



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ**

**ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΥ ΡΟΛΟΥ ΤΩΝ ΠΑΡΑΓΟΝΤΩΝ ΠΗΞΗΣ Χ_a ΚΑΙ
ΘΡΟΜΒΙΝΗΣ ΣΤΗΝ ΑΘΗΡΟΘΡΟΜΒΩΣΗ**

ΣΤΥΛΙΑΝΗ ΠΑΠΑΔΑΚΗ

ΒΙΟΛΟΓΟΣ, MSc

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ, ΙΑΝΟΥΑΡΙΟΣ 2020



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ**

**ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΥ ΡΟΛΟΥ ΤΩΝ ΠΑΡΑΓΟΝΤΩΝ ΠΗΞΗΣ Χ_a ΚΑΙ
ΘΡΟΜΒΙΝΗΣ ΣΤΗΝ ΑΘΗΡΟΘΡΟΜΒΩΣΗ**

ΣΤΥΛΙΑΝΗ ΠΑΠΑΔΑΚΗ

ΒΙΟΛΟΓΟΣ, MSc

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ, ΙΑΝΟΥΑΡΙΟΣ 2020

«Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από το Τμήμα Χημείας της Σχολής Θετικών Επιστημών,
του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων δεν υποδηλώνει αποδοχή των γνώμων του συγγραφέα Ν.
5343/32, άρθρο 202, παράγραφος 2»

Ορισμός Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής από τη Γ.Σ.Ε.Σ.: 909^A/ 22-05-2015

Μέλη Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής:

Επιβλέπων:

Αλέξανδρος Τσελέπης

Μέλη:

Δημόκριτος Τσουκάτος

Χαράλαμπος Μηλιώνης

Ημερομηνία ορισμού θέματος: 911^A /05-06-2015

Θέμα: «Μελέτη του ρόλου των παραγόντων πήξης Χα και θρομβίνης στην αθηροθρόμβωση»

Ημερομηνία ανασυγκρότησης Μελών Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής από τη Γ.Σ.Ε.Σ.:
1009^A/21-11-2019

Επιβλέπων:

Αλέξανδρος Τσελέπης

Μέλη:

Πασχάλης-Θωμάς Δούλιας

Χαράλαμπος Μηλιώνης

ΟΡΙΣΜΟΣ ΕΠΤΑΜΕΛΟΥΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ από τη Γ.Σ.Ε.Σ.: 1012^A/19-12-2019

1. Αλέξανδρος Τσελέπης
2. Πασχάλης-Θωμάς Δούλιας
3. Χαράλαμπος Μηλιώνης
4. Άννα-Ειρήνη Κούκκου
5. Ευγενία Πάνου-Πομώνη
6. Παναγιώτης Κοραντζόπουλος
7. Ελευθερία Χατζημιχαήλ

Έγκριση Διδακτορικής Διατριβής με βαθμό «Άριστα» στις 28-01-2020

Η Πρόεδρος του Τμήματος Χημείας
Λουλούδη Μαρία

Η Γραμματέας του Τμήματος
Ξανθή Τουτουζόγλου

Στη μητέρα μου
Στα αδέρφια μου
Στη γιαγιά μου
Στη Λυγερή
Στον Άρη

Σε όσους ήρθαν για να μείνουν!

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα διδακτορική διατριβή εκπονήθηκε στο Ερευνητικό Κέντρο Αθηροθρόμβωσης του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων υπό την επίβλεψη του Καθηγητή Βιοχημείας και Κλινικής Χημείας κ. Αλέξανδρο Τσελέπη. Καθ' όλη τη διάρκεια του διδακτορικού μου, στο μυαλό μου τριγυρνούσαν λέξεις και φράσεις με τις οποίες θα ευχαριστούσα κάθε άτομο που με βοήθησε να ολοκληρώσω τη διατριβή μου. Θεωρώ ότι το πιο δύσκολο κομμάτι είναι αυτό, γιατί ελάχιστες λέξεις και φράσεις μπορούν να εκφράσουν την ευγνωμοσύνη μου.

Πρώτο από όλους θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κ. Τσελέπη ο οποίος μου έδωσε την ευκαιρία να εκπονήσω τη διατριβή μου υπό την καθοδήγηση του. Βρισκόμενη στο Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων 13 χρόνια έχω συναντήσει ελάχιστους ανθρώπους σαν και αυτόν. Εργατικός και τελειομανής, καθημερινά προσπαθούσε να κάνει ότι καλύτερο για όλους όσους είχε υπό την επίβλεψή του. Κάθε μέρα κοντά του με έκανε να θέλω να είμαι όλο και καλύτερη, παρά το άγχος και την κούραση. Χωρίς τις συμβουλές και τη στήριξη του δεν θα ήταν δυνατό να ολοκληρωθεί η παρούσα διατριβή.

Εν συνεχεία, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τα μέλη της τριμελούς επιτροπής μου κ. Χαράλαμπο Μηλιώνη, Καθηγητή Παθολογίας της Ιατρικής Σχολής και κ. Πασχάλη-Θωμά Δούλια, Επίκουρο Καθηγητή Βιοχημείας του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, για την άψογη συνεργασία κατά τη διάρκεια της διδακτορικής μου διατριβής.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τα υπόλοιπα μέλη της επταμελούς επιτροπής της παρούσας διατριβής τις κυρίες Άννα-Ειρήνη Κούκκου και Ευγενία Πάνου-Πομώνη, Αναπληρώτριες Καθηγήτριες Βιοχημείας του Τμήματος Χημείας, καθώς και τους κ. Παναγιώτη Κοραντζόπουλο, Επίκουρο Καθηγητή Καρδιολογίας και την κα. Ελευθερία Χατζημιχαήλ, Επίκουρη Καθηγήτρια Αιματολογίας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων.

Εν συνεχεία, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον κ. Δημόκριτο Τσουκάτο, Καθηγητή του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, ο οποίος ήταν ο επιβλέπων της μεταπτυχιακής μου διατριβής, αλλά και μέλος της τριμελούς επιτροπής της παρούσας διατριβής μέχρι και το καλοκαίρι του 2019. Δεν θα ξεχάσω ποτέ ότι ήταν εκείνος που μου έδωσε την ευκαιρία να ολοκληρώσω τις μεταπτυχιακές μου σπουδές. Οι συμβουλές του τόσο κατά τη διάρκεια της μεταπτυχιακής, όσο και της διδακτορικής μου διατριβής ήταν καθοριστικές για την ολοκλήρωσή τους.

Πολλές ευχαριστίες απευθύνω στο τμήμα Αιμοληψιών καθώς και στο Ιατρείο Λιπιδίων και Μεταβολικών Διαταραχών του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Ιωαννίνων και σε όλους τους συνεργάτες των παραπάνω τμημάτων, για την εξαιρετη συνεργασία και τη λήψη των δειγμάτων αίματος. Θα ήθελα ιδιαίτερα να ευχαριστήσω τις νοσηλεύτριες Αθανασία Μπανιώτη, Ευδοκία Μάνθου, Παρασκευή Λούκα, Χριστίνα Γιαννέτα και Ρέα Ντότη για την εξαιρετη συνεργασία που είχαμε όλα αυτά τα χρόνια. Ακόμη, ένα μεγάλο ευχαριστώ απευθύνω στη Γυναικολογική Κλινική του ΠΓΝΙ για τη λήψη και διάθεση των δειγμάτων αίματος από ομφάλιο λώρο και ιδιαίτερα στην κα. Αγγέλα.

Θερμές ευχαριστίες θα ήθελα να απευθύνω στον Τομέα Παθολογίας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων για την παραχώρηση του χώρου των κυτταροκαλλιιεργειών που βρίσκεται στο εργαστήριο Ανοσολογίας. Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τις κυρίες Δήμητρα Αρχιμανδρίτη, Τζένη Σπύρου και Κλεοπάτρα Γκαραλέα για την εξαιρετη συνεργασία και τη βοήθεια τους όποτε τη χρειαζόμουν. Ιδιαίτερα ευχαριστώ τη Δήμητρα και τη Τζένη για τη φιλική σχέση που αναπτύξαμε και για τη στήριξη τους όποτε την είχα ανάγκη.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την Ελληνική Εταιρεία Αθηροσκλήρωσης για την χορήγηση υποτροφίας για την εκπόνηση της παρούσας διδακτορικής διατριβής.

Επιπλέον, οφείλω ένα ευχαριστώ στο Δρ. Βασίλη Χαντζηχρήστο ο οποίος με καθοδήγησε στις πειραματικές διαδικασίες καλλιέργειας κυττάρων. Τον ευχαριστώ για τη φιλία του, αλλά και για τη βοήθεια και τις συμβουλές του σε όποια δυσκολία προέκυπτε. Επιπρόσθετα, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Δρ. Κωνσταντίνο Τέλλη για τη βοήθεια και την καθοδήγηση του σε ότι αφορούσε τη μεθοδολογία ELISA, αλλά και σε οποιοδήποτε πρόβλημα προέκυπτε. Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω την υποψήφια διδάκτορα Σοφία Σιδηροπούλου με την οποία κάναμε μαζί τα πρώτα μας βήματα σε κάποιες μεθοδολογίες του εργαστηρίου, αλλά και πραγματοποιήσαμε αρκετά πειράματα μαζί. Ακόμη, θα ήθελα να ευχαριστήσω την υποψήφια διδάκτορα Κατερίνα Τσούκα για την πολύ καλή συνεργασία που είχαμε όλα αυτά τα χρόνια, καθώς επίσης την Δρ. Δέσποινα Πανταζή και τους συνεργάτες Λουίζα Πεχλιβάνη και Γιάννη Κουτσαλιάρη για τη σύντομη μεν αλλά ευχάριστη συνεργασία. Ένα ευχαριστώ οφείλω στους μεταπτυχιακούς φοιτητές Στέλιο Παπαδόπουλο και Έλενα Παπά για την πολύ καλή συνεργασία μας όλα αυτά τα χρόνια.

Η παρούσα διατριβή θα ήταν αδύνατο να πραγματοποιηθεί εάν δεν υπήρχαν άτομα εντός εργαστηριακού χώρου που εκτός από συνάδελφοι δεν ήταν και φίλοι. Γι' αυτό θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τους Αγγελική Καλογεροπούλου, Αλεξία Τσαπίνου και Χρήστο Φανίτσιο για

τις ατέλειωτες ώρες συζήτησης και γέλιου αυτά τα χρόνια, εντός και εκτός εργαστηριακού χώρου, που έκαναν κάθε δύσκολο πείραμα να μοιάζει εύκολο, κάθε δυσάρεστο, ευχάριστο και κάθε απογοήτευση μία νέα αρχή! Θα ήθελα να προσθέσω μερικά λόγια επιπλέον για το Χρήστο, έναν άνθρωπο που με συμβούλεψε ιδιαίτερα τον τελευταίο χρόνο και έδειξε απίστευτη ωριμότητα και σεβασμό σε καταστάσεις δύσκολες και περίπλοκες.

Ακόμη, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον φίλο μου τον γιατρό, Βαγγέλη Σφήκα. Γνωριζόμαστε και είμαστε φίλοι από τον πρώτο χρόνο στο πανεπιστήμιο. Ήμασταν συμφοιτητές, διαβάζαμε μαζί, βγαίναμε μαζί και όταν όλοι οι φίλοι μας έφυγαν μείναμε οι δυο μας στα Γιάννενα που τόσο αγαπάμε και τόσα είχαμε ζήσει. Παρά το γεγονός ότι οι συνθήκες δε μας επέτρεπαν να βρισκόμαστε συχνά, η φιλία του ήταν πάντα ένα σημαντικό στήριγμα για μένα.

Θεωρώ τον εαυτό μου τυχερό γιατί αν και πολλά άτομα έχουν έρθει και έχουν φύγει από τη ζωή μου, έχω φίλες οι οποίες αν και είναι μίλια μακριά είναι και θα είναι πάντα δίπλα μου. Ευχαριστώ μέσα από την καρδιά μου τις Γιώτα Κυριακίδου, Δήμητρα Μαντζώρου, Κωνσταντίνα Σούλη, Σύλβια Χριστοδουλάκη και Χαρά Καμπύλη για κάθε στιγμή στα σχεδόν 13 χρόνια που γνωριζόμαστε και που ακόμη και η απόσταση δεν έχει αποτελέσει εμπόδιο για μας. Η ζωή μου θα ήταν τόσο διαφορετική αν δεν τις είχα γνωρίσει. Η αγάπη τους και η στήριξη τους αποτέλεσαν τις βάσεις για τον άνθρωπο που είμαι σήμερα. Ότι και να γράψω ποτέ δε θα μπορέσει να περιγράψει την αξία τους για μένα και την αγάπη που τους έχω.

Στη ζωή μας λέμε με μεγάλη ευκολία ποτέ και πάντα και ακόμη πιο εύκολα κρίνουμε ανθρώπους και καταστάσεις χωρίς να σκεφτούμε. Ήθελα να ευχαριστήσω τη φίλη μου Γιώτα γιατί σε πολύ σύντομο χρονικό διάστημα κατάλαβε τι άνθρωπος είμαι και σε αντίθεση με άλλους ανθρώπους, μου στάθηκε σε δύσκολες στιγμές με πολλή αγάπη και κατανόηση χωρίς να με κρίνει.

Υπάρχουν επίσης άνθρωποι που έρχονται από το πουθενά και σου αλλάζουν τη ζωή! Δύο τέτοιοι άνθρωποι είναι οι Άρης και Αχιλλέας Κάπης. Γνωριζόμαστε μόνο 6 χρόνια και είναι σα να γνωριζόμαστε μια ολόκληρη ζωή. Στον Άρη οφείλω τόσα πολλά που ποτέ δε θα μπορέσω να εκφράσω με λόγια την ευγνωμοσύνη μου. Και οι δύο με βοήθησαν σε σημαντικές δυσκολίες που προέκυψαν όλα τα χρόνια που γνωριζόμαστε, μα πάνω από όλα με έμαθαν ότι υπάρχουν ακόμα καλοί άνθρωποι στον κόσμο, έτοιμοι να δώσουν τα πάντα σε όποιον το χρειάζεται.

Από την πρώτη μέρα στο πανεπιστήμιο μέχρι και σήμερα, έχω αλλάξει πιστεύω προς το καλύτερο. Την καθοριστικότερη βοήθεια στο να βελτιωθώ σαν άνθρωπος μου πρόσφερε η Λυγερή. Ακόμη, με βοήθησε να ξεπεράσω τα σημαντικότερα προβλήματα μου και να μάθω να ζω

με αυτά που δεν θα ξεπεράσω ποτέ. Την ευχαριστώ που είναι παρούσα στη ζωή μου, σε χαρές και λύπες. Δεν ξέρω τι θα έκανα χωρίς εκείνη.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω την οικογένεια μου που υπήρξε το στήριγμά μου σε όλη μου τη ζωή. Η αγάπη τους ήταν και είναι το φως στο σκοτάδι. Θα ήθελα να προσθέσω μερικά λόγια παραπάνω για τον μικρό μου αδερφό, Στέλιο, ο οποίος ειδικά τον τελευταίο χρόνο της διατριβής μου με στήριξε ψυχολογικά όσο λίγοι και η συνειδητοποίηση του πόσο έχει μεγαλώσει και ωριμάσει, αποτέλεσε δύναμη για να συνεχίσω να προσπαθώ.

Το μεγαλύτερο ευχαριστώ θέλω να το απευθύνω στον άνθρωπο που ήταν δίπλα μου όλα αυτά τα χρόνια, Ηρακλή Μοσχονά. Είναι ένας από τους καλύτερους ανθρώπους που έχω γνωρίσει και δυστυχώς ελάχιστοι άνθρωποι έχουν τόσο αγνή καρδιά, ευγένεια και ήθος. Χωρίς αυτόν η πραγματοποίηση της διδακτορικής μου διατριβής θα ήταν αδύνατη. Σε κάθε απογοήτευση ήταν εκεί να μου θυμίσει ότι η αποτυχία αποτελεί σκαλοπάτι προς την επιτυχία. Με έκανε καλύτερο άνθρωπο και καθώς δουλεύουμε μαζί και καλύτερη επιστήμονα.

Τέλος, θα ήθελα να αναφέρω πως όσα πειράματα και αν κάνουμε, όσο πετυχημένοι και αν γίνουμε, το σημαντικότερο είναι να είμαστε καλοί άνθρωποι, να δίνουμε ότι μπορούμε, να στηρίζουμε όσους μας χρειάζονται, να χαιρόμαστε με τη χαρά του άλλου και να έχουμε γύρω μας ανθρώπους που αγαπάμε και μας αγαπούν. Αν κάνουμε όλα τα παραπάνω η επιτυχία είναι δεδομένη! Θα κλείσω με μία φράση που έχει γράψει ο αγαπημένος μου συγγραφέας Leo Buscaglia στο βιβλίο του «Να ζεις, Να αγαπάς, Να μαθαίνεις»: **“Όσο ψηλά και αν έχεις φτάσει τις γνώσεις σου, για μένα εξακολουθείς να μην είσαι πουθενά. Μας εντυπωσιάζουν οι άνθρωποι με τους ηχηρούς τίτλους. Πιστεύουμε ότι ένα πτυχίο, ένα ντοκτορά κάνει τους ανθρώπους σοφούς. Άλλες είναι οι δικές μου πληροφορίες! Μερικοί από τους πιο ηλίθιους ανθρώπους που γνωρίζω έχουν ντοκτορά! Μερικοί από τους σοφότερους ανθρώπους που γνωρίζω, δεν ξέρουν καν τι είναι το ντοκτορά!”**

ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ

AC	Αδενυλική κυκλάση
ACS	Οξύ στεφανιαίο σύνδρομο
ADP	Διφωσφορική αδενοσίνη
AEE	Αγγειακό εγκεφαλικό επεισόδιο
AF	Κολπική μαρμαρυγή
AMI	Οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου
Ang	Αγγειοτενσίνη
AMP	Μονοφωσφορική αδενοσίνη
APC	Ενεργοποιημένη πρωτεΐνη C
ATP	Τριφωσφορική αδενοσίνη
CAD	Στεφανιαία νόσος
CAM	Ενεργός μεταβολίτης της κλοπιδογρέλης
cAMP	Κυκλική μονοφωσφορική αδενοσίνη
cGMP	Κυκλική μονοφωσφορική γουανοσίνη
COX-1	Κυκλοοξυγονάση-1
CVD	Καρδιαγγειακή νόσος
CY	Κυτόχρωμα
DAG	Διακυλογλυκερόλη
DOACs	Άμεσοι από του στόματος χορηγούμενοι αναστολείς
DTS	Πυκνό σωληνοειδές σύστημα
DVT	Εν τω βάθει φλεβική θρόμβωση
e-EPCs	Πρώιμα πρόδρομα ενδοθηλιακά κύτταρα
ECs	Ενδοθηλιακά κύτταρα
ECM	Εξωκυττάρια θεμέλια ουσία
EGF	Επιδερμικός αυξητικός παράγοντας
EPCs	Πρόδρομα ενδοθηλιακά κύτταρα
F	Παράγοντας
FXa	Ενεργοποιημένος παράγοντας X
FcR	Υποδοχέας Fc
FGF	Αυξητικός παράγοντας ινοβλαστών

GLA	γ-καρβοξυγλουταμικά κατάλοιπα
GPCRs	Υποδοχείς που συζευγνύονται με G πρωτεΐνες
hEPCs	Αιμοποιητικής προέλευσης EPCs
HTB	2-υδροξυ-4τριφθορομέθυλο βενζοϊκό οξύ
HTPR	Υψηλή υπό θεραπεία αντιδραστικότητα των αιμοπεταλίων
HUVECs	Ανθρώπινα ενδοθηλιακά κύτταρα ομφαλίου λώρου
ICAM-1	Μόριο της διακυτταρικής προσκόλλησης-1
IG	Ανοσοσφαιρίνες
IL	Ιντερλευκίνη
IP ₃	1,4,5 τριφωσφορική ινοσιτόλη
KDR	Υποδοχέας κινάσης της τυροσίνης
LLRs	Περιοχές πλούσιες σε λευκίνη
MACS	Μαγνητικός διαχωρισμός κυττάρων
MCP-1	Χημειοτακτική πρωτεΐνη-1 των μονοκυττάρων
MFI	Μέση ένταση φθορισμού
MIDAS	Περιοχή δέσμευσης κατιόντων
MMP	Μεταλλοπρωτεάσες
MNCs	Μονοπύρηνα κύτταρα
NF-κB	Πυρηνικός παράγοντας-κB
NO	Μονοξείδιο του αζώτου
Non-hEPCs	Μη αιμοποιητικής προέλευσης EPCs
OCS	Ανοιχτό καναλοειδές σύστημα
OECs	Προχωρημένης ωρίμανσης EPCs
PAD	Περιφερική αρτηριακή νόσος
PAM	Ενεργός μεταβολίτης της πρασουγγρέλης
PARs	Υποδοχείς που ενεργοποιούνται από πρωτεάσες
PCI	Διαδερμική στεφανιαία επέμβαση
PDE	Φωσφοδιεστεράσες
PE	Πνευμονική εμβολή
PG	Προσταγλανδίνη
PGI ₂	Προστακυκλίνη

PIP ₂	4,5-δισφωφορική φωσφατιδυλοϊνοσιτόλη
PKC	Πρωτεϊνική κινάση C
PLC	Φωσφολιπάση C
PPP	Πλάσμα φτωχό σε αιμοπετάλια
PRP	Πλάσμα πλούσιο σε αιμοπετάλια
PSLG-1	Γλυκοπρωτεϊνικός προσδέτης της P-σελεκτίνης
RANTES	Ρυθμιζόμενη μετά από ενεργοποίηση κανονικών T κυττάρων πρωτεΐνη που εκφράζεται και εκκρίνεται
ROS	Δραστικές μορφές οξυγόνου
S1P	Φωσφορική σφιγγοσίνη-1
SMCs	Λεία μυϊκά κύτταρα
TF	Ιστικός παράγοντας
TIA	Παροδικό ισχαιμικό εγκεφαλικό επεισόδιο
TLRs	Υποδοχείς τύπου Toll
TNF α	Παράγοντας νέκρωσης όγκου α
TRAP-6	Μιμητικό εξαπεπτίδιο του υποδοχέα της θρομβίνης
TxA ₂	Θρομβοξάνιο A ₂
UDP	Διφωσφορική ουριδίνη
UTP	Τριφωσφορική ουριδίνη
VCAM-1	Προσκολλητικό μόριο του αγγειακού τοιχώματος-1
VE-C	Ενδοθηλιακή καντχερίνη
VEGF	Αγγειακός ενδοθηλιακός αυξητικός παράγοντας
VEGFR-2	Υποδοχέας 2 του αγγειακού ενδοθηλιακού αυξητικού παράγοντα
VKAs	Ανταγωνιστές της βιταμίνη K
VTE	Φλεβική θρομβοεμβολή
vWF	Παράγοντας von Willebrand
WPBs	Κοκκία Weibel-Palade

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ.....	1
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1. ΑΙΜΟΠΕΤΑΛΙΑ.....	2
1.1 Παραγωγή και απελευθέρωση των αιμοπεταλίων.....	2
1.2 Δομή αιμοπεταλίων.....	3
1.3 Υποδοχείς των αιμοπεταλίων.....	9
1.3.1 Ιντεγκρίνες.....	10
1.3.2 Οικογένεια γλυκοπρωτεϊνών πλούσιων σε λευκίνη.....	13
1.3.3 Ανοσοσφαιρίνες.....	15
1.3.4 Υποδοχείς P2.....	16
1.3.5 Υποδοχείς που ενεργοποιούνται από πρωτεάσες.....	19
1.3.6 Οικογένεια των υποδοχέων των προσταγλανδινών.....	22
1.4 Αγωνιστές των αιμοπεταλίων.....	23
1.4.1 ADP.....	23
1.4.2 Θρομβίνη.....	24
1.4.3 vWF.....	25
1.4.4 Κολλαγόνο.....	26
1.4.5 TxA ₂	26
1.5 Αιμοπεταλιακή προσκόλληση.....	27
1.6 Αιμοπεταλιακή ενεργοποίηση.....	28
1.7 Αιμοπεταλιακή συσσώρευση.....	29
1.8 Αντιαιμοπεταλιακή Αγωγή.....	30
1.9.1 Αναστολείς της COX-1.....	31
1.9.2 Ανταγωνιστές του υποδοχέα P2Y ₁₂	34
1.9.3 Ανταγωνιστές των PARs.....	38
1.9.4 Αναστολείς των φωσφοδιεστερασών.....	40
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2. ΚΑΤΑΡΡΑΚΤΗΣ ΤΗΣ ΠΗΞΗΣ.....	43
2.1 Παράγοντας Χα.....	44
2.2 Θρομβίνη.....	46
2.3 Αντιπηκτική αγωγή.....	48
2.3.1 Άμεσοι από του στόματος χορηγούμενοι αναστολείς του παράγοντα Χα.....	50

2.3.2 Άμεσοι από του στόματος χορηγούμενοι αναστολείς της θρομβίνης.....	56
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3. ΚΥΤΤΑΡΙΚΕΣ ΔΡΑΣΕΙΣ ΤΩΝ ΠΑΡΑΓΟΝΤΩΝ ΠΗΞΗΣ Xa ΚΑΙ ΘΡΟΜΒΙΝΗΣ.....	60
3.1. Ρόλος στη φλεγμονή.....	60
3.2 Ρόλος στην αθηροσκλήρωση.....	62
3.3 Ρόλος στην ίνωση και την αγγειογένεση.....	64
3.4 Πλειοτροπικές δράσεις των DOACs.....	66
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4. ΠΡΟΔΡΟΜΑ ΕΝΔΟΘΗΛΙΑΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ	68
4.1 Ταυτοποίηση των EPCs.....	69
4.2 EPCs και παθοφυσιολογία της αθηρωμάτωσης	73
4.2.1 Τα EPCs στην αναγέννηση του ενδοθηλίου.....	73
4.2.2 Τα EPCs στην αγγειογένεση.....	74
4.2.3 Τα EPCs στην αθηροσκλήρωση.....	77
4.3 Αλληλεπιδράσεις των EPCs με τα αιμοπετάλια.....	78
4.4 Οι κυριότερες λειτουργίες των ECs.....	79
4.4.1 Ενδοθηλιακή δυσλειτουργία.....	82
4.4.2 Αλληλεπιδράσεις του ενδοθηλίου με τα αιμοπετάλια και τα λευκοκύτταρα.....	84
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	86
5.1 Συσσωρευομετρία οπτικής διαπερατότητας (Light transmittance aggregometry, LTA).....	86
5.1.1 Παρασκευή PRP.....	86
5.1.2 Παρασκευή πλυμένων αιμοπεταλίων.....	90
5.1.3 Έλεγχος της βιολογικής δράσης ουσιών PRP.....	93
5.1.4 Έλεγχος της βιολογικής δράσης ουσιών σε πλυμένα αιμοπετάλια.....	97
5.2 Συσσωρευομετρία εμπέδησης (Impedance aggregometry).....	100
5.3 Καλλιέργεια ενδοθηλιακών κυττάρων.....	102
5.3.1 Απομόνωση των CD34 ⁺ κυττάρων.....	102
5.3.2 Καλλιέργεια των CD34 ⁺ κυττάρων και σχηματισμός OECs.....	107
5.3.3 Καλλιέργεια HUVECs.....	111
5.4 Κυτταρομετρία ροής.....	113
5.4.1 Έλεγχος της βιολογικής δράσης ουσιών σε PRP και πλυμένα αιμοπετάλια	116
5.3.2 Έλεγχος της βιολογικής δράσης ουσιών σε ολικό αίμα.....	118

5.4.3 Εκτίμηση της καθαρότητας των CD34 ⁺ κυττάρων.....	120
5.4.4 Επίδραση των παραγόντων πήξης FXa και θρομβίνης στην έκφραση του ενδοθηλιακού φαινοτύπου από τα CD34 ⁺ κύτταρα.....	121
5.4.5 Επίδραση των παραγόντων πήξης FXa και θρομβίνης σε OECs και HUVECs....	121
5.6 Μεθοδολογία ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay).....	127
5.6.1 Ανοσοενζυμικός προσδιορισμός του MCP-1.....	127
5.6.2 Ανοσοενζυμικός προσδιορισμός της PGI ₂	129
5.6.3 Ανοσοενζυμικός προσδιορισμός του vWF.....	131
5.7 Στατιστική ανάλυση.....	133
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	134
6.1 Μελέτη της δράσης των voraparaxar, dabigatran και rivaroxaban σε PRP με τη μέθοδο της LTA.....	134
6.2 Ο ρόλος του FXa στην αιμοπεταλιακή συσσώρευση.....	137
6.3 Μελέτη της δράσης των voraparaxar, dabigatran και rivaroxaban σε πλυμένα αιμοπετάλια με τη μέθοδο της LTA.....	138
6.4 Μελέτη της δράσης των voraparaxar, dabigatran και rivaroxaban σε ολικό αίμα με τη μέθοδο της συσσωρευομετρίας εμπέδησης.....	143
6.5 Μελέτη της δράσης του FXa σε πλυμένα αιμοπετάλια και PRP με τη μέθοδο της κυτταρομετρίας ροής. Ρόλος του PAR-1 στην ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων.....	144
6.6 Μελέτη της δράσης του voraparaxar στη διαφοροποίηση CD34 ⁺ κυττάρων και στη δημιουργία συζευγμάτων CD34 ⁺ κυττάρων με αιμοπετάλια σε ολικό αίμα, με τη μέθοδο της κυτταρομετρίας ροής.....	151
6.7 Εκτίμηση της καθαρότητας των CD34 ⁺ κυττάρων που απομονώθηκαν από ομφάλιο λώρο ανθρώπου. Μελέτη του ρόλου της θρομβίνης και του FXa στη διαφοροποίηση των CD34 ⁺ κυττάρων προς OECs.....	155
6.8 Μελέτη της δράσης της θρομβίνης και του FXa στην έκφραση του ICAM-1 από τα OECs και τα HUVECs.....	157
6.9 Μελέτη της δράσης της θρομβίνης και του FXa στην έκφραση της E-σελεκτίνης από τα OECs και τα HUVECs.....	179
6.10 Μελέτη της δράσης της θρομβίνης και του FXa στην έκκριση των MCP-1, PGI ₂ και vWF από τα OECs και τα HUVECs.....	183

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	198
ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	205
ABSTRACT.....	207
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΑΝΑΦΟΡΕΣ.....	209
ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ-ΔΙΑΚΡΙΣΕΙΣ.....	231

ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ

Είναι ευρέως γνωστό ότι τα αιμοπετάλια και τα ενδοθηλιακά κύτταρα διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην αθηροθρόμβωση. Τα αιμοπετάλια ενεργοποιούνται από ασυνέχειες του ενδοθηλίου, έχοντας ως αποτέλεσμα τη θρόμβωση και τις κλινικές της εκφάνσεις, όπως είναι το έμφραγμα του μυοκαρδίου και το ισχαιμικό αγγειακό εγκεφαλικό επεισόδιο. Ταυτόχρονα, τα ενδοθηλιακά κύτταρα συμμετέχουν στην αναγέννηση του ενδοθηλίου και την αγγειογένεση, ενώ η ενδοθηλιακή δυσλειτουργία, η οποία είναι παρούσα κατά τα πρώτα στάδια της αθηρωμάτωσης, συμβάλλει στη φλεγμονώδη απόκριση διαμέσου της στρατολόγησης των λευκοκυττάρων. Τα πρόδρομα ενδοθηλιακά κύτταρα (endothelial progenitor cells, EPCs) αποτελούν κύτταρα τα οποία επίσης συμβάλλουν στην αναγέννηση του ενδοθηλίου και την αγγειογένεση, μετά από τη διαφοροποίησή τους σε ώριμα ενδοθηλιακά κύτταρα. Έχει βρεθεί ότι τα κυκλοφορούντα CD34⁺ κύτταρα μετά από την αλληλεπίδρασή τους με τα αιμοπετάλια διαφοροποιούνται σε EPCs. Επιπρόσθετα, η παραπάνω αλληλεπίδραση οδηγεί στην περαιτέρω ωρίμανση των EPCs σε ώριμα ενδοθηλιακά κύτταρα, συμβάλλοντας στην αναγέννηση του ενδοθηλίου και την αγγειογένεση.

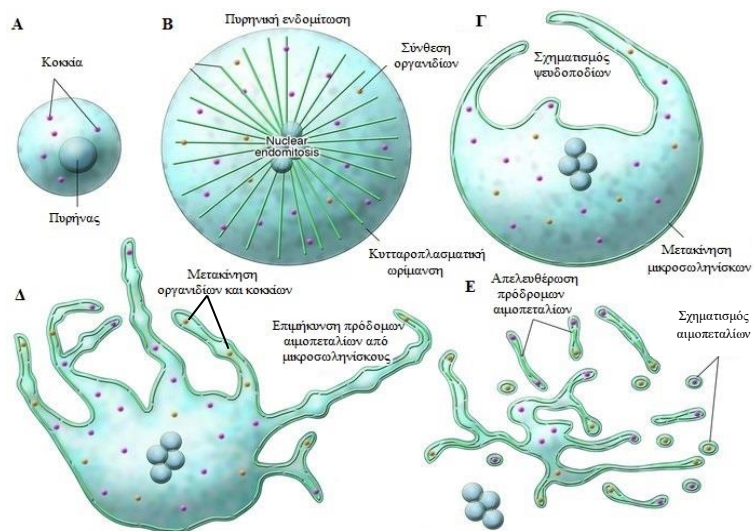
Από την άλλη πλευρά, οι παράγοντες πήξης Xa και θρομβίνη εμφανίζουν μη αιμοστατικές κυτταρικές δράσεις που διαμεσολαβούνται από τους υποδοχείς που ενεργοποιούνται από πρωτεάσες. Οι παραπάνω δράσεις εντοπίζονται σε πληθώρα κυτταρικών τύπων, συμπεριλαμβανομένων των αιμοπεταλίων και των ενδοθηλιακών κυττάρων.

Σκοπός της παρούσας Διατριβής ήταν η διερεύνηση της δράσης των παραγόντων πήξης Xa και θρομβίνης στην αιμοπεταλιακή και ενδοθηλιακή ενεργοποίηση. Επιπρόσθετα, θεωρήθηκε σημαντικό να διερευνηθεί η δράση των παραγόντων αυτών στη διαφοροποίηση των CD34⁺ κυττάρων προς EPCs και συνεπώς η πιθανή συμβολή τους στην αναγέννηση του ενδοθηλίου και την αγγειογένεση. Ως αναστολείς των δράσεων των παραγόντων Xa και θρομβίνης χρησιμοποιήθηκαν οι άμεσοι από του στόματος χορηγούμενοι αντιπηκτικοί παράγοντες, rivaroxaban και dabigatran, που χρησιμοποιούνται στην καθημερινή κλινική πράξη, καθώς και ο εκλεκτικός ανταγωνιστής του υποδοχέα που ενεργοποιείται από πρωτεάσες-1, voraparaxar.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1. ΑΙΜΟΠΕΤΑΛΙΑ

1.1 Παραγωγή και απελευθέρωση των αιμοπεταλίων

Τα μεγακαρυοκύτταρα συνιστούν εξειδικευμένα πρόδρομα κύτταρα του μυελού των οστών των οποίων η μόνη λειτουργία είναι η παραγωγή και η απελευθέρωση των αιμοπεταλίων στην κυκλοφορία του αίματος. Ο μηχανισμός παραγωγής των αιμοπεταλίων από τα μεγακαρυοκύτταρα έχει αποτελέσει αντικείμενο διχογνωμίας, με αποτέλεσμα να έχουν προταθεί ποικίλα μοντέλα. Το επικρατέστερο μοντέλο παραγωγής των αιμοπεταλίων είναι εκείνο του σχηματισμού πρόδρομων αιμοπεταλίων (proplatelets). Κατά τη διαδικασία σχηματισμού των αιμοπεταλίων, τα μεγακαρυοκύτταρα μεγαλώνουν σε μέγεθος (διάμετρος 100 nm) και υπόκεινται σε αντιγραφή του DNA τους χωρίς επακόλουθη κυτταρική διαίρεση, μία διαδικασία που ονομάζεται ενδομίτωση [1]. Παράλληλα, συνθέτουν οργανίδια και ενισχύουν την παραγωγή αιμοπεταλιακών πρωτεϊνών. Ο κυτταροσκελετός των μεγακαρυοκυττάρων συμμετέχει στις διαμορφωτικές αλλαγές κατά τη διάρκεια της διαδικασίας ωρίμανσης [2, 3]. Συγκεκριμένα, οι κυτταροπλασματικές πρωτεΐνες ακτίνη και τουμπουλίνη πολυμερίζονται αντιστρεπτά σε κυτταροσκελετικά ινίδια που εκτείνονται από ένα κεντρόσωμα. Πριν το σχηματισμό των πρόδρομων αιμοπεταλίων το κεντρόσωμα αποσυναρμολογείται και τα ινίδια μετατοπίζονται ακριβώς κάτω από τη μεμβράνη σχηματίζοντας χοντρές δέσμες μικροσωληνίσκων. Στη συνέχεια, τα ώριμα πλέον μεγακαρυοκύτταρα υπόκεινται σε αναδιοργάνωση του κυτταροπλάσματος και των μεμβρανών τους, ξεκινώντας την παραγωγή των πρόδρομων αιμοπεταλίων, εκτείνοντας ψευδοπόδια με πυκνές δέσμες μικροσωληνίσκων να διατρέχουν όλο το μήκος του πρόδρομου αιμοπεταλίου. Παράλληλα, διαμέσου των μικροσωληνίσκων πραγματοποιείται και η μεταφορά των οργανιδίων και των κοκκίων από τα μεγακαρυοκύτταρα προς τα πρόδρομα αιμοπετάλια [4]. Τα πρόδρομα αιμοπετάλια μεγαλώνουν και ολόκληρο το κυτταρόπλασμα του μεγακαρυοκυττάρου μετατρέπεται σε πρόδρομα αιμοπετάλια, τα οποία και απελευθερώνονται [5], ενώ ο πυρήνας του μεγακαρυοκυττάρου υπόκειται σε απόπτωση [6]. Τα πρόδρομα αιμοπετάλια υπόκειται σε περαιτέρω θραυσματοποίηση σχηματίζοντας εκατομμύρια μονήρη αιμοπετάλια [7]. Η διαδικασία παραγωγής και απελευθέρωσης των αιμοπεταλίων παρουσιάζεται σχηματικά στην Εικόνα 1.1.



Εικόνα 1.1 Παραγωγή και απελευθέρωση των αιμοπεταλίων από τα μεγακαρυοκύτταρα. (Α) Ανώριμο μεγακαρυοκύτταρο. (Β) Πυρηνική ενδομίτωση, σύνθεση οργανιδίων, κυτταροπλασματική ωρίμανση και έκταση του κυτταροσκελετού από το κεντρόσωμα. (Γ) Μετακίνηση κυτταροσκελετού κάτω από τη μεμβράνη και σχηματισμός πυκνής δέσμης μικροσωληνίσκων. (Δ) Έκταση ψευδοποδίων και μετακίνηση των οργανιδίων και των κοκκίων στα πρόδρομα αιμοπετάλια (Ε) Απελευθέρωση των πρόδρομων αιμοπεταλίων και σχηματισμός αιμοπεταλίων. Τροποποιημένη εικόνα από την παραπομπή [7].

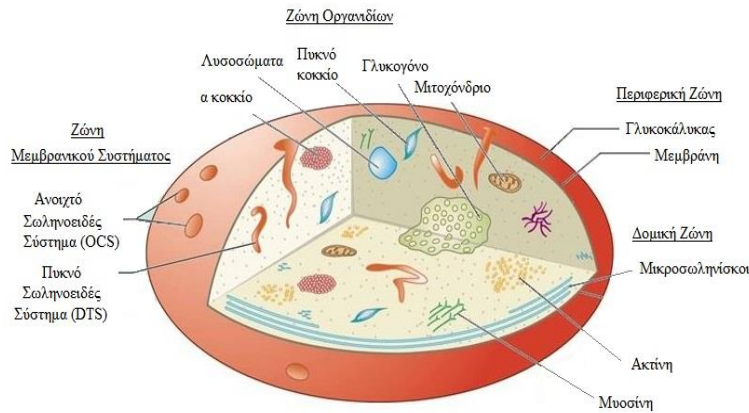
1.2 Δομή των αιμοπεταλίων

Τα αιμοπετάλια αποτελούν τα μικρότερα κύτταρα του αίματος με δισκοειδές σχήμα, διάμετρο 2-5 μm και πάχος 0,5 μm . Τα αιμοπετάλια διαθέτουν μιτοχόνδρια, λυσοσώματα και δύο είδη κοκκίων [8]. Τα φυσιολογικά επίπεδα των αιμοπεταλίων στο αίμα κυμαίνονται από 150.000 μέχρι 450.000 αιμοπετάλια/ μL και η κύρια λειτουργία τους αφορά στην αιμόσταση [9]. Ο χρόνος ζωής τους στην κυκλοφορία του αίματος είναι 7-10 ημέρες, ενώ αν δεν επιτελέσουν αιμοστατική λειτουργία, φαγοκυτταρώνονται στον σπλήνα και το ήπαρ [10]. Υπό φυσιολογικές συνθήκες, τα αιμοπετάλια κυκλοφορούν κοντά στην περιφέρεια των αγγείων [11]. Μετά από αγγειακό τραυματισμό, τα αιμοπετάλια προσκολλώνται γρήγορα στο σημείο της βλάβης, όπου ενεργοποιούνται, σχηματίζουν ψευδοπόδια και συσσωρεύονται οδηγώντας στο σχηματισμό του θρόμβου [11].

Τα αιμοπετάλια μπορούν δομικά να χωριστούν σε τέσσερις ζώνες (Εικόνα 1.2):

- α) Περιφερική ζώνη
- β) Δομική ζώνη

- γ) Ζώνη των οργανιδίων
- δ) Ζώνη μεμβρανικού συστήματος



Εικόνα 1.2 Σχηματική απεικόνιση των τεσσάρων ζωνών ενός αιμοπεταλίου.

α) Περιφερική ζώνη

Η περιφερική ζώνη αποτελείται από μία λεία κυτταρική μεμβράνη και έναν παχύ γλυκοκάλυκα (15-20 nm). Ο γλυκοκάλυκας δεν εξυπηρετεί μόνο ως φραγμός μεταξύ του εσωτερικού και του εξωτερικού περιβάλλοντος, αλλά κυρίως είναι μία δυναμική δομή η οποία αποτελεί την περιοχή πρώτης επαφής εντοπίζοντας αλλαγές που συμβαίνουν στο αγγειακό τοίχωμα και απαιτούν αιμοστατική απόκριση [12]. Ο γλυκοκάλυκας καλύπτεται από πληθώρα γλυκοπρωτεϊνικών υποδοχέων που είναι απαραίτητοι για την προσκόλληση των αιμοπεταλίων στο τραυματισμένο ενδοθήλιο, την πλήρη αιμοπεταλιακή ενεργοποίηση και συσσώρευση και την αλληλεπίδραση με άλλα κυτταρικά στοιχεία [12]. Το αυξημένο αρνητικό φορτίο του γλυκοκάλυκα λόγω σιαλικών οξέων που είναι προσδεμένα σε πρωτεΐνες και λιπίδια, εμποδίζει την προσκόλληση των εν ηρεμία κυκλοφορούντων αιμοπεταλίων [13].

Η κυτταρική μεμβράνη των αιμοπεταλίων έχει τη δομή λιπιδικής διπλοστιβάδας με πάχος 7-9 nm και διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην επιτάχυνση της πήξης του αίματος. Στην κυτταρική μεμβράνη εντοπίζονται φωσφολιπίδια, γλυκολιπίδια, γλυκοπρωτεΐνες, υδαάνθρακες και χοληστερόλη, ενώ αντλίες Na^+ και Ca^{2+} ρυθμίζουν τη μετακίνηση ιόντων διαμέσου της μεμβράνης [14]. Η ασύμμετρη κατανομή των φωσφολιπιδίων στα εσωτερικά και εξωτερικά τμήματα της μεμβράνης είναι υπεύθυνη για τη ρύθμιση της πήξης. Τα αρνητικά φορτισμένα φωσφολιπίδια (κυρίως φωσφατιδυλοσερίνη, φωσφατιδυλοαιθανολαμίνη και φωσφατιδυλοϊνσιτόλη)

εντοπίζονται στο εσωτερικό τμήμα της μεμβράνης, διατηρώντας την σε μη-προθρομβωτική κατάσταση, ενώ στο εξωτερικό της τμήμα εντοπίζονται τα ουδέτερα φωσφολιπίδια (κυρίως σφιγγομυελίνη και φωσφατιδυλοχολίνη) [14, 15]. Κατά την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων τα αρνητικά φορτισμένα φωσφολιπίδια εκτίθεται στο εξωτερικό τμήμα της μεμβράνης οδηγώντας στην επακόλουθη έκθεση του ιστικού παράγοντα (tissue factor, TF), των αιμοπεταλιακών υποδοχέων και την αιμοπεταλιακή συσσώρευση [12, 15].

Η υπομεμβρανική περιοχή, η οποία εντοπίζεται κάτω από τη κυτταρική μεμβράνη, είναι κρίσιμη για τη λειτουργία των αιμοπεταλίων. Τα οργανίδια που εντοπίζονται στο κυτταρόπλασμα των εν ηρεμία αιμοπεταλίων δεν αλληλεπιδρούν ποτέ με την υπομεμβρανική περιοχή, ενώ οι κυτταροπλασματικές περιοχές των διαμεμβρανικών υποδοχέων αλληλεπιδρούν με ποικίλες πρωτεΐνες της περιοχής αυτής, ρυθμίζοντας σηματοδοτικά μονοπάτια της ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων. Οι κυριότερες από αυτές τις πρωτεΐνες είναι η καλμοδουλίνη, η μυοσίνη και τα νημάτια ακτίνης που απαρτίζουν τον κυτταροσκελετό [12].

β) Δομική ζώνη

Τη δομική ζώνη των αιμοπεταλίων απαρτίζουν οι μικροσωληνίσκοι, τα μικροϊνίδια ακτίνης και το γλυκογόνο.

Οι μικροσωληνίσκοι μαζί με τα μικροϊνίδια, ή αλλιώς ινίδια ακτίνης, απαρτίζουν τον κυτταροσκελετό, μία δυναμική δομή που εκτείνεται σε όλο το κυτταρόπλασμα, δίνει στήριξη στο κύτταρο και αναδιοργανώνεται ανάλογα με τις ανάγκες του. Στα αιμοπετάλια, οι μικροσωληνίσκοι συμβάλλουν στη διατήρηση του δισκοειδούς σχήματος των εν ηρεμία αιμοπεταλίων, ενώ τα μικροϊνίδια εμπλέκονται στην αλλαγή του σχήματος κατά την ενεργοποίησή τους [16]. Επιπρόσθετα, στα εν ηρεμία αιμοπετάλια τα μικροϊνίδια φαίνεται να αποτελούν τη μήτρα πάνω στην οποία ακινητοποιούνται οργανίδια και άλλα δομικά συστατικά με αποτέλεσμα να αποτρέπουν τη μεταξύ τους επαφή [16]. Μετά την αιμοπεταλιακή ενεργοποίηση, ο κυτταροσκελετός φέρει τα α-κοκκία και τα πυκνά κοκκία των αιμοπεταλίων σε στενή επαφή στο κέντρο του κυττάρου συμβάλλοντας στην έκκριση του περιεχομένου των κοκκίων [17, 18].

Το κυτταρόπλασμα των αιμοπεταλίων είναι πλούσιο σε γλυκογόνο, ένα διακλαδισμένο πολυσακχαρίτη που αποτελείται από μόρια γλυκόζης. Η κατανομή του γίνεται τυχαία είτε ως μεμονωμένα σωματίδια γλυκογόνου, είτε ως μάζες γλυκογόνου. Δεν είναι γνωστό γιατί το γλυκογόνο κατανέμεται με αυτόν τον τρόπο, ωστόσο, έχει παρατηρηθεί ότι τμήματα της

μεμβράνης συχνά αλληλεπιδρούν με μάζες γλυκογόνου δημιουργώντας ένα έγκλειστο τμήμα εντός αυτών, απομονώνοντας το εσώκλειστο γλυκογόνο. Η παραπάνω διαδικασία έχει συσχετιστεί με το σχηματισμό των γλυκοσωμάτων [19].

γ) Ζώνη των οργανιδίων

Τα αιμοπετάλια περιέχουν στο κυτταρόπλασμα τους τρεις κύριους τύπους εκκριτικών οργανιδίων: τα α-κοκκία, τα πυκνά κοκκία και τα λυσοσώματα. Τα οργανίδια αυτά έχουν διακριτή μοριακή σύνθεση, δομική μορφολογία, κινητική εξωκυττάρωσης και διαφορετικές εκκριτικές αποκρίσεις ανάλογα με τα ερεθίσματα. Τα κοκκία αναπτύσσονται εντός των μεγακαρυοκυττάρων [20]. Στο κυτταρόπλασμα των αιμοπεταλίων συναντώνται επίσης μιτοχόνδρια που συμβάλλουν στον ενεργειακό μεταβολισμό, αλλά και γλυκοσώματα.

Τα α-κοκκία είναι τα πολυπληθέστερα κοκκία των αιμοπεταλίων καταλαμβάνοντας το 10% του συνολικού όγκου [20, 21]. Συνήθως υπάρχουν 40-80 α-κοκκία ανά αιμοπετάλιο και ο αριθμός αυτός εξαρτάται από το μέγεθος του αιμοπεταλίου αλλά και από την παρουσία δομών, όπως οι μάζες γλυκογόνου, οι οποίες περιορίζουν το χώρο εντός του κυτταροπλάσματος [22]. Τα α-κοκκία στα εν ηρεμία αιμοπετάλια δεν έρχονται σε επαφή μεταξύ τους. Το σχήμα τους είναι σφαιρικό προς οβάλ, έχουν διάμετρο 200-500 nm και το εσωτερικό τους χωρίζεται σε ζώνες [12]. Στην υπομεμβρανική ζώνη εντοπίζεται ο παράγοντας von Willebrand (von Willebrand factor, vWF) οργανωμένος σε σωληνοειδείς δομές [23]. Στην περιφερική ζώνη εντοπίζονται πρωτεΐνες των αιμοπεταλίων που έχουν συντεθεί από τα μεγακαρυοκύτταρα, όπως ο vWF και η P-σελεκτίνη (ή αλλιώς CD62P), αλλά και πρωτεΐνες που συντίθεται από άλλα κύτταρα και προσλαμβάνονται με ενδοκυττάρωση από τα αιμοπετάλια, όπως το ινωδογόνο [24]. Η κεντρική ζώνη είναι πυκνότερη από την περιφερική και πιθανότατα περιέχει πρωτεΐνες οι οποίες φέρουν θέσεις πρόσδεσης για βαρέα μέταλλα. Επίσης, τα α-κοκκία αποτελούν αποθήκες υποδοχέων προσκόλλησης των αιμοπεταλίων, όπως η ιντεγκρίνη $\alpha_{IIb}\beta_3$, υποδοχέων προσκόλλησης αιμοπεταλίου-ενδοθηλίου, όπως ο $\alpha_v\beta_3$, αλλά και χημειοκινών, παραγώγων του αραχιδονικού οξέος, όπως είναι το θρομβοξάνιο A_2 (thromboxane A_2 , TxA_2) και η αδενυλική κυκλάση (adenylyl cyclase, AC).

Η αιμοπεταλιακή ενεργοποίηση οδηγεί σε έκκριση του περιεχομένου των α-κοκκίων, τα οποία περιέχουν τόσο μεμβρανοσύνδετες πρωτεΐνες οι οποίες εκφράζονται στην μεμβράνη των αιμοπεταλίων, όσο και διαλυτές πρωτεΐνες οι οποίες απελευθερώνονται στον εξωκυττάριο χώρο. Κάποιες από τις μεμβρανοσύνδετες πρωτεΐνες, όπως η $\alpha_{IIb}\beta_3$, εντοπίζονται στη μεμβράνη των εν

ηρεμία αιμοπεταλίων και η ενεργοποίηση οδηγεί σε αύξηση των αντιγράφων στην αιμοπεταλιακή επιφάνεια [25]. Πρωτεωμικές μελέτες έδειξαν ότι κατά την αιμοπεταλιακή ενεργοποίηση τα α-κοκκία απελευθερώνουν μέχρι και 300 διαλυτές πρωτεΐνες [26].

Τα πυκνά κοκκία είναι μικρότερα σε μέγεθος από τα α-κοκκία, απαντώνται σε μικρότερους αριθμούς (3-8 ανά αιμοπετάλιο) και έχουν υψηλή μορφολογική ετερογένεια. Τα πυκνά κοκκία περιέχουν στο εσωτερικό τους υψηλές συγκεντρώσεις μικρών μορίων, όπως η διφωσφορική αδενοσίνη (adenosine diphosphate, ADP), η τριφωσφορική αδενοσίνη (adenosine triphosphate, ATP), η σεροτονίνη, τα Ca^{2+} και Mg^{2+} [27, 28]. Η ενεργός μεταφορά πιστεύεται ότι συμβάλλει στη διατήρηση των υψηλών συγκεντρώσεων των παραπάνω μορίων [27]. Η απελευθέρωση του περιεχομένου των πυκνών κοκκίων έχει αποδειχθεί ότι είναι γρηγορότερη από εκείνη των α-κοκκίων, ανεξάρτητα από τον αγωνιστή που προκάλεσε την αιμοπεταλιακή ενεργοποίηση [29]. Κατά την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων, η απελευθέρωση του ADP των πυκνών κοκκίων διαμέσου θετικής ανατροφοδότησης οδηγεί στην περαιτέρω ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων από τον υποδοχέα $P2Y_{12}$ [28, 30].

Τα αιμοπετάλια περιέχουν λίγα λυσοσώματα (όχι πάνω από 3), με διάμετρο η οποία κυμαίνεται μεταξύ 175-250 nm [31], τα οποία στο εσωτερικό τους έχουν υδρολυτικά ένζυμα όπως καθεψίνες, β-γαλακτοσιδάση, όξινη φωσφατάση κ.α. Ο ρόλος των λυσοσωμάτων δεν είναι ξεκάθαρος, αλλά φαίνεται να συμμετέχουν στην πέψη φαγοκυτταρικών και κυτταροπλασματικών συστατικών [32, 33]. Το περιεχόμενο των λυσοσωμάτων μετά από την έκκριση του μπορεί να συμβάλλει σε εξωκυτάριες διεργασίες, όπως η ινωδύλωση και η αποικοδόμηση συστατικών της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας (extracellular matrix, ECM). Τα αιμοπετάλια έχουν μία ενεργή οδό αυτοφαγίας, η οποία ρυθμίζεται από την ασιτία, αλλά παραμένει άγνωστο ποια κυτταροπλασματικά συστατικά καταστρέφονται με αυτή τη διαδικασία [34].

Επιπρόσθετα, τα αιμοπετάλια διαθέτουν λίγα μιτοχόνδρια τα οποία συμβάλλουν σημαντικά στον ενεργειακό μεταβολισμό του κυττάρου, ενώ πιστεύεται ότι αποτελούν πηγή Ca^{2+} που είναι απαραίτητη για την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων [12]. Επιπλέον, τα μιτοχόνδρια εμπλέκονται στην απόπτωση. Πρόσφατες μελέτες απέδειξαν ότι οι αλλαγές στην ακεραιότητα της μεμβράνης των μιτοχονδρίων οδηγεί στην απελευθέρωση από αυτά αποπτωτικών παραγόντων συμπεριλαμβανομένου του κυτοχρώματος C που με τη σειρά του οδηγεί στην ενεργοποίηση κασπασών [35].

Τέλος, στο κυτταρόπλασμα των αιμοπεταλίων εντοπίζονται γλυκοσώματα τα οποία έχουν οβάλ σχήμα, περικλείονται από μία τυπική μεμβράνη και το μέγεθος τους είναι παρόμοιο με αυτό των α-κοκκίων [19].

δ) Ζώνη μεμβρανικού συστήματος

Η ζώνη αυτή αποτελείται από δύο ξεχωριστά περιβαλλόμενα από μεμβράνη σωληνοειδή συστήματα: το ανοιχτό καναλοειδές σύστημα (open canalicular system, OCS) και το πυκνό σωληνοειδές σύστημα (dense tubular system, DTS).

Open canalicular system

Το OCS αποτελεί μέρος της κυτταρικής μεμβράνης του αιμοπεταλίου παρ' όλα αυτά πολλοί ερευνητές θεωρούν ότι είναι ένα μοναδικό μεμβρανικό σύστημα το οποίο δεν σχετίζεται με τις δραστηριότητες της μεμβράνης. Το OCS αποτελείται από ελικοειδείς εγκοιλώσεις της αιμοπεταλιακής μεμβράνης που συνδέουν το κυτταρόπλασμα με το εξωτερικό περιβάλλον, παρέχοντας ένα σύστημα εισόδου, διαμέσου του οποίου προσλαμβάνονται και μεταφέρονται εντός του αιμοπεταλίου ουσίες όπως το ινωδογόνο, οι οποίες στη συνέχεια αποθηκεύονται στα α-κοκκία [36, 37]. Επιπρόσθετα, το OCS αποτελεί ένα σύστημα εξόδου ουσιών που είναι αποθηκευμένες στα α-κοκκία των αιμοπεταλίων, κατά την αιμοπεταλιακή ενεργοποίηση [18]. Ακόμη, το OCS διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην αιμόσταση καθώς αποτελεί την κύρια πηγή αύξησης της μεμβρανικής επιφάνειας των ενεργοποιημένων αιμοπεταλίων. Μετά από αγγειακό τραυματισμό, τα αιμοπετάλια προσκολλώνται στο σημείο της βλάβης και εκτείνουν ψευδοπόδια, με αποτέλεσμα την αύξηση της μεμβρανικής επιφάνειας μέχρι και 420% .

Dense tubular system

Το DTS αποτελεί ένα μικρό κλειστό ενδομεμβρανικό σύστημα με επιμήκη και ακανόνιστα κανάλια, τα οποία κατανέμονται τυχαία εντός του κυτταροπλάσματος. Το DTS προέρχεται από κανάλια του αδρού ενδοπλασματικού δικτύου των μεγακαρυοκυττάρων και σε αυτό αποθηκεύονται Ca^{2+} , καθώς και ένζυμα που συμμετέχουν στον έλεγχο της ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων [31, 38]. Συνεπώς, μπορεί να θεωρηθεί ως ένα οργανίδιο των αιμοπεταλίων το οποίο, σε αντίθεση με τα υπόλοιπα, εντοπίζεται γειτονικά της περιφερικής δέσμης των μικροσωληνίσκων και συνεισφέρει στη διατήρηση του δισκοειδούς σχήματος των αιμοπεταλίων.

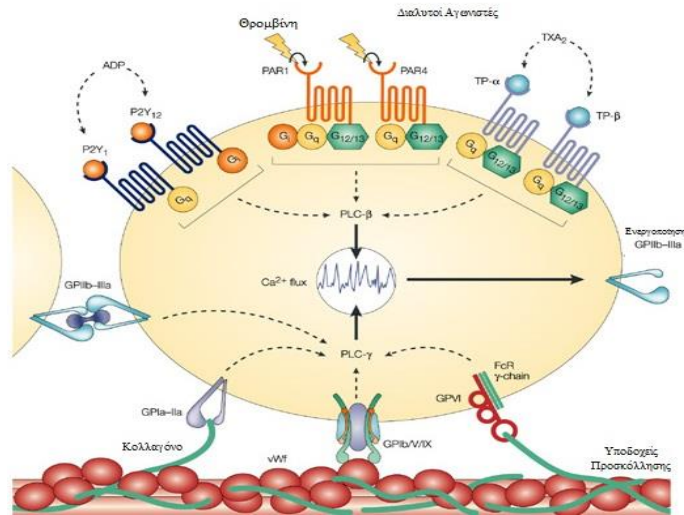
Επίσης, αποθηκεύει ένζυμα που συμμετέχουν στο μεταβολισμό του αραχιδονικού οξέος, προς ουσίες οι οποίες ελευθερώνονται κατά την ενεργοποίηση του αιμοπεταλίου [38].

Ενώ το OCS εμφανίζει διακριτή δομή καναλιών, το DTS είναι γεμάτο από άμορφο υλικό παρόμοιο με του κυτταροπλάσματος. Επίσης, αντίθετα από το OCS, το DTS δεν έρχεται σε επαφή με τη μεμβράνη του αιμοπεταλίου ή των οργανιδίων του. Τέλος, δεν υπάρχει καμία φυσική επικοινωνία μεταξύ των OCS και DTS και έτσι τα αιμοπετάλια έχουν δύο διακριτά μεμβρανικά συστήματα που απουσιάζουν από τα υπόλοιπα κύτταρα του αίματος [12].

1.3 Υποδοχείς των αιμοπεταλίων

Στην επιφάνεια των αιμοπεταλίων εντοπίζεται πληθώρα υποδοχέων, οι οποίοι μαζί με το περιεχόμενο των κοκκίων, καθορίζουν την κυτταρική ταυτότητα των αιμοπεταλίων. Αντίθετα από τα υπόλοιπα κύτταρα, τα απύρρινα αιμοπετάλια δεν έχουν τη δυνατότητα σύνθεσης πρωτεϊνών, συνεπώς πρέπει να είναι εξοπλισμένα με πληθώρα μορίων, ώστε να μπορούν να επιτελούν φυσιολογικές λειτουργίες και να αντιμετωπίζουν παθολογικές καταστάσεις. Ένας τρόπος με τον οποίο μπορούν τα αιμοπετάλια να αλλάξουν το φαινότυπο τους ώστε να προσαρμοστούν σε ποικίλες καταστάσεις, είναι διαμέσου των υποδοχέων που βρίσκονται αποθηκευμένοι εντός των κοκκίων τους και οι οποίοι μετά από την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων, εκφράζονται στην αιμοπεταλιακή επιφάνεια.

Καθώς η κυριότερη λειτουργία των αιμοπεταλίων είναι η αιμόσταση, η πλειοψηφία των αιμοπεταλιακών υποδοχέων σχετίζεται με αυτή τη διαδικασία. Έτσι, οι υποδοχείς συμμετέχουν στην ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων, την προσκόλλησή τους στο τραυματισμένο ενδοθήλιο και την αλληλεπίδραση αιμοπεταλίου-αιμοπεταλίου που οδηγεί στη συσσώρευση και το σχηματισμό θρόμβου. Επιπρόσθετα, καθώς τα αιμοπετάλια εμπλέκονται και σε άλλες διαδικασίες όπως η φλεγμονή και η αγγειογένεση, στην επιφάνεια τους εκφράζονται υποδοχείς που συμμετέχουν στην αλληλεπίδραση αιμοπεταλίων με άλλα κύτταρα. Στην εικόνα 1.3 παρουσιάζονται οι σημαντικότεροι υποδοχείς των αιμοπεταλίων και οι αγωνιστές τους.



Εικόνα 1.3 Σχηματική αναπαράσταση των σημαντικότερων αιμοπεταλιακών υποδοχέων και των αγωνιστών τους. Τροποποιημένη εικόνα από την παραπομπή [39].

1.3.1 Ιντεγκρίνες

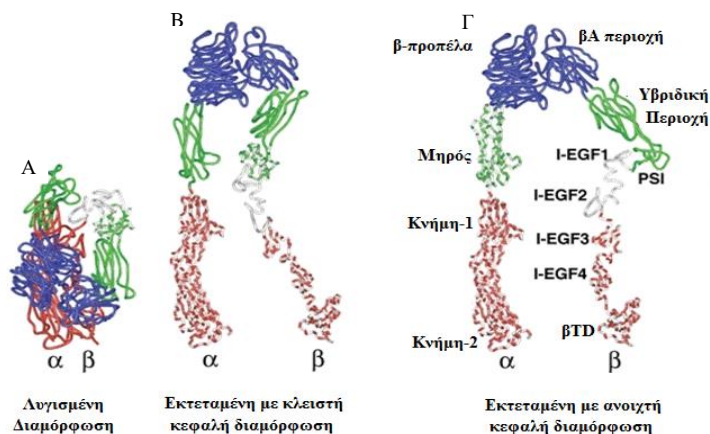
Οι ιντεγκρίνες αποτελούν μία οικογένεια διαμεμβρανικών γλυκοπρωτεϊνικών υποδοχέων, οι οποίοι συνδέουν το ενδοκυττάριο με το εξωκυττάριο περιβάλλον. Πιο συγκεκριμένα, οι ιντεγκρίνες είναι κρίσιμοι διαμεσολαβητές τόσο κυτταρικής σηματοδότησης, όσο και αλληλεπιδράσεων κυττάρου-κυττάρου και κυττάρου-ECM [40, 41]. Αποτελούν ετεροδιμερή μιας α (120-180 kDa) και μιας β υπομονάδας (90-100 kDa) οι οποίες είναι μη ομοιοπολικά συνδεδεμένες μεταξύ τους. Στα σπονδυλωτά έχουν ταυτοποιηθεί 18 α και 8 β υπομονάδες οι οποίες συνδυάζονται συνθέτοντας 24 διαφορετικά ετεροδιμερή, τα οποία μπορούν να κατηγοριοποιηθούν σε υποοικογένειες ανάλογα με τη β υπομονάδα τους [40]. Κάθε υπομονάδα διαπερνά τη μεμβράνη μία φορά, ενώ κάθε ετεροδιμερές αποτελείται από μία μεγάλη εξωκυττάρια αμινοτελική περιοχή στην οποία προσδένονται πρωτεΐνες, μία υδρόφοβη διαμεμβρανική περιοχή και μία μικρού μήκους κυτταροπλασματική περιοχή, η οποία συνδέεται με τον κυτταροσκελετό διαμέσου πρωτεϊνών [40, 42]. Οι ιντεγκρίνες διαδραματίζουν κρίσιμο ρόλο σε ποικιλία κυτταρικών λειτουργιών, συμπεριλαμβανομένης της κυτταρικής μετανάστευσης, της αμφίδρομης μεταγωγής σημάτων συνδέοντας το εξωκυττάριο περιβάλλον με τον κυτταροσκελετό, καθώς και του ελέγχου της κυτταρικής ανάπτυξης, προσκόλλησης και διαφοροποίησης [43, 44]. Αντίθετα με άλλους υποδοχείς, οι ιντεγκρίνες μπορούν να υπάρξουν σε δύο διαμορφώσεις, μία χαμηλής και μία υψηλής συγγένειας με το πρόσδεμα [45].

Οι αιμοπεταλιακές ιντεγκρίνες μετά από την ενεργοποίησή τους προς την υψηλής συγγένειας διαμόρφωση, αλληλεπιδρούν με προσδέματα της ECM, συμβάλλοντας στο σχηματισμό του αιμοστατικού ή παθολογικού θρόμβου [41]. Τα αιμοπετάλια εκφράζουν 5 α και 2 β υπομονάδες, για το σχηματισμό 5 ιντεγκρινών ($\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$, $\alpha_{\text{V}}\beta_3$, $\alpha_2\beta_1$, $\alpha_5\beta_1$, $\alpha_6\beta_1$) [41]. Τόσο οι β_3 ιντεγκρίνες, όσο και η $\alpha_5\beta_1$ αλληλεπιδρούν με τα προσδέματα της ECM μέσω της χαρακτηριστικής αλληλουχίας Arg-Gly-Asp (RGD). Από τις αιμοπεταλιακές ιντεγκρίνες, σημαντικότερη για τη συσσώρευση είναι η ιντεγκρίνη $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ [46]. Παρ' όλα αυτά, οι περισσότερες αιμοπεταλιακές αποκρίσεις μετά τον τραυματισμό του αγγειακού τοιχώματος, προϋποθέτουν τη συμμετοχή και άλλων ιντεγκρινών.

Η ιντεγκρίνη $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$

Η ιντεγκρίνη $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ είναι η μοναδική ιντεγκρίνη που εκφράζεται μόνο στα αιμοπετάλια και αποτελεί την κύρια μεμβρανική πρωτεΐνη της επιφάνειας τους, ενώ εντοπίζεται και στη μεμβράνη των α -κοκκίων. Συνολικά, υπάρχουν περίπου 50.000 με 80.000 αντίγραφα της ιντεγκρίνης ανά αιμοπετάλιο [47, 48]. Η $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ εκφράζεται στην επιφάνεια των αιμοπεταλίων ως ένα α/β ετεροδιμερές και κάθε υπομονάδα αποτελεί το προϊόν ενός ξεχωριστού γονιδίου επί του χρωμοσώματος 17 [49]. Παρά το γεγονός ότι και οι δύο υπομονάδες συντίθενται ως ενιαίες γλυκοζυλιωμένες πολυπεπτιδικές αλυσίδες, η υπομονάδα α_{IIb} υφίσταται πρωτεολυτική διάσπαση προς μια βαριά και μία ελαφριά αλυσίδα, οι οποίες παραμένουν συνδεδεμένες μεταξύ τους με δισουλφιδικό δεσμό [50, 51]. Η υπομονάδα α_{IIb} αποτελείται από 1008 αμινοξέα, με τη βαριά αλυσίδα (125 kDa) να αποτελείται από 871 αμινοξέα και την ελαφριά (23 kDa) να αποτελείται από 137 αμινοξέα. Η υπομονάδα β_3 είναι μονής αλυσίδας και αποτελείται από 762 αμινοξέα [52].

Η ηλεκτρονική μικροσκοπία αποκάλυψε τρεις βασικές διαμορφωτικές καταστάσεις της $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$, οι οποίες εμφανίζουν διαφορετική συγγένεια για τα εξωκυττάρια προσδέματα. Στη λυγισμένη διαμόρφωση η $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ βρίσκεται στη χαμηλής συγγένειας κατάσταση, στην εκτεταμένη με κλειστή κεφαλή διαμόρφωση βρίσκεται σε μία ενδιάμεσης συγγένειας κατάσταση, ενώ στην εκτεταμένη με ανοιχτή κεφαλή διαμόρφωση, βρίσκεται στην υψηλής συγγένειας κατάσταση (Εικόνα 1.4) [53].



Εικόνα 1.4 Σχηματική αναπαράσταση της δομής και των τριών διαμορφωτικών καταστάσεων της $\alpha_{1\text{b}}\beta_3$. (Α) Η χαμηλής συγγένειας διαμόρφωση για τα εξωκυττάρια προσδέματα. (Β) Η ενδιάμεσης συγγένειας διαμόρφωση για τα εξωκυττάρια προσδέματα. (Γ) Η υψηλής συγγένειας διαμόρφωση για τα εξωκυττάρια προσδέματα. Παρουσιάζονται οι υπομονάδες α και β , καθώς και οι επιμέρους δομές που απαρτίζουν την εξωκυττάρια περιοχή της ιντεγκρίνης. Τροποποιημένη εικόνα από την παραπομπή [53].

Τα κυριότερα προσδέματα της $\alpha_{1\text{b}}\beta_3$ είναι το ινωδογόνο, ο vWF, η φιβρονεκτίνη, η βιτρονεκτίνη και η αναγνώριση τους από την ιντεγκρίνη πραγματοποιείται διαμέσου της αλληλουχίας RGD των προσδεμάτων. Το ινωδογόνο περιέχει δύο RGD αλληλουχίες στην Αα αλυσίδα του, παρ' όλα αυτά η πρόσδεσή του στην $\alpha_{1\text{b}}\beta_3$ δεν γίνεται μόνο διαμέσου αυτών αλλά κυρίως διαμέσου μίας δωδεκαπεπτιδικής αλληλουχία (HHLGGAKQAGDV) στο C-τελικό άκρο της γ -αλυσίδας. Η πρόσδεση του ινωδογόνου οδηγεί στο σχηματισμό γεφυρών μεταξύ αιμοπεταλίων, οδηγώντας στη συσσώρευση και τη σταθεροποίηση του θρόμβου. Η πρόσδεση των άλλων προσδεμάτων επιτρέπει την προσκόλληση των αιμοπεταλίων στον υποενδοθηλιακό χώρο και τη ρύθμιση της συσσώρευσης.

Η ιντεγκρίνη $\alpha_2\beta_1$

Η δεύτερη σημαντικότερη αιμοπεταλιακή ιντεγκρίνη, η $\alpha_2\beta_1$, συναντάται σε 2.000-4.000 αντίγραφα ανά αιμοπετάλιο και αποτελεί υποδοχέα του κολλαγόνου τόσο στα αιμοπετάλια, όσο και σε πληθώρα άλλων κυτταρικών τύπων. Η $\alpha_2\beta_1$ συνίσταται από την υπομονάδα α_2 η οποία συνδέεται μη ομοιοπολικά με την υπομονάδα β_1 . Ανήκει σε μία ιδιαίτερη κατηγορία ιντεγκρινών οι οποίες περιέχουν μία εξαιρετικά διατηρημένη εξωκυττάρια περιοχή I και η οποία διαμεσολαβεί στη δέσμευση των προσδετών του υποδοχέα. Η περιοχή I εντοπίζεται στην α_2 υπομονάδα και

αποτελείται από 220 αμινοξέα, ενώ περιέχει μία διατηρημένη περιοχή που δεσμεύει κατιόντα (metal ion-dependent adhesion site, MIDAS), κυρίως Mg^{2+} και Mn^{2+} , η οποία είναι κρίσιμη για την αναγνώριση και δέσμευση του κολλαγόνου. Η υπομονάδα β_2 διαθέτει περιοχές I και μία αλληλουχία παρόμοια με εκείνη της περιοχής MIDAS, η οποία δεσμεύει κυρίως Ca^{2+} . Η $\alpha_2\beta_1$ αναγνωρίζει την περιοχή GFOGER η οποία περιέχεται στα κολλαγόνα τύπου I, II και XI, ακόμη και στη χαμηλής συγγένειας διαμόρφωση, χωρίς να έχει προηγηθεί ενεργοποίηση.

Στα αιμοπετάλια, η $\alpha_2\beta_1$ συμμετέχει σε ποικίλες φυσιολογικές και παθοφυσιολογικές λειτουργίες, συμπεριλαμβανομένης της αιμόστασης, της θρόμβωσης και της φλεγμονής. Αν και ο αριθμός των αντιγράφων της είναι χαμηλός, έχει αποδειχθεί ότι η $\alpha_2\beta_1$ είναι απαραίτητη για την εξαρτώμενη από Mg^{2+} προσκόλληση των αιμοπεταλίων στο κολλαγόνο μετά από αγγειακό τραυματισμό.

1.3.2 Οικογένεια γλυκοπρωτεϊνών πλούσιων σε λευκίνη

Οι περιοχές πλούσιες σε λευκίνη (leucine-rich repeats, LLRs), με μήκος 20-29 αμινοξέα, αποτελούν διατηρημένο κατάλοιπο σε πληθώρα πρωτεϊνών και φαίνεται να παρέχουν μία ευέλικτη δομή για αλληλεπιδράσεις πρωτεΐνης-πρωτεΐνης [54].

Το σύμπλοκο GPIb-IX-V

Στα αιμοπετάλια η οικογένεια των γλυκοπρωτεϊνών (GP) πλούσιων σε λευκίνη αντιπροσωπεύεται από το σύμπλοκο GPIb-IX-V, με κατά προσέγγιση 50.000 αντίγραφα ανά αιμοπετάλιο, αποτελώντας τον δεύτερο πιο άφθονο αιμοπεταλιακό υποδοχέα [55]. Το σύμπλοκο GPIb-IX-V αποτελείται από τέσσερις υπομονάδες, τις GPIba (610 αμινοξέα), GPIb β (181 αμινοξέα), GPIX (160 αμινοξέα) και GPV (544 αμινοξέα), έχοντας κυριότερο πρόσδεμα τον vWF, αλλά συνδέεται και με άλλα μόρια που εμπλέκονται στην αιμόσταση και τη θρόμβωση, όπως είναι η θρομβίνη και η P-σελεκτίνη [56, 57]. Κάθε υπομονάδα του συμπλόκου αποτελεί μία τύπου I διαμεμβρανική πρωτεΐνη, αποτελούμενη από μία μεγάλη εξωκυττάρια αμινοτελική περιοχή, μία διαμεμβρανική έλικα που διαπερνά τη μεμβράνη μία φορά και μία μικρού μήκους κυτταροπλασματική περιοχή που εμφανίζει ενζυμική δράση [56, 58]. Η εξωκυττάρια περιοχή κάθε υπομονάδας φέρει LLRs. Η υπομονάδα GPIba είναι η κυριότερη υπομονάδα, φέρει μία περιοχή πρόσδεσης (His1-Glu282) με 8 LLRs, περίπου 24 αμινοξέων η κάθε μία, καθώς και μία ανιοντική αλληλουχία (Asp269-Glu282) που περιέχει τρεις στις Tyr275, Tyr278 και Tyr279 στις

οποίες προστίθενται θειϊκές ομάδες, μια μετα-μεταφραστική τροποποίηση η οποία είναι απαραίτητη για την πρόσδεση του vWF και της θρομβίνης [58]. Η υπομονάδα GPIbβ φέρει μόνο μία LLR και μία περιοχή N-γλυκοζυλίωσης (Asn41). Οι Cys484 και Cys485 της GPIba υπομονάδας φαίνεται να συνδέονται με δισουλφιδικό δεσμό με την Cys122 δύο υπομονάδων GPIbβ [59]. Τέλος, οι GPIIX και GPV περιέχουν 1 και 13 LLRs, αντίστοιχα.

Toll-like υποδοχείς

Οι υποδοχείς τύπου Toll (toll-like receptors, TLRs) αποτελούν σημαντικούς υποδοχείς που σχετίζονται με την ανοσολογική απόκριση, καθώς η αναγνώριση παθογόνων μικροοργανισμών από αυτούς είναι απαραίτητη για την έναρξη της φλεγμονώδους απόκρισης. Συνιστούν τύπου I διαμεμβρανικούς υποδοχείς με μία εξωκυττάρια περιοχή που περιέχει πολλές LLRs και μία κυτταροπλασματική σηματοδοτική περιοχή Toll/Ιντερλευκίνη-1 (interleukin-1, IL-1). Ανάμεσα στους TLRs υπάρχουν δύο επιμέρους κατηγορίες υποδοχέων: αυτοί που συσπειρώνονται σε α-έλικα και εκείνοι που συσπειρώνονται σε μία πιο ανοιχτή και χαλαρή δομή. Στα αιμοπετάλια εντοπίζονται οι TLR1, 2, 4, 6 και 9 [60-62], με τους TLR2 και 4 να αποτελούν τους κυριότερους εκπροσώπους αυτής της κατηγορίας υποδοχέων. Όλο και περισσότερες μελέτες εξετάζουν την συμμετοχή των αιμοπεταλίων σε μη αιμοστατικές λειτουργίες, όπως είναι η φλεγμονή και οι πλειοψηφία των μελετών αυτών έχει επικεντρωθεί στους TLR2 και TLR4.

TLR4

Ο TLR4 αποτελείται από δύο περιοχές στην εξωκυττάρια περιοχή του οι οποίες φέρουν από 9 μέχρι 11 LLRs και χωρίζονται από μία λιγότερο καθορισμένη περιοχή που περιέχει δύο κυστεΐνες οι οποίες σχηματίζουν μία δισουλφιδική γέφυρα που αποτελεί μία ευέλικτη συνδετική περιοχή [55]. Όπως σε όλους τους TLRs, η κυτταροπλασματική περιοχή του σχηματίζει μία σηματοδοτική περιοχή Toll/IL-1, ενώ απαιτείται η πρόσδεση στο αμινοτελικό άκρο του ενός μικρού μορίου (MD-2) το οποίο ανήκει σε μία οικογένεια πρωτεϊνών που δεσμεύουν λιποπρωτεΐνες. Ο TLR4 αναγνωρίζει λιποπολυσακχαρίτες στην επιφάνεια Gram αρνητικών βακτηρίων [63].

1.3.3 Ανοσοσφαιρίνες

Οι ανοσοσφαιρίνες (Immunoglobulins, Ig) είναι ετεροδιμερείς πρωτεΐνες αποτελούμενες από δύο βαριές και δύο ελαφριές αλυσίδες. Κάθε ελαφριά αλυσίδα συνδέεται με τη βαριά με ένα

δισουλφιδικό δεσμό, ενώ και οι βαριές αλυσίδες συνδέονται μεταξύ τους με δισουλφιδικούς δεσμούς. Κάθε αλυσίδα αποτελείται από μία αμινοτελική μεταβλητή περιοχή και από μία καρβοξυτελική σταθερή περιοχή. Η μεταβλητή περιοχή αναγνωρίζει το αντιγόνο, ενώ η σταθερή περιοχή είναι υπεύθυνη για ποικίλες βιολογικές δράσεις όπως η ενεργοποίηση του συμπληρώματος ή δέσμευση σε άλλους υποδοχείς για την έκφραση της ανοσολογικής απόκρισης [64].

Η γλυκοπρωτεΐνη VI

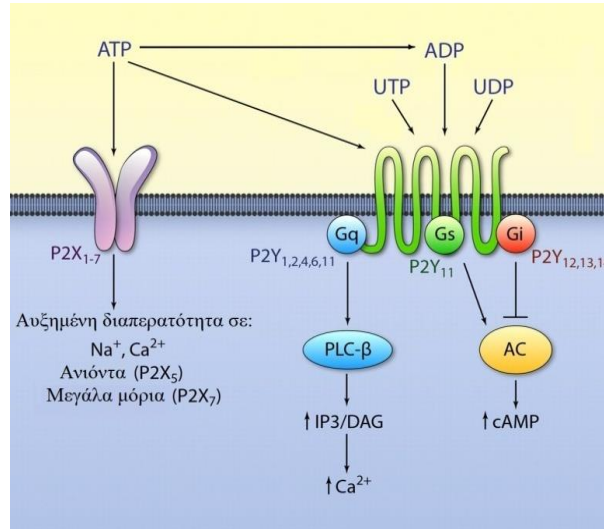
Ο σημαντικότερος υποδοχέας αυτής της κατηγορίας στα αιμοπετάλια είναι η γλυκοπρωτεΐνη VI (GPVI, 60-65 kDa), η οποία αποτελεί υποδοχέα του κολλαγόνου. Αποτελεί μία γλυκοπρωτεΐνη 339 αμινοξέων και ένα σηματοδοτικό πεπτίδιο 20 αμινοξέων, με μία εξωκυττάρια, μία διαμεμβρανική και μία κυτταροπλασματική περιοχή [65]. Η εξωκυττάρια περιοχή έχει δύο περιοχές Ig-C2-like και μία περιοχή πλούσια σε κατάλοιπα Ser και Thr [66]. Οι υποδοχείς GPVI σχηματίζουν διμερή μέσω της γ -αλυσίδας του υποδοχέα Fc (Fc receptor, FcR). Πιο συγκεκριμένα, κατάλοιπα Asp στη διαμεμβρανική περιοχή του FcR σχηματίζουν γέφυρα άλατος με την Arg252 της GPVI [67, 68]. Η κυτταροπλασματική περιοχή της GPVI (51 αμινοξέα) φέρει μία περιοχή με βασικά αμινοξέα κοντά στη διαμεμβρανική περιοχή, η οποία πιστεύεται ότι δεσμεύει την καλμοδουλίνη [69] και μία περιοχή πλούσια σε προλίνη, η οποία δρα ως θέση δέσμευσης κινασών τυροσίνης της οικογένειας Src και συγκεκριμένα τις Fyn και Lyn [70]. Αυτή η περιοχή έχει αποδειχθεί ότι είναι απαραίτητη για την ενδοκυττάρια σηματοδότηση [70].

Μελέτες έδειξαν ότι η GPVI ως μονομερές εμφανίζει χαμηλή συγγένεια για το κολλαγόνο. Αντιθέτως, η σύνδεση της GPVI με την γ -αλυσίδα του FcR και ο σχηματισμός διμερούς αυξάνει την συγγένεια με το κολλαγόνο [71]. Η δέσμευση του κολλαγόνου στο διμερές GPVI-FcR, οδηγεί στην αλληλεπίδραση του FcR με τις πρωτεΐνες Fyn και Lyn με επακόλουθο την φωσφορυλίωση μιας τυροσίνης στην γ -αλυσίδα του [70].

1.3.4 Υποδοχείς P2

Οι πουρίνες και οι πυριμιδίνες είναι εξωκυττάρια σηματοδοτικά μόρια, τα οποία είτε απελευθερώνονται από κατεστραμμένα κύτταρα, είτε εκκρίνονται μέσω μη λυτικών μηχανισμών και αλληλεπιδρούν με μία κατηγορία υποδοχέων που ονομάζονται P2, ρυθμίζοντας τη κυτταρική λειτουργία. Οι υποδοχείς P2 χωρίζονται σε δύο υποοικογένειες ανάλογα με τη μοριακή τους δομή:

α) την υποοικογένεια των υποδοχέων που συζευγνύονται με G πρωτεΐνες (G protein- coupled receptors, GPCRs), P2Y και β) την υποοικογένεια των ιοντικών διαύλων που συνδέονται με προσδέτες, P2X. Στην εικόνα 1.5 παρουσιάζεται σχηματικά η δομή των P2 υποδοχέων.



Εικόνα 1.5 Σχηματική απεικόνιση της δομής των P2 υποδοχέων. Οι υποδοχείς P2Y είναι συζευγμένοι με G πρωτεΐνες και αποτελούνται από 7 διαμεμβρανικές έλικες. Μπορούν να προσδέσουν είτε ADP και τριφωσφορική αδενοσίνη (adenosine triphosphate, ATP), είτε UDP (διφωσφορική ουριδίνη, uridine diphosphate) και UTP (τριφωσφορική ουριδίνη, uridine triphosphate). Οι υποδοχείς P2X αποτελούν διαύλους ιόντων συμβάλλοντας στην κυτταρική σηματοδότηση. Τροποποιημένη εικόνα από την παραπομπή [72].

Υποδοχείς P2Y

Οι υποδοχείς P2Y ανήκουν στην οικογένεια των GPCRs, τη σημαντικότερη οικογένεια υποδοχέων στα αιμοπετάλια, με εξωκυττάριο αμινοτελικό άκρο και ενδοκυττάριο καρβοξυτελικό άκρο. Το μοριακό βάρος τους μετά από γλυκοζυλίωση κυμαίνεται από 41-53 kDa. Η μεταγωγή σήματος περιλαμβάνει την ενεργοποίηση της φωσφολιπάσης C (phospholipase C, PLC) και ρύθμιση της δραστηριότητας της AC. Μέχρι σήμερα, έχουν ταυτοποιηθεί οκτώ υποδοχείς P2Y: P2Y₁, P2Y₂, P2Y₄, P2Y₆, P2Y₁₁, P2Y₁₂, P2Y₁₃, P2Y₁₄ [73]. Δομικά, οι υποδοχείς P2Y μπορούν να διακριθούν σε 2 επιμέρους υποομάδες: α) σε αυτούς που είναι δεσμευμένοι με G_α πρωτεΐνες (P2Y₁, P2Y₂, P2Y₄, P2Y₆, P2Y₁₁) και β) σε αυτούς που είναι δεσμευμένοι με G_ι πρωτεΐνες (P2Y₁₂, P2Y₁₃, P2Y₁₄) [74]. Ο P2Y₁₁ είναι επιπλέον συζευγμένος και με G_α πρωτεΐνες [75]. Φαρμακολογικά, οι P2Y μπορούν να διαιρεθούν σε υποκατηγορίες ανάλογα με ποιο νουκλεοτίδιο

προσδένουν, αδενίνη ή ουρακίλη. Οι P2Y₁, P2Y₁₁ και P2Y₁₂ προσδένουν αδενίνη (ADP και ATP), οι P2Y₄ και P2Y₆ αναγνωρίζουν ουρακίλη (UDP και UTP), ο P2Y₄ μπορεί να προσδέσει και αδενίνη και ουρακίλη, ενώ ο P2Y₁₄ μόνο UDP [74]. Τα ανθρώπινα αιμοπετάλια εκφράζουν κυρίως τους υποδοχείς P2Y₁ και P2Y₁₂, με τον δεύτερο να εντοπίζεται σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις.

Υποδοχέας P2Y₁

Ο ανθρώπινος υποδοχέας P2Y₁ εντοπίζεται σε ποικίλους ιστούς και εμφανίζει την κλασική δομή των υποδοχέων που συζευγνύονται με G πρωτεΐνες, αποτελείται από 373 αμινοξέα και έχει μέγεθος 42 kDa [76]. Τα αμινοξέα Arg333 και Arg334 στο καρβοξυτελικό άκρο του υποδοχέα είναι κρίσιμα για τη σύζευξή του με την G_α πρωτεΐνη, ενώ τα τελευταία 39 αμινοξέα του υποδοχέα είναι σημαντικά για την ενεργοποίησή του [74, 77]. Στα αιμοπετάλια, περίπου το 40% των υποδοχέων P2Y₁ εντοπίζεται στη μεμβράνη ως ετεροδιμερές, μία διαδικασία στην οποία εμπλέκονται τα τελευταία 19 αμινοξέα του υποδοχέα, ενώ μετά από ενεργοποίηση αυτό το ποσοστό μπορεί να φτάσει από 85 μέχρι 100% [74]. Ο υποδοχέας P2Y₁ εντοπίζεται και στο εσωτερικό των αιμοπεταλίων και συγκεκριμένα στις μεμβράνες των α-κοκκίων αλλά και στο OCS [78].

Ο P2Y₁ αποτελεί υποδοχέα του ADP, διαμεσολαβεί στην αλλαγή του σχήματος των αιμοπεταλίων και την ταχεία, αντιστρεπτή αιμοπεταλιακή συσσώρευση. Πρόσδεση του ADP στον P2Y₁ οδηγεί στη διαμεσολαβούμενη από G_α πρωτεΐνες ενεργοποίηση της β ισομορφής της PLC η οποία υδρολύει την 4,5-διφωσφορική φωσφατιδυλινοσιτόλη (phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate, PIP₂) προς 1,4,5 τριφωσφορική ινοσιτόλη (inositol triphosphate, IP₃) και διακυλογλυκερόλη (diacylglycerol, DAG), οδηγώντας στην αύξηση των ενδοκυττάρων επιπέδων των Ca²⁺. Η αύξηση των Ca²⁺ στο κυτταρόπλασμα επιτυγχάνεται μετά από την απελευθέρωση των Ca²⁺ που είναι αποθηκευμένα στο κύτταρο, αλλά και από εισροή Ca²⁺ από την ECM [79].

Υποδοχέας P2Y₁₂

Ο ανθρώπινος υποδοχέας P2Y₁₂, ο κυριότερος υποδοχέας του ADP, εμφανίζει την κλασική δομή των υποδοχέων που συζευγνύονται με G πρωτεΐνες, αποτελείται από 342 αμινοξέα και δύο πιθανές θέσεις N-γλυκοζυλίωσης στην εξωκυττάρια περιοχή του. Έχει αποδειχθεί, ότι οι θέσεις N-γλυκοζυλίωσης συμβάλλουν στη μεταγωγή σήματος, αλλά όχι στη σύνδεση του προσδέματος ή στην έκφραση του υποδοχέα στην αιμοπεταλιακή επιφάνεια [80]. Ο υποδοχέας P2Y₁₂ πέραν του

ότι εκφράζεται στην επιφάνεια των εν ηρεμία αιμοπεταλίων, εντοπίζεται και σε απόθεμα εντός των αιμοπεταλίων το οποίο και εκτίθεται στην αιμοπεταλιακή επιφάνεια μετά από ενεργοποίησή τους από ισχυρούς αγωνιστές [81].

Η πρόσφατη περιγραφή της τρισδιάστατης δομής του υποδοχέα έδειξε την ύπαρξη δύο δισουλφιδικών δεσμών μεταξύ των Cys17-Cys270 και Cys97-Cys175 στην εξωκυττάρια περιοχή του [82]. Επίσης, έχει βρεθεί ότι οι ενεργοί μεταβολίτες των θεινοπυριδινικών αναστολέων του P2Y₁₂, μπορούν να σπάσουν τη δισουλφιδική γέφυρα Cys97-Cys175, διαμέσου της ομοιοπολικής τους σύνδεσης με την Cys97 [83, 84]. Παράλληλα, αυτές οι κυστεΐνες σχετίζονται και με την ενεργοποίηση του υποδοχέα καθώς μετάλλαξη οποιουδήποτε από τα 4 αμινοξικά κατάλοιπα Cys με αλανίνη, οδήγησε σε μειωμένη πρόσδεση του αγωνιστή [85].

Η πρόσδεση του ADP στον υποδοχέα P2Y₁₂ οδηγεί στην ενεργοποίηση της G_{ai2} πρωτεΐνης και την επακόλουθη αναστολή της AC [86]. Η ενεργοποίηση της G_{ai2} από το ADP είναι κρίσιμη για την ενεργοποίηση της α_{11b}β₃ και την αιμοπεταλιακή συσσώρευση, ενώ η αναστολή της AC από την G_{ai2} δε σχετίζεται με τη συσσώρευση παρά μόνο με την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων [87]. Παρ' όλα αυτά η αναστολή της AC ίσως διαδραματίζει έμμεσο ρόλο στη συσσώρευση *in vivo*, καθώς αντισταθμίζει τη βιολογική δράση της προστακυκλίνης η οποία αναστέλλει τη λειτουργία των αιμοπεταλίων μέσω της αύξησης των επιπέδων της κυκλικής μονοφωσφορικής αδενοσίνης (cyclic adenosine monophosphate, cAMP) [88].

Υποδοχείς P2X

Οι υποδοχείς P2X αποτελούν ιοντικούς διαύλους, οι οποίοι διαμεσολαβούν τις αλλαγές της διαπερατότητας της μεμβράνης σε μονοσθενή και δισθενή κατιόντα, συμπεριλαμβανομένων των Na⁺, K⁺ και Ca²⁺. Η εισροή ιόντων εντός του κυττάρου είναι υπεύθυνη για κυτταρική σηματοδότηση, καθώς αλλάζει το διαμεμβρανικό δυναμικό και η συγκέντρωση των ιόντων. Οι υποδοχείς P2X περιλαμβάνουν 388-595 αμινοξέα και αποτελούνται από δύο υπομονάδες καθεμία από τις οποίες απαρτίζεται από μία υδρόφοβη διαμεμβρανική περιοχή και από ένα ενδοκυττάριο αμινο- και καρβοξυτελικό άκρο [89]. Ακόμη, ο υποδοχέας σχηματίζει ένα μεγάλο εξωκυττάριο άκρο με 10 κατάλοιπα κυστεΐνης που σχηματίζουν, διαμέσου δισουλφιδικών δεσμών, ένα βρόχο ο οποίος αποτελεί το σημείο σύνδεσης με τους προσδέτες [90].

Μέχρι σήμερα έχουν βρεθεί 7 υποδοχείς P2X (P2X₁₋₇) και συνήθως εντοπίζονται στις μεμβράνες σαν ομο- ή ετεροολιγομερή. Ο κυριότερος προσδέτης των υποδοχέων αυτών είναι το

ATP. Έχει βρεθεί ότι η πρόσδεση του ATP πραγματοποιείται διαμέσου συντηρημένων αμινοξικών καταλοίπων. Συγκεκριμένα, η φωσφορική ουρά του ATP προσανατολίζεται από τις Lys68 και Lys70 της μίας υπομονάδας και τη Lys309 της άλλης υπομονάδας με ένα δακτύλιο αδενίνης που βρίσκεται σε ένα συντηρημένο μοτίβο μεταξύ των αμινοξέων 290-292 που βρίσκονται βαθύτερα εντός της αύλακας που σχηματίζουν οι δύο υπομονάδες [90].

Ο υποδοχέας P2X₁

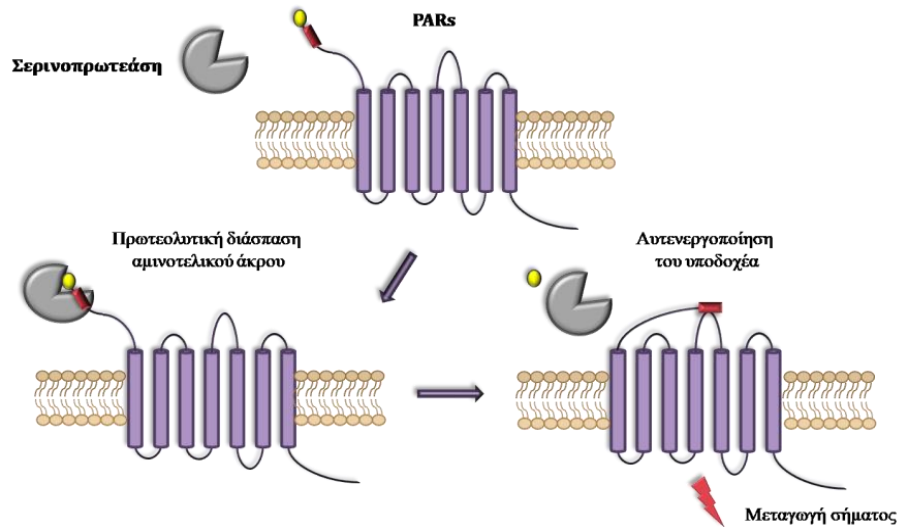
Ο υποδοχέας P2X₁ εντοπίζεται στα αιμοπετάλια όπου μετά από τη σύνδεση του ATP προκαλεί γρήγορη εισροή Ca²⁺ εντός του κυττάρου η οποία σχετίζεται με την αλλαγή του σχήματός τους [91], αλλά και γρήγορη αποπόλωση η οποία φαίνεται να ενισχύει τη σηματοδότηση διαμέσου του P2Y₁ και άλλων υποδοχέων που συνδέονται με Gα_q πρωτεΐνες [92]. Αν και η ενεργοποίηση του P2X₁ δεν είναι αρκετή για να προκαλέσει αιμοπεταλιακή συσσώρευση, έχει βρεθεί ότι συμβάλει στη συσσώρευση και έκκριση του περιεχομένου των κοκκίων ως απόκριση σε χαμηλές συγκεντρώσεις κολλαγόνου [93, 94], αλλά και δρώντας συνεργατικά με άλλους αιμοπεταλιακούς αγωνιστές [95].

1.3.5 Υποδοχείς που ενεργοποιούνται από πρωτεάσες

Οι υποδοχείς που ενεργοποιούνται από πρωτεάσες (protease-activated receptors, PARs) αποτελούν μία οικογένεια των GPCR και αυτενεργοποιούνται μετά από πρωτεολυτική διάσπαση του αμινοτελικού τους άκρου από σερινοπρωτεάσες. Μέχρι σήμερα έχουν ανακαλυφθεί 4 PARs οι PAR-1, PAR-2, PAR-3 και PAR-4. Οι PAR-1 και PAR-3 ενεργοποιούνται κυρίως από τη θρομβίνη, ο PAR-2 από τη θρυψίνη και πρωτεΐνες που μοιάζουν με τη θρυψίνη, ενώ ο PAR-4 τόσο από τη θρομβίνη, όσο και από τη θρυψίνη [96]. Η δράση των σερινοπρωτεασών οδηγεί στην αποκάλυψη ενός νέου αμινοτελικού άκρου το οποίο προσδένεται στον υποδοχέα επάγοντας κυτταρική σηματοδότηση.

Συνθετικά πεπτίδια τα οποία μιμούνται τη δομή του νέου αμινοτελικού άκρου που προκύπτει μετά την πρωτεολυτική διάσπαση, μπορούν να ενεργοποιήσουν τον υποδοχέα χωρίς να είναι απαραίτητη η δράση των σερινοπρωτεασών. Αυτό δεν ισχύει για τον PAR-3 ο οποίος έχει δειχθεί ότι δεν ενεργοποιείται από συνθετικά πεπτίδια [97, 98]. Οι PARs αποτελούν διαμεσολαβητές, μεταξύ άλλων, της αιμόστασης, της θρόμβωσης και της φλεγμονής. Στα ανθρώπινα αιμοπετάλια

εντοπίζονται μόνο οι PAR-1 και PAR-4. Στην εικόνα 1.6 παρουσιάζεται σχηματικά η ενεργοποίηση των PARs.



Εικόνα 1.6 Σχηματική απεικόνιση της ενεργοποίησης των PARs.

PAR-1

Ο PAR-1 είναι ο κυριότερος υποδοχέας της θρομβίνης που αποτελείται από 425 αμινοξέα και απαρτίζεται από 3 εξωκυττάριους και 3 ενδοκυττάριους βρόχους. Καθώς εμφανίζει μεγάλη συγγένεια για τη θρομβίνη, ακόμα και χαμηλές συγκεντρώσεις της τάξης των pM ενεργοποιούν τον υποδοχέα. Μεταξύ της θέσης δέσμευσης της θρομβίνης και του σημείου πρωτεολυτικής διάσπασης στον υποδοχέα, εντοπίζεται μία υδρόφοβη περιοχή που μοιάζει με ιρουδίνη με αλληλουχία $K^{51}YEPF^{55}$ και ένα ανιοντικό σύμπλεγμα ($E^{57}DEE^{60}$). Η ηλεκτροστατική αλληλεπίδραση της θετικά φορτισμένης περιοχής anion-binding exosite I της θρομβίνης με τις παραπάνω περιοχές του υποδοχέα, επιτρέπει τον κατάλληλο προσανατολισμό και την αλλοστερική σύνδεση της θρομβίνης στον υποδοχέα [99]. Η δράση της θρομβίνης, προκαλεί τη διάσπαση του δεσμού μεταξύ Arg41-Ser42 και το νέο άκρο που προκύπτει έχει την αλληλουχία $S^{42}FLLRN^{47}$. Η αλληλουχία αυτή ενεργοποιεί τον PAR-1 οδηγώντας σε διαμορφωτικές αλλαγές στον υποδοχέα και τη μεταγωγή σήματος [100]. Ο PAR-1 είναι συζευγμένος με $G_{\alpha_{12/13}}$ και G_{α_q} πρωτεΐνες οι οποίες οδηγούν σε ενεργοποίηση των Rho κινασών και της β -PLC, αντίστοιχα. Οι Rho κινάσες εμπλέκονται στην ενίσχυση της φωσφορυλίωσης της ελαφριάς αλυσίδας της μυοσίνης και τη συστολή της ακτίνης, ενώ η β -PLC υδρολύει την PIP_2 προς IP_3 και DAG.

Αποτέλεσμα της παραγωγής IP_3 είναι η αύξηση των επιπέδων Ca^{2+} , ενώ η DAG οδηγεί στην ενεργοποίηση της πρωτεϊνικής κινάσης C (protein kinase c, PKC) [101]. Η ενεργοποίηση του PAR-1 οδηγεί στην απελευθέρωση του ADP από τα πυκνά κοκκία, την ενεργοποίηση του $P2Y_{12}$ και τελικά προκαλεί μη αναστρέψιμη αιμοπεταλιακή συσσώρευση [102]. Η απενεργοποίηση του υποδοχέα πραγματοποιείται με τρεις διαφορετικούς τρόπους: φωσφορυλίωση, πρόσδεση της β-αρρεστίνης ή εσωτερίκευση και αποικοδόμηση του υποδοχέα [103-105].

PAR-3

Ο PAR-3 παρουσιάζει ομολογία σε ποσοστό 35-37% με τους PAR-1, -2 και -4 και αποτελεί υψηλής συγγένειας υποδοχέα για τη θρομβίνη. Η πρωτεολυτική διάσπαση του από τη θρομβίνη, κόβει το δεσμό Lys38-Thr39 και αποκαλύπτει ένα νέο αμινοτελικό άκρο με αλληλουχία $T^{39}FRGAP^{44}$. Επιπλέον, όπως και ο PAR-1, ο PAR-3 περιέχει μία περιοχή που μοιάζει με ιρουδίνη με αλληλουχία FEEFP, η οποία ευθύνεται για την υψηλή συγγένεια του υποδοχέα για τη θρομβίνη [98]. Ακόμη, έχει βρεθεί ότι ο PAR-3 δρα ως συμπάροντας για την ενεργοποίηση του PAR-4 από τη θρομβίνη. Ενώ οι PAR-1, -2 και -4 ενεργοποιούνται από συνθετικά μιμητικά πεπτίδια, πεπτίδια που μιμούνται το νέο αμινοτελικό άκρο του PAR-3 μετά την διάσπαση από τη θρομβίνη, προκαλούν ασθενή ή καθόλου ενεργοποίηση του υποδοχέα ακόμη και σε συγκεντρώσεις έως και 100 μM [97, 98].

PAR-4

Ο PAR-4 είναι υποδοχέας της θρομβίνης με 28-36% ομολογία με τους άλλους PARs και αποτελείται από 385 αμινοξέα. Η πρωτεολυτική διάσπαση από τη θρομβίνη στο δεσμό Arg47-Gly48 οδηγεί στην αποκάλυψη του νέου αμινοτελικού άκρου με αλληλουχία $G^{48}YPGQV^{53}$. Καθώς ο PAR-4 στερείται αλληλουχίας που μοιάζει με ιρουδίνη, η συγγένεια του υποδοχέα για τη θρομβίνη είναι χαμηλή [106]. Παρ' όλα αυτά, στον PAR-4 εντοπίζεται ένα ανιοντικό σύμπλεγμα με τα Asp57, Asp59, Glu62, Asp65, το οποίο συμβάλει στην αργή αποδέσμευση της θρομβίνης από τον υποδοχέα, καθώς και δύο κατάλοιπα προλίνης τα οποία παρέχουν υψηλής συγγένειας αλληλεπιδράσεις. Η διάσπαση του αμινοτελικού άκρου του PAR-4 προκαλεί παρατεταμένη μη αναστρέψιμη σηματοδότηση [107, 108].

1.3.6 Οικογένεια των υποδοχέων των προσταγλανδινών

Οι προσταγλανδίνες (prostaglandins, PGs) συντίθεται *de novo* από το μεταβολισμό του αραχιδονικού οξέος της κυτταρικής μεμβράνης από την κυκλοξυγονάση (cyclooxygenase, COX), μετά από τραυματισμό των κυττάρων ή κάποιο ερέθισμα, όπως η απελευθέρωση κυτταροκινών και δρουν ως αυτοκρινείς ή παρακρινείς λιπιδικοί διαμεσολαβητές. Οι σημαντικότεροι υποδοχείς των προσταγλανδινών στα αιμοπετάλια είναι οι παρακάτω:

Υποδοχείς του θρομβοξανίου

Το θρομβοξανίου αποτελεί σημαντικό μεταβολίτη του αραχιδονικού οξέος, ενώ το TxA_2 αποτελεί σημαντικό και ισχυρό αγωνιστή των αιμοπατελίων. Στα αιμοπετάλια συναντάται μόνο ο υποδοχέας του $\text{TxA}_2/\text{PGH}_2$ με μοριακό βάρος 57 kDa και 2 θέσεις N-γλυκοζυλίωσης, ο οποίος είναι συζευγμένος με διάφορες G πρωτεΐνες, συμπεριλαμβανομένων των G_q και $G_{12/13}$ [55, 109]. Ο υποδοχέας $\text{TxA}_2/\text{PGH}_2$ έχει δύο ισομορφές, οι οποίες υπάρχουν στα αιμοπετάλια και επάγουν διαφορετικά σηματοδοτικά μονοπάτια. Πιο συγκεκριμένα, και οι δύο ισομορφές ενεργοποιούν την PLC, αλλά η α ισομορφή ενεργοποιεί την AC, ενώ η β ισομορφή αναστέλλει την ενεργοποίησή της [110].

Υποδοχείς της προστακυκλίνης

Ο υποδοχέας της προστακυκλίνης ή προσταγλανδίνης I_2 (prostaglandin I_2 , PGI_2 και υποδοχέας IP) έχει μοριακό βάρος από 41-83 kDa και στα αιμοπετάλια δεσμεύει την προστακυκλίνη η οποία απελευθερώνεται από τα ενδοθηλιακά κύτταρα (endothelial cells, ECs) και δρα ως αγγειοδιασταλτικός παράγοντας, αλλά και ως αιμοπεταλιακός αγωνιστής [111, 112]. Ο υποδοχέας IP είναι συζευγμένος με G_s πρωτεΐνες και οδηγεί σε ενεργοποίηση της AC και την επακόλουθη αναστολή του cAMP, ενώ περιέχει και 2 θέσεις N-γλυκοζυλίωσης, μία στην εξωκυττάρια περιοχή του στην Asn7 και μία στον πρώτο εξωκυττάριο βρόχο στην Asn78 [113]. Η PGI_2 έχει ένα κυκλοπεντανικό δακτύλιο και παράπλευρες αλυσίδες, δομικά χαρακτηριστικά που αναγνωρίζονται από τον υποδοχέα IP σταθεροποιώντας την πρόσδεσή τους. Γενικά, οι PGs δεν είναι εξειδικευμένες για έναν υποδοχέα, και ο υποδοχέας IP μπορεί να αλληλεπιδράσει με τον κυκλοπεντανικό δακτύλιο των PGI_2 , PGE_1 και PGE_2 (προσταγλανδίνη E_1 και E_2 , prostaglandin E_1 και E_2) [111].

Υποδοχείς της προσταγλανδίνης E₂

Οι υποδοχείς της PGE₂ εμφανίζονται σε ποικίλους ιστούς και περιλαμβάνουν τους EP1-4. Η PGE₂ σε χαμηλές συγκεντρώσεις ενισχύει την αιμοπεταλιακή απόκριση στο ADP και στο κολλαγόνο, ενώ σε υψηλές συγκεντρώσεις προκαλεί αναστολή της αιμοπεταλιακής συσσώρευσης. Ο EP1 διαμεσολαβεί την απελευθέρωση Ca²⁺. Οι EP2 και EP4 συζευγνύονται με G_s πρωτεΐνες και ενεργοποιούν την AC αναστέλλοντας την παραγωγή του cAMP και συνεπώς, την αιμοπεταλιακή απόκριση. Αντίθετα, ο EP3 συζευγνύεται με G_i πρωτεΐνες μειώνοντας τα επίπεδα του cAMP και ενισχύοντας την αιμοπεταλιακή απόκριση [114].

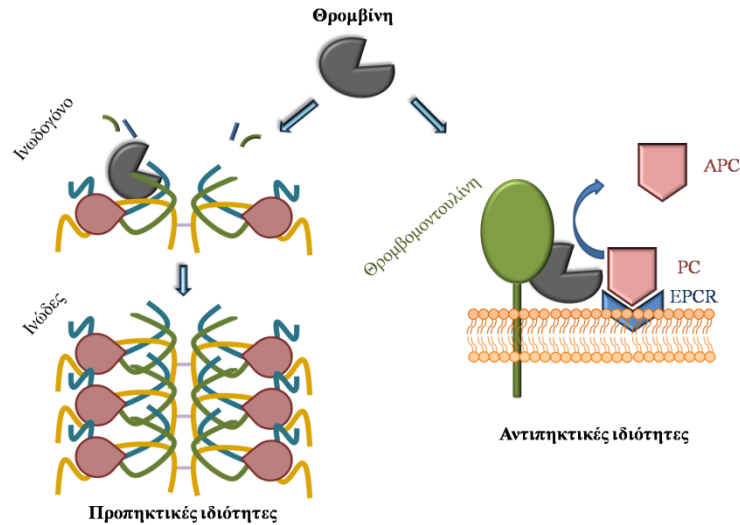
1.4 Αγωνιστές των αιμοπεταλίων

1.4.1 ADP

Το ADP αποτελεί ασθενή αγωνιστή των αιμοπεταλίων που εντοπίζεται αποθηκευμένο σε μεγάλες συγκεντρώσεις στα πυκνά κοκκία και απελευθερώνεται μετά την αιμοπεταλιακή ενεργοποίηση. Μετά την πρόσδεσή του στους υποδοχείς του, προκαλεί αλλαγή του σχήματος των αιμοπεταλίων και αναστρέψιμη συσσώρευση. Επιπλέον, ενισχύει τις αιμοπεταλιακές αποκρίσεις που προκαλούνται από άλλους αγωνιστές. Η πρόσδεση του ADP στον P2Y₁ οδηγεί στην παροδική αύξηση της συγκέντρωσης των Ca²⁺, την αλλαγή του σχήματος και την ταχεία αλλά αναστρέψιμη συσσώρευση. Η πρόσδεση του ADP στον P2Y₁₂ οδηγεί στην αναστολή της AC και την ενεργοποίηση της α₁β₃ [115].

1.4.2 Θρομβίνη

Η θρομβίνη αποτελεί τη σημαντικότερη σερίνοπρωτεάση του καταρράκτη της πήξης καθώς μετατρέπει το ινωδογόνο σε ινώδες και οδηγεί σε σταθεροποίηση του θρόμβου. Επιπλέον, καθώς έχει βρεθεί ότι η θρομβίνη εμφανίζει τόσο προπηκτικές όσο και αντιπηκτικές ιδιότητες, αποτελεί και έναν κρίσιμο ρυθμιστή της ισορροπίας μεταξύ της φυσιολογικής αιμόστασης και της θρόμβωσης [116]. Η θρομβίνη από μόνη της εμφανίζει προπηκτικές ιδιότητες, ενώ το σύμπλοκο θρομβίνης-θρομβομοντουλίνης παρουσιάζει αντιπηκτικές ιδιότητες διαμέσου της διάσπασης και ενεργοποίησης της πρωτεΐνης C (Εικόνα 1.7) [117, 118]. Πέραν του ρόλου που διαδραματίζει στον καταρράκτη της πήξης, η θρομβίνη αποτελεί έναν από τους σημαντικότερους αιμοπεταλιακούς αγωνιστές.



Εικόνα 1.7 Σχηματική απεικόνιση των προπηκτικών και αντιπηκτικών ιδιοτήτων της θρομβίνης. Η θρομβίνη καταλύει τον πολυμερισμό του ινωδογόνου σε ινώδες και τη σταθεροποίηση του θρόμβου παρουσιάζοντας προπηκτικές ιδιότητες, ενώ παράλληλα, δημιουργώντας σύμπλοκο με τη θρομβομοντουλίνη, ενεργοποιεί τη συνδεδεμένη στον υποδοχέα της πρωτεΐνη C, ο οποίος εντοπίζεται στην επιφάνεια των ενδοθηλιακών κυττάρων (endothelial cell protein C receptor, EPCR). Η ενεργοποιημένη πρωτεΐνη C (activated protein C, APC) απενεργοποιεί τους παράγοντες πήξης Va και VIIIa οι οποίοι συμβάλλουν στην παραγωγή της θρομβίνης [117].

Η προθρομβίνη αποτελεί την πρόδρομη ένωση της θρομβίνης η οποία συντίθεται αποκλειστικά στο ήπαρ ως αδρανές ζυμογόνο. Η ενεργοποίηση της προθρομβίνης στην ενεργό θρομβίνη γίνεται από το σύμπλοκο της προθρομβινάσης, ενώ τα Ca^{2+} είναι απαραίτητα για την ενεργοποίηση. Η θρομβίνη αποτελείται από δύο πολυπεπτιδικές αλυσίδες, A (36 αμινοξέα) και B (259 αμινοξέα) οι οποίες συνδέονται ομοιοπολικά από μία δισουλφιδική γέφυρα και παρουσιάζει μία ελλειψοειδή δομή. Το καταλυτικό κέντρο καθώς και όλοι οι λειτουργικοί επίτοποι του ενζύμου εντοπίζονται στην B αλυσίδα, ενώ η A αλυσίδα δεν έχει κάποιο λειτουργικό ρόλο. Το καταλυτικό κέντρο της θρομβίνης απαρτίζεται από τα αμινοξέα His57, Asp102 και Ser195, ενώ η καταλυτική δραστηριότητα της θρομβίνης εξαρτάται από περιοχές που αναγνωρίζονται από τους υποδοχείς και τα υποστρώματα της, μεταξύ των οποίων είναι η περιοχή αναγνώρισης του ινωδογόνου (anion binding exosite I) που απαρτίζεται από τον βρόχο Arg 67-Ile82 και την περιοχή πρόσδεσης της ηπαρίνης (anion binding exosite II) [119, 120]. Αυτές οι περιοχές δεν είναι εγγύς του καταλυτικού κέντρου της θρομβίνης. Γνωστά υποστρώματα της θρομβίνης είναι οι παράγοντες πήξης VIII, V, XIII καθώς και το ινωδογόνο. Η θρομβίνη καταλύει την πρωτεολυτική διάσπαση του δεσμού

Arg16-Gly17 στην Αα-αλυσίδα και του δεσμού Arg14-Gly15 στη Ββ-αλυσίδα του ινωδογόνου, ρυθμίζοντας τον πολυμερισμό του προς ινώδες και οδηγώντας στη σταθεροποίηση του θρόμβου [121]. Επιπλέον, η θρομβίνη συμβάλλει στη θρόμβωση καθώς ενεργοποιεί τα αιμοπετάλια διαμέσου της πρωτεολυτικής διάσπασης του αμινοτελικού άκρου των PAR-1 και -4.

1.4.3 vWF

Ο vWF αποτελεί μία γλυκοπρωτεΐνη που εντοπίζεται στον υποενδοθηλιακό χώρο και το πλάσμα, η οποία συμβάλλει στην αιμοπεταλιακή προσκόλληση μετά από αγγειακό τραυματισμό, διαμέσου του συμπλόκου GPIb-IX-V, καθώς και στην αλληλεπίδραση αιμοπεταλίου-αιμοπεταλίου. Ο ώριμος vWF περιέχει πολλά κατάλοιπα Cys τα οποία σχηματίζουν δισουλφιδικούς δεσμούς, ενώ απαρτίζεται από 2050 αμινοξέα (275 kDa) και 4 διακριτές περιοχές οι οποίες επαναλαμβάνονται από 2 μέχρι 4 φορές. Συγκεκριμένα, υπάρχουν 3 A περιοχές, 3 B περιοχές, 2 C περιοχές και 4 D περιοχές. Οι A περιοχές είναι φτωχές σε Cys, οι B περιοχές αποτελούνται από 25-35 αμινοξέα, οι 2 C περιοχές από 116-119 αμινοξέα και οι 4 D περιοχές από 351-376 αμινοξέα [122]. Κάθε περιοχή επιτελεί συγκεκριμένες λειτουργίες. Η A1 είναι η περιοχή πρόσδεσης της υπομονάδας GPIb του συμπλόκου GPIb-IX-V, ενώ κάποιιοι ερευνητές υποστηρίζουν ότι αποτελεί και περιοχή δέσμευσης για το κολλαγόνο τύπου VI [123, 124]. Επιπλέον, τα κολλαγόνα τύπου I και III προσδένονται στην περιοχή A3 [125]. Η C1 περιοχή περιέχει μια αλληλουχία RGD, η οποία αποτελεί μοτίβο πρόσδεσης για τις ιντεγκρίνες $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ και $\alpha_{\text{v}}\beta_3$ [126]. Ο vWF παράγεται από τα μεγακαρυοκύτταρα και τα ECs όπου και αποθηκεύεται στα α -κοκκία και στα κοκκία Weibel-Palade (Weibel-Palade bodies, WPBs), αντίστοιχα. Η απελευθέρωση του vWF από τα α -κοκκία απαιτεί την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων και οδηγεί σε περαιτέρω ενεργοποίησή τους [127, 128].

Η αλληλεπίδραση του vWF με την υπομονάδα GPIb του συμπλόκου GPIb-IX-V απαιτεί ένα ερέθισμα που ενεργοποιεί είτε τον υποδοχέα, είτε τον ίδιο τον vWF, όπως είναι η υψηλή διατμητική τάση εντός του αγγείου ή ο αγγειακός τραυματισμός. Μετά την έκθεση του κολλαγόνου στην κυκλοφορία του αίματος, ο vWF δεσμεύεται στο κολλαγόνο τύπου I και III και ακινητοποιείται στον εκτεθειμένο υποενδοθηλιακό χώρο, όπου εμφανίζει μεγαλύτερη συγγένεια για την υπομονάδα GPIb, διαμεσολαβώντας την προσκόλληση των αιμοπεταλίων [57]. Ακολούθως, η αλληλεπίδραση του vWF με την αιμοπεταλιακή ιντεγκρίνη $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ διαμέσου της αλληλουχίας RGD, σταθεροποιεί την προσκόλληση [126].

1.4.4 Κολλαγόνο

Το κολλαγόνο αποτελεί το πιο θρομβογόνο συστατικό του υποενδοθηλιακού χώρου και σημαντικό αιμοπεταλιακό αγωνιστή. Μετά από αγγειακό τραυματισμό, το κολλαγόνο εκτίθεται στην κυκλοφορία του αίματος όπου και προσδένεται άμεσα στους υποδοχείς GPVI και $\alpha_2\beta_1$, οδηγώντας στην αιμοπεταλιακή ενεργοποίηση και συσσώρευση [129]. Στον άνθρωπο εντοπίζονται πάνω από 20 διαφορετικοί τύποι κολλαγόνου, εκ των οποίων 9 εκφράζονται στο ενδοθήλιο. Κάποιοι από αυτούς τους τύπους κολλαγόνου, όπως είναι ο τύπος IV, προκαλούν ασθενέστερη αιμοπεταλιακή απόκριση εν συγκρίσει με άλλους τύπους κολλαγόνου του ενδοθηλίου, όπως οι I, III και VI [66].

Κάτω από συνθήκες χαμηλής διατμητικής τάσης, το κολλαγόνο υποστηρίζει την άμεση προσκόλληση των αιμοπεταλίων διαμέσου των υποδοχέων του, επάγοντας κυτταρική σηματοδότηση που οδηγεί στην ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων. Το κολλαγόνο αποτελείται από επαναλαμβανόμενα GlyXY μοτίβα, όπου τα X,Y είναι συχνά προλίνη και υδροξυπρολίνη, τα οποία αποτελούν θέσεις αναγνώρισης του από τους υποδοχείς του. Επιπλέον, ο ρόλος του κολλαγόνου στην προσκόλληση των αιμοπεταλίων στον υποενδοθηλιακό χώρο μπορεί να είναι και έμμεσος διαμέσου της πρόσδεσης του vWF με το σύμπλοκο GPIb-V-IX στην αιμοπεταλιακή επιφάνεια. Η αλληλεπίδραση του κολλαγόνου με τον vWF είναι εξαιρετικά σημαντική για την προσκόλληση των αιμοπεταλίων κάτω από συνθήκες υψηλής διατμητικής τάσης, λόγω του γρήγορου ρυθμού σύνδεσης μεταξύ vWF και του συμπλόκου GPI-V-IX [66, 130].

1.4.5 TxA₂

Το TxA₂ αποτελεί σημαντικό αιμοπεταλιακό αγωνιστή, διαδραματίζοντας ρόλο τόσο στην ενεργοποίηση όσο και στη συσσώρευση των αιμοπεταλίων. Η παραγωγή του TxA₂ γίνεται από το αραχιδονικό οξύ στη μεμβράνη των αιμοπεταλίων. Συγκεκριμένα, μετά από την αιμοπεταλιακή ενεργοποίηση και την απελευθέρωση Ca²⁺, το αραχιδονικό οξύ απελευθερώνεται από τα μεμβρανικά φωσφολιπίδια με τη δράση του ενζύμου φωσφολιπάση A₂. Στη συνέχεια, η COX-1 καταλύει τη μετατροπή του αραχιδονικού οξέος σε PG, G₂ και PGH₂. Η PGH₂ μετατρέπεται σε PGI₂, TxA₂ και PGE₂ διαμέσου των αντίστοιχων συνθασών. Το παραγόμενο TxA₂ συνδέεται με υποδοχείς των προστανοϊδών που αποτελούν GPCRs, οδηγώντας σε περαιτέρω απελευθέρωση Ca²⁺. Σε υδατικό περιβάλλον το TxA₂ είναι πολύ ασταθές και υδρολύεται ταχέως προς το βιολογικά ανενεργό TxB₂, με αποτέλεσμα να δρα κυρίως ως αυτοκρινής ή παρακρινής

παράγοντας στους ιστούς κοντά στο σημείο παραγωγής του. Πρόσδεση του TxA₂ στον υποδοχέα του οδηγεί στην ενεργοποίηση της ιντεγκρίνης α_{IIb}β₃, την αποκοκκίωση και την επακόλουθη απελευθέρωση Ca²⁺ και ADP, οδηγώντας στην αιμοπεταλιακή ενεργοποίηση και συσσώρευση [131].

1.5 Αιμοπεταλιακή προσκόλληση

Τα ECs επενδύουν το τοίχωμα των αγγείων αποτρέποντας την προσκόλληση των κυκλοφορούντων αιμοπεταλίων υπό φυσιολογικές συνθήκες. Ασυνέχεια στο ενδοθήλιο η οποία προκαλείται μετά από αγγειακό τραυματισμό οδηγεί στην έκθεση συστατικών του υποενδοθηλιακού χώρου, την προσκόλληση των αιμοπεταλίων στο σημείο της βλάβης και την επακόλουθη επιδιόρθωση της. Τα κυριότερα συστατικά του υποενδοθηλιακού χώρου που συμβάλλουν στην αιμοπεταλιακή προσκόλληση είναι το κολλαγόνο, ο vWF και η φιβρονεκτίνη (Εικόνα 1.8).

Μετά τον αγγειακό τραυματισμό, πραγματοποιείται έκθεση κυρίως του κολλαγόνου τύπου I και III το οποίο εντοπίζεται σε βαθύτερες στοιβάδες του αγγειακού τοιχώματος, καθώς και τύπου VI το οποίο εντοπίζεται στην υποενδοθηλιακή μήτρα [132]. Ο κυκλοφορούν vWF, που προέρχεται από τα WPBs των ECs και από τα α-κοκκία των αιμοπεταλίων, δεσμεύεται στο εκτεθειμένο κολλαγόνο τύπου I και III διαμέσου της A3 περιοχής του και στο κολλαγόνο τύπου VI διαμέσου της A1 περιοχής του [133]. Η προσκόλληση των αιμοπεταλίων στο σημείο της αγγειακής βλάβης διαμέσου του vWF γίνεται σε δύο στάδια. Αρχικά, πραγματοποιείται η πρόσδεσή τους διαμέσου της αλληλεπίδρασης της A1 περιοχής του vWF με την υπομονάδα GPIIbα του συμπλόκου GPIIb-IX-V. Η αλληλεπίδραση αυτή γίνεται γρήγορα και είναι παροδική με αποτέλεσμα να μην μπορεί να προκαλέσει σταθερή προσκόλληση. Παρ' όλα αυτά, επιτρέπει την αργή κύλιση των αιμοπεταλίων επάνω στην επιφάνεια της βλάβης, επιτρέποντας περαιτέρω αλληλεπιδράσεις που σταθεροποιούν την προσκόλληση, υπό συνθήκες μέτριας ή χαμηλής ροής. Δύο από αυτές τις αλληλεπιδράσεις είναι ο σχηματισμός δεσμού μεταξύ της αλληλουχίας RGD της C1 περιοχής του vWF με την ενεργοποιημένη α_{IIb}β₃, καθώς και η αλληλεπίδραση του κολλαγόνου με τους υποδοχείς του στην επιφάνεια του αιμοπεταλίου [126, 134].

Η υπομονάδα GPIIbα αλληλεπιδρά μόνο με τον ακινητοποιημένο και όχι με τον διαλυτό vWF, με αποτέλεσμα να αποτρέπεται ο σχηματισμός θρόμβου εντός του αγγείου. Αυτό συμβαίνει διότι πιθανώς ο ακινητοποιημένος vWF εμφανίζει διαμορφωτικές αλλαγές εξαρτώμενες από τη

διατμητική τάση, οι οποίες θα μπορούσαν να εκθέτουν περισσότερες A1 περιοχές, επιτρέποντας περισσότερους δεσμούς και ισχυρότερη αλληλεπίδραση με τα αιμοπετάλια [135]. Επιπλέον στοιχεία υποστηρίζουν την ύπαρξη μίας ενεργούς διαμόρφωσης της A1 περιοχής [136].

Από τις 4 ιντεγκρίνες που δεσμεύουν κολλαγόνο, μόνο η $\alpha_2\beta_1$ εντοπίζεται στην αιμοπεταλιακή επιφάνεια. Η πρόσδεση του κολλαγόνου στην $\alpha_2\beta_1$ γίνεται διαμέσου της περιοχής I της α_2 υπομονάδας [137]. Μελέτες έχουν αποδείξει ότι η αλληλεπίδραση της $\alpha_2\beta_1$ με το κολλαγόνο οδηγεί στη σταθερή προσκόλληση των αιμοπεταλίων στο τραυματισμένο ενδοθήλιο, ακόμη και υπό συνθήκες υψηλής διατμητικής τάσης, αλλά δεν είναι αρκετή για την αιμοπεταλιακή ενεργοποίηση που είναι απαραίτητη για τη συσσώρευση [138]. Περαιτέρω μελέτες έχουν προτείνει ότι η $\alpha_2\beta_1$ είναι υποδοχέας σηματοδότησης και η πρόσδεση του κολλαγόνου, οδηγεί σε φωσφορυλίωση τυροσίνης σηματοδοτικών μορίων, όπως η πρωτεΐνη Syk και η PLC γ 2, συμβάλλοντας στην αιμοπεταλιακή ενεργοποίηση [139, 140].

1.6 Αιμοπεταλιακή ενεργοποίηση

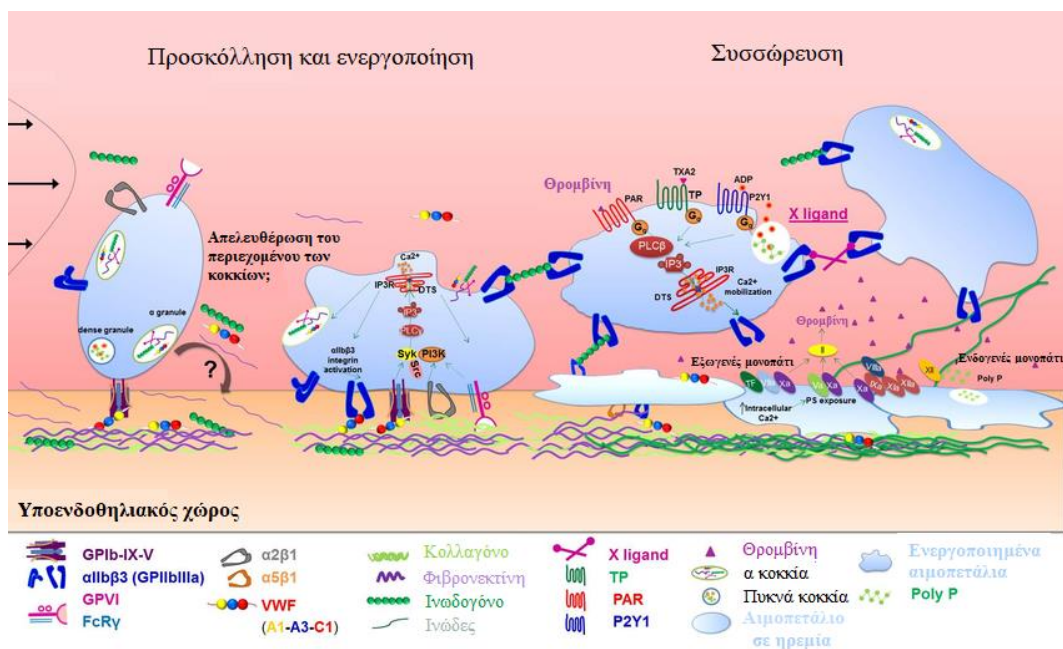
Μετά από τη σταθερή προσκόλληση των αιμοπεταλίων στο σημείο της αγγειακής βλάβης, ξεκινάει η ενεργοποίηση τους μέσα από ποικίλα σηματοδοτικά μονοπάτια που διαμεσολαβούνται από διάφορους υποδοχείς, με κυριότερους το σύμπλοκο GPIb-IX-V και τον GPVI (Εικόνα 1.8). Υπό συνθήκες υψηλής διατμητικής τάσης, ο vWF προσδένεται στο σύμπλοκο GPIb-IX-V σχηματίζοντας γέφυρες μεταξύ του εκτεθειμένου κολλαγόνου στο σημείο της αγγειακής βλάβης και των αιμοπεταλίων. Έτσι, το εκτεθειμένο κολλαγόνο έρχεται σε στενή επαφή με την αιμοπεταλιακή επιφάνεια και συγκεκριμένα με την GPVI, ενεργοποιώντας τα αιμοπετάλια. Η παραπάνω ενεργοποίηση προκαλεί διαμορφωτικές αλλαγές που οδηγούν σε αλλαγή του σχήματος των αιμοπεταλίων και αποκοκκίωση [141]. Υπό συνθήκες χαμηλής ή μέτριας διατμητικής τάσης, το κολλαγόνο μπορεί να ενεργοποιήσει τα αιμοπετάλια χωρίς να είναι απαραίτητος ο σχηματισμός γέφυρας διαμέσου του vWF.

Επιπλέον, στην ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων συμβάλλουν και διαλυτοί αγωνιστές όπως το ADP, το TxA₂ και η θρομβίνη. Το ADP απελευθερώνεται από τα τραυματισμένα ECs και από τα πυκνά κοκκία των αιμοπεταλίων μετά από ενεργοποίησή τους από το κολλαγόνο και αλληλεπιδρά με τους P2Y₁ και P2Y₁₂, οδηγώντας στην περαιτέρω αιμοπεταλιακή ενεργοποίηση. Το TxA₂ παράγεται και απελευθερώνεται από τα ενεργοποιημένα αιμοπετάλια, επάγοντας περαιτέρω ενεργοποίηση διαμέσου GPCR υποδοχέων. Η θρομβίνη αποτελεί τον ισχυρότερο αιμοπεταλιακό

αγωνιστή που ενεργοποιεί τα αιμοπετάλια διαμέσου της πρωτεολυτικής διάσπασης του PAR-1. Το τελικό αποτέλεσμα της ενεργοποίησης από τους παραπάνω αγωνιστές είναι η αλλαγή του σχήματος των αιμοπεταλίων, η έκταση ψευδοποδίων με αποτέλεσμα την έκθεση περισσότερων αντιγράφων της $\alpha_{IIb}\beta_3$ στην αιμοπεταλιακή επιφάνεια, καθώς και η αύξηση των ενδοκυττάρων επιπέδων Ca^{2+} , η οποία οδηγεί σε ενεργοποίηση της $\alpha_{IIb}\beta_3$ “από μέσα προς τα έξω” [142, 143].

1.7 Αιμοπεταλιακή συσσώρευση

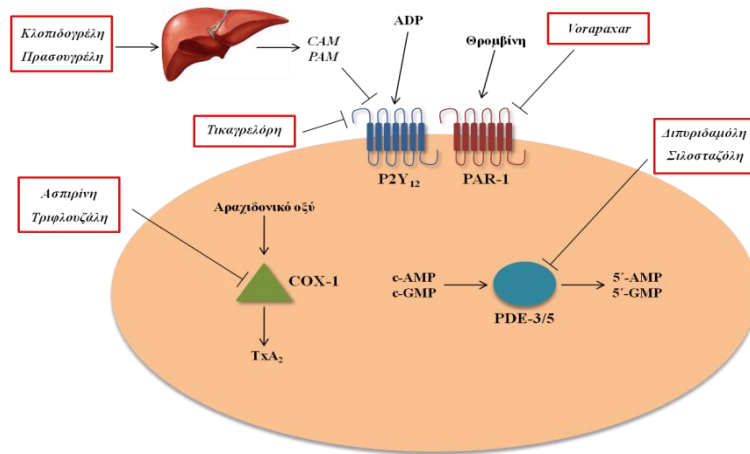
Η συσσώρευση αφορά στην αλληλεπίδραση αιμοπεταλίου-αιμοπεταλίου και είναι απαραίτητη για το σχηματισμό του αιμοστατικού θρόμβου στο σημείο της αγγειακής βλάβης. Η ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων οδηγεί στην ενεργοποίηση της $\alpha_{IIb}\beta_3$. Η πρόσδεση του ινωδογόνου στην ενεργοποιημένη $\alpha_{IIb}\beta_3$ οδηγεί στο σχηματισμό γεφυρών ινωδογόνου μεταξύ αιμοπεταλίων και τον επακόλουθο σχηματισμό του θρόμβου (Εικόνα 1.8). Στα πρώτα λεπτά μετά το σχηματισμό του θρόμβου, η συσσώρευση είναι αντιστρεπτή και η στρατολόγηση των αιμοπεταλίων στο σημείο της βλάβης οδηγεί στη μεταγωγή σημάτων σε βαθύτερα στρώματα του θρόμβου, τα οποία είναι απαραίτητα για την αποφυγή της διάλυσής του. Η πρόσδεση του ινωδογόνου και άλλων προσδεμάτων στην $\alpha_{IIb}\beta_3$, προκαλεί μεταγωγή ενδοκυτταρικής σηματοδότησης που οδηγεί στον πολυμερισμό της ακτίνης και την αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού. Συνεπώς, η σηματοδότηση αυτή είναι απαραίτητη για την αλλαγή του σχήματος των αιμοπεταλίων, τη στενή προσκόλληση και εξάπλωση τους στο σημείο της αγγειακής βλάβης, καθώς και τη σταθεροποίηση του σχηματιζόμενου θρόμβου σε συνθήκες υψηλής διατμητικής τάσης. Τέλος, η ενεργοποίηση του καταρράκτη της πήξης και ο σχηματισμός του ινώδους οδηγούν στην περαιτέρω σταθεροποίηση του θρόμβου [144].



Εικόνα 1.8 Σχηματική απεικόνιση της προσκόλλησης, ενεργοποίησης και συσσώρευσης των αιμοπεταλίων. Τροποποιημένη εικόνα από την παραπομπή [145].

1.8 Αντιαιμοπεταλιακή αγωγή

Όπως εκτενώς αναφέρθηκε παραπάνω, τα αιμοπετάλια διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην αιμόσταση και τη θρόμβωση. Επιπλέον, τα αιμοπετάλια εμπλέκονται στο σχηματισμό του παθολογικού θρόμβου σε ασθενείς με καρδιαγγειακή νόσο (cardiovascular disease, CVD), μία από τις κυριότερες αιτίες θανάτου στις σύγχρονες χώρες. Η αθηροσκλήρωση, αποτελεί μία χρόνια φλεγμονώδη νόσο του αγγειακού τοιχώματος που οδηγεί στη στένωση του αγγείου, ως αποτέλεσμα της εναπόθεσης λιπιδίων στο αγγειακό τοίχωμα. Παράλληλα, η στρατολόγηση λευκοκυττάρων στο τοίχωμα και ο σχηματισμός των αφρωδών κυττάρων, έχει σαν αποτέλεσμα την ανάπτυξη της αθηρωματικής πλάκας. Η διάρρηξη της αθηρωματικής πλάκας οδηγεί στην προσκόλληση των αιμοπεταλίων στο σημείο της βλάβης και την ενεργοποίησή τους, με τελικό αποτέλεσμα τη θρόμβωση [146]. Η αντιαιμοπεταλιακή αγωγή στοχεύει στην αναστολή της ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων. Παρακάτω αναλύονται τα κυριότερα από του στόματος χορηγούμενα αντιαιμοπεταλιακά φάρμακα και ο μηχανισμός δράσης τους (Εικόνα 1.9).



Εικόνα 1.9 Τα από του στόματος χορηγούμενα αντιαιμοπεταλιακά φάρμακα και οι μηχανισμοί δράσης τους. Συντμήσεις: CAM (clopidogrel active metabolite), ενεργός μεταβολίτης της κλοπιδογρέλης. PAM (prasugrel active metabolite), ενεργός μεταβολίτης της πρασουγρέλης. PAR-1 (protease-activated receptor-1), υποδοχέας που ενεργοποιείται από πρωτεάσες-1. COX-1 (cyclooxygenase-1), κυκλοξυγονάση-1. TxA₂ (thromboxane A₂), θρομβοξάνιο A₂. cAMP (cyclic adenosine monophosphate), κυκλική μονοφωσφορική αδενοσίνη. cGMP (cyclic guanosine monophosphate), κυκλική μονοφωσφορική γουανοσίνη. PDE (phosphodiesterase), φωσφοδιεστεράση. 5'-AMP, 5'-μονοφωσφορική αδενοσίνη. 5'-GMP, 5'-μονοφωσφορική γουανοσίνη.

1.8.1 Αναστολείς της COX-1

Κατά την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων, η μετατροπή του απελευθερούμενου από τα φωσφολιπίδια των κυτταρικών μεμβρανών αραχιδονικού οξέος προς TxA₂ καταλύεται από την COX-1. Καθώς το TxA₂ αποτελεί ισχυρό αιμοπεταλιακό αγωνιστή και αγγειοσυσταλτικό παράγοντα, η αναστολή της COX-1 στα αιμοπετάλια παρεμποδίζει την επαγόμενη από το TxA₂ ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων, αποτελώντας σημαντικό στόχο της αντιαιμοπεταλιακής αγωγής [147].

Ασπιρίνη

Η ασπιρίνη (ακετυλοσαλικυλικό οξύ) αποτελεί το σημαντικότερο αναστολέα της COX-1, έχοντας εξέχοντα ρόλο στην αντιαιμοπεταλιακή θεραπεία, τόσο στην πρωτογενή όσο και στη δευτερογενή πρόληψη της CVD. Η ασπιρίνη ακετυλιώνει την υδροξυλομάδα της σερίνης 529 κοντά στο ενεργό κέντρο της COX-1 και αναστέλλει μη αντιστρεπτά τη δράση της, παρεμποδίζοντας την παραγωγή TxA₂ και συνεπώς την αιμοπεταλιακή ενεργοποίηση. Η ασπιρίνη απορροφάται ταχέως από το στομάχι και το λεπτό έντερο, ενώ υδρολύεται από εστεράσες του

γαστρεντερικού βλεννογόνου και του ήπατος προς ανενεργό σαλικυλικό οξύ. Η μέγιστη συγκέντρωση της ασπιρίνης στο πλάσμα επιτυγχάνεται 30-40 min μετά τη χορήγησή της, ενώ η πλήρης αναστολή της αιμοπεταλιακής ενεργοποίησης επιτυγχάνεται μέσα σε 1 h. Η βιοδιαθεσιμότητα της είναι περίπου 40-50%, ο χρόνος ημιζωής της είναι 15-20 min και η απέκκρισή της είναι νεφρική [148]. Η δράση της ασπιρίνης διατηρείται καθ' όλη τη διάρκεια ζωής των αιμοπεταλίων, με αποτέλεσμα η φυσιολογική λειτουργία των αιμοπεταλίων μετά από τη χορήγησή της να επανέρχεται με την παραγωγή νέων αιμοπεταλίων από το μυελό των οστών. Καθημερινά ανανεώνεται περίπου το 10-12% των αιμοπεταλίων με αποτέλεσμα μέσα σε δύο ημέρες, το 20-25% των κυκλοφορούντων αιμοπεταλίων να είναι ικανά να παράγουν TxA₂ και συνεπώς να ενεργοποιούνται [149].

Αξίζει να αναφερθεί ότι ένα ποσοστό ασθενών (5-65%) που λαμβάνουν ασπιρίνη εμφανίζουν «υψηλή υπό θεραπεία αντιδραστικότητα των αιμοπεταλίων» (high on-treatment platelet reactivity, HTPR), ένα φαινόμενο που είναι γνωστό και ως «αντίσταση στην ασπιρίνη». Ο προσδιορισμός της HTPR πραγματοποιείται με ποικίλες μεθοδολογίες και για το λόγο αυτό το εύρος του παραπάνω ποσοστού είναι πολύ μεγάλο. Η HTPR στην ασπιρίνη μπορεί να οφείλεται στη μη συμμόρφωση του ασθενούς, την ηλικία, το σωματικό βάρος, τη χαμηλή εντερική απορρόφηση, την αλληλεπίδραση με τα άλλα φάρμακα που στοχεύουν την COX-1, καθώς και σε γενετικούς πολυμορφισμούς ενζύμων που σχετίζονται με το μεταβολισμό του αραχιδονικού οξέος. Η HTPR συσχετίζεται με αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης νέου ισχαιμικού θρομβωτικού επεισοδίου [150, 151].

Η ασπιρίνη αποτελεί το περισσότερο χορηγούμενο και σημαντικότερο αντιαιμοπεταλιακό φάρμακο για τη δευτερογενή πρόληψη των ισχαιμικών αγγειακών εγκεφαλικών επεισοδίων (ΑΕΕ). Επιπλέον, η ασπιρίνη είναι αποτελεσματική ως προς τη δευτερογενή πρόληψη σε ασθενείς με παροδικό ισχαιμικό εγκεφαλικό επεισόδιο (transient ischemic attack, TIA), οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου (acute myocardial infarction, AMI), ασταθή ή σταθερή στηθάγχη και περιφερική αρτηριακή νόσο (peripheral artery disease, PAD). Ακόμη, η ασπιρίνη μπορεί να χορηγηθεί έναντι της αντιπηκτικής θεραπείας για την πρόληψη καρδιοεμβολικού εγκεφαλικού επεισοδίου σε ασθενείς με κολπική μαρμαρυγή (atrial fibrillation, AF) [152]. Σε κλινικές μελέτες που συμπεριέλαβαν συνολικά 41.325 ασθενείς που είχαν υποστεί ισχαιμικό ΑΕΕ εντός των τελευταίων 48 h, η ασπιρίνη σε δόση 160-300 mg ημερησίως ως μονοθεραπεία για 2-4 εβδομάδες,

μείωσε την εμφάνιση ενός υποτροπιάζοντος ισχαιμικού ΑΕΕ, αλλά αύξησε τη συχνότητα εμφάνισης συμπτωματικών ενδοκράνιων αιμορραγιών [153].

Τριφλουζάλη

Η τριφλουζάλη (2-ακετυλοξυ-4-τριφθορομέθυλο βενζοϊκό οξύ) έχει παρόμοια δομή με εκείνη της ασπιρίνης, φέροντας μία επιπλέον τριφθορομεθυλομάδα στη θέση 4, ενώ εμφανίζει διαφορετικό φαρμακοκινητικό και φαρμακοδυναμικό προφίλ. Η τριφλουζάλη αναστέλλει μη αντιστρεπτά τη δράση της COX-1 και αποτελεί μία πολλά υποσχόμενη εναλλακτική θεραπεία έναντι της ασπιρίνης. Η χορήγησή της γίνεται από το στόμα, η απορρόφησή της από το λεπτό έντερο, ενώ εμφανίζει βιοδιαθεσιμότητα 83-100% [154]. Η τριφλουζάλη δεσμεύεται σχεδόν εξ' ολοκλήρου από πρωτεΐνες του πλάσματος. Στο ήπαρ απακετυλιώνεται, σχηματίζοντας το 2-υδροξυ-4-τριφθορομέθυλο βενζοϊκό οξύ (2-hydroxy-4-trifluoromethyl benzoic acid, HTB), ο οποίος είναι ο κύριος και ενεργός μεταβολίτης της, που αναστέλλει αντιστρεπτά την COX-1 [155]. Το HTB και η τριφλουζάλη έχουν χρόνο ημιζωής στο πλάσμα 40 h και περίπου 30 min, αντίστοιχα [156], ενώ και οι δύο παράγοντες αναστέλλουν επίσης τις φωσφοδιεστεράσες των αιμοπεταλίων αυξάνοντας την ενδοκυττάρια συγκέντρωση του cAMP και της κυκλικής μονοφωσφορικής γουανοσίνης (cyclic guanosine monophosphate, cGMP) [157]. Η τριφλουζάλη σχετίζεται με χαμηλότερο ποσοστό ενδοκράνιων και γαστρεντερικών αιμορραγιών, αποτελώντας ασφαλέστερη εναλλακτική από την ασπιρίνη. Η απέκκριση της τριφλουζάλης και του HTB είναι κυρίως νεφρική [157].

Η τριφλουζάλη εμφανίζει παρόμοια αποτελεσματικότητα με την ασπιρίνη ως προς τη πρόληψη αγγειακών συμβάντων σε ασθενείς με AMI, ισχαιμικό ΑΕΕ ή ΤΙΑ, ενώ εμφανίζει μικρότερο ποσοστό αιμορραγιών [158]. Η μελέτη TACIP (Comparison of triflusal and aspirin for prevention of vascular events in patients after cerebral infarction) συνέκρινε την αποτελεσματικότητα της τριφλουζάλης (600 mg ημερησίως) έναντι της ασπιρίνης (325 mg ημερησίως), για την πρόληψη ισχαιμικών αγγειακών συμβάντων σε 2.113 ασθενείς με εγκεφαλικό επεισόδιο ή ΤΙΑ, με περίοδο παρακολούθησης 2,5 χρόνια. Μεταξύ των δύο ομάδων δεν υπήρξε στατιστικά σημαντική διαφορά ως προς τη μείωση του σύνθετου πρωτογενούς καταληκτικού σημείου ή των μη θανατηφόρων εγκεφαλικών επεισοδίων, αλλά εμφανίστηκε στατιστικά σημαντικά μειωμένος κίνδυνος μειζόνων αιμορραγιών στην ομάδα της τριφλουζάλης [159].

1.8.2 Ανταγωνιστές του υποδοχέα P2Y₁₂

Θεινοπυριδίνες

Το ADP αποτελεί έναν από τους σημαντικότερους αγωνιστές των αιμοπεταλίων, καθώς προσδένεται στον P2Y₁₂ οδηγώντας στην ενεργοποίηση και συσσώρευση των αιμοπεταλίων. Συνεπώς, ο P2Y₁₂ αποτελεί σημαντικό στόχο της αντιαιμοπεταλιακής θεραπείας. Οι θεινοπυριδίνες είναι από του στόματος χορηγούμενοι ανταγωνιστές του P2Y₁₂, οι οποίοι μετά από μεταβολική ενεργοποίηση προσδένονται ισχυρά και μη αντιστρεπτά στον υποδοχέα, αναστέλλοντας την αιμοπεταλιακή ενεργοποίηση [160].

Κλοπιδογρέλη

Η κλοπιδογρέλη αποτελεί προφάρμακο που απορροφάται στο έντερο (50%) και μεταβολίζεται προς τον ενεργό της μεταβολίτη (clopidogrel active metabolite, CAM), ο οποίος αναστέλλει ισχυρά, εκλεκτικά και μη αντιστρεπτά τη δράση του ADP. Από το 50% του προφαρμάκου που απορροφάται, το 85% υδρολύεται από καρβοξυλεστεράσες προς μη ενεργούς μεταβολίτες [161]. Το εναπομείναν 15% μεταβολίζεται στο ήπαρ αρχικά προς το μεταβολίτη 2-οξο-κλοπιδογρέλη και στη συνέχεια προς τον CAM διαμέσου της δράσης ενζύμων του κυτοχρώματος P450 (cytochrome P450, CYP450), κυρίως του CYP2C19, αλλά και των CYP3A4, CYP3A5, CYP1A2, CYP2B6 και CYP2C9 [148, 162]. Η μέγιστη συγκέντρωση του CAM στο πλάσμα υγείων ατόμων επιτυγχάνεται 30-60 min μετά τη χορήγηση του φαρμάκου, ανεξάρτητα από τη δόση [163]. Τόσο η κλοπιδογρέλη, όσο και ο CAM δεσμεύονται ισχυρά σε πρωτεΐνες του πλάσματος. Καθώς η κλοπιδογρέλη χρειάζεται μεταβολική ενεργοποίηση, η μέγιστη αναστολή του P2Y₁₂ επιτυγχάνεται 4-5 ημέρες μετά από τη χορήγηση 75 mg ημερησίως, ενώ ο χρόνος ημιζωής της στο πλάσμα είναι 8 h. Χορήγηση δόσης φόρτισης του φαρμάκου (300-600 mg) οδηγεί στη μείωση του χρόνου έναρξης της δράσης του σε μόλις 2-5 h μετά τη χορήγηση. Η απέκκριση της κλοπιδογρέλης γίνεται κατά 60% από τα ούρα [164]. Τέλος, καθώς η δράση της είναι μη αντιστρεπτή, η ανασταλτική της δράση διαρκεί καθ' όλη τη διάρκεια ζωής των αιμοπεταλίων.

Ένα ποσοστό των ασθενών που λαμβάνει κλοπιδογρέλη εμφανίζει HTPR, κυρίως εξαιτίας σημαντικών διακυμάνσεων ως προς τη μεταβολική ενεργοποίηση του φαρμάκου και της παραγωγής του CAM [165]. Η σημαντικότερη αιτία εμφάνισης HTPR στην κλοπιδογρέλη είναι οι πολυμορφισμοί των ισοενζύμων του CYP450, οι οποίοι προκαλούν μείωση της ενεργότητας τους, επηρεάζοντας σημαντικά την παραγωγή του CAM. Επιπλέον, η HTPR στην κλοπιδογρέλη

μπορεί να οφείλεται στη μειωμένη απορρόφηση του φαρμάκου, το κάπνισμα, τη διακύμανση της ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων από το ADP, την ηλικία, το σωματικό βάρος και τη συμμόρφωση του ασθενούς.

Η μελέτη CAPRIE (A randomised, blinded, trial of clopidogrel versus aspirin in patients at risk of ischaemic events) συνέκρινε την αποτελεσματικότητα της κλοπιδογρέλης (75 mg ημερησίως) με εκείνη της ασπιρίνης (325 mg ημερησίως) ως προς τη δευτερογενή πρόληψη σε 19.185 ασθενείς με ισχαιμικό ΑΕΕ, ΑΜΙ ή ΡΑΔ. Η κλοπιδογρέλη μείωσε στατιστικά σημαντικά το ετήσιο ποσοστό υποτροπιάζοντος ισχαιμικού ΑΕΕ, ΑΜΙ ή θανάτου αγγειακής αιτιολογίας [166]. Επιπλέον, η μελέτη CHARISMA (Clopidogrel for High Atherothrombotic Risk and Ischemic Stabilization, Management and Avoidance) ενέταξε συνολικά 15.603 ασθενείς με CVD οι οποίοι τυχαιοποιήθηκαν σε χαμηλή δόση ασπιρίνης (75-162 mg ημερησίως) ή σε συνδυασμό ασπιρίνης/κλοπιδογρέλης (75-162/75 mg ημερησίως), με μέσο χρόνο παρακολούθησης τους 28 μήνες. Ο συνδυασμός ασπιρίνης/κλοπιδογρέλης μείωσε μη στατιστικά σημαντικά το σύνθετο πρωτογενές καταληκτικό σημείο συγκριτικά με τη μονοθεραπεία με ασπιρίνη, ενώ αύξησε στατιστικά σημαντικά τις σοβαρές αιμορραγίες, αλλά μη στατιστικά σημαντικά το ποσοστό των θανατηφόρων αιμορραγιών [167].

Η μελέτη MATCH (Aspirin and clopidogrel compared with clopidogrel alone after recent ischaemic stroke or transient ischaemic attack in high-risk patients) με συνολικά 7.599 ασθενείς και διάστημα παρακολούθησης 3,5 χρόνων συνέκρινε την αποτελεσματικότητα του συνδυασμού ασπιρίνης/κλοπιδογρέλης (75 mg ανά φάρμακο ημερησίως) με τη μονοθεραπεία με ασπιρίνη (75 mg ημερησίως), για την πρόληψη των αγγειακών επεισοδίων σε ασθενείς με πρόσφατο ισχαιμικό ΑΕΕ ή ΤΙΑ. Δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική μείωση του πρωτογενούς και του δευτερογενούς καταληκτικού σημείου μεταξύ των δύο ομάδων. Οι θανατηφόρες και οι μείζονες αιμορραγίες ήταν αυξημένες στην ομάδα που ελάμβανε διπλή αγωγή [168].

Η μελέτη CHANCE (Clopidogrel in High-risk Patients With Acute Non-disabling Cerebrovascular Events) πραγματοποιήθηκε στην Κίνα και συνέκρινε την αποτελεσματικότητα του συνδυασμού ασπιρίνης/κλοπιδογρέλης (75 mg ασπιρίνης ημερησίως για 21 ημέρες και 300 mg δόση φόρτισης κλοπιδογρέλης ακολουθούμενη από 75 mg ημερησίως για 3 μήνες) έναντι της μονοθεραπείας με ασπιρίνη (75 mg ημερησίως) για 3 μήνες, σε 5.170 ασθενείς που είχαν υποστεί ΤΙΑ υψηλού κινδύνου ή οξύ έλασσον ΑΕΕ εντός 24 h από την εμφάνιση του συμβάντος, ως προς τη μείωση του κινδύνου εμφάνισης υποτροπιάζοντος εγκεφαλικού επεισοδίου. Ο συνδυασμός

ασπιρίνης/κλοπιδογρέλης μείωσε στατιστικά σημαντικά το πρωτογενές καταληκτικό σημείο συγκριτικά με την ασπιρίνη, ενώ δεν υπήρξε στατιστικά σημαντική διαφορά στα αιμορραγικά συμβάντα μεταξύ των δύο ομάδων [169].

Πρασουγρέλη

Η πρασουγρέλη αποτελεί προφάρμακο και απαιτεί ηπατικό μεταβολισμό για να ασκήσει την αντιαιμοπεταλιακή της δράση. Η χημική δομή της πρασουγρέλης επιτρέπει τη μεταβολική της ενεργοποίηση σε ένα στάδιο, με την συμμετοχή λιγότερων ισοενζύμων CYP450 συγκριτικά με την κλοπιδογρέλη, με αποτέλεσμα την ταχύτερη και ισχυρότερη δράση της [170]. Τα κυτοχρώματα που εμπλέκονται στο μεταβολισμό της πρασουγρέλης προς τον ενεργό της μεταβολίτη (prasugrel active metabolite, PAM) είναι τα CYP3A, CYP2B6, CYP2C9 και CYP2C19 [171]. Ο PAM αποτελεί εκλεκτικό, μη αντιστρεπτό ανταγωνιστή του P2Y₁₂, με την έναρξη της δράσης του στο πλάσμα να επιτυγχάνεται σε 30 min-4 h από τη στιγμή χορήγησης του φαρμάκου, ανάλογα με τις κλινικές συνθήκες [161]. Ο χρόνος ημιζωής του φαρμάκου είναι 2-15 h, ενώ από τους σημαντικότερους παράγοντες που επηρεάζουν τη δράση του είναι το σωματικό βάρος [172]. Το 70% της πρασουγρέλης απεκκρίνεται από τους νεφρούς και το 30% από τα κόπρανα.

Μικρός αριθμός μελετών έχει αναφέρει την ύπαρξη ΗTPR στην πρασουγρέλη, με μικρότερο όμως επιπολασμό συγκριτικά με την κλοπιδογρέλη [173]. Πράγματι, έχει αποδειχθεί ότι η ανεπαρκής απόκριση στην κλοπιδογρέλη μπορεί να ξεπεραστεί αποτελεσματικότερα με την αντικατάσταση του φαρμάκου από την πρασουγρέλη, παρά με τη χορήγηση υψηλότερων δόσεων κλοπιδογρέλης [174].

Η μελέτη TRITON-TIMI 38 (A Comparison of Prasugrel (CS-747) and Clopidogrel in Acute Coronary Syndrome Subjects Who Are to Undergo Percutaneous Coronary Intervention) στρατολόγησε 13.608 ασθενείς μετρίου έως υψηλού κινδύνου εμφάνισης οξέος στεφανιαίου συνδρόμου (acute coronary syndrome, ACS) με προγραμματισμένη διαδερμική στεφανιαία επέμβαση (percutaneous coronary intervention, PCI). Οι ασθενείς τυχαιοποιήθηκαν να λάβουν πρασουγρέλη (60 mg δόση φόρτισης ακολουθούμενη από 10 mg ημερησίως) ή κλοπιδογρέλη (600 mg δόση φόρτισης, ακολουθούμενα από 75 mg ημερησίως) για 6-15 μήνες. Η πρασουγρέλη μείωσε στατιστικά σημαντικά τα ισχαιμικά συμβάντα συγκριτικά με την κλοπιδογρέλη, ενώ αύξησε στατιστικά σημαντικά τις μείζονες αιμορραγίες [175].

Τικαγρελόρη

Η τικαγρελόρη είναι μία κυκλοπεντυλο-τριαζολο-πυριμιδίνη και αποτελεί ισχυρό και εκλεκτικό ανταγωνιστή του P2Y₁₂. Η τικαγρελόρη προσδένεται στον P2Y₁₂ μη ομοιοπολικά, αντιστρεπτά και σε διαφορετική θέση από το ADP, με αποτέλεσμα να μην επηρεάζει την πρόσδεση του ADP στον υποδοχέα [176]. Η τικαγρελόρη δεν αποτελεί προφάρμακο, απορροφάται ταχέως από το γαστρεντερικό σωλήνα και προσδένεται στο στόχο της αυτούσια [177]. Η βιοδιαθεσιμότητα της είναι 36%, ενώ εμφανίζει ταχεία έναρξη δράσης, επιτυγχάνοντας μέγιστη αναστολή της αιμοπεταλιακής ενεργοποίησης σε 30 min-4 h από τη λήψη, ανάλογα με τις κλινικές συνθήκες [161]. Η τικαγρελόρη αποικοδομείται στο ήπαρ διαμέσου της δράσης των ισομορφών του CYP450, CYP3A4 και CYP3A5, έχει χρόνο ημιζωής στο πλάσμα 7-8 h και απεκκρίνεται κυρίως διαμέσου της χοληφόρου οδού. Ο μεταβολισμός της αποδίδει τόσο ανενεργούς όσο και ενεργούς μεταβολίτες, με σημαντικότερο τον AR-C124910XX ο οποίος έχει χρόνο ημιζωής 10 h και συμμετέχει κατά 30-40% στη συνολική δράση του φαρμάκου [177].

Η τικαγρελόρη στις δόσεις που χορηγείται στην καθημερινή κλινική πράξη (180 mg δόση φόρτισης, ακολουθούμενη από 90 mg δις ημερησίως), επιτυγχάνει μεγαλύτερη αναστολή της αιμοπεταλιακής ενεργοποίησης σε σχέση με εκείνη που επιτυγχάνει η κλοπιδογρέλη και εμφανίζει μικρότερη διακύμανση στην απόκριση. Επιπλέον, η δράση της αντιστρέφεται ταχύτερα σε σχέση με αυτήν της κλοπιδογρέλης, μετά τη διακοπή χορήγησης του φαρμάκου [178]. Η τικαγρελόρη δεν εμφανίζει HTPR και συνεπώς το φαρμακοδυναμικό της αποτέλεσμα δεν εξαρτάται από τους πολυμορφισμούς των ισοενζύμων CYP450. Συνεπώς, σε ασθενείς που εμφανίζουν HTPR στην κλοπιδογρέλη συνίσταται εναλλακτικά η χορήγηση τικαγρελόρης [162].

Η μελέτη SOCRATES (SOCRATES -Acute Stroke Or Transient IsChaemic Attack Treated With Aspirin or Ticagrelor and Patient OutcomES) στρατολόγησε 13.199 ασθενείς με έλασσον ισχαιμικό ΑΕΕ ή υψηλού κινδύνου ΤΙΑ μη καρδιοεμβολικής αιτιολογίας. Οι ασθενείς αυτοί τυχαιοποιήθηκαν να λάβουν εντός 24 h από το επεισόδιο τικαγρελόρη (180 mg δόση φόρτισης ακολουθούμενη από 90 mg δις ημερησίως) ή ασπιρίνη (300 mg δόση φόρτισης ακολουθούμενη από 100 mg ημερησίως), για 3 μήνες. Η τικαγρελόρη μείωσε μη στατιστικά σημαντικά το ποσοστό του σύνθετου πρωτογενούς καταληκτικού σημείου, ενώ μείωσε στατιστικά σημαντικά το ποσοστό ισχαιμικών ΑΕΕ. Τα δύο φάρμακα δεν εμφάνισαν στατιστικά σημαντική διαφορά του πρωτογενούς καταληκτικού σημείου ασφάλειας. Η παρούσα μελέτη δεν κατάφερε να αποδείξει

την ανωτερότητα της τικαγρελόρης έναντι της ασπιρίνης ως προς τη δευτερογενή πρόληψη του υποτροπιάζοντος ΑΕΕ [179].

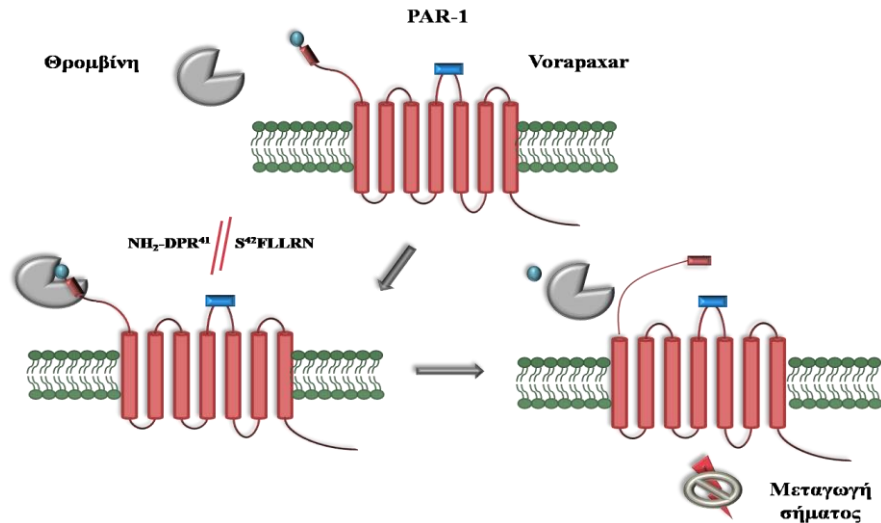
Επιπλέον, η μελέτη PLATO (A Comparison of Ticagrelor (AZD6140) and Clopidogrel in Patients With Acute Coronary Syndrome) συνέκρινε την αποτελεσματικότητα και την ασφάλεια της τικαγρελόρης (180 mg δόση φόρτισης ακολουθούμενη από 90 mg δις ημερησίως) έναντι της κλοπιδογρέλης (300-600 mg δόση φόρτισης ακολουθούμενη από 75 mg ημερησίως) ως προς την πρόληψη καρδιαγγειακών συμβάντων σε 18.624 ασθενείς που προσήλθαν στο νοσοκομείο με ACS, με ή χωρίς ανάσπαση του διαστήματος ST. Η τικαγρελόρη μείωσε στατιστικά σημαντικά το θάνατο από αγγειακή αιτία, το AMI ή το εγκεφαλικό επεισόδιο, χωρίς αύξηση του ποσοστού των μειζόνων αιμορραγιών, αλλά αύξησε στατιστικά σημαντικά τις μείζονες αιμορραγίες που δεν σχετίζονταν με επέμβαση αορτοστεφανιαίας παράκαμψης [180]. Τέλος, μία πρόσφατη μετα-ανάλυση που συμπεριέλαβε 7 κλινικές μελέτες και συνολικά 20.895 ασθενείς με ACS, συνέκρινε την αποτελεσματικότητα και την ασφάλεια της τικαγρελόρης σε σύγκριση με την κλοπιδογρέλη και την πρασουγρέλη. Από το σύνολο των ασθενών, οι 10.471 τυχαιοποιήθηκαν να λάβουν τικαγρελόρη και οι 10.424 κλοπιδογρέλη ή πρασουγρέλη. Η τικαγρελόρη μείωσε στατιστικά σημαντικά την εμφάνιση μειζόνων ανεπιθύμητων καρδιαγγειακών συμβάντων και το θάνατο από οποιαδήποτε αιτία, αλλά αύξησε το ποσοστό των μειζόνων αιμορραγιών. Η παρούσα μετα-ανάλυση προτείνει ότι η τικαγρελόρη είναι αποτελεσματικότερη από την κλοπιδογρέλη και την πρασουγρέλη, αλλά λιγότερο ασφαλής, σε ασθενείς με ACS [181].

1.8.3 Ανταγωνιστές των PARs

Vogaraaxar

Το vogaraaxar αποτελεί το μοναδικό ανταγωνιστή του PAR-1 που χρησιμοποιείται στην κλινική πράξη ως αντιαιμοπεταλιακό φάρμακο. Αποτελεί ένα συνθετικό τρικυκλικό 3-φαινυλοπυριδινικό ανάλογο του φυσικού προϊόντος ιμβακίνη. Το vogaraaxar αναστέλλει ισχυρά, εκλεκτικά και αντιστρεπτά τον PAR-1 (Εικόνα 1.10). Το vogaraaxar δεν αποτελεί προφάρμακο και μετά την χορήγησή του από το στόμα, απορροφάται ταχέως και εμφανίζει πολύ υψηλή βιοδιαθεσιμότητα (>90%). Ο χρόνος ημιζωής του στο πλάσμα κυμαίνεται από 159-311 h, ενώ ο χρόνος ημιζωής της αποδέσμευσής του από τον υποδοχέα είναι περίπου 20 h, με αποτέλεσμα το vogaraaxar να εμφανίζει μία παρατεταμένη αντιαιμοπεταλιακή δράση. Το vogaraaxar μεταβολίζεται στο ήπαρ στους δύο κύριους μεταβολίτες του, M19 και M20. Το CYP3A4 είναι υπεύθυνο για το

μεταβολισμό του vorapaxar και το σχηματισμό των δύο μεταβολιτών του, ενώ για στο σχηματισμό του M20 συμμετέχει και το CYP2J2. Ο M19 είναι ανενεργός μεταβολίτης, ενώ ο M20 εμφανίζει παρόμοια φαρμακολογική δράση με το vorapaxar, μέχρι να μεταβολιστεί στον M19. Η απέκκριση του vorapaxar γίνεται κυρίως από τα κόπρανα και σε μικρό ποσοστό από τα ούρα [101].



Εικόνα 1.10 Σχηματική απεικόνιση της αναστολής του PAR-1 από το vorapaxar.

Η μελέτη TRA-CER (Trial to Assess the Effects of Vorapaxar (SCH 530348; MK-5348) in Preventing Heart Attack and Stroke in Participants With Acute Coronary Syndrome) συμπεριέλαβε 12.944 ασθενείς με ACS χωρίς ανάσπαση του διαστήματος ST που έλαβαν συνδυασμό ασπιρίνης/κλοπιδογρέλης και τυχαιοποιήθηκαν να λάβουν vorapaxar (40 mg δόση φόρτισης ακολουθούμενη από 2,5 mg ημερησίως) ή εικονικό φάρμακο, με μέσο χρόνο παρακολούθησης τους 16,7 μήνες. Η παρούσα μελέτη έδειξε ότι η προσθήκη του vorapaxar στην καθιερωμένη αντιαιμοπεταλιακή θεραπεία δε μείωσε σημαντικά το σύνθετο πρωτογενές καταληκτικό σημείο, ενώ αύξησε το ποσοστό των μειζόνων αιμορραγιών [182]. Επιπλέον, η μελέτη TRA 2P-TIMI 50 (Trial to Assess the Effects of Vorapaxar (SCH 530348; MK-5348) in Preventing Heart Attack and Stroke in Patients With Atherosclerosis) συμπεριέλαβε 26.449 ασθενείς με ιστορικό MI, ισχαιμικό AEE ή PAD που έλαβαν ασπιρίνη ή/και κλοπιδογρέλη και τυχαιοποιήθηκαν να λάβουν vorapaxar (2,5 mg ημερησίως) ή εικονικό φάρμακο, με μέσο χρόνο παρακολούθησης τους 30 μήνες. Το vorapaxar μείωσε στατιστικά σημαντικά το ποσοστό των

καρδιαγγειακών θανάτων ή των ισχαιμικών συμβάντων, ενώ αύξησε το ποσοστό των αιμορραγιών μετρίου και υψηλού κινδύνου [183].

1.8.4 Αναστολείς των φωσφοδιεστερασών

Οι φωσφοδιεστεράσες (phosphodiesterases, PDEs) καταλύουν την υδρόλυση των cAMP και cGMP, μειώνοντας τα ενδοκυττάρια επίπεδά τους και ρυθμίζοντας τη σηματοδότηση διαμέσου αυτών των μορίων. Οι PDEs εμπλέκονται σε πληθώρα φυσιολογικών λειτουργιών, συμπεριλαμβανομένης της αιμοπεταλιακής ενεργοποίησης, συνεπώς η αναστολή της δράσης τους αποτέλεσε σημαντικό πεδίο μελέτης.

Σιλοσταζόλη

Η σιλοσταζόλη (2-οξοκινολόνη) αποτελεί ισχυρό και αντιστρεπτό αναστολέα της PDE-3, αναστέλλοντας την παραγωγή του cAMP και τη συνεπακόλουθη αιμοπεταλιακή ενεργοποίηση και συσσώρευση που προκαλείται από το ADP, το κολλαγόνο και το αραχιδονικό οξύ. Επιπρόσθετα, η σιλοσταζόλη προσδέεται στον υποδοχέα equilibrative nucleoside transporter-1 (ENT-1), αναστέλλοντας την επαναπρόσληψη της αδενοσίνης και την αύξηση της συγκέντρωσης της στο πλάσμα, προκαλώντας ποικίλες βιολογικές αποκρίσεις, όπως αντιφλεγμονώδεις δράσεις, αγγειοδιαστολή, αναστολή του πολλαπλασιασμού των λείων μυϊκών κυττάρων (smooth muscle cells, SMCs), κλπ. Η χορήγηση της σιλοσταζόλης γίνεται από το στόμα και η μέγιστη συγκέντρωση της στο πλάσμα επιτυγχάνεται μετά από 2,4 h. Η σιλοσταζόλη δεσμεύεται ισχυρά σε πρωτεΐνες του πλάσματος (95-98%) και κυρίως στην αλβουμίνη. Επιπλέον, μεταβολίζεται στο ήπαρ κυρίως από τα ισοένζυμα CYP3A5 και CYP2C19, ενώ απεκκρίνεται κατά 74% από τους νεφρούς, αλλά και κατά 20% διαμέσου των κοπράνων. Ο μέσος χρόνος ημιζωής της σιλοσταζόλης είναι περίπου 10 h, ενώ η φαρμακοκινητική της δεν επηρεάζεται σημαντικά από την ηλικία ή το φύλο σε υγιή άτομα ηλικίας μέχρι 80 ετών. Η σιλοσταζόλη δεν πρέπει να χορηγείται σε ασθενείς με καρδιακή ανεπάρκεια, ενώ η δράση της μπορεί να επηρεαστεί από φάρμακα που μεταβολίζονται διαμέσου των ισοενζύμων CYP3A5 και CYP2C19.

Η χορήγηση της σιλοσταζόλης προτείνεται για τη δευτερογενή πρόληψη των ισχαιμικών AEE ή TIA. Η αποτελεσματικότητα της σιλοσταζόλης ως προς τη δευτερογενή πρόληψη των AEE αξιολογήθηκε στη μελέτη CSPS (Cilostazol Stroke Prevention Study for Antiplatelet Combination) κατά την οποία 1.095 ασθενείς τυχαιοποιήθηκαν να λάβουν σιλοσταζόλη (100 mg

δισ ημερησίως) ή εικονικό φάρμακο. Η σιλοσταζόλη μείωσε στατιστικά σημαντικά τον κίνδυνο υποτροπιάζοντος εγκεφαλικού επεισοδίου σε σχέση με το εικονικό φάρμακο [184].

Μία μετα-ανάλυση συμπεριέλαβε 24 κλινικές μελέτες και συνολικά 85.667 ασθενείς με ισχαιμικό ΑΕΕ ή ΤΙΑ, οι οποίοι έλαβαν μακρόχρονη αντιαιμοπεταλιακή αγωγή (τουλάχιστον 1 χρόνο) για δευτερογενή πρόληψη. Η σιλοσταζόλη μείωσε στατιστικά σημαντικά τα υποτροπιάζοντα εγκεφαλικά επεισόδια σε σύγκριση με την ασπιρίνη, ενώ ταυτόχρονα μείωσε στατιστικά σημαντικά τις ενδοκράνιες αιμορραγίες σε σύγκριση με τα υπόλοιπα αντιαιμοπεταλιακά φάρμακα. Η παρούσα μετα-ανάλυση πρότεινε ότι η μακρόχρονη μονοθεραπεία με αντιαιμοπεταλιακά φάρμακα αποτελεί αποτελεσματικότερη επιλογή εν συγκρίσει με τη διπλή αντιαιμοπεταλιακή αγωγή, ενώ φαίνεται πως η σιλοσταζόλη αποτελεί την καλύτερη και ασφαλέστερη επιλογή αντιαιμοπεταλιακού φαρμάκου για τη δευτερογενή πρόληψη εγκεφαλικού επεισοδίου σε ασθενείς μετά από ΤΙΑ ή ισχαιμικό ΑΕΕ [185]. Μία ακόμη μετα-ανάλυση που συμπεριέλαβε 36 κλινικές μελέτες και συνολικά 82.144 ασθενείς που είχαν υποστεί ΤΙΑ ή ισχαιμικό ΑΕΕ έδειξε επίσης ότι η σιλοσταζόλη είναι αποτελεσματικότερη από την κλοπιδογρέλη και την ασπιρίνη για τη δευτερογενή πρόληψη των σοβαρών αγγειακών συμβάντων, με σημαντικά χαμηλότερο ποσοστό αιμορραγιών σε σύγκριση με χαμηλές δόσεις ασπιρίνης και του συνδυασμού ασπιρίνης/κλοπιδογρέλης [186]. Οι δύο παραπάνω μετα-αναλύσεις συμπεριέλαβαν κυρίως ασθενείς από την Ασία, συνεπώς είναι απαραίτητο να πραγματοποιηθούν κλινικές μελέτες και σε άλλες χώρες για να αποσαφηνιστεί η αποτελεσματικότητα και η ασφάλεια της σιλοσταζόλης ως προς τη δευτερογενή πρόληψη.

Τέλος, η χορήγηση της σιλοσταζόλης προτείνεται για τη θεραπεία της διαλείπουσας χωλότητας σε ασθενείς με PAD, καθώς βελτιώνει την απόσταση βάρδισης [187].

Διπυριδαμόλη

Η διπυριδαμόλη αποτελεί ένα πυριμιδοπυριμιδινικό παράγωγο που αναστέλλει τη PDE-5 των αιμοπεταλίων, αυξάνοντας την ενδοκυττάρια συγκέντρωση του cGMP και επάγει τη βιοσύνθεση της PGI₂. Επιπρόσθετα, αναστέλλει τον ENT-1 οδηγώντας στην αύξηση της συγκέντρωσης της αδενοσίνης στο πλάσμα. Συνεπώς, η διπυριδαμόλη εμφανίζει ποικίλες βιολογικές δράσεις όπως αντιφλεγμονώδεις δράσεις, αγγειοδιαστολή, αναστολή του πολλαπλασιασμού των SMCs, κλπ. Για την αποτελεσματική απορρόφηση της από του στόματος χορηγούμενης διπυριδαμόλης είναι απαραίτητη η χαμηλή οξύτητα του στομάχου. Η διπυριδαμόλη εμφανίζει μικρή βιοδιαθεσιμότητα,

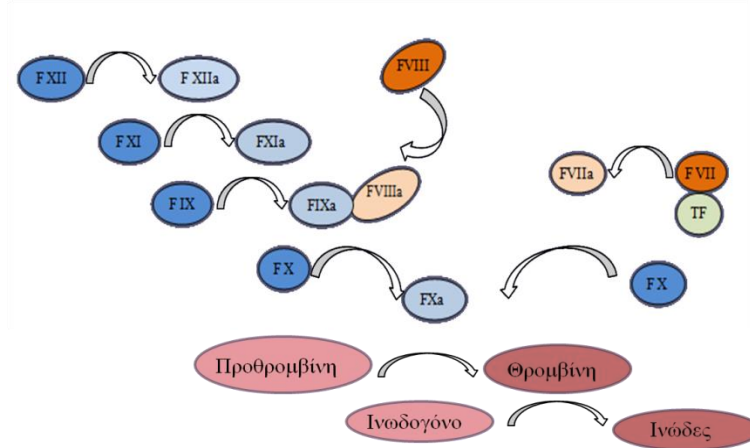
η έναρξη της αντιαιμοπεταλιακής της δράσης παρατηρείται εντός 1-2 h από τη λήψη, ενώ ο χρόνος ημιζώης της είναι 10 h. Η απέκκρισής της πραγματοποιείται κυρίως διαμέσου της γαστρεντερικής οδού.

Η μελέτη ESPS-1 (European Stroke Prevention Study-1) συμπεριέλαβε 2.500 ασθενείς με κλινική διάγνωση πρόσφατου ισχαιμικού ΑΕΕ αθηροθρομβωτικής προέλευσης και συνέκρινε την αποτελεσματικότητα του συνδυασμού ασπιρίνης/διπυριδαμόλης (325 mg/75 mg τρις ημερησίως) με εικονικό φάρμακο, με χρόνο παρακολούθησης 24 μήνες. Ο συνδυασμός ασπιρίνης/διπυριδαμόλης μείωσε το ποσοστό υποτροπιάζοντος ΑΕΕ ή θανάτου σε σύγκριση με την ομάδα του εικονικού φαρμάκου [188]. Επιπλέον στη μελέτη ESPS-2 (European Stroke Prevention Study-2), 6.602 ασθενείς που είχαν υποστεί ισχαιμικό ΑΕΕ ή ΤΙΑ χωρίστηκαν σε 4 ομάδες. Η πρώτη ομάδα λάμβανε 25 mg ασπιρίνης/200 mg διπυριδαμόλης δις ημερησίως, η δεύτερη λάμβανε 25 mg ασπιρίνης δις ημερησίως, η τρίτη λάμβανε 200 mg διπυριδαμόλης δις ημερησίως και η τέταρτη εικονικό φάρμακο. Η μονοθεραπεία με ασπιρίνη ή διπυριδαμόλη, καθώς και ο συνδυασμός τους μείωσε στατιστικά σημαντικά το ποσοστό υποτροπιάζοντος ισχαιμικού ΑΕΕ, σε σύγκριση με το εικονικό φάρμακο. Σε καμία ομάδα δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική μείωση του θανάτου ή των θανατηφόρων ΑΕΕ. Καθώς ο συνδυασμός ασπιρίνης/διπυριδαμόλης μείωσε στατιστικά σημαντικά τα υποτροπιάζοντα ΑΕΕ σε σύγκριση με τη μονοθεραπεία με καθένα από τα παραπάνω φάρμακα, η παρούσα μελέτη πρότεινε την υπεροχή του συνδυασμού ασπιρίνης/διπυριδαμόλης στη δευτερογενή πρόληψη των ισχαιμικών ΑΕΕ. Η κεφαλαλγία αποτέλεσε τη συχνότερη ανεπιθύμητη ενέργεια της μελέτης, η οποία παρατηρήθηκε κυρίως στους ασθενείς που έλαβαν διπυριδαμόλη [189].

Επιπρόσθετα, μία μετα-ανάλυση συμπεριέλαβε 6 κλινικές μελέτες και συνολικά 7.648 ασθενείς με ιστορικό εγκεφαλικού ή ΤΙΑ, οι οποίοι έλαβαν είτε συνδυασμό ασπιρίνης/διπυριδαμόλης είτε ασπιρίνη ως μονοθεραπεία. Η παρούσα ανάλυση έδειξε ότι ο συνδυασμός ασπιρίνης/διπυριδαμόλης είναι αποτελεσματικότερος ως προς τη δευτερογενή πρόληψη εγκεφαλικού και AMI, σε σύγκριση με την ασπιρίνη ως μονοθεραπεία [190].

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2. ΚΑΤΑΡΡΑΚΤΗΣ ΤΗΣ ΠΗΞΗΣ

Η αιμόσταση αποτελεί ένα φυσιολογικό μηχανισμό διαμέσου του οποίου ο οργανισμός αποτρέπει την εκτεταμένη απώλεια αίματος μετά από τραυματισμό του αγγειακού τοιχώματος. Αποτελεί μία δυναμική διαδικασία η οποία εξαρτάται τόσο από την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων, όσο και του καταρράκτη της πήξης. Ο καταρράκτης της πήξης βασίζεται σε μία σειρά πρωτεολυτικών αντιδράσεων που ρυθμίζονται από σερινοπρωτεάσες, οι οποίες ονομάζονται παράγοντες πήξης (Factor I-Factor XIII, FI-FXIII) και οδηγούν στη μετατροπή του ινωδογόνου σε ινώδες (Εικόνα 2.1). Ο σχηματισμός του ινώδους μπορεί να πραγματοποιηθεί διαμέσου δύο συγκλινόντων σηματοδοτικών μονοπατιών, του εξωγενούς και του ενδογενούς. Η σηματοδότηση διαμέσου και των δύο μονοπατιών ξεκινάει από την έκθεση του TF στην κυκλοφορία του αίματος μετά από τον αγγειακό τραυματισμό, το σχηματισμό του συμπλόκου TF-FVII και την αυτενεργοποίηση του FVII προς FVIIa. Στο εξωγενές μονοπάτι το σύμπλοκο TF-FVIIa δεσμεύεται στον FX οδηγώντας στο σχηματισμό του συμπλόκου TF-FVIIa-FX το οποίο καταλύει την ενεργοποίηση του FX προς τον ενεργοποιημένο FX (activated FX, FXa), καθώς και την ενεργοποίηση μικρού ποσοστού του FIX. Στο ενδογενές μονοπάτι ο FX ενεργοποιείται έμμεσα διαμέσου της ενεργοποίησης του FIX, η οποία διαμεσολαβείται από το σύμπλοκο TF-FVIIa. Ο FIXa σχηματίζει σύμπλοκο με τον FVIII, το οποίο ενεργοποιεί τον FX. Μετά την ενεργοποίηση του και από τα δύο μονοπάτια, αποδεσμεύεται από το σύμπλοκο TF-FVIIa-FXa, αλληλεπιδρά με τα φωσφολιπίδια της κυτταρικής επιφάνειας και τον FVa για να σχηματίζει το σύμπλοκο της προθρομβινάσης το οποίο μετατρέπει την ανενεργό προθρομβίνη σε θρομβίνη. Η θρομβίνη μετατρέπει το ινωδογόνο σε ινώδες οδηγώντας στη σταθεροποίηση του αιμοστατικού θρόμβου, ενώ παράλληλα ενεργοποιεί τα αιμοπετάλια. Ο FXa αποτελεί σημείο σύγκλισης των δύο μονοπατιών του καταρράκτη της πήξης και ενεργοποιεί την διαδικασία της πήξης αρχικά μέσω της παραγωγής μικρών ποσοτήτων θρομβίνης διαμέσου του εξωγενούς μονοπατιού και στη συνέχεια ενισχύει την πήξη διαμέσου του ενδογενούς μονοπατιού. Συνεπώς, η εκτεταμένη πήξη απαιτεί την ταυτόχρονη ενεργοποίηση και των δύο μονοπατιών.



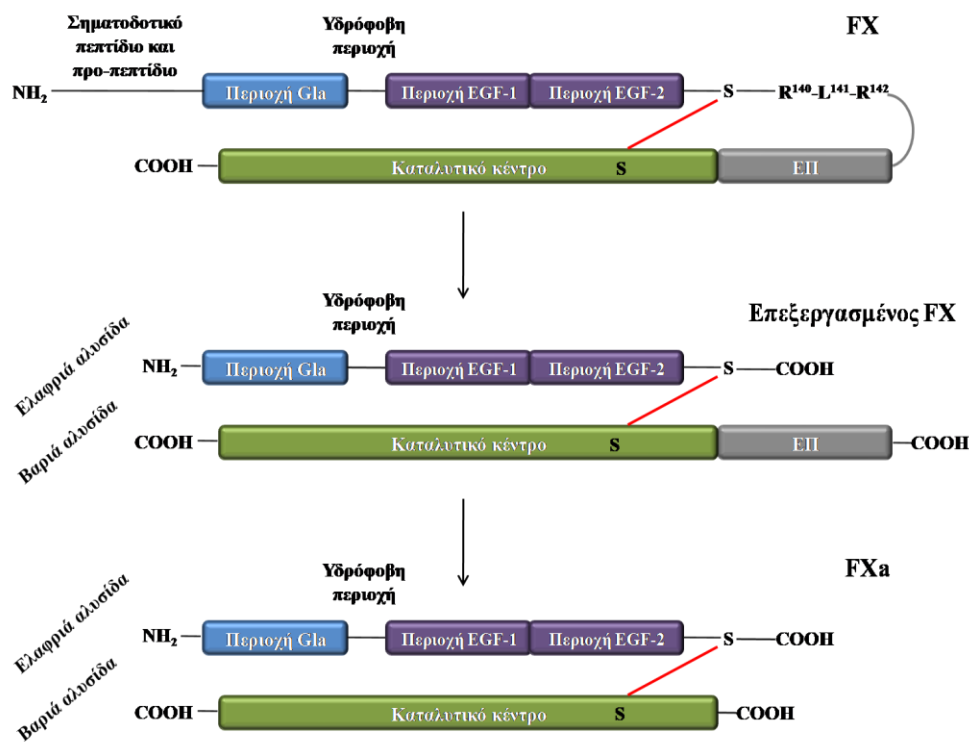
Εικόνα 2.1 Σχηματική απεικόνιση του καταρράκτη της πήξης.

2.1 Παράγοντας Xa

Ο FXa αποτελεί μία εξαρτώμενη από τη βιταμίνη K σερίνοπρωτεάση και όπως όλες οι πρωτεΐνες της πήξης, συντίθεται στη μη ενεργοποιημένη του μορφή. Ο μη ενεργοποιημένος FX είναι το προϊόν ενός γονιδίου εντός του χρωμοσώματος 13q34 και αποτελεί μία γλυκοπρωτεΐνη μονής πρωτεϊνικής αλυσίδας 74 kDa, η οποία υπόκειται σε μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις προκειμένου να εκκριθεί από το ήπαρ στην κυκλοφορία του αίματος. Αποτελείται από ένα σηματοδοτικό πεπτίδιο, ένα προ-πεπτίδιο, μία ελαφριά αλυσίδα, ένα συνδετικό πεπτίδιο και μία βαριά αλυσίδα. Το τελικό στάδιο τροποποιήσεων του FX περιλαμβάνει τη διάσπαση του στην ελαφριά (16,2 kDa) και τη βαριά αλυσίδα (42 kDa), καθώς και την απελευθέρωση του βασικού τριπεπτιδίου R¹⁴⁰KR¹⁴² από το κέντρο του μορίου. Οι δύο αλυσίδες που συνδέονται με δισουλφιδικό δεσμό αποτελούν τον ώριμο FX, ο οποίος εκκρίνεται από το ήπαρ και στη συνέχεια ενεργοποιείται προς FXa στην κυκλοφορία του αίματος προκειμένου να εκφράσει τις προπηκτικές και κυτταρικές του δράσεις [191].

Πριν την έκκρισή του στην κυκλοφορία ο FX υπόκειται σε ποικίλες μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις. Αρχικά, μεταφέρεται στο ενδοπλασματικό δίκτυο όπου μία πεπτιδάση κόβει το σηματοδοτικό πεπτίδιο [192]. Το προ-πεπτίδιο περιέχει στοιχεία που κατευθύνουν την εξαρτώμενη από τη βιταμίνη K γ-καρβοξυλάση, ώστε να μετατρέψει 10-12 γλουταμινικά αμινοξικά κατάλοιπα, τα οποία εντοπίζονται στο N-τελικό άκρο, σε κατάλοιπα Gla (gamma-carboxyglutamin acid), επιτρέποντάς τους να προσδέσουν Ca²⁺ [193]. Επιπλέον, η περιοχή που μοιάζει με τον επιδερμικό αυξητικό παράγοντα-1 (epidermal growth factor-like-1, EGF-1) και μία επιπλέον περιοχή κοντά στο ενεργοποιητικό πεπτίδιο υδροξυλιώνονται. Η πρωτεολυτική

ενεργοποίηση του FX πραγματοποιείται από τη διάσπαση του βασικού τριπεπτιδίου Arg¹⁴⁰-Lys¹⁴¹-Arg¹⁴² από το κέντρο του μορίου, καθώς και από τη διάσπαση του δεσμού μεταξύ των αμινοξέων Arg¹⁹⁴-Phe¹⁹⁵ που οδηγεί στην απελευθέρωση του ενεργοποιητικού πεπτιδίου (Εικόνα 2.2) [194]. Επιπλέον, έχει αναφερθεί ότι καρβοξυλικές δομές του ενεργοποιητικού πεπτιδίου εμπλέκονται στην αναγνώριση του FX από το σύμπλοκο TF-FVIIa, οδηγώντας στη διάσπαση και ενεργοποίηση του [195, 196].



Εικόνα 2.2 Σχηματική απεικόνιση της δομής, των μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων και της ενεργοποίησης του FX. Ο δισουλφιδικός δεσμός μεταξύ της ελαφριάς και της βαριάς αλυσίδας απεικονίζεται ως μία κόκκινη γραμμή. Σύντμηση: ΕΠ, ενεργοποιητικό πεπτίδιο. Τροποποιημένη εικόνα από την παραπομπή [197].

Η ελαφριά αλυσίδα του FXa αποτελείται από τρεις δομικές περιοχές, μία περιοχή πλούσια σε γ-καρβοξυγλουταμινικά κατάλοιπα (Ala¹-Gla³⁹), ακολουθούμενη από μία υδρόφοβη περιοχή (Phe⁴⁰-Lys⁴⁵) και τις περιοχές EGF-1 (Asp⁴⁶-Phe⁸⁴) και -2 (Thr⁸⁵-Gly¹²⁸) [194]. Η περιοχή πλούσια σε Gla κατάλοιπα είναι απαραίτητη για την ενεργοποίηση του FX μετά από την έκκριση του από το ήπαρ. Έχει βρεθεί ότι πρόσδεση Ca²⁺ στην περιοχή EGF-1 οδηγεί στην αναδίπλωση της περιοχής Gla με τέτοιο τρόπο ώστε τα Ca²⁺ παγιδεύονται μεταξύ των δύο αυτών περιοχών. Η

παραπάνω αναδίπλωση έχει σαν αποτέλεσμα την έκθεση της υδρόφοβης περιοχής, με αποτέλεσμα να ενισχύεται η πρόσδεση του FXa στα φωσφολιπίδια των μεμβρανών [198, 199]. Η βαριά αλυσίδα του FXa αποτελείται από ένα ενεργοποιητικό πεπτίδιο 52 αμινοξέων (Ser¹⁴³-Arg¹⁹⁴) και το καταλυτικό του κέντρο (Phe¹⁹⁵-Lys⁴⁴⁸) [194].

Το ενεργό κέντρο του FXa αποτελείται από 4 θήκες (S1-4). Η θήκη S1 είναι η σημαντικότερη για την εκλεκτικότητα και την πρόσδεση του FXa στο στόχο του [200]. Η θήκη S2 είναι μικρή και ο ρόλος της δεν είναι ξεκάθαρος, αλλά πρόσφατα δεδομένα προτείνουν ότι τα αμινοξικά κατάλοιπα Gly216 και Gly218 είναι κρίσιμα για τη συγγένεια πρόσδεσης [201]. Η θήκη S3 εντοπίζεται πάνω από το κατάλοιπο 217 της θήκης S1. Η θήκη S4 απαρτίζεται από 3 περιοχές δέσμευσης για προσδέματα (“hydrophobic box”, “the cationic hole” και “water site”) και συγχωνεύεται με τη θήκη S2. Έχει αναφερθεί ότι οι θήκες S1 και S4 είναι κρίσιμες για την πρόσδεση των αναστολέων του FXa. Συγκεκριμένα, οι αναστολείς του FXa αλληλεπιδρούν με τα αμινοξέα Asp189, Ser195 και Tyr228 της θήκης S1 και με τα αμινοξέα Tyr99, Phe174 και Trp228 της θήκης S4 [200].

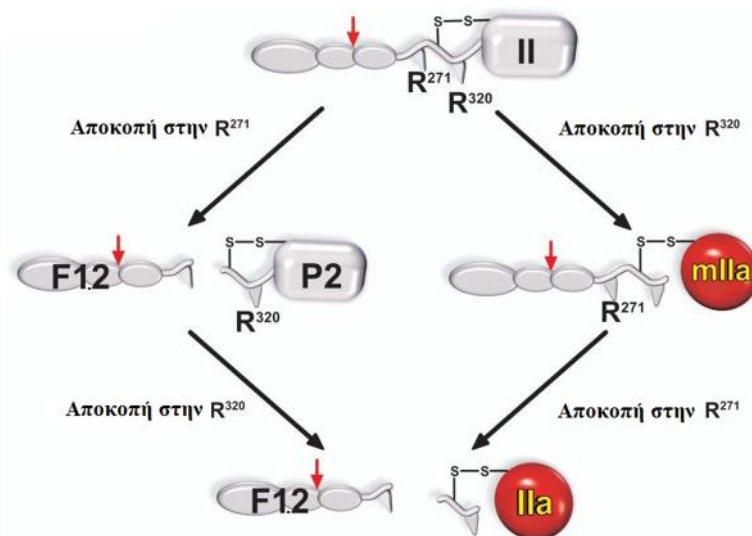
2.2 Θρομβίνη

Η θρομβίνη αποτελεί μία σερινοπρωτεάση που διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στον καταρράκτη της πήξης, καθώς μετατρέπει το ινωδογόνο σε ινώδες. Κυκλοφορεί ως ανενεργό ζυμογόνο, την προθρομβίνη, η οποία αποτελεί μία γλυκοπρωτεΐνη 70 kDa που συντίθεται στο ήπαρ και εκκρίνεται στην κυκλοφορία του αίματος. Η διάσπαση της προθρομβίνης από τον FXa οδηγεί στο σχηματισμό της λειτουργικής θρομβίνης η οποία αποτελείται από δύο αλυσίδες που συνδέονται μεταξύ τους με δισουλφιδικό δεσμό. Η ελαφριά αλυσίδα αποτελείται από 36 αμινοξέα, ενώ η βαριά αλυσίδα αποτελείται από 259 αμινοξέα.

Η προθρομβίνη αποτελείται από ένα σηματοδοτικό πεπτίδιο, ένα προ-πεπτίδιο, μία περιοχή Gla 40 αμινοξέων, δύο περιοχές kringle 80 αμινοξέων η καθεμία, μία ελαφριά και μία βαριά αλυσίδα. Η προθρομβίνη υπόκειται σε μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις πριν πραγματοποιηθεί η μετατροπή της σε θρομβίνη. Μετά την μεταφορά της προθρομβίνης στο ενδοπλασματικό δίκτυο, μία πεπτιδάση απομακρύνει το σηματοδοτικό πεπτίδιο. Στη συνέχεια, το προ-πεπτίδιο αναγνωρίζεται από μία εξαρτώμενη από τη βιταμίνη K γ-καρβοξυλάση, η οποία μετατρέπει 10 γλουταμινικά αμινοξικά κατάλοιπα σε κατάλοιπα Gla, εντός της περιοχής Gla [202, 203]. Αυτή η τροποποίηση επιτρέπει στην περιοχή Gla να δεσμεύει Ca²⁺ και να υιοθετεί μία διαμόρφωση που

επιτρέπει την πρόσδεση επάνω στα αρνητικά φορτισμένα φωσφολιπίδια της μεμβράνης των αιμοπεταλίων, αλλά και στα σημεία της αγγειακής βλάβης [204]. Μετά από τη δράση της γ-καρβοξυλάσης, το προ-πεπτίδιο απομακρύνεται και δημιουργείται ένα νέο N-τελικό άκρο. Ακολούθως, η τροποποιημένη προθρομβίνη υπόκειται σε N-γλυκοζυλίωση σε δύο σημεία εντός της περιοχής kringle-1 και σε ένα σημείο εντός της βαριάς αλυσίδας και εκκρίνεται στην κυκλοφορία όπου εντοπίζεται σε συγκέντρωση περίπου 1,2 μM [202].

Μετά την ενεργοποίηση του καταρράκτη της πήξης, ο FXa του συμπλόκου της προθρομβινάσης μετατρέπει την προθρομβίνη σε θρομβίνη, με διάσπαση των δεσμών μετά τις Arg271 και Arg320 (Εικόνα 2.3). Έτσι, απελευθερώνεται η θρομβίνη και το θραύσμα 1.2 (F1.2) το οποίο περιέχει την περιοχή Gla και τις δύο περιοχές kringle [205]. Το μόριο της θρομβίνης που προκύπτει έχει μοριακό βάρος 35,5 kDa και περιλαμβάνει μία ελαφριά αλυσίδα 49 αμινοξέων και μία βαριά αλυσίδα 259 αμινοξέων συνδεδεμένες μεταξύ τους με δισουλφιδικό δεσμό, ενώ στη B-αλυσίδα εντοπίζονται 3 επιπλέον δισουλφιδικοί δεσμοί. Η θρομβίνη υπόκειται σε μία επιπλέον πρωτεολυτική διάσπαση του δεσμού Arg13-Thr14 εντός της ελαφριάς αλυσίδας, με αποτέλεσμα να απομακρύνονται άλλα 13 αμινοξέα από το N-τελικό άκρο της και η ελαφριά αλυσίδα της να αποτελείται πλέον από 36 αμινοξέα [202].



Εικόνα 2.3 Η μετατροπή της προθρομβίνης σε θρομβίνη. Η μετατροπή της προθρομβίνης σε θρομβίνη απαιτεί τη διάσπαση των δεσμών στις Arg271 και Arg320. Η διάσπαση του δεσμού στην Arg271 οδηγεί στο σχηματισμό των F1.2 και P2 (αριστερή εικόνα). Το ζυμογόνο P2 απαιτεί περαιτέρω διάσπαση του δεσμού της Arg320 για να προκύψει η θρομβίνη. Η διάσπαση του δεσμού στην Arg320 οδηγεί στο σχηματισμό της πρωτεΐνης mIIa (δεξιά εικόνα), η οποία απαιτεί μία επιπλέον διάσπαση του δεσμού στην Arg271 για το σχηματισμό της θρομβίνης. Τροποποιημένη εικόνα από την παραπομπή [206].

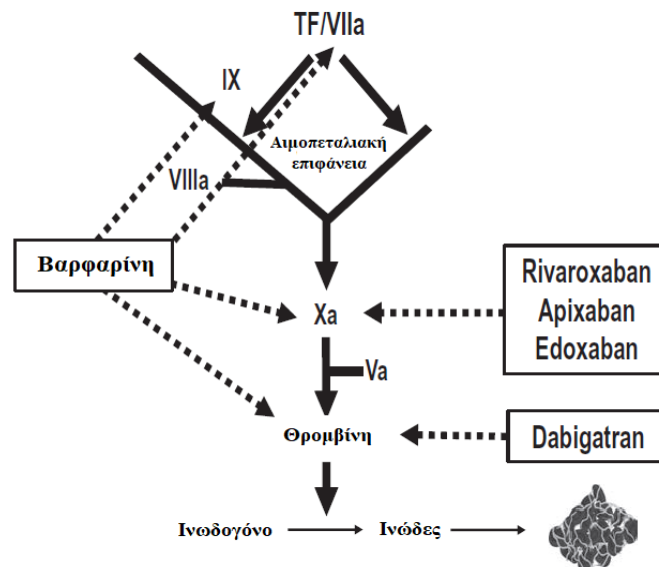
Η θρομβίνη διαθέτει μία καταλυτική τριάδα (Ser, His, Asp) και κόβει τα υποστρώματά της ακριβώς μετά από βασικά αμινοξικά κατάλοιπα. Η θρομβίνη διαθέτει ιδιαίτερη εκλεκτικότητα για τα υποστρώματά της, κυρίως χάρη στις περιοχές anion-binding exosite I και II. Η περιοχή anion-binding exosite I περιλαμβάνει τα αμινοξέα Lys21, Arg62, Arg68, Arg70, Tyr71, Arg73, Lys106, και Lys107 [202]. Εκτός από περιοχή αναγνώρισης για το ινωδογόνο, η περιοχή anion-binding exosite I είναι σημαντική για την αναγνώριση του PAR-1 [207]. Η περιοχή anion-binding exosite II βρίσκεται αντίθετα από την I και με κυριότερα αμινοξέα τα Arg89, Arg98, Arg245, Lys248 και Lys252. Μελέτες έχουν δείξει ότι και οι δύο περιοχές είναι σημαντικές για την αναγνώριση των παραγόντων FV και ο FVIII [208].

2.3 Αντιπηκτική αγωγή

Οι ανταγωνιστές της βιταμίνης K (vitamin K antagonists, VKAs) χρησιμοποιούνται ως μακροχρόνια από του στόματος χορηγούμενη αντιπηκτική θεραπεία, δρώντας ως αναστολείς του ενζύμου αναγωγή του εποξειδίου της βιταμίνης K. Η χρήση των VKAs στην κλινική πράξη εμφανίζει ποικίλα προβλήματα. Αρχικά, εμφανίζουν στενό θεραπευτικό παράθυρο και

μεταβλητότητα στη δράση τους μεταξύ των ασθενών εξαιτίας γενετικών και άλλων παραγόντων. Επιπλέον, εμφανίζουν αλληλεπιδράσεις με άλλα φάρμακα και επηρεάζονται από την πρόσληψη τροφής, ενώ δεν έχουν προβλέψιμο φαρμακοδυναμικό και φαρμακοκινητικό προφίλ [209].

Τα παραπάνω προβλήματα είχαν σαν αποτέλεσμα τη συνεχή έρευνα για την ανάπτυξη νέων αντιπηκτικών φαρμάκων που θα αποτελούσαν εναλλακτική θεραπεία έναντι των VKAs. Η έρευνα αυτή οδήγησε στην ανάπτυξη δύο εναλλακτικών προσεγγίσεων: των άμεσων από του στόματος χορηγούμενων αναστολέων (direct oral anticoagulants, DOACs) α) του FXa και β) της θρομβίνης (Εικόνα 2.4).



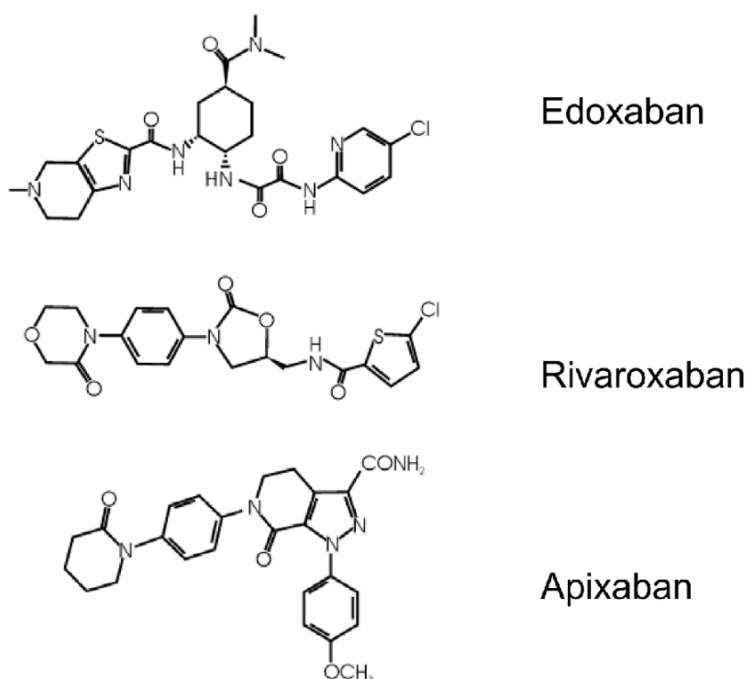
Εικόνα 2.4 Δράση της βαρφαρίνης και των DOACs. Τροποποιημένη εικόνα από την παραπομπή [210].

Αντίθετα από τους VKAs, τα DOACs χαρακτηρίζονται από προβλέψιμο φαρμακοδυναμικό και φαρμακοκινητικό προφίλ, ευκολότερη χορήγηση, υψηλότερη βιοδιαθεσιμότητα, εκλεκτικότητα για το στόχο και ταχεία έναρξη και τερματισμό της δράσης τους. Ακόμη, η δράση των DOACs δεν επηρεάζεται από την πρόσληψη τροφής και δεν έχουν παρατηρηθεί αλληλεπιδράσεις τους με άλλα φάρμακα. Τα DOACs είναι εξίσου αποτελεσματικά με τους VKAs, αλλά εμφανίζουν χαμηλότερο ποσοστό ενδοκράνιων αιμορραγιών. Τέλος, τα DOACs έχουν σύντομο χρόνο ημιζωής και η κάθαρση τους από το ήπαρ και τα ούρα μειώνει την πιθανότητα συσσώρευσης του φαρμάκου σε ασθενείς με ήπια νεφρική δυσλειτουργία [211, 212].

Τα DOACs χρησιμοποιούνται στην καθημερινή κλινική πράξη για την πρόληψη καρδιοεμβολικού ισχαιμικού αγγειακού εγκεφαλικού επεισοδίου σε ασθενείς με μη βαλβιδική ΑΦ, για θρομβοπροφύλαξη μετά από ορθοπεδικό χειρουργείο και για τη θεραπεία και δευτερογενή πρόληψη της εν τω βάθει φλεβικής θρόμβωσης (deep vein thrombosis, DVT) και της πνευμονικής εμβολής (pulmonary embolism, PE).

2.3.1 Άμεσοι από του στόματος χορηγούμενοι αναστολείς του παράγοντα Χα

Τα τελευταία χρόνια, έχουν αναπτυχθεί τρία DOACs που στοχεύουν τον FXa, το rivaroxaban, το apixaban και το edoxaban (Εικόνα 2.5). Τα τρία αυτά φάρμακα προσδένονται απευθείας στο ενεργό κέντρο του FXa, αναστέλλοντας τη δράση του.



Εικόνα 2.5 Οι δομές των DOACs που στοχεύουν τον FXa. Εικόνα από την παραπομπή [213].

Rivaroxaban

Το rivaroxaban χορηγείται από το στόμα και δεσμεύεται γρήγορα, εκλεκτικά και αντιστρεπτά στο ενεργό κέντρο του FXa, αναστέλλοντας τη δράση του και αποτρέποντας το σχηματισμό της θρομβίνης. Το rivaroxaban είναι ένα μικρό μόριο το οποίο μπορεί να αναστείλει τον FXa στην ελεύθερη μορφή του, όταν αποτελεί μέρος του συμπλόκου της προθρομβινάσης, αλλά και εντός του σχηματισμένου θρόμβου [214]. Η εκλεκτικότητά του για τον FXa είναι 10.000 φορές

μεγαλύτερη σε σχέση με οποιαδήποτε άλλη σερινοπρωτεάση του καταρράκτη της πήξης [215]. Μετά από τη χορήγησή του απορροφάται ταχέως και εμφανίζει βιοδιαθεσιμότητα από 60-80%. Η μέγιστη συγκέντρωση του στο πλάσμα επιτυγχάνεται μετά από 2-4 h και ο χρόνος ημιζωής του ποικίλει μεταξύ 5-9 h σε άτομα ηλικίας 20-45 ετών και 11-13 h σε άτομα μεγαλύτερης ηλικίας. Περίπου το 92-95% του φαρμάκου δεσμεύεται από τις πρωτεΐνες του πλάσματος. Το 1/3 του rivaroxaban απεκκρίνεται κυρίως από τα ούρα χωρίς να μεταβολιστεί, ενώ τα 2/3 του φαρμάκου μεταβολίζονται στο ήπαρ από τα ένζυμα CYP3A4/5 και CYP2J2 (18% και 14% της συνολικής απέκκρισης, αντίστοιχα), καθώς και από μηχανισμούς ανεξάρτητους από τα ένζυμα του CYP που περιλαμβάνουν υδρόλυση του φαρμάκου συμβάλλοντας στο 14% της συνολικής απέκκρισης του. Η απέκκριση του φαρμάκου μετά το μεταβολισμό γίνεται μέσω των ούρων και των κοπράνων. Δεν έχουν εντοπιστεί κυκλοφορούντες ενεργοί μεταβολίτες του φαρμάκου. [212, 216].

Η μελέτη ROCKET AF (Rivaroxaban Once-daily oral direct factor Xa inhibition Compared with vitamin K antagonism for prevention of stroke and Embolism Trial in Atrial Fibrillation), συμπεριέλαβε 14.264 ασθενείς με μη βαλβιδική AF και αυξημένο ποσοστό για εγκεφαλικό ή συστηματική εμβολή και συνέκρινε την αποτελεσματικότητα και την ασφάλεια του rivaroxaban (20 mg ημερησίως) έναντι προσαρμοσμένης δόσης βαρφαρίνης. Το rivaroxaban δεν ήταν κατώτερο από τη βαρφαρίνη, ενώ δεν εμφανίστηκε στατιστικά σημαντική διαφορά στις μείζονες αιμορραγίες μεταξύ των δύο ομάδων. Παρ' όλα αυτά, αξίζει να σημειωθεί ότι η ομάδα που ελάμβανε rivaroxaban εμφάνισε λιγότερες ενδοκράνιες και θανατηφόρες αιμορραγίες [217].

Επιπρόσθετα, δύο κλινικές μελέτες, οι RECORD-1 και -2 (RECORD Program: REgulation of Coagulation in major Orthopedic surgery reducing the Risk of DVT and PE), συνέκριναν την αποτελεσματικότητα και την ασφάλεια του rivaroxaban έναντι της ενοξαπαρίνης για την πρόληψη της φλεβικής θρομβοεμβολής (venous thromboembolism, VTE), σε ασθενείς που επρόκειτο να υποβληθούν σε επέμβαση αντικατάστασης ισχίου. Στη RECORD-1, 4.541 ασθενείς τυχαιοποιήθηκαν να λάβουν 10 mg rivaroxaban ή 40 mg ενοξαπαρίνης μία φορά ημερησίως για 31-39 ημέρες [218], ενώ στη RECORD-2, 2.509 ασθενείς τυχαιοποιήθηκαν να λάβουν 10 mg rivaroxaban μία φορά ημερησίως για 31-39 ημέρες ή 40 mg ενοξαπαρίνης μία φορά ημερησίως για 10-14 ημέρες και στη συνέχεια εικονικό φάρμακο [219].

Ακόμη, δύο κλινικές μελέτες, οι RECORD-3 and -4, συνέκριναν την αποτελεσματικότητα και ασφάλεια του rivaroxaban έναντι της ενοξαπαρίνης για την πρόληψη της VTE σε ασθενείς που επρόκειτο να υποβληθούν σε επέμβαση αντικατάστασης γόνατος. Στη RECORD-3, 2.531

ασθενείς τυχαιοποιήθηκαν να λάβουν 10 mg rivaroxaban ή 40 mg ενοξαπαρίνης μία φορά ημερησίως για 10-14 ημέρες [220], ενώ στη RECORD-4, 3.148 ασθενείς τυχαιοποιήθηκαν να λάβουν 10 mg rivaroxaban μία φορά ημερησίως ή 30 mg ενοξαπαρίνης δις ημερησίως για 10-14 ημέρες [221].

Και οι 4 μελέτες του προγράμματος RECORD έδειξαν ότι το rivaroxaban είναι αποτελεσματικότερο συγκριτικά με την ενοξαπαρίνη για την πρόληψη της VTE σε ασθενείς που επρόκειτο να υποβληθούν σε επέμβαση αντικατάστασης ισχίου ή γόνατος και εμφανίζει ένα ασφαλέστερο προφίλ με χαμηλότερο ποσοστό μειζόνων αιμορραγιών.

Τρεις κλινικές μελέτες συνέκριναν την αποτελεσματικότητα και την ασφάλεια του rivaroxaban με της ενοξαπαρίνης σε συνδυασμό με έναν VKA για τη θεραπεία της οξείας DVT και την πρόληψη υποτροπιάζουσας DVT ή PE. Οι μελέτες EINSTEIN DVT (Oral Direct Factor Xa Inhibitor Rivaroxaban in Patients With Acute Symptomatic Deep Vein Thrombosis) με 3.449 ασθενείς και EINSTEIN PE (Oral Direct Factor Xa Inhibitor Rivaroxaban in Patients With Acute Symptomatic Pulmonary Embolism) με 4.832 ασθενείς, συνέκριναν την αποτελεσματικότητα του rivaroxaban σε δόση 15 mg δις ημερησίως για 3 εβδομάδες, ακολουθούμενη από 20 mg μία φορά ημερησίως, έναντι της καθιερωμένης θεραπείας με ενοξαπαρίνη σε δόση 1 mg/kg δις ημερησίως για τουλάχιστον 5 ημέρες, ακολουθούμενη από χορήγηση ενός VKA για 3, 6 ή 12 μήνες, σε ασθενείς με οξεία DVT ή PE, αντίστοιχα. Και οι δύο μελέτες έδειξαν ότι το rivaroxaban ως μονοθεραπεία εμφανίζει παρόμοια αποτελεσματικότητα με την καθιερωμένη θεραπεία για την οξεία DVT και PE. Επιπλέον, δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά ως προς τις κλινικά σχετιζόμενες αιμορραγίες μεταξύ των ομάδων κάθε μελέτης, αλλά σε ασθενείς με PE που ελάμβαναν rivaroxaban παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική μείωση των μειζόνων αιμορραγιών [222, 223].

Στη μελέτη EINSTEIN EXT (Once-Daily Oral Direct Factor Xa Inhibitor Rivaroxaban In The Long-Term Prevention Of Recurrent Symptomatic Venous Thromboembolism In Patients With Symptomatic Deep-Vein Thrombosis Or Pulmonary Embolism. The Einstein-Extension Study) 1.196 ασθενείς οι οποίοι είχαν ολοκληρώσει 6μηνη ή 12μηνη θεραπεία για VTE (με rivaroxaban ή καθιερωμένη θεραπεία), συνέχισαν τη θεραπεία με 20 mg rivaroxaban μία φορά ημερησίως ή εικονικό φάρμακο για άλλους 6 με 12 μήνες. Η παράταση της θεραπείας με rivaroxaban ήταν αποτελεσματικότερη για την πρόληψη υποτροπιάζουσας VTE, ενώ το ποσοστό των ασθενών που εμφάνισε μη θανατηφόρες μείζονες αιμορραγίες ήταν 0.7% [222].

Τέλος, η μελέτη ATLAS ACS 2-TIMI 51 (Anti-Xa Therapy to Lower Cardiovascular Events in Addition to Standard Therapy in Subjects With Acute Coronary Syndrome ACS 2–Thrombolysis In Myocardial Infarction 51), αξιολόγησε την αποτελεσματικότητα και την ασφάλεια του rivaroxaban στην πρόληψη της καρδιαγγειακής θνητότητας σε ασθενείς με πρόσφατο ACS. Συνολικά 15.526 ασθενείς έλαβαν 2,5 ή 5 mg rivaroxaban, ή εικονικό φάρμακο δις ημερησίως για 13-31 μήνες. Το rivaroxaban μείωσε στατιστικά σημαντικά το θάνατο από κάθε αιτιολογία, αλλά αύξησε τα μείζονες και ενδοκράνιες αιμορραγίες. Τα περιστατικά θανατηφόρων αιμορραγιών ήταν παρόμοια μεταξύ των δύο ομάδων [224].

Apixaban

Το apixaban αποτελεί ένα μικρό μόριο το οποίο προσδένεται ισχυρά και αντιστρεπτά στο ενεργό κέντρο του FXa, εμφανίζοντας εκλεκτικότητα περίπου 30.000 φορές σε σχέση με άλλες πρωτεΐνες του καταρράκτη της πήξης. Αναστέλλει τη δράση του FXa τόσο στην ελεύθερη μορφή του, όσο και όταν είναι μέρος του συμπλόκου της προθρομβινάσης. Η βιοδιαθεσιμότητα του φαρμάκου είναι περίπου 50%, ενώ η μέγιστη συγκέντρωσή του στο πλάσμα επιτυγχάνεται μέσα σε 3-4 h. Το φάρμακο δεσμεύεται από τις πρωτεΐνες του πλάσματος σε ποσοστό 87% και ο χρόνος ημιζωής του είναι περίπου 12 h. Το apixaban μεταβολίζεται στο ήπαρ σε ανενεργούς μεταβολίτες κυρίως από το ένζυμο CYP3A4/5, ενώ στο μεταβολισμό του συμμετέχουν επίσης τα ένζυμα CYP1A2, CYP2C8, CYP2C9, CYP2C19 και CYP2J2. Απεκκρίνεται από τους νεφρούς κατά 27% και από τα κόπρανα κατά 56% [225].

Η αποτελεσματικότητα και η ασφάλεια του apixaban για την πρόληψη εγκεφαλικού σε ασθενείς με AF που δεν μπορούσαν να λάβουν VKAs αξιολογήθηκε σε δύο κλινικές μελέτες, τις AVERROES (A Phase III Study of Apixaban in Patients With Atrial Fibrillation) και ARISTOTLE (Apixaban for the Prevention of Stroke in Subjects With Atrial Fibrillation). Στη μελέτη AVERROES, στρατολογήθηκαν 5.599 ασθενείς οι οποίοι τυχαιοποιήθηκαν να λάβουν 5 mg apixaban δις ημερησίως ή 81-324 mg ασπιρίνης μία φορά ημερησίως. Το apixaban μείωσε στατιστικά σημαντικά την εμφάνιση εγκεφαλικού ή συστημικής εμβολής σε σύγκριση με την ασπιρίνη, χωρίς να αυξάνει τις μείζονες και ενδοκράνιες αιμορραγίες. Η παραπάνω μελέτη τερματίστηκε πρόωρα εξαιτίας της εμφανούς κλινικά σημαντικής μείωσης του εγκεφαλικού και της συστημικής εμβολής, καθώς και του προφίλ ασφαλείας του apixaban σε σύγκριση με την ασπιρίνη [226]. Στη μελέτη ARISTOTLE (Apixaban for the Prevention of Stroke in Subjects With

Atrial Fibrillation) στρατολογήθηκαν 18.201 ασθενείς οι οποίοι τυχαιοποιήθηκαν να λάβουν 5 mg apixaban ή προσαρμοσμένη δόση βαρφαρίνης. Το apixaban μείωσε στατιστικά σημαντικά την εμφάνιση εγκεφαλικού ή συστημικής εμβολής, καθώς και το θάνατο οποιασδήποτε αιτιολογίας, προκαλώντας λιγότερα αιμορραγικά συμβάντα σε σύγκριση με τη βαρφαρίνη [227].

Επιπλέον, το apixaban δοκιμάστηκε για θρομβοπροφύλαξη μετά από επέμβαση ολικής αντικατάστασης ισχίου ή γόνατος σε 3 κλινικές μελέτες. Στη μελέτη ADVANCE-1 (Apixaban Dose Orally Vs. ANtiCoagulation with Enoxaparin 1) στρατολογήθηκαν 3.195 ασθενείς οι οποίοι τυχαιοποιήθηκαν να λάβουν 2,5 mg apixaban δις ημερησίως ή 30 mg ενοξαπαρίνης μία φορά ημερησίως, 12-24 h μετά από το χειρουργείο και για 10-14 ημέρες. Το apixaban εμφάνισε παρόμοια αποτελεσματικότητα με την ενοξαπαρίνη, αλλά με μειωμένο ποσοστό μειζόνων αιμορραγιών [228].

Στις μελέτες ADVANCE-2 (Study of an Investigational Drug for the Prevention of Thrombosis-related Events Following Knee Replacement Surgery) και -3 (Study of an Investigational Drug for the Prevention of Thrombosis-related Events Following Hip Replacement Surgery) στρατολογήθηκαν 3.057 και 3.866 ασθενείς αντίστοιχα. Στη μελέτη ADVANCE-2 οι ασθενείς τυχαιοποιήθηκαν να λάβουν 2,5 mg apixaban δις ημερησίως 12-24 h μετά από το κλείσιμο της πληγής ή 40 mg ενοξαπαρίνης μία φορά ημερησίως 12 ώρες πριν από επέμβαση αντικατάστασης γόνατος, για 10-14 ημέρες [229]. Στη μελέτη ADVANCE-3 οι ασθενείς τυχαιοποιήθηκαν να λάβουν 2,5 mg apixaban δις ημερησίως 12-24 h μετά από το κλείσιμο της πληγής ή 40 mg ενοξαπαρίνης μία φορά ημερησίως 12 ώρες πριν από επέμβαση αντικατάστασης ισχίου, για 35 ημέρες [230]. Και οι δύο μελέτες έδειξαν ότι το apixaban είναι αποτελεσματικότερο από την ενοξαπαρίνη για την πρόληψη της VTE μετά από επέμβαση αντικατάστασης ισχίου ή γόνατος, χωρίς να αυξάνει τις μείζονες αιμορραγίες.

Edoxaban

Το edoxaban αποτελεί από του στόματος χορηγούμενο αντιστρεπτό αναστολέα του FXa με προβλέψιμο φαρμακοκινητικό προφίλ. Εμφανίζει βιοδιαθεσιμότητα 62%, ενώ το 55% του φαρμάκου δεσμεύεται στις πρωτεΐνες του πλάσματος. Το edoxaban εμφανίζει ταχεία έναρξης δράσης και η μέγιστη συγκέντρωση του στο πλάσμα επιτυγχάνεται 1-2 h μετά από τη χορήγηση του. Ο χρόνος ημιζωής του φαρμάκου είναι 10-14 h. Το edoxaban μεταβολίζεται στο ήπαρ από το ένζυμο CYP2A4, αλλά το 70% του φαρμάκου απεκκρίνεται χωρίς να μεταβολιστεί από τα ούρα

και διαμέσου της χοληφόρου οδού. Τρεις μεταβολίτες εμφανίζουν αντιπηκτική δράση, οι M-4, -6 και -8, από τους οποίους ο αθρονότερος είναι ο M-4. Οι μεταβολίτες αυτοί, εξαιτίας της χαμηλής συγκέντρωσης τους στο πλάσμα, αλλά και εξαιτίας της αυξημένης πρωτεϊνικής δέσμευσης τους, συμβάλλουν περιορισμένα στη φαρμακολογική δραστικότητα του edoxaban [231].

Η αποτελεσματικότητα και η ασφάλεια του edoxaban σε σύγκριση με τη βαρφαρίνη ως προς την πρόληψη εγκεφαλικού ή συστημικής εμβολής σε ασθενείς με μη βαλβιδική AF, αξιολογήθηκε από τη μελέτη ENGAGE-AF TIMI 48 (Global Study to Assess the Safety and Effectiveness of Edoxaban (DU-176b) vs Standard Practice of Dosing With Warfarin in Patients With Atrial Fibrillation). Συνολικά στρατολογήθηκαν 21.105 ασθενείς οι οποίοι τυχαιοποιήθηκαν να λάβουν 30 ή 60 mg edoxaban ή προσαρμοσμένη δόση βαρφαρίνης, μία φορά ημερησίως. Το edoxaban εμφάνισε παρόμοια αποτελεσματικότητα με τη βαρφαρίνη ως προς την πρόληψη εγκεφαλικού ή συστημικής εμβολής, αλλά εμφάνισε μικρότερο ποσοστό μειζόνων αιμορραγιών και θανάτου καρδιαγγειακής αιτιολογίας [232].

Επιπλέον, η μελέτη ENSURE AF (Edoxaban vs Warfarin in Subjects Undergoing Cardioversion of Nonvalvular Atrial Fibrillation) στρατολόγησε 2.199 ασθενείς με μη βαλβιδική AF και συνέκρινε την αποτελεσματικότητα και την ασφάλεια του edoxaban σε σύγκριση με ενοξαπαρίνη-βαρφαρίνη, ως προς την πρόληψη εγκεφαλικού ή συστημικής εμβολής. Οι ασθενείς τυχαιοποιήθηκαν να λάβουν 60 mg edoxaban ή προσαρμοσμένη δόση ενοξαπαρίνης-βαρφαρίνης, μία φορά ημερησίως για 28-30 ημέρες. Το edoxaban εμφάνισε παρόμοια αποτελεσματικότητα και ασφάλεια με το συνδυασμό ενοξαπαρίνης-βαρφαρίνης [233].

Τέλος, η μελέτη Hokusai VTE (Comparative Investigation of Low Molecular Weight (LMW) Heparin/Edoxaban Tosylate (DU176b) Versus (LMW) Heparin/Warfarin in the Treatment of Symptomatic Deep-Vein Blood Clots and/or Lung Blood Clots) στρατολόγησε 4.921 ασθενείς με συμπτωματική οξεία VTE και συνέκρινε την αποτελεσματικότητα και την ασφάλεια του edoxaban με της βαρφαρίνης. Οι ασθενείς οι οποίοι είχαν ξεκινήσει θεραπεία με ηπαρίνη τυχαιοποιήθηκαν να λάβουν 60 mg edoxaban ή προσαρμοσμένη δόση βαρφαρίνης μία φορά ημερησίως για 3-12 μήνες. Το edoxaban εμφάνισε παρόμοια αποτελεσματικότητα με τη βαρφαρίνη ως προς τη θεραπεία της VTE, αλλά με στατιστικά σημαντικά χαμηλότερο ποσοστό μειζόνων αιμορραγιών [234].

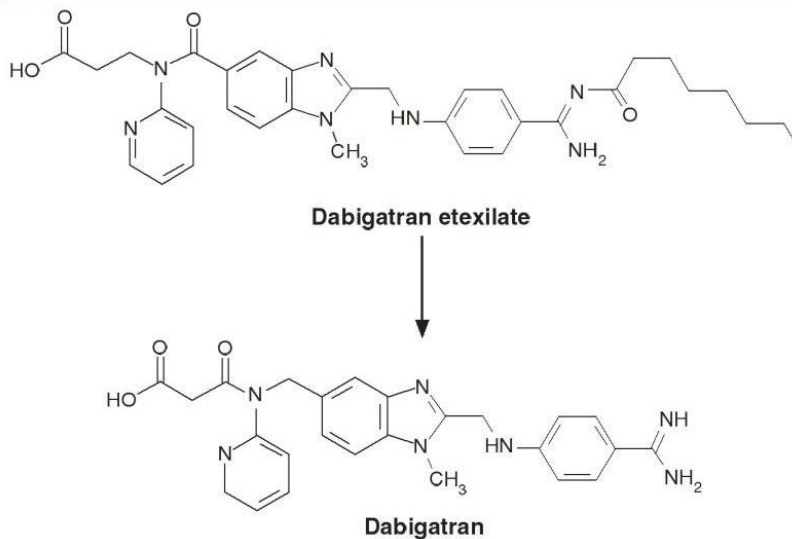
2.3.2 Άμεσοι από του στόματος χορηγούμενοι αναστολείς της θρομβίνης

Το πρώτο DOAC που στόχευε τη δράση της θρομβίνης ήταν το ximelagatran, το οποίο εμφάνιζε παρόμοια αποτελεσματικότητα με τα κλασικά αντιπηκτικά ως προς την πρόληψη και τη θεραπεία φλεβικών και αρτηριακών θρομβώσεων, αλλά και για τη δευτερογενή πρόληψη καρδιαγγειακών συμβάντων μετά από AMI. Το φάρμακο εγκρίθηκε στην Ευρώπη για την πρόληψη φλεβικής θρομβοεμβολής μετά από ορθοπεδικά χειρουργεία. Παρ' όλα αυτά το ximelagatran αποσύρθηκε από τις Ευρωπαϊκές αγορές 20 μήνες μετά από την κυκλοφορία του, ενώ δεν κυκλοφόρησε ποτέ στην Αμερική καθώς μελέτες έδειξαν ότι η χορήγησή του για πάνω από 35 ημέρες συσχετιζόταν με ηπατοτοξικότητα [235].

Το περισσότερο μελετημένο DOAC που στοχεύει τη θρομβίνη είναι το dabigatran, το οποίο αποτελεί και ένα πολλά υποσχόμενο φάρμακο.

Dabigatran

Το dabigatran etexilate αποτελεί ένα από του στόματος χορηγούμενο προφάρμακο το οποίο μεταβολίζεται ταχέως προς dabigatran, ένα μικρού μοριακού βάρους μόριο (Εικόνα 2.6). Το dabigatran προσδένεται στο ενεργό κέντρο της θρομβίνης μέσω ιοντικών αλληλεπιδράσεων και αναστέλλει τη δράση της τόσο στην ελεύθερη μορφή της, όσο και όταν αποτελεί μέρος του θρόμβου. Προσδένεται γρήγορα και αντιστρεπτά στη θρομβίνη και εμφανίζει μεγάλη εκλεκτικότητα σε σύγκριση με άλλες σερινοπρωτεάσες. Το dabigatran ως ένα ισχυρά πολικό και φορτισμένο μόριο εμφανίζει χαμηλή εντερική απορρόφηση και καθόλου βιοδιαθεσιμότητα όταν χορηγηθεί από το στόμα. Η μετατροπή της καρβοξυλικής ομάδας του dabigatran σε εστερική ομάδα και η κάλυψη του αμιδινικού καταλοίπου από έναν καρβαμικό εστέρα, οδήγησε στην ανάπτυξη του dabigatran etexilate που αποτελεί ένα ισχυρά λιπόφιλο μόριο που απορροφάται γαστρεντερικά. Μετά τη χορήγησή του το dabigatran etexilate μετατρέπεται ταχέως στο ενεργό dabigatran μετά από διάσπαση των δύο λιπόφιλων ομάδων από εστεράσες της σερίνης και το σχηματισμό δύο ενδιάμεσων προϊόντων, των BIBR951 και BIBR1087 [236].



Εικόνα 2.6 Η δομή του *dabigatran etexilate* και του ενεργού μεταβολίτη *dabigatran*. Εικόνα από την παραπομπή [237].

Η απόλυτη βιοδιαθεσιμότητα του *dabigatran* είναι 6-7% και είναι ανεξάρτητη από τη δόση χορήγησης του *dabigatran etexilate* BIBR1087 [236]. Επιπρόσθετα, μελέτες έχουν δείξει ότι η συγκέντρωση του *dabigatran* στο πλάσμα αυξάνεται με δοσο-εξαρτώμενο τρόπο και είναι απαραίτητο να χορηγηθεί υψηλή δόση του *dabigatran etexilate* για να επιτευχθεί επαρκής συγκέντρωση του *dabigatran* στο πλάσμα [238]. Η απορρόφηση του *dabigatran etexilate* είναι βέλτιστη σε όξινο περιβάλλον και για το λόγο αυτό η κάψουλα του περιέχει ταρταρικό οξύ. Ακόμη ένα χαρακτηριστικό του προφαρμάκου αυτού είναι ότι για το μεταβολισμό του δεν απαιτείται η συμμετοχή ισοενζύμων του CYP450 [239]. Ο μεταβολισμός του *dabigatran etexilate* προς *dabigatran* πραγματοποιείται σε εντεροκύτταρα και ηπατοκύτταρα. Το 20% του *dabigatran* δεσμεύεται με γλυκουρονικό οξύ, σχηματίζοντας ενεργά γλυκουρονικά συζεύγματα [240]. Μετά το μεταβολισμό του, το προφάρμακο και οι ενδιάμεσοι μεταβολίτες BIBR951 και BIBR1087 εντοπίζονται στο πλάσμα για περίπου 2 h [241].

Όπως αναφέρθηκε εκτενώς, το *dabigatran etexilate* μεταβολίζεται ταχέως προς *dabigatran*, το οποίο φτάνει σε μέγιστη συγκέντρωση στο πλάσμα 1,5-2 h μετά από τη χορήγησή του, ανεξάρτητα από την ηλικία ή το φύλο [242]. Επιπλέον, ο χρόνος ημιζωής του είναι 12-14 h, ανεξάρτητα από τη δόση χορήγησης [238]. Έχει βρεθεί ότι η ταυτόχρονη πρόσληψη τροφής μπορεί να αυξήσει κατά 2 h το χρόνο που απαιτείται για να φτάσει η συγκέντρωση του φαρμάκου στο μέγιστο, χωρίς να επηρεάζει την απορρόφησή του [242]. Το φαρμακοκινητικό προφίλ του *dabigatran* δεν

επιηρεάζεται από τη συγχορήγηση του με άλλα φάρμακα. Τέλος, η κύρια οδός απέκκρισης του dabigatran είναι οι νεφροί [239].

Η αποτελεσματικότητα και η ασφάλεια του dabigatran σε σύγκριση με τη βαρφαρίνη ως προς την πρόληψη εγκεφαλικού επεισοδίου και συστημικής εμβολής σε ασθενείς με AF αξιολογήθηκε από τη μελέτη RE-LY (Randomized Evaluation of Long Term Anticoagulant Therapy with Dabigatran Etxilate). Συνολικά, στρατολογήθηκαν 18.113 ασθενείς οι οποίοι τυχαιοποιήθηκαν να λάβουν είτε μία από τις δύο δόσεις dabigatran δύο φορές ημερησίως (110 ή 150 mg), είτε προσαρμοσμένη δόση βαρφαρίνης για 2 χρόνια. Το dabigatran στη δόση των 110 mg εμφάνισε παρόμοια αποτελεσματικότητα με τη βαρφαρίνη ως προς την πρόληψη εγκεφαλικού επεισοδίου και συστημικής εμβολής, ενώ εμφάνισε χαμηλότερο ποσοστό μειζόνων αιμορραγιών. Επιπρόσθετα, στη δόση των 150 mg εμφάνισε καλύτερη αποτελεσματικότητα, αλλά παρόμοιο ποσοστό μειζόνων αιμορραγιών σε σύγκριση με τη βαρφαρίνη [243].

Επιπρόσθετα, η μελέτη RELY-ABLE (Long Term Multi-center Extension of Dabigatran Treatment in Patients With Atrial Fibrillation Who Completed RE-LY Trial) στρατολόγησε ασθενείς οι οποίοι δε διέκοψαν τη θεραπεία κατά τη διάρκεια της μελέτης RE-LY, με σκοπό να δώσει επιπρόσθετες πληροφορίες για τη μακροπρόθεσμη χορήγηση των δύο δόσεων του dabigatran. Συνολικά στρατολογήθηκαν 5.851 ασθενείς και ο επιπλέον μέσος όρος παρακολούθησης τους ήταν 2,25 χρόνια. Η δόση των 150 mg εμφάνισε μεγαλύτερο ποσοστό μειζόνων αιμορραγιών σε σύγκριση με εκείνη των 110 mg και παρόμοιο ποσοστό εγκεφαλικών επεισοδίων και θανάτων [244].

Η μελέτη RE-COVER I (Efficacy and Safety of Dabigatran Compared to Warfarin for 6 Month Treatment of Acute Symptomatic Venous Thromboembolism) αξιολόγησε την αποτελεσματικότητα και την ασφάλεια του dabigatran σε δόση 150 mg δύο φορές ημερησίως για 6 μήνες, σε σύγκριση με προσαρμοσμένη δόση βαρφαρίνης, σε 2.564 ασθενείς με VTE. Το dabigatran εμφάνισε παρόμοια αποτελεσματικότητα και ασφάλεια με τη βαρφαρίνη ως προς τη θεραπεία της VTE [245]. Επιπρόσθετα, η μελέτη RE-COVER II (Phase III Study Testing Efficacy & Safety of Oral Dabigatran Etxilate vs Warfarin for 6 m Treatment for Acute Symp Venous Thromboembolism) στρατολόγησε συνολικά 2.589 ασθενείς και επιβεβαίωσε τα αποτελέσματα της μελέτης RE-COVER I ως προς την αποτελεσματικότητα του dabigatran σε σχέση με τη βαρφαρίνη στη θεραπεία της VTE, ενώ έδειξε ότι το dabigatran εμφανίζει χαμηλότερο ποσοστό αιμορραγιών [246].

Τέλος, οι μελέτες RE-MEDY (Secondary Prevention of Venous Thrombo Embolism) και RE-SONATE (Twice-daily Oral Direct Thrombin Inhibitor Dabigatran Etxilate in the Long Term Prevention of Recurrent Symptomatic VTE) στρατολόγησαν 2.866 και 1.353 ασθενείς με VTE, αντίστοιχα, που είχαν ολοκληρώσει 3 μήνες θεραπεία. Οι δύο μελέτες συνέκριναν την αποτελεσματικότητα του dabigatran σε δόση 150 mg δύο φορές ημερησίως, με εκείνη της βαρφαρίνης και με εικονικό φάρμακο, αντίστοιχα. Το dabigatran εμφάνισε παρόμοια αποτελεσματικότητα και χαμηλότερο ποσοστό μειζόνων αιμορραγιών σε σύγκριση με τη βαρφαρίνη, αλλά μεγαλύτερο ποσοστό σε σύγκριση με το εικονικό φάρμακο [247].

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3. ΚΥΤΤΑΡΙΚΕΣ ΔΡΑΣΕΙΣ ΤΩΝ ΠΑΡΑΓΟΝΤΩΝ ΠΗΞΗΣ Xa ΚΑΙ ΘΡΟΜΒΙΝΗΣ

Εκτός από το σημαντικό ρόλο που διαδραματίζουν στον καταρράκτη της πήξης, οι FXa και θρομβίνη εμφανίζουν κυτταρικές μη αιμοστατικές δράσεις σε διάφορους κυτταρικούς τύπους που σχετίζονται με ποικίλες φυσιολογικές και παθοφυσιολογικές καταστάσεις, συμπεριλαμβανομένης της φλεγμονής, της αθηροσκλήρωσης και της αγγειογένεσης [197, 248]. Οι κυτταρικές δράσεις του FXa διαμεσολαβούνται από τους PAR-1 και -2, ενώ της θρομβίνης από τον PAR-1. Η πρωτεολυτική δράση των παραγόντων αυτών στον PAR-1 οδηγεί στη διάσπαση του δεσμού R⁴¹-S⁴² και την αποκάλυψη του νέου N-τελικού άκρου S⁴²FLLRN⁴². Η πρωτεολυτική δράση του FXa στον PAR-2 οδηγεί στη διάσπαση του δεσμού R³⁶-S³⁷ και την αποκάλυψη του άκρου S³⁷LIGKV⁴². Η πρωτεολυτική διάσπαση των υποδοχέων οδηγεί στην ενεργοποίηση της σηματοδότησης που εξαρτάται από τις G-πρωτεΐνες.

Ο PAR-1 υπό συγκεκριμένες συνθήκες μπορεί να σχηματίσει ετεροδιμερή με τον PAR-2 και η πρωτεολυτική διάσπαση του PAR-1 από τη θρομβίνη μπορεί να ενεργοποιήσει και τον PAR-2, διαμέσου μιας διαδικασίας που καλείται trans-ενεργοποίηση. Η ταυτόχρονη ενεργοποίησή των PAR-1 και -2 από τη θρομβίνη φαίνεται να εμπλέκεται στην επαγόμενη από τον PAR-1 μετανάστευση καρκινικών κυττάρων και τη μετάσταση. Επιπλέον, μελέτες έχουν δείξει ότι η σηματοδότηση που επάγει ο FXa διαμέσου του PAR-2 είναι σημαντικότερη για την εξέλιξη παθοφυσιολογικών καταστάσεων που συνδέονται με την ενεργοποίηση του καταρράκτη της πήξης [248]. Η ενεργοποίηση του ενός έναντι του άλλου (PAR-1 ή PAR-2) εξαρτάται από τη μορφή του FXa. Ο PAR-1 ενεργοποιείται από τον FXa μόνο στη διαλυτή του μορφή, ενώ ο PAR-2 μπορεί να ενεργοποιηθεί είτε όταν ο FXa είναι διαλυτός, είτε όταν είναι τμήμα του συμπλόκου TF-FVIIa-FXa. Επιπλέον, η έκφραση των υποδοχέων στην κυτταρική επιφάνεια, η αλληλεπίδραση του FXa με άλλες πρωτεΐνες της πήξης, αλλά και ο τύπος του κυττάρου είναι παράγοντες από τους οποίους εξαρτάται ποιος υποδοχέας θα ενεργοποιηθεί από τον FXa [249, 250].

3.1 Ρόλος στη φλεγμονή

Ο FXa ενεργοποιεί τους PAR-1 και -2 που εντοπίζονται στην επιφάνεια των ECs και η σηματοδότηση που πυροδοτείται σχετίζεται με προφλεγμονώδεις και φλεγμονώδεις αποκρίσεις

[248, 251]. Έχει αναφερθεί ότι η σηματοδότηση από τον FXa είναι πιο αποτελεσματική όταν αποτελεί τμήμα του συμπλόκου TF-FVIIa, πιθανότατα επειδή βρίσκεται σε στενότερη αλληλεπίδραση με την κυτταρική μεμβράνη και συνεπώς πιο κοντά στους PARs [250, 252].

Καθώς η αλληλεπίδραση ECs και λευκοκυττάρων είναι βασική για την φλεγμονώδη απόκριση, μόρια που ευνοούν την προσκόλληση των λευκοκυττάρων στα ECs και κυτταροκίνες που είναι διαμεσολαβητές της έκφρασης μορίων προσκόλλησης, συμβάλλουν στη φλεγμονή. Ποικίλες *in vitro* μελέτες με κύτταρα HUVECs (human umbilical vein endothelial cells), έχουν αποδείξει ότι ο FXa επάγει την έκφραση προφλεγμονωδών κυτταροκινών, συμπεριλαμβανομένων των ιντερλευκινών-6 και -8 (interleukin-6 και -8, IL-6 και -8) [253], καθώς και της χημειοτακτικής πρωτεΐνης-1 των μονοκυττάρων MCP-1 (monocyte chemoattractant protein-1, MCP-1) από τα ECs, συμβάλλοντας στη φλεγμονώδη απόκριση [254]. Επιπλέον, ο FXa μεσολαβεί στη μεμβρανική έκφραση της E-σελεκτίνης (η αλλιώς CD62E) και των μορίων προσκόλλησης ICAM-1 (intercellular adhesion molecule-1) και VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule-1), από τα HUVECs, συμβάλλοντας στην προσκόλληση των λευκοκυττάρων [255].

Επιπρόσθετα, ο FXa επάγει την απελευθέρωση του μονοξειδίου του αζώτου (nitric oxide, NO) από τα ECs του αγγειακού τοιχώματος [256], ρυθμίζοντας την αγγειοδιαστολή και προκαλώντας καθυστέρηση στην αλλαγή των επιπέδων των Ca^{2+} στα HUVECs, με χρόνο εξαρτώμενο από τη συγκέντρωση του FXa [257]. Επιπλέον, ο FXa επάγει την έκφραση του TF στα ECs, κυρίως διαμέσου την ενεργοποίησης του πυρηνικού παράγοντα-κB (nuclear factor-κB, NF-κB) [258, 259]. Συγκεκριμένα, καθώς ο υποκινητής του γονιδίου του TF περιέχει θέσεις δέσμησης για τον NF-κB, ενεργοποίηση του NF-κB από τον FXa οδηγεί σε μεταφορά του μεταγραφικού παράγοντα στον πυρήνα και στην αυξημένη έκφραση του [258].

Η κυριότερη λειτουργία των ECs είναι ο σχηματισμός μίας στοιβάδας που επενδύει το αγγειακό τοίχωμα και δημιουργεί ένα ημιπερατό δυναμικό φραγμό ο οποίος ρυθμίζει την αλληλεπίδραση των συστατικών του αίματος με τους υποκείμενους ιστούς. Υπό φυσιολογικές συνθήκες, τα ECs είναι στενά συνδεδεμένα μεταξύ τους, αλληλεπιδρώντας ασθενώς με τα κυκλοφορούντα κύτταρα, ενώ φλεγμονώδεις παράγοντες, κυτταροκίνες και αυξητικοί παράγοντες μπορούν να επηρεάσουν τη λειτουργία τους. Η διάρρηξη του προστατευτικού αυτού τοιχώματος σχετίζεται με την ανάπτυξη παθοφυσιολογικών καταστάσεων, όπως είναι η φλεγμονή. *In vitro* μελέτες προτείνουν ότι η σηματοδότηση που επάγει ο FXa διαμέσου των PAR-1 και -2, οδηγεί

στη μείωση της ενδοθηλιακής διαπερατότητας, προσδίδοντας στον παράγοντα αυτό και αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες [260, 261].

Η φλεγμονή και η πήξη είναι δύο συνδεδεμένες διαδικασίες και έχει αποδειχθεί ότι η φλεγμονή οδηγεί σε ενεργοποίηση του καταρράκτη της πήξης. Συνεπώς, η ενεργοποίηση του καταρράκτη της πήξης και η παραγωγή της θρομβίνης δημιουργούν ένα προφλεγμονώδες περιβάλλον που επηρεάζει το ενδοθήλιο και τα κύτταρα που εμπλέκονται στην ανοσία. Όπως λοιπόν ο FXa, έτσι και η θρομβίνη διαμέσου της ενεργοποίησης του PAR-1 επάγει την έκφραση κυτταροκινών και μορίων προσκόλλησης από διάφορους κυτταρικούς τύπους, συμπεριλαμβανομένων των ECs. Ποικίλες *in vitro* μελέτες σε HUVECs έχουν αποδείξει την επαγόμενη από τη θρομβίνη έκφραση των μορίων προσκόλλησης ICAM-1, VCAM-1, P-σελεκτίνης και E-σελεκτίνης από τα ECs [262, 263]. Η ενεργοποίηση του PAR-1 από τη θρομβίνη και η έκφραση των μορίων ICAM-1 και VCAM-1 από τα ECs διαμεσολαβείται από την ενεργοποίηση του NF-κB [264-266]. Επιπλέον, η θρομβίνη επάγει την έκφραση κυτταροκινών [267], συμπεριλαμβανομένων των MCP-1 [268], IL-1 [269], IL-6 [270] και IL-8 [271] από τα ECs. Η έκφραση του MCP-1 και της IL-8 διαμεσολαβείται από το σηματοδοτικό μονοπάτι της p38 MAP κινάσης [267], ενώ και οι δύο χημειοκίνες φαίνεται να πυροδοτούν την κύλιση και τη σταθερή προσκόλληση των μονοκυττάρων σε ECs που εκφράζουν E-σελεκτίνη υπό συνθήκες ροής [272]. Ακόμη, η θρομβίνη επάγει την έκφραση της προστακυκλίνης, η οποία αποτελεί αγγειοδιασταλτικό παράγοντα και αναστολέα της αιμοπεταλιακής συσσώρευσης από τα ECs, διαμέσου της αύξησης των Ca^{2+} [273, 274].

Τέλος, μελέτες έχουν δείξει ότι η θρομβίνη σε χαμηλές συγκεντρώσεις (20-75 pM) εμφανίζει προστατευτική δράση του ενδοθηλιακού φραγμού, ενώ σε υψηλές συγκεντρώσεις (>100 pM) επάγει σηματοδότηση που προκαλεί τη διάρρηξή του και την αύξηση της ενδοθηλιακής διαπερατότητας [275, 276]. Παράλληλα, η θρομβίνη επάγει τη στρατολόγηση και μετανάστευση των λευκοκυττάρων διαμέσου του ενδοθηλίου, καθώς οδηγεί σε αύξηση της έκφρασης χημειοκινών [277].

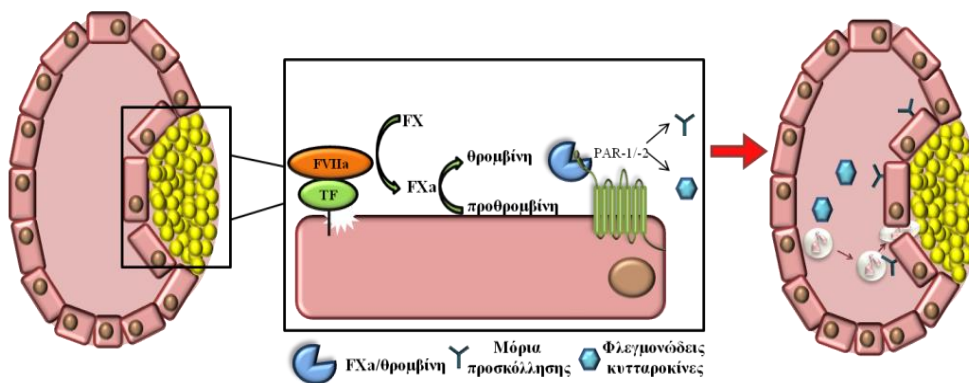
3.2 Ρόλος στην αθηροσκλήρωση

Η αθηροσκλήρωση χαρακτηρίζεται από τη στένωση του αγγείου ως αποτέλεσμα της σταδιακής εναπόθεσης λιποπρωτεϊνών στο αγγειακό τοίχωμα και αποτελεί τη βάση για την ανάπτυξη ποικίλων παθολογικών καταστάσεων, όπως η στεφανιαία νόσος (coronary artery disease, CAD) και το εγκεφαλικό επεισόδιο [278]. Δομικές και λειτουργικές αλλαγές του

αγγειακού τοιχώματος, ενδοθηλιακή δυσλειτουργία, μετανάστευση και πολλαπλασιασμός των SMCs, ίνωση και εναπόθεση κολλαγόνου, μπορούν να συμβάλουν στην ανάπτυξη της αθηροσκλήρωσης [279].

Μελέτες έχουν δείξει ότι εντός των αθηρωματικών πλακών εντοπίζονται πρωτεΐνες της πήξης, προτείνοντας μία σύνδεση μεταξύ του καταρράκτη της πήξης και της αθηροσκλήρωσης [280-282]. Πρωτεΐνες της πήξης όπως οι FXa, FXII, FVII, TF, η προθρομβίνη και η θρομβίνη εντοπίζονται στις αθηρωματικές πλάκες και εμφανίζουν πρωτεολυτική δράση η οποία πιθανώς συμβάλλει στην εξέλιξη της αθηροσκλήρωσης [283, 284]. Επιπλέον, έχει βρεθεί ότι η πρωτεολυτική δράση του TF, των FXa και FXIIa, καθώς και της θρομβίνης είναι περισσότερο ενισχυμένη στα αρχικά στάδια ανάπτυξης των αθηρωματικών πλακών, σε σχέση με τις σταθερές πλάκες [283]. Επιπρόσθετα, φαίνεται ότι πρωτεΐνες του καταρράκτη της πήξης συντίθενται εντός των αθηρωματικών πλακών [283, 285].

Η αυξημένη έκφραση των TF και FVII εντός των αθηρωματικών πλακών οδηγεί σε ενεργοποίηση του εξωγενούς μονοπατιού του καταρράκτη της πήξης και στην συνεπακόλουθη ενεργοποίηση του FX. Η πρωτεολυτική δράση του FXa επάγει την έκφραση φλεγμονωδών κυτταροκινών και μορίων προσκόλλησης διαμέσου των PAR-1 και -2, οδηγώντας στην στρατολόγηση και προσκόλληση των λευκοκυττάρων και άλλων κυττάρων στο αρτηριακό τοίχωμα, συμβάλλοντας στην ανάπτυξη της αθηρωματικής πλάκας. Επιπλέον, η θρομβίνη διαμέσου του PAR-1 φαίνεται να ενισχύει αθηρογενετικές διαδικασίες, όπως είναι η ενδοθηλιακή δυσλειτουργία, η διάρρηξη του ενδοθηλιακού φραγμού, το οξειδωτικό στρες, η απόπτωση και η στρατολόγηση των λευκοκυττάρων, συμβάλλοντας στην ανάπτυξη της αθηρωματικής πλάκας [286]. Ακόμη, η θρομβίνη οδηγεί στην έκφραση φλεγμονωδών κυτταροκινών και μορίων προσκόλλησης διαμέσου του PAR-1, οδηγώντας στην αλληλεπίδραση μονοκυττάρων-ενδοθηλίου αλλά και στην κύλιση, προσκόλληση και μετανάστευση των λευκοκυττάρων διαμέσου του ενδοθηλίου, συμβάλλοντας στην έναρξη της αθηροσκλήρωσης (Εικόνα 3.1) [287].



Εικόνα 3.1 FXa, θρομβίνη και αθηροσκλήρωση. Η αυξημένη πρωτεολυτική δράση του FXa και της θρομβίνης εντός των αθηρωματικών πλακών επάγει την έκφραση μορίων προσκόλλησης και φλεγμονωδών κυτταροκινών διαμέσου της ενεργοποίησης των PAR-1 και -2, οδηγώντας στη στρατολόγηση λευκοκυττάρων στο αγγειακό τοίχωμα και την μετανάστευσή τους εντός της πλάκας, συμβάλλοντας στην ανάπτυξη και την εξέλιξή της.

Επιπλέον, τόσο ο FXa, όσο και η θρομβίνη επάγουν τη μετανάστευση και τον πολλαπλασιασμό των SMCs διαμέσου της ενεργοποίησης του PAR-1, συμβάλλοντας στην εξέλιξη της αθηροσκλήρωσης [288]. Μία πρόσφατη μελέτη έδειξε ότι ο FXa αυξάνει την έκφραση της κινάσης της σφιγγοσίνης-1 και συνεπακόλουθα της φωσφορικής σφιγγοσίνης-1 (sphingosine-1-phosphate, S1P), η οποία αποτελεί ρυθμιστή της ενδοθηλιακής διαπερατότητας και διαμεσολαβητή κυτταρικών λειτουργιών όπως η μετανάστευση, ο πολλαπλασιασμός και η διαφοροποίηση [289, 290]. Η δράσης της S1P ελέγχει τη στρατολόγηση των λευκοκυττάρων και τη λειτουργία των SMCs, συνεπώς σχετίζεται με την ανάπτυξη της αθηρωματικής πλάκας [291].

Συνεπώς, ο FXa και η θρομβίνη επηρεάζουν την εξέλιξη της αθηροσκλήρωσης διαμέσου της ενεργοποίησης των PAR-1 και -2 σε ποικίλους τύπους κυττάρων, οδηγώντας στην ανάπτυξη της αθηρωματικής πλάκας. Έτσι, και οι δύο παράγοντες εμφανίζουν προφλεγμονώδεις λειτουργίες συνδέοντας την πήξη με την αθηροσκλήρωση.

3.3 Ρόλος στην ίνωση και την αγγειογένεση

Η ίνωση αποτελεί μία παθοφυσιολογική κατάσταση κατά την οποία παρατηρείται εκτεταμένη εναπόθεση ινώδους συνδετικού ιστού στο αγγειακό τοίχωμα, μετά από αγγειακό τραυματισμό [292]. Οι ινοβλάστες και οι μυοϊνοβλάστες είναι τα κύτταρα που ρυθμίζουν την ίνωση, διαμέσου της έκκρισης πρωτεϊνών της ECM, όπως ο TF και το κολλαγόνο. Πολλαπλασιασμός και μετανάστευση των ινοβλαστών εντός των περιοχών της βλάβης και η διαφοροποίησή τους σε

μυοϊνοβλάστες ενισχύει την διαδικασία της επούλωσης [293]. Η ίνωση περιλαμβάνει ένα ευρύ φάσμα παθολογικών καταστάσεων κατά τις οποίες όλα τα όργανα επηρεάζονται και υπολειτουργούν [294].

Η αγγειογένεση αποτελεί μία αυστηρά ελεγχόμενη φυσιολογική διαδικασία η οποία οδηγεί στο σχηματισμό νέων αγγείων από τα ECs υπαρχόντων αγγείων, αλλά και στην επούλωση μετά από αγγειακό τραυματισμό. Απορρύθμιση του μηχανισμού της αγγειογένεσης μπορεί να συμβάλει στην εξέλιξη χρόνιας φλεγμονής και σε παθολογικές καταστάσεις ίνωσης. Ο αγγειακός ενδοθηλιακός αυξητικός παράγοντας (vascular endothelial growth factor, VEGF) αποτελεί ρυθμιστή της αγγειογένεσης που προωθεί την ανάπτυξη νέων αγγείων διαμέσου του υποδοχέα του, VEGFR-2, διεγείροντας τον πολλαπλασιασμό και τη μετανάστευση των ECs [295]. Επιπρόσθετα, οι μεταλλοπρωτεάσες της ECM (matrix metalloproteinases, MMPs), αποτελούν πρωτεολυτικά ένζυμα που εμπλέκονται στην αγγειογένεση καθώς αποικοδομούν συστατικά της ECM, επάγοντας τη μετανάστευση των ECs και απελευθερώνοντας τον αποθηκευμένο VEGF [296].

Έχει παρατηρηθεί ότι ο καταρράκτης της πήξης είναι ενεργός κατά την ίνωση και την αγγειογένεση σε ποικίλες παθολογικές καταστάσεις, όπως είναι η αθηροσκλήρωση [297-299]. Ποικίλες μελέτες έχουν υποδείξει το ρόλο του FXa και της θρομβίνης στην ίνωση και την αγγειογένεση διαμέσου της ενεργοποίησης των PAR-1 και -2. Ο FXa αποτελεί έναν ισχυρό χημειοτακτικό παράγοντα για τους ινοβλάστες, καθώς διαμέσου της ενεργοποίησης του PAR-2 επάγει τη μετανάστευσή τους σε σημεία αγγειακού τραυματισμού [300], ενώ διαμέσου της ενεργοποίησης του PAR-1 επάγει τον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίησή τους σε μυοϊνοβλάστες [301]. Οι μυοϊνοβλάστες με τη σειρά τους πολλαπλασιάζονται και εκκρίνουν προαγγειογενετικούς παράγοντες, συμβάλλοντας στην ίνωση και την αγγειογένεση [297]. Επιπλέον, ο FXa αποτελεί διαμεσολαβητή της ενεργοποίησης των ινοβλαστών, οδηγώντας στην έκφραση κυτταροκινών, όπως η IL-6 και ο MCP-1, οι οποίες σχετίζονται με την ίνωση [300, 302]. Ακόμη, ο FXa δεν αποτελεί άμεσο διαμεσολαβητή της αγγειογένεσης, καθώς δεν επάγει τη μετανάστευση και τον πολλαπλασιασμό των ECs [303], αλλά επάγει την έκφραση του VEGF από τους ινοβλάστες και την απελευθέρωση και ενεργοποίηση των MMPs από τα SMCs [304].

Η θρομβίνη εμφανίζει αγγειογενετικές ιδιότητες καθώς, διαμέσου της ενεργοποίησης του PAR-1, επάγει την έκφραση της αγγειοποιητίνης-2 [305], του VEGF και την αυξορρύθμιση των υποδοχέων του VEGF στα ECs [306, 307]. Επιπρόσθετα, συμβάλλει στον πολλαπλασιασμό των

ECs, αλλά και στην έκφραση από αυτά ποικίλων αγγειογενετικών διαμεσολαβητών [308]. Ακόμη, η θρομβίνη διαμέσου του PAR-1 μειώνει την ικανότητα των ECs να προσκολλώνται σε πρωτεΐνες της ECM [309]. Αυτή η δράση της θρομβίνης σε συνδυασμό με την ικανότητά της να ενεργοποιεί την MMP-2 [310], φαίνεται να διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στα αρχικά στάδια της αγγειογένεσης, όπου τα ECs πρέπει να αποκολληθούν από το αγγειακό τοίχωμα για να μεταναστεύσουν και να σχηματίσουν νέα αγγεία.

Όλο και περισσότερα δεδομένα υποστηρίζουν ότι ο VEGF δεν αποτελεί μόνο ρυθμιστή της αγγειογένεσης αλλά και της ίνωσης, η οποία χαρακτηρίζεται από την αυξημένη έκκριση του VEGF από τους ινοβλάστες. Συνεπώς, ο FXa και η θρομβίνη συμβάλλουν στην ίνωση διαμέσου της έκφρασης του VEGF [311, 312].

3.4 Πλειοτροπικές δράσεις των DOACs

Καθώς τόσο ο FXa όσο και η θρομβίνη εμφανίζουν μη αιμοστατικές κυτταρικές δράσεις, όλο και περισσότερες μελέτες διερευνούν τις πιθανές πλειοτροπικές δράσεις των DOACs. *In vivo* μελέτες έχουν αποδείξει την αθηροπροστατευτική δράση του rivaroxaban και του dabigatran. Συγκεκριμένα, σε ApoE^{-/-} ποντίκια με εγκατεστημένη αθηρωματική πλάκα το rivaroxaban μείωσε την έκφραση διαμεσολαβητών της φλεγμονής όπως ο TNF α (tumor necrosis factor α), ο MCP-1 και η IL-6, χωρίς να επηρεάσει την εξέλιξη της πλάκας. Παρ' όλα αυτά, μακροχρόνια χορήγηση του φαρμάκου φαίνεται να οδηγεί σε σταθεροποίηση της αθηρωματικής πλάκας διαμέσου της ενίσχυσης του πάχους της ινώδους κάψας [313]. Μία ακόμη μελέτη έδειξε ότι το rivaroxaban μειώνει την εξέλιξη της αθηρωμάτωσης και οδηγεί στη σταθεροποίηση της, ενώ παράλληλα μειώνει την έκφραση διαμεσολαβητών της φλεγμονής [314]. Επιπρόσθετα, έχει βρεθεί ότι το dabigatran βελτιώνει την ενδοθηλιακή λειτουργία και μειώνει την αθηρωματική πλάκα και το οξειδωτικό στρες σε ApoE^{-/-} ποντίκια [315, 316].

Ακόμη, μελέτες έχουν δείξει ότι τα DOACs εμφανίζουν αντιφλεγμονώδεις δράσεις. Συγκεκριμένα, *in vivo* μελέτες σε ποντίκια έδειξαν ότι το rivaroxaban αναστέλλει την αλληλεπίδραση των λευκοκυττάρων με το ενδοθήλιο και τα αιμοπετάλια [317]. Ακόμη, το rivaroxaban ανέστειλε τον *in vitro* πολλαπλασιασμό και τη μετανάστευση SMCs ποντικού [318]. Επιπρόσθετα, έχει αποδειχθεί ότι το rivaroxaban, το apixaban και το dabigatran αναστέλλουν την έκφραση γονιδίων προφλεγμονωδών παραγόντων, συμπεριλαμβανομένων των ICAM-1 και MCP-1 [319, 320]. Τέλος, μία πρόσφατη κλινική μελέτη που συνέκρινε τις αντιφλεγμονώδεις δράσεις

των rivaroxaban και dabigatran σε ασθενείς με μη βαλβιδική AF έδειξε ότι μεταξύ των δύο φαρμάκων δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά ως προς τη δράση τους [321].

Καθώς η ενεργοποίηση του καταρράκτη της πήξης και η αιμοπεταλιακή συσσώρευση εμπλέκονται στη θρόμβωση, μελέτες έχουν διερευνήσει τη δράση των DOACs στην αναστολή της αιμοπεταλιακής ενεργοποίησης και συσσώρευσης. Έχει βρεθεί ότι το rivaroxaban αναστέλλει την επαγόμενη από το ADP *ex vivo* αιμοπεταλιακή συσσώρευση σε υγιή ποντίκια 2 h μετά από τη χορήγηση του φαρμάκου, ενώ η ανασταλτική του δράση πιθανότατα οφείλεται στην αναστολή της αλληλεπίδρασης των αιμοπεταλίων με άλλα κύτταρα [322]. Ακόμη, έχει βρεθεί ότι το rivaroxaban και το dabigatran αναστέλλουν την επαγόμενη από TF αιμοπεταλιακή συσσώρευση σε ολικό αίμα και πλάσμα πλούσιο σε αιμοπετάλια (platelet-rich plasma, PRP) υγείων εθελοντών, *in vitro* [323]. Το dabigatran έχει βρεθεί ότι αναστέλλει την επαγόμενη από τη θρομβίνη αιμοπεταλιακή συσσώρευση σε PRP υγείων εθελοντών, *in vitro* [324]. Αντίθετα, σε ασθενείς με AF που ελάμβαναν dabigatran, το φάρμακο φαίνεται να ενισχύει την αιμοπεταλιακή συσσώρευση που επάγεται από θρομβίνη, διαμέσου της αύξησης της πυκνότητας του PAR-1 στην επιφάνεια των αιμοπεταλίων [325]. Μελέτες έδειξαν ότι το arixaban και το edoxaban αναστέλλουν την επαγόμενη από τον TF αιμοπεταλιακή συσσώρευση σε PRP υγείων εθελοντών, *in vitro* [326, 327]. Τέλος, έχει βρεθεί ότι το rivaroxaban και το arixaban αναστέλλουν την επαγόμενη από τη θρομβίνη αιμοπεταλιακή συσσώρευση σε ασθενείς με μη βαλβιδική AF, 2 h μετά τη χορήγηση του φαρμάκου. Η παραπάνω δράση εμφανίστηκε μόνο σε ασθενείς που ελάμβαναν την αγωγή πάνω από 7 ημέρες [328]. Αντίθετα, μία άλλη μελέτη σε ασθενείς με AF που ελάμβαναν μακροχρόνια rivaroxaban ή arixaban έδειξε ότι τα δύο φάρμακα δεν αναστέλλουν την αιμοπεταλιακή συσσώρευση ολικού αίματος πριν, 2 και 6 h μετά τη χορήγηση των φαρμάκων από κανέναν αγωνιστή [329].

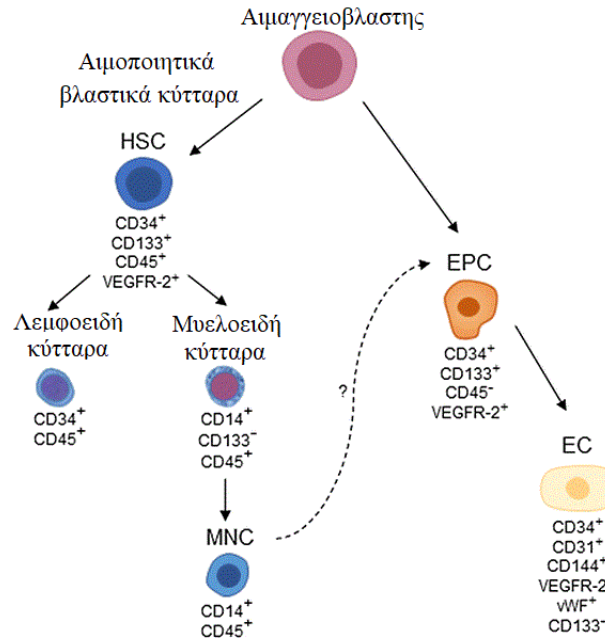
Παρ' όλο που υπάρχουν ενδείξεις για την ύπαρξη πλειοτροπικών δράσεων των DOACs, συχνά τα αποτελέσματα των μελετών είναι αντικρουόμενα, επομένως η πλήρης διαλεύκανση της ύπαρξης των παραπάνω δράσεων χρήζει περαιτέρω διερεύνησης.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4. ΠΡΟΔΡΟΜΑ ΕΝΔΟΘΗΛΙΑΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ

Τα ECs διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη φυσιολογία αλλά και σε παθολογικές καταστάσεις, όπως είναι η αθηροσκλήρωση. Επενδύουν το αγγειακό τοίχωμα και ο κυριότερος ρόλος τους είναι να διατηρούν την ομοιόσταση του αγγειακού τοιχώματος. Επιπρόσθετα, επιτελούν ποικίλες φυσιολογικές λειτουργίες, όπως είναι η αγγειογένεση, η απόκριση στη φλεγμονή και τη σήψη, η στρατολόγηση λευκοκυττάρων, η αποκατάσταση της αγγειακής βλάβης, η μεταβολή των διαδικασιών της πήξης και της ινωδόλυσης, η μεταβολή της ροής του αίματος, η διέλευση κυτταρικών συστατικών από το αίμα στους ιστούς κα [330].

Είναι γνωστό ότι τα ECs εκφράζουν μόρια στην επιφάνειά τους τα οποία αποτελούν διαμεσολαβητές της αλληλεπίδρασης τους με άλλους τύπους κυττάρων, αλλά και υποδοχείς που αναγνωρίζουν διάφορα προσδέματα. Αυτές οι αλληλεπιδράσεις οδηγούν στην ενεργοποίηση του ενδοθηλίου η οποία έχει σαν αποτέλεσμα την έκκριση διαμεσολαβητών της φλεγμονής, όπως είναι οι κυτταροκίνες, οι χημειοκίνες, οι αυξητικοί παράγοντες, αλλά και τη μεταβολή της έκφρασης μορίων που εμπλέκονται στην πήξη και την ινωδόλυση [330].

Τα ECs, ως ώριμα κύτταρα, είναι πλήρως διαφοροποιημένα, εμφανίζουν χαμηλό δυναμικό πολλαπλασιασμού και η ικανότητά τους να επιδιορθώνουν ή να δημιουργούν νέα αγγεία είναι περιορισμένη. Επομένως, η ενδοθηλιακή επιδιόρθωση και η αγγειογένεση απαιτούν τη συμμετοχή και άλλων αγγειογεννητικών κυττάρων. Έχει βρεθεί ότι το περιφερικό αίμα περιέχει πρόδρομα πολυδύναμα κύτταρα που προέρχονται από το μυελό των οστών τα οποία μπορούν να διαφοροποιηθούν σε ECs και χαρακτηρίζονται ως πρόδρομα ενδοθηλιακά κύτταρα (endothelial progenitor cells, EPCs) (Εικόνα 4.1).



Εικόνα 4.1 Σχηματική αναπαράσταση της προέλευσης και διαφοροποίησης των EPCs. Τροποποιημένη εικόνα από την παραπομπή [331].

Τα EPCs μπορούν να απομονωθούν από μυελό των οστών, περιφερικό αίμα ή αίμα από ομφάλιο λώρο και απομονώνονται είτε από μονοκύτταρα (mononuclear cells, MNCs), είτε με μαγνητική επισήμανση εξειδικευμένων αντιγόνων της επιφάνειάς τους, όπως τα CD34, CD31 και CD133 [332-335]. Μετά την απομόνωση, τα MNCs καλλιεργούνται σε τρυβλία επικαλυμμένα με φιβρονεκτίνη ή κολλαγόνο και σε θρεπτικό υλικό με τους κατάλληλους αυξητικούς παράγοντες οι οποίοι ευνοούν την ανάπτυξη κυττάρων που μοιάζουν με ενδοθηλιακά.

4.1 Ταυτοποίηση των EPCs

Η ταυτοποίηση των EPCs είναι δύσκολη κυρίως εξαιτίας του ότι τα κύτταρα αυτά δεν εκφράζουν έναν συγκεκριμένο και εξειδικευμένο δείκτη στην επιφάνειά τους. Αντίθετα, τα EPCs εκφράζουν ποικίλους δείκτες, τόσο αιμοποιητικής βλαστικής, όσο και ενδοθηλιακής προέλευσης.

Ένας από τους σημαντικότερους δείκτες αιμοποιητικής βλαστικής προέλευσης από τα EPCs είναι το αντιγόνο CD34. Το αντιγόνο CD34 αποτελεί μία πρωτεΐνη που εκφράζεται σε πληθώρα κυτταρικών πληθυσμών, συμπεριλαμβανομένων των ECs, με αποτέλεσμα να μην αποτελεί εξειδικευμένο δείκτη των EPCs. Η πρωτεΐνη CD34 είναι διαμεμβρανική με εκτεταμένη εξωκυττάρια περιοχή και μικρή ενδοκυττάρια περιοχή, με μέγεθος 115-120 kDa. Η πρωτεΐνη

CD34 φαίνεται να συμμετέχει σε ποικίλες βιολογικές αποκρίσεις συμπεριλαμβανομένων της ενίσχυσης του πολλαπλασιασμού και την παρεμπόδιση της διαφοροποίησης των βλαστικών ή πρόδρομων κυττάρων, την προσκόλληση λεμφοκυττάρων στο τοίχωμα των αγγείων, την παρεμπόδιση της κυτταρικής προσκόλλησης, τη στρατολόγηση αιμοποιητικών κυττάρων και [336].

Το αντιγόνο KDR (kinase insert domain receptor ή αλλιώς VEGFR-2) αποτελεί μία πρωτεϊνική κινάση τυροσίνης και υποδοχέα του VEGF. Αποτελείται από μία εκτεταμένη εξωκυττάρια περιοχή, μία σύντομη διαμεμβρανική και μία ενδοκυττάρια περιοχή, ενώ η δομή της μοιάζει με εκείνη των ανοσοσφαιρινών. Η πρόσδεση του VEGF στο KDR οδηγεί σε σηματοδότηση στα ECs που σχετίζεται με τον πολλαπλασιασμό, την ανάπτυξη και τη μετανάστευσή τους. Όπως και το CD34, έτσι και το KDR αποτελεί δείκτη που εκφράζεται τόσο στα EPCs, όσο και στα ECs, με αποτέλεσμα να μην αποτελεί εξειδικευμένο δείκτη ταυτοποίησης για τα EPCs. Αντίθετα με το CD34 το οποίο αποτελεί δείκτη αιμοποιητικής βλαστικής προέλευσης, το KDR αποτελεί δείκτη ενδοθηλιακής προέλευσης.

Ένας άλλος δείκτης αιμοποιητικής βλαστικής προέλευσης που εντοπίζεται στην επιφάνεια των EPCs είναι το αντιγόνο CD133. Το CD133 αποτελεί μία γλυκοπρωτεΐνη με 5 διαμεμβρανικές έλικες και μέγεθος 120 kDa. Καθώς δεν εντοπίζεται στην επιφάνεια των ECs, το CD133 αποτελεί ένα εξειδικευμένο δείκτη αιμοποιητικών βλαστικών κυττάρων, ενώ όλο και περισσότερα δεδομένα δείχνουν ότι διαδραματίζει ρόλο στην κυτταρική ανάπτυξη, την ανάπτυξη όγκων και τη μετάσταση [334, 337].

Πέρα από το KDR, τα EPCs εκφράζουν στην επιφάνειά τους και άλλους δείκτες ενδοθηλιακής προέλευσης. Τα κυριότερα είναι τα αντιγόνα CD31, CD146, η αγγειακή ενδοθηλιακή καντχερίνη (vascular endothelial cadherin, VE-C), ο vWF και η συνθάση του NO. Το CD31 αποτελεί ένα μόριο προσκόλλησης, με δομή που μοιάζει με εκείνη των ανοσοσφαιρινών, το οποίο φαίνεται να εμπλέκεται σε σηματοδότηση που σχετίζεται με την προσκόλληση των λευκοκυττάρων, την αιμοπεταλιακή ενεργοποίηση και την αγγειογένεση [338]. Το CD146 αποτελεί ένα μόριο προσκόλλησης με σηματοδοτική λειτουργία που εμπλέκεται στον πολλαπλασιασμό, τη μετανάστευση και την αγγειογένεση [339]. Η VE-C αποτελεί ένα μόριο προσκόλλησης σημαντικό για τη διατήρηση των συνδέσμων μεταξύ των ECs, καθώς και για τον έλεγχο της ενδοθηλιακής διαπερατότητας και της μετανάστευσης των λευκοκυττάρων. Τέλος, η VE-C ρυθμίζει και κυτταρικές διαδικασίες, όπως ο πολλαπλασιασμός και η απόπτωση [340].

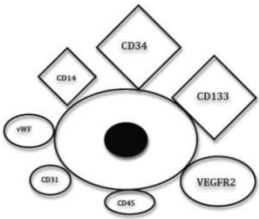
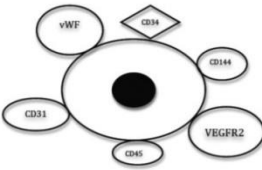
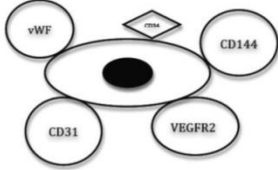
Τα EPCs που προέρχονται από τον μυελό των οστών, εκφράζουν το αντιγόνο CD133 στην επιφάνεια τους και αποτελούν περισσότερο ανώριμα κύτταρα. Ο φαινότυπός τους είναι συνήθως CD133⁺/CD34⁺/KDR⁺/VE-C⁻ [333, 334]. Αντίθετα, τα EPCs που προέρχονται από το περιφερικό αίμα χάνουν την ικανότητα να εκφράζουν CD133, εμφανίζουν φαινότυπο CD34⁺/CD31⁺/KDR⁺/VE-C⁺ και σταδιακά διαφοροποιούνται σε ECs. Τα ECs εκφράζουν υψηλά επίπεδα της KDR, της VE-C, καθώς και του vWF. Συνεπώς, φαίνεται ότι η σταδιακή μείωση της έκφρασης του CD133 αντικατοπτρίζει τη διαφοροποίηση των EPCs σε ECs [341, 342].

Η εύρεση κυττάρων CD133⁺/CD34⁺/KDR⁺ τα οποία χαρακτηρίζονται ως EPCs είναι σπάνια και για το λόγο αυτό, η ανίχνευση ενός τουλάχιστον δείκτη αιμοποιητικής και ενός ενδοθηλιακής προέλευσης, είναι αρκετή για το χαρακτηρισμό των κυττάρων ως EPCs. Κύτταρα CD34⁺/KDR⁺ μπορούν να θεωρηθούν EPCs, ενώ κύτταρα μόνο CD34⁺ μπορούν να χαρακτηριστούν ως πρόδρομα αιμοποιητικά κύτταρα. Καθώς όπως αναφέρθηκε το CD34⁺ εκφράζεται και στα ECs, ο φαινότυπος CD133⁺/KDR⁺ είναι πιο αντιπροσωπευτικός για το χαρακτηρισμό των EPCs [341].

Το μεγαλύτερο ποσοστό των CD34⁺ κυττάρων εκφράζουν στην επιφάνεια τους και το αντιγόνο CD45 που αποτελεί δείκτη λευκοκυττάρων. Το CD45 δεν εκφράζεται στην επιφάνεια των ECs. Έχει βρεθεί ότι κύτταρα CD34⁺/CD45⁺ που προέρχονται από το μυελό των οστών ή από ομφάλιο λώρο, δεν μπορούν να διαφοροποιηθούν σε ECs. Αντίθετα, από κύτταρα CD34⁺/CD45⁻ προκύπτουν αποικίες ECs με υψηλή πολλαπλασιαστική ικανότητα [343]. Συνεπώς, ο φαινότυπος CD133⁺/CD34⁺/KDR⁺/CD45⁻ αποτελεί το φαινότυπο που χαρακτηρίζει EPCs που με σταδιακή μείωση του CD133 διαφοροποιούνται σε ECs.

Λειτουργικά, τα EPCs εμφανίζουν τόσο αιμοποιητικές όσο και ενδοθηλιακές ιδιότητες. Τα κυκλοφορούντα EPCs μπορούν να χωριστούν στα αιμοποιητικής (hematopoietic EPCs, hEPCs) και τα μη αιμοποιητική προέλευσης (non-hematopoietic EPCs, non-hEPCs). Τα hEPCs, προέρχονται από έναν υποπληθυσμό των αιμοποιητικών βλαστικών κυττάρων από το μυελό των οστών και αποτελούν έναν ανομοιογενή πληθυσμό. Τα hEPCs αποτελούν τα πρώιμης ωρίμανσης EPCs (early-EPCs, e-EPCs) και χωρίζονται στα κυκλοφορούντα αγγειογενετικά κύτταρα που εκφράζουν στην επιφάνειά τους CD34, CD133 και KDR [344] και στα κύτταρα που σχηματίζουν αποικίες [345]. Τα non-hEPCs μπορούν να απομονωθούν από ιστούς ή αίμα, χαρακτηρίζονται ως προχωρημένης ωρίμανσης EPCs (late-outgrowth endothelial cells, OECs) και εμφανίζουν φαινότυπο παρόμοιο με αυτό των ECs, ή διαφοροποιούνται σε κύτταρα με παρόμοιο φαινότυπο με τα ECs [344].

Τα e-EPCs εκφράζουν στην επιφάνειά τους CD14, CD31, CD34, CD45, CD133, KDR και vWF, δεν εμφανίζουν μορφολογία ECs, έχουν χαμηλή πολλαπλασιαστική ικανότητα και δεν μπορούν να διαφοροποιηθούν σε ECs. Συνεπώς, δε συμμετέχουν στη *de novo* σύνθεση αγγείων, αλλά ενισχύουν την αγγειογένεση από τα ECs με παρακρινή τρόπο. Τα OECs εκφράζουν στην επιφάνειά τους CD31, CD34, CD146, KDR και vWF, ενώ δεν εκφράζουν τους δείκτες αιμοποιητικής βλαστικής προέλευσης CD14, CD45 και CD133. Επιπλέον, τα OECs εμφανίζουν μορφολογία ECs, υψηλή πολλαπλασιαστική ικανότητα και διαφοροποιούνται προς ECs συμβάλλοντας στο *de novo* σχηματισμό αγγείων και την αγγειογένεση (Εικόνα 4.2) [346].

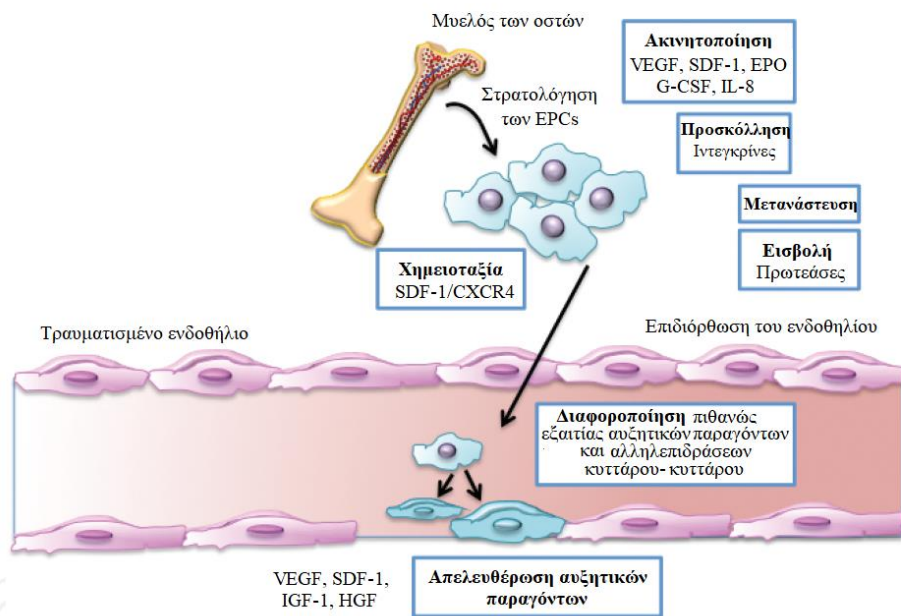
	Early EPC	Late Outgrowth EPC	Ώριμα EC
Χαρακτηριστικά καλλιέργειας	Στρογγυλό σχήμα Εμφάνιση <10 ημέρες Αργός πολλαπλασιασμός	Επίμηκες και πλακώδες σχήμα Εμφάνιση >14 ημέρες Έντονος πολλαπλασιασμός	Ατρακτοειδές σχήμα Χάνουν τη λειτουργικότητά τους μετά από πολλές γενιές
Έκφραση δεικτών επιφανείας			
Λειτουργικά χαρακτηριστικά			
<i>In vitro</i>			
Πρόσληψη Ac-LDL	√√	√√	√√
Σχηματισμός αγγείων	√√	√√√	√√
Μετανάστευση	√√	√√	√√
<i>In vivo</i>			
Σχηματισμός νέων αγγείων	√	√√	-
Ενσωμάτωση σε ήδη υπάρχοντα αγγεία	√√√	√√	-
Βελτίωση της λειτουργίας υπαρχόντων αγγείων	√√	√√	-

Εικόνα 4.2 Διαφοροποίηση των *early EPCs*, *late outgrowth EPCs* και *ώριμων ECs*. Συντμήσεις: Ac-LDL, ακετυλιωμένη LDL, √: μικρού βαθμού ικανότητα, √√: μεσαίου βαθμού ικανότητα, √√√: μεγάλου βαθμού ικανότητα, -: μηδενική ικανότητα. Τροποποιημένη εικόνα από την παραπομπή [347].

4.2 EPCs και παθοφυσιολογία της αθηρωμάτωσης

4.2.1 Τα EPCs στην αναγέννηση του ενδοθηλίου

Τα EPCs που προέρχονται από το μυελό των οστών συμμετέχουν στην επιδιόρθωση των αγγείων μετά από τραυματισμό (Εικόνα 4.3). Έχει αποδειχθεί ότι τα EPCs ενισχύουν την αγγειακή επιδιόρθωση, μειώνουν την υπερπλασία του ενδοθηλίου και την αθηρογένεση. Μελέτη σε ποντίκια μετά από τραυματισμό του ενδοθηλίου στις καρωτιδικές αρτηρίες, έδειξε ότι κύτταρα προερχόμενα από το μυελό των οστών μπορεί να εντοπιστούν στην περιοχή της βλάβης. Επιπλέον, η χορήγηση στατίνης αύξησε τον αριθμό των κυκλοφορούντων EPCs, αλλά και τη στρατολόγηση και προσκόλληση στο ενδοθήλιο κυττάρων προερχόμενων από το μυελό των οστών, οδηγώντας στην ενίσχυση της επανενδοθηλιοποίησης, ενώ συγχρόνως παρατηρήθηκε και μείωση της υπερπλασίας του ενδοθηλίου [348]. Μία ακόμη μελέτη απέδειξε ότι η χορήγηση στατίνης αυξάνει την επανενδοθηλιοποίηση διαμέσου της αύξησης του αριθμού, αλλά και της αυξημένης κινητοποίησης προερχόμενων από το μυελό των οστών EPCs [349].



Εικόνα 4.3 Στρατολόγηση των EPCs και επιδιόρθωση του τραυματισμένου ενδοθηλίου. Τροποποιημένη εικόνα από την παραπομπή [350].

In vivo μελέτες έχουν δείξει ότι η έγχυση απομονωμένων κυκλοφορούντων EPCs σε περιοχές όπου προκλήθηκε βλάβη σε καρωτιδικές αρτηρίες κουνελιών, ενισχύει την επανενδοθηλιοποίηση

και μειώνει την υπερπλασία του ενδοθηλίου [351, 352]. Ακόμη, η έγχυση EPCs σε καρωτιδικές αρτηρίες ποντικών που είχαν υποστεί βλάβη, οδήγησε σε αυξημένη επανενδοθηλιοποίηση και σε μειωμένη υπερπλασία του ενδοθηλίου [353].

Παρά τα δεδομένα που υποδεικνύουν τη συμμετοχή των EPCs στην επιδιόρθωση του ενδοθηλίου, δεν είναι ακόμη βέβαιο ότι τα κύτταρα αυτά συμβάλλουν άμεσα στην επανενδοθηλιοποίηση. Συγκεκριμένα, μία μελέτη συνέκρινε την ικανότητα επανενδοθηλιοποίησης EPCs από υγιείς και διαβητικούς εθελοντές, μετά από έγχυση αυτών σε ποντίκια τα οποία είχαν υποστεί βλάβη στις καρωτιδικές τους αρτηρίες. Η μελέτη αυτή έδειξε ότι τα διαβητικά EPCs, παρά του ότι είχαν παρόμοια έκφραση ενδοθηλιακών δεικτών με τα υγιή EPCs, εμφάνισαν μειωμένη ικανότητα επανενδοθηλιοποίησης εξαιτίας του αυξημένου οξειδωτικού στρες και της επακόλουθης μειωμένης βιοδιαθεσιμότητας του NO [354]. Συνεπώς, από τα παραπάνω δεδομένα προκύπτει ότι οι ευεργετικές ιδιότητες των EPCs στην αναγέννηση του ενδοθηλίου δεν οφείλονται μόνο στην άμεση επιδιορθωτική τους δράση αλλά και σε παρακρινείς δράσεις τους, που διεγείρουν τους μηχανισμούς επιδιόρθωσης.

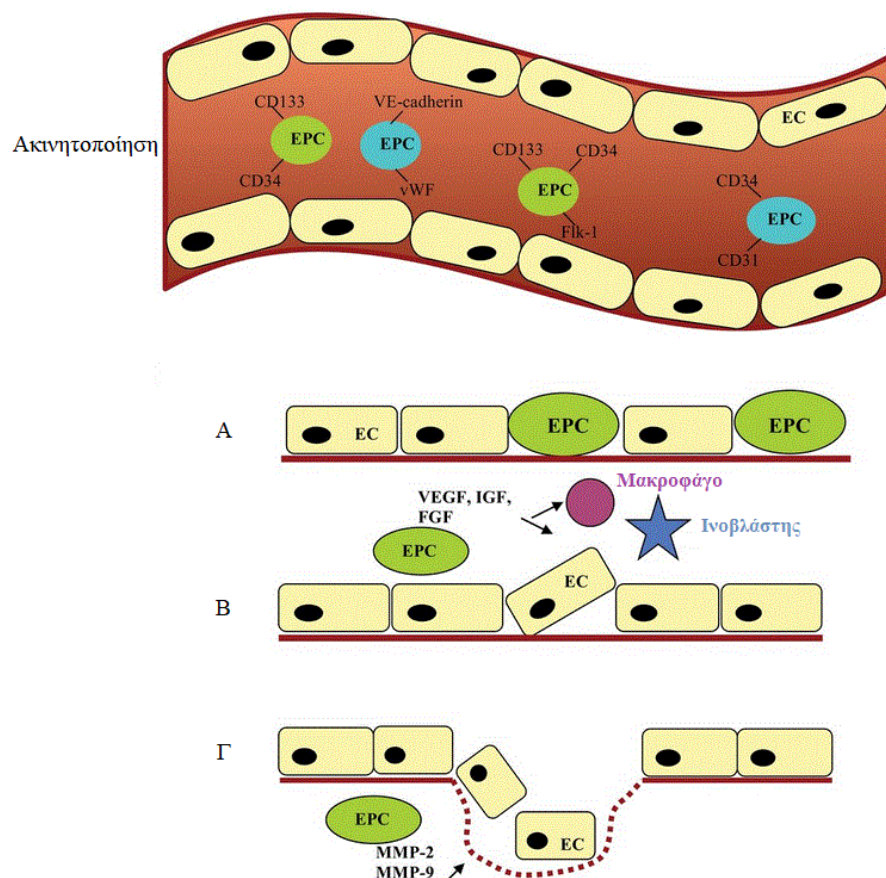
4.2.2 Τα EPCs στην αγγειογένεση

Τα EPCs αποτελούν μία εναλλακτική πηγή ECs και βρίσκουν εφαρμογή στην αναγεννητική ιατρική, καθώς διαφοροποιούνται σε ECs συμμετέχοντας στην αγγειογένεση [355, 356]. Κλινικές μελέτες φάσης I και II στόχευσαν στην αποκατάσταση της ροής του αίματος σε ισχαιμικούς ιστούς χρησιμοποιώντας EPCs [357-362]. Τα EPCs μείωσαν το μέγεθος του εμφράκτου και αύξησαν την αιμάτωση του μυοκαρδίου στην πλειοψηφία των μελετών. Παρά την αποδεδειγμένη ευνοϊκή δράση της έγχυσης EPCs, υπάρχει διχογνωμία σχετικά με το εάν τα EPCs συμμετέχουν άμεσα στη δημιουργία νέων αγγείων ή εάν επάγουν την αγγειογένεση μέσω διαφόρων παρακρινών μηχανισμών [363]. Μελέτες σε πειραματόζωα έδειξαν ότι τα χορηγούμενα EPCs εντοπίζονται για σύντομο χρονικό διάστημα μετά την έγχυσή τους, ενώ φαίνεται να μη συμμετέχουν άμεσα στην αγγειογένεση, αλλά έμμεσα διαμέσου της έκκρισης προαγγειογενετικών παραγόντων [364-366].

Η απόφραξη των περιφερικών ή στεφανιαίων αρτηριών, οδηγεί σε μειωμένη ροή αίματος και συνεπώς σε χαμηλή οξυγόνωση, οδηγώντας στην έκκριση παραγόντων που διεγείρουν την αγγειογένεση. Η δράση του μεταγραφικού παράγοντα HIF-1 (hypoxia-inducible factor-1) σε συνθήκες υποξίας, οδηγεί στην αύξηση της μεταγραφής προαγγειογενετικών παραγόντων, συμπεριλαμβανομένων των VEGF, SDF-1 (stroma cell-derived factor-1), MCP-1 και

αγγειοτενσίνη (angiotensin, Ang)-I [367-369]. Η έκκριση των παραγόντων αυτών, διαμεσολαβεί τη στρατολόγηση των EPCs από το μυελό των οστών ή το περιφερικό αίμα στα σημεία της αγγειογένεσης [370]. Η εξωγενής χορήγηση του VEGF σε πειραματόζωα οδηγεί στην ταχεία στρατολόγηση των EPCs στο περιφερικό αίμα [371]. Ακόμη, σε ασθενείς με σοβαρή στηθάγχη και χωρίς τη δυνατότητα διαδερμικής ή χειρουργικής επανααγγείωσης, ενδομυοκαρδιακή έγχυση ενός πλασμιδίου που κωδικοποιεί τον VEGF, οδήγησε σε αύξηση του αριθμού των EPCs στο περιφερικό αίμα [372]. Επιπλέον, έχει βρεθεί ότι η υπερέκφραση της Ang-I αυξάνει τη μετανάστευση, τον πολλαπλασιασμό και την αγγειογενετική ικανότητα των EPCs [373, 374].

Υπό συνθήκες υποξίας, παρατηρείται αύξηση της ενδοθηλιακής διαπερατότητας ως απόκριση στους παράγοντες VEGF και MCP-1. Η πρόσδεση του VEGF στο KDR και η σηματοδότηση που προκαλείται, οδηγεί σε καταστροφή των ενδοθηλιακών συνδέσμων και στην αύξηση της ενδοθηλιακής διαπερατότητας, ενώ η πρόσδεση του MCP-1 στον υποδοχέα του, ενισχύει την εξαρτώμενη από τον VEGF αύξηση της διαπερατότητας. Η εξαγγείωση των EPCs εξαρτάται από την αλληλεπίδρασή τους με τα ECs και την ενδοθηλιακή διαπερατότητα. Τα ECs αυξάνουν την έκφραση μορίων προσκόλλησης στην επιφάνειά τους, όπως τα ICAM-1 και VCAM-1, ως απόκριση σε προφλεγμονώδη ερεθίσματα. Τα κυκλοφορούντα EPCs αλληλεπιδρούν ασθενώς με τα ECs που επενδύουν το ενδοθήλιο, οδηγώντας στην έκφραση μορίων προσκόλλησης στην επιφάνεια των EPCs, ισχυροποιώντας την αλληλεπίδραση μεταξύ των δύο κυτταρικών τύπων και εκκινώντας τη διαδικασία της μετανάστευσης των EPCs. Μετά τη μετανάστευση τους, τα EPCs συναντούν την ECM και εκκρίνουν MMPs για την αποικοδόμηση των συστατικών της. Η παραπάνω διαδικασία μετανάστευσης και αποικοδόμησης των συστατικών της ECM, οδηγεί στο σχηματισμό σωληνοειδών δομών που δρουν ως βάση για το σχηματισμό των νέων αγγείων. Παρακρινής σηματοδότηση από τα EPCs οδηγεί στην έκφραση αγγειογενετικών παραγόντων που διεγείρουν τον πολλαπλασιασμό των ECs ώστε να καλύψουν τις σχηματιζόμενες από τα EPCs σωληνοειδείς δομές, σχηματίζοντας ένα λειτουργικό και ώριμο νέο αγγείο (Εικόνα 4.4) [363, 375].



Εικόνα 4.4 Σχηματική απεικόνιση της ακινητοποίησης των EPCs και της συμβολής τους στην αγγειογένεση. Τα EPCs ακινητοποιούνται και εισβάλλουν σε σημεία ισχαιμίας όπου συμμετέχουν στην αγγειογένεση. (Α) Τα EPCs ενσωματώνονται άμεσα στα σημεία της βλάβης επιδιορθώνοντας το ενδοθήλιο. (Β) Τα EPCs εκφράζουν αγγειογενετικούς παράγοντες στα σημεία ισχαιμίας και συμβάλλουν στην αγγειογένεση με παρακρινή τρόπο. Οι παράγοντες αυτοί στρατολογούν κυκλοφορούντα ECs, ινοβλάστες και μακροφάγα στο σημείο ισχαιμίας, συμβάλλοντας στην αγγειογένεση και την επιδιόρθωση της βλάβης. (Γ) Τα EPCs εκκρίνουν μεταλλοπρωτεάσες που οδηγούν στην αποικοδόμηση των συστατικών της ECM, επιτρέποντας την μετανάστευση των ECs και την αγγειακή αναδιαμόρφωση. Συντμήσεις: IGF (insulin-like growth factor), αυξητικός παράγοντας που μοιάζει με την ινσουλίνη. FGF (fibroblast growth factor), αυξητικός παράγοντας ινοβλαστών. MMPs (metalloproteases), μεταλλοπρωτεάσες. Τροποποιημένη εικόνα από την παραπομπή [376].

Πέραν των ευεργετικών ιδιοτήτων των EPCs, μελέτες έχουν αποδείξει τη συμβολή τους στην ανάπτυξη διαφόρων μορφών καρκίνου και στη μετάσταση, εξαιτίας της συμμετοχής τους στην αγγειογένεση [377-379]. Έχει βρεθεί ότι ο αριθμός των EPCs είναι αυξημένος σε ποικίλους τύπους καρκίνου, ενώ τα EPCs φαίνεται να συμβάλλουν στην ανάπτυξη των όγκων σε πρώιμα αλλά και μεταγενέστερα στάδια [380].

4.2.3 Τα EPCs στην αθηροσκλήρωση

Η ενδοθηλιακή δυσλειτουργία προάγει την διατάραξη της ομοιόστασης του ενδοθηλίου, και σχετίζεται με την αθηροσκλήρωση. Συγκεκριμένα, παράγοντες κινδύνου που σχετίζονται με την αθηροσκλήρωση όπως, το κάπνισμα, η υπερλιπιδαιμία και η υπέρταση, οδηγούν σε οξειδωτικό στρες επηρεάζοντας τη λειτουργία του ενδοθηλίου. Δραστικές μορφές οξυγόνου (reactive oxygen species, ROS) παράγονται από τις βιοχημικές αντιδράσεις εντός των κυττάρων. Υπό φυσιολογικές συνθήκες υπάρχει μία ισορροπία στην παραγωγή των ROS και στην απομάκρυνση τους από αντιοξειδωτικούς παράγοντες και ένζυμα [381]. Το οξειδωτικό στρες προκύπτει όταν διαταραχθεί αυτή η ισορροπία και υπάρχει αυξημένη έκφραση των ROS, αλλά και όταν οι αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί είναι ανεπαρκείς. Συνεπώς, οι ROS αποτελούν δευτερογενείς αγγελιοφόρους που παράγονται ως απόκριση σε περιβαλλοντικό στρες.

Έχει αποδειχθεί ότι, η ενδοθηλιακή δυσλειτουργία εξαιτίας του οξειδωτικού στρες διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη της αθηροσκλήρωσης. Τα ECs, τα SMCs και τα μακροφάγα αποτελούν πηγές ROS. Οι ROS περιορίζουν τη βιοδιαθεσιμότητα του NO και αυξάνουν την έκφραση φλεγμονωδών γονιδίων, την ανάπτυξη των κυττάρων, την απόπτωση, τη μετανάστευση, την αναδιοργάνωση της ECM, μηχανισμοί που διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη και την εξέλιξη της αθηροσκλήρωσης [382]. Επιπλέον, μελέτες έχουν δείξει ότι η ενδοθηλιακή δυσλειτουργία συμβαίνει στα αρχικά στάδια της αθηρογένεσης και οδηγεί στην αύξηση της διαπερατότητας του ενδοθηλίου, καθώς και στην έκφραση μορίων προσκόλλησης [383]. Τα παραπάνω έχουν σαν αποτέλεσμα την είσοδο λιποπρωτεϊνών και λευκοκυττάρων στον υποενδοθηλιακό χώρο, συμβάλλοντας στο σχηματισμό και την εξέλιξη των αθηρωματικών πλακών [384].

Κλινικές μελέτες έχουν δείξει ότι ο αριθμός των κυκλοφορούντων EPCs είναι αντιστρόφως ανάλογος με τους παράγοντες κινδύνου της αθηροσκλήρωσης. Οι καρδιαγγειακοί παράγοντες κινδύνου φαίνεται να σχετίζονται άμεσα με μειωμένο αριθμό κυκλοφορούντων EPCs και

μειωμένη λειτουργικότητα [385-387]. Όλες οι εκφάνσεις της CVD σχετίζονται με μειωμένο αριθμό κυκλοφορούντων EPCs και μειωμένη ικανότητα μετανάστευσής τους. Επιπλέον, τα κυκλοφορούντα CD34⁺/KDR⁺ κύτταρα βρίσκονται σε χαμηλά επίπεδα σε ασθενείς με CAD [388-390]. Αγγειοπροστατευτικοί παράγοντες αυξάνουν τον αριθμό των κυκλοφορούντων EPCs και τη λειτουργικότητά τους, βελτιώνοντας την ενδοθηλιακή λειτουργία και αποτρέποντας την εξέλιξη της αθηροσκλήρωσης. Πράγματι, μελέτες έδειξαν ότι η χρόνια θεραπεία με EPCs από μυελό των οστών νεαρών ApoE^{-/-} ποντικών χωρίς ανεπτυγμένη αθηρωματική πλάκα, μειώνει την εξέλιξη της αθηρωμάτωσης σε ApoE^{-/-} ποντίκια, ανεξάρτητα από την υπερχοληστερολαιμία. Αντίθετα, τα EPCs από το μυελό των οστών από γηραιότερα ApoE^{-/-} ποντίκια με αθηροσκλήρωση δεν αποτέλεσαν τόσο αποτελεσματική θεραπεία. Η παραπάνω μελέτη απέδειξε ότι η έλλειψη του γονιδίου της ApoE, πιθανώς δεν επηρεάζει την αποτελεσματικότητα των EPCs ως προς την αγγειακή επιδιόρθωση, αλλά η χρόνια θεραπεία με EPCs από γηραιά και με υπερχοληστερολαιμία ApoE^{-/-} ποντίκια εξασθενεί σημαντικά την επιδιορθωτική τους ικανότητα [391]. Ακόμη, μελέτες έχουν αποδείξει ότι αυξημένος αριθμός των EPCs σχετίζεται με χαμηλότερο ποσοστό καρδιαγγειακών συμβάντων, υπογραμμίζοντας την αγγειοπροστατευτική δράση των EPCs [392, 393]. Τέλος, έχει προταθεί ότι ο αριθμός των EPCs μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως προγνωστικός βιοδείκτης του καρδιαγγειακού κινδύνου και της αγγειακής λειτουργίας [345].

Βέβαια, τα EPCs δεν έχουν πάντα ευεργετικές ιδιότητες. ApoE^{-/-} ποντίκια που έλαβαν MNCs από μυελό των οστών μετά από προκαλούμενη ισχαιμία στα πίσω άκρα, εμφάνισαν αυξημένη νεοαγγειογένεση στις περιοχές με χαμηλή οξυγόνωση, αλλά και αυξημένο σχηματισμό της αθηρωματικής πλάκας σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου [394]. Σε μία επιπλέον μελέτη, ποντίκια που έλαβαν θεραπεία με EPCs εμφάνισαν επίσης αυξημένο σχηματισμό της αθηρωματικής πλάκας, αλλά και μειωμένη σταθερότητα της πλάκας [395].

4.3 Αλληλεπιδράσεις των EPCs με τα αιμοπετάλια

Κατά την αθηρογένεση παρατηρείται μία ισορροπία ανάμεσα στην ενδοθηλιακή βλάβη και επιδιόρθωση. Η αποτυχημένη ενδοθηλιακή επιδιόρθωση συνδέεται με τη φλεγμονή και το σχηματισμό της αθηρωματικής πλάκας. Υπό φυσιολογικές συνθήκες, η ακεραιότητα του ενδοθηλίου μετά από αγγειακή βλάβη επαναφέρεται από τον πολλαπλασιασμό των παρακείμενων ECs, ενώ υπό συνθήκες εκτεταμένης ενδοθηλιακής βλάβης η αγγειακή επιδιόρθωση υποβοηθείται από τα στρατολογούμενα EPCs. Μελέτες έχουν αποδείξει ότι τα προσκολλημένα στο

τραυματισμένο ενδοθήλιο αιμοπετάλια, συμβάλλουν στη στρατολόγηση των EPCs, *in vitro* και *in vivo*, και επάγουν τη διαφοροποίησή τους είτε προς ECs, είτε προς αφρώδη κύτταρα [396-398].

Η στρατολόγηση των EPCs στο τραυματισμένο ενδοθήλιο διαμεσολαβείται από τα αποπτωτικά ECs. Συγκεκριμένα, η απόπτωση των ECs οδηγεί στην αποκάλυψη συστατικών του υποενδοθηλιακού χώρου, όπως το κολλαγόνο, και στην επακόλουθη στρατολόγηση και ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων [399]. Τα ενεργοποιημένα αιμοπετάλια εκφράζουν στην επιφάνεια τους μόρια που υποβοηθούν τη στρατολόγηση των EPCs. Συνεπώς, η αλληλεπίδραση των EPCs με το τραυματισμένο ενδοθήλιο γίνεται διαμέσου των αιμοπεταλίων και έχει σαν αποτέλεσμα τη διαφοροποίησή τους προς ECs [400]. Επιπρόσθετα, έχει βρεθεί ότι όταν καλλιέργειες EPCs εκτεθούν σε αιμοπετάλια, η ικανότητα των EPCs να σχηματίζουν αποικίες, να πολλαπλασιάζονται, να μεταναστεύουν και να εκφράζουν ενδοθηλιακούς δείκτες, ενισχύεται [396, 401]. Σε *in vitro* πειράματα έχει αποδειχθεί ότι η αλληλεπίδραση μεταξύ των αιμοπεταλίων και των EPCs συμβαίνει σε στατικές αλλά και σε συνθήκες ροής [402, 403]. Οι παρατηρήσεις αυτές ενισχύονται και από *in vivo* πειράματα με τραυματισμένες καρωτίδες ποντικών που έδειξαν ότι τα αιμοπετάλια παρέχουν το σήμα για τη στρατολόγηση πρόδρομων κυττάρων που προέρχονται από το μυελό των οστών στα σημεία της αγγειακής βλάβης [404].

Σε παθολογικές καταστάσεις τα αιμοπετάλια μπορεί να οδηγήσουν στη διαφοροποίηση των EPCs σε αφρώδη κύτταρα. Ο σχηματισμός των αφρωδών κυττάρων φαίνεται να διαμεσολαβείται από την οξειδωμένη LDL η οποία προσδένεται και ενεργοποιεί τα αιμοπετάλια. Η φαγοκυττάρωση των αιμοπεταλίων που προσδένουν την οξειδωμένη LDL, οδηγεί στο σχηματισμό αφρωδών κυττάρων, συμβάλλοντας στα πρώιμα στάδια της αθηρογένεσης [396]. Η ισορροπία μεταξύ της διαμεσολαβούμενης από τα αιμοπετάλια διαφοροποίησης των EPCs σε ECs ή σε αφρώδη κύτταρα μπορεί να καθορίζει το βαθμό και την εξέλιξη της αθηροσκλήρωσης.

4.4 Οι κυριότερες λειτουργίες των ECs

Τα ECs επιτελούν ποικίλες λειτουργίες οι οποίες αναλύονται παρακάτω:

- ✓ Φυσιολογική ροή του αίματος και αιμόσταση

Υπό φυσιολογικές συνθήκες, εντός των αγγείων και των φλεβών το αίμα ρέει ερχόμενο σε επαφή με το μη θρομβογόνο εν ηρεμία ενδοθήλιο. Τα εν ηρεμία αιμοπετάλια και τα λευκοκύτταρα δεν προσκολλώνται στην επιφάνεια των ECs. Τα υποενδοθηλιακά συστατικά είναι ισχυρά

θρομβογόνα και έκθεσή τους στη ροή του αίματος μετά από αγγειακό τραυματισμό, οδηγεί στο σχηματισμό θρόμβου. Συνεπώς, το ενδοθήλιο διατηρεί την ισορροπία μεταξύ αιμόστασης και θρόμβωσης.

Η διάρρηξη της συνέχειας του ενδοθηλίου, οδηγεί στην έκθεση του vWF και του κολλαγόνου στη ροή του αίματος, οδηγώντας στην προσκόλληση των αιμοπεταλίων στο σημείο της βλάβης (Βλ. Κεφάλαιο 1). Επιπρόσθετα, τα ECs συνθέτουν τον παράγοντα ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων, που προάγει τόσο την προσκόλληση όσο και την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων [405]. Υπό φυσιολογικές συνθήκες, η ενεργοποίηση και συσσώρευση των αιμοπεταλίων οδηγεί στην απελευθέρωση από τα ECs της PGI₂ και του NO, περιορίζοντας τη συσσώρευση και αποτρέποντας τη θρόμβωση [406, 407].

✓ Διαπερατότητα

Το ενδοθήλιο αποτελεί ένα ημιπερατό φραγμό που ελέγχει τη μεταφορά συστατικών από το αίμα στους ιστούς και αντίστροφα. Μικρά μόρια και υγρά μπορούν να περάσουν ανάμεσα από τα ECs, μεγάλα μόρια μπορούν να περάσουν είτε ανάμεσα από τα ECs, είτε μέσα από τα ECs [408, 409].

✓ Στρατολόγηση και μετανάστευση των λευκοκυττάρων

Η αλληλεπίδραση των ECs με τα λευκοκύτταρα συμβάλλει στην ανοσολογική απόκριση, στην επιδιόρθωση βλαβών, τη θρόμβωση, καθώς και την οξεία και χρόνια φλεγμονή. Η μετανάστευση των λευκοκυττάρων στους ιστούς διαμέσου του ενδοθηλίου, είναι μία πολύπλοκη διαδικασία που απαιτεί τη χαλαρή προσκόλληση, την κύλιση και τη σταθερότερη προσκόλληση τους στα ECs.

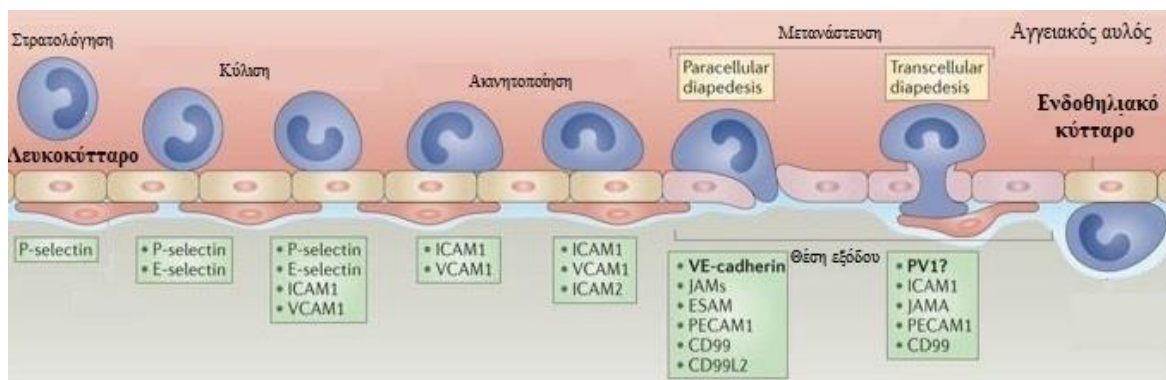
Υπό φυσιολογικές συνθήκες τα λευκοκύτταρα δεν προσκολλώνται στα ECs. Η ενεργοποίηση και των δύο κυτταρικών τύπων οδηγεί στην έκφραση μορίων προσκόλλησης στην επιφάνεια τους οδηγώντας στη χαλαρή προσκόλληση των λευκοκυττάρων στα ECs. Τα κυριότερα μόρια προσκόλλησης είναι οι σελεκτίνες, που αποτελούν διαμεμβρανικές γλυκοπρωτεΐνες με σημαντικά δομική ομολογία. Τα ECs εκφράζουν στην επιφάνειά τους την P- και E-σελεκτίνη, ενώ τα λευκοκύτταρα την L-σελεκτίνη [410].

Στα εν ηρεμία ECs, η P-σελεκτίνη βρίσκεται αποθηκευμένη στα κοκκία Weibel-Palade (Weibel-Palade bodies, WPBs), ενώ μετά από ενεργοποίηση εκφράζεται ταχέως στην ενδοθηλιακή επιφάνεια. Η E-σελεκτίνη δεν υπάρχει αποθηκευμένη στα εν ηρεμία ECs, αλλά

εκφράζεται κατά την ενεργοποίηση διαμέσου μεταγραφικής ρύθμισης. Η P- και η E-σελεκτίνη διαμεσολαβούν στην προσκόλληση και την κύλιση των λευκοκυττάρων επάνω στο ενδοθήλιο. Ο κυριότερος υποδοχέας των λευκοκυττάρων για τις δύο σελεκτίνες είναι ο γλυκοπρωτεϊνικός προσδέτης της P-σελεκτίνης (P-selectin glycoprotein ligand, PSGL-1) [411].

Η κύλιση των λευκοκυττάρων στο ενδοθήλιο προκαλεί τη στενότερη επαφή μεταξύ των κυττάρων και την ενεργοποίηση των λευκοκυττάρων από ενδοθηλιακές χημειοκίνες, οδηγώντας σε διαμορφωτικές αλλαγές των ιντεγκρινών της επιφάνειάς τους. Οι ιντεγκρίνες των λευκοκυττάρων αλληλεπιδρούν με ενδοθηλιακά μόρια προσκόλλησης όπως τα ICAM-1, VCAM-1, PECAM-1 (platelet-endothelial cell adhesion molecule-1) και JAM (junctional adhesion molecule), οδηγώντας στη σταθερότερη προσκόλληση. Το ICAM-1 εκφράζεται στην επιφάνεια των εν ηρεμία ECs και διαμεσολαβεί τόσο την κύλιση όσο και τη σταθερότερη προσκόλληση των λευκοκυττάρων. Το VCAM-1 εκφράζεται σε μικρό βαθμό στα εν ηρεμία ECs, αλλά η έκφρασή του αυξάνεται ταχέως από φλεγμονώδεις διαμεσολαβητές, συμμετέχοντας τόσο στην κύλιση όσο και στην προσκόλληση των λευκοκυττάρων [410]. Η έκφραση των μορίων ICAM-1 και VCAM-1 επάγεται από διάφορους αγωνιστές, συμπεριλαμβανομένων της θρομβίνης και του FXa.

Η μετανάστευση των λευκοκυττάρων μπορεί να πραγματοποιηθεί είτε διαμέσου δια-ενδοθηλιακών συνδέσμων που σχηματίζονται μεταξύ των ECs (paracellular diapedesis), είτε μέσα από το ενδοθηλιακό κύτταρο (transcellular diapedesis) (Εικόνα 4.5) [412-414].



Εικόνα 4.5 Στρατολόγηση και μετανάστευση των λευκοκυττάρων διαμέσου του ενδοθηλίου. Τροποποιημένη εικόνα από την παραπομπή [415].

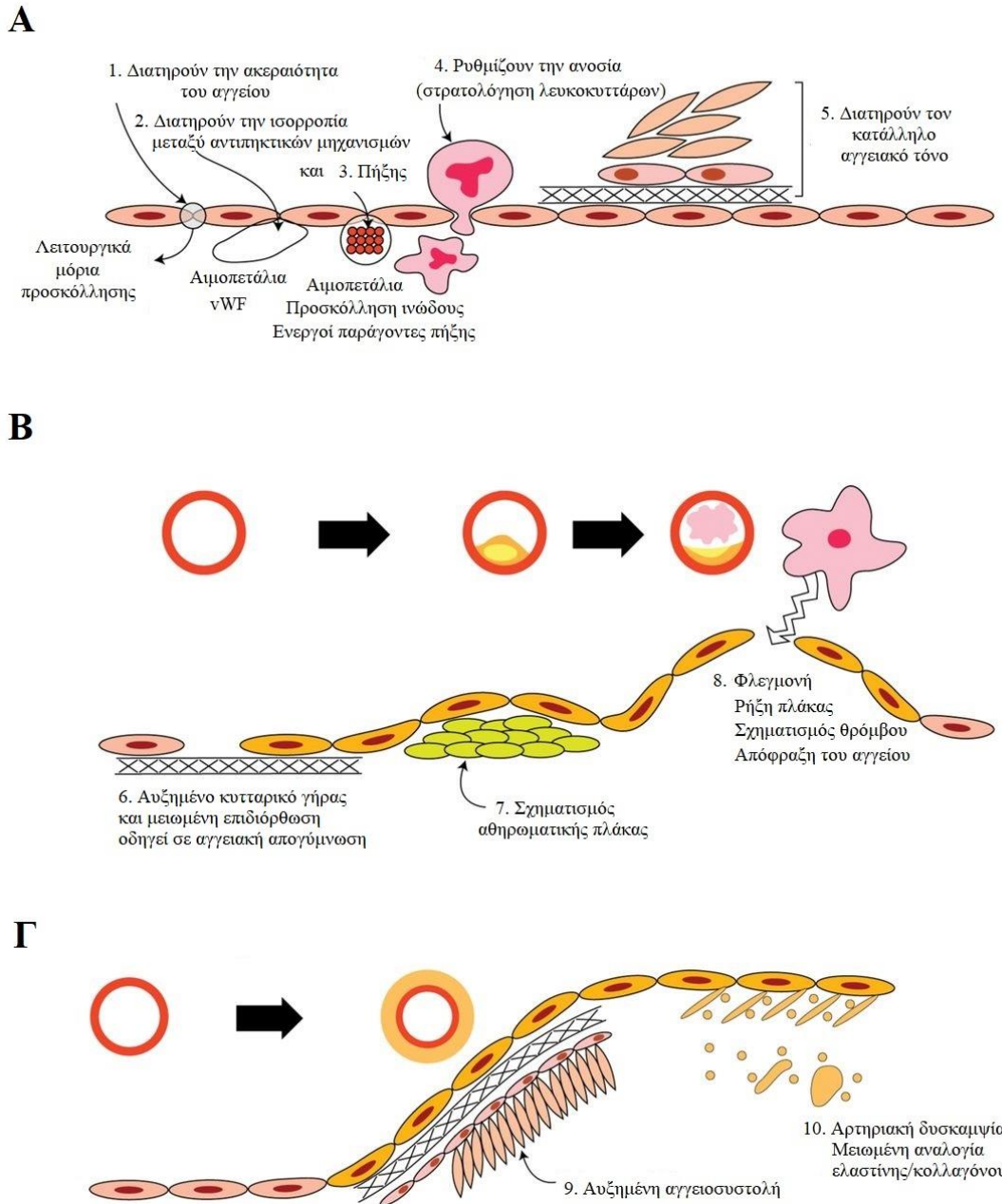
✓ Αγγειογένεση

Η αγγειογένεση εξαρτάται από αγγειογενετικούς παράγοντες που εκκρίνονται από υποξικούς ιστούς και οδηγούν στην ενεργοποίηση των ECs τα οποία πολλαπλασιάζονται πολύ γρήγορα και μεταναστεύουν στο σημείο που απαιτείται η αγγειογένεση. Η μετανάστευση των ECs απαιτεί τη “χαλάρωση” των ενδοθηλιακών συνδέσμων, αύξηση της ενδοθηλιακής διαπερατότητας, αλλά και την αποικοδόμηση των συστατικών της ECM και της βασικής μεμβράνης [416, 417].

Στην αποικοδόμηση της ECM εμπλέκονται ποικίλες πρωτεϊνικές οικογένειες, συμπεριλαμβανομένων των MMPs, των ενεργοποιητών του πλασμινογόνου, τρυπτάσες, καθεψίνες, καθώς και οι αναστολείς τους. Οι παραπάνω πρωτεΐνες οδηγούν στην απελευθέρωση από την ECM αυξητικών παραγόντων με αγγειογενετικές ιδιότητες, συμπεριλαμβανομένων των VEGF, TNF α κα. Καθώς η φυσιολογική αγγειογένεση αποτελεί μία ελεγχόμενη διαδικασία, από την ECM απελευθερώνονται και αναστολείς της, όπως η θρομβοσπονδίνη-1, η αρρεστίνη, η αγγειοστατίνη κα. Μετά από τη διάρρηξη του ενδοθηλιακού φραγμού από τους αυξητικούς παράγοντες και εξαιτίας των χημειοκινών που παράγονται, τα ECs πολλαπλασιάζονται και μεταναστεύουν [418]. Από τους αυξητικούς παράγοντες που απελευθερώνονται σε συνθήκες υποξίας, ο σημαντικότερος είναι ο VEGF, ο οποίος επάγει τον πολλαπλασιασμό και τη μετανάστευση των ECs, ενώ στη διαδικασία της αγγειογένεσης συμβάλλουν σημαντικά η αγγειοποιητίνη-1, ιντεγκρίνες και χημειοκίνες. Ο VEGF φαίνεται να εμπλέκεται επίσης και στο σχηματισμό των νέων αγγείων, καθώς προάγει το σχηματισμό από τα ECs σωληνοειδών δομών [419, 420].

4.4.1 Ενδοθηλιακή δυσλειτουργία

Η ενεργοποίηση του ενδοθηλίου από εκκρινόμενους παράγοντες μετά από αγγειακό τραυματισμό και η αναγέννηση του ενδοθηλίου είναι αυστηρά ελεγχόμενες διαδικασίες. Τα ECs παράγουν αγγειοδιασταλτικούς και συσταλτικούς παράγοντες, προπηκτικούς και αντιπηκτικούς παράγοντες, φλεγμονώδεις και αντιφλεγμονώδεις παράγοντες, ινωδολυτικούς και αντινωδολυτικούς παράγοντες, οξειδωτικούς και αντιοξειδωτικούς παράγοντες, διατηρώντας μία ισορροπία μεταξύ των διαδικασιών που επιτελεί το ενδοθήλιο [421]. Δυσλειτουργία του ενδοθηλίου διαταράσσει την παραπάνω ισορροπία, συμβάλλοντας στην ανάπτυξη ποικίλων παθολογικών καταστάσεων όπως είναι η αθηροσκλήρωση, καθώς και η αρτηριακή και φλεβική θρόμβωση (Εικόνα 4.6).



Εικόνα 4.6 Ο ρόλος των ECs υπό φυσιολογικές και παθολογικές συνθήκες. (A) Υπό φυσιολογικές συνθήκες τα ECs διατηρούν την 1. ακεραιότητα του ενδοθηλίου, 2. την ισορροπία μεταξύ των αντιπηκτικών και 3. πηκτικών μηχανισμών 4. ρυθμίζουν το μηχανισμό της ανοσίας διαμέσου της στρατολόγησης των λευκοκυττάρων και 5. διατηρούν τον αρτηριακό τόνο. (B) και (Γ) Αντίθετα, υπό παθολογικές καταστάσεις, γηρασμένα ECs με μειωμένη ικανότητα επιδιόρθωσης οδηγούν σε 6. αγγειακή απογύμνωση, 7. σχηματισμό αθηρωματικής πλάκας και 8. ρήξη, θρόμβωση και αγγειακή απόφραξη, καθώς επίσης και σε 9. αυξημένη αγγειοσυστολή και 10. αρτηριακή δυσκαμψία. Τροποποιημένη εικόνα από την παραπομπή [347].

Τα περισσότερα ερεθίσματα που προκαλούν αγγειοδιαστολή οδηγούν σε απελευθέρωση του NO. Το NO ως μικρό και λιπόφιλο μόριο, διαχέεται εύκολα διαμέσου των κυτταρικών μεμβρανών και φτάνει στους λείους μύες του αρτηριακού τοιχώματος όπου αποικοδομεί το GTP απελευθερώνοντας cGMP. Το cGMP ρυθμίζει τα επίπεδα των κυτοσολικών Ca^{2+} προκαλώντας χαλάρωση των λείων μυϊκών ινών και αγγειοδιαστολή [422]. Το NO επιπλέον μειώνει την ενδοθηλιακή διαπερατότητα, αναστέλλει την αιμοπεταλιακή συσσώρευση, την οξειδωση των ιστών, τον πολλαπλασιασμό και τη μετανάστευση των κυττάρων, την έκφραση προφλεγμονωδών και προαθηρογόνων κυτταροκινών. Αντίθετα, η Ang-II αποτελεί ανταγωνιστή του NO, προκαλώντας αγγειοσυστολή, προαθηρογόνες και οξειδωτικές δράσεις, ενώ ευνοεί την έκφραση μορίων προσκόλλησης και την προσκόλληση των λευκοκυττάρων. Συνεπώς, το NO θεωρείται αντιαθηρογόνο μόριο [423], ενώ η Ang-II προαθηρογόνο μόριο [424]. Επιπρόσθετα, η PGI_2 αποτελεί ένα σημαντικό αγγειοδιασταλτικό παράγοντα, η οποία οδηγεί στην απελευθέρωση cAMP από το ATP, ρυθμίζοντας επίσης τα επίπεδα των Ca^{2+} .

Η ενδοθηλιακή δυσλειτουργία χαρακτηρίζεται από τη μειωμένη παραγωγή NO και αυξημένη σύνθεση Ang-II, λόγω παρατεταμένης έκθεσης σε οξειδωτικό στρες που οφείλεται σε ποικίλους παράγοντες κινδύνου. Η κατάσταση αυτή ευνοεί την αιμοπεταλιακή συσσώρευση και την προσκόλληση λευκοκυττάρων στο ενδοθήλιο, καθώς και την ενεργοποίηση κυτταροκινών με αποτέλεσμα την αύξηση της ενδοθηλιακής διαπερατότητας σε οξειδωμένες λιποπρωτεΐνες και φλεγμονώδεις διαμεσολαβητές, οδηγώντας τελικά σε καταστροφή της δομής του αγγειακού τοιχώματος, τον πολλαπλασιασμό των SMCs και την ανάπτυξη της αθηρωματικής πλάκας [425].

4.3.2 Αλληλεπίδραση του ενδοθηλίου με τα αιμοπετάλια και τα λευκοκύτταρα

Η προσκόλληση των αιμοπεταλίων και των λευκοκυττάρων στο ενδοθήλιο αποτελούν τα αρχικά στάδια μιας διαδικασίας πολλών σταδίων που οδηγεί στην έξοδο των λευκοκυττάρων από την κυκλοφορία και την είσοδό τους εντός των αγγείων στα σημεία φλεγμονής ή μόλυνσης, με τελικό αποτέλεσμα την απόφραξη των αγγείων. Η στρατολόγηση των αιμοπεταλίων και των λευκοκυττάρων στα σημεία αγγειακής βλάβης είναι μία γρήγορη διαδικασία που διαμεσολαβείται από την απελευθέρωση του περιεχομένου των WPBs των ECs, και κυρίως από τον vWF και την P-σελεκτίνη. Ο PSGL-1 εκφράζεται στην επιφάνεια των ουδετεροφίλων, των μονοκυττάρων και σε υποπληθυσμούς των λεμφοκυττάρων. Τα αιμοπετάλια εκφράζουν επίσης τον PSGL-1 και διαμέσου αυτού αναγνωρίζουν και προσδένουν την P-σελεκτίνη των ECs [426]. Επιπλέον, η

αλληλεπίδραση της P-σελεκτίνης με τον υποδοχέα της είναι σημαντική για την αλληλεπίδραση αιμοπεταλίων-λευκοκυττάρων. Η αλληλεπίδραση αυτή συμβάλλει στη στρατολόγηση των λευκοκυττάρων στα σημεία αγγειακής βλάβης, αλλά και το σχηματισμό συζευγμάτων αιμοπεταλίων-λευκοκυττάρων στην κυκλοφορία του αίματος [427]. Η πρόσδεση της P-σελεκτίνης των αιμοπεταλίων στον PSGL-1 οδηγεί στη μεταγωγή σήματος εντός των λευκοκυττάρων, που σχετίζεται με την κύλισή τους στο ενδοθήλιο και τη σταθερή προσκόλληση τους με τα αιμοπετάλια.

Ακόμη, η κύλιση και η προσκόλληση των λευκοκυττάρων διαμεσολαβείται από β_1 και β_2 ιντεγκρίνες, οι οποίες απαιτούν ενεργοποίηση για τη δέσμευση των προσδεμάτων τους και την επακόλουθη μεταγωγή σήματος. Η πρόσδεση της P-σελεκτίνης των αιμοπεταλίων στον PSGL-1 επάγει την ενεργοποίηση των ιντεγκρινών, οδηγώντας στη σταθερή προσκόλληση αυτών των κυττάρων με τα αιμοπετάλια, ενώ παράλληλα επάγει την έκφραση μεταγραφικών παραγόντων όπως ο NF- κ B, οι οποίοι ρυθμίζουν την έκφραση γονιδίων προφλεγμονωδών μορίων [428].

Επιπλέον, τα αιμοπετάλια περιέχουν στα κοκκία τους πληθώρα μορίων που αποτελούν διαμεσολαβητές της φλεγμονής και της ανοσολογικής απόκρισης. Τα α -κοκκία περιέχουν πρωτεΐνες που αποτελούν παράγοντες πήξης, αγγειογενετικούς παράγοντες και διαμεσολαβητές της φλεγμονής [21]. Η αιμοπεταλιακή ενεργοποίηση οδηγεί στη σύντηξη των κοκκίων με τη μεμβράνη των αιμοπεταλίων και την έκφραση των παραγόντων στην επιφάνεια τους ή την έκκριση τους. Τα α -κοκκία περιέχουν χημειοκίνες, όπως είναι ο παράγοντας των αιμοπεταλίων-4, η πρωτεΐνη RANTES (regulated on activation, normal T cell expressed and secreted protein) και ο MCP-1, μόρια τα οποία συμβάλλουν στη στρατολόγηση και ενεργοποίηση των λευκοκυττάρων και συνεπώς συμμετέχουν στη φλεγμονή.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

5.1 Συσσωρευομετρία οπτικής διαπερατότητας (Light transmittance aggregometry, LTA)

Ως συσσώρευση καλείται η διαδικασία που περιγράφει το σχηματισμό συσσωματωμάτων αιμοπεταλίων. Η συσσώρευση των αιμοπεταλίων *in vivo*, πραγματοποιείται μετά από τραυματισμό του αγγειακού τοιχώματος, συμβάλλοντας στην πρωτογενή αιμόσταση. Η συσσώρευση των αιμοπεταλίων *in vitro*, σε PRP ή σε πλυμένα αιμοπετάλια, προκαλείται με τη χρήση εξωγενώς προστιθέμενων αγωνιστών. Η προκαλούμενη από τον εξωγενώς προστιθέμενο αγωνιστή συσσώρευση των αιμοπεταλίων, έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση της διαπερατότητας του εναιωρήματος τους, η οποία μετράται με ένα ειδικό νεφελόμετρο, το συσσωρευόμετρο.

Το συσσωρευόμετρο είναι ένα φασματοφωτόμετρο σταθερού μήκους κύματος. Μία ακτίνα υπέρυθρου φωτός περνά μέσα από μία κυψελίδα που περιέχει το δείγμα (PRP ή πλυμένα αιμοπετάλια) και μέσα από μία δεύτερη που περιέχει το δείγμα αναφοράς, το οποίο μπορεί να είναι είτε πλάσμα φτωχό σε αιμοπετάλια (platelet-poor plasma, PPP), είτε διάλυμα εναιώρησης των αιμοπεταλίων, αντίστοιχα. Φωτοдиодοι σιλικόνης ανιχνεύουν το φως που πέρασε μέσα από τις δυο κυψελίδες. Τα δείγματα βρίσκονται υπό συνεχή ανάδευση, η οποία είναι απαραίτητη για την *in vitro* συσσώρευση και σε θερμοκρασία 37°C προς μίμηση των *in vivo* συνθηκών. Η φωτομετρική καταγραφή της συσσώρευσης πραγματοποιείται μέχρι τη σταθεροποίησή της και ο χρόνος παρακολούθησης ποικίλει ανάλογα με τον αγωνιστή που έχει χρησιμοποιηθεί.

Το πλεονέκτημα της μεθόδου της συσσωρευομετρίας είναι ότι παρέχει μια συνεχή εικόνα της συμπεριφοράς των αιμοπεταλίων, ενώ επιπρόσθετα διακρίνει την πρωτογενή από τη δευτερογενή συσσώρευση. Σημαντικό μειονέκτημα της μεθόδου είναι ότι τα *in vitro* πειράματα δεν αντανακλούν πάντα την *in vivo* λειτουργικότητα των αιμοπεταλίων. Επίσης, οι συνθήκες επεξεργασίας και απομόνωσης του PRP ή των πλυμένων αιμοπεταλίων, μπορεί να επηρεάσουν τη συμπεριφορά των αιμοπεταλίων και την επακόλουθη συσσώρευση τους.

5.1.1 Παρασκευή PRP

Η παρασκευή του PRP έχει ως σκοπό τον έλεγχο της δράσης των προς μελέτη ουσιών παρουσία των παραγόντων του πλάσματος. Η απομόνωση του PRP πρέπει να γίνει με ιδιαίτερη προσοχή, ώστε να αποφευχθεί η αιμοπεταλιακή ενεργοποίηση.

Κατά την αιμοληψία πρέπει να λαμβάνονται υπόψη τα εξής :

α) Επειδή πολλά φάρμακα επιδρούν στην αιμοπεταλιακή λειτουργία, οι αιμοδότες θα πρέπει να μην έχουν κάνει χρήση αυτών τις προηγούμενες 14 ημέρες. Φάρμακα όπως η ασπιρίνη, άλλα μη στεροειδή αντιφλεγμονώδη και αντισταμινικά, μπορεί να επηρεάσουν τη συσσώρευση των αιμοπεταλίων.

β) Οι αιμοδότες θα πρέπει να είναι νηστικοί για τουλάχιστον 12 ώρες, να μην έχουν καταναλώσει καφεΐνη και να μην έχουν καπνίσει.

γ) Η αιμοληψία πρέπει να γίνεται σε χαλαρό για το δότη, περιβάλλον. Το στρες πιθανόν να επηρεάσει τα επακόλουθα πειράματα.

δ) Κατά την λήψη του αίματος είναι απαραίτητη η χρήση αντιπηκτικού διαλύματος.

ε) Η λήψη του αίματος και η πειραματική επεξεργασία των αιμοπεταλίων πρέπει να γίνεται σε πλαστικά σωληνάκια πολυπροπυλενίου, διότι το γυαλί μπορεί να προκαλέσει ενεργοποίηση τους.

στ) Το αίμα πρέπει να εισέρχεται ελεύθερα και χωρίς βία στα σωληνάκια με το αντιπηκτικό, έτσι ώστε να αποφευχθεί η ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων. Η ήπια ανάμιξη αίματος-αντιπηκτικού πρέπει να ακολουθείται αμέσως μετά την αιμοληψία.

ζ) Τα αιμοπετάλια είναι προτιμότερο να διατηρούνται σε θερμοκρασία δωματίου ή στους 37°C καθ' όλη τη διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας.

Αντιδραστήρια

- ✓ Άνυδρο Κιτρικό οξύ: Anhydrous citric acid ($C_6H_8O_7$), M.W.: 192,12 g/mol
- ✓ Γλυκόζη: Anhydrous D (+) Glucose ($C_6H_{12}O_6$), M.W.: 180,16 g/mol
- ✓ Ένυδρο κιτρικό νάτριο: Enhydrous sodium citrate ($C_6H_5Na_3O_7 \cdot 2H_2O$), M.W.: 294,10 g/mol
- ✓ Οξαλικό αμμώνιο: Ammonium oxalate [$(NH_4)_2C_2O_4H_2O$], M.W.: 142,11 g/mol

Όργανα-Υλικά

- ✓ Αιμοκυτταρόμετρο: Haemocytometer chamber ή πλάκα Neubauer
- ✓ Αυτόματες πιπέτες
- ✓ Οπτικό μικροσκόπιο φωτεινού πεδίου: Olympus CX41
- ✓ Πλαστικά σωληνάκια πολυπροπυλενίου
- ✓ Φυγόκεντρος πάγκου: Hettich Rotofix 32
- ✓ Vortex

Διαλύματα Εργασίας

Αντιπηκτικό διάλυμα ACD: Το αντιπηκτικό διάλυμα κιτρικών αλάτων (Acid–Citrate–Dextrose ή ACD) έχει την παρακάτω σύσταση:

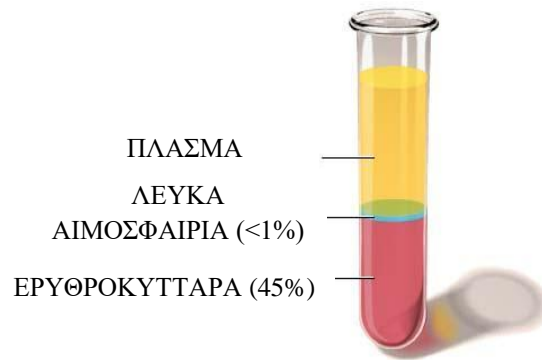
- Κιτρικό οξύ 0,8 % w/v
- Κιτρικό νάτριο 2,2 % w/v
- D (+) γλυκόζη 2,5 % w/v

Η διάλυση των ουσιών γίνεται σε απεσταγμένο νερό. Δε γίνεται ρύθμιση του pH. Το αντιπηκτικό αποθηκεύεται για 1 μήνα στους 4°C. Το κιτρικό οξύ δεσμεύει χηλικά τα Ca²⁺, τα οποία με τη δράση ενζύμων μετατρέπουν το ινωδογόνο σε αδιάλυτο ινώδες συμβάλλοντας στη δημιουργία του θρόμβου. Η γλυκόζη αποτελεί απαραίτητη πηγή μεταβολικής ενέργειας για τα κύτταρα του αίματος. Η αναλογία αίματος : αντιπηκτικού είναι 9 : 1 v/v.

Διάλυμα οξαλικού αμμωνίου 1% w/v: Το οξαλικό αμμώνιο διαλύεται σε απεσταγμένο νερό και το διάλυμα αποθηκεύεται στους 4°C. Το οξαλικό αμμώνιο βοηθάει στη λύση τυχόν υπάρχοντων ερυθροκυττάρων και χρησιμεύει στη μέτρηση των αιμοπεταλίων.

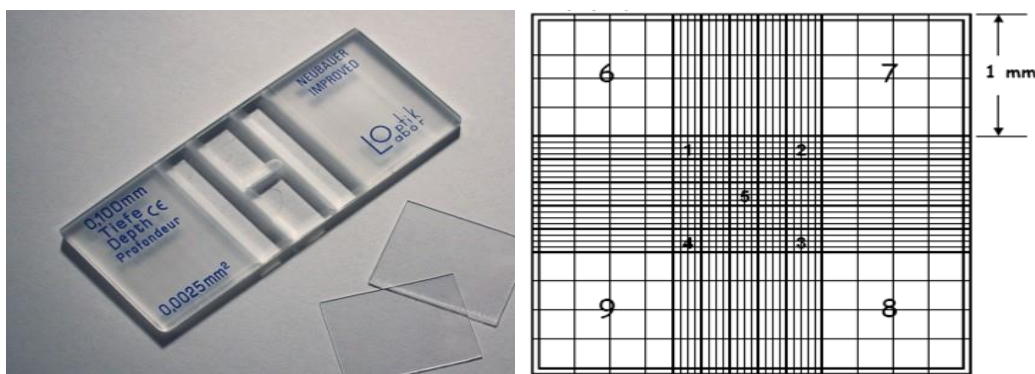
Πειραματική Πορεία

1. Σε σωληνάκι πολυπροπυλενίου που περιέχει 1 mL αντιπηκτικό προστίθενται 9 mL ολικού αίματος.
2. Πραγματοποιείται φυγοκέντρηση στα 126 x g για 15 min σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά τη φυγοκέντρηση εμφανίζονται τρεις στιβάδες (Εικόνα 5.1): α) συγκεντρωμένα ερυθροκύτταρα στο κάτω μέρος του σωλήνα, β) μια πολύ λεπτή στοιβάδα λευκών αιμοσφαιρίων και γ) PRP.



Εικόνα 5.1 Απεικόνιση των τριών στιβάδων του αίματος μετά τη φυγοκέντρηση στα 126 x g.

3. Τα 2/3 του PRP μεταφέρονται σε σωληνάκι πολυπροπυλενίου και μετράται ο όγκος που έχει απομονωθεί.
4. Για τη λήψη του PPP το αρχικό μας δείγμα επαναφυγοκεντρείται στα 1500 x g για 15-20 min.
5. Το PPP μεταφέρεται σε σωληνάκι προπυλενίου και μετράται ο όγκος που έχει απομονωθεί.
6. Πραγματοποιείται μέτρηση του αριθμού των αιμοπεταλίων με την πλάκα Neubauer. Η διαδικασία περιλαμβάνει τα παρακάτω στάδια:
 - α) Σε 190 μL διαλύματος οξαλικού αμμωνίου 1% w/v προστίθενται 10 μL από το PRP (αραίωση 1:20).
 - β) Η πλάκα Neubauer καλύπτεται με μια καλυπτρίδα και 10 μL του παραπάνω διαλύματος μεταφέρονται στις δύο εσοχές της πλάκας (Εικόνα 5.2).
 - γ) Η πλάκα τοποθετείται σε τρυβλίο Petri με υγρό βαμβάκι για 15 min.
 - δ) Πραγματοποιείται η μέτρηση των αιμοπεταλίων με οπτικό μικροσκόπιο φωτεινού πεδίου στη μεγέθυνση 40X.



Εικόνα 5.2 Αιμοκυτταρόμετρο. Στη δεξιά εικόνα παρουσιάζεται η περιοχή των γραμμώσεων της πλάκας.

Η μέτρηση του αριθμού των αιμοπεταλίων με την πλάκα Neubauer γίνεται ως εξής: Όπως φαίνεται στην εικόνα 5.2, η περιοχή με τις γραμμώσεις στην πλάκα διαιρείται σε 9 μεγάλα τετράγωνα με πλευρά 1 mm το καθένα. Το κεντρικό μεγάλο τετράγωνο υποδιαιρείται σε άλλα 25 τετράγωνα μετρίου μεγέθους και το καθένα από αυτά υποδιαιρείται σε άλλα 16 μικρά τετράγωνα. Μετρώνται τα τέσσερα γωνιακά και το μεσαίο τετράγωνο (τετράγωνα 1-5 στην εικόνα 5.2 δεξιά). Τα μικρά τετράγωνα έχουν πλευρά 1/20 mm και ο χώρος της περιοχής μέτρησης έχει βάθος 1/10 mm. Επομένως, ο όγκος του εναιωρήματος αιμοπεταλίων σε ένα μικρό τετράγωνο είναι 1/4000 mm^3 . Εμείς μετράμε 80 μικρά τετράγωνα οπότε τα αιμοπετάλια βρίσκονται σε όγκο 80/4000 mm^3

ή $1/50 \text{ mm}^3$. Επειδή η αραιώση είναι 20 φορές, τα αιμοπετάλια που μετρήθηκαν αντιστοιχούν ουσιαστικά με $1/50 \times 1/20$ ή σε $1/1000 \text{ mm}^3$. Ο υπολογισμός του αριθμού των αιμοπεταλίων που υπάρχουν σε 1 mm^3 δείγματος γίνεται ως εξής:

Συγκέντρωση = άθροισμα αιμοπεταλίων στα 5 μεσαία τετράγωνα $\times 1000$ (plts/ μL).

7. Στο PRP προστίθεται τόσος όγκος PPP ώστε η τελική συγκέντρωση των αιμοπεταλίων στην κυβελίδα να ισούται με 250.000 αιμοπετάλια/ μL . Πραγματοποιείται ήπια ανακίνηση.

5.1.2 Παρασκευή πλυμένων αιμοπεταλίων

Ορισμένοι παράγοντες του πλάσματος, όπως είναι οι πρωτεΐνες και το Ca^{2+} , είναι δυνατόν να επηρεάσουν τη λειτουργία των αιμοπεταλίων. Με τη μέθοδο των πλυμένων αιμοπεταλίων πραγματοποιείται απομάκρυνση των παραγόντων αυτών.

Αντιδραστήρια

- ✓ Άνυδρο κιτρικό οξύ: Anhydrous citric acid ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$), M.W.: 192,12 g/mol
- ✓ Άνυδρο χλωριούχο ασβέστιο: Anhydrous calcium chloride (CaCl_2), M.W.: 110,98 g/mol
- ✓ Απυράση: Apyrase, 200 Units, Grade I : From potato, Sigma-Aldrich-Aldrich
- ✓ Απόλυτη αιθανόλη: Ethanol absolute
- ✓ Γλυκόζη: D (+) Glucose anhydrous ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$), M.W.: 180,16 g/mol
- ✓ HEPES: N-[2-Hydroxyethyl] piperazine-N-[2-ethanesulfonic acid] ($\text{C}_8\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_4\text{S}$), M.W.: 238,3 g/mol, Sigma-Aldrich-Aldrich
- ✓ Ένυδρο κιτρικό νάτριο: Enhydrous sodium citrate ($\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), M.W.: 294,10 g/mol
- ✓ Ένυδρο χλωριούχο ασβέστιο: Enhydrous calcium chloride ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), M.W.: 147,00 g/mol
- ✓ Ένυδρο χλωριούχο μαγνήσιο: Enhydrous magnesium chloride ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$), M.W.: 203,30 g/mol
- ✓ Οξαλικό αμμώνιο: Ammonium oxalate [$(\text{NH}_4)_2\text{C}_2\text{O}_4\text{H}_2\text{O}$], M.W.: 142,11 g/mol
- ✓ Όξινο ανθρακικό νάτριο: Sodium hydrogen carbonate (NaHCO_3), M.W.: 84,01 g/mol
- ✓ Προσταγλανδίνη E_1 (PGE_1): [11a , 13E , 15 S] 11,15-Dihydroxy-9 oxoprost-13-en-1-oic-acid ($\text{C}_{20}\text{H}_{34}\text{O}_5$), M.W.: 354,50 g/mol, Sigma-Aldrich
- ✓ Φυσιολογικός ορός (0,9% χλωριούχο νάτριο): Normal saline (0.9% Sodium chloride)
- ✓ Χλωριούχο κάλιο: Potassium chloride (KCl), M.W.: 74,56 g/mol
- ✓ Χλωριούχο νάτριο: Sodium chloride (NaCl), M.W.: 58,44 g/mol

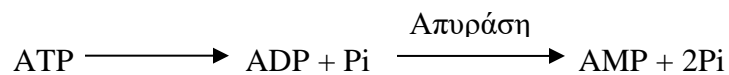
Όργανα-Υλικά

- ✓ Αιμοκυτταρόμετρο: Haemocytometer chamber ή πλάκα Neubauer
- ✓ Αυτόματες πιπέτες
- ✓ Οπτικό μικροσκόπιο φωτεινού πεδίου: Olympus CX41
- ✓ Πλαστικά σωληνάκια πολυπροπυλενίου
- ✓ Φυγόκεντρος πάγκου: Hettich Rotofix 32
- ✓ Vortex

Διαλύματα Εργασίας

Αντιπηκτικό διάλυμα ACD: Όπως περιγράφεται παραπάνω.

Διάλυμα απυράσης: 200 Units απυράσης διαλύθηκαν σε 2 mL φυσιολογικού ορού (stock 100 U/mL). Η απυράση είναι μία φωσφατάση, η οποία μετατρέπει το απελευθερωμένο από τα αιμοπετάλια ADP σε ανενεργό AMP σύμφωνα με την αντίδραση :



Η αποθήκευση γίνεται στους -80°C .

Διάλυμα PGE₁: 1 mg PGE₁ διαλύεται σε 1,4 mL απόλυτης αιθανόλης (stock 2 mM). Η PGE₁ ενεργοποιεί την AC οδηγώντας στην αύξηση των επιπέδων του cAMP και στην αναστολή της ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων. Η αποθήκευσή γίνεται στους -80°C .

Διάλυμα οξαλικού αμμωνίου 1% w/v: Όπως περιγράφεται παραπάνω.

Διάλυμα χλωριούχου ασβεστίου: Προετοιμάζεται διάλυμα CaCl₂ συγκέντρωσης 1 M. Η διάλυση γίνεται σε απεσταγμένο νερό και το διάλυμα αποθηκεύεται στους 4°C .

Διάλυμα έκπλυσης αιμοπεταλίων 10X: Το διάλυμα αυτό περιέχει:

- 6 % w/v NaCl
- 0,373 % KCl
- 0,9 % w/v γλυκόζη
- 6,912 % w/v άνυδρο κιτρικό οξύ
- 0,294 % w/v ένυδρο CaCl₂
- 0,203 % w/v ένυδρο MgCl₂

Οι ουσίες διαλύονται σε 100 mL απεσταγμένο νερό. Το διάλυμα μοιράζεται σε όγκους των 10 mL και αποθηκεύεται στους -20°C . Οι παραπάνω συγκεντρώσεις είναι δεκαπλάσιες (10X) από αυτές που χρησιμοποιούνται κατά την έκπλυση των αιμοπεταλίων (1X). Γι' αυτό, πριν την έναρξη της πειραματικής διαδικασίας γίνεται αραιώση του παραπάνω διαλύματος με απεσταγμένο νερό. Ακολουθεί ρύθμιση του pH στο 6,5. Τα αραιωμένα διαλύματα διατηρούνται για 2 εβδομάδες στους 4°C .

Διάλυμα εναιώρησης των αιμοπεταλίων 10X: Το διάλυμα αυτό περιέχει:

- 8,18 % w/v NaCl
- 0,22 % w/v KCl
- 1,8 % w/v γλυκόζη
- 0,1 % w/v ένυδρο MgCl_2
- 2,38 % w/v HEPES
- 0,42 % w/v NaHCO_3

Οι ουσίες διαλύονται σε απεσταγμένο νερό. Το διάλυμα μοιράζεται σε όγκους των 5 mL και αποθηκεύεται στους -20°C . Οι παραπάνω συγκεντρώσεις είναι δεκαπλάσιες (10X) από αυτές που χρησιμοποιούνται για την εναιώρηση των αιμοπεταλίων (1X). Γι' αυτό πριν από την έναρξη της πειραματικής διαδικασίας γίνεται αραιώση του παραπάνω διαλύματος με απεσταγμένο νερό. Ακολουθεί ρύθμιση του pH στο 7,35. Τα αραιωμένα διαλύματα διατηρούνται για 2 εβδομάδες στους 4°C .

Πειραματική Πορεία

Για την παρασκευή πλυμένων αιμοπεταλίων από ολικό αίμα, εφαρμόζεται η τροποποιημένη μέθοδος του Mustard, η οποία περιλαμβάνει τα εξής βήματα :

1. Σε σωληνάκι πολυπροπυλενίου που περιέχει 1 mL αντιπηκτικό προστίθενται 9 mL ολικού αίματος. Ακολουθεί προσθήκη 10 μL απυράσης, ώστε η τελική της συγκέντρωση στο δείγμα να είναι 0,1 U/mL και 5 μL PGE_1 , συγκέντρωσης 2 mM, ώστε η τελική συγκέντρωση της στο δείγμα να είναι 1 μM .
2. Πραγματοποιείται φυγοκέντρηση στα 126 x g για 15 min σε θερμοκρασία δωματίου.
3. Το PRP μεταφέρεται σε άλλο σωληνάκι πολυπροπυλενίου, μετράται ο όγκος του και προστίθεται ως τα 10 mL διάλυμα έκπλυσης 1X. Επίσης, προστίθεται 1,5 μL απυράσης (τελική

συγκέντρωση 0,015 U/mL) και 5 μ L αραιωμένης PGE₁, συγκέντρωσης 0,2 mM (τελική συγκέντρωση 0,1 μ M). Πραγματοποιείται ήπια ανακίνηση.

4. Πραγματοποιείται φυγοκέντρωση στα 975 x g για 12 min σε θερμοκρασία δωματίου.
5. Σε σωληνάκι πολυπροπυλενίου προστίθενται 10 mL διαλύματος έκπλυσης 1X, 1.5 μ L απυράσης και 5 μ L αραιωμένης PGE₁. Πραγματοποιείται ήπια ανακίνηση.
6. Μετά το τέλος της φυγοκέντρωσης, αποχύνεται απότομα το υπερκείμενο και αυτό που απομένει στον πυθμένα είναι το αιμοπεταλιακό ίζημα.
7. Το ίζημα αναδιασπείρεται προσεκτικά με το διάλυμα του βήματος 6 και ακολουθεί ήπια ανακίνηση.
8. Πραγματοποιείται φυγοκέντρωση στα 975 x g για 12 min σε θερμοκρασία δωματίου.
9. Μετά το τέλος της φυγοκέντρωσης αποχύνεται απότομα το υπερκείμενο.
10. Το αιμοπεταλιακό ίζημα αναδιασπείρεται προσεκτικά με το διάλυμα εναιώρησης των αιμοπεταλίων 1X. Προστίθεται όγκος διαλύματος εναιώρησης ίσος με το 1/3 του αρχικού όγκου του PRP που απομονώθηκε στο βήμα 3. Πραγματοποιείται ήπια ανακίνηση.
11. Ακολουθεί μέτρηση των αιμοπεταλίων όπως περιγράφεται παραπάνω.
12. Στο εναιώρημα των αιμοπεταλίων προστίθεται τόσος όγκος διαλύματος εναιώρησης 1X, ώστε η συγκέντρωση των αιμοπεταλίων στην κυψελίδα συσσωρευομετρίας να ισούται με 250.000 αιμοπετάλια/ μ L. Πραγματοποιείται ήπια ανακίνηση.
13. Το τελικό εναιώρημα των αιμοπεταλίων αφήνεται σε ηρεμία για 15 min, αφού πρώτα προστεθεί ο απαιτούμενος όγκος διαλύματος CaCl₂, ώστε η τελική συγκέντρωση του να ισούται με 1 mM.

5.1.3 Έλεγχος της βιολογικής δράσης ουσιών σε PRP

Στην παρούσα διδακτορική διατριβή, πραγματοποιήθηκε έλεγχος της βιολογικής δράσης του αντιαιμοπεταλιακού φαρμάκου voraparaxar στη συσσώρευση αιμοπεταλίων σε PRP. Καθώς φαρμακοδυναμικά δεν έχει διαλευκανθεί πλήρως η αλληλεπίδραση του voraparaxar με τον PAR-1, κρίθηκε σημαντικό να διερευνηθούν οι βέλτιστες συνθήκες δράσης του και για το σκοπό αυτό, πραγματοποιήθηκαν δοσο- και χρονο-εξαρτώμενες επώσεις στους 25°C και 37°C και ακολούθησε ενεργοποίηση του PRP με TRAP-6 (thrombin receptor activator peptide-6). Ακολούθως, με σκοπό να διερευνηθεί η εκλεκτικότητα του voraparaxar ως προς την αναστολή του PAR-1, τα αιμοπετάλια επώαστηκαν με voraparaxar στις βέλτιστες συνθήκες δράσης του και

ακολούθησε η ενεργοποίηση τους με ADP, αραχιδονικό οξύ και κολλαγόνο. Η επιλογή των αγωνιστών που χρησιμοποιούνται εξαρτάται από τους περιορισμούς που τίθενται από την απομόνωση των αιμοπεταλίων. Η θρομβίνη και ο FXa δεν μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την ενεργοποίηση του PRP, καθώς η παρουσία παραγόντων πήξης στο δείγμα οδηγεί στην παραγωγή ινώδους.

Αντιδραστήρια

- ✓ Απόλυτη αιθανόλη: Ethanol absolute
- ✓ Αραχιδονικό οξύ: Arachidonic acid 100 mg, Sigma-Aldrich
- ✓ Διμεθυλοσουλφοξείδιο: Dimethyl sulfoxide, DMSO
- ✓ Διφωσφορική αδενοσίνη: Adenosine diphosphate (ADP), Chrono-log
- ✓ Κολλαγόνο: Collagen 1 mg/mL, Chrono-log
- ✓ Φυσιολογικός ορός (0,9% χλωριούχο νάτριο): Normal saline (0.9% Sodium chloride)
- ✓ TRAP-6: 5 mg, M.W.: 748,88 g/mol, Bachem
- ✓ Vorapaxar: 5 mg, M.W.: 492,58 g/mol, AxonMedChem

Όργανα-Υλικά

- ✓ Αυτόματες πιπέτες
- ✓ Γυάλινες κυψελίδες συσσωρευομετρίας
- ✓ Μαγνητάκια συσσώρευσης: Stir bars siliconized, Chrono-Log
- ✓ Συσσωρευόμετρο 4 καναλιών: Whole blood Lumi - Aggregometer [Ca²⁺], Chrono-Log, Model 700-4DR. Συνοδεύεται από το λογισμικό Aggrolink
- ✓ Vortex

Διαλύματα Εργασίας

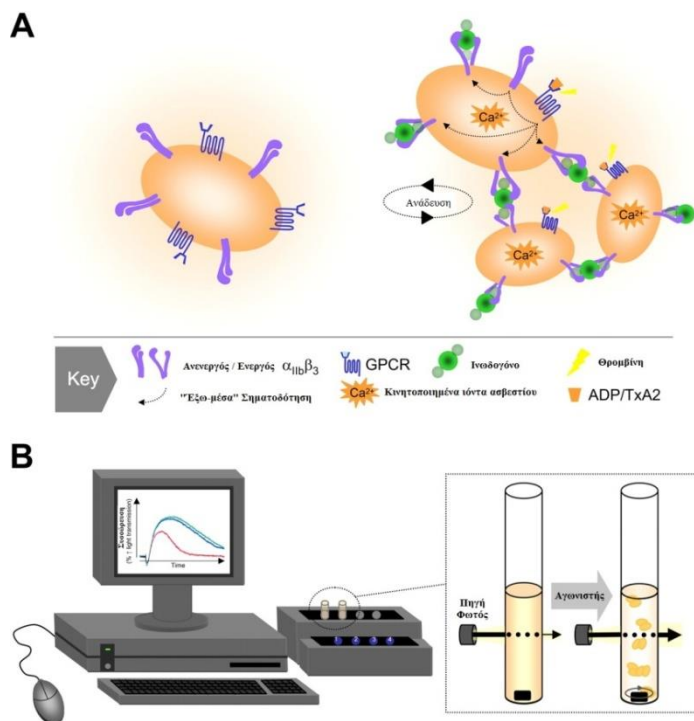
Διάλυμα 50 mM αραχιδονικού οξέος: 100 mg αραχιδονικού οξέος διαλύονται σε 4,1 mL απόλυτης αιθανόλης. Η αποθήκευση γίνεται στους -80°C.

Διαλύματα 10 mM και 1 mM ADP: 2,5 mg ADP διαλύονται σε 5 mL φυσιολογικού ορού. Ακολουθεί αραιώση 1:10, ώστε να προκύψει το διάλυμα εργασίας του 1 mM. Τα διαλύματα διατηρούνται στους -80°C.

Διάλυμα 5 mM TRAP-6: 5 mg TRAP-6 διαλύονται σε 1,335 mL φυσιολογικού ορού. Η αποθήκευση γίνεται στους -80°C .

Πειραματική Πορεία

1. Ανοίγουμε το συσσωρευόμετρο 30 min πριν την έναρξη των επωάσεων ώστε να φτάσει η θερμοκρασία του οργάνου στους 37°C .
2. Ανοίγουμε το πρόγραμμα Agrolink.
3. Προετοιμάζονται τόσα δείγματα reference όσα και τα κανάλια του οργάνου που θα χρησιμοποιήσουμε. Το διάλυμα που θα περιέχεται σε αυτά είναι 500 μL PPP. Στα δείγματα αυτά δεν τοποθετείται μαγνητάκι και παραμένουν στη θέση "PPP" του οργάνου μέχρι το τέλος του πειράματος.
4. Προετοιμάζεται μια σειρά από γυάλινες κυψελίδες συσσώρευσης με μαγνητάκι, στις οποίες θα τοποθετηθούν τα δείγματα.
5. Αρχικά, ελέγχεται η καταλληλότητα του δείγματος των αιμοπεταλίων με την προετοιμασία ενός δείγματος το οποίο περιέχει PRP και το διαλύτη του φαρμάκου που θα ελεγχθεί.
6. Το δείγμα τοποθετείται στο όργανο και ξεκινάει η μέτρηση. Γίνεται καταγραφή της συσσώρευσης για 1 min και ακολουθεί η προσθήκη του αγωνιστή. Η συσσώρευση του δείγματος καταγράφεται μέχρι να σταθεροποιηθεί η συσσώρευση (Εικόνα 5.3).



Εικόνα 5.3 Μοντέλο της αιμοπεταλιακής συσσώρευσης.

Όταν ελεγχθεί η καταλληλότητα του δείγματος PRP, ακολουθούν επώσεις με σκοπό τη μελέτη της βιολογικής δράσης των προς μελέτη ουσιών:

- PRP επώστηκε με 0,4% DMSO ή ένα εύρος συγκεντρώσεων νοραραχαρ από 0,05-5 μM για 5, 15, 30 και 60 min στους 25°C και 37°C με ήπια ανάδευση κάθε 10 min και ακολούθησε ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων με 10 μM TRAP-6.
- PRP επώστηκε με 0,4% DMSO ή ένα εύρος συγκεντρώσεων νοραραχαρ από 0,025-5 μM για 5, 15, 30 και 60 min στους 37°C με ήπια ανάδευση κάθε 10 min και ακολούθησε ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων με 10 μM TRAP-6, με σκοπό την εύρεση των τιμών IC_{50} του φαρμάκου.
- PRP επώστηκε με 0,4% DMSO, 2,5 ή 5 μM νοραραχαρ για 60 min στους 37°C με ήπια ανάδευση κάθε 10 min και ακολούθησε ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων με 10 μM ADP, 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ κολλαγόνου ή 500 μM αραχιδονικού οξέος.
- PRP επώστηκε για 1 min με 0,4% HCl/DMSO, 0,4% DMSO, 10 μM dabigatran ή 10 μM rivaroxaban στους 37°C και ακολούθησε ενεργοποίηση με 10 μM ADP, 10 μM TRAP-6, 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ κολλαγόνου ή 500 μM αραχιδονικού οξέος, υπό συνεχή ανάδευση.

Το ποσοστό της αναστολής της αιμοπεταλιακής συσσώρευσης των προς μελέτη φαρμάκων δίνεται από την σχέση:

$$\% \text{ΑΝΑΣΤΟΛΗ} = \frac{\% \text{ΣΥΣΣΩΡΕΥΣΗ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ ΑΝΑΦΟΡΑΣ} - \% \text{ΣΥΣΣΩΡΕΥΣΗ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ}}{\% \text{ΣΥΣΣΩΡΕΥΣΗ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ ΑΝΑΦΟΡΑΣ}} \times 100\%$$

5.1.4 Έλεγχος της βιολογικής δράσης ουσιών σε πλυμένα αιμοπετάλια

Παρ' ότι έχει αποδειχθεί ότι ο FXa εμφανίζει μη αιμοστατικές κυτταρικές δράσεις, δεν έχει διερευνηθεί εκτενώς η επίδρασή του στην αιμοπεταλιακή ενεργοποίηση. Συνεπώς, στην παρούσα διδακτορική διατριβή πραγματοποιήθηκαν δοσο-εξαρτώμενα πειράματα σε πλυμένα αιμοπετάλια για τη διερεύνηση της δράσης του FXa.

Ακόμη, πραγματοποιήθηκε έλεγχος της δράσης του voraparaxar, καθώς και των αντιπηκτικών φαρμάκων dabigatran και rivaroxaban στη συσσώρευση πλυμένων αιμοπεταλίων. Για την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων χρησιμοποιήθηκαν οι αγωνιστές FXa, TRAP-6 αραχιδονικό οξύ και κολλαγόνο. Το ADP που αποτελεί κλασικό αιμοπεταλιακό αγωνιστή δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί στα πλυμένα αιμοπετάλια, καθώς η χρήση της απυράσης και της PGE₁ στα στάδια απομόνωσης και έκπλυσης των αιμοπεταλίων εμποδίζουν την ενεργοποίησή τους από το ADP.

Αρχικά, πραγματοποιήθηκαν δοσο- και χρονο-εξαρτώμενες επώσεις στους 25°C και 37°C και ακολούθησε ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων με TRAP-6. Ακολούθως, με σκοπό να διερευνηθεί η εκλεκτικότητα του voraparaxar ως προς την αναστολή του PAR-1, τα αιμοπετάλια επώαστηκαν με το voraparaxar στις βέλτιστες συνθήκες δράσης του και ακολούθησε η ενεργοποίησή τους με τους υπόλοιπους αγωνιστές. Επιπρόσθετα, προκειμένου να διερευνηθεί η δράση αλλά και η εκλεκτικότητα των dabigatran και rivaroxaban ως προς τα υποστρώματα τους (θρομβίνη και FXa, αντίστοιχα), κρίθηκε σημαντικό να πραγματοποιηθούν δοσο-εξαρτώμενες επώσεις με τα δύο φάρμακα ξεχωριστά και ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων με θρομβίνη και FXa.

Αντιδραστήρια

- ✓ Αλβουμίνη βόειου ορού: Bovine serum albumin (BSA), Sigma-Aldrich
- ✓ Απόλυτη Αιθανόλη: Ethanol absolute
- ✓ Αραχιδονικό οξύ: Arachidonic acid 100 mg, Sigma-Aldrich

- ✓ Γλυκερόλη: Glycerol
- ✓ Διμεθυλοσουλφοξείδιο: Dimethyl sulfoxide, DMSO
- ✓ Θρομβίνη: Human thrombin 1000 Units, Sigma-Aldrich
- ✓ Κολλαγόνο: Collagen 1 mg/mL, Chronolog
- ✓ Παράγοντας Xa: Human FXa 100 μg, Haematologic Technologies
- ✓ Φυσιολογικός ορός (0,9% χλωριούχο νάτριο): Normal saline (0.9% Sodium chloride)
- ✓ Dabigatran: 5 mg, M.W.: 471,51 g/mol, MedChem Express
- ✓ Rivaroxaban: 5 mg, M.W.: 435,88 g/mol, MedChem Express
- ✓ TRAP-6: 5 mg, M.W.: 748,88 g/mol, Bachem
- ✓ Vorapaxar: 5 mg, M.W.: 492,58 g/mol, AxonMedChem

Όργανα-Υλικά

- ✓ Αυτόματες πιπέτες
- ✓ Γυάλινες κυψελίδες συσσωρευομετρίας
- ✓ Μαγνητάκια συσσώρευσης: Stir bars siliconized, Chrono-Log
- ✓ Συσσωρευόμετρο 4 καναλιών: Whole blood Lumi - Aggregometer [Ca⁺²], Chrono-Log, Model 700-4DR. Συνοδεύεται από το λογισμικό Aggrolink
- ✓ Vortex

Διαλύματα Εργασίας

Διάλυμα 50 mM αραχιδονικού οξέος: Όπως περιγράφεται παραπάνω.

Διαλύματα 100 και 10 U/mL θρομβίνης: 1000 U θρομβίνης διαλύονται σε 10 mL διαλύματος 0.1% BSA/dH₂O. Με αρραίωση 1:10 προκύπτει το διάλυμα 10 U/mL. Η αποθήκευση γίνεται στους -20°C.

Διάλυμα 3 μM FXa: 100 μg FXa διαλύονται σε 724 μL διαλύματος 50% γλυκερόλης/dH₂O. Η αποθήκευση γίνεται στους -20°C.

Διάλυμα 10 mM dabigatran: 5 mg dabigatran διαλύονται σε 1,06 mL διαλύματος 1N HCl/DMSO (αναλογία 2/7). Η αποθήκευση γίνεται στους -80°C.

Διάλυμα 10 mM rivaroxaban: 5 mg rivaroxaban διαλύονται σε 1,147 mL DMSO. Η αποθήκευση γίνεται στους -80°C.

Διάλυμα 10 mM voraparaxar: 5 mg voraparaxar διαλύονται σε 1,016 mL DMSO. Η αποθήκευση γίνεται στους -20°C .

Διάλυμα 5 mM TRAP-6: Όπως περιγράφεται παραπάνω.

Πειραματική Πορεία

1. Ανοίγουμε το συσσωρευόμετρο 30 min πριν την έναρξη των επώασεων ώστε να φτάσει η θερμοκρασία του οργάνου στους 37°C .
2. Ελέγχεται η καταλληλότητα του δείγματος πλυμένων αιμοπεταλίων και ακολουθούν επώσεις με σκοπό τη μελέτη της βιολογικής δράσης των προς μελέτη ουσιών:
 - Πλυμένα αιμοπετάλια επώαστηκαν με ένα εύρος συγκεντρώσεων FXa από 0,01-0,1 nM για 20-30 min στους 37°C υπό συνεχή ανάδευση, για την εύρεση των βέλτιστων συνθηκών δράσης του.
 - Πλυμένα αιμοπετάλια επώαστηκαν με 0,4% DMSO ή ένα εύρος συγκεντρώσεων voraparaxar από 0,1-100 nM για 5, 15, 30 και 60 min στους 37°C με ήπια ανάδευση κάθε 10 min και ακολούθησε ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων με 10 μM TRAP-6, υπό συνεχή ανάδευση.
 - Πλυμένα αιμοπετάλια επώαστηκαν με 0,4% DMSO ή ένα εύρος συγκεντρώσεων voraparaxar από 0,25-100 nM για 5, 15, 30 και 60 min στους 37°C με ήπια ανάδευση κάθε 10 min και ακολούθησε ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων με 10 μM TRAP-6, υπό συνεχή ανάδευση, με σκοπό την εύρεση των τιμών IC_{50} του φαρμάκου.
 - Πλυμένα αιμοπετάλια επώαστηκαν με 0,4% DMSO ή ένα εύρος συγκεντρώσεων voraparaxar από 2,5-50 nM για 15 min στους 37°C υπό συνεχή ανάδευση και ακολούθησε ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων με 0,025 nM FXa, με σκοπό την εύρεση της τιμής IC_{50} του φαρμάκου. Επιπλέον, αιμοπετάλια επώαστηκαν με 0,4% DMSO ή ένα εύρος συγκεντρώσεων από 62,5-500 μM του συνθετικού πεπτιδίου trans-cinnamoyl-YPGKF-NH₂, το οποίο αποτελεί ανταγωνιστή του PAR-4, για 3 min στους 37°C υπό συνεχή ανάδευση και ακολούθησε ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων με 0,025 nM FXa.
 - Πλυμένα αιμοπετάλια επώαστηκαν με 0,4% DMSO, 2,5 ή 5 μM voraparaxar για 60 min στους 37°C με ήπια ανάδευση κάθε 10 min και ακολούθησε ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων με 5 $\mu\text{g/mL}$ κολλαγόνου ή 500 μM αραχιδονικού οξέος, υπό συνεχή ανάδευση.

- Πλυμένα αιμοπετάλια επωάστηκαν για 1 min με 0,4% HCl/DMSO, 0,4% DMSO ή ένα εύρος συγκεντρώσεων dabigatran από 1-10 nM και rivaroxaban από 1,25-20 μM στους 37°C και ακολούθησε ενεργοποίηση με 0,1 U/mL θρομβίνης, υπό συνεχή ανάδευση, με σκοπό την εύρεση των τιμών IC₅₀ των φαρμάκων.
- Πλυμένα αιμοπετάλια επωάστηκαν για 1 min με 0,4% HCl/DMSO, 0,4% DMSO ή ένα εύρος συγκεντρώσεων dabigatran από 0,1-5 nM και rivaroxaban από 0,5-20 nM στους 37°C και ακολούθησε ενεργοποίηση με 0,025 nM FXa, υπό συνεχή ανάδευση, με σκοπό την εύρεση των τιμών IC₅₀ των φαρμάκων.
- Πλυμένα αιμοπετάλια επωάστηκαν για 1 min με 0,4% HCl/DMSO, 0,4% DMSO, 10 μM dabigatran ή rivaroxaban στους 37°C και ακολούθησε ενεργοποίηση με 10 μM TRAP-6, 5 μg/mL κολλαγόνου ή 500 μM αραχιδονικού οξέος, υπό συνεχή ανάδευση.

5.2 Συσσωρευομετρία εμπέδησης (Impedance aggregometry)

Η συσσωρευομετρία εμπέδησης πραγματοποιείται σε ολικό αίμα και αποτελεί απλούστερη μέθοδο από την LTA. Μελετά την αιμοπεταλιακή λειτουργία σε συνθήκες που προσομοιάζουν περισσότερο τις *in vivo*, καθώς τα αιμοπετάλια αλληλεπιδρούν με όλα τα κύτταρα του αίματος. Για τη διεξαγωγή του πειράματος, ένα ηλεκτρόδιο που φέρει δύο μεταλλικά ελάσματα τοποθετείται εντός της κυψελίδας που περιέχει ολικό αίμα. Ρεύμα περνάει από το κύκλωμα και το όργανο μετράει την αντίσταση μεταξύ των δύο μεταλλικών συρμάτων. Η συσσώρευση των αιμοπεταλίων μετά από την προσθήκη κάποιου αγωνιστή, οδηγεί στο σχηματισμό ενός συσσωρεύματος αιμοπεταλίων μεταξύ των δύο μεταλλικών συρμάτων προκαλώντας αύξηση της αντίστασης στο κύκλωμα, η οποία μετράται σε Ohm. Η αύξηση της αντίστασης είναι ανάλογη της μάζας του αιμοπεταλιακού συσσωρεύματος.

Αντιδραστήρια

- ✓ Απόλυτη αιθανόλη: Ethanol absolute
- ✓ Αραχιδονικό οξύ: Arachidonic acid 100 mg, Sigma-Aldrich
- ✓ Διμεθυλοσουλφοξείδιο: Dimethyl sulfoxide, DMSO
- ✓ Διφωσφορική αδενοσίνη: Adenosine diphosphate (ADP), Sigma-Aldrich
- ✓ Κολλαγόνο: Collagen 1 mg/mL, Chrono-log
- ✓ Φυσιολογικός ορός (0,9% χλωριούχο νάτριο): Normal saline (0.9% Sodium chloride)

- ✓ TRAP-6: 5 mg, M.W.: 748,88 g/mol, Bachem
- ✓ Dabigatran: 5 mg, M.W.: 471,51 g/mol, MedChem Express
- ✓ Rivaroxaban: 5 mg, M.W.: 435,88 g/mol, MedChem Express
- ✓ Vorapaxar: 5 mg, M.W.: 492,58 g/mol, AxonMedChem

Όργανα-Υλικά

- ✓ Αυτόματες πιπέτες
- ✓ Πλαστικές κυψελίδες συσσωρευομετρίας
- ✓ Καταγραφικό: Chrono-Log
- ✓ Μαγνητάκια συσσώρευσης: Stir bars siliconized, Chrono-Log
- ✓ Συσσωρευόμετρο 4 καναλιών: Whole blood Lumi - Aggregometer [Ca⁺²], Chrono-Log, Model 700-4DR. Συνοδεύεται από το λογισμικό Aggrolink
- ✓ Vortex

Διαλύματα Εργασίας

Διάλυμα 50 mM αραχιδονικού οξέος: Όπως περιγράφεται παραπάνω.

Διάλυμα 10 και 1 mM ADP: Όπως περιγράφεται παραπάνω.

Διάλυμα 10 mM vorapaxar: Όπως περιγράφεται παραπάνω.

Διάλυμα 5 mM TRAP-6: Όπως περιγράφεται παραπάνω.

Πειραματική Πορεία

1. Σε σωληνάκι πολυπροπυλενίου που περιέχει 1 mL αντιπηκτικό προστίθενται 9 mL ολικού αίματος. Στα πειράματα που χρησιμοποιείται ADP, το αίμα αφήνεται να ηρεμήσει για 15 min. Οι επώσεις που πραγματοποιήθηκαν με σκοπό τη μελέτη της βιολογικής δράσης των προς μελέτη ουσιών ήταν οι παρακάτω:
 - Ολικό αίμα επώαστηκε με 0,4% DMSO (δείγμα αναφοράς) ή ένα εύρος συγκεντρώσεων vorapaxar από 0,023-0,23 μM για 60 min στους 37°C, με ήπια ανάδευση κάθε 10 min και ακολούθησε ενεργοποίηση τους με 10 μM TRAP-6, υπό συνεχή ανάδευση, με σκοπό την εύρεση της τιμής IC₅₀ του φαρμάκου.

- Ολικό αίμα επώαστηκε με 0,4% DMSO, 1 ή 5 μM voraparaxar για 60 min στους 37°C με ήπια ανάδευση κάθε 10 min και ακολούθησε ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων με 10 μM ADP ή 500 μM αραχιδονικού οξέος, υπό συνεχή ανάδευση.
- Ολικό αίμα επώαστηκε για 1 min με 0,4% HCl/DMSO, 0,4% DMSO, 10 μM dabigatran ή 10 μM rivaroxaban στους 37°C και ακολούθησε ενεργοποίηση με 10 μM ADP, 5 $\mu\text{g/mL}$ κολλαγόνου ή 500 μM αραχιδονικού οξέος, υπό συνεχή ανάδευση.

5.3 Καλλιέργεια ενδοθηλιακών κυττάρων

Όπως αναφέρθηκε εκτενώς παραπάνω, τα ανθρώπινα ενδοθηλιακά κύτταρα, έχουν ως κύρια λειτουργία την επένδυση του αγγειακού τοιχώματος και διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη φυσιολογία αλλά και σε παθολογικές καταστάσεις. Στην παρούσα διδακτορική διατριβή πραγματοποιήθηκε απομόνωση και καλλιέργεια CD34⁺ κυττάρων για τη διαφοροποίησή τους προς OECs, αλλά και καλλιέργεια HUVECs, με σκοπό να μελετηθεί η δράση των παραγόντων πήξης θρομβίνη και FXa στην έκφραση μορίων προσκόλλησης και στην έκκριση παραγόντων από τα κύτταρα αυτά.

5.3.1 Απομόνωση των CD34⁺ κυττάρων

Τα CD34⁺ απομονώνονται από αίμα ομφάλιου λώρου με τη μέθοδο του μαγνητικού διαχωρισμού (magnetic cell sorting, MACs). Με τη μέθοδο αυτή πραγματοποιείται διαχωρισμός κυτταρικών πληθυσμών με υψηλή καθαρότητα, βάσει των αντιγόνων που φέρουν στην επιφάνειά τους. Συγκεκριμένα, αντίσωμα κατά του επιθυμητού αντιγόνου επιφανείας του υπό μελέτη πληθυσμού είναι συζευγμένο με μαγνητικά μικροσφαιρίδια. Η μέθοδος αυτή επιτρέπει την ήπια απομόνωση βιώσιμων και λειτουργικών κυττάρων.

Αντιδραστήρια

- ✓ Αλβουμίνη βόειου ορού: Bovine serum albumin (BSA), Sigma-Aldrich
- ✓ Γλυκερόλη: Glycerol
- ✓ Διάλυμα φικόλης: Biocoll separating solution, 500 mL, Biochrom AG
- ✓ Διμεθυλοσουλφοξείδιο: Dimethyl sulfoxide, DMSO
- ✓ Θερμικά απενεργοποιημένος ορός από έμβρυο βοός: heat inactivated fetal bovine serum, FBS, Gibco BRL Life Technologies

- ✓ Θρεπτικό υλικό των ενδοθηλιακών κυττάρων: Endothelial cell basal medium-2, EBM-2 500 mL, Lonza και περιλαμβάνει τους παρακάτω αυξητικούς παράγοντες:
 - Αγγειακό ενδοθηλιακό αυξητικό παράγοντα: Vascular endothelial growth factor, VEGF, 0,5 mL
 - Ανθρώπινο επιδερμικό αυξητικό παράγοντα: human epidermal growth factor, hEGF, 0,5 mL
 - Ασκορβικό οξύ: Ascorbic acid, 0,5mL
 - Αυξητικό παράγοντα Β των ανθρώπινων ινοβλαστών: human fibroblast growth factor-B, hFGF-B, 2 mL
 - Αυξητικό παράγοντα R3: R3 insulin like growth factor-1, R3-IGF-1, 0,5 mL
 - Διάλυμα Γενταμικίνης/Αμφοτερικίνης Β: Gentamicine/Amphotericine B solution, 0,5 mL
 - Ηπαρίνη: Heparin, 0,5 mL
 - Ορό από έμβρυο βοός: Fetal bovine serum, FBS, 10 mL
 - Υδροκορτιζόνη: Hydrocortizone, 0,5 mL
- ✓ Θρομβίνη: Human thrombin 1000 Units, Sigma-Aldrich
- ✓ Οξικό οξύ (17,5 N): CH₃COOH
- ✓ Παράγοντας Χα: Human FXa 100 μg, Haematologic Technologies
- ✓ Χρωστική Giemsa: Ferak Berlin
- ✓ D-PBS: Dulbecco's phosphate buffered saline, 500 mL, Gibco BRL Life Technologies
- ✓ EDTA: Ethylenediaminetetraacetic acid, αιθυλενοδιαμινοτετραοξικό οξύ, M.W.: 292,29 g/mol
- ✓ Vorapaxar: 5 mg, M.W.: 492,58 g/mol, AxonMedChem

Όργανα-Υλικά

- ✓ Αιμοκυτταρόμετρο: Haemocytometer chamber ή πλάκα Neubauer
- ✓ Ανάστροφο μικροσκόπιο: A. Krüss Optronics
- ✓ Αποστειρωμένα βαθμονομημένα σωληνάκια των 15 και 50 mL
- ✓ Αποστειρωμένα πλαστικά σιφόνια των 5, 10 και 25 mL
- ✓ Αυτόματες πιπέτες
- ✓ Γυάλινες πιπέτες Pasteur

- ✓ Διαχωριστής MACs
- ✓ Επωαστικός θάλαμος
- ✓ Θάλαμος νηματοειδούς ροής
- ✓ Μικροσφαιρίδια CD34: CD34 microbeads, Miltenyi Biotec
- ✓ Μαγνητικές στήλες
- ✓ Φυγόκεντρος πάγκου: Hermle Z320

Διαλύματα Εργασίας

Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (PBS) 10 mM, pH 7,4: Το διάλυμα περιέχει:

- 8,186 g NaCl
- 1,38 g ένυδρο NaH_2PO_4
- 1,7795 g ένυδρο Na_2HPO_4

Οι ουσίες διαλύονται σε 100 mL απεσταγμένο νερό, το pH ρυθμίζεται στο 7,4 και η τελική συγκέντρωση του διαλύματος που προκύπτει είναι 10 mM.

Διάλυμα PBS 1X pH 7,4: 100 mL διαλύματος D-PBS αραιώνονται με 900 mL αποστειρωμένου H_2O (water for injection). Το διάλυμα φυλάσσεται σε θερμοκρασία δωματίου.

Διάλυμα EDTA (Titriplex III) 100X: 1,58 g EDTA διαλύονται σε 100 mL απεσταγμένου νερού και προκύπτει διάλυμα τελικής συγκέντρωσης 54 mM. Το διάλυμα φυλλάσσεται σε θερμοκρασία δωματίου.

Διάλυμα 2 mM EDTA/PBS: Το διάλυμα παρασκευάζεται σε τελικό όγκο 1 L και φυλλάσσεται στους 4°C.

Διάλυμα 20 mM EDTA/PBS: Το διάλυμα παρασκευάζεται σε τελικό όγκο 50 mL, χρησιμοποιείται ως αντιπηκτικό και φυλλάσσεται στους 4°C.

Διάλυμα 0,5% BSA/2 mM EDTA/PBS: Το διάλυμα παρασκευάζεται σε τελικό όγκο 50 mL και χρειάζεται απαέρωση. Φυλλάσσεται στους 4°C.

Διάλυμα 0,02 N CH_3COOH : CH_3COOH 17,5 N αραιώνεται με απεσταγμένο νερό.

Διάλυμα 3 μM FXa: Όπως περιγράφεται παραπάνω.

Διάλυμα 10 mM voraparaxar: Όπως περιγράφεται παραπάνω.

Διάλυμα 100 U/mL θρομβίνης: Όπως περιγράφεται παραπάνω.

Διάλυμα 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ κολλαγόνου: Το εμπορικά διαθέσιμο κολλαγόνο αραιώνεται με το διάλυμα CH_3COOH 0,02 N. Το διάλυμα αποθηκεύεται στους 4°C.

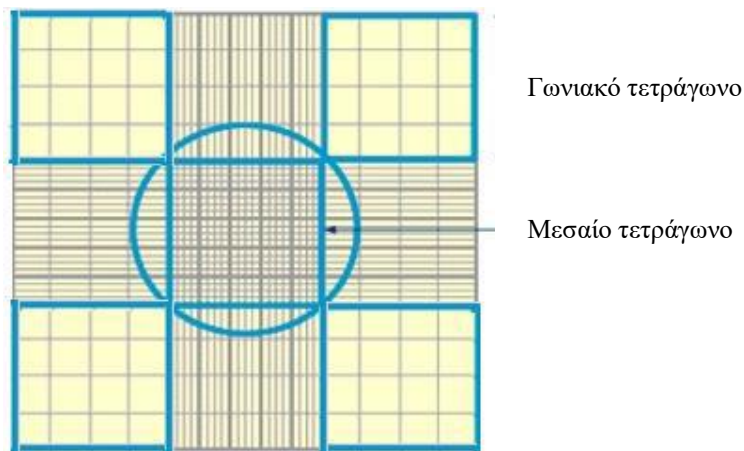
Διάλυμα χρώσης: Παρασκευάζεται με αραιώση της χρωστικής Giemsa με 10 mM PBS σε αναλογία 1:50. Η χρωστική παρασκευάζεται λίγο πριν τη μέτρηση των κυττάρων.

Πειραματική Πορεία

Όλη η πειραματική διαδικασία της απομόνωσης και καλλιέργειας των CD34⁺ κυττάρων γίνεται με αποστειρωμένα υλικά και υπό στείρες συνθήκες εντός του θαλάμου νηματοειδούς ροής. Η διαδικασία πρέπει να γίνει γρήγορα και σε θερμοκρασία 2-8°C ώστε να αποφευχθεί η μη ειδική επισήμανση των κυττάρων.

➤ Απομόνωση MNCs

1. Ολικό αίμα από ομφάλιο λώρο συλλέγεται σε σωληνάκι που περιέχει 6 mL αντιπηκτικό διάλυμα 20 mM EDTA/PBS.
2. Αφαιρούνται με προσοχή θρόμβοι που έχουν σχηματιστεί και το υπόλοιπο αίμα μοιράζεται σε σωληνάκια των 50 mL ανά 9 ή 10 mL τα οποία αραιώνονται σε αναλογία 1:4 με διάλυμα 2 mM EDTA/PBS.
3. Ετοιμάζονται σωληνάκια των 50 mL σε ίσο αριθμό με αυτόν που προέκυψε στο βήμα 2 και στα οποία προστίθενται 15 mL φικόλης. Ακολουθεί η στάγδην προσθήκη του αραιωμένου αίματος του βήματος 2 μέχρι τα 50 mL.
4. Πραγματοποιείται φυγοκέντρηση στα 400 x g για 35 min.
5. Από κάθε σωληνάκι, αφαιρείται η πάνω στοιβάδα με προσοχή και απομονώνονται τα MNCs σε νέο πλαστικό σωληνάκι των 50 mL. Το σωληνάκι συμπληρώνεται μέχρι τα 50 mL με διάλυμα 2 mM EDTA/PBS, αναδεύεται και φυγοκεντρείται στα 300 x g για 10 min.
6. Μετά τη φυγοκέντρηση, αφαιρείται το υπερκείμενο και το ίζημα εκπλένεται με 50 mL διαλύματος 2 mM EDTA/PBS. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στα 200 x g για 10 min.
7. Αφαιρείται το υπερκείμενο και προστίθενται 30 mL διαλύματος 2 mM EDTA/PBS. Ακολουθεί μέτρηση των κυττάρων. Σε 90 μL αραιωμένης χρωστικής Giemsa τοποθετούνται 10 μL εναιωρήματος κυττάρων και 10 μL από το διάλυμα που προκύπτει τοποθετούνται στην πλάκα Neubauer. Μετρώνται τα κύτταρα που εντοπίζονται στα 5 τετράγωνα της πλάκας (Εικόνα 5.4) και ο αριθμός που προκύπτει διαιρείται με το 5 και πολλαπλασιάζεται με 10⁵ επί τον όγκο του εναιωρήματος κυττάρων, ώστε να βρεθεί ο συνολικός αριθμός κυττάρων.



Εικόνα 5.4 Σχηματική απεικόνιση της πλάκας Neubauer. Μετρώνται τα 4 γωνιακά τετράγωνα και το μεσαίο.

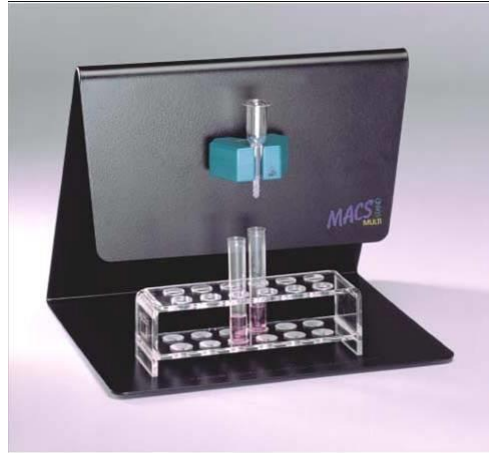
8. Τα κύτταρα μπορούν να διατηρηθούν στους 4°C υπό ανάδευση overnight και η διαδικασία του μαγνητικού διαχωρισμού να πραγματοποιηθεί την επόμενη μέρα, μετά από ένα ακόμη βήμα έκπλυσης.
9. Το σωληνάκι με τα κύτταρα συμπληρώνεται μέχρι τα 50 mL με 2 mM EDTA/PBS και ακολουθεί μία φυγοκέντρηση στα 200 x g για 10 min.
10. Μετά το τέλος της φυγοκέντρησης, απομακρύνεται το υπερκείμενο και τα κύτταρα (μέχρι $0,5 \times 10^8$ κύτταρα) επαναιωρούνται σε 300 μ L διαλύματος 0,5% BSA/2 mM EDTA/PBS και ακολουθεί η μαγνητική επισήμανση.

➤ **Μαγνητική επισήμανση**

11. Στο εναιώρημα κυττάρων που προκύπτει από το βήμα 10 προστίθενται 100 μ L του FcR blocking και 100 μ L σφαιριδίων CD34. Ακολουθεί έντονη ανάδευση και τα κύτταρα επωάζονται στους 4°C για 30 min με ανάδευση κάθε 10 min.
12. Στη συνέχεια, προστίθενται 10 mL διαλύματος 0,5% BSA/2 mM EDTA/PBS και ακολουθεί φυγοκέντρηση στα 300 x g για 10 min.
13. Το υπερκείμενο απομακρύνεται και προστίθενται 500 μ L διαλύματος 0,5% BSA/2 mM EDTA/PBS.

➤ **Μαγνητικός διαχωρισμός**

14. Αρχικά, η στήλη τοποθετείται στο μαγνητικό διαχωριστή (Εικόνα 5.5) και εκπλένεται 3 φορές με 500 μL διαλύματος 0,5% BSA/2 mM EDTA/PBS. Χρειάζεται πολύ προσοχή καθώς η στήλη δεν πρέπει να στεγνώσει. Συνεπώς, κάθε προσθήκη διαλύματος (ή κυττάρων σε επόμενο βήμα), πραγματοποιείται πριν περάσει όλο το υγρό που είχε προστεθεί μέσα από τη στήλη.



Εικόνα 5.5 MACs διαχωριστής, μαγνήτης και στήλη για μαγνητική επισημάνση κυττάρων.

15. Το εναιώρημα των κυττάρων τοποθετείται στη στήλη, αφήνεται να περάσει και τα μη επισημασμένα κύτταρα συλλέγονται σε σωληνάκι των 15 mL.
16. Η στήλη εκπλένεται 3 φορές με το διάλυμα 0,5% BSA/2 mM EDTA/PBS και το διάλυμα συλλέγεται στο ίδιο σωληνάκι με τα μη επισημασμένα κύτταρα.
17. Εν συνεχεία, 1 mL διαλύματος 0,5% BSA/2 mM EDTA/PBS τοποθετείται στη στήλη η οποία μεταφέρεται σε νέο σωληνάκι των 15 mL. Με έμβολο πραγματοποιείται η συλλογή των μαγνητικά επισημασμένων κυττάρων.
18. Για αυξημένη καθαρότητα των CD34^+ κυττάρων, επαναλαμβάνονται τα βήματα 14-17 στο κλάσμα που συλλέχθηκε στο βήμα 17. Η εκτίμηση της καθαρότητας των CD34^+ κυττάρων γίνεται με τη μέθοδο της κυτταρομετρίας ροής.

5.3.2 Καλλιέργεια των CD34^+ κυττάρων και σχηματισμός OECs

Αντιδραστήρια

- ✓ Αλβουμίνη βόειου ορού: Bovine serum albumin (BSA), Sigma-Aldrich
- ✓ Γλυκερόλη: Glycerol
- ✓ Διμεθυλοσουλφοξείδιο: Dimethyl sulfoxide, DMSO

- ✓ Θερμικά απενεργοποιημένος ορός από έμβρυο βοός: heat inactivated fetal bovine serum, FBS, Gibco BRL Life Technologies
- ✓ Θρεπτικό υλικό των ενδοθηλιακών κυττάρων: Endothelial cell basal medium-2, EBM-2 500 mL, Lonza και περιλαμβάνει τους παρακάτω αυξητικούς παράγοντες:
 - Αγγειακό ενδοθηλιακό αυξητικό παράγοντα: Vascular endothelial growth factor, VEGF, 0,5 mL
 - Ανθρώπινο επιδερμικό αυξητικό παράγοντα: human epidermal growth factor, hEGF, 0,5 mL
 - Ασκορβικό οξύ: Ascorbic acid, 0,5mL
 - Αυξητικό παράγοντα Β των ανθρώπινων ινοβλαστών: human fibroblast growth factor-B, hFGF-B, 2 mL
 - Αυξητικό παράγοντα R3: R3 insulin like growth factor-1, R3-IGF-1, 0,5 mL
 - Διάλυμα Γενταμικίνης/Αμφοτερικίνης Β: Gentamicine/Amphotericine B solution, 0,5 mL
 - Ηπαρίνη: Heparin, 0,5 mL
 - Ορό από έμβρυο βοός: Fetal bovine serum, FBS, 10 mL
 - Υδροκορτιζόνη: Hydrocortizone, 0,5 mL
- ✓ Θρυψίνη/EDTA: Trypsin/EDTA, Gibco BRL Life Technologies
- ✓ Κολλαγόνο: Collagen type I, rat tail, BD Biosciences
- ✓ Οξικό οξύ (17,5 N): CH₃COOH
- ✓ D-PBS: Dulbecco's phosphate buffered saline, 500 mL, Gibco BRL Life Technologies
- ✓ EDTA: Ethylenediaminetetraacetic acid, αιθυλενοδιαμινοτετραοξικό οξύ, M.W.: 292,29 g/mol

Όργανα-Υλικά

- ✓ Αιμοκυτταρόμετρο: Haemocytometer chamber ή πλάκα Neubauer
- ✓ Ανάστροφο μικροσκόπιο: A.Krüss Optronics
- ✓ Αποστειρωμένα βαθμονομημένα σωληνάκια των 15 και 50 mL
- ✓ Αποστειρωμένα κρυοφιαλίδια των 2 mL
- ✓ Αποστειρωμένα πλαστικά πλακίδια καλλιέργειας κυττάρων 6 θέσεων
- ✓ Αποστειρωμένα πλαστικά τρυβλία καλλιέργειας

- ✓ Αποστειρωμένα πλαστικά σιφόνια των 5, 10 και 25 mL
- ✓ Αυτόματες πιπέτες
- ✓ Γυάλινες πιπέτες Pasteur
- ✓ Επωαστικός θάλαμος
- ✓ Θάλαμος νηματοειδούς ροής
- ✓ Φυγόκεντρος πάγκου: Hermle Z320

Διαλύματα Εργασίας

Διάλυμα PBS 1X pH 7,4: Όπως περιγράφεται παραπάνω.

Διάλυμα 0,02 N CH₃COOH: Όπως περιγράφεται παραπάνω.

Διάλυμα 50 µg/mL κολλαγόνου: Όπως περιγράφεται παραπάνω.

Πειραματική Πορεία

1. Μία θέση σε πλακίδιο 6 θέσεων επιστρώνεται με διάλυμα 50 µg/mL κολλαγόνου ώστε να καλυφθεί ο πυθμένας (650-700 µL) και τοποθετείται στο θάλαμο επώασης για 20 min.
 2. Πραγματοποιούνται 2 εκπλύσεις με 2 mL PBS 1X (2 mL).
 3. Τα CD34⁺ κύτταρα τοποθετούνται στη θέση του πλακιδίου καλλιέργειας στο οποίο προστίθενται μέχρι τα 2 mL θρεπτικό υλικό και αναδεύονται σταυρωτά ώστε η κατανομή τους να είναι ομοιόμορφη.
 4. Μετά από 4 h, πραγματοποιούνται 2 εκπλύσεις με PBS 1X (2 mL) και αλλαγή θρεπτικού υλικού (2 mL).
 5. Πραγματοποιείται καθημερινά αλλαγή θρεπτικού υλικού (2 mL), μετά από 2 εκπλύσεις με PBS 1X (2 mL), για περίπου 15 ημέρες και κάθε 2 ημέρες για άλλες 15 ημέρες. Η διαφοροποίηση των κυττάρων παρατηρείται στις 7 με 15 ημέρες.
- ✓ Επίδραση των παραγόντων FXa και θρομβίνης στη διαφοροποίηση των CD34⁺ κυττάρων προς OECs.
 - Έπειτα από 3 ημέρες καλλιέργειας, μετά από κάθε αλλαγή θρεπτικού, τα κύτταρα επωάζονται με 50 nM FXa ή 8 U/mL θρομβίνης για 10 ημέρες. Σκοπός είναι να ελεγχθεί η πιθανή δράση του FXa και της θρομβίνης στην ταχύτητα της διαφοροποίησης των κυττάρων προς OECs, μικροσκοπικά.

6. Όταν τα κύτταρα καλύψουν το 70-90% του πλακιδίου, μπορούν να αποθηκευτούν (1^η γενιά) ή να ανακαλλιεργηθούν.

➤ **Ανακαλλιέργεια κυττάρων**

7. Πραγματοποιούνται 2 εκπλύσεις με PBS 1X (2 mL) και προστίθενται 200 μL διαλύματος θρυψίνης/EDTA. Το πλακίδιο τοποθετείται στο θάλαμο επώασης για 2 min, ώστε να αποκολληθούν τα κύτταρα.
8. Το διάλυμα θρυψίνης/EDTA αραιώνεται 1:10 με θρεπτικό υλικό.
9. Τα κύτταρα συλλέγονται σε σωληνάκι των 15 mL, μετρώνται και φυγοκεντρώνονται στα 340 x g για 5 min. Η μέτρηση των OECs διαφέρει σε σχέση με εκείνη των CD34⁺ καθώς δεν πραγματοποιείται η χρήση χρωστικής. Αντίθετα, 10 μL κυττάρων μεταφέρονται στην πλάκα Neubauer και τα κύτταρα μετρώνται όπως αναφέρθηκε παραπάνω, με τη διαφορά ότι ο αριθμός που προκύπτει πολλαπλασιάζεται με 10⁴ καθώς τα κύτταρα δεν έχουν αραιωθεί. Ο αριθμός των κυττάρων που επιστρώνονται σε ένα τρυβλίο είναι 500.000-2.000.000, ανάλογα με τις πειραματικές ανάγκες.
10. Μετά τη φυγοκέντρωση τα κύτταρα επαναιωρούνται σε 10 mL θρεπτικού υλικού και τοποθετούνται σε τρυβλίο που έχει επιστρωθεί με κολλαγόνο.
11. Πραγματοποιείται αλλαγή θρεπτικού υλικού (10 mL) κάθε 2 ημέρες, μετά από 2 εκπλύσεις με PBS 1X (10 mL) μέχρι τα κύτταρα να καλύψουν το 70-90% του τρυβλίου.

➤ **Πάγωμα κυττάρων**

12. Στο τρυβλίο πραγματοποιούνται 2 εκπλύσεις με PBS 1X (10 mL) και προστίθεται 1 mL θρυψίνη/EDTA για 2 min στους 37°C.
13. Η θρυψίνη αραιώνεται 1:10 με θρεπτικό υλικό και τα κύτταρα συλλέγονται σε σωληνάκι των 15 mL.
14. Τα κύτταρα μετρώνται και μοιράζονται σε σωληνάκια των 15 mL ανά 500.000-1.000.000.
15. Πραγματοποιείται φυγοκέντρωση στα 340 x g για 5 min και τα κύτταρα από κάθε σωληνάκι αναδιασπείρονται σε 1 mL παγωμένου διαλύματος 5% DMSO/FBS.
16. Τα κύτταρα 2^{ης} γενιάς μεταφέρονται σε ίσο αριθμό κρυοφιαλιδίων και τοποθετούνται για 2-3 ημέρες στους -80°C και στη συνέχεια σε υγρό άζωτο για μακρόχρονη διατήρηση.

5.3.3 Καλλιέργεια HUVECs

Τα HUVECs, καθώς είναι ώριμα ενδοθηλιακά κύτταρα εκτενώς μελετημένα, χρησιμοποιούνται ως θετικός μάρτυρας. Τα HUVECs επωάζονται με τις ίδιες συνθήκες που δοκιμάζονται στα OECs με σκοπό να μελετηθούν πιθανές διαφορές ως προς την έκφραση και έκκριση ουσιών μεταξύ των δύο κυτταρικών σειρών.

Αντιδραστήρια

- ✓ Αλβουμίνη βόειου ορού: Bovine serum albumin (BSA), Sigma-Aldrich
- ✓ Ανθρώπινα ώριμα ενδοθηλιακά κύτταρα: HUVECs, Lonza
- ✓ Αντιβιοτικά Πενικιλίνη/Στρεπτομυκίνη: 10.000 U/mL penicillin/10.000 µg/mL streptomycin, 100x PAA
- ✓ Αυξητικό συμπλήρωμα ενδοθηλιακών κυττάρων: Endothelial cell growth supplement (ECGS), φιαλίδια των 15 mg, Sigma-Aldrich
- ✓ Διμεθυλοσουλφοξείδιο: Dimethyl sulfoxide, DMSO
- ✓ Ηπαρίνη: Heparin 5.000 iu/mL, LEO
- ✓ Θερμικά απενεργοποιημένος ορός από έμβryo βοός: heat inactivated fetal bovine serum, FBS, Gibco BRL Life Technologies
- ✓ Θρεπτικό υλικό Medium 199 (M199, Μη πλήρες): 500 mL, Gibco BRL Life Technologies
- ✓ Θρυψίνη/EDTA: Trypsin/EDTA, Gibco BRL Life Technologies
- ✓ Κολλαγόνο: Collagen type I, rat tail, BD Biosciences
- ✓ Οξικό οξύ (17,5 N): CH₃COOH
- ✓ D-PBS: Dulbecco's phosphate buffered saline, 500 mL, Gibco BRL Life Technologies

Όργανα-Υλικά

- ✓ Αιμοκυτταρόμετρο: Haemocytometer chamber ή πλάκα Neubauer
- ✓ Ανάστροφο μικροσκόπιο: A.Krüss Optronics
- ✓ Αποστειρωμένα βαθμονομημένα σωληνάκια των 15 mL
- ✓ Αποστειρωμένα πλαστικά πλακίδια καλλιέργειας κυττάρων 6 θέσεων
- ✓ Αποστειρωμένα πλαστικά σιφόνια των 5, 10 και 25 mL
- ✓ Αποστειρωμένα πλαστικά τρυβλία καλλιέργειας
- ✓ Επωαστικός θάλαμος

- ✓ Θάλαμος νηματοειδούς ροής
- ✓ Φυγόκεντρος πάγκου: Hermle Z320

Διαλύματα Εργασίας

Διάλυμα PBS 1X pH 7,4: Όπως περιγράφεται παραπάνω.

Διάλυμα 50 µg/mL κολλαγόνου: Όπως περιγράφεται παραπάνω.

Πλήρες θρεπτικό υλικό Medium 199. Σε 237 mL M199 προστίθενται:

- 15 mg ECGS
- 60 mL FBS
- 3 mL διαλύματος πενικιλίνης/στρεπτομυκίνης
- 150 µL ηπαρίνη

Το θρεπτικό υλικό φυλάσσεται στους 4°C.

Πειραματική Πορεία

Τα εμπορικά διαθέσιμα HUVECs 1^{ns} γενιάς ήταν αποθηκευμένα σε υγρό άζωτο.

1. Επιστρώνονται 3,5 mL 50 µg/mL κολλαγόνου σε τρυβλίο το οποίο τοποθετείται για 20 min στους 37°C.
2. Παράλληλα σε σωληνάκι των 15 mL τοποθετούνται 10 mL πλήρους θρεπτικού υλικού.
3. Το φιαλίδιο που περιέχει τα HUVECs τοποθετείται στους 37°C για να πραγματοποιηθεί η απόψυξη των κυττάρων. Τα κύτταρα αμέσως μόλις ξεπαγώσουν μεταφέρονται στο σωληνάκι με το θρεπτικό υλικό και αναδιασπείρονται καλά ώστε η κατανομή τους να είναι ομοιόμορφη.
4. Μετά το πέρας των 20 min, το τρυβλίο εκπλένεται 2 φορές με PBS 1X (10 mL) και ακολουθεί η επίστρωση των κυττάρων.
5. Ακολουθεί αλλαγή θρεπτικού υλικού εντός 16-24 h (10 mL) καθώς το DMSO που χρησιμοποιείται στο διάλυμα παγώματος είναι τοξικό για τα κύτταρα.
6. Τέλος, πραγματοποιείται αλλαγή θρεπτικού υλικού (10 mL) κάθε 2 ημέρες, μετά από 2 εκπλύσεις με PBS 1X (10 mL), μέχρι τα κύτταρα να καλύψουν το 70-90% της επιφάνειας του τρυβλίου.

➤ Ανακαλλιέργεια HUVECs

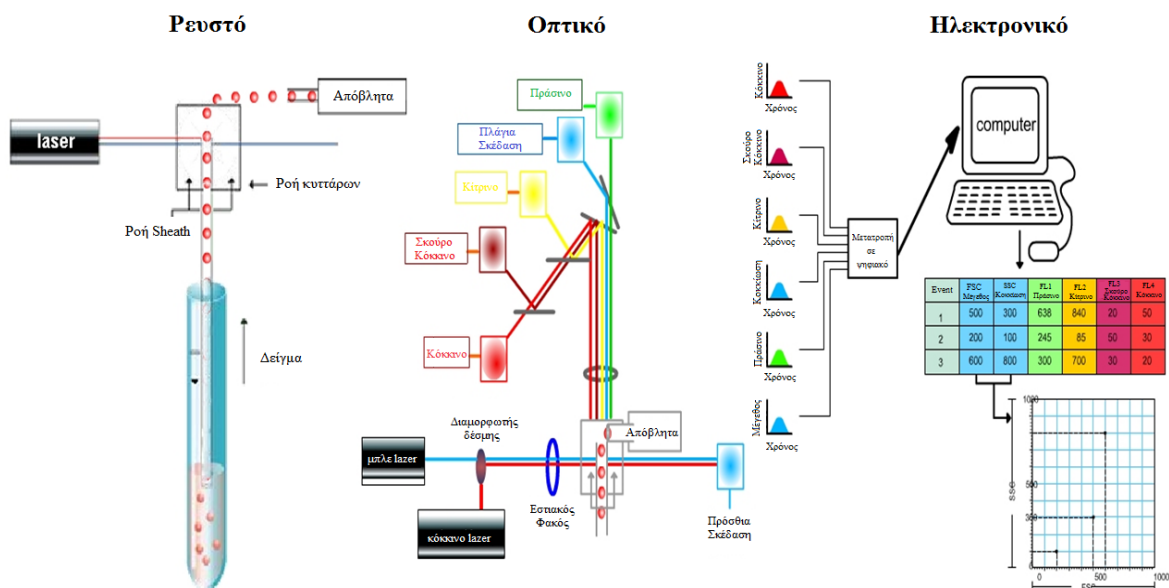
7. Τα HUVECs 1^{ης} γενιάς ανακαλλιεργούνται σε τρυβλία, όπως περιγράφεται παραπάνω, ανά 500.000 κύτταρα, με σκοπό να αποθηκευθούν πολλά φιαλίδια 2^{ης} γενιάς. Σε όλα τα πειράματα που έγιναν στην παρούσα διδακτορική διατριβή, χρησιμοποιήθηκαν HUVECs 3^{ης} γενιάς.

5.4 Κυτταρομετρία ροής

Η κυτταρομετρία ροής είναι μία γρήγορη, ποσοτική και δυναμική τεχνική με την οποία μπορούμε ταυτόχρονα να μετρήσουμε και να αναλύσουμε πληθώρα φυσικών κυτταρικών χαρακτηριστικών. Σχεδιάστηκε για να ενισχύσει τη μικροσκοπική ανάλυση των κυττάρων με χρήση φθορίζοντων ιχνηθετών. Για τη μέτρηση και την ανάλυση είναι απαραίτητη η ροή των κυττάρων μέσω μίας συσκευής οπτικής ανίχνευσης, ενώ με τη χρήση φθορίζουσων χρωστικών πραγματοποιείται ενίσχυση της μικροσκοπικής ανάλυσης τους. Το κυτταρόμετρο ροής είναι το όργανο που ανιχνεύει και μετράει το ποσό της φθορίζουσας χρώσης επί των κυττάρων. Αποτελείται από μία ή περισσότερες δέσμες φωτός που παρέχουν την απαραίτητη ενέργεια διέγερσης και από μία σειρά ανιχνευτών φθορισμού. Δύο επιπλέον ανιχνευτές αναλύουν δύο ανεξάρτητες από το φθορισμό φυσικές κυτταρικές παραμέτρους: την πρόσθια σκέδαση, που είναι ανάλογη του μεγέθους και την πλάγια σκέδαση που είναι ανάλογη της κοκκίωσης.

Τρία είναι τα συστήματα που απαρτίζουν ένα κυτταρόμετρο ροής: ένα ρευστό, ένα οπτικό και ένα ηλεκτρονικό (Εικόνα 5.6). Το σύστημα των ρευστών μεταφέρει και διευθετεί τα κύτταρα, έτσι ώστε να περνούν ένα-ένα από τη δέσμη φωτός. Το οπτικό σύστημα αποτελείται α) από δέσμες φωτός οι οποίες μετά την πρόσπτωση τους στα κύτταρα παράγουν οπτικά σήματα και β) από οπτικά φίλτρα τα οποία κατευθύνουν τα σήματα φωτός στους κατάλληλους ανιχνευτές. Το ηλεκτρονικό σύστημα μετατρέπει σήματα πρόσθιας και πλάγιας σκέδασης, καθώς και σήματα φθορισμού, σε ηλεκτρικά σήματα τα οποία μπορούν να επεξεργαστούν από τον Η/Υ.

Τα 3 Συστήματα του Κυτταρομέτρου Ροής



Εικόνα 5.6 Σχηματική απεικόνιση των τριών συστημάτων που απαρτίζουν ένα κυτταρομέτρο ροής.

Λόγω της πολυπλοκότητας της μεθόδου, για τη σωστή διεξαγωγή της πρέπει να ληφθούν υπόψη τα παρακάτω:

- Το δείγμα πρέπει να βρίσκεται σε μορφή κυτταρικού εναιωρήματος.
- Τα προς ανάλυση κύτταρα πρέπει να έχουν μέγεθος μεταξύ 0,2-150 μm .
- Τα προς ανάλυση κύτταρα πρέπει να επισημαίνονται με αντισώματα που έχουν σημανθεί με τις κατάλληλες φθορίζουσες χρωστικές.

Τα σημασμένα αντισώματα συνδέονται στην επιφάνεια των κυττάρων με τα αντίστοιχα αντιγόνα. Κατόπιν, τα κύτταρα εκπλένονται για την απομάκρυνση της περίσσειας αντισώματος και ακολουθεί η ανάλυση με το κυτταρομέτρο ροής και η καταγραφή του ποσού φθορισμού και των δεικτών σκέδασης. Ο προσδιορισμός των επιθυμητών αντιγόνων γίνεται μέσω των παραγόμενων σημάτων φθορισμού. Τέλος, οι καταγεγραμμένες πληροφορίες αναλύονται από τον υπολογιστή.

Τα αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα διδακτορική διατριβή είναι τα παρακάτω:

- Το PAC-1-FITC, ένα εξειδικευμένο μονοκλωνικό αντίσωμα το οποίο αναγνωρίζει έναν επίτοπο στην ενεργοποιημένη ιντεγκρίνη $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ των ενεργοποιημένων αιμοπεταλίων, ενώ δεν αναγνωρίζει τη μη ενεργοποιημένη μορφή της ιντεγκρίνης.

- Το anti-CD31-FITC, ένα εξειδικευμένο μονοκλωνικό αντίσωμα το οποίο αναγνωρίζει έναν επίτοπο στο μόριο PECAM-1 που εκφράζεται στην επιφάνεια των ECs και το οποίο αποτελεί δείκτη ενδοθηλιακού φαινοτύπου.
- Το anti-CD34-FITC, ένα εξειδικευμένο μονοκλωνικό αντίσωμα το οποίο αναγνωρίζει έναν επίτοπο στη γλυκοπρωτεΐνη CD34 που εκφράζεται στην επιφάνεια των CD34⁺ κυττάρων και αποτελεί δείκτη αιμοποιητικής προέλευσης.
- Το anti-CD45-PE, ένα εξειδικευμένο μονοκλωνικό αντίσωμα το οποίο αναγνωρίζει έναν επίτοπο στην πρωτεΐνη CD45 που εκφράζεται στην επιφάνεια των λευκοκυττάρων.
- Το anti-CD54-PE, ένα εξειδικευμένο μονοκλωνικό αντίσωμα το οποίο αναγνωρίζει έναν επίτοπο το μόριο ICAM-1 που εκφράζεται στην επιφάνεια των ECs.
- Το anti-CD62E-PE, ένα εξειδικευμένο μονοκλωνικό αντίσωμα το οποίο αναγνωρίζει έναν επίτοπο στην E-σελεκτίνη.
- Το anti-CD62P-PE, ένα εξειδικευμένο μονοκλωνικό αντίσωμα το οποίο αναγνωρίζει έναν επίτοπο στην P-σελεκτίνη.
- Το anti-VEGFR-R₂/KDR-PE, ένα εξειδικευμένο μονοκλωνικό αντίσωμα που αναγνωρίζει έναν επίτοπο στον υποδοχέα του VEGF.
- Το anti-CD61-PerCP, ένα εξειδικευμένο μονοκλωνικό αντίσωμα το οποίο αναγνωρίζει έναν επίτοπο στη β₃ υπομονάδα της ιντεγκρίνης α_{IIb}β₃, είτε στην ενεργοποιημένη, είτε στην ανενεργή της κατάσταση, αποτελώντας αιμοπεταλιακό δείκτη.

Ο προσδιορισμός των αντιγόνων στην κυτταρική επιφάνεια, γίνεται μέσω των παραγόμενων σημάτων φθορισμού από τα σημασμένα αντισώματα. Για να παραχθούν τα σήματα φθορισμού απαιτείται μία πηγή ενέργειας συγκεκριμένου μήκους κύματος, η οποία προέρχεται από τη δέσμη φωτός του οργάνου. Η ακτινοβολία αυτή είναι σταθερή και μονοχρωματική, ισχύος 15 mW και μήκους κύματος 488 nm και προκαλεί τη διέγερση των φθορίζουσών ουσιών. Μετά τη διέγερση τους, οι φθορίζουσες χρωστικές εκπέμπουν σε διάφορα μήκη κύματος, μεγαλύτερα από εκείνα της διέγερσης. Οι χρωστικές ισοθειοκυανική φλουορεσκεΐνη (FITC), φυκοερυθρίνη (PE) και πρωτεϊνικό σύμπλοκο περιδινίνης-χλωροφύλλης (PerCP) που χρησιμοποιούνται για τη σήμανση των αντισωμάτων, εκπέμπουν σε μήκη κύματος 520, 578 και 678 nm, αντίστοιχα. Τα αποτελέσματα αναπαρίστανται ως διαγράμματα δύο παραμέτρων, της πρόσθιας και της πλάγιας σκέδασης, ως διαγράμματα δύο διαφορετικών φθοριοχρωμάτων ή ως ιστογράμματα όπου παριστάνονται τα συμβάματα ως προς την ένταση φθορισμού ενός φθοριοχρώματος.

5.4.1 Έλεγχος της βιολογικής δράσης ουσιών σε PRP και πλυμένα αιμοπετάλια

Μελετήθηκε η δόσο- και χρονο-εξαρτώμενη δράση του voraparaxar στην επαγόμενη από TRAP-6 ενεργοποίηση του υποδοχέα $\alpha_{IIb}\beta_3$, καθώς και στην έκφραση της P-σελεκτίνης, σε PRP. Ακόμη, πραγματοποιήθηκε έλεγχος της βιολογικής δράσης του FXa στην ενεργοποίηση του υποδοχέα $\alpha_{IIb}\beta_3$ και την έκφραση της P-σελεκτίνης, σε πλυμένα αιμοπετάλια. Καθώς δεν έχει μελετηθεί η δράση του FXa στη ενεργοποίηση πλυμένων αιμοπεταλίων με κυτταρομετρία ροής, πραγματοποιήθηκαν δόσο και χρονο-εξαρτώμενα πειράματα. Επιπλέον, μελετήθηκε και η δόσο-εξαρτώμενη δράση του voraparaxar στην επαγόμενη από τον FXa ενεργοποίηση του υποδοχέα $\alpha_{IIb}\beta_3$, καθώς και στην έκφραση της P-σελεκτίνης, σε πλυμένα αιμοπετάλια.

Αντιδραστήρια

- ✓ Διμεθυλοσουλφοξείδιο: Dimethyl sulfoxide, DMSO
- ✓ Δις-ένυδρο μονόξινο φωσφορικό νάτριο: Di-Sodium hydrogen phosphate dihydrate ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), M.W.: 177,99 g/mol
- ✓ Ένυδρο δισόξινο φωσφορικό νάτριο: Sodium dihydrogen phosphate monohydrate ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$), M.W.: 137,99 g/mol
- ✓ Θρομβίνη: Human thrombin 1000 Units, Sigma-Aldrich
- ✓ Παράγοντας Xa: Human FXa 100 μg , Haematologic Technologies
- ✓ Υγρό περιροής: Sheath fluid, Becton Dickinson
- ✓ Φυσιολογικός ορός (0,9% χλωριούχο νάτριο): Normal saline (0.9% Sodium chloride)
- ✓ Χλωριούχο νάτριο: Sodium chloride (NaCl), M.W.: 58,44 g/mol
- ✓ PAC-1-FITC: Μονοκλωνικό αντίσωμα, Becton Dickinson
- ✓ Anti-CD62P-PE: Μονοκλωνικό αντίσωμα, Becton Dickinson
- ✓ Anti-CD61-PerCP: Μονοκλωνικό αντίσωμα, Becton Dickinson
- ✓ Voraparaxar: 5 mg, M.W.: 492,58 g/mol, AxonMedChem

Όργανα-Υλικά

- ✓ Αιμοκυτταρόμετρο: Haemocytometer chamber ή πλάκα Neubauer
- ✓ Αυτόματες πιπέτες
- ✓ Κυτταρόμετρο ροής FACScalibur: Flow Cytometer, Becton Dickinson
- ✓ Λογισμικό Cell Quest Software: Becton Dickinson
- ✓ Οπτικό μικροσκόπιο φωτεινού πεδίου: Olympus CX41

- ✓ Πλαστικά σωληνάκια πολυστυρενίου: Becton Dickinson
- ✓ Φυγόκεντρος πάγκου: Hettich Rotofix 32
- ✓ Vortex

Διαλύματα Εργασίας

Διάλυμα 10 mM PBS, pH 7,4: Όπως περιγράφεται παραπάνω.

Διάλυμα 10 U/mL θρομβίνης: Όπως περιγράφεται παραπάνω.

Διάλυμα 3 μM FXa: Όπως περιγράφεται παραπάνω.

Διάλυμα 10 mM voraparaxar: Όπως περιγράφεται παραπάνω.

Πειραματική Πορεία

1. Πραγματοποιείται παρασκευή PRP και πλυμένων αιμοπεταλίων όπως περιγράφεται παραπάνω και η συγκέντρωσή τους προσαρμόζεται στα 250.000 αιμοπετάλια/μL.
2. Προετοιμάζονται τόσα erpendorfs όσα και ο αριθμός των προς μελέτη δειγμάτων. Ανοίγονται τρύπες στο καπάκι των erpendorfs για την καλή οξυγόνωση των κυττάρων κατά τη διάρκεια των επώσεων.
3. Τοποθετούνται 300 μL εναιωρήματος PRP ή πλυμένων αιμοπεταλίων σε κάθε erpendorf.
Οι επώσεις που πραγματοποιήθηκαν με σκοπό τη μελέτη της βιολογικής δράσης των προς μελέτη ουσιών ήταν οι παρακάτω:
 - PRP επώστηκε με 0,4% DMSO ή ένα εύρος συγκεντρώσεων voraparaxar από 0,1-10 μM για 5, 15, 30 και 60 min στους 37°C, με ήπια ανάδευση κάθε 10 min και ακολούθησε ενεργοποίηση τους με 10 μM TRAP-6.
 - Για την εύρεση των βέλτιστων συνθηκών δράσης του FXa, πλυμένα αιμοπετάλια επώστηκαν με 0,05 ή 0,5 nM FXa για 5 ή 20 min στους 37°C, με ήπια ανάδευση κάθε 10 min.
 - Πλυμένα αιμοπετάλια επώστηκαν με 0,4% DMSO ή ένα εύρος συγκεντρώσεων voraparaxar από 5-100 nM για 15 min στους 37°C και ακολούθησε ενεργοποίηση τους με 0,05 nM FXa, με ήπια ανάδευση κάθε 10 min.
4. Προετοιμάζονται σωληνάκια Becton-Dickinson που αντιστοιχούν στον αριθμό των συνθηκών, 15 min πριν ολοκληρωθούν οι επώσεις. Στον πυθμένα τοποθετούνται με προσοχή και χωρίς

να έρθουν σε επαφή 5 μ L από κάθε ένα από τα αντισώματα PAC-1-FITC, anti-CD62P-PE και anti-CD61-PerCP.

5. Μετά το πέρας των επωάσεων τοποθετούνται 5 μ L από κάθε δείγμα σε κάθε σωληνάκι με προσοχή ώστε να μην έρθει σε επαφή με τα αντισώματα.
6. Όλα τα δείγματα συμπληρώνονται με 50 μ L 10 mM PBS, pH 7,4 και ακολουθεί πολύ ήπια ανάδευση σε vortex.
7. Τα δείγματα επωάζονται για 20 min σε θερμοκρασία δωματίου, στο σκοτάδι.
8. Σε κάθε σωληνάκι προστίθενται 450 μ L 10 mM PBS και ακολουθεί ανάδευση σε vortex.
9. Πραγματοποιείται η μέτρηση των δειγμάτων στο κυτταρόμετρο ροής, με υψηλή ροή και μέχρι τα 10.000 events.
10. Τέλος, ακολουθεί η ανάλυση των δεδομένων στον υπολογιστή. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέση ένταση φθορισμού (mean fluorescence intensity, MFI) και ως %gated PAC-1/CD61⁺ και CD62P/CD61⁺ κύτταρα.

5.4.2 Έλεγχος της βιολογικής δράσης ουσιών σε ολικό αίμα

Στην παρούσα διατριβή διερευνήθηκε ο ρόλος του PAR-1 στη διαφοροποίηση CD34⁺ κυττάρων προς EPCs, καθώς και στην αλληλεπίδραση των αιμοπεταλίων με τα CD34⁺ κύτταρα. Συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκε ως αγωνιστής το TRAP-6, ενώ πραγματοποιήθηκαν πειράματα με voraparaxar, για τον έλεγχο της πιθανής ανασταλτικής του δράσης τόσο στη διαφοροποίηση των CD34⁺ κυττάρων, όσο και στη δημιουργία συζευγμάτων τους με τα αιμοπετάλια. Επιπρόσθετα, χρησιμοποιήθηκε ως αγωνιστής και το ADP και μελετήθηκε επίσης η πιθανή ανασταλτική δράση του voraparaxar.

Αντιδραστήρια

- ✓ Διμεθυλοσουλφοξείδιο: Dimethyl sulfoxide, DMSO
- ✓ Όξινο ανθρακικό κάλιο: Potassium hydrogen carbonate (KHCO₃), M.W.: 100,12 g/mol
- ✓ Φυσιολογικός ορός (0,9% χλωριούχο νάτριο): Normal saline (0.9% Sodium chloride)
- ✓ Χλωριούχο αμμώνιο: Ammonium chloride (NH₄Cl), M.W.:53,49 g/mol
- ✓ Anti-CD34-FITC: Μονοκλωνικό αντίσωμα, Becton Dickinson
- ✓ Anti-VEGFR-R₂/KDR-PE: Μονοκλωνικό αντίσωμα, Becton Dickinson
- ✓ Anti-CD61-PerCP: Μονοκλωνικό αντίσωμα, Becton Dickinson

- ✓ Ka_2EDTA :
- ✓ TRAP-6: 5 mg, M.W.: 748,88 g/mol, Bachem
- ✓ Voraraxar: 5 mg, M.W.: 492,58 g/mol, AxonMedChem

Όργανα-Υλικά

- ✓ Κυτταρόμετρο ροής FACScalibur: Flow Cytometer, Becton Dickinson
- ✓ Λογισμικό Cell Quest Software: Becton Dickinson
- ✓ Πλαστικά σωληνάκια πολυστυρενίου: Becton Dickinson
- ✓ Vortex

Διαλύματα Εργασίας

Διάλυμα 10 mM PBS, pH 7,4: Όπως περιγράφεται παραπάνω.

Διάλυμα λύσης των ερυθροκυττάρων pH 7,4: Το διάλυμα περιέχει:

- 0,834 g NH_4Cl
- 0,1 g $KHCO_3$
- 0,0036 g Ka_2EDTA

Οι ουσίες διαλύονται σε 100 mL απεσταγμένο νερό και το pH ρυθμίστηκε στο 7,4. Το διάλυμα διατηρείται στο ψυγείο.

Διάλυμα 10 mM ADP: Όπως περιγράφεται παραπάνω.

Διάλυμα 5 mM TRAP-6: Όπως περιγράφεται παραπάνω.

Διάλυμα 10 mM voraraxar: Όπως περιγράφεται παραπάνω.

Πειραματική Πορεία

1. Σε σωληνάκι πολυπροπυλενίου που περιέχει 1 mL αντιπηκτικό προστίθενται 9 mL ολικού αίματος
2. Ολικό αίμα επωάζεται σε eppendorfs με 0,05% DMSO ή 2 μM voraraxar για 60 min στους 37°C, με ήπια ανάδευση κάθε 10 min.
3. Ετοιμάζονται τα αντίστοιχα σωληνάκια κυτταρομέτρου στα οποία προστίθενται 5 μL των αντισωμάτων anti-CD34-FITC, anti-VEGFR-R₂/KDR-PE και anti-CD61-PerCP. Απαιτείται προσοχή ώστε να μην αναμιχθούν τα αντισώματα.

4. Στα σωληνάκια με τα αντισώματα προστίθενται 50 μL ολικού αίματος που έχει επωαστεί με DMSO ή voraparaxar.
5. Ακολουθεί ενεργοποίηση με 50 μM TRAP-6 ή ADP για 10 ή 60 min στους 37°C, με ήπια ανάδευση κάθε 10 min.
6. Μετά το πέρας της επώασης, σε κάθε δείγμα προστίθενται 2 mL διαλύματος λύσης και ακολουθεί έντονη ανάδευση. Τα δείγματα τοποθετούνται στον πάγο για 20-30 min για να πραγματοποιηθεί λύση των ερυθροκυττάρων.
7. Πραγματοποιείται φυγοκέντρηση στα 630 x g για 5 min.
8. Το υπερκείμενο αποχύνεται απότομα και πραγματοποιείται αναδιασπορά σε 500 μL 10 mM PBS.
9. Πραγματοποιείται η μέτρηση των δειγμάτων στο κυτταρόμετρο ροής, με υψηλή ροή και μέχρι τα 100.000 events.
10. Τέλος, ακολουθεί η ανάλυση των δεδομένων στον υπολογιστή. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως % gated CD34⁺/KDR⁺ και ως % gated CD34⁺/CD61⁺ συζεύγματα.

5.4.3 Εκτίμηση της καθαρότητας των CD34⁺ κυττάρων

Για την εκτίμηση της καθαρότητας των CD34⁺ κυττάρων, χρησιμοποιούνται τα αντισώματα anti-CD34-FITC και anti-CD45-PE .

1. Ετοιμάζονται 3 σωληνάκια κυτταρομέτρου στα οποία τοποθετούνται 20 μL μονοπύρηνων κυττάρων πριν το διαχωρισμό, 20 μL των μη επισημασμένων κυττάρων και 20 μL των μαγνητικά επισημασμένων κυττάρων, τα οποία και αραιώνονται με 80 μL PBS 1X. Σε περίπτωση που η διαδικασία του μαγνητικού διαχωρισμού πραγματοποιηθεί δύο φορές, ετοιμάζονται άλλα 2 σωληνάκια που περιέχουν 20 μL των μη επισημασμένων κυττάρων και 20 μL των μαγνητικά επισημασμένων κυττάρων, μετά το πέρας του από τη δεύτερη στήλη.
2. Πραγματοποιείται επώαση με τα αντισώματα anti-CD34-FITC και anti-CD45-PE για 20 min στους 4°C.
3. Μετά το πέρας της επώασης, προστίθεται στο σωληνάκι 1 mL PBS 1X και πραγματοποιείται φυγοκέντρηση στα 670 x g για 5 min.
4. Το υπερκείμενο αποχύνεται και πραγματοποιείται αναδιασπορά σε 500 μL PBS 1X.

5. Πραγματοποιείται η μέτρηση των δειγμάτων στο κυτταρόμετρο ροής, με υψηλή ροή και μέχρι τα 10.000 events.
6. Τέλος, ακολουθεί η ανάλυση των δεδομένων στον υπολογιστή.

5.4.4 Επίδραση των παραγόντων πήξης FXa και θρομβίνης στην έκφραση του ενδοθηλιακού φαινοτύπου από τα CD34⁺ κύτταρα

Για το σκοπό αυτό πραγματοποιήθηκαν οι παρακάτω επώσεις:

- 100.000 CD34⁺ κύτταρα επώστηκαν σε σωληνάκια κυτταρομετρίας με 50 nM FXa ή 8 U/mL θρομβίνης για 1 h στους 37°C.
- 100.000 CD34⁺ κύτταρα επώστηκαν σε σωληνάκια κυτταρομετρίας με 0,4% DMSO ή 10 nM voraparaxar για 1 h και στη συνέχεια με 50 nM FXa ή 8 U/mL θρομβίνης για 1 h στους 37°C.
- Σε όλα τα σωληνάκια προστίθενται 5 μL αντισώματος anti-CD34-FITC και 5 μL anti-VEGFR-R₂/KDR-PE και πραγματοποιείται επώση για 30 min στους 4°C.
- Πραγματοποιείται η μέτρηση των δειγμάτων στο κυτταρόμετρο ροής, με υψηλή ροή και μέχρι τα 10.000 events.
- Τέλος, ακολουθεί η ανάλυση των δεδομένων στον υπολογιστή.

5.4.5 Επίδραση των παραγόντων πήξης θρομβίνη και FXa σε OECs και HUVECs

Αντιδραστήρια

- ✓ Αλβουμίνη βόειου ορού: Bovine serum albumin (BSA), Sigma-Aldrich
- ✓ Αντιβιοτικά Πενικιλίνη/Στρεπτομυκίνη: 10.000 U/mL penicillin/10.000 μg/mL streptomycin, 100x PAA
- ✓ Αυξητικό συμπλήρωμα ενδοθηλιακών κυττάρων: Endothelial cell growth supplement (ECGS), φιαλίδια των 15 mg, Sigma-Aldrich
- ✓ Γλυκερόλη: Glycerol
- ✓ Διμεθυλοσουλφοξείδιο: Dimethyl sulfoxide, DMSO
- ✓ Ηπαρίνη: Heparin 5.000 IU/mL, LEO
- ✓ Θερμικά απενεργοποιημένος ορός από έμβρυο βοός: heat inactivated fetal bovine serum, FBS, Gibco BRL Life Technologies
- ✓ Θρεπτικό υλικό Medium 199 (M199, Μη πλήρες): 500 mL, Gibco BRL Life Technologies

- ✓ Θρεπτικό υλικό των ενδοθηλιακών κυττάρων: Endothelial cell basal medium-2, EBM-2 500 mL, Lonza και περιλαμβάνει τους παρακάτω αυξητικούς παράγοντες:
 - Αγγειακό ενδοθηλιακό αυξητικό παράγοντα: Vascular endothelial growth factor, VEGF, 0,5 mL
 - Ανθρώπινο επιδερμικό αυξητικό παράγοντα: human epidermal growth factor, hEGF, 0,5 mL
 - Ασκορβικό οξύ: Ascorbic acid, 0,5mL
 - Αυξητικό παράγοντα Β των ανθρώπινων ινοβλαστών: human fibroblast growth factor-B, hFGF-B, 2 mL
 - Αυξητικό παράγοντα R3: R3 insulin like growth factor-1, R3-IGF-1, 0,5 mL
 - Διάλυμα Γενταμυκίνης/Αμφοτερικίνης Β: Gentamicine/Amphotericine B solution, 0,5 mL
 - Ηπαρίνη: Heparine, 0,5 mL
 - Ορό από έμβρυο βοός: Fetal bovine serum, FBS, 10 mL
 - Υδροκορτιζόνη: Hydrocortizone, 0,5 mL
- ✓ Θρυψίνη/EDTA: Trypsin/EDTA, Gibco BRL Life Technologies
- ✓ Θρομβίνη: Human thrombin 1000 Units, Sigma-Aldrich
- ✓ Κολλαγόνο: Collagen type I, rat tail, BD Biosciences
- ✓ Οξικό οξύ (17.5 N): CH₃COOH
- ✓ Παράγοντας νέκρωσης όγκου α: Tumor necrosis factor-α, TNFα 10 μg, Sigma-Aldrich
- ✓ Παράγοντας Χα: Human FXa 100 μg, Haematologic Technologies
- ✓ Anti-CD31-FITC: Μονοκλωνικό αντίσωμα, Becton Dickinson
- ✓ Anti-CD54-PE: Μονοκλωνικό αντίσωμα, Becton Dickinson
- ✓ Anti-CD62E-PE: Μονοκλωνικό αντίσωμα, Becton Dickinson
- ✓ D-PBS: Dulbecco's phosphate buffered saline, 500 mL, Gibco BRL Life Technologies
- ✓ Dabigatran: 5 mg, M.W.: 471,51 g/mol, MedChem Express
- ✓ Rivaroxaban: 5 mg, M.W.: 435,88 g/mol, MedChem Express
- ✓ Vorapaxar: 5 mg, M.W.: 492,58 g/mol, AxonMedChem

Όργανα-Υλικά

- ✓ Αιμοκυτταρόμετρο: Haemocytometer chamber ή πλάκα Neubauer
- ✓ Ανάστροφο μικροσκόπιο: A.Krüss Optronic
- ✓ Αποστειρωμένα βαθμονομημένα σωληνάκια των 15 mL
- ✓ Αποστειρωμένα πλαστικά πλακίδια καλλιέργειας κυττάρων 6 θέσεων
- ✓ Αποστειρωμένα πλαστικά σιφόνια των 5, 10 και 25 mL
- ✓ Αποστειρωμένα πλαστικά τρυβλία καλλιέργειας
- ✓ Αυτόματες πιπέτες
- ✓ Γυάλινες πιπέτες Pasteur
- ✓ Επωαστικός θάλαμος
- ✓ Θάλαμος νηματοειδούς ροής
- ✓ Κυτταρόμετρο ροής FACScalibur: Flow Cytometer, Becton Dickinson
- ✓ Λογισμικό Cell Quest Software: Becton Dickinson
- ✓ Πλαστικά σωληνάκια πολυστυρενίου: Becton Dickinson
- ✓ Φυγόκεντρος πάγκου: Hermle Z320
- ✓ Vortex

Διαλύματα Εργασίας

Διάλυμα PBS 1X pH 7,4: Όπως περιγράφεται παραπάνω.

Διάλυμα 0,02 N CH₃COOH: Όπως περιγράφεται παραπάνω.

Διάλυμα 50 μg/mL κολλαγόνου: Όπως περιγράφεται παραπάνω.

Διαλύματα 5 και 10% FBS/M199: Τα διαλύματα παρασκευάζονται με προσθήκη FBS σε μη πλήρες M199 και διατηρούνται στους 4°C.

Διάλυμα επίδρασης: Σε διάλυμα 5% FBS/M199 προστίθεται πενικιλίνη/στρεπτομυκίνη. Διατηρείται στους 4°C.

Διάλυμα 10 mg/mL TNFα: Τα 10 μg του εμπορικά διαθέσιμου TNFα διαλύονται σε 1 mL 0,1% BSA/PBS. Πραγματοποιήθηκε περαιτέρω αραίωση στα 500 ng/mL ώστε να προκύψει το διάλυμα εργασίας. Τα διαλύματα διατηρούνται στους -20°C.

Πειραματική Πορεία

1. OECs 3^{ης} γενιάς και HUVECs 2^{ης} γενιάς καλλιεργούνται σε τρυβλία καλλιέργειας μέχρι να καλύψουν το 70-90% της επιφάνειας, όπως περιγράφεται παραπάνω.
2. Πραγματοποιείται ανακαλλιέργεια τους σε πλακίδια των 6 θέσεων (επιστρώνονται 80.000-120.000 κύτταρα), ανάλογα με τις πειραματικές ανάγκες. Κάθε θέση αποτελεί και μία πειραματική συνθήκη.
3. Πραγματοποιείται αλλαγή θρεπτικού υλικού (2 mL) κάθε 2 ημέρες μέχρι τα κύτταρα να καλύψουν το 70-90% της επιφάνειας του τρυβλίου. Πραγματοποιούνται 2 εκπλύσεις με PBS 1X (2 mL) και προστίθεται 1,5 mL από το διάλυμα επίδρασης σε κάθε θέση του πλακιδίου.

4^α. Στην παρούσα διδακτορική διατριβή πραγματοποιήθηκαν πειράματα για τη μελέτη της δράσης των παραγόντων θρομβίνη και FXa στην έκφραση του μορίου προσκόλλησης ICAM-1 και του μορίου E-σελεκτίνη από τα OECs και τα HUVECs. Παρακάτω παρουσιάζονται οι πειραματικές συνθήκες που δοκιμάστηκαν. Όλες οι παρακάτω επώσεις γίνονται στους 37°C.

- Σε προκαταρκτικά πειράματα για την εύρεση των βέλτιστων συνθηκών δράσης της θρομβίνης, HUVECs 3^{ης} γενιάς επώαστηκαν με α) 1, 2, 5 και 8 U/mL για 24 h και β) 8 U/mL για 1, 3, 6 και 24 h. Επιπλέον, για την εύρεση των βέλτιστων συνθηκών δράσης του FXa, HUVECs 3^{ης} γενιάς επώαστηκαν με α) 25 nM FXa για 1, 3, 6 και 24 h και β) 25, 50 και 100 nM FXa για 24 h. Ο TNFα χρησιμοποιήθηκε ως θετικός μάρτυρας.
- OECs 4^{ης} και HUVECs 3^{ης} γενιάς επώαστηκαν με 8 U/mL θρομβίνης ή 50 nM FXa για 24 h, με σκοπό να βρεθούν πιθανές διαφορές στην έκφραση του ICAM-1 από τους δύο παράγοντες πήξης μεταξύ των δύο κυτταρικών σειρών.
- OECs 4^{ης} και HUVECs 3^{ης} γενιάς επώαστηκαν με ένα εύρος συγκεντρώσεων voraparaxar από 0,05-10 nM για 1 h και στη συνέχεια ενεργοποιήθηκαν με 8 U/mL θρομβίνης ή 50 nM FXa, για 24 h, με σκοπό να βρεθεί η δράση του voraparaxar στην επαγόμενη από θρομβίνη και FXa έκφραση του ICAM-1.
- OECs 4^{ης} και HUVECs 3^{ης} γενιάς επώαστηκαν με ένα εύρος συγκεντρώσεων dabigatran και rivaroxaban από 1-20 μM για 10 min και στη συνέχεια ενεργοποιήθηκαν με 8 U/mL θρομβίνης ή 50 nM FXa, για 24 h με σκοπό να βρεθεί η δράση των δύο φαρμάκων στην επαγόμενη από θρομβίνη και FXa έκφραση του ICAM-1.

- OECs και HUVECs επώαστηκαν με 0,1-10 μM rivaroxaban για 10 min και στη συνέχεια ενεργοποιήθηκαν με 8 U/mL θρομβίνης ή 1 ng/mL TNF α , για 24 h.
 - OECs 4^{ης} και HUVECs 3^{ης} γενιάς επώαστηκαν με 10 και 5 nM voraparaxar, αντίστοιχα, για 1 h και στη συνέχεια με ένα εύρος συγκεντρώσεων rivaroxaban από 0,1-10 μM για 10 min. Ακολούθησε ενεργοποίηση με 8 U/mL θρομβίνης ή 1 ng/mL TNF α , για 24 h.
 - Σε προκαταρκτικά πειράματα, OECs 4^{ης} και HUVECs 3^{ης} γενιάς επώαστηκαν 8 U/mL θρομβίνης ή 50 nM FXa για 6, 12 και 24 h, με σκοπό την εύρεση των κατάλληλων συνθηκών δράσης τους στην έκφραση της E-σελεκτίνης. Ο TNF α χρησιμοποιήθηκε ως θετικός μάρτυρας.
 - OECs 4^{ης} και HUVECs 3^{ης} γενιάς επώαστηκαν με 8 U/mL θρομβίνης για 6 h, με σκοπό να βρεθούν πιθανές διαφορές στην έκφραση της E-σελεκτίνης, μεταξύ των δύο κυτταρικών σειρών.
 - OECs 4^{ης} και HUVECs 3^{ης} γενιάς επώαστηκαν με 10 nM voraparaxar για 1 h και ενεργοποιήθηκαν με 8 U/mL θρομβίνης για 6 h, με σκοπό να βρεθεί η δράση του voraparaxar στην επαγόμενη από τη θρομβίνη έκφραση της E-σελεκτίνης.
5. Μετά το πέρας της 24 h επώασης, συλλέγονται υπερκείμενα από κάθε συνθήκη και φυγοκεντρώνονται στα 16.000 x g για 10 min, με σκοπό να απομακρυνθούν κύτταρα και θραύσματα κυττάρων. Στα δείγματα αυτά, μελετήθηκε η έκκριση του MCP-1 από τα κύτταρα με τη μέθοδο της ELISA.
 6. Πραγματοποιούνται 2 εκπλύσεις με PBS (2 mL) και σε κάθε θέση του πλακιδίου προστίθενται 200 μL θρυψίνης. Το πλακίδιο τοποθετείται για 2 min στους 37°C.
 7. Η θρυψίνη αραιώνεται 1:10 με διάλυμα 10% FBS/M199. Πραγματοποιείται συλλογή των κυττάρων σε σωληνάκια των 15 mL και φυγοκέντρωση στα 340 x g για 5 min.
 8. Το υπερκείμενο αφαιρείται και προστίθενται 500 μL διαλύματος 10% FBS/M199. Ακολουθεί μέτρηση των κυττάρων όπως περιγράφεται παραπάνω.
 9. 100.000 κύτταρα επιάζονται με 5 μL anti-CD31-FITC και 5 μL anti-CD54-PE ή 5 μL anti-CD31-FITC και 5 μL anti-CD62E-PE για 30 min στους 4°C.
 10. Πραγματοποιείται φυγοκέντρωση στα 340 x g για 5 min, το υπερκείμενο απομακρύνεται και πραγματοποιούνται 3 εκπλύσεις με 200 μL 5% FBS/M199 (φυγοκέντρωση στα 340 x g για 5 min).
 11. Μετά την τελευταία έκπλυση, προστίθενται 500 μL 5% FBS/M199.

12. Πραγματοποιείται η μέτρηση των δειγμάτων στο κυτταρόμετρο ροής, με υψηλή ροή και μέχρι τα 10.000 events.

13. Τέλος, ακολουθεί η ανάλυση των δεδομένων στον υπολογιστή. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως τιμές MFI και ως %gated διπλοθετικά κύτταρα.

4^β. Επιπλέον, στην παρούσα μελέτη πραγματοποιήθηκαν πειράματα για τη μελέτη της δράσης των παραγόντων θρομβίνη και FXa στην έκκριση της PGI₂ από τα OECs και τα HUVECs. Παρακάτω παρουσιάζονται οι πειραματικές συνθήκες που δοκιμάστηκαν. Όλες οι παρακάτω επώσεις γίνονται στους 37°C.

- OECs 4^{ης} και HUVECs 3^{ης} γενιάς αφέθηκαν να εγκλιματιστούν για 2 h με το διάλυμα επίδρασης. Στη συνέχεια, επώαστηκαν με 1 U/mL θρομβίνης ή 0,5 nM FXa για 20 min, με σκοπό να διερευνηθεί η δράση τους στην έκκριση της PGI₂.

Μετά το πέρας των 20 min, συλλέγονται υπερκείμενα από κάθε συνθήκη και φυγοκεντρώνονται στα 16.000 x g για 10 min, με σκοπό να μελετηθεί η έκκριση της PGI₂ από τα κύτταρα με τη μέθοδο της ELISA. Ακολουθούνται τα βήματα 6-8 όπως περιγράφεται παραπάνω.

4^γ. Τέλος, πραγματοποιήθηκαν πειράματα για τη μελέτη της δράσης των παραγόντων θρομβίνη και FXa στην έκκριση του vWF από τα OECs και τα HUVECs. Παρακάτω παρουσιάζονται οι πειραματικές συνθήκες που δοκιμάστηκαν. Όλες οι παρακάτω επώσεις γίνονται στους 37°C.

- HUVECs 3^{ης} γενιάς αφέθηκαν να εγκλιματιστούν για 2 h με το διάλυμα επίδρασης. Στη συνέχεια, επώαστηκαν με 1, 5 και 8 U/mL θρομβίνης για 1 h και στη συνέχεια με 1 U/mL θρομβίνης για 1, 3 και 6 h ή με 0,5 nM FXa για 1 h, με σκοπό να βρεθούν οι βέλτιστες συνθήκες δράσεις τους στην έκκριση του vWF.

Μετά το πέρας των επώσεων, συλλέγονται υπερκείμενα από κάθε συνθήκη και φυγοκεντρώνονται στα 3.000 x g για 10 min, με σκοπό να μελετηθεί η έκκριση του vWF από τα κύτταρα με τη μέθοδο της ELISA. Ακολουθούνται τα βήματα 6-8 για τη μέτρηση των κυττάρων όπως περιγράφεται παραπάνω.

5.6 Μεθοδολογία ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay)

Η μεθοδολογία ELISA είναι μία υψηλής ευαισθησίας τεχνική που χρησιμοποιείται για τον ποσοτικό προσδιορισμό αντισωμάτων, αντιγόνων, κυτταροκινών και ορμονών σε ένα δείγμα, με τη χρήση ενζυμο-συζευγμένων αντισωμάτων και χρωμογόνου υποστρώματος. Η αρχή της μεθόδου βασίζεται στην αλληλεπίδραση αντιγόνου-αντισώματος. Υπάρχουν διάφοροι τύποι ELISA που έχουν ως κοινά στοιχεία την πρόσδεση και ακινητοποίηση του αντιγόνου ή του αντισώματος σε στερεή επιφάνεια, τη χρήση ενζυμο-συζευγμένου αντισώματος και τη χρήση χρωμογόνου υποστρώματος, το οποίο αντιδρά με το ένζυμο παράγοντας χρώμα, επιτρέποντας την ποσοτικοποίηση της αλληλεπίδρασης αντιγόνου-αντισώματος. Η μέτρηση του προϊόντος της αντίδρασης πραγματοποιείται με τη χρήση της οπτικής πυκνότητας (optical density, OD) των δειγμάτων.

5.6.1 Ανοσοενζυμικός προσδιορισμός του MCP-1

Η μέθοδος ELISA που χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό του MCP-1 σε υπερκείμενα κυττάρων είναι τύπου sandwich. Ένα μονοκλωνικό αντίσωμα εξειδικευμένο για τον ανθρώπινο MCP-1 έχει προεπωαστεί στις θέσεις του πλακιδίου. Πρότυπα δείγματα και τα υπερκείμενα των κυττάρων επωάζονται με το αντίσωμα και ο MCP-1 προσδένεται στο ακινητοποιημένο αντίσωμα. Στη συνέχεια, προστίθεται ένα πολυκλωνικό αντίσωμα που είναι συζευγμένο με ένζυμο, το οποίο είναι εξειδικευμένο για τον ανθρώπινο MCP-1. Τέλος, προστίθεται υπόστρωμα το οποίο παράγει χρώμα σε αναλογία με το ποσοστό του MCP-1 που έχει προσδεθεί.

Αντιδραστήρια

- ✓ Human CCL2/MCP-1 Immunoassay: R&D Systems και περιλαμβάνει τα παρακάτω:
 - Human MCP-1 microplate, 96 θέσεις
 - Human MCP-1 standard
 - Human MCP-1 conjugate, 21 mL
 - Assay diluent RD1-83, 11 mL
 - Calibrator diluent RD5L concentrate, 21 mL
 - Calibrator diluent RD6Q, 21 mL
 - Wash buffer concentrate, 21 mL
 - Color reagent A, 12 mL

- Color reagent B, 12 mL
- Stop solution, 6 mL
- Plate sealers

Όργανα-υλικά

- ✓ Αυτόματες πιπέτες
- ✓ Φασματοφωτόμετρο ELISA Reader: Tecan M200 Pro

Διαλύματα Εργασίας

Wash buffer: 20 mL από το wash buffer concentrate αραιώνονται με απεσταγμένο νερό μέχρι τελικό όγκο 500 mL. Το διάλυμα φυλάσσεται στους 4°C.

Calibrator diluent RD5L: 20 mL calibrator diluent αραιώνονται με απεσταγμένο νερό μέχρι τα 100 mL.

Human MCP-1 standard: Το πρότυπο δείγμα MCP-1 διαλύεται σε 5 mL calibrator diluent RD5L και προκύπτει διάλυμα 2000 pg/mL. Το διάλυμα αφήνεται σε ηρεμία για 15 min και μετά γίνονται περαιτέρω αραιώσεις για να προκύψουν διαλύματα των 1000, 500, 250, 125, 62,5, και 31,3 pg/mL. Ο calibrator diluent RD5L χρησιμοποιείται ως τυφλό δείγμα (0 pg/mL).

Substrate solution: Τα αντιδραστήρια color reagent A και B αναμιγνύονται σε αναλογία 1:1 και το διάλυμα που προκύπτει πρέπει να χρησιμοποιηθεί εντός 15 min. Το διάλυμα είναι φωτοευαίσθητο.

Πειραματική Πορεία

1. Όλα τα αντιδραστήρια και τα προς μελέτη δείγματα πρέπει να έρθουν σε θερμοκρασία δωματίου πριν την έναρξη του πειράματος.
2. Τα δείγματα αραιώνονται κατάλληλα με διάλυμα επίδρασης.
3. Απομονώνονται όσες θέσεις θα χρησιμοποιηθούν και οι υπόλοιπες αποθηκεύονται.
4. Σε κάθε θέση προστίθενται 200 µL από τα πρότυπα και τα προς μελέτη δείγματα, με προσοχή ώστε να μη δημιουργηθούν φυσαλίδες. Οι θέσεις καλύπτονται και πραγματοποιείται επώαση για 2 h σε θερμοκρασία δωματίου.
5. Το περιεχόμενο των θέσεων αποχύνεται και πραγματοποιούνται 3 εκπλύσεις με 400 µL wash buffer ανά θέση. Πριν την κάθε έκπλυση πρέπει να απομακρύνεται με προσοχή όλο το υγρό.

6. Σε κάθε θέση προστίθενται 200 μL human MCP-1 conjugate και ακολουθεί επώαση για 1 h σε θερμοκρασία δωματίου.
7. Πραγματοποιούνται 3 εκπλύσεις όπως περιγράφηκε στο βήμα 5.
8. Σε κάθε θέση προστίθενται 200 μL substrate solution και ακολουθεί επώαση για 30 min, σε θερμοκρασία δωματίου και στο σκοτάδι.
9. Σε κάθε θέση προστίθενται 50 μL stop solution και ακολουθεί μέτρηση στα 450 nm με διόρθωση μήκους κύματος στα 540 nm, εντός 30 min.
10. Για τον υπολογισμό των pg/mL αφαιρείται από κάθε τιμή οπτικής πυκνότητας η τιμή του τυφλού δείγματος. Στη συνέχεια, δημιουργείται η πρότυπη καμπύλη με τη χρήση ενός προγράμματος four parameter logistic curve-fit, από την οποία θα προκύψει η συγκέντρωση του MCP-1 ανά δείγμα.

5.6.2 Ανοσοενζυμικός προσδιορισμός της PGI₂

Καθώς η PGI₂ έχει σύντομο χρόνο ημιζωής τόσο στο πλάσμα (60 min), όσο και σε buffer (2-3 min), η έκκριση της υπολογίζεται με τη μέτρηση της 6-keto-PGF_{1 α} , η οποία παράγεται από τη μη ενζυμική ενυδάτωση της PGI₂. Το kit χρησιμοποιεί ένα πολυκλωνικό αντίσωμα εξειδικευμένο για την 6-keto-PGF_{1 α} , το οποίο επωάζεται ταυτόχρονα με τα πρότυπα δείγματα και τα υπερκείμενα των κυττάρων. Στη συνέχεια, προστίθεται υπόστρωμα το οποίο παράγει χρώμα σε αναλογία με το ποσοστό της 6-keto-PGF_{1 α} που έχει προσδεθεί.

Αντιδραστήρια

- ✓ 6-keto-PGF_{1 α} ELISA kit: Enzo Life Sciences και περιλαμβάνει τα παρακάτω:
 - Donkey anti-sheep IgG microtiter plate, 96 θέσεις
 - 6-keto-PGF_{1 α} ELISA conjugate, 5 mL
 - 6-keto-PGF_{1 α} ELISA antibody, 5 mL
 - Assay buffer, 27 mL
 - Wash buffer concentrate, 27 mL
 - 6-keto-PGF_{1 α} standard, 0,5 mL, 500.000 pg/mL
 - pNpp substrate, 20 mL
 - Stop solution, 5 mL
 - 6-keto-PGF_{1 α} assay layout sheet

Όργανα-υλικά

- ✓ Αυτόματες πιπέτες
- ✓ Φασματοφωτόμετρο ELISA Reader: Tecan M200 Pro

Διαλύματα Εργασίας

6-keto-PGF_{1α} standard: Πραγματοποιούνται αραιώσεις στο πρότυπο δείγμα με διάλυμα επίδρασης, ώστε να προκύψουν διαλύματα των 50.000, 10.000, 2.000, 400, 80, 16 και 3,2 pg/mL.

Τα πρότυπα δείγματα πρέπει να χρησιμοποιηθούν εντός 1 h.

Conjugate 1:10 dilution for total activity measurement: 50 μL από το 6-keto-PGF_{1α} ELISA conjugate αραιώνονται με 450 μL από το assay buffer. Το διάλυμα πρέπει να χρησιμοποιηθεί εντός 3 h.

Wash buffer: 5 mL από το wash buffer concentrate αραιώνονται με 95 mL νερό. Το διάλυμα φυλλάσσεται σε θερμοκρασία δωματίου για 3 μήνες.

Πειραματική Πορεία

1. Όλα τα αντιδραστήρια και τα προς μελέτη δείγματα πρέπει να έρθουν σε θερμοκρασία δωματίου πριν την έναρξη του πειράματος.
2. Τα δείγματα αραιώνονται κατάλληλα με διάλυμα επίδρασης.
3. Απομονώνονται όσες θέσεις θα χρησιμοποιηθούν και οι υπόλοιπες αποθηκεύονται. Εκτός από τα πρότυπα δείγματα, κάθε φορά υπολογίζονται 4 θέσεις που αντιστοιχούν στο τυφλό (BL), στη συνολική δραστηριότητα (TA), τη μη ειδική πρόσδεση (NSB) και το δείγμα 0 pg/mL (B0).
4. Στις θέσεις που αντιστοιχούν στα NSB και B0, προστίθενται 100 μL από το διάλυμα επίδρασης.
5. Προστίθενται 100 μL από τα πρότυπα και τα προς μελέτη δείγματα στις αντίστοιχες θέσεις.
6. Στο NSB προστίθενται 50 μL από το assay buffer
7. Προστίθενται 50 μL από το 6-keto-PGF_{1α} ELISA conjugate (blue) σε όλες τις θέσεις εκτός από τα BL και TA.
8. Προστίθενται 50 μL από το 6-keto-PGF_{1α} ELISA antibody (yellow) σε όλες τις θέσεις εκτός από τα BL, TA και NSB.
9. Πραγματοποιείται επώαση για 2 h σε θερμοκρασία δωματίου υπό ανάδευση στα 500 rpm.

10. Το περιεχόμενο των wells αποχύνεται και πραγματοποιούνται 3 εκπλύσεις με 400 μL wash buffer ανά θέση. Πριν την κάθε έκπλυση πρέπει να απομακρύνεται με προσοχή όλο το υγρό.
11. Στο TA προστίθενται 5 μL από το conjugate 1:10 dilution.
12. Προστίθενται 200 μL από το pNpp substrate σε όλες τις θέσεις και πραγματοποιείται επώαση για 2 h σε θερμοκρασία δωματίου, χωρίς ανάδευση.
13. Σε κάθε θέση προστίθενται 50 μL stop solution και αμέσως ακολουθεί μέτρηση στα 405 nm.
14. Για τον υπολογισμό των pg/mL αφαιρείται από κάθε τιμή οπτικής πυκνότητας η τιμή που προκύπτει από τη διαφορά NSB-B0. Στη συνέχεια, κάθε τιμή διαιρείται με την οπτική πυκνότητα του B0. Δημιουργείται η πρότυπη καμπύλη με τη χρήση ενός προγράμματος four parameter logistic curve-fit, από την οποία θα προκύψει η συγκέντρωση της 6-keto-PGF_{1 α} ανά δείγμα.

5.6.3 Ανοσοενζυμικός προσδιορισμός του vWF

Η μέθοδος ELISA που χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό του vWF σε υπερκείμενα κυττάρων είναι τύπου sandwich. Ένα μονοκλωνικό αντίσωμα εξειδικευμένο για τον ανθρώπινο vWF έχει προεπωαστεί στις θέσεις του πλακιδίου. Πρότυπα δείγματα και τα υπερκείμενα των κυττάρων επωάζονται με το αντίσωμα και ο vWF προσδένεται στο ακινητοποιημένο αντίσωμα. Στη συνέχεια, προστίθεται ένα αντίσωμα που είναι συζευγμένο με ένζυμο, το οποίο είναι εξειδικευμένο για τον ανθρώπινο vWF. Τέλος, προστίθεται το υπόστρωμα streptavidin-peroxidase το οποίο παράγει χρώμα σε αναλογία με το ποσοστό του vWF που έχει προσδεθεί.

Αντιδραστήρια

- ✓ Human vWF ELISA Kit: Abcam και περιλαμβάνει τα παρακάτω:
 - vWF Microplate, 96 θέσεις
 - vWF standard, 1 vial
 - 10X diluent N concentrate, 30 mL
 - 50X Biotinylated human vWF antibody, 1 vial
 - 100X Streptavidin-Peroxidase conjugate (SP conjugate), 80 μL
 - Chromogen substrate, 8 mL
 - Stop solution, 12 mL
 - 20X wash buffer concentrate, 2 x 30 mL

Όργανα-υλικά

- ✓ Αυτόματες πιπέτες
- ✓ Φασματοφωτόμετρο ELISA Reader: Tecan M200 Pro

Διαλύματα Εργασίας

1X diluent N: Το 10X diluent N concentrate αραιώνεται 1:10 με απεσταγμένο νερό. Το διάλυμα φυλάσσεται για ένα μήνα στους 4°C.

1X wash buffer: Το 10X wash buffer concentrate αραιώνεται 1:20 με απεσταγμένο νερό.

1X biotinylated vWF detector antibody: Το 50X biotinylated vWF detector antibody αραιώνεται 1:50 με 1X diluent N.

1X SP conjugate: Το 100X SP conjugate αραιώνεται 1:100 με 1X diluent N.

vWF standard: Ο vWF διαλύεται σε 1X diluent N ώστε να προκύψει διάλυμα 80 mIU/mL. Το διάλυμα αφήνεται σε ηρεμία για 10 min και μετά γίνονται περαιτέρω αραιώσεις για να προκύψουν διαλύματα των 40, 20, 10, 5 και 2,5 mIU/mL. Ο 1X diluent N χρησιμοποιείται ως τυφλό δείγμα (0 mIU/mL).

Πειραματική Πορεία

1. Όλα τα αντιδραστήρια και τα προς μελέτη δείγματα πρέπει να έρθουν σε θερμοκρασία δωματίου πριν την έναρξη του πειράματος. Σε κάθε βήμα η προσθήκη των αντιδραστηρίων ή των δειγμάτων πρέπει να γίνεται με προσοχή ώστε να καλυφθεί όλος ο πυθμένας και να μη δημιουργηθούν φυσαλίδες.
2. Απομονώνονται όσες θέσεις θα χρησιμοποιηθούν και οι υπόλοιπες αποθηκεύονται.
3. Σε κάθε θέση προστίθενται 50 µL από τα πρότυπα και τα προς μελέτη δείγματα. Οι θέσεις καλύπτονται και πραγματοποιείται επώαση για 2 h σε θερμοκρασία δωματίου.
4. Το περιεχόμενο των θέσεων αποχύνεται και πραγματοποιούνται 5 εκπλύσεις με 200 µL 1X wash buffer ανά θέση. Πριν την κάθε έκπλυση πρέπει να απομακρύνεται με προσοχή όλο το υγρό.
5. Σε κάθε θέση προστίθενται 50 µL από το 1X biotinylated vWF antibody και ακολουθεί επώαση για 2 h σε θερμοκρασία δωματίου.
6. Πραγματοποιούνται 5 εκπλύσεις όπως περιγράφηκε στο βήμα 5.

7. Σε κάθε θέση προστίθενται 50 μL από το 1X SP conjugate και ακολουθεί επώαση για 30 min.
8. Πραγματοποιούνται 5 εκπλύσεις όπως περιγράφηκε στο βήμα 5.
9. Σε κάθε θέση προστίθενται 50 μL chromogen substrate και ακολουθεί επώαση για 20 min.
10. Σε κάθε θέση προστίθενται 50 μL stop solution και αμέσως ακολουθεί μέτρηση στα 450 nm με διόρθωση μήκους κύματος στα 570 nm.
11. Για τον υπολογισμό των mIU/mL αφαιρείται από κάθε τιμή οπτικής πυκνότητας η τιμή του τυφλού δείγματος. Στη συνέχεια, δημιουργείται η πρότυπη καμπύλη με τη χρήση ενός προγράμματος four parameter logistic curve-fit, από την οποία θα προκύψει η συγκέντρωση του vWF ανά δείγμα.

5.7 Στατιστική Ανάλυση

Η στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων έγινε με τη χρήση του στατιστικού προγράμματος SPSS 20.0. Οι τιμές εκφράστηκαν ως μέσος όρος \pm τυπική απόκλιση (SD). Η σύγκριση των τιμών έγινε χρησιμοποιώντας τα paired samples και independent samples t-tests και το επίπεδο της στατιστικής σημαντικότητας θεωρήθηκε ως $p < 0,05$.

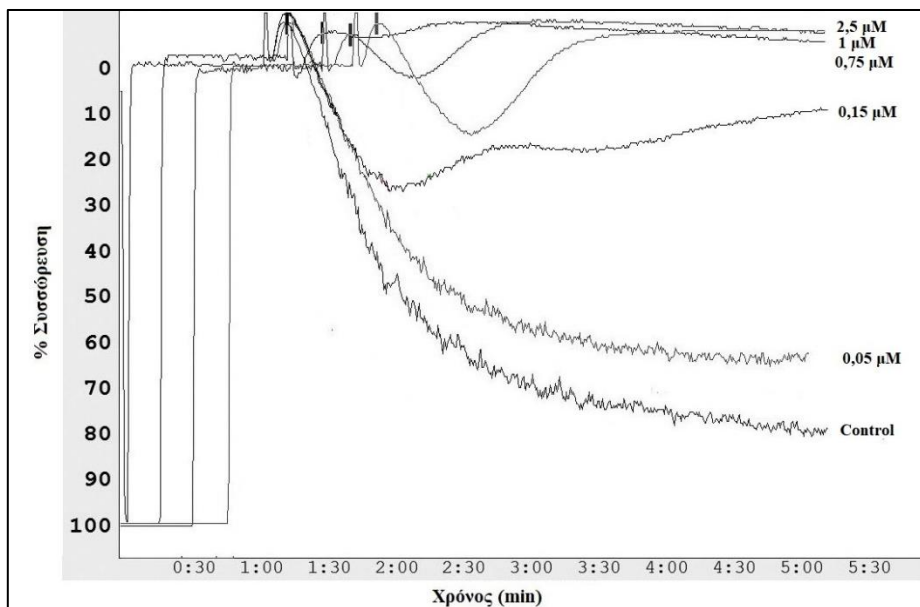
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

6.1 Μελέτη της δράσης των voraparaxar, dabigatran και rivaroxaban σε PRP με τη μέθοδο της LTA

Αρχικά, πραγματοποιήθηκαν δοσο- και χρονο-εξαρτώμενα πειράματα για τη μελέτη της ανασταλτικής δράσης του voraparaxar στη συσσώρευση PRP. Συγκεκριμένα, PRP επώαστηκε με 0,05-5 μM voraparaxar για 5, 15, 30 και 60 min στους 25 και 37°C και εν συνεχεία ενεργοποιήθηκε με 10 μM TRAP-6 για 5 min. Το voraparaxar παρουσίασε καλύτερη ανασταλτική δράση στους 37°C, ενώ ανέστειλε δοσο- και χρονο-εξαρτώμενα την αιμοπεταλιακή συσσώρευση (Πίνακας 6.1). Στην εικόνα 6.1 παρουσιάζονται αντιπροσωπευτικές καμπύλες συσσώρευσης του voraparaxar στα 60 min επώασης.

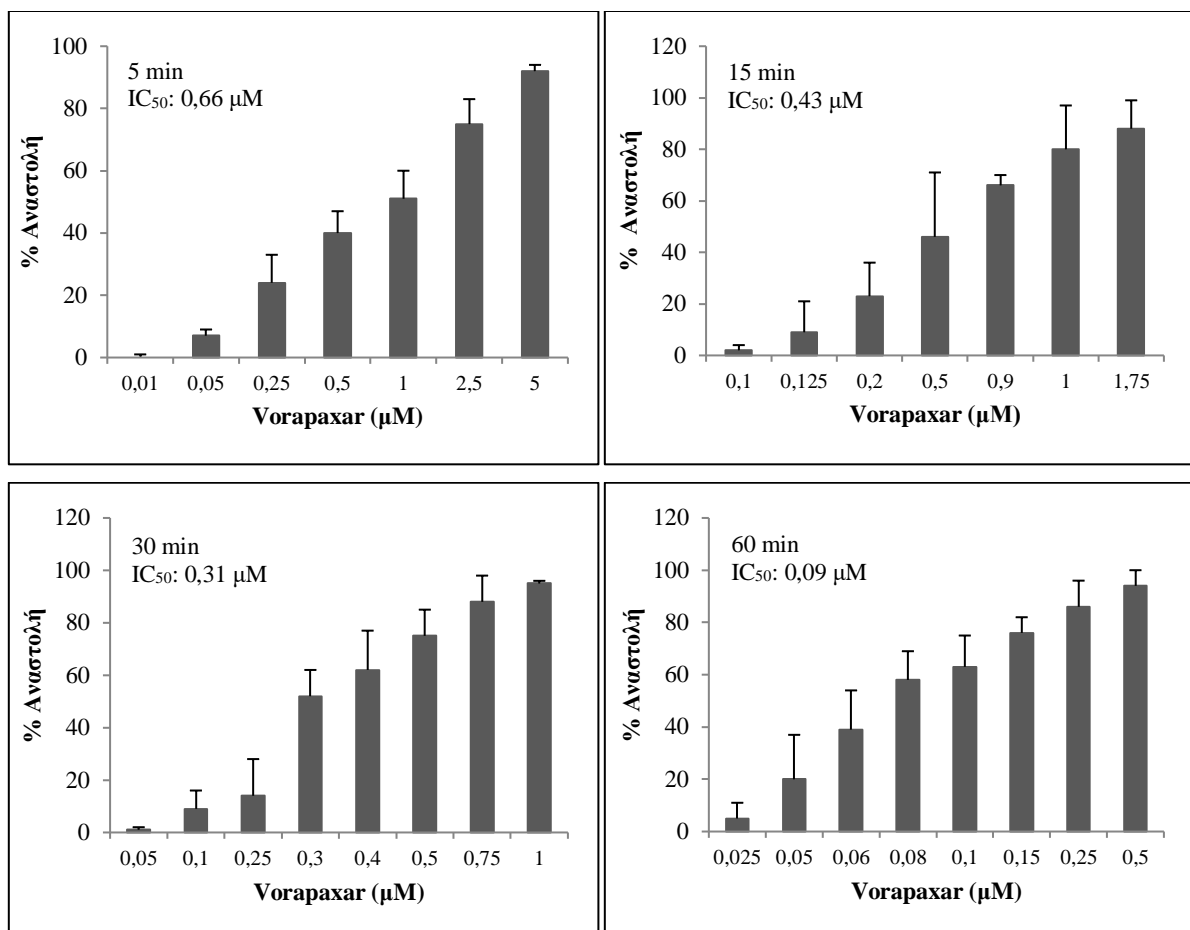
Πίνακας 6.1 Η % αναστολή της επαγόμενης από το TRAP-6 αιμοπεταλιακής συσσώρευσης από το voraparaxar, σε PRP.

	Χρόνος (min)							
	5		15		30		60	
Voraparaxar (μM)	25°C	37°C	25°C	37°C	25°C	37°C	25°C	37°C
5	90%	92%	93%	100%	97%	100%	100%	100%
2,5	70%	75%	85%	94%	94%	100%	97%	100%
1	< 10%	51%	<10%	80%	81%	95%	97%	99%
0,75	<10%	50%	<10%	56%	<10%	94%	54%	100%
0,25	<10%	24%	<10%	31%	<10%	14%	19%	82%
0,05	<10%	<10%	<10%	<10%	<10%	<10%	<10%	11%



Εικόνα 6.1 Αντιπροσωπευτικές καμπύλες συσώρευσης του νοραραχα. PRP επώαστηκε με 0,05-2,5 μM νοραραχα για 60 min στους 37°C και στη συνέχεια ενεργοποιήθηκε με 10 μM TRAP-6.

Επιπρόσθετα, PRP επώαστηκε με 0,025-5 μM νοραραχα για 5, 15, 30 και 60 min στους 37°C και εν συνεχεία ενεργοποιήθηκε με 10 μM TRAP-6, για την εύρεση των τιμών IC_{50} του φαρμάκου για τους διαφορετικούς χρόνους επώασης (Εικόνα 6.2).



Εικόνα 6.2 Η ανασταλτική δράση του vorapaxar στην επαγόμενη από TRAP-6 συσσώρευση PRP. PRP επώαστηκε με 0,025-5 μM vorapaxar για 5, 15, 30 και 60 min στους 37°C και στη συνέχεια ενεργοποιήθηκε με 10 μM TRAP-6. Παρουσιάζονται οι τιμές IC₅₀ για τις διάφορες χρονικές στιγμές επώασης. Οι τιμές εκφράζονται ως μέσος όρος±SD από 4 ανεξάρτητες παρασκευές PRP για τα 5, 15 και 30 min επώασης και από 7 ανεξάρτητες παρασκευές PRP για τα 60 min επώασης.

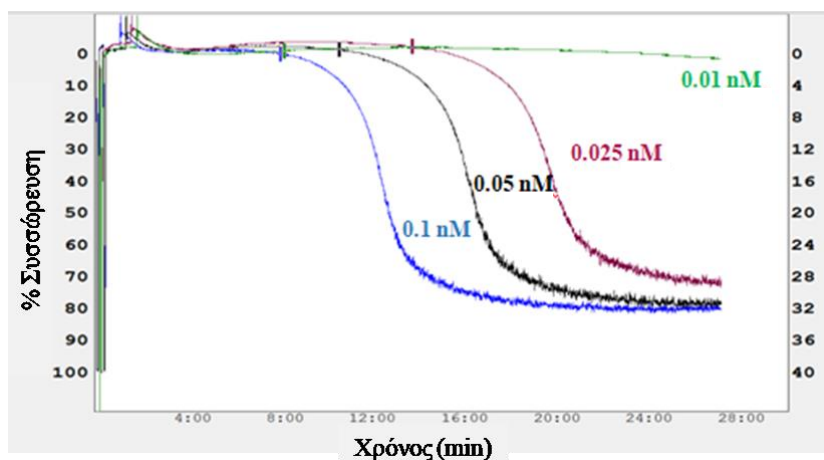
Τέλος, μελετήθηκε η πιθανή ανασταλτική δράση του vorapaxar στην αιμοπεταλιακή συσσώρευση που πραγματοποιείται από άλλους κλασσικούς αιμοπεταλιακούς αγωνιστές. Συγκεκριμένα, PRP επώαστηκε με 2,5 ή 5 μM vorapaxar για 60 min και στη συνέχεια ενεργοποιήθηκε με 10 μM ADP, 5 μg/mL κολλαγόνου ή 500 μM αραχιδονικού οξέος. Το vorapaxar δεν ανέστειλε την επαγόμενη από ADP, κολλαγόνο ή αραχιδονικό οξύ αιμοπεταλιακή συσσώρευση.

Εν συνεχεία, πραγματοποιήθηκε μελέτη της δράσης των αντιπηκτικών φαρμάκων dabigatran και rivaroxaban στην επαγόμενη από κλασσικούς αιμοπεταλιακούς αγωνιστές συσσώρευση PRP.

Συγκεκριμένα, PRP επώαστηκε με 10 μM dabigatran ή 10 μM rivaroxaban για 1 min στους 37°C και ενεργοποιήθηκε με 10 μM TRAP-6, 10 μM ADP, 5 $\mu\text{g/mL}$ κολλαγόνου ή 500 μM αραχιδονικού οξέος. Τα φάρμακα δεν ανέστειλαν την αιμοπεταλιακή συσσώρευση που επάγεται από τους παραπάνω αγωνιστές.

6.2 Ο ρόλος του FXa στην αιμοπεταλιακή συσσώρευση

Πραγματοποιήθηκαν δοσο-εξαρτώμενα πειράματα σε πλυμένα αιμοπετάλια για τη μελέτη του ρόλου του FXa στην αιμοπεταλιακή ενεργοποίηση και συσσώρευση. Συγκεκριμένα, πλυμένα αιμοπετάλια ενεργοποιήθηκαν με FXa από 0,01-0,1 nM (N=7), στους 37°C και η αιμοπεταλιακή συσσώρευση καταγράφηκε για 20-30 min. Όπως παρουσιάζεται στην εικόνα 6.3, χαμηλές συγκεντρώσεις FXa οδηγούν σε ισχυρή αιμοπεταλιακή συσσώρευση. Η επαγόμενη από τον FXa αιμοπεταλιακή συσσώρευση απαιτεί αρκετά λεπτά για να ξεκινήσει (8-16 min, ανάλογα με τη συγκέντρωση του FXa), εν αντιθέσει με άλλους κλασικούς αιμοπεταλιακούς αγωνιστές οι οποίοι εκκινούν τη συσσώρευση αμέσως μετά την προσθήκη τους. Αύξηση της συγκέντρωσης του FXa έχει σαν αποτέλεσμα την ταχύτερη έναρξη της αιμοπεταλιακής συσσώρευσης. Ως βέλτιστη συγκέντρωση του FXa για την επαγωγή της αιμοπεταλιακής συσσώρευσης σε πλυμένα αιμοπετάλια επιλέχθηκε εκείνη των 0,025 nM.



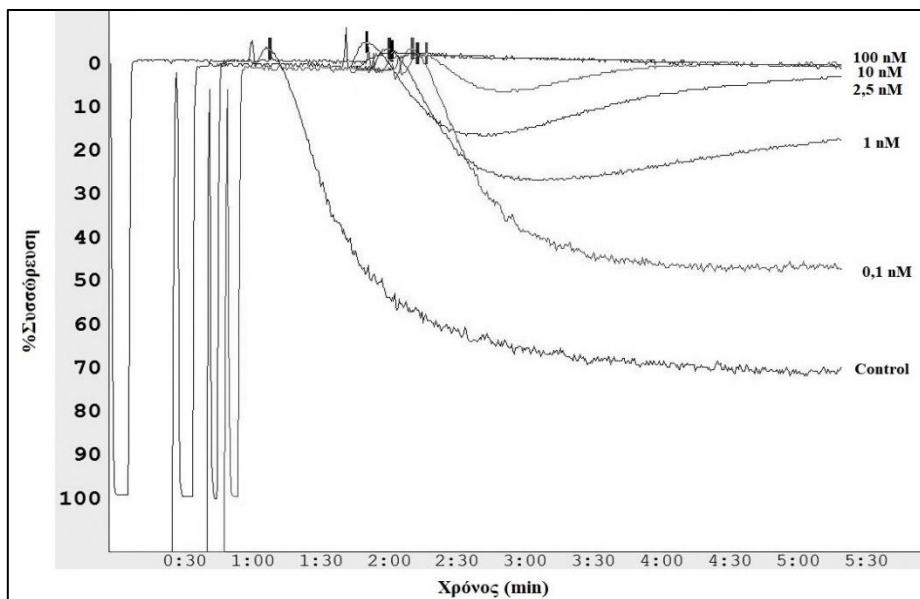
Εικόνα 6.3 Αντιπροσωπευτικές καμπύλες της δοσο-εξαρτώμενης δράσης του FXa στην αιμοπεταλιακή συσσώρευση. Πλυμένα αιμοπετάλια επώαστηκαν με 0,01-0,1 nM FXa και πραγματοποιήθηκε καταγραφή της συσσώρευσης για 20-30 min.

6.3 Μελέτη της δράσης των vorapaxar, dabigatran και rivaroxaban σε πλυμένα αιμοπετάλια με τη μέθοδο της LTA

Αρχικά, πραγματοποιήθηκαν δοσο- και χρονο-εξαρτώμενα πειράματα για τη μελέτη της ανασταλτικής δράσης του vorapaxar στη συσσώρευση πλυμένων αιμοπεταλίων. Συγκεκριμένα, πλυμένα αιμοπετάλια επώαστηκαν με 0,1-100 nM vorapaxar για 5, 15, 30 και 60 min στους 37°C και εν συνεχεία ενεργοποιήθηκαν με 10 μM TRAP-6 για 5 min. Το vorapaxar παρουσίασε καλύτερη ανασταλτική δράση στους 37°C, ενώ ανέστειλε δοσο- και χρονο-εξαρτώμενα την αιμοπεταλιακή συσσώρευση (Πίνακας 6.2). Στην εικόνα 6.4 παρουσιάζονται αντιπροσωπευτικές καμπύλες συσσώρευσης του vorapaxar στα 60 min επώασης.

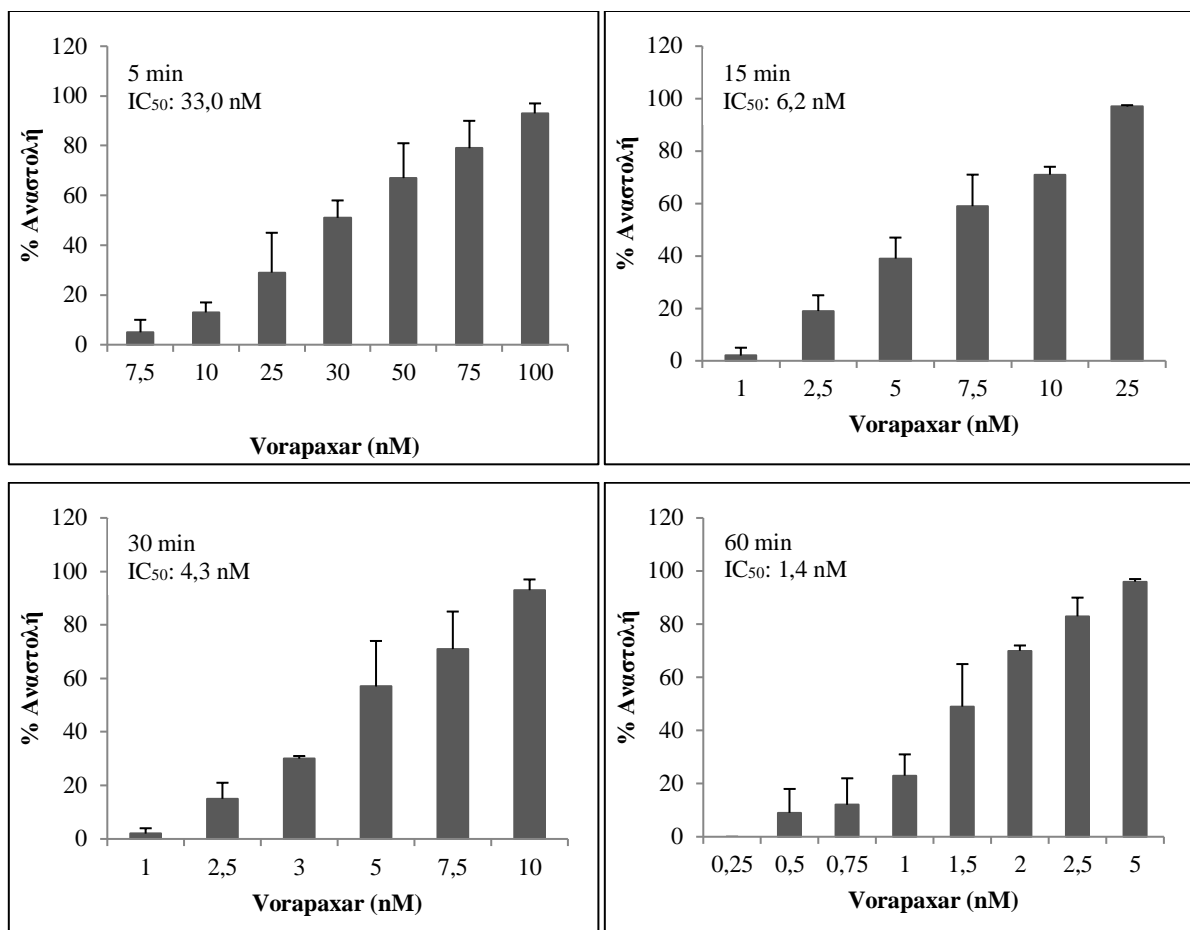
Πίνακας 6.2 Η % αναστολή της επαγόμενης από 10 μM TRAP-6 αιμοπεταλιακής συσσώρευσης από το vorapaxar σε πλυμένα αιμοπετάλια.

	Χρόνος (min)			
	5	15	30	60
Vorapaxar (nM)	37°C			
100	96%	90%	96%	96%
10	64%	70%	80%	93%
1	<10%	<10%	<10%	86%
0,1	<10%	<10%	<10%	29%



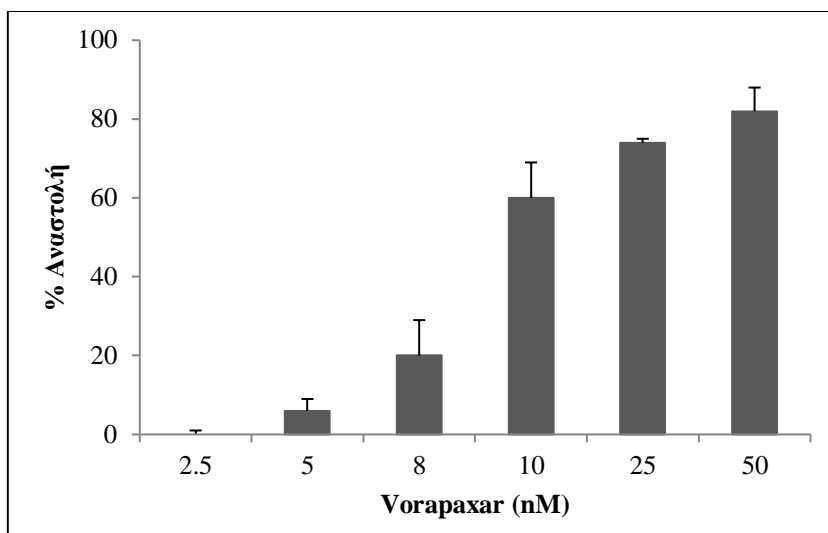
Εικόνα 6.4 Αντιπροσωπευτικές καμπύλες συσσώρευσης του vonaraaxar. Πλυμένα αιμοπετάλια επώαστηκαν με 0,1-100 nM vonaraaxar για 60 min στους 37°C και στη συνέχεια ενεργοποιήθηκε με 10 μM TRAP-6.

Επιπρόσθετα, πλυμένα αιμοπετάλια επώαστηκαν με 0,25-100 nM vonaraaxar για 5, 15, 30 και 60 min στους 37°C και εν συνεχεία ενεργοποιήθηκαν με 10 μM TRAP-6, με σκοπό την εύρεση των τιμών IC_{50} του φαρμάκου για τους διαφορετικούς χρόνους επώασης (Εικόνα 6.5).



Εικόνα 6.5 Η ανασταλτική δράση του vorapaxar στην επαγόμενη από TRAP-6 συσσώρευση πλυμένων αιμοπεταλίων. Πλυμένα αιμοπετάλια επώαστηκαν με 0,25-100 nM vorapaxar για 5, 15, 30 και 60 min στους 37°C και στη συνέχεια ενεργοποιήθηκαν με 10 μM TRAP-6. Παρουσιάζονται οι τιμές IC₅₀ για τις διάφορες χρονικές στιγμές επώασης. Οι τιμές εκφράζονται ως μέσος όρος±SD από 3 ανεξάρτητες παρασκευές PRP για τα 15 και 30 min επώασης και από 4 ανεξάρτητες παρασκευές PRP για τα 5 και 60 min επώασης.

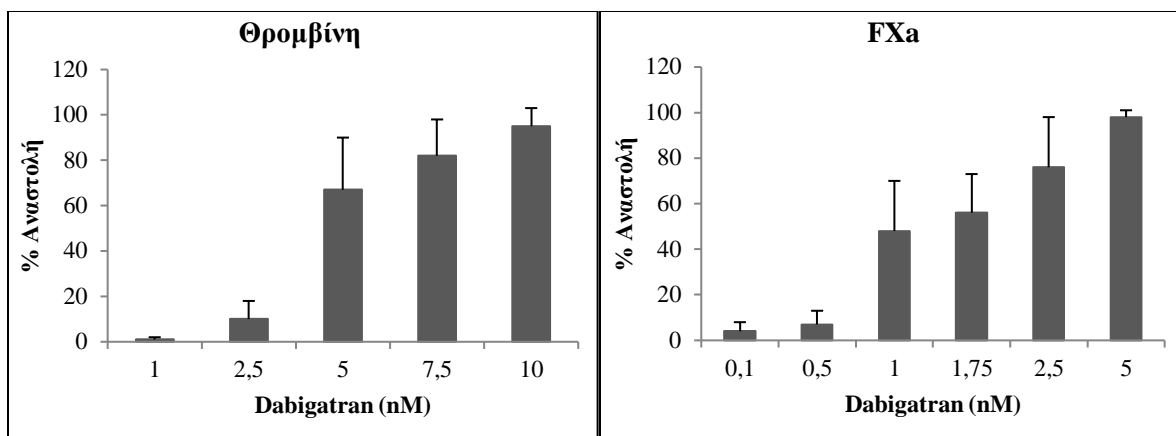
Ακολούθησαν πειράματα για τη μελέτη της δράσης του vorapaxar στην επαγόμενη από τον FXa αιμοπεταλιακή συσσώρευση. Συγκεκριμένα, πλυμένα αιμοπετάλια επώαστηκαν με 2,5-50 nM vorapaxar για 15 min στους 37°C και εν συνεχεία ενεργοποιήθηκαν με 0,025 nM FXa. Η αιμοπεταλιακή συσσώρευση καταγράφηκε για 30 min. Το vorapaxar ανέστειλε δόσο-εξαρτώμενα την επαγόμενη από τον FXa αιμοπεταλιακή συσσώρευση με τιμή IC₅₀=9,0 nM (Εικόνα 6.6).



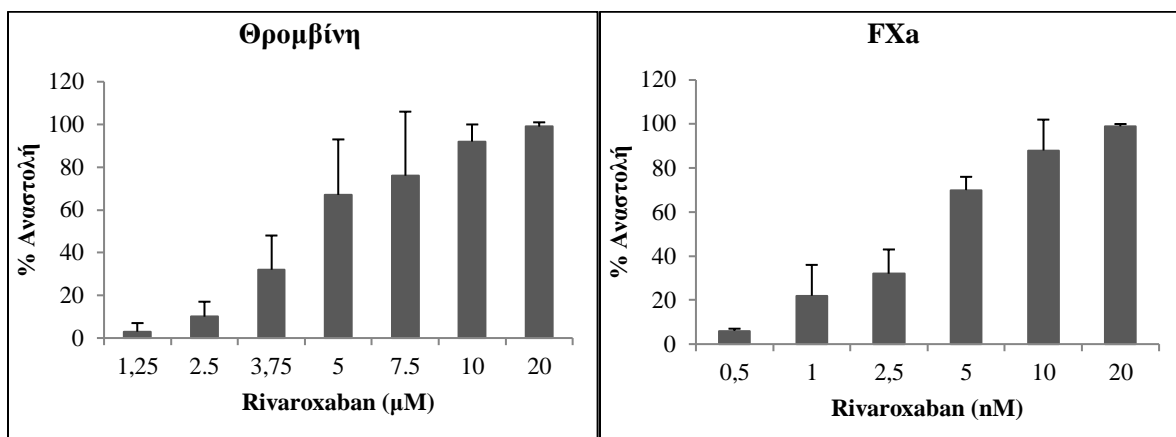
Εικόνα 6.6 Η ανασταλτική δράση του voraparaxar στην επαγόμενη από τον FXa αιμοπεταλιακή συσσώρευση. Πλυμένα αιμοπετάλια επώαστηκαν με 2,5-50 nM voraparaxar για 15 min στους 37° C και στη συνέχεια ενεργοποιήθηκαν με 0,025 nM FXa. Οι τιμές εκφράζονται ως μέσος όρος±SD από 3 ανεξάρτητες παρασκευές πλυμένων αιμοπεταλίων.

Τέλος, αν και το voraparaxar αποτελεί εξειδικευμένο ανταγωνιστή του PAR-1, μελετήθηκε η δράση του στην αιμοπεταλιακή συσσώρευση που πραγματοποιείται από άλλους κλασσικούς αιμοπεταλιακούς αγωνιστές. Συγκεκριμένα, πλυμένα αιμοπετάλια επώαστηκαν με 2,5 ή 5 μ M voraparaxar για 60 min και στη συνέχεια ενεργοποιήθηκαν με 5 μ g/mL κολλαγόνου ή 500 μ M αραχιδονικού οξέος. Το voraparaxar δεν ανέστειλε την επαγόμενη από κολλαγόνο ή αραχιδονικό οξύ αιμοπεταλιακή συσσώρευση.

Εν συνεχεία, πραγματοποιήθηκε μελέτη της δράσης των αντιπηκτικών φαρμάκων dabigatran και rivaroxaban στη συσσώρευση πλυμένων αιμοπεταλίων. Συγκεκριμένα, πλυμένα αιμοπετάλια επώαστηκαν με 0,1-10 nM dabigatran ή 0,5 nM-20 μ M rivaroxaban για 1 min στους 37°C και ενεργοποιήθηκαν είτε με 0,1 U/mL θρομβίνη, είτε με 0,025 nM FXa. Και τα δύο φάρμακα ανέστειλαν δόσο-εξαρτώμενα την αιμοπεταλιακή συσσώρευση και από τους δύο αγωνιστές (Εικόνες 6.7 και 6.8). Οι τιμές IC₅₀ για το dabigatran ήταν 4,1 και 1,4 nM για τη θρομβίνη και τον FXa, αντίστοιχα, ενώ για το rivaroxaban ήταν 4,6 μ M και 3,5 nM για τη θρομβίνη και τον FXa, αντίστοιχα.



Εικόνα 6.7 Η ανασταλτική δράση του dabigatran στην επαγόμενη από τη θρομβίνη και τον FXa αιμοπεταλιακή συσσώρευση. Πλυμένα αιμοπετάλια επωάστηκαν με 0,1-10 nM dabigatran για 1 min στους 37°C και στη συνέχεια ενεργοποιήθηκαν είτε με 0,1 U/mL θρομβίνη, είτε με 0,025 nM FXa. Οι τιμές εκφράζονται ως μέσος όρος±SD από 7 ανεξάρτητες παρασκευές πλυμένων αιμοπεταλίων.

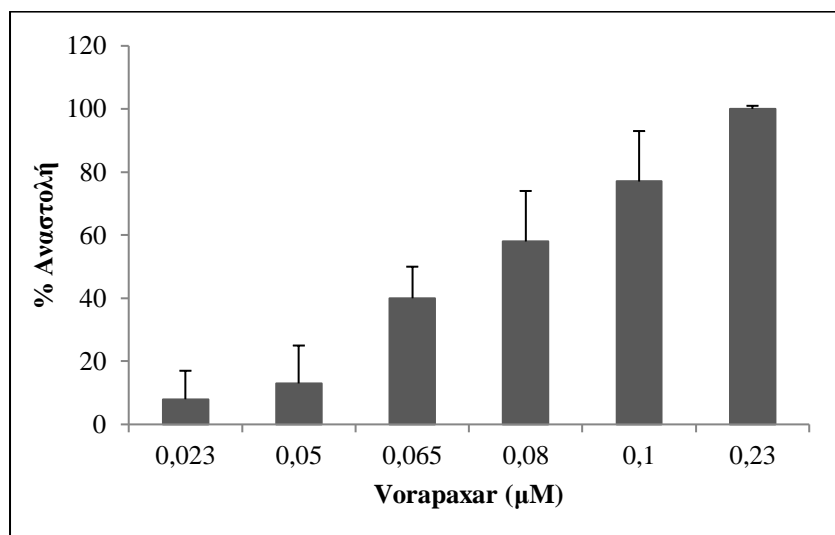


Εικόνα 6.8 Η ανασταλτική δράση του rivaroxaban στην επαγόμενη από τη θρομβίνη και τον FXa αιμοπεταλιακή συσσώρευση. Πλυμένα αιμοπετάλια επωάστηκαν είτε με 1,25-20 μM rivaroxaban για 1 min στους 37°C και στη συνέχεια ενεργοποιήθηκαν με 0,1 U/mL θρομβίνη, είτε με 0,5-20 nM rivaroxaban για 1 min στους 37°C και στη συνέχεια ενεργοποιήθηκαν με 0,025 nM FXa. Οι τιμές εκφράζονται ως μέσος όρος±SD από 5 ανεξάρτητες παρασκευές πλυμένων αιμοπεταλίων.

Τέλος, μελετήθηκε η πιθανή ανασταλτική δράση των παραπάνω φαρμάκων στην αιμοπεταλιακή συσσώρευση που πραγματοποιείται από άλλους κλασσικούς αιμοπεταλιακούς αγωνιστές. Συγκεκριμένα, πλυμένα αιμοπετάλια επωάστηκαν με 10 μM dabigatran ή rivaroxaban για 1 min και στη συνέχεια ενεργοποιήθηκαν με 10 μM TRAP-6, 5 μg/mL κολλαγόνου ή 500 μM αραχιδονικού οξέος. Τα δύο φάρμακα δεν ανέστειλαν την επαγόμενη από TRAP-6, κολλαγόνο ή αραχιδονικό οξύ αιμοπεταλιακή συσσώρευση.

6.4 Μελέτη της δράσης των voraparaxar, dabigatran και rivaroxaban σε ολικό αίμα με τη μέθοδο της συσσωρευομετρίας εμπέδησης

Πραγματοποιήθηκε μελέτη της δράσης του voraparaxar αλλά και των dabigatran και rivaroxaban στην αναστολή της συσσώρευσης ολικού αίματος από TRAP-6, ADP, κολλαγόνο ή αραχιδονικό οξύ. Συγκεκριμένα, ολικό αίμα επώαστηκε με voraparaxar σε ένα εύρος συγκεντρώσεων από 0,023-23 μM για 60 min στους 37°C και στη συνέχεια ενεργοποιήθηκε με 10 μM TRAP-6 για 5 min, με σκοπό τον υπολογισμό του IC_{50} του φαρμάκου που βρέθηκε να είναι 0,077 μM (Εικόνα 6.9).



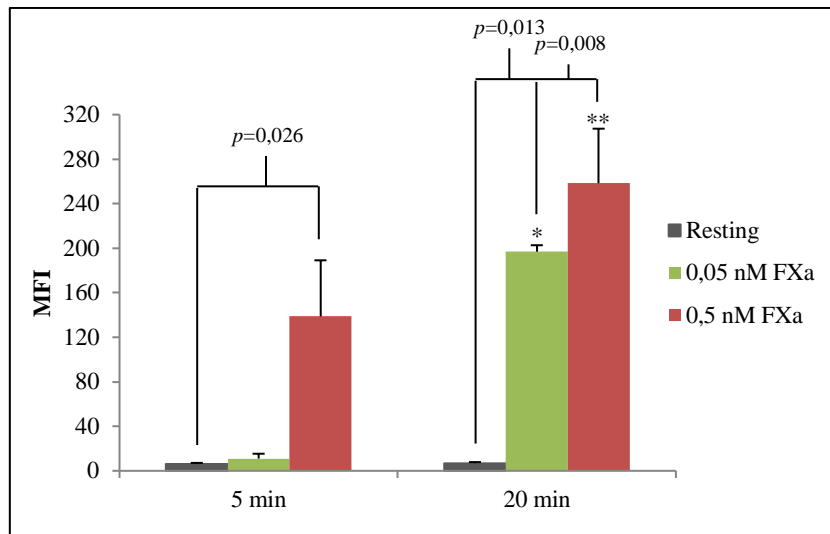
Εικόνα 6.9 Η ανασταλτική δράση του voraparaxar στην επαγόμενη από TRAP-6 αιμοπεταλιακή συσσώρευση σε ολικό αίμα. Ολικό αίμα επώαστηκε με 0,023-0,23 μM voraparaxar για 60 min στους 37°C και στη συνέχεια ενεργοποιήθηκε με 10 μM TRAP-6. Οι τιμές εκφράζονται ως μέσος όρος \pm SD από 4 ανεξάρτητες παρασκευές ολικού αίματος.

Ακόμη, ολικό αίμα επώαστηκε με 1 ή 5 μM voraparaxar για 60 min στους 37°C και ακολούθησε ενεργοποίηση με 10 μM ADP ή 500 μM αραχιδονικού οξέος. Το voraparaxar δεν ανέστειλε την αιμοπεταλιακή συσσώρευση σε ολικό αίμα από τους παραπάνω αγωνιστές.

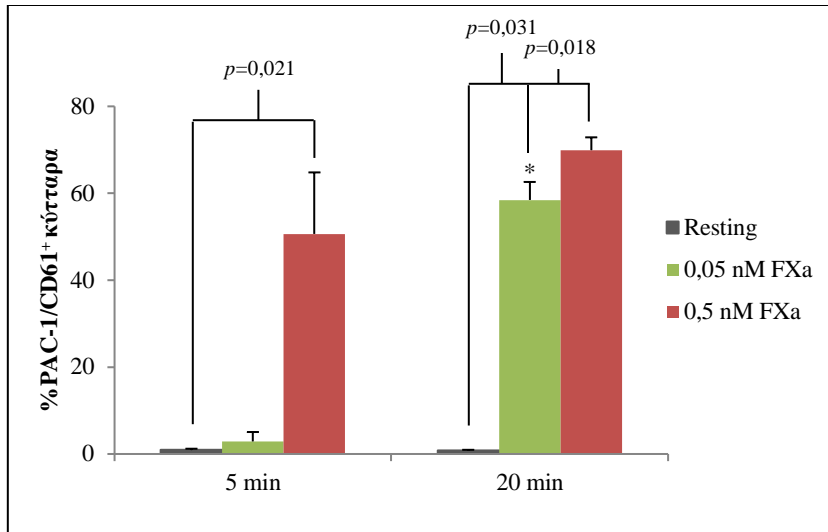
Τέλος, ολικό αίμα επώαστηκε με 10 μM dabigatran ή 10 μM rivaroxaban για 1 min στους 37°C και ακολούθησε ενεργοποίηση με 10 μM TRAP-6, 10 μM ADP, 5 $\mu\text{g/mL}$ κολλαγόνου ή 500 μM αραχιδονικού οξέος. Κανένα από τα δύο φάρμακα δεν ανέστειλε την αιμοπεταλιακή συσσώρευση από τους παραπάνω αγωνιστές.

6.5 Μελέτη της δράσης του FXa σε πλυμένα αιμοπετάλια και PRP με τη μέθοδο της κυτταρομετρίας ροής. Ρόλος του PAR-1 στην ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων

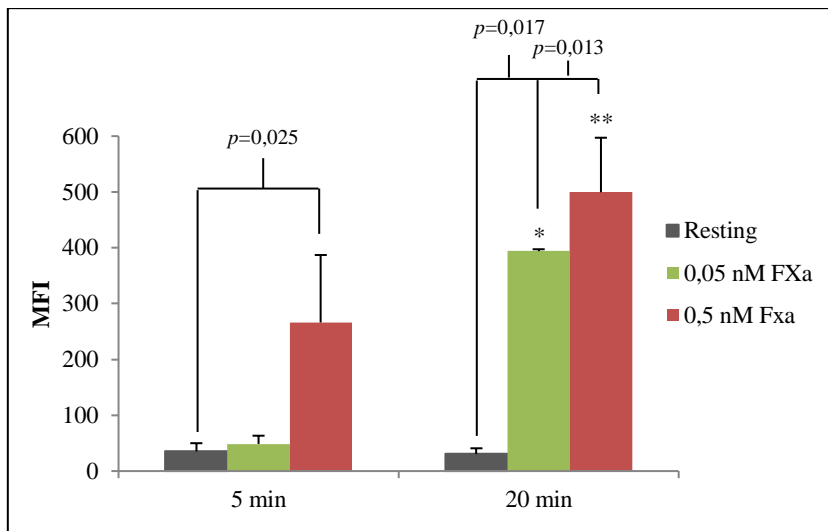
Αρχικά, πραγματοποιήθηκαν δοσο- και χρονο-εξαρτώμενα πειράματα για την εύρεση των βέλτιστων συνθηκών δράσης του FXa στην ενεργοποίηση του υποδοχέα $\alpha_{IIb}\beta_3$ και την έκφραση της P-σελεκτίνης σε πλυμένα αιμοπετάλια. Συγκεκριμένα, πλυμένα αιμοπετάλια επώαστηκαν με 0,05 ή 0,5 nM FXa για 5 ή 20 min στους 37°C. Ο FXa οδήγησε στην ενεργοποίηση του υποδοχέα $\alpha_{IIb}\beta_3$ (Εικόνες 6.10 και 6.11) και στην έκφραση της P-σελεκτίνης (Εικόνες 6.12 και 6.13), τόσο ως τιμές MFI, όσο και ως %gated PAC-1/CD61⁺ και CD62P/CD61⁺ κύτταρα, με τη βέλτιστη δράση να παρατηρείται στη συγκέντρωση των 0,5 nM μετά από 20 min επώαση.



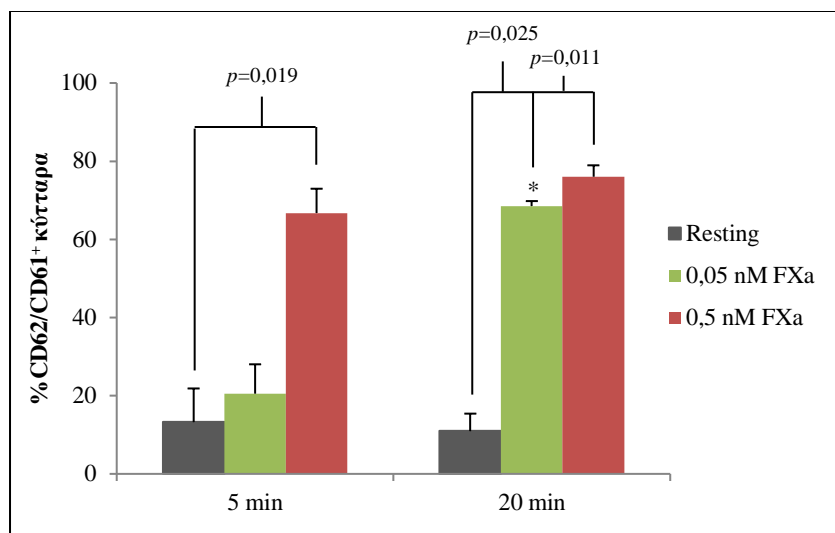
Εικόνα 6.10 Η δοσο- και χρονο-εξαρτώμενη επίδραση του FXa στην ενεργοποίηση του υποδοχέα $\alpha_{IIb}\beta_3$, ως τιμές MFI. Πλυμένα αιμοπετάλια επώαστηκαν με 0,05 ή 0,5 nM FXa για 5 ή 20 min στους 37°C. Η μέγιστη έκφραση του υποδοχέα $\alpha_{IIb}\beta_3$ παρατηρήθηκε σε συγκέντρωση 0,5 nM FXa, μετά από 20 min επώαση. Οι τιμές εκφράζονται ως μέσος όρος \pm SD από 3 ανεξάρτητες παρασκευές πλυμένων αιμοπεταλίων. [$*p=0,008$ και $**p=0,006$ σε σύγκριση με τα 5 min].



Εικόνα 6.11 Η δόσο- και χρονο-εξαρτώμενη επίδραση του FXa στην ενεργοποίηση του υποδοχέα $\alpha_{IIb}\beta_3$, ως %gated PAC-1/CD61⁺ κύτταρα. Πλυμένα αιμοπετάλια επώαστηκαν με 0,05 ή 0,5 nM FXa για 5 ή 20 min στους 37°C. Η μέγιστη έκφραση του υποδοχέα $\alpha_{IIb}\beta_3$ παρατηρήθηκε σε συγκέντρωση 0,5 nM FXa, μετά από 20 min επώαση. Οι τιμές εκφράζονται ως μέσος όρος±SD από 3 ανεξάρτητες παρασκευές πλυμένων αιμοπεταλίων. [* $p=0,016$ σε σύγκριση με τα 5 min].

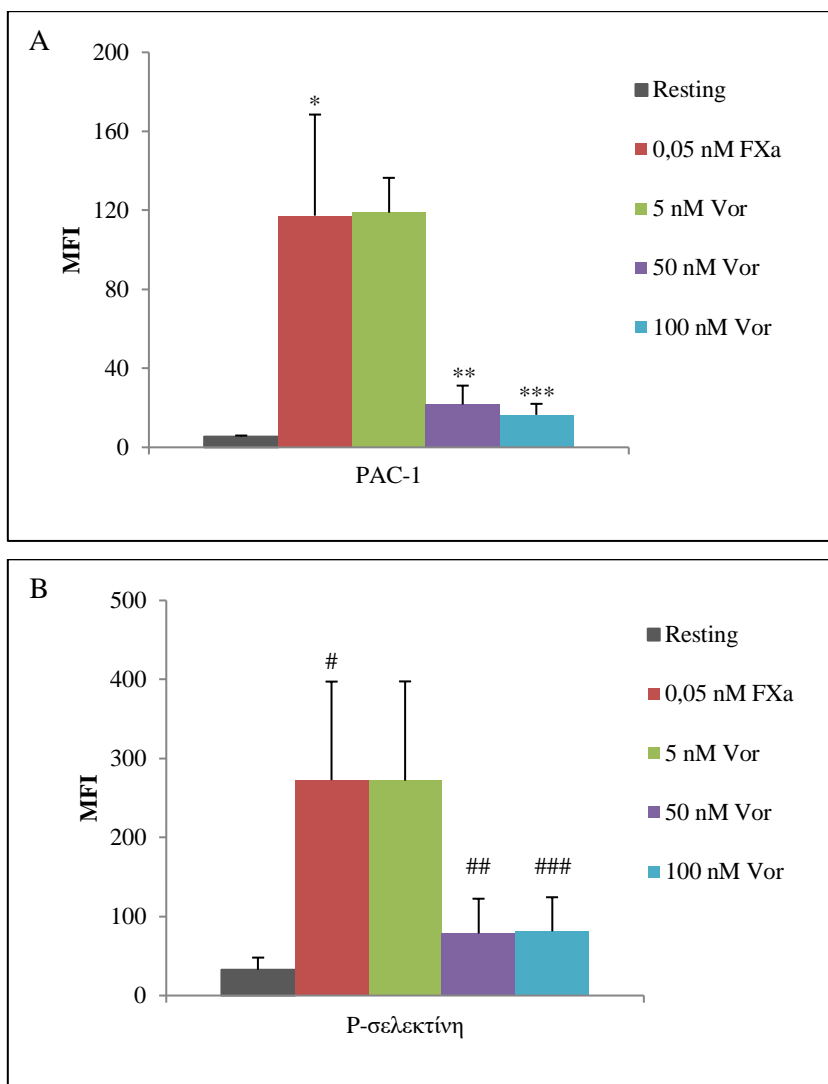


Εικόνα 6.12 Η δόσο- και χρονο-εξαρτώμενη επίδραση του FXa στη μεμβρανική έκφραση της P-σελεκτίνης, ως τιμές MFI. Πλυμένα αιμοπετάλια επώαστηκαν με 0,05 ή 0,5 nM FXa για 5 ή 20 min στους 37°C. Η μέγιστη έκφραση της P-σελεκτίνης παρατηρήθηκε σε συγκέντρωση 0,5 nM FXa, μετά από 20 min επώαση. Οι τιμές εκφράζονται ως μέσος όρος±SD από 3 ανεξάρτητες παρασκευές πλυμένων αιμοπεταλίων [* $p=0,023$ και ** $p=0,045$ σε σύγκριση με τα 5 min].

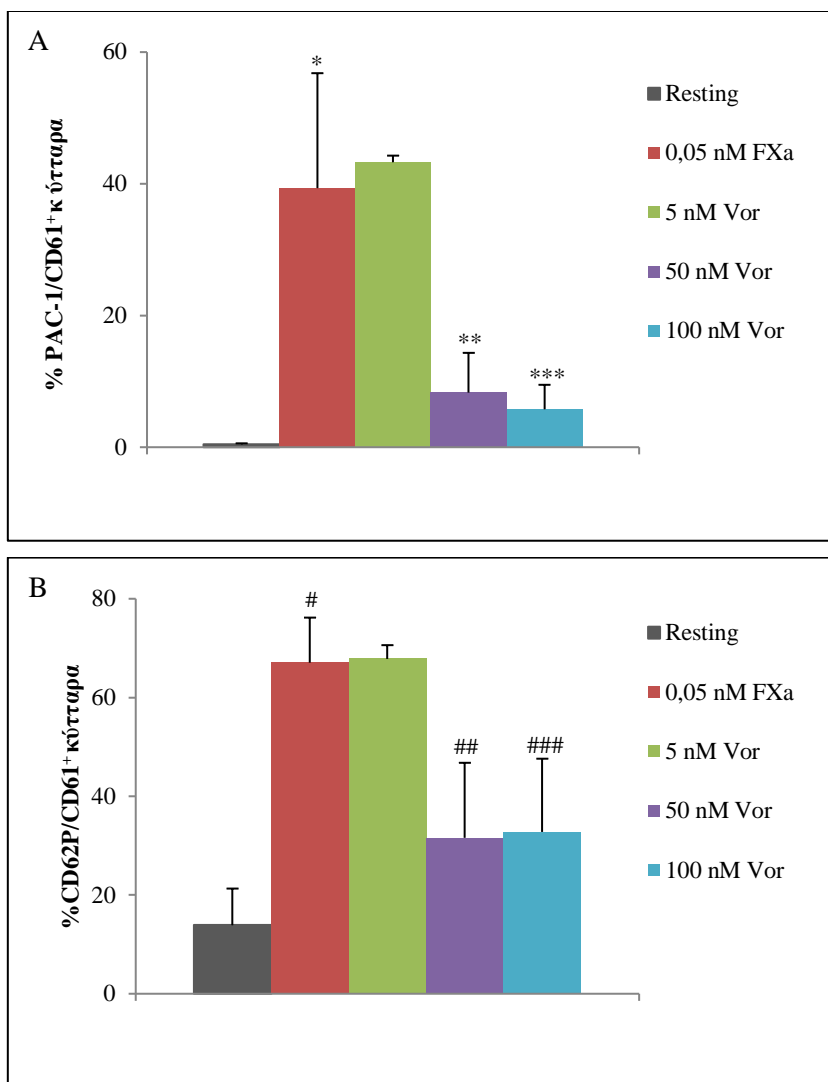


Εικόνα 6.13 Η δόσο- και χρονο-εξαρτώμενη επίδραση του FXa στη μεμβρανική έκφραση της P-σελεκτίνης, ως %gated PAC-1/CD61⁺ κύτταρα. Πλυμένα αιμοπετάλια επωάστηκαν με 0,05 ή 0,5 nM FXa για 5 ή 20 min στους 37°C. Η μέγιστη έκφραση της P-σελεκτίνης παρατηρήθηκε σε συγκέντρωση 0,5 nM FXa, μετά από 20 min επώαση. Οι τιμές εκφράζονται ως μέσος όρος±SD από 3 ανεξάρτητες παρασκευές πλυμένων αιμοπεταλίων [*p*=0,004 σε σύγκριση με τα 5 min].

Προκειμένου να διερευνηθεί ο ρόλος του PAR-1 στην επαγόμενη από τον FXa ενεργοποίηση του υποδοχέα α_{IIb}β₃ και την έκφραση της P-σελεκτίνης, πλυμένα αιμοπετάλια επωάστηκαν με 5, 50 και 100 nM νογαραχαρ για 15 min στους 37°C και ακολούθησε ενεργοποίηση τους με 0,05 nM FXa. Το νογαραχαρ σε συγκεντρώσεις 50 και 100 nM ανέστειλε στατιστικά σημαντικά την ενεργοποίηση του α_{IIb}β₃ (κατά 88±7% και 91±3%, αντίστοιχα) και της P-σελεκτίνης (κατά 78±17% και 81±12%, αντίστοιχα), ως τιμές MFI (Εικόνα 6.14), αλλά και ως %gated PAC-1/CD61⁺ (κατά 88±12% και 91±7%, αντίστοιχα) και CD62P/CD61⁺ (κατά 65±24% και 69±22%, αντίστοιχα), (Εικόνες 6.15). Στη συγκέντρωση των 5 nM, το νογαραχαρ εμφάνισε ασθενή ανασταλτική δράση στην ενεργοποίηση του α_{IIb}β₃ και την έκφραση της P-σελεκτίνης.

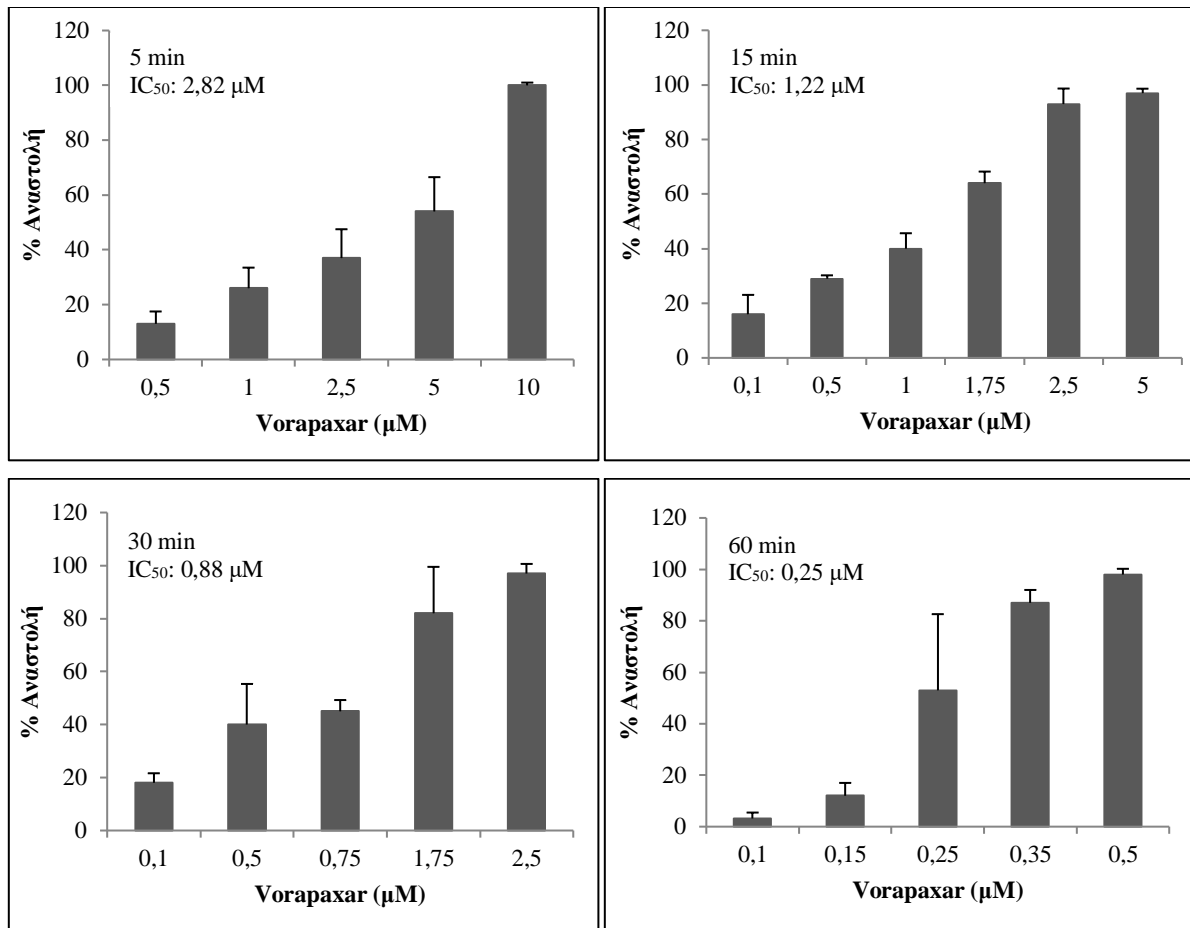


Εικόνα 6.14 Η ανασταλτική δράση του νοραραχαρ στην επαγόμενη από τον FXa (A) ενεργοποίηση του υποδοχέα $\alpha_{IIb}\beta_3$ και (B) έκφραση της P-σελεκτίνης, ως τιμές MFI. Πλυμένα αιμοπετάλια εפוάστηκαν με 5, 50 και 100 nM νοραραχαρ για 15 min και στη συνέχεια ενεργοποιήθηκαν με 0,05 nM FXa για 20 min. Οι τιμές εκφράζονται ως μέσος όρος \pm SD από 3 ανεξάρτητες παρασκευές πλυμένων αιμοπεταλίων. * $p=0,022$ και # $p=0,035$ σε σύγκριση με το αντίστοιχο resting, ** $p=0,020$, *** $p=0,022$, ## $p=0,036$ και ### $p=0,028$ σε σύγκριση με την αντίστοιχη 0,05 nM FXa.

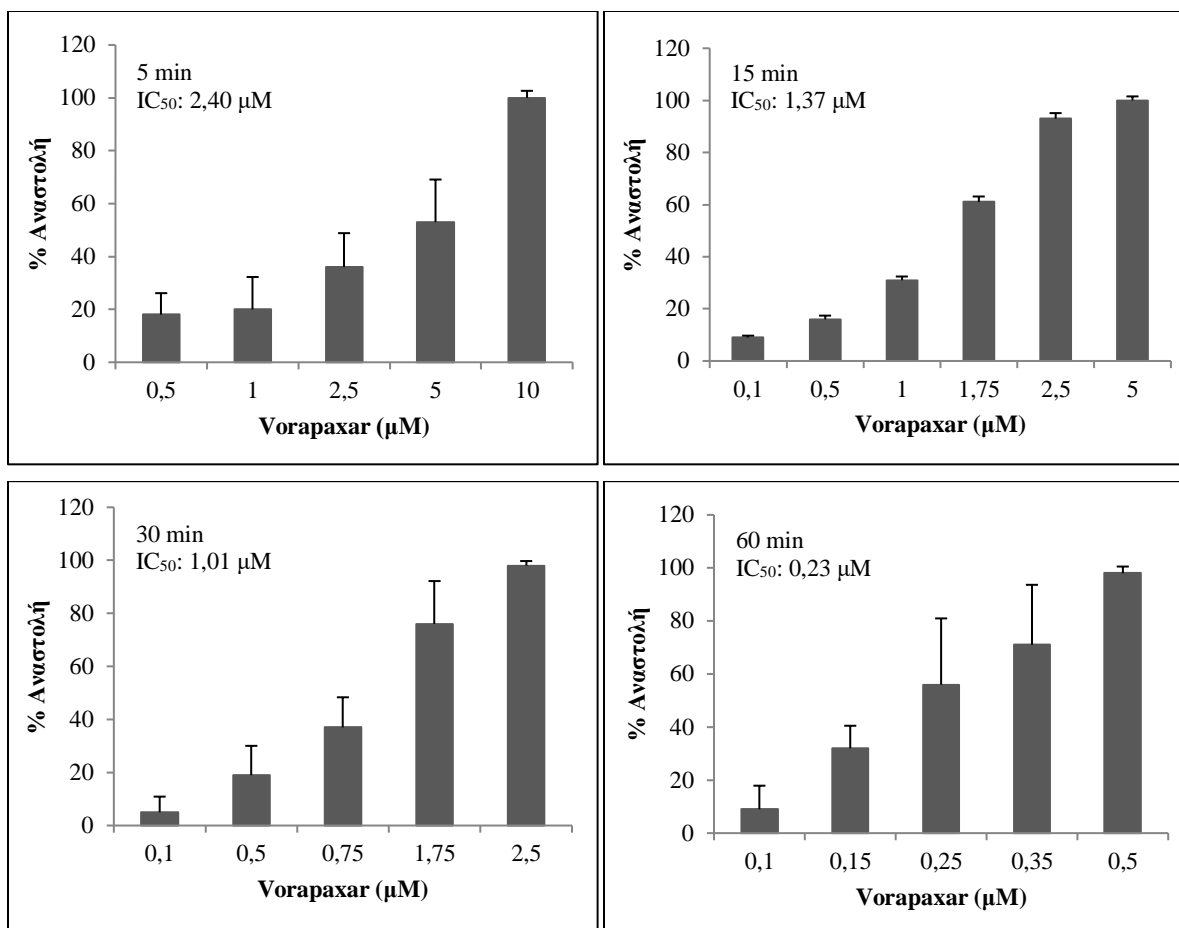


Εικόνα 6.15 Η ανασταλτική δράση του voraparaxar στην επαγόμενη από τον FXa (A) ενεργοποίηση του υποδοχέα α_{IIb}β₃ και (B) έκφραση της P-σελεκτίνης, ως τιμές %gated PAC-1/CD61⁺ και CD62P/CD61⁺ κύτταρα. Πλυμένα αιμοπετάλια επώαστηκαν με 5, 50 και 100 nM voraparaxar για 15 min και στη συνέχεια ενεργοποιήθηκαν με 0,05 nM FXa για 20 min. Οι τιμές εκφράζονται ως μέσος όρος±SD από 3 ανεξάρτητες παρασκευές πλυμένων αιμοπεταλίων. * $p=0,012$ και # $p=0,0001$ σε σύγκριση με το αντίστοιχο resting, ** $p=0,008$, *** $p=0,009$, ## $p=0,0011$ και ### $p=0,010$ σε σύγκριση με την αντίστοιχη 0,05 nM FXa.

Επιπρόσθετα, PRP επώαστηκε με 0,1-10 μ M voraparaxar για 5, 15, 30 και 60 min στους 37°C και εν συνεχεία ενεργοποιήθηκε με 50 μ M TRAP-6. Το voraparaxar ανέστειλε ισχυρά τόσο την ενεργοποίηση του α_{IIb}β₃ (Εικόνα 6.16), όσο και την έκφραση της P-σελεκτίνης (Εικόνα 6.17), ως τιμές MFI, σε όλες τις χρονικές στιγμές, με τη βέλτιστη δράση να εμφανίζεται στα 60 min επώασης.



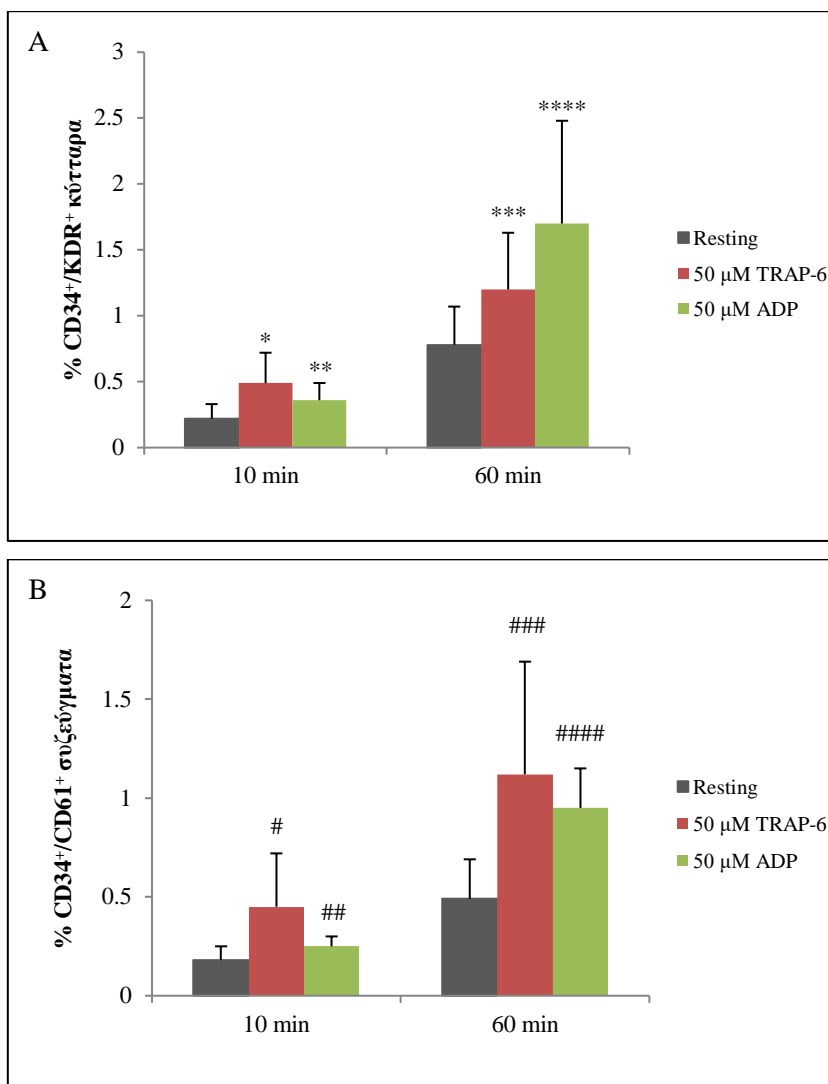
Εικόνα 6.16 Η ανασταλτική δράση του vorapaxar στην επαγόμενη από TRAP-6 ενεργοποίηση του υποδοχέα $\alpha_3\beta_3$ σε PRP. PRP επώαστηκε με 0,1-10 μM vorapaxar για 5, 15, 30 και 60 min στους 37°C και στη συνέχεια ενεργοποιήθηκε με 50 μM TRAP-6. Παρουσιάζονται οι τιμές IC₅₀ για τις διάφορες χρονικές στιγμές επώασης. Οι τιμές εκφράζονται ως μέσος όρος \pm SD από 3 ανεξάρτητες παρασκευές PRP για τα 5, 15 και 30 min επώασης και από 7 ανεξάρτητες παρασκευές PRP για τα 60 min επώασης.



Εικόνα 6.17 Η ανασταλτική δράση του vorapaxar στην επαγόμενη από TRAP-6 έκφραση της P-σελεκτίνης σε PRP. PRP επώαστηκε με 0,1-10 μM vorapaxar για 5, 15, 30 και 60 min στους 37°C και στη συνέχεια ενεργοποιήθηκε με 50 μM TRAP-6. Παρουσιάζονται οι τιμές IC₅₀ για τις διάφορες χρονικές στιγμές επώασης. Οι τιμές εκφράζονται ως μέσος όρος±SD από 3 ανεξάρτητες παρασκευές PRP για τα 5, 15 και 30 min επώασης και από 7 ανεξάρτητες παρασκευές PRP για τα 60 min επώασης.

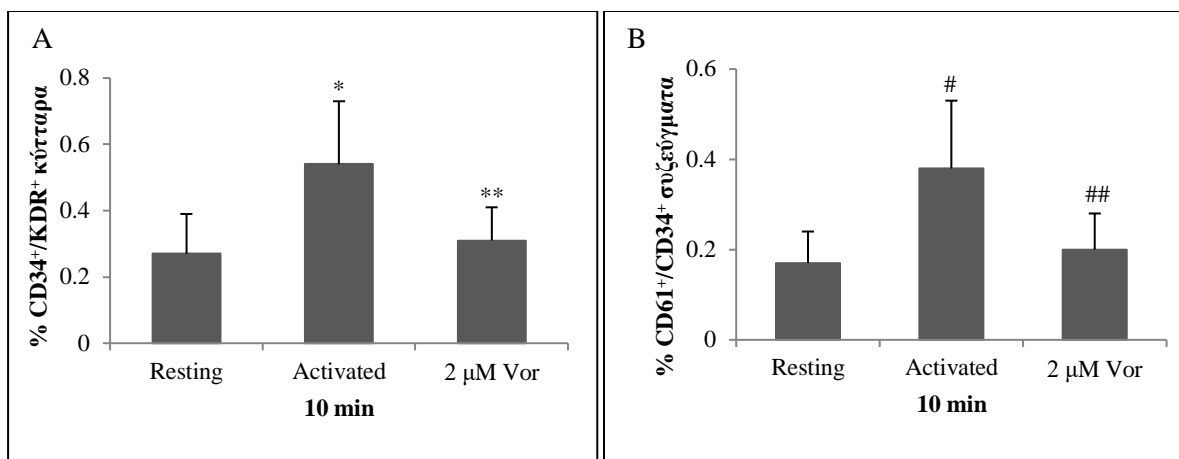
6.6 Μελέτη της δράσης του voraparaxar στη διαφοροποίηση CD34⁺ κυττάρων και στη δημιουργία συζευγμάτων CD34⁺ κυττάρων με αιμοπετάλια σε ολικό αίμα, με τη μέθοδο της κυτταρομετρίας ροής

Προκειμένου να μελετηθεί ο ρόλος του PAR-1 στη διαφοροποίηση των CD34⁺ κυττάρων προς EPCs, καθώς και στην αλληλεπίδραση των αιμοπεταλίων με τα CD34⁺ κύτταρα, ολικό αίμα επώαστηκε με 50 μM TRAP-6 για 10 ή 60 min. Επιπρόσθετα, ολικό αίμα επώαστηκε με 50 μM ADP για 10 ή 60 min. Ακολούθως, ολικό αίμα επώαστηκε με 0,05% DMSO ή 2 μM voraparaxar για 1 h και στη συνέχεια ενεργοποιήθηκε με 50 μM TRAP-6 ή ADP για 10 ή 60 min. Το TRAP-6 αύξησε την έκφραση των CD34⁺/KDR⁺ κυττάρων από 0,22±0,11% προς 0,49±0,23% στα 10 min και από 0,78±0,29% προς 1,20±0,38% στα 60 min, καθώς και το σχηματισμό CD34⁺/CD61⁺ συζευγμάτων από 0,18±0,07% προς 0,46±0,23% στα 10 min επώασης και από 0,45±0,16% προς 0,84±0,41% στα 60 min (Εικόνα 6.18). Επιπρόσθετα, το ADP αύξησε την έκφραση των CD34⁺/KDR⁺ κυττάρων από 0,22±0,11% προς 0,36±0,13% στα 10 min και από 0,78±0,29% προς 1,70±0,78% στα 60 min, καθώς και το σχηματισμό CD34⁺/CD61⁺ συζευγμάτων από 0,18±0,06% προς 0,25±0,05% στα 10 min επώασης και από 0,49±0,20% προς 0,95±0,20% στα 60 min (Εικόνα 6.18).

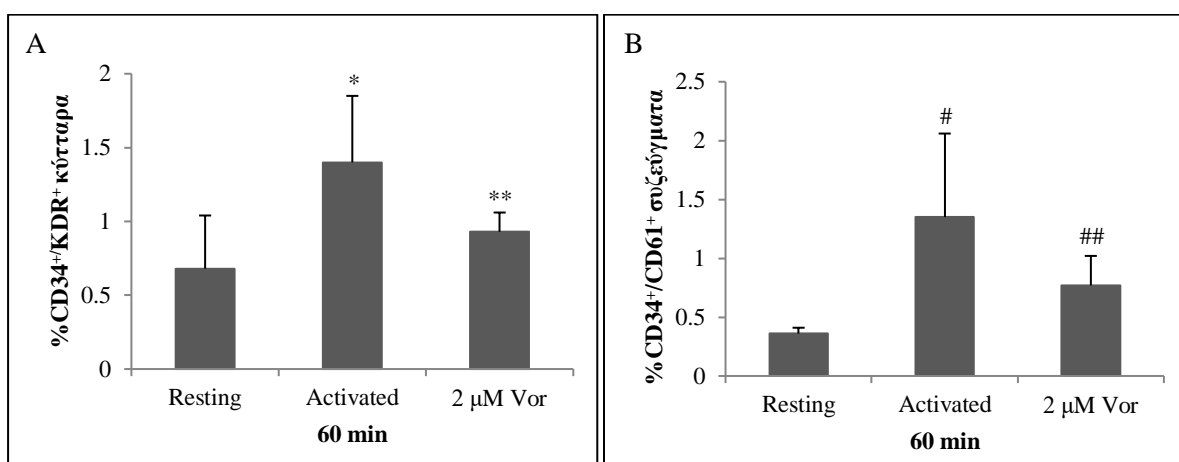


Εικόνα 6.18 (A) Η διαφοροποίηση των CD34⁺ κυττάρων προς EPCs και (B) ο σχηματισμός CD34⁺/CD61⁺ συζευγμάτων. Ολικό αίμα επωάστηκε με 50 μM TRAP-6 ή ADP για 10 και 60 min στους 37°C. Οι τιμές εκφράζονται ως μέσος όρος±SD από 5 ανεξάρτητες παρασκευές ολικού αίματος για το TRAP-6 και από 4 ανεξάρτητες παρασκευές ολικού αίματος για το ADP. (A) * $p=0,018$, ** $p=0,003$ *** $p=0,046$, **** $p=0,049$ και (B) # $p=0,028$, ## $p=0,044$, ### $p=0,035$, #### $p=0,027$, σε σύγκριση με το αντίστοιχο resting.

Το νογαραχαρ ανέστειλε τη διαφοροποίηση των CD34⁺ κυττάρων προς EPCs που επάγεται από το TRAP-6 κατά 85±10% μετά από 10 min (Εικόνα 6.19) και κατά 73±18% μετά από 60 min (Εικόνα 6.20), καθώς και το σχηματισμό CD34⁺/CD61⁺ συζευγμάτων κατά 88±6% μετά από 10 min (Εικόνα 6.19) και κατά 67±10% μετά από 60 min (Εικόνα 6.20).

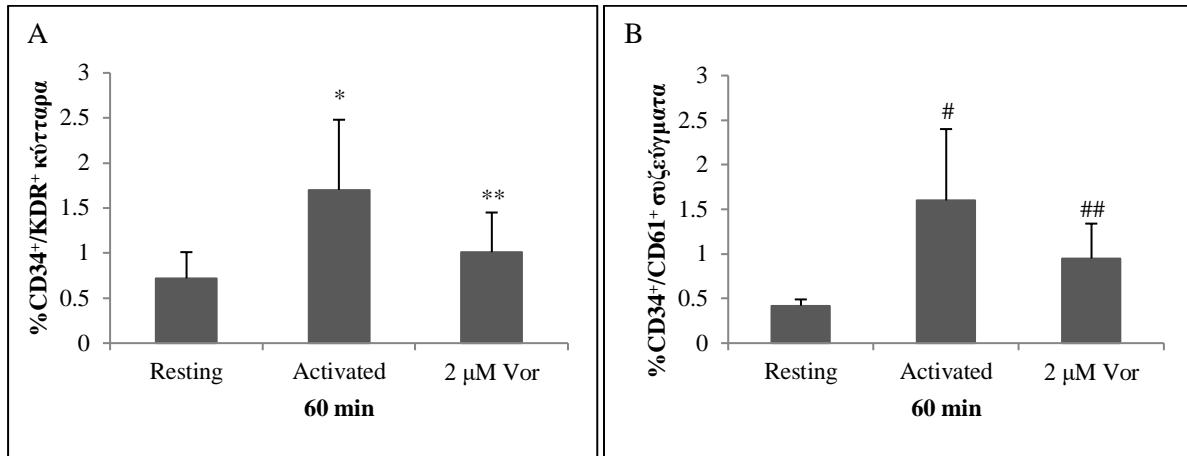


Εικόνα 6.19 Η ανασταλτική δράση του νοραραχαρ στην επαγόμενη από TRAP-6 (A) διαφοροποίηση των $CD34^+$ κυττάρων προς EPCs και (B) σχηματισμό $CD34^+/CD61^+$ συζευγμάτων μετά από 10 min. Ολικό αίμα επώαστηκε με 2 μM νοραραχαρ για 60 min και ενεργοποιήθηκε με 50 μM TRAP-6 για 10 min στους 37°C. Οι τιμές εκφράζονται ως μέσος όρος \pm SD από 4 ανεξάρτητες παρασκευές ολικού αίματος. (A) * $p=0,041$ σε σύγκριση με το resting και ** $p=0,043$ σε σύγκριση με το activated, (B) # $p=0,012$ σε σύγκριση με το resting και ## $p=0,014$ σε σύγκριση με το activated.



Εικόνα 6.20 Η ανασταλτική δράση του νοραραχαρ στην επαγόμενη από TRAP-6 (A) διαφοροποίηση των $CD34^+$ κυττάρων προς EPCs και (B) σχηματισμό $CD34^+/CD61^+$ συζευγμάτων μετά από 60 min. Ολικό αίμα επώαστηκε με 2 μM νοραραχαρ για 60 min και ενεργοποιήθηκε με 50 μM TRAP-6 για 60 min στους 37°C. Οι τιμές εκφράζονται ως μέσος όρος \pm SD από 4 ανεξάρτητες παρασκευές ολικού αίματος. (A) * $p=0,05$ σε σύγκριση με το resting και ** $p=0,038$ σε σύγκριση με το activated, (B) # $p=0,05$ σε σύγκριση με το resting και ## $p=0,05$ σε σύγκριση με το activated.

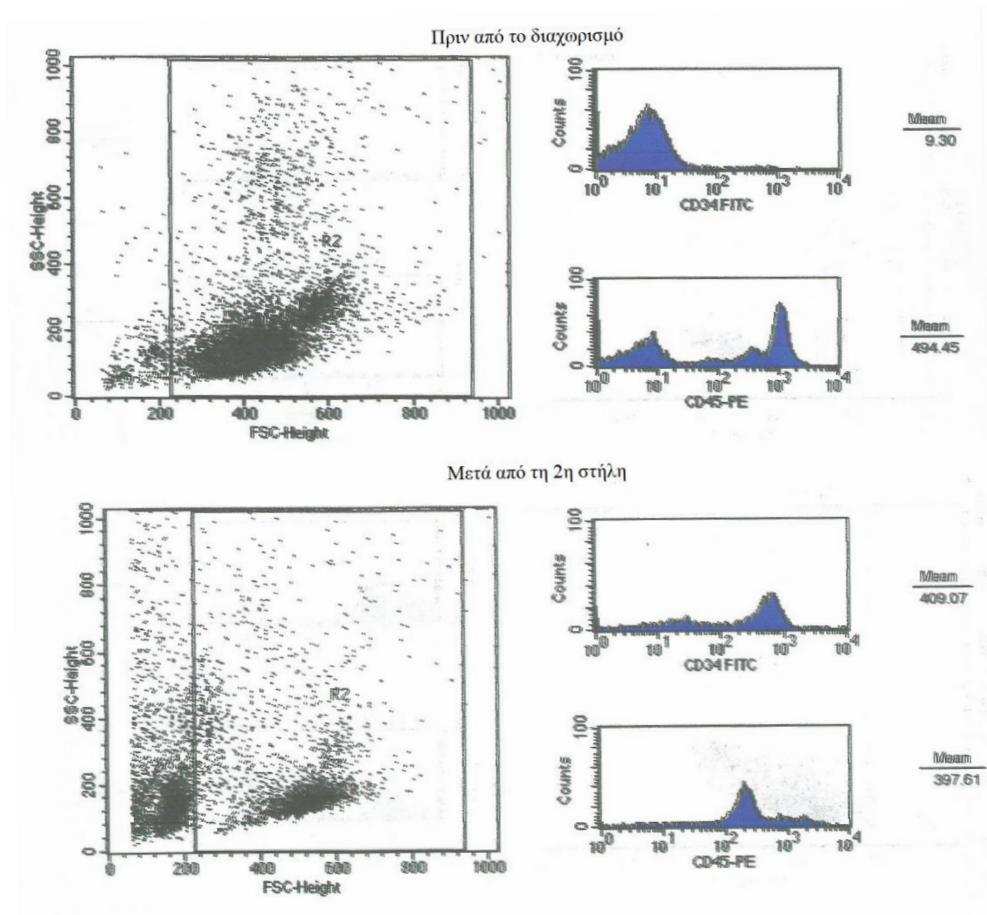
Επιπρόσθετα, το νοραραχαρ ανέστειλε τη διαφοροποίηση των CD34⁺ κυττάρων προς EPCs από το ADP κατά 70±25%, καθώς και το σχηματισμό CD34⁺/CD61⁺ συζευγμάτων κατά 54±8% μόνο μετά από 60 min (Εικόνα 6.21).

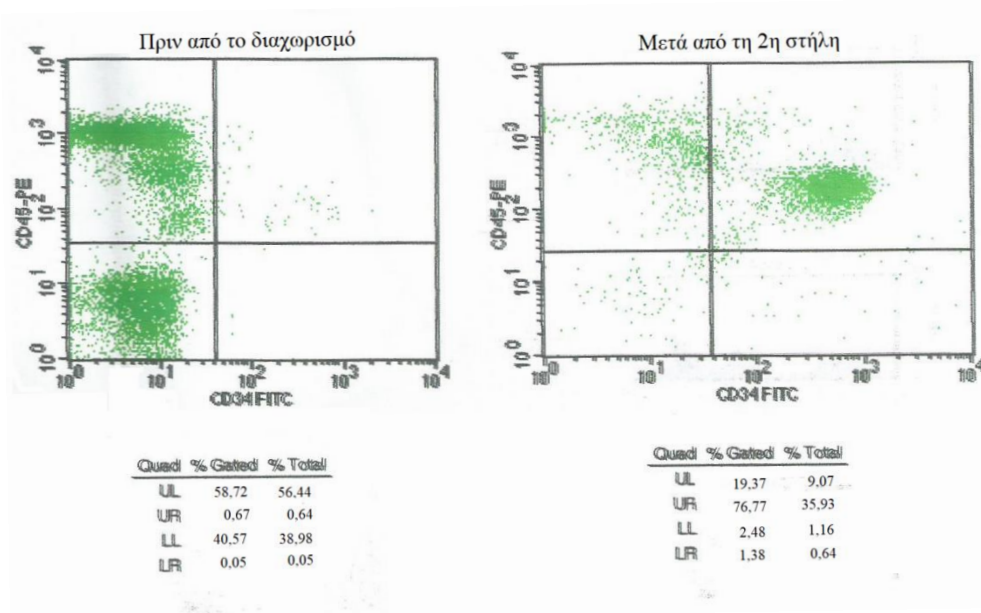


Εικόνα 6.21 Η ανασταλτική δράση του νοραραχαρ στην επαγόμενη από ADP (A) διαφοροποίηση των CD34⁺ κυττάρων προς EPCs και (B) σχηματισμό CD34⁺/CD61⁺ συζευγμάτων μετά από 60 min. Ολικό αίμα επώαστηκε με 2 μM νοραραχαρ για 60 min και ενεργοποιήθηκε με 50 μM ADP για 60 min στους 37°C. Οι τιμές εκφράζονται ως μέσος όρος±SD από 4 ανεξάρτητες παρασκευές ολικού αίματος. (A) * $p=0,049$ σε σύγκριση με το resting και ** $p=0,019$ σε σύγκριση με το activated, (B) # $p=0,05$ σε σύγκριση με το resting και ## $p=0,05$ σε σύγκριση με το activated.

6.7 Εκτίμηση της καθαρότητας των CD34⁺ κυττάρων που απομονώθηκαν από ομφάλιο λώρο ανθρώπου. Μελέτη του ρόλου της θρομβίνης και του FXa στη διαφοροποίηση των CD34⁺ κυττάρων προς OECs.

Η εκτίμηση της καθαρότητας των CD34⁺ κυττάρων γίνεται με τη χρήση του anti-CD34 αντισώματος, ενώ το anti-CD54 αντίσωμα αποτελεί δείκτη λευκοκυττάρων. Πριν το μαγνητικό διαχωρισμό, το CD45 είναι αυξημένο γεγονός που οφείλεται στα λευκοκύτταρα που εντοπίζονται στο δείγμα. Μετά την πρώτη στήλη παρατηρείται μείωση του CD45 και αύξηση του CD34, ενώ μετά τη δεύτερη στήλη, η καθαρότητα των CD34⁺ κυττάρων είναι της τάξης του 70-90%. Στην εικόνα 6.22 παρουσιάζεται το κυτταρομετρικό προφίλ των CD34⁺ κυττάρων πριν και μετά το μαγνητικό διαχωρισμό.



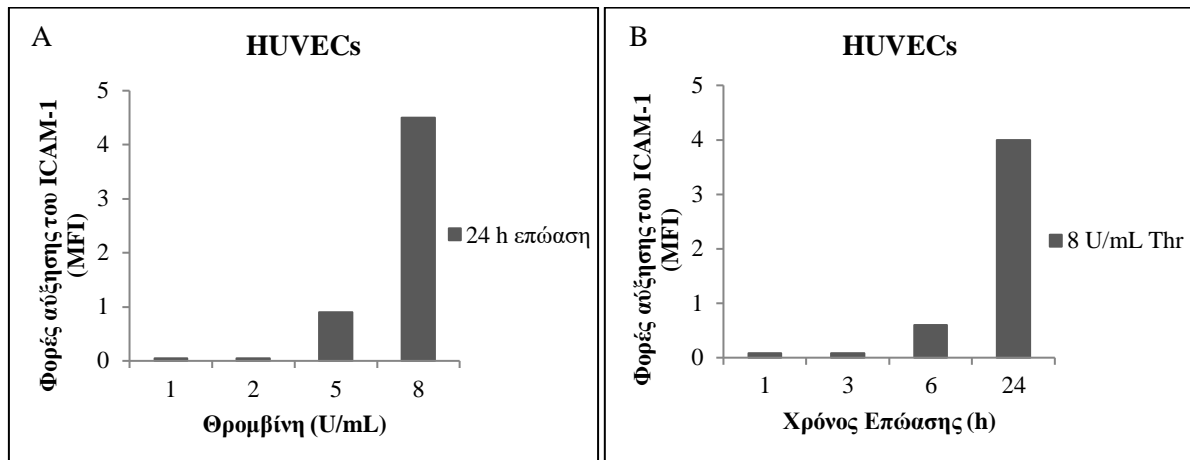


Εικόνα 6.22 Κυτταρομετρικό προφίλ των απομονωμένων από ανθρώπινο ομφάλιο λώρο $CD34^+$ κυττάρων μετά από δύο στήλες για μαγνητικό διαχωρισμό.

Η θρομβίνη και ο FXa δεν επάγουν την έκφραση του ενδοθηλιακού φαινοτύπου στα $CD34$ κύτταρα μετά από 1 h επώαση. Επιπρόσθετα, οι παράγοντες αυτοί δεν επάγουν τη διαφοροποίηση των $CD34^+$ κυττάρων προς OECs μετά από 10 ημέρες επώασης.

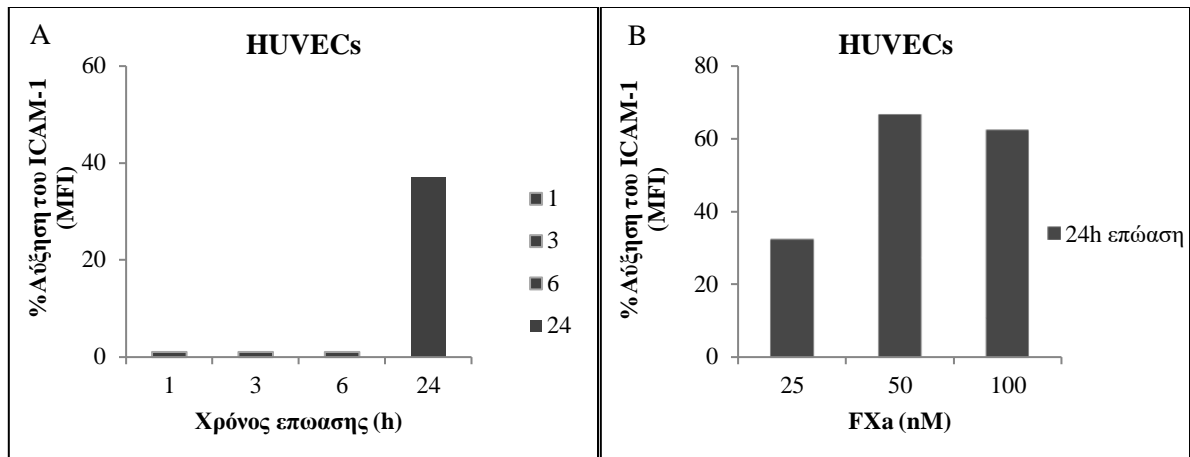
6.8 Μελέτη της δράσης της θρομβίνης και του FXa στην έκφραση του ICAM-1 από τα OECs και τα HUVECs

Αρχικά, πραγματοποιήθηκαν δοσο- και χρονο-εξαρτώμενα πειράματα για την εύρεση των βέλτιστων συνθηκών δράσης της θρομβίνης και του FXa ως προς την έκφραση του ICAM-1 από ενδοθηλιακά κύτταρα. Η θρομβίνη επάγει την έκφραση του ICAM-1 με δοσο- και χρονο-εξαρτώμενο τρόπο με τη βέλτιστη δράση να παρατηρείται στη συγκέντρωση των 8 U/mL μετά από 24 h επώασης στους 37°C (Εικόνα 6.23).



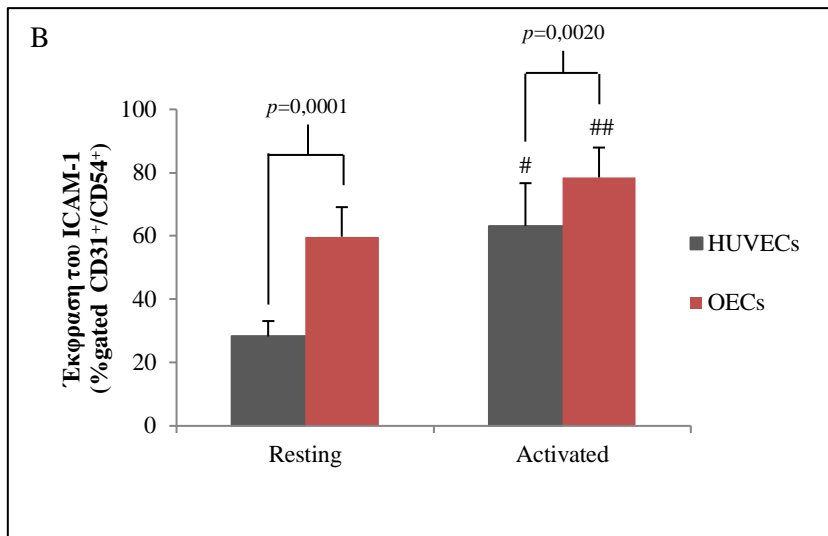
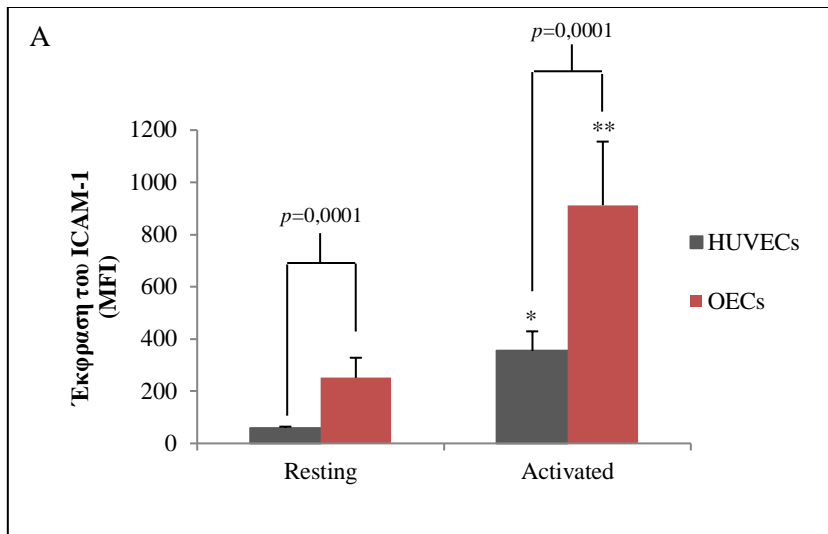
Εικόνα 6.23 Αντιπροσωπευτικά διαγράμματα της (A) δοσο- και (B) χρονο-εξαρτώμενης δράσης της θρομβίνης στην έκφραση του ICAM-1 από τα HUVECs. HUVECs επώαστηκαν (A) με 1, 2, 5 και 8 U/mL θρομβίνης για 24 h και (B) με 8 U/mL για 1, 3, 6 και 24 h.

Ομοίως, ο FXa επάγει την έκφραση του ICAM-1 με δοσο- και χρονο-εξαρτώμενο τρόπο με τη βέλτιστη δράση να παρατηρείται στη συγκέντρωση των 50 nM μετά από 24 h επώασης (Εικόνα 6.24).

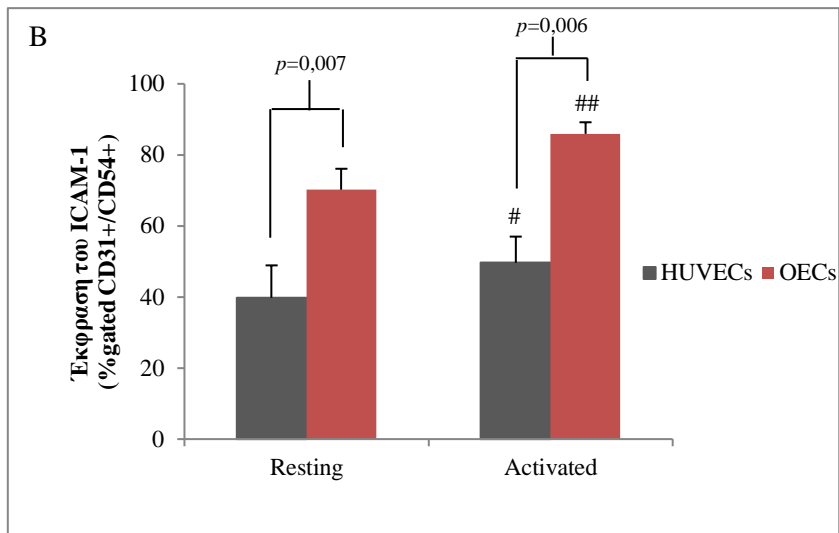
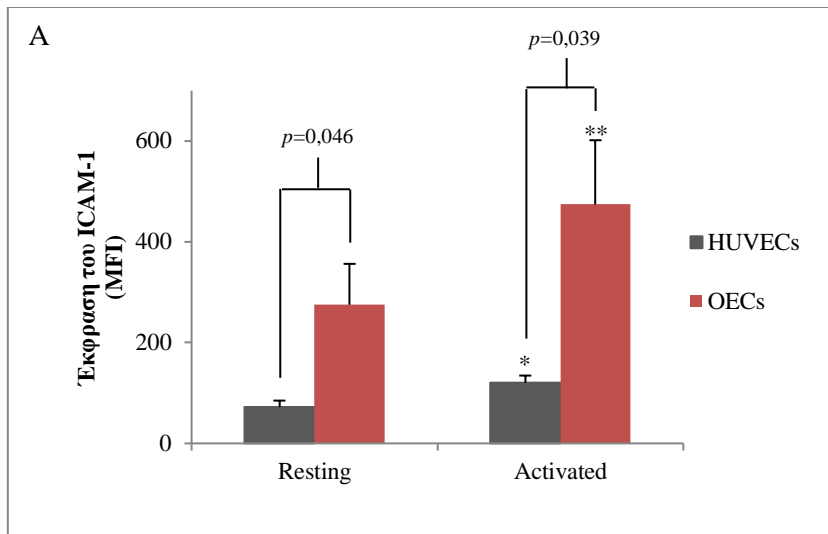


Εικόνα 6.24 Αντιπροσωπευτικά διαγράμματα της (A) χρονο- και (B) δόσο-εξαρτώμενης δράσης του FXa στην έκφραση του ICAM-1 από τα HUVECs. HUVECs επώαστηκαν (A) με 25 nM FXa για 1, 3, 6 και 24 h και (B) με 25, 50 και 100 nM FXa για 24 h.

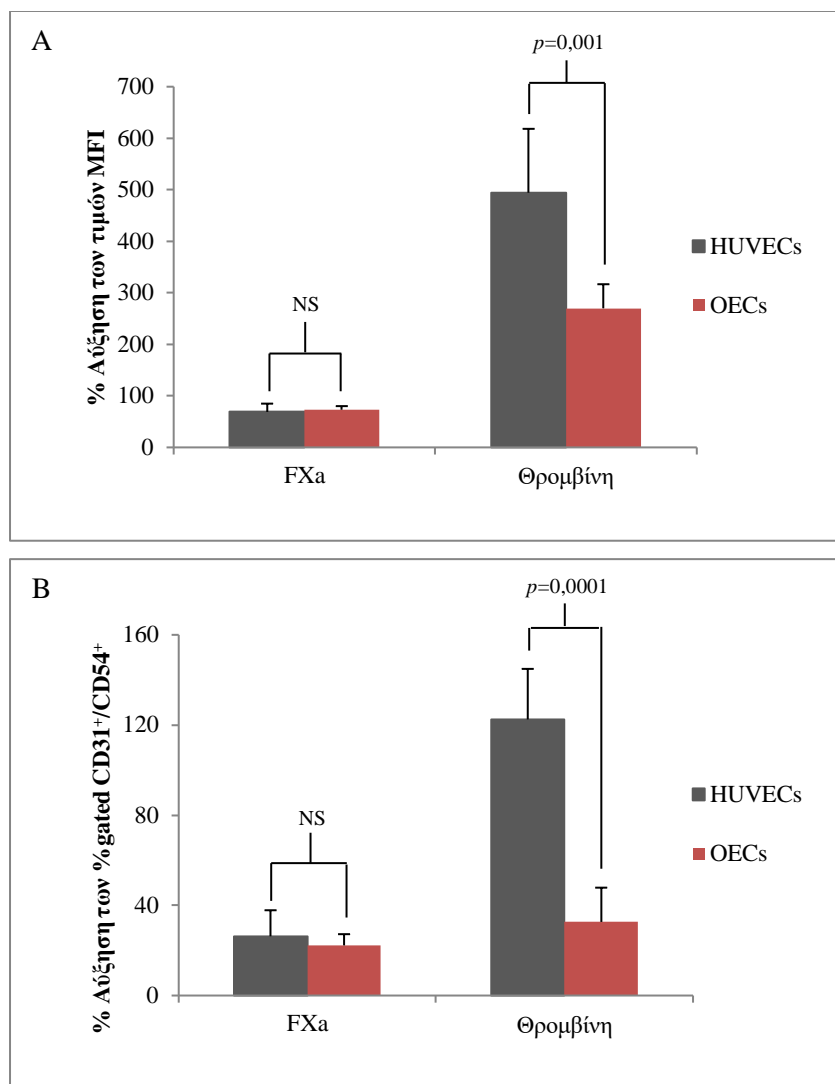
Σε άλλα πειράματα, OECs και HUVECs επώαστηκαν με 8 U/mL θρομβίνης ή 50 nM FXa για 24 h στους 37°C, με σκοπό να βρεθούν πιθανές διαφορές στην έκφραση του ICAM-1 μεταξύ των δύο κυτταρικών σειρών. Η θρομβίνη αύξησε την έκφραση του ICAM-1 στα OECs κατά 2,7 φορές ως τιμές MFI και κατά 30% ως %gated CD31⁺/CD54⁺ κύτταρα (Εικόνα 6.25). Ακόμη, ο FXa αύξησε την έκφραση του ICAM-1 στα OECs κατά 72% ως τιμές MFI και κατά 22% ως %gated CD31⁺/CD54⁺ κύτταρα (Εικόνα 6.26). Επιπρόσθετα, παρατηρήθηκε ότι η έκφραση του ICAM-1 στα μη ενεργοποιημένα OECs ήταν αυξημένη σε σχέση με εκείνη στα μη ενεργοποιημένα HUVECs. Η αύξηση του ICAM-1 στα OECs που προκάλεσε η θρομβίνη ήταν στατιστικά σημαντικά χαμηλότερη σε σχέση με τα HUVECs, ως τιμές MFI (2,69±0,47 φορές αύξησης στα OECs έναντι 4,94±1,24 στα HUVECs) και ως %CD31⁺/CD54⁺ (0,33±0,15 φορές αύξησης στα OECs έναντι 1,23±0,22 στα HUVECs) ενώ εκείνη που προκάλεσε ο FXa δεν εμφάνισε στατιστική σημαντικότητα (Εικόνα 6.27).



Εικόνα 6.25 Η επίδραση της θρομβίνης στην έκφραση του ICAM-1 ως (A) τιμές MFI και (B) %gated CD31⁺/CD54⁺ κύτταρα από τα OECs. Σύγκριση μεταξύ OECs και HUVECs. OECs και HUVECs επώστηκαν με 8 U/mL θρομβίνης για 24 h. Οι τιμές εκφράζονται ως μέσος όρος±SD από 7 ανεξάρτητα πειράματα. (A) * $p=0,0001$ και ** $p=0,0001$, σε σύγκριση με το resting, (B) # $p=0,0001$ και ## $p=0,0001$, σε σύγκριση με το resting.



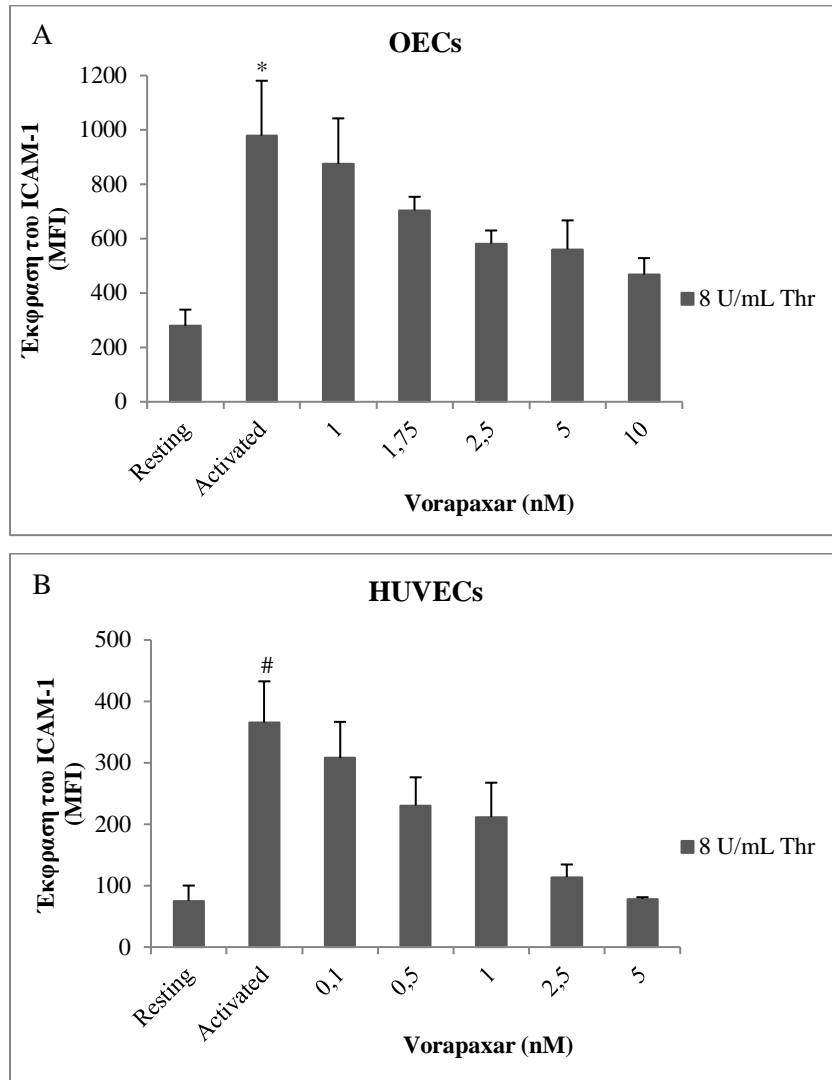
Εικόνα 6.26 Η επίδραση του FXα στην έκφραση του ICAM-1 ως (A) τιμές MFI και (B) %gated CD31⁺/CD54⁺ κύτταρα από τα OECs. Σύγκριση μεταξύ OECs και HUVECs. OECs και HUVECs επώστηκαν με 50 nM FXα για 24 h. Οι τιμές εκφράζονται ως μέσος όρος±SD από 3 ανεξάρτητα πειράματα. (A) * $p=0,009$ και ** $p=0,019$, σε σύγκριση με το resting, (B) # $p=0,018$ και ## $p=0,032$, σε σύγκριση με το resting.



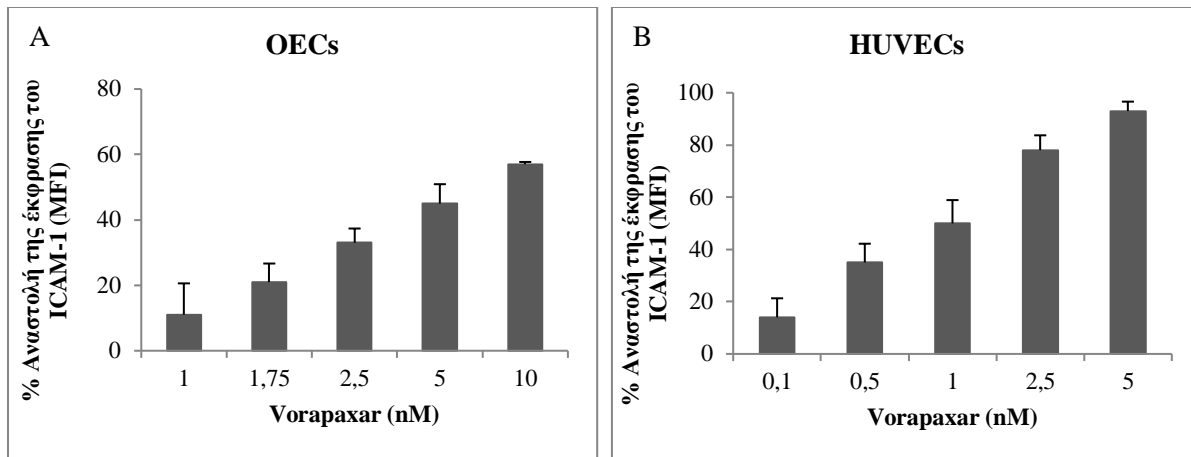
Εικόνα 6.27 Σύγκριση της επίδρασης της θρομβίνης και του FXa στην έκφραση του ICAM-1 ως (A) τιμές MFI και (B) %gated CD31⁺/CD54⁺ κύτταρα από τα OECs και τα HUVECs. Οι τιμές εκφράζονται ως μέσος όρος±SD από 7 ανεξάρτητα πειράματα για τη θρομβίνη και από 3 ανεξάρτητα πειράματα για τον FXa. Συντομογραφίες: NS, Non significant.

Στη συνέχεια, προκειμένου να διερευνηθεί ο ρόλος του PAR-1 στην αύξηση της έκφρασης του ICAM-1, OECs και HUVECs επωάστηκαν με 0,05-10 nM voraparaxar για 1 h και στη συνέχεια ενεργοποιήθηκαν είτε με 8 U/mL θρομβίνης, είτε με 50 nM FXa, για 24 h στους 37°C. Το voraparaxar ανέστειλε δόσο-εξαρτώμενα την επαγόμενη από τη θρομβίνη έκφραση του ICAM-1 ως τιμές MFI (Εικόνα 6.28) με τιμές IC₅₀ 2,9 και 1,0 nM για τα OECs και τα HUVECs, αντίστοιχα (Εικόνα 6.29). Επιπρόσθετα, το voraparaxar ανέστειλε δόσο-εξαρτώμενα την επαγόμενη από τον

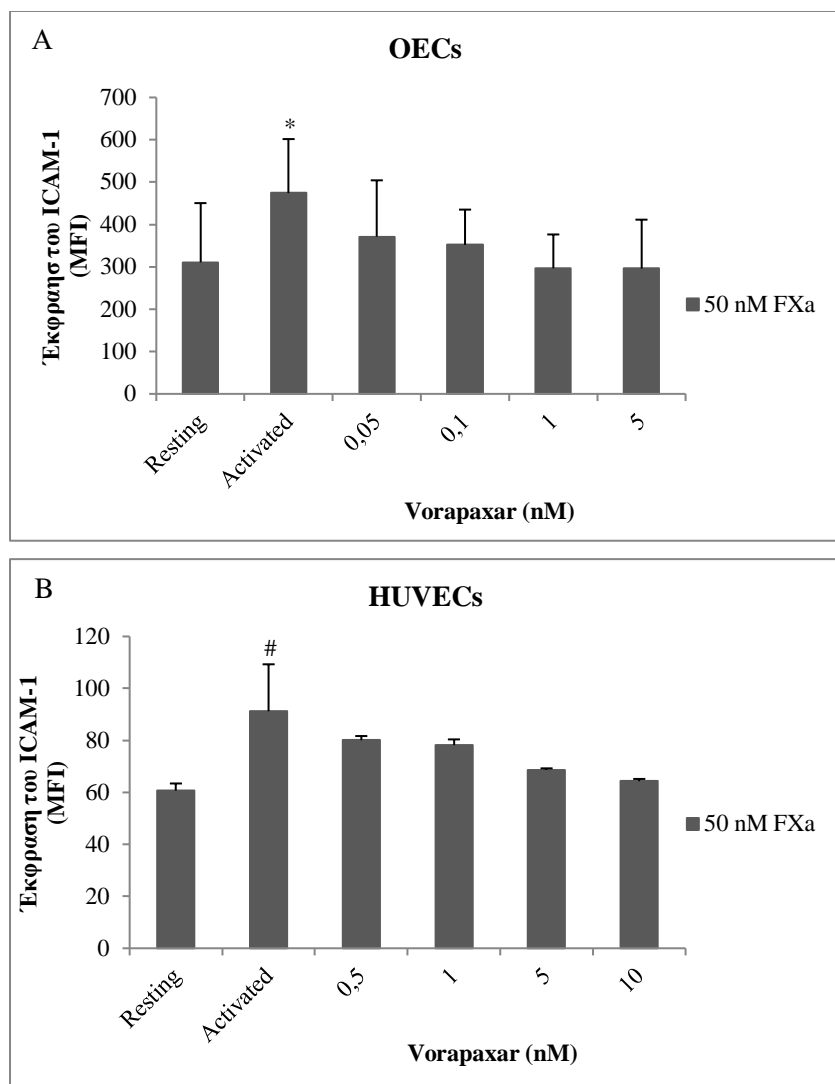
FXa έκφραση του ICAM-1 ως τιμές MFI (Εικόνα 6.30) με τιμές IC₅₀ 0,5 και 1,0 nM για τα OECs και τα HUVECs, αντίστοιχα (Εικόνα 6.31).



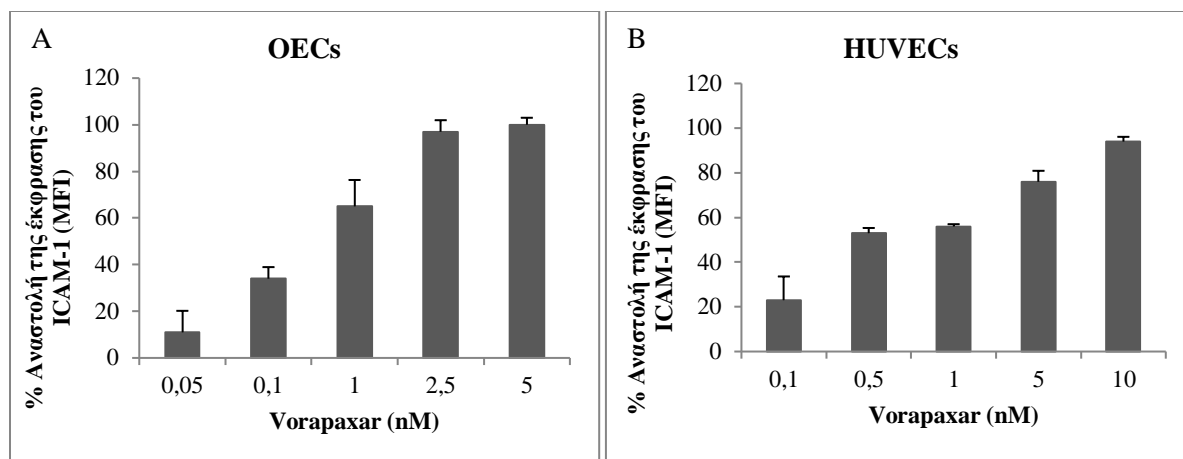
Εικόνα 6.28 Η δράση του vorapaxar στην επαγόμενη από τη θρομβίνη έκφραση του ICAM-1 από OECs και HUVECs. OECs και HUVECs επώαστηκαν με 0,1-10 nM vorapaxar για 1 h και στη συνέχεια ενεργοποιήθηκαν με 8 U/mL θρομβίνης για 24 h στους 37°C. Οι τιμές εκφράζονται ως μέσος όρος±SD από 4 ανεξάρτητα πειράματα. (A) * $p=0,0001$, σε σύγκριση με το resting, ενώ $p_1=0,063$, $p_{1,75}=0,024$, $p_{2,5}=0,046$, $p_5=0,010$ και $p_{10}=0,009$, σε σύγκριση με το activated (B) # $p=0,0001$ σε σύγκριση με το resting ενώ $p_{0,1}=0,046$, $p_{0,5}=0,001$, $p_1=0,001$, $p_{2,5}=0,065$, $p_5=0,029$ σε σύγκριση με το activated.



Εικόνα 6.29 Η ανασταλτική δράση του vorapaxar στην επαγόμενη από τη θρομβίνη έκφραση του ICAM-1 από (A) OECs και (B) HUVECs. OECs και HUVECs επώαστηκαν με 0,1-10 nM vorapaxar για 1 h και στη συνέχεια ενεργοποιήθηκαν με 8 U/mL θρομβίνης για 24 h στους 37°C. Οι τιμές εκφράζονται ως μέσος όρος±SD από 4 ανεξάρτητα πειράματα.

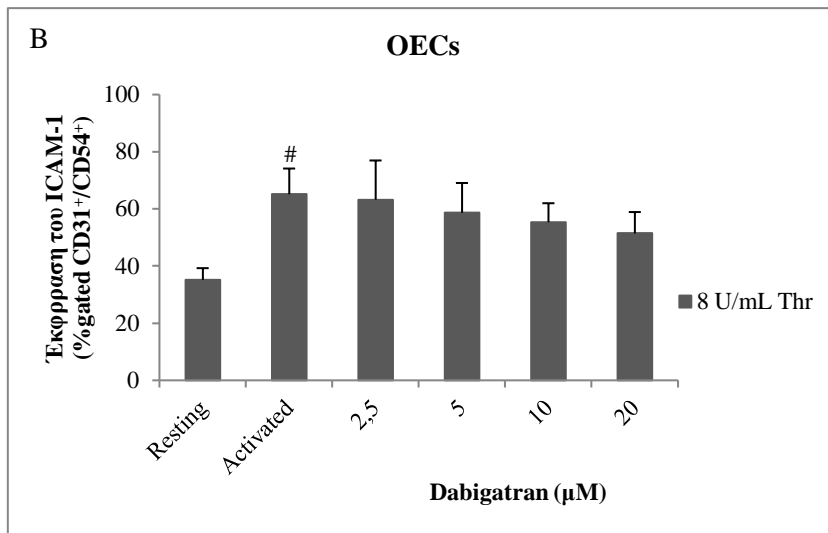
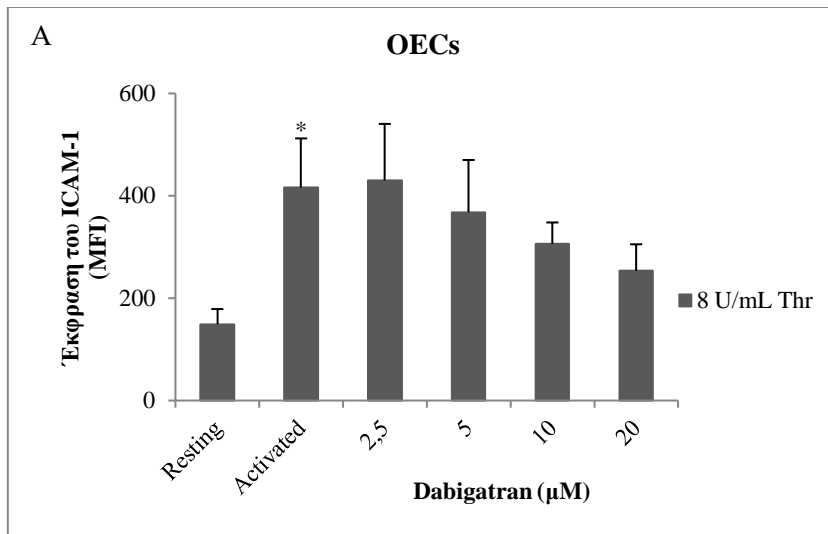


Εικόνα 6.30 Η δράση του vorapaxar στην επαγόμενη από τον FXa έκφραση του ICAM-1 από (A) OECs και (B) HUVECs. OECs και HUVECs επώστηκαν με 0,05-10 nM vorapaxar για 1 h και στη συνέχεια ενεργοποιήθηκαν με 50 nM FXa για 24 h στους 37°C. Οι τιμές εκφράζονται ως μέσος όρος±SD από 3 ανεξάρτητα πειράματα. (A) * $p=0,021$, σε σύγκριση με το resting, ενώ $p_{0,05}=0,423$, $p_{0,1}=0,048$, $p_1=0,038$ και $p_5=0,011$, σε σύγκριση με το activated (B) # $p=0,037$ σε σύγκριση με το resting ενώ $p_{0,5}=0,001$, $p_1=0,138$, $p_5=0,005$ και $p_{10}=0,002$, σε σύγκριση με το activated.

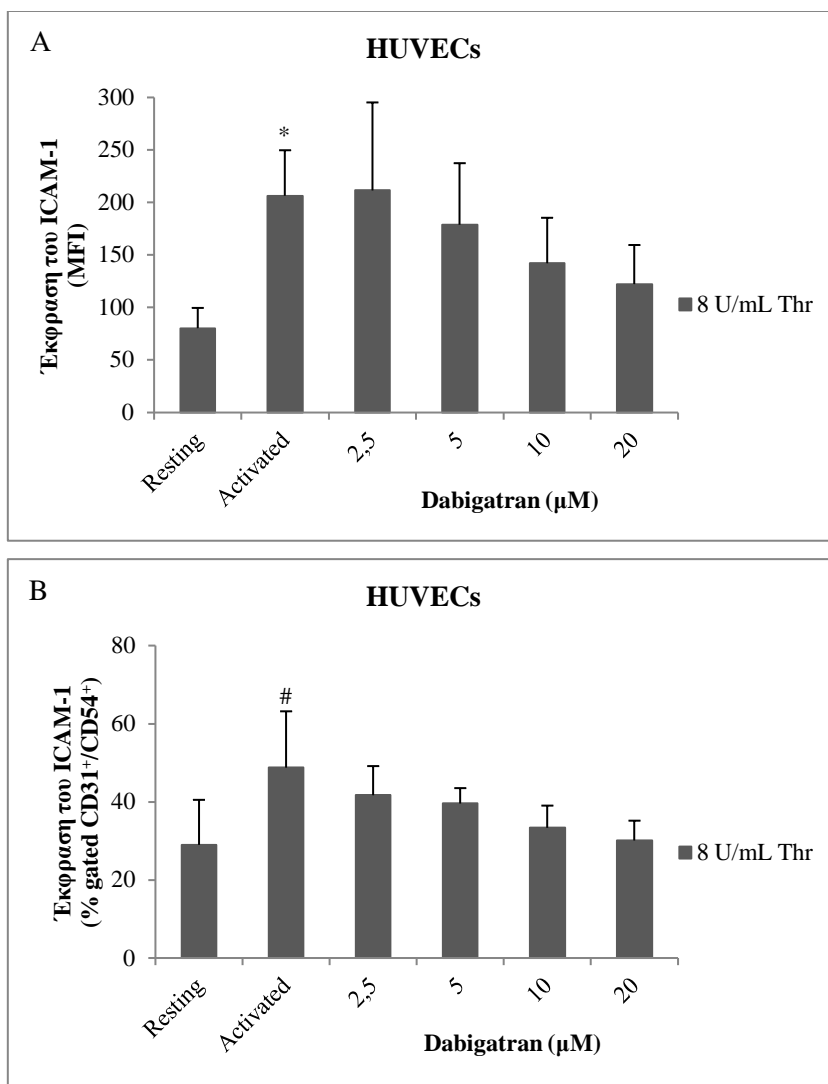


Εικόνα 6.31 Η ανασταλτική δράση του vorapaxar στην επαγόμενη από τον FXa έκφραση του ICAM-1 από (A) OECs και (B) HUVECs. OECs και HUVECs επώαστηκαν με 0,05-10 nM vorapaxar για 1 h και στη συνέχεια ενεργοποιήθηκαν με 50 nM FXA για 24 h στους 37°C. Οι τιμές εκφράζονται ως μέσος όρος±SD από 3 ανεξάρτητα πειράματα.

Στη συνέχεια, προκειμένου να διερευνηθεί ο ρόλος των άμεσων αναστολέων της θρομβίνης και του FXa στην έκφραση του ICAM-1, OECs και HUVECs επώαστηκαν με 2,5-20 μM dabigatran ή με 1-20 μM rivaroxaban για 10 min και στη συνέχεια ενεργοποιήθηκαν με 8 U/mL θρομβίνης ή 50 nM FXa για 24 h στους 37°C. Το dabigatran ανέστειλε δόσο-εξαρτωμένα την επαγόμενη από τη θρομβίνη έκφραση του ICAM-1, τόσο ως τιμές MFI όσο και ως %gated CD31⁺/CD54⁺ κύτταρα από τα OECs (Εικόνα 6.32) και από τα HUVECs (Εικόνα 6.33).

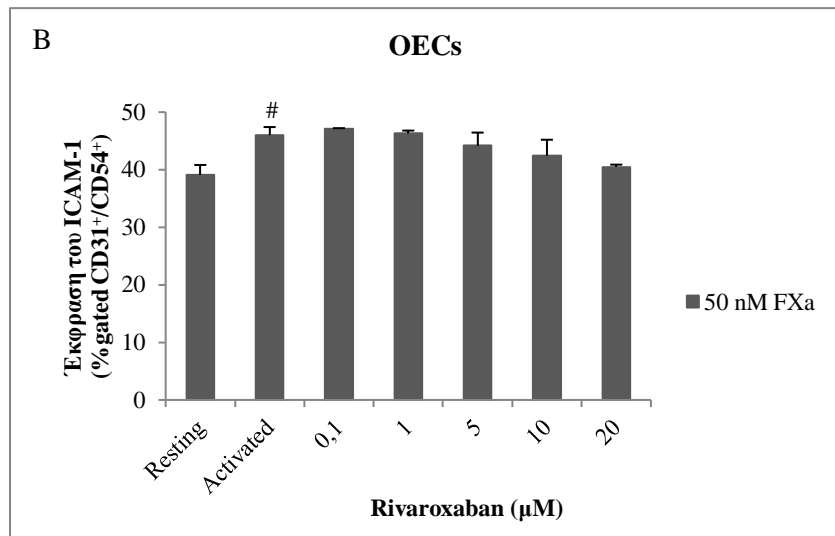
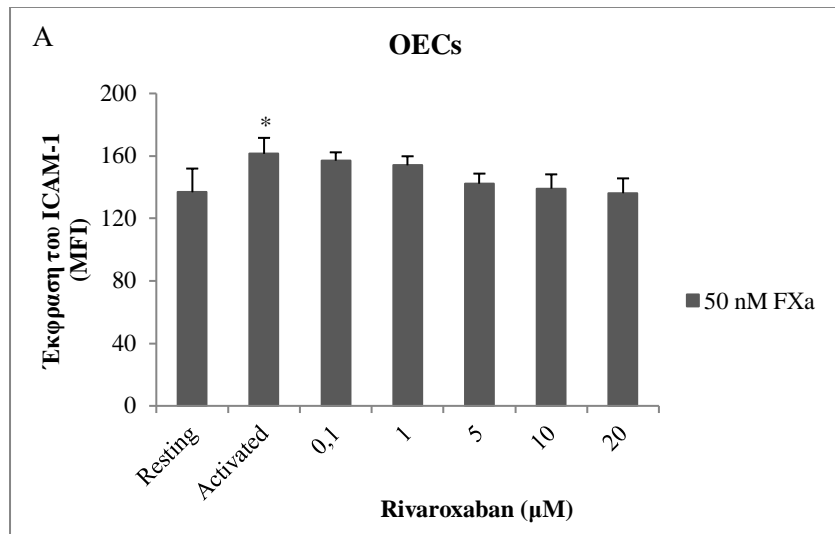


Εικόνα 6.32 Η δράση του *dabigatran* στην επαγόμενη από τη θρομβίνη έκφραση του *ICAM-1* ως (A) τιμές *MFI* και (B) %gated *CD31*⁺/*CD54*⁺ κύτταρα από τα *OECs*. *OECs* επώστηκαν με 2,5-20 μM *dabigatran* για 10 min και στη συνέχεια ενεργοποιήθηκαν με 8 U/mL θρομβίνης για 24 h στους 37°C. Οι τιμές εκφράζονται ως μέσος όρος±SD από 4 ανεξάρτητα πειράματα. (A) * $p=0,012$, σε σύγκριση με το resting, ενώ $p_{10}=0,043$ και $p_{20}=0,005$, σε σύγκριση με το activated, (B) # $p=0,012$ σε σύγκριση με το resting ενώ $p_5=0,01$, $p_{10}=0,026$ και $p_{20}=0,011$, σε σύγκριση με το activated.

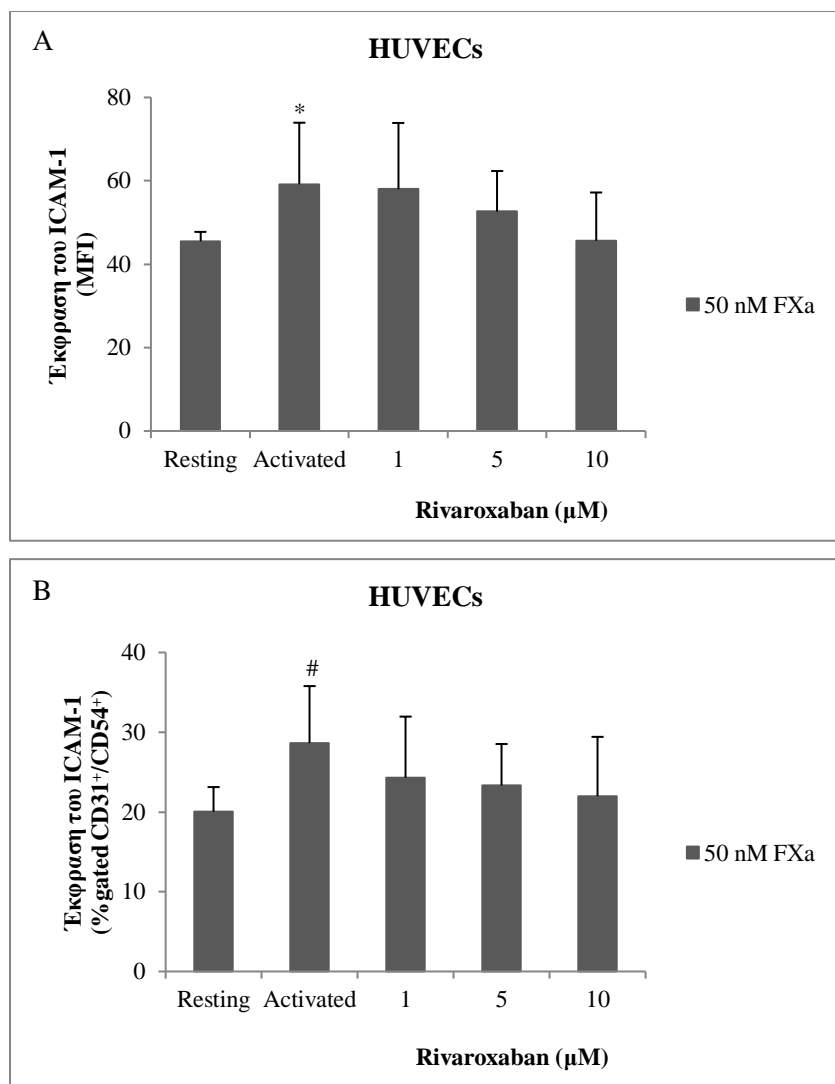


Εικόνα 6.33 Η δράση του *dabigatran* στην επαγόμενη από τη θρομβίνη έκφραση του *ICAM-1* ως (A) τιμές *MFI* και (B) %gated *CD31⁺/CD54⁺* κύτταρα από τα *HUVECs*. *HUVECs* επώαστηκαν με 2,5-20 μM *dabigatran* για 10 min και στη συνέχεια ενεργοποιήθηκαν με 8 U/mL θρομβίνης για 24 h στους 37°C. Οι τιμές εκφράζονται ως μέσος όρος±SD από 4 ανεξάρτητα πειράματα. (A) * $p=0,001$, σε σύγκριση με το resting, ενώ $p_5=0,028$, $p_{10}=0,004$ και $p_{20}=0,011$, σε σύγκριση με το activated, (B) # $p=0,0001$ σε σύγκριση με το resting ενώ $p_5=0,007$, $p_{10}=0,007$ και $p_{20}=0,032$, σε σύγκριση με το activated.

Επιπρόσθετα, το *rinaxaban* ανέστειλε δόσο-εξαρτωμένα την επαγόμενη από τον FXa έκφραση του *ICAM-1*, τόσο ως τιμές *MFI* όσο και ως %gated *CD31⁺/CD54⁺* κύτταρα από τα *OECs* (Εικόνα 6.34) και από τα *HUVECs* (Εικόνα 6.35).



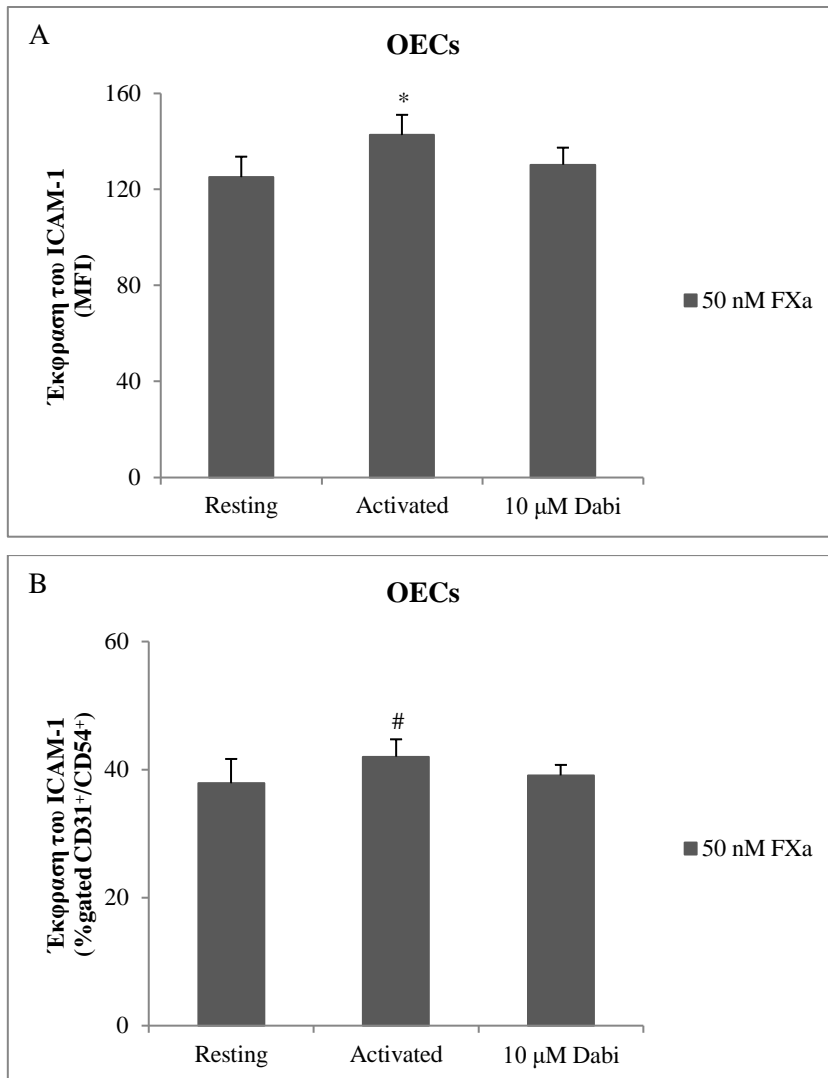
Εικόνα 6.34 Η δράση του rivaroxaban στην επαγόμενη από τον FXa έκφραση του ICAM-1 ως (A) τιμές MFI και (B) %gated CD31⁺/CD54⁺ κύτταρα από τα OECs. OECs επώαστηκαν με 0,1-20 μM rivaroxaban για 10 min και στη συνέχεια ενεργοποιήθηκαν με 50 nM FXa για 24 h στους 37°C. Οι τιμές εκφράζονται ως μέσος όρος±SD από 4 ανεξάρτητα πειράματα. (A) * $p=0,018$, σε σύγκριση με το resting, ενώ $p_5=0,017$, $p_{10}=0,013$ και $p_{20}=0,0011$, σε σύγκριση με το activated, (B) # $p=0,008$ σε σύγκριση με το resting ενώ $p_{10}=0,006$ και $p_{20}=0,014$, σε σύγκριση με το activated.



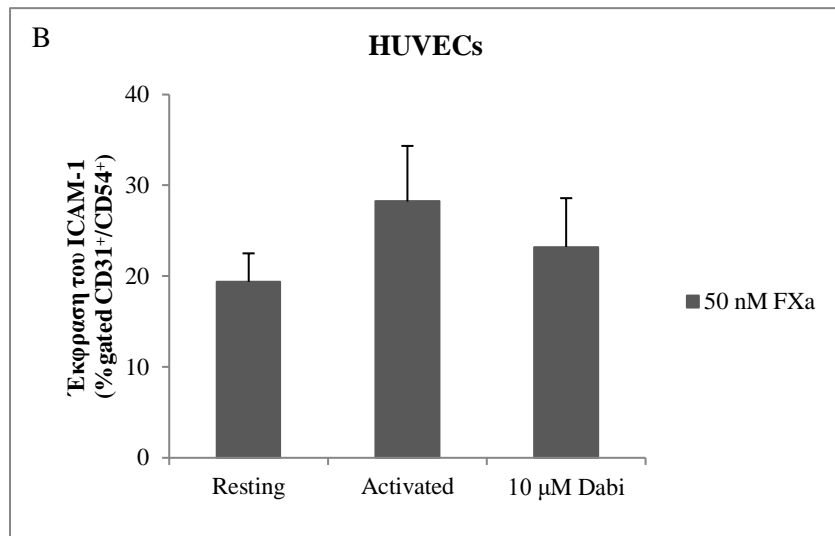
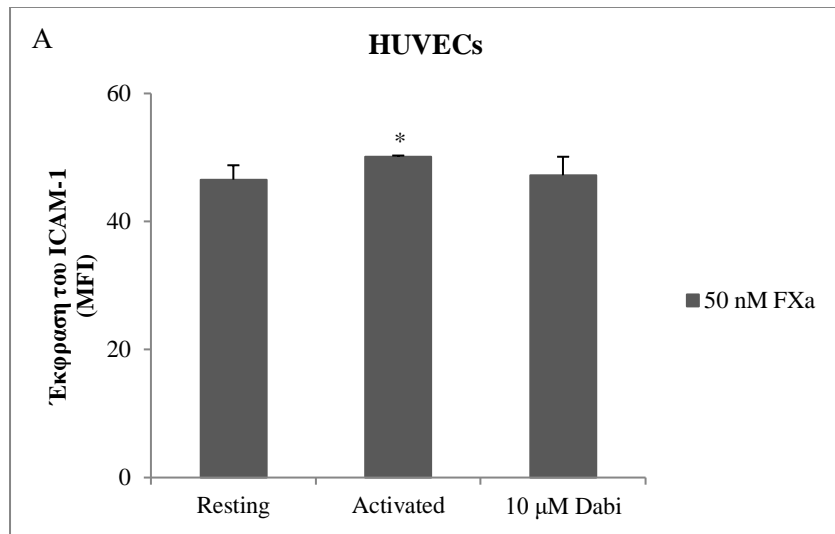
Εικόνα 6.35 Η δράση του rivaroxaban στην επαγόμενη από τον FXa έκφραση του ICAM-1 ως (A) τιμές MFI και (B) %gated CD31⁺/CD54⁺ κύτταρα από τα HUVECs. HUVECs επώαστηκαν με 1-10 μM rivaroxaban για 10 min και στη συνέχεια ενεργοποιήθηκαν με 50 nM FXa για 24 h στους 37°C. Οι τιμές εκφράζονται ως μέσος όρος±SD από 4 ανεξάρτητα πειράματα. (A) * $p=0,001$, σε σύγκριση με το resting, ενώ $p_1=0,04$, $p_5=0,002$ και $p_{10}=0,0001$, σε σύγκριση με το activated, (B) # $p=0,009$ σε σύγκριση με το resting ενώ $p_{10}=0,026$, σε σύγκριση με το activated.

Επιπρόσθετα, καθώς παρατηρήθηκε ότι το dabigatran και το rivaroxaban δεν εμφανίζουν εκλεκτικότητα ως προς την αναστολή της αιμοπεταλιακής ενεργοποίησης που επάγεται από τη θρομβίνη και τον FXa, αντίστοιχα, πραγματοποιήθηκαν πειράματα για διερεύνηση της δράσης του dabigatran και του rivaroxaban στην έκφραση του ICAM-1 από OECs και HUVECs που επάγεται από τον FXa και τη θρομβίνη, αντίστοιχα. Για το σκοπό αυτό, OECs και HUVECs

επώαστηκαν με 10 μM dabigatran για 10 min και στη συνέχεια ενεργοποιήθηκαν με 50 nM FXa για 24 h στους 37°C. Το dabigatran ανέστειλε μη στατιστικά σημαντικά την επαγόμενη από τον FXa έκφραση του ICAM-1, τόσο ως τιμές MFI όσο και ως %gated CD31⁺/CD54⁺ κύτταρα από τα OECs (Εικόνα 6.36) και από τα HUVECs (Εικόνα 6.37).

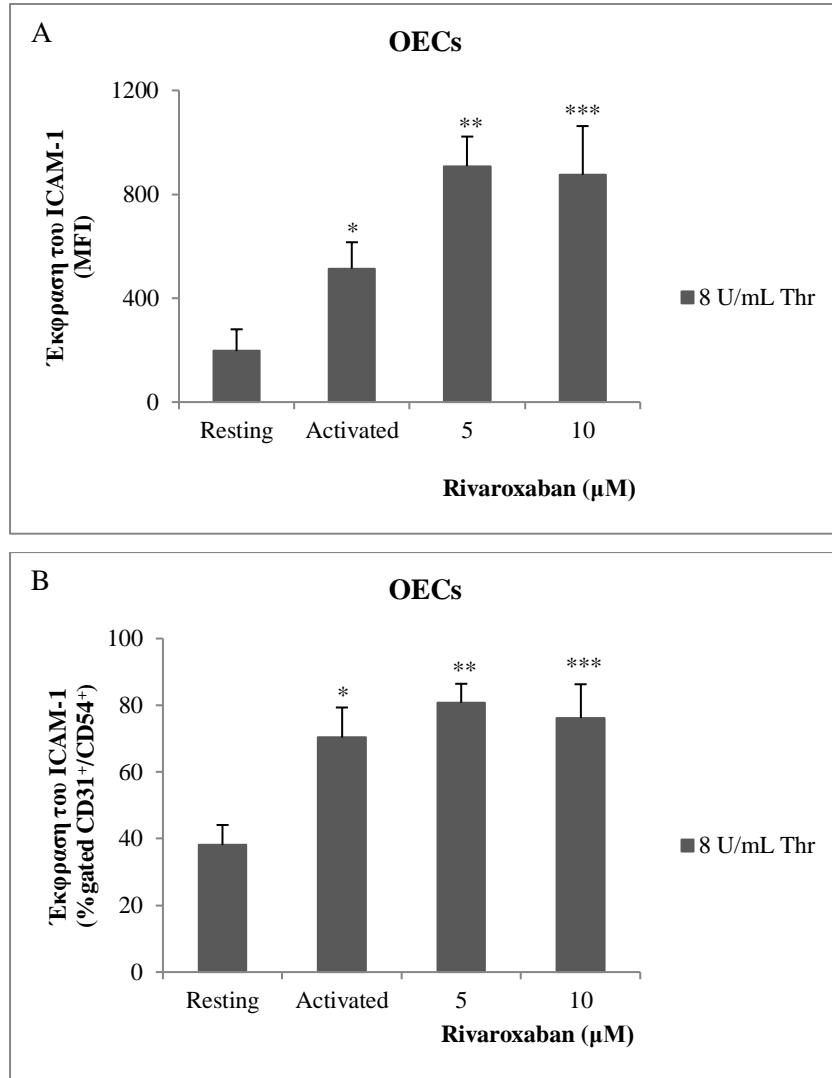


Εικόνα 6.36 Η δράση του dabigatran στην επαγόμενη από τον FXa έκφραση του ICAM-1 ως (A) τιμές MFI και (B) %gated CD31⁺/CD54⁺ κύτταρα από τα OECs. OECs επώαστηκαν με 10 μM dabigatran για 10 min και στη συνέχεια ενεργοποιήθηκαν με 50 nM FXa για 24 h στους 37°C. Οι τιμές εκφράζονται ως μέσος όρος \pm SD από 3 ανεξάρτητα πειράματα. (A) * $p=0,001$ και (B) # $p=0,048$ σε σύγκριση με το αντίστοιχο resting.

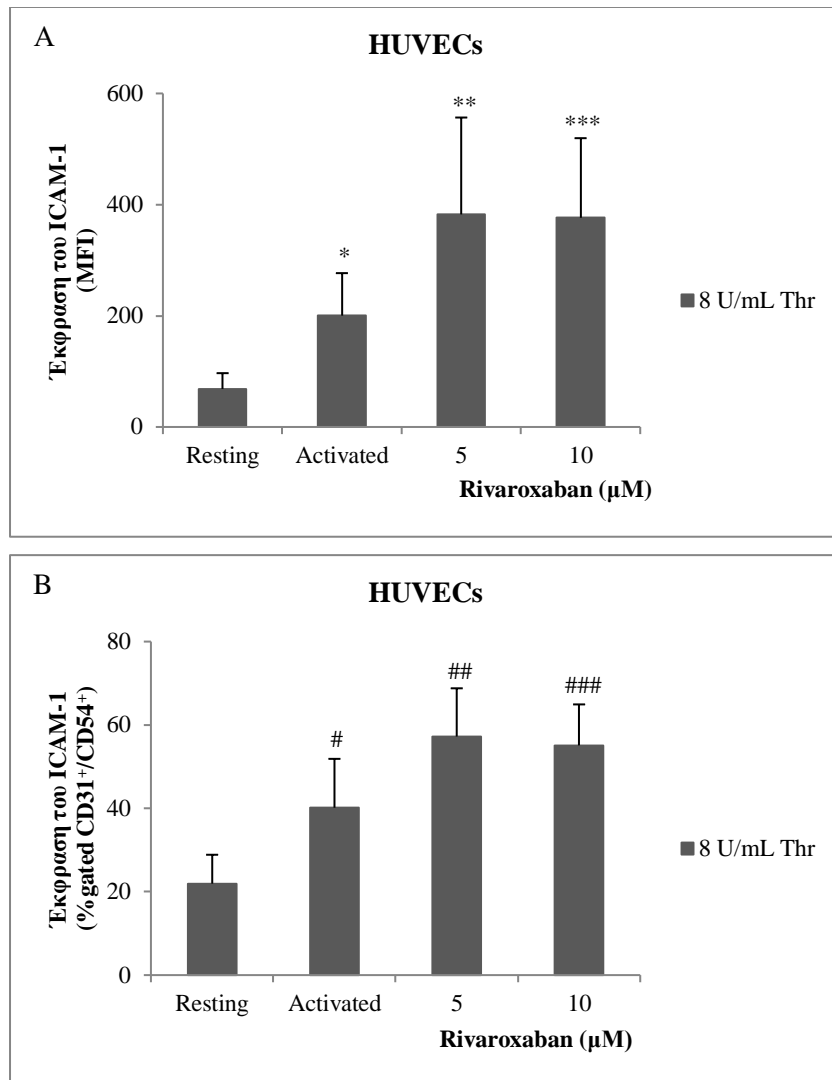


Εικόνα 6.37 Η δράση του dabigatran στην επαγόμενη από τον FXa έκφραση του ICAM-1 ως (A) τιμές MFI και (B) %gated CD31⁺/CD54⁺ κύτταρα από τα HUVECs. HUVECs επώσθησαν με 10 μ M dabigatran για 10 min και στη συνέχεια ενεργοποιήθηκαν με 50 nM FXa για 24 h στους 37°C. Οι τιμές εκφράζονται ως μέσος όρος \pm SD από 3 ανεξάρτητα πειράματα. (A) * $p=0,042$ σε σύγκριση με το resting.

Επιπρόσθετα, OECs και HUVECs επώαστηκαν με 5 ή 10 μM rivaroxaban για 10 min και στη συνέχεια ενεργοποιήθηκαν με 8 U/mL θρομβίνης για 24 h στους 37°C. Το rivaroxaban οδήγησε σε αύξηση της έκφραση του ICAM-1, τόσο ως τιμές MFI όσο και ως %gated CD31⁺/CD54⁺ κύτταρα από τα OECs (Εικόνα 6.38) και από τα HUVECs (Εικόνα 6.39).

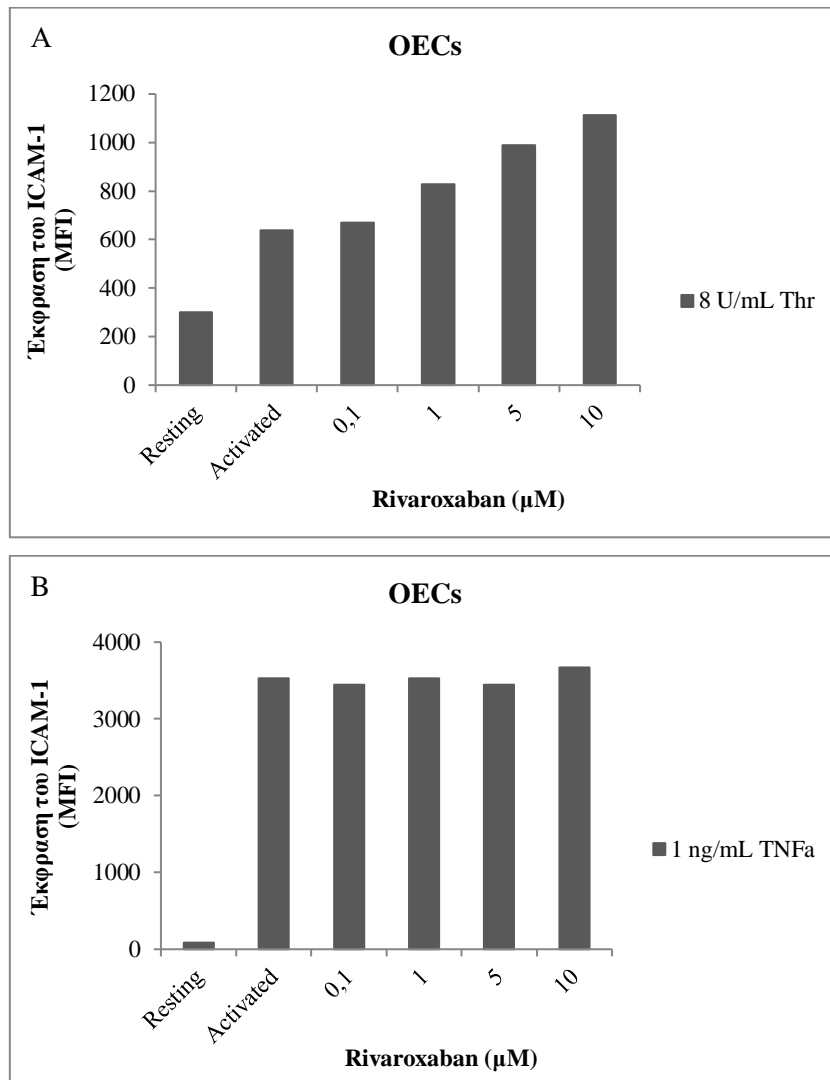


Εικόνα 6.38 Η δράση του rivaroxaban στην επαγόμενη από τη θρομβίνη έκφραση του ICAM-1 ως (A) τιμές MFI και (B) %gated CD31⁺/CD54⁺ κύτταρα από τα OECs. OECs επώαστηκαν με 5 και 10 μM rivaroxaban για 10 min και στη συνέχεια ενεργοποιήθηκαν με 8 U/mL θρομβίνης για 24 h στους 37°C. Οι τιμές εκφράζονται ως μέσος όρος \pm SD από 3 ανεξάρτητα πειράματα. (A) * $p=0,003$, σε σύγκριση με το resting και ** $p=0,05$ και *** $p=0,004$ σε σύγκριση με το activated, (B) # $p=0,001$ σε σύγκριση με το resting και ## $p=0,032$ και ### $p=0,001$ σε σύγκριση με το activated.

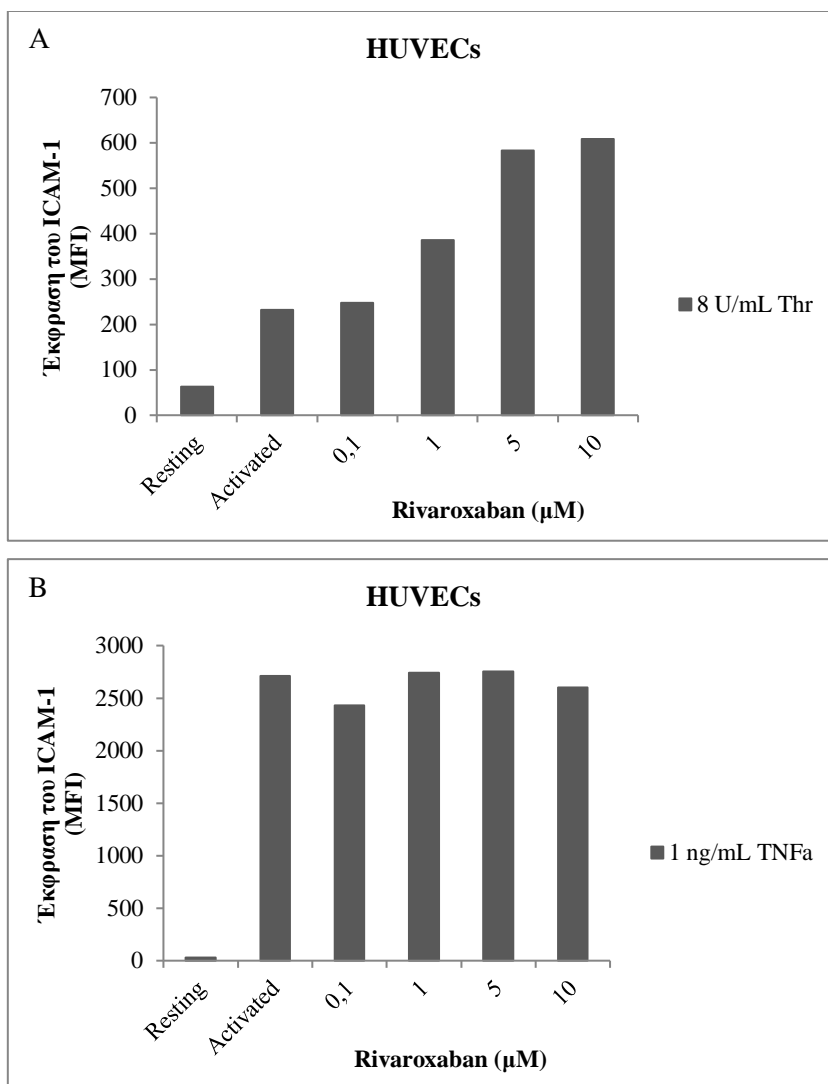


Εικόνα 6.39 Η δράση του rivaroxaban στην επαγόμενη από τη θρομβίνη έκφραση του ICAM-1 ως (A) τιμές MFI και (B) %gated CD31⁺/CD54⁺ κύτταρα από τα HUVECs. HUVECs επώαστηκαν με 5 και 10 μM rivaroxaban για 10 min και στη συνέχεια ενεργοποιήθηκαν με 8 U/mL θρομβίνης για 24 h στους 37°C. Οι τιμές εκφράζονται ως μέσος όρος±SD από 3 ανεξάρτητα πειράματα. (A) * $p=0,005$, σε σύγκριση με το resting και ** $p=0,035$ και *** $p=0,036$ σε σύγκριση με το activated, (B) # $p=0,005$ σε σύγκριση με το resting και ## $p=0,01$ και ### $p=0,013$ σε σύγκριση με το activated.

Στη συνέχεια, OECs και HUVECs επωάστηκαν με 0,1-10 μM rivaroxaban για 10 min και ενεργοποιήθηκαν με 8 U/mL θρομβίνης ή 1 ng/mL TNF α για 24 h, με σκοπό να διερευνηθεί εάν η ενισχυτική δράση του rivaroxaban στην επαγόμενη από τη θρομβίνη έκφραση του ICAM-1 είναι δοδο-εξαρτώμενη και εάν αντίστοιχη δράση παρατηρείται μετά από ενεργοποίηση με τον TNF α . Το rivaroxaban ενίσχυσε δοδο-εξαρτώμενα την επαγόμενη από τη θρομβίνη έκφραση του ICAM-1 ως τιμές MFI από τα OECs και τα HUVECs, ενώ δεν προκάλεσε κάποια δράση στην επαγόμενη από τον TNF α έκφραση του ICAM-1 (Εικόνες 6.40 και 6.41).



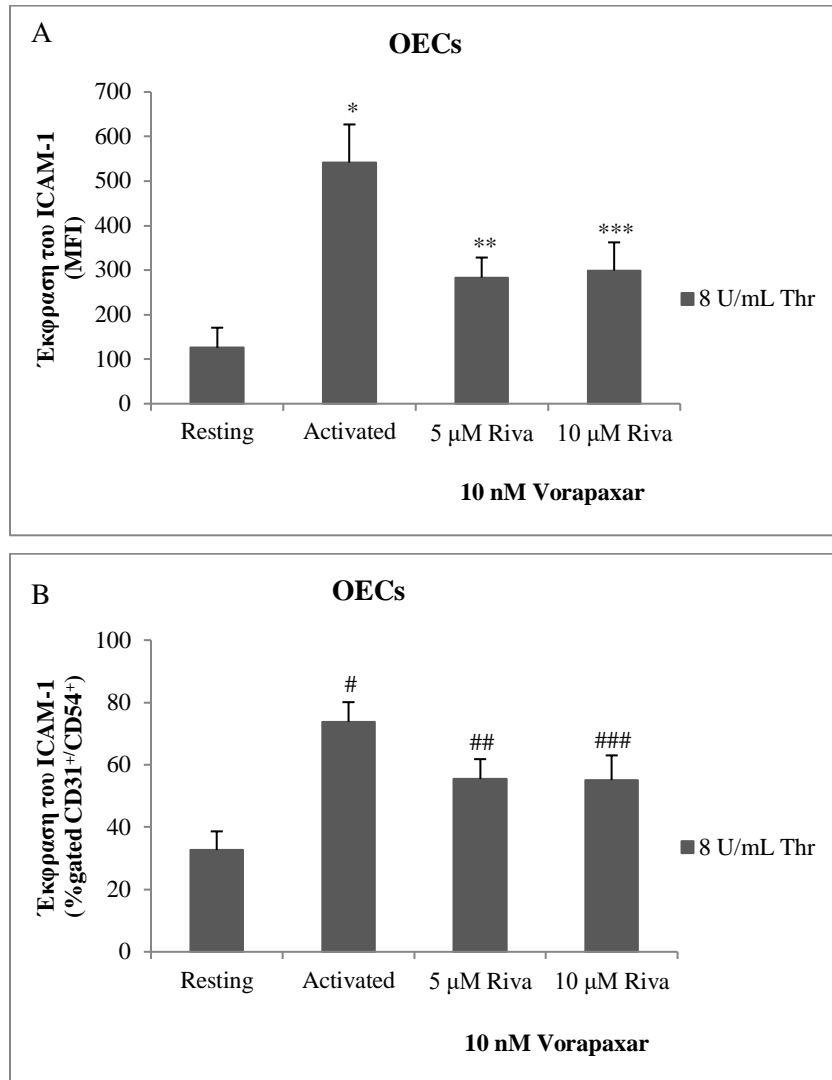
Εικόνα 6.40 Αντιπροσωπευτικά διαγράμματα της δοδο-εξαρτώμενης δράσης του rivaroxaban στην επαγόμενη από (A) τη θρομβίνη και (B) τον TNF α έκφραση του ICAM-1 ως τιμές MFI από τα OECs. OECs επωάστηκαν με 0,1-10 μM rivaroxaban για 10 min και στη συνέχεια ενεργοποιήθηκαν με 8 U/mL θρομβίνης ή 1 ng/mL TNF α για 24 h στους 37°C.



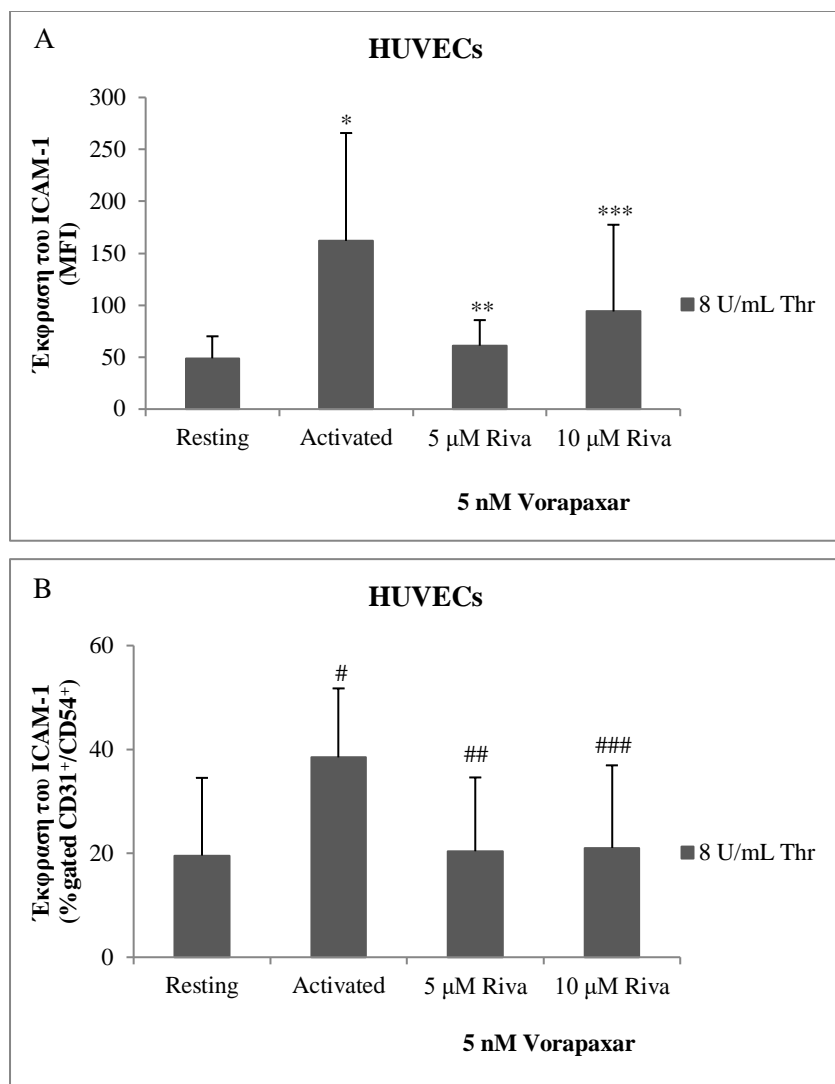
Εικόνα 6.41 Αντιπροσωπευτικά διαγράμματα της δόσο-εξαρτώμενης δράσης του rivaroxaban στην επαγόμενη από (A) τη θρομβίνη και (B) τον TNFα έκφραση του ICAM-1 ως τιμές MFI από τα HUVECs. HUVECs επώαστηκαν με 0,1-10 μM rivaroxaban για 10 min και στη συνέχεια ενεργοποιήθηκαν με 8 U/mL θρομβίνης ή 1 ng/mL TNFα για 24 h στους 37°C.

Εν συνεχεία, με σκοπό να διερευνηθεί εάν ο PAR-1 διαδραματίζει ρόλο στο μηχανισμό διαμέσου του οποίου το rivaroxaban ενισχύει τη δράση της θρομβίνης ως προς την έκφραση του ICAM-1 από τα OECs και τα HUVECs, τα κύτταρα αυτά επώαστηκαν με τη συγκέντρωση του voraraxar που προκαλεί τη μέγιστη αναστολή της έκφρασης του ICAM-1 για 1 h (10 και 5 nM, αντίστοιχα), στη συνέχεια με 5 ή 10 μM rivaroxaban για 10 min και τέλος ενεργοποιήθηκαν με 8 U/mL θρομβίνης ή 1 ng/mL TNFα για 24 h. Παρουσία του voraraxar, παρατηρήθηκε αναστολή

της ενίσχυσης από το rivaroxaban της επαγόμενης από τη θρομβίνη έκφρασης του ICAM-1 ως τιμές MFI και %gated CD31⁺/CD54⁺ από τα OECs (Εικόνα 6.42) και τα HUVECs (Εικόνα 6.43).



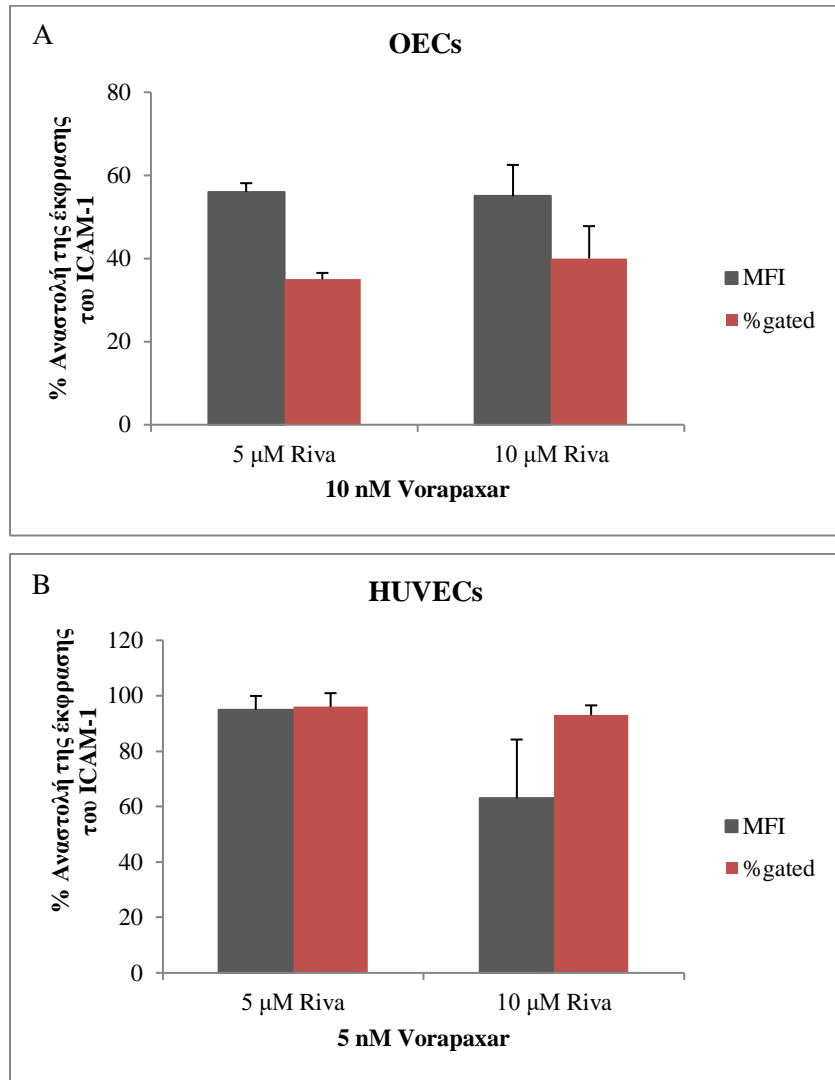
Εικόνα 6.42 Ο ρόλος του PAR-1 στην ενίσχυση της επαγόμενης από τη θρομβίνη έκφρασης του ICAM-1 από το rivaroxaban ως (A) τιμές MFI και (B) %gated CD31⁺/CD54⁺ κύτταρα από τα OECs. OECs επώαστηκαν με 10 nM vorapaxar για 1 h, στη συνέχεια με 5 ή 10 μM rivaroxaban για 10 min και τέλος ενεργοποιήθηκαν με 8 U/mL θρομβίνης για 24 h στους 37°C. Οι τιμές εκφράζονται ως μέσος όρος±SD από 3 ανεξάρτητα πειράματα. (A) * $p=0,001$, σε σύγκριση με το resting και ** $p=0,003$ και *** $p=0,001$ σε σύγκριση με το activated, (B) # $p=0,036$ σε σύγκριση με το resting και ## $p=0,018$ και ### $p=0,05$ σε σύγκριση με το activated.



Εικόνα 6.43 Ο ρόλος του PAR-1 στην ενίσχυση της επαγόμενης από τη θρομβίνη έκφρασης του ICAM-1 από το rivaroxaban, ως (A) τιμές MFI και (B) %gated CD31⁺/CD54⁺ κύτταρα από τα HUVECs. HUVECs επώαστηκαν με 5 nM vorapaxar για 1 h, στη συνέχεια με 5 ή 10 μM rivaroxaban για 10 min και τέλος ενεργοποιήθηκαν με 8 U/mL θρομβίνης για 24 h στους 37°C. Οι τιμές εκφράζονται ως μέσος όρος±SD από 3 ανεξάρτητα πειράματα. (A) * $p=0,044$, σε σύγκριση με το resting και ** $p=0,05$ και *** $p=0,004$ σε σύγκριση με το activated, (B) # $p=0,001$ σε σύγκριση με το resting και ## $p=0,002$ και ### $p=0,001$ σε σύγκριση με το activated.

Συγκεκριμένα, το vorapaxar ανέστειλε κατά 56±2% και κατά 55±8% ως τιμές MFI, και κατά 35±2% και κατά 40±8% ως %gated CD31⁺/CD54⁺ κύτταρα την επαγόμενη από τη θρομβίνη έκφραση του ICAM-1, παρουσία 5 και 10 μM rivaroxaban αντίστοιχα, από τα OECs. Επιπρόσθετα, το vorapaxar ανέστειλε κατά 95±5% και κατά 63±21% ως τιμές MFI, και κατά

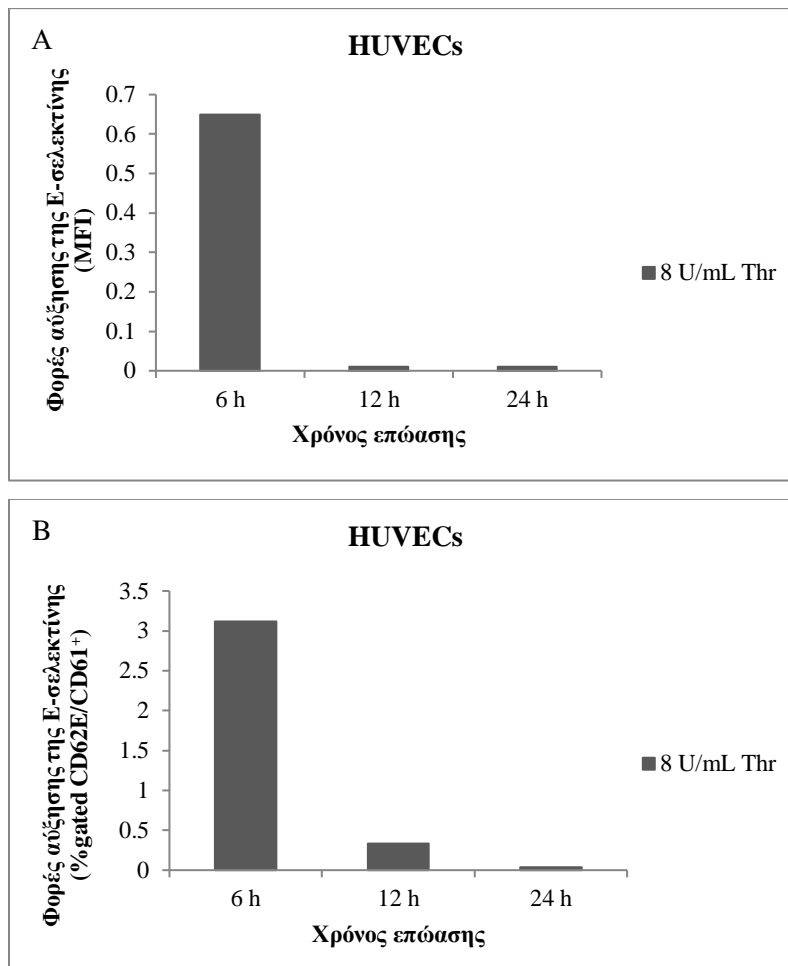
96±5% και κατά 93±4% ως %gated CD31⁺/CD54⁺ κύτταρα την επαγόμενη από τη θρομβίνη έκφραση του ICAM-1, παρουσία 5 και 10 μM ριναροχάβαν αντίστοιχα, από τα HUVECs (Εικόνα 6.44).



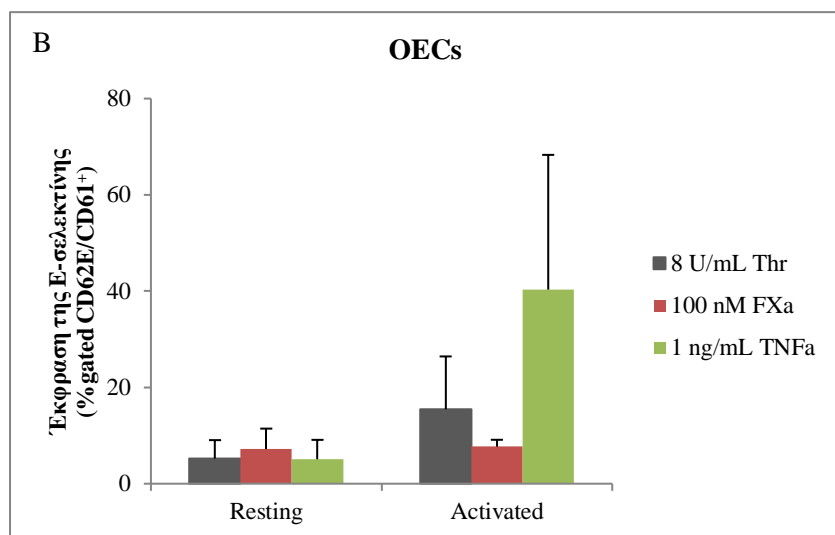
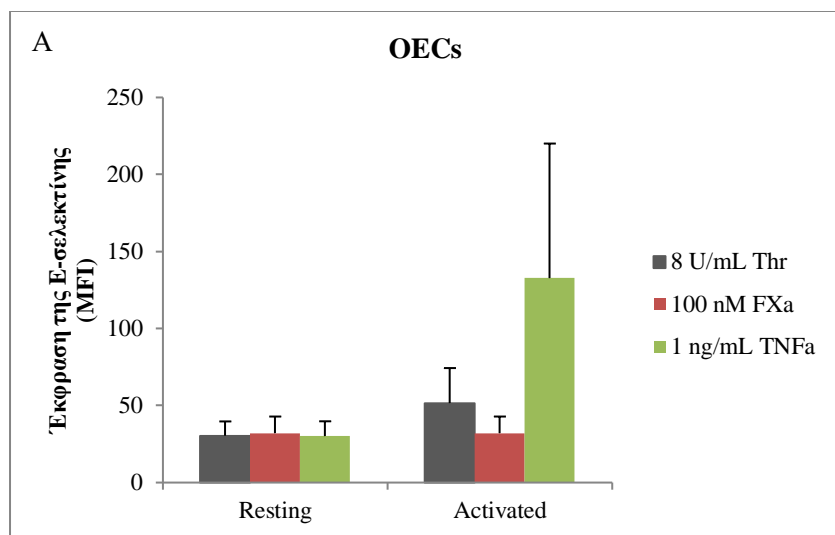
Εικόνα 6.44 Η ανασταλτική δράση του vorapaxar στην ενίσχυση της επαγόμενης από τη θρομβίνη έκφρασης του ICAM-1 από το ριναροχάβαν από (A) τα OECs και (B) τα HUVECs. (A) OECs επωάστηκαν με 10 nM vorapaxar για 1 h, στη συνέχεια με 5 ή 10 μM ριναροχάβαν για 10 min και τέλος ενεργοποιήθηκαν με 8 U/mL θρομβίνης για 24 h στους 37°C. (B) HUVECs επωάστηκαν με 5 nM vorapaxar για 1 h, στη συνέχεια με 5 ή 10 μM ριναροχάβαν για 10 min και τέλος ενεργοποιήθηκαν με 8 U/mL θρομβίνης για 24 h στους 37°C. Οι τιμές εκφράζονται ως μέσος όρος±SD από 3 ανεξάρτητα πειράματα.

6.9 Μελέτη της δράσης της θρομβίνης και του FXa στην έκφραση της E-σελεκτίνης από τα OECs και τα HUVECs

Αρχικά, πραγματοποιήθηκαν χρονο-εξαρτώμενα πειράματα για την εύρεση των βέλτιστων συνθηκών δράσης της θρομβίνης και του FXa ως προς την έκφραση της E-σελεκτίνης από ενδοθηλιακά κύτταρα. HUVECs επώαστηκαν με 8 U/mL θρομβίνης ή 50 nM FXa για 6, 12 και 24 h. Βρέθηκε ότι η θρομβίνη οδηγεί στη μέγιστη έκφραση της E-σελεκτίνης στις 6 h (Εικόνα 6.45), ενώ ο FXa δεν προκάλεσε αύξηση της έκφρασης της E-σελεκτίνης. Επιπρόσθετα, OECs και HUVECs επώαστηκαν με 8 U/mL θρομβίνης ή 100 nM FXa για 6 h και βρέθηκε ότι μόνο η θρομβίνη επάγει την έκφραση της E-σελεκτίνης και από τους δύο τύπους κυττάρων (Εικόνα 6.46). Ο TNFα χρησιμοποιήθηκε ως θετικός μάρτυρας.

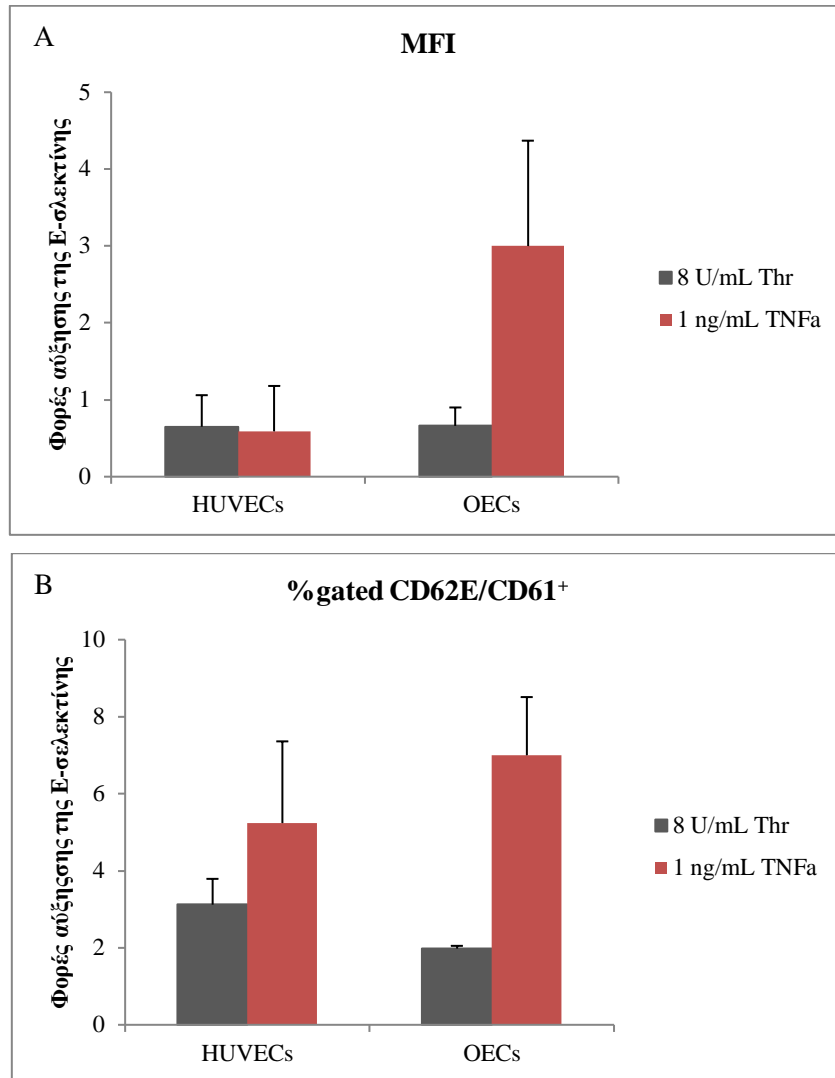


Εικόνα 6.45 Αντιπροσωπευτικά διαγράμματα της χρονο-εξαρτώμενης δράσης της θρομβίνης στην έκφραση της E-σελεκτίνης ως (A) τιμές MFI και ως (B) %gated CD62E/CD61⁺ κύτταρα από τα HUVECs. HUVECs επώαστηκαν με 8 U/mL θρομβίνης, για 6, 12 και 24 h στους 37°C.



Εικόνα 6.46 Η επίδραση της θρομβίνης και του FXa στην έκφραση της E-σελεκτίνης ως (A) τιμές MFI και ως (B) %gated CD62E/CD61⁺ κύτταρα από τα OECs. OECs επώαστηκαν με 8 U/mL θρομβίνης ή 100 nM FXa για 6 h στους 37°C. Ο TNFα χρησιμοποιήθηκε ως θετικός μάρτυρας σε συγκέντρωση 1 ng/mL. Οι τιμές εκφράζονται ως μέσος όρος±SD από 3 ανεξάρτητα πειράματα.

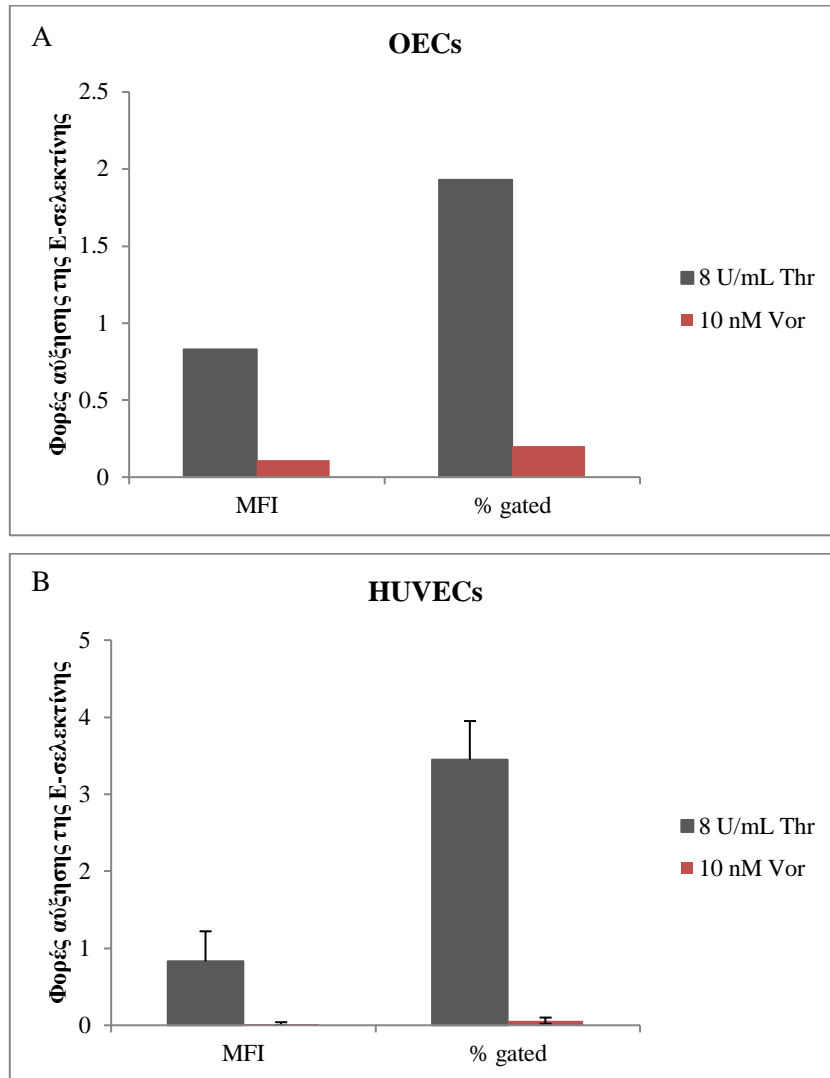
Συγκεκριμένα, η θρομβίνη αύξησε την έκφραση της E-σελεκτίνης κατά $0,66\pm 0,24$ φορές στα OECs και κατά $0,65\pm 0,41$ φορές στα HUVECs ως τιμές MFI και κατά $1,98\pm 0,07$ φορές στα OECs και κατά $3,12\pm 0,67$ φορές στα HUVECs ως %gated CD62E/CD61⁺ κύτταρα (Εικόνα 6.47).



Εικόνα 6.47 Η επίδραση της θρομβίνης στην έκφραση της E-σελεκτίνης ως (A) τιμές MFI και ως (B) %gated CD62E/CD61⁺ κύτταρα. Σύγκριση μεταξύ των OECs και των HUVECs. OECs και HUVECs επώαστηκαν με 8 U/mL θρομβίνης για 6 h στους 37°C. Ο TNFα χρησιμοποιήθηκε ως θετικός μάρτυρας σε συγκέντρωση 1 ng/mL. Οι τιμές εκφράζονται ως μέσος όρος±SD από 3 ανεξάρτητα πειράματα.

Τέλος, με σκοπό να διερευνηθεί εάν η έκφραση της E-σελεκτίνης από τη θρομβίνη διαμεσολαβείται από τον PAR-1, OECs και HUVECs επώαστηκαν με 10 nM voraparaxar για 1 h και στη συνέχεια ενεργοποιήθηκαν με 8 U/mL θρομβίνης για 24 h, στους 37°C. Το voraparaxar

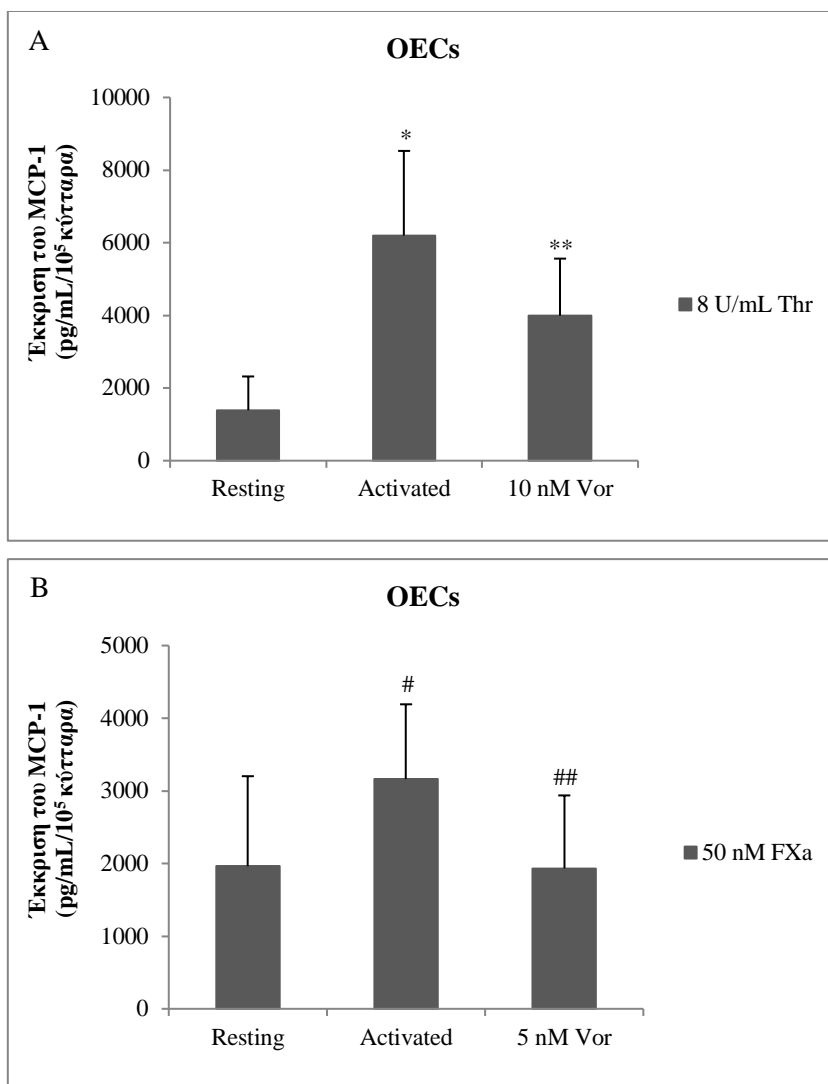
ανέστειλε την επαγόμενη από τη θρομβίνης έκφραση της E-σελεκτίνης ως τιμές MFI και ως %gated CD62E/CD61⁺ κύτταρα και από τους δύο κυτταρικούς τύπους (Εικόνα 6.48).



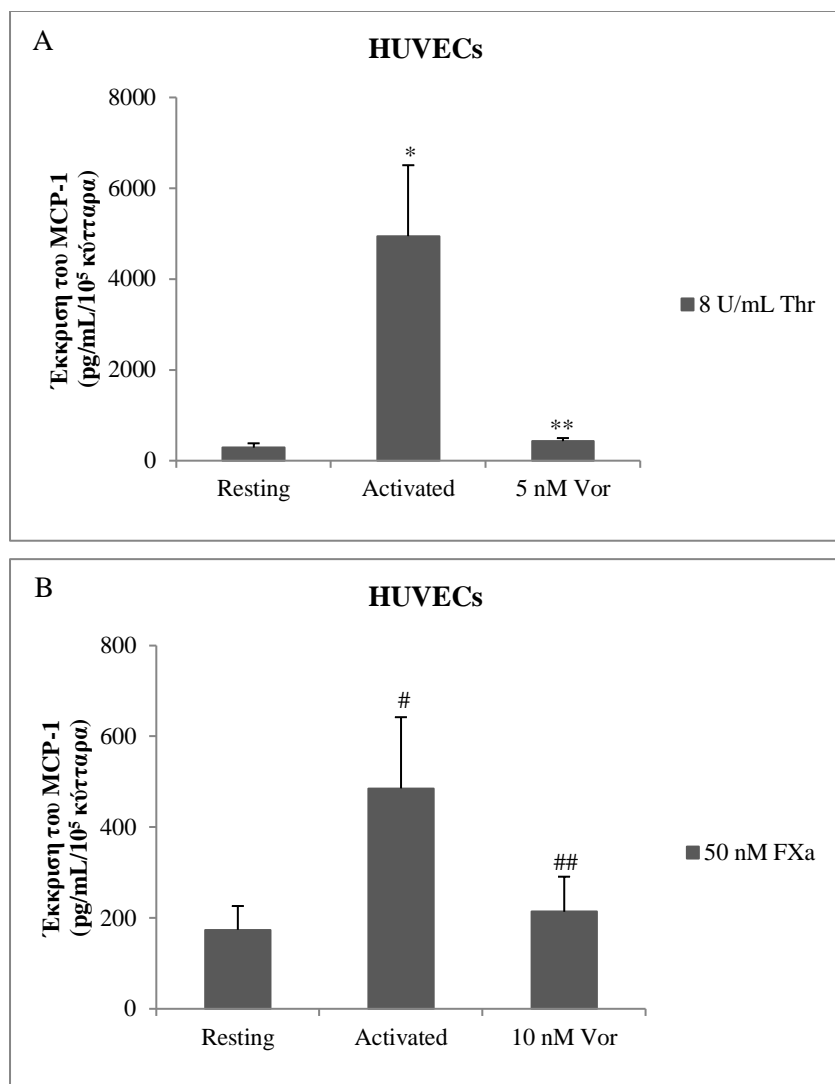
Εικόνα 6.48 Η ανασταλτική δράση του voraparaxar στην επαγόμενη από τη θρομβίνη έκφραση της E-σελεκτίνης ως τιμές MFI και ως %gated CD62E/CD61⁺ κύτταρα από (A) τα OECs και από (B) τα HUVECs. OECs και HUVECs επώαστηκαν με 10 nM voraparaxar για 1 h και στη συνέχεια ενεργοποιήθηκαν με 8 U/mL θρομβίνης για 6 h, στους 37°C.

6.10 Μελέτη της δράσης της θρομβίνης και του FXa στην έκκριση των MCP-1, PGI₂ και vWF από τα OECs και τα HUVECs

Για να μελετηθεί η επίδραση των παραγόντων πήξης θρομβίνη και FXa στην έκκριση του MCP-1, OECs και HUVECs επωάστηκαν με 8 U/mL θρομβίνης ή 50 nM FXa για 24 h, στους 37°C. Ακολούθησε συλλογή των υπερκειμένων και φυγοκέντρωση τους στα 16.000 x g για 10 min. Ο FXa και η θρομβίνη οδήγησαν σε αύξηση της έκκρισης του MCP-1 από τα OECs κατά $0,59 \pm 0,35$ και $5,45 \pm 3,35$ φορές, αντίστοιχα (Εικόνα 6.49) και από τα HUVECs κατά $1,05 \pm 0,55$ και $11,82 \pm 5,50$ φορές, αντίστοιχα (Εικόνα 6.50). Επιπρόσθετα, προκειμένου να διερευνηθεί η δράση του νογαραχαρ στην επαγόμενη από τη θρομβίνη και τον FXa έκκριση του MCP-1, OECs και HUVECs επωάστηκαν με 5 ή 10 nM νογαραχαρ και στη συνέχεια ενεργοποιήθηκαν με 8 U/mL θρομβίνης ή 50 nM FXa για 24 h στους 37°C. Το νογαραχαρ ανέστειλε την επαγόμενη από τη θρομβίνη και την επαγόμενη από τον FXa έκκριση του MCP-1 τόσο από τα OECs (Εικόνα 6.51) όσο και από τα HUVECs (Εικόνα 6.52).

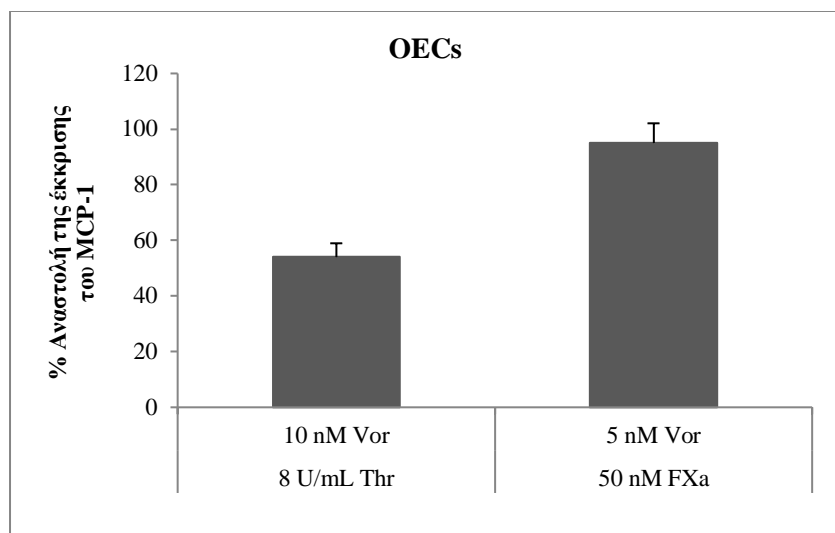


Εικόνα 6.49 Η επίδραση (A) της θρομβίνης και (B) του FXa στην έκκριση του MCP-1 από τα OECs. Μελέτη του ρόλου του PAR-1. OECs επωάστηκαν με (A) 10 nM και (B) 5 nM voraparaxar για 1 h και στη συνέχεια ενεργοποιήθηκαν με 8 U/mL θρομβίνης ή 50 nM FXa, αντίστοιχα, για 24 h στους 37°C. Τα υπερκείμενα συλλέχθηκαν και φυγοκεντρήθηκαν στις 16.000 x g για 10 min. Οι τιμές εκφράζονται ως μέσος όρος±SD από 3 ανεξάρτητα πειράματα. (A) * $p=0,005$ σε σύγκριση με το resting και ** $p=0,031$ σε σύγκριση με το activated και (B) # $p=0,001$ σε σύγκριση με το resting και ## $p=0,0001$ σε σύγκριση με το activated.

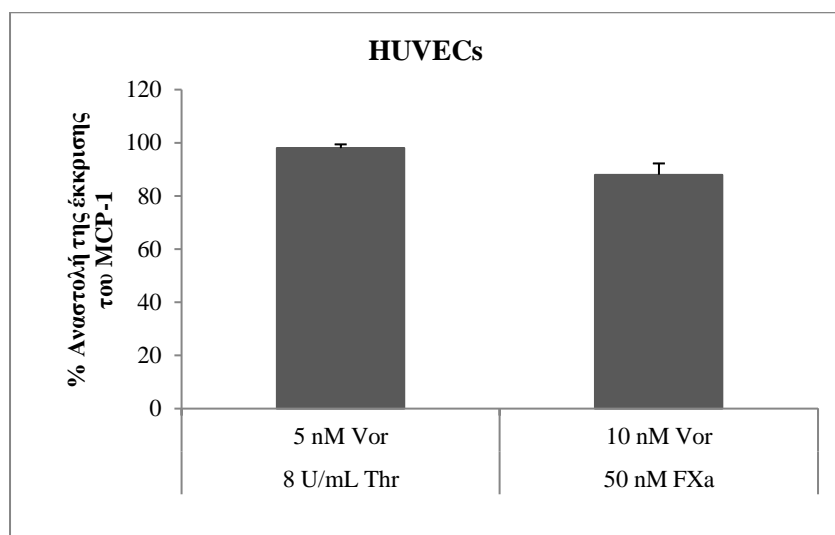


Εικόνα 6.50 Η επίδραση (A) της θρομβίνης και (B) του FXa στην έκκριση του MCP-1 από τα HUVECs. Μελέτη του ρόλου του PAR-1. HUVECs επωάστηκαν με (A) 5 nM και (B) 10 nM νοραπαξαχάρ για 1 h και στη συνέχεια ενεργοποιήθηκαν με 8 U/mL θρομβίνης ή 50 nM FXa, αντίστοιχα, για 24 h στους 37°C. Τα υπερκείμενα συλλέχθηκαν και φυγοκεντρήθηκαν στις 16.000 x g για 10 min. Οι τιμές εκφράζονται ως μέσος όρος±SD από 3 ανεξάρτητα πειράματα. (A) * $p=0,002$ σε σύγκριση με το resting και ** $p=0,01$ σε σύγκριση με το activated και (B) # $p=0,005$ σε σύγκριση με το resting και ## $p=0,004$ σε σύγκριση με το activated.

Συγκεκριμένα, το νοραπαξαχάρ ανέστειλε κατά 54±5% και κατά 95±7% την επαγόμενη από τη θρομβίνη και τον FXa, αντίστοιχα, έκκριση του MCP-1 από τα OECs (Εικόνα 6.51) και κατά 98±1% και κατά 88±4% την επαγόμενη από τη θρομβίνη και τον FXa, αντίστοιχα, έκκριση του MCP-1 από τα HUVECs (Εικόνα 6.52).

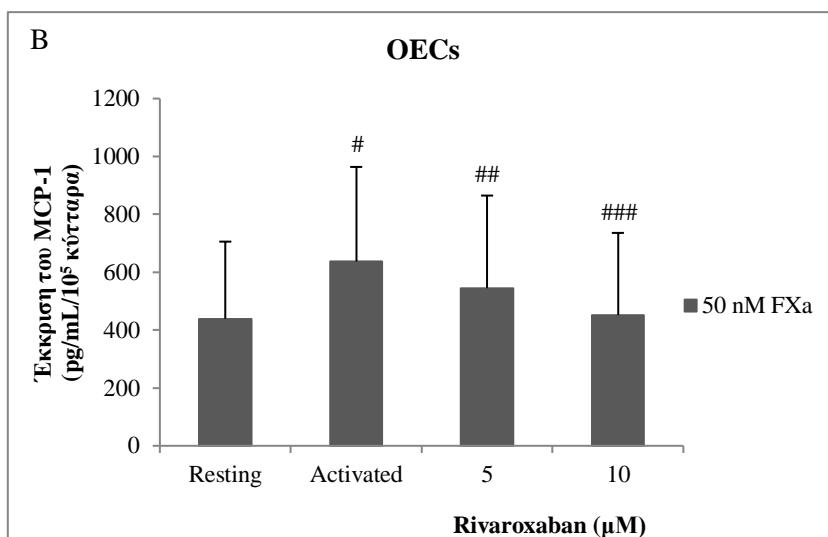
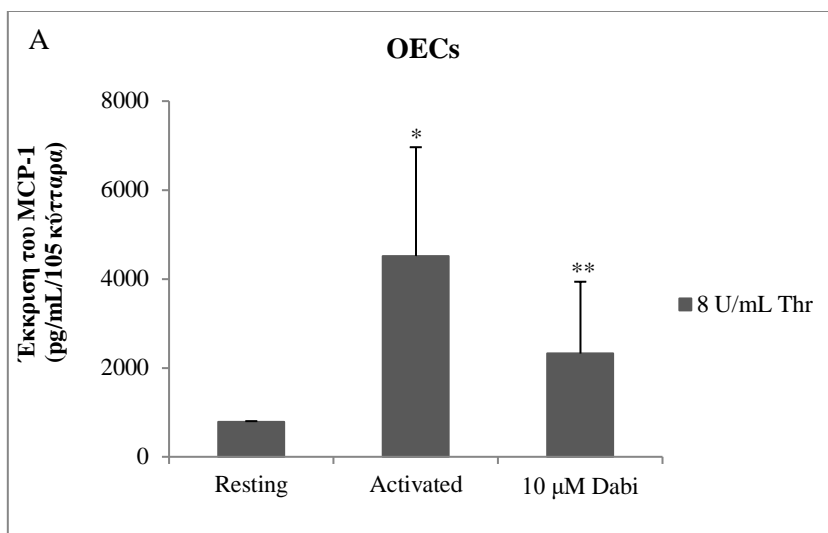


Εικόνα 6.51 Η ανασταλτική δράση του voraraxar στην επαγόμενη από τη θρομβίνη και τον FXa έκκριση του MCP-1 από τα OECs. OECs επώαστηκαν με 10 ή 5 nM voraraxar για 1 h και στη συνέχεια ενεργοποιήθηκαν με 8 U/mL θρομβίνης ή 50 nM FXa, αντίστοιχα, για 24 h στους 37°C. Τα υπερκείμενα συλλέχθηκαν και φυγοκεντρήθηκαν στις 16.000 x g για 10 min. Οι τιμές εκφράζονται ως μέσος όρος±SD από 3 ανεξάρτητα πειράματα.

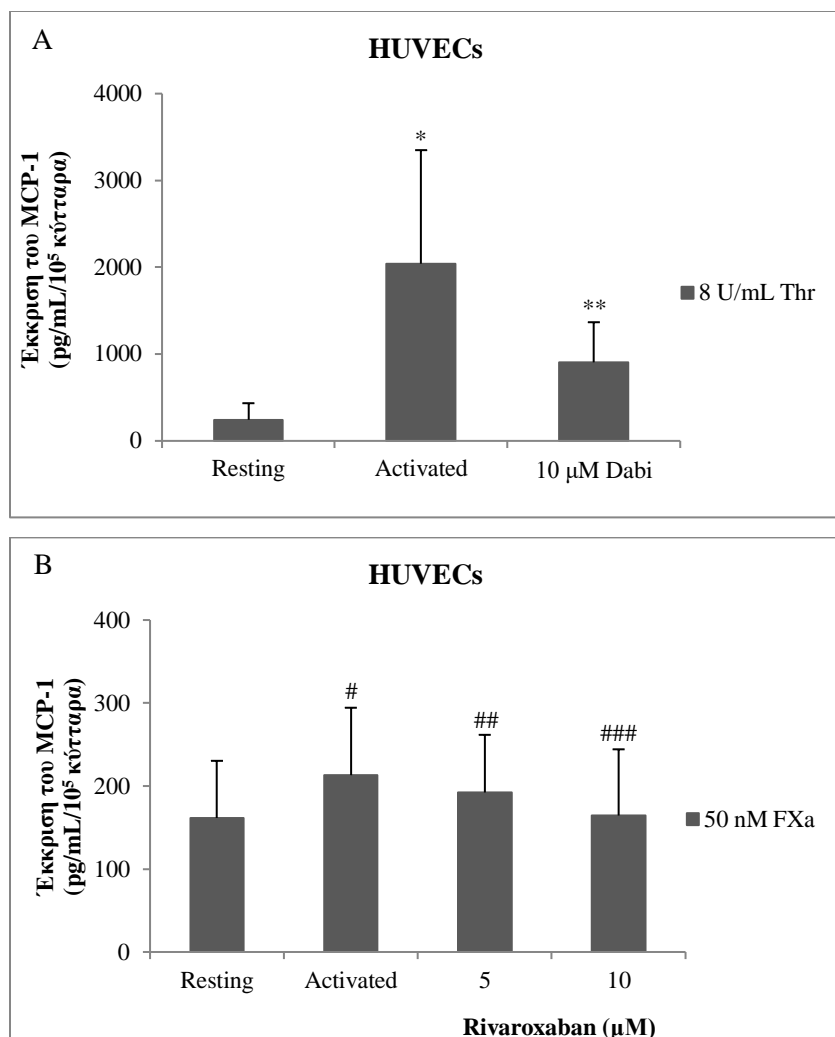


Εικόνα 6.52 Η ανασταλτική δράση του voraraxar στην επαγόμενη από τη θρομβίνη και τον FXa έκκριση του MCP-1 από τα HUVECs. HUVECs επώαστηκαν με 5 ή 10 nM voraraxar για 1 h και στη συνέχεια ενεργοποιήθηκαν με 8 U/mL θρομβίνης ή 50 nM FXa, αντίστοιχα, για 24 h στους 37°C. Τα υπερκείμενα συλλέχθηκαν και φυγοκεντρήθηκαν στις 16.000 x g για 10 min. Οι τιμές εκφράζονται ως μέσος όρος±SD από 3 ανεξάρτητα πειράματα.

Επιπρόσθετα, μελετήθηκε η δράση των dabigatran και rivaroxaban στην επαγόμενη από τη θρομβίνη και τον FXa, αντίστοιχα, έκκριση του MCP-1 από τα OECs και τα HUVECs. Συγκεκριμένα, OECs και HUVECs επώαστηκαν με 10 μ M dabigatran και 5 ή 10 μ M rivaroxaban για 10 min και στη συνέχεια ενεργοποιήθηκαν με 8 U/mL θρομβίνης ή 50 nM FXa, αντίστοιχα. Και τα δύο φάρμακα ανέστειλαν την επαγόμενη από το στόχο τους έκκριση του MCP-1 από τα OECs (Εικόνα 6.53) και από τα HUVECs (Εικόνα 6.54).

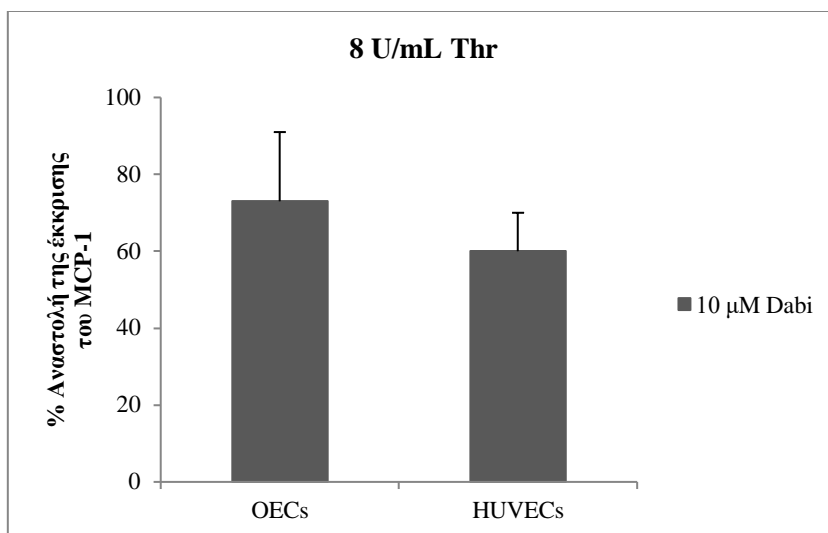


Εικόνα 6.53 (A) Η επίδραση του *dabigatran* στην επαγόμενη από τη θρομβίνη και (B) του *rivaroxaban* στην επαγόμενη από τον FXa έκκριση του MCP-1 από τα OECs. OECs επώαστηκαν με (A) 10 μM *dabigatran* (B) 5 ή 10 μM *rivaroxaban* για 10 min και στη συνέχεια ενεργοποιήθηκαν με 8 U/mL θρομβίνης ή 50 nM FXa, αντίστοιχα, για 24 h στους 37°C. Τα υπερκείμενα συλλέχθηκαν και φυγοκεντρήθηκαν στις 16.000 x g για 10 min. Οι τιμές εκφράζονται ως μέσος όρος±SD από 3 ανεξάρτητα πειράματα. (A) * $p=0,034$ σε σύγκριση με το resting και ** $p=0,008$ σε σύγκριση με το activated και (B) # $p=0,004$ σε σύγκριση με το resting και ## $p=0,0001$ και ### $p=0,002$ σε σύγκριση με το activated.

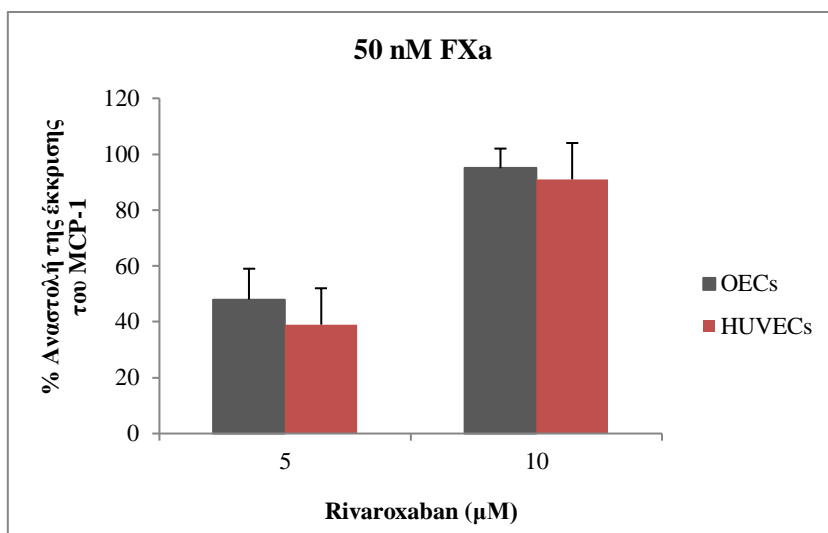


Εικόνα 6.54 (A) Η επίδραση του dabigatran στην επαγόμενη από τη θρομβίνη και (B) του rivaroxaban στην επαγόμενη από τον FXa έκκριση του MCP-1 από τα HUVECs. HUVECs επώαστηκαν με (A) 10 μM dabigatran (B) 5 ή 10 μM rivaroxaban για 10 min και στη συνέχεια ενεργοποιήθηκαν με 8 U/mL θρομβίνης ή 50 nM FXa, αντίστοιχα, για 24 h στους 37°C. Τα υπερκείμενα συλλέχθηκαν και φυγοκεντρήθηκαν στις 16.000 x g για 10 min. Οι τιμές εκφράζονται ως μέσος όρος±SD από 3 ανεξάρτητα πειράματα. (A) * $p=0,029$ σε σύγκριση με το resting και ** $p=0,046$ σε σύγκριση με το activated και (B) # $p=0,02$ σε σύγκριση με το resting και ## $p=0,023$ και ### $p=0,0001$ σε σύγκριση με το activated.

Συγκεκριμένα, το dabigatran ανέστειλε κατά 73±18% και κατά 60±10% την επαγόμενη από τη θρομβίνη έκκριση του MCP-1 από τα OECs και από τα HUVECs (Εικόνα 6.55). Επιπρόσθετα, το rivaroxaban στη συγκέντρωση των 5 μM ανέστειλε κατά 48±11% και κατά 39±13% και στη συγκέντρωση των 10 μM κατά 95±7% και κατά 91±13% την επαγόμενη από τον FXa έκκριση του MCP-1 από τα OECs και τα HUVECs, αντίστοιχα (Εικόνα 6.56).

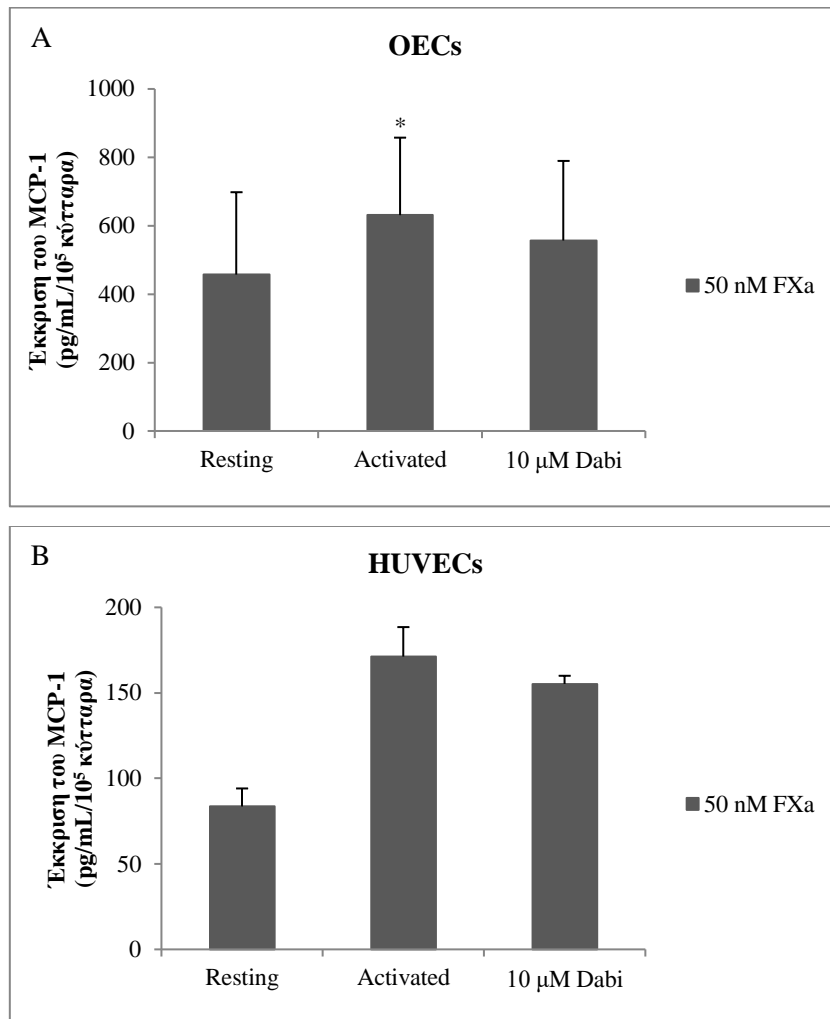


Εικόνα 6.55 Η ανασταλτική δράση του *dabigatran* στην επαγόμενη από τη θρομβίνη έκκριση του *MCP-1* από τα *OECs* και τα *HUVECs*. *OECs* και *HUVECs* επώαστηκαν με 10 μM *dabigatran* για 10 min και στη συνέχεια ενεργοποιήθηκαν με 8 U/mL θρομβίνης για 24 h στους 37°C. Τα υπερκείμενα συλλέχθηκαν και φυγοκεντρήθηκαν στις 16.000 x g για 10 min. Οι τιμές εκφράζονται ως μέσος όρος±SD από 3 ανεξάρτητα πειράματα.

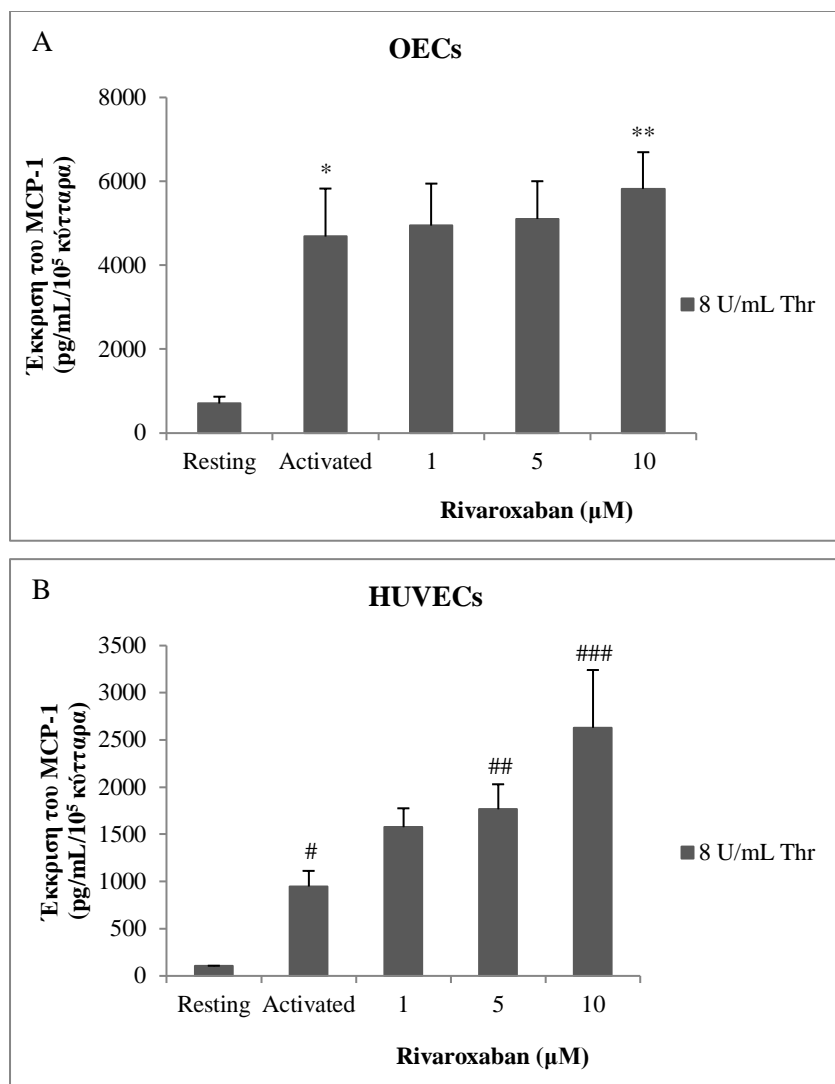


Εικόνα 6.56 Η ανασταλτική δράση του *rivaroxaban* στην επαγόμενη από τον *FXa* έκκριση του *MCP-1* από τα *OECs* και τα *HUVECs*. *OECs* και *HUVECs* επώαστηκαν με 5 ή 10 μM *rivaroxaban* για 10 min και στη συνέχεια ενεργοποιήθηκαν με 50 nM *FXa* για 24 h στους 37°C. Τα υπερκείμενα συλλέχθηκαν και φυγοκεντρήθηκαν στις 16.000 x g για 10 min. Οι τιμές εκφράζονται ως μέσος όρος±SD από 3 ανεξάρτητα πειράματα.

Στη συνέχεια, μελετήθηκε η δράση των dabigatran και rivaroxaban στην επαγόμενη από τον FXa και τη θρομβίνη, αντίστοιχα, έκκριση του MCP-1 από τα OECs και τα HUVECs. Συγκεκριμένα, OECs και HUVECs επωάστηκαν με 10 μ M dabigatran και 1, 5 ή 10 μ M rivaroxaban για 10 min και στη συνέχεια ενεργοποιήθηκαν με 50 nM FXa ή 8 U/mL θρομβίνης αντίστοιχα. Το dabigatran ανέστειλε μη στατιστικά σημαντικά την επαγόμενη από τον FXa έκκριση του MCP-1 από τα OECs και τα HUVECs (Εικόνα 6.57). Αντίθετα, το rivaroxaban οδήγησε στην αύξηση της επαγόμενη από τη θρομβίνη έκκριση του MCP-1 και από τους δύο κυτταρικούς τύπους (Εικόνα 6.58).

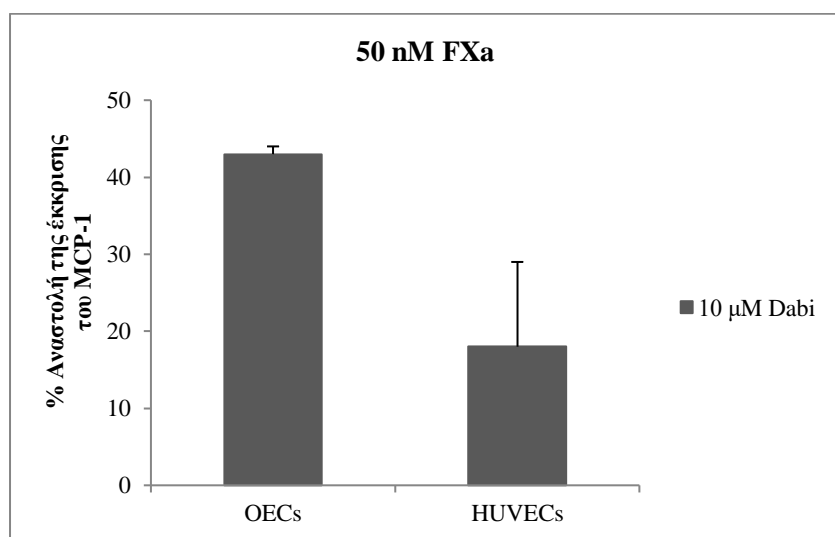


Εικόνα 6.57 Η ανασταλτική δράση του dabigatran στην επαγόμενη από τον FXa έκκριση του MCP-1 από (A) τα OECs και (B) τα HUVECs. OECs και HUVECs επωάστηκαν με 10 μ M dabigatran για 10 min και στη συνέχεια ενεργοποιήθηκαν με 50 nM FXa για 24 h στους 37°C. Τα υπερκείμενα συλλέχθηκαν και φυγοκεντρήθηκαν στις 16.000 x g για 10 min. Οι τιμές εκφράζονται ως μέσος όρος \pm SD από 3 ανεξάρτητα πειράματα. (A) * $p=0,037$ σε σύγκριση με το resting.

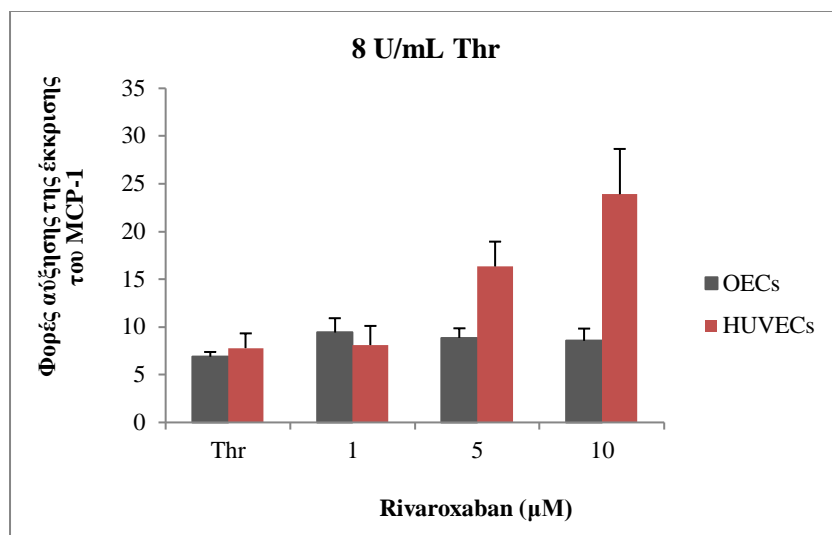


Εικόνα 6.58 Η δράση του rivaroxaban στην επαγόμενη από τη θρομβίνη έκκριση του MCP-1 από (A) τα OECs και (B) τα HUVECs. OECs και HUVECs επώστηκαν με 1, 5 ή 10 μM rivaroxaban για 10 min και στη συνέχεια ενεργοποιήθηκαν με 8 U/mL θρομβίνης για 24 h στους 37°C. Τα υπερκείμενα συλλέχθηκαν και φυγοκεντρήθηκαν στις 16.000 x g για 10 min. Οι τιμές εκφράζονται ως μέσος όρος±SD από 3 ανεξάρτητα πειράματα. (A) * $p=0,025$ σε σύγκριση με το resting και ** $p=0,021$ σε σύγκριση με το activated. (B) # $p=0,013$ σε σύγκριση με το resting και ## $p=0,019$ και ### $p=0,040$ σε σύγκριση με το activated.

Συγκεκριμένα, το dabigatran ανέστειλε κατά $43\pm 1\%$ και κατά $18\pm 1\%$ την επαγόμενη από τον FXa έκκριση του MCP-1 από τα OECs και από τα HUVECs, αντίστοιχα (Εικόνα 6.59). Επιπρόσθετα, το rivaroxaban οδήγησε στην αύξηση της επαγόμενης από τη θρομβίνη έκκρισης του MCP-1 με δόσο-εξαρτώμενο τρόπο. Πιο συγκεκριμένα, στα OECs, η θρομβίνη αύξησε την έκκριση του MCP-1 κατά $6,89\pm 0,49$ φορές, ενώ το rivaroxaban σε συγκέντρωση $10\ \mu\text{M}$ αύξησε την έκκριση του MCP-1 κατά $8,52\pm 1,28$ φορές. Επιπρόσθετα, στα HUVECs, η θρομβίνη αύξησε την έκκριση του MCP-1 κατά $7,79\pm 1,54$ φορές, ενώ το rivaroxaban σε συγκέντρωση $10\ \mu\text{M}$ αύξησε την έκκριση του MCP-1 κατά $23,91\pm 4,74$ φορές (Εικόνα 6.60).

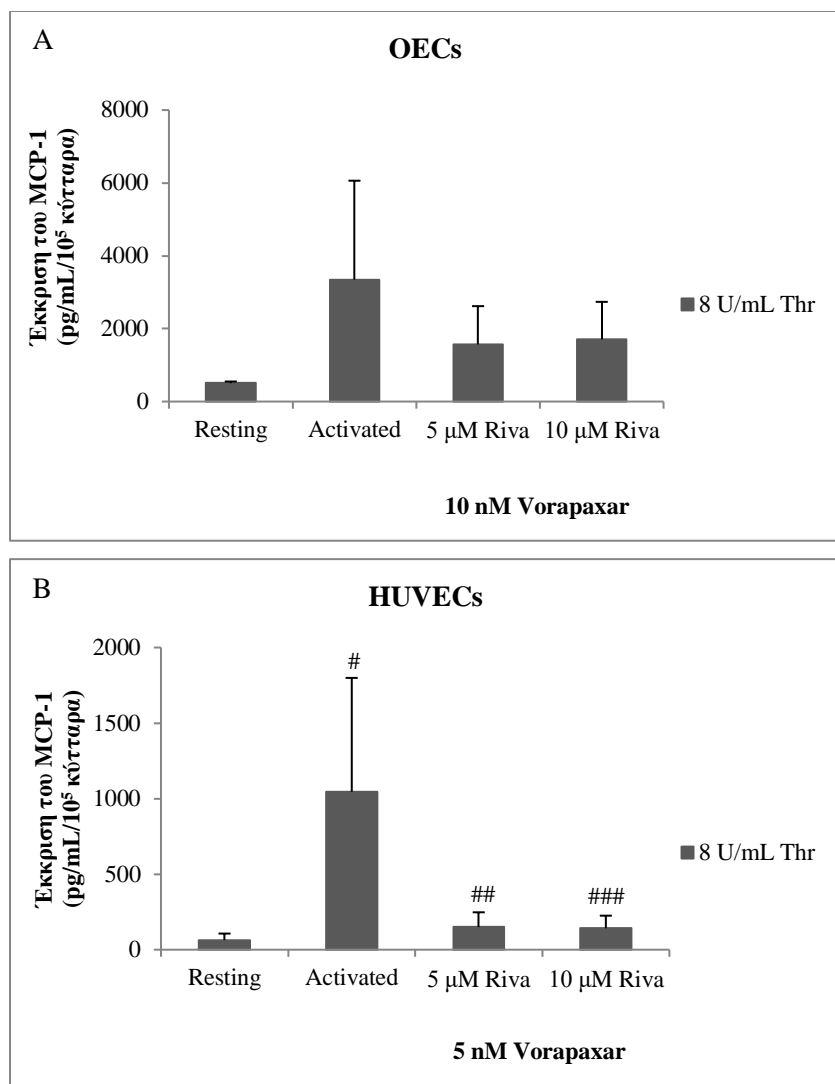


Εικόνα 6.59 Η ανασταλτική δράση του dabigatran στην επαγόμενη από τον FXa έκκριση του MCP-1 από τα OECs και τα HUVECs. OECs και HUVECs επώαστηκαν με $10\ \mu\text{M}$ dabigatran για 10 min και στη συνέχεια ενεργοποιήθηκαν με $50\ \text{nM}$ FXa για 24 h στους 37°C . Τα υπερκείμενα συλλέχθηκαν και φυγοκεντρήθηκαν στις $16.000\ \times\ \text{g}$ για 10 min. Οι τιμές εκφράζονται ως μέσος όρος \pm SD από 3 ανεξάρτητα πειράματα.



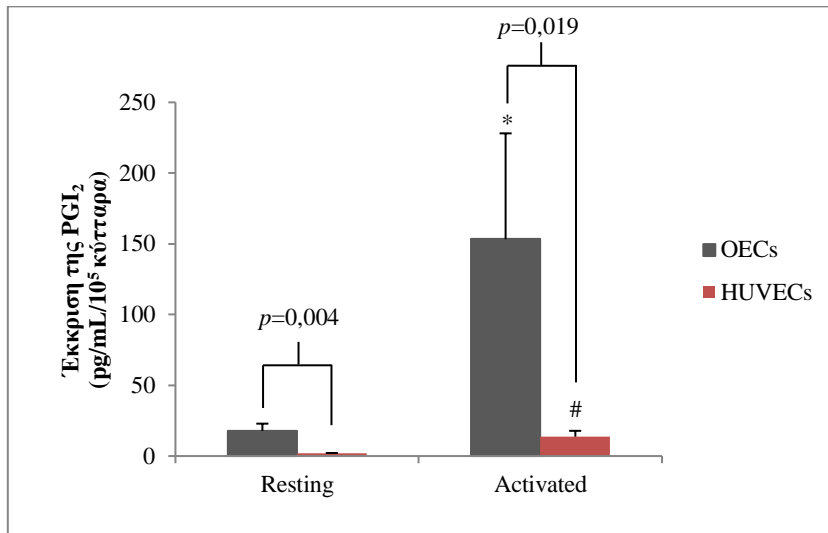
Εικόνα 6.60 Η δράση του rivaroxaban στην επαγόμενη από τη θρομβίνη έκκριση του MCP-1 από τα OECs και τα HUVECs. OECs και HUVECs επώαστηκαν με 1, 5 ή 10 μM rivaroxaban για 10 min και στη συνέχεια ενεργοποιήθηκαν με 8 U/mL θρομβίνης για 24 h στους 37°C. Τα υπερκείμενα συλλέχθηκαν και φυγοκεντρήθηκαν στις 16.000 x g για 10 min. Οι τιμές εκφράζονται ως μέσος όρος±SD από 3 ανεξάρτητα πειράματα.

Τέλος, με σκοπό να διερευνηθεί εάν ο PAR-1 διαδραματίζει ρόλο στο μηχανισμό διαμέσου του οποίου το rivaroxaban ενισχύει τη δράση της θρομβίνης ως προς την έκκριση του MCP-1 από τα OECs και τα HUVECs, τα κύτταρα αυτά επώαστηκαν με τη 10 και 5 nM voraparaxar, αντίστοιχα, στη συνέχεια με 5 ή 10 μM rivaroxaban για 10 min και τέλος ενεργοποιήθηκαν με 8 U/mL θρομβίνης για 24 h. Παρουσία του voraparaxar, παρατηρήθηκε αναστολή της ενίσχυσης από το rivaroxaban της επαγόμενης από τη θρομβίνη έκκρισης του MCP-1 και στους δύο τύπους κυττάρων (Εικόνα 6.61).

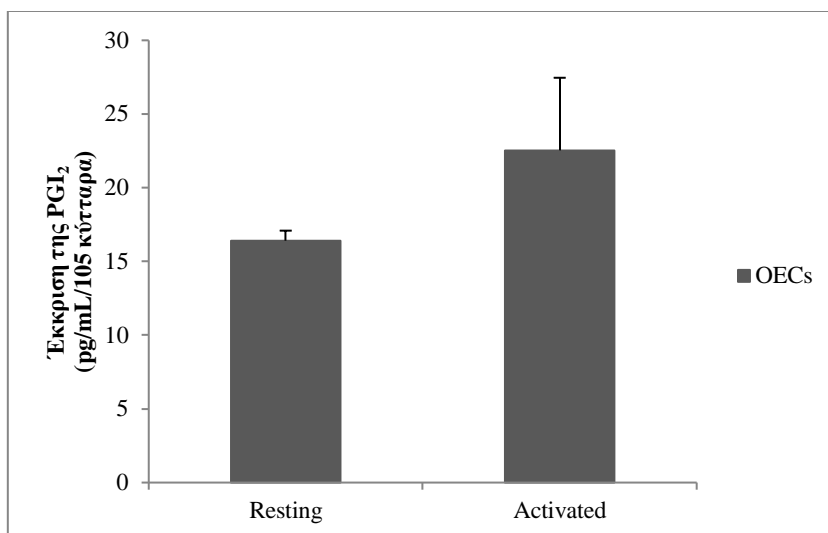


Εικόνα 6.61 Ο ρόλος του PAR-1 στην ενίσχυση της επαγόμενης από τη θρομβίνη έκκρισης του MCP-1 από το rivaroxaban, από (A) τα OECs και (B) τα HUVECs. (A) OECs επώαστηκαν με 10 nM vorapaxar και (B) HUVECs επώαστηκαν με 5 nM vorapaxar για 1 h, στη συνέχεια με 5 ή 10 μM rivaroxaban για 10 min και τέλος ενεργοποιήθηκαν με 8 U/mL θρομβίνης για 24 h στους 37°C. Οι τιμές εκφράζονται ως μέσος όρος±SD από 3 ανεξάρτητα πειράματα. (B) [#] $p=0,043$ σε σύγκριση με το resting και ^{##} $p=0,044$ και ^{###} $p=0,046$ σε σύγκριση με το activated.

Για να μελετηθεί η επίδραση των παραγόντων πήξης θρομβίνη και FXa στην έκκριση της PGI₂, OECs και HUVECs επώαστηκαν με 1 U/mL θρομβίνης, 0,5 nM FXa για 20 min, στους 37°C. Ακολούθησε συλλογή των υπερκειμένων και φυγοκέντρωση τους στα 16.000 x g για 10 min. Η θρομβίνη οδήγησε σε αύξηση της έκκρισης της PGI₂ από τα OECs και από τα HUVECs (Εικόνα 6.62). Αντίθετα, ο FXa δεν προκάλεσε την αύξηση της έκκρισης της PGI₂ στα HUVECs, ενώ προκάλεσε μία μη στατιστικά σημαντική αύξηση στα OECs (Εικόνα 6.63).



Εικόνα 6.62 Η επίδραση της θρομβίνης στην έκκριση της PGI₂ από τα OECs και τα HUVECs. OECs και HUVECs επώαστηκαν με 8 U/mL θρομβίνης για 20 min στους 37°C. Τα υπερκείμενα συλλέχθηκαν και φυγοκεντρήθηκαν στις 16.000 x g για 10 min. Οι τιμές εκφράζονται ως μέσος όρος±SD από 3 ανεξάρτητα πειράματα. * $p=0,005$ και # $p=0,025$ σε σύγκριση με το αντίστοιχο resting.



Εικόνα 6.63 Η επίδραση του FXa στην έκκριση της PGI₂ από τα OECs. OECs επώαστηκαν με 50 nM FXa για 20 min στους 37°C. Τα υπερκείμενα συλλέχθηκαν και φυγοκεντρήθηκαν στις 16.000 x g για 10 min. Οι τιμές εκφράζονται ως μέσος όρος±SD από 3 ανεξάρτητα πειράματα.

Τέλος, για να μελετηθεί η επίδραση των παραγόντων πήξης θρομβίνη και FXa στην έκκριση του vWF, HUVECs επώαστηκαν με 1, 5 ή 8 U/mL θρομβίνης για 1 h και στη συνέχεια με 1 U/mL θρομβίνης για 1, 3 και 6 h ή 0,5 nM FXa για 1 h, στους 37°C. Ακολούθησε συλλογή των υπερκειμένων και φυγοκέντρωση τους στα 3.000 x g για 10 min. Η θρομβίνη οδήγησε σε μικρή αύξηση της έκκρισης του vWF η οποία ήταν βέλτιστη στο 1 U/mL θρομβίνης μετά από 1 h επώασης, ενώ ο FXa δεν εμφάνισε καμία δράση. Συγκεκριμένα, η θρομβίνη αύξησε την έκκριση του vWF μη στατιστικά σημαντικά από 0,30±0,10 προς 0,45±0,07 mUI/mL/10⁵ κύτταρα.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η παρούσα διδακτορική διατριβή είχε ως στόχο να μελετήσει τη δράση που διαδραματίζουν ο FXa και η θρομβίνη στην αθηροθρόμβωση, διαμέσου της ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων και των EPCs. Αποδείχθηκε ότι τόσο ο FXa όσο και η θρομβίνη ενεργοποιούν τα αιμοπετάλια και τα EPCs, συμβάλλοντας στην αθηροθρόμβωση.

Αρχικά, η παρούσα διατριβή έδειξε για πρώτη φορά ότι ο FXa οδηγεί στην αργή χρονικά, αλλά ισχυρή αιμοπεταλιακή συσσώρευση, καθώς επίσης και στην ενεργοποίηση του υποδοχέα $\alpha_{IIb}\beta_3$ και τη μεμβρανική έκφραση της P-σελεκτίνης. Εν συνεχεία, με σκοπό να μελετηθεί ο ρόλος του PAR-1 στην επαγόμενη από τον FXa και τη θρομβίνη αιμοπεταλιακή συσσώρευση και ενεργοποίηση, πραγματοποιήθηκαν δοσο- και χρονο-εξαρτώμενα πειράματα στους 25 και 37°C για την εύρεση των βέλτιστων συνθηκών δράσης του εκλεκτικού ανταγωνιστή του PAR-1, voraparaxar. Το φάρμακο εμφάνισε τη βέλτιστη δράση του μετά από 1 h επώασης με τα αιμοπετάλια στους 37°C. Οι μη αιμοστατικές δράσεις της θρομβίνης και του FXa φαίνεται να διαμεσολαβούνται κυρίως από τον PAR-1, καθώς το voraparaxar ανέστειλε τόσο την αιμοπεταλιακή συσσώρευση όσο και την ενεργοποίηση του $\alpha_{IIb}\beta_3$ και την έκφραση της P-σελεκτίνης με δοσο-εξαρτώμενο τρόπο. Η μέγιστη αναστολή από το voraparaxar παρατηρήθηκε σε νανομοριακή συγκέντρωση, πολύ χαμηλότερη από τη συγκέντρωση του φαρμάκου που προκύπτει στο αίμα μετά από τη χορήγησή του στη θεραπευτική δόση των 2,5 mg. Το voraparaxar δεν ανέστειλε την αιμοπεταλιακή συσσώρευση από άλλους κλασικούς αγωνιστές.

Επιπρόσθετα, μελετήθηκε η δράση των dabigatran και rivaroxaban στην επαγόμενη από τη θρομβίνη και τον FXa αιμοπεταλιακή συσσώρευση, αντίστοιχα. Το dabigatran ανέστειλε δοσο-εξαρτώμενα την επαγόμενη από τη θρομβίνη αιμοπεταλιακή συσσώρευση, ενώ το rivaroxaban ανέστειλε δοσο-εξαρτώμενα την επαγόμενη από τον FXa αιμοπεταλιακή συσσώρευση. Η μέγιστη αναστολή της αιμοπεταλιακής συσσώρευσης από τα δύο φάρμακα παρατηρήθηκε σε συγκέντρωση χαμηλότερη από εκείνη που προκύπτει στο πλάσμα μετά από τη χορήγηση θεραπευτικής δόσης [238, 429-431]. Ακόμη, το dabigatran ανέστειλε την επαγόμενη από τον FXa αιμοπεταλιακή συσσώρευση και το rivaroxaban την επαγόμενη από τη θρομβίνη αιμοπεταλιακή συσσώρευση. Η ανασταλτική δράση του rivaroxaban στην επαγόμενη από τη θρομβίνη αιμοπεταλιακή συσσώρευση ήταν 1000 φορές ασθενέστερη σε σχέση με εκείνη στην επαγόμενη από τον FXa συσσώρευση, ενώ η ανασταλτική δράση του dabigatran ήταν 2 φορές ισχυρότερη

στην επαγόμενη από τον FXa αιμοπεταλιακή συσσώρευση σε σχέση με εκείνη στην επαγόμενη από τη θρομβίνη συσσώρευση. Μία πρόσφατη μελέτη διερεύνησε τη δράση του rivaroxaban στην επαγόμενη από τη θρομβίνη αιμοπεταλιακή συσσώρευση *ex vivo* και έδειξε ότι η συσσώρευση ήταν χαμηλότερη 2 h μετά από τη χορήγηση του φαρμάκου, σε ασθενείς που ελάμβαναν rivaroxaban για πάνω από 7 ημέρες [328]. Παρόμοια, μία άλλη μελέτη έδειξε ότι το dabigatran μειώνει την επαγόμενη από τη θρομβίνη αιμοπεταλιακή συσσώρευση 2 h μετά από τη χορήγησή του, σε ασθενείς που ελάμβαναν το φάρμακο για τουλάχιστον 7 ημέρες [324]. Αντίθετα, έχει προταθεί ότι το dabigatran ενισχύει την αιμοπεταλιακή συσσώρευση ασθενών μετά από τη χορήγηση του φαρμάκου, διαμέσου της αύξησης της έκφρασης του PAR-1 στην αιμοπεταλιακή επιφάνεια [325]. Τέλος, τα δύο φάρμακα δεν ανέστειλαν την αιμοπεταλιακή συσσώρευση από άλλους κλασικούς αγωνιστές. Συνεπώς, τα παραπάνω αποτελέσματα σε συνδυασμό με την υπάρχουσα βιβλιογραφία, προτείνουν ότι τα φάρμακα αυτά δεν είναι εκλεκτικά ως προς το στόχο τους. Επιπρόσθετα, καθώς είναι αποδεδειγμένο ότι εμφανίζουν πλειοτροπικές δράσεις είναι απαραίτητο αυτές να διερευνηθούν περαιτέρω σε επίπεδο κλινικών μελετών ώστε να εξακριβωθεί η ευεργετική ή επιβλαβής τους δράση.

Ακόμη, μελετήθηκε ο ρόλος του voraparaxar στην διαφοροποίηση CD34⁺ κυττάρων προς EPCs, αλλά και στη δημιουργία συζευγμάτων των κυττάρων αυτών με τα αιμοπετάλια. Το φάρμακο ανέστειλε την διαφοροποίηση των CD34⁺ κυττάρων προς EPCs, καθώς και το σχηματισμό συζευγμάτων CD34⁺ κυττάρων/αιμοπεταλίων που επάγεται από το TRAP-6 και από το ADP. Μία μελέτη απέδειξε ότι το ADP οδηγεί στην παραγωγή θρομβίνης σε PRP και συνεπώς, στην ενεργοποίηση του PAR-1. Επιπρόσθετα, αναστολείς του PAR-1 ανέστειλαν το δεύτερο κύμα ενεργοποίησης που προκάλεσε το ADP, αλλά και την ενεργοποίηση του α_{IIb}β₃ και την έκφραση της P-σελεκτίνης [432]. Συνεπώς, η επαγόμενη από το ADP διαφοροποίηση των CD34⁺ κυττάρων προς EPCs, αλλά και ο σχηματισμός συζευγμάτων CD34⁺ κυττάρων/αιμοπεταλίων, πιθανώς να ενισχύεται από τον επακόλουθο σχηματισμό θρομβίνης, ενώ η αναστολή από το voraparaxar να οφείλεται στην αναστολή της ενεργοποίησης του PAR-1.

Εν συνεχεία, μελετήθηκε ο ρόλος του FXa και της θρομβίνης στην ενεργοποίηση των EPCs, χρησιμοποιώντας ως θετικό μάρτυρα τα ώριμα ECs. Αρχικά, αποδείχθηκε για πρώτη φορά ότι η έκφραση του μορίου προσκόλλησης ICAM-1 είναι αυξημένη στα μη ενεργοποιημένα OECs σε σχέση με τα μη ενεργοποιημένα HUVECs. Μία υπόθεση που θα μπορούσε να εξηγήσει την παραπάνω παρατήρηση είναι ότι, καθώς το ICAM-1 αποτελεί μόριο που διαμεσολαβεί τη

στρατολόγηση των EPCs στο ενδοθήλιο [433], η αυξημένη έκφραση του στην επιφάνεια των OECs να εξυπηρετεί την προσκόλληση τους στο ενδοθήλιο, ένα πρώιμο βήμα που είναι απαραίτητο για τη διαφοροποίηση τους προς ώριμα ECs και συνεπώς, στην αναγέννηση του ενδοθηλίου και την αγγειογένεση. Επιπρόσθετα, η αυξημένη έκφραση του ICAM-1 πιθανά να αποτελεί δείκτη πρόδρομων κυττάρων. Οι παραπάνω υποθέσεις απαιτούν περαιτέρω διερεύνηση.

Η παρούσα μελέτη απέδειξε για πρώτη φορά ότι η θρομβίνη και ο FXa επάγουν την έκφραση του ICAM-1 από τα OECs. Η μέγιστη έκφραση παρατηρήθηκε στις 24 h επώασης με τους παραπάνω παράγοντες, γεγονός που έρχεται σε συμφωνία με μελέτες που έχουν αποδείξει ότι η έκφραση του ICAM-1 απαιτεί μεταγραφή του mRNA και πρωτεϊνοσύνθεση, διαδικασίες που απαιτούν αρκετές ώρες για να ολοκληρωθούν [434, 435]. Η θρομβίνη αποτέλεσε ισχυρότερο ενεργοποιητή των OECs από τον FXa, ενώ η παρατηρούμενη αύξηση της έκφρασης του ICAM-1 από τα HUVECs ήταν υψηλότερη σε σχέση με τα OECs. Το αποτέλεσμα αυτό πιθανότατα οφείλεται στο ότι η έκφραση του ICAM-1 είναι υψηλότερη σε μη ενεργοποιημένα OECs σε σχέση με μη ενεργοποιημένα HUVECs. Εναλλακτικά, αυτό το αποτέλεσμα προτείνει ότι το ενδοκυττάριο σηματοδοτικό μονοπάτι που οδηγεί στο σχηματισμό του ICAM-1 στα OECs μετά από ενεργοποίηση από τη θρομβίνη, μπορεί να μην είναι πλήρως ώριμο σε αυτά τα κύτταρα ή η έκφραση του PAR-1 να είναι χαμηλότερη στα OECs σε σχέση με τα HUVECs. Οι παραπάνω υποθέσεις χρειάζονται περαιτέρω διερεύνηση. Αντίθετα, η αύξηση που προκαλεί ο FXa στην έκφραση του ICAM-1 δεν διαφέρει στατιστικά σημαντικά μεταξύ των δύο κυτταρικών σειρών. Η επαγόμενη από τη θρομβίνη έκφραση του ICAM-1 από EPCs ποντικού έχει δειχθεί σε μία πρόσφατη μελέτη, ένα αποτέλεσμα που έρχεται σε συμφωνία με τις δικές μας παρατηρήσεις [436]. Το ICAM-1 αποτελεί ένα προφλεγμονώδες μόριο και η επαγωγή της έκφρασής του από τον FXa ή τη θρομβίνη σε HUVECs, έχει συσχετιστεί με φλεγμονώδεις καταστάσεις [282, 437]. Συνεπώς, η ενεργοποίηση των OECs από τους παραπάνω παράγοντες, θα μπορούσε να συμβάλλει επίσης στον παθοφυσιολογικό μηχανισμό διαφόρων φλεγμονωδών καταστάσεων, όπως η αθηρογένεση.

Τα DOACs χρησιμοποιούνται ευρέως ως αντιπηκτικά, αλλά ποικίλες μελέτες προτείνουν ότι διαμέσου της αναστολής του FXa και της θρομβίνης, τα φάρμακα αυτά μπορεί να εμφανίζουν πλειοτροπικές δράσεις [197, 248]. Συνεπώς, η παρούσα μελέτη επικεντρώθηκε στο ρόλο των DOACs που στοχεύουν τον FXa και τη θρομβίνη, τα rivaroxaban και dabigatran, αντίστοιχα, στην επαγόμενη από τους παράγοντες αυτούς έκφραση του ICAM-1 από τα OECs. Το dabigatran ανέστειλε δόσο-εξαρτώμενα τη δράση της θρομβίνης και το rivaroxaban ανέστειλε δόσο-

εξαρτώμενα τη δράση του FXa, αποδεικνύοντας μία ακόμη πλειοτροπική δράση των φαρμάκων αυτών. Η δράση των φαρμάκων παρατηρήθηκε σε συγκεντρώσεις που σχετίζονται με εκείνες που προκύπτουν μετά από την από του στόματος χορήγησή τους *in vivo*, προτείνοντας ότι τα φάρμακα αυτά εμφανίζουν αντιφλεγμονώδεις δράσεις, αλλά θα μπορούσαν επίσης να συμμετέχουν στη στρατολόγηση των EPCs στο αρτηριακό τοίχωμα, την αναγέννηση του ενδοθηλίου και την αγγειογένεση. Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης έρχονται σε συμφωνία με μελέτες σε HUVECs όπου αποδείχθηκε η αντιφλεγμονώδης δράση των φαρμάκων αυτών [313, 319, 321], αλλά και με μία μελέτη που προτείνει ότι το rivaroxaban βελτιώνει τη νεοαγγειογένεση που διαμεσολαβείται από τα EPCs, υπό υπεργλυκαιμικές συνθήκες [438].

Στη συνέχεια, διερευνήθηκε ο ρόλος του PAR-1 στην επαγόμενη από τη θρομβίνη και τον FXa έκφραση του ICAM-1, με τη χρήση του voraparaxar. Το voraparaxar ανέστειλε δόσο-εξαρτώμενα την έκφραση του ICAM-1 από τα OECs. Στη μέγιστη συγκέντρωση του φαρμάκου που δοκιμάστηκε, η επαγόμενη από τον FXa έκφραση του ICAM-1 ανεστάλη πλήρως, ενώ η επαγόμενη από τη θρομβίνη έκφραση του ICAM-1 ανεστάλη κατά 57%. Καθώς είναι γνωστό ότι ο FXa ασκεί τις μη αιμοστατικές κυτταρικές του δράσεις διαμέσου των PAR-1 και -2 [197], μπορεί να υποθεθεί ότι η έκφραση του ICAM-1 από αυτόν τον παράγοντα διαμεσολαβείται κυρίως από τον PAR-1, ενώ στην έκφραση του ICAM-1 από τη θρομβίνη θα μπορούσε να διαδραματίζει ρόλο και ο PAR-4. Στη βιβλιογραφία υπάρχει διχογνωμία σχετικά με την έκφραση του PAR-4 στην επιφάνεια των ενδοθηλιακών κυττάρων [439-441]. Μία πρόσφατη μελέτη έδειξε ότι ο PAR-4 δεν εντοπίζεται στην επιφάνεια κυττάρων που εμφανίζουν παρόμοια χαρακτηριστικά με τα OECs [442]. Συνεπώς, χρειάζονται περαιτέρω μελέτες για να εξακριβωθεί η παρουσία του PAR-4, καθώς και η λειτουργικότητα του στα κύτταρα αυτά. Έχει βρεθεί, ότι η ενεργοποίηση του PAR-1 στα OECs ενισχύει την αγγειογένεση *in vitro* [443] και παρά το γεγονός ότι οι ερευνητές προτείνουν τη συμμετοχή δύο χημειοκινών, πιθανώς η επαγόμενη από τον FXa και τη θρομβίνη έκφραση του ICAM-1, όπως αναφέρεται στην παρούσα μελέτη, να σχετίζεται με την παραπάνω διαδικασία.

Η παρούσα διατριβή μελέτησε για πρώτη φορά τη δράση της θρομβίνης και του FXa στην έκφραση της E-σελεκτίνης από τα OECs. Βρέθηκε ότι μόνο η θρομβίνη επάγει την έκφραση της E-σελεκτίνης, αλλά τα επίπεδα αυτής της έκφρασης είναι σαφώς χαμηλότερα σε σχέση με εκείνα του ICAM-1. Επιπρόσθετα, η επαγόμενη από τη θρομβίνη έκφραση της E-σελεκτίνης ήταν μεγαλύτερη στα OECs σε σχέση με τα HUVECs. Παλαιότερες μελέτες έχουν δείξει ότι η θρομβίνη και ο FXa επάγουν την έκφραση της E-σελεκτίνης από τα HUVECs [255, 262, 444], ενώ μία πιο

πρόσφατη μελέτη έδειξε ότι ο FXa δεν επάγει την έκφραση της E-σελεκτίνης από τα HUVECs [445].

Επιπρόσθετα, η παρούσα μελέτη απέδειξε για πρώτη φορά ότι η έκκριση του MCP-1 είναι αυξημένη στα μη ενεργοποιημένα OECs σε σχέση με τα μη ενεργοποιημένα HUVECs, παρατήρηση που έρχεται σε συμφωνία με την αυξημένη έκφραση του ICAM-1 στα μη ενεργοποιημένα OECs. Το MCP-1 αποτελεί ένα προφλεγμονώδες μόριο το οποίο όμως εμφανίζει και αγγειογενετικές ιδιότητες [446]. Συνεπώς, μία υπόθεση που θα εξηγούσε την αυξημένη έκκριση του MCP-1 στα μη ενεργοποιημένα OECs θα μπορούσε να είναι η συμβολή του στη στρατολόγηση των OECs στο ενδοθήλιο, ένα σημαντικό βήμα για την αναγέννηση του ενδοθηλίου και την αγγειογένεση. Επιπρόσθετα, η παρούσα μελέτη απέδειξε ότι οι παράγοντες θρομβίνη και Xa αποτελούν διαμεσολαβητές της έκκρισης του MCP-1 από τα OECs. Συνεπώς, η επαγόμενη από τους παραπάνω παράγοντες έκκριση του MCP-1 θα μπορούσε να σχετίζεται με τη στρατολόγηση των OECs στο ενδοθήλιο. Έχει αποδειχθεί ότι η θρομβίνη και ο FXa επάγουν την έκκριση του MCP-1 από τα ώριμα ενδοθηλιακά κύτταρα [255, 268]. Το dabigatran και το rivaroxaban ανέστειλαν την επαγόμενη από τη θρομβίνη και τον FXa, αντίστοιχα, έκκριση του MCP-1 από τα OECs. Το αποτέλεσμα αυτό έρχεται σε συμφωνία με δεδομένα που έχουν δείξει την ανασταλτική δράση των φαρμάκων αυτών στην έκκριση του MCP-1 από ώριμα ενδοθηλιακά κύτταρα [319, 447]. Έχει προταθεί ότι η επαγόμενη από τον FXa έκκριση του MCP-1 από τα HUVECs, διαμεσολαβείται από τον PAR-1. Τα αποτελέσματα της παρούσας διατριβής επιβεβαιώνουν την παραπάνω παρατήρηση, καθώς το voraparaxar ανέστειλε πλήρως την επαγόμενη από τον FXa έκκριση του MCP-1 από τα OECs και από τα HUVECs. Όπως αναμενόταν, το voraparaxar ανέστειλε και την επαγόμενη από τη θρομβίνη έκκριση του MCP-1. Η αναστολή αυτή δεν ήταν πλήρης ακόμη και στη μέγιστη δόση του voraparaxar, στα OECs, ενώ στα HUVECs παρατηρήθηκε πλήρης αναστολή της επαγόμενης από τη θρομβίνη έκκρισης του MCP-1. Τα αποτελέσματα αυτά έρχονται σε συμφωνία με τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τη μελέτη της έκφρασης του ICAM-1 και ενισχύουν την υπόθεση ότι ο PAR-4 θα μπορούσε να διαδραματίζει κάποιο ρόλο στην δράση της θρομβίνης στα OECs.

Μία εξαιρετικά ενδιαφέρουσα παρατήρηση της παρούσας εργασίας ήταν η δράση του rivaroxaban στην επαγόμενη από τη θρομβίνη έκφραση του ICAM-1 και την έκκριση του MCP-1. Το rivaroxaban φαίνεται να ενισχύει τη δράση της θρομβίνης, οδηγώντας τόσο σε αυξημένη έκφραση του ICAM-1 όσο και έκκριση του MCP-1 από τα OECs και τα HUVECs. Μία πολύ

πρόσφατη μελέτη απέδειξε ότι, το rivaroxaban μπορεί να αναστείλει την επαγόμενη από τη θρομβίνη αιμοπεταλιακή συσσώρευση ασθενών με μη AF που ελάμβαναν το φάρμακο για τουλάχιστον 7 ημέρες [328]. Ο μηχανισμός που διέπει αυτήν την πλειοτροπική δράση του φαρμάκου δεν είναι γνωστός και θα μπορούσε να σχετίζεται με την αναστολή της δράσης της θρομβίνης. Επιπλέον, όπως προαναφέρθηκε το dabigatran ενισχύει τη δράση της θρομβίνης, πιθανότατα διαμέσου της αύξησης της μεμβρανικής έκφρασης του PAR-1 στην επιφάνεια των αιμοπεταλίων [325]. Συνεπώς, η ενισχυτική δράση του rivaroxaban θα μπορούσε να οφείλεται επίσης στην αύξηση της έκφρασης του PAR-1 στην επιφάνεια των ενδοθηλιακών κυττάρων. Η παραπάνω υπόθεση απαιτεί περαιτέρω πειράματα για να επιβεβαιωθεί. Τέλος, η ενισχυτική δράση του rivaroxaban στην επαγόμενη από τη θρομβίνη έκφραση του ICAM-1 και έκκριση του MCP-1 από τα OECs και τα HUVECs ανεστάλη από το voraparaxar, αποτελώντας ένδειξη ότι το φαινόμενο αυτό διαμεσολαβείται από τον PAR-1.

Ακολούθως, μελετήθηκε η δράση των παραγόντων θρομβίνη και Xa στην έκκριση της PGI₂ και του vWF από τα OECs. Η θρομβίνη οδήγησε στην έκκριση της PGI₂ από τα OECs και από τα HUVECs, ενώ ο FXa οδήγησε σε μη στατιστικά σημαντική αύξηση της έκκρισης της PGI₂ από τα κύτταρα αυτά. Η επαγόμενη από τη θρομβίνη έκκριση της PGI₂ ήταν στατιστικά σημαντικά υψηλότερη στα OECs σε σχέση με τα HUVECs. Μελέτες έχουν αποδείξει τη δράση της θρομβίνης στην έκκριση της PGI₂ από τα ώριμα ενδοθηλιακά κύτταρα [448, 449]. Αντίθετα, μελέτες για τη δράση του FXa στην έκφραση αυτή δεν έχουν πραγματοποιηθεί. Όσον αφορά στη δράση της θρομβίνης στην έκκριση του vWF, η παρούσα μελέτη δεν επιβεβαιώνει την αύξησή της όπως προτείνει η βιβλιογραφία για τα HUVECs [450, 451]. Συγκεκριμένα, βρέθηκε μη στατιστικά σημαντική αύξηση της έκκρισης του vWF από τη θρομβίνη, ενώ ο FXa δεν εμφάνισε καμία δράση.

Συμπερασματικά, όπως εκτενώς αναφέρθηκε, η ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων και των ενδοθηλιακών κυττάρων είναι διαδικασίες που συμβάλλουν στην αθηροθρόμβωση. Συνεπώς, οι παράγοντες πήξης θρομβίνη και FXa μπορούν διαμέσου της δράσης τους στα παραπάνω κύτταρα να αποτελέσουν διαμεσολαβητές της θρόμβωσης και της φλεγμονής. Ταυτόχρονα, η δράση των παραπάνω παραγόντων στα πρόδρομα ενδοθηλιακά κύτταρα θα μπορούσε να έχει ευεργετική δράση διαμέσου της στρατολόγησής τους στα σημεία ενδοθηλιακής βλάβης με επακόλουθο την αναγέννηση του ενδοθηλίου. Η παρούσα μελέτη καλύπτει ένα ευρύ φάσμα μη αιμοστατικών κυτταρικών δράσεων που επάγονται από τους παράγοντες θρομβίνη και Xa και σχετίζονται με την αθηροθρόμβωση. Όλο και περισσότερες μελέτες επικεντρώνονται στη διερεύνηση των

πλειοτροπικών δράσεων των φαρμάκων που αναστέλλουν τη δράση της θρομβίνης και του FXa, γεγονός που υποδηλώνει την αναγκαιότητα σχεδιασμού κλινικών μελετών που θα επιβεβαιώσουν την ευεργετική δράση των φαρμάκων αυτών σε διαδικασίες που σχετίζονται με την αθηροθρόμβωση.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τα ενδοθηλιακά κύτταρα και τα αιμοπετάλια διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην αθηροθρόμβωση. Η ενδοθηλιακή δυσλειτουργία συμβάλλει στα πρώτα στάδια της αθηρωμάτωσης, διαμέσου της στρατολόγησης των λευκοκυττάρων στο ενδοθήλιο. Η ρήξη της αθηρωματικής πλάκας οδηγεί στην ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων και τη θρόμβωση. Τα πρόδρομα ενδοθηλιακά κύτταρα (endothelial progenitor cells, EPCs) αποτελούν πολυδύναμα κύτταρα τα οποία διαφοροποιούνται σε ώριμα, συμμετέχοντας στην αναγέννηση του ενδοθηλίου. Είναι αποδεδειγμένο ότι τα κυκλοφορούντα CD34⁺ κύτταρα μετά από την αλληλεπίδρασή τους με τα αιμοπετάλια διαφοροποιούνται σε EPCs, ενώ η παραπάνω αλληλεπίδραση οδηγεί στην περαιτέρω ωρίμανση τους σε ώριμα ενδοθηλιακά κύτταρα.

Οι παράγοντες πήξης Χα (factor Χα, FXa) και θρομβίνη, εκτός του αιμοστατικού τους ρόλου, εμφανίζουν μη αιμοστατικές κυτταρικές δράσεις που διαμεσολαβούνται από τους υποδοχείς που ενεργοποιούνται από πρωτεάσες (protease-activated receptors, PARs) και εντοπίζονται σε πληθώρα κυτταρικών τύπων, συμπεριλαμβανομένων των αιμοπεταλίων και των ενδοθηλιακών κυττάρων.

Σκοπός της παρούσας διδακτορικής διατριβής ήταν η διερεύνηση της δράσης των FXa και θρομβίνης στην ενεργοποίηση και συσσώρευση των αιμοπεταλίων, καθώς και την ενεργοποίηση πρόδρομων ενδοθηλιακών κυττάρων. Για την επίτευξη του σκοπού αυτού, μελετήθηκε η επίδραση των παραγόντων αυτών στην αιμοπεταλιακή ενεργοποίηση και συσσώρευση σε PRP, πλυμένα αιμοπετάλια ή ολικό αίμα, καθώς και ο ρόλος των άμεσων από του στόματος αναστολέων του FXa και της θρομβίνης, rivaroxaban και dabigatran, αντίστοιχα. Ακόμη, μελετήθηκε ο ρόλος του υποδοχέα PAR-1 στην επαγόμενη από τον FXa ή τη θρομβίνη αιμοπεταλιακή ενεργοποίηση και συσσώρευση, με τη χρήση του εκλεκτικού ανταγωνιστή του υποδοχέα, voraparaxar. Η αιμοπεταλιακή ενεργοποίηση και συσσώρευση εκτιμήθηκε με τις μεθόδους της συσσωρευομετρίας οπτικής διαπερατότητας, συσσωρευομετρίας εμπέδησης και κυτταρομετρίας ροής. Επιπρόσθετα, μελετήθηκε ο ρόλος του PAR-1 στη διαφοροποίηση των CD34⁺ κυττάρων προς EPCs, καθώς και στη δημιουργία συζευγμάτων CD34⁺ κυττάρων/αιμοπεταλίων, με τη μέθοδο της κυτταρομετρίας ροής. Εν συνεχεία, μελετήθηκε η δράση των FXa και θρομβίνης στην ενεργοποίηση προχωρημένης ωρίμανσης ενδοθηλιακών κυττάρων (late-outgrowth endothelial cells, OECs), χρησιμοποιώντας ως δείκτες ενεργοποίησης τη μεμβρανική έκφραση του μορίου προσκόλλησης ICAM-1 και την έκκριση του MCP-1. Πραγματοποιήθηκε μελέτη του ρόλου των

rinaroxaban και dabigatran, καθώς και του PAR-1, στην επαγόμενη από τους δύο παράγοντες ενδοθηλιακή ενεργοποίηση.

Η παρούσα μελέτη απέδειξε ότι τόσο ο FXa όσο και η θρομβίνη αποτελούν ισχυρούς αγωνιστές της αιμοπεταλιακής ενεργοποίησης και συσσώρευσης, με τον FXa να έχει μία χρονικά καθυστερημένη δράση. Η δράση των δύο παραγόντων βρέθηκε να διαμεσολαβείται από τον PAR-1. Επιπρόσθετα, τα rinaroxaban και dabigatran ανέστειλαν δόσο-εξαρτώμενα την αιμοπεταλιακή συσσώρευση που προκαλείται από τον FXa και τη θρομβίνη, χωρίς να παρουσιάζεται εκλεκτικότητα ως προς το φάρμακο-στόχο. Επιπρόσθετα, ο PAR-1 βρέθηκε να διαμεσολαβεί και τη διαφοροποίηση των CD34⁺ κυττάρων προς EPCs, αλλά και τη δημιουργία συζευγμάτων CD34⁺ κυττάρων/αιμοπεταλίων. Ακόμη, η παρούσα μελέτη απέδειξε ότι ο FXa και η θρομβίνη επάγουν την έκφραση του ICAM-1 και την έκκριση του MCP-1 από τα OECs, συμβάντα που διαμεσολαβούνται κυρίως από τον PAR-1. Το voraparaxar δεν ανέστειλε πλήρως την επαγόμενη από τη θρομβίνη έκφραση του ICAM-1 και την έκκριση του MCP-1 από τα OECs, σε αντίθεση με τα HUVECs στα οποία η αναστολή ήταν πλήρης, αποτέλεσμα που προτείνει και τη συμμετοχή του PAR-4 στα OECs. Τα rinaroxaban και dabigatran ανέστειλαν δόσο-εξαρτώμενα την επαγόμενη από τον FXa και τη θρομβίνη, αντίστοιχα, έκφραση του ICAM-1 και την έκκριση του MCP-1. Ένα ενδιαφέρον αποτέλεσμα που παρατηρήθηκε για πρώτη φορά ήταν ότι το rinaroxaban ενίσχυσε την επαγόμενη από τη θρομβίνη έκφραση του ICAM-1 και την έκκριση του MCP-1. Η ενισχυτική δράση του rinaroxaban ανεστάλη από το voraparaxar, γεγονός που υποδηλώνει τη συμμετοχή του PAR-1 στο φαινόμενο αυτό.

Συμπερασματικά, η ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων και των ενδοθηλιακών κυττάρων από τον FXa και τη θρομβίνη θα μπορούσε να συμβάλει στην αθηροθρόμβωση. Επιπρόσθετα, η δράση των παραγόντων αυτών στα πρόδρομα ενδοθηλιακά κύτταρα θα μπορούσε να είναι ευεργετική για την αναγέννηση του ενδοθηλίου. Παρά το γεγονός ότι η παρούσα μελέτη διερεύνησε εκτενώς ένα ευρύ φάσμα μη αιμοστατικών κυτταρικών δράσεων του FXa και της θρομβίνης, περισσότερες μελέτες απαιτούνται για να διαλευκανθεί πλήρως ο ρόλος των παραγόντων αυτών, αλλά και η συμβολή των φαρμάκων που στοχεύουν τη δράση τους στην αθηροθρόμβωση, την αναγέννηση του ενδοθηλίου και την αγγειογένεση.

ABSTRACT

Endothelial cells play a crucial role in atherosclerosis. Endothelial dysfunction contributes to the first stages of plaque formation through the recruitment of leukocytes to the endothelium. The rupture of the atherosclerotic plaque leads to platelet activation and thrombosis. Endothelial progenitor cells (EPCs) are pluripotent cells that differentiate into mature endothelial cells, contributing to endothelial regeneration. It has been proved that circulating CD34⁺ cells differentiate into EPCs after their interaction with platelets and that this interaction leads to further maturation into endothelial cells.

Coagulation factors Xa (FXa) and thrombin, apart from their haemostatic role, exhibit also non-haemostatic cellular effects that are mediated through protease-activated receptors (PARs), which are found on various cell types, such as platelets and endothelial cells.

The aim of the present study was to investigate the role of FXa and thrombin in platelet activation and aggregation, as well as their role in EPC activation. For this purpose, the role of these factors in platelet activation and aggregation, as well as the effect of the direct oral anticoagulants rivaroxaban and dabigatran, which target FXa and thrombin respectively, was studied using PRP, washed platelets and whole blood. Additionally, the role of PAR-1 in FXa- or thrombin-induced platelet activation and aggregation was studied using the selective PAR-1 antagonist, vorapaxar. Platelet activation and aggregation were evaluated using light transmittance aggregometry, impedance aggregometry and flow cytometry. Moreover, the role of PAR-1 in the differentiation of CD34⁺ cells into EPCs, as well as on the formation of CD34⁺ cells/platelets conjugates, were also studied using flow cytometry. Consequently, the role of FXa and thrombin in late-outgrowth endothelial cell activation (OECs) was investigated using the membrane expression of the adhesion molecule ICAM-1, as well as the expression of MCP-1, as activation markers. The role of rivaroxaban and dabigatran, as well as the role of PAR-1 on OEC activation by FXa and thrombin, were also evaluated.

The present study proved that FXa and thrombin are potent platelet agonists and that FXa exhibits a delayed aggregatory effect. Platelet activation by these factors is mediated mainly via PAR-1. Furthermore, rivaroxaban and dabigatran inhibit FXa- and thrombin-induced platelet aggregation in a dose-dependent manner, without showing selectivity over one factor. PAR-1 also mediates the differentiation of CD34⁺ cells into EPCs, as well as the formation of CD34⁺ cells/platelets conjugates. The present study also proved that FXa and thrombin induce the

expression of ICAM-1 and MCP-1 from OECs, mainly through PAR-1 activation. Vorapaxar does not fully inhibit thrombin-induced ICAM-1 expression and MCP-1 secretion from OECs, whereas it fully inhibits the above expression from HUVECs, a result that suggests the contribution of PAR-4 in this expression from OECs. Rivaroxaban and dabigatran inhibit in a dose-dependent manner FXa- and thrombin-induced ICAM-1 expression and MCP-1 secretion, respectively. An interesting finding that was observed for the first time was the enhancement of the thrombin-induced ICAM-1 expression and MCP-1 secretion by rivaroxaban. This enhancement effect was inhibited by vorapaxar, showing the participation of PAR-1 in this action.

In conclusion, platelet and endothelial cell activation by FXa and thrombin could contribute in atherothrombosis. In addition, their action on OECs could be beneficial on endothelial regeneration. Even though in the present study various cellular effects of FXa and thrombin were investigated, more studies are required in order to fully decipher their role, as well as the contribution of their respective drugs, in atherothrombosis, endothelial regeneration and angiogenesis.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΑΝΑΦΟΡΕΣ

1. Long, M.W., N. Williams, and S. Ebbe, *Immature megakaryocytes in the mouse: physical characteristics, cell cycle status, and in vitro responsiveness to thrombopoietic stimulatory factor*. Blood, 1982. **59**(3): p. 569-75.
2. Schwer, H.D., et al., *A lineage-restricted and divergent beta-tubulin isoform is essential for the biogenesis, structure and function of blood platelets*. Curr Biol, 2001. **11**(8): p. 579-86.
3. Tablin, F., M. Castro, and R.M. Leven, *Blood platelet formation in vitro. The role of the cytoskeleton in megakaryocyte fragmentation*. J Cell Sci, 1990. **97 (Pt 1)**: p. 59-70.
4. Kelley, M.J., et al., *Mutation of MYH9, encoding non-muscle myosin heavy chain A, in May-Hegglin anomaly*. Nat Genet, 2000. **26**(1): p. 106-8.
5. Italiano, J.E., Jr., et al., *Blood platelets are assembled principally at the ends of proplatelet processes produced by differentiated megakaryocytes*. J Cell Biol, 1999. **147**(6): p. 1299-312.
6. Gordge, M.P., *Megakaryocyte apoptosis: sorting out the signals*. Br J Pharmacol, 2005. **145**(3): p. 271-3.
7. Patel, S.R., J.H. Hartwig, and J.E. Italiano, Jr., *The biogenesis of platelets from megakaryocyte proplatelets*. J Clin Invest, 2005. **115**(12): p. 3348-54.
8. Thomas, M.R. and R.F. Storey, *The role of platelets in inflammation*. Thromb Haemost, 2015. **114**(3): p. 449-58.
9. Kaushansky, K., *The molecular mechanisms that control thrombopoiesis*. J Clin Invest, 2005. **115**(12): p. 3339-47.
10. Varga-Szabo, D., I. Pleines, and B. Nieswandt, *Cell adhesion mechanisms in platelets*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2008. **28**(3): p. 403-12.
11. Kaplan, Z.S. and S.P. Jackson, *The role of platelets in atherothrombosis*. Hematology Am Soc Hematol Educ Program, 2011. **2011**: p. 51-61.
12. White, J.G., *Platelet Structure*, in *Platelets*, A.D. Michelson, Editor. 2013, Academic Press: Philadelphia. p. 117-44.
13. Nurden, A.T., *Platelet membrane glycoproteins: a look back into the past and a view to the future*. Thromb Haemost, 2007. **98**(1): p. 49-54.
14. Thon, J.N. and J.E. Italiano, *Platelets: production, morphology and ultrastructure*. Handb Exp Pharmacol, 2012(210): p. 3-22.
15. Heemskerk, J.W., E.M. Bevers, and T. Lindhout, *Platelet activation and blood coagulation*. Thromb Haemost, 2002. **88**(2): p. 186-93.
16. Escolar, G., M. Krumwiede, and J.G. White, *Organization of the actin cytoskeleton of resting and activated platelets in suspension*. Am J Pathol, 1986. **123**(1): p. 86-94.
17. White, J.G., *Fine structural alterations induced in platelets by adenosine diphosphate*. Blood, 1968. **31**(5): p. 604-22.
18. White, J.G. and M. Krumwiede, *Further studies of the secretory pathway in thrombin-stimulated human platelets*. Blood, 1987. **69**(4): p. 1196-203.
19. White, J.G., *Platelet glycosomes*. Platelets, 1999. **10**(4): p. 242-6.
20. King, S.M. and G.L. Reed, *Development of platelet secretory granules*. Semin Cell Dev Biol, 2002. **13**(4): p. 293-302.
21. Blair, P. and R. Flaumenhaft, *Platelet alpha-granules: basic biology and clinical correlates*. Blood Rev, 2009. **23**(4): p. 177-89.
22. Frojmovic, M.M. and J.G. Milton, *Human platelet size, shape, and related functions in health and disease*. Physiol Rev, 1982. **62**(1): p. 185-261.
23. Harrison, P. and E.M. Cramer, *Platelet alpha-granules*. Blood Rev, 1993. **7**(1): p. 52-62.
24. Reed, G.L., *Platelet secretory mechanisms*. Semin Thromb Hemost, 2004. **30**(4): p. 441-50.

25. Maynard, D.M., et al., *Proteomic analysis of platelet alpha-granules using mass spectrometry*. J Thromb Haemost, 2007. **5**(9): p. 1945-55.
26. Coppinger, J.A., et al., *Characterization of the proteins released from activated platelets leads to localization of novel platelet proteins in human atherosclerotic lesions*. Blood, 2004. **103**(6): p. 2096-104.
27. Flaumenhaft, R., *Platelet secretion*, in *Platelets*, A.D. Michelson, Editor. 2013, Academic Press: Philadelphia. p. 343-66.
28. Golebiewska, E.M. and A.W. Poole, *Platelet secretion: From haemostasis to wound healing and beyond*. Blood Rev, 2015. **29**(3): p. 153-62.
29. Jonnalagadda, D., L.T. Izu, and S.W. Whiteheart, *Platelet secretion is kinetically heterogeneous in an agonist-responsive manner*. Blood, 2012. **120**(26): p. 5209-16.
30. McNicol, A. and S.J. Israels, *Platelet dense granules: structure, function and implications for haemostasis*. Thromb Res, 1999. **95**(1): p. 1-18.
31. Rendu, F. and B. Brohard-Bohn, *The platelet release reaction: granules' constituents, secretion and functions*. Platelets, 2001. **12**(5): p. 261-73.
32. Heijnen, H. and P. van der Sluijs, *Platelet secretory behaviour: as diverse as the granules ... or not?* J Thromb Haemost, 2015. **13**(12): p. 2141-51.
33. Ciferri, S., et al., *Platelets release their lysosomal content in vivo in humans upon activation*. Thromb Haemost, 2000. **83**(1): p. 157-64.
34. Feng, W., et al., *Dissection of autophagy in human platelets*. Autophagy, 2014. **10**(4): p. 642-51.
35. Leytin, V., *Apoptosis in the anucleate platelet*. Blood Rev, 2012. **26**(2): p. 51-63.
36. White, J.G. and G. Escolar, *The blood platelet open canalicular system: a two-way street*. Eur J Cell Biol, 1991. **56**(2): p. 233-42.
37. Escolar, G. and J.G. White, *The platelet open canalicular system: a final common pathway*. Blood Cells, 1991. **17**(3): p. 467-85; discussion 486-95.
38. Gerrard, J.M., J.G. White, and D.A. Peterson, *The platelet dense tubular system: its relationship to prostaglandin synthesis and calcium flux*. Thromb Haemost, 1978. **40**(2): p. 224-31.
39. Jackson, S.P. and S.M. Schoenwaelder, *Antiplatelet therapy: in search of the 'magic bullet'*. Nat Rev Drug Discov, 2003. **2**(10): p. 775-89.
40. Hynes, R.O., *Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines*. Cell, 2002. **110**(6): p. 673-87.
41. Bennett, J.S., B.W. Berger, and P.C. Billings, *The structure and function of platelet integrins*. J Thromb Haemost, 2009. **7 Suppl 1**: p. 200-5.
42. Campbell, I.D. and M.J. Humphries, *Integrin structure, activation, and interactions*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2011. **3**(3).
43. Shattil, S.J., C. Kim, and M.H. Ginsberg, *The final steps of integrin activation: the end game*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2010. **11**(4): p. 288-300.
44. Barczyk, M., S. Carracedo, and D. Gullberg, *Integrins*. Cell Tissue Res, 2010. **339**(1): p. 269-80.
45. Srichai, M.B., Zent, R., *Integrin Structure and Function*, in *Cell-Extracellular Matrix Interactions in Cancer*, R. Zent, Pozzi, A., Editor. 2010, Springer: New York, NY.
46. Plow, E.F. and T. Byzova, *The biology of glycoprotein IIb-IIIa*. Coron Artery Dis, 1999. **10**(8): p. 547-51.
47. Wagner, C.L., et al., *Analysis of GPIIb/IIIa receptor number by quantification of 7E3 binding to human platelets*. Blood, 1996. **88**(3): p. 907-14.
48. Cramer, E.M., et al., *Alpha-granule pool of glycoprotein IIb-IIIa in normal and pathologic platelets and megakaryocytes*. Blood, 1990. **75**(6): p. 1220-7.
49. Sosnoski, D.M., et al., *Chromosomal localization of the genes for the vitronectin and fibronectin receptors alpha subunits and for platelet glycoproteins IIb and IIIa*. J Clin Invest, 1988. **81**(6): p. 1993-8.

50. Duperray, A., et al., *Biosynthesis and processing of platelet GPIIb-IIIa in human megakaryocytes*. J Cell Biol, 1987. **104**(6): p. 1665-73.
51. Collier, B.S. and S.J. Shattil, *The GPIIb/IIIa (integrin alphaIIb beta3) odyssey: a technology-driven saga of a receptor with twists, turns, and even a bend*. Blood, 2008. **112**(8): p. 3011-25.
52. Zimrin, A.B., et al., *The genomic organization of platelet glycoprotein IIIa*. J Biol Chem, 1990. **265**(15): p. 8590-5.
53. Xiao, T., et al., *Structural basis for allostery in integrins and binding to fibrinogen-mimetic therapeutics*. Nature, 2004. **432**(7013): p. 59-67.
54. Kobe, B. and A.V. Kajava, *The leucine-rich repeat as a protein recognition motif*. Curr Opin Struct Biol, 2001. **11**(6): p. 725-32.
55. Clemetson, K.J., Clementson, J.M., *Platelet Receptors*, in *Platelets*, A.D. Michelson, Editor. 2013, Academic Press: Philadelphia. p. 169-94.
56. Li, R. and J. Emsley, *The organizing principle of the platelet glycoprotein Ib-IX-V complex*. J Thromb Haemost, 2013. **11**(4): p. 605-14.
57. Andrews, R.K., et al., *Glycoprotein Ib-IX-V*. Int J Biochem Cell Biol, 2003. **35**(8): p. 1170-4.
58. Uff, S., et al., *Crystal structure of the platelet glycoprotein Ib(alpha) N-terminal domain reveals an unmasking mechanism for receptor activation*. J Biol Chem, 2002. **277**(38): p. 35657-63.
59. Luo, S.Z., et al., *Glycoprotein Ibalpha forms disulfide bonds with 2 glycoprotein Ibbeta subunits in the resting platelet*. Blood, 2007. **109**(2): p. 603-9.
60. Blair, P., et al., *Stimulation of Toll-like receptor 2 in human platelets induces a thromboinflammatory response through activation of phosphoinositide 3-kinase*. Circ Res, 2009. **104**(3): p. 346-54.
61. Del Conde, I., et al., *Tissue-factor-bearing microvesicles arise from lipid rafts and fuse with activated platelets to initiate coagulation*. Blood, 2005. **106**(5): p. 1604-11.
62. Cognasse, F., et al., *Evidence of Toll-like receptor molecules on human platelets*. Immunol Cell Biol, 2005. **83**(2): p. 196-8.
63. Beaulieu, L.M. and J.E. Freedman, *The role of inflammation in regulating platelet production and function: Toll-like receptors in platelets and megakaryocytes*. Thromb Res, 2010. **125**(3): p. 205-9.
64. Schroeder, H.W., Jr. and L. Cavacini, *Structure and function of immunoglobulins*. J Allergy Clin Immunol, 2010. **125**(2 Suppl 2): p. S41-52.
65. Ezumi, Y., T. Uchiyama, and H. Takayama, *Molecular cloning, genomic structure, chromosomal localization, and alternative splice forms of the platelet collagen receptor glycoprotein VI*. Biochem Biophys Res Commun, 2000. **277**(1): p. 27-36.
66. Nieswandt, B. and S.P. Watson, *Platelet-collagen interaction: is GPVI the central receptor?* Blood, 2003. **102**(2): p. 449-61.
67. Berlanga, O., et al., *The Fc receptor gamma-chain is necessary and sufficient to initiate signalling through glycoprotein VI in transfected cells by the snake C-type lectin, convulxin*. Eur J Biochem, 2002. **269**(12): p. 2951-60.
68. Zheng, Y.M., et al., *Expression of the platelet receptor GPVI confers signaling via the Fc receptor gamma-chain in response to the snake venom convulxin but not to collagen*. J Biol Chem, 2001. **276**(16): p. 12999-3006.
69. Andrews, R.K., et al., *Interaction of calmodulin with the cytoplasmic domain of platelet glycoprotein VI*. Blood, 2002. **99**(11): p. 4219-21.
70. Suzuki-Inoue, K., et al., *Association of Fyn and Lyn with the proline-rich domain of glycoprotein VI regulates intracellular signaling*. J Biol Chem, 2002. **277**(24): p. 21561-6.
71. Moroi, M. and S.M. Jung, *Platelet glycoprotein VI: its structure and function*. Thromb Res, 2004. **114**(4): p. 221-33.

72. Yang, R. and B.T. Liang, *Cardiac P2X(4) receptors: targets in ischemia and heart failure?* Circ Res, 2012. **111**(4): p. 397-401.
73. Cattaneo, M., *The Platelet P2 Receptors*, in *Platelets*, A.D. Michelson, Editor. 2013, Academic Press: Philadelphia. p. 261-81.
74. Jacobson, K.A., et al., *Pharmacochimistry of the platelet purinergic receptors*. Purinergic Signal, 2011. **7**(3): p. 305-24.
75. Qi, A.D., et al., *Differential coupling of the human P2Y(11) receptor to phospholipase C and adenylyl cyclase*. Br J Pharmacol, 2001. **132**(1): p. 318-26.
76. Leon, C., et al., *Cloning and sequencing of a human cDNA encoding endothelial P2Y1 purinoceptor*. Gene, 1996. **171**(2): p. 295-7.
77. Ding, Z., et al., *Arg333 and Arg334 in the COOH terminus of the human P2Y1 receptor are crucial for Gq coupling*. Am J Physiol Cell Physiol, 2005. **288**(3): p. C559-67.
78. Nurden, P., et al., *Immunolocalization of P2Y1 and TPalpha receptors in platelets showed a major pool associated with the membranes of alpha -granules and the open canalicular system*. Blood, 2003. **101**(4): p. 1400-8.
79. Sage, S.O., R. Reast, and T.J. Rink, *ADP evokes biphasic Ca2+ influx in fura-2-loaded human platelets. Evidence for Ca2+ entry regulated by the intracellular Ca2+ store*. Biochem J, 1990. **265**(3): p. 675-80.
80. Zhong, X., et al., *N-linked glycosylation of platelet P2Y12 ADP receptor is essential for signal transduction but not for ligand binding or cell surface expression*. FEBS Lett, 2004. **562**(1-3): p. 111-7.
81. Haberstock-Debic, H., et al., *A clopidogrel-insensitive inducible pool of P2Y12 receptors contributes to thrombus formation: inhibition by elinogrel, a direct-acting, reversible P2Y12 antagonist*. J Pharmacol Exp Ther, 2011. **339**(1): p. 54-61.
82. Zhang, K., et al., *Structure of the human P2Y12 receptor in complex with an antithrombotic drug*. Nature, 2014. **509**(7498): p. 115-8.
83. Kauffenstein, G., et al., *Adenine triphosphate nucleotides are antagonists at the P2Y receptor*. J Thromb Haemost, 2004. **2**(11): p. 1980-8.
84. Schmidt, P., et al., *Identification of determinants required for agonistic and inverse agonistic ligand properties at the ADP receptor P2Y12*. Mol Pharmacol, 2013. **83**(1): p. 256-66.
85. Zhang, J., et al., *Agonist-bound structure of the human P2Y12 receptor*. Nature, 2014. **509**(7498): p. 119-22.
86. Cattaneo, M., *P2Y12 receptors: structure and function*. J Thromb Haemost, 2015. **13 Suppl 1**: p. S10-6.
87. Savi, P., A.M. Pflieger, and J.M. Herbert, *cAMP is not an important messenger for ADP-induced platelet aggregation*. Blood Coagul Fibrinolysis, 1996. **7**(2): p. 249-52.
88. Cattaneo, M. and A. Lecchi, *Inhibition of the platelet P2Y12 receptor for adenosine diphosphate potentiates the antiplatelet effect of prostacyclin*. J Thromb Haemost, 2007. **5**(3): p. 577-82.
89. Khakh, B.S. and R.A. North, *P2X receptors as cell-surface ATP sensors in health and disease*. Nature, 2006. **442**(7102): p. 527-32.
90. Mahaut-Smith, M.P., S. Jones, and R.J. Evans, *The P2X1 receptor and platelet function*. Purinergic Signal, 2011. **7**(3): p. 341-56.
91. Rolf, M.G., C.A. Brearley, and M.P. Mahaut-Smith, *Platelet shape change evoked by selective activation of P2X1 purinoceptors with alpha,beta-methylene ATP*. Thromb Haemost, 2001. **85**(2): p. 303-8.
92. Mahaut-Smith, M.P., J. Martinez-Pinna, and I.S. Gurung, *A role for membrane potential in regulating GPCRs?* Trends Pharmacol Sci, 2008. **29**(8): p. 421-9.

93. Oury, C., et al., *P2X(1)-mediated activation of extracellular signal-regulated kinase 2 contributes to platelet secretion and aggregation induced by collagen*. *Blood*, 2002. **100**(7): p. 2499-505.
94. Toth-Zsomboki, E., et al., *P2X1-mediated ERK2 activation amplifies the collagen-induced platelet secretion by enhancing myosin light chain kinase activation*. *J Biol Chem*, 2003. **278**(47): p. 46661-7.
95. Erhardt, J.A., K. Pillarisetti, and J.R. Toomey, *Potentiation of platelet activation through the stimulation of P2X1 receptors*. *J Thromb Haemost*, 2003. **1**(12): p. 2626-35.
96. Soh, U.J., et al., *Signal transduction by protease-activated receptors*. *Br J Pharmacol*, 2010. **160**(2): p. 191-203.
97. Nakanishi-Matsui, M., et al., *PAR3 is a cofactor for PAR4 activation by thrombin*. *Nature*, 2000. **404**(6778): p. 609-13.
98. Ishihara, H., et al., *Protease-activated receptor 3 is a second thrombin receptor in humans*. *Nature*, 1997. **386**(6624): p. 502-6.
99. Seeley, S., et al., *Structural basis for thrombin activation of a protease-activated receptor: inhibition of intramolecular liganding*. *Chem Biol*, 2003. **10**(11): p. 1033-41.
100. Vu, T.K., et al., *Molecular cloning of a functional thrombin receptor reveals a novel proteolytic mechanism of receptor activation*. *Cell*, 1991. **64**(6): p. 1057-68.
101. Moschonas, I.C., J.A. Goudevenos, and A.D. Tselepis, *Protease-activated receptor-1 antagonists in long-term antiplatelet therapy. Current state of evidence and future perspectives*. *Int J Cardiol*, 2015. **185**: p. 9-18.
102. Trumel, C., et al., *A key role of adenosine diphosphate in the irreversible platelet aggregation induced by the PAR1-activating peptide through the late activation of phosphoinositide 3-kinase*. *Blood*, 1999. **94**(12): p. 4156-65.
103. Ishii, K., et al., *Inhibition of thrombin receptor signaling by a G-protein coupled receptor kinase. Functional specificity among G-protein coupled receptor kinases*. *J Biol Chem*, 1994. **269**(2): p. 1125-30.
104. Paing, M.M., et al., *beta -Arrestins regulate protease-activated receptor-1 desensitization but not internalization or Down-regulation*. *J Biol Chem*, 2002. **277**(2): p. 1292-300.
105. Wang, Y.J., et al., *Prohibitin is involved in the activated internalization and degradation of protease-activated receptor 1*. *Biochim Biophys Acta*, 2014. **1843**(7): p. 1393-401.
106. Zhang, P., Covic, L., Kuliopoulos A., *Protease-Activated Receptors*, in *Platelets*, A.D. Michelson, Editor. 2013, Academic Press: Philadelphia.
107. Covic, L., A.L. Gresser, and A. Kuliopulos, *Biphasic kinetics of activation and signaling for PAR1 and PAR4 thrombin receptors in platelets*. *Biochemistry*, 2000. **39**(18): p. 5458-67.
108. Shapiro, M.J., et al., *Protease-activated receptors 1 and 4 are shut off with distinct kinetics after activation by thrombin*. *J Biol Chem*, 2000. **275**(33): p. 25216-21.
109. Funk, C.D., *Prostaglandins and leukotrienes: advances in eicosanoid biology*. *Science*, 2001. **294**(5548): p. 1871-5.
110. Hirata, T., et al., *Two thromboxane A2 receptor isoforms in human platelets. Opposite coupling to adenylyl cyclase with different sensitivity to Arg60 to Leu mutation*. *J Clin Invest*, 1996. **97**(4): p. 949-56.
111. Kobayashi, T., et al., *Identification of domains conferring ligand binding specificity to the prostanoid receptor. Studies on chimeric prostacyclin/prostaglandin D receptors*. *J Biol Chem*, 1997. **272**(24): p. 15154-60.
112. Katsuyama, M., et al., *Cloning and expression of a cDNA for the human prostacyclin receptor*. *FEBS Lett*, 1994. **344**(1): p. 74-8.
113. Smyth, E.M. and G.A. FitzGerald, *Human prostacyclin receptor*. *Vitam Horm*, 2002. **65**: p. 149-65.

114. Iyu, D., et al., *The role of prostanoid receptors in mediating the effects of PGE(2) on human platelet function*. Platelets, 2010. **21**(5): p. 329-42.
115. Cattaneo, M. and C. Gachet, *ADP receptors and clinical bleeding disorders*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 1999. **19**(10): p. 2281-5.
116. Gasper, P.M., et al., *Allosteric networks in thrombin distinguish procoagulant vs. anticoagulant activities*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2012. **109**(52): p. 21216-22.
117. Dang, O.D., A. Vindigni, and E. Di Cera, *An allosteric switch controls the procoagulant and anticoagulant activities of thrombin*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**(13): p. 5977-81.
118. Hall, S.W., et al., *Thrombin interacts with thrombomodulin, protein C, and thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor via specific and distinct domains*. J Biol Chem, 1999. **274**(36): p. 25510-6.
119. Di Cera, E., *Thrombin*. Mol Aspects Med, 2008. **29**(4): p. 203-54.
120. Di Cera, E., *Thrombin as procoagulant and anticoagulant*. J Thromb Haemost, 2007. **5 Suppl 1**: p. 196-202.
121. Binnie, C.G. and S.T. Lord, *The fibrinogen sequences that interact with thrombin*. Blood, 1993. **81**(12): p. 3186-92.
122. Peyvandi, F., I. Garagiola, and L. Baronciani, *Role of von Willebrand factor in the haemostasis*. Blood Transfus, 2011. **9 Suppl 2**: p. s3-8.
123. Romijn, R.A., et al., *Identification of the collagen-binding site of the von Willebrand factor A3-domain*. J Biol Chem, 2001. **276**(13): p. 9985-91.
124. Mazzucato, M., et al., *Identification of domains responsible for von Willebrand factor type VI collagen interaction mediating platelet adhesion under high flow*. J Biol Chem, 1999. **274**(5): p. 3033-41.
125. Cruz, M.A., et al., *Interaction of the von Willebrand factor (vWF) with collagen. Localization of the primary collagen-binding site by analysis of recombinant vWF A domain polypeptides*. J Biol Chem, 1995. **270**(33): p. 19668.
126. Savage, B., E. Saldivar, and Z.M. Ruggeri, *Initiation of platelet adhesion by arrest onto fibrinogen or translocation on von Willebrand factor*. Cell, 1996. **84**(2): p. 289-97.
127. Jaffe, E.A., L.W. Hoyer, and R.L. Nachman, *Synthesis of von Willebrand factor by cultured human endothelial cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1974. **71**(5): p. 1906-9.
128. Kulkarni, S., et al., *A revised model of platelet aggregation*. J Clin Invest, 2000. **105**(6): p. 783-91.
129. Roberts, D.E., A. McNicol, and R. Bose, *Mechanism of collagen activation in human platelets*. J Biol Chem, 2004. **279**(19): p. 19421-30.
130. Farndale, R.W., et al., *The role of collagen in thrombosis and hemostasis*. J Thromb Haemost, 2004. **2**(4): p. 561-73.
131. FitzGerald, G.A., *Mechanisms of platelet activation: thromboxane A2 as an amplifying signal for other agonists*. Am J Cardiol, 1991. **68**(7): p. 11B-15B.
132. Ruggeri, Z.M. and G.L. Mendolicchio, *Adhesion mechanisms in platelet function*. Circ Res, 2007. **100**(12): p. 1673-85.
133. Bonnefoy, A., et al., *von Willebrand factor A1 domain can adequately substitute for A3 domain in recruitment of flowing platelets to collagen*. J Thromb Haemost, 2006. **4**(10): p. 2151-61.
134. Savage, B., F. Almus-Jacobs, and Z.M. Ruggeri, *Specific synergy of multiple substrate-receptor interactions in platelet thrombus formation under flow*. Cell, 1998. **94**(5): p. 657-66.
135. Siedlecki, C.A., et al., *Shear-dependent changes in the three-dimensional structure of human von Willebrand factor*. Blood, 1996. **88**(8): p. 2939-50.
136. Dumas, J.J., et al., *Crystal structure of the wild-type von Willebrand factor A1-glycoprotein Ibalpha complex reveals conformation differences with a complex bearing von Willebrand disease mutations*. J Biol Chem, 2004. **279**(22): p. 23327-34.

137. Popova, S.N., et al., *Physiology and pathology of collagen receptors*. Acta Physiol (Oxf), 2007. **190**(3): p. 179-87.
138. Kato, K., et al., *The contribution of glycoprotein VI to stable platelet adhesion and thrombus formation illustrated by targeted gene deletion*. Blood, 2003. **102**(5): p. 1701-7.
139. Keely, P.J. and L.V. Parise, *The alpha2beta1 integrin is a necessary co-receptor for collagen-induced activation of Syk and the subsequent phosphorylation of phospholipase Cgamma2 in platelets*. J Biol Chem, 1996. **271**(43): p. 26668-76.
140. Inoue, O., et al., *Integrin alpha2beta1 mediates outside-in regulation of platelet spreading on collagen through activation of Src kinases and PLCgamma2*. J Cell Biol, 2003. **160**(5): p. 769-80.
141. Jennings, L.K., *Mechanisms of platelet activation: need for new strategies to protect against platelet-mediated atherothrombosis*. Thromb Haemost, 2009. **102**(2): p. 248-57.
142. Stegner, D. and B. Nieswandt, *Platelet receptor signaling in thrombus formation*. J Mol Med (Berl), 2011. **89**(2): p. 109-21.
143. Yun, S.H., et al., *Platelet Activation: The Mechanisms and Potential Biomarkers*. Biomed Res Int, 2016. **2016**: p. 9060143.
144. Jackson, S.P., *The growing complexity of platelet aggregation*. Blood, 2007. **109**(12): p. 5087-95.
145. Xu, X.R., et al., *Platelets are versatile cells: New discoveries in hemostasis, thrombosis, immune responses, tumor metastasis and beyond*. Crit Rev Clin Lab Sci, 2016. **53**(6): p. 409-30.
146. Willoughby, S., A. Holmes, and J. Loscalzo, *Platelets and cardiovascular disease*. Eur J Cardiovasc Nurs, 2002. **1**(4): p. 273-88.
147. Gachet, C., *Antiplatelet drugs: which targets for which treatments?* J Thromb Haemost, 2015. **13** **Suppl 1**: p. S313-22.
148. Patrono, C., et al., *Antiplatelet Agents for the Treatment and Prevention of Coronary Atherothrombosis*. J Am Coll Cardiol, 2017. **70**(14): p. 1760-1776.
149. Michelson, A.D., *Antiplatelet therapies for the treatment of cardiovascular disease*. Nat Rev Drug Discov, 2010. **9**(2): p. 154-69.
150. Floyd, C.N. and A. Ferro, *Mechanisms of aspirin resistance*. Pharmacol Ther, 2014. **141**(1): p. 69-78.
151. Fiolaki, A., et al., *High on treatment platelet reactivity to aspirin and clopidogrel in ischemic stroke: A systematic review and meta-analysis*. J Neurol Sci, 2017. **376**: p. 112-116.
152. Dai, Y. and J. Ge, *Clinical use of aspirin in treatment and prevention of cardiovascular disease*. Thrombosis, 2012. **2012**: p. 245037.
153. Sandercock, P.A., et al., *Antiplatelet therapy for acute ischaemic stroke*. Cochrane Database Syst Rev, 2008(3): p. CD000029.
154. Ramis, J., et al., *Pharmacokinetics of triflusal and its main metabolite HTB in healthy subjects following a single oral dose*. Eur J Drug Metab Pharmacokinet, 1991. **16**(4): p. 269-73.
155. Murdoch, D. and G.L. Plosker, *Triflusal: a review of its use in cerebral infarction and myocardial infarction, and as thromboprophylaxis in atrial fibrillation*. Drugs, 2006. **66**(5): p. 671-92.
156. Valle, M., et al., *Access of HTB, main metabolite of triflusal, to cerebrospinal fluid in healthy volunteers*. Eur J Clin Pharmacol, 2005. **61**(2): p. 103-11.
157. Gonzalez-Correa, J.A. and J.P. De La Cruz, *Triflusal: an antiplatelet drug with a neuroprotective effect?* Cardiovasc Drug Rev, 2006. **24**(1): p. 11-24.
158. Costa, J., et al., *Triflusal for preventing serious vascular events in people at high risk*. Cochrane Database Syst Rev, 2005(3): p. CD004296.
159. Matias-Guiu, J., et al., *Comparison of triflusal and aspirin for prevention of vascular events in patients after cerebral infarction: the TACIP Study: a randomized, double-blind, multicenter trial*. Stroke, 2003. **34**(4): p. 840-8.

160. Close, S.L., *Pharmacogenetics and pharmacogenomics of thienopyridines: clinically relevant?* *Fundam Clin Pharmacol*, 2012. **26**(1): p. 19-26.
161. Franchi, F., F. Rollini, and D.J. Angiolillo, *Antithrombotic therapy for patients with STEMI undergoing primary PCI*. *Nat Rev Cardiol*, 2017. **14**(6): p. 361-379.
162. Kalantzi, K.I., et al., *Pharmacodynamic properties of antiplatelet agents: current knowledge and future perspectives*. *Expert Rev Clin Pharmacol*, 2012. **5**(3): p. 319-36.
163. Floyd, C.N., G. Passacquale, and A. Ferro, *Comparative pharmacokinetics and pharmacodynamics of platelet adenosine diphosphate receptor antagonists and their clinical implications*. *Clin Pharmacokinet*, 2012. **51**(7): p. 429-42.
164. Ferri, N., A. Corsini, and S. Bellosa, *Pharmacology of the new P2Y₁₂ receptor inhibitors: insights on pharmacokinetic and pharmacodynamic properties*. *Drugs*, 2013. **73**(15): p. 1681-709.
165. Bonello, L., et al., *Consensus and future directions on the definition of high on-treatment platelet reactivity to adenosine diphosphate*. *J Am Coll Cardiol*, 2010. **56**(12): p. 919-33.
166. Committee, C.S., *A randomised, blinded, trial of clopidogrel versus aspirin in patients at risk of ischaemic events (CAPRIE)*. CAPRIE Steering Committee. *Lancet*, 1996. **348**(9038): p. 1329-39.
167. Bhatt, D.L., et al., *Clopidogrel and aspirin versus aspirin alone for the prevention of atherothrombotic events*. *N Engl J Med*, 2006. **354**(16): p. 1706-17.
168. Diener, H.C., et al., *Aspirin and clopidogrel compared with clopidogrel alone after recent ischaemic stroke or transient ischaemic attack in high-risk patients (MATCH): randomised, double-blind, placebo-controlled trial*. *Lancet*, 2004. **364**(9431): p. 331-7.
169. Wang, Y., et al., *Clopidogrel with aspirin in acute minor stroke or transient ischemic attack*. *N Engl J Med*, 2013. **369**(1): p. 11-9.
170. Wiviott, S.D., et al., *Prasugrel compared with high loading- and maintenance-dose clopidogrel in patients with planned percutaneous coronary intervention: the Prasugrel in Comparison to Clopidogrel for Inhibition of Platelet Activation and Aggregation-Thrombolysis in Myocardial Infarction 44 trial*. *Circulation*, 2007. **116**(25): p. 2923-32.
171. Jakubowski, J.A., et al., *Prasugrel: a novel thienopyridine antiplatelet agent. A review of preclinical and clinical studies and the mechanistic basis for its distinct antiplatelet profile*. *Cardiovasc Drug Rev*, 2007. **25**(4): p. 357-74.
172. Small, D.S., et al., *Effect of intrinsic and extrinsic factors on the clinical pharmacokinetics and pharmacodynamics of prasugrel*. *Clin Pharmacokinet*, 2010. **49**(12): p. 777-98.
173. Bonello, L., et al., *High on-treatment platelet reactivity after prasugrel loading dose and cardiovascular events after percutaneous coronary intervention in acute coronary syndromes*. *J Am Coll Cardiol*, 2011. **58**(5): p. 467-73.
174. Trenk, D., et al., *A randomized trial of prasugrel versus clopidogrel in patients with high platelet reactivity on clopidogrel after elective percutaneous coronary intervention with implantation of drug-eluting stents: results of the TRIGGER-PCI (Testing Platelet Reactivity In Patients Undergoing Elective Stent Placement on Clopidogrel to Guide Alternative Therapy With Prasugrel) study*. *J Am Coll Cardiol*, 2012. **59**(24): p. 2159-64.
175. Wiviott, S.D., et al., *Prasugrel versus clopidogrel in patients with acute coronary syndromes*. *N Engl J Med*, 2007. **357**(20): p. 2001-15.
176. Husted, S., et al., *Pharmacodynamics, pharmacokinetics, and safety of the oral reversible P2Y₁₂ antagonist AZD6140 with aspirin in patients with atherosclerosis: a double-blind comparison to clopidogrel with aspirin*. *Eur Heart J*, 2006. **27**(9): p. 1038-47.
177. Teng, R. and K. Butler, *Pharmacokinetics, pharmacodynamics, tolerability and safety of single ascending doses of ticagrelor, a reversibly binding oral P2Y₁₂ receptor antagonist, in healthy subjects*. *Eur J Clin Pharmacol*, 2010. **66**(5): p. 487-96.

178. Storey, R.F., et al., *Inhibitory effects of ticagrelor compared with clopidogrel on platelet function in patients with acute coronary syndromes: the PLATO (PLATElet inhibition and patient Outcomes) PLATELET substudy*. J Am Coll Cardiol, 2010. **56**(18): p. 1456-62.
179. Johnston, S.C., et al., *Ticagrelor versus Aspirin in Acute Stroke or Transient Ischemic Attack*. N Engl J Med, 2016. **375**(1): p. 35-43.
180. Wallentin, L., et al., *Ticagrelor versus clopidogrel in patients with acute coronary syndromes*. N Engl J Med, 2009. **361**(11): p. 1045-57.
181. Jing, Y., et al., *Efficacy and safety of ticagrelor in patients with acute coronary syndrome: A meta-analysis of randomized controlled trials*. Clin Exp Pharmacol Physiol, 2018. **45**(2): p. 122-126.
182. Tricoci, P., et al., *Thrombin-receptor antagonist vorapaxar in acute coronary syndromes*. N Engl J Med, 2012. **366**(1): p. 20-33.
183. Morrow, D.A., et al., *Vorapaxar in the secondary prevention of atherothrombotic events*. N Engl J Med, 2012. **366**(15): p. 1404-13.
184. Gotoh, F., et al., *Cilostazol stroke prevention study: A placebo-controlled double-blind trial for secondary prevention of cerebral infarction*. J Stroke Cerebrovasc Dis, 2000. **9**(4): p. 147-57.
185. Xie, W., et al., *Long-Term Antiplatelet Mono- and Dual Therapies After Ischemic Stroke or Transient Ischemic Attack: Network Meta-Analysis*. J Am Heart Assoc, 2015. **4**(8): p. e002259.
186. Niu, P.P., et al., *Antiplatelet regimens in the long-term secondary prevention of transient ischaemic attack and ischaemic stroke: an updated network meta-analysis*. BMJ Open, 2016. **6**(3): p. e009013.
187. Bedenis, R., et al., *Cilostazol for intermittent claudication*. Cochrane Database Syst Rev, 2014(10): p. CD003748.
188. *The European Stroke Prevention Study (ESPS). Principal end-points. The ESPS Group*. Lancet, 1987. **2**(8572): p. 1351-4.
189. Diener, H.C., et al., *European Stroke Prevention Study. 2. Dipyridamole and acetylsalicylic acid in the secondary prevention of stroke*. J Neurol Sci, 1996. **143**(1-2): p. 1-13.
190. Verro, P., P.B. Gorelick, and D. Nguyen, *Aspirin plus dipyridamole versus aspirin for prevention of vascular events after stroke or TIA: a meta-analysis*. Stroke, 2008. **39**(4): p. 1358-63.
191. Krupiczkoj, M.A., C.J. Scotton, and R.C. Chambers, *Coagulation signalling following tissue injury: focus on the role of factor Xa*. Int J Biochem Cell Biol, 2008. **40**(6-7): p. 1228-37.
192. Wallin, R. and R. Turner, *Propeptide recognition by the vitamin K-dependent carboxylase in early processing of prothrombin and factor X*. Biochem J, 1990. **272**(2): p. 473-8.
193. Robberts, H.R., Monroe III, D.M., Hoffman, M., *Molecular biology and biochemistry of the coagulation factors and pathways of hemostasis*, in *Williams Hematology*. 2010, McGraw-Hill Education LLC: New York.
194. Venkateswarlu, D., et al., *Structure and dynamics of zymogen human blood coagulation factor X*. Biophys J, 2002. **82**(3): p. 1190-206.
195. Inoue, K. and T. Morita, *Identification of O-linked oligosaccharide chains in the activation peptides of blood coagulation factor X. The role of the carbohydrate moieties in the activation of factor X*. Eur J Biochem, 1993. **218**(1): p. 153-63.
196. Sinha, U. and D.L. Wolf, *Carbohydrate residues modulate the activation of coagulation factor X*. J Biol Chem, 1993. **268**(5): p. 3048-51.
197. Papadaki, S. and A.D. Tselepis, *Nonhemostatic Activities of Factor Xa: Are There Pleiotropic Effects of Anti-FXa Direct Oral Anticoagulants?* Angiology, 2019: p. 3319719840861.
198. Sunnerhagen, M., et al., *The relative orientation of Gla and EGF domains in coagulation factor X is altered by Ca²⁺ binding to the first EGF domain. A combined NMR-small angle X-ray scattering study*. Biochemistry, 1996. **35**(36): p. 11547-59.

199. Muller, M.P., et al., *Lipid specificity of the membrane binding domain of coagulation factor X*. J Thromb Haemost, 2017. **15**(10): p. 2005-2016.
200. Brandstetter, H., et al., *X-ray structure of active site-inhibited clotting factor Xa. Implications for drug design and substrate recognition*. J Biol Chem, 1996. **271**(47): p. 29988-92.
201. Bhunia, S.S., K.K. Roy, and A.K. Saxena, *Profiling the structural determinants for the selectivity of representative factor-Xa and thrombin inhibitors using combined ligand-based and structure-based approaches*. J Chem Inf Model, 2011. **51**(8): p. 1966-85.
202. Davie, E.W. and J.D. Kulman, *An overview of the structure and function of thrombin*. Semin Thromb Hemost, 2006. **32 Suppl 1**: p. 3-15.
203. Rai, R., et al., *Perspectives on factor Xa inhibition*. Curr Med Chem, 2001. **8**(2): p. 101-19.
204. Hansson, K. and J. Stenflo, *Post-translational modifications in proteins involved in blood coagulation*. J Thromb Haemost, 2005. **3**(12): p. 2633-48.
205. Brufatto, N. and M.E. Nesheim, *Analysis of the kinetics of prothrombin activation and evidence that two equilibrating forms of prothrombinase are involved in the process*. J Biol Chem, 2003. **278**(9): p. 6755-64.
206. Krishnaswamy, S., *The transition of prothrombin to thrombin*. J Thromb Haemost, 2013. **11 Suppl 1**: p. 265-76.
207. Mathews, II, et al., *Crystallographic structures of thrombin complexed with thrombin receptor peptides: existence of expected and novel binding modes*. Biochemistry, 1994. **33**(11): p. 3266-79.
208. Esmon, C.T. and P. Lollar, *Involvement of thrombin anion-binding exosites 1 and 2 in the activation of factor V and factor VIII*. J Biol Chem, 1996. **271**(23): p. 13882-7.
209. Ufer, M., *Comparative pharmacokinetics of vitamin K antagonists: warfarin, phenprocoumon and acenocoumarol*. Clin Pharmacokinet, 2005. **44**(12): p. 1227-46.
210. Yeh, C.H., K. Hogg, and J.I. Weitz, *Overview of the new oral anticoagulants: opportunities and challenges*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2015. **35**(5): p. 1056-65.
211. Yeh, C.H., P.L. Gross, and J.I. Weitz, *Evolving use of new oral anticoagulants for treatment of venous thromboembolism*. Blood, 2014. **124**(7): p. 1020-8.
212. Tsoumani, M.E. and A.D. Tselepis, *Antiplatelet Agents and Anticoagulants: From Pharmacology to Clinical Practice*. Curr Pharm Des, 2017. **23**(9): p. 1279-1293.
213. Nakamura, M., N. Yamada, and M. Ito, *Direct Oral Anticoagulants for the Treatment of Venous Thromboembolism in Japan*. J Atheroscler Thromb, 2017. **24**(6): p. 560-565.
214. Mueck, W., et al., *Clinical pharmacokinetic and pharmacodynamic profile of rivaroxaban*. Clin Pharmacokinet, 2014. **53**(1): p. 1-16.
215. Perzborn, E., et al., *In vitro and in vivo studies of the novel antithrombotic agent BAY 59-7939--an oral, direct Factor Xa inhibitor*. J Thromb Haemost, 2005. **3**(3): p. 514-21.
216. Burness, C.B. and C.M. Perry, *Rivaroxaban: a review of its use in the treatment of deep vein thrombosis or pulmonary embolism and the prevention of recurrent venous thromboembolism*. Drugs, 2014. **74**(2): p. 243-62.
217. Patel, M.R., et al., *Rivaroxaban versus warfarin in nonvalvular atrial fibrillation*. N Engl J Med, 2011. **365**(10): p. 883-91.
218. Eriksson, B.I., et al., *Rivaroxaban versus enoxaparin for thromboprophylaxis after hip arthroplasty*. N Engl J Med, 2008. **358**(26): p. 2765-75.
219. Kakkar, A.K., et al., *Extended duration rivaroxaban versus short-term enoxaparin for the prevention of venous thromboembolism after total hip arthroplasty: a double-blind, randomised controlled trial*. Lancet, 2008. **372**(9632): p. 31-9.
220. Lassen, M.R., et al., *Rivaroxaban versus enoxaparin for thromboprophylaxis after total knee arthroplasty*. N Engl J Med, 2008. **358**(26): p. 2776-86.

221. Turpie, A.G., et al., *Rivaroxaban versus enoxaparin for thromboprophylaxis after total knee arthroplasty (RECORD4): a randomised trial*. Lancet, 2009. **373**(9676): p. 1673-80.
222. Investigators, E., et al., *Oral rivaroxaban for symptomatic venous thromboembolism*. N Engl J Med, 2010. **363**(26): p. 2499-510.
223. Investigators, E.-P., et al., *Oral rivaroxaban for the treatment of symptomatic pulmonary embolism*. N Engl J Med, 2012. **366**(14): p. 1287-97.
224. Mega, J.L., et al., *Rivaroxaban in patients with a recent acute coronary syndrome*. N Engl J Med, 2012. **366**(1): p. 9-19.
225. Keating, G.M., *Apixaban: a review of its use for reducing the risk of stroke and systemic embolism in patients with nonvalvular atrial fibrillation*. Drugs, 2013. **73**(8): p. 825-43.
226. Connolly, S.J., et al., *Apixaban in patients with atrial fibrillation*. N Engl J Med, 2011. **364**(9): p. 806-17.
227. Granger, C.B., et al., *Apixaban versus warfarin in patients with atrial fibrillation*. N Engl J Med, 2011. **365**(11): p. 981-92.
228. Lassen, M.R., et al., *Apixaban or enoxaparin for thromboprophylaxis after knee replacement*. N Engl J Med, 2009. **361**(6): p. 594-604.
229. Lassen, M.R., et al., *Apixaban versus enoxaparin for thromboprophylaxis after knee replacement (ADVANCE-2): a randomised double-blind trial*. Lancet, 2010. **375**(9717): p. 807-15.
230. Lassen, M.R., et al., *Apixaban versus enoxaparin for thromboprophylaxis after hip replacement*. N Engl J Med, 2010. **363**(26): p. 2487-98.
231. Parasrampur, D.A. and K.E. Truitt, *Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Edoxaban, a Non-Vitamin K Antagonist Oral Anticoagulant that Inhibits Clotting Factor Xa*. Clin Pharmacokinet, 2016. **55**(6): p. 641-55.
232. Giugliano, R.P., et al., *Edoxaban versus warfarin in patients with atrial fibrillation*. N Engl J Med, 2013. **369**(22): p. 2093-104.
233. Goette, A., et al., *Edoxaban versus enoxaparin-warfarin in patients undergoing cardioversion of atrial fibrillation (ENSURE-AF): a randomised, open-label, phase 3b trial*. Lancet, 2016. **388**(10055): p. 1995-2003.
234. Hokusai, V.T.E.I., et al., *Edoxaban versus warfarin for the treatment of symptomatic venous thromboembolism*. N Engl J Med, 2013. **369**(15): p. 1406-15.
235. Keisu, M. and T.B. Andersson, *Drug-induced liver injury in humans: the case of ximelagatran*. Handb Exp Pharmacol, 2010(196): p. 407-18.
236. Blech, S., et al., *The metabolism and disposition of the oral direct thrombin inhibitor, dabigatran, in humans*. Drug Metab Dispos, 2008. **36**(2): p. 386-99.
237. Blommel, M.L. and A.L. Blommel, *Dabigatran etexilate: A novel oral direct thrombin inhibitor*. Am J Health Syst Pharm, 2011. **68**(16): p. 1506-19.
238. Stangier, J., et al., *The pharmacokinetics, pharmacodynamics and tolerability of dabigatran etexilate, a new oral direct thrombin inhibitor, in healthy male subjects*. Br J Clin Pharmacol, 2007. **64**(3): p. 292-303.
239. Lee, C.J. and J.E. Ansell, *Direct thrombin inhibitors*. Br J Clin Pharmacol, 2011. **72**(4): p. 581-92.
240. Stangier, J., *Clinical pharmacokinetics and pharmacodynamics of the oral direct thrombin inhibitor dabigatran etexilate*. Clin Pharmacokinet, 2008. **47**(5): p. 285-95.
241. Eriksson, B.I., D.J. Quinlan, and J.I. Weitz, *Comparative pharmacodynamics and pharmacokinetics of oral direct thrombin and factor xa inhibitors in development*. Clin Pharmacokinet, 2009. **48**(1): p. 1-22.
242. Stangier, J., et al., *Pharmacokinetic profile of the oral direct thrombin inhibitor dabigatran etexilate in healthy volunteers and patients undergoing total hip replacement*. J Clin Pharmacol, 2005. **45**(5): p. 555-63.

243. Connolly, S.J., et al., *Dabigatran versus warfarin in patients with atrial fibrillation*. N Engl J Med, 2009. **361**(12): p. 1139-51.
244. Connolly, S.J., et al., *The Long-Term Multicenter Observational Study of Dabigatran Treatment in Patients With Atrial Fibrillation (RELY-ABLE) Study*. Circulation, 2013. **128**(3): p. 237-43.
245. Schulman, S., et al., *Dabigatran versus warfarin in the treatment of acute venous thromboembolism*. N Engl J Med, 2009. **361**(24): p. 2342-52.
246. Schulman, S., et al., *Treatment of acute venous thromboembolism with dabigatran or warfarin and pooled analysis*. Circulation, 2014. **129**(7): p. 764-72.
247. Schulman, S., et al., *Extended use of dabigatran, warfarin, or placebo in venous thromboembolism*. N Engl J Med, 2013. **368**(8): p. 709-18.
248. Spronk, H.M., et al., *Pleiotropic effects of factor Xa and thrombin: what to expect from novel anticoagulants*. Cardiovasc Res, 2014. **101**(3): p. 344-51.
249. Camerer, E., W. Huang, and S.R. Coughlin, *Tissue factor- and factor X-dependent activation of protease-activated receptor 2 by factor VIIa*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(10): p. 5255-60.
250. Jiang, X., et al., *Formation of tissue factor-factor VIIa-factor Xa complex promotes cellular signaling and migration of human breast cancer cells*. J Thromb Haemost, 2004. **2**(1): p. 93-101.
251. Esmon, C.T., *Targeting factor Xa and thrombin: impact on coagulation and beyond*. Thromb Haemost, 2014. **111**(4): p. 625-33.
252. Riewald, M. and W. Ruf, *Mechanistic coupling of protease signaling and initiation of coagulation by tissue factor*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(14): p. 7742-7.
253. Busch, G., et al., *Coagulation factor Xa stimulates interleukin-8 release in endothelial cells and mononuclear leukocytes: implications in acute myocardial infarction*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2005. **25**(2): p. 461-6.
254. Shimizu, T., et al., *Macrophage migration inhibitory factor is induced by thrombin and factor Xa in endothelial cells*. J Biol Chem, 2004. **279**(14): p. 13729-37.
255. Senden, N.H., et al., *Factor Xa induces cytokine production and expression of adhesion molecules by human umbilical vein endothelial cells*. J Immunol, 1998. **161**(8): p. 4318-24.
256. Papapetropoulos, A., et al., *Hypotension and inflammatory cytokine gene expression triggered by factor Xa-nitric oxide signaling*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(8): p. 4738-42.
257. Daubie, V., et al., *Factor Xa and thrombin evoke additive calcium and proinflammatory responses in endothelial cells subjected to coagulation*. Biochim Biophys Acta, 2006. **1763**(8): p. 860-9.
258. Jiang, R., et al., *Factor Xa induces tissue factor expression in endothelial cells by P44/42 MAPK and NF-kappaB-dependent pathways*. J Surg Res, 2011. **169**(2): p. 319-27.
259. Bukowska, A., et al., *Coagulation factor Xa induces an inflammatory signalling by activation of protease-activated receptors in human atrial tissue*. Eur J Pharmacol, 2013. **718**(1-3): p. 114-23.
260. Feistritzer, C. and M. Riewald, *Endothelial barrier protection by activated protein C through PAR1-dependent sphingosine 1-phosphate receptor-1 crossactivation*. Blood, 2005. **105**(8): p. 3178-84.
261. Bae, J.S., L. Yang, and A.R. Rezaie, *Factor X/Xa elicits protective signaling responses in endothelial cells directly via PAR-2 and indirectly via endothelial protein C receptor-dependent recruitment of PAR-1*. J Biol Chem, 2010. **285**(45): p. 34803-12.
262. Kaplanski, G., et al., *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**(4): p. 1259-67.
263. Chan, B.C. and D.C. Patel, *Perioperative management and the associated rate of adverse events in dermatological procedures performed by dermatologists in New Zealand*. Australas J Dermatol, 2009. **50**(1): p. 23-8.

264. Rahman, A., et al., *Protein kinase C-delta regulates thrombin-induced ICAM-1 gene expression in endothelial cells via activation of p38 mitogen-activated protein kinase*. Mol Cell Biol, 2001. **21**(16): p. 5554-65.
265. Rahman, A., et al., *Alpha(q) and Gbetagamma regulate PAR-1 signaling of thrombin-induced NF-kappaB activation and ICAM-1 transcription in endothelial cells*. Circ Res, 2002. **91**(5): p. 398-405.
266. Minami, T., et al., *Thrombin stimulation of vascular adhesion molecule-1 in endothelial cells is mediated by protein kinase C (PKC)-delta-NF-kappa B and PKC-zeta-GATA signaling pathways*. J Biol Chem, 2003. **278**(9): p. 6976-84.
267. Marin, V., et al., *The p38 mitogen-activated protein kinase pathway plays a critical role in thrombin-induced endothelial chemokine production and leukocyte recruitment*. Blood, 2001. **98**(3): p. 667-73.
268. Kawanami, D., et al., *Thrombin induces MCP-1 expression through Rho-kinase and subsequent p38MAPK/NF-kappaB signaling pathway activation in vascular endothelial cells*. Biochem Biophys Res Commun, 2011. **411**(4): p. 798-803.
269. Drake, W.T., et al., *Thrombin enhancement of interleukin-1 and tumor necrosis factor-alpha induced polymorphonuclear leukocyte migration*. Lab Invest, 1992. **67**(5): p. 617-27.
270. Marin, V., et al., *The IL-6-soluble IL-6Ralpha autocrine loop of endothelial activation as an intermediate between acute and chronic inflammation: an experimental model involving thrombin*. J Immunol, 2001. **167**(6): p. 3435-42.
271. Ueno, A., et al., *Thrombin stimulates production of interleukin-8 in human umbilical vein endothelial cells*. Immunology, 1996. **88**(1): p. 76-81.
272. Gerszten, R.E., et al., *MCP-1 and IL-8 trigger firm adhesion of monocytes to vascular endothelium under flow conditions*. Nature, 1999. **398**(6729): p. 718-23.
273. Hallam, T.J., J.D. Pearson, and L.A. Needham, *Thrombin-stimulated elevation of human endothelial-cell cytoplasmic free calcium concentration causes prostacyclin production*. Biochem J, 1988. **251**(1): p. 243-9.
274. Horie, S., H. Ishii, and M. Kazama, *Heparin-like glycosaminoglycan is a receptor for antithrombin III-dependent but not for thrombin-dependent prostacyclin production in human endothelial cells*. Thromb Res, 1990. **59**(6): p. 895-904.
275. Bae, J.S., et al., *The ligand occupancy of endothelial protein C receptor switches the protease-activated receptor 1-dependent signaling specificity of thrombin from a permeability-enhancing to a barrier-protective response in endothelial cells*. Blood, 2007. **110**(12): p. 3909-16.
276. Bae, J.S., et al., *Concentration dependent dual effect of thrombin in endothelial cells via Par-1 and Pi3 Kinase*. J Cell Physiol, 2009. **219**(3): p. 744-51.
277. Popovic, M., et al., *Thrombin-induced expression of endothelial CX3CL1 potentiates monocyte CCL2 production and transendothelial migration*. J Leukoc Biol, 2008. **84**(1): p. 215-23.
278. Tedgui, A. and Z. Mallat, *Cytokines in atherosclerosis: pathogenic and regulatory pathways*. Physiol Rev, 2006. **86**(2): p. 515-81.
279. Insull, W., Jr., *The pathology of atherosclerosis: plaque development and plaque responses to medical treatment*. Am J Med, 2009. **122**(1 Suppl): p. S3-S14.
280. Loeffen, R., H.M. Spronk, and H. ten Cate, *The impact of blood coagulability on atherosclerosis and cardiovascular disease*. J Thromb Haemost, 2012. **10**(7): p. 1207-16.
281. Levi, M., T. van der Poll, and H.R. Buller, *Bidirectional relation between inflammation and coagulation*. Circulation, 2004. **109**(22): p. 2698-704.
282. Ebrahimi, S., et al., *Factor Xa Signaling Contributes to the Pathogenesis of Inflammatory Diseases*. J Cell Physiol, 2017. **232**(8): p. 1966-1970.
283. Borissoff, J.I., et al., *Early atherosclerosis exhibits an enhanced procoagulant state*. Circulation, 2010. **122**(8): p. 821-30.

284. ten Cate, H., *Tissue factor-driven thrombin generation and inflammation in atherosclerosis*. Thromb Res, 2012. **129 Suppl 2**: p. S38-40.
285. Wilcox, J.N., S. Noguchi, and J. Casanova, *Extrahepatic synthesis of factor VII in human atherosclerotic vessels*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2003. **23**(1): p. 136-41.
286. Borissoff, J.I., H.M. Spronk, and H. ten Cate, *The hemostatic system as a modulator of atherosclerosis*. N Engl J Med, 2011. **364**(18): p. 1746-60.
287. Kalz, J., H. ten Cate, and H.M. Spronk, *Thrombin generation and atherosclerosis*. J Thromb Thrombolysis, 2014. **37**(1): p. 45-55.
288. Rauch, B.H., et al., *Thrombin- and factor Xa-induced DNA synthesis is mediated by transactivation of fibroblast growth factor receptor-1 in human vascular smooth muscle cells*. Circ Res, 2004. **94**(3): p. 340-5.
289. Bohm, A., et al., *Factor-Xa-induced mitogenesis and migration require sphingosine kinase activity and S1P formation in human vascular smooth muscle cells*. Cardiovasc Res, 2013. **99**(3): p. 505-13.
290. Spiegel, S. and S. Milstien, *Sphingosine-1-phosphate: an enigmatic signalling lipid*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2003. **4**(5): p. 397-407.
291. Daum, G., A. Grabski, and M.A. Reidy, *Sphingosine 1-phosphate: a regulator of arterial lesions*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2009. **29**(10): p. 1439-43.
292. Wynn, T.A. and T.R. Ramalingam, *Mechanisms of fibrosis: therapeutic translation for fibrotic disease*. Nat Med, 2012. **18**(7): p. 1028-40.
293. Diegelmann, R.F. and M.C. Evans, *Wound healing: an overview of acute, fibrotic and delayed healing*. Front Biosci, 2004. **9**: p. 283-9.
294. Wynn, T.A., *Integrating mechanisms of pulmonary fibrosis*. J Exp Med, 2011. **208**(7): p. 1339-50.
295. Carmeliet, P. and R.K. Jain, *Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis*. Nature, 2011. **473**(7347): p. 298-307.
296. Rundhaug, J.E., *Matrix metalloproteinases and angiogenesis*. J Cell Mol Med, 2005. **9**(2): p. 267-85.
297. Chambers, R.C. and G.J. Laurent, *Coagulation cascade proteases and tissue fibrosis*. Biochem Soc Trans, 2002. **30**(2): p. 194-200.
298. Carmeliet, P., *Angiogenesis in health and disease*. Nat Med, 2003. **9**(6): p. 653-60.
299. Mercer, P.F. and R.C. Chambers, *Coagulation and coagulation signalling in fibrosis*. Biochim Biophys Acta, 2013. **1832**(7): p. 1018-27.
300. Borensztajn, K., et al., *Factor Xa stimulates proinflammatory and profibrotic responses in fibroblasts via protease-activated receptor-2 activation*. Am J Pathol, 2008. **172**(2): p. 309-20.
301. Blanc-Brude, O.P., et al., *Factor Xa stimulates fibroblast procollagen production, proliferation, and calcium signaling via PAR1 activation*. Exp Cell Res, 2005. **304**(1): p. 16-27.
302. Bachli, E.B., et al., *Factor Xa and thrombin, but not factor VIIa, elicit specific cellular responses in dermal fibroblasts*. J Thromb Haemost, 2003. **1**(9): p. 1935-44.
303. Borensztajn, K.S., et al., *Coagulation factor Xa drives tumor cells into apoptosis through BH3-only protein Bim up-regulation*. Exp Cell Res, 2007. **313**(12): p. 2622-33.
304. Rauch, B.H., et al., *Factor Xa releases matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) from human vascular smooth muscle cells and stimulates the conversion of pro-MMP-2 to MMP-2: role of MMP-2 in factor Xa-induced DNA synthesis and matrix invasion*. Circ Res, 2002. **90**(10): p. 1122-7.
305. Huang, Y.Q., et al., *Thrombin induces increased expression and secretion of angiopoietin-2 from human umbilical vein endothelial cells*. Blood, 2002. **99**(5): p. 1646-50.
306. Tsopanoglou, N.E. and M.E. Maragoudakis, *On the mechanism of thrombin-induced angiogenesis. Potentiation of vascular endothelial growth factor activity on endothelial cells by up-regulation of its receptors*. J Biol Chem, 1999. **274**(34): p. 23969-76.

307. Dupuy, E., et al., *Thrombin induces angiogenesis and vascular endothelial growth factor expression in human endothelial cells: possible relevance to HIF-1alpha*. J Thromb Haemost, 2003. **1**(5): p. 1096-102.
308. Tsopanoglou, N.E. and M.E. Maragoudakis, *Thrombin's central role in angiogenesis and pathophysiological processes*. Eur Cytokine Netw, 2009. **20**(4): p. 171-9.
309. Tsopanoglou, N.E. and M.E. Maragoudakis, *On the mechanism of thrombin-induced angiogenesis: inhibition of attachment of endothelial cells on basement membrane components*. Angiogenesis, 1998. **1**(2): p. 192-200.
310. Fernandez-Patron, C., et al., *Rapid release of matrix metalloproteinase (MMP)-2 by thrombin in the rat aorta: modulation by protein tyrosine kinase/phosphatase*. Thromb Haemost, 1999. **82**(4): p. 1353-7.
311. Kanazawa, H. and T. Yoshikawa, *Up-regulation of thrombin activity induced by vascular endothelial growth factor in asthmatic airways*. Chest, 2007. **132**(4): p. 1169-74.
312. Wynn, T.A., *Cellular and molecular mechanisms of fibrosis*. J Pathol, 2008. **214**(2): p. 199-210.
313. Zhou, Q., et al., *Evaluation of plaque stability of advanced atherosclerotic lesions in apo E-deficient mice after treatment with the oral factor Xa inhibitor rivaroxaban*. Mediators Inflamm, 2011. **2011**: p. 432080.
314. Hara, T., et al., *Rivaroxaban, a novel oral anticoagulant, attenuates atherosclerotic plaque progression and destabilization in ApoE-deficient mice*. Atherosclerosis, 2015. **242**(2): p. 639-46.
315. Lee, I.O., et al., *The effects of direct thrombin inhibition with dabigatran on plaque formation and endothelial function in apolipoprotein E-deficient mice*. J Pharmacol Exp Ther, 2012. **343**(2): p. 253-7.
316. Pingel, S., et al., *Thrombin inhibition by dabigatran attenuates atherosclerosis in ApoE deficient mice*. Arch Med Sci, 2014. **10**(1): p. 154-60.
317. Iba, T., et al., *Rivaroxaban attenuates leukocyte adhesion in the microvasculature and thrombus formation in an experimental mouse model of type 2 diabetes mellitus*. Thromb Res, 2014. **133**(2): p. 276-80.
318. Hara, T., et al., *Inhibition of activated factor X by rivaroxaban attenuates neointima formation after wire-mediated vascular injury*. Eur J Pharmacol, 2018. **820**: p. 222-228.
319. Ellinghaus, P., et al., *Expression of pro-inflammatory genes in human endothelial cells: Comparison of rivaroxaban and dabigatran*. Thromb Res, 2016. **142**: p. 44-51.
320. Ishibashi, Y., T. Matsui, and S. Yamagishi, *Apixaban exerts anti-inflammatory effects in mesangial cells by blocking thrombin/protease-activated receptor-1 system*. Thromb Res, 2014. **134**(6): p. 1365-7.
321. Kikuchi, S., et al., *Comparison of anti-inflammatory effects of rivaroxaban vs. dabigatran in patients with non-valvular atrial fibrillation (RIVAL-AF study): multicenter randomized study*. Heart Vessels, 2019. **34**(6): p. 1002-1013.
322. Flierl, U., et al., *The direct factor Xa inhibitor Rivaroxaban reduces platelet activation in congestive heart failure*. Pharmacol Res, 2013. **74**: p. 49-55.
323. Wan, H., et al., *An in-vitro evaluation of direct thrombin inhibitor and factor Xa inhibitor on tissue factor-induced thrombin generation and platelet aggregation: a comparison of dabigatran and rivaroxaban*. Blood Coagul Fibrinolysis, 2016. **27**(8): p. 882-885.
324. Vinholt, P.J., et al., *Dabigatran reduces thrombin-induced platelet aggregation and activation in a dose-dependent manner*. J Thromb Thrombolysis, 2017. **44**(2): p. 216-222.
325. Achilles, A., et al., *Dabigatran enhances platelet reactivity and platelet thrombin receptor expression in patients with atrial fibrillation*. J Thromb Haemost, 2017. **15**(3): p. 473-476.

326. Wong, P.C. and X. Jiang, *Apixaban, a direct factor Xa inhibitor, inhibits tissue-factor induced human platelet aggregation in vitro: comparison with direct inhibitors of factor VIIa, XIa and thrombin*. *Thromb Haemost*, 2010. **104**(2): p. 302-10.
327. Honda, Y., C. Kamisato, and Y. Morishima, *Edoxaban, a direct factor Xa inhibitor, suppresses tissue-factor induced human platelet aggregation and clot-bound factor Xa in vitro: Comparison with an antithrombin-dependent factor Xa inhibitor, fondaparinux*. *Thromb Res*, 2016. **141**: p. 17-21.
328. Sokol, J., et al., *First evidence: rivaroxaban and apixaban reduce thrombin-dependent platelet aggregation*. *J Thromb Thrombolysis*, 2018. **46**(3): p. 393-398.
329. Steppich, B., et al., *Effect of the FXa inhibitors Rivaroxaban and Apixaban on platelet activation in patients with atrial fibrillation*. *J Thromb Thrombolysis*, 2017. **43**(4): p. 490-497.
330. Pate, M., et al., *Endothelial cell biology: role in the inflammatory response*. *Adv Clin Chem*, 2010. **52**: p. 109-30.
331. Tenreiro, M.M., M.L. Correia, and M.A. Brito, *Endothelial progenitor cells in multiple myeloma neovascularization: a brick to the wall*. *Angiogenesis*, 2017. **20**(4): p. 443-462.
332. Asahara, T., et al., *Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis*. *Science*, 1997. **275**(5302): p. 964-7.
333. Gehling, U.M., et al., *In vitro differentiation of endothelial cells from AC133-positive progenitor cells*. *Blood*, 2000. **95**(10): p. 3106-12.
334. Peichev, M., et al., *Expression of VEGFR-2 and AC133 by circulating human CD34(+) cells identifies a population of functional endothelial precursors*. *Blood*, 2000. **95**(3): p. 952-8.
335. Quirici, N., et al., *Differentiation and expansion of endothelial cells from human bone marrow CD133(+) cells*. *Br J Haematol*, 2001. **115**(1): p. 186-94.
336. Nielsen, J.S. and K.M. McNagny, *Novel functions of the CD34 family*. *J Cell Sci*, 2008. **121**(Pt 22): p. 3683-92.
337. Li, Z., *CD133: a stem cell biomarker and beyond*. *Exp Hematol Oncol*, 2013. **2**(1): p. 17.
338. Liu, L. and G.P. Shi, *CD31: beyond a marker for endothelial cells*. *Cardiovasc Res*, 2012. **94**(1): p. 3-5.
339. Kratzer, A., et al., *Endothelial cell adhesion molecule CD146: implications for its role in the pathogenesis of COPD*. *J Pathol*, 2013. **230**(4): p. 388-98.
340. Vestweber, D., *VE-cadherin: the major endothelial adhesion molecule controlling cellular junctions and blood vessel formation*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2008. **28**(2): p. 223-32.
341. Hristov, M. and C. Weber, *Endothelial progenitor cells: characterization, pathophysiology, and possible clinical relevance*. *J Cell Mol Med*, 2004. **8**(4): p. 498-508.
342. Hristov, M., W. Erl, and P.C. Weber, *Endothelial progenitor cells: mobilization, differentiation, and homing*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2003. **23**(7): p. 1185-9.
343. Timmermans, F., et al., *Endothelial outgrowth cells are not derived from CD133+ cells or CD45+ hematopoietic precursors*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2007. **27**(7): p. 1572-9.
344. Asahara, T., A. Kawamoto, and H. Masuda, *Concise review: Circulating endothelial progenitor cells for vascular medicine*. *Stem Cells*, 2011. **29**(11): p. 1650-5.
345. Hill, J.M., et al., *Circulating endothelial progenitor cells, vascular function, and cardiovascular risk*. *N Engl J Med*, 2003. **348**(7): p. 593-600.
346. Sieveking, D.P., et al., *Strikingly different angiogenic properties of endothelial progenitor cell subpopulations: insights from a novel human angiogenesis assay*. *J Am Coll Cardiol*, 2008. **51**(6): p. 660-8.
347. Sen, S., et al., *Endothelial progenitor cells: novel biomarker and promising cell therapy for cardiovascular disease*. *Clin Sci (Lond)*, 2011. **120**(7): p. 263-83.

348. Werner, N., et al., *Bone marrow-derived progenitor cells modulate vascular reendothelialization and neointimal formation: effect of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme a reductase inhibition*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2002. **22**(10): p. 1567-72.
349. Walter, D.H., et al., *Statin therapy accelerates reendothelialization: a novel effect involving mobilization and incorporation of bone marrow-derived endothelial progenitor cells*. *Circulation*, 2002. **105**(25): p. 3017-24.
350. Nova-Lamperti E., et al., *Vascular regeneration by endothelial progenitor cells in health and diseases*, in *Microcirculation revisited - from molecules to clinical practice*, Lenasi H., Editor. 2016.
351. Griese, D.P., et al., *Isolation and transplantation of autologous circulating endothelial cells into denuded vessels and prosthetic grafts: implications for cell-based vascular therapy*. *Circulation*, 2003. **108**(21): p. 2710-5.
352. Ma, Z.L., et al., *Inhibited atherosclerotic plaque formation by local administration of magnetically labeled endothelial progenitor cells (EPCs) in a rabbit model*. *Atherosclerosis*, 2009. **205**(1): p. 80-6.
353. Werner, N., et al., *Intravenous transfusion of endothelial progenitor cells reduces neointima formation after vascular injury*. *Circ Res*, 2003. **93**(2): p. e17-24.
354. Sorrentino, S.A., et al., *Oxidant stress impairs in vivo reendothelialization capacity of endothelial progenitor cells from patients with type 2 diabetes mellitus: restoration by the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonist rosiglitazone*. *Circulation*, 2007. **116**(2): p. 163-73.
355. Asahara, T. and A. Kawamoto, *Endothelial progenitor cells for postnatal vasculogenesis*. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2004. **287**(3): p. C572-9.
356. Kawamoto, A., T. Asahara, and D.W. Losordo, *Transplantation of endothelial progenitor cells for therapeutic neovascularization*. *Cardiovasc Radiat Med*, 2002. **3**(3-4): p. 221-5.
357. Ahmadi, H., et al., *Safety analysis and improved cardiac function following local autologous transplantation of CD133(+) enriched bone marrow cells after myocardial infarction*. *Curr Neurovasc Res*, 2007. **4**(3): p. 153-60.
358. Meyer, G.P., et al., *Intracoronary bone marrow cell transfer after myocardial infarction: eighteen months' follow-up data from the randomized, controlled BOOST (BOne marrOW transfer to enhance ST-elevation infarct regeneration) trial*. *Circulation*, 2006. **113**(10): p. 1287-94.
359. Wollert, K.C., et al., *Intracoronary autologous bone-marrow cell transfer after myocardial infarction: the BOOST randomised controlled clinical trial*. *Lancet*, 2004. **364**(9429): p. 141-8.
360. Erbs, S., et al., *Restoration of microvascular function in the infarct-related artery by intracoronary transplantation of bone marrow progenitor cells in patients with acute myocardial infarction: the Doppler Substudy of the Reinfusion of Enriched Progenitor Cells and Infarct Remodeling in Acute Myocardial Infarction (REPAIR-AMI) trial*. *Circulation*, 2007. **116**(4): p. 366-74.
361. Hirsch, A., et al., *Intracoronary infusion of autologous mononuclear bone marrow cells in patients with acute myocardial infarction treated with primary PCI: Pilot study of the multicenter HEBE trial*. *Catheter Cardiovasc Interv*, 2008. **71**(3): p. 273-81.
362. Losordo, D.W., et al., *Intramyocardial transplantation of autologous CD34+ stem cells for intractable angina: a phase I/IIa double-blind, randomized controlled trial*. *Circulation*, 2007. **115**(25): p. 3165-72.
363. Krenning, G., M.J. van Luyn, and M.C. Harmsen, *Endothelial progenitor cell-based neovascularization: implications for therapy*. *Trends Mol Med*, 2009. **15**(4): p. 180-9.
364. Ziegelhoeffer, T., et al., *Bone marrow-derived cells do not incorporate into the adult growing vasculature*. *Circ Res*, 2004. **94**(2): p. 230-8.
365. Kinnaird, T., et al., *Marrow-derived stromal cells express genes encoding a broad spectrum of arteriogenic cytokines and promote in vitro and in vivo arteriogenesis through paracrine mechanisms*. *Circ Res*, 2004. **94**(5): p. 678-85.

366. Popa, E.R., et al., *Circulating CD34+ progenitor cells modulate host angiogenesis and inflammation in vivo*. J Mol Cell Cardiol, 2006. **41**(1): p. 86-96.
367. Grunewald, M., et al., *VEGF-induced adult neovascularization: recruitment, retention, and role of accessory cells*. Cell, 2006. **124**(1): p. 175-89.
368. Hattori, K., et al., *Vascular endothelial growth factor and angiopoietin-1 stimulate postnatal hematopoiesis by recruitment of vasculogenic and hematopoietic stem cells*. J Exp Med, 2001. **193**(9): p. 1005-14.
369. Yamaguchi, J., et al., *Stromal cell-derived factor-1 effects on ex vivo expanded endothelial progenitor cell recruitment for ischemic neovascularization*. Circulation, 2003. **107**(9): p. 1322-8.
370. Moore, M.A., et al., *Mobilization of endothelial and hematopoietic stem and progenitor cells by adenovector-mediated elevation of serum levels of SDF-1, VEGF, and angiopoietin-1*. Ann NY Acad Sci, 2001. **938**: p. 36-45; discussion 45-7.
371. Asahara, T., et al., *VEGF contributes to postnatal neovascularization by mobilizing bone marrow-derived endothelial progenitor cells*. EMBO J, 1999. **18**(14): p. 3964-72.
372. Kalka, C., et al., *VEGF gene transfer mobilizes endothelial progenitor cells in patients with inoperable coronary disease*. Ann Thorac Surg, 2000. **70**(3): p. 829-34.
373. Lu, Z., et al., *Overexpression of Angiopoietin-1 Potentiates Endothelial Progenitor Cells for the Treatment of Aneurysm*. Ann Vasc Surg, 2017.
374. Balaji, S., et al., *Angiopoietin-1 improves endothelial progenitor cell-dependent neovascularization in diabetic wounds*. Surgery, 2015. **158**(3): p. 846-56.
375. Moldovan, N.I., et al., *Contribution of monocytes/macrophages to compensatory neovascularization: the drilling of metalloelastase-positive tunnels in ischemic myocardium*. Circ Res, 2000. **87**(5): p. 378-84.
376. Chen, A.F., et al., *Free radical biology of the cardiovascular system*. Clin Sci (Lond), 2012. **123**(2): p. 73-91.
377. Ahn, J.B., et al., *Circulating endothelial progenitor cells (EPC) for tumor vasculogenesis in gastric cancer patients*. Cancer Lett, 2010. **288**(1): p. 124-32.
378. Moschetta, M., et al., *Role of endothelial progenitor cells in cancer progression*. Biochim Biophys Acta, 2014. **1846**(1): p. 26-39.
379. Marcola, M. and C.E. Rodrigues, *Endothelial progenitor cells in tumor angiogenesis: another brick in the wall*. Stem Cells Int, 2015. **2015**: p. 832649.
380. de la Puente, P., et al., *Cell trafficking of endothelial progenitor cells in tumor progression*. Clin Cancer Res, 2013. **19**(13): p. 3360-8.
381. Gutteridge, J.M. and J. Mitchell, *Redox imbalance in the critically ill*. Br Med Bull, 1999. **55**(1): p. 49-75.
382. Victor, V.M., et al., *Oxidative stress, endothelial dysfunction and atherosclerosis*. Curr Pharm Des, 2009. **15**(26): p. 2988-3002.
383. Sitia, S., et al., *From endothelial dysfunction to atherosclerosis*. Autoimmun Rev, 2010. **9**(12): p. 830-4.
384. Du, F., et al., *Endothelial progenitor cells in atherosclerosis*. Front Biosci (Landmark Ed), 2012. **17**: p. 2327-49.
385. Hughes, A.D., et al., *Reduced endothelial progenitor cells in European and South Asian men with atherosclerosis*. Eur J Clin Invest, 2007. **37**(1): p. 35-41.
386. Bakogiannis, C., et al., *Circulating endothelial progenitor cells as biomarkers for prediction of cardiovascular outcomes*. Curr Med Chem, 2012. **19**(16): p. 2597-604.
387. Aragona, C.O., et al., *Endothelial Progenitor Cells for Diagnosis and Prognosis in Cardiovascular Disease*. Stem Cells Int, 2016. **2016**: p. 8043792.

388. Vasa, M., et al., *Number and migratory activity of circulating endothelial progenitor cells inversely correlate with risk factors for coronary artery disease*. *Circ Res*, 2001. **89**(1): p. E1-7.
389. Chen, J.Z., et al., *Effects of homocysteine on number and activity of endothelial progenitor cells from peripheral blood*. *J Mol Cell Cardiol*, 2004. **36**(2): p. 233-9.
390. Verma, S., et al., *C-reactive protein attenuates endothelial progenitor cell survival, differentiation, and function: further evidence of a mechanistic link between C-reactive protein and cardiovascular disease*. *Circulation*, 2004. **109**(17): p. 2058-67.
391. Rauscher, F.M., et al., *Aging, progenitor cell exhaustion, and atherosclerosis*. *Circulation*, 2003. **108**(4): p. 457-63.
392. Werner, N., et al., *Circulating endothelial progenitor cells and cardiovascular outcomes*. *N Engl J Med*, 2005. **353**(10): p. 999-1007.
393. Schmidt-Lucke, C., et al., *Reduced number of circulating endothelial progenitor cells predicts future cardiovascular events: proof of concept for the clinical importance of endogenous vascular repair*. *Circulation*, 2005. **111**(22): p. 2981-7.
394. Silvestre, J.S., et al., *Transplantation of bone marrow-derived mononuclear cells in ischemic apolipoprotein E-knockout mice accelerates atherosclerosis without altering plaque composition*. *Circulation*, 2003. **108**(23): p. 2839-42.
395. George, J., et al., *Transfer of endothelial progenitor and bone marrow cells influences atherosclerotic plaque size and composition in apolipoprotein E knockout mice*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2005. **25**(12): p. 2636-41.
396. Daub, K., et al., *Platelets induce differentiation of human CD34+ progenitor cells into foam cells and endothelial cells*. *FASEB J*, 2006. **20**(14): p. 2559-61.
397. Stellos, K., et al., *Platelet interaction with progenitor cells: vascular regeneration or inquiry?* *Pharmacol Rep*, 2008. **60**(1): p. 101-8.
398. Raz, O., et al., *Pathways mediating the interaction between endothelial progenitor cells (EPCs) and platelets*. *PLoS One*, 2014. **9**(6): p. e95156.
399. Stellos, K., et al., *Platelet-derived stromal cell-derived factor-1 regulates adhesion and promotes differentiation of human CD34+ cells to endothelial progenitor cells*. *Circulation*, 2008. **117**(2): p. 206-15.
400. de Boer, H.C., 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**(7): p. 1653-9.
401. Leshem-Lev, D., et al., *Exposure to platelets promotes functional properties of endothelial progenitor cells*. *J Thromb Thrombolysis*, 2010. **30**(4): p. 398-403.
402. Langer, H., et al., *Adherent platelets recruit and induce differentiation of murine embryonic endothelial progenitor cells to mature endothelial cells in vitro*. *Circ Res*, 2006. **98**(2): p. e2-10.
403. Lev, E.I., et al., *Potential role of activated platelets in homing of human endothelial progenitor cells to subendothelial matrix*. *Thromb Haemost*, 2006. **96**(4): p. 498-504.
404. Massberg, S., 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**(5): p. 1221-33.
405. Pearson, J.D., *Endothelial cell function and thrombosis*. *Baillieres Best Pract Res Clin Haematol*, 1999. **12**(3): p. 329-41.
406. Gomez, E., et al., *Aging and prostacyclin responses in aorta and platelets from WKY and SHR rats*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2008. **295**(5): p. H2198-211.
407. Roger, S., et al., *The anti-aggregating effect of BAY 41-2272, a stimulator of soluble guanylyl cyclase, requires the presence of nitric oxide*. *Br J Pharmacol*, 2010. **161**(5): p. 1044-58.
408. Aird, W.C., *Phenotypic heterogeneity of the endothelium: I. Structure, function, and mechanisms*. *Circ Res*, 2007. **100**(2): p. 158-73.

409. Minshall, R.D. and A.B. Malik, *Transport across the endothelium: regulation of endothelial permeability*. Handb Exp Pharmacol, 2006(176 Pt 1): p. 107-44.
410. Ley, K. and J. Reutershan, *Leucocyte-endothelial interactions in health and disease*. Handb Exp Pharmacol, 2006(176 Pt 2): p. 97-133.
411. Hicks, A.E., et al., *Recombinant P-selectin glycoprotein ligand-1 directly inhibits leukocyte rolling by all 3 selectins in vivo: complete inhibition of rolling is not required for anti-inflammatory effect*. Blood, 2003. **101**(8): p. 3249-56.
412. Feng, D., et al., *Neutrophils emigrate from venules by a transendothelial cell pathway in response to FMLP*. J Exp Med, 1998. **187**(6): p. 903-15.
413. Feng, D., et al., *Ultrastructural studies define soluble macromolecular, particulate, and cellular transendothelial cell pathways in venules, lymphatic vessels, and tumor-associated microvessels in man and animals*. Microsc Res Tech, 2002. **57**(5): p. 289-326.
414. Carman, C.V. and T.A. Springer, *A transmigratory cup in leukocyte diapedesis both through individual vascular endothelial cells and between them*. J Cell Biol, 2004. **167**(2): p. 377-88.
415. Vestweber, D., *How leukocytes cross the vascular endothelium*. Nat Rev Immunol, 2015. **15**(11): p. 692-704.
416. Seandel, M., et al., *Growth factor-induced angiogenesis in vivo requires specific cleavage of fibrillar type I collagen*. Blood, 2001. **97**(8): p. 2323-32.
417. Adair, T.H. and J.P. Montani, in *Angiogenesis*. 2010: San Rafael (CA).
418. Feletou, M., in *The Endothelium: Part 1: Multiple Functions of the Endothelial Cells-Focus on Endothelium-Derived Vasoactive Mediators*. 2011: San Rafael (CA).
419. Johnson, K.E. and T.A. Wilgus, *Vascular Endothelial Growth Factor and Angiogenesis in the Regulation of Cutaneous Wound Repair*. Adv Wound Care (New Rochelle), 2014. **3**(10): p. 647-661.
420. Gale, N.W. and G.D. Yancopoulos, *Growth factors acting via endothelial cell-specific receptor tyrosine kinases: VEGFs, angiopoietins, and ephrins in vascular development*. Genes Dev, 1999. **13**(9): p. 1055-66.
421. Esper, R.J., et al., *Endothelial dysfunction: a comprehensive appraisal*. Cardiovasc Diabetol, 2006. **5**: p. 4.
422. Loscalzo, J. and G. Welch, *Nitric oxide and its role in the cardiovascular system*. Prog Cardiovasc Dis, 1995. **38**(2): p. 87-104.
423. Cooke, J.P. and P.S. Tsao, *Is NO an endogenous antiatherogenic molecule?* Arterioscler Thromb, 1994. **14**(5): p. 653-5.
424. Benigni, A., P. Cassis, and G. Remuzzi, *Angiotensin II revisited: new roles in inflammation, immunology and aging*. EMBO Mol Med, 2010. **2**(7): p. 247-57.
425. Widmer, R.J. and A. Lerman, *Endothelial dysfunction and cardiovascular disease*. Glob Cardiol Sci Pract, 2014. **2014**(3): p. 291-308.
426. Ley, K., et al., *Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated*. Nat Rev Immunol, 2007. **7**(9): p. 678-89.
427. Cerletti, C., et al., *Platelet-leukocyte interactions in thrombosis*. Thromb Res, 2012. **129**(3): p. 263-6.
428. Weyrich, A.S., et al., *Activated platelets signal chemokine synthesis by human monocytes*. J Clin Invest, 1996. **97**(6): p. 1525-34.
429. Reilly, P.A., et al., *The effect of dabigatran plasma concentrations and patient characteristics on the frequency of ischemic stroke and major bleeding in atrial fibrillation patients: the RE-LY Trial (Randomized Evaluation of Long-Term Anticoagulation Therapy)*. J Am Coll Cardiol, 2014. **63**(4): p. 321-8.

430. Sennesael, A.L., et al., *Rivaroxaban plasma levels in patients admitted for bleeding events: insights from a prospective study*. *Thromb J*, 2018. **16**: p. 28.
431. Kreutz, R., *Pharmacodynamic and pharmacokinetic basics of rivaroxaban*. *Fundam Clin Pharmacol*, 2012. **26**(1): p. 27-32.
432. Jiang, L., et al., *A critical role of thrombin/PAR-1 in ADP-induced platelet secretion and the second wave of aggregation*. *J Thromb Haemost*, 2013. **11**(5): p. 930-40.
433. Wu, Y., et al., *Essential role of ICAM-1/CD18 in mediating EPC recruitment, angiogenesis, and repair to the infarcted myocardium*. *Circ Res*, 2006. **99**(3): p. 315-22.
434. Ledebur, H.C. and T.P. Parks, *Transcriptional regulation of the intercellular adhesion molecule-1 gene by inflammatory cytokines in human endothelial cells. Essential roles of a variant NF-kappa B site and p65 homodimers*. *J Biol Chem*, 1995. **270**(2): p. 933-43.
435. Brant-Zawadzki, P.B., et al., *Translational control in endothelial cells*. *J Vasc Surg*, 2007. **45 Suppl A**: p. A8-14.
436. Zhang, X., et al., *Protective effect of Astragalus polysaccharide on endothelial progenitor cells injured by thrombin*. *Int J Biol Macromol*, 2016. **82**: p. 711-8.
437. Popovic, M., et al., *Thrombin and vascular inflammation*. *Mol Cell Biochem*, 2012. **359**(1-2): p. 301-13.
438. Wu, T.C., et al., *Rivaroxaban, a factor Xa inhibitor, improves neovascularization in the ischemic hindlimb of streptozotocin-induced diabetic mice*. *Cardiovasc Diabetol*, 2015. **14**: p. 81.
439. O'Brien, P.J., et al., *Thrombin responses in human endothelial cells. Contributions from receptors other than PAR1 include the transactivation of PAR2 by thrombin-cleaved PAR1*. *J Biol Chem*, 2000. **275**(18): p. 13502-9.
440. Hamilton, J.R., A.G. Frauman, and T.M. Cocks, *Increased expression of protease-activated receptor-2 (PAR2) and PAR4 in human coronary artery by inflammatory stimuli unveils endothelium-dependent relaxations to PAR2 and PAR4 agonists*. *Circ Res*, 2001. **89**(1): p. 92-8.
441. Megyeri, M., et al., *Complement protease MASP-1 activates human endothelial cells: PAR4 activation is a link between complement and endothelial function*. *J Immunol*, 2009. **183**(5): p. 3409-16.
442. Fortunato, T.M., et al., *Expression of protease-activated receptor 1 and 2 and anti-tubulogenic activity of protease-activated receptor 1 in human endothelial colony-forming cells*. *PLoS One*, 2014. **9**(10): p. e109375.
443. Smadja, D.M., et al., *PAR-1 activation on human late endothelial progenitor cells enhances angiogenesis in vitro with upregulation of the SDF-1/CXCR4 system*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2005. **25**(11): p. 2321-7.
444. Kaplanski, G., et al., *Thrombin induces endothelial type II activation in vitro: IL-1 and TNF-alpha-independent IL-8 secretion and E-selectin expression*. *J Immunol*, 1997. **158**(11): p. 5435-41.
445. Hezi-Yamit, A., et al., *Synergistic induction of tissue factor by coagulation factor Xa and TNF: evidence for involvement of negative regulatory signaling cascades*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005. **102**(34): p. 12077-82.
446. Yadav, A., V. Saini, and S. Arora, *MCP-1: chemoattractant with a role beyond immunity: a review*. *Clin Chim Acta*, 2010. **411**(21-22): p. 1570-9.
447. Seki, K., et al., *Demeanor of rivaroxaban in activated/inactivated FXa*. *J Pharmacol Sci*, 2017. **133**(3): p. 156-161.
448. Schaeffer, P., et al., *Nonproteolytic activation of the thrombin receptor promotes human umbilical vein endothelial cell growth but not intracellular CA2+, prostacyclin, or permeability*. *Biochem Pharmacol*, 1997. **53**(4): p. 487-91.

449. Sato, T., et al., *The mechanism of thrombin-induced prostacyclin synthesis in human endothelial cells with reference to the gene transcription of prostacyclin-related enzymes and Ca²⁺ kinetics*. J Pharmacol Toxicol Methods, 1999. **41**(4): p. 173-82.
450. Cleator, J.H., et al., *Differential regulation of endothelial exocytosis of P-selectin and von Willebrand factor by protease-activated receptors and cAMP*. Blood, 2006. **107**(7): p. 2736-44.
451. Rusu, L., et al., *G protein-dependent basal and evoked endothelial cell vWF secretion*. Blood, 2014. **123**(3): p. 442-50.

ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ-ΔΙΑΚΡΙΣΕΙΣ

Από την παρούσα διδακτορική διατριβή, προέκυψαν οι παρακάτω δημοσιεύσεις και διακρίσεις:

➤ ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ ΣΕ ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΑ ΠΕΡΙΟΔΙΚΑ

1. S. Papadaki, A.D. Tselepis. "Nonhemostatic activities of factor Xa: Are there pleiotropic effects of Anti-FXa direct oral anticoagulants?". *Angiology* 2019; **70**(10):896-907.
2. S. Papadaki, S. Sidiropoulou, V. Chantzichristos, M. Paschopoulos, A. Tselepis. "Effect of thrombin on human endothelial progenitor cells". *Hellenic Journal of Atherosclerosis* 2017; **8**(1): 16-23.

➤ ΠΑΡΟΥΣΙΑΣΕΙΣ ΣΕ ΔΙΕΘΝΗ ΣΥΝΕΔΡΙΑ

1. S. Papadaki, S. Sidiropoulou, I.C. Moschonas, A.D. Tselepis. "Dabigatran inhibits the activation of endothelial progenitor cells induced by thrombin". **ESC Congress**, August 31-September 4, Paris, France.
2. S. Papadaki, I.C. Moschonas, S. Sidiropoulou, A.D. Tselepis. "The effect of dabigatran and rivaroxaban on thrombin- and FXa-induced platelet aggregation". **26th Anniversary International Congress on Thrombosis - EMLTD Congress 2019**, June 19-22, Athens, Greece.
3. S. Papadaki, I.C. Moschonas, A.D. Tselepis. "The role of protease activated receptor-1 on factor Xa-induced platelet activation". **26th Anniversary International Congress on Thrombosis - EMLTD Congress 2019**, June 19-22, Athens, Greece.
4. S. Papadaki, A.D. Tselepis. "The effect of FXa on platelet activation, *in vitro*". **ISTH SSC**, July 18-21 2018, Dublin, Ireland.
5. S. Papadaki, I.C. Moschonas, A. Tselepis. "The effect of vorapaxar on the interaction of CD34⁺ progenitor cells with platelets". **86th EAS Congress**, May 05-08 2018, Lisbon, Portugal.
6. S. Papadaki, I.C. Moschonas, A.D. Tselepis. "Vorapaxar inhibits the interaction of CD34⁺ progenitor cells with platelets". **ALPIC: Advanced Learning on Platelets and Thrombosis International Course**, March 23-25 2018, Metsovo, Greece.

7. S. Papadaki, S. Sidiropoulou, V.Chantzichristos, M. Paschopoulos, A. Tselepis. "The effect of Factor Xa and Thrombin on ICAM-1 expression on endothelial progenitor cells. The role of PAR-1". **85th EAS Congress**, April 23-26 2017, Prague, Czech Republic
8. I.C. Moschonas, S Papadaki, A.D. Tselepis. "Exploring the specificity and optimal conditions for expressing the maximum activity of the novel antiplatelet agent vorapaxar, *in vitro*". **24th Biennial International Congress on Thrombosis - EMLTD Congress 2016**, May 04-07, Istanbul, Turkey.

➤ ΠΑΡΟΥΣΙΑΣΕΙΣ ΣΕ ΕΛΛΗΝΙΚΑ ΣΥΝΕΔΡΙΑ

1. Σ. Παπαδάκη, Α. Τσελέπης. "Ο ρόλος των dabigatran και rivaroxaban στην επαγόμενη από τη θρομβίνη και τον παράγοντα Xa αιμοπεταλιακή ενεργοποίηση". **8^ο Πανελλήνιο Συνέδριο των Ομάδων Εργασίας της ΕΕΑ**, 29-30 Νοεμβρίου 2019, Αθήνα, Ελλάδα.
2. Σ. Παπαδάκη, Σ. Σιδηροπούλου, Ι. Μοσχονάς, Α. Τσελέπης. "Το dabigatran αναστέλλει την ενεργοποίηση των πρόδρομων ενδοθηλιακών κυττάρων που επάγεται από τη θρομβίνη". **8^ο Πανελλήνιο Συνέδριο των Ομάδων Εργασίας της ΕΕΑ**, 29-30 Νοεμβρίου 2019, Αθήνα, Ελλάδα.
3. Σ. Παπαδάκη, Η.Χ. Μοσχονάς, Α.Δ. Τσελέπης. "Ο ρόλος του υποδοχέα-1 που ενεργοποιείται από πρωτεάσες στην ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων που επάγεται από τον παράγοντα πήξης Xa". **7^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Θρόμβωσης-Αντιθρομβωτικής Αγωγής**, 19-22 Σεπτεμβρίου 2018, Ερέτρια, Ελλάδα.
4. Σ. Παπαδάκη, Η. Μοσχονάς, Α. Τσελέπης. "Μελέτη του ρόλου του υποδοχέα-1 που ενεργοποιείται από πρωτεάσες στην αλληλεπίδραση των CD34⁺ πρόδρομων κυττάρων με τα αιμοπετάλια". **8^ο Πανελλήνιο Συνέδριο της ΕΕΑ**, 29 Νοεμβρίου-1 Δεκεμβρίου 2018, Αθήνα, Ελλάδα.
5. Σ. Παπαδάκη, Α. Τσελέπης. "Ο ρόλος του υποδοχέα-1 που ενεργοποιείται από πρωτεάσες στην ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων που επάγεται από τον παράγοντα πήξης Xa". **8^ο Πανελλήνιο Συνέδριο της ΕΕΑ**, 29 Νοεμβρίου-1 Δεκεμβρίου 2018, Αθήνα, Ελλάδα.
6. Σ. Παπαδάκη, Η. Μοσχονάς, Α. Τσελέπης. "Ο ρόλος του vorapaxar στην αλληλεπίδραση των CD34⁺ πρόδρομων κυττάρων με τα αιμοπετάλια". **6^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Θρόμβωσης-Αντιθρομβωτικής Αγωγής**, 27-29 Σεπτεμβρίου 2018, Αθήνα, Ελλάδα.

7. Σ. Παπαδάκη, Α. Τσελέπης. “Ο παράγοντας πήξης Χα (FXa) είναι ένας ισχυρός ενεργοποιητής της αιμοπεταλιακής συσσώρευσης και έκκρισης, *in vitro*”. **6^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Θρόμβωσης-Αντιθρομβωτικής Αγωγής**, 27-29 Σεπτεμβρίου 2018, Αθήνα, Ελλάδα.
8. Σ. Παπαδάκη, Α. Τσελέπης. “Η επίδραση του παράγοντα Χα στην ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων *in vitro*”. **7^ο Συμπόσιο των Ομάδων Εργασίας της ΕΕΑ**, 1-2 Δεκεμβρίου 2017, Αθήνα, Ελλάδα.
9. Σ. Παπαδάκη, Σιδηροπούλου, Β Χαντζηχρήστος, Μ. Πασχόπουλος, Α. Τσελέπης. “Ο ρόλος του υποδοχέα PAR-1 στην ενεργοποίηση πρόδρομων ενδοθηλιακών κυττάρων από τους παράγοντες πήξης Χα και θρομβίνη”. **7^ο Συμπόσιο των Ομάδων Εργασίας της ΕΕΑ**, 1-2 Δεκεμβρίου 2017, Αθήνα, Ελλάδα.
10. Σ. Παπαδάκη, Σ. Σιδηροπούλου, Β Χαντζηχρήστος, Μ. Πασχόπουλος, Α. Τσελέπης. “Ο ρόλος του υποδοχέα PAR-1 στην ενεργοποίηση πρόδρομων ενδοθηλιακών κυττάρων από τον παράγοντα Χα”. **5^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Θρόμβωσης-Αντιθρομβωτικής Αγωγής**, 21-23 Σεπτεμβρίου 2017, Αθήνα, Ελλάδα.
11. Σ. Παπαδάκη, Σ. Σιδηροπούλου, Β Χαντζηχρήστος, Μ. Πασχόπουλος, Α. Τσελέπης. “Το vonaparaxa αναστέλλει την ενεργοποίηση των πρόδρομων ενδοθηλιακών κυττάρων από τη θρομβίνη”. **5^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Θρόμβωσης-Αντιθρομβωτικής Αγωγής**, 21-23 Σεπτεμβρίου 2017, Αθήνα, Ελλάδα.
12. Σ. Παπαδάκη, Σ. Σιδηροπούλου, Β Χαντζηχρήστος, Μ. Πασχόπουλος, Α. Τσελέπης. “Μελέτη του ρόλου του υποδοχέα PAR-1 στην ενεργοποίηση πρόδρομων ενδοθηλιακών κυττάρων από τη θρομβίνη”. **7^ο Πανελλήνιο Συνέδριο της ΕΕΑ**, 1-3 Δεκεμβρίου 2016, Αθήνα, Ελλάδα.
13. Σ. Παπαδάκη, Σ. Σιδηροπούλου, Β Χαντζηχρήστος, Α. Τσελέπης. “Μελέτη της δράσης του FXa στη μεμβρανική έκφραση του ICAM-1 σε ενδοθηλιακά κύτταρα. Ο ρόλος του PAR-1”. **4^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Θρόμβωσης-Αντιθρομβωτικής Αγωγής**, 22-24 Σεπτεμβρίου 2016, Αθήνα, Ελλάδα.
14. Σ. Παπαδάκη, Σ. Σιδηροπούλου, Β Χαντζηχρήστος, Μ. Πασχόπουλος, Α. Τσελέπης. “Μελέτη του ρόλου του υποδοχέα PAR-1 στην ενεργοποίηση πρόδρομων ενδοθηλιακών κυττάρων από τη θρομβίνη”. **4^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Θρόμβωσης-Αντιθρομβωτικής Αγωγής**, 22-24 Σεπτεμβρίου 2016, Αθήνα, Ελλάδα.

15. Η.Χ. Μοσχονάς, Σ. Παπαδάκη, Α. Τσελέπης. “Διερεύνηση των συνθηκών που εξασφαλίζουν την ισχυρότερη δράση του αντιαιμοπεταλιακού φαρμάκου voraparaxar *in vitro*”. **4^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Θρόμβωσης-Αντιθρομβωτικής Αγωγής**, 22-24 Σεπτεμβρίου 2016, Αθήνα, Ελλάδα.

➤ ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΑ ΣΥΓΓΡΑΜΑΤΑ

1. Α.Δ. Τσελέπης, Σ. Παπαδάκη, Η.Χ. Μοσχονάς. Κεφάλαιο ΙΧ “Πρόληψη της υποτροπής του ισχαιμικού αγγειακού εγκεφαλικού επεισοδίου και καρδιαγγειακών συμβαμάτων” σελ. 249-255 στο σύγγραμμα με τίτλο “Αγγειακά εγκεφαλικά επεισόδια”.

➤ ΔΙΑΚΡΙΣΕΙΣ

1. **Προσκεκλημένη ομιλήτρια** για το θέμα με τίτλο “Ο ρόλος των παραγόντων πήξης Χα και θρομβίνη καθώς και των άμεσων από του στόματος αναστολέων τους στην αθηρογένεση” στο 8^ο Πανελλήνιο Συνέδριο της Ελληνικής Εταιρείας Αθηροσκλήρωσης, 29/11-1/12/18, Αθήνα.
2. **Έπαινος** για την ανακοίνωση με τίτλο: “Ο ρόλος του υποδοχέα PAR-1 στην ενεργοποίηση πρόδρομων ενδοθηλιακών κυττάρων από τους παράγοντες πήξης Χα και θρομβίνη”, 7^ο Πανελλήνιο Συνέδριο των ομάδων εργασίας της ΕΕΑ, 1-2/12/17, Αθήνα.
3. **Βραβείο καλύτερης προφορικής εργασίας** με τίτλο: “Ο ρόλος του υποδοχέα PAR-1 στην ενεργοποίηση πρόδρομων ενδοθηλιακών κυττάρων από τον παράγοντα πήξης Χα”, 5^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Ι.Μ.Ε.Θ.Α, 21-23/09/17, Αθήνα
4. Επιχορήγηση για τη συμμετοχή μου με ηλεκτρονικά αναρτημένη ανακοίνωση στο 85^ο Συνέδριο της ΕΑΣ (**Young Investigator Fellowship**), 23-26/4/17, Πράγα, Τσεχία.
5. **Βραβείο καλύτερης εργασίας** για την αναρτημένη ανακοίνωση με τίτλο: “Μελέτη του ρόλου του υποδοχέα PAR-1 στην ενεργοποίηση πρόδρομων ενδοθηλιακών κυττάρων από τη θρομβίνη”, 7^ο Πανελλήνιο Συνέδριο της ΕΕΑ, 1-3/12/16, Αθήνα.
6. **Βραβείο καλύτερης εργασίας** για την προφορική ανακοίνωση με τίτλο: “Μελέτη του ρόλου του υποδοχέα PAR-1 στην ενεργοποίηση πρόδρομων ενδοθηλιακών κυττάρων από τη θρομβίνη”, 4^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Ι.Μ.Ε.Θ.Α, 22-24/09/16, Αθήνα.

7. **Βραβείο καλύτερης εργασίας** για την αναρτημένη ανακοίνωση με τίτλο: “Διερεύνηση των συνθηκών που εξασφαλίζουν την ισχυρότερη δράση του αντιαιμοπεταλιακού φαρμάκου voraparaxar *in vitro*”, 4^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Ι.Μ.Ε.Θ.Α, 22-24/09/16, Αθήνα.
8. Επιχορήγηση παρακολούθησης του 84^{ου} Συνεδρίου της EAS, 29/5/16-1/6/16, Ίνσμπρουκ, Αυστρία.
9. **Υπότροφος της Ελληνικής Εταιρείας Αθηροσκλήρωσης** για την εκπόνηση της παρούσας διδακτορικής διατριβής με τίτλο “Μελέτη του ρόλου των παραγόντων πήξης Χα και θρομβίνης στην αθηροθρόμβωση”.