



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ**

**Η ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ ΑΙΜΟΠΕΤΑΛΙΩΝ ΣΤΟΥΣ ΑΣΘΕΝΕΙΣ
ΜΕ ΚΑΡΔΙΑΓΓΕΙΑΚΗ ΝΟΣΟ - ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΝΕΩΝ ΔΕΙΚΤΩΝ
ΓΙΑ ΤΗΝ ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΤΗΣ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΙΚΟΤΗΤΑΣ
ΑΝΤΙΑΙΜΟΠΕΤΑΛΙΑΚΩΝ ΠΑΡΑΓΟΝΤΩΝ**

ΜΑΡΙΑ Ε. ΤΣΟΥΜΑΝΗ
ΒΙΟΛΟΓΟΣ, MSc

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2015



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ**

**Η ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ ΑΙΜΟΠΕΤΑΛΙΩΝ ΣΤΟΥΣ ΑΣΘΕΝΕΙΣ
ΜΕ ΚΑΡΔΙΑΓΓΕΙΑΚΗ ΝΟΣΟ - ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΝΕΩΝ ΔΕΙΚΤΩΝ
ΓΙΑ ΤΗΝ ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΤΗΣ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΙΚΟΤΗΤΑΣ
ΑΝΤΙΑΙΜΟΠΕΤΑΛΙΑΚΩΝ ΠΑΡΑΓΟΝΤΩΝ**

ΜΑΡΙΑ Ε. ΤΣΟΥΜΑΝΗ
ΒΙΟΛΟΓΟΣ, MSc

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2015

«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.: 837^A/ 16-12-2012

Μέλη Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής:

Επιβλέπων:

Τσελέπης Αλέξανδρος, Καθηγητής Τμήματος Χημείας Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Μέλη:

Γουδέβενος Ιωάννης, Καθηγητής Τμήματος Ιατρικής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Τσουκάτος Δημόκριτος, Καθηγητής Τμήματος Χημείας Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Ημερομηνία ορισμού θέματος: 2-3-2012

Θέμα: «Η ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων στους ασθενείς με καρδιαγγειακή νόσο. Διερεύνηση νέων δεικτών για την εκτίμηση της αποτελεσματικότητας αντιαιμοπεταλιακών παραγόντων»

ΟΡΙΣΜΟΣ ΕΠΤΑΜΕΛΟΥΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ από τη Γ.Σ.Ε.Σ.: 912^A / 24-6-2015

1. Τσελέπης Αλέξανδρος, Καθηγητής Τμήματος Χημείας Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
2. Γουδέβενος Ιωάννης, Καθηγητής Τμήματος Ιατρικής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
3. Τσουκάτος Δημόκριτος, Καθηγητής Τμήματος Χημείας Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
4. Κιόρτσος Δημήτριος, Καθηγητής Τμήματος Ιατρικής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
5. Κούκκου Άννα-Ειρήνη, Αν. Καθηγήτρια Τμήματος Χημείας, Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
6. Μηλιώνης Χαράλαμπος, Αν. Καθηγητής Τμήματος Ιατρικής, Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
7. Τζάκος Ανδρέας, Επικ. Καθηγητής Τμήματος Χημείας, Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Έγκριση Διδακτορικής Διατριβής με βαθμό «ΑΡΙΣΤΑ» στις 13-7-2015

Η Πρόεδρος του Τμήματος Χημείας

Λέκκα Μαρία - Ελένη, Καθηγήτρια

Η Γραμματέας του Τμήματος

Ελένη Αδαμαντίου



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ
ΤΟΜΕΑΣ ΟΡΓΑΝΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ
Εργαστήριο Βιοχημείας
Αλέξανδρος Τσελέπης
Καθηγητής Βιοχημείας-Κλινικής Χημείας

Ιωάννινα, 13-7-2015

Η επταμελής Εξεταστική Επιτροπή που ορίστηκε για την κρίση της Διδακτορικής Διατριβής της κας **Μαρίας Τσουμάνη**, Βιολόγου, συνήλθε σε συνεδρίαση στο Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων τη Δευτέρα 13 Ιουλίου 2015, όπου παρακολούθησε την υποστήριξη της διατριβής με τίτλο:
«Η ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων στους ασθενείς με καρδιαγγειακή νόσο. Διερεύνηση νέων δεικτών για την εκτίμηση της αποτελεσματικότητας αντιαιμοπεταλιακών παραγόντων»

Η επιτροπή έκρινε ομόφωνα ότι η διατριβή είναι πρωτότυπη, και αποτελεί ουσιαστική συμβολή στην πρόοδο της Επιστήμης, η δε κατάρτιση του υποψηφίου είναι ευρεία και ολοκληρωμένη. Με βάση τα παραπάνω η Εξεταστική Επιτροπή αποφάσισε να γίνει η απονομή του τίτλου του διδάκτορα από το Τμήμα Χημείας του Παν/μίου Ιωαννίνων στην κα **Μαρία Τσουμάνη** με βαθμό **Άριστα**.

Με τιμή

Τα μέλη της εξεταστικής Επιτροπής

1. Τσελέπης Αλέξανδρος, Καθηγητής Βιοχημείας-Κλινικής Χημείας Τμήματος Χημείας

2. Γουδέβενος Ιωάννης, Καθηγητής Καρδιολογίας Τμήματος Ιατρικής

3. Τσουκάτος Δημόκριτος, Καθηγητής Βιοχημείας Τμήματος Χημείας

4. Κιόρτσης Δημήτριος, Καθηγητής Φυσιολογίας Τμήματος Ιατρικής

5. Κούκκου Άννα-Ειρήνη, Αν. Καθηγήτρια Βιοχημείας Τμήματος Χημείας

6. Μηλιώνης Χαράλαμπος Αν. Καθηγητής Τμήματος Ιατρικής

7. Τζάκος Ανδρέας, Επίκ. Καθηγητής Οργανικής Χημείας Τμήματος Χημείας

Πρόλογος

Η παρούσα διατριβή εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Βιοχημείας του Τμήματος Χημείας, του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, από τον Φεβρουάριο του 2012 έως τον Ιούλιο του 2015. Μέρος της διατριβής αυτής πραγματοποιήθηκε στα πλαίσια ενός ερευνητικού προγράμματος που συγχρηματοδοτήθηκε από την Ευρωπαϊκή Ένωση και μέσω του Επιχειρησιακού Προγράμματος «Ανταγωνιστικότητα και Επιχειρηματικότητα» του Εθνικού Στρατηγικού Πλαισίου Αναφοράς (ΕΣΠΑ) – Ερευνητικό Πρόγραμμα Χρηματοδότησης: Συνεργασία 2009. Δράση Ι. Συνεταιρισμός μικρής και μεσαίας κλίμακας (κωδικός έργου: 09ΣΥΝ-12-827). Θερμές ευχαριστίες εκφράζονται στην Ελληνική Εταιρεία Αθηροσκλήρωσης, η οποία μου χορήγησε υποτροφία ύψους 3000€ για την εκπόνηση της διδακτορικής μου διατριβής.

Κατ' αρχήν θα ήθελα να εκφράσω την ευγνωμοσύνη μου και τις θερμές μου ευχαριστίες στον επιβλέποντα καθηγητή μου κ. Αλέξανδρο Τσελέπη για την ανάθεση του θέματος της παρούσας διατριβής. Ιδιαίτερα θα ήθελα να τον ευχαριστήσω για την εμπιστοσύνη που έδειξε στο πρόσωπό μου, τις ερευνητικές κατευθύνσεις που μου υπέδειξε και την έμπρακτη βοήθειά του τόσο στο πειραματικό όσο και στο συγγραφικό κομμάτι αυτής της διατριβής. Επίσης, τον ευχαριστώ από ψυχής για την ευκαιρία και την ώθηση που μου έδωσε να εκφέρω τον επιστημονικό μου λόγο συμμετέχοντας ενεργά σε εθνικά και διεθνή συνέδρια. Ήταν πραγματικά ξεχωριστή εμπειρία για μένα και πάντα θα τον ευγνωμονώ γι' αυτό.

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

Ευχαριστώ πολύ τον Επ. Καθηγητή του τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων κ. Ανδρέα Τζάκο για τη βοήθεια του να πραγματοποιηθεί ένα μέρος της παρούσας διατριβής. Επίσης, ευχαριστώ πολύ και τα υπόλοιπα μέλη της 7μελούς επιτροπής για την ευγενική αποδοχή να συμμετέχουν στην εξεταστική μου επιτροπή.

Οφείλω ένα μεγάλο ευχαριστώ στους καρδιολόγους, Δρ. Λορέτα Καλαντζή και Γιάννη Ντάλα για την άψογη συνεργασία μας κατά τη συλλογή των κλινικών δειγμάτων. Η

καθημερινή μας επαφή για τρία χρόνια οδήγησε σε πραγματική φιλία. Επίσης ευχαριστώ τους Λευτέρη Κλούρα και Φώτη Μάρκα, μέλη του εξωτερικού ιατρείου λιπιδίων του Πανεπιστημιακού Περιφερειακού Νοσοκομείου Ιωαννίνων για την εξαιρετική συνεργασία μας στη συλλογή δειγμάτων υγιών εθελοντών.

Ευχαριστώ επίσης τον Δρ. Κώστα Τέλλη, πολύτιμο δάσκαλο για τα θέματα των λιπιδίων και των λιποπρωτεϊνών. Η έμπρακτη βοήθειά του καθώς και οι χρήσιμες συμβουλές του κατέστησε δυνατή την ολοκλήρωση μέρους της παρούσας διατριβής. Επίσης, τις θερμές μου ευχαριστίες οφείλω στις Δρ. Βασιλική Κοντογιάννη, Μαρία Χατζηαθανασιάδου και Αντιγόνη Κατσικούδη για την άψογη συνεργασία μας, την ευγένεια και την ηθική συμπαράσταση που μου πρόσφεραν απλόχερα. Τους εύχομαι από καρδιάς, τα καλύτερα.

Ευχαριστώ θερμά το Δρ. Γιάννη Μήτσιο, παλιό μέλος του εργαστηρίου μας που είχα την τύχη να τον γνωρίσω για το μικρό χρονικό διάστημα παραμονής του στην Ελλάδα. Τον ευχαριστώ για τη βοήθεια του στην αρχική προσπάθεια μου να αναπτύξω τη μεθοδολογία προσκόλλησης των αιμοπεταλίων υπό ροή και τη φιλία που μου έδειξε.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω το Εργαστήριο Φαρμακολογίας, σπίτι της μητέρας μου για 25 χρόνια, για την παραχώρηση του μετρητή υγρού σπινθηρισμού. Ιδιαίτερα ευχαριστώ τον Αναπληρωτή Καθηγητή κ. Παππά Περικλή για τη φιλοξενία και τη βοήθειά του σε τεχνικά ζητήματα.

Ιδιαίτερα θα ήθελα να ευχαριστήσω την άμεση συνεργάτιδά μα πάνω από όλα φίλη μου Ρία Τατσίδου για τη βοήθεια, τη στήριξη, τις υπέροχες στιγμές που περάσαμε μαζί εντός και εκτός του εργαστηρίου. Δύο χρόνια γέμισε την καθημερινότητά μου και έδωσε άλλο χρώμα στη δύσκολη ζωή μου ως ερευνήτρια.

Ευχαριστώ επίσης όλα τα μέλη του ερευνητικού εργαστηρίου Βιοχημείας, τους παλιούς, Δρ. Βασίλη Χαντζηχρήστο και Δρ. Αλεξία Γκουρογιάννη και τους νεότερους, Ηρακλή Μοσχονά, Γλυκερία Βελιβάση, Σοφία Σιδηροπούλου, Ελευθερία Καζεπίδου, Στελίνα Παπαδάκη, Μαρία Κολιού, Σοφία Τσάφου, και την Κρητικοπούλα Πελαγία Πελεκού για το ευχάριστο κλίμα. Εύχομαι στον καθένα προσωπικά καλή επαγγελματική εξέλιξη.

Δε θα μπορούσα να ξεχάσω τους φίλους μου από το εργαστήριο Οργανικής Χημείας, Βιβή Τρύπου και Αθηνά Γκεσούλη για τη φιλία τους και την υποστήριξή τους οποιαδήποτε στιγμή και αν τη χρειάστηκα. Επίσης, ευχαριστώ τον Μάκη Παπά για την έμπρακτη βοήθεια που μου προσέφερε και τις γνώσεις που μοιράστηκε μαζί μου ιδιαίτερα

στις αναλυτικές τεχνικές. Η προσπάθεια ωστόσο να με μετατρέψει από Βιολόγο σε Χημικό κατέληξε άκαρπη! Επίσης, ευχαριστώ τους πιο δικούς μου ανθρώπους, Νικόλ, Μαρία-Ελευθερία, Άλεξ και Θάνο για τη φιλία τους αλλά κυρίως για τις φορές που με έβγαζαν από τον μικρόκοσμό μου. Η συνεισφορά τους στο να διατηρώ το χαμόγελο μου ακόμη και μετά από μια δύσκολη ημέρα υπήρξε περισσότερο πολύτιμη από όσο φαντάζονται.

Τέλος, το μεγαλύτερο ευχαριστώ οφείλω στους γονείς μου Ευαγόρα και Όλγα καθώς και στα αδέρφια μου Βασίλη και Βικτωρία για την υποστήριξη που μου δείχνουν σε κάθε μου βήμα. Πραγματικοί συμπαραστάτες, γνωρίζουν πλέον για τα αιμοπετάλια καλύτερα και από εμένα!

Μαρία Ε. Τσουμάνη

Ιωάννινα, 2015

Στην οικογένεια μου, με αγάπη

Συντμήσεις

AA	Αραχιδονικό οξύ
ABCA1	Μεμβρανικός μεταφορέας A1
AC	Αδενυλική κυκλάση
ADP	Διφωσφορική αδενοσίνη
AHA	Αμερικανική Καρδιολογική Εταιρεία
Apo	Απολιποπρωτεΐνη
ATP	Τριφωσφορική αδενοσίνη
BSA	Αλβουμίνη από ορό βοδιού
BSS	Σύνδρομο Bernard-Soulier
[Ca²⁺]	Συγκέντρωση του ενδοκυττάριου ασβεστίου
cAMP	Κυκλική μονοφωσφορική αδενοσίνη
cGMP	Κυκλική μονοφωσφορική γουανοσίνη
CD62P	P-σελεκτίνη
CD61	B ₃ υπομονάδα του υποδοχέα α _{IIb} β ₃
CD40L	Προσδέτης του CD40
CK	Κρεατινική κινάση
COX-1	Κυκλοξυγονάση-1
COX-2	Κυκλοξυγονάσης-2
Cu²⁺	Χαλκός
Cys	Κυστεΐνη
DAG	Διακυλογλυκερόλη
DES	Φαρμακευτικά Επικαλυμμένο Stent (Drug Eluting Stent)
DMSO	Διμεθυλοσουλφοξείδιο
EE	Ειδική Ενεργότητα
ELISA	Ενζυμοσύνδετη ανοσοπροσροφητική τεχνική
ESC	Ευρωπαϊκή Καρδιολογική Εταιρεία
ESI	Σύστημα ηλεκτροψεκασμού
FC	Κυτταρομετρία ροής
Fg	Ινωδογόνο
FITC	Ισοθειοκυανική φλουορεσκεΐνη
G	Γουανίνη
GDP	Διφωσφορική γουανοσίνη
Glu	Γλουταμίνη
GM-CSF	Διεγερτικός παράγοντας κοκκιοκυττάρων-μακροφάγων
GP	Γλυκοπρωτεΐνες
GPCRs	Υποδοχείς συζευγμένοι με G-πρωτεΐνες
GTP	Τριφωσφορική γουανοσίνη
HDL	Υψηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνη
HKΓ	Ηλεκτροκαρδιογράφημα
Hs-CRP	Υψηλής ευαισθησίας C-αντιδρώσα πρωτεΐνη
HTB	2-υδροξυ-4-τριφθορομεθυλο-βενζοϊκό οξύ
ICAM1	Ενδοκυτταρικό μόριο προσκόλλησης 1
IDL	Ενδιάμεσης πυκνότητας λιποπρωτεΐνη
IL-1b	Ιντερλευκίνη 1b

IP₃	Τριφωσφορική ινοσιτόλη
JAMs	Συνενωτικά μόρια προσκόλλησης
LDL	Χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνη
LIBS	Ligand-Induced Binding Sites
Lp(a)	Λιποπρωτεΐνη a
Lp-PLA₂	Λιποπρωτεϊνική φωσφολιπάση A ₂
LPS	Λιποπολυσακχαρίτης
Lyso-PC	Λυσοφωσφατιδυλοχολίνη
LTA	Συσσωρευομετρία με μετάδοσης φωτός
MCP-1	Χημειοτακτική πρωτεΐνη-1 των μονοκυττάρων
MPR4	Πολυφαρμακευτική αντίσταση πρωτεΐνης 4
MFI	Μέση ένταση φθορισμού
MPO	Μυελοϋπεροξειδάση
MRM	Παρακολούθηση πολλαπλής αντίδρασης
Mrna	Αγγελιοφόρο ριβονουκλεϊκό οξύ
NF-κB	Πυρηνικός παράγοντας-κB
NO	Μονοξείδιο του αζώτου
NO₂	Διοξείδιο του αζώτου
NSAIDs	Μη στεροειδή αντιφλεγμονώδη φάρμακα
OEM	Οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου
ΟΣΣ	Οξύ στεφανιαίο σύνδρομο
OxLDL	Οξειδωμένη LDL
OxPL	Οξειδωμένα φωσφολιπίδια
ΠΑΝ	Περιφερική αρτηριακή νόσος
PAF	Παράγοντας ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων
PARs	Ενεργοποιημένοι υποδοχείς των πρωτεασών
PBS	Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών
PC	Φωσφατιδυλοχολίνη
PDGF	Αυξητικός παράγοντας των αιμοπεταλίων
PECAM-1	Προσκολλητικό μόριο των αιμοπεταλίων και των ενδοθηλιακών κύτταρων
PF4	Αιμοπεταλιακός παράγοντας 4
PGE₂	Προσταγλανδίνη E ₂
PGI₂	Προσταγλανδίνη I ₂
PI	Φωσφατιδυλοϊνοσιτόλη
PIP₂	4,5-δισφωσφορική-φωσφατιδυλοϊνοσιτόλη
PC	Φωσφατιδυλοχολίνη
PE	Φωσφατιδυλοαιθανολαμίνη
PKC	Πρωτεϊνική κινάση C
PL	Φωσφολιπίδια
PLC	Φωσφολιπάση C
PON-1	Παραοξονάση 1
PP	Πρωτεϊνική φωσφατάση
PPIs	Αναστολείς της αντλίας πρωτονίων
PPP	Πλάσμα φτωχό σε αιμοπετάλια
PRI	Δείκτες αιμοπεταλιακής δραστηριότητας
PRP	Πλάσμα πλούσιο σε αιμοπετάλια

PRU	Μονάδες αιμοπεταλιακής δραστηριότητας
PS	Φωσφατιδυλοσερίνη
PSGL-1	Γλυκοπρωτεϊνικός προσδέτης της P-σελεκτίνης
RGD	Αργινίνη/Γλυκίνη/Ασπαρτικό οξύ
SC	Επιφάνεια προσκόλλησης αιμοπεταλίων
Ser, S	Σερίνη
sGPVI	Διαλυτή GPVI
Shear stress	Διατμητική τάση
sP-σελεκτίνη	Διαλυτή P-σελεκτίνη
TCA	Τριχλωροξικό οξύ
TF	Ιστικός παράγοντας
TG	Τριγλυκερίδια
TGF-β	Μετασχηματίζων αυξητικός παράγοντας-β
Thr	Θρεονίνη
TNF-α	Παράγοντας νέκρωσης των όγκων-α
Tpa	Ιστικός ενεργοποιητής του πλασμινογόνου
TPR	Χρόνος αρχικής προσκόλλησης αιμοπεταλίων
TRAP-14	Δραστικό πεπτίδιο του υποδοχέα της θρομβίνης-14
TS	Συνθάση του θρομβοξανίου
TSP1	Θρομβοσπονδίνη
TxA₂	Θρομβοξάνιο A ₂
VASP	Αγγειοδιασταλτική-επαγόμενη φωσφοπρωτεΐνη
VCAM-1	Προσκολλητικό μόριο του αγγειακού τοιχώματος-1
VEGF	Αυξητικός παράγοντας των ενδοθηλιακών κυττάρων του αγγείου
VHDL	Πολύ υψηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνες
VLDL	Πολύ χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνες
VWf	Παράγοντας von Willebrand

Συντμήσεις κλινικών μελετών που περιλαμβάνονται στο κείμενο:

- ♦ **CHARISMA**: Clopidogrel for High Atherothrombotic Risk and Ischemic Stabilization, Management and Avoidance
- ♦ **CLARITY-TIMI 28**: CLopidogrel as Adjunctive Reperfusion Therapy - Thrombolysis In Myocardial Infarction Study 28
- ♦ **CLEAR PLATELETS**: Clopidogrel Loading with Eptifibatide to Arrest PLATELET reactivity
- ♦ **COMMIT**: Clopidogrel and Metoprolol in Myocardial Infarction Trial
- ♦ **CREDO**: Clopidogrel for the Reduction of Events During Observation trial
- ♦ **CURE**: Clopidogrel in Unstable angina to prevent Recurrent ischemic Events
- ♦ **CURRENT-OASIS 7**: Clopidogrel Aspirin Optimal Dose Usage to Reduce Recurrent Events— Seventh Organization to Assess Strategies in Ischemic Symptoms
- ♦ **DAPT**: Dual Antiplatelet Therapy
- ♦ **GRAVITAS**: Gauging Responsiveness with A VerifyNow assay-Impact on Thrombosis And Safety
- ♦ **HOPE**: Heart Outcomes Prevention Evaluation

- ◆ **ISIS-2:** International Study of Infarct Survival-2
- ◆ **JUMBO:** Joint Utilization of Medications to Block Platelets Optimally
- ◆ **PEGASUS TIMI 54:** Prevention of Cardiovascular Events in Patients With Prior Heart Attack Using Ticagrelor Compared to Placebo on a Background of Aspirin-**TIMI 54**
- ◆ **PLATO:** Platelet Inhibition and Patient Outcomes
- ◆ **PREPARE POST STENTING:** Platelet Reactivity in Patients and Recurrent Events **POST STENTING**
- ◆ **RESPOND:** Response to ticagrelor in clopidogrel nonresponders and responders and effect of switching therapies
- ◆ **SWAP:** SWitching Anti Platelet
- ◆ **TIMI 11B:** Thrombolysis in Myocardial Infarction 11B
- ◆ **TRACER:** Thrombin Receptor Antagonist for Clinical Event Reduction in Acute Coronary Syndrome
- ◆ **TRA 2P–TIMI 50:** Thrombin receptor Antagonist in Secondary Prevention of atherothrombotic ischemic events
- ◆ **TRILOGY ACS:** TaRgeted platelet Inhibition to cLarify the Optimal strateGy to medicallY manage Acute Coronary Syndromes
- ◆ **TRITON–TIMI 38:** Trial to Assess Improvement in Therapeutic Outcomes by Optimizing Platelet Inhibition With Prasugrel–Thrombolysis In Myocardial Infarction 38

Πίνακας περιεχομένων

Πρόλογος.....	ix
Συντμήσεις.....	xv
1. ΑΙΜΟΠΕΤΑΛΙΑ.....	1
2. ΥΠΟΔΟΧΕΙΣ ΤΩΝ ΑΙΜΟΠΕΤΑΛΙΩΝ	5
2.1. Εισαγωγή	5
2.2. Υποδοχείς που συμμετέχουν στην αρχική φάση της αιμοπεταλιακής στρατολόγησης στο σημείο της αγγειακής βλάβης	9
2.3 Υποδοχείς που συμμετέχουν στην προσκόλληση και συσσώρευση των αιμοπεταλίων	11
2.3.1. Αιμοπεταλιακοί υποδοχείς του κολλαγόνου	11
2.4. Υποδοχείς που συμμετέχουν στη φάση της ενίσχυσης του φαινομένου της προσκόλλησης και συσσώρευσης των αιμοπεταλίων	18
2.4.1 Οι αιμοπεταλιακοί υποδοχείς P2.....	19
2.4.2.Υποδοχείς του θρομβοξανίου.....	26
2.4.3. Υποδοχείς της προσταγλανδίνης E ₂ (PGE ₂).....	26
2.4.4. Υποδοχείς της προσταγλανδίνης I ₂ (PGI ₂).....	27
2.4.5. Υποδοχείς της θρομβίνης.....	28
2.5. Υποδοχείς που συμμετέχουν στη σταθεροποίηση της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων	31
2.5.1. Οι υποδοχείς των Eph κινασών.....	31
2.5.2. Η Gas-6 πρωτεΐνη και οι υποδοχείς της.....	32
2.5.3. Η υπεροικογένεια των τετρασπανινών	32
2.5.4. Ο υποδοχέας-περισυλλέκτης CD36.....	33
2.5.5. Ο υποδοχέας TLT-1	34
2.5.6. Ο υποδοχέας PEAR1	34
2.5.7. Σύμπλεγμα P-σελεκτίνη/PSGL-1	34
2.5.8. Σύμπλεγμα CD40/CD40L	34
2.6. Υποδοχείς που εμπλέκονται στη μειορύθμιση της ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων	35
3. ΑΙΜΟΠΕΤΑΛΙΑ ΚΑΙ ΚΑΡΔΙΑΓΓΕΙΑΚΗ ΝΟΣΟΣ	37
3.1 Εισαγωγή	37

3.2. Ο ρόλος των αιμοπεταλίων στην αθηροσκλήρωση	39
3.3. Ο ρόλος των αιμοπεταλίων στη φλεγμονή. Πως σχετίζεται με την καρδιαγγειακή νόσο;.....	42
3.4. Ο ρόλος των αιμοπεταλίων στην αθηροθρόμβωση. Η παθοφυσιολογία των ΟΣΣ	45
4. ΑΝΤΙΑΙΜΟΠΕΤΑΛΙΑΚΗ ΘΕΡΑΠΕΙΑ.....	57
4.1 Εισαγωγή	57
4.2 Αναστολείς της COX-1.....	62
4.2.1 Ασπιρίνη	64
4.2.2 Τριφλουζάλη	68
4.3. Ανταγωνιστές του υποδοχέα P2Y ₁₂ του ADP.....	69
4.3.1 Κλοπιδογρέλη	71
4.3.2. Πρασουγρέλη.....	77
4.3.3. Τικαγρελόρη.....	78
4.3.4. Καγρελόρη.....	80
4.4 Ανταγωνιστές του υποδοχέα αIIbβ ₃	81
4.5 Αναστολείς των φωσφοδιεστερασών.....	83
4.6 Ανταγωνιστές του υποδοχέα της θρομβίνης PAR-1	84
4.7 Νεότεροι αντιαιμοπεταλιακοί παράγοντες υπό διερεύνηση	85
4.8. Η αντιαιμοπεταλιακή αγωγή στα οξέα στεφανιαία σύνδρομα σήμερα	85
5. ΤΟ ΦΑΙΝΟΜΕΝΟ ΤΗΣ ΑΝΤΙΣΤΑΣΗΣ	89
5.1 Εισαγωγή	89
5.2 Αντίσταση στην ασπιρίνη.....	90
5.2.1. Μηχανισμοί που οδηγούν στην αντίσταση στην ασπιρίνη	91
5.2.2. Εργαστηριακή διερεύνηση της αντίστασης στην ασπιρίνη	95
5.3 Αντίσταση στην κλοπιδογρέλη.....	98
5.3.1 Μηχανισμοί που οδηγούν στην αντίσταση στην κλοπιδογρέλη.....	99
5.3.2. Εργαστηριακή διερεύνηση της αντίστασης στην κλοπιδογρέλη	102
5.4 Αντίσταση στην πρασουγρέλη	104
5.5 Αντίσταση στην τικαγρελόρη	104
6. ΠΛΕΙΟΤΡΟΠΙΚΕΣ ΔΡΑΣΕΙΣ ΑΝΤΙΑΙΜΟΠΕΤΑΛΙΑΚΩΝ ΦΑΡΜΑΚΩΝ.....	105

6.1. Εισαγωγή	105
6.2. Πλειοτροπικές δράσεις των θεινοπυριδινών	105
6.3. Πλειοτροπικές δράσεις της τικαγρελόρης.....	109
ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ	113
ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	115
1. Συσσωρευομετρία οπτικής διαπερατότητας (Light transmittance aggregometry, LTA).....	117
2. Εκτίμηση της απόκρισης στους P2Y ₁₂ ανταγωνιστές με τη μελέτη της φωσφορυλίωσης της φωσφοπρωτεΐνης VASP (vasodilator stimulated phosphoprotein)	122
3. Προσδιορισμός της μεμβρανικής έκφρασης της P-σελεκτίνης και της έκφρασης του υποδοχέα α _{IIb} β ₃ με κυτταρομετρία ροής (Flow Cytometry, FC)	126
4. Σύστημα μελέτης της προσκόλλησης κυττάρων υπό συνθήκες ροής (Σύστημα Cellix)	129
5. Προσδιορισμός εκκρινόμενων δεικτών της ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων	133
6. Μέθοδος ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay).....	140
6.1. Ανοσοενζυμικός προσδιορισμός του TxB ₂	141
6.2. Ανοσοενζυμικός προσδιορισμός του 11- δεϋδρο TxB ₂ στα ούρα.....	145
6.3. Ανοσοενζυμικός προσδιορισμός της διαλυτής P- σελεκτίνης.....	147
7. Ενζυμικός φωτομετρικός προσδιορισμός της ολικής χοληστερόλης	151
8. Προσδιορισμός HDL χοληστερόλης.....	152
9. Προσδιορισμός τριγλυκεριδίων.....	153
10. Προσδιορισμός της κρεατινίνης στα ούρα με τη χρωμομετρική μέθοδο Fixed Time χωρίς αποπρωτεϊνοποίηση (τροποποιημένη μέθοδος).....	155
11. Απομόνωση των λιποπρωτεϊνών με διαδοχικές υπερφυγοκεντρήσεις	156
12. Προσδιορισμός των πρωτεϊνών με τη μέθοδο BCA.....	159
13. Προσδιορισμός της ενεργότητας της Lp-PLA ₂	160
14. Μελέτη της αλληλεπίδρασης της κλοπιδογρέλης με την Lp-PLA ₂ με τη μέθοδο της φασματοσκοπίας φθορισμού.....	163
15. Μελέτη της πιθανής συμμετοχής της Lp-PLA ₂ στην αποικοδόμηση της κλοπιδογρέλης με τη μέθοδο της υγρής χρωματογραφίας/φασματομετρίας μάζας (LC/MS-MS).....	167

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ..... 173

1. Μελέτη της απόκρισης των αιμοπεταλίων στην ασπιρίνη και την κλοπιδογρέλη	175
2. Σχεδιασμός της μελέτης.....	175
3. Δημογραφικά, κλινικά και βιοχημικά χαρακτηριστικά του πληθυσμού της μελέτης.....	177
4. Μελέτη των αντιθρομβωτικών και πλειοτροπικών δράσεων της ασπιρίνης...	178
4.1. Διερεύνηση της αντίστασης στην ασπιρίνη.....	178
4.2. Επίδραση της ασπιρίνης στη συσσώρευση στο TRAP και η πιθανή συσχέτιση με την αντίσταση	179
4.3. Μελέτη της δράσης της ασπιρίνης στην έκκριση αιμοπεταλιακών παραγόντων. Συσχέτιση με την αντίσταση.....	181
5. Μελέτη των αντιθρομβωτικών και πλειοτροπικών δράσεων της κλοπιδογρέλης	190
5.1. Απόκριση των ασθενών στην κλοπιδογρέλη	190
5.2. Επίδραση της κλοπιδογρέλης στη συσσώρευση των αιμοπεταλίων σε διάφορους αγωνιστές.....	192
5.3. Μελέτη της δράσης της κλοπιδογρέλης στην έκφραση και έκκριση αιμοπεταλιακών παραγόντων. Συσχέτιση με την αντίσταση.....	195
5.4. Σύγκριση της αντιαιμοπεταλιακής δράσης της τικαγρελόρης έναντι της κλοπιδογρέλης.....	203
6.1 Μελέτη της επίδρασης της διατημητικής τάσης στην προσκόλληση υπό ροή. 208	
6.2. Σύγκριση του προφίλ προσκόλλησης των αιμοπεταλίων σε υγιείς εθελοντές και ασθενείς με ΟΣΣ.....	211
6.3. Επίδραση της κλοπιδογρέλης στην προσκόλληση των αιμοπεταλίων	215
6.4. Συγκριτική μελέτη της επίδρασης της κλοπιδογρέλης έναντι της τικαγρελόρης στην προσκόλληση των αιμοπεταλίων	220
7. Διερεύνηση της πιθανής αλληλεπίδρασης της κλοπιδογρέλης με την Lp-PLA ₂ ..	222
7.1. Μελέτη της πιθανής αλληλεπίδρασης της κλοπιδογρέλης με την Lp-PLA ₂ με τη μέθοδο της φασματοσκοπίας φθορισμού	223
7.2. Μελέτη της πιθανής συμμετοχής της Lp-PLA ₂ στην αποικοδόμηση της κλοπιδογρέλης με τη μέθοδο LC/MS-MS.....	228
7.3. Μελέτη της επίδρασης της κλοπιδογρέλης στην ενεργότητα της Lp-PLA ₂ ...	230
7.4. Προσδιορισμός των επιπέδων της Lp-PLA ₂ στο πλάσμα ασθενών με ΟΣΣ..	234

ΣΥΖΗΤΗΣΗ	239
ΠΕΡΙΛΗΨΕΙΣ	253
Περίληψη στα ελληνικά	253
Περίληψη στα αγγλικά	255
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	257
ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ-ΑΝΑΚΟΙΝΩΣΕΙΣ ΣΕ ΣΥΝΕΔΡΙΑ	279
ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ ΣΕ ΞΕΝΑ ΠΕΡΙΟΔΙΚΑ	279
ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ ΣΕ ΕΛΛΗΝΙΚΑ ΠΕΡΙΟΔΙΚΑ	279
ΑΝΑΚΟΙΝΩΣΕΙΣ ΣΕ ΣΥΝΕΔΡΙΑ	279

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1. ΑΙΜΟΠΕΤΑΛΙΑ

Τα αιμοπετάλια ή θρομβοκύτταρα είναι τα βασικά κύτταρα του αίματος που είναι υπεύθυνα για την αιμόσταση. Τα αιμοπετάλια είναι μικροσκοπικά με διάμετρο 2-4 μm απύρηννα κυτταρικά τμήματα των μεγακαρυοκυττάρων. Στον ανθρώπινο οργανισμό, περίπου το 70% των αιμοπεταλίων βρίσκονται στην κυκλοφορία ενώ το υπόλοιπο 30% είναι αποθηκευμένο στο σπλήνα. Τα αιμοπετάλια παράγονται με ρυθμό 200 δισεκατομμυρίων τη μέρα, με σκοπό τη διατήρηση του αριθμού τους στο περιφερικό αίμα στη φυσιολογική μέση τιμή των $150 - 400 \times 10^9$ ανά λίτρο αίματος. Δεδομένου ότι δεν διαθέτουν πυρήνα, ο χρόνος ζωής τους στο αίμα δεν ξεπερνά τις 10 μέρες εφ' όσον βέβαια δεν χρησιμοποιηθούν ενδιάμεσα για τη διαδικασία της αιμόστασης. Στη συνέχεια, απομακρύνονται από την κυκλοφορία από τον σπλήνα και το ήπαρ. Σε κατάσταση ηρεμίας τα αιμοπετάλια έχουν μορφή αμφίκυρτου δίσκου κατά την ενεργοποίησή τους όμως αλλάζουν σχήμα και αποκτούν ψευδοπόδια.

Παρ' όλο που φαίνονται σαν κυστίδια στο περιφερικό αίμα, τα αιμοπετάλια είναι υποκυτταρικά σωματίδια με κοκκώδη κυτταροπλασματικό περιεχόμενο, με πολύπλοκη αλλά συνάμα οργανωμένη δομή. Δομικά, τα αιμοπετάλια μπορεί να χωριστούν σε τέσσερις ζώνες με βάση την οργάνωση και τη λειτουργία τους: την περιφερική ζώνη, (2) τη δομική ζώνη, (3) τη ζώνη των οργανιδίων και τη μεμβρανική ζώνη ή σύστημα (Εικόνα 1.1).

Η περιφερική ζώνη αποτελείται από την εξωκυτταρική και ενδοκυτταρική κυτταρική μεμβράνη που περιβάλλεται από το γλυκοκάλυκα και ένα καναλοειδές σύστημα που καλείται ανοιχτό καναλοειδές σύστημα. Το ανοιχτό καναλοειδές σύστημα είναι υπεύθυνο για τη μοριακή ανταλλαγή με το εξωκυτταρικό περιβάλλον και συγκεκριμένα με τη σημαντική απελευθέρωση μορίων κατά τη διάρκεια της εκκριτικής φάσης των αιμοπεταλίων μετά από την ενεργοποίησή τους. Η κυτταρική μεμβράνη των αιμοπεταλίων έχει πάχος 7-9 nm και είναι διάτρητη από ένα σύστημα μικροσωληνίσκων, το οποίο αυξάνει εντυπωσιακά την έκταση αλλά και τη λειτουργικότητά της. Προέρχεται από το ενδοπλασματικό δίκτυο των μεγακαρυοκυττάρων και αποτελεί φυσικό και χημικό φραγμό που χωρίζει το εσωτερικό του κυττάρου από τις διάφορες εξωτερικές επιδράσεις. Επιπλέον επιτελεί μια ακόμη ουσιαστική λειτουργία μεταδίδοντας μηνύματα και επιδράσεις από το εξωτερικό περιβάλλον στο εσωτερικό του κυττάρου. Επιπρόσθετα, η κύρια λειτουργία της

μεμβράνης των αιμοπεταλίων είναι να επιτρέπει την ενεργό δίοδο ιόντων και μεταβολιτών, παρά να λειτουργεί ως φραγμός. Η ιδιότητα αυτή αποδίδεται στην ύπαρξη της αντλίας Na/K αλλά και άλλων αντλιών, οι οποίες είναι υπεύθυνες για τη διατήρηση του ελέγχου της διακίνησης των διαφόρων ιόντων διά της μεμβράνης. Η μεμβράνη των αιμοπεταλίων έχει ασύμμετρη όψη και δομή. Τα κύρια συστατικά της είναι τα λιπίδια (35%), οι πρωτεΐνες (57%) και οι υδατάνθρακες (8%), ενώ στην εξωτερική της επιφάνεια υπάρχει πλήθος υποδοχέων. Πιο συγκεκριμένα, αποτελείται από τρεις στιβάδες, δύο φωσφολιπιδικές και μια πρωτεϊνική που βρίσκεται ανάμεσά τους. Η λιπιδική στιβάδα απαρτίζεται εξωτερικά από σφινγκομυελίνη και φωσφατιδυλοχολίνη¹, με ουδέτερο ηλεκτρικό φορτίο και δεν παίρνει μέρος στην αιμόσταση ενώ εσωτερικά αποτελείται κυρίως από φωσφατιδυλοσερίνη (PS) και φωσφατιδυλοαιθυλαμίνη (PE) και έχει αρνητικό ηλεκτρικό φορτίο. Κατά την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων η εσωτερική στιβάδα ξεδιπλώνεται προς τα έξω αποκαλύπτοντας με αυτό τον τρόπο τους υποδοχείς τους.

Η δομική ζώνη βρίσκεται κάτω από την περιφερική ζώνη και αποτελείται από τον κυτταροσκελετό. Η ακτίνη του κυτταροσκελετού είναι υπεύθυνη για την αλλαγή του σχήματος των αιμοπεταλίων μετά την ενεργοποίησή τους ενώ οι μικροσωληνίσκοι είναι απαραίτητοι για τη διατήρηση του δισκοειδούς σχήματος. Αρχικά, η φωσφορυλίωση των ελαφριών αλυσίδων της μυοσίνης στη σερίνη 19 της μυοσίνης IIΑ επάγει την ενεργοποίηση της ΑΤΡάσης που επιτρέπει την αλληλεπίδραση μεταξύ μυοσίνης και των νηματίων της ακτίνης. Οι αιμοπεταλιακοί αγωνιστές επάγουν τη σηματοδότηση που είναι υπεύθυνη για τη ταυτόχρονη ενεργοποίηση δύο ρυθμιστικών ενζύμων: της MLC κινάσης (MLCK) και της MLC φωσφατάσης. Τα ένζυμα αυτά ενεργοποιούν τη φωσφορυλίωση της MLC. Στη συνέχεια, οι μικροσωληνίσκοι κατευθύνουν στο κέντρο των αιμοπεταλίων τα κοκκία για την απελευθέρωση του περιεχόμενου τους μέσω του ανοιχτού καναλοειδούς συστήματος. Τελικά, η αλληλεπίδραση της ακτίνης-μυοσίνης οδηγεί στη σύσπαση της ακτίνης του κυτταροσκελετού που είναι απαραίτητη για την αλλαγή του σχήματος, την επέκταση με τα ψευδοπόδια και την έκκριση των κοκκίων.

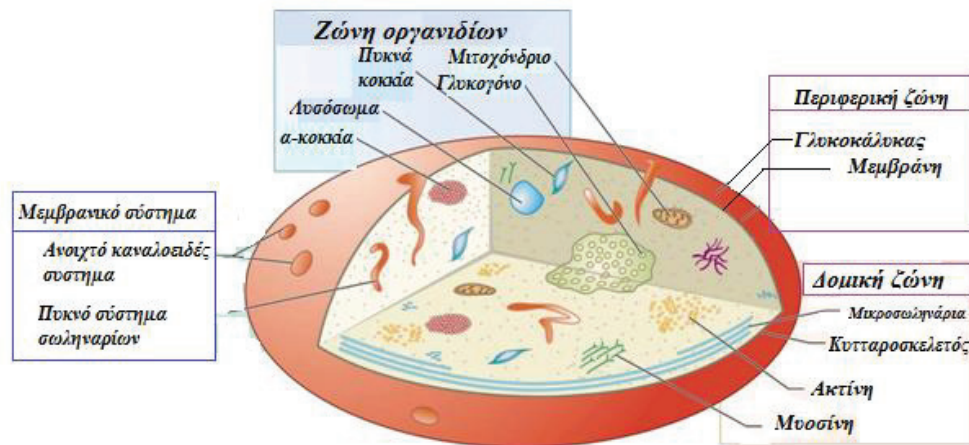
Η ζώνη των οργανιδίων βρίσκεται στο κέντρο των αιμοπεταλίων. Περιέχει πλήθος σωματιδίων, τα οποία αποτελούν κυρίως τόπους αποθήκευσης πρωτεϊνών αλλά και άλλων ουσιών, οι οποίες είναι πρωταρχικής σημασίας για τη λειτουργία των αιμοπεταλίων και βρίσκονται στο κυτταρόπλασμα. Τα κυριότερα από τα σωματίδια αυτά είναι τα α-κοκκία και τα πυκνά κοκκία. Επίσης, υπάρχουν και τα λ- κοκκία.

Τα **α-κοκκία (a-granules)** περιέχουν αιμοστατικά δραστικές ουσίες, όπως τον αιμοπεταλιακό παράγοντα 4 (PF4), τον παράγοντα VIII/ παράγοντα von Willebrand, τον αυξητικό παράγοντα αιμοπεταλιακής προέλευσης (PDGF), άλλους παράγοντες πήξης (ινωδογόνο, παράγοντα V), πρωτεΐνες όπως η φιβρονεκτίνη και η θρομβοσπονδίνη, τον μετασχηματίζων αυξητικό παράγοντα β (TGFβ), το θρομβοξανίο A₂ (TxA₂), άλλα παράγωγα του αραχιδονικού οξέος, την P-σελεκτίνη, τους βλεννοπολυσακχαρίτες, τις όξινες φωσφατάσες και την αδενυλική κυκλάση. Η απελευθέρωση του περιεχομένου των α κοκκίων κατά τη διάρκεια της ενεργοποίησης του αιμοπεταλίου στη θέση του ενδοθηλιακού τραύματος του αγγείου, παίζει σημαντικό ρόλο στην αιμόσταση, στην τελική αποκατάσταση του τραύματος και στην παθογένεια της αθηροσκλήρωσης. Τα **πυκνά ή δ-κοκκία (dense bodies)** αποτελούν την αποθήκη των μη μεταβολικών ουσιών των αιμοπεταλίων, όπως της σεροτονίνης, των ιόντων ασβεστίου και των νουκλεοτιδίων, τα οποία δεν παίρνουν μέρος στις ενδοκυττάριας μεταβολικές διεργασίες. Τα **λυσοσώματα (lysosomes)** ή **λ-κοκκία**. Τα κοκκία αυτά στα αιμοπετάλια του ανθρώπου είναι σχετικά λίγα. Δεν εμφανίζουν ιδιαίτερα μορφολογικά γνωρίσματα και έτσι η διάκρισή τους από τα πυκνά κοκκία είναι δυσχερής. Είναι γεμάτα υδρολυτικά ένζυμα, παρόμοια με αυτά των ουδετεροφίλων, τα οποία εκκρίνονται κατά τη διάρκεια της ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων.

Η μεμβρανική ζώνη ή μεμβρανικό σύστημα περιλαμβάνει ένα πυκνό σύστημα σωληναρίων το οποίο αποθηκεύει τα ιόντα του ασβεστίου (Ca⁺⁺) και ένα σύστημα ενζύμων που εμπλέκεται στη σύνθεση και παραγωγή της προσταγλανδίνης.

Στα κύρια χαρακτηριστικά της δομής των αιμοπεταλίων και της λειτουργίας τους περιλαμβάνονται οι διαφορετικοί υποδοχείς που βρίσκονται στην επιφάνεια τους καθώς και οι αποθηκευμένοι στο εσωτερικό τους παράγοντες των αιμοπεταλίων. Εξωτερικά, στην επιφάνεια των αιμοπεταλίων βρίσκονται οι ιντεγκρίνες όπως οι GPIb και GPα_{IIb}β₃ που επιτρέπουν στα αιμοπετάλια να προσκολλώνται ταχύτατα σε περιοχές που έχουν υποστεί κάποια βλάβη και να συσσωρεύονται μεταξύ τους, αντίστοιχα. Ειδικότερα, η αιμοπεταλιακή προσκόλληση αρχικά γίνεται διαμέσου της σύνδεσης μεταξύ της GPIb και του παράγοντα von Willebrand (vWf), (βρίσκεται διασκορπισμένος στον ορό του αίματος και εκκρίνεται από άλλα αιμοπετάλια) και του κολλαγόνου (μία κοινή δομική πρωτεΐνη στα αγγεία και την εξωκυτταρική μήτρα). Σε αντίθεση, η GP α_{IIb}β₃ πρώτα προσδένεται στο ινωδογόνο και στον vWf, παράγοντες που και οι δύο βρίσκονται σε άλλα αιμοπετάλια και

διασκορπισμένα στον ορό του αίματος. Όλοι οι υποδοχείς των αιμοπεταλίων θα περιγραφούν αναλυτικά στο Κεφάλαιο 2.

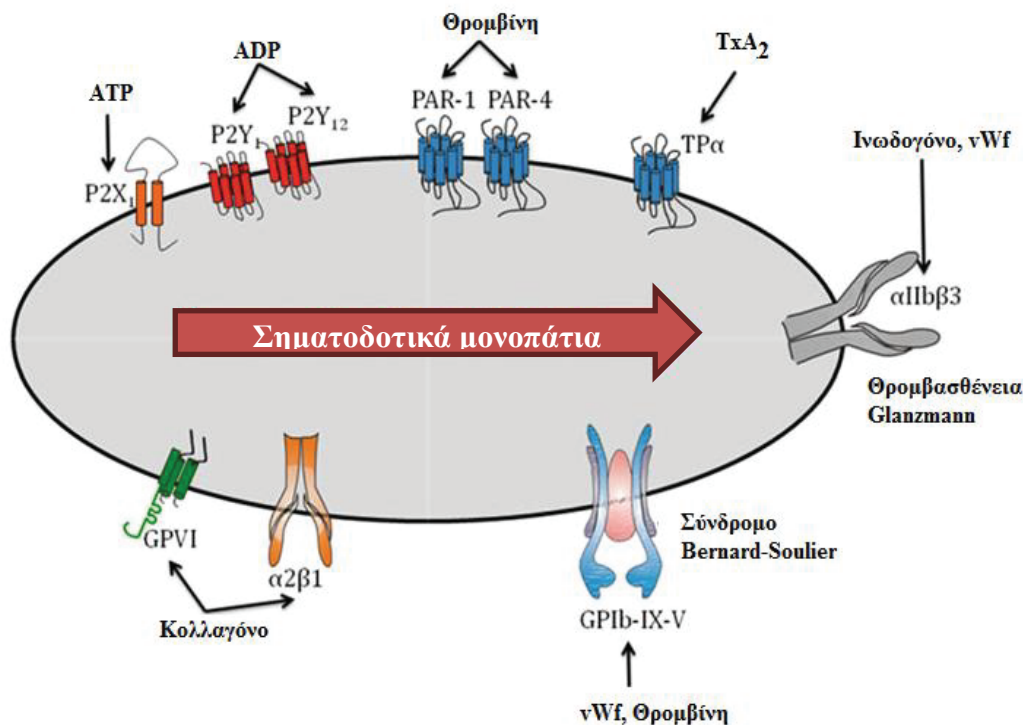


Εικόνα 1.1. Η δομή των αιμοπεταλίων.

2. ΥΠΟΔΟΧΕΙΣ ΤΩΝ ΑΙΜΟΠΕΤΑΛΙΩΝ

2.1. Εισαγωγή

Σε σημεία της αγγειακής βλάβης, οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ υποδοχέα-προσδέματος, είναι απαραίτητες για τη στρατολόγηση των κυκλοφορούντων αιμοπεταλίων στα εκτεθειμένα συστατικά της υποενδοθηλιακής εξωκυτταρικής μήτρας καθώς επίσης και στην επακόλουθη ενεργοποίηση και συσσώρευση των αιμοπεταλίων. Δεν προκαλεί καμία έκπληξη ότι αυτές οι αλληλεπιδράσεις προσδέματος-υποδοχέα προσέλκυσαν το ερευνητικό ενδιαφέρον αφού όπως αποδείχθηκε παίζουν σπουδαίο ρόλο σε βασικές λειτουργίες των αιμοπεταλίων (Εικόνα 2.1).



Εικόνα 2.1. Αλληλεπιδράσεις των υποδοχέων-προσδεμάτων. Επισκόπηση των κύριων υποδοχέων των αιμοπεταλίων καθώς και του τρόπου ενεργοποίησής τους που οδηγεί στην ενεργοποίηση της αIIbβ3. Μεταλλάξεις στα γονίδια των ιντεγκρινών GPIIb-IX-V και αIIbβ3 οδηγούν στο σύνδρομο Bernard-Soulier και στη θρομβασθενία Glanzmann, αντιστοίχως.

Ειδικότερα, στις μικρότερες αρτηρίες και αρτηριόλια όπου οι διατμητικές δυνάμεις είναι υψηλότερες, οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ της ιντεγκρίνης GPIIb και του vWf είναι κρίσιμες.

Τα πολυμερή του vWf αφού συντεθούν από τα ενδοθηλιακά κύτταρα, εναποτίθενται στον υποενδοθηλιακό χώρο.

Ο vWf συνδέεται με τα ινίδια κολλαγόνου, που εκτίθενται στο σημείο της αγγειακής βλάβης, προσδενόμενος στην ιντεγκρίνη GPIb, χωρίς όμως να επιτυγχάνεται σταθερή προσκόλληση των αιμοπεταλίων στο σημείο τραυματισμού του αγγείου. Η σταθερή προσκόλληση των αιμοπεταλίων προϋποθέτει τη σύζευξη και άλλων υποδοχέων-προσδεμάτων (Πίνακας 2.1).

Πίνακας 2.1. Οι υποδοχείς των αιμοπεταλίων στη στρατολόγηση των κυττάρων στο σημείο της αγγειακής βλάβης, την προσκόλληση και τη συσσώρευση.

Υποδοχείς	Οικογένεια	Προσδέματα	Παρατηρήσεις
Στρατολόγηση των αιμοπεταλίων στο σημείο της αγγειακής βλάβης			
Σύμπλοκο GPIb-IX-V	Πλούσιοι σε λευκίνη	vWf, θρομβίνη, FXI, FXII, P-σελεκτίνη, Mac-1, TSP-1	Σύνδρομο Bernard–Soulie
Προσκόλληση αιμοπεταλίων και συσσώρευση			
GPVI	Υπεροικογένεια ιντεγκρινών	Κολλαγόνο, Λαμινίνη	
α2β1		Κολλαγόνο	
α5β1		Φιβρονεκτίνη	
α6β1		Λαμινίνη	
ανβ3		Βιτρονεκτίνη, ινωδογόνο, vWf, Οστεοποντίνη	
αIIbβ3		Ινωδογόνο, ινώδες, vWf, TSP-1, φιβρονεκτίνη, βιτρονεκτίνη	Θρομβασθένεια Glanzmann
CD148	Υποδοχέας με δράση τυροσίνης- φωσφατάσης	Άγνωστο	Ρύθμιση της GPVI
CLEC-2	Υποδοχέας λεκτίνης τύπου C	Ποδοπλανίνη (αιμοπετάλια? CLEC-2?)	

Πρωταρχικής σημασίας είναι συγκεκριμένες ακολουθίες στα εκτεθειμένα ινίδια κολλαγόνου που αναγνωρίζονται από τον υποδοχέα του κολλαγόνου, την ιντεγκρίνη GPVI, μια διαδικασία που πυροδοτεί την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων και ενδυναμώνει τη μικρή ενεργοποίηση που προκύπτει από τη σύζευξη των GPIb–VWF. Τα γεγονότα αυτά μεταξύ άλλων ενεργοποιούν την ενδοκυτταρική σηματοδότηση που οδηγεί σε αλλαγή της διαμόρφωσης της μεμβράνης των β-ιντεγκρινών στην επιφάνεια των αιμοπεταλίων από κατάσταση χαμηλής σε υψηλής συγγένειας. Αυτό αντίστοιχα προκαλεί

ισχυρή αιμοπεταλιακή προσκόλληση στο κολλαγόνο μέσω της ιντεγκρίνης $\alpha_2\beta_1$, η οποία με τη σειρά της πυροδοτεί την εξάπλωση των αιμοπεταλίων καθώς επίσης και τη συσσώρευση των αιμοπεταλίων μέσω αλληλεπιδράσεων της ιντεγκρίνης $\alpha_{IIb}\beta_3$ με το ινωδογόνο, αυτές οι αλληλεπιδράσεις είναι απαραίτητες στο κεντρικό δίκτυο των αγγείων που εκτίθενται σε μέτρια διατμητική τάση.

Για να διατηρηθεί η αιμόσταση, απαιτείται η συνέργεια πολλών ακόμη υποδοχέων από υποδοχείς που αναγνωρίζονται από διαλυτούς διαμεσολαβητές, που απελευθερώνονται και παράγονται από τα αιμοπετάλια μέχρι υποδοχείς για τη θρομβίνη που γεννάται κατά την ενεργοποίηση του μηχανισμού της πήξης, ούτως ώστε να ελέγχεται η ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων και να σταματά η απώλεια αίματος (Πίνακας 2.2).

Η φυσιολογική ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων συνεπάγεται πως τα αιμοπετάλια αυτά είναι ικανά να δημιουργήσουν άμεσες και έμμεσες γέφυρες μεταξύ των παρακείμενων αιμοπεταλίων επιτρέποντας την παρακρινή δράση από τα μόρια που απελευθερώνονται από τα αιμοπετάλια, ευνοώντας την μεταφορά της πληροφορίας όπως συμβαίνει σε μια νευρωνική σύναψη.

Μαζί με το σχηματισμό του ινώδους στα ενεργοποιημένα αιμοπετάλια, αυτή η ισχυρή σύνδεση περιορίζει επίσης τη διάχυση παραγόντων του πλάσματος αποτρέποντας την πρόωρη ινωδόλυση από την πλασμίνη στον ολοένα και μεγαλύτερο σχηματιζόμενο θρόμβο.

Επίσης, οι υποδοχείς των αιμοπεταλίων διαμεσολαβούν τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ του ενεργοποιημένου/ φλεγμονώδους αγγειακού ενδοθηλίου και συμμετέχουν στις προφλεγμονώδεις αλληλεπιδράσεις με τα λευκοκύτταρα στο αγγειακό τοίχωμα.

Πίνακας 2.2. Υποδοχείς των αιμοπεταλίων κατά την ενεργοποίησή τους.

Υποδοχείς	Οικογένεια	Προσδέματα	Σχόλια
P2Y ₁	Συζευγμένοι με G-πρωτεΐνες	ADP	Υψηλή συγγένεια Χαμηλή συγγένεια
P2Y ₁₂		ADP	
PAR1		Θρομβίνη	
PAR4		Θρομβίνη	
Τρα		Θρομβοξάνιο	PAF: Παράγοντας ενεργοποίησης αιμοπεταλίων
PGE ₂ υποδοχέας (EP3)		PGE ₂	
PAF υποδοχείς		1-O-αλκυλ-2-ακετυλ-sn-γλυκερο-3-φωσφοχολίνη (PAF)	
Υποδοχείς λυσοφωσφατιδικού οξέος		Λυσοφωσφατιδικό οξύ	
Υποδοχείς χημειοκινών		Χημειοκίνες	
Υποδοχέας V1a βασοπρεσίνης		Βασοπρεσίνη	
Υποδοχέας αδενοσίνης A2a		Αδενοσίνη	
B2 αδρενεργικός υποδοχέας		Επινεφρίνη	
Υποδοχέας σεροτονίνης		Σεροτονίνη	
Υποδοχέας ντοπαμίνης		Ντοπαμίνη	
P2X1		ATP	
c-mpl		TPO	
Υποδοχέας της λεπτίνης		Λεπτίνη	
Υποδοχέας της ινσουλίνης		Ινσουλίνη	
Υποδοχέας PDGF		PDGF	

Ο διαθέσιμος κατάλογος με τους υποδοχείς των αιμοπεταλίων που παίζουν συγκεκριμένο ρόλο στην αιμοπεταλιακή ενεργοποίηση, πιθανόν είναι ημιτελής. Οι καινοτόμες στρατηγικές της πρωτεομικής και της γενομικής ανάλυσης αναδεικνύουν νέους υποψήφιους υποδοχείς, ακόμη και αν βασίζονται στην παρουσία μιας διαμεμβρανικής και εξωκυτταρικής περιοχής. Συνεπώς, μερικοί από τους υποψηφίους υποδοχείς είναι προς το παρόν «ορφανοί», χωρίς να είναι γνωστό το πρόσδεμά τους, παρ'όλο που μοντέλα ποντικών knock-out ή/και γενετικά δεδομένα (SNPs και μεταλλάξεις) προτείνουν τη συμμετοχή τους σε (παθο)φυσιολογική αιμόσταση.

2.2. Υποδοχείς που συμμετέχουν στην αρχική φάση της αιμοπεταλιακής στρατολόγησης στο σημείο της αγγειακής βλάβης

➤ Το σύμπλοκο GPIb-IX-V

Μετά την αγγειακή βλάβη, τα ινίδια κολλαγόνου εκτίθενται στον υποενδοθηλιακό χώρο μαζί με άλλους υποενδοθηλιακούς παράγοντες όπως ο vWf, η λαμινίνη, οι πρωτεογλυκάνες, η φιβρονεκτίνη, η βιτρονεκτίνη και άλλα. Ενώ πιστευόταν πως ο υποενδοθηλιακός vWf προσδένεται στο κολλαγόνο VI, τα εκτεθειμένα ινίδια κολλαγόνου τύπου I και III μπορούν περαιτέρω να στρατολογούν τον κυκλοφορούντα vWf, παρέχοντας ένα δίκτυο που αποτελείται από αλυσίδες πολυμερών vWf οι οποίες μπορούν να δεσμευθούν στο γλυκοπρωτεϊνικό υποδοχέα των αιμοπεταλίων Iba (GPIba), δίνοντας το έναυσμα για την κύλιση των αιμοπεταλίων στο κατεστραμμένο ενδοθήλιο.

Βιοχημικά, υπάρχουν τέσσερις διαμεμβρανικές πρωτεΐνες, η GPIba (135 kDa), η GPIbβ (26 kDa), η GPIX (20 kDa), και η GPV (82 kDa), οι οποίες συναθροίζονται στην επιφάνεια των μεγακαρυοκυττάρων του μυελού των οστών για να δημιουργήσουν τελικά τον λειτουργικό υποδοχέα GPIb. Οι τέσσερις υπομονάδες κωδικοποιούνται από γονίδια που χαρτογραφούνται στο χρωμόσωμα 17p12 (GPIBA), 22q11.2 (GPIBB), 3q29 (GP5), και 3q21 (GP9). Τα γονίδια αυτά ανήκουν στην οικογένεια των πρωτεϊνών πλούσιων σε λευκίνη και εκφράζονται σχεδόν αποκλειστικά στα αιμοπετάλια, με εξαίρεση την ασθενή τους έκφραση στα ενδοθηλιακά κύτταρα. Ένα σύμπλοκο του GPIb σχηματίζεται από δύο αλυσίδες του GPIba, 2 GPIbβ, 2 GPIX και 1 GPV (2 :2 :2 :1). Η συνοχή του συμπλόκου GPIb-IX-V εξαρτάται από μία συνοδό πρωτεΐνη στο ενδοπλασματικό δίκτυο, την gr96 (grp94, HSP90b1). Οι GPIbβ, και IX βρίσκονται σε 25.000 αντίγραφα στο αιμοπετάλιο ενώ η GPV σε 12.500 αντίγραφα. Οι GPIba, GPIbβ, και GPIX είναι στενά συνδεδεμένες και απαιτούνται όλες ώστε να επαρκεί η βιοδιαθεσιμότητα του GPIb. Έλλειψη μιας μόνο υπομονάδας μειώνει δραματικά την έκφραση όλου του συμπλόκου. Η απουσία της GPV ούτε παρεμποδίζει την έκφραση της GPIb ούτε επηρεάζει την αλληλεπίδρασή της με τον vWf. Αντίθετα, παίζει σπουδαίο ρόλο στην πρόσδεση της θρομβίνης στην GPIba. Η GPIba περιέχει 8 περιοχές πλούσιες σε λευκίνη, μία αρνητικά φορτισμένη περιοχή που περιέχουν θεικές τυροσίνες, μία O και N-γλυκοζυλιωμένη περιοχή, μία διαμεμβρανική και μία κυτταροπλασματική περιοχή. Η ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων επάγει την παροδική κάθαρση της GPIb από την επιφάνεια των αιμοπεταλίων, ακολουθούμενη από

μια αρχή επανεμφάνιση στε φυσιολογικά επίπεδα, μετά από 30-60 min. Η μετατόπιση φαίνεται πως σχετίζεται με το σχηματισμό GPIb συμπλεγμάτων.

Η εξωκυτταρική περιοχή της GPIb περιλαμβάνει τη θέση πρόσδεσης για τον vWf, την P-σελεκτίνη και Mac-1. Εκτός από το ρόλο στη στρατολόγηση των αιμοπεταλίων πάνω στον vWf, το σύμπλοκο GPIb λειτουργεί ως ένας υποδοχέας για τους παράγοντες πήξης XII, XI, για τη θρομβίνη και για το κινινογόνο υψηλού μοριακού βάρους. Ως εκ τούτου, η GPIb είναι ένας υποδοχέας που συνδέει την πρωτογενή με τη δευτερογενή αιμόσταση. Η πρόσδεση της θρομβίνης με την GPIb φαίνεται να ευνοεί την παρουσίαση της θρομβίνης στον κατάλληλο υποδοχέα της, τον ενεργοποιημένο από πρωτεάσες υποδοχέα (PAR1). Η GPV μπορεί να δρα ως αρνητικός ρυθμιστής της επαγόμενης από τη θρομβίνη ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων καθώς η διάσπαση της θρομβίνης αποκαλύπτει την GPIb-IX και διευκολύνει την πρόσδεση της θρομβίνης στην GPIb. Η GPIb αλληλεπιδρά με την αγγειακή P-σελεκτίνη, αναδεικνύοντας τη λειτουργία της στη φλεγμονώδη διαδικασία που συμμετέχουν τα αιμοπετάλια.

➤ *Το σύνδρομο Bernard-Soulier*

Το σύνδρομο **Bernard-Soulier** (BSS) συνιστά μια διαταραχή λειτουργικότητας των αιμοπεταλίων, όπου διαπιστώνεται ανωμαλία σε τρία γονίδια που κωδικοποιούν την GPIb οδηγώντας σε σοβαρή αιμορραγική διάθεση που συνοδεύεται από μορφολογικές ανωμαλίες των αιμοπεταλίων (τεράστια αιμοπετάλια). Είναι αυτοσωματικό υπολειπόμενο νόσημα, που σημαίνει ότι και οι 2 γονείς θα πρέπει να πάσχουν, για να προκύψει πάσχον παιδί. Είναι σπάνιο σύνδρομο αφού εμφανίζεται σε συχνότητα 1 στο 1.000.000. Το σύνδρομο εμφανίζεται στα νεογέννητα ή στην παιδική ηλικία με συμπτώματα όπως οι επιστάξεις, εύκολοι μωλωπισμοί ή συλорραγίες. Σε μεγαλύτερη ηλικία στα συμπτώματα περιλαμβάνονται η βαριά ή επιμηκυσμένη αιμορραγία στην εμμηνορρυσία, η αιμορραγία μετά από οδοντιατρικές εργασίες ή χειρουργεία και οι αιμορραγίες από το γαστρεντερικό σύστημα. Οι πάσχοντες αποφεύγουν τη χρήση ασπιρίνης, μη στεροειδών αντιφλεγμονωδών φαρμάκων, που μπορούν να επιβαρύνουν τα συμπτώματά τους. Η διάγνωση γίνεται σε εξειδικευμένα κέντρα πήξης- αιμόστασης, ενώ η αντιμετώπιση περιλαμβάνει αντιϊνωδολυτικές φαρμακευτικές ουσίες, ανασυνδυασμένος παράγοντας VIIa, δεσμοπρεσσίνη, ορμονική θεραπεία, σκευάσματα σιδήρου, ακόμα και μεταγγίσεις αιμοπεταλίων, όταν υπάρχει σοβαρή αιμορραγία.

2.3 Υποδοχείς που συμμετέχουν στην προσκόλληση και συσσώρευση των αιμοπεταλίων

2.3.1. Αιμοπεταλιακοί υποδοχείς του κολλαγόνου

Το κολλαγόνο αποτελεί έναν από τους πιο σημαντικούς φυσιολογικούς αγωνιστές των αιμοπεταλίων καθώς επάγει ισχυρά την αιμοπεταλιακή συσσώρευση και είναι άφθονο στον υποενδοθηλιακό χώρο (20-40% των ολικών πρωτεϊνών στην αορτή), το οποίο εκτίθεται στην επιφάνεια του υποενδοθηλιακού χώρου όταν υπάρχει αγγειακή βλάβη. Τα εκτεθειμένα ινίδια κολλαγόνου τύπου I, III, V, και VI καθώς και το κολλαγόνο τύπου IV και VIII διαμέσου της αλληλεπίδρασης τους με τα κυκλοφορούντα αιμοπετάλια συνεισφέρουν στο σχηματισμό του θρόμβου. Παρ'όλο που τα αιμοπετάλια έχουν πολλούς υποδοχείς για το κολλαγόνο όπως η GPVI, $\alpha_2\beta_1$, p65, p47, THICBP, GPIV, η ιντεγκρίνη $\alpha_2\beta_1$ και η GPVI παίζουν το σημαντικότερο ρόλο στην αιμοπεταλιακή προσκόλληση και ενεργοποίηση.

➤ *Η ιντεγκρίνη VI (GPVI)*

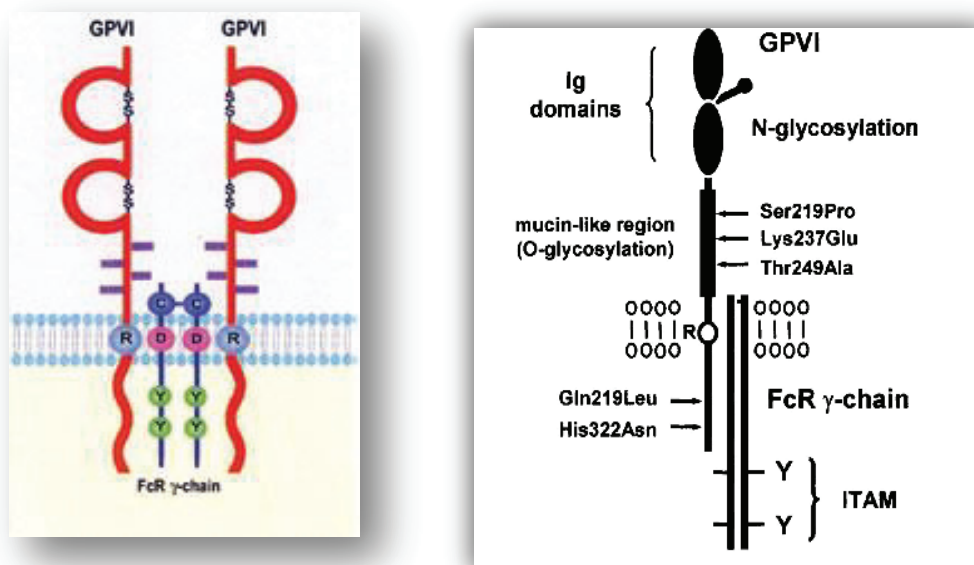
Η ιντεγκρίνη GPVI είναι μια διαμεμβρανική πρωτεΐνη που αποτελείται από την εξωκυτταρική της περιοχή με δύο Ig-like περιοχές, D1 και D2, οι οποίες συνδέονται με μια γλυκοζυλιωμένη πεπτιδική αλυσίδα, μια διαμεμβρανική περιοχή και μια κυτταροπλασματική ουρά. Μεταξύ των Ig-like περιοχών και της διαμεμβρανικής περιοχής υπάρχει μια περιοχή πλούσια σε σερίνη και θρεονίνη (Ser/Thr). Η GPVI είναι μέλος των Ig-like υποδοχέων και το γονίδιο της αποτελείται από 8 εξόνια και βρίσκεται στο χρωμόσωμα 19q13.4 στο ανθρώπινο γονιδίωμα². Εκφράζεται αποκλειστικά στα αιμοπετάλια και τα μεγακαρυοκύτταρα (περίπου 3.700 αντίγραφα ανά αιμοπετάλιο), όπου συνδέεται με τη διαμεμβρανική πρωτεΐνη προσαρμογέα FcR γ . Η FcR γ αλυσίδα κωδικοποιείται στο χρωμόσωμα 1.

Η Ig-like περιοχή είναι υπεύθυνη για την σύνδεση της GPVI στο κολλαγόνο. Επίσης, πολλές υδατανθρακικές αλυσίδες είναι συζευγμένες στην περιοχή πλούσια σε κατάλοιπα σερίνης και θρεονίνης. Μπορούμε να υποθέσουμε ότι η Ig-like περιοχή εκτείνεται έξω από το πολυσακχαριτικό σώμα πάνω από την επιφάνεια των αιμοπεταλίων σχηματίζοντας μια δομή παρόμοια της GPIb. Η γλυκοζυλιωμένη πεπτιδική αλυσίδα συνδέει την D2 περιοχή

με τη διαμεμβρανική περιοχή και κατόπιν σε μία σχετικά μικρή (50 αμινοξέα) κυτταροπλασματική περιοχή η οποία μπορεί να προσδέσει την καλμοδοουλίνη κοντά στην πλασματική μεμβράνη, και τις κινάσες της Src οικογένειας Fyn και Lyn διαμέσου μια περιοχής πλούσιας σε προλίνη κοντά στο τελικό C-κυτταροπλασματικό άκρο. Άλλο ένα δομικό χαρακτηριστικό της GPVI είναι η παρουσία της αργινίνης (Arg252) στη διαμεμβρανική της περιοχή της. Η παρουσία αυτού του φορτισμένου κατάλοιπου αμινοξέος είναι γνωστό ότι αποτελεί χαρακτηριστικό για τις πρωτεΐνες που σχετίζονται με την FcRγ, η οποία περιέχει ένα αρνητικά φορτισμένο κατάλοιπο ασπαργίνης στη διαμεμβρανική της περιοχή. Έτσι η γέφυρα άλατος που δημιουργείται μεταξύ της GPVI και της FcRγ σταθεροποιεί το σύμπλοκο του υποδοχέα (Εικόνα 2.2)³.

Όταν το κολλαγόνο προσδένεται στον υποδοχέα αυτό τότε επάγεται μια σειρά φωσφορυλίσεων που ξεκινά με τη φωσφορυλίωση του μοτίβου ενεργοποίησης ανοσοϋποδοχέων βασισμένων στην τυροσίνη (ITAM: immunoreceptor tyrosine-based activation motif) του υποδοχέα FcRγ (Εικόνα 2.2)⁴. Η φωσφορυλίωση του μοτίβου ITAM από δύο Src κινάσες (Fyn και Lyn) ξεκινούν την αιμοπεταλιακή σηματοδότηση που οδηγεί σε σημαντική αιμοπεταλιακή ενεργοποίηση. Η GPVI εκφράζεται στα αιμοπετάλια σαν ένα μίγμα από μονομερή και διμερή με στοιχειομετρία ενός GPVI σε κάθε ομοιοπολικό διμερές της FcRγ-αλυσίδας. Η συγγένεια του κολλαγόνου για τη μονομερή GPVI είναι πολύ χαμηλή για να μπορέσει να πυροδοτήσει αιμοπεταλιακή ενεργοποίηση σε φυσιολογικές συγκεντρώσεις κολλαγόνου ενώ η διμερής GPVI σχηματίζει μια μοναδική διαμόρφωση με υψηλότερη συγγένεια για το κολλαγόνο.

Τα F(ab)2 θραύσματα αντισωμάτων για αυτή τη δομή επάγουν την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων ενώ τα Fab θραύσματα παρεμποδίζουν την ενεργοποίηση από το κολλαγόνο. Τα αποτελέσματα αυτά προτείνουν ένα σηματοδοτικό μοντέλο όπου η ενεργοποίηση επιτυγχάνεται μέσω της σταυροσύνδεσης των δύο GPVI διμερών.



Εικόνα 2.2. Η δομή της GPVI που περιλαμβάνει δύο εξωκυττάριους βρόχους C-2, μια διαμεμβρανική περιοχή και μια κοντή κυτταροπλασματική ουρά. Βρίσκεται ως σύμπλοκο με τη γ -αλυσίδα του υποδοχέα Fc (GPVI/ FcR γ).

Συνεπώς, η βασική λειτουργία της GPVI είναι όταν συνδέεται στο κολλαγόνο να προκαλεί μια ισχυρή σηματοδότηση μέσω των αλυσίδων της FcR γ επιτρέποντας τη σταθερή προσκόλληση των αιμοπεταλίων στο κολλαγόνο του υποενδοθηλιακού χώρου. Έχει προταθεί επίσης πως η GPVI μπορεί να προσδέσει τη λαμνίνη, σημαντικό συστατικό της βασικής μεμβράνης. Η αλληλεπίδραση με τη λαμνίνη εξαρτάται από την ιντεγκρίνη $\alpha_6\beta_1$ και οδηγεί μεν στην εξάπλωση των αιμοπεταλίων αλλά όχι και στη συσσώρευση των αιμοπεταλίων ίσως γιατί έχει περίπου 10 φορές λιγότερη συγγένεια από αυτή της GPVI με το κολλαγόνο. Η φυσιολογική σημασία της αλληλεπίδρασης της λαμνίνης με τα αιμοπετάλια είναι η αποκατάσταση της βλάβης σε μικρές περιοχές των αγγείων απουσία του θρόμβου.

Η GPVI μπορεί γρήγορα να απελευθερωθεί από την επιφάνεια των αιμοπεταλίων *in vitro* ως απόκριση στη διέγερση από μια ποικιλία ειδικών για την GPVI προσδεμάτων όπως είναι η κονβουλξίνη και το κολλαγόνο απελευθερώνοντας στο υπερκείμενο την περιοχή πρόσδεσης του προσδέματος του GPVI (55 kDa) διατηρώντας το υπόλοιπο στο μίσχο της μεμβράνης (10 kDa). Η απελευθέρωση της GPVI επάγεται επίσης από την ενεργοποίηση του υποδοχέα χαμηλότερης συγγένειας Fc γ RIIA, η οποία επίσης προκαλεί σηματοδότηση διαμέσου του μονοπατιού που είναι ITAM-εξαρτώμενο, από τη μιτοχονδριακή καταστροφή και από την ενεργοποίηση του παράγοντα Xa. Αντίθετα, οι

αγωνιστές που συζευγνύονται με G-πρωτεΐνες όπως η θρομβίνη δεν προκαλούν την απελευθέρωση της GPVI.

Η απελευθέρωση της GPVI από τα αιμοπετάλια εξεργάται από μεταλλοπρωτεΐνάσες και παρεμποδίζεται από τα GM6001, TAPI ή EDTA. Επίσης, παρεμποδίζεται από αναστολείς των Src/Lyn (πρωτεϊνικές φωσφατάσες 1 και 2, PP1 και PP2), Syk και PI3K που εμπλέκονται στο σηματοδοτικό μονοπάτι της GPVI/FcRγ. Η συσσώρευση των αιμοπεταλίων δεν είναι απαραίτητη για την απελευθέρωση της GPVI καθώς αιμοπετάλια από υγιείς εθελοντές που επώαστηκαν με τον $\alpha_{IIb}\beta_3$ αναστολέα που περιέχει την αλληλουχία αργινίνη/γλυκίνη/ασπαρτικό οξύ (RGD), μπορούσαν να επάγουν την απελευθέρωση της ιντεγκρίνης.

Η απελευθέρωση της GPVI ως απόκριση στη σύνδεση της GPVI διαμεσολαβείται από την ADAM10 και πιστεύεται πως εμπλέκεται στη διάσπαση της καλμοδουλίνης από μια θετικά φορτισμένη, αμφιπαθή ακολουθία στην κυτταροπλασματική ουρά του υποδοχέα του κολλαγόνου. Σε αντίθεση, η μιτοχονδριακή καταστροφή επάγει την απελευθέρωση της GPVI διαμέσου της ADAM17.

Η διαλυτή GPVI (sGPVI) αποτελεί έναν εξαιρετικό δείκτη αιμοπεταλιακής ενεργοποίησης στο πλάσμα καθώς είναι ένας ειδικός για τα αιμοπετάλια υποδοχέας, δεν ανιχνεύεται κάποιο υπόλοιπο θραύσμα GPVI στα εν ηρεμία αιμοπετάλια, υποδεικνύοντας ότι τα επίπεδα του υποδοχέα στα φυσιολογικά κυκλοφορούντα αιμοπετάλια είναι σταθερά. Φαίνεται επίσης πως τα επίπεδα της sGPVI στο πλάσμα δεν επηρεάζονται από την ηλικία, το φύλο ή το κάπνισμα. Μελέτες έχουν δείξει πως τα επίπεδα της sGPVI είναι σημαντικά αυξημένα στους ασθενείς με αθηροθρόμβωση (εγκεφαλικό επεισόδιο ή σταθερή στηθάγχη) ή άλλες ασθένειες σε σύγκριση με τους υγιείς εθελοντές⁵.

➤ Η ιντεγκρίνη $\alpha_2\beta_1$

Η ιντεγκρίνη $\alpha_2\beta_1$ (ή VLA2, CD49b/CD29, GPIa/IIa) αποτελείται από μια α_2 αλυσίδα (150 kDa) και μια β_1 αλυσίδα (130 kDa). Η $\alpha_2\beta_1$ στα αιμοπετάλια αλληλεπιδρά μόνο με το κολλαγόνο ενώ σε άλλα κύτταρα δεν είναι ειδική για το κολλαγόνο αφού αλληλεπιδρά με τη λαμινίνη και τη φιβρονεκτίνη. Εκφράζεται σε 1730 ± 500 αντίγραφα για κάθε αιμοπετάλιο, με ένα επίπεδο έκφρασης από 900-4000 αντίγραφα ανά αιμοπετάλιο. Η α_2 υπομονάδα χαρακτηρίζεται από την παρουσία μίας I περιοχής που αποτελείται από ακολουθία 200 καταλοίπων και ονομάστηκε έτσι εξαιτίας της θέσης της ανάμεσα στις

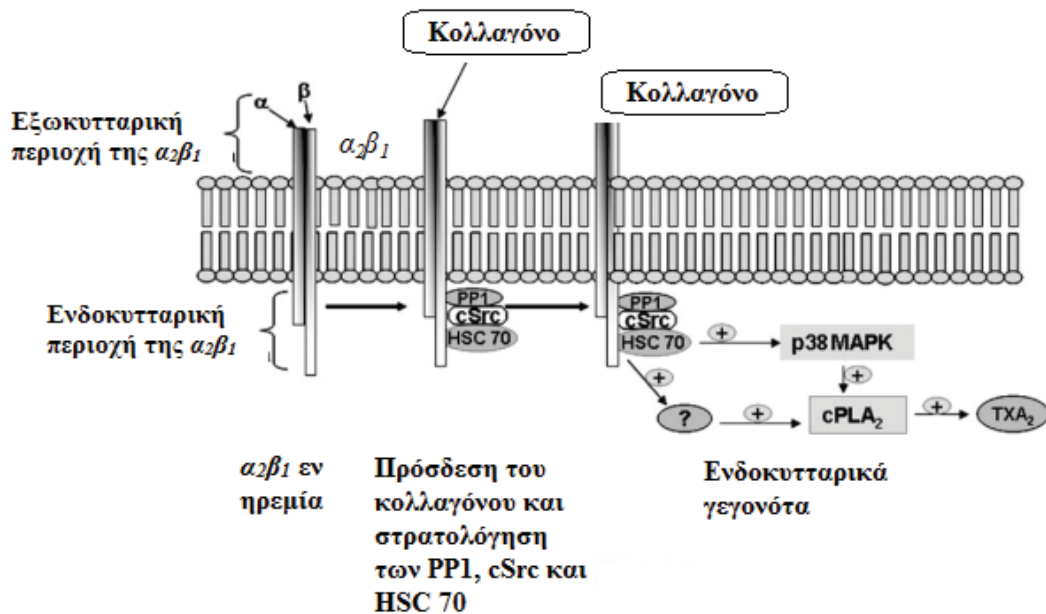
λεπίδες 2 και 3 της β-προπέλας. Η κρυσταλλική δομή της περιοχής αυτής αποκάλυψε πως η περιοχή αυτή περιλαμβάνει επτά έλικες που περιβάλλουν έναν πυρήνα από πέντε παράλληλες β-αλυσίδες, μια μικρή αντιπαράλληλη β-αλυσίδα και μια C-τελική έλικα. Η έλικα 7, μέσα στην περιοχή I, συνδέει το κατιόν γνωστό με την ονομασία MIDAS το οποίο έχει προτίμηση στα Mg^{2+}/Mn^{2+} και προσδένει το κολλαγόνο με το ομόλογο του στην I περιοχή της β υπομονάδας. Δομικές μελέτες της περιοχής I παρουσία και απουσία πεπτιδίου κολλαγόνου δείχνει την σπουδαιότητα του MIDAS για την σύνδεση του προσδέματος και δείχνει την αλλαγή της I περιοχής από κλειστή σε ανοιχτή διαμόρφωση κατά τη σύνδεση με το πρόσδεμα.

Η β υπομονάδα περιέχει μια υβριδική περιοχή η οποία περιλαμβάνει ένα πολυπεπτίδιο κοντά στην I περιοχή και ένα απομακρυσμένο τμήμα που οδηγεί στην περιοχή PSI (Plexin-Semaphorin-Integrin), εκεί όπου βρίσκεται το N-τελικό άκρο. Επίσης, περιέχει πλούσιες σε κυστεΐνη EGF περιοχές. Οι κυτταροπλασματικές περιοχές περιέχουν θέσεις πρόσδεσης για πολλά σηματοδοτικά μόρια.

Πολλές αλληλουχίες του κολλαγόνου τύπου I και III αναγνωρίζονται από την $\alpha_2\beta_1$ όπως τα μοτίβα GFOGER, GLOGER, GASGER, GROGER, και GLOGEN, με διαφορετική συγγένεια το καθένα. Η $\alpha_2\beta_1$ αναγνωρίζει αλληλουχίες στην ανενεργή κατάσταση αλλά η ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων από κλασικούς αγωνιστές μέσω ενδοκυτταρικών σηματοδοτικών μονοπατιών θα ενεργοποιήσει την $\alpha_2\beta_1$ διαμέσου μιας δομικής αναδιάταξης των $\alpha_2\beta_1$ περιοχών, προκαλώντας την αυξορρύθμισή της συγγένειας τους για τα προσδέματα⁶. Για παράδειγμα, το δομικό μοτίβο GFOGER του κολλαγόνου του αγγειακού τοιχώματος, του κολλαγόνου τύπου I και IV, φαίνεται πως προσδένει την “ανενεργή” $\alpha_2\beta_1$ με επαρκή συγγένεια για να ξεκινήσει η αιμοπεταλιακή προσκόλληση χωρίς να απαιτείται η παρουσία αγωνιστή. Η “ενεργοποίηση” μπορεί να χαρίσει στην $\alpha_2\beta_1$ μεγαλύτερη ικανότητα στο να προσδένει τύπους κολλαγόνου με λιγότερα άφθονα GFOGER μοτίβα.

Το κολλαγόνο συνδεόμενο με την ιντεγρίνη $\alpha_2\beta_1$ δίνει το έναυσμα για την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων. Η ενεργοποίηση της GPIa/IIa οδηγεί στην ενεργοποίηση της φωσφολιπάσης A_2 . Η υδρόλυση των φωσφολιπιδίων της μεμβράνης από την φωσφολιπάση A_2 απελευθερώνει το αραχιδονικό οξύ, το οποίο μεταβολίζεται από την κυκλοοξυγενάση και την συνθετάση της θρομβοξάνης ώστε να παράγει το TxA_2 , το οποίο ακολούθως οδηγεί στην αύξηση του ενδοκυτταρικού ασβεστίου (Εικόνα 2.3.)⁷. Τα

ενδοκυτταρικά γεγονότα που συνδέονται με την $\alpha_2\beta_1$ μεσολαβούν στην ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων και στην ενεργοποίηση της Src οικογένειας των κινασών, της πρωτεϊνικής φωσφατάσης 1 (PP1) και της Src^{8,9}.



Εικόνα 2.3. Τα ενδοκυτταρικά γεγονότα σηματοδότησης που συμβαίνουν με τη σύνδεση της $\alpha_2\beta_1$ στο κολλαγόνο οδηγούν στην ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων. Η σύνδεση του κολλαγόνου με την εξωκυτταρική περιοχή της $\alpha_2\beta_1$ οδηγεί στη πρόσληψη της PP1, της cSrc και του HSC70. Η δημιουργία αυτού του συμπλόκου συνδέεται με την ενεργοποίηση της GPIa/IIa, η οποία ενεργοποιεί τη cPLA₂. Η ενεργοποίηση της cPLA₂ οδηγεί στο σχηματισμό του TXA₂.

Εν κατακλείδι, τα αιμοπετάλια έχουν δύο κύριους υποδοχείς για το κολλαγόνο: τον $\alpha_2\beta_1$ ο οποίος έχει υψηλότερη συγγένεια για το κολλαγόνο αλλά χρειάζεται ενεργοποίηση για την πλήρη έκφρασή του και τον GPVI που ενεργοποιεί τα αιμοπετάλια. Κινητικές μελέτες που χρησιμοποίησαν ανασυνδιασμένο GPVI έδειξαν πως αυτός ο υποδοχέας έχει ασθενέστερη συγγένεια για το κολλαγόνο από τον $\alpha_2\beta_1$. Κάτω από φυσιολογικές συνθήκες, αυτοί οι δύο υποδοχείς θα μπορούσαν να δρουν συνεργιστικά με την $\alpha_2\beta_1$ να συμβάλει στην προσκόλληση και την GPVI να συμβάλει στην ενεργοποίηση, και οι δύο μαζί στον σχηματισμό του θρόμβου.

➤ **Η ιντεγκρίνη αIIbβ3**

Ο αιμοπεταλιακός υποδοχέας του ινωδογόνου αIIbβ3 είναι η περισσότερο άφθονη ιντεγκρίνη που εκφράζεται στην επιφάνεια των αιμοπεταλίων (40.000-80.000 αντίγραφα ανα αιμοπετάλιο), με μία επιπλέον δεξαμενή που μπορεί να χρησιμοποιηθεί μετά από την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων από κάποιον αγωνιστή.

Οι ώριμες αIIb και β3 υπομονάδες είναι πρωτεΐνες με μέγεθος 148-kDa και 95-kDa, αντίστοιχα. Η αIIbβ3 προσδένεται στον επίτοπο πρωτεϊνών που περιέχουν την RGD αλληλουχία αργινίνη/γλυκίνη/ασπαρτικό οξύ όπως το ινωδογόνο, το ινώδες, ο vWf και η φιβρονεκτίνη. Το κύριο πρόσδεμα της αIIbβ3 είναι το ινωδογόνο, το οποίο έχει συμμετρία δύο κατευθύνσεων, με δύο RGD περιοχές και στα δύο άκρα του μορίου, ιδιότητα που το κάνει ιδανικό για την σύνδεση του ενός αιμοπεταλίου με το άλλο. Ο παράγοντας von Willebrand έχει RGD ομάδες και γι' αυτό μπορεί να προσδένεται σε πολλές πρωτεΐνες της εξωκυτταρικής περιοχής.

Η γλυκοπρωτεΐνη αIIbβ3 είναι ανενεργή στα εν ηρεμία αιμοπετάλια. Ενεργοποιείται κατά την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων και προκαλεί την αιμοπεταλιακή συσσώρευση. Η αλλαγή της ιντεγκρίνης αIIbβ3 από την κατάσταση χαμηλής συγγένειας σε υψηλή θεωρείται το τελικό κοινό μονοπάτι της ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων. Αυτή η αλλαγή είναι απαραίτητη για να μπορέσει η ιντεγκρίνη αIIbβ3 να αλληλεπιδράσει με το ινωδογόνο.

➤ **Η θρομβασθένεια Glanzmann**

Η **θρομβασθένεια Glanzmann** συνιστά διαταραχή λειτουργικότητας αιμοπεταλίων, όπου υπάρχει ανωμαλία στα γονίδια για την ιντεγκρίνη αIIbβ3. Εξαιτίας της έλλειψης ή υπολειτουργίας αυτών των υποδοχέων, τα αιμοπετάλια πάλι δεν μπορούν να προσκολληθούν μεταξύ τους στο σημείο του τραυματισμού, δεν συσσωρεύονται και τελικά δεν σχηματίζεται θρόμβος. Είναι αυτοσωμική υπολειπόμενη διαταραχή, που σημαίνει ότι και οι δύο γονείς πρέπει να πάσχουν, για να μεταδώσουν το νόσημα στο παιδί τους. Όπως και στο BSS, στα συμπτώματα περιλαμβάνονται επιστάξεις, εύκολοι μωλωπισμοί, ουλορραγίες, βαριά ή επιμηνυσμένη αιμορραγία στην εμμηνορρυσία, αιμορραγία μετά οδοντιατρικές εργασίες ή χειρουργεία, αιμορραγίες από το γαστρεντερικό σύστημα.

2.4. Υποδοχείς που συμμετέχουν στη φάση της ενίσχυσης του φαινομένου της προσκόλλησης και συσσώρευσης των αιμοπεταλίων

Οι διαλυτοί αγωνιστές των αιμοπεταλίων παίζουν κρίσιμο ρόλο στην ενεργοποίησή τους και το σχηματισμό του θρόμβου. Το TXA_2 συντίθεται από τα ενεργοποιημένα αιμοπετάλια ενώ το ADP και το ATP απελευθερώνονται από τα κατεστραμμένα ερυθροκύτταρα και τα πυκνά κοκκία των αιμοπεταλίων. Όλα δρουν προς την ενίσχυση της ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων και της προσέλκυσης και άλλων αιμοπεταλίων στο σημείο της αγγειακής βλάβης ούτως ώστε να επιτευχθεί η συσσώρευση των αιμοπεταλίων.

Οι αγωνιστές αυτοί ενεργοποιούν τα αιμοπετάλια μέσω υποδοχέων συζευγμένους με G-πρωτεΐνες (GPCRs), μια οικογένεια υποδοχέων με 7-διαμεμβρανικές περιοχές που μεταδίδουν μηνύματα μέσω των ετεροτριμερών G πρωτεϊνών και μέσω του ιοντικού διαύλου P2X_1 . Ίχνη θρομβίνης που παράγονται κατά την αρχική φάση της πήξης, ενισχύουν την επαγόμενη από τη θρομβίνη ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων μέσω των υποδοχέων PARs, πολύ πριν η διαδικασία της πήξης έρθει σε πέρας. Το ADP θα ελέγχει την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων μέσω δύο υποδοχέων, του P2Y_1 (συζευγμένος με G_q πρωτεΐνες) και του P2Y_{12} (συζευγμένος με G_i πρωτεΐνες), ενώ το ATP θα επάγει γρήγορη ενεργοποίηση μέσω της εισροής ιόντων Ca^{2+} διαμέσου του υποδοχέα P2X_1 . Η θρομβίνη που προσδένεται στην GPIIb θα ενεργοποιήσει ταχύτατα τον υποδοχέα PAR1 στα ανθρώπινα αιμοπετάλια. Ο PAR4 υποδοχέας χρειάζεται υψηλότερες συγκεντρώσεις θρομβίνης για να ενεργοποιηθεί.

Τα προστανοειδή είναι μια οικογένεια βιοδραστικών λιπιδικών διαμεσολαβητών που σχηματίζονται από την κυκλοοξυγονάση που παράγεται από το αραχιδονικό οξύ που απελευθερώνεται από την κυτταρική μεμβράνη. Εμπλέκονται σε πολλές φυσιολογικές λειτουργίες, όπως η συσσώρευση των αιμοπεταλίων, η αγγειοσύσπαση και η αγγειοχάλαση, η τοπική φλεγμονώδης απόκριση και η προσκόλληση λευκοκυττάρων-ενδοθηλιακών κυττάρων.

Η ενίσχυση της ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων από τη σύνθεση του TXA_2 και η πρόσδεση στον υποδοχέα TXA_2 /prostaglandin H_2 receptor (TP) έχει μελετηθεί αρκετά εξαιτίας της ασπιρίνης που δρα σε αυτό το μονοπάτι. Αντιθέτως, η προσταγλανδίνη (PGI_2) και PGD_2 είναι γνωστό πως αναστέλλουν τη συσσώρευση των αιμοπεταλίων ενώ η PGE_2 ενισχύει ή αναστέλλει την απόκριση των αιμοπεταλίων κατά δοσο-εξαρτώμενο τρόπο.

2.4.1 Οι αιμοπεταλιακοί υποδοχείς P2

Τα νουκλεοτίδια πουρίνες και πυριμιδίνες είναι εξωκυτταρικά μόρια σηματοδότησης τα οποία ρυθμίζουν τη λειτουργία από κάθε κύτταρο του σώματος. Απελευθερώνονται από τα κατεστραμμένα κύτταρα ή εκκρίνονται μέσω μη λυτικών μηχανισμών και αλληλεπιδρούν με ειδικούς υποδοχείς στην πλασματική μεμβράνη των κυττάρων. Αυτοί οι υποδοχείς καλούνται P2 και ταξινομούνται σε δύο υποκατηγορίες ανάλογα με τη μοριακή δομή τους: τους υποδοχείς με G-συζευγμένες πρωτεΐνες ή "μεταβοτροπικούς" που ορίζονται ως P2Y και τους ιοντικούς διαύλους που σχηματίζουν σύμπλοκο ή "ιονοτροπικούς" υποδοχείς, που ορίζονται ως P2X. Παρόμοιοι υποδοχείς είναι οι τέσσερις υπότυποι υποδοχείς της αδενοσίνης, A₁, A_{2A}, A_{2B}, A₃.

Οι P2Y υποδοχείς είναι πρωτεΐνες με επτά διαμεμβρανικές έλικες με μοριακό βάρος από 41 μέχρι 53 kDa μετά από γλυκοζυλίωση. Το καρβοξυτελικό άκρο βρίσκεται στην κυτταροπλασματική μεμβράνη ενώ το αμινοτελικό άκρο είναι στο εξωκυτταρικό περιβάλλον. Οι κοινοί μηχανισμοί μεταγωγής σήματος (όπως η ενεργοποίηση της φωσφολιπάσης C και/ή ρύθμιση της αδενυλικής κυκλάσης) ενεργοποιούνται και με τους συγκεκριμένους υποδοχείς. Οκτώ P2Y υποδοχείς έχουν αναγνωρισθεί μέχρι στιγμής: οι P2Y₁, P2Y₂, P2Y₄, P2Y₆, P2Y₁₁, P2Y₁₂, P2Y₁₃ και P2Y₁₄.

Οι ιονοτροπικοί υποδοχείς P2X συμμετέχουν στις ραγδαίες αλλαγές που γίνονται στη διαπερατότητα της μεμβράνης σε μονοσθενή και δισθενή κατιόντα, συμπεριλαμβανομένου του Na⁺, K⁺, τα οποία αποπολώνουν τα διεγερμένα κύτταρα και ενεργοποιούν κυτοσολικά ένζυμα. Οι υποδοχείς P2X ποικίλλουν από 384 έως 595 αμινοξέα και δύο διαμεμβρανικές περιοχές οι οποίες διαχωρίζονται από μία μεγάλη εξωκυτταρική περιοχή. Σε αντίθεση με τους P2Y υποδοχείς, το αμινοτελικό και το καρβοξυτελικό άκρο βρίσκονται στην κυτταροπλασματική πλευρά της πλασματικής μεμβράνης. Επτά P2X υποδοχείς έχουν αναγνωρισθεί μέχρι στιγμής (P2X₁-P2X₇). Σε αντίθεση με τους P2Y υποδοχείς που διαφορετικοί υποδοχείς μπορούν να προσδένουν διαφορετικά νουκλεοτίδια (πχ. οι P2Y₁, P2Y₁₁, P2Y₁₂ και P2Y₁₃ την αδενίνη, οι P2Y₄ και P2Y₆ την ουρακίλη), όλοι οι P2X υποδοχείς είναι ATP υποδοχείς.

Τα ανθρώπινα αιμοπετάλια εκφράζουν τουλάχιστον τρεις υποδοχείς που αλληλεπιδρούν με το ADP και το ATP: τους P2Y₁, P2Y₁₂ και P2X₁. Ως προς το επίπεδο έκφρασης, ταξινομούνται ως ακολούθως: P2Y₁₂ >> P2Y₁ > P2X₁. Επίσης, εκφράζουν μικρή ποσότητα του mRNA και της πρωτεΐνης P2Y₁₄, χωρίς ακόμη να έχει αποσαφηνιστεί ο

ρόλος του υποδοχέα αυτού στην αιμοπεταλιακή λειτουργία. Τα ανθρώπινα αιμοπετάλια εκφράζουν επίσης δύο υποτύπους των υποδοχέων της αδενοσίνης, το A_{2A} και A_{2B} .

Το ADP, ο πρώτος γνωστός μικρού μοριακού βάρους αιμοπεταλιακός παράγοντας, είναι ένας σχετικά ασθενής αιμοπεταλιακός αγωνιστής. Ως τέτοιος, επάγει μόνο την αλλαγή σχήματος των αιμοπεταλίων και την αντιστρεπτή συσσώρευσή τους, την έκκριση των συστατικών των πυκνών κοκκίων των αιμοπεταλίων, την επαγόμενη δευτερογενή συσσώρευση που πολλές φορές παρατηρείται στο πλάσμα πλούσιο σε αιμοπετάλια (PRP) και πυροδοτείται από το θρομβοξανθίο A_2 , του οποίου η σύνθεση διεγείρεται από την αιμοπεταλιακή συσσώρευση. Αυτό το φαινόμενο παρατηρείται στο PRP σε ένα μικρό ποσοστό φυσιολογικών ανθρώπων όπου η συγκέντρωση του Ca^{+} στο πλάσμα διατηρείται σε φυσιολογικά επίπεδα, αλλά είναι πολύ αυξημένη και μπορεί να παρατηρηθεί στους περισσότερους φυσιολογικούς όταν η συγκέντρωση του Ca^{+} στο πλάσμα είναι ψευδώς μειωμένη σε μικρομοριακό επίπεδο, όπως στο PRP σε κίτρινα. Αν και το ADP, όπως προαναφέραμε είναι ένας ασθενής αγωνιστής, το ADP παίζει κύριο ρόλο στην αιμοπεταλιακή λειτουργία καθώς όταν εκκρίνεται από τα πυκνά κοκκία των αιμοπεταλίων, ενισχύει την αιμοπεταλιακή απόκριση που επάγεται από άλλους αγωνιστές και σταθεροποιεί τα συσσωρεύματα αιμοπεταλίων. Η μεταγωγή του σήματος στην οδό που ενεργοποιεί το ADP περιλαμβάνει την αναστολή της αδενυλικής κυκλάσης και την συνακόλουθη παροδική αύξηση στη συγκέντρωση του κυτταροπλασματικού Ca^{+} , εξαιτίας της εισροής των ιόντων Ca^{+} και της κινητοποίησης των εσωτερικών αποθηκών.

Μετά από επίπονη έρευνα και ξεπερνώντας διάφορες τεχνικές δυσκολίες, έχει πλέον καθιερωθεί πως τα αιμοπετάλια εκφράζουν δύο υποδοχείς για το ADP, τον $P2Y_1$ διαμέσου του οποίου γίνεται η παροδική αύξηση του κυτταροπλασματικού Ca^{+} , η αλλαγή του σχήματος των αιμοπεταλίων και η ραγδαία αντιστρεπτή συσσώρευση και τον $P2Y_{12}$ διαμέσου του οποίου γίνεται η αναστολή της αδενυλικής κυκλάσης και ενισχύεται η αιμοπεταλιακή συσσώρευση. Η ταυτόχρονη ενεργοποίηση των G_q και G_i μονοπατιών από το ADP είναι απαραίτητη για την συσσώρευση των αιμοπεταλίων. Το πόσο απαραίτητη είναι έγινε σαφές μετά από παρατηρήσεις ερευνητών πως η αιμοπεταλιακή συσσώρευση ως απόκριση στο ADP μπορεί να αποκατασταθεί με την πρόσδεση της επινεφρίνης στην ανασταλτική G πρωτεΐνη G_2 , στα αιμοπετάλια με ελαττωματικό $P2Y_{12}$, και με την πρόσδεση της σεροτονίνης στην πρωτεΐνη G_q στα αιμοπετάλια με ελαττωματικό $P2Y_1$.

Το ATP, ένας ανταγωνιστής των υποδοχέων P2Y₁ και P2Y₁₂, αναστέλλει την αιμοπεταλιακή ενεργοποίηση από το ADP. Παρ' όλα αυτά διαμέσου της αλληλεπίδρασης του με το P2X₁, μπορεί επίσης να ενεργοποιεί τα αιμοπετάλια επάγοντας μεγάλη εισροή των ιόντων Ca⁺ από το εξωκυττάριο μέσο, η οποία συσχετίζεται με την παροδική αλλαγή του σχήματος των αιμοπεταλίων. Η αιμοπεταλιακή ενεργοποίηση από το ATP ενισχύει την αιμοπεταλιακή απόκριση σε άλλους αγωνιστές, ιδιαίτερα κάτω από συνθήκες ροής οι οποίες χαρακτηρίζονται από υψηλές διατμητικές δυνάμεις (Εικόνα 2.4.).

➤ P2Y₁

Ο ανθρώπινος υποδοχέας P2Y₁ είναι μια πρωτεΐνη 42 kDa η οποία περιέχει 373 κατάλοιπα αμινοξέων και έχει την κλασσική δομή ενός υποδοχέα που συζευγνύεται με G-πρωτεΐνες δηλαδή έχει επτά διαμεμβρανικές περιοχές, και εκφράζεται σε πολλά κύτταρα και ιστούς του ανθρώπινου σώματος συμπεριλαμβανομένου της καρδιάς, των αγγείων, των λείων μυικών κυττάρων, του νευρικού ιστού, τον προστάτη αδένα, τις ωοθήκες και τα αιμοπετάλια. Στα αιμοπετάλια, εκφράζονται περίπου 150 θέσεις πρόσδεσης ανά αιμοπετάλιο.

Τα κατάλοιπα αμινοξέων R333 και R334 στην καρβοξυτελική περιοχή είναι υπεύθυνα για τη σύζευξη του υποδοχέα με την Gq πρωτεΐνη. Το P2Y₁ γονίδιο χαρτογραφείται στο χρωμόσωμα 3q21-q25. Τα τελευταία 39 αμινοξέα είναι σημαντικά για την ενεργοποίηση του P2Y₁ από αγωνιστές. Περίπου το 40% των υποδοχέων P2Y₁ υπάρχουν σε διμερή μορφή, ενώ κατά την έκθεση στους αγωνιστές, γίνονται διμερή το 80-100% των υποδοχέων. Στον P2Y₁ υποδοχέα υπάρχουν το 20-30% των συνολικών περιοχών πρόσδεσης του ADP στην επιφάνεια των αιμοπεταλίων. Επιπλέον, από τη μεμβράνη των αιμοπεταλίων, οι P2Y₁ υποδοχείς βρίσκονται και στο εσωτερικό του αιμοπεταλίου και ειδικότερα στις μεμβράνες των α-κοκκίων και στο ανοιχτό καναλοειδές σύστημα.

Η έκφραση και η λειτουργία του P2Y₁ υποδοχέα εξαρτάται από την αύξηση του cAMP που διαμεσολαβείται από τον A_{2B} υποδοχέα της αδενোসίνης (όπου μειώνεται) και από τα αιμοπετάλια σε συνθήκες τραυματισμού ή στρες *in vivo* (όπου αυξάνεται).

Ο P2Y₁ υποδοχέας παίζει κρίσιμο ρόλο στην αλλαγή του σχήματος των αιμοπεταλίων και στην ταχεία, αντιστρεπτή συσσώρευσή τους που επάγεται από το ADP. Η ενεργοποίηση του υποδοχέα από το ADP οδηγεί στην ενεργοποίηση της β-ισομορφής της φωσφολιπάσης C (PLC) και στην αύξηση του ενδοκυτταρικού Ca⁺, κυρίως μέσω της

απελευθέρωσης των ιόντων ασβεστίου στο κυτταρόπλασμα από τις ενδοκυτταρικές αποθήκες και μερικώς από την εισροή των Ca^{+} από το εξωκυτταρικό μέσο. Επιπλέον, η αλληλεπίδραση της καλμοδουλίνης με το C-τελικό άκρο είναι εξίσου σημαντική.

Η αναστολή της λειτουργίας του υποδοχέα ή κάποια μετάλλαξη στο γονίδιο που κωδικοποιεί τον υποδοχέα P2Y_1 μπορεί να οδηγήσει σε μη συσσώρευση των αιμοπεταλίων καθώς επίσης να μην αλλάξουν το σχήμα τους ως απόκριση στη δράση του ADP. Το ADP είναι περισσότερο ισχυρός αγωνιστής από το ATP και τα 2-μεθυλθειο παράγωγά τους είναι περισσότερο ισχυρά από τα πατρικά μόρια. Τα UTP, UDP, CTP, και GTP είναι ανενεργά. Το ATP είναι ένας μερικός αγωνιστής του υποδοχέα P2Y_1 και σε χαμηλά επίπεδα έκφρασης μπορεί να δρα ως ανταγωνιστής¹⁰.

Μια κοινή μετάλλαξη στον γενετικό τόπο του P2Y_1 είναι ο διμορφισμός 1622AG που σχετίζεται με την αιμοπεταλιακή δραστικότητα στο ADP. Ο γονότυπος αυτός μπορεί να εξηγήσει μερικώς τη διακύμανση στην απόκριση στο ADP, που μπορεί να έχει κλινικές προεκτάσεις σε σχέση με το θρομβωτικό κίνδυνο.

➤ **P2Y_{12}**

Όπως και ο υποδοχέας P2Y_1 , ο P2Y_{12} υποδοχέας χαρτογραφείται στο χρωμόσωμα 3q21-q25. Περιέχει 342 κατάλοιπα αμινοξέων, έχει την κλασική δομή των υποδοχέων που συζευγνύονται με G-πρωτεΐνες, και φαίνεται πως έχει μια μεγαλύτερη ειδικότητα από τον P2Y_1 σε σχέση με τους ιστούς που εκφράζεται, αν και το mRNA του P2Y_{12} ανιχνεύεται και σε άλλους ιστούς συμπεριλαμβανομένου των λείων μυικών κυττάρων και τα μικρογλοιακά κύτταρα τα οποία συμμετέχουν στα αρχικά στάδια της απόκρισης του κεντρικού νευρικού συστήματος σε έναν τραυματισμό. Ο P2Y_{12} υποδοχέας περιέχει δύο σημαντικές N-συνδεδεμένες γλυκοζυλιωμένες περιοχές στο εξωκυτταρικό αμινοτελικό άκρο του που ρυθμίζουν την ενεργοποίηση του. Ο P2Y_{12} υποδοχέας έχει 4 κατάλοιπα κυστεΐνης στις θέσεις 17, 97, 175, και 270. Μελέτες έχουν δείξει τον κρίσιμο ρόλο που παίζει ο σχηματισμός μια δισουλφιδικής γέφυρας μεταξύ των κυστεϊνών στις θέσεις 97 και 175 για την έκφραση του υποδοχέα και ότι οι κυστεΐνες στις θέσεις 17 και 270 είναι στόχοι για τις θειόλες, συμπεριλαμβανομένου των pCMBS και των ενεργών μεταβολιτών των θειενοπυριδινών. Ο P2Y_{12} παίζει κεντρικό ρόλο στην αιμοπεταλιακή λειτουργία.

Το ADP και τα ανάλογα του όπως το 2-μεθυλθειο-ADP και το ¹¹-μεθανοκαρβο-2-μεθυλθειο-ADP, επάγουν την διαμεσολαβούμενη από τον P2Y_{12} υποδοχέα αναστολή της

αδενυλικής κυκλάσης, το ATP και τα ανάλογα τριφωσφατάσης είναι ανταγωνιστές του υποδοχέα, υποδεικνύοντας την ανάγκη για απομάκρυνση των εναπομεινάντων διφωσφορικών και την αποτροπή της παραγωγής διφωσφορικών παραγώγων νουκλεοτιδίων από κυτταρικές εξωνουκλεοσιδάσες. Η διααδενοσίνη 5',5''- P¹², P¹²-τετραφωσφορική, η οποία είναι αποθηκευμένη στα πυκνά κοκκία των αιμοπεταλίων, δρα τόσο ως αγωνιστής όσο και ως ανταγωνιστής του υποδοχέα P2Y₁₂. Ο P2Y₁₂ αναστέλλει την αδενυλική κυκλάση μέσω της ενεργοποίησης μια G_{ai2} πρωτεΐνης η οποία είναι κρίσιμη για την ενεργοποίηση της ιντεγκρίνης αIIbβ3 και την αιμοπεταλιακή συσσώρευση. Επίσης, σημαντικό ρόλο παίζει η φωσφατιδυλοϊνοσιτολική -3-κινάση (PI 3-K) η οποία διεγείρεται από τις υπομονάδες γ και β της πρωτεΐνης Gi. Τα αιμοπετάλια εκφράζουν 4 ισομορφές της PI 3-K: PI 3-Kα, PI 3-Kβ, PI 3-Kδ και PI 3-Kγ. Μελέτες έχουν δείξει πως για τη συσσώρευση των αιμοπεταλίων και την πρόσδεση του ινωδογόνου, ο υπότυπος PI 3-Kγ είναι ο περισσότερο σημαντικός.

Δύο σημαντικοί στόχοι μειορρύθμισης της ενεργοποίησης της PI 3-K είναι η σερινη-θρεονίνη πρωτεϊνική κινάση B/ Akt (PKB/Akt) και η μικρή GTPάση Rap1. Η αλληλεπίδραση του υποδοχέα P2Y₁₂ με το ADP οδηγεί στη φωσφορυλίωση της PKB/Akt σε φυσιολογικά αιμοπετάλια, αλλά όχι σε αιμοπετάλια με έλλειψη της PI 3-Kγ ή της PI 3-Kβ. Η Rap1 φαίνεται πως συνεισφέρει στη διατήρηση της ενεργοποίησης της ιντεγκρίνης αIIbβ3 ενώ η ενεργοποίησή της από τον υποδοχέα P2Y₁₂ δεν απαιτεί την αναστολή της αδενυλικής κυκλάσης αλλά εξαρτάται από την ενεργοποίηση της PI 3-K.

Ο P2Y₁₂ υποδοχέας ενισχύει την κινητοποίηση του κυτταροπλασματικού Ca⁺ που διαμεσολαβείται από τον P2Y₁ και άλλους υποδοχείς και ρυθμίζει τη σηματοδότηση που εξαρτάται από την διακυλογλυκερόλη. Αν αυτή η επίδραση διαμεσολαβείται από την αναστολή της αδενυλικής κυκλάσης ή από την PI 3-K ή από κάτι άλλο δεν έχει προς το παρόν ξεκαθαριστεί. Ενδιαφέρον είναι πως η G_{ai2} φαίνεται να μην είναι απαραίτητη για την κινητοποίηση των ιόντων ασβεστίου καθώς η απόκριση τους στο ADP δεν εξαλείφτηκε στα G_{ai2} knockout ποντίκια.

Οι ασθενείς με συγγενείς ανωμαλίες στον υποδοχέα P2Y₁₂ εμφανίζουν ήπια έως μέτρια αιμορραγική προδιάθεση, που χαρακτηρίζεται από βλεννοδερματικές αιμορραγίες και υπερβολική μετεγχειρητική απώλεια αίματος. Μπορεί κάποιος να καταλάβει αν ο P2Y₁₂ υποδοχέας είναι ελαττωματικός όταν ακόμη και σε υψηλές συγκεντρώσεις (>10μM) το ADP δεν μπορεί να προκαλέσει πλήρη, μη αντιστρεπτή συσσώρευση των αιμοπεταλίων¹⁰.

➤ **P2X₁**

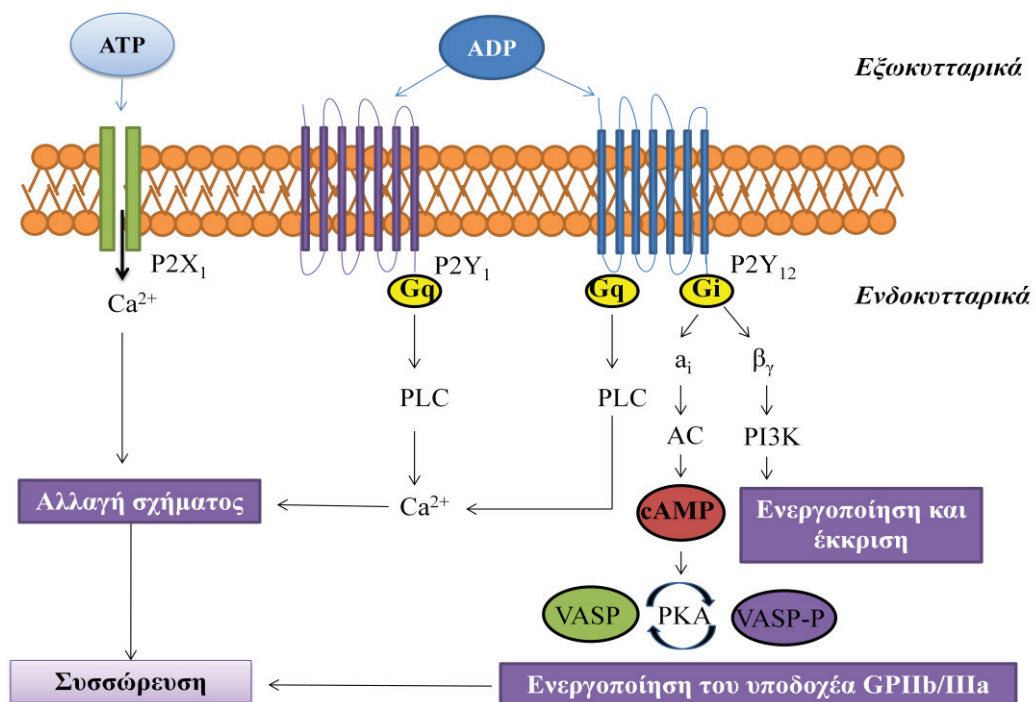
Ο P2X₁ είναι ένας ιοντικός δίαυλος που εκφράζεται κυρίως στα μεγακαρυοκύτταρα και τα αιμοπετάλια. Το γονίδιο χαρτογραφείται στο 17p13.2, περιέχει 12 εξώνια και κωδικοποιεί 399 αμινοξέα που οργανώνονται σε δύο διαμεμβρανικές περιοχές (TM1 και TM2) που διαχωρίζονται από μία μεγάλη εξωκυτταρική περιοχή που περιέχει 10 κατάλοιπα κυστεΐνης. Για πολύ καιρό, οι ερευνητές πίστευαν πως αυτός ο υποδοχέας δεν παίζει ρόλο στην αιμοπεταλιακή λειτουργία. Αυτό συνέβαινε για τρεις λόγους: α) θεωρούνταν ότι είναι υποδοχέας στον οποίο προσδένεται το ADP και έτσι ο ρόλος του διευρευνούνταν στην επαγόμενη από το ADP αιμοπεταλιακή συσσώρευση ενώ τώρα είναι ξεκάθαρο πως ο P2X₁ ενεργοποιείται μέσω του ATP μόνο, β) ο P2X₁ υφίσταται ταχεία απευαισθητοποίηση κατά τη προετοιμασία των δειγμάτων για τη μελέτη της λειτουργίας των αιμοπεταλίων και γ) η έλλειψη ισχυρών και ειδικών ανταγωνιστών του υποδοχέα δεν επέτρεπε τη μελέτη της λειτουργίας του.

Τρία μόρια του ATP προσδένονται στην εξωκυτταρική περιοχή του υποδοχέα P2X₁, πυροδοτώντας αλλαγές στη διαμόρφωση που οδηγούν στη διάνοιξη ενός κατιονικού πόρου, επιτρέποντας ραγδαίες αλλαγές στη διαπερατότητα της μεμβράνης για μονοσθενή ή δισθενή κατιόντα, συμπεριλαμβανομένου των ιόντων Ca²⁺, Na⁺, και K⁺. Η ενεργοποίηση των υποδοχέων P2X₁ προκαλεί παροδική αλλαγή σχήματος, με τα αιμοπετάλια να μετατρέπονται από δισκοειδή σε σφαιρικά. Η ενεργοποίηση του υποδοχέα P2X₁ ενισχύει περαιτέρω την απόκριση των αιμοπεταλίων σε χαμηλές συγκεντρώσεις άλλων αγωνιστών με ταχεία κινητική. Ωστόσο, P2X₁ συμβάλλει εξίσου στην ενεργοποίηση σε χαμηλά και υψηλά επίπεδα του υποδοχέα A₂ του θρομβοξανίου. Σημαντικό είναι πως η ενεργοποίηση του υποδοχέα P2X₁ φαίνεται να είναι απαραίτητη για την ενίσχυση της προσκόλλησης των αιμοπεταλίων και τον σχηματισμό θρόμβων υπό υψηλούς ρυθμούς διάτμησης¹³.

Το 2001, η έρευνα των Rolf και συν. έδειξε πως η απευαισθητοποίηση του P2X₁ υποδοχέα προλαμβάνεται με την προσθήκη μεγάλης συγκέντρωσης απυράσης (ATP-διφωσφουδρολάση E.C.3.6.1.5.), και του ειδικού P2X₁ αγωνιστή, α,β-μεθυλεν-ATP (α,β-MeATP) που επάγει την ταχεία εισροή των ιόντων ασβεστίου που συσχετίζεται με παροδική αλλαγή του σχήματος των ανθρώπινων αιμοπεταλίων. Τα φιλοπόδια που σχηματίζονται με την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων από το α,β-MeATP είναι πολύ ισχυρότερα σε σχέση με αυτά που σχηματίζονται με την ADP επαγόμενη ενεργοποίηση. Αυτή η μορφολογική διαφορά μπορεί να αποδοθεί, τουλάχιστον μερικώς στην έλλειψη

σχηματισμού μεγάλων συσσωρευμάτων που παρατηρούνται μετά από την διέγερση των αιμοπεταλίων από το α, β -MeATP. Η αλλαγή του σχήματος των αιμοπεταλίων περιλαμβάνει τη φωσφορυλίωση της ελαφριάς αλυσίδας της μυοσίνης αλλά όχι της Rho κινάσης και συσχετίζεται με την μετατόπιση στο κέντρο των εκκριτικών κοκκίων, παρ'όλο που η απελευθέρωση των πυκνών κοκκίων δεν έχει ανιχνευτεί. Η υπερέκφραση του υποδοχέα P2X₁ στα διαγονιδιακά ποντίκια δεν οδηγούν στη συσσώρευση ή στην έκκριση ως απόκριση στο α, β -MeATP, ενώ η εισροή των ιόντων Ca²⁺ και η αλλαγή του σχήματος αυξάνονται. Πρόσφατα, έχει περιγραφεί πως η διαδενοσίνη 5',5''-P¹²,P¹²-τετραφωσφορική, η οποία αποθηκεύεται στα πυκνά κοκκία των αιμοπεταλίων, δρα ως ανταγωνιστής του υποδοχέα. Ο P2X₁ υποδοχέας συνεισφέρει στην αιμοπεταλιακή συσσώρευση και έκκριση μετά από επίδραση του κολλαγόνου σε χαμηλή συγκέντρωση ίσως μέσω της ενεργοποίησης της ERK2 πρωτεϊνικής κινάσης που ενεργοποιείται από μιτογόνους παράγοντες (MAPK), η οποία μέσω του κολλαγόνου αυξάνει την αιμοπεταλιακή έκκριση.

Ο υποδοχέας P2X₁ μπορεί να αποτελέσει έναν καινούργιο στόχο της φαρμακολογίας για την αντιθρομβωτική αγωγή καθώς η αναστολή του θα έχει ήπια επίδραση στην αιμοπεταλιακή λειτουργία και συνεπώς θα το καθιστά ένα ασφαλές φάρμακο.



Εικόνα 2.4. Λειτουργίες των υποδοχέων P2 στα ανθρώπινα αιμοπετάλια.

2.4.2. Υποδοχείς του Θρομβοξανίου

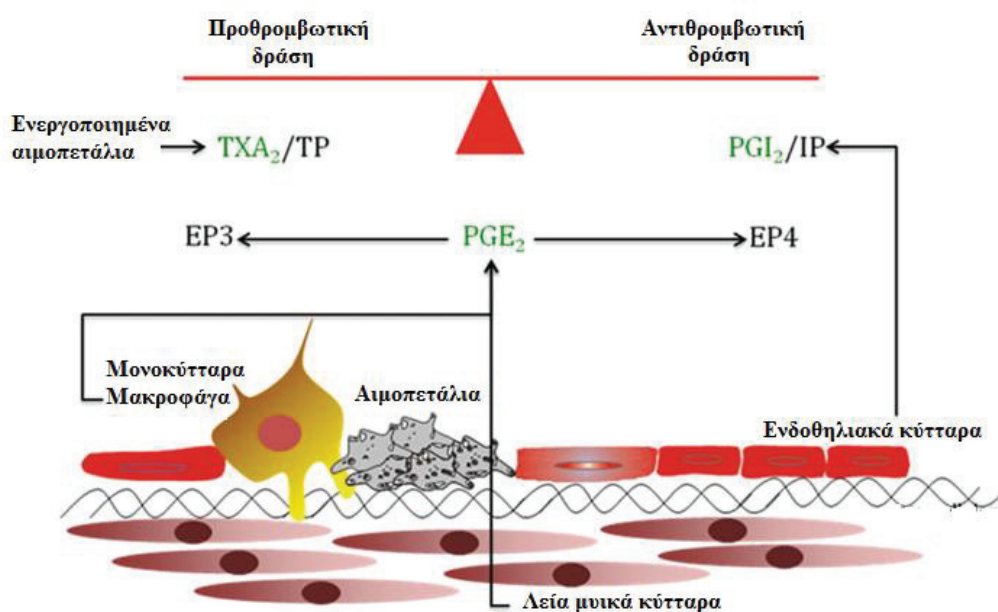
Το TXA₂ παράγεται από το αραχιδονικό οξύ μέσω του μονοπατιού της κυκλοοξυγονάσης. Ο TP ή ο TXA₂/προσταγλανδίνη (PG) H2 υποδοχέας (57 kDa) είναι ένας διαμεμβρανικός υποδοχέας που συζευγνύεται με G-πρωτεΐνες. Οι ανθρώπινοι TP υποδοχείς υπάρχουν σε δύο ισομορφές, τη TP α και TP β , οι οποίες διαφέρουν στη C-τελική κυτταροπλασματική περιοχή. Και οι δύο ισομορφές κωδικοποιούνται από το ίδιο γονίδιο αλλά είναι προϊόντα διαφορετικού ματίσματος. Παρ' όλο που mRNA των ισομορφών TP α και TP β βρίσκεται στα αιμοπετάλια, μόνο η ισομορφή εκφράζεται στα αιμοπετάλια ενώ η ισομορφή TP β εκφράζεται στα ενδοθηλιακά κύτταρα. Η μεταγωγή σήματος από τον υποδοχέα TP α γίνεται διαμέσου αρκετών G πρωτεϊνών συμπεριλαμβανομένου των G α και G $\alpha_{12/13}$. Οι TP υποδοχείς εκφράζονται και σε άλλους τύπους κυττάρων που εμπλέκονται στην αθηροθρόμβωση όπως τα λεία μυικά κύτταρα, τα μακροφάγα και τα μονοκύτταρα.

2.4.3. Υποδοχείς της προσταγλανδίνης E₂ (PGE₂)

Κατά τη διάρκεια της φλεγμονώδους απόκρισης, αυξάνεται η σύνθεση των προστανοειδών στα ενδοθηλιακά κύτταρα και στα λεία μυικά κύτταρα. Η PGE₂ εμφανίζει μια διφασική, εξαρτώμενη από τη συγκέντρωση επίδραση στη συσσώρευση των αιμοπεταλίων. Παρ' όλο που υψηλές συγκεντρώσεις αναστέλλουν τη συσσώρευση των αιμοπεταλίων, μικρότερες συγκεντρώσεις την αυξάνουν. Η PGE₂ ενεργοποιεί 4 υποδοχείς που συζευγνύονται με G πρωτεΐνες (EP1, EP2, EP3, και EP4) καθένας από τους οποίους έχει μια ξεχωριστή φαρμακολογική λειτουργία και διαφορετική ενδοκυτταρική μεταγωγή σήματος. Η διέγερση των υποδοχέων EP3 οδηγεί στην αύξηση των επιπέδων του ασβεστίου ενδοκυτταρικά ενώ η διέγερση των EP2 και EP4 συνήθως αυξάνουν ενδοκυτταρικά τα επίπεδα του cAMP μέσω ενεργοποίησης της G α s πρωτεΐνης που οδηγεί στη μείωση των ενδοκυτταρικών επιπέδων του ασβεστίου. Τα αιμοπετάλια έχουν mRNA για όλους τους υποδοχείς εκτός από τον υποδοχέα EP2.

Η προσυσσωρευτική ικανότητα της PGE₂ έχει αποδοθεί στην ενεργοποίηση του EP3 υποδοχέα η οποία οδηγεί στην αναστολή της αύξησης του cAMP, στην αυξημένη κινητοποίηση ασβεστίου και την αυξημένη έκφραση της P-σελεκτίνης στα αιμοπετάλια. Πρόσφατα, ένας εκλεκτικός αγωνιστής του EP4, ο ONO AE1-329 έχει δείξει να αναστέλλει τη συσσώρευση των αιμοπεταλίων, την κινητοποίηση του ασβεστίου και την αυξορρύθμιση της P-σελεκτίνης. Επιπλέον, η ενεργοποίηση του EP4 ενισχύει την

ανασταλτική δράση της ασπιρίνης. Αντίθετα, δύο χημικά διαφορετικοί EP4 ανταγωνιστές, οι GW627368x και ONO AE3-208, καταργούν την ανασταλτική δράση του ONO AE1-329 στη συσσώρευση των αιμοπεταλίων¹⁴. Οι υποδοχείς EP4 θα μπορούσαν να διαδραματίσουν ένα σημαντικό ρόλο στον έλεγχο της αιμόστασης εξισορροπώντας την προσυσωρευτική δράση των EP3 υποδοχέων (Εικόνα 2.5.). Οι EP4 αγωνιστές θα μπορούσαν να αποτελέσουν μια νέα κατηγορία αντιθρομβωτικών παραγόντων που να είναι κλινικά χρήσιμη σε περιπτώσεις όπου η ασπιρίνη ή οι P2Y₁₂ ανταγωνιστές δεν επαρκούν για την αναστολή της συσσώρευσης¹⁴.



Εικόνα 2.5. Η ισορροπία μεταξύ των θρομβωτικών και αντιθρομβωτικών δράσεων των προστανοειδών. Ως απόκριση στην αγγειακή βλάβη, παράγεται η PGI₂ από τα ενδοθηλιακά κύτταρα ενάντια στην αυξημένη προθρομβωτική δράση του TxA₂ που παράγεται από τα αιμοπετάλια. Τα λεία μυϊκά κύτταρα, τα μονοκύτταρα και τα μακροφάγα απελευθερώνουν προστανοειδή όπως η PGE₂ κατά τη διάρκεια της φλεγμονής. Η PGE₂ έχει μια διφασική, δόσο-εξαρτώμενη δράση στη συσσώρευση των αιμοπεταλίων.

2.4.4. Υποδοχείς της προσταγλανδίνης I₂ (PGI₂)

Η PGI₂ ή προστακυκλίνη είναι ένα παράγωγο του αραχιδονικού οξέος που απελευθερώνεται από τα ενδοθηλιακά κύτταρα και χρησιμεύει σαν ένας ισχυρός αγγειοδιασταλτικός παράγοντας, αποτελεί αναστολέα της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων και ρυθμιστή του πολλαπλασιασμού, της μετανάστευσης και της διαφοροποίησης διαμέσου του ειδικού μεμβρανικού υποδοχέα της προστακυκλίνης (IP υποδοχέας) (Εικόνα 2.5.). Ο υποδοχέας ανήκει στην οικογένεια των προστανοειδών των υποδοχέων που

συζευγνύονται με τις G πρωτεΐνες, οι οποίοι κυρίως εκφράζονται στα αιμοπετάλια και στα λεία μυϊκά κύτταρα. Ο υποδοχέας έχει μοριακό βάρος 37–41 kDa που εξαρτάται από τα διαφορετικά επίπεδα γλυκοζυλίωσης. Η γλυκοζυλίωση της εξωκυτταρικής περιοχής είναι απαραίτητη για την πρόσδεση του προσδέματος, την ενεργοποίηση του υποδοχέα και το μεμβρανικό εντοπισμό. Στην κυτταροπλασματική περιοχή, τα κατάλοιπα σερίνης S328 και S374 είτε φωσφορυλιώνονται από τις GPCR κινάσες ή από τις κινάσες PKC και (δευτερογενή μηνύματα) και παίζουν σημαντικό ρόλο στην επαγόμενη από κάποιον αγωνιστή φωσφορυλίωση ή στην απευαισθητοποίηση από κινάσες. Οι προσταγλανδίνες έχουν δύο χαρακτηριστικά δομικά γνωρίσματα, έναν κυκλοπεντανικό δακτύλιο και πλευρικές αλυσίδες που αναγνωρίζονται από τον υποδοχέα τους και σταθεροποιούν την πρόσδεση του προσδέματος. Ο υποδοχέας IP συνδέεται πιο συχνά με σύζευξη με την υπομονάδα Gas των ετεροτριμερών G-πρωτεϊνών, η οποία μετά από την ενεργοποίηση του υποδοχέα διεγείρει τη δεσμευμένη στη μεμβράνη αδενυλική κυκλάση να καταλύσει το σχηματισμό του δεύτερου αγγελιοφόρου, cAMP.

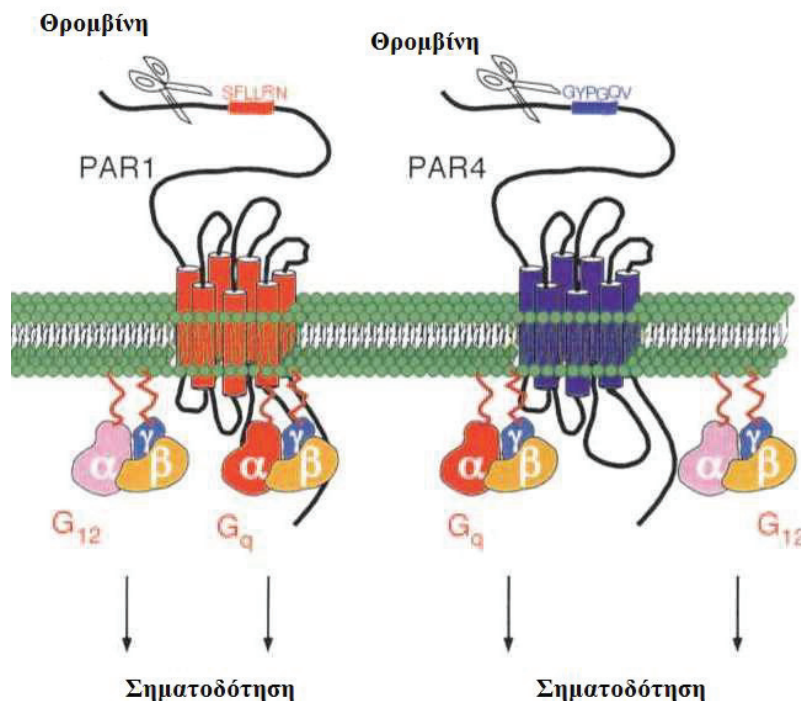
2.4.5. Υποδοχείς της θρομβίνης

Η θρομβίνη είναι μία πρωτεάση σερίνης η οποία συμβάλει σημαντικά τόσο στην ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων όσο και στην διαδικασία της πήξης. Όπως αναφέρθηκε νωρίτερα, η ενεργοποίηση αυτή εξαρτάται μερικώς από το σύμπλοκο GPIb-IX-V, κυρίως όμως από τους υποδοχείς PARs (Protease Activated Receptors). Η οικογένεια των υποδοχέων PARs ή υποδοχείς της θρομβίνης αποτελεί υποοικογένεια των υποδοχέων που είναι συζευγμένοι με G-πρωτεΐνες. Εκφράζονται κυρίως στα αιμοπετάλια αλλά και σε μικρότερο βαθμό στα ενδοθηλιακά κύτταρα, στα μονοκύτταρα και στους νευρώνες¹⁵. Είναι γνωστοί τέσσερις υποδοχείς που ανήκουν σε αυτήν την οικογένεια και χωρίζονται σε δύο κατηγορίες: Στην πρώτη κατηγορία ανήκουν οι υποδοχείς PAR-1, PAR-3 και PAR-4 οι οποίοι ενεργοποιούνται από την θρομβίνη και στην δεύτερη κατηγορία ο PAR-2 ο οποίος ενεργοποιείται από την θρυψίνη και από άλλες πρωτεάσες (Thrypsin-like proteases). Η ενεργοποίηση ανθρώπινων αιμοπεταλίων λόγω της θρομβίνης έχει βρεθεί ότι λαμβάνει χώρα μέσω των PAR-1 και PAR-4. Ο PAR-1 δρα ως ο κύριος υποδοχέας της θρομβίνης και προκαλεί την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις (EC50 50 pM) σε σχέση με τον υποδοχέα PAR-4 ο οποίος απαιτεί μεγαλύτερες συγκεντρώσεις θρομβίνης (EC50 5nM). Επίσης είναι γνωστό ότι η θρομβίνη

συνδέεται και με τον PAR-3, παρόλα αυτά δεν είναι ακόμη γνωστό ακόμη η φυσική σημασία αυτής της αλληλεπίδρασης¹⁶. Ο υποδοχέας PAR-1 ενεργοποιείται με την υδρόλυση του πεπτιδικού δεσμού μεταξύ Arg41 και Ser42, η οποία καταλύεται από τη θρομβίνη οδηγώντας στο σχηματισμό ενός νέου αμινο-τελικού άκρου, το οποίο αλληλεπιδρά με τμήματα αμινοξέων που βρίσκονται στην εξωκυττάρια περιοχή του υποδοχέα καθώς επίσης και με το αμινοτελικό άκρο της θρομβίνης¹⁷. Το νέο αμινοτελικό άκρο αποτελείται από το πεπτίδιο με την αλληλουχία Ser-Phe-Leu-Leu-Arg-Asn (SFLLRN). Το SFLLRN μπορεί να ενεργοποιήσει τα αιμοπετάλια απουσία της α-θρομβίνης. Όμοια με τον PAR-1 και το αμινοτελικό άκρο του PAR-3 διαθέτει αλληλουχίες κατάλληλες για πέψη από την θρομβίνη. Και στους δυο υποδοχείς η ανιονική αλληλουχία ομοιάζει με την καρβοξυλική ουρά της αντιθρομβωτικής ιρουδίνης. Αυτού του είδους η αλληλεπίδραση είναι σημαντική για την πρωτεόλυση των υποδοχέων σε χαμηλές συγκεντρώσεις θρομβίνης. Η παρουσία αυτών των εκτεταμένων περιοχών των PAR-1 και PAR-3 κατάλληλων για λύση από την θρομβίνη υποδεικνύουν ότι αυτοί οι δύο υποδοχείς εμπλέκονται σε ανταποκρίσεις της θρομβίνης έναντι άλλων πρωτεασών. Παρόμοια περιοχή δεν είναι εμφανής στους PAR-2 και PAR-4. Ο PAR-2 δεν μπορεί να υποστεί παραγωγική λύση από την θρομβίνη, ενώ ο PAR-4 απαιτεί υψηλότερες συγκεντρώσεις θρομβίνης για να ενεργοποιηθεί σε σχέση με τον PAR-1. Επιπλέον είναι πιθανό ο PAR-4, εφόσον δεν διαθέτει κατάλληλη περιοχή δέσμευσης για την θρομβίνη και την ιρουδίνη, να ανταποκρίνεται και σε άλλες πρωτεάσες πέρα από την θρομβίνη. Ωστόσο ο εντοπισμός της θρομβίνης στην επιφάνεια των αιμοπεταλίων μπορεί να μετατρέψει τον PAR-4 σε αποτελεσματικό μεσολαβητή στην σηματοδότηση της θρομβίνης. Η πρωτεόλυση του υποδοχέα αποτελεί διαδικασία μη αναστρέψιμη και ο “πεπτιδικός αγωνιστής” που αποκαλύπτεται με την πρωτεόλυση παραμένει προσδεδεμένος στον υποδοχέα. Η θρομβίνη είναι ένα ένζυμο κάτι που υποδηλώνει ότι ένα μόριο θρομβίνης μπορεί να πρωτεολύσει και κατ’ επέκταση να ενεργοποιήσει αμέτρητους PAR1 υποδοχείς. Ο PAR1 αποδεσμεύεται από την σηματοδότηση σε πολύ σύντομο χρονικό διάστημα μετά την ενεργοποίησή του και στην συνέχεια εισέρχεται στο κύτταρο με φωσφρυλιο-εξαρτώμενους μηχανισμούς, όπου και αποικοδομείται στα λυσοσώματα. Η ενεργοποίηση των PAR-1 έχει ως αποτέλεσμα την ενεργοποίηση των ετεροτριμερών G-πρωτεϊνών. Ο PAR-1 συνδέεται με τις Gαq, Gα12/13 και Gαi/z υπομονάδες των G-πρωτεϊνών οι οποίες ενεργοποιούν αρκετά σηματοδοτικά μονοπάτια με ποικίλες επιδράσεις στον φαινότυπο των αιμοπεταλίων

(Εικόνα 2.6.). Η ενεργοποίηση των PAR-1 μεταξύ των άλλων περιλαμβάνει την αναδιάταξη του κυτταροσκελετού προς αλλαγή του σχήματος, την ενεργοποίηση του υποδοχέα GPIIb/IIIa, την έκκριση του περιεχομένου των πυκνών και των α-κοκκίων, την παραγωγή TxA₂, και την έναρξη της προθρομβωτικής δραστηριότητας των αιμοπεταλίων.

Όμοια με τον PAR-1, ο PAR-4 ενεργοποιεί τις G_q και G_{12/13} α υπομονάδες των G-πρωτεϊνών αλλά δεν ενεργοποιεί το σηματοδοτικό μονοπάτι μέσω της G_{ai} (Εικόνα 2.6.). Ο υποδοχέας PAR-4 έχει βρεθεί ότι ενεργοποιείται, απενεργοποιείται και μεταφέρεται στο εσωτερικό των αιμοπεταλίων για αποικοδόμηση με πολύ μικρότερο ρυθμό σε σχέση με τον PAR-1. Επιπλέον έχει βρεθεί ότι PAR1 συμμετέχει στην βραχεία αλλά και πρόωμη μεταφορά του Ca²⁺ στον ενδοκυττάριο χώρο, ενώ ο PAR-4 ασκεί τη δράση της παρατεταμένης μεταφοράς Ca²⁺. Η σημασία αυτών των ποιοτικών διαφορών στην πορεία μεταγωγής σήματος των ενεργοποιημένων PAR-1 και PAR-4 στην απόκριση των αιμοπεταλίων στη θρομβίνη δεν έχει ακόμη διευκρινιστεί. Η υπόθεση που επικρατεί είναι ο PAR-4 δρα ως βοηθητικός υποδοχέας για την σηματοδότηση της θρομβίνης είτε μέσω ανεξάρτητων ενεργειών είτε με διαφορετική κινητική σε σχέση με τον PAR-1. Επιπλέον θεωρείται πιθανό ο PAR-4 να αλληλεπιδρά άμεσα ή έμμεσα με τον PAR-1 ή η απόκριση του να οφείλεται σε άλλες πρωτεάσες εκτός της θρομβίνης. Τέλος είναι γνωστό ότι η θρομβίνη αλληλεπιδρά και με τον PAR-3, το αποτέλεσμα όμως αυτής της αλληλεπίδρασης δεν είναι γνωστό. Μία υπόθεση που επικρατεί είναι ότι PAR-3 αλληλεπιδρά με τους PARs και συνεισφέρει στην ρύθμιση της σηματοδότησης τους¹⁶.



Εικόνα 2.6. Ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων από τη θρομβίνη διαμέσου των υποδοχέων PARs. Τα ανθρώπινα αιμοπετάλια εκφράζουν τους υποδοχείς *PAR-1* και *PAR-4*, οι οποίοι συζευγνύονται με G πρωτεΐνες.

2.5. Υποδοχείς που συμμετέχουν στη σταθεροποίηση της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων

Η σταθεροποίηση των συσσωρευμένων αιμοπεταλίων είναι μια δυναμική διαδικασία που κυρίαρχο ρόλο παίζει η “από έξω προς τα μέσα” σηματοδότηση των ιντεγκρινών και κυρίως της αIIbβ3. Η μεταγωγή σήματος που ξεκινά με την πρόσδεση του προσδέματος οδηγεί στην αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού, την επιμήκυνση των συσσωρευμένων αιμοπεταλίων, την ανάπτυξη της προθρομβωτικής επιφάνειας και τη συστολή του θρόμβου. Αυτές οι διαδικασίες αυξάνουν τοπικά τη συγκέντρωση των διαλυτών αιμοπεταλιακών αγωνιστών συμπεριλαμβανομένου παραγόντων που προκαλούν αποκοκκίωση των αιμοπεταλίων.

2.5.1. Οι υποδοχείς των Eph κινασών

Τα ανθρώπινα αιμοπετάλια εκφράζουν τις κινάσες EphA4, EphB1, και ephrinB1. Η πρώτη συσχετίζεται με την ιντεγκρίνη αIIbβ3 τόσο στα εν ηρεμία όσο και στα ενεργοποιημένα αιμοπετάλια. Η συμπεγματοποίηση είτε της EphA4 ή της ephrinB1 προκαλεί την προσκόλληση των αιμοπεταλίων στο ακινητοποιημένο ινωδογόνο αλλά ο

αποκλεισμός των αλληλεπιδράσεων Eph/ephrin εμποδίζει τη συστολή του θρόμβου μειώνοντας τη β3 φωσφορυλίωση. Αυτό οδηγεί στην αναστολή της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων σε μικρές συγκεντρώσεις αγωνιστή με συνέπεια το σχηματισμό μικρότερου θρόμβου στις επιφάνειες με κολλαγόνο κάτω από συνθήκες αρτηριακών διατμητικών δυνάμεων προκαλώντας την πρόωμη αποσυσσώρευση των αιμοπεταλίων¹⁸.

2.5.2. Η Gas-6 πρωτεΐνη και οι υποδοχείς της

Η Gas-6 πρωτεΐνη εξαρτάται από τη βιταμίνη K και εμπλέκονται στην ανάπτυξη των κυττάρων, την προσκόλληση και μετανάστευσή τους διαμέσου αλληλεπιδράσεων με τους υποδοχείς των κινασών τυροσίνης της TAM (Tyro 3, Axl, και Mer) οικογένειας. Ο ρόλος της Gas-6 στη λειτουργία των αιμοπεταλίων περιλαμβάνει την ενίσχυση της "από έξω προς τα μέσα" σηματοδότησης μέσω ενεργοποίησης των PI-3 K και Akt, και τη προώθηση της β3 φωσφορυλίωσης και γι'αυτό το λόγο τη συστολή του θρόμβου. Όλα αυτά συνδράμουν στη σταθεροποίηση του θρόμβου από το ADP. Η αναστολή της σηματοδότησης της Gas-6 έχει προταθεί ως ένας νέος ελκυστικός στόχος για το σχεδιασμό νέων αντιθρομβωτικών παραγόντων¹⁹.

2.5.3. Η υπερικογένεια των τετρασπανινών

Οι τετρασπανίνες είναι διαμεμβρανικές πρωτεΐνες και το μήκος τους κυμαίνεται μεταξύ 200 και 350 αμινοξικών καταλοίπων. Η πεπτιδική τους αλυσίδα διαπερνά τέσσερις φορές τη πλασματική μεμβράνη, εξ ου και η ονομασία τους. Οι τέσσερις διαμεμβρανικές περιοχές είναι υδρόφοβες και προσδιορίζονται ως TM1, TM2, TM3 και TM4. Άλλες δομικές περιοχές των τετρασπανινών είναι: η βραχεία εξωκυττάρια φουρκέτα (EC1), η οποία ενώνει την TM1 με τη TM2, η μακρά εξωκυττάρια φουρκέτα (EC2) που περιέχει 4 ή περισσότερα κατάλοιπα κυστεΐνης και που ενώνει τη TM3 με τη TM4, μία πολύ μικρή ενδοκυττάρια φουρκέτα (IL) που ενώνει τη TM2 με τη TM3 και από μία βραχεία κυτταροπλασματική ουρά στο αμινοτελικό και καρβοξυτελικό άκρο της πρωτεΐνης. Στην υπερικογένεια αυτή ανήκουν το CD151 και TSSC6 που σχετίζονται με λειτουργίες των αιμοπεταλίων. Το CD151 φαίνεται να ρυθμίζει την πρόσδεση του ινωδογόνου από την ιντεγκρίνης αIIbβ3. Η απουσία του CD151 οδηγεί σε μικρότερους, ασταθείς θρόμβους *in vivo*²⁰. Η απουσία του αιμοπεταλιακού TSSC6 επηρεάζει τη σταθερότητα του αρτηριακού

θρόμβου που σχηματίζεται μετά την αγγειακή βλάβη, ρυθμίζοντας τα γεγονότα της `` από έξω προς τα μέσα `` σηματοδότησης²¹.

2.5.4. Ο υποδοχέας-περισυλλέκτης CD36

Το CD36 εκφράζεται στην επιφάνεια των περισσότερων κυττάρων όπως τα αιμοπετάλια, τα μονοκύτταρα, τα λεία μυϊκά κύτταρα και τα καρδιομυοκύτταρα. Το γονίδιο του βρίσκεται στο χρωμόσωμα 7. Η CD36 πρωτεΐνη αποτελείται από μια μονή πεπτιδική αλυσίδα από 474 αμινοξέα και έχει μοριακό βάρος 80-90 kDa. Στα αιμοπετάλια υπάρχουν 10,000-25,000 μόρια CD36. Έχει διαμόρφωση "φουρκέτας" και περιέχει δύο διαμεμβρανικές περιοχές, μία κοντά στο N-τελικό άκρο και μία ακόμη κοντά στο C-τελικό άκρο, που διαχωρίζονται μεταξύ τους από ένα μεγάλο, γλυκοζυλιωμένο εξωκυτταρικό βρόχο. Οι αιμοπεταλιακοί προσδέτες του CD36 περιλαμβάνουν την θρομβοσπονδίνη (TSP1), τα οξειδωμένα φωσφολιπίδια (oxPL), την οξειδωμένη χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνη (oxLDL) και τα μακράς αλυσού λιπαρά οξέα. Ο υποδοχέας CD36 περιγράφηκε αρχικά στα αιμοπετάλια ως ένας υποδοχέας για το κολλαγόνο τύπου I και III. Ωστόσο, τα αιμοπετάλια από ασθενείς με έλλειψη στον υποδοχέα CD36 ανταποκρίνονται φυσιολογικά μετά από ενεργοποίηση τους με κολλαγόνο. Παρ' όλο που είναι τεκμηριωμένη η πρόσδεση του CD36 με το μη ινιδιακό κολλαγόνο τύπου V, σήμερα είναι σαφές ότι το CD36 δεν είναι ο κύριος υποδοχέας του κολλαγόνου²². Η ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων ρυθμίζεται από αλληλεπιδράσεις του CD36 με πολλά διαφορετικά προσδέματα. Για παράδειγμα, διαμέσου του CD36, η TSP-1 εμποδίζει τη σηματοδότηση από τα cAMP/πρωτεϊνική κινάση A²³. Πράγματι, η TSP-1 ενεργοποιεί τα CD36-εξαρτώμενα μηνύματα που ελαττώνουν την ευαισθησία των αιμοπεταλίων στη PGE1, μειώνοντας την ικανότητα της να αναστέλλει τη συσσώρευση των αιμοπεταλίων κάτω από συνθήκες ροής²⁴. Από την άλλη πλευρά, τα oxLDL που σχηματίζονται στην υπερλιπιδαιμία και την αθηροσκλήρωση μπορούν να ενεργοποιήσουν τα αιμοπετάλια με CD36-εξαρτώμενο τρόπο.

Το επίπεδο έκφρασης στην επιφάνεια των αιμοπεταλίων ποικίλλει στο γενικό πληθυσμό. Αυτή η διακύμανση επηρεάζει την αιμοπεταλιακή λειτουργία ως απόκριση στα oxLDL και σχετίζεται με την κληρονομικότητα ειδικών γονιδιακών πολυμορφισμών στους Καυκάσιους και τους Αφρικανούς²⁵.

2.5.5. Ο υποδοχέας TLT-1

Ο υποδοχέας TLT-1 είναι ένας «ορφανός» υποδοχέας που βρίσκεται ειδικά στα α-κοκκία των αιμοπεταλίων και των μεγακαρυοκυττάρων ενώ μετά από την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων μετατοπίζεται στην επιφάνειά τους. Μπορεί να δρα σε συνέργεια με τον υποδοχέα $\alpha\text{IIb}\beta_3$ διευκολύνοντας την αλληλεπίδραση των αιμοπεταλίων με το ινωδογόνο και τελικά τη συσσώρευση των αιμοπεταλίων²⁶.

2.5.6. Ο υποδοχέας PEAR1

Ο υποδοχέας PEAR1 (Platelet Endothelial Aggregation Receptor-1) (ή γνωστός ως MEGF12 ή JEDI) είναι μια διαμεμβρανική πρωτεΐνη που κυρίως εκφράζεται στα αιμοπετάλια και τα ενδοθηλιακά κύτταρα. Κατά τη διάρκεια της αιμοπεταλιακής συσσώρευσης, ο υποδοχέας PEAR1 φωσφορυλιώνεται στις θέσεις Tyr-925 και Ser-953/1029, σε έναν εξαρτώμενο από τον υποδοχέα $\alpha\text{IIb}\beta_3$ τρόπο. Παίζει ρόλο στην αλληλεπίδραση των αιμοπεταλίων μεταξύ τους²⁷.

2.5.7. Σύμπλεγμα P-σελεκτίνη/PSGL-1

Η P-σελεκτίνη ή όπως είναι γνωστή CD62P είναι ένα μόριο κυτταρικής προσκόλλησης που ανήκει στην οικογένεια των σελεκτινών. Βρίσκεται αποθηκευμένη στα α-κοκκία των αιμοπεταλίων και μετά από την ενεργοποίησή τους εκτίθεται στην επιφάνειά τους. Το κύριο πρόσδεμα για την P-σελεκτίνη είναι το PSGL-1 (P-selectin glycoprotein ligand-1), ο οποίος βρίσκεται πάνω σε όλα τα λευκοκύτταρα. Οι παροδικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ της P-σελεκτίνης και του PSGL-1 επιτρέπουν στα λευκοκύτταρα και τα ενεργοποιημένα αιμοπετάλια να κυλούν κατά μήκος του ενδοθηλίου. Η διαλυτή P-σελεκτίνη (Soluble P-selectin, sP-σελεκτίνη) κυκλοφορεί στο αίμα σε συγκέντρωση 100 ng/ml. Αυξημένα επίπεδα της sP-σελεκτίνης αποτελούν σημαντικό παράγοντα κινδύνου για την εμφάνιση καρδιαγγειακών επεισοδίων καθώς η P-σελεκτίνη σχετίζεται με την ενεργοποίηση και τη λειτουργία των αιμοπεταλίων. Αυξημένη έκφραση της P-σελεκτίνης παρατηρείται στη στεφανιαία νόσο, στο οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου, στο εγκεφαλικό επεισόδιο και τη περιφερική αρτηριακή νόσο²⁸.

2.5.8. Σύμπλεγμα CD40/CD40L

Το CD40L (ή CD154) είναι ο προσδέτης για το CD40 ο οποίος βρίσκεται αποθηκευμένος στα κοκκία των αιμοπεταλίων. Είναι μία 39-kDa γλυκοπρωτεΐνη της

μεμβράνης τύπου II. Τα αιμοπετάλια είναι ικανά να εκφράζουν το CD40L στην επιφάνειά τους λίγα λεπτά μετά τη διέγερσή τους. Μετά την απελευθέρωση του, το αιμοπεταλιακό CD40L μπορεί να αλληλεπιδρά με το CD40 των ενδοθηλιακών κυττάρων και να προκαλεί τη φλεγμονώδη απόκριση. Η διάρκεια που εκφράζεται το CD40L μετά από την απελευθέρωσή του από τα κοκκία ρυθμίζεται από την έκφραση του CD40 από την επιφάνεια των αιμοπεταλίων και η πρόσδεση αυτών των δύο μορίων οδηγεί στην απώλεια της εξωκυτταρικής περιοχής του CD40L ως ένα διαλυτό μόριο (sCD40L). Το σύστημα CD40/CD40L θεωρείται πως παίζει σημαντικό ρόλο στη διατήρηση της φλεγμονώδους απόκρισης και εμπλέκεται στην αθηροσκλήρωση²⁹. Έχει βρεθεί πως αυξημένα επίπεδα του CD40L στο πλάσμα συσχετίζονται με δυσμενή κλινική έκβαση στους ασθενείς με οξύ στεφανιαίο σύνδρομο (ΟΣΣ) καθιστώντας τον έναν ενδιαφέροντα θεραπευτικό στόχο³⁰.

2.6. Υποδοχείς που εμπλέκονται στη μειορύθμιση της ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων

Ο αρνητικός ρυθμιστικός ρόλος του μονοξειδίου του αζώτου (NO) και της προστακυκλίνης (PGI₂) ούτως ώστε να αποφευχθεί η μη ελεγχόμενη θρόμβωση έχει περιγραφεί εκτενώς. Τελευταία, έχουν περιγραφεί και άλλοι υποδοχείς με ή χωρίς την ITIM περιοχή που μπορεί να αναστείλουν ενεργά το σχηματισμό του θρόμβου. Το **PECAM-1** ή CD31 είναι ένα μόριο προσκόλλησης που μπορεί να αναστείλει την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων. Όπως και ο υποδοχέας GPVI, το μόριο PECAM-1 ανήκει στην υπερικογένεια των ανοσοσφαιρινών με 6 εξωκυτταρικές Ig περιοχές, μια διαμεμβρανική περιοχή και μια κυτταροπλασματική ουρά. Η κυτταροπλασματική περιοχή του PECAM-1 μορίου περιέχει την περιοχή ITIM, η οποία φωσφορυλιώνεται κατά τη διέγερσή της από ομοφιλικές αλληλεπιδράσεις και/ή συμπλεγματοποίηση, διευκολύνοντας τη στρατολόγηση της τυροσίνης, της σερίνης/θρεονίνης ή πιθανώς των λιπιδικών φωσφατασών και την επακόλουθη αναστολή της σηματοδότησης μέσω των κινασών. Συνεπώς, το PECAM-1 παίζει ρόλο στην εξασθένηση του σχηματισμού του θρόμβου από τη δράση των GPVI, GPIb, και της αιμοπεταλιακής ενεργοποίησης από τη δράση της θρομβίνης. Ένα ακόμη μέλος της υπερικογένειας των ανοσοσφαιρινών, η **G6b-B** φαίνεται πως παίζει ρόλο στον περιορισμό της ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων. Αποτελείται από 241 αμινοξέα (26-kDa), είναι προϊόν εναλλακτικού ματίσματος, υποβάλλεται σε φωσφορυλίωση της τυροσίνης και συσχετίζεται με την περιοχή SH2 που

περιέχει φωσφατάση. Περιέχει μια διαμεμβρανική περιοχή και δύο ITIM που υποβοηθούν την πρόσδεση της σε δύο περιοχές, SHP1 και SHP2³¹. Τέλος, ο υποδοχέας του PACAP (pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide), **VPAC1** (vasoactive intestinal peptide/pituitary adenylate cyclase-activating peptide receptor 1) στα αιμοπετάλια συζευγνύεται με την ενεργοποίηση από την αδενυλική κυκλάση. Είναι γνωστό πως αυξημένα επίπεδα του cAMP σε αιμοπετάλια ασθενών αποτελούν τη βάση για μειωμένη συσσώρευση των αιμοπεταλίων. Υπερέκφραση του υποδοχέα σε ποντίκια προκαλεί την αυξημένη απελευθέρωσή του PACAP από τα αιμοπετάλια, τη μειωμένη ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων καθώς επίσης παρατείνει τον χρόνο αιμορραγίας³².

3. ΑΙΜΟΠΕΤΑΛΙΑ ΚΑΙ ΚΑΡΔΙΑΓΓΕΙΑΚΗ ΝΟΣΟΣ

3.1 Εισαγωγή

Η καρδιαγγειακή νόσος είναι μια από τις κυριότερες αιτίες νοσηρότητας και θνητότητας στις σύγχρονες κοινωνίες. Στις χώρες της Ευρωπαϊκής Ένωσης περισσότερο από 1,9 εκατομμύρια άνθρωποι πεθαίνουν ετησίως από νοσήματα του καρδιαγγειακού συστήματος, που αντιστοιχούν περίπου σε 42% των συνολικών θανάτων. Η αθηροσκλήρωση και η πιθανή τελική της έκβαση, η αθηροθρόμβωση, αποτελεί τον κύριο υποκείμενο παθοφυσιολογικό μηχανισμό της καρδιαγγειακής νόσου με τα αιμοπετάλια να διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο.

Η αθηροσκλήρωση αποτελεί μια πολυπαραγοντική, παθοφυσιολογική κατάσταση που εξαρτάται από γενετικούς, περιβαλλοντικούς και διατροφικούς παράγοντες. Ο όρος αναφέρεται σε ειδικές αλλαγές όπως δημιουργία πλακών στα αγγειακά τοιχώματα που αποτελούνται από συνδυασμό λίπους και συνδετικού ιστού. Είναι πολύ διαδεδομένη γιατί επηρεάζει αγγεία όπως η αορτή, οι εγκεφαλικές αρτηρίες, η καρωτίδα και τα στεφανιαία αγγεία. Γι' αυτό το λόγο, αποτελεί μία από τις κυριότερες αιτίες θανάτου στο δυτικό κόσμο³³. Εμπλέκονται διάφοροι παθοφυσιολογικοί μηχανισμοί όπως η φλεγμονή, το οξειδωτικό στρες, διαταραχές του μεταβολισμού των λιπιδίων και των λιποπρωτεϊνών, διαταραχές των μηχανισμών πήξης και θρόμβωσης και γονιδιακοί πολυμορφισμοί. Η αθηροθρόμβωση αρχίζει από πολύ νωρίς στην παιδική ηλικία και εξελίσσεται ασυμπτωματικά καθόλη την ενήλικη ζωή³³. Συγκεκριμένα, η εναπόθεση λίπους στις αρτηρίες αρχίζει από τα πρώτα δέκα χρόνια και συνεχίζει και τις επόμενες δεκαετίες. Ωστόσο, οι πλάκες αρχίζουν να φαίνονται από τη δεύτερη δεκαετία. Οι πλάκες αυτές μπορεί να υποστούν ρήξη, οδηγώντας στην ενεργοποίηση του μηχανισμού πήξης και τελικά στην αθηροθρόμβωση.

Η δυσλειτουργία του ενδοθηλίου όπως προκύπτει με τη μεταβολή της ενδοθηλιακής λειτουργίας, τη συσσώρευση λιποπρωτεϊνών που περιέχουν την απολιποπρωτεΐνη (apo) B στο αγγειακό τοίχωμα και την εμφάνιση μιας χρόνιας φλεγμονώδους διεργασίας που εμπλέκει πολλά είδη κυττάρων (μακροφάγα, λεία μυϊκά κύτταρα) θεωρείται ο κυριότερος μηχανισμός έναρξης της αθηροσκλήρωσης³⁴. Η άμεση ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων και ο επικείμενος σχηματισμός του θρόμβου έπεται από τη ρήξη της αθηρωματικής

πλάκας οδηγούν στα οξέα στεφανιαία σύνδρομα (ΟΣΣ), στην περιφερική αρτηριακή νόσο και στο ισχαιμικό εγκεφαλικό επεισόδιο.

Το ΟΣΣ χρησιμοποιείται ως όρος για ένα φάσμα κλινικών διαταραχών που προκαλείται από την οξεία ισχαιμία του μυοκαρδίου και περιλαμβάνει:

- ❖ την **ασταθή στηθάγχη**, στην οποία συνήθως υπάρχει μερική απόφραξη από θρόμβο (38%). Άτομα με ασταθή στηθάγχη διατρέχουν αυξημένο κίνδυνο καρδιακής προσβολής, σοβαρή καρδιακή αρρυθμία, και καρδιακή ανακοπή.
- ❖ το **οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου (OEM) χωρίς ανάσπαση του ST τμήματος** (NSTEMI - Non ST Elevation Myocardial Infarction), στο οποίο συνήθως υπάρχει ατελής απόφραξη από θρόμβο (25%). Η πλήρης απόφραξη εξαιτίας μιας πλάκας ή ενός θρόμβου μπορεί να προκαλέσει **NSTEMI** σε ασθενείς με καλή παράπλευρη κυκλοφορία.

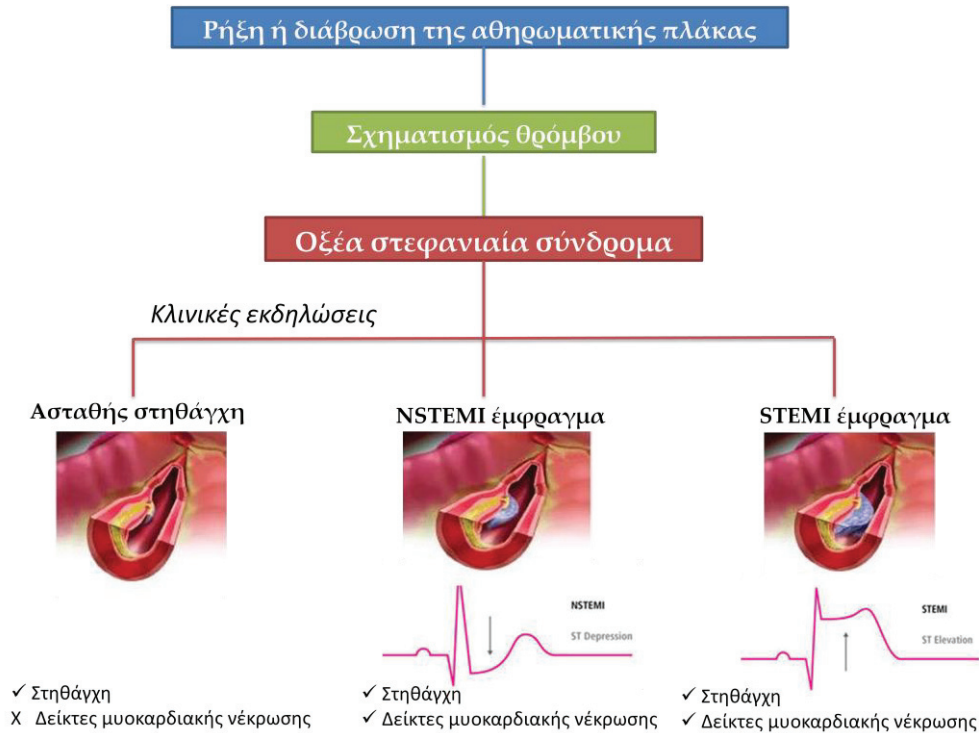
Η ασταθής στηθάγχη και το NSTEMI έμφραγμα είναι δύο δυσδιάκριτες μεταξύ τους οντότητες και η διαφορά τους έγκειται στο γεγονός ότι το NSTEMI χαρακτηρίζεται από περισσότερο εκτεταμένη μυοκαρδιακή βλάβη, με απελευθέρωση στην κυκλοφορία Τροπονίνης T ή I (TnT ή TnI) ή των ενζύμων Κρεατινική Κινάση (CK) και του ισοενζύμου MB (CK-MB).

- ❖ το **οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου με ανάσπαση του ST τμήματος** (STEMI – ST Elevation Myocardial Infarction), συνήθως πλήρη απόφραξη από θρόμβο (30%). Αυτό σημαίνει ότι το μυοκάρδιο έχει υποστεί σοβαρή βλάβη, η οποία συνήθως οφείλεται σε πλήρη και επίμονη απόφραξη της στεφανιαίας αρτηρίας. Αν δεν αποκατασταθεί η αιμάτωση στην αρτηρία το μυοκάρδιο του ασθενή θα υποστεί πιθανότητα σε σημαντική νέκρωση που θα οδηγήσει σε ανεπαρκή λειτουργία της καρδιάς και τελικά σε καρδιακή ανεπάρκεια και θάνατο.

Η κατάταξη των ΟΣΣ κρίνεται από δύο βασικά δεδομένα: Την ύπαρξη ή όχι ανάσπασης του ST τμήματος στο ηλεκτροκαρδιογράφημα (ΗΚΓ) και την ανίχνευση τυχόν μυοκαρδιακής βλάβης, κυρίως μέσω της ανίχνευσης TnT ή TnI αλλά και από τα ένζυμα CK-MB.

Τα οξέα στεφανιαία σύνδρομα, παρά τις επιμέρους διαφορές, αποτελούν ενιαία παθολογική οντότητα με κοινό παθοφυσιολογικό μηχανισμό, τη διαδικασία της αθηροθρόμβωσης (Εικόνα 3.1.). Το παρόν κεφάλαιο περιλαμβάνονται περιληπτικά τα

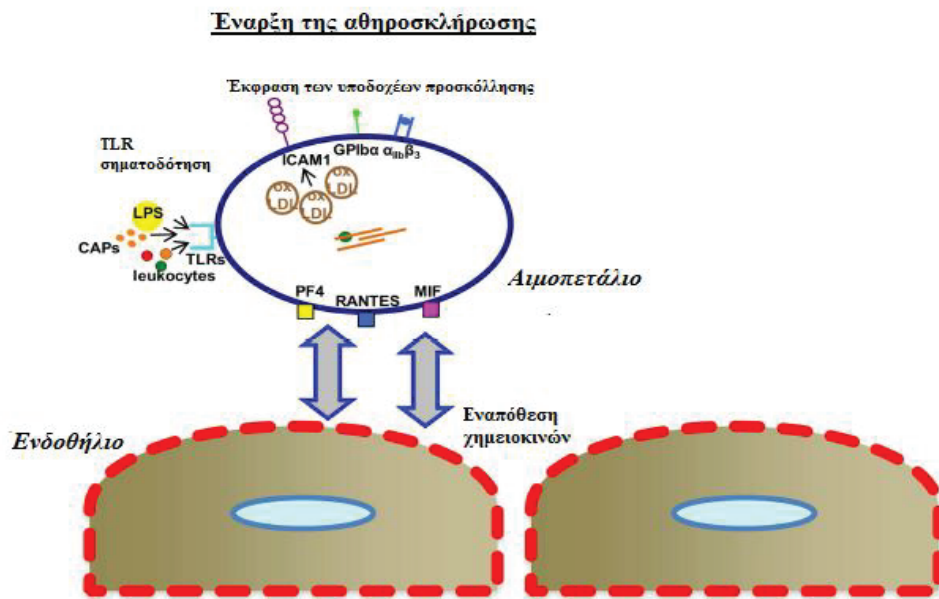
κύριότερα σημεία της συμμετοχής των αιμοπεταλίων στην καρδιαγγειακή νόσο καθώς αυτό αποτελεί ένα ιδιαίτερα εκτενές επιστημονικό πεδίο.



Εικόνα 3.1. Κλινικές εκδηλώσεις των ΟΣΣ.

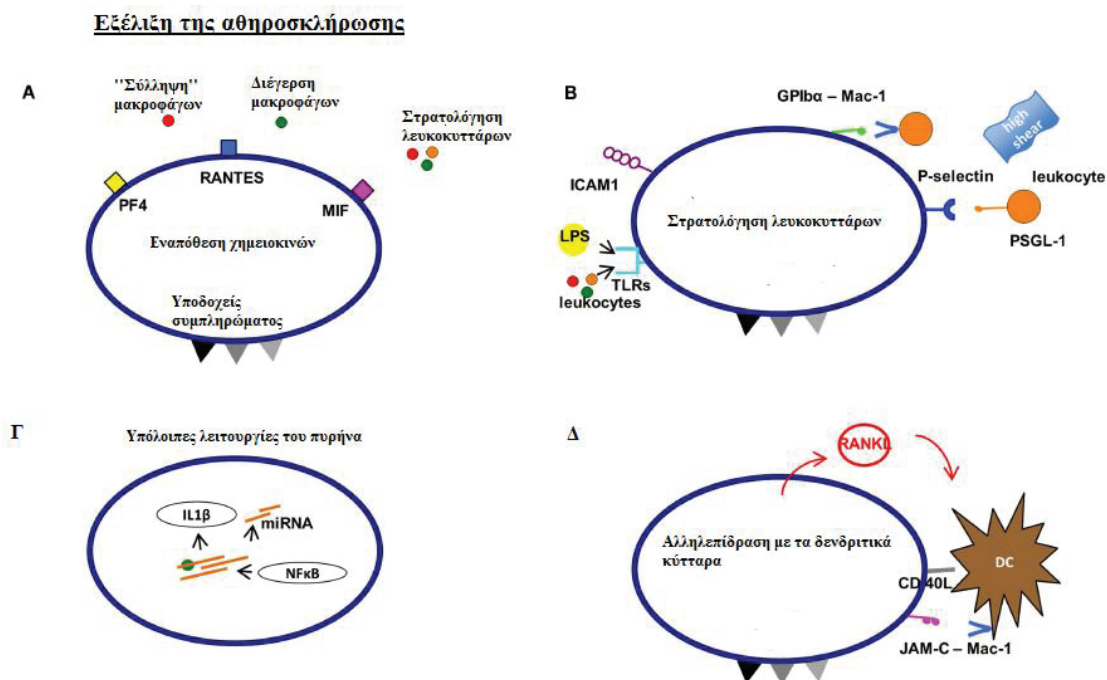
3.2. Ο ρόλος των αιμοπεταλίων στην αθηροσκλήρωση

Στην αθηροσκλήρωση, τα αιμοπετάλια συνεισφέρουν από το αρχικό στάδιο αυτής της χρόνιας αγγειακής παθολογίας (Εικόνα 3.2.) όπως είναι η ενδοθηλιακή δυσλειτουργία μέχρι και το τελικό στάδιο της ρήξης της αθηρωματικής πλάκας.



Εικόνα 3.2. Μηχανισμός με τον οποίο τα αιμοπετάλια επηρεάζουν την έναρξη της αθηροσκλήρωσης. Κατά την ενεργοποίηση μέσα στο μικροπεριβάλλον της αθηρωματικής πλάκας ή ακόμη στα πρώτα στάδια της αθηρογένεσης στις περιοχές με υψηλές διατμητικές τάσεις, τα αιμοπετάλια εκφράζουν αυξημένα επίπεδα φλεγμονωδών υποδοχέων προσκόλλησης (ICAM1, ενδοκυτταρικό μόριο προσκόλλησης 1, GPIIb, α IIb β 3) που σχετίζονται με την πρόσδεση της oxLDL στα αιμοπετάλια. Η σηματοδότηση διαμέσου του TLR μπορεί να συνεισφέρει μέσω της πρόσδεσης των λιποπολυσακχαριτών (LPS), της αλληλεπίδρασης των λευκοκυττάρων ή της πρόσδεσης των καρβοξυλακυλπυρολίων (CAPs). Το σύστημα του συμπληρώματος επίσης συνεισφέρει στην αθηρογένεση.

Για παράδειγμα, τα αιμοπετάλια συμμετέχουν στην αθηρογένεση με την απελευθέρωση των χημειοκινών, τη σύνδεση στην επιφάνεια της οξειδωμένης LDL (oxLDL), την άμεση αλληλεπίδραση μεταξύ κυττάρων, την απελευθέρωση των μικροσωματιδίων, την παροχή φλεγμονωδών παραγόντων. Τα αιμοπετάλια μέσα στην αθηρωματική πλάκα μπορούν να παραμένουν ενεργοποιημένα για πολύ καιρό όπου εκκρίνουν την προφλεγμονώδη ιντερλευκίνη 1b (IL-1b) (Εικόνα 3.3). Μία από τις πιο γνωστές λειτουργίες των αιμοπεταλίων στην αθηροσκλήρωση είναι η στρατολόγηση των λευκοκυττάρων διαμέσου άμεσων αλληλεπιδράσεων μεταξύ των υποδοχέων και των προσδεμάτων ή απελευθέρωση παραγόντων όπως οι χημειοκίνες (Εικόνα 3.3). Ο ρόλος του ειδικού λευκοκυτταρικού υποτύπου-DCs, το κλασικό αντιγόνο που υπάρχει σε όλα τα κύτταρα του σώματός μας στην αθηροσκλήρωση αναδείχθηκε μετά την αλληλεπίδραση του με τα αιμοπετάλια. Πράγματι, η αλληλεπίδραση των GPIIb–Mac-1 μπορεί να αποτελέσει ένα ενδιαφέρον σηματοδοτικό μονοπάτι το οποίο θα ρυθμίζει την εξέλιξη της αθηροσκλήρωσης³⁵.



Εικόνα 3.3. Μηχανισμός με τον οποίο τα αιμοπετάλια επηρεάζουν την εξέλιξη της αθηροσκλήρωσης. Τα αιμοπετάλια συνεισφέρουν στην εξέλιξη της αθηροσκλήρωσης με Α. εναπόθεση χημειοκινών και Β. στρατολόγηση λευκοκυττάρων. Γ. Υπόλοιπες "πυρηνικές" λειτουργίες όπως είναι η ικανότητα να μεταφράζουν και να τροποποιούν το mRNA προωθώντας τη φλεγμονή και την ενδοθηλιακή πόλωση. Δ. Επιπλέον, η αλληλεπίδραση με τα δενδριτικά κύτταρα συνεισφέρουν στην εξέλιξη της αθηροσκλήρωσης εμπλέκοντας υποδοχείς προσκόλληση και διαλυτούς διαμεσολαβητές.

Το σύστημα του συμπληρώματος λαμβάνει ολοένα και μεγαλύτερη προσοχή στη μελέτη της παθοφυσιολογίας της αθηροσκλήρωσης. Η ενεργοποίηση του συμπληρώματος είναι σημαντική για φλεγμονώδεις καταστάσεις που σχετίζονται με αγγειακή βλάβη. Έχει αναφερθεί πως τα αιμοπετάλια μπορούν να εκφράσουν υποδοχείς του συμπληρώματος που έχουν σημασία για τη λειτουργία των αιμοπεταλίων και την αλληλεπίδραση τους με το τοπικό μικροπεριβάλλον. Αρκετά συστατικά του συμπληρώματος μπορεί να δεσμεύονται στην επιφάνεια των αιμοπεταλίων. Βρέθηκε επίσης πως η έκφραση των υποδοχέων του συμπληρώματος στα αιμοπετάλια έχει ισχυρή και θετική συσχέτιση με δείκτες ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων, όπως η P-σελεκτίνη σε ασθενείς με αθηροσκλήρωση.

Στο τελευταίο στάδιο της αθηροσκλήρωσης, ένζυμα των αιμοπεταλίων που αποικοδομούν τη θεμέλια ουσία κάνουν τις αθηρωματικές πλάκες πιο επιρρεπείς στη ρήξη σχηματίζοντας ρωγμές στην ινώδη κάψα της πλάκας. Αυτό εκθέτει τον πλούσιο σε λιπίδια

πυρήνα της πλάκας ο οποίος περιέχει σε μεγάλες ποσότητες τη θρομβοπλαστίνη. Η έκθεση στην εξωκυττάρια θεμέλια ουσία μπορεί να οδηγήσει σε περαιτέρω προσκόλληση, ενεργοποίηση και συσσώρευση των αιμοπεταλίων. Η δημιουργία του αιμοπεταλιακού θρόμβου είναι συνήθως ένα από τα τελευταία στάδια της αθηροθρόμβωσης που οδηγούν σε ένα οξύ στεφανιαίο σύνδρομο όπως το έμφραγμα του μυοκαρδίου.

Συνεπώς, η παθοφυσιολογία των ΟΣΣ αρχίζει με μία ρήξη ή συχνότερα σε γυναίκες με μία διάβρωση της κάψας της αθηρωματικής πλάκας με αποτέλεσμα την επαφή των αιμοπεταλίων με το θρομβογόνο υλικό της πλάκας. Η αρχική αυτή επαφή οδηγεί σε προσκόλληση των αιμοπεταλίων στο σημείο της ρήξης, στην ενεργοποίησή τους και στην έκκριση πληθώρα παραγόντων και κυτοκινών, μερικοί από τους οποίους επάγουν την αγγειογένεση ενώ κάποιοι την αναστέλλουν³⁶. Τελικώς, τα αιμοπετάλια συσσωρεύονται και σχηματίζουν τον αρχικό αιμοπεταλιακό θρόμβο. Παράλληλα, διεργασίες ενεργοποίησης του μηχανισμού πήξης και μικροεμβολισμών στην περιφέρεια του αγγειακού δικτύου σταθεροποιούν το θρόμβο και επιτείνουν την προκαλούμενη από αυτόν ισχαιμία. Τέλος, τα αιμοπετάλια εκτός από τη δημιουργία του θρόμβου συμμετέχουν και στην ισχαιμία που προκαλείται στα ΟΣΣ με εμβολές μικροσωματιδίων αλλά και με αγγειοσύσπαση στο αγγειακό δίκτυο περιφερικά του θρόμβου.

3.3. Ο ρόλος των αιμοπεταλίων στη φλεγμονή. Πως σχετίζεται με την καρδιαγγειακή νόσο;

Η φλεγμονή διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην αθηροσκλήρωση και την καρδιαγγειακή νόσο. Ο ρόλος αυτός υποστηρίζεται τόσο από πειράματα *in vitro* και μελέτες σε πειραματόζωα *in vivo*, όσο και από τα αποτελέσματα κλινικών μελετών που δείχνουν ότι τα επίπεδα διαφόρων δεικτών της φλεγμονής όπως CD40L^{37,38}, CRP^{39,40}, TNF- α ^{41,42}, MCP-1⁴³, IL-6^{39,41}, ICAM-1^{44,45} κλπ, συσχετίζονται με αυξημένο καρδιαγγειακό κίνδυνο. Για παράδειγμα, τα αυξημένα επίπεδα υψηλής ευαισθησίας CRP (hsCRP) που παρατηρούνται σε ασθενείς με σταθερή ή ασταθή στηθάγχη⁴⁶ αποτελούν ανεξάρτητο προγνωστικό παράγοντα για μελλοντικό ισχαιμικό επεισόδιο⁴⁰ (Πίνακας 3.1). Επίσης, όπως αναφέρεται στην επόμενη παράγραφο, η αλληλεπίδραση αιμοπεταλίων-λευκοκυττάρων διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην αθηρογένεση και στις επιπλοκές της⁴⁷. Τα επίπεδα αυτών των συμπλεγμάτων στο περιφερικό αίμα είναι αυξημένα σε ασθενείς με ασταθή στηθάγχη, έμφραγμα του μυοκαρδίου, σε ασθενείς που υποβάλλονται

σε αγγειοπλαστική καθώς και σε ασθενείς με περιφερική αρτηριακή νόσο⁴⁷⁻⁴⁹ (Πίνακας 3.1).

Πίνακας 3.1. Δείκτες φλεγμονής σε ασθενείς με καρδιαγγειακή νόσο

Δείκτες φλεγμονής	Πληθυσμός μελέτης	Κλινική έκβαση
CD40L	Ασθενείς με ΟΣΣ ή ασταθή στηθάγχη	Αυξημένος κίνδυνος καρδιαγγειακών επεισοδίων
sCD40L	Ασθενείς μετά από PCI ή με ασταθή στηθάγχη	Αυξημένος κίνδυνος καρδιαγγειακών επεισοδίων
ICAM-1	Ασθενείς που υποβάλλονται σε στεφανιαία αγγειογραφία	Αυξημένος κίνδυνος ΚΝ
sICAM-1	Υγιείς εθελοντές (άντρες)	Αυξημένος κίνδυνος συμπτωματικής αρτηριακής νόσου
MCP-1	Ασθενείς με ΠΑΝ	Αυξημένος κίνδυνος ΚΝ
HsCRP	Ασθενείς με σταθερή ή ασταθή στηθάγχη	Μελλοντικά ισχαιμικά επεισόδια
IL-6	Ασθενείς που υποβάλλονται σε στεφανιαία αγγειογραφία, Ασθενείς με οξύ καρδιοεμβολικό ισχαιμικό επεισόδιο	Αυξημένος κίνδυνος ΚΝ Υψηλή ενεργοποίηση της οξείας φάσης της φλεγμονής
TNF-α	Ασθενείς με ΚΝ και ασθενείς με οξύ καρδιοεμβολικό ισχαιμικό επεισόδιο	Αυξημένα επίπεδα του TNF-α Υψηλή ενεργοποίηση της οξείας φάσης της φλεγμονής
Συσσωματώματα αιμοπεταλίων-λευκοκυττάρων	Ασθενείς με ασταθή στηθάγχη, με OEM, που υποβάλλονται σε PCI, με ΠΑΝ	Αυξημένα επίπεδα των συσσωματωμάτων αιμοπεταλίων-λευκοκυττάρων

ΟΣΣ: Οξύ στεφανιαίο σύνδρομο, PCI: Διαδερμική αγγειοπλαστική στεφανιαίων αρτηριών, ΚΝ: Καρδιαγγειακή Νόσος, OEM: Οξύ Έμφραγμα του Μυοκαρδίου, ΠΑΝ: Περιφερική Αρτηριακή Νόσος

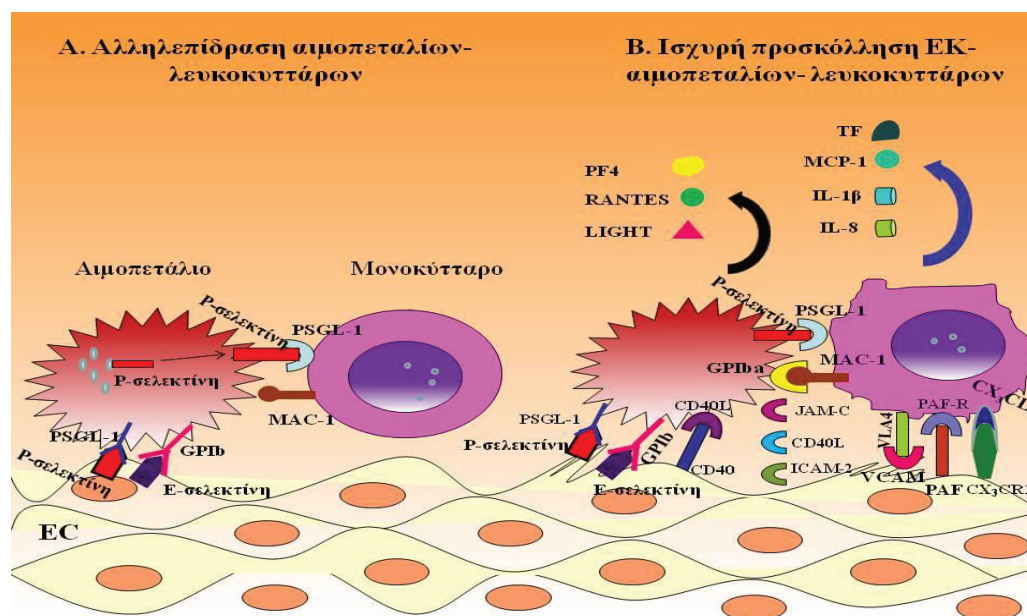
Εκτός από την τεκμηριωμένη συμμετοχή τους στη θρόμβωση, τα αιμοπετάλια πιθανώς διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο και στη φλεγμονή. Είναι γνωστό ότι τα αιμοπετάλια αλληλεπιδρούν με ποικίλους τρόπους τόσο με τα ενδοθηλιακά κύτταρα όσο και με τα λευκοκύτταρα. Υπό συνθήκες ενεργοποίησης, τα αιμοπετάλια σχηματίζουν συσσωματώματα με τα λευκοκύτταρα και στη συνέχεια προκαλούν τη στρατολόγησή τους στο ενδοθήλιο αλληλεπιδρώντας με τα ενδοθηλιακά κύτταρα. Εναλλακτικά, τα αιμοπετάλια μπορεί πρώτα να προσκολληθούν στο ενδοθήλιο και στη συνέχεια να προσελκύσουν τα λευκοκύτταρα στο ενδοθήλιο. Οι αλληλεπιδράσεις αυτές διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στις φλεγμονώδεις αντιδράσεις πριν και μετά τη ρήξη της αθηρωματικής πλάκας στο αρτηριακό τοίχωμα και διαμεσολαβούνται από διάφορους προφλεγμονώδεις παράγοντες όπως είναι τα μόρια προσκόλλησης^{50,51}.

Στην αλληλεπίδραση των αιμοπεταλίων με τα λευκοκύτταρα, σημαντικό ρόλο διαδραματίζει η P-σελεκτίνη η οποία αναγνωρίζει στην επιφάνεια των λευκοκυττάρων τον PSGL-1¹ (Εικόνα 3.4.A). Επίσης, τα μονοκύτταρα ή τα ουδετερόφιλα προσκολλώνται στα αιμοπετάλια διαμέσου του CD11b/CD18⁵². Ο προσδέτης αυτός των λευκοκυττάρων αναγνωρίζει υποδοχείς και παράγοντες των αιμοπεταλίων όπως η ιντεγκρίνη GPIbα⁵⁰, οι διαμεμβρανικές πρωτεΐνες JAM-C, JAM-3⁵²⁻⁵⁴, το CD40L^{55,56} και το ICAM-2⁵⁷ (Εικόνα 3.4.B).

Η πρόσδεση της αιμοπεταλιακής P-σελεκτίνης στον υποδοχέα PSGL-1 των μονοκυττάρων επάγει την ενεργοποίηση των β1 και β2 ιντεγκρινών. Επίσης, ενισχύει τη στρατολόγηση των μονοκυττάρων στο ενεργοποιημένο ενδοθήλιο και επάγει διάφορες χημειοκίνες όπως η MCP-1, η ιντερλευκίνη-1β και η ιντερλευκίνη-8.

Τα αιμοπετάλια αλληλεπιδρούν επίσης με τα ενδοθηλιακά κύτταρα. Σημαντικό ρόλο στην αλληλεπίδραση αυτή διαδραματίζει το CD40L και ο μεμβρανικός του υποδοχέας CD40. Μετά την ενεργοποίησή τους, τα αιμοπετάλια εκφράζουν στην επιφάνειά τους το CD40L και επίσης εκκρίνουν τη διαλυτή του μορφή, το sCD40L.

Το CD40L συνεισφέρει στην προσκόλληση των αιμοπεταλίων στο ενδοθήλιο ρυθμίζοντας την έκφραση της MCP-1, της E-σελεκτίνης, του VCAM-1 και του ICAM-1, μόρια που διαμεσολαβούν τη στρατολόγηση και την προσκόλληση των μονοκυττάρων και των λεμφοκυττάρων στο αρτηριακό τοίχωμα^{55,56}. Η χημειοκίνη CXCL4 (PF4) που εκκρίνεται από τα ενεργοποιημένα αιμοπετάλια, ενισχύει τη στρατολόγηση των ουδετεροφίλων και των μονοκυττάρων στις αθηρωματικές πλάκες και επάγει τη διαφοροποίηση των μονοκυττάρων σε μακροφάγα⁵⁸. Τέλος, σημαντικό ρόλο στην αλληλεπίδραση αιμοπεταλίων-λευκοκυττάρων-ενδοθηλιακών κυττάρων διαδραματίζει ο PAF που συντίθεται και εκφράζεται στην κυτταρική μεμβράνη ή εκκρίνεται από τα παραπάνω κύτταρα. Η μεμβρανική έκφραση του PAF στα ενδοθηλιακά κύτταρα συνεισφέρει στην προσέλκυση των ουδετεροφίλων και των μονοκυττάρων στο ενεργοποιημένο ενδοθήλιο. Επίσης επάγει την προσκόλληση των αιμοπεταλίων στο ενδοθήλιο παρουσία ενεργοποιημένων μονοκυττάρων και ουδετεροφίλων⁵⁹ (Εικόνα 3.4.B).



Εικόνα 3.4. Αλληλεπίδραση των αιμοπεταλίων με τα ενδοθηλιακά κύτταρα και τα λευκοκύτταρα **A.** Η μεταφορά της P-σελεκτίνης από τα α- κοκκία στην κυτταρική μεμβράνη επιτρέπει στα λευκοκύτταρα να προσκολληθούν στα αιμοπετάλια μέσω του PSGL-1. **B.** Ισχυρή πρόσδεση μεταξύ των ενεργοποιημένων αιμοπεταλίων-ενδοθηλιακών κυττάρων και λευκοκυττάρων

3.4. Ο ρόλος των αιμοπεταλίων στην αθηροθρόμβωση. Η παθοφυσιολογία των ΟΣΣ

➤ Προσκόλληση των αιμοπεταλίων στο αρτηριακό τοίχωμα

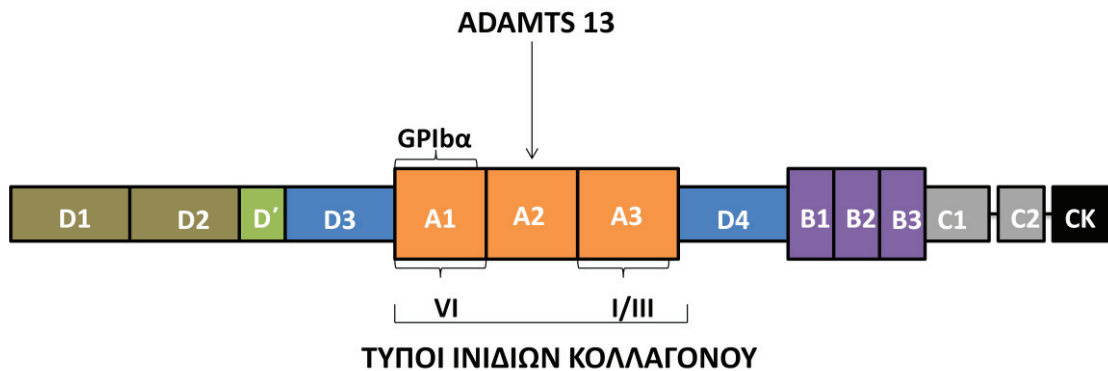
Υπό φυσιολογικές συνθήκες, τα κυκλοφορούντα αιμοπετάλια δεν αλληλεπιδρούν με το φυσιολογικό αγγειακό τοίχωμα λόγω της παραγωγής από το ενδοθήλιο παραγόντων που αποτρέπουν την προσκόλλησή τους⁶⁰. Σε αυτούς τους παράγοντες περιλαμβάνονται το μονοξείδιο του αζώτου και η PGI₂¹¹. Επίσης, σε φυσιολογικές συνθήκες το ενδοθήλιο εκκρίνει ποσότητες cAMP και cGMP (αναστέλλουν την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων), CD39 ectoADPάση η οποία αποδομεί το ADP, θειική ηπαράνη η οποία συμμετέχει στην απενεργοποίηση της θρομβίνης και θρομβομοντουλίνη η οποία ελαττώνει την ειδικότητα της θρομβίνης ως προς το ινώδες που είναι το υπόστρωμά της. Τέλος, εκκρίνεται ιστικός ενεργοποιητής του πλασμινογόνου ο οποίος αποδομεί την ινική (η οποία σταθεροποιεί τον θρόμβο). Το ίδιο συμβαίνει και με τον κυκλοφορούντα vWf ο οποίος δεν προσκολλάται στο υγιές ακέραιο ενδοθήλιο.

Στην περίπτωση όμως ενεργοποίησης του ενδοθηλίου ή βλάβη της ενδοθηλιακής στιβάδας, μερικές πρωτεΐνες εκτίθενται στον υποενδοθηλιακό χώρο (πχ. κολλαγόνο, vWf,

φιβρονεκτίνη και λαμινίνη) αναγκάζοντας τα αιμοπετάλια να κυλούν παθητικά στις περιοχές κοντά στην αγγειακή βλάβη χωρίς όμως να προσκολλώνται σταθερά. Η κύλιση αυτή επιτυγχάνεται με την αλληλεπίδραση του vWf του υποενδοθηλίου με την υπομονάδα GPIIb του συμπλέγματος του αιμοπεταλιακού υποδοχέα GPIIb-V-IX. Ο υποδοχέας αυτός αποτελείται από τη γλυκοπρωτεΐνη GPIIb που συνδέεται με διθειοφιδικό δεσμό με τη GPIIb και ετεροπολικά με τις GPIIb και GPV. Το σύμπλεγμα GPIIb/β διαθέτει περιοχές πρόσδεσης για τον vWf, καθώς και για τη θρομβίνη και τους παράγοντες πήξης XI και XII⁶¹.

Ο vWf διαδραματίζει έναν ιδιαίτερα σημαντικό ρόλο στην προσκόλληση και τη συσσώρευση των αιμοπεταλίων υπό συνθήκες υψηλών διατμητικών τάσεων (shear stress) όπως αυτές των μικρών αρτηριών, αρτηριολίων και των αρτηριών με στενώσεις⁶². Κατά τη φάση της προσκόλλησης, αλλάζουν οι διαμορφώσεις τόσο του συμπλόκου GPIIb/IX-V όσο και του vWf ώστε να επιτευχθεί η μεγαλύτερη δυνατή πρόσδεση. Επιπρόσθετα, η αλληλεπίδραση GPIIb-vWf επάγει την ενδοκυττάρια σηματοδότηση με αποτέλεσμα την ενεργοποίηση του υποδοχέα GPIIb/IIIa. Η αλληλεπίδραση μεταξύ του vWf και του συμπλέγματος GPIIb-V-IX θεωρείται σήμερα ως ένας πολλά υποσχόμενος νέος στόχος για την αντιαιμοπεταλιακή θεραπεία⁶³. Υπό συνθήκες χαμηλών διατμητικών τάσεων, (όπως συμβαίνει με τη διατμητική ροή των φλεβών) η προσκόλληση των αιμοπεταλίων δεν εξαρτάται από τη γλυκοπρωτεΐνη GPIIb και η ιντεγκρίνη GPIIb/IIIa παίζει τον κεντρικό ρόλο.

Ο vWf διαθέτει διάφορες λειτουργικές περιοχές εκ των οποίων οι σημαντικότερες για την αιμόσταση είναι η περιοχή A1 στην οποία υπάρχει το τμήμα πρόσδεσης με την υπομονάδα GPIIb του GPIIb-V-IX καθώς και με τα ινίδια κολλαγόνου τύπου VI, η περιοχή A3 στην οποία υπάρχει το τμήμα πρόσδεσης με τα ινίδια κολλαγόνου τύπου I και III και η περιοχή A2 στην οποία δρα η μεταλλοπρωτεάση ADAMTS 13 αποικοδομώντας τον vWf αναστέλλοντας έτσι την αιμόσταση (Εικόνα 3.5.)⁶⁴.



Εικόνα 3.5. Δομή του παράγοντα von Willebrand (vWf) στην οποία φαίνονται οι περιοχές που επηρεάζουν την αιμοπεταλιακή προσκόλληση.

Εκτός από τις αλληλεπιδράσεις GPIIb-vWf, σημαντικό ρόλο στην προσκόλληση των αιμοπεταλίων στον υποενδοθηλιακό χώρο διαδραματίζει η σύνδεση των αιμοπεταλιακών υποδοχέων αIIbβ3 και GPVI με το κολλαγόνο η οποία προάγει μια σταθερότερη προσκόλληση με τον GPVI να συμβάλλει στην περαιτέρω ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων διαμέσου ειδικής σηματοδότησης⁶⁵. Η φιβρονεκτίνη και η λαμινίνη συμπλέκονται με τις ιντεγκρίνες $\alpha_5\beta_1$ και $\alpha_6\beta_1$, αντίστοιχα. Έλλειψη σε κάποιον από τους προαναφερθέντες υποδοχείς δεν προκαλεί σοβαρή αιμορραγική διαταραχή αναδεικνύοντας την επάρκεια των μηχανισμών που ρυθμίζουν τις αλληλεπιδράσεις των αιμοπεταλίων με το αγγειακό τοίχωμα.

Μετά την προσκόλληση, τα αιμοπετάλια υποβάλλονται σε αξιοσημείωτες μορφολογικές και βιοχημικές αλλαγές που οδηγούν στην απελευθέρωση του περιεχομένου των κοκκίων τους όπως το ADP, η θρομβίνη και το TxA_2 ⁶⁶ καθώς και στην αυξορύθμιση της ιντεγκρίνης αIIbβ3 η οποία κυρίως συμβάλλει στην έναρξη των ενδοκυττάρων σημάτων υπεύθυνων για την ενεργοποίηση των ιντεγκρινών αIIbβ3 και για την απελευθέρωση των αιμοπεταλιακών αγωνιστών. Η ενεργοποιημένη ιντεγκρίνη αIIbβ3 προσδένει πολλαπλά προσδέματα συμπεριλαμβανομένου του VWF, του ινωδογόνου, της ινικής και της φιβρονεκτίνης και είναι απαραίτητη για το σχηματισμό σταθερών αιμοπεταλιακών συσσωρευμάτων.

➤ *Έκκριση των αιμοπεταλίων*

Κεντρικό ρόλο στην ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων είναι η παραγωγή και απελευθέρωση των διαλυτών αγωνιστών στα σημεία της αγγειακής βλάβης όπως η TxA_2 και το ADP. Η TxA_2 συντίθεται από το αραχιδονικό οξύ μέσω της κυκλοοξυγονάσης και της συνθάσης της θρομβοξάνης. Προκαλεί αγγειοσύσπαση της μικροκυκλοφορίας περιφερικά του θρόμβου η οποία επιτείνεται από την έκκριση σεροτονίνης από τα αιμοπετάλια. Η σύνδεση με τους υποδοχείς της προκαλεί ενεργοποίηση των ιντεγκρινών GPIIb/IIIa , αποκοκκίωση των αιμοπεταλίων και έκκριση ADP και ασβεστίου (Ca^{2+}) καθώς και μεταβολή στο σχήμα των αιμοπεταλίων. Το ADP που απελευθερώνεται από τα πυκνά κοκκία των ενεργοποιημένων αιμοπεταλίων συνδέεται στους P_2Y υποδοχείς και προκαλεί σύσπαση του κυτταροσκελετού μέσω των ιόντων Ca^{2+} και μεταβολή στο σχήμα των αιμοπεταλίων. Επίσης, προκαλεί δευτερεύουσες δράσεις όπως έκφραση της P-σελεκτίνης, σύνθεση TxA_2 , ενεργοποίηση του μηχανισμού πήξης και συσσώρευση περισσότερων αιμοπεταλίων στην περιοχή δημιουργίας του θρόμβου. Επιπλέον της σύνθεσης και της απελευθέρωσης των διαλυτών αγωνιστών, τα αιμοπετάλια παρέχουν μια καταλυτική επιφάνεια για τη σύνδεση των συμπλόκων που συμμετέχουν στην πήξη απαραίτητα για την παραγωγή της α-θρομβίνης. Η θρομβίνη είτε αυτή που παράγεται από τον ιστικό παράγοντα που βρίσκεται στην επιφάνεια της αθηρωματικής πλάκας ή αυτή που παράγεται από τα αιμοπετάλια παίζει ρόλο κλειδί κατά την εκκριτική φάση. Συνδέεται στον υποδοχέα PAR-1 και προκαλεί μια σειρά από ενδοκυττάριας αντιδράσεις στα αιμοπετάλια που έχουν ως αποτέλεσμα τη μεταβολή του σχήματος των αιμοπεταλίων από σφαιρικό αιμοπετάλιο σε αιμοπετάλιο με ψευδοπόδια. Η θρομβίνη, το ADP και η TxA_2 ενισχύουν περαιτέρω την ενεργοποίησή των αιμοπεταλίων και τελικά τη συσσώρευσή τους.

Επίσης, μετά την αρχική προσκόλληση τα αιμοπετάλια εκκρίνουν πολλούς παράγοντες με ποικίλες δράσεις όπως χημειοκίνες και αυξητικούς παράγοντες συμπεριλαμβανομένου του παράγοντα RANTES, μια χημειοκίνη που διεγείρει τα μονοκύτταρα και τα T κύτταρα να αυξάνουν την παραγωγή των φλεγμονωδών παραγόντων των μονοκυττάρων, τον παράγοντα PDGF (Platelet-derived growth factor) ο οποίος επάγει την μετανάστευση και τον πολλαπλασιασμό των λείων μυικών κυττάρων και τέλος τον TGF (Transforming growth factor) παράγοντα που επίσης διεγείρει τον πολλαπλασιασμό των λείων μυικών κυττάρων. Επίσης, απελευθερώνουν άλλα προφλεγμονώδη μόρια όπως είναι η P-

σελεκτίνη, ο ιστικός παράγοντας (tissue factor, TF), ο CD40L, οι μεταλλοπρωτεϊνάσες MMP-1 και MMP-2 και η ιντερλευκίνη IL-1 β , τα οποία ρυθμίζουν την αλληλεπίδραση των αιμοπεταλίων με τα ενδοθηλιακά κύτταρα, την ενεργοποίηση των ενδοθηλιακών κυττάρων, και την επικείμενη προσέλευση των λευκοκυττάρων στην περιοχή της φλεγμονής.

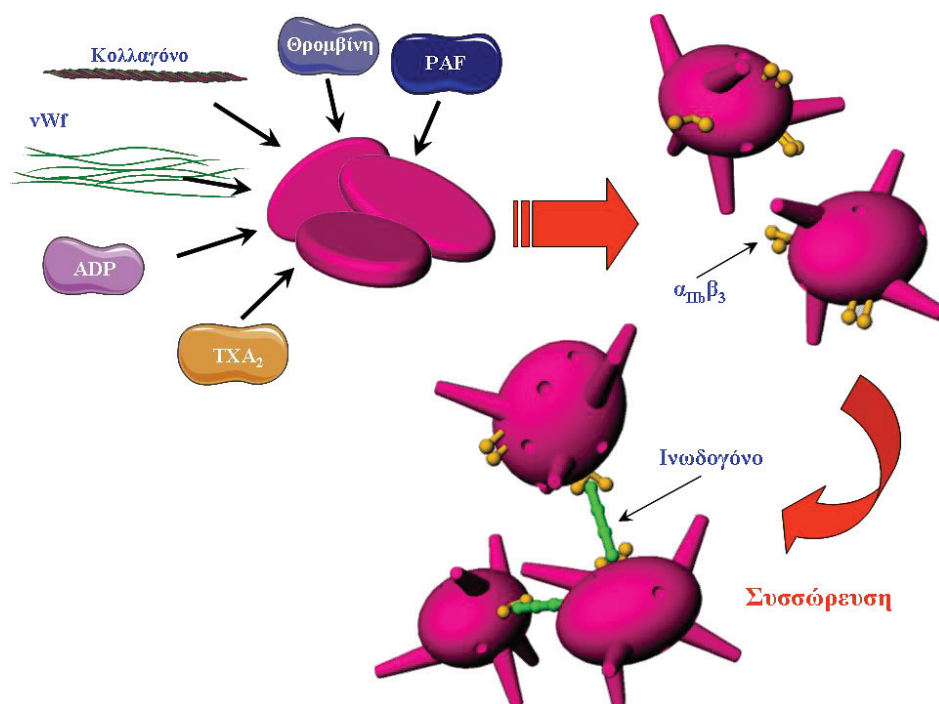
➤ *Συσσώρευση των αιμοπεταλίων*

Η συσσώρευση περιλαμβάνει την αλληλεπίδραση του αιμοπεταλίου με αιμοπετάλιο και είναι απαραίτητη για την αποτελεσματική αιμόσταση και συνεπώς για τη σταθεροποίηση του θρόμβου. Όπως περιγράφηκε προηγουμένως, μετά την προσκόλληση των αιμοπεταλίων, τα αιμοπετάλια ενεργοποιούνται από τους αγωνιστές τους που δρουν σε συγκεκριμένους υποδοχείς και οδηγούν σε μια σειρά από καθοδικά γεγονότα που συνολικά αυξάνουν την ενδοκυτταρική συγκέντρωση των ιόντων ασβεστίου. Η αύξηση αυτή προκύπτει μέσω της απελευθέρωσης του περιεχομένου των ενδοκυτταρικών κοκκίων και της εισροής του ασβεστίου μέσω της πλασματικής μεμβράνης. Οι υποδοχείς που συζευγνύονται με τις G-πρωτεΐνες ενεργοποιούν τη φωσφολιπάση C β (PLC β), ενώ οι υποδοχείς που δρουν μέσω μονοπατιών με κινάσες τυροσίνης όπως ο υποδοχέας του κολλαγόνου GrVI ενεργοποιούν τη φωσφολιπάση C γ (PLC γ)⁶⁷. Η ενεργοποίηση της φωσφολιπάσης είτε της ισομορφής β είτε της γ οδηγούν στην παραγωγή δύο δευτερογενών μηνυμάτων, στη διακυλογλυκερόλη και στη τριφωσφορική ινοσιτόλη. Η διακυλογλυκερόλη διαμεσολαβεί στην εισροή των ιόντων ασβεστίου ενώ η τριφωσφορική ινοσιτόλη στην απελευθέρωση του ασβεστίου από τις ενδοκυτταρικές αποθήκες. Επιπλέον, η εισροή ασβεστίου μπορεί να επάγεται απευθείας από κάποιους αγωνιστές όπως η πρόσδεση του ATP στον πουρινεργικό υποδοχέα P2X I ⁶⁸. Όπως περιγράφηκε, η αυξημένη συγκέντρωση ασβεστίου οδηγεί σε μια σειρά δομικών και λειτουργικών αλλαγών στα αιμοπετάλια όπως η αλλαγή του σχήματος από δισκοειδές σε σφαιρικό. Επίσης, επάγει την ενεργότητα της φωσφολιπάσης A $_2$ στα αιμοπετάλια η οποία απελευθερώνει το αραχιδονικό οξύ από τα φωσφολιπίδια της μεμβράνης οδηγώντας τελικά στο σχηματισμό της TxA $_2$. Η αλλαγή αυτή οδηγεί σε εκτεταμένη αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού, πολυμερισμό της ακτίνης και φωσφορυλίωση των ελαφριών αλυσίδων της μυοσίνης. Οι αποκρίσεις αυτές ποικίλλουν ανάλογα με το χρόνο και το ερέθισμα. Συνεπώς, οι μεγάλες προεξοχές της μεμβράνης που προκύπτουν από την αλλαγή του σχήματος φέρνουν κοντά το ένα αιμοπετάλιο με το άλλο με αποτέλεσμα τη συσσώρευση⁶⁹.

Όπως φαίνεται από τα παραπάνω, το αποτέλεσμα της ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων είναι η ενεργοποίηση των υποδοχέων $\alpha_{IIb}\beta_3$, οι οποίοι είναι πολυάριθμοι στα αιμοπετάλια και βρίσκονται και στην πλασματική μεμβράνη και στα α-κοκκία. Στα εν ηρεμία αιμοπετάλια οι υποδοχείς $\alpha_{IIb}\beta_3$ βρίσκονται στην ανενεργό μορφή. Απαραίτητη για τη συσσώρευση των αιμοπεταλίων είναι η μετατροπή τους από την ανενεργό στην ενεργό μορφή μέσω της "από μέσα προς τα έξω" σηματοδότησης όπου η ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων από σχεδόν όλους τους αγωνιστές επάγει αλλαγές στη διαμόρφωση του ώστε να μπορεί να ανταγωνίζεται την πρόσδεση του διαλυτού ινωδογόνου του πλάσματος (Εικόνα 3.6.). Διακρίνονται δύο φάσεις συσσώρευσης, η πρωτογενής συσσώρευση που είναι αντιστρέψιμη και η μη αντιστρεπτή δευτερογενής συσσώρευση. Στην πρωτογενή συσσώρευση τα αιμοπετάλια με τη βοήθεια γεφυρών ινωδογόνου συνδέονται χαλαρά μεταξύ τους. Στην δευτερογενή συσσώρευση απαραίτητη προϋπόθεση είναι η απελευθέρωση του περιεχομένου των κοκκίων των αιμοπεταλίων. Σε ασθενείς με δυσλειτουργία στην έκκριση των αποθηκευτικών κοκκίων, η δευτερογενής συσσώρευση είναι ελαττωμένη ή απουσιάζει τελείως, κάτι που οδηγεί σε αιμορραγική διάθεση⁷⁰.

Ο ρόλος του συμπλέγματος του υποδοχέα, η φωσφορυλίωση και η σύνδεση με τον κυτταροσκελετό και διάφορα άλλα κυτταροπλασματικά μόρια που επάγουν τις αλλαγές στη διαμόρφωση του $\alpha_{IIb}\beta_3$ δεν έχουν ξεκαθαριστεί πλήρως. Παρ' όλα αυτά, το ινωδογόνο που δεσμεύεται στον υποδοχέα δρα ως γέφυρα μεταξύ των δύο μορίων των υποδοχέων $\alpha_{IIb}\beta_3$ σε παρακείμενα αιμοπετάλια⁶⁷. Αυτό είναι το τελικό κοινό μονοπάτι της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων που επάγεται από τους διάφορους αγωνιστές. Ωστόσο, ο παράγοντας vWf μπορεί να υποκαθιστά το ινωδογόνο ως ένα μόριο-γέφυρα μεταξύ των υποδοχέων $\alpha_{IIb}\beta_3$ για τη συσσώρευση των αιμοπεταλίων κάτω από συνθήκες υψηλών διατμητικών δυνάμεων ενώ κάτω από συνθήκες χαμηλών διατμητικών δυνάμεων δεν παίζει τέτοιο ρόλο⁷¹.

Μέσω των υποδοχέων αυτών τα αιμοπετάλια συσσωρεύονται μεταξύ τους σχηματίζοντας συσσωματώματα με τον αρχικό αιμοπεταλιακό θρόμβο αν και την τελευταία δεκαετία είχε προταθεί πως μπορεί και άλλα μόρια να συνεισφέρουν στο σχηματισμό του θρόμβου όπως τα συνενωτικά μόρια προσκόλλησης (JAMs), η οικογένεια πρωτεϊνών SLAM (signaling lymphocyte activation molecule) και ο προσδέτης CD40L⁷²⁻⁷⁴.



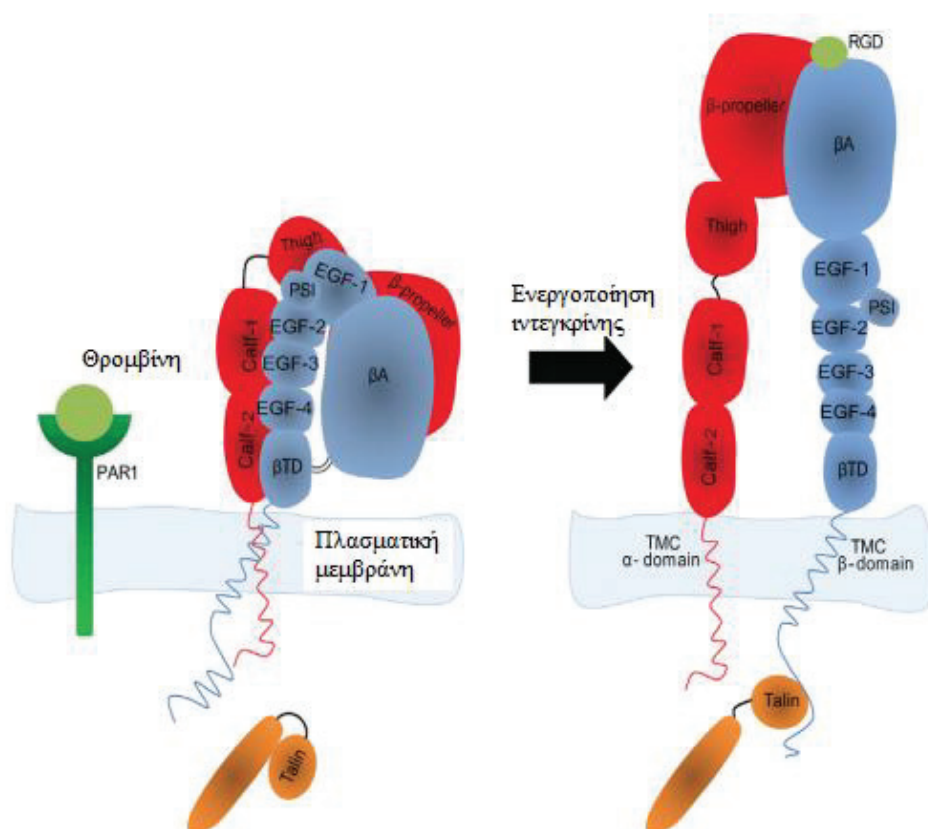
Εικόνα 3.6. Σχηματική απεικόνιση της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων.

Τα γεγονότα μεταγωγής σήματος που αρχίζουν μετά την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων και επεκτείνονται από το εσωτερικό των αιμοπεταλίων προς την $\alpha_{IIb}\beta_3$ και προκαλούν την αλλαγή διαμόρφωσής της από χαμηλής σε υψηλής συγγένειας είναι γνωστά με τον όρο “από μέσα προς τα έξω” σηματοδότηση. Αποτέλεσμα αυτής της σηματοδότησης είναι η ανοδιοργάνωση του κυτταροσκελετού που παίζει σημαντικό ρόλο στη δυνατότητα δέσμευσης της $\alpha_{IIb}\beta_3$ με το ινωδογόνο ή με άλλους προσδέτες⁷⁵.

Σε γενικές γραμμές, η “από μέσα προς τα έξω” σηματοδότηση περιλαμβάνει την ενεργοποίηση μίας ή περισσότερων ισομορφών της φωσφολιπάσης C (PLC). Τα αιμοπετάλια περιέχουν τις βήτα και τις γάμα ισομορφές αυτού του ενζύμου. Οι βήτα ισομορφές ενεργοποιούνται από ετεροτρινερείς G πρωτεΐνες (G_{aq} και/ή $G_{i\beta\gamma}$ πρωτεΐνες), ενώ οι γάμα (PLC γ 2) ρυθμίζονται από την φωσφορυλίωση της τυροσίνης. Να σημειωθεί ότι η ενεργοποίηση της PLC β αποτελεί το πρωταρχικό μονοπάτι σηματοδότησης κατά την ενεργοποίηση του αιμοπεταλίου. Η ενεργοποίηση της PLC οδηγεί στην αύξηση της κυτταροσολικής συγκέντρωσης του Ca^{2+} και στην ενεργοποίηση της πρωτεϊνικής κινάσης C (PKC). Στα αιμοπετάλια η PKC φωσφορυλιώνει συγκεκριμένα υποστρώματα : α) την ελαφριά αλυσίδα της Μυοσίνης (MLC, 20 kD), η οποία αποτελεί το κυρίως υπόστρωμα για την MLCK⁷⁶ και β) την πλεκστρίνη, μια πρωτεΐνη με M.B 47 kD, που είναι γνωστή και σαν P47⁷⁷. Η φωσφορυλίωση των δυο αυτών υποστρωμάτων σε θέσεις σερίνης και

θρεονίνης είναι απαραίτητη για την έκκριση του περιεχομένου των κοκκίων των αιμοπεταλίων. Οι υποδοχείς των διαφόρων αγωνιστών που βρίσκονται στο αιμοπετάλιο συνδέονται με ετεροτριμερείς πρωτεΐνες που δεσμεύουν το GTP, οι οποίες βοηθούν στην σύνδεση με τον υποδοχέα. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα την ενεργοποίηση της φωσφολιπάσης C η οποία υδρολύει την 4,5 διφωσφο-φωσφατιδυλinoσιτόλη (PIP₂) της κυτταρικής μεμβράνης για να σχηματιστεί η 1,4,5-τριφωσφορική ινοσιτόλη (IP₃) και η διακυλογλυκερόλη⁷⁸. Η IP₃ επάγει την απελευθέρωση Ca²⁺ από το πυκνό σωληνοειδές σύστημα (DTS) ενώ η DAG ενεργοποιεί ένα άλλο ένζυμο, την πρωτεϊνική κινάση C (PKC) η οποία φωσφορυλιώνει μια σειρά σηματοδοτικών πρωτεϊνών που ελέγχουν την έκκριση των κοκκίων και την ενεργοποίηση της α_{IIb}β₃, μία από τις οποίες είναι και η ταλίνη⁷⁹.

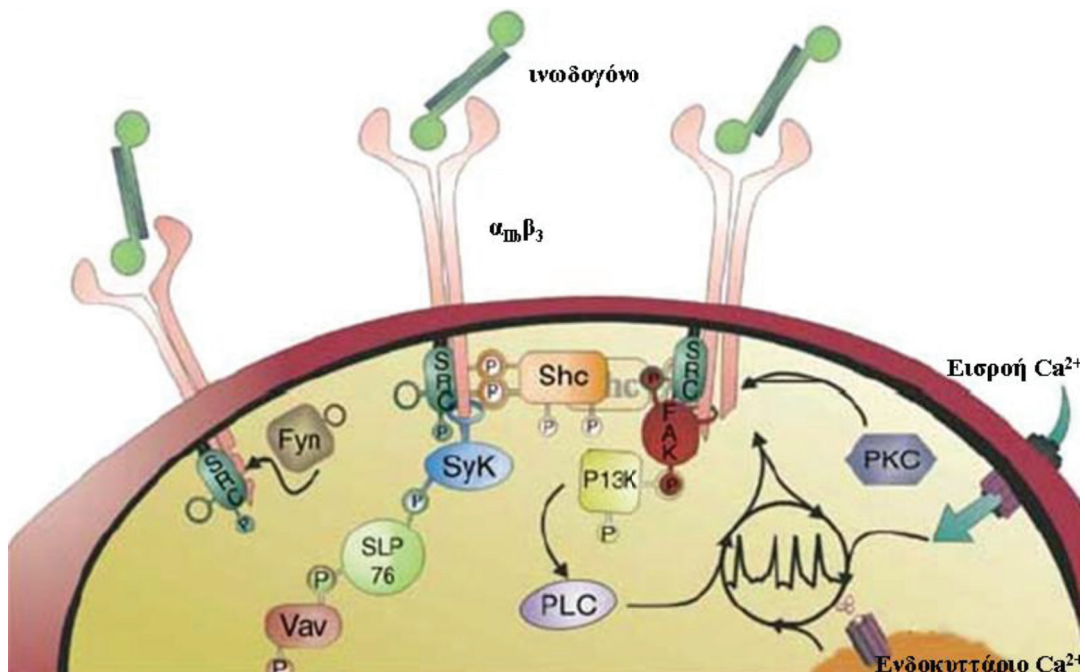
Όπως φαίνεται και στην εικόνα 3.7., ένα χαρακτηριστικό παράδειγμα της "από μέσα προς τα έξω" σηματοδότησης είναι αυτή που ενεργοποιείται από την πρόσδεση της θρομβίνης στον PAR1. Η πρόσδεση αυτή οδηγεί στην υδρόλυση των φωσφολιπιδίων που καταλήγει στην παραγωγή της τριφωσφορικής ινοσιτόλης και της διακυλογλυκερόλης και στην αύξηση της συγκέντρωσης του ασβεστίου η οποία με τη σειρά της ενεργοποιεί το CALDAGGEF1 και την πρωτεϊνική κινάση C (PKC) και μετατρέπει τον PAR1 από μία GDP-δεσμευμένη προσκολλημένη στη μεμβράνη μορφή σε μία GTP-δεσμευμένη μορφή. Η ενεργοποίηση του PAR1 οδηγεί σε στρατολόγηση του RAP1-GTP-μορίου προσαρμογέα-αλληλεπίδρασης (RIAM), και της ταλίνης στην πλασματική μεμβράνη. Αυτό διευκολύνει την πρόσβαση της ταλίνης στην ουρά της β3 υπομονάδας της α_{IIb}β₃ με αυτό να αποτελεί έναν από τους σημαντικότερους παράγοντες που διαχωρίζουν τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των δύο υπομονάδων της ιντεγκρίνης που διαχωρίζουν τις διαμεμβρανικές κυτταροπλασματικές περιοχές.



Εικόνα 3.7. Σχηματική παρουσίαση ενός από τα κύρια μονοπάτια της «από μέσα προς τα έξω» ενεργοποίησης της ιντεγκρίνης $\alpha_{IIb}\beta_3$. Η πρόσδεση της θρομβίνης στον PAR1 προκαλούν διαχωρισμό της κεφαλής και την ουρά της ταλίνης. Συνεπώς, οι περιοχές στην κεφαλή της ταλίνης συσχετίζονται με την κυτταροπλασματικής περιοχής της β_3 υπομονάδας, ενεργοποιώντας την ιντεγκρίνη $\alpha_{IIb}\beta_3$.

Η σύνδεση του ινωδογόνου στην $\alpha_{IIb}\beta_3$ οδηγεί στην ενεργοποίηση της «από έξω προς τα μέσα» σηματοδότησης η οποία προκαλεί αντιδράσεις φωσφορύλωσης και ανασυγκρότησης του κυτταροσκελετού (Εικόνα 3.8.)⁸⁰. Αποτέλεσμα της δέσμευσης του προσδέτη στον υποδοχέα $\alpha_{IIb}\beta_3$ είναι η ρύθμιση και σταθεροποίηση των αιμοπεταλίων, η εξάπλωση τους, η δευτερογενής τους συσσώρευση, η αποκοκκίωση τους, η συρρίκνωση του θρόμβου και πιθανώς αύξηση της προπηκτικής ικανότητας του αιμοπεταλίου⁸¹. Η σύνδεση του ινωδογόνου στον υποδοχέα προκαλεί την εμφάνιση νέων επιτόπων γνωστών σαν LIBS (Ligand-Induced Binding Sites) μερικοί από τους οποίους μπορούν να ανιχνευθούν με ειδικά μονοκλωνικά αντισώματα γνωστά σαν αντισώματα LIBS¹¹. Η αλλαγή στη διαμόρφωση του υποδοχέα μετά την πρόσδεση οδηγεί σε μη αντιστρεπτή σύνδεση ινωδογόνου – $\alpha_{IIb}\beta_3$ ^{82, 83}. Η σύνδεση του ινωδογόνου ή/και του vWf στον υποδοχέα $\alpha_{IIb}\beta_3$ προκαλεί ενδοκυττάρειες αντιδράσεις όπως είναι ο σχηματισμός

συμπλεγμάτων υποδοχέων $\alpha_{IIb}\beta_3$, η φωσφορυλίωση των τυροσινών και η ενεργοποίηση της κινάσης Syk. Μετά από λίγα δευτερόλεπτα, τα αιμοπετάλια αρχίζουν να σχηματίζουν μικροσκοπικά συσσωρεύματα. Η ‘‘από έξω προς τα μέσα’’ σηματοδότηση περιλαμβάνει αλληλεπιδράσεις μεταξύ κυτοπλασματικών τμημάτων της $\alpha_{IIb}\beta_3$, σηματοδοτικών μορίων και πρωτεϊνών του κυτταροσκελετού, στις οποίες συμπεριλαμβάνεται η βινικουλίνη, η ταλίνη και η α -ακτινίνη. Οι αρχικές σηματοδοτικές αντιδράσεις συνεχίζουν τη συγκρότηση του συμπλέγματος προωθώντας τις πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις, τον πολυμερισμό της ακτίνης και την ανασυγκρότηση του κυτταροσκελετού. Η πλήρης συσσώρευση και εξάπλωση των αιμοπεταλίων συσχετίζεται με τις κινάσες της τυροσίνης και την ενεργοποίηση των κινασών της $pp60^{Src}$ και της $pp125^{FAK}$ ⁸⁴.



Εικόνα 3.8. Ο μηχανισμός της ‘έξω-μέσα’ σηματοδότησης της ιντεγκρίνης $\alpha_{IIb}\beta_3$.

Τελικά, ο θρόμβος που δημιουργείται συνήθως είναι ασταθής και εύθρυπτος άρα και σπάνια αποφρακτικός, σε μικρά όμως αγγεία μπορεί να προκαλέσει σοβαρή αιμόσταση. Στα ΟΣΣ ο αρχικός αυτός άσπρος θρόμβος προκαλεί συχνά στηθαγχικά επεισόδια με τη μορφή ασταθούς στηθάγχης ή NSTEMI εμφράγματος χωρίς συνήθως να υπάρξει πλήρη απόφραξη της ροής του αγγείου.

Τα ενεργοποιημένα αιμοπετάλια στρατολογούν και άλλα αιμοπετάλια στον ολόένα αυξανόμενο αιμοπεταλιακό θρόμβο μέσω μηχανισμών ανάδρασης όπου απελευθερώνουν τους αγωνιστές τους και συνθέτουν *de novo* τον προ-συσσωρευτικό παράγοντα TxA_2 . Η

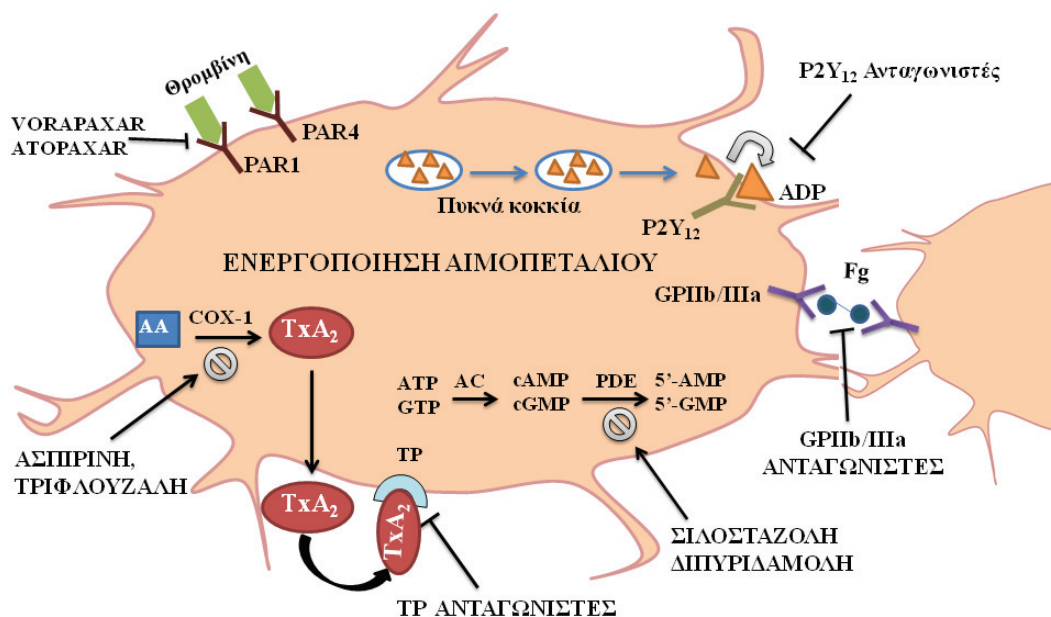
απελευθέρωση του ADP και η σύνθεση του TxA_2 σταθεροποιούν τον αρχικό αιμοπεταλιακό θρόμβο ενώ ταυτόχρονα προωθούν τη συμμετοχή και άλλων αιμοπεταλίων στη δημιουργία του θρόμβου στο σημείο της αγγειακής βλάβης. Τέλος, τα αιμοπετάλια παίζουν κύριο ρόλο στη δευτερογενή αιμόσταση όπου παράγοντες στην επιφάνεια των αιμοπεταλίων καταλύουν την ενεργοποίηση του μηχανισμού της πήξης που οδηγεί στη δημιουργία σταθερότερου συνήθως αποφρακτικού θρόμβου. Η δημιουργία δικτύου ινικής παγιδεύει και άλλα κυτταρικά στοιχεία ενώ με τη σύσπαση και τη συρρίκνωση του θρόμβου αυτός γίνεται σταθερός. Τέτοιοι θρόμβοι συναντώνται συχνά στα εμφράγματα STEMI στα οποία η θεραπεία είναι κυρίως θρομβολυτική με σκοπό την ενεργοποίηση του πλασμινογόνου και τη δημιουργία πλασμίνης που λύει το θρόμβο αυτού του είδους.

4. ΑΝΤΙΑΙΜΟΠΕΤΑΛΙΑΚΗ ΘΕΡΑΠΕΙΑ

4.1 Εισαγωγή

Τα διαθέσιμα σήμερα αντιαιμοπεταλιακά φάρμακα στοχεύουν σε σημεία-κλειδιά της ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων όπως η σύνθεση του TxA_2 διαμέσου της κυκλοοξυγονάσης-1 (COX-1), ο υποδοχέας του ADP, P2Y_{12} , και ο υποδοχέας $\alpha\text{IIb}\beta_3$. Επιπλέον, η τρέχουσα έρευνα έχει ήδη τραφεί στην ανάπτυξη ανταγωνιστών που θα στοχεύουν άλλους υποδοχείς των αιμοπεταλίων όπως είναι ο υποδοχέας της θρομβίνης PAR-1, ο υποδοχέας του TxA_2 , κλπ (Εικόνα 4.1.). Η διαχείριση των ασθενών υπό αντιαιμοπεταλιακή αγωγή απαιτεί μια βαθιά κατανόηση των φαρμακοκινητικών και φαρμακοδυναμικών ιδιοτήτων των φαρμάκων καθώς και των αλληλεπιδράσεων τους με άλλα φάρμακα που μπορεί να επηρεάσουν την θεραπευτική τους αποτελεσματικότητα.

Κεντρικό ρόλο στη διαχείριση των ασθενών με ΟΣΣ που υποβάλλονται σε αγγειοπλαστική παίζουν οι ανταγωνιστές του υποδοχέα P2Y_{12} ^{85,86}. Σύμφωνα με τις οδηγίες της Ευρωπαϊκής Καρδιολογικής Εταιρείας (ESC) και της Αμερικανικής Καρδιολογικής Εταιρείας (AHA), για τη θεραπεία των ΟΣΣ συνιστάται η λήψη διπλής αντιαιμοπεταλιακής αγωγής με ασπιρίνη και έναν P2Y_{12} ανταγωνιστή^{87,88}.



Εικόνα 4.1. Σημεία δράσης των αντιαιμοπεταλιακών φαρμάκων που χρησιμοποιούνται στην κλινική πράξη ή είναι υπό διερεύνηση. Συντμήσεις: AA; Αραχιδονικό οξύ, AC; αδενυλοκυκλάση, ATP; τριφωσφορική αδενοσίνη, ADP; διφωσφορική αδενοσίνη, c-AMP; Κυκλική μονοφωσφορική αδενοσίνη, c-GMP; Κυκλική μονοφωσφορική γουανοσίνη, TP; Υποδοχέας Θρομβοξανίου και ενδοϋπεροξειδίων των προσταγλανδινών, COX-1; Κυκλοξυγονάση-1, αIIbβ3; Γλυκοπρωτεϊνικός υποδοχέας IIb/IIIa, PAR; υποδοχέας ενεργοποιούμενος από πρωτεάσες; TxA₂; θρομβοξανίο A₂ Fg; ινωδογόνο, PDE; φωσφοδιεστεράση.

Τα τελευταία 25 χρόνια έχουν πραγματοποιηθεί διάφορες κλινικές μελέτες μεγάλης κλίμακας οι οποίες έχουν διερευνήσει την αποτελεσματικότητα και ασφάλεια των φαρμακευτικών παραγόντων συμπεριλαμβανομένων της ασπιρίνης και των P2Y₁₂ ανταγωνιστών ως μονοθεραπεία ή σε συνδυασμό (Πίνακας 4.1.).

Οι μελέτες αυτές βοήθησαν στην επιλογή των αντιαιμοπεταλιακών φαρμάκων που θα συνταγογραφηθούν σε κάθε ασθενή. Η επιλογή αυτή πρέπει να γίνεται με γνώμονα την ανάλυση κινδύνου-οφέλους ούτως ώστε να βρεθεί η ισορροπία μεταξύ του οφέλους της μείωσης των ισχαιμικών επεισοδίων και του αυξημένου κινδύνου εμφάνισης των παθολογικών αιμορραγιών. Γενικά, όταν μετά το ισχαιμικό επεισόδιο ο κίνδυνος θνησιμότητας ή/και νοσηρότητας είναι αυξημένος χορηγούνται τα περισσότερα ισχυρά αντιαιμοπεταλιακά φάρμακα τα οποία αυξάνουν τον κίνδυνο αιμορραγίας⁸⁹.

Πίνακας 4.1. Μεγάλης κλίμακας κλινικές μελέτες πάνω στην αποτελεσματικότητα και ασφάλεια της θεραπευτικής αντιμετώπισης των ΟΣΣ

Κλινική μελέτη	Πληθυσμός μελέτης	Ομάδες	Background θεραπεία	Προηγμένες καταληκτικό σημείο αποτελεσματικότητα	Αποτελέσματα για την αποτελεσματικότητα	Προηγμένες καταληκτικό σημείο ασφάλειας	Αποτελέσματα για την ασφάλεια
ISIS-2 (1988) ⁹⁰	17.187 ασθενείς με OEM	Στρεπτοκινάση, ασπιρίνη, και τα δυο, και εικονικό φάρμακο	Καμία	Καρδιαγγειακή θνησιμότητα σε 5 εβδομάδες	10,4%,* 10,7%,* 8,0%,*† 13,2%	Αιμορραγία που χρειάζεται μετάγγιση	0,51%,* 0,16%, 0,56%,* 0,26%
CURE (2001) ⁹¹	12.562 ασθενείς με NSTE ΟΣΣ	Κλοπιδογρέλη 300 mg ακολουθούμενη από 75 mg μία φορά ημερησίως και εικονικό φάρμακο	Ασπιρίνη	Καρδιαγγειακός θάνατος, OEM, εγκεφαλικό στους 12 μήνες	9,3%, 11,4%, p<0,001	Μειζονες αιμορραγίες κατά CURE	3,7%, 2,7%, p=0,001
CLARITY-TIMI 28 (2005) ⁹²	3.491 ασθενείς με STEMI	από 75 mg μία φορά ημερησίως και εικονικό φάρμακο	Ασπιρίνη (και ηπαρίνη όταν είναι απαραίτητο)	Αποφραγμένη εξαιτίας εμφράκτου <i>σπερμανιά</i> α ρτηρία, θάνατος, OEM στις 30-ημέρες	15,0%, 21,7%, p<0,001	Μειζονες αιμορραγίες κατά TIMI	1,3%, 1,1%, p=0,64
COMMIT (2005) ⁸⁵	45.852 ασθενείς με OEM	Κλοπιδογρέλη 75 mg/ ημέρα	Ασπιρίνη	Θάνατος, νέο έμφραγμα, εγκεφαλικό επεισόδιο (θάνατος από κάθε αιτία) σε 28 ημέρες	9,2% (7,5%), 10,1% (8,1%), p=0,002 (p=0,03)	Όλες οι θανατηφόρες ή ενδοκράνιες αιμορραγίες	0,58%, 0,55%, p=0,59
CURRENT-OASIS 7 (2010) ⁹³	25.086 ασθενείς με NSTE ή STEMI ΟΣΣ	Κλοπιδογρέλη 600 mg ακολουθούμενη από 150 mg/ημέρα για 7 ημέρες ακολουθούμενη	Ασπιρίνη	Καρδιαγγειακός θάνατος, OEM, εγκεφαλικό επεισόδιο στις 30 ημέρες	4,2%, 4,4%, p=0,30	CURRENT μειζονες αιμορραγίες	2,5%, 2,0%, p=0,01

TRITON– TIMI 38 (2007) ⁹⁴	13. 608 ασθενείς με ΟΣΣ NSTE ή STEMI που υποβάλλονται ι σε PCI	από 75 mg/ημέρα, Κλοπιδογρέλη 300mg ακολουθούμενη από 75 mg/ημέρα Πρασουγρέλη 60 mg ακολουθούμενη από 10 mg/ημέρα, και κλοπιδογρέλη 300 mg ακολουθούμενη από 75 mg/ημέρα	Ασπιρίνη	Καρδιαγγειακός θάνατος, OEM, εγκεφαλικό επεισόδιο στις 450 ημέρες	9,9%, 12,1%, p<0,001	Μη σχετικές με την αορτοστεφανιαία παράκαμψη μειζονες αιμορραγίες κατά TIMI	2,4%, 1,8%, p=0,03
	7.243 ασθενείς ηλικίας <75 ετών με STEMI ή ασταθή στηθάγχη χωρίς Επαναγγείωσ η	Πρασουγρέλη 10 mg/ημέρα και κλοπιδογρέλη 75 mg/ημέρα			13,9%, 16,0%, p=0,21	Μειζονες αιμορραγίες κατά GUSTO (TIMI)	0,4% (1,1%), 0,4% (0,8%), p=0,87 (p=0,27)
PLATO (2009) ⁹⁶	18.624 ασθενείς με ΟΣΣ NSTE ή STEMI	Τικαγρελόρη 180 mg ακολουθούμενη από 90 mg δύο φορές την ημέρα και κλοπιδογρέλη 300–600 mg ακολουθούμενη	Ασπιρίνη	Καρδιαγγειακός θάνατος, OEM, εγκεφαλικό επεισόδιο στους 12 μήνες	9,8%, 11,7%, p<0,001	PLATO Μειζονες αιμορραγίες	11,6%, 11,2%, p=0,43

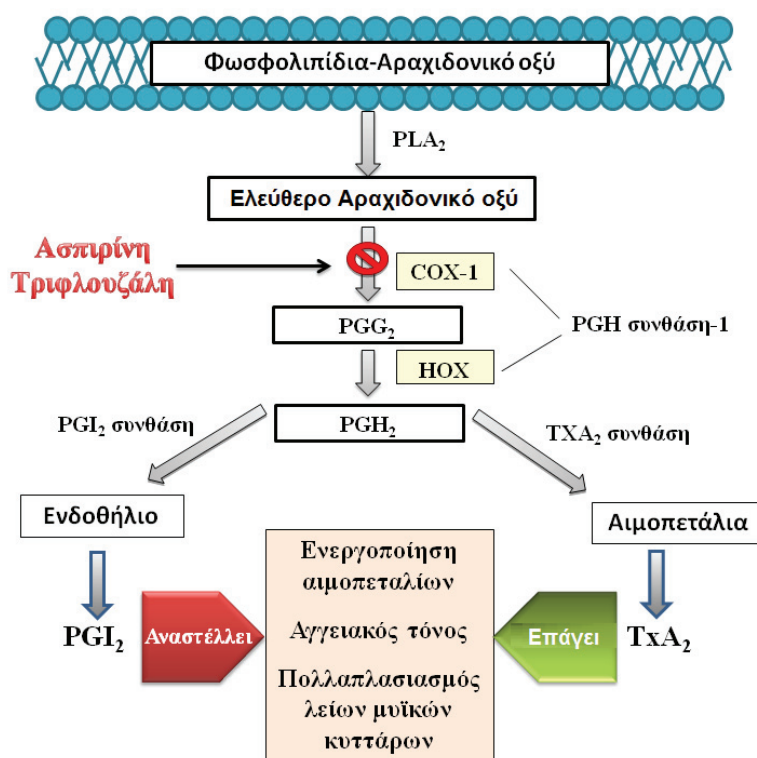
PEGASUS-TIMI 54 (2015) ^{97,98}	>21 000 ασθενείς με OEM πριν από 1–3 χρόνια	75 mg/ημέρα από Τικαγρελόρη 90 mg δύο φορές την ημέρα, Τικαγρελόρη 60 mg δύο φορές την ημέρα και εικονικό φάρμακο		Ασπιρίνη	Καρδιαγγειακός θάνατος, OEM, εγκεφαλικό επεισόδιο	Μείζονες αιμορραγίες κατά TIMI
TRACER (2012) ⁹⁹	12.944 ασθενείς με ΟΣΣ NSTEMI	Vorapaxar 40 mg ακολουθούμενη από 2,5 mg/ημέρα και εικονικό φάρμακο		Συνηθισμένη θεραπεία	εγκεφαλικό επεισόδιο, υποτροπιάζουσα ισχαιμία στο νοσοκομείο, επείγουσα επαναγγείωση στα 2 χρόνια	Μέτρια-σοβαρή αιμορραγία κατά GUSTO 7,2%, 5,2%, p<0,001
TRA 2P-TIMI 50 (2012) ²³	26 449 ασθενείς με ιστορικό OEM, ισχαιμικό επεισόδιο ή ΠΑΝ	Vorapaxar 2,5 mg/ημέρα και εικονικό φάρμακο		Ασπιρίνη	Καρδιαγγειακός θάνατος, OEM, εγκεφαλικό επεισόδιο στα 3 χρόνια	Μέτρια-σοβαρή αιμορραγία κατά GUSTO 4,2%, 2,5%, p<0,001

ΟΣΣ=οξύ στεφανιαίο σύνδρομο, OEM= οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου, ΠΑΝ=περιφερική αρτηριακή νόσος. *p<0,001 έναντι εικονικού φαρμάκου. †p<0,001 έναντι μονού φαρμάκου

Στο παρόν κεφάλαιο θα αναφερθούν οι φαρμακοδυναμικές και φαρμακοκινητικές ιδιότητες όλων των αντιαιμοπεταλιακών φαρμάκων που χρησιμοποιούνται στην καθημερινή κλινική πράξη ενώ θα γίνει ιδιαίτερη αναφορά στα φάρμακα που λαμβάνουν οι ασθενείς με ΟΣΣ.

4.2 Αναστολείς της COX-1

Μια από τις συνέπειες της ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων είναι η απελευθέρωση του αραχιδονικού οξέος (AA) από τα φωσφολιπίδια της κυτταρικής μεμβράνης με τη δράση μιας κυτοσολικής φωσφολιπάσης A_2 . Στη συνέχεια το ελεύθερο AA μετατρέπεται στις ασταθείς προσταγλανδίνες (PG)- ενδοϋπεροξειδία, PGG₂ και PGH₂ με τη δράση του ενζύμου συνθάση-1 της PGH το οποίο έχει δύο καταλυτικές δράσεις, τη δράση COX-1 που οδηγεί στο σχηματισμό της PGG₂ και τη δράση υδροϋπεροξειδάσης που μετατρέπει την PGG₂ σε PGH₂. Στα αιμοπετάλια, η PGH₂ μεταβολίζεται σε TxA₂ με τη δράση του ενζύμου συνθάση του TxA₂. Το TxA₂ ενεργοποιεί περαιτέρω τα αιμοπετάλια διαμέσου των ειδικών μεμβρανικών υποδοχέων TP (Thromboxane and Prostaglandin endoperoxide PGG₂ / PGH₂ receptors), ενώ παράλληλα ασκεί διάφορες φλεγμονώδεις δράσεις σε κύτταρα του αρτηριακού τοιχώματος¹⁰⁰. Στα ενδοθηλιακά κύτταρα το AA μεταβολίζεται προς PGI₂ με τη δράση του ενζύμου συνθάση της PGI₂¹⁰⁰. Σε αντίθεση με το TxA₂, η PGI₂ ασκεί ισχυρή αντιαιμοπεταλιακή δράση. Η αναστολή της COX-1 στα αιμοπετάλια αναστέλλει σημαντικά την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων που εξαρτάται από το TxA₂, παρά το ότι αφήνει όλα τα υπόλοιπα μονοπάτια ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων ανεπηρέαστα (Εικόνα 4.2.).



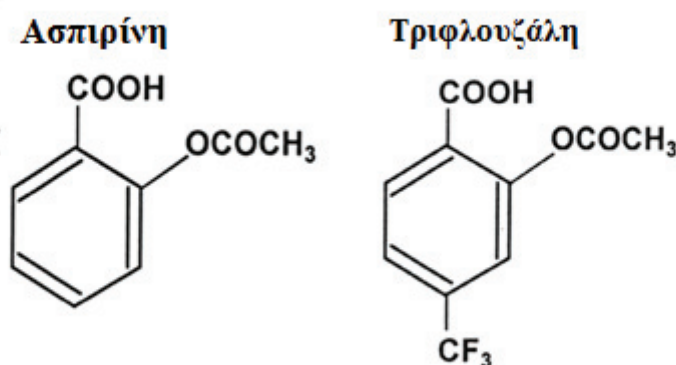
Εικόνα 4.2. Μεταβολισμός του αραχιδονικού οξέος

Το TxA_2 κυρίως παράγεται από τα ενεργοποιημένα αιμοπετάλια και συμπεριφέρεται ως αγγειοδραστικός παράγοντας που επηρεάζει τη ροή του αίματος και την πίεση. Επίσης, μπορεί να επηρεάζεται ως προθρομβωτικός παράγοντας, ικανός να προάγει την ενεργοποίηση και την επακόλουθη συσσώρευση των αιμοπεταλίων. Η τελευταία λειτουργία συντελείται από την πρόσδεση του TxA_2 στους αντίστοιχους αιμοπεταλιακούς υποδοχείς (TPR) με αποτέλεσμα να ενεργοποιείται η φωσφολιπάση C και να επάγονται οι κυτταροπλασματικές εξαρτώμενες από τα ιόντα Ca^{+} Rho κινάσες που με τη σειρά τους ενεργοποιούν τη φωσφολιπάση A_2 με αποτέλεσμα τη ρύθμιση και την έκφραση της ιντεγκρίνης $\alpha\text{IIb}\beta_3$ στην επιφάνεια των αιμοπεταλίων¹⁰¹.

Επειδή το TxA_2 είναι ένας βιοδραστικός, σχετιζόμενος με κλινικά επεισόδια προθρομβωτικός μεταβολίτης θρομβοξανίου, αποτελούσε μια λογική επιλογή για τον προσδιορισμό του στο εργαστήριο. Παρ'όλα αυτά, η υψηλή του αστάθεια και ο πολύ μικρός χρόνος ημίσειας ζωής (20-30 s) κάνει την μέτρησή του τεχνικά πολύ δύσκολη και μη πρακτική. Πράγματι, το TxA_2 υδρολύεται γρήγορα σε ένα βιολογικά ανενεργό αλλά περισσότερο σταθερό μεταβολίτη το θρομβοξανίο B_2 (TxB_2), το οποίο μεταβολίζεται περαιτέρω στο ήπαρ στο 11- δέυδρο-θρομβοξανίο B_2 που απεκκρίνεται με τα ούρα. Το 11-

δέϋδρο-θρομβοξανίο B₂ στα ούρα άμεσα αντανakλά την αιμοπεταλιακή παραγωγή του TxA₂ και αποτελεί έναν καλό και αξιόπιστο βιοδείκτη για τον εργαστηριακό προσδιορισμό της αιμοπεταλιακής ενεργοποίησης¹⁰².

Η ασπιρίνη είναι ο κυριότερος μη αντιστρεπτός αναστολέας της COX-1 ο οποίος αποτελεί για πολλές δεκαετίες τον ακρογωνιαίο λίθο της αντιαιμοπεταλιακής θεραπείας. Παρόμοια δράση με την ασπιρίνη στην COX-1 έχει και η τριφλουζάλη. Στην εικόνα 4.3. φαίνονται οι χημικές δομές των αναστολέων της COX-1.



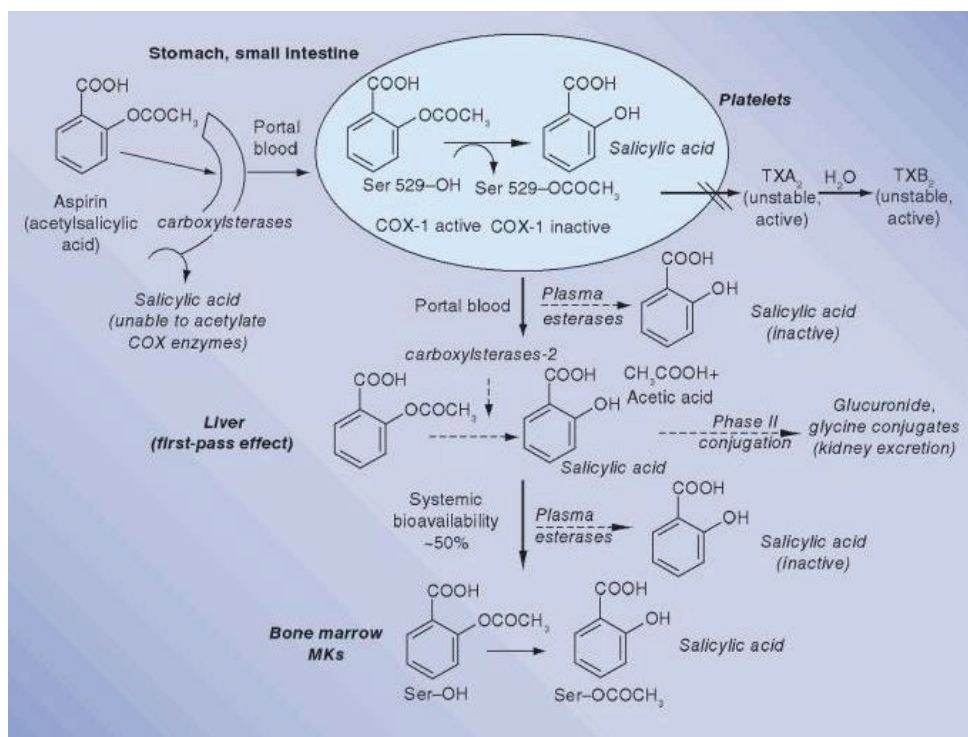
Εικόνα 4.3. Χημικές δομές των αναστολέων της COX-1.

4.2.1 Ασπιρίνη

Η ασπιρίνη (ακετυλοσαλικυλικό οξύ) είναι από τα περισσότερο χρησιμοποιούμενα φάρμακα παγκοσμίως. Αναπτύχθηκε τον 19^ο αιώνα και αμέσως διατέθηκε στο εμπόριο ως πανάκεια για κοινές ασθένειες. Κατά τη διάρκεια του 20^{ου} αιώνα, ανακαλύφθηκαν οι αντιφλεγμονώδεις ιδιότητές της, οι οποίες αποδόθηκαν στην αναστολή της κυκλοοξυγονάσης που οδηγούσε σε περιορισμένη σύνθεση της προσταγλανδίνης. Η καρδιοπροστατευτική της δράση δεν είχε εδραιωθεί τουλάχιστον μέχρι τη δεκαετία του 1980, παρ' όλο που παρείχε ένα σημαντικό πλεονέκτημα επιβίωσης μετά από έμφραγμα του μυοκαρδίου. Αυτή ήταν η αρχή για να αναδειχθεί η υψηλή αποτελεσματικότητά της στη δευτερογενή πρόληψη της καρδιαγγειακής νόσου με αποτέλεσμα σήμερα να αποτελεί τον ακρογωνιαίο λίθο της αντιαιμοπεταλιακής αγωγής εξαιτίας του αποδεδειγμένου προφίλ ασφάλειας και κλινικής αποτελεσματικότητας. Ο κύριος μηχανισμός της αντιαιμοπεταλιακής της δράσης έγκειται στη μη ειδική και μη αντιστρεπτή αναστολή της COX-1 με ακετυλίωση της υδροξυλομάδας της σερίνης-529 του καταλυτικού της κέντρου.

Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση της σύνθεσης του TxA_2 και συνεπώς την αναστολή της συσώρευσης των αιμοπεταλίων¹⁰³ (Εικόνα 4.4.).

Μετά την από του στόματος χορήγησή της, η ασπιρίνη συναντά το βλεννογόνο του στομάχου και το άνω μέρος του εντέρου στην λιπόφιλη της κατάσταση με βιοδιαθεσιμότητα από 40-50%. Υπόκειται σε σημαντική προ-συστημική υδρόλυση σε σαλικυλικό οξύ από τις εστεράσες του πλάσματος και του ενδοθηλίου (Εικόνα 16). Ο χρόνος ημίσειας ζωής στο πλάσμα είναι περίπου 15-20 min σε όλες τις δόσεις θεραπείας. Η αναστολή της αιμοπεταλιακής COX-1 γίνεται πρώτα στην πυλαία κυκλοφορία όπως αποδεικνύεται από την πτώση των επιπέδων του θρομβοξανίου B_2 (TxB_2) στον ορό σε σύγκριση με αυτά που είχαν ανιχνευτεί πριν την ανίχνευση της ασπιρίνης στην συστηματική κυκλοφορία καθώς επίσης και εξαιτίας της απορρόφησης της ασπιρίνης κατά 50% κατά τον πρώτο ηπατικό μεταβολισμό.



Εικόνα 4.4. Η ασπιρίνη που απορροφάται στο στομάχι και στο μικρό έντερο, ασκεί τη φαρμακοδυναμική της δράση μέσω της ακετυλίωσης της σερίνης στη θέση 529 της COX-1. Βιομετασχηματίζεται στο ανενεργό σαλικυλικό οξύ από τη δράση των εστερασών του εντέρου, του πλάσματος και του ήπατος. Η βιοδιαθεσιμότητα της ασπιρίνης είναι το 50% της δόσης που έχει χορηγηθεί. Μόλις εισέλθει στη συστηματική κυκλοφορία, η ασπιρίνη φτάνει στα μεγακαρυοκύτταρα του μυελού των οστών και αναστέλλει την COX-1 και -2 των μεγακαρυοκυττάρων.

Για την πλήρη αναστολή της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων από την ασπιρίνη, είναι απαραίτητη η αναστολή > 90% του σχηματισμού του TxA_2 , η οποία μπορεί να επιτευχθεί με χορήγηση ημερήσιας δόσης ασπιρίνης 30 mg. Όταν τα αιμοπετάλια βρίσκονται υπό τη δράση της ασπιρίνης, η COX-1 απενεργοποιείται και παραμένει ανενεργός για όλη την υπόλοιπη διάρκεια ζωής του αιμοπεταλίου (7-10 ημέρες) καθώς ως απύρηννα κύτταρα δεν μπορούν να συνθέσουν νέα μόρια COX-1. Συνεπώς, η αποκατάσταση της ομαλής λειτουργίας των αιμοπεταλίων μετά από τη χορήγηση της ασπιρίνης συμβαίνει μόνο με την παραγωγή νέων αιμοπεταλίων. Θα πρέπει να τονιστεί ότι οι χαμηλές δόσεις ασπιρίνης δεν επηρεάζουν τη δράση της COX-1 των ενδοθηλιακών κυττάρων και συνεπώς δεν μειώνουν την παραγωγή της PGI_2 , η οποία έχει ισχυρή αντιαιμοπεταλιακή δράση¹⁰⁴. Τέλος η ασπιρίνη σε υψηλές συγκεντρώσεις αναστέλλει το ένζυμο κυκλοοξυγονάση-2 (COX-2) με αποτέλεσμα την εκδήλωση αντιφλεγμονώδους δράσης¹⁰⁵.

Μία δόση ημερησίως φάνηκε πως μπορεί να προκαλέσει επαρκή αναστολή της αιμοπεταλιακής COX-1 σε υγιείς εθελοντές και σε ασθενείς με καρδιαγγειακή νόσο. Το εύρημα ίσως προκαλεί έκπληξη αν λάβουμε υπόψη μας πως τα αιμοπετάλια επιζούν για 10 ημέρες και πως θεωρητικά θα υπήρχαν περίπου 10% αιμοπετάλια που δεν θα είχαν εκτεθεί στην ασπιρίνη πριν τη χορήγηση κάθε δόσης ημερησίως. Παρ'όλα αυτά, η ικανότητα της ασπιρίνης να αναστέλλει την COX-1 των μεγακαρυοκυττάρων είναι πολύ πιθανό να οδηγήσει τα αιμοπετάλια να εισαχθούν στην κυκλοφορία με ήδη ανεσταλμένη την COX-1 καθώς τα αιμοπετάλια στα τελικά στάδια ανάπτυξής τους δεν μπορούν να αναγεννήσουν COX-1 πριν την απελευθέρωσή τους (Εικόνα 4.5.).

Ο βαθμός με τον οποίο η αιμοπεταλιακή COX-1 και συνεπώς η σύνθεση του TxA_2 πρέπει να αναστέλλεται πριν την αιμοπεταλιακή συσσώρευση παραμένει θέμα αντιλογίας. Η παρατήρηση πως τα αιμοπετάλια έχουν την ικανότητα να παράγουν TxA_2 *in vitro* που υπερβαίνει κατά πολύ τη συστηματική παραγωγή του TxA_2 που μετράται *in vivo* αναδεικνύει πως η αναστολή της αιμοπεταλιακής COX-1 μπορεί να επιτρέψει τη διαμεσολαβούμενη από το TxA_2 συσσώρευση. Περαιτέρω εργασίες στις οποίες προσδιορίστηκαν *in vivo* οι μεταβολίτες του TxA_2 στα ούρα και *ex vivo* η αιμοπεταλιακή ενεργότητα οδήγησαν στην ανάπτυξη της 'υπόθεσης του 95%', η οποία δηλώνει πως είναι απαραίτητη αναστολή μεγαλύτερη του 95% του TxA_2 που παράγεται από την COX-1 για την αναστολή της αιμοπεταλιακής συσσώρευσης.

Πρόσφατα, χρησιμοποιώντας ένα ευρύ φάσμα συγκεντρώσεων αγωνιστών αποκαλύφθηκε πως για τους αγωνιστές που εξαρτώνται από το TxA_2 , αραχιδονικό οξύ και χαμηλής-δοσολογίας κολλαγόνο υπάρχει γραμμική σχέση μεταξύ της αναστολής της παραγωγής του αιμοπεταλιακού TxA_2 και της καταστολής της διαμεσολαβούμενης από το TxA_2 αιμοπεταλιακής συσσώρευσης.

➤ *Η ασπιρίνη ως θεραπεία για την αντιμετώπιση της καρδιαγγειακής νόσου*

Η ασπιρίνη είναι θεμελιώδης επιλογή στην αντιμετώπιση και πρόληψη της καρδιαγγειακής νόσου. Πράγματι, ιστορικά η ασπιρίνη ήταν το πρώτο αντιαιμοπεταλιακό φάρμακο που έδειξε όφελος στην αντιμετώπιση των ΟΣΣ. Η πρώτη μεγάλη κλινική μελέτη ISIS που πραγματοποιήθηκε ανέδειξε τα οφέλη της θρομβόλυσης και της χρήσης της χαμηλής δόσης της ασπιρίνης στα ΟΣΣ⁹⁰. Αργότερα βρέθηκε πως η μικρή δόση ασπιρίνης μειώνει τα αγγειακά επεισόδια 6,7% έναντι 8,2% ανα χρόνο, $p < 0,001$) και τα συνολικά εγκεφαλικά επεισόδια (2,08% έναντι 2,54% ανα χρόνο, $p = 0,002$)¹⁰⁶. Από τότε, η ασπιρίνη υπήρξε ο θεμελιώδης λίθος της αντιθρομβωτικής θεραπείας για όλες τα ΟΣΣ.

Σε μία πρόσφατη μετα-ανάλυση 197 τυχαιοποιημένων κλινικών μελετών στην οποία συμπεριλαμβάνονται 135.640 ασθενείς αποδείχθηκε πως η ασπιρίνη μειώνει κατά 25% τον κίνδυνο αγγειακού επεισοδίου ή καρδιαγγειακού θανάτου ασθενών υψηλού κινδύνου κατά τη δευτερογενή πρόληψη. Το ποσοστό αυτό θα μπορούσε να είναι μεγαλύτερο αν δεν υπήρχε αυτή η μεγάλη ετερογένεια στην αιτιολογία των ασθενών, ειδικά στην περίπτωση του ισχαιμικού εγκεφαλικού που οι μηχανισμοί που οδηγούν σε αυτό μπορεί να είναι μη αθηροθρομβολικοί και να μην διαμεσολαβούνται από τα αιμοπετάλια. Επιπλέον, οι μικρές δόσεις ασπιρίνης (75-100 mg) φαίνεται πως είναι εξίσου αποτελεσματικές στην πρόληψη επεισοδίων ή καρδιαγγειακού θανάτου όσο οι μεγαλύτερες δόσεις (300mg). Η ασπιρίνη είναι επίσης αποτελεσματική στη μείωση της θνητότητας από καρδιαγγειακά επεισόδια σε ασθενείς χαμηλού κινδύνου που δεν έχουν προγενέστερα καρδιαγγειακά επεισόδια. Η μελέτη που έγινε για την πρωτογενή πρόληψη ανέδειξε μείωση του σχετικού κινδύνου του θανάτου στο 0,56 σε ασθενείς που λαμβάνουν ασπιρίνη 100 mg ημερησίως. Παρ' όλα αυτά η ασπιρίνη δεν μπορεί να προστατεύσει όλους τους ασθενείς¹⁰⁷. Η κλινική μελέτη (TIMI 11B) ανέδειξε πως η χρόνια χρήση ασπιρίνης μπορεί να αποτελέσει έναν δείκτη υψηλού κινδύνου για τα οξέα στεφανιαία σύνδρομα και μπορεί να δημιουργήσει μια νέα ομάδα ασθενών υψηλού κινδύνου που δεν έχουν προηγουμένως εγκατεστημένη

καρδιαγγειακή νόσο. Επιπλέον, μια μελέτη από τους *Belch και συν.* το 2008 στην οποία συμμετείχαν 1274 ασθενείς προτάθηκε πως η πρωτογενής πρόληψη των καρδιαγγειακών επεισοδίων δεν είναι τόσο αποτελεσματική στους ασθενείς με διαβήτη μετά από χορήγηση ασπιρίνης.

Παρ' όλα αυτά, εκτιμάται ότι το 5-60% των ασθενών που λαμβάνουν θεραπεία με ασπιρίνη για δευτερογενή πρόληψη δεν αποκρίνονται καλά στην ασπιρίνη, ένα ετερογενές φαινόμενο που έγινε γνωστό ως αντίσταση στην ασπιρίνη¹⁰⁸.

Όπως συμβαίνει με όλα τα φάρμακα, η θεραπεία με ασπιρίνη έχει παρενέργειες οι οποίες προέρχονται από την αναστολή των προστανοειδών στους ιστούς εκτός των αιμοπεταλίων. Ειδικότερα, η μείωση των γαστρικών προστανοειδών μπορεί να οδηγήσουν σε θανατηφόρα γαστρεντερική αιμορραγία¹⁰⁹ και η μείωση της σύνθεσης των νεφρικών προστανοειδών μπορεί να οδηγήσει σε επιδείνωση της νεφρικής λειτουργίας και σε καρδιακή ανεπάρκεια¹¹⁰.

4.2.2 Τριφλουζάλη

Η τριφλουζάλη (2-ακετυλοξυ-4-τριφθορομεθυλο-βενζοϊκό οξύ, Εικόνα 4.3.), είναι ένα αντιαιμοπεταλιακό φάρμακο που η χημική του δομή μοιάζει με της ασπιρίνης αλλά το φαρμακοδυναμικό και φαρμακοκινητικό της προφίλ διαφέρει. Χορηγείται από το στόμα και η βιοδιαθεσιμότητά της κυμαίνεται από 83% έως 100%¹¹¹. Δεσμεύεται σχεδόν πλήρως στις πρωτεΐνες του πλάσματος και διέρχεται με ευκολία τους οργανικούς φραγμούς. Η τριφλουζάλη αφού αποακετυλιωθεί στο ήπαρ, σχηματίζει τον κύριο μεταβολίτη της, το 2-υδροξυ-4-τριφθορομεθυλο-βενζοϊκό οξύ (HTB) ο οποίος εξακολουθεί να έχει αντιαιμοπεταλιακή δράση, σε αντίθεση με τον ανενεργό μεταβολίτη της ασπιρίνης (σαλικυλικό οξύ), και χρόνο ημίσειας ζωής περίπου 40h¹¹². Η τριφλουζάλη αναστέλλει μη αντιστρεπτά, σε μικρότερο βαθμό από την ασπιρίνη, την COX-1 και μειώνει την παραγωγή του TxA₂. Επίσης, η τριφλουζάλη και κυρίως ο μεταβολίτης της, HTB, αναστέλλει τη φωσφοδιεστεράση των αιμοπεταλίων, αυξάνοντας έτσι τα επίπεδα της κυκλικής μονοφωσφορικής αδενοσίνης (c-AMP) και της κυκλικής μονοφωσφορικής γουανοσίνης (c-GMP) που έχουν ισχυρή αντιαιμοπεταλιακή δράση¹¹³.

4.3. Ανταγωνιστές του υποδοχέα P2Y₁₂ του ADP

Οι ανταγωνιστές του υποδοχέα P2Y₁₂ που χρησιμοποιούνται σήμερα στην κλινική πράξη είναι η κλοπιδογρέλη, η πρασουγρέλη και η τικαγρελόρη¹¹⁴. Ο πρώτος χρονικά ανταγωνιστής ήταν η τικλοπιδίνη της οποίας όμως η χρήση έχει σήμερα περιοριστεί σημαντικά, εξαιτίας των διαφόρων επιπλοκών. Επίσης, υπάρχουν δύο νεώτεροι ανταγωνιστές του P2Y₁₂, η καγκρελόρη και η ελινογρέλη¹¹⁴. Τα κύρια χαρακτηριστικά των ανταγωνιστών του υποδοχέα P2Y₁₂ φαίνονται στον πίνακα 4.2..

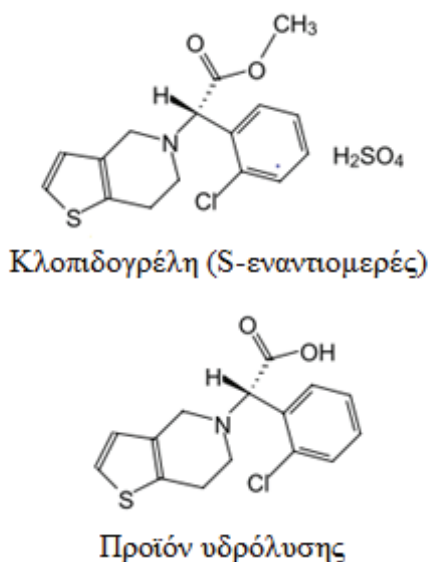
Πίνακας 4.2. Χαρακτηριστικά των ανταγωνιστών του υποδοχέα P2Y₁₂

Ανταγωνιστής P2Y ₁₂	Τύπος	Χορήγηση	Δράση	Χρόνος για μέγιστη ανασταλτική δράση	Χρόνος ημίσειας ζωής	Δόση φόρτισης / συντηρήσης	Αλληλεπιδράσεις με άλλα φάρμακα	Αντίσταση
Κλοπιδογρέλη	Θειενοπυριδίνη	Από του στόματος	Ηπατική ενεργοποίηση, μη αντιστρεπτή αναστολή	6-12 h	7-8 h	300-600mg / 75 mg ημερησίως	Ναι	Ναι
Πρασουγρέλη	Θειενοπυριδίνη	Από του στόματος	Ηπατική ενεργοποίηση, μη αντιστρεπτή αναστολή	2 h	7-8 h	60 mg / 10 mg ημερησίως	Ναι	Ναι/Όχι
Τικαγρελόρη	Κυκλοπεντυλο- τριαζολο- πυριμιδίνη	Από του στόματος	Άμεση, μη συναγωνιστική, αντιστρεπτή αναστολή	2 h	6-8 h	180 mg / 90 mg x 2 ημερησίως	Δεν έχει αναφερθεί	Όχι
Καργελόρη	ΑΤΡ ανάλογο	Ενδοφλέβια	Άμεση, συναγωνιστική, αντιστρεπτή αναστολή	Sec	3-9 min	30-μg/kg / συνεχής έγχυση 4 μg/kg/min	Δεν έχει αναφερθεί	Όχι
Ελινογρέλη	κιναζολινο-2,4- δiónη	Από του στόματος / Ενδοφλέβια	Άμεση, συναγωνιστική, αντιστρεπτή αναστολή	4-6 h	12 h	mg έγχυση / 50-150 mg από του στόματος x 2 ημερησίως	Δεν έχει αναφερθεί	Όχι

4.3.1 Κλοπιδογρέλη

➤ Το μόριο κλοπιδογρέλη

Η κλοπιδογρέλη, (S)-(+)-μεθυλ-(2-χλωροφαινυλ)(6,7-διυδρο-4H-θειενο [3,2-c]πυριδ-5-υλ) οξικό άλας είναι ένα θειενοπυριδινικό ανάλογο το οποίο περιέχει έναν ασύμμετρο άνθρακα που οδηγεί σε δύο εναντιομερή (R και S) (Εικόνα 4.5.). Μελέτες που έγιναν από την εταιρεία που πρώτη ανέπτυξε την κλοπιδογρέλη (Sanofi–Synthelabo) έδειξαν πως το περισσότερο δραστικό μόριο είναι το S-εναντιομερές¹¹⁵. Το R εναντιομερές στον άνθρακα στη θέση 8 δεν έχει ανασταλτική δράση στη συσσώρευση των αιμοπεταλίων και δεν γίνεται ανεκτό.



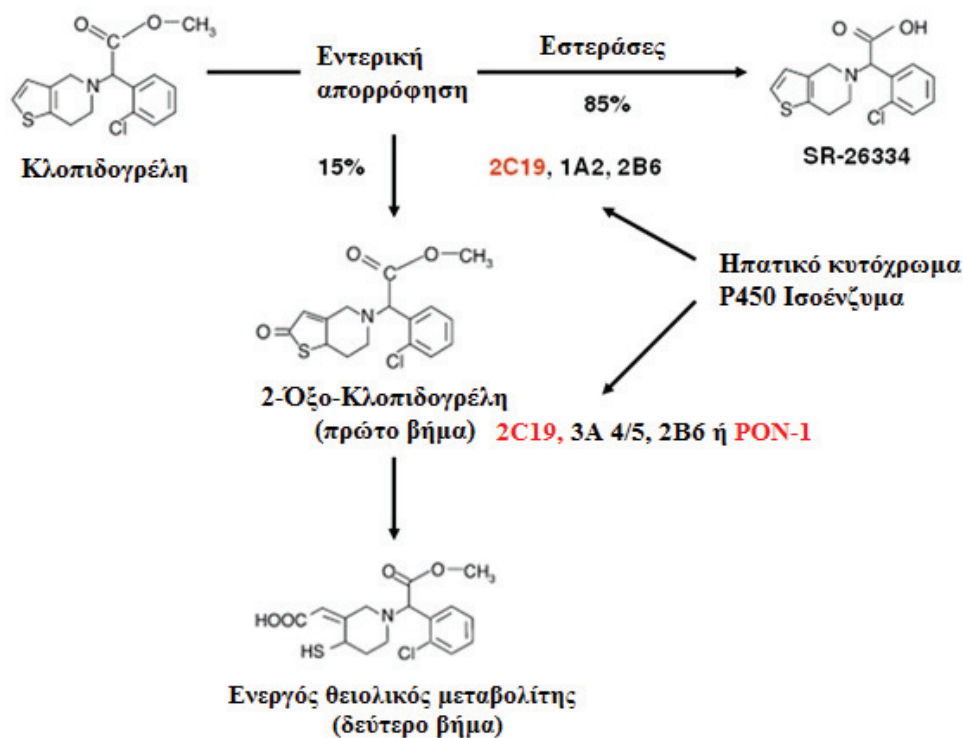
Εικόνα 4.5. Η χημική δομή της κλοπιδογρέλης (όξινο θειικό άλας) και το προϊόν υδρόλυσής της.

➤ Το φαρμακολογικό προφίλ της κλοπιδογρέλης

Η κλοπιδογρέλη είναι μία δεύτερης γενιάς θειενοπυριδίνη καθώς έχει αντικαταστήσει την τικλοπιδίνη λόγω του ασφαλέστερου προφίλ της. Είναι ένα προφάρμακο που μεταβολίζεται *in vivo* στο φαρμακολογικά ενεργό μεταβολίτη της. Μετά τη χορήγησή της απορροφάται στο έντερο με μια διαδικασία στην οποία σημαντικό ρόλο διαδραματίζει ο πρωτεϊνικός μεταφορέας MDR1 (P-γλυκοπρωτεΐνη) που κωδικοποιείται από το γονίδιο *ABCB1* και ανήκει στους ABC μεταφορείς. Ένας γονιδιακός πολυμορφισμός του *ABCB1*, ο C3435T, έχει ως αποτέλεσμα τη σημαντική μείωση της απορρόφησης της κλοπιδογρέλης στο έντερο. Το μεγαλύτερο ποσοστό (περίπου το 85%) της κλοπιδογρέλης, υδrolύεται

στην εστερική της ομάδα από τις καρβοξυλεστεράσες του εντερικού βλεννογόνου και του αίματος σε έναν ανενεργό μεταβολίτη καρβοξυλικού οξέος, (S) - (+) - (2-χλωροφαινυλ) - 6,7- διυδρο-4H-θειενο [3,2-c] πυριδινό-5-υλ οξικό οξύ¹¹⁶ (Εικόνα 4.6.). Το υπόλοιπο 15% μεταβολίζεται στο ήπαρ στο φαρμακολογικά ενεργό μεταβολίτη της με τη δράση διαφόρων ισομορφών του κυτοχρώματος P450 (CYP450). Η μετατροπή της κλοπιδογρέλης στην ενεργό μορφή της γίνεται σε δύο στάδια. Κατά το πρώτο στάδιο, οι ισομορφές CYP2C19, CYP1A2 και CYP2B6 καταλύουν την οξείδωση του δακτύλου θειοφενίου της κλοπιδογρέλης σε 2-οξο-κλοπιδογρέλη η οποία είναι ανενεργός. Η 2-οξο-κλοπιδογρέλη υπό τη δράση των CYP2C19, CYP3A4, CYP3A5, CYP2B6 και CYP2C9, υφίσταται δεύτερη οξείδωση η οποία οδηγεί στο άνοιγμα του δακτυλίου του θειοφενίου και στο σχηματισμό του ενεργού θειολικού μεταβολίτη (R130964) (Εικόνα 4.6.). Πρόσφατη μελέτη έδειξε ότι σημαντικό ρόλο στο δεύτερο στάδιο μεταβολικής ενεργοποίησης της κλοπιδογρέλης, διαδραματίζει το ένζυμο παραοξονάση-1 (PON-1) το οποίο καταλύει την υδρολυτική διάσπαση του δακτυλίου της 2-οξο κλοπιδογρέλης. Η PON-1 είναι μία εστεράση η οποία συντίθεται στο ήπαρ, κυκλοφορεί στο πλάσμα συνδεδεμένη με τις HDL και προστατεύει την LDL από την οξείδωση¹¹⁷. Στη διεθνή βιβλιογραφία υπάρχουν αντικρουόμενες μελέτες για το εάν τελικά η PON-1 είναι ένα ένζυμο κλειδί για τη μεταβολική ενεργοποίηση και κλινική αποτελεσματικότητα της κλοπιδογρέλης^{118,119}. Ο ενεργός θειολικός μεταβολίτης της κλοπιδογρέλης δρα σχηματίζοντας δισουλφιδικούς δεσμούς με δύο κατάλοιπα κυστεΐνης (Cys17 και Cys270) της εξωκυττάριας περιοχής του υποδοχέα με αποτέλεσμα τη μη αντιστρεπτή αναστολή της πρόσδεσης του ADP στον υποδοχέα P2Y₁₂¹²⁰. Ο ενεργός θειολικός μεταβολίτης είναι μία χειρόμορφη ένωση που μπορεί να υπάρξει ως τέσσερα ισομερή (H1-H4), εκ των οποίων το H4 ισομερές θεωρείται ως το μόνο δραστικό ισομερές του θειολικού μεταβολίτη¹²¹. Λόγω της θειολικής ομάδας είναι ασταθής στο πλάσμα, συνεπώς δεν μπορεί να ποσοτικοποιηθεί εύκολα με τη χρήση των αναλυτικών μεθόδων. Στις φαρμακοκινητικές μελέτες χρησιμοποιούνται διάφοροι αλκυλιωτικοί παράγοντες ούτως ώστε να σταθεροποιηθεί η θειολική ομάδα και να προσδιοριστεί η συγκέντρωση κλοπιδογρέλης στο πλάσμα^{122,123}. Μέγιστα επίπεδα του ενεργού μεταβολίτη στο αίμα παρατηρούνται εντός 1 h από τη χορήγηση 600 mg κλοπιδογρέλης από το στόμα. Ο χρόνος ημίσειας ζωής του ενεργού μεταβολίτη ύστερα από μεμονωμένη ή και επαναλαμβανόμενη χορήγηση κλοπιδογρέλης είναι 8 h. Η αναστολή της πρόσδεσης του ADP στον υποδοχέα P2Y₁₂ από το μεταβολίτη

της κλοπιδογρέλης έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση των επιπέδων του c-AMP στο κυτταρόπλασμα των αιμοπεταλίων, η οποία μεταξύ των άλλων επάγει τη φωσφορυλίωση της αγγειοδιασταλτικής φωσφοπρωτεΐνης VASP (Vasodilator Stimulated Phosphoprotein), με τελικό αποτέλεσμα την αναστολή της ενεργοποίησης των υποδοχέων αIIbβ3 και συνεπώς την παρεμπόδιση της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων. Η μέγιστη ανασταλτική δράση της κλοπιδογρέλης επιτυγχάνεται σε 24 h μετά από χορήγηση 75 mg, σε 6 h μετά από χορήγηση 300 mg και σε 2 h μετά από δόση φόρτισης 600 mg. Με δεδομένο ότι το 10% των αιμοπεταλίων του αίματος ανανεώνεται καθημερινά, σε 5 ημέρες μετά τη λήψη της τελευταίας δόσης της κλοπιδογρέλης το 50% των κυκλοφορούντων αιμοπεταλίων θα είναι πλήρως λειτουργικά και ικανά να εξασφαλίσουν αποτελεσματική αιμόσταση. Μετά τη χορήγηση δόσης 75 mg κλοπιδογρέλης, το 41% του φαρμάκου απεκκρίνεται στα ούρα και το 35–57% στα κόπρανα¹²⁴. Δεν χρειάζεται προσαρμογή της δοσολογίας της κλοπιδογρέλης σε νεφρική ή ηπατική ανεπάρκεια¹²⁵.



Εικόνα 4.6. Μεταβολισμός της κλοπιδογρέλης.

➤ Κλινική χρησιμότητα κλοπιδογρέλης

Η κλινική χρησιμότητα της κλοπιδογρέλης έχει αποδειχθεί σε πολλές κλινικές μελέτες μεγάλης κλίμακας. Έτσι, η κλοπιδογρέλη έχει χρησιμοποιηθεί εκτενώς σε ένα μεγάλο φάσμα ασθενών που βρίσκονται σε κίνδυνο θρόμβωσης. Συγκεκριμένα, η κλοπιδογρέλη ενδείκνυται για την πρόληψη και θεραπεία της στεφανιαίας νόσου (ΣΝ), της περιφερικής αρτηριακής νόσου και του ισχαιμικού εγκεφαλικού επεισοδίου, ως μονοθεραπεία ή σε συνδυασμό με ασπιρίνη^{91,126}.

Η κλινική μελέτη CURE⁸⁶ αποτελεί τη μελέτη ορόσημο για την καθιέρωση της διπλής αντιαιμοπεταλιακής αγωγής στους ασθενείς με ΟΣΣ χωρίς ανάσπαση του διαστήματος ST. Το σύνθετο καταληκτικό σημείο της μελέτης ήταν καρδιαγγειακός θάνατος, ΕΜ και ΑΕΕ. Στην ομάδα της κλοπιδογρέλης παρατηρήθηκε μείωση της εμφάνισης του σύνθετου καταληκτικού σημείου κατά 20% και του απόλυτου κινδύνου κατά 2,1% (συχνότητα επεισοδίων 9,3% έναντι 11,4%, $p < 0,001$) στους 9-12 μήνες θεραπείας. Το όφελος προήλθε από τη μείωση του μη θανατηφόρου ΕΜ και όχι του αγγειακού θανάτου ή του ΑΕΕ. Το μέγεθος του οφέλους αντισταθμίστηκε από την κατά 1% αύξηση του απόλυτου κινδύνου των μεγάλων αιμορραγιών (3,7% έναντι 2,7%, $p = 0,001$). Στη μελέτη αυτή η επίπτωση μειζόνων και ελασσόνων αιμορραγιών με το συνδυασμό ασπιρίνης και κλοπιδογρέλης ήταν 3,7% και 5,1% αντίστοιχα χωρίς να καταγραφεί αύξηση των απειλητικών για τη ζωή αιμορραγιών σε σύγκριση με μόνη την ασπιρίνη.

Ο σκοπός της μελέτης CLARITY⁹² (Clopidogrel as Adjunctive Reperfusion Therapy) ήταν να απαντήσει στο ερώτημα αν η προσθήκη κλοπιδογρέλης (300mg δόση φόρτισης και 75mg δόση συντήρησης) σε ασθενείς με STEMI (ηλικίας < 75 έτη) που υποβάλλονται σε θρομβόλυση ωφελεί ή όχι. Το τελικό καταληκτικό σημείο ήταν διαπίστωση αποφραγμένης αρτηρίας (ροή TIMI 0 ή 1), καρδιαγγειακός θάνατος, ή υποτροπή ΕΜ πριν τη στεφανιογραφία. Μετά από 30 ημέρες παρακολούθησης η συχνότητα του τελικού σημείου ήταν σημαντικά μικρότερη κατά 6,7% στην ομάδα της κλοπιδογρέλης σε σύγκριση με το εικονικό φάρμακο (21,7% έναντι 15%, $p < 0,001$).

Παρομοίως, στη μελέτη COMMIT⁸⁵ (Clopidogrel and Metoprolol in Myocardial Infarction Trial) τυχαιοποιήθηκαν 45.852 Κινέζοι ασθενείς με STEMI εντός 24 h από την έναρξη των συμπτωμάτων (μέσος χρόνος 10 h) σε κλοπιδογρέλη (75 mg την ημέρα) ή εικονικό φάρμακο ως προσθήκη στην ασπιρίνη (162 mg την ημέρα). Στους μισούς ασθενείς χορηγήθηκε θρομβόλυση (κυρίως ουροκινάση) και μόνο το 4% υπεβλήθη σε

στεφανιογραφία. Ο συνδυασμός ασπιρίνης και κλοπιδογρέλης μείωσε σε σύγκριση με μόνη την ασπιρίνη την ολική θνητότητα κατά 7% (7,5% έναντι 8,1% $p=0,029$) και το σύνθετο καταληκτικό σημείο (θάνατος, επανέμφραγμα ή ΑΕΕ) κατά 9% (από 10,1% σε 9,2%) στις 28 ημέρες θεραπείας.

Η μεγάλη διπλά-τυφλή κλινική μελέτη CURRENT-OASIS 7⁹³ (Clopidogrel Optimal Loading Dose Usage to Reduce Recurrent Events- Optimal Antiplatelet Strategy for Interventions) συνέκρινε τη διπλάσια δόση φόρτισης με κλοπιδογρέλη με την κλασική δόση φόρτισης. Συγκεκριμένα, 25.087 ασθενείς (71% NSTEMI, 29% STEMI) τυχαιοποιήθηκαν σε φόρτιση με 600 mg κλοπιδογρέλης, 150 mg/ημέρα για 7 ημέρες και στη συνέχεια 75 mg/ημέρα ή στην κλασική φόρτιση με 300 mg και στη συνέχεια 75 mg/ημέρα. Συγχρόνως οι ασθενείς τυχαιοποιήθηκαν σε μικρές (75-100 mg) ή μεγάλες δόσεις (300-325 mg) ασπιρίνης. Τα καταληκτικά σημεία ήταν καρδιαγγειακός θάνατος, ΕΜ, ΑΕΕ ή θρόμβωση του stent (δευτερογενής στόχος) στις 30 ημέρες. Στο σκέλος της μελέτης που συγκρίθηκαν οι δόσεις της κλοπιδογρέλης δεν παρατηρήθηκαν διαφορές στο πρωτογενές καταληκτικό σημείο (4,4% με την κλασική φόρτιση έναντι 4,2% με τη διπλή φόρτιση ($p=0,3$)). Οι μείζονες αιμορραγίες σύμφωνα με την κατάταξη CURRENT ήταν 2,0% και 2,5% αντίστοιχα ($p<0.01$). Η ανάλυση της υποομάδας των 17.232 ασθενών που υποβλήθηκε σε αγγειοπλαστική έδειξε μείωση κατά 25% στο καταληκτικό σημείο (3,9% με τη διπλή φόρτιση έναντι 4,5% με την κλασική, $p<0,0039$). Οι μείζονες αιμορραγίες κατά CURRENT ήταν συχνότερες με τη διπλή δόση κλοπιδογρέλης (1,6% έναντι 1,1%, $p=0,009$) αλλά δεν διέφεραν σημαντικά όταν χρησιμοποιηθεί ο ορισμός κατά TIMI (1,0% έναντι 0,7%, $p=0,074$).

Αξίζει να σημειωθεί ότι, τα στοιχεία για τα οφέλη του συνδυασμού ασπιρίνης και κλοπιδογρέλης στα ΟΣΣ με κάποιον τρόπο επέβαλλαν τη διενέργεια της PCI στην καθ' ημέρα κλινική πράξη. Παράλληλα με τις μελέτες για τα ΟΣΣ, κλινικές μελέτες ανέδειξαν το ρόλο-κλειδί που παίζει η αναστολή της COX-1 και του P2Y₁₂ υποδοχέα με το συνδυασμό της ασπιρίνης και της κλοπιδογρέλης στη μείωση του κινδύνου θρόμβωσης του stent μετά την PCI^{127,128}. Άλλες τυχαιοποιημένες μελέτες καθιέρωσαν την πρωτογενή PCI για έγκαιρη επαναιμάτωση στους ασθενείς με STEMI OEM¹²⁹.

Από τότε, ο συνδυασμός ασπιρίνης και ενός P2Y₁₂ ανταγωνιστή αποτελεί την προτεινόμενη αντιμετώπιση των ασθενών που λαμβάνουν stents. Παρά το γεγονός ότι τα επιστημονικά δεδομένα για το ΕΜ περιορίζονταν στον πρώτο μήνα μετά την οξεία φάση,

οι κατευθυντήριες οδηγίες παγκοσμίως ενέκριναν τη χρήση ασπιρίνης και κλοπιδογρέλης μέχρι και 12 μήνες μετά από ένα ΟΣΣ, με δόση φόρτισης 300 mg (η οποία μπορεί να αυξηθεί σε 600 mg σε ασθενείς που αντιμετωπίζονται παρεμβατικά) ακολουθούμενη από δόση συντήρησης 75 mg / ημέρα. Σε ασθενείς που έλαβαν θρομβόλυση δεν θα πρέπει να χρησιμοποιείται δόση εφόδου στους ασθενείς εκείνους που είναι μεγαλύτεροι των 75 ετών με βάση τις μελέτες CLARITY και COMMIT.

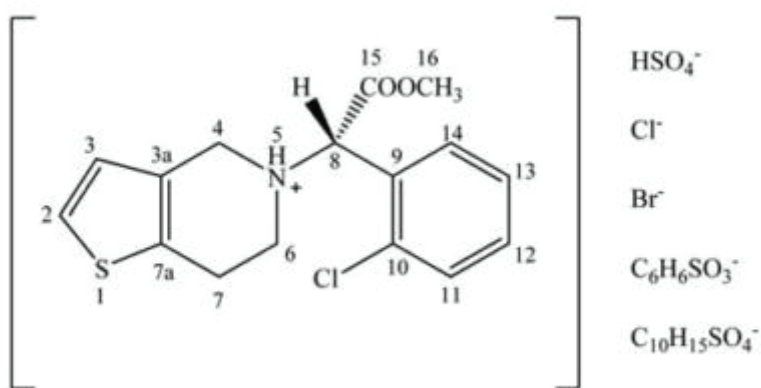
➤ **Αλληλεπιδράσεις με άλλα φάρμακα**

Διάφορα φάρμακα που μεταβολίζονται διαμέσου του CYP450 μπορεί να επηρεάσουν το μεταβολισμό της κλοπιδογρέλης, να μειώσουν ή να αυξήσουν τα επίπεδα του ενεργού μεταβολίτη της και συνεπώς να επηρεάσουν την αντιαιμοπεταλιακή δραστηριότητα της κλοπιδογρέλης. Το μεγαλύτερο ενδιαφέρον έχει επικεντρωθεί στην αλληλεπίδραση της κλοπιδογρέλης με τους PPIs. Μελέτες παρατήρησης στις οποίες διερευνήθηκε η πιθανή επίδραση των PPIs στην αντιαιμοπεταλιακή αποτελεσματικότητα της κλοπιδογρέλης έχουν καταλήξει σε αντικρουόμενα αποτελέσματα. Η μόνη τυχαιοποιημένη κλινική μελέτη είναι η μελέτη COGENT η οποία έδειξε ότι η συγχορήγηση κλοπιδογρέλης και ομεπραζόλης σε ασθενείς με ΟΣΣ που υποβάλλονται σε αγγειοπλαστική δεν αυξάνει τον κίνδυνο μειζόνων καρδιαγγειακών επεισοδίων, ενώ επιφέρει σημαντική μείωση των γαστρεντερικών επιπλοκών σε σχέση με του ασθενείς που δεν έλαβαν ομεπραζόλη. Η μελέτη αυτή διεκόπη πρόωρα γι αυτό έχει περιορισμένη στατιστική ισχύ για να καταλήξει σε ασφαλή κλινικά συμπεράσματα. Συνεπώς η συγχορήγηση PPIs με κλοπιδογρέλη θα πρέπει να γίνεται με προσοχή και να περιορίζεται μόνο στους ασθενείς με αυξημένο κίνδυνο γαστρεντερικών επιπλοκών. Η συγχορήγηση κλοπιδογρέλης με λιπόφιλες στατίνες ή με ανταγωνιστές των διαύλων ασβεστίου είναι επίσης ασφαλής όπως έδειξαν τόσο φαρμακοδυναμικές όσο και κλινικές μελέτες. Η ριφαμπικίνη που επάγει το CYP3A4 και το CYP2C19, καθώς και η λήψη του βοτάνου του Αγίου Ιωάννη που επάγει το CYP3A4, ενισχύουν τη δράση της κλοπιδογρέλης^{130,131}. Αντίθετα η φαινπροκουμόνη, ένα κουμαρινικό παράγωγο, ανάλογο της ασενοκουμαρόλης, το οποίο χρησιμοποιείται στη Γερμανία, ανταγωνίζεται την κλοπιδογρέλη για τα ισοένζυμα CYP3A4 και CYP2C9 και ελαττώνει το μετασχηματισμό της σε ενεργό μεταβολίτη¹³².

➤ **Γενόσημες μορφές κλοπιδογρέλης**

Όλες οι φαρμακοδυναμικές και κλινικές μελέτες που έχουν επιβεβαιώσει την αποτελεσματικότητα, την ασφάλεια και το κλινικό όφελος της κλοπιδογρέλης είτε ως μονοθεραπεία είτε συγχωρηγούμενη με την ασπιρίνη έχουν πραγματοποιηθεί με την όξινη θειική κλοπιδογρέλη. Τα τελευταία χρόνια έχουν εισαχθεί στην αγορά γενόσημες μορφές κλοπιδογρέλης χαμηλού κόστους.

Όταν η κλοπιδογρέλη είναι σε μορφή βάσης ($pK_a = 4,5$) είναι μια ελαιώδης ουσία με υψηλό ιξώδες και σχετικά ασταθής υπό αυξημένη υγρασία και θερμοκρασία. Η κλοπιδογρέλη δεν μπορεί να σχηματίσει στερεά κρυσταλλική φάση και γι' αυτό το λόγο είναι δύσκολο να καθαριστεί. Η μετατροπή της βάσης κλοπιδογρέλης σε άλας έκανε το μόριο περισσότερο σταθερό και έκανε πιο εύκολο τον καθαρισμό με κρυσταλλοποίηση¹¹⁶. Στην εικόνα 4.7. φαίνονται μερικά από τα άλατα κλοπιδογρέλης που αναπτύχθηκαν από τη φαρμακευτική βιομηχανία.

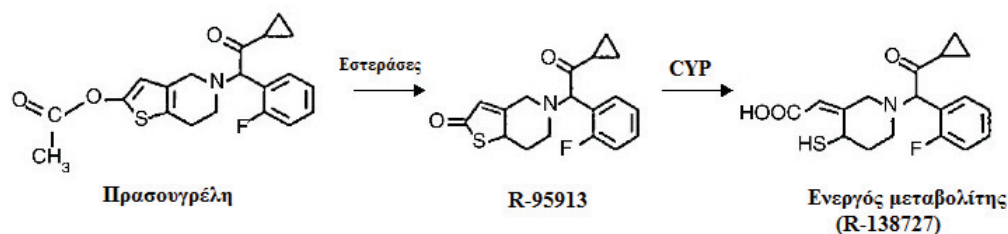


Εικόνα 4.7. Χημική δομή των αλάτων κλοπιδογρέλης: όξινηθειική, υδροχλωρική, υδροβρωμίου, βεσυλική και (-) -καμφορο-10-σουλφονικό άλας.

4.3.2. Πρασουγκρέλη

Η πρασουγγρέλη είναι μια τρίτης γενιάς θειενοπουριδίνη με ταχύτερη αντιαιμοπεταλιακή δράση *ex vivo* σε σύγκριση με την κλοπιδογρέλη εξαιτίας της συντομότερης μεταβολικής οδού που ακολουθεί. Ομοίως με την κλοπιδογρέλη, η πρασουγγρέλη είναι ένα προφάρμακο που αρχικά μετατρέπεται στον ενδιάμεσο μεταβολίτη της με τη δράση εστερασών στο έντερο, στο αίμα και στο ήπαρ και στη συνέχεια μετατρέπεται στο ήπαρ στον ενεργό μεταβολίτη με τη δράση διαφόρων ισοενζύμων του CYP450¹²⁰ (Εικόνα 4.8). Ο ενεργός μεταβολίτης της πρασουγγρέλης εμφανίζεται στην κυκλοφορία μέσα σε 15 min μετά τη χορήγηση δόσης φόρτισης 60 mg και φτάνει τη μέγιστη συγκέντρωση στο πλάσμα σε 30 min. Δόση φόρτισης 60 mg ακολουθούμενη από δόση συντήρησης 10 mg/ημέρα οδηγεί σε

μεγαλύτερη αναστολή της ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων σε σχέση με την κλοπιδογρέλη σε ασθενείς που υποβάλλονται σε προγραμματισμένη PCI¹³³.



Εικόνα 4.8. Ο μεταβολισμός της πρασουγρέλης.

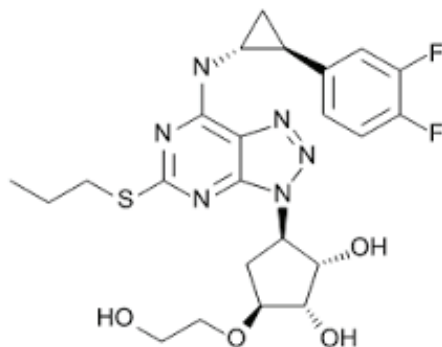
Η μελέτη TRITON-TIMI 38 συνέκρινε την κλινική αποτελεσματικότητα και ασφάλεια της πρασουγρέλης σε σχέση με την κλοπιδογρέλη σε 13.608 ασθενείς με ασταθή στηθάγχη ή έμφραγμα του μυοκαρδίου οι οποίοι υπεβλήθησαν σε PCI. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η χορήγηση πρασουγρέλης μείωσε τα θανατηφόρα καρδιαγγειακά επεισόδια κατά 19%, ωστόσο αύξησε τον κίνδυνο αιμορραγικών επιπλοκών, συμπεριλαμβανομένων των θανατηφόρων αιμορραγιών σε ορισμένες υποκατηγορίες ασθενών¹¹⁸. Η μελέτη φάσης 2, SWAP έδειξε ότι η αντικατάσταση της κλοπιδογρέλης από την πρασουγρέλη σε ασθενείς με ΟΣΣ, είναι ομαλή, αποτελεσματική και ασφαλής. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της μελέτης φάσης 3, TRILOGY ACS, η μακροχρόνια χορήγηση πρασουγρέλης (10 mg ημερησίως) σε ασθενείς με ασταθή στηθάγχη ή NSTEMI που αντιμετωπίζονται με φαρμακευτική αγωγή δεν οδήγησε σε στατιστικά σημαντική μείωση του πρωτογενούς καταληκτικού σημείου (καρδιαγγειακός θάνατος, έμφραγμα του μυοκαρδίου ή ΑΕΕ σε σύγκριση με την κλοπιδογρέλη (75 mg ημερησίως). Επιπρόσθετα, δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές μεταξύ των 2 φαρμάκων ως προς τις μείζονες αιμορραγικές επιπλοκές συμπεριλαμβανομένων των ενδοκρανιακών αιμορραγιών¹³⁴.

4.3.3. Τικαγρελόρη

➤ Το φαρμακολογικό προφίλ της τικαγρελόρης

Η τικαγρελόρη (AZD 6140) είναι ένας νέος, ισχυρός, εκλεκτικός ανταγωνιστής του υποδοχέα P2Y₁₂ του ADP. Είναι μία κυκλοπεντυλ-τριαζολο-πυριμιδίνη (CPTP), η οποία χορηγείται από του στόματος σε ενεργό μορφή χωρίς να απαιτείται μεταβολική ενεργοποίηση όπως συμβαίνει στις θειενοπυριδίνες (Εικόνα 4.9)¹³⁵. Η τικαγρελόρη

προκαλεί αντιστρεπτή αναστολή του P2Y₁₂ συνδεδεμένη μη ομοιοπολικά σε διαφορετική θέση από αυτή στην οποία συνδέονται οι θειενοπυριδίνες, συνεπώς δεν επηρεάζει τη σύνδεση του ADP στον υποδοχέα (μη συναγωνιστική αναστολή)¹³⁶.



Εικόνα 4.9. Χημική δομή της τικαγρελόρης.

Η χορήγηση τικαγρελόρης (180 mg δόση φόρτισης, 90 mg/ημέρα δόση συντήρησης) επιφέρει γρηγορότερη και ισχυρότερη αναστολή της ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων σε σχέση με την κλοπιδογρέλη (600 mg δόση φόρτισης, 75 mg/ημέρα δόση συντήρησης) η οποία αντιστρέφεται γρηγορότερα σε σχέση με την κλοπιδογρέλη μετά τη διακοπή χορήγησης του φαρμάκου. Απορροφάται ταχέως από το λεπτό έντερο και ο χρόνος ημίσειας ζωής της είναι περίπου 6–8 h ενώ αποικοδομείται στο ήπαρ διαμέσου των ισοενζύμων CYP3A4/5. Η αποικοδόμηση της τικαγρελόρης οδηγεί στην παραγωγή τόσο αδρανών όσο και ενεργών μεταβολιτών όπως είναι ο AR-C124910XX ο οποίος έχει χρόνο ημίσειας ζωής 8-12h και συμβάλει κατά 30-40% στη συνολική αντιαιμοπεταλιακή δράση της τικαγρελόρης. Ο χρόνος ημίσειας ζωής της τικαγρελόρης στο πλάσμα μπορεί να παραταθεί με τη συγχορήγηση αναστολέων του CYP3A4, όπως η κετοконаζόλη (η συγχορήγηση αντενδείκνυται) ή διλτιαζέμη, καθώς και με υποστρώματα του CYP3A4, όπως η σιμβαστατίνη (η συγχορήγηση με σιμβαστατίνη 40mg δεν συνιστάται)¹³⁷.

➤ Κλινική σημασία της τικαγρελόρης

Η κλινική αποτελεσματικότητα και ασφάλεια της τικαγρελόρης διερευνήθηκε στην πολυκεντρική τυχαιοποιημένη μελέτη PLATO η οποία συνέκρινε την τικαγρελόρη (180 mg δόση φόρτισης και μετά 90 mg δύο φορές ημερησίως) σε σχέση με την κλοπιδογρέλη (300 ή 600 mg δόση φόρτισης και 75 mg/ημέρα δόση συντήρησης) για την πρόληψη καρδιαγγειακών επεισοδίων σε ένα ευρύ φάσμα ασθενών με ΟΣΣ¹³⁸. Η μελέτη έδειξε πως

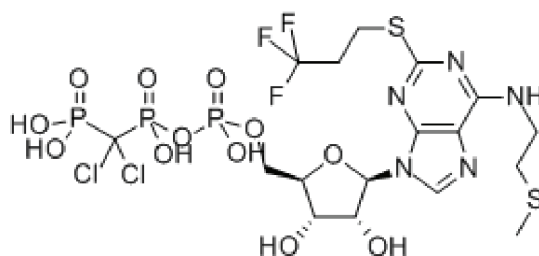
η τικαγρελόρη πλεονεκτεί της κλοπιδογρέλης ως προς το πρωτογενές καταληκτικό σημείο (μείωση της καρδιαγγειακής θνητότητας του οξέος εμφράγματος του μυοκαρδίου και των ΑΕΕ). Δεν παρατηρήθηκαν διαφορές ως προς τις μείζονες αιμορραγικές επιπλοκές μεταξύ των δυο φαρμάκων, με εξαίρεση τις αιμορραγίες που δεν οφειλόταν σε επεμβάσεις αορτοστεφανιαίας παράκαμψης οι οποίες ήταν αυξημένες στην ομάδα που έλαβε τικαγρελόρη⁹⁶. Η τικαγρελόρη παρουσίασε υπεροχή στην ομάδα των ηλικιωμένων αλλά και στους ασθενείς που δεν αντιμετωπίστηκαν παρεμβατικά. Εξαιρετικής σημασίας είναι το γεγονός ότι παρατηρήθηκε μείωση της θνητότητας στους ασθενείς που έλαβαν τικαγρελόρη σε σχέση με αυτούς που έλαβαν κλοπιδογρέλη: αγγειακός θάνατος 4% έναντι 5,1% ($p=0,001$), θάνατος από οποιαδήποτε αιτία 10,2% έναντι 12,3% ($p<0,001$) σε τικαγρελόρη και κλοπιδογρέλη αντίστοιχα, γεγονός το οποίο δεν παρατηρήθηκε στη μελέτη της πρασουγρέλης. Η αυξημένη αποτελεσματικότητα της τικαγρελόρης συνοδευόταν όμως και από μη αναμενόμενες ανεπιθύμητες ενέργειες, όπως δύσπνοια, υπερουριχαιμία, αύξηση κρεατινίνης και βραδυκαρδία, για τις οποίες έχουν προταθεί διάφορες αιτίες που κυρίως εμπλέκουν τον μηχανισμό δράσης της.

Η μελέτη RESPOND έδειξε ότι η θεραπεία με τικαγρελόρη μπορεί να αποτελεί μια κατάλληλη προσέγγιση για να αντιμετωπιστεί η μειωμένη απόκριση στην κλοπιδογρέλη σε ασθενείς με σταθερή στεφανιαία νόσο. Κατά τη θεραπεία με τικαγρελόρη, η αντιδραστικότητα των αιμοπεταλίων ήταν κάτω από τις τιμές ουδού που προηγούμενα συνδέονταν με ισχαιμικό κίνδυνο, όπως μετρήθηκαν με τις με- θόδους LTA, τη VerifyNow P2Y₁₂, και τη VASP, σε 98% με 100% των ασθενών έναντι του 44% με 76% των ασθενών μετά από θεραπεία με κλοπιδογρέλη. Επιπλέον, η αντιαιμοπεταλιακή δράση της τικαγρελόρης ήταν η ίδια σε ασθενείς με καλή και κακή απόκριση¹³⁹.

4.3.4. Καγρελόρη

Η καγρελόρη (AR-C69931MX) ανήκει στην οικογένεια των ATP αναλόγων και είναι ένας συναγωνιστικός, αντιστρεπτός ανταγωνιστής του υποδοχέα P2Y₁₂ (Εικόνα 4.10). Έχει ταχεία έναρξη δράσης (μερικά δευτερόλεπτα) και μικρό χρόνο ημιζωής (3-9 min). Η ανασταλτική δράση της καγρελόρης αναστρέφεται σε 60 min μετά τη διακοπή της έγχυσης του φαρμάκου. Η καγρελόρη δεν είναι προφάρμακο, χορηγείται στη φαρμακολογικά ενεργό μορφή της και αποικοδομείται γρήγορα από μία ADPάση που βρίσκεται στην επιφάνεια των ενδοθηλιακών κυττάρων των αγγείων προς ανενεργό μεταβολίτη¹⁴⁰. Ο

συνδυασμός του μικρού χρόνου ημίσειας ζωής και της αντιστρεπτής αντιαιμοπεταλιακής δράσης της καργελόρης, προσδίδουν το πλεονέκτημα ότι τα αιμοπετάλια καθίστανται πλήρως λειτουργικά εντός 60-120 min μετά από τη διακοπή της ενδοφλέβιας χορήγησης του φαρμάκου.



Εικόνα 4.10. Χημική δομή της καργελόρης.

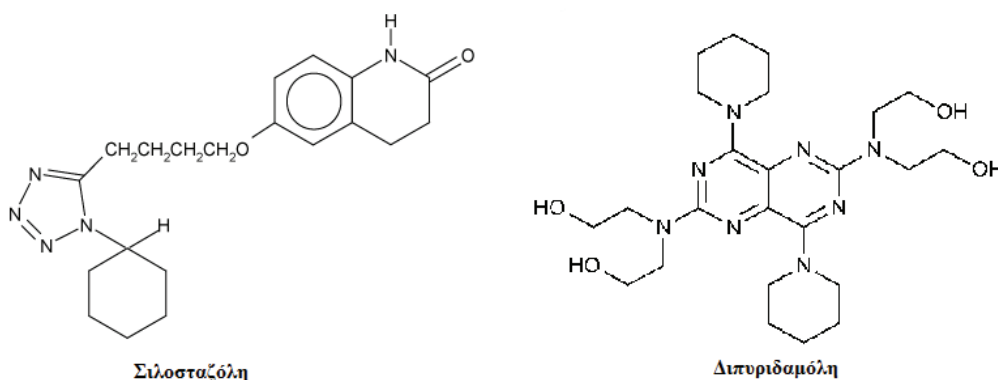
Η καργελόρη, μελετήθηκε στις μελέτες CHAMPION-PLATFORM¹⁴¹ και CHAMPION-PCI¹⁴². Και οι δύο μελέτες απέτυχαν στο να δείξουν υπεροχή της καργελόρης σε σύγκριση με την κλοπιδογρέλη. Σε μια πρόσφατη μελέτη (μελέτη BRIDGE) η καργελόρη χορηγήθηκε με ενδοφλέβια έγχυση (0,75 μg/kg/min) σε ασθενείς με ΟΣΣ οι οποίοι ελάμβαναν θεραπεία με θειενοपुरιδίνη και προγραμματίστηκαν να υποβληθούν σε CABG. Η καργελόρη χορηγήθηκε μετά τη διακοπή της θειενοपुरιδίνης για τουλάχιστον 48h και διεκόπη 1-6h πριν την επέμβαση. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η χορήγηση καργελόρης διατηρεί σε επαρκές επίπεδο την αναστολή της αιμοπεταλιακής ενεργότητας που είχε επιτευχθεί με την θειενοपुरιδίνη, χωρίς να υπάρχουν μείζονες αιμορραγικές επιπλοκές, ένδειξη ότι η ενδοφλέβια χορήγηση καργελόρης αποτελεί αποτελεσματική και ασφαλή αντιμετώπιση των ασθενών κατά το χρονικό διάστημα μεταξύ της διακοπής της από του στόματος αντιαιμοπεταλιακής αγωγής και της επέμβασης¹⁴³.

4.4 Ανταγωνιστές του υποδοχέα αIIbβ3

Οι ανταγωνιστές του υποδοχέα αIIbβ3 αναστέλλουν την πρόσδεση του ινωδογόνου στον υποδοχέα και τη συσσώρευση των αιμοπεταλίων, ανεξάρτητα από τον αγωνιστή που προκάλεσε την αιμοπεταλιακή ενεργοποίηση¹⁴⁴. Κατά συνέπεια, οι ανταγωνιστές του υποδοχέα αIIbβ3 είναι ισχυρά αντιαιμοπεταλιακά φάρμακα με καλή κλινική αποτελεσματικότητα αλλά αυξημένο αιμορραγικό κίνδυνο. Τα φάρμακα αυτά παρουσιάζουν σημαντικές δυσκολίες στην τιτλοποίηση της δόσης, χορηγούνται ενδοφλεβίως και η χρήση τους περιορίζεται, κατά κύριο λόγο, κατά τη διάρκεια και

4.5 Αναστολείς των φωσφοδιεστερασών

Οι αναστολείς των φωσφοδιεστερασών που χρησιμοποιούνται σήμερα στην κλινική πράξη είναι η διπυριδαμόλη και η σιλοσταζόλη (Εικόνα 4.12), φάρμακα που εμφανίζουν τόσο αντιαιμοπεταλιακή όσο και αγγειοδιασταλτική δράση¹⁰⁰. Ο κύριος μηχανισμός δράσης τους στα αιμοπετάλια είναι η αναστολή των φωσφοδιεστερασών 3 και 5 των κυκλικών νουκλεοτιδίων c-AMP και c-GMP, αντίστοιχα, με αποτέλεσμα την αύξηση της ενδοαιμοπεταλιακής συγκέντρωσης των νουκλεοτιδίων αυτών τα οποία αναστέλλουν την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων. Επιπρόσθετα, η διπυριδαμόλη αναστέλλει τη δέσμευση-μεταφορά της αδενοσίνης στα κύτταρα^{100,149}.

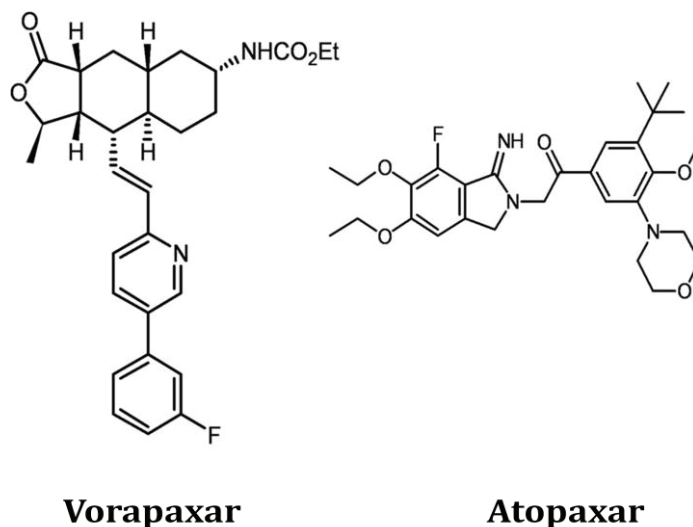


Εικόνα 4.12. Χημικές δομές της σιλοσταζόλης και της διπυριδαμόλης

Η απορρόφηση της κλασικής φαρμακοτεχνικής μορφής διπυριδαμόλης ποικίλλει, ενώ η βιοδιαθεσιμότητά της είναι χαμηλή. Απεκκρίνεται διαμέσου της χοληφόρου οδού ενώ ο χρόνος ημίσειας ζωής της είναι 10 h¹⁵⁰⁻¹⁵². Η σιλοσταζόλη μεταβολίζεται στο ήπαρ διαμέσου των ισοενζύμων CYP450, επομένως η δράση της μπορεί να επηρεασθεί από φάρμακα που μεταβολίζονται διαμέσου αυτής της οδού, (πχ ερυθρομυκίνη, ομεπραζόλη, κλπ). Ο χρόνος ημίσειας ζωής του φαρμάκου είναι 10 h¹⁵³. Οι μεταβολίτες της σιλοσταζόλης απεκκρίνονται κυρίως από τους νεφρούς. Δύο μεταβολίτες της είναι ενεργοί και συμβάλλουν κατά 50% στη συνολική δραστηριότητα της σιλοσταζόλης. Ο συνδυασμός διπυριδαμόλης και ασπιρίνης είναι περισσότερο αποτελεσματικός σε σύγκριση με την μονοθεραπεία με ασπιρίνη¹⁵⁴ αλλά όχι σε σύγκριση με τη μονοθεραπεία με κλοπιδογρέλη¹⁵⁵ ως προς τη δευτερογενή πρόληψη των εγκεφαλικών επεισοδίων. Σε αντίθεση με τη διπυριδαμόλη, η σιλοσταζόλη δεν είναι εμπορικά διαθέσιμη στην Ελλάδα.

4.6 Ανταγωνιστές του υποδοχέα της θρομβίνης PAR-1

Δύο ανταγωνιστές του PAR-1, το Atopaxar (E5555) και το Vorapaxar (SCH530348) μελετήθηκαν σε κλινικές μελέτες φάσης 2 και 3. Οι χημικές δομές των ανταγωνιστών του PAR-1 φαίνονται στην εικόνα 4.13.



Εικόνα 4.13. Χημικές δομές του vorapaxar και του atopaxar.

Το atopaxar είναι ένας από του στόματος ισχυρός ανταγωνιστής του PAR-1 υποδοχέα με βραδεία έναρξη δράσης (3,5 h) και μικρό χρόνο ημίσειας ζωής (23 h). Το atopaxar μελετήθηκε στις κλινικές μελέτες φάσης 2, J-LANCELOT¹⁵⁶ και LANCELOT ACS¹⁵⁷. Τα αποτελέσματα ως προς την αποτελεσματικότητα και ασφάλεια του φαρμάκου δεν ήταν τα αναμενόμενα και η περαιτέρω κλινική αξιολόγηση του atopaxar έχει ανασταλεί ¹⁵⁶⁻¹⁵⁸.

Το vorapaxar είναι ένας από του στόματος, ισχυρός και συναγωνιστικός, υψηλής συγγένειας ανταγωνιστής του PAR-1 υποδοχέα. Η αξιολόγηση της αποτελεσματικότητας και της ασφάλειας του vorapaxar, έγινε στις μελέτες φάσης 3, TRA-CER¹⁵⁹ και TRA-2P-TIMI 50¹⁶⁰. Η μελέτη TRA-CER στην οποία έγινε σύγκριση του vorapaxar με το εικονικό φάρμακο ως επιπλέον αγωγή στην καθιερωμένη διπλή αντιαιμοπεταλιακή αγωγή (92% των ασθενών λάμβανε ασπιρίνη και κλοπιδογρέλη) δεν έδειξε κλινικό όφελος σε σχέση με τα πρωτεύοντα καταληκτικά σημεία και διεκόπη πρόωρα εξαιτίας της αύξησης των περιστατικών με ενδοκρανιακή αιμορραγία ιδιαίτερα σε ασθενείς με ιστορικό ΑΕΕ. Η μελέτη TRA-2P-TIMI 50 στην οποία συμμετείχαν 26449 ασθενείς με προηγούμενο OEM, εγκεφαλικό επεισόδιο ή ΠΑΝ εκτίμησε την κλινική αποτελεσματικότητα του φαρμάκου ως επιπλέον στη χορηγηθείσα φαρμακευτική αγωγή. Η μελέτη διεκόπη πρόωρα για τους

ασθενείς με ΑΕΕ καθώς η χορήγηση του νοραραχαρ συνοδεύτηκε από αύξηση των ενδοκρανιακών αιμορραγιών. Η αναστολή του υποδοχέα PAR-1 από το Vorapaxar μείωσε τον κίνδυνο καρδιαγγειακού θανάτου ή ισχαιμικών συμβάντων σε ασθενείς με σταθερή νόσο που έπαιρναν κλασική θεραπεία, αυξάνοντας όμως τον κίνδυνο μέτριας ή σοβαρής αιμορραγίας συμπεριλαμβανομένης και της ενδοκρανιακής αιμορραγίας^{161,162}. Τα κλινικά επεισόδια ήταν λίγα με το νοραραχαρ στους ασθενείς που είχαν προηγούμενο OEM ή ΠΑΝ. Με βάση τα δεδομένα αυτά, ο διεθνής οργανισμός FDA ενέκρινε τη χρήση του νοραραχαρ για δευτερογενή πρόληψη των αγγειακών επεισοδίων στους ασθενείς με ΕΜ ή ΠΑΝ αλλά όχι σε αυτούς που είχαν προηγούμενο εγκεφαλικό ή παροδικό ισχαιμικό επεισόδιο και δεν ενέκρινε τη χορήγηση του στους ασθενείς με ΟΣΣ κατά την οξεία φάση. Ο Ευρωπαϊκός οργανισμός (EMA) ενέκρινε επίσης τη χρήση του νοραραχαρ μόνο μετά από ένα ΕΜ. Στο μέλλον, αναμένονται οι μελέτες που θα διερευνήσουν την αποτελεσματικότητα της χορήγησης του συνδυασμού νοραραχαρ με πρασουγρέλη ή τικαγρελόρη.

4.7 Νεότεροι αντιαιμοπεταλιακοί παράγοντες υπό διερεύνηση

Πολλοί αντιαιμοπεταλιακοί παράγοντες βρίσκονται σήμερα υπό διερεύνηση. Σ' αυτούς συμπεριλαμβάνονται οι ανταγωνιστές του υποδοχέα TP του TxA₂, οι ανταγωνιστές της συνθάσης του TxA₂, οι ανταγωνιστές των υποδοχέων προσκόλλησης των αιμοπεταλίων (υποδοχείς κολλαγόνου και vWf), οι αναστολείς της ενδοκυττάριας σηματοδότησης (αναστολείς ενδοκυττάρων κινασών), κλπ. Τα πρώτα αποτελέσματα από τις μελέτες *in vitro* και *in vivo* για μερικούς τουλάχιστον από τους παράγοντες αυτούς είναι ενθαρρυντικά, γεγονός που μπορεί να οδηγήσει στη χρήση των παραγόντων αυτών σε μελέτες φάσης 3, με στόχο τη βελτίωση μελλοντικά της κλινικής αποτελεσματικότητας και ασφάλειας της αντιαιμοπεταλιακής θεραπείας.

4.8. Η αντιαιμοπεταλιακή αγωγή στα οξέα στεφανιαία σύνδρομα σήμερα

Από τη στιγμή που σημαντικές μελέτες έδειξαν μεγαλύτερη κλινική αποτελεσματικότητα για την πρασουγρέλη ή τικαγρελόρη, τα δύο φάρμακα αυτά υπερέχουν της κλοπιδογρέλης ως πρώτη επιλογή για το συνδυασμό με ασπιρίνη για τους περισσότερους ασθενείς με ΟΣΣ σύμφωνα με τις Ευρωπαϊκές και Αμερικάνικες κατευθυντήριες οδηγίες^{88,163}. Συνεπώς σήμερα, προτιμάται η χορήγηση πρασουγρέλης

στους ασθενείς που υποβάλλονται σε PCI (εκτός των ασθενών με προηγούμενη εγκεφαλικό ή παροδικό ισχαιμικό επεισόδιο, με βάρος μικρότερο των 60 kg ή ηλικίας άνω των 75 ετών) ενώ η τικαγρελόρη αποτελεί καλύτερη επιλογή για τους ασθενείς μέτριου έως υψηλού κινδύνου για ΟΣΣ. Στην περίπτωση όμως του υψηλού αιμορραγικού κινδύνου, της θρομβόλυσης ή της μακροχρόνιας λήψης αντιπηκτικών φαρμάκων για κάποιον ασθενή τότε χορηγείται κλοπιδογρέλη. Επίσης, για τους ασθενείς με STEMI που λαμβάνουν μορφίνη, η αντιαιμοπεταλιακή αποτελεσματικότητα της τικαγρελόρης και πρασουγρέλης μπορεί να καθυστερήσει για αρκετές ώρες με αποτέλεσμα να μείνουν οι ασθενείς χωρίς επαρκή προστασία στη συσσώρευση των αιμοπεταλίων ειδικά κατά τη διάρκεια των πρώτων κρίσιμων ωρών θεραπείας. Στον καιρό της κρίσης, δεν θα πρέπει να ξεχνάμε πως και η παράμετρος του κόστους των φαρμάκων παίζει πολύ σημαντικό ρόλο στην επιλογή του αντιαιμοπεταλιακού φαρμάκου.

Η βέλτιστη διάρκεια της αντιαιμοπεταλιακής θεραπείας αποτελεί αντικείμενο συζήτησης καθώς ο κίνδυνος όψιμης και πολύ όψιμης θρόμβωσης των stent πρέπει να ζυγιστεί απέναντι στην επίπτωση αιμορραγικών επεισοδίων. Με βάση τις μελέτες CURE και CREDO συνίσταται γενικά διπλή αντιαιμοπεταλιακή αγωγή για ένα χρόνο μετά από ΟΣΣ. Στη μελέτη DAPT διερευνήθηκε η παρατεταμένη χρήση της ασπιρίνης μαζί με ένα δεύτερο αντιαιμοπεταλιακό φάρμακο μετά από τοποθέτηση stent σε ασθενείς οι οποίοι υπεβλήθησαν σε αγγειοπλαστική. Όλοι έλαβαν ασπιρίνη μαζί με ένα ακόμα αντιαιμοπεταλιακό (κλοπιδογρέλη ή πρασουγρέλη) για ένα χρόνο. Μετά το πέρας των 12 μηνών οι ερευνητές τυχαιοποίησαν 9.961 ασθενείς από αυτούς που είχαν καλώς ανεχτεί τη διπλή θεραπεία σε 18 ακόμα μήνες ή στην ομάδα ελέγχου που έλαβε ασπιρίνη και εικονικό φάρμακο.

Οι ασθενείς της μελέτης που έλαβαν ασπιρίνη και είτε κλοπιδογρέλη είτε πρασουγρέλη για 30 μήνες μετά την τοποθέτηση stent είχαν κατά 50% μειωμένο κίνδυνο για νέο έμφραγμα μυοκαρδίου και περίπου κατά 1/3 μειωμένο κίνδυνο της εμφάνισης θρομβωτικών επεισοδίων σε σχέση με την ομάδα ελέγχου. Μετρίου έως σοβαρού βαθμού αιμορραγία ήταν πιο συχνή στην ομάδα της παρατεταμένης αντιαιμοπεταλιακής θεραπείας (2,5% έναντι 1,6%), παρά το γεγονός ότι η αιμορραγία ως αίτιο θανάτου ήταν σπάνια και στις δύο ομάδες.

Σημαντικό εύρημα αποτελεί η αύξηση του κινδύνου θρόμβωσης του stent και εμφράγματος του μυοκαρδίου και στις δύο ομάδες τρεις μήνες μετά τη διακοπή της διπλής

αντιαιμοπεταλιακής αγωγής. Συμπερασματικά, η μελέτη καταλήγει πως η συνέχιση της διπλής αντιαιμοπεταλιακής αγωγής σε ασθενείς με drug-eluting stent πέρα των 12 μηνών (στους οποίους όμως η αγωγή ήταν καλώς ανεκτή) μείωσε σημαντικά τον κίνδυνο θρόμβωσης του stent, μείζονος καρδιαγγειακού επεισοδίου και αγγειακού εγκεφαλικού επεισοδίου αλλά σχετίστηκε με αυξημένο κίνδυνο αιμορραγίας.

Η μελέτη PEGASUS TIMI 54⁹⁸ διερεύνησε την τικαγρελόρη (σε δύο δόσεις 90 mg ή 60mg δύο φορές ημερησίως) συγκριτικά με το εικονικό φάρμακο επιπρόσθετα της χαμηλής δόσης ασπιρίνης, σε σταθεροποιημένους ασθενείς ηλικίας άνω των 50 ετών με ιστορικό καρδιακής προσβολής και τουλάχιστον έναν επιπρόσθετο παράγοντα καρδιαγγειακού κινδύνου. Η μελέτη σχεδιάστηκε με στόχο τη διερεύνηση της καλύτερης αντιμετώπισης των ασθενών πέρα από τους 12 μήνες. Τα αποτελέσματα έδειξαν πως και οι δύο δόσεις μειώνουν το πρωτογενές καταληκτικό σημείο του καρδιαγγειακού θανάτου, ΕΜ, ή εγκεφαλικού επεισοδίου αναδεικνύοντας ένα επιπλέον όφελος του συνδιασμού τικαγρελόρης και ασπιρίνης πέρα των 12 μηνών.

5. ΤΟ ΦΑΙΝΟΜΕΝΟ ΤΗΣ ΑΝΤΙΣΤΑΣΗΣ

5.1 Εισαγωγή

Λαμβάνοντας υπόψη πως πολλά φάρμακα δεν καταφέρνουν να θεραπεύσουν την ασθένεια για την οποία χορηγούνται αναδεικνύοντας την πολυπαραγοντική φύση της αιμοπεταλιακής ενεργοποίησης και της θρόμβωσης, δεν προκαλεί καμία έκπληξη πως η ασπιρίνη ή κάποιο άλλο αντιαιμοπεταλιακό φάρμακο δεν προλαμβάνει πάντα τα θρομβωτικά επεισόδια. Το φαινόμενο αυτό διαπιστώνεται με τη χρήση διαφόρων εργαστηριακών μεθόδων¹⁶⁴. Οι περισσότερες μέθοδοι εκτίμησης της λειτουργίας των αιμοπεταλίων συσχετίζονται με τον αυξημένο κίνδυνο καρδιαγγειακών επεισοδίων ή θνητότητας αναδεικνύοντας μία ξεχωριστή ομάδα ασθενών που δεν αποκρίνονται καλά στη θεραπεία και βρίσκονται σε υψηλότερο κίνδυνο. Το φαινόμενο αυτό αναφέρεται ως «αντίσταση» ή «κακή απόκριση» στην αντιαιμοπεταλιακή αγωγή ή ως «αυξημένη υπό αγωγή αιμοπεταλιακή αντιδραστικότητα»¹⁶⁵. Το φαινόμενο της αντίστασης έχει περιγραφεί κυρίως για την ασπιρίνη και την κλοπιδογρέλη, ενώ υπάρχουν κάποιες μελέτες που αναφέρουν ότι πιθανώς υπάρχουν ασθενείς που εμφανίζουν αντίσταση στην πρασουγρέλη¹⁶⁶.

Οι μηχανισμοί με τους οποίους προκύπτει ένα αθηροθρομβωτικό επεισόδιο είναι πολλοί και καθώς αρκετά συχνά μπορεί να είναι ανεξάρτητοι των αιμοπεταλίων και σε χαμηλή συχνότητα στους ασθενείς με σταθερή καρδιαγγειακή νόσο, η αναγνώριση της αντίστασης στα αντιαιμοπεταλιακά φάρμακα με βάση τα κλινικά επεισόδια δεν παρουσιάζει ευαισθησία και ειδικότητα. Γι' αυτό το λόγο προτιμούνται οι εργαστηριακοί ορισμοί της αντίστασης καθώς θεωρητικά μπορεί να παρέχουν μια περισσότερο αξιόπιστη εκτίμηση της αντιαιμοπεταλιακής αποτελεσματικότητας των φαρμάκων, παρ' όλα αυτά οι εργαστηριακές μεθοδολογίες δρουν ως υποκατάστατα των κλινικών σημείων. Μάλιστα γίνεται προσπάθεια να απλοποιηθούν οι εργαστηριακές μεθοδολογίες, πολλές φορές με το κόστος να απομακρύνονται από την προσομοίωση των *in vivo* διαδικασιών, ούτως ώστε να αυξηθεί η κλινική τους χρησιμότητα. Παρατηρείται μεγάλη διακύμανση στην εργαστηριακή εκτίμηση της αντίστασης στην ασπιρίνη, από 2,8% σε 59,5%¹⁶⁷.

5.2 Αντίσταση στην ασπιρίνη

Το φαινόμενο της αντίστασης στην ασπιρίνη, αποτέλεσε αντικείμενο συζήτησης και διαφωνιών πάνω από δέκα χρόνια. Η αντίσταση στην ασπιρίνη είναι δύσκολο να οριστεί και ίσως να αναπαριστά πολλά διαφορετικά φαινόμενα. Οι ασθενείς που θεωρείται πως εμφανίζουν αντίσταση είναι αυτοί που παρ' όλη τη θεραπεία με ασπιρίνη εξακολουθούν να βιώνουν καρδιαγγειακά επεισόδια καθώς επίσης και οι ασθενείς που δεν εμφανίζουν αναστολή της αιμοπεταλιακής ενεργοποίησης με βάση τα εργαστηριακά τεστ.

Η εργαστηριακή αντίσταση περιγράφεται καλύτερα ως η αποτυχία της ασπιρίνης να αποτρέψει την παραγωγή του αιμοπεταλιακού TxA_2 που προέρχεται από τα αιμοπετάλια και γενικά προσδιορίζεται είτε με τη μέτρηση των μεταβολιτών (το θρομβοξανίο B_2 (TxB_2) στον ορό) ή μελετώντας την αιμοπεταλιακή λειτουργία. Οι μεθοδολογίες που χρησιμοποιούνται για την ανίχνευση της εργαστηριακής αντίστασης στην ασπιρίνη διαφέρουν μεταξύ τους και υπόκεινται σε σφάλματα στην ευαισθησία και στην ειδικότητα, με συνέπεια τον φτωχό συσχετισμό μεταξύ τους και έτσι η χρήση μία μόνο μεθοδολογίας είναι σχεδόν απίθανο να παράγει πραγματικά αξιοποιήσιμα αποτελέσματα.

Υπάρχουν πολλές προσεγγίσεις για τη διάγνωση και την κατηγοριοποίηση της αντίστασης στην ασπιρίνη¹⁰⁸. Ένας πιο επίσημος ορισμός της ασπιρίνης δόθηκε από τους Weber και συν. οι οποίοι κατηγοριοποίησαν την αντίσταση στην ασπιρίνη σε τρεις διακριτούς φαρμακοδυναμικούς ή φαρμακοκινητικούς υποτύπους:

- Η αντίσταση στην ασπιρίνη τύπου 1 η οποία περιλαμβάνει την αποτυχία της ασπιρίνης να καταστείλει την παραγωγή θρομβοξανίου A_2 (TxA_2) *in vitro* αλλά όχι *in vivo* (φαρμακοκινητικά)
- Η αντίσταση στην ασπιρίνη τύπου 2 η οποία περιλαμβάνει την αποτυχία της ασπιρίνης να καταστείλει την παραγωγή TxA_2 τόσο *in vitro* όσο και *in vivo* (φαρμακοδυναμικά) και
- Η αντίσταση στην ασπιρίνη τύπου 3 η οποία περιλαμβάνει την αιμοπεταλιακή ενεργοποίηση παρ' όλη την επαρκή καταστολή της παραγωγής του TxA_2 (ψευδοαντίσταση).

Μολονότι το μοντέλο αυτό παρέχει ένα χρήσιμο εργαλείο για τη μελέτη πιθανών αιτιών της αντίστασης στην ασπιρίνη, δεν έχει ακόμη αποδεδειγμένη κλινική χρησιμότητα.

Παρόλο που δεν υπάρχει καλή συσχέτιση μεταξύ των μεθοδολογιών που εργαστηριακά διερευνούν την αντίσταση στην ασπιρίνη, είναι αδιαμφισβήτητο πως η αντίσταση στην

ασπιρίνη, ανεξάρτητα από τη μεθοδολογία με την οποία έχει προσδιοριστεί, συσχετίζεται με υψηλότερο κίνδυνο θνητότητας ή περαιτέρω καρδιαγγειακά επεισόδια. Δεδομένα από τις μελέτες HOPE και CHARISMA έδειξαν πως υψηλά επίπεδα του 11-δεϋδρο-θρομβοξανίου B2 προβλέπουν τον αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης μειζόνων καρδιαγγειακών επεισοδίων σε ασθενείς που λαμβάνουν χρονίως ασπιρίνη^{168,169}.

Μια ανασκόπηση και μία μετα-ανάλυση 20 μελετών της αντίστασης στην ασπιρίνη έδειξαν πως σε συνολικό πληθυσμό 2930 ασθενών υπάρχει σχεδόν τέσσερις φορές μεγαλύτερη αύξηση του κινδύνου για περαιτέρω καρδιαγγειακά επεισόδια (Odds Ratio (OR) 3,85, 95% CI 3,08–4,80 ($p<0,001$)) και έξι φορές αύξηση του κινδύνου του θανάτου (OR 5,99, 95% CI 2,28–15,72 ($p<0,003$)) σε ασθενείς που εμφάνισαν αντίσταση στην ασπιρίνη από διάφορες εργαστηριακές μεθόδους¹⁷⁰. Ενώ αυτή η μελέτη σαφώς καταδεικνύει ότι η αντίσταση στην ασπιρίνη συσχετίζεται με κακή έκβαση, δεν συμβάλει στην κατανόηση της αιτίας, της εκτίμησης της αντίστασης και της θεραπείας του φαινομένου. Οι είκοσι μελέτες που συμπεριλήφθηκαν στη μετα-ανάλυση, επίσης, καταδεικνύουν σαφώς τη δυσκολία που έχει η μελέτη της αντίστασης. Για την εκτίμηση της λειτουργίας των αιμοπεταλίων χρησιμοποιήθηκαν έξι διαφορετικές μέθοδοι μελέτης της λειτουργίας των αιμοπεταλίων, διάφορες δόσεις ασπιρίνης σε κάθε μελέτη καθώς και διαφορετικοί πληθυσμοί ασθενών (π.χ. ΟΣΣ, εγκεφαλικό επεισόδιο, αορτοστεφανιαίας παράκαμψης με μόσχευμα)¹⁷⁰. Κατά συνέπεια, με τόσες διαφοροποιήσεις είναι δύσκολο να εξαχθεί συμπέρασμα σχετικά με την αντίσταση στην ασπιρίνη.

5.2.1. Μηχανισμοί που οδηγούν στην αντίσταση στην ασπιρίνη

Οι μηχανισμοί που ενοχοποιήθηκαν ως υπεύθυνοι για την αντίσταση στην ασπιρίνη περιγράφονται παρακάτω:

1. Η φαρμακοκινητική κάθε φαρμάκου μπορεί να ρυθμίζεται από αντλίες που αυξάνουν ή μειώνουν τις συγκεντρώσεις του φαρμάκου σε κυτταρικό ή οργανικό επίπεδο. Στα αιμοπετάλια, υπάρχει η ανιονική αντλία, η πολυφαρμακευτική αντίσταση πρωτεΐνη 4 (multidrug resistance protein 4, MPR4) που ανήκει στην υποοικογένεια C των μεταφορέων με ATP-Κασέτα πρόσδεσης. Αυτή η αντλία είναι γνωστό πως μπορεί να ρυθμίζει την ενδοκυτταρική συγκέντρωση φαρμάκων¹⁷¹, και στα αιμοπετάλια εκφράζεται και στις μεμβράνες των πυκνών κοκκίων και στην κυτταρική μεμβράνη¹⁷².

Μετά από την επέμβαση αορτοστεφανιαίας παράκαμψης, πολλοί ασθενείς εμφανίζουν παροδική αντίσταση στην ασπιρίνη η οποία δεν παρέρχεται με υψηλότερες συγκεντρώσεις ασπιρίνης *in vitro*, προτείνοντας ένα μηχανισμό ο οποίος δεν οφείλεται αποκλειστικά στην αντιδραστική θρομβοκυττάρωση ή στην επιτάχυνση του ρυθμού μεταβολισμού της ασπιρίνης¹⁷³. Την πέμπτη ημέρα μετά την επέμβαση, αυτοί οι ασθενείς έχουν αυξημένη έκφραση της αιμοπεταλιακής MRP4 η οποία ξεπερνιέται τη δέκατη ημέρα. Επιπλέον, την πέμπτη ημέρα, η αντίσταση στην ασπιρίνη μπορεί να ξεπεραστεί *in vitro* χρησιμοποιώντας MRP4 αναστολείς¹⁷⁴. Στους ασθενείς, οι οποίοι λαμβάνουν ασπιρίνη χρονίως υπάρχει μερική αποκατάσταση της αιμοπεταλιακής λειτουργίας οδηγώντας σε μείωση της ευαισθησίας της ασπιρίνης¹⁷⁵. Πρόσφατα *in vitro* και *in vivo* δεδομένα έδειξαν πως γι' αυτό το φαινόμενο μπορεί να είναι υπεύθυνη η αυξημένη έκφραση της MRP4, καθώς η ασπιρίνη αυξάνει την έκφραση της MRP4 των αιμοπεταλίων σε γονιδιακό επίπεδο¹⁷⁶.

2. Η αντιαιμοπεταλιακή δράση της ασπιρίνης μπορεί να εξασθενήσει από παράγοντες που εμποδίζουν την ικανότητα της να ακετυλιώνει την περιοχή πρόσδεσης της COX-1. Το φαινόμενο αυτό εμφανίζεται με την ταυτόχρονη λήψη άλλων μη στεροειδών αντιφλεγμονωδών φαρμάκων (NSAIDs). Τα NSAIDs ανταγωνίζονται τη δράση της ασπιρίνης, αναστέλλοντας αναστρέψιμα, όμως, την COX-1. Έτσι, η αντιθρομβωτική τους δράση διαρκεί για μικρό χρονικό διάστημα. Η ταυτόχρονη χορήγηση NSAIDs και ασπιρίνης έχει ως αποτέλεσμα τον ανταγωνισμό των δύο φαρμάκων για τους ίδιους ελεύθερους υποδοχείς σύνδεσής τους, αναστέλλοντας αντιστρεπτά ή μόνιμα την COX-1, αντίστοιχα. Αυτός ο ανταγωνισμός μειώνει την αντιθρομβωτική δράση της ασπιρίνης. Το πρόβλημα αυτό δεν προκαλείται από την ταυτόχρονη χορήγηση ασπιρίνης και ειδικών αναστολέων της COX-2¹⁷⁷.
3. Γενετικοί πολυμορφισμοί των ενζύμων COX-1, COX-2 και της συνθετάσης της TXA2, που τα κάνει λιγότερο ευαίσθητα στην ασπιρίνη μπορεί να είναι μια άλλη πιθανή αιτία αντίστασης. Το γονίδιο COX-1 είναι αρκετά πολυμορφικό, με 10 διαφορετικές ισομορφές που έχουν προκύψει μετά από υποκατάσταση σε ένα μόνο νουκλεοτίδιο κάθε φορά. Ο περισσότερος μελετημένος πολυμορφισμός είναι ο C50T. Μελέτες στις οποίες χρησιμοποιήθηκε ο ορισμός της εργαστηριακής αντίστασης παρουσίασαν διαφορετικά αποτελέσματα σε σχέση με την συσχέτιση ή όχι των γονιδιακών πολυμορφισμών και της αντίστασης. Μία μετα-ανάλυση συμπέρανε πως δεν υπάρχει

σημαντική συσχέτιση (OR 1,37, 95% CI 0,81–2,31, $p=0,89$)¹⁷⁸. Η μετα-ανάλυση αυτή δέχθηκε κριτική καθώς μόνο τρεις από τις 8 μελέτες που αναλύθηκαν ήταν πραγματικά κατάλληλες για τη στατιστική ανάλυση. Παρ' όλα αυτά, πρόσφατες μελέτες φαίνεται πως επιβεβαιώνουν το συμπέρασμα της μετα-ανάλυσης πως υπάρχει χαμηλή συσχέτιση μεταξύ των πολυμορφισμών της COX-1, της εργαστηριακής αντίστασης και της κλινικής έκβασης^{179,180}. Αντίσταση στην ασπιρίνη έχει συσχετιστεί, επίσης, και με τον πολυμορφισμό του PLA2 γονιδίου, το οποίο κωδικοποιεί τη γλυκοπρωτεΐνη IIIa, ένα συστατικό στοιχείο της γλυκοπρωτεΐνης αIIbβ3 των αιμοπεταλίων. Εύρημα που ανέδειξε και η προαναφερθείσα μετα-ανάλυση. Ο πολυμορφισμός αυτός έχει συχνότητα στους Καυκάσιους 0,15 και έχει βρεθεί πως συσχετίζεται με την οξεία θρόμβωση, ειδικά σε ασθενείς που έχουν προγενέστερο συμβάν πριν την ηλικία των 60 χρόνων. Η στατιστική ανάλυση 10 μελετών από 19 που ανιχνεύθηκαν έδειξαν πως ο πολυμορφισμός συσχετίζεται σημαντικά με την αντίσταση στην ασπιρίνη σε υγιείς εθελοντές (OR 2,36, 95% CI 1,24– 4,49, $p=0,009$) αλλά το αντίθετο αποτέλεσμα βρέθηκε όταν αυτές οι μελέτες συνδυάστηκαν με αυτές που διενεργήθηκαν σε ασθενείς με καρδιαγγειακή νόσο (OR 1,14, 95% CI 0,84– 1,54, $p=0,40$)¹⁷⁸. Πρέπει να λαμβάνουμε υπόψη πως η συσχέτιση ή μη του πολυμορφισμού με την αντίσταση στην ασπιρίνη εξαρτάται από τη μεθοδολογία με την οποία εκτιμήθηκε η αντίσταση. Ο μηχανισμός με τον οποίο ο πολυμορφισμός μπορεί να συνεισφέρει στην αντίσταση στην ασπιρίνη δεν είναι ξεκάθαρος αλλά, εξαιτίας της εξωκυτταρικής του θέσης, είναι πολύ πιθανό να περιλαμβάνει δράσεις της εξώ-μέσα σηματοδότησης.

Ασθενείς με τέτοιου είδους μηχανισμό αντίστασης στην ασπιρίνη, πιθανόν να επωφελούνται από υψηλότερες δόσεις ασπιρίνης ή από τη λήψη διαφορετικών αντιαιμοπεταλιακών φαρμάκων, όπως η κλοπιδογρέλη¹⁸¹.

4. Αυξημένη αντιδραστικότητα των αιμοπεταλίων έναντι άλλων παραγόντων συσώρευσης των αιμοπεταλίων. Τα αιμοπετάλια μπορούν να ενεργοποιηθούν και από διαφορετικούς δρόμους από αυτόν της θρομβοξάνης, τον οποίο αναστέλλει η δράση της ασπιρίνης. Η υπερλειτουργία τέτοιων εναλλακτικών δρόμων ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων, όπως η ενεργοποίησή τους από τα ερυθρά αιμοσφαίρια, η αυξημένη ευαισθησία στο κολλαγόνο και στο ADP, τα αυξημένα επίπεδα του vWf, της νοραδρεναλίνης, μπορεί να είναι υπεύθυνη για την αποτυχία της θεραπευτικής δράσης της ασπιρίνης. Η ταυτόχρονη χορήγηση άλλων αντιαιμοπεταλιακών φαρμάκων και η

τροποποίηση του τρόπου ζωής μπορεί να αποδειχθούν επωφελή για τέτοιου είδους ασθενείς.

5. Αυξημένος ρυθμός εισόδου νέων αιμοπεταλίων στην κυκλοφορία. Κλινικές καταστάσεις όπως έμφραγμα του μυοκαρδίου, επεμβάσεις αορτοστεφανιαίας παράκαμψης (bypass surgery) ή άλλες χειρουργικές επεμβάσεις, σχετίζονται με αυξημένο ρυθμό εισόδου νεοσχηματισθέντων και μη «ασπιρινισμένων» αιμοπεταλίων στην κυκλοφορία. Το ποσοστό των νέων αιμοπεταλίων που έχουν ενεργό το ένζυμο κυκλοοξυγενάση¹⁸² μπορεί να ευθύνεται για την αντίσταση στην ασπιρίνη. Η χορήγηση υψηλότερων δόσεων ασπιρίνης σε τέτοιους ασθενείς ίσως να φανεί περισσότερο αποτελεσματική.
6. Εναλλακτικοί δρόμοι για τη σύνθεση της θρομβοξάνης. Η δράση του ισοενζύμου κυκλοοξυγονάση-2 (COX-2) μπορεί να συνεισφέρει στην παραγωγή των προστανοειδών κυρίως σε συνθήκες στρες (πχ. φλεγμονή). Υπάρχει 63% ομολογία ανάμεσα στις δύο ισομορφές με την COX-2 να μπορεί να χρησιμοποιήσει περισσότερα λιπαρά οξέα ως υποστρώματα από την COX-1 που συνήθως περιορίζεται στη χρήση του αραχιδονικού οξέος. Η διαφορά στην ομολογία καταλήγει η COX-2 να είναι 170 φορές λιγότερο ευαίσθητη από την COX-1 στη δράση της ασπιρίνης. Συνεπώς, ενώ χαμηλή δόση της ασπιρίνης αναστέλλει το ισοένζυμο κυκλοοξυγονάση-1 (COX-1) των αιμοπεταλίων, η αναστολή της COX-2 απαιτεί υψηλότερες δόσεις (>500 mg/ημέρα). Η COX-2 συνήθως δεν εκφράζεται στα αιμοπετάλια. Αυτό συμβαίνει γιατί η έκφρασή της επάγεται κατά τη διάρκεια των τελευταίων σταδίων της ανθρώπινης μεγακαρυοποίησης με αποτέλεσμα να εκφράζεται μόνο στα νεοσχηματιζόμενα αιμοπετάλια. Λαμβάνοντας υπόψη πως η διάρκεια ζωής των αιμοπεταλίων είναι 10 ημέρες στους υγιείς εθελοντές και το γεγονός πως η έκφραση της COX-2 από τα αιμοπετάλια χάνεται μετά από περίπου μία ημέρα, η έκφρασή της περιορίζεται μόνο στο 10% των αιμοπεταλίων. Το ποσοστό έκφρασής της αυξάνεται όταν τα αιμοπετάλια ενεργοποιηθούν από αυξητικούς παράγοντες ή φλεγμονώδεις διαμεσολαβητές, ιδιαίτερα στις αθηρωματώδεις πλάκες. Η κλινική σημασία της έκφρασης της αιμοπεταλιακής COX-2 έχει διερευνηθεί και *in vitro* και *in vivo*. Σε 100 ασθενείς που λάμβαναν ασπιρίνη χρονίως, η COX-2 ανιχνεύθηκε περίπου στο 50% των ασθενών, το 10% των οποίων είχαν υψηλή παραγωγή TXA₂, η οποία βρέθηκε πως οφείλεται στην

COX-2. Έτσι, ο σχηματισμός της TXA₂ στα αιμοπετάλια από την COX-2 ενδεχομένως να αποτελεί μια άλλη πιθανή αιτία της αντίστασης στην ασπιρίνη.

7. Επίσης, ότι τα αιμοπετάλια μπορούν και λαμβάνουν πρόδρομες ουσίες της TXA₂, όπως η προσταγλανδίνη H₂, από τα μονοκύτταρα ή τα ενδοθηλιακά κύτταρα και συνθέτουν TXA₂ αποτελεί μια άλλη πιθανή αιτία της αντίστασης στην ασπιρίνη.
8. Επίσης, έχουν δημοσιευτεί πολλές ερευνητικές μελέτες και για παράγοντες που προκαλούν αντίσταση στην αντιαιμοπεταλιακή δράση της ασπιρίνης. Ως τέτοιοι, αναφέρονται το κάπνισμα, η ασταθής στηθάγχη, η υπερλιπιδαιμία κ.ά.
9. Τέλος, δεν πρέπει να υποτιμάται και η πιθανότητα κακής συμμόρφωσης στη λήψη της ασπιρίνης.

5.2.2. Εργαστηριακή διερεύνηση της αντίστασης στην ασπιρίνη

Η κατάλληλη μεθοδολογία για την εκτίμηση της αντίστασης στην ασπιρίνη αποτελεί αντικείμενο πολλών συζητήσεων. Πολλές *in vitro* μεθοδολογίες είναι διαθέσιμες αλλά η καθεμιά προσεγγίζει την αιμοπεταλιακή λειτουργία από διαφορετική σκοπιά, συνεπώς τα αποτελέσματα δεν είναι πάντα αναπαραγώγιμα.

Το 11-δεϋδρο θρομβοξανίο B₂ στα ούρα είναι ένας σταθερός μεταβολίτης του TXA₂ και γι' αυτό το λόγο θεωρείται ένας άμεσος μετρήσιμος δείκτης της αναστολής της COX-1 από την ασπιρίνη. Μερική αναστολή του TXA₂ από την ασπιρίνη συσχετίζεται με νέκρωση του καρδιακού μυός και απελευθέρωση καρδιακών ενζύμων στους STEMI ασθενείς. Σε μία πολυκεντρική μελέτη με 488 ασθενείς με ιστορικό καρδιαγγειακής νόσου βρέθηκε πως αυξημένα επίπεδα του 11-δεϋδρο TxB₂ στα ούρα σχετίζεται με δύο φορές αύξηση του κινδύνου εμφάνισης εμφράγματος του μυοκαρδίου (OR 2,0, 95% CI: 1,2–3,4 p=0,006) και τρεις φορές αύξηση του καρδιαγγειακού κινδύνου (OR 3,5; 95% CI: 1,7–7,4 p<0,001). Παρ'όλα αυτά, αυξημένα επίπεδα στα ούρα του 11-δεϋδρο θρομβοξανίου B₂ συσχετίζεται με υψηλότερο προφίλ καρδιαγγειακού κινδύνου¹⁸³ το οποίο είναι συμβατό με προηγούμενα ευρήματα που έδειχναν πως η σοβαρότητα της αθηροθρομβωτικής νόσου μπορεί να τροποποιήσει την παραγωγή θρομβοξανίου που είναι ανεξάρτητη από την ασπιρίνη¹⁸⁴ μέσω αυξημένης έκφρασης της COX-2 στα λευκοκύτταρα και στο ενδοθήλιο¹⁸⁵. Επιπλέον, σε μια μελέτη που συμπεριλήφθηκαν Αфро-Αμερικάνοι ασθενείς με εγκεφαλικό επεισόδιο, τα επίπεδα του 11-δεϋδρο θρομβοξανίου B₂ παρουσίασαν διακυμάνσεις με το χρόνο και κατά δοσο-εξαρτώμενο τρόπο και δεν συσχετίστηκαν με

καρδιαγγειακά επεισόδια σε περίοδο δύο χρόνων¹⁸⁶. Επιπλέον, αρκετές μελέτες έδειξαν πως υψηλότερες δόσεις ασπιρίνης μειώνουν κατ' ανάλογο τρόπο τα επίπεδα του 11-δεϋδρο θρομβοξανίου B₂ στα ούρα, πιθανώς μέσω της αναστολής της COX-2^{187,188,189}. Το εύρημα αυτό δεν είναι σε συνάφεια με τις μεγάλες κλινικές μελέτες που δείχνουν ότι χαμηλές δόσεις ασπιρίνης είναι το ίδιο αποτελεσματικές με τις υψηλότερες δόσεις στη μείωση των καρδιαγγειακών επεισοδίων¹⁹⁰. Γι' αυτό το λόγο, η έλλειψη μείωσης των επιπέδων του 11-δεϋδρο θρομβοξανίου B₂ στα ούρα μπορεί να μην αναπαριστά πάντα την αντίσταση στην ασπιρίνη αλλά να αποτελεί έναν δείκτη της μη ευαισθησίας της ασπιρίνης στην παραγωγή του θρομβοξανίου μέσω άλλων μηχανισμών και παρ' όλη την επαρκή αναστολή της αιμοπεταλιακής ενεργότητας της COX-1 από την ασπιρίνη. Συνεπώς, τα επίπεδα του 11-δεϋδρο θρομβοξανίου B₂ στα ούρα μπορεί να μην είναι πάντα ένας αξιόπιστος δείκτης για την εκτίμηση της απόκρισης των αιμοπεταλίων στην ασπιρίνη.

Μια άλλη μέθοδος που χρησιμοποιείται για την εκτίμηση της αντίστασης στην ασπιρίνη είναι η συσσωρευομετρία με μετάδοσης φωτός (LTA). Στη μέθοδο αυτή μετράται η συσσώρευση των αιμοπεταλίων μετά από ενεργοποίηση τους με τον αγωνιστή αραχιδονικό οξύ. Η μέτρηση αυτή μπορεί να προσφέρει ακριβή ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων σε σχέση με άλλες και γι' αυτό θεωρείται ως «χρυσή μέθοδος»¹⁹¹. Η μέθοδος αυτή συσχετίζεται με κλινικά επεισόδια σε μελέτη με 326 ασθενείς παρατηρήθηκε πως οι ασθενείς που εμφάνισαν αντίσταση με βάση τα αποτελέσματα της LTA διέτρεχαν τρεις φορές μεγαλύτερο κίνδυνο εμφάνισης καρδιαγγειακών επεισοδίων. Παρ' όλα αυτά, το ποσοστό της αντίστασης στην ασπιρίνη όπως μετράται με την LTA είναι σημαντικά χαμηλότερο σε σχέση με άλλες μεθοδολογίες (4% έναντι 10,3%–51,7%) καθώς επίσης δεν υπάρχει καλή συσχέτιση μεταξύ των μεθοδολογιών¹⁶⁷. Το εύρημα αυτό θα μπορούσε να εξηγηθεί από το γεγονός πως από τη μεθοδολογία της LTA λείπουν τα λευκοκύτταρα και τα ερυθροκύτταρα (αφού πραγματοποιείται σε PRP) που *in vivo* θα μπορούσαν να επηρεάζουν τη συσσώρευση των αιμοπεταλίων. Επιπλέον, η συσσώρευση των αιμοπεταλίων *in vivo* δεν εξαρτάται μόνο από το αραχιδονικό οξύ αλλά και από άλλους αγωνιστές όπως το ADP και το κολλαγόνο¹⁹². Ένα μειονέκτημα της μεθοδολογίας αυτής είναι πως διαφορετικά εργαστήρια μπορεί να ακολουθούν διαφορετικά πρωτόκολλα παρασκευής PRP και γι' αυτό από διαφορετικά εργαστήρια μπορεί να δίνονται διαφορετικές τιμές αναφοράς. Σημαντικότερα, υψηλές συγκεντρώσεις AA (0,5 mg/ml)

μπορεί να επάγουν τη λύση του αιμοπεταλίου και η επακόλουθη αύξηση στη μετάδοση φωτός να λαμβάνεται λανθασμένα ως αιμοπεταλιακή συσσώρευση¹⁹³.

Η μέθοδος VerifyNow®(Acumetrics) χρησιμοποιεί ολικό αίμα και εκτιμά την συσσώρευση των αιμοπεταλίων που ενεργοποιούνται από φυσιολογικούς αγωνιστές όπως το AA και το ινωδογόνο. Η μέτρηση της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων γίνεται με βάση την αρχή της αλλαγής της οπτικής πυκνότητας του δείγματος ολικού αίματος. Τα αποτελέσματα εκφράζονται σε PRU (Platelet Reaction Units) με τις PRU τιμές για την ασπιρίνη (Aspirin Reaction Units (ARU)) να έχουν προκαθοριστεί για την αντίσταση στην ασπιρίνη σε μεγαλύτερες από 550 ARU¹⁶⁷. Σε μελέτη με 110 ασθενείς με στεφανιαία νόσο, οι τιμές ARU του VerifyNow® συσχετίστηκαν με τη συσσώρευση των αιμοπεταλίων στο αραχιδονικό οξύ και ήταν ανεξάρτητες από τα επίπεδα του ινωδογόνου και του vWf. Επιπλέον, υψηλότερες ARU τιμές συσχετίστηκαν με τις τιμές της αιμοπεταλιακής συσσώρευσης σε άλλους αγωνιστές όπως το ADP και το κολλαγόνο υποδεικνύοντας πως το VerifyNow® σύστημα θα μπορούσε να αναγνωρίσει ασθενείς με αιμοπεταλιακή δραστικότητα ανεξάρτητη της COX. Τα καρδιαγγειακά επεισόδια είναι συνυφασμένα με υψηλές ARU τιμές. Σε μελέτη στην οποία συμπεριλήφθηκαν 468 ασθενείς, η αντίσταση στην ασπιρίνη έτσι όπως ορίστηκε με τιμές ARU>550, συσχετίστηκε με τρεις φορές μεγαλύτερο κίνδυνο θανάτου ή νέων καρδιαγγειακών επεισοδίων σε ασθενείς με σταθερή στεφανιαία νόσο (15,6% έναντι 53%, hazard ratio (HR) 3,12, 95% CI 1,65–5,91, $p<0,001$)¹⁹⁴. Παρ'όλα αυτά, δεν υπάρχει καλή συσχέτιση μεταξύ του συστήματος VerifyNow® και άλλων *in vitro* μεθόδων εκτίμησης της αιμοπεταλιακής λειτουργίας¹⁹⁵.

Τέλος, υπάρχει το σύστημα ανάλυσης της αιμοπεταλιακής λειτουργικότητας, PFA-100 (Platelet function analysis system, PFA-100®) το οποίο εκτιμά την αιμοπεταλιακή συσσώρευση μέσω της πρόσδεσης του παράγοντα vWf στη γλυκοπρωτεΐνη 1b κάτω από συνθήκες υψηλής διατμητικής τάσης χρησιμοποιώντας ολικό αίμα με σκοπό να μιμηθεί το σχηματισμό του θρόμβου σε κάποιο μικρό αγγείο. Η μέθοδος αυτή μετρά το χρόνο που χρειάζεται για να διακοπεί η ροή αίματος που περνά από ένα μικροσωληνάριο τα τοιχώματα του οποίου είναι επικαλυμμένα με αγωνιστές των αιμοπεταλίων όπως ADP, αδρεναλίνη και κολλαγόνο. Για την εκτίμηση της αντίστασης στην ασπιρίνη χρησιμοποιείται το PFA-100 test που είναι επικαλυμμένο με αδρεναλίνη καθώς θεωρείται ως εξαρτώμενο από την COX. Η χρησιμότητα της μεθόδου έχει διερευνηθεί σε μετα-

ανάλυση 15 μελετών και αφορά συνολικά 2963 ασθενείς με συμπτωματική αθηρωματική νόσο. Η μετα-ανάλυση ανέδειξε πως υπάρχει 2-φορές αύξηση στην εμφάνιση επαναλαμβανόμενων αγγειακών επεισοδίων στους ασθενείς που εμφάνισαν αντίσταση σύμφωνα με το σύστημα PFA-100 (OR 2,1; 95% CI 1,4–3.4; $p < 0,001$)¹⁹⁶.

Στα μειονεκτήματα της μεθόδου συγκαταλέγεται ότι ο χρόνος που χρειάζεται για να διακοπεί η ροή του αίματος εξαρτάται από τον vWf, τον αριθμό των αιμοπεταλίων και τον αιματοκρίτη¹⁹⁷.

Η μέθοδος αυτή είναι χρήσιμη για την εκτίμηση του κινδύνου αιμορραγίας που οφείλεται σε επίκτητες διαταραχές των αιμοπεταλίων ίσως από τα φάρμακα. Πρόκειται για μια μέθοδο γρήγορη, απλή και αναπαραγώγιμη, αρκετά ευαίσθητη για μεγάλης έκτασης δυσλειτουργία των αιμοπεταλίων όπως στη νόσο von Willebrand και στις βαριές κληρονομικές θρομβοπάθειες έχει όμως περιορισμένη ευαισθησία για τις ήπιες λειτουργικές διαταραχές των αιμοπεταλίων¹⁹⁸.

5.3 Αντίσταση στην κλοπιδογρέλη

Το μεγαλύτερο ενδιαφέρον ως προς την αντίσταση στην αντιαιμοπεταλιακή αγωγή έχει επικεντρωθεί τα τελευταία χρόνια στην κλοπιδογρέλη. Η αυξημένη αιμοπεταλιακή αντιδραστικότητα στην κλοπιδογρέλη, όπως αυτή διαπιστώνεται χρησιμοποιώντας διάφορες εργαστηριακές μεθόδους, συνοδεύεται από αυξημένο κίνδυνο για ένα νέο θρομβωτικό επεισόδιο συμπεριλαμβανομένης και της θρόμβωσης του stent^{199,200}. Σύμφωνα με διάφορες μελέτες, το ποσοστό των ασθενών που εμφανίζει αντίσταση στην κλοπιδογρέλη κυμαίνεται από 5-44%²⁰¹. Η απόκριση στην κλοπιδογρέλη μπορεί να βελτιωθεί αυξάνοντας τη δόση φόρτισης στα 600 mg. Η διακύμανση στην απόκριση στην κλοπιδογρέλη διαπιστώθηκε αρχικά στους ασθενείς που είχαν υποβληθεί σε αγγειοπλαστική.

Τα επιστημονικά δεδομένα που συνδέουν την αντίσταση στην κλοπιδογρέλη με τα κλινικά συμβάντα είναι περιορισμένα. Έχει βρεθεί πως στους ασθενείς με stent που εμφανίζουν υψηλή συσσώρευση των αιμοπεταλίων μετά από ενεργοποίησή τους με ADP έχουν 40 % πιθανότητα να εμφανίσουν ένα νέο καρδιαγγειακό επεισόδιο στους 6 μήνες. Επίσης, το 25% των ασθενών μπορεί να πάθουν θρόμβωση του stent λόγω αντίστασης στην κλοπιδογρέλη²⁰². Στη μελέτη PREPARE POST STENTING, οι ασθενείς που υποφέρουν από επαναλαμβανόμενα ισχαιμικά επεισόδια μέσα στους έξι μήνες μετά την

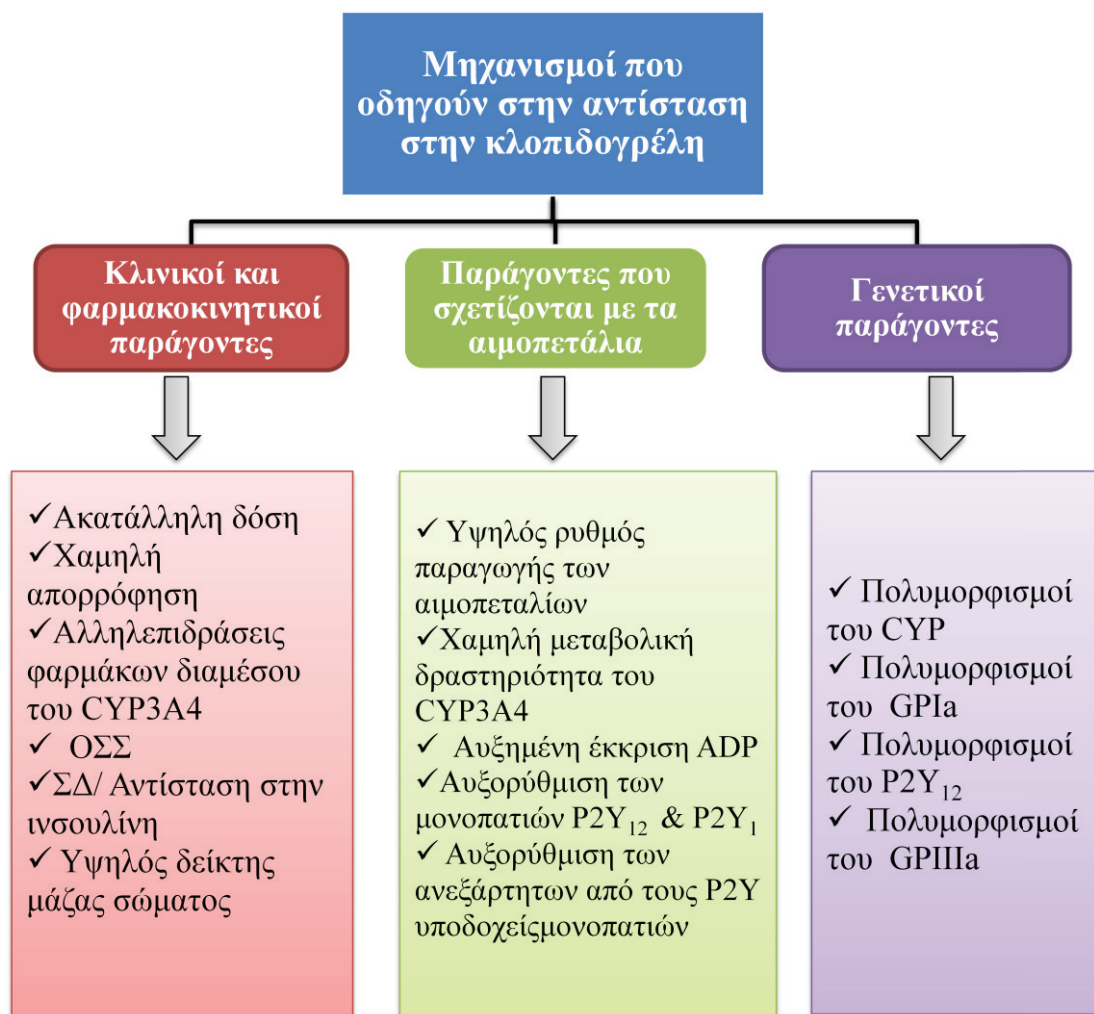
τοποθέτηση του stent έχουν μεγαλύτερη αιμοπεταλιακή αντιδραστικότητα στο ADP σε σχέση με τους ασθενείς χωρίς νέο θρομβωτικό επεισόδιο²⁰³.

Οι μελέτες CLEAR PLATELETS και CLEAR PLATELETS 1b, έδειξαν πως σε ασθενείς που τοποθετείται stent, η δόση φόρτισης κλοπιδογρέλης των 600 mg συσχετίζεται με μεγαλύτερη αναστολή της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων σε σύγκριση με τη δόση των 300mg. Η μεγαλύτερη αναστολή έχει ως συνέπεια τη μείωση της νέκρωσης του μυοκαρδίου και της έκφρασης των φλεγμονωδών δεικτών²⁰⁴.

Όλα τα παραπάνω ευρήματα οδήγησαν στο συμπέρασμα πως η υψηλή αιμοπεταλιακή αντιδραστικότητα παρ' όλη τη λήψη της αντιαιμοπεταλιακής θεραπείας αποτελεί παράγοντα κινδύνου για εμφάνιση ισχαιμίας σε ασθενείς που υποβάλλονται σε PCI. Γι' αυτό το λόγο, την τελευταία δεκαετία έγιναν πολλές μελέτες για τη διερεύνηση των μηχανισμών που οδηγούν στην αντίσταση στην κλοπιδογρέλη.

5.3.1 Μηχανισμοί που οδηγούν στην αντίσταση στην κλοπιδογρέλη

Στα αίτια της αντίστασης στην κλοπιδογρέλη συμπεριλαμβάνονται διάφοροι μηχανισμοί (Εικόνα 5.1.). Η κακή συμμόρφωση του ασθενούς ως προς τη λήψη του φαρμάκου, η παχυσαρκία, ο σακχαρώδης διαβήτης ιδίως εάν δεν είναι καλά ρυθμισμένος—και τα οξέα στεφανιαία σύνδρομα σχετίζονται με μειωμένη ανταπόκριση στη θεραπεία με κλοπιδογρέλη, πιθανόν λόγω αυξημένης αρχικής αιμοπεταλιακής συσσώρευσης. Όμως κύρια αιτία της αντίστασης στην κλοπιδογρέλη φαίνεται να είναι τα μειωμένα επίπεδα του ενεργού μεταβολίτη της στο αίμα των ασθενών που παρουσιάζουν το φαινόμενο. Πιθανοί μηχανισμοί που οδηγούν σε μειωμένη συγκέντρωση του ενεργού μεταβολίτη της κλοπιδογρέλης στο αίμα των ασθενών είναι: α) γενετικοί πολυμορφισμοί των ισομορφών του κυττοχρώματος P, που οδηγούν σε μικρότερη βιομετατροπή του αρχικού φαρμάκου β) αλληλία του γονιδίου ABCB1 της γλυκοπρωτεΐνης P, που ελαττώνουν την απορρόφηση της κλοπιδογρέλης και γ) συγχορήγηση άλλων φαρμάκων, όπως οι αναστολείς της αντλίας πρωτονίων (Proton Pump Inhibitors, PPIs).



Εικόνα 5.1. Μηχανισμοί που οδηγούν στην αντίσταση στην κλοπιδογρέλη.

Μεταξύ των γενετικών παραγόντων, οι γονιδιακοί πολυμορφισμοί του CYP2C19 και του ABCB1 επηρεάζουν σημαντικά τις φαρμακοκινητικές και φαρμακοδυναμικές ιδιότητες της κλοπιδογρέλης²⁰⁵⁻²⁰⁷.

Έχει αποδειχθεί πως *in vitro*, η απορρόφηση της κλοπιδογρέλης από τα επιθηλιακά κύτταρα του εντέρου εξαρτάται από τον μεταφορέα εκροής P- γλυκοπρωτεΐνη, ο οποίος όταν αναστέλλεται αυξάνει την εισροή του φαρμάκου²⁰⁸. Οι ασθενείς οι οποίοι φέρουν έναν γενετικό πολυμορφισμό που κωδικοποιεί υψηλότερη έκφραση της P- γλυκοπρωτεΐνης, το γονίδιο MDR1 (multidrug resistance 1), εμφανίζουν μικρότερη μέγιστη συγκέντρωση (Cmax) της κλοπιδογρέλης είτε μετά από δόση φόρτισης 300mg ή

600mg²⁰⁸. Στους ομοζυγώτες ασθενείς για αυτόν τον πολυμορφισμό είναι αυξημένος ο κίνδυνος καρδιαγγειακής θνητότητας σε σύγκριση με τους ομοζυγώτες για τον κανονικό (άγριο) τύπο^{209,210}.

Ασθενείς με τον πολυμορφισμό CYP2C19*2 ή τον ABCB1 C3435T έχουν χαμηλότερα επίπεδα του ενεργού μεταβολίτη της κλοπιδογρέλης στο πλάσμα, μικρότερη αναστολή των αιμοπεταλίων και συνεπώς μεγαλύτερο κίνδυνο ενός νέου θρομβωτικού επεισοδίου μετά από ένα ΟΣΣ ή PCI. Αντίθετα, ασθενείς που εμφανίζουν τον πολυμορφισμό CYP2C19*17 έχουν αυξημένα επίπεδα του ενεργού μεταβολίτη της κλοπιδογρέλης, αυξημένη αναστολή του P2Y₁₂ και αυξημένο αιμορραγικό κίνδυνο²⁰⁶. Προοπτικές μελέτες σε ασθενείς που έλαβαν κλοπιδογρέλη μετά από PCI έδειξαν ότι οι ασθενείς που έχουν μη λειτουργικά αλληλίες των παραπάνω γονιδίων (CYP2C19*2 ή ABCB1 C3435T) εμφανίζουν στατιστικά σημαντική αύξηση του κινδύνου μειζόνων καρδιαγγειακών επεισοδίων κατά τη διάρκεια 12 μηνών παρακολούθησης μετά από PCI, σε σύγκριση με τους ασθενείς που έχουν λειτουργικά αλληλίες των παραπάνω γονιδίων^{206,207}. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα μετα-ανάλυσης 9 μελετών που συμπεριέλαβε 9.685 ασθενείς που υποβλήθηκαν σε PCI, το 26,3% και το 2,2% των ασθενών είχαν ένα ή δύο, αντίστοιχα, CYP2C19*2 αλληλίες και εμφάνισαν σημαντική αύξηση της συχνότητας του εμφράγματος του μυοκαρδίου, ισχαιμικού ΑΕΕ ή καρδιαγγειακού θανάτου, καθώς και τετραπλασιασμό της συχνότητας θρόμβωσης στο stent²¹¹. Αντίθετα, τα αποτελέσματα γονοτυπικής ανάλυσης σε υποπληθυσμό της μελέτης CHARISMA έδειξαν ότι δεν υπάρχει συσχέτιση μεταξύ των πολυμορφισμών του CYP2C19 και ισχαιμικών επεισοδίων σε ασθενείς με ιστορικό στεφανιαίας νόσου (Coronary Artery Disease, CAD) ή σε ασθενείς υψηλού κινδύνου για CAD. Επιπρόσθετα, φαρμακογενετική ανάλυση 2 τυχαιοποιημένων κλινικών μελετών δεν επιβεβαίωσε τη συσχέτιση μεταξύ των CYP2C19*2 αλληλίων και του κινδύνου μειζόνων καρδιαγγειακών επεισοδίων²⁰⁵. Τέλος πρόσφατες μετα-αναλύσεις έδειξαν ότι δεν υπάρχει ουσιαστική και σταθερή επίδραση των πολυμορφισμών του CYP2C19 στην κλινική αποτελεσματικότητα της κλοπιδογρέλης²¹². Συνεπώς, ο πιθανός ρόλος των πολυμορφισμών του CYP2C19 στην κλινική αποτελεσματικότητα της κλοπιδογρέλης χρειάζεται περισσότερη διερεύνηση.

Τέλος, διατυπώθηκε η υπόθεση πως πολυμορφισμοί στον υποδοχέα P2Y₁₂ μπορεί να ευθύνεται για το φαινόμενο της αντίστασης. Πράγματι, έχουν ταυτοποιηθεί μεταλλάξεις που ευθύνονται για συγγενή αιμορραγία και διακύμανση στο βαθμό συσσώρευσης των

αιμοπεταλίων μετά από ενεργοποίηση τους με ADP σε υγιή άτομα^{213,214}. Ωστόσο, δεν έχει αποδειχθεί πως οι γενετικοί πολυμορφισμοί στους υποδοχείς P2Y₁₂ ή P2Y₁ μπορούν να εξηγήσουν την αντίσταση στην κλοπιδογρέλη.

5.3.2. Εργαστηριακή διερεύνηση της αντίστασης στην κλοπιδογρέλη

Εκτός από τη χρήση φαρμακογενετικών μεθόδων για τον προσδιορισμό των γονοτύπων, η αντίσταση στην κλοπιδογρέλη μπορεί να προσδιοριστεί με μεθόδους οι οποίες προσδιορίζουν τη λειτουργικότητα των αιμοπεταλίων. Η κλασική μέθοδος προσδιορισμού της λειτουργικότητας των αιμοπεταλίων υπό την επίδραση της κλοπιδογρέλης είναι η LTA χρησιμοποιώντας το ADP ως αγωνιστή. Η συσσώρευση των αιμοπεταλίων μπορεί επίσης να προσδιοριστεί με περισσότερο απλές και εύχρηστες στην καθημερινή κλινική πράξη μεθόδους όπως είναι η μέθοδος VerifyNow® P2Y₁₂ (Acumetrics), η συσσωρευομετρία στον αναλυτή Multiplate® (Dynabate) και η συσσωρευομετρία στον αναλυτή Platelet-works. Άλλες μέθοδοι είναι αυτές που χρησιμοποιούν την κυτταρομετρία ροής όπως είναι ο προσδιορισμός της φωσφορυλίωσης της φωσφοπρωτεΐνης VASP, κλπ²¹⁵. Σε συμφωνία ειδικών που πραγματοποιήθηκε το 2010 για την αντιαιμοπεταλιακή αγωγή καθορίστηκαν τα όρια της απόκρισης των αιμοπεταλίων στην αντιαιμοπεταλιακή αγωγή για τις περισσότερο χρησιμοποιούμενες εργαστηριακές μεθόδους²¹⁶. Σύμφωνα με τα συμπεράσματα αυτής της συμφωνίας, κακή απόκριση των αιμοπεταλίων στην ακολουθούμενη αντιαιμοπεταλιακή αγωγή με κλοπιδογρέλη συμβαίνει όταν υπάρχει ένα ή περισσότερα από τα παρακάτω κριτήρια:

1. PRI >50%, με τη μέθοδο VASP-P
2. PRU >235-240, με τη συσκευή Verify Now P2Y₁₂
3. MPA (Maximal Platelet Aggregation) >46% στα 5-μmol/l ADP, με τη μέθοδο LTA, >468 units/ min μετά από ενεργοποίηση με ADP με τον αναλυτή Multiplate.

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, πρόσφατες μετα-αναλύσεις έδειξαν ότι δεν υπάρχει σημαντική και σταθερή επίδραση των πολυμορφισμών του CYP2C19 στην κλινική αποτελεσματικότητα της κλοπιδογρέλης. Επίσης η μελέτη EXCELSIOR έδειξε ότι η γονοτυπική ανάλυση μόνη της ή σε συνδυασμό με κλινικά δεδομένα σε ασθενείς που υποβάλλονται σε εκλεκτική PCI με τοποθέτηση stent, δεν μπορεί να υποκαταστήσει τις μεθόδους προσδιορισμού της αιμοπεταλιακής λειτουργικότητας, η οποία φαίνεται ότι είναι

περισσότερο χρήσιμη στην καθημερινή κλινική πράξη από τους γενετικούς προσδιορισμούς²¹⁷.

➤ Διαχείριση της αντίστασης

Η διαχείριση της αντίστασης της κλοπιδογρέλης στην κλινική πράξη όπως ήδη προαναφέρθηκε περιελάμβανε την αύξηση της δόσης φόρτισης στα 600 mg έναντι των 300 mg.

Η μελέτη CURRENT OASIS-7 τυχαιοποίησε 25.087 ασθενείς με ΟΣΣ (STEMI και NSTEMI) σε αγωγή με υψηλή δόση κλοπιδογρέλης (600 mg δόση φόρτισης την πρώτη μέρα, ακολουθούμενη από 150 mg την ημέρα για 6 ημέρες) ή την καθιερωμένη αγωγή (300 mg την πρώτη μέρα και κατόπιν 75 mg/ημέρα), σε συνδυασμό με χαμηλή (75-100mg) ή υψηλή (300-325 mg) δόση ασπιρίνης. Στις 30 ημέρες, στο συνολικό πληθυσμό της μελέτης, δεν υπήρξε στατιστικά σημαντική διαφορά όσον αφορά το σύνθετο κύριο καταληκτικό σημείο (καρδιαγγειακός θάνατος, έμφραγμα μυοκαρδίου και εγκεφαλικό επεισόδιο) μεταξύ των δύο δόσεων κλοπιδογρέλης (4,2% έναντι 4,4%). Οι μείζονες αιμορραγίες σύμφωνα με την κατάταξη CURRENT ήταν 2,0% και 2,5% αντίστοιχα ($p<0.01$)²¹⁸. Η ανάλυση της υποομάδας των 17.232 ασθενών που υποβλήθηκε σε αγγειοπλαστική έδειξε μείωση κατά 25% στο καταληκτικό σημείο (3,9% με τη διπλή φόρτιση έναντι 4,5% με την κλασική, $p<0,0039$). Η μείωση αφορούσε κυρίως τα EM (2,0% έναντι 2,6%). Η θρόμβωση του stent μειώθηκε σημαντικά κατά 32% στην ομάδα της διπλής φόρτισης (1,6% έναντι 2,3%, $p= 0,002$) (σίγουρη ή πιθανολογούμενη)²¹⁸.

Η μεγάλη πολυκεντρική μελέτη GRAVITAS διερεύννησε την αποτελεσματικότητα της χορήγησης για 6 μήνες υψηλής δόσης κλοπιδογρέλης (600mg επιπλέον δόση φόρτισης / 150 mg δόση συντήρησης), συγκριτικά με τη συνήθη δόση συντήρησης (75 mg χωρίς επιπλέον δόση φόρτισης) σε 2.214 ασθενείς που υποβλήθηκαν σε αγγειοπλαστική με φαρμακευτικά επικαλυμμένο stent (DES), λόγω ΟΣΣ χωρίς ανάσπαση του διαστήματος ST (NSTEMI) ή λόγω σοβαρής σταθερής στεφανιαίας νόσου και παρουσίαζαν αυξημένη αντιδραστικότητα των αιμοπεταλίων, 12 έως 24 h μετά την αγγειοπλαστική, παρόλη την προηγουμένως χορηγηθείσα κλοπιδογρέλη. Παράλληλα παρακολούθηθηκε μια ομάδα 586 ασθενών χωρίς υψηλή αντιδραστικότητα αιμοπεταλίων. Η μέτρηση της αντιδραστικότητας των αιμοπεταλίων έγινε με τη συσκευή Verify Now και ως αντίσταση στην κλοπιδογρέλη ορίστηκε η τιμή PRU ≥ 230 . Καταγράφηκαν τα καρδιαγγειακά συμβάντα και η

αντιδραστικότητα των αιμοπεταλίων στις 30 ημέρες και στους 6 μήνες. Τα μείζονα καρδιαγγειακά επεισόδια (καρδιαγγειακός θάνατος, ΕΜ, θρόμβωση του stent) στην ομάδα της διπλάσιας δόσης ήταν παρόμοια με αυτά της καθιερωμένης δόσης κλοπιδογρέλης, τόσο στις 30, όσο και στις 180 ημέρες: 1,9% έναντι 1,6% ($p=0,6$) και 2,3% έναντι 2,3% ($p=0,97$) αντίστοιχα. Παρόμοιες επίσης ήταν οι αιμορραγικές επιπλοκές. Σε σύγκριση με τους ασθενείς που δεν είχαν αυξημένη αντιδραστικότητα, οι ασθενείς με αντίσταση στην κλοπιδογρέλη εμφάνισαν αυξημένη συχνότητα καρδιαγγειακών επεισοδίων, 1,6% έναντι 0,7% στις 30 ημέρες και 2,3% έναντι 1,4% στους 6 μήνες, χωρίς όμως αυτή η διαφορά να φθάνει τα επίπεδα στατιστικής σημαντικότητας. Παρόλο που φαρμακοδυναμικά οι ασθενείς της υψηλής δόσης παρουσίαζαν σημαντικότερη μείωση της αιμοπεταλιακής αντιδραστικότητας από την ομάδα της συμβατικής δοσολογίας, οι συγγραφείς κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι η χορήγηση διπλάσιας δόσης κλοπιδογρέλης δεν οδηγούσε σε καλύτερα κλινικά αποτελέσματα²¹⁹.

5.4 Αντίσταση στην πρασουγρέλη

Σε αντίθεση με την κλοπιδογρέλη, το φαινόμενο της αντίστασης παρουσιάζεται σπάνια στους ασθενείς που λαμβάνουν πρασουγρέλη, σύμφωνα με τα αποτελέσματα μελετών όπως η μελέτη φάσης 2, SWAP και η φαρμακογενετική ανάλυση που έγινε σε ασθενείς που συμμετείχαν στη μελέτη TRITON-TIMI 38^{220,221}. Πρέπει να αναφερθεί ότι σύμφωνα με πρόσφατη μελέτη ασθενείς με ΟΣΣ που υποβλήθηκαν σε PCI και έλαβαν πρασουγρέλη (60 mg δόση φόρτισης και 10 mg/ημέρα) εμφάνισαν μεγάλη διακύμανση ως προς την αντιαιμοπεταλιακή δράση του φαρμάκου (διακύμανση τιμών VASP 1%- 82%) ενώ το 25,2% των ασθενών εμφάνισε αντίσταση στην πρασουγρέλη (τιμές VASP >50%), η οποία προσδιορίστηκε 6-12 h μετά τη φόρτιση. Οι ασθενείς με αντίσταση στην πρασουγρέλη εμφάνισαν αυξημένη συχνότητα θανάτων καρδιαγγειακής αιτιολογίας, μη θανατηφόρου εμφράγματος του μυοκαρδίου και θρόμβωσης του stent, ένα μήνα μετά την έναρξη της θεραπείας¹⁶⁶.

5.5 Αντίσταση στην τικαγρελόρη

Τέλος, το φαινόμενο της αντίστασης δεν έχει παρουσιαστεί μέχρι σήμερα στους ασθενείς που λαμβάνουν τικαγρελόρη σύμφωνα με τη φαρμακογενετική ανάλυση που έγινε σε ασθενείς που συμμετείχαν στη μελέτη PLATO²²².

6. ΠΛΕΙΟΤΡΟΠΙΚΕΣ ΔΡΑΣΕΙΣ ΑΝΤΙΑΙΜΟΠΕΤΑΛΙΑΚΩΝ ΦΑΡΜΑΚΩΝ

6.1. Εισαγωγή

Η διπλή αντιαιμοπεταλιακή θεραπεία με ασπιρίνη και έναν P2Y₁₂ ανταγωνιστή αποτελεί τον ακρογωνιαίο λίθο της θεραπευτικής αντιμετώπισης ασθενών με ΟΣΣ. Οι ανταγωνιστές του υποδοχέα P2Y₁₂ που χρησιμοποιούνται σήμερα στην κλινική πράξη είναι οι θειενοπυριδίνες, κλοπιδογρέλη και πρασουγρέλη, καθώς επίσης και η τικαγρελόρη¹¹⁴. Υπάρχουν αρκετά επιστημονικά δεδομένα που δείχνουν πως αυτοί οι ανταγωνιστές μπορεί να ασκούν και άλλες δράσεις, εκτός της αναστολής της ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων. Μια πιθανή εξήγηση είναι ότι εκτός από τα αιμοπετάλια ο υποδοχέας P2Y₁₂ βρίσκεται και σε διάφορα κύτταρα και ιστούς όπως είναι τα λεία μυϊκά κύτταρα, τα λευκοκύτταρα, τα μακροφάγα, τα δενδριτικά κύτταρα, διάφορες περιοχές του εγκεφάλου, κλπ με αποτέλεσμα να αυξάνεται το φάσμα των δράσεων των ανταγωνιστών του υποδοχέα P2Y₁₂ (πλειοτροπικές δράσεις). Επιπλέον, οι πλειοτροπικές δράσεις των P2Y₁₂ ανταγωνιστών μπορεί να συνδέονται και με μηχανισμούς διαφορετικούς ανεξάρτητους από την αλληλεπίδρασή τους με τον P2Y₁₂ υποδοχέα. Η φλεγμονώδης απόκριση, η ενδοθηλιακή λειτουργία, ο αγγειακός τόνος, ο μεταβολισμός της αδενοσίνης, κλπ επηρεάζονται από τη δράση των ανταγωνιστών του P2Y₁₂. Αυτές οι πλειοτροπικές δράσεις μπορεί να συμβάλλουν στο αποδεδειγμένο κλινικό όφελος των φαρμάκων αυτών στην καρδιαγγειακή νόσο²²³. Στο παρόν κεφάλαιο αναφέρονται οι πλειοτροπικές δράσεις των P2Y₁₂ ανταγωνιστών καθώς και η πιθανή σημασία τους στην κλινική πράξη.

6.2. Πλειοτροπικές δράσεις των θειενοπυριδινών

Το κλινικό όφελος των θειενοπυριδινών κλοπιδογρέλη και πρασουγρέλη έχει αποδοθεί κυρίως στη δράση τους στον αιμοπεταλιακό υποδοχέα P2Y₁₂ του ADP και στην αναστολή της συσώρευσης των αιμοπεταλίων. Ωστόσο, η αναστολή αυτού του μονοπατιού ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων επηρεάζει και άλλες λειτουργίες των κυττάρων αυτών όπως αυτές που σχετίζονται με τη φλεγμονώδη αντίδραση. Επίσης, ο υποδοχέας P2Y₁₂ υπάρχει και σε άλλα κύτταρα όπως είναι τα λεία μυϊκά κύτταρα, τα λευκοκύτταρα, τα μακροφάγα, τα δενδριτικά κύτταρα, κλπ συνεπώς τα φάρμακα αυτά μπορεί να επηρεάζουν

τη λειτουργικότητα και άλλων κυττάρων, εκτός των αιμοπεταλίων. Σύμφωνα με τα παραπάνω τόσο η κλοπιδογρέλη όσο και η πρασουγρέλη, εκτός από την πολύ καλά τεκμηριωμένη ανασταλτική τους δράση στη συσσώρευση των αιμοπεταλίων, εμφανίζουν ποικιλία δράσεων (πλειοτροπικές δράσεις). Οι περισσότερες μελέτες που αναφέρονται στις πλειοτροπικές δράσεις των θειενοπυριδινών αφορούν τις δράσεις τους στη φλεγμονή.

➤ **Επίδραση των θειενοπυριδινών στη φλεγμονώδη απόκριση**

Διάφορες μελέτες *in vitro* έχουν αποδείξει ότι τόσο η κλοπιδογρέλη όσο και η πρασουγρέλη αναστέλλουν την έκφραση του CD40L και της P-σελεκτίνης, παράλληλα με την αναστολή της αιμοπεταλιακής συσσώρευσης²²⁴⁻²²⁶. Η κλοπιδογρέλη επίσης αναστέλλει τη μεμβρανική έκφραση του CD40L στα αιμοπετάλια, μειώνει την αλληλεπίδραση αιμοπεταλίων-μονοκυττάρων και αιμοπεταλίων-ουδετεροφίλων λευκοκυττάρων καθώς και τα επίπεδα της sP-σελεκτίνης και του sCD40L στο περιφερικό αίμα ασθενών με ΟΣΣ, 24h μετά από δόση φόρτισης 300 mg²²⁷. Σε μια υπομελέτη της κλινικής μελέτης ASCET (Aspirin non-responsiveness and Clopidogrel Endpoint Trial)²²⁸, η κλοπιδογρέλη μείωσε σημαντικά, αλλά σε παρόμοιο ποσοστό με την ασπιρίνη, τα επίπεδα των δεικτών φλεγμονής CRP, TNF-α, IL-6, IL-10, MCP-1, CD40L, P-σελεκτίνη και TGF-β μετά από 1 έτος χορήγησης⁴². Επίσης, σε μια μετα-ανάλυση της μελέτης CREDO διερευνήθηκε η πιθανή συσχέτιση του κλινικού οφέλους της κλοπιδογρέλης σε σχέση με τα επίπεδα της hsCRP πριν τη χορήγηση του φαρμάκου²²⁹. Η ανάλυση αυτή έδειξε ότι το σύνθετο καταληκτικό σημείο θανάτου, εμφράγματος του μυοκαρδίου ή εγκεφαλικού επεισοδίου στον 1 χρόνο συσχετιζόταν με τα υψηλά τεταρτημόρια των επιπέδων της hsCRP στους ασθενείς που έλαβαν εικονικό φάρμακο. Επιπρόσθετα, στους ασθενείς που έλαβαν κλοπιδογρέλη, παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική μείωση κατά 44% του σύνθετου καταληκτικού σημείου στους ασθενείς με το υψηλότερο τεταρτημόριο επιπέδων hsCRP. Το όφελος αυτό από τη χορήγηση κλοπιδογρέλης παρατηρήθηκε τόσο εντός 28 ημερών μετά την αγγειοπλαστική όσο και στο διάστημα μεταξύ 28 ημερών και 1 έτους όπου ήταν περισσότερο εμφανές²³⁰ (Πίνακας 6.1.). Σύμφωνα με μελέτες της ερευνητικής μας ομάδας, υπάρχει διαφοροποίηση ως προς την ανασταλτική δράση της κλοπιδογρέλης (ημερήσια δόση 75 mg) στην αιμοπεταλιακή συσσώρευση και στη φλεγμονή που επάγεται από τα αιμοπετάλια σε ασθενείς με ΟΣΣ που υποβάλλονται σε αγγειοπλαστική, εντός 30 ημερών από την έναρξη της θεραπείας, ένα φαινόμενο που

επηρεάζεται σημαντικά από τη μεγάλη διακύμανση της απόκρισης των ασθενών στο φάρμακο (αντίσταση στην κλοπιδογρέλη)²³¹. Είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι η διπλή αντιαιμοπεταλιακή αγωγή (συνδυασμός ασπιρίνης με ανταγωνιστή του P2Y₁₂) είναι περισσότερο αποτελεσματική από ότι η μονοθεραπεία με ανταγωνιστή του P2Y₁₂, ως προς τη μείωση των επιπέδων διαφόρων δεικτών της φλεγμονής²³²⁻²³⁴. Σε ασθενείς με NSTEMI και υψηλή αιμοπεταλιακή ενεργότητα, τα επίπεδα των φλεγμονωδών δεικτών hsCRP και sCD40L μειώθηκαν στατιστικά σημαντικά μόνο στους ασθενείς που έλαβαν διπλή αντιαιμοπεταλιακή αγωγή με κλοπιδογρέλη και ασπιρίνη²³⁴.

Σε μία υπομελέτη που έγινε στα πλαίσια της κλινικής μελέτης JUMBO σε ασθενείς με ΟΣΣ που υποβλήθηκαν σε αγγειοπλαστική με τοποθέτηση stent και έλαβαν ασπιρίνη και πρασουγρέλη, τα επίπεδα των φλεγμονωδών δεικτών P-σελεκτίνη και CD40L ήταν στατιστικά χαμηλότερα στις 24h και 30 ημέρες από την έναρξη της θεραπείας σε σχέση με αυτά πριν την έναρξη της φαρμακευτικής αγωγής²³⁵. Επίσης, σε μια τυχαιοποιημένη μελέτη στην οποία συμμετείχαν 110 ασθενείς με σταθερή στεφανιαία νόσο που ελάμβαναν ασπιρίνη, η προσθήκη πρασουγρέλης είχε ως συνέπεια τη στατιστικά μεγαλύτερη μείωση των επιπέδων των συμπλεγμάτων αιμοπεταλίων-λευκοκυττάρων και της P-σελεκτίνης, 2h και 24h καθώς και 14 και 29 ημέρες μετά την προσθήκη της πρασουγρέλης σε σχέση με αυτούς που έλαβαν συνδυασμό ασπιρίνης και κλοπιδογρέλης²³⁶ (Πίνακας 6.1.). Επιπλέον, χρησιμοποιώντας πειραματικό μοντέλο ποντικών βρέθηκε πως η πρασουγρέλη μειώνει την αλληλεπίδραση των αιμοπεταλίων με τα μονοκύτταρα μειώνοντας τη συγκέντρωση στο πλάσμα φλεγμονωδών δεικτών όπως η έκφραση της P-σελεκτίνης, η παραγωγή του TxA₂ και τη σύνθεση του TNF-α. Επίσης, αυξάνει την παραγωγή του NO.

Πίνακας 6.1. Κλινικές μελέτες που διερεύνησαν την επίδραση των θειενοπυριδινών στη φλεγμονώδη απόκριση.

Αντιαιμοπεταλιακό φάρμακο	Πληθυσμός μελέτης	Φλεγμονώδεις δείκτες	Σχεδιασμός μελέτης	Follow-up	Έκβαση σχετική με τη φλεγμονή
Ασπιρίνη	Ασθενείς με ΚΝ, Ασθενείς με ΟΣΣ	hsCRP, IL-6, MCP-1, TGF-β, TNF-α	Τυχαιοποιημένη	1- χρόνος	Μείωση
Κλοπιδογρέλη	Ασθενείς με ΟΣΣ	CD40L, P-σελεκτίνη, Συσσωματώματα αιμοπεταλίων- λευκοκυττάρων	Case control	24-h	Μείωση
	Ασθενείς που υποβάλλονται σε PCI	hsCRP	Post hoc ανάλυση	1- χρόνος	Μείωση
Πρασουγρέλη	Ασθενείς που υποβάλλονται σε PCI	CD40L, P-σελεκτίνη	Τυχαιοποιημένη	1-μήνας	Μείωση
Ασπιρίνη+ Κλοπιδογρέλη	NSTEMI ασθενείς	hsCRP, sCD40L	Τυχαιοποιημένη	6- ημέρες	Μείωση
Ασπιρίνη+ Κλοπιδογρέλη έναντι Ασπιρίνη+ Πρασουγρέλη	Ασθενείς με ΚΝ	P-σελεκτίνη	Τυχαιοποιημένη	29- ημέρες	Μικρότερη μείωση στην ομάδα ασθενών με ασπιρίνη+ κλοπιδογρέλη σε σύγκριση με την ομάδα ασθενών ασπιρίνη + πρασουγρέλη
Ασπιρίνη+ Πρασουγρέλη	Ασθενείς με ΟΣΣ	P-σελεκτίνη, CD40L	Τυχαιοποιημένη	1- χρόνος	Αναστολή

ΟΣΣ: Οξύ στεφανιαίο σύνδρομο, PCI: Διαδερμική αγγειοπλαστική στεφανιαίων αρτηριών, ΚΝ: Καρδιαγγειακή Νόσος

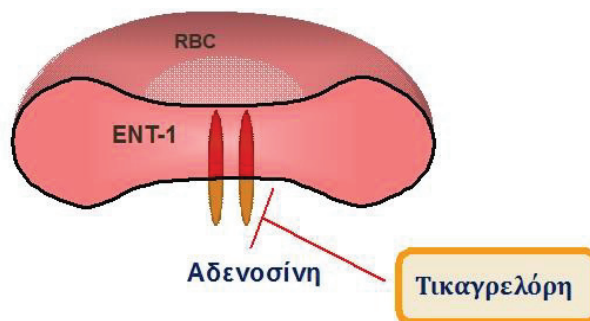
➤ **Άλλες πλειοτροπικές δράσεις των θειενοπυριδινών**

Κλινικές μελέτες έχουν αποδείξει πως η χορήγηση κλοπιδογρέλης έχει ευεργετικές επιδράσεις στους ασθενείς με αθηροθρομβωτική νόσο. Πρόσφατες *in vitro* μελέτες έδειξαν ότι η κλοπιδογρέλη επηρεάζει τη λειτουργικότητα των ενδοθηλιακών κυττάρων με μηχανισμό διαφορετικό από αυτόν της αναστολής της αιμοπεταλιακής συσσώρευσης. Επίσης, η κλοπιδογρέλη βελτιώνει την ενδοθηλιακή δυσλειτουργία σε ασθενείς με στεφανιαία νόσο. Πενήντα έξι ασθενείς με καρδιαγγειακή νόσο τυχαιοποιήθηκαν στο να λάβουν μία εφάπαξ δόση κλοπιδογρέλης 600mg ή 300mg. Η ενδοθηλιακή λειτουργία εκτιμήθηκε με τη μέτρηση της ροής στη βραχιόνια αρτηρία πριν καθώς και 2, 4 και 22 h μετά τη χορήγηση της κλοπιδογρέλης. Επίσης προσδιορίστηκε η ανασταλτική δράση της κλοπιδογρέλης στη συσσώρευση των αιμοπεταλίων με την ανάλυση VASP. Η κλοπιδογρέλη στη δόση των 600 mg βελτίωσε σημαντικά τη ροή και στα 3 χρονικά διαστήματα ενώ στη δόση των 300 mg μόνο στις 4 και 22 h. Συνεπώς, η κλοπιδογρέλη βελτιώνει την ενδοθηλιακή δυσλειτουργία με χρόνο- και δοσο- εξαρτώμενο τρόπο²³⁷. Σε πειραματικό μοντέλο αρουραίου η κλοπιδογρέλη προκαλεί αγγειοδιαστολή των αρτηριών χωρίς να χρειάζεται η ηπατική βιομετατροπή και ενεργοποίησή της και ανεξάρτητα από τη συγκέντρωσή της²³⁸. Τέλος, σε άλλη μελέτη διερευνήθηκε αν η αντιαιμοπεταλιακή θεραπεία με σιλοσταζόλη και κλοπιδογρέλη σε πειραματικό μοντέλο ποντικού μπορεί να επηρεάσει τη σταθερότητα της αθηρωματικής πλάκας. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, τόσο η σιλοσταζόλη όσο και η κλοπιδογρέλη μειώνουν τις ασταθείς και αυξάνουν τις σταθερές περιοχές της αθηρωματικής πλάκας, οδηγώντας παράλληλα στη μείωση του αθηρώματος²³⁹. Τα παραπάνω αποτελέσματα αποτελούν ισχυρές ενδείξεις ότι η κλοπιδογρέλη εκφράζει πλειοτροπικές δράσεις επηρεάζοντας τη λειτουργικότητα διαφόρων κυττάρων εκτός των αιμοπεταλίων οι οποίες πιθανώς συμβάλλουν στις ευεργετικές επιδράσεις της κλοπιδογρέλης στην καρδιαγγειακή νόσο.

6.3. Πλειοτροπικές δράσεις της τικαγρελόρης

Ένα από τα σημαντικά αποτελέσματα της μελέτης PLATO, η οποία συνέκρινε την αποτελεσματικότητα και ασφάλεια της τικαγρελόρης σε σχέση με την κλοπιδογρέλη σε ένα ευρύ φάσμα ασθενών με ΟΣΣ είναι η μείωση της καρδιαγγειακής και συνολικής θνητότητας στους ασθενείς που έλαβαν τικαγρελόρη^{240,241}. Το αποτέλεσμα αυτό υποθέτει ότι η τικαγρελόρη δρα και με μηχανισμό ανεξάρτητο από την αναστολή του

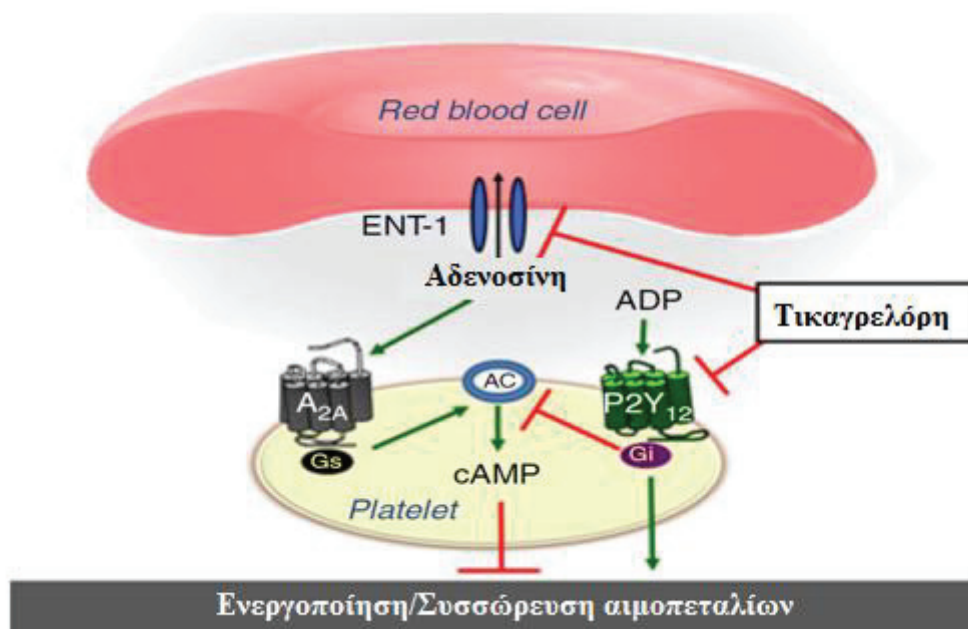
αιμοπεταλιακού υποδοχέα P2Y₁₂. Κατά τη διάρκεια της υπομελέτης Holter στην PLATO, περισσότεροι ασθενείς που έλαβαν τικαγρελόρη είχαν κοιλιακές παύσεις ≥ 3 sec σε σχέση με αυτούς που έλαβαν κλοπιδογρέλη κατά τη διάρκεια της οξείας φάσης του ΟΣΣ. Επίσης, αναφέρθηκε η δύσπνοια ως παρενέργεια της χορήγησης της τικαγρελόρης, με συνέπεια 0,9% των ασθενών να διακόψει την αγωγή (έναντι 0,1% της κλοπιδογρέλης). Τα αποτελέσματα αυτά ενισχύουν την παραπάνω υπόθεση για επιπλέον δράση (εις) της τικαγρελόρης πέραν της αναστολής του αιμοπεταλιακού P2Y₁₂ (πλειοτροπικές δράσεις). Με βάση την παρατήρηση ότι οι κοιλιακές παύσεις και η δύσπνοια εμφανίζονται επίσης μετά από χορήγηση αδενοσίνης, διατυπώθηκε η υπόθεση ότι η τικαγρελόρη μπορεί τουλάχιστον μερικώς να εμφανίζει πλειοτροπικές δράσεις αυξάνοντας τα επίπεδα της αδενοσίνης στο πλάσμα. Μελέτες τόσο σε πειραματόζωα όσο και σε ασθενείς απέδειξαν ότι η τικαγρελόρη αυξάνει σημαντικά τα επίπεδα της αδενοσίνης στο πλάσμα με ένα μηχανισμό ανεξάρτητο από τον υποδοχέα P2Y₁₂, αναστέλλοντας την πρόσληψη της αδενοσίνης από τα ερυθροκύτταρα μέσω του εξισορροπιστή μεταφορέα-1 των νουκλεοσιδίων, ENT1²⁴² (Εικόνα 6.1.).



Εικόνα 6.1. Η τικαγρελόρη αναστέλλει την πρόσληψη της αδενοσίνης από τα ερυθροκύτταρα μέσω του ENT-1.

Μεταξύ των δράσεων της αδενοσίνης που θα μπορούσαν να συμβάλλουν στις πλειοτροπικές δράσεις της τικαγρελόρης στους ασθενείς με ΟΣΣ είναι η αγγειοδιαστολή, η βελτίωση της ενδοθηλιακής λειτουργίας, οι αντιφλεγμονώδεις και καρδιοπροστατευτικές δράσεις, καθώς και η αναστολή της ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων²⁴³. Πράγματι πρόσφατες μελέτες απέδειξαν ότι η χορήγηση τικαγρελόρης σε ασθενείς με ΟΣΣ, αυξάνει τα επίπεδα της αδενοσίνης²⁴⁴, βελτιώνει την ενδοθηλιακή λειτουργία σε σχέση με την

κλοπιδογρέλη ή την πρασουγρέλη²⁴⁵, αυξάνει την ταχύτητα της αιματικής ροής στα στεφανιαία αγγεία^{246,247} και αναστέλλει την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων όχι μόνο αναστέλλοντας τον P2Y₁₂ αλλά και διαμέσου της δράσης της αδενοσίνης στους αιμοπεταλιακούς υποδοχείς της²⁴² (Εικόνα 6.2.).



Εικόνα 6.2. Η τικαγρελόρη αναστέλλει την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων τόσο αναστέλλοντας τον υποδοχέα P2Y₁₂ όσο και διαμέσου της αδενοσίνης.

Ένας εναλλακτικός μηχανισμός, πιθανώς υπεύθυνος για τις διαμεσολαβούμενες από την αδενοσίνη πλειοτροπικές δράσεις της τικαγρελόρης, είναι η απελευθέρωση της τριφωσφορικής αδενοσίνης (ATP) από τα ερυθροκύτταρα²⁴³ η οποία στη συνέχεια αποικοδομείται ενζυμικά στην κυκλοφορία προς αδενοσίνη αυξάνοντας έτσι τα επίπεδά της στο πλάσμα. Όμως ο μηχανισμός αυτός δεν φαίνεται να συμβάλλει σημαντικά στη συνολικά αύξηση των επιπέδων της αδενοσίνης που προκαλεί η τικαγρελόρη.

Εκτός από τις διαμεσολαβούμενες από την αδενοσίνη δράσεις της τικαγρελόρης, το πλεονέκτημα της τικαγρελόρης έναντι της κλοπιδογρέλης ως προς τη μείωση της καρδιαγγειακής και ολικής θνητότητας που ανέδειξε η κλινική μελέτη PLATO, μπορεί επίσης να προέρχεται από την επίδραση που ασκεί η τικαγρελόρη στα κύτταρα των αθηρωματικών πλακών στα στεφανιαία αγγεία διαμέσου των υποδοχέων P2Y₁₂, η παρουσία των οποίων έχει αποδειχθεί από τους Lee και συν²⁴⁸. Συνεπώς, η τικαγρελόρη

αλλά και οι άλλοι P2Y₁₂ ανταγωνιστές μπορεί να ασκούν και αντιαθηρογόνες δράσεις επάγοντας τη σταθεροποίηση της αθηρωματικής πλάκας, με την τικαγρελόρη να ασκεί ισχυρότερη δράση σε σύγκριση με την κλοπιδογρέλη και την πρασουγρέλη λόγω της φαρμακοκινητικής της υπεροχής. Επίσης, η τικαγρελόρη βελτιώνει την ενδοθηλιακή λειτουργία στα περιφερικά αγγεία ασθενών με ιστορικό ΟΣΣ σε σύγκριση με τους ασθενείς που λαμβάνουν κλοπιδογρέλη ή πρασουγρέλη²⁴⁵.

Συμπερασματικά, οι ανταγωνιστές του υποδοχέα P2Y₁₂ ασκούν διάφορες δράσεις εκτός από αυτή της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων. Κατ' επέκταση, τα φάρμακα αυτά επηρεάζουν την παθογένεια της καρδιαγγειακής νόσου σε πολλά διαφορετικά επίπεδα. Η μείωση της φλεγμονής, η βελτίωση της ενδοθηλιακής λειτουργίας, οι αγγειοδιασταλτικές δράσεις καθώς και οι επιδράσεις που διαμεσολαβούνται από την αδενοσίνη (στην περίπτωση της τικαγρελόρης) είναι μόνο μερικές από τις δράσεις των φαρμάκων αυτών που μπορεί να είναι ευεργετικές για τον ασθενή με καρδιαγγειακή νόσο ιδιαίτερα μετά από ένα ΟΣΣ. Ωστόσο, οι μηχανισμοί με τους οποίους οι P2Y₁₂ ανταγωνιστές ασκούν τις πλειοτροπικές δράσεις τους και η πιθανή κλινική σημασία των δράσεων αυτών χρειάζονται περισσότερη διερεύνηση.

ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Είναι πλέον πολύ καλά τεκμηριωμένο ότι τα αιμοπετάλια διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην παθογένεια των οξέων στεφανιαίων συνδρόμων. Το φαινόμενο αυτό έχει ενισχύσει σημαντικά τη θέση των αντιαιμοπεταλιακών φαρμάκων στη θεραπεία, αλλά και στην πρόληψη των συνδρόμων αυτών. Τα κυριότερα από του στόματος χορηγούμενα αντιαιμοπεταλιακά φάρμακα που χρησιμοποιούνται στην κλινική πράξη είναι η ασπιρίνη σε συνδυασμό με έναν P2Y₁₂ ανταγωνιστή όπως η κλοπιδογρέλη ή η τικαγρελόρη. Παράλληλα με την αντιθρομβωτική τους δράση, τα φάρμακα αυτά μπορεί να εμφανίζουν ποικίλες πλειοτροπικές δράσεις είτε εξαρτώμενες από τα αιμοπετάλια είτε ανεξάρτητες από αυτά. Οι πλειοτροπικές αυτές δράσεις δεν έχουν διερευνηθεί επαρκώς, έχουν όμως ιδιαίτερη σημασία για την αποτελεσματικότητα των αντιαιμοπεταλιακών φαρμάκων στους ασθενείς, ιδιαίτερα κατά τη διάρκεια της μακροχρόνιας χορήγησής τους, μεγαλύτερης από ένα μήνα όπως προβλέπουν οι κατευθυντήριες οδηγίες. Επιπρόσθετα, με δεδομένο την ύπαρξη διακύμανσης της αποτελεσματικότητας της κλοπιδογρέλης και της ασπιρίνης σε διάφορους ασθενείς, η ανάδειξη αξιόπιστων δεικτών της αποτελεσματικότητας των φαρμάκων αυτών έχει μεγάλη σημασία.

Σκοπός της παρούσας διατριβής ήταν η διερεύνηση των πλειοτροπικών δράσεων της ασπιρίνης και της κλοπιδογρέλης και η συσχέτισή τους με τις κλασικές παραμέτρους εκτίμησης της αιμοπεταλιακής λειτουργίας καθώς και με το φαινόμενο της διακύμανσης (αντίσταση). Ιδιαίτερα, η μελέτη αυτή εστιάστηκε σε πλειοτροπικές δράσεις των αντιαιμοπεταλιακών φαρμάκων που εξαρτώνται από τα αιμοπετάλια όπως είναι η προσκόλληση των αιμοπεταλίων, η έκκριση φλεγμονωδών και αγγειογενετικών παραγόντων καθώς και σε πλειοτροπικές δράσεις ανεξάρτητες των αιμοπεταλίων που σχετίζονται όμως με τους παράγοντες κινδύνου που οδηγούν στην αθηρογένεση όπως η λιποπρωτεϊνική φωσφολιπάση A₂ (Lp-PLA₂). Ιδιαίτερη έμφαση δόθηκε επίσης στη διερεύνηση της εξάρτησης των νέων δεικτών που μελετήθηκαν με την προαναφερθείσα διακύμανση στην αποτελεσματικότητα των αντιαιμοπεταλιακών παραγόντων.

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

1. Συσσωρευομετρία οπτικής διαπερατότητας (Light transmittance aggregometry, LTA)

Αρχή της μεθόδου

Η συσσωρευομετρία μετάδοσης φωτός πρωτοανακαλύφθηκε στις αρχές του 1960 από τον Born, ο οποίος παρατήρησε ορατές θολωσιμετρικές αλλαγές σε διάλυμα πλούσιο σε αιμοπετάλια (PRP; **p**latelet **r**ich **p**lasma) μετά την προσθήκη του ADP. Έκτοτε, η συσσωρευομετρία θεωρείται η μέθοδος αναφοράς για την εκτίμηση της λειτουργικότητας των αιμοπεταλίων.

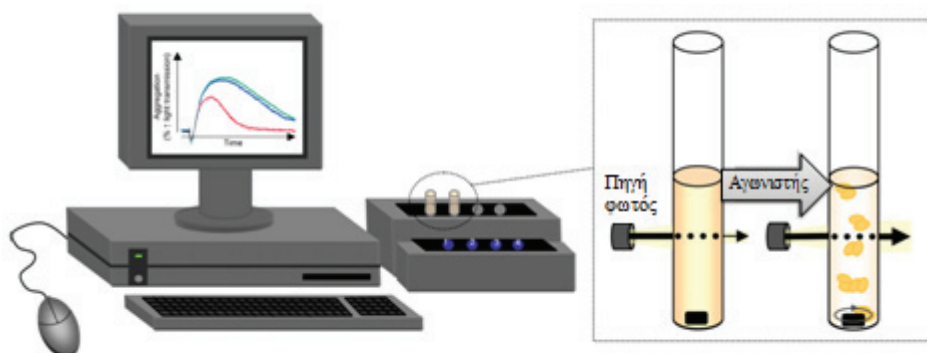
Η μέθοδος απαιτεί την παρασκευή του PRP και πραγματοποιείται σε ειδικό όργανο, το συσσωρευόμετρο (aggregometer) (Εικόνα 1.1.).



Εικόνα 1.1. Διάταξη του συσσωρευομέτρου.

Το συσσωρευόμετρο είναι ένα φασματοφωτόμετρο σταθερού μήκους κύματος με τέσσερις θέσεις δειγμάτων, οι οποίες επιτρέπουν την ταυτόχρονη μέτρηση της συσώρευσης σε τέσσερα διαφορετικά δείγματα. Κατά τη διάρκεια του πειράματος, τα δείγματα θερμαίνονται στους 37°C προσομοιάζοντας της *in vivo* συνθήκες και αναδεύονται με ειδικό μαγνητάκι στις 1200 rpm. Το μαγνητάκι βοηθά στην παραγωγή

διατμητικών δυνάμεων και την ανάδευση των αιμοπεταλίων. Μια ακτίνα υπέρυθρου φωτός περνά μέσα από τις κυψελίδες, οι οποίες περιέχουν PRP και πλάσμα φτωχό σε αιμοπετάλια (PPP; **p**latelet **p**oor **p**lasma). Φωτοδίοδοι σιλικόνης ανιχνεύουν το φως, το οποίο περνά μέσα από τις δυο κυψελίδες. Αυθαίρετα, το φως που πέρασε από την κυψελίδα με πλάσμα πλούσιο σε αιμοπετάλια (πριν την προσθήκη αγωνιστή) θεωρείται 0% διαπερατότητα ή 0% συσσώρευση και το φως που πέρασε από την κυψελίδα με πλάσμα φτωχό σε αιμοπετάλια θεωρείται 100% διαπερατότητα ή 100% συσσώρευση. Στα πειράματα με PRP το δείγμα αναφοράς αποτελούνταν από το ομόλογο PPP. Η συσσωρευτική ικανότητα των αιμοπεταλίων κρίνεται βάσει των αλλαγών στην εκπομπή του φωτός. Η διαδικασία της συσσώρευσης καταγράφεται φωτομετρικά και αναπαρίσταται ως κατερχόμενη καμπύλη. Η προσθήκη ενός αγωνιστή σε PRP προκαλεί αύξηση της αλληλεπίδρασης των αιμοπεταλίων, με αποτέλεσμα τη μεταβολή της διαπερατότητας του φωτός. Τα αιμοπετάλια, ανταποκρινόμενα στη προσθήκη του αγωνιστή, υφίστανται αλλαγή του σχήματος τους. Το μέγεθος τους αυξάνεται και επιτρέπει σε λιγότερο φως να περάσει από την κυψελίδα, αυτό καταγράφεται ως μικρότερη διαπερατότητα. Κατόπιν τα αιμοπετάλια προσκολλώνται το ένα στο άλλο σχηματίζοντας συσσωματώματα, έτσι περνά περισσότερο φως από την κυψελίδα κάτι που καταγράφεται ως μεγαλύτερη διαπερατότητα. Η καταγραφή της *in vitro* συσσώρευσης χαρακτηρίζεται από την αλλαγή σχήματος των αιμοπεταλίων (μικρή ανερχόμενη καμπύλη, μείωση διαπερατότητας), την μέγιστη αύξηση στη διαπερατότητα του φωτός που προκαλείται από τον αγωνιστή (% συσσώρευση), το ρυθμό της συσσώρευσης (% μεταβολή συσσώρευσης ανά min), την πρωτογενή συσσώρευση (κατερχόμενη καμπύλη, αύξηση διαπερατότητας) η οποία οδηγεί είτε σε αποσυσσώρευση (ανερχόμενη καμπύλη, μείωση διαπερατότητας) είτε σε ένα σταθερό πλατό (ευθεία γραμμή, σταθερή διαπερατότητα) είτε περνά ένα πλατό και προχωρά στη δεύτερη φάση της συσσώρευσης (δευτερογενής συσσώρευση), που συμβαίνει όταν τα αιμοπετάλια εκκρίνουν τα συστατικά των κοκκίων τους τα οποία προκαλούν επιπρόσθετη συσσώρευση (δεύτερη κατερχόμενη καμπύλη, επιπρόσθετη αύξηση διαπερατότητας). Η καταγραφή της συσσώρευσης πραγματοποιείται για 4-5 min.



Εικόνα 1.2. Συσσώρευση με μετάδοση φωτός.

Αντιδραστήρια

- Κιτρικό οξύ ($C_6H_8O_7$, M.B. : 192,13, Merck)
- Κιτρικό νάτριο ($C_6H_5Na_3O_7 \cdot H_2O$, M.B. : 294,10, Merck)
- D (+) Γλυκόζη [$(HOCH_2CH(CHOH)_4O$, M.B.:180,16, Fluka]
- Απεσταγμένο νερό (dH_2O)
- Οξαλικό αμμώνιο [$(NH_4)_2C_2O_4 \cdot H_2O$, M.B. :142,11 Mallinckrodt]
- Διφωσφορική αδενοσίνη (ADP, Chrono-Log)
- Αραχιδονικό οξύ (Sigma- Aldrich)
- Απόλυτη αιθανόλη (Pancreac)
- Δραστικό πεπτίδιο του υποδοχέα της θρομβίνης-14 (TRAP-14) (Sigma- Aldrich)
- Κολλαγόνο (Collagen, Chrono-Log)

Όργανα-Αναλώσιμα

- Φυγόκεντρος πάγκου (Hermle, Z 320)
- Αιματοκυτόμετρο (Neubauer)
- Μικροσκόπιο (Olympus)
- Συσσωρευόμετρο (Aggregometer, μοντέλο 700- 4 κανάλια, CHRONO-LOG)
- Καταγραφικό (AggroLink, CHRONO-LOG)
- Γυάλινες κυψελίδες συσσώρευσης (CHRONO-LOG)
- Ειδικά μαγνητάκια συσσώρευσης (CHRONO-LOG)

Διαλύματα εργασίας

- **Αντιπηκτικό διάλυμα κιτρικών αλάτων (ACD):** Το αντιπηκτικό διάλυμα ACD περιέχει 42 mM κιτρικού οξέος, 75 mM κιτρικού νατρίου και 139 mM D(+) γλυκόζη. Αναλυτικότερα ζυγίζουμε 0,8 g κιτρικό νάτριο, 2,2 g κιτρικό οξύ και 2,5 g D(+) γλυκόζη τα οποία διαλυτοποιούνται σε 100 ml H_2O . Το διάλυμα διατηρείται στους $4^{\circ}C$.

- **Διάλυμα οξαλικού αμμωνίου:** 1 gr οξαλικού αμμωνίου διαλύεται σε 100 ml απεσταγμένου ύδατος. Το διάλυμα αποθηκεύεται στους 4 °C.
- **Διάλυμα 1mM διφωσφορικής αδενοσίνης (ADP):** Το διάλυμα της διφωσφορικής αδενοσίνης προέρχεται από 2.5mg λυοφιλοποιημένου ADP διαλυτοποιημένο σε 5ml φυσιολογικό ορό. Το διάλυμα διατηρείται στους -80°C σε κλάσματα των 50μl.
- **Διάλυμα 50mM αραχιδονικού οξέος (AA):** 10 mg αραχιδονικού οξέος διαλύονται σε 655 μl απόλυτης αιθανόλης.
- **Διάλυμα 0,575 mM TRAP-14:** 1 mg διαλύματος TRAP-14 διαλύονται σε 100 μl φυσιολογικού ορού. Στη συνέχεια γίνεται αραίωση (1:10) για την παρασκευή διαλύματος 0,575mM.
- **Διάλυμα Κολλαγόνου:** 1 mg διαλύματος κολλαγόνου τύπου I διαλύονται σε ισοτονικό διάλυμα γλυκόζης σε pH=2,7.

Πειραματική διαδικασία

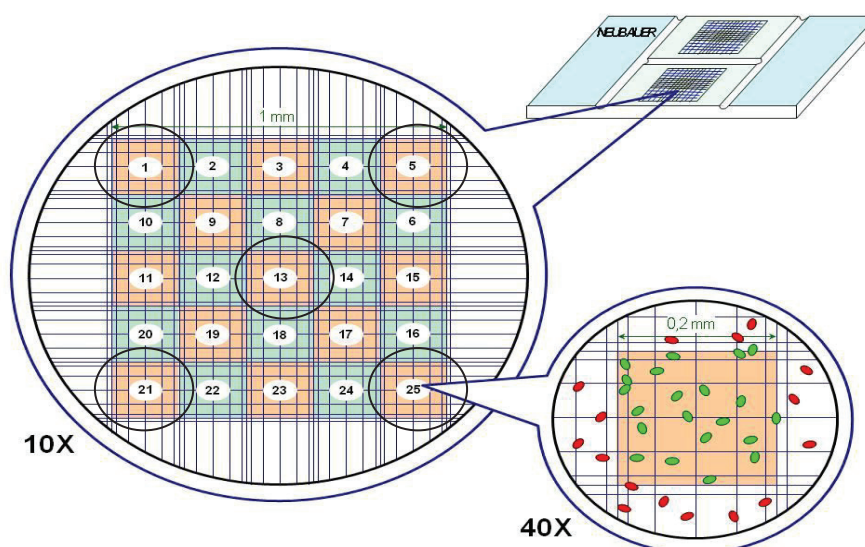
Απομόνωση του PRP και PPP από ολικό αίμα

1. Η συλλογή του περιφερικού φλεβικού αίματος γίνεται σε πλαστικούς φυγοκεντρικούς σωλήνες πολυαιθυλενίου (χωρητικότητας 12 ml), στους οποίους έχει προστεθεί ACD. Η αναλογία αίματος-ACD σε κάθε πλαστικό σωλήνα είναι 9:1.
2. Το αίμα υφίσταται ήπια φυγοκέντρωση στις 900-1000 rpm (120 x g) για 15 min σε θερμοκρασία δωματίου όπου και απομονώνεται με πιπέτα το 1/3 ml από το υπερκείμενο υγρό, το οποίο και αποτελεί το PRP.
3. Επαναφυγοκέντρωση του υπολειπόμενου πλάσματος μαζί με τα κύτταρα του αίματος στις 3.100 rpm (1500 x g) για 15min σε θερμοκρασία δωματίου και απομονώνεται με πιπέτα το υπερκείμενο υγρό το οποίο αποτελεί το PPP.

Μέτρηση του αριθμού των αιμοπεταλίων

4. Γίνεται αραίωση 10 μl PRP σε 190 μl διαλύματος οξαλικού αμμωνίου 1% (αραίωση 1:20). Στη συνέχεια, 10 μl του παραπάνω αιωρήματος τοποθετούνται στην πλάκα Neubauer που τοποθετείται σε τρυβλίο Petri για 15 min.
5. Η καταμέτρηση των αιμοπεταλίων γίνεται με μικροσκόπιο (Εικόνα 1.3) και η συγκέντρωσή τους ανά κυβικό χιλιοστό υπολογίζεται από τη σχέση:

$$5 \text{ θέσεις της πλάκας newbauer} \times \text{μέσος όρος κυττάρων ανά θέση} \times 1000$$



Εικόνα 1.3. Μέτρηση των αιμοπεταλίων με τη πλάκα Neubauer. Σε κύκλο φαίνονται τα τετράγωνα στα οποία μετράμε τα αιμοπετάλια ενώ δεξιά φαίνονται με πράσινο χρώμα τα αιμοπετάλια που λαμβάνουμε υπόψη στη μέτρηση

6. Παρασκευή τελικού δείγματος με κατάλληλη αραιώση, έτσι ώστε να έχουμε 250.000 αιμοπετάλια ανά mm^3 . Ο απαιτούμενος όγκος V_{PRP} του πλάσματος φτωχού σε αιμοπετάλια που απαιτείται για την αραιώση, προκύπτει από τη σχέση:

$$AA \times V_{\text{PRP}} = 250.000 \times (V_{\text{PRP}} + V_{\text{PPP}})$$

όπου: AA ο αριθμός των αιμοπεταλίων ανά mm^3 στο αρχικό PRP, V_{PRP} ο όγκος του PRP, V_{PPP} ο όγκος του PPP.

Ρύθμιση και χρήση του οργάνου

7. Ανοίγουμε το συσσωρευόμετρο δεκαπέντε min πριν τη μέτρηση για να φτάσει η θερμοκρασία του οργάνου στους 37°C . Ετοιμάζουμε μια σειρά από γυάλινες κυψελίδες συσσώρευσης όπου θα τοποθετηθούν τα δείγματά μας. Καθεμία φέρει από ένα μαγνητάκι. Ετοιμάζουμε ένα δείγμα από 500 μl PPP (στο οποίο δεν τοποθετούμε μαγνητάκι) και το τοποθετούμε στη θέση 'POOR' του οργάνου. Το δείγμα αυτό παραμένει στη θέση αυτή μέχρι να τελειώσει το πείραμα.

8. Εισαγωγή του δείγματος (500 μl PRP) στη θέση 'RICH' του οργάνου

9. Μέτρηση της συσσώρευσης. Εισάγουμε το διάλυμα του αγωνιστή μετά από ένα λεπτό. Χρησιμοποιήθηκε ως αγωνιστής το ADP σε τελικές συγκεντρώσεις 5 και 20 μM , το Αραχιδονικό οξύ σε τελική συγκέντρωση 500 μM , το TRAP-14 σε τελική συγκέντρωση

10 μ M και το κολλαγόνο σε τελική συγκέντρωση 2 μ g/ml. Παρατηρούμε τη συσσώρευση του δείγματος για 4 min. Καταγράφουμε και τυπώνουμε την % συσσώρευση του δείγματος.

 Υπολογισμός του ποσοστού (%) αναστολής της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων που προκαλεί η διπλή αντιαιμοπεταλιακή αγωγή με ασπιρίνη και κλοπιδογρέλη ή τικαγρελόρη

Το ποσοστό της αναστολής της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων που προκαλεί η κλοπιδογρέλη δίνεται από την σχέση:

$$\% \text{ Αναστολή} = (\text{Δείγμα baseline} - \text{Δείγμα μετά από 5 ή 30 ημέρες}) / \text{Δείγμα baseline} \times 100$$

Baseline: δείγμα πριν τη χορήγηση της αντιαιμοπεταλιακής αγωγής

2. Εκτίμηση της απόκρισης στους P2Y₁₂ ανταγωνιστές με τη μελέτη της φωσφορυλίωσης της φωσφοπρωτεΐνης VASP (vasodilator stimulated phosphoprotein)

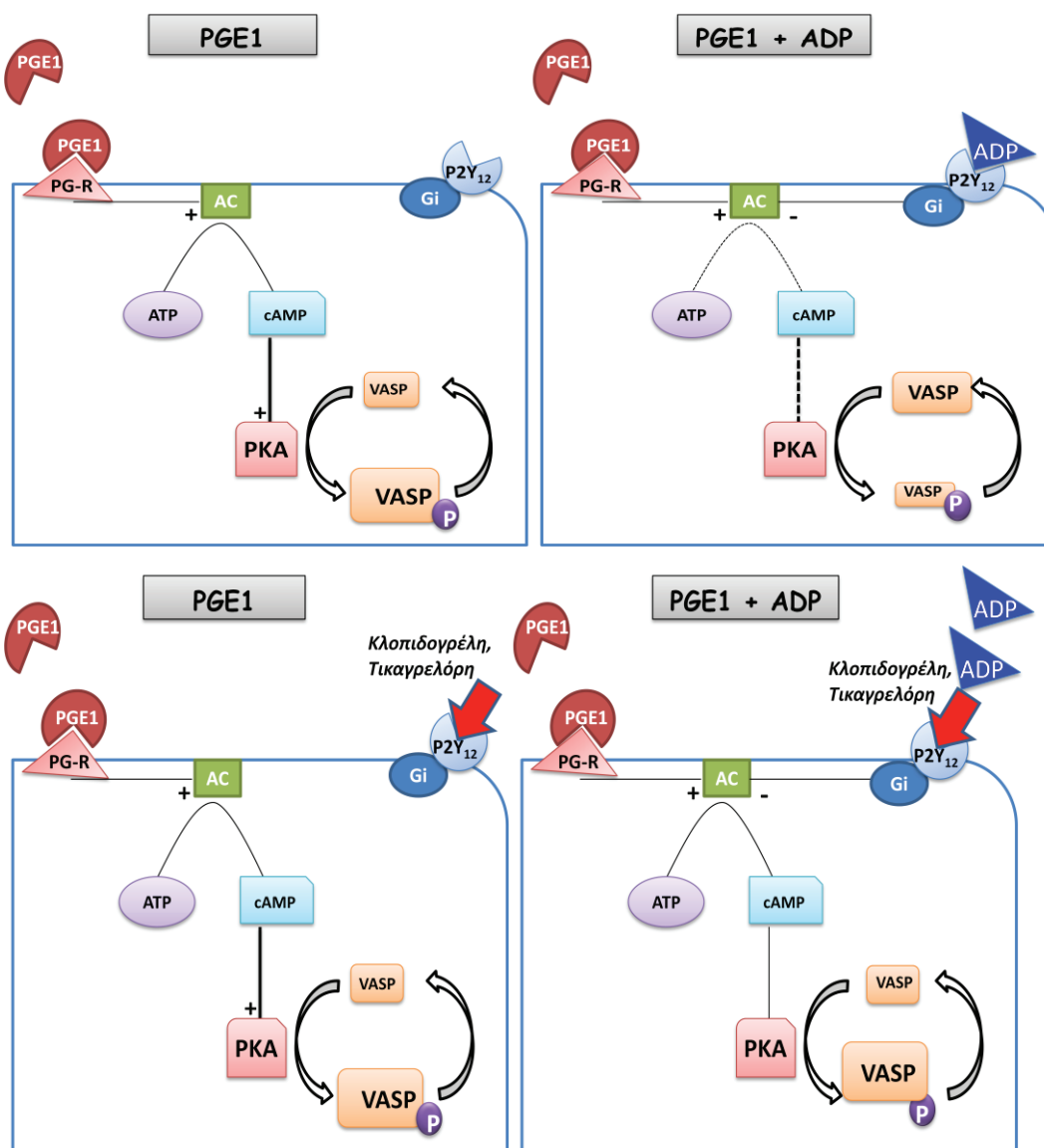
Αρχή της μεθόδου

Ο προσδιορισμός γίνεται με κυτταρομετρία ροής χρησιμοποιώντας ένα εξειδικευμένο μονοκλωνικό αντίσωμα που αναγνωρίζει τη φωσφορυλιωμένη μορφή της αγγειοδιασταλτικής-επαγόμενης φωσφοπρωτεΐνης (VASP). Η μέθοδος αυτή επιτρέπει την εκτίμηση της απόκρισης των αιμοπεταλίων στη δράση των P2Y₁₂ ανταγωνιστών η οποία ποσοτικοποιείται με τον δείκτη αιμοπεταλιακής δραστηριότητας (Platelet Reactivity Index, PRI).

Ο υποδοχέας P2Y₁₂ συνδέεται με την ανασταλτική πρωτεΐνη Gi. Η σηματοδότηση διαμέσου αυτού του υποδοχέα οδηγεί σε χαμηλά επίπεδα cAMP και απενεργοποίηση της PKA, της οποίας ένα υπόστρωμα είναι η VASP. Αντίθετα, η PGE1 οδηγεί σε υψηλότερα επίπεδα cAMP και ενεργοποίηση της PKA.

Ο μηχανισμός της σηματοδότησης διαμέσου αυτού του μονοπατού περιγράφεται ακολούθως: αιμοπετάλια που δεν βρίσκονται υπό την επίδραση κάποιου ανταγωνιστή του P2Y₁₂ επωάζονται *in vitro* με PGE1, η VASP φωσφορυλιώνεται και τα αιμοπετάλια αναστέλλονται. Σε αντίθεση, τα αιμοπετάλια που επωάζονται με PGE1 και ADP η VASP αποφωσφορυλιώνεται και τα αιμοπετάλια ενεργοποιούνται (Εικόνα 2.1). Ωστόσο, τα αιμοπετάλια που είναι υπό την επίδραση κάποιου P2Y₁₂ ανταγωνιστή (πχ. κλοπιδογρέλη,

τικαγρελόρη) και έπειτα επωάζονται είτε μόνο με PGE1 είτε με PGE1 και ADP, η VASP φωσφορυλιώνεται συνεχώς και τα αιμοπετάλια απενεργοποιούνται. Αυτό συμβαίνει διότι, οι P2Y₁₂ ανταγωνιστές αντιστρεπτά ή μη αντιστρεπτά προσδένονται στον υποδοχέα P2Y₁₂, παρεμποδίζοντας την πρόσδεση του ADP στον υποδοχέα του αναστέλλοντας την αποφωσφορυλίωση της VASP (Εικόνα 2.1.).



Εικόνα 2.1. Η αρχή της μεθόδου της ανάλυσης VASP.

Αντιδραστήρια- Όργανα

- Εμπορικό kit VASP/P2Y₁₂ (BioCytex, Marseille, France) το οποίο περιέχει τα ακόλουθα: Αντιδραστήριο 1 : Διάλυμα εργασίας (60 ml)
 - Αντιδραστήριο 2α : PGE1
 - Αντιδραστήριο 2β : PGE1 + ADP
 - Αντιδραστήριο 3: Διάλυμα μονιμοποίησης που περιέχει 2-5% παραφορμαλδεΰδη)
 - Αντιδραστήριο 4α: Anti-VASP-P μονοκλωνικό αντίσωμα ποντικού και διάλυμα διαπερατότητας
 - Αντιδραστήριο 4β: Αρνητικό ισοτυπικό control
 - Αντιδραστήριο 5: Διάλυμα χρώσης, πολυκλωνικό αντίσωμα ποντικού IgG-FITC και αντι CD61-PE για τη μέτρηση των αιμοπεταλίων και διάλυμα διαπερατότητας
- Σωληνάκια πολυστυρενίου (Becton Dickinson, San Jose, CA)
- Κυτταρόμετρο ροής FACScalibur (Flow Cytometer, Becton Dickinson, San Jose, CA)
- Κυκλοαναδευτήρας (vortex)

Διαλύματα εργασίας

- Διάλυμα PGE1 (αντιδραστήριο 2α) και PGE1+ADP (αντιδραστήριο 2β) διαλύονται σε 400 μl απεσταγμένου νερού

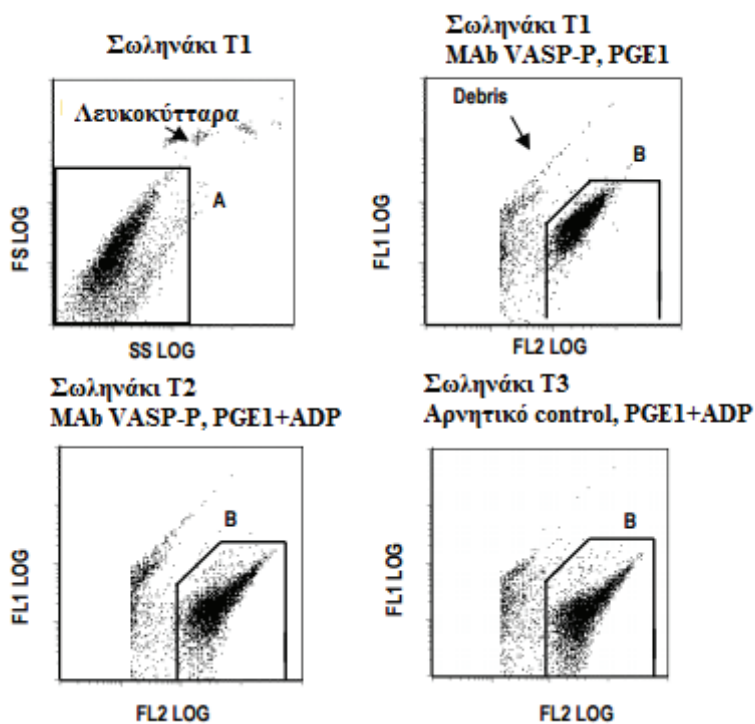
Πειραματική διαδικασία

1. Για κάθε δείγμα αίματος χρησιμοποιούνται τρία πλαστικά σωληνάκια πολυστυρενίου τα οποία αριθμούνται ως T1, T2 και T3 :
 - Στο σωληνάκι T1 τοποθετούμε 10 μl PGE1
 - Στα σωληνάκια T2 και T3 τοποθετούμε 10 μl PGE1+ ADP
 - Στα σωληνάκια T1, T2 και T3 προσθέτουμε 10 μl ολικού αίματος
2. Ομογενοποίηση για 1-2 δευτερόλεπτα χρησιμοποιώντας το vortex ρυθμισμένο σε χαμηλή ταχύτητα. Στη συνέχεια τα δείγματα επώάζονται για 10 min σε θερμοκρασία δωματίου.
3. Στα σωληνάκια T1, T2 και T3 προσθέτουμε 10 μl από το αντιδραστήριο μονιμοποίησης που περιέχει 2% έως 5% παραφορμαλδεΰδη.
4. Ομογενοποίηση με το vortex για 1-2 δευτερόλεπτα και επώαση για 5 min σε θερμοκρασία δωματίου.

5. Στα σωληνάκια T1 και T2 προσθέτουμε 10 μ l από το αντι VASP-P μονοκλωνικό αντίσωμα ενώ στο σωληνάκι T3 προσθέτουμε 10 μ l από το αρνητικό ισotypικό control.
6. Ομογενοποίηση με το vortex ρυθμισμένο σε χαμηλή ταχύτητα για 1-2 δευτερόλεπτα και επώαση για 5 min σε θερμοκρασία δωματίου.
7. Στα σωληνάκια T1, T2 και T3 προσθέτουμε 10 μ l αντι IgG-FITC + αντι CD61-PE + αντιδραστήριο διαπερατότητας.
8. Τα δείγματα ομογενοποιούνται με το vortex ρυθμισμένο σε χαμηλή ταχύτητα για 1-2 δευτερόλεπτα και επώάζονται για 5 min σε θερμοκρασία δωματίου.
9. Τέλος, προστίθενται 2 ml διαλύματος αραιώσης σε κάθε σωληνάκι.
10. Μετά από ισχυρή ανάδευση ακολουθεί κυτταρομετρική ανάλυση. Τα αποτελέσματα της κυτταρομετρικής ανάλυσης αξιολογούνται με τη χρήση του λογισμικού Cell Quest.

Επεξεργασία των αποτελεσμάτων

Για την επεξεργασία των αποτελεσμάτων ακολουθούμε το παρακάτω σχήμα (Εικόνα 2.2). Αρχικά, διακρίνεται η περιοχή των αιμοπεταλίων (περιοχή A) από τα λευκοκύτταρα. Στη συνέχεια, η υπόλοιπη ανάλυση πραγματοποιείται ως προς την περιοχή A.



Εικόνα 2.2. Κυτταρομετρικές εικόνες κατά την ανάλυση VASP.

Αφού δημιουργήσουμε τις παραπάνω εικόνες υπολογίζουμε τις MFI τιμές για τα PGE1 και PGE1+ADP σύμφωνα με τις παρακάτω εξισώσεις:

$$\begin{aligned} \text{MFI}_{\text{PGE1}} &= \text{MFI}(\text{T1}) - \text{MFI}(\text{T3}) \\ \text{MFI}_{\text{PGE1+ADP}} &= \text{MFI}(\text{T2}) - \text{MFI}(\text{T3}) \end{aligned}$$

Στη συνέχεια υπολογίζεται ο δείκτης PRI σύμφωνα με την παρακάτω εξίσωση:

$$\text{PRI} = [(\text{MFIc PGE1} - \text{MFIc (PGE1 + ADP)}) / \text{MFIc PGE1}] \times 100$$

Συνήθως οι τιμές PRI κυμαίνονται από 6,6% σε 85,8%.

3. Προσδιορισμός της μεμβρανικής έκφρασης της P-σελεκτίνης και της έκφρασης του υποδοχέα $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ με κυτταρομετρία ροής (Flow Cytometry, FC)

Αρχή της μεθόδου

Η κυτταρομετρία ροής χρησιμοποιήθηκε για τη μελέτη της μεμβρανικής έκφρασης της P-σελεκτίνης και την έκφραση του υποδοχέα $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$. Η τεχνική αυτή απαιτεί κατάλληλο εξοπλισμό, το κυτταρόμετρο ροής (Εικόνα 3.1) και δίνει τη δυνατότητα να γίνουν ποικίλες μετρήσεις και προσδιορισμοί σε κατάλληλα προετοιμασμένα κύτταρα. Η προετοιμασία των κυττάρων έγκειται στη σήμανσή τους με φθορίζουσες χρωστικές. Τα κύτταρα ρέουν με μορφή εναιωρήματος μποροστά από μια φωτεινή ακτίνα laser δια μέσου θαλάμου με ταχύτητα αρκετών χιλιάδων ανα sec. Η μέτρηση, αναγνώριση και διαλογή γίνεται με τον εκπεμπόμενο φθορισμό και τη σκέδαση του φωτός, δηλαδή με βάση το μέγεθος και την κοκκίωση. Η ανάλυση των προαναφερόμενων δεικτών στηρίχθηκε στη χρήση ειδικών μονοκλωνικών αντισωμάτων συζευγμένων με φθοριοχρώματα τα οποία αναγνωρίζουν ειδικά αντιγόνα (Clusters of differentiation, CD) στην επιφάνεια των αιμοπεταλίων.



Εικόνα 3.1. Το κύτταρομετρο ροής FACS Calibur.

Τα αντισώματα που χρησιμοποιήσαμε είναι το CD62P-PE που αναγνωρίζει την έκφραση της P-σελεκτίνης, το PAC-1-FITC που αναγνωρίζει έναν επίτοπο της ιντεγκρίνης $\alpha_{IIb}\beta_3$ των ενεργοποιημένων αιμοπεταλίων κοντά στη θέση πρόσδεσης του ινωδογόνου και το CD61-PerCP που αναγνωρίζει την β_3 υπομονάδα του $\alpha_{IIb}\beta_3$ ανεξάρτητα από το αν είναι ενεργοποιημένη ή όχι η ιντεγκρίνη. Τα φθοριοχρώματα που χρησιμοποιήθηκαν είναι η φυκοερυθρίνη (PE) με κίτρινο φθορισμό, η ισοθειοκυανική φλουοροσκεΐνη (FITC) με πράσινο φθορισμό και η περινιδίνη χλωροφυλλη-Α πρωτεΐνη με κόκκινο φθορισμό τα οποία εκπέμπουν σε μήκη κύματος 530nm, 650 nm και 585nm αντίστοιχα.

Αντιδραστήρια

- Κιτρικό οξύ ($C_6H_8O_7$, M.B. : 192,13, Merck)
- Κιτρικό νάτριο ($C_6H_5Na_3O_7 \cdot H_2O$, M.B. : 294,10, Merck)
- D (+) Γλυκόζη [$(HOCH_2CH(CHOH)_4O$, M.B.:180,16, Fluka]
- Οξαλικό αμμώνιο [$(NH_4)_2C_2O_4 \cdot H_2O$, M.B. :142,11 Mallinckrodt]
- Anti-CD61-PerCP (Becton Dickinson, San Jose, CA)
- Anti-CD62- PE (Becton Dickinson, San Jose, CA)
- PAC-1 –FITC (Becton Dickinson, San Jose, CA)
- Χλωριούχο νάτριο (NaCl, M.B.:58,449 Merck)
- Ένυδρο δισόξινο φωσφορικό νάτριο ($NaH_2PO_4 \cdot H_2O$, M.B.:137,99 Merck)
- Δι-ένυδρο όξινο φωσφορικό νάτριο ($Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$, M.B.:177,49 Merck)

Όργανα-Αναλώσιμα

- Φυγόκεντρος πάγκου (Hermle, Z 320)
- Σωληνάκια πολυστυρενίου (Becton Dickinson, San Jose, CA)
- Κυτταρόμετρο ροής FACScalibur (Flow Cytometer, Becton Dickinson, San Jose, CA)
- Cell Quest Software (Becton Dickinson, San Jose, CA)
- Επωαστικός θάλαμος 37°C

Διαλύματα εργασίας

- **Αντιπηκτικό διάλυμα κιτρικών (ACD):** Το αντιπηκτικό διάλυμα ACD περιέχει 42 mM κιτρικού οξέος, 75 mM κιτρικού νατρίου και 139 mM D(+) γλυκόζη. Αναλυτικότερα ζυγίζουμε 0,8 g κιτρικό νάτριο, 2,2 g κιτρικό οξύ και 2,5 g D(+) γλυκόζη τα οποία διαλυτοποιούνται σε 100 ml H₂O. Το διάλυμα διατηρείται στους 4°C.
- **Διάλυμα 1mM διφωσφορικής αδενοσίνης (ADP):** Το διάλυμα της διφωσφορικής αδενοσίνης προέρχεται από 2.5mg λυοφιλοποιημένου ADP διαλυτοποιημένο σε 5ml φυσιολογικό ορό. Το διάλυμα διατηρείται στους -80°C σε κλάσματα των 50μl.
- **Διάλυμα 10 mM PBS (pH 7,4):** 8.1816 g NaCl, 1.3800 g NaH₂PO₄•H₂O και 1.7795 g Na₂HPO₄•2H₂O διαλυτοποιούνται σε 800 ml H₂O και αφού ρυθμιστεί το pH στο 7.4, συμπληρώνεται ο όγκος στο 1 L με d H₂O. Το διάλυμα διατηρείται σε θερμοκρασία δωματίου.

Πειραματική διαδικασία

1. Συλλογή περιφερικού φλεβικού αίματος σε σωληνάκι που περιέχει αντιπηκτικό ACD. Η αναλογία αίματος-ACD σε κάθε πλαστικό σωλήνα είναι 9:1.
2. Ήπια φυγοκέντρηση στις 900-1000 rpm για 15 min σε θερμοκρασία δωματίου για απομόνωση του PRP.
3. Επαναφυγοκέντρηση του υπολειπόμενου πλάσματος στις 3.100 rpm για 15min σε θερμοκρασία δωματίου για απομόνωση του PPP.
4. Αραίωση 10 μl PRP σε 190 μl διαλύματος οξαλικού αμμωνίου 1% και τοποθέτηση 10 μl του παραπάνω αιωρήματος στην πλάκα Neubauer για 15 min.
5. Μέτρηση των αιμοπεταλίων στο μικροσκόπιο
6. Παρασκευή τελικού δείγματος με κατάλληλη αραίωση, έτσι ώστε να έχουμε 250.000 αιμοπετάλια ανά mm³.
7. Σε δύο eppendorf τοποθετούμε 95 μl από το αραιωμένο δείγμα PRP και σε αυτό που θέλουμε να αναλύσουμε τα μη ενεργοποιημένα αιμοπετάλια προσθέτουμε 5 μl διαλύματος PBS, 10 mM ενώ στο σωληνάκι για τα ενεργοποιημένα αιμοπετάλια προσθέτουμε 5 μl ADP (C_{τελ}=50mM).
8. Ήπια ανάδευση. Επωάζουμε για 5 min, στους 30 °C. Εναλλακτικά, μπορούμε να επωάσουμε τα αιμοπετάλια με τον αγωνιστή για 20 min σε θερμοκρασία δωματίου.
9. Σε κάθε σωληνάκι κυτταρομέτρου τοποθετούμε 5μl από τα μονοκλωνικά αντισώματα διαφορετικού φθοριοχρώματος (τριπλός φθορισμός) και με το πέρας της επώασης 5 μl από τα αντίστοιχα PRP στο κέντρο από το αντίστοιχο σωληνάκι.
10. Προσθέτουμε 30 μl PBS, 10 mM.

11. Ήπια ανάδευση. Επωάζουμε για 20 min στο σκοτάδι σε θερμοκρασία δωματίου.
12. Προσθέτουμε 450μl PBS, 10 mM.
13. Ακολουθεί ισχυρότερη ανάδευση με vortex και ανάλυση με κυτταρομετρία ροής.

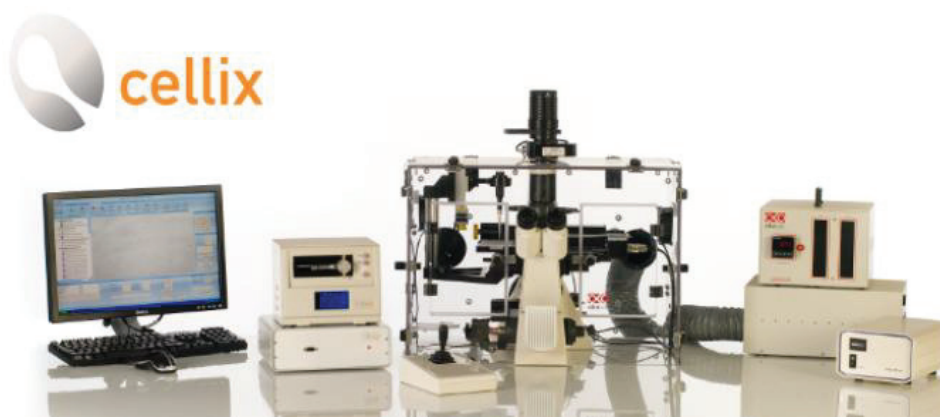
Επεξεργασία των αποτελεσμάτων

Κατά την επεξεργασία των αποτελεσμάτων υπολογίζουμε την μέση ένταση φθορισμού (Mean Fluorescence Intensity, MFI) του αντι-CD62-PE και του PAC-1-FITC τόσο στα μη ενεργοποιημένα αιμοπετάλια όσο και στα ενεργοποιημένα αιμοπετάλια.

4. Σύστημα μελέτης της προσκόλλησης κυττάρων υπό συνθήκες ροής (Σύστημα Cellix)

Αρχή της μεθόδου

Τα βήματα που οδηγούν στην προσκόλληση κυττάρων γίνονται παρουσία της διατμητικής ροής (shear flow=shear rate), ένας παράγοντας που δεν λαμβάνεται υπόψη σε μεθόδους οι οποίες χρησιμοποιούν πλακίδια (wells) και θεωρούνται στατικές. Η εταιρεία Cellix Ltd έχει αναπτύξει ένα νέο σύστημα μελέτης της προσκόλλησης κυττάρων που αποτελείται από μία αντλία με αισθητήρα ροής και ελέγχεται από υπολογιστή με εγκαταστημένο λογισμικό (Εικόνα 4.1).



Εικόνα 4.1. Το σύστημα προσκόλλησης της Cellix

Αυτή η αντλία μικροροής επιτρέπει τη ρύθμιση, με ακρίβεια, της ροής διαμέσου του biochip και μπορεί να μιμηθεί και να δημιουργεί συνθήκες διατμητικών τάσεων ισοδύναμες με αυτές που υπάρχουν στα αιμοφόρα αγγεία. Συγκεκριμένα, για τις αρτηρίες, η διατμητική τάση κυμαίνεται μεταξύ 10 και 70 dynes/cm² ενώ για τις φλέβες κυμαίνεται μεταξύ 1 και 6 dynes/cm². Επιπλέον τα biochip αποτελούνται από 8 διαφορετικά κανάλια και οι διαστάσεις τους είναι ανάλογες των διαστάσεων των αιμοφόρων αγγείων (Πίνακας 4.1).

Πίνακας 4.1. Χαρακτηριστικά των Vena8/Vena8 Fluoro+ biochips

Κανάλι	Vena8/Vena8 Fluoro+
Μήκος	2.8
Πλάτος	0.04
Ύψος	0.01

Αντιδραστήρια

- Κιτρικό οξύ (C₆H₈O₇, M.B. : 192,13, Merck)
- Κιτρικό νάτριο(C₆H₅Na₃O₇ H₂O, M.B. : 294,10, Merck)
- D (+) Γλυκόζη [(HOCH₂CH(CHOH)₄O, M.B.:180,16, Fluka]
- Χλωριούχο νάτριο (NaCl, M.B.:58,449 Merck)
- Ένυδρο δισόξινο φωσφορικό νάτριο (NaH₂PO₄•H₂O, M.B.:137,99 Merck)
- Δι-ένυδρο όξινο φωσφορικό νάτριο (Na₂HPO₄•2H₂O, M.B.:177,49 Merck)
- Απεσταγμένο νερό
- Αιθανόλη [CH₃CH₂OH 70% (v/v)]
- Κολλαγόνο τύπου I (Rat tail), 3.36 mg/ml, BD Biosciences)
- Οξικό οξύ (CH₃COOH,17.5M, Riedel-deHaën)
- BSA (>96%, Sigma)
- Μεπακρίνη (M.B. 472,88, Sigma)
- Arg-Gly-Asp-Ser (RGDS) (M.B.: 433,4, Sigma)

Όργανα

- Σύστημα προσκόλλησης Cellix:
 - Αντλία μικροροής (Mirus™ 2.0 Nanopump),*
 - Μικροσκόπιο φθορισμού (Olympus IX71),*
 - Λογισμικό Ducocell*

Διαλύματα εργασίας

- **Διάλυμα 200 µg/ml κολλαγόνου:** Ποσότητα του αρχικού διαλύματος (stock) κολλαγόνου αραιώνεται σε κατάλληλο όγκο CH_3COOH 0.02 M προς σχηματισμό διαλύματος συγκέντρωσης 200 µg/ml. Το διάλυμα διατηρείται στους 4°C.
- **Διάλυμα 0.02 M CH_3COOH :** Ποσότητα διαλύματος CH_3COOH 17.5 M (stock διάλυμα) αραιώνεται σε αποστειρωμένο dH_2O προς σχηματισμό διαλύματος συγκέντρωσης 0.02 M. Το διάλυμα διατηρείται σε θερμοκρασία δωματίου.
- **Διάλυμα 0,1% BSA:** 10 µl διαλύματος 10% BSA (1 gr BSA διαλύονται σε 10 ml PBS (1X)) αραιώνονται σε 990 µl PBS (1X).
- **Αντιπηκτικό διάλυμα κιτρικών (ACD):** Το υδατικό αντιπηκτικό διάλυμα ACD περιέχει 42 mM κιτρικού οξέος, 75 mM κιτρικού νατρίου και 139 mM D(+) γλυκόζη. Αναλυτικότερα ζυγίζουμε 0,8 g κιτρικό νάτριο, 2,2 g κιτρικό οξύ και 2,5 g D(+) γλυκόζη τα οποία διαλυτοποιούνται σε 100 ml H_2O . Το διάλυμα διατηρείται στους 4°C.
- **Διάλυμα 1 mM μεπακρίνης:** Αρχικά 0,0422 gr διαλυτοποιούνται σε 10 ml H_2O και στη συνέχεια γίνεται αραιώση με νερό. Η χρωστική διατηρείται στους 4°C και καλύπτεται με αλουμινόχαρτο καθώς είναι φωτοευαίσθητη.
- **Διάλυμα 10 mM PBS (pH 7,4):** 8.1816 g NaCl, 1.3800 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ και 1.7795 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ διαλυτοποιούνται σε 800 ml H_2O και αφού ρυθμιστεί το pH στο 7.4, συμπληρώνεται ο όγκος στο 1 L με dH_2O . Το διάλυμα διατηρείται σε θερμοκρασία δωματίου.
- **Διάλυμα 23,07mM Arg-Gly-Asp-Ser (RGDS):** Το RGDS παραλαμβάνεται από το εμπόριο κλεισμένο σε αεροστεγές φιαλίδιο που περιέχει 5mg πεπτιδίου και φυλάσσεται στους -20°C. Το RGDS διαλυτοποιείται σε 500µL PBS (10mM, pH=7.4) με τελική συγκέντρωση 23,07mM. Το διάλυμα διατηρείται στους -20°C σε κλάσματα των 50µL.

Πειραματική διαδικασία

1^η ημέρα

1. Το Vena8 Fluoro+TM biochip επιστρώνεται με 12 µl διαλύματος 200µg/ml κολλαγόνου σε κάθε κανάλι
2. Το biochip τοποθετείται σε ειδικό κουτί με υγρασία και αφήνεται overnight στους 4°C. Εναλλακτικά, μπορούμε να το αφήσουμε δύο h σε θερμοκρασία δωματίου
3. Προσθήκη 10 µl 0.1% BSA σε κάθε κανάλι και επώαση για 30 min -1 h σε θερμοκρασία δωματίου

2^η ημέρα

4. Συλλογή περιφερικού φλεβικού αίματος σε σωληνάκι που περιέχει αντιπηκτικό ACD. Η αναλογία αίματος-ACD σε κάθε πλαστικό σωλήνα είναι 9:1.

5. Προσθήκη μεπακρίνης (10 μ l) σε 1ml ολικού αίματος.

Σημείωση: Για τα πειράματα με το RGDS, παράλληλα με την προσθήκη της μεπακρίνης προστίθεται και το πεπτίδιο RGDS στη συγκέντρωση που μας ενδιαφέρει.

6. Ήπια ανάδευση.

7. Επώαση για 15-20 min στους 37 °C.

8. Άνοιγμα όλων των τμημάτων του οργάνου.

9. Άνοιγμα του λογισμικού Venaflux Assay και του ειδικού πρωτοκόλλου για το ολικό αίμα.

10. Εκτέλεση του πρωτοκόλλου που περιλαμβάνει τα ακόλουθα:

- ✓ Venaflux Setup: Λειτουργία της αντλίας
- ✓ Geometry Setup (έλεγχος ότι το ιζώδες του δείγματος είναι ρυθμισμένο στο 4,5)
- ✓ Πλύσιμο της αντλίας διαδοχικά με νερό-αιθανόλη- νερό
- ✓ Πλύσιμο του καλωδίου με 40 μ l PBS (pH=7.4) και ρύθμιση της διατμητικής τάσης στις 160 dyne/ cm^2 για ξέπλυμα της περίσσειας ποσότητας κολλαγόνου και της BSA.
- ✓ Ρυθμός ροής: διατμητική τάση, συνεχής -60 dynes/ cm^2 και διάρκεια του πειράματος (6 min)

11. Ένθεση του δείγματος. Παρατήρηση της αιματικής ροής σε μεγέθυνση 20x, της ‘κύλισης’ και της προσκόλλησης και λήψη εικόνων ή video (σε σημείο κοντά στο σημείο ένθεσης (inlet) του δείγματος). Παρατήρηση του σημείου inlet για τυχόν θρόμβους. Οι ρυθμίσεις του μικροσκοπίου που περιλαμβάνουν την αντίθεση, την φωτεινότητα και τη μεγέθυνση παρέμειναν σταθερές ούτως ώστε η σύγκριση των αποτελεσμάτων να είναι αξιόπιστη.

12. Αποσύνδεση της βελόνας με το δείγμα και ξέπλυμα του biochip χωρίς την επίδραση ροής.

Επεξεργασία των αποτελεσμάτων

Η επεξεργασία των αποτελεσμάτων γίνεται με το λογισμικό DucoCell™. Μετά από την επιλογή όλων των κυττάρων που έχουν προσκολληθεί, τα αποτελέσματα μπορούν να επεξεργαστούν στο Microsoft Excel. Η προσκόλληση εκτιμάται με τις ακόλουθες παραμέτρους:

- α) το **χρόνο** που απαιτείται για την πρωταρχική προσκόλληση των αιμοπεταλίων στο κολλαγόνο (TPR; **time to platelet recruitment**),
- β) την **περίμετρο**, τον **αριθμό** των προσκολλημένων αιμοπεταλίων καθώς και την **περιοχή** που καλύπτει κάθε αιμοπετάλιο και
- γ) την **επιφάνεια** του διαύλου που έχει καλυφθεί από αιμοπετάλια μετά από 6 min (SC; **% surface coverage**) η οποία θεωρείται ισοδύναμη της προσκόλλησης των αιμοπεταλίων. Το ποσοστό της προσκόλλησης των αιμοπεταλίων προκύπτει πολλαπλασιάζοντας την παράμετρο του αριθμού των προσκολλημένων αιμοπεταλίων με τη μέση τιμή της περιοχής που καλύπτει κάθε αιμοπετάλιο.

5. Προσδιορισμός εκκρινόμενων δεικτών της ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων

Αρχή της μεθόδου

Η τεχνολογία πολλαπλής χαρτογράφησης (xMAP) είναι μια μέθοδος που βασίζεται σε σύγχρονα επιστημονικά ευρήματα και μεθόδους κυτταρομετρίας ροής, μικροσφαιρίδια, lasers, ψηφιακή επεξεργασία σήματος και παραδοσιακές χημικές μεθόδους, συνδυασμένα με ένα μοναδικό τρόπο. Η τεχνολογία xMAP μπορεί να τροποποιηθεί ώστε να πραγματοποιηθεί ευρύ φάσμα βιολογικών εξετάσεων γρήγορα, οικονομικά και με ακρίβεια.

Το Bio Plex 200 (Εικόνα 5.1.) είναι ένα σύστημα ανάλυσης πρωτεϊνών το οποίο στηρίζεται στην μέθοδο της μικροσωματιδιακής ανοσοενζυμικής τεχνολογίας. Ειδικότερα βασίζεται στην χρήση 100 μαγνητικών μικροσφαιριδίων του ίδιου μεγέθους αλλά διαφορετικής σήμανσης η οποία πραγματοποιείται από την χρήση δύο διαφορετικών φθορισμών σε δέκα διαφορετικές συγκεντρώσεις που εκπέμπουν σε δύο διαφορετικά μήκη κύματος (πορτοκαλί και κόκκινο). Για κάθε οικογένεια μικροσφαιριδίων πραγματοποιούνται πολλαπλές μετρήσεις έτσι ώστε να επαληθευτούν τα αποτελέσματα. Με αυτό τον τρόπο η τεχνολογία xMAP επιτρέπει την ταυτόχρονη ανίχνευση μέχρι και 100 διαφορετικών παραγόντων στο ίδιο αρχικό δείγμα γρήγορα και με ακρίβεια.

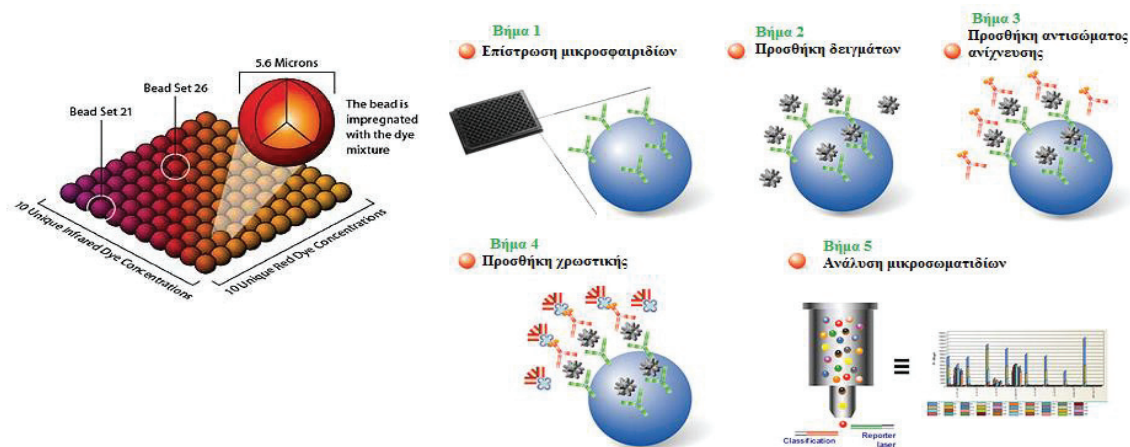


Εικόνα 5.1. Το σύστημα BioPlex 200

Με τη μέθοδο αυτή επιτρέπεται η απλή χημική σύζευξη αντιδραστηρίων όπως αντισώματα, ολιγονουκλεοτίδια, πεπτίδια ή υποδοχείς με τα μικροσφαιρίδια. Ακολουθώντας τις αρχές της κυτταρομετρίας ροής και χρησιμοποιώντας ένα σύστημα υγρών προκαλείται η ροή αιωρούμενων μικροσφαιριδίων σε μία μονή σειρά όπου δέχονται την επίδραση διπλού laser πριν από τη διέλευσή τους από το θάλαμο ανίχνευσης. Το σύστημα ανιχνεύει και μετρά μόρια που δεσμεύονται στις επιφάνειες των φθορισμένων μικροσφαιριδίων, παρέχοντας υψηλής ακρίβειας και σε πραγματικό χρόνο ψηφιακή ανάλυση ορού ή δειγμάτων καλλιιεργειών. Αυτό επιτρέπει την ποσοτική ανάλυση βιολογικών δειγμάτων για ανοσολογικές δοκιμασίες, πολύπλοκες γενετικές αναλύσεις και ενζυμικές δοκιμές.

Όπως παρουσιάζεται στην εικόνα 5.2, τα μικροσφαιρίδια χρωματίζονται και κατατάσσονται σε 100 διαφορετικές αναλογίες. Κάθε μία οικογένεια μικροσφαιριδίων μπορεί να επιστρωθεί με μία ουσία/αντιδραστήριο που επιτρέπει την ανίχνευση ενός συγκεκριμένου αντίστοιχου παράγοντα σε μία βιολογική εξέταση. Στη συνέχεια προστίθεται το δείγμα στα μικροσφαιρίδια και η αναλυτέα ουσία δεσμεύεται. Στο τέλος προστίθεται το αντίσωμα ανίχνευσης. Η ανάλυση πραγματοποιείται σε πλάκα 96 θέσεων και στη συνέχεια εισάγεται στην πλατφόρμα. Για την ανάλυση των δειγμάτων χρησιμοποιείται το λογισμικό Bio-Plex Manager. Το σύστημα ανίχνευσης χρησιμοποιεί δύο laser για την ανάλυση των μικροσφαιριδίων σε ένα ρεύμα ροής. Το πρώτο laser προσδιορίζει το κάθε μικροσφαιρίδιο και την σχετιζόμενη αναλυτέα ουσία με βάση το φθορισμό του μικροσφαιριδίου και το δεύτερο laser μετρά την ποσότητα της αναλυτέας

ουσίας. Όταν η ανάλυση ολοκληρωθεί το Bio-Plex Manager εμφανίζει όλα τα αποτελέσματα τα οποία μπορούν περαιτέρω να επεξεργαστούν στο Microsoft excel.



Εικόνα 5.2. Τα βασικά βήματα που ακολουθούνται όταν χρησιμοποιούμε την τεχνολογία πολλαπλής χαρτογράφησης (xMAP)

Αντιδραστήρια

- Μαγνητικά σωματίδια (10x)
- Αντισώματα αντίγνωσης (10x)
- Πρότυπο για τον προσδιορισμό κυτταροκινών σε λυοφιλοποιημένη μορφή
- Στρεπταβιδίνη (Streptavidin) PE (100x)
- Διάλυμα εναιώρησης προτύπου (10ml)
- Διάλυμα εναιώρησης δειγμάτων (8ml)
- Διάλυμα εναιώρησης των αντισωμάτων αντίγνωσης (5ml)
- Διάλυμα έκπλυσης (150ml)
- Διάλυμα εργασίας (50ml)

Σημείωση: Όλα τα παραπάνω παρέχονται με την αγορά του κιτ

- Ισοπροπανόλη 70%,
- Υποχλωριώδες νάτριο (NaClO)
- Απεσταγμένο νερό

Όργανα

- Σύστημα Bioplex 200:
 - Σύστημα πολλαπλής ανάλυσης
 - Πλατφόρμα για το πλακίδιο Bio-Plex MCV plate IV
 - Ηλεκτρονικός υπολογιστής
 - Λογισμικό Bio-Plex Manager
 - Ανακινούμενη βάση
 - Πλυστικό μηχάνημα (Bio Plex wash station)

- ❖ Οκτακάναλη πολυπιπέτα μεταβαλλόμενου όγκου

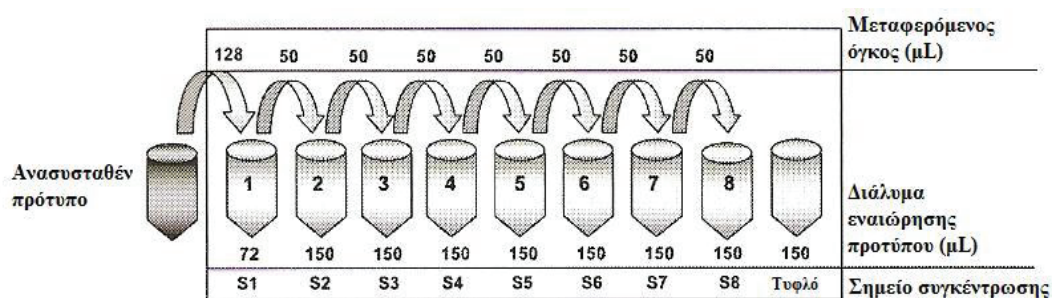
Διαλύματα εργασίας

- ❖ **Πρότυπο διάλυμα κυτταροκινών:** Το πρότυπο είναι σε λυοφιλοποιημένη μορφή και διαλυτοποιείται σε 500μl διαλύματος εναιώρησης προτύπου. Διατηρείται στον πάγο και παραμένει σταθερό για 4 h.
- ❖ **Διάλυμα 10x μαγνητικών σωματιδίων:** 575μl του εναιωρήματος των σωματιδίων αραιώνονται σε 5,175ml διαλύματος εργασίας.
- ❖ **Διάλυμα αντισωμάτων ανίχνευσης:** Διαλυτοποιούνται 300μl αντισώματος ανίχνευσης σε 2,7ml διαλύματος εναιώρησης των αντισωμάτων ανίχνευσης.
- ❖ **Διάλυμα 100x Στρεπταβιδίνη-PE:** Διαλυτοποιούνται 60μl στρεπταβιδίνη-PE σε 5,94 ml διαλύματος εργασίας. Το διάλυμα αυτό παρασκευάζεται 10min πριν τη χρήση και προστατεύεται από το φως.

Πειραματική διαδικασία

Για τα πειράματά μας δεν χρησιμοποιήσαμε κάποιο έτοιμο εμπορικό kit αλλά κάναμε την πλέξη των δεικτών στον πάγο. Οι δείκτες που επιλέξαμε να μελετήσουμε είναι οι εξής: **IL-1β**, **IL-8**, **GM-CSF** (διεγερτικός παράγοντας κοκκιοκυττάρων-μακροφάγων), **RANTES**, **VEGF** (αυξητικός παράγοντας ενδοθηλιακών κυττάρων του αγγείου).

1. Χρησιμοποιούνται δείγματα πλάσματος τα οποία αμέσως μετά την παρασκευή τους (εντός τριών h από την αιμοληψία) τοποθετούνται στους -80°C . Γίνεται απόψυξη και καλή ομογενοποίηση των δειγμάτων
2. Φυγοκέντρωση στις $1000 \times g$ για 10min στους 4°C για την απομάκρυνση ιζημάτων.
3. Αραίωση $\frac{1}{4}$ των δειγμάτων με το διάλυμα εναιώρησης. Αναμιγνύουμε με την πιπέτα ώστε να έχουμε ένα καλά ομογενοποιημένο δείγμα.
4. Παρασκευή πρότυπων διαλυμάτων σύμφωνα με το παρακάτω σχήμα:

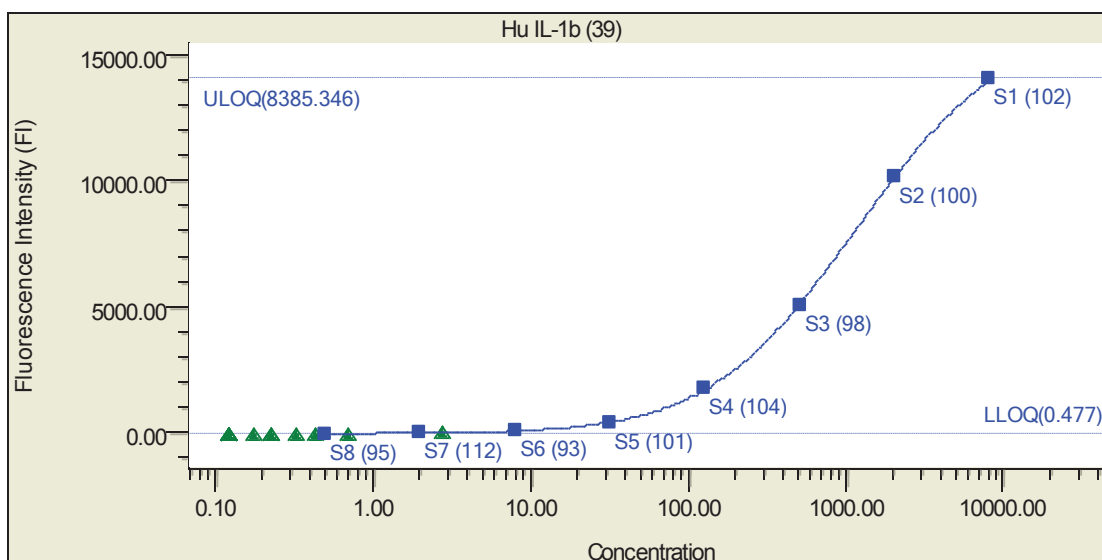


5. Στη συνέχεια σε ένα άλλο πλακίδιο 96 θέσεων (ειδικό μαύρο) τοποθετούμε 50μl από το εναιώρημα μαγνητικών σωματιδίων σε κάθε θέση.

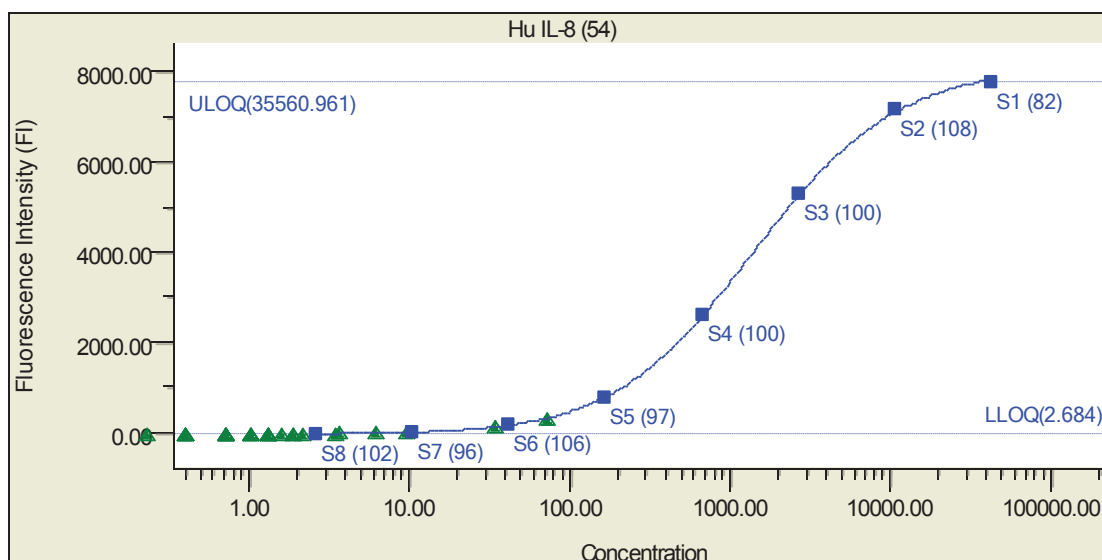
6. Πλύση 2 φορές σε πλαστικό μηχάνημα (Bio Plex wash station) για την απομάκρυνση πιθανής περίσσειας χρωμοφόρων ομάδων.
7. Μεταφέρουμε 50μl από τα πρότυπα και τα δείγματα του προηγούμενου πλακιδίου στο πλακίδιο που είχαμε τοποθετήσει τα μαγνητικά μικροσφαιρίδια και επωάζουμε για 30 min σε θερμοκρασία δωματίου υπό ανάδευση 850 ± 50 rpm, στο σκοτάδι.
8. Πλύση 3 φορές στο Bio Plex wash station.
9. Προσθέτουμε 25μl από το διάλυμα ανίχνευσης αντισώματος σε κάθε θέση του πλακιδίου και επωάζουμε για 30min σε θερμοκρασία δωματίου υπό ανάδευση 850 ± 50 rpm.
10. Ακολουθεί πλύση 3 φορές στο Bio Plex wash station.
11. Προσθέτουμε 50μl διαλύματος στρεπταβιδίνης-PE σε κάθε θέση του πλακιδίου και επωάζουμε για 10 min σε θερμοκρασία δωματίου, στο σκοτάδι.
12. Ακολουθεί πλύση 3 φορές στο Bio Plex wash station.
13. Προσθέτουμε 125μl διαλύματος εργασίας σε κάθε θέση του πλακιδίου. Η πλάκα ανακινείται ήπια για 1min σε θερμοκρασία δωματίου και μεταφέρεται στον μετρητή για ανάλυση.

Επεξεργασία των αποτελεσμάτων

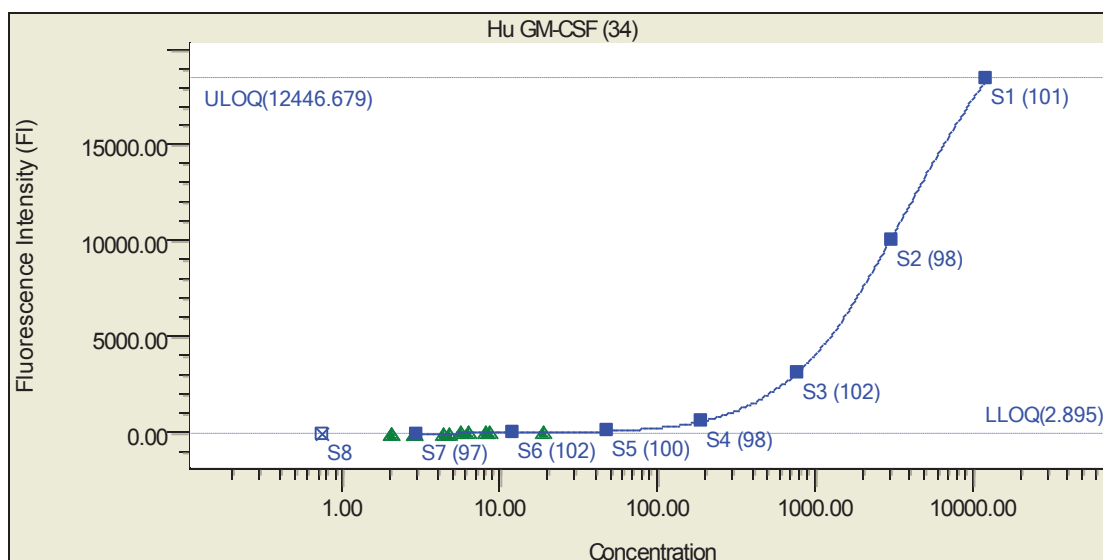
Με τη βοήθεια των πρότυπων διαλυμάτων κατασκευάζονται οι πρότυπες καμπύλες για κάθε αναλυτέα ουσία. Από τις καμπύλες υπολογίζονται οι συγκεντρώσεις των δειγμάτων. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως συγκέντρωση σε pg/ml. Στις εικόνες 5.3-5.6 παρουσιάζονται οι πρότυπες καμπύλες δια μέσου των οποίων προσδιορίσαμε τα επίπεδα των συγκεντρώσεων της κάθε ουσίας στα δείγματα μας.



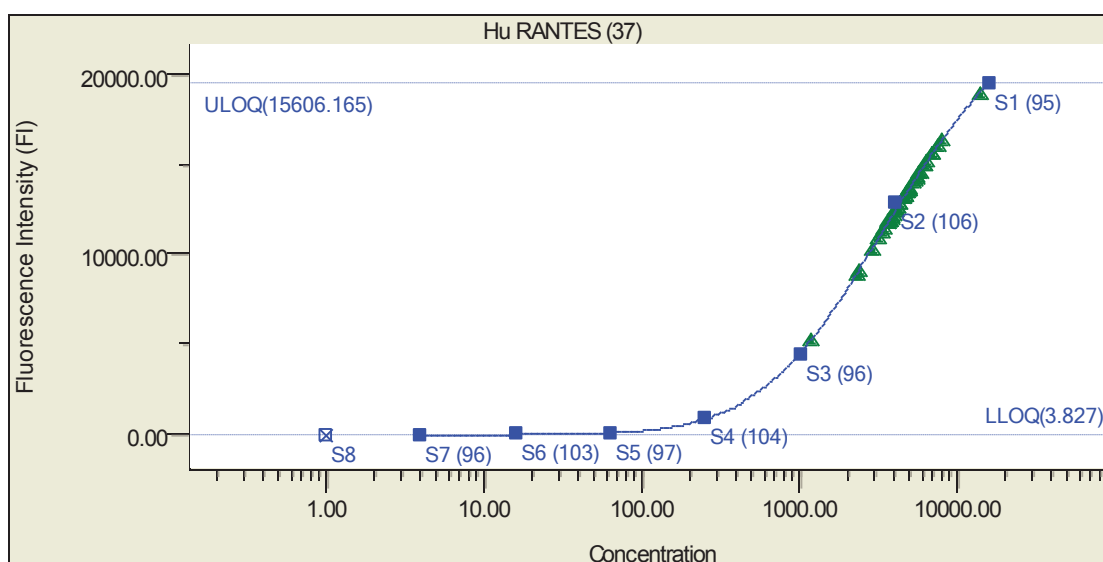
Εικόνα 5.3. Πρότυπη καμπύλη της IL-1b στην οποία απεικονίζονται οι συγκεντρώσεις των δειγμάτων.



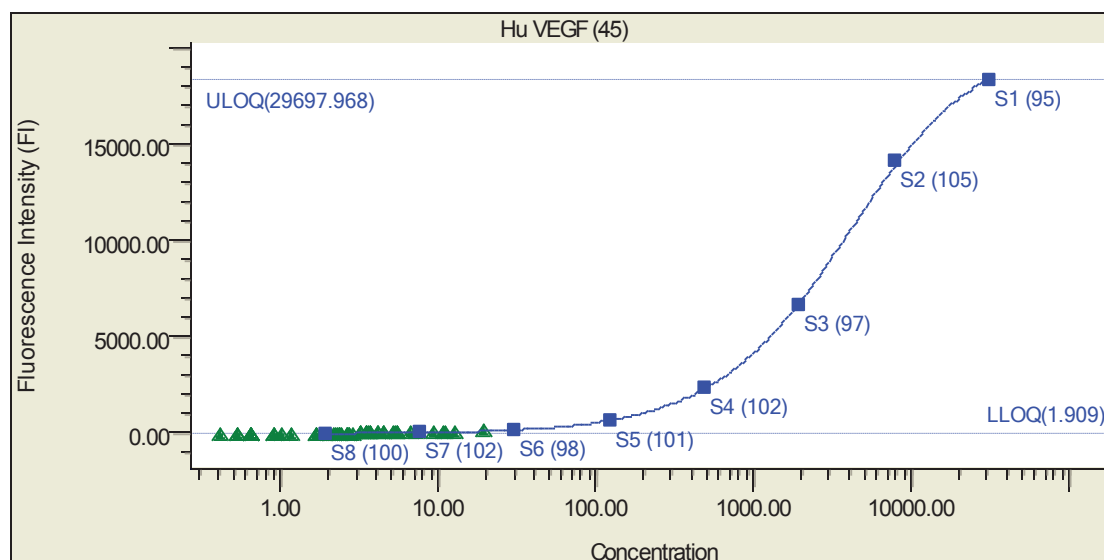
Εικόνα 5.4. Πρότυπη καμπύλη της IL-8 στην οποία απεικονίζονται οι συγκεντρώσεις των δειγμάτων.



Εικόνα 5.5. Πρότυπη καμπύλη του GM-CSF στην οποία απεικονίζονται οι συγκεντρώσεις των δειγμάτων.



Εικόνα 5.5. Πρότυπη καμπύλη του RANTES στην οποία απεικονίζονται οι συγκεντρώσεις των δειγμάτων.



Εικόνα 5.6. Πρότυπη καμπύλη του VEGF στην οποία απεικονίζονται οι συγκεντρώσεις των δειγμάτων.

6. Μέθοδος ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay)

Αρχή της μεθόδου

Η ELISA είναι μία βιοχημική τεχνική που χρησιμοποιείται κυρίως στην ανοσολογία για την ανίχνευση της παρουσίας ενός αντισώματος ή αντιγόνου σε ένα δείγμα. Οι τεχνικές της ELISA μπορούν να χρησιμοποιηθούν τόσο για ποσοτική όσο για ποιοτική ανάλυση. Η ποιοτική ανάλυση παρέχει απλά ενδείξεις για την ύπαρξη θετικού ή αρνητικού αποτελέσματος σε ένα δείγμα. Η ποσοτική ανάλυση στηρίζεται στη μέτρηση της απορρόφησης ή οπτικής πυκνότητας (OD) του δείγματος και στη σύγκριση αυτής με μια πρότυπη καμπύλη προκειμένου να προσδιοριστεί η συγκέντρωση του αντιγόνου ή αντισώματος στο δείγμα.

Για την ποσοτική μέτρηση της αλληλεπίδρασης αντιγόνου-αντισώματος έχουν χρησιμοποιηθεί διάφοροι τρόποι επισήμανσης που επιτρέπουν την ανίχνευση του μορίου που μας ενδιαφέρει. Έτσι έχουμε:

- α) Επισήμανση με ραδιενέργεια (ραδιοανοσολογικός προσδιορισμός –RIA)
- β) Επισήμανση με ένζυμο (ανοσοενζυμικός προσδιορισμός-EIA)

γ) Χρήση φθορίζοντων συστατικών, ως ιχνηθετών, μαζί με υποστρώματα που προκαλούν φθορισμό (φθορισμομετρικός προσδιορισμός-FIA)

Η παραπάνω τεχνική απαιτεί τη βοήθεια ειδικού φασματοφωτομέτρου τύπου ELISA (Εικόνα 6.1).



Εικόνα 6.1 Φασματοφωτομέτρου τύπου ELISA

6.1. Ανοσοενζυμικός προσδιορισμός του TxB_2

Ο ποσοτικός προσδιορισμός του TxB_2 (σταθερό καταβολικό προϊόν του TxA_2) στο πλάσμα έγινε με ανοσοενζυμικό προσδιορισμό μέθοδο (EIA) χρησιμοποιώντας αντιδραστήρια της εταιρείας R and D.

Αρχή της μεθόδου: Η αρχή στην οποία στηρίζεται ο ποσοτικός προσδιορισμός των επιπέδων του TxB_2 στο πλάσμα είναι η τεχνική της ανταγωνιστικής πρόσδεσης στην οποία το TxB_2 που βρίσκεται στο πλάσμα ανταγωνίζεται το HRP (horseradish peroxidase) για τις λίγες θέσεις πρόσδεσης στο μονοκλωνικό αντίσωμα ποντικού. Το TxB_2 του δείγματος προσδένεται στο αντίσωμα κατά την πρώτη επώαση ενώ το HRP καταλαμβάνει τις υπόλοιπες θέσεις πρόσδεσης κατά τη δεύτερη επώαση. Ακολουθεί πλύση για την απομάκρυνση των αντισωμάτων που δεν έχουν προσδεθεί. Για τον προσδιορισμό της ενεργότητας του ενζύμου προστίθεται διάλυμα υποστρώματος. Η ανάπτυξη του χρώματος σταματά και η απορρόφηση μετράται στα 450 nm. Η ένταση του χρώματος είναι αντιστρόφως ανάλογη με τη συγκέντρωση του TxB_2 στο δείγμα.

Αντιδραστήρια

- Πρότυπο διάλυμα TxB_2 , 200ng σε λυοφυλιωμένη μορφή
- Διάλυμα έκπλυσης 10x, 100 ml από πυκνό διάλυμα επιφανειοδραστικού

- Calibrator Diluent RD5-57, 2 φιαλίδια (21 ml/φιαλίδιο)
- Συζυγές TxB₂, 6 ml από TxB₂ συζευγμένου με υπεροξειδάση κρένου με κόκκινη χρωστική και συντηρητικά
- Διάλυμα πρωτογενούς αντισώματος, 6 ml μονοκλωνικού αντισώματος ποντικού για το TxB₂ με μπλε χρωστική και συντηρητικά
- Έγχρωμο αντιδραστήριο A, 12 ml από σταθεροποιημένο υπεροξείδιο του υδρογόνου
- Έγχρωμο αντιδραστήριο B, 12 ml από σταθεροποιημένο χρωμογόνο (τετραμεθυλβενζιδίνη)
- Διάλυμα τερματισμού, 11 ml από 2N θειικού οξέος

Όργανα

- Φασματοφωτόμετρο τύπου ELISA (MicroELISA Reader: Infinite 200 PRO, TECAN)
- Ανακινούμενη βάση
- Οκτακάναλη πολυπιπέτα μεταβαλλόμενου όγκου

Διαλύματα εργασίας

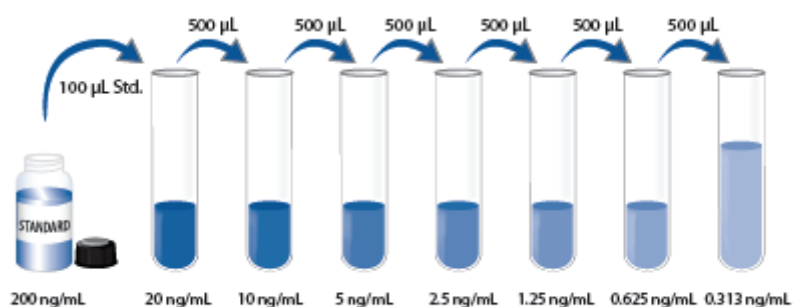
- **Διάλυμα έκπλυσης:** Αραίωση (1:10) του διαλύματος πλύσης με απεσταγμένο νερό.
- **Διάλυμα υποστρώματος:** Αναμιγνύονται ίσες ποσότητες από το έγχρωμο αντιδραστήριο A και το έγχρωμο αντιδραστήριο B. Το έγχρωμο αντιδραστήριο A περιέχει 12 ml σταθεροποιημένου υπεροξειδίου του υδρογόνου και το έγχρωμο αντιδραστήριο B 12 ml σταθεροποιημένου χρωμογόνου (τετραμεθυλβενζιδίνης). Το διάλυμα χρησιμοποιείται μέσα σε 15 min από την παρασκευή του.

Προετοιμασία δειγμάτων

Σε όλα τα δείγματα γίνεται 1:2 αραίωση χρησιμοποιώντας το Calibrator Diluent RD5-57 που παρέχεται από το kit.

Πρότυπη καμπύλη

Γίνεται ανασύσταση του πρότυπου διαλύματος του TxB₂ με 1 ml Calibrator Diluent RD5-57 ώστε να παρασκευαστεί διάλυμα με συγκέντρωση 200 ng/ml. Οι διαδοχικές αραιώσεις πραγματοποιούνται μετά από 15 min από την ανασύσταση του διαλύματος. Οι αραιώσεις γίνονται σύμφωνα με το παρακάτω σχήμα:



Πειραματική διαδικασία

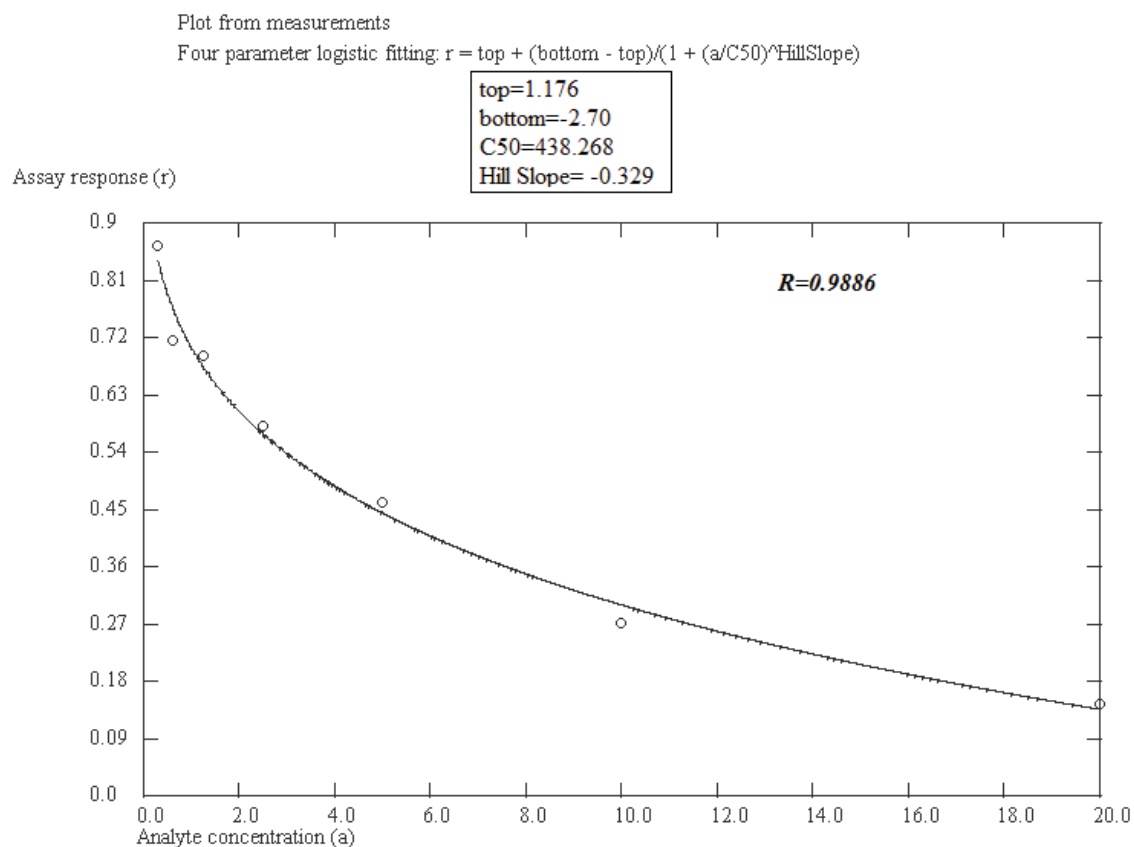
1. Όλα τα αντιδραστήρια θα πρέπει να έρθουν σε θερμοκρασία δωματίου.
2. Προσθέτουμε 150 µl από το Calibrator Diluent RD5-57 στα πηγαδάκια (wells) για τη μη ειδική πρόσδεση (NSB:Non-specific binding).
3. Προσθέτουμε 100 µl από το Calibrator Diluent RD5-57 για το τυφλό (B_0 well).
4. Προσθέτουμε 100 µl από τα πρότυπα και τα δείγματα στα υπόλοιπα πηγαδάκια.
5. Προσθέτουμε 50 µl από το πρωτογενές αντίσωμα σε όλα τα πηγαδάκια εκτός από τα πηγαδάκια για τη μη ειδική πρόσδεση. Όλα τα πηγαδάκια εκτός από τα πηγαδάκια τη μη ειδική πρόσδεση χρωματίζονται μπλε.
6. Επώαση για 2 h σε θερμοκρασία δωματίου και υπό ανάδευση στα 500 rpm $\pm$ 50 rpm.
7. Προσθέτουμε 50 µl από το συζυγές TxB₂ σε όλα τα πηγαδάκια, τα οποία χρωματίζονται μωβ (εκτός από τα πηγαδάκια με τη μη ειδική πρόσδεση που χρωματίζεται ροζ).
8. Επώαση για 1 h σε θερμοκρασία δωματίου και υπό ανάδευση στα 500 rpm $\pm$ 50 rpm.
9. Πλύση 4 φορές με το διάλυμα έκπλυσης. Μετά την τελευταία πλύση, στεγνώνουμε καλά την πλάκα μικροτιτλοδότησης.
10. Προσθέτουμε 200 µl από το διάλυμα υποστρώματος σε κάθε well. Επώαση για 30 min σε θερμοκρασία δωματίου προστατεύοντας την πλάκα μικροτιτλοδότησης από την έκθεσή της στο φως.
11. Προσθέτουμε 100 µl από το διάλυμα τερματισμού σε κάθε πηγαδάκι και αναδεύουμε ήπια.
12. Μετρούμε την οπτική απορρόφηση στα 450 nm σε κάθε πηγαδάκι μέσα σε 30 min.

Υπολογισμός αποτελεσμάτων

1. Βρίσκουμε τον μέσο όρο των οπτικών απορροφήσεων για τα πρότυπα και τα δείγματα.

2. Αφαιρούμε την απορρόφηση από τα πηγαδάκια με τη μη ειδική πρόσδεση από τα πρότυπα και τα δείγματα.
3. Κατασκευάζουμε την πρότυπη καμπύλη επιλέγοντας τον τύπο παλινδρόμησης ώστε να είναι αυτός των τεσσάρων παραμέτρων.

Η πρότυπη καμπύλη που χρησιμοποιήσαμε για τον υπολογισμό της συγκέντρωσης των δειγμάτων μας φαίνεται στην εικόνα 6.2.



Εικόνα 6.2. Πρότυπη καμπύλη επιλέγοντας τον τύπο παλινδρόμησης ώστε να είναι αυτός των τεσσάρων παραμέτρων.

6.2. Ανοσοενζυμικός προσδιορισμός του 11- δεϋδρο TxB₂ στα ούρα

Ο προσδιορισμός του 11-δεϋδρο θρομβοξανίου B₂ πραγματοποιήθηκε σε δείγματα ούρων με τη βοήθεια του σχετικού εμπορικού kit Cayman Chemical Company.

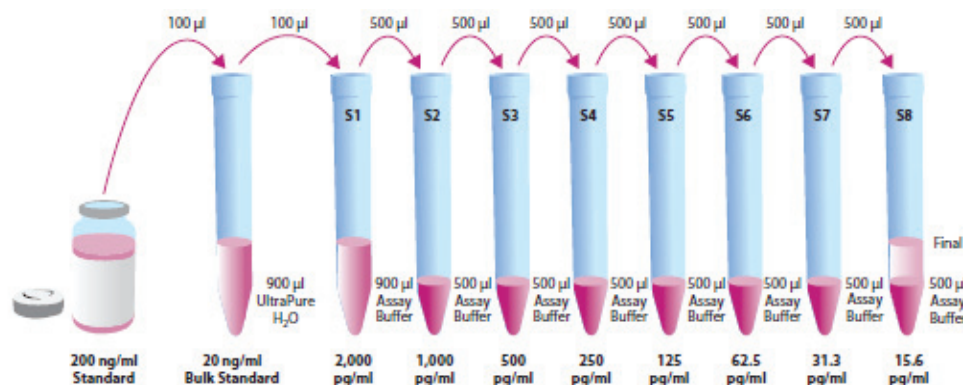
Αρχή της μεθόδου: Η μέθοδος αυτή βασίζεται στον ανταγωνισμό μεταξύ του ελεύθερου TxB₂ και του συμπλέγματος της 11-δεϋδρο ακετυλοχολινεστεράσης (AchE) για έναν περιορισμένο αριθμό περιοχών πρόσδεσης του 11-δεϋδρο-ειδικού μονοκλωνικού αντισώματος. Η συγκέντρωση του ιχνοθέτη είναι σταθερή ενώ η συγκέντρωση του ελεύθερου TxB₂ ποικίλλει. Συνεπώς, η ποσότητα του tracer που θα μπορέσει να προσδεθεί στο 11-δεϋδρο μονοκλωνικό αντίσωμα θα είναι αντιστρόφως ανάλογη με την συγκέντρωση του ελεύθερου TxB₂ σε κάθε πηγαδάκι (well). Το σύμπλεγμα μονοκλωνικό αντίσωμα- 11-δεϋδρο θρομβοξανίου B₂ (είτε ελεύθερο ή ιχνοθετημένου) προσδένεται στο ακινητοποιημένο σε κάθε πηγαδάκι του IgG πολυκλωνικού αντι-ποντικού αντισώματος. Με τις πλύσεις απομακρύνεται ό,τι δε δεσμεύτηκε και έπειτα προστίθεται το αντιδραστήριο Ellman's το οποίο περιέχει το υπόστρωμα της ακετυλοχολινεστεράσης. Το προϊόν αυτής της αντίδρασης έχει ένα έντονο κίτρινο χρώμα που απορροφά ισχυρά στα 412 nm. Η ένταση του χρώματος προσδιορίζεται φασματοφωτομετρικά και είναι ανάλογο με την ποσότητα του ιχνοθέτη που έχει προσδεθεί σε κάθε πηγαδάκι το οποίο είναι αντιστρόφως ανάλογο με την ποσότητα του ελεύθερου TxB₂ που υπάρχει στο κάθε πηγαδάκι.

Αντιδραστήρια

- Διάλυμα εργασίας 11-δεϋδρο TxB₂
- Διάλυμα έκπλυσης
- Ιχνοθέτης
- Αντίσωμα
- Υπερκαθαρό νερό

Διαλύματα εργασίας

- **Διάλυμα εργασίας 11-δεϋδρο TxB₂:** Διάλυση με 90 ml υπερκαθαρού νερού
- **Διάλυμα έκπλυσης:** Διάλυση των 5 ml σε 2 L και προσθήκη 1 ml πολυσορβικού 20
- **Ιχνοθέτης:** Ανασύσταση του 100 dtn vial με 6 ml διαλύματος εργασίας.
- **Αντίσωμα:** Ανασύσταση του 100 dtn vial με 6 ml διαλύματος εργασίας.
- **Πρότυπο διάλυμα:** Τα πρότυπα διαλύματα παρασκευάζονται όπως φαίνεται στην εικόνα. Επωάζονται για 2h σε θερμοκρασία δωματίου.



Όργανα

- Φασματοφωτόμετρο τύπου ELISA (MicroELISA Reader: Infinite 200 PRO, TECAN)
- Ανακινούμενη βάση
- Οκτακάναλη πολυπιπέτα μεταβαλλόμενου όγκου

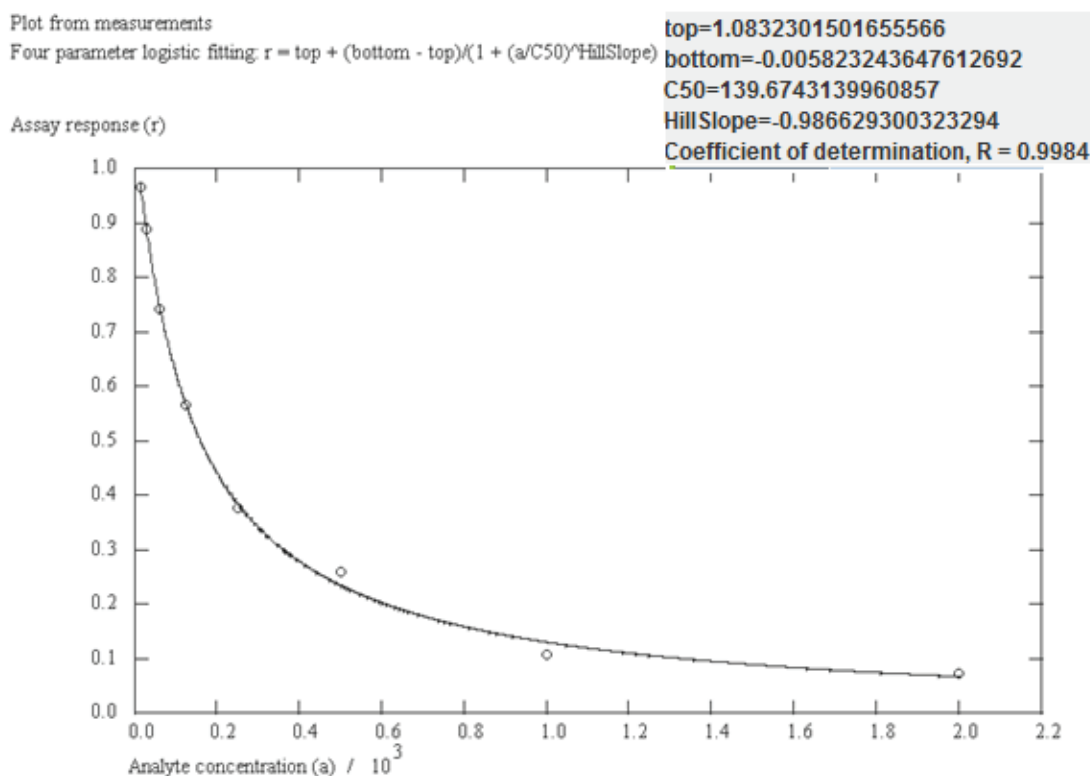
Πειραματική διαδικασία

1. Προστίθενται 100 µl διαλύματος εργασίας, στα πηγαδάκια που προορίζονται για τη μη ειδική πρόσδεση και 50 µl στα πηγαδάκια που προορίζονται για το B₀.
2. Προστίθενται 50 µl από κάθε πρότυπο και δείγμα στα καθορισμένα πηγαδάκια.
3. Προσθήκη 50 µl από το διάλυμα ιχνοθέτη σε όλα τα wells, συμπεριλαμβανομένων των B₀ και των NSB.
4. Προσθήκη 50 µl από το αντίσωμα στα πηγαδάκια των B₀, των προτύπων και των δειγμάτων
5. Επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 2 h υπό ανάδευση στα 100 rpm
6. Τα πηγαδάκια πλένονται 5 φορές με το διάλυμα έκπλυσης.
7. Προστίθενται 5 µl του διαλύματος ιχνοθέτη στα πηγαδάκια που προορίζονται για το TA.
8. Προστίθενται 200 µl του διαλύματος Ellman's σε όλα τα πηγαδάκια.
9. Επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για περίπου 60-90 min υπό ήπια ανάδευση στα 100 rpm
10. Μετράται η απορρόφηση όλων των κελιών στα 405-420 nm.

Υπολογισμός αποτελεσμάτων

- Βρίσκουμε τον μέσο όρο των οπτικών απορροφήσεων για τα πρότυπα και τα δείγματα.
- Αφαιρούμε την απορρόφηση από τα πηγαδάκια με τη μη ειδική πρόσδεση από τα πρότυπα και τα δείγματα → διορθωμένη τιμή για τη μέγιστη πρόσδεση
- Αφαιρούμε τη μη ειδική πρόσδεση από τα πρότυπα και τα δείγματα και διαιρούμε με τη διορθωμένη τιμή για τη μέγιστη πρόσδεση
- Κατασκευάζουμε την πρότυπη καμπύλη επιλέγοντας τον τύπο παλινδρόμησης ώστε να είναι αυτός των τεσσάρων παραμέτρων.

Η πρότυπη καμπύλη που χρησιμοποιήσαμε για τον υπολογισμό της συγκέντρωσης των δειγμάτων μας φαίνεται στην εικόνα 6.3.



Εικόνα 6.3. Πρότυπη καμπύλη επιλέγοντας τον τύπο παλινδρόμησης ώστε να είναι αυτός των τεσσάρων παραμέτρων

6.3. Ανοσοενζυμικός προσδιορισμός της διαλυτής P-σελεκτίνης

Ο ποσοτικός προσδιορισμός της διαλυτής P-σελεκτίνης (sP-σελεκτίνης) στο πλάσμα έγινε με ανοσοενζυμική μέθοδο (EIA) χρησιμοποιώντας αντιδραστήρια της εταιρείας invitrogen.

Αρχή της μεθόδου: Η αρχή της μεθόδου βασίζεται στο αντι-sP-σελεκτίνη μονοκλωνικό αντίσωμα που είναι ακινητοποιημένο στα πηγαδάκια και στην πρόσδεση της διαλυτής P-σελεκτίνης που βρίσκεται στο δείγμα ή στο πρότυπο στο αντίσωμα αυτό. Ένα δευτερογενές HRP-συζευγμένο μονοκλωνικό αντι-sP-σελεκτίνης αντίσωμα προστίθεται και δεσμεύεται από τη sP-σελεκτίνη που έχει προσδεθεί με το πρωτογενές αντίσωμα. Μετά την επώαση, το μη δεσμευμένο ένζυμο που είναι συζευγμένο με το δευτερογενές αντίσωμα αντι-sP-σελεκτίνη απομακρύνεται στο στάδιο της πλύσεως και προστίθεται ένα διάλυμα υποστρώματος που αντιδρά με το HRP διάλυμα. Σχηματίζεται ένα έγχρωμο προϊόν ανάλογα με την ποσότητα της sP-σελεκτίνης που υπάρχει στο δείγμα ή στο πρότυπο. Η αντίδραση τερματίζεται με την προσθήκη οξέος, και με την μέτρηση της απορρόφησης στα 450nm. Κατασκευάζεται μια πρότυπη καμπύλη απορρόφησης συναρτήσει της συγκέντρωσης των επτά πρότυπων δειγμάτων sP-σελεκτίνης.

Αντιδραστήρια

- HRP-Συζυγές αντι-sP-σελεκτίνης μονοκλωνικό αντίσωμα, 0,06 ml
- Διάλυμα εργασίας 20x (PBS με 1% Tween 20 και 10% BSA), 5 ml
- Διάλυμα έκπλυσης 20x (PBS με 1% Tween 20), 50 ml
- Πρότυπο διάλυμα διαλυτής P-σελεκτίνης 80 ng/ml
- Διάλυμα υποστρώματος (TMB), 15 ml
- Διάλυμα τερματισμού (1M φωσφορικού οξέος), 15ml

Διαλύματα εργασίας

- **Διάλυμα έκπλυσης:** Εάν έχουν σχηματιστεί κρύσταλλοι στο πυκνό διάλυμα έκπλυσης, πρέπει να ζεσταθεί ελαφρά μέχρις ότου να διαλυθούν εντελώς. Μεταφέρεται ολόκληρο το περιεχόμενο (50 ml) του διαλύματος έκπλυσης σε ένα καθαρό ογκομετρικό κύλινδρο των 1000 ml και προστίθεται απεσταγμένο νερό μέχρι τελικό όγκο 1000 ml. Το διάλυμα αναμιγνύεται απαλά για να αποφευχθεί ο αφρισμός. Το pH του τελικού διαλύματος ρυθμίζεται σε 7,4.
- **Διάλυμα εργασίας:** Το διάλυμα εργασίας που παρέχεται από το kit προστίθεται σε 95 ml απεσταγμένο ή απιονισμένο νερό, και αναμειγνύουμε ελαφρά για να αποφευχθεί ο σχηματισμός αφρού.
- **Πρότυπο διάλυμα διαλυτής P-σελεκτίνης:** Γίνεται ανασύσταση του πρότυπου διαλύματος της sP-σελεκτίνης με 330 ml απεσταγμένου νερού σύμφωνα με το kit. Αναδεύουμε το μίγμα μέχρι να διαλυθεί πλήρως.

■ **Διάλυμα HRP-Συζυγές αντισώματος:** Αραιώνουμε (1:100) το HRP-αντίσωμα με το διάλυμα εργασίας μόλις πριν από τη χρήση σε ένα καθαρό πλαστικό δοκιμαστικό σωλήνα, καθώς θα πρέπει να χρησιμοποιηθεί εντός 30 min μετά την αραιώση.

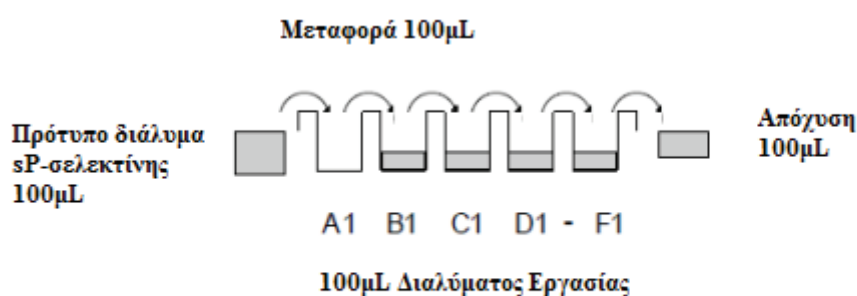
Όργανα

- Φασματοφωτόμετρο τύπου ELISA (MicroELISA Reader: Infinite 200 PRO, TECAN)
- Ανακινούμενη βάση
- Οκτακάναλη πολυπιπέτα μεταβαλλόμενου όγκου
- Πεχάμετρο

Πειραματική διαδικασία

Προετοιμασία δειγμάτων: Σε όλα τα δείγματα γίνεται 1:10 αραιώση χρησιμοποιώντας το διάλυμα εργασίας που παρέχεται από το kit.

1. Η μικροπλάκα τιτλοδότησης πλένεται τρεις φορές με περίπου 300 µl διαλύματος έκπλυσης ανά πηγαδάκι προσεχτικά.
2. Μετά την τελευταία πλύση, τα άδεια πηγαδάκια στεγνώνονται καλά και χρησιμοποιούνται αμέσως μετά την πλύση.
3. Προστίθενται 100 µl διαλύματος εργασίας, σε όλα τα πηγαδάκια με τα πρότυπα, δημιουργώντας διαδοχικές αραιώσεις που κυμαίνονται από 40 έως 0,63 ng/ml σύμφωνα με το παρακάτω σχήμα:

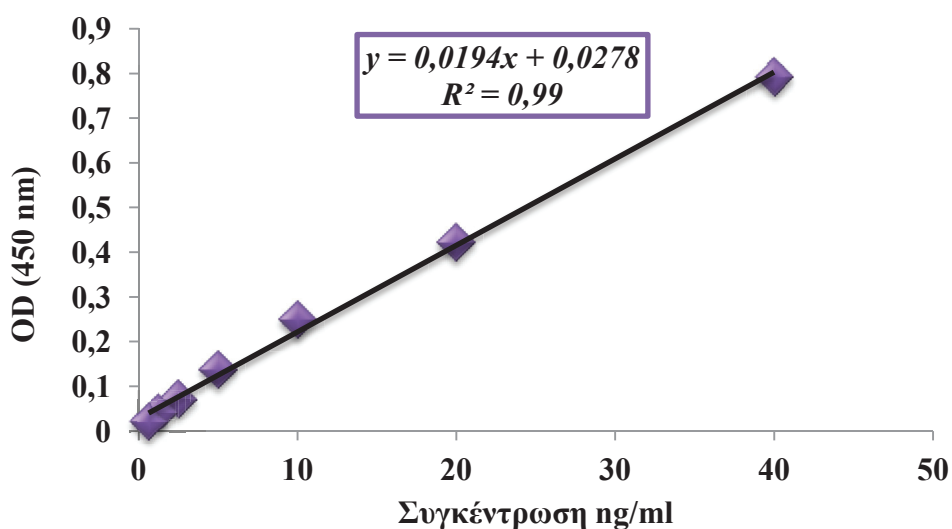


4. Προστίθενται 100 µl διαλύματος εργασίας, στα πηγαδάκια με τα τυφλά.
5. Προστίθενται 90 µl διαλύματος εργασίας, στα πηγαδάκια με τα δείγματα.
6. Προστίθενται 10 µl από κάθε δείγμα στα καθορισμένα πηγαδάκια.
7. Ετοιμάζεται το HRP-Conjugate όπως περιγράφηκε προηγουμένως.
8. Προσθήκη 50 µl από το διάλυμα HRP-Conjugate σε όλα τα πηγαδάκια, συμπεριλαμβανομένων των τυφλών.

9. Επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 2h υπό ανάδευση στα 100 rpm
10. Τα πηγαδάκια πλένονται 3 φορές με το διάλυμα έκπλυσης.
11. Προστίθενται 100 µl του διαλύματος TMB υποστρώματος σε όλα τα πηγαδάκια, συμπεριλαμβανομένου και των τυφλών.
12. Επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για περίπου 15 min υπό ανάδευση στα 100 rpm.
13. Σταματάει η αντίδραση του ενζύμου προσθέτοντας το διάλυμα τερματισμού σε όλα τα πηγαδάκια, συμπεριλαμβανομένων και των τυφλών.
14. Μετράται άμεσα η απορρόφηση των προτύπων και των δειγμάτων στα 450 nm.

Υπολογισμός αποτελεσμάτων:

1. Βρίσκουμε τον μέσο όρο των οπτικών απορροφήσεων για τα πρότυπα και τα δείγματα.
2. Δημιουργία της πρότυπης καμπύλης της απορρόφησης συναρτήσει της συγκέντρωσης της sP-σελεκτίνης (Εικόνα 6.4).

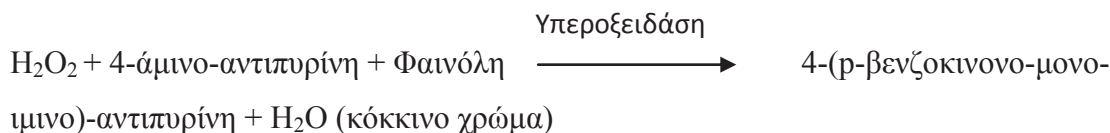
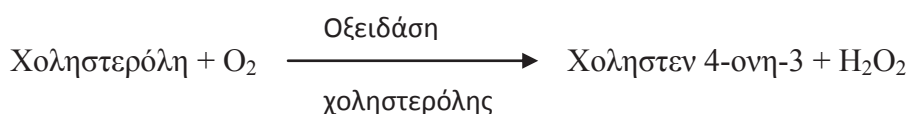
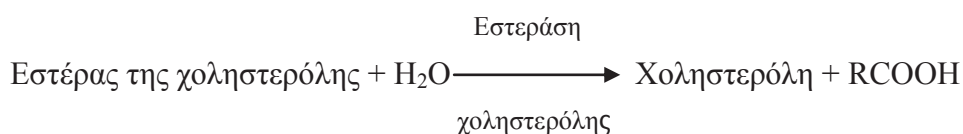


Εικόνα 6.4. Κατασκευή της πρότυπης καμπύλης.

7. Ενζυμικός φωτομετρικός προσδιορισμός της ολικής χοληστερόλης

Αρχή της μεθόδου

Η αρχή του ενζυμικού φωτομετρικού προσδιορισμού φαίνεται παρακάτω:



Αντιδραστήρια- Όργανα

R1: Διάλυμα μίγματος αντιδρώντων, ενζύμων και ρυθμιστικού διαλύματος των ανωτέρω αντιδράσεων: περιέχει ρυθμιστικό διάλυμα 100 mM φωσφορικών pH 6.5, 5 mM φαινόλη, 0,25 mM 4-αμινο-αντιπυρίνη, ≥ 150 U/L εστεράση της χοληστερόλης, ≥ 100 KU/L οξειδάση της χοληστερόλης, ≥ 5 KU/L υπεροξειδάση

R2: Πρότυπο χοληστερόλης, 200 mg/100 ml (5.17 mM)

■ Φασματοφωτόμετρο τύπου ELISA (MicroELISA Reader: Infinite 200 PRO, TECAN)

Πειραματική διαδικασία

1. Προσθέτουμε τα αντιδραστήρια όπως φαίνονται στον παρακάτω πίνακα:

	Τυφλό	Πρότυπο	Δείγμα
Πρότυπο (1:10 Φ.Ο.)		20 μ l	
Δείγμα (1:10 Φ.Ο.)			20 μ l
Αντιδραστήριο εργασίας	200 μ l	200 μ l	200 μ l

2. Αναδεύουμε και επωάζουμε για 5 min στους 37 °C

3. Μετρούμε τις απορροφήσεις στα 510 nm

Υπολογισμός αποτελεσμάτων

Ο ενζυμικός προσδιορισμός της συγκέντρωσης της χοληστερόλης δίνεται από την παρακάτω σχέση:

$$\text{Χοληστερόλη, mg/100 ml} = 200 \times \frac{A (\text{δείγμα})}{A (\text{πρότυπο})}$$

8. Προσδιορισμός HDL χοληστερόλης

Αρχή της μεθόδου

Τα χυλομικρά, οι πολύ χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνες (VLDL) και οι χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνες (LDL) καταβυθίζονται με την προσθήκη φωσφοβολφραμικού οξέος και ιόντων μαγνησίου στο δείγμα. Μετά από φυγοκέντρηση παραμένει στο υπερκείμενο μόνο η υψηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνη (HDL), στο οποίο η ποσότητα της χοληστερόλης προσδιορίζεται ενζυμικά.

Αντιδραστήρια - Όργανα

R₁: Φωσφοβολφραμικό οξύ 14 mmol/L

R₂: Χλωριούχο μαγνήσιο 1 mmol/L

Πρότυπο διάλυμα: Διάλυμα χοληστερόλης 200 mg/100ml

Αντιδραστήριο καταβύθισης: Αναμιγνύονται 4 όγκοι R₁ με ένα όγκο R₂

■ Φασματοφωτόμετρο τύπου ELISA (MicroELISA Reader: Infinite 200 PRO, TECAN)

Πειραματική διαδικασία

1. Καταβυθίζουμε τα χυλομικρά, τις VLDL και τις LDL αναμιγνύοντας 200 μl δείγματος και 20 μl αντιδραστηρίου καταβύθισης.
2. Αναδεύουμε και επωάζουμε για 10 min σε θερμοκρασία δωματίου
3. Φυγοκεντρούμε για 2 min σε 12.000 rpm
4. Στο υπερκείμενο προσδιορίζουμε τη χοληστερόλη σύμφωνα με τον παρακάτω πίνακα:

	Τυφλό	Πρότυπο	Δείγμα
Φυσιολογικός ορός	20μl		
Πρότυπο χοληστερόλης		20μl	
Υπερκείμενο			20μl
Αντιδραστήριο χοληστερόλης	200μl	200μl	200μl

5. Αναδεύουμε και επωάζουμε για 5 min στους 37 °C
6. Μετρούμε την απορρόφηση στα 510 nm

Υπολογισμός HDL χοληστερόλης:

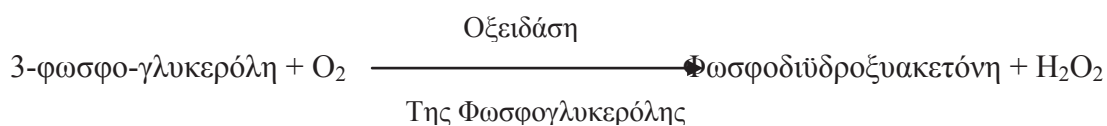
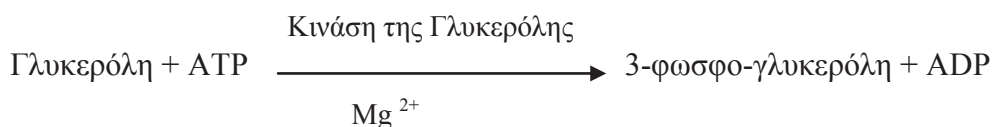
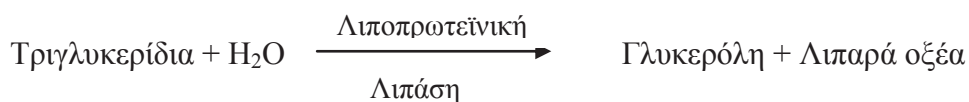
$$\frac{\text{Α δείγματος}}{\text{Α προτύπου}} \times 200 : 10 \times 1.1$$

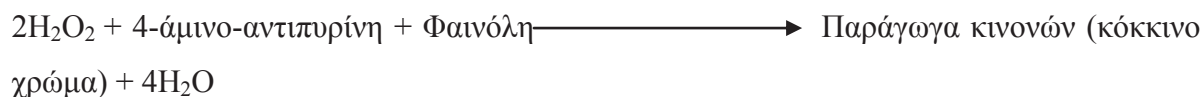
Σημείωση: Ο συντελεστής 1:1 εκφράζει την αραίωση λόγω της προσθήκης του αντιδραστηρίου καταβύθισης

9. Προσδιορισμός τριγλυκεριδίων

Αρχή της μεθόδου

Η ενζυμική φωτομετρική μέθοδος προσδιορισμού τριγλυκεριδίων στηρίζεται στην παρακάτω σειρά αντιδράσεων:





Αντιδραστήρια - Όργανα

R₁: Ρυθμιστικό διάλυμα που περιέχει 50 mM Tris pH 7.5, 5mM 4- χλωροφαινόλη, 4,5 mM MgCl₂, 2 mM ATP, $\geq 1,3$ U/ml λιπάση, $\geq 0,5$ U/ml Υπεροξειδάση $\geq 0,4$ U/ml γλυκεροκινάση, 0,05% οξείδιο του νατρίου 0,25 mM 4-αμινο αντιπυρίνη $\geq 1,5$ U/ml οξειδάση της 3 φωσφορικής διυδροξυακετόνης

R₂: Πρότυπο διάλυμα τριγλυκεριδίων 200 mg/dl

■ Φασματοφωτόμετρο τύπου ELISA (MicroELISA Reader: Infinite 200 PRO, TECAN)

Πειραματική διαδικασία

1. Προσθέτουμε τα αντιδραστήρια όπως φαίνονται στον παρακάτω πίνακα:

	Τυφλό	Πρότυπο	Δείγμα
Πρότυπο (1:10 Φ.Ο.)		20 μ l	
Δείγμα (1:10 Φ.Ο.)			20 μ l
Αντιδραστήριο εργασίας	200 μ l	200 μ l	200 μ l

2. Αναδεύουμε και επωάζουμε για 5 min στους 37 °C

3. Μετρούμε την απορρόφηση έναντι του τυφλού στα 510 nm μέσα σε 30 min

Υπολογισμός τριγλυκεριδίων

$$\text{Τριγλυκερίδια, mg/100 ml} = \frac{\text{Α δείγματος}}{\text{Α πρότυπου}} \times 200$$

Για τον προσδιορισμό της LDL χοληστερόλης χρησιμοποιούμε τον παρακάτω τύπο:

$\text{LDL χοληστερόλη} = \text{Ολική χοληστερόλη} - \frac{\text{Τριγλυκερίδια}}{5} - \text{HDL χοληστερόλη}$ (mg/100ml)

10. Προσδιορισμός της κρεατινίνης στα ούρα με τη χρωμομετρική μέθοδο Fixed Time χωρίς αποπρωτεϊνοποίηση (τροποποιημένη μέθοδος)

Αρχή της μεθόδου

Η κρεατινίνη με πικρικό οξύ σε αλκαλικό περιβάλλον σχηματίζει έγχρωμο σύμπλοκο. Η παραγωγή του έγχρωμου συμπλόκου υπολογίζεται με την αύξηση της απορρόφησης που είναι ανάλογη με την ποσότητα της κρεατινίνης του δείγματος



Αντιδραστήρια- Όργανα

- Αντιδραστήριο 1: Καυστικό νάτριο (NaOH), 160 mmol/l
- Αντιδραστήριο 2: Πικρικό οξύ ($\text{C}_6\text{H}_3\text{N}_3\text{O}_7$), 13,9 mmol/l
- Πρότυπο διάλυμα κρεατινίνης 2mg/dl ή 176,8 $\mu\text{mol/l}$
- Φασματοφωτόμετρο τύπου ELISA (MicroELISA Reader: Infinite 200 PRO, TECAN)

Διάλυμα εργασίας

Αναμιγνύουμε 4 μέρη από το αντιδραστήριο 1 και ένα μέρος από το αντιδραστήριο 2

Πειραματική διαδικασία

1. Αραιώνουμε τα δείγματα ούρων 1:50.
2. Φέρνουμε τα αντιδραστήρια στη θερμοκρασία εργασίας, στους 37 °C.
3. Σε ειδικό πλακίδιο ELISA προσθέτουμε 30μl από τα πρότυπα και 30 μl από τα δείγματα.
4. Προσθέτουμε 300 μl από το αντιδραστήριο εργασίας.
5. Αναμιγνύουμε και επωάζουμε για 30 sec.
6. Παίρνουμε τις απορροφήσεις των προτύπων και των δειγμάτων στα 492 nm (490 nm-510 nm) (A1 απορροφήσεις).

7. Μετά από 2 min ακριβώς, παίρνουμε τις απορροφήσεις των προτύπων και των δειγμάτων στα 492 nm (490 nm- 510 nm) (A2 απορροφήσεις).

Σημείωση: Φροντίζουμε η θερμοκρασία να παραμένει σταθερή $\pm 0,5^{\circ}\text{C}$ σε όλη τη διάρκεια εκτέλεσης του προσδιορισμού.

Υπολογισμός αποτελεσμάτων

Η συγκέντρωση της κρεατινίνης (mg/dl) στα ούρα υπολογίζεται από τον παρακάτω τύπο:

$$C = 100 \times \Delta A \text{ δείγματος} / \Delta A \text{ προτύπου}$$

11. Απομόνωση των λιποπρωτεϊνών με διαδοχικές υπερφυγοκεντρήσεις

Αρχή της μεθόδου

Ο διαχωρισμός των λιποπρωτεϊνών του πλάσματος με υπερφυγοκέντρωση βασίζεται στην παρατήρηση ότι διαφορές στο λιπιδιακό περιεχόμενο των λιποπρωτεϊνών έχουν ως αποτέλεσμα την επιπλευσή τους σε διαφορετικές πυκνότητες²⁴⁹. Απομονώνονται οι εξής λιποπρωτεΐνες στις αντίστοιχες πυκνότητες.

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

Αντιδραστήρια

- Αντιβιοτικό Garamycin (Gentamicin sulfate, Schering-Plough)
- Titriplex III ($\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_8 \cdot 2\text{Na} \cdot \text{H}_2\text{O}$, MB: 372.24 g/mol, Merck)
- Βρωμιούχο κάλιο (KBr, Merck)
- EDTA, (F.W. 368.4, Sigma)
- Απεσταγμένο νερό

Όργανα

- Φυγόκεντρος πάγκου (Hermle, Z 320)
- Υπερφυγόκεντρος (L7, Beckman)
- Κεφαλή υπερφυγοκέντρου (NVT-65, Beckman)

- Σωλήνες υπερφυγοκέντρου (Quickseal, Beckman)
- Σωλήνες υπερφυγοκέντρου (Optiseal, Beckman)
- Μεμβράνη διαπίδυσης (Sigma)
- Φίλτρα διήθησης 0.20 μ (Corning)
- Σύριγγες (5-10 ml)
- Πεχάμετρο

Διαλύματα εργασίας

- **Διάλυμα 10% EDTA, pH 7.0:** 12.8247g EDTANa₂H₂O (Titriplex III) διαλύονται σε 90 ml dH₂O. Το pH ρυθμίζεται στο 7 και ο όγκος συμπληρώνεται στα 100 ml με dH₂O. Το διάλυμα διατηρείται στους 4 °C.
- **Διάλυμα KBr πυκνότητας 1.019 g/ml:** 14.92 g KBr διαλυτοποιούνται σε dH₂O μέχρι τελικό όγκο, 500 ml. Το διάλυμα αυτό περιέχει 5μl/ml 10% EDTA και 1.25 μl/ml Garamycin και διατηρείται στους 4°C.
- **Διάλυμα KBr πυκνότητας 1.063 g/ml:** 45.99 g KBr διαλυτοποιούνται σε dH₂O μέχρι τελικό όγκο, 500 ml. Το διάλυμα αυτό περιέχει 5μl/ml 10% EDTA και 1.25 μl/ml Garamycin και διατηρείται στους 4°C.
- **Διάλυμα KBr πυκνότητας 1.210 g/ml:** 159.03 g KBr διαλυτοποιούνται σε d H₂O μέχρι τελικό όγκο, 500 ml. Το διάλυμα αυτό περιέχει 5μl/ml 10% EDTA και 1.25 μl/ml Garamycin και διατηρείται στους 4°C.
- **Ρυθμιστικό διάλυμα 10 mM PBS + 0.05%EDTA, pH 7.4:** 8.1816 g NaCl, 1.3800 g NaH₂PO₄H₂O και 1.7795 g Na₂HPO₄H₂O διαλυτοποιούνται σε 800 ml dH₂O και αφού ρυθμιστεί το pH σε 7.4 συμπληρώνεται ο όγκος στο 1 l με dH₂O. Στο διάλυμα αυτό προστίθενται 5 ml διαλύματος 10% EDTA. Το διάλυμα διατηρείται στους 4°C.
- **Μεμβράνη διαπίδυσης:** Η μεμβράνη ενεργοποιείται σε PBS για 3 h και κατακρατά οποιοδήποτε συστατικό έχει μοριακό βάρος μεγαλύτερο από 12 kDa.
- **Βρωμιούχο κάλιο:** Το KBr ξηραίνεται σε κλίβανο στους 100°C για 24 h και διατηρείται σε ξηραντήρα.
- **Αντιβιοτικό Garamycin:** Το διάλυμα περιέχει 40 mg θευκής γενταμυκίνης/ml και υπάρχει σε φιαλίδια των 2 ml.

Πειραματική διαδικασία

■ Απομόνωση του πλάσματος

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

■ Απομόνωση των VLDL και IDL

2. Αρχικά μετριέται με ακρίβεια ο όγκος του πλάσματος σε ml και πολλαπλασιάζεται με το συντελεστή 0.0212. Ο αριθμός που προκύπτει ισούται με τα gr του στερεού KBr που πρέπει να προστεθούν στο πλάσμα ώστε η πυκνότητά του να γίνει 1.019g/ml. Το πλάσμα στη συνέχεια μοιράζεται σε σωληνάκια υπερφυγοκέντρου Quickseal, ο όγκος των οποίων συμπληρώνεται με διάλυμα KBr πυκνότητας 1.019 g/ml. Τα σωληνάκια, αφού ζυγοσταθμιστούν, σφραγίζονται και τοποθετούνται σε υπερφυγόκεντρο όπου φυγοκεντρούνται στις 40000 rpm για 10 h, στους 14°C. Μετά το τέλος της υπερφυγοκέντρωσης οι VLDL και IDL έχουν συγκεντρωθεί στην επιφάνεια του σωλήνα διαχωρισμένες από τα υπόλοιπα συστατικά του πλάσματος.

3. Οι VLDL και IDL συλλέγονται προσεκτικά με σύριγγα από την κορυφή του σωλήνα (2-2.5 ml). Στη συνέχεια συλλέγεται και το υπόλοιπο του πλάσματος το οποίο περιέχει τις λιποπρωτεΐνες LDL και HDL καθώς και άλλα συστατικά του πλάσματος.

■ Απομόνωση της LDL

4. Μετριέται με ακρίβεια ο όγκος του υπολοίπου του πλάσματος της πρώτης υπερφυγοκέντρωσης σε ml και πολλαπλασιάζεται με το συντελεστή 0.060. Ο αριθμός που προκύπτει ισούται με τα gr του στερεού KBr που θα πρέπει να προστεθούν στο υπόλοιπο του πλάσματος, ώστε η πυκνότητά του να αυξηθεί από 1.019 σε 1.063g/ml. Το υπόλοιπο του πλάσματος μοιράζεται σε σωληνάκια υπερφυγοκέντρου Optiseal, ο όγκος των οποίων συμπληρώνεται με διάλυμα KBr πυκνότητας 1.063g/ml. Τα σωληνάκια, αφού ζυγοσταθμιστούν, σφραγίζονται και τοποθετούνται σε υπερφυγόκεντρο όπου φυγοκεντρούνται στις 40000 rpm, για 10 h, στους 14°C.

5. Μετά το τέλος της υπερφυγοκέντρωσης η LDL η οποία έχει συγκεντρωθεί στην επιφάνεια του σωλήνα διαχωρισμένη από τα υπόλοιπα συστατικά του πλάσματος συλλέγεται προσεκτικά με σύριγγα από την κορυφή του σωλήνα (2-2.5 ml).

■ Έκπλυση της LDL

6. Η απομονωμένη LDL υποβάλλεται ακόμα μία φορά σε υπερφυγοκέντρωση ώστε να καθαριστεί όσο το δυνατό περισσότερο από την αλβουμίνη του πλάσματος. Η LDL μοιράζεται σε σωληνάκια υπερφυγοκέντρου Optiseal ο όγκος των οποίων συμπληρώνεται με διάλυμα KBr πυκνότητας 1.063 g/ml. Τα σωληνάκια, αφού ζυγοσταθμιστούν και σφραγιστούν, τοποθετούνται σε υπερφυγόκεντρο όπου φυγοκεντρούνται στις 40000 rpm,

για 10 h, στους 14°C. Μετά το τέλος της υπερφυγοκέντρωσης η LDL έχει συγκεντρωθεί στην επιφάνεια του σωλήνα απ' όπου συλλέγεται με σύριγγα (2-2.5 ml).

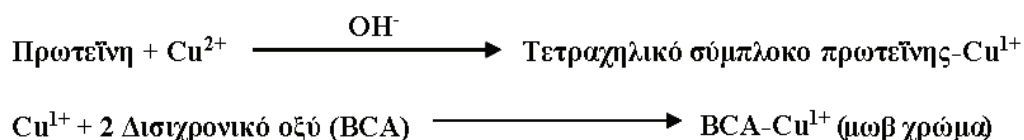
■ Διαπίδυση της LDL

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

12. Προσδιορισμός των πρωτεϊνών με τη μέθοδο BCA

Αρχή της μεθόδου

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



Αντιδραστήρια-Όργανα

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

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

Διαλύματα Εργασίας

■ **Διάλυμα εργασίας:** Το διάλυμα εργασίας προκύπτει από την ανάμιξη των αντιδραστηρίων Α και Β σε κατ' όγκο αναλογία 50:1. Το αντιδραστήριο παρασκευάζεται λίγο πριν τη χρήση του.

■ **Πρότυπα διαλύματα BSA:** Παρασκευάζονται με κατάλληλη αραιώση του διαλύματος BSA 2 mg/ml, έτσι ώστε να προκύψουν διαλύματα 0.25-1.5 mg/ml BSA. Τα πρότυπα διαλύματα BSA διατηρούνται στους 4°C.

Πειραματική διαδικασία

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

Επεξεργασία των αποτελεσμάτων

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

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

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

13. Προσδιορισμός της ενεργότητας της Lp-PLA₂**Αρχή της μεθόδου**

Η ενεργότητα της Lp-PLA₂ προσδιορίζεται με την μέθοδο ιζηματοποίησης με τριχλωροξικό οξύ²⁵⁰. Η μέτρηση της ενεργότητας της Lp-PLA₂ πραγματοποιείται έμμεσα με την μέτρηση των ραδιοσημασμένων οξικών ομάδων που ελευθερώνονται κατά την υδρόλυση του υποστρώματος [³H]-PAF από το ένζυμο. Οι ομάδες αυτές παραμένουν στο υπερκείμενο κατά την καταβύθιση με TCA του παραγόμενου lyso-PAF καθώς και του [³H]-PAF που δεν διασπάστηκε, οι οποίοι βρίσκονται δεσμευμένοι σε BSA που

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

Αντιδραστήρια

- PAF (1-O-δεκαεξάκυλο-2-ακετυλο-sn-γλυκερο-3-φωσφοχολίνη, M.B. 523.7 g/mol, Sigma)
- Πρότυπο διάλυμα [³H]-PAF (1-O-δεκαεξέκυλο-2-[³Hακετυλο]-sn-γλυκερο-3-φωσφοχολίνη, 0.25 mCi/0.5 ml, 10 Ci/mmol, DuPont New England Nuclear Boston MA)
- Υγρό σπινθηρισμού, Scintillation liquid Optiphase Hisafe 3
- Τριχλωροξικό οξύ (TCA, Merck)
- Αλβουμίνη βοδινού ορού ελεύθερη λιπαρών οξέων (FFA BSA, Sigma)
- HEPES (C₁₈H₁₈N₂O₄S, M.B. 238.31 g/mol, Sigma)
- Χλωριούχο νάτριο (NaCl, M.B. 58.44 g/mol, Sigma)
- Χλωρίουχο κάλιο (KCl, M.B. 74.56 g/mol, Sigma)
- Titriplex III (C₁₀H₁₄N₂O₈.2Na₂.H₂O, MB: 372.24 g/mol, Merck)
- DMSO, 0.03% H₂O Ferax
- Κλοπιδογρέλη: *Η ουσία κλοπιδογρέλη ήταν ευγενική χορηγία της εταιρείας ELPEN A.E.*

Όργανα

- Μετρητής υγρού σπινθηρισμού, Packard (TriCarb 2100 TR)
- Μικροφυγόκεντρος για erpendorf
- Υδατόλουτρο 37°C
- Φιαλίδια σπινθηρισμού των 4 ml

Διαλύματα εργασίας

- **Διάλυμα 20 mM PAF:** 25 mg σκόνης PAF διαλύονται σε 2.387 ml 80% αιθανόλης. Το διάλυμα διατηρείται στους -20°C.
- **Διάλυμα 20% TCA:** 20 g TCA διαλυτοποιούνται σε 100 ml H₂O. Το διάλυμα διατηρείται στους 4°C.
- **Διάλυμα 2.5 mg/ml BSA:** 25mg BSA διαλύονται σε 10 ml φυσιολογικό ορό. Το διάλυμα διατηρείται στους -20°C.
- **Διάλυμα 100 mg/ml BSA:** 1 g BSA διαλυτοποιείται σε 10 ml φυσιολογικό ορό. Το διάλυμα διατηρείται στους -20°C.
- **Ρυθμιστικό διάλυμα Hepes pH 7.4:** Διαλύονται 1.0009 g Hepes, 8.0063 g NaCl, 0.1939 g KCl και 0.7445 g Titriplex III σε 1 l dH₂O. Το pH ρυθμίζεται στο 7.4 και το διάλυμα διατηρείται στους 4°C.

- ✦ **Διάλυμα 1000μM [³H]-PAF (Απλός):** Αναμιγνύονται σε σωληνάκι πολυπροπυλενίου 50 μl από το διάλυμα 20 mM PAF με 15 μl από το πρότυπο διάλυμα [³H]-PAF. Εξατμίζεται η αιθανόλη μέχρι ξηρού σε ρεύμα αζώτου υπό ήπιες συνθήκες και το μίγμα PAF-[³H]-PAF αναδιασπείρεται σε 1 ml του διαλύματος 2,5 mg/ml BSA. Το μίγμα επωάζεται στους 37 °C για 30 min ώστε ο PAF και ο [³H]-PAF να δεσμευτούν ποσοτικά στη BSA. Μετά το πέρας των 30 λεπτών το διάλυμα αναδεύεται ισχυρά σε κυκλοαναδευτήρα και διατηρείται στους -20°C.
- ✦ **Διάλυμα 100mM κλοπιδογρέλης:** 3,21 mg κλοπιδογρέλης διαλύονται σε 100 μl DMSO.

Πειραματική διαδικασία

1. Ως πηγή του ενζύμου χρησιμοποιούνται 4 μg πρωτεΐνης LDL τα οποία αναμιγνύονται με ρυθμιστικό διάλυμα Hepes με pH=7.4 μέχρι τελικού όγκου 90 μl ή 50 μl πλάσματος (αραιωμένου 1:50 με ρυθμιστικό διάλυμα Hepes με pH=7.4 μέχρι τελικού όγκου 90 μl). Παράλληλα ετοιμάζεται και δείγμα ελέγχου (τυφλό) όπου περιέχει 90 μl Hepes pH 7.4. Τα eppendorfs τοποθετούνται σε υδατόλουτρο.
2. Προστίθεται η κλοπιδογρέλη και αμέσως ξεκινά η ενζυμική αντίδραση με την προσθήκη 10 μl [³H]-PAF σε δείγμα και τυφλό.
3. Ακολουθεί επώαση στους 37°C για 30 min ακριβώς για τα δείγματα με την rLp-PLA₂, τις LDL και το πλάσμα
4. Μόλις συμπληρωθεί ο απαραίτητος χρόνος επώασης, η ενζυμική αντίδραση σταματά με την προσθήκη 20 μl διαλύματος 100 mg/ml BSA. Στη συνέχεια τα eppendorfs αναδεύονται ισχυρά σε Vortex και τοποθετούνται σε θερμοκρασία 4°C (παγόλουτρο) για 15 min τουλάχιστον.
5. Προστίθενται 80 μl διαλύματος 20% TCA, τα eppendorfs αναδεύονται ισχυρά σε Vortex και τοποθετούνται σε θερμοκρασία 4°C για άλλα 30 min τουλάχιστον.
6. Ακολουθεί φυγοκέντρωση, σε μικροφυγόκεντρο eppendorf, σε 10.000 rpm (7,200xg) για 3.5 min ώστε να καταβυθιστούν οι πρωτεΐνες.
7. Στη συνέχεια, 100 μl από το υπερκείμενο μεταφέρονται σε σωληνάκι σπινθηρισμού, προστίθενται 2 ml υγρού σπινθηρισμού, το σωληνάκι αναδεύεται καλά και τοποθετείται στο μετρητή υγρού σπινθηρισμού.
8. Η μέτρηση γίνεται για 1 min και τα αποτελέσματα δίνονται σε κρούσεις (counts/min, cpm).

Υπολογισμός ειδικής ενεργότητας (E.E.)

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

$$\text{E.E. (cpm/nmol)} = \frac{\text{cpm}_{\text{st}}}{10}$$

Υπολογισμός ενζυμικής ενεργότητας

Στο μετρητή υγρού σπινθηρισμού μετρούνται οι κρούσεις των 100 μl του δείγματος (cpm_δ) και του δείγματος ελέγχου (cpm_τ). Πριν από την μέτρηση υπήρχε συνολικά όγκος 200 μl, ο οποίος δίνει 2 x cpm_δ κρούσεις από τις οποίες αφαιρούνται οι κρούσεις που οφείλονται στο δείγμα ελέγχου (τυφλό) 2 x cpm_τ. Άρα, οι καθαρές κρούσεις που οφείλονται στο δείγμα είναι 2 x (cpm_δ - cpm_τ). Έτσι η ενεργότητα της Lp-PLA₂ υπολογίζεται από τον παρακάτω τύπο:

$$\text{Ενεργότητα Lp-PLA}_2 = 2 \frac{(\text{cpm}_{\delta} - \text{cpm}_{\tau}) \times 1000}{\text{E.E.} \times \alpha \times \beta}$$

όπου: **cpm_δ**: είναι οι κρούσεις που αποδίδουν τα 100 μl κάθε δείγματος
cpm_τ: είναι οι κρούσεις που αποδίδουν τα 100 μl τυφλού
E.E.: είναι η ειδική ενεργότητα του διαλύματος του [³H]-PAF 100μM
1000: είναι ο συντελεστής για την μετατροπή των μg πρωτεΐνης σε mg, ή των μl διαλύματος που χρησιμοποιήθηκε ως πηγή ενζύμου σε ml
α: είναι ο χρόνος επώασης του δείγματος σε min
β: είναι τα μl της LDL ή τα μl των πλασμάτων

Έτσι, η ενεργότητα της Lp-PLA₂ εκφράζεται ως nmol/min/ml

14. Μελέτη της αλληλεπίδρασης της κλοπιδογρέλης με την Lp-PLA₂ με τη μέθοδο της φασματοσκοπίας φθορισμού

Αρχή της μεθόδου

Η ενέργεια που προσλαμβάνεται κατά τη φωτοδιέγερση ενός μορίου με απορρόφηση ενός φωτονίου δε διατηρείται στο διεγερμένο μόριο, αλλά αποβάλλεται με διάφορους τρόπους συνήθως υπό μορφή θερμότητας αλλά και με εκπομπή δευτερεύουσας

ακτινοβολίας η οποία χαρακτηρίζεται με το γενικό όρο φωταύγεια. Ειδικότερα, η φωταύγεια χαρακτηρίζεται ως φθορισμός εάν η εκπομπή γίνεται σε χρόνο $10^{-9} - 10^{-6}$ μετά τη διέγερση.

Κατά τη φθορισμομετρική μελέτη μιας ουσία λαμβάνονται δύο είδη φασμάτων, διεγέρσεως και εκπομπής. Η γραφική απεικόνιση της εντάσεως της ακτινοβολίας φθορισμού F (για σταθερό μήκος κύματος λ της ακτινοβολίας φθορισμού, συνήθως το μήκος κύματος μέγιστου φθορισμού) ως συνάρτηση του μήκους κύματος της ακτινοβολίας διεγέρσεως αποτελεί το φάσμα διεγέρσεως της εξεταζόμενης ουσίας, ενώ η γραφική παράσταση του F (για σταθερό λ της ακτινοβολίας διεγέρσεως) ως συνάρτηση του λ της ακτινοβολίας φθορισμού αποτελεί το φάσμα εκπομπής (φθορισμού) της ουσίας. Τα φάσματα διεγέρσεως και εκπομπής λαμβάνονται με τα φθορισμόμετρα, τα οποία περιέχουν δυο μονοχρωμάτορες για την απομόνωση του επιθυμητού μήκους κύματος διεγέρσεως και φθορισμού (Εικόνα 13.1).



Εικόνα 13.1. Διάταξη φθορισμόμετρου.

Στο φθορισμόμετρο μετράται η ένταση της ακτινοβολίας φθορισμού (εκπομπής) κάθετα προς την διεύθυνση της ακτινοβολίας διεγέρσεως. Η ακτινοβολία που εκπέμπεται από την πηγή φωτός διέρχεται από ένα πρωτογενές φίλτρο (φίλτρο διεγέρσεως), το οποίο επιτρέπει την διόδο μόνο εκείνου του τμήματος της δέσμης φωτός, το οποίο θα χρησιμοποιηθεί για την διεγέρση των μορίων. Η ακτινοβολία φθορισμού εκπέμπεται από το δείγμα προς όλες τις κατευθύνσεις. Η ακτινοβολία φθορισμού εκπέμπεται από ένα δευτερογενές φίλτρο (φίλτρο εκπομπής ή μονοχρωμάτορας), το οποίο επιτρέπει την διόδο μικρού τμήματός της (από την μία και από την άλλη μεριά της κορυφής της ταινίας φθορισμού) και προσπίπτει

στον ανιχνευτή (φωτοπολλαπλασιαστή). Το σήμα εξόδου το ενισχύεται και παρουσιάζεται σε ένα όργανο ανάγνωσης (αναλογικό ή ψηφιακό μετρητή, καταγραφέα ή παλμογράφο). Τα μήκη κύματος της διέγερσης και του φθορισμού καθώς και η ένταση του φθορισμού συσχετίζονται σε τρισδιάστατο φάσμα φθορισμού. Στην πράξη το μήκος κύματος της διέγερσης διατηρείται σταθερό και απεικονίζεται το φάσμα φθορισμού (εκπομπής) (Εικόνα 13.1.).

Η φθορισμομετρία χρησιμοποιείται για την μελέτη της αλλαγής στη διαμόρφωση της δομής των πρωτεϊνών που περιέχουν στο μόριο τους τα αμινοξέα Τρυπτοφάνη και Τυροσίνη, τα οποία έχουν την τάση να φθορίζουν όταν ακτινοβοληθούν με μονοχρωματική ακτίνα συγκεκριμένου μήκους κύματος. Η αλλαγή στη δομή της πρωτεΐνης γίνεται αντιληπτή με την μεταβολή της έντασης της εκπομπής φθορισμού και του μέγιστου μήκους κύματος εκπομπής.

Αντιδραστήρια

- DMSO, 0.03% H₂O Ferax
- Κλοπιδογρέλη: *Η ουσία κλοπιδογρέλη ήταν ευγενική χορηγία της εταιρείας ELPEN A.E.*
- rLp-PLA₂: 20mg/ml

Όργανα-Αναλώσιμα

- Φθορισμόμετρο (Perkin Elmer LS55)
- Κυβέττα (Quartz 1.0cm)

Διαλύματα εργασίας

- **Διάλυμα 1mM κλοπιδογρέλης:** 0,32 mg διαλύονται σε 1 ml DMSO
- **Διάλυμα 10 mM PBS (pH 7,4):** 8.1816 g NaCl, 1.3800 g NaH₂PO₄•H₂O και 1.7795 g Na₂HPO₄•2H₂O διαλυτοποιούνται σε 800 ml H₂O και αφού ρυθμιστεί το pH στο 7,4, συμπληρώνεται ο όγκος στο 1 L με d H₂O. Το διάλυμα διατηρείται σε θερμοκρασία δωματίου.
- **Διάλυμα 2 μM rLp-PLA₂** αραιώνεται σε όγκο 4 ml PBS.
- **Διάλυμα 1mM CV-3988:** 0,59 mg διαλύονται σε 1ml αιθανόλης.

Πειραματική διαδικασία

1. Λήψη ενός αρχικού φάσματος της rLp-PLA₂ (2μM) και απουσία του μορίου της κλοπιδογρέλης. Η διέγερση του ενζύμου έγινε στα 285nm, έτσι ώστε να αποφευχθεί κατά το δυνατόν η διέγερση των Τυροσινών και παράλληλα να διατηρηθεί η ένταση φθορισμού

της Τρυπτοφάνης σε ικανοποιητικό βαθμό για την ακρίβεια της μεθόδου. Οι σχισμές (slits) από όπου διαπερνά η διεγείρουσα και διεγερμένη ακτινοβολία ρυθμίστηκαν αμφότερες στα 7nm.

2. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκαν τιτλοδοτήσεις αυξανόμενης συγκέντρωσης της κλοπιδογρέλης (0-20μM) σε διάλυμα ενζύμου rLp-PLA₂ σταθερής συγκέντρωσης (2μM) σε ρυθμιστικό διάλυμα PBS, pH=7,4 σε θερμοκρασία δωματίου.

3. Κάθε μέτρηση διαρκούσε 3 min και κάθε φορά καταγράφονταν τα αντίστοιχα φάσματα.

Υπολογισμός αποτελεσμάτων

Μία ενδεχόμενη πτώση του φθορισμού μπορεί να οφείλεται και στην απορρόφηση της εκπεμπόμενης ακτινοβολίας της Τρυπτοφάνης από το μόριο προσδέτη²⁵¹. Αυτό συμβαίνει όταν ο προσδέτης φέρει χρωμοφόρο ομάδα της οποίας το φάσμα απορρόφησης αλληλεπικαλύπτεται με το φάσμα εκπομπής του υποδοχέα. Επειδή η κλοπιδογρέλη απορροφά στο μήκος κύματος όπου φθορίζει η Τρυπτοφάνη πραγματοποιήθηκε διόρθωση της μέγιστης τιμής φθορισμού για κάθε φάσμα σύμφωνα με τον παρακάτω τύπο:

$$F_{cor} = F_{obs} \times 10^{-(\epsilon_{\lambda_{exc}} + \epsilon_{\lambda_{em}}) \times l \times L_0}$$

Όπου F_{obs} η ένταση εκπομπής φθορισμού που έχει μετρηθεί, $\epsilon_{\lambda_{exc}}$ και $\epsilon_{\lambda_{em}}$ ο μοριακός συντελεστής απορρόφησης του προσδέτη στο μήκος κύματος διέγερσης και εκπομπής αντίστοιχα, l το μήκος της κυψελίδας σε cm και L_0 η συνολική συγκέντρωση του προσδέτη που υπάρχει στο διάλυμα.

Οι διορθωμένες τιμές φθορισμού σε συνάρτηση με τις αντίστοιχες συγκεντρώσεις κλοπιδογρέλης παρουσιάζουν διάγραμμα με μορφή υπερβολής. Τελικά, η σταθερά πρόσδεσης υπολογίστηκε εφαρμόζοντας την παρακάτω εξίσωση:

$$F_0 - F = \frac{(F_0 - F_{\infty}) \times L_0}{K_d + L_0}$$

Όπου F_0 και F η ένταση του φθορισμού απουσία και παρουσία του προσδέτη αντίστοιχα F_{∞} είναι η ένταση του φθορισμού όταν η πρωτεΐνη έχει κορεστεί με τον προσδέτη, K_d σταθερά πρόσδεσης και L_0 συγκέντρωση κλοπιδογρέλης για κάθε μέτρηση.

Για τον υπολογισμό της σταθεράς πρόσδεσης χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα ORIGIN 8.0.

Η παραπάνω πειραματική διαδικασία επαναλήφθηκε για τον υπολογισμό του K_d του αναστολέα CV-3988 και το πείραμα ανταγωνισμού για υπολογισμό του K_d του αναστολέα CV-3988 στην rLp-PLA₂ παρουσία σταθερής συγκέντρωσης κλοπιδογρέλης.

15. Μελέτη της πιθανής συμμετοχής της Lp-PLA₂ στην αποικοδόμηση της κλοπιδογρέλης με τη μέθοδο της υγρής χρωματογραφίας/φασματομετρίας μάζας (LC/MS-MS)

Αρχή της μεθόδου

Η φασματομετρία μαζών βασίζεται στην αρχή της ανίχνευσης των ιόντων της ουσίας που θέλουμε να αναλύσουμε, του διαχωρισμού τους (μοριακών και θραυσμάτων) με ηλεκτρικά και μαγνητικά πεδία και τέλος της καταγραφής, της σχετικής αφθονίας των ιόντων που διαχωρίστηκαν. Στη φασματομετρία μαζών μπορούμε να χρησιμοποιήσουμε πολύ μικρή ποσότητα της ουσίας που μας ενδιαφέρει (10^{-3} - 10^{-9} g) και να προσδιορίσουμε το μοριακό βάρος, τη δομή, την ταυτότητα, την ποσότητα και την καθαρότητα της εκάστοτε ουσίας.

Αναλυτικότερα, η φασματομετρία μαζών βασίζεται στη δημιουργία μοριακού ιόντος και ιοντικών θραυσμάτων, κυρίως κατιόντων, τα οποία μπορούν να δημιουργηθούν με πολλούς τρόπους, ανάλογα με την τεχνική ιονισμού και κατ' επέκταση της πηγής ιονισμού που είναι εξοπλισμένος ο κάθε φασματογράφος. Ένας σύνηθες τρόπος είναι η δημιουργία ιόντων με τον βομβαρδισμό της ένωσης με δέσμη ηλεκτρονίων μεγάλης ενέργειας (70eV~1500 Kcal/mol). Με αυτόν τον τρόπο δημιουργείται η κατιονική ρίζα που αντιστοιχεί στο μοριακό ιόν M^+ . Το μοριακό ιόν λόγω της μεγάλης ενέργειας που έχει διασπάται σε επιμέρους ιόντα, η ένταση των οποίων εξαρτάται από την σχετική σταθερότητα. Τα θυγατρικά ιόντα μπορούν να δώσουν νέα ιόντα τα οποία αφού διαχωριστούν καταγράφονται στο φασματογράφο. Αυτό που κάνει εξαιρετικά χρήσιμη αυτή την τεχνική είναι ότι ο τρόπος θραυσματοποίησης είναι χαρακτηριστικός για κάθε ένωση και με παρόμοιο τρόπο θραυσματοποιούνται και οι υπόλοιπες ένωσης της ομόλογης σειράς που ανήκει.

Οι φασματογράφοι μαζών μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε σειρά με έναν υγρό χρωματογράφο (LC, Liquid chromatography) και να μας δώσουν πληροφορίες για τις ενώσεις που διαχωρίζονται με τον υγρό χρωματογράφο (Εικόνα 15.1).

Με την υγρή χρωματογραφία μπορούν να διαχωριστούν ποικίλα οργανικά συστατικά. Παραδοσιακά, οι ανιχνευτές της υγρής χρωματογραφίας περιλαμβάνουν δείκτες διάθλασης, ηλεκτροχημικούς ανιχνευτές, ανιχνευτές φθορισμού καθώς και ανιχνευτές ορατού φωτός και υπεριώδους ακτινοβολίας (UV-Vis). Μερικοί από αυτούς τους ανιχνευτές παράγουν δύο διαστάσεων δεδομένα που αντιπροσωπεύουν την ένταση του σήματος (συνήθως την ένταση απορρόφησης ή εκπομπής) συναρτήσει του χρόνου. Άλλοι ανιχνευτές συμπεριλαμβανομένου των ανιχνευτών φθορισμού και ορατής-υπεριώδους ακτινοβολίας παράγουν τριών διαστάσεων δεδομένα, την ένταση και το φάσμα σε ένα μεγάλο εύρος μηκών κύματος για κάθε χρονική στιγμή.

Ένας φασματογράφος μάζας εμφανίζει μεγαλύτερη ευαισθησία και εξειδίκευση σε σύγκριση με όλους τους LC ανιχνευτές.

Ο σκοπός μιας χρωματογραφικής μεθόδου είναι πάντοτε ο επιτυχής διαχωρισμός των συστατικών ενός μίγματος. Η ικανότητα αυτή ενός χρωματογραφικού συστήματος εκφράζεται και αποδίδεται ποσοτικά με ορισμένες παραμέτρους όπως είναι ο χρόνος συγκράτησης ή ανάσχεσης (Retention Time, t_R), που ορίζεται σαν το χρόνο που μεσολαβεί από την είσοδο του δείγματος στη στήλη, μέχρι τη στιγμή της εμφάνισης του μέγιστου της αντίστοιχης χρωματογραφικής κορυφής. Ένα άλλο χαρακτηριστικό της λειτουργίας ενός χρωματογραφικού συστήματος είναι η αποτελεσματικότητα της στήλης (column efficiency), η οποία αποτελεί μέτρο της ικανότητας της να δίνει οξείες κορυφές ανεξάρτητα από το χρόνο συγκράτησης. Αυτή εκφράζεται με τον αριθμό των θεωρητικών πλακών N (plate number). Οι παραπάνω παράμετροι αφορούν την περίπτωση ενός μόνο προσδιοριζόμενου συστατικού. Παρόλα αυτά είναι σημαντικό να γνωρίζει κανείς και να αποδίδει ποσοτικά την επιτυχία το διαχωρισμού περισσότερων συστατικών. Έτσι εισάγεται η διακριτική ικανότητα (resolution) των δυο κορυφών, που εξαρτάται από την μεταξύ τους απόσταση και από το εύρος τους. Για ικανοποιητική διάκριση των κορυφών θα πρέπει η διακριτική ικανότητα να παίρνει τιμές μεγαλύτερες από 1.5. Αυτός ο αριθμός ποιοτικά σημαίνει πως δύο γειτονικές κορυφές διαχωρίζονται πλήρως και δεν υπάρχει καμία συνέκλουση.

Για τα πειράματα μας χρησιμοποιήθηκε ο φασματογράφος μάζας με σύστημα ηλεκτροψεκασμού (Electrospray Ionization, ESI) (Εικόνα 15.1). Με την τεχνική ESI είναι εφικτή η ανάλυση μαζών σχεδόν οποιουδήποτε ιόντος σε διάλυμα, συμπεριλαμβανομένου από ανόργανα άλατα έως μεγαλομόρια, όπως πρωτεΐνες και νουκλεϊκά οξέα. Στα

πλεονεκτήματα της μεθόδου περιλαμβάνεται η ηπιότητα της διαδικασίας του ηλεκτροψεκασμού όπου επεκτείνει τα όρια της πολικότητας των αναλυόμενων ενώσεων πολύ περισσότερο από ότι οι προγενέστερες τεχνικές MS. Το σημαντικότερο πλεονέκτημα της τεχνικής ESI-MS σε σχέση με άλλες τεχνικές ήπιου ιοντισμού, όπως το MALDI, είναι η συμβατότητα του με την υγρή χρωματογραφία.



Εικόνα 15.1. Σύστημα LC-MS

Αντιδραστήρια

- Ακετονιτρίλιο (CH_3CN , Fisher Scientific)
- Νερό
- DMSO, 0.03% H_2O Ferax
- Κλοπιδογρέλη: Η ουσία κλοπιδογρέλη ήταν ευγενική χορηγία της εταιρείας ELPEN A.E.

Όργανα

- Agilent G2445 LC/MSD Trap SL, (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA)
- Αναλυτική στήλη μοντέλο Zorbax SB-C18 (2.1 x 30 mm i.d., 3.5 μm)

Διαλύματα εργασίας

- **Διάλυμα 100 mM κλοπιδογρέλης:** 3.21 mg διαλύονται σε 0.1 ml DMSO
- **Διάλυμα 10 mM PBS (pH 7,4):** 8.1816 g NaCl, 1.3800 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ και 1.7795 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ διαλυτοποιούνται σε 800 ml H_2O και αφού ρυθμιστεί το pH στο 7.4, συμπληρώνεται ο όγκος στο 1 L με d H_2O . Το διάλυμα διατηρείται σε θερμοκρασία δωματίου
- **Διάλυμα 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Lp-PLA₂:** Προέρχεται από stock του ενζύμου συγκέντρωσης 20 mg/ml. Η αραιώση του stock γίνεται με PBS

Πειραματική διαδικασία

1. 25 μ l διαλύματος κλοπιδογρέλης προστίθενται σε 475 μ l διαλύματος PBS στο οποίο υπήρχε ένζυμο Lp-PLA₂ συγκέντρωσης 2 μ g/ ml.
2. Μετά από επώαση 30 min ακολούθησε λυοφιλίωση αυτού.
3. Ελάχιστη ποσότητα αυτού (0,22 mg) διαλύεται σε 0,5ml του μίγματος των διαλυτών της κινητής φάσης 90% A (ακετονιτρίλιο) - 10% B (νερό).
4. Ακολουθεί καταγραφή των φασμάτων. Η καταγραφή του φάσματος μάζας (full scan) πραγματοποιήθηκε από m/z 100 έως m/z 1200. Τα δεδομένα καταγράφηκαν σε συνθήκες θετικού ιοντισμού σε MRM (Multiple Reaction Monitoring-Παρακολούθηση πολλαπλής αντίδρασης).

Η ίδια διαδικασία ακολουθήθηκε και για διάλυμα κλοπιδογρέλης απουσία ενζύμου σε διάλυμα PBS.

16. Στατιστική ανάλυση

Η ανάλυση των αποτελεσμάτων έγινε με χρήση του στατιστικού πακέτου IBM SPSS έκδοση 21.0. Χρησιμοποιήθηκαν μέθοδοι περιγραφικής στατιστικής για την παρουσίαση των κατανομών των μεταβλητών α) με διαγραμματικές απεικονίσεις (ραβδογράμματα, κυκλικά διαγράμματα) για τις κατηγορικές μεταβλητές (ως σχετικές (%) συχνότητες) και β) με υπολογισμό μέσων τιμών και τυπικών αποκλίσεων για τις ποσοτικές μεταβλητές. Για τη συγκριτική αξιολόγηση της έκφρασης των αντιαιμοπεταλιακών παραγόντων στις 5 και 30 ημέρες σε σύγκριση με το baseline καθώς και μεταξύ των ομάδων που εμφάνιζαν αντίσταση και καλή απόκριση στα αντιαιμοπεταλιακά φάρμακα κατασκευάστηκαν διαγράμματα που απεικονίζουν τις μέσες τιμές και τις τυπικές αποκλίσεις. Οι ποσοτικές μεταβλητές ακολουθούσαν την κανονική κατανομή, έπειτα από την πραγματοποίηση του ελέγχου Kolmogorov-Smirnov και την εξέταση των ιστογραμμάτων και των διαγραμμάτων κανονικότητας (normal probability plots). Έτσι, η αναζήτηση σχέσεων μεταξύ επιλεγμένων μεταβλητών της αιμοπεταλιακής λειτουργίας που συνδέονται με την αντίσταση ελέγχθηκαν: α) με τη δοκιμασία χ^2 όταν επρόκειτο για συνάφεια μεταξύ κατηγορικών μεταβλητών β) με t-test (unpaired και paired T-τεστ) ακολουθούμενη από έλεγχο πολλαπλών συγκρίσεων, στις περιπτώσεις σχέσης ποσοτικής με κατηγορική μεταβλητή και γ) με υπολογισμό του συντελεστή συσχέτισης του Pearson και έλεγχο της

στατιστικής του σημαντικότητας (p) στις περιπτώσεις σχέσης μεταξύ δύο ποσοτικών μεταβλητών. Το επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας ορίστηκε ίσο με 0,05.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

1. Μελέτη της απόκρισης των αιμοπεταλίων στην ασπιρίνη και την κλοπιδογρέλη

Αντικείμενο της παρούσας εργασίας ήταν η εκτίμηση της αιμοπεταλιακής λειτουργίας πριν τη χορήγηση της διπλής αντιαιμοπεταλιακής θεραπείας καθώς 5 και 30 ημέρες μετά τη φόρτιση σε ασθενείς με ΟΣΣ. Συνεπώς, προσδιορίσαμε τη λειτουργικότητα των αιμοπεταλίων με συσσωρευομετρία σε PRP έπειτα από ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων με ADP, AA, TRAP-14 και κολλαγόνο. Επίσης με κυτταρομετρία ροής, μελετήσαμε τη μεμβρανική έκφραση της P-σελεκτίνης και την έκφραση του $\alpha\text{IIb}\beta_3$ (πρόσδεση PAC-1) μετά από ενεργοποίηση με ADP. Επιπλέον, μελετήθηκε ο ρόλος της αντίστασης στην ασπιρίνη και την κλοπιδογρέλη στην έκκριση παραγόντων μετά από ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων από διάφορους αγωνιστές και συσχετίστηκαν τα επίπεδα τους με την αντίσταση στην ασπιρίνη και την κλοπιδογρέλη.

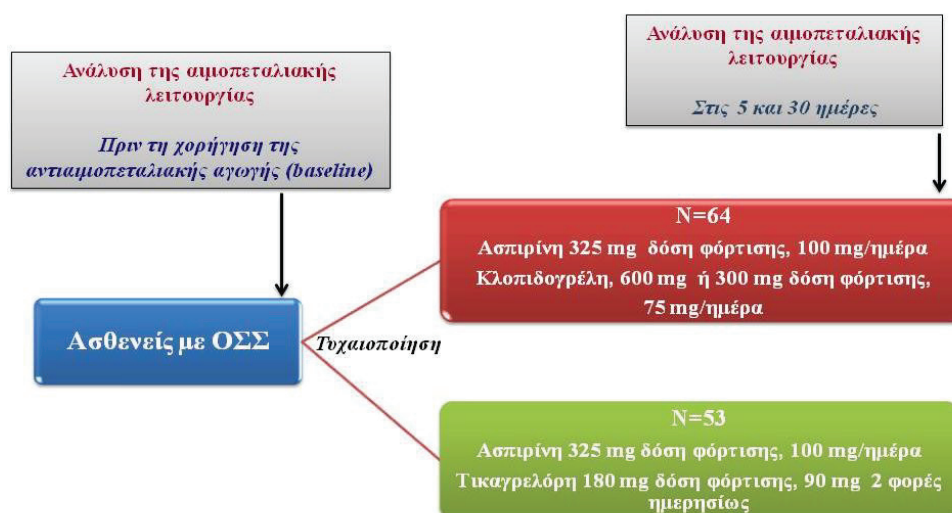
2. Σχεδιασμός της μελέτης

Στη μελέτη αυτή συμμετείχαν 117 ασθενείς (105 άνδρες και 12 γυναίκες), με ΟΣΣ (OEM με ή χωρίς ανάσπαση του διαστήματος ST στο ηλεκτροκαρδιογράφημα ή ασταθής στηθάγχη) που προσήλθαν στην Καρδιολογική Κλινική του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ιωαννίνων. Το ΟΣΣ ορίστηκε ως θωρακικό άλγος διάρκειας 5 ή περισσότερων λεπτών στην ηρεμία με την ταυτόχρονη παρουσία ισχαιμικού ST-T διαστήματος ή ως αύξηση των επιπέδων της τροπονίνης T στο αίμα.

Κατά τη διάρκεια της νοσηλείας τους όλοι οι ασθενείς έλαβαν 325 mg ασπιρίνης ως δόση φόρτισης ακολουθούμενη από 100 mg/ημέρα και τυχαιοποιήθηκαν ώστε να λάβουν δόση φόρτισης με 600 ή 300 mg κλοπιδογρέλης ή 180 mg τικαγρελόρης ακολουθούμενη από δόση συντήρησης 75 mg ημερησίως ή 90 mg δύο φορές ημερησίως, αντίστοιχα. Χαμηλού μοριακού βάρους ηπαρίνη (ενοξαπαρίνη) δόθηκε υποδορίως σε δόση 1 mg/kg κάθε 12 h. Δε χορηγήθηκε κανένα άλλο αντιθρομβωτικό φάρμακο, συμπεριλαμβανομένων των ανταγωνιστών της γλυκοπρωτεΐνης $\alpha\text{IIb}\beta_3$. Η υπόλοιπη φαρμακευτική αγωγή (β -αναστολείς, Αναστολείς του Μετατρεπτικού Ενζύμου της Αγγειοτενσίνης (α -MEA), ανταγωνιστές του υποδοχέα της αγγειοτενσίνης II (ATII), ανταγωνιστές ασβεστίου) που

ακολουθήθηκε ήταν σύμφωνα με τις ανάγκες κάθε ασθενούς ξεχωριστά. Όλοι οι ασθενείς υπεβλήθησαν σε διαγνωστική στεφανιογραφία των στεφανιαίων αγγείων μέσα σε 72 h από την εισαγωγή τους στο νοσοκομείο.

Η ανάλυση της αιμοπεταλιακής λειτουργίας πραγματοποιήθηκε πριν τη χορήγηση της διπλής αντιαιμοπεταλιακής αγωγής (baseline) καθώς 3-5 και 30 ημέρες μετά τη φόρτιση (Εικόνα 2.1.). Η αιμοληψία πραγματοποιήθηκε από φλέβα του αντιβραχίου των ασθενών με τη βοήθεια πεταλούδας με βελόνα 19 gauge. Η συλλογή έγινε με ελεύθερη ροή (χωρίς τη χρήση ελαστικής περίδεσης) ώστε να αποφευχθεί η ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων. Αφού αφαιρέθηκαν τα 2 πρώτα ml αίματος από την αιμοληψία, το αίμα συλλέχθηκε με αναλογία όγκων 9:1 (αίματος:αντιπηκτικού) σε πλαστικά σωληνάρια που περιείχαν ACD ως αντιπηκτικό.



Εικόνα 2.1. Σχεδιασμός της μελέτης.

Στους ασθενείς έγινε καταγραφή όλων των κλασικών παραγόντων κινδύνου για στεφανιαία νόσο (αρτηριακή υπέρταση, κάπνισμα, κληρονομικό ιστορικό πρώιμης στεφανιαίας νόσου, υπερλιπιδαιμία και παχυσαρκία). Επίσης, πραγματοποιήθηκαν γενικές εξετάσεις αίματος στις οποίες προσδιορίστηκε ο αριθμός και η μορφολογία των λευκών αιμοσφαιρίων και των υποπληθυσμών τους, η ποσότητα της αιμοσφαιρίνης, ο αριθμός και η μορφολογία των ερυθρών αιμοσφαιρίων και το ύψος του αιματοκρίτη καθώς επίσης ο αριθμός και ο μέσος όγκος των αιμοπεταλίων (MPV). Επίσης, πραγματοποιήθηκαν βιοχημικές εξετάσεις για τον προσδιορισμό πολλών βιοχημικών παραμέτρων όπως γλυκόζη, ουρία, ουρικό οξύ κ.α.

3. Δημογραφικά, κλινικά και βιοχημικά χαρακτηριστικά του πληθυσμού της μελέτης

Τα βασικά δημογραφικά, κλινικά και εργαστηριακά χαρακτηριστικά του πληθυσμού της μελέτης φαίνονται στον πίνακα 3.1. Οι περισσότεροι ασθενείς που στρατολογήθηκαν στη μελέτη ήταν άντρες (83,3%). Επίσης, μεγάλο ποσοστό των ασθενών ήταν ενεργοί καπνιστές (70,4%) ενώ πάνω από τους μισούς είχαν υπέρταση. Τα χαρακτηριστικά του πληθυσμού της μελέτης δεν διαφοροποιούνται ανάμεσα στις 2 ομάδες ασθενών.

Πίνακας 3.1. Δημογραφικά, κλινικά και βιοχημικά χαρακτηριστικά του πληθυσμού της μελέτης.

Παράμετρος	Σύνολο ασθενών (v=117)	Κλοπιδογρέλη (v=64)	Τικαγρελόρη (v=53)
Ηλικία (έτη)	62±11	63±12	61±11
Φύλο, Άνδρας/ Γυναίκα (n)	102/ 15	54/10	48/5
<u>Παράγοντες καρδιαγγειακού κινδύνου</u>			
Ενεργητικό κάπνισμα, %	70,4	70,2	70,6
Υπέρταση, %	54,1	61,7	48,9
Υπερλιπιδαιμία, %	31,6	30,8	32,1
Διαβήτης, %	19,4	15,6	23,8
Παχυσαρκία, %	4,1	3,8	4,5
Οικογενειακό ιστορικό καρδιαγγειακής νόσου, %	5,1	4,4	6,2
<u>Αιματολογικοί δείκτες</u>			
Λευκοκύτταρα ($\times 10^9/L$)	10,3±4,6	11,1±4,9	10,1±2,9
Ουδετερόφιλα ($\times 10^9/L$)	7,1±4,1	7,7±5,3	6,9±2,8
Μονοκύτταρα ($\times 10^9/L$)	0,6±0,2	0,6±0,2	0,6±0,2
Αιμοπετάλια ($\times 10^9/L$)	230±83	229±86	231±77
Μέσος όγκος αιμοπεταλίων, MPV (fl)	10,7±0,95	10,5±0,8	10,9±0,7
Αιμοσφαιρίνη, HgB (g/dl)	14,1±1,80	15,1±1,0	14,0±0,8
Αιματοκρίτης, HCT (%)	41,5±5,1	39,5±6,1	41,2±4,2
Ολική χοληστερόλη (mg/dL)	198±52	191±58	208±48
HDL- χοληστερόλη (mg/dL)	42±9	40±8	44±9
Τριγλυκερίδια (mg/dL)	157±50	138±64	176±42
LDL- χοληστερόλη (mg/dL)	127±37	131±31	125±32
<u>Χορηγούμενα φάρμακα</u>			
B-αναστολείς, %	20,4	20,9	19,3
Ανταγωνιστές ασβεστίου, %	17,3	16,4	17,8
Αναστολείς του Μετατρεπτικού Ενζύμου της Αγγειοτενσίνης, %	31,6	30,0	32,5
Αναστολείς αγγειοτενσίνης II, %	22,4	20,2	25,0
Αναστολείς της αντλίας πρωτονίων, %	32,7	28,0	32,7
Στατίνες, %	35,7	29,0	32,4
Αντιδιαβητικά, %	18,4	17,6	19,2

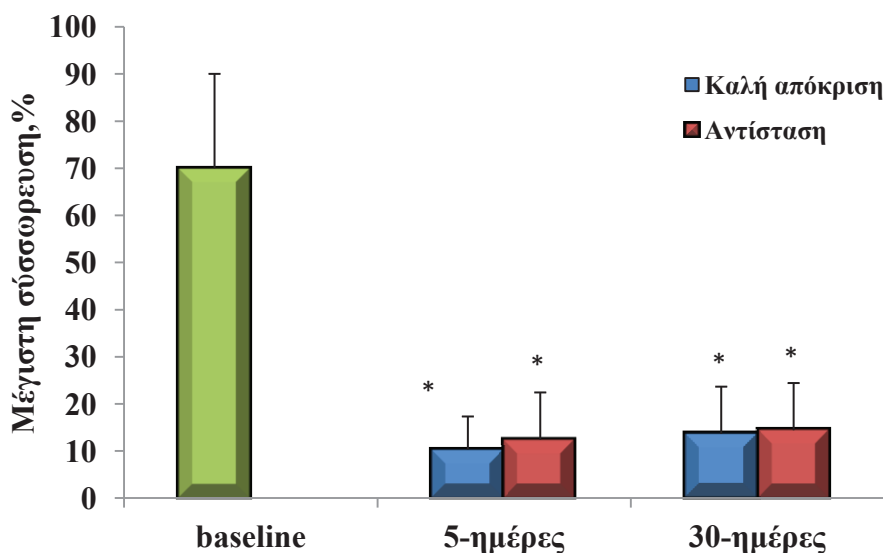
Οι αιματολογικοί δείκτες εκφράζονται ως τιμές: μέση τιμή ± τυπική απόκλιση

4. Μελέτη των αντιθρομβωτικών και πλειοτροπικών δράσεων της ασπιρίνης

4.1. Διερεύνηση της αντίστασης στην ασπιρίνη

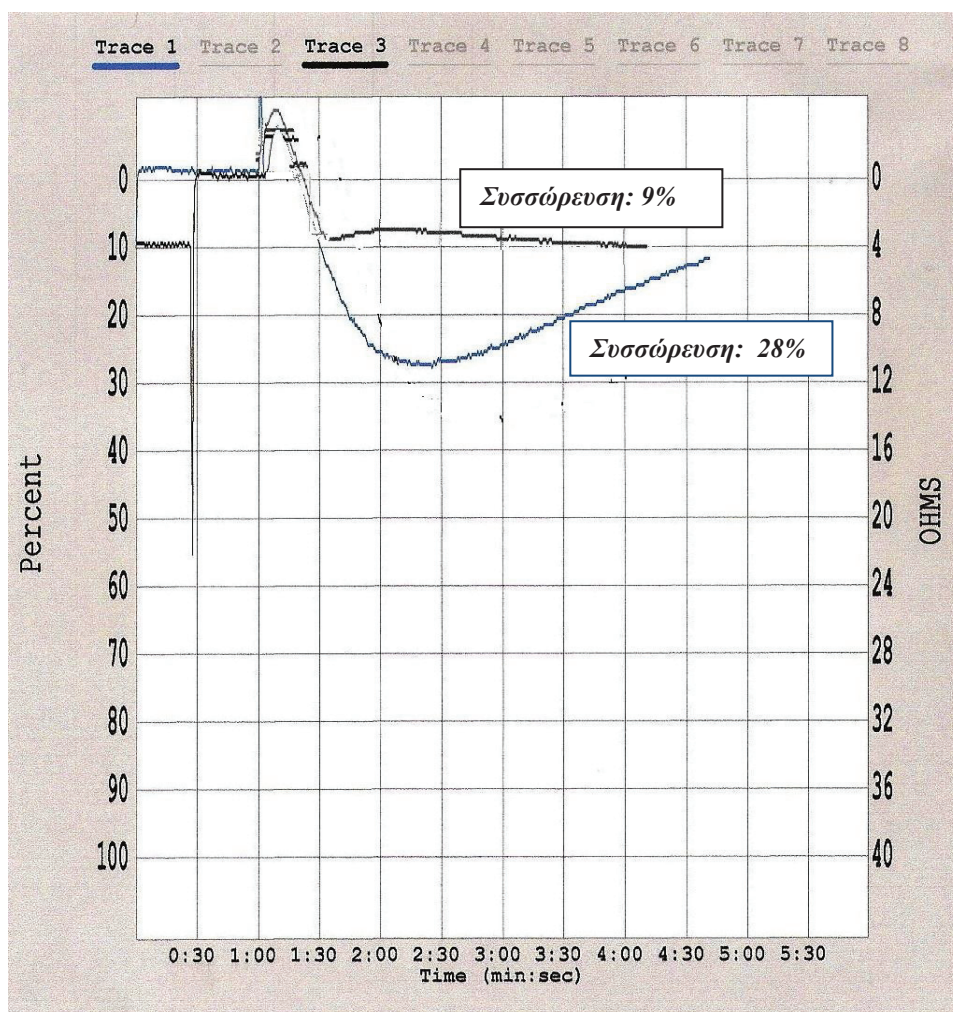
Στην παρούσα διατριβή, η εργαστηριακή αντίσταση στην ασπιρίνη εκτιμήθηκε με τη μέθοδο LTA μετά από ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων με AA στις 5 και 30-ημέρες και ορίστηκε για τιμές συσσώρευσης μεγαλύτερες από 20% σύμφωνα με τους ειδικούς που την έχουν καθιερώσει ως μέθοδο αναφοράς^{252,253}.

Το 21% του συνόλου των ασθενών παρουσιάζουν αντίσταση στην ασπιρίνη καθώς είχαν τιμές μέγιστης συσσώρευσης αιμοπεταλίων $38,5 \pm 18\%$. Αντίθετα το 79% των ασθενών εμφανίζουν καλή απόκριση στην ασπιρίνη με τιμές μέγιστης συσσώρευσης $7,43 \pm 5,2\%$. Οι τιμές συσσώρευσης στο AA στις 30-ημέρες δεν μεταβλήθηκαν τόσο στους ασθενείς που εμφάνισαν αντίσταση στην ασπιρίνη όσο και σε αυτούς με καλή απόκριση στο φάρμακο (Εικόνα 4.1). Συνεπώς, στις 5-ημέρες στους ασθενείς με καλή απόκριση, η ανασταλτική δράση της ασπιρίνης είναι 89% ενώ για τους ασθενείς με αντίσταση 45%. Παρόμοια ανασταλτική δράση καταγράφεται και στις 30-ημέρες.



Εικόνα 4.1. Μέγιστη συσσώρευση αιμοπεταλίων μετά από ενεργοποίηση με AA στις 5 και 30-ημέρες μετά τη χορήγηση της ασπιρίνης σε ασθενείς με αντίσταση και καλή απόκριση στο φάρμακο. * $p < 0,05$ σε σύγκριση με τις τιμές στο baseline.

Στην εικόνα 4.2 φαίνονται χαρακτηριστικές εικόνες συσσωρευομετρίας μετά από την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων με την προσθήκη AA σε ασθενή με αντίσταση στην ασπιρίνη (τιμή μέγιστης συσσώρευσης: 28%) και σε ασθενή με καλή απόκριση στο φάρμακο (τιμή μέγιστης συσσώρευσης: 9%).

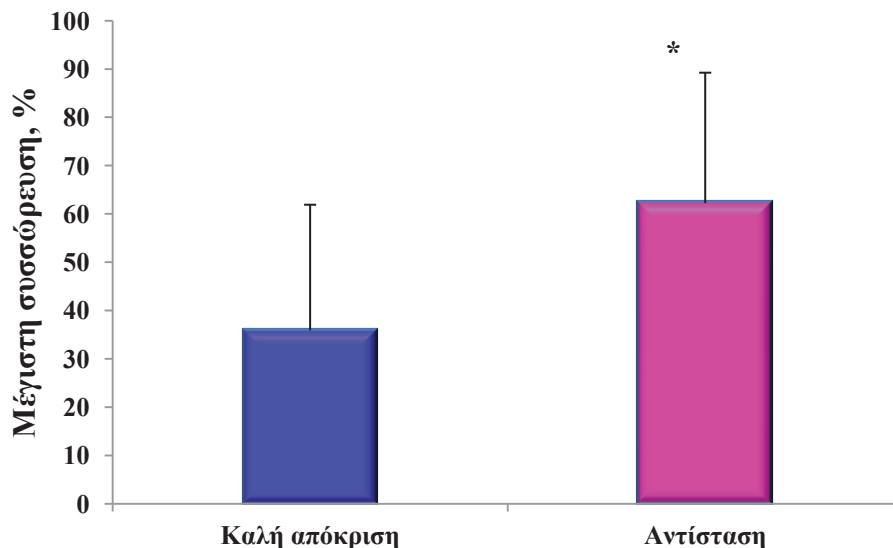


Εικόνα 4.2. Χαρακτηριστικές εικόνες συσσωρευομετρίας σε ασθενή με αντίσταση στην ασπιρίνη και σε ασθενή με καλή απόκριση στο φάρμακο.

4.2. Επίδραση της ασπιρίνης στη συσσώρευση στο TRAP και η πιθανή συσχέτιση με την αντίσταση

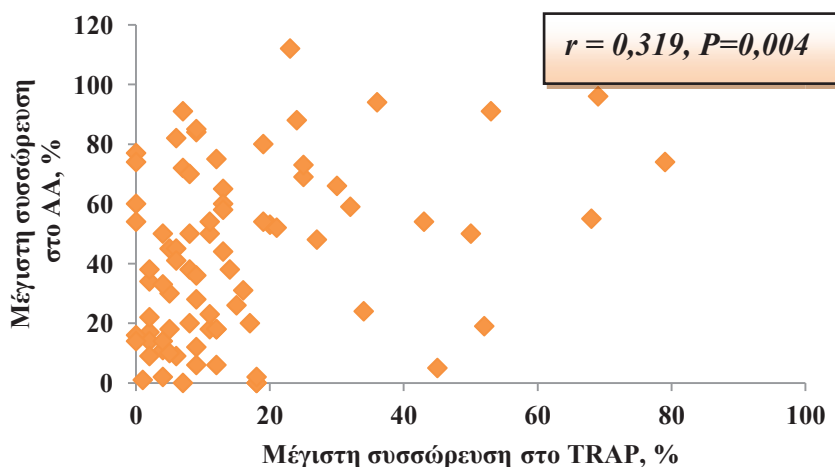
Σε πειράματα συσσωρευομετρίας, τα αιμοπετάλια ενεργοποιήθηκαν με τον αγωνιστή TRAP-14 ο οποίος ενεργοποιεί τα αιμοπετάλια διαμέσου του υποδοχέα PAR-1. Στους ασθενείς με αντίσταση στην ασπιρίνη η επαγόμενη από το TRAP-14 μέγιστη συσσώρευση

είναι 2 φορές μεγαλύτερη σε σύγκριση με τους ασθενείς με καλή απόκριση στο φάρμακο (Εικόνα 4.3).



Εικόνα 4.3. Μέγιστη συσσώρευση στο TRAP-14 στους ασθενείς με καλή απόκριση στην ασπιρίνη και αντίσταση στο φάρμακο. Οι τιμές εκφράζονται ως μέση τιμή $\pm$ τυπική απόκλιση. * $p<0,05$ σε σύγκριση με τη μέγιστη συσσώρευση στους ασθενείς με καλή απόκριση.

Φαίνεται πως η απόκριση στην ασπιρίνη μπορεί να επηρεάζει τις τιμές μέγιστης συσσώρευσης στο TRAP. Για το λόγο αυτό έγινε συσχέτιση των δύο παραμέτρων. Πράγματι παρατηρείται ισχυρή θετική συσχέτιση μεταξύ της μέγιστης συσσώρευσης στο AA και της μέγιστης συσσώρευσης στο TRAP (Εικόνα 4.4).

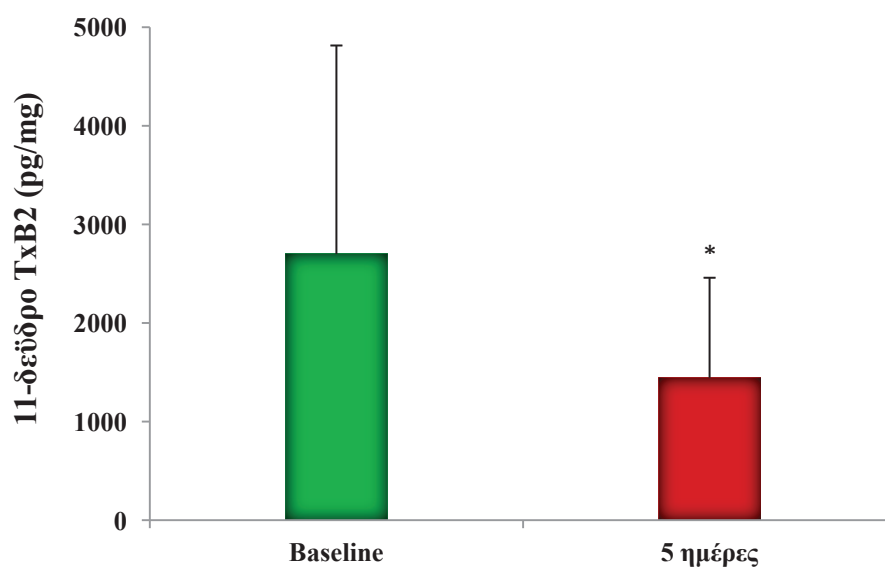


Εικόνα 4.4. Γράφημα συσχέτισης (r) μεταξύ της μέγιστης συσσώρευσης των αιμοπεταλίων στο AA και της μέγιστης συσσώρευσης των αιμοπεταλίων στο TRAP.

4.3. Μελέτη της δράσης της ασπιρίνης στην έκκριση αιμοπεταλιακών παραγόντων. Συσχέτιση με την αντίσταση

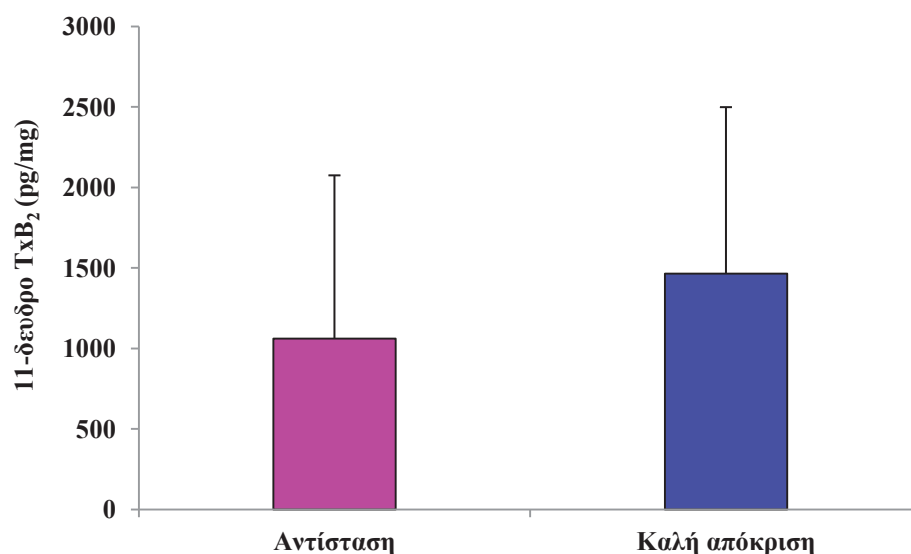
Στη συνέχεια, προσδιορίστηκαν παράγοντες που εκκρίνονται από τα ενεργοποιημένα αιμοπετάλια, όπως το TxB_2 στο πλάσμα και το 11-δεϋδρο- TxB_2 στα ούρα. Οι παράγοντες αυτοί συσχετίζονται με την αντίσταση στην ασπιρίνη. Τα επίπεδα του 11-δεϋδρο- TxB_2 επηρεάζονται από τη νεφρική λειτουργία²⁵⁴. Γι' αυτό το λόγο προσδιορίσαμε τα επίπεδα κρεατινίνης στα ούρα και οι τιμές του 11-δεϋδρο TxB_2 εκφράστηκαν ως pg/mg κρεατινίνης.

Τα επίπεδα του 11-δεϋδρο TxB_2 στα ούρα στο baseline και στις 5 ημέρες μετά τη φόρτιση με ασπιρίνη φαίνονται στην εικόνα 4.5. Η χορήγηση ασπιρίνης μείωσε τα επίπεδα του 11-δεϋδρο TxB_2 στα ούρα από το baseline στις 5 ημέρες κατά 46,7%.



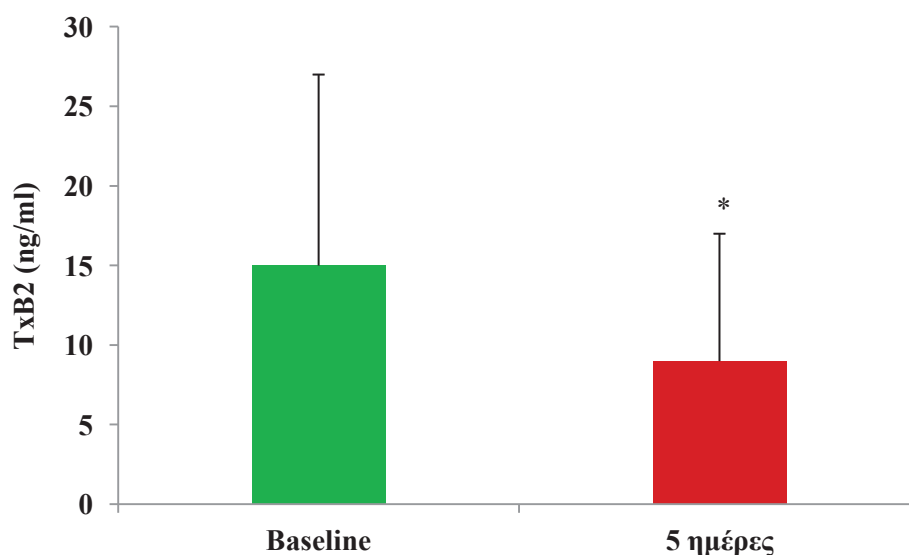
Εικόνα 4.5. Επίπεδα 11-δεϋδρο TxB_2 στα ούρα σε ασθενείς με ΟΣΣ στο baseline καθώς και στις 5 ημέρες μετά τη φόρτιση με ασπιρίνη. Οι τιμές εκφράζονται ως μέση τιμή $\pm$ τυπική απόκλιση, * $p < 0,05$ σε σύγκριση με τις τιμές στο baseline.

Στις 5-ημέρες, τα επίπεδα του 11-δεϋδρο TxB_2 στα ούρα δεν διαφοροποιούνται για τους ασθενείς που εμφανίζουν αντίσταση και σε αυτούς με καλή απόκριση στην ασπιρίνη (Εικόνα 4.6).

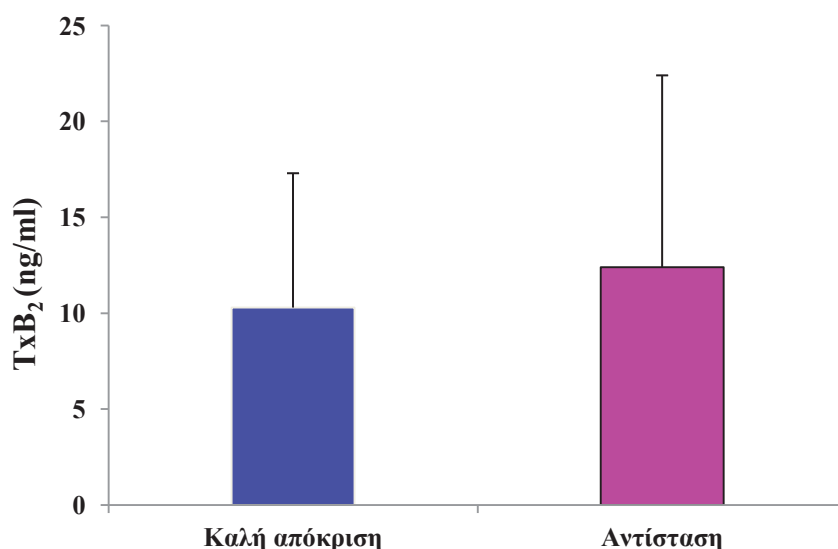


Εικόνα 4.6. Επίπεδα του 11-δεϋδρο TxB₂ στα ούρα στους ασθενείς με αντίσταση και με καλή απόκριση στην ασπιρίνη. Οι τιμές εκφράζονται ως μέση τιμή ± τυπική απόκλιση.

Επιπρόσθετα προσδιορίστηκαν, τα επίπεδα του TxB₂ στο πλάσμα. Παρατηρήθηκε ότι η χορήγηση ασπιρίνης μειώνει τα επίπεδα του TxB₂ στο πλάσμα από το baseline στις 5 ημέρες κατά 34,5% (Εικόνα 4.7). Τα επίπεδα του TxB₂ στο πλάσμα δεν διαφοροποιήθηκαν στους ασθενείς με αντίσταση στην ασπιρίνη και σε εκείνους με καλή απόκριση στις 5-ημέρες μετά την έναρξη της χορήγησης του φαρμάκου (Εικόνα 4.8).



Εικόνα 4.7. Επίπεδα TxB₂ στο πλάσμα σε ασθενείς με ΟΣΣ στο baseline και στις 5 ημέρες μετά τη φόρτιση με ασπιρίνη. Οι τιμές εκφράζονται ως μέση τιμή ± τυπική απόκλιση, $p < 0,05$ σε σύγκριση με τις τιμές στο baseline.



Εικόνα 4.8. Επίπεδα TxB₂ στο πλάσμα σε ασθενείς με ΟΣΣ που εμφανίζουν αντίσταση και σε αυτούς που εμφανίζουν καλή απόκριση στην ασπιρίνη 5 ημέρες μετά τη φόρτιση. Οι τιμές εκφράζονται ως μέση τιμή ± τυπική απόκλιση.

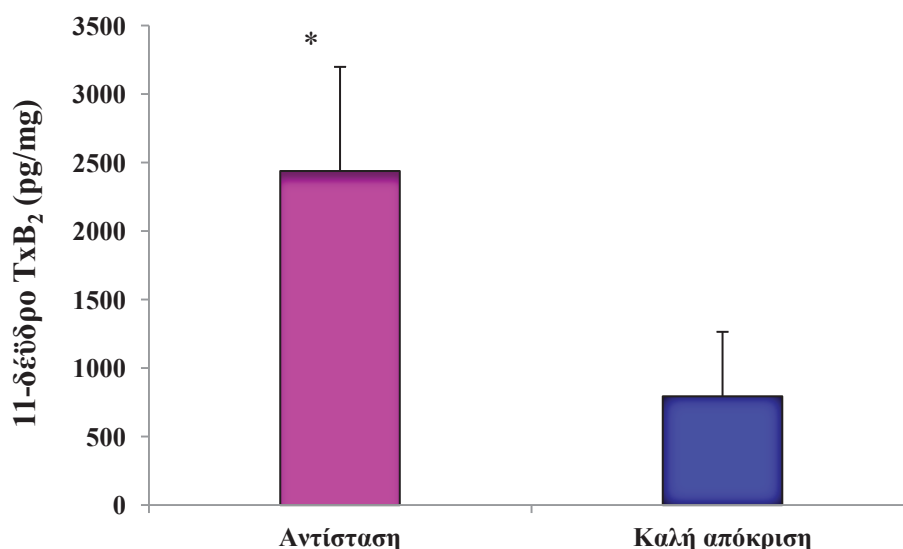
Από τα παραπάνω φαίνεται πως η αντίσταση όπως προσδιορίστηκε με τη μέθοδο LTA δεν επηρεάζει τα επίπεδα του 11-δεϋδρο TxB₂ στα ούρα και του TxB₂ στο πλάσμα. Γι' αυτό το λόγο πραγματοποιήσαμε συσχετίσεις μεταξύ των τριών παραμέτρων (Πίνακας 4.1.). Πράγματι, η μέγιστη συσσώρευση των αιμοπεταλίων στο AA δεν συσχετίζεται με τα επίπεδα του 11-δεϋδρο TxB₂ στα ούρα και του TxB₂ στο πλάσμα. Ωστόσο, παρατηρείται στατιστικά σημαντική συσχέτιση ανάμεσα στα επίπεδα του 11-δεϋδρο TxB₂ και του TxB₂.

Πίνακας 4.1. Συσχετίσεις (r) κατά Pearson και τιμές στατιστικής σημαντικότητας (p) των συσχετίσεων των παραμέτρων συσσώρευση με AA και επιπέδων 11-δεϋδρο TxB₂ στα ούρα και TxB₂ στο πλάσμα.

Παράμετροι	r	P
LTA(AA)- 11-δεϋδρο TxB ₂	-0,243	0,317
LTA(AA)-TxB ₂	-0,030	0,820
11-δεϋδρο TxB ₂ -TxB ₂	0,427	0,05

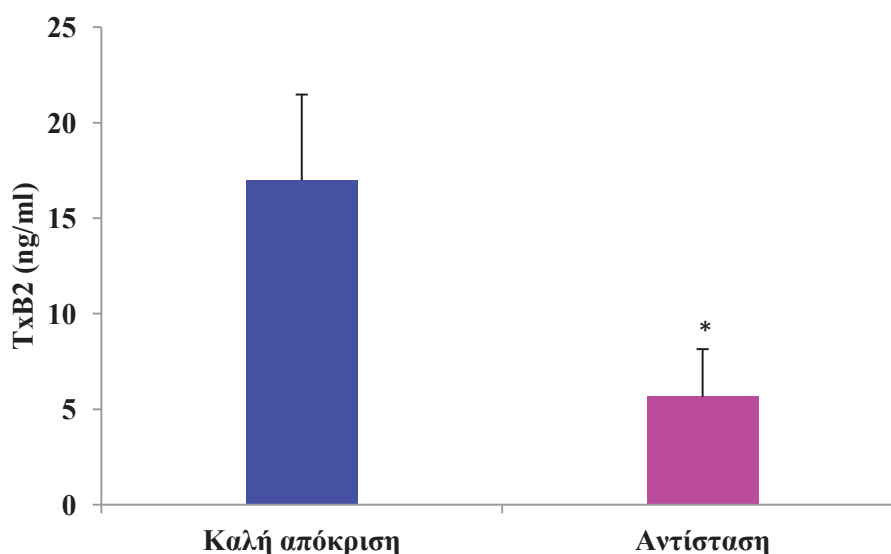
Το εύρημα αυτό μας οδήγησε στην αναζήτηση τιμών κατωφλίου για τον ορισμό της αντίστασης στην ασπιρίνη με προσδιορισμό των επιπέδων TxB₂. Σύμφωνα με μελέτες (οι οποίες δεν έχουν οδηγήσει σε συμφωνία ειδικών), η αντίσταση των ασθενών μπορεί να οριστεί: (i) για επίπεδα 11-δεϋδρο-TxB₂ στα ούρα πάνω από 1500 pg/mg κρεατινίνης και (ii) για επίπεδα TxB₂ στο πλάσμα πάνω από 10 ng/ml.

Με βάση το κριτήριο (i), το 34,8% είχαν αντίσταση στην ασπιρίνη με τρεις φορές υψηλότερα επίπεδα σε σύγκριση με αυτούς που εμφανίζουν καλή απόκριση στην ασπιρίνη (Εικόνα 4.9).



Εικόνα 4.9. Επίπεδα 11-δεϋδρο TxB₂ στα ούρα σε ασθενείς με ΟΣΣ που εμφανίζουν αντίσταση και σε αυτούς που εμφανίζουν καλή απόκριση στην ασπιρίνη 5 ημέρες μετά τη φόρτιση. Οι τιμές εκφράζονται ως μέση τιμή ± τυπική απόκλιση. * $p < 0,05$ σε σύγκριση με τους ασθενείς με καλή απόκριση.

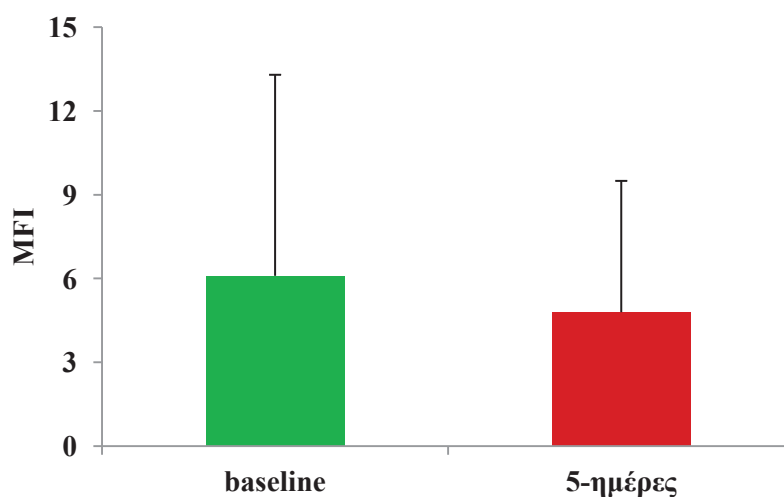
Με βάση το κριτήριο (ii), το 32% του συνόλου των ασθενών εμφανίζει επίπεδα TxB₂ στο πλάσμα ≥ 10 ng/ml και άρα αντίσταση στην ασπιρίνη. Οι ασθενείς αυτοί είχαν τρεις φορές υψηλότερα επίπεδα TxB₂ στο πλάσμα σε σύγκριση με αυτούς που εμφανίσαν καλή απόκριση στην ασπιρίνη (Εικόνα 4.10).



Εικόνα 4.10. Επίπεδα TxB₂ στο πλάσμα σε ασθενείς με ΟΣΣ που εμφανίζουν αντίσταση και σε αυτούς που εμφανίζουν καλή απόκριση στην ασπιρίνη 5 ημέρες μετά τη φόρτιση. Οι τιμές εκφράζονται ως μέση τιμή $\pm$ τυπική απόκλιση. * $p < 0,05$ σε σύγκριση με τους ασθενείς με καλή απόκριση.

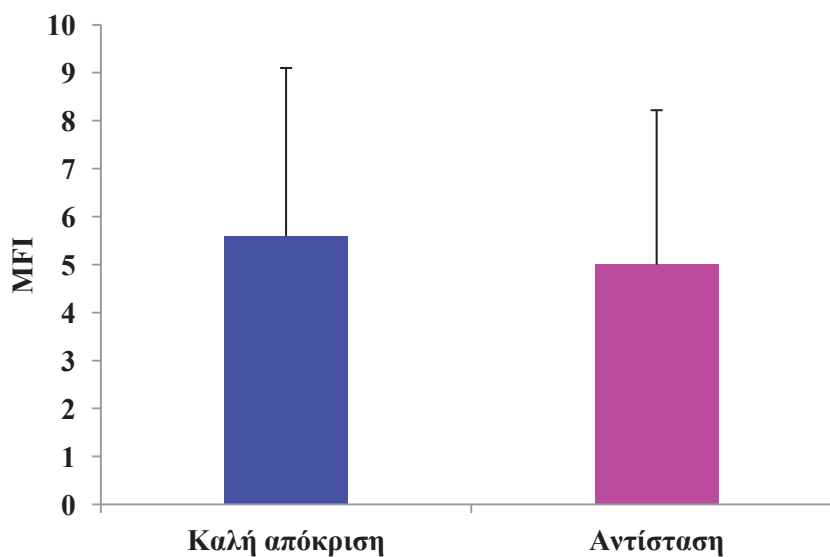
Επιπρόσθετα μελετήσαμε σε μη ενεργοποιημένα αιμοπετάλια την επίδραση της ασπιρίνης στη μεμβρανική έκφραση της P-σελεκτίνης καθώς και στην έκκριση της P-σελεκτίνης (sP-σελεκτίνης) στο baseline και στις 5-ημέρες.

Οι τιμές MFI της μεμβρανικής έκφρασης της P-σελεκτίνης στο baseline και στις 5-ημέρες φαίνονται στην εικόνα 4.11. Η χορήγηση της ασπιρίνης μείωσε την έκφραση της P-σελεκτίνης κατά 21,5%



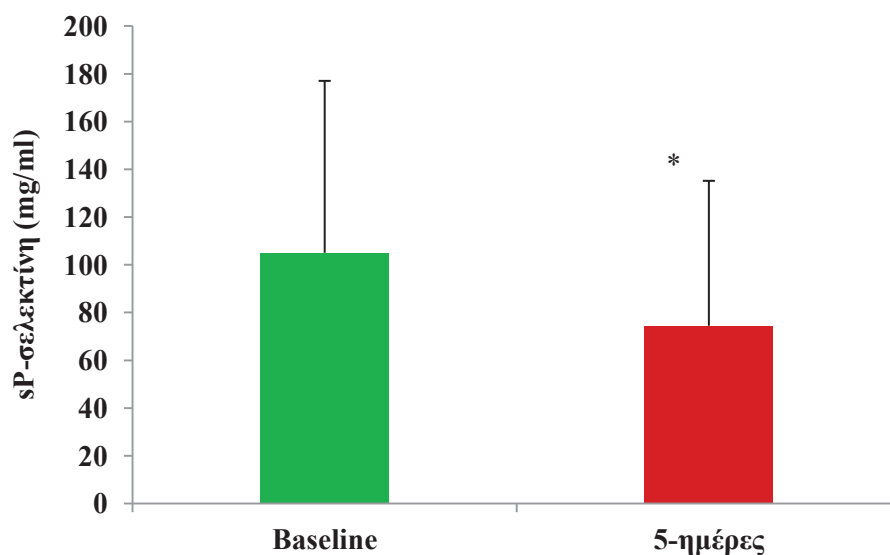
Εικόνα 4.11. Τιμές MFI της P-σελεκτίνης στο baseline καθώς και στις 5-ημέρες μετά τη φόρτιση. Οι τιμές εκφράζονται ως μέση τιμή $\pm$ τυπική απόκλιση.

Στις 5-ημέρες, η μεμβρανική έκφραση της P-σελεκτίνης δεν διαφοροποιείται ανάμεσα στους ασθενείς με αντίσταση στην ασπιρίνη και στους ασθενείς με καλή απόκριση στο φάρμακο (Εικόνα 4.12).



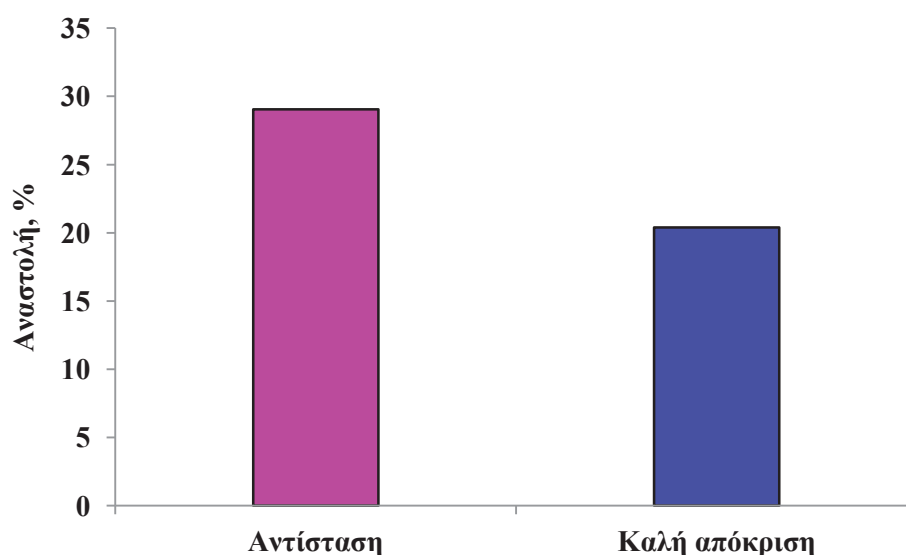
Εικόνα 4.12. Τιμές MFI μεμβρανικής έκφρασης P-σελεκτίνης στους ασθενείς με αντίσταση στην ασπιρίνη και με καλή απόκριση στο φάρμακο. Οι τιμές εκφράζονται ως μέση τιμή $\pm$ τυπική απόκλιση.

Τα επίπεδα της sP-σελεκτίνης προσδιορίστηκαν στο baseline και στις 5-ημέρες (Εικόνα 4.13). Η χορήγηση της διπλής αντιαιμοπεταλιακή αγωγής μειώνει τα επίπεδα της sP-σελεκτίνης κατά 30%.



Εικόνα 4.13. Τα επίπεδα της sP-σελεκτίνης στο baseline και στα 5-ημέρες. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μέση τιμή $\pm$ τυπική απόκλιση.

Στις 5-ημέρες, η ανασταλτική δράση της ασπιρίνης στα επίπεδα της sP-σελεκτίνης δεν διαφοροποιείται στους ασθενείς με αντίσταση ($p=0,445$) (Εικόνα 4.14).



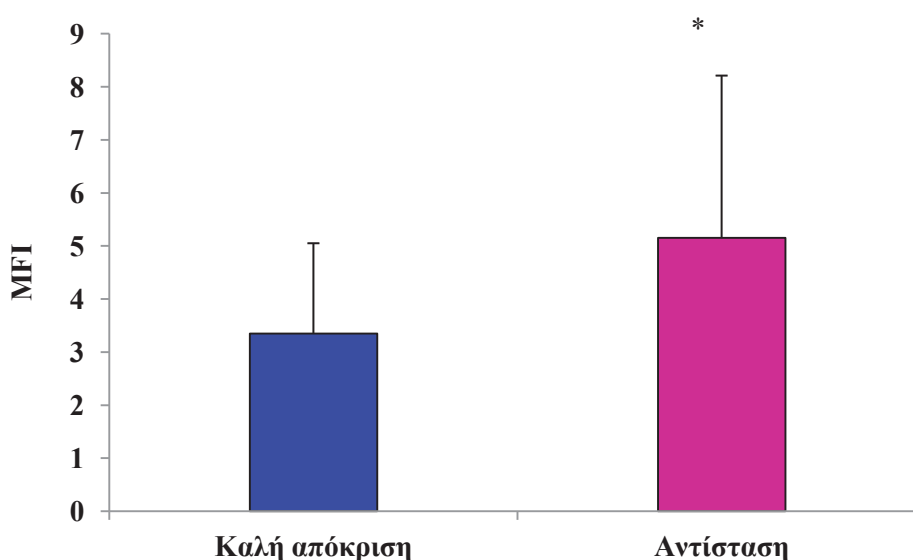
Εικόνα 4.14. Ανασταλτική δράση της ασπιρίνης στην έκκριση της sP-σελεκτίνης στους ασθενείς με καλή απόκριση και αντίσταση στην ασπιρίνη.

Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε συσχέτιση μεταξύ της μεμβρανικής έκφρασης της P-σελεκτίνης και της sP-σελεκτίνης (Πίνακας 4.2). Δεν βρέθηκε καμία συσχέτιση μεταξύ της μεμβρανικής έκφρασης της P-σελεκτίνης στα μη ενεργοποιημένα αιμοπετάλια στο baseline και στις 5-ημέρες με τα επίπεδα της sP-σελεκτίνης στο baseline και στις 5-ημέρες.

Πίνακας 4.2. Συσχετίσεις (r) κατά Pearson και τιμές στατιστικής σημαντικότητας (p) των συσχετίσεων των παραμέτρων μεμβρανική έκφραση της P-σελεκτίνης και της sP-σελεκτίνης.

Παράμετροι	r	p
Μεμβρανική έκφραση baseline-sP-σελεκτίνη baseline	-0,185	0,477
Μεμβρανική έκφραση 5-ημέρες-sP-σελεκτίνη 5-ημέρες	-0,034	0,847

Επιπλέον, μελετήθηκε η επίδραση της ασπιρίνης στην έκφραση του υποδοχέα $\alpha_{IIb}\beta_3$ (πρόσδεση PAC-1) στα μη ενεργοποιημένα αιμοπετάλια. Στις 5-ημέρες, η έκφραση του $\alpha_{IIb}\beta_3$ είναι μεγαλύτερη στους ασθενείς με αντίσταση στην ασπιρίνη σε σύγκριση με τους ασθενείς που έχουν καλή απόκριση στο φάρμακο (Εικόνα 4.15).



Εικόνα 4.15. Τιμές MFI του PAC-1 στους ασθενείς με αντίσταση στην ασπιρίνη και με καλή απόκριση στο φάρμακο. Οι τιμές εκφράζονται ως μέση τιμή $\pm$ τυπική απόκλιση.

Τέλος, προσδιορίστηκαν τα επίπεδα βιολογικά δραστικών παραγόντων (κυτταροκίνες, χημειοκίνες, αυξητικοί παράγοντες) στο πλάσμα στο baseline και στις 5-ημέρες μετά τη

φόρτιση. Χρησιμοποιήθηκε για πρώτη φορά στο εργαστήριο μας η μέθοδος της μικροσωματιδιακής ανοσοενζυμικής τεχνολογίας που βασίζεται στην τεχνολογία πολλαπλής χαρτογράφησης (xMAP) με τη βοήθεια του οργάνου Bio-Plex 200 για τον ταυτόχρονο προσδιορισμό 5 παραγόντων. Στον πίνακα 4.3 φαίνονται τα επίπεδα των βιολογικά δραστικών παραγόντων στο πλάσμα των ΟΣΣ ασθενών στο baseline καθώς και στις 5-ημέρες στους ασθενείς που είχαν καλή απόκριση στην ασπιρίνη και στους ασθενείς με αντίσταση.

Τα επίπεδα του RANTES, του VEGF και της IL-8, μειώνονται από το baseline στις 5-ημέρες μετά τη φόρτιση. Επιπλέον, στα δείγματα που μετρήθηκαν δεν ανιχνεύθηκε η IL-1b ενώ τα επίπεδα του GM-CSF παραμένουν σταθερά. Τα επίπεδα των εκκρινόμενων δεικτών της ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων δεν διαφοροποιούνται για τους ασθενείς με καλή απόκριση και σε εκείνους με αντίσταση στο φάρμακο. Συνεπώς, η απόκριση στην ασπιρίνη δεν επηρεάζει σημαντικά τα επίπεδα των κυτταροκινών.

Πίνακας 4.3. Επίπεδα εκκρινόμενων δεικτών της ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων στο πλάσμα ασθενών με ΟΣΣ στο baseline καθώς και 5-ημέρες μετά τη φόρτιση με ασπιρίνη και κλοπιδογρέλη. Τα επίπεδα εκφράζονται ως μέση τιμή $\pm$ τυπική απόκλιση.

Εκκρινόμενοι δείκτες (pg/ml)	Baseline	5-ημέρες	
		Καλή απόκριση	Αντίσταση
GM-CSF	38,30 $\pm$ 23,18	32,53 $\pm$ 20	32,69 $\pm$ 24
RANTES	18989 $\pm$ 12988	12594 $\pm$ 6132*	12780 $\pm$ 2278*
IL-8	15,39 $\pm$ 13,45	9,43 $\pm$ 3,16*	5,11 $\pm$ 1,24*
IL-1b	ΔΑ	ΔΑ	ΔΑ
VEGF	18,18 $\pm$ 20,89	8,14 $\pm$ 4,87*	12,98 $\pm$ 11,65*

(ΔΑ-Δεν Ανιχνεύθηκαν)

* $p < 0,05$ σε σύγκριση με τα επίπεδα στο baseline σύμφωνα με τον έλεγχο *paired t-test*

Από τις συσχετίσεις των παραπάνω παραμέτρων με τη μέγιστη συσσώρευση στο ΑΑ (Πίνακας 4.4) αναδεικνύεται ότι η πρόσδεση του PAC-1 στα μη ενεργοποιημένα αιμοπετάλια μπορεί να αποτελέσει δείκτη διάγνωσης της αντίστασης στην ασπιρίνη.

Πίνακας 4.4. Συσχετίσεις (r) κατά Pearson και τιμές στατιστικής σημαντικότητας (p) των μεταβλητών με τη μέγιστη συσσώρευση στο ΑΑ.

LTA-AA	R	P
Μεμβρανική P-σελεκτίνη (εν ηρεμία αιμοπετάλια)	0,110	0,434
sP-σελεκτίνη στο πλάσμα	0,075	0,607
PAC-1 (εν ηρεμία αιμοπετάλια)	0,293	0,032

5. Μελέτη των αντιθρομβωτικών και πλειοτροπικών δράσεων της κλοπιδογρέλης

5.1. Απόκριση των ασθενών στην κλοπιδογρέλη

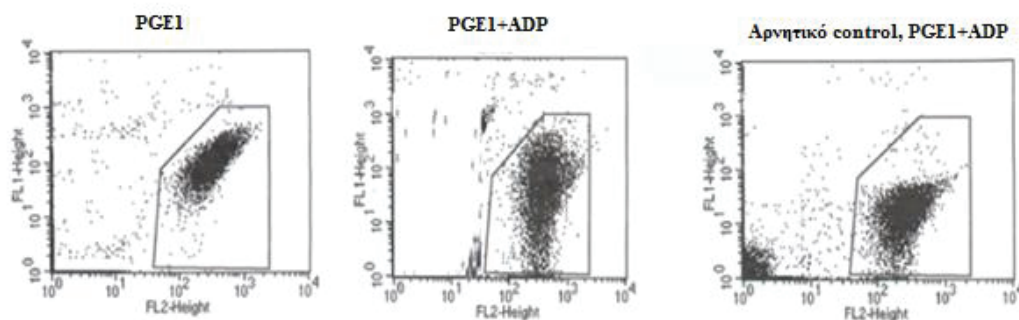
Για τη διερεύνηση της διαφορετικής αιμοπεταλιακής απόκρισης στην κλοπιδογρέλη πραγματοποιήθηκε ο έλεγχος της φωσφορυλίωσης της VASP στις 3-5 ημέρες και μετά από 30 ημέρες. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της δοκιμασίας VASP που πραγματοποιήθηκε κατά το χρονικό διάστημα 3-5 ημερών, οι ασθενείς εμφάνισαν μεγάλη διακύμανση στις τιμές του δείκτη PRI. Στη συμφωνία των ειδικών για την αντιαιμοπεταλιακή αγωγή καθορίστηκαν τα όρια της απόκρισης των αιμοπεταλίων στην αντιαιμοπεταλιακή αγωγή για τις περισσότερο χρησιμοποιούμενες εργαστηριακές μεθόδους. Ένα από αυτά τα κριτήρια είναι η τιμή του δείκτη της αιμοπεταλιακής δραστηριότητας να είναι μεγαλύτερη από 50%, σύμφωνα με τη δοκιμασία VASP²⁵⁵. Έτσι, τιμές του PRI ίσες ή μεγαλύτερες του 50% υποδεικνύουν κακή απόκριση στην κλοπιδογρέλη²⁵⁶.

Σύμφωνα με το παραπάνω κριτήριο, στις 3-5 ημέρες, τα αποτελέσματά μας έδειξαν ότι 33% του συνόλου των ασθενών που λάμβαναν κλοπιδογρέλη είχαν ως μέσο όρο τιμές $PRI=66,50\pm 13,20\%$ και ταξινομήθηκαν ως κακοί ανταποκριτές στην κλοπιδογρέλη. Οι υπόλοιποι ασθενείς που εμφάνισαν καλή απόκριση στην κλοπιδογρέλη είχαν τιμές $PRI=30,68\pm 14,02\%$. Στις 30 ημέρες, οι τιμές PRI μειώθηκαν σημαντικά σε $38,3\pm 24,0$ ($P<0.05$ εν συγκρίσει με τις 5-ημέρες) και μόνο το 20% του συνόλου των ασθενών εμφάνισαν κακή απόκριση στην κλοπιδογρέλη (Εικόνα 5.1).

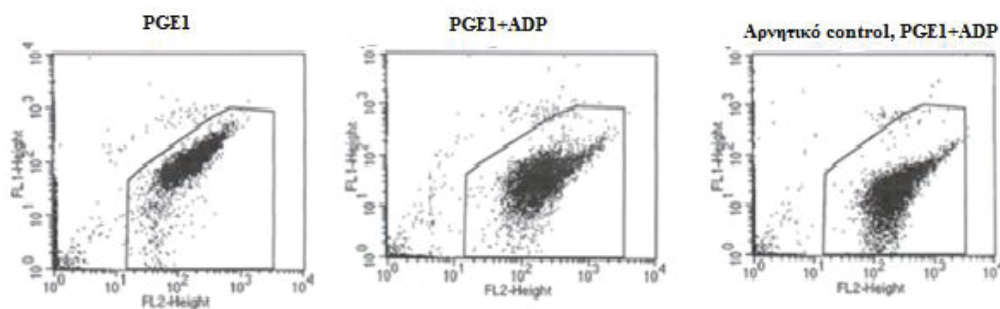


Εικόνα 5.1. Διάγραμμα που αναπαριστά το ποσοστό των ασθενών που εμφανίζουν καλή ή κακή απόκριση στην κλοπιδογρέλη σύμφωνα με την ανάλυση VASP στις 5 ημέρες και στις 30 ημέρες μετά τη φόρτιση με ασπιρίνη και κλοπιδογρέλη.

Στην εικόνα 5.2 παρουσιάζονται χαρακτηριστικές εικόνες κυτταρομετρίας ροής αιμοπεταλίων ασθενούς με καλή απόκριση στην κλοπιδογρέλη ενώ στην εικόνα 5.3 ασθενούς με κακή απόκριση (αντίσταση) στην κλοπιδογρέλη.



Εικόνα 5.2. Χαρακτηριστικές εικόνες κυτταρομετρίας ροής αιμοπεταλίων ασθενούς με καλή απόκριση στην κλοπιδογρέλη (PRI= 20,6%) με βάση την ανάλυση VASP.

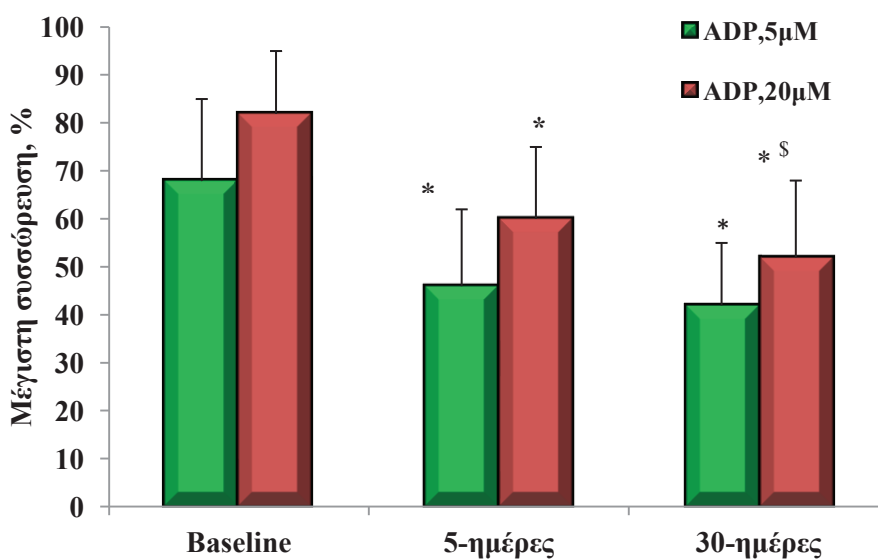


Εικόνα 5.3. Χαρακτηριστικές εικόνες κυτταρομετρίας ροής αιμοπεταλίων ασθενούς με και κακή απόκριση (αντίσταση) στην κλοπιδογρέλη (PRI= 76,4%).

5.2 Επίδραση της κλοπιδογρέλης στη συσσώρευση των αιμοπεταλίων σε διάφορους αγωνιστές

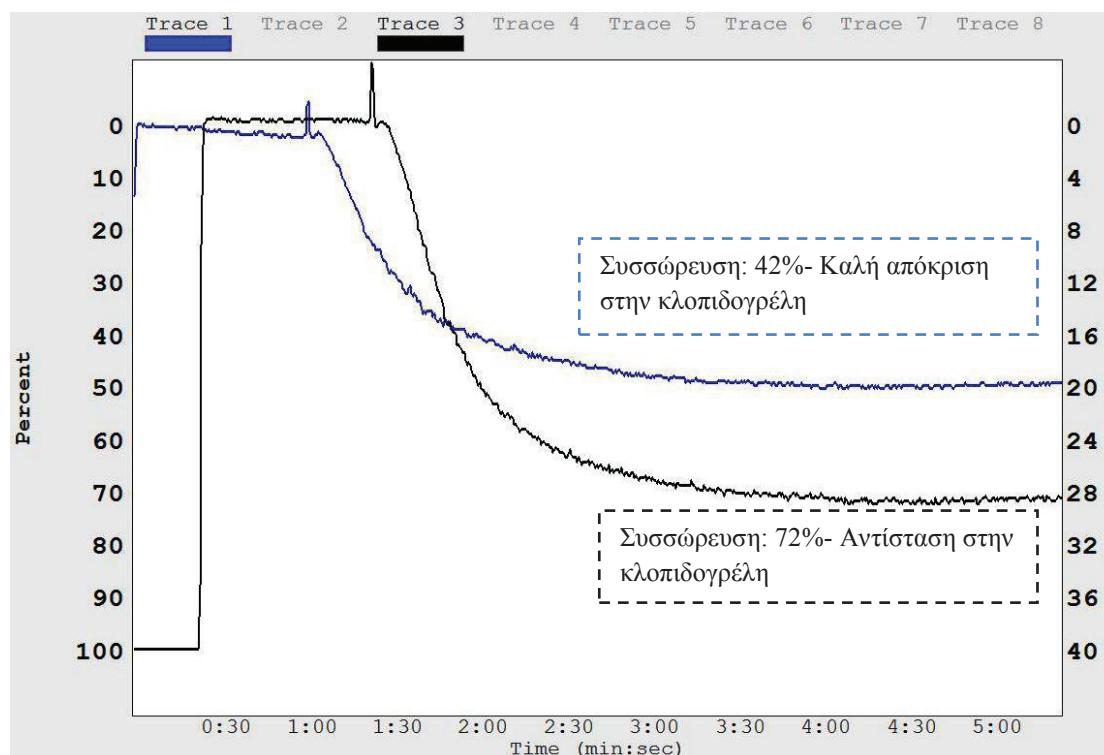
Στη συνέχεια, μελετήθηκε η επίδραση της κλοπιδογρέλης στη συσσώρευση των αιμοπεταλίων μετά από ενεργοποίηση με ADP, AA και TRAP-14 με χρήση της μεθόδου LTA. Η συσσωρευομετρία πραγματοποιήθηκε στο baseline, στις 5 ημέρες καθώς και μετά από 30 ημέρες.

Στην εικόνα 5.4 παρουσιάζονται οι τιμές της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων ασθενών που λάμβαναν κλοπιδογρέλη μετά από την ενεργοποίησή τους με ADP (5 και 20 μ M) στο baseline, στις 3-5 ημέρες και στις 30-ημέρες. Η κλοπιδογρέλη μειώνει τις τιμές συσσώρευσης μετά από ενεργοποίηση. Φαίνεται πως η ανασταλτική της δράση αυξάνεται από τις 5- στις 30-ημέρες.



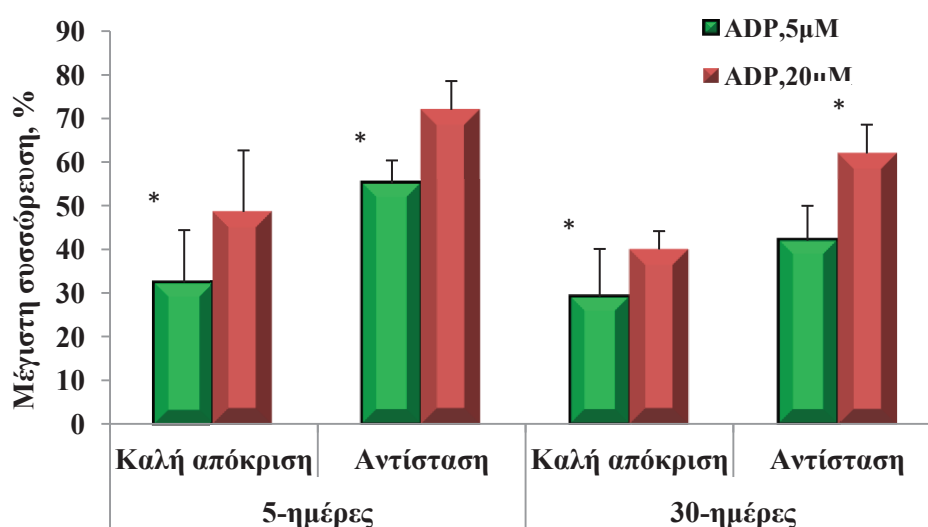
Εικόνα 5.4. Συσσώρευση των αιμοπεταλίων μετά από ενεργοποίηση με ADP, 5 και 30 ημέρες μετά τη χορήγηση κλοπιδογρέλης. Οι τιμές εκφράζονται ως μέση τιμή $\pm$ τυπική απόκλιση. * $P < 0,05$ για τις τιμές σε σύγκριση με το baseline \$ $P < 0.05$ για τις τιμές σε σύγκριση με τις 5-ημέρες.

Στην εικόνα 5.5 παρουσιάζονται χαρακτηριστικές εικόνες συσσωρευομετρίας μετά από ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων με ADP, 5 μ M και 20 μ M ασθενούς με καλή απόκριση στην κλοπιδογρέλη και ασθενούς με αντίσταση στο φάρμακο.



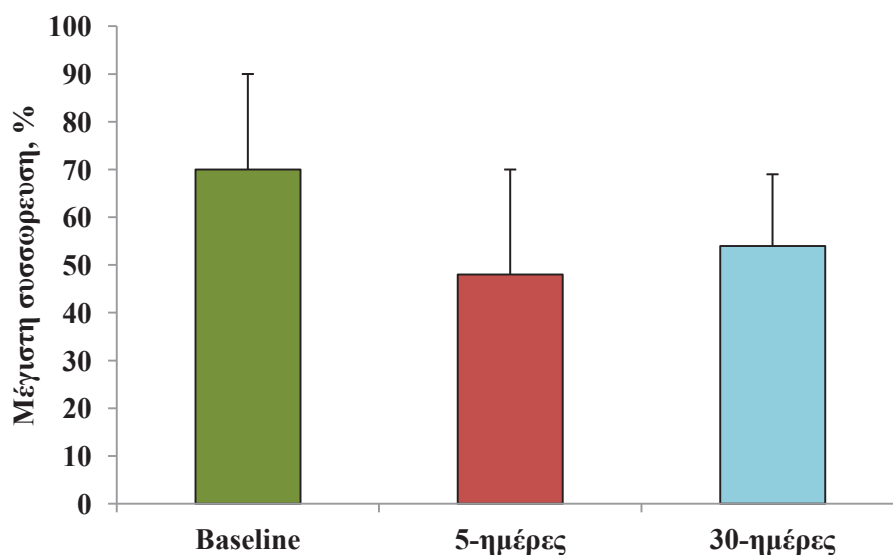
Εικόνα 5.5. Χαρακτηριστικές εικόνες συσσωρευομετρίας μετά από ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων με ADP 20 μ M σε ασθενή με αντίσταση και καλή απόκριση στην κλοπιδογρέλη.

Στη συνέχεια μελετήθηκε η επαγόμενη από το ADP συσσωρευση των αιμοπεταλίων σε σχέση με την αντίσταση με βάση την ανάλυση VASP. Η συσσωρευση των αιμοπεταλίων ήταν σημαντικά μεγαλύτερη για τους ασθενείς που εμφάνισαν αντίσταση σε σχέση με αυτούς που εμφάνισαν καλή απόκριση στην κλοπιδογρέλη 5 και 30-ημέρες μετά την έναρξη της αγωγής (Εικόνα 5.6).



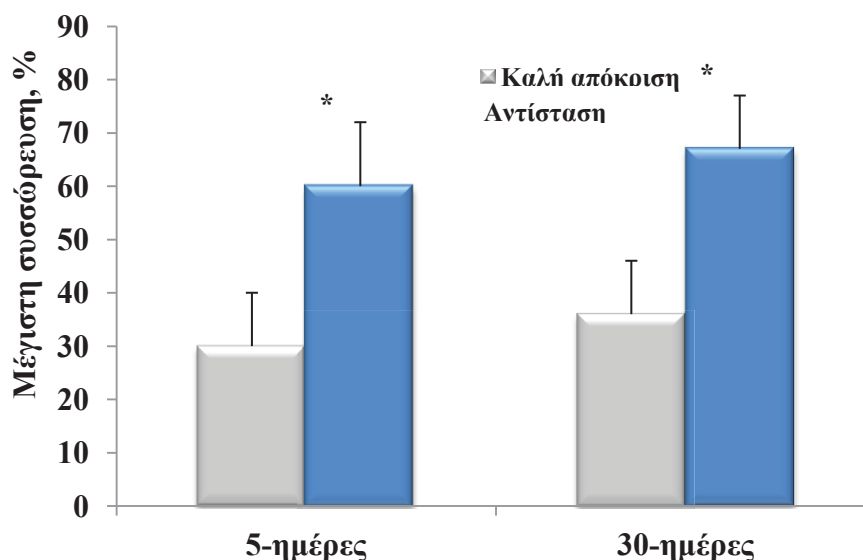
Εικόνα 5.6. Συσσώρευση των αιμοπεταλίων μετά από ενεργοποίηση με ADP σε ασθενείς με καλή απόκριση στην κλοπιδογρέλη και σε ασθενείς με αντίσταση στο φάρμακο. Οι τιμές εκφράζονται ως μέση τιμή $\pm$ τυπική απόκλιση. $P < 0,05$ σε σύγκριση με τις αντίστοιχες τιμές για την αντίσταση.

Παράλληλα, έγινε ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων με τον αγωνιστή TRAP-14. Στην εικόνα 5.7 παρουσιάζονται συγκριτικά οι τιμές της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων στο baseline, στις 5 και στις 30 ημέρες. Η χορήγηση κλοπιδογρέλης μειώνει την επαγόμενη από το TRAP συσσώρευση κατά 31,5% και 23% για τις 5 και τις 30 ημέρες, αντίστοιχα.



Εικόνα 5.7. Μέγιστη συσσώρευση των αιμοπεταλίων μετά από την ενεργοποίησή τους με TRAP-14 στο baseline καθώς 5 και 30 ημέρες μετά την έναρξη χορήγησης της κλοπιδογρέλης.

Για τους ασθενείς που εμφάνισαν αντίσταση στην κλοπιδογρέλη, η επαγόμενη από το TRAP συσσώρευση των αιμοπεταλίων ήταν 2 φορές υψηλότερη σε σύγκριση με τους ασθενείς που εμφανίζουν καλή απόκριση τόσο στις 5-ημέρες όσο και στις 30-ημέρες ($P<0.05$) (Εικόνα 5.8).



Εικόνα 5.8. Συσσώρευση των αιμοπεταλίων μετά από ενεργοποίηση με TRAP-14 σε ασθενείς με αντίσταση στην κλοπιδογρέλη και με καλή απόκριση στο φάρμακο. Οι τιμές εκφράζονται ως μέση τιμή $\pm$ τυπική απόκλιση. * $P<0,05$ σύγκριση με τις τιμές για την καλή απόκριση στην κλοπιδογρέλη.

5.3. Μελέτη της δράσης της κλοπιδογρέλης στην έκφραση και έκκριση αιμοπεταλιακών παραγόντων. Συσχέτιση με την αντίσταση

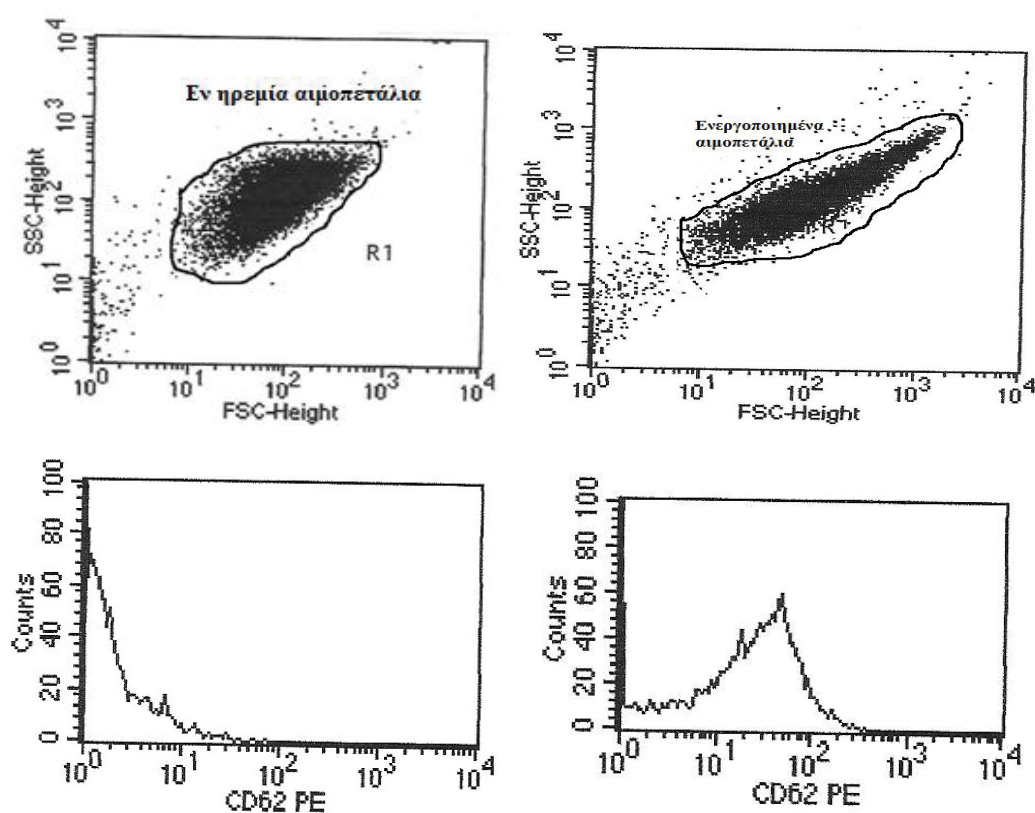
Επιπλέον, διερευνήθηκε η επίδραση της κλοπιδογρέλης στη μεμβρανική έκφραση της P-σελεκτίνης σε εν ηρεμία αιμοπετάλια καθώς και σε ενεργοποιημένα με ADP αιμοπετάλια στις 5 και 30 ημέρες μετά την έναρξη της χορήγησής της. Η μέση έκφραση της P-σελεκτίνης είναι σημαντικά αυξημένη στο baseline των ασθενών στα εν ηρεμία αιμοπετάλια ενώ μειώνεται με τη χορήγηση της κλοπιδογρέλης στις 5 και 30-ημέρες (Πίνακας 5.1).

Πίνακας 5.1. Έκφραση της P-σελεκτίνης σε εν ηρεμία και ενεργοποιημένα με ADP αιμοπετάλια στους ασθενείς με ΟΣΣ, στο baseline καθώς και στις 5 και 30-ημέρες μετά τη χορήγηση κλοπιδογρέλης.

Αιμοπετάλια	Baseline	Κλοπιδογρέλη	
		5-ημέρες	30-ημέρες
Εν ηρεμία	6,1±7,2	4,9±2,9	4,7±1,6
Ενεργοποιημένα	53,3±23,5**	42,0±17,4**	34,0±13,0**

Οι τιμές εκφράζονται ως μέση τιμή ± τυπική απόκλιση. ** $p < 0,01$ σε σύγκριση με τις αντίστοιχες τιμές στα μη ενεργοποιημένα αιμοπετάλια.

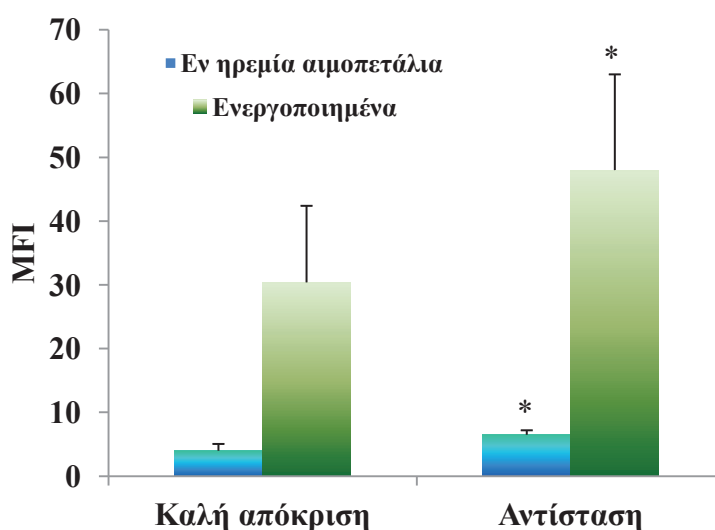
Η μέση έκφραση της P-σελεκτίνης αυξάνεται σημαντικά ($p < 0,01$) με την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων με ADP σε όλες τις χρονικές στιγμές (Πίνακας 5.1). Στην εικόνα 5.9 παρουσιάζονται χαρακτηριστικές κυτταρομετρικές εικόνες εν ηρεμία αιμοπεταλίων καθώς και ενεργοποιημένων με ADP αιμοπεταλίων και τα αντίστοιχα ιστογράμματα της έκφρασης του αντισώματος CD62P.



Εικόνα 5.9. Χαρακτηριστικές κυτταρομετρικές εικόνες εν ηρεμία και ενεργοποιημένων με ADP αιμοπεταλίων. Έκφραση του αντισώματος antiCD62P με ιστογράμματα.

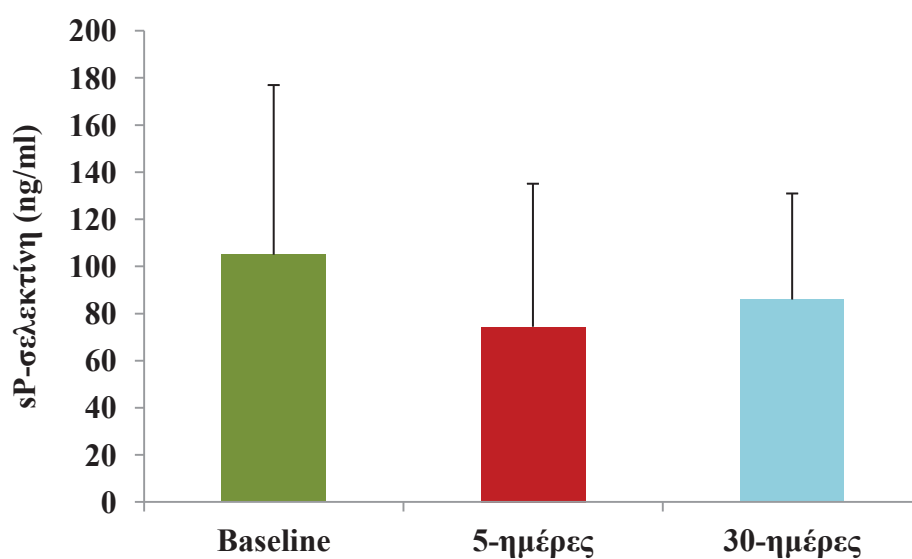
Η έκφραση της P-σελεκτίνης στα ενεργοποιημένα αιμοπετάλια μειώνεται σταδιακά από τις 5 στις 30-ημέρες σε σύγκριση με το baseline (Πίνακας 5.1).

Στους ασθενείς με αντίσταση στην κλοπιδογρέλη, η έκφραση της P-σελεκτίνης στα εν ηρεμία αιμοπετάλια είναι στατιστικά σημαντικά υψηλότερη ($6,5 \pm 0,7$ έναντι $4,0 \pm 1,1$) σε σύγκριση με αυτούς που εμφανίζουν καλή απόκριση στο φάρμακο ($P=0,001$). Ομοίως, η έκφραση της P-σελεκτίνης στα ενεργοποιημένα αιμοπετάλια είναι στατιστικά σημαντικά υψηλότερη ($48,0 \pm 15$ έναντι $30,4 \pm 12$) στους ασθενείς που εμφανίζουν αντίσταση σε σύγκριση με αυτούς που εμφανίζουν καλή απόκριση στην κλοπιδογρέλη ($P<0,05$) (Εικόνα 5.10).

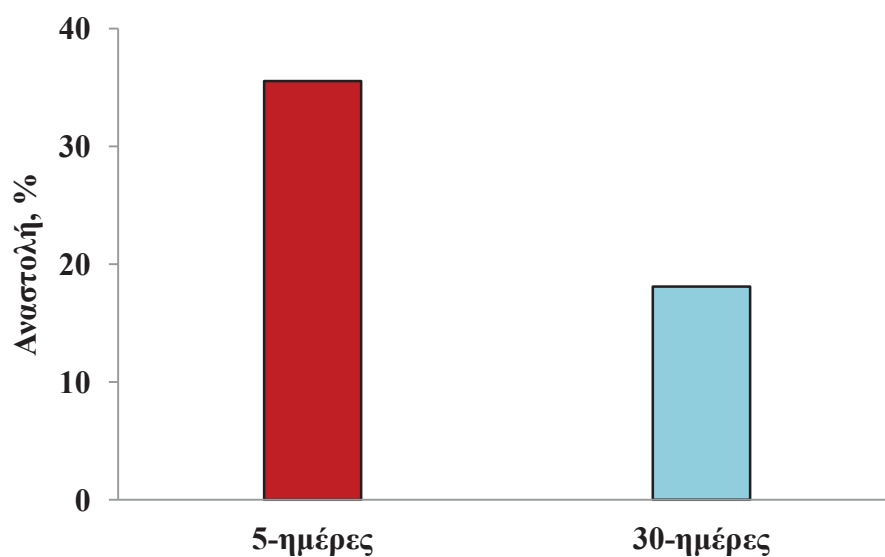


Εικόνα 5.10. Μεμβρανική έκφραση της P-σελεκτίνης σε ασθενείς με ΟΣΣ που λαμβάνουν θεραπεία με κλοπιδογρέλη. Οι τιμές εκφράζονται ως μέση τιμή $\pm$ τυπική απόκλιση. $P<0,05$ σε σύγκριση με τις αντίστοιχες τιμές στους ασθενείς με καλή απόκριση στην κλοπιδογρέλη,

Επιπλέον, έγινε προσδιορισμός των επιπέδων στο πλάσμα της sP-σελεκτίνης στο baseline, στις 5 καθώς και στις 30-ημέρες μετά την έναρξη χορήγησης της κλοπιδογρέλης. Τα επίπεδα της sP-σελεκτίνης στις τρεις χρονικές στιγμές φαίνονται στην εικόνα 5.11 ενώ στην εικόνα 5.12 φαίνεται η ανασταλτική δράση της κλοπιδογρέλης στην έκκριση της sP-σελεκτίνης στις 5 και 30-ημέρες.

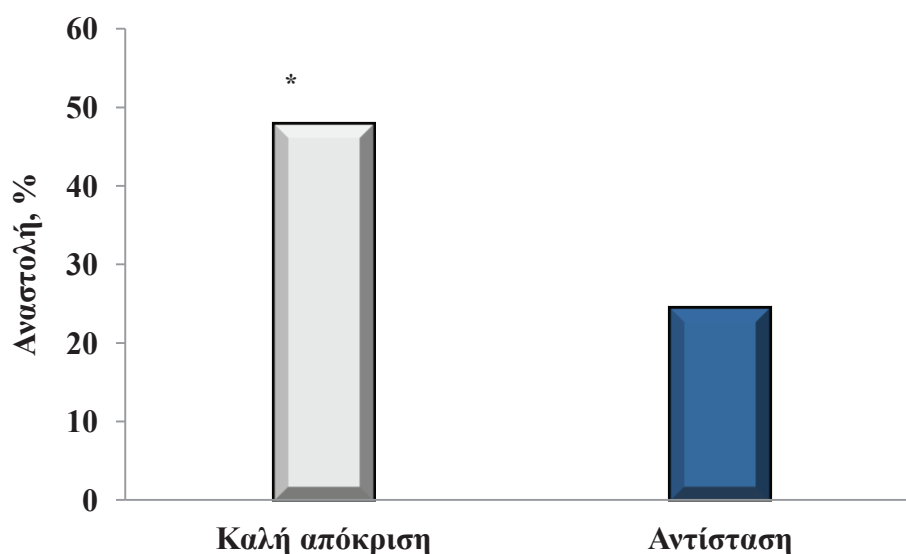


Εικόνα 5.11. Επίπεδα sP-σελεκτίνης στο baseline, καθώς και στις 5 και 30-ημέρες μετά τη χορήγηση κλοπιδογρέλης. Οι τιμές εκφράζονται ως μέση τιμή $\pm$ τυπική απόκλιση.



Εικόνα 5.12. Ανασταλτική δράση της κλοπιδογρέλης στην έκκριση της sP-σελεκτίνης στις 5 και 30-ημέρες.

Συγκρίνοντας τα επίπεδα της sP-σελεκτίνης στις 5 ημέρες στους ασθενείς με βάση την απόκριση τους στην κλοπιδογρέλη παρατηρήθηκε μεγαλύτερη ανασταλτική δράση της κλοπιδογρέλης σε αυτούς που εμφανίζουν καλή απόκριση έναντι των ασθενών με αντίσταση στην κλοπιδογρέλη ($p=0.047$) (Εικόνα 5.13).



Εικόνα 5.13. Ανασταλτική δράση της κλοπιδογρέλης στην έκκριση της sP-σελεκτίνης στους ασθενείς με καλή απόκριση και αντίσταση στην κλοπιδογρέλη. * $p < 0,05$ σε σύγκριση με τα επίπεδα στους ασθενείς με αντίσταση στην κλοπιδογρέλη.

Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε συσχέτιση μεταξύ της μεμβρανικής έκφρασης της P-σελεκτίνης και της sP-σελεκτίνης (Πίνακας 5.2). Δεν βρέθηκε καμία συσχέτιση μεταξύ της μεμβρανικής έκφρασης της P-σελεκτίνης στα ενεργοποιημένα αιμοπετάλια στο baseline στις 5 και 30-ημέρες με τα επίπεδα της sP-σελεκτίνης στο baseline, στις 5 και 30-ημέρες.

Πίνακας 5.2. Συσχετίσεις (r) κατά Pearson και τιμές στατιστικής σημαντικότητας (p) των συσχετίσεων των παραμέτρων μεμβρανική έκφραση της P-σελεκτίνης στα ενεργοποιημένα με ADP αιμοπετάλια και της sP-σελεκτίνης.

Παράμετροι	r	p
Μεμβρανική έκφραση-sP-σελεκτίνη, baseline	-0,174	0,504
Μεμβρανική έκφραση-sP-σελεκτίνη, 5-ημέρες	0,121	0,487
Μεμβρανική έκφραση-sP-σελεκτίνη, 30-ημέρες	0,465	0,094

Παράλληλα, διερευνήθηκε η επίδραση της κλοπιδογρέλης στην έκφραση του υποδοχέα $\alpha_{IIb}\beta_3$ (πρόσδεση PAC-1) τόσο στα εν ηρεμία όσο και στα ενεργοποιημένα με ADP

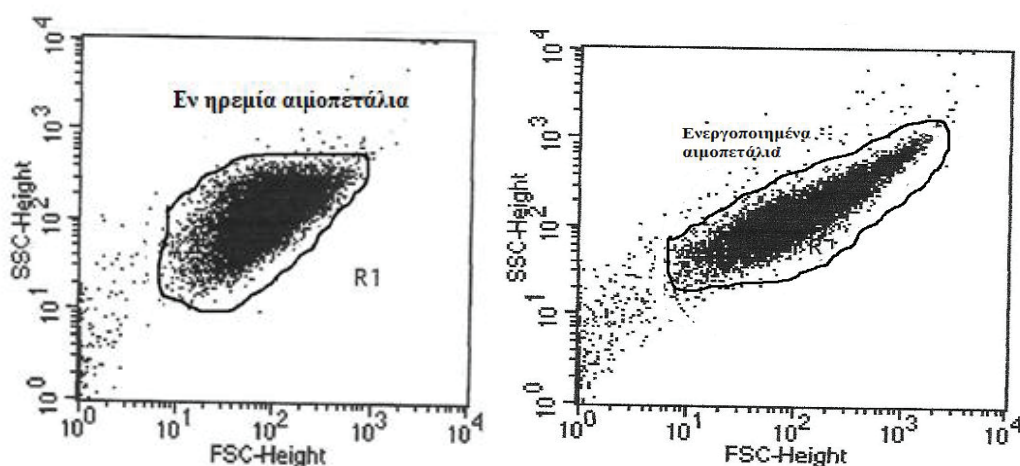
αιμοπετάλια στις 5 και 30-ημέρες μετά την έναρξη χορήγησης της κλοπιδογρέλης. Η πρόσδεση του PAC-1 στο baseline καθώς και μετά από 5 και 30-ημέρες χορήγησης της κλοπιδογρέλης παρουσιάζεται στον πίνακα 5.2. Η μέση έκφραση του PAC-1 είναι σημαντικά αυξημένη στα ενεργοποιημένα αιμοπετάλια στο baseline των ασθενών ενώ μειώνεται με τη χορήγηση της κλοπιδογρέλης στις 5 και 30-ημέρες (Πίνακας 5.3).

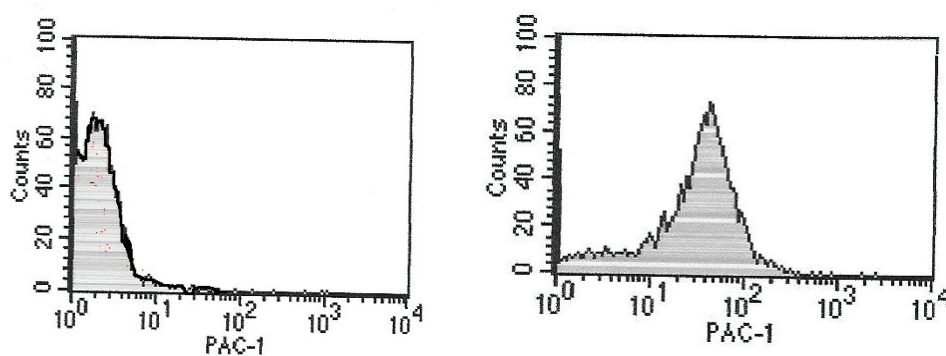
Πίνακας 5.3. Επίδραση της κλοπιδογρέλης στην έκφραση του γλυκοπρωτεϊνικού υποδοχέα $\alpha_{IIb}\beta_3$ (έκφραση PAC-1) στο baseline, στις 5 και 30-ημέρες μετά την έναρξη χορήγησης της κλοπιδογρέλης.

Αιμοπετάλια	Κλοπιδογρέλη		
	Baseline	5-ημέρες	30-ημέρες
Εν ηρεμία	4,35±4,2	4,42±1,68	3,38±1,04
Ενεργοποιημένα	41,3±24**	30,5±14,1**	30,21±15,59**

Οι τιμές εκφράζονται ως μέση τιμή $\pm$ τυπική απόκλιση. * $p < 0,05$ σε σύγκριση με τις τιμές στο baseline και $^{\$}p < 0,01$ σε σύγκριση με τις αντίστοιχες τιμές στα μη ενεργοποιημένα αιμοπετάλια, σύμφωνα με τον έλεγχο paired t-test

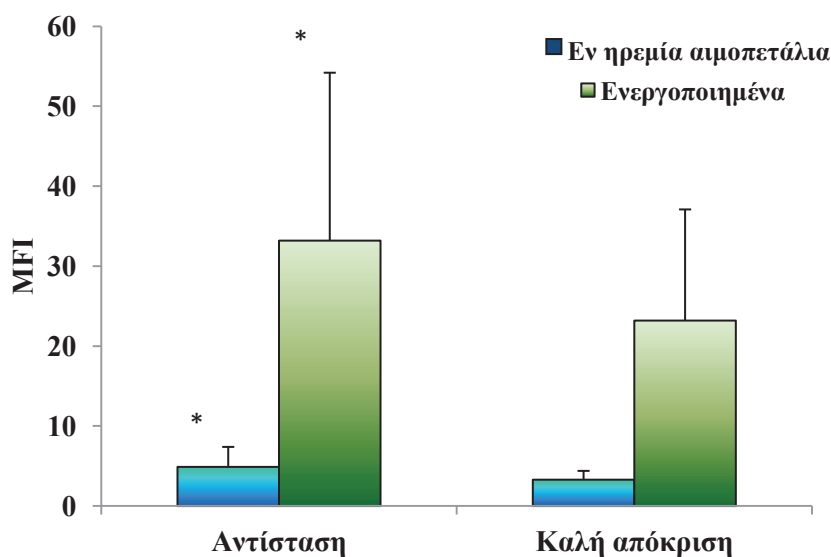
Στην εικόνα 5.14 παρουσιάζονται χαρακτηριστικές κυτταρομετρικές εικόνες εν ηρεμία και ενεργοποιημένων αιμοπεταλίων και αντίστοιχα ιστογράμματα του αντισώματος PAC-1.





Εικόνα 5.14. Χαρακτηριστικές κυτταρομετρικές εικόνες εν ηρεμία και ενεργοποιημένων με ADP αιμοπεταλίων. Έκφραση του αντισώματος PAC-1.

Η έκφραση του $\alpha_{IIb}\beta_3$ στα εν ηρεμία αιμοπετάλια ήταν σημαντικά υψηλότερη στους ασθενείς με αντίσταση στην κλοπιδογρέλη σε σύγκριση με τους καλά ανταποκρινόμενους ασθενείς με τιμές MFI για την πρόσδεση του PAC-1 ($4,9 \pm 2,5$ έναντι $3,3 \pm 1,1$, $P=0,023$). Ομοίως, στα ενεργοποιημένα αιμοπετάλια είναι στατιστικά σημαντικά υψηλότερη ($33,2 \pm 21$ έναντι $23,2 \pm 13,9$) στους ασθενείς που εμφανίζουν αντίσταση σε σύγκριση με αυτούς που εμφανίζουν καλή απόκριση στην κλοπιδογρέλη ($P<0,05$) (Εικόνα 5.15).



Εικόνα 5.15. Τιμές MFI για την έκφραση του υποδοχέα $\alpha_{IIb}\beta_3$ στους ασθενείς με καλή και κακή απόκριση στην κλοπιδογρέλη. Οι τιμές εκφράζονται ως μέση τιμή $\pm$ τυπική απόκλιση. * $p<0,05$ σε σύγκριση με τις τιμές των ασθενών με καλή απόκριση στην κλοπιδογρέλη.

Τέλος, διερευνήθηκε η επίδραση της κλοπιδογρέλης στα επίπεδα των εκκρινόμενων δεικτών της ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων στο πλάσμα. Στον πίνακα 5.4 φαίνονται τα επίπεδα των εκκρινόμενων δεικτών της ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων στο πλάσμα των ΟΣΣ ασθενών στο baseline καθώς και στις 5-ημέρες.

Τα επίπεδα του RANTES, της IL-8, και του VEGF μειώνονται από το baseline στις 3-5 ημέρες μετά τη φόρτιση. Επιπλέον, στα δείγματα που μετρήθηκαν δεν ανιχνεύθηκε η IL-1b ενώ τα επίπεδα του GM-CSF δεν μεταβλήθηκαν από τη χορήγηση της διπλής αντιαιμοπεταλιακής αγωγής. Φαίνεται πως η διακύμανση στην απόκριση στην κλοπιδογρέλη δεν επηρεάζει τα επίπεδα των εκκρινόμενων δεικτών της ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων.

Πίνακας 5.4. Επίπεδα εκκρινόμενων δεικτών της ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων στο πλάσμα ασθενών με ΟΣΣ στο baseline καθώς και 5-ημέρες μετά τη φόρτιση με κλοπιδογρέλη.

Εκκρινόμενοι δείκτες (pg/ml)	Baseline	5-ημέρες	
		Καλή απόκριση	Αντίσταση
GM-CSF	38,30±23,18	39,06±22,4	39,12±15,28
RANTES	18989±12988	11458±6168*	15100±2990
IL-8	15,39±13,45	7,81±3,34*	9,15±4,8*
IL-1b	ΔΑ	ΔΑ	ΔΑ
VEGF	18,18±15,89	10,85±7,72*	8,62±5,39*

Οι τιμές εκφράζονται ως μέση τιμή ± τυπική απόκλιση. * $P < 0,05$ σε σύγκριση με το baseline, σύμφωνα με τον έλεγχο *paired t-test*

Από τα παραπάνω αποτελέσματα αναδεικνύονται δείκτες που θα μπορούσαν να χρησιμεύσουν ως δείκτες διάγνωσης για την αντίσταση στην κλοπιδογρέλη. Στον συγκεντρωτικό πίνακα 5.5 φαίνονται οι συσχετίσεις των παραμέτρων αυτών σε σύγκριση με τα επίπεδα φωσφορυλίωσης της VASP και οι τιμές στατιστικής σημαντικότητας.

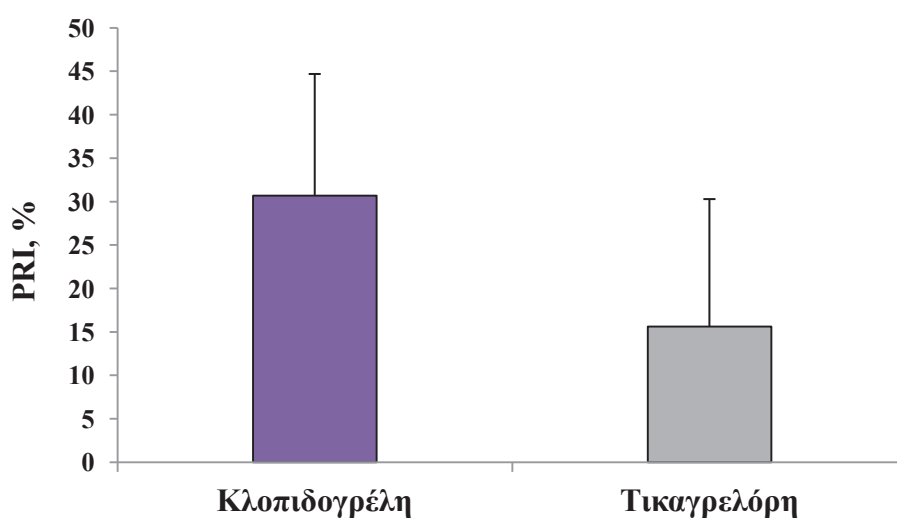
Πίνακας 5.5. Συσχετίσεις (r) κατά Pearson και τιμές στατιστικής σημαντικότητας (p) των συσχετίσεων των αναφερθέντων μεταβλητών με τα επίπεδα φωσφορυλίωσης της VASP.

Μέθοδος VASP-PRI	r	P
ADP, 20Μμ	0,576	0,006
ADP, 5μM	0,530	0,002
TRAP-14, 10μM	0,307	0,04
P-σελεκτίνη (εν ηρεμία αιμοπετάλια)	0,489	0,04
P-σελεκτίνη (ενεργοποιημένα αιμοπετάλια)	0,525	0,002
PAC-1 (εν ηρεμία αιμοπετάλια)	0,445	0,014
PAC-1 (ενεργοποιημένα αιμοπετάλια)	0,248	0,129
sP-σελεκτίνη (% αναστολής)	0,284	0,09

5.4. Σύγκριση της αντιαιμοπεταλιακής δράσης της τικαγρελόρης έναντι της κλοπιδογρέλης

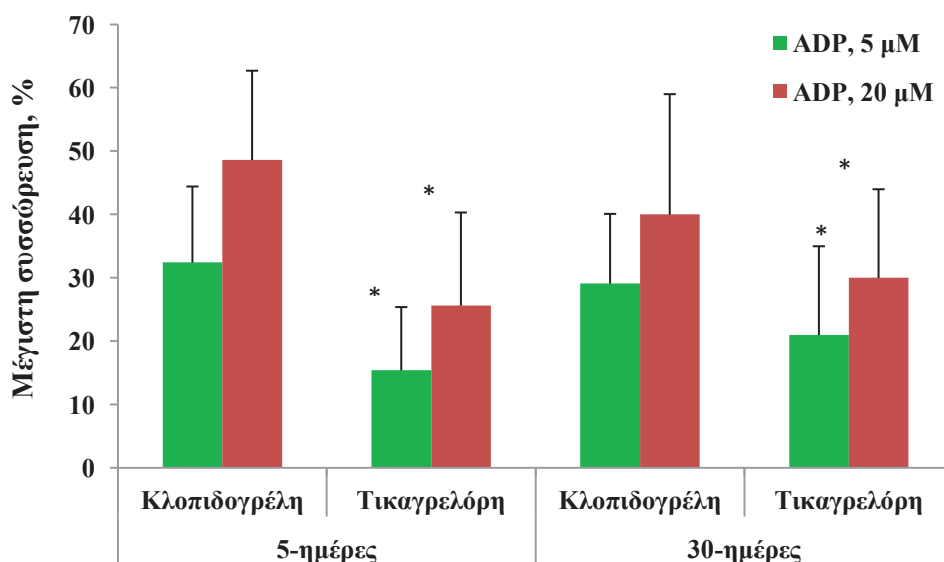
Σύμφωνα με την ανάλυση VASP, οι ασθενείς που έλαβαν τικαγρελόρη, είχαν τιμές PRI $15,6 \pm 14,7$ %. Συνεπώς, κανένας ασθενής που έλαβε τικαγρελόρη δεν εμφάνισε το φαινόμενο της αντίστασης. Η διερεύνηση της επίδρασης της τικαγρελόρης στην αιμοπεταλιακή λειτουργία πραγματοποιήθηκε συγκρίνοντας αυτούς τους ασθενείς με εκείνους που έλαβαν κλοπιδογρέλη και είχαν καλή απόκριση.

Συγκρίνοντας τους ασθενείς αυτούς με τους ασθενείς που εμφανίζουν καλή απόκριση στην κλοπιδογρέλη παρατηρήθηκε πως οι τιμές PRI για την ομάδα της τικαγρελόρης είναι χαμηλότερες κατά 50% (Εικόνα 5.16). Πρόσφατα, ορίστηκε πως ασθενείς με τιμές $PRI < 16\%$ εμφανίζουν χαμηλή αιμοπεταλιακή δραστικότητα (LTPR; Low on Treatment Platelet Reactivity) με αποτέλεσμα την αύξηση του αιμορραγικού κινδύνου²⁵⁷. Το 68% των ασθενών που έλαβε τικαγρελόρη είχαν τιμές $PRI < 16\%$.



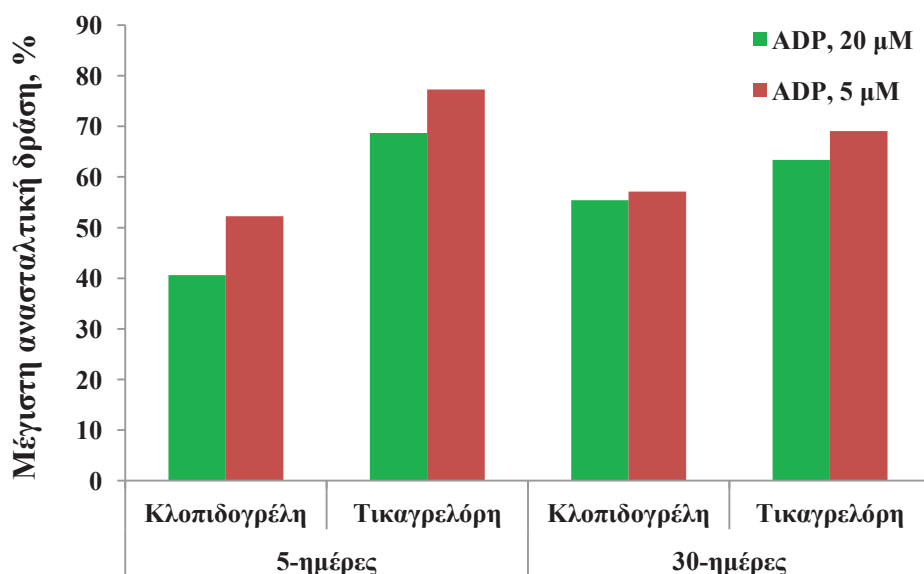
Εικόνα 5.16. Τιμές PRI στους ασθενείς με καλή απόκριση στην κλοπιδογρέλη και σε αυτούς που έλαβαν τικαγρελόρη.

Στην εικόνα 5.17 παρουσιάζονται συγκριτικά οι τιμές της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων ασθενών με καλή απόκριση στην κλοπιδογρέλη και ασθενών που έλαβαν τικαγρελόρη μετά από την ενεργοποίησή τους με ADP (20 και 5 μ M). Όπως ήταν αναμενόμενο, η τικαγρελόρη, ως ισχυρότερο αντιαιμοπεταλιακό φάρμακο, μειώνει σε μεγαλύτερο βαθμό τη συσσώρευση των αιμοπεταλίων στο ADP σε σύγκριση με τους ασθενείς που έχουν καλή απόκριση στην κλοπιδογρέλη.



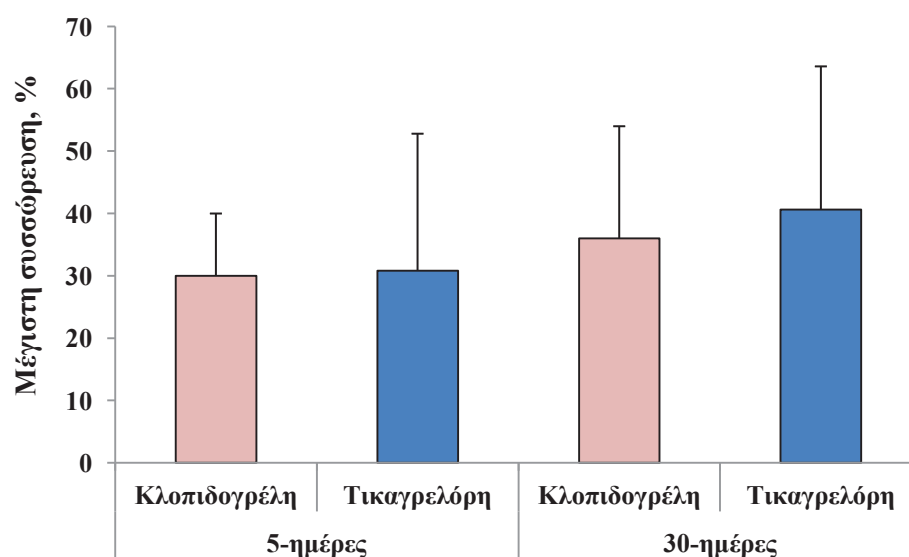
Εικόνα 5.17. Μέγιστη συσσώρευση των αιμοπεταλίων μετά από ενεργοποίηση με ADP, 5 και 30 ημέρες μετά τη χορήγηση κλοπιδογρέλης (ασθενείς με καλή απόκριση) ή τικαγρελόρης. Οι τιμές εκφράζονται ως μέση τιμή $\pm$ τυπική απόκλιση. * $P < 0,05$ σε σύγκριση με τις αντίστοιχες τιμές των ασθενών με καλή απόκριση στην κλοπιδογρέλη.

Στην εικόνα 5.18 φαίνεται η μέγιστη ανασταλτική δράση που προκαλούν η κλοπιδογρέλη και η τικαγρελόρη. Παρατηρείται πως η ανασταλτική δράση της κλοπιδογρέλης αυξάνεται από τις 5 στις 30 ημέρες ενώ η μεγαλύτερη ανασταλτική δράση της τικαγρελόρης παραμένει σχεδόν σταθερή στις 30-ημέρες σε σύγκριση με τις 5 ημέρες και σε παρόμοιο ποσοστό με την καλή απόκριση στην κλοπιδογρέλη.



Εικόνα 5.18. Σύγκριση της ανασταλτικής δράσης της χορήγησης κλοπιδογρέλης ή τικαγρελόρης στη συσσώρευση των αιμοπεταλίων μετά από ενεργοποίηση με ADP.

Η μελέτη της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων μετά από ενεργοποίησή τους με TRAP-14 έδειξε πως όταν συμπεριλάβουμε στη σύγκριση μόνο τους ασθενείς που εμφανίσουν καλή απόκριση στην κλοπιδογρέλη τα δύο φάρμακα δεν διαφοροποιούνται ως προς τις τιμές μέγιστης συσσώρευσης και συνεπώς ως προς την ανασταλτική τους δράση τόσο στις 5 όσο και στις 30-ημέρες (Εικόνα 5.19).



Εικόνα 5.19. Σύγκριση της μέγιστης συσσώρευσης των αιμοπεταλίων μετά από ενεργοποίηση με TRAP, 5 και 30 ημέρες μετά τη χορήγηση κλοπιδογρέλης και τικαγρελόρης.

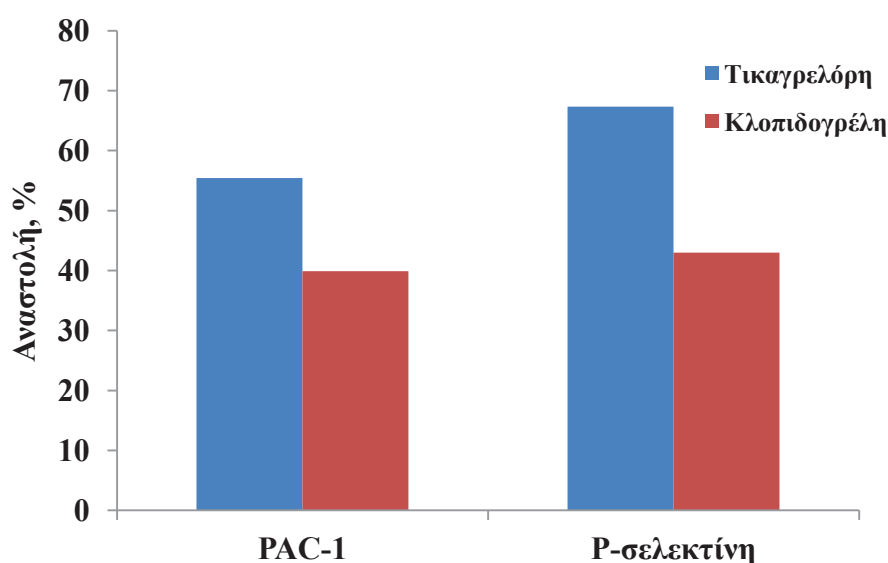
Η τικαγρελόρη μειώνει τόσο την έκφραση του υποδοχέα $\alpha_{IIb}\beta_3$ όσο και την έκφραση της P-σελεκτίνης στις 5-ημέρες. Στις 30-ημέρες η μείωση αυτή παραμένει σταθερή και για τις δύο παραμέτρους (Πίνακας 5.6)

Πίνακας 5.6. Επίδραση της τικαγρελόρης στην έκφραση του γλυκοπρωτεϊνικού υποδοχέα $\alpha_{IIb}\beta_3$ (πρόσδεση PAC-1) και στη μεμβρανική έκφραση της P-σελεκτίνης 5 και 30-ημέρες μετά την έναρξη της θεραπείας.

	Έκφραση $\alpha_{IIb}\beta_3$			Έκφραση P-σελεκτίνης		
	Baseline	5-ημέρες	30-ημέρες	Baseline	5-ημέρες	30-ημέρες
Αιμοπετάλια Εν ηρεμία	4,35±4,2	4,8±3,8	4,4±1,7	6,1±7,2	4,7±1,8	4,5±1,7
Ενεργοποιημένα	38,6±21,9	17,2±14,9 ^{*,§}	18,7±13,2 ^{*,§}	53,3±23,5	17,4±15,1 ^{*,§}	21,5±11,0 ^{*,§}

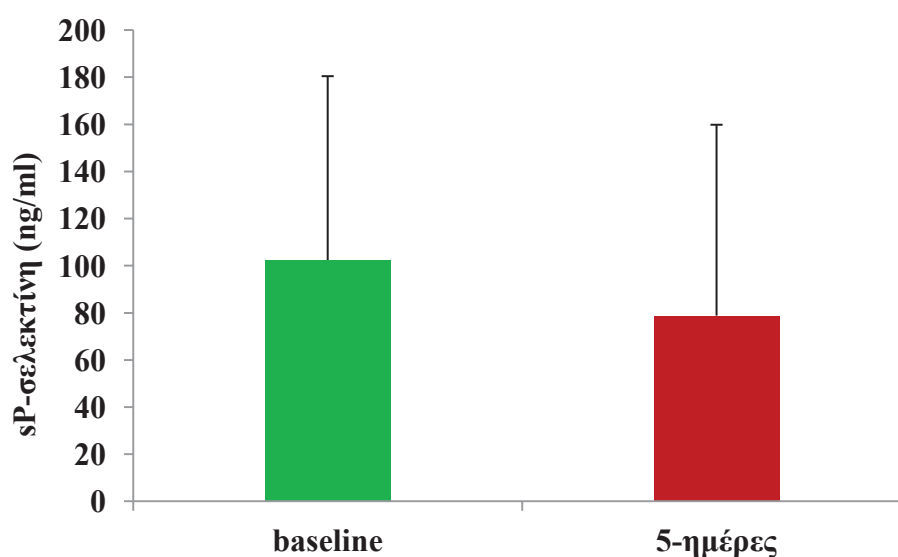
[§] $p < 0,01$, σύγκριση με τις τιμές στο baseline & $*p < 0,05$, σύγκριση με τις τιμές για τα ενεργοποιημένα αιμοπετάλια (paired t-test)

Η ανασταλτική δράση της τικαγρελόρης στην έκφραση του $\alpha_{IIb}\beta_3$ (πρόσδεση PAC-1) και στη μεμβρανική έκφραση της P-σελεκτίνης είναι σημαντικά μεγαλύτερη σε σύγκριση με τους ασθενείς με καλή απόκριση στην κλοπιδογρέλη (Εικόνα 5.20).



Εικόνα 5.20. Ανασταλτική δράση της τικαγρελόρης στην έκφραση του α_{IIb}β₃ (πρόσδεση PAC-1) και στη μεμβρανική έκφραση της P-σελεκτίνης σε σύγκριση με ασθενείς με καλή απόκριση στην κλοπιδογρέλη.

Τέλος, η τικαγρελόρη μειώνει τα επίπεδα της sP-σελεκτίνης στις 5-ημέρες από τη χορήγηση της αγωγής από $102,47 \pm 78,69$ ng/ml σε $78,86 \pm 81$ ng/ml. Στις 30-ημέρες τα επίπεδα της sP-σελεκτίνης αυξήθηκαν σε $85,81 \pm 29,0$ ng/ml χωρίς αυτή η μεταβολή να είναι στατιστικά σημαντική (Εικόνα 5.21).



Εικόνα 5.21. Επίπεδα της sP-σελεκτίνης στο baseline και στις 5-ημέρες μετά την έναρξη χορήγησης της τικαγρελόρης. Οι τιμές εκφράζονται ως μέση τιμή $\pm$ τυπική απόκλιση.

6. Μελέτη της προσκόλλησης των αιμοπεταλίων υπό ροή

Μελετήθηκε η προσκόλληση των αιμοπεταλίων υπό ροή στο κολλαγόνο και προσδιορίστηκαν οι παράμετροι προσκόλλησης σε ασθενείς με ΟΣΣ σε σύγκριση με τα φυσιολογικά άτομα. Επιπλέον, μελετήθηκε η επίδραση της αντιαιμοπεταλιακής αγωγής στις παραπάνω παραμέτρους συγκρίνοντας τις παραμέτρους αυτές στους ασθενείς πριν και 5 ημέρες μετά την έναρξη χορήγησης της αγωγής.

6.1 Μελέτη της επίδρασης της διατμητικής τάσης στην προσκόλληση υπό ροή

Η μελέτη της προσκόλλησης των αιμοπεταλίων πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας ένα σύστημα μελέτης της προσκόλλησης κυττάρων υπό ροή το οποίο εγκαταστάθηκε στο εργαστήριο μας το 2011. Αρχικά, έγινε προσπάθεια ανάπτυξης της μεθοδολογίας για τον προσδιορισμό των παραμέτρων προσκόλλησης των αιμοπεταλίων υπό ροή. Γι' αυτό το λόγο, έγινε συλλογή αίματος από υγιείς εθελοντές (controls) οι οποίοι δεν είχαν λάβει ασπιρίνη ή άλλα αντιαιμοπεταλιακά φάρμακα τις τελευταίες δύο εβδομάδες πριν τη στιγμή της αιμοληψίας.

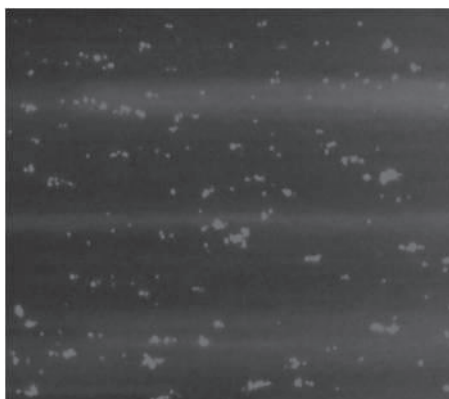
Αρχικά, κάθε κανάλι επιστρώθηκε με κολλαγόνο (4°C, overnight) και στη συνέχεια προστέθηκε BSA. Επιπλέον, έγινε επίστρωση των καναλιών μόνο με BSA. Το ολικό αίμα εγχέεται στα κανάλια που είναι επιστρωμένα με κολλαγόνο (200μg/ml) κάτω από καθορισμένα οι οποίες κυμάνθηκαν από 7-120 dynes/cm². Στο χαμηλό εύρος shear stress οι παράμετροι προσκόλλησης ήταν σημαντικά μικρότερες σε σχέση με τα υψηλά shear stress. Όσο γινόταν επίδραση με μεγαλύτερες τιμές shear stress, οι παράμετροι προσκόλλησης αυξάνονταν (Πίνακας 6.1).

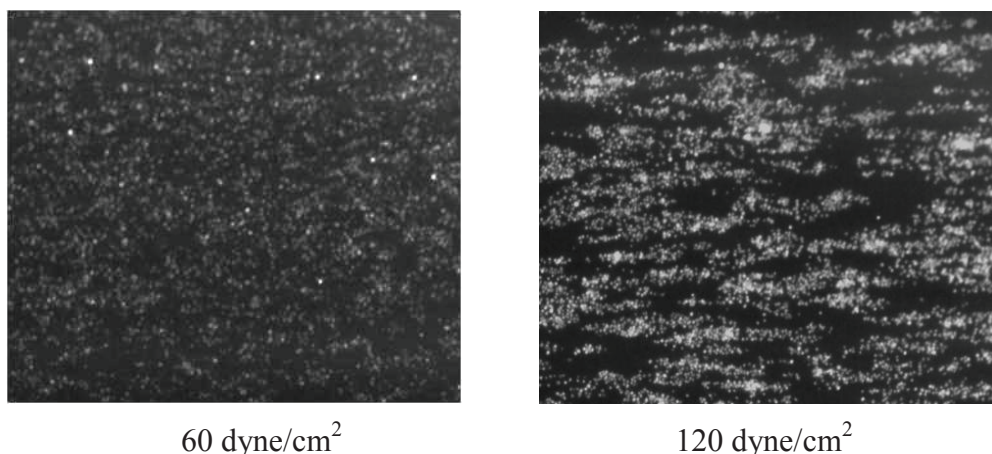
Πίνακας 6.1. Επίδραση των διαφορετικών shear stress στις παραμέτρους προσκόλλησης.

Shear stress (dyne/cm ²)	Περιοχή	Περίμετρος
7	73,3	42,3
13,5	89,9	44,7
22,5	240,1	87,1
40	483,1	130,4
60	1265,0	166,9
120	3021,0	292,0

Στο κανάλι που επιστρώθηκε με BSA δεν παρατηρήθηκε προσκόλληση των αιμοπεταλίων στις πρωτεΐνες υπό ροή αποδεικνύοντας την ειδικότητα των πρωτεϊνών να προκαλούν την κύλιση και τελικά την προσκόλληση των αιμοπεταλίων στο κολλαγόνο.

Στην εικόνα 6.1. φαίνονται χαρακτηριστικές εικόνες προσκόλλησης των αιμοπεταλίων στο κολλαγόνο μετά από την άσκηση διαφορετικών shear stress (7, 40, 60, 120 dyne/cm²).

7 dyne/cm²40 dyne/cm²



Εικόνα 6.1. Το προφίλ προσκόλλησης των αιμοπεταλίων στο κολλαγόνο μετά από άσκηση διατμητικής τάσης (7, 40, 60 και 120 dyne/cm²).

Παρατηρήθηκε πως η άσκηση μικρής διατμητικής τάση έχει ως αποτέλεσμα την κύλιση και προσκόλληση των αιμοπεταλίων ενώ υψηλή διατμητική τάση προκαλεί το σχηματισμό συσσωρευμάτων αιμοπεταλίων και τελικά το σχηματισμό του θρόμβου.

Λαμβάνοντας υπόψη πως η διατμητική τάση των 60 dyne/cm² αποτελεί το κατώτατο όριο που απαιτείται για το σχηματισμό θρόμβου, συνθήκες που συναντάμε στη μικροκυκλοφορία, στη συνέχεια των πειραμάτων μας έγινε χρήση συνεχούς διατμητικής τάσης στα 60 dyne/cm². Συνεπώς, μετά από τη χρώση των αιμοπεταλίων με τη μεπακρίνη, το ολικό αίμα εγχέεται με συνεχή διατμητική τάση στα 60 dynes/cm² για 6 min σε κανάλι που έχει επιστρωθεί με κολλαγόνο (200μg/ml).

Σε άλλα προκαταρκτικά πειράματα, έγινε μελέτη της επίδρασης του Arg-Gly-Asp-Ser (RGDS) πεπτιδίου στην προσκόλληση των αιμοπεταλίων στο κολλαγόνο υπό ροή. Το RGDS πεπτίδιο αναστέλλει τη συσσώρευση των αιμοπεταλίων εμποδίζοντας την πρόσδεση του ινωδογόνου στην ενεργοποιημένη μορφή του υποδοχέα α_{IIb}β₃²⁵⁸. Η συγκέντρωση RGDS που χρησιμοποιήσαμε είναι 200 μM που αποτελεί το IC₅₀ της αναστολής της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων μετά από ενεργοποίησή τους με ADP²⁵⁹. Το πεπτίδιο RGDS μείωσε το ποσοστό της επιφάνειας που καλύπτεται από αιμοπετάλια που έχουν προσκολληθεί σε 1,14% καθώς μειώθηκε κατά πολύ ο συνολικός αριθμός συσσωματωμάτων αιμοπεταλίων που προσκολλήθηκαν ενώ η μέση τιμή της περιοχής που καλύφθηκε από αιμοπετάλια και η περίμετρος τους ήταν παρόμοιες με αυτές που παρατηρούνται απουσία του RGDS (Πίνακας 6.2).

Πίνακας 6.2. Παράμετροι προσκόλλησης παρουσία και απουσία του πεπτιδίου RGDS.

Παράμετροι προσκόλλησης	RGDS	
	-	+
SC, %	9,57	1,14
Αριθμός συσσωματωμάτων	406	57
Περιοχή, μm^2	452,87	385,68
Περίμετρος	96,05	91,52

SC: Surface coverage. Τα αποτελέσματα προέρχονται από $n=3$ ανεξάρτητα πειράματα.

6.2. Σύγκριση του προφίλ προσκόλλησης των αιμοπεταλίων σε υγιείς εθελοντές και ασθενείς με ΟΣΣ

Στη συνέχεια, έγινε διερεύνηση του προφίλ προσκόλλησης των αιμοπεταλίων στο κολλαγόνο σε υγιείς εθελοντές ($n=18$) καθώς και σε υποομάδα ασθενών που συμμετείχαν στη μελέτη ($n=32$). Όπως φαίνεται και στον πίνακα 6.3 με τα βασικά κλινικά, αιματολογικά και βιοχημικά χαρακτηριστικά του πληθυσμού της μελέτης, οι ασθενείς ήταν παρόμοιας ηλικίας και φύλου με τους υγιείς εθελοντές. Παρατηρήθηκε πως οι ασθενείς είχαν περισσότερους παράγοντες κινδύνου εμφάνισης καρδιαγγειακής νόσου ενώ το 62,5% των ασθενών ήταν ενεργοί καπνιστές έναντι 44,4% για τους υγιείς εθελοντές. Επίσης, οι ασθενείς εμφανίζουν αυξημένο αριθμό λευκοκυττάρων σε σύγκριση με τους υγιείς εθελοντές. Ωστόσο, ο αιματοκρίτης και ο αριθμός των αιμοπεταλίων που είναι παράγοντες που μπορεί να επηρεάζουν την αλληλεπίδραση των αιμοπεταλίων με το κολλαγόνο είναι παρόμοιος μεταξύ των δύο ομάδων.

Πίνακας 6.3. Κλινικά, αιματολογικά και βιοχημικά χαρακτηριστικά του πληθυσμού της μελέτης.

Παράμετρος	Υγιείς εθελοντές	Ασθενείς με ΟΣΣ
Φύλο (Άνδρας/γυναίκα)	14/4	28/4
Ηλικία (έτη)	50±13	63±14
<u>Παράγοντες καρδιαγγειακού κινδύνου,</u>		
n (%)		
Ενεργητικό κάπνισμα	8 (44,4%)	20 (62,5%)
Υπέρταση	-	11 (34,3%)
Υπερλιπιδαιμία	-	20 (62,5%)
Σακχαρώδης διαβήτης	-	5 (15,6%)
Παχυσαρκία	-	5 (15,6%)
Οικογενειακό ιστορικό καρδιαγγειακής νόσου	-	5 (15,6%)
Λευκοκύτταρα ($\times 10^9/L$)	6,4± 1,7	11,2±5,5
Ουδετερόφιλα ($\times 10^9/L$)	3,5±0,9	8,4± 5,0
Μονοκύτταρα ($\times 10^9/L$)	0,4±0,1	0,5±0,3
Αιμοπετάλια ($\times 10^9/L$)	210±47	279±154
Μέσος όγκος αιμοπεταλίων, MPV (fl)	10,9±0,7	10,7±1,1
Αιμοσφαιρίνη, HgB (g/dl)	13,7± 2,0	14,1±1,8
Αιματοκρίτης, HCT (%)	40,5±4,8	41,5±5,1
Ολική χοληστερόλη (mg/dL)	180±35	178±50
HDL- χοληστερόλη (mg/dL)	60±10	37,8 ±8,3
Τριγλυκερίδια (mg/dL)	101±40	157±50
LDL- χοληστερόλη (mg/dL)	101±20	127±37

Παρατηρήθηκε πως τόσο για τους υγιείς εθελοντές όσο και για τους ΟΣΣ ασθενείς, ο χρόνος που απαιτείται για την αρχική σταθερή προσκόλληση των αιμοπεταλίων κυμαίνεται από 40-60 sec. Η μέγιστη τελική προσκόλληση όπως και οι παράμετροι προσκόλλησης των αιμοπεταλίων στο κολλαγόνο υπό ροή καταγραφόταν με το τέλος του πειράματος στα 6 min (Πίνακας 6.4).

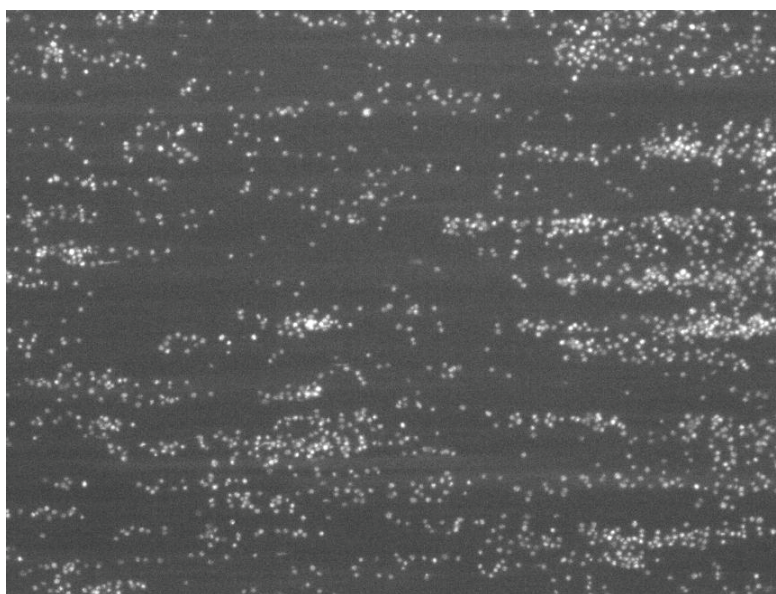
Πίνακας 6.4. Παράμετροι προσκόλλησης αιμοπεταλίων στους υγιείς εθελοντές και στους ασθενείς με ΟΣΣ στο baseline.

Παράμετρος	Υγιείς εθελοντές	Ασθενείς με ΟΣΣ
SC, %	14	16
Αριθμός συσσωματωμάτων αιμοπεταλίων	1175,0±212,0	351,0±58,0*
Περιοχή, μm^2	218,0±72,3	1580,2±528,1 *
Περίμετρος	80,4±27,9	180,7±255,2*

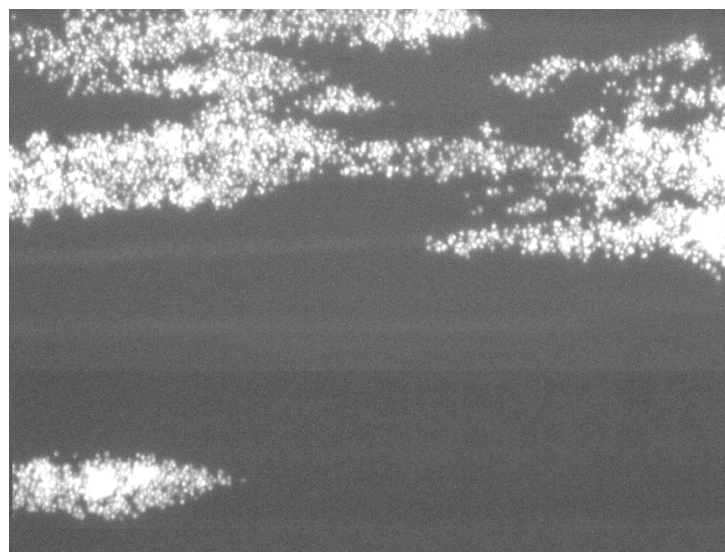
SC: Surface coverage. Οι τιμές εκφράζονται ως μέση τιμή± τυπική απόκλιση. $p<0,05$ σε σύγκριση με τις τιμές για τους υγιείς εθελοντές.

Συγκρίνοντας τις παραμέτρους από τον πίνακα 6.4. τόσο η περιοχή που καλύπτουν τα αιμοπετάλια όσο και η περίμετρος είναι σημαντικά μεγαλύτερες ($P<0.001$) στους ασθενείς με ΟΣΣ σε σύγκριση με τους υγιείς εθελοντές, εύρημα που υποδεικνύει πως στους ασθενείς με ΟΣΣ στο baseline τα προσκολληθέντα αιμοπετάλια έχουν σχηματίσει συσσωρεύματα. Το ποσοστό προσκόλλησης των αιμοπεταλίων ασθενών και υγιών εθελοντών δεν διαφοροποιείται σημαντικά στους υγιείς εθελοντές και τους ασθενείς με ΟΣΣ.

Στην εικόνα 6.2. παρουσιάζεται η αιμοπεταλιακή προσκόλληση στο κολλαγόνο στους υγιείς εθελοντές ενώ στην εικόνα 6.3. παρουσιάζεται η αιμοπεταλιακή προσκόλληση στο κολλαγόνο για τους ασθενείς με ΟΣΣ στο baseline.



Εικόνα 6.2. Το προφίλ προσκόλλησης των αιμοπεταλίων υγιών εθελοντών στο κολλαγόνο υπό συνεχή διατμητική τάση (60 dyne/cm^2) στα 6 min.



Εικόνα 6.3. Προσκόλληση των αιμοπεταλίων ασθενών στο κολλαγόνο υπό ροή σε ασθενείς με ΟΣΣ πριν τη χορήγηση της αντιαιμοπεταλιακής αγωγής στα 6 min

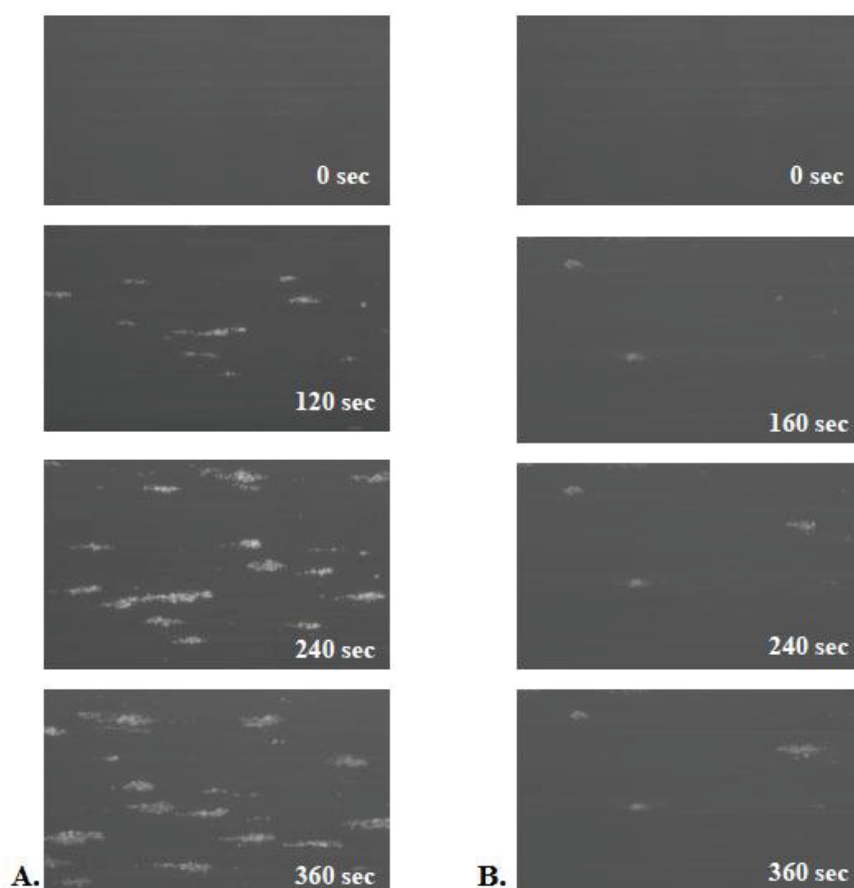
Από τις παραπάνω εικόνες αιμοπεταλιακής προσκόλλησης συμπεραίνεται πως τα αιμοπετάλια των ασθενών σχηματίζουν πολύ περισσότερα συσσωρεύματα καθώς το ένα αιμοπετάλιο κολλάει με το άλλο και στην εικόνα είναι δυσδιάκριτα ενώ αντίθετα στις

εικόνες προσκόλλησης των υγίων εθελοντών τα περισσότερα αιμοπετάλια προσκολλώνται ως μονήρη.

6.3. Επίδραση της κλοπιδογρέλης στην προσκόλληση των αιμοπεταλίων

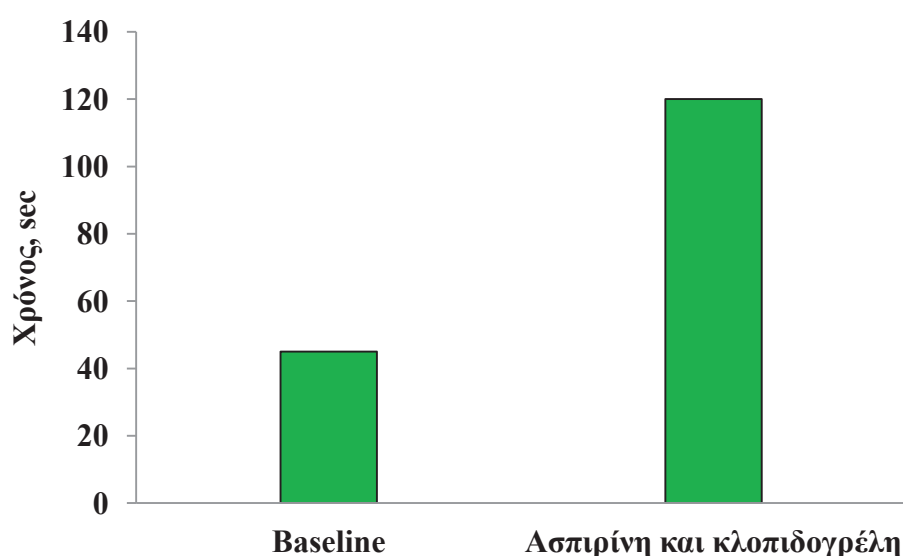
Στη συνέχεια, διερευνήθηκε η επίδραση της διπλής αντιαιμοπεταλιακής αγωγής με ασπιρίνη και κλοπιδογρέλη στην προσκόλληση των αιμοπεταλίων σε 16 ασθενείς που συμμετείχαν στη μελέτη. Συνεπώς, έγινε καταγραφή του προφίλ της αιμοπεταλιακής προσκόλλησης στις 5-ημέρες μετά την έναρξη της διπλής αντιαιμοπεταλιακής αγωγής και έγινε σύγκριση με το baseline.

Στις 5-ημέρες, παρατηρήθηκαν διαφορές στο χρόνο που απαιτείται για την αρχική σταθερή προσκόλληση των αιμοπεταλίων. Στην εικόνα 6.4 φαίνονται οι εικόνες προσκόλλησης των αιμοπεταλίων στο κολλαγόνο σε διαφορετικά χρονικά διαστήματα.

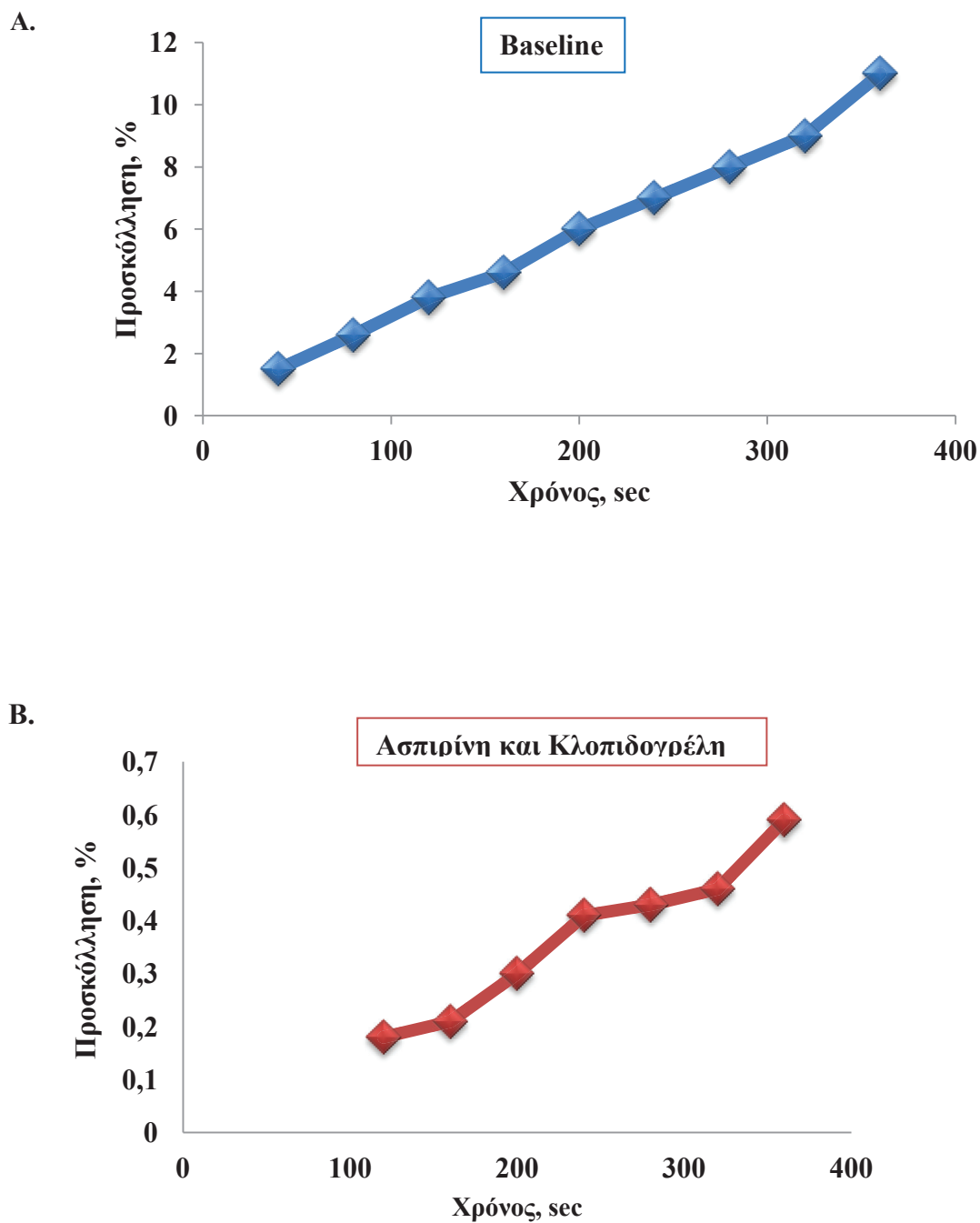


Εικόνα 6.4. Το προφίλ προσκόλλησης των αιμοπεταλίων στο κολλαγόνο υπό ροή στους ασθενείς **A.** πριν τη χορήγηση της αντιαιμοπεταλιακής αγωγής (baseline), καθώς και **B.** 5-ημέρες μετά τη χορήγηση της διπλής αντιαιμοπεταλιακής αγωγής με ασπιρίνη και κλοπιδογρέλη.

Παρατηρήθηκε πως ο χρόνος που απαιτείται για την αρχική σταθερή προσκόλληση παρατείνεται στους ασθενείς που λαμβάνουν διπλή αντιαιμοπεταλιακή αγωγή με ασπιρίνη και κλοπιδογρέλη για 5- ημέρες σε σύγκριση με το baseline. Πράγματι, στους ασθενείς πριν τη χορήγηση της διπλής αντιαιμοπεταλιακής αγωγής η προσκόλληση είναι εμφανής σε λιγότερο από ένα λεπτό (45 sec) ενώ 5-μέρες μετά η αιμοπεταλιακή προσκόλληση παρατείνεται και παρατηρείται πλέον μετά από 2 min (Εικόνα 6.5). Στις εικόνες 6.6 φαίνεται η χρονοεξαρτώμενη αύξηση του ποσοστού προσκόλλησης των αιμοπεταλίων στο κολλαγόνο.

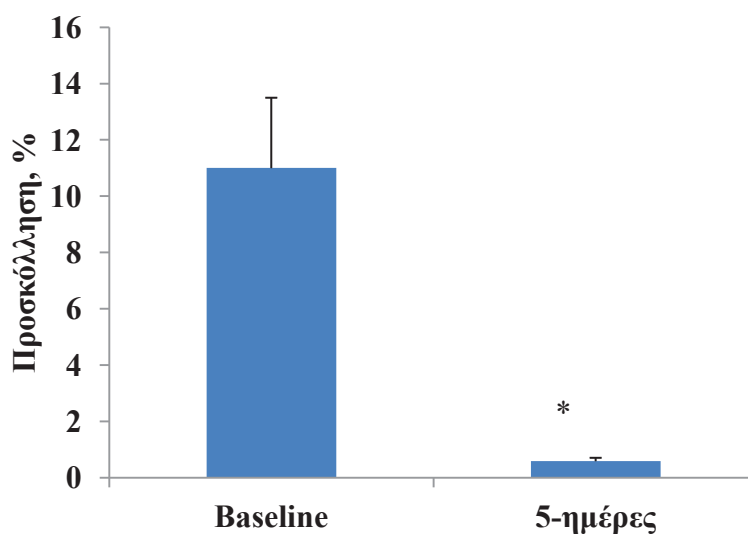


Εικόνα 6.5. Ο χρόνος που απαιτείται για την αρχική προσκόλληση των αιμοπεταλίων αυξάνεται στους ασθενείς που λαμβάνουν διπλή αντιαιμοπεταλιακή αγωγή σε σύγκριση με το baseline.



Εικόνα 6.6. Η προσκόλληση αιμοπεταλίων στο κολλαγόνο έναντι του χρόνου **A.** στο baseline καθώς και 5-ημέρες μετά τη χορήγηση **B.** Ασπιρίνης και κλοπιδογρέλης.

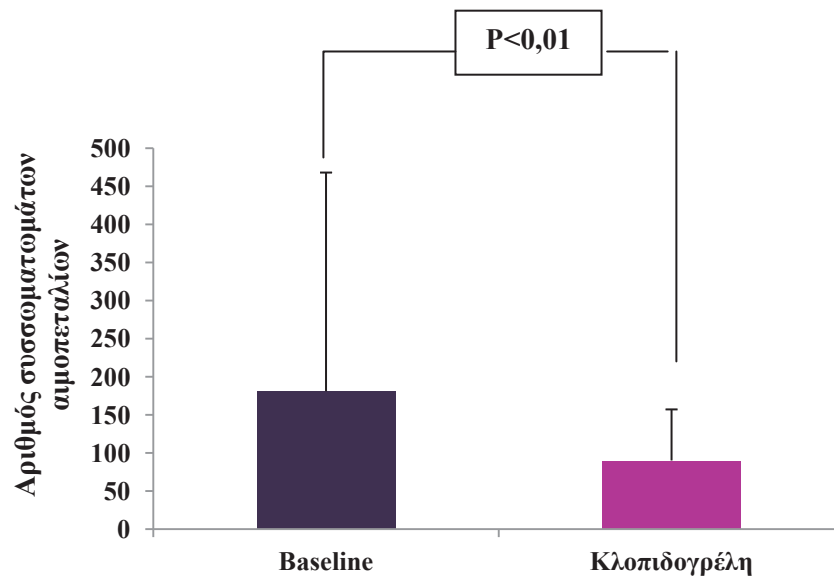
Συνεπώς, στα 6 min και ενώ τα αιμοπετάλια βρίσκονται υπό ροή παρατηρείται η μέγιστη αιμοπεταλιακή προσκόλληση. Στις 5-ημέρες, το ποσοστό προσκόλλησης των αιμοπεταλίων για την κλοπιδογρέλη είναι σημαντικά μικρότερο σε σύγκριση με το baseline ($0,59 \pm 0,12\%$ έναντι $11 \pm 2,5\%$, $P < 0,01$) (Εικόνα 6.7)



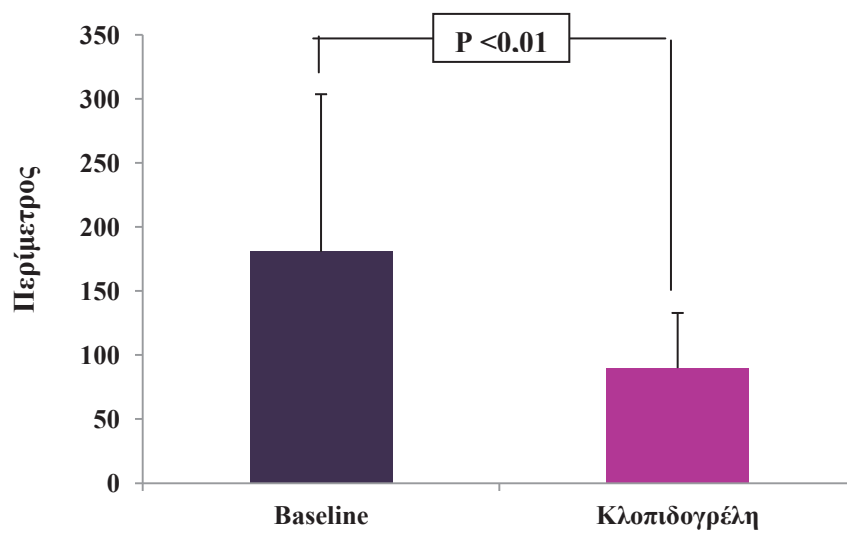
Εικόνα 6.7. Ποσοστό προσκόλλησης στους ασθενείς που λαμβάνουν διπλή αντιαιμοπεταλιακή αγωγή με ασπιρίνη και κλοπιδογρέλη για 5-ημέρες σε σύγκριση με το baseline. Οι τιμές εκφράζονται ως μέση τιμή $\pm$ τυπική απόκλιση. * $p < 0,05$ σε σύγκριση με το ποσοστό προσκόλλησης στο baseline.

Τέλος, συγκρίναμε τις παραμέτρους της αιμοπεταλιακής προσκόλλησης στο baseline καθώς και στις 5-ημέρες μετά την έναρξη της θεραπείας. Στο baseline, οι τιμές του αριθμού των συσσωματωμάτων αιμοπεταλίων που προσκολλήθηκαν, της μέσης τιμής της επιφάνειας που καλύπτουν και της περιμέτρου τους είναι στατιστικά σημαντικά πολύ υψηλότερες σε σχέση με τις τιμές στις 5-ημέρες (Εικόνα 6.8). Συνεπώς, η διπλή αντιαιμοπεταλιακή αγωγή με ασπιρίνη και κλοπιδογρέλη μειώνει τις παραμέτρους προσκόλλησης.

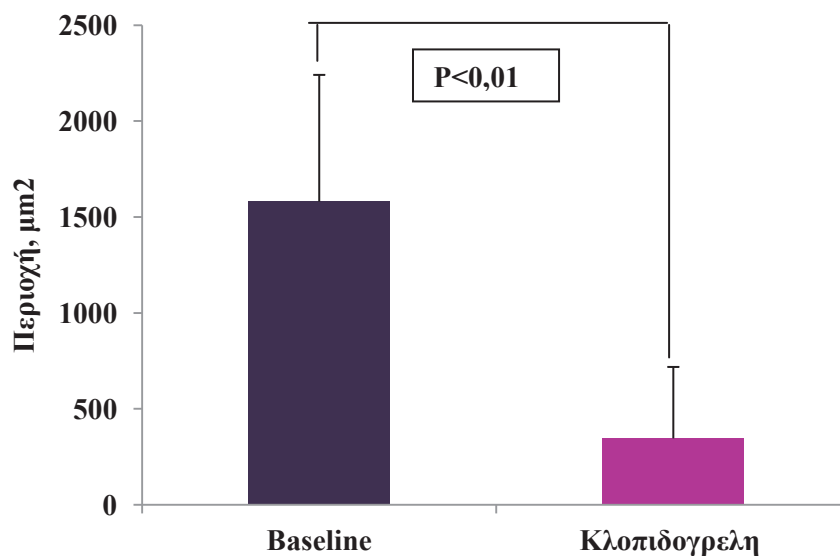
A.



B.



Γ.

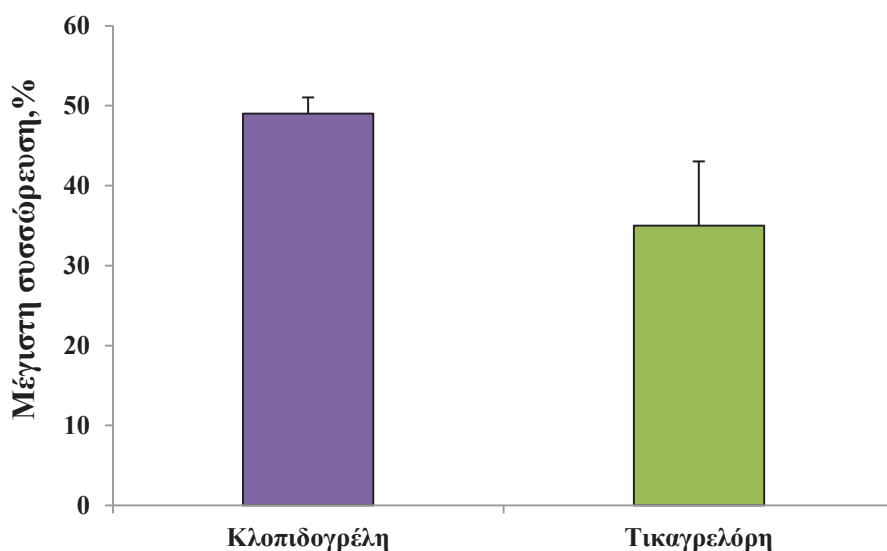


Εικόνα 6.8. Α. Ο αριθμός των συσσωματωμάτων αιμοπεταλίων, Β. η περίμετρος και Γ. η μέση περιοχή των αιμοπεταλίων στο baseline και στις 5-ημέρες χορήγησης ασπιρίνης και κλοπιδογρέλης. Οι τιμές εκφράζονται ως μέση τιμή ± τυπική απόκλιση.

6.4. Συγκριτική μελέτη της επίδρασης της κλοπιδογρέλης έναντι της τικαγρελόρης στην προσκόλληση των αιμοπεταλίων

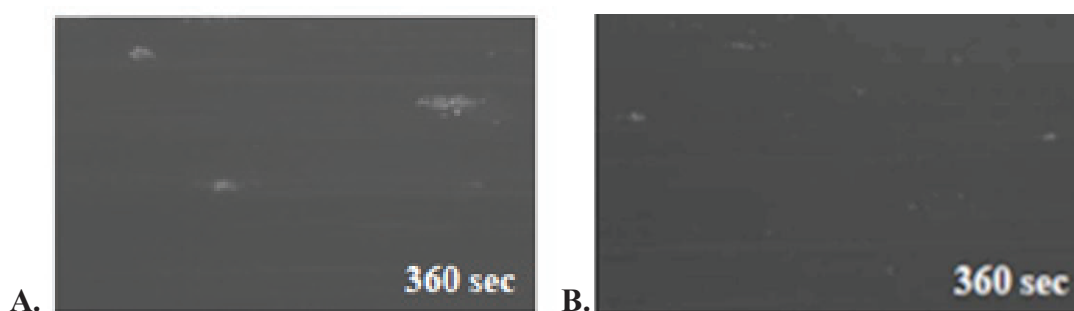
Τέλος, συγκρίναμε την επίδραση της διπλής αντιαιμοπεταλιακής αγωγής με ασπιρίνη και τικαγρελόρη (v=16) στην προσκόλληση των αιμοπεταλίων στο κολλαγόνο με τους ασθενείς που έλαβαν ασπιρίνη και κλοπιδογρέλη (v=16).

Για λόγους σύγκρισης μελετήθηκε τη συσσώρευση των αιμοπεταλίων στο κολλαγόνο στις ομάδες ασθενών με τη μέθοδο LTA. Οι τιμές συσσώρευσης των αιμοπεταλίων στο κολλαγόνο είναι περισσότερο μειωμένες στην ομάδα της τικαγρελόρης σε σύγκριση με την ομάδα της κλοπιδογρέλης (Εικόνα 6.9).



Εικόνα 6.9. Τιμές συσσώρευσης των αιμοπεταλίων μετά από ενεργοποίηση τους με κολλαγόνο στις δύο ομάδες ασθενών. Οι τιμές εκφράζονται ως μέση τιμή ± τυπική απόκλιση.

Αρχικά παρατηρήθηκε διαφορά στο χρόνο που απαιτείται για την αρχική σταθερή προσκόλληση των αιμοπεταλίων ο οποίος ήταν 220 sec έναντι 160 sec για τους ασθενείς που έλαβαν τικαγρελόρη και κλοπιδογρέλη, αντίστοιχα χωρίς ωστόσο αυτή η διαφορά που παρατηρείται να είναι στατιστικά σημαντική. Στην εικόνα 6.10 φαίνονται εικόνες αιμοπεταλιακής προσκόλλησης στα 6 min για την κλοπιδογρέλη και την τικαγρελόρη.



Εικόνα 6.10. Εικόνες αιμοπεταλιακής προσκόλλησης στα 6 min για τους ασθενείς που λαμβάνουν ασπιρίνη και Α. κλοπιδογρέλη και Β. τικαγρελόρη

Υπολογίστηκαν όλες οι παράμετροι προσκόλλησης των αιμοπεταλίων για τους ασθενείς που έλαβαν ασπιρίνη και τικαγρελόρη και συγκρίθηκαν με τις αντίστοιχες

παραμέτρους για τους ασθενείς που έλαβαν ασπιρίνη και κλοπιδογρέλη (Πίνακας 6.5). Το ποσοστό προσκόλλησης των αιμοπεταλίων στο κολλαγόνο είναι παρόμοιο για τους ασθενείς που έλαβαν κλοπιδογρέλη και σε αυτούς που έλαβαν τικαγρελόρη. Ωστόσο, για τα δύο φάρμακα παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές στις τιμές της περιμέτρου των αιμοπεταλίων ($p<0.05$) και της μέσης επιφάνειας που καλύπτει κάθε αιμοπετάλιο ($p<0.05$). Το εύρημα αυτό αναδεικνύει πως κατά την αιμοπεταλιακή προσκόλληση στο κολλαγόνο, σχηματίζονται περισσότερα συσσωρεύματα αιμοπεταλίων στους ασθενείς που λαμβάνουν κλοπιδογρέλη σε σύγκριση με τους ασθενείς που λαμβάνουν τικαγρελόρη για 5 ημέρες.

Πίνακας 6.5. Συγκριτικός πίνακας παραμέτρων προσκόλλησης για τους ασθενείς που έλαβαν ασπιρίνη και τικαγρελόρη έναντι ασπιρίνης και κλοπιδογρέλης.

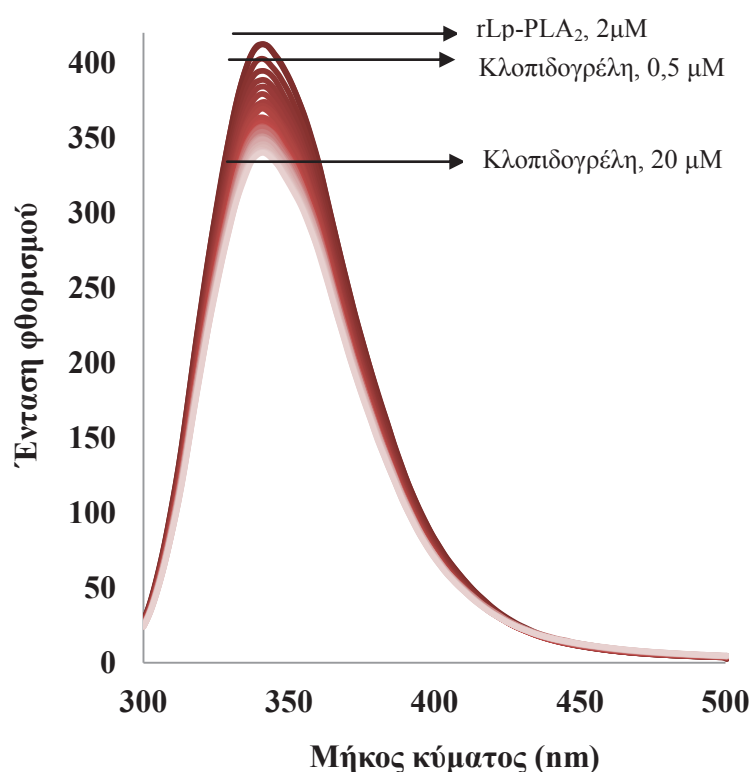
Παράμετροι προσκόλλησης	Κλοπιδογρέλη	Τικαγρελόρη	P
Προσκόλληση, %	0,59	0,45	0,286
Αριθμός συσσωματωμάτων αιμοπεταλίων	56	93	0,266
Περίμετρος	89,97	56,41	0,011
Περιοχή	346,26	145,47	0,044

7.Διερεύνηση της πιθανής αλληλεπίδρασης της κλοπιδογρέλης με την Lp-PLA₂

Ακόμη, λαμβάνοντας υπόψη ότι η PON1 πιθανώς εμπλέκεται στο μεταβολισμό της κλοπιδογρέλης²⁶⁰ και πως μπορεί να ασκεί PAF- υδρολυτική δραστηριότητα²⁶¹, διερευνήθηκε η πιθανή επίδραση της κλοπιδογρέλης στην ενεργότητα της Lp-PLA₂, *in vitro*. Επίσης, εκτιμήθηκε η σημασία του φαινομένου αυτού σε κλινικό επίπεδο προσδιορίζοντας τα επίπεδα της Lp-PLA₂ στο baseline καθώς και 5-ημέρες μετά την έναρξη της αντιαιμοπεταλιακής αγωγής.

7.1. Μελέτη της πιθανής αλληλεπίδρασης της κλοπιδογρέλης με την Lp-PLA₂ με τη μέθοδο της φασματοσκοπίας φθορισμού

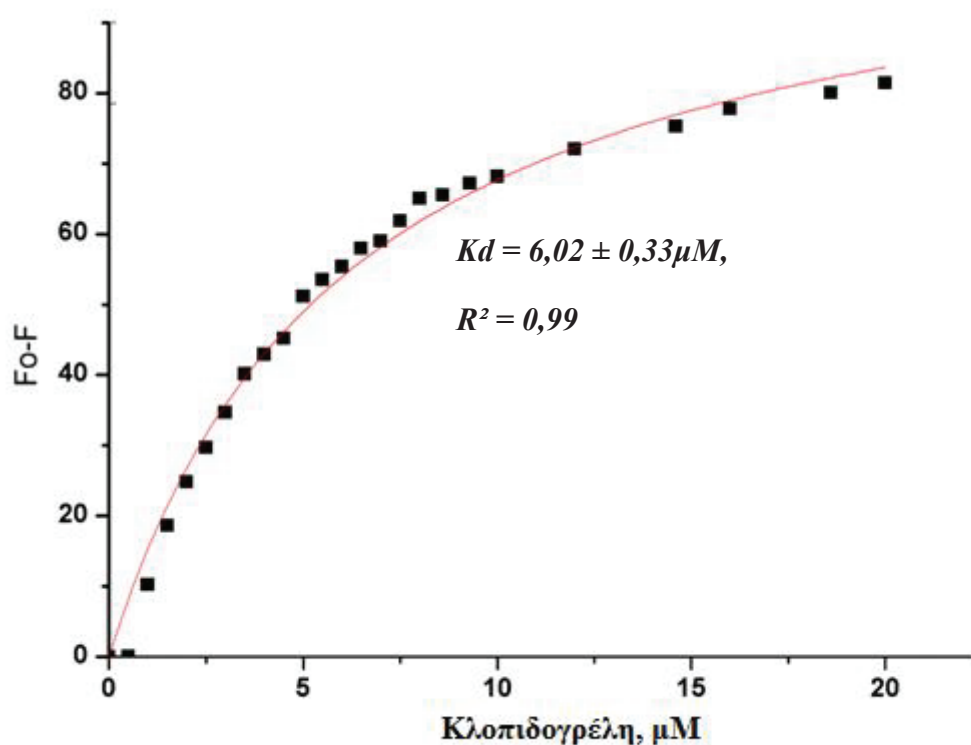
Με πειράματα φθορισμομετρίας, όπου τιτλοδοτήθηκαν 24 διαφορετικές συγκεντρώσεις κλοπιδογρέλης αυξανόμενες από 0,5 μM έως 20 μM σε σταθερή συγκέντρωση rLp-PLA₂ (2 μM) παρατηρήθηκε σταδιακή μείωση του φθορισμού (Εικόνα 7.1).



Εικόνα 7.1. Μείωση του φθορισμού με την προσθήκη κλοπιδογρέλης συγκέντρωσης από 0,5 έως 20 μM .

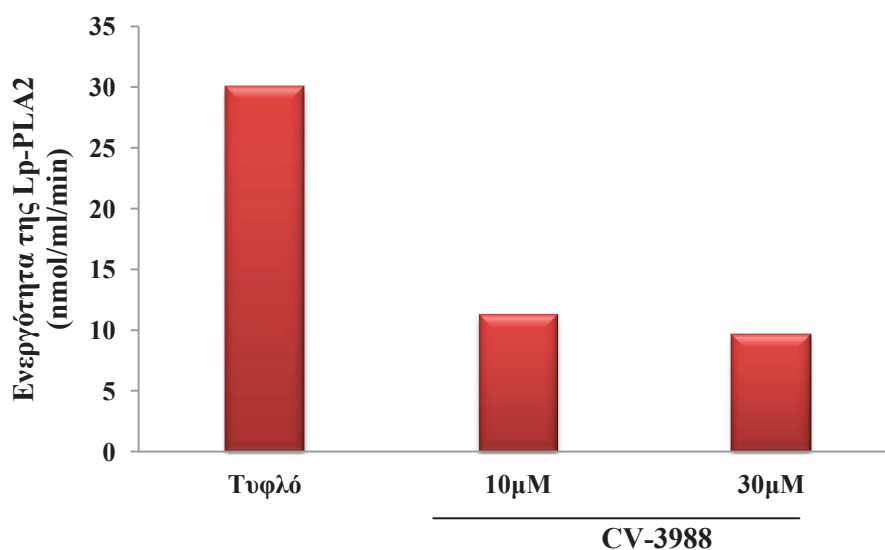
Σύμφωνα με την βιβλιογραφία, ένας από τους λόγους που οδηγεί σε αυτήν την μείωση είναι η πρόσδεση ενός προσδέματος στο ένζυμο²⁶². Στη συνέχεια, παίρνοντας την μέγιστη τιμή από κάθε φάσμα και τη συγκέντρωση της κλοπιδογρέλης που είχε προστεθεί σε κάθε μέτρηση, πραγματοποιήθηκε η γραφική παράσταση φάσματος (Fo-F) –συγκέντρωσης (C). Με Fo συμβολίστηκε η μέγιστη ένταση φθορισμού που ελήφθη στο πρώτο φάσμα όπου υπήρχε μόνο η rLp-PLA₂. Για την κατασκευή της γραφικής παράστασης, από την τιμή Fo αφαιρείται η μέγιστη τιμή από κάθε φάσμα που προκύπτει μετά την προσθήκη της κάθε συγκέντρωσης της κλοπιδογρέλης (Εικόνα 7.2). Τέλος, χρησιμοποιώντας μια εξίσωση

υπερβολής της μορφής $y = (P1 \cdot x) / (P2 + x)$ υπολογίστηκε η συγγένεια πρόσδεσης (K_d) της κλοπιδογρέλης στην rLp-PLA₂ στην τιμή $6,02 \pm 0,33 \mu\text{M}$.



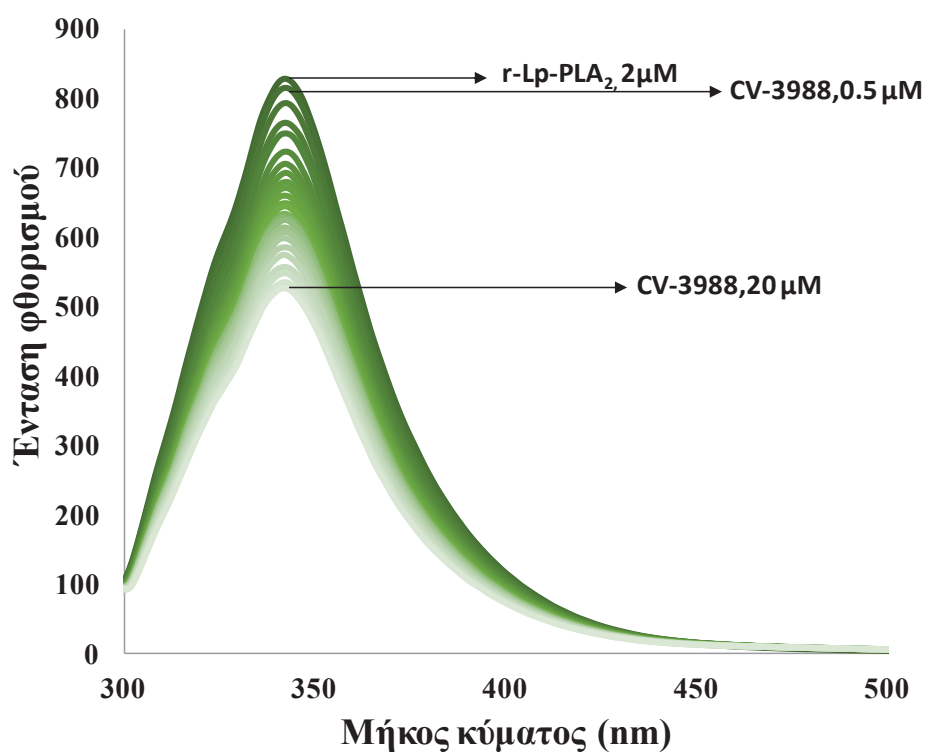
Εικόνα 7.2. Γραφική παράσταση φάσματος- κλοπιδογρέλης και υπολογισμός της τιμής K_d .

Για να έχουμε μία πρώτη προσέγγιση για την ισχύ και τη θέση πρόσδεσης της κλοπιδογρέλης έγινε επίδραση με τον αναστολέα CV-3988, ο οποίος είναι ειδικός ανταγωνιστής του PAF για την πρόσδεση του στον υποδοχέα του και ισχυρός αναστολέας της Lp-PLA₂. Ο αναστολέας CV-3988 αναστέλλει την ενεργότητα της Lp-PLA₂ σε συγκεντρώσεις 10 και 30 μM σε ποσοστά 63% και 70%, αντίστοιχα (Εικόνα 7.3).

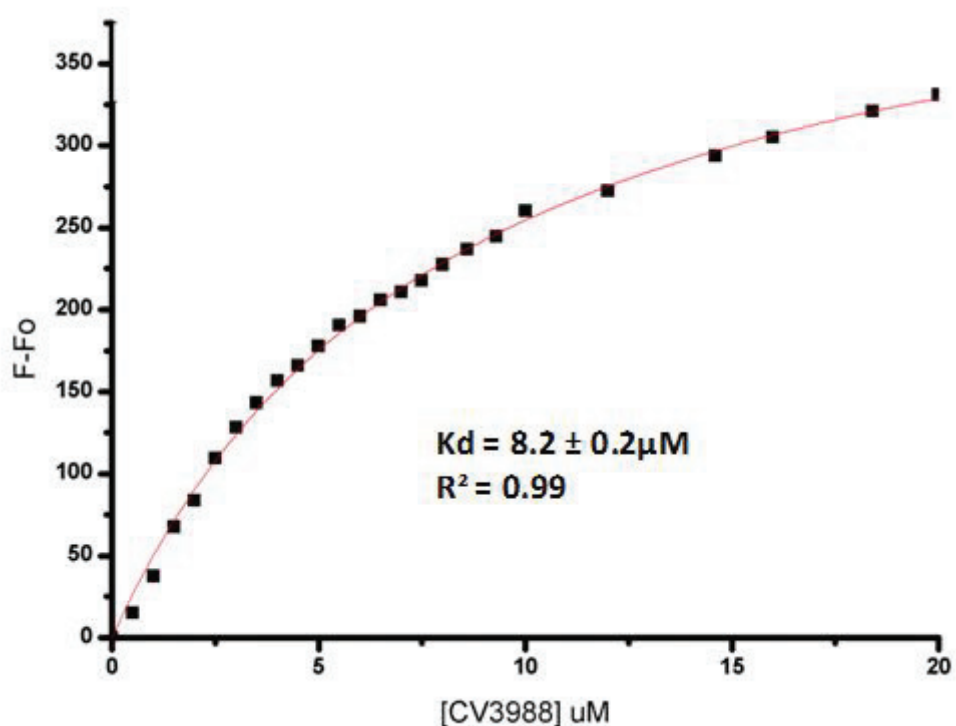


Εικόνα 7.3. Επίδραση του αναστολέα CV-3988 στην ενζυμική ενεργότητα της Lp-PLA₂.

Επίσης, υπολογίστηκε η τιμή K_d του CV-3988 στην rLp-PLA₂. Σε σταθερή συγκέντρωση rLp-PLA₂, τιτλοδοτήθηκαν αυξανόμενες συγκεντρώσεις αναστολέα CV-3988 από 0,5 μ M έως 20 μ M. Ομοίως με παραπάνω, παρατηρήθηκε σταδιακή μείωση του φθορισμού και υπολογίστηκε η τιμή K_d του CV-3988 στην rLp-PLA₂ σε $8,2 \pm 0,2 \mu$ M (Εικόνα 7.4).



A.

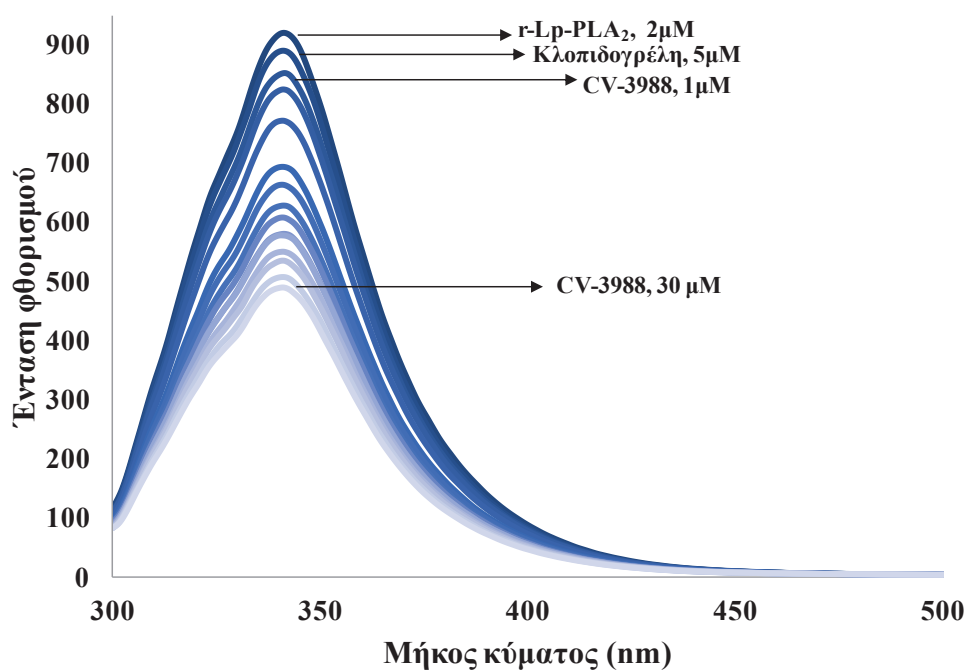


B.

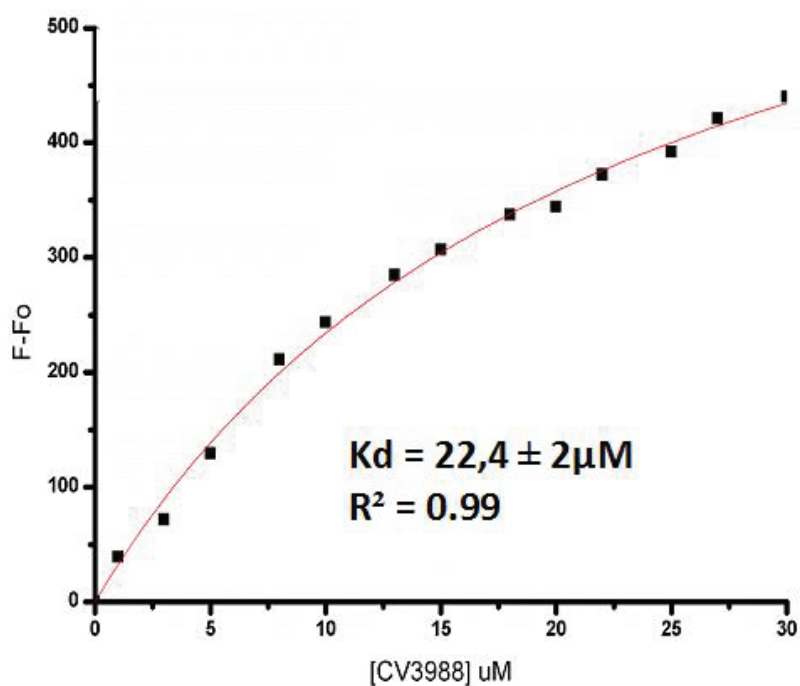
Εικόνα 7.4. Α. Μείωση του φθορισμού με την προσθήκη CV-3988. Οι συγκεντρώσεις CV-3988 που χρησιμοποιήθηκαν ήταν 0,5-20μM

Β. Γραφική παράσταση φάσματος- CV3988 και υπολογισμός της τιμής K_d .

Τέλος, πραγματοποιήθηκε πείραμα ανταγωνισμού, σκοπός του οποίου ήταν ο υπολογισμός της τιμής K_d του αναστολέα CV-3988 στην rLp-PLA₂ παρουσία σταθερής συγκέντρωσης κλοπιδογρέλης. Σε σταθερή συγκέντρωση rLp-PLA₂ (2μM) και κλοπιδογρέλης (5μM), έγινε τιτλοδότηση με αυξανόμενες συγκεντρώσεις CV-3988 που κυμαίνονταν από 1-30 μM. Παρατηρήθηκε σημαντική μείωση του φθορισμού (Εικόνα 7.5.A). Ομοίως με παραπάνω, υπολογίστηκε η τιμή K_d του CV-3988 στην rLp-PLA₂ παρουσία κλοπιδογρέλης ($22,4 \pm 2\mu\text{M}$) (Εικόνα 7.5.B).



Α.



Β.

Εικόνα 7.5. Α. Μείωση του φθορισμού με την προσθήκη CV-3988. Οι συγκεντρώσεις CV-3988 που χρησιμοποιήθηκαν ήταν από 1 μM έως 30 μM , Β. Γραφική παράσταση φάσματος- CV3988 και υπολογισμός της τιμής K_d .

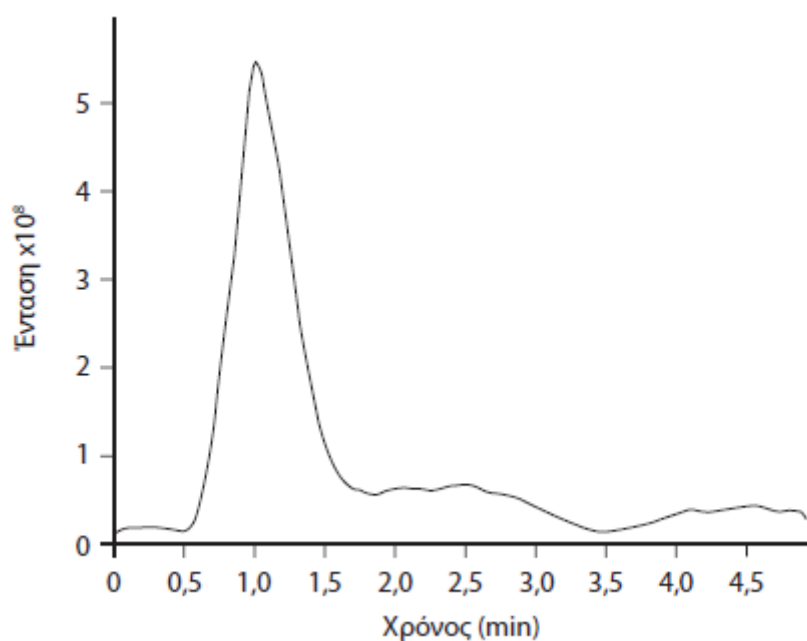
Συγκρίνοντας την τιμή K_d από το πείραμα ανταγωνισμού (παρουσία κλοπιδογρέλης) με την τιμή K_d του αναστολέα παρατηρήθηκε αύξηση του K_d 2,5 φορές από $8,2 \pm 0,2 \mu\text{M}$ σε

$22,4 \pm 2 \mu\text{M}$. Η αύξηση της τιμής K_d αποδεικνύει πως η κλοπιδογρέλη παρεμποδίζει την αλληλεπίδραση του CV-3988 με την rLp-PLA₂ καθώς όσο μεγαλύτερη είναι η τιμή K_d τόσο μικρότερη είναι η αλληλεπίδραση.

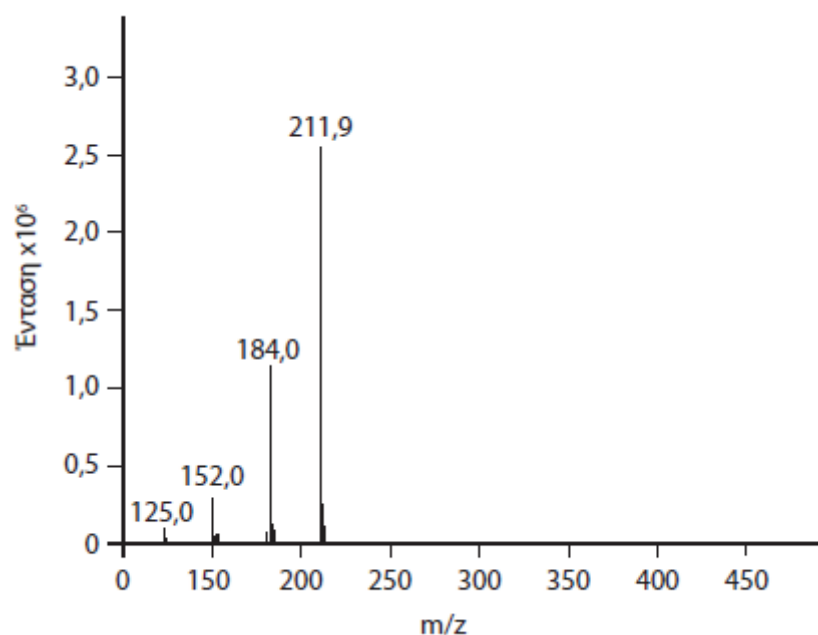
7.2. Μελέτη της πιθανής συμμετοχής της Lp-PLA₂ στην αποικοδόμηση της κλοπιδογρέλης με τη μέθοδο LC/MS-MS

Στη συνέχεια διερευνήθηκε η υπόθεση ότι η πρόσδεση της κλοπιδογρέλης στην rLp-PLA₂ μπορεί να έχει ως αποτέλεσμα την αποικοδόμηση της κλοπιδογρέλης. Η πιθανή ενζυμική αποικοδόμηση της κλοπιδογρέλης από την rLp-PLA₂ διερευνήθηκε με τη μέθοδο της υγρής χρωματογραφίας/φασματομετρίας μάζας πριν και μετά από επώαση της κλοπιδογρέλης (100 mM) με την rLp-PLA₂ (2 $\mu\text{g/mL}$) για 30 min.

Αρχικά έγινε λήψη φάσματος MRM της κλοπιδογρέλης πριν την επώαση με το ένζυμο (απομόνωση και θραυσματοποίηση της κορυφής με m/z 322 που αντιστοιχεί στην κλοπιδογρέλη). Το συνολικό ιόν MRM δίνεται στην εικόνα 7.6 και το φάσμα MS² της κορυφής στην εικόνα 7.7.

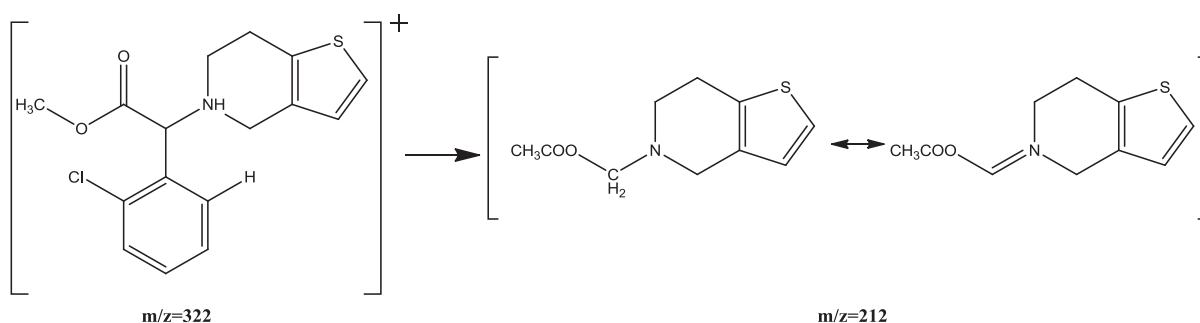


Εικόνα 7.6. Το συνολικό ιόν MRM της κλοπιδογρέλης (χρόνος κατακράτησης, $R_t = 0.8$ min) πριν και μετά την επώαση με την rLp-PLA₂.



Εικόνα 7.7. Φάσμα MS^2 του κύριου ιόντος m/z 322 της κλοπιδογρέλης πριν και μετά την επώαση με την rLp-PLA₂.

Φαίνονται τα χαρακτηριστικά θραύσματα της κλοπιδογρέλης, η θραυσματοποίηση της οποίας ακολουθεί την πορεία που φαίνεται στην εικόνα 7.8.



Εικόνα 7.8. Πορεία θραυσματοποίησης της κλοπιδογρέλης.

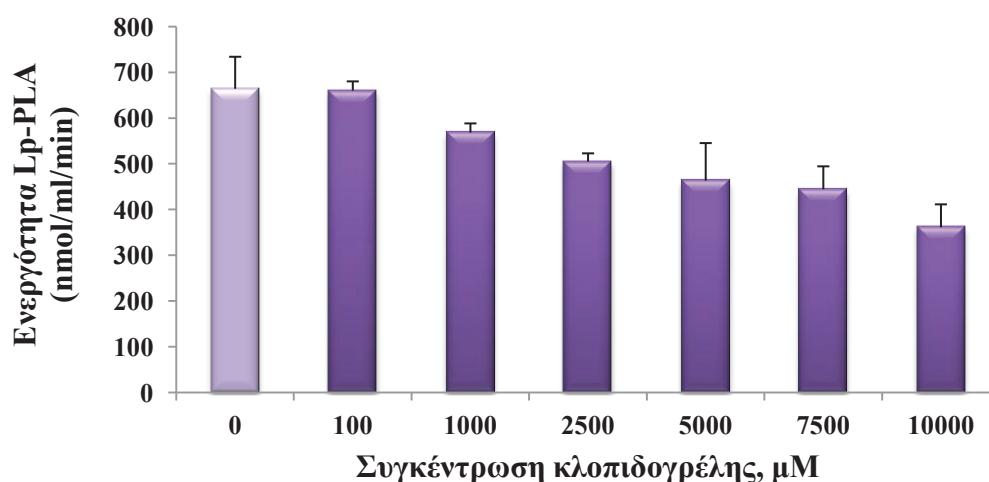
Στη συνέχεια, καταγράφηκε το φάσμα MRM του προϊόντος της επώασης κλοπιδογρέλης με την rLp-PLA₂ για 30 min. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, η επώαση με το ένζυμο δεν επηρέασε το μόριο της κλοπιδογρέλης καθώς το φάσμα MRM ήταν ακριβώς το ίδιο με αυτό που ελήφθη πριν την επώαση με την rLp-PLA₂ (Εικόνα 7.6). Επίσης, δεν ανιχνεύθηκαν τα ιόντα του ενεργού μεταβολίτη της κλοπιδογρέλης με κύριο μοριακό ιόν σε m/z 356 και του ανενεργού μεταβολίτη SR26334 με κύριο μοριακό ιόν σε m/z 308.

Επίσης τα ολοκληρώματα των απομονωμένων κορυφών με m/z 322 που αντιστοιχεί στην κλοπιδογρέλη πριν και μετά από επώαση με την rLp-PLA₂ δεν διαφέρουν (Εικόνα 7.7). Συνεπώς, η κλοπιδογρέλη δεν υφίσταται οποιαδήποτε μεταβολική τροποποίηση μετά την επώασή της με την rLp-PLA₂.

7.3. Μελέτη της επίδρασης της κλοπιδογρέλης στην ενεργότητα της Lp-PLA₂

Αφού διαπιστώθηκε πως η πρόσδεση της κλοπιδογρέλης δεν επηρεάζει τη μεταβολική ενεργοποίηση του φαρμάκου, μελετήθηκε η επίδραση της κλοπιδογρέλης στην ενζυμική ενεργότητα.

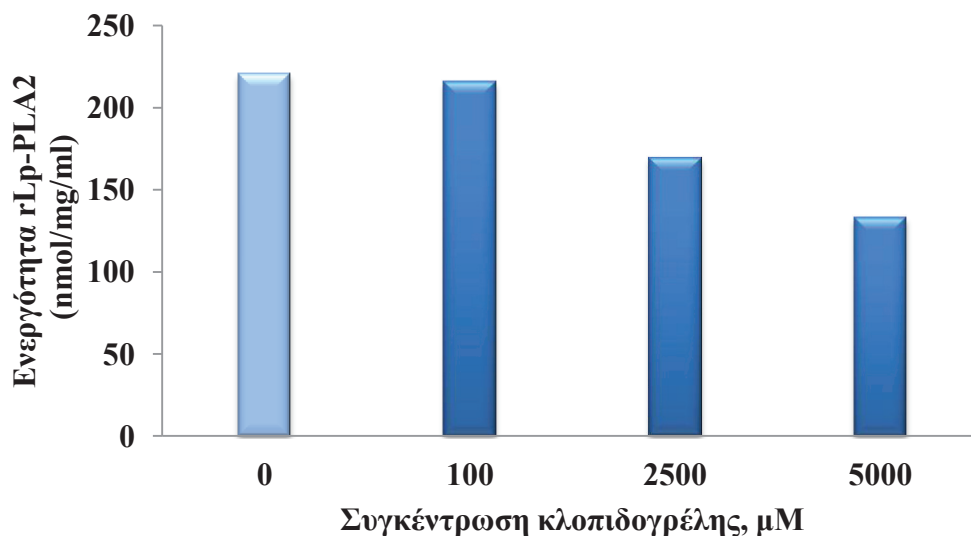
Όπως φαίνεται στην εικόνα 7.9, η κλοπιδογρέλη αναστέλλει την ενεργότητα της rLp-PLA₂ κατά δόσοεξαρτώμενο τρόπο. Μεγαλύτερη αναστολή της ενζυμικής ενεργότητας (1 $\mu\text{g/ml}$) παρατηρήθηκε παρουσία της κλοπιδογρέλης σε συγκεντρώσεις από 2.500 έως 10.000 μM .



Εικόνα 7.9. Επίδραση της κλοπιδογρέλης στην ενζυμική ενεργότητα της rLp-PLA₂ (1 $\mu\text{g/ml}$). Οι τιμές εκφράζονται ως μέση τιμή $\pm$ τυπική απόκλιση.

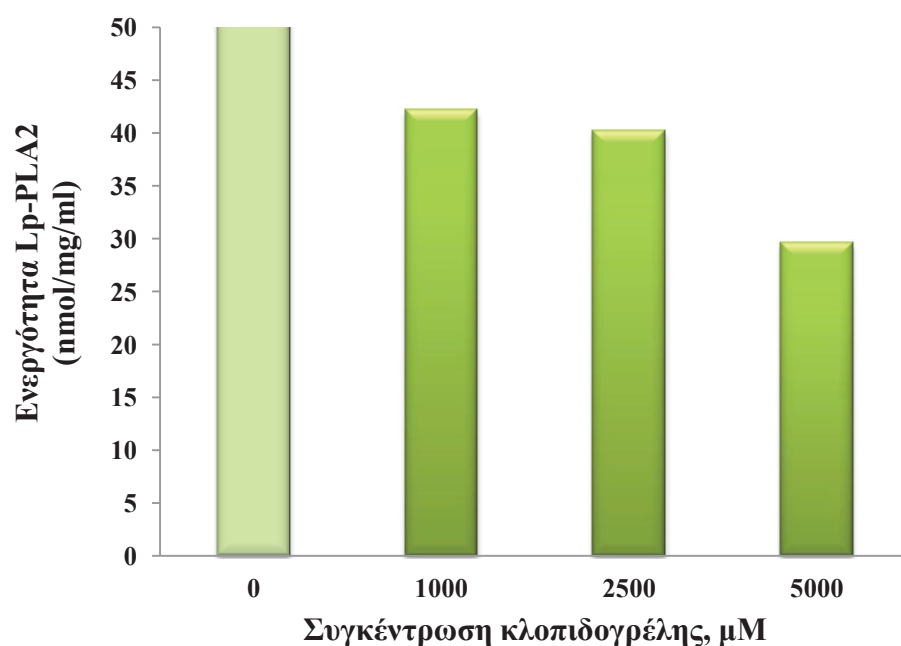
Το παραπάνω πείραμα επαναλήφθηκε χρησιμοποιώντας συγκέντρωση rLp-PLA₂ 0.66 $\mu\text{g/ml}$ και συγκεντρώσεις κλοπιδογρέλης 100 μM , 2500 μM και 5000 μM . Με βάση τα αποτελέσματα αυτά επιβεβαιώθηκε πως η μικρή συγκέντρωση κλοπιδογρέλης δεν προκαλεί καμία αναστολή της ενζυμικής ενεργότητας ενώ η κλοπιδογρέλη σε συγκέντρωση 5000 μM αναστέλλει κατά 40% την ενζυμική ενεργότητα της rLp-PLA₂ (από 220 σε 130 nmol/mg/min) (Εικόνα 7.10).

Το ίδιο φαινόμενο αλλά σε μικρότερη έκταση παρατηρείται και μετά από επώαση του ενζύμου με την 2-οξο κλοπιδογρέλη.



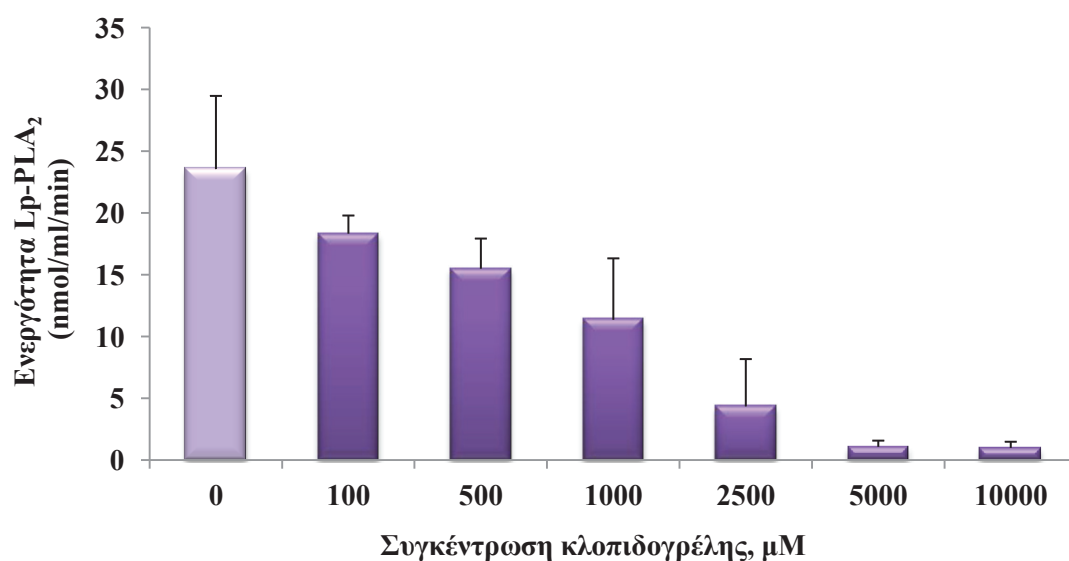
Εικόνα 7.10. Επίδραση της κλοπιδογρέλης στην ενζυμική ενεργότητα της rLp-PLA₂ (0,66 $\mu\text{g/ml}$).

Στη συνέχεια, από ανθρώπινο πλάσμα απομονώθηκε LDL με διαδοχικές υπερφυγοκεντρήσεις²⁶³ και μελετήθηκε η επίδραση της κλοπιδογρέλης στην ενζυμική ενεργότητα της rLp-PLA₂ με πηγή του ενζύμου τις LDL. Αρχικά, προσδιορίστηκε με τη μέθοδο BCA ότι απομονώθηκαν 7 μg LDL. Ομοίως με προηγούμενως, επαναλήφθηκε το ίδιο πείραμα προσδιορίζοντας την ενζυμική ενεργότητα της Lp-PLA₂ απουσία κλοπιδογρέλης και παρουσία κλοπιδογρέλης σε συγκεντρώσεις 1000, 2500 και 5000 μM . Παρατηρήθηκε πως η κλοπιδογρέλη αναστέλλει κατά δοσοεξαρτώμενο τρόπο την ενεργότητα της LpPLA₂ που είναι συνδεδεμένη με την LDL (LDL-Lp-PLA₂) (Εικόνα 7.11).



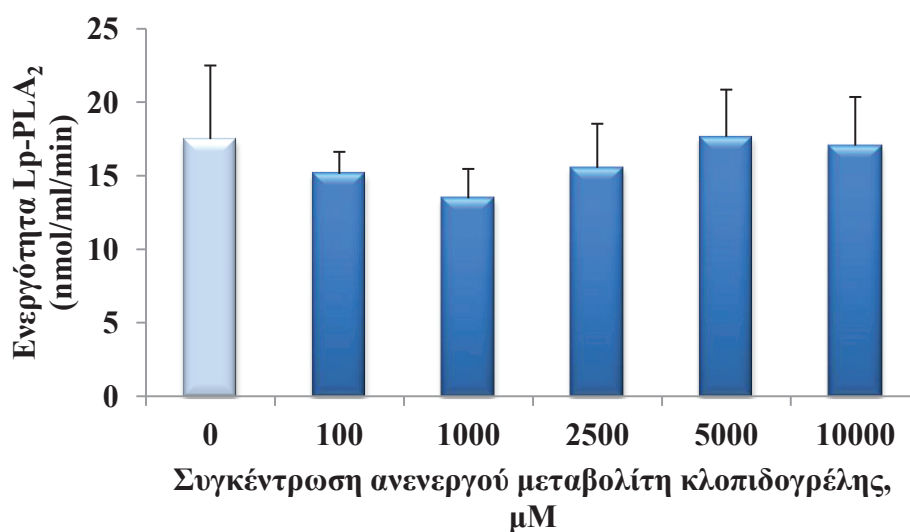
Εικόνα 7.11. Επίδραση της κλοπιδογρέλης στην ενζυμική ενεργότητα της Lp-PLA₂ με πηγή ενζύμου τις χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνες (LDL).

Τέλος, μελετήθηκε η επίδραση της κλοπιδογρέλης στην Lp-PLA₂ στο ολικό πλάσμα που προερχόταν από υγιείς εθελοντές. Η κλοπιδογρέλη σε συγκεντρώσεις από 100 μM – 10000 μM αναστέλλει την ενζυμική ενεργότητα της Lp-PLA₂ κατά δοσο-εξαρτώμενο τρόπο (Εικόνα 7.12). Αξίζει να σημειωθεί πως προσθέτοντας 1000 μM κλοπιδογρέλης στο πλάσμα, η ενζυμική ενεργότητα της Lp-PLA₂ μειώνεται κατά 50% (από $23,56 \pm 5,96$ σε $11,36 \pm 4,97$ nmol/ml/min) ενώ οι μεγαλύτερες συγκεντρώσεις κλοπιδογρέλης (2500-10000 μM) σχεδόν εξαλείφουν την ενζυμική ενεργότητα της Lp-PLA₂.

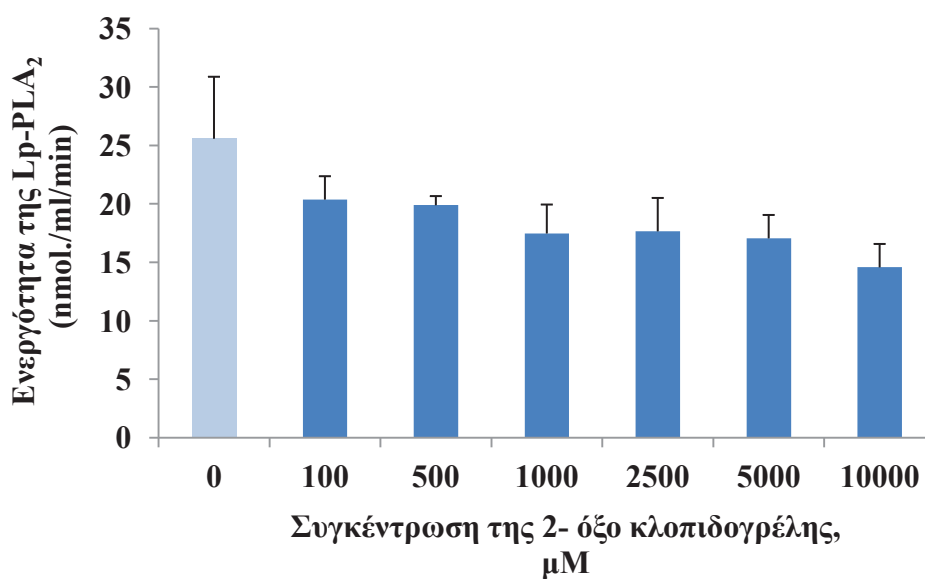


Εικόνα 7.12. Η κλοπιδογρέλη αναστέλλει την ενζυμική ενεργότητα της Lp-PLA₂ στο πλάσμα κατά δοσο-εξαρτώμενο τρόπο.

Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε το ίδιο πείραμα με τη διαφορά πως προστέθηκε στο πλάσμα τον ανενεργό μεταβολίτη της κλοπιδογρέλης (μεταβολίτης καρβοξυλικού οξέως) και τον ενδιάμεσο μεταβολίτη, 2- οξο κλοπιδογρέλη. Ο ανενεργός μεταβολίτης της κλοπιδογρέλης δεν προκάλεσε αναστολή της ενεργότητας του ενζύμου ακόμη και όταν χρησιμοποιήθηκαν μεγάλες συγκεντρώσεις κλοπιδογρέλης (Εικόνα 7.13). Αντίθετα, η 2- οξο κλοπιδογρέλη αναστέλλει την ενζυμική ενεργότητα της Lp-PLA₂, ιδιαίτερα όταν χρησιμοποιούνται μεγάλες συγκεντρώσεις (Εικόνα 7.14).



Εικόνα 7.13. Επίδραση του ανενεργού μεταβολίτη της κλοπιδογρέλης στην ενζυμική ενεργότητα της Lp-PLA₂.



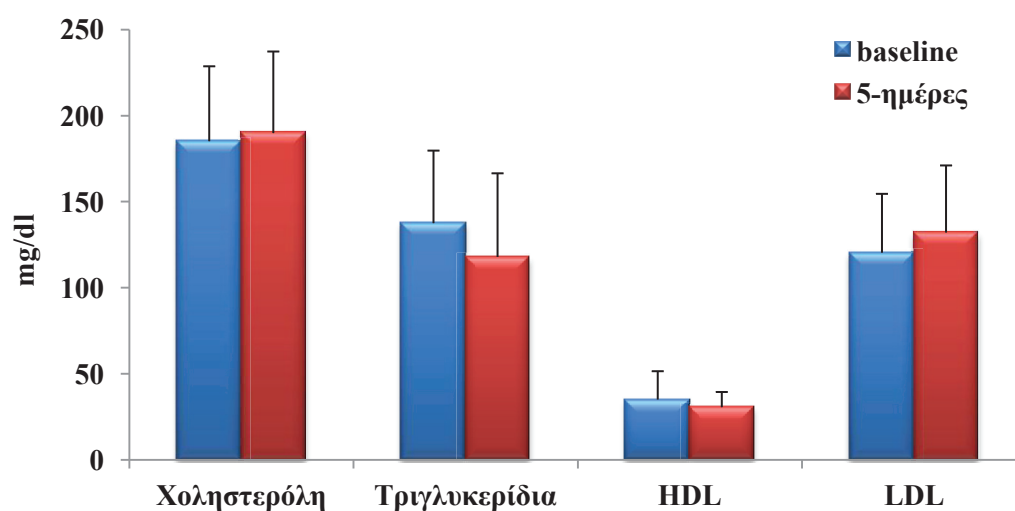
Εικόνα 7.14. Επίδραση της 2-οξο κλοπιδογρέλης στην ενζυμική ενεργότητα της Lp-PLA₂.

7.4. Προσδιορισμός των επιπέδων της Lp-PLA₂ στο πλάσμα ασθενών με ΟΣΣ

Με βάση τα παραπάνω αποτελέσματα ότι η κλοπιδογρέλη αναστέλλει την ενζυμική ενεργότητα της Lp-PLA₂ *in vitro* στη συνέχεια προσδιορίστηκαν τα επίπεδα της Lp-PLA₂ σε πλάσμα ασθενών με ΟΣΣ που συμμετείχαν στη μελέτη ($n=50$, 42 άνδρες) πριν τη

χορήγηση της διπλής αντιαιμοπεταλιακής αγωγής με ασπιρίνη και κλοπιδογρέλη καθώς και 5-ημέρες μετά.

Δεδομένου ότι η Lp-PLA₂ συνδέεται με τις λιποπρωτεΐνες, αρχικά προσδιορίστηκε το λιπιδαιμικό προφίλ των ασθενών (ολική χοληστερόλη, τριγλυκερίδια, HDL, LDL) τόσο στο baseline όσο και 5-ημέρες μετά. Δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των επιπέδων των λιπιδίων στις δύο χρονικές στιγμές (Εικόνα 7.15).



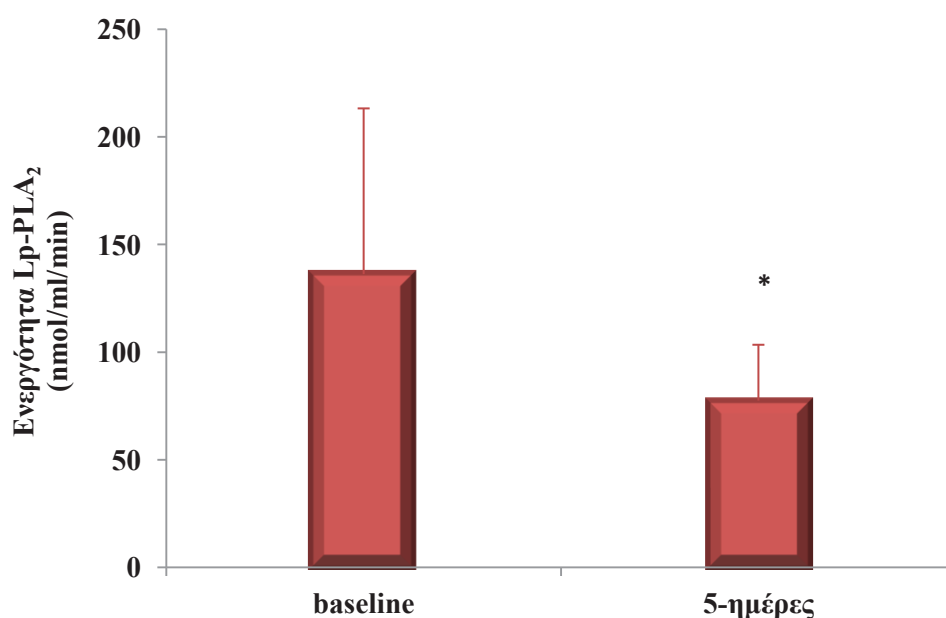
Εικόνα 7.15. Επίπεδα λιπιδίων στους ασθενείς με ΟΣΣ στο baseline και 5-ημέρες μετά τη χορήγηση κλοπιδογρέλης.

Στη συνέχεια προσδιορίστηκαν τα επίπεδα της Lp-PLA₂ στο baseline των ασθενών και συσχετίστηκαν με τις παραπάνω λιπιδαιμικές παραμέτρους. Όπως ήταν αναμενόμενο στο baseline, τα επίπεδα της ενεργότητας της Lp-PLA₂ εμφανίζουν ισχυρή θετική συσχέτιση με την ολική χοληστερόλη και την LDL-χοληστερόλη ($P < 0.01$) (Πίνακας 7.1).

Πίνακας 7.1. Συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων της ενεργότητας της Lp-PLA₂ του πλάσματος και των λιπιδίων στους ασθενείς με ΟΣΣ.

	Lp-PLA ₂	
	R	P
Ολική χοληστερόλη	0.519	0.009
Τριγλυκερίδια	-0.169	NS
HDL-χοληστερόλη	-0.005	NS
LDL-χοληστερόλη	0.589	0.001

Επιπλέον, διερευνήθηκε αν η χορήγηση κλοπιδογρέλης για 5-ημέρες επηρεάζει τα επίπεδα της Lp-PLA₂. Βρέθηκε πως τα επίπεδα της Lp-PLA₂ 5-ημέρες μετά τη χορήγηση της αντιαιμοπεταλιακής αγωγής μειώνονται σε σύγκριση με το baseline από 137 ± 70 σε 78 ± 25 nmol/ml/min ($P=0,001$) (Εικόνα 7.16).



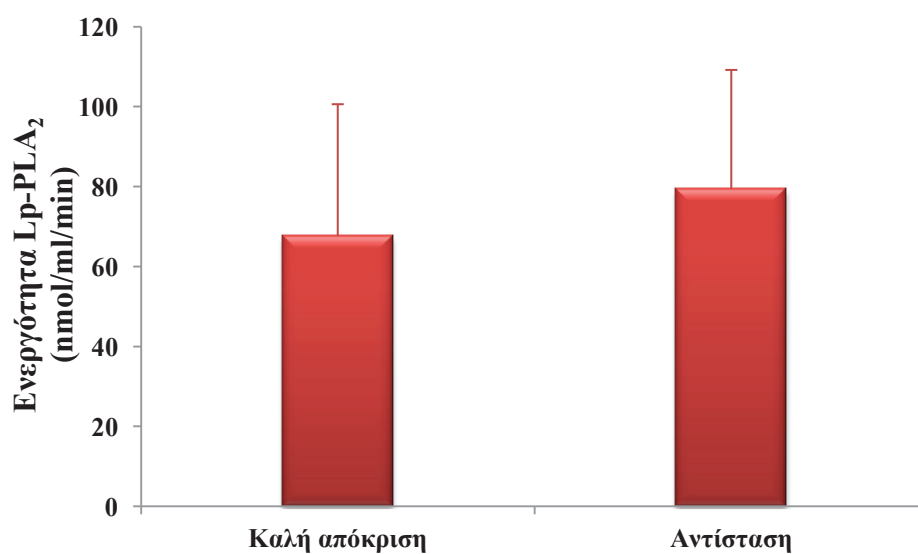
Εικόνα 7.16. Τα επίπεδα της Lp-PLA₂ στο baseline καθώς και 5-ημέρες μετά τη χορήγηση κλοπιδογρέλης. Οι τιμές εκφράζονται ως μέση τιμή ± τυπική απόκλιση, * $p<0,05$ σε σύγκριση με τα επίπεδα της Lp-PLA₂ στο baseline.

Για τη διερεύνηση της υπόθεσης ότι η μείωση της Lp-PLA₂ στο πλάσμα οφείλεται σε χαμηλότερα επίπεδα λιπιδίων, έγινε συσχέτιση αυτών με τα επίπεδα της Lp-PLA₂ στο πλάσμα (Πίνακας 7.2). Στις 5-ημέρες μετά τη χορήγηση κλοπιδογρέλης τα επίπεδα της ενεργότητας της Lp-PLA₂ δεν συσχετίζονται με την ολική χοληστερόλη. Επιπλέον, παρατηρείται θετική συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων της Lp-PLA₂ και της LDL-χοληστερόλης η οποία ωστόσο είναι σημαντικά μικρότερη σε σχέση με το baseline και στα όρια της στατιστικής σημαντικότητας.

Πίνακας 7.2. Συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων της Lp-PLA₂ του πλάσματος και των λιπιδίων στους ασθενείς με ΟΣΣ.

	Lp-PLA ₂	
	R	P
Ολική χοληστερόλη	0.001	NS
Τριγλυκερίδια	-0.036	NS
HDL-χοληστερόλη	0.018	NS
LDL-χοληστερόλη	0.285	0.055

Τέλος, διερευνήθηκε αν τα επίπεδα της Lp-PLA₂ στις 5-ημέρες επηρεάζονται από την απόκριση των ασθενών στην κλοπιδογρέλη. Στην υποομάδα των ασθενών που εξετάστηκε, το 74% του συνόλου είχαν καλή απόκριση στην κλοπιδογρέλη ενώ το 26% (13/50) εμφάνισε αντίσταση. Τα επίπεδα της Lp-PLA₂ ήταν παρόμοια στους ασθενείς με καλή απόκριση στην κλοπιδογρέλη σε σχέση με τους ασθενείς που εμφάνισαν αντίσταση (Εικόνα 7.17).



Εικόνα 7.17. Τα επίπεδα της Lp-PLA₂ στις 5-ημέρες στους ασθενείς με καλή απόκριση στην κλοπιδογρέλη και ασθενών με αντίσταση στο φάρμακο. Οι τιμές εκφράζονται ως μέση τιμή $\pm$ τυπική απόκλιση.

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η αντιαιμοπεταλιακή θεραπεία είναι απαραίτητη σε ασθενείς με καρδιαγγειακή νόσο (ΟΣΣ, σταθερή στηθάγχη, εγκεφαλικά ισχαιμικά μη καρδιοεμβολικά επεισόδια, ΠΑΝ). Τα κυριότερα από του στόματος χορηγούμενα αντιαιμοπεταλιακά φάρμακα που χρησιμοποιούνται σήμερα στην κλινική πράξη είναι η ασπιρίνη σε συνδυασμό με έναν P2Y₁₂ ανταγωνιστή (κλοπιδογρέλη, πρασουγρέλη, τικαγρελόρη). Παρά την αναμφισβήτητη κλινική χρησιμότητα των από του στόματος χορηγούμενων αντιαιμοπεταλιακών φαρμάκων στην αντιμετώπιση της καρδιαγγειακής νόσου, πολλές μελέτες τα τελευταία χρόνια απέδειξαν ότι σε μερικούς ασθενείς εμφανίζεται ανεπαρκής ανταπόκριση των αιμοπεταλίων στην ανασταλτική δράση της ασπιρίνης και της κλοπιδογρέλης το οποίο ορίζεται ως αντίσταση στην ασπιρίνη ή την κλοπιδογρέλη. Το φαινόμενο αυτό έχει σοβαρές κλινικές συνέπειες αφού οι ασθενείς με αντίσταση εμφανίζουν αυξημένο κίνδυνο να εμφανίσουν ένα νέο ισχαιμικό θρομβωτικό επεισόδιο. Αυτό έχει οδηγήσει τις διεθνείς επιστημονικές καρδιολογικές εταιρείες και τους επιστήμονες που ασχολούνται ερευνητικά με την αντίσταση, στην αναζήτηση των αιτιών της αντίστασης και στην ανάπτυξη των κατάλληλων μεθοδολογιών για τη διάγνωσή της με στόχο να συμβάλλουν στην επιλογή των κατάλληλων θεραπευτικών παρεμβάσεων για την αντιμετώπισή της.

Η διάγνωση της αντίστασης έχει προσεγγιστεί με δύο τρόπους: με τη μελέτη των γονιδιακών πολυμορφισμών που έχει βρεθεί πως σχετίζονται με την αντίσταση στα φάρμακα και με ανάλυση της αιμοπεταλιακής λειτουργίας. Στην παρούσα διατριβή, ασχοληθήκαμε με την ανάλυση της αιμοπεταλιακής λειτουργίας σε μια προσπάθεια να αναδειχθούν νέοι δείκτες της αντίστασης στην ασπιρίνη και την κλοπιδογρέλη. Η ανάλυση της αιμοπεταλιακής λειτουργίας είναι ιδιαίτερα χρήσιμη για τους ασθενείς με ΟΣΣ που υποβάλλονται σε PCI ή/και τοποθέτηση stent²⁶⁴ καθώς μπορεί να συμβάλλει όχι μόνο στην εκτίμηση του θρομβωτικού κινδύνου αλλά και του αιμορραγικού. Στην περίοδο των πρώτων 30-ημερών μετά το ΟΣΣ (οξεία φάση), οι ασθενείς κινδυνεύουν περισσότερο από ένα νέο ισχαιμικό θρομβωτικό επεισόδιο ή από αιμορραγίες που σχετίζονται συνήθως με τη χορήγηση των νεότερων P2Y₁₂ ανταγωνιστών^{96,94}. Ωστόσο, υπάρχει αντιγνωμία για το κατά πόσον η παρακολούθηση της λειτουργίας των αιμοπεταλίων με τις μεθόδους που χρησιμοποιούνται σήμερα ευρέως μπορεί να βελτιώσει την τελική έκβαση των ασθενών²⁶⁵.

Υπάρχουν πολλά ερευνητικά δεδομένα σχετικά με την αντίσταση της ασπιρίνης. Ωστόσο, η συχνότητα εμφάνισής της διαφέρει ανάλογα με το είδος του πληθυσμού της μελέτης και τη μέθοδο που χρησιμοποιείται για τη διάγνωσή της.

Στη δική μας μελέτη, το ποσοστό των ασθενών που εμφανίζει αντίσταση διαφέρει ανάλογα με τη μεθοδολογία που χρησιμοποιήσαμε για τη διάγνωσή της. Σύμφωνα με τη μέθοδο LTA, η συχνότητα αντίστασης στην ασπιρίνη ήταν 21% ενώ με τον προσδιορισμό των επιπέδων του 11-δέυδρο TxB₂ στα ούρα και του TxB₂ στο πλάσμα ήταν 34,8% και 32,05%, αντίστοιχα. Τα διαφορετικά ποσοστά αντίστασης στην ασπιρίνη που προκύπτουν λόγω διαφορετικής μεθοδολογίας προσδιορισμού της είναι σε συμφωνία με τη διεθνή βιβλιογραφία όπου περιγράφεται ασθενής συσχέτιση μεταξύ των διαφορετικών μεθοδολογιών^{167,253,266}. Σε μελέτη στην οποία έγινε σύγκριση 6 διαφορετικών μεθόδων για τη διάγνωση της αντίστασης στην ασπιρίνη, βρέθηκε μικρή συσχέτιση μεταξύ των μεθόδων VerifyNow® για την ασπιρίνη, LTA-AA και 11-δέυδρο TxB₂¹⁶⁷. Παρ' όλο που υπήρχε μικρή συσχέτιση μεταξύ των μεθόδων VerifyNow® και LTA-AA, δεν υπήρχε καμία συμφωνία μεταξύ της LTA-AA και του 11-δέυδρο TxB₂, ίδιο εύρημα με αυτό της δικής μας μελέτης. Το ποσοστό των ασθενών που εμφανίζουν αντίσταση στην ασπιρίνη σύμφωνα με τον προσδιορισμό του 11-δέυδρο TxB₂ στα ούρα είναι παρόμοιο με άλλες μελέτες²⁶⁷. Τα υψηλά επίπεδα (> 1500 pg/mg κρεατινίνης) του 11-δέυδρο TxB₂ στα ούρα μετά τη χορήγηση ασπιρίνης ενδέχεται να αντιπροσωπεύουν παραγωγή του θρομβοξανίου που δεν προέρχεται μόνο από τα αιμοπετάλια αλλά και από άλλα κύτταρα όπως τα μονοκύτταρα/μακροφάγα.

Όλα αυτά τα αποτελέσματα υποδεικνύουν ότι η μέτρηση της απόκρισης των αιμοπεταλίων στην ασπιρίνη παρουσιάζει μεγάλη διακύμανση που πιθανώς να οφείλεται στη διαφορετική εξάρτηση, μεταξύ των τεχνικών, από το μονοπάτι του αραχιδονικού οξέος. Δεδομένου ότι όλες οι αναλύσεις μετρούν τη λειτουργία των αιμοπεταλίων, τεχνικές οι οποίες θα μετρούν συγκεκριμένα την αναστολή της κυκλοοξυγονάσης ή την ακετυλίωση θα μπορούσαν να αυξήσουν την ευαισθησία και την ειδικότητα στη διάγνωση της αντίστασης στην ασπιρίνη.

Στη συνέχεια μελετήθηκε η αντίσταση των ασθενών στην κλοπιδογρέλη και έγινε σύγκριση με την απόκριση των ασθενών στην τικαγρελόρη με την ανάλυση VASP. Επίσης, έγινε προσπάθεια συσχέτισής της με άλλους δείκτες ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων καθώς και με εκκρινόμενους από τα αιμοπετάλια παράγοντες. Η ανάλυση

VASP έχει αρκετά πλεονεκτήματα σε σύγκριση με άλλες μεθοδολογίες ανάλυσης της αιμοπεταλιακής λειτουργίας. Αποτελεί την περισσότερο ειδική τεχνική για την εκτίμηση της αναστολής της ενεργοποίησης του υποδοχέα P2Y₁₂ από το ADP^{268,269}. Σε αντίθεση με άλλες μεθόδους, η ανάλυση VASP δεν επηρεάζεται από την ασπιρίνη²⁷⁰. Επίσης, έχει καλή προγνωστική αξία τόσο για ισχαιμικά όσο και για αιμορραγικά επεισόδια²⁷¹. Επιπλέον, φαίνεται πως μπορεί να έχει μεγαλύτερη διακριτική ικανότητα στις χαμηλές τιμές PRI ούτως ώστε να εκτιμάται με μεγαλύτερη ακρίβεια ο αιμορραγικός κίνδυνος των ασθενών σε σύγκριση με άλλες μεθόδους όπως η συσσωρευομετρία²⁷¹. Σύμφωνα με την τελευταία συμφωνία των ειδικών, το θεραπευτικό παράθυρο για τους ασθενείς που λαμβάνουν διπλή αντιαιμοπεταλιακή αγωγή με ασπιρίνη και έναν P2Y₁₂ ανταγωνιστή κυμαίνεται για τις τιμές PRI από 16-50%²⁵⁷.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης, το 33% του συνόλου των ασθενών που έλαβαν κλοπιδογρέλη εμφάνισαν αντίσταση ενώ το ποσοστό αυτό μειώθηκε στο 20% ένα μήνα μετά την έναρξη της θεραπείας. Το εύρημα αυτό είναι σε συνάφεια με προηγούμενες μελέτες του εργαστηρίου μας που δείχνουν πως στο 10% του συνόλου των ασθενών που εμφανίζουν αντίσταση στην κλοπιδογρέλη στις 5-ημέρες, η αντίσταση θα παρέλθει ένα μήνα μετά την έναρξη της θεραπείας^{231,272}. Συνεπώς, η αιμοπεταλιακή απόκριση στην κλοπιδογρέλη σε ασθενείς με ΟΣΣ που λαμβάνουν δόση συντήρησης 75mg ημερησίως μπορεί να σταθεροποιηθεί σε ένα μήνα^{231,272}.

Στην παρούσα μελέτη, κανένας ασθενής που έλαβε τικαγρελόρη, δεν εμφάνισε αντίσταση τόσο στις 5 ημέρες όσο και στις 30-ημέρες. Ωστόσο, το 68% των ασθενών εμφανίζει χαμηλή αιμοπεταλιακή δραστηριότητα, παρόμοιο ποσοστό που έχει αναφερθεί σε άλλες μελέτες^{273,274}. Σύμφωνα με πρόσφατη μελέτη, η ανάλυση VASP υπερεκτιμά την ανασταλτική δράση της τικαγρελόρης εξαιτίας της επιπρόσθετης δράσης της τικαγρελόρης στην αδενοσίνη²⁷³ αναστέλλοντας την επαναπρόσληψη της αδενοσίνης από τα ερυθροκύτταρα²⁴⁴. Έπειτα, η αυξημένη συγκέντρωση της αδενοσίνης στο πλάσμα μπορεί να ενεργοποιεί τον A2 υποδοχέα της αδενοσίνης στα αιμοπετάλια και το cAMP το οποίο επάγει τη φωσφορυλίωση της VASP από πρωτεϊνικές κινάσες εξαρτώμενες από το cAMP²⁷⁵. Συνεπώς, η τιμή κατωφλίου για τη χαμηλή αιμοπεταλιακή δραστηριότητα ίσως να έπρεπε να αναθεωρηθεί για την τικαγρελόρη. Αυτό θα εξηγούσε και το εύρημα ότι οι αιμορραγίες δεν ήταν σημαντικά αυξημένες με την τικαγρελόρη έναντι της κλοπιδογρέλης και της πρασουγρέλης στις μεγάλες κλινικές μελέτες PLATO και TRITON^{94,96}.

Με τη βοήθεια της συσσωρευομετρίας μελετήθηκε η αντιαιμοπεταλιακή δράση της κλοπιδογρέλης και της τικαγρελόρης, διερευνώντας την αναστολή της συσώρευσης των αιμοπεταλίων μετά από ενεργοποίησή τους με τους αγωνιστές ADP και TRAP-14. Η συσώρευση παίζει κυρίαρχο ρόλο στην παθογένεια των οξέων καρδιαγγειακών επεισοδίων αποτελώντας έναν θεραπευτικό στόχο-κλειδί στη διαχείριση ασθενών με στεφανιαία νόσο, ειδικά μετά από ένα ΟΣΣ.

Όπως ήταν αναμενόμενο, στις 5- και 30-ημέρες θεραπείας, η ανασταλτική δράση παρουσία του αγωνιστή ADP, είναι στατιστικά σημαντικά μεγαλύτερη στους ασθενείς που λαμβάνουν τικαγρελόρη σε σχέση με αυτούς που λαμβάνουν κλοπιδογρέλη και δεν εμφανίζουν αντίσταση ($P < 0,005$). Επίσης, η τικαγρελόρη μειώνει περισσότερο τη συσώρευση των αιμοπεταλίων παρουσία του αγωνιστή TRAP, καθώς η συσσωρευτική πορεία του TRAP εξαρτάται και από την ενεργοποίηση με ADP.

Σε αντίθεση με την ασπιρίνη, παρατηρήθηκε ισχυρή θετική συσχέτιση μεταξύ της επαγόμενης από το ADP και το TRAP συσώρευσης των αιμοπεταλίων και της ανάλυσης VASP που χρησιμοποιήθηκε για τη διάγνωση της αντίστασης στην κλοπιδογρέλη. Συνεπώς, η επαγόμενη από το TRAP και το ADP συσώρευση των αιμοπεταλίων θα μπορούσε να αποτελεί μέθοδο διάγνωσης ή προγνωστικό δείκτη της αντίστασης στην κλοπιδογρέλη ασθενών με ΟΣΣ που υποβάλλονται σε PCI, 5 ημέρες μετά τη χορήγηση του φαρμάκου.

Είναι γνωστό ότι τα αιμοπετάλια εκτός από την τεκμηριωμένη συμμετοχή τους στη θρόμβωση, διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη δημιουργία της αθηρωματικής πλάκας μέσω της φλεγμονώδους δράσης τους. Σημαντικό ρόλο στην πυροδότηση και στην περαιτέρω ενίσχυση της φλεγμονώδους αντίδρασης στο αρτηριακό τοίχωμα διαδραματίζουν διάφορα βιολογικά δραστικά μόρια που εκκρίνονται από τα αιμοπετάλια ή μόρια προσκόλλησης που εκφράζονται στη μεμβράνη τους²⁷⁶. Γι' αυτό το λόγο μελετήσαμε την έκκριση των α-κοκκίων προσδιορίζοντας την έκφραση της P-σελεκτίνης, η οποία παίζει σημαντικό ρόλο στην αθηροσκλήρωση. Η P-σελεκτίνη και η sP-σελεκτίνη αποτελούν δείκτες αιμοπεταλιακής ενεργοποίησης^{277,278}. Επίσης, μελετήθηκε ταυτόχρονα το σημείο πρόσδεσης του ινωδογόνου στον υποδοχέα αIIbβ3 καθώς εκτίθεται στα αιμοπετάλια κατά την αλλαγή του σχήματος τους (πρόσδεση PAC-1).

Η μεμβρανική έκφραση της P-σελεκτίνης θα μπορούσε να αποτελεί έναν ευαίσθητο δείκτη για την κατάσταση ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων μετά από ένα οξύ ισχαιμικό

στεφανιαίο επεισόδιο καθώς έχει βρεθεί πως τα επίπεδα της μπορούν να μείνουν αυξημένα μέχρι ένα μήνα μετά την ασταθή στηθάγχη ή το OEM. Η εμμένουσα κατάσταση ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων μπορεί να οφείλεται στην παρατεταμένη φλεγμονώδη απόκριση²⁷⁹. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της κυτταρομετρίας ροής, η διπλή αντιαιμοπεταλιακή αγωγή με ασπιρίνη και κλοπιδογρέλη ή τικαγρελόρη μειώνουν την έκφραση της P-σελεκτίνης και του PAC-1 ενώ η τικαγρελόρη έχει μεγαλύτερη ανασταλτική δράση σε σύγκριση με την κλοπιδογρέλη στις 5 και 30 ημέρες μετά τη φόρτιση.

Επιπλέον, προσδιορίσαμε τα επίπεδα της sP-σελεκτίνης στο baseline, στις 5 και 30 ημέρες μετά τη φόρτιση. Πολλές μελέτες έχουν δείξει πως τα αυξημένα επίπεδα της sP-σελεκτίνης στους ασθενείς με ασταθή στηθάγχη μπορεί να οφείλονται στη ρήξη της πλάκας καθώς επίσης και στην αλληλεπίδραση με τα ενεργοποιημένα λευκοκύτταρα. Γι' αυτόν το λόγο, τα επίπεδα της sP-σελεκτίνης θα μπορούσαν να χρησιμεύσουν ως δείκτης αποσταθεροποίησης της πλάκας στην ασταθή στηθάγχη²⁸⁰. Προηγούμενες μελέτες όπως η υπομελέτη SELECT της ARMYDA-2 έχουν δείξει πως τα επίπεδα της sP-σελεκτίνης δεν διέφεραν μεταξύ ΟΣΣ ασθενών στους οποίους χορηγήθηκε δόση φόρτισης της κλοπιδογρέλης 600 mg και 300 mg (μέσος όρος 91ng/ml, $p=0,69$). Οι τιμές της sP-σελεκτίνης 24h μετά την αγγειοπλαστική ήταν σημαντικά ελαττωμένες και δεν διέφεραν μεταξύ των 2 ομάδων²⁸¹.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματά μας, τα επίπεδα της sP-σελεκτίνης μειώθηκαν σημαντικά με τη χορήγηση της διπλής αντιαιμοπεταλιακής θεραπείας για 5 και 30-ημέρες σε σύγκριση με το baseline. Ωστόσο, παρόλη την ισχυρή αντιαιμοπεταλιακή δράση της τικαγρελόρης, δεν υπήρχε καμία διαφορά στα επίπεδα της sP-σελεκτίνης ανάμεσα στις δυο ομάδες ασθενών. Το εύρημα αυτό είναι σε συνάφεια με μελέτη από τους Husted και συν. που έδειξαν πως η τικαγρελόρη δεν διέφερε από την κλοπιδογρέλη στη μείωση φλεγμονωδών δεικτών (CRP, IL-6, μυελοπεροξειδάση και sCD40L) σε ασθενείς με ΟΣΣ 4 εβδομάδες μετά τη φόρτιση.

Τα παραπάνω ευρήματα υποδεικνύουν πως τα αντιαιμοπεταλιακά φάρμακα μπορεί να ασκούν και αντιφλεγμονώδεις δράσεις. Η κλινική χρησιμότητα και σημασία των παραπάνω δεικτών μένει να αποδειχθεί σε μεγαλύτερης κλίμακας κλινικές μελέτες. Προς το παρόν, πρόσφατες μελέτες έδειξαν πως η μεμβρανική έκφραση της P-σελεκτίνης στα μη ενεργοποιημένα (εν ηρεμία) αιμοπετάλια και η επαγόμενη από το TRAP συσσώρευσή

τους μπορούν να προβλέψουν την εντός δύο ετών κλινική έκβαση ασθενών με σταθερή στεφανιαία νόσο που υποβάλλονται σε PCI και λαμβάνουν διπλή αντιαιμοπεταλιακή θεραπεία²⁸².

Σε συνέχεια των πειραμάτων μας θελήσαμε να μελετήσουμε τα επίπεδα εκκρινόμενων παραγόντων της ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων (IL1b, IL8, GM-CSF, RANTES και VEGF) στο πλάσμα των ασθενών που έλαβαν διπλή αντιαιμοπεταλιακή αγωγή με ασπιρίνη και κλοπιδογρέλη. Έχει αναφερθεί πως προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες και η hsCRP σχετίζονται με υψηλό κίνδυνο εμφάνισης καρδιαγγειακής νόσου. Επίσης, έχει αναφερθεί πως τόσο η ασπιρίνη όσο και η κλοπιδογρέλη μπορεί να ασκούν αντιφλεγμονώδεις δράσεις. Για τη διερεύνηση των επιπέδων των εκκρινόμενων δεικτών αμέσως μετά το ΟΣΣ προσδιορίσαμε τα επίπεδα τους στο baseline. Επίσης, διερευνήθηκε η επίδραση της διπλής αντιαιμοπεταλιακής αγωγής ασπιρίνη και κλοπιδογρέλη 3-5 ημέρες μετά τη φόρτιση.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα μας, τα επίπεδα του RANTES, του VEGF, της IL-8 μειώνονται από το baseline στις 5 ημέρες μετά τη φόρτιση χωρίς ωστόσο η μείωση που καταγράφεται να είναι στατιστικά σημαντική. Προηγούμενη μελέτη έχει δείξει επίσης ότι η χορήγηση κλοπιδογρέλης για 7 ημέρες δεν μεταβάλλει τα επίπεδα του VEGF²⁸³. Σε σταθεροποιημένους καρδιαγγειακούς ασθενείς, οι Heitzer και συν. μειώθηκαν τα επίπεδα της hsCRP και του RANTES μετά την προσθήκη κλοπιδογρέλης στη μονοθεραπεία με ασπιρίνη²⁸⁴. Επιπλέον, στα δείγματα που μετρήθηκαν δεν ανιχνεύθηκε η IL1b ενώ τα επίπεδα του GM-CSF παρέμειναν ανεπηρέαστα από τη χορήγηση της διπλής αντιαιμοπεταλιακής αγωγής. Το εύρημα αυτό συνάδει με πρόσφατη μελέτη στην οποία χρησιμοποιήθηκε η ίδια τεχνολογία και μετρήθηκαν τα επίπεδα εκκρινόμενων δεικτών πριν και μετά τη χορήγηση ασπιρίνης. Οι ερευνητές καταλήγουν πως τα επίπεδα της IL-6 και του G-CSF δεν μεταβάλλονται με τη χορήγηση ασπιρίνης²⁸⁵. Σε άλλη προοπτική, τυχαιοποιημένη μελέτη βρέθηκε πως τα επίπεδα των CRP, GM-CSF, IL-6 και IL-1b σε ασθενείς με σταθερή στηθάγχη μειώνονται σημαντικά μετά τη χορήγηση ασπιρίνης για 6 εβδομάδες²⁸⁶.

Η ετερογενής απόκριση των δεικτών της αιμοπεταλιακής ενεργοποίησης στην ανασταλτική δράση της κλοπιδογρέλης θα μπορούσε να αποδοθεί στα διαφορετικά μονοπάτια που έπονται της μεμβρανικής έκφρασης ή έκκρισης του κάθε δείκτη κατά τη διάρκεια της ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων καθώς επίσης και σε διαφορές που

υπάρχουν ανάμεσα σε αυτά τα μονοπάτια και του σηματοδοτικού μονοπατιού του υποδοχέα P2Y₁₂.

Μέσα από όλους τους παραπάνω δείκτες που προσδιορίστηκαν, έγινε προσπάθεια ανάδειξης νέων δεικτών που να σχετίζονται με την αντίσταση στην ασπιρίνη και την κλοπιδογρέλη. Για την αντίσταση στην ασπιρίνη, όπως προσδιορίστηκε, με τη μέθοδο LTA, βρέθηκε πως η έκφραση του αIIbβ3 (πρόσδεση PAC-1) μπορεί να αποτελέσει νέο δείκτη αντίστασης στο φάρμακο. Για τον ορισμό τιμών κατωφλίου που να ορίζουν την αντίσταση στην ασπιρίνη χρειάζονται μεγαλύτερες κλινικές μελέτες ούτως ώστε να μπορούσε να καθιερωθεί ως διαγνωστικό τεστ. Ο προσδιορισμός της έκφρασης του αIIbβ3 πραγματοποιήθηκε με την κυτταρομετρία ροής στο PRP. Η μέθοδος αυτή είναι υψηλού κόστους, απαιτεί ειδικό εξοπλισμό και εξειδικευμένο τεχνικό προσωπικό, ιδιότητες που καταστούν την προοπτική να χρησιμοποιείται στην κλινική πράξη δυσοίωνη. Επίσης, η επαγόμενη από το TRAP θα μπορούσε να αποτελέσει δείκτης αντίστασης για την ασπιρίνη. Καμία άλλη παράμετρος από αυτές που εξετάστηκαν, δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως δείκτης αντίστασης της ασπιρίνης.

Για την αντίσταση στην κλοπιδογρέλη, βρέθηκε πως πολλοί δείκτες συσχετίζονται με την αντίσταση στο φάρμακο. Ισχυρότεροι δείκτες αναδείχθηκαν η έκφραση του PAC-1 και η μεμβρανική έκφραση της P-σελεκτίνης στα εν ηρεμία αιμοπετάλια καθώς και η μεμβρανική έκφραση της P-σελεκτίνης στα ενεργοποιημένα αιμοπετάλια. Ομοίως με την ασπιρίνη, η επαγόμενη από το TRAP συσσώρευση των αιμοπεταλίων συσχετίζεται ισχυρά με την αντίσταση στην κλοπιδογρέλη. Ωστόσο, η επαγόμενη από το TRAP συσσώρευση των αιμοπεταλίων συσχετίζεται ισχυρότερα με την αντίσταση στην ασπιρίνη παρα με την αντίσταση στην κλοπιδογρέλη. Ο μηχανισμός διαμέσου του οποίου μπορεί ο αγωνιστής TRAP να επηρεάζει την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων βασίζεται στην ενεργοποίηση της ERK. Η πρόσδεση της θρομβίνης στον υποδοχέα PAR-1 που είναι συζευγμένος με Gαq πρωτεΐνες οδηγεί στην έκκριση του ADP από την ενεργοποίηση της PKC και την αύξηση του ενδοκυττάριου Ca²⁺, ενώ το εκκρινόμενο ADP ενεργοποιεί τους συζευγμένους με Gαί P2Y₁₂ υποδοχείς ενισχύοντας περαιτέρω την ενεργοποίηση της ERK1/2 που διαμεσολαβείται από τον PAR-1 και την παραγωγή του TxA₂²⁸⁷. Επιπλέον, η φωσφορυλίωση της ERK1/2 μπορεί να ρυθμίσει την PKC-p47 και το μεταβολισμό του AA που διαμεσολαβείται από την COX-1, υποδεικνύοντας πως η φωσφορυλίωση της ERK1/2 ρυθμίζει τη μεταγωγή σήματος που διαμεσολαβείται από το cAMP και τη δραστηριότητα

της COX-1. Συνεπώς, η μεγαλύτερη συσχέτιση της μέγιστης συσσώρευσης στο AA με την μέγιστη συσσώρευση στο TRAP μπορεί να εξηγηθεί με βάση το μηχανισμό φωσφορυλίωσης της ERK1/2²⁸⁸.

Η χρησιμότητα των παραμέτρων αυτών θα πρέπει να αποτυπωθεί με τη διενέργεια μεγάλων κλινικών μελετών που θα περιλαμβάνουν και συσχετίσεις με την εμφάνιση νέων ισχαιμικών επεισοδίων.

Η παραπάνω ανάλυση της αιμοπεταλιακής λειτουργίας πραγματοποιήθηκε με εξειδικευμένες τεχνικές που εκτιμούν την ενεργοποίηση και τη συσσώρευσή τους. Στη συνέχεια η μελέτη αυτή εστιάστηκε σε μία ακόμη πλειοτροπική δράση των αντιαιμοπεταλιακών φαρμάκων που εξαρτάται από τα αιμοπετάλια, την προσκόλληση των αιμοπεταλίων που αποτελεί το πρώτο στάδιο σχηματισμού του θρόμβου.

Για τη μελέτη της αιμοπεταλιακής προσκόλλησης, αναπτύχθηκε για πρώτη φορά στο εργαστήριο μας η τεχνική της προσκόλλησης των αιμοπεταλίων υπό ροή στο κολλαγόνο με το σύστημα Cellix. Είναι γνωστό πως η αιμοπεταλιακή λειτουργία μπορεί να επηρεάζεται από τη ροή του αίματος και πως αυξημένη διατμητική τάση μπορεί να οδηγήσει στο σχηματισμό του θρόμβου. Πράγματι, σε προκαταρκτικά πειράματα, αυξάνοντας τη διατμητική τάση παρατηρήθηκε αυξημένη αιμοπεταλιακή προσκόλληση με σχηματισμό συσσωματωμάτων αιμοπεταλίων. Από όλες τις τιμές διατμητικής τάσης που χρησιμοποιήσαμε, στη συνέχεια των πειραμάτων μας επιλέξαμε τη διατμητική τάση των 60dyne/cm² που ισοδυναμεί με ρυθμό διάτμησης 1333 s⁻¹ που θεωρείται ένας υψηλός φυσιολογικός ρυθμός ροής^{289,290}.

Στην προσπάθεια να διακρίνουμε τη συσσώρευση από την προσκόλληση των αιμοπεταλίων χρησιμοποιήσαμε το RGDS πεπτίδιο που λειτουργεί ως ανταγωνιστής της ιντεγκρίνης αIIbβ3. Επιπλέον, πολλές ιντεγκρίνες αναγνωρίζουν την RGD αλληλουχία στα προσδέματά τους²⁹¹. Στη δική μας μελέτη, το RGDS πεπτίδιο ανέστειλε την προσκόλληση των αιμοπεταλίων, εύρημα που οδηγεί ότι μπορεί να λειτουργεί ως ανταγωνιστής του υποδοχέα του κολλαγόνου GPVI καθώς τα αιμοπετάλια προσκολλώνται στο ινιδιακό κολλαγόνο κυρίως μέσω αυτού του υποδοχέα. Η ανασταλτική δράση του πεπτιδίου RGDS στην προσκόλληση των αιμοπεταλίων έχει περιγραφεί και σε προηγούμενη μελέτη²⁹². Συνεπώς, με βάση τα αποτελέσματα αποφασίσαμε να μην χρησιμοποιήσουμε το RGDS πεπτίδιο στη συγκριτική μελέτη της επίδρασης της κλοπιδογρέλης και τικαγρελόρης στην

προσκόλληση των αιμοπεταλίων καθώς η χρήση του δεν μας διευκόλυνε να ξεχωρίσουμε την προσκόλληση από τη συσσώρευση των αιμοπεταλίων.

Η αλληλεπίδραση των αιμοπεταλίων με το κολλαγόνο διαμέσου του GPVI προκαλεί την έκκριση καθώς και την ενεργοποίηση των ιντεγκρινών. Συνεπώς, το επικαλυμμένο με κολλαγόνο τύπου I biochip μπορεί να επάγει ολόκληρη τη διαδικασία σχηματισμού του θρόμβου μέσα σε λίγα λεπτά. Στη δική μας μελέτη, τόσο τα αιμοπετάλια των ΟΣΣ ασθενών στο baseline όσο και των υγιών εθελοντών κάτω υπο συνεχή διατμητική τάση 60dyne/cm^2 προσκολλώνται σταθερά στο πρώτο λεπτό. Το εύρημα αυτό είναι σε συμφωνία με προηγούμενες μελέτες που έχουν δείξει πως τα αιμοπετάλια προσκολλώνται σταθερά στο κολλαγόνο μέσα σε ένα λεπτό ενώ η επακόλουθη συσσώρευση των αιμοπεταλίων διαμέσου των αλληλεπιδράσεων αιμοπεταλίου με αιμοπετάλιο συμβαίνει μέσα σε 300sec^{293} . Παρατηρώντας τις εικόνες αιμοπεταλιακής προσκόλλησης, αναδείχθηκε πως τα αιμοπετάλια των ασθενών έχουν την τάση να σχηματίζουν περισσότερα συσσωματώματα αιμοπεταλίων σε σύγκριση με τα αιμοπετάλια που προέρχονται από υγιείς εθελοντές. Αυτό συμβαίνει γιατί η αιμοπεταλιακή λειτουργία είναι αυξημένη κάτω από υψηλή διατμητική τάση σε ασθενείς με ΟΣΣ²⁹⁴. Το εύρημα αυτό αποτυπώθηκε με τη σύγκριση και των παραμέτρων προσκόλλησης (περιοχή και περίμετρος) που ήταν σημαντικά αυξημένες στους ασθενείς με ΟΣΣ.

Στη συνέχεια, θελήσαμε να ερευνήσουμε την επίδραση της κλοπιδογρέλης και της τικαγρελόρης στην προσκόλληση των αιμοπεταλίων. Η χορήγηση των P2Y₁₂ ανταγωνιστών στις 5 ημέρες αυξάνει το χρόνο που απαιτείται για την αρχική προσκόλληση των αιμοπεταλίων σε σύγκριση με τους ασθενείς στο baseline και τους υγιείς εθελοντές. Επιπλέον, το ποσοστό προσκόλλησης είναι σημαντικά μικρότερο για τους ασθενείς υπό διπλή αντιαιμοπεταλιακή θεραπεία σε σχέση με το baseline. Συνεπώς, η διπλή αντιαιμοπεταλιακή θεραπεία αναστέλλει την προσκόλληση των αιμοπεταλίων. Το ερώτημα που προκύπτει είναι αν το φαινόμενο αυτό οφείλεται στην ασπιρίνη ή στους P2Y₁₂ ανταγωνιστές ή σε συνεργατική τους δράση. Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, η χορήγηση ασπιρίνης ως μονοθεραπεία δεν αναστέλλει την προσκόλληση των αιμοπεταλίων στο κολλαγόνο ενώ ο συνδυασμός της με κλοπιδογρέλη μειώνει την προσκόλληση²⁹⁵⁻²⁹⁷. Δεν υπάρχουν ερευνητικά δεδομένα για την επίδραση της τικαγρελόρης στην προσκόλληση των αιμοπεταλίων. Κάτω από τις δικές μας πειραματικές συνθήκες, η κλοπιδογρέλη και η τικαγρελόρη μειώνουν κατά παρόμοιο τρόπο την

προσκόλληση των αιμοπεταλίων στο κολλαγόνο με την κλοπιδογρέλη να έχει μια μεγαλύτερη διακύμανση στο προφίλ προσκόλλησης. Επιπλέον, η τικαγρελόρη διαφοροποιείται από την κλοπιδογρέλη ως προς την μορφή των προσκολλημένων αιμοπεταλίων καθώς η περιοχή που καλύπτει κάθε αιμοπετάλιο και η περίμετρος τους ήταν σημαντικά μειωμένες για την τικαγρελόρη. Συνεπώς, στους ασθενείς που έλαβαν τικαγρελόρη σχηματίστηκαν μικρότερα συσσωματώματα σε σύγκριση με την κλοπιδογρέλη. Για να διαπιστώσουμε αν υπάρχει διαφοροποίηση μεταξύ κλοπιδογρέλης και τικαγρελόρης στην επίδρασή τους στη συσσώρευση των αιμοπεταλίων, ενεργοποιήσαμε τα αιμοπετάλια με κολλαγόνο. Η τικαγρελόρη αναστέλλει σε μεγαλύτερο βαθμό τη συσσώρευση των αιμοπεταλίων από το κολλαγόνο. Το φαινόμενο αυτό ίσως οφείλεται στην ισχυρότερη αντιαιμοπεταλιακή δράση της τικαγρελόρης.

Τέλος, με δεδομένο ότι τα αντιαιμοπεταλιακά φάρμακα μπορούν να μειώνουν ανεξάρτητους από τα αιμοπετάλια φλεγμονώδεις δείκτες όπως η hsCRP, διερευνήσαμε για πρώτη φορά την πιθανή αλληλεπίδραση της κλοπιδογρέλης με την Lp-PLA₂, έναν εξειδικευμένο για την αγγειακή φλεγμονή δείκτη. Επίσης, έγινε διερεύνηση των συνεπειών αυτής της αλληλεπίδρασης στην ενεργότητα του ενζύμου και στο μεταβολισμό της κλοπιδογρέλης.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, η κλοπιδογρέλη συνδέεται στην Lp-PLA₂ και μειώνει σημαντικά την ενεργότητα του ενζύμου, όμως δεν αποτελεί υπόστρωμα του ενζύμου αφού η παραπάνω αλληλεπίδραση δεν οδηγεί στην αποικοδόμηση του φαρμάκου.

Είναι γνωστό πως η κλοπιδογρέλη είναι προφάρμακο και μεταβολίζεται *in vivo* προς τον ενεργό θειολικό μεταβολίτη ο οποίος προσδένεται μη αντιστρεπτά στον υποδοχέα P2Y₁₂ των αιμοπεταλίων σχηματίζοντας δισουλφιδικούς δεσμούς με δύο κατάλοιπα κυστεΐνης (Cys17 και Cys270) του υποδοχέα²⁹⁸. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της μελέτης μας, η πρόσδεση της κλοπιδογρέλης στο ένζυμο είναι πιθανώς αντιστρεπτή όμως η φύση των δεσμών που συμβάλλουν στην πρόσδεση αυτή χρειάζεται επιπλέον διερεύνηση. Επιπρόσθετα, είναι πιθανόν να υπάρχει ομοιοπολική αλληλεπίδραση μεταξύ του ενεργού μεταβολίτη της κλοπιδογρέλης και της Lp-PLA₂, παρόμοια με αυτή που παρατηρείται με τον υποδοχέα P2Y₁₂ αφού η αμινοξική αλληλουχία του ενζύμου περιλαμβάνει 5 κατάλοιπα κυστεϊνών (Cys 67, Cys 229, Cys 291, Cys 334, Cys 407)²⁹⁹. Από το πείραμα ανταγωνισμού βρέθηκε πως η τιμή kd του αναστολέα στην rLp-PLA₂ παρουσία σταθερής συγκέντρωσης κλοπιδογρέλης αυξήθηκε κατά 2,5 φορές, εύρημα που

υποδεικνύει πως η κλοπιδογρέλη παρεμποδίζει την αλληλεπίδραση του CV-3988 με την rLp-PLA₂. Το εύρημα αυτό ανοίγει το δρόμο για να διαπιστώσουμε αν η κλοπιδογρέλη προσδένεται στο ενεργό κέντρο.

Στη συνέχεια, διερευνήθηκε αν η πρόσδεση της κλοπιδογρέλης στην Lp-PLA₂, μπορεί να οδηγήσει στον καταβολισμό της κλοπιδογρέλης. Πράγματι, εκτός από την υδρόλυση του PAF και OxPL, η Lp-PLA₂, εκφράζει ενεργότητα εστεράσης και τρανσακυλάσης έναντι υδρόφοβων υποστρωμάτων^{300,301}. Η κλοπιδογρέλη είναι υδρόφοβο μόριο και το 85% του φαρμάκου μετά την από του στόματος χορήγησή του μετατρέπεται από εστεράσες του εντερικού βλεννογόνου και του πλάσματος σε ανενεργό μεταβολίτη, ενώ μόνο το 15% του χορηγούμενου φαρμάκου μετατρέπεται στον ενεργό θειολικό μεταβολίτη που δρα στον υποδοχέα P2Y₁₂²⁹⁸. Συνεπώς είναι πιθανόν η κλοπιδογρέλη μετά την πρόσδεσή της στην Lp-PLA₂ να υδρολύεται μέσω της ενεργότητας εστεράσης της Lp-PLA₂ προς τον ανενεργό καρβοξυλικό μεταβολίτη. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της φασματομετρίας μάζας, το προφίλ της κλοπιδογρέλης δεν επηρεάστηκε μετά την επώασή της με την Lp-PLA₂, ενώ παράλληλα δεν ανιχνεύτηκε ο ανενεργός μεταβολίτης της, συνεπώς το ένζυμο αυτό δεν συμβάλει στην αποικοδόμηση της κλοπιδογρέλης τουλάχιστον στο πρώτο στάδιο του μεταβολισμού της. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα προηγούμενων μελετών, σημαντικό ρόλο σε επόμενο στάδιο του μεταβολισμού της κλοπιδογρέλης και ειδικότερα στο στάδιο μετατροπής της 2-οξο κλοπιδογρέλης στον ενεργό θειολικό μεταβολίτη διαδραματίζει η PON-1²⁶⁰, ένα ένζυμο που μεταξύ των άλλων εκφράζει και ενεργότητα Lp-PLA₂^{260,301}. Συνεπώς, η Lp-PLA₂ θα μπορούσε να συμβάλλει στη μεταβολική ενεργοποίηση του φαρμάκου σε μεταγενέστερα στάδια.

Η πρόσδεση της κλοπιδογρέλης στην Lp-PLA₂ αν και δεν επηρεάζει το αρχικό στάδιο μεταβολισμού του φαρμάκου, έχει σημαντική ανασταλτική επίδραση στην ενεργότητα του ενζύμου. Πράγματι σύμφωνα με τα αποτελέσματά μας η κλοπιδογρέλη αναστέλλει την ενζυμική ενεργότητα της rLp-PLA₂ καθώς και την ενεργότητα του ενζύμου στο πλάσμα. Με δεδομένο ότι η Lp-PLA₂ μεταφέρεται στο πλάσμα συνδεδεμένη με τις λιποπρωτεΐνες και κυρίως με την LDL, μελετήσαμε την επίδραση της κλοπιδογρέλης στην ενζυμική ενεργότητα της LDL-Lp-PLA₂. Υπάρχουν πολλά ερευνητικά δεδομένα από μελέτες τόσο *in vitro* όσο και σε πειραματόζωα *in vivo* που δείχνουν πως η LDL-Lp-PLA₂ είναι προ-αθηρογόνο ένζυμο. Μέσα στην αθηρωματική πλάκα, η LDL-Lp-PLA₂ υδρολύει τα OxPL που μεταφέρονται με τα σωματίδια της οξειδωμένης LDL οδηγώντας στο σχηματισμό της

lyso-PC και των oxNEFA τα οποία έχουν ποικίλες αθηρογόνες δράσεις^{302,303}. Συνεπώς, η LDL-Lp-PLA₂ συμβάλει ενεργά στην αθηρογένεση³⁰⁴. Ο προ-αθηρογόνος ρόλος της LDL-Lp-PLA₂ υποστηρίζεται από πλειάδα μεγάλων κλινικών μελετών που δείχνουν ότι η Lp-PLA₂ του πλάσματος και κυρίως αυτή της LDL συσχετίζεται με αυξημένο κίνδυνο καρδιαγγειακής νόσου³⁰⁵. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της μελέτης μας η κλοπιδογρέλη αναστέλλει την ενεργότητα της LDL-Lp-PLA₂. Προηγούμενες μελέτες έχουν αποδείξει ότι εκτός από την αναστολή της ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων, η κλοπιδογρέλη εμφανίζει ποικίλες βιολογικές δράσεις (πλειοτροπικές δράσεις) πολλές από τις οποίες είναι ανεξάρτητες της δράσης του φαρμάκου στα αιμοπετάλια^{223,306}.

Συνεπώς, η μείωση της ενεργότητας της LDL-Lp-PLA₂ από την κλοπιδογρέλη μπορεί να αποτελεί μια νέα πλειοτροπική δράση (αντιαθηρογόνο) του φαρμάκου αυτού. Η δράση αυτή θα πρέπει να αποδειχθεί και *in vivo*, σε ασθενείς με καρδιαγγειακή νόσο που λαμβάνουν αντιαιμοπεταλιακή αγωγή με κλοπιδογρέλη. Συνεπώς, η κλινική σημασία των παραπάνω ευρημάτων διερευνήθηκε σε ομάδα ασθενών της μελέτης που λαμβάνουν κλοπιδογρέλη. Η ενζυμική ενεργότητα της Lp-PLA₂ είναι σημαντικά μειωμένη στις 5-ημέρες λήψης της κλοπιδογρέλης σε σύγκριση με το baseline στους ασθενείς με ΟΣΣ. Το φαινόμενο αυτό δεν αποδίδεται στη χορήγηση στατινών καθώς δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές στα επίπεδα των λιπιδίων στις 5-ημέρες σε σύγκριση με το baseline.

Συμπερασματικά, από την παρούσα διατριβή προκύπτει ότι τα αντιαιμοπεταλιακά φάρμακα μπορεί να εμφανίζουν ποικίλες πλειοτροπικές δράσεις εξαρτώμενες από τα αιμοπετάλια με τη μείωση χαρακτηριστικών δεικτών ενεργοποίησης αιμοπεταλίων και τη μείωση της προσκόλλησης τους στο κολλαγόνο καθώς και δράσεις ανεξάρτητες των αιμοπεταλίων όπως η μείωση της ενεργότητας της Lp-PLA₂. Από τη μελέτη αυτή, αναδεικνύονται νέοι δείκτες διάγνωσης της αντίστασης στην ασπιρίνη (TRAP, PAC-1) και την κλοπιδογρέλη (TRAP, PAC-1, P-σελεκτίνη). Για να είναι οι δείκτες αυτοί χρήσιμοι διαγνωστικά, θα πρέπει να πραγματοποιηθούν μεγάλες κλινικές μελέτες.

ΠΕΡΙΛΗΨΕΙΣ

Περίληψη στα ελληνικά

Εισαγωγή-Σκοπός: Η ασπιρίνη σε συνδυασμό με έναν P2Y₁₂ ανταγωνιστή έχει ισχυρή αντιθρομβωτική δράση στην αντιμετώπιση των οξέων στεφανιαίων συνδρόμων (ΟΣΣ). Παράλληλα, μπορεί να εμφανίζουν ποικίλες πλειοτροπικές δράσεις είτε εξαρτώμενες από τα αιμοπετάλια είτε ανεξάρτητες από αυτά με μεγάλη σημασία για την αποτελεσματικότητα των αντιαιμοπεταλιακών φαρμάκων στους ασθενείς, ιδιαίτερα κατά τη διάρκεια της μακροχρόνιας χορήγησής τους. Σκοπός της παρούσας διατριβής ήταν η διερεύνηση των πλειοτροπικών δράσεων της ασπιρίνης και της κλοπιδογρέλης και η συσχέτισή τους με τις κλασικές παραμέτρους εκτίμησης της αιμοπεταλιακής λειτουργίας καθώς και με το φαινόμενο της αντίστασης. Επίσης, σκοπός ήταν η ανάδειξη κάποιων παραμέτρων που θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν ως δείκτες διάγνωσης της αντίστασης.

Υλικά και μέθοδοι: Στη μελέτη συμπεριελήφθησαν 118 ΟΣΣ ασθενείς που υποβλήθηκαν σε PCI και έλαβαν διπλή αντιαιμοπεταλιακή αγωγή με ασπιρίνη και κλοπιδογρέλη (δόση φόρτισης 325mg και 600 ή 300mg ακολουθούμενη από 100mg/ημέρα και 75mg/ημέρα, αντίστοιχα) ή ασπιρίνη και τικαγρελόρη (δόση φόρτισης 325mg και 180mg ακολουθούμενη από 90mg 2 φορές ημερησίως, αντίστοιχα). Η αντίσταση στην ασπιρίνη προσδιορίστηκε με τη μέθοδο LTA μετά από ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων με αραχιδονικό οξύ (AA) ενώ η αντίσταση στην κλοπιδογρέλη εκτιμήθηκε με τη μέθοδο φωσφορυλίωσης VASP (τιμές PRI; platelet reactivity index). Στους δείκτες που προσδιορίστηκαν για τη διερεύνηση της πιθανής συσχέτισης τους με την αντίσταση περιλαμβάνονται: η συσσώρευση των αιμοπεταλίων σε διάφορους αγωνιστές με τη μέθοδο συσσωρευομετρίας, τα επίπεδα του TxB₂ στο πλάσμα και του 11-δεϋδρο TxB₂ στα ούρα καθώς και της sP-σελεκτίνης με τη μέθοδο της ELISA, η μεμβρανική έκφραση της P-σελεκτίνης (PE-CD62P) και της ιντεγκρίνης α_{IIb}β₃ (πρόσδεση FITC-PAC-1) με κυτταρομετρία ροής και τα επίπεδα των εκκρινόμενων δεικτών της ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων (IL-1β, IL-8, VEGF, RANTES, GM-CSF) με τη μέθοδο της της μικροσωματιδιακής ανοσοενζυμικής τεχνολογίας. Επιπλέον, η μελέτη της προσκόλλησης των αιμοπεταλίων έγινε σε ολικό αίμα υπό συνεχή διατμητική τάση με το σύστημα Cellix. Τέλος, με τη μέθοδο φασματοσκοπίας φθορισμού διερευνήθηκε η αλληλεπίδραση της κλοπιδογρέλης με την rLp-PLA₂ ενώ η επίδραση αυτής της πρόσδεσης στην ενεργότητα του ενζύμου μελετήθηκε με τη μέθοδο ιζηματοποίησης με τριχλωροξικό οξύ χρησιμοποιώντας ως υπόστρωμα [³H]PAF και ως πηγές του ενζύμου το ολικό πλάσμα, την χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνη (LDL) και την rLp-PLA₂. Η συνέπεια της αλληλεπίδρασης αυτής στο μεταβολισμό του φαρμάκου διαπιστώθηκε με φασματομετρία μάζας.

Αποτελέσματα: Η διπλή αντιαιμοπεταλιακή αγωγή εμφάνισε διάφορες πλειοτροπικές δράσεις με τη μείωση των επιπέδων του TxB_2 στο πλάσμα και του 11-δεϋδρο TxB_2 στα ούρα, τη μείωση της μεμβρανικής έκφρασης της P-σελεκτίνης και της sP-σελεκτίνης, τη μείωση της έκφρασης του $\alpha\text{IIb}\beta_3$ και τη μείωση των εκκρινόμενων δεικτών των αιμοπεταλίων του πλάσματος. Επίσης, μείωσε την αιμοπεταλιακή προσκόλληση στο κολλαγόνο καθώς και την ενεργότητα της Lp-PLA_2 αναδεικνύοντας τις πλειοτροπικές δράσεις των φαρμάκων αυτών. Σύμφωνα με τη μέθοδο LTA, η συχνότητα αντίστασης στην ασπιρίνη ήταν 21% ενώ σύμφωνα με την ανάλυση VASP το 33% του συνόλου των ασθενών που έλαβαν κλοπιδογρέλη εμφάνισαν αντίσταση στο φάρμακο. Ανάμεσα στις παραμέτρους που εξετάστηκαν και τη συσσώρευση στο AA, για την αντίσταση στην ασπιρίνη δεν παρατηρήθηκε ισχυρή συσχέτιση παρά μόνο για την έκφραση της ιντεγκρίνης $\alpha\text{IIb}\beta_3$ και της συσσώρευσης από το TRAP. Ανάμεσα στις παραμέτρους που εξετάστηκαν και τα επίπεδα φωσφορυλίωσης της VASP παρουσιάστηκε ισχυρή θετική συσχέτιση με πολλές από αυτές με τη μεμβρανική έκφραση της P-σελεκτίνης και της επαγόμενης από το TRAP συσσώρευσης να ξεχωρίζουν.

Συμπέρασμα: Τα αντιαιμοπεταλιακά φάρμακα μπορεί να εμφανίζουν ποικίλες πλειοτροπικές δράσεις εξαρτώμενες από τα αιμοπετάλια με τη μείωση χαρακτηριστικών δεικτών ενεργοποίησης αιμοπεταλίων και τη μείωση της προσκόλλησης τους στο κολλαγόνο καθώς και δράσεις ανεξάρτητες των αιμοπεταλίων όπως η μείωση της ενεργότητας της Lp-PLA_2 . Από τη μελέτη αυτή, αναδεικνύονται νέοι δείκτες διάγνωσης της αντίστασης στην ασπιρίνη (TRAP, PAC-1) και την κλοπιδογρέλη (TRAP, PAC-1, P-σελεκτίνη).

Περίληψη στα αγγλικά

Introduction-Purpose: Aspirin in combination with a P2Y₁₂ antagonist has strong antithrombotic activity in the treatment of acute coronary syndromes (ACS). At the same time, they may show various pleiotropic effects which are dependent of platelets or independent of them and are of great importance for the effectiveness of antiplatelet drugs to patients, particularly during their long-term therapy. The purpose of this study was to investigate the pleiotropic actions of aspirin and clopidogrel, and their correlation with traditional assessment of platelet function parameters as well as the phenomenon of resistance. Also, we aimed to highlight any parameters that could be used as diagnostic tools for resistance.

Materials and Methods: The study included 118 ACS patients undergoing PCI and receiving dual antiplatelet therapy with aspirin and clopidogrel (loading dose 325mg to 600 or 300mg followed by 100mg / day and 75mg / day, respectively), or aspirin and ticagrelor (loading dose 325mg and 180mg followed by 90mg twice a day, respectively). The resistance to aspirin was determined with LTA upon activation of platelets with arachidonic acid (AA) and clopidogrel resistance was evaluated by the method of phosphorylation VASP (PRI values; platelet reactivity index). Markers identified for investigation of their possible association with resistance include: platelet aggregation at various agonists with LTA method, the levels of thromboxane and sP-selectin by ELISA, the membrane expression of P-selectin (PE-CD62P) and integrin αIIbβ3 (binding of FITC-PAC-1) by flow cytometry and cytokine levels using x-map technology. Moreover, adhesion of platelets in whole blood was studied under constant shear stress with Cellix system. Finally, fluorescence spectroscopy method investigated the interaction of clopidogrel with rLp-PLA2 and the effect of this binding on the activity of the enzyme was studied by the method of precipitation with trichloroacetic acid using as substrate [3H] PAF as the sources of the enzyme in total plasma, the low density lipoprotein (LDL) and rLp-PLA2. The consequence of this interaction in the metabolism of the drug was found by mass spectrometry.

Results: Dual antiplatelet therapy showed several pleiotropic effects by reducing plasma TxB₂ levels and 11-dehydro TxB₂ in urine, a reduction of membrane expression of P-selectin and sP-selectin, a reduction of the expression of αIIbβ3 and reduction of plasma cytokines. Also, dual antiplatelet therapy reduced platelet adhesion to collagen and activity of Lp-PLA2 highlighting the pleiotropic effects of these drugs. In accordance with LTA-AA, the frequency of resistance to aspirin was 21%, while according to the analysis VASP 33% of all patients receiving clopidogrel exhibited drug resistance. Among the parameters tested and aggregation in AA, for resistance to aspirin, there was strong correlation for the expression of integrin αIIbβ3 and aggregation to TRAP. Among the parameters tested and VASP phosphorylation levels, membrane expression of P-selectin and TRAP-induced aggregation had strong positive correlation.

Conclusion: The antiplatelet drugs may exhibit a variety of pleiotropic actions which are dependent of platelets, for example by reducing key platelet activation markers or/and reduce its adhesion to collagen and independent of platelet effects such as reducing the activity of Lp-PLA2. From this study, TRAP and PAC-1 and TRAP, PAC-1 and P-selectin could become new diagnostic tools for aspirin and clopidogrel resistance, respectively.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Fernandes S. Laura CDI, Smitha C. Wayne , Kansasb S. Geoffrey, Snappc R.Karen, Benneta Nelson, Ballantyne Christie, McIntire V. Larry, Smitha E. O'Brian , Klema A. Jeffrey et al. Platelet-monocyte complex formation: effect of blocking PSGL-1 alone, and in combination with aIIb β 3 and aM β 2, in coronary stenting. *Thrombosis Research* 2003;111:171-7.
2. Ezumi Y, Uchiyama T, Takayama H. Molecular cloning, genomic structure, chromosomal localization, and alternative splice forms of the platelet collagen receptor glycoprotein VI. *Biochem Biophys Res Commun* 2000;277:27-36.
3. Jung SM, Moroi M. Platelet glycoprotein VI. *Adv Exp Med Biol* 2008;640:53-63.
4. Nieswandt B WS. Platelet-collagen interaction: is GPVI the central receptor? *Blood* 2003;102:449-61.
5. Al-Tamimi M, Arthur JF, Gardiner E, Andrews RK. Focusing on plasma glycoprotein VI. *Thromb Haemost* 2012;107:648-55.
6. Emsley J, Knight CG, Farndale RW, Barnes MJ, Liddington RC. Structural basis of collagen recognition by integrin α 2 β 1. *Cell* 2000;101:47-56.
7. Watson S, Berlanga O, Best D, Frampton J. Update on collagen receptor interactions in platelets: is the two-state model still valid? *Platelets* 2000;11:252-8.
8. Chen H, Kahn ML. Reciprocal signaling by integrin and nonintegrin receptors during collagen activation of platelets. *Mol Cell Biol* 2003;23:4764-77.
9. Inoue O, Suzuki-Inoue K, Dean WL, Frampton J, Watson SP. Integrin α 2 β 1 mediates outside-in regulation of platelet spreading on collagen through activation of Src kinases and PLC γ 2. *J Cell Biol* 2003;160:769-80.
10. Gachet C. P2 receptors, platelet function and pharmacological implications. *Thromb Haemost* 2008;99:466-72.
11. Τσελέπης ΑΔ, Γουδέβενος ΙΑ. Ο ρόλος των αιμοπεταλίων στα οξέα στεφανιαία σύνδρομα. προοπτικές για αποτελεσματικότερη θεραπευτική αντιμετώπιση. *Ελλ Καρδιολ Επιθ* 1998;39:216-29.
12. Fernando H DA, Peter K, Shaw JA. *Thromb Haemost* 2011; 105: 933–944. Proton pump inhibitors, genetic polymorphisms and response to clopidogrel therapy. *Thromb Haemost* 2011;105:933-44.
13. Oury C, Sticker E, Cornelissen H, De Vos R, Vermeylen J, Hoylaerts MF. ATP augments von Willebrand factor-dependent shear-induced platelet aggregation through Ca²⁺-calmodulin and myosin light chain kinase activation. *J Biol Chem* 2004;279:26266-73.
14. Philipose S, Konya V, Sreckovic I, et al. The prostaglandin E2 receptor EP4 is expressed by human platelets and potently inhibits platelet aggregation and thrombus formation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2010;30:2416-23.
15. Reems JA, Pineault N, Sun S. In vitro megakaryocyte production and platelet biogenesis: state of the art. *Transfus Med Rev* 2010;24:33-43.

16. Angiolillo DJ, Capodanno D, Goto S. Platelet thrombin receptor antagonism and atherothrombosis. *Eur Heart J* 2010;31:17-28.
17. Sambrano GR, Weiss EJ, Zheng YW, Huang W, Coughlin SR. Role of thrombin signalling in platelets in haemostasis and thrombosis. *Nature* 2001;413:74-8.
18. Prevost N, Woulfe DS, Jiang H, et al. Eph kinases and ephrins support thrombus growth and stability by regulating integrin outside-in signaling in platelets. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;102:9820-5.
19. Cosemans JM, Van Kruchten R, Olieslagers S, et al. Potentiating role of Gas6 and Tyro3, Axl and Mer (TAM) receptors in human and murine platelet activation and thrombus stabilization. *J Thromb Haemost* 2010;8:1797-808.
20. Orłowski E, Chand R, Yip J, et al. A platelet tetraspanin superfamily member, CD151, is required for regulation of thrombus growth and stability in vivo. *J Thromb Haemost* 2009;7:2074-84.
21. Goschnick MW, Lau LM, Wee JL, et al. Impaired "outside-in" integrin $\alpha IIb\beta 3$ signaling and thrombus stability in TSSC6-deficient mice. *Blood* 2006;108:1911-8.
22. Nergiz-Unal R, Rademakers T, Cosemans JM, Heemskerk JW. CD36 as a multiple-ligand signaling receptor in atherothrombosis. *Cardiovasc Hematol Agents Med Chem* 2011;9:42-55.
23. Morrow DA, Braunwald E, Bonaca MP, et al. Vorapaxar in the secondary prevention of atherothrombotic events. *N Engl J Med* 2012;366:1404-13.
24. Roberts W, Magwenzi S, Aburima A, Naseem KM. Thrombospondin-1 induces platelet activation through CD36-dependent inhibition of the cAMP/protein kinase A signaling cascade. *Blood* 2010;116:4297-306.
25. Ghosh A, Murugesan G, Chen K, et al. Platelet CD36 surface expression levels affect functional responses to oxidized LDL and are associated with inheritance of specific genetic polymorphisms. *Blood* 2011;117:6355-66.
26. Washington AV, Gibot S, Acevedo I, et al. TREM-like transcript-1 protects against inflammation-associated hemorrhage by facilitating platelet aggregation in mice and humans. *J Clin Invest* 2009;119:1489-501.
27. Nanda N, Bao M, Lin H, et al. Platelet endothelial aggregation receptor 1 (PEAR1), a novel epidermal growth factor repeat-containing transmembrane receptor, participates in platelet contact-induced activation. *J Biol Chem* 2005;280:24680-9.
28. Abdullah NM, Kachman M, Walker A, et al. Microparticle surface protein are associated with experimental venous thrombosis: a preliminary study. *Clin Appl Thromb Hemost* 2009;15:201-8.
29. Henn V, Slupsky JR, Grafe M, et al. CD40 ligand on activated platelets triggers an inflammatory reaction of endothelial cells. *Nature* 1998;391:591-4.
30. Heeschen C, Dimmeler S, Hamm CW, et al. Soluble CD40 ligand in acute coronary syndromes. *N Engl J Med* 2003;348:1104-11.
31. Mori J, Pearce AC, Spalton JC, et al. G6b-B inhibits constitutive and agonist-induced signaling by glycoprotein VI and CLEC-2. *J Biol Chem* 2008;283:35419-27.

32. Freson K, Hashimoto H, Thys C, et al. The pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide is a physiological inhibitor of platelet activation. *J Clin Invest* 2004;113:905-12.
33. Viles-Gonzalez JF, Fuster V, Badimon JJ. Atherothrombosis: a widespread disease with unpredictable and life-threatening consequences. *Eur Heart J* 2004;25:1197-207.
34. Weiss N, Keller C, Hoffmann U, Loscalzo J. Endothelial dysfunction and atherothrombosis in mild hyperhomocysteinemia. *Vasc Med* 2002;7:227-39.
35. Nording HM, Seizer P, Langer HF. Platelets in inflammation and atherogenesis. *Front Immunol* 2015;6:98.
36. Willoughby S, Holmes A, Loscalzo J. Platelets and cardiovascular disease. *Eur J Cardiovasc Nurs* 2002;1:273-88.
37. Varo N, de Lemos JA, Libby P, et al. Soluble CD40L: risk prediction after acute coronary syndromes. *Circulation* 2003;108:1049-52.
38. Aukrust P, Muller F, Ueland T, et al. Enhanced levels of soluble and membrane-bound CD40 ligand in patients with unstable angina. Possible reflection of T lymphocyte and platelet involvement in the pathogenesis of acute coronary syndromes. *Circulation* 1999;100:614-20.
39. Noto D, Cottone S, Baldassare Cefalu A, et al. Interleukin 6 plasma levels predict with high sensitivity and specificity coronary stenosis detected by coronary angiography. *Thromb Haemost* 2007;98:1362-7.
40. Ridker PM, Rifai N, Rose L, Buring JE, Cook NR. Comparison of C-reactive protein and low-density lipoprotein cholesterol levels in the prediction of first cardiovascular events. *N Engl J Med* 2002;347:1557-65.
41. Licata G, Tuttolomondo A, Di Raimondo D, Corrao S, Di Sciacca R, Pinto A. Immuno-inflammatory activation in acute cardio-embolic strokes in comparison with other subtypes of ischaemic stroke. *Thromb Haemost* 2009;101:929-37.
42. Solheim S, Pettersen AA, Arnesen H, Seljeflot I. No difference in the effects of clopidogrel and aspirin on inflammatory markers in patients with coronary heart disease. *Thromb Haemost* 2006;96:660-4.
43. Hoogeveen RC, Morrison A, Boerwinkle E, et al. Plasma MCP-1 level and risk for peripheral arterial disease and incident coronary heart disease: Atherosclerosis Risk in Communities study. *Atherosclerosis* 2005;183:301-7.
44. Albert MA, Glynn RJ, Buring JE, Ridker PM. Differential effect of soluble intercellular adhesion molecule-1 on the progression of atherosclerosis as compared to arterial thrombosis: a prospective analysis of the Women's Health Study. *Atherosclerosis* 2008;197:297-302.
45. Pradhan AD, Rifai N, Ridker PM. Soluble intercellular adhesion molecule-1, soluble vascular adhesion molecule-1, and the development of symptomatic peripheral arterial disease in men. *Circulation* 2002;106:820-5.
46. Zebrack JS, Anderson JL, Maycock CA, Horne BD, Bair TL, Muhlestein JB. Usefulness of high-sensitivity C-reactive protein in predicting long-term risk of death or

- acute myocardial infarction in patients with unstable or stable angina pectoris or acute myocardial infarction. *Am J Cardiol* 2002;89:145-9.
47. Sarma J, Laan CA, Alam S, Jha A, Fox KA, Dransfield I. Increased platelet binding to circulating monocytes in acute coronary syndromes. *Circulation* 2002;105:2166-71.
48. Garlichs CD, Eskafi S, Raaz D, et al. Patients with acute coronary syndromes express enhanced CD40 ligand/CD154 on platelets. *Heart* 2001;86:649-55.
49. Furman MI, Barnard MR, Krueger LA, et al. Circulating monocyte-platelet aggregates are an early marker of acute myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol* 2001;38:1002-6.
50. Von Hundelshausen Philip WC. Platelets as Immune Cells: Bridging Inflammation and Cardiovascular Disease. *Circ Res* 2007;100:27-40.
51. Zarbock A P-GR, Ley K. Platelet-neutrophil-interactions: linking hemostasis and inflammation. *Blood Rev* 2007;21:99-111.
52. Santoso S SU, Kroll H, Linder M, Ruf A, Preissner KT, Chavakis T. The junctional adhesion molecule 3 (JAM-3) on human platelets is a counterreceptor for the leukocyte integrin Mac-1. *J Exp Med* 2002;196:679-91.
53. Ravi M. Rao LY, Guillermo Garcia-Cardena, Francis W. Luscinskas. Endothelial-Dependent Mechanisms of Leukocyte Recruitment to the Vascular Wall. *Circ Res* 2007;101:234-47.
54. Christian Weber LF, Elisabetta Dejana. The role of junctional adhesion molecules in vascular inflammation. *Nature Reviews Immunology* 2007;7:467-77.
55. Zirlik A MC, Gerdes N, MacFarlane L, Soosairajah J, Bavendiek U, Ahrens I, Ernst S, Bassler N, Missiou A, Patko Z, Aikawa M, Schönbeck U, Bode C, Libby P, Peter K. CD40 ligand mediates inflammation independently of CD40 by interaction with Mac-1. *Circulation* 2007;115:1571-80.
56. Dirk Lievens WJE, Eric A.L. Biessen, Mat J. A. P. Daemen, Esther Lutgens. The multi-functionality of CD40L and its receptor CD40 in atherosclerosis. *Thromb Haemost* 2009;102:206-14.
57. Diacovo TG dFA, Bainton DF, Springer TA. A functional integrin ligand on the surface of platelets: intercellular adhesion molecule-2. *J Clin Invest* 1994;94:1243-51.
58. von Hundelshausen P KR, Sack M, et al. Heterophilic interactions of platelet factor 4 and RANTES promote monocyte arrest on endothelium. *Blood* 2005;105:924-30.
59. Tatsuji Takahashi YN, Fumihiko Hato, Haruo Shintaku, Nobuji Maeda, Nagatoshi Fujiwara, Masaaki Inaba, Kazuo Kobayashi, Seiichi Kitagawa. Neutrophil-activating activity and platelet-activating factor synthesis in cytokine-stimulated endothelial cells: Reduced activity in growth-arrested cells. *Microvascular Research* 2007;73:29-34.
60. Massberg S, Schurzinger K, Lorenz M, et al. Platelet adhesion via glycoprotein IIb integrin is critical for atheroprogession and focal cerebral ischemia: an in vivo study in mice lacking glycoprotein IIb. *Circulation* 2005;112:1180-8.
61. Berny MA, White TC, Tucker EI, et al. Thrombin mutant W215A/E217A acts as a platelet GPIb antagonist. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2008;28:329-34.

62. Schneider SW, Nuschele S, Wixforth A, et al. Shear-induced unfolding triggers adhesion of von Willebrand factor fibers. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007;104:7899-903.
63. Spiel AO, Gilbert JC, Jilma B. von Willebrand factor in cardiovascular disease: focus on acute coronary syndromes. *Circulation* 2008;117:1449-59.
64. Crawley JT, de Groot R, Xiang Y, Luken BM, Lane DA. Unraveling the scissile bond: how ADAMTS13 recognizes and cleaves von Willebrand factor. *Blood* 2011;118:3212-21.
65. Moroi M, Jung SM. Platelet glycoprotein VI: its structure and function. *Thromb Res* 2004;114:221-33.
66. Nieswandt B, Watson SP. Platelet-collagen interaction: is GPVI the central receptor? *Blood* 2003;102:449-61.
67. Varga-Szabo D, Pleines I, Nieswandt B. Cell adhesion mechanisms in platelets. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2008;28:403-12.
68. Murugappan S, Shankar H, Kunapuli SP. Platelet receptors for adenine nucleotides and thromboxane A2. *Semin Thromb Hemost* 2004;30:411-8.
69. Fox JE. Cytoskeletal proteins and platelet signaling. *Thromb Haemost* 2001;86:198-213.
70. Siess W. Molecular mechanisms of platelet activation. *Physiol Rev* 1989 69:58-178
71. Goto S, Ikeda Y, Saldivar E, Ruggeri ZM. Distinct mechanisms of platelet aggregation as a consequence of different shearing flow conditions. *J Clin Invest* 1998;101:479-86.
72. Sobocka MB, Sobocki T, Babinska A, et al. Signaling pathways of the F11 receptor (F11R; a.k.a. JAM-1, JAM-A) in human platelets: F11R dimerization, phosphorylation and complex formation with the integrin GPIIIa. *J Recept Signal Transduct Res* 2004;24:85-105.
73. Nanda N, Andre P, Bao M, et al. Platelet aggregation induces platelet aggregate stability via SLAM family receptor signaling. *Blood* 2005;106:3028-34.
74. Andre P, Prasad KS, Denis CV, et al. CD40L stabilizes arterial thrombi by a beta3 integrin--dependent mechanism. *Nat Med* 2002;8:247-52.
75. Litjens P, Akkerman J, van Willigen G. Platelet integrin alphaIIb beta3: target and generator of signalling. *Platelets* 2000 11:310-9.
76. Hathaway D, Adelstein R. Human platelet myosin light chain kinase requires the calcium – binding protein calmodulin for activity. *Proc Natl Acad Sci* 1979;76:1653 – 7.
77. Sano K, Takai Y, Yamanishi J, Nishizuka Y. A role of calcium – activated phospholipids – dependent protein kinase in human platelet activation. *J BiolChem* 1983;258:2010 – 3.
78. Reny JL, Millot O, Vanderecamer T, et al. Admission NT-proBNP levels, renal insufficiency and age as predictors of mortality in elderly patients hospitalized for acute dyspnea. *Eur J Intern Med* 2009;20:14-9.

79. Shattil SJ, Kim C, Ginsberg MH. The final steps of integrin activation: the end game. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2010;11:288-300.
80. Shattil S, Kashiwagi H, Pampori N. Integrin signaling: the platelet paradigm. *Blood* 1998 91:2645-57.
81. Peerschke E. Regulation of platelet aggregation by post-fibrinogen binding events. Insights provided by dithiothreitol-treated platelets. *Thromb Haemost* 1995;73:862-7.
82. Nurden A, Poujol C, P. N. Different activation states of GPIIb/IIIa complexes in platelets. *Blood Coagul Fibrinolysis* 1999;10:567 – 70.
83. Plow E, Byzova T. The biology of glycoprotein IIb – IIIa *Coron Artery Dis* 1999 10:547 – 51.
84. Shattil S, Kashiwagi H, Pampori N. Integrin signaling: the platelet paradigm. *Blood* 1998;91:2645-57.
85. Chen ZM, Jiang LX, Chen YP, et al. Addition of clopidogrel to aspirin in 45,852 patients with acute myocardial infarction: randomised placebo-controlled trial. *Lancet* 2005;366:1607-21.
86. Fox KA, Mehta SR, Peters R, et al. Benefits and risks of the combination of clopidogrel and aspirin in patients undergoing surgical revascularization for non-ST-elevation acute coronary syndrome: the Clopidogrel in Unstable angina to prevent Recurrent ischemic Events (CURE) Trial. *Circulation* 2004;110:1202-8.
87. O'Gara PT, Kushner FG, Ascheim DD, et al. 2013 ACCF/AHA guideline for the management of ST-elevation myocardial infarction: a report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines. *J Am Coll Cardiol* 2013;61:e78-140.
88. Steg PG, James SK, Atar D, et al. ESC Guidelines for the management of acute myocardial infarction in patients presenting with ST-segment elevation. *Eur Heart J* 2012;33:2569-619.
89. Hamm CW, Bassand JP, Agewall S, et al. ESC Guidelines for the management of acute coronary syndromes in patients presenting without persistent ST-segment elevation: The Task Force for the management of acute coronary syndromes (ACS) in patients presenting without persistent ST-segment elevation of the European Society of Cardiology (ESC). *Eur Heart J* 2011;32:2999-3054.
90. Randomised trial of intravenous streptokinase, oral aspirin, both, or neither among 17,187 cases of suspected acute myocardial infarction: ISIS-2. ISIS-2 (Second International Study of Infarct Survival) Collaborative Group. *Lancet* 1988;2:349-60.
91. Yusuf S, Zhao F, Mehta SR, Chrolavicius S, Tognoni G, Fox KK. Effects of clopidogrel in addition to aspirin in patients with acute coronary syndromes without ST-segment elevation. *N Engl J Med* 2001;345:494-502.
92. Sabatine MS, Cannon CP, Gibson CM, et al. Addition of clopidogrel to aspirin and fibrinolytic therapy for myocardial infarction with ST-segment elevation. *N Engl J Med* 2005;352:1179-89.
93. Mehta SR, Bassand JP, Chrolavicius S, et al. Dose comparisons of clopidogrel and aspirin in acute coronary syndromes. *N Engl J Med* 2010;363:930-42.

94. Wiviott SD, Braunwald E, McCabe CH, et al. Prasugrel versus clopidogrel in patients with acute coronary syndromes. *N Engl J Med* 2007;357:2001-15.
95. Roe MT, Armstrong PW, Fox KA, et al. Prasugrel versus clopidogrel for acute coronary syndromes without revascularization. *N Engl J Med* 2012;367:1297-309.
96. Wallentin L, Becker RC, Budaj A, et al. Ticagrelor versus clopidogrel in patients with acute coronary syndromes. *N Engl J Med* 2009;361:1045-57.
97. Elmariah S, Mauri L, Doros G, et al. Extended duration dual antiplatelet therapy and mortality: a systematic review and meta-analysis. *Lancet* 2015;385:792-8.
98. Bonaca MP, Bhatt DL, Braunwald E, et al. Design and rationale for the Prevention of Cardiovascular Events in Patients With Prior Heart Attack Using Ticagrelor Compared to Placebo on a Background of Aspirin-Thrombolysis in Myocardial Infarction 54 (PEGASUS-TIMI 54) trial. *Am Heart J* 2014;167:437-44 e5.
99. Tricoci P, Huang Z, Held C, et al. Thrombin-receptor antagonist vorapaxar in acute coronary syndromes. *N Engl J Med* 2012;366:20-33.
100. Patrono C, Andreotti F, Arnesen H, et al. Antiplatelet agents for the treatment and prevention of atherothrombosis. *Eur Heart J* 2011;32:2922-32.
101. Offermanns S. Activation of platelet function through G protein-coupled receptors. *Circ Res* 2006;99:1293-304.
102. Ciabattini G, Pugliese F, Davi G, Pierucci A, Simonetti BM, Patrono C. Fractional conversion of thromboxane B2 to urinary 11-dehydrothromboxane B2 in man. *Biochim Biophys Acta* 1989;992:66-70.
103. AD M. Antiplatelet therapies for the treatment of cardiovascular disease. *Nat Rev Drug Discov* 2010 9 154-69.
104. Papathanasiou A GJ, Tselepis AD. Resistance to Aspirin and Clopidogrel: Possible Mechanisms, Laboratory Investigation, and Clinical Significance. *Hellenic J Cardiol* 2007;48:352-63.
105. Weksler BB PS, Alonso D, et al. Differential inhibition by aspirin of vascular and platelet prostaglandin synthesis in atherosclerotic patients. *N Engl J Med* 1983;308:800-5.
106. Baigent C, Blackwell L, Collins R, et al. Aspirin in the primary and secondary prevention of vascular disease: collaborative meta-analysis of individual participant data from randomised trials. *Lancet* 2009;373:1849-60.
107. De Caterina R. [The Primary Prevention Project Study Group. Low-dose aspirin and vitamin E in people at cardiovascular risk: a randomized trial in general practice]. *Ital Heart J Suppl* 2001;2:681-4.
108. Floyd CN, Ferro A. Mechanisms of aspirin resistance. *Pharmacol Ther* 2014;141:69-78.
109. Hart J, Hawkey CJ, Lanos A, et al. Predictors of gastroduodenal erosions in patients taking low-dose aspirin. *Aliment Pharmacol Ther* 2010;31:143-9.
110. Akinbamowo AO, Salzberg DJ, Weir MR. Renal consequences of prostaglandin inhibition in heart failure. *Heart Fail Clin* 2008;4:505-10.

111. Anninos H AG, Pastromas S, Sakellariou D, Theodorakis G, Vardas P. Triflusal: An Old Drug in Modern Antiplatelet Therapy. Review of Its Action, Use, Safety and Effectiveness. *Hellenic J Cardiol* 2009;50:199-207.
112. Valle M BM, Donner A, et al. Access of HTB, main metabolite of triflusal, to cerebrospinal fluid in healthy volunteers. *Eur J Clin Pharmacol* 2005;61:103-11.
113. Antonijuan RM GI, Azaro A, Sainz S, Balanzó J, Izquierdo I, Borja J, Donado E, Blanch I, Barbanoj MJ. Gastrointestinal safety of triflusal solution in healthy volunteers: a proof of concept endoscopic study. *Eur J Clin Pharmacol* 2011;67:663-9.
114. Cattaneo M. New P2Y₁₂ inhibitors. *Circulation* 2010;121:171-9.
115. Gomez Y, Adams E, Hoogmartens J. Analysis of purity in 19 drug product tablets containing clopidogrel: 18 copies versus the original brand. *J Pharm Biomed Anal* 2004;34:341-8.
116. Zupancic V, Smrkolj M, Benkic P, et al. Preformulation investigation of some clopidogrel addition salts. *Acta Chim Slov* 2010;57:376-85.
117. Mackness B, Mackness MI, Arrol S, Turkie W, Durrington PN. Effect of the human serum paraoxonase 55 and 192 genetic polymorphisms on the protection by high density lipoprotein against low density lipoprotein oxidative modification. *FEBS Lett* 1998;423:57-60.
118. Bonello L C-JL, Armero S, Com O, Arques S, Burignat-Bonello C, Giacomoni MP, Bonello R, Collet F, Rossi P, Barragan P, Dignat-George F, Paganelli F. Tailored clopidogrel loading dose according to platelet reactivity monitoring to prevent acute and subacute stent thrombosis. *Am J Cardiol* 2009;103:5-10.
119. Sibbing D, Koch W, Massberg S, et al. No association of paraoxonase-1 Q192R genotypes with platelet response to clopidogrel and risk of stent thrombosis after coronary stenting. *Eur Heart J* 2011;32:1605-13.
120. L W. P2Y₁₂ inhibitors: differences in properties and mechanisms of action and potential consequences for clinical use. *European Heart Journal* 2009;30:1964-77.
121. Pereillo JM, Maftouh M, Andrieu A, et al. Structure and stereochemistry of the active metabolite of clopidogrel. *Drug Metab Dispos* 2002;30:1288-95.
122. Farid NA, Payne CD, Small DS, et al. Cytochrome P450 3A inhibition by ketoconazole affects prasugrel and clopidogrel pharmacokinetics and pharmacodynamics differently. *Clin Pharmacol Ther* 2007;81:735-41.
123. Jemal M, Hawthorne DJ. Quantitative determination of BMS-186716, a thiol compound, in rat plasma by high-performance liquid chromatography-positive ion electrospray mass spectrometry after hydrolysis of the methyl acrylate adduct by the native esterases. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 1997;698:123-32.
124. Lins R, Broekhuysen J, Necciari J, Deroubaix X. Pharmacokinetic profile of ¹⁴C-labeled clopidogrel. *Semin Thromb Hemost* 1999;25 Suppl 2:29-33.
125. Slugg PH, Much DR, Smith WB, Vargas R, Nichola P, Necciari J. Cirrhosis does not affect the pharmacokinetics and pharmacodynamics of clopidogrel. *J Clin Pharmacol* 2000;40:396-401.

126. Matsagas M, Jagroop IA, Geroulakos G, Mikhailidis DP. The effect of a loading dose (300 mg) of clopidogrel on platelet function in patients with peripheral arterial disease. *Clin Appl Thromb Hemost* 2003;9:115-20.
127. Leon MB, Baim DS, Popma JJ, et al. A clinical trial comparing three antithrombotic-drug regimens after coronary-artery stenting. Stent Anticoagulation Restenosis Study Investigators. *N Engl J Med* 1998;339:1665-71.
128. Bertrand ME, Rupprecht HJ, Urban P, Gershlick AH. Double-blind study of the safety of clopidogrel with and without a loading dose in combination with aspirin compared with ticlopidine in combination with aspirin after coronary stenting : the clopidogrel aspirin stent international cooperative study (CLASSICS). *Circulation* 2000;102:624-9.
129. Keeley EC, Boura JA, Grines CL. Primary angioplasty versus intravenous thrombolytic therapy for acute myocardial infarction: a quantitative review of 23 randomised trials. *Lancet* 2003;361:13-20.
130. Judge HM, Patil SB, Buckland RJ, Jakubowski JA, Storey RF. Potentiation of clopidogrel active metabolite formation by rifampicin leads to greater P2Y₁₂ receptor blockade and inhibition of platelet aggregation after clopidogrel. *J Thromb Haemost* 2010;8:1820-7.
131. Lau WC, Welch TD, Shields T, Rubenfire M, Tantry US, Gurbel PA. The effect of St John's Wort on the pharmacodynamic response of clopidogrel in hyporesponsive volunteers and patients: increased platelet inhibition by enhancement of CYP3A4 metabolic activity. *J Cardiovasc Pharmacol* 2011;57:86-93.
132. Sibbing D, von Beckerath N, Morath T, et al. Oral anticoagulation with coumarin derivatives and antiplatelet effects of clopidogrel. *Eur Heart J* 2010;31:1205-11.
133. Wiviott S, Trenk D, Frelinger AL, et al. Prasugrel compared with high loading- and maintenance-dose clopidogrel in patients with planned percutaneous coronary intervention: The prasugrel in comparison to clopidogrel for inhibition of platelet activation and aggregation-thrombolysis in myocardial infarction 44 trial. *Circulation* 2007;116:2923-32.
134. Roe MT AP, Fox KA, White HD, Prabhakaran D, Goodman SG, Cornel JH, Bhatt DL, Clemmensen P, Martinez F, Ardissino D, Nicolau JC, Boden WE, Gurbel PA, Ruzyllo W, Dalby AJ, McGuire DK, Leiva-Pons JL, Parkhomenko A, Gottlieb S, Topacio GO, Hamm C, Pavlides G, Goudev AR, Oto A, Tseng CD, Merkely B, Gasparovic V, Corbalan R, Cintează M, McLendon RC, Winters KJ, Brown EB, Lokhnygina Y, Aylward PE, Huber K, Hochman JS, Ohman EM; TRILOGY ACS Investigators. Prasugrel versus clopidogrel for acute coronary syndromes without revascularization. *N Engl J Med* 2012;367:1297-309.
135. Springthorpe B BA, Barton P, et al. From ATP to AZD6140: The discovery of an orally active reversible P2Y₁₂ receptor antagonist for the prevention of thrombosis. *Bioorgan Med Chem Lett* 2007;17:6013-8.
136. RF S. Pharmacology and clinical trials of reversibly-binding P2Y₁₂ inhibitors. *Thromb Haemost* 2011;105 S75–S81.

137. Gurbel PA BK, Butler K, 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.
138. James S BA, Aylward P, et al. Ticagrelor versus clopidogrel in acute coronary syndromes in relation to renal function: results from the platelet inhibition and patient outcomes (PLATO) trial. *Circulation* 2010;122:1056-67.
139. Gurbel PA, Bliden KP, Butler K, et al. Response to ticagrelor in clopidogrel nonresponders and responders and effect of switching therapies: the RESPOND study. *Circulation* 2010;121:1188-99.
140. Angiolillo DJ BD, Gurbel PA, Jennings LK. Advances in Antiplatelet Therapy: Agents in Clinical Development. *Am J Cardiol* 2009;103 [SUPPL]:40A-51A.
141. Bhatt DL, Lincoff AM, Gibson CM, et al. Intravenous platelet blockade with cangrelor during PCI. *N Engl J Med* 2009;361:2330-41.
142. Harrington RA, Stone GW, McNulty S, et al. Platelet inhibition with cangrelor in patients undergoing PCI. *N Engl J Med* 2009;361:2318-29.
143. Angiolillo DJ, Firstenberg MS, Price MJ, et al. Bridging antiplatelet therapy with cangrelor in patients undergoing cardiac surgery: a randomized controlled trial. *JAMA* 2012;307:265-74.
144. Goudevenos JA, Tselepis AD. Basic and clinical aspects of platelet integrin alphaIIb beta3 receptor antagonists in acute coronary syndromes. *Curr Opin Investig Drugs* 2001;2:244-9.
145. Bhatt DL, Topol EJ. Current role of platelet glycoprotein IIb/IIIa inhibitors in acute coronary syndromes. *JAMA* 2000;284:1549-58.
146. Boersma E, Harrington RA, Moliterno DJ, White H, Simoons ML. Platelet glycoprotein IIb/IIIa inhibitors in acute coronary syndromes. *Lancet* 2002;360:342-3.
147. Phillips DR CI, Parise LV, Fitzgerald LA. The platelet membrane glycoprotein IIb-IIIa complex. *Blood* 1988;71:831-43.
148. Lippi G MM, Danese E, Favaloro EJ, Franchini M. Glycoprotein IIb/IIIa inhibitors: an update on the mechanism of action and use of functional testing methods to assess antiplatelet efficacy. *Biomark Med* 2011;5:63-70.
149. Harker LA, Kadatz RA. Mechanism of action of dipyridamole. *Thromb Res Suppl* 1983;4:39-46.
150. Muller TH SC, Weisenberger H, Brickl R, Nehmiz G, Eisert WG. Dipyridamole alone or combined with low-dose acetylsalicylic acid inhibits platelet aggregation in human whole blood ex vivo. *Br J Clin Pharmacol* 1990;30:179-86.
151. Diener HC CL, Forbes C, Sivenius J, Smets P, Lowenthal A. European Stroke Prevention Study. 2. Dipyridamole and acetylsalicylic acid in the secondary prevention of stroke. *J Neurol Sci* 1996;143:1-13.
152. Halkes PH vGJ, Kappelle LJ, Koudstaal PJ, Algra A. Aspirin plus dipyridamole versus aspirin alone after cerebral ischaemia of arterial origin (ESPRIT): randomised controlled trial. *Lancet* 2006;367:1665-73.

153. K S. The pharmacology of cilostazol. *Diabetes Obes Metab* 2002;4:S14-9.
154. Verro P, Gorelick PB, Nguyen D. Aspirin plus dipyridamole versus aspirin for prevention of vascular events after stroke or TIA: a meta-analysis. *Stroke* 2008;39:1358-63.
155. Sacco RL, Diener HC, Yusuf S, et al. Aspirin and extended-release dipyridamole versus clopidogrel for recurrent stroke. *N Engl J Med* 2008;359:1238-51.
156. 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.
157. O'Donoghue ML, Bhatt DL, Wiviott SD, 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.
158. Wiviott SD FM, O'Donoghue ML, et al. Randomized trial of atopaxar in the treatment of patients with coronary artery disease: the lessons from antagonizing the cellular effect of Thrombin-Coronary Artery Disease Trial. *Circulation* 2011;123:1854-63.
159. The Thrombin Receptor Antagonist for Clinical Event Reduction in Acute Coronary Syndrome (TRA*CER) trial: study design and rationale. *Am Heart J* 2009;158:327-34 e4.
160. Tricoci P HZ, Held C, et al .TRACER Investigators. Thrombin-receptor antagonist vorapaxar in acute coronary syndromes. . *N Engl J Med* 2012;366:20-33.
161. Angiolillo DJ FM, Price MJ, Tummala PE, Hutyra M, Welsby IJ, Voeltz MD, Chandna H, Ramaiah C, Brtko M, Cannon L, Dyke C, Liu T, Montalescot G, Manoukian SV, Prats J, Topol EJ; BRIDGE Investigators. Bridging antiplatelet therapy with cangrelor in patients undergoing cardiac surgery: a randomized controlled trial. *JAMA* 2012;307:265-74.
162. Morrow DA BE, Bonaca MP, et al. Vorapaxar in the secondary prevention of atherothrombotic events. *N Engl J Med* 2012;366:1404-13.
163. Amsterdam EA, Wenger NK, Brindis RG, et al. 2014 AHA/ACC Guideline for the Management of Patients with Non-ST-Elevation Acute Coronary Syndromes: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines. *J Am Coll Cardiol* 2014;64:e139-228.
164. Papathanasiou A, Goudevenos J, Tselepis AD. Resistance to aspirin and clopidogrel: possible mechanisms, laboratory investigation, and clinical significance. *Hellenic J Cardiol* 2007;48:352-63.
165. Gorog DA, Sweeny JM, Fuster V. Antiplatelet drug 'resistance'. Part 2: laboratory resistance to antiplatelet drugs-fact or artifact? *Nat Rev Cardiol* 2009;6:365-73.
166. Bonello L, Pansieri M, Mancini J, et al. High on-treatment platelet reactivity after prasugrel loading dose and cardiovascular events after percutaneous coronary intervention in acute coronary syndromes. *J Am Coll Cardiol* 2011;58:467-73.

167. Lordkipanidze M, Pharand C, Schampaert E, Turgeon J, Palisaitis DA, Diodati JG. A comparison of six major platelet function tests to determine the prevalence of aspirin resistance in patients with stable coronary artery disease. *Eur Heart J* 2007;28:1702-8.
168. Eikelboom JW, Hirsh J, Weitz JI, Johnston M, Yi Q, Yusuf S. Aspirin-resistant thromboxane biosynthesis and the risk of myocardial infarction, stroke, or cardiovascular death in patients at high risk for cardiovascular events. *Circulation* 2002;105:1650-5.
169. Eikelboom JW, Hankey GJ, Thom J, et al. Incomplete inhibition of thromboxane biosynthesis by acetylsalicylic acid: determinants and effect on cardiovascular risk. *Circulation* 2008;118:1705-12.
170. Krasopoulos G, Brister SJ, Beattie WS, Buchanan MR. Aspirin "resistance" and risk of cardiovascular morbidity: systematic review and meta-analysis. *BMJ* 2008;336:195-8.
171. Russel FG, Koenderink JB, Masereeuw R. Multidrug resistance protein 4 (MRP4/ABCC4): a versatile efflux transporter for drugs and signalling molecules. *Trends Pharmacol Sci* 2008;29:200-7.
172. Jedlitschky G, Tirschmann K, Lubenow LE, et al. The nucleotide transporter MRP4 (ABCC4) is highly expressed in human platelets and present in dense granules, indicating a role in mediator storage. *Blood* 2004;104:3603-10.
173. Zimmermann N, Wenk A, Kim U, et al. Functional and biochemical evaluation of platelet aspirin resistance after coronary artery bypass surgery. *Circulation* 2003;108:542-7.
174. Mattiello T, Guerriero R, Lotti LV, et al. Aspirin extrusion from human platelets through multidrug resistance protein-4-mediated transport: evidence of a reduced drug action in patients after coronary artery bypass grafting. *J Am Coll Cardiol* 2011;58:752-61.
175. Helgason CM, Bolin KM, Hoff JA, et al. Development of aspirin resistance in persons with previous ischemic stroke. *Stroke* 1994;25:2331-6.
176. Massimi I, Guerriero R, Lotti LV, et al. Aspirin influences megakaryocytic gene expression leading to up-regulation of multidrug resistance protein-4 in human platelets. *Br J Clin Pharmacol* 2014;78:1343-53.
177. FitzGerald GA. Parsing an enigma: the pharmacodynamics of aspirin resistance. *Lancet* 2003;361:542-4.
178. Goodman T, Ferro A, Sharma P. Pharmacogenetics of aspirin resistance: a comprehensive systematic review. *Br J Clin Pharmacol* 2008;66:222-32.
179. Chakroun T, Addad F, Yacoub S, et al. The cyclooxygenase-1 C50T polymorphism is not associated with aspirin responsiveness status in stable coronary artery disease in Tunisian patients. *Genet Test Mol Biomarkers* 2011;15:513-6.
180. Yi X, Zhou Q, Lin J, Chi L, Han Z. Platelet response to aspirin in Chinese stroke patients is independent of genetic polymorphisms of COX-1 C50T and COX-2 G765C. *J Atheroscler Thromb* 2013;20:65-72.
181. Schror K, Weber AA, Hohlfeld T. Aspirin "resistance". *Blood Cells Mol Dis* 2006;36:171-6.

182. Storey RF, Husted S, Harrington RA, et al. Inhibition of platelet aggregation by AZD6140, a reversible oral P2Y₁₂ receptor antagonist, compared with clopidogrel in patients with acute coronary syndromes. *J Am Coll Cardiol* 2007;50:1852-6.
183. Faraday N, Becker DM, Yanek LR, et al. Relation between atherosclerosis risk factors and aspirin resistance in a primary prevention population. *Am J Cardiol* 2006;98:774-9.
184. Belton O, Byrne D, Kearney D, Leahy A, Fitzgerald DJ. Cyclooxygenase-1 and -2-dependent prostacyclin formation in patients with atherosclerosis. *Circulation* 2000;102:840-5.
185. Patrignani P. [Clinical pharmacology of selective inhibitors of cyclooxygenase-2]. *Acta Otorhinolaryngol Ital* 2003;23:13-8, 37-40.
186. Bruno A, McConnell JP, Cohen SN, et al. Serial urinary 11-dehydrothromboxane B₂, aspirin dose, and vascular events in blacks after recent cerebral infarction. *Stroke* 2004;35:727-30.
187. Dippel DW, Van Kooten F, Leebeek FW, et al. What is the lowest dose of aspirin for maximum suppression of in vivo thromboxane production after a transient ischemic attack or ischemic stroke? *Cerebrovasc Dis* 2004;17:296-302.
188. Hart RG, Leonard AD, Talbert RL, et al. Aspirin dosage and thromboxane synthesis in patients with vascular disease. *Pharmacotherapy* 2003;23:579-84.
189. Perneby C, Wallen NH, Rooney C, Fitzgerald D, Hjelm Dahl P. Dose- and time-dependent antiplatelet effects of aspirin. *Thromb Haemost* 2006;95:652-8.
190. Hankey GJ, Eikelboom JW. Aspirin resistance. *Lancet* 2006;367:606-17.
191. Gurbel PA, Becker RC, Mann KG, Steinhubl SR, Michelson AD. Platelet function monitoring in patients with coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol* 2007;50:1822-34.
192. Ohmori T, Yatomi Y, Nonaka T, et al. Aspirin resistance detected with aggregometry cannot be explained by cyclooxygenase activity: involvement of other signaling pathway(s) in cardiovascular events of aspirin-treated patients. *J Thromb Haemost* 2006;4:1271-8.
193. Cattaneo M. Aspirin and clopidogrel: efficacy, safety, and the issue of drug resistance. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004;24:1980-7.
194. Chen WH, Cheng X, Lee PY, et al. Aspirin resistance and adverse clinical events in patients with coronary artery disease. *Am J Med* 2007;120:631-5.
195. Cattaneo M. Laboratory detection of 'aspirin resistance': what test should we use (if any)? *Eur Heart J* 2007;28:1673-5.
196. Reny JL, De Moerloose P, Dauzat M, Fontana P. Use of the PFA-100 closure time to predict cardiovascular events in aspirin-treated cardiovascular patients: a systematic review and meta-analysis. *J Thromb Haemost* 2008;6:444-50.
197. Michelson AD. Methods for the Measurement of Platelet Function *The American Journal of Cardiology* 2009;103:20-6.
198. Harrison P FAI, Furman MI, Michelson AD. Measuring antiplatelet drug effects in the laboratory. *Thrombos Res* 2007;120:323-36.

199. Buonamici P, Marcucci R, Migliorini A, et al. Impact of platelet reactivity after clopidogrel administration on drug-eluting stent thrombosis. *J Am Coll Cardiol* 2007;49:2312-7.
200. Hochholzer W, Trenk D, Bestehorn HP, et al. Impact of the degree of per-interventional platelet inhibition after loading with clopidogrel on early clinical outcome of elective coronary stent placement. *J Am Coll Cardiol* 2006;48:1742-50.
201. Gurbel PA, Tantry US. Clopidogrel resistance? *Thromb Res* 2007;120:311-21.
202. Matetzky S, Shenkman B, Guetta V, et al. Clopidogrel resistance is associated with increased risk of recurrent atherothrombotic events in patients with acute myocardial infarction. *Circulation* 2004;109:3171-5.
203. Gurbel PA, Bliden KP, Guyer K, et al. Platelet reactivity in patients and recurrent events post-stenting: results of the PREPARE POST-STENTING Study. *J Am Coll Cardiol* 2005;46:1820-6.
204. Gurbel PA, Bliden KP, Zaman KA, Yoho JA, Hayes KM, Tantry US. Clopidogrel loading with eptifibatide to arrest the reactivity of platelets: results of the Clopidogrel Loading With Eptifibatide to Arrest the Reactivity of Platelets (CLEAR PLATELETS) study. *Circulation* 2005;111:1153-9.
205. Pare G, Mehta SR, Yusuf S, et al. Effects of CYP2C19 genotype on outcomes of clopidogrel treatment. *N Engl J Med* 2010;363:1704-14.
206. Sibbing D, Koch W, Gebhard D, et al. Cytochrome 2C19*17 allelic variant, platelet aggregation, bleeding events, and stent thrombosis in clopidogrel-treated patients with coronary stent placement. *Circulation* 2010;121:512-8.
207. Sibbing D, Stegherr J, Latz W, et al. Cytochrome P450 2C19 loss-of-function polymorphism and stent thrombosis following percutaneous coronary intervention. *Eur Heart J* 2009;30:916-22.
208. Taubert D, von Beckerath N, Grimberg G, et al. Impact of P-glycoprotein on clopidogrel absorption. *Clin Pharmacol Ther* 2006;80:486-501.
209. Mega JL, Close SL, Wiviott SD, et al. Genetic variants in ABCB1 and CYP2C19 and cardiovascular outcomes after treatment with clopidogrel and prasugrel in the TRITON-TIMI 38 trial: a pharmacogenetic analysis. *Lancet* 2010;376:1312-9.
210. Simon T, Verstuyft C, Mary-Krause M, et al. Genetic determinants of response to clopidogrel and cardiovascular events. *N Engl J Med* 2009;360:363-75.
211. Mega JL, Simon T, Collet JP, et al. Reduced-function CYP2C19 genotype and risk of adverse clinical outcomes among patients treated with clopidogrel predominantly for PCI: a meta-analysis. *JAMA* 2010;304:1821-30.
212. Bhatt DL, Pare G, Eikelboom JW, et al. The relationship between CYP2C19 polymorphisms and ischaemic and bleeding outcomes in stable outpatients: the CHARISMA genetics study. *Eur Heart J* 2012;33:2143-50.
213. Cattaneo M, Zighetti ML, Lombardi R, et al. Molecular bases of defective signal transduction in the platelet P2Y₁₂ receptor of a patient with congenital bleeding. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100:1978-83.

214. Fontana P, Dupont A, Gandrille S, et al. Adenosine diphosphate-induced platelet aggregation is associated with P2Y₁₂ gene sequence variations in healthy subjects. *Circulation* 2003;108:989-95.
215. van Werkum JW, van der Stelt CA, Seesing TH, ten Berg JM, Hackeng CM. The flow cytometric VASP assay can be used to determine the effectiveness of clopidogrel in patients treated with abciximab. *J Thromb Haemost* 2007;5:881-3.
216. Bonello L, Tantry US, Marcucci R, et al. Consensus and future directions on the definition of high on-treatment platelet reactivity to adenosine diphosphate. *J Am Coll Cardiol* 2010;56:919-33.
217. Qureshi Z, Hobson AR. Clopidogrel "resistance": where are we now? *Cardiovasc Ther* 2013;31:3-11.
218. Mehta SR, Tanguay JF, Eikelboom JW, et al. Double-dose versus standard-dose clopidogrel and high-dose versus low-dose aspirin in individuals undergoing percutaneous coronary intervention for acute coronary syndromes (CURRENT-OASIS 7): a randomised factorial trial. *Lancet* 2010;376:1233-43.
219. Price MJ, Berger PB, Teirstein PS, et al. Standard- vs high-dose clopidogrel based on platelet function testing after percutaneous coronary intervention: the GRAVITAS randomized trial. *JAMA* 2011;305:1097-105.
220. Angiolillo DJ, Saucedo JF, Deraad R, et al. Increased platelet inhibition after switching from maintenance clopidogrel to prasugrel in patients with acute coronary syndromes: results of the SWAP (SWitching Anti Platelet) study. *J Am Coll Cardiol* 2010;56:1017-23.
221. Alexopoulos D. Prasugrel resistance: fact or fiction. *Platelets* 2012;23:83-90.
222. Wallentin L, James S, Storey RF, et al. Effect of CYP2C19 and ABCB1 single nucleotide polymorphisms on outcomes of treatment with ticagrelor versus clopidogrel for acute coronary syndromes: a genetic substudy of the PLATO trial. *Lancet* 2010;376:1320-8.
223. Adamski P, Kozinski M, Ostrowska M, et al. Overview of pleiotropic effects of platelet P2Y₁₂ receptor inhibitors. *Thromb Haemost* 2014;112:224-42.
224. Evangelista V, Manarini S, Dell'Elba G, et al. Clopidogrel inhibits platelet-leukocyte adhesion and platelet-dependent leukocyte activation. *Thromb Haemost* 2005;94:568-77.
225. Judge HM, Buckland RJ, Sugidachi A, Jakubowski JA, Storey RF. The active metabolite of prasugrel effectively blocks the platelet P2Y₁₂ receptor and inhibits procoagulant and pro-inflammatory platelet responses. *Platelets* 2008;19:125-33.
226. Frelinger AL, 3rd, Jakubowski JA, Li Y, et al. The active metabolite of prasugrel inhibits ADP-stimulated thrombo-inflammatory markers of platelet activation: Influence of other blood cells, calcium, and aspirin. *Thromb Haemost* 2007;98:192-200.
227. Xiao Z, Theroux P. Clopidogrel inhibits platelet-leukocyte interactions and thrombin receptor agonist peptide-induced platelet activation in patients with an acute coronary syndrome. *J Am Coll Cardiol* 2004;43:1982-8.

228. Pettersen AA, Seljeflot I, Abdelnoor M, Arnesen H. High On-Aspirin Platelet Reactivity and Clinical Outcome in Patients With Stable Coronary Artery Disease: Results From ASCET (Aspirin Nonresponsiveness and Clopidogrel Endpoint Trial). *J Am Heart Assoc* 2012;1:e000703.
229. Beinart SC, Kolm P, Veledar E, et al. Long-term cost effectiveness of early and sustained dual oral antiplatelet therapy with clopidogrel given for up to one year after percutaneous coronary intervention results: from the Clopidogrel for the Reduction of Events During Observation (CREDO) trial. *J Am Coll Cardiol* 2005;46:761-9.
230. Steinhubl SR, Topol EJ. Risk reduction with long-term clopidogrel following percutaneous coronary intervention. *Eur Heart J* 2004;25:2169-70; author reply 70-1.
231. Kalantzi KI, Dimitriou AA, Millionis HJ, Goudevenos IA, Tselepis AD. Clopidogrel differentially affects platelet-mediated thrombosis and inflammatory response in patients with acute coronary syndromes. *J Thromb Haemost* 2011;9:875-8.
232. Klinkhardt U, Bauersachs R, Adams J, Graff J, Lindhoff-Last E, Harder S. Clopidogrel but not aspirin reduces P-selectin expression and formation of platelet-leukocyte aggregates in patients with atherosclerotic vascular disease. *Clin Pharmacol Ther* 2003;73:232-41.
233. Rao AK, Vaidyula VR, Bagga S, et al. Effect of antiplatelet agents clopidogrel, aspirin, and cilostazol on circulating tissue factor procoagulant activity in patients with peripheral arterial disease. *Thromb Haemost* 2006;96:738-43.
234. Vavuranakis M, Latsios G, Aggelis D, et al. Randomized comparison of the effects of ASA plus clopidogrel versus ASA alone on early platelet activation in acute coronary syndromes with elevated high-sensitivity C-reactive protein and soluble CD40 ligand levels. *Clin Ther* 2006;28:860-71.
235. Serebruany VL, Midei MG, Meilman H, Malinin AI, Lowry DR. Platelet inhibition with prasugrel (CS-747) compared with clopidogrel in patients undergoing coronary stenting: the subset from the JUMBO study. *Postgrad Med J* 2006;82:404-10.
236. Braun OO, Johnell M, Varenhorst C, et al. Greater reduction of platelet activation markers and platelet-monocyte aggregates by prasugrel compared to clopidogrel in stable coronary artery disease. *Thromb Haemost* 2008;100:626-33.
237. Warnholtz A, Ostad MA, Velich N, et al. A single loading dose of clopidogrel causes dose-dependent improvement of endothelial dysfunction in patients with stable coronary artery disease: results of a double-blind, randomized study. *Atherosclerosis* 2008;196:689-95.
238. Frolidi G, Bertin R, Dorigo P, Montopoli M, Caparrotta L. Endothelium-independent vasorelaxation by ticlopidine and clopidogrel in rat caudal artery. *J Pharm Pharmacol* 2011;63:1056-62.
239. Takeda M, Yamashita T, Shinohara M, et al. Beneficial effect of anti-platelet therapies on atherosclerotic lesion formation assessed by phase-contrast X-ray CT imaging. *Int J Cardiovasc Imaging* 2012;28:1181-91.
240. Serebruany VL. Mortality benefit in PLATO cannot be explained by antiplatelet properties of ticagrelor. *Cardiology* 2010;117:231-3.

241. Serebruany VL. Adenosine release: a potential explanation for the benefits of ticagrelor in the PLATElet inhibition and clinical outcomes trial? *Am Heart J* 2011;161:1-4.
242. Cattaneo M, Schulz R, Nylander S. Adenosine-mediated effects of ticagrelor: evidence and potential clinical relevance. *J Am Coll Cardiol* 2014;63:2503-9.
243. 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.
244. Bonello L, Laine M, Kipson N, et al. Ticagrelor increases adenosine plasma concentration in patients with an acute coronary syndrome. *J Am Coll Cardiol* 2014;63:872-7.
245. Torngren K, Ohman J, Salmi H, Larsson J, Erlinge D. Ticagrelor improves peripheral arterial function in patients with a previous acute coronary syndrome. *Cardiology* 2013;124:252-8.
246. Alexopoulos D, Moulias A, Koutsogiannis N, 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.
247. Wittfeldt A, Emanuelsson H, Brandrup-Wognsen G, et al. Ticagrelor enhances adenosine-induced coronary vasodilatory responses in humans. *J Am Coll Cardiol* 2013;61:723-7.
248. Lee CW, Hwang I, Park CS, et al. Comparison of differential expression of P2Y₁(2) receptor in culprit coronary plaques in patients with acute myocardial infarction versus stable angina pectoris. *Am J Cardiol* 2011;108:799-803.
249. Karabina SA, Liapikos TA, Grekas G, Goudevenos J, Tselepis AD. Distribution of PAF-acetylhydrolase activity in human plasma low-density lipoprotein subfractions. *Biochim Biophys Acta* 1994;1213:34-8.
250. Mozaffarian D, Wu JH, de Oliveira Otto MC, et al. Fish oil and post-operative atrial fibrillation: a meta-analysis of randomized controlled trials. *J Am Coll Cardiol* 2013;61:2194-6.
251. Epps DE, Raub TJ, Caiolfa V, Chiari A, Zamai M. Determination of the affinity of drugs toward serum albumin by measurement of the quenching of the intrinsic tryptophan fluorescence of the protein. *J Pharm Pharmacol* 1999;51:41-8.
252. Gum PA, Kottke-Marchant K, Poggio ED, et al. Profile and prevalence of aspirin resistance in patients with cardiovascular disease. *Am J Cardiol* 2001;88:230-5.
253. Santilli F, Rocca B, De Cristofaro R, et al. Platelet cyclooxygenase inhibition by low-dose aspirin is not reflected consistently by platelet function assays: implications for aspirin "resistance". *J Am Coll Cardiol* 2009;53:667-77.
254. Beigel R, Matetzky S, Fefer P, Dvir D, Hod H. Aspirin--issues in daily practice: an update. *Isr Med Assoc J* 2007;9:221-6.
255. Bonello L TU, Marcucci R, Blindt R, Angiolillo DJ, Becker R, Bhatt DL, Cattaneo M, Collet JP, Cuisset T, Gachet C, Montalescot G, Jennings LK, Kereiakes D, Sibbing D,

- Trenk D, Van Werkum JW, Paganelli F, Price MJ, Waksman R, Gurbel PA Working Group on High On-Treatment Platelet Reactivity. Consensus and future directions on the definition of high on-treatment platelet reactivity to adenosine diphosphate. *J Am Coll Cardiol* 2010;56:919-33.
256. Barragan P BJ, Roquebert PO, et al. Resistance to thienopyridines: clinical detection of coronary stent thrombosis by monitoring of vasodilator stimulated phosphoprotein phosphorylation. *Catheter Cardiovasc Interv* 2003;59:295-302.
257. Tantry US, Bonello L, Aradi D, et al. Consensus and update on the definition of on-treatment platelet reactivity to adenosine diphosphate associated with ischemia and bleeding. *J Am Coll Cardiol* 2013;62:2261-73.
258. Taub R, Gould RJ, Garsky VM, et al. A monoclonal antibody against the platelet fibrinogen receptor contains a sequence that mimics a receptor recognition domain in fibrinogen. *J Biol Chem* 1989;264:259-65.
259. Kouki A, Mitsios JV, Sakarellos-Daitsiotis M, et al. Highly constrained cyclic (S,S)-CXaaC- peptides as inhibitors of fibrinogen binding to platelets. *J Thromb Haemost* 2005;3:2324-30.
260. Bouman HJ, Schomig E, van Werkum JW, et al. Paraoxonase-1 is a major determinant of clopidogrel efficacy. *Nat Med* 2011;17:110-6.
261. Rodrigo L, Mackness B, Durrington PN, Hernandez A, Mackness MI. Hydrolysis of platelet-activating factor by human serum paraoxonase. *Biochem J* 2001;354:1-7.
262. Jun HW, Luzzi LA. Fluorescence techniques in drug-plasma protein binding. *J Pharm Sci* 1971;60:1430-1.
263. Liapikos TA, Antonopoulou S, Karabina SP, Tsoukatos DC, Demopoulos CA, Tselepis AD. Platelet-activating factor formation during oxidative modification of low-density lipoprotein when PAF-acetylhydrolase has been inactivated. *Biochim Biophys Acta* 1994;1212:353-60.
264. Pakala R, Waksman R. Currently available methods for platelet function analysis: advantages and disadvantages. *Cardiovasc Revasc Med* 2011;12:312-22.
265. Collet JP, Cayla G, Cuisset T, et al. Randomized comparison of platelet function monitoring to adjust antiplatelet therapy versus standard of care: rationale and design of the assessment with a double randomization of (1) a fixed dose versus a monitoring-guided dose of aspirin and clopidogrel after DES implantation, and (2) treatment interruption versus continuation, 1 year after stenting (ARCTIC) study. *Am Heart J* 2011;161:5-12 e5.
266. Cattaneo M. The clinical relevance of response variability to antiplatelet therapy. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2011;2011:70-5.
267. Lopez LR, Guyer KE, Torre IG, Pitts KR, Matsuura E, Ames PR. Platelet thromboxane (11-dehydro-Thromboxane B2) and aspirin response in patients with diabetes and coronary artery disease. *World J Diabetes* 2014;5:115-27.
268. Schwarz UR, Geiger J, Walter U, Eigenthaler M. Flow cytometry analysis of intracellular VASP phosphorylation for the assessment of activating and inhibitory signal transduction pathways in human platelets--definition and detection of ticlopidine/clopidogrel effects. *Thromb Haemost* 1999;82:1145-52.

269. Bouman HJ, Parlak E, van Werkum JW, et al. Which platelet function test is suitable to monitor clopidogrel responsiveness? A pharmacokinetic analysis on the active metabolite of clopidogrel. *J Thromb Haemost* 2010;8:482-8.
270. Geiger J, Teichmann L, Grossmann R, et al. Monitoring of clopidogrel action: comparison of methods. *Clin Chem* 2005;51:957-65.
271. Cuisset T, Grosdidier C, Loundou AD, et al. Clinical implications of very low on-treatment platelet reactivity in patients treated with thienopyridine: the POBA study (predictor of bleedings with antiplatelet drugs). *JACC Cardiovasc Interv* 2013;6:854-63.
272. Tsoumani ME, Kalantzi KI, Dimitriou AA, Ntalas IV, Goudevenos IA, Tselepis AD. Effect of clopidogrel besylate on platelet reactivity in patients with acute coronary syndromes. Comparison with clopidogrel hydrogen sulfate. *Expert Opin Pharmacother* 2012;13:149-58.
273. Dillinger JG, Manzo Silberman S, Bal dit Sollier C, et al. Ticagrelor effectiveness overestimated by VASP index: platelet inhibition by ticagrelor versus prasugrel in acute coronary syndrome patients according to platelet function tests. *Int J Cardiol* 2014;176:557-9.
274. Laine M, Toesca R, Berbis J, et al. Platelet reactivity evaluated with the VASP assay following ticagrelor loading dose in acute coronary syndrome patients undergoing percutaneous coronary intervention. *Thromb Res* 2013;132:e15-8.
275. Gessi S, Varani K, Merighi S, Ongini E, Borea PA. A(2A) adenosine receptors in human peripheral blood cells. *Br J Pharmacol* 2000;129:2-11.
276. von Hundelshausen P, Weber C. Platelets as immune cells: bridging inflammation and cardiovascular disease. *Circ Res* 2007;100:27-40.
277. Gurbel PA, Kereiakes DJ, Serebruany VL. Soluble P-selectin is not a surrogate marker for platelet P-selectin: evidence from a multicenter chest pain study group. *J Thromb Thrombolysis* 2000;10:15-22.
278. Burdess A, Michelsen AE, Brosstad F, Fox KA, Newby DE, Nimmo AF. Platelet activation in patients with peripheral vascular disease: reproducibility and comparability of platelet markers. *Thromb Res* 2012;129:50-5.
279. Ault KA, Cannon CP, Mitchell J, et al. Platelet activation in patients after an acute coronary syndrome: results from the TIMI-12 trial. *Thrombolysis in Myocardial Infarction. J Am Coll Cardiol* 1999;33:634-9.
280. Draz N, Hamdy MS, Gomaa Y, Ramzy AA. Soluble P-selectin is a marker of plaque destabilization in unstable angina. *Egypt J Immunol* 2003;10:83-7.
281. Patti G, Chello M, Pasceri V, et al. Pretreatment with different loading doses of clopidogrel influences P-selectin levels in patients undergoing percutaneous coronary intervention: results from the ARMYDA-2 (antiplatelet therapy for reduction of myocardial damage during angioplasty) SELECT substudy. *J Cardiovasc Med (Hagerstown)* 2011;12:151-6.
282. Gremmel T, Steiner S, Seidinger D, Koppensteiner R, Panzer S, Kopp CW. In vivo and protease-activated receptor-1-mediated platelet activation but not response to

- antiplatelet therapy predict two-year outcomes after peripheral angioplasty with stent implantation. *Thromb Haemost* 2014;111:474-82.
283. Smadja DM, Bura A, Szymezak J, et al. Effect of clopidogrel on circulating biomarkers of angiogenesis and endothelial activation. *J Cardiol* 2012;59:30-5.
284. Heitzer T, Rudolph V, Schwedhelm E, et al. Clopidogrel improves systemic endothelial nitric oxide bioavailability in patients with coronary artery disease: evidence for antioxidant and antiinflammatory effects. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006;26:1648-52.
285. Tomkiewicz-Pajak L, Wojcik T, Chlopicki S, et al. Aspirin resistance in adult patients after Fontan surgery. *Int J Cardiol* 2015;181:19-26.
286. Ikonomidis I, Andreotti F, Economou E, Stefanadis C, Toutouzas P, Nihoyannopoulos P. Increased proinflammatory cytokines in patients with chronic stable angina and their reduction by aspirin. *Circulation* 1999;100:793-8.
287. Shankar H, Garcia A, Prabhakar J, Kim S, Kunapuli SP. P2Y12 receptor-mediated potentiation of thrombin-induced thromboxane A2 generation in platelets occurs through regulation of Erk1/2 activation. *J Thromb Haemost* 2006;4:638-47.
288. Lee JJ, Han JH, Jung SH, et al. Antiplatelet action of indirubin-3'-monoxime through suppression of glycoprotein VI-mediated signal transduction: a possible role for ERK signaling in platelets. *Vascul Pharmacol* 2014;63:182-92.
289. Jackson SP. The growing complexity of platelet aggregation. *Blood* 2007;109:5087-95.
290. Maxwell MJ, Westein E, Nesbitt WS, Giuliano S, Dopheide SM, Jackson SP. Identification of a 2-stage platelet aggregation process mediating shear-dependent thrombus formation. *Blood* 2007;109:566-76.
291. Ruoslahti E. RGD and other recognition sequences for integrins. *Annu Rev Cell Dev Biol* 1996;12:697-715.
292. Moroi M, Jung SM, Shinmyozu K, Tomiyama Y, Ordinas A, Diaz-Ricart M. Analysis of platelet adhesion to a collagen-coated surface under flow conditions: the involvement of glycoprotein VI in the platelet adhesion. *Blood* 1996;88:2081-92.
293. Flamm MH, Colace TV, Chatterjee MS, et al. Multiscale prediction of patient-specific platelet function under flow. *Blood* 2012;120:190-8.
294. Harrison P, Mackie I, Mathur A, et al. Platelet hyper-function in acute coronary syndromes. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2005;16:557-62.
295. Cadroy Y, Bossavy JP, Thalamas C, Sagnard L, Sakariassen K, Boneu B. Early potent antithrombotic effect with combined aspirin and a loading dose of clopidogrel on experimental arterial thrombogenesis in humans. *Circulation* 2000;101:2823-8.
296. Mendolicchio GL, Zavalloni D, Bacci M, et al. Variable effect of P2Y12 inhibition on platelet thrombus volume in flowing blood. *J Thromb Haemost* 2011;9:373-82.
297. Bossavy JP, Thalamas C, Sagnard L, et al. A double-blind randomized comparison of combined aspirin and ticlopidine therapy versus aspirin or ticlopidine alone on experimental arterial thrombogenesis in humans. *Blood* 1998;92:1518-25.

298. Kalantzi KI, Tsoumani ME, Goudevenos IA, Tselepis AD. Pharmacodynamic properties of antiplatelet agents: current knowledge and future perspectives. *Expert Rev Clin Pharmacol* 2012;5:319-36.
299. Stafforini DM, Tjoelker LW, McCormick SP, et al. Molecular basis of the interaction between plasma platelet-activating factor acetylhydrolase and low density lipoprotein. *J Biol Chem* 1999;274:7018-24.
300. Tselepis AD, Dentan C, Karabina SA, Chapman MJ, Ninio E. PAF-degrading acetylhydrolase is preferentially associated with dense LDL and VLDL-1 in human plasma. Catalytic characteristics and relation to the monocyte-derived enzyme. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1995;15:1764-73.
301. Tellis CC, Tselepis AD. The role of lipoprotein-associated phospholipase A2 in atherosclerosis may depend on its lipoprotein carrier in plasma. *Biochim Biophys Acta* 2009;1791:327-38.
302. MacPhee CH, Moores KE, Boyd HF, et al. Lipoprotein-associated phospholipase A2, platelet-activating factor acetylhydrolase, generates two bioactive products during the oxidation of low-density lipoprotein: use of a novel inhibitor. *Biochem J* 1999;338 (Pt 2):479-87.
303. Steen DL, O'Donoghue ML. Lp-PLA2 Inhibitors for the Reduction of Cardiovascular Events. *Cardiol Ther* 2013;2:125-34.
304. Tribble DL, Holl LG, Wood PD, Krauss RM. Variations in oxidative susceptibility among six low density lipoprotein subfractions of differing density and particle size. *Atherosclerosis* 1992;93:189-99.
305. Tellis CC, Tselepis AD. Pathophysiological role and clinical significance of lipoprotein-associated phospholipase A(2) (Lp-PLA(2)) bound to LDL and HDL. *Curr Pharm Des* 2014;20:6256-69.
306. Tsoumani ME, Kalantzi KI, Goudevenos IA, Tselepis AD. Platelet-mediated inflammation in cardiovascular disease. Potential role of platelet-endothelium interactions. *Curr Vasc Pharmacol* 2012;10:539-49.

ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ-ΑΝΑΚΟΙΝΩΣΕΙΣ ΣΕ ΣΥΝΕΔΡΙΑ

ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ ΣΕ ΞΕΝΑ ΠΕΡΙΟΔΙΚΑ

1. Ntalas IV, Kalantzi KI, **Tsoumani ME**, Vakalis I, Vasilakopoulos V, Vardakis C, Vemmos K, Voukelatou M, Giannakoulas G, Giatrakos I, Giogiakas V, Goumas G, Dimoulis N, Draganigos A, Efthimiadis I, Thoma M, Kazakos E, Kipouridis N, Konstantinou S, Milionis H, Mpourdakis A, Nikolopoulos D, Peltekis L, Prokopakis N, Sintelis I, Stroumbis C, Terzoudi K, Tsilias K, Xaraktis I, Charmpas C, Hatzithanasiou G, Christogiannis Z, Panagiotakos DB, Goudevenos JA, Tselepis AD. Generic Clopidogrel Besylate in the Secondary Prevention of Atherothrombotic Events: A 6-month Follow-up of a Randomised Clinical Trial. *Curr Vasc Pharmacol*. 2015 Mar 16. [Epub ahead of print].
2. **Tsoumani ME**, Ntalas IV, Goudevenos JA, Tselepis AD. Evaluating the bioequivalence of clopidogrel generic formulations. *Curr Med Res Opin*. 2015; 31:861-4.
3. **Tsoumani ME**, Kalantzi KI, Goudevenos IA, Tselepis AD. Clopidogrel Generic Formulations in the Era of New Antiplatelets. A Systematic Review. *Curr Vasc Pharmacol*. 2014;12:766-77.

ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ ΣΕ ΕΛΛΗΝΙΚΑ ΠΕΡΙΟΔΙΚΑ

1. **Μαρία Ε. Τσουμάνη**, Καλλιρρόη Ι. Καλαντζή, Ιωάννης Α. Γουδέβενος, Αλέξανδρος Δ. Τσελέπης. Αιμοπεταλιακή δυσλειτουργία στο σακχαρώδη διαβήτη. Πόσο επηρεάζει την από του στόματος αντιαιμοπεταλιακή αγωγή; *Καρδιά και αγγεία*. 2014;2:89-98.
2. **Μαρία Ε. Τσουμάνη**, Προκοπία Τ. Τατσίδου, Αλέξανδρος Δ. Τσελέπης. Αντιαιμοπεταλιακοί παράγοντες υπό διερεύνηση. Θα έχουν θέση στη σύγχρονη αντιαιμοπεταλιακή αγωγή; *Heart, vessels and brain*. 2013;3:33-44.

ΑΝΑΚΟΙΝΩΣΕΙΣ ΣΕ ΣΥΝΕΔΡΙΑ

1. **M.E. Tsoumani**, C.C Tellis, M.V. Chatziathanasiadou, A.N.Katsikoudi, V.G. Kontogianni, A.G Tzakos, A.D. Tselepis. Clopidogrel binds to Lp-PLA₂ and inhibits the enzyme activity. A new pleiotropic effect of this antipatelet drug? 17th International Symposium of Atherosclerosis. May 23-26 2015. Amsterdam, The Netherlands.
2. **M.E. Tsoumani**, I.V. Ntalas, K.I. Kalantzi, J.A. Goudevenos, A.D. Tselepis. The increased activation state of resting platelets and the TRAP-induced platelet aggregation are related to platelet response variability to clopidogrel in acute coronary syndrome patients. 81st EAS Congress. March 22-25 2015. Glasgow, Scotland.
3. **Maria E. Tsoumani**, Prokopia T. Tatsidou, Ioannis V. Ntalas, Kallirroi I. Kalantzi, Ioannis A. Goudevenos, Alexandros D. Tselepis. Effect of ticagrelor versus clopidogrel on dynamic platelet adhesion in patients with an acute coronary syndrome. 23rd Biennial International MLTD Congress, May 14-17. 2014. Valencia, Spain.

4. **M.E. Τσουμάνη**, Κ.Χ. Τέλλης, Μ.Β. Χατζηαθανασιάδου, Α.Ν. Κατσικούδη, Β.Γ. Κοντογιάννη, Α.Γ. Τζάκος, Α.Δ. Τσελέπης. Η κλοπιδογρέλη προσδένεται στην Lp-PLA₂ και αναστέλλει την ενζυμική της ενεργότητα. Μια νέα πλειοτροπική δράση του φαρμάκου; 6^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Αθηροσκλήρωσης. 4-6 Δεκεμβρίου 2014. Αθήνα.
5. **M. Τσουμάνη**, Π. Τατσίδου, Ι. Ντάλας, Κ. Καλαντζή, Ι. Γουδέβενος, Α. Τσελέπης. Η τικαγρελόρη και η κλοπιδογρέλη είναι φαρμακοδυναμικά ισοδύναμες ως προς την αναστολή της προσκόλλησης των αιμοπεταλίων σε ασθενών με οξύ στεφανιαίο σύνδρομο. 2ο Πανελλήνιο Συνέδριο Θρόμβωσης- Αντιθρομβωτικής Αγωγής. 11-12 Απριλίου 2014. Αθήνα.
6. **Maria E. Tsoumani**, Ioannis V. Ntalas, Kallirroi I. Kalantzi, Ioannis A. Goudevenos, Alexandros D. Tselepis. Effects of ticagrelor on platelet-mediated thrombosis and inflammatory response in patients with acute coronary syndromes. 81st EAS Congress. June 2-5 2013. Lyon, France.
7. **M.E. Τσουμάνη**, Κ.Ι. Καλαντζή, Ι.Β. Ντάλας, Ι.Α. Γουδέβενος, Α.Δ. Τσελέπης. Μελέτη της αντιφλεγμονώδους δράσης της τικαγρελόρης σε σύγκριση με την κλοπιδογρέλη σε ασθενείς με οξύ στεφανιαίο σύνδρομο. 5^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Αθηροσκλήρωσης. 29 Νοεμβρίου-1 Δεκεμβρίου 2012. Αθήνα.

