



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ  
ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ  
ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ**

**ΠΛΕΙΟΤΡΟΠΙΚΕΣ ΔΡΑΣΕΙΣ  
ΑΓΩΝΙΣΤΩΝ ΑΙΜΟΠΕΤΑΛΙΑΚΩΝ ΥΠΟΔΟΧΕΩΝ:  
ΥΠΟΚΕΙΜΕΝΟΙ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΚΑΙ  
ΠΑΘΟΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΟΣ ΡΟΛΟΣ**

**ΣΟΦΙΑ ΣΙΔΗΡΟΠΟΥΛΟΥ**  
ΧΗΜΙΚΟΣ, MSc

**ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ  
ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2020**



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ  
ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ  
ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ**

**ΠΛΕΙΟΤΡΟΠΙΚΕΣ ΔΡΑΣΕΙΣ  
ΑΓΩΝΙΣΤΩΝ ΑΙΜΟΠΕΤΑΛΙΑΚΩΝ ΥΠΟΔΟΧΕΩΝ:  
ΥΠΟΚΕΙΜΕΝΟΙ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΚΑΙ  
ΠΑΘΟΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΟΣ ΡΟΛΟΣ**

**ΣΟΦΙΑ ΣΙΔΗΡΟΠΟΥΛΟΥ**  
ΧΗΜΙΚΟΣ, MSc

**ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ  
ΙΩΑΝΝΙΝΑ 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.: 899<sup>Α</sup>/19-12-2014

Μέλη Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής:

Επιβλέπων:

Τσελέπης Αλέξανδρος, Καθηγητής Τμήματος Χημείας Π/μιου Ιωαννίνων

Μέλη:

Δούλιας Πασχάλης-Θωμάς, Επίκουρος Καθηγητής Τμήματος Χημείας Π/μιου Ιωαννίνων

Μηλιώνης Χαράλαμπος, Καθηγητής Ιατρικής Σχολής Π/μιου Ιωαννίνων

Ημερομηνία ορισμού θέματος: 12-01-2015

Θέμα: «Πλειοτροπικές δράσεις αγωνιστών αιμοπεταλιακών υποδοχέων: Υποκείμενοι μηχανισμοί και παθοφυσιολογικός ρόλος»

ΟΡΙΣΜΟΣ ΕΠΤΑΜΕΛΟΥΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ από τη Γ.Σ.Ε.Σ.: 1012<sup>Α</sup>/19-12-2019

1. Τσελέπης Αλέξανδρος, Καθηγητής Τμήμα Χημείας Π/μιου Ιωαννίνων
2. Δούλιας Πασχάλης-Θωμάς, Επίκουρος Καθηγητής Τμήματος Χημείας Π/μιου Ιωαννίνων
3. Μηλιώνης Χαράλαμπος, Καθηγητής Ιατρικής Σχολής Π/μιου Ιωαννίνων
4. Κούκκου Άννα-Ειρήνη, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Τμήματος Χημείας Π/μιου Ιωαννίνων
5. Πάνου-Πομώνη Ευγενία, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Τμήματος Χημείας Π/μιου Ιωαννίνων
6. Κοραντζόπουλος Παναγιώτης, Επίκουρος Καθηγητής Ιατρικής Σχολής Π/μιου Ιωαννίνων
7. Χατζημιχαήλ Ελευθερία, Επίκουρη Καθηγήτρια Ιατρικής Σχολής Π/μιου Ιωαννίνων

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

Η Πρόεδρος του Τμήματος Χημείας  
Λουλούδη Μαρία

Η Γραμματέας του Τμήματος  
Ξανθή Τουτουτζόγλου



*„Alle Hindernisse und Schwierigkeiten sind Stufen, auf denen wir in die Höhe steigen“*

*Friedrich Nietzsche*





## Πρόλογος – Ευχαριστίες

Η παρούσα διατριβή εκπονήθηκε στον Τομέα Οργανικής Χημείας και Βιοχημείας, στο Ερευνητικό Κέντρο Αθηροθρόμβωσης/Ερευνητικό Εργαστήριο Λιπιδίων και Λιποπρωτεϊνών, του Τμήματος Χημείας, του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, από το Δεκέμβριο του 2014 έως τον Ιανουάριο του 2020.

Κατ' αρχήν, θα ήθελα να εκφράσω την ευγνωμοσύνη μου στον επιβλέποντα καθηγητή μου κ. Αλέξανδρο Τσελέπη για την ανάθεση του θέματος της παρούσας διατριβής. Τον ευχαριστώ για την ευκαιρία που μου έδωσε να ενταχθώ στην ομάδα του και για την εμπιστοσύνη που έδειξε στο πρόσωπο μου, αλλά και για τον πολύτιμο χρόνο που αφιέρωσε καθ' όλη τη διάρκεια της διατριβής προσπαθώντας να μου μεταδώσει τις γνώσεις του και να με βοηθήσει στις δυσκολίες που προέκυπταν. Επίσης, τον ευχαριστώ για τη συμμετοχή μου σε ερευνητικό πρόγραμμα, καθώς και για την οικονομική ενίσχυση, γιατί χωρίς αυτή δεν θα ήταν εφικτή η ολοκλήρωση της διδακτορικής μου διατριβής.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τα μέλη της τριμελούς επιτροπής μου κ. Δημόκριτο Τσουκάτο, Καθηγητή Βιοχημείας του τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, καθώς και τον κ. Χαράλαμπο Μηλιώνη, Καθηγητή Παθολογίας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων για την άψογη συνεργασία μας κατά τη διάρκεια της διδακτορικής μου διατριβής. Ευχαριστώ τον κ. Πασχάλη-Θωμά Δούλια, Επίκουρο Καθηγητή Βιοχημείας του τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, για την αποδοχή να αντικαταστήσει τον κ. Δημόκριτο Τσουκάτο στην τριμελή επιτροπή. Επίσης, ευχαριστώ πολύ και τα υπόλοιπα μέλη της επταμελούς επιτροπής για την ευγενική αποδοχή να συμμετέχουν στην εξεταστική μου επιτροπή.

Ευχαριστώ θερμά τον καθηγητή κ. Κωνσταντίνο Στέλλο, ο οποίος μου έδωσε τη δυνατότητα να επισκεφθώ το εργαστήριο του στο Πανεπιστήμιο Γκαίτε της Φρανκφούρτης, προκειμένου να εκπαιδευτώ σε νέες εργαστηριακές τεχνικές, καθώς και για την καθοδήγησή του κατά τη διάρκεια των πειραμάτων μου. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τη Δρ. Αικατερίνη Γατσιού, καθώς και την Τεχνικό εργαστηρίου Carolin Amrhein, το φοιτητή Ιατρικής Marco Sachse και τη Δρ. Francesca Bonini για τις πολύτιμες συμβουλές τους, τη βοήθεια τους και το χρόνο που αφιέρωσαν σε μένα, καθώς και για τις ευχάριστες στιγμές που περάσαμε μαζί καθ' όλη τη διάρκεια της διαμονής μου στο εργαστήριο.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τη Δρ. Μαρία Τσουμάνη για τις γνώσεις που μου μετέδωσε, καθώς αποτέλεσε τον άνθρωπο που με καθοδήγησε στα πρώτα μου βήματα στο εργαστήριο και στο χώρο των αιμοπεταλίων, αλλά και για τη βοήθεια και τις πολύτιμες συμβουλές της κατά τη διάρκεια της εκμάθησης των νέων εργαστηριακών τεχνικών.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ στους φίλους μου Δρ. Βασίλειο Χαντζηχρήστο, Δρ. Αλεξία Γκουρογιάννη και υπ. Διδάκτωρ Γλυκερία Βελιβάση για τις ευχάριστες στιγμές που μου χάρισαν, καθώς και για την ηθική και ψυχολογική στήριξη, τις συμβουλές αλλά και τη βοήθεια τους εντός και εκτός εργαστηρίου. Χωρίς αυτούς, η ολοκλήρωση της παρούσας διατριβής δεν θα μπορούσε να επιτευχθεί, καθώς πίστεψαν σε μένα και στάθηκαν δίπλα μου ως πραγματικοί φίλοι σε κάθε δύσκολη στιγμή. Ευχαριστώ πολύ την υπ. Διδάκτωρ Γλυκερία Βελιβάση για την ιδιαίτερη τιμή που μου έκανε για την πιο σημαντική στιγμή της ζωής της. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω το Δρ. Βασίλειο Χαντζηχρήστο για την καθοδήγησή του και τις γνώσεις που μου μετέδωσε στα πρώτα μου βήματα στο χώρο των κυττάρων, αλλά και για τις μετέπειτα συμβουλές του, καθώς και τη Δρ. Αλεξία Γκουρογιάννη για τη βοήθεια της στην αρχή των πειραμάτων μου.

Ευχαριστώ θερμά τη συνεργάτιδα και φίλη μου υπ. Διδάκτωρ Αικατερίνη Τσούκα για την πολύτιμη στήριξη της, καθώς και για τις ευχάριστες και διασκεδαστικές στιγμές που ζήσαμε και συνεχίζουμε να ζούμε εντός και εκτός εργαστηρίου. Παρόλο που δε μας δόθηκε η πρώτη ευκαιρία να «γνωριστούμε», την ευχαριστώ γιατί μου έμαθε πως δεν πρέπει να μένουμε στην αρχική εντύπωση και πως ποτέ δεν είναι αργά για να δοθεί η δεύτερη ευκαιρία σε ανθρώπους, προκειμένου να τους γνωρίσεις καλύτερα. Επίσης, θέλω να ευχαριστήσω τους φίλους μου και μεταπτυχιακούς φοιτητές Έλενα Παπά και Στυλιανό Παπαδόπουλο, πάνω απ' όλα για τη φιλία τους, αλλά για τις ευχάριστες και πολύχρωμες πινελιές που προσθέτουν στην καθημερινότητα και στη ζωή μου. Οι τρεις τους έγραψαν τον ομορφότερο επίλογο στην ολοκλήρωση της διδακτορικής μου διατριβής.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω το Δρ. Κωνσταντίνο Τέλλη για τις χρήσιμες συμβουλές του και την πολύτιμη βοήθειά του σε κάθε πρόβλημα που προέκυπτε. Ευχαριστώ τους υπ. Διδάκτωρ Ηρακλή Μοσχονά και Στυλιανή Παπαδάκη για τη συνεργασία τους, καθώς και για στιγμές που ζήσαμε. Επίσης, θέλω να ευχαριστήσω και τα νέα μέλη του εργαστηρίου, την υπ. Διδάκτωρ Λουίζα Πεχλιβάνη και το μεταπτυχιακό φοιτητή Ιωάννη Κουτσαλιάρη για το ευχάριστο κλίμα.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ στους εκτός εργαστηρίου φίλους μου, οι οποίοι ήταν δίπλα μου ομορφαίνοντας τη δύσκολη καθημερινότητα μου. Θα ήθελα να τους ευχαριστήσω όλους ονομαστικά. Ωστόσο, όλα τα ονόματα τους είναι δύσκολο να αποτυπωθούν σε μια κόλλα χαρτί. Ανάμεσα σε αυτούς όμως, δεν γίνεται να μην ευχαριστήσω τις Δρ. Χριστίνα Μπάτση και Δρ. Άννα Χήτα, και πλέον επίκουρη καθηγήτρια στο Τμήμα Γερμανικής Γλώσσας και Φιλολογίας του Πανεπιστημίου Αθηνών, οι οποίες ήταν δίπλα μου, ακούγοντας τους προβληματισμούς μου και δίνοντας μου απλόχερα τις πολύτιμες συμβουλές τους. Vielen Dank für alles!!

Δε θα μπορούσα να ξεχάσω το σύντροφο μου και συνοδοιπόρο στη ζωή μου Γεώργιο Τσιούρη. Τον ευχαριστώ ιδιαίτερος για την υπομονή του, καθώς έχοντας «άγνοια κινδύνου» ήταν δίπλα μου σε όλες τις δύσκολες στιγμές της ζωής μου. Θέλω να τον ευχαριστήσω για την στήριξη του όλα αυτά τα χρόνια, για τις όμορφες και ευχάριστες στιγμές που ζήσαμε μαζί, καθώς για την εμπιστοσύνη του για το μέλλον.

Τέλος, ευχαριστώ ολόψυχα τους γονείς μου Φίλιππο και Σταυρούλα για τις θυσίες που έκαναν προκειμένου να ολοκληρωθούν οι σπουδές μου, αλλά και για την αγάπη, την υπομονή και τη συμπαράστασή τους όλα τα χρόνια της ζωής μου. Ένα μεγάλο ευχαριστώ στα αδέρφια μου Δέσποινα και Κυριάκο, καθώς και στις οικογένειές τους, οι οποίοι αν και μακριά, βρίσκονται πάντα δίπλα μου προκειμένου να με βοηθήσουν και να με στηρίξουν.

*Σοφία Σιδηροπούλου*

*Ιωάννινα, 2020*



## Περιεχόμενα

Συντμήσεις .....	1
Συντμήσεις κλινικών μελετών.....	5
Σκοπός της Διατριβής.....	9
<b>1<sup>ο</sup> Κεφάλαιο – Αιμοπετάλια.....</b>	<b>11</b>
1.1. Εισαγωγή .....	11
1.2. Δομικά χαρακτηριστικά των αιμοπεταλίων .....	11
1.3. Υποδοχείς προσκόλλησης .....	16
1.4. PAR υποδοχείς .....	22
1.5. P2 υποδοχείς.....	25
1.6. Προστανοειδή και οι υποδοχείς τους .....	29
1.7. Προσκόλληση, ενεργοποίηση και συσσώρευση των αιμοπεταλίων .....	32
<b>2<sup>ο</sup> Κεφάλαιο – Πρόδρομα Ενδοθηλιακά Κύτταρα .....</b>	<b>39</b>
2.1. Εισαγωγή .....	39
2.2. Χαρακτηρισμός των EPCs.....	40
2.3. Ταυτοποίηση και ταξινόμηση των EPCs.....	41
2.4. Κινητοποίηση, παλιννόστηση και ενσωμάτωση των EPCs .....	47
2.5. Αλληλεπιδράσεις μεταξύ αιμοπεταλίων, λευκοκυττάρων και ενδοθηλίου.....	50
2.6. EPCs και καρδιαγγειακός κίνδυνος.....	64
<b>3<sup>ο</sup> Κεφάλαιο – Τικαγρελόρη και Αδενοσίνη .....</b>	<b>67</b>
3.1. Εισαγωγή .....	67
3.2. Ανταγωνιστές του P2Y <sub>12</sub> R .....	69
3.3. Φαρμακοκινητικό και φαρμακοδυναμικό προφίλ της τικαγρελόρης.....	75
3.4. Πλειοτροπικές δράσεις της τικαγρελόρης .....	79
3.5. Αδενοσίνη και καρδιαγγειακό σύστημα.....	83

<b>4<sup>ο</sup> Κεφάλαιο – Υλικά και Μέθοδοι .....</b>	<b>93</b>
4.1. Συσσωρευομετρία οπτικής διαπερατότητας.....	93
4.2. Συσσωρευομετρία εμπέδησης .....	102
4.3. Κυτταρομετρία ροής.....	107
4.4. Μέθοδος μαγνητικού κυτταρικού διαχωρισμού.....	113
4.5. Κυτταρική καλλιέργεια .....	121
4.6. Ανοσοενζυμική μέθοδος.....	131
4.7. Αγγειογένεση.....	137
4.8. Στατιστική ανάλυση .....	143
<b>5<sup>ο</sup> Κεφάλαιο – Αποτελέσματα .....</b>	<b>145</b>
5.1. Η δράση της τικαγρελόρης και της αδενοσίνης στην αιμοπεταλιακή συσσώρευση.....	145
5.2. Η δράση της τικαγρελόρης και της αδενοσίνης στην έκφραση του ενδοθηλιακού φαινοτύπου των CD34 <sup>+</sup> πρόδρομων κυττάρων, καθώς και στην αλληλεπίδραση τους με τα αιμοπετάλια .....	150
5.3. Η δράση της τικαγρελόρης και της αδενοσίνης στα πρόδρομα και ώριμα ECs ....	161
5.4. Η δράση της τικαγρελόρης και της αδενοσίνης στην αγγειογένεση .....	171
<b>6<sup>ο</sup> Κεφάλαιο – Συζήτηση .....</b>	<b>181</b>
<b>7<sup>ο</sup> Κεφάλαιο – Βιβλιογραφία .....</b>	<b>191</b>
<b>Περίληψη .....</b>	<b>243</b>
<b>Abstract.....</b>	<b>247</b>
<b>Δημοσιεύσεις – Ανακοινώσεις σε Επιστημονικά Συνέδρια .....</b>	<b>251</b>







## Συντμήσεις

AA	αραχιδονικό οξύ (arachidonic acid)
AC	αδενυλική κυκλάση (adenylate cyclase)
ACS	οξύ στεφανιαίο σύνδρομο
ADA	δεαμινάση της αδενοσίνης (adenosine deaminase)
ADP	διφωσφορική αδενοσίνη (adenosine diphosphate)
AMP	μονοφωσφορική αδενοσίνη (adenosine monophosphate)
AR	υποδοχέας αδενοσίνης (adenosine receptor)
ATP	τριφωσφορική αδενοσίνη (adenosine triphosphate)
AYPGKF	αλανίνη-τυροσίνη-προλίνη-γλυκίνη-λυσίνη-φαινυλαλανίνη (Ala-Tyr-Pro-Gly-Lys-Phe)
bFGF	βασικός ινοβλαστικός αυξητικός παράγοντας (basic fibroblast growth factor)
BM	μυελός των οστών (bone marrow)
BSA	αλβουμίνη βόειου ορού (bovine serum albumin)
cAMP	κυκλική μονοφωσφορική αδενοσίνη (cyclic adenosine monophosphate)
CAC	κυκλοφορούν αγγειογενετικό κύτταρο (circulating angiogenic cell)
CBFV	ταχύτητα στεφανιαία αιματική ροή (coronary blood flow velocity_
CFU-Hill ή CFU	EPC, το οποίο έχει την ικανότητα σχηματισμού αποικιών (colony forming unit)
CNT	συγκεντρωτικός μεταφορέας νουκλεοσιδίων (concentrative nucleoside transporter)
COX	κυκλοξυγονάση (cyclooxygenase)
DAPT	διπλή αντιαιμοπεταλιακή αγωγή (dual antiplatelet therapy)
DTS	πυκνό σωληνοειδές σύστημα (dense tubular system)
EC	ενδοθηλιακό κύτταρο (endothelial cell)
ECFC	κύτταρο με ικανότητα να σχηματίζει ενδοθηλιακές αποικίες (endothelial colony-forming cell)
EDRF	ενδοθηλιακός παράγοντας χάλασης (endothelium-derived relaxing factor)
eNOS	συνθετάση του ενδοθηλιακού μονοξειδίου του αζώτου (endothelial nitric

	oxide synthase)
ENT	εξισοροπιστής μεταφορέας νουκλεοσιδίων (equilibrative nucleoside transporter)
EPC	πρόδρομο ενδοθηλιακό κύτταρο (endothelial progenitor cell)
ERK	πρωτεϊνική κινάση που ρυθμίζεται από εξωκυτάρια σήματα (extracellular signal-regulated kinase)
FC	κυτταρομετρία ροής (flow cytometry)
FDA	Υπηρεσία Τροφίμων και Φαρμάκων (Food and Drug Administration)
GM-CSF	παράγοντας διέγερσης σχηματισμού αποικιών από μακροφάγα (granulocyte/macrophage colony-stimulating factor)
GP	γλυκοπρωτεΐνη (glycoprotein)
GPCR	υποδοχέας συζευγμένος με G-πρωτεΐνες (G protein-coupled receptor)
G-CSF	παράγοντας διέγερσης αποικιών των κοκκιοκυττάρων (granulocyte colony-stimulating factor)
HGF	αυξητικός παράγοντας ηπατοκυττάρων (hepatocyte growth factor)
HIF-1	επαγόμενος από την υποξία παράγοντας-1 (hypoxia-inducible factor-1)
IA	συσσωρευομετρία εμπέδησης (impedance aggregometry)
ICAM	διακυτταρικό μόριο προσκόλλησης (intracellular adhesion molecule)
IL	ιντερλευκίνη (interleukin)
IP	prostaglandin I <sub>2</sub> receptor
IP3	τριφωσφορική ινοσιτόλη (inositol triphosphate)
JAM	junctional adhesion molecule
KDR (CD309)	kinase insert domain receptor
LDL	λιποπρωτεΐνη χαμηλής πυκνότητας (low density lipoprotein)
LTA	συσσωρευομετρία οπτικής διαπερατότητας (light transmission aggregometry)
MAPK	πρωτεϊνική κινάση που ενεργοποιείται από το μιτογόνο (mitogen-activated protein kinase)
MCAM (CD146)	προσκολλητικό μόριο κυττάρων μελανώματος (melanoma cell adhesion molecule)
MCP-1	χημειοτακτικός παράγοντας των μονοκυττάρων (monocyte

	chemoattractant protein-1)
MFI	μέση ένταση φθορισμού (mean fluorescence index)
MMP	μεταλλοπρωτεϊνάση θεμέλιας ουσίας (matrix metalloproteinase)
MNC	μονοπύρρηνα κύτταρα (mononuclear cell)
NF -κB	πυρηνικός μεταγραφικός παράγοντας (nuclear factor-kappa B)
NO	μονοξείδιο του αζώτου (nitric oxide)
NSAID	μη στεροειδές αντιφλεγμονώδες φάρμακο (non-steroidal anti-inflammatory drug)
OEC	προχωρημένης ωρίμανσης EPC (late-outgrowth endothelial cell)
OCS	ανοιχτό σωληνοειδές σύστημα (open canalicular system)
PAR	ενεργοποιημένος υποδοχέας των πρωτεασών (protease-activated receptor)
PCI	διαδερμική στεφανιαία επέμβαση (percutaneous coronary intervention)
PDGF	αιμοπεταλιακός αυξητικός παράγοντας (platelet-derived growth factor)
PECAM-1 (CD31)	προσκολλητικό μόριο των αιμοπεταλίων και των ενδοθηλιακών κυττάρων (platelet endothelial cell adhesion molecule-1)
PF-4/CXCL4	αιμοπεταλιακός παράγοντας-4 (platelet factor-4)
PG	προσταγλανδίνη (prostaglandin)
PGI <sub>2</sub>	προστακυκλίνη (prostacyclin)
PI3K	κινάση του φωσφοϊνοσιτιδίου 3 (phosphoinositide 3-kinase)
PK	πρωτεϊνική κινάση (protein kinase)
PRP	πλάσμα πλούσιο σε αιμοπετάλια (platelet-rich plasma)
PSGL-1	P-selectin glycoprotein ligand-1
RANTES/CCL5	εκκρίνεται στην ενεργοποίηση, φυσιολογικά T-λεμφοκύτταρα την εκφράζουν και την εκκρίνουν (regulated upon activation, normal T cell expressed and secreted)
RGD	αργινίνη-γλυκίνη-ασπαραγινικό οξύ
ROS	δραστικές μορφές οξυγόνου (reactive oxygen species)
RT	θερμοκρασία δωματίου (room temperature)
SCFR (CD117)	υποδοχέας του αυξητικού παράγοντα των βλαστοκυττάρων (mast/stem cell growth factor receptor)
SDF-1/CXCL12	προερχόμενος από κύτταρα του στρώματος παράγοντας-1 (stromal cell-derived factor-1)

SFLLRN	σερίνη-φαινυλαλανίνη-λευκίνη-λευκίνη-αργινίνη-ασπαραγίνη (Ser-Phe-Leu-Leu-Arg-Asn)
TF	ιστικός παράγοντας (tissue factor)
TGF- $\beta$	αυξητικός παράγοντας μετασχηματισμού- $\beta$ (transforming growth factor- $\beta$ )
TNF	παράγοντας νέκρωσης των όγκων (tumor necrosis factor)
TP	thromboxane prostanoid receptor
TRAP	πεπτίδιο-ενεργοποιητή του υποδοχέα της θρομβίνης (thrombin receptor-activating peptide)
Tx	θρομβοξάνιο (thromboxane)
UEA-1	Ulex europaeus agglutinin-1
VASP	αγγειοδιασταλτική φωσφοπρωτεΐνη (vasodilator-stimulated phosphoprotein)
VEGF	αγγειακός ενδοθηλιακός αυξητικός παράγοντας (vascular endothelial growth factor)
VSMC	αγγειακό λείο μυϊκό κύτταρο (vascular smooth muscle cell)
vWF	παράγοντας von Willebrand (von Willebrand factor)
WP	πλυμένο αιμοπετάλιο (washed platelet)

## Συντμήσεις κλινικών μελετών

CHAMPION	Cangrelor Versus Standard Therapy to Achieve Optimal
PHOENIX	Management of Platelet Inhibition
DISPERSE	Dose confirmation Study assessing antiPlatelet Effects of AZD6140 vs clopidogrel in non-ST segment Elevation myocardial infarction
ISAR	Intracoronary Stenting and Angiographic Results
J-LANCELOT	Japanese-Lesson from Antagonizing the Cellular Effect of Thrombin
JUMBO-TIMI 26	Joint Utilization of Medications to Block Platelets Optimally-Thrombolysis In Myocardial Infarction 26
LANCELOT-ACS	Lessons from Antagonizing the Cellular Effect of Thrombin-Acute Coronary Syndromes
ONSET/OFFSET	ONSET and OFFSET of the antiplatelet effects of ticagrelor versus clopidogrel in patients with stable coronary artery disease
PEGASUS	Prevention of Cardiovascular Events in Patients With Prior Heart Attack Using Ticagrelor Compared to Placebo on a Background of Aspirin
PHILO	Phase the International Study of Ticagrelor and Clinical Outcomes in Asian ACS Patients
PLATO	Platelet Inhibition and Patient Outcomes
PRINCIPLE-TIMI 44	Prasugrel In Comparison To Clopidogrel For Inhibition Of Platelet Activation And Aggregation–Thrombolysis In Myocardial Infarction 44
RESPOND	Response to Ticagrelor in Clopidogrel Nonresponders and Responders and Effect of Switching Therapies
STEP-AMI	Safety, Tolerability and Effect on Patency in Acute Myocardial Infarction
TRA-PCI	Thrombin Receptor Antagonist-Percutaneous Coronary Intervention

TRACER	Thrombin Receptor Antagonist for Clinical Event Reduction in Acute Coronary Syndrome
TRITON-TIMI 38	Trial to Assess Improvement in Therapeutic Outcomes by Optimizing Platelet Inhibition with Prasugrel-Thrombolysis in Myocardial Infarction 38







## Σκοπός της Διατριβής

Τα νέα αντιαμοπεταλιακά φάρμακα, συμπεριλαμβανομένου της τικαγρελόρης, εισάγονται διαδοχικά στη θεραπεία αθηροθρομβωτικών καταστάσεων λόγω της ανωτερότητάς τους έναντι ενός τυπικού συνδυασμού της κλοπιδογρέλης με την ασπιρίνη σε ασθενείς με οξύ στεφανιαίο σύνδρομο. Η τικαγρελόρη, ένας ανταγωνιστής του P2Y<sub>12</sub> υποδοχέα, παρουσιάζει μια μοναδικότητα μεταξύ των αντιαμοπεταλιακών φαρμάκων, καθώς αναστέλλει με αντιστρεπτό τρόπο τον αιμοπεταλιακό P2Y<sub>12</sub> υποδοχέα και επειδή επιδεικνύει ένα ευρύ φάσμα πλεονεκτικών πλειοτροπικών δράσεων, ο οποίες πιθανότατα σχετίζονται με την αυξημένη συγκέντρωση της αδενοσίνης, καθώς αναστέλλεται η κυτταρική της πρόσληψη από τα ερυθροκύτταρα. Οι πλειοτροπικές δράσεις της τικαγρελόρης περιλαμβάνουν την καρδιοπροστασία, την αποκατάσταση του μυοκαρδίου μετά από ισχαιμικό επεισόδιο, την προαγωγή απελευθέρωσης αντιπηκτικών παραγόντων και, τέλος, αντιφλεγμονώδεις δράσεις. Πέραν των πλεονεκτικών αποτελεσμάτων, η αυξημένη συγκέντρωση της αδενοσίνης είναι υπεύθυνη, επίσης, για ορισμένες ανεπιθύμητες δράσεις της τικαγρελόρης, συμπεριλαμβανομένης της δύσπνοιας και της βραδυκαρδίας.

Σκοπός της παρούσας διατριβής ήταν η παροχή νέων δεδομένων των υποκείμενων μηχανισμών σχετικά με τις δράσεις της τικαγρελόρης, πέραν της αιμοπεταλιακής συσσώρευσης και θρόμβωσης *in vitro*, διερευνώντας αν η τικαγρελόρη, είτε άμεσα διαμέσου του P2Y<sub>12</sub> υποδοχέα είτε έμμεσα διαμέσου της αδενοσίνης, μπορεί να επηρεάσει την επαγόμενη από τα αιμοπετάλια διαφοροποίηση των CD34<sup>+</sup> πρόδρομων κυττάρων σε πρόδρομα ενδοθηλιακά κύτταρα, καθώς και τη λειτουργικότητα των πρόδρομων και ώριμων ενδοθηλιακών κυττάρων, δεδομένα τα οποία αποτελούν σημαντικά συστατικά των μηχανισμών που εμπλέκονται στην παθοφυσιολογία της καρδιαγγειακής νόσου.



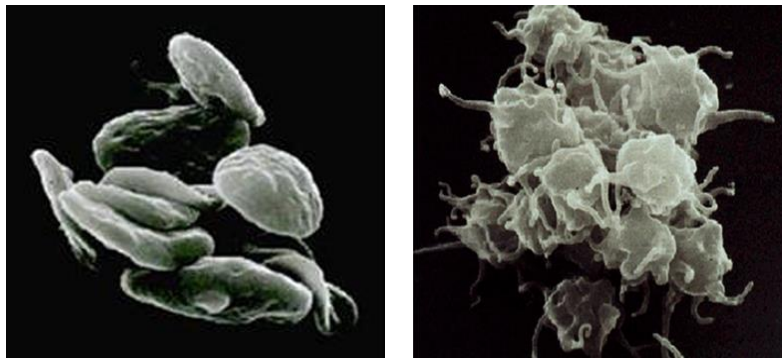
## 1<sup>ο</sup> Κεφάλαιο – Αιμοπετάλια

### 1.1. Εισαγωγή

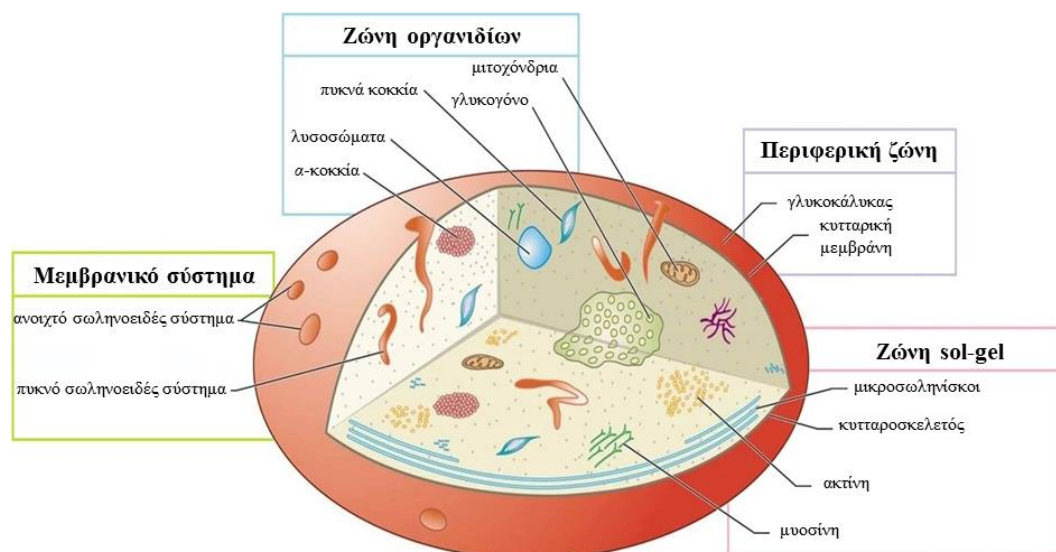
Τα αιμοπετάλια, εκτός από τον καθιερωμένο ρόλο τους στη θρόμβωση και την αιμόσταση, διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο και σε άλλες παθοφυσιολογικές διεργασίες [1–3]. Τα αιμοπετάλια ή θρομβοκύτταρα είναι μικρά απύρρηνα κυτταρικά θραύσματα του κυτταροπλάσματος των μεγακαρυοκυττάρων, με πολλαπλές λειτουργίες και μικρή διάρκεια ζωής. Τα μεγακαρυοκύτταρα προέρχονται από τα πολυδύναμα βλαστοκύτταρα και είναι μεγάλα, εξειδικευμένα πρόδρομα κύτταρα, τα οποία χρησιμεύουν για την απελευθέρωση των αιμοπεταλίων στην κυκλοφορία του αίματος. Η θρομβοποίηση (παραγωγή των αιμοπεταλίων) λαμβάνει χώρα κυρίως στο μυελό των οστών (BM) και προηγείται της διαφοροποίησης των αιμοποιητικών βλαστοκυττάρων σε πολυπλοειδή μεγακαρυοκύτταρα. Ο χρόνος ζωής των αιμοπεταλίων στο αίμα δεν ξεπερνά τις 7-10 d, ενώ απομακρύνονται από την κυκλοφορία με διάφορους τρόπους, όπως με την απομόνωση στον σπλήνα και σε άλλα όργανα, την «κατανάλωση» για τη διατήρηση της αγγειακής ακεραιότητας, την εναπόθεση στο ενεργοποιημένο αγγειακό τοίχωμα, την ενεργοποίηση καθαυτού ή τη γήρανση. Ωστόσο, ποια κλάσματα των αιμοπεταλίων απομακρύνονται με μια από τις παραπάνω οδούς είναι άγνωστο.

### 1.2. Δομικά χαρακτηριστικά των αιμοπεταλίων

Τα αιμοπετάλια έχουν μέση διάμετρο 2-5  $\mu\text{m}$ , πάχος 0,5  $\mu\text{m}$  και μέσο όγκο 6-10 fL. Σε κατάσταση ηρεμίας έχουν δισκοειδές σχήμα, ενώ κατά την ενεργοποίησή τους αλλάζουν σχήμα και διαμόρφωση αποκτώντας ψευδοπόδια (Εικ. 1.1), τα οποία αποτελούν προεκτάσεις της κυτταρικής μεμβράνης των αιμοπεταλίων. Τα αιμοπετάλια μπορούν να διαχωριστούν δομικά σε τέσσερις περιοχές, με βάση την οργάνωση και τη λειτουργία τους: την περιφερική ζώνη, τη ζώνη sol-gel, τη ζώνη των οργανιδίων και τη ζώνη μεμβρανικού συστήματος [4] (Εικ. 1.2).



Εικ. 1.1. Χαρακτηριστικό σχήμα εν ηρεμία (αριστερά) και ενεργοποιημένων (δεξιά) αιμοπεταλίων.



Εικ. 1.2. Δομή αιμοπεταλίων.

### ✚ Περιφερική ζώνη

Η περιφερική ζώνη των αιμοπεταλίων αποτελείται από τη λεία πλασματική μεμβράνη και το γλυκοκάλυκα. Ο γλυκοκάλυκας των αιμοπεταλίων είναι παχύτερος συγκριτικά με αυτόν άλλων κυττάρων του αίματος, ενώ προσδίδει μια δυναμική δομή, καθώς περιβάλλει εξωτερικά τα αιμοπετάλια. Αποτελείται από βλεννοπολυσακχαρίτες και από μια μεγάλη ποσότητα σιαλικού οξέος, ενώ περιλαμβάνει και γλυκοπρωτεΐνες (GPs), οι οποίες απαιτούνται για την αλληλεπίδραση των αιμοπεταλίων με τον υποενδοθηλιακό χώρο του τραυματισμένου αγγειακού τοιχώματος, καθώς και για την αιμοπεταλιακή ενεργοποίηση, προσκόλληση και συσώρευση. Κάτω από το γλυκοκάλυκα βρίσκεται η λιπιδική διπλοστοιβάδα, η οποία εμφανίζει όμοια μορφολογικά χαρακτηριστικά με τις μεμβράνες άλλων κυττάρων, ωστόσο παίζει σημαντικό ρόλο στην πήξη του αίματος. Η υπομεμβρανική περιοχή των αιμοπεταλίων βρίσκεται ακριβώς κάτω από τη λιπιδική διπλοστοιβάδα, η οποία περιέχει λεπτά νημάτια ακτίνης, τα οποία είναι απαραίτητα για

την αλλαγή σχήματος των αιμοπεταλίων, καθώς και για τη μετατόπιση υποδοχέων και σωματιδίων στην επιφάνεια των αιμοπεταλίων. Στην υπομεμβρανική περιοχή, οι κυτταροπλασματικοί τομείς των διαμεμβρανικών υποδοχέων αλληλεπιδρούν με πρωτεΐνες, πολλές από τις οποίες συνδέονται με καλμοδουλίνη, μυοσίνη και νημάτια ακτίνης συγκροτώντας τον κυτταροσκελετό. Με αυτόν τον τρόπο, ρυθμίζονται οι διαδικασίες σηματοδότησης, οι οποίες απαιτούνται για την ενεργοποίηση αιμοπεταλίων.

### **Ζώνη sol-gel**

Η διαφανής αλλά ωστόσο παχύρρευστη θεμέλια ουσία εσωτερικά των αιμοπεταλίων χαρακτηρίζεται ως ζώνη sol-gel. Μοιάζει με υγρή πηκτή και περιέχει μικροσωληνίσκους και μικρονημάτια, τυχαία κατανεμημένο γλυκογόνο, μερικά λεία κυστίδια καλυμμένα με κλαθρίνη, καθώς και εκκριτικά οργανίδια. Οι μικροσωληνίσκοι είναι διατεταγμένοι σε περιφερικά σπειράματα κοντά στο κυτταρικό τοίχωμα, σχηματίζοντας ένα σύστημα, το οποίο στηρίζει τον κυτταροσκελετό. Τα μικρονημάτια ακτίνης σχηματίζουν μια θεμέλια ουσία κυτταροπλασματικών νηματίων ακτίνης, όπου αιωρούνται όλα τα οργανίδια. Μετά την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων, το κυτταροπλασματικό σύστημα ακτίνης συστέλλει τα σπειράματα των μικροσωληνίσκων μετακινώντας τα  $\alpha$ -κοκκία και τα πυκνά κοκκία στο κέντρο των αιμοπεταλίων, γεγονός που μπορεί τελικά να οδηγήσει στην έκκριση των περιεχομένων τους μέσω του ανοιχτού σωληνοειδούς συστήματος (OCS).

### **Ζώνη οργανιδίων**

Η ζώνη των οργανιδίων περιέχει τρεις κύριους τύπους εκκριτικών οργανιδίων, τα  $\alpha$ -κοκκία, τα πυκνά κοκκία και τα λυσοσώματα. Επιπλέον, τα αιμοπετάλια περιέχουν μιτοχόνδρια και γλυκοσώματα.

#### **$\alpha$ -κοκκία**

Τα  $\alpha$ -κοκκία διαθέτουν στρογγυλό προς ωοειδές σχήμα με διάμετρο 200-500 nm. Ένα αιμοπετάλιο περιέχει 50-80  $\alpha$ -κοκκία, γεγονός που τα καθιστά τα επικρατέστερα οργανίδια, ενώ αποτελούν περίπου το 10% του συνολικού όγκου των αιμοπεταλίων. Τα  $\alpha$ -κοκκία περιέχουν μια μεγάλη ποικιλία πρωτεϊνών προσκόλλησης, οι οποίες είναι σημαντικές για την πρωτογενή αιμόσταση, συμπεριλαμβανομένων του παράγοντα von Willebrand (vWF), του ινωδογόνου, της φμπρονεκτίνης, της βιτρονεκτίνης και της θρομβοσπονδίνης. Οι συγκεκριμένες πρωτεΐνες είναι σημαντικές για την

## *Αιμοπετάλια*

προσκόλληση των αιμοπεταλίων και το σχηματισμό ενός σταθερού θρόμβου. Τα  $\alpha$ -κοκκία περιέχουν επίσης έναν μεγάλο αριθμό διαμεσολαβητών, οι οποίοι συμμετέχουν στην πήξη, την επούλωση πληγών, τη φλεγμονή και την αγγειογένεση, συμπεριλαμβανομένων μεταξύ άλλων του αιμοπεταλιακού παράγοντα-4 (PF-4/CXCL4), της  $\beta$ -θρομβοσφαιρίνης, της χημειοκίνης RANTES/CCL5, της ιντερλευκίνης-8 (IL-8), του αιμοπεταλιακού αυξητικού παράγοντα (PDGF), του αυξητικού παράγοντα μετασχηματισμού- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) και του αγγειακού ενδοθηλιακού αυξητικού παράγοντα (VEGF) [5]. Τέλος, η κεντρική ζώνη των  $\alpha$ -κοκκίων είναι πυκνότερη από την περιφερειακή τους ζώνη, υποδεικνύοντας ενδεχομένως την παρουσία πρωτεϊνών με θέσεις πρόσδεσης για βαρέα μέταλλα.

### Πυκνά κοκκία

Τα πυκνά κοκκία ή  $\delta$ -κοκκία (3-8 κοκκία/αιμοπετάλιο) είναι μικρότερα από τα  $\alpha$ -κοκκία και παρουσιάζουν μεγάλη μορφολογική μεταβλητότητα. Έχουν κυρίως σφαιρικό σχήμα, αλλά μπορούν επίσης να υιοθετήσουν και εκτεταμένες μορφές. Τα πυκνά κοκκία περιέχουν διάφορα αιμοστατικά ενεργά μόρια, τα οποία εκκρίνονται κατά τη διάρκεια της ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων. Εκτός από νουκλεοτίδια αδενίνης, όπως την τριφωσφορική και τη διφωσφορική αδενοσίνη (ATP και ADP, αντίστοιχα), περιέχουν κατεχολαμίνες, σεροτονίνη, πυροφωσφορικά ιόντα, καθώς και ιόντα ασβεστίου και μαγνησίου.

### Λυσοσώματα

Τα αιμοπετάλια περιέχουν μόνο λίγα λυσοσώματα, τα οποία είναι ελαφρώς μικρότερα από τα  $\alpha$ -κοκκία. Περιέχουν τουλάχιστον 13 όξινες υδρολάσες, καθεψίνη D και E, τη μεμβρανική γλυκοπρωτεΐνη των λυσοσωμάτων LAMP-2 και τη τετρασπανίνη CD63. Ωστόσο, ο ρόλος των λυσοσωμάτων στη λειτουργία των αιμοπεταλίων και την αιμόσταση παραμένει σε μεγάλο βαθμό άγνωστος.

### Γλυκοσώματα

Τα γλυκοσώματα, τα οποία περιέχουν γλυκογόνο, είναι ένα άλλο συστατικό της ζώνης των οργανιδίων. Έχουν στρογγυλό ή ωοειδές σχήμα και παρόμοιο μέγεθος με τα  $\alpha$ -κοκκία, ενώ εύκολα συγχέονται με τα αυτά που φέρουν γλυκογόνο.

### Μιτοχόνδρια

Τέλος, στη ζώνη των οργανιδίων υπάρχουν και τα μιτοχόνδρια. Τα αιμοπετάλια περιέχουν κατά μέσο όρο 7 μιτοχόνδρια, τα οποία εμπλέκονται στο μεταβολισμό της οξειδωτικής ενέργειας. Τα μιτοχόνδρια των αιμοπεταλίων έχουν διάμετρο περίπου 200 nm και αναγνωρίζονται εύκολα από την κλασσική μεμβρανική δομή τους. Μαζί με την είσοδο γλυκόζης, τα μιτοχόνδρια συμβάλλουν στη διατήρηση ενός επαρκούς αιμοπεταλιακού ενεργειακού περιεχομένου, τόσο σε σταθερή κατάσταση όσο και κατά τη διάρκεια δραστηριοτήτων των αιμοπεταλίων όπως προσκόλληση, συσσώρευση, έκκριση και συστολή [6]. Επίσης, ρυθμίζουν την ενδοκυττάρια σηματοδότηση μέσω της παραγωγής δραστικών μορφών οξυγόνου (ROS) ως δεύτερου αγγελιοφόρου [7]. Επιπλέον, τα μιτοχόνδρια ξεκινούν την απόπτωση μέσω της απελευθέρωσης του κυτοχρώματος *c*, η οποία είναι σημαντική για την επιβίωση των αιμοπεταλίων.

### Μεμβρανικό σύστημα

Εκτός από την εξωτερική πλασματική μεμβράνη, το μεμβρανικό σύστημα των αιμοπεταλίων περιλαμβάνει συμπλέγματα Golgi, το OCS, το οποίο συνδέεται με την επιφάνεια, το πυκνό σωληνοειδές σύστημα (DTS) και το αδρό ή τραχύ ενδοπλασματικό δίκτυο.

#### Ανοιχτό σωληνοειδές σύστημα (OCS)

Το OCS αποτελεί τμήμα της μεμβρανικής επιφάνειας των αιμοπεταλίων, το οποίο εκτείνεται προς το εσωτερικό του κυττάρου σχηματίζοντας μια σωληνοειδή δομή. Τα κανάλια του μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τη μεταφορά συστατικών του πλάσματος, όπως τη μεταφορά του ινωδογόνου στα  $\alpha$ -κοκκία, ενώ μπορούν επίσης να χρησιμοποιηθούν ως δίοδο για την απελευθέρωση των περιεχομένων των κοκκίων κατά την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων. Επιπλέον, τα κανάλια του OCS μπορούν να εγκολληθούν παρέχοντας μεμβρανικά τμήματα, τα οποία απαιτούνται για την εξάπλωση των αιμοπεταλίων προκειμένου να προσκολληθούν στο τραυματισμένο αγγειακό τοίχωμα. Μέσω αυτού του μηχανισμού, τα ενεργοποιημένα αιμοπετάλια είναι ικανά να αυξήσουν την επιφάνεια τους τέσσερις φορές περισσότερο σε σύγκριση με τα δισκοειδή εν ηρεμία αιμοπετάλια.



### Πυκνό σωληνοειδές σύστημα (DTS)

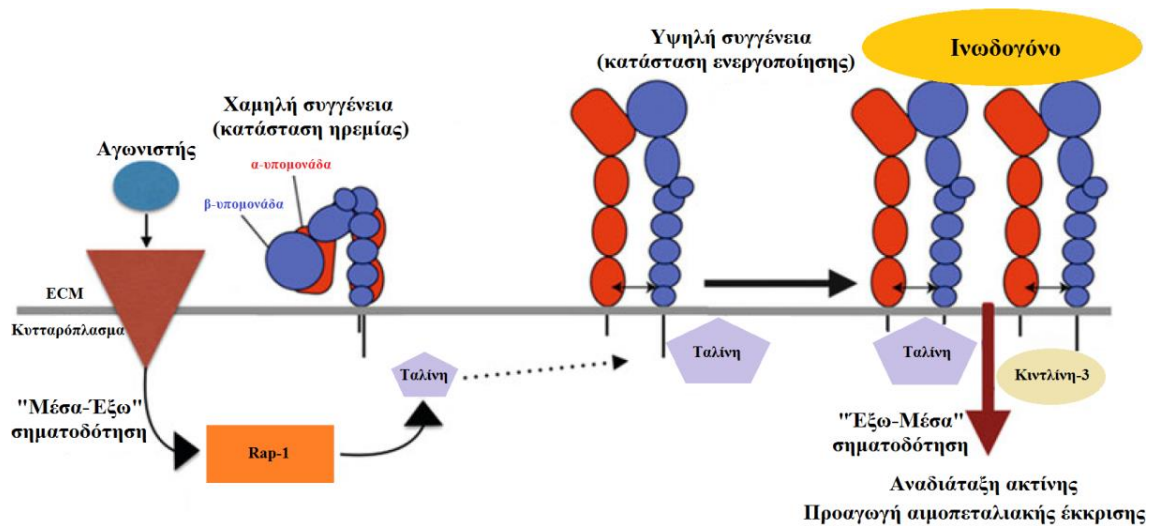
Το DTS είναι υπόλειμμα του λείου ενδοπλασματικού δικτύου του μητρικού μεγακαρυοκυττάρου και αποτελείται από κανάλια, τα οποία είναι τυχαία διασκορπισμένα στο κυτταρόπλασμα των αιμοπεταλίων. Τα κανάλια του διαχωρίζονται από εκείνα του OCS, τα οποία φαίνονται κενά και περιέχουν μια άμορφη ουσία.

### 1.3. Υποδοχείς προσκόλλησης

Τα αιμοπετάλια μπορούν να χαρακτηριστούν ως μηχανές προσκόλλησης. Πράγματι, κάθε γνωστή βιολογική λειτουργία ή παθολογικός ρόλος των αιμοπεταλίων, από την αιμόσταση-θρόμβωση μέχρι τη ρύθμιση της εμβρυϊκής ανάπτυξης [8,9], τη συμμετοχή στη φυσική (μη ειδική) και επίκτητη (ειδική) ανοσία [10] και τη προαγωγή των όγκων [11], περιλαμβάνει τους αιμοπεταλιακούς υποδοχείς προσκόλλησης με τον έναν ή τον άλλο τρόπο. Οι λειτουργίες προσκόλλησης και σηματοδότησης των συγκεκριμένων πλασματικών μεμβρανικών υποδοχέων ρυθμίζονται αυστηρά για να επιτρέψουν ταχείες αιμοστατικές αποκρίσεις των αιμοπεταλίων σε αγγειακές βλάβες και για να αποφευχθούν υπερβολικές αποκρίσεις των αιμοπεταλίων, οι οποίες οδηγούν σε παθολογική θρόμβωση, συμπεριλαμβανομένου του εμφράγματος του μυοκαρδίου και του εγκεφαλικού επεισοδίου [12–14].

Τα αιμοπετάλια εκφράζουν αρκετά μέλη της υπερικογένειας των ιντεγκρινών:  $\alpha_{IIb}\beta_3$  (GPIIb/IIIa),  $\alpha_V\beta_3$ ,  $\alpha_2\beta_1$  (GPIa/IIa),  $\alpha_5\beta_1$  και  $\alpha_6\beta_1$ . Όλες οι ιντεγκρίνες είναι τύπου I διαμεμβρανικά  $\alpha$ - και  $\beta$ -ετεροδιμερή, όπου κάθε υπομονάδα αποτελείται από μια σχετικά μεγάλη εξωκυττάρια περιοχή, μια διαμεμβρανική περιοχή και μια μικρή κυτταροπλασματική περιοχή. Τα κύρια προσδέματα για την ιντεγκρίνη  $\alpha_{IIb}\beta_3$  είναι το ινωδογόνο και ο vWF, αν και κάτω από κατάλληλες πειραματικές συνθήκες στον υποδοχέα μπορεί να προσδεθούν και άλλα προσδέματα, τα οποία περιέχουν την πεπτιδική αλληλουχία RGD, όπως η βιτρονεκτίνη και η φιμπρονεκτίνη. Τα κύρια προσδέματα για τις αιμοπεταλιακές ιντεγκρίνες  $\alpha_V\beta_3$ ,  $\alpha_2\beta_1$ ,  $\alpha_5\beta_1$  και  $\alpha_6\beta_1$  είναι η βιτρονεκτίνη, το κολλαγόνο, η φιμπρονεκτίνη και η λαμινίνη, αντίστοιχα. Σε σύγκριση με την ιντεγκρίνη  $\alpha_{IIb}\beta_3$ , η έκφραση των παραπάνω ιντεγκρινών στα αιμοπετάλια είναι μικρότερη από 1-2%. Αυτό όμως δεν σημαίνει ότι δεν έχουν λειτουργικό ρόλο, αλλά ότι οι ρόλοι τους είναι πιθανώς σχετικά μικροί κάτω από φυσιολογικές συνθήκες.

Τα αιμοπετάλια περιέχουν RNA και μηχανισμό μετάφρασης του RNA σε πρωτεΐνες, αλλά δεν περιέχουν δικό τους DNA. Κατά συνέπεια, η λειτουργία των αιμοπεταλιακών ιντεγκρινών ρυθμίζεται κυρίως στο μετα-μεταφραστικό επίπεδο [12–14]. Η ρύθμιση της ιντεγκρίνης  $\alpha_{IIb}\beta_3$  συχνά διαιρείται αυθαίρετα σε δύο φάσεις: στη «μέσα-έξω» σηματοδότηση, η οποία ελέγχει την κατάσταση ενεργοποίησης της ιντεγκρίνης και την πρόσδεση του προσδέματος, και την «έξω-μέσα» σηματοδότηση, η οποία ενεργοποιείται με την πρόσδεση του προσδέματος οδηγώντας στη δημιουργία εσωτερικών σημάτων, τα οποία προάγουν περαιτέρω αποκρίσεις των αιμοπεταλίων, συμπεριλαμβανομένης της ενεργοποίησης επιπλέον ιντεγκρινών, της αναδιάταξης του κυτταροσκελετού, της έκκρισης των αιμοπεταλίων και της ανάπτυξης της προπηκτικής δραστηριότητας των αιμοπεταλίων [15] (Εικ. 1.3).



**Εικ. 1.3.** Σχηματική απεικόνιση της ενεργοποίησης της ιντεγκρίνης  $\alpha_{IIb}\beta_3$ . Στα εν ηρεμία αιμοπετάλια η ιντεγκρίνη  $\alpha_{IIb}\beta_3$  είναι σε κατάσταση χαμηλής συγγένειας, ενώ κατά την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων ενεργοποιείται η «μέσα-έξω» σηματοδότηση και η ιντεγκρίνη  $\alpha_{IIb}\beta_3$  μετατρέπεται, μέσω διαδοχικών διαμορφωτικών αλλαγών, σε κατάσταση υψηλής συγγένειας, ικανή να αλληλεπιδράσει με το ινωδογόνο (τροποποιημένη εικόνα από [16]).

### ■ GPIb-IX-V

Το σύμπλοκο GPIb-IX-V είναι ένας υποδοχέας της πλασματικής μεμβράνης και εκφράζεται σχεδόν αποκλειστικά σε αιμοπετάλια και μεγακαρυοκύτταρα. Ο όρος «σύμπλοκο GPIb-IX-V» αναφέρεται γενικά σε ένα σύμπλοκο τεσσάρων πρωτογενών πολυπεπτιδίων, GPIba, GPIbβ, GPIX και GPV, τα οποία υπάρχουν στη μεμβράνη των αιμοπεταλίων σε στοιχειομετρία 2:4:2:1, αντίστοιχα. Μέσα στο σύμπλεγμα, το πολυπεπτίδιο GPIba είναι συνδεδεμένο με δισουλφιδικό δεσμό με δυο πολυπεπτίδια

## Αιμοπετάλια

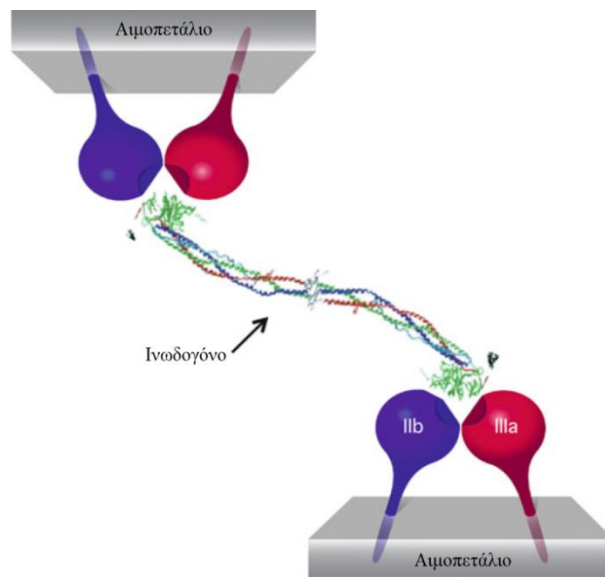
GPIIb/IIIa, το πολυπεπτιδίο GPIX είναι μη ομοιοπολικά, και μάλλον στενά, συνδεδεμένο με την πολυπεπτιδική μονάδα GPIIb ( $\alpha\beta_2$ ), ενώ το πολυπεπτιδίο GPV συνδέεται πιο χαλαρά [17]. Το σύμπλοκο GPIIb-IX-V έχει πολλά φυσιολογικά προσδέματα, τα οποία περιλαμβάνουν μόρια προσκόλλησης, όπως τον vWF, τη θρομβοσπονδίνη-1 και το ινώδες, μεμβρανικούς υποδοχείς των λευκοκυττάρων ( $\alpha_M\beta_2$ ) και των ενδοθηλιακών κυττάρων (ECs) (P-σελεκτίνη), καθώς και μια πληθώρα πρωτεϊνών του πλάσματος, συμπεριλαμβανομένης της θρομβίνης, των παραγόντων XI και XII, και του υψηλού μοριακού βάρους κινινογόνου.

Τα σήματα μεταδίδονται διαμέσου της αιμοπεταλιακής πλασματικής μεμβράνης μέσω της πρόσδεσης του συμπλόκου GPIIb-IX-V είτε με τον vWF είτε με τη θρομβίνη. Τα συγκεκριμένα σήματα ενεργοποιούν τις ιντεγκρίνες  $\alpha_{IIb}\beta_3$  [18] και  $\alpha_2\beta_1$  [19] και έτσι καθιστούν δυνατή την σταθερή προσκόλληση των αιμοπεταλίων και την επακόλουθη συσσώρευση. Οι κυτταροπλασματικές περιοχές των πολυπεπτιδίων του συμπλόκου GPIIb-IX-V συνδέονται με μια ποικιλία μορίων, οι οποίες εμπλέκονται στην μεταγωγή σήματος, συμπεριλαμβανομένης της πρωτεΐνης 14-3-3ζ, της κινάσης του φωσφοϊνοσιτιδίου 3 (PI3K), της φιλαμίνης, της καλμοδουλίνης και των κινασών της Src οικογένειας [20]. Επιπλέον, το σύμπλοκο GPIIb-IX-V συνδέεται με δύο άλλες μεμβρανικές πρωτεΐνες ικανές για μεταγωγή σήματος: με το σύμπλοκο GPVI/Fcγ και τον αιμοπεταλιακό, χαμηλής συγγένειας, Fc υποδοχέα, FcγRIIa [21].

### ■ $\alpha_{IIb}\beta_3$ (GPIIb/IIIa)

Η μεμβρανική πρωτεΐνη των αιμοπεταλίων  $\alpha_{IIb}\beta_3$ , αλλιώς γνωστή ως γλυκοπρωτεΐνη IIb/IIIa (GPIIb/IIIa), είναι μέλος της οικογένειας ιντεγκρινών των διαμεμβρανικών ετεροδιμερών και είναι απολύτως απαραίτητη για την αιμοπεταλιακή συσσώρευση. Η ιντεγκρίνη  $\alpha_{IIb}\beta_3$  είναι ένας υποδοχέας για το ινωδογόνο, τον vWF, τη φιβρονεκτίνη και τη βιτρονεκτίνη σε ενεργοποιημένα αιμοπετάλια και απαιτείται απολύτως για την *in vitro* και *in vivo* αιμοπεταλιακή συσσώρευση. Η πρόσδεση της ιντεγκρίνης  $\alpha_{IIb}\beta_3$  στο ινωδογόνο ή τον vWF ενισχύει την αιμοπεταλιακή συσσώρευση επειδή τα συγκεκριμένα πολυδύναμα προσδέματα μπορούν να εμπλακούν σε διακυτταρικές αλληλεπιδράσεις, λειτουργώντας έτσι ως γέφυρες μεταξύ των  $\alpha_{IIb}\beta_3$  υποδοχέων σε γειτονικά αιμοπετάλια (Εικ. 1.4). Περαιτέρω, η διαμεσολαβούμενη από την  $\alpha_{IIb}\beta_3$  αιμοπεταλιακή συσσώρευση είναι υπεύθυνη για το σχηματισμό θρόμβων σε κατεστραμμένες αρτηρίες. Έτσι, η

ιντεγκρίνη  $\alpha_{IIb}\beta_3$  είναι απαραίτητη για την φυσιολογική αιμόσταση, ενώ παίζει κρίσιμο ρόλο στην αρτηριακή θρόμβωση.



**Εικ. 1.4.** Σχηματική απεικόνιση της διαμεσολαβούμενης από την ιντεγκρίνη  $\alpha_{IIb}\beta_3$  αιμοπεταλιακής συσσώρευσης (τροποποιημένη εικόνα από [22]).

Η ιντεγκρίνη  $\alpha_{IIb}\beta_3$  είναι μια ετεροδιμερής πρωτεΐνη και αποτελείται από μια  $\alpha_{IIb}$  και μια  $\beta_3$  υπομονάδα, οι οποίες συντίθενται και οι δυο ως απλές γλυκοζυλιωμένες πολυπεπτιδικές αλυσίδες. Και οι δύο υπομονάδες περιλαμβάνουν μια μεγάλη εξωκυττάρια περιοχή, ένα διαμεμβρανικό τμήμα και μια μικρή κυτταροπλασματική ουρά. Η  $\alpha_{IIb}\beta_3$  αλλάζει από την κατάσταση χαμηλής συγγένειας σε υποδοχέα υψηλής συγγένειας στο τελικό στάδιο της ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων (**Εικ. 1.3**) και ακολούθως διαμεσολαβεί την αιμοπεταλιακή συσσώρευση σε μοριακό επίπεδο [23]. Η ιντεγκρίνη  $\alpha_{IIb}\beta_3$  εκφράζεται σε υψηλά επίπεδα, με περίπου 80.000 αντίγραφα στην επιφάνεια των εν ηρεμία αιμοπεταλίων [23].

Τα αιμοπετάλια κυκλοφορούν σε ένα περιβάλλον, το οποίο περιέχει ινωδογόνο, το κύριο πρόσδεμα της ιντεγκρίνης  $\alpha_{IIb}\beta_3$ , του οποίου η συγκέντρωση στο πλάσμα είναι 100 φορές μεγαλύτερη από τη σταθερά διάστασης του για την ενεργοποιημένη  $\alpha_{IIb}\beta_3$ . Έτσι, η ιντεγκρίνη  $\alpha_{IIb}\beta_3$  διατηρείται σε ανενεργή διαμόρφωση στα κυκλοφορούντα αιμοπετάλια για να αποτρέπεται ο αυθόρμητος σχηματισμός αιμοπεταλιακών συσσωματωμάτων. Ωστόσο, όταν τα αιμοπετάλια συναντήσουν ένα κατεστραμμένο αιμοφόρο αγγείο, η ιντεγκρίνη  $\alpha_{IIb}\beta_3$  μετατρέπεται σχεδόν στιγμιαία στην ενεργή διαμόρφωση της στην επιφάνεια των αιμοπεταλίων. Η μετατροπή της ιντεγκρίνης  $\alpha_{IIb}\beta_3$  στην εκτεταμένη διαμόρφωσή της είναι ένα ουσιαστικό γεγονός για την ενεργοποίησή της, ωστόσο, δεν είναι κατ' ανάγκη ικανή για την πρόσδεση των προσδεμάτων [24], καθώς απαιτείται,

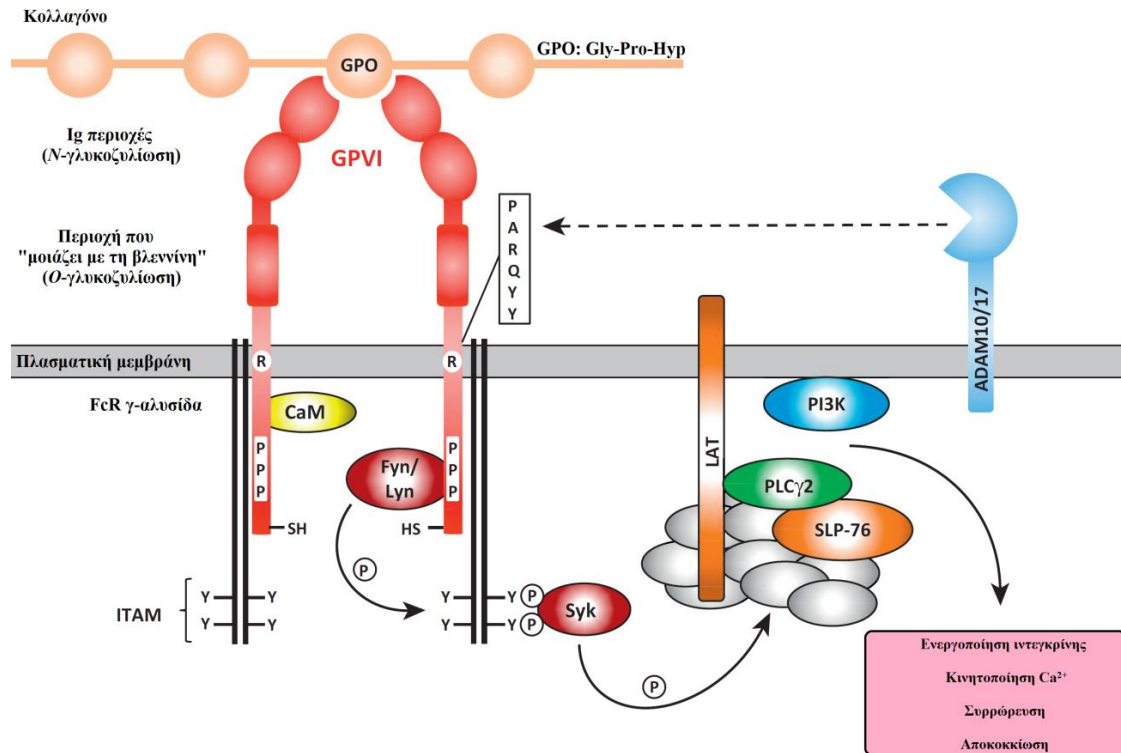
## *Αιμοπετάλια*

επίσης, «άνοιγμα» της θέσης πρόσδεσης του προσδέματος. Η ενεργοποίηση της ιντεγκρίνης  $\alpha_{IIb}\beta_3$  προκύπτει από σήματα που προέρχονται από το κυτοσόλιο των αιμοπεταλίων, τα οποία μεταδίδονται διαμέσου της πλασματικής μεμβράνης.

### **GPVI**

Η GPVI περιγράφηκε αρχικά ως μια γλυκοζυλιωμένη αιμοπεταλιακή μεμβρανική πρωτεΐνη, ενώ αργότερα αναγνωρίστηκε ως ένας υποδοχέας του κολλαγόνου. Ο κύριος ρόλος της GPVI είναι να προάγει τον σχηματισμό θρόμβων, ενώ όλο και περισσότερες μελέτες αποδεικνύουν ότι η GPVI συμβάλλει σε πολλές διεργασίες πέρα από την αιμόσταση και τη θρόμβωση, συμπεριλαμβανομένης της φλεγμονής [25] και της μετάστασης όγκων [26].

Η GPVI είναι μια διαμεμβρανική πρωτεΐνη τύπου I με μοριακή μάζα 58-60 kDa, το 45% της οποίας είναι υδατάνθρακες, και ανήκει στην υπεροικογένεια των ανοσοσφαιρινών. Αποτελείται από μια εξωκυτταρική περιοχή με δυο Ig-like περιοχές, οι οποίες συνδέονται με μια γλυκοζυλιωμένη πεπτιδική αλυσίδα, μια διαμεμβρανική περιοχή και μια κυτταροπλασματική ουρά. Η GPVI υπάρχει ως σύμπλοκο με τη  $\gamma$ -αλυσίδα του Fc υποδοχέα, η οποία εκφράζεται στα αιμοπετάλια σε μονομερείς και διμερείς μορφές [27] (**Εικ. 1.5**) Η μονομερής μορφή εντοπίζεται κυρίως στα μη ενεργοποιημένα αιμοπετάλια, με πολύ χαμηλή συγγένειά ως προς το κολλαγόνο, η οποία δεν προκαλεί την αιμοπεταλιακή ενεργοποίηση σε απόκριση φυσιολογικών συγκεντρώσεων κολλαγόνου [28]. Αντιθέτως, η διμερής μορφή έχει αυξημένη συγγένεια ως προς το κολλαγόνο. Η πρόσδεση του κολλαγόνου στο διμερές σύμπλοκο μπορεί να έχει ως αποτέλεσμα ενδοκυττάρια σηματοδότηση, οδηγώντας στη δημιουργία επιπλέον διμερών [29]. Η GPVI δεν φθάνει στην επιφάνεια των αιμοπεταλίων απουσία της  $\gamma$ -αλυσίδας του Fc υποδοχέα, με αποτέλεσμα να μην πραγματοποιείται η επαγόμενη από το κολλαγόνο αιμοπεταλιακή ενεργοποίηση [30].



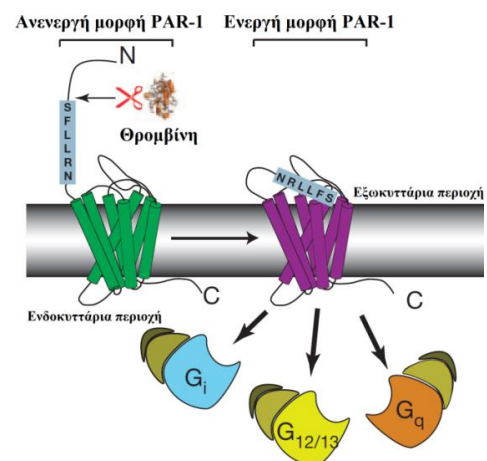
**Εικ. 1.5.** Σχηματική απεικόνιση της δομής και της σηματοδότησης του συμπλόκου της GPVI και της  $\gamma$ -αλυσίδας του Fc υποδοχέα (τροποποιημένη εικόνα από [31]).

Η έκφραση της GPVI περιορίζεται στα αιμοπετάλια και τα μεγακαρυοκύτταρα [32]. Η πρώτη αναγνωρισμένη λειτουργία της GPVI είναι να είναι ένας υποδοχέας για ινδικά κολλαγόνα (κυρίως τύπου I και III). Η ετερόλογη έκφραση της GPVI είναι επαρκής για να επάγει την κυτταρική προσκόλληση στο κολλαγόνο [32]. Η GPVI απαιτείται για την σταθερή αιμοπεταλιακή προσκόλληση, μέσω της άμεσης αλληλεπίδρασης με το κολλαγόνο, αλλά και έμμεσα μέσω της ικανότητάς της να προάγει την παρατεταμένη αιμοπεταλιακή ενεργοποίηση, αυξορυθμίζοντας έτσι τις αιμοπεταλιακές ιντεγκρίνες [33]. Επιπλέον, η συσταδοποίηση των GPVI από το κολλαγόνο πυροδοτεί την έκκριση θρομβοξανίου (Tx)  $A_2$  και ADP, δύο βασικών αγωνιστών, οι οποίοι με τη σειρά τους προάγουν την αποτελεσματική ανάπτυξη και σταθερότητα του θρόμβου [34]. Επίσης, η θρομβίνη πυροδοτεί τον σχηματισμό του ινώδους, και πρόσφατα αποδείχθηκε ότι η GPVI αποτελεί υποδοχέα του πολυμερισμένου ινώδους [35]. Η αλληλεπίδραση της GPVI με το ινώδες επιτρέπει την στρατολόγηση επιπλέον αιμοπεταλίων και ενισχύει περαιτέρω την παραγωγή θρομβίνης, προάγοντας έτσι τη σταθερότητα και την ανάπτυξη του θρόμβου [35].

## 1.4. PAR υποδοχείς

Η θρομβίνη είναι μια σερινοπρωτεάση, η οποία παίζει σημαντικό ρόλο στην πήξη και την αιμόσταση, καθώς διαμεσολαβεί την παραγωγή ινώδους μέσω της υδρολυτικής διάσπασης του ινωδογόνου. Παράγεται στο πλάσμα από το σύμπλοκο της προθρομβινάσης, το οποίο καταλύει την πρωτεολυτική ενεργοποίηση του ζυμογόνου, της προθρομβίνης (παράγοντας Π), για να σχηματίσει την ενεργή πρωτεάση, τη θρομβίνη (παράγοντας Πα). Η θρομβίνη αποτελεί τον πιο ισχυρό αγωνιστή των αιμοπεταλίων, η οποία προσδένεται σε δυο διαφορετικούς τύπους υποδοχέων, στο σύμπλοκο GPIb-V-IX και τους ενεργοποιημένους υποδοχείς των πρωτεασών (PARs). Οι PARs ανήκουν στην υπεροικογένεια των υποδοχέων συζευγμένων με G-πρωτεΐνες (GPCRs) και αποτελούνται από τέσσερις υποδοχείς, οι οποίοι έχουν ονομαστεί σύμφωνα με τη σειρά ανακάλυψής τους, PAR-1 έως -4 [36]. Η ενεργοποίηση των ανθρώπινων αιμοπεταλίων από τη θρομβίνη λαμβάνει χώρα διαμέσου των PAR-1 και PAR-4, καθώς αποτελεί τον κύριο ενεργοποιητή των PARs στα αιμοπετάλια. Και οι δύο υποδοχείς μπορούν να διαμεσολαβήσουν ανεξάρτητα τη σηματοδότηση της θρομβίνης, με τον PAR-1 να ενεργοποιείται σε χαμηλή συγκέντρωση θρομβίνης, ενώ PAR-4 σε υψηλή συγκέντρωση [37]. Η θρομβίνη διασπά το εξοκυττάριο N-τελικό άκρο των PAR-1 και PAR-4, δημιουργώντας ένα νέο N-τελικό άκρο, το οποίο στη συνέχεια δρα ως «ενσωματωμένο πρόσδεμα» (tethered-ligand), με πεπτιδική αλληλουχία SFLLRN (Εικ. 1.6) και AYPGKF, αντίστοιχα [38], προσδένεται στον υποδοχέα και επάγει τη μεταγωγή σήματος.

**Εικ. 1.6.** Σχηματική απεικόνιση της ενεργοποίησης του PAR-1. Η θρομβίνη διασπά το άκρο N-τελικό άκρο του PAR-1, εκθέτοντας ένα νέο N-τερματικό πεπτίδιο, με πεπτιδική αλληλουχία SFLLRN, το οποίο μπορεί να προσδεθεί και να ενεργοποιήσει το διαμεμβρανικό πυρήνα του PAR-1 (τροποποιημένη εικόνα από [39]).



Οι αιμοπεταλιακές αποκρίσεις στη θρομβίνη είναι πολλές και ποικίλες. Ο PAR-1 και PAR-4 συνεργάζονται για να διαμεσολαβηθεί το πλήρες σηματοδοτικό εύρος της θρομβίνης στα ανθρώπινα αιμοπετάλια με τη σύζευξη πολλαπλών ετεροτριμερών G-πρωτεϊνών. Ο PAR-1 και ο PAR-4 έχουν πολλές αλληλοεπικαλυπτόμενες σηματοδοτικές λειτουργίες, οι οποίες

οδήγησαν στην αρχική υπόθεση ότι το PAR-4 είναι ένας περιττός, εφεδρικός, υποδοχέας. Στα ανθρώπινα αιμοπετάλια, τόσο ο PAR-1 όσο και ο PAR-4 παράγουν σήματα μέσω των  $G_{\alpha_q}$  και  $G_{\alpha_{12/13}}$ . Η ενεργοποίηση της  $G_{\alpha_q}$  διεγείρει τον σχηματισμό τριφωσφορικής ινοσιτόλης (IP3) και διακυλγλυκερόλης, η οποία επάγει την κινητοποίηση ενδοκυττάριου ασβεστίου και την ενεργοποίηση της πρωτεϊνικής κινάσης (PK) C, αντίστοιχα. Το συγκεκριμένο μονοπάτι ελέγχει μια ποικιλία αιμοπεταλιακών αποκρίσεων, οι οποίες περιλαμβάνουν την έκκριση των κοκκίων, την ενεργοποίηση των ιντεγκρινών και την αιμοπεταλιακή συσσώρευση.

Η παρουσία διακριτών  $\alpha$ -κοκκίων στα αιμοπετάλια με προ- ή αντι-αγγειογενετικούς παράγοντες είναι αμφιλεγόμενη με μελέτες που υποστηρίζουν τόσο την εκλεκτική όσο και την τυχαία έκκριση των περιεχομένων των κοκκίων. Η διαφορετική απελευθέρωση προ- και αντι-αγγειογενετικών παραγόντων από τα αιμοπετάλια, στα οποία έχει διεγερθεί ο PAR-1 έναντι του PAR-4, αντίστοιχα, περιγράφηκε για πρώτη φορά από τον Ma και τους συνεργάτες του [40]. Το πεπτίδιο-ενεργοποιητή του PAR-4 διεγείρει την απελευθέρωση ενδοστατίνης, ενώ καταστέλλει την απελευθέρωση του VEGF. Αντίθετα, το πεπτίδιο-ενεργοποιητή του PAR-1 διεγείρει την απελευθέρωση του VEGF και καταστέλλει την απελευθέρωση της ενδοστατίνης. Περιέργως, η ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων με θρομβίνη δεν επάγει την απελευθέρωση κανενός παράγοντα. Ο PAR-1 και PAR-4 μπορούν επίσης να επηρεάσουν τον βαθμό έκκρισης [41].

Εκτός από τη θρομβίνη, αρκετές άλλες σερίνοπρωτεάσες είναι ικανές να ενεργοποιούν τους PARs, όπως ο παράγοντας Χα, η πλασμίνη, οι μεταλλοπρωτεϊνάσες θεμέλιας ουσίας-1 και -13 (MMP-1 και -13, αντίστοιχα), η ελαστάση, η ενεργοποιημένη πρωτεΐνη C, η πρωτεϊνάση-3, το κοκκιοένζυμο, η καθεψίνη G και η καλπαΐνη [42]. Ανάλογα με τη θέση διάσπασης, οι PARs μπορούν να ενεργοποιηθούν ή να αδρανοποιηθούν από τις συγκεκριμένες πρωτεάσες. Επιπλέον, οι εναλλακτικές θέσεις διάσπασης μπορούν να δημιουργήσουν νέα «ενσωματωμένα προσδέματα» ξεκινώντας ειδικά σηματοδοτικά μονοπάτια.

Το voraparaxar (SCH-530348) είναι ένας από του στόματος, ισχυρός, εκλεκτικός, συναγωνιστικός ανταγωνιστής του PAR-1, με υψηλή συγγένεια ως προς τον υποδοχέα [43]. Το voraparaxar δεν παρεμβαίνει σε άλλες λειτουργίες της θρομβίνης, όπως τη διάσπαση του ινωδογόνου και τη παραγωγή ινώδους, αφήνοντας ανεπηρέαστο τον καταρράκτη της πήξης. Επίσης, δεν έχει σημαντική επίδραση στην διαμεσολαβούμενη από τον PAR-4 απόκριση στη



## *Αιμοπετάλια*

θρομβίνη [44]. Το voraparaxar απορροφάται ταχέως κατόπιν χορήγησης από το στόμα, η μέγιστη συγκέντρωση στο πλάσμα επιτυγχάνεται σε 1-2 h μετά τη χορήγηση υπό συνθήκες νηστείας και εμφανίζει υψηλή βιοδιαθεσιμότητα (σχεδόν 100%). Το voraparaxar μεταβολίζεται στο ήπαρ από τα κυτόχρωμα CYP3A4 και CYP2J2 [45]. Ο χρόνος ημιζωής είναι 8 d, με αποτέλεσμα την παρατεταμένη αναστολή των αιμοπεταλίων, ενώ 50% της ανασταλτικής του δράσης εξακολουθεί να παρατηρείται μετά από 4 εβδομάδες. Οι μεταβολίτες του voraparaxar απεκκρίνονται κυρίως μέσω των κοπράνων (περίπου 60%), ενώ αποβάλλεται σε μικρότερο από τους νεφρούς (25%).

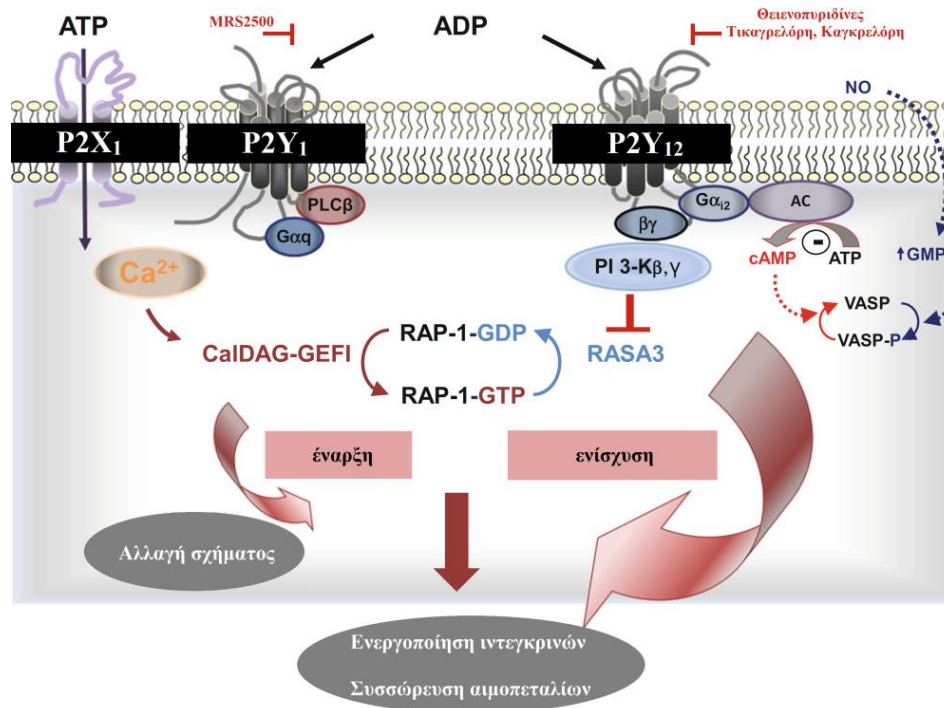
Το voraparaxar αναστέλλει κατά δόσοεξαρτώμενο τρόπο την επαγόμενη από το πεπτιδιο-ενεργοποιητή του υποδοχέα της θρομβίνης (TRAP) αιμοπεταλιακή συσσώρευση, ενώ δεν έχει σημαντική επίδραση στην επαγόμενη από την ADP, το αραχιδονικό οξύ (AA) ή το κολλαγόνο αιμοπεταλιακή συσσώρευση [46]. Σε υγιείς εθελοντές, το voraparaxar σε μονή δόση φόρτισης των 20 ή 40 mg ανέστειλε ισχυρά (>80%) την επαγόμενη από το TRAP αιμοπεταλιακή συσσώρευση εντός 1 h, ενώ το συγκεκριμένο αποτέλεσμα διατηρήθηκε για 72 h [45]. Μελέτες σχετικά με τη δράση του φαρμάκου στην αιμοπεταλιακή συσσώρευση πραγματοποιήθηκαν στις κλινικές μελέτες φάσης II TRA-PCI, μεταξύ ατόμων που υποβλήθηκαν σε διαδερμική στεφανιαία επέμβαση (PCI), και φάσης III TRACER, μεταξύ ασθενών με οξύ στεφανιαίο σύνδρομο χωρίς ανάσπαση του διαστήματος ST (NSTE-ACS). Στη κλινική μελέτη φάσης II TRA-PCI, η μονή δόση φόρτισης (40 mg) του voraparaxar ανέστειλε ισχυρά (>80%) την επαγόμενη από το TRAP αιμοπεταλιακή συσσώρευση σε σχεδόν 30% των ασθενών σε 30 min, σε 70% των ασθενών σε 1 h και 96% των ασθενών σε 2 h [47]. Η υπομελέτη της κλινικής μελέτης TRACER αξιολόγησε την δράση του voraparaxar στις χρησιμοποιούμενες δόσεις (40 mg δόση φόρτισης, 2,5 mg δόση συντήρησης) σε ασθενείς NSTE-ACS, οι οποίοι υποβλήθηκαν σε ταυτόχρονη θεραπεία με κλοπιδογρέλη [48]. Το voraparaxar ανέστειλε 97% της μέγιστης επαγόμενης από το TRAP αιμοπεταλιακής συσσώρευσης 2 h μετά της χορήγησης του. Το επίπεδο της αιμοπεταλιακής αναστολής διατηρήθηκε με 2,5 mg δόση συντήρησης μέχρι το τέλος της θεραπείας. Η μελέτη έδειξε επίσης ότι η επαγόμενη από το TRAP αιμοπεταλιακή συσσώρευση των αιμοπεταλίων στους ασθενείς που συμμετείχαν στη μελέτη κατά την έναρξη (δηλ. πριν από την χορήγηση του voraparaxar) ήταν χαμηλότερη σε σύγκριση με μια ομάδα υγιών εθελοντών, υποδηλώνοντας ότι η ταυτόχρονη θεραπεία με κλοπιδογρέλη μπορεί να έχει κάποια επίδραση στην επαγόμενη από το TRAP αιμοπεταλιακή συσσώρευση [48]. Ταυτόχρονα, παρατηρήθηκαν μετρήσιμες

μειώσεις της αγγειοδιασταλτικής φωσφοπρωτεΐνης (VASP) με το νογαραχαρ στην επαγόμενη από την ADP αιμοπεταλιακή συσσώρευση. Τα συγκεκριμένα δεδομένα υποδηλώνουν πιθανή αλληλεπίδραση μεταξύ του αποκλεισμού του P2Y<sub>12</sub> υποδοχέα και του ανταγωνισμού του PAR-1, η οποία μπορεί να παίζει ρόλο στην αντιαιμοπεταλιακή δράση όταν οι ανταγωνιστές του PAR-1 και του P2Y<sub>12</sub> υποδοχέα χρησιμοποιούνται ταυτόχρονα. Μια αξιοσημείωτη παρατήρηση από την παρούσα μελέτη είναι ότι η θεραπεία με το νογαραχαρ οδηγεί σε μειωμένη έκφραση του PAR-1 μετά από 1 μήνα.

Το atoraxar είναι ένας άλλος από του στόματος, ισχυρός, εκλεκτικός, αντιστρεπτός ανταγωνιστής του PAR-1 [49], με βραδύτερη έναρξη δράσης (3,5 h) από το νογαραχαρ. Μεταβολίζεται στο ήπαρ από το κυτόχρωμα CYP3A4, με μικρότερο χρόνο ημιζωής (23 h), ενώ απεκκρίνεται κυρίως μέσω των κοπράνων. Η ασφάλεια και η αποτελεσματικότητα του atoraxar αξιολογήθηκαν σε δύο κλινικές μελέτες φάσης II, την J-LANCELOT [50] και την LANCELOT-ACS [51]. Ωστόσο, η μικρή αποτελεσματικότητα του φαρμάκου και η περιορισμένη ασφάλειά του ανέστειλαν το πρόγραμμα ανάπτυξης του [50,51].

## **1.5. P2 υποδοχείς**

Πριν από τη μοριακή ταυτοποίηση των διαφόρων αιμοπεταλιακών υποδοχέων για την ADP και την ATP, θεωρήθηκε πως η ενδοκυττάρια σηματοδότησή τους διαμεσολαβείται είτε από ένα μοναδικό υποδοχέα, ο επονομαζόμενος P2T, είτε από ξεχωριστές οντότητες, όπου καθεμία είναι συνδεδεμένη με την αναστολή του σχηματισμού της κυκλικής μονοφωσφορικής αδενοσίνης (cAMP). Στις αρχές της δεκαετίας του 1990, οι συγκεκριμένοι υποδοχείς ταυτοποιήθηκαν σταδιακά. Ανήκουν στην οικογένεια των P2 υποδοχέων και αποτελούνται από δύο κατηγορίες μεμβρανικών υποδοχέων: τους ιονοτροπικούς P2X υποδοχείς (P2X<sub>1-7</sub>) και τους P2Y υποδοχείς συζευγμένους με G-πρωτεΐνες (P2Y<sub>1,2,4,6,11,12,13,14</sub>) [52]. Τέσσερις υπότυποι των P2 υποδοχέων εντοπίζονται στα αιμοπετάλια, από τους οποίους οι P2Y<sub>1</sub> και P2Y<sub>12</sub> υποδοχείς ενεργοποιούνται από την ADP, ενώ ο P2X<sub>1</sub> υποδοχέας από την ATP. Κάθε ένας από αυτούς τους υποδοχείς έχει μια ειδική λειτουργία στην αιμοπεταλιακή ενεργοποίηση και συσσώρευση, η οποία έχει επιπτώσεις για τη συμμετοχή τους στην αιμόσταση και τη θρόμβωση. Τα αιμοπετάλια εκφράζουν επίσης τον P2Y<sub>14</sub> υποδοχέα, ο οποίος ενεργοποιείται από την διφωσφορική ουριδίνη (UDP) και UDP-γλυκόζη, αλλά μέχρι στιγμής ο ρόλος του, αν υπάρχει, παραμένει ασαφής [53] (Εικ. 1.7).



**Εικ. 1.7.** Σχηματική απεικόνιση των αιμοπεταλιακών P2 υποδοχέων και του αντίστοιχου ρόλου τους στην αιμοπεταλιακή ενεργοποίηση (τροποποιημένη εικόνα από [54]).

### ■ P2Y<sub>1</sub> υποδοχέας (P2Y<sub>1</sub>R)

Ο P2Y<sub>1</sub>R βρίσκεται ευρέως σε πολλά κύτταρα και ιστούς. Τα αιμοπετάλια εκφράζουν περίπου 150 υποδοχείς/κύτταρο [55]. Η συγκεκριμένη αναλογία είναι πολύ χαμηλή σε σύγκριση, για παράδειγμα, με τον υποδοχέα του TxA<sub>2</sub> (TP) ή τον υποδοχέα της θρομβίνης, PAR-1 (1000-2000 υποδοχείς/αιμοπετάλια) και πιθανόν να εξηγεί γιατί το επαγόμενο σήμα από την ενεργοποίηση του P2Y<sub>1</sub>R είναι ασθενές σε σύγκριση με τα σήματα άλλων υποδοχέων συζευγμένων με G<sub>q</sub>-πρωτεΐνες. Η ADP είναι ο φυσικός αγωνιστής του P2Y<sub>1</sub>R, ενώ η ATP συμπεριφέρεται ως ανταγωνιστής στα αιμοπετάλια. Ο P2Y<sub>1</sub>R έχει την κλασσική δομή ενός GPCR. Η ενεργοποίησή του οδηγεί στη διαμεσολαβούμενη από την G<sub>αq</sub> ενεργοποίηση των β-ισομορφών της φωσφολιπάσης C και στη μεταβατική αύξηση της συγκέντρωσης του ενδοκυττάριου ασβεστίου, κυρίως μέσω της απελευθέρωσης ασβεστίου στο κυτταρόπλασμα από τις ενδοκυττάρια αποθήκες και επιπλέον μέσω της εισροής ασβεστίου από το εξωτερικό μέσο [56]. Επιπλέον, ο P2Y<sub>1</sub>R συμβάλλει στην επαγόμενη από το κολλαγόνο συσσώρευση και απαιτείται για την επαγόμενη από το κολλαγόνο αλλαγή σχήματος των αιμοπεταλίων [57]. Τέλος, τα αιμοπετάλια που ενεργοποιούνται από την ADP καθίστανται ανθεκτικά

στην επαναδιέγερση, ένα φαινόμενο που οφείλεται στην απευαισθητοποίηση και την εσωτερίκευση του P2Y<sub>1</sub>R [58].

#### ■ P2Y<sub>12</sub> υποδοχέας (P2Y<sub>12</sub>R)

Ο P2Y<sub>12</sub>R ανήκει στην οικογένεια των GPCRs και ενεργοποιείται από την ADP, ενώ η ATP συμπεριφέρεται ως ανταγωνιστής. Τα αιμοπετάλια εκφράζουν περίπου 400 αντίγραφα του υποδοχέα/κύτταρο [59]. Ο συγκεκριμένος υποδοχέας παίζει κεντρικό ρόλο στην ενίσχυση των αιμοπεταλιακών αποκρίσεων σε οποιοδήποτε ερέθισμα, γεγονός που εξηγεί γιατί είναι ο μοριακός στόχος ισχυρών αντιαιμοπεταλιακών φαρμάκων, συμπεριλαμβανομένων των θειενοπυριδινικών ενώσεων, τικλοπιδίνη, κλοπιδογρέλη και πρασουγρέλη, οι οποίες είναι προφάρμακα, καθώς και των άμεσων ανταγωνιστών, τικαγρελόρη και κανγρελόρη [60,61] (αναλυτική περιγραφή στο 3<sup>ο</sup> κεφάλαιο). Η ιστική κατανομή του συγκεκριμένου υποδοχέα θεωρήθηκε για πολύ καιρό πως περιορίζεται στα αιμοπετάλια και τις υποπεριφέρειες του εγκεφάλου. Περαιτέρω μελέτες αποκάλυψαν αργότερα την έκφραση και τις λειτουργίες του στα αγγειακά λεία μυϊκά κύτταρα (VSMCs), τα δενδριτικά κύτταρα, τα μικρογλοιακά κύτταρα, τα λευκοκύτταρα και τα μακροφάγα [62]. Ο P2Y<sub>12</sub>R είναι υπεύθυνος για την ολοκλήρωση της συσσώρευσης, η οποία ξεκινά από τον P2Y<sub>1</sub>R και για την ενίσχυση της επαγόμενης από οποιονδήποτε άλλο αγωνιστή συσσώρευση. Αν και η ADP από μόνη της δεν μπορεί να επάγει την έκκριση των κοκκίων των αιμοπεταλίων, η αλληλεπίδρασή της με τον P2Y<sub>12</sub>R ενισχύει σημαντικά την έκκριση, σταθεροποιεί τα αιμοπεταλιακά συσσωματώματα *in vitro* και το σχηματισμό θρόμβων *in vivo* [63].

Ο P2Y<sub>12</sub>R ενεργοποιεί την Gα<sub>i2</sub>, η οποία αποτελεί ένα κρίσιμο παράγοντα του σηματοδοτικού μονοπατιού για την ενεργοποίηση της ιντεγκρίνης α<sub>IIb</sub>β<sub>3</sub>. Η Gα<sub>i2</sub> είναι υπεύθυνη για την ενεργοποίηση δύο ισομορφών της PI3K, οι οποίες ρυθμίζουν την ενεργοποίηση της ιντεγκρίνης α<sub>IIb</sub>β<sub>3</sub> [64]. Επιπλέον, η Gα<sub>i2</sub> αναστέλλει τη δράση της αδενυλικής κυκλάσης (AC) και ελαττώνει τα αυξημένα επίπεδα της cAMP. Η εξαρτώμενη από την cAMP αναστολή της PKA οδηγεί σε αναστολή της φωσφορυλίωσης της VASP [65]. Αν και η συγκεκριμένη πρωτεΐνη δεν παίζει βασικό ρόλο στην ενεργοποίηση της ιντεγκρίνης, η κατάσταση φωσφορυλίωσης της χρησιμοποιείται ως δείκτης της κατάστασης ενεργοποίησης του P2Y<sub>12</sub>R, ιδιαίτερα για την παρακολούθηση

## *Αιμοπετάλια*

των αποτελεσμάτων των αντιαιμοπεταλιακών φαρμάκων, τα οποία αναστέλλουν τον συγκεκριμένο υποδοχέα [66].

Η συν-ενεργοποίηση των P2Y<sub>1</sub>R και P2Y<sub>12</sub>R είναι απαραίτητη για μια πλήρη απόκριση της αιμοπεταλιακής συσσώρευσης στην ADP, δεδομένου ότι η ξεχωριστή αναστολή ενός από τους υποδοχείς χρησιμοποιώντας εκλεκτικούς ανταγωνιστές καταλήγει σε δραματική μείωση της συσσώρευσης. Ωστόσο, οι P2Y<sub>1</sub>R και P2Y<sub>12</sub>R εμπλέκονται διαφορετικά στην επαγόμενη από άλλους αγωνιστές αιμοπεταλιακή συσσώρευση, με τον P2Y<sub>12</sub>R να υποστηρίζει την ενίσχυση αυτών των αποκρίσεων και τον P2Y<sub>1</sub>R να παίζει μόνο ένα δευτερεύοντα ρόλο, εκτός από την περίπτωση της επαγόμενης από το κολλαγόνο ενεργοποίησης. Οι P2Y<sub>1</sub>R και P2Y<sub>12</sub>R εμπλέκονται, επίσης, διαφορετικά στην προ-πηκτική δραστηριότητα των αιμοπεταλίων. Και οι δύο υποδοχείς εμπλέκονται έμμεσα μέσω της έκθεσης της P-σελεκτίνης στα αιμοπετάλια και του σχηματισμού συζευγμάτων αιμοπεταλίων-λευκοκυττάρων, γεγονός που οδηγεί σε έκθεση του ιστικού παράγοντα (TF) στα λευκοκύτταρα [67]. Παρ'όλα αυτά, μόνο ο P2Y<sub>12</sub>R εμπλέκεται άμεσα στην προ-πηκτική δραστηριότητα των αιμοπεταλίων μέσω της έκθεσης της φωσφατιδυλοσερίνης στην επιφάνεια των κυττάρων [67].

### **P2X<sub>1</sub> υποδοχέας (P2X<sub>1</sub>R)**

Ο P2X<sub>1</sub>R είναι ένας ιοντικός διάυλος ελεγχόμενος από το προσδεδεμένο μόριο, ο οποίος ενεργοποιείται από την ATP και αναστέλλεται από την ADP. Η πρόσδεση της ATP στον υποδοχέα οδηγεί στην εισροή ασβεστίου στα αιμοπετάλια, η οποία έχει ως αποτέλεσμα την αλλαγή σχήματος των αιμοπεταλίων, την αποκοκκίωση, το σχηματισμό ψευδοποδιών και την ενεργοποίησή τους [68]. Η ενεργοποίηση του P2X<sub>1</sub>R μόνο από την ATP δεν προκαλεί την αιμοπεταλιακή συσσώρευση, ωστόσο, μπορεί να ενισχύσει τη διαμεσολαβούμενη από την ADP συσσώρευση τους μέσω του P2Y<sub>1</sub>R [69]. Επιπλέον, κατά τη διάρκεια των πρώτων σταδίων της αγγειακής βλάβης, παρουσία χαμηλής συγκέντρωσης κολλαγόνου, η ATP συμβάλλει στην αυξημένη συσσώρευση μέσω του P2X<sub>1</sub> υποδοχέα [70]. Παρομοίως, ο P2X<sub>1</sub>R μπορεί να ενισχύσει τη διαμεσολαβούμενη από τη θρομβίνη αιμοπεταλιακή συσσώρευση, όταν τα επίπεδα θρομβίνης είναι χαμηλά, μέσω του PAR-1 [71]. Επιπλέον, μπορεί να συμβάλλει στην αιμοπεταλιακή έκκριση TxA<sub>2</sub> και να ενισχύσει τη διαμεσολαβούμενη από το TxA<sub>2</sub> αιμοπεταλιακή συσσώρευση [72]. Τέλος, σε περιπτώσεις που παίζει συν-διεγερτικό ρόλο μαζί με τη σηματοδότηση του

P2Y<sub>1</sub>R, ο P2X<sub>1</sub>R αυξάνει την εισροή ασβεστίου και ενισχύει την επακόλουθη σηματοδότηση ασβεστίου μέσω του P2Y<sub>1</sub>R και άλλων αιμοπεταλιακών υποδοχέων συζευγμένων με G<sub>α</sub>-πρωτεΐνες [69].

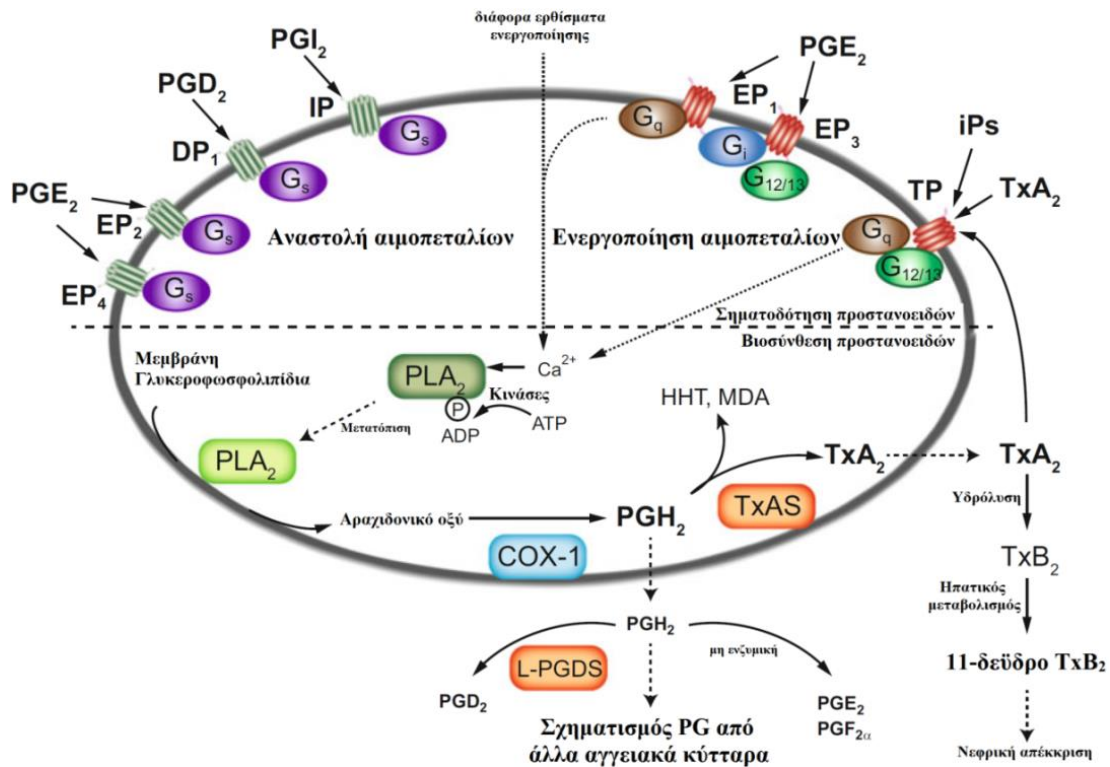
Τα αιμοπετάλια διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση διαφόρων φλεγμονωδών αποκρίσεων, συμπεριλαμβανομένων των χρόνιων αποκρίσεων, όπως η αθηροσκλήρωση, και των οξειών αποκρίσεων, όπως η σηψαιμία ή το αλλεργικό άσθμα [73–75]. Επομένως, οι ανταγωνιστές και οι αναστολείς των διαφόρων αιμοπεταλιακών P2 υποδοχέων θα μπορούσαν επίσης να έχουν και αντιφλεγμονώδη δράση, επιπλέον της αντιαιμοπεταλιακής τους δράσης. Επιπλέον, οι P2Y<sub>1</sub>R, P2Y<sub>12</sub>R και P2X<sub>1</sub>R εκφράζονται από κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος, καθώς και από αγγειακά κύτταρα. Συγκεκριμένα, ο P2Y<sub>12</sub>R εντοπίζεται στα VSMCs, τα δενδριτικά κύτταρα και σε ορισμένους υπότυπους λευκοκυττάρων, ενώ P2Y<sub>1</sub>R εκφράζεται σε αγγειακά ECs, τα VSMCs και πληθυσμούς λευκοκυττάρων συμπεριλαμβανομένων των μακροφάγων. Τέλος, ο P2X<sub>1</sub>R εντοπίζεται στα VSMCs και τα ουδετερόφιλα. Έτσι, οι συγκεκριμένοι P2 υποδοχείς εμπλέκονται, επίσης, άμεσα στη ρύθμιση της φλεγμονής και στις ανοσολογικές αποκρίσεις κατά τη διάρκεια του σχηματισμού θρόμβου, ανεξάρτητα από διεργασίες σχετικές με τα αιμοπετάλια [76,77].

## **1.6. Προστανοειδή και οι υποδοχείς τους**

Τα προστανοειδή, τα οποία περιλαμβάνουν τις προσταγλανδίνες (PGs) και τα Tx<sub>s</sub>, αποτελούν μια οικογένεια ενεργών λιπιδικών διαμεσολαβητών. Ο πρόδρομος των προστανοειδών, το AA, απελευθερώνεται από τα μεμβρανικά φωσφολιπίδια μέσω της δράσης της φωσφολιπάσης A<sub>2</sub> και είναι άμεσα διαθέσιμο για να μεταβλιστεί στα προστανοειδή διαμέσου της δράσης των κυκλοξυγονασών (COXs). (**Εικ. 1.8**). Η μετατροπή του AA σε PGI<sub>2</sub>, TxA<sub>2</sub>, PGD<sub>2</sub>, PGE<sub>2</sub> και PGF<sub>2α</sub> περιλαμβάνει αντιδράσεις οξειδοαναγωγής και αναδιάταξης μέσω των δράσεων των COXs και των PG συνθασών [78]. Το AA μεταβολίζεται προς τις PGG<sub>2</sub>/H<sub>2</sub> μέσω της δράσης της PGH συνθάσης, η οποία έχει δύο καταλυτικές δράσεις, τη δράση της COX-1, η οποία οδηγεί στο σχηματισμό της PGG<sub>2</sub>, και τη δράση της υδροξυπεροξειδάσης, η οποία μετατρέπει την PGG<sub>2</sub> σε PGH<sub>2</sub>. Οι COX-1 και COX-2 είναι εξαιρετικά ομόλογες, ωστόσο μεταβολίζουν το AA με διακριτή κινητική. Συνεπώς, πιστεύεται ότι, η COX-1 βρίσκεται σε μία κατάσταση συνεχούς αναστολής που απαιτεί υψηλές συγκεντρώσεις AA για την έναρξη της βιοσύνθεσης των PGs, ενώ η COX-2

## Αιμοπετάλια

ενεργοποιείται σε πολύ χαμηλότερες συγκεντρώσεις [79]. Αυτό μπορεί να εξηγήσει την παρόμοια συμβολή και των δύο ισομορφών στην παραγωγή των προστανοειδών στο αγγειακό τοίχωμα, αν και η COX-1 εκφράζεται περισσότερο. Η COX-2 επάγεται πιο εύκολα από φλεγμονώδεις διεγέρτες από ότι η COX-1 και είναι η κύρια πηγή των PGs. Ωστόσο, η COX-2 εκφράζεται και σε πολλούς μη φλεγμονώδεις ιστούς. Τα ώριμα αιμοπετάλια εκφράζουν μόνο την COX-1 [80].



**Εικ. 1.9.** Σχηματική απεικόνιση της βιοσύνθεσης και της σηματοδότησης των προστανοειδών στα αιμοπετάλια (τροποποιημένη εικόνα από [81]).

Το κυρίαρχο βιοσυνθετικό μονοπάτι των προστανοειδών είναι ο σχηματισμός του TxA<sub>2</sub> διαμέσου της δράσης της Tx συνθάσης (TxS), η οποία συνθέτει ταχέως μεγάλες ποσότητες TxA<sub>2</sub> σε απόκριση της αιμοπεταλιακής ενεργοποίησης. Το TxA<sub>2</sub> δεν αποθηκεύεται στα αιμοπετάλια και η βιοσυνθετική ικανότητα υπερβαίνει κατά πολύ τις ποσότητες που απαιτούνται για την αιμοπεταλιακή ενεργοποίηση [82]. Το TxA<sub>2</sub> υδρολύεται ταχέως (χρόνος ημιζωής περίπου 30 sec) στην σταθερή και βιολογικά αδρανή ένωση TxB<sub>2</sub>. Το TxB<sub>2</sub> εξαλείφεται από την κυκλοφορία μέσω του μεταβολισμού του ήπατος, με αποτέλεσμα την ουρική έκκριση του μεταβολίτη, 11-δεϋδρο-TxB<sub>2</sub>. Το TxA<sub>2</sub> δρα μέσω του TP υποδοχέα, ο οποίος αποτελείται από δυο ισομορφές, την TP<sub>α</sub>, η οποία αποτελεί την κυρίαρχη ισομορφή και αλληλεπιδρά κυρίως με G<sub>q</sub> και G<sub>12/13</sub>, και την TP<sub>β</sub> [82,83].

Η προστακυκλίνη (PGI<sub>2</sub>) απελευθερώνεται συνεχώς στην κυκλοφορία με σχετικά σταθερό ρυθμό και αποικοδομείται υδρολυτικά ταχέως (χρόνος ημιζωής <3 min) στην 6-κετο-PGF<sub>1α</sub>. Η PGI<sub>2</sub> συνθάση (PGIS), η οποία καταλύει την ισομερή αναδιάταξη της PGH<sub>2</sub> σε PGI<sub>2</sub> εκφράζεται στα ECs και VSMCs [84]. Οι COX-1 και COX-2 εκφράζονται επίσης στο αγγειακό σύστημα και συμβάλλουν και οι δυο στο σχηματισμό της PGI<sub>2</sub> [85]. Σε καταστάσεις επιταχυνόμενων αλληλεπιδράσεων των αιμοπεταλίων με το αγγειακό τοίχωμα, όπως η ασταθής στηθάγχη και το έμφραγμα του μυοκαρδίου, ο σχηματισμός της PGI<sub>2</sub> αυξορυθμίζεται και συμπίπτει με την απελευθέρωση του TxA<sub>2</sub> από τα αιμοπετάλια [86,87]. Η μεταφορά ενδοπεροξειδίου από τα αιμοπετάλια στα αγγειακά κύτταρα μπορεί να συμβάλλει, εν μέρει, στην αύξηση του σχηματισμού της PGI<sub>2</sub>. Η απόκριση στην PGI<sub>2</sub> πιστεύεται ότι δρα ως ένα σήμα αρνητικής ανάδρασης, το οποίο περιορίζει τον θρόμβο στο σημείο της ενδοθηλιακής βλάβης [88], επειδή η PGI<sub>2</sub> αναστέλλει την αιμοπεταλιακή ενεργοποίηση μέσω του ειδικού υποδοχέα της, τον IP υποδοχέα. Ο IP υποδοχέας είναι συζευγμένος με G<sub>s</sub> και η προκύπτουσα αύξηση της cAMP ενεργοποιεί την PKA, η οποία, μεταξύ ενός αριθμού πρωτεϊνών-στόχων, απενεργοποιεί την κινάση της ελαφριάς αλυσίδας της μυοσίνης οδηγώντας σε μειωμένη φωσφορυλίωση της μυοσίνης και αιμοπεταλιακή συσσώρευση. Η PKA φωσφορυλιώνει επίσης την VASP, η οποία ρυθμίζει τη πρόσδεση του ινωδογόνου διαμορφώνοντας την «μέσα-έξω» σηματοδότηση της ιντεγκρίνης α<sub>IIb</sub>β<sub>3</sub>. Η PGI<sub>2</sub> μπορεί επίσης να επηρεάσει το αιμοστατικό σύστημα ρυθμίζοντας την έκφραση των υποδοχέων της θρομβίνης και της θρομβομοντουλίνης [89].

Η ασπιρίνη αποτελεί τον ακρογωνιαίο λίθο της αντιαιμοπεταλιακής θεραπείας για την αντιμετώπιση των οξέων ισχαιμικών συνδρόμων, τόσο των στεφανιαίων όσο και των εγκεφαλοαγγειακών, καθώς και για τη δευτερογενή πρόληψή τους [90–92]. Ωστόσο, ο ρόλος της στην πρωτογενή πρόληψη της αθηροθρόμβωσης αποτέλεσε το αντικείμενο συζήτησης τα τελευταία 10 χρόνια και παραμένει εξαιρετικά αμφιλεγόμενο [93]. Η ασπιρίνη αναστέλλει τη διαμεσολαβούμενη από το Tx αιμοπεταλιακή ενεργοποίηση μέσω μιας μη αντιστρεπτής αναστολής της COX-1. Η αντιαιμοπεταλιακή δράση της ασπιρίνης διαμεσολαβείται από την ικανότητά της να ακετυλιώνει μόνιμα ένα κατάλοιπο σερίνης (Ser530) κοντά στην ενεργό θέση της αιμοπεταλιακής COX-1, οδηγώντας σε μια μη αντιστρεπτή αναστολή του ενζύμου, με αποτέλεσμα την εξασθένιση του σχηματισμού του TxA<sub>2</sub>, και, ακολούθως, της επαγόμενης από το TxA<sub>2</sub> αιμοπεταλιακής συσσώρευσης. Δεδομένου ότι τα αιμοπετάλια δεν διαθέτουν πυρήνα και δεν μπορούν να συνθέσουν νέες πρωτεΐνες, η δράση της ασπιρίνης στην



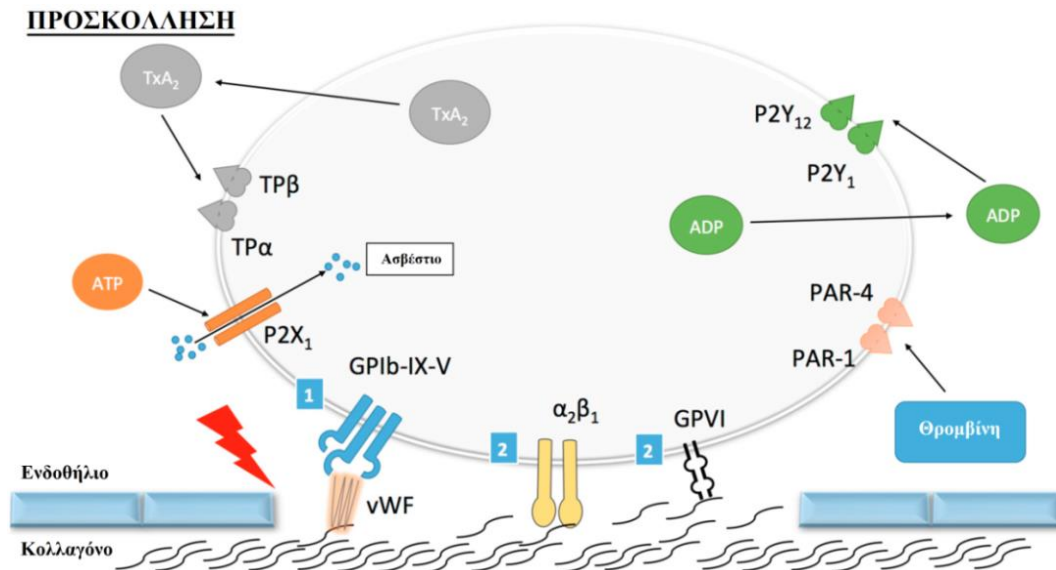
## *Αιμοπετάλια*

αιμοπεταλιακή COX διατηρείται για όλη τη διάρκεια ζωής των αιμοπεταλίων (7-10 d). Έτσι, οι επαναλαμβανόμενες ημερήσιες δόσεις ασπιρίνης έχουν μια συσσωρευτική επίδραση στην αιμοπεταλιακή λειτουργία, αναστέλλοντας μη αντιστρεπτά τα νεοσχηματισμένα αιμοπετάλια σε συνεχή βάση. Η αναστολή της αιμοπεταλιακής COX-1 χρησιμεύει ως βάση για την καρδιοπροστατευτική δράση της ασπιρίνης και άλλων μη στεροειδών αντιφλεγμονωδών φαρμάκων (NSAIDs). Η ασπιρίνη εκτίθεται παροδικά στην κυκλοφορία, με χρόνο ημιζωής περίπου 15-20 min. Μετά την από του στόματος χορήγηση, η ασπιρίνη αποακετυλιώνεται ταχέως σε σαλικυλικό οξύ, έναν ενεργό μεταβολίτη. Ωστόσο, όταν λάβει χώρα η αποακετυλίωση, χάνεται η ανασταλτική της ικανότητα. Συνεπώς, υπάρχει ένα στενό χρονικό παράθυρο για την ασπιρίνη για να ακετυλιωθεί η αιμοπεταλιακή COX-1 και να ανασταλθεί η παραγωγή του Tx. Παρόλα αυτά, η καθημερινή έκθεση, ακόμη και σε χαμηλές δόσεις ασπιρίνης, έχει ως αποτέλεσμα μια συσσωρευτική και σχεδόν πλήρη αναστολή της παραγωγής του προερχόμενου από τα αιμοπετάλια Tx. Τα NSAIDs ταξινομούνται είτε ως μη εκλεκτικοί αναστολείς της COX, οι οποίοι αναστέλλουν τόσο την COX-1 όσο και την COX-2, είτε ως εκλεκτικοί αναστολείς COX-2 (coxibs), ανάλογα με τη σχετική τους εκλεκτικότητα. Τα μη εκλεκτικά NSAIDs (όπως η ιβουπροφαίνη και η ναπροξένη) είναι ικανά να αναστέλλουν τη δράση των αιμοπεταλίων. Τα αντιαιμοπεταλιακά αποτελέσματα της ιβουπροφαίνης, της ναπροξένης και άλλων μη επιλεκτικών NSAIDs διαμεσολαμβάνονται μέσω της αναστολής της COX-1, παρεμποδίζοντας το σχηματισμό του TxA<sub>2</sub> και εμποδίζοντας την εξαρτώμενη από το Tx συσσώρευση των αιμοπεταλίων. Αντίθετα με την ασπιρίνη, ωστόσο, η ιβουπροφαίνη και η ναπροξένη προσδέονται αντιστρεπτά στην COX. Λόγω της παροδικής φύσης αυτής της πρόσδεσης, τα μόρια των NSAIDs αποδεσμεύουν τελικά το ένζυμο, το οποίο αν αφηθεί ελεύθερο, μπορεί να συμβάλει και πάλι στην παραγωγή του Tx. Η έκταση και η διάρκεια της πρόσδεσης των NSAIDs στην αιμοπεταλιακή COX-1 και επομένως η αναστολή του Tx ποικίλλει με βάση τη συγγένεια για το ένζυμο COX-1, καθώς και το φαρμακοκινητικό προφίλ του μεμονωμένου παράγοντα [94–96].

### **1.7. Προσκόλληση, ενεργοποίηση και συσσώρευση των αιμοπεταλίων**

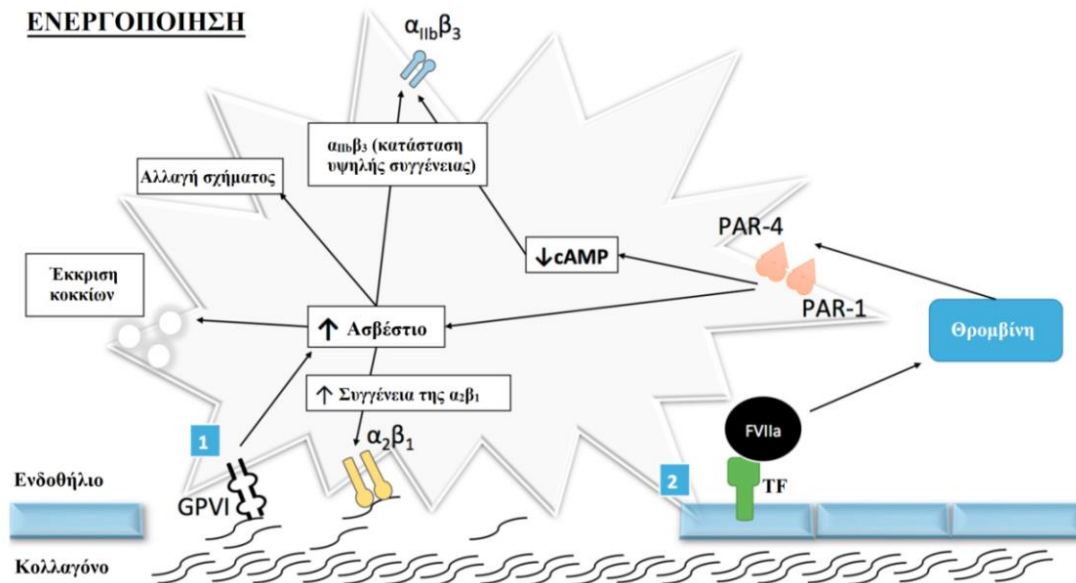
Με τη ρήξη του ινώδους καλύμματος, η πολύ θρομβογενετική υποενδοθηλιακή θεμέλια ουσία εκτίθεται σε κυκλοφορούντα αιμοπετάλια. Η συγκεκριμένη επαφή δίνει το έναυσμα για την εκκίνηση της πρωτογενούς αιμόστασης, με πρώτο στάδιο την προσκόλληση των αιμοπεταλίων στο σημείο της αγγειακής βλάβης. Δύο μονοπάτια είναι γνωστό ότι

συμμετέχουν στην αιμοπεταλιακή προσκόλληση, το άμεσο και το έμμεσο μονοπάτι [97]. Σε συνθήκες ταχείας ροής του αίματος, όπως η αρτηριακή ροή, πρέπει να δημιουργηθεί μια ισχυρή και γρήγορη σύνδεση μεταξύ του αγγειακού τοιχώματος και των αιμοπεταλίων. Αυτός είναι ο ρόλος του έμμεσου μονοπατιού, το οποίο λειτουργεί κυρίως μέσω του vWF. Ο vWF εντοπίζεται στην υποενδοθηλιακή θεμέλια ουσία, στην κυκλοφορία του αίματος ως αδρανής μορφή, στα Weibel-Palade σωματίδια των ECs και στα  $\alpha$ -κοκκία των αιμοπεταλίων. Όταν το κολλαγόνο είναι εκτεθειμένο, ο vWF προσδένεται σε αυτό και υφίσταται διαμορφωτικές αλλαγές. Αυτές οι αλλαγές λαμβάνουν χώρα σε υψηλή διατμική τάση και αποκαλύπτουν τη θέση πρόσδεσης για το σύμπλοκο GPIIb-IX-V στον vWF [97]. Η πρόσδεση του vWF στο σύμπλοκο GPIIb-IX-V επιτρέπει την πρόσδεση των αιμοπεταλίων στο αγγειακό τοίχωμα στο σημείο της βλάβης, επιτρέποντας την προσκόλληση τους στο κολλαγόνο (**Εικ. 1.9**). Το άμεσο μονοπάτι αντιστοιχεί στην αλληλεπίδραση μεταξύ των υποενδοθηλιακών δομών, όπως το κολλαγόνο με τους υποδοχείς στην επιφάνεια των αιμοπεταλίων, την ιντεγκρίνη  $\alpha_2\beta_1$  και την GPVI [97]. Το άμεσο μονοπάτι παίζει το ρόλο του σε συνθήκες χαμηλής ροής του αίματος και ενισχύει την προσκόλληση μεταξύ των αιμοπεταλίων. Μέσω αυτού του μηχανισμού, δημιουργείται μια μονοστιβάδα ενεργοποιημένων αιμοπεταλίων, η οποία επιτρέπει την περαιτέρω στρατολόγηση και ανάπτυξη του αιμοπεταλιακού θρόμβου [98]. Μόλις το προσκολλημένο σύμπλοκο σταθεροποιηθεί, η αιμοπεταλιακή ενεργοποίηση λαμβάνει χώρα περιλαμβάνοντας την αλλαγή σχήματος, καθώς και την εκκίνηση της έκκρισης των κοκκίων. Η αλλαγή της ιντεγκρίνης  $\alpha_{IIb}\beta_3$  από την κατάσταση ηρεμίας χαμηλής συγγένειας σε μια κατάσταση υψηλής συγγένειας ολοκληρώνει τη διαδικασία της ενεργοποίησης, διαμεσολαβώντας, στη συνέχεια, την αιμοπεταλιακή συσσώρευση [99].



**Εικ. 1.9.** Σχηματική απεικόνιση της αιμοπεταλιακής προσκόλλησης. (1) Έμμεσο μονοπάτι προσκόλλησης: όταν τα κυκλοφορούντα αιμοπετάλια εκτίθενται στην θρομβογενετική υποενδοθηλιακή θεμέλια ουσία, ο vWF προσδένεται στο κολλαγόνο και υφίσταται διαμορφωτική αλλαγή, επιτρέποντας την επακόλουθη πρόσδεση στο σύμπλοκο GPIb-IX-V. (2) Άμεσο μονοπάτι προσκόλλησης: μόλις επιβραδυνθούν τα αιμοπετάλια, λαμβάνει χώρα η πρόσδεση του κολλαγόνου στη GPVI και τη  $\alpha_2\beta_1$  και προάγεται η σταθερή προσκόλληση των αιμοπεταλίων στο αγγειακό τοίχωμα (τροποποιημένη εικόνα από [100]).

Τα αιμοπετάλια ενεργοποιούνται από πολυάριθμους αγωνιστές, όπως τη θρομβίνη, η οποία παράγεται σε μικρές ποσότητες μετά την πρόσδεση του TF στους παράγοντες πήξης στην επιφάνεια των ενεργοποιημένων αιμοπεταλίων [101], επιτρέποντας την περαιτέρω ενεργοποίηση και στρατολόγηση των αιμοπεταλίων κατά τη διάρκεια της ενεργοποίησης του PAR-1 και PAR-4, καθώς και για την επακόλουθη αλλαγή σχήματος των αιμοπεταλίων και την ενδοκυτταροπλασματική απελευθέρωση ασβεστίου [98]. Επιπλέον, τα αιμοπετάλια μπορούν να προσδεθούν στο κολλαγόνο μέσω διαφόρων υποδοχέων, όπως της GPVI και των ιντεγκρινών  $\alpha_2\beta_1$  και  $\alpha_{IIb}\beta_3$  (**Εικ. 1.10**). Ενώ η GPVI συμμετέχει στην αιμοπεταλιακή ενεργοποίηση, η ιντεγκρίνη  $\alpha_2\beta_1$  έχει σημαντικότερο ρόλο στην αιμοπεταλιακή προσκόλληση και η ιντεγκρίνη  $\alpha_{IIb}\beta_3$  στη συσσώρευση.

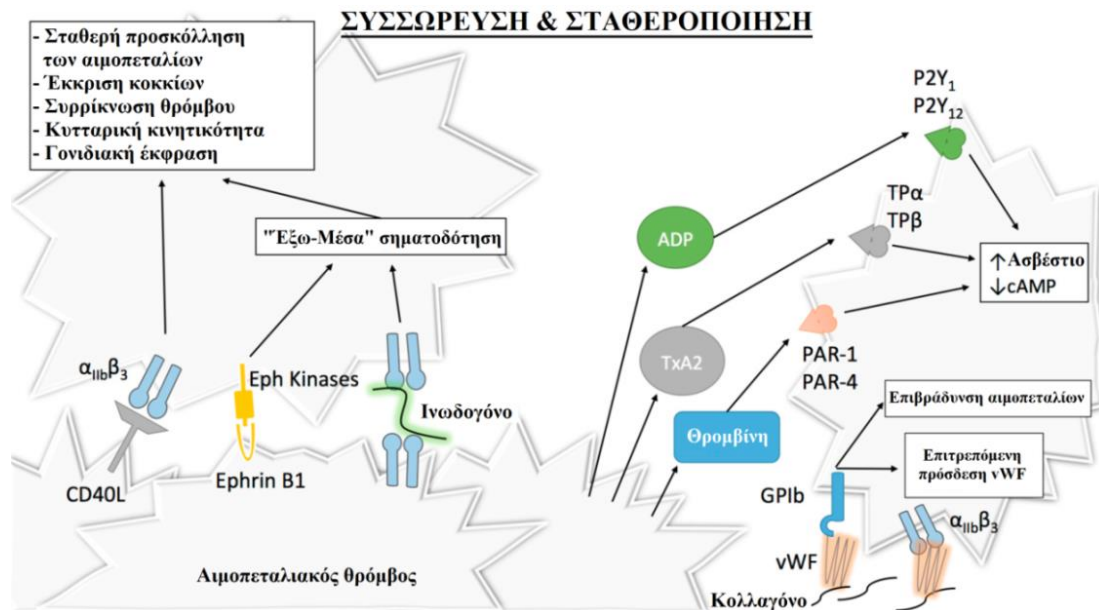


**Εικ. 1.10.** Σχηματική απεικόνιση της αιμοπεταλιακής ενεργοποίησης. (1) Επαγόμενη από το κολλαγόνο αιμοπεταλιακή ενεργοποίηση: η πρόσδεση των υποενδοθηλιακών ινιδίων κολλαγόνου στην GPVI επάγει τη διασταυρούμενη σύνδεση και την επακόλουθη ενεργοποίηση του συμπλόκου της γ-αλυσίδας του Fc υποδοχέα με τη GPVI. (2) Διαμεσολαβούμενη από τη θρομβίνη αιμοπεταλιακή ενεργοποίηση: ο TF στην ενεργό του μορφή προσδένεται και ενεργοποιεί τον παράγοντα VIIa, προάγοντας τον σχηματισμό μικρών ποσοτήτων θρομβίνης και μια μεταγενέστερη έκρηξη στον σχηματισμό της. Η θρομβίνη στη συνέχεια ευνοεί την αιμοπεταλιακή ενεργοποίηση μέσω των PARs (τροποποιημένη εικόνα από [100]).

Το τελικό στάδιο της αιμοπεταλιακής ενεργοποίησης είναι η προαγωγή της αλλαγής της ιντεγκρίνης  $\alpha_{IIb}\beta_3$  από την κατάσταση χαμηλής συγγένειας στην κατάσταση υψηλής συγγένειας, η οποία επιτρέπει την αντιστρεπτή πρόσδεση της  $\alpha_{IIb}\beta_3$  στο ινωδογόνο και τον vWF οδηγώντας σε σταθερά αιμοπεταλιακά συσσωματώματα αιμοπεταλίων [12] (**Εικ. 1.11**). Όπως η ιντεγκρίνη  $\alpha_{IIb}\beta_3$  αποτελεί ένα κεντρικό παράγοντα στην αιμοπεταλιακή συσσώρευση, πολυάριθμες πρωτεΐνες επηρεάζουν τη διαμορφωτική αλλαγή [102]. Από αυτές τις πρωτεΐνες, η ταλίνη θεωρείται ιδιαίτερα σημαντική για την ενεργοποίηση της ιντεγκρίνης  $\alpha_{IIb}\beta_3$  [103], ενώ οι κιντλίνες (και ιδιαίτερα η κιντλίνη-3) έχουν περιγραφεί ως ρυθμιστές της αλληλεπίδρασης της ταλίνης με την ιντεγκρίνη και δρουν ως διεγέρτες της ενεργοποίησης της ιντεγκρίνης  $\alpha_{IIb}\beta_3$  [104]. Μετά την ενεργοποίηση της ιντεγκρίνης  $\alpha_{IIb}\beta_3$ , λαμβάνουν χώρα διαμορφωτικές αλλαγές στις διαμεμβρανικές και κυτταροπλασματικές της περιοχές. Επίσης, λαμβάνει χώρα μικροσυσταδοποίηση, η οποία είναι μια απροσδιόριστη διαδικασία όπου οι υποδοχείς στοιβάζονται στην κυτταρική επιφάνεια [105]. Οι συγκεκριμένες τροποποιήσεις προκαλούν αρκετά ενδοκυττάρια γεγονότα, τα οποία οδηγούν στην σταθερή προσκόλληση

## Αιμοπετάλια

των αιμοπεταλίων, την έκκριση των κοκκίων, τη συρρίκνωση του θρόμβου, καθώς και την κυτταρική κινητικότητα ή γονιδιακή έκφραση [23,106].



**Εικ. 1.11.** Σχηματική απεικόνιση της αιμοπεταλιακής συσσώρευσης και της σταθεροποίησης του θρόμβου. Συσσώρευση αιμοπεταλίων: η ντεγκρίνη αIIbβ3 (κατάσταση υψηλής συγγένειας) επιτρέπει την πρόσδεση της στο ινωδογόνο, δίνοντας το έναυσμα για την «έξω-μέσα» σηματοδότηση και προάγοντας την σταθερή συσσώρευση. Επέκταση και σταθεροποίηση του αιμοπεταλιακού θρόμβου: η επέκταση του αιμοπεταλιακού θρόμβου λαμβάνει χώρα μέσω της παρακρινούς έκκρισης αιμοπεταλιακών αγωνιστών, προάγοντας την αιμοπεταλιακή ενεργοποίηση και συσσώρευση, την στρατολόγηση περισσότερων αιμοπεταλίων, καθώς και την αλλαγή σχήματος των αιμοπεταλίων (τροποποιημένη εικόνα από [100]).





## **2<sup>ο</sup> Κεφάλαιο – Πρόδρομα Ενδοθηλιακά Κύτταρα**

### **2.1. Εισαγωγή**

Η ακεραιότητα του ενδοθηλίου εξαρτάται από την ισορροπία μεταξύ της έκτασης της βλάβης των ECs και της ικανότητας για ενδογενή επιδιόρθωση. Η απώλεια της ακεραιότητας του ενδοθηλίου μπορεί να προκαλέσει αθηροσκλήρωση οδηγώντας σε στεφανιαία νόσο και εγκεφαλικό επεισόδιο [107–109]. Σε υγιή άτομα, τα γειτονικά ώριμα ECs είναι ικανά να αναδιπλασιάζονται τοπικά και να αντικαθιστούν κατεστραμμένα κύτταρα [107]. Ωστόσο, ο τοπικός αναδιπλασιασμός έχει περιορισμένο δυναμικό και μπορεί να είναι ανεπαρκής εάν τα επιβλαβή ερεθίσματα παραμένουν και/ή επαναλαμβάνονται [110]. Συνεπώς, απαιτείται ένας εναλλακτικός μηχανισμός. Ένας προτεινόμενος μηχανισμός εξαρτάται από τα αδιαφοροποίητα κύτταρα, τα οποία μεταναστεύουν σε θέσεις αγγειακής βλάβης [111–113] και στη συνέχεια διαφοροποιούνται σε ώριμα ECs [114–118]. Πιστεύεται ότι τα συγκεκριμένα αδιαφοροποίητα κύτταρα έχουν κεντρικό ρόλο στην αγγειακή αποκατάσταση λόγω της ικανότητάς τους να πολλαπλασιάζονται, να μεταναστεύουν στο σημείο της αγγειακής βλάβης και στη συνέχεια να διαφοροποιούνται σε ώριμο αγγειακό ενδοθήλιο. Τα συγκεκριμένα κύτταρα είναι, επίσης, ικανά να αυξήσουν το συγκεκριμένο κύκλο εκκρίνοντας προ-αγγειογενετικές κυτοκίνες [119,120]. Από την πρώτη αναφερθείσα παρατήρηση προερχόμενων από το BM κυκλοφορούντων πρόδρομων κυττάρων έχει ακολουθήσει έντονη έρευνα. Τα συγκεκριμένα κύτταρα ονομάστηκαν πρόδρομα ενδοθηλιακά κύτταρα (EPCs) από τον Asahara και τους συνεργάτες του [121,122]. Πιστεύεται ότι τα EPCs προέρχονται από πολυδύναμα βλαστοκύτταρα εντός του BM και αντιπροσωπεύουν μόνο το 0,001-0,0001% του περιφερικού αίματος [123]. Θεωρείται ότι τα κυκλοφορούντα EPCs μεταναστεύουν σε περιοχές αγγειακής βλάβης και στη συνέχεια διαφοροποιούνται σε ώριμα ECs [121]. Τα EPCs μπορούν να απομονωθούν από το BM ή την κυκλοφορία ως ένας υποπληθυσμός των μονοπύρηνων κυττάρων (MNCs) [121,124], τα οποία εκφράζουν μια ποικιλία ενδοθηλιακών δεικτών στην επιφάνειά τους [125].

Ωστόσο, παραμένει, μέχρι σήμερα, η έλλειψη ομοφωνίας για την ταυτοποίηση και τη λειτουργία των EPCs [126–128]. Σύγχυση προκαλεί το γεγονός ότι μερικές μελέτες έχουν χρησιμοποιήσει δείγματα EPCs, τα οποία έχουν ληφθεί από ετερογενή κυτταρικό πληθυσμό χωρίς να λάβουν υπόψη την πιθανή συνεργική επίδραση διαφόρων κυτταρικών πληθυσμών



## *Πρόδρομα Ενδοθηλιακά Κύτταρα*

[129]. Επιπλέον, τα EPCs συχνά αναφέρονται ως μια διαφορετική ομάδα κυτταρικών γενιών, τα οποία έχουν αγγειογενετικό δυναμικό παρά το γεγονός ότι ορισμένοι από αυτούς τους κυτταρικούς πληθυσμούς δεν μπορούν να διαφοροποιηθούν σε λειτουργικά ECs [126]. Κατά συνέπεια, η τρέχουσα ονοματολογία των EPCs θεωρείται ευρέως ως μη βέλτιστη.

## **2.2. Χαρακτηρισμός των EPCs**

Τα EPCs θεωρήθηκαν αρχικά ως μια ομάδα κυττάρων, τα οποία κινητοποιούνται από το ΒΜ και συμμετέχουν στη δημιουργία και την επιδιόρθωση του αγγειακού ενδοθηλίου [121]. Πρόσφατα, θεωρήθηκαν ως ένας ετερογενής κυτταρικός πληθυσμός σε διαφορετικά στάδια ωρίμανσης, με διαφορετική προέλευση και αρκετά σημεία «κατοικίας», όπως τον σπλήνα, το αγγειακό ενδοθήλιο και τον έξω χιτώνα [130]. Τα EPCs προσκολλώνται σε μόρια της θεμέλιας ουσίας, όπως τη φιμπρονεκτίνη, και είναι θετικά τόσο για τη πρόσληψη της ακετυλιωμένης λιποπρωτεΐνης χαμηλής πυκνότητας (acLDL) όσο και για δέσμευση της λεκτίνης *Ulex europaeus agglutinin-1* (UEA-1) [121]. Μέχρι σήμερα, δεν υπάρχει συγκεκριμένος δείκτης για την ταυτοποίηση των EPCs.

Ο Asahara και συνεργάτες του ανέφεραν ότι τα κυκλοφορούντα MNCs, τα οποία είναι θετικά στην έκφραση του αντιγόνου CD34 και του υποδοχέα 2 του VEGF [VEGFR2 – επίσης γνωστός και ως KDR/Flk-1 ή CD309], μπορούν να διευκολύνουν τη νεο-αγγειογένεση. Οι συγκεκριμένοι δύο δείκτες κυτταρικής επιφάνειας ήταν οι πρώτοι πιθανοί δείκτες, οι οποίοι προτάθηκαν για την ταυτοποίηση των EPCs [121]. Στη συνέχεια, τα αντιγόνα CD34 και CD133, καθώς και ο VEGFR2, χρησιμοποιήθηκαν για τον χαρακτηρισμό των EPCs. Οι συγκεκριμένοι βιοδείκτες είναι οι πιο συχνά χρησιμοποιούμενοι επιφανειακοί δείκτες για τον ορισμό ενός πληθυσμού EPCs [125,131].

Τα EPCs αποτελούνται από δύο διαφορετικούς υποπληθυσμούς: τα «πρώιμα» EPCs (early EPCs) και τα «όψιμα» EPCs (late EPCs). Τα πρώιμα EPCs αναφέρονται επίσης ως κυκλοφορούντα αγγειογενετικά κύτταρα (CACs) ή EPCs τα οποία έχουν την ικανότητα σχηματισμού αποικιών (CFU-Hill ή CFUs) και είναι προσκολλητικά κύτταρα με ατρακτοειδές σχήμα, τα οποία αναπτύσσονται μετά από 4-7 d, πεθαίνουν μετά από 4 εβδομάδες και έχουν πολύ μειωμένη ικανότητα πολλαπλασιασμού [132–134]. Ο συγκεκριμένος υποπληθυσμός EPCs εκφράζει ορισμένους δείκτες στην επιφάνειά του, χαρακτηριστικοί των πρόδρομων κυττάρων, συμπεριλαμβανομένων των CD133 και CD34,

των ενδοθηλιακών δεικτών CD31 [γνωστός και ως προσκολλητικό μόριο των αιμοπεταλίων και των ενδοθηλιακών κυττάρων (PECAM-1)] και vWF, του δείκτη των λευκοκυττάρων CD45 και του δείκτη των μονοκυττάρων CD14. Τα πρώιμα EPCs υστερούν εντυπωσιακά στην αντιγραφική ικανότητα, ωστόσο, αποτελούν παραγωγοί πολλών αυξητικών παραγόντων και κυτοκινών, συμπεριλαμβανομένου του VEGF, του αυξητικού παράγοντα ηπατοκυττάρων (HGF), του παράγοντα διέγερσης αποικιών των κοκκιοκυττάρων (G-CSF), του παράγοντα διέγερσης σχηματισμού αποικιών από μακροφάγα (GM-CSF) και της IL-8 [133]. Επιπλέον, τα συγκεκριμένα κύτταρα δεν μπορούν να σχηματίσουν αγγειακό δίκτυο *in vitro*, ωστόσο, μπορούν να προσκολληθούν σε ώριμα ECs και να προωθήσουν το σχηματισμό δικτύων, καθώς και να επιδιορθώσουν τραυματισμένα ECs μέσω παρακρινή μηχανισμού [132]. Τα όψιμα EPCs, τα οποία ονομάζονται και προχωρημένης ωρίμανσης EPCs (late-OECs) ή κύτταρα με ικανότητα να σχηματίζουν ενδοθηλιακές αποικίες (ECFCs) παρουσιάζουν μια μορφολογία λιθόστρωτου (cobblestone) και αρχίζουν να πολλαπλασιάζονται και να διαφοροποιούνται σε ώριμα ECs μετά από 2-3 εβδομάδες. Τα συγκεκριμένα κύτταρα εκφράζουν ενδοθηλιακούς δείκτες όπως το KDR, το CD144 [γνωστό και ως αγγειοενδοθηλιακή καντερίνη (VE-cadherin)] και το CD146 [γνωστό και ως προσκολλητικό μόριο κυττάρων μελανώματος (MCAM)] [126]. Τα όψιμα EPCs μπορούν να βελτιώσουν άμεσα την αγγειογένεση, καθώς ενσωματώνονται σε νέα αγγεία και διαφοροποιούνται στη συνέχεια σε ώριμα ECs [135,136]. Τα πρώιμα και όψιμα EPCs μπορεί να προέρχονται από διαφορετικούς τύπους αγγειογενετικών κυττάρων [135].

### **2.3. Ταυτοποίηση και ταξινόμηση των EPCs**

Μετά τις δύσκολες μελέτες του Asahara και των συνεργατών του [121], αναπτύχθηκαν αρκετές μεθοδολογίες για την αξιολόγηση και το χαρακτηρισμό των EPCs. Η κυτταρομετρία ροής και η καλλιέργεια κυττάρων έχουν χρησιμοποιηθεί ευρέως για τον ποσοτικό και ποιοτικό χαρακτηρισμό των συγκεκριμένων κυττάρων σε διαφορετικές κλινικές καταστάσεις, καθώς και σε υγιή άτομα.

#### **■ Κυτταρομετρία ροής**

Η κυτταρομετρία ροής είναι μία από τις πιο συχνά χρησιμοποιούμενες τεχνικές για την απομόνωση μεμονωμένων κυττάρων για τη μετέπειτα ανάλυση τους. Η καταμέτρηση του αριθμού των κυττάρων με κυτταρομετρία ροής βασίζεται στην ανοσοεπισημάνση με

## *Πρόδρομα Ενδοθηλιακά Κύτταρα*

αντισώματα-στόχους έναντι επιφανειακών ή ενδοκυττάρων αντιγόνων και αποτελεί αυτή τη στιγμή την καλύτερη μέθοδο για την απόκτηση καθαρών ποσοτικών δεδομένων για πιθανά EPCs. Η κυτταρομετρία ροής επιτρέπει, επίσης, τον προσδιορισμό αρκετών κυτταρικών παραμέτρων, οι οποίες σχετίζονται με τον πολλαπλασιασμό, τη μορφολογία και τη διαφοροποίηση των κυττάρων. Ωστόσο, η συγκεκριμένη μέθοδος έχει δύο σημαντικούς περιορισμούς [137]. Ο πρώτος περιορισμός σχετίζεται με το αντιγονικό προφίλ, το οποίο πρέπει να χρησιμοποιηθεί για την ταυτοποίηση των EPCs, καθώς ο ακριβής αντιγονικός φαινότυπος των EPCs δεν είναι ακόμη γνωστός και τα αντιγόνα που εκφράζονται από τα EPCs εκφράζονται επίσης από άλλες κυτταρικές γενιές [122,137,138]. Ιδανικά, τα EPCs θα πρέπει να προσδιορίζονται χρησιμοποιώντας όσο το δυνατόν περισσότερα αντιγόνα για να εξασφαλιστεί η εξειδίκευση των ταυτοποιημένων κυττάρων. Ωστόσο, τότε δημιουργείται ένας δεύτερος περιορισμός, ο οποίος είναι, κατά κάποιο τρόπο, αντιφατικός. Τα κυκλοφορούντα EPCs είναι ένας σπάνιος κυτταρικός πληθυσμός στο περιφερικό αίμα, απαιτώντας τη χρήση περιορισμένου αριθμού επιφανειακών αντιγόνων για τη διεξαγωγή της κυτταρομετρίας ροής [122,137]. Παρόλα αυτά, ο συγκεκριμένος περιορισμός μπορεί να ελαχιστοποιηθεί αυξάνοντας τον αριθμό των συμβάντων/δείγμα [127,138]. Παρά τους περιορισμούς, προτείνεται ότι η κυτταρομετρία ροής θα πρέπει να είναι η προτιμώμενη μέθοδος για τη μέτρηση των EPCs ως βιοδείκτη μιας νόσου και, εφόσον παραμένει το οριστικό τους αντιγονικό προφίλ προς διαπίστωση, θα πρέπει να αναφέρονται ως «πιθανά» EPCs [127,137,138].

Αρκετά αντιγονικά προφίλ έχουν προταθεί για τα EPCs, ωστόσο, δεν υπάρχει ακόμα ομοφωνία σχετικά με τον ανοσοφαινότυπο, ο οποίος αντιστοιχεί ακριβώς στα EPCs. Παρόλα αυτά, προτείνεται ότι τα EPCs θα πρέπει να προσδιορίζονται χρησιμοποιώντας τουλάχιστον έναν δείκτη βλαστικής ικανότητας/ανωριμότητας (γενικά το CD34 και/ή το CD133) και τουλάχιστον έναν δείκτη ενδοθηλιακής γενιάς (συνήθως το KDR) [127,139]. Το CD34 είναι ένα εξειδικευμένο αντιγόνο του σταδίου διαφοροποίησης, το οποίο εκφράζεται από αιμοποιητικά βλαστικά και πρόδρομα κύτταρα [140,141]. Το CD34 εκφράζεται επίσης σε ένα υποσύνολο των ECs [141,142]. Το CD133 είναι ένα πολύ πρώιμο αντιγόνο, το οποίο εκφράζεται εκλεκτικά σε αιμοποιητικά βλαστικά και πρόδρομα κύτταρα, το οποίο χάνεται γρήγορα κατά τη διαφοροποίηση των κυττάρων [143], ενώ ταυτοποιεί περισσότερα ανώριμα πρόδρομα κύτταρα από ότι το CD34 μόνο του [144]. Το KDR αποτελεί υποδοχέα για τον VEGF [122] και ένα δείκτη για την

ενδοθηλιακή γενιά [125,139,145]. Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, τα CD34<sup>+</sup>/CD133<sup>+</sup>/KDR<sup>+</sup> και τα CD133<sup>+</sup>/KDR<sup>+</sup> κύτταρα μπορεί να αντιπροσωπεύουν περισσότερα ανώριμα EPCs, ενώ τα CD34<sup>+</sup>/KDR<sup>+</sup> κύτταρα μπορεί να αντιπροσωπεύουν έναν περισσότερο διαφοροποιημένο πληθυσμό των EPCs [125,146] με υψηλότερα επίπεδα στο περιφερικό αίμα [145]. Ωστόσο, παρά την εκτεταμένη μελέτη για τα EPCs, δεν υπάρχει ακόμα ομοφωνία για το ακριβές αντιγονικό προφίλ. Ο Fadini και οι συνεργάτες του πρότειναν ότι τα CD34<sup>+</sup>/KDR<sup>+</sup> EPCs θα πρέπει να είναι ο επιλεγμένος φαινότυπος ενός καρδιαγγειακού βιοδείκτη [145]. Ωστόσο, το περιφερικό αίμα περιέχει αρκετούς κυτταρικούς τύπους, οι οποίοι εκφράζουν επιφανειακούς ενδοθηλιακούς δείκτες, συμπεριλαμβανομένων των αιμοποιητικών βλαστοκυττάρων (με δυναμικό αιμαγγειοβλάστη) και των μονοπύρηνων φαγοκυττάρων (μονοκύτταρα-μακροφάγα) [147]. Προκειμένου να αυξηθεί η εξειδίκευση των EPCs, έχουν χρησιμοποιηθεί από διάφορες ομάδες και άλλοι επιφανειακοί δείκτες και συνδυασμοί διαφόρων αντιγόνων. Ορισμένοι συγγραφείς υποδεικνύουν την παράλληλη χρήση του CD45 (το κοινό αντιγόνο των λευκοκυττάρων) για να διακρίνουν τα μυελοειδή κύτταρα (τα οποία είναι CD45<sup>+</sup> και μιμούνται στην καλλιέργεια την ενδοθηλιακή μορφολογία) από τύπους ECs (CD45<sup>-</sup> ή CD45<sup>dim</sup>) [122,148]. Αν και τα αρχικά «πιθανά» EPCs περιγράφηκαν για πρώτη φορά ως CD45<sup>-</sup> κύτταρα, η πρόσφατη εφαρμογή πολυχρωματικών κυτταρομέτρων ροής, με περισσότερα κανάλια ανάλυσης, αποκάλυψε ότι τα EPCs, τα οποία περιγράφονται ως CD45<sup>-</sup> είναι στην πραγματικότητα CD45<sup>dim</sup> [149]. Επιπλέον, η Schmidt-Lucke και οι συνεργάτες της απέδειξαν ότι μόνο το CD45<sup>dim</sup> κλάσμα περιέχει τους σχετικούς προγονωτικούς πληθυσμούς EPCs, υποδηλώνοντας ότι τα συγκεκριμένα κύτταρα αντιπροσωπεύουν τα «αληθινά» κυκλοφορούντα EPCs [139].

Άλλα αντιγόνα (όπως τα CD117, CD31, CD105) έχουν επίσης προταθεί ως δείκτες EPCs [150,151]. Το CD117, επίσης γνωστό ως c-Kit, αποτελεί υποδοχέα του αυξητικού παράγοντα των βλαστοκυττάρων (SCFR) και, ως εκ τούτου, είναι ένας δείκτης για την επιλογή βλαστοκυττάρων [152]. Επιπλέον, ο CD117<sup>+</sup> κυτταρικός πληθυσμός περιλαμβάνει πρόδρομα ενδοθηλιακά κύτταρα με δυνατότητα ενδοθηλιακής διαφοροποίησης και μπορεί να μοιράζονται τα χαρακτηριστικά των CD34<sup>+</sup> κυττάρων [152,153]. Τα CD31 και CD105, γνωστό και ως ενδογλίνη, χρησιμοποιούνται ως δείκτες ενδοθηλιακής γενιάς [151]. Η έκφραση του CD105 είναι αυξημένη σε ενεργοποιημένα ECs σε ιστούς που υφίστανται αγγειογένεση, εμπλέκοντας έτσι στην αγγειακή

## **Πρόδρομα Ενδοθηλιακά Κύτταρα**

αναδιαμόρφωση [154,155]. Το CD31 αντιπροσωπεύει έναν τυπικό ενδοθηλιακό ειδικό δείκτη [125,156].

Οι ετερογενείς φαινοτυπικοί προσδιορισμοί των EPCs έχουν συμβάλει στην αντιπαράθεση στην ταυτοποίηση των συγκεκριμένων κυττάρων και στην κατανόηση της βιολογίας τους *in vitro* ή *in vivo*.

### **■ Καλλιέργεια κυττάρων**

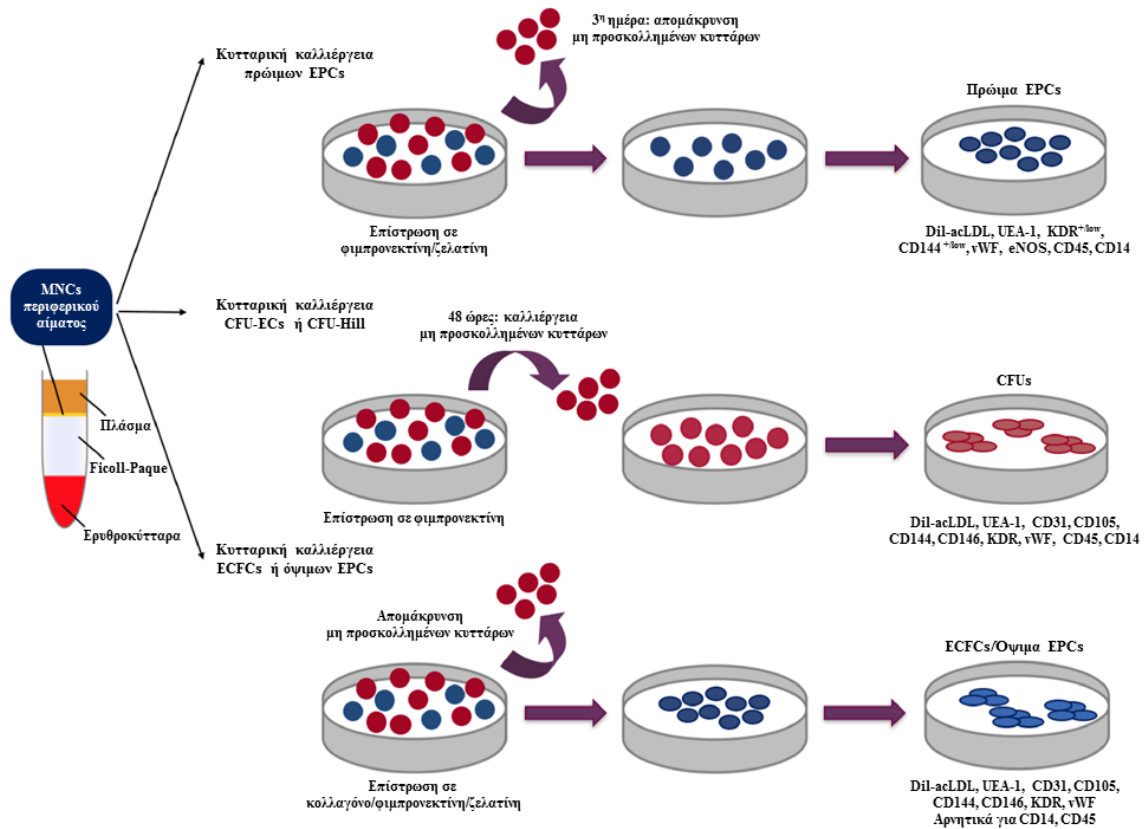
Η κυτταρομετρία ροής επιτρέπει μόνο την ποσοτική αξιολόγηση των EPCs. Τα συγκεκριμένα κύτταρα πρέπει να μελετηθούν και σε καλλιέργεια για να ληφθούν ποιοτικά δεδομένα. Όσον αφορά τις μεθόδους των κυτταροκαλλιεργειών, περιγράφονται διάφορες προσεγγίσεις και πρωτόκολλα, είτε μέσω καλλιέργειας μη επιλεγμένων MNCs είτε προεπιλεγμένων κυττάρων με ειδικούς δείκτες. Στο αρχικό πρωτόκολλο από τον Asahara και τους συνεργάτες του, όταν απομονώθηκαν τα CD34<sup>+</sup> MNCs από περιφερικό αίμα και επιστρώθηκαν σε τρυβλία επικαλυμμένα με φιμπρονεκτίνη, παρουσία θρεπτικού μέσου, εμφάνισαν ατρακτοειδές σχήμα μέσα σε 3 d και πολλαπλασιάστηκαν για 4 εβδομάδες, παρουσιάζοντας ιδιότητες παρόμοιες με το ενδοθήλιο, όπως πρόσληψη της acLDL, δέσμευση της λεκτίνης UEA-1 και έκφραση δεικτών της ενδοθηλιακής γενιάς (CD31, Tie-2, E-σελεκτίνη και KDR) [121]. Στη μεθοδολογία των CFU-Hill, η οποία περιγράφηκε από τον Hill και τους συνεργάτες του, τα MNCs καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό μέσο μετά από προ-επίστρωση των κυττάρων προς αποφυγή μόλυνσης από ώριμα κυκλοφορούντα ECs [117]. Ο αριθμός των αποικιών μετρήθηκε 7 d μετά την επίστρωση και οι αποικίες των EPCs, οι οποίες αποτελούνταν από πολλαπλά λεπτά επίπεδα κυττάρων, τα οποία προέρχονταν από ένα κεντρικό σύμπλεγμα στρόγγυλων κυττάρων, ονομάστηκαν CFU-Hill [117]. Η επιβεβαίωση της γενιάς των ECs πραγματοποιήθηκε μέσω της χρήσης ενδοθηλιακών-εξειδικευμένων αντισωμάτων έναντι του VEGFR2 και του CD31 ή της Dil-acLDL (1,1'-dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindocarbocyanine perchlorate-acLDL) και ταυτόχρονης χρώσης με λεκτίνη, όπως είχε περιγραφεί προηγουμένως από τον Asahara και τους συνεργάτες του [117,121]. Η ικανότητα να επεκταθούν κλωνικά και να δημιουργηθούν αποικίες σε ένα ειδικό θρεπτικό μέσο φαίνεται να αποτελεί ένα βασικό λειτουργικό χαρακτηριστικό των EPCs.

Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, και όπως έχει ήδη αναφερθεί παραπάνω, τα EPCs μπορούν να διακριθούν φαινοτυπικά σε δύο κύριους κυτταρικούς τύπους, τα πρώιμα και

τα όψιμα EPCs. Ο Hug και οι συνεργάτες του περιέγραψαν την ταυτοποίηση αυτών των δύο ειδών κυττάρων σύμφωνα με το χρόνο εμφάνισής τους [134]. Τα πρώιμα EPCs εμφανίζονται μετά από 3-5 d σε καλλιέργεια, επιμηκυμένα και με ατρακτοειδές σχήμα, παρόμοια με τα EPCs, τα οποία αναφέρθηκαν πρώτη φορά από τον Asahara και τους συνεργάτες τους [121,134]. Τόσο τα πρώιμα EPCs όσο και τα CFU-Hill προέρχονται από το αιμοποιητικό σύστημα και εκφράζουν μυελοειδείς και αιμοποιητικούς δείκτες, παρουσιάζοντας μερικά κοινά χαρακτηριστικά με τα μονοκύτταρα/μακροφάγα [127]. Ωστόσο, υπάρχει μια σημαντική διαφορά μεταξύ αυτών των δύο τύπων κυττάρων. Σε αντίθεση με τη μεθοδολογία των CFU-Hill, η μεθοδολογία που χρησιμοποιήθηκε για την απόκτηση πρώιμων EPCs δεν περιλαμβάνει ένα αρχικό βήμα προ-επίστρωσης, το οποίο χρησιμοποιήθηκε από τον Hill και τους συνεργάτες του για την απομάκρυνση ταχέως προσκολλημένων ώριμων ECs και την αποφυγή μόλυνσης. Στη μεθοδολογία της καλλιέργειας των πρώιμων EPCs, τα μη προσκολλημένα κύτταρα απομακρύνονται και όλα τα προσκολλημένα κύτταρα ανήκουν στον πληθυσμό-στόχο [117,127,134]. Τα όψιμα EPCs εμφανίζονται σε 2-4 εβδομάδες μετά την επίστρωση σε διαφορετικές πιθανές μήτρες (δηλαδή κολλαγόνο, ζελατίνη και φιμπρονεκτίνη). Στη συγκεκριμένη, μακροχρόνια, καλλιέργεια τα κύτταρα παρουσιάζουν ένα ομαλότερο κυτταροπλασματικό περίγραμμα, προσκολλούνται σταθερά στο τρυβλίο και εμφανίζουν μορφολογία λιθόστρωτου (cobblestone) [134] (**Εικ. 2.1**). Τα πρώιμα και τα όψιμα EPCs έχουν διαφορετική μορφολογία, ρυθμό πολλαπλασιασμού, χαρακτηριστικά επιβίωσης και προφίλ γονιδιακής έκφρασης, ωστόσο, και τα δύο είδη κυττάρων προσλαμβάνουν την Dil-acLDL και δεσμεύουν τη λεκτίνη UEA-1 [134,157].

Ο Yoder και οι συνεργάτες του πρότειναν το 2007 να μετονομαστούν τα όψιμα EPCs σε ECFCs ώστε να αντανakλούν την εκτεταμένη ικανότητα πολλαπλασιασμού και σχηματισμού νέων αγγείων *in vivo* [158]. Τα συγκεκριμένα κύτταρα εκφράζουν ομοιόμορφα δείκτες ενδοθηλιακών αλλά όχι αιμοποιητικών κυττάρων στην επιφάνειά τους, όπως το CD45 ή CD14 [159] (**Εικ. 2.1**).

## Πρόδρομα Ενδοθηλιακά Κύτταρα



Εικ. 2.1. Μέθοδοι κυτταρικών καλλιέργειών EPCs (τροποποιημένη εικόνα από [127]).

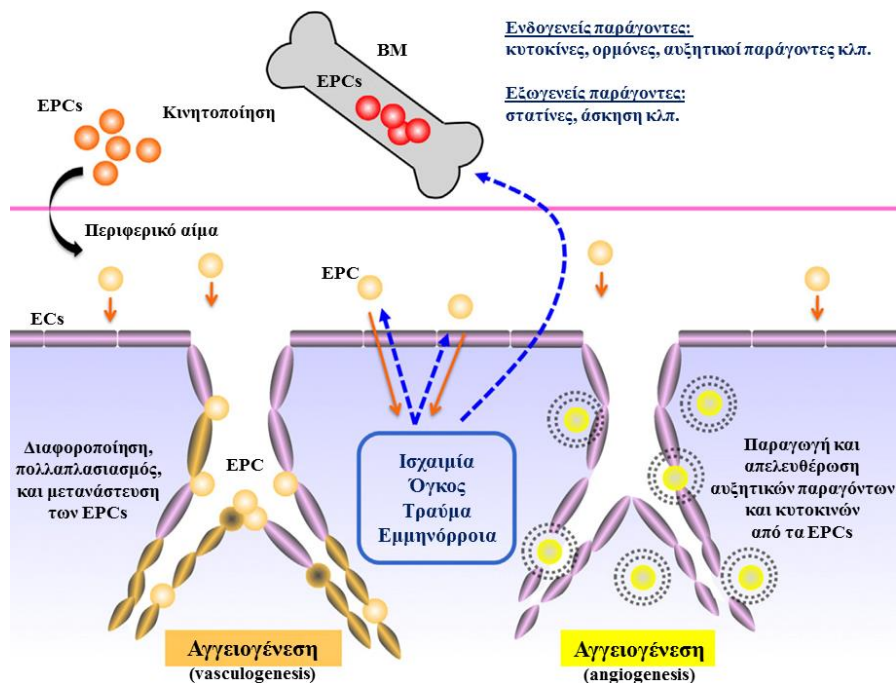
Τα EPCs μπορούν να αναλυθούν από το περιφερικό αίμα είτε με απευθείας απαρίθμηση χρησιμοποιώντας κυτταρομετρία ροής είτε μετά από καλλιέργεια MNCs. Η κυτταρομετρία ροής επιτρέπει την απαρίθμηση των παρθένων (naïve) λεμφοκυττάρων χρησιμοποιώντας ένα συγκεκριμένο φαινότυπο και την τεχνική του πολυχρωματικού διαχωρισμού κυτταρικού πληθυσμού (multicolour fluorescence-activated cell sorting analysis) για την ταυτοποίηση συγκεκριμένων κυτταρικών πληθυσμών. Ωστόσο, ο ανοσοκυτταρολογικός προσδιορισμός των EPCs με βάση τους επιφανειακούς δείκτες εξακολουθεί να είναι αμφιλεγόμενος και θέμα μόνιμης συζήτησης [160,161]. Όσον αφορά τις μεθόδους καλλιέργειας, η αναπαραγωγικότητα και η επαναληψιμότητα εξαρτώνται αυστηρά από τη χρησιμοποιούμενη μέθοδο [160]. Η βιβλιογραφία παρουσιάζει διαφορετικές μεθοδολογίες, και ακόμη μικρές αλλαγές μπορούν να προκαλέσουν σημαντικές διαφορές. Επομένως, ο χαρακτηρισμός των EPCs χρησιμοποιώντας μεθόδους καλλιέργειας καθίσταται λιγότερος συγκεκριμένος. Είναι σημαντικό να διευκρινιστεί ότι ο αριθμός των EPCs σε κυτταροκαλλιέργεια δεν αντιστοιχεί απαραίτητα στον αριθμό των κυκλοφορούντων EPCs [162]. Οι αναλύσεις με κυτταρομετρία ροής και καλλιέργεια κυττάρων είναι εξαιρετικά διαφορετικές τεχνικές, οι

οποίες παρέχουν διαφορετικές βιολογικές πληροφορίες. Όταν χρησιμοποιούνται τα EPCs ως δείκτης καρδιαγγειακού κινδύνου, μπορούν να ληφθούν από δείγματα ποσοτικά δεδομένα μέσω κυτταρομετρίας ροής και ποιοτικά δεδομένα μέσω κυτταρικών καλλιιεργειών, κατά τρόπο συμπληρωματικό [137].

Δεδομένου ότι δεν υπάρχει συνοχή στη βιβλιογραφία σχετικά με τον προσδιορισμό και την ταυτοποίηση των EPCs, είτε με κυτταρομετρία ροής είτε με καλλιέργειες κυττάρων, απαιτούνται πρότυπα πρωτόκολλα και για τις δύο μεθόδους, έτσι ώστε τα αποτελέσματα των μελετών να είναι συγκρίσιμα και συνεπώς να εφαρμόζονται στην κλινική πρακτική.

## 2.4. Κινητοποίηση, παλιννόστηση και ενσωμάτωση των EPCs

Τα EPCs κινητοποιούνται από το ΒΜ στην κυκλοφορία του αίματος (κινητοποίηση) και φαίνεται να παλιννοστούν κατά προτίμηση σε σημεία αγγειακού τραυματισμού ή ισχαιμίας [παλιννόστηση/μετανάστευση]. Ορισμένα EPCs ενσωματώνονται σε νέα αιμοφόρα αγγεία του αγγειακού ενδοθηλίου (ενσωμάτωση), τα οποία σχηματίζονται είτε από την επέκταση των υπαρχόντων αγγείων (angiogenesis) ή είτε *de novo* (vasculogenesis) (Εικ. 2.2).



Εικ. 2.2. Ο ρόλος των EPCs στην αγγειογένεση (τροποποιημένη εικόνα από [163]).

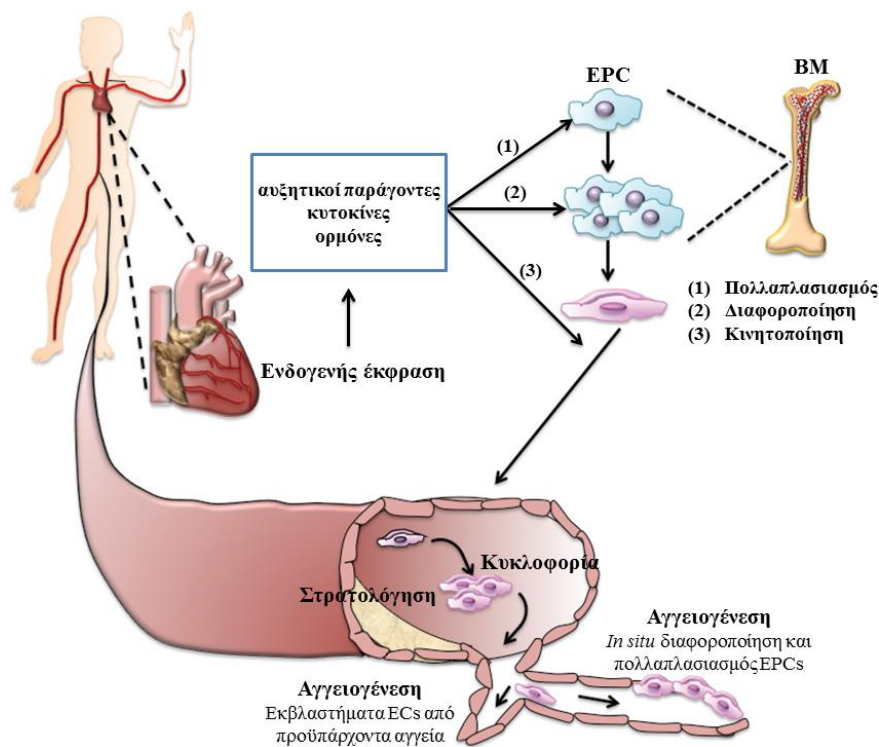
Τα βλαστικά και πρόδρομα κύτταρα διατηρούνται στο μικροπεριβάλλον του ΒΜ σε μια μη διαφοροποιημένη και ήρεμη κατάσταση, διαμέσου εξωγενών σημάτων, τα οποία



### *Πρόδρομα Ενδοθηλιακά Κύτταρα*

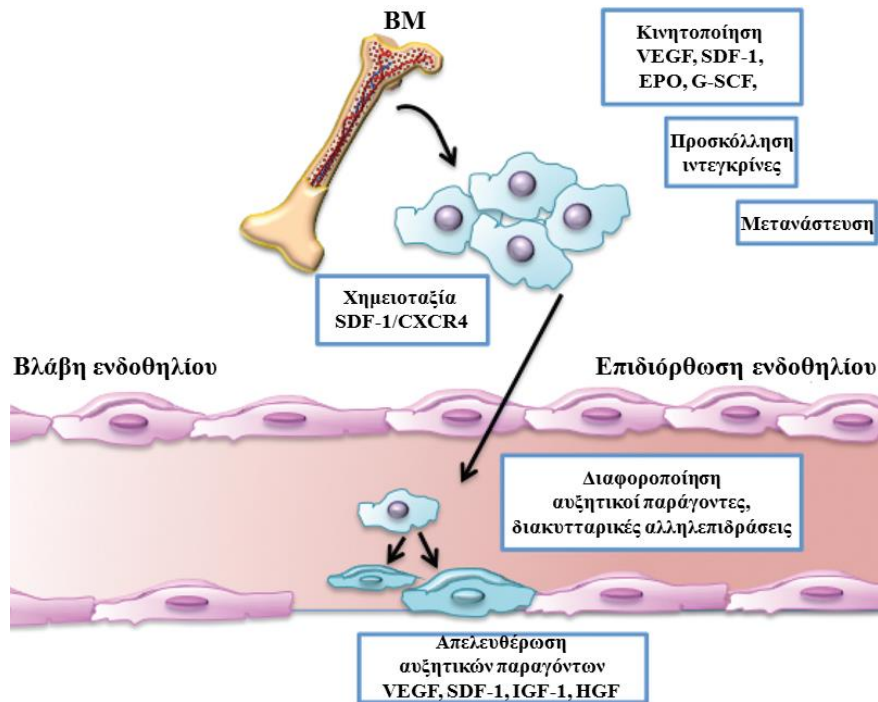
παρέχονται από τα κύτταρα του στρώματος [164]. Η αλληλεπίδραση μεταξύ του προερχόμενου από κύτταρα του στρώματος παράγοντα-1 (SDF-1/CXCL12) και του υποδοχέα του CXCR4, ο οποίος εντοπίζεται στα πρόδρομα κύτταρα, συμβάλλει στη συγκράτηση των βλαστοκυττάρων στις «φωλιές» (niches) τους [165]. Η κινητοποίηση των πρόδρομων κυττάρων από το BM αποτελεί μια σημαντική διαδικασία για την αποκατάσταση κατεστραμμένων αγγείων και το σχηματισμό νέων αγγείων και λαμβάνει χώρα σε απόκριση σημάτων όπως υποξία, αυξητικοί παράγοντες, χημειοτακτικά σήματα και χημειοκίνες (**Εικ. 2.3**) [166–168]. Ακολούθως, τα EPCs μεταναστεύουν και ενσωματώνονται σε φλεγμονώδεις ή κατεστραμμένους ιστούς και διαφοροποιούνται σε ECs και/ή ρυθμίζουν τα τοπικά ECs διαμέσου παρακρινής ή συνδετοκρινής σηματοδότησης (**Εικ. 2.4**) [169]. Οι υποκείμενοι μηχανισμοί της στρατολόγησης των EPCs σε σημεία τραυματισμού φαίνεται ότι περιλαμβάνουν διάφορους παράγοντες κινητοποίησης των EPCs, όπως, μεταξύ άλλων, τον SDF-1/CXCL12, τον VEGF και τον επαγόμενο από την υποξία παράγοντα-1 (HIF-1) [170–172]. Η υποξία αποτελεί βασικό ερέθισμα για την στρατολόγηση των EPCs κατά τη μεταγεννητική αγγειογένεση σε διάφορες παθολογικές καταστάσεις, όπως ισχαιμία και αγγειογένεση όγκων [169]. Η υποξία, η οποία λαμβάνει χώρα στους περιφερικούς ιστούς, προάγει την απελευθέρωση του HIF-1, ο οποίος ρυθμίζει την έκφραση παραγόντων κινητοποίησης των EPCs, όπως των SDF-1/CXCL12 και VEGF [172,173]. Τα κύτταρα εντός της «φωλιάς» των βλαστοκυττάρων εκκρίνουν πρωτεΐνες, οι οποίες διασπών τις ενδοκυττάρια προσκολλήσεις μεταξύ των EPCs και των κυττάρων του στρώματος [174]. Συγκεκριμένα, η MMP-9 παίζει σημαντικό ρόλο στην κινητοποίηση των EPCs προκαλώντας την διάσπαση του SDF-1/CXCL12 στα κύτταρα του στρώματος, απελευθερώνοντάς τον από τον CXCR4 υποδοχέα στα EPCs και επιτρέποντάς τα να βγουν από τη «φωλιά» των βλαστοκυττάρων, με αποτέλεσμα την εισαγωγή τους στην κυκλοφορία του αίματος [175,176]. Η στρατολόγηση των EPCs σε αναγεννημένους ιστούς διαμεσολαβείται από υποξικές διαβαθμίσεις διαμέσου της επαγόμενης έκφρασης του SDF-1/CXCL12 από τον HIF-1 [172]. Το συγκεκριμένο γεγονός επιτρέπει την εμφάνιση μιας διαβάθμισης του SDF-1/CXCL12 στο περιφερικό αίμα και, κατά συνέπεια, της κινητοποίησης των CXCR4<sup>+</sup> EPCs σε θέσεις ενδοθηλιακού τραυματισμού ή ισχαιμίας [170]. Στην πραγματικότητα, ο SDF-1/CXCL12 θεωρείται πως είναι η σημαντικότερη χημειοκίνη, η οποία εμπλέκεται στην κινητοποίηση και μετανάστευση των EPCs σε ισχαιμικούς ιστούς, ενώ η έκφρασή του αυξάνεται μετά από έμφραγμα του μυοκαρδίου [172,177,178]. Το SDF-1/CXCL12-CXCR4 μονοπάτι ενεργοποιεί διάφορα σηματοδοτικά μονοπάτια, συμπεριλαμβανομένων των

PI3K/Akt και πρωτεϊνικών κινασών που ενεργοποιούνται από το μιτογόνο (MAPK)/πρωτεϊνικών κινασών που ρυθμίζονται από εξωκυτάρια σήματα (ERK), τα οποία με τη σειρά της ρυθμίζουν τις λειτουργίες και την επιβίωση των EPCs [167,178]. Παρόμοια με τον SDF-1/CXCL12, ο VEGF αυξορυθμίζεται επίσης κατά τη διάρκεια της ισχαιμίας [178]. Ο αγγειακός τραυματισμός μπορεί να προκαλέσει απελευθέρωση του VEGF, γεγονός το οποίο συμβάλλει στη μεταγεννητική νεοαγγειογένεση κινητοποιώντας τα προερχόμενα από το BM EPCs στην περιφερική κυκλοφορία και κατευθύνοντάς τα σε τραυματισμένα σημεία ακολουθώντας μια διαβάθμιση του VEGF [168,171,179]. Ο VEGF μπορεί επίσης να ρυθμίσει τον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση των EPC διαμέσου της ενεργοποίησης των PI3K/Akt/συνθετάσης του ενδοθηλιακού μονοξειδίου του αζώτου (eNOS) και MAPK/ERK σηματοδοτικών μονοπατιών [180,181]. Επιπλέον, η εμπλοκή του VEGF σε αυτές τις διεργασίες εξαρτάται από την ενεργοποίηση του SDF-1/CXCL12-CXCR4 μονοπατιού [178].



Εικ. 2.3. Κινητοποίηση EPCs από το BM (τροποποιημένη εικόνα από [182]).

## Πρόδρομα Ενδοθηλιακά Κύτταρα



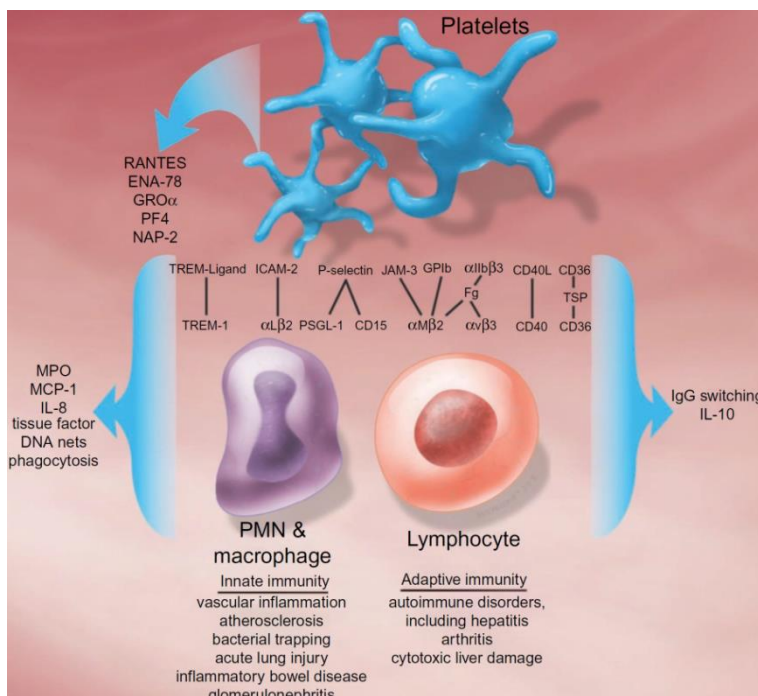
Εικ. 2.4. Στρατολόγηση και ενσωμάτωση EPCs σε σημεία ισχαιμίας (τροποποιημένη εικόνα από [182]).

Η φλεγμονή μπορεί να διαδραματίσει σημαντικό ρόλο στην κινητοποίηση των EPCs στην περιφερική κυκλοφορία μετά από τραυματισμό [183]. Η φλεγμονώδης απόκριση στον τραυματισμό ενός ιστού οδηγεί στην απελευθέρωση προ-φλεγμονωδών κυτοκινών, όπως των  $IL-1\beta$  και  $-8$ , οι οποίες συμμετέχουν στη χημειοταξία και την κινητοποίηση των EPCs [178,184]. Η φλεγμονή παίζει βασικό ρόλο στην αθηροσκλήρωση. Η οξειδωση λιποπρωτεϊνών διεγείρει την ενεργοποίηση των ECs, τα οποία προάγουν την στρατολόγηση κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος και άλλων αθηρογενών παραγόντων, δίνοντας το έναυσμα για την έναρξη φλεγμονωδών σηματοδοτικών μονοπατιών [185]. Οι οξειδωμένες μορφές της LDL μειώνουν τη PI3K/Akt φωσφορυλίωση, αποδυναμώνοντας το αγγειογενετικό δυναμικό των EPCs και αυξάνοντας την απόπτωση και τη γήρανσή τους [185].

## 2.5. Αλληλεπιδράσεις μεταξύ αιμοπεταλίων, λευκοκυττάρων και ενδοθηλίου

Ενώ ο πρωταρχικός φυσιολογικός ρόλος των αιμοπεταλίων είναι η διατήρηση της αιμόστασης, συμβάλλουν επίσης στη φλεγμονή ρυθμίζοντας τις φυσικές και ειδικές ανοσοαποκρίσεις. Τα αιμοπετάλια εκτελούν ποικίλες λειτουργίες, οι οποίες σχετίζονται με το

ανοσοποιητικό σύστημα μέσω της ικανότητάς τους να αλληλεπιδρούν με διαφορετικές κατηγορίες λευκοκυττάρων [186–188], καθώς και να απελευθερώνουν μια μεγάλη ποικιλία ανοσορρυθμιστικών μορίων [74]. Τα αιμοπετάλια και τα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος αλληλεπιδρούν διαμέσου άμεσης επαφής, η οποία επιτυγχάνεται από ειδικά μόρια προσκόλλησης, καθώς και από διαμεσολαβητές που έχουν απελευθερωθεί (Εικ. 2.5). Τα αιμοπετάλια, τα οποία αισθάνονται πρώτα τη βλάβη των αγγείων, επιθεωρούν τα σημεία της βλάβης, επικοινωνώντας με το ανοσοποιητικό σύστημα και δίνοντας το έναυσμα για την έναρξη της αμυντικής (host defense) απόκρισης. Η συγκεκριμένη διαδικασία μπορεί να μην έχει καλή έκβαση, όπως συμβαίνει στα σημεία των αθηρωματικών πλακών, όπου οι εξαρτώμενες από τα αιμοπετάλια στρατολόγηση και ενεργοποίηση των λευκοκυττάρων μπορούν να συνεισφέρουν στη φλεγμονώδη αντίδραση του αγγειακού τοιχώματος και έτσι να επιδεινώσουν την αθηρωματική διαδικασία, να προάγουν την υπερπλασία του έσω χιτώνα και να αποσταθεροποιήσουν την πλάκα. Οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ των αιμοπεταλίων και των λευκοκυττάρων μπορούν να διαμορφώσουν άλλες παθολογικές αποκρίσεις σε ένα ευρύ φάσμα φλεγμονωδών ασθενειών και να προκαλέσουν βλάβη σε ιστούς. Επιπλέον, τα αιμοπετάλια συμβάλλουν στην αγγειακή ανάπτυξη, την ακεραιότητα και τις αποκρίσεις αναδιαμόρφωσης μέσω άμεσων και έμμεσων αλληλεπιδράσεων με το αγγειακό τοίχωμα.

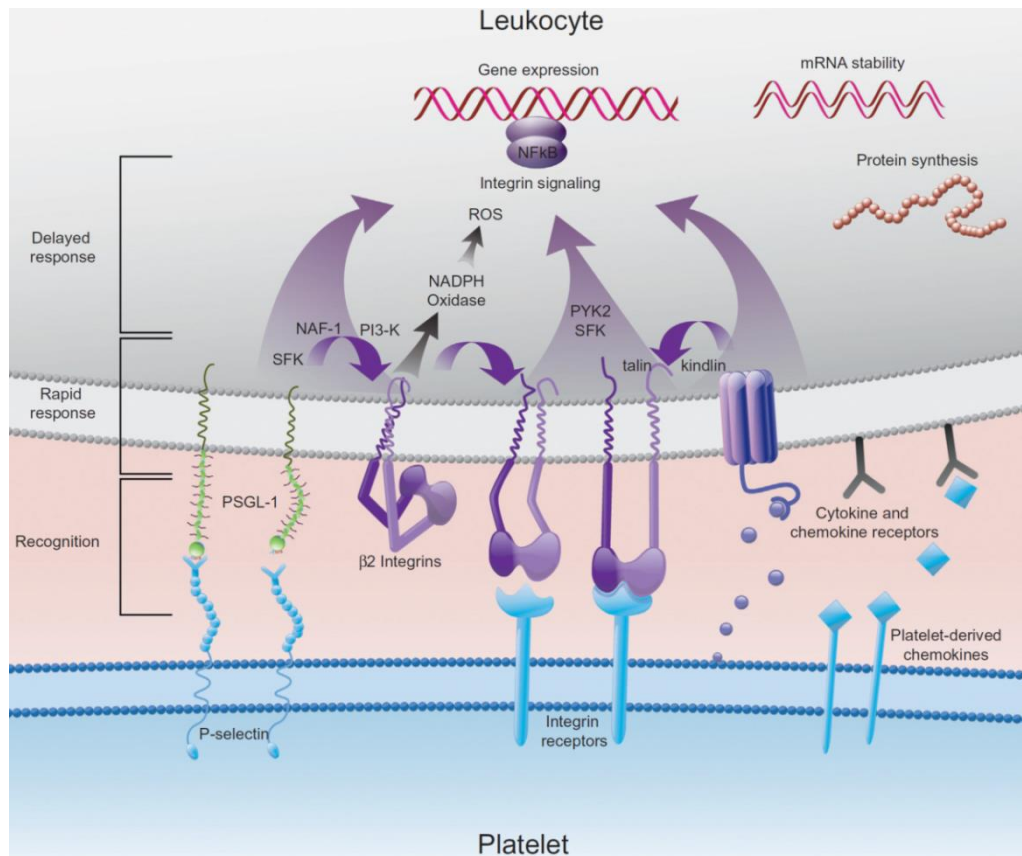


Εικ. 2.5. Σχηματική απεικόνιση των μορίων που εμπλέκονται στις αλληλεπιδράσεις των αιμοπεταλίων με τα λευκοκύτταρα [189].

**✚ Αλληλεπιδράσεις μεταξύ αιμοπεταλίων και λευκοκυττάρων**

Η P-σελεκτίνη (CD62P), είναι μια ενσωματωμένη μεμβρανική πρωτεΐνη των  $\alpha$ -κοκκίων των αιμοπεταλίων και των Weibel-Palade σωματιδίων των ECs [190]. Κατά την κυτταρική ενεργοποίηση, η σύντηξη των κοκκίων με την εξωτερική μεμβράνη εκφράζει την P-σελεκτίνη στην επιφάνεια του κυττάρου. Και τα τρία μέλη της οικογένειας των σελεκτινών μοιράζονται παρόμοια χαρακτηριστικά – η E- και L-σελεκτίνη εκφράζονται από τα ECs και τα λευκοκύτταρα, αντίστοιχα. Ο γλυκοπρωτεϊνικός υποδοχέας PSGL-1 εμφανίζει υψηλή συγγένεια για τη P-σελεκτίνη (**Εικ. 2.6**). Ο PSGL-1 υποδοχέας εκφράζεται στην επιφάνεια των ουδετερόφιλων, των μονοκυττάρων, των δενδριτικών κυττάρων και σε υποκατηγορίες λεμφοκυττάρων. Ο συγκεκριμένος υποδοχέας εκφράζεται και στα αιμοπεταλία, ο οποίος χρησιμοποιείται για την πρόσδεση της P-σελεκτίνης που εκφράζεται στα ECs [191]. Οι ταχείας ταχύτητες σύνδεσης/αποσύνδεσης της αλληλεπίδρασης της P-σελεκτίνης με τον PSGL-1 υποδοχέα είναι θεμελιώδεις για την αρχική πρόσδεση και κύλιση των λευκοκυττάρων στις επιφάνειες της P-σελεκτίνης κατά τη ροή του αίματος [192,193]. Η P-σελεκτίνη και ο PSGL-1 υποδοχέας αποτελούν το κύριο ζεύγος προσδέτη-υποδοχέα, το οποίο διαμεσολαβεί τις φυσικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των αιμοπεταλίων και των λευκοκυττάρων. Η πρόσδεση επιτρέπει την αποτελεσματική στρατολόγηση των λευκοκυττάρων στη θέση της αγγειακής βλάβης και το σχηματισμό μικτών συζευγμάτων αιμοπεταλίων-λευκοκυττάρων στο αίμα [194]. Η αλληλεπίδρασή τους πυροδοτεί, επίσης, το σχηματισμό ινώδους και την ανάπτυξη θρόμβου συγκεντρώνοντας προερχόμενα από τα λευκοκύτταρα μικροσωματίδια, τα οποία φέρουν τον PSGL-1 υποδοχέα, μαζί με τον TF στην επιφάνεια των ενεργοποιημένων αιμοπεταλίων [195,196]. Μετά την πρόσδεση της P-σελεκτίνης, ο PSGL-1 υποδοχέας μεταδίδει ενδοκυττάρια σήματα στα λευκοκύτταρα, τα οποία είναι σημαντικά για τη μετατροπή της κύλισης των λευκοκυττάρων κατά μήκος της επιφάνειας των αιμοπεταλίων σε σταθερή προσκόλληση [197]. Σε αντίθεση με την πρόσδεση της P-σελεκτίνης στον PSGL-1 υποδοχέα, η οποία δεν απαιτεί κάποιο σήμα κυτταρικής ενεργοποίησης για τη διαμεσολάβηση της κύλισης, η σταθερή προσκόλληση, η οποία διαμεσολαβείται από τις  $\beta_2$  ιντεγκρίνες των λευκοκυττάρων, απαιτεί ενεργοποίηση. Η πρόσδεση της αιμοπεταλιακής P-σελεκτίνης στον PSGL-1 υποδοχέα των ουδετεροφίλων προάγει την ενεργοποίηση των  $\alpha_M\beta_2$  (CD11b/CD18 ή Mac-1) και  $\alpha_L\beta_2$  (CD11a/CD18 ή LFA-1) ιντεγκρινών στα ουδετερόφιλα [197–199] και των  $\beta_1$  και  $\beta_2$  ιντεγκρινών στα

μονοκύτταρα [200] και τα λεμφοκύτταρα [201,202]. Οι  $\alpha_M\beta_2$  και  $\alpha_L\beta_2$  ιντεγκρίνες διαμεσολαβούν κυρίως την σταθερή προσκόλληση των ουδετεροφίλων, των μονοκυττάρων και μερικών υποκατηγοριών λεμφοκυττάρων στα ενεργοποιημένα αιμοπετάλια. Η  $\alpha_M\beta_2$  ιντεγκρίνη αναγνωρίζει τουλάχιστον 3 υποδοχείς που εκφράζονται στην επιφάνεια των αιμοπεταλίων: το ινωδογόνο, το οποίο προσδέεται στην αιμοπεταλιακή ιντεγκρίνη  $\alpha_{IIb}\beta_3$  [203], την GPIIb [204], και το μόριο προσκόλλησης JAM-3 [205]. Το διακυτταρικό μόριο προσκόλλησης-2 (ICAM-2) αποτελεί μέλος της υπεροικογένειας των ανοσοσφαιρινών, το οποίο εκφράζεται ιδιосуστατικά από τα αιμοπετάλια, είναι πιθανώς ο βασικός προσδέτης της  $\alpha_L\beta_2$  ιντεγκρίνης, η οποία εκφράζεται στην επιφάνεια των αιμοπεταλίων [206].



Εικ. 2.6. Σηματοδοτικά μονοπάτια της αλληλεπίδρασης των αιμοπεταλίων με τα λευκοκύτταρα [189].

Τα αιμοπετάλια περιέχουν ένα πλήθος από βιολογικά δραστικά μόρια αποθηκευμένα σε τουλάχιστον τρεις τύπους ενδοκυτταρικών κοκκίων: στα  $\alpha$ -κοκκία, τα πυκνά κοκκία και τα λυσοσώματα. Πολλές από τις αιμοστατικές και μη αιμοστατικές λειτουργίες των αιμοπεταλίων προκύπτουν από την ικανότητά τους να εκκρίνουν το φορτίο των κοκκίων κατά την ενεργοποίηση. Τα  $\alpha$ -κοκκία, συγκεκριμένα, περιέχουν έναν αριθμό πρωτεϊνών,

## ***Πρόδρομα Ενδοθηλιακά Κύτταρα***

συμπεριλαμβανομένων παραγόντων πήξης, μιτογόνων και αγγειογενετικών παραγόντων, και φλεγμονωδών διαμεσολαβητών. Ως συνέπεια της σύντηξης των  $\alpha$ -κοκκίων με την πλασματική μεμβράνη κατά την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων, οι αιμοπεταλιακοί φλεγμονώδεις διαμεσολαβητές μπορούν να εκφραστούν στην επιφάνεια των αιμοπεταλίων ή να απελευθερωθούν ως διαλυτά μόρια, τα οποία μπορούν να δράσουν τοπικά ή συστηματικά.

### **PF-4/CXCL4 και $\beta$ -θρομβοσφαιρίνη**

Ο PF-4/CXCL4 και η  $\beta$ -θρομβοσφαιρίνη συγκαταλέγονται στις κυριότερες πρωτεΐνες που περιέχονται στα  $\alpha$ -κοκκία των αιμοπεταλίων. Υπάρχουν ενδείξεις ότι ο PF-4/CXCL4 επάγει την ενεργοποίηση των ουδετερόφιλων, συμπεριλαμβανομένης της διαμεσολαβούμενης από τη  $\beta_2$  ιντεγκρίνη προσκόλλησης στα ECs, καθώς και της εξωκυττάρωσης διαμέσου ενδοκυτταρικής σηματοδότησης, η οποία διαμεσολαβείται από διαδοχική ενεργοποίηση του καταρράκτη των κινασών [207]. Η  $\beta$ -θρομβοσφαιρίνη παρουσιάζει διάφορες μοριακές παραλλαγές, οι οποίες είναι αποτέλεσμα διαδοχικής πρωτεολυτικής τροποποίησης [208]. Το ενεργοποιητικό πεπτίδιο των ουδετεροφίλων-2 (NAP-2/CXCL7), δρώντας διαμέσου των CXCR1 και CXCR2 υποδοχέων της IL-8, εμφανίζει ισχυρή χημειοτακτική δράση για τα ουδετερόφιλα [209]. Το NAP-2 μπορεί επίσης να μειορυθμίσει τον CXCR2 υποδοχέα μειώνοντας τις δράσεις άλλων χημειοκινών, οι οποίες δρουν σε αυτόν τον υποδοχέα, και να εξασθενήσει τις αποκρίσεις των ουδετερόφιλων.

### **RANTES/CCL5**

Η χημειοκίνη RANTES/CCL5 εκκρίνεται από ενεργοποιημένα αιμοπετάλια και αποτελεί ένα ισχυρό χημειο-ελκυστικό παράγοντα για τα ηωσινόφιλα [210], ενώ δρώντας διαμέσου των CCR1, CCR3 και CCR5 υποδοχέων, προκαλεί τη προσκόλληση και μετανάστευση των μονοκυττάρων και των T-λεμφοκυττάρων [211,212].

### **Χημειοτακτικός παράγοντας των μονοκυττάρων (MCP-1/CCL2)**

Ο MCP-1/CCL2 αποτελεί μια κύρια χημειοκίνη για τα μονοκύτταρα, η οποία δρα διαμέσου του CCR2A υποδοχέα και συμβάλλει στην αθηροσκλήρωση [213–215]. Αν και δεν παράγεται αποκλειστικά από τα αιμοπετάλια, υπάρχουν δεδομένα που

υποστηρίζουν ότι ο αιμοπεταλιακός MCP-1/CCL2 εμπλέκεται στην αγγειακή απόκριση ενός τραυματισμού *in vivo* [216].

### **CD40L**

Το μόριο CD40L (CD154), μια τριμερής διαμεμβρανική πρωτεΐνη, η οποία σχετίζεται δομικά με τον παράγοντα νέκρωσης των όγκων- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), επάγει φλεγμονώδεις και προ-θρομβωτικές αποκρίσεις μέσω του συγγενικού υποδοχέα CD40 [217]. Στα ECs το CD40L διεγείρει την έκφραση μορίων προσκόλλησης και χημειοκινών, ενισχύοντας την στρατολόγηση των κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος και του TF [218]. Το CD40 εκφράζεται επίσης από τα μονοκύτταρα, όπου διεγείρει την έκφραση κυτοκινών και του TF [219], και από τα δενδριτικά κύτταρα και B-λεμφοκύτταρα, όπου διεγείρει διάφορες φλεγμονώδεις αποκρίσεις [220]. Το προερχόμενο από τα αιμοπετάλια CD40L συμβάλλει επίσης στην ειδική ανοσία, επάγοντας την ωρίμανση των δενδριτικών κυττάρων, στηρίζοντας τη διαφοροποίηση των B-λεμφοκυττάρων, κυττάρων και την ισοτυπική μεταστροφή, καθώς και την ενεργοποίηση των CD8<sup>+</sup> T-λεμφοκυττάρων [202]. Τα αιμοπετάλια αντιπροσωπεύουν την κύρια πηγή της διαλυτής κυκλοφορούσας μορφής του CD40L [221,222]. Τα επίπεδα του CD40L στο πλάσμα χρησιμοποιούνται συστηματικά ως δείκτες ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων.

### **TGF- $\beta$**

Ο TGF- $\beta$  εντοπίζεται σε μεγάλες ποσότητες στα κοκκία των αιμοπεταλίων και η αιμοπεταλιακή αποθήκευση φαίνεται να είναι σημαντική για τη διατήρηση των κυκλοφορούντων επιπέδων του συγκεκριμένου ισχυρού ανοσορρυθμιστικού παράγοντα [223]. Η άμεση συμβολή του TGF- $\beta$  στις αλληλεπιδράσεις των αιμοπεταλίων με τα λευκοκύτταρα δεν είναι γνωστή, ωστόσο, αν και περιορισμένα τα δεδομένα, υποδηλώνουν ότι ο TGF- $\beta$  παίζει ρόλο στην παράταση της επιβίωσης των ουδετερόφιλων σε μείγμα εναιωρήματος αιμοπεταλίων-ουδετεροφίλων [224].

Μετά από τις άμεσες διακυτταρικές αλληλεπιδράσεις, τα ενεργοποιημένα αιμοπετάλια μπορούν να μεταφέρουν χημειοκίνες, οι οποίες έχουν απελευθερωθεί στην επιφάνεια του φλεγμονώδους ή αθηρωματικού ενδοθηλίου. Με αυτόν τον τρόπο, τα ενεργοποιημένα αιμοπετάλια αφήνουν ένα «μήνυμα» στο αγγειακό τοίχωμα, το οποίο μπορεί να



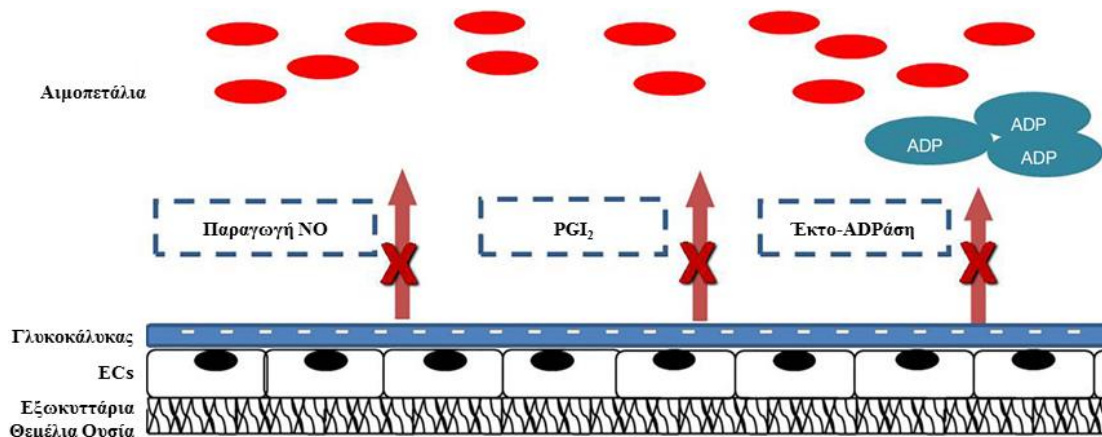
## *Πρόδρομα Ενδοθηλιακά Κύτταρα*

«διαβαστεί» από τα κυκλοφορούντα μονοκύτταρα και μπορεί να συμβάλει στην στρατολόγηση και την ενεργοποίηση της φλεγμονής σε σημεία φλεγμονής ή τραυματισμού [225]. Επιπλέον, τα ενεργοποιημένα αιμοπετάλια διαχέουν μικροσωματίδια, τα οποία είναι άθικτα κυστίδια που σχηματίζονται με εκβλάστηση από τη μεμβράνη. Όπως και με τα ολόκληρα αιμοπετάλια, τα συγκεκριμένα μικροσωματίδια αλληλεπιδρούν με τα λευκοκύτταρα και άλλα φλεγμονώδη κύτταρα και μπορούν να ενισχύσουν τις φλεγμονώδεις αντιδράσεις [226].

### **Αλληλεπιδράσεις μεταξύ αιμοπεταλίων και ενδοθηλίου**

Υπό φυσιολογικές συνθήκες, τα αιμοπετάλια κυκλοφορούν χωρίς να προσκολληθούν στο άθικτο και αδρανές ενδοθήλιο. Ο γλυκοκάλυκας, ο οποίος βρίσκεται μεταξύ των ECs και των αιμοπεταλίων και αποτελείται από μια στιβάδα πρωτεογλυκανών και γλυκοπρωτεϊνών [227], ρυθμίζει τη διαπερατότητα του ενδοθηλίου και τις αλληλεπιδράσεις του με άλλα κύτταρα, όπως τα αιμοπετάλια και τα λευκοκύτταρα, απωθώντας τα κυρίως εξαιτίας του αρνητικού φορτίου, ενώ περιορίζει την έκθεση του ενδοθηλίου σε μόρια προσκόλλησης. Επιπλέον, η PGI<sub>2</sub>, προϊόν του μεταβολισμού του AA στα ECs με αγγειοδιασταλτικές ιδιότητες, αναστέλλει την αιμοπεταλική συσσώρευση αυξάνοντας την cAMP. Η PGI<sub>2</sub> έχει συνεργική δράση με το μονοξειδίο του αζώτου (NO), το οποίο αποτελεί το σημαντικότερο ενδοθηλιακό παράγοντα χάλασης (EDRF), ενώ αναστέλλει την αιμοπεταλιακή ενεργοποίηση ενισχύοντας την παραγωγή της μονοφωσφορικής γουανοσίνης (GMP). Το γεγονός αυτό έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση του ενδοκυττάρου Ca<sup>2+</sup>, καθώς και την καταστολή του μετασχηματισμού της ιντεγκρίνης α<sub>IIb</sub>β<sub>3</sub> μαζί με την πρόσδεση της ιντεγκρίνης στο ινωδογόνο [228,229]. Επιπλέον, η εκτο-ADPάση (CD39), η οποία εντοπίζεται στην επιφάνεια των ECs και υδρολύει τόσο την ATP όσο και την ADP με σκοπό την παραγωγή της μονοφωσφορικής αδενοσίνης (AMP), εξασθενίζει την αιμοπεταλιακή αντιδραστικότητα (**Εικ. 2.7**) [228,230]. Το ενδοθήλιο παράγει επίσης ουσίες με αγγειοσυστολική και προθρομβωτική συμπεριφορά, όπως το TxA<sub>2</sub>, το οποίο προάγει την αιμοπεταλιακή συσσώρευση, εκφράζει συν-παράγοντες προσκόλλησης για τα αιμοπετάλια, όπως ο vWF, η φιμπρονεκτίνη και η θρομβοσπονδίνη, και προπηκτικούς παράγοντες, όπως ο παράγοντας V. Οι προερχόμενοι από το ενδοθήλιο αγγειοσυστολικοί παράγοντες αντιτίθενται στη δράση των αγγειοδιασταλτικών παραγόντων [231], οι σημαντικότεροι μεταξύ των οποίων είναι η ενδοθηλίνη-1, η αγγειοτενσίνη-II και οι αγγειοσυσταλτικές PGs [232]. Η ενδοθηλιακή δυσλειτουργία

αποτελεί μια διαταραχή της φυσιολογικής λειτουργίας του ενδοθηλίου ως συνέπεια διαφορετικών ερεθισμάτων ή κλινικών συνθηκών. Η συγκεκριμένη διαταραγμένη ισορροπία μπορεί να οδηγήσει στη συσσώρευση και προσκόλληση των αιμοπεταλίων στο ενδοθήλιο, ενεργοποιώντας έτσι και ενθαρρύνοντας την προσκόλληση των λευκοκυττάρων, καθώς και απελευθερώνοντας PDGFs, οι οποίοι διεγείρουν την υπερπλασία του έσω χιτώνα.

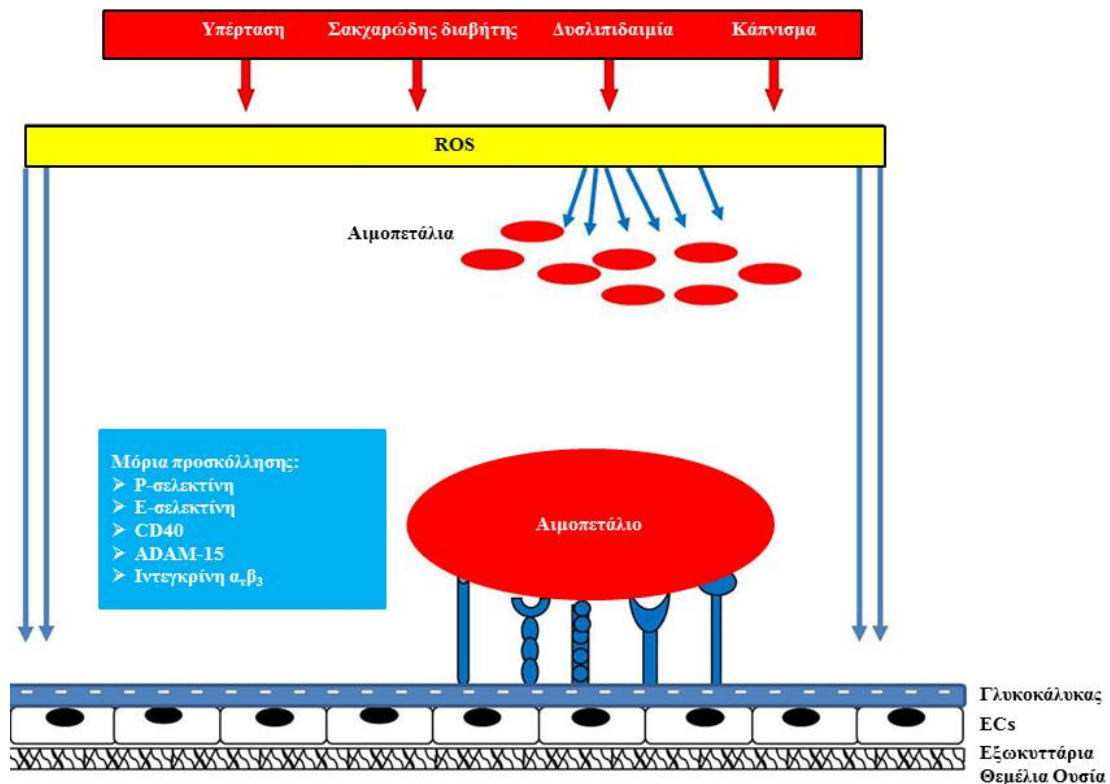


**Εικ. 2.7.** Σχηματική απεικόνιση μηχανισμών που αποτρέπουν την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων και την προσκόλληση τους στο ενδοθήλιο υπό φυσιολογικές συνθήκες (τροποποιημένη εικόνα από [233]).

Η αθηροσκλήρωση χαρακτηρίζεται από δύο παράλληλες διαδικασίες: από τη διήθηση των φλεγμονωδών κυττάρων και τη λιπιδική συσσώρευση στο εσωτερικό του αρτηριακού τοιχώματος [234]. Η χρόνια φλεγμονή καθορίζει την εξέλιξη της αθηρωματικής πλάκας, από τα πρώτα στάδια έως τη ρήξη και την αθηροθρόμβωση. Υπάρχουν ολοένα και περισσότερες ενδείξεις ότι τα αιμοπετάλια διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην έναρξη και τη διατήρηση της συγκριμένης διαδικασίας, μέσω σύνθετων αλληλεπιδράσεων με τα ECs και φλεγμονώδη κύτταρα [235–237]. Η έναρξη της αθηροσκλήρωσης απαιτεί την παρουσία είτε ενεργοποιημένων αιμοπεταλίων είτε ενεργοποιημένων ECs ή και των δύο [238]. Μια σειρά παθολογικών ερεθισμάτων, όπως η υπέρταση, ο σακχαρώδης διαβήτης, το κάπνισμα και η δυσλιπιδαιμία, μπορούν να οδηγήσουν στην ενδοθηλιακή δυσλειτουργία και στην ενεργοποίηση της αθηρωματικής διαδικασίας. Το οξειδωτικό στρες και ιδιαίτερα η συσσώρευση της LDL, έχει ως αποτέλεσμα τα μειωμένα επίπεδα του NO και την ενεργοποίηση φλεγμονωδών μονοπατιών [239]. Ταυτόχρονα, η οξειδωμένη LDL (oxLDL) ενισχύει την έκφραση της ενδοθηλίνης-1 στα ECs, προκαλώντας αγγειοσυστολή και πολλαπλασιασμό των ινοβλαστών και των VSMCs. Επιπλέον, η oxLDL αυξάνει την παραγωγή και την έκκριση της φιμπρονεκτίνης, της

## Πρόδρομα Ενδοθηλιακά Κύτταρα

θρομβοσπονδίνης και άλλων GPs, ενισχύοντας την προσκόλληση των λευκοκυττάρων και των αιμοπεταλίων (Εικ. 2.8) [240].

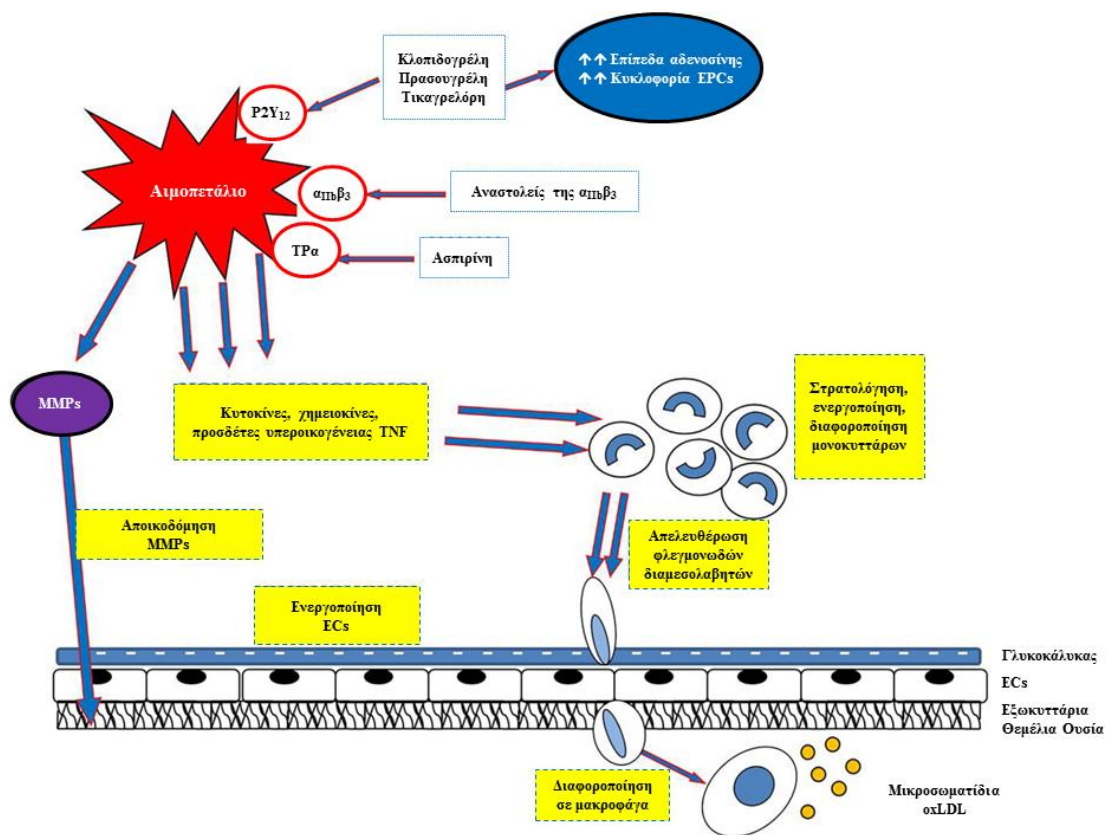


Εικ. 2.8. Σχηματική απεικόνιση της ενεργοποίησης του ενδοθηλίου και των αιμοπεταλίων από παθολογικά ερεθίσματα (τροποποιημένη εικόνα από [233]).

Εναλλακτικά, τα κυκλοφορούντα ενεργοποιημένα αιμοπετάλια μπορούν να εκκρίνουν φλεγμονώδεις και μιτογόνους παράγοντες στο τοπικό μικροπεριβάλλον, οδηγώντας σε ενεργοποίηση των ECs και στρατολόγηση των μονοκυττάρων [75]. Η αρχική επαφή μεταξύ των αιμοπεταλίων και των ECs διαμεσολαβείται από την Ρ-σελεκτίνη, την Ε-σελεκτίνη και τον PSGL-1 υποδοχέα, ο οποίος εκφράζεται στην επιφάνεια των ECs κατά τη διάρκεια φλεγμονωδών διεργασιών. Η παρουσία των ιντεγκρινών, οι οποίες διαμεσολαβούν την προσκόλληση των κυττάρων στην επιφάνεια των αιμοπεταλίων, ενισχύει περαιτέρω τη συγκεκριμένη πρόσδεση, οδηγώντας σε μια πιο σταθερή προσκόλληση μεταξύ των αιμοπεταλίων και των ECs [241,242]. Επιπλέον, τα ECs εκφράζουν την ADAM-15, μια διαμεμβρανική πρωτεΐνη (δισιντεγκρίνη και MMP), η οποία εντοπίζεται στην επιφάνεια των κυττάρων και προσδένεται στα αιμοπετάλια διαμέσου της ιντεγκρίνης  $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$  προωθώντας την ενεργοποίησή τους [243]. Τα αιμοπετάλια καθώς εισέρχονται σε κατάσταση ενεργοποίησης, απελευθερώνουν πληθώρα φλεγμονωδών διαμεσολαβητών και αυξητικών παραγόντων, οι οποίοι έχουν ήδη

αναφερθεί παραπάνω, ενεργοποιώντας περαιτέρω τα ECs και στρατολογώντας τα μονοκύτταρα/μακροφάγα.

Το αθροιστικό αποτέλεσμα της δράσης όλων αυτών των ουσιών είναι η διαμόρφωση των βιολογικών ιδιοτήτων των ECs, των λευκοκυττάρων/μονοκυττάρων και των ίδιων των αιμοπεταλίων, από την άποψη της χημειοταξίας, της διαφοροποίησης, της προσκόλλησης των κυττάρων, του πολλαπλασιασμού και της συσσώρευσης. Με τον τρόπο αυτό τα αιμοπετάλια προάγουν τη φλεγμονή με αυτοσυντηρούμενο τρόπο, προετοιμάζοντας το επόμενο βήμα, το οποίο είναι ο σχηματισμός αθηρωματικής πλάκας (Εικ. 2.9).



**Εικ. 2.9.** Ενεργοποιημένα αιμοπετάλια απελευθερώνουν πληθώρα ουσιών, οι οποίες έχουν ως αποτέλεσμα την στρατολόγηση και ενεργοποίηση των λευκοκυττάρων/μονοκυττάρων, την αποικοδόμηση πρωτεϊνών της εξοκυττάριας θεμέλιας ουσίας και την περαιτέρω ενεργοποίηση του ενδοθηλίου (τροποποιημένη εικόνα από [233]).

#### ✚ Αλληλεπιδράσεις μεταξύ αιμοπεταλίων και CD34<sup>+</sup> πρόδρομων κυττάρων

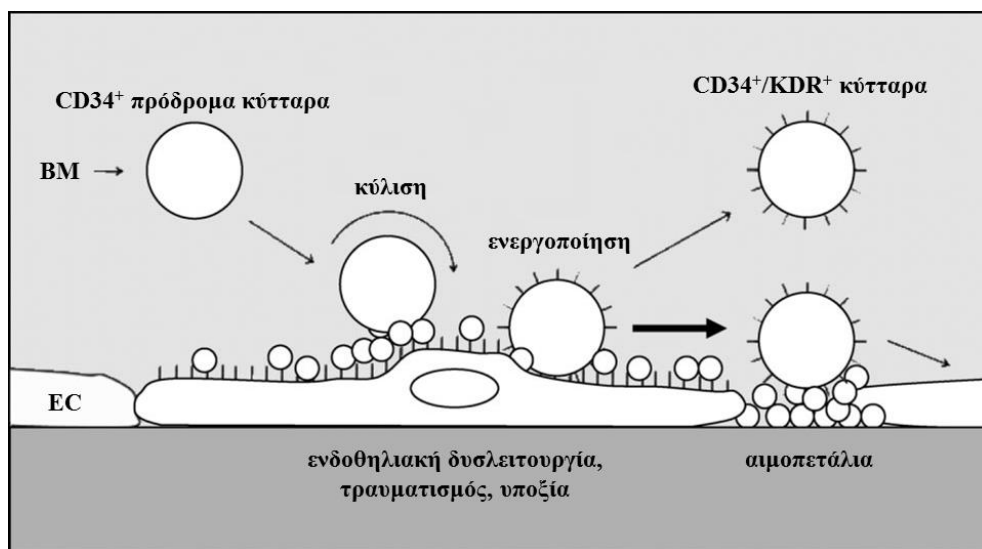
Τα CD34<sup>+</sup> πρόδρομα κύτταρα αποτελούν ένα πολύ καλά χαρακτηρισμένο πληθυσμό βλαστοκυττάρων, τα οποία έχουν την ικανότητα να διαφοροποιηθούν σε διαφορετικούς κυτταρικούς πληθυσμούς, όπως τα ECs και τα λεία μυϊκά κύτταρα. Κύριες πηγές

## **Πρόδρομα Ενδοθηλιακά Κύτταρα**

παραγωγής CD34<sup>+</sup> πρόδρομων κυττάρων αποτελούν ο ΒΜ και ο ομφάλιος λώρος. Όλο ένα και περισσότερες μελέτες υποστηρίζουν το ρόλο των CD34<sup>+</sup> πρόδρομων κυττάρων στην αγγειογένεση και την αποκατάσταση του τραυματισμένου ενδοθηλίου του αρτηριακού τοιχώματος. Έχει αναφερθεί πως τα CD34<sup>+</sup> πρόδρομα κύτταρα κινητοποιούνται από το ΒΜ και προσκολλώνται στο τραυματισμένο αρτηριακό τοίχωμα, ενώ στη συνέχεια μπορούν να διαφοροποιηθούν είτε σε ECs είτε σε λεία μυϊκά κύτταρα με αποτέλεσμα την πλήρη αποκατάσταση της ακεραιότητας του τραυματισμένου αρτηριακού τοιχώματος [244,245].

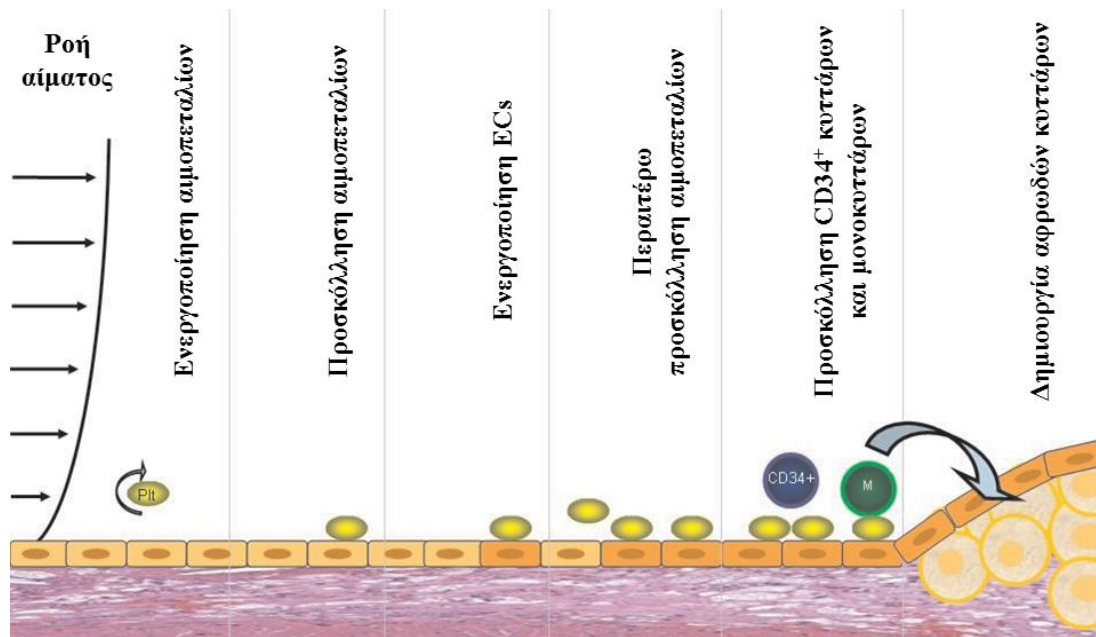
Διαταραχή ή ρήξη της αθηρωματικής πλάκας έχει ως αποτέλεσμα τη διέγερση των αιμοπεταλίων, τα οποία προσκολλώνται και συσσωρεύονται στο σημείο της βλάβης. Τα ενεργοποιημένα αιμοπετάλια αλληλεπιδρούν επίσης με τα κυκλοφορούντα CD34<sup>+</sup> πρόδρομα κύτταρα, τα οποία κυλούν πάνω στα αιμοπετάλια διαμέσου ασθενών συνδέσεων μεταξύ της αιμοπεταλιακής Ρ-σελεκτίνης και του PSGL-1 υποδοχέα, ο οποίος εντοπίζεται στα CD34<sup>+</sup> πρόδρομα κύτταρα [246]. Σε προηγούμενες μελέτες έχει αποδειχθεί πως η Ρ-σελεκτίνη μπορεί να συνδεθεί και με τον υποδοχέα της ιντεγκρίνης β<sub>3</sub>, ο οποίος εκφράζεται στα CD34<sup>+</sup> πρόδρομα κύτταρα [247]. Επιπλέον, τα αιμοπετάλια εκφράζουν το μόριο προσκόλλησης JAM-A, το οποίο είτε προσδένεται στον υποδοχέα της ιντεγκρίνης α<sub>L</sub>β<sub>2</sub> είτε αλληλεπιδρούν με το μόριο προσκόλλησης JAM-A των CD34<sup>+</sup> πρόδρομων κυττάρων συμβάλλοντας έτσι στη μεταξύ τους προσκόλληση [248]. Το μόριο προσκόλλησης JAM-A συμβάλει επίσης στη διαφοροποίηση των CD34<sup>+</sup> πρόδρομων κυττάρων σε EPCs διευκολύνοντας την επανενδοθηλιοποίηση *in vitro* [249]. Αντίθετα, έχει αποδειχθεί ότι το μόριο προσκόλλησης JAM-C, το οποίο εκκρίνεται από τα αιμοπετάλια, δεν επάγει τη διαφοροποίηση των CD34<sup>+</sup> πρόδρομων κυττάρων προς τον ενδοθηλιακό φαινότυπο *in vitro*, παρόλο που προάγει την στρατολόγηση και προσκόλληση των συγκεκριμένων κυττάρων στα αιμοπετάλια [250]. Ένας άλλος μηχανισμός, ο οποίος διαμεσολαβεί την αλληλεπίδραση των CD34<sup>+</sup> πρόδρομων κυττάρων με τα αιμοπετάλια, είναι διαμέσου του αιμοπεταλιακού SDF-1α/CXCL12 και CXCR4 υποδοχέα, ο οποίος εκφράζεται στα CD34<sup>+</sup> πρόδρομα κύτταρα [247,251], επιτυγχάνοντας μια πρωτογενή προσκόλληση στο αρτηριακό τοίχωμα. Τα CD34<sup>+</sup> πρόδρομα κύτταρα δεν μπορούν να προσκολληθούν στο αρτηριακό τοίχωμα χωρίς την ύπαρξη των αιμοπεταλίων, καθώς δεν διαθέτουν κατάλληλους υποδοχείς για να αλληλεπιδράσουν με πρωτεΐνες του υποενδοθηλιακού χώρου [249].

Η αλληλεπίδραση των αιμοπεταλίων με τα  $CD34^+$  πρόδρομα κύτταρα έχει ως αποτέλεσμα την έκφραση του ενδοθηλιακού φαινοτύπου στα συγκεκριμένα κύτταρα. Μελέτες έχουν δείξει πως τα κυκλοφορούντα  $CD34^+$  πρόδρομα κύτταρα εκφράζουν σε μικρό βαθμό τον υποδοχέα KDR, χαρακτηριστικό υποδοχέα των ECs [252]. Η προσκόλληση των  $CD34^+$  πρόδρομων κυττάρων πάνω στα ενεργοποιημένα αιμοπετάλια στο σημείο της αγγειακής βλάβης έχει ως αποτέλεσμα τη μετακίνηση μεγαλύτερης ποσότητας του υποδοχέα KDR, ο οποίος βρίσκεται σε κυστίδια στο εσωτερικό των  $CD34^+$  πρόδρομων κυττάρων, προς την επιφάνειά τους, μετατρέποντάς τα έτσι σε EPCs [252] (Εικ. 2.10).



Εικ. 2.10. Σχηματική απεικόνιση της διαφοροποίησης των  $CD34^+$  πρόδρομων κυττάρων σε  $CD34^+/KDR^+$  κύτταρα (τροποποιημένη εικόνα από [252]).

Ωστόσο, η παραπάνω αλληλεπίδραση μπορεί να έχει αντίθετο αποτέλεσμα εάν συνυπάρχουν παράγοντες κινδύνου για καρδιαγγειακή νόσο, όπως είναι τα αυξημένα επίπεδα της LDL και της oxLDL. Το συγκεκριμένο γεγονός μπορεί να έχει ως συνέπεια η αλληλεπίδραση μεταξύ των αιμοπεταλίων και των  $CD34^+$  πρόδρομων κυττάρων να συμβάλει αρχικά στη διαφοροποίηση των συγκεκριμένων κυττάρων πρώτα σε μονοκύτταρα και στη συνέχεια σε μακροφάγα και αφρώδη κύτταρα (Εικ. 2.11), τα οποία αποτελούν χαρακτηριστικό παθολογικό εύρημα των πρώτων σταδίων ανάπτυξης της αθηρωματικής πλάκας [253].



Εικ. 2.11. Σχηματική απεικόνιση της αλληλεπίδρασης των αιμοπεταλίων με τα CD34<sup>+</sup> κυττάρων στο σχηματισμό αφρωδών κυττάρων (τροποποιημένη εικόνα από [245]).

#### ✚ Αλληλεπιδράσεις μεταξύ αιμοπεταλίων και EPCs

Ένας άλλος μηχανισμός με τον οποίο τα αιμοπετάλια συμμετέχουν στη φλεγμονή και την επιδιόρθωση της αγγειακής βλάβης είναι μέσω της αλληλεπίδρασής τους με τα EPCs. Αρκετές μελέτες έχουν δείξει ότι τα αιμοπετάλια διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην στρατολόγηση των EPCs σε θέσεις αγγειακού τραυματισμού, καθώς και στην ωρίμανση και τη διαφοροποίησή τους [247,253–256]. Έχει παρατηρηθεί, πως υπό συνθήκες στατικής και ροής *in vitro* λαμβάνει χώρα μια σημαντική αλληλεπίδραση μεταξύ των EPCs και των ενεργοποιημένων αιμοπεταλίων [255–257]. Οι συγκεκριμένες παρατηρήσεις έχουν επιβεβαιωθεί και σε *in vivo* πειράματα σε ποντίκια, όπου αποδείχθηκε ότι τα αιμοπετάλια παρέχουν ένα κρίσιμο σήμα για την πρόωμη στρατολόγηση των προερχόμενων από το BM πρόδρομων κυττάρων στις θέσεις της αγγειακής βλάβης [247]. Πέραν του συγκεκριμένου αποτελέσματος, τα αιμοπετάλια φαίνεται να υποστηρίζουν και να προάγουν την ωρίμανση και τη διαφοροποίηση των EPCs σε κύτταρα, τα οποία εκφράζουν δείκτες ECs και να αυξάνουν τις λειτουργικές τους ιδιότητες [253,254]. Η έκθεση των EPCs σε αιμοπετάλια υπό συνθήκες κυτταρικής καλλιέργειας ενισχύει την ικανότητά τους να σχηματίζουν αποικίες, να πολλαπλασιάζονται, να μεταναστεύουν, να εκφράζουν δείκτες ECs και να παράγουν μεταβολίτες του NO [253,254].

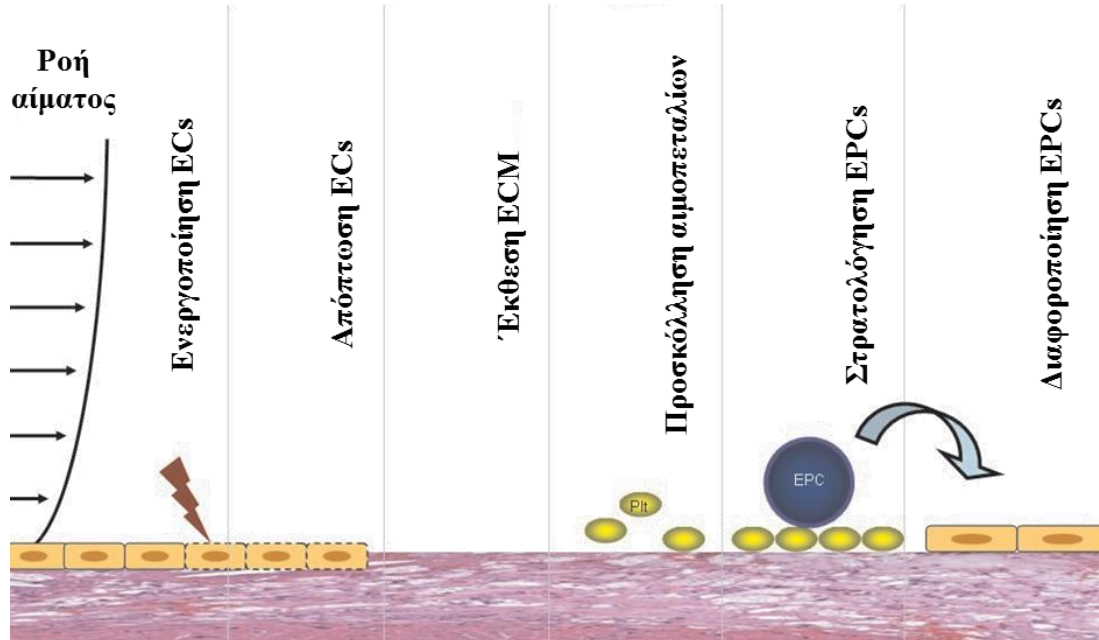
Αν και η δράση των αιμοπεταλίων στα EPCs και τη διαφοροποίησή τους σε κύτταρα με δείκτες ECs έχει τεκμηριωθεί καλά, ο μηχανισμός της συγκεκριμένης αλληλεπίδρασης παραμένει ασαφής. Μία πιθανή εξήγηση είναι ότι η θετική επίδραση των αιμοπεταλίων στις λειτουργικές ιδιότητες των EPCs μπορεί να διαμεσολαβείται από διάφορους αυξητικούς παράγοντες και χημειοκίνες, οι οποίοι εκκρίνονται από αιμοπετάλια, όπως τον PDGF και το βασικό ινοβλαστικό αυξητικό παράγοντα (bFGF) [258]. Τόσο ο PDGF όσο και ο bFGF αποτελούν βασικοί παράγοντες της αγγειογενετικής διαδικασίας [259,260]. Οι ισομορφές PDGFB και PDGFC είναι ουσιώδης για την ωρίμανση των αιμοφόρων αγγείων και έχει αποδειχθεί ότι διεγείρουν την στρατολόγηση των EPCs από το BM, ενώ προάγουν τη διαφοροποίησή τους σε κύτταρα, τα οποία εκφράζουν δείκτες ECs και λείων μυϊκών κυττάρων [260,261]. Ο FGF επιταχύνει την επιβίωση, τον πολλαπλασιασμό και τη μετανάστευση των ECs [259], ενώ έχει αποδειχθεί ότι ο FGF προάγει τον πολλαπλασιασμό και τη μετανάστευση των EPCs [262].

Η έκθεση του υποενδοθηλιακού χώρου και της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας, η οποία αποτελείται κυρίως από κολλαγόνο [249,263], έχει ως αποτέλεσμα την προσκόλληση των αιμοπεταλίων, καθώς εκφράζουν μια ποικιλία από υποδοχείς, συμπεριλαμβανομένου του υποδοχέα του κολλαγόνου, GPVI. Μετά την προσκόλλησή τους, τα αιμοπετάλια ενεργοποιούνται και εκφράζουν μια πληθώρα υποδοχέων προσκόλλησης στην επιφάνειά τους, όπως την P-σελεκτίνη και την ενεργοποιημένη μορφή του υποδοχέα της ιντεγκρίνης  $\alpha_{IIb}\beta_3$ , ενώ εκκρίνουν πλήθος χημειοκινών, όπως τον SDF-1/CXCL12, διευκολύνοντας έτσι την στρατολόγηση των EPCs στην περιοχή της αγγειακής βλάβης [247,253]. Η αλληλεπίδραση των αιμοπεταλίων με τα EPCs έχει σαν αποτέλεσμα το μειωμένο αριθμό αποπτωτικών EPCs, γεγονός που οδηγεί στο συμπέρασμα ότι τα αιμοπετάλια συμβάλλουν στην επιβίωση των EPCs [256]. Αποτέλεσμα όλων αυτών είναι η διαφοροποίηση των EPCs σε ώριμα ECs (**Εικ. 2.12**) [253,256]. Ωστόσο, κάτω από παθοφυσιολογικές καταστάσεις είναι δυνατόν τα ενεργοποιημένα αιμοπετάλια να επάγουν τη διαφοροποίηση των κυκλοφορούντων EPCs σε μακροφάγα. Μετά την ενεργοποίησή τους, τα αιμοπετάλια αρχικά κυλούν και μετά προσκολλώνται σταθερά στα ECs, ενώ στη συνέχεια εκκρίνουν προφλεγμονώδη μόρια, όπως το CD40L και την IL-1 $\beta$ , οδηγώντας στην ενεργοποίηση των ECs, η οποία προκαλεί την περαιτέρω προσκόλληση, έκκριση και έκφραση μορίων προσκόλλησης στην επιφάνεια των αιμοπεταλίων και τελικά την στρατολόγηση μονοκυττάρων και EPCs. Η



## Πρόδρομα Ενδοθηλιακά Κύτταρα

ενδοκυττάρωση των αιμοπεταλίων από τα μονοκύτταρα και τα EPCs, οδηγεί τα τελευταία στη διαφοροποίησή τους σε μακροφάγα σε αρχική φάση και σε αφρώδη κύτταρα μετά, οδηγώντας στην ανάπτυξη της αθηρωματικής πλάκας (Εικ. 2.11) [249,253].



Εικ. 2.12. Σχηματική απεικόνιση της αλληλεπίδρασης των αιμοπεταλίων με τα EPCs στην επαναγένεση των EPCs του αρτηριακού τοιχώματος (τροποποιημένη εικόνα από [245]).

## 2.6. EPCs και καρδιαγγειακός κίνδυνος

Τα χαμηλά επίπεδα κυκλοφορούντων πρόδρομων κυττάρων, τα οποία έχουν την ικανότητα της αγγειακής αναγέννησης, όπως είναι τα EPCs, μεταφράζονται σε υψηλό κίνδυνο για κακές καρδιαγγειακές εκβάσεις [264]. Η μείωση του αποθέματος των κυκλοφορούντων EPCs φαίνεται να εμπλέκεται στην παθογένεση της ενδοθηλιακής δυσλειτουργίας, της αθηροσκλήρωσης και της στεφανιαίας νόσου [265]. Η ενδοθηλιακή λειτουργία συσχετίζεται με τον αριθμό των κυκλοφορούντων EPCs παρέχοντας νέες μηχανιστικές γνώσεις και δυνατότητες για την εκτίμηση του καρδιαγγειακού κινδύνου [265]. Η ενδοθηλιακή δυσλειτουργία οδηγεί στην ανάπτυξη της αθηρωματικής πλάκας και αποτελεί ένα προγνωστικό δείκτη του κινδύνου αγγειακών επεισοδίων [266]. Προτείνεται ότι τα EPCs συμβάλλουν στην αποκατάσταση και τη διατήρηση της ενδοθηλιακής μονοστιβάδας [267,268]. Η μείωση των κυκλοφορούντων EPCs αντιπροσωπεύει ταυτόχρονα ένα βιοδείκτη καρδιαγγειακού κινδύνου και ένα παθογόνο στάδιο της αθηρογένεσης [145]. Η αθηροσκλήρωση εμπλέκει την ενδοθηλιακή δυσλειτουργία, τη φλεγμονή και τη συσσώρευση

λιπιδικών εναποθέσεων, ινώδους ιστού και κυτταρικών υπολειμμάτων, οι οποίες σχηματίζουν μια μεγάλη και αναπτυσσόμενη μάζα, η οποία ονομάζεται «πλάκα». Στις καρδιαγγειακές παθήσεις, η ρήξη μιας ασταθούς αθηρωματικής πλάκας μπορεί να προκαλέσει την απόφραξη της ροής του αίματος μέσω της αρτηρίας με επακόλουθη μείωση του οξυγόνου στο όργανο στόχο. Έχει βρεθεί πως το επίπεδο των κυκλοφορούντων CD34<sup>+</sup>/KDR<sup>+</sup> EPCs συσχετίζεται αντιστρόφως με την πρόωμη αθηροσκλήρωση στο γενικό πληθυσμό, υποδηλώνοντας ότι η μείωση των EPCs ελαττώνει την ικανότητα αποκατάστασης του ενδοθηλίου, προκαλώντας έτσι την ανάπτυξη της αθηρωματικής πλάκας [145]. Επιπλέον, υπάρχει αντίστροφη συσχέτιση μεταξύ των EPCs και του αριθμού των παραγόντων καρδιαγγειακού κινδύνου [139]. Ο Werner και οι συνεργάτες του απέδειξαν μια σχέση μεταξύ των μειωμένων επιπέδων των EPCs και της εμφάνισης ενός πρώτου μείζονος καρδιαγγειακού επεισοδίου, όπως οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου, νοσηλεία, επαναγγείωση ή θάνατος από καρδιαγγειακά αίτια, σε ασθενείς με στεφανιαία νόσο [267]. Πρότειναν ότι η μέτρηση των CD34<sup>+</sup>/KDR<sup>+</sup> EPCs μπορεί να θεωρηθεί χρήσιμο εργαλείο για την πρόβλεψη καρδιαγγειακών συμβαμάτων, βελτιώνοντας τη διαστρωμάτωση κινδύνου [267]. Τα επίπεδα των κυκλοφορούντων EPCs μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως υποκατάστατο βιολογικό δείκτη και τελικά για την παρακολούθηση νέων θεραπευτικών προσεγγίσεων, οι οποίες στοχεύουν στην ενίσχυση της ενδογενούς αγγειακής αποκατάστασης, τροποποιώντας έτσι την εξέλιξη της καρδιαγγειακής νόσου [269].

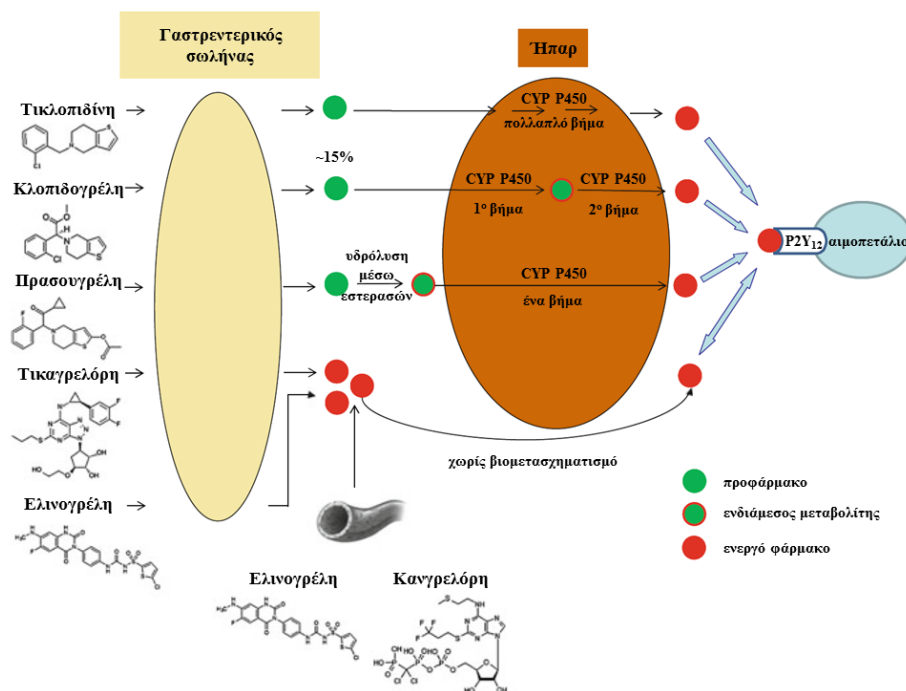


3<sup>ο</sup> Κεφάλαιο – Τικαγρελόρη και Αδενοσίνη

## 3.1. Εισαγωγή

Η διπλή αντιαιμοπεταλιακή θεραπεία (DAPT), η οποία αποτελείται από έναν ανταγωνιστή του P2Y<sub>12</sub>R και την ασπιρίνη, αποτελεί τον ακρογωνιαίο λίθο για τη θεραπεία ασθενών με ACS, καθώς και ασθενών που υποβάλλονται σε PCI. Η διέγερση του αιμοπεταλιακού P2Y<sub>12</sub>R από την ADP οδηγεί σε μια σύνθετη αλληλουχία ενεργειών, οι οποίες μπορεί να οδηγήσουν σε αθηροθρόμβωση. Αυτός είναι ο λόγος για τον οποίο ο P2Y<sub>12</sub>R αποτελεί σημαντικό μοριακό στόχο για την ανάπτυξη αντιαιμοπεταλιακών φαρμάκων.

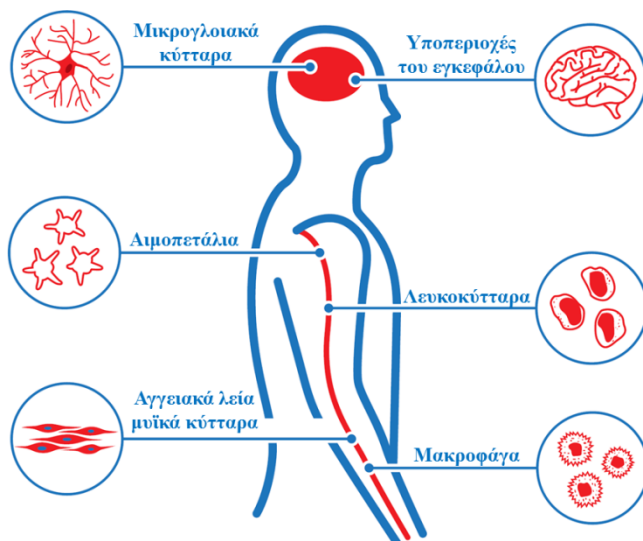
Οι ανταγωνιστές του P2Y<sub>12</sub>R μπορούν να ταξινομηθούν με βάση τη χημική τους δομή. Η ομάδα των θειονοπυριδινών περιλαμβάνει την τικλοπιδίνη, την κλοπιδογρέλη και την πρασουγρέλη, χορηγούμενα από του στόματος προφάρμακα, τα οποία οδηγούν σε μη αντιστρεπτή αναστολή του P2Y<sub>12</sub>R. Η δεύτερη ομάδα περιλαμβάνει μη θειονοπυριδινικά παράγωγα, την τικαγρελόρη, την κανγρελόρη και την ελινογρέλη, τα οποία έχουν ως αποτέλεσμα την αντιστρεπτή αναστολή του P2Y<sub>12</sub>R, ενώ σε αντίθεση με τις θειονοπυριδίνες, δεν απαιτείται ηπατική βιοενεργοποίηση (Εικ. 3.1).



Εικ. 3.1. Μεταβολισμός αντιαιμοπεταλιακών φαρμάκων του P2Y<sub>12</sub>R (τροποποιημένη εικόνα από [270]).

## Τικαγρελόρη και Αδενοσίνη

Ωστόσο, υπάρχουν δεδομένα, ότι εκτός από την αναστολή της αιμοπεταλιακής ενεργοποίησης, οι συγκεκριμένες ενώσεις ασκούν και άλλες (πλειοτροπικές) δράσεις. Μια πιθανή εξήγηση είναι ότι εκτός από τα αιμοπετάλια, ο P2Y<sub>12</sub>R μπορεί επίσης να εντοπιστεί σε μια μεγάλη ποικιλία ιστών, συμπεριλαμβανομένων ορισμένων υποπεριοχών του εγκεφάλου [271], των ECs [272,273], των VSMCs [274], των μικρογλοιακών κυττάρων [275,276], των δενδριτικών κυττάρων [277], των μακροφάγων [278], καθώς και ορισμένων υποπληθυσμών των λευκοκυττάρων [279], όπως των λεμφοκυττάρων και των CD34<sup>+</sup> πρόδρομων κυττάρων [280], αυξάνοντας έτσι τη δυναμική της δράσης των ανταγωνιστών του P2Y<sub>12</sub>R (Εικ. 3.2). Επιπλέον, οι πλειοτροπικές δράσεις των συγκεκριμένων ανταγωνιστών μπορεί επίσης να προκύψουν από μηχανισμούς διαφορετικούς από την αλληλεπίδραση τους με τον P2Y<sub>12</sub>R. Φλεγμονώδεις διεργασίες, η ενδοθηλιακή λειτουργία, ο αγγειακός τόνος, τα επίπεδα της αδενοσίνης στο πλάσμα και η καρδιοπροστασία φαίνεται πως επηρεάζονται από τους ανταγωνιστές του P2Y<sub>12</sub>R. Οι συγκεκριμένες εκτός-στόχου (off-target) δράσεις μπορεί να είναι επωφελείς, ωστόσο, μπορεί να σχετίζονται και με δυσμενείς παρενέργειες. Η αντιαιμοπεταλιακή δράση της κλοπιδογρέλης, της πρασουγρέλης, της τικαγρελόρης και άλλων ανταγωνιστών του P2Y<sub>12</sub>R είναι γνωστή και αναμφισβήτητη, ωστόσο οι πλειοτροπικές επιδράσεις των συγκεκριμένων ουσιών, οι οποίες αν και έχουν παρατηρηθεί σε πολυάριθμες μελέτες, εξακολουθούν να απαιτούν περαιτέρω διεξοδική διερεύνηση για τον προσδιορισμό της κλινικής τους σημασίας, καθώς και των λεπτομερών υποκείμενων μηχανισμών.



Εικ. 3.2. Ιστική κατανομή του P2Y<sub>12</sub>R (τροποποιημένη εικόνα από [62]).

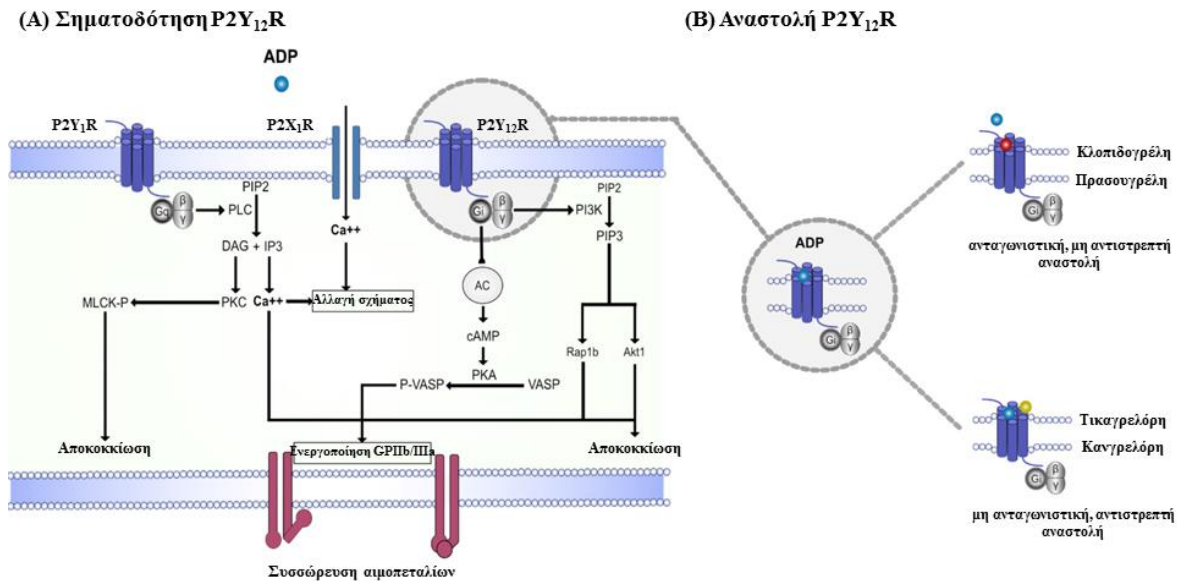
### 3.2. Ανταγωνιστές του P2Y<sub>12</sub>R

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, οι ανταγωνιστές του P2Y<sub>12</sub>R αποτελούν βασικό συστατικό της DAPT, το οποίο είναι το τρέχον θεραπευτικό πρότυπο σε ασθενείς με ACS με ή χωρίς τοποθέτηση ενδονάρθηκα (stent), καθώς και σε σταθερούς ασθενείς με στεφανιαία νόσο μετά από PCI, αντίστοιχα [281]. Λόγω ενός αιμοπεταλιακού περιορισμένου μοτίβου έκφρασης του P2Y<sub>12</sub>R, οι συγκεκριμένοι ανταγωνιστές αποτελούν ειδικοί, ασφαλείς και αποτελεσματικοί αντιαιμοπεταλιακοί παράγοντες. Ωστόσο, η αναστολή του P2Y<sub>12</sub>R συνδέεται στενά με την αύξηση της αιμορραγίας. Ο κάθε ανταγωνιστής του P2Y<sub>12</sub>R παρουσιάζει διαφορετικές φαρμακοδυναμικές και φαρμακοκινητικές ιδιότητες (Πίνακας 3.1, Εικ. 3.1 και Εικ. 3.3), οι οποίες πρέπει να λαμβάνονται υπόψη σε διάφορες κλινικές καταστάσεις.

**Πίνακας 3.1.** Επισκόπηση των φαρμακοδυναμικών και φαρμακοκινητικών χαρακτηριστικών των ανταγωνιστών του P2Y<sub>12</sub>R.

Ανταγωνιστής	Τικλοπιδίνη	Κλοπιδογρέλη	Πρασουγρέλη	Τικαγρελόρη	Κανγρελόρη
<b>Ομάδα</b>	θειενοπυριδίνη	θειενοπυριδίνη	θειενοπυριδίνη	CPTP	ανάλογο της ATP
<b>Χορήγηση</b>	από το στόμα	από το στόμα	από το στόμα	από το στόμα	ενδοφλέβια
<b>Προφάρμακο</b>	ναι	ναι	ναι	όχι	όχι
<b>Αναστολή</b>	μη αντιστρεπτή	μη αντιστρεπτή	μη αντιστρεπτή	αντιστρεπτή	αντιστρεπτή
<b>Δοσολογία</b>	2 × 250 mg	75 mg	10 mg	2 × 90 mg	30 μg/kg χάπι και 4 μg/kg/min έγχυση
<b>Έναρξη Δράσης</b>	3-5 d	3-4 h	1-2 h	1-2 h	15-30 min
<b>Λήξη Δράσης</b>	4-5 d	7 d	7d	5 d	1 h
<b>Απέκκριση</b>	νεφροί κόπρανα	νεφροί (50%) χολή (46%)	νεφροί (68%) κόπρανα (27%)	χολή	νεφροί (58%) χολή (35%)

## Τικαγρελόρη και Αδενοσίνη



**Εικ. 3.3.** Σηματοδότηση της ADP στα αιμοπετάλια και φαρμακοδυναμική των P2Y<sub>12</sub> ανταγωνιστών (τροποποιημένη εικόνα από [282]).

### 🚦 Τικλοπιδίνη

Η τικλοπιδίνη αποτελεί την πρώτη γενιά θειενοπυριδινών, ένα χορηγούμενο από του στόματος προφάρμακο και χορηγείται δυο φορές ημερησίως. Μετά τον ηπατικό βιομετασχηματισμό από τα κυτοχρώματα CYP3A4, CYP2B6 και CYP2C19, δρα ως ένας μη αντιστρεπτός αναστολέας του P2Y<sub>12</sub>R (**Πίνακας 3.1**). Η λειτουργία των αιμοπεταλίων μειώνεται εντός 3-5 d, αλλά συνήθως ανακάμπτει εντός 3-4 d μετά τη διακοπή της δόσης συντήρησης της τικλοπιδίνης [283].

Η μελέτη ISAR πρωτοστάτησε στην έννοια της DAPT συγκρίνοντας για πρώτη φορά μια αγωγή, η οποία αποτελείται από ασπιρίνη σε συνδυασμό με τικλοπιδίνη κατά της αντιπηκτικής θεραπείας (ηπαρίνη, φενπροκουμόνη) μαζί με ασπιρίνη μετά από PCI [284], με αποτέλεσμα να είναι το πρώτο φάρμακο που εγκρίθηκε από την Υπηρεσία Τροφίμων και Φαρμάκων (FDA) ως συμπληρωματική θεραπεία μαζί με την ασπιρίνη για την πρόληψη της υποξείας θρόμβωσης του stent σε ασθενείς, οι οποίοι είχαν υποβληθεί σε επιτυχή PCI. Σήμερα, η τικλοπιδίνη έχει αντικατασταθεί σε μεγάλο βαθμό στη DAPT εξαιτίας ενός υψηλότερου ποσοστού σοβαρών παρενεργειών σε σύγκριση με την κλοπιδογρέλη, συμπεριλαμβανομένης της ουδετεροπενίας, της γαστρεντερικής τοξικότητας και της σπάνιας θρομβωτικής θρομβοκυτταροπενικής πορφύρας [285].

### ✚ Κλοπιδογρέλη

Η κλοπιδογρέλη είναι ένα προφάρμακο δεύτερης γενιάς θειενοπυριδινών και μπορεί να αναστείλει μη αντιστρεπτά τον P2Y<sub>12</sub>R (**Πίνακας 3.1** και **Εικ. 3.3**). Η δόση φόρτωσης, συνήθως 600 mg, χορηγείται από το στόμα μία φορά ημερησίως και μπορεί να βελτιώσει περαιτέρω τη συμμόρφωση του ασθενούς, ενώ συνήθης δόση συντήρησης είναι 75 mg/d. Μετά από τη χορήγηση, ένα σημαντικό ποσοστό της κλοπιδογρέλης αδρανοποιείται από εντερικές εστεράσες, με αποτέλεσμα την απορρόφηση μόνο 15% του προφαρμάκου (**Εικ. 3.1**). Μετά από δύο στάδια ηπατικής ενεργοποίησης, ο ενεργό μεταβολίτης της κλοπιδογρέλης (R-130964) αναστέλλει μη αντιστρεπτά τον P2Y<sub>12</sub>R σχηματίζοντας ένα δισουλφιδικό δεσμό εντός της ενεργού θέσης πρόσδεσης της ADP. Τα μέγιστα επίπεδα του ενεργού μεταβολίτη της κλοπιδογρέλης φτάνουν 1-2 h μετά την κατάποση στο πλάσμα, με την υψηλότερη αναστολή των αιμοπεταλίων να επιτυγχάνεται σε 2-3 h [283,286], ενώ η απομάκρυνση της κλοπιδογρέλης πραγματοποιείται μέσω των νεφρών και του ήπατος [287]. Μετά τη διακοπή της χορήγησης της κλοπιδογρέλης, η αιμοπεταλιακή συσσώρευση επιστρέφει στα αρχικά επίπεδα (baseline) μεταξύ 3-5 d.

Η κλοπιδογρέλη τροποποιείται εκτεταμένα στο ανθρώπινο σώμα και λόγω αυτού του περίπλοκου βιομετασχηματισμού (**Εικ. 3.1**), η απόκριση του φαρμάκου είναι πολύπλοκη λόγω της έντονης μεταβλητότητας των ασθενών [288]. Παράγοντες, οι οποίοι επηρεάζουν το συγκεκριμένο γεγονός, είναι τα χαρακτηριστικά του ασθενούς, η συν-νοσηρότητα και ορισμένες συν-φαρμακευτικές αγωγές. Εκτός από τους εξωγενείς παράγοντες, οι ασθενείς διαθέτουν μονονουκλεοτιδικούς πολυμορφισμούς ενζύμων, τα οποία καταλύουν τη μεταφορά και το βιομετασχηματισμό, αντιπροσωπεύοντας περισσότερο από 10% της μεταβλητότητας στην απόκριση της κλοπιδογρέλης [289]. Η διακύμανση της απόκρισης στην κλοπιδογρέλη μεταξύ διαφορετικών ασθενών, η οποία μπορεί να οδηγήσει είτε σε ισχαιμικές ή αιμορραγικές επιπλοκές, έχει δώσει το έναυσμα για την ανάπτυξη πολλαπλών δοκιμών *in vitro* για την πρόβλεψη της έντασης της αιμοπεταλιακής αναστολής ή για τον έλεγχο της συμμόρφωσης των ασθενών μετά την PCI.

### ✚ Πρασουγρέλη

Η πρασουγρέλη, όπως και η κλοπιδογρέλη, αποτελεί έναν μη αντιστρεπτό ανταγωνιστή του P2Y<sub>12</sub>R, ο οποίος προσδέεται ομοιοπολικά στον υποδοχέα διαμέσου ενός δισουλφιδικού δεσμού (**Πίνακας 3.1** και **Εικ. 3.3**). Σε σύγκριση με την



## **Τικαγρελόρη και Αδενοσίνη**

κλοπιδογρέλη, ο βιομετασχηματισμός της πρασουγρέλης είναι πιο αποτελεσματικός. Πράγματι, μετά από τη δράση μιας εντερικής εστεράσης στο μεταβολίτη 2-οξο-πρασουγρέλη, μόνο μία οξείδωση του CYP450 είναι απαραίτητη για την επαρκή μετατροπή στον ενεργό μεταβολίτη της [290,291] (**Εικ. 3.1**). Έτσι, η από το στόματος χορήγηση, οδηγεί σε μια ταχύτερη, ισχυρότερη και σταθερότερη αναστολή των αιμοπεταλίων με μέγιστη συγκέντρωση του ενεργού μεταβολίτη 30 min μετά τη χορήγηση με μέσο χρόνο ημιζωής 2-15 h [292]. Στη συνέχεια, ο ενεργός μεταβολίτης της πρασουγρέλης (R-138727) απενεργοποιείται μέσω μιας S-μεθυλίωσης και αποβάλλεται κυρίως με νεφρική απέκκριση (**Πίνακας 3.1**). Μετά τη διακοπή της θεραπείας με πρασουγρέλη, η διαταραγμένη αιμοπεταλιακή συσσώρευση επανέρχεται στα αρχικά επίπεδα (baseline) εντός 7-9 d, εξαρτώμενη από την αντιδραστικότητα των αιμοπεταλίων κατά τη διάρκεια της θεραπείας, ενώ καθυστερεί περισσότερο σε σύγκριση με την κλοπιδογρέλη [287].

Οι σταθερές και έντονες αντιαιμοπεταλιακές δράσεις της πρασουγρέλης αξιολογήθηκαν σε άτομα με στεφανιαία νόσο, οι οποίοι είχαν υποβληθεί σε καρδιακό καθετηριασμό στη μελέτη φάσης II PRINCIPLE-TIMI 44 [293], η οποία επιβεβαίωσε ένα σταθερότερο επίπεδο της αιμοπεταλιακής αναστολής σε πολλαπλά χρονικά σημεία σε ένα κλινικό περιβάλλον με χαμηλή μεταβλητότητα μεταξύ ασθενών. Σε αντίθεση η μελέτη JUMBO-TIMI 26, η οποία αξιολόγησε τα δεδομένα ασφάλειας των ασθενών μετά από θεραπεία με διαφορετικές δόσεις πρασουγρέλης ή κλοπιδογρέλης την στιγμή της προγραμματισμένης PCI, έδειξε χαμηλά ποσοστά αιμορραγίας και για τα δύο φάρμακα [294]. Οι συγκεκριμένες μελέτες αποτέλεσαν τη βάση για την ακόλουθη μεγαλύτερη, πολυκεντρική μελέτη φάσης III, TRITON-TIMI 38, συγκρίνοντας την αποτελεσματικότητα της πρασουγρέλης και της κλοπιδογρέλης σε ασθενείς με προγραμματισμένη PCI. Στη μελέτη TRITON-TIMI 38 [295] η συνολική θνησιμότητα των ασθενών δεν ήταν διακριτή μεταξύ των ομάδων θεραπείας. Τέλος, μια ανάλυση υποομάδας έδειξε τρία σύνολα ασθενών με τάση αιμορραγίας: ηλικιωμένοι, λιποβαρής και ασθενείς με ιστορικό εγκεφαλικού επεισοδίου/παροδικού ισχαιμικού επεισοδίου. Έτσι, σύμφωνα με τους γιατρούς της μελέτης TRITON-TIMI 38, θα πρέπει να σταθμίζονται τα οφέλη και οι κίνδυνοι κάθε ασθενούς πριν από τη θεραπεία με τη πρασουγρέλη έναντι της κλοπιδογρέλης και να λαμβάνεται υπόψη η μείωση της δόσης σε συγκεκριμένες περιστάσεις.

## ✚ Τικαγρελόρη

Η επαγόμενη μη αντιστρεπτή αναστολή του P2Y<sub>12</sub>R από τα θειενοπυριδινικά παράγωγα, όπως κλοπιδογρέλη και πρασουγγρέλη (Πίνακας 3.1 και Εικ. 3.3) καθορίζει μία παρατεταμένη περίοδο ανάκτησης της αιμοπεταλιακής συσσώρευσης. Επιπλέον, η θειενοπυριδίνη απαιτεί την ενεργοποίηση του μεταβολισμού «πρώτης διόδου», καταλήγοντας τελικά σε δυνητικούς μη ανταποκρινόμενους μεταβολίτες. Και τα δύο μειονεκτήματα έχουν παρακαμφθεί από την ανάπτυξη της κυκλοπεντυλο-τριαζολο-πυριμιδίνης και αναλόγου της ATP, τικαγρελόρη. Μετά την εντερική απορρόφηση, η τικαγρελόρη είναι ενζυμικά αδρανής και αποικοδομείται μερικώς σε τουλάχιστον μία δραστική ουσία [283]. Σε αντίθεση με τις θειενοπυριδίνες, η τικαγρελόρη είναι ένας αντιστρεπτός, μη ανταγωνιστικός, αναστολέας του P2Y<sub>12</sub>R, εμφανίζοντας μια σταθερή και ταχεία αναστολή των αιμοπεταλίων εντός 2 h μετά την από του στόματος λήψη [296] (Πίνακας 3.1 και Εικ. 3.1). Σε σύγκριση με την κλοπιδογρέλη, η τικαγρελόρη επιδεικνύει ισχυρότερη αιμοπεταλιακή αναστολή σε αρκετούς προσδιορισμούς της αιμοπεταλιακής λειτουργίας και αποτρέπει ολόκληρη τη μεταγωγή σήματος του P2Y<sub>12</sub>R, ενώ ακόμη υπερисχύει έναντι της μη απόκρισης στην κλοπιδογρέλη σε ασθενείς με σταθερό ACS, όπως φαίνεται στην μελέτη RESPOND [297]. Τα επίπεδα της τικαγρελόρης στο πλάσμα κορυφώνονται στις 4 h [298] και μειώνονται μετά από 12 h με μέσο χρόνο ημιζωής 6-12 h, ανεξάρτητα από τη δόση, η οποία οδηγεί στη φυσιολογική αντιδραστικότητα των αιμοπεταλίων περίπου 5 d μετά τη διακοπή του φαρμάκου, γεγονός που επιβεβαιώθηκε στη μελέτη ONSET/OFFSET [299].

Η τικαγρελόρη έχει ορισμένες διακριτές παρενέργειες, οι οποίες δεν σχετίζονται άμεσα με την αναστολή του P2Y<sub>12</sub>R. Επηρεάζει έντονα τον μεταβολισμό των πουρινών *in vivo* παρεμποδίζοντας την πρόσληψη και διευκολύνοντας την απελευθέρωση της αδενοσίνης στα ερυθροκύτταρα με αποτέλεσμα ανεπιθύμητες παρενέργειες, όπως βραδυκαρδία, κοιλιακές παύσεις, δύσπνοια και αύξηση του ουρικού οξέος. Η μελέτη φάσης II DISPERSE ήταν η πρώτη μελέτη επιβεβαίωσης της δοσολογίας, η οποία αξιολόγησε την αντιαιμοπεταλιακή αποτελεσματικότητα της τικαγρελόρης. Η τικαγρελόρη είχε ως αποτέλεσμα μια αποτελεσματικότερη και ταχύτερη αναστολή των αιμοπεταλίων από την κλοπιδογρέλη, ωστόσο, αύξηση της δόσης της τικαγρελόρης είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση της ελάσσονος αιμορραγίας και της δύσπνοιας [300]. Κατά συνέπεια, η τικαγρελόρη δοκιμάστηκε σε μια δεύτερη μελέτη φάσης II, τη DISPERSE-2

## **Τικαγρελόρη και Αδενοσίνη**

[298], για την εκτίμηση της ασφάλειας και της αποτελεσματικότητας σε ασθενείς με NSTEMI. Ως εκ τούτου, οι ασθενείς έλαβαν τυχαία είτε τικαγρελόρη είτε κλοπιδογρέλη και στη συνέχεια, η ομάδα της τικαγρελόρης υπο-τυχαιοποιήθηκε για να λάβει ή όχι δόση φόρτωσης. Γενικά, δεν παρατηρήθηκαν διαφορές σε μείζονα αιμορραγικά συμβάματα στην ομάδα της τικαγρελόρης έναντι της κλοπιδογρέλης. Ωστόσο, παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση των συμβαμάτων δύσπνοιας και βραδυκαρδίας κατά τη διάρκεια της θεραπείας με τικαγρελόρη. Η ακόλουθη πολυκεντρική, διπλή-τυφλή και τυχαιοποιημένη μελέτη PLATO [301] συνέκρινε το καταληκτικό σημείο αποτελεσματικότητας της τικαγρελόρης έναντι της κλοπιδογρέλης στην πρόληψη του καρδιαγγειακού θανάτου, του έμφραγματος του μυοκαρδίου ή του εγκεφαλικού επεισοδίου μεταξύ ασθενών που είχαν εισαχθεί στο νοσοκομείο με ACS. Η τικαγρελόρη ήταν ανώτερη από την κλοπιδογρέλη στη μείωση του πρωτογενούς ισχαιμικού καταληκτικού σημείου. Ωστόσο, η συγκεκριμένη μείωση του ισχαιμικού κινδύνου προήλθε από την αύξηση των μείζονων αιμορραγικών συμβαμάτων, ένα εύρημα που αναμένεται όταν εφαρμόζεται ισχυρή αναστολή των αιμοπεταλίων.

## **✚ Κανγρελόρη**

Η κανγρελόρη αποτελεί τον πρώτο ενδοφλέβιο ανταγωνιστή του P2Y<sub>12</sub>R, ο οποίος αναστέλλει αντιστρεπτά την σηματοδότηση της ADP με μη ανταγωνιστικό τρόπο (**Πίνακας 3.1** και **Εικ. 3.3**). Έχει σχεδιαστεί ως ένα υψηλής συγγένειας ATP ανάλογο, το οποίο αποφωσφορυλιώνεται/απενεργοποιείται ταχέως με μέσο χρόνο ημιζωής μόνο 3-6 min, χωρίς να απαιτείται μεταβολική ενεργοποίηση. Σε μία μελέτη φάσης I, υγιείς εθελοντές έλαβαν έγχυση, με αποτέλεσμα την δόσο-εξαρτώμενη αιμοπεταλιακή αναστολή, η οποία ήταν πλήρως αντιστρεπτή 20 min μετά τη διακοπή του φαρμάκου [302]. Σε αντίθεση με την κλοπιδογρέλη, η κανγρελόρη έχει ως αποτέλεσμα μια παρόμοια ισχυρή αναστολή των αιμοπεταλίων όπως η τικαγρελόρη και η πρασουγρέλη [303].

Μετά από προκλινικές μελέτες και μελέτες φάσης I, διεξήχθησαν αρκετές μελέτες για την αξιολόγηση της ασφάλειας και της αποτελεσματικότητας της κανγρελόρης σε κλινικές συνθήκες. Η μελέτη STEP-AMI αξιολόγησε τη δυνατότητα συνδυασμού της κανγρελόρης με την ινωδολυτική θεραπεία, δείχνοντας ότι οι ανεπιθύμητες ενέργειες ήταν συγκρίσιμες σε αυτές τις ομάδες με μη σημαντική μείωση στην ανάκαμψη του διαστήματος ST όταν συγχρηγείται η κανγρελόρη [304]. Στη συνέχεια, δύο κλινικές

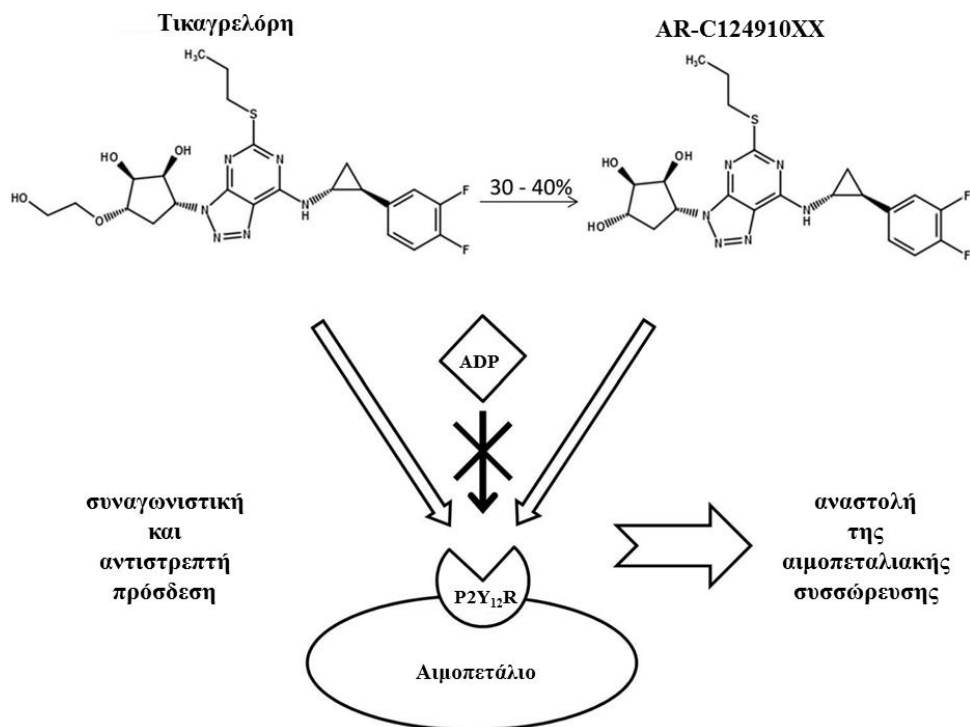
μελέτες φάσης II εξέτασαν τη φαρμακοδυναμική καθώς και την ασφάλεια και την αποτελεσματικότητα της κανγρελόρης. Σε μια σύγκριση της κανγρελόρης με την κλοπιδογρέλη σε ασθενείς με ισχαιμική καρδιακή νόσο, η κανγρελόρη πέτυχε πλήρη αντιαιμοπεταλιακή δράση 4 min μετά την έγχυση, ενώ η κλοπιδογρέλη έφθασε μόνο σε 60% αναστολή [305]. Στις ακόλουθες δύο μελέτες φάσης III, η περιφερική εφαρμογή της κανγρελόρης απέτυχε να δείξει υπεροχή στο πρωτεύον καταληκτικό σημείο σε σύγκριση με τη δόση φόρτωσης των 600 mg κλοπιδογρέλης σε ασθενείς με ACS. Συνεπώς, η μελέτη σταμάτησε πριν ολοκληρωθεί μετά από μια ενδιάμεση ανάλυση, η οποία έδειξε έλλειψη αποτελεσματικότητας [306,307]. Αντίθετα, η μεγάλης κλίμακας μελέτη CHAMPION PHOENIX παρείχε αποδείξεις για τη μείωση ισχαιμικών επεισοδίων χωρίς αύξηση σοβαρής αιμορραγίας [308].

### **3.3. Φαρμακοκινητικό και φαρμακοδυναμικό προφίλ της τικαγρελόρης**

#### **Φαρμακοκινητικό προφίλ**

Το φαρμακοκινητικό προφίλ της τικαγρελόρης έχει αξιολογηθεί σε υγιείς εθελοντές, καθώς και σε ασθενείς με στεφανιαία νόσο, αθηροσκλήρωση και ACS. Μια μελέτη απορρόφησης του φαρμάκου σε υγιείς εθελοντές έδειξε ότι το ποσοστό της τικαγρελόρης, το οποίο απορροφήθηκε, μείωσε περαιτέρω την γαστρεντερική οδό της δόσης που απελευθερώθηκε [309]. Σε υγιείς εθελοντές, μονές από του στόματος χορηγούμενες δόσεις τικαγρελόρης των 0,1-400 mg απορροφήθηκαν ταχέως, με μέσο χρόνο για να φτάσει τη μέγιστη συγκέντρωση πλάσματος ( $t_{max}$ ) περίπου 1,3-2 h. Ομοίως, η μέση τιμή  $t_{max}$  για τον ενεργό μεταβολίτη της τικαγρελόρης, AR-C124910XX, ήταν 1,5-3 h [310,311]. Οι εναλλακτικές μέθοδοι χορήγησης έχουν δείξει ότι αυξάνουν το ρυθμό απορρόφησης της τικαγρελόρης. Σε υγιείς εθελοντές, η χορήγηση της τικαγρελόρης ως ένα θρυμματισμένο δισκίο (από του στόματος χορηγούμενη δόση ή μέσω του ρινογαστρικού σωλήνα) αύξησε τη συγκέντρωση της στο πλάσμα, καθώς και του AR-C124910XX σε πρώιμα χρονικά σημεία (0,5 και 1 h μετά τη δόση) σε σχέση με την από του στόματος χορήγηση ενός ολόκληρου δισκίου. Η  $t_{max}$  της τικαγρελόρης ήταν μικρότερη μετά το θρυμματισμό έναντι της πλήρους χορήγησης των δισκίων (1 vs 2 h) (Εικ. 3.4) [312].

## Τικαγρελόρη και Αδενοσίνη



Εικ. 3.4. Μεταβολισμός της τικαγρελόρης και μηχανισμός δράσης (τροποποιημένη εικόνα από [313]).

Η μέση απόλυτη βιοδιαθεσιμότητα της τικαγρελόρης σε υγιείς εθελοντές είναι 36% [309]. Οι μέσες και μέγιστες τιμές συγκέντρωσης της τικαγρελόρης και του AR-C124910XX στο πλάσμα ( $C_{max}$ ) αυξάνονται γραμμικά και προβλέψιμα κατά δοσοεξαρτώμενο τρόπο και είναι σταθερές σε σταθερή κατάσταση σε υγιείς εθελοντές [314], καθώς και σε ασθενείς με αθηροσκλήρωση [300], στεφανιαία νόσο [315] και ACS [316]. Η επίδραση της τροφής στην έκθεση της τικαγρελόρης και του AR-C124910XX είναι μικρή και θεωρείται ότι έχει ελάχιστη κλινική σημασία. Επομένως, η τικαγρελόρη μπορεί να χορηγηθεί με ή χωρίς τροφή [317].

Για την αξιολόγηση του μεταβολισμού της τικαγρελόρης πραγματοποιήθηκαν μελέτες *in vitro* σε ηπατοκυτταρικά και μικροσωματικά παρασκευάσματα από διάφορα είδη ζώων [318]. Αρκετοί μεταβολίτες αναγνωρίστηκαν και οι κύριοι μεταβολίτες σε όλα τα είδη ήταν οι AR-C124910XX και AR-C133913XX. Τα κυτοχρώματα CYP3A4 και CYP3A5 είναι κυρίως υπεύθυνα για το σχηματισμό του AR-C124910XX, ενώ ο σχηματισμός του AR-C133913XX λαμβάνει χώρα πιθανότατα μέσω του CYP3A4, με μικρότερη συμβολή από το CYP3A5 [319].

Σε πειράματα, τα οποία διεξήχθησαν με ραδιοεπισημασμένη τικαγρελόρη σε υγιείς άνδρες, εντοπίστηκαν 10 διακριτοί μεταβολίτες, με την αμετάβλητη τικαγρελόρη και τον

AR-C124910XX να είναι οι κύριες οντότητες, οι οποίες παρατηρήθηκαν στο πλάσμα. Ο AR-C124910XX είναι παρόν σε περίπου 30-40% της συγκέντρωσης της μητρικής ένωσης [300,309]. Μετά τη χορήγηση της [<sup>14</sup>C]-τικαγρελόρης, το 58% ανακτήθηκε στα κόπρανα και το 27% στα ούρα, ενώ τα επίπεδα της αμετάβλητης τικαγρελόρης και του AR-C124910XX ήταν <0,05% στα ούρα [309]. Τα συγκεκριμένα δεδομένα υποδεικνύουν ότι η τικαγρελόρη εκκρίνεται κυρίως στα κόπρανα, ενώ η νεφρική απέκκριση παίζει μόνο έναν δευτερεύοντα ρόλο. Η κύρια οδός έκκρισης για τον ενεργό μεταβολίτη είναι κατά πάσα πιθανότητα η χολική έκκριση. Ο μέσος χρόνος ημίσειας ζωής για την απομάκρυνση της τικαγρελόρης είναι 7,7-13,1 h, ενώ ο μέσος χρόνος ημίσειας ζωής για την απομάκρυνση του AR-C124910XX είναι 7,5-12,4 h [310].

#### **Φαρμακοδυναμικό προφίλ**

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, η τικαγρελόρη προσδένεται στον P2Y<sub>12</sub>R με ισχυρό και αντιστρεπτό τρόπο χρησιμοποιώντας μια θέση πρόσδεσης διαφορετική από τη θέση πρόσδεσης της ADP [296]. Συνεπώς, η πρόσδεση δεν προκαλεί την επαγόμενη από την ADP διαμορφωτική αλλαγή στον P2Y<sub>12</sub>R, οι G-πρωτεΐνες δεν ενεργοποιούνται, ο υποδοχέας παραμένει αδρανής και η σηματοδότηση της ADP παρεμποδίζεται [320]. Η τικαγρελόρη συνδέεται μόνο με τον P2Y<sub>12</sub>R και όχι με άλλους τύπους P2YR [321]. Σε αντίθεση με την κλοπιδογρέλη και την πρασουγρέλη, η τικαγρελόρη δεν απαιτεί μεταβολική ενεργοποίηση και ο δραστικός μεταβολίτης της, AR-C124910XX, είναι περίπου ισοδύναμος με την τικαγρελόρη στον P2Y<sub>12</sub>R και συμβάλλει στην αντιαιμοπεταλιακή δράση με τη χορήγηση τικαγρελόρη [311].

Η τικαγρελόρη ανέστειλε την επαγόμενη από την ADP συσσώρευση των αιμοπεταλίων κατά δόσο-εξαρτώμενο τρόπο σε υγιείς εθελοντές που είχαν λάβει μονές δόσεις των 30-400 mg μόνο, με τις δόσεις μικρότερες των 30 mg να μην παρουσιάζουν σημαντικό ανασταλτικό αποτέλεσμα [310]. Όταν χορηγήθηκε δύο φορές ημερησίως (50-300 mg), η τικαγρελόρη παρείχε σταθερά μεγαλύτερη αιμοπεταλιακή αναστολή σε σύγκριση με την ισοδύναμη ημερήσια δόση (100-600 mg) [314]. Στη μελέτη των μονών και πολλαπλών αυξανόμενων δόσεων τικαγρελόρης σε υγιείς Ιάπωνες και Καυκάσιους εθελοντές, αναφέρθηκε μια ελαφρώς μεγαλύτερη έκθεση στην ομάδα των Ιαπώνων σε σύγκριση με αυτή των Καυκάσιων, παρόλο που οι φαρμακοδυναμικές αποκρίσεις,

## *Τικαγρελόρη και Αδενοσίνη*

σχετικά με την αναστολή της αιμοπεταλιακής συσσώρευσης και το χρόνο αιμορραγίας, ήταν παρόμοιες μεταξύ των δυο ομάδων [322].

Σε Ασιάτες ασθενείς με σταθερή στεφανιαία νόσο, οι οποίοι έλαβαν τικαγρελόρη (2×45 ή 2×90 mg/d) ή κλοπιδογρέλη (75 mg/d), η αναστολή της αιμοπεταλιακής συσσώρευσης ήταν δοσο-εξαρτώμενη και μεγαλύτερη με την τικαγρελόρη έναντι της κλοπιδογρέλης [323]. Περαιτέρω μελέτες σύγκρισης της τικαγρελόρης έναντι της κλοπιδογρέλης σε Ισπανόφωνους και Αφροαμερικανούς ασθενείς ανέφεραν παρόμοια αποτελέσματα [323,324]. Σε ασθενείς με σταθερή αθηροσκλήρωση παρατηρήθηκε μεγαλύτερη αναστολή της αιμοπεταλιακής συσσώρευσης για την τικαγρελόρη σε σύγκριση με την κλοπιδογρέλη [300]. Υψηλότερες δόσεις τικαγρελόρης (2×100 και 2×200 mg/d ημερησίως και 400 mg/d) είχαν αποτελεσματικότερη αναστολή της αιμοπεταλιακής συσσώρευσης από τα 2×50 mg/d τικαγρελόρης ή τα 75 mg/d κλοπιδογρέλης σε 2 h μετά την αρχική χορήγηση και σε σταθερή κατάσταση. Επιπλέον, 4 h μετά τη δοσολόγηση σε σταθερή κατάσταση, διατηρήθηκε η μεγαλύτερη αναστολή της αιμοπεταλιακής συσσώρευσης, η οποία παρατηρήθηκε με τις υψηλότερες δόσεις τικαγρελόρης σε σύγκριση με τα 2×50 mg/d τικαγρελόρης ή τα 75 mg/d κλοπιδογρέλης [300].

Η μελέτη PLATO δεν ανέφερε σημαντικές διαφορές στα μείζονα αιμορραγικά συμβάματα, τη θανατηφόρα/απειλητική για τη ζωή αιμορραγία, τα ποσοστά της σχετιζόμενης με την επέμβαση αορτοστεφανιαίας παράκαμψης [coronary artery bypass grafting (CABG)] μείζονος αιμορραγίας ή την απαιτούμενης μετάγγισης αιμορραγία ανάμεσα στις ομάδες της τικαγρελόρης και της κλοπιδογρέλης [301]. Σε σύγκριση με την κλοπιδογρέλη, τα ποσοστά της μη σχετιζόμενης με την CABG και της θανατηφόρας ενδοκρανιακής αιμορραγίας ήταν υψηλότερα με την τικαγρελόρη. Για άλλους τύπους θανατηφόρων αιμορραγιών, τα ποσοστά ήταν χαμηλότερα με την τικαγρελόρη έναντι της κλοπιδογρέλης. Στην υποομάδα των ασθενών με ACS στη μελέτη PLATO, οι οποίοι υποβλήθηκαν σε CABG και σταμάτησαν να λαμβάνουν αντιαιμοπεταλιακή θεραπεία από  $\leq 1$  έως  $>6$  d πριν από τη χειρουργική επέμβαση, δεν υπήρχε διαφορά στη σχετιζόμενη με την CABG μείζονα αιμορραγία μεταξύ των δυο ομάδων [325]. Μια υπομελέτη της μελέτης PLATO έδειξε μεγαλύτερη αναστολή της αιμοπεταλιακής συσσώρευσης με την τικαγρελόρη έναντι της κλοπιδογρέλης, με διαχωρισμό των προφίλ, τα οποία αναφέρθηκαν μέσα στις πρώτες ώρες τις θεραπειάς αλλά και τη διάρκεια της διατήρησης

της θεραπείας [326]. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της μελέτης PLATO, στη μελέτη DISPERSE-2 δεν υπήρχαν διαφορές στις ομάδες της τικαγρελόρης και της κλοπιδογρέλης σε ασθενείς με NSTEMI στα ποσοστά της μείζονος αιμορραγίας [298]. Ωστόσο, αν και όχι σημαντικά, φάνηκε να υπάρχει μια τάση στη μείωση στα ποσοστά του εμφράγματος του μυοκαρδίου για την τικαγρελόρη έναντι της κλοπιδογρέλης.

### **3.4. Πλειοτροπικές δράσεις της τικαγρελόρης**

Η ανάπτυξη των αιμοπεταλιακών ανταγωνιστών του P2Y<sub>12</sub>R ήταν καθοριστική, καθώς αποτέλεσε βασική θεραπεία της στεφανιαίας νόσου. Όπως έχει ήδη αναφερθεί, τα αιμοπετάλια παίζουν κεντρικό ρόλο στη θρόμβωση. Μετά τη ρήξη της πλάκας, τα αιμοπετάλια προσκολλώνται στο εκτεθειμένο κολλαγόνο μέσω του υποδοχέα της GPVI, οδηγώντας στην αιμοπεταλιακή ενεργοποίηση, η οποία ενισχύεται περαιτέρω από την θρομβίνη, η παραγωγή της οποίας είναι αποτέλεσμα της έκφρασης του TF. Το συγκεκριμένο γεγονός οδηγεί στην απελευθέρωση πολλαπλών αγωνιστών, συμπεριλαμβανομένης της ADP, η οποία ενισχύει και διατηρεί την αιμοπεταλιακή ενεργοποίηση διαμέσου του P2Y<sub>12</sub>R. Τα ενεργοποιημένα αιμοπετάλια υφίστανται αλλαγή σχήματος και εκφράζουν ενεργοποιημένους υποδοχείς της ιντεγκρίνης α<sub>IIb</sub>β<sub>3</sub>, στους οποίους προσδένεται το ινωδογόνο, το οποίο διαμεσολαβεί τη διασταυρούμενη σύνδεση των αιμοπεταλίων, με αποτέλεσμα την αιμοπεταλιακή συσσώρευση και το σχηματισμό θρόμβων. Η στόχευση του αιμοπεταλιακού P2Y<sub>12</sub>R αποδείχθηκε επιτυχής στη μείωση των ισχαιμικών συμβαμάτων, καθώς, όπως έχει ήδη αναφερθεί παραπάνω, η DAPT, η οποία περιλαμβάνει την ασπιρίνη και ένα ανταγωνιστή του P2Y<sub>12</sub>R, συνιστάται μετά από ACS και PCI.

Η μελέτη PLATO [301] συνέκρινε την τικαγρελόρη με την κλοπιδογρέλη σε ασθενείς με ACS και διαπίστωσε ότι είναι ανώτερη της κλοπιδογρέλης στη μείωση των μείζονων δυσμενών καρδιαγγειακών συμβαμάτων. Η τικαγρελόρη συσχετίστηκε επίσης με τη βελτίωση της θνησιμότητας όλων των αιτιών, σε σχέση με ότι παρατηρήθηκε σε άλλες μελέτες με τη χρήση διαφορετικών ανταγωνιστών του P2Y<sub>12</sub>R. Τα ποσοστά αιφνίδιου θανάτου, λοιμώξεων κατώτερου αναπνευστικού συστήματος, καθώς θανάτων που σχετίζονται με τη σηψαιμία ήταν χαμηλότερα στην ομάδα της τικαγρελόρης σε σύγκριση με την ομάδα της κλοπιδογρέλης [327–329]. Το συγκεκριμένο γεγονός οδήγησε στην υπόθεση ότι η τικαγρελόρη μπορεί να παρουσιάζει ακούσιες – «εκτός στόχου» – δράσεις, πέρα από



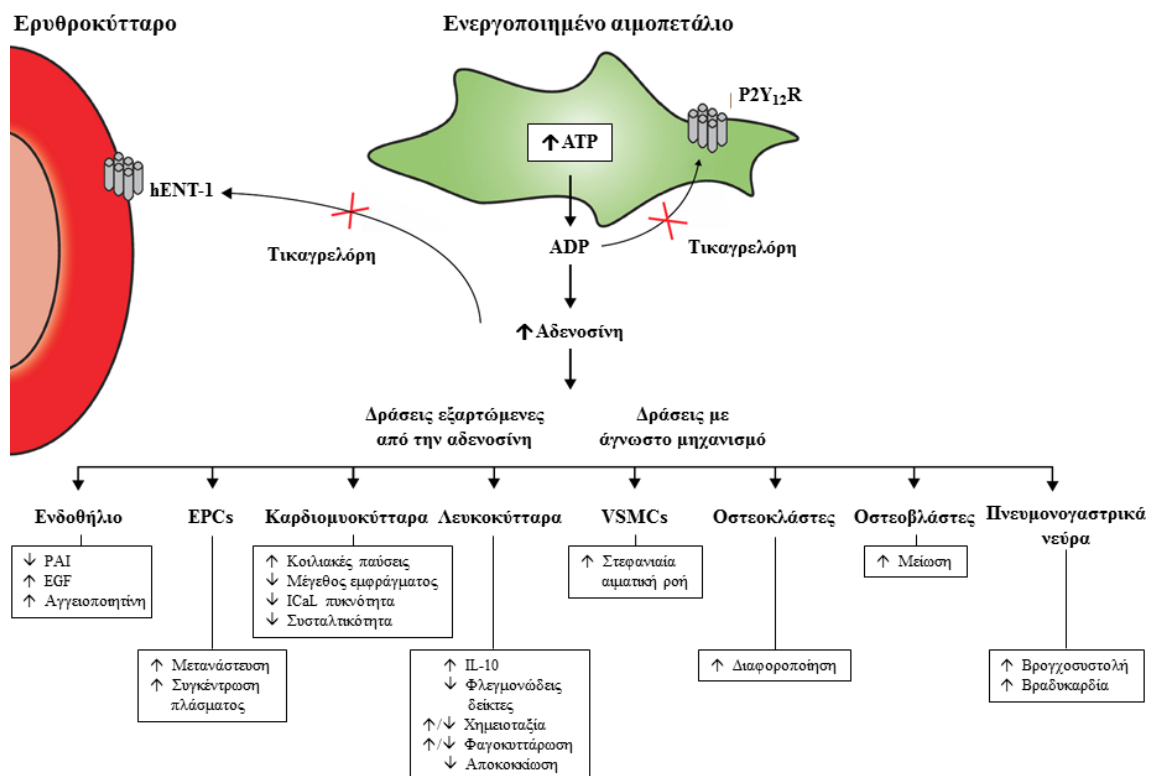
### *Τικαγρελόρη και Αδενοσίνη*

εκείνες που σχετίζονται με την πρόληψη της θρόμβωσης και πως αυτό μπορεί να σχετίζεται με την κλινική αποτελεσματικότητά της. Αυτό είχε σαν αποτέλεσμα την προσέλκυση πληθώρα ερευνών για τις πλειοτροπικές δράσεις της τικαγρελόρης.

Τα αποτελέσματα της μελέτης PLATO αγκαλιάστηκαν με αυξανόμενο ενδιαφέρον για τις μη αιμοπεταλιακές δράσεις της τικαγρελόρης. Η χορήγηση της τικαγρελόρης αποδείχθηκε ότι συσχετίζεται με την αυξημένη συγκέντρωση της αδενοσίνης, γεγονός το οποίο είναι αποτέλεσμα 1) της αναστολή της επαναπρόσληψης της αδενοσίνης παρεμποδίζοντας τον εξισορροπιστή μεταφορέα-1 νουκλεοσιδίων (ENT-1) [330] και 2) της αυξημένης απελευθέρωσης ATP, η οποία στη συνέχεια μπορεί να μετατραπεί σε αδενοσίνη [331]. Αν και είχε αποδειχθεί πως η τικαγρελόρη αυξάνει τα επίπεδα αδενοσίνης στον ορό μόνο σε υψηλότερες από τις πρότυπες δόσεις, αποδείχθηκε και περιγράφηκε μια ομοιότητα μεταξύ των πλειοτροπικών δράσεων που ασκούσε η τικαγρελόρη και εκείνων που διαμεσολαβούνται από την αδενοσίνη [332,333]. Το γεγονός αυτό οδήγησε στο συμπέρασμα πως μερικές πλειοτροπικές δράσεις της τικαγρελόρης επιτυγχάνονται μέσω μηχανισμών εξαρτώμενων από την αδενοσίνη. Δράσεις, οι οποίες προκαλούνται από την αυξημένη συγκέντρωση της αδενοσίνης και της διέγερσης των υποδοχέων της (ARs) συνοψίζονται στον **Πίνακα 3.2** [333]. Πιθανές εξαρτώμενες από την αδενοσίνη πλειοτροπικές δράσεις της τικαγρελόρης μαζί με τους πιθανούς υποκείμενους μηχανισμούς παρουσιάζονται στην **Εικ. 3.5**.

Πίνακας 3.2. Δράσεις επαγόμενες από τη διέγερση των ARs [334].

AR	Ρόλος της τικαγρελόρης	Επίδραση στην cAMP	C <sub>αδενοσίνης</sub>
A <sub>1</sub>	<ul style="list-style-type: none"> <li>σπασμός στεφανιαίων αγγείων</li> <li>προαγωγή χημειοταξίας/φαγοκυττάρωσης ουδετερόφιλων</li> <li>αρνητική χρονοτροπική δράση</li> <li>δύσπνοια</li> <li>μείωση ρυθμού σπειραματικής διήθησης</li> </ul>	μείωση	χαμηλή
A <sub>2A</sub>	<ul style="list-style-type: none"> <li>διαστολή στεφανιαίων αγγείων</li> <li>μετανάστευση EPCs</li> <li>αναστολή αιμοπεταλιακής ενεργοποίησης</li> <li>δύσπνοια</li> <li>αναστολή κυκλοφορίας ουδετερόφιλων, απελευθέρωση κοκκίων &amp; παραγωγή φλεγμονωδών διαμεσολαβητών</li> </ul>	αύξηση	χαμηλή
A <sub>2B</sub>	<ul style="list-style-type: none"> <li>διαστολή στεφανιαίων αγγείων</li> <li>αναστολή αιμοπεταλιακής ενεργοποίησης</li> <li>αναστολή κυκλοφορίας ουδετερόφιλων &amp; απελευθέρωση κοκκίων</li> <li>αναστολή παραγωγής φλεγμονωδών διαμεσολαβητών</li> </ul>	αύξηση	υψηλή
A <sub>3</sub>	<ul style="list-style-type: none"> <li>σπασμός στεφανιαίων αγγείων</li> <li>μετανάστευση EPCs</li> <li>προαγωγή χημειοταξίας/φαγοκυττάρωσης ουδετερόφιλων</li> </ul>	μείωση	χαμηλή



Εικ. 3.5. Υποκείμενοι μηχανισμοί των πιθανών πλειοτροπικών δράσεων της τικαγρελόρης (τροποποιημένη εικόνα από [334]).

## *Τικαγρελόρη και Αδενοσίνη*

Η πρώτη πλειοτροπική δράση που περιγράφηκε ήταν η μείωση του ποσοστού θνησιμότητας σε ασθενείς με ACS, οι οποίοι λάμβαναν τικαγρελόρη (υποομάδα της μελέτης PLATO) και εμφάνισαν σηψαιμία ή πνευμονική λοίμωξη [327]. Το συγκεκριμένο φαινόμενο προτάθηκε πως βασίζεται στη μείωση προφλεγμονωδών παραγόντων, οι οποίοι σχετίζονται με την αδενοσίνη, δρώντας στους  $A_{2A}AR$  και  $A_{2B}AR$ , καθώς και στη μειωμένη αιμοπεταλιακή αντιδραστικότητα, οδηγώντας στην πρόληψη της διάχυτης ενδοαγγειακής πήξης [335,336]. Σε μια άλλη μελέτη περιγράφηκε η αγγειοδιαστολή στεφανιαίων αρτηριών και η αυξημένη ταχύτητα στεφανιαίας ροής αίματος (CBFV) σε ασθενείς με NSTEMI, οι οποίοι είχαν υποβληθεί σε PCI. Η τικαγρελόρη παρουσίασε υψηλότερη αναλογία  $CBFV_{max}/CBFV_{baseline}$  σε σύγκριση με την πρασουγρέλη σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις ρυθμού έγχυσης αδενοσίνης, επιβεβαιώνοντας ότι η αυξημένη CBFV παρουσία της τικαγρελόρης σχετίζεται με την αναστολή της επαναπρόσληψης της αδενοσίνης [337]. Σε μια μελέτη που διεξήχθη σε διαβητικούς αρουραίους, η τικαγρελόρη σε συνδυασμό με τη ροσουβαστατίνη μείωσε το μέγεθος του εμφράγματος λόγω της ισχυρότερης εξαρτώμενης από την αδενοσίνη επαναιμάτωσης του μυοκαρδίου [338]. Έχει δειχθεί πως η τικαγρελόρη αυξάνει τη συγκέντρωση των  $CD34^+/CD133^+$  EPCs στο περιφερικό αίμα, τα οποία ευθύνονται για την ενδοθηλιακή αναγέννηση σε ασθενείς μετά από ACS [339]. Επίσης, έχει δειχθεί ότι η τικαγρελόρη αναστέλλει τη διαφοροποίηση των οστεοκλαστών και προάγει τη διαφοροποίηση των οστεοβλαστών διαμέσου του  $A_{2A}AR$  [340]. Μια άλλη πλειοτροπική δράση της τικαγρελόρης περιλαμβάνει τη μειωμένη έκφραση και δραστηριότητα του TF και του αναστολέα του ενεργοποιητή του πλασμινογόνου-1 στην αριστερή κοιλιακή απόφυση ενδοκαρδιακών κυττάρων απομονωμένα από ασθενείς με κοιλιακή μαρμαρυγή [341].

Η αυξημένη συγκέντρωση αδενοσίνης στον ορό φαίνεται να είναι υπεύθυνη και για τις ανεπιθύμητες δράσεις της τικαγρελόρης, όπως δύσπνοια, κοιλιακές παύσεις, βραδυκαρδία και βραδυαρρυθμίες. Η δύσπνοια κατά τη διάρκεια της χορήγησης της τικαγρελόρης και κατά τη διάρκεια της ταυτόχρονης έγχυσης αδενοσίνης επιβεβαιώθηκε σε πολλές μελέτες [342–344]. Η δύσπνοια προκαλείται από την αδενοσίνη, η οποία δρα στους  $A_1AR$  και  $A_{2A}AR$ , προκαλώντας βρογχοσύσπαση [345]. Η εμφάνιση δύσπνοιας ποικίλει μεταξύ των μελετών και εξαρτάται κυρίως από τη διάρκεια χορήγησης και τη δοσολογία της τικαγρελόρης. Η βραδυκαρδία, καθώς και οι κοιλιακές παύσεις, είναι παρενέργειες, οι οποίες οφείλονται στη διέγερση του  $A_1AR$ , ο οποίος εντοπίζεται στον καρδιακό ιστό [346]. Η βραδυκαρδία αναγνωρίζεται ως παρενέργεια όλων των από του στόματος ανταγωνιστών του  $P2Y_{12}R$ .

Ωστόσο, φαίνεται να εμφανίζεται συχνότερα παρουσία της τικαγρελόρης. Λόγω της χρονοτροπικής επίδρασης, η τικαγρελόρη μειώνει τον καρδιακό ρυθμό σε όλους τους ασθενείς, αλλά μόνο σε μερικές περιπτώσεις προκαλεί κλινικά σημαντική βραδυκαρδία. Για παράδειγμα, σε 300 ασθενείς με οξύ MI, η τικαγρελόρη συσχετίστηκε με διπλάσιο κίνδυνο βραδυκαρδίας από ότι η κλοπιδογρέλη [347]. Ωστόσο, δεν είναι γνωστό ποιο κλινικό περιστατικό, το οποίο περιγράφεται ως βραδυκαρδία, ικανοποιεί τον κλινικό της ορισμό, καθώς η επίπτωσή της ποικίλλει σημαντικά μεταξύ των μελετών (PHILO, PLATO, PEGASUS), όπου η συχνότητα της βραδυκαρδίας κυμαινόταν από 1,5% έως 7%. Σε μία υπομελέτη της μελέτης PLATO, το 5,8% των ασθενών ανέπτυξαν ασυμπτωματικές κοιλιακές παύσεις (>3s) κατά τη διάρκεια της πρώτης εβδομάδας θεραπείας, η οποία σταμάτησε με το χρόνο [348]. Στις μελέτες PHILO και PEGASUS η εμφάνιση των κοιλιακών παύσεων ήταν 0% και 1,6%, αντίστοιχα, καθιστώντας την κοιλιακή παύση μια κλινικά άσχετη επιπλοκή. Αξίζει να σημειωθεί ότι, σε μία περίπτωση, τόσο η βραδυκαρδία όσο και η δύσπνοια αναστράφηκαν χρησιμοποιώντας αμινοφυλλίνη, υποδηλώνοντας ότι η χορήγηση αμινοφυλλίνης μπορεί να εξουδετερώσει τις ανεπιθύμητες ενέργειες της τικαγρελόρης, οι οποίες σχετίζονται με την αδενοσίνη [349].

### **3.5. Αδενοσίνη και καρδιαγγειακό σύστημα**

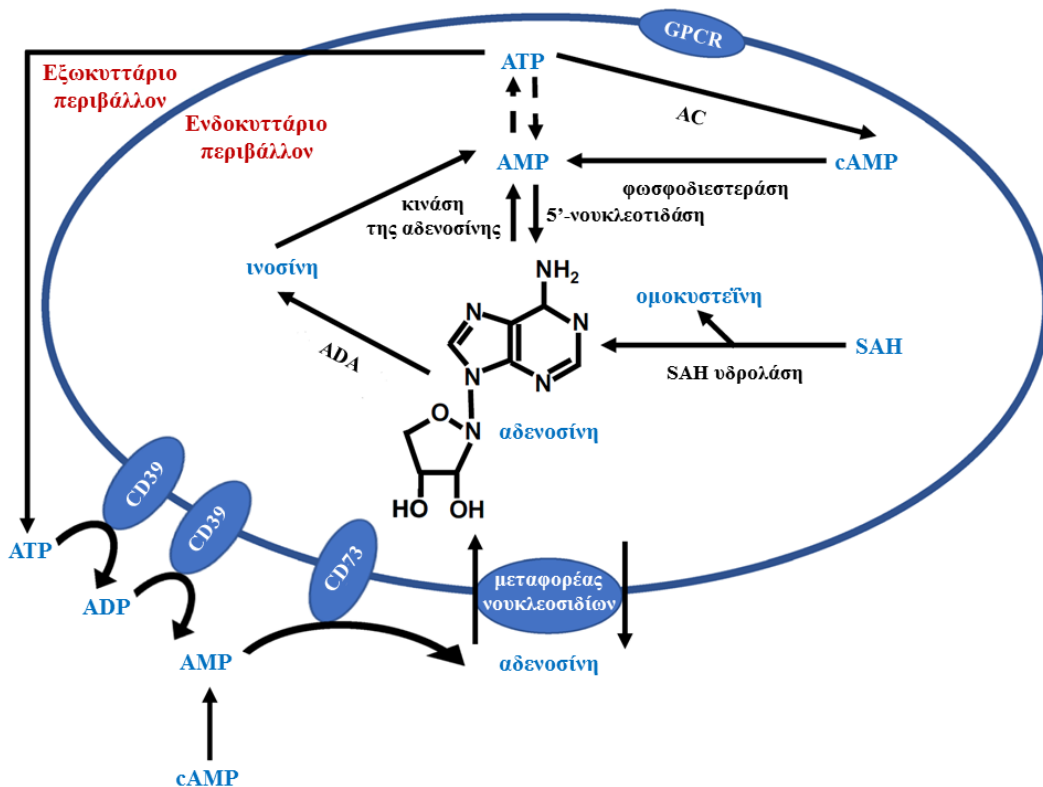
Η αδενοσίνη είναι ένα ενδογενές νουκλεοτίδιο με διάχυτη παρουσία στον οργανισμό και ασκεί πολλαπλές βιοχημικές δράσεις, οι οποίες εξυπηρετούν σημαντικούς ρόλους στην καρδιακή και αγγειακή βιολογία [350–352]. Είναι γνωστό ότι η αδενοσίνη ρυθμίζει λειτουργίες του μυοκαρδίου και της στεφανιαίας κυκλοφορίας, ενώ ασκεί και ισχυρές αγγειοδιασταλτικές δράσεις [353,354]. Η δράσεις της αδενοσίνης διαμεσολαβούνται κυρίως διαμέσου της αλληλεπίδρασής της με τους τέσσερις GPCRs, τους A<sub>1</sub>AR, A<sub>2A</sub>AR, A<sub>2B</sub>AR και A<sub>3</sub>AR (P1 υποδοχείς), οι οποίοι εκφράζονται σε διάφορα κύτταρα και ιστούς του σώματος.

#### **✚ Προέλευση και μεταβολισμός**

Η αδενοσίνη απελευθερώνεται στους ιστούς σε στιγμές κυτταρικού στρες, όπως υποξία, ισχαιμία και φλεγμονή. Με την ισχαιμική προσβολή, όταν οι μεταβολικές απαιτήσεις υπερβαίνουν την παροχή οξυγόνου, αυξάνονται ταχέως τα ενδογενή επίπεδα της αδενοσίνης [355]. Η κυτταρική υποξία αποτελεί ένα ισχυρό ερέθισμα για την απελευθέρωση της αδενοσίνης. Η αδενοσίνη σχηματίζεται διαμέσου αποφωσφορυλίωσης

### *Τικαργελόρη και Αδενοσίνη*

της ATP τόσο εντός όσο και εκτός του κυττάρου (**Εικ. 3.6**). Μπορεί να σχηματιστεί ενδοκυττάρια από την ATP, την ADP ή την AMP διαμέσου της δράσης της κυτταροπλασματικής 5'-νουκλεοτιδάσης ή εξωκυττάρια από την ATP ή την ADP διαμέσου διαδοχικών δράσεων της απυράσης (CD39), μια ATP-διφωσφοϋδρολάση, σχηματίζοντας την AMP και διαμέσου της εκτο-5'-νουκλεοτιδάσης (CD73), η οποία μετατρέπει την AMP σε αδενοσίνη. Η αδενοσίνη μπορεί επίσης να παραχθεί από την S-αδενοσυλο-ομοκυστεΐνη (SAH) διαμέσου της SAH υδρολάσης. Η αδενοσίνη είναι ικανή να ταξιδεύει διαμέσου των κυτταρικών μεμβρανών για να διατηρήσει την ισορροπία μεταξύ των ενδοκυττάρια και εξωκυττάρια συγκεντρώσεων της αδενοσίνης. Η εξωκυττάρια αδενοσίνη προσλαμβάνεται ταχέως εντός των κυττάρων διαμέσου των εξαρτώμενων και ανεξάρτητων από το νάτριο μεταφορέων για να μεταβλιστεί στη συνέχεια. Πολύ ταχεία πρόσληψη της αδενοσίνης λαμβάνει χώρα μέσω των ECs, των ερυθροκυττάρων και των γειτονικών ιστών, όπου η αδενοσίνη μπορεί να κινηθεί διαμέσου του χώρου της πλασματικής μεμβράνης και να χρησιμοποιηθεί εντός του κυττάρου. Μόλις προσληφθεί η αδενοσίνη από το ενδοθήλιο, φωσφορυλιώνεται από κινάσες της αδενοσίνης για να σχηματίσει AMP ή αποικοδομείται από τη δεαμινάση της αδενοσίνης (ADA) σε ινοσίνη. Υπό κανονικές φυσιολογικές συνθήκες, τα επίπεδα της εξωκυττάριας αδενοσίνης κυμαίνονται μεταξύ 20 και 300 nM, τα οποία μπορούν να αυξηθούν μέχρι 30 μM σε παθολογικές καταστάσεις, όπως ισχαιμία και τραυματισμός ιστού, ο οποίος οδηγεί σε κυτταρικό θάνατο [356]. Ο χρόνος ημιζωής της αδενοσίνης στο ανθρώπινο πλάσμα είναι πολύ μικρός και κυμαίνεται από 0,6 έως 1,5 sec. Ο σύντομος χρόνος ημιζωής αποδίδεται στην ταχεία εξάλειψη της αδενοσίνης από τον εξωκυττάρια χώρο, ο οποίος εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από τους μεταφορείς νουκλεοσιδίων. Η αδενοσίνη κινείται διαμέσου των συγκεκριμένων μεταφορέων επειδή είναι υδρόφιλη και δεν είναι διαπερατή στις κυτταρικές μεμβράνες. Οι δράσεις της αδενοσίνης τερματίζονται λόγω της πρόσληψης της στα κύτταρα από τους συγκεκριμένους μεταφορείς, οι οποίοι κατηγοριοποιούνται σε εξισορροπιστές και συγκεντρωτικούς μεταφορείς νουκλεοσιδίων (ENTs και CNTs, αντίστοιχα) [357,358].



Εικ. 3.6. Μεταβολισμός της αδενοσίνης και μεταφορά στο εξοκυττάριο περιβάλλον (τροποποιημένη εικόνα από [359]).

#### ✚ Υποδοχείς αδενοσίνης (ARs)

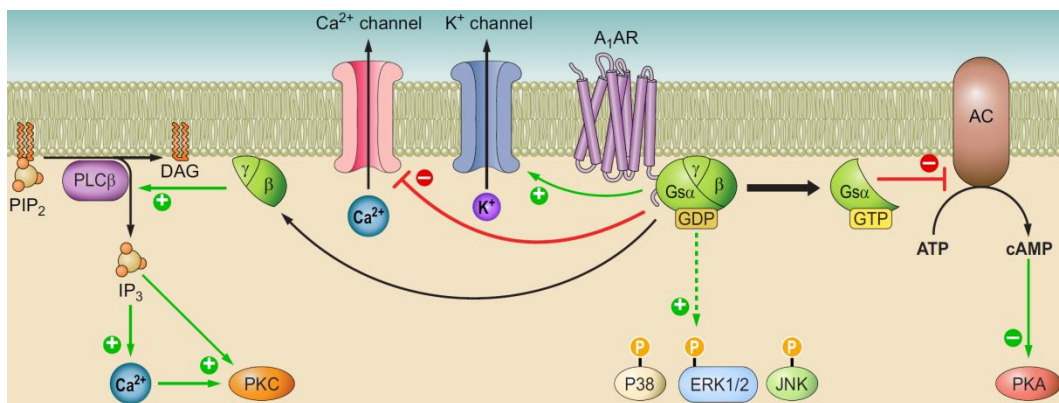
Όπως έχει ήδη αναφερθεί παραπάνω, η αδενοσίνη δρα διαμέσου τεσσάρων ARs, οι οποίοι κωδικοποιούνται από διακριτά γονίδια και διαφοροποιούνται με βάση τις συγγενείες τους για τους αγωνιστές και ανταγωνιστές της αδενοσίνης και ενεργοποιούνται από διαφορετικές κλίμακες ενδογενών συγκεντρώσεων αδενοσίνης. Οι ARs χαρακτηρίζονται από διαφορετική ιστική κατανομή, καθώς και από την υψηλή ή χαμηλή συγγένεια για το μητρικό μόριο.

#### 📖 A<sub>1</sub>AR και A<sub>3</sub>AR

Οι A<sub>1</sub>AR και A<sub>3</sub>AR εμφανίζουν υψηλή συγγένεια για την αδενοσίνη, ενώ είναι συζευγμένοι με G<sub>i</sub>- και G<sub>o</sub>-πρωτεΐνη, με αποτέλεσμα την αναστολή της AC οδηγώντας σε μείωση της cAMP. Ο A<sub>1</sub>AR εκφράζεται κυρίως στο κεντρικό νευρικό σύστημα [360], ενώ υψηλά επίπεδα εντοπίζονται στους κόλπους της καρδιάς, τους νεφρούς, το λιπώδη ιστό και το πάγκρεας, όπου προκαλεί αρνητικές χρονοτροπικές, ινοτροπικές και δρομοτροπικές δράσεις, μειώνει τη ροή του αίματος προς τους

## Τικαγρελόρη και Αδενοσίνη

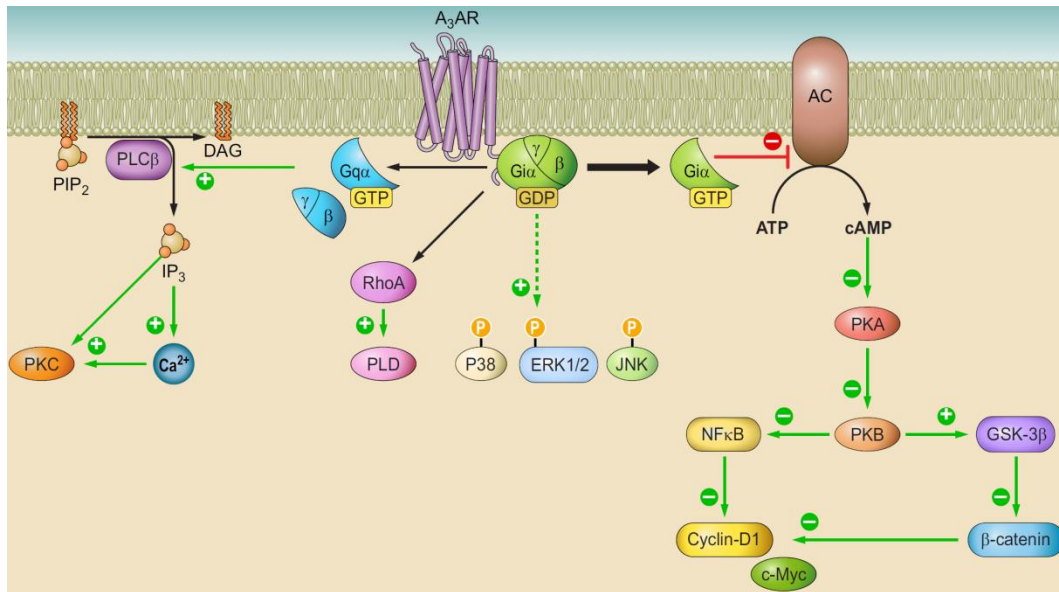
νεφρούς και την απελευθέρωση ρενίνης, και αναστέλλει τη λιπόλυση και την έκκριση ινσουλίνης, αντίστοιχα [361–363]. Ο συγκεκριμένος υποδοχέας εκφράζεται επίσης στα επιθηλιακά και λεία μυϊκά κύτταρα των αεραγωγών, όπου διεγείρει τη βρογχοσυστολή, και σε αρκετά κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος, όπως ουδετερόφιλα, ηωσινόφιλα, μακροφάγα και μονοκύτταρα, όπου προάγει προφλεγμονώδεις δράσεις [364,365]. Ο  $A_1AR$  επάγει την ενεργοποίηση της  $\beta$ -ισομορφής της φωσφολιπάσης C, αυξάνοντας έτσι την  $IP_3$  και τα ενδοκυττάρια επίπεδα του  $Ca^{2+}$ , διεγείροντας την εξαρτώμενη από το ασβέστιο PKC ή/και άλλες προσδεμένες στο ασβέστιο πρωτεΐνες. Περαιτέρω, έχει αναφερθεί η εμπλοκή του  $A_1AR$  στον ενδοκυττάριο φωσφορυλιωμένο καταρράκτη της MAPK οικογένειας [366] (Εικ. 3.7).



Εικ. 3.7. Σχηματική απεικόνιση των ενδοκυττάρων σηματοδοτικών μονοπατιών του  $A_1AR$  [367].

Ο  $A_3AR$  εκφράζεται ευρέως σε μια ποικιλία πρωτογενών κυττάρων, ιστών και κυτταρικών σειρών. Έχει αναφερθεί πως χαμηλά επίπεδα του υποδοχέα εντοπίζονται στον εγκέφαλο. Αν και είναι γνωστό ότι ο  $A_3AR$  έχει καρδιοπροστατευτικές δράσεις και πως εκφράζεται σε μεγάλο βαθμό στην στεφανιαία και καρωτιδική αρτηρία, η ακριβής του θέση στην καρδιά δεν έχει αναφερθεί ακόμα. Ωστόσο, σε περιφερικό επίπεδο ο  $A_3AR$  εντοπίζεται στους εντερικούς νευρώνες, καθώς και στα επιθηλιακά κύτταρα, το βλεννογόνο του παχέως εντέρου, το πνευμονικό παρέγχυμα και τους βρόγχους. Επιπλέον, ο συγκεκριμένος υποδοχέας έχει ευρεία κατανομή σε φλεγμονώδη κύτταρα [355]. Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι ο  $A_3AR$  υπερεκφράζεται σε αρκετά καρκινικά κύτταρα και ιστούς και επομένως είναι πιθανό να έχει σημαντικό αντικαρκινικό ρόλο [368]. Ο  $A_3AR$  ενεργοποιεί μια ποικιλία ενδοκυττάριας σηματοδότησης κατά προτίμηση με σύζευξη στις  $G_i$ -πρωτεΐνες,

διαμέσου τις οποίες μειώνονται τα επίπεδα της cAMP, με αποτέλεσμα την αναστολή της PKA, και σε υψηλές συγκεντρώσεις των αγωνιστών του A<sub>3</sub>AR, στις G<sub>q</sub>-πρωτεΐνες ή τις G<sub>βγ</sub>-υπομονάδες, αυξάνοντας έτσι τόσο τη φωσφολιπάση C όσο και το ασβέστιο. Είναι επίσης γνωστό πως ο A<sub>3</sub>AR ρυθμίζει τα σηματοδοτικά μονοπάτια των MAPK, PI3K/Akt και πυρηνικού μεταγραφικού παράγοντα (NF-κB), διαμέσου των οποίων ασκεί αντιφλεγμονώδεις δράσεις [369] (Εικ. 3.8).



Εικ. 3.8. Σχηματική απεικόνιση των ενδοκυττάρων σηματοδοτικών μονοπατιών του A<sub>3</sub>AR [367].

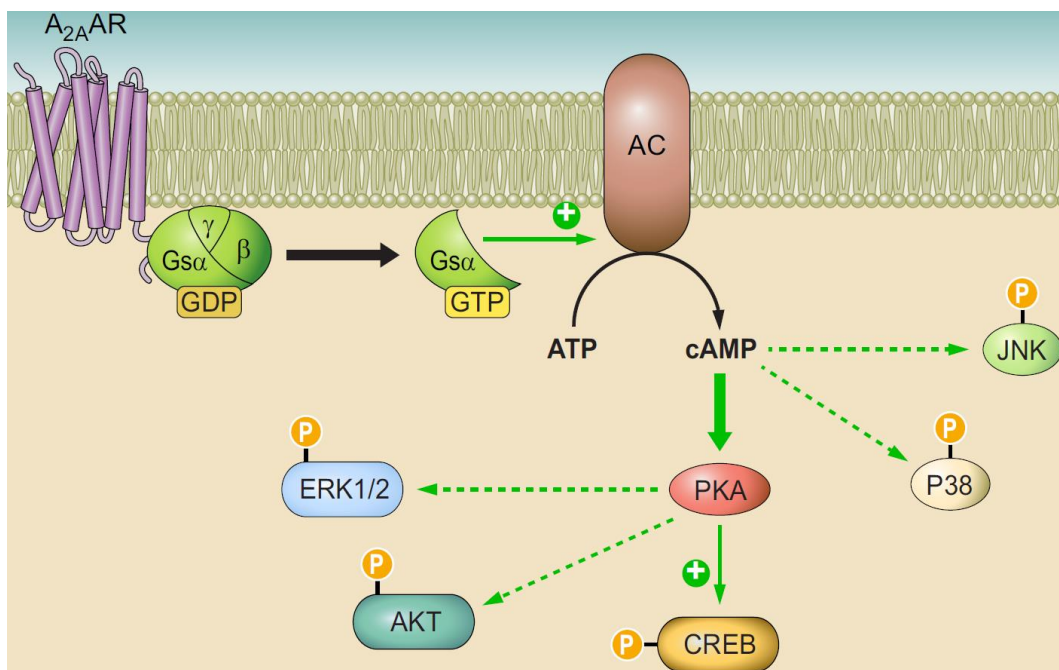
### A<sub>2A</sub>AR και A<sub>2B</sub>AR

Οι A<sub>2A</sub>AR και A<sub>2B</sub>AR είναι συζευγμένοι με G<sub>s</sub>-πρωτεΐνη, η οποία διεγείρει την AC και αυξάνει την cAMP, ωστόσο ο A<sub>2A</sub>AR εμφανίζει υψηλή συγγένεια προς την αδενοσίνη σε αντίθεση με τον A<sub>2B</sub>AR, ο οποίος εμφανίζει χαμηλή συγγένεια για την αδενοσίνη. Ο A<sub>2A</sub>AR εντοπίζεται τόσο κεντρικά όσο και περιφερικά, ωστόσο η μεγαλύτερη έκφρασή του βρίσκεται στο ραβδωτό σώμα, τον οσφρητικό σωλήνα και το ανοσοποιητικό σύστημα, ενώ χαμηλότερα επίπεδα εντοπίζονται στον εγκεφαλικό φλοιό, τον ιππόκαμπο, την καρδιά, τους πνεύμονες και τα αιμοφόρα αγγεία. Επιπλέον, ο A<sub>2A</sub>AR εκφράζεται τόσο στους προσυναπτικούς, όσο και στους μετασυναπτικούς νευρώνες, όπου ρυθμίζει μια σειρά λειτουργιών, οι οποίες σχετίζονται με τη διεγερτοτοξικότητα, τη γλοιακή αντιδραστικότητα, τη διαπερατότητα του αιματοεγκεφαλικού φραγμού και τη μετανάστευση των κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος. Στο περιφερικό ανοσοποιητικό σύστημα, ο A<sub>2A</sub>AR



### Τικαγρελόρη και Αδενοσίνη

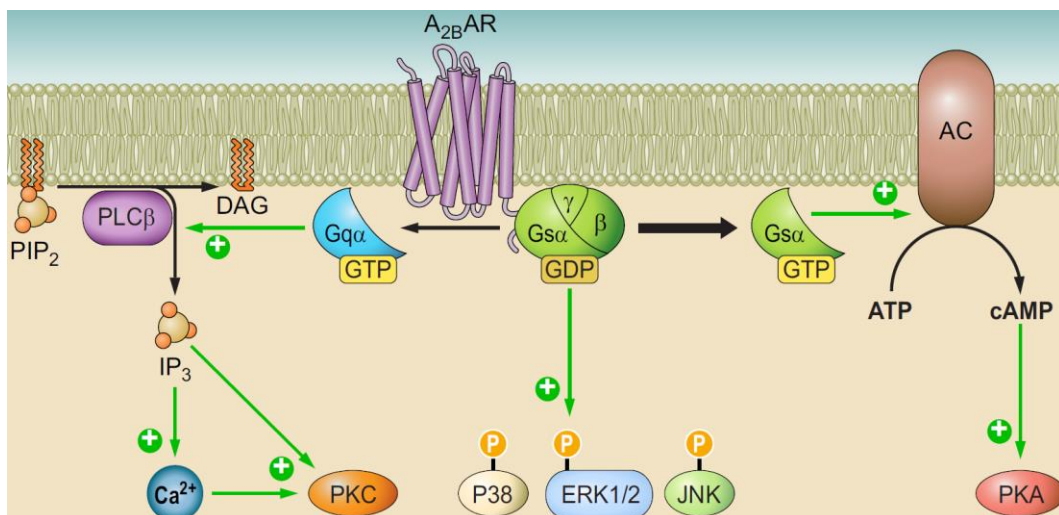
εκφράζεται ιδιαίτερος στα λευκοκύτταρα, τα αιμοπετάλια και την αγγείωση, όπου διαμεσολαβεί πολυάριθμες αντιφλεγμονώδεις, αντιθρομβωτικές και αγγειοδιασταλτικές δράσεις, αντίστοιχα [370]. Η εξαρτώμενη από την cAMP PKA αποτελεί τον πιο συνηθισμένο τελεστή, η οποία αυξάνεται με την ενεργοποίηση του  $A_{2A}AR$ , φωσφορυλιώνοντας και ενεργοποιώντας πολυάριθμες πρωτεΐνες, συμπεριλαμβανομένων υποδοχέων και φωσφοδιεστερασών [371]. Τέλος, έχει αναφερθεί πως ο  $A_{2A}AR$  εμπλέκεται στη διαμόρφωση της MAPK σηματοδότησης σε διαφορετικά κυτταρικά μοντέλα [372] (Εικ. 3.9).



Εικ. 3.9. Σχηματική απεικόνιση των ενδοκυττάρων σηματοδοτικών μονοπατιών του  $A_{2A}AR$  [367].

Ο  $A_{2B}AR$  εκφράζεται σε μεγάλο βαθμό περιφερικά, συμπεριλαμβανομένων του εντέρου, της ουροδόχου κύστης, των πνευμόνων, των σπερματικών πόρων, καθώς και σε διαφορετικούς κυτταρικούς τύπους συμπεριλαμβανομένων των ινοβλαστών, των λείων μυών κυττάρων, των ECs, των κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος, των κυψελιδικών επιθηλιακών κυττάρων, των κυττάρων χρωματοφίνης, των κυττάρων της γεύσης και των αιμοπεταλίων. Σε κεντρικό επίπεδο ο υποδοχέας εντοπίζεται στα αστροκύτταρα, τους νευρώνες και τα μικρογλοία [373,374], ενώ όλο ένα και περισσότερα στοιχεία υποδεικνύουν το ρόλο του στη ρύθμιση της φλεγμονής και των ανοσολογικών αποκρίσεων σε επιλεγμένες παθολογικές καταστάσεις, όπως τον καρκίνο και το διαβήτη, καθώς και σε νεφρικές, πνευμονικές και αγγειακές παθήσεις. Επιπλέον, σε διάφορες βλαβερές συνθήκες, όπως υποξία, φλεγμονή και κυτταρικό

στρες, ο  $A_{2B}AR$  αυξορρυθμίζει την έκφρασή του [375,376]. Τα σηματοδοτικά μονοπάτια του  $A_{2B}AR$  περιλαμβάνουν την ενεργοποίηση της AC οδηγώντας σε φωσφορυλίωση της PKA και εισαγωγή διαφόρων εξαρτώμενων από την cAMP τελεστών. Ενδιαφέρον παρουσιάζει ο ρόλος του  $A_{2B}AR$  στην ενίσχυση της σύζευξης των χασμοσυνδέσμων (gap junction coupling) διαμέσου του μονοπατιού της cAMP στα εγκεφαλικά μικροαγγειακά ECs [377]. Επιπλέον, ο  $A_{2B}AR$  μπορεί να διεγείρει τη φωσφολιπάση C διαμέσου της  $G_q$ -πρωτεΐνης, με αποτέλεσμα την κινητοποίηση του  $Ca^{2+}$ , ενώ μπορούν να ρυθμίσουν τους διαύλους ιόντων διαμέσου των  $\beta\gamma$  υπομονάδων τους. Επίσης, ο συγκεκριμένος υποδοχέας δρα ως διεγέρτης της ενεργοποίησης της MAPK σε αρκετά κυτταρικά μοντέλα τόσο σε κεντρικό όσο και σε περιφερικό σύστημα [378] (Εικ. 3.10).



Εικ. 3.10. Σχηματική απεικόνιση των ενδοκυττάρων σηματοδοτικών μονοπατιών του  $A_{2A}AR$  [367].

#### ✚ Δράσεις της αδενοσίνης σε κυτταρικό επίπεδο

Η αδενοσίνη είναι σε θέση να ρυθμίζει τον αγγειακό τόνο στο αρτηριακό δέντρο χαλαρώνοντας τους αρτηριακούς λείους μύες [379]. Η συγκεκριμένη χαλάρωση μειώνει την αγγειακή αντίσταση διευκολύνοντας έτσι τη ροή του αίματος και την παροχή οξυγόνου [380]. Οι δράσεις της αδενοσίνης στην στεφανιαία αιματική ροή θεωρείται ότι διαμεσολαβούνται κυρίως διαμέσου της ενεργοποίησης του  $A_{2A}AR$  [381]. Άλλοι ARs και μηχανισμοί μπορούν επίσης να συνεισφέρουν, ιδιαίτερα σε παθολογικές καταστάσεις, όπως το διαβήτη και την καρδιαγγειακή νόσο [382]. Επίσης, έχει προταθεί πως η αδενοσίνη δρα στο ενδοθήλιο για να προκαλέσει την απελευθέρωση του NO, το οποίο, με τη σειρά του, διαστέλλει τις στεφανιαίες αρτηρίες [382].

Ο αγγειακός τόνος ρυθμίζεται από την ενεργοποίηση των ARs κυρίως στα ECs και σε μικρότερο βαθμό στα VSMCs [383]. Τα ECs, τα οποία ευθυγραμμίζουν την κοιλιακή επιφάνεια των αιμοφόρων αγγείων, λειτουργούν ως ένα σύμπλοκο σύστημα μεταβολικά ενεργών οργάνων, το οποίο εμπλέκεται στη ρύθμιση της ροής του αίματος, την ανταλλαγή θρεπτικών ουσιών, τη διέλευση αποβλήτων και τον έλεγχο της θρόμβωσης/θρομβόλυσης [384]. Το ενδοθήλιο συμμετέχει ενεργά στη διατήρηση της αγγειακής ομοιόστασης με τον  $A_{2A}AR$ , ο οποίος εκφράζεται στα ECs, συμμετέχει στη συγκεκριμένη διαδικασία προκαλώντας αγγειοδιαστολή και αγγειακή χαλάρωση. Τόσο στα ανθρώπινα όσο και στα χοίρεια αρτηριακά ECs, ο  $A_{2A}AR$  αυξάνει την παραγωγή του αγγειοδιασταλτικού NO, ενώ ο  $A_1AR$  προκαλεί τη μείωση του. Η διέγερση του  $A_{2A}AR$  πυροδοτεί την ενεργοποίηση της eNOS, οδηγώντας σε αυξημένη σύνθεση NO στο ανθρώπινο ενδοθήλιο [385].

Όπως έχει ήδη αναφερθεί παραπάνω, ο  $A_{2B}AR$  έχει χαμηλή συγγένεια για την αδενοσίνη και ενεργοποιείται μόνο υπό παθολογικές συνθήκες, στις οποίες επιτυγχάνονται υψηλές συγκεντρώσεις, όπως στην ισχαιμία. Έλεγχος των μεταγραφικών επιπέδων των ARs στον καρδιακό ιστό σε άτομα με ισχαιμική καρδιακή νόσο έδειξε επιλεκτική επαγωγή του  $A_{2B}AR$  σε σύγκριση με υγιείς άτομα, το οποίο μπορεί να αποτελεί προσαρμογή του μυοκαρδίου στην ισχαιμία [386]. Παρόλο που υπάρχουν αντιφατικά αποτελέσματα σχετικά με την καρδιοπροστατευτική αξία του  $A_{2B}AR$ , ποντίκια, τα οποία δεν διέθεταν το συγκεκριμένο υποδοχέα, παρουσίασαν αυξημένη ευαισθησία στην ισχαιμία του μυοκαρδίου [387], ενώ οι αντιφλεγμονώδεις δράσεις του  $A_{2B}AR$  έχουν καθοριστική σημασία για τον περιορισμό της βλάβης [388]. Ο  $A_{2B}AR$  μπορεί επίσης να διαμεσολαβήσει τη διαστολή της στεφανιαίας αρτηρίας, ωστόσο η συμβολή του μπορεί να είναι ελάχιστη υπό κανονικές συνθήκες και πιο εμφανής σε καταστάσεις ασθενειών, όπως στο μεταβολικό σύνδρομο [389,390].

Τα ECs παράγουν αδενοσίνη όταν τραυματιστούν. Η αδενοσίνη δρα άμεσα στη λειτουργία του ενδοθηλιακού φραγμού, ο οποίος είναι πολύ σημαντικός για τη διατήρηση του αρτηριακού αυλού και την παρεμπόδιση της ανάπτυξης της αθηροσκλήρωσης. Οι επαγόμενες από φλεγμονή αυξήσεις της αγγειακής διαπερατότητας αμβλύνουν την αδενοσίνη, διατηρώντας έτσι τη διακυτταρική προσκόλληση και την αγγειακή ακεραιότητα [391,392]. Ωστόσο, ποιοι ARs εμπλέκονται στις συγκεκριμένες επιδράσεις στον ενδοθηλιακό φράγμα είναι ασαφείς και απαιτείται είτε ενεργοποίηση τόσο του

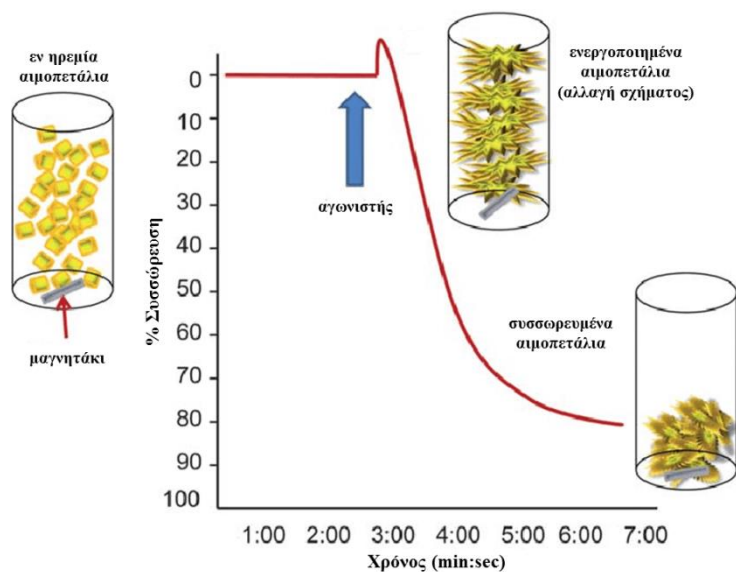
$A_{2A}AR$  όσο και του  $A_{2B}AR$  είτε μόνο του  $A_{2A}AR$  [393,394]. Η αδενοσίνη διεγείρει τον πολλαπλασιασμό των ECs, μια διαδικασία όπου εμπλέκεται ο  $A_{2B}AR$  [395,396]. Η σύνδεση του  $A_{2B}AR$  προάγει την παραγωγή αγγειογενετικών παραγόντων, συμπεριλαμβανομένου του VEGF [397,398]. *In vitro* μελέτες, οι οποίες περιελάμβαναν καλλιέργειες λείων μυϊκών κύτταρων στεφανιαίας αρτηρίας, έδειξαν ότι τα συγκεκριμένα κύτταρα εκφράζουν κυρίως τους  $A_1AR$  και  $A_{2B}AR$ , και σε συνδυασμό με πειράματα σίγασης του  $A_{2B}AR$ , αποδείχθηκε επιπλέον ότι οι αντι-πολλαπλασιαστικές δράσεις της αδενοσίνης διαμεσολαβούνται μέσω του  $A_{2B}AR$ , πιθανώς διαμέσου του AC/cAMP/PKA άξονα [399]. Ο περιορισμός του πολλαπλασιασμού των λείων μυϊκών κυττάρων διαμέσου της ενεργοποίησης του  $A_{2B}AR$  μπορεί να προστατεύσει από τη στένωση του αυλού και τη μετέπειτα βλάβη [400].



## 4<sup>ο</sup> Κεφάλαιο – Υλικά και Μέθοδοι

### 4.1. Συσσωρευομετρία οπτικής διαπερατότητας

Η συσσωρευομετρία οπτικής διαπερατότητας (LTA) αποτελεί ιστορική «gold standard» τεχνική για τη μέτρηση της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων σε πλάσμα πλούσιο σε αιμοπετάλια (PRP) ή πλυμένα αιμοπετάλια (WPs). Η μέθοδος βασίζεται στην ανίχνευση της διαφοράς της οπτικής διαπερατότητας, με τη χρήση ενός φωτόμετρου, μετά την προσθήκη ενός αιμοπεταλιακού αγωνιστή στο PRP ή τα WPs (Εικ. 4.1). Οι μετρήσεις παρέχουν μια καμπύλη συσσώρευσης, η οποία περιγράφει τις μεταβολές της οπτικής διαπερατότητας στα δείγματα. Τα δείγματα μπορούν να εκτεθούν σε ένα ευρύ φάσμα αγωνιστών, παρέχοντας μια εικόνα των διαφορετικών οδών αιμοπεταλιακής ενεργοποίησης/συσσώρευσης. Η μέγιστη έκταση της συσσώρευσης, εκφρασμένη σε ποσοστά, η φάση προσαρμογής και η κλίση της καμπύλης αποτελούν τις παραμέτρους οι οποίες προδιορίζονται συνήθως.



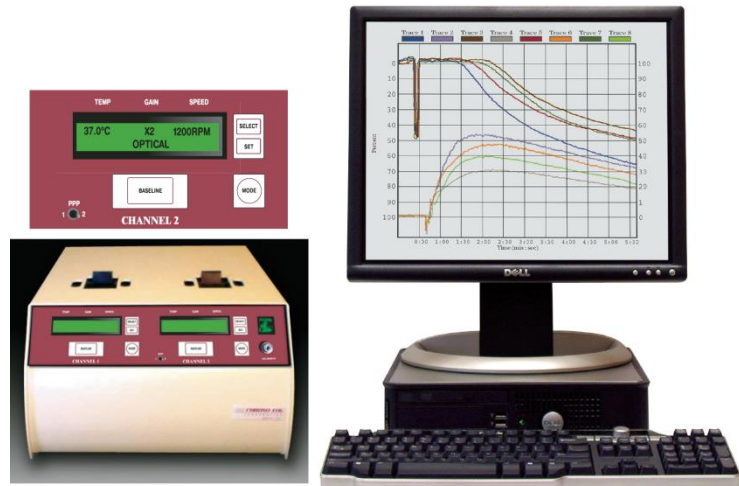
Εικ. 4.1. Αρχή μεθόδου της LTA

Η μέθοδος απαιτεί τη χρήση ενός ειδικού οργάνου, το οποίο ονομάζεται συσσωρευόμετρο, ένα φασματοφωτόμετρο σταθερού μήκους κύματος με μια ή τέσσερις θέσεις δειγμάτων, οι οποίες επιτρέπουν την ταυτόχρονη μέτρηση της συσσώρευσης σε τέσσερα διαφορετικά δείγματα (Εικ. 4.2). Κατά τη διάρκεια του πειράματος, τα δείγματα θερμαίνονται στους 37°C, προσομοιάζοντας τις *in vivo* συνθήκες, και αναδεύονται με ειδικό μαγνητάκι στις 1200 rpm, βοηθώντας στην παραγωγή διατμητικών δυνάμεων και την

## ***Υλικά και Μέθοδοι***

ανάδευση των αιμοπεταλίων. Μια ακτίνα υπέρυθρου φωτός, το οποίο ανιχνεύεται από φωτοδιόδους σιλικόνης, περνά μέσα από τις κυψελίδες, οι οποίες περιέχουν PRP ή WPs και ομόλογο πλάσμα φτωχό σε αιμοπετάλια (PPP) ή διάλυμα εναιώρησης (δείγμα και δείγμα αναφοράς, αντίστοιχα). Το φως, το οποίο περνάει από την κυψελίδα που περιέχει PRP ή WPs (πριν την προσθήκη του αγωνιστή) θεωρείται 0% διαπερατότητα ή συσσώρευση, ενώ το φως, το περνάει από την κυψελίδα που περιέχει PPP ή διάλυμα εναιώρησης θεωρείται 100% διαπερατότητα ή συσσώρευση. Η συσσωρευτική ικανότητα των αιμοπεταλίων κρίνεται βάσει των αλλαγών στην εκπομπή του φωτός, η οποία καταγράφεται φωτομετρικά και αναπαρίσταται ως κατερχόμενη καμπύλη. Η προσθήκη ενός αγωνιστή στο δείγμα προκαλεί αύξηση της αλληλεπίδρασης των αιμοπεταλίων, με αποτέλεσμα τη μεταβολή της διαπερατότητας του διαλύματος. Τα αιμοπετάλια, ανταποκρινόμενα στη προσθήκη του αγωνιστή, υφίστανται αλλαγή του σχήματος τους, οδηγώντας σε αύξηση του μεγέθους τους με αποτέλεσμα να επιτρέπεται να περάσει λιγότερο φως από την κυψελίδα, το οποίο καταγράφεται ως μικρότερη διαπερατότητα. Στη συνέχεια, τα αιμοπετάλια προσκολλώνται το ένα πάνω στο άλλο με αποτέλεσμα να σχηματίζονται συσσωματώματα, το οποίο καταγράφεται ως μεγαλύτερη διαπερατότητα, καθώς περνάει περισσότερο φως από την κυψελίδα. Η καταγραφή της συσσώρευσης *in vitro* χαρακτηρίζεται από την αλλαγή σχήματος των αιμοπεταλίων (μικρή ανερχόμενη καμπύλη και μείωση διαπερατότητας), τη μέγιστη αύξηση στη διαπερατότητα του φωτός, η οποία προκαλείται από τον αγωνιστή (% συσσώρευση), το ρυθμό της συσσώρευσης (% μεταβολή συσσώρευσης/min), την πρωτογενή συσσώρευση (κατερχόμενη καμπύλη και αύξηση διαπερατότητας), η οποία οδηγεί είτε σε αποσυσσώρευση (ανερχόμενη καμπύλη και αύξηση διαπερατότητας) είτε σε ένα σταθερό πλατό (ευθεία γραμμή και σταθερή διαπερατότητα) είτε περνά ένα πλατό και προχωρά στη δεύτερη φάση της συσσώρευσης (δευτερογενής συσσώρευση), η οποία συμβαίνει όταν τα αιμοπετάλια εκκρίνουν τα συστατικά των κοκκίων τους, τα οποία προκαλούν επιπρόσθετη συσσώρευση (δεύτερη κατερχόμενη καμπύλη και επιπρόσθετη αύξηση διαπερατότητας). Η καταγραφή της συσσώρευσης πραγματοποιείται για 5 min.

Εικ. 4.2. Διάταξη συσσωρευομέτρου.



## Αντιδραστήρια – Όργανα

### Αντιδραστήρια

- Ανυδρο κιτρικό οξύ ( $C_6H_8O_7$ , 192,13 g/mol, Merck)
- Διένυδρο κιτρικό νάτριο ( $C_6H_5Na_5O_7 \times 2H_2O$ , 294,10 g/mol, Merck)
- Ανυδρη D(+)-γλυκόζη ( $C_6H_{12}O_6$ , 180,16 g/mol, Fluka)
- Οξαλικό αμμώνιο [ $(NH_4)_2C_2O_4$ , 142,11 g/mol, Mallinckrodt]
- Απυράση (EC 3.6.1.5, Sigma)
- PGE<sub>1</sub> (EC Number 212-017-2, Sigma)
- Απόλυτη αιθανόλη [abs. EtOH ( $C_2H_5OH$ , 46,07 g/mol, Merck)]
- Χλωριούχο νάτριο (NaCl, 58,44 g/mol, Sigma)
- Χλωριούχο κάλιο (KCl, 74,56 g/mol, Sigma)
- Διένυδρο χλωριούχο ασβέστιο ( $CaCl_2 \times 2H_2O$ , 147 g/mol, Sigma)
- Εξαένυδρο χλωριούχο μαγνήσιο ( $MgCl_2 \times 6H_2O$ , 203,31 g/mol, Sigma)
- HEPES ( $C_{18}H_{18}N_2O_4S$ , 238,31 g/mol, Sigma)
- Όξινο ανθρακικό νάτριο ( $NaHCO_3$ , 84,01 g/mol, Fluka)
- Χλωριούχο ασβέστιο ( $CaCl_2$ , 110,99 g/mol, Merck)
- Διφωσφορική αδενοσίνη [ADP ( $C_{10}H_{15}N_5O_{10}P_2$ ) 427,201 g/mol, Chrono-Log]
- Πεπτίδιο-ενεργοποιητή του υποδοχέα της θρομβίνης-6 [TRAP-6 ( $C_{34}H_{56}N_{10}O_9$ , 748,87 g/mol, Bachem)]



## Υλικά και Μέθοδοι

- Αραχιδονικό οξύ [AA ( $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4(\text{CH}=\text{CHCH}_2)_4\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}_2\text{H}$ , 304,47 g/mol, Sigma)].
- Κολλαγόνο (Chrono-Log)
- Θρομβίνη (EC 3.4.21.5, Sigma)
- Αλβουμίνη βόειου ορού [BSA (EC Number 232-936-2, Sigma)]
- Διμεθυλοσουλφοξείδιο [DMSO ( $\text{C}_2\text{H}_6\text{OS}$ , 78,13 g/mol, Carloerba)]
- Τικαργελόρη ( $\text{C}_{23}\text{H}_{28}\text{F}_2\text{N}_6\text{O}_4\text{S}$ , 522,6 g/mol, AstraZeneca)
- Αδενοσίνη ( $\text{C}_{10}\text{H}_{13}\text{N}_5\text{O}_4$ , 267,24 g/mol, Sigma)
- SCH58621 [ $\text{A}_{2A}\text{AR}$  ανταγωνιστής ( $\text{C}_{18}\text{H}_{15}\text{N}_7\text{O}$ , 345,36 g/mol, Tocris)]
- MRS1706 [ $\text{A}_{2B}\text{AR}$  αντιστρεπτός αγωνιστής και ανταγωνιστής ( $\text{C}_{27}\text{H}_{29}\text{N}_5\text{O}_5$ , 503,56 g/mol, Tocris)]
- DPCPX [ $\text{A}_1\text{AR}$  ανταγωνιστής ( $\text{C}_{16}\text{H}_{24}\text{N}_4\text{O}_2$ , 304,39 g/mol, Sigma)]
- MRS1220 [ $\text{A}_3\text{AR}$  ανταγωνιστής ( $\text{C}_{21}\text{H}_{14}\text{ClN}_5\text{O}_2$ , 403,83 g/mol, Tocris)]

## ■ Όργανα

- Φυγόκεντρος πάγκου Rotofix 32 (Hettich)
- Αιματοκυτόμετρο Neubauer
- Οπτικό μικροσκόπιο (Olympus CX41)
- Συσσωρευόμετρο 700-4DR (Chrono-Log)
- Λογισμικό Aggrolink8 (Chrono-Log)
- Γυάλινες κυψελίδες (Chrono-Log)
- Μαγνητάκια (Chrono-Log)


## Διαλύματα εργασίας

### ■ Αντιπηκτικό διάλυμα κιτρικών αλάτων (ACD)

- 0,8% w/v  $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$
- 2,2% w/v  $\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_5\text{O}_7 \times 2\text{H}_2\text{O}$
- 2,5% w/v  $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$

Το διάλυμα διατηρείται στους 4°C για 1 μήνα.

#### Διάλυμα $(\text{NH}_4)_2\text{C}_2\text{O}_4$

 1% w/v  $(\text{NH}_4)_2\text{C}_2\text{O}_4$

Το διάλυμα αποθηκεύεται στους 4°C.

#### Διάλυμα απυράσης


Η εμπορικά διαθέσιμη συσκευασία περιέχει απυράση σε λυοφιλοποιημένη μορφή, η οποία διαλύεται σε φυσιολογικό ορό δίνοντας διάλυμα τελικής συγκέντρωσης 100 U/mL. Το διάλυμα μοιράζεται σε erpendorfs, τα οποία αποθηκεύονται στους -80°C.

#### Διάλυμα $\text{PGE}_1$


Η εμπορικά διαθέσιμη συσκευασία περιέχει  $\text{PGE}_1$  σε λυοφιλοποιημένη μορφή, η οποία διαλύεται σε abs. EtOH δίνοντας διάλυμα τελικής συγκέντρωσης 2 mM. Το διάλυμα μοιράζεται σε erpendorfs, τα οποία αποθηκεύονται στους -80°C.

#### Διάλυμα έκπλυσης αιμοπεταλίων pH 6,5 (10X)


 6% w/v NaCl

 0,373% w/v KCl

 0,9% w/v  $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$


 6,912% w/v  $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$


 0,294% w/v  $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$

 0,203% w/v  $\text{MgCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$

Το διάλυμα μοιράζεται σε όγκους των 10 mL, τα οποία αποθηκεύονται στους -20°C. Πριν από τη χρήση το διάλυμα αραιώνεται (1X) και ρυθμίζεται το pH στο 6,5. Το διάλυμα (1X) διατηρείται για 2 βδομάδες στους 4°C.


#### Διάλυμα εναιώρησης αιμοπεταλίων pH 7,35 (10X)

 8,18% w/v NaCl

 0,22% w/v KCl

 1,8% w/v  $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$

 0,1% w/v  $\text{MgCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$

 2,38% w/v HEPES

 0,42% w/v  $\text{NaHCO}_3$

Το διάλυμα μοιράζεται σε όγκους των 5 mL, τα οποία αποθηκεύονται στους -20°C. Πριν από τη χρήση το διάλυμα αραιώνεται (1X) και ρυθμίζεται το pH στο 7,35. Το διάλυμα (1X) διατηρείται για 2 βδομάδες στους 4°C.

## Υλικά και Μέθοδοι

### ■ Διάλυμα CaCl<sub>2</sub>

■ 1 M CaCl<sub>2</sub>

Το διάλυμα αποθηκεύεται στους 4°C.

### ■ Διάλυμα φυσιολογικού ορού (saline)

■ 0,9% w/v NaCl

Το διάλυμα αποθηκεύεται σε RT.

### ■ Διάλυμα ADP

Η εμπορικά διαθέσιμη συσκευασία περιέχει ADP σε λυοφιλοποιημένη μορφή, η οποία διαλύεται σε 0,9% NaCl δίνοντας διάλυμα τελικής συγκέντρωσης 5 mM. Το διάλυμα μοιράζεται σε eppendorfs, τα οποία αποθηκεύονται στους -80°C.

### ■ Διάλυμα TRAP-6

Η εμπορικά διαθέσιμη συσκευασία περιέχει TRAP-6 σε λυοφιλοποιημένη μορφή, η οποία διαλύεται σε 0,9% NaCl δίνοντας διάλυμα τελικής συγκέντρωσης 5 mM. Το διάλυμα μοιράζεται σε eppendorfs, τα οποία αποθηκεύονται στους -80°C.

### ■ Διάλυμα AA

Η εμπορικά διαθέσιμη συσκευασία περιέχει AA σε υγρή μορφή, η οποία διαλύεται σε abs. EtOH δίνοντας διάλυμα τελικής συγκέντρωσης 50 mM. Το διάλυμα μοιράζεται σε eppendorfs, τα οποία αποθηκεύονται στους -80°C.

### ■ Διάλυμα κολλαγόνου

Από την εμπορικά διαθέσιμη συσκευασία 1 mg/mL κολλαγόνου διαλύονται σε ισοτονικό διάλυμα γλυκόζης (C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>O<sub>6</sub>) pH 2,7.

### ■ Διάλυμα BSA

■ 0,1% w/v BSA

Το διάλυμα μοιράζεται σε όγκους των 5 mL, τα οποία αποθηκεύονται στους -20°C.

### ■ Διάλυμα θρομβίνης

Η εμπορικά διαθέσιμη συσκευασία περιέχει θρομβίνη σε λυοφιλοποιημένη μορφή, η οποία διαλύεται σε 0,1% BSA δίνοντας διάλυμα τελικής συγκέντρωσης 100 U/mL. Το διάλυμα μοιράζεται σε eppendorfs, τα οποία αποθηκεύονται στους -20°C.

**■ Διάλυμα τικαγρελόρης**

20 mg τικαγρελόρης διαλύθηκαν σε 3,827 mL DMSO δίνοντας διάλυμα τελικής συγκέντρωσης 10 mM. Το διάλυμα μοιράστηκε σε eppendorfs, τα οποία αποθηκεύθηκαν στους -80°C.

**■ Διάλυμα αδενοσίνης**

Κατάλληλη ποσότητα αδενοσίνης διαλύεται σε DMSO δίνοντας διάλυμα τελικής συγκέντρωσης 200 mM. Το διάλυμα μοιράστηκε σε eppendorfs, τα οποία αποθηκεύθηκαν στους -80°C.

**■ Διάλυμα SCH58621**

Η εμπορικά διαθέσιμη συσκευασία περιέχει SCH58621 σε λυοφιλοποιημένη μορφή, η οποία διαλύεται σε DMSO δίνοντας διάλυμα τελικής συγκέντρωσης 10 mM. Το διάλυμα μοιράζεται σε eppendorfs, τα οποία αποθηκεύονται στους -80°C.

**■ Διάλυμα MRS1706**

Η εμπορικά διαθέσιμη συσκευασία περιέχει MRS1706 σε λυοφιλοποιημένη μορφή, η οποία διαλύεται σε DMSO δίνοντας διάλυμα τελικής συγκέντρωσης 5 mM. Το διάλυμα μοιράζεται σε eppendorfs, τα οποία αποθηκεύονται στους -80°C.

**■ Διάλυμα DPCPX**

Η εμπορικά διαθέσιμη συσκευασία περιέχει DPCPX σε λυοφιλοποιημένη μορφή, η οποία διαλύεται σε DMSO δίνοντας διάλυμα τελικής συγκέντρωσης 30 mM. Το διάλυμα μοιράζεται σε eppendorfs, τα οποία αποθηκεύονται στους -80°C.

**■ Διάλυμα MRS1220**

Η εμπορικά διαθέσιμη συσκευασία περιέχει MRS1220 σε λυοφιλοποιημένη μορφή, η οποία διαλύεται σε DMSO δίνοντας διάλυμα τελικής συγκέντρωσης 10 mM. Το διάλυμα μοιράζεται σε eppendorfs, τα οποία αποθηκεύονται στους -80°C.

**Πειραματική πορεία – Παρασκευή PRP**

1. Συλλογή περιφερικού φλεβικού αίματος σε πλαστικούς φυγοκεντρικούς σωλήνες πολυαιθυλενίου, οι οποίοι περιέχουν ACD (1:9).
2. Φυγοκέντρηση δειγμάτων στα 120×g για 15 min σε RT.

## Υλικά και Μέθοδοι

3. Συλλογή των 2/3 του υπερκειμένου, το οποίο αποτελεί το PRP.
4. Φυγοκέντρηση υπόλοιπων δειγμάτων στα  $1500\times g$  για 15 min σε RT.
5. Συλλογή υπόλοιπου υπερκειμένου, το οποίο αποτελεί το PPP.
6. Μέτρηση αριθμού αιμοπεταλίων:
  - i. Αραίωση PRP σε 1%  $(\text{NH}_4)_2\text{C}_2\text{O}_4$  (1:20).
  - ii. Τοποθέτηση 10  $\mu\text{L}$  του παραπάνω εναιωρήματος σε κάθε εσοχή της πλάκας Neubauer.
  - iii. Επώαση της πλάκας Neubauer που τοποθετείται σε τρυβλίο Petri για 15 min.
  - iv. Μέτρηση αιμοπεταλίων στην πλάκα Neubauer σε οπτικό μικροσκόπιο φωτεινού πεδίου (40X).

$$C_{\text{plts}} = \text{άθροισμα αιμοπεταλίων στα 5 μεσαία τετράγωνα} \times 1000 \text{ (plts}/\mu\text{L)}$$

7. Υπολογισμός συγκέντρωσης αιμοπεταλίων στις  $250\times 10^3$  plts/ $\mu\text{L}$ .

$$C_{\text{αρχ.}} \times V_{\text{PRP}} = C_{\text{τελ.}} \times (V_{\text{PRP}} + V_{\text{PPP}})$$

8. Μέτρηση στο συσσωρευόμετρο.

## Πειραματική πορεία – Παρασκευή WPs (τροποποιημένη μέθοδος Mustard)

1. Συλλογή περιφερικού φλεβικού αίματος σε πλαστικούς φυγοκεντρικούς σωλήνες πολυαιθυλενίου, οι οποίοι περιέχουν ACD (1:9).
2. Προσθήκη 1 U/mL απυράση και 1  $\mu\text{M}$   $\text{PGE}_1$  στα δείγματα.
3. Φυγοκέντρηση δειγμάτων στα  $120\times g$  για 15 min σε RT.
4. Συλλογή υπερκειμένου, το οποίο αποτελεί το PRP.
5. Συμπλήρωση μέχρι 10 mL με διάλυμα έκπλυσης (1X) pH 6,5 και προσθήκη 0,015 U/mL απυράση και 0,1  $\mu\text{M}$   $\text{PGE}_1$  στα δείγματα.
6. Φυγοκέντρηση δειγμάτων στα  $975\times g$  για 12 min σε RT.
7. Προετοιμασία 10 mL διαλύματος έκπλυσης (1X) pH 6,5 και προσθήκη 0,015 U/mL απυράση και 0,1  $\mu\text{M}$   $\text{PGE}_1$ .
8. Απόχυση υπερκειμένου και επαναιώρηση ιζήματος με το παραπάνω διάλυμα.
9. Φυγοκέντρηση δειγμάτων στα  $975\times g$  για 12 min σε RT.

10. Απόχυση υπερκειμένου και επαναιώρηση ιζήματος με διάλυμα εναιώρησης (1X) pH 7,35 (ο όγκος που προστίθεται ισούται με το 1/3 του PRP).
11. Μέτρηση αριθμού αιμοπεταλίων:
- Αραίωση εναιωρήματος αιμοπεταλίων σε 1%  $(\text{NH}_4)_2\text{C}_2\text{O}_4$  (1:20).
  - Τοποθέτηση 10  $\mu\text{L}$  του παραπάνω εναιωρήματος σε κάθε εσοχή της πλάκας Neubauer.
  - Επώαση της πλάκας Neubauer που τοποθετείται σε τρυβλίο Petri για 15 min.
  - Μέτρηση αιμοπεταλίων στην πλάκα Neubauer σε οπτικό μικροσκόπιο φωτεινού πεδίου (40X).

$$C_{\text{plts}} = \text{άθροισμα αιμοπεταλίων στα 5 μεσαία τετράγωνα} \times 1000 \text{ (plts}/\mu\text{L)}$$

12. Υπολογισμός συγκέντρωσης αιμοπεταλίων στις  $250 \times 10^3$  plts/ $\mu\text{L}$ .

$$C_{\text{αρχ.}} \times V_{\text{WPs}} = C_{\text{τελ.}} \times (V_{\text{WPs}} + V_{\Delta/\mu\alpha \text{ εναιώρησης}})$$

13. Προσθήκη 1 mM  $\text{CaCl}_2$  στα δείγματα και επώαση αυτών για 15 min σε RT.
14. Μέτρηση στο συσσωρευόμετρο.

### Πειραματική πορεία – Ρύθμιση και χρήση οργάνου

- Άνοιγμα συσσωρευομέτρου 15 min πριν τη μέτρηση για να φτάσει η θερμοκρασία του οργάνου στους  $37^\circ\text{C}$ .
- Επιλογή λειτουργίας «OPTICAL».
- Προσθήκη 500  $\mu\text{L}$  PPP ή διαλύματος εναιωρήματος σε γυάλινη κυψελίδα (χωρίς μαγνητάκι) και τοποθέτηση κυψελίδας στη θέση «POOR» του οργάνου (το δείγμα παραμένει στη συγκεκριμένη θέση μέχρι το τέλος του πειράματος).
- Προσθήκη 500  $\mu\text{L}$  PRP ή WPs σε γυάλινη κυψελίδα (με μαγνητάκι) και τοποθέτηση κυψελίδας στη θέση «RICH» του οργάνου.
- Μέτρηση της συσσώρευσης μετά την προσθήκη αγωνιστή:
  - 10  $\mu\text{M}$  ADP (μόνο σε PRP)
  - 10  $\mu\text{M}$  TRAP-6 (σε PRP και WPs)
  - 0,5 mM AA (σε PRP και WPs)

## Υλικά και Μέθοδοι

- iv. 5 µg/mL κολλαγόνο (σε PRP και WPs)
- v. 0,1 U/mL θρομβίνη (μόνο σε WPs)

### Πειραματική πορεία – Μελέτη της δράσης της τικαγρελόρης και της αδενοσίνης, καθώς και της δράσης των ανταγωνιστών των ARs στη συσσώρευση του PRP ή των WPs

#### ■ Μελέτη της δράσης της τικαγρελόρης

1. Επώαση 500 µL PRP ή WPs με διάφορες συγκεντρώσεις τικαγρελόρης (έως 4 µM) για 2 min στους 37°C (1200 rpm).
2. Προσθήκη αγωνιστή στους 37°C (1200 rpm).  
Ως τυφλό δείγμα χρησιμοποιήθηκε 0,4% DMSO.
3. Καταγραφή καμπύλης συσσώρευσης για 5 min.
4. Υπολογισμός αναστολής και IC<sub>50</sub>.

$$\% \text{Αναστολή} = [(\text{Τυφλό δείγμα} - \text{Δείγμα}) / \text{Τυφλό δείγμα}] \times 100$$

#### ■ Μελέτη της δράσης της αδενοσίνης

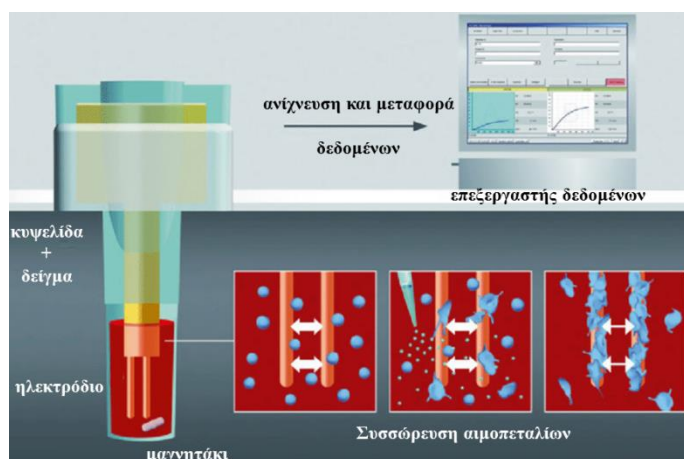
1. Επώαση 500 µL PRP ή WPs με διάφορες συγκεντρώσεις αδενοσίνης (έως 20 µM) για 1 min στους 37°C (1200 rpm). Επίσης, προ-επώαση ορισμένων δειγμάτων με διάφορες συγκεντρώσεις SCH58621 (έως 10 µM), MRS1706 (έως 20 µM), DPCPX (έως 60 µM) ή MRS1220 (έως 40 µM) για 5 min στους 37°C (1200 rpm) πριν την επώαση των δειγμάτων με 20 µM αδενοσίνη
2. Προσθήκη αγωνιστή στους 37°C (1200 rpm).  
Ως τυφλό δείγμα χρησιμοποιήθηκε 0,4% DMSO.
3. Καταγραφή καμπύλης συσσώρευσης για 5 min.
4. Υπολογισμός αναστολής και IC<sub>50</sub>.

$$\% \text{Αναστολή} = [(\text{Τυφλό δείγμα} - \text{Δείγμα}) / \text{Τυφλό δείγμα}] \times 100$$

## 4.2. Συσσωρευομετρία εμπέδησης

Η συσσωρευομετρία εμπέδησης (IA) είναι μια μη οπτική μέθοδος, η οποία μετρά τη μεταβολή της ηλεκτρικής αντίστασης μεταξύ δύο ηλεκτροδίων όταν η συσσώρευση των

αιμοπεταλίων επάγεται από έναν αγωνιστή. Η αρχή της μεθόδου είναι παρόμοια με εκείνη της LTA, εκτός από το ότι η ΙΑ πραγματοποιείται σε ολικό αίμα, αποφεύγοντας με αυτόν τον τρόπο την ανάγκη παρασκευής εναιωρήματος αιμοπεταλίων. Τα αιμοπετάλια συσσωρεύονται πάνω στη μονοστοιβάδα των αιμοπεταλίων, η οποία βρίσκεται προσκολλημένη στα στερεωμένα ηλεκτρόδια, καθώς εφαρμόζεται μια τάση εναλλασσόμενου ρεύματος (mV), με αποτέλεσμα την αύξηση της ηλεκτρικής εμπέδησης (Εικ. 4.3). Η συσσώρευση των αιμοπεταλίων αξιολογείται από την αύξηση της ηλεκτρικής εμπέδησης, η οποία καταγράφεται σε Ohms.



Εικ. 4.3. Αρχή μεθόδου της ΙΑ.

## Αντιδραστήρια – Όργανα

### Αντιδραστήρια

- ▣ Άνυδρο κιτρικό οξύ ( $C_6H_8O_7$ , 192,13 g/mol, Merck)
- ▣ Διένυδρο κιτρικό νάτριο ( $C_6H_5Na_5O_7 \times 2H_2O$ , 294,10 g/mol, Merck)
- ▣ Άνυδρη D(+)-γλυκόζη ( $C_6H_{12}O_6$ , 180,16 g/mol, Fluka)
- ▣ Απόλυτη αιθανόλη [abs. EtOH ( $C_2H_5OH$ , 46,07 g/mol, Merck)]
- ▣ Χλωριούχο νάτριο (NaCl, 58,44 g/mol, Sigma)
- ▣ Διφωσφορική αδενοσίνη [ADP ( $C_{10}H_{15}N_5O_{10}P_2$ ) 427,201 g/mol, Chrono-Log]
- ▣ Πεπτίδιο-ενεργοποιητή του υποδοχέα της θρομβίνης-6 [TRAP-6 ( $C_{34}H_{56}N_{10}O_9$ , 748,87 g/mol, Bachem)]
- ▣ Αραχιδονικό οξύ [AA ( $CH_3(CH_2)_4(CH=CHCH_2)_4CH_2CH_2CO_2H$ , 304,47 g/mol, Simga)].
- ▣ Κολλαγόνο (Chrono-Log)



## Υλικά και Μέθοδοι

- ☐ Διμεθυλοσουλφοξείδιο [DMSO ( $C_2H_6OS$ , 78,13 g/mol, Carloerba)]
- ☐ Τικαγρελόρη ( $C_{23}H_{28}F_2N_6O_4S$ , 522,6 g/mol, AstraZeneca)
- ☐ Αδενοσίνη ( $C_{10}H_{13}N_5O_4$ , 267,24 g/mol, Sigma – A4036)
- ☐ Διπυριδαμόλη ( $C_{24}H_{40}N_8O_4$ , 504,63 g/mol, Sigma)
- ☐ SCH58621 [ $A_{2A}AR$  ανταγωνιστής ( $C_{18}H_{15}N_7O$ , 345,36 g/mol, Tocris)]
- ☐ MRS1706 [ $A_{2B}AR$  αντιστρεπτός αγωνιστής και ανταγωνιστής ( $C_{27}H_{29}N_5O_5$ , 503,56 g/mol, Tocris)]
- ☐ DPCPX [ $A_1AR$  ανταγωνιστής ( $C_{16}H_{24}N_4O_2$ , 304,39 g/mol, Sigma)]
- ☐ MRS1220 [ $A_3AR$  ανταγωνιστής ( $C_{21}H_{14}ClN_5O_2$ , 403,83 g/mol, Tocris)]

### ☐ Όργανα

- ☐ Συσσωρευόμετρο 700-4DR (Chrono-Log)
- ☐ Λογισμικό Aggrolink8 (Chrono-Log)
- ☐ Ηλεκτρόδια πολλαπλών χρήσεων (Chrono-Log)
- ☐ Πλαστικές κυψελίδες (Chrono-Log)
- ☐ Μαγνητάκια (Chrono-Log)

## Διαλύματα εργασίας

### ☐ Αντιπηκτικό διάλυμα κιτρικών αλάτων (ACD)

Περιγραφή παρασκευής στην παράγραφο 4.1.

### ☐ Διάλυμα φυσιολογικού ορού (saline)

Περιγραφή παρασκευής στην παράγραφο 4.1.

### ☐ Διάλυμα ADP

Περιγραφή παρασκευής στην παράγραφο 4.1.

### ☐ Διάλυμα TRAP-6

Περιγραφή παρασκευής στην παράγραφο 4.1.

### ☐ Διάλυμα AA

Περιγραφή παρασκευής στην παράγραφο 4.1.

■ **Διάλυμα κολλαγόνου**

Περιγραφή παρασκευής στην παράγραφο 4.1.

■ **Διάλυμα τικαγρελόρης**

Περιγραφή παρασκευής στην παράγραφο 4.1.

■ **Διάλυμα αδενοσίνης**

Περιγραφή παρασκευής στην παράγραφο 4.1.

■ **Διάλυμα SCH58621**

Περιγραφή παρασκευής στην παράγραφο 4.1.

■ **Διάλυμα MRS1706**

Περιγραφή παρασκευής στην παράγραφο 4.1.

■ **Διάλυμα DPCPX**

Περιγραφή παρασκευής στην παράγραφο 4.1.

■ **Διάλυμα MRS1220**

Περιγραφή παρασκευής στην παράγραφο 4.1.

■ **Διάλυμα διπυριδαμόλης**

Κατάλληλη ποσότητα διπυριδαμόλης διαλύονται σε DMSO δίνοντας διάλυμα τελικής συγκέντρωσης 2,5 mM. Το διάλυμα αποθηκεύεται σε RT στο σκοτάδι.

### **Πειραματική πορεία – Ρύθμιση και χρήση οργάνου**

1. Άνοιγμα συσσωρευομέτρου 15 min πριν τη μέτρηση για να φτάσει η θερμοκρασία του οργάνου στους 37°C.
2. Επιλογή λειτουργίας «IMPEDANCE».
3. Προσθήκη 500 µL ολικού αίματος σε πλαστική κυψελίδα (με μαγνητάκι) και τοποθέτηση κυψελίδας στη θέση «WHOLE BLOOD» του οργάνου.
4. Μέτρηση της συσσώρευσης με τη χρήση του ηλεκτροδίου μετά την προσθήκη αγωνιστή:
  - i. 10 µM ADP

## Υλικά και Μέθοδοι

- ii. 10  $\mu\text{M}$  TRAP-6
- iii. 0,5 mM AA
- iv. 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  κολλαγόνο

**Πειραματική πορεία – Μελέτη της δράσης της τικαγρελόρης και της αδενοσίνης, καθώς και της δράσης των ανταγωνιστών των ARs στη συσσώρευση των αιμοπεταλίων σε ολικό αίμα.**

### ■ Μελέτη της δράσης της τικαγρελόρης

1. Συλλογή περιφερικού φλεβικού αίματος σε πλαστικούς φυγοκεντρικούς σωλήνες πολυαιθυλενίου, οι οποίοι περιέχουν ACD (1:9).
2. Επώαση 500  $\mu\text{L}$  ολικού αίματος με διάφορες συγκεντρώσεις τικαγρελόρης (έως 4  $\mu\text{M}$ ) για 5 min στους 37°C (1200 rpm).
3. Αραίωση δείγματος με 0,9% NaCl (1:1) και επώαση για 5 min στους 37°C (1200 rpm).
4. Προσθήκη αγωνιστή στους 37°C (1200 rpm).  
Ως τυφλό δείγμα χρησιμοποιήθηκε 0,4% DMSO.
5. Καταγραφή καμπύλης συσσώρευσης για 6 min.
6. Υπολογισμός αναστολής και  $\text{IC}_{50}$ .

$$\% \text{Αναστολή} = [(\text{Τυφλό δείγμα} - \text{Δείγμα}) / \text{Τυφλό δείγμα}] \times 100$$

### ■ Μελέτη της δράσης της αδενοσίνης

1. Αραίωση 500  $\mu\text{L}$  ολικού αίματος με 0,9% NaCl (1:1) και επώαση για 5 min στους 37°C (1200 rpm). Επίσης, προ-επώαση ορισμένων δειγμάτων με 2,5  $\mu\text{M}$  διπυριδαμόλη ή  $\text{IC}_{50}$  τικαγρελόρης για 5 min στους 37°C (1200 rpm) πριν την αραίωση. Τέλος, προ-επώαση ορισμένων δειγμάτων με 10  $\mu\text{M}$  SCH58621, 5  $\mu\text{M}$  MRS1706, 30  $\mu\text{M}$  DPCPX ή 10  $\mu\text{M}$  MRS1220 για 5 min στους 37°C (1200 rpm) πριν την επώαση με τικαγρελόρη.
2. Επώαση δείγματος με διάφορες συγκεντρώσεις αδενοσίνης (έως 20  $\mu\text{M}$ ) για 1 min στους 37°C (1200 rpm).
3. Προσθήκη αγωνιστή στους 37°C (1200 rpm).

Ως τυφλό δείγμα χρησιμοποιήθηκε 0,4% DMSO.

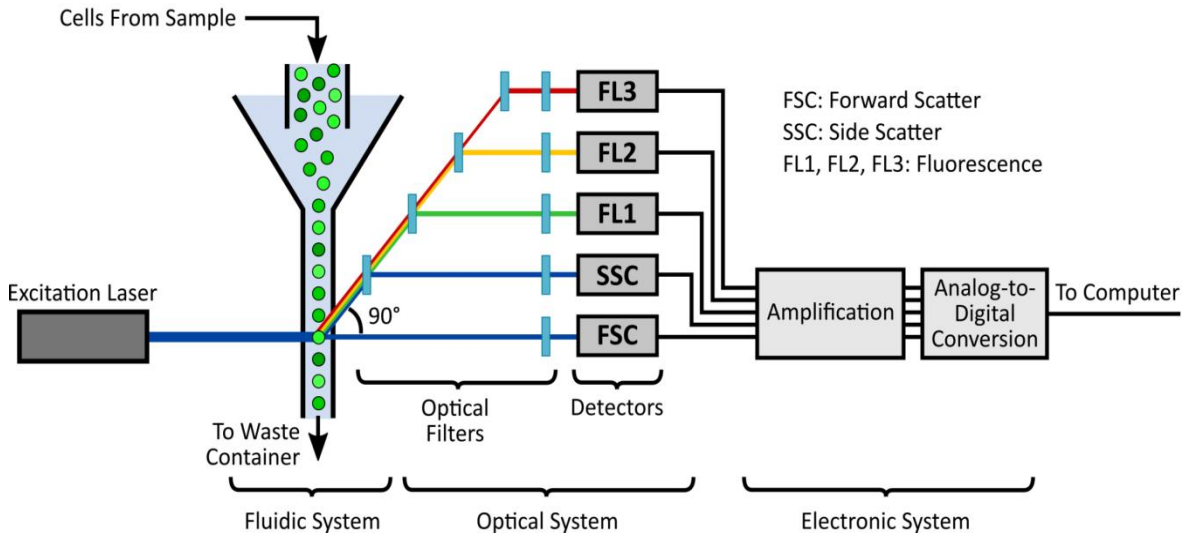
4. Καταγραφή καμπύλης συσσώρευσης για 6 min.
5. Υπολογισμός αναστολής και IC<sub>50</sub>.

$$\% \text{Αναστολή} = [(\text{Τυφλό δείγμα} - \text{Δείγμα}) / \text{Τυφλό δείγμα}] \times 100$$

### 4.3. Κυτταρομετρία ροής

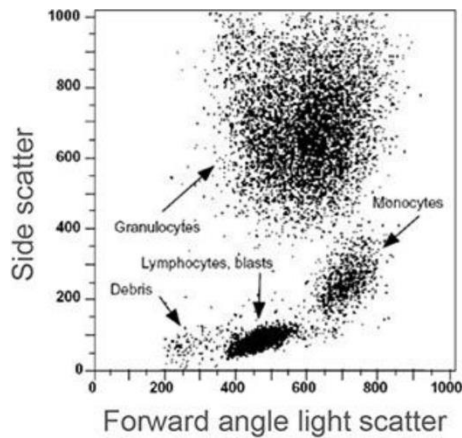
Η κυτταρομετρία ροής (FC) είναι μια τεχνική αυτοματοποιημένης κυτταρικής ανάλυσης, η οποία επιτρέπει την ταυτόχρονη ανάλυση πολλών παραμέτρων των φυσικών ή χημικών χαρακτηριστικών μεμονωμένων σωματιδίων (π.χ. κυττάρων) καθώς διέρχονται σε νηματική ροή από ένα σταθερό σημείο, στο οποίο προσπίπτει ακτίνα laser (**Εικ. 4.4**). Το κυτταρόμετρο ροής χρησιμεύει για την ανίχνευση και τη μέτρηση του ποσού φθορίζουσας χρώσης επί των σωματιδίων και αποτελείται από μια ή περισσότερες πηγές laser για την παροχή ενέργειας διέγερσης. Δυο ανιχνευτές μετρούν δύο ανεξάρτητες του φθορισμού φυσικές παραμέτρους των σωματιδίων, την πρόσθια σκέδαση [Forward Scatter (FSC)], η οποία είναι ανάλογη του μεγέθους του σωματιδίου, και την πλάγια σκέδαση πλάγια σκέδαση [Side Scatter (SSC)], η οποία είναι ανάλογη της κοκκίωσης του σωματιδίου. Τα προς μέτρηση δείγματα θα πρέπει να βρίσκονται σε μορφή εναιωρήματος, ενώ τα προς εξέταση κύτταρα επισημαίνονται με ένα ή περισσότερα ειδικά κατά περίπτωση μονοκλωνικά αντισώματα, τα οποία έχουν επισημανθεί με κατάλληλες φθορίζουσες ουσίες με στόχο την πρόσδεση των αντισωμάτων στα αντίστοιχα αντιγόνα στην επιφάνεια των κυττάρων. Η ένταση φθορισμού, καθώς και οι δείκτες σκέδασης καταγράφονται για κάθε κύτταρο και οι πληροφορίες αναλύονται με πρόγραμμα υπολογιστή. Οι φθορίζουσες ουσίες, οι οποίες χρησιμοποιούνται και διεγείρονται από laser 488 nm, είναι η ισοθειοκυανική φλουοροσκεΐνη [Fluorescein Isothiocyanate (FITC)], η φυκοερυθρίνη [Phycoerythrin (PE)] και το πρωτεϊνικό σύμπλοκο peridinin-χλωροφύλλης [Peridinin Chlorophyll Protein Complex (PerCP)], οι οποίες εκπέμπουν σε μήκη κύματος 530 nm, 585 nm και 650 nm αντίστοιχα. Τα αποτελέσματα αναπαρίστανται ως σημειακό γράφημα κυτταροδιάγραμμα (dot plot), το οποίο παρουσιάζει τις τιμές δυο διαφορετικών χαρακτηριστικών ενός κυτταρικού πληθυσμού (**Εικ. 4.5α**), ως ιστόγραμμα έντασης φθορισμού (histogram), στο οποίο η απεικόνιση της έντασης φθορισμού είναι ανάλογη του αριθμού των φθορίζοντων αντισωμάτων στην επιφάνεια του κυτταρικού πληθυσμού (**Εικ. 4.5β**) ή ως ισομετρικό διάγραμμα (isometric plot) (**Εικ. 4.5γ**).

Υλικά και Μέθοδοι

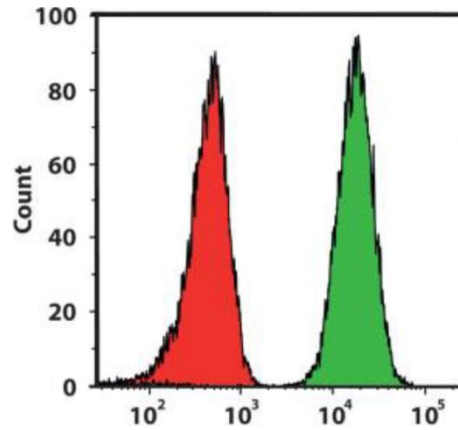


Εικ. 4.4. Αρχή λειτουργία της FC.

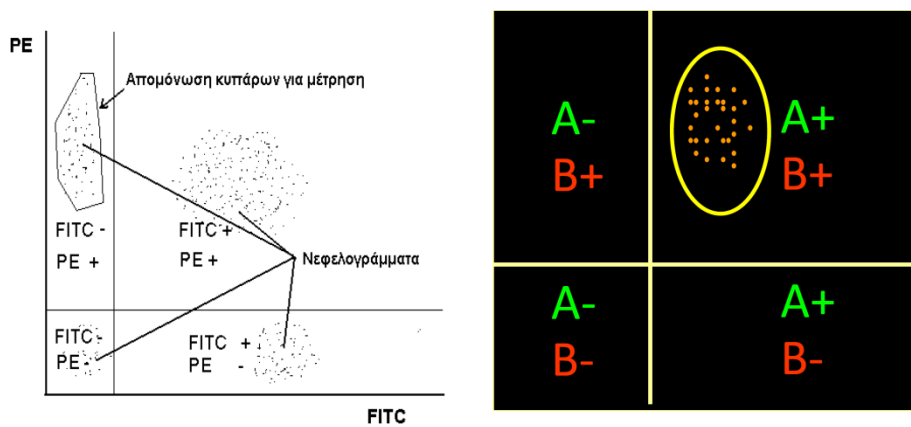
(α)



(β)



























(γ)



Εικ. 4.5. Έκφραση αποτελεσμάτων FC: (α) σημειακό γράφημα κυτταροδιαγράμματος, (β) ιστόγραμμα έντασης φθορισμού και (γ) ισομετρικό διάγραμμα.

## Αντιδραστήρια – Όργανα

 Αντιδραστήρια

-  Ανυδρο κιτρικό οξύ ( $C_6H_8O_7$ , 192,13 g/mol, Merck)
-  Διένυδρο κιτρικό νάτριο ( $C_6H_5Na_5O_7 \times 2H_2O$ , 294,10 g/mol, Merck)
-  Ανυδρη D(+)-γλυκόζη ( $C_6H_{12}O_6$ , 180,16 g/mol, Fluka)
-  Χλωριούχο νάτριο (NaCl, 58,44 g/mol, Sigma)
-  Ένυδρο δισόξινο φωσφορικό νάτριο ( $NaH_2PO_4 \times H_2O$ , 137,99 g/mol, Merck)
-  Διένυδρο όξινο φωσφορικό νάτριο ( $Na_2HPO_4 \times 2H_2O$ , 177,49 g/mol, Merck)
-  Χλωριούχο αμμώνιο ( $NH_4Cl$ , 53,491 g/mol, Merck)
-  Όξινο ανθρακικό κάλιο ( $KHCO_3$ , 100,115 g/mol, Ferak)
-  Αιθυλενοδιαμινοτετραοξικό κάλιο [ $K_2EDTA$  ( $C_{10}H_{14}K_2N_2O_8$ , 368,42 g/mol, Sigma)].
-  Διφωσφορική αδενοσίνη [ADP ( $C_{10}H_{15}N_5O_{10}P_2$ ) 427,201 g/mol, Chrono-Log]
-  Πεπτίδιο-ενεργοποιητή του υποδοχέα της θρομβίνης-6 [TRAP-6 ( $C_{34}H_{56}N_{10}O_9$ , 748,87 g/mol, Bachem)]
-  Μονοκλωνικό αντίσωμα FITC mouse anti-human CD34 (BD Biosciences)
-  Μονοκλωνικό αντίσωμα PE mouse anti-human VEGFR2/KDR (R&D Systems)
-  Μονοκλωνικό αντίσωμα PerCP mouse anti-human CD61 (BD Biosciences)
-  FACSFlow Sheath Fluid (BD Biosciences)
-  FACS Rinse Solution (BD Biosciences)
-  FACS Clean Solution (BD Biosciences)
-  Water for injection (WFI)
-  Διμεθυλοσουλφοξείδιο [DMSO ( $C_2H_6OS$ , 78,13 g/mol, Carloerba)]
-  Τικαγρελόρη ( $C_{23}H_{28}F_2N_6O_4S$ , 522,6 g/mol, AstraZeneca)
-  Αδενοσίνη ( $C_{10}H_{13}N_5O_4$ , 267,24 g/mol, Sigma)
-  SCH58621 [ $A_{2A}AR$  ανταγωνιστής ( $C_{18}H_{15}N_7O$ , 345,36 g/mol, Tocris)]
-  MRS1706 [ $A_{2B}AR$  αντριστρεπτός αγωνιστής και ανταγωνιστής ( $C_{27}H_{29}N_5O_5$ , 503,56 g/mol, Tocris)]
-  DPCPX [ $A_1AR$  ανταγωνιστής ( $C_{16}H_{24}N_4O_2$ , 304,39 g/mol, Sigma)]

## Υλικά και Μέθοδοι

■ MRS1220 [ $A_3AR$  ανταγωνιστής ( $C_{21}H_{14}ClN_5O_2$ , 403,83 g/mol, Tocris)]

### ■ Όργανα

- Φυγόκεντρος πάγκου Rotofix 32 (Hettich)
- Κυτταρόμετρο ροής FACSCalibur (Becton Dickinson)
- Λογισμικό CellQuest (Becton Dickinson)
- Σωληνάκια κυτταρομέτρου ροής (Becton Dickinson)
- Επωαστικός θάλαμος 37°C

## Διαλύματα εργασίας

### ■ Αντιπηκτικό διάλυμα κιτρικών αλάτων (ACD)

Περιγραφή παρασκευής στην παράγραφο 4.1.

### ■ Ρυθμιστικό διάλυμα 10 mM PBS pH 7,4

- 0,818% w/v NaCl
- 0,138% w/v  $NaH_2PO_4 \times H_2O$
- 0,178% w/v  $Na_2HPO_4 \times 2H_2O$

Το διάλυμα αποθηκεύεται σε RT.

### ■ Διάλυμα λύσης ερυθροκυττάρων pH 7,4

- 0,834% w/v  $NH_4Cl$
- 0,1% w/v  $KHCO_3$
- 0,0036% w/v  $K_2EDTA$

Κατά τη διάρκεια του πειράματος το διάλυμα διατηρείται στον πάγο. Το διάλυμα αποθηκεύεται στους 4°C.

### ■ Διάλυμα φυσιολογικού ορού (saline)

Περιγραφή παρασκευής στην παράγραφο 4.1.

### ■ Διάλυμα ADP

Περιγραφή παρασκευής στην παράγραφο 4.1.

### ■ Διάλυμα TRAP-6

Περιγραφή παρασκευής στην παράγραφο 4.1.

■ **Διάλυμα τικαγρελόρης**

Περιγραφή παρασκευής στην παράγραφο 4.1.

■ **Διάλυμα αδενοσίνης**

Περιγραφή παρασκευής στην παράγραφο 4.1.

■ **Διάλυμα SCH58621**

Περιγραφή παρασκευής στην παράγραφο 4.1.

■ **Διάλυμα MRS1706**

Περιγραφή παρασκευής στην παράγραφο 4.1.

■ **Διάλυμα DPCPX**

Περιγραφή παρασκευής στην παράγραφο 4.1.

■ **Διάλυμα MRS1220**

Περιγραφή παρασκευής στην παράγραφο 4.1.

**Πειραματική πορεία – Χρονο-εξαρτώμενη μελέτη της δράσης της ADP και του TRAP-6 στην εμφάνιση του ενδοθηλιακού φαινοτύπου στα CD34<sup>+</sup> πρόδρομα κύτταρα, καθώς και στην αλληλεπίδραση των αιμοπεταλίων με τα CD34<sup>+</sup> και CD34<sup>+</sup>/KDR<sup>+</sup> κύτταρα.**

1. Συλλογή περιφερικού φλεβικού αίματος σε πλαστικούς φυγοκεντρικούς σωλήνες πολυαιθυλενίου, οι οποίοι περιέχουν ACD (1:9).
2. Προσθήκη 5  $\mu$ L CD34-FITC, VEGFR2/KDR-PE και CD61-PerCP μονοκλωνικού αντισώματος αντιδιαμετρικά στο σωληνάκι κυτταρομέτρου ροής.
3. Προσθήκη 50  $\mu$ L ολικού αίματος στο κέντρο από το σωληνάκι.
4. Επώαση δειγμάτων με 0,9% NaCl (resting) ή με 50  $\mu$ M ADP ή 10  $\mu$ M TRAP-6 (activated) για 10 min και 60 min στους 37°C (ήπια ανάδευση) στο σκοτάδι.
5. Προσθήκη 2 mL διαλύματος λύσης ερυθροκυττάρων για 20 min στον πάγο (έντονη ανάδευση).
6. Φυγοκέντρωση δειγμάτων στα 670 $\times$ g για 5 min σε RT.
7. Απόχυση υπερκειμένου.
8. Προσθήκη 500  $\mu$ L 10 mM PBS pH 7,4 (έντονη ανάδευση).



## **Υλικά και Μέθοδοι**

### **9. Κυτταρομετρική ανάλυση.**

Κατά την επεξεργασία των δειγμάτων υπολογίζεται το ποσοστό των CD34<sup>+</sup>/KDR<sup>+</sup> κυττάρων, καθώς και των CD61<sup>+</sup>/CD34<sup>+</sup> και CD61<sup>+</sup>/KDR<sup>+</sup> κυτταρικών συζευγμάτων στους διαφορετικούς χρόνους επώασης. Το ποσοστό εκφράζεται ως ποσοστό στην περιοχή των λέμφο-μονοκυττάρων (% gated). Η κυτταρομετρική ανάλυση λαμβάνει χώρα στα 100.000 συμβάντα.

## **Πειραματική πορεία – Ρύθμιση και χρήση οργάνου**

1. Άνοιγμα κυτταρομέτρου ροής 15-20 min πριν τη μέτρηση.
2. Έκπλυση οργάνου με WFI για 5 min.
3. Εισαγωγή ρυθμίσεων αντίστοιχου πρωτοκόλλου.
4. Μέτρηση δείγματος.
5. Έκπλυση οργάνου μετά το τέλος της μέτρησης με FACS Rinse Solution, FACS Clean Solution και WFI για 10 min έκαστο.
6. Απόχυση δοχείου αποβλήτων.
7. Συμπλήρωση δοχείου με FACSTFlow Sheath Fluid.

**Πειραματική πορεία – Μελέτη της δράσης της τικαγρελόρης και της αδενοσίνης, καθώς και της δράσης των ανταγωνιστών της αδενοσίνης στην εμφάνιση του ενδοθηλιακού φαινοτύπου στα CD34<sup>+</sup> πρόδρομα κύτταρα, καθώς και στην αλληλεπίδραση των αιμοπεταλίων με τα CD34<sup>+</sup> και CD34<sup>+</sup>/KDR<sup>+</sup> κύτταρα.**

### **■ Μελέτη της δράσης της τικαγρελόρης**

1. Συλλογή περιφερικού φλεβικού αίματος σε πλαστικούς φυγοκεντρικούς σωλήνες πολυαιθυλενίου, οι οποίοι περιέχουν ACD (1:9).
2. Επώαση ολικού αίματος με 1 μM τικαγρελόρη για 5 min στους 37°C.  
Ως τυφλό δείγμα χρησιμοποιήθηκε 0,4% DMSO.
3. Προσθήκη 5 μL CD34-FITC, VEGFR2/KDR-PE και CD61-PerCP μονοκλωνικού αντισώματος αντιδιαμετρικά στο σωληνάκι κυτταρομέτρου ροής.
4. Προσθήκη 50 μL δείγματος στο κέντρο από το σωληνάκι.

5. Επώαση δείγματος με 0,9% NaCl (resting) ή με 50  $\mu$ M ADP ή 10  $\mu$ M TRAP-6 (activated) για 10 min στους 37°C (ήπια ανάδευση) στο σκοτάδι.
6. Βήματα 5-9 της ενότητας «Χρονο-εξαρτώμενη μελέτη της δράσης της ADP και του TRAP-6»

#### **Μελέτη της δράσης της αδενοσίνης**

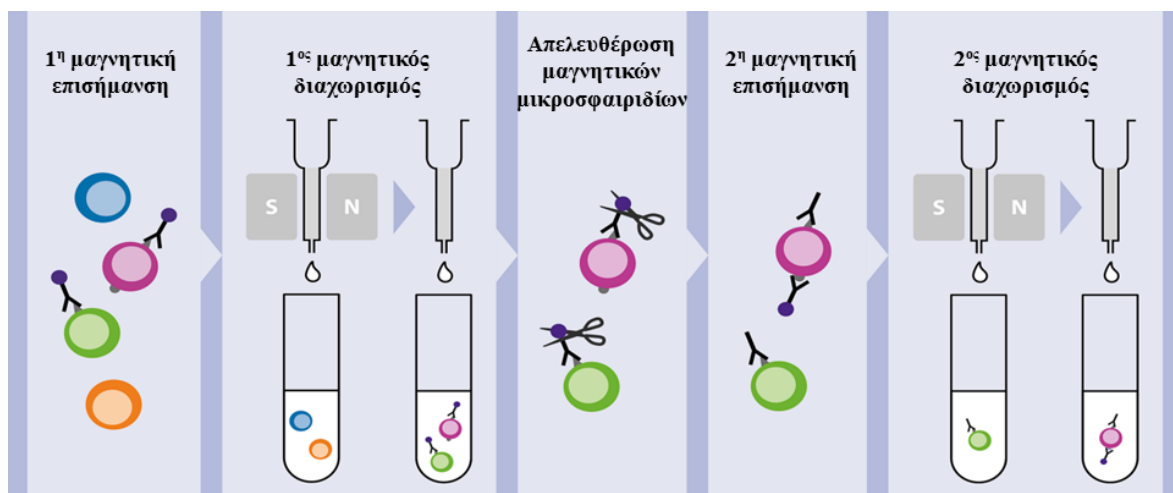
1. Συλλογή περιφερικού φλεβικού αίματος σε πλαστικούς φυγοκεντρικούς σωλήνες πολυαιθυλενίου, οι οποίοι περιέχουν ACD (1:9).
2. Επώαση ολικού αίματος με 20  $\mu$ M αδενοσίνη για 1 min στους 37°C. Επίσης, προ-επώαση δειγμάτων με 1  $\mu$ M τικαγρελόρη για 5 min στους 37°C πριν την προσθήκη της αδενοσίνης. Τέλος, προ-επώαση ορισμένων δειγμάτων με 10  $\mu$ M SCH58621, 5  $\mu$ M MRS1706, 30  $\mu$ M DPCPX ή 10  $\mu$ M MRS1220 για 5 min στους 37°C πριν την επώαση με τικαγρελόρη.  
Ως τυφλό δείγμα χρησιμοποιήθηκε 0,4% DMSO.
3. Προσθήκη 5  $\mu$ L CD34-FITC, VEGFR2/KDR-PE και CD61-PerCP μονοκλωνικού αντισώματος αντιδιαμετρικά στο σωληνάκι κυτταρομέτρου ροής.
4. Προσθήκη 50  $\mu$ L δείγματος στο κέντρο του σωλήνα.
5. Επώαση δείγματος με 0,9% NaCl (resting) ή με 50  $\mu$ M ADP ή 10  $\mu$ M TRAP-6 (activated) για 10 min στους 37°C (ήπια ανάδευση) στο σκοτάδι.
6. Βήματα 5-9 της ενότητας «Χρονο-εξαρτώμενη μελέτη της δράσης της ADP και του TRAP-6»

#### **4.4. Μέθοδος μαγνητικού κυτταρικού διαχωρισμού**

Η μέθοδος του μαγνητικού κυτταρικού διαχωρισμού [Magnetic cell sorting (MACS)] αποτελεί μια μεθοδολογία διαχωρισμού διαφόρων κυτταρικών πληθυσμών, η οποία βασίζεται στα αντιγόνα, τα οποία βρίσκονται στην επιφάνεια των κυττάρων. Η συγκεκριμένη μεθοδολογία αναπτύχθηκε από την εταιρεία Miltenyi Biotec και αξιοποιεί τη MACS τεχνολογία, η οποία θεωρείται η «gold standard» τεχνική για την απομόνωση των κυττάρων. Η συγκεκριμένη τεχνολογία βασίζεται στα MACS υπερπαραμαγνητικά νανοσωματίδια (μικροσφαιρίδια), τις MACS στήλες διαχωρισμού και τους MACS διαχωριστές. Η MACS μεθοδολογία συνεισφέρει στην ήπια απομόνωση βιώσιμων και λειτουργικά ενεργών

## Υλικά και Μέθοδοι

κυττάρων, την πολύ καλή καθαρότητα και ανάκτηση σπάνιων κυττάρων, καθώς και την ανάπτυξη ευέλικτων στρατηγικών διαχωρισμού κυττάρων. Τα κύτταρα, τα οποία βρίσκονται σε εναιώρημα, φέρουν στην επιφάνειά τους αντιγόνα, τα οποία δεσμεύονται με μεγάλη εξειδίκευση σε μονοκλωνικά αντισώματα, τα οποία είναι ομοιοπολικά συνδεδεμένα με τα MACS μικροσφαιρίδια (microbeads). Στη συνέχεια, το κυτταρικό εναιώρημα τοποθετείται σε μια MACS στήλη, η οποία εφαρμόζεται στο μαγνητικό πεδίο ενός MACS διαχωριστή. Τα μαγνητικά επισημασμένα κύτταρα κατακρατούνται μέσα στη στήλη, ενώ, αντίθετα, τα μη επισημασμένα κύτταρα διέρχονται από τη στήλη, με αποτέλεσμα το κυτταρικό κλάσμα που συλλέγεται να μην εμπλουτισμένο με τα κύτταρα-στόχους. Τέλος, μετά από το στάδιο των εκπλύσεων, η στήλη απομακρύνεται από το μαγνητικό πεδίο του MACS διαχωριστή και τα κατακρατημένα κύτταρα μπορούν να εκλουστούν από τη στήλη με τη βοήθεια ενός εμβόλου με αποτέλεσμα τη συλλογή του κυτταρικού πληθυσμού που μας ενδιαφέρει. Στην **Εικ. 4.6** απεικονίζεται σχηματικά ολόκληρη η πειραματική διαδικασία.



**Εικ. 4.6.** Σχηματική απεικόνιση των σταδίων της τεχνολογίας του μαγνητικού διαχωρισμού.

### MACS στήλες

Οι MACS στήλες έχουν αναπτυχθεί για την ήπια απομόνωση των επισημασμένων με μικροσφαιρίδια κυττάρων. Οι συγκεκριμένες στήλες περιέχουν ένα βελτιωμένο υλικό, το οποίο συνεισφέρει στη δημιουργία ενός ισχυρού μαγνητικού πεδίου, όταν τοποθετούνται σε ένα μόνιμο μαγνήτη, όπως ο MACS διαχωριστής. Οι MACS στήλες περιλαμβάνουν ένα υλικό, το οποίο αποτελείται από σιδηρομαγνητικά σφαιρίδια, καλυμμένα με μια υδρόφιλη επίστρωση, η οποία είναι φιλική προς τα κύτταρα και επιτρέπει έτσι τη γρήγορη πλήρωσή τους. Όταν τοποθετηθούν τα σφαιρίδια στο μαγνητικό διαχωριστή ενισχύουν το

μαγνητικό πεδίο μέχρι χίλιες φορές, προκαλώντας μία υψηλή βαθμίδωση μέσα στη στήλη. Το συγκεκριμένο γεγονός είναι σημαντικό για την απομόνωση των κυττάρων, τα οποία επισημαίνονται σε μικρό βαθμό αφήνοντας έτσι αρκετούς επίτοπους ελεύθερους για να γίνει ταυτόχρονη χρώση των αντισωμάτων. Η χωρητικότητα των στηλών είναι  $10^7$ - $2 \times 10^8$  μαγνητικά επισημασμένα κύτταρα και χρησιμοποιούνται αποκλειστικά και μόνο μία φορά κατά την πειραματική διαδικασία.

### **MACS διαχωριστής**

Οι MACS διαχωριστές αποτελούν ειδικές συσκευές, οι οποίες δημιουργούν ένα μαγνητικό πεδίο υψηλής βαθμίδωσης, το οποίο είναι αρκετά ισχυρό ώστε να μπορεί να συγκρατεί τα ταυτοποιημένα κύτταρα, καθώς τα μικροσφαιρίδια είναι εξαιρετικά μικρά και η ποσότητα του μαγνητίσιμου υλικού, το οποίο περιβάλλει τα κύτταρα, δεν είναι μεγάλη. Η τεχνολογία MACS χρησιμοποιεί υψηλά βαθμονομημένες μαγνητικές μονάδες κυτταρικού διαχωρισμού, οι οποίες αποτελούνται από έναν ισχυρό μόνιμο μαγνήτη (0,4-1 T) και μια διαχωριστική στήλη με ένα περίβλημα από σιδηρομαγνητικά σφαιρίδια. Για να αποφευχθεί η διάβρωση ή η πιθανή καταστροφή των κυττάρων εξαιτίας της άμεσης επαφής με το υλικό του περιβλήματος, αυτό επικαλύπτεται με ένα λεπτό πλαστικό στρώμα πολυμερούς. Όταν οι στήλες τοποθετηθούν ανάμεσα στους πόλους του μαγνήτη του MACS διαχωριστή, υψηλές μαγνητικές μεταβολές πραγματοποιούνται γύρω από το σιδηρομαγνητικό περίβλημα. Η μαγνητική δύναμη είναι αρκετή ώστε να συγκρατήσει τα κύτταρα-στόχους, τα οποία ταυτοποιήθηκαν μαζί με ένα μικρό αριθμό μικροσφαιριδίων. Όταν η στήλη απομακρυνθεί από τον μαγνήτη, το περίβλημά της απομαγνητίζεται γρήγορα και τα κύτταρα που έχουν κατακρατηθεί μπορούν εύκολα και εξ' ολοκλήρου να εκλουστούν.

### **MACS μικροσφαιρίδια**

Τα MACS μικροσφαιρίδια είναι υπερπαραμαγνητικά μόρια διαμέτρου 50 nm, τα οποία είναι συζευγμένα σε αντισώματα με μεγάλη εξειδίκευση έναντι ενός συγκεκριμένου αντιγόνου που υπάρχει πάνω στην κυτταρική επιφάνεια. Με τον όρο «υπερπαραμαγνητικά μόρια» χαρακτηρίζονται συγκεκριμένα σωματίδια, τα οποία παρουσιάζουν μαγνητικές ιδιότητες μόνο εφόσον υπάρχει εξωτερικό μαγνητικό πεδίο, όπου οι πυρήνες του FeO μαγνητίζονται ισχυρά. Επίσης, τα συγκεκριμένα σωματίδια μπορούν εύκολα να απομακρυνθούν από ένα εναιώρημα με έναν απλό μαγνητικό








## **Υλικά και Μέθοδοι**

διαχωριστή, ενώ όταν απομακρυνθούν από το μαγνητικό πεδίο δεν διατηρούν καθόλου μαγνητισμό.

Τα σωματίδια αποτελούνται από FeO στον πυρήνα και ένα επικαλυπτικό στρώμα από δεξτράνη. Εξαιτίας του μικρού τους μεγέθους, τα μικροσφαιρίδια δεν ενεργοποιούν τα κύτταρα και δεν καλύπτουν τους επίτοπους της κυτταρικής επιφάνειας. Επιπλέον, είναι μη τοξικά και βιοαποικοδομήσιμα, οπότε δεν μεταβάλουν τις κυτταρικές λειτουργίες. Σε αντίθεση με τα μεγαλύτερα σφαιρίδια, τα MACS μικροσφαιρίδια δεν χρειάζεται να απομακρυνθούν κατά τη διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας. Επίσης, τα μικροσφαιρίδια βρίσκονται πάντα σε εναιώρημα (κολλοειδές διάλυμα), επιτρέποντας με αυτόν τον τρόπο ταχεία κινητική δέσμευση και σύντομες διαδικασίες επισήμανσης. Αντίθετα, στην περίπτωση των μη κολλοειδών διαλυμάτων ή των πολύ μεγάλων σφαιριδίων, υπάρχει μεγάλος κίνδυνος σφαλμάτων λόγω δημιουργίας κυτταρικών συσσωματωμάτων. Τέλος, η λειτουργικότητα των κυττάρων μπορεί να επηρεαστεί από την κυτταρική επιφάνεια του αντιγόνου-στόχου και από το βαθμό της διασταύρωσης τους με τα μονοκλωνικά αντισώματα, τα οποία είναι συζευγμένα με τα μικροσφαιρίδια και όχι στα μικροσφαιρίδια αυτά καθαυτά. Το διάστημα ανάμεσα στα σφαιρίδια είναι μεγάλο, οπότε τα πρωτογενή κύτταρα, όπως επίσης και τα περισσότερα καλλιεργήσιμα κύτταρα διέρχονται ελεύθερα διαμέσου της στήλης. Τα μαγνητικά επισημασμένα κύτταρα διατηρούνται σε εναιώρημα μέσα στη στήλη και ουσιαστικά δεν δεσμεύονται στο υλικό της στήλης.

## **Αντιδραστήρια – Όργανα**

### **Antidrashteria**

-  Dulbecco's Phosphate Buffered Saline [DPBS (10X)] (Gibco)
-  Water for injection (WFI)
-  Αιθυλενοδιαμινοτετραοξικό οξύ [EDTA (C<sub>10</sub>H<sub>16</sub>N<sub>2</sub>O<sub>8</sub>, 292,24 g/mol, Sigma)]
-  Αλβουμίνη βόειου ορού [BSA (EC Number 232-936-2, Sigma)]
-  Διάλυμα Ficoll πυκνότητας 1.077 g/ml (Biocoll separating solution, Biochrom AG)
-  CD34 Microbead Kit Human (Miltenyi Biotec)
-  Μονοκλωνικό αντίσωμα FITC mouse anti-human CD34 (BD Biosciences)

- 📄 Μονοκλωνικό αντίσωμα PE mouse anti-human CD45 (BD Biosciences)
- 📄 Μονοκλωνικό αντίσωμα PE mouse anti-human VEGFR2/KDR (R&D Systems)
- 📄 Μονοκλωνικό αντίσωμα FITC mouse anti-human IgG<sub>1</sub> (BD Biosciences)
- 📄 Μονοκλωνικό αντίσωμα PE mouse anti-human IgG<sub>1</sub> (BD Biosciences)
- 📄 Χρωστική Giemsa (Ferak Berlin)

### 📄 Όργανα

- 📄 MACS στήλες (Miltenyi Biotec)
- 📄 MACS διαχωρηστής (Miltenyi Biotec)
- 📄 Αιματοκυτόμετρο Neubauer
- 📄 Ανάστροφο μικροσκόπιο (A. Krüss Optronic)
- 📄 Φυγόκεντρος πάγκου Rotofix 32 (Hettich)
- 📄 Επωαστικός κλίβανος ατμόσφαιρας 5% CO<sub>2</sub> (Nuair)
- 📄 Κωνικά βαθμονομημένα σωληνάρια των 15 και 50 mL (Corning)
- 📄 Αποστειρωμένα σιφώνια 5 mL (Starstedt)
- 📄 Αποστειρωμένα σιφώνια 10 mL (Starstedt)
- 📄 Αποστειρωμένα σιφώνια 25 mL (Starstedt)
- 📄 Φίλτρα διήθησης 0,2 μm (Corning)

### Διαλύματα εργασίας

#### 📄 Ρυθμιστικό διάλυμα PBS (1X)

Ποσότητα διαλύματος DPBS (10X) αραιώνεται 1:10 σε WFI προς παρασκευή διαλύματος PBS (1X). Το διάλυμα αποθηκεύεται σε RT.

#### 📄 Διάλυμα EDTA (100X) pH 7,4

Παρασκευή διαλύματος 54 mM EDTA και ρύθμιση pH στο 7,4. Το διάλυμα αποστειρώνεται σε κλίβανο υγρής αποστείρωσης και στη συνέχεια αποθηκεύεται σε RT.

## **Υλικά και Μέθοδοι**


### **■ Διάλυμα 20 mM EDTA/PBS (1X)**

Ποσότητα διαλύματος 54 mM EDTA αραιώνεται προς παρασκευή διαλύματος 20 mM EDTA σε PBS (1X). Το διάλυμα αποθηκεύεται στους 4°C.

### **■ Διάλυμα 2 mM EDTA/PBS (1X)**

Ποσότητα διαλύματος 54 mM EDTA αραιώνεται προς παρασκευή διαλύματος 2 mM EDTA σε PBS (1X). Το διάλυμα αποθηκεύεται στους 4°C.

### **■ Διάλυμα 0,5% BSA/2 mM EDTA/PBS (1X)**

 0,5% w/v BSA (μπορεί να αντικατασταθεί και από άλλες πρωτεΐνες, π.χ. αλβουμίνη ανθρώπινου ορού, ανθρώπινος ορός ή ορός εμβρύου βοδιού)

Διάλυση της BSA σε 2 mM EDTA/PBS (1X). Στη συνέχεια, ακολουθεί απαέρωση του διαλύματος (οι φυσαλίδες αέρα μπορεί να μπλοκάρουν τη στήλη), και τέλος, ακολουθεί αποστείρωση του διαλύματος πριν τη χρήση. Το διάλυμα αποθηκεύεται για 2 βδομάδες στους 4°C.

## **Απομόνωση CD34<sup>+</sup> πρόδρομων κυττάρων από αίμα από ομφάλιο λώρο**

### **■ Προετοιμασία κυττάρων από αίμα ομφάλιου λώρου**

Το πείραμα πρέπει να εκτελείται γρήγορα, ενώ το δείγμα και τα διαλύματα εργασίας κατά τη διάρκεια του πειράματος διατηρούνται στους 4°C προς αποφυγή πρόσδεσης των αντισωμάτων στην κυτταρική επιφάνεια, καθώς και μη ειδικής επισήμανσης των κυττάρων.

1. Παραλαβή 50 mL δείγματος σε σωληνάριο, το οποίο περιέχει αντιπηκτικό διάλυμα 20 mM EDTA/PBS (1X) (1:50).
2. Έλεγχος δείγματος για τυχόν θρόμβους, οι οποίοι απομακρύνονται.
3. Αραίωση δείγματος 2 mM EDTA/PBS (1X) σε αναλογία 1:4 → 10 mL δείγματος σε 30 mL 2 mM EDTA/PBS (1X).
4. Επιστοίβαση 35 mL αραιωμένου δείγματος σε 15 mL Ficoll.
5. Φυγοκέντρηση δειγμάτων στα 400×g για 35 min στους 20°C (χωρίς τη χρήση φρένου).

Η φυγοκέντρηση μπορεί να πραγματοποιηθεί έως και 800×g προκειμένου να επιτευχθεί η απόκτηση ενός πιο ευδιάκριτου πληθυσμού MNCs.

6. Απομάκρυνση πλάσματος και συλλογή κλάσματος MNCs.
7. Έκπλυση κυττάρων με 2 mM EDTA/PBS (1X) (συμπλήρωση έως 50 mL).
8. Φυγοκέντρηση δειγμάτων στα 300×g για 10 min στους 20°C.
9. Απομάκρυνση υπερκειμένου και επαναιώρηση κυττάρων και έκπλυση με 2 mM EDTA/PBS (1X) (συμπλήρωση έως 50 mL).
10. Φυγοκέντρηση δειγμάτων στα 200×g για 10 min στους 20°C.
11. Απομάκρυνση υπερκειμένου και επαναιώρηση κυττάρων σε 10-20 mL 2 mM EDTA/PBS (1X).
12. Μέτρηση MNCs:
  - i. Αραίωση χρωστικής Giemsa σε PBS (1X) (1:50).
  - ii. Αραίωση εναιώρημα MNCs στο παραπάνω αραιωμένο διάλυμα Giemsa (1:10).
  - iii. Τοποθέτηση 10 μL του παραπάνω εναιωρήματος σε κάθε εσοχή της πλάκας Neubauer.
  - iv. Μέτρηση MNCs στην πλάκα Neubauer σε ανάστροφο μικροσκόπιο (10X).

$\text{Αρ. κυττάρων} = [(\text{Συν. αρ. κυττάρων στα 5 τετράγωνα})/5] \times 10^5 \times V_{2 \text{ mM EDTA/PBS (1X)}}$
--

13. Φυγοκέντρηση δείγματος στα 200×g για 10 min στους 20°C.
14. Απομάκρυνση υπερκειμένου και επαναιώρηση κυττάρων σε 300 μL 0,5% BSA/2 mM EDTA/PBS (1X) για  $0,5 \times 10^8$  κύτταρα.

#### Μαγνητική επισήμανση και διαχωρισμός

1. Προσθήκη 100 μL FcR Blocking Reagent και 100 μL CD34 microbeads (ήπια ανάδευση).
2. Επώαση κυττάρων για 30 min στους 4°C.
3. Προσθήκη 5-10 mL 0,5% BSA/2 mM EDTA/PBS (1X).
4. Φυγοκέντρηση δείγματος στα 300×g για 10 min στους 20°C.



## Υλικά και Μέθοδοι

5. Απομάκρυνση υπερκειμένου και επαναιώρηση κυττάρων με 500  $\mu\text{L}$  0,5% BSA/2 mM EDTA/PBS (1X) [before separation (συλλογή 2 $\times$ 20  $\mu\text{L}$  δείγματος για κυτταρομετρία ροής)].
6. Έκπλυση στήλης με 500  $\mu\text{L}$  0,5% BSA/2 mM EDTA/PBS (1X).
7. Προσθήκη εναιώρημα κυττάρων στην στήλη και συμπλήρωση με 500  $\mu\text{L}$  0,5% BSA/2 mM EDTA/PBS (1X).
8. Συλλογή κυττάρων [1<sup>st</sup> unlabeled (συλλογή 20  $\mu\text{L}$  δείγματος για κυτταρομετρία ροής)].
9. Προσθήκη 1 mL 0,5% BSA/2 mM EDTA/PBS (1X) στη στήλη.
10. Συλλογή κυττάρων [1<sup>st</sup> labeled (συλλογή 2 $\times$ 20  $\mu\text{L}$  δείγματος για κυτταρομετρία ροής)].
11. Προσθήκη εναιώρημα κυττάρων (1<sup>st</sup> unlabeled) στην στήλη και συμπλήρωση με 500  $\mu\text{L}$  0,5% BSA/2 mM EDTA/PBS (1X).
12. Συλλογή κυττάρων [2<sup>nd</sup> unlabeled (συλλογή 20  $\mu\text{L}$  δείγματος για κυτταρομετρία ροής)].
13. Προσθήκη 1 mL 0,5% BSA/2 mM EDTA/PBS (1X) στη στήλη.
14. Συλλογή κυττάρων [2<sup>nd</sup> labeled (συλλογή 2 $\times$ 20  $\mu\text{L}$  δείγματος για κυτταρομετρία ροής)].
15. Φυγοκέντρηση δείγματος στα 300 $\times$ g για 10 min στους 20°C.
16. Απομάκρυνση υπερκειμένου και επαναιώρηση κυττάρων με 500  $\mu\text{L}$  EGM-2.
17. Μέτρηση κυττάρων:
  - i. Αραίωση χρωστικής Giemsa σε PBS (1X) (1:50).
  - ii. Αραίωση εναιώρημα κυττάρων στο παραπάνω αραιωμένο διάλυμα Giemsa (1:10).
  - iii. Τοποθέτηση 10  $\mu\text{L}$  του παραπάνω εναιωρήματος σε κάθε εσοχή της πλάκας Neubauer.
  - iv. Μέτρηση MNCs στην πλάκα Neubauer σε ανάστροφο μικροσκόπιο (10X).

$$\text{Αρ. κυττάρων} = [(\text{Συν. αρ. κυττάρων στα 5 τετράγωνα})/5] \times 10^5 \times V_{2 \text{ mM EDTA/PBS (1X)}}$$

### Εκτίμηση καθαρότητας των CD34<sup>+</sup> πρόδρομων κυττάρων με κυτταρομετρία ροής

Η καθαρότητα των απομονωμένων CD34<sup>+</sup> πρόδρομων κυττάρων μπορεί να αξιολογηθεί με τη χρήση της κυτταρομετρίας ροής (ρύθμιση και χρήση οργάνου στην παράγραφο 4.3). Για τη βέλτιστη διάκριση των CD34<sup>+</sup> πρόδρομων κυττάρων από τα υπόλοιπα












λευκοκύτταρα, γίνεται χρώση των κυττάρων με ένα μονοκλωνικό αντίσωμα έναντι του αντιγόνου CD45. Τα CD34<sup>+</sup> πρόδρομα κύτταρα εκφράζουν το CD45 σε μειωμένο βαθμό σε σύγκριση με τα λεμφοκύτταρα.

1. Προσθήκη 20  $\mu$ L εναιώρημα κυττάρων σε σωληνάκι κυτταρομέτρου ροής.
2. Προσθήκη 80  $\mu$ L PBS (1X).
3. Προσθήκη 2  $\mu$ L CD34-FITC και CD45-PE μονοκλωνικού αντισώματος, καθώς και ισοτυπικού control IgG<sub>1</sub>-FITC και IgG<sub>1</sub>-PE μονοκλωνικού αντισώματος.
4. Επώαση δειγμάτων για 20 min στους 4°C (ανάδευση) στο σκοτάδι.
5. Προσθήκη 1 mL PBS (1X).
6. Φυγοκέντρηση δειγμάτων στα 670 $\times$ g για 5 min σε RT.
7. Απόχυση υπερκειμένου και επαναιώρηση κυττάρων σε 500  $\mu$ L PBS (1X).
8. Κυτταρομετρική ανάλυση.

Κατά την επεξεργασία των δειγμάτων υπολογίζεται το ποσοστό των CD34<sup>+</sup>/CD45<sup>+</sup> κυττάρων. Η κυτταρομετρική ανάλυση λαμβάνει χώρα στα 10.000 συμβάντα.

## 4.5. Κυτταρική καλλιέργεια

### Αντιδραστήρια

-  Κολλαγόνο τύπου I (BD Biosciences)
-  17,5 N Οξικό οξύ (CH<sub>3</sub>COOH, Riedel- de Haën)
-  Θρεπτικό μέσο EGM-2 Bulletkit (Lonza)
-  Θρεπτικό μέσο Medium 199 (Gibco)
-  Ορός έμβριου βοδιού, θερμικά απενεργοποιημένος (FBS, heat inactivated, Gibco)
-  Endothelial cell growth supplement (ECGS) (Sigma)
-  Αντιβιοτικά πενικιλίνη/τρεπτομυκίνη [10.000 U/mL/10.000  $\mu$ g/mL (100X)] (PAA)
-  Ηπαρίνη (5.000 iu/mL) (LEO)
-  Διάλυμα θρυψίνης/EDTA (Biochrom)
-  Dulbecco's Phosphate Buffered Saline [DPBS (10X)] (Gibco)
-  Water for injection (WFI)

## Υλικά και Μέθοδοι

- Αλβουμίνη βόειου ορού [BSA (EC Number 232-936-2, Sigma)]
- Θρομβίνη (EC 3.4.21.5, Sigma – T6884)
- Παράγοντας νέκρωσης όγκων- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ , (Sigma)
- Μονοκλωνικό αντίσωμα FITC mouse anti-human CD31 (BD Biosciences)
- Μονοκλωνικό αντίσωμα PE mouse anti-human CD54 (BD Biosciences)
- Διμέθυλοσουλφοξείδιο [DMSO ( $C_2H_6OS$ , 78,13 g/mol, Carloerba – 44510)]
- Τικαγρελόρη ( $C_{23}H_{28}F_2N_6O_4S$ , 522,6 g/mol, AstraZeneca)
- Αδενοσίνη ( $C_{10}H_{13}N_5O_4$ , 267,24 g/mol, Sigma – A4036)

## ■ Όργανα

- Αιματοκυτόμετρο Neubauer
- Ανάστροφο μικροσκόπιο (A. Krüss Optronic)
- Φυγόκεντρος πάγκου Rotofix 32 (Hettich)
- Επωαστικός κλίβανος ατμόσφαιρας 5%  $CO_2$  (Nuair)
- Τρυβλία κυτταρικής καλλιέργειας (Corning)
- Πλακίδια κυτταρικής καλλιέργειας 6-θέσεων (Corning)
- Κωνικά βαθμονομημένα σωληνάρια των 15 και 50 mL (Corning)
- Φίλτρα διήθησης 0,2  $\mu m$  (Corning)
- Αποστειρωμένα σιφώνια 5 mL (Starstedt)
- Αποστειρωμένα σιφώνια 10 mL (Starstedt)
- Αποστειρωμένα σιφώνια 25 mL (Starstedt)
- Σωληνάκια κυτταρομέτρου ροής (Becton Dickinson)

## Διαλύματα εργασίας

### ■ Ρυθμιστικό διάλυμα PBS (1X)

Περιγραφή παρασκευής στην παράγραφο 4.4.

### ■ Διάλυμα 50 $\mu g/mL$ κολλαγόνου

Ποσότητα διαλύματος 17,5 N  $CH_3COOH$  αραιώνεται προς παρασκευή διαλύματος 0,02 N  $CH_3COOH$ , το οποίο στη συνέχεια χρησιμοποιείται για την αραιώση της

εμπορικά διαθέσιμης συσκευασίας κολλαγόνου για παρασκευή διαλύματος κολλαγόνου τελικής συγκέντρωσης 50 µg/mL. Το διάλυμα αποθηκεύεται στους 4°C.

**■ Πλήρες θρεπτικό μέσο M199**

Από την εμπορικά διαθέσιμη συσκευασία αφαιρούνται 26 mL και στη συνέχεια προστίθενται 120 mL FBS, 30 mg ECGS (διάλυση σε αυθαίρετη ποσότητα M199 και αποστείρωση με τη χρήση φίλτρο διήθησης 0,2 µm), 300 µL ηπαρίνη και 6 mL διαλύματος πενικιλίνη/στρεπτομυκίνη. Το διάλυμα αποθηκεύεται για 1 μήνα στους 4°C.

**■ Πλήρες θρεπτικό μέσο EGM-2**

Η εμπορικά διαθέσιμη συσκευασία διαθέτει μικροφιαλίδια αυξητικών παραγόντων, οι οποίοι προστίθενται στα 500 mL βασικού θρεπτικού μέσου EBM-2. Επιπλέον προστίθενται 50 mL FBS στο θρεπτικό μέσο. Το διάλυμα αποθηκεύεται για 1 μήνα στους 4°C.

**■ Διάλυμα παγώματος**

**■ 7,5% v/v DMSO**

Κατάλληλος όγκος DMSO διαλύεται σε FBS. Το διάλυμα αποθηκεύεται για 1 μήνα στους 4°C.

**■ Διάλυμα τικαγρελόρης**

Περιγραφή παρασκευής στην παράγραφο 4.1.

**■ Διάλυμα αδενοσίνης**

Περιγραφή παρασκευής στην παράγραφο 4.1.

**■ Διάλυμα BSA**

Περιγραφή παρασκευής στην παράγραφο 4.1.

**■ Διάλυμα θρομβίνης**

Περιγραφή παρασκευής στην παράγραφο 4.1.

■ **Διάλυμα επίδρασης**

Κατάλληλος όγκος FBS και διαλύματος πενικιλίνη/στρεπτομυκίνη διαλύονται σε θρεπτικό μέσο M199 προς σχηματισμό διαλύματος 20% FBS/1% Pen/Str/M199. Το διάλυμα αποθηκεύεται για 1 μήνα στους 4°C.

■ **Διάλυμα 10% FBS/M199 και 5% FBS/M199**

Κατάλληλος όγκος FBS διαλύονται σε θρεπτικό μέσο M199 προς σχηματισμό διαλύματος 10% και 5% FBS σε M199. Το διάλυμα αποθηκεύεται για 1 μήνα στους 4°C.

■ **Διάλυμα τικαγρελόρης**

Περιγραφή παρασκευής στην παράγραφο 4.1.

■ **Διάλυμα αδενοσίνης**

Περιγραφή παρασκευής στην παράγραφο 4.1.

**Πειραματική πορεία – Καλλιέργεια απομονωμένων CD34<sup>+</sup> πρόδρομων κυττάρων και διαφοροποίηση τους προς προχωρημένης ωρίμανσης EPCs (OECs)**

1. Επώαση πλακιδίου κυτταρικής καλλιέργειας 6-θέσεων (μια θέση) με 650 μL 50 μg/mL κολλαγόνο για 20 min σε επωαστικό κλίβανο (37°C, 5%CO<sub>2</sub>) ή για 1 h στο θάλαμο νηματικής ροής.
2. Έκπλυση πλακιδίου με 2×2 mL PBS (1X).
3. Προσθήκη 2 mL EGM-2 συμπεριλαμβανομένων των απομονωμένων CD34<sup>+</sup> πρόδρομων κυττάρων και επώαση κυττάρων για 4 h σε επωαστικό κλίβανο (37°C, 5%CO<sub>2</sub>).
4. Απομάκρυνση μη προσκολλημένων κυττάρων.
5. Έκπλυση πλακιδίου με 2×2 mL PBS (1X).
6. Προσθήκη 2 mL EGM-2.
7. Επώαση κυττάρων σε επωαστικό κλίβανο

Επανάληψη βημάτων 4-6 (αλλαγή θρεπτικού μέσου) καθημερινά μέχρι την εμφάνιση της πρώτης αποικίας κυττάρων. Έπειτα, η αλλαγή θρεπτικού μέσου πραγματοποιείται συνήθως κάθε 2-3 d, ανάλογα με το ρυθμό ανάπτυξης και πολλαπλασιασμού των

κυττάρων. Τα κύτταρα καλλιεργούνται για 20-30 d προκειμένου να γίνει η διαφοροποίησή τους σε OECs. Όταν τα κύτταρα πολλαπλασιαστούν και καλύψουν σχεδόν πλήρως την επιφάνεια του πλακιδίου (confluent), τότε έχουμε την 1<sup>η</sup> γενιά (p1) OECs. Στη συνέχεια, μπορούν να πραγματοποιηθούν ανακαλλιέργειες των OECs (αναλυτική περιγραφή παρακάτω).

### **Πειραματική πορεία – Μελέτης της δράσης της τικαγρελόρης και της αδενοσίνης στη διαφοροποίηση απομονωμένων CD34<sup>+</sup> πρόδρομων κυττάρων σε OECs**

Ακολουθείται η πειραματική πορεία «Καλλιέργεια CD34<sup>+</sup> πρόδρομων κυττάρων και διαφοροποίησή τους προς προχωρημένης ωρίμανσης EPCs (OECs)», ενώ, στη συνέχεια, πραγματοποιείται επώαση κυττάρων με 1 μM τικαγρελόρης ή 20 μM αδενοσίνης, καθώς και με το συνδυασμό των παραπάνω ουσιών την 2<sup>η</sup> μέρα (ως τυφλό δείγμα χρησιμοποιήθηκε 0,4% DMSO) πριν την προσθήκη 50 μM ADP. Η επώαση των κυττάρων με τικαγρελόρη και αδενοσίνη συνεχίζεται καθημερινά μέχρι την εμφάνιση της πρώτης αποικίας κυττάρων.

### **Πειραματική πορεία – Κυτταρική καλλιέργεια OECs ή HUVECs**

#### **■ Απόψυξη κυττάρων**

1. Επώαση τρυβλίου κυτταρικής καλλιέργειας με 3,5 mL 50 μg/mL κολλαγόνο για 20 min στον επωαστικό κλίβανο (37°C, 5%CO<sub>2</sub>) ή για 1 h στο θάλαμο νηματικής ροής.
2. Έκπλυση τρυβλίου με 2×10 mL PBS (1X).
3. Προσθήκη 500-750×10<sup>3</sup> κυττάρων, τα οποία είναι αποθηκευμένα σε υγρό N<sub>2</sub> (dewar), σε κωνικό βαθμονομημένο σωληνάριο, το οποίο περιέχει 10 mL πλήρους θρεπτικού μέσου EGM-2 ή M199 για την καλλιέργεια OECs ή HUVECs, αντίστοιχα (έντονη ανάδευση).
4. Μεταφορά κυττάρων σε τρυβλίο (ήπια και σταυρωτή ανακίνηση με σκοπό την ομοιόμορφη κατανομή των κυττάρων) και επώαση αυτών για 18-22 h σε επωαστικό κλίβανο (37°C, 5%CO<sub>2</sub>).
5. Απομάκρυνση μη προσκολλημένων κυττάρων.
6. Έκπλυση τρυβλίου με 2×10 mL PBS (1X).
7. Προσθήκη 10 mL πλήρους θρεπτικού μέσου.

## Υλικά και Μέθοδοι

Επανάληψη βημάτων 5-6 (αλλαγή θρεπτικού μέσου) κάθε 2 d μέχρι πλήρους κάλυψης (70-90%) της επιφάνειας του τρυβλίου κυτταρικής καλλιέργειας (confluent).

### ■ Αραίωση κυττάρων (split) – Απόκτηση νέας γενιάς κυττάρων

Μόλις τα κύτταρα καλύψουν το 70-90% της επιφάνειας του τρυβλίου κυτταρικής καλλιέργειας, τότε πραγματοποιείται αραίωση των κυττάρων.

1. Απομάκρυνση μη προσκολλημένων κυττάρων.
2. Έκπλυση τρυβλίου με 2×10 mL PBS (1X).
3. Επώαση κυττάρων με 2 mL διαλύματος θρυψίνης/EDTA για 3 min σε RT (συνεχή ανακίνηση).
4. Προσθήκη 10 mL πλήρους θρεπτικού μέσου και συλλογή κυττάρων σε κωνικό βαθμονομημένο σωληνάριο.
5. Μέτρηση κυττάρων (τοποθέτηση 10  $\mu$ L εναιωρήματος κυττάρων σε κάθε εσοχή της πλάκας Neubauer)

$$\text{Αρ. κυττάρων} = [(\text{Συνολικός αρ. κυττάρων στα 5 τετράγωνα})/5] \times 10^4 \times V$$

6. Φυγοκέντρηση κυττάρων στα 374×g για 5 min.
7. Απομάκρυνση υπερκειμένου και επαναιώρηση κυττάρων σε 10 mL πλήρους θρεπτικού μέσου.
8. Επώαση τρυβλίων με 3,5 mL 50  $\mu$ g/mL κολλαγόνο για 20 min στον επωαστικό κλίβανο (37°C, 5%CO<sub>2</sub>) ή για 1 h στο θάλαμο νηματικής ροής (παράλληλη διεργασία).
9. Έκπλυση τρυβλίων με 2×10 mL PBS (1X).
10. Προσθήκη πλήρους θρεπτικού μέσου συμπεριλαμβανομένων των κυττάρων και επώαση κυττάρων για σε επωαστικό κλίβανο (37°C, 5%CO<sub>2</sub>).

Η αλλαγή θρεπτικού μέσου πραγματοποιείται κάθε 2 d μέχρι πλήρους κάλυψης (70-90%) της επιφάνειας του τρυβλίου κυτταρικής καλλιέργειας (confluent). Ανάλογα με την αραίωση των κυττάρων (split) που πραγματοποιείται, διαφέρει το χρ. διάστημα το οποίο για να αναπτυχθούν τα κύτταρα έτσι ώστε να καλύψουν πλήρως την επιφάνεια του εκάστοτε τρυβλίου κυτταρικής καλλιέργειας (confluent).

Αραίωση κυττάρων (split)	Κυτταρική καλλιέργεια (confluent)
1:3	~ 2 d
1:4	~ 2-3d
1:5	~ 4-5 d
1:6	~ 5-6 d

### ■ Ψύξη κυττάρων (stock)

Μόλις τα κύτταρα καλύψουν το 70-90% της επιφάνειας του τρυβλίου κυτταρικής καλλιέργειας μπορεί να πραγματοποιηθεί ψύξη κυττάρων.

1. Απομάκρυνση μη προσκολλημένων κυττάρων.
2. Έκπλυση τρυβλίων με 2×10 mL PBS (1X).
3. Επώαση κυττάρων με 2 mL διαλύματος θρυψίνης/EDTA για 3 min σε RT (συνεχή ανακίνηση).
4. Προσθήκη 10 mL πλήρους θρεπτικού μέσου και συλλογή κυττάρων σε κωνικό βαθμονομημένο σωληνάριο.
5. Μέτρηση κυττάρων (τοποθέτηση 10  $\mu$ L εναιωρήματος κυττάρων σε κάθε εσοχή της πλάκας Neubauer)
6. Φυγοκέντρηση κυττάρων στα 374×g για 5 min.
7. Απομάκρυνση υπερκειμένου και επαναιώρηση κυττάρων σε κατάλληλο όγκο διαλύματος παγώματος 7,5% DMSO/FBS.
8. Αποθήκευση 1 mL του παραπάνω εναιωρήματος κυττάρων ( $500-750 \times 10^3$  κύτταρα) σε κρυοφιαλίδιο αρχικά για 15 min στους 4°C, στη συνέχεια για 2-3 d στους -80°C και τέλος, για μεγαλύτερα χρονικά διαστήματα στο υγρό N<sub>2</sub> (σταδιακή ψύξη κυττάρων).

### Πειραματική πορεία – Μελέτη της δράσης της τικαγρελόρης και της αδενοσίνης στη μεμβρανική έκφραση του ICAM-1 στα OECs

1. Βήματα 1-7 της υποενότητας «Απόψυξη κυττάρων» στην ενότητα «Κυτταρική καλλιέργεια OECs ή HUVECs».
2. Βήματα 1-7 της υποενότητας «Αραίωση κυττάρων (split) – Απόκτηση νέα γενιά» στην ενότητα «Κυτταρική καλλιέργεια OECs ή HUVECs».



### **Υλικά και Μέθοδοι**

3. Επώαση πλακιδίου κυτταρικής καλλιέργειας 6-θέσεων με 650  $\mu\text{L}$  50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  κολλαγόνο για 20 min στον επωαστικό κλίβανο ( $37^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$ ) ή για 1 h στο θάλαμο νηματικής ροής (παράλληλη διεργασία).
  4. Έκπλυση πλακιδίου με  $2 \times 2$  mL PBS (1X).
  5. Προσθήκη του κυτταρικού εναιωρήματος ( $10^5$  κύτταρα) σε πλήρες θρεπτικό μέσο EGM-2 και επώαση κυττάρων σε κλίβανο ( $37^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$ ).
- Η αλλαγή θρεπτικού μέσου πραγματοποιείται κάθε 2 d μέχρι πλήρους κάλυψης (70-90%) της επιφάνειας του πλακιδίου κυτταρικής καλλιέργειας (confluent).
6. Απομάκρυνση μη προσκολλημένων κυττάρων.
  7. Έκπλυση πλακιδίου με 2 mL PBS (1X) ανά θέση.
  8. Προ-επώαση κυττάρων με 4  $\mu\text{M}$  τικαγρελόρη ή 20  $\mu\text{M}$  αδενοσίνη για 5 min ή 1 min, αντίστοιχα, καθώς και με τον συνδυασμό τους σε 1,5 mL διάλυμα επίδρασης 20% FBS/1% Pen/Str/M199 στον επωαστικό κλίβανο ( $37^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$ ).
- Ως τυφλό δείγμα χρησιμοποιήθηκε 0,4% DMSO.
9. Επώαση κυττάρων με 8 U/mL θρομβίνη ή 1 ng/mL TNF- $\alpha$  για 24h στον επωαστικό κλίβανο ( $37^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$ ).
  10. Απομάκρυνση μη προσκολλημένων κυττάρων.
  11. Έκπλυση πλακιδίου με 2 mL PBS (1X) ανά θέση.
  12. Επώαση κυττάρων με 0,4 mL διαλύματος θρυψίνης/EDTA ανά θέση για 3 min σε RT (συνεχή ανακίνηση).
  13. Προσθήκη 2 mL πλήρους 10% FBS/M199 ανά θέση και συλλογή κυττάρων σε κωνικό βαθμονομημένο σωληνάριο.
  14. Μέτρηση κυττάρων ανά συνθήκη (τοποθέτηση 10  $\mu\text{L}$  εναιωρήματος κυττάρων σε κάθε εσοχή της πλάκας Neubauer)
  15. Φυγοκέντρηση κυττάρων στα  $374 \times g$  για 5 min.
  16. Απομάκρυνση υπερκειμένου και επαναιώρηση κυττάρων σε 500  $\mu\text{L}$  10% FBS/M199 ανά συνθήκη ( $10^5$  κύτταρα).
  17. Προσθήκη 200  $\mu\text{L}$  5% FBS/M199 ανά συνθήκη.
  18. Επώαση κυττάρων με 5  $\mu\text{L}$  CD54-PE και CD31-FITC μονοκλωνικού αντισώματος για 30 min στους  $4^\circ\text{C}$ .

19. Φυγοκέντρηση κυττάρων στα 374×g για 5 min.
20. Απομάκρυνση υπερκειμένου και επαναιώρηση κυττάρων σε 200 μL 5% FBS/M199 ανά συνθήκη (1<sup>η</sup> έκπλυση κυττάρων).
21. Επανάληψη βημάτων 17-18 (2<sup>η</sup> και 3<sup>η</sup> έκπλυση κυττάρων)
22. Φυγοκέντρηση κυττάρων στα 374×g για 5 min.
23. Απομάκρυνση υπερκειμένου και επαναιώρηση κυττάρων σε 200 μL 5% FBS/M199 ανά συνθήκη.
24. Κυτταρομετρική ανάλυση.

Κατά την επεξεργασία των αποτελεσμάτων υπολογίζεται η μέση ένταση φθορισμού (MFI) του CD54 στα ενεργοποιημένα κύτταρα. Η κυτταρομετρική ανάλυση λαμβάνει χώρα στα 10.000 συμβάντα.

Όλα τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν σε OECs p2. Ως θετικό δείγμα αναφοράς χρησιμοποιήθηκαν HUVECs p3.

#### **Πειραματική πορεία – Μελέτη της δράσης της ADP στη μεμβρανική έκφραση του ICAM-1 στα OECs**

1. Βήματα 1-7 της ενότητας «Μελέτη της δράσης της τικαγρελόρης και της αδενοσίνης στη μεμβρανική έκφραση του ICAM-1 στα OECs».
2. Επώαση κυττάρων με 20 μM ADP για 24h στον επωαστικό κλίβανο (37°C, 5%CO<sub>2</sub>).
3. Βήματα 10-24 της ενότητας «Μελέτη της δράσης της τικαγρελόρης και της αδενοσίνης στη μεμβρανική έκφραση του ICAM-1 στα OECs».

Όλα τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν σε OECs p2. Ως θετικό δείγμα αναφοράς χρησιμοποιήθηκαν HUVECs p3.

#### **Πειραματική πορεία – Μελέτη της δράσης της τικαγρελόρης και της αδενοσίνης στη μεμβρανική έκφραση του ICAM-1 στα OECs παρουσία εναιωρήματος αιμοπεταλίων**

1. Βήματα 1-7 της ενότητας «Μελέτη της δράσης της τικαγρελόρης και της αδενοσίνης στη μεμβρανική έκφραση του ICAM-1 στα OECs».

## **Υλικά και Μέθοδοι**

2. Παρασκευή PRP, όπως περιγράφηκε στην ενότητα «Παρασκευή PRP» στην παράγραφο «Συσσωρευομετρία οπτικής διαπερατότητας» υπό αποστειρωμένες συνθήκες (χωρίς προσαρμογή αιμοπεταλίων στις  $250 \times 10^3$  plts/ $\mu$ L).
3. Προσθήκη PRP σε κύτταρα (προσαρμογή αιμοπεταλίων στις  $250 \times 10^3$  plts/ $\mu$ L μέσα σε κάθε θέση του πλακιδίου) σε κατάλληλη ποσότητα διαλύματος επίδρασης 20% FBS/1% Pen/Str/M199 τελικού όγκου 1,5 mL.
4. Προ-επώαση κυττάρων-αιμοπεταλίων με 4  $\mu$ M τικαγρελόρη ή 20  $\mu$ M αδενοσίνη για 5 min ή 1 min, αντίστοιχα, καθώς και με τον συνδυασμό τους στον επωαστικό κλίβανο ( $37^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$ ).
5. Ενεργοποίηση αιμοπεταλίων *in situ* με 20  $\mu$ M ADP και επώαση κυττάρων-αιμοπεταλίων για 6 h στον επωαστικό κλίβανο ( $37^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$ ) [για τη μελέτη των  $\text{PGI}_2$ , vWF και MCP-1 αποθηκεύονται υπερκείμενα κυττάρων-αιμοπεταλίων στα 20 min, τη 1 h και τις 24 h στους  $-80^\circ\text{C}$  (ακολουθείται πειραματική πορεία σύμφωνα με τις οδηγίες τους εκάστοτε κατασκευαστή, η οποία περιγράφεται αναλυτικά παρακάτω)].
6. Βήματα 10-17 της ενότητας «Μελέτη της δράσης της τικαγρελόρης και της αδενοσίνης στη μεμβρανική έκφραση του ICAM-1 στα OECs».
7. Επώαση κυττάρων με 5  $\mu$ L CD54-PE και CD31-FITC μονοκλωνικού αντισώματος για 30 min στους  $4^\circ\text{C}$ .
8. Βήματα 19-24 της ενότητας «Μελέτη της δράσης της τικαγρελόρης και της αδενοσίνης στη μεμβρανική έκφραση του ICAM-1 στα OECs».

Όλα τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν σε OECs p2. Ως θετικό δείγμα αναφοράς χρησιμοποιήθηκαν HUVECs p3.

### **Πειραματική πορεία – Μελέτη της δράσης της τικαγρελόρης και της αδενοσίνης στη μεμβρανική έκφραση του ICAM-1 στα OECs παρουσία υπερκειμένου αιμοπεταλίων**

1. Βήματα 1-7 της ενότητας «Μελέτη της δράσης της τικαγρελόρης και της αδενοσίνης στη μεμβρανική έκφραση του ICAM-1 στα OECs».
2. Παρασκευή PRP, όπως περιγράφηκε στην ενότητα «Παρασκευή PRP» στην παράγραφο «Συσσωρευομετρία οπτικής διαπερατότητας».

3. Επώαση αιμοπεταλίων με 4 τικαγρελόρη και ενεργοποίηση αυτών με 10  $\mu\text{M}$  ADP, όπως περιγράφηκε στην ενότητα «Μελέτη της δράσης της τικαγρελόρης και της αδενοσίνης, καθώς και της δράσης των ανταγωνιστών της αδενοσίνης στη συσσώρευση του PRP ή των WPs» στην παράγραφο «Συσσωρευομετρία οπτικής διαπερατότητας».
4. Προσθήκη υπερκειμένων αιμοπεταλίων σε κύτταρα σε κατάλληλη ποσότητα διαλύματος επίδρασης 20% FBS/1% Pen/Str/M199 τελικού όγκου 1,5 mL.
5. Επώαση κυττάρων-υπερκειμένων αιμοπεταλίων για 6 h στον επωαστικό κλίβανο ( $37^{\circ}\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$ ) [για τη μελέτη των  $\text{PGI}_2$  και MCP-1 αποθηκεύονται υπερκείμενα κυττάρων-υπερκειμένων αιμοπεταλίων στα 20 min και τις 24 h στους  $-80^{\circ}\text{C}$  (ακολουθείται πειραματική πορεία σύμφωνα με τις οδηγίες τους εκάστοτε κατασκευαστή, η οποία περιγράφεται αναλυτικά παρακάτω)].
6. Βήματα 10-17 της ενότητας «Μελέτη της δράσης της τικαγρελόρης και της αδενοσίνης στη μεμβρανική έκφραση του ICAM-1 στα OECs».
7. Επώαση κυττάρων με 5  $\mu\text{L}$  CD54-PE και CD31-FITC μονοκλωνικού αντισώματος για 30 min στους  $4^{\circ}\text{C}$ .
8. Βήματα 19-24 της ενότητας «Μελέτη της δράσης της τικαγρελόρης και της αδενοσίνης στη μεμβρανική έκφραση του ICAM-1 στα OECs».

Όλα τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν σε OECs p2. Ως θετικό δείγμα αναφοράς χρησιμοποιήθηκαν HUVECs p3.

#### **4.6. Ανοσοενζυμική μέθοδος**




Η ανοσοενζυμική μέθοδος [Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)] είναι μια μέθοδος υψηλής ευαισθησίας, η οποία επιτρέπει τον ποσοτικό προσδιορισμό αντισωμάτων, αντιγόνων, κυτταροκινών, χημικών ουσιών, ορμονών σε βιολογικά υγρά με τη χρήση ενζυμο-συζευγμένων αντισωμάτων και χρωμογόνου υποστρώματος. Η αρχή της μεθόδου βασίζεται στην ειδική αλληλεπίδραση αντιγόνου-αντισώματος. Η ELISA αποτελεί μία ιδιαίτερα προσαρμόσιμη τεχνική δεδομένου ότι ανάλογα με την εφαρμογή, τα αντιδραστήρια και την ευαισθησία που επιδιώκεται, η μέθοδος παρουσιάζει διάφορες παραλλαγές, όπως η άμεση και έμμεση ELISA, η ELISA τύπου Sandwich και η ανταγωνιστική ELISA. Σε όλες τις παραλλαγές της μεθόδου, τα βασικά στοιχεία που τη χαρακτηρίζουν είναι: (α) η πρόσδεση και ακινητοποίηση του αντιγόνου ή του αντισώματος σε στερεή επιφάνεια

## **Υλικά και Μέθοδοι**

(ανοσοπροσρόφηση), (β) η χρήση ενός ενζυμο-συζευγμένου αντισώματος και (γ) η χρήση χρωμογόνων υποστρωμάτων, τα οποία μετά από αντίδραση με το ένζυμο παράγουν διαλυτό έγχρωμο προϊόν (χρώμα ή φθορισμό) επιτρέποντας την ποσοτικοποίηση της αλληλεπίδρασης αντιγόνου-αντισώματος.

Η επιλογή του ενζύμου και του υποστρώματος καθορίζουν τη μέθοδο ανίχνευσης και μέτρησης του προϊόντος της μεθόδου. Η μέτρηση του τελικού προϊόντος μπορεί να πραγματοποιηθεί με φωταύγεια, φθορισμομετρία ή χρωματομετρία. Παρόλο που η χημειοφωταύγεια παρέχει αυξημένη ευαισθησία στη δοκιμασία, οι πιο διαδεδομένες μέθοδοι μέτρησης είναι οι χρωματομετρικές. Η μέτρηση του προϊόντος της χρωμογόνου αντίδρασης πραγματοποιείται με μέτρηση της οπτικής πυκνότητας [Optical density (OD)] των δειγμάτων.

### **■ Αντιδραστήρια**

-  6-keto-PGF<sub>1α</sub> ELISA Kit (Enzo)
-  Human Von Willebrand Factor ELISA Kit (Abcam)
-  Human CCL2/MCP-1 Quantikine ELISA Kit (R&D Systems)








### **■ Όργανα**

-  Φασματοφωτόμετρο ELISA Reader (Tecan M200 Pro)

**Πειραματική πορεία – Μελέτη της δράσης της τυκαγρελόρης και της αδενοσίνης στην έκκριση της PGI<sub>2</sub>, του vWF και του MCP-1 στα OECs παρουσία εναιωρήματος ή υπερκλειμένου αιμοπεταλίων**

**Ανοσοενζυμικός προσδιορισμός της PGI<sub>2</sub>**

### **■ Αντιδραστήρια**

-  96 θέσεις donkey anti-sheep IgG microtiter plate
-  5 mL 6-keto-PGF<sub>1α</sub> ELISA conjugate
-  5 mL 6-keto-PGF<sub>1α</sub> ELISA antibody
-  27 mL assay buffer
-  0.5 mL 6-keto-Prostaglandin F<sub>1α</sub> standard
-  20 mL pNpp substrate
-  5 mL stop solution


 6-keto-PGF<sub>1α</sub> assay layout sheet

 Plate sealer

### Διαλύματα εργασίας

#### **6-keto-Prostaglandin F<sub>1α</sub> standard**

Το πρότυπο δείγμα 500.000 pg/mL αραιώνεται 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 60 min.

#### **Conjugate 1:10 dilution for total activity measurement**

50 μL από το 6-keto-PGF<sub>1α</sub> 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 αραιώνονται με 95 mL dH<sub>2</sub>O. Το διάλυμα φυλάσσεται σε RT για 3 μήνες.

### Πειραματική Πορεία

1. Τα αντιδραστήρια και προς μελέτη δείγματα έρχονται σε RT.
2. Προσθήκη 100 μL διαλύματος επίδρασης στις θέσεις NSB (μη ειδική πρόσδεση) και B0 (0 pg/mL).
3. Προσθήκη 100 μL πρότυπων και προς μελέτη δειγμάτων στις αντίστοιχες θέσεις.
4. Προσθήκη 50 μL assay buffer στη θέση NSB.
5. Προσθήκη 50 μL 6-keto-PGF<sub>1α</sub> ELISA conjugate (blue) σε όλες τις θέσεις εκτός από τις BL (τυφλό) και TA (συνολική δραστητικότητα).
6. Προσθήκη 50 μL 6-keto-PGF<sub>1α</sub> ELISA antibody (yellow) σε όλες τις θέσεις εκτός από τις BL, TA και NSB και επώαση δειγμάτων για 2 h σε RT (500 rpm)
7. Απόχυση υπερκειμένων και έκπλυση θέσεων με 3×400 μL wash buffer.
8. Προσθήκη 5 μL conjugate 1:10 dilution στη θέση TA.
9. Προσθήκη 200 μL pNpp substrate σε όλες τις θέσεις και επώαση δειγμάτων για 2 h σε RT.

## **Υλικά και Μέθοδοι**

10. Προσθήκη 50  $\mu$ L Stop solution και άμεση μέτρηση στα 405 nm.

Για τον υπολογισμό των pg/mL αφαιρείται από κάθε τιμή OD η τιμή που προκύπτει από τη διαφορά NSB-B0. Στη συνέχεια, κάθε τιμή διαιρείται με την OD του B0. Δημιουργείται η πρότυπη καμπύλη με τη χρήση προγράμματος four parameter logistic curve-fit, από την οποία υπολογίζεται η συγκέντρωση της 6-keto-PGF<sub>1 $\alpha$</sub>  κάθε δείγματος.

### **Ανοσοενζυμικός προσδιορισμός του vWF**

#### **■ Αντιδραστήρια**

- 96 θέσεις vWF microplate
- 1 vial vWF standard
- 30 mL Diluent N concentrate (30X)
- 1 vial Biotinylated human vWF antibody (50X)
- 80  $\mu$ L Streptavidin-peroxidase conjugate [SP Conjugate (100X)]
- 8 mL Chromogen substrate
- 12 mL Stop solution
- 2×30 mL Wash buffer concentrate (20X)
- Sealing tapes

### **Διαλύματα εργασίας**

#### **■ Diluent N (1X)**

Αραίωση 1:10 του Diluent N (10X) με dH<sub>2</sub>O. Το διάλυμα φυλάσσεται για 1 μήνα στους 4°C.

#### **■ Wash buffer (1X)**

Αραίωση 1:10 του Wash buffer concentrate (10X) με dH<sub>2</sub>O.

#### **■ Biotinylated vWF detector antibody (1X)**

Αραίωση 1:50 του Biotinylated vWF detector antibody (50X) με Diluent N (1X).

#### **■ SP conjugate (1X)**

Αραίωση 1:100 του SP conjugate (100X) με Diluent N (1X).

### vWF standard

Διάλυση vWF με Diluent N (1X), ώστε να προκύψει διάλυμα 80 mIU/mL. Το διάλυμα αφήνεται σε ηρεμία για 10 min. Ακολουθούν διαδοχικές αραιώσεις, ώστε να προκύψουν διαλύματα 40, 20, 10, 5 και 2,5 mIU/mL. Το διάλυμα Diluent N (1X) χρησιμοποιείται ως τυφλό δείγμα (0 mIU/mL).






### Πειραματική Πορεία

1. Τα αντιδραστήρια και προς μελέτη δείγματα έρχονται σε RT.
2. Προσθήκη 50 µL πρότυπων και προς μελέτη δειγμάτων στις αντίστοιχες θέσεις και επώαση για 2 h σε RT.
3. Απόχυση υπερκειμένων και έκπλυση θέσεων με 5×200 µL wash buffer (1X).
4. Προσθήκη 50 µL Biotinylated vWF detector antibody (1X) και επώαση για 2 h σε RT.
5. Απόχυση υπερκειμένων και έκπλυση θέσεων με 5×200 µL wash buffer (1X).
6. Προσθήκη 50 µL SP conjugate (1X) και επώαση για 30 min σε RT.
7. Απόχυση υπερκειμένων και έκπλυση θέσεων με 5×200 µL wash buffer (1X).
8. Προσθήκη 50 µL Chromogen substrate και επώαση για 20 min σε RT.
9. Προσθήκη 50 µL Stop solution και άμεση μέτρηση στα 450 nm με διόρθωση μήκους κύματος στα 570 nm.

Για τον υπολογισμό των mIU/mL αφαιρείται από κάθε τιμή OD η τιμή του τυφλού δείγματος. Δημιουργείται η πρότυπη καμπύλη με τη χρήση προγράμματος four parameter logistic curve-fit, από την οποία υπολογίζεται η συγκέντρωση του vWF κάθε δείγματος.







### Ανοσοενζυμικός προσδιορισμός του MCP-1

#### Αντιδραστήρια

-  96 θέσεις Human MCP-1 microplate
-  Human MCP-1 standard
-  2 mL Human MCP-1 conjugate
-  11 mL Assay diluent RD1-83
-  21 mL Calibrator diluent RD5L concentrate



## Υλικά και Μέθοδοι

-  21 mL Calibrator diluent RD6Q
-  21 mL Wash buffer concentrate
-  12 mL Color reagent A
-  12 mL Color reagent B
-  6 mL Stop solution
-  Plate sealers

## Διαλύματα εργασίας

### **Wash buffer**

20 mL Wash buffer concentrate αραιώνονται με dH<sub>2</sub>O μέχρι τελικό όγκο 500 mL. Το διάλυμα φυλάσσεται στους 4°C.

### **Calibrator diluent RD5L**

Αραίωση Calibrator diluent RD5L με dH<sub>2</sub>O μέχρι τελικό όγκο 100 mL.

### **Human MCP-1 standard**

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. Ακολουθούν διαδοχικές αραιώσεις, ώστε να προκύψουν διαλύματα 1000, 500, 250, 125, 62,5 και 31,3 pg/mL. Το διάλυμα Calibrator diluent RD5L χρησιμοποιείται ως τυφλό δείγμα (0 pg/mL).

### **Substrate solution**

Τα αντιδραστήρια Color reagent A και B αναμιγνύονται σε αναλογία 1:1. Το διάλυμα χρησιμοποιείται εντός 15 min.

## Πειραματική Πορεία



















1. Τα αντιδραστήρια και προς μελέτη δείγματα έρχονται σε RT.
2. Προσθήκη 200 µL πρότυπων και προς μελέτη δειγμάτων στις αντίστοιχες θέσεις και επώαση για 2 h σε RT.
3. Απόχυση υπερκειμένων και έκπλυση θέσεων με 3×400 µL wash buffer.
4. Προσθήκη 200 µL Human MCP-1 conjugate και επώαση για 1 h σε RT.

5. Απόχυση υπερκειμένων και έκπλυση θέσεων με 3×400  $\mu\text{L}$  wash buffer.
6. Προσθήκη 200  $\mu\text{L}$  Substrate solution και επώαση για 30 min σε RT στο σκοτάδι.
7. Προσθήκη 50  $\mu\text{L}$  Stop solution και άμεση μέτρηση στα 450 nm με διόρθωση μήκους κύματος στα 540 nm.

Για τον υπολογισμό των pg/mL αφαιρείται από κάθε τιμή OD η τιμή του τυφλού δείγματος. Δημιουργείται η πρότυπη καμπύλη με τη χρήση προγράμματος four parameter logistic curve-fit, από την οποία υπολογίζεται η συγκέντρωση του MCP-1 κάθε δείγματος.

## 4.7. Αγγειογένεση

### Αντιδραστήρια

-  Θρεπτικό μέσο EGM-Plus Bulletkit (Lonza)
-  Θρεπτικό μέσο Medium 199 (Gibco)
-  Ορός εμβρύου βοδιού, θερμικά απενεργοποιημένος (FBS, heat inactivated, Gibco)
-  Υπόστρωμα Matrigel (μειωμένοι αυξητικοί παράγοντες) (BD Biosciences)
-  Μεθυλοκυτταρίνη (4.000 cP) (Sigma)
-  Θρεπτικό μέσο M199 (10X) (Sigma)
-  HEPES ( $\text{C}_{18}\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_4\text{S}$ , 238,31 g/mol, Sigma)
-  Υδροξείδιο του νατρίου (NaOH, 40,00 g/mol, Merck)
-  Αγγειακός ενδοθηλιακός αυξητικός παράγοντας (VEGF) (Pepro Tech)
-  Αλβουμίνη βόειου ορού [BSA (EC Number 232-936-2, Sigma)]
-  Διάλυμα θρυψίνης/EDTA (Biochrom)
-  Dulbecco's Phosphate Buffered Saline [DPBS (10X)] (Gibco)
-  Water for injection (WFI)
-  Κολλαγόνο τύπου I (BD Biosciences)
-  17,5 N Οξικό οξύ ( $\text{CH}_3\text{COOH}$ , Riedel- de Haën)
-  37% Φορμαλδεΰδη (Merck)
-  Διμεθυλοσουλφοξείδιο [DMSO ( $\text{C}_2\text{H}_6\text{OS}$ , 78,13 g/mol, Carloerba)]
-  Τικαγρελόρη ( $\text{C}_{23}\text{H}_{28}\text{F}_2\text{N}_6\text{O}_4\text{S}$ , 522,6 g/mol, AstraZeneca)

## Υλικά και Μέθοδοι

- Αδενοσίνη ( $C_{10}H_{13}N_5O_4$ , 267,24 g/mol, Sigma)
- SCH58621 [ $A_{2A}AR$  ανταγωνιστής ( $C_{18}H_{15}N_7O$ , 345,36 g/mol, Tocris)]
- MRS1220 [ $A_3AR$  ανταγωνιστής ( $C_{21}H_{14}ClN_5O_2$ , 403,83 g/mol, Tocris)]
- DPCPX [ $A_1AR$  ανταγωνιστής ( $C_{16}H_{24}N_4O_2$ , 304,39 g/mol, Sigma)]
- MRS1706 [ $A_{2B}AR$  αντιστρεπτός αγωνιστής και ανταγωνιστής ( $C_{27}H_{29}N_5O_5$ , 503,56 g/mol, Tocris)]

## ■ Όργανα

- Λογισμικό AxioVision 4.9 (Carl Zeiss)
- Αιματοκυτόμετρο Neubauer
- Ανάστροφο μικροσκόπιο (A. Krüss Optronic και IX71)
- Φυγόκεντρος πάγκου Rotofix 32 (Hettich)
- Επωαστικός κλίβανος ατμόσφαιρας 5%  $CO_2$  (Nuair)
- Τρυβλία κυτταρικής καλλιέργειας (Corning)
- Πλακίδια κυτταρικής καλλιέργειας 12-θέσεων (Corning)
- Πλακίδια κυτταρικής καλλιέργειας 96-θέσεων (U-bottom) (Starstedt)
- Πλακίδια κυτταρικής καλλιέργειας 24-θέσεων (Corning)
- Κωνικά βαθμονομημένα σωληνάρια των 15 και 50 mL (Corning)
- Αποστειρωμένα σιφώνια 5 mL (Starstedt)
- Αποστειρωμένα σιφώνια 10 mL (Starstedt)
- Αποστειρωμένα σιφώνια 25 mL (Starstedt)
- Φίλτρα διήθησης 0,2  $\mu m$  (Corning)
- Αποστειρωμένες πιπέτες Pasteur 3,5 mL (Starstedt)
- Πεχαμετρικό χαρτί
- Γυάλινη φιάλη 500 mL
- Μαγνητάκι ανάδευσης

## Διαλύματα εργασίας

### ■ Ρυθμιστικό διάλυμα PBS (1X)

Περιγραφή παρασκευής στην παράγραφο 4.4.

■ **Διάλυμα 50 µg/mL κολλαγόνου**

Περιγραφή παρασκευής στην παράγραφο 4.4.

■ **Πλήρες θρεπτικό μέσο EGM-Plus**

Η εμπορικά διαθέσιμη συσκευασία διαθέτει μικροφιαλίδια αυξητικών παραγόντων, οι οποίοι προστίθενται στα 500 mL βασικού θρεπτικού μέσου EBM-2. Επιπλέον προστίθενται 50 mL FBS στο θρεπτικό μέσο. Το διάλυμα αποθηκεύεται για 1 μήνα στους 4°C.

■ **Πλήρες θρεπτικό μέσο M199**

Περιγραφή παρασκευής στην παράγραφο 4.5.

■ **Διάλυμα Methocel**

6 g μεθυλοκυτταρίνης προστίθενται μαζί με μαγνητάκι ανάδευσης σε γυάλινη φιάλη 500 mL και αποστειρώνονται σε κλίβανο ροής αποστείρωσης. Στη συνέχεια, προστίθενται 250 mL θρεπτικού μέσου M199 (προ-θέρμανση θρεπτικού μέσου στους 60°C) και αφήνονται υπό ανάδευση για 20 min σε RT. Έπειτα, προστίθενται τα υπόλοιπα 250 mL θρεπτικού μέσου M199 και αφήνονται υπό ανάδευση μέχρι την επόμενη μέρα στους 4°C. Την επόμενη μέρα το διάλυμα μοιράζεται σε κωνικά βαθμονομημένα σωληνάρια των 50 mL, τα οποία φυγοκεντρώνονται στα 5000×g για 2 h σε RT. Τέλος, το 90-95% του υπερκειμένου μεταφέρεται εκ νέου σε βαθμονομημένα σωληνάρια των 50 mL, τα οποία αποθηκεύονται στους 4°C.

■ **Διάλυμα HEPES**

■ 1 M HEPES

Το διάλυμα αποστειρώνεται με φίλτρα διήθησης 0,2 µm και αποθηκεύεται στους 4°C.

■ **Διάλυμα NaOH**

■ 0,2 M NaOH

Το διάλυμα αποστειρώνεται με φίλτρα διήθησης 0,2 µm και αποθηκεύεται στους 4°C.

■ **Διάλυμα VEGF**

Η εμπορικά διαθέσιμη συσκευασία περιέχει VEGF σε λυοφιλοποιημένη μορφή, η οποία διαλύεται σε 0,1% BSA/PBS (1X) δίνοντας διάλυμα τελικής συγκέντρωσης 10 µg/mL. Το διάλυμα μοιράζεται σε eppendorfs, τα οποία αποθηκεύονται στους -20°C.

## **Υλικά και Μέθοδοι**

### **■ Διάλυμα τικαγρελόρης**

Περιγραφή παρασκευής στην παράγραφο 4.1.

### **■ Διάλυμα αδενοσίνης**

Περιγραφή παρασκευής στην παράγραφο 4.1.

### **■ Διάλυμα SCH58621**

Περιγραφή παρασκευής στην παράγραφο 4.1.

### **■ Διάλυμα MRS1706**

Περιγραφή παρασκευής στην παράγραφο 4.1.

### **■ Διάλυμα DPCPX**

Περιγραφή παρασκευής στην παράγραφο 4.1.

### **■ Διάλυμα MRS1220**

Περιγραφή παρασκευής στην παράγραφο 4.1.

### **■ Διάλυμα 4% παραφορμαλδεΐδης (PFA)**

Κατάλληλος όγκος φορμαλδεΐδης αραιώνεται προς σχηματισμό 4% PFA. Το διάλυμα αποθηκεύεται στους 4°C.

## **Πειραματική πορεία – Μελέτη της δράσης της τικαγρελόρης και της αδενοσίνης, καθώς και των ανταγωνιστών των ARs στο σχηματισμό κυτταρικών αυλών και εκβλαστημάτων**

### **■ Κυτταρική καλλιέργεια**

1. Βήματα 1-7 (ως πλήρες θρεπτικό μέσο χρησιμοποιήθηκε το M199 και το EGM-2 Plus για την κυτταρική καλλιέργεια των OECs και HUVECs, αντίστοιχα) της υποενότητας «Απόψυξη κυττάρων» στην ενότητα «Κυτταρική καλλιέργεια OECs ή HUVECs» (παράγραφος «Κυτταρική καλλιέργεια»).
2. Βήματα 1-10 (ως πλήρες θρεπτικό μέσο χρησιμοποιήθηκε το M199 και το EGM-2 Plus για την κυτταρική καλλιέργεια των OECs και HUVECs, αντίστοιχα) της υποενότητας «Αραίωση κυττάρων (split) – Απόκτηση νέα γενιά» στην ενότητα «Κυτταρική καλλιέργεια OECs ή HUVECs» (παράγραφος «Κυτταρική καλλιέργεια»).

3. Απομάκρυνση μη προσκολλημένων κυττάρων.
4. Έκπλυση τρυβλίου με  $2 \times 10$  mL PBS (1X).
5. Επώαση κυττάρων με 2 mL διαλύματος θρυψίνης/EDTA για 3 min σε RT (συνεχή ανακίνηση).
6. Προσθήκη 10 mL θρεπτικού μέσου M199 και συλλογή κυττάρων σε κωνικό βαθμονομημένο σωληνάριο.
7. Μέτρηση κυττάρων (τοποθέτηση 10  $\mu$ L εναιωρήματος κυττάρων σε κάθε εσοχή της πλάκας Neubauer)

#### Μέθοδος Matrigel

8. Επίστρωση πλακιδίου κυτταρικής καλλιέργειας 12-θέσεων με 200  $\mu$ L υποστρώματος Matrigel ανά θέση.
9. Επώαση πλακιδίου για 1,5-2 h σε επωαστικό κλίβανο ( $37^{\circ}\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$ ).
10. Προσθήκη 1 mL πλήρους θρεπτικού μέσου ανά θέση πλακιδίου.
11. Επώαση πλακιδίου για 1-2 h σε επωαστικό κλίβανο ( $37^{\circ}\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$ ).
12. Προσθήκη 1 mL εναιωρήματος κυττάρων, το οποίο περιέχει  $1-2 \times 10^5$  κύτταρα, ανά θέση πλακιδίου.
13. Επώαση κυττάρων με 25 ng/mL VEGF για 16-18 h σε επωαστικό κλίβανο ( $37^{\circ}\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$ ).
14. Απομάκρυνση μη προσκολλημένων κυττάρων.
15. Έκπλυση τρυβλίου με  $2 \times 1$  mL PBS (1X).
16. Μονιμοποίηση κυττάρων με 500  $\mu$ L 4% PFA για 10 min σε RT.
17. Έκπλυση τρυβλίου με  $2 \times 1$  mL PBS (1X).
18. Ποσοτικοποίηση σχηματισμού νέων αυλών (υπολογίζεται το συνολικό μήκος των νέων αυλών που σχηματίστηκαν).

Για τη μελέτη της δράσης της τικαγρελόρης και της αδενοσίνης, καθώς και των ανταγωνιστών των ARs στο σχηματισμό κυτταρικών αυλών επώαστηκαν κύτταρα με 4  $\mu$ M τικαγρελόρη ή 20  $\mu$ M αδενοσίνης, καθώς και με το συνδυασμό τους για 16-18 h σε επωαστικό κλίβανο ( $37^{\circ}\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$ ). Επίσης, πραγματοποιήθηκε προ-επώαση ορισμένων κυτταρικών δειγμάτων με 10  $\mu$ M SCH58621, 5  $\mu$ M MRS1706, 30  $\mu$ M DPCPX ή 10  $\mu$ M

## **Υλικά και Μέθοδοι**

MRS1220 για 5 min σε επωαστικό κλίβανο (37°C, 5% CO<sub>2</sub>) πριν την προσθήκη τικαγρελόρης ή αδενοσίνης. Ως τυφλό δείγμα χρησιμοποιήθηκε 0,4% DMSO.

### **■ Μέθοδος εκβλάστησης κυτταρικών σφαιριδίων**

8. Προετοιμασία διαλύματος 20% Methocel/80% πλήρες θρεπτικό μέσο M199 τελικού όγκου 25 mL.
9. Προσθήκη εναιωρήματος κυττάρων, το οποίο περιέχει 10<sup>5</sup> κύτταρα.
10. Προσθήκη 100 μL του παραπάνω εναιωρήματος κυττάρων ανά θέση πλακιδίου κυτταρικής καλλιέργειας 96-θέσεων.
11. Επώαση κυττάρων για 20-24 h σε επωαστικό κλίβανο (37°C, 5% CO<sub>2</sub>).
12. Έλεγχος σφαιριδίων σε ανάστροφο μικροσκόπιο (χρήση μόνο σχηματισμένων σφαιριδίων).
13. Μεταφορά σφαιριδίων σε κωνικό βαθμονομημένο σωληνάριο 50 mL με τη χρήση πλαστικής πιπέτας Pasteur.
14. Φυγοκέντρηση σφαιριδίων στα 200-300×g για 3 min σε RT.
15. Απομάκρυνση υπερκειμένου και επαναιώρηση σφαιριδίων σε 1 mL διαλύματος 80% Methocel/20% FBS (ήπια ανάδευση).
16. Προετοιμασία διαλύματος κολλαγόνου (φυλάσσεται στον πάγο κατά τη διάρκεια του πειράματος):
  - i. 4 mL κολλαγόνο
  - ii. 500 μL θρεπτικό μέσο M199 (10X)
  - iii. 90 μL 1M HEPESΡύθμιση pH στο 7,3-7,6 με την προσθήκη κατάλληλου όγκου 0,5 M NaOH.
17. Προσθήκη 1 mL διαλύματος κολλαγόνο σε εναιώρημα σφαιριδίων.
18. Επώαση σφαιριδίων για 2 min σε RT.
19. Προσθήκη 1 mL εναιωρήματος σφαιριδίων ανά θέση πλακιδίου κυτταρικής καλλιέργειας 24-θέσεων.
20. Επώαση σφαιριδίων για 5 min σε επωαστικό κλίβανο (37°C, 5% CO<sub>2</sub>).
21. Επανάληψη βημάτων 17-20.
22. Επώαση σφαιριδίων για 30 min σε επωαστικό κλίβανο (37°C, 5% CO<sub>2</sub>).

23. Προσθήκη 100  $\mu\text{L}$  πλήρους θρεπτικού μέσου.
24. Επώαση κυττάρων με 5 ng/mL VEGF για 24 h σε επωαστικό κλίβανο ( $37^{\circ}\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$ ).
25. Απομάκρυνση πλήρους θρεπτικού μέσου.
26. Έκπλυση τρυβλίου με  $2 \times 100 \mu\text{L}$  PBS (1X).
27. Μονιμοποίηση κυττάρων με 100  $\mu\text{L}$  4% PFA για 10 min σε RT.
28. Έκπλυση τρυβλίου με  $2 \times 100 \mu\text{L}$  PBS (1X).
29. Ποσοτικοποίηση σχηματισμού εκβλαστημάτων (υπολογίζεται το συνολικό μήκος των εκβλαστημάτων που σχηματίστηκαν από δέκα σφαιρίδια).

Για τη μελέτη της δράσης της τικαγρελόρης και της αδενοσίνης, καθώς και των ανταγωνιστών των ARs στην εκβλάστηση κυτταρικών σφαιριδίων επώαστηκαν τα κύτταρα με 4  $\mu\text{M}$  τικαγρελόρη ή 20  $\mu\text{M}$  αδενοσίνης, καθώς και με το συνδυασμό τους για 24 h σε επωαστικό κλίβανο ( $37^{\circ}\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$ ). Επίσης, πραγματοποιήθηκε προ-επώαση ορισμένων κυτταρικών δειγμάτων με 10  $\mu\text{M}$  SCH58621, 5  $\mu\text{M}$  MRS1706, 30  $\mu\text{M}$  DPCPX ή 10  $\mu\text{M}$  MRS1220 για 5 min σε επωαστικό κλίβανο ( $37^{\circ}\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$ ) πριν την προσθήκη τικαγρελόρης ή αδενοσίνης. Ως τυφλό δείγμα χρησιμοποιήθηκε 0,4% DMSO.

Όλα τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν σε OECs p2. Ως θετικό δείγμα αναφοράς χρησιμοποιήθηκαν HUVECs p2.

#### 4.8. Στατιστική ανάλυση

Η στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων έγινε με τη βοήθεια του στατιστικού λογισμικού SPSS 23. Οι τιμές εκφράστηκαν ως η μέση τιμή  $\pm$  τυπική απόκλιση (SD), ενώ η σύγκριση των τιμών έγινε χρησιμοποιώντας το Mann–Whitney U test ή το Kruskal-Wallis 1-way ANOVA. Σε κάθε περίπτωση το επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας θεωρήθηκε ως  $p < 0,05$ .





## 5<sup>ο</sup> Κεφάλαιο – Αποτελέσματα

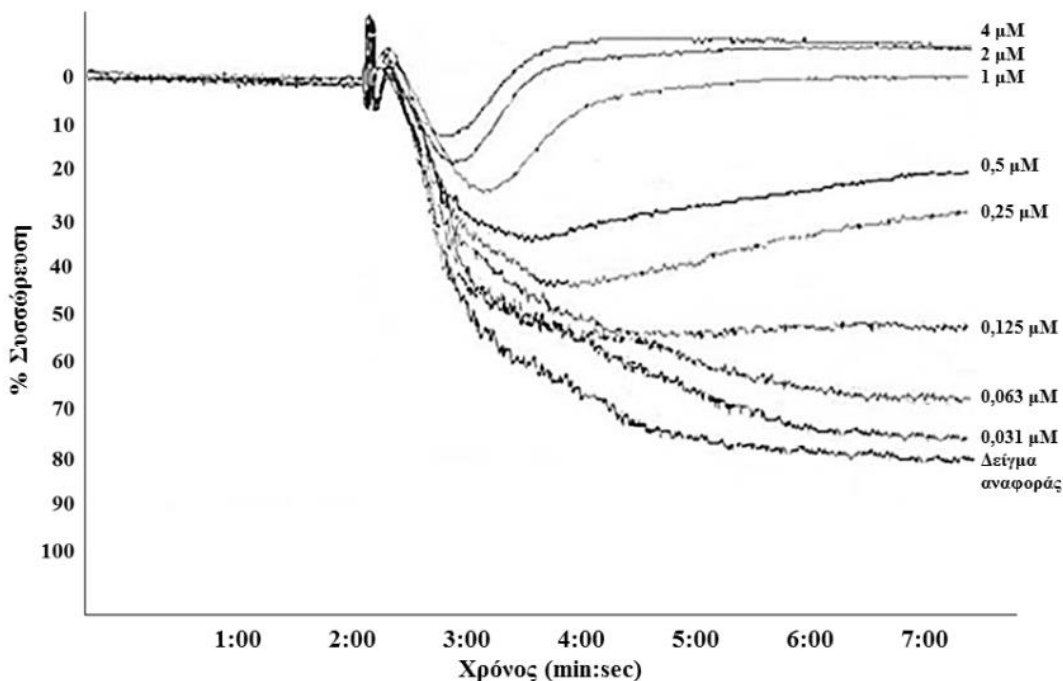
### 5.1. Η δράση της τικαγρελόρης και της αδενοσίνης στην αιμοπεταλιακή συσσώρευση

#### ✚ Συσσωρευομετρία σε WPs και PRP

Η δράση της τικαγρελόρης στην αιμοπεταλιακή συσσώρευση μελετήθηκε αρχικά σε WPs με τη χρήση της LTA. Η τικαγρελόρη ανέστειλε την επαγόμενη από το TRAP-6 και τη θρομβίνη συσσώρευση των αιμοπεταλίων με  $IC_{50}$  τιμή  $0,04 \pm 0,02 \mu\text{M}$  και  $2,90 \pm 0,40 \mu\text{M}$ , αντίστοιχα ( $n = 5$ ), καθώς και την επαγόμενη από το κολλαγόνο αιμοπεταλιακή συσσώρευση με  $IC_{50}$  τιμή  $0,05 \pm 0,01 \mu\text{M}$  ( $n = 5$ ). Ωστόσο, δεν ανέστειλε τη συσσώρευση των αιμοπεταλίων παρουσία του AA ( $n = 5$ ). Παρομοίως, μελετήθηκε και η δράση της αδενοσίνης στην αιμοπεταλιακή συσσώρευση σε WPs, ωστόσο, δεν την ανέστειλε παρουσία των παραπάνω αγωνιστών ( $n = 3$ ).

Στη συνέχεια, μελετήθηκαν η δράση τόσο της τικαγρελόρης όσο και της αδενοσίνης στην αιμοπεταλιακή συσσώρευση σε PRP με τη χρήση της LTA. Η τικαγρελόρη ανέστειλε την επαγόμενη από τη ADP συσσώρευση των αιμοπεταλίων με  $IC_{50}$  τιμή  $0,65 \pm 0,31 \mu\text{M}$  ( $n = 5$ ), καθώς και την επαγόμενη τόσο από το TRAP-6 όσο και από το AA με  $IC_{50}$  τιμή  $3,50 \pm 2,00 \mu\text{M}$  και  $1,41 \pm 0,36$ , αντίστοιχα ( $n = 5$ ), ενώ δεν ανέστειλε τη συσσώρευση των αιμοπεταλίων παρουσία του κολλαγόνου ( $n = 5$ ). Η αδενοσίνη ανέστειλε την επαγόμενη από το TRAP-6 και το AA αιμοπεταλιακή συσσώρευση με  $IC_{50}$  τιμή  $3,84 \pm 0,50 \mu\text{M}$  και  $1,65 \pm 0,48$ , αντίστοιχα ( $n = 3$ ), ωστόσο, δεν ανέστειλε τη συσσώρευση των αιμοπεταλίων παρουσία τόσο της ADP όσο και του κολλαγόνου ( $n = 3$ ). Στην **Εικ. 5.1** φαίνονται αντιπροσωπευτικές καμπύλες συσσωρευομετρίας της επαγόμενης από τη ADP αιμοπεταλιακής συσσώρευσης παρουσία τικαγρελόρης σε PRP.

## Αποτελέσματα

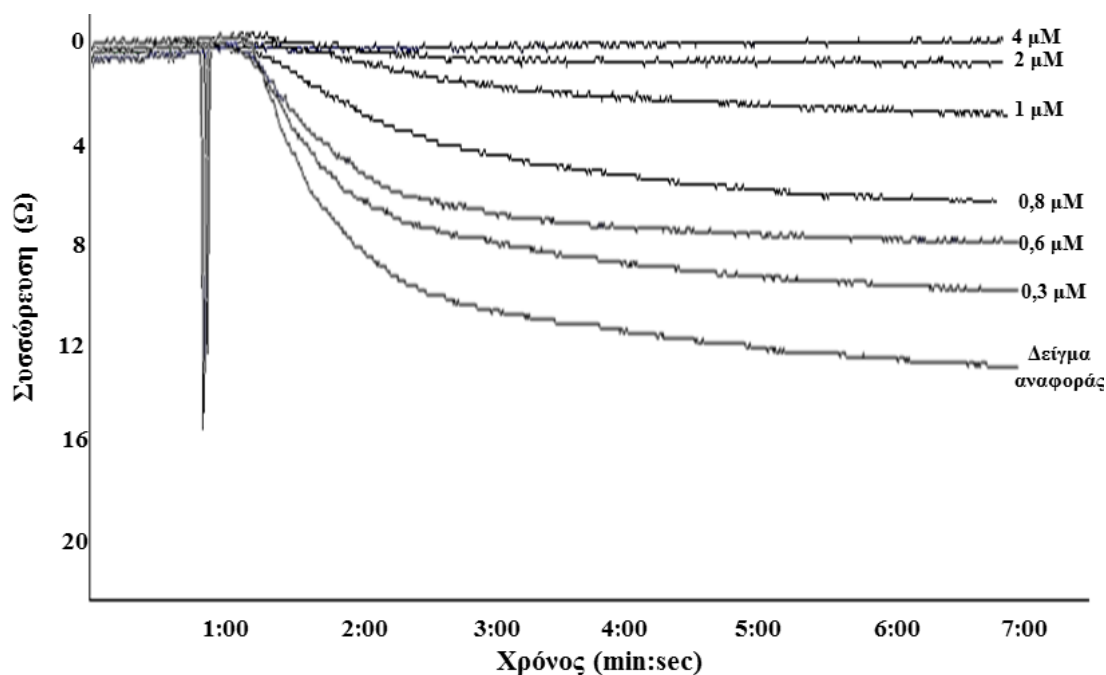


**Εικ. 5.1.** Αντιπροσωπευτικές καμπύλες συσσωρευομετρίας της επαγόμενης από 10  $\mu\text{M}$  ADP αιμοπεταλιακής συσσώρευσης παρουσία διαφόρων συγκεντρώσεων τικαγρελόρης σε PRP.

Τέλος, η δράση της αδενοσίνης μελετήθηκε και παρουσία των  $A_1\text{AR}$ ,  $A_3\text{AR}$ ,  $A_{2A}\text{AR}$  ανταγωνιστών, DPCPX, MRS1220 και SCH58621, αντίστοιχα, καθώς και παρουσία του  $A_{2B}\text{AR}$  αντιστρεπτού αγωνιστή και ανταγωνιστή, MRS1706. Η ανασταλτική δράση της αδενοσίνης στην επαγόμενη από το TRAP-6 και το AA συσσώρευση των αιμοπεταλίων παρεμποδίστηκε παρουσία του SCH58621, καθώς και παρουσία των DPCPX και MRS1220 ( $n = 3$ ). Αντίθετα, η παρουσία του MRS1706 δεν επηρέασε την ανασταλτική δράση της αδενοσίνης παρουσία των παραπάνω αγωνιστών ( $n = 3$ ).

### ✚ Συσσωρευομετρία σε ολικό αίμα

Η δράση της τικαγρελόρης μελετήθηκε επίσης στην αιμοπεταλιακή συσσώρευση σε ολικό αίμα με τη χρήση της IA. Η τικαγρελόρη ανέστειλε την επαγόμενη από τη ADP καθώς και από το AA συσσώρευση των αιμοπεταλίων με  $\text{IC}_{50}$  τιμή  $0,78 \pm 0,08 \mu\text{M}$  και  $0,91 \pm 0,16$ , αντίστοιχα ( $n = 3$ ). Αντίθετα, η τικαγρελόρη δεν ανέστειλε την αιμοπεταλιακή συσσώρευση παρουσία του TRAP-6 και του κολλαγόνου ( $n = 3$ ). Στην **Εικ. 5.2** φαίνονται αντιπροσωπευτικές καμπύλες συσσωρευομετρίας της επαγόμενης από τη ADP αιμοπεταλιακής συσσώρευσης παρουσία τικαγρελόρης σε ολικό αίμα.



**Εικ. 5.2.** Αντιπροσωπευτικές καμπύλες συσσωρευομετρίας της επαγόμενης από 10  $\mu\text{M}$  ADP αιμοπεταλιακής συσσώρευσης παρουσία διαφόρων συγκεντρώσεων τικαγρελόρης σε ολικό αίμα.

Στη συνέχεια, μελετήθηκε η δράση της αδενοσίνης στην αιμοπεταλιακή συσσώρευση σε ολικό αίμα, χρησιμοποιώντας ως αγωνιστές τη ADP και το AA. Προκειμένου να παρεμποδιστεί η κυτταρική πρόσληψη της αδενοσίνης από τον ENT-1, ο οποίος εκφράζεται στα ερυθροκύτταρα, η δράση της αδενοσίνης μελετήθηκε παρουσία της τικαγρελόρης, χρησιμοποιώντας τις αντίστοιχες  $\text{IC}_{50}$  τιμές της στην επαγόμενη από τη ADP και το AA αιμοπεταλιακή συσσώρευση. Η αδενοσίνη ανέστειλε κατά δόσο-εξαρτώμενη τρόπο την επαγόμενη από τη ADP και το AA συσσώρευση των αιμοπεταλίων παρουσία 0,78  $\mu\text{M}$  και 0,91  $\mu\text{M}$  τικαγρελόρης, αντίστοιχα ( $n = 3$ ). Επίσης, η δράση της αδενοσίνης μελετήθηκε στη μέγιστη συγκέντρωσής της, δηλ. 20  $\mu\text{M}$ , απουσία της τικαγρελόρης, ωστόσο δεν ανέστειλε στην αιμοπεταλιακή συσσώρευση παρουσία των παραπάνω αγωνιστών ( $n = 3$ ).

Επίσης, η δράση της αδενοσίνης μελετήθηκε και παρουσία της διπυριδαμόλης, η οποία αναστέλλει την κυτταρική πρόσληψη της αδενοσίνης από τα ερυθροκύτταρα. Η αδενοσίνη ανέστειλε κατά δόσο-εξαρτώμενη τρόπο την επαγόμενη από τη ADP και το AA αιμοπεταλιακή συσσώρευση παρουσία 2,5  $\mu\text{M}$  διπυριδαμόλης, η συγκέντρωση της οποίας δεν επηρέασε τη συσσώρευση των αιμοπεταλίων, ωστόσο η αναστολή ήταν μικρότερης έντασης σε σχέση με την τικαγρελόρη ( $n = 3$ ).

## Αποτελέσματα

Τέλος, η δράση της αδενοσίνης μελετήθηκε παρουσία των A<sub>1</sub>AR, A<sub>3</sub>AR, A<sub>2A</sub>AR ανταγωνιστών, DPCPX, MRS1220 και SCH58621, αντίστοιχα, καθώς και παρουσία του A<sub>2B</sub>AR αντιστρεπτού αγωνιστή και ανταγωνιστή, MRS1706, στην αιμοπεταλιακή συσσώρευση σε ολικό αίμα σε συνδυασμό με τη τικαγρελόρη. Η ανασταλτική δράση της αδενοσίνης στην επαγόμενη από τη ADP και το AA συσσώρευση των αιμοπεταλίων παρεμποδίστηκε παρουσία μόνο του SCH58621 και όχι των DPCPX, MRS1220, MRS1706 σε συνδυασμό με 0,78 μM και 0,91 μM τικαγρελόρη (n = 3).

Συγκεντρωτικά, τα παραπάνω αποτελέσματα παρουσιάζονται στους παρακάτω πίνακες, συμπεριλαμβανομένων των IC<sub>50</sub> τιμών της τικαγρελόρης και της αδενοσίνης, καθώς και των ανταγωνιστών της αδενοσίνης.

**Πίνακας 5.1.** Οι IC<sub>50</sub> τιμές (α) της τικαγρελόρης και (β) της αδενοσίνης, καθώς και (γ) των ανταγωνιστών της αδενοσίνης στην αιμοπεταλιακή συσσώρευση παρουσία διαφόρων αγωνιστών.

### (α) Τικαγρελόρη

Αγωνιστής	IC <sub>50</sub> τιμές (μM)		
	IA	LTA	
	Ολικό αίμα	PRP	WPs
ADP	0,78 ± 0,08	0,65 ± 0,31	
TRAP-6	×	3,50 ± 2,00	0,04 ± 0,02
AA	0,91 ± 0,16	1,41 ± 0,36	×
Κολλαγόνο	×	×	0,05 ± 0,01
Θρομβίνη			2,90 ± 0,40

### (β) Αδενοσίνη

Αγωνιστής	IC <sub>50</sub> τιμές (μM)	
	LTA	
	PRP	WPs
ADP	×	
TRAP-6	3,84 ± 0,50	×
AA	1,65 ± 0,48	×
Κολλαγόνο	×	×
Θρομβίνη		×

		Αγωνιστής				
		ADP		AA		
IA	0,78 $\mu$ M Tic	Συσσώρευση ( $\Omega$ )	Αναστολή (%)	0,91 $\mu$ M Tic	Συσσώρευση ( $\Omega$ )	Αναστολή (%)
	20 $\mu$ M Ado	0	100	20 $\mu$ M Ado	2	71
	10 $\mu$ M Ado	1	83	10 $\mu$ M Ado	3	57
	5 $\mu$ M Ado	2	67	7,5 $\mu$ M Ado	6	14
	4 $\mu$ M Ado	4	33	5 $\mu$ M Ado	7	
	1 $\mu$ M Ado	6	0			
	Δείγμα αναφοράς (Tic)	6		Δείγμα αναφοράς (Tic)	7	
	Δείγμα αναφοράς (DMSO)	11		Δείγμα αναφοράς (DMSO)	12	

Συντμήσεις: Tic: τικαγρελόρη, Ado: αδενοσίνη

		Αγωνιστής			
		ADP		AA	
IA	2,5 $\mu$ M Dip	Συσσώρευση ( $\Omega$ )	Αναστολή (%)	Συσσώρευση ( $\Omega$ )	Αναστολή (%)
	20 $\mu$ M Ado	6	50	7	46
	10 $\mu$ M Ado	9	25	9	31
	5 $\mu$ M Ado	10	17	11	15
	1 $\mu$ M Ado	12	0	13	0
	Δείγμα αναφοράς (Dip)	12		13	
	Δείγμα αναφοράς (DMSO)	12		13	

Συντμήσεις: Dip: διπυριδαμόλη, Ado: αδενοσίνη

## Αποτελέσματα

### (γ) Ανταγωνιστές ARs

IC <sub>50</sub> τιμές (μM)		LTA PRP			
		SCH58621 (A <sub>2A</sub> AR)	MRS1706 (A <sub>2B</sub> AR)	DPCPX (A <sub>1</sub> AR)	MRS1220 (A <sub>3</sub> AR)
20 μM Αδενοσίνη	TRAP-6	2,72 ± 0,66	×	47,97 ± 12,32	13,69 ± 2,51
	AA	1,99 ± 0,44	×	8,47 ± 2,23	16,14 ± 0,29

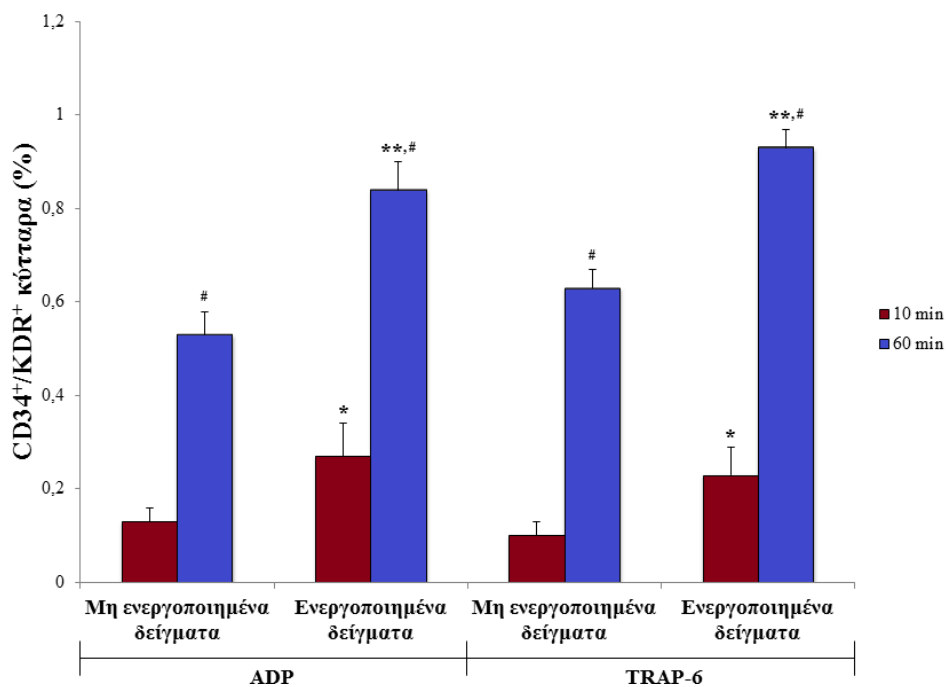
		IA Ολικό αίμα			
		SCH58621 (A <sub>2A</sub> AR)	MRS1706 (A <sub>2B</sub> AR)	DPCPX (A <sub>1</sub> AR)	MRS1220 (A <sub>3</sub> AR)
20 μM Αδενοσίνη	ADP 0,78 μM Tic	✓	×	×	×
	AA 0,91 μM Tic	✓	×	×	×

Συντμήσεις: Tic: τικαγρελόρη

## 5.2. Η δράση της τικαγρελόρης και της αδενοσίνης στην έκφραση του ενδοθηλιακού φαινοτύπου των CD34<sup>+</sup> πρόδρομων κυττάρων, καθώς και στην αλληλεπίδραση τους με τα αιμοπετάλια

Αρχικά, μελετήθηκε η μεμβρανική έκφραση του KDR στα CD34<sup>+</sup> πρόδρομα κύτταρα (CD34<sup>+</sup>/KDR<sup>+</sup> κύτταρα) σε μη ενεργοποιημένα δείγματα ολικού αίματος, καθώς και μετά από ενεργοποίηση των δειγμάτων με ADP, με τη χρήση της κυτταρομετρίας ροής σε διάφορες χρονικές στιγμές. Παρατηρήθηκε μια χρονο-εξαρτώμενη αύξηση της έκφρασης του KDR στα CD34<sup>+</sup> πρόδρομα κύτταρα από τα 10 min στα 60 min στα μη ενεργοποιημένα δείγματα [0,13 ± 0,03% vs. 0,53 ± 0,05% (n = 4), p<0,03], ενώ η προσθήκη της ADP στα συγκεκριμένα δείγματα αύξησε επιπλέον την έκφραση του KDR και στις δυο χρονικές στιγμές [από 0,13 ± 0,03% σε 0,27 ± 0,07% στα 10 min (n = 20), p<0,005, και από 0,53 ± 0,05% σε 0,84 ± 0,06% στα 60 min (n = 4), p<0,03] (Εικ. 5.3). Επίσης, μια χρονο-εξαρτώμενη αύξηση παρατηρήθηκε στην αλληλεπίδραση των αιμοπεταλίων με τα CD34<sup>+</sup> κύτταρα (CD61<sup>+</sup>/CD34<sup>+</sup> κυτταρικά συζεύγματα) από τα 10 min στα 60 min στα μη ενεργοποιημένα δείγματα [0,18 ± 0,04% vs. 0,57 ± 0,06% (n = 4), p<0,03] (Εικ. 5.4), καθώς και στην αλληλεπίδραση των

αιμοπεταλίων μετά τα  $CD34^+/KDR^+$  κύτταρα ( $CD61^+/KDR^+$  κυτταρικά συζεύγματα) [ $4,65 \pm 1,24\%$  vs.  $8,02 \pm 0,66\%$  ( $n = 4$ ),  $p < 0,03$ ] (Εικ. 5.5). Και οι δυο αλληλεπιδράσεις αυξήθηκαν και στις δυο χρονικές στιγμές μετά από ενεργοποίηση των δειγμάτων με ADP [για τα  $CD61^+/CD34^+$  κυτταρικά συζεύγματα από  $0,18 \pm 0,04\%$  σε  $0,50 \pm 0,15\%$  στα 10 min ( $n = 18$ ),  $p < 0,005$ , και από  $0,57 \pm 0,06\%$  σε  $1,08 \pm 0,13\%$  στα 60 min,  $p < 0,03$  ( $n = 4$ ), και για τα  $CD61^+/KDR^+$  κυτταρικά συζεύγματα από  $4,65 \pm 1,24\%$  σε  $6,61 \pm 1,26\%$  στα 10 min ( $n = 13$ ),  $p < 0,005$ , και από  $8,02 \pm 0,66\%$  σε  $9,10 \pm 0,70\%$  στα 60 min ( $n = 4$ ),  $p < 0,05$ ] (Εικ. 5.4 και 5.5). Στην Εικ. 5.6 παρουσιάζονται αντιπροσωπευτικά σημειακά γραφήματα κυτταροδιαγράμματος και ισομετρικά διαγράμματα δειγμάτων σε κατάσταση ηρεμίας, καθώς και μετά από ενεργοποίηση παρουσία ADP στα 10 min επώασης.

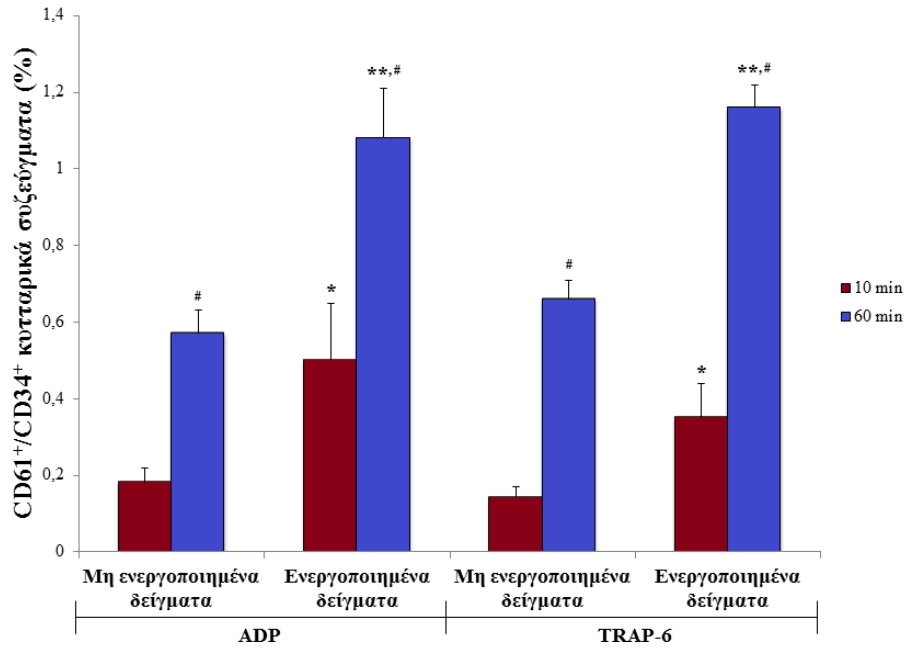


**Εικ. 5.3.** Χρονο-εξαρτώμενη αύξηση της μεμβρανικής έκφρασης του KDR στα  $CD34^+$  πρόδρομα κύτταρα τόσο στα μη ενεργοποιημένα όσο και στα ενεργοποιημένα με 50  $\mu$ M ADP και 10  $\mu$ M TRAP-6.

Οι τιμές αντιπροσωπεύουν τη μέση τιμή  $\pm$  τυπική απόκλιση 3 τουλάχιστον ανεξάρτητων πειραμάτων ( $*p < 0,005$  και  $**p < 0,03$  σε σύγκριση με μη ενεργοποιημένα δείγματα σε αντίστοιχες χρονικές στιγμές,  $^{\#}p < 0,03$  σε σύγκριση με 10 min σε αντίστοιχα δείγματα).

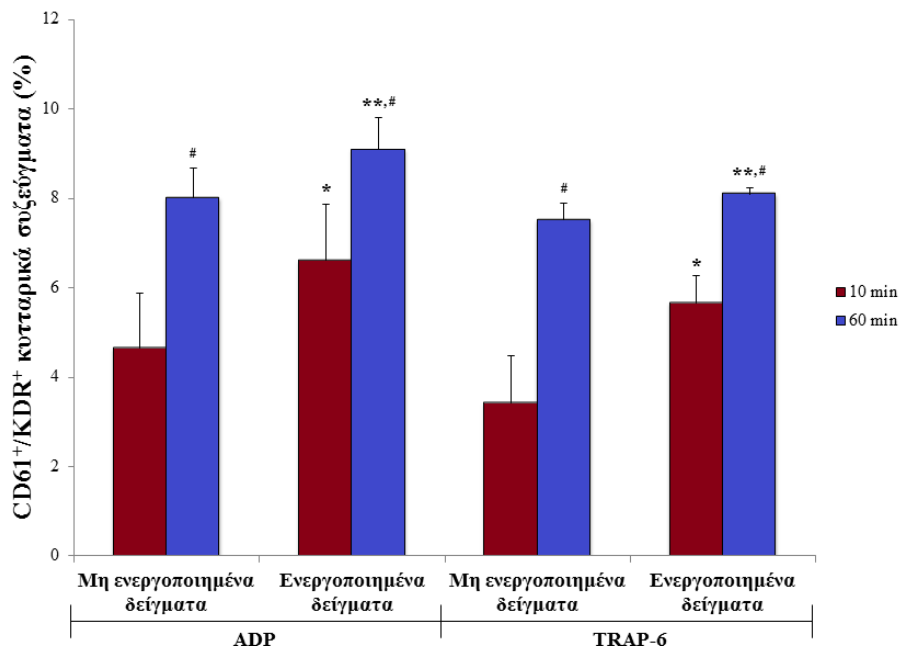


## Αποτελέσματα



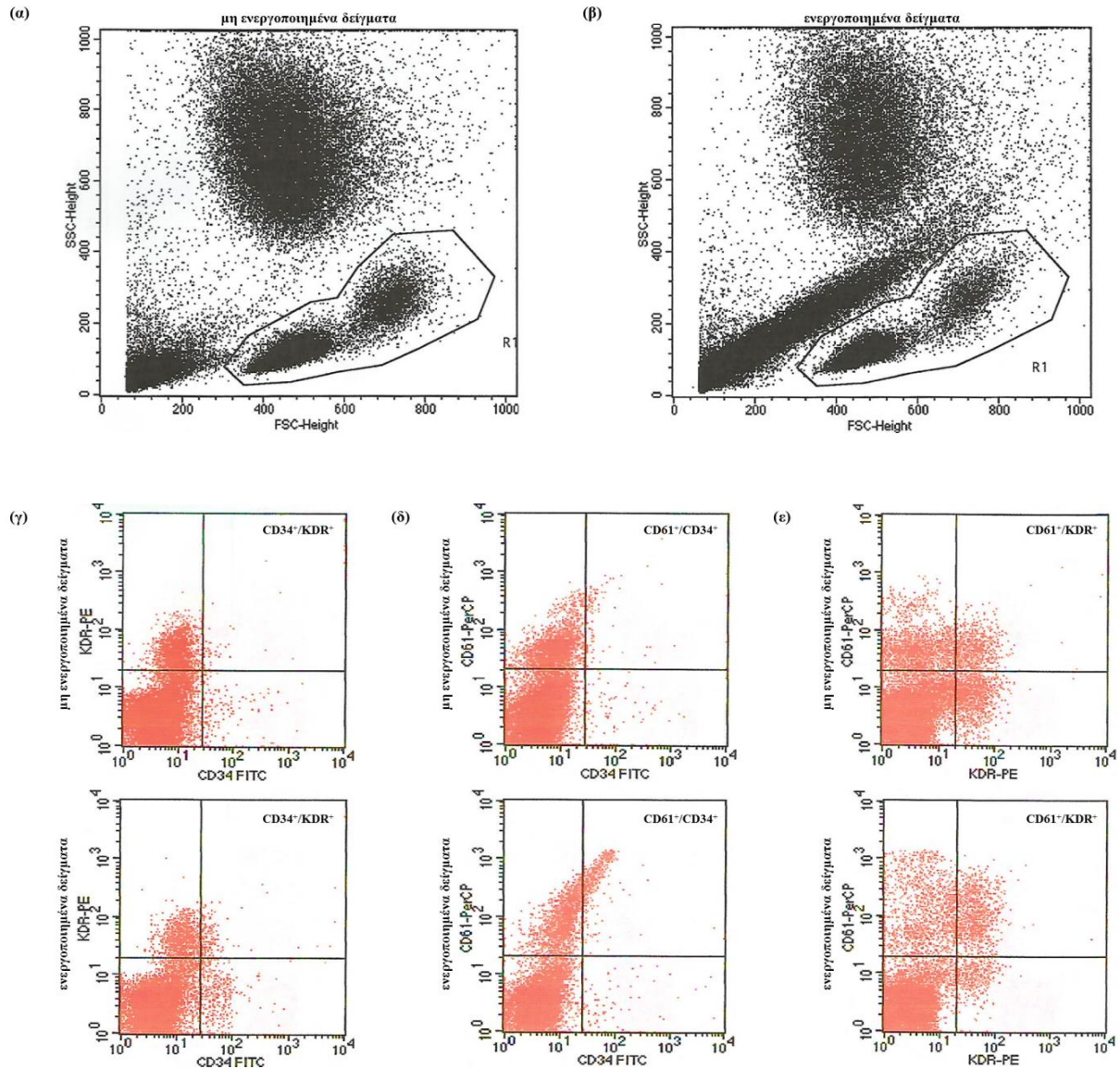
**Εικ. 5.4.** Χρονο-εξαρτώμενη αύξηση της αλληλεπίδρασης των αιμοπεταλίων με τα CD34<sup>+</sup> κύτταρα τόσο στα μη ενεργοποιημένα όσο και στα ενεργοποιημένα με 50  $\mu$ M ADP και 10  $\mu$ M TRAP-6.

Οι τιμές αντιπροσωπεύουν τη μέση τιμή  $\pm$  τυπική απόκλιση 3 τουλάχιστον ανεξάρτητων πειραμάτων (\* $p$ <0,005 και \*\* $p$ <0,03 σε σύγκριση με μη ενεργοποιημένα δείγματα σε αντίστοιχες χρονικές στιγμές, <sup>#</sup> $p$ <0,03 σε σύγκριση με 10 min σε αντίστοιχα δείγματα).



**Εικ. 5.5.** Χρονο-εξαρτώμενη αύξηση της αλληλεπίδρασης των αιμοπεταλίων με τα CD34<sup>+</sup>/KDR<sup>+</sup> κύτταρα τόσο στα μη ενεργοποιημένα όσο και στα ενεργοποιημένα με 50  $\mu$ M ADP και 10  $\mu$ M TRAP-6.

Οι τιμές αντιπροσωπεύουν τη μέση τιμή  $\pm$  τυπική απόκλιση 3 τουλάχιστον ανεξάρτητων πειραμάτων (\* $p$ <0,005 και \*\* $p$ <0,05 σε σύγκριση με μη ενεργοποιημένα δείγματα σε αντίστοιχες χρονικές στιγμές, <sup>#</sup> $p$ <0,03 σε σύγκριση με 10 min σε αντίστοιχα δείγματα).



**Εικ. 5.6.** Αντιπροσωπευτικά σημειακά γραφήματα κυτταροδιαγράμματος **(α)** μη ενεργοποιημένων και **(β)** ενεργοποιημένων δειγμάτων ολικού αίματος, όπου εντοπίζονται οι κυτταρικοί πληθυσμοί των λεμφοκυττάρων και μονοκυττάρων (περιοχή R1). Αντιπροσωπευτικά ισομετρικά διαγράμματα (περιοχή R1), τα οποία δείχνουν την έκφραση **(γ)** των  $CD34^+/KDR^+$  κυττάρων, καθώς και την αλληλεπίδραση των αιμοπεταλίων με τα **(δ)**  $CD34^+$  και **(ε)**  $CD34^+/KDR^+$  κύτταρα σε μη ενεργοποιημένα και ενεργοποιημένα δείγματα ολικού αίματος.

Με βάση τα παραπάνω αποτελέσματα, μελετήθηκε η δράση της τικαγρελόρης στη μεμβρανική έκφραση του KDR στα  $CD34^+$  πρόδρομα κύτταρα και την αλληλεπίδραση των αιμοπεταλίων με τα  $CD34^+$  και  $CD34^+/KDR^+$  κύτταρα χρησιμοποιώντας ως χρόνο επώασης τα 10 min, καθώς στο συγκεκριμένο χρόνο παρατηρείται μια ελάχιστη αυθόρμητη αύξηση σε όλες τις υπό μελέτη παραμέτρους των μη ενεργοποιημένων δειγμάτων. Παρατηρήθηκε πως η τικαγρελόρη αύξησε τα επίπεδα έκφρασης του KDR στα  $CD34^+$  κύτταρα παρουσία της ADP [από  $0,28 \pm 0,07\%$  σε  $0,41 \pm 0,09\%$  ( $n = 17$ ),  $p < 0,05$ ] (**Εικ. 5.7**). Επιπλέον, παρατηρήθηκε

## Αποτελέσματα

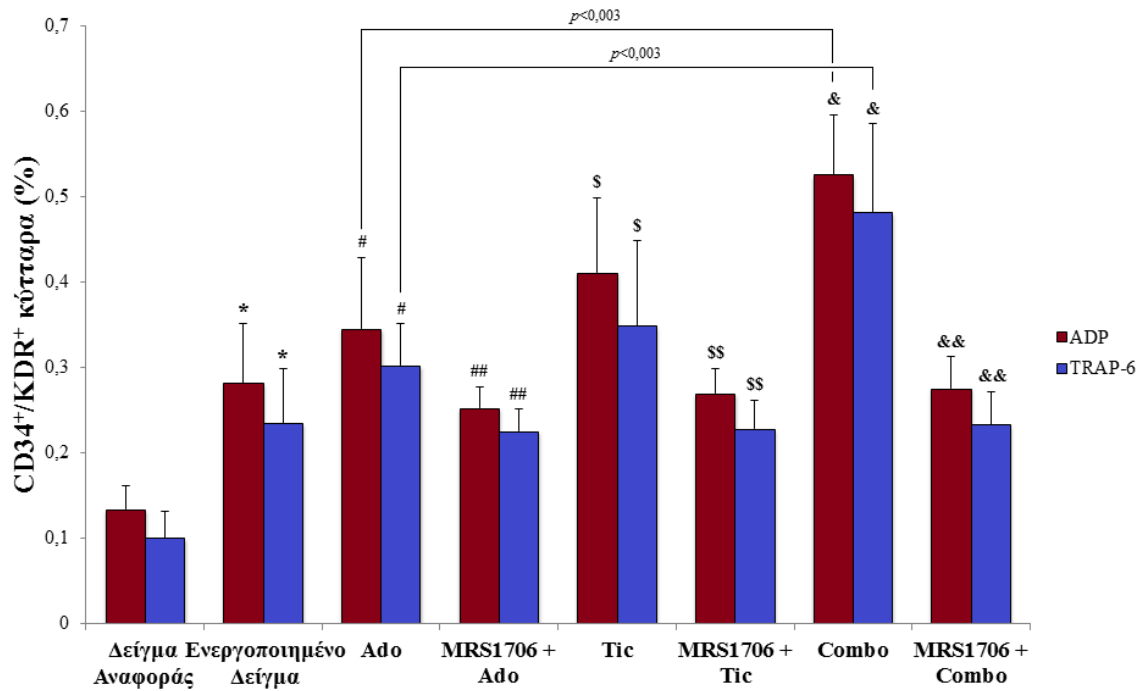
πως η τικαγρελόρη αύξησε την αλληλεπίδραση των αιμοπεταλίων με τα CD34<sup>+</sup>/KDR<sup>+</sup> κύτταρα μετά την ενεργοποίηση των δειγμάτων με ADP [από 6,61 ± 1,26% σε 8,70 ± 0,619% (n = 12), p<0,005] (Εικ. 5.9), ωστόσο, ανέστειλε την αλληλεπίδραση των αιμοπεταλίων με τα CD34<sup>+</sup> κύτταρα [από 0,50 ± 0,15% σε 0,20 ± 0,06% (n = 14), p<0,001] (Εικ. 5.8). Στη συνέχεια, μελετήθηκε η δράση της αδενοσίνης και παρατηρήθηκε πως μόνη της, καθώς και σε συνδυασμό με την τικαγρελόρη αύξησαν την έκφραση του KDR στα CD34<sup>+</sup> πρόδρομα κύτταρα σε ενεργοποιημένα με ADP δείγματα [για την αδενοσίνη από 0,28 ± 0,07% σε 0,35 ± 0,08% (n = 13), p<0,05, και για το συνδυασμό της τικαγρελόρης με την αδενοσίνη από 0,28 ± 0,07% σε 0,53 ± 0,07% (n = 13), p<0,005] (Εικ. 5.7). Η αδενοσίνη μόνη της και ο συνδυασμός της με την τικαγρελόρη αύξησε την αλληλεπίδραση των αιμοπεταλίων με τα CD34<sup>+</sup>/KDR<sup>+</sup> κύτταρα [για την αδενοσίνη από 6,61 ± 1,26% σε 7,60 ± 0,76% (n = 10), p<0,05, και για το συνδυασμό της τικαγρελόρης με την αδενοσίνη από 6,61 ± 1,26% σε 9,99 ± 0,72% (n = 10), p<0,005] (Εικ. 5.9), ωστόσο, δεν επηρέασε την αλληλεπίδραση των αιμοπεταλίων με τα CD34<sup>+</sup> κύτταρα (n = 10) (Εικ. 5.8).

Με βάση τα παραπάνω αποτελέσματα και πως η προσθήκη της ADP αποτελεί ένα προαπαιτούμενο βήμα για την αύξηση της μεμβρανικής έκφρασης του KDR στα CD34<sup>+</sup> πρόδρομα κύτταρα παρουσία της αδενοσίνης και της τικαγρελόρης, αξιολογήθηκε αν το συγκεκριμένο φαινόμενο λαμβάνει χώρα στην παρουσία ενός άλλου αιμοπεταλιακού αγωνιστή. Για το λόγο αυτό, επιλέχθηκε η χρήση του TRAP-6 ως αγωνιστή, καθώς η επαγόμενη από το TRAP-6 αιμοπεταλιακή συσσώρευση δεν αναστάλθηκε παρουσία της τικαγρελόρης σε ολικό αίμα (Πίνακας 5.1). Παράλληλα, η δράση του TRAP-6 μελετήθηκε σε διάφορες χρονικές στιγμές στις παραπάνω αλληλεπιδράσεις (από τα 10 min στα 60 min), παρατηρώντας, όπως και στην περίπτωση της ADP, παρόμοια αποτελέσματα (Εικ. 5.3, 5.4 και 5.5). Το TRAP-6 αύξησε τα επίπεδα έκφρασης του KDR στα CD34<sup>+</sup> πρόδρομα κύτταρα σε δείγματα ολικού αίματος [από 0,10 ± 0,03 σε 0,23 ± 0,06 (n = 8), p<0,005], ενώ, όπως και στην περίπτωση της ADP, η επαγόμενη αύξηση ενισχύθηκε παρουσία της τικαγρελόρης ή της αδενοσίνης, καθώς και του συνδυασμού τους [για την τικαγρελόρη από 0,23 ± 0,06% σε 0,35 ± 0,10% (n = 8), p<0,05, για την αδενοσίνη από 0,23 ± 0,06% σε 0,30 ± 0,05% (n = 8), p<0,05, και για το συνδυασμό της τικαγρελόρης με την αδενοσίνη από 0,23 ± 0,06% σε 0,48 ± 0,10% (n = 8), p<0,005] (Εικ. 5.7). Παρόμοιο φαινόμενο παρατηρήθηκε και στην αλληλεπίδραση των αιμοπεταλίων με τα CD34<sup>+</sup>/KDR<sup>+</sup> κύτταρα, όπου η ενεργοποίηση των δειγμάτων με το TRAP-6 αύξησε τη συγκεκριμένη αλληλεπίδραση [από 3,42 ± 1,05% σε

$5,66 \pm 0,61\%$  ( $n = 8$ ),  $p < 0,005$ ], η οποία ενισχύθηκε παρουσία της τικαγρελόρης ή της αδενοσίνης, καθώς και του συνδυασμού τους [για την τικαγρελόρη από  $5,66 \pm 0,61\%$  σε  $7,68 \pm 0,73\%$  ( $n = 8$ ),  $p < 0,005$ , για την αδενοσίνη από  $5,66 \pm 0,61\%$  σε  $6,90 \pm 0,88\%$  ( $n = 8$ ),  $p < 0,05$ , και για το συνδυασμό της τικαγρελόρης με την αδενοσίνη από  $5,66 \pm 0,61\%$  σε  $8,54 \pm 0,87\%$  ( $n = 8$ ),  $p < 0,005$ ] (**Εικ. 5.9**). Το TRAP-6 αύξησε επίσης την αλληλεπίδραση των αιμοπεταλίων με τα  $CD34^+$  κύτταρα [ $0,14 \pm 0,03\%$  σε  $0,35 \pm 0,09\%$  ( $n = 8$ ),  $p < 0,005$ ], ωστόσο, σε αντίθεση με την ενεργοποίηση των δειγμάτων με την ADP, η διακυτταρική αλληλεπίδραση δεν επηρεάστηκε από την τικαγρελόρη ή την αδενοσίνη ή το συνδυασμό τους ( $n = 8$ ) (**Εικ. 5.8**).

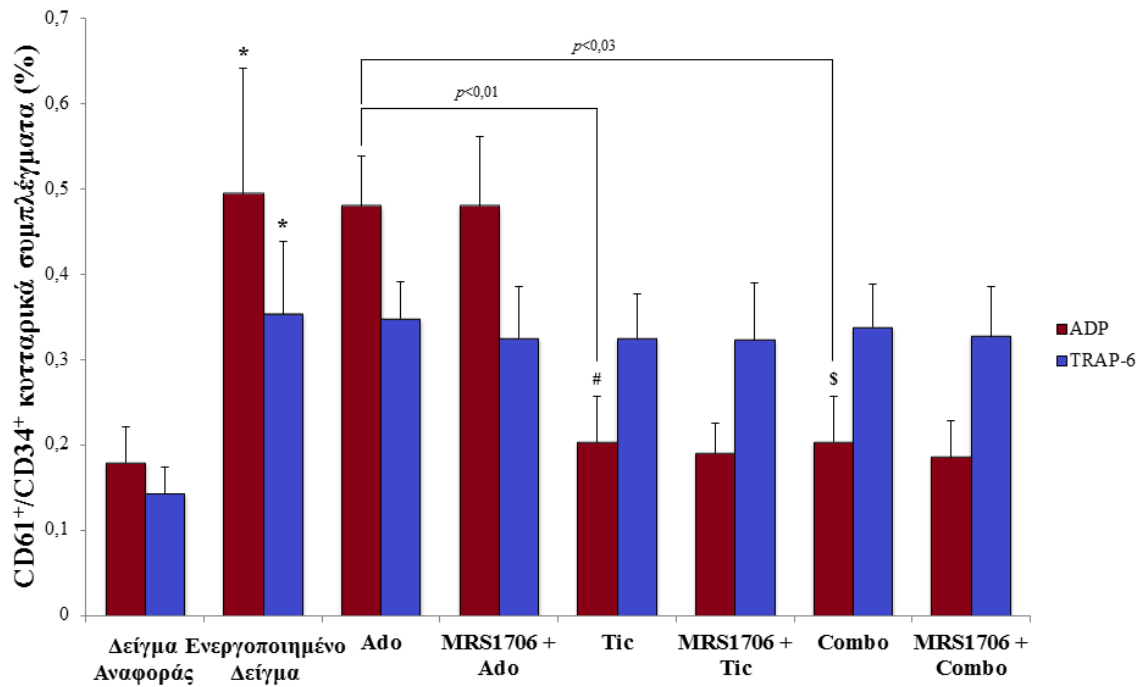
Λαμβάνοντας υπόψη, ότι η αδενοσίνη επηρεάζει τη μεμβρανική έκφραση του KDR στα  $CD34^+$  πρόδρομα κύτταρα, καθώς και την αλληλεπίδραση των αιμοπεταλίων με τα  $CD34^+/KDR^+$  κύτταρα, μελετήθηκε η δράση των τεσσάρων ανταγωνιστών των ARs προκειμένου να αξιολογηθεί αν οι παραπάνω επαγόμενες από την αδενοσίνη και την τικαγρελόρη αυξήσεις διαμεσολαμβάνονται από κάποιον AR. Παρατηρήθηκε πως η αύξηση στα επίπεδα των  $CD34^+/KDR^+$  κυττάρων παρουσία της αδενοσίνης, της τικαγρελόρης ή του συνδυασμού τους μετά από ενεργοποίηση των δειγμάτων με ADP ή TRAP-6 αναστάλθηκε πλήρως παρουσία του MRS1706 ( $n = 8$ ), ενώ η παρουσία των DPCPX, MRS1220 και SCH58621 δεν είχαν κάποια επίδραση στη συγκεκριμένη αύξηση ( $n = 3$ ) (**Εικ. 5.7**). Ωστόσο, η παρουσία των παραπάνω ανταγωνιστών σε ενεργοποιημένα με ADP ή TRAP-6 δείγματα δεν μετέβαλε την επαγόμενη από την αδενοσίνη, την τικαγρελόρη ή το συνδυασμό τους αύξηση της αλληλεπίδρασης των αιμοπεταλίων με τα  $CD34^+/KDR^+$  κύτταρα ( $n = 3$ ) (**Εικ. 5.9**). Θα πρέπει να αναφερθεί πως η αδενοσίνη και η τικαγρελόρη, καθώς και ο συνδυασμός τους, δεν επηρέασαν τη μεμβρανική έκφραση του KDR στα  $CD34^+$  πρόδρομα κύτταρα και την αλληλεπίδραση των αιμοπεταλίων με τα  $CD34^+/KDR^+$  κύτταρα σε μη ενεργοποιημένα δείγματα ( $n = 3$ ).

## Αποτελέσματα



**Εικ. 5.7.** Η δράση του MRS1706 (5  $\mu$ M) στην επαγόμενη αύξηση από την αδενοσίνη [Ado (20  $\mu$ M)] και την τικαγρελόρη [Tic (1  $\mu$ M)], καθώς και από το συνδυασμό τους (Combo), της μεμβρανικής έκφρασης του KDR παρουσία 50  $\mu$ M ADP και 10  $\mu$ M TRAP-6.

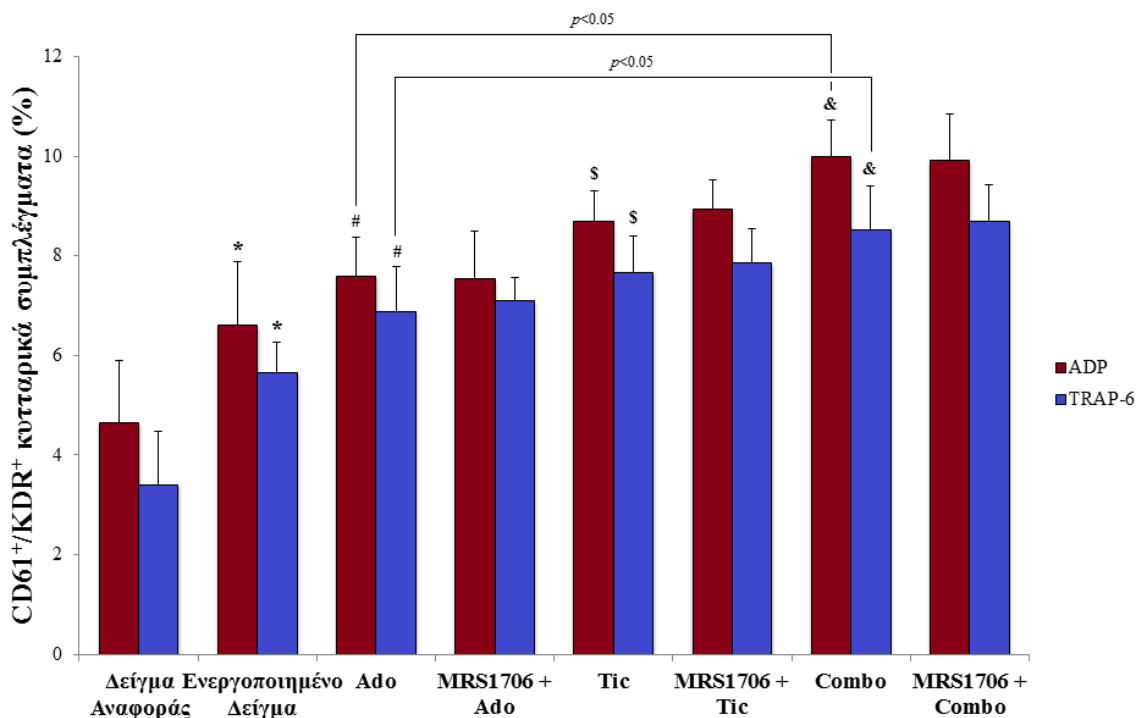
Οι τιμές αντιπροσωπεύουν τη μέση τιμή  $\pm$  τυπική απόκλιση 3 τουλάχιστον ανεξάρτητων πειραμάτων [ $*p<0,005$  σε σύγκριση με τις αντίστοιχες τιμές του δείγματος αναφοράς,  $#p<0,05$ ,  $$p<0,05$  και  $&p<0,005$  σε σύγκριση με τις αντίστοιχες τιμές του ενεργοποιημένου δείγματος,  $##p<0,01$  σε σύγκριση με τις αντίστοιχες τιμές της αδενοσίνης (Ado),  $$$p<0,05$  σε σύγκριση με τις αντίστοιχες τιμές της τικαγρελόρης (Tic),  $&&p<0,01$  σε σύγκριση με τις αντίστοιχες τιμές του συνδυασμού (Combo)].



**Εικ. 5.8.** Η δράση του MRS1706 (5  $\mu$ M) στην επαγόμενη αύξηση από την ADP (50  $\mu$ M) και το TRAP-6 (10  $\mu$ M) τις αλληλεπίδρασης των αιμοπεταλίων με τα CD34<sup>+</sup> κύτταρα παρουσία 20  $\mu$ M αδενοσίνης (Ado) και 1  $\mu$ M τικαγρελόρης (Tic), καθώς και του συνδυασμού τους (Combo).

Οι τιμές αντιπροσωπεύουν τη μέση τιμή  $\pm$  τυπική απόκλιση 3 τουλάχιστον ανεξάρτητων πειραμάτων (\* $p$ <0,005 σε σύγκριση με τις αντίστοιχες τιμές του δείγματος αναφοράς, # $p$ <0,05 και \$ $p$ <0,005 σε σύγκριση με τις αντίστοιχες τιμές του ενεργοποιημένου δείγματος).

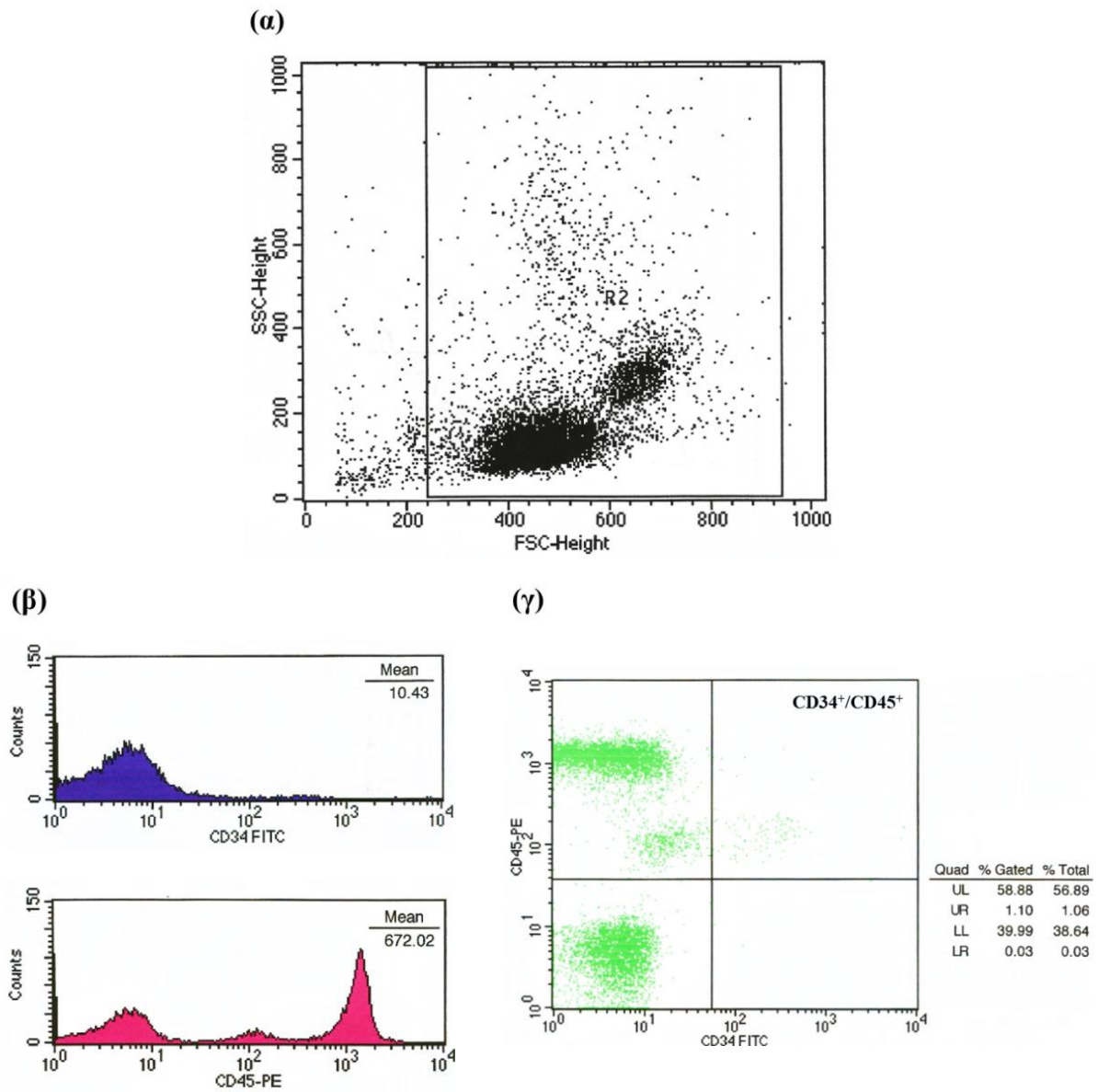
## Αποτελέσματα



**Εικ. 5.9.** Η δράση του MRS1706 (5  $\mu$ M) στην επαγόμενη αύξηση από την αδενοσίνη [Ado (20  $\mu$ M)] και την τικαγρελόρη [Tic (1  $\mu$ M)], καθώς και από το συνδυασμό τους (Combo), της αλληλεπίδρασης των αιμοπεταλίων με τα CD34<sup>+</sup>/KDR<sup>+</sup> κύτταρα παρουσία 50  $\mu$ M ADP και 10  $\mu$ M TRAP-6.

Οι τιμές αντιπροσωπεύουν τη μέση τιμή  $\pm$  τυπική απόκλιση 3 τουλάχιστον ανεξάρτητων πειραμάτων (\* $p$ <0,005 σε σύγκριση με τις αντίστοιχες τιμές του δείγματος αναφοράς, # $p$ <0,05, \$ $p$ <0,005 και & $p$ <0,005 σε σύγκριση με τις αντίστοιχες τιμές του ενεργοποιημένου δείγματος).

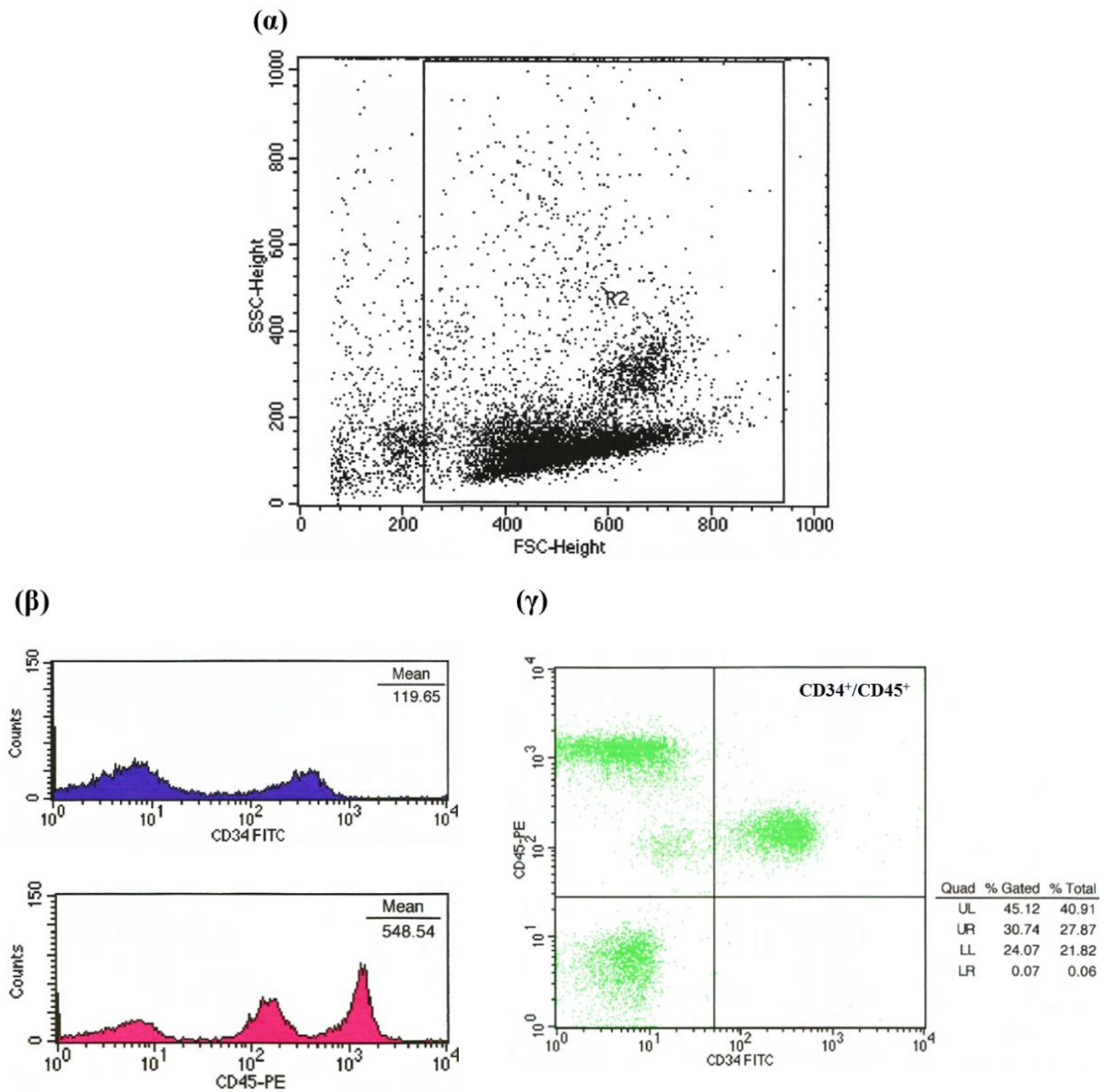
Τέλος, η δράση της τικαγρελόρης και της αδενοσίνης μελετήθηκε στην έκφραση του ενδοθηλιακού φαινοτύπου σε απομονωμένα CD34<sup>+</sup> πρόδρομα κύτταρα από αίμα ομφάλιου λώρου με τη χρήση της κυτταρικής καλλιέργειας, προκειμένου να διερευνηθεί αν τα συγκεκριμένα κύτταρα αυξάνουν την μεμβρανική έκφραση του KDR παρουσία ή απουσία ADP. Αρχικά, αξιολογήθηκε η καθαρότητα των απομονωμένων με μαγνητικό διαχωρισμό CD34<sup>+</sup> πρόδρομων κυττάρων με τη χρήση της κυτταρομετρίας ροής. Στις **Εικ. 5.10, 5.11** και **5.12** ακολουθούν αντιπροσωπευτικά σημειακά γραφήματα κυτταροδιαγράμματος, ιστογράμματα έντασης φθορισμού και ισομετρικά διαγράμματα του κυτταρομετρικού προφίλ των απομονωμένων MNCs και CD34<sup>+</sup> πρόδρομων κυττάρων. Η παρουσία είτε της τικαγρελόρης είτε της αδενοσίνης σε απομονωμένα CD34<sup>+</sup> πρόδρομα κύτταρα παρουσία ή απουσία ADP δεν προκάλεσε κάποια μεταβολή στο σχηματισμό πρώτης κυτταρικής αποικίας με την πάροδο του χρόνου.



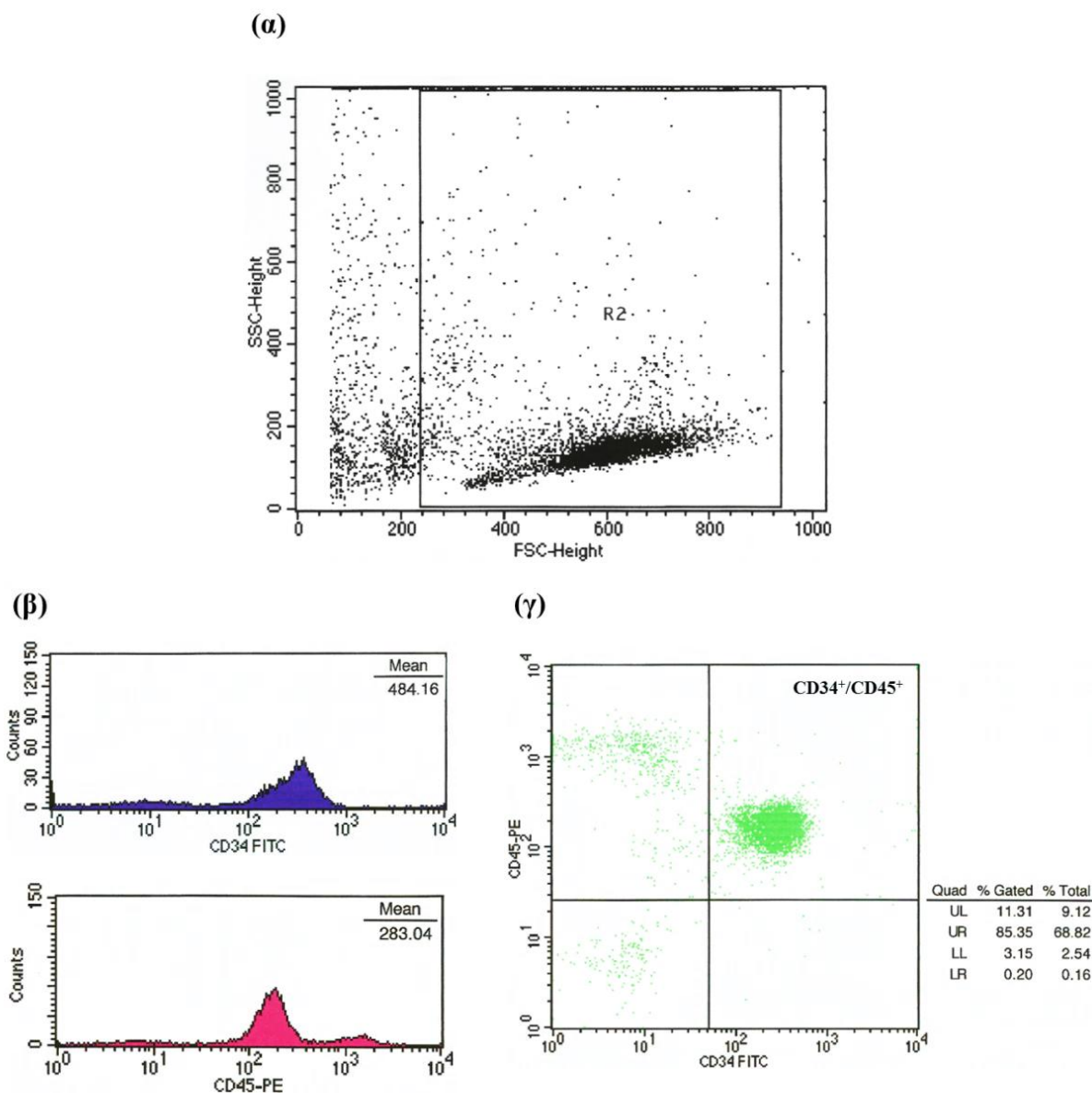
**Εικ. 5.10.** (α) Χαρακτηριστικό κυτταρομετρικό προφίλ των MNCs από αίμα από ομφάλιου λώρου πριν το μαγνητικό διαχωρισμό. (β) Χαρακτηριστική έκφραση των φθορισμένων μονοκλωνικών αντισωμάτων CD34 και CD45. (γ) Χαρακτηριστικό ισομετρικό διάγραμμα, τα δείχνουν την έκφραση των CD34<sup>+</sup>/CD45<sup>+</sup> κυττάρων στο πάνω δεξιά τεταρτημόριο (% Gated UR).



Αποτελέσματα



**Εικ. 5.11. (α)** Χαρακτηριστικό κυτταρομετρικό προφίλ των επισημασμένων  $CD34^+$  MNCs από αίμα ομφάλιου λώρου μετά την πρώτη στήλη διαχωρισμού. **(β)** Χαρακτηριστική έκφραση των φθορισμένων μονοκλωνικών αντισωμάτων CD34 και CD45. **(γ)** Χαρακτηριστικό ισομετρικό διάγραμμα, τα δείχνουν την έκφραση των  $CD34^+/CD45^+$  κυττάρων στο πάνω δεξιά τεταρτημόριο (% Gated UR).



**Εικ. 5.12.** (α) Χαρακτηριστικό κυτταρομετρικό προφίλ των επισημασμένων  $CD34^+$  MNCs από αίμα ομφάλιου λώρου μετά την δεύτερη στήλη διαχωρισμού. (β) Χαρακτηριστική έκφραση των φθορισμένων μονοκλωνικών αντισωμάτων CD34 και CD45. (γ) Χαρακτηριστικό ισομετρικό διάγραμμα, τα δείχνουν την έκφραση των  $CD34^+/CD45^+$  κυττάρων στο πάνω δεξιά τεταρτημόριο (% Gated UR).

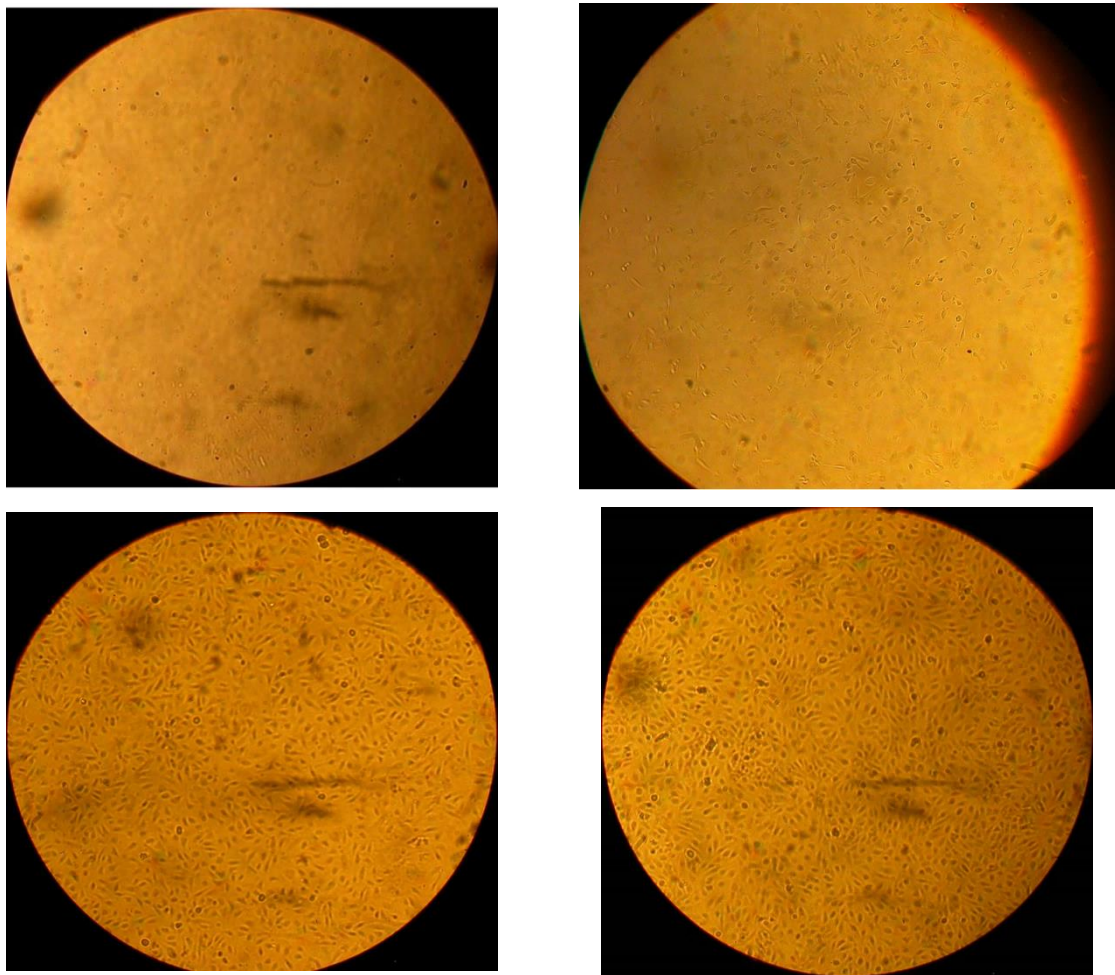
### 5.3. Η δράση της τικαγρελόρης και της αδενοσίνης στα πρόδρομα και ώριμα ECs

#### ✚ Χαρακτηρισμός των OECs

Τα απομονωμένα από MNCs από αίμα ομφάλιου λώρου  $CD34^+$  πρόδρομα κύτταρα διαφοροποιήθηκαν σε OECs μετά από περίπου 30 d κυτταρικής καλλιέργειας. Τα OECs

### Αποτελέσματα

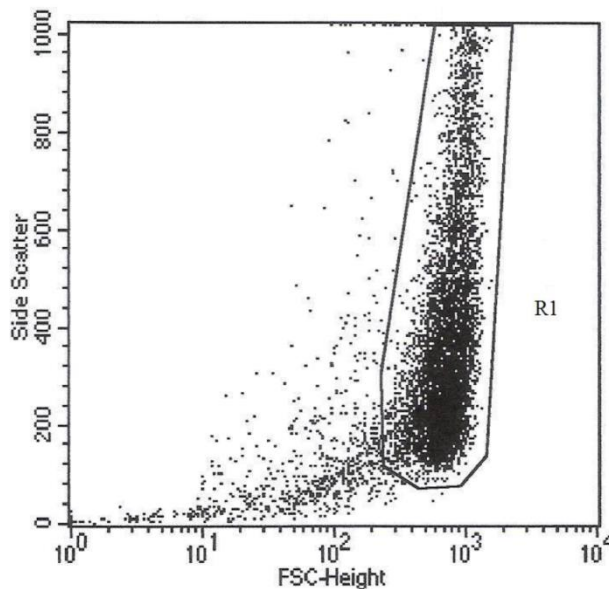
παρουσιάζουν παρόμοια χαρακτηριστικά με αυτά των HUVECs ως προς το σχήμα, τη μορφολογία, καθώς και την ικανότητα εξάπλωσής τους (Εικ. 5.13). Στον Πίνακα 5.3 που ακολουθεί υπάρχει αντιπροσωπευτικό σημειακό γράφημα κυτταροδιαγράμματος, καθώς και οι τιμές MFI της έκφρασης των μονοκλωνικών αντισωμάτων CD31, CD34, KDR και CD45 OECs p1.



**Εικ. 5.13.** Αντιπροσωπευτικές εικόνες μικροσκοπίου (10X) των CD34<sup>+</sup> πρόδρομων κυττάρων [1<sup>η</sup> ημέρα (πάνω αριστερά) και 14<sup>η</sup> ημέρα (πάνω δεξιά) κυτταρικής καλλιέργειας], των OECs (κάτω αριστερά) και των HUVECs (κάτω δεξιά).

**Πίνακας 5.3. OECs p1:** αντιπροσωπευτικό σημειακό γράφημα κυτταροδιαγράμματος –τιμές MFI έκφρασης των μονοκλωνικών αντισωμάτων CD31, CD34, KDR και CD45.

### OECs p1

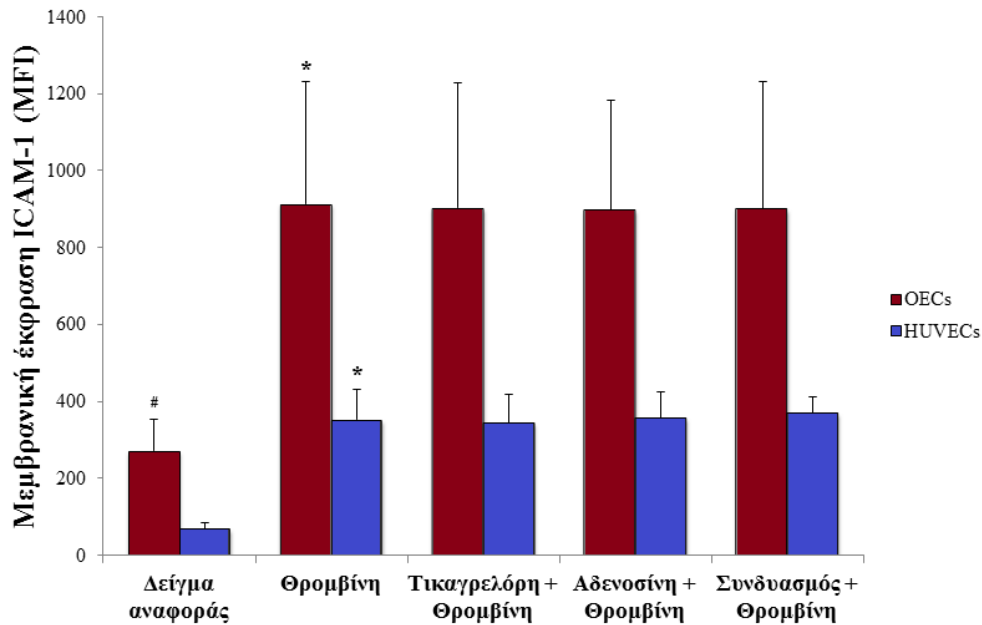


CD31-PE	CD34-FITC	VEGFR2/KDR-PE	CD45-PE
283,46	12,89	16,72	0

### ✚ Μεμβρανική έκφραση ICAM-1

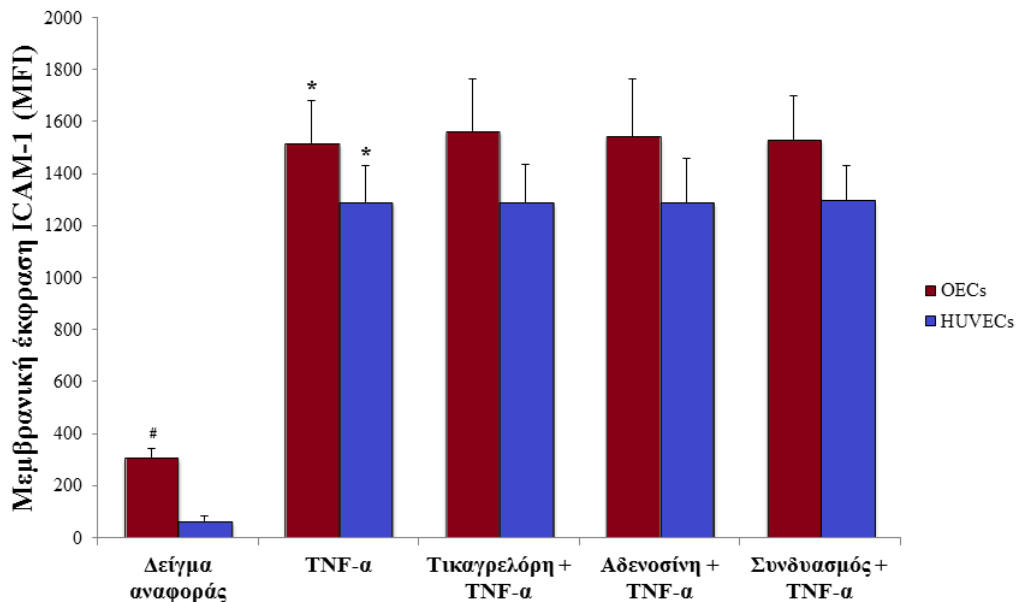
Η δράση της τικαγρελόρης και της αδενοσίνης μελετήθηκε στη μεμβρανική έκφραση του ICAM-1 σε OECs, μετά από ενεργοποίηση των κυττάρων με είτε με θρομβίνη είτε με TNF- $\alpha$ . Ωστόσο, παρατηρήθηκε πως ούτε η τικαγρελόρη ούτε η αδενοσίνη, αλλά ούτε και ο συνδυασμός τους, έχει κάποια επίδραση στην επαγόμενη από τη θρομβίνη ή από τον TNF- $\alpha$  μεμβρανική έκφραση του ICAM-1 στα OECs (n = 3) (Εικ. 5.14 και 5.15). Όλα τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν και σε HUVECs, όπου παρατηρήθηκαν παρόμοια αποτελέσματα (n = 3) (Εικ. 5.14 και 5.15).

## Αποτελέσματα



**Εικ. 5.14.** Η δράση της τικαγρελόρης (4  $\mu$ M) και της αδενοσίνης (20  $\mu$ M), καθώς και του συνδυασμού τους, στη μεμβρανική έκφραση του ICAM-1 σε OECs και HUVECs μετά από ενεργοποίηση των κυττάρων με 8 U/mL θρομβίνη για 24 h.

Οι τιμές αντιπροσωπεύουν τη μέση τιμή  $\pm$  τυπική απόκλιση 3 ανεξάρτητων πειραμάτων (\* $p < 0,001$  σε σύγκριση με αντίστοιχο δείγμα αναφοράς, # $p < 0,001$  σε σύγκριση με δείγμα αναφοράς των HUVECs).

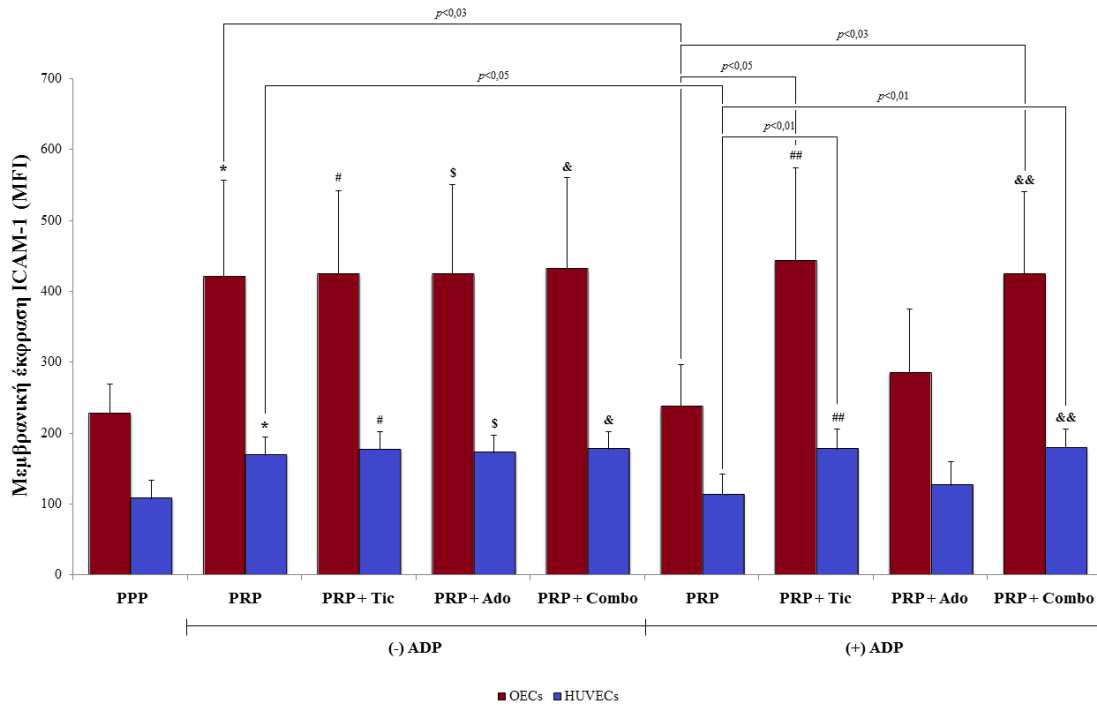


**Εικ. 5.15.** Η δράση της τικαγρελόρης (4  $\mu$ M) και της αδενοσίνης (20  $\mu$ M), καθώς και του συνδυασμού τους, στη μεμβρανική έκφραση του ICAM-1 σε OECs και HUVECs μετά από ενεργοποίηση των κυττάρων με 1 ng/mL TNF- $\alpha$  για 24 h.

Οι τιμές αντιπροσωπεύουν τη μέση τιμή  $\pm$  τυπική απόκλιση 3 ανεξάρτητων πειραμάτων (\* $p < 0,001$  σε σύγκριση με αντίστοιχο δείγμα αναφοράς, # $p < 0,001$  σε σύγκριση με δείγμα αναφοράς των HUVECs).

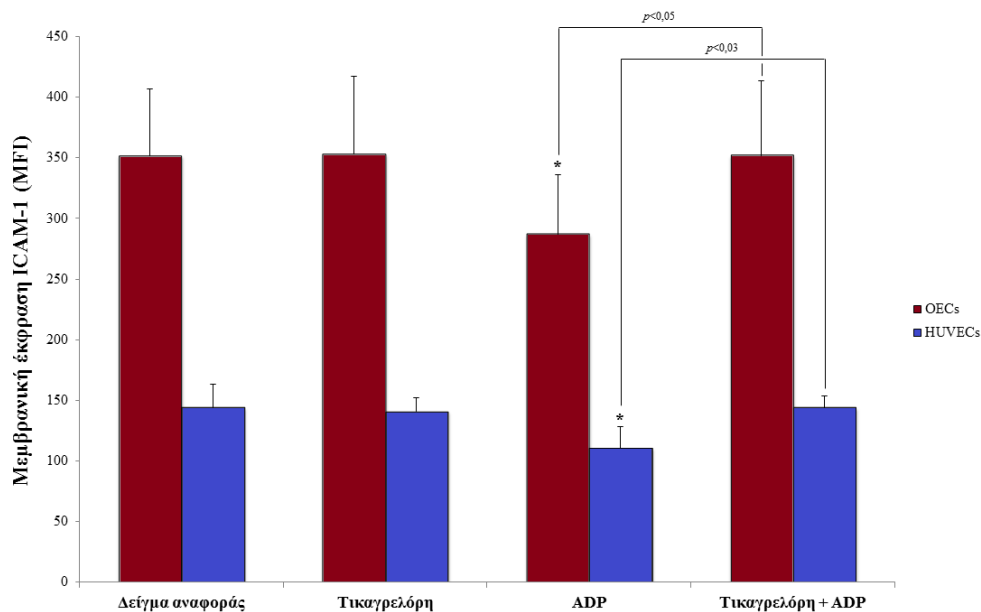
Στη συνέχεια, μελετήθηκε η επίδραση εναιωρήματος αιμοπεταλίων στη μεμβρανική έκφραση του ICAM-1 στα OECs, καθώς και η δράση της τικαγρελόρης και της αδενοσίνης. Αρχικά, παρατηρήθηκε πως τα εν ηρεμία αιμοπετάλια σε PRP αυξάνουν τη μεμβρανική έκφραση του ICAM-1 στα OECs σε σύγκριση με το πλάσμα (PPP) [MFI τιμές: από  $227,65 \pm 41,09$  σε  $420,99 \pm 136,40$  ( $n = 6$ ),  $p < 0,03$ ] (Εικ. 5.16). Αντίθετα, η ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων *in situ* με ADP δεν επηρέασε την έκφραση του ICAM-1 σε σύγκριση με το PPP ( $n = 6$ ) (Εικ. 5.16). Υπό συνθήκες ηρεμίας, η τικαγρελόρη και η αδενοσίνη, καθώς και ο συνδυασμός τους δεν επηρέασαν τη συγκεκριμένη έκφραση στα OECs ( $n = 6$ ) (Εικ. 5.16). Ωστόσο, προ-επώαση των κυττάρων με τικαγρελόρη ή με το συνδυασμό της τικαγρελόρης με την αδενοσίνη, παρουσία αιμοπεταλίων, πριν την ενεργοποίησή τους με ADP, αύξησε σημαντικά, σε σύγκριση με το PPP, τη μεμβρανική έκφραση του ICAM-1 στα OECs [MFI τιμές:  $227,65 \pm 41,09$  σε  $442,60 \pm 131,94$  ( $n = 6$ ) και από  $227,65 \pm 41,09$  σε  $424,55 \pm 116,02$  ( $n = 3$ ), αντίστοιχα,  $p < 0,03$  για τις δυο συγκρίσεις] (Εικ. 5.16). Αντίθετα, η αδενοσίνη μόνη της δεν επηρέασε την έκφραση του ICAM-1 ( $n = 3$ ) (Εικ. 5.16). Επίσης, μελετήθηκε και η επίδραση υπερκειμένων αιμοπεταλίων, τα οποία είχαν επωαστεί με τικαγρελόρη, πριν και μετά την ενεργοποίησή τους με ADP, στη μεμβρανική έκφραση του ICAM-1 σε OECs. Παρατηρήθηκε πως τα υπερκείμενα των ενεργοποιημένων με ADP αιμοπεταλίων μείωσαν την έκφραση του ICAM-1 σε σύγκριση με τα υπερκείμενα των μη ενεργοποιημένων αιμοπεταλίων [MFI τιμές: από  $351,54 \pm 55,48$  σε  $286,93 \pm 48,84$  ( $n = 3$ ),  $p < 0,03$ ] (Εικ. 5.17). Αντίθετα, τα υπερκείμενα των αιμοπεταλίων, τα οποία είχαν επωαστεί με τικαγρελόρη, πριν την ενεργοποίησή τους με ADP, δεν επηρέασαν την έκφραση του ICAM-1 στα OECs ( $n = 3$ ). ενώ δεν παρατηρήθηκε κάποια διαφορά μεταξύ των υπερκειμένων των εν ηρεμία αιμοπεταλίων παρουσία ή απουσία τικαγρελόρης ( $n = 3$ ) (Εικ. 5.17). Όλα τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν και σε HUVECs, όπου παρατηρήθηκαν παρόμοια αποτελέσματα (Εικ. 5.16 και 5.17).

## Αποτελέσματα



**Εικ. 5.16.** Η επίδραση εναιωρήματος αιμοπεταλίων μετά την προσθήκη 4  $\mu\text{M}$  τικαγρελόρης (Tic) και 20  $\mu\text{M}$  αδενοσίνη (Ado), καθώς και του συνδυασμού τους (Combo), παρουσία ή απουσία 20  $\mu\text{M}$  ADP, στη μεμβρανική έκφραση του ICAM-1 στα OECs και τα HUVECs μετά από 6 h επώαση.

Οι τιμές αντιπροσωπεύουν τη μέση τιμή  $\pm$  τυπική απόκλιση τουλάχιστον 3 ανεξάρτητων πειραμάτων (\*, #, S, &  $p < 0,03$  και ##, &&  $p < 0,01$  σε σύγκριση με τις αντίστοιχες τιμές του PPP κάθε κυτταρικού τύπου).



**Εικ. 5.17.** Η επίδραση υπερκειμένου αιμοπεταλίων μετά την προσθήκη 4  $\mu\text{M}$  τικαγρελόρης (Tic), παρουσία ή απουσία 20  $\mu\text{M}$  ADP, στη μεμβρανική έκφραση του ICAM-1 στα OECs και τα HUVECs μετά από 6 h επώαση.

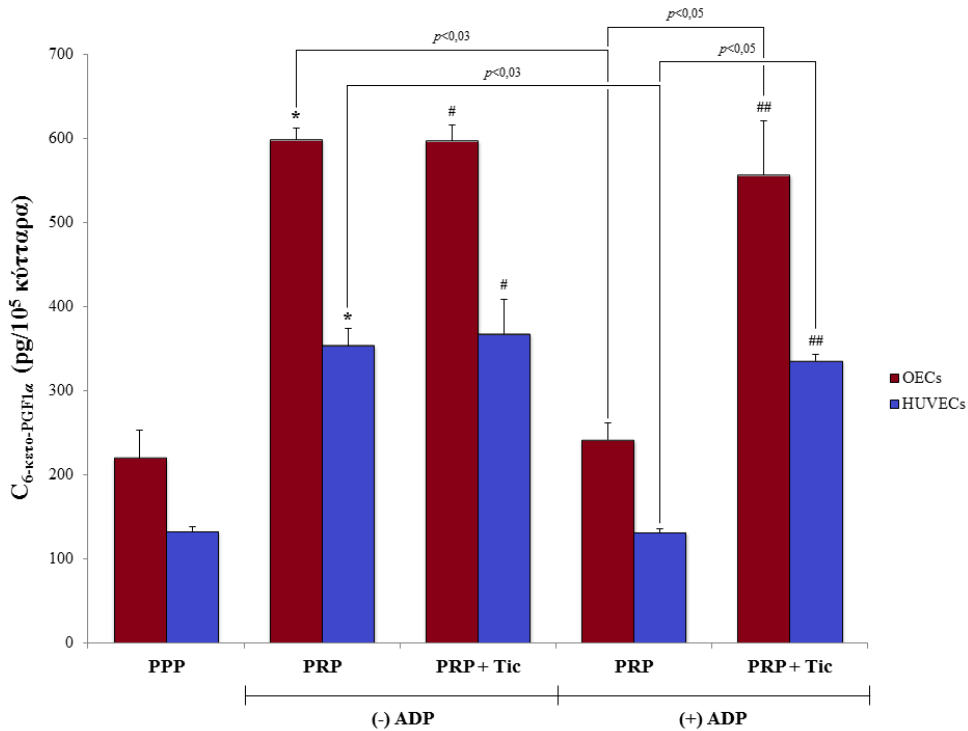
Οι τιμές αντιπροσωπεύουν τη μέση τιμή  $\pm$  τυπική απόκλιση 3 ανεξάρτητων πειραμάτων (\* $p < 0,03$  σε σύγκριση με τις αντίστοιχες τιμές του δείγματος αναφοράς κάθε κυτταρικού τύπου).

### ✚ Έκκριση PGI<sub>2</sub>

Υπερκείμενα από OECs σε κυτταρική καλλιέργεια, στα οποία είχαν προστεθεί PRP ή υπερκείμενα αιμοπεταλίων, υπό τις πειραματικές συνθήκες που περιγράφηκαν παραπάνω, συλλέχθηκαν στα 20 min επώασης, προκειμένου να προσδιοριστεί η έκκριση της PGI<sub>2</sub>. Η PGI<sub>2</sub> έχει χρόνο ημιζωής 60 min στο πλάσμα αλλά μόνο 2-3 min σε διάλυμα. Για το λόγο αυτό, η παραγωγή της PGI<sub>2</sub> παρακολουθείται με τη μέτρηση του σταθερού μεταβολίτη της, 6-κετο-PGF<sub>1 $\alpha$</sub> , ο οποίος παράγεται από τη μη ενζυματική υδρόλυση της PGI<sub>2</sub>. Η επώαση των OECs με εναιώρημα εν ηρεμία αιμοπεταλίων (PRP) αύξησε τα επίπεδα της 6-κετο-PGF<sub>1 $\alpha$</sub>  σε σύγκριση με το PPP [από  $219,69 \pm 32,88$  pg/10<sup>5</sup> κύτταρα σε  $598,66 \pm 13,11$  pg/10<sup>5</sup> κύτταρα (n = 3),  $p < 0,005$ ] (Εικ. 5.18). Αντίθετα, η ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων *in situ* με ADP δεν επηρέασε τα επίπεδα του μεταβολίτη σε σύγκριση με το PPP (n = 3), καθώς, επίσης, υπό συνθήκες ηρεμίας η τικαγρελόρη δεν επηρέασε την παραγωγή της 6-κετο-PGF<sub>1 $\alpha$</sub>  (n = 3) (Εικ. 5.18). Ωστόσο, προ-επώαση των κυττάρων με τικαγρελόρη, παρουσία των αιμοπεταλίων, πριν την ενεργοποίηση με ADP, αύξησε σημαντικά, σε σύγκριση με το PPP, τα επίπεδα του μεταβολίτη 6-κετο-PGF<sub>1 $\alpha$</sub>  [από  $219,95 \pm 41,09$  pg/10<sup>5</sup> κύτταρα σε  $556,55 \pm 64,00$  pg/10<sup>5</sup> κύτταρα (n = 3),  $p < 0,05$ ] (Εικ. 5.18). Επώαση των κυττάρων με τα υπερκείμενα των ενεργοποιημένων με ADP αιμοπεταλίων μείωσε τα επίπεδα της 6-κετο-PGF<sub>1 $\alpha$</sub>  σε σύγκριση με τα κύτταρα αναφοράς [από  $387,27 \pm 46,00$  pg/10<sup>5</sup> κύτταρα σε  $201,41 \pm 16,53$  pg/10<sup>5</sup> κύτταρα (n = 3),  $p < 0,01$ ], ενώ τα υπερκείμενα των αιμοπεταλίων, στα οποία είχε προστεθεί τικαγρελόρη πριν την ενεργοποίηση με ADP, δεν επηρέασαν τα επίπεδα του μεταβολίτη (n = 3) (Εικ. 5.19). Τέλος, δεν παρατηρήθηκε κάποια διαφορά μεταξύ των υπερκειμένων των εν ηρεμία αιμοπεταλίων παρουσία ή απουσία της τικαγρελόρης (n = 3) (Εικ. 5.19). Όλα τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν και σε HUVECs, όπου παρατηρήθηκαν παρόμοια αποτελέσματα (Εικ. 5.18 και 5.19).

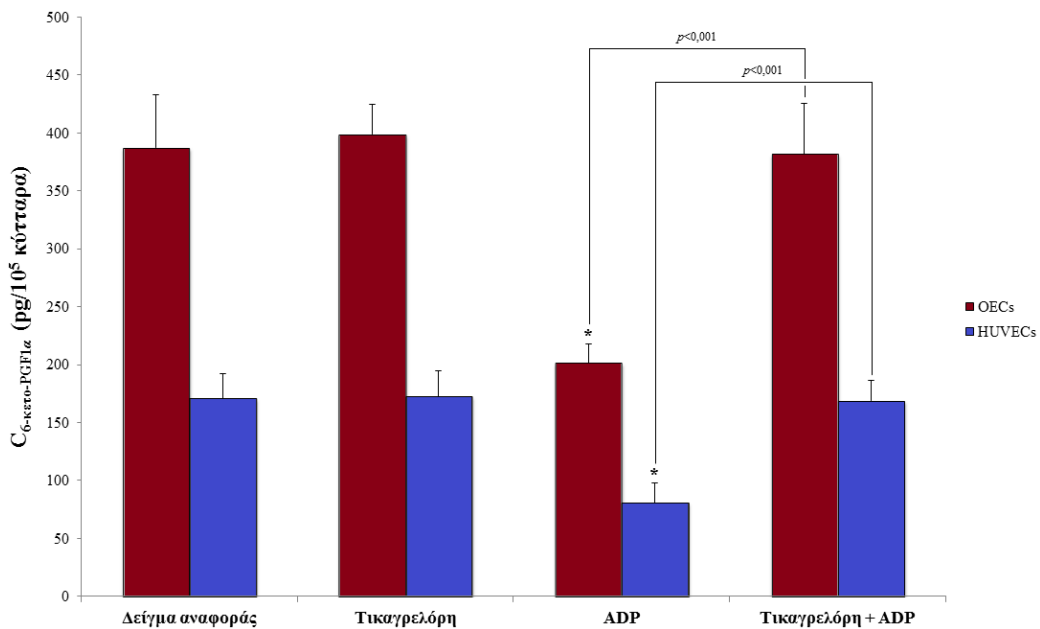


## Αποτελέσματα



**Εικ. 5.18.** Η επίδραση εναιωρήματος αιμοπεταλίων μετά την προσθήκη 4  $\mu\text{M}$  τικαγρελόρης (Tic), παρουσία ή απουσία 20  $\mu\text{M}$  ADP, στην έκκριση της  $\text{PGI}_2$  στα OECs και τα HUVECs μετά από 20 min επώαση.

Οι τιμές αντιπροσωπεύουν τη μέση τιμή  $\pm$  τυπική απόκλιση 3 ανεξάρτητων πειραμάτων (\*<sup>#</sup> $p < 0,005$  και <sup>##</sup> $p < 0,03$  σε σύγκριση με τις αντίστοιχες τιμές του PPP κάθε κυτταρικού τύπου).



**Εικ. 5.19.** Η επίδραση υπερκειμένου αιμοπεταλίων μετά την προσθήκη 4  $\mu\text{M}$  τικαγρελόρης (Tic), παρουσία ή απουσία 20  $\mu\text{M}$  ADP, στην έκκριση της  $\text{PGI}_2$  στα OECs και τα HUVECs μετά από 20 min επώαση.

Οι τιμές αντιπροσωπεύουν τη μέση τιμή  $\pm$  τυπική απόκλιση 3 ανεξάρτητων πειραμάτων (\* $p < 0,01$  σε σύγκριση με τις αντίστοιχες τιμές του δείγματος αναφοράς κάθε κυτταρικού τύπου).

### ✚ Έκκριση vWF

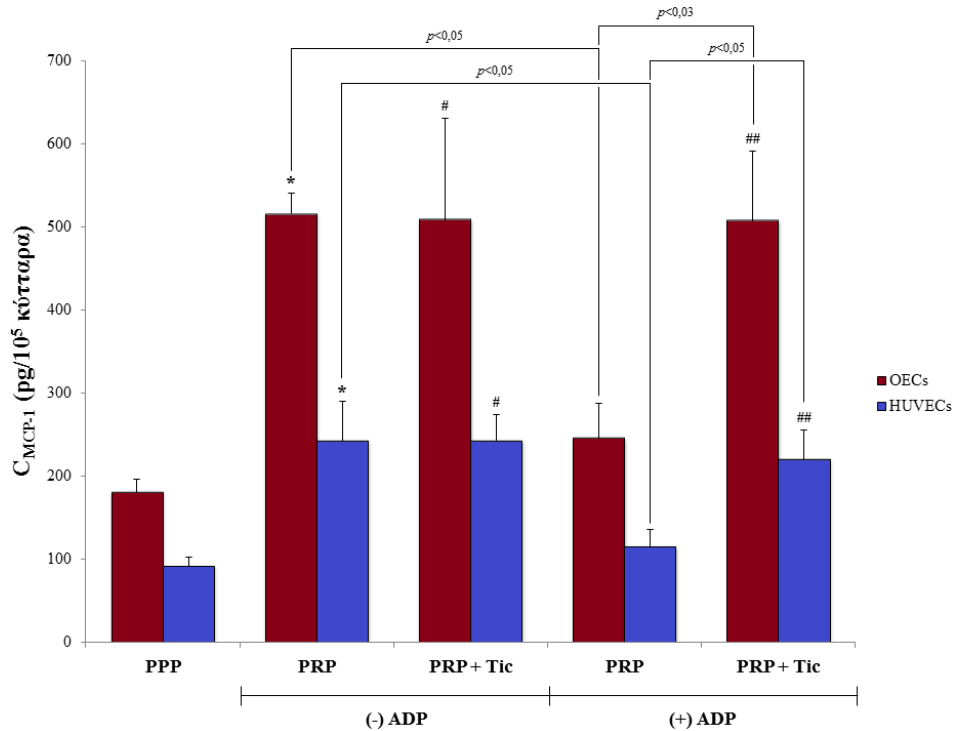
Συλλέχθηκαν, επίσης, υπερκείμενα από OECs σε κυτταρική καλλιέργεια, στα οποία είχαν προστεθεί PRP, στη 1 h επώαση, προκειμένου να προσδιοριστεί η έκκριση του vWF. Τα επίπεδα του vWF στα υπερκείμενα των OECs, απουσία κάποιου παράγοντα επίδρασης ή PPP, ήταν  $0,41 \pm 0,12$  mIU/ $10^5$  κύτταρα, ενώ τα επίπεδα των υπερκειμένων που συλλέχθηκαν από OECs, στα οποία είχαν προστεθεί PPP, PRP ή ενεργοποιημένο με ADP PRP, ήταν  $17,61 \pm 6,12$  mIU/ $10^5$  κύτταρα,  $14,79 \pm 3,51$  mIU/ $10^5$  κύτταρα και  $12,59 \pm 3,84$  mIU/ $10^5$  κύτταρα, αντίστοιχα. Αξιολογώντας τα επίπεδα του vWF στο PPP, διαπιστώθηκε πως είναι παρόμοια με εκείνα των υπερκειμένων που είχαν συλλεχθεί ( $14,63 \pm 4,42$  mIU/ $10^5$  κύτταρα), υποδεικνύοντας την ύπαρξη ανιχνεύσιμων επιπέδων vWF στο πλάσμα. Με βάση τα παραπάνω αποτελέσματα θεωρήθηκε πως ο vWF δεν αποτελεί αξιόπιστο δείκτη ECs κάτω από τις συγκεκριμένες πειραματικές συνθήκες.

### ✚ Έκκριση MCP-1

Υπερκείμενα από OECs σε κυτταρική καλλιέργεια, στα οποία είχαν προστεθεί PRP ή υπερκείμενα αιμοπεταλίων, υπό τις πειραματικές συνθήκες που περιγράφηκαν παραπάνω, συλλέχθηκαν στις 6 h επώασης, προκειμένου να προσδιοριστεί η έκκριση του MCP-1. Η επώαση των OECs με εναιώρημα εν ηρεμία αιμοπεταλίων (PRP) αύξησε την έκκριση του MCP-1 από τα OECs σε σύγκριση με το PPP [από  $180,33 \pm 15,24$  pg/ $10^5$  κύτταρα σε  $515,58 \pm 24,58$  pg/ $10^5$  κύτταρα ( $n = 3$ ),  $p < 0,003$ ] (Εικ. 5.20). Αντίθετα, η ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων *in situ* με ADP δεν επηρέασε τον MCP-1 σε σύγκριση με το PPP ( $n = 3$ ), καθώς, επίσης, υπό συνθήκες ηρεμίας η τικαγρελόρη δεν επηρέασε την έκκριση του από τα OECs ( $n = 3$ ) (Εικ. 5.20). Ωστόσο, η προ-επώαση των κυττάρων με τικαγρελόρη, παρουσία των αιμοπεταλίων, πριν την ενεργοποίησή τους με ADP, αύξησε σημαντικά, σε σύγκριση με το PPP, τα επίπεδα έκκρισης του MCP-1 [από  $180,33 \pm 15,24$  pg/ $10^5$  κύτταρα σε  $507,95 \pm 83,54$  pg/ $10^5$  κύτταρα ( $n = 3$ ),  $p < 0,05$ ] (Εικ. 5.20). Επώαση των κυττάρων με τα υπερκείμενα των ενεργοποιημένων με ADP αιμοπεταλίων μείωσε την έκκριση του MCP-1 στα OECs σε σύγκριση με τα κύτταρα αναφοράς [από  $345,37 \pm 62,43$  pg/ $10^5$  κύτταρα σε  $234,45 \pm 48,88$  pg/ $10^5$  κύτταρα ( $n = 3$ ),  $p < 0,01$ ], ενώ τα υπερκείμενα των αιμοπεταλίων, στα οποία είχε προστεθεί τικαγρελόρη πριν την ενεργοποίησή τους με ADP, δεν επηρέασαν τα επίπεδα του MCP-1 ( $n = 3$ ) (Εικ. 5.21). Τέλος, δεν παρατηρήθηκε κάποια διαφορά μεταξύ των υπερκειμένων των εν ηρεμία

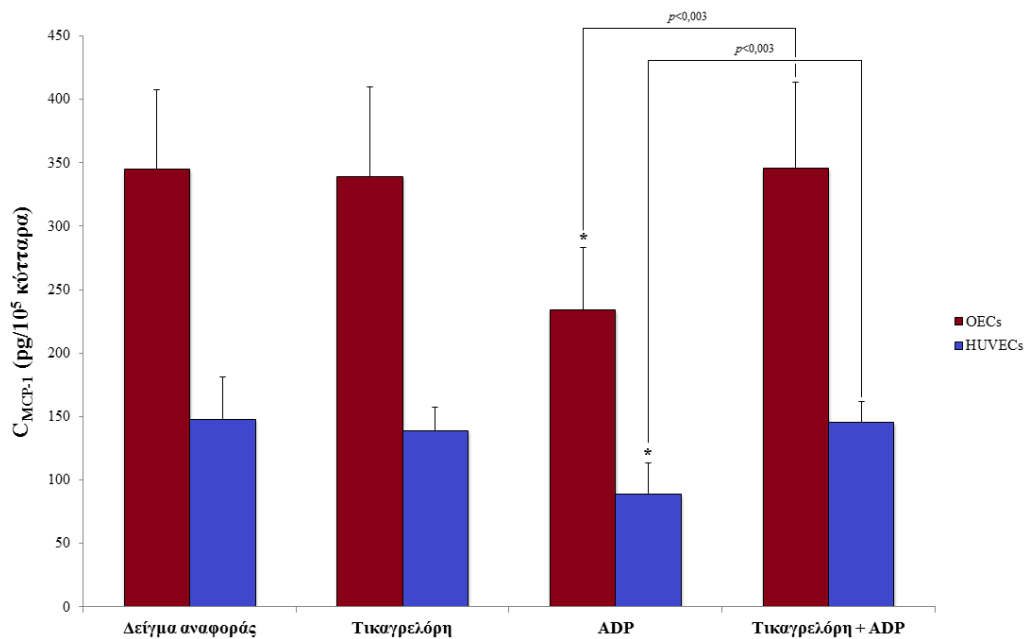
## Αποτελέσματα

αιμοπεταλίων που δεν είχαν επωαστεί με τικαγρελόρη και αυτών που είχαν επωαστεί ( $n = 3$ ) (Εικ. 5.21). Όλα τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν και σε HUVECs, όπου παρατηρήθηκαν παρόμοια αποτελέσματα (Εικ. 5.20 και 5.21).



**Εικ. 5.20.** Η επίδραση εναιωρήματος αιμοπεταλίων μετά την προσθήκη 4  $\mu\text{M}$  τικαγρελόρης (Tic), παρουσία ή απουσία 20  $\mu\text{M}$  ADP, στην έκκριση του MCP-1 στα OECs και τα HUVECs μετά από 6 h επώαση.

Οι τιμές αντιπροσωπεύουν τη μέση τιμή  $\pm$  τυπική απόκλιση 3 ανεξάρτητων πειραμάτων (\*, #, ##  $p < 0,003$  σε σύγκριση με τις αντίστοιχες τιμές του PPP κάθε κυτταρικού τύπου).



**Εικ. 5.21.** Η επίδραση υπερκειμένου αιμοπεταλίων μετά την προσθήκη 4  $\mu\text{M}$  τικαγρελόρης (Tic), παρουσία ή απουσία 20  $\mu\text{M}$  ADP, στην έκκριση του MCP-1 στα OECs και τα HUVECs μετά από 6 h επώαση. Οι τιμές αντιπροσωπεύουν τη μέση τιμή  $\pm$  τυπική απόκλιση 3 ανεξάρτητων πειραμάτων ( $*p < 0,01$  σε σύγκριση με τις αντίστοιχες τιμές του δείγματος αναφοράς κάθε κυτταρικού τύπου).

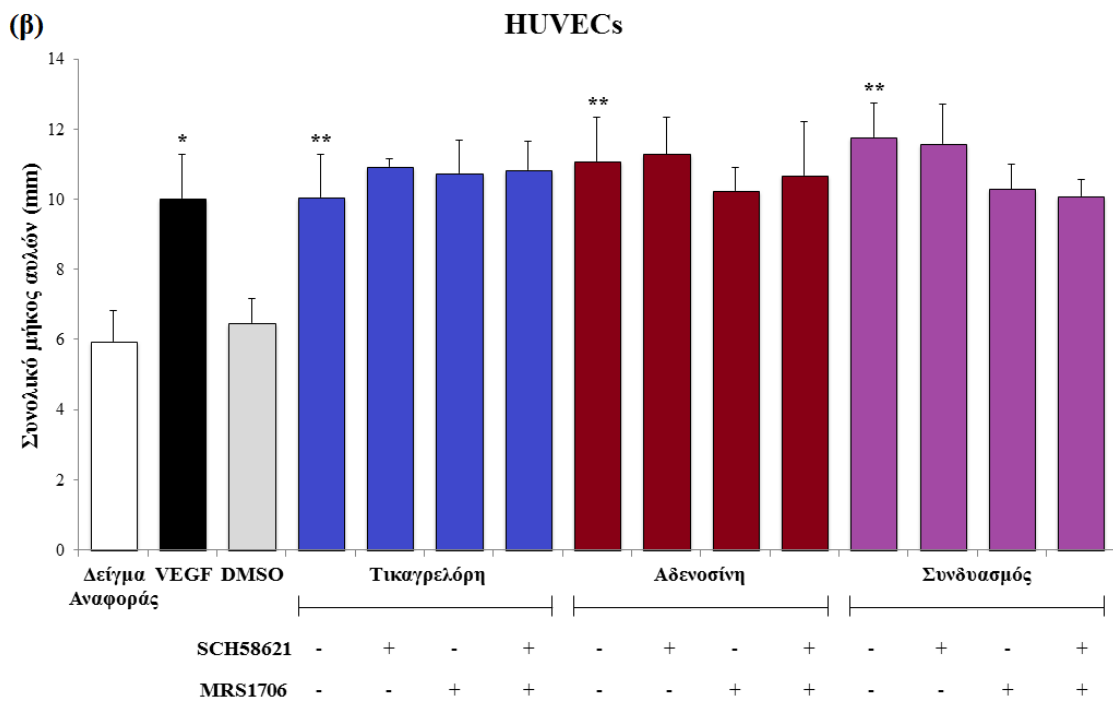
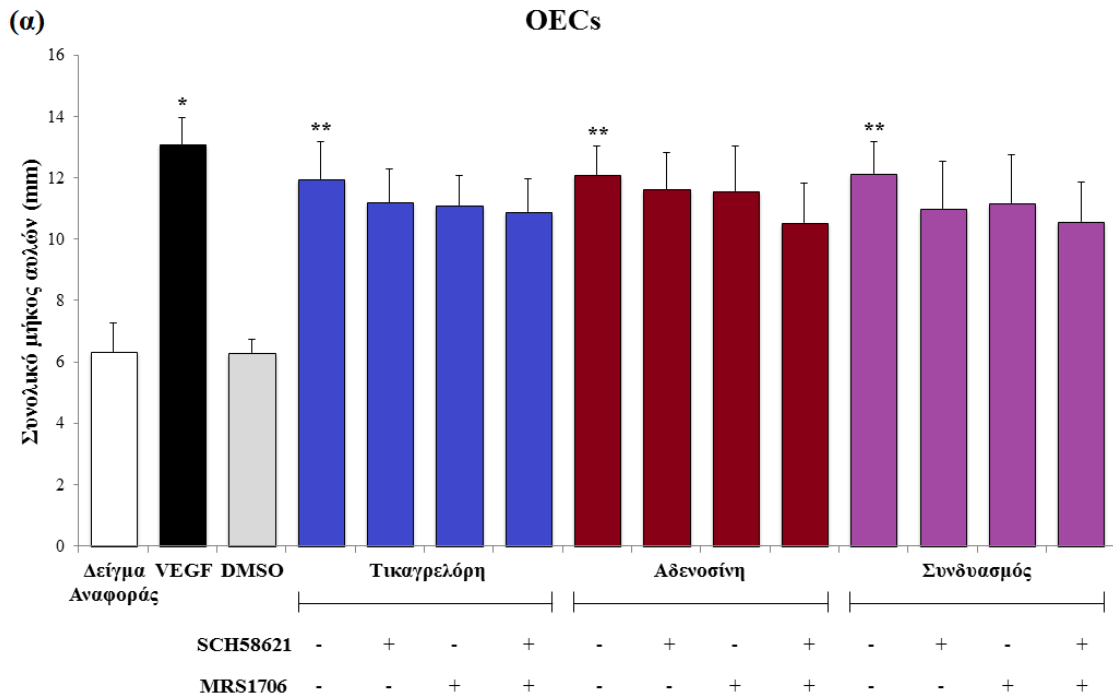
#### 5.4. Η δράση της τικαγρελόρης και της αδενοσίνης στην αγγειογένεση

Η δράση της τικαγρελόρης και της αδενοσίνης μελετήθηκε στην ικανότητα των OECs να δημιουργούν αγγειακές δομές με τη χρήση των μεθόδων αγγειογένεσης, Matrigel (σχηματισμός αυλών) και εκβλάστηση κυτταρικών σφαιριδίων.

##### Μέθοδος Matrigel

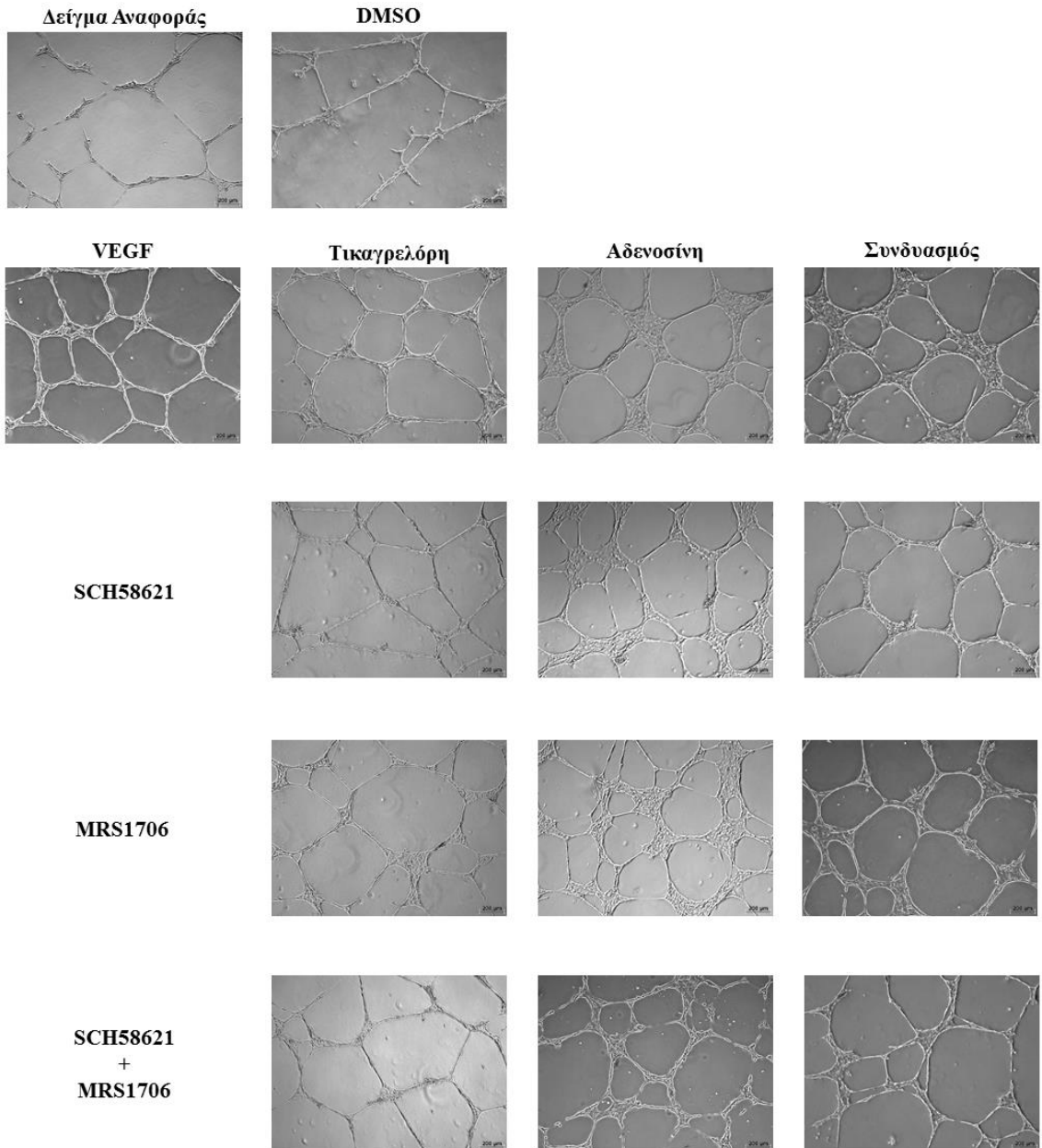
Παρατηρήθηκε πως η τικαγρελόρη και η αδενοσίνη, καθώς και ο συνδυασμός τους αύξησαν το σχηματισμό των νέων αυλών στα OECs [από  $6,29 \pm 0,44$  mm σε  $11,97 \pm 1,19$  mm για την τικαγρελόρη ( $n = 6$ ), σε  $12,09 \pm 0,94$  mm για την αδενοσίνη ( $n = 6$ ) και σε  $12,14 \pm 1,03$  mm για το συνδυασμό τους ( $n = 6$ ),  $p < 0,001$  για όλες τις συγκρίσεις] (**Εκ. 5.22α**). Ωστόσο, η παρουσία των ανταγωνιστών ARs δεν επηρέασε τον επαγόμενη από την τικαγρελόρη και την αδενοσίνη σχηματισμό νέων αυλών ( $n = 6$ ) (**Εκ. 5.22α**). Όλα τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν και σε HUVECs ( $n = 12$ ), όπου παρατηρήθηκαν παρόμοια αποτελέσματα ( $p < 0,001$  για όλες τις συγκρίσεις) (**Εκ. 5.22α**). Ο VEGF χρησιμοποιήθηκε ως θετικό δείγμα αναφοράς της μεθόδου και αύξησε το σχηματισμό νέων αυλών από  $6,33 \pm 0,95$  mm σε  $13,11 \pm 0,84$  mm για τα OECs ( $n = 6$ ) ( $p < 0,001$ ) και από  $5,96 \pm 0,87$  mm σε  $10,02 \pm 1,27$  mm για τα HUVECs ( $n = 12$ ) ( $p < 0,001$ ) (**Εκ. 5.22α** και **5.22β**). Αντιπροσωπευτικές εικόνες μικροσκοπίου του 2D σχηματισμού τριχοειδών δικτύων στα OECs και τα HUVECs φαίνονται στις **Εικ. 5.22γ** και **5.22δ**, αντίστοιχα.

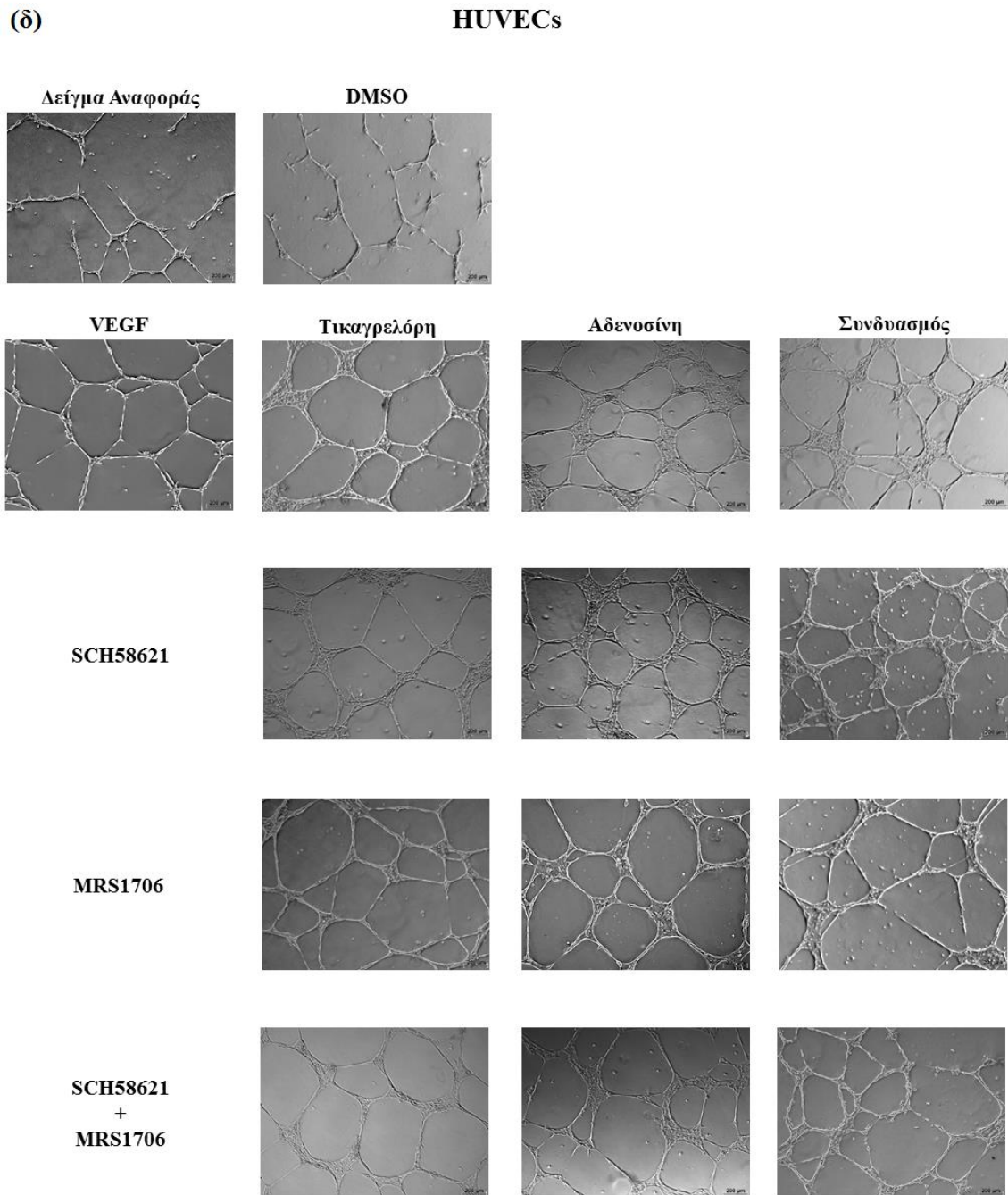
## Αποτελέσματα



(γ)

OECs





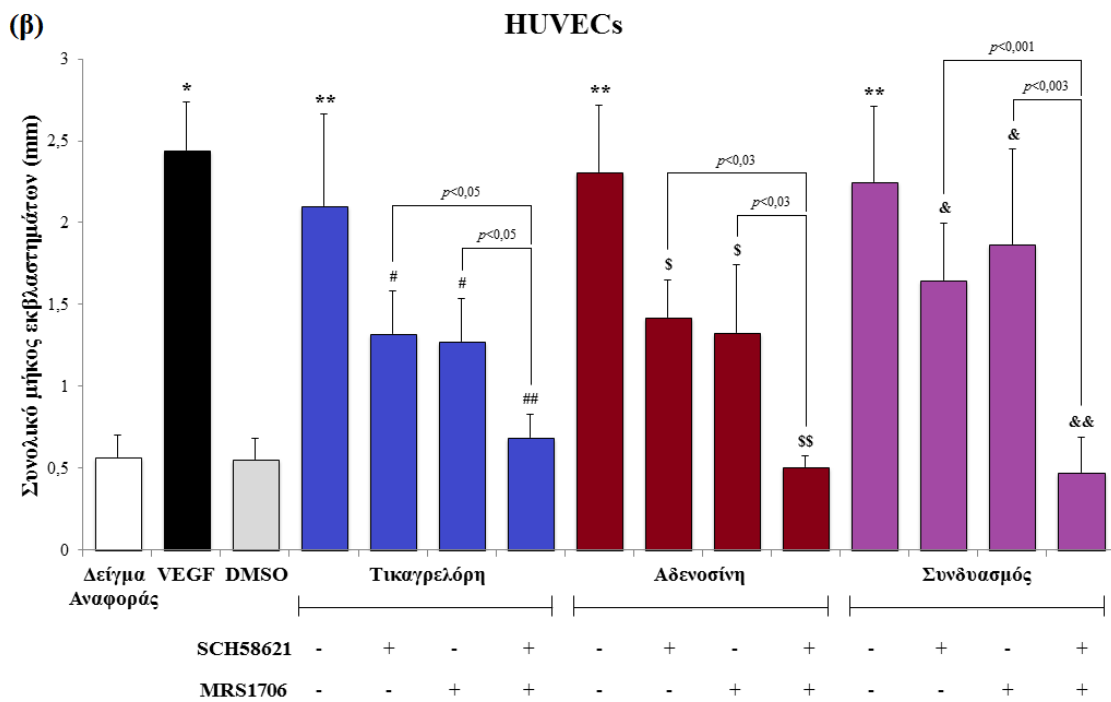
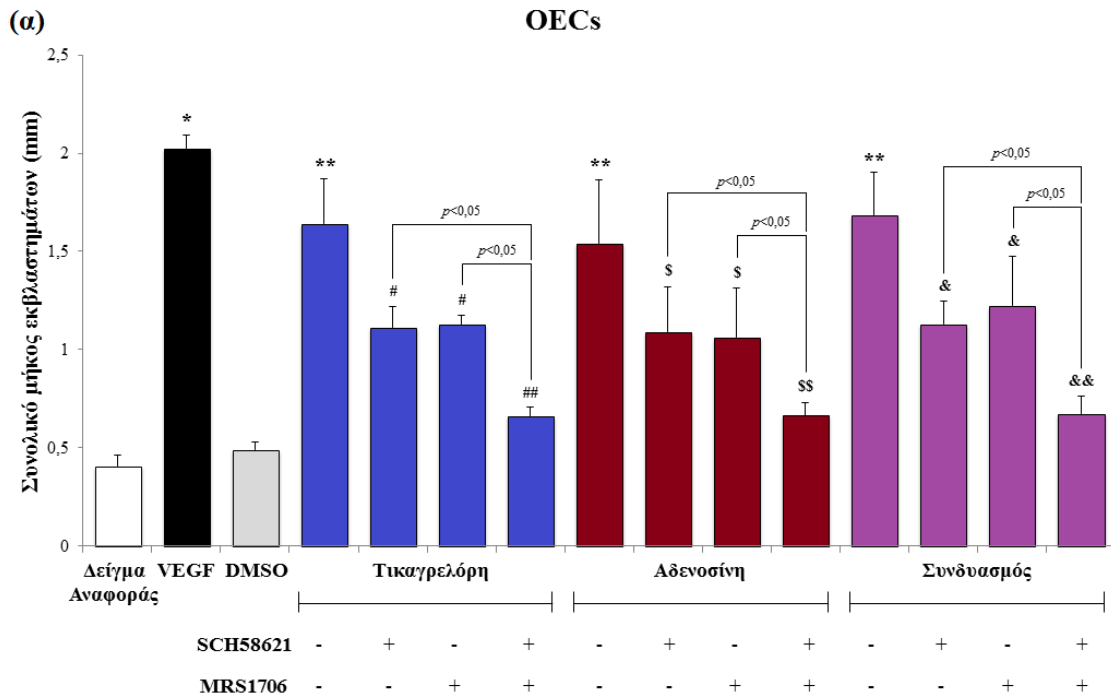
**Εικ. 5.22.** Η δράση της τικαγρελόρης (4  $\mu$ M) και της αδενοσίνης (20  $\mu$ M) παρουσία 10  $\mu$ M SCH58621 και 5  $\mu$ M MRS1706 στο σχηματισμό νέων αυλών στα (α) OECs και τα (β) HUVECs. Αντιπροσωπευτικές εικόνες μικροσκοπίου (5X) του 2D σχηματισμού τριχοειδών δικτύων στα (γ) OECs και τα (δ) HUVECs. Οι τιμές αντιπροσωπεύουν τη μέση τιμή  $\pm$  τυπική απόκλιση 6 τουλάχιστον ανεξάρτητων πειραμάτων (\* $p$ <0,001 σε σύγκριση με το δείγμα αναφοράς, \*\* $p$ <0,001 σε σύγκριση με το DMSO).

### ✚ Μέθοδος εκβλάστησης κυτταρικών σφαιριδίων

Παρατηρήθηκε πως η τικαγρελόρη και η αδενοσίνη, καθώς και ο συνδυασμός του αύξησαν το σχηματισμό εκβλαστημάτων από κυτταρικά σφαιρίδια, τα οποία είχαν δημιουργηθεί από OECs (από  $0,49 \pm 0,04$  mm σε  $1,64 \pm 0,23$  mm για την τικαγρελόρη, σε  $1,54 \pm 0,32$  mm για την αδενοσίνη και σε  $1,69 \pm 0,21$  mm για το συνδυασμό τους,  $p < 0,001$  για όλες τις συγκρίσεις) (**Εικ. 5.23α**). Παρόμοια αποτελέσματα παρατηρήθηκαν και για τα HUVECs ( $p < 0,001$  για όλες τις συγκρίσεις) (**Εικ. 5.23β**). Οι ανταγωνιστές των  $A_{2A}AR$  και  $A_{2B}AR$ , SCH58621 και MRS1706, αντίστοιχα, μείωσαν τον επαγόμενο από την τικαγρελόρη και την αδενοσίνη, καθώς και από το συνδυασμό τους, σχηματισμό εκβλαστημάτων στα OECs (για την τικαγρελόρη από  $1,64 \pm 0,23$  mm σε  $1,11 \pm 0,11$  mm και από  $1,64 \pm 0,23$  mm σε  $1,13 \pm 0,04$  mm, αντίστοιχα, για την αδενοσίνη από  $1,54 \pm 0,32$  mm σε  $1,09 \pm 0,23$  mm και από  $1,54 \pm 0,32$  mm σε  $1,06 \pm 0,25$  mm, αντίστοιχα, και για το συνδυασμό τους από  $1,69 \pm 0,21$  mm σε  $1,13 \pm 0,11$  mm και από  $1,69 \pm 0,21$  mm σε  $1,22 \pm 0,25$  mm, αντίστοιχα,  $p < 0,005$  για όλες τις συγκρίσεις) (**Εικ. 5.23α**). Ωστόσο, ο συνδυασμός και των δυο ανταγωνιστών ανέστειλε πλήρως τον επαγόμενο σχηματισμό εκβλαστημάτων στα OECs (για την τικαγρελόρη από  $1,64 \pm 0,23$  mm σε  $0,66 \pm 0,05$  mm, για την αδενοσίνη από  $1,54 \pm 0,32$  mm σε  $0,67 \pm 0,07$  mm και για το συνδυασμό τους από  $1,69 \pm 0,21$  mm σε  $0,67 \pm 0,09$  mm,  $p < 0,05$  για όλες τις συγκρίσεις) (**Εικ. 5.23α**). Παρόμοια αποτελέσματα παρατηρήθηκαν και στα HUVECs παρουσία των SCH58621 και MRS1706 ( $p < 0,05$  σε σύγκριση με την αντίστοιχη τιμή της τικαγρελόρης και της αδενοσίνης, καθώς και του συνδυασμού τους), καθώς και του συνδυασμού τους ( $p < 0,005$  σε σύγκριση με την αντίστοιχη τιμή της τικαγρελόρης και της αδενοσίνης, καθώς και του συνδυασμού τους) (**Εικ. 5.23β**). Αντίθετα, οι ανταγωνιστές των  $A_1AR$  και  $A_3AR$ , DPCPX και MRS1220, αντίστοιχα, δεν επηρέασαν τον επαγόμενο σχηματισμό των εκβλαστημάτων ούτε από την τικαγρελόρη ούτε από την αδενοσίνη, καθώς ούτε από το συνδυασμό τους. Ο VEGF χρησιμοποιήθηκε ο θετικό δείγμα αναφοράς της μεθόδου και αύξησε το σχηματισμό νέων εκβλαστημάτων από  $0,41 \pm 0,05$  mm σε  $2,03 \pm 0,07$  mm για τα OECs ( $p < 0,001$ ) και από  $0,56 \pm 0,13$  mm σε  $2,44 \pm 0,30$  mm για τα HUVECs ( $p < 0,001$ ). Αντιπροσωπευτικές εικόνες μικροσκοπίου της 3D *in vitro* μεθόδου αγγειογένεσης για τα OECs και τα HUVECs φαίνονται στις **Εικ. 5.23γ** και **5.23δ**.

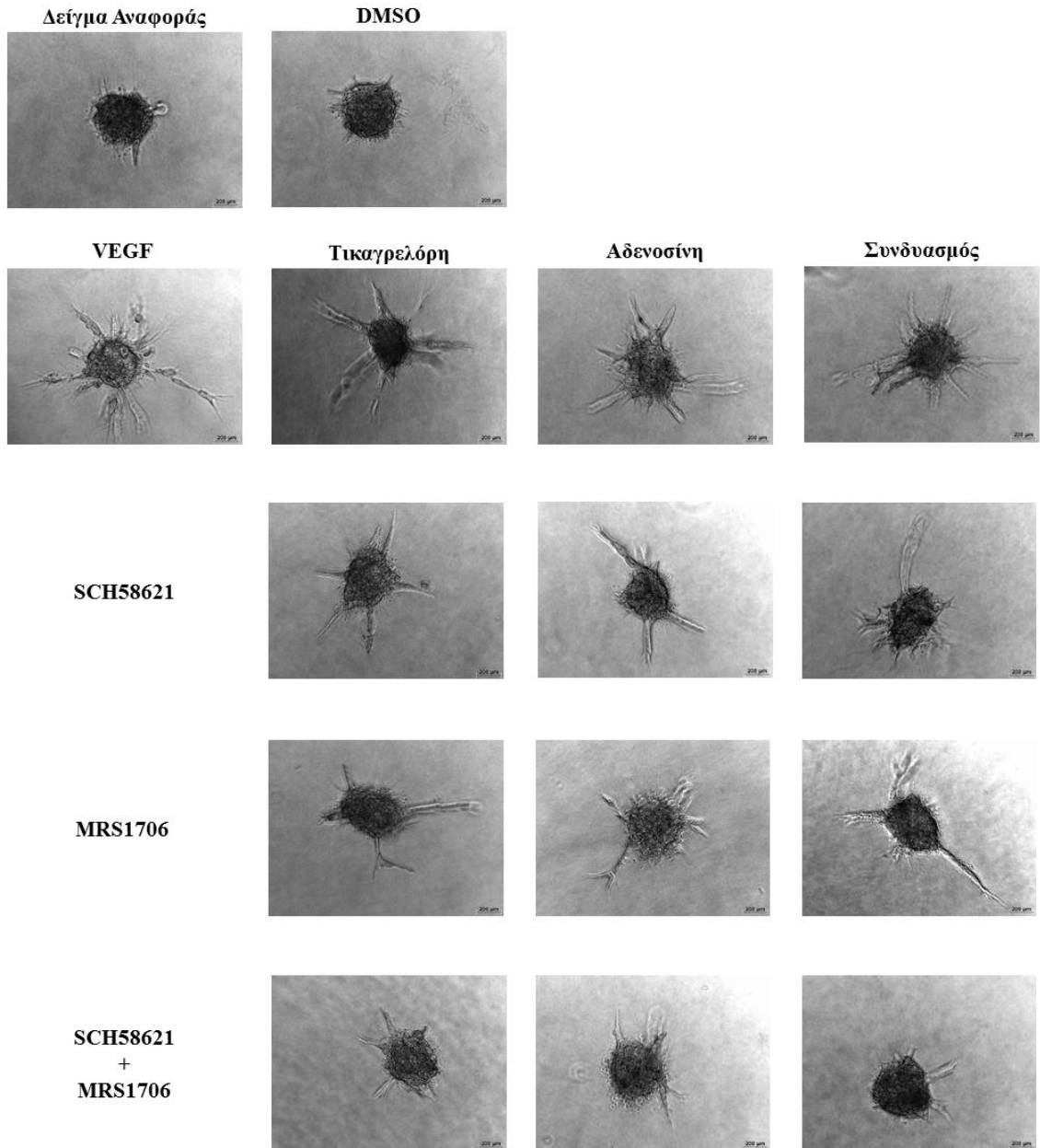


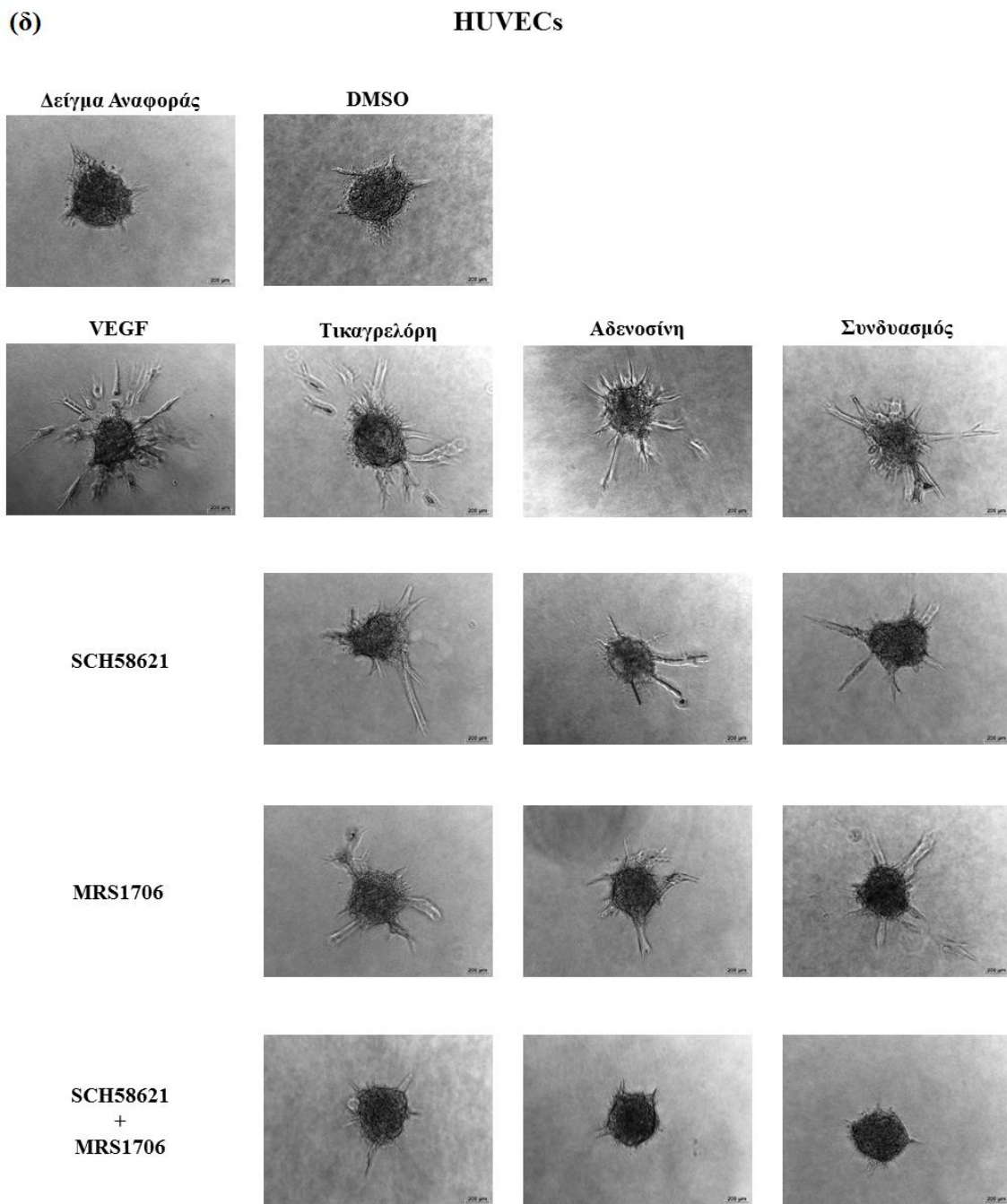
## Αποτελέσματα



(γ)

OECs





**Εικ. 5.23.** Η δράση της τικαγρελόρης (4  $\mu$ M) και της αδενοσίνης (20  $\mu$ M) παρουσία 10  $\mu$ M SCH58621 και 5  $\mu$ M MRS1706 στο σχηματισμό εκβλαστημάτων σε κυτταρικά σφαιρίδια (α) OECs και (β) HUVECs. Αντιπροσωπευτικές εικόνες μικροσκοπίου (20X) της 3D *in vitro* μεθόδου αγγειογένεσης για τα (γ) OECs και (δ) τα HUVECs παρουσία τικαγρελόρης και αδενοσίνης και μετά την προσθήκη των SCH58621 και MRS1706.

Οι τιμές αντιπροσωπεύουν τη μέση τιμή  $\pm$  τυπική απόκλιση 6 τουλάχιστον ανεξάρτητων πειραμάτων (\* $p$ <0,001 σε σύγκριση με το δείγμα αναφοράς, \* $p$ <0,001 σε σύγκριση με το DMSO, # $p$ <0,05 και ## $p$ <0,005 σε σύγκριση με την τικαγρελόρη, § $p$ <0,05 και §§ $p$ <0,005 σε σύγκριση με την αδενοσίνη, & $p$ <0,05 και && $p$ <0,005 σε σύγκριση με το συνδυασμό της τικαγρελόρης και της αδενοσίνης).





## 6<sup>ο</sup> Κεφάλαιο – Συζήτηση

Τα νέα αντιαιμοπεταλιακά φάρμακα, συμπεριλαμβανομένης της τικαγρελόρης, εισάγονται διαδοχικά στη θεραπεία αθηροθρομβωτικών καταστάσεων λόγω της ανωτερότητάς τους έναντι ενός τυπικού συνδυασμού της κλοπιδογρέλης με την ασπιρίνη σε ασθενείς με ACS. Η τικαγρελόρη, ένας ανταγωνιστής του P2Y<sub>12</sub>R, παρουσιάζει μια μοναδικότητα μεταξύ των αντιαιμοπεταλιακών φαρμάκων, καθώς αναστέλλει με αντιστρεπτό τρόπο τον αιμοπεταλιακό P2Y<sub>12</sub>R και επειδή επιδεικνύει ένα ευρύ φάσμα πλεονεκτικών πλειοτροπικών δράσεων, ο οποίες σχετίζονται με την αυξημένη συγκέντρωση της αδενοσίνης. Οι πλειοτροπικές δράσεις της τικαγρελόρης περιλαμβάνουν την καρδιοπροστασία, την αποκατάσταση του μυοκαρδίου μετά από ισχαιμικό επεισόδιο, την προαγωγή απελευθέρωσης αντιπηκτικών παραγόντων και, τέλος, αντιφλεγμονώδεις δράσεις. Πέραν των πλεονεκτικών αποτελεσμάτων, η αυξημένη συγκέντρωση αδενοσίνης είναι υπεύθυνη για ορισμένες ανεπιθύμητες δράσεις της τικαγρελόρης, συμπεριλαμβανομένης της δύσπνοιας και της βραδυκαρδίας. Κλινικές μελέτες μεγάλης κλίμακας απέδειξαν ότι τόσο η τυπική θεραπεία διάρκειας 12 μηνών όσο και η μακροχρόνια χρήση της τικαγρελόρης μειώνουν τον κίνδυνο εμφάνισης καρδιαγγειακών επεισοδίων σε ασθενείς με ACS, αλλά εις βάρος υψηλότερου κινδύνου μείζονος αιμορραγίας. Περαιτέρω μελέτες επικεντρώθηκαν στη χρήση της τικαγρελόρης σε άλλες καταστάσεις εκτός του ACS, συμπεριλαμβανομένου του ισχαιμικού αγγειακού εγκεφαλικού επεισοδίου και της περιφερικής αρτηριακής νόσου, καθώς και της κατάστασης μετά από CABG. Τα αποτελέσματα των συγκεκριμένων μελετών υποδηλώνουν συγκρίσιμη αποτελεσματικότητα και ασφάλεια της τικαγρελόρης και της κλοπιδογρέλης επιπλέον των στεφανιαίων ενδείξεων, ωστόσο σαφή συμπεράσματα αναμένονται από τρέχουσες μελέτες.

Σκοπός της παρούσας διατριβής ήταν η παροχή νέων δεδομένων σχετικά με τις δράσεις της τικαγρελόρης, πέραν της αιμοπεταλιακής συσσώρευσης και θρόμβωσης *in vitro*, διερευνώντας αν η τικαγρελόρη, είτε άμεσα διαμέσου του P2Y<sub>12</sub>R είτε έμμεσα διαμέσου της αδενοσίνης, μπορεί να επηρεάσει την επαγόμενη από τα αιμοπετάλια διαφοροποίηση των CD34<sup>+</sup> πρόδρομων κυττάρων σε EPCs, καθώς και τη λειτουργικότητα των EPCs και ώριμων ECs, δεδομένα τα οποία αποτελούν σημαντικά συστατικά των μηχανισμών που εμπλέκονται στην παθοφυσιολογία της καρδιαγγειακής νόσου.

## Συζήτηση

Αρχικά, διερευνήθηκε η δράση της τικαγρελόρης και της αδενοσίνης στη μεμβρανική έκφραση του KDR από τα CD34<sup>+</sup> πρόδρομα κύτταρα, καθώς και στην αλληλεπίδραση των αιμοπεταλίων με τα CD34<sup>+</sup> και CD34<sup>+</sup>/KDR<sup>+</sup> κύτταρα. Τα αποτελέσματα της παρούσας διατριβής δείχνουν πως η ADP και το TRAP-6 επάγουν τη μεμβρανική έκφραση του KDR στα CD34<sup>+</sup> πρόδρομα κύτταρα, ο οποίος βρίσκεται σε κυστίδια στο εσωτερικό των κυττάρων [252]. Το συγκεκριμένο φαινόμενο μπορεί να αποδοθεί στην άμεση δράση της ADP και του TRAP-6 στους αντίστοιχους υποδοχείς τους, τον P2Y<sub>12</sub>R και τον PAR-1, τα mRNA των οποίων έχουν εντοπιστεί στα CD34<sup>+</sup> κύτταρα [280,401,402]. Επιπλέον, κατά την ενεργοποίησή τους, τα αιμοπετάλια εκφράζουν βιοδραστικούς διαμεσολαβητές, όπως τον VEGF, οι οποίοι θα μπορούσαν επίσης να επηρεάσουν την αύξηση του KDR στα συγκεκριμένα κύτταρα [339]. Η τικαγρελόρη επάγει τη μεμβρανική έκφραση του KDR στα CD34<sup>+</sup> πρόδρομα κύτταρα μόνο όταν τα δείγματα ολικού αίματος έχουν ενεργοποιηθεί με ADP ή TRAP-6. Από τη στιγμή που η τικαγρελόρη δεν αναστέλλει την επαγόμενη από το TRAP-6 αιμοπεταλιακή συσσώρευση σε ολικό αίμα, μπορούμε να προτείνουμε πως η δράση της τικαγρελόρης στη μεμβρανική έκφραση του KDR είναι ανεξάρτητη από την ανασταλτική της δράση στην αιμοπεταλιακή ενεργοποίηση.

Προηγούμενες μελέτες έχουν δείξει πως η τικαγρελόρη αυξάνει τα επίπεδα των επιπέδων των EPCs σε ασθενείς σε σύγκριση με την κλοπιδογρέλη ή την πρασουγρέλη [339,403,404], προτείνοντας πως η συγκεκριμένη δράση διαμεσολαβείται πιθανότητα από την αδενοσίνη. Είναι γνωστό, πως η τικαγρελόρη, σε αντίθεση με τις θειενοπυριδίνες (κλοπιδογρέλη και πρασουγρέλη), έχει την ικανότητα να αυξάνει την εξωκυττάρια συγκέντρωση της αδενοσίνης, αναστέλλοντας την κυτταρική της πρόσληψη διαμέσου του ENT-1, ένας υποδοχέας που εκφράζεται στα ερυθροκύτταρα και σε άλλους τύπους κυττάρων [405–407]. Στην παρούσα διατριβή δείξαμε για πρώτη φορά πως η επαγωγή της μεμβρανικής έκφρασης του KDR σε ενεργοποιημένα δείγματα ολικού αίματος διαμεσολαβείται από την αδενοσίνη, και συγκεκριμένα από τον A<sub>2B</sub>AR, σε αντίθεση με την αιμοπεταλιακή συσσώρευση, η οποία διαμεσολαβείται από τον A<sub>2A</sub>AR, γεγονός το οποίο έρχεται σε συμφωνία με προηγούμενα δεδομένα [408]. Έχει αποδειχθεί πως τα CD34<sup>+</sup> πρόδρομα κύτταρα εκφράζουν τον A<sub>2B</sub>AR [401,409]. Η ενεργοποίηση του A<sub>2B</sub>AR σε ECs μπορεί να οδηγήσει σε νεοαγγειογένεση διαμέσου ενός μηχανισμού, ο οποίος περιλαμβάνει αυξημένη έκφραση αγγειογενετικών αυξητικών παραγόντων [398,410–412]. Ο A<sub>2B</sub>AR είναι συζευγμένος με G<sub>s</sub>-πρωτεΐνη, το οποίο έχει ως αποτέλεσμα την ενεργοποίηση της AC και την αύξηση των επιπέδων της

ενδοκυττάριας cAMP. Ωστόσο, ο  $A_{2B}AR$  μπορεί να συζευχθεί στο μονοπάτι της  $G_q$ -φωσφολιπάσης C και να επάγει την ενεργοποίηση της MAPK [366,378]. Ο  $A_{2B}AR$  επάγει επίσης τη φωσφορυλίωση της ERK1/2 στα ανθρώπινα ECs [409,413], ενεργοποιώντας μεταγραφικούς παράγοντες και οδηγώντας στην επαγωγή μηνυμάτων για τον VEGF.

Επιπλέον, η ADP και το TRAP-6 επάγουν την αλληλεπίδραση των αιμοπεταλίων με τα  $CD34^+$  και τα  $CD34^+/KDR^+$  κύτταρα. Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, τα ενεργοποιημένα αιμοπετάλια απελευθερώνουν βιοδραστικούς διαμεσολαβητές και παρουσιάζουν αυξημένη έκφραση της P-σελεκτίνης και έκκριση του SDF-1 στην επιφάνεια τους [251,414–416]. Με βάση προηγούμενα δεδομένα, η συγκεκριμένη αλληλεπίδραση των αιμοπεταλίων με τα  $CD34^+$  κύτταρα διαμεσολαβείται διαμέσου της πρόσδεσης του μορίου προσκόλλησης P-σελεκτίνης, η οποία εκφράζεται μόνο σε ενεργοποιημένα αιμοπετάλια, και του SDF-1, ο οποίος εκκρίνεται μετά την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων, στους αντίστοιχους υποδοχείς τους στα  $CD34^+$  κύτταρα, PSGL-1 και CXCR4, αντίστοιχα [263,417]. Η τικαγρελόρη αναστέλλει τη συγκεκριμένη αλληλεπίδραση μόνο παρουσία της ADP και όχι του TRAP-6, υποδεικνύοντας πως η ανασταλτική δράση της τικαγρελόρης στην επαγόμενη από την ADP αιμοπεταλιακή συσσώρευση σε ολικό αίμα διαδραματίζει ένα σημαντικό ρόλο στην αλληλεπίδραση των αιμοπεταλίων με τα  $CD34^+$  κύτταρα. Τέλος, η τικαγρελόρη και η αδενοσίνη επάγουν την αλληλεπίδραση των αιμοπεταλίων με τα  $CD34^+/KDR^+$  κύτταρα μετά από ενεργοποίηση των δειγμάτων ολικού αίματος παρουσία τόσο της ADP όσο και του TRAP-6. Τα υψηλά επίπεδα των κυτταρικών συζευγμάτων αιμοπεταλίων- $CD34^+/KDR^+$  κυττάρων μπορεί να οφείλεται στην υψηλότερη μεμβρανική έκφραση του KDR στα  $CD34^+$  κύτταρα παρουσία της τικαγρελόρης και της αδενοσίνης μετά την ενεργοποίηση των δειγμάτων.

Συμπερασματικά, η τικαγρελόρη ενισχύει την επαγόμενη από την ADP και το TRAP-6 μεμβρανική έκφραση του KDR στα  $CD34^+$  πρόδρομα κύτταρα, μια δράση η οποία μπορεί πρωτίστως να διαμεσολαβείται από την αδενοσίνη διαμέσου του  $A_{2B}AR$ , επάγοντας τη διαφοροποίηση των  $CD34^+$  πρόδρομων κυττάρων προς EPCs. Από τη στιγμή που η τικαγρελόρη αναστέλλει ισχυρά την αλληλεπίδραση των αιμοπεταλίων με τα  $CD34^+$  πρόδρομα κύτταρα παρουσία μόνο της ADP και όχι του TRAP-6, μπορεί να προταθεί πως η συγκεκριμένη επαγωγή της έκφρασης του KDR στα  $CD34^+$  πρόδρομα κύτταρα είναι ανεξάρτητη της αλληλεπίδρασης των αιμοπεταλίων με τα συγκεκριμένα κύτταρα, απαιτώντας την προ-ενεργοποίηση είτε του  $P2Y_{12}R$  είτε του υποδοχέα της θρομβίνης, συμβάλλοντας



## Συζήτηση

πιθανότητα με αυτόν τον τρόπο στην διαμεσολαβούμενη από τα κυκλοφορούντα CD34<sup>+</sup> κύτταρα ενδοθηλιακή αναγέννηση και νεοαγγειογένεση.

Στη συνέχεια, διερευνήθηκε η ικανότητα της τικαγρελόρης και της αδενοσίνης να διεγείρουν τις προ-αγγειογενετικές ιδιότητες των προερχόμενων από CD34<sup>+</sup> πρόδρομα κύτταρα OECs καθώς και των ώριμων ECs. Στην παρούσα διατριβή δείξαμε πως η τικαγρελόρη διεγείρουν τις προ-αγγειογενετικές ιδιότητες των EPCs και ώριμων ECs *in vitro* και πως η συγκεκριμένη αγγειογενετική δράση της τικαγρελόρης και της αδενοσίνης διαμεσολαβείται κυρίως μέσω των A<sub>2A</sub>AR και A<sub>2B</sub>AR. Ωστόσο, σε αντίθεση με τη μεμονωμένη δράση της τικαγρελόρης και της αδενοσίνης, ο συνδυασμός των δυο ουσιών στις συγκεκριμένες *in vitro* συγκεντρώσεις δεν είχε ως αποτέλεσμα μια επιπλέον δράση στη διέγερση των προ-αγγειογενετικών ιδιοτήτων των κυττάρων.

Αρκετές μελέτες έχουν προτείνει πως η τικαγρελόρη μπορεί να ασκεί μια διαμεσολαβούμενη από την αδενοσίνη δράση με ανεξάρτητο από τον P2Y<sub>12</sub>R μηχανισμό επηρεάζοντας στη λειτουργία των ECs [418–423]. Ανάλογα με την ομάδα μελέτης (υγιείς ή ασθενείς), καθώς και με τη σύσταση του διαλύματος, το οποίο χρησιμοποιείται για να ανασταθθεί πλήρως η κυτταρική πρόσληψη και ο μεταβολισμός της αδενοσίνης [424], η συγκεκριμένη άποψη έχει αμφισβητηθεί από μελέτες, οι οποίες δείχνουν ότι η τικαγρελόρη δεν έχει πάντα τη δυνατότητα να αυξήσει τη συγκέντρωση της αδενοσίνης στο πλάσμα [332,425–427], υποδεικνύοντας ότι η αυξημένη συγκέντρωση της αδενοσίνης να μην αντιπροσωπεύει το μοναδικό μηχανισμό με τον οποίο η τικαγρελόρη βελτιώνει την ενδοθηλιακή λειτουργία και ότι άλλοι μοριακοί στόχοι μπορεί να εμπλέκονται. Μια πρόσφατη μελέτη απέδειξε πως η τικαγρελόρη, σε σύγκριση με την κλοπιδογρέλη, είναι σε θέση να μειώσει τα επίπεδα του κυκλοφορούντα επιφανειακού αυξητικού παράγοντα [epidermal growth factor (EGF)] και ότι, με τη σειρά του, τα χαμηλότερα επίπεδα EGF στον ορό επηρεάζουν θετικά την ενδοθηλιακή λειτουργία διευκολύνοντας τη δραστηριότητα της eNOS [422]. Επιπλέον, άλλη μια μελέτη εξέτασε πως οι αιμοπεταλιακοί ανταγωνιστές των P2Y<sub>12</sub>R (τικαγρελόρη, πρασουγρέλη και κλοπιδογρέλη) επηρεάζουν τις αγγειογενετικές ιδιότητες των ECs [423]. Στη συγκεκριμένη μελέτη, τα ECs εκτέθηκαν στις υψηλότερες συγκεντρώσεις των P2Y<sub>12</sub>R ανταγωνιστών, οι οποίες παραλαμβάνονται στον ορό μετά τη θεραπεία με τη δόση φόρτισης. Ανάμεσα στις ελεγχόμενες αγγειογενετικές ιδιότητες των ECs, φάνηκε ότι οι ανταγωνιστές του P2Y<sub>12</sub>R μείωσαν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό αλλά δεν περιόρισαν την κυτταρική αναγέννηση και των σχηματισμό νέων αυλών. Από τα τρία

φάρμακα φάνηκε πως η τικαγρελόρη στη συγκέντρωση της δόσης φόρτισης (2  $\mu\text{M}$ ) είχε την πιο ισχυρή δράση στην παραγωγή αγγειογενετικών και αγγειοστατικών παραγόντων *in vitro*, αλλά η δυναμική της *in vitro*, στις ελεγχόμενες συγκεντρώσεις, δεν ήταν αρκετά ισχυρή για να μειώσει την επούλωση και το σχηματισμός νέων αυλών. Τα αποτελέσματα της παρούσας διατριβής δεν συμφωνούν με τη συγκεκριμένη μελέτη όσο αφορά τη διέγερση του σχηματισμού νέων αυλών παρουσία της τικαγρελόρης. Μια σημαντική διαφορά αποτελεί η συγκέντρωση της τικαγρελόρης σε σύγκριση με την παρούσα διατριβή (4  $\mu\text{M}$ ), η οποία επάγει το σχηματισμό τριχοειδών δομών και τη δημιουργία αγγειογενετικών εκβλαστημάτων από σφαιρίδια EPCs και ώριμων ECs. Όσο αφορά την ύπαρξη του P2Y<sub>12</sub>R στα EPCs, καθώς και την άμεση δράση της τικαγρελόρης στον υποδοχέα υπάρχει έλλειψη δεδομένων, ενώ υπάρχουν αντιφατικά στοιχεία για την έκφραση του σε ώριμα ECs [272,428–430].

Η αγγειογένεση λαμβάνει χώρα διαμέσου σύγκλισης διαφόρων σηματοδοτικών μηχανισμών με εμφανείς μονοπάτια, τα οποία περιλαμβάνουν μια αυτοκρινή δράση του VEGF [431]. Οι ARs έχουν προσελκύσει το ενδιαφέρον για τη συμβολή τους στην αγγειογένεση, ενώ ο ρόλος τους, ιδιαίτερα των A<sub>2A</sub>AR και A<sub>2B</sub>AR, στην αγγειογένεση έχει περιγραφεί καλά [432–435]. Τα αποτελέσματά της παρούσας διατριβής συμφωνούν με δημοσιευμένα δεδομένα, τα οποία αναφέρουν ότι ο A<sub>2A</sub>AR έχει προ-αγγειογενετικές ιδιότητες και αυξάνει τον σχηματισμό νέων αυλών σε πνευμονικά ECs [436]. Επιπλέον, προηγούμενες μελέτες αναφέρουν ότι ένας επιλεκτικός αγωνιστής του A<sub>2A</sub>AR (GS21680) ενισχύει σημαντικά την αγγειογένεση και την επιδιόρθωση πληγών μόνο σε άγριου τύπου και όχι σε A<sub>2A</sub>AR knockout ποντίκια [437]. Υπάρχουν αρκετές μελέτες, οι οποίες υποστηρίζουν τον κεντρικό ρόλο του A<sub>2B</sub>AR στην αγγειογένεση αυξάνοντας τα επίπεδα έκφρασης αγγειογενετικών παραγόντων, συμπεριλαμβανομένων του VEGF και της IL-8 στα μικροαγγειακά ECs [438], καθώς και ρυθμίζοντας την έκφραση άλλων αγγειογενετικών παραγόντων, συμπεριλαμβανομένης της eNOS στα ECs [439]. Επιπλέον, η διεγερτική δράση του αναλόγου της αδενοσίνης NECA στην αγγειογένεση αναστάληκε παρουσία του αντίστροφου αγωνιστή και ανταγωνιστή του A<sub>2B</sub>AR, MRS1706, σε έμβρυα zebrafish [440]. Τα συγκεκριμένα δεδομένα, σε συνδυασμό με τα αποτελέσματά της παρούσας διατριβής, υποστηρίζουν τον κεντρικό ρόλο και τη διεγερτική δράση των A<sub>2A</sub>AR και A<sub>2B</sub>AR στην αγγειογένεση. Όσο αφορά την έλλειψη δράσεις των ανταγωνιστών των ARs στη μέθοδο σχηματισμού νέων αυλών, η οποία πραγματοποιήθηκε σε υπόστρωμα Matrigel, σε σύγκριση με τη μέθοδο εκβλαστημάτων κυτταρικών σφαιριδίων μπορεί να εξηγηθεί λόγω της σύνθεσης

## *Συζήτηση*

του υποστρώματος Matrigel, το οποίο περιλαμβάνει διάφορους αυξητικούς παράγοντες, ενώ τα κυτταρικά σφαιροειδή καλλιεργούνται σε ένα καθαρό τζελ κολλαγόνο με ελεγχόμενη περιεκτικότητα σε ορό.

Συμπερασματικά, η τικαγρελόρη επάγει την ενσωμάτωση των EPCs και ώριμων ECs σε αγγειακές δομές, ένα αποτέλεσμα που πιθανώς διαμεσολαβείται από την αδενοσίνη διαμέσου τόσο του  $A_{2A}AR$  όσο και του  $A_{2B}AR$ , παρόλο που ο συνδυασμός της τικαγρελόρης με την αδενοσίνη δεν εμφανίζει επιπρόσθετη δράση. Η υπόθεση ότι οι αγγειογενετικές δράσεις της τικαγρελόρης μπορεί να διαμεσολαβούνται από την αδενοσίνη χρειάζεται περαιτέρω διερεύνηση, καθώς υπάρχει έλλειψη δεδομένων για την ύπαρξη του  $P2Y_{12}R$  και αντιφατικά δεδομένα για την έκφρασή του σε EPCs και ώριμα ECs, αντίστοιχα. Αντίθετα, και οι δύο τύποι κυττάρων εκφράζουν τους ARs διαμέσου των οποίων η αδενοσίνη μπορεί να ελέγξει την παραγωγή προ-αγγειογενετικών παραγόντων.

Στη συνέχεια, διερευνήθηκε η δράση της τικαγρελόρης και της αδενοσίνης στη μεμβρανική έκφραση του ICAM-1 στην επαγόμενη από τη θρομβίνη και τον TNF- $\alpha$  ενεργοποίηση των EPCs και ώριμων ECs. Αρχικά, δείξαμε πως τα επίπεδα της μεμβρανικής έκφρασης του ICAM-1 στα μη ενεργοποιημένα EPCs ήταν σημαντικά υψηλότερα σε σύγκριση με τα ώριμα ECs, προτείνοντας ότι η αυξημένη έκφραση του συγκεκριμένου μορίου προσκόλλησης μπορεί να διευκολύνει την προσκόλληση των EPCs στο αρτηριακό τοίχωμα, ένα προαπαιτούμενο βήμα για την ωρίμανση τους σε ECs οδηγώντας έτσι στην αναγέννηση του αρτηριακού τοιχώματος του ενδοθηλίου. Είναι ευρέως γνωστό ότι η θρομβίνη και ο TNF- $\alpha$  επάγουν τη μεμβρανική έκφραση του ICAM-1 στα ανθρώπινα ECs [441,442]. Τα αποτελέσματα της παρούσας διατριβής έρχονται σε συμφωνία με τα συγκεκριμένα δεδομένα. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης, η ADP δεν επηρεάζει την έκφραση του ICAM-1 στα ανθρώπινα ECs. Αν και προηγούμενα δεδομένα έχουν δείξει ότι τα ώριμα ECs εκφράζουν ελάχιστα [428] ή καθόλου [429] τον  $P2Y_{12}R$ , υπάρχουν στοιχεία ότι η ADP προάγει την έκφραση φλεγμονωδών μορίων, όπως το ICAM-1 και τον MCP-1 σε ώριμα ECs, ενώ η προεργασία των κυττάρων με τικαγρελόρη αναστέλλει τις συγκεκριμένες αποκρίσεις [430]. Τα αποτελέσματά της παρούσας διατριβής έρχονται σε αντίθεση σχετικά με την ανασταλτική δράση της τικαγρελόρης, καθώς η τικαγρελόρη δεν αναστέλλει την επαγόμενη από τη θρομβίνη και τον TNF- $\alpha$  μεμβρανική έκφραση του ICAM-1. Επιπλέον, έχουν δημοσιευθεί αντιφατικά αποτελέσματα σχετικά με τη δράση της αδενοσίνης στα επίπεδα έκφρασης του ICAM-1 σε ενεργοποιημένα ώριμα ECs, καθώς μια

μελέτη δείχνει ότι η αδενοσίνη δεν επηρεάζει την έκφραση του ICAM-1 [443], η οποία είναι σύμφωνη με τα αποτελέσματά μας, ενώ μια άλλη μελέτη δείχνει ότι αγωνιστές του  $A_{2A}AR$  αναστέλλουν τη μεμβρανική έκφραση του ICAM-1 [444].

Τέλος, διερευνήθηκε η δράση τόσο του εναιωρήματος όσο και του υπερκειμένου αιμοπεταλίων στη λειτουργικότητα των EPCs και ώριμων ECs, καθώς και η δράση της τικαγρελόρης και της αδενοσίνης στην παραπάνω επίδραση. Στην παρούσα μελέτη δείξαμε ότι το PRP σε κατάσταση ηρεμίας επάγει τη μεμβρανική έκφραση του ICAM-1 τόσο στα EPCs όσο και στα ώριμα ECs, καθώς και την έκκριση της  $PGI_2$  και του MCP-1 από τους δυο κυτταρικούς τύπους. Επιπλέον στην παρούσα διατριβή δείξαμε ότι τα ενεργοποιημένα με ADP αιμοπετάλια δεν επηρεάζουν την έκφραση και την έκκριση των παραπάνω δεικτών ECs. Ωστόσο, η παρουσία της τικαγρελόρης στα ενεργοποιημένα με ADP αιμοπετάλια αύξησε τα επίπεδα τόσο της μεμβρανικής έκφρασης του ICAM-1 όσο και της έκκρισης της  $PGI_2$  και του MCP-1, σε σύγκριση με το PPP, από τα EPCs και ώριμα ECs. Αντίθετα, η τικαγρελόρη δεν επηρέασε τα επίπεδα των παραπάνω δεικτών ECs μετά την αιμοπεταλιακή ενεργοποίηση με ADP σε σύγκριση με το εν ηρεμία PRP. Σε αντίθεση με την τικαγρελόρη, η παρουσία της αδενοσίνης δεν επηρεάζει την έκφραση και την έκκριση των παραπάνω δεικτών και στους δυο κυτταρικούς τύπους παρουσία των ενεργοποιημένων με ADP αιμοπεταλίων. Η τικαγρελόρη αναστέλλει στην επαγόμενη από την ADP αιμοπεταλιακή συσσώρευση σε αντίθεση με την αδενοσίνη. Ωστόσο, τα συγκεκριμένα αποτελέσματα, όσο αφορά την ανασταλτική δράση της αδενοσίνης μετά την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων με ADP, έρχονται σε αντίθεση με προηγούμενα δεδομένα [445], τα οποία δείχνουν ότι η αδενοσίνη αναστέλλει την επαγόμενη από την ADP ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων σε PRP. Θα πρέπει να αναφερθεί πως στη συγκεκριμένη μελέτη η αδενοσίνη χρησιμοποιήθηκε σε πολύ υψηλές συγκεντρώσεις, δηλ. 2 mM, σε σύγκριση με τη χρησιμοποιούμενη συγκέντρωση της παρούσας διατριβής, δηλ. 20  $\mu M$ , μια συγκέντρωση βιολογικά σχετική, καθώς έχει εκτιμηθεί πως σε παθολογικές καταστάσεις η εξωκυττάρια συγκέντρωση της αδενοσίνης αυξάνεται μέχρι και 30  $\mu M$  [356]. Ως εκ τούτου, οι συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα διατριβή είναι πιο κοντά σε *in vivo* καταστάσεις.

Η συγκεκριμένη επίδραση των αιμοπεταλίων στη λειτουργικότητα των EPCs και των ώριμων ECs επιλέχθηκε να μελετηθεί παρουσία PRP και όχι WPs, καθώς οι συγκεκριμένες συνθήκες είναι πιο κοντά στις *in vivo* καταστάσεις. Τα αποτελέσματα έρχονται σε συμφωνία με προηγούμενα δεδομένα όσο αφορά την επαγωγή της μεμβρανικής έκφρασης του ICAM-1

## Συζήτηση

σε ώριμα ECs, υποθέτοντας πως η συγκεκριμένη αύξηση είναι αποτέλεσμα ενός συνδυασμού ουσιών, οι οποίες περιέχονται από τα αιμοπετάλια και το πλάσμα [446]. Ο NF-κB ρυθμίζει ένα πλήθος γονιδίων, τα οποία κωδικοποιούν προ-φλεγμονώδη κυτοκίνες (IL-1 $\beta$  και TNF- $\alpha$ ), χημειοκίνες (IL-8 και MCP-1) και μόριο προσκόλλησης (ICAM-1 και E-σελεκτίνη). Είναι γνωστό ότι τα αιμοπετάλια εκκρίνουν TNF- $\alpha$  [447] με το PRP να περιέχει 3 φορές περισσότερη ποσότητα σε σύγκριση με το PPP [448]. Σε απόκριση στο PRP, τα μονοπάτια των TNF- $\alpha$  και NF-κB είναι λειτουργικά ενεργά [448]. Ο TNF- $\alpha$ /NF-κB σηματοδοτικός καταρράκτης είναι ένας πολύ γνωστός διαμεσολαβητής της φλεγμονής. Η ενεργοποίηση του IKK συμπλέγματος, το οποίο ενεργοποιείται μετά την πρόσδεση του TNF- $\alpha$  στον αντίστοιχο υποδοχέα του, TNFR-1, είναι υπεύθυνη για την ενεργοποίηση της υπομονάδας του μεταγραφικού παράγοντα p65 του NF-κB διαμέσου ενός συνδυασμού αποικοδόμησης του ανασταλτικού I $\kappa$ B συμπλέγματος και φωσφορυλίωσης του NF-κB [449,450]. Μετά την ενεργοποίηση, ο NF-κB μετακινείται στον πυρήνα και επάγει την έκφραση πολυάριθμων γονιδίων.

Επιπλέον, αποδείχθηκε ότι η επαγωγή των παραπάνω δεικτών ECs δεν επάγεται όταν τα αιμοπετάλια ενεργοποιούνται *in situ* παρουσία τόσο των EPCs όσο και των ώριμων ECs. Στην παρούσα μελέτη δείξαμε επίσης τη μείωση των επιπέδων των ενδοθηλιακών δεικτών, όταν και οι δύο κυτταρικοί τύποι επωάζονται με τα υπερκείμενα προ-ενεργοποιημένων αιμοπεταλίων σε σύγκριση με τα υπερκείμενα των εν ηρεμία αιμοπεταλίων ή των ενεργοποιημένων με ADP αιμοπεταλίων που έχουν προ-επωαστεί με τικαγρελόρη. Τα συγκεκριμένα αποτελέσματά έρχονται σε αντίθεση με προηγούμενα δημοσιευμένα δεδομένα, τα οποία υποδηλώνουν ότι τα ενεργοποιημένα WPs επάγουν την έκκριση χημειοκινών και την έκφραση μορίων προσκόλλησης σε ECs μετά από ενεργοποίηση του NF-κB [216,451]. Τα συγκεκριμένα αντιφατικά αποτελέσματα μπορεί να αποδοθούν κατά κύριο λόγο στην παρουσία συστατικών του πλάσματος, μια πρόταση η οποία χρειάζεται περαιτέρω διερεύνηση. Μια άλλη πιθανή εξήγηση θα μπορούσε να είναι η έκκριση ουσιών από τα αιμοπετάλια, όπως ο HGF [452], οι οποίες αναστέλλουν τη δραστηριότητα του NF-κB και την γονιδιακή έκφραση της COX-2. Τα αποτελέσματα της παρούσας διατριβής έρχονται σε συμφώνα με προηγούμενα δημοσιευμένα αποτελέσματα, παρόλο που έχει χρησιμοποιηθεί διαφορετικός τύπος κυττάρων, συγκεκριμένα χονδροκύτταρα [452]. Στη συγκεκριμένη μελέτη, στην οποία χρησιμοποιήθηκε PRP και όχι WPs, έχει αποδειχθεί ότι το ενεργοποιημένο PRP μειώνει στα χονδροκύτταρα τη μετενεργοποιητική δραστηριότητα του

NF- $\kappa$ B, ενισχύοντας την κυτταρική έκφραση του I $\kappa$ B $\alpha$  και ελαττώνει την έκφραση της COX-2, η οποία μετατρέπει το AA σε PGI<sub>2</sub>, σε γονίδια-στόχους [452]. Τέλος, τα αποτελέσματα της παρούσας διατριβής δείχνουν ότι οι επαγόμενες από τα εν ηρεμία αιμοπετάλια έκφραση και έκκριση των παραπάνω περιγραφέντων δεικτών των ECs διατηρούνται από την τικαγρελόρη παρουσία *in situ* ενεργοποιημένων αιμοπεταλίων ή προ-ενεργοποιημένων αιμοπεταλίων με ADP, ένα αναμενόμενο φαινόμενο καθώς η τικαγρελόρη αναστέλλει την επαγόμενη από την ADP αιμοπεταλιακή ενεργοποίηση, υποδεικνύοντας ότι η αναστολή της ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων παίζει σημαντικό ρόλο στις επαγόμενες από τα αιμοπετάλια μεταβολές της λειτουργικότητας των ECs.

Συμπερασματικά, τα εν ηρεμία και όχι τα ενεργοποιημένα αιμοπετάλια επάγουν την ενεργοποίηση των EPCs και ώριμων ECs. Το συγκεκριμένο φαινόμενο παρατηρείται και παρουσία της τικαγρελόρης, ακόμα και μετά την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων με ADP. Η ενεργοποίηση των EPCs είναι ένα προαπαιτούμενο βήμα για την προσκόλληση τους στο τραυματισμένο αρτηριακό τοίχωμα και του πολλαπλασιασμού σε ώριμα ECs [247,253–255,257,453,454]. Τα συγκεκριμένα αποτελέσματα προτείνουν ότι η τικαγρελόρη μπορεί να προάγει την αναγέννηση του ενδοθηλίου εμποδίζοντας την αιμοπεταλιακή ενεργοποίηση, επιτρέποντας έτσι στα εν ηρεμία αιμοπετάλια να ενεργοποιηθούν τα EPCs, ένα φαινόμενο το οποίο δεν παρατηρείται παρουσία των ενεργοποιημένων αιμοπεταλίων.



## **7<sup>ο</sup> Κεφάλαιο – Βιβλιογραφία**

- [1] Gay LJ, Felding-Habermann B. Contribution of platelets to tumour metastasis. *Nat Rev Cancer* 2011;11:123–34. doi:10.1038/nrc3004.
- [2] Engelmann B, Massberg S. Thrombosis as an intravascular effector of innate immunity. *Nat Rev Immunol* 2013;13:34–45. doi:10.1038/nri3345.
- [3] Nording HM, Seizer P, Langer HF. Platelets in inflammation and atherogenesis. *Front Immunol* 2015;6:1–11. doi:10.3389/fimmu.2015.00098.
- [4] White JG, Clawson CC. Overview article: Biostructure of blood platelets. *Ultrastruct Pathol* 1980;1:533–58. doi:10.3109/01913128009140561.
- [5] Maynard DM, Heijnen HFG, Horne MK, White JG, Gahl WA. Proteomic analysis of platelet  $\alpha$ -granules using mass spectrometry. *J Thromb Haemost* 2007;5:1945–55. doi:10.1111/j.1538-7836.2007.02690.x.
- [6] Garcia-Souza LF, Oliveira MF. Mitochondria: Biological roles in platelet physiology and pathology. *Int J Biochem Cell Biol* 2014;50:156–60. doi:10.1016/j.biocel.2014.02.015.
- [7] Zharikov S, Shiva S. Platelet mitochondrial function: from regulation of thrombosis to biomarker of disease. *Biochem Soc Trans* 2013;41:118–23. doi:10.1042/BST20120327.
- [8] Echtler K, Stark K, Lorenz M, Kerstan S, Walch A, Jennen L, et al. Platelets contribute to postnatal occlusion of the ductus arteriosus. *Nat Med* 2010;16:75–82. doi:10.1038/nm.2060.
- [9] Watson SP, Lowe K, Finney BA. Platelets in lymph vessel development and integrity. *Adv Anatomy, Embryol Cell Biol* 2014;214:93–105. doi:10.1007/978-3-7091-1646-3.
- [10] Herter JM, Rossaint J, Zarbock A. Platelets in inflammation and immunity. *J Thromb Haemost* 2014;12:1764–75. doi:10.1111/jth.12730.
- [11] Labelle M, Begum S, Hynes RO. Direct signaling between platelets and cancer cells



## *Βιβλιογραφία*

- induces an epithelial-mesenchymal-like transition and promotes metastasis. *Cancer Cell* 2011;20:576–90. doi:10.1016/j.ccr.2011.09.009.
- [12] Shattil SJ, Kim C, Ginsberg MH. The final steps of integrin activation: the end game. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2010;11:288–300. doi:10.1038/nrm2871.
- [13] Plow EF, Meller J, Byzova T V. Integrin function in vascular biology: a view from 2013. *Curr Opin Hematol* 2014;21:241–7. doi:10.1097/MOH.0000000000000042.
- [14] Bennett JS. Regulation of integrins in platelets. *Biopolymers* 2015;104:323–33. doi:10.1002/bip.22679.
- [15] Coller BS, Shattil SJ. The GPIIb/IIIa (integrin  $\alpha$ IIB $\beta$ 3) odyssey: a technology-driven saga of a receptor with twists, turns, and even a bend. *Blood* 2008;112:3011–25. doi:10.1182/blood-2008-06-077891.story.
- [16] Kasirer-Friede A, Shattil SJ. Regulation of platelet adhesion receptors. In: Gresele P, Kleiman NS, Lopez JA, Page CP, editors. *Platelets Thromb. Non-Thrombotic Disord.*, 2017, p. 69–84. doi:10.1007/978-3-319-47462-5.
- [17] Luo S-Z, Mo X, Afshar-Kharghan V, Srinivasan S, López JA, Li R. Glycoprotein Ib $\alpha$  forms disulfide bonds with 2 glycoprotein Ib $\beta$  subunits in the resting platelet. *Blood* 2007;109:603–9. doi:10.1182/blood-2006-05-024091.
- [18] Kasirer-Friede A, Cozzi MR, Mazzucato M, De Marco L, Ruggeri ZM, Shattil SJ. Signaling through GP Ib-IX-V activates  $\alpha$ IIB $\beta$ 3 independently of other receptors. *Blood* 2004;103:3403–11. doi:10.1182/blood-2003-10-3664.Supported.
- [19] Cruz MA, Chen J, Whitelock JL, Morales LD, López JA. The platelet glycoprotein Ib-von Willebrand factor interaction activates the collagen receptor alpha2beta1 to bind collagen: activation-dependent conformational change of the alpha2-I domain. *Blood* 2005;105:1986–91. doi:10.1182/blood-2004-04-1365.Supported.
- [20] Canobbio I, Balduini C, Torti M. Signalling through the platelet glycoprotein Ib-V-IX complex. *Cell Signal* 2004;16:1329–44. doi:10.1016/j.cellsig.2004.05.008.
- [21] Wu Y, Suzuki-Inoue K, Satoh K, Asazuma N, Yatomi Y, Berndt MC, et al. Role of Fc receptor gamma-chain in platelet glycoprotein Ib-mediated signaling. *Blood*

- 2001;97:3836–45.
- [22] Yin H, Slusky JS, Berger BW, Walters RS, Vilaire G, Litvinov RI, et al. Computational design of peptides that target transmembrane helices. *Science* (80- ) 2007;315:1817–23.
- [23] Hynes RO. Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell* 2002;110:673–87. doi:10.1016/S0092-8674(02)00971-6.
- [24] Takagi J, Petre BM, Walz T, Springer TA. Global conformational rearrangements in integrin extracellular domains in outside-in and inside-out signaling. *Cell* 2002;110:599–611.
- [25] Gros A, Ollivier V, Ho-Tin-Noé B. Platelets in inflammation: Regulation of leukocyte activities and vascular repair. *Front Immunol* 2015;5:678. doi:10.3389/fimmu.2014.00678.
- [26] Jain S, Russell S, Ware J. Platelet glycoprotein VI facilitates experimental lung metastasis in syngenic mouse models. *J Thromb Haemost* 2009;7:1713–7. doi:10.1111/j.1538-7836.2009.03559.x.
- [27] Berlanga O, Bori-Sanz T, James JR, Frampton J, Davis SJ, Tomlinson MG, et al. Glycoprotein VI oligomerization in cell lines and platelets. *J Thromb Haemost* 2007;5:1026–33. doi:10.1111/j.1538-7836.2007.02449.x.
- [28] Zahid M, Loyau S, Bouabdelli M, Aubrey N, Jandrot-Perrus M, Billiald P. Design and reshaping of an scFv directed against human platelet glycoprotein VI with diagnostic potential. *Anal Biochem* 2011;417:274–82. doi:10.1016/j.ab.2011.06.036.
- [29] Jung SM, Tsuji K, Moroi M. Glycoprotein (GP) VI dimer as a major collagen-binding site of native platelets: Direct evidence obtained with dimeric GPVI-specific Fabs. *J Thromb Haemost* 2009;7:1347–55. doi:10.1111/j.1538-7836.2009.03496.x.
- [30] Nieswandt B, Bergmeier W, Schulte V, Rackebrandt K, Gessner JE, Zirngibl H. Expression and function of the mouse collagen receptor glycoprotein VI is strictly dependent on its association with the FcR $\gamma$  chain. *J Biol Chem* 2000;275:23998–4002. doi:10.1074/jbc.M003803200.

## *Βιβλιογραφία*

- [31] Dütting S, Bender M, Nieswandt B. Platelet GPVI: a target for antithrombotic therapy?! *Trends Pharmacol Sci* 2012;33:583–90. doi:doi.org/10.1016/j.tips.2012.07.004.
- [32] Jandrot-Perrus M, Busfield S, Lagrue A-H, Xiong X, Debili N, Chickering T, et al. Cloning, characterization, and functional studies of human and mouse glycoprotein VI: a platelet-specific collagen receptor from the immunoglobulin superfamily. *Blood* 2000;96:1798–807. doi:10.1182/blood.v100.13.4462.
- [33] Nieswandt B, Watson SP. Platelet-collagen interaction: Is GPVI the central receptor? *Blood* 2003;102:449–61. doi:10.1182/blood-2002-12-3882.
- [34] Nieswandt B, Bergmeier W, Eckly A, Schulte V, Ohlmann P, Cazenave JP, et al. Evidence for cross-talk between glycoprotein VI and Gi-coupled receptors during collagen-induced platelet aggregation. *Blood* 2001;97:3829–35. doi:10.1182/blood.V97.12.3829.
- [35] Mammadova-Bach E, Ollivier V, Loyau S, Schaff M, Dumont B, Favier R, et al. Platelet glycoprotein VI binds to polymerized fibrin and promotes thrombin generation. *Blood* 2015;126:683–91. doi:10.1182/blood-2015-02-629717.
- [36] Sidhu TS, French SL, Hamilton JR. Differential signaling by protease-activated receptors: implications for therapeutic targeting. *Int J Mol Sci* 2014;15:6169–83. doi:10.3390/ijms15046169.
- [37] Coughlin SR. Thrombin signalling and protease-activated receptors. *Nature* 2000;407:258–64.
- [38] Coughlin SR. Protease-activated receptors in hemostasis, thrombosis and vascular biology. *J Thromb Haemost* 2005;3:1800–14. doi:10.1016/S0140-6736(01)96724-8.
- [39] Zhang C, Srinivasan Y, Arlow DH, Fung JJ, Palmer D, Zheng Y, et al. High-resolution crystal structure of human protease-activated receptor 1. *Nature* 2012;492:387–92. doi:10.1038/nature11701.
- [40] Ma L, Perini R, McKnight W, Dickey M, Klein A, Hollenberg MD, et al. Proteinase-activated receptors 1 and 4 counter-regulate endostatin and VEGF release from human

- platelets. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;102:216–20. doi:10.1073/pnas.0406682102.
- [41] Nguyen KA, Hamzeh-Cognasse H, Laradi S, Pozzetto B, Garraud O, Cognasse F. Specific activation, signalling and secretion profiles of human platelets following PAR-1 and PAR-4 stimulation. *Platelets* 2015;26:795–8. doi:10.3109/09537104.2015.1050585.
- [42] Zhao P, Metcalf M, Bunnett NW. Biased signaling of protease-activated receptors. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2014;5:67. doi:10.3389/fendo.2014.00067.
- [43] Chackalamannil S, Xia Y, Greenlee WJ, Clasby M, Tsai H, Asberom T, et al. Discovery of potent orally active thrombin receptor (protease activated receptor 1) antagonists as novel antithrombotic agents. *J Med Chem* 2005;48:5884–7.
- [44] Judge HM, Jennings LK, Moliterno DJ, Hord E, Ecob R, Tricoci P, et al. PAR1 antagonists inhibit thrombin-induced platelet activation whilst leaving the PAR4-mediated response intact. *Platelets* 2015;26:236–242. doi:10.3109/09537104.2014.902924.
- [45] Kosoglou T, Reyderman L, Tiessen RG, van Vlier AA, Fales RR, Keller R, et al. Pharmacodynamics and pharmacokinetics of the novel PAR-1 antagonist vorapaxar (formerly SCH 530348) in healthy subjects. *Eur J Clin Pharmacol* 2012;68:249–58. doi:10.1007/s00228-011-1120-6.
- [46] Angiolillo DJ, Capodanno D, Goto S. Platelet thrombin receptor antagonism and atherothrombosis. *Eur Heart J* 2010;31:17–28. doi:10.1093/eurheartj/ehp504.
- [47] Becker RC, Moliterno DJ, Jennings LK, Pieper KS, Pei J, Niederman A, et al. Safety and tolerability of SCH 530348 in patients undergoing non-urgent percutaneous coronary intervention: a randomised, double-blind, placebo-controlled phase II study. *Lancet* 2009;373:919–28. doi:10.1016/S0140-6736(09)60230-0.
- [48] Storey RF, Kotha J, Smyth SS, Moliterno DJ, Rorick TL, Moccetti T, et al. Effects of vorapaxar on platelet reactivity and biomarker expression in non-ST-elevation acute coronary syndromes. The TRACER Pharmacodynamic Substudy. *Thromb Haemost* 2014;111:883–91. doi:10.1160/TH13-07-0624.

## *Βιβλιογραφία*

- [49] White HD. Oral antiplatelet therapy for atherothrombotic disease: current evidence and new directions. *Am Heart J* 2011;161:450–61. doi:10.1016/j.ahj.2010.10.043.
- [50] Goto S, Ogawa H, Takeuchi M, Flather MD, Bhatt DL. Double-blind, placebo-controlled Phase II studies of the protease-activated receptor 1 antagonist E5555 (atopaxar) in Japanese patients with acute coronary syndrome or high-risk coronary artery disease. *Eur Heart J* 2010;31:2601–13. doi:10.1093/eurheartj/ehq320.
- [51] O'Donoghue ML, Bhatt DL, Wiviott SD, Goodman SG, Fitzgerald DJ, Angiolillo DJ, et al. Safety and tolerability of atopaxar in the treatment of patients with acute coronary syndromes: the lessons from antagonizing the cellular effects of Thrombin–Acute Coronary Syndromes Trial. *Circulation* 2011;123:1843–53. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.110.000786.
- [52] Burnstock G. Purine and pyrimidine receptors. *Cell Mol Life Sci* 2007;64:1471–83. doi:10.1007/s00018-007-6497-0.
- [53] Dovlatova N, Wijeyeratne YD, Fox SC, Manolopoulos P, Johnson AJ, White AE, et al. Detection of P2Y(14) protein in platelets and investigation of the role of P2Y(14) in platelet function in comparison with the EP(3) receptor. *Thromb Haemost* 2008;100:261–70. doi:10.1160/TH07-10-0601.
- [54] Hechler B, Gachet C. P2 receptors and platelet function. *Purinergic Signal* 2011;7:293–303. doi:10.1007/s11302-011-9247-6.
- [55] Baurand A, Raboisson P, Freund M, Léon C, Cazenave JP, Bourguignon JJ, et al. Inhibition of platelet function by administration of MRS2179, a P2Y1 receptor antagonist. *Eur J Pharmacol* 2001;412:213–21. doi:10.1016/S0014-2999(01)00733-6.
- [56] Sage SO, Reast R, Rink TJ. ADP evokes biphasic Ca<sup>2+</sup> influx in fura-2-loaded human platelets. Evidence for Ca<sup>2+</sup> entry regulated by the intracellular Ca<sup>2+</sup> store. *Biochem J* 1990;265:675–80. doi:10.1186/1741-7007-4-21.
- [57] Mangin P, Ohlmann P, Eckly A, Cazenave J-P, Lanza F, Gachet C. The P2Y1 receptor plays an essential role in the platelet shape change induced by collagen when TxA<sub>2</sub> formation is prevented. *J Thromb Haemost* 2004;2:969–77. doi:10.1111/j.1538-7836.2004.00722.x.

- [58] Baurand A, Eckly A, Bari N, Léon C, Hechler B, Cazenave J-P, et al. Desensitization of the platelet aggregation response to ADP: differential down-regulation of the P2Y1 and P2cyc receptors. *Thromb Haemost* 2000;84:484–91. doi:10.1055/s-0037-1614049.
- [59] Ohlmann P, Lecchi A, El-Tayeb A, Müller CE, Cattaneo M, Gachet C. The platelet P2Y(12) receptor under normal and pathological conditions. Assessment with the radiolabeled selective antagonist [(3)H]PSB-0413. *Purinergic Signal* 2013;9:59–66. doi:10.1007/s11302-012-9329-0.
- [60] Cattaneo M. The platelet P2Y12 receptor for adenosine diphosphate: congenital and drug-induced defects. *Blood* 2011;117:2102–12. doi:10.1182/blood-2010-08-263111.
- [61] Michelson AD. New P2Y12 antagonists. *Curr Opin Hematol* 2009;16:371–7. doi:10.1097/MOH.0b013e32832ea2f2.
- [62] Adamski P, Koziński M, Ostrowska M, Fabiszak T, Navarese EP, Paciorek P, et al. Overview of pleiotropic effects of platelet P2Y12 receptor inhibitors. *Thromb Haemost* 2014;112:224–42. doi:10.2174/1381612820666140414211543.
- [63] André P, Delaney SM, LaRocca T, Vincent D, DeGuzman F, Jurek M, et al. P2Y12 regulates platelet adhesion/activation, thrombus growth, and thrombus stability in injured arteries. *J Clin Invest* 2003;112:398–406. doi:10.1172/JCI17864.
- [64] Gratacap M-P, Guillermet-Guibert J, Martin V, Chicanne G, Tronchère H, Gaits-Iacovoni F, et al. Regulation and roles of PI3K $\beta$ , a major actor in platelet signaling and functions. *Adv Enzyme Regul* 2011;51:106–16. doi:10.1016/j.advenzreg.2010.09.011.
- [65] Geiger J, Brich J, Hönig-Liedl P, Eigenthaler M, Schanzenbächer P, Herbert JM, et al. Specific impairment of human platelet P2Y(AC) ADP receptor-mediated signaling by the antiplatelet drug clopidogrel. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999;19:2007–11.
- [66] Aleil B, Ravanat C, Cazenave J-P, Rochoux G, Heitz A, Gachet C. Flow cytometric analysis of intraplatelet VASP phosphorylation for the detection of clopidogrel resistance in patients with ischemic cardiovascular diseases. *J Thromb Haemost* 2005;3:85–92. doi:10.1111/j.1538-7836.2004.01063.x.
- [67] Léon C, Ravanat C, Freund M, Cazenave JP, Gachet C. Differential involvement of the

## *Βιβλιογραφία*

- P2Y1 and P2Y12 receptors in platelet procoagulant activity. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003;23:1941–7. doi:10.1161/01.ATV.0000092127.16125.E6.
- [68] Mahaut-Smith MP. The unique contribution of ion channels to platelet and megakaryocyte function. *J Thromb Haemost* 2012;10:1722–32. doi:10.1111/j.1538-7836.2012.04837.x.
- [69] Jones S, Evans RJ, Mahaut-Smith MP. Ca<sup>2+</sup> influx through P2X1 receptors amplifies P2Y1 receptor-evoked Ca<sup>2+</sup> signaling and ADP-evoked platelet aggregation. *Mol Pharmacol* 2014;86:243–51. doi:10.1124/mol.114.092528.
- [70] Oury C, Toth-Zsomboki E, Thys C, Tytgat J, Vermeylen J, Hoylaerts MF. The ATP-gated P2X1 ion channel acts as a positive regulator of platelet responses to collagen. *Thromb Haemost* 2001;86:1264–71. doi:01111264 [pii].
- [71] Erhardt JA, Toomey JR, Douglas SA, Johns DG. P2X1 stimulation promotes thrombin receptor-mediated platelet aggregation. *J Thromb Haemost* 2006;4:882–90. doi:10.1111/j.1538-7836.2006.01849.x.
- [72] Huang Z, Liu P, Zhu L, Li N, Hu H. P2X1-initiated p38 signalling enhances thromboxane A<sub>2</sub>-induced platelet secretion and aggregation. *Thromb Haemost* 2014;112:142–50.
- [73] Idzko M, Pitchford S, Page C. Role of platelets in allergic airway inflammation. *J Allergy Clin Immunol* 2015;135:1416–23. doi:10.1016/j.jaci.2015.04.028.
- [74] Semple JW, Italiano JEJ, Freedman J. Platelets and the immune continuum. *Nat Rev Immunol* 2011;11:264–74. doi:10.1038/nri2956.
- [75] Gawaz M, Langer H, May AE. Platelets in inflammation and atherogenesis. *J Clin Invest* 2005;115:3378–84. doi:10.1172/JCI27196.
- [76] Idzko M, Ferrari D, Eltzschig HK. Nucleotide signalling during inflammation. *Nature* 2014;509:310–7. doi:10.1038/nature13085.
- [77] Ferrari D, Vitiello L, Idzko M, la Sala A. Purinergic signaling in atherosclerosis. *Trends Mol Med* 2015;21:184–92. doi:10.1016/j.molmed.2014.12.008.

- [78] Smith WL, Urade Y, Jakobsson P-J. Enzymes of the cyclooxygenase pathways of prostanoid biosynthesis. *Chem Rev* 2011;111:5821–65. doi:10.1021/cr2002992.
- [79] Chen W, Pawelek TR, Kulmacz RJ. Hydroperoxide dependence and cooperative cyclooxygenase kinetics in prostaglandin H synthase-1 and -2. *J Biol Chem* 1999;274:20301–6. doi:10.1074/jbc.274.29.20301.
- [80] Patrignani P, Sciulli MG, Manarini S, Santini G, Cerletti C, Evangelista V. COX-2 is not involved in thromboxane biosynthesis by activated human platelets. *J Physiol Pharmacol* 1999;50:661–7.
- [81] Fries S, Grosser T. Platelet prostanoids and their receptors. In: Gresele P, Kleiman NS, Lopez JA, Page CP, editors. *Platelets Thromb. Non-Thrombotic Disord.*, 2017, p. 203–11. doi:10.1007/978-3-319-47462-5.
- [82] Reilly IAG, FitzGerald GA. Inhibition of thromboxane formation in vivo and ex vivo: implications for therapy with platelet inhibitory drugs. *Blood* 1987;69:180–6.
- [83] Coyle AT, Miggin SM, Kinsella BT. Characterization of the 5' untranslated region of alpha and beta isoforms of the human thromboxane A2 receptor (TP). Differential promoter utilization by the TP isoforms. *Eur J Biochem* 2002;269:4058–73. doi:10.1046/j.1432-1033.2002.03098.x.
- [84] Wu KK, Liou JY. Cellular and molecular biology of prostacyclin synthase. *Biochem Biophys Res Commun* 2005;338:45–52. doi:10.1016/j.bbrc.2005.08.021.
- [85] Ricciotti E, Yu Y, Grosser T, FitzGerald GA. COX-2, the dominant source of prostacyclin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2013;110:E183. doi:10.1073/pnas.1219073110.
- [86] FitzGerald GA, Smith B, Pederson AK, Brash AR. Increased prostacyclin biosynthesis in patients with severe atherosclerosis and platelet activation. *N Engl J Med* 1984;310:1065–8. doi:10.1056/NEJM199311113292002.
- [87] FitzGerald GA, Catella F, Oates JA. Eicosanoid biosynthesis in human cardiovascular disease. *Hum Pathol* 1987;18:248–52. doi:10.1016/S0046-8177(87)80007-2.
- [88] Cheng Y, Austin SC, Rocca B, Koller BH, Coffman TM, Grosser T, et al. Role of



## *Βιβλιογραφία*

- prostacyclin in the cardiovascular response to thromboxane A<sub>2</sub>. *Science* (80- ) 2002;296:539–41. doi:10.1126/science.1068711.
- [89] Schrör K, Bretschneider E, Fischer K, Fischer JW, Pape R, Rauch BH, et al. Thrombin receptors in vascular smooth muscle cells - function and regulation by vasodilatory prostaglandins. *Thromb Haemost* 2010;103:884–90. doi:10.1160/TH09-09-0627.
- [90] Amsterdam EA, Wenger NK, Brindis RG, Casey DE, Ganiats TG, Holmes DR, et al. 2014 AHA/ACC Guideline for the management of patients with non-ST-elevation acute coronary syndromes. *J Am Coll Cardiol* 2014;64:e139–228. doi:10.1016/j.jacc.2014.09.017.
- [91] Parekh AK, Galloway JM, Hong Y, Wright JS. Aspirin in the secondary prevention of cardiovascular disease. *N Engl J Med* 2013;368:204–5. doi:10.1056/NEJMp1213380.
- [92] Roffi M, Patrono C, Collet J-P, Mueller C, Valgimigli M, Andreotti F, et al. 2015 ESC Guidelines for the management of acute coronary syndromes in patients presenting without persistent st-segment elevation: Task force for the management of acute coronary syndromes in patients presenting without persistent ST-segment elevation of . *Eur Heart J* 2016;37:267–315. doi:10.1093/eurheartj/ehv320.
- [93] Patrono C. Low-dose aspirin in primary prevention: cardioprotection, chemoprevention, both, or neither? *Eur Heart J* 2013;34:3403–11. doi:10.1093/eurheartj/eht058.
- [94] Patrono C, Ciabarroni G, Patrignani P, Pugliese F, Filabozzi P, Catella F, et al. Clinical pharmacology of platelet cyclooxygenase inhibition. *Circulation* 1985;72:1177–84.
- [95] Van Hecken A, Schwartz JI, Depré M, De Lepeleire I, Dallob A, Tanaka W, et al. Comparative inhibitory activity of rofecoxib, meloxicam, diclofenac, ibuprofen, and naproxen on COX-2 versus COX-1 in healthy volunteers. *J Clin Pharmacol* 2000;40:1109–20. doi:10.1177/009127000004001005.
- [96] Meek IL, Vonkeman HE, Kasemier J, Movig KLL, Van De Laar MAFJ. Interference of NSAIDs with the thrombocyte inhibitory effect of aspirin: a placebo-controlled, ex vivo, serial placebo-controlled serial crossover study. *Eur J Clin Pharmacol* 2013;69:365–71. doi:10.1007/s00228-012-1370-y.

- [97] Nuyttens BP, Thijs T, Deckmyn H, Broos K. Platelet adhesion to collagen. *Thromb Res* 2011;127:S26–9. doi:10.1016/S0049-3848(10)70151-1.
- [98] Brass LF. Thrombin and platelet activation. *Chest* 2003;124:18S-25S. doi:10.1378/chest.124.3\_suppl.18S.
- [99] Gremmel T, Frelinger III AL, Michelson AD. Platelet Physiology. *Semin Thromb Hemost* 2016;42:191–204.
- [100] Molica F, Stierlin FB, Fontana P, Kwak BR. Pannexin- and connexin-mediated intercellular communication in platelet function. *Int J Mol Sci* 2017;18:850. doi:10.3390/ijms18040850.
- [101] Lawson JH, Kalafatis M, Stram S, Mann KG. A model for the tissue factor pathway to thrombin. I. An empirical study. *J Biol Chem* 1994;269:23357–66.
- [102] Liu S, Calderwood DA, Ginsberg MH. Integrin cytoplasmic domain-binding proteins. *J Cell Sci* 2000;113:3563–71. doi:10.1103/PhysRevLett.101.266402.
- [103] Tadokoro S, Shattil SJ, Eto K, Tai V, Liddington RC, de Pereda JM, et al. Talin binding to integrin beta tails: a final common step in integrin activation. *Science* (80- ) 2003;302:103–6. doi:10.1126/science.1086652.
- [104] Ma Y-Q, Qin J, Wu C, Plow EF. Kindlin-2 (Mig-2): a co-activator of beta3 integrins. *J Cell Biol* 2008;181:439–46. doi:10.1083/jcb.200710196.
- [105] Ginsberg MH, Partridge A, Shattil SJ. Integrin regulation. *Curr Opin Cell Biol* 2005;17:509–16. doi:10.1016/j.ceb.2005.08.010.
- [106] Shattil SJ, Newman PJ. Integrins: dynamic scaffolds for adhesion and signaling in platelets. *Blood* 2004;104:1606–15. doi:10.1182/blood-2004-04-1257.Supported.
- [107] Deanfield JE, Halcox JP, Rabelink TJ. Endothelial function and dysfunction: testing and clinical relevance. *Circulation* 2007;115:1285–95. doi:10.1161/circulationaha.106.652859.
- [108] Widlansky ME, Gokce N, Keaney JF, Vita JA. The clinical implications of endothelial dysfunction. *J Am Coll Cardiol* 2003;42:1149–60. doi:10.1016/S0735-1097(03)00994-

## *Βιβλιογραφία*

X.

- [109] Münzel T, Sinning C, Post F, Warnholtz A, Schulz E. Pathophysiology, diagnosis and prognostic implications of endothelial dysfunction. *Ann Med* 2008;40:180–96. doi:10.1080/07853890701854702.
- [110] Buijs JO den, Musters M, Verrips T, Post JA, Braam B, van Riel N. Mathematical modeling of vascular endothelial layer maintenance: the role of endothelial cell division, progenitor cell homing, and telomere shortening. *Am J Physiol - Hear Circ Physiol* 2004;287:H2651–8. doi:10.1152/ajpheart.00332.2004.
- [111] Walter DH, Rittig K, Bahlmann FH, Kirchmair R, Silver M, Murayama T, et al. Statin therapy accelerates reendothelialization: a novel effect involving mobilization and incorporation of bone marrow-derived endothelial progenitor cells. *Circulation* 2002;105:3017–24. doi:10.1161/01.cir.0000018166.84319.55.
- [112] Griese DP, Ehsan A, Melo LG, Kong D, Zhang L, Mann MJ, et al. Isolation and transplantation of autologous circulating endothelial cells into denuded vessels and prosthetic grafts: implications for cell-based vascular therapy. *Circulation* 2003;108:2710–5. doi:10.1161/01.CIR.0000096490.16596.A6.
- [113] Fujiyama S, Amano K, Uehira K, Yoshida M, Nishiwaki Y, Nozawa Y, et al. Bone marrow monocyte lineage cells adhere on injured endothelium in a monocyte chemoattractant protein-1-dependent manner and accelerate reendothelialization as endothelial progenitor cells. *Circ Res* 2003;93:980–9. doi:10.1161/01.RES.0000099245.08637.CE.
- [114] Bhattacharya V, McSweeney PA, Shi Q, Bruno B, Ishida A, Nash R, et al. Enhanced endothelialization and microvessel formation in polyester grafts seeded with CD34+ bone marrow cells. *Blood* 2000;95:581–5.
- [115] Gehling UM, Ergün S, Schumacher U, Wagener C, Pantel K, Otte M, et al. In vitro differentiation of endothelial cells from AC133-positive progenitor cells. *Blood* 2000;95:3106–12. doi:10.1146/annurev.cb.11.110195.000445.
- [116] Hu Y, Davison F, Zhang Z, Xu Q. Endothelial replacement and angiogenesis in arteriosclerotic lesions of allografts are contributed by circulating progenitor cells.

- Circulation 2003;108:3122–7. doi:10.1161/01.CIR.0000105722.96112.67.
- [117] Hill JM, Zalos G, Halcox JPJ, Schenke WH, Waclawiw MA, Quyyumi AA, et al. Circulating endothelial progenitor cells, vascular function, and cardiovascular risk. *N Engl J Med* 2003;348:593–600.
- [118] Urbich C, Heeschen C, Aicher A, Dernbach E, Zeiher AM, Dimmeler S. Relevance of monocytic features for neovascularization capacity of circulating endothelial progenitor cells. *Circulation* 2003;108:2511–6. doi:10.1161/01.CIR.0000096483.29777.50.
- [119] Dong C, Goldschmidt-Clermont PJ. Endothelial progenitor cells: a promising therapeutic alternative for cardiovascular disease. *J Interv Cardiol* 2007;20:93–9. doi:10.1111/j.1540-8183.2007.00251.x.
- [120] Mukai N, Akahori T, Komaki M, Li Q, Kanayasu-Toyoda T, Ishii-Watabe A, et al. A comparison of the tube forming potentials of early and late endothelial progenitor cells. *Exp Cell Res* 2008;314:430–40. doi:10.1016/j.yexcr.2007.11.016.
- [121] Asahara T, Murohara T, Sullivan A, Silver M, Van Der Zee R, Li T, et al. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science* (80- ) 1997;275:964–7.
- [122] Yoder MC. Human endothelial progenitor cells. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2012;2:a006692. doi:10.1101/cshperspect.a006692.
- [123] Ingram DA, Caplice NM, Yoder MC. Unresolved questions, changing definitions, and novel paradigms for defining endothelial progenitor cells. *Blood* 2005;106:1525–31. doi:10.1182/blood-2005-04-1509.
- [124] Lin Y, Weisdorf DJ, Solovey A, Hebbel RP. Origins of circulating endothelial cells and endothelial outgrowth from blood. *J Clin Invest* 2000;105:71–7. doi:10.1172/JCI8071.
- [125] Peichev M, Naiyer AJ, Pereira D, Zhu Z, Lane WJ, Williams M, et al. Expression of VEGFR-2 and AC133 by circulating human CD34(+) cells identifies a population of functional endothelial precursors. *Blood* 2000;95:952–8.
- [126] Hirschi KK, Ingram DA, Yoder MC. Assessing identity, phenotype, and fate of endothelial progenitor cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2008;28:1584–95.

## *Βιβλιογραφία*

- doi:10.1161/ATVBAHA.107.155960.
- [127] Fadini GP, Losordo D, Dimmeler S. Critical reevaluation of endothelial progenitor cell phenotypes for therapeutic and diagnostic use. *Circ Res* 2012;110:624–37. doi:10.1161/CIRCRESAHA.111.243386.
- [128] Medina RJ, Barber CL, Sabatier F, Dignat-George F, Melero-Martin JM, Khosrotehrani K, et al. Endothelial progenitors: A consensus statement on nomenclature. *Stem Cells Transl Med* 2017;6:1316–20. doi:10.1002/sctm.16-0360.
- [129] Yoon CH, Hur J, Park KW, Kim JH, Lee CS, Oh IY, et al. Synergistic neovascularization by mixed transplantation of early endothelial progenitor cells and late outgrowth endothelial cells: The role of angiogenic cytokines and matrix metalloproteinases. *Circulation* 2005;112:1618–27. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.104.503433.
- [130] Yoder MC. Is endothelium the origin of endothelial progenitor cells? *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2010;30:1094–103. doi:10.1161/ATVBAHA.109.191635.
- [131] Urbich C, Dimmeler S. Endothelial progenitor cells: characterization and role in vascular biology. *Circ Res* 2004;95:343–53. doi:10.1161/01.RES.0000137877.89448.78.
- [132] Sieveking DP, Buckle A, Celermajer DS, Ng MKC. Strikingly different angiogenic properties of endothelial progenitor cell subpopulations: insights from a novel human angiogenesis assay. *J Am Coll Cardiol* 2008;51:660–8. doi:10.1016/j.jacc.2007.09.059.
- [133] Rehman J, Li J, Orschell CM, March KL. Peripheral blood “endothelial progenitor cells” are derived from monocyte/macrophages and secrete angiogenic growth factors. *Circulation* 2003;107:1164–9. doi:10.1161/01.CIR.0000058702.69484.A0.
- [134] Hur J, Yoon C-H, Kim H-S, Choi J-H, Kang H-J, Hwang K-K, et al. Characterization of two types of endothelial progenitor cells and their different contributions to neovasculogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004;24:288–93. doi:10.1161/01.ATV.0000114236.77009.06.
- [135] Madonna R, De Caterina R. Circulating endothelial progenitor cells: Do they live up to

- their name? *Vascul Pharmacol* 2015;67–69:2–5. doi:10.1016/j.vph.2015.02.018.
- [136] Lee PSS, Poh KK. Endothelial progenitor cells in cardiovascular diseases. *World J Stem Cells* 2014;6:355–66. doi:10.4252/wjsc.v6.i3.355.
- [137] Fadini GP, Baesso I, Albiero M, Sartore S, Agostini C, Avogaro A. Technical notes on endothelial progenitor cells: Ways to escape from the knowledge plateau. *Atherosclerosis* 2008;197:496–503. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2007.12.039.
- [138] Khan SS, Solomon MA, McCoy JP. Detection of circulating endothelial cells and endothelial progenitor cells by flow cytometry. *Cytom Part B - Clin Cytom* 2005;64:1–8. doi:10.1002/cyto.b.20040.
- [139] Schmidt-Lucke C, Fichtlscherer S, Aicher A, Tschöpe C, Schultheiss H-P, Zeiher AM, et al. Quantification of circulating endothelial progenitor cells using the modified ISHAGE protocol. *PLoS One* 2010;5:e13790. doi:10.1371/journal.pone.0013790.
- [140] Sidney LE, Branch MJ, Dunphy SE, Dua HS, Hopkinson A. Concise review: evidence for CD34 as a common marker for diverse progenitors. *Stem Cells* 2014;32:1380–9. doi:10.1002/stem.1661.
- [141] Krause DS, Fackler MJ, Civin CI, May WS. CD34: structure, biology, and clinical utility. *Blood* 1996;87:1–13.
- [142] Siemerink MJ, Klaassen I, Vogels IMC, Griffioen AW, Van Noorden CJF, Schlingemann RO. CD34 marks angiogenic tip cells in human vascular endothelial cell cultures. *Angiogenesis* 2012;15:151–63. doi:10.1007/s10456-011-9251-z.
- [143] Yin AH, Miraglia S, Zanjani ED, Almeida-Porada G, Ogawa M, Leary AG, et al. AC133, a novel marker for human hematopoietic stem and progenitor cells. *Blood* 1997;90:5002–12. doi:10.1103/PhysRevB.83.115205.
- [144] Stauffer BL, MacEneaney OJ, Kushner EJ, Cech JN, Greiner JJ, Westby CM, et al. Gender and endothelial progenitor cell number in middle-aged adults. *Artery Res* 2008;2:156–60. doi:10.1016/j.artres.2008.10.001.
- [145] Fadini GP, Coracina A, Baesso I, Agostini C, Tiengo A, Avogaro A, et al. Peripheral blood CD34+KDR+ endothelial progenitor cells are determinants of subclinical

## *Βιβλιογραφία*

- atherosclerosis in a middle-aged general population. *Stroke* 2006;37:2277–82. doi:10.1161/01.STR.0000236064.19293.79.
- [146] Friedrich EB, Walenta K, Scharlau J, Nickenig G, Werner N. CD34-/CD133+/VEGFR-2+ endothelial progenitor cell subpopulation with potent vasoregenerative capacities. *Circ Res* 2006;98:e20–5. doi:10.1161/01.RES.0000205765.28940.93.
- [147] Schatteman GC, Awad O. Hemangioblasts, angioblasts, and adult endothelial cell progenitors. *Anat Rec Part A Discov Mol Cell Evol Biol* 2004;276:13–21. doi:10.1002/ar.a.10131.
- [148] Chao H, Hirschi KK. Hemato-vascular origins of endothelial progenitor cells? *Microvasc Res* 2010;79:169–73. doi:10.1016/j.mvr.2010.02.003.
- [149] Estes ML, Mund JA, Mead LE, Prater DN, Cai S, Wang H, et al. Application of polychromatic flow cytometry to identify novel subsets of circulating cells with angiogenic potential. *Cytom Part A* 2010;77:831–9. doi:10.1002/cyto.a.20921.
- [150] Massa M, Rosti V, Ferrario M, Campanelli R, Ramajoli I, Rosso R, et al. Increased circulating hematopoietic and endothelial progenitor cells in the early phase of acute myocardial infarction. *Blood* 2005;105:199–206. doi:10.1182/blood-2004-05-1831.
- [151] Kuliczowski W, Derzhko R, Prajs I, Podolak-Dawidziak M, Serebruany VL. Endothelial progenitor cells and left ventricle function in patients with acute myocardial infarction: potential therapeutic considerations. *Am J Ther* 2012;19:44–50. doi:10.1097/MJT.0b013e3181e0cab3.
- [152] Li T-S, Hamano K, Nishida M, Hayashi M, Ito H, Mikamo A, et al. CD117+ stem cells play a key role in therapeutic angiogenesis induced by bone marrow cell implantation. *Am J Physiol Circ Physiol* 2015;285:H931–7. doi:10.1152/ajpheart.01146.2002.
- [153] Li T-S, Hayashi M, Liu Z-L, Ito H, Mikamo A, Furutani A, et al. Low angiogenic potency induced by the implantation of ex vivo expanded CD117(+) stem cells. *Am J Physiol Circ Physiol* 2004;286:H1236–41. doi:10.1152/ajpheart.00950.2003.
- [154] Duff SE, Li C, Garland JM, Kumar S. CD105 is important for angiogenesis: evidence and potential applications. *FASEB J* 2003;17:984–92. doi:10.1096/fj.02-0634rev.

- [155] Li C, Hampson IN, Hampson L, Kumar P, Bernabeu C, Kumar S. CD105 antagonizes the inhibitory signaling of transforming growth factor  $\beta$ 1 on human vascular endothelial cells. *FASEB J* 2018;14:55–64. doi:10.1096/fasebj.14.1.55.
- [156] Hager G, Holnthoner W, Wolbank S, Husa AM, Godthardt K, Redl H, et al. Three specific antigens to isolate endothelial progenitor cells from human liposuction material. *Cytotherapy* 2013;15:1426–35. doi:10.1016/j.jcyt.2013.06.018.
- [157] Wang C-H, Huang P-H, Chen J-W, Lin S-J, Lee M-F, Yang N-I, et al. Clinical application of endothelial progenitor cell: Are we ready? *Acta Cardiol Sin* 2013;29:479–87.
- [158] Yoder MC, Mead LE, Prater D, Krier TR, Mroueh KN, Li F, et al. Redefining endothelial progenitor cells via clonal analysis and hematopoietic stem/progenitor cell principals. *Hematology* 2011;109:1801–9. doi:10.1182/blood-2006-08-043471.
- [159] Ingram DA, Mead LE, Tanaka H, Meade V, Fenoglio A, Mortell K, et al. Identification of a novel hierarchy of endothelial progenitor cells using human peripheral and umbilical cord blood. *Blood* 2004;104:2752–60. doi:10.1182/blood-2004-04-1396.Supported.
- [160] Lekakis J, Abraham P, Balbarini A, Blann A, Boulanger CM, Cockcroft J, et al. Methods for evaluating endothelial function: A position statement from the European Society of Cardiology Working Group on Peripheral Circulation. *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil* 2011;18:775–89. doi:10.1177/1741826711398179.
- [161] Huizer K, Mustafa DAM, Spelt JC, Kros JM, Sacchetti A. Improving the characterization of endothelial progenitor cell subsets by an optimized FACS protocol. *PLoS One* 2017;12:e0184895. doi:10.1371/journal.pone.0184895.
- [162] Shantsila E, Watson T, Tse HF, Lip GYH. Endothelial colony forming units: Are they a reliable marker of endothelial progenitor cell numbers? *Ann Med* 2007;39:474–9. doi:10.1080/07853890701329283.
- [163] Masuda H, Kawamoto A, Ii M, Asahara T. Endothelial progenitor cells for vascular medicine. *Regen. Med. Peripher. Artery Dis.*, 2016, p. 71–90. doi:10.1248/yakushi.127.841.



## *Βιβλιογραφία*

- [164] Heissig B, Hattori K, Dias S, Friedrich M, Ferris B, Hackett NR, et al. Recruitment of stem and progenitor cells from the bone marrow niche requires MMP-9 mediated release of Kit-ligand. *Cell* 2002;109:625–37. doi:10.1016/S0092-8674(02)00754-7.
- [165] Dar A, Kollet O, Lapidot T. Mutual, reciprocal SDF-1/CXCR4 interactions between hematopoietic and bone marrow stromal cells regulate human stem cell migration and development in NOD/SCID chimeric mice. *Exp Hematol* 2006;34:967–75. doi:10.1016/j.exphem.2006.04.002.
- [166] Takahashi T, Kalka C, Masuda H, Chen D, Silver M, Kearney M, et al. Ischemia- and cytokine-induced mobilization of bone marrow-derived endothelial progenitor cells for neovascularization. *Nat Med* 1999;5:434–8.
- [167] Briasoulis A, Tousoulis D, Antoniadis C, Papageorgiou N, Stefanadis C. The role of endothelial progenitor cells in vascular repair after arterial injury and atherosclerotic plaque development. *Cardiovasc Ther* 2011;29:125–39. doi:10.1111/j.1755-5922.2009.00131.x.
- [168] Shintani S, Murohara T, Ikeda H, Ueno T, Honma T, Katoh A, et al. Mobilization of endothelial progenitor cells in patients with acute myocardial infarction. *Circulation* 2001;103:2776–9. doi:10.1161/hc2301.092122.
- [169] Balaji S, King A, Crombleholme TM, Keswani SG. The Role of endothelial progenitor cells in postnatal vasculogenesis: Implications for therapeutic neovascularization and wound healing. *Adv Wound Care* 2013;2:283–95. doi:10.1089/wound.2012.0398.
- [170] De Falco E, Porcelli D, Torella AR, Straino S, Iachininoto MG, Orlandi A, et al. SDF-1 involvement in endothelial phenotype and ischemia-induced recruitment of bone marrow progenitor cells. *Blood* 2004;104:3472–82. doi:10.1182/Blood.
- [171] Asahara T, Takahashi T, Masuda H, Kalka C, Chen D, Iwaguro H, et al. VEGF contributes to postnatal neovascularization by mobilizing bone marrow-derived endothelial progenitor cells. *EMBO J* 1999;18:3964–72. doi:10.1093/emboj/18.14.3964.
- [172] Ceradini DJ, Kulkarni AR, Callaghan MJ, Tepper OM, Bastidas N, Kleinman ME, et al. Progenitor cell trafficking is regulated by hypoxic gradients through HIF-1

- induction of SDF-1. *Nat Med* 2004;10:858–64. doi:10.1038/nm1075.
- [173] Krock BL, Skuli N, Simon MC. Hypoxia-induced angiogenesis: good and evil. *Genes and Cancer* 2011;2:1117–33. doi:10.1177/1947601911423654.
- [174] Aicher A, Zeiher AM, Dimmeler S. Mobilizing endothelial progenitor cells. *Hypertension* 2005;45:321–5. doi:10.1161/01.HYP.0000154789.28695.ea.
- [175] Huang P-H, Chen Y-H, Wang C-H, Chen J-S, Tsai H-Y, Lin F-Y, et al. Matrix metalloproteinase-9 is essential for ischemia-induced neovascularization by modulating bone marrow-derived endothelial progenitor cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2009;29:1179–84. doi:10.1161/ATVBAHA.109.189175.
- [176] Petit I, Jin D, Rafii S. The SDF-1-CXCR4 signaling pathway: a molecular hub modulating neo-angiogenesis. *Trends Immunol* 2007;28:299–307. doi:10.1016/j.it.2007.05.007.
- [177] Fortunato O, Spinetti G, Specchia C, Cangiano E, Valgimigli M, Madeddu P. Migratory activity of circulating progenitor cells and serum SDF-1 $\alpha$  predict adverse events in patients with myocardial infarction. *Cardiovasc Res* 2013;100:192–200. doi:10.1093/cvr/cvt153.
- [178] Tilling L, Chowienczyk P, Clapp B. Progenitors in motion: mechanisms of mobilization of endothelial progenitor cells. *Br J Clin Pharmacol* 2009;68:484–92. doi:10.1111/j.1365-2125.2009.03486.x.
- [179] Gill M, Dias S, Hattori K, Rivera ML, Hicklin D, Witte L, et al. Vascular trauma induces rapid but transient mobilization of VEGFR2(+)/AC133(+) endothelial precursor cells. *Circ Res* 2001;88:167–74.
- [180] Xu J, Liu X, Jiang Y, Chu L, Hao H, Liua Z, et al. MAPK/ERK signalling mediates VEGF-induced bone marrow stem cell differentiation into endothelial cell. *J Cell Mol Med* 2008;12:2395–406. doi:10.1111/j.1582-4934.2008.00266.x.
- [181] Cheng Y, Jiang S, Hu R, Lv L. Potential mechanism for endothelial progenitor cell therapy in acute myocardial infarction: Activation of VEGF- PI3K/Akt-eNOS pathway. *Ann Clin Lab Sci* 2013;43:395–401.

## *Βιβλιογραφία*

- [182] Nova-Lamperti E, Zúñiga F, Ormazábal V, Escudero C, Aguayo C. Vascular regeneration by endothelial progenitor cells in health and diseases. *Microcirc. Revisit. from Mol. to Clin. Pract.*, 2016, p. 231–57. doi:<http://dx.doi.org/10.5772/57353>.
- [183] Wu Y, Potempa LA, Kebir DE, Filep JG. C-reactive protein and inflammation: conformational changes affect function. *Biol Chem* 2015;396:1181–97. doi:10.1515/hsz-2015-0149.
- [184] Peplow P V. Influence of growth factors and cytokines on angiogenic function of endothelial progenitor cells: a review of in vitro human studies. *Growth Factors* 2014;32:83–116. doi:10.3109/08977194.2014.904300.
- [185] Du F, Zhou J, Gong R, Huang X, Pansuria M, Virtue A, et al. Endothelial progenitor cells in atherosclerosis. *Front Biosci (Landmark Ed)* 2012;17:2327–49.
- [186] Zarbock A, Polanowska-Grabowska RK, Ley K. Platelet-neutrophil-interactions: linking hemostasis and inflammation. *Blood Rev* 2007;21:99–111. doi:10.1016/j.blre.2006.06.001.
- [187] van Gils JM, Zwaginga JJ, Hordijk PL. Molecular and functional interactions among monocytes, platelets, and endothelial cells and their relevance for cardiovascular diseases. *J Leukoc Biol* 2009;85:195–204. doi:10.1189/jlb.0708400.
- [188] Li N. Platelet-lymphocyte cross-talk. *J Leukoc Biol* 2008;83:1069–78. doi:10.1189/jlb.0907615.
- [189] Li Z, Smyth SS. Interactions between platelets, leukocytes and the endothelium. In: Michelson AD, editor. *Platelets*. 4th ed., Elsevier Inc.; 2019, p. 295–312. doi:10.1016/B978-0-12-387837-3.00016-X.
- [190] Furie B, Furie BC. The molecular basis of platelet and endothelial cell interaction with neutrophils and monocytes: role of P-selectin and the P-selectin ligand, PSGL-1. *Thromb Haemostasis* 1995;74:224–7.
- [191] Frenette PS, Denis C V., Weiss L, Jurk K, Subbarao S, Kehrel B, et al. P-Selectin glycoprotein ligand 1 (PSGL-1) is expressed on platelets and can mediate platelet-endothelial interactions in vivo. *J Exp Med* 2000;191:1413–22.

- doi:10.1084/jem.191.8.1413.
- [192] Yang J, Furie BC, Furie B. The biology of P-selectin glycoprotein ligand-1: its role as a selectin counterreceptor in leukocyte-endothelial and leukocyte-platelet interaction. *Thromb Haemost* 1999;81:1–7.
- [193] McEver RP, Cummings RD. Perspectives series: cell adhesion in vascular biology. Role of PSGL-1 binding to selectins in leukocyte recruitment. *J Clin Invest* 1997;100:485–91. doi:10.1172/jci119556.
- [194] Fernandes LS, Conde ID, Smith CW, Kansas GS, Snapp KR, Bennet N, et al. Platelet–monocyte complex formation: effect of blocking PSGL-1 alone, and in combination with  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 and  $\alpha$ M $\beta$ 2, in coronary stenting. *Thromb Res* 2003;111:171–7. doi:10.1016/j.thromres.2003.08.017.
- [195] Zwicker JI, Trenor CC, Furie BC, Furie B. Tissue factor-bearing microparticles and thrombus formation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2011;31:728–33. doi:10.1161/ATVBAHA.109.200964.
- [196] Falati S, Liu Q, Gross P, Merrill-Skoloff G, Chou J, Vandendries E, et al. Accumulation of tissue factor into developing thrombi in vivo is dependent upon microparticle P-selectin glycoprotein ligand 1 and platelet P-selectin. *J Exp Med* 2003;197:1585–98. doi:10.1084/jem.20021868.
- [197] Wang H-B, Wang J-T, Zhang L, Geng ZH, Xu W-L, Xu T, et al. P-selectin primes leukocyte integrin activation during inflammation. *Nat Immunol* 2007;8:882–92. doi:10.1038/ni1491.
- [198] Evangelista V, Pamuklar Z, Piccoli A, Manarini S. Src family kinases mediate neutrophil adhesion to adherent platelets. *Blood* 2007;109:2461–9. doi:10.1182/blood-2006-06-029082.
- [199] Miner JJ, Xia L, Yago T, Kappelmayer J, Liu Z, Klopocki AG, et al. Separable requirements for cytoplasmic domain of PSGL-1 in leukocyte rolling and signaling under flow. *Blood* 2008;112:2035–45. doi:10.1182/blood-2008-04-149468.
- [200] Martins PA da C, van Gils JM, Mol A, Hordijk PL, Zwaginga JJ. Platelet binding to

## *Βιβλιογραφία*

- monocytes increases the adhesive properties of monocytes by up-regulating the expression and functionality of  $\beta 1$  and  $\beta 2$  integrins. *J Leukoc Biol* 2006;79:499–507. doi:10.1189/jlb.0605318.1.
- [201] Diacovo TG, Puri KD, Warnock RA, Springer TA, von Andrian UH. Platelet-mediated lymphocyte delivery to high endothelial venules. *Science* (80- ) 1996;273:252–5.
- [202] Elzey BD, Tian J, Jensen RJ, Swanson AK, Lees JR, Lentz SR, et al. Platelet-mediated modulation of adaptive immunity. A communication link between innate and adaptive immune compartments. *Immunity* 2003;19:9–19. doi:10.1016/j.smim.2016.10.008.
- [203] Weber C, Springer TA. Neutrophil accumulation on activated, surface-adherent platelets in flow is mediated by interaction of Mac-1 with fibrinogen bound to  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 and stimulated by platelet-activating factor. *J Clin Invest* 1997;100:2085–93. doi:10.1172/JCI119742.
- [204] Simon DI, Chen Z, Xu H, Li CQ, Dong J -f., McIntire L V., et al. Platelet Glycoprotein Ib Is a Counterreceptor for the Leukocyte Integrin Mac-1 (Cd11b/Cd18). *J Exp Med* 2000;192:193–204. doi:10.1084/jem.192.2.193.
- [205] Santoso S, Sachs UJH, Kroll H, Linder M, Ruf A, Preissner KT, et al. The junctional adhesion molecule 3 (JAM-3) on human platelets is a counterreceptor for the leukocyte integrin Mac-1. *J Exp Med* 2002;196:679–91. doi:10.1084/jem.20020267.
- [206] Diacovo TG, DeFougerolles AR, Bainton DF, Springer TA. A functional integrin ligand on the surface of platelets: intercellular adhesion molecule-2. *J Clin Invest* 1994;94:1243–51. doi:10.1172/JCI117442.
- [207] Kasper B, Brandt E, Ernst M, Petersen F. Neutrophil adhesion to endothelial cells induced by platelet factor 4 requires sequential activation of Ras, Syk, and JNK MAP kinases. *Blood* 2006;107:1768–75. doi:10.1182/blood-2005-06-2501.
- [208] Walz A, Baggiolini M. Generation of the neutrophil-activating peptide NAP-2 from platelet basic protein or connective tissue-activating peptide III through monocyte proteases. *J Exp Med* 1990;171:449–54. doi:10.1084/jem.171.2.449.
- [209] Walz A, Dewald B, von Tschärner V, Baggiolini M. Effects of the neutrophil-

- activating peptide NAP-2, platelet basic protein, connective tissue-activating peptide III and platelet factor 4 on human neutrophils. *J Exp Med* 1989;170:1745–50.
- [210] Kameyoshi Y, Dörschner A, Mallet AI, Christophers E, Schröder J-M. Cytokine RANTES released by thrombin-stimulated platelets is a potent attractant for human eosinophils. *J Exp Med* 1992;176:587–92.
- [211] Gilat D, Hershkovich R, Mekori YA, Vlodaysky I, Lider O. Regulation of adhesion of CD4+ T lymphocytes to intact or heparinase-treated subendothelial extracellular matrix by diffusible or anchored RANTES and MIP-1 beta. *J Immunol* 1994;153:4899–906.
- [212] von Hundelshausen P, Weber KSC, Huo Y, Proudfoot AEI, Nelson PJ, Ley K, et al. RANTES deposition by platelets triggers monocyte arrest on inflamed and atherosclerotic endothelium. *Circulation* 2001;103:1772–7. doi:10.1161/01.cir.103.13.1772.
- [213] Gosling J, Slaymaker S, Gu L, Tseng L, Zlot CH, Young SG, et al. MCP-1 deficiency reduces susceptibility to atherosclerosis in mice that overexpress human apolipoprotein B. *J Clin Invest* 1999;103:773–8. doi:10.1172/jci5624.
- [214] Boring L, Gosling J, Cleary M, Charo IF. Decreased lesion formation in CCR2<sup>-/-</sup> mice reveals a role for chemokines in the initiation of atherosclerosis. *Nature* 1998;394:894–7. doi:10.1038/29788.
- [215] Dawson TC, Kuziel WA, Osahar TA, Maeda N. Absence of CC chemokine receptor-2 reduces atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Atherosclerosis* 1999;143:205–11. doi:10.1016/S0021-9150(98)00318-9.
- [216] Gawaz M, Neumann F-J, Dickfeld T, Koch W, Laugwitz K-L, Adelsberger H, et al. Activated platelets induce monocyte chemotactic protein-1 secretion and surface expression of intercellular adhesion molecule-1 on endothelial cells. *Circulation* 1998;98:1164–71. doi:10.1161/01.cir.98.12.1164.
- [217] Grewal IS, Flavell RA. CD40 and CD154 in cell-mediated immunity. *Annu Rev Immunol* 1998;16:111–35. doi:10.1146/annurev.immunol.16.1.111.
- [218] Henn V, Supsy JR, Gräfe M, Anagnostopoulos I, Förster R, Müller-Berghaus G, et

## *Βιβλιογραφία*

- al. CD40 ligand on activated platelets triggers an inflammatory reaction of endothelial cells. *Nature* 1998;391:591–4.
- [219] Sanguigni V, Ferro D, Pignatelli P, Del Ben M, Nadia T, Saliola M, et al. CD40 ligand enhances monocyte tissue factor expression and thrombin generation via oxidative stress in patients with hypercholesterolemia. *J Am Coll Cardiol* 2005;45:35–42. doi:10.1016/j.jacc.2004.09.047.
- [220] Schönbeck U, Libby P. The CD40/CD154 receptor/ligand dyad. *Cell Mol Life Sci* 2001;58:4–43.
- [221] Nannizzi-Alaimo L, Alves VL, Phillips DR. Inhibitory effects of glycoprotein IIb/IIIa antagonists and aspirin on the release of soluble CD40 ligand during platelet stimulation. *Circulation* 2003;107:1123–8. doi:10.1161/01.CIR.0000053559.46158.AD.
- [222] Viallard J-F, Solanilla A, Gauthier B, Contin C, Déchanet J, Grosset C, et al. Increased soluble and platelet-associated CD40 ligand in essential thrombocythemia and reactive thrombocytosis. *Blood* 2002;99:2612–4.
- [223] Assoians RK, Komoriya A, Meyers CA, Miller DM, Sporn MB. Transforming growth factor-beta in human platelets. Identification of a major storage site, purification, and characterization. *J Biol Chem* 1983;258:7155–60.
- [224] Brunetti M, Martelli N, Manarini S, Mascetra N, Musiani P, Cerletti C, et al. Polymorphonuclear leukocyte apoptosis is inhibited by platelet-released mediators, role of TGFbeta-1. *Thromb Haemost* 2000;84:478–183.
- [225] Weber C. Platelets and chemokines in atherosclerosis: partners in crime. *Circ Res* 2005;96:612–6. doi:10.1161/01.RES.0000160077.17427.57.
- [226] Boilard E, Nigrovic PA, Larabee K, Watts GFM, Coblyn JS, Weinblatt ME, et al. Platelets amplify inflammation in arthritis via collagen-dependent microparticle production. *Science* (80-) 2010;327:580–3. doi:10.1126/science.1181928.
- [227] Alphonse CS, Rodseth RN. The endothelial glycocalyx: a review of the vascular barrier. *Anaesthesia* 2014;69:777–84. doi:10.1111/anae.12661.

- [228] Jin RC, Voetsch B, Loscalzo J. Endogenous mechanisms of inhibition of platelet function. *Microcirculation* 2005;12:247–58. doi:10.1080/10739680590925493.
- [229] Moncada S. Adventures in vascular biology: a tale of two mediators. *Philos Trans R Soc B* 2006;361:735–59. doi:10.1098/rstb.2005.1775.
- [230] Marcus AJ, Broekman MJ, Drosopoulos JHF, Olson KE, Islam N, Pinsky DJ, et al. Role of CD39 (NTPDase-1) in thromboregulation, cerebroprotection, and cardioprotection. *Semin Thromb Homeost* 2005;31:234–46.
- [231] Alexander RW, Griendling KK. Signal transduction in vascular smooth muscle. *J Hypertens* 1996;14:S51–4.
- [232] Rosen B, Barg J, Zimlichman R. The effects of angiotensin II, endothelin-1, and protein kinase C inhibitor on DNA synthesis and intracellular calcium mobilization in vascular smooth muscle cells from young normotensive and spontaneously hypertensive rats. *Am J Hypertens* 1999;12:1243–51.
- [233] Hamilos M, Petousis S, Parthenakis F. Interaction between platelets and endothelium: from pathophysiology to new therapeutic options. *Cardiovasc Diagn Ther* 2018;8:568–80. doi:10.21037/cdt.2018.07.01.
- [234] Hansson GK. Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. *N Engl J Med* 2005;352:1685–95.
- [235] May AE, Seizer P, Gawaz M. Platelets: inflammatory firebugs of vascular walls. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2008;28:s5–10. doi:10.1161/ATVBAHA.107.158915.
- [236] Smyth SS, McEver RP, Weyrich AS, Morrell CN, Hoffman MR, Arepally GM, et al. Platelet functions beyond hemostasis. *J Thromb Haemost* 2009;7:1759–66. doi:10.1007/978-3-319-39562-3\_10.
- [237] von Hundelshausen P, Weber C. Platelets as immune cells: bridging inflammation and cardiovascular disease. *Circ Res* 2007;100:27–40. doi:10.1161/01.res.0000252802.25497.b7.
- [238] Palomo I, Toro C, Alarcón M. The role of platelets in the pathophysiology of atherosclerosis (Review). *Mol Med Recept* 2008;1:179–84.



## *Βιβλιογραφία*

- [239] Willerson JT, Kereiakes DJ. Endothelial dysfunction. *Circulation* 2003;108:2060–1. doi:10.1161/01.CIR.0000099580.72044.83.
- [240] Badrnya S, Butler LM, Söderberg-Naucler C, Volf I, Assinger A. Platelets directly enhance neutrophil transmigration in response to oxidised low-density lipoprotein. *Thromb Haemost* 2012;108:719–29. doi:10.1160/TH12-03-0206.
- [241] Gawaz M, Neumann F-J, Dickfeld T, Reininger A, Adelsberger H, Gebhardt A, et al. Vitronectin receptor (alpha(v)beta3) mediates platelet adhesion to the luminal aspect of endothelial cells: implications for reperfusion in acute myocardial infarction. *Circulation* 1997;96:1809–18. doi:10.1161/01.cir.96.6.1809.
- [242] Bombeli T, Schwartz BR, Harlan JM. Adhesion of activated platelets to endothelial cells: evidence for a GPIIbIIIa-dependent bridging mechanism and novel roles for endothelial intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1), alphavbeta3 integrin, and GPIbalpha. *J Exp Med* 1998;187:329–39. doi:10.1084/jem.187.3.329.
- [243] Langer H, May AE, Bültmann A, Gawaz M. ADAM 15 is an adhesion receptor for platelet GPIIb-IIIa and induces platelet activation. *Thromb Haemost* 2005;94:555–61. doi:10.1160/TH04.
- [244] Stellos K, Gawaz M. Platelet interaction with progenitor cells: Potential implications for regenerative medicine. *Thromb Haemost* 2007;98:922–9. doi:10.1160/TH07.
- [245] Stellos K, Gnerlich S, Kraemer B, Lindemann S, Gawaz M. Platelet interaction with progenitor cells: Vascular regeneration or injury? *Pharmacol Reports* 2008;60:101–8.
- [246] Stellos K, Bigalke B, Stakos D, Henkelmann N, Gawaz M. Platelet-bound P-selectin expression in patients with coronary artery disease: impact on clinical presentation and myocardial necrosis, and effect of diabetes mellitus and anti-platelet medication. *J Thromb Haemost* 2010;8:205–18. doi:10.1111/j.1538-7836.2009.03659.x.
- [247] Massberg S, Konrad I, Schürzinger K, Lorenz M, Schneider S, Zohlnhoefer D, 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;203:1221–33. doi:10.1084/jem.20051772.

- [248] Stellos K, Langer H, Gnerlich S, Panagiota V, Paul A, Schönberger T, et al. Junctional adhesion molecule a expressed on human CD34+ cells promotes adhesion on vascular wall and differentiation into endothelial progenitor cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2010;30:1127–36. doi:10.1161/ATVBAHA.110.204370.
- [249] Stellos K, Langer H, Daub K, Schoenberger T, Gauss A, Geisler T, et al. Platelet-derived stromal cell-derived factor-1 regulates adhesion and promotes differentiation of human CD34+ cells to endothelial progenitor cells. *Circulation* 2008;117:206–15. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.107.714691.
- [250] Stellos K, Panagiota V, Gnerlich S, Borst O, Bigalke B, Gawaz M. Expression of junctional adhesion molecule-C on the surface of platelets supports adhesion, but not differentiation, of human CD34 cells in vitro. *Cell Physiol Biochem* 2012;29:153–62. doi:10.1159/000337596.
- [251] Chatterjee M, Gawaz M. Platelet-derived CXCL12 (SDF-1 $\alpha$ ): basic mechanisms and clinical implications. *J Thromb Haemost* 2013;11:1954–67. doi:10.1111/jth.12404.
- [252] de Boer HC, Hovens MM, Van Oeveren-Rietdijk AM, Snoep JD, De Koning EJP, Tamsma JT, et al. Human CD34+/KDR+ cells are generated from circulating CD34+ cells after immobilization on activated platelets. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2011;31:408–15. doi:10.1161/ATVBAHA.110.216879.
- [253] Daub K, Langer H, Seizer P, Stellos K, May AE, Goyal P, et al. Platelets induce differentiation of human CD34+ progenitor cells into foam cells and endothelial cells. *FASEB J* 2006;20:2559–61. doi:10.1096/fj.06-6265fje.
- [254] Leshem-Lev D, Omelchenko A, Perl L, Kornowski R, Battler A, Lev EI. Exposure to platelets promotes functional properties of endothelial progenitor cells. *J Thromb Thrombolysis* 2010;30:398–403. doi:10.1007/s11239-010-0514-0.
- [255] Langer H, May AE, Daub K, Heinzmann U, Lang P, Schumm M, et al. Adherent platelets recruit and induce differentiation of murine embryonic endothelial progenitor cells to mature endothelial cells in vitro. *Circ Res* 2006;98:e2–10. doi:10.1161/01.RES.0000201285.87524.9e.
- [256] de Boer HC, Verseyden C, Ulfman LH, Zwaginga JJ, Bot I, Biessen EA, et al. Fibrin

## *Βιβλιογραφία*

- and activated platelets cooperatively guide stem cells to a vascular injury and promote differentiation towards an endothelial cell phenotype. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006;26:1653–9. doi:10.1161/01.ATV.0000222982.55731.f1.
- [257] Lev EI, Estrov Z, Aboufatova K, Harris D, Granada JF, Alviar C, et al. Potential role of activated platelets in homing of human endothelial progenitor cells to subendothelial matrix. *Thromb Haemost* 2006;96:498–504. doi:10.1160/TH06-05-0250.
- [258] Raz O, Lev DL, Battler A, Lev EI. Pathways mediating the interaction between endothelial progenitor cells (EPCs) and platelets. *PLoS One* 2014;9:e95156. doi:10.1371/journal.pone.0095156.
- [259] Cross MJ, Claesson-Welsh L. FGF and VEGF function in angiogenesis: signalling pathways, biological responses and therapeutic inhibition. *Trends Pharmacol Sci* 2001;22:201–7. doi:10.1016/S0165-6147(00)01676-X.
- [260] Dimmeler S. Platelet-derived growth factor CC - A clinically useful angiogenic factor at last? *N Engl J Med* 2005;352:1815–6. doi:10.1056/NEJMcibr050670.
- [261] Li X, Tjwa M, Moons L, Fons P, Noel A, Ny A, et al. Revascularization of ischemic tissues by PDGF-CC via effects on endothelial cells and their progenitors. *J Clin Invest* 2005;115:118–27. doi:10.1172/JCI19189.
- [262] Sufen G, Xianghong Y, Yongxia C, Qian P. bFGF and PDGF-BB have a synergistic effect on the proliferation, migration and VEGF release of endothelial progenitor cells. *Cell Biol Int* 2011;35:545–51. doi:10.1042/cbi20100401.
- [263] Sopova K, Tatsidou P, Stellos K. Platelets and platelet interaction with progenitor cells in vascular homeostasis and inflammation. *Curr Vasc Pharmacol* 2012;10:555–62. doi:10.2174/157016112801784486.
- [264] Rigato M, Avogaro A, Fadini GP. Levels of circulating progenitor cells, cardiovascular outcomes and death: a meta-analysis of prospective observational studies. *Circ Res* 2016;118:1930–9. doi:10.1161/circresaha.116.308366.
- [265] Werner N, Wassermann S, Ahlers P, Shiegl T, Kosiol S, Link A, et al. Endothelial progenitor cells correlate with endothelial function in patients with coronary artery

- disease. *Basic Res Cardiol* 2007;102:565–71. doi:10.1007/s00395-007-0680-1.
- [266] Chu K, Jung K-H, Lee S-T, Park H-K, Sinn D-I, Kim J-M, et al. Circulating endothelial progenitor cells as a new marker of endothelial dysfunction or repair in acute stroke. *Stroke* 2008;39:1441–7. doi:10.1161/STROKEAHA.107.499236.
- [267] Werner N, Kosiol S, Schiegl T, Ahlers P, Walenta K, Link A, et al. Circulating endothelial progenitor cells and cardiovascular outcomes. *N Engl J Med* 2005;353:999–1007. doi:10.1016/j.accreview.2005.11.011.
- [268] Torsney E, Mandal K, Halliday A, Jahangiri M, Xu Q. Characterisation of progenitor cells in human atherosclerotic vessels. *Atherosclerosis* 2007;191:259–64. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2006.05.033.
- [269] Schmidt-lucke C, Rössig L, Fichtlscherer S, Vasa M, Britten M, Kämper U, 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;111:2981–7. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.104.504340.
- [270] Bernlochner I, Sibbing D. Thienopyridines and other ADP-receptor antagonists. In: Gresele P, Born GVR, Patrono C, Page CP, editors. *Handb. Exp. Pharmacol.*, vol. 210, 2012, p. 165–98. doi:10.1007/978-3-642-29423-5.
- [271] Hollopeter G, Jantzen H-M, Vincent D, Li G, England L, Ramakrishnan V, et al. Identification of the platelet ADP receptor targeted by antithrombotic drugs. *Nature* 2001;409:202–7. doi:10.1038/35051599.
- [272] Shanker G, Kontos JL, Eckman DM, Wesley-Farrington D, Sane DC. Nicotine upregulates the expression of P2Y<sub>12</sub> on vascular cells and megakaryoblasts. *J Thrombos Thrombolysis* 2006;22:213–20. doi:10.1007/s11239-006-9033-4.
- [273] Simon J, Filippov AK, Göransson S, Wong YH, Frelin C, Michel AD, et al. Characterization and channel coupling of the P2Y<sub>12</sub> nucleotide receptor of brain capillary endothelial cells. *J Biol Chem* 2002;277:31390–400. doi:10.1074/jbc.M110714200.

## *Βιβλιογραφία*

- [274] Wihlborg AK, Wang L, Braun OÖ, Eyjolfsson A, Gustafsson R, Gudbjartsson T, et al. ADP receptor P2Y<sub>12</sub> is expressed in vascular smooth muscle cells and stimulates contraction in human blood vessels. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004;24:1810–5. doi:10.1161/01.ATV.0000142376.30582.ed.
- [275] Haynes SE, Hollopeter G, Yang G, Kurpius D, Dailey ME, Gan WB, et al. The P2Y<sub>12</sub> receptor regulates microglial activation by extracellular nucleotides. *Nat Neurosci* 2006;9:1512–9. doi:10.1038/nn1805.
- [276] Gelosa P, Lecca D, Fumagalli M, Wypych D, Pignieri A, Cimino M, et al. Microglia is a key player in the reduction of stroke damage promoted by the new antithrombotic agent ticagrelor. *J Cereb Blood Flow Metab* 2014;34:979–88. doi:10.1038/jcbfm.2014.45.
- [277] Ben Addi A, Cammarata D, Conley PB, Boeynaems J-M, Robaye B. Role of the P2Y<sub>12</sub> receptor in the modulation of murine dendritic cell function by ADP. *J Immunol* 2010;185:5900–6. doi:10.4049/jimmunol.0901799.
- [278] Kronlage M, Song J, Sorokin L, Isfort K, Schwerdtle T, Leipziger J, et al. Autocrine purinergic receptor signaling is essential for macrophage chemotaxis. *Sci Signal* 2010;3:ra55. doi:10.1126/scisignal.2000588.
- [279] Diehl P, Olivier C, Halscheid C, Helbing T, Bode C, Moser M. Clopidogrel affects leukocyte dependent platelet aggregation by P2Y<sub>12</sub> expressing leukocytes. *Basic Res Cardiol* 2010;105:379–87. doi:10.1007/s00395-009-0073-8.
- [280] Wang L, Jacobsen SEW, Bengtsson A, Erlinge D. P2 receptor mRNA expression profiles in human lymphocytes, monocytes and CD34<sup>+</sup> stem and progenitor cells. *BMC Immunol* 2004;5:16. doi:10.1186/1471-2172-5-16.
- [281] Valgimigli M, Bueno H, Byrne RA, Collet J-P, Costa F, Jeppsson A, et al. 2017 ESC focused update on dual antiplatelet therapy in coronary artery disease developed in collaboration with EACTS: The Task Force for dual antiplatelet therapy in coronary artery disease of the European Society of Cardiology (ESC) and of the European . *Eur Heart J* 2018;39:213–260. doi:10.1093/eurheartj/ehx334.
- [282] Kupka D, Sibbing D. P2Y<sub>12</sub> receptor inhibitors: an evolution in drug design to prevent

- arterial thrombosis. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 2018;14:303–15. doi:10.1080/17425255.2018.1428557.
- [283] Wallentin L. P2Y<sub>12</sub> inhibitors: Differences in properties and mechanisms of action and potential consequences for clinical use. *Eur Heart J* 2009;30:1964–77. doi:10.1093/eurheartj/ehp296.
- [284] Schömig A, Neumann F-J, Kastrati A, Schühlen H, Blasini R, Hadamitzky M, et al. A randomized comparison of antiplatelet and anticoagulant therapy after the placement of coronary-artery stents. *N Engl J Med* 1996;334:1084–9. doi:10.1056/nejm199604253341702.
- [285] Quinn MJ, Fitzgerald DJ. Ticlopidine and clopidogrel. *Circulation* 1999;100:1667–72.
- [286] Price MJ, Coleman JL, Steinhubl SR, Wong GB, Cannon CP, Teirstein PS. Onset and offset of platelet inhibition after high-dose clopidogrel loading and standard daily therapy measured by a point-of-care assay in healthy volunteers. *Am J Cardiol* 2006;98:681–4. doi:10.1016/j.amjcard.2006.03.054.
- [287] Price MJ, Walder JS, Baker BA, Heiselman DE, Jakubowski JA, Logan DK, et al. Recovery of platelet function after discontinuation of prasugrel or clopidogrel maintenance dosing in aspirin-treated patients with stable coronary disease: the recovery trial. *J Am Coll Cardiol* 2012;59:2338–43. doi:10.1016/j.jacc.2012.02.042.
- [288] Siller-Matula JM, Trenk D, Schrör K, Gawaz M, Kristensen SD, Storey RF, et al. Response variability to P2Y<sub>12</sub> receptor inhibitors: expectations and reality. *JACC Cardiovasc Interv* 2013;6:1111–28. doi:10.1016/j.jcin.2013.06.011.
- [289] Hochholzer W, Trenk D, Fromm MF, Valina CM, Stratz C, Bestehorn HP, et al. Impact of cytochrome P450 2C19 loss-of-function polymorphism and of major demographic characteristics on residual platelet function after loading and maintenance treatment with clopidogrel in patients undergoing elective coronary stent placement. *J Am Coll Cardiol* 2010;55:2427–34. doi:10.1016/j.jacc.2010.02.031.
- [290] Farid NA, Kurihara A, Wrighton SA. Metabolism and disposition of the thienopyridine antiplatelet drugs ticlopidine, clopidogrel, and prasugrel in humans. *J Clin Pharmacol* 2010;50:126–42. doi:10.1177/0091270009343005.

## *Βιβλιογραφία*

- [291] Rehmel JLF, Eckstein JA, Farid NA, Heim JB, Kasper SC, Kurihara A, et al. Interactions of two major metabolites of prasugrel, a thienopyridine antiplatelet agent, with the cytochromes P450. *Drug Metab Dispos* 2006;34:600–7. doi:10.1124/dmd.105.007989.
- [292] Payne CD, Li YG, Small DS, Ernest CS, Farid NA, Jakubowski JA, et al. Increased active metabolite formation explains the greater platelet inhibition with prasugrel compared to high-dose clopidogrel. *J Cardiovasc Pharmacol* 2007;50:555–62. doi:10.1097/FJC.0b013e3181492209.
- [293] Wiviott SD, Trenk D, Frelinger AL, O’Donoghue M, Neumann F-J, Michelson AD, 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. *Circulation* 2007;116:2923–32. doi:10.1161/circulationaha.107.740324.
- [294] Wiviott SD, Antman EM, Winters KJ, Weerakkody G, Murphy SA, Behounek BD, et al. Randomized comparison of prasugrel (CS-747, LY640315), a novel thienopyridine P2Y<sub>12</sub> antagonist, with clopidogrel in percutaneous coronary intervention: results of the Joint Utilization of Medications to Block Platelets Optimally (JUMBO)-TIMI 26 trial. *Circulation* 2005;111:3366–73. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.104.502815.
- [295] Wiviott SD, Braunwald E, McCabe CH, Montalescot G, Ruzyllo W, Gottlieb S, et al. Prasugrel versus clopidogrel in patients with acute coronary syndromes. *N Engl J Med* 2007;357:2001–15. doi:10.1056/NEJMoa1402685.
- [296] van Giezen JJJ, Nilsson L, Berntsson P, Wissing BM, Giordanetto F, Tomlinson W, et al. Ticagrelor binds to human P2Y<sub>12</sub> independently from ADP but antagonizes ADP-induced receptor signaling and platelet aggregation. *J Thromb Haemost* 2009;7:1556–65. doi:10.1111/j.1538-7836.2009.03527.x.
- [297] Gurbel PA, Bliden KP, Butler K, Antonino MJ, Wei C, Teng R, et al. Response to ticagrelor in clopidogrel nonresponders and responders and effect of switching therapies: the RESPOND study. *Circulation* 2010;121:1188–99. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.109.919456.

- [298] Cannon CP, Husted S, Harrington RA, Scirica BM, Emanuelsson H, Peters G, et al. Safety, tolerability, and initial efficacy of AZD6140, the first reversible oral adenosine diphosphate receptor antagonist, compared with clopidogrel, in patients with non-ST-segment elevation acute coronary syndrome: primary results of the DISPERSE-2 tri. *J Am Coll Cardiol* 2007;50:1844–51. doi:10.1016/j.jacc.2007.07.053.
- [299] Gurbel PA, Bliden KP, Butler K, Tantry US, Gesheff T, Wei C, et al. Randomized double-blind assessment of the ONSET and OFFSET of the antiplatelet effects of ticagrelor versus clopidogrel in patients with stable coronary artery disease: The ONSET/OFFSET study. *Circulation* 2009;120:2577–85. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.109.912550.
- [300] Husted S, Emanuelsson H, Heptinstal S, Sandset PM, Wickens M, Peters G. Pharmacodynamics, pharmacokinetics, and safety of the oral reversible P2Y<sub>12</sub> antagonist AZD6140 with aspirin in patients with atherosclerosis: a double-blind comparison to clopidogrel with aspirin. *Eur Heart J* 2006;27:1038–47. doi:10.1093/eurheartj/ehi754.
- [301] Wallentin L, Becker RC, Budaj A, Cannon CP, Emanuelsson H, Held C, et al. Ticagrelor versus clopidogrel in patients with acute coronary syndromes. *N Engl J Med* 2009;361:1045–57.
- [302] Angiolillo DJ, Guzman LA. Clinical overview of promising nonthienopyridine antiplatelet agents. *Am Heart J* 2008;156:S23–8. doi:10.1016/j.ahj.2008.06.006.
- [303] Angiolillo DJ, Capranzano P. Pharmacology of emerging novel platelet inhibitors. *Am Heart J* 2008;156:S10–5. doi:10.1016/j.ahj.2008.06.004.
- [304] Greenbaum AB, Ohman EM, Gibson CM, Borzak S, Stebbins AL, Lu M, et al. Preliminary experience with intravenous P2Y<sub>12</sub> platelet receptor inhibition as an adjunct to reduced-dose alteplase during acute myocardial infarction: results of the Safety, Tolerability and Effect on Patency in Acute Myocardial Infarction (STEP-AMI) angi. *Am Heart J* 2007;154:702–9. doi:10.1016/j.ahj.2007.06.001.
- [305] Storey RF, Wilcox RG, Heptinstall S. Comparison of the pharmacodynamic effects of the platelet ADP receptor antagonists clopidogrel and AR-C69931MX in patients with



## *Βιβλιογραφία*

- ischaemic heart disease. *Platelets* 2002;13:407–13.
- [306] Harrington RA, Stone GW, McNulty S, White HD, Lincoff AM, Gibson CM, et al. Platelet inhibition with cangrelor in patients undergoing PCI. *N Engl J Med* 2009;361:2318–29. doi:10.1056/nejmoa0908628.
- [307] Bhatt DL, Lincoff AM, Gibson CM, Stone GW, McNulty S, Montalescot G, et al. Intravenous platelet blockade with cangrelor during PCI. *N Engl J Med* 2009;361:2330–41. doi:10.1056/nejmoa0908629.
- [308] Bhatt DL, Stone GW, Mahaffey KW, Gibson CM, Steg PG, Hamm CW, et al. Effect of platelet inhibition with cangrelor during PCI on ischemic events. *N Engl J Med* 2013;368:1303–13. doi:10.1056/NEJMoa1300815.
- [309] Teng R, Maya J. Absolute bioavailability and regional absorption of ticagrelor in healthy volunteers. *J Drug Assess* 2014;3:43–50. doi:10.3109/21556660.2014.946604.
- [310] Teng R, Butler K. Pharmacokinetics, pharmacodynamics, tolerability and safety of single ascending doses of ticagrelor, a reversibly binding oral P2Y<sub>12</sub> receptor antagonist, in healthy subjects. *Eur J Clin Pharmacol* 2010;66:487–96. doi:10.1007/s00228-009-0778-5.
- [311] Teng R, Oliver S, Hayes MA, Butler K. Absorption, distribution, metabolism, and excretion of radiolabeled naldemedine in healthy subjects. *Drug Metab Dispos* 2010;38:1514–21. doi:10.1080/00498254.2018.1536815.
- [312] Teng R, Carlson G, Hsia J. An open-label, randomized bioavailability study with alternative methods of administration of crushed ticagrelor tablets in healthy volunteers. *Int J Clin Pharmacol Ther* 2015;53:182–9. doi:10.5414/CP202202.
- [313] Danielak D, Karaźniewicz-Łada M, Główna F. Ticagrelor in modern cardiology - an up-to-date review of most important aspects of ticagrelor pharmacotherapy. *Expert Opin Pharmacother* 2018;19:103–12. doi:10.1080/14656566.2017.1421634.
- [314] Butler K, Teng R. Pharmacokinetics, pharmacodynamics, safety and tolerability of multiple ascending doses of ticagrelor in healthy volunteers. *Br J Clin Pharmacol* 2010;70:65–77. doi:10.1111/j.1365-2125.2010.03669.x.

- [315] Husted SE, Storey RF, Bliden K, Tantry US, Høimark L, Butler K, et al. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of ticagrelor in patients with stable coronary artery disease: Results from the ONSET-OFFSET and RESPOND studies. *Clin Pharmacokinet* 2012;51:397–409. doi:10.2165/11599830-000000000-00000.
- [316] Storey RF, Husted S, Harrington RA, Heptinstall S, Wilcox RG, Peters G, et al. Inhibition of platelet aggregation by AZD6140, a reversible oral P2Y<sub>12</sub> receptor antagonist, compared with clopidogrel in patients with acute coronary syndromes. *J Am Coll Cardiol* 2007;50:1852–6. doi:10.1016/j.jacc.2007.07.058.
- [317] Teng R, Mitchell PD, Butler K. Lack of significant food effect on the pharmacokinetics of ticagrelor in healthy volunteers. *J Clin Pharm Ther* 2012;37:464–8. doi:10.1111/j.1365-2710.2011.01307.x.
- [318] Li Y, Landqvist C, Grimm SW. Disposition and metabolism of ticagrelor, a novel P2Y<sub>12</sub> receptor antagonist, in mice, rats, and marmosets. *Drug Metab Dispos* 2011;39:1555–67. doi:10.1124/dmd.111.039669.
- [319] Zhou D, Andersson TB, Grimm SW. In vitro evaluation of potential drug-drug interactions with ticagrelor: cytochrome P450 reaction phenotyping, inhibition, induction, and differential kinetics. *Drug Metab Dispos* 2011;39:703–10. doi:10.1124/dmd.110.037143.
- [320] Husted S, van Giezen JJJ. Ticagrelor: The first reversibly binding oral P2Y<sub>12</sub> receptor antagonist. *Cardiovasc Ther* 2009;27:259–74. doi:10.1111/j.1755-5922.2009.00096.x.
- [321] Patil SBG, Norman KE, Robins SJ, Crosdale DJ, Nylander S, Francis SE, et al. Inhibition of thrombosis by AZD6140 via selective blockade of the P2Y<sub>12</sub> receptor in a murine laser-injury model. *J Thromb Haemost* 2007;5:P-W-632. doi:10.1111/j.1538-7836.2007.tb03189.x.
- [322] Teng R, Butler K. Pharmacokinetics, pharmacodynamics, and tolerability of single and multiple doses of ticagrelor in Japanese and Caucasian volunteers. *Int J Clin Pharmacol Ther* 2014;52:478–91. doi:10.5414/CP202017.
- [323] Hiasa Y, Teng R, Emanuelsson H. Pharmacodynamics, pharmacokinetics and safety of ticagrelor in Asian patients with stable coronary artery disease. *Cardiovasc Interv Ther*

## *Βιβλιογραφία*

- 2014;29:324–33. doi:10.1007/s12928-014-0277-1.
- [324] Waksman R, Maya J, Angiolillo DJ, Carlson GF, Teng R, Caplan RJ, et al. Ticagrelor versus clopidogrel in black patients with stable coronary artery disease: prospective, randomized, open-label, multiple-dose, crossover pilot study. *Circ Cardiovasc Interv* 2015;8:e002232. doi:10.1161/CIRCINTERVENTIONS.114.002232.
- [325] Held C, Åsenblad N, Bassand JP, Becker RC, Cannon CP, Claeys MJ, et al. Ticagrelor versus clopidogrel in patients with acute coronary syndromes undergoing coronary artery bypass surgery: results from the PLATO (Platelet Inhibition and Patient Outcomes) trial. *J Am Coll Cardiol* 2011;57:672–84. doi:10.1016/j.jacc.2010.10.029.
- [326] Storey RF, Angiolillo DJ, Patil SB, Desai B, Ecob R, Husted S, 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;56:1456–62. doi:10.1016/j.jacc.2010.03.100.
- [327] Storey RF, James SK, Siegbahn A, Varenhorst C, Held C, Ycas J, et al. Lower mortality following pulmonary adverse events and sepsis with ticagrelor compared to clopidogrel in the PLATO study. *Platelets* 2014;25:517–25. doi:10.3109/09537104.2013.842965.
- [328] Varenhorst C, Alström U, Braun OÖ, Storey RF, Mahaffey KW, Bertilsson M, et al. Causes of mortality with ticagrelor compared with clopidogrel in acute coronary syndromes. *Heart* 2014;100:1762–9. doi:10.1136/heartjnl-2014-305619.
- [329] Varenhorst C, Alström U, Scirica BM, Hogue CW, Åsenblad N, Storey RF, et al. Factors contributing to the lower mortality with ticagrelor compared with clopidogrel in patients undergoing coronary artery bypass surgery. *J Am Coll Cardiol* 2012;60:1623–30. doi:10.1016/j.jacc.2012.07.021.
- [330] van Giezen JJJ, Sidaway J, Glaves P, Kirk I, Björkman J-A. Ticagrelor inhibits adenosine uptake in vitro and enhances adenosine-mediated hyperemia responses in a canine model. *J Cardiovasc Pharmacol Ther* 2012;17:164–72. doi:10.1177/1074248411410883.

- [331] Ohman J, Kudira R, Albinsson S, Olde B, Erlinge D. Ticagrelor induces adenosine triphosphate release from human red blood cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2012;418:754–8. doi:10.1016/j.bbrc.2012.01.093.
- [332] van den Berg TNA, El Messaoudi S, Rongen GA, van den Broek PHH, Bilos A, Donders ART, et al. Ticagrelor does not inhibit adenosine transport at relevant concentrations: A randomized cross-over study in healthy subjects in vivo. *PLoS One* 2015;10:e0137560. doi:10.1371/journal.pone.0137560.
- [333] Cattaneo M, Schulz R, Nylander S. Adenosine-mediated effects of ticagrelor: evidence and potential clinical relevance. *J Am Coll Cardiol* 2014;63:2503–9. doi:10.1016/j.jacc.2014.03.031.
- [334] Kubisa M, Jeżewski MP, Gasecka A, Siller-Matula JM, Postuła M. Ticagrelor - toward more efficient platelet inhibition and beyond. *Ther Clin Risk Manag* 2018;14:129–40. doi:10.2147/tcrm.s152369.
- [335] Müller KAL, Chatterjee M, Rath D, Geisler T. Platelets, inflammation and anti-inflammatory effects of antiplatelet drugs in ACS and CAD. *Thromb Haemost* 2015;114:498–518. doi:10.1160/TH15-08-0632.
- [336] Haskó G, Cronstein BN. Adenosine: an endogenous regulator of innate immunity. *Trends Immunol* 2004;25:33–9. doi:10.1016/j.it.2003.11.003.
- [337] Alexopoulos D, Moulias A, Koutsogiannis N, Xanthopoulou I, Kakkavas A, Mavronasiou E, et al. Differential effect of ticagrelor versus prasugrel on coronary blood flow velocity in patients with non-ST-elevation acute coronary syndrome undergoing percutaneous coronary intervention: An exploratory study. *Circ Cardiovasc Interv* 2013;6:277–83. doi:10.1161/CIRCINTERVENTIONS.113.000293.
- [338] Birnbaum Y, Birnbaum GD, Birnbaum I, Nylander S, Ye Y. Ticagrelor and rosuvastatin have additive cardioprotective effects via adenosine. *Cardiovasc Drugs Ther* 2016;30:539–50. doi:10.1007/s10557-016-6701-2.
- [339] Bonello L, Frere C, Cointe S, Laine M, Mancini J, Thuny F, et al. Ticagrelor increases endothelial progenitor cell level compared to clopidogrel in acute coronary syndromes: A prospective randomized study. *Int J Cardiol* 2015;187:502–7.

## *Βιβλιογραφία*

- doi:10.1016/j.ijcard.2015.03.414.
- [340] Mediero A, Wilder T, Reddy VSR, Cheng Q, Tovar N, Coelho PG, et al. Ticagrelor regulates osteoblast and osteoclast function and promotes bone formation in vivo via an adenosine-dependent mechanism. *FASEB J* 2016;30:201600616R. doi:10.1096/fj.201600616R.
- [341] Reiner MF, Breitenstein A, Holy EW, Glanzmann M, Amstalden H, Stämpfli SF, et al. Ticagrelor, but not clopidogrel active metabolite, displays antithrombotic properties in the left atrial endocardium. *Eur Heart J* 2017;38:916–9. doi:10.1093/eurheartj/ehw578.
- [342] Wittfeldt A, Emanuelsson H, Brandrup-Wognsen G, van Giezen JJJ, Jonasson J, Nylander S, et al. Ticagrelor enhances adenosine-induced coronary vasodilatory responses in humans. *J Am Coll Cardiol* 2013;61:723–7. doi:10.1016/j.jacc.2012.11.032.
- [343] Storey RF, Bliden KP, Patil SB, Karunakaran A, Ecob R, Butler K, et al. Incidence of dyspnea and assessment of cardiac and pulmonary function in patients with stable coronary artery disease receiving ticagrelor, clopidogrel, or placebo in the ONSET/OFFSET study. *J Am Coll Cardiol* 2010;56:185–93. doi:10.1016/j.jacc.2010.01.062.
- [344] Butler K, Maya J, Teng R. Effect of ticagrelor on pulmonary function in healthy elderly volunteers and asthma or chronic obstructive pulmonary disease patients. *Curr Med Res Opin* 2013;29:569–77. doi:10.1185/03007995.2013.781502.
- [345] Unverdorben M, Parodi G, Pistolesi M, Storey RF. Dyspnea related to reversibly-binding P2Y<sub>12</sub> inhibitors: A review of the pathophysiology, clinical presentation and diagnostics. *Int J Cardiol* 2016;202:167–73. doi:10.1016/j.ijcard.2015.08.162.
- [346] Mustafa SJ, Morrison RR, Teng B, Pelleg A. Adenosine receptors and the heart: role in regulation of coronary blood flow and cardiac electrophysiology. *Handb Exp Pharmacol* 2009;193:161–88. doi:10.1016/B978-0-12-385526-8.00002-3.
- [347] Ren Q, Ren C, Liu X, Dong C, Zhang X. Ticagrelor vs. clopidogrel in non-ST-elevation acute coronary syndromes. *Herz* 2016;41:246–9. doi:10.1007/s00059-015-4359-3.

- [348] Scirica BM, Cannon CP, Emanuelsson H, Michelson EL, Harrington RA, Husted S, et al. The incidence of bradyarrhythmias and clinical bradyarrhythmic events in patients with acute coronary syndromes treated with ticagrelor or clopidogrel in the PLATO (Platelet Inhibition and Patient Outcomes) trial: Results of the continuous electrocardiogr. *J Am Coll Cardiol* 2011;57:1908–16. doi:10.1016/j.jacc.2010.11.056.
- [349] Minner SA, Simone P, Chung BB, Shah AP. Successful reversal of bradycardia and dyspnea with aminophylline after ticagrelor load. *J Pharm Pract* 2018;31:112–4. doi:10.1177/0897190016680978.
- [350] Tabrizchi R, Bedi S. Pharmacology of adenosine receptors in the vasculature. *Pharmacol Ther* 2001;91:133–47. doi:10.1016/S0163-7258(01)00152-8.
- [351] Sands WA, Palmer TM. Adenosine receptors and the control of endothelial cell function in inflammatory disease. *Immunol Lett* 2005;101:1–11. doi:10.1016/j.imlet.2005.04.005.
- [352] O'Regan M. Adenosine and the regulation of cerebral blood flow. *Neurol Res* 2005;27:175–81.
- [353] Mubagwa K, Mullane K, Flameng W. Role of adenosine in the heart and circulation. *Cardiovasc Res* 1996;32:797–813.
- [354] Hori M, Kitakaze M. Adenosine, the heart, and coronary circulation. *Hypertension* 1991;18:565–574.
- [355] Borea PA, Gessi S, Merighi S, Varani K. Adenosine as a multi-signalling guardian angel in human diseases: when, where and how does it exert its protective effects? *Trends Pharmacol Sci* 2016;37:419–34. doi:10.1016/j.tips.2016.02.006.
- [356] Fredholm BB. Physiological and pathophysiological roles of adenosine. *Sleep Biol Rhythms* 2011;9:24–8. doi:10.1111/j.1479-8425.2010.00460.x.
- [357] Li RWS, Yang C, Sit ASM, Lin SYT, Ho EYW, Leung GPH. Physiological and pharmacological roles of vascular nucleoside transporters. *J Cardiovasc Pharmacol* 2012;59:10–5. doi:10.1097/FJC.0b013e31820eb788.
- [358] Boswell-Casteel RC, Hays FA. Equilibrative nucleoside transporters-A review.

## *Βιβλιογραφία*

- Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids 2017;36:7–30. doi:10.1080/15257770.2016.1210805.
- [359] Reiss AB, Grossfeld D, Kasselmann LJ, Renna HA, Vernice NA, Drewes W, et al. Adenosine and the cardiovascular system. *Am J Cardiovasc Drugs* 2019; 19:449-64. doi: 10.1007/s40256-019-00345-5.
- [360] Stockwell J, Jakova E, Cayabyab FS. Adenosine A1 and A2A receptors in the brain: Current research and their role in neurodegeneration. *Molecules* 2017;22:676. doi:10.3390/molecules22040676.
- [361] Dhalla AK, Chisholm JW, Reaven GM. A1 adenosine receptor: role in diabetes and obesity. *Handb Exp Pharmacol* 2009;193:271–95. doi:10.1007/978-3-540-89615-9.
- [362] Rabadi MM, Lee HT. Adenosine receptors and renal ischaemia reperfusion injury. *Acta Physiol* 2015;213:222–31. doi:10.1111/apha.12402.
- [363] Vallon V, Müller B, Osswald H. Adenosine and kidney function. *Physiol Rev* 2006;86:901–40. doi:10.1152/physrev.00031.2005.
- [364] Ponnoth DS, Nadeem A, Tilley S, Mustafa SJ. Involvement of A1 adenosine receptors in altered vascular responses and inflammation in an allergic mouse model of asthma. *Am J Physiol Circ Physiol* 2010;299:H81–7. doi:10.1152/ajpheart.01090.2009.
- [365] Wilson CN, Nadeem A, Spina D, Brown R, Page CP, Mustafa SJ. Adenosine receptors and asthma. *Handb Exp Pharmacol* 2009;193:329–62.
- [366] Schulte G, Fredholm BB. Signalling from adenosine receptors to mitogen-activated protein kinases. *Cell Signal* 2003;15:813–27. doi:10.1016/S0898-6568(03)00058-5.
- [367] Borea PA, Gessi S, Merighi S, Vincenzi F, Varani K. Pharmacology of adenosine receptors: the state of the art. *Physiol Rev* 2018;98:1591–625. doi:10.1152/physrev.00049.2017.
- [368] Fishman P, Bar-yehuda S, Madi L, Cohn I, Tikva P, Biopharma IC, et al. A3 adenosine receptor as a target for cancer therapy. *Anticancer Drugs* 2002;13:437–43.
- [369] Borea PA, Varani K, Vincenzi F, Baraldi PG, Tabrizi MA, Merighi S, et al. The A3

- adenosine receptor: history and perspectives. *Pharmacol Rev* 2015;67:74–102.
- [370] de Lera Ruiz M, Lim Y-H, Zheng J. Adenosine A2A receptor as a drug discovery target. *J Med Chem* 2014;57:3623–50.
- [371] Preti D, Baraldi PG, Moorman AR, Borea PA, Varani K. History and perspectives of A2A adenosine receptor antagonists as potential therapeutic agents. *Med Res Rev* 2015;35:790–848. doi:10.1002/med.
- [372] Chen J-F, Eltzschig HK, Fredholm BB. Adenosine receptors as drug targets — what are the challenges? *Nat Rev Drug Discov* 2013;12:265–86. doi:10.1016/j.biotechadv.2011.08.021.Secreted.
- [373] Koupenova M, Johnston-Cox H, Vezeridis A, Gavras H, Yang D, Zannis V, et al. A2b adenosine receptor regulates hyperlipidemia and atherosclerosis. *Circulation* 2012;125:354–63. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.111.057596.
- [374] Pedata F, Dettori I, Coppi E, Melani A, Fusco I, Corradetti R, et al. Purinergic signalling in brain ischemia. *Neuropharmacology* 2015;104:105–30. doi:10.1016/j.neuropharm.2015.11.007.
- [375] Kong T, Westerman KA, Faigle M, Eltzschig HK, Colgan SP. HIF-dependent induction of adenosine A2B receptor in hypoxia. *FASEB J* 2006;20:2242–50. doi:10.1096/fj.06-6419com.
- [376] Eckle T, Kewley EM, Brodsky KS, Tak E, Bonney S, Gobel M, et al. Identification of hypoxia-inducible factor HIF-1A as transcriptional regulator of the A2B adenosine receptor during acute lung injury. *J Immunol* 2014;192:1249–56. doi:10.4049/jimmunol.1100593.
- [377] Bader A, Bintig W, Begandt D, Klett A, Siller IG, Gregor C, et al. Adenosine receptors regulate gap junction coupling of the human cerebral microvascular endothelial cells hCMEC/D3 by Ca<sup>2+</sup> influx through cyclic nucleotide-gated channels. *J Physiol* 2017;595:2497–517. doi:10.1113/JP273150.
- [378] Sun Y, Huang P. Adenosine A2B receptor: From cell biology to human diseases. *Front Chem* 2016;4. doi:10.3389/fchem.2016.00037.



## *Βιβλιογραφία*

- [379] Burnstock G, Ralevic V. Purinergic signaling and blood vessels in health and disease. *Pharmacol Rev* 2013;66:102–92. doi:10.1007/978-3-319-40980-1\_5.
- [380] Talukder MAH, Morrison RR, Ledent C, Mustafa SJ. Endogenous adenosine increases coronary flow by activation of both A2A and A2B receptors in mice. *J Cardiovasc Pharmacol* 2003;41:562–70.
- [381] Hein TW, Wang W, Zoghi B, Muthuchamy M. Functional and molecular characterization of receptor subtypes mediating coronary microvascular dilation to adenosine. *J Mol Cell Cardiol* 2001;33:271–82. doi:10.1006/jmcc.2000.1298.
- [382] Sato A, Terata K, Miura H, Toyama K, Loberiza FR, Hatoum OA, et al. Mechanism of vasodilation to adenosine in coronary arterioles from patients with heart disease. *Am J Physiol Circ Physiol* 2005;53226288:H1633-H1640. doi:10.1152/ajpheart.00575.2004.
- [383] Headrick JP, Peart JN, Reichelt ME, Haseler LJ. Adenosine and its receptors in the heart: regulation, retaliation and adaptation. *Biochim Biophys Acta* 2011;1808:1413–28. doi:10.1016/j.bbamem.2010.11.016.
- [384] Godo S, Shimokawa H. Endothelial functions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2017;37:e108–14. doi:10.1161/ATVBAHA.117.309813.
- [385] Li J-M, Fenton RA, Wheeler HB, Powell CC, Peyton BD, Cutler BS, et al. Adenosine A2a receptors increase arterial endothelial cell nitric oxide. *J Surg Res* 1998;80:357–64.
- [386] Eckle T, Hartmann K, Bonney S, Reithel S, Mittelbronn M, Walker LA, et al. Adora2b-elicited Per2 stabilization promotes a HIF-dependent metabolic switch critical for myocardial adaptation to ischemia. *Nat Med* 2012;18:774–82. doi:10.1038/nm.2728.
- [387] Eckle T, Krahn T, Grenz A, Köhler D, Mittelbronn M, Ledent C, et al. Cardioprotection by ecto-5'-nucleotidase (CD73) and A2B adenosine receptors. *Circulation* 2007;115:1581–90. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.106.669697.
- [388] Koeppen M, Harter PN, Bonney S, Bonney M, Reithel S, Zachskorn C, et al. Adora2b signaling on bone marrow derived cells dampens myocardial ischemia-reperfusion

- injury. *Anesthesiology* 2012;116:1245–57. doi:10.1038/jid.2014.371.
- [389] Bender SB, Tune JD, Borbouse L, Long X, Sturek M, Laughlin MH. Altered mechanism of adenosine-induced coronary arteriolar dilation in early-stage metabolic syndrome. *Exp Biol Med* 2009;234:683–92. doi:10.3181/0812-rm-350.
- [390] Berwick ZC, Payne GA, Lynch B, Dick GM, Sturek M, Tune JD. Contribution of adenosine A(2A) and A(2B) receptors to ischemic coronary dilation: role of K(V) and K(ATP) channels. *Microcirculation* 2010;17:600–7. doi:10.1111/j.1549-8719.2010.00054.x.
- [391] Richard LF, Dahms TE, Webster RO. Adenosine prevents permeability increase in oxidant-injured endothelial monolayers. *Am J Physiol Circ Physiol* 1998;274:H35–42. doi:10.1152/ajpheart.1998.274.1.h35.
- [392] Haselton FR, Alexander JS, Mueller SN. Adenosine decreases permeability of in vitro endothelial monolayers. *J Appl Physiol* 1993;74:1581–90. doi:10.1152/jappl.1993.74.4.1581.
- [393] Umopathy NS, Fan Z, Zemskov EA, Alieva IB, Black SM, Verin AD. Molecular mechanisms involved in adenosine-induced endothelial cell barrier enhancement. *Vascul Pharmacol* 2010;52:199–206. doi:10.1016/j.vph.2009.12.008.
- [394] Harrington EO, Newton J, Morin N, Rounds S. Barrier dysfunction and RhoA activation are blunted by homocysteine and adenosine in pulmonary endothelium. *Am J Physiol Cell Mol Physiol* 2004;287:L1091–7. doi:10.1152/ajplung.00421.2003.
- [395] Ethier MF, Chander V, Dobson JG. Adenosine stimulates proliferation of human endothelial cells in culture. *Am J Physiol Circ Physiol* 1993;265:H131–8. doi:10.1152/ajpheart.1993.265.1.h131.
- [396] Dubey RK, Gillespie DG, Jackson EK. A2B adenosine receptors stimulate growth of porcine and rat arterial endothelial cells. *Hypertension* 2002;39:530–5.
- [397] Valladares D, Quezada C, Montecinos P, Concha, Yañez AJ, Sobrevia L, et al. Adenosine A(2B) receptor mediates an increase on VEGF-A production in rat kidney glomeruli. *Biochem Biophys Res Commun* 2008;366:180–5.

## *Βιβλιογραφία*

- doi:10.1016/j.bbrc.2007.11.113.
- [398] Feoktistov I, Goldstein AE, Ryzhov S, Zeng D, Belardinelli L, Voyno-Yasenetskaya T, et al. Differential expression of adenosine receptors in human endothelial cells: Role of A2B receptors in angiogenic factor regulation. *Circ Res* 2002;90:531–8. doi:10.1161/01.RES.0000012203.21416.14.
- [399] Dubey RK, Fingerle J, Gillespie DG, Mi Z, Rosselli M, Imthurn B, et al. Adenosine attenuates human coronary artery smooth muscle cell proliferation by inhibiting multiple signaling pathways that converge on cyclin D. *Hypertension* 2015;66:1207–19. doi:10.1161/HYPERTENSIONAHA.115.05912.
- [400] Bot I, De Vries H, Korporaal SJA, Foks AC, Bot M, Van Veldhoven J, et al. Adenosine A2B receptor agonism inhibits neointimal lesion development after arterial injury in apolipoprotein E-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2012;32:2197–205. doi:10.1161/ATVBAHA.112.252924.
- [401] Steidl U, Bork S, Schaub S, Selbach O, Seres J, Aivado M, et al. Primary human CD34+ hematopoietic stem and progenitor cells express functionally active receptors of neuromediators. *Blood* 2004;104:81–8. doi:10.1182/blood-2004-01-0373.
- [402] Bäumer N, Krause A, Köhler G, Lettermann S, Evers G, Hascher A, et al. Proteinase-activated receptor 1 (PAR1) regulates leukemic stem cell functions. *PLoS One* 2014;9:e94993. doi:10.1371/journal.pone.0094993.
- [403] Jeong HS, Hong SJ, Cho SA, Kim JH, Cho JY, Lee SH, et al. Comparison of ticagrelor versus prasugrel for inflammation, vascular function, and circulating endothelial progenitor cells in diabetic patients with non–ST-segment elevation acute coronary syndrome requiring coronary atenting: A prospective, randomized, . *JACC Cardiovasc Interv* 2017;10:1646–58. doi:10.1016/j.jcin.2017.05.064.
- [404] Tatsidou PT, Chantzichristos VG, Tsoumani ME, Sidiropoulou S, Ntalas I V., Goudevenos JA, et al. Circulating progenitor cells and their interaction with platelets in patients with an acute coronary syndrome. *Platelets* 2019;30:314–21. doi:10.1080/09537104.2018.1430355.
- [405] Armstrong D, Summers C, Ewart L, Nylander S, Sidaway JE, Van Giezen JJJ.

- Characterization of the adenosine pharmacology of ticagrelor reveals therapeutically relevant inhibition of equilibrative nucleoside transporter 1. *J Cardiovasc Pharmacol Ther* 2014;19:209–19. doi:10.1177/1074248413511693.
- [406] Nylander S, Femia EA, Scavone M, Berntsson P, Asztély A-K, Nelander K, et al. Ticagrelor inhibits human platelet aggregation via adenosine in addition to P2Y<sub>12</sub> antagonism. *J Thromb Haemost* 2013;11:1867–76. doi:10.1111/jth.12360.
- [407] van Giezen JJJ, Sidaway J, Glaves P, Kirk I, Björkman JA. Ticagrelor inhibits adenosine uptake in vitro and enhances adenosine-mediated hyperemia responses in a canine model. *J Cardiovasc Pharmacol Ther* 2012;17:164–72. doi:10.1177/1074248411410883.
- [408] Koupenova M, Ravid K. Biology of platelet purinergic receptors and implications for platelet heterogeneity. *Front Pharmacol* 2018;9. doi:10.3389/fphar.2018.00037.
- [409] Miller R, Grant M. Increased expression of Adenosine A<sub>2B</sub> receptor in endothelial precursor cells contributes to diabetes-induced dysfunction. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2013;54.
- [410] Grant MB, Davis MI, Caballero S, Feoktistov I, Biaggioni I, Belardinelli L. Proliferation, migration, and ERK activation in human retinal endothelial cells through A<sub>2B</sub> adenosine receptor stimulation. *Investig Ophthalmol Vis Sci* 2001;42:2068–73.
- [411] Grant MB, Tarnuzzer RW, Caballero S, Ozeck MJ, Davis MI, Spoerri PE, et al. Adenosine receptor activation induces vascular endothelial growth factor in human retinal endothelial cells. *Circ Res* 1999;85:699–706.
- [412] Du X, Ou X, Song T, Zhang W, Cong F, Zhang S, et al. Adenosine A<sub>2B</sub> receptor stimulates angiogenesis by inducing VEGF and eNOS in human microvascular endothelial cells. *Exp Biol Med* 2015;240:1472–9. doi:10.1177/1535370215584939.
- [413] Fang Y, Olah ME. Cyclic AMP-dependent, protein kinase A-independent activation of extracellular signal-regulated kinase 1/2 following adenosine receptor stimulation in human umbilical vein endothelial cells: role of exchange protein activated by cAMP 1 (Epac1). *J Pharmacol Exp Ther* 2007;322:1189–200. doi:10.1124/jpet.107.119933.

## *Βιβλιογραφία*

- [414] Hsu-Lin S-C, Berman CL, Furie BC, August D, Furie B. A platelet membrane protein expressed during platelet activation and secretion. Studies using a monoclonal antibody specific for thrombin-activated platelets. *J Biol Chem* 1984;259:9121–6.
- [415] McEver RP, Beckstead JH, Moore KL, Marshall-Carlson L, Bainton DF. GMP-140, a platelet  $\alpha$ -granule membrane protein, is also synthesized by vascular endothelial cells and is localized in Weibel-Palade bodies. *J Clin Invest* 1989;84:92–9. doi:10.1172/JCI114175.
- [416] Chatterjee M, Huang Z, Zhang W, Jiang L, Hultenby K, Zhu L, et al. Distinct platelet packaging, release, and surface expression of proangiogenic and antiangiogenic factors on different platelet stimuli. *Blood* 2011;117:3907–11. doi:10.1182/blood-2010-12-327007.
- [417] Massberg S, Konrad I, Schürzinger K, Lorenz M, Schneider S, Zohlnhoefer D, et al. Platelets secrete stromal cell-derived factor 1 $\alpha$  and recruit bone marrow-derived progenitor cells to arterial thrombi in vivo. *J Exp Med* 2006;203:1221–33. doi:10.1084/jem.20051772.
- [418] Schnorbus B, Daiber A, Jurk K, Warnke S, König J, Krahn U, et al. Effects of clopidogrel, prasugrel and ticagrelor on endothelial function, inflammatory and oxidative stress parameters and platelet function in patients undergoing coronary artery stenting for an acute coronary syndrome. A randomised, prospective, control. *BMJ Open* 2014;4:e005268. doi:10.1136/bmjopen-2014-005268.
- [419] Li Z, Li Y, Zhang T, Miao W, Su G. Comparison of the influence of ticagrelor and clopidogrel on inflammatory biomarkers and vascular endothelial function for patients with ST-segment elevation myocardial infarction receiving emergency percutaneous coronary intervention: study protocol for . *Trials* 2016;17:75. doi:10.1186/s13063-016-1168-9.
- [420] Campo G, Dalla Sega FV, Pavasini R, Aquila G, Gallo F, Fortini F, et al. Biological effects of ticagrelor over clopidogrel in patients with stable coronary artery disease and chronic obstructive pulmonary disease. *Thromb Haemost* 2017;117:1208–16. doi:10.1160/TH16-12-0973.

- [421] Kim HK, Jeong MH, Lim KS, Kim JH, Lim HC, Kim MC, et al. Effects of ticagrelor on neointimal hyperplasia and endothelial function, compared with clopidogrel and prasugrel, in a porcine coronary stent restenosis model. *Int J Cardiol* 2017;240:326–31. doi:10.1016/j.ijcard.2017.04.108.
- [422] Vieceli Dalla Sega F, Fortini F, Aquila G, Pavasini R, Biscaglia S, Bernucci D, et al. Ticagrelor improves endothelial function by decreasing circulating epidermal growth factor (EGF). *Front Physiol* 2018;9. doi:10.3389/fphys.2018.00337.
- [423] Korybalska K, Rutkowski R, Luczak J, Czepulis N, Karpinski K, Witowski J. The role of purinergic P2Y12 receptor blockers on the angiogenic properties of endothelial cells: an in vitro study. *J Physiol Pharmacol* 2018;69. doi:10.26402/jpp.2018.4.06.
- [424] Löfgren L, Pehrsson S, Hägglund G, Tjellström H, Nylander S. Accurate measurement of endogenous adenosine in human blood. *PLoS One* 2018;13:e0205707. doi:10.1371/journal.pone.0205707.
- [425] Ariotti S, Ortega-Paz L, van Leeuwen M, Brugaletta S, Leonardi S, Akkerhuis KM, et al. Effects of ticagrelor, prasugrel, or clopidogrel on endothelial function and other vascular biomarkers: a randomized crossover study. *JACC Cardiovasc Interv* 2018;11:1576–86. doi:10.1016/j.jcin.2018.04.022.
- [426] Kiers D, van der Heijden WA, van Ede L, Gerretsen J, de Mast Q, van der Ven AJ, et al. A randomised trial on the effect of anti-platelet therapy on the systemic inflammatory response in human endotoxaemia. *Thromb Haemost* 2017;117:1798–807. doi:10.1160/TH16-10-0799.
- [427] Orme RC, Parker WAE, Thomas MR, Judge HM, Baster K, Sumaya W, et al. Study of two dose regimens of ticagrelor compared with clopidogrel in patients undergoing percutaneous coronary intervention for stable coronary artery disease. *Circulation* 2018;138:1290–300. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.118.034790.
- [428] Shen J, DiCorleto PE. ADP stimulates human endothelial cell migration via P2Y1 nucleotide receptor-mediated mitogen-activated protein kinase pathways. *Circ Res* 2008;102:448–56. doi:10.1161/CIRCRESAHA.107.165795.
- [429] Wang W, Luo J, Xiang F, Liu X, Jiang M, Liao L, et al. Nucleolin down-regulation is

## *Βιβλιογραφία*

- involved in ADP-induced cell cycle arrest in S phase and cell apoptosis in vascular endothelial cells. *PLoS One* 2014;9:e110101. doi:10.1371/journal.pone.0110101.
- [430] Ganbaatar B, Fukuda D, Salim HM, Nishimoto S, Tanaka K, Higashikuni Y, et al. Ticagrelor, a P2Y<sub>12</sub> antagonist, attenuates vascular dysfunction and inhibits atherogenesis in apolipoprotein-E-deficient mice. *Atherosclerosis* 2018;275:124–32. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2018.05.053.
- [431] Shergill U, Das A, Langer D, Adluri R, Maulik N, Shah VH. Inhibition of VEGF- and NO-dependent angiogenesis does not impair liver regeneration. *Am J Physiol Integr Comp Physiol* 2010;298:R1279–87. doi:10.1152/ajpregu.00836.2009.
- [432] Dubey RK, Gillespie DG, Jackson EK. A<sub>2</sub>B adenosine receptors stimulate growth of porcine and rat arterial endothelial cells. *Hypertension* 2002;39:530–5.
- [433] Afzal A, Shaw LC, Caballero S, Spoerri PE, Lewin AS, Zeng D, et al. Reduction in preretinal neovascularization by ribozymes that cleave the A<sub>2</sub>B adenosine receptor mRNA. *Circ Res* 2003;93:500–6. doi:10.1161/01.RES.0000091260.78959.BC.
- [434] Montesinos MC, Shaw JP, Yee H, Shamamian P, Cronstein BN. Adenosine A<sub>2</sub>A receptor activation promotes wound neovascularization by stimulating angiogenesis and vasculogenesis. *Am J Pathol* 2004;164:1887–92. doi:10.1016/S0002-9440(10)63749-2.
- [435] Grant MB, Tarnuzzer RW, Caballero S, Ozeck MJ, Davis MI, Spoerri PE, et al. Adenosine receptor activation induces vascular endothelial growth factor in human retinal endothelial cells. *Circ Res* 1999;85:699–706. doi:10.1161/01.res.85.8.699.
- [436] Ahmad A, Ahmad S, Glover L, Miller SM, Shannon JM, Guo X, et al. Adenosine A<sub>2</sub>A receptor is a unique angiogenic target of HIF-2α in pulmonary endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009;106:10684–9. doi:10.1073/pnas.0901326106.
- [437] Montesinos MC, Desai A, Chen JF, Yee H, Schwarzschild MA, Fink JS, et al. Adenosine promotes wound healing and mediates angiogenesis in response to tissue injury via occupancy of A<sub>2</sub>A receptors. *Am J Pathol* 2002;160:2009–18. doi:10.1016/S0002-9440(10)61151-0.

- [438] Feoktistov I, Goldstein AE, Ryzhov S, Zeng D, Belardinelli L, Voyno-Yasenetskaya T, et al. Differential expression of adenosine receptors in human endothelial cells: role of A2B receptors in angiogenic factor regulation. *Circ Res* 2002;90:531–8. doi:10.1161/01.res.0000012203.21416.14.
- [439] Du X, Ou X, Song T, Zhang W, Cong F, Zhang S, et al. Adenosine A2B receptor stimulates angiogenesis by inducing VEGF and eNOS in human microvascular endothelial cells. *Exp Biol Med* 2015;240:1472–9. doi:10.1177/1535370215584939.
- [440] Rizvi YQ, Mehta CS, Oyekan A. Interactions of PPAR-alpha and adenosine receptors in hypoxia-induced angiogenesis. *Vascul Pharmacol* 2013;59:144–51. doi:10.1016/j.vph.2013.09.001.
- [441] Ellinghaus P, Perzborn E, Hauenschild P, Gerdes C, Heitmeier S, Visser M, et al. Expression of pro-inflammatory genes in human endothelial cells: Comparison of rivaroxaban and dabigatran. *Thromb Res* 2016;142:44–51. doi:10.1016/j.thromres.2016.04.008.
- [442] Marino F, Schembri L, Rasini E, Pinoli M, Scanzano A, Luini A, et al. Characterization of human leukocyte-HUVEC adhesion: Effect of cell preparation methods. *J Immunol Methods* 2017;443:55–63. doi:10.1016/j.jim.2017.01.013.
- [443] Bouma MG, Van Den Wildenberg FAJM, Buurman WA. Adenosine inhibits cytokine release and expression of adhesion molecules by activated human endothelial cells. *Am J Physiol - Cell Physiol* 1996;270:C522–9.
- [444] Hassanian SM, Dinarvand P, Rezaie AR. Adenosine regulates the proinflammatory signaling function of thrombin in endothelial cells. *J Cell Physiol* 2014;229:1292–300. doi:10.1038/jid.2014.371.
- [445] Fuentes E, Pereira J, Mezzano D, Alarcón M, Caballero J, Palomo I. Inhibition of platelet activation and thrombus formation by adenosine and inosine: studies on their relative contribution and molecular modeling. *PLoS One* 2014;9:e112741. doi:10.1371/journal.pone.0112741.
- [446] Cenni E, Ciapetti G, Granchi D, Fotia C, Perut F, Giunti A, et al. Endothelial cells incubated with platelet-rich plasma express PDGF-B and ICAM-1 and induce bone



## *Βιβλιογραφία*

- marrow stromal cell migration. *J Orthop Res* 2009;27:1493–8. doi:10.1002/jor.20896.
- [447] Stack G, Snyder E. Cytokine generation in stored platelet concentrates. *Transfusion* 1994;34:20–5. doi:10.1046/j.1537-2995.1994.34194098597.x.
- [448] Hudgens JL, Sugg KB, Grekin JA, Gumucio JP, Bedi A, Mendias CL. Platelet-rich plasma activates proinflammatory signaling pathways and induces oxidative stress in tendon fibroblasts. *Am J Sports Med* 2016;44:1931–40. doi:10.1177/0363546516637176.
- [449] Pelzer C, Thome M. IKK $\alpha$  takes control of canonical NF- $\kappa$ B activation. *Nat Immunol* 2011;12:815–6. doi:10.1038/ni.2082.
- [450] Buss H, Handschick K, Jurrmann N, Pekkonen P, Beuerlein K, Müller H, et al. Cyclin-dependent kinase 6 phosphorylates NF- $\kappa$ B P65 at serine 536 and contributes to the regulation of inflammatory gene expression. *PLoS One* 2012;7:e51847. doi:10.1371/journal.pone.0051847.
- [451] Cha J-K, Jeong M-H, Bae H-R, Han J-Y, Jeong S-J, Jin H-J, et al. Activated platelets induce secretion of interleukin-1 $\beta$ , monocyte chemoattractant protein-1, and macrophage inflammatory protein-1 $\alpha$  and surface expression of intercellular adhesion molecule-1 on cultured endothelial cells. *J Korean Med Sci* 2000;15:273. doi:10.3346/jkms.2000.15.3.273.
- [452] Bendinelli P, Matteucci E, Dogliotti G, Corsi MM, Banfi G, Maroni P, et al. Molecular basis of anti-inflammatory action of platelet-rich plasma on human chondrocytes: mechanisms of NF- $\kappa$ B inhibition via HGF. *J Cell Physiol* 2010;225:757–66. doi:10.1002/jcp.22274.
- [453] de Boer HC, Verseyden C, Ulfman LH, Zwaginga JJ, Bot I, Biessen EA, 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;26:1653–9. doi:10.1161/01.ATV.0000222982.55731.f1.
- [454] Li D-W, Liu Z-Q, Wei J, Liu Y, Hu L-S. Contribution of endothelial progenitor cells to neovascularization (Review). *Int J Mol Med* 2012;30:1000–6. doi:10.3892/ijmm.2012.1108.





## Περίληψη

**Εισαγωγή – Σκοπός:** Η τικαγρελόρη, ένας ισχυρός ανταγωνιστής του αιμοπεταλιακού P2Y<sub>12</sub> υποδοχέα (P2Y<sub>12</sub>R), παρουσιάζει μια μοναδικότητα μεταξύ των αντιαιμοπεταλιακών φαρμάκων, καθώς αναστέλλει με αντιστρεπτό τρόπο τον P2Y<sub>12</sub>R, αλλά και επειδή επιδεικνύει ένα ευρύ φάσμα πλειοτροπικών δράσεων, οι οποίες πιθανότατα σχετίζονται με την αυξημένη συγκέντρωση της αδενοσίνης. Οι πλειοτροπικές δράσεις της τικαγρελόρης περιλαμβάνουν την καρδιοπροστασία, την αποκατάσταση του μυοκαρδίου μετά από ισχαιμικό επεισόδιο, την προαγωγή απελευθέρωσης αντιπηκτικών παραγόντων και, τέλος, αντιφλεγμονώδεις δράσεις. Ωστόσο, πέραν των πλεονεκτικών αποτελεσμάτων, η αυξημένη συγκέντρωση της αδενοσίνης είναι υπεύθυνη, επίσης, για ορισμένες ανεπιθύμητες δράσεις της τικαγρελόρης, συμπεριλαμβανομένης της δύσπνοιας και της βραδυκαρδίας. Σκοπός της παρούσας διατριβής ήταν η παροχή νέων σημαντικών δεδομένων των υποκείμενων μηχανισμών σχετικά με τις πλειοτροπικές δράσεις της τικαγρελόρης. Διερευνήθηκε αν η τικαγρελόρη, είτε άμεσα διαμέσου του P2Y<sub>12</sub>R είτε έμμεσα διαμέσου της αδενοσίνης, μπορεί να επηρεάσει την επαγόμενη από τα αιμοπετάλια διαφοροποίηση των CD34<sup>+</sup> πρόδρομων κυττάρων σε πρόδρομα ενδοθηλιακά κύτταρα, καθώς και τη λειτουργικότητα των πρόδρομων και ώριμων ενδοθηλιακών κυττάρων, δεδομένα τα οποία αποτελούν σημαντικά συστατικά των μηχανισμών που εμπλέκονται στην παθοφυσιολογία της καρδιαγγειακής νόσου.

**Υλικά και Μέθοδοι:** Η δράση της τικαγρελόρης, καθώς και ο ρόλος της αδενοσίνης, μελετήθηκαν στην έκφραση του ενδοθηλιακού φαινοτύπου (μεμβρανική έκφραση του υποδοχέα KDR) από τα CD34<sup>+</sup> πρόδρομα κύτταρα, καθώς επίσης και στην αλληλεπίδραση των αιμοπεταλίων με τα CD34<sup>+</sup> και τα CD34<sup>+</sup>/KDR<sup>+</sup> κύτταρα μετά από ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων με τη ADP και το TRAP-6 με τη χρήση της κυτταρομετρίας ροής. Στη συνέχεια, μελετήθηκε η επίδραση εναιωρήματος και υπερκειμένου αιμοπεταλίων στη λειτουργικότητα των πρόδρομων ενδοθηλιακών κυττάρων (EPCs). Πιο συγκεκριμένα, μελετήθηκε η επίδραση εναιωρήματος αιμοπεταλίων στη μεμβρανική έκφραση του μορίου προσκόλλησης ICAM-1 με τη χρήση της κυτταρομετρίας ροής, καθώς επίσης και η έκκριση της προστακυκλίνης (PGI<sub>2</sub>) και του χημειοτακτικού παράγοντα των μονοκυττάρων (MCP-1) με τη χρήση της ανοσοενζυμικής μεθόδου ELISA, από τα προχωρημένης ωρίμανσης EPCs (OECs). Η επίδραση υπερκειμένου αιμοπεταλίων μελετήθηκε επίσης στους παραπάνω δείκτες ενδοθηλιακών κυττάρων. Επιπλέον, μελετήθηκε και ο ρόλος της τικαγρελόρης στη

λειτουργικότητα των EPCs παρουσία εναιωρήματος και υπερκειμένου αιμοπεταλίων. Τέλος, η δράση της τικαγρελόρης και της αδενοσίνης μελετήθηκε στην ικανότητα των EPCs να ενσωματωθούν σε αγγειακές δομές σχηματίζοντας κυτταρικούς αυλούς και εκβλαστήματα από κυτταρικά σφαιρίδια. Όλα τα πειράματα διεξήχθησαν και σε ώριμα ενδοθηλιακά κύτταρα από ομφάλιο λώρο (HUVECs).

**Αποτελέσματα:** Η τικαγρελόρη αύξησε την επαγόμενη από την ADP και το TRAP-6 μεμβρανική έκφραση του KDR στα CD34<sup>+</sup> πρόδρομα κύτταρα, η οποία αυξήθηκε επιπλέον παρουσία του συνδυασμού της τικαγρελόρης με την αδενοσίνη, μια δράση που αναστάλθηκε παρουσία του αντιστρεπτού αγωνιστή και ανταγωνιστή του A<sub>2B</sub> υποδοχέα της αδενοσίνης (AR), MRS1706. Η τικαγρελόρη μείωσε την επαγόμενη από την ADP αλληλεπίδραση των αιμοπεταλίων με τα CD34<sup>+</sup> κύτταρα, ωστόσο, δεν είχε καμία δράση στην επαγόμενη από το TRAP-6 διακυτταρική αλληλεπίδραση. Επίσης, η τικαγρελόρη αύξησε την επαγόμενη από την ADP και το TRAP-6 αλληλεπίδραση των αιμοπεταλίων με τα CD34<sup>+</sup>/KDR<sup>+</sup> κύτταρα, η οποία αυξήθηκε παρουσία της αδενοσίνης. Η τικαγρελόρη αύξησε τη μεμβρανική έκφραση του ICAM-1 παρουσία ενεργοποιημένων με ADP αιμοπεταλίων στα OECs, ένα φαινόμενο που παρατηρήθηκε παρουσία εν ηρεμία αιμοπεταλίων και όχι παρουσία ενεργοποιημένων με ADP αιμοπετάλια. Παρόμοια αποτελέσματα παρατηρήθηκαν τόσο για την έκκριση της PGI<sub>2</sub> όσο και του MCP-1. Τέλος, η τικαγρελόρη αύξησε το σχηματισμό νέων κυτταρικών αυλών στα OECs, φαινόμενο που παρατηρήθηκε και παρουσία της αδενοσίνης. Επίσης, τόσο η τικαγρελόρη όσο και η αδενοσίνη αύξησαν το σχηματισμό εκβλαστημάτων σε κυτταρικά σφαιρίδια. Η συγκεκριμένη αύξηση αναστάλθηκε τόσο παρουσία του ανταγωνιστή του A<sub>2A</sub>AR, SCH58621, όσο και παρουσία του αντιστρεπτού αγωνιστή και ανταγωνιστή του A<sub>2B</sub>AR, MRS1706, ενώ ο συνδυασμός τους είχε πλήρη αναστολή του παραπάνω φαινομένου. Παρόμοια αποτελέσματα παρατηρήθηκαν και στα HUVECs.

**Συμπέρασμα:** Η παρούσα μελέτη δείχνει πως η τικαγρελόρη επάγει τη διαφοροποίηση των CD34<sup>+</sup> πρόδρομων κυττάρων σε EPCs, καθώς και την ενσωμάτωση αυτών σε αγγειακές δομές, φαινόμενα τα οποία πιθανότητα διαμεσολαβούνται από την αδενοσίνη, συμβάλλοντας με αυτόν τον τρόπο στην ενδοθηλιακή αναγέννηση και νεοαγγειογένεση. Επιπλέον, η παρούσα μελέτη δείχνει πως τα εν ηρεμία και όχι τα ενεργοποιημένα αιμοπετάλια επάγουν την ενεργοποίηση των EPCs. Το συγκεκριμένο γεγονός παρατηρείται και παρουσία της τικαγρελόρης, ακόμα και μετά την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων, προτείνοντας ότι η τικαγρελόρη μπορεί να προάγει την αναγέννηση του ενδοθηλίου εμποδίζοντας την

αιμοπεταλιακή ενεργοποίηση, επιτρέποντας έτσι στα εν ηρεμία αιμοπετάλια να ενεργοποιήσουν τα EPCs.



## Abstract

**Background – Aim:** Ticagrelor, a potent platelet P2Y<sub>12</sub> receptor (P2Y<sub>12</sub>R), is unique among antiplatelet drugs because it inhibits the P2Y<sub>12</sub>R in a reversible manner as well as it demonstrates a variety of advantageous pleiotropic effects associated probably with the increased concentration of adenosine. The pleiotropic effects of ticagrelor include cardioprotection, myocardium restoration after an ischemic event, and promotion of anticoagulative factor release as well as anti-inflammatory effects. However, beyond these advantageous effects, the increased adenosine concentration is also responsible for some adverse effects of ticagrelor including dyspnea and bradycardia. Aim of the present study was to shed more light into the mechanisms underlying the pleiotropic effects of ticagrelor. We investigated whether ticagrelor, either directly through P2Y<sub>12</sub>R or indirectly through adenosine, has the ability to affect the platelet-induced the CD34<sup>+</sup> progenitor cell differentiation into endothelial progenitor cells (EPCs) as well as the functionality of EPCs and mature endothelial cells. These data will be important components of the mechanisms which are involved in the pathophysiology of cardiovascular disease.

**Materials and Methods:** The effect of ticagrelor, as well as the role of adenosine, was studied on the expression of the endothelial phenotype (membrane expression of KDR) by CD34<sup>+</sup> progenitor cells as well as on the interaction of platelets with CD34<sup>+</sup> and CD34<sup>+</sup>/KDR<sup>+</sup> cells followed by ADP- and TRAP-6-activation using flow cytometry. We also studied the effect of platelet suspension and supernatant on the functionality of EPCs. In particular, the effect of platelet suspension was studied on the membrane expression of the adhesion molecule ICAM-1 using flow cytometry as well as on the secretion of prostacyclin (PGI<sub>2</sub>) and monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) using ELISA from late-outgrowth endothelial cells (OECs). The effect of platelet supernatant was also studied on the above described endothelial cell markers. Furthermore, we evaluated the effect of both ticagrelor and adenosine on the ability of EPCs to integrate into vascular structures forming capillary-like tubes and sprouts from cell spheroids. All experiments were also conducted in human umbilical vein endothelial cells (HUVECs).

**Results:** Ticagrelor increased the ADP- and TRAP-6-induced membrane expression of KDR on CD34<sup>+</sup> progenitor cells, which was further amplified in the presence of the combination of



ticagrelor with adenosine, an effect which was inhibited by the inverse agonist and antagonist of the  $A_{2B}$  adenosine receptor (AR), MRS1706. Ticagrelor reduced the ADP-induced interaction of platelets with  $CD34^+$  cells in contrast to the TRAP-6-induced intercellular interaction which was not affected by ticagrelor. Ticagrelor also increased the ADP- and TRAP-6-induced interaction of platelets with  $CD34^+/KDR^+$  cells, which was further amplified in the presence of adenosine. Ticagrelor increased the membrane expression of ICAM-1 in the presence of activated platelets on OECs, an effect which was also observed in the presence of resting platelets but not in the presence of ADP-activated platelets. Similar results were also observed for the secretion of  $PGI_2$  and MCP-1 from OECs. Finally, both ticagrelor and adenosine increased the capillary-like tube formation as well as the sprout formation on cell spheroids formed by OECs. Sprout formation was inhibited either in the presence of the  $A_{2A}$ AR antagonist, SCH58621, or in the presence of the  $A_{2B}$ AR inverse agonist and antagonist, MRS1706, while their combination inhibited totally the above described phenomenon. Similar results were also observed when HUVECs were used.

**Conclusion:** The present study demonstrates that ticagrelor induces the differentiation of  $CD34^+$  progenitor cells into EPCs as well as their ability to integrate into vascular structures, phenomena which are probably mediated through adenosine contributing thus to endothelial regeneration and neoangiogenesis. Furthermore, the present study demonstrates that resting and not activated platelets induce the activation of EPCs. This phenomenon is also observed in the presence, even after platelet activation, suggesting that ticagrelor may promote endothelial regeneration by inhibiting platelet activation and thus allowing resting platelets to activate EPCs.





## Δημοσιεύσεις – Ανακοινώσεις σε Επιστημονικά Συνέδρια

### Δημοσιεύσεις σε Επιστημονικά Περιοδικά

P.T. Tatsidou, V.G. Chantzichristos, M.E. Tsoumani, **S. Sidiropoulou**, I.V. Ntalas, J.A. Goudevenos, K. Stellos, A.D. Tselepis. “Circulating progenitor cells and their interaction with platelets in patients with an acute coronary syndrome”. *Platelets* 2019; 30: 314-321

**S. Sidiropoulou**, K.M. Hansson, A.D. Tselepis. “Ticagrelor induces the expression of the endothelial phenotype on CD34<sup>+</sup> progenitor cells via an adenosine-mediated mechanism” *Platelets* (submitted)

**S. Sidiropoulou**, S. Papadaki, V.G. Chantzichristos, M.E. Paschopoulos, K.M. Hansson, A.D. Tselepis. “The effect of platelets on endothelial progenitor cell functionality. The role of ticagrelor” *Cardiovasc Res* (submitted)

**S. Sidiropoulou**, A. Gatsiou, K. M. Hansson, K. Stellos, A.D. Tselepis. “Ticagrelor induces angiogenesis in endothelial progenitor cells. The role of adenosine” *Microvas Res* (submitted)

### Ανακοινώσεις σε Διεθνή Επιστημονικά Συνέδρια

**S. Sidiropoulou**, A.D. Tselepis. “Platelet interaction with circulating CD34<sup>+</sup> progenitor cells. The effect of adenosine”. 26<sup>th</sup> Anniversary International Congress on Thrombosis, 19–22 Ιουλίου, 2019, Αθήνα/Ελλάδα

**S. Sidiropoulou**, S. Papadaki, V.G. Chantzichristos, M.E. Paschopoulos, K.M. Hansson, A.D. Tselepis. “The effect of ticagrelor on platelet-endothelial progenitor cell interaction”. 87<sup>th</sup> Congress of the European Atherosclerosis Society, 26–29 Μαΐου, 2019, Μάαστριχτ/Ολλανδία [Proceedings: *Atherosclerosis* 2019; 287: e123–e288 (p e264)]

**S. Sidiropoulou**, K.M. Hansson, A.D. Tselepis. “Ticagrelor induces the expression of the endothelial phenotype CD34<sup>+</sup> progenitor cells in the presence of ADP via an adenosine-mediated mechanism”. 64<sup>th</sup> Annual Scientific and Standardization Committee (SSC) Meeting, 18–21 Ιουλίου, 2018, Δουβλίνο/Ιρλανδία [Proceedings: *Res Pract Thromb Haemost* 2018; 2(Suppl 1): 1–368 (p 164)]

**S. Sidiropoulou**, A. D. Tselepis. “Exploring the pleiotropic effects of ticagrelor”. ALPIC: Advanced Learning on Platelets and Thrombosis International Course, 25–26 Μαρτίου, 2016, Καλάβρυτα/Ελλάδα

### **Ανακοινώσεις σε Εθνικά Επιστημονικά Συνέδρια**

**Σ. Σιδηροπούλου**, Σ. Παπαδάκη, Β. Χαντζηχρήστος, Μ. Πασχόπουλος, Α.Δ. Τσελέπης «Η επίδραση της τικαγρελόρης στην αλληλεπίδραση των αιμοπεταλίων με τα πρόδρομα ενδοθηλιακά κύτταρα». 7<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Συνέδριο Θρόμβωσης – Αντιθρομβωτικής Αγωγής, 19–22 Σεπτεμβρίου, 2019, Ερέτρια/Ελλάδα

**Σ. Σιδηροπούλου**, C. Amrhein, Α. Γατσιού, Β. Χαντζηχρήστος, Κ. Στέλλος, Α.Δ. Τσελέπης. «Επίδραση της τικαγρελόρης στην αγγειογένεση. Ο ρόλος της αδενοσίνης». 8<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Συνέδριο Ελληνικής Εταιρείας Αθηροσκλήρωσης, 29 Νοεμβρίου–1 Δεκεμβρίου, 2018, Αθήνα/Ελλάδα

**Σ. Σιδηροπούλου**, Α.Δ. Τσελέπης. «Επίδραση αιμοπεταλιακών αγωνιστών στη διαφοροποίηση των CD34<sup>+</sup> πρόδρομων κυττάρων σε πρόδρομα ενδοθηλιακά κύτταρα. Ο ρόλος της τικαγρελόρης». 7<sup>ο</sup> Συμπόσιο των Ομάδων Εργασίας της Ελληνικής Εταιρείας Αθηροσκλήρωσης, 1–2 Δεκεμβρίου, 2017, Αθήνα/Ελλάδα

**Σ. Σιδηροπούλου**, Α.Δ. Τσελέπης. «Η τικαγρελόρη επάγει την εμφάνιση ενδοθηλιακού φαινοτύπου στα CD34<sup>+</sup> πρόδρομα κύτταρα *in vitro*». 5<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Συνέδριο Θρόμβωσης – Αντιθρομβωτικής Αγωγής, 21–23 Σεπτεμβρίου, 2017, Αθήνα/Ελλάδα

**Σ. Σιδηροπούλου**, Α.Δ. Τσελέπης. «Η τικαγρελόρη μειώνει την αλληλεπίδραση των αιμοπεταλίων με τα CD34<sup>+</sup> πρόδρομα κύτταρα στο περιφερικό αίμα». 7<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Συνέδριο Ελληνικής Εταιρείας Αθηροσκλήρωσης, 1–3 Δεκεμβρίου, 2016, Αθήνα/Ελλάδα

**Σ. Σιδηροπούλου**, Α.Δ. Τσελέπης. «Η επίδραση της τικαγρελόρης στην αλληλεπίδραση των αιμοπεταλίων με τα CD34<sup>+</sup> πρόδρομα κύτταρα». 4<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Συνέδριο Θρόμβωσης – Αντιθρομβωτικής Αγωγής, 22–24 Σεπτεμβρίου, 2016, Αθήνα/Ελλάδα