



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ**

**ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ  
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ  
ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΟΣ ΤΟΜΕΑΣ  
ΚΑΡΔΙΟΛΟΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ**

**ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ  
ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ  
ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΟ ΚΕΝΤΡΟ ΑΘΗΡΟΘΡΟΜΒΩΣΗΣ**

**ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΚΥΚΛΙΚΩΝ ΚΑΙ ΥΒΡΙΔΙΚΩΝ ΠΕΠΤΙΔΙΚΩΝ ΑΝΑΛΟΓΩΝ  
ΤΟΥ ΥΠΟΔΟΧΕΑ ΙΝΤΕΓΚΡΙΝΗ II<sub>β</sub>III<sub>α</sub> ΣΕ ΕΝΑ ΜΟΝΤΕΛΟ  
ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗΣ ΑΡΤΗΡΙΑΚΗΣ ΘΡΟΜΒΩΣΗΣ ΣΕ ΚΟΥΝΕΛΙΑ**

**ΕΓΓΛΕΖΟΠΟΥΛΟΣ Β. ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΣ**

ΚΑΡΔΙΟΛΟΓΟΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2022





**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ**

**ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ  
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ  
ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΟΣ ΤΟΜΕΑΣ  
ΚΑΡΔΙΟΛΟΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ**

**ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ  
ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ  
ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΟ ΚΕΝΤΡΟ ΑΘΗΡΟΘΡΟΜΒΩΣΗΣ**

**ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΚΥΚΛΙΚΩΝ ΚΑΙ ΥΒΡΙΔΙΚΩΝ ΠΕΠΤΙΔΙΚΩΝ ΑΝΑΛΟΓΩΝ  
ΤΟΥ ΥΠΟΔΟΧΕΑ ΙΝΤΕΓΚΡΙΝΗΣ  $II_{\beta}III_{\alpha}$  ΣΕ ΕΝΑ ΜΟΝΤΕΛΟ  
ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗΣ ΑΡΤΗΡΙΑΚΗΣ ΘΡΟΜΒΩΣΗΣ ΣΕ ΚΟΥΝΕΛΙΑ**

**ΕΓΓΛΕΖΟΠΟΥΛΟΣ Β. ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΣ**

**ΚΑΡΔΙΟΛΟΓΟΣ**

**ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ**

**ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2022**

«Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από το Τμήμα Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων δεν υποδηλώνει αποδοχή των γνωμών του συγγραφέα Ν. 5343/32, άρθρο 202, παράγραφος 2 (νομική κατοχύρωση του Ιατρικού Τμήματος)»

Ημερομηνία αίτησης του κ. Εγγλεζόπουλου Κωνσταντίνου: 28-11-2007

Ημερομηνία ορισμού Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής: 623α/18-12-2007

**Μέλη Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής:**

Επιβλέπων:

Μιχάλης Λάμπρος, Καθηγητής Καρδιολογίας

Μέλη:

Κατσούρας Χρήστος, Επίκουρος Καθηγητής Καρδιολογίας

Τσελέπης Αλέξανδρος, Καθηγητής Οργανικής Χημείας και Βιοχημείας και του Τμήματος Χημείας

Ημερομηνία ορισμού θέματος: 20-12-2007

«Επίδραση κυκλικών και υβριδικών πεπτιδικών αναλόγων του υποδοχέα ιντεγκρίνη IIβIII<sub>α</sub> σε ένα μοντέλο πειραματικής αρτηριακής θρόμβωσης σε κουνέλια»

Ανασυγκρότηση Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής: 680<sup>α</sup>/02-03-2010

Επιβλέπων:

Μιχάλης Λάμπρος, Καθηγητής Καρδιολογίας

Μέλη:

Τσίκαρης Βασίλειος, Καθηγητής Οργανικής Χημείας και Βιοχημείας του Τμήματος Χημείας

Τσελέπης Αλέξανδρος, Καθηγητής Οργανικής Χημείας και Βιοχημείας του Τμήματος Χημείας

**ΟΡΙΣΜΟΣ ΕΠΤΑΜΕΛΟΥΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ 960α/21-04-2021**

1. Μιχάλης Λάμπρος, Καθηγητής Καρδιολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
2. Τσελέπης Αλέξανδρος, Καθηγητής Οργανικής Χημείας και Βιοχημείας του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
3. Τσίκαρης Βασίλειος, Καθηγητής Οργανικής Χημείας και Βιοχημείας του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
4. Νάκα Αικατερίνη, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Καρδιολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
5. Κατσούρας Χρήστος, Αναπληρωτής Καθηγητής Καρδιολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
6. Κοραντζόπουλος Παναγιώτης, Αναπληρωτής Καθηγητής Καρδιολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
7. Λυμπερόπουλος Ευάγγελος, Αναπληρωτής Καθηγητής Παθολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Έγκριση Διδακτορικής Διατριβής με βαθμό «ΑΡΙΣΤΑ» στις 30-03-2022

Ιωάννινα 04-05-2022

**ΠΡΟΕΔΡΟΣ ΤΟΥ ΤΜΗΜΑΤΟΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**

**Άννα Μπατιστάτου**

Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομίας



Η Γραμματέας του Τμήματος

**ΜΑΡΙΑ ΚΑΠΙΤΟΠΟΥΛΟΥ**

*Αφιερώνεται στους αγαπημένους μου γονείς Βασίλειο-Γεώργιο και Νότα.  
Χωρίς εσάς τίποτα δε θα ήταν δυνατό ...*

*στον αείμνηστο διδάσκαλό μου Δημήτρη Μπελντέκο  
που με δίδαξε ανθρωπιά, ήθος και επιστήμη ...*

*και στις ψυχές των ζώων που θυσιάσαμε στο βωμό της ανακάλυψης νέων,  
αποτελεσματικότερων θεραπειών ...*

## ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η Διδακτορική Διατριβή που ακολουθεί εκπονήθηκε στο Τμήμα Ιατρικής της Σχολής Επιστημών Υγείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, σε συνεργασία με το Τμήμα Χημείας του Πανεπιστημίου και το Ερευνητικό Κέντρο Αθηροθρόμβωσης. Για την ολοκλήρωσή της χρειάστηκε η συνεισφορά μιας πληθώρας ανθρώπων, οι οποίοι συνεργάστηκαν μαζί μου με συνέπεια και αφοσίωση, οδηγώντας στο αποτέλεσμα που παρουσιάζεται στις σελίδες που ακολουθούν.

Ως εκ τούτου, οφείλω να ευχαριστήσω θερμά:

τον Καθηγητή Καρδιολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων κύριο Λάμπρο Μιχάλη για την ανάθεση της Διατριβής και για την επιμονή του να ολοκληρωθεί αυτή η προσπάθεια ακόμα και όταν τα πράγματα δεν εξελίσσονταν όπως τα είχαμε σχεδιάσει.

τον Καθηγητή Βιοχημείας και Κλινικής Χημείας, του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων κύριο Αλέξανδρο Τσελέπη, για την παραχώρηση πρόσβασης στις εγκαταστάσεις του Ερευνητικού Κέντρου Αθηροθρόμβωσης, όπου πραγματοποιήθηκαν τα *ex vivo* πειράματα. Επίσης για την καθοδήγηση του στην ερμηνεία των αποτελεσμάτων των πειραμάτων και για την επιμέλεια του άρθρου στο οποίο δημοσιεύθηκαν τα αποτελέσματα όλης αυτής της δουλειάς.

Τον Καθηγητή Οργανικής Χημείας, του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων κύριο Βασίλη Τσίκαρη και τον Βασίλη Μούσση για τη χρονοβόρα και δαπανηρή διαδικασία της σύνθεσης των πεπτιδίων που μελετήθηκαν. Όσες φορές και αν χρειάστηκε.

Τους συναδέλφους μου Νικόλαο Παπαμιχαήλ και Βασιλική Ρούσση για τη βοήθεια τους στην εκτέλεση πολλών από τα πειράματα που συνθέτουν την παρούσα μελέτη.

Την Ελένη Σταθοπούλου για τα πρώτα πειράματα συσσωρευομετρίας, την Κλεοπάτρα Ρούσουλη για τη συνέχεια, το Βασίλη Χαντζηχρήστο και τη Μαρία Τσουμάνη για τη βοήθειά τους σε διάφορα χρονικά σημεία αυτής της διαδρομής.

Το Ελληνικό Γραφείο Νεαπόλεως του ΝΑΤΟ στην Ιταλία, όπου έλαβε χώρα κατά τη διάρκεια της στρατιωτικής μου θητείας το μεγαλύτερο τμήμα από τη συγγραφή του κειμένου που ακολουθεί.

Τους σημαντικότερους ανθρώπους τους άφησα για το τέλος. Στον πατέρα μου Βασίλειο-Γεώργιο και στη μητέρα μου Νότα εκφράζω την αγάπη μου και την ευγνωμοσύνη μου. Χωρίς τη δική τους οικονομική και ψυχολογική υποστήριξη αυτός ο επιστημονικός στόχος δε θα είχε επιτευχθεί. Ευχαριστώ μέσα από την καρδιά μου το νεογέννητο γιο μου Βασίλειο που με φωνές και κλάματα συντρόφευσε την τελική ανασκόπηση και διόρθωση του κειμένου και την αγαπημένη μου σύζυγο Βασιλική για τις υπεράνθρωπες προσπάθειες της να τον ηρεμήσει.

Εύχομαι ολόψυχα τα αποτελέσματα αυτής της προσπάθειας να ωθήσουν τις επιστήμες της Χημείας και της Καρδιολογίας ένα σκαλί πιο ψηλά προς την ανακάλυψη νέων και αποτελεσματικότερων θεραπειών. Έτσι θα αποκτήσει νόημα το πιο ψυχοφθόρο για εμένα κομμάτι αυτής της Διδακτορικής Διατριβής: η θυσία των ζώων, που ως άλλοι ασθενείς δοκιμάστηκαν στη χειρουργική αίθουσα όπου πραγματοποιήθηκαν τα πειράματα αυτής της μελέτης...

Αθήνα, Κυριακή 1<sup>η</sup> Νοεμβρίου 2020



### ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Η ενεργοποίηση και η συσσώρευση των αιμοπεταλίων αποτελούν τους υπεύθυνους μηχανισμούς για τα στεφανιαία σύνδρομα. Ο υποδοχέας  $\alpha_{IIb}\beta_3$  αποτελεί το τελικό μονοπάτι στην παθογένεσή τους. Συνεπώς, οι αναστολείς των υποδοχέων αυτών είναι μεγάλης θεραπευτικής σημασίας. Δύο συνθετικά πεπτίδια, το κυκλικό μόριο (S,S) PSRCDCR-NH<sub>2</sub> και το YMESRADR έχουν ήδη μελετηθεί και παρουσιάζει ισχυρή *in vivo* και *ex vivo* αντιαιμοπεταλιακή δραστηριότητα, δοκιμαζόμενα σε ένα μοντέλο πειραματικής αρτηριακής θρόμβωσης σε κουνέλια. Στην κλινική πράξη η αναγκαιότητα αποτελεσματικής διπλής αντιαιμοπεταλιακής αγωγής με περιορισμένες αιμορραγικές επιπλοκές είναι καλά τεκμηριωμένη. Στην αντιμετώπιση ασθενών με οξεία στεφανιαία σύνδρομα με ή χωρίς ανάσπαση του διαστήματος ST, η ενδοφλέβια χορήγηση αναστολέων του υποδοχέα GPIIb/IIIa ενδείκνυται σε καταστάσεις διάσωσης (αγγειογραφική απεικόνιση θρόμβου ή/και φαινόμενο no-reflow) και σε συνδυασμό με τη χορήγηση διπλής αντιαιμοπεταλιακής αγωγής (ασπιρίνη και ανταγωνιστές του υποδοχέα P<sub>2</sub>Y<sub>12</sub>). Πρόσφατα δεδομένα υποστηρίζουν μάλιστα ότι σε συγκεκριμένους ασθενείς υπάρχει όφελος από την παράταση της διπλής αντιαιμοπεταλιακής αγωγής για έως και 30 μήνες. Βάσει των παραπάνω κρίθηκε σκόπιμο να μελετηθεί η συνδυαστική επίδραση κάθε ενός από τα πεπτίδια YMESRADR και (S,S) PSRCDCR-NH<sub>2</sub> με την από του στόματος χορήγηση ασπιρίνης. Αποφασίσθηκε να δοκιμαστούν ήδη γνωστές και δραστικές δόσεις από τα δύο πεπτίδια σε συνδυασμό με μη αποτελεσματικές δόσεις τις ασπιρίνης. Ο σκοπός ήταν να αποδειχθεί εάν η ασπιρίνη σε μια δόση με δραστηριότητα εφάμιλλη της ομάδας ελέγχου θα μπορούσε να οδηγήσει σε ενισχυμένα, συνεργικά αποτελέσματα συγκριτικά με την ομάδα του αντίστοιχου πεπτιδίου.

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

### ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Κεφάλαιο 1<sup>ο</sup>: Μεγακαρυοποίηση, δομή, φυσιολογία και βιοχημεία αιμοπεταλίου ..9

- Η δημιουργία του μεγακαρυοκυττάρου.....10
- Ρύθμιση της μεγακαρυοποίησης.....12
  - Η θρομβοποιητίνη.....12
  - Η δομή της θρομβοποιητίνης .....16
  - Λοιποί παράγοντες ρύθμισης της μεγακαρυοποίησης .....16
- Η δομή του μεγακαρυοκυττάρου.....21
- Το αιμοπετάλιο.....23
  - Η δομή του αιμοπεταλίου .....24
    - Κυτταρική μεμβράνη.....25
    - Μembranικά συστήματα.....26
    - Ο κυτταροσκελετός.....28
    - Αιμοπεταλιακά κοκκία και οργανίδια.....30
  - Φυσιολογία του αιμοπεταλίου.....37
    - Παράγοντας Von Willebrand και ο υποδοχέας του.....39
      - Μοριακή προσέγγιση υποδοχέα GPIb-IX-V.....40
      - Πρόσδεση του παράγοντα Von Willebrand στον υποδοχέα του .....42
      - Μεταγωγή σήματος μέσω του GPIb-IX-V.....45
- Οι ιντεγκρίνες.....47
  - Η δομή των υποδοχέων ιντεγκρίνης: εξωκυττάριο τμήμα.....49
  - Η δομή των υποδοχέων ιντεγκρίνης: ενδοκυττάριο τμήμα....57
  - Η ενεργοποίηση των υποδοχέων ιντεγκρίνης.....59
- Ο υποδοχέας ιντεγκρίνης GPIIb/IIIa.....61
  - Μεταγωγή σήματος μέσω της ιντεγκρίνης GPIIb/IIIa: από μέσα προς τα έξω («inside-out»).....63
  - Μεταγωγή σήματος μέσω της ιντεγκρίνης GPIIb/IIIa: από έξω προς τα μέσα («outside-in»).....64

- Το Ινωδογόνο.....66
  - Αλληλεπίδραση ινωδογόνου με τον υποδοχέα GPIIb/IIIa.....69
- Το κολλαγόνο και οι υποδοχείς του.....70
  - Μεταγωγή σήματος μέσω των υποδοχέων GPIa/IIa.....72
  - Μεταγωγή σήματος μέσω του υποδοχέα GPVI.....73
- Η θρομβίνη και οι υποδοχείς της .....74
  - Μεταγωγή σήματος μέσω των υποδοχέων PAR1 και PAR4....78
- Υποδοχείς νουκλεοτιδίων αδενίνης.....80
- Η θρομβοξάνη και ο υποδοχέας της.....84
- Η  $\rho$ -σελεκτίνη και ο ρόλος της στο σχηματισμό του θρόμβου.....86
- Η επινεφρίνη.....89
- Άλλοι αιμοπεταλιακοί υποδοχείς.....90
- Βιοχημεία και μεταβολισμός του αιμοπεταλίου.....91
  - Μεταβολισμός της γλυκόζης.....91
  - Μεταβολισμός των νουκλεοτιδίων.....92
  - Μεταβολισμός των λιπιδίων.....93
- Η αλληλεπίδραση αιμοπεταλίων με τον καταρράκτη της πήξης.....94

Κεφάλαιο 2<sup>ο</sup>: μελέτη αντιθρομβωτικών παραγόντων με πειραματικά μοντέλα αρτηριακής θρόμβωσης.....98

- Πειραματικά μοντέλα αρτηριακής θρόμβωσης.....99
  - Τραυματισμός του αγγείου με  $FeCl_3$  .....99
  - Με φωτοχημική αντίδραση.....107
  - Με χάλκινο σπείραμα.....112
  - Με χρήση Laser.....115
  - Με απολίνωση.....119
  - Με εφαρμογή ηλεκτρικού ρεύματος.....120
  - Με περιαγγειακό δακτύλιο (μέθοδος Folts).....125

Κεφάλαιο 3<sup>ο</sup>: τα συνθετικά πεπτίδια (S,S) PSRCDRCR-NH<sub>2</sub> και YMESRADR.....128

- Η RGD αλληλουχία.....129

- Συνθετικά πεπτίδια που αναστέλουν τη σύνδεση του ινωδογόνου με τον υποδοχέα GPIIb/IIIa.....131
  - Το συνθετικό πεπτίδιο (S,S) PSRCDCR-NH<sub>2</sub>.....132
  - Το συνθετικό πεπτίδιο YMESRADR.....135
  - Η σύνθεση των πεπτιδίων.....140
- Η επιλογή λευκών κουνελιών Νέας Ζηλανδίας.....141

## ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

### Κεφάλαιο 1<sup>ο</sup>: η πειραματική διαδικασία.....143

- In vivo πειραματική διαδικασία.....144
  - Τα πειραματόζωα.....144
  - Ουσίες που εξετάστηκαν.....146
  - Δημιουργία θρόμβου και ροή αίματος .....149
  - Αξιολόγηση της ασφάλειας.....152
  - Βάρος του θρόμβου.....152
- Ex vivo πειραματική διαδικασία.....153
  - Συσσωρευομετρία αιμοπεταλίων.....153
  - Πειραματική διαδικασία συσσωρευομετρίας.....156
- Στατιστική ανάλυση.....158

### Κεφάλαιο 2<sup>ο</sup>: αποτελέσματα.....159

- Μελέτη της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων in vivo.....160
  - Συνθετικό πεπτίδιο YMESRADR.....160
    - Ομάδα ελέγχου.....160
    - YMESRADR 3 mg/kg.....162
    - YMESRADR 7,5 mg/kg.....164
    - YMESRADR 12 mg/kg.....166
    - YMESRADR 15 mg/kg.....168
    - Συνολική επίδραση των ομάδων.....170
  - Το πεπτίδιο (S,S) PSRCDCR-NH<sub>2</sub>.....175
    - (S,S) PSRCDCDR-NH<sub>2</sub> 3 mg/kg.....175

○ (S,S) PSRCDCCR-NH <sub>2</sub> 6 mg/kg.....	177
○ (S,S) PSRCDCCR-NH <sub>2</sub> 12 mg/kg.....	179
○ Συνολική επίδραση των ομάδων.....	182
• Σκοπός της παρούσας μελέτης.....	188
○ Ομάδες Ασπιρίνης.....	189
○ Ασπιρίνη 5 mg/kg.....	189
○ Ασπιρίνη 10 mg/kg.....	192
• In vivo δοκιμή του πεπτιδίου (S,S) PSRCDCCR-NH <sub>2</sub> με την ασπιρίνη...	197
○ (S,S) PSRCDCCR-NH <sub>2</sub> 6 mg/kg με ασπιρίνη 5 mg/kg.....	197
○ (S,S) PSRCDCCR-NH <sub>2</sub> 12 mg/kg με ασπιρίνη 5 mg/kg.....	200
○ Σύγκριση της επίδρασης των ομάδων του (S,S) PSRCDCCR-NH <sub>2</sub> .....	205
• In vivo δοκιμή του πεπτιδίου YMESRADR με την ασπιρίνη.....	211
○ YMESRADR 7,5 mg/kg με ασπιρίνη 5 mg/kg.....	211
○ YMESRADR 12 mg/kg με ασπιρίνη 5 mg/kg.....	216
○ Σύγκριση της επίδρασης των ομάδων του YMESRADR.....	221
<b>ΣΥΖΗΤΗΣΗ-ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....</b>	<b>228</b>
<b>ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....</b>	<b>244</b>
<b>ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....</b>	<b>249</b>



# ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1<sup>ο</sup>:

ΜΕΓΑΚΑΡΥΟΠΟΙΗΣΗ, ΔΟΜΗ,

ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ ΚΑΙ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑ

ΑΙΜΟΠΕΤΑΛΙΟΥ

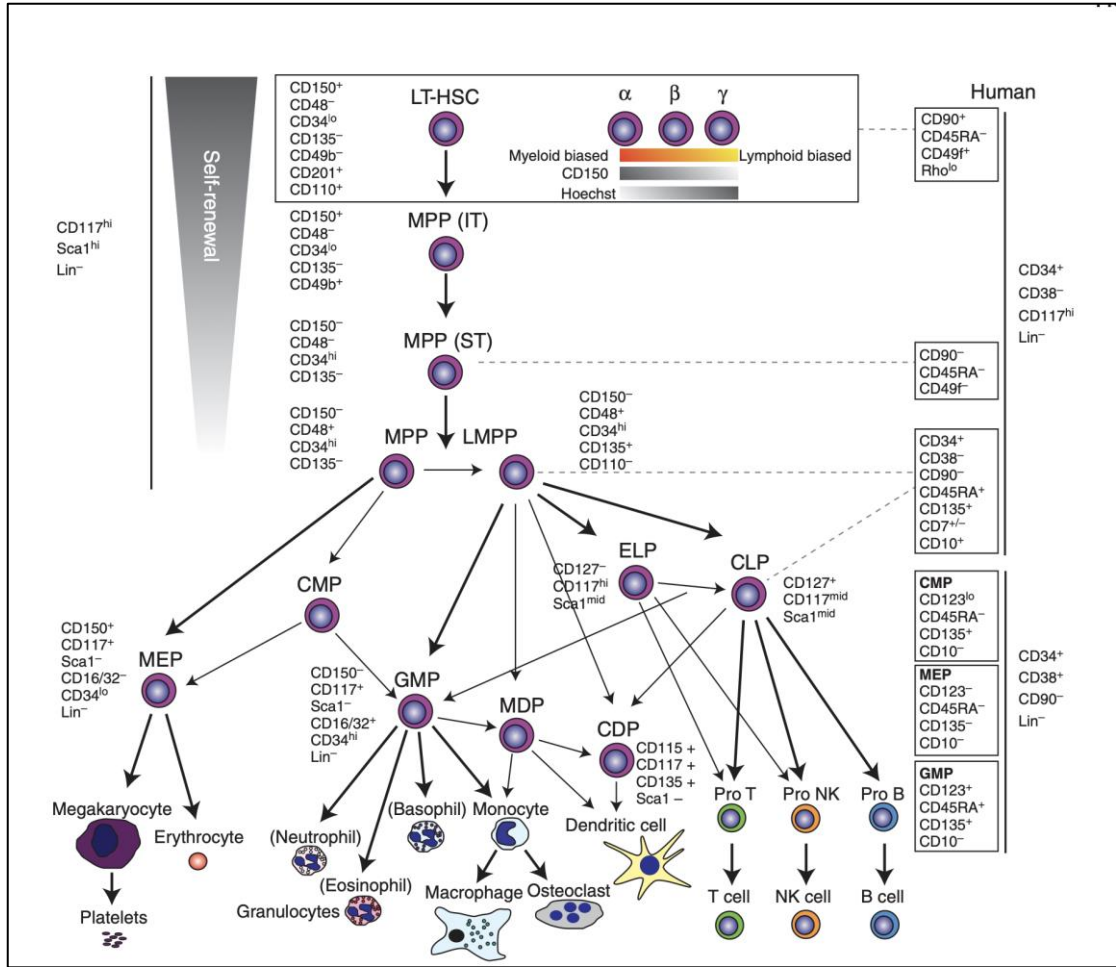
## Η ΔΗΜΙΟΥΡΓΙΑ ΤΟΥ ΜΕΓΑΚΑΡΥΟΚΥΤΤΑΡΟΥ

Όταν το αρχέγονο πολυδύναμο αιμοποιητικό κύτταρο (Stem cell) διαφοροποιείται στο μυελό των οστών προς το μεγακαρυοκύτταρο, τότε ξεκινά ο κύκλος ζωής του αιμοπεταλίου. Το κύτταρο αυτό, με ένα ρόλο τόσο πολυδιάστατο ώστε να μην έχει ακόμη αποσαφηνιστεί πλήρως, αποτελεί αντικείμενο εκτεταμένων μελετών τόσο κλινικών όσο και πειραματικών. Αν και υπό φυσιολογικές συνθήκες η δράση του είναι ωφέλιμη για τον οργανισμό (αποκατάσταση της ακεραιότητας του αγγειακού ενδοθηλίου και διακοπή της αιμορραγίας), σε συγκεκριμένες περιπτώσεις μπορεί να είναι επιβλαβής ή και θανατηφόρα (οξέα στεφανιαία σύνδρομα, εγκεφαλικά επεισόδια, κτλ).

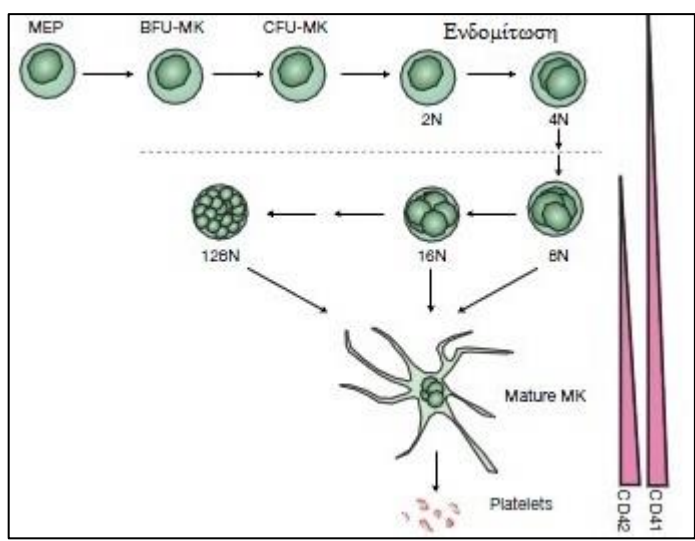
Η μεγακαρυοποίηση είναι η διαδικασία με την οποία τα προγονικά κύτταρα του μυελού των οστών εξελίσσονται σε ώριμα μεγακαρυοκύτταρα τα οποία εν συνεχεία παράγουν τα αιμοπετάλια που απαιτούνται για τη φυσιολογική αιμόσταση. Είναι σπάνια κύτταρα. Μέσα σε ένα φυσιολογικό ανθρώπινο μυελό των οστών, μόνο το 0,05% του ανευρισκόμενου κυτταρικού πληθυσμού είναι μεγακαρυοκύτταρο(1).

Σύμφωνα με την κλασική θεωρία της αιμοποίησης (εικ. 1), το αρχέγονο πολυδύναμο αιμοποιητικό κύτταρο (Haematopoietic Stem Cell – εφεξής HSC) διαφοροποιείται και παράγει δύο γεννεές κυττάρων: τα κοινά λεμφικά προγονικά κύτταρα (Common Lymphoid Progenitor – εφεξής CLP) και τα κοινά μυελοειδή προγονικά κύτταρα (Common Myeloid Progenitor – εφεξής CMP). Τα CLP παράγουν τα λεμφοκύτταρα (Κύτταρα φυσικοί φονείς, T και B λεμφοκύτταρα) ενώ τα CMP παράγουν τα προγονικά κύτταρα των κοκκιοκυττάρων/μακροφάγων (granulocyte/macrophage progenitor cells – εφεξής GMP) και τα προγονικά κύτταρα των μεγακαρυοκυττάρων και των ερυθρών αιμοσφαιρίων (megakaryocyte/erythroid progenitor cells – εφεξής MEP)(2). Όπως φαίνεται στην εικόνα 1, εκτός από την κλασική θεωρία παραγωγής των μεγακαρυοκυττάρων, έρευνες υποστηρίζουν ότι τα MEP ίσως να πηγάζουν απευθείας από τα HSC, χωρίς δηλαδή τα ενδιάμεσα CMP(2). Στη συνέχεια, τα MEP διαφοροποιούνται προς τα Burst Forming Unit Megakaryocytes (εφεξής BFU – MK), τα οποία αποτελούν τον πρώτο τύπο προγονικού κυττάρου αποκλειστικά αφοσιωμένο στην παραγωγή μεγακαρυοκυττάρων. Από τη διαφορο-





**Εικ. 1:** η ιεραρχία της αιμοποίησης. Τα αρχέγονα πολυδύναμα αιμοποιητικά κύτταρα βρίσκονται στην κορυφή δίνοντας γέννηση σε όλους τους τύπους προγονικών κυττάρων που παράγουν τις κυτταρικές σειρές(2).



**Εικ. 2:** η διαφοροίση των MEP προς τα Μεγακαρυοκύτταρα κι από εκεί προς τα λειτουργικά αιμοπετάλια του περιφερικού αίματος(3).

ποίηση των τελευταίων προκύπτουν τα κύτταρα σχηματισμού αποικιών μεγακαρυοκυττάρων ( Colony Forming Unit Megakaryocyte – εφεξής CFU-MK). Και τα δυο αυτά είδη κυττάρων εκφράζουν το αντιγόνο CD34(4, 5). Τα CFU-MK είναι υπεύθυνα για τη δημιουργία απλών αποικιών που περιέχουν 3 έως 50 ώριμα μεγακαρυοκύτταρα(6), ενώ τα BFU-MK για τη δημιουργία περισσότερο περίπλοκων αποικιών, οι οποίες περιέχουν διάφορες συλλογές μεγακαρυοκυττάρων και μπορεί να αριθμούν αρκετές εκατοντάδες κύτταρα(4, 7). Εν συνεχεία, μέσω ενδομίτωσης γίνονται πολυπλοειδή πριν παραχθεί το ώριμο μεγακαρυοκύτταρο(3). Η ενδομίτωση είναι το πιο χαρακτηριστικό στοιχείο της εξέλιξης των μεγακαρυοκυττάρων. Πρόκειται για μια διαδικασία στην οποία το DNA αντιγράφεται συνεχώς, παράγοντας σε κάθε κύκλο ένα ακριβές αντίγραφο των χρωμοσωμάτων χωρίς όμως να οδηγεί σε διαίρεση του κυττάρου, δηλαδή σε κυττοκίνηση. Αυτό συμβαίνει διότι τα δύο αντίγραφα των χρωμοσωμάτων που έχουν παραχθεί δε μεταναστεύουν στους δύο πόλους του κυττάρου, η πυρηνική μεμβράνη επανασχηματίζεται γύρω τους και το κύτταρο μπαίνει ξανά στη φάση G1 της μεσόφασης. Γι' αυτό και η ενδομίτωση έχει θεωρηθεί μια επαναλαμβανόμενη αποτυχημένη μίτωση. Ο πολυπλοειδισμός είναι μια φάση του κυτταρικού κύκλου που επιτρέπει στα μεγακαρυοκύτταρα να αυξάνουν το περιεχόμενό τους σε DNA. Ο αριθμός πλοειδίας κυμαίνεται από 8N έως 128N, μπορούν δηλαδή να φέρουν έως και 128 φορές το φυσιολογικό διπλοειδές DNA(3). Καθώς τα προγονικά κύτταρα διαφοροποιούνται προς ώριμα μεγακαρυοκύτταρα, αυξάνεται η έκφραση των αντιγόνων CD41 (που είναι η υπομονάδα  $\alpha_{IIb}$  του υποδοχέα GPIIb/IIIa του ινωδογόνου) και CD42 (που είναι η υπομονάδα Ib του υποδοχέα GPIb-IX-V του παράγοντα von Willebrand)(3).

### **ΡΥΘΜΙΣΗ ΤΗΣ ΜΕΓΑΚΑΡΥΟΠΟΙΗΣΗΣ**

#### **Η ΘΡΟΜΒΟΠΟΙΗΤΙΝΗ**

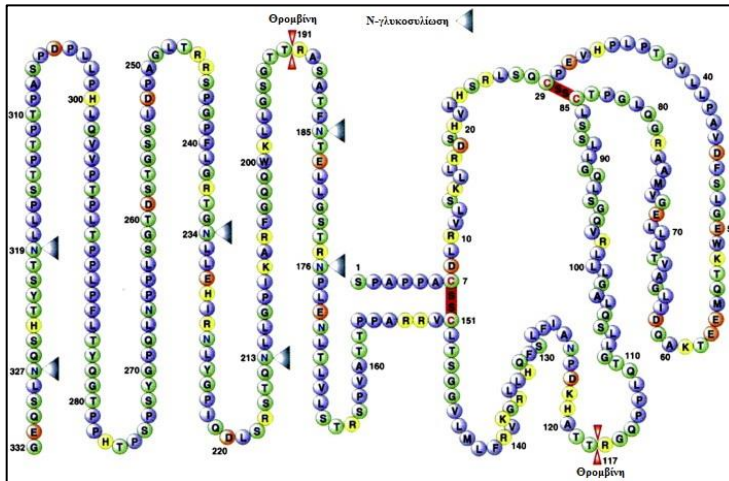
Η κυρίαρχη κυττοκίνη η οποία εμπλέκεται τόσο στη μεγακαρυοποίηση όσο και στη θρομβοποίηση (το σύνολο των διεργασιών που οδηγούν στην παραγωγή

αιμοπεταλίων) είναι η θρομβοποιητίνη (Thrombopoietin – εφεξής TPO)(5, 8, 9). Αυτό έχει αποδειχθεί με αρκετές μελέτες. Ενδεικτικά αναφέρεται ο Carver-Moore K. και οι συνεργάτες του, οι οποίοι έδειξαν ότι διαγονιδιακά ποντίκια τα οποία δεν εξέφραζαν την TPO ή τον υποδοχέα της, είχαν έως και 85% μειωμένα κυκλοφορούντα αιμοπετάλια και παρουσίαζαν επίσης εκσεσημασμένη μείωση της παρουσίας των μεγακαρυοκυττάρων στο μυελό των οστών(10). Η TPO περιγράφηκε για πρώτη φορά πάνω από 50 χρόνια πριν, όταν βρέθηκε ότι παρουσιάζει αυξημένη συγκέντρωση στο αίμα θρομβοπενικών ασθενών(11). Ασκεί τη δράση της μέσω του ομώνυμου υποδοχέα της ο οποίος εκφράζεται λιγότερο στην επιφάνεια των μεγακαρυοκυττάρων και των προγόνων τους και περισσότερο στην επιφάνεια των αιμοπεταλίων(5) όπως θα αναλυθεί παρακάτω. Όσον αφορά στα μεγακαρυοκύτταρα, η TPO προάγει την *in vitro* διαφοροποίηση των CFU-MK. Τα μεγακαρυοκύτταρα που παράγονται υπό την επίδρασή της έχουν αυξημένη πλοειδία(12). Υπάρχουν αντικρουόμενα δεδομένα για το εάν η TPO δρα από τα πρόδρομα στάδια της αιμοποίησης ή επηρεάζει μόνο κύτταρα τα οποία έχουν ήδη διαφοροποιηθεί προς τη μεγακαρυοκυτταρική σειρά. Αν και υπάρχουν μελέτες οι οποίες υποστηρίζουν την επίδραση της TPO και του υποδοχέα της στην πρόδρομη αιμοποίηση(13), τα νεότερα δεδομένα υποστηρίζουν την τελευταία άποψη κι έτσι το θέμα δεν έχει πλήρως αποσαφηνιστεί(5).

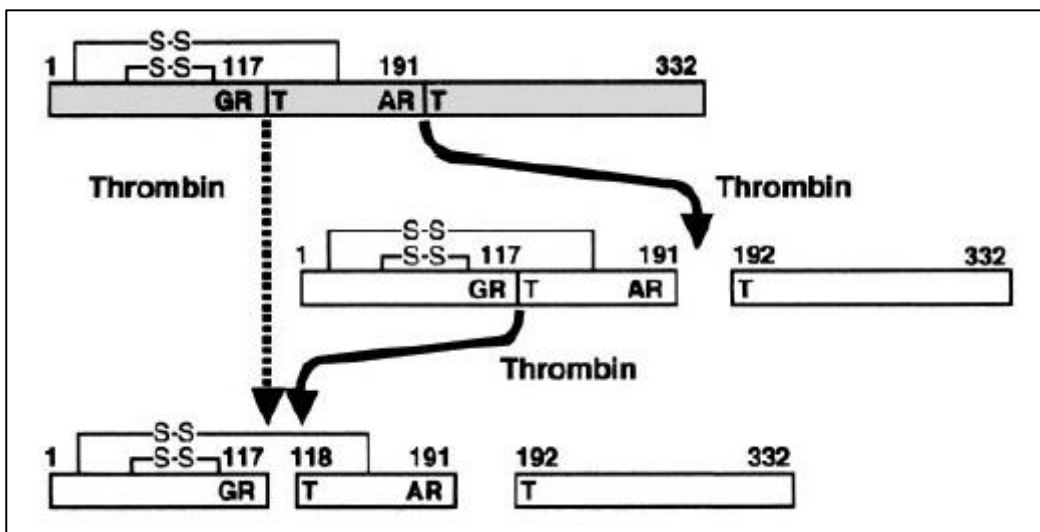
Η TPO παράγεται κυρίως στο ήπαρ και τα επίπεδά της ρυθμίζονται από τον ίδιο τον υποδοχέα της, αφού μετά την πρόσδεση η απομακρύνεται από την κυκλοφορία και καταστρέφεται μειώνοντας έτσι τα επίπεδά της στο αίμα(5). Ο Paul J. Fielder με τους συνεργάτες του απέδειξε το 1996 ότι η ρύθμιση των επιπέδων της TPO γίνεται από τα αιμοπετάλια μέσω του υποδοχέα της. Εκτέλεσε πειράματα που έδειξαν ότι η TPO διασπάται μόνο σε περιβάλλον πλάσματος πλούσιου σε αιμοπετάλια (Platelet Rich Plasma – εφεξής PRP) κι όχι σε περιβάλλον πλάσματος πτωχού σε αιμοπετάλια (Platelet Poor Plasma – εφεξής PPP)(14). Ο Takashi K. και οι συνεργάτες του προχώρησαν ακόμη παραπέρα. Το 1997 έδειξαν ότι στα πλαίσια του μεταβολισμού της από τα αιμοπετάλια η TPO υφίσταται επιλεκτική πρωτεόλυση από τη θρομβίνη (μια πρωτεάση που αποτελεί τον κύριο ρυθμιστή του καταρράκτη της πήξης και ενεργοποιεί διάφορα είδη κυττάρων όπως αιμοπετάλια και ενδοθηλιακά κύτταρα).

Έτσι, διασπάται σε συγκεκριμένα σημεία (εικ. 3). Αυτό συμβαίνει τόσο στα ανθρώπινα μόρια TPO, όσο και στον αρουραίων, των επιμύων και των σκύλων(9). Τα πειράματά τους περιελάμβαναν μόρια ανασυνδυασμένης ανθρώπινης TPO που επώαστηκαν με ανθρώπινα αιμοπετάλια παρουσία ασβεστίου, έτσι ώστε να είναι δυνατή η παραγωγή της θρομβίνης. Το αποτέλεσμα ήταν ότι τα μόρια της TPO διασπάστηκαν σε μικρότερα πεπτίδια. Αποδεικτικό ότι αυτό ήταν αποτέλεσμα της θρομβίνης υπήρξε το γεγονός ότι όταν στο πείραμα προστέθηκε η Ιρουδίνη (Hirudin) που αποτελεί τον αναστολέα της, η διάσπαση της TPO αναστάλη πλήρως. Το ίδιο συνέβη και όταν δεν έγινε προσθήκη ασβεστίου. Καθορίστηκαν έτσι τα δύο κυριότερα σημεία όπου η θρομβίνη ασκεί την πρωτεολυτική της δράση στο μόριο της TPO: το πρώτο ήταν στην αλληλουχία R<sup>191</sup>-T<sup>192</sup> της καρβοξυτελικής υπομονάδος όπου η θρομβίνη δρα αρχικά και το άλλο στην αλληλουχία R<sup>117</sup>-T<sup>118</sup> στην αμινοτελική υπομονάδα όπου η διάσπαση γίνεται αργότερα ύστερα από παρατεταμένη έκθεση στη θρομβίνη (εικ. 4). Απεδείχθη δηλαδή ότι η θρομβίνη ασκεί επιλεκτική δράση ανάλογα με το χρόνο επώασης. Ο λόγος που η αλληλουχία R<sup>117</sup>-T<sup>118</sup> είναι περισσότερο ανθεκτική στη δράση της θρομβίνης δεν αποσαφηνίστηκε πλήρως. Πιθανολογείται όμως ότι οφείλεται στη δομή της αμινοτελικής υπομονάδος. Πρέπει να αναφερθεί ότι σε *in vitro* μελέτες των ίδιων ερευνητών, η δραστηριότητα της TPO αυξήθηκε μετά την πρώτη διάσπαση στην αλληλουχία R<sup>191</sup>-T<sup>192</sup> αλλά μειώνεται πολύ ή καταστρέφεται μετά τη δεύτερη διάσπαση στην αλληλουχία R<sup>117</sup>-T<sup>118</sup> (9).

Η παραγωγή της TPO είναι συνεχής αλλά η απομάκρυνσή της (άρα και τα εναπομείναντα επίπεδα της στο αίμα που θα επηρεάσουν περαιτέρω τη (μεγακαρουο-



**Εικ. 3:** Το μόριο της ανθρώπινης θρομβοποιητινης. Δεξιά η αμινοτελική υπομονάδα με τους δύο δισουλφιδικούς δεσμούς. Αριστερά η καρβοξυτελική υπομονάδα(15). Με κόκκινα βέλη τα σημεία διάσπασης από τη δράση της θρομβίνης(9, 15).



**Εικ 4:** η διάσπαση της TPO από τη θρομβίνη. Αρχικά διασπάται η αλληλουχία  $R^{191}-T^{192}$ της καρβοξυτελικής υπομονάδας, δίνοντας έτσι γέννηση σε δύο πεπτίδια κι ύστερα η αλληλουχία  $R^{117}-T^{118}$  της αμινοτελικής υπομονάδας, οδηγώντας στη δημιουργία τριών πεπτιδίων (Thrombin: Θρομβίνη).

ποίηση) εξαρτάται από το σύνολο των υποδοχέων της (c-mpl) οι οποίοι εκφράζονται κυρίως στα αιμοπετάλια και λιγότερο στα μεγακαρυοκύτταρα. Όπως είναι λοιπόν επόμενο, καταστάσεις θρομβοκύτωσης αυξάνουν τη διάσπαση της TPO μειώνοντας τη μεγακαρυοποίηση, ενώ αντιθέτως καταστάσεις θρομβοπενίας οδηγούν σε αυξημένα επίπεδα της ορμόνης στο αίμα. Έτσι προωθείται η ανάκαμψη του χαμηλού πληθυσμού των μεγακαρυοκυττάρων και των αιμοπεταλίων(16).

### Η ΔΟΜΗ ΤΗΣ ΘΡΟΜΒΟΠΟΙΗΤΙΝΗΣ

Το αρχικό προϊόν της μετάφρασης του γονιδίου της ΤΡΟ είναι μία πρόδρομος πρωτεΐνη 353 αμινοξέων με μοριακό βάρος 35 kDa. Αφού αφαιρεθεί ένα τμήμα 21 αμινοξέων, η αλληλουχία των υπολοίπων 332 αμινοξέων υφίσταται γλυκοζυλίωση. Αυτό οδηγεί στην παραγωγή της ώριμης πρωτεΐνης με μοριακό βάρος 60 – 70 kDa. Πάνω από το 50% του τελικού μορίου της ΤΡΟ αποτελείται από υδρογονάνθρακες κι εκεί αποδίδεται το μεγαλύτερο μοριακό βάρος του ώριμου μορίου συγκριτικά με το πρόδρομο. Έχει αναφερθεί ετερογένεια όσον αφορά στο μοριακό βάρος της ΤΡΟ. Αυτό παρατηρήθηκε ιδιαίτερα στο πλάσμα θρομβοπενικών ασθενών όπου βρέθηκαν κατακερματισμένα μόρια ΤΡΟ με μοριακά βάρη από 18.000 έως 36.700(9).

Αποτελείται από δύο υπομονάδες: μία αμινοτελική την οποία αποτελούν τα αμινοξέα 1 έως 153 και μια καρβοξυτελική. Στην αμινοτελική υπομονάδα γίνεται η πρόσδεση της ΤΡΟ με τον υποδοχέα της, τον c-MPL(5) (εικ. 3). Έχει διατηρηθεί από είδος σε είδος και είναι ζωτικής σημασίας για τη λειτουργία της ΤΡΟ. Το γεγονός αυτό οφείλεται στους δύο δισουλφιδικούς δεσμούς που περιέχει. Η σημασία της συγκεκριμένης υπομονάδας έχει αποδειχθεί στο παρελθόν με πειράματα ανασυνδυασμένης ΤΡΟ, από την οποία αφαιρέθηκε η καρβοξυτελική υπομονάδα χωρίς όμως αυτό να οδηγήσει σε απώλεια της δραστηριότητάς της(15).

Η καρβοξυτελική υπομονάδα παρέχει στο μόριο της ΤΡΟ σταθερότητα και τον χρόνο ημίσειας ζωής της, ο οποίος είναι περίπου 20-40 ώρες. Χωρίς αυτήν, ο χρόνος ημίσειας ζωής της ΤΡΟ στην κυκλοφορία είναι μόλις λίγα λεπτά(5). Η υπομονάδα αυτή είναι λιγότερο διατηρημένη από είδος σε είδος.

### ΛΟΙΠΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΡΥΘΜΙΣΗΣ ΤΗΣ ΜΕΓΑΚΑΡΥΟΠΟΙΗΣΗΣ

Τα γονίδια που ρυθμίζουν τη φυσιολογική μίτωση έχουν κι εδώ σημαντικό ρυθμιστικό ρόλο. Για παράδειγμα τα CCND1 (cyclin D1) και CCND3 (cyclin D3)

αυξάνουν την πλοειδία των μεγακαρυοκυττάρων in vivo, ενώ αντιθέτως η απώλεια της λειτουργίας τους προκαλεί χαμηλή πλοειδία(3). Πως όμως ένας οργανισμός ο οποίος διαθέτει κύτταρα με τέτοιες ικανότητες διαφοροποίησης και πολλαπλασιασμού προστατεύεται από τη δημιουργία όγκων; Προφανώς έχοντας αναπτύξει ασφαλιστικές δικλίδες. Η κυρίαρχη θεωρία που επικρατεί είναι ότι η p53 (Tumor Protein 53, μία πρωτεΐνη καταστολής δημιουργίας όγκων η οποία στους ανθρώπους κωδικοποιείται από το γονίδιο TP53(17)) παρακολουθεί τον αριθμό των χρωμοσωμάτων που προκύπτουν από την ενδομίτωση και σταματά τη διαδικασία όταν χρειάζεται(3). Η ενδομίτωση ελέγχεται και στο επίπεδο της μεταγραφής από διάφορους παράγοντες όπως ο GATA – 1, ο FLI1, ο RUNX1 και ο serum response factor (SRF)(3).

Την ανάπτυξη των μεγακαρυοκυττάρων πυροδοτούν επίσης διάφορες κυτοκίνες. Έχει αποδειχθεί από τη δεκαετία του 1990 ότι η ιντερλευκίνη 3 (εφεξής IL-3) κι ο αυξητικός παράγοντας των κοκκιοκυττάρων και των μακροφάγων (granulocyte-macrophage colony-stimulating factor – εφεξής GM-CSF) προωθούν τον πολλαπλασιασμό των προγονικών κυττάρων των μεγακαρυοκυττάρων σε διάφορες καλλιέργειες(18-20). Πιο συγκεκριμένα, για την IL-3 έχουν υπάρξει στο παρελθόν μελέτες που ενθαρρύνουν τη χρησιμοποίησή της στην πρόληψη και την αντιμετώπιση της θρομβοπενίας μετά από χημειοθεραπεία(21), καθώς και στα μυελοδυσπλαστικά σύνδρομα σε συνδυασμό με άλλες κυτοκίνες(22). Τέλος, η βιβλιογραφία περιέχει δεδομένα τα οποία προτείνουν τη συνεργική δράση της IL-3 με την ιντερλευκίνη 11 (εφεξής IL-11) στο πεδίο της μεγακαρυοποίησης(23) καθώς και με την ιντερλευκίνη 6 (εφεξής IL-6)(24).

Η IL-6 είναι μία κυτοκίνη που παράγεται ύστερα από φλεγμονώδη ερεθίσματα από T-κύτταρα, ινοβλάστες και μακροφάγα. Ο θρομβοποιητικός της ρόλος ανακαλύφθηκε στα τέλη της δεκαετίας του 1990. Σε αντίθεση με τα αιμοπετάλια των οποίων ο αριθμός επηρεάζεται από την εξωγενή χορήγηση IL-6, στα μεγακαρυοκύτταρα βρέθηκε να μην επιδρά στον αριθμό τους αλλά μάλλον στην ωρίμανση, το μέγεθος και την πλοειδία τους(24-26). Η επίρεια της IL-6 στην πλοειδία των μεγακαρυοκυττάρων ίσως είναι δοσοεξαρτώμενη όπως έδειξε ο Burstein SA και οι συνεργάτες του σε πειράματα που πραγματοποιήθηκαν σε σκύλους(27).

Προκειμένου να αυξηθεί ο αριθμός των αποικιών των μεγακαρυοκυττάρων η συνεργική δράση της IL-6 φαίνεται να είναι απαραίτητη(28). Η IL-6 προάγει επίσης τη θρομβοποίηση μέσω αύξησης της έκφρασης της θρομβοποιητίνης στο ήπαρ(8, 29).

Η IL-11 ερεθίζει απευθείας την παραγωγή μεγακαρυοκυττάρων(8, 30, 31) και μειώνει τη θρομβοπενία(32). Αυτό αποδείχθη το 2000 από τον Saitoh M και τους συνεργάτες του. Στη μελέτη τους ανέλυσαν τα αποτελέσματα που είχε η χορήγηση ανασυνδυσασμένης ανθρώπινης IL-11 σε μυελοκατασταλμένους χιμπατζίδες. Η χορήγηση της IL-11 απέτρεψε τα ζώα από σοβαρή θρομβοπενία, ενώ τα αιμοπετάλια του περιφερικού αίματος επανήλθαν στο φυσιολογικό πολύ νωρίτερα από τη ομάδα ελέγχου. Επίσης παρατηρήθηκαν μεγαλύτερα μεγακαρυοκύτταρα στα ζώα αυτά, γεγονός που σημαίνει ότι η IL-11 κατάφερε να πυροδοτήσει μεγακαρυοποίηση σε ένα μυελοκατασταλμένο περιβάλλον(33). Στο ίδιο μοτίβο, ένα χρόνο μετά δοκίμασαν τη χορήγηση ανασυνδυσασμένης ανθρώπινης IL-11 σε μυελοκατεσταλμένα ποντίκια. Τα αποτελέσματα τους ήταν εντυπωσιακά κι έδειξαν ότι η θεραπεία με ανασυνδυσασμένη ανθρώπινη IL-11 αύξησε τον αριθμό των προδρόμων κυττάρων της μεγακαρυοκυτταρικής σειράς στο μυελό των οστών των πειραματοζώων. Αυτό οδήγησε σε αύξηση στον αριθμό των μεγακαρυοκυττάρων, τα οποία μάλιστα παρουσίαζαν αύξηση της πλοειδίας τους κατά έως και 64N. Επίσης έδειξαν μείωση τόσο στο βαθμό όσο και στη διάρκεια της περιφερικής θρομβοπενίας(34). Η ικανότητα της IL-11 να επάγει τη θρομβοποίηση σε ανοσοκατασταλμένους μυελούς των οστών έχει αποδειχθεί και σε δοκιμές με άλλα χημειοθεραπευτικά φάρμακα όπως η καρβοπλατίνη(35), γεγονός που ανοίγει νέους ορίζοντες στην αντιμετώπιση ή την πρόληψη της θρομβοπενίας σε χημειοθεραπευμένους ασθενείς . Έχει βρεθεί επίσης ότι δρα συνεργικά με την IL-3 για να προάγει το σχηματισμό και την ωρίμανση των μεγακαρυοκυττάρων(23). Αν και οι παραπάνω κυττοκίνες δεν είναι τόσο ζωτικής σημασίας για την ανάπτυξη του μεγακαρυοκυττάρου όσο η TPO, έρευνες έδειξαν ότι μόνη της αδυνατεί να οδηγήσει τα μεγακαρυοκύτταρα σε μεγάλους αριθμούς πλοειδίας ακόμα κι όταν προστίθεται σε μεγάλες συγκεντρώσεις. Έτσι είναι πλέον ξεκάθαρο ότι απαιτείται η συνεργική δράση διάφορων κυττοκινών εκτός της TPO για την πλήρη ανάπτυξη κι ωρίμανση των μεγακαρυοκυττάρων(5, 36).

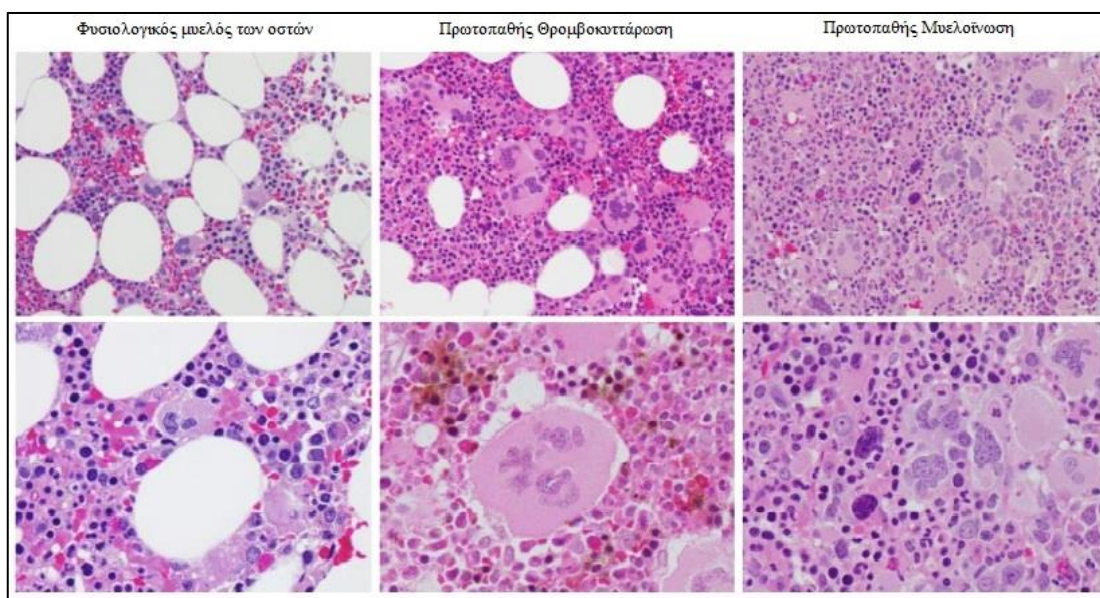


Αρκετές ουσίες έχει βρεθεί να ρυθμίζουν αρνητικά τη μεγακαρυοποίηση. Μια οικογένεια αυξητικών παραγόντων που ονομάζεται TGF-β (transforming growth factor β), περιέχει 5 ισομορφές. Η TGF-β<sub>1</sub> είναι η κυρίαρχη ισομορφή που εντοπίζεται σε αιμοποιητικούς ιστούς, ενώ τα α κοκκία των αιμοπεταλίων είναι ιδιαίτερα πλούσια σε αυτή. Οι TGF είναι γενικά αναστολείς της αιμοποίησης και ιδίως της δημιουργίας των μεγακαρυοκυττάρων. Ο Ishibashi T. κι οι συνεργάτες του έδειξαν μάλιστα το 1987 ότι η αρνητική ρυθμιστική τους δράση μπορεί να υπερσχύει της δράσης της IL-3. Ο αριθμός των μεγακαρυοκυττάρων σε ειδικά διαμορφωμένες καλλιέργειες που ανταποκρίθηκε θετικά στο ερέθισμα της IL-3 αυξάνοντας το μέγεθός τους, μειώθηκε από 20% έως 68% όταν στις καλλιέργειες αυτές προστέθηκε μαζί με την IL-3 ο TGFβ(37). Επίσης, Ο Kuter DJ κι οι συνεργάτες του απέδειξαν το 1992 ότι η πλοειδία και ο αριθμός των μεγακαρυοκυττάρων που καλλιεργούνται σε ορό, αυξάνεται όταν στις καλλιέργειες προστίθεται ένα αντίσωμα που εξουδετερώνει τον TGFβ. Επίσης, η μείωση της πλοειδίας που παρατηρείται στο πλάσμα θρομβοκυτταρικών αρουραίων αναστέλεται με την προσθήκη του ίδιου αντισώματος(38). Ο TGFβ ασκεί τις ανασταλτικές του ιδιότητες στη μεγακαρυοποίηση διακόπτοντας τον κυτταρικό κύκλο σε δύο σημεία: στη φάση G1 και στη φάση S.

Ένας άλλος παράγοντας ο οποίος ρυθμίζει αρνητικά τη μεγακαρυοποίηση είναι ο αιμοπεταλιακός παράγοντας 4 (Platelet Factor 4 – εφεξής PF4). Είναι ένας παράγοντας που συντίθεται κυρίως από τα μεγακαρυοκύτταρα(8). Ο Gewirtz AM κι οι συνεργάτες του έδειξαν το 1989 ότι ο σχηματισμός μεγακαρυοκυττάρων αναστάλη κατά 80% σε μη ενεργοποιημένες καλλιέργειες και κατά 58% σε καλλιέργειες όπου είχαν προστεθεί IL-3 και GM-CSF, όταν σε αυτές προστέθηκε ανθρώπινος PF4(39). Η σχετική με τον υποδοχέα της LDL πρωτεΐνη 1 (low-density lipoprotein receptor-related protein 1 – εφεξής LRP1) έχει βρεθεί στο παρελθόν ότι επάγει την αρνητική απάντηση των κυττάρων στον PF4. Η Lambert MP και οι συνεργάτες της έδειξαν ότι η LRP1 απουσιάζει από τα αιμοπετάλια και τα MEP (έτσι δεν ασκείται η αρνητική επίδραση του PF4 και είναι δυνατή η διαφοροποίηση προς μεγακαρυοκύτταρα) ενώ παρουσιάζει μέγιστη συγκέντρωση στα μεγάλα, πολυπλοειδή μεγακαρυοκύτταρα. Επίσης έδειξαν ότι μπλοκάροντας την LRP1 ή περιορίζοντας την έκφρασή της

ανεστάλη ή περιορίστηκε η αρνητική επίδραση του PF4 σε αποικίες μεγακαρυοκυττάρων, οι οποίες άρχισαν να αυξάνονται(8). Αρνητική επίδραση στη δημιουργία των μεγακαρυοκυττάρων ασκούν τέλος η β-θρομβοσφαιρίνη και η ιντερφερόνη-α(40). Συνεπώς, η μέτρια έως σοβαρή θρομβοπενία αποτελεί γνωστή παρενέργεια κατά τη θεραπεία ασθενών με χρόνια ηπατίτιδα.

Απώλεια του ελέγχου σε οποιοδήποτε επίπεδο μπορεί να προκαλέσει υπερπολλαπλασιασμό των μεγακαρυοκυττάρων και να μεταβάλλει τον αριθμό των αιμοπεταλίων του περιφερικού αίματος, οδηγώντας έτσι σε πρωτοπαθή θρομβοκυττάρωση ή πρωτοπαθή μυελοίνωση, δύο γνωστά μυελουπερπλαστικά νοσήματα. Ο μυελός των οστών στην πρωτοπαθή θρομβοκυττάρωση παρουσιάζει χαρακτηριστικές αλλοιώσεις, όπως αυξημένη κυτταροβρίθεια με εκσεσημασμένη υπερπλασία των μεγακαρυοκυττάρων τα οποία παρουσιάζουν επίσης αυξημένη πλοειδία, όχι όμως αλλοίωση της της μορφολογίας τους. Αντιθέτως στην πρωτοπαθή μυελοίνωση παρουσιάζονται δυσπλαστικά μεγακαρυοκύτταρα και ίνωση του μυελού των οστών (εικ. 5). Οι ασθενείς αυτοί παρουσιάζουν σπληνομεγαλία ενώ στο περιφερικό αίμα παρατηρούνται δύσμορφα ερυθρά και τεράστια αιμοπετάλια(3).



**Εικ. 5:** Σύγκριση του φυσιολογικού μυελού των οστών με αυτόν ασθενούς με πρωτοπαθή θρομβοκυττάρωση και πρωτοπαθή μυελοίνωση.

### Η ΔΟΜΗ ΤΟΥ ΜΕΓΑΚΑΡΥΟΚΥΤΤΑΡΟΥ

Η αναγνώριση των μεγακαρυοκυττάρων στο μικροσκόπιο διευκολύνεται από την τεράστια διάμετρός τους (50-100 $\mu$ m) και τον πολυλοβωτό, πολυπλοειδή πυρήνα τους ο οποίος περιέχει τα άφθονα αντίγραφα του γενετικού υλικού. Κάθε λοβός αντιπροσωπεύει ένα αντίγραφο διπλοειδούς DNA. Όσο περισσότερα τέτοια αντίγραφα φέρει ένα μεγακαρυοκύτταρο, τόσο μεγαλύτερο είναι σε μέγεθος. Όσο εξελίσσεται ο ανθρώπινος οργανισμός από την εμβρυική στην ενήλικη ζωή τα μεγακαρυοκύτταρα αυξάνουν σε πλοειδία. Για παράδειγμα τα μεγακαρυοκύτταρα ενός νεαρού εμβρύου φέρουν πλοειδία της τάξης του 2N και 4N, ενώ στις είκοσι εβδομάδες κύησης της τάξης του 8N. Περίπου τα μισά από τα μεγακαρυοκύτταρα που αναγνωρίζονται στο μικροσκόπιο θα έχουν στην περιφέρεια τους νεοσχηματισθέντα αιμοπετάλια.

Η μεμβράνη του μεγακαρυοκυττάρου είναι πολύ μεγάλη σε μήκος και εισέρχεται μέσα στο κύτταρο δημιουργώντας το περιχαρακωμένο μεμβρανικό σύστημα, διαμερίσματα δηλαδή τα οποία θα αποκοπούν κι έτσι θα δημιουργηθούν τα αιμοπετάλια. Τόσο η κυτταρική μεμβράνη όσο και οι μεμβράνες του περιχαρακωμένου μεμβρανικού συστήματος φέρουν γλυκοπρωτεϊνικούς υποδοχείς IIbIIIa (υποδοχείς για το ινοδογόνο), Ib-IX-V (υποδοχείς για τον παράγοντα vW) και γλυκοπρωτεϊνικούς υποδοχείς για το κολλαγόνο. Η δημιουργία των παραπάνω υποδοχέων λαμβάνει χώρα χρονικά πρώτα στην κυτταρική μεμβράνη και ύστερα στο περιχαρακωμένο μεμβρανικό σύστημα.

Το κυτταρόπλασμα των μεγακαρυοκυττάρων ουσιαστικά κληροδοτείται στα αιμοπετάλια όταν αποσπώνται από αυτό, διότι τα τελευταία έχουν πολύ μικρή δυνατότητα παραγωγής πρωτεϊνών, λόγω έλλειψης πυρήνα. Με το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο διακρίνονται τα παρακάτω είδη κοκκίων(41):

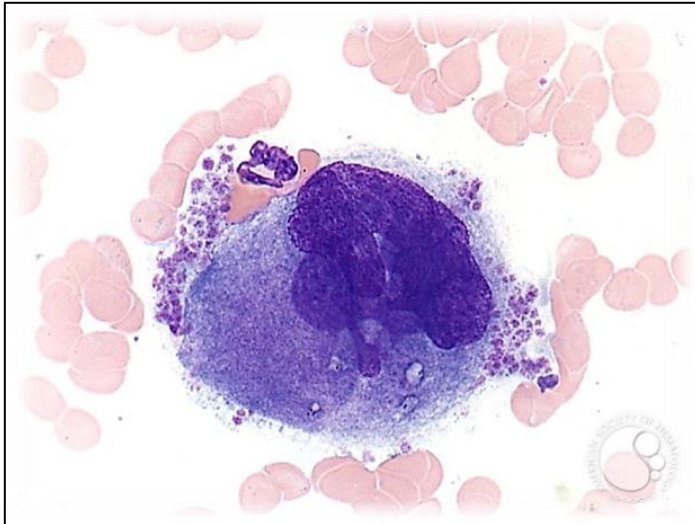
1.  $\alpha$ -κοκκία: σχηματίζονται παράλληλα με την ωρίμανση του μεγακαρυοκυττάρου. Ανώριμα μεγακαρυοκύτταρα περιέχουν μικρά και ανώριμα  $\alpha$ -κοκκία τα οποία μεγαλώνουν όσο τα μεγακαρυοκύτταρα που τα περιέχουν ωριμάζουν. Έχουν διάμετρο 300 – 500 nm, είναι τα πολυπληθέστερα και σχηματίζονται πολύ νωρίς στην εξέλιξη του

μεγακαρυοκυττάρου πριν απο το περιχαρακωμένο μεμβρανικό σύστημα, ενώ περιέχουν πολλές πρωτείνες των αιμοπεταλίων σημαντικές για την πήξη του αίματος όπως: i) τον αιμοπεταλιακό παράγοντα 4 (PF4) που ρυθμίζει αρνητικά τη μεγακαρυοποίηση, εξουδετερώνει την αντιπηκτική δράση της ηπαρίνης, ρυθμίζει την αγγειακή διαπερατότητα και τη χημειοταξία μονοκυττάρων και ουδετεροφύλων, ii) τον παράγοντα Von Willebrand που επάγει την προσκόλληση των αιμοπεταλίων στις περιοχές βλάβης του αγγειακού ενδοθηλίου αλλά και παράγοντες πήξης (ινωδογόνο, παράγοντα V), iii) θρομβοσπονδίνη η οποία είναι μια πρωτεΐνη υπεύθυνη για τη συσσώρευση και την προσκόλληση των αιμοπεταλίων κατά τη διαδικασία της πήξης, iv) τον αυξητικό παράγοντα αιμοπεταλιακής προέλευσης (platelet derived growth factor) ο οποίος εμπλέκεται στη διαδικασία επιδιόρθωσης φθαρμένων αγγείων.

2. δ – κοκκία ή πυκνά κοκκία: έχουν διάμετρο 250 – 300 nm. Όταν τα αιμοπετάλια αποσπαστούν από το μεγακαρυοκύτταρο, τα κοκκία αυτά εμπλουτίζονται με ουσίες οι οποίες εμπλέκονται στη συσσώρευση των αιμοπεταλίων όπως: i) σεροτονίνη (δε παράγεται στα μεγακαρυοκύτταρα αλλά απορροφάται από το πλάσμα), ii) ιόντα ασβεστίου, iii) ATP και ADP (παράγονται στα μεγακαρυοκύτταρα).

3. Λυσοσωματικά κοκκία (διάμετρος 175 – 250 nm) τα οποία αναγνωρίζονται στα πρώιμα μεγακαρυοκύτταρα και σχηματίζονται πολύ πριν το σχηματισμό των α – κοκκίων. Φέρουν δύο ομώνυμα ένζυμα, αρχικά μέσα σε μικρά κυστίδια διαμέτρου περίπου 70nm. Αυτά τα κυστίδια συγχωνεύονται για να σχηματίσουν μεγαλύτερα κατά την εξέλιξη του μεγακαρυοκυττάρου ενώ επίσης αυξάνουν σε αριθμό.

4. Μικροϋπεροξειδιοσωματικά κοκκία (διάμετρος 90 nm) με ενζυμική δραστηριότητα υπεροξειδάσης.



**Εικ. 6:** Ένα ώριμο μεγακαρυοκύτταρο από το οποίο αποσπώνται αιμοπετάλια προς την περιφέρεια. Αναγνωρίζεται ο πολυλοβωτός πυρήνας, ενδεικτικός της υψηλής πλοειδίας του κυττάρου, καθώς και τα κοκκία τα οποία κληροδοτούνται από το κυτταρόπλασμα του μεγακαρυοκυττάρου στα νέα αιμοπετάλια.

### ΤΟ ΑΙΜΟΠΕΤΑΛΙΟ

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, το αιμοπετάλιο παράγεται αποσπώμενο κατά τη θραυσματοποίηση του κυτταροπλάσματος του ώριμου μεγακαρυοκυττάρου και λαμβάνει από αυτό τα περισσότερα συστατικά του. Θα παραμείνει στην κυκλοφορία για περίπου 8 έως 12 ημέρες. Η απόσπαση γίνεται από προεξοχές δίκην ψευδοποδίων της κυτταρικής μεμβράνης των μεγακαρυοκυττάρων που ονομάζονται προαιμοπετάλια (proplatelets), έως ότου να εξαντληθεί όλο το απόθεμα σε κυτταρικές μεμβράνες, οργανίδια, κοκκία και διαλυτά μακρομόρια. Έχει υπολογιστεί ότι κάθε μέρα ένας μέσος ενήλικας παράγει  $1 \times 10^{11}$  αιμοπετάλια, αριθμός που μπορεί να αυξηθεί έως και δέκα φορές σε καταστάσεις αυξημένης ζήτησης(42), ενώ κάθε μεγακαρυοκύτταρο μπορεί να παράγει από 1000 έως 3000 αιμοπετάλια(43). Η εναπομείνουσα κυτταρική μάζα απομακρύνεται με φαγοκυττάρωση από τα μακροφάγα(44). Το αιμοπετάλιο εμπλέκεται στη φυσιολογική διαδικασία της αιμόστασης αλλά και στην επικίνδυνη διαδικασία της θρόμβωσης.

Τα αιμοπετάλια παρουσιάζουν ετερογένεια. Ποικίλλουν σε αριθμό, μέγεθος, πυκνότητα, ηλικία αλλά και αποτελεσματικότητα. Μια σημαντική κλινική παρατήρηση που επιβεβαιώνει τα παραπάνω προκύπτει από το γεγονός ότι ασθενείς με σοβαρή θρομβοκυττοπενία παρουσιάζουν μικρή ή και καθόλου αιμορραγία,

φέρουν όμως μορφολογικά τεράστια αιμοπετάλια. Φαίνεται δηλαδή ότι λίγα «υπερλειτουργικά» αιμοπετάλια μπορεί να αντισταθμίσουν το χαμηλό αριθμό λόγω της αυξημένης αποτελεσματικότητάς τους(45). Έχει βρεθεί ότι τα νεαρά αιμοπετάλια είναι μεγαλύτερα σε μέγεθος, πυκνότερα, περιέχουν περισσότερες πρωτεΐνες και παρουσιάζουν ορισμένες λειτουργικές διαφορές συγκρινόμενα με τα μικρότερα. Τα αιμοπετάλια που έχουν ήδη κυκλοφορήσει στο περιφερικό αίμα, χάνουν μέγεθος κατά τη διάρκεια της ζωής τους αποβάλλοντας ορισμένα στοιχεία της επιφανείας τους, τα οποία συμμετέχουν σε αιμοστατικές διαδικασίες χωρίς να απαιτείται η ολική αχρήστευση του κυττάρου.

Η σήμανση των αιμοπεταλίων με  $^{51}\text{Cr}$  έχει ευρέως χρησιμοποιηθεί(46). Η μεταμόσχευση αιμοπεταλίων τα οποία έχουν σημανθεί με  $^{51}\text{Cr}$ , δείχνει ότι τα 2/3 παραμένουν στην κυκλοφορία (σε αντίθεση με το 100% σε ασθενείς με σπληνεκτομή). Επιπροσθέτως, η χορήγηση επινεφρίνης, η οποία απελευθερώνει τα αιμοπετάλια από το σπλήνα, αυξάνει τον αριθμό τους στην περιφέρεια κατά 30 – 50%. Τα παραπάνω οδηγούν στο συμπέρασμα ότι το εναπομείνον ποσό αιμοπεταλίων αποθηκεύεται στο σπλήνα κι ανταλλάσσεται ελεύθερα με τα αιμοπετάλια της περιφέρειας.

### **Η ΔΟΜΗ ΤΟΥ ΑΙΜΟΠΕΤΑΛΙΟΥ**

Στο περιφερικό αίμα, τα αιμοπετάλια υπάρχουν σε δύο καταστάσεις: ενεργοποιημένη και αδρανή. Στην αδρανή φάση εκτελούν μόνο βασικές μεταβολικές λειτουργίες, ενώ ενεργοποιούνται ως απάντηση σε ερεθίσματα αγωνιστών (π.χ θρομβίνη). Στην ηρεμία έχουν τη μορφή επίπεδων δίσκων με ομαλό περίγραμμα και τυχαία ανοίγματα ενός ενδοκυττάριου δικτύου, που ονομάζεται «συνδεδεμένο με την επιφάνεια σύστημα αγωγών» (surface-connected canalicular system – SCCS) ή αλλιώς «ανοιχτό σύστημα αγωγών» (open canalicular system – OCS) μέσω του οποίου σε κατάσταση ενεργοποίησης, τα κυτταροπλασματικά κοκκία θα εξωκυτταρώσουν το περιεχόμενό τους(47, 48). Σε αντίθεση με τα ευκαρυωτικά κύτταρα, τα αιμοπετάλια

δε φέρουν πυρήνα, αποτελούνται όμως από ένα σύνολο δομών και οργανιδίων απαραίτητων για τη φυσιολογική αιμόσταση. Η δομή ενός φυσιολογικού αιμοπεταλίου αποτελείται από τα παρακάτω:

### ΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΜΕΜΒΡΑΝΗ

Πρόκειται για μια φωσφολιπιδική διπλοστοιβάδα εξαιρετικά πολύπλοκη τόσο σε σύνθεση όσο και σε διάταξη και λειτουργία. Ενσωματώνει ένα μεγάλο αριθμό γλυκοπρωτεϊνών και λιπιδίων και διαδραματίζει κυρίαρχο ρόλο για το αιμοπετάλιο σε τομείς διαπερατότητας, ερεθισμού από αγωνιστές, συσσώρευσης αιμοπεταλίων, ενεργοποίησης, έκκρισης και προσκόλλησης. Διαπερνάται από ένα πλήθος διαμεμβρανικών αιμοπεταλιακών υποδοχέων, όπως είναι ο γλυκοπρωτεϊνικός υποδοχέας ιντεγκρίνης IIbIIIa, ο οποίος αποτελεί και το ουσιαστικό αντικείμενο του παρόντος συγγράμματος. Εκεί βρίσκεται και το μεγαλύτερο ποσοστό των λιπιδίων του αιμοπεταλίου (περίπου 60%), τα οποία διανέμονται ασύμμετρα, με τα ουδέτερα μόρια να κατανέμονται κυρίως προς την επιφάνεια και τα ανιόντα, όπως η φωσφατίδυλοσερίνη, προς το εσωτερικό. Η κατανομή αυτή έχει ιδιαίτερη σημασία για τη λειτουργία του αιμοπεταλίου: όπως είναι γνωστό, οι ενεργοποιημένες μορφές των παραγόντων πήξης X και V, δημιουργούν, παρουσία ασβεστίου, σύμπλεγμα επάνω στη φωσφολιπιδική στοιβάδα του αιμοπεταλίου προκειμένου να μετατρέψουν την προθρομβίνη σε θρομβίνη (σύμπλεγμα προθρομβινάσης) που είναι και ο κύριος ρυθμιστής του καταρράκτη της πήξεως. Έχει αποδειχθεί ότι η φωσφατίδυλοσερίνη παίζει κυρίαρχο ρόλο στο θέμα της σύνδεσης του συμπλέγματος προθρομβινάσης με τη φωσφολιπιδική επιφάνεια του αιμοπεταλίου(49-51). Συνεπώς, ένα ανενεργό αιμοπετάλιο, φέροντας τα μόρια της φωσφατιδυλοσερίνης «στραμμένα» προς τα έσω, δε μπορεί να συμμετάσχει στο σχηματισμό θρομβίνης κι αυτός είναι ένας από τους πολλούς μηχανισμούς που προστατεύουν τον οργανισμό από την κακοήγη δημιουργία θρόμβων. Ένα άλλο σημείο στο οποίο η φωσφολιπιδική αιμοπεταλιακή διπλοστοιβάδα συνεισφέρει στην πήξη, είναι η μετατροπή του παράγοντα X στην ενεργοποιημένη μορφή του Xa (παρουσία ασβεστίου)(52). Τέλος φέρει αντλίες ασβεστίου – νατρίου ATPάσης,

ιδιαίτερα σημαντικές για τη διατήρηση της ομοιοστασίας των ιόντων. Η παραπάνω μεμβράνη μαζί με το ενδοκυττάριο δίκτυο περιβάλλονται από ένα στρώμα γλυκοκάλυκα, πάχους περίπου 15 – 20 nm, το οποίο αλληλεπιδρά τόσο με το πλάσμα, όσο και με τα έμμορφα στοιχεία του αίματος. Πρόκειται για ένα στρώμα λιπιδίων, σακχάρων και πρωτεϊνών, το οποίο αποτελεί μεταφορικό μέσο για τις πρωτεΐνες του πλάσματος οι οποίες μέσω ενδοκύττωσης απορροφώνται από τα κοκκία προκειμένου να χρησιμοποιηθούν για έκκριση. Είναι αρνητικά φορτισμένο λόγω της ύπαρξης σιαλικών οξέων συνδεδεμένων στις πρωτεΐνες και τα λιπίδια, γεγονός το οποίο δυσκολεύει τη συγκόλληση τόσο γειτονικών αιμοπεταλίων όσο και τη συγκόλληση αιμοπεταλίων με το ενδοθήλιο αγγείων. Φέροντας στην εξωτερική του επιφάνεια μεγάλο αριθμό τόσο γλυκοπρωτεϊνικών υποδοχέων συγκόλλησης όσο και υποδοχέων αγωνιστών συσσώρευσης, ο γλυκοκάλυκας συμμετέχει ενεργά σε όλες τις λειτουργίες του αιμοπεταλίου, εντός των οποίων και η αιμόσταση(53). Οι υποδοχείς που εντοπίζονται στη μεμβράνη του γλυκοκάλυκα προσδένουν μια ποικιλία αγωνιστών πήξεως, συσσώρευσης και προσκόλλησης. Πιο συγκεκριμένα, εντοπίζονται ιντεγκρίνες, υποδοχείς για τις σελεκτίνες (GMP 140 ή P-σελεκτίνη), για τις ανοσοσφαιρίνες, για τη διφωσφορική αδενοσίνη (Adenosine Diphosphate – ADP), το κολλαγόνο, την επινεφρίνη, τη θρομβίνη κ.τ.λ(54).

### ΜΕΜΒΡΑΝΙΚΑ ΣΥΣΤΗΜΑΤΑ

Τα αιμοπετάλια έχουν λειτουργίες που προσομοιάζουν αυτές μυικών κυττάρων κι αυτό φαίνεται τόσο από τη υψηλή περιεκτικότητά τους σε ακτίνη όσο και στη συσπαστική αντίδρασή τους κατά την ενεργοποίηση. Παρόμοιες ιδιότητες φαίνεται να έχουν και τα δύο μεμβρανικά συστήματα των αιμοπεταλίων, το SCCS ή OCS και το πυκνό σωληναριακό σύστημα (dense tubular system - DTS).

Το SCCS αποτελεί συνέχεια της κυτταρικής μεμβράνης κι ως εκ τούτου έρχεται σε επαφή με την επιφάνεια του κυττάρου ενώ διασχίζει το κυτταρόπλασμα σε ένα ελικοειδές μοτίβο. Ο γλυκοκάλυκας δεν εισέρχεται μέσα στο SCCS. Ο υποδοχέας IIb/IIIa εντοπίζεται τόσο στην επιφάνεια όσο και σε όλη την έκταση του συστήματος. Ο ρόλος του SCCS είναι πολυδιάστατος: αποτελεί αποθηκευτικό χώρο μεμβρανών οι



οποίες χρησιμοποιούνται όταν το κύτταρο εκτείνεται και δημιουργεί ψευδοπόδια κατά την ενεργοποίηση, αυξάνοντας έτσι το εμβαδό της επιφανείας του(55), αλλά και αποθηκευτικό χώρο γλυκοπρωτεϊνών, όπως της Ib-IX-V και της IIbIIIa της οποίας η συγκέντρωση στην επιφάνεια αυξάνεται κατά τον ερεθισμό του κυττάρου από αγωνιστές συσώρευσης(56). Παρέχει επίσης διόδους τόσο έκκρισης για το περιεχόμενο των κοκκίων όσο και εισόδου – εξόδου στα μόρια που ανταλλάσσονται ανάμεσα στο κύτταρο και το πλάσμα.

Αντιθέτως το DTS αποτελεί ένα κλειστό σύστημα στενών αγωγών, δηλαδή ένα ενδομεμβρανικό σύστημα, το οποίο δεν επικοινωνεί ούτε με την κυτταρική μεμβράνη, ούτε με τα κοκκία. Έχει διάμετρο περίπου 40 – 60 nm και περιορισμένη μεμβρανική έκταση. Εντοπίζεται κοντά στην κυτταρική μεμβράνη και τους μικροσωληνίσκους(41). Στην ουσία πρόκειται για υπολειμματικό ενδοπλασματικό δίκτυο το οποίο προέρχεται απευθείας από το μεγακαρυοκύτταρο. Σε αντίθεση με το SCCS που απεικονίζεται ως ελεύθερα κανάλια, το DTS είναι γεμάτο από μία άμορφη μάζα, περίπου τόσο αδιαφανή όσο και το κυτταρόπλασμα. Ο ρόλος του συνοψίζεται στην αποθήκευση ασβεστίου (η ποσότητα που αποθηκεύεται εδώ αποτελεί το 30% περίπου του συνολικού ασβεστίου του αιμοπεταλίου) και μιας σειράς ενζύμων σημαντικών για τον έλεγχο της αιμοπεταλιακής ενεργοποίησης. Ως εκ τούτου θεωρείται αιμοπεταλιακό οργανίδιο(41). Στο DTS εντοπίζονται επίσης υπεροξειδάση και αδενυλική κυκλάση (cAMPase – ένας ακόμα σημαντικός ρυθμιστής της ενεργοποίησης του αιμοπεταλίου)(57, 58), ενώ στις μεμβράνες του υπάρχουν αντλίες ATPάσης που ονομάζονται ATPάσες ασβεστίου σαρκοπλασματικού ενδοπλασματικού δικτύου (sarcoplasmic endoplasmic reticulum calcium ATPases – SERCAs) οι οποίες (λόγω της γειτνίασης του DTS με την κυτταρική μεμβράνη) βρίσκονται σε στενή συσχέτιση με τις ATPάσες ασβεστίου της πλασματικής μεμβράνης (plasma membrane calcium ATPases)(41). Το σύστημα αυτό διαδραματίζει σπουδαίο ρόλο στη ρύθμιση του ενδοκυττάρου ασβεστίου. Οι ATPάσες ελέγχονται από τα κυτταροπλασματικά επίπεδα του cAMP το οποίο κρατά το ασβέστιο αποθηκευμένο στο DTS. Η μείωση των επιπέδων του οδηγεί σε απελευθέρωση του ασβεστίου από το DTS προς το κυτταρόπλασμα. Η κυτταροπλασματική συγκέντρωση ασβεστίου αποτελεί τον πρωταρχικό παράγοντα

για την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων. Όταν αυτή ξεπεράσει ένα επίπεδο, το αιμοπετάλιο ενεργοποιείται κι εκκρίνει το περιεχόμενο των κοκκίων του. Το DTS αποτελεί επίσης μέρος σύνθεσης των προσταγλαδινών(59) αφού εδώ λαμβάνει χώρα ο μεταβολισμός του αραχιδονικού οξέος (Arachidonic Acid – AA) προς θρομβοξάνη  $A_2$  (Thromboxane – εφεξής  $TXA_2$ ), μέσω ενζύμων που ονομάζονται κυκλοξυγενάσες. Κατά την ενεργοποίηση, η  $TXA_2$  εξωκυτταρώνεται βρίσκει τον υποδοχέα της στην επιφάνεια του αιμοπεταλίου και συνεισφέρει στην ενεργοποίηση του αιμοπεταλίου, ενισχύοντάς τη παραπέρα(41).

### Ο ΚΥΤΤΑΡΟΣΚΕΛΕΤΟΣ

Τόσο το σχήμα των αιμοπεταλίων όσο και η δυνατότητά τους να συστέλλονται και να εκτείνονται οφείλεται σε ένα σκελετό νηματίων και σωληνίσκων, τον κυτταροσκελετό. Ρυθμίζει τις αλλαγές στο σχήμα του αιμοπεταλίου, δημιουργεί τα ψευδοπόδια, ρυθμίζει την έκκριση από τα εκκριτικά κοκκία κι επηρεάζει την αντίδραση της επιφάνειας του κυττάρου σε διάφορα ερεθίσματα. Ο ρόλος του κυτταροσκελετού επιτυγχάνεται χάρη στις τρεις ξεχωριστές δομές του: i) το σκελετό της μεμβράνης (ή υπομεμβρανικό σκελετό) που αποτελεί έρεισμα για την έσω επιφάνεια της κυτταρικής μεμβράνης διατηρώντας, σε συνδυασμό με τους μικροσωληνίσκους (βλ. παρακάτω), το δισκοειδές σχήμα του ήρεμου αιμοπεταλίου. Πρόκειται για μια συνάθροιση μικρών νηματίων ακτίνης αγκυροβολημένων στην κυτταρική μεμβράνη τα οποία εκτός από τον παραπάνω ρόλο τους, συνδέουν τους υποδοχείς της επιφανείας με τον κύριο όγκο νηματίων ακτίνης που βρίσκεται στο κυτταρόπλασμα. Έτσι ρυθμίζεται η κινητικότητά τους στην επιφάνεια. Για παράδειγμα ο σκελετός της μεμβράνης συνδέεται με το κυτταροπλασματικό τμήμα του γλυκοπρωτεϊνικού υποδοχέα GPIb-IX-V όπως επίσης και με του GPIIb/IIIa. Ένα πλήθος πρωτεϊνών που σχετίζονται με το σκελετό της μεμβράνης έχουν ανακαλυφθεί, όπως η σπεκτρίνη και η ταλίνη, με ρόλους πρόσδεσης και μεταγωγής σήματος. ii) την κυτταροπλασματική ακτίνη και τα ενδιάμεσα νημάτια τα οποία βρίσκονται άφθονα στο κυτταρόπλασμα (ονομάζονται επίσης ζώνη Sol – gel). Αποτελεί το μεγαλύτερο μέρος του κυτταροσκελετού και το 25% των πρωτεϊνών του

αιμοπεταλίου. Άλλες αιμοπεταλιακές κυτταροσκελετικές πρωτεΐνες, όπως η τροπομοουσίνη, υπάρχουν σε μικρότερες ποσότητες. Η ακτίνη εμφανίζεται είτε σε μορφή μονομερούς (G – ακτίνη), είτε σε μορφή νηματίου (F – ακτίνη) και συνδέεται με το μεμβρανικό σκελετό. Σε κατάσταση ηρεμίας, μόνο το 40% της ακτίνης του αιμοπεταλίου βρίσκεται σε μορφή μικροϊνιδίων διασκορπισμένων στο κυτταρόπλασμα, τα οποία δεν είναι ορατά αφενώς λόγω του μικρού μεγέθους τους κι αφετέρου λόγω των διαφόρων οργανιδίων του αιμοπεταλίου που τα αποκρύπτουν, όπως για παράδειγμα τα κοκκία. Τα διάμεσα ινίδια είναι πιο ανθεκτικές και ισχυρές κατασκευές και φαίνεται να είναι επιφορτισμένα με τάσεις μέσα στο κυτταρόπλασμα. Η ζώνη Sol – gel εμπλέκεται ενεργά στη διαδικασία ενεργοποίησης του αιμοπεταλίου η οποία χαρακτηρίζεται από έκδηλες αλλαγές στη δομή του κυτταροσκελετού. Μορφολογικά, το κύτταρο χάνει το ήρεμο, συμμετρικό δισκοειδές σχήμα του, γίνεται σφαιρικό κι εκτείνει ψευδοπόδια. Μέσω των πυκνών σωληναρίων, παρατηρείται άυξηση στην ενδοπλασματική συγκέντρωση ασβεστίου που οδηγεί σε ραγδαία αύξηση της F – ακτίνης κατά 60%-70%(60). Τα μονομερή της ακτίνης (G – ακτίνη) πολυμερίζονται σε ινίδια ακτίνης στην περιφέρεια του αιμοπεταλίου και δημιουργούν δεσμίδες οι οποίες χρησιμοποιούνται για να υποστηρίξουν το σχηματισμό των ψευδοποδιών(61). Η μυοσίνη φωσφορυλιώνεται με αποτέλεσμα τη σύνδεση της με την ακτίνη, γεγονός που παρέχει τις απαραίτητες τάσεις για τη συγκέντρωση των κοκκίων, προκειμένου να είναι έτοιμα για έκκριση και για την κίνηση των ψευδοποδιών. iii) Μικροσωληνίσκοι: πρόκειται για μία δεσμίδα κυκλοτερών μικροσωληνίσκων που χρησιμεύει στην υποστήριξη του δισκοειδούς σχήματος του αιμοπεταλίου στη φάση της ηρεμίας(62). Αποτελούνται από δύο πρωτεΐνες – υπομονάδες την  $\alpha$  και  $\beta$  τουμπουλίνη. Το έρεισμα των μικροσωληνίσκων, με πάχος περίπου 25 nm, βρίσκεται ακριβώς δίπλα από την κυτταρική μεμβράνη, χωρίς όμως να έρχεται σε επαφή μαζί της. Στην ηρεμία, οι μικροσωληνίσκοι είναι δομές πολυμερών ενώ στη φάση της ενεργοποίησης αποσυντίθεται με σκοπό αργότερα να δημιουργηθούν και πάλι. Έτσι επιτρέπεται στο αιμοπετάλιο να αλλάξει το σχήμα του και να εκτείνει τα ψευδοπόδιά του όπως περιγράφηκε παραπάνω.

## ΑΙΜΟΠΕΤΑΛΙΑΚΑ ΚΟΚΚΙΑ ΚΑΙ ΟΡΓΑΝΙΔΙΑ

Αν και προκαρυωτικά κύτταρα, τα αιμοπετάλια παρουσιάζουν μια ιδιαίτερη πολυπλοκότητα σε επίπεδο τόσο οργάνωσης, όσο και λειτουργιών. Συνοπτικά, τα ενδοκυττάρια οργανίδια τους, είναι i) τα κοκκία που αποτελούνται από τα α κοκκία, τα πυκνά κοκκία και τα λυσοσωμάτια ii) το σύστημα των πυκνών σωληναρίων στο οποίο αναφερθήκαμε παραπάνω ως τμήμα των μεμβρανών του αιμοπεταλίου, iii) τα μιτοχόνδρια και iv) τα υπεροξειδωσώματα.

- I. Αιμοπεταλιακά εκκριτικά κοκκία: προκειμένου να επιτελέσουν τη δράση τους, τα αιμοπετάλια φαίνεται ότι βασίζονται σε μια δευτερογενή ενίσχυση του ερεθίσματος που λαμβάνουν από εξωτερικούς παράγοντες και στη ρύθμισή τους μέσω αυτής. Το ρόλο αυτό του ενισχυτή, διαδραματίζουν τα εκκριτικά κοκκία που ελήφθησαν από το μητρικό μεγακαρυοκύτταρο αλλά και διάφοροι άλλοι μηχανισμοί. Μέσω των παραπάνω, απελευθερώνονται προς το περιβάλλον μιας εξελισσόμενης αιμόστασης ή ενός εξελισσόμενου θρόμβου επιπλέον «ερεθιστικοί» παράγοντες, οι οποίοι έως εκείνη τη στιγμή βρίσκονταν απομονωμένοι μέσα σε ένα ήρεμο αιμοπετάλιο. Τα δύο είδη εκκριτικών κοκκίων είναι τα α – κοκκία και τα δ – κοκκία (ή πυκνά κοκκία) τα οποία μετά την απόσπαση του αιμοπεταλίου από το μεγακαρυοκύτταρο εμπλουτίστηκαν με αγωνιστές συσσώρευσης όπως το ADP και το ινωδογόνο. Η εκκριτική δραστηριότητα των κοκκίων ξεκινά με μία ραγδαία αύξηση στη μεταβολική δραστηριότητα του αιμοπεταλίου η οποία πυροδοτείται από μια αύξηση της ενδοκυττάριας συγκέντρωσης του ασβεστίου και χαρακτηρίζεται από αυξημένη παραγωγή ATP. Έτσι παρέχεται η ενέργεια που χρειάζεται για τις αλλαγές που θα συμβούν στον κυτταροσκελετό δηλαδή τη σύνδεση των νηματίων ακτίνης σε δεσμίδες και τη δημιουργία δακτυλιδιών γύρω από τα εκκριτικά κοκκία τα οποία θα τα οδηγήσουν προς σύσπαση και έκκριση του περιεχομένου τους προς το ανοικτό σύστημα αγωγών κι από εκεί στο εξωκυττάριο περιβάλλον. Η έκκριση των κοκκίων λαμβάνει χώρα μετά τη συγχώνευση τόσο με την κυτταρική μεμβράνη όσο και με το SCCS. Η έκκριση των κοκκίων δεν είναι μια σταθερή διαδικασία και το μέγεθός της είναι άμεση συνάρτηση του μεγέθους του ερεθίσματος. Για παράδειγμα το ερέθισμα που ασκούν στο αιμοπετάλιο

αγωνιστές όπως η θρομβίνη και το κολλαγόνο είναι ισχυρότερο από αυτό που ασκεί το ADP.

Τα  $\alpha$  – κοκκία αποτελούν τα κύρια κοκκία τόσο σε πληθυσμό (είναι περίπου 50 σε κάθε αιμοπετάλιο), όσο και σε μέγεθος (έχουν μέση διάμετρο περίπου 300 nm). Είναι σφαιρικά ή ωοειδή και με το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο φαίνεται ότι αποτελούνται από 2 τμήματα με διαφορετική πυκνότητα ηλεκτρονίων: η πυκνή ζώνη είναι συνήθως τοποθετημένη έκκεντρα και είναι πλούσια σε πρωτεογλυκάνες, οι οποίες παρέχουν στο  $\alpha$ -κοκκίο μία σχετική σταθερότητα(41), και σε ειδικές αιμοπεταλιακές πρωτεΐνες όπως η  $\beta$  – θρομβοσφαιρίνη(41, 54). Η δεύτερη ζώνη χαμηλής πυκνότητας βρίσκεται στην περιφέρεια πολύ κοντά στη μεμβράνη του κοκκίου και περιέχει σωληνώδεις κατασκευές με γλυκοπρωτεΐνες, όπως ο παράγοντας von Willebrand κι ο παράγοντας V. Τα αιμοπετάλια έχουν πολύ περιορισμένη δυνατότητα σύνθεσης, γι αυτό και τις περιεχόμενες στα  $\alpha$  – κοκκία πρωτεΐνες τις λαμβάνουν είτε απευθείας από το μητρικό μεγακαρυοκύτταρο είτε τις απορροφούν από το πλάσμα. Η ενδοκύτωση πρωτεϊνών οι οποίες αποθηκεύονται στα αιμοπετάλια σε μεγάλες συγκεντρώσεις (μεγαλύτερες από αυτές του πλάσματος), απαιτούν την ύπαρξη υποδοχέων. Χαρακτηριστικό είναι το παράδειγμα του ινωδογόνου που προσλαμβάνεται μέσω του IIbIIIa υποδοχέα(41). Στον πίνακα 1 αναγράφονται οι κυριότερες πρωτεΐνες που περιέχονται στα  $\alpha$  – κοκκία των αιμοπεταλίων και εκκρίνονται κατά την ενεργοποίηση. Η λειτουργία τους μπορεί να είναι μιτογόνος ή προσκολλητική και η προέλευσή τους μπορεί είτε να είναι από το μεγακαρυοκύτταρο είτε όχι.

**Πίνακας 1: τα κύρια συστατικά των  $\alpha$  – κοκκίων(41, 54).**

**Πρωτεογλυκάνες**

Οι ειδικές για τα αιμοπετάλια  $\beta$ -θρομβοσφαιρίνη ( $\beta$ -TG) και PF4, κι άλλες

**Γλυκοπρωτεΐνες προσκόλλησης**

Ινονεκτίνη, Βιτρονεκτίνη, παράγοντας von Willebrand, Θρομβοσπονδίνη

**Παράγοντες πήξης**

Ινωδογόνο, παράγοντας V, VII, XI, XIII, κινινογόνα, πρωτεΐνη S, Πλασμινογόνο

**Μιτογόνοι κι αγγειογενετικοί παράγοντες**

Αιμοπεταλιακός αυξητικός παράγοντας (Platelet derived growth factor – PDGF)

Αυξητικός παράγοντας αγγειακού ενδοθηλίου (Vascular Endothelial growth factor – VEGF)

Αυξητικός παράγοντας των ενδοθηλιακών κυττάρων (Endothelial cell growth factor – ECGF)

β-αυξητικός παράγοντας μετατροπής (Transforming growth factor-β – TGF-β)

**Αναστολείς πρωτεασών**

Αναστολέας ενεργοποιητή πλασμινογόνου-1 (PAI-1)

**Μικρότερης σημασίας**

Αλβουμίνη, ανοσοσφαιρίνες

Τρεις από τις παραπάνω πρωτεΐνες, η β – θρομβοσφαιρίνη (βTG), ο αιμοπεταλιακός παράγοντας 4 (PF4) και η θρομβοσπονδίνη βρίσκονται σε υψηλή συγκέντρωση μέσα στο α – κοκκίο και συντίθεται από το μεγακαρυοκύτταρο. Η βTG κι ο PF4 εντοπίζονται στην πυκνή ζώνη του α – κοκκίου μαζί με τις πρωτεογλυκάνες, δεσμεύουν την ηπαρίνη κι ανήκουν στην ίδια οικογένεια των χημειοκινών. Επειδή παράγονται αποκλειστικά από τα μεγακαρυοκύτταρα, αποτελούν πρωτεΐνες ειδικές για τα αιμοπετάλια και μπορούν να χρησιμοποιηθούν για να σηματοδοτήσουν τα αιμοπετάλια στον ορό ή στο πλάσμα. Το τρίτο μέλος της ομάδας, η θρομβοσπονδίνη, απελευθερώνεται ως απάντηση στη θρομβίνη και συμμετέχει στο σχηματισμό του θρόμβου. Στη ζώνη χαμηλής πυκνότητας των α-κοκκίων περιέχονται πρωτεΐνες προσκόλλησης όπως ο παράγοντας von Willebrand, η ινονεκτίνη, η βιτρονεκτίνη κι η προαναφερθείσα θρομβοσπονδίνη. Ο παράγοντας von Willebrand συντίθεται από τα μεγακαρυοκύτταρα και από τα ενδοθηλιακά κύτταρα κι άρα εντοπίζεται επίσης στα ενδοθηλιακά κύτταρα των αγγείων. Επίσης περιέχονται παράγοντες πήξης όπως το ινωδογόνο κι ο παράγοντας V. Το ινωδογόνο, είναι μια πρωτεΐνη η οποία συμβάλει στην πήξη του αίματος και λαμβάνεται από το πλάσμα, δε συντίθεται στα μεγακαρυοκύτταρα. Επίσης, τα κοκκία αυτά περιέχουν μιτογόνους παράγοντες κι

αναστολείς πρωτεασών(41). Οι μιτογόνοι παράγοντες έχουν ιδιαίτερη κλινική σημασία: πλήθος ενεργοποιημένων και συσσωρευόμενων αιμοπεταλίων μπορεί να εκκρίνουν τα αυξητικά τους ερεθίσματα, τα οποία θα επηρεάσουν τα ενδοθηλιακά κύτταρα των οποίων ο πολλαπλασιασμός θα επαχθεί, γεγονός που σχετίζεται με τη διόρθωση βλαβών του αγγειακού δικτύου αλλά και με αρτηριοσκληρυντικές αγγειακές βλάβες και την επαναστένωση που παρατηρείται στα αγγεία μετά από επεμβατικές θεραπείες με ενδοαυλικούς νάρθηκες (stents). Όσον αφορά στη μεμβράνη των α-κοκκίων, η κυριότερη πρωτεΐνη που περιέχει είναι η μεμβρανική πρωτεΐνη 140 (granule membrane protein 140 – GMP140) επίσης γνωστή ως p-σελεκτίνη, η οποία εκφράζεται στην επιφάνεια του αιμοπεταλίου όταν αυτό ενεργοποιείται(41). Προς την εσωτερική επιφάνεια της μεμβράνης του α-κοκκίου εδράζει ο γλυκοπρωτεϊνικός υποδοχέας IIbIIIa(41). Σε in vitro μελέτες έχει βρεθεί ότι αντισώματα για τους IIbIIIa υποδοχείς μετακινούνται από την επιφάνεια του αιμοπεταλίου προς τα α – κοκκία, ενώ αμοιβαία μεταφορά γλυκοπρωτεϊνικών υποδοχέων IIbIIIa ανάμεσα στην κυτταρική μεμβράνη του αιμοπεταλίου και τα α κοκκία έχει επίσης αποδειχθεί(63), γεγονός που υποδεικνύει ότι οι μεμβράνες των α κοκκίων αποτελούν αποθήκες αυτών των υποδοχέων του ινωδογόνου, που συμβάλλουν σημαντικά στην αύξηση της συγκέντρωσης τους στην επιφάνεια του αιμοπεταλίου κατά την ενεργοποίηση. Μικρά ποσά από διάφορες πρωτεΐνες του πλάσματος μπορούν θεωρητικά να απορροφηθούν από τα α – κοκκία, όπως η αλβουμίνη.

**Πίνακας 2: συστατικά της μεμβράνης των α-κοκκίων(41)**

**Πρωτεΐνες που δεσμεύουν το GTP**

Rab4,rab6,rab8,Rap1

**Υποδοχείς κι αντιγόνα**

P-σελεκτίνη (CD62)

GPIIbIIIa

GPIbIX

GPIV(CD36)

p24 (CD9),

Μόριο προσκόλλησης αιμοπεταλίου ενδοθηλίου (platelet endothelial cell adhesion molecule-PECAM (CD 31))

Υποδοχέας βιτρονεκτίνης

Μεταφορέας γλυκόζης GLUT-3

Τα δ – κοκκία ή πυκνά κοκκία είναι περίπου 5 σε κάθε αιμοπετάλιο, έχουν αυξημένη πυκνότητα και είναι εύκολα διακριτά στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο χάρη στον εξαιρετικά πυκνό πυρήνα τους. Συντίθενται και κληροδοτούνται από το μητρικό μεγακαρυοκύτταρο. Με μέση διάμετρο περίπου 150 nm, αποτελούν τα μικρότερα αιμοπεταλιακά κοκκία. Αποθηκεύουν τεράστιες ποσότητες διφωσφορικής αδενοσίνης (ADP), ενός πολύ βασικού αγωνιστή αιμοπεταλιακής συσώρευσης και είναι επίσης πλούσια σε τριφωσφορική αδενοσίνη (ATP). Αυτή η δεξαμενή νουκλεοτιδίων αδενοσίνης είναι μεταβολικά αδρανής(41). Υπάρχει περισσότερο ADP από ATP σε μία αναλογία περίπου 3:2. Και τα δύο μόρια μπορούν να παράγουν AMP, το οποίο εν συνεχεία μπορεί να αποφωσφορυλιωθεί σε αδενοσίνη ή να κυκλοποιηθεί σε κυκλικό AMP (cAMP), το οποίο αποτελεί αναστολέα της απάντησης των αιμοπεταλίων σε ερεθίσματα. Τα πυκνά κοκκία περιέχουν επίσης πυροφωσφορικά και σεροτονίνη ενώ περιέχουν μικρότερα ποσά τριφωσφορικής γουανοσίνης (GTP) και διφωσφορικής γουανοσίνης (GDP). Περιέχουν το 70% του ολικού περιεχομένου του αιμοπεταλίου σε δισθενή κατιόντα, με το ασβέστιο να είναι το κυρίαρχο. Αυτή η δεξαμενή ασβεστίου είναι διαχωρισμένη από του DTS και δεν κινητοποιείται κατά την ενεργοποίηση του αιμοπεταλίου(41). Τα ADP και ATP συντίθενται από τα μεγακαρυοκύτταρα, ενώ η σεροτονίνη απορροφάται στα πυκνά κοκκία από το πλάσμα δημιουργώντας μέσα τους μία συσώρευση 1000 φορές μεγαλύτερη από αυτή του πλάσματος(41). Από τα νουκλεοτίδια της αδενοσίνης μπορεί να παραχθεί μονοφωσφορική αδενοσίνη (AMP) η οποία εν συνεχεία μπορεί να κυκλοποιηθεί σε κυκλικό AMP. Σε μικρότερες συγκεντρώσεις, περιέχονται επίσης φώσφορος και μαγνήσιο. Τα συστατικά των πυκνών κοκκίων συνοψίζονται στον πίνακα 3. Οι μεμβράνες τους περιέχουν πρωτείνες πρόσδεσης GTP, υποδοχείς GPIb και GPIIb/IIIa, καθώς και P-σελεκτίνη (πίνακας 4).



Τα **λυσσοσώματα** είναι το τρίτο και τελευταίο είδος εκκριτικού κοκκίου που περιέχεται στο αιμοπετάλιο. Είναι μικρά όξινα σωματίδια με διάμετρο ενδιάμεση αυτής των α- και πυκνών κοκκίων (περίπου 200 nm), τα οποία αναγνωρίζονται μόνο με συγκεκριμένες χρώσεις (π.χ όξινης φωσφατάσης) και περιέχουν όξινες υδρολάσες με pH από 3.5 έως 5.5. Χωρίς χρώση η πυκνότητά τους είναι ίδια με του α-κοκκίου. Η αναγνώρισή τους είναι δυνατή μόνο από το γεγονός ότι, σε αντίθεση με τα α-κοκκία, δεν έχουν ζώνες αλλά η πυκνότητά τους γεμίζει όλη την έκτασή τους. Κατά την ενεργοποίηση, τα συστατικά των λυσσοσωμάτων απελευθερώνονται πολύ πιο αργά από αυτά των κοκκίων ενώ το γεγονός αυτό απαιτεί ισχυρότερους αγωνιστές, όπως το κολλαγόνο και η θρομβίνη. Αυτό σημαίνει ότι δε διαδραματίζουν ρόλο στην άμεση αιμοστατική απάντηση. Τα περιεχόμενα των λυσσοσωμάτων συνοψίζονται στον πίνακα 5.

<b>Πίνακας 3: συστατικά των πυκνών κοκκίων(41)</b>
<p><b><u>Νουκλεοτίδια</u></b>  Αδενίνης: ATP, ADP  Γουανίνης: GTP, GDP</p> <p><b><u>Σεροτονίνη</u></b></p> <p><b><u>Δισθενή κατιόντα</u></b>  Ασβέστιο  Μαγνήσιο</p>
<b>Πίνακας 5: συστατικά των λυσσοσωμάτων(41)</b>
<b>Πίνακας 4: συστατικά των μεμβρανών των πυκνών κοκκίων(41)</b>
<p><b><u>Πρωτείνες πρόσδεσης GTP</u></b>  Ral  Rab 27</p> <p><b><u>Γλυκοπρωτεϊνικοί υποδοχείς</u></b>  GPIb  GPIIbIIIa</p> <p><b><u>P-σελεκτίνη</u></b></p>

**Όξινες πρωτεάσες**

Καθεψίνες D, E

Καρβοξυπεπτιδάσες (A, B)

Κολλαγενάσες

Όξινες φωσφατάσες

**Γλυκοϋδρολάσες**

Ηπαρινάση

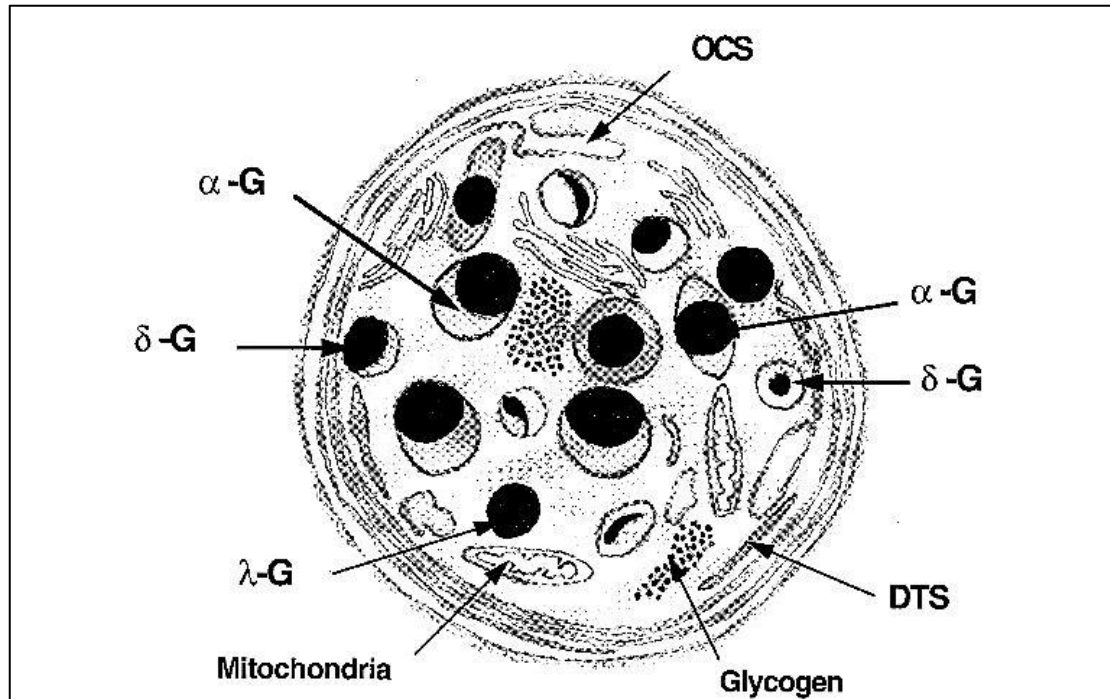
β-γλυκουρονιδάση

β-γαλακτοσιδάση

β-γλυκεροφωσφατάση

II. Αιμοπεταλιακά οργανίδια: Τα μιτοχόνδρια είναι περίπου 7 σε κάθε αιμοπετάλιο. Αναγνωρίζονται εύκολα από την κλασική μορφή τους με τις δύο συγκεντρικές μεμβράνες εκ των οποίων η εσωτερική σχηματίζει πολυάριθμες προεξοχές προς τα έσω. Είναι υπεύθυνα για τις τυπικές δραστηριότητες του μεταβολισμού των λιπαρών οξέων και της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης και γενικότερα συνεισφέρουν στη διαχείριση της ενέργειας του αιμοπεταλίου

Λοιπά οργανίδια των αιμοπεταλίων αποτελούν τα μικροϋπεροξειδωσώματα, και το γλυκογόνο. Τα μικροϋπεροξειδωσώματα είναι σπάνια, μικρά κοκκία (διάμετρος 90 nm), ενώ το γλυκογόνο παίζει κυρίαρχο ρόλο στο μεταβολισμό του αιμοπεταλίου και βρίσκεται σε μικρά σωματίδια ή σε συναθροίσεις τέτοιων σωματιδίων.



**Εικ. 7:** Σχηματική αναπαράσταση του ήρεμου αιμοπεταλίου και των οργανιδίων του. OCS = Ανοιχτό σύστημα αγωγών, α-G = α-κοκκία, δ-G = πυκνά κοκκία, DTS = πυκνό σωληναριακό σύστημα, λ-G = λυσοσώματα

### ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ ΤΟΥ ΑΙΜΟΠΕΤΑΛΙΟΥ

Σε αντίθεση με την πολύπλοκη δομή τους, ο ρόλος του αιμοπεταλίου είναι απλός: επιδιορθώνει τις βλάβες του αγγειακού δικτύου. Η κλινική σημασία της χαλιναγώγησης της δράσης του αποδείχθηκε με τη χρήση των αναστολέων IIb/IIIa (π.χ επιτιφιματιδης, αμπσιξιμάμπη) σε καταστάσεις διάσωσης κατά τη διάρκεια αγγειοπλαστικής (no reflow φαινόμενο, παρουσία θρόμβου)(64, 65) και με τη γενικότερη αποδοχή της αντιαιμοπεταλιακής αγωγής (ασπιρίνη, κλοπιδογρέλη, πρασουγρέλη και τικαγρελόρης) τόσο στη σταθερή στεφανιαία νόσο(66) όσο και στην οξεία φάση αλλά και τη δευτεροπαθή πρόληψη οξέων στεφανιαίων συνδρόμων(64, 65) και των αγγειακών εγκεφαλικών επεισοδίων(67). Σε όλη τη διάρκεια της ζωής του (περίπου 10 μέρες), το αιμοπετάλιο κάνει αμέτρητους κύκλους στο αγγειακό δίκτυο κυκλοφορώντας πολύ κοντά στο τοίχωμα των αγγείων. Εν τη απουσία αγωνιστών, το αιμοπετάλιο θα παραμείνει αδρανές. Οι επιφανειακοί υποδοχείς του, τα συσπαστικά

τμήματα του κυτταροσκελετού του και τα μονοπάτια μεταγωγής σήματός του παραμένουν ανενεργά και οι μεταβολικές του λειτουργίες (π.χ η δημιουργία ATP, η δημιουργία προσταγλαδινών κ.τ.λ) υποτυπώδεις. Εάν όμως το παραπάνω ήρεμο αιμοπετάλιο συναντήσει ένα τραυματισμό στο αγγειακό δίκτυο, μια αθηρωματική πλάκα ή εάν τα μόρια ενός αγωνιστή προσκολληθούν στους υποδοχείς του, τότε αμέσως πυροδοτεί τη διαδικασία της αιμόστασης. Τα παραπάνω μπορούν να συμβούν σε οποιοδήποτε τμήμα του αγγειακού δικτύου.

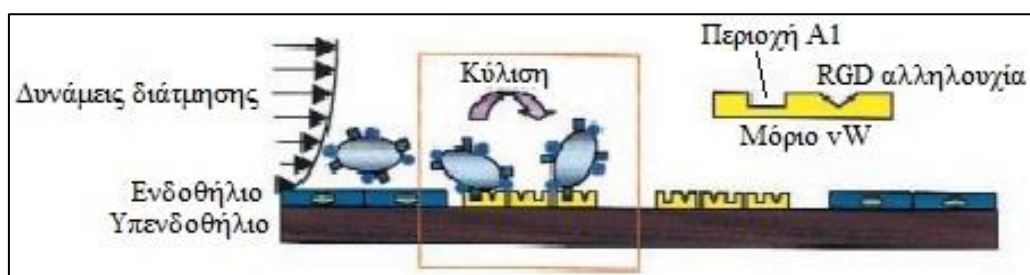
Πρέπει να σημειωθεί ότι τα αιμοπετάλια είναι πολύ αποτελεσματικά στη διακοπή της αιμορραγίας του αρτηριακού δικτύου, σε αντίθεση με το φλεβικό δίκτυο όπου αποτελεσματικότερη είναι η ινική. Το παραπάνω οφείλεται στις διαφορές στη ροή του αίματος ανάμεσα στα δύο συστήματα. Στο αρτηριακό δίκτυο οι ταχύτητα της ροής του αίματος είναι υψηλή. Τα αιμοπετάλια έχουν τα μέσα να αντιμετωπίσουν τις δυνάμεις που αναπτύσσονται (παράγοντας VW, υποδοχέας GPIIb-IX-V) και να εκκινήσουν τη δημιουργία θρόμβου, ενώ το σύστημα της ινικής όχι. Αντιθέτως, στο φλεβικό δίκτυο όπου η ταχύτητα της ροής του αίματος είναι μικρή, το σύστημα της ινικής φαίνεται να είναι αποτελεσματικότερο. Αυτό έχει ιδιαίτερη κλινική σημασία στην αντιμετώπιση καταστάσεων θρόμβωσης, με τα αντιαιμοπεταλιακά φάρμακα (ασπιρίνη, κλοπιδογρέλη, πρασουγρέλη, τικαγρελόρη) να χρησιμοποιούνται στην αντιμετώπιση των οξέων αρτηριακών συμβαμάτων και τη δευτερογενή πρόληψή τους (οξέα στεφανιαία σύνδρομα, εγκεφαλικά επεισόδια)(64, 65, 67). Αντιθέτως, τα αντιπηκτικά φάρμακα (ασενοκουμαρόλη, απιξαμπάνη, ριβαροξαμπάνη, νταμπικατράνη, κλασική ηπαρίνη, ηπαρίνες χαμηλού μοριακού βάρους) χρησιμοποιούνται στην αντιμετώπιση και την πρόληψη της εν τω βάθει φλεβοθρόμβωσης(68).

Τα αιμοπετάλια κυκλοφορούν κοντά στο τοίχωμα του αγγειακού αυλού, ενώ τα μεγαλύτερα ερυθροκύτταρα και λευκά αιμοσφαίρια κοντά στο κέντρο. Η ταχύτητα του αίματος είναι μέγιστη στο κέντρο και προοδευτικά μειώνεται προς την περιφέρεια του αυλού, μέχρι να μηδενιστεί ακριβώς δίπλα από το τοίχωμά του. Τα αιμοπετάλια υπόκεινται στις δυνάμεις διάτμησης (shear stress) που δημιουργεί αυτή η διαφορά στην ταχύτητα ροής του αίματος ανάμεσα στον αυλό και το τραυματισμένο αρτηριακό τοίχωμα(69). Παρά το γεγονός αυτό έχουν τη δυνατότητα

να σταματήσουν την κίνηση τους και να προσκολληθούν άμεσα όταν συναντήσουν ένα τμήμα τραυματισμένου αγγειακού ενδοθηλίου. Αυτό συμβαίνει χάρη στην αλληλεπίδραση του αιμοπεταλίου με τον παράγοντα von Willebrand.

#### Ο ΠΑΡΑΓΟΝΤΑΣ VON WILLEBRAND ΚΑΙ Ο ΥΠΟΔΟΧΕΑΣ ΤΟΥ

Υπεύθυνος για την πρώτη επαφή του κυκλοφορούντος αιμοπεταλίου με το τραυματισμένο ενδοθήλιο είναι ο παράγοντας von Willebrand(70, 71), ο οποίος έχει εκτεθεί κατά τον τραυματισμό του ενδοθηλίου και είναι συνδεδεμένος με το κολλαγόνο που βρίσκεται εκεί(72). Ο παράγοντας von Willebrand προσδέεται στον υποδοχέα επιφανείας του αιμοπεταλίου GPIb-IX-V, με τον οποίο έχει τη μέγιστη συγγένεια. Ο δεσμός ανάμεσα σε αυτά τα δύο στοιχεία είναι ευαίσθητος και παροδικός, με αποτέλεσμα τα αιμοπετάλια να κυλούν επάνω στο εκτεθειμένο υπενδοθήλιο(73), αποσπώμενα από το ένα μόριο von Willebrand και προσδενόμενα στο διαδοχικό του. Έτσι σταδιακά επιβραδύνονται και ενεργοποιούνται (εικ. 8). Πρέπει να αναφερθεί ότι όταν τραυματίζεται το ενδοθήλιο, η ποσότητα του «ιθαγενούς» παράγοντα von Willebrand που υπάρχει ήδη εκεί δεν είναι αρκετή για να επιβραδύνει τα αιμοπετάλια καθώς αυτά λόγω της υψηλής κινητικής ενέργειας που ήδη διαθέτουν ξεφεύγουν από τα πρώτα μόρια με τα οποία έρχονται σε επαφή.



**Εικ. 8:** η πρόσδεση του κυκλοφορούντος αιμοπεταλίου στο εκτεθειμένο υπενδοθήλιο χάρη στον παράγοντα vW με το μοντέλο κύλισης όπως περιγράψαμε(73).

Έτσι απαιτείται η συνεισφορά των κυκλοφορούντων στο αίμα μορίων του παράγοντα von Willebrand. Αυτά προσδέονται με την περοχή A3 του μορίου τους στο κολλαγόνο του υπενδοθηλίου. Έτσι αυξάνεται η συγκέντρωσή του στην περιοχή του

τραυματισμού, με αποτέλεσμα να είναι αρκετός για να επιτελέσει πλέον τη λειτουργία του(73).

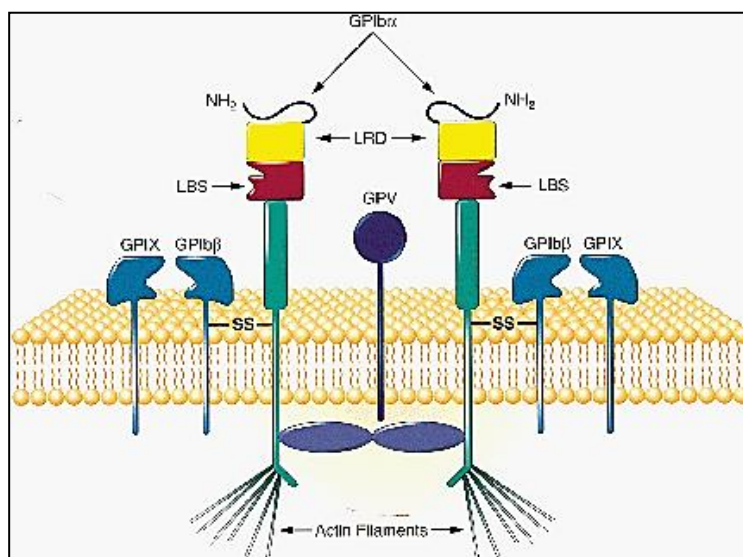
Ο παράγοντας von Willebrand είναι μια τεράστια πολυμερής πρωτεΐνη, παρούσα στο πλάσμα του αίματος και παράγεται βασικά στο ενδοθήλιο (στα σωματίδια Weibel-Palade), στα μεγακαρυοκύτταρα (αποθηκεύεται στα α-κοκκία των αιμοπεταλίων) και στον υπενδοθηλιακό συνδετικό ιστό(74). Κάθε μονομερές συστατικό είναι ένα σύνολο περιοχών με διαφορετικές ιδιότητες: i) η περιοχή D3 η οποία προσδένεται στον παράγοντα VIII, ii) η περιοχή A1 η οποία προσδένεται στους αιμοπεταλιακούς υποδοχείς GPIb-IX-V, iii) η περιοχή A3 η οποία προσδένεται στο κολλαγόνο και iv) η περιοχή C1 με την RGD αλληλουχία η οποία προσδένεται στον αιμοπεταλιακό υποδοχέα GPIIb/IIIa. Το μεγάλο μήκος του von Willebrand (περίπου το μισό από τη διάμετρο του αιμοπεταλίου) απαιτείται, για τη σύλληψη του κυκλοφορούντος αιμοπεταλίου στο αρτηριακό δίκτυο. Πρέπει όμως να είναι συγκεκριμένο, καθώς εάν υπερβεί ένα συγκεκριμένο όριο, τότε έχουμε τη θρομβωτική θρομβοπενική πορφύρα. Αυτή οφείλεται ουσιαστικά σε έλλειψη μιας μεταλοπρωτεάσης, η οποία μειώνει το μήκος του von Willebrand στο επιθυμητό μη παθολογικό μέγεθος. Εκδηλώνεται κλινικά με αιμορραγίες λόγω εξάντλησης των αιμοπεταλίων.

#### ΜΟΡΙΑΚΗ ΠΡΟΣΕΓΓΙΣΗ ΤΟΥ ΥΠΟΔΟΧΕΑ GPIb-IX-V

Ο υποδοχέας GPIb-IX-V κι οι άλλοι υποδοχείς αιμοπεταλιακής προσκόλλησης είναι οι πυροδοτές της ενεργοποίησης του αιμοπεταλίου σε περιοχές τραυματισμού του αγγειακού ενδοθηλίου. Εκεί τα αιμοπετάλια έρχονται σε επαφή με πρωτεΐνες προσκόλλησης, οι οποίες αποτελούν τους προσδέτες των υποδοχέων τους. Εκτός από τον παράγοντα von Willebrand, ο υποδοχέας GPIb-IX-V μπορεί να συνδεθεί και με άλλους προσδέτες όπως η P-σελεκτίνη στα ενεργοποιημένα αιμοπετάλια ή τα ενδοθηλιακά κύτταρα, η α-θρομβίνη, οι παράγοντες πήξης XI/XIIa και το υψηλού μοριακού βάρους κινινογόνο, γεγονός που του προσδίδει μεγάλη κλινική σημασία(75).

Οι γλυκοπρωτεϊνικοί υποδοχείς GPIb-IX-V είναι ένα άθροισμα τεσσάρων πολυπεπτιδικών αλυσίδων οι οποίες κωδικοποιούνται από τέσσερα διαφορετικά γονίδια που βρίσκονται σε διαφορετικά σημεία των χρωμοσωμάτων(76-78). Ωστόσο, για λόγους απλούστευσης, στη βιβλιογραφία αναφέρεται συχνά ως υποδοχέας GPIb. Όλες οι υπομονάδες μοιράζονται παρόμοια δομικά χαρακτηριστικά όπως πλήθος αμινοξέων λυσίνης (ανήκουν στην οικογένεια πρωτεϊνών πλούσιων σε λυσίνη – Leucine rich family-LRF). Ο υποδοχέας αποτελείται από την υπομονάδα GPIba συνδεδεμένη με δισουλφιδικό δεσμό με την GPIbβ. Μαζί αναφέρονται ως υπομονάδα GPIb, η οποία με ετεροπολικό δεσμό συνδέεται με τις υπομονάδες GPIX και GPV, σε αναλογία 2 GPIba:2 GPIbβ:2 GPIX :1 GPV(75) (εικ. 9). Ο von Willebrand προσδένεται στο ενεργό κέντρο του υποδοχέα το οποίο σχηματίζουν τα αμινοτελικά άκρα των δύο GPIa υπομονάδων(75). Η σύνδεση αυτή γίνεται στην περιοχή A1 του παράγοντα von Willebrand, μακριά από την RGD αλληλουχία, η οποία βρίσκεται στην περιοχή C1 και η οποία χρησιμεύει για την πρόσδεση στον υποδοχέα GPIIbIIIa και θα περιγραφεί παρακάτω(73) (εικ. 8). Το ενεργό κέντρο του υποδοχέα δεσμεύει επίσης και τους άλλους προσδέτες που αναφέραμε νωρίτερα. Η κάθε υπομονάδα έχει διαφορετικά χαρακτηριστικά: οι GPIba, όντας πλούσιες σε σιαλικά οξέα, συνεισφέρουν στο αρνητικό φορτίο της κυτταρικής μεμβράνης. Επίσης συνδέονται με τον αιμοπεταλιακό κυτταροσκελετό, προσδένοντας το ενδοκυττάριο τμήμα τους στα ινίδια ακτίνης. Εξέχουν προς το εξωκυττάριο περιβάλλον και δημιουργούν το ενεργό κέντρο του υποδοχέα, επιτυγχάνοντας τη σύλληψη του κυκλοφορούντος αιμοπεταλίου μέσω σύνδεσης με τον παράγοντα von Willebrand. Οι GPIbβ επιτελούν διεργασίες φωσφορυλίωσης και είναι συνδεδεμένες με τις GPIba μέσω δισουλφιδικών δεσμών. Η υπομονάδα GPV, επάγει τη σύνδεση του υποδοχέα με το κολλαγόνο (εικ. 9).

Στην κλινική πράξη, μεταλλάξεις των γονιδίων που κωδικοποιούν τις τέσσερις υπομονάδες προκαλούν αιμορραγικά σύνδρομα όπως το Bernard – Soullier(79, 80) αλλά και το ψευδοσύνδρομο Von Willebrand(81) στο οποίο οι υπομονάδες GPIba παρουσιάζουν αυξημένη συγγένεια για τον von Willebrand και τον δεσμεύουν σε αυξημένα ποσοστά, με αποτέλεσμα αιμορραγίες λόγω εξάντλησης των αιμοπεταλίων.



Εικ. 9: σχηματική απεικόνιση του αιμοπεταλιακού υποδοχέα GPIIb-IX-V και των υπομονάδων του. Τα νημάτια ακτίνης του κυτταροσκελετού συνδέονται με τις υπομονάδες GPIIbα.

#### ΠΡΟΣΔΕΣΗ ΤΟΥ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑ VON WILLEBRAND ΣΤΟΝ ΥΠΟΔΟΧΕΑ ΤΟΥ

Όταν ο von Willebrand που βρίσκεται στο υπενδοθήλιο συνδεδεμένος με το κολλαγόνο εκτίθεται, προσδένεται στον υποδοχέα GPIIb-IX-V του αιμοπεταλίου(72). Έτσι ξεκινούν διαδικασίες μεταγωγής σήματος που ως αποτέλεσμα έχουν την αποκοκκίωση, την αύξηση της ενδοκυττάριας συγκέντρωσης ασβεστίου(82) καθώς και την από μέσα προς τα έξω ενεργοποίηση (“inside-out” activation) των υποδοχέων GPIIbIIIa. Ξεκινά δηλαδή η σταδιακή ενεργοποίηση και η συσσώρευση των αιμοπεταλίων. Η ακινητοποίηση και μη αναστρέψιμη πρόσδεση του αιμοπεταλίου γίνεται μέσω ενός ενεργοποιημένου υποδοχέα GPIIbIIIa ο οποίος θα προσδέσει ένα μονομερές von Willebrand στην RGD αλληλουχία του, καθώς και με αλληλεπιδράσεις μεταξύ του κολλαγόνου και του υποδοχέα του GPVI(73) (εικ. 11).

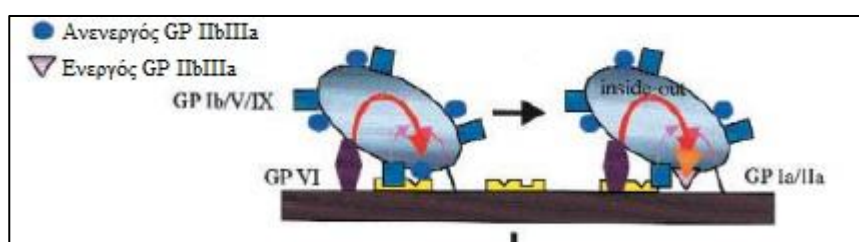
Ο παράγοντας von Willebrand που κυκλοφορεί στο αίμα δεν ενεργοποιεί τα αιμοπετάλια υπό φυσιολογικές συνθήκες. Προσπαθώντας να εξηγήσουν το φαινόμενο αυτό, ο Ciediecki και οι συνεργάτες του το 1996 έκαναν μία πολύ ενδιαφέρουσα μελέτη επάνω σε αυτό το θέμα. Όπως αναφέρουν, η δομή του παράγοντα von Willebrand είναι σφαιρική υπό φυσιολογικές συνθήκες. Όταν όμως



εκτεθεί συνδεδεμένος στο κολλαγόνο του υπενδοθηλίου (ή όταν φτάσει στο σημείο του τραυματισμού με την κυκλοφορία του αίματος και προσδεθεί στο κολλαγόνο), τότε οι ισχυρές δυνάμεις διάτμησης που αναπτύσσονται στο σημείο της βλάβης και που ασκούνται στο μόριό του παράγοντα von Willebrand προκαλούν αλλαγές της στερεοδιάταξής του. Η σφαιρική του δομή ανοίγει με αποτέλεσμα την απελευθέρωση της περιοχής A1, η οποία ως τότε βρισκόταν κρυμμένη στο κέντρο της σφαίρας (εικ. 10). Μόνο τότε μπορεί ο von Willebrand να αλληλοεπιδράσει με τον παράγοντα GPIb-IX-V(83).



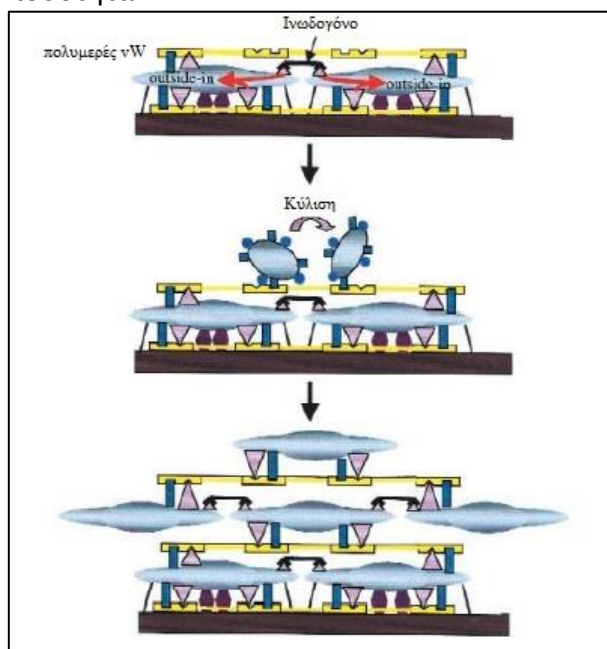
**Εικ. 10:** Οι αλλαγές της στερεοδιάταξης του παράγοντα von Willebrand από σφαιρικό σε εκτεταμένο μόριο, ανάλογα με τις διατμητικές δυνάμεις που του ασκούνται. Υπό φυσιολογικές συνθήκες, η περιοχή A1 βρίσκεται στο κέντρο της σφαίρας, δεν εκτίθεται και έτσι δεν αλληλεπιδρά με τον GPIb-IX-V(83).



**Εικ. 11:** η οριστική πρόσδεση του αιμοπεταλίου στο υπενδοθήλιο μέσω “inside – out” ενεργοποίησης του υποδοχέα GPIIbIIIa, η οποία πυροδοτήθηκε από τη σύνδεση του γειτονικού GPIb με τον παράγοντα von Willebrand του υπενδοθηλίου(73).

Η μεγάλη αύξηση της συγκέντρωσης ασβεστίου, η οποία έχει πυροδοτηθεί από τη σύνδεση του παράγοντα von Willebrand με τον υποδοχέα GPIb-IX-V(82), οδηγεί σε αλλαγές του κυτταροσκελετού έτσι ώστε το αιμοπετάλιο να απλώνεται και να

σχηματίζει μία μεγάλη θρομβογόνο βάση για την πρόσδεση νέων αιμοπεταλίων(84). Ένα άλλο μόριο GPIIb/IIIa του συλληφθέντος αιμοπεταλίου θα προσδέσει το ινωδογόνο για να σχηματίσει γέφυρες με γειτονικά ακινητοποιημένα αιμοπετάλια και να σταθεροποιήσει την κατασκευή. Ταυτόχρονα, οι GPIb-IX-V υποδοχείς του προσκολλημένου αιμοπεταλίου, αιχμαλωτίζουν νέα πολυμερή μόρια του παράγοντα von Willebrand τα οποία λόγω των ισχυρών διατμητικών δυνάμεων στην περιοχή της βλάβης έχουν εκτείνει το μόριο τους κι έχουν εκθέσει την περιοχή A1(83). Έτσι, όπως το αρχικό μόριο von Willebrand (αυτό δηλαδή που εκτίθεται αρχικά συνδεδεμένο με το κολλαγόνο στο τραυματισμένο ενδοθήλιο), θα συνεισφέρουν στη σύλληψη νέων αιμοπεταλίων, τα οποία «κυλούν» επάνω στα πρώτα όπως περιγράψαμε και θα ακινητοποιηθούν από τον ενεργοποιημένο υποδοχέα GPIIb/IIIa ο οποίος θα προσδέσει στην RGD αλληλουχία του μόρια παράγοντα von Willebrand. Νέα μόρια ινωδογόνου θα προσδεθούν από υποδοχείς GPIIb/IIIa του νέου στρώματος αιμοπεταλίων για να σταθεροποιήσουν το θρόμβο, του οποίου ο σχηματισμός εξελίσσεται επαναλαμβάνοντας τα παραπάνω στάδια(73). Πρέπει να σημειωθεί ότι το ινωδογόνο δεν κυκλοφορεί σε αρκετή ποσότητα στο πλάσμα. Έτσι, τα α – εκκριτικά κοκκία των αιμοπεταλίων που μόλις ενεργοποιήθηκαν απελευθερώνουν επιπλέον ποσότητα.



**Εικ. 12:** η επανάληψη της ίδιας διεργασίας με την οποία το αιμοπετάλιο δεσμεύει τον von Willebrand κι αυτός με τη σειρά του το νέο αιμοπετάλιο, οδηγεί στην ανάπτυξη του θρόμβου(73).

Τα παραπάνω συνοπτικά περιγράφονται με τον όρο

πρωτογενής αιμόσταση. Ο πλούσιος σε αιμοπετάλια θρόμβος που δημιουργείται

είναι ασταθής και θα σταθεροποιηθεί με τον καταρράκτη της πήξης και το σχηματισμό ινικής, γεγονός που αποτελεί τη *δευτερογενή αιμόσταση*.

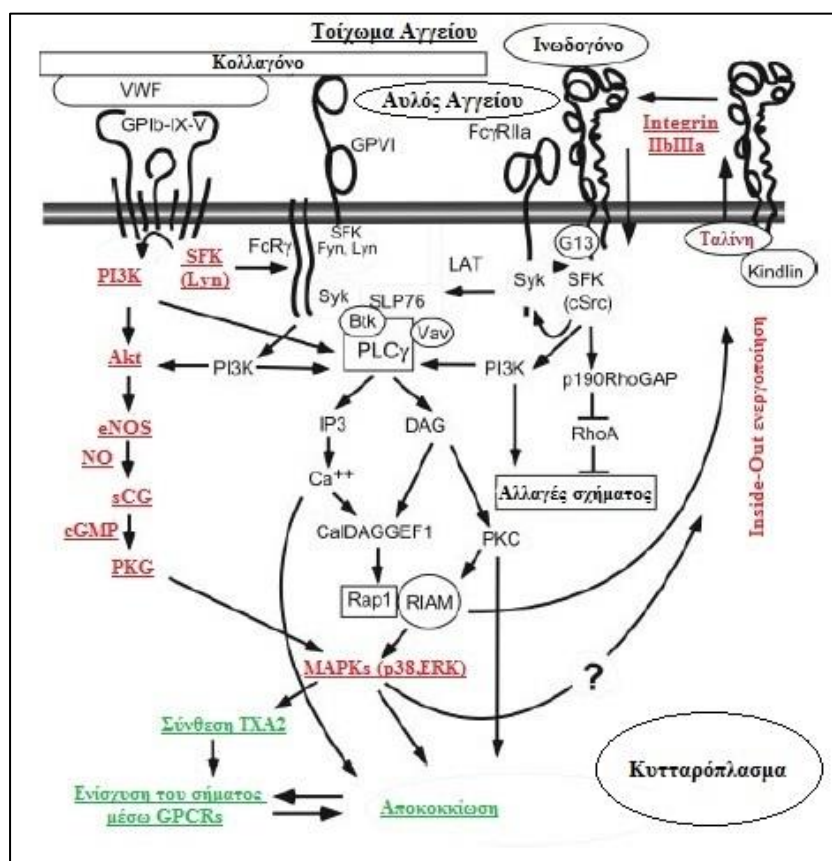
Σε αντίθεση με ό,τι πιστεύαμε παλαιότερα, δηλαδή ότι η σταθεροποίηση του θρόμβου οφείλεται μόνο σε γέφυρες ινωδογόνου με GPIIb/IIIa υποδοχείς, σήμερα γνωρίζουμε ότι κάτι τέτοιο ισχύει μόνο στον «πυρήνα» του θρόμβου και τον ισχυροποιεί. Στην επιφάνειά του, κυρίαρχο ρόλο στη σύλληψη και την πρόσδεση των νέων αιμοπεταλίων στον αναπτυσσόμενο θρόμβο παίζουν οι δεσμοί ανάμεσα στον κυκλοφορούντα παράγοντα von Willebrand με τον επιφανειακό υποδοχέα GPIb-IX-V των αιμοπεταλίων. Αυτό διαψεύδει και τις προηγούμενες γνώσεις μας γύρω από τον ίδιο τον παράγοντα von Willebrand, καθώς θεωρείτο ότι ο ρόλος του περιορίζεται αποκλειστικά στην πρόσδεση του αιμοπεταλίου πάνω στην τραυματισμένη ενδοθηλιακή στοιβάδα και ότι από εκεί κι έπειτα η ανάπτυξη του θρόμβου γινόταν μόνο με γέφυρες ινωδογόνου – GPIIb/IIIa. Εάν όμως, αφού συλληφθεί το αιμοπετάλιο δεν ενεργοποιηθεί ο δεσμός GPIIb/IIIa – ινωδογόνου, τότε το πιθανότερο είναι ότι αυτό θα απελευθερωθεί, αφενός λόγω της εύκολα αναστρέψιμης δέσμευσης του παράγοντα von Willebrand με τον υποδοχέα GPIb-IX-V και αφετέρου λόγω της μεγάλης ταχύτητας με την οποία το αιμοπετάλιο έρχεται σε επαφή με το εκτεθειμένο υπενδοθήλιο.

#### ΜΕΤΑΓΩΓΗ ΣΗΜΑΤΟΣ ΜΕΣΩ ΤΟΥ ΥΠΟΔΟΧΕΑ GPIb-IX-V

Όπως ήδη αναφέρθηκε, η πρόσδεση του παράγοντα von Willebrand στον υποδοχέα του οδηγεί σε ενδοκυττάρια μεταγωγή σήματος η οποία έχει δύο αποτελέσματα: i) την ενεργοποίηση του αιμοπεταλίου και ii) την από μέσα προς τα έξω (inside-out) ενεργοποίηση του υποδοχέα GPIIb/IIIa που θα οδηγήσει στη συσσώρευση των αιμοπεταλίων, αλλά κι άλλων ιντεγκρινών.

Το κυτταροπλασματικό τμήμα του υποδοχέα, αλληλεπιδρά με την κινάση Lyn, της οικογένειας Src (Src Family Kinases – SFK) η οποία ενεργοποιεί την κινάση του φωσφοϊνοσιτίδιου 3 (Phosphoinositide-3 kinases – PI3Ks). Αυτές οι δύο κινάσες είναι υπεύθυνες για την αρχική μεταγωγή του σήματος και οδηγούν σε αύξηση του

ενδοκυττάριου ασβεστίου και σε ενεργοποίηση των ιντεγκρινών, ανεξάρτητη από άλλους υποδοχείς. Εν συνεχεία ενεργοποιείται μια κινάση σερίνης θρεονίνης, η Akt (επίσης γνωστή ως πρωτεϊνική κινάση B), η οποία θα οδηγήσει με τη βοήθεια του μονοξειδίου του αζώτου που συντίθεται από την ομώνυμη συνθετάση, και της κυκλικής μονοφωσφορικής γουανοσίνης (της οποίας τα επίπεδα αυξάνονται) στην ενεργοποίηση ιντεγκρινών μέσω των MAP κινασών (MAPKs) p38 και ERK. Τα επίπεδα του μονοξειδίου του αζώτου και της cGMP παίζουν ρυθμιστικό ρόλο στην ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων: τα χαμηλά επίπεδα επάγουν την ενεργοποίηση, ενώ τα υψηλά την αναστέλλουν. Αυτό πιθανώς να χρησιμεύει σα δικλείδα ασφαλείας αποτρέποντας την παθολογική ανάπτυξη του θρόμβου. Με λίγα λόγια, ο δρόμος μεταγωγής σήματος μέσω του υποδοχέα GPIb-IX-V που αναφέραμε (εικ 13), παίζει καθοριστικό ρόλο στη ρύθμιση της ενεργοποίησης του αιμοπεταλίου αλλά και στην inside-out ενεργοποίηση του υποδοχέα GPIIb/IIIa(85).

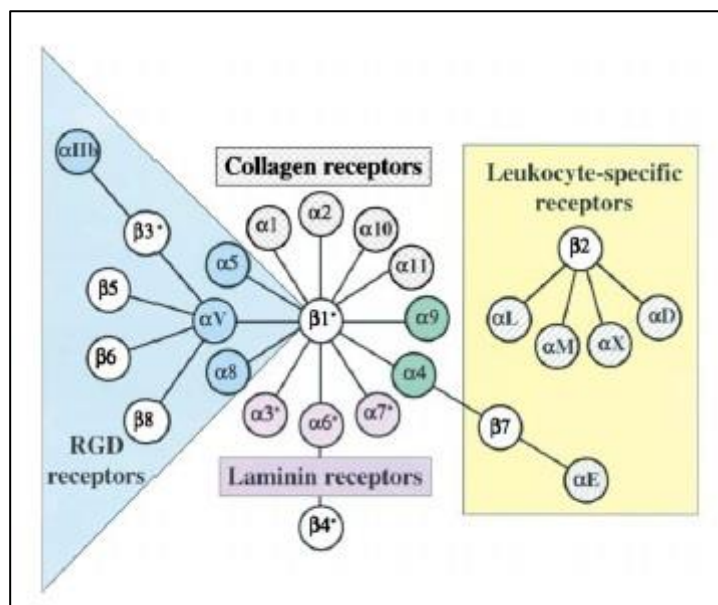


**Εικ. 13:** μεταγωγή σήματος κατά την πρόσδεση του παράγοντα von Willebrand στον υποδοχέα του GPIbIX-V (GPCRs: G-protein Coupled Receptors). Με πράσινους χαρακτήρες τα βήματα που οδηγούν σε ενεργοποίηση του αιμοπεταλίου(85).

## ΟΙ ΙΝΤΕΓΚΡΙΝΕΣ

Οι ιντεγκρίνες είναι σημαντικοί υποδοχείς προσκόλλησης, οι οποίοι μεταδίδουν αμφίδρομα σήματα δια μέσου της κυτταρικής μεμβράνης. Αποτελούνται από το εξωκυττάριο τμήμα το οποίο χρησιμεύει για τη σύνδεση με το μόριο του προσδέτη και το ενδοκυττάριο το οποίο χρησιμεύει για τη μεταγωγή σήματος και τη σύνδεση του μορίου με τον κυτταροσκελετο του αιμοπεταλίου(86). Επάγουν τόσο την πρόσδεση του αιμοπεταλίου με εξωκυττάρια πρωτεΐνες, όσο και την προσκόλληση των αιμοπεταλίων μεταξύ τους. Αν συμμετέχουν στην ανοσιακή απάντηση, την κίνηση των λευκοκυττάρων και τον καρκίνο, ο κυρίαρχος ρόλος τους είναι η επαγωγή της αιμόστασης και της θρόμβωσης. Η λειτουργικότητά τους βρίσκεται στην καρδιά των οξέων στεφανιαίων συνδρόμων και αποτελεί στόχο πολυάριθμων φαρμάκων.

Οι πρωτόγονοι οργανισμοί είχαν τουλάχιστον δυο διαφορετικές διμερείς ιντεγκρίνες αποτελούμενες από μία α και μία β υπομονάδα. Από εκεί εξελίχθηκε η μεγάλη και περίπλοκη οικογένεια των ιντεγκρινών που εντοπίζονται σήμερα στα θηλαστικά. Η οικογένεια αυτή περιέχει 24 διαφορετικά μόρια ιντεγκρινών (εικ 14) τα οποία προέκυψαν από συνδυασμούς 8 διαφορετικών β υπομονάδων και 18 διαφορετικών α υπομονάδων(86):



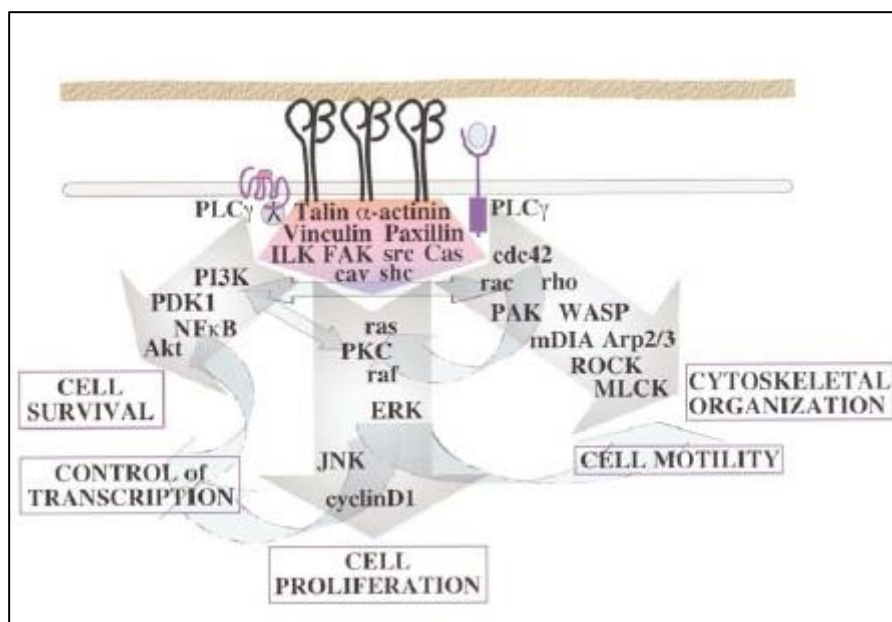
**Εικ. 14:** η οικογένεια των ιντεγκρινών(86).

Υπάρχουν 4 κύριες ομάδες ιντεγκρινών: η πρώτη ομάδα, αναγνωρίζει την τριπεπτιδική αλληλουχία RGD σε προσδετικά μόρια όπως η ινονεκτίνη και η βιτρονεκτίνη, το ινωδογόνο και ο παράγοντας von Willebrand. Η δεύτερη προσδέεται στη λαμινίνη και η τρίτη περιέχει υποδοχείς πρόσδεσης για το κολλαγόνο. Τέλος, η τέταρτη περιέχει υποδοχείς ειδικούς για τα λευκοκύτταρα που δημιουργούνται από δύο β υπομονάδες μοναδικές γι' αυτά, αναγνωρίζουν τις ανοσοσφαιρίνες και επάγουν τη σύνδεση κυττάρου με κύτταρο. Τις ανοσοσφαιρίνες αναγνωρίζουν επίσης και 2 ιντεγκρίνες από την οικογένεια των RGD υποδοχέων, η  $\alpha_4\beta_1$  κι η  $\alpha_9\beta_1(86)$ . Οι υπομονάδες  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\alpha_{10}$ ,  $\alpha_{11}$ ,  $\alpha_L$ ,  $\alpha_M$ ,  $\alpha_X$ ,  $\alpha_D$ ,  $\alpha_E$  φέρουν ειδικές περιοχές που ονομάζονται I/A (η σημασία τους θα εξηγηθεί παρακάτω). Οι ιντεγκρίνες της οικογένειας των RGD υποδοχέων και της οικογένειας των υποδοχέων λαμινίνης θεωρούνται αρχαίες. Τέλος, η εξειδίκευση του ιντεγκρινικού υποδοχέα για τον προσδέτη του, εξαρτάται και από τις δύο υπομονάδες του.

Κάθε μία από τις 24 ιντεγκρίνες που φαίνονται στην εικ 14 έχει το δικό της ξεχωριστό αλλά σημαντικό ρόλο, ακόμα κι όταν αναφερόμαστε σε ιντεγκρίνες της ίδιας οικογένειας. Αυτό απεδείχθη με πειράματα σε διαγονιδιακά ποντίκια όπου διαδοχικά ανεστάλη η έκφραση όλων των β υπομονάδων και των 14 από τις α υπομονάδες, οδηγώντας σε διαφορετικό κάθε φορά φαινότυπο που εξέφραζε από διαταραχές στην ανάπτυξη (υπομονάδες  $\alpha_4$ ,  $\alpha_5$ ,  $\alpha_v$  και  $\beta_8$ ), λευκοκυτταρικές δυσλειτουργίες (υπομονάδες  $\alpha_L$ ,  $\alpha_M$ ,  $\alpha_E$ ,  $\beta_2$  και  $\beta_7$ ), διαταραχές στην αγγειογένεση (υπομονάδες  $\alpha_1$ ,  $\beta_3$ ), διαταραχές στην αιμόσταση (υπομονάδες  $\alpha_{11b}$ ,  $\beta_3$ ,  $\alpha_2$ ) έως και περιγεννητική θνητότητα (υπομονάδες  $\alpha_3$ ,  $\alpha_6$ ,  $\alpha_8$ ,  $\alpha_v$ ,  $\beta_4$  και  $\beta_8$ )(87-90).

Εκτός από την ικανότητα πρόσδεσης εξωκυττάρων πρωτεϊνών και υποδοχέων άλλων κυττάρων, οι ιντεγκρίνες διαθέτουν μηχανικούς δεσμούς και με τον κυτταροσκελετό. Όλες οι ιντεγκρίνες, εκτός από την  $\alpha_6\beta_4$ , προσδέονται στα νημάτια ακτίνης του κυτταροσκελετού, τον οποίο έτσι μπορούν να ελέγξουν και να τροποποιήσουν(86). Λόγω αυτής της σύνδεσης, η πρόσδεσή τους σε πρωτεΐνες του εξωκυττάρου ή σε υποδοχείς άλλων κυττάρων επάγει μέσω μεταγωγής σήματος μία πληθώρα αλλαγών στη συμπεριφορά του κυττάρου. Αυτές συμπεριλαμβάνουν τον πολλαπλασιασμό, την επιβίωση ή την απόπτωση, το σχήμα, την πολικότητα, την έκφραση γονιδίων και τη διαφοροποίηση. Έχει μάλιστα

αποδειχθεί ότι τα παραπάνω είναι αποτέλεσμα συνεργικής δράσης τόσο των υποδοχέων ιντεγκρίνης όσο και άλλων υποδοχέων (όπως G protein coupled receptors – GPCRs και υποδοχέων κινασών, εικ 15)(86). Είναι επίσης γνωστό ότι σε αρκετές περιπτώσεις οι ιντεγκρίνες αλληλεπιδρούν και επικοινωνούν είτε μεταξύ τους είτε με άλλους υποδοχείς προκειμένου να ανασταλούν ή να ενεργοποιηθούν(91). Ένα χαρακτηριστικό παράδειγμα τέτοιου είδους ενεργοποίησης αποτελεί η ιντεγκρίνη IIbIIIa ή  $\alpha_{IIb}\beta_3$ , η κυρίαρχη ιντεγκρίνη των αιμοπεταλίων. Μπορεί να ενεργοποιηθεί είτε λόγω της πρόσδεσης του παράγοντα von Willebrand στον υποδοχέα του GPIIb-IX-V όπως αναφέρθηκε, είτε λόγω της πρόσδεσης του κολλαγόνου στον υποδοχέα του GPIV ή στην ιντεγκρίνη  $\alpha_2\beta_1$ , είτε λόγω της πρόσδεσης της επινεφρίνης, της θρομβίνης ή του ADP στους υποδοχείς τους.



**Εικ. 15:** τα κυρίαρχα μονοπάτια μεταγωγής σήματος μέσω των ιντεγκρινών, τα οποία οφείλονται συχνά στη συνεργική δράση τους με υποδοχείς κινάσης ή GPCRs(86).

#### Η ΔΟΜΗ ΤΩΝ ΥΠΟΔΟΧΕΩΝ ΙΝΤΕΓΚΡΙΝΗΣ: ΕΞΩΚΥΤΤΑΡΙΟ ΤΜΗΜΑ

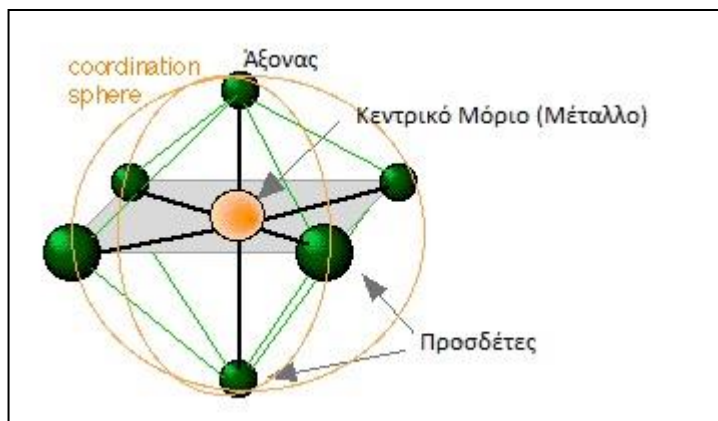
Η πρώτη περιοχή του μορίου των ιντεγκρινών η οποία κρυσταλλοποιήθηκε ήταν η περιοχή I/A των  $\alpha$  υπομονάδων από τον Lee και τους συνεργάτες του το 1995, οι

οποίοι για το σκοπό αυτό εξέτασαν την ιντεγκρίνη  $\alpha_M\beta_2$ (92). Η περιοχή I/A έχει εισαχθεί κατά την εξέλιξη των υποδοχέων στις μισές από τις  $\alpha$  υπομονάδες των θηλαστικών ( $\alpha_1, \alpha_2, \alpha_{10}, \alpha_{11}, \alpha_L, \alpha_M, \alpha_X, \alpha_D$  κι  $\alpha_E$ ). Οι παραπάνω ερευνητές έδειξαν ότι διαθέτει τη δομή μίας πτυχής Rossman με ένα πυρήνα παράλληλων  $\beta$  φύλλων, που περιτριγυρίζονται από αμφιπαθητικές  $\alpha$  έλικες. Η περιοχή I/A είναι ιδιαίτερα σημαντική. Περιέχει την αλληλουχία σύνδεσης του υποδοχέα με τον προσδέτη. Ο Lee με τους συνεργάτες του περιέγραψαν επίσης μια περιοχή κοντά στην κορυφή της I/A, στο επίκεντρο της οποίας βρίσκεται ένα μεταλλικό ιόν και η οποία περιέχει κατάλοιπα από τρεις διαφορετικές έλικες της I/A. Επίσης, την προσοχή τράβηξε ένα κατάλοιπο γλουταμικού από ένα διαφορετικό γειτονικό μόριο, το οποίο είχε κρυσταλλοποιηθεί μαζί με την περιοχή I/A. Έτσι εξηγήθηκε αυτό που ήταν γνωστό από παλαιότερα, ότι δηλαδή οι ιντεγκρίνες χρειάζονται τη σύνδεση δισθενών κατιόντων σε συγκεκριμένα σημεία της  $\alpha$  υπομονάδας τους, τόσο για να διατηρήσουν τη δομή του ετεροδιμερούς, όσο και για τη σύνδεση με τον προσδέτη τους(86). Ήταν επίσης γνωστό ότι το ασπαρτικό (D) ή το γλουταμικό (E) ήταν τα κατάλοιπα κλειδιά σε όλες τις περιοχές των προσδετών οι οποίες χρησιμοποιούνταν για την αναγνώριση αυτών των υποδοχέων(86). Τα παραπάνω οδήγησαν στο συμπέρασμα ότι η σύνδεση του προσδέτη στον υποδοχέα γίνεται με μία άρθρωση στο κέντρο της οποίας βρίσκεται το δισθενές κατιόν συνδεδεμένο με τρία κατάλοιπα της περιοχής I/A της ιντεγκρίνης (από τις τρεις διαφορετικές έλικες που αναφέραμε) και το κατάλοιπο ασπαρτικού ή γλουταμικού του προσδέτη. Ένα τέτοιο σύμπλεγμα ενός μετάλλου το οποίο συνδέεται με ένα πλήθος μορίων (τους προσδέτες) στη διεθνή ορολογία αναφέρεται ως "coordination complex". Στα ελληνικά μπορεί να αποδοθεί ως «μεταλλικό σύμπλεγμα», λόγω του μεταλλικού δισθενούς ιόντος που φέρει στο κέντρο του (εικ 16). Ο Lee με τους συνεργάτες του τα συνέδεσαν όλα αυτά μαζί και πρότειναν ένα μοντέλο, το MIDAS (σημείο πρόσδεσης εξαρτώμενο από μεταλλικό ιόν – metal-ion dependent adhesion site) για το σημείο πρόσδεσης στον υποδοχέα (εικ 17), ενώ υπέδειξαν μια ομόλογη περιοχή στη  $\beta$ -υπομονάδα της ιντεγκρίνης.

Στις μελέτες που ακολούθησαν, βρέθηκε ότι η περιοχή I/A μπορεί να λάβει δύο στερεοδιατάξεις, μια ενεργή και μια ανενεργή ("On/Off") ανάλογα με τη διάταξη στο χώρο του δισθενούς κατιόντος(93, 94) και ότι η σύνδεση του προσδέτη συνεπάγεται

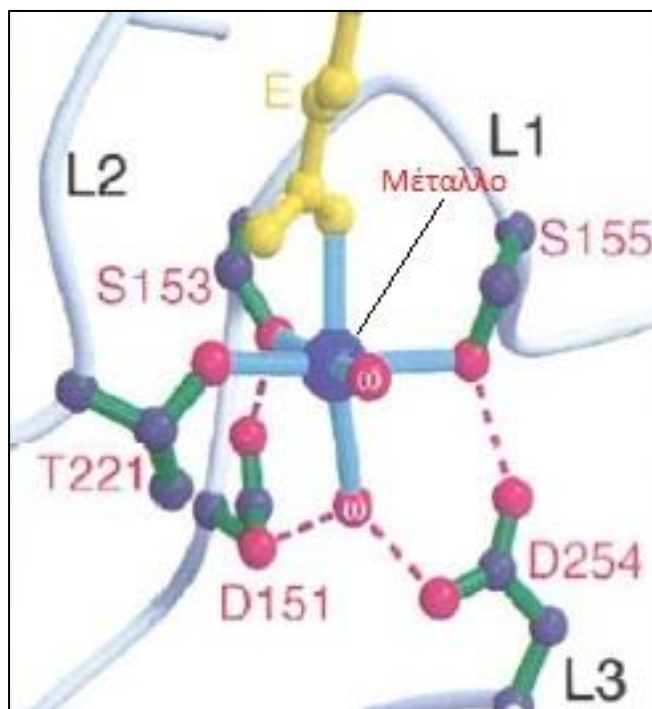


την αλλαγή από την ανενεργή στην ενεργή μορφή. Αυτό αποδείχθηκε όταν μελετήθηκε η δομή της περιοχής I/A της υπομονάδας  $\alpha_2$  με και χωρίς προσδέτη(95, 96), με βάση την

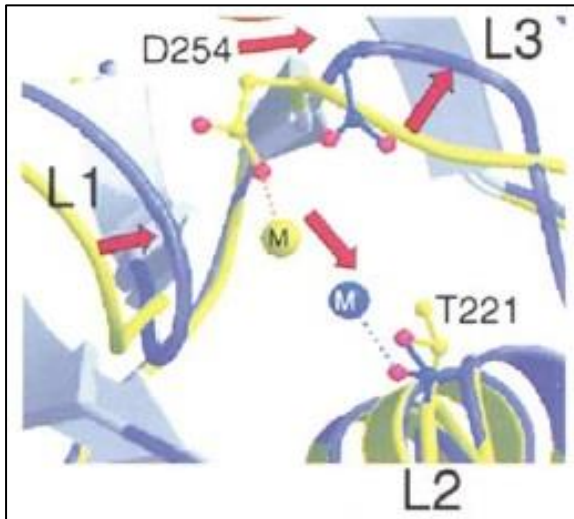


Εικ. 16: Το μεταλλικό σύμπλεγμα.

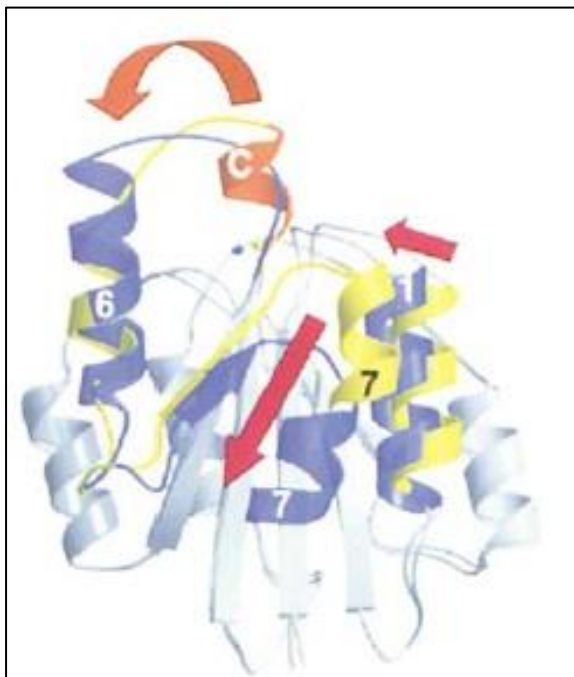
περιοχή αναγνώρισης του κολλαγόνου. Βρέθηκε ότι ο προσδέτης όντως συνδέεται στο κεντρικό μεταλλικό ιόν με μια καρβοξυτελική ομάδα, επηρεάζοντας τη στερεοδιάταξη του μετάλλου με αποτέλεσμα να αλλάζει η στερεοδιάταξη όλης της περιοχής I/A μέσω των τριών ελίκων που συνδέονται σε αυτό. Οι αλλαγές που συμβαίνουν στην περιοχή I/A περιέχουν: 1) πλευρική μετακίνηση των δομών θηλιάς που περιέχουν τα κατάλοιπα της I/A που προσδέονται στο μεταλλικό σύμπλεγμα και 2) μετακίνηση της καρβοξυτελικής έλικας της περιοχής I/A κατά μήκος αυτής, προς τα κάτω κατά περίπου  $10^\circ$  (εικ 18,19).



Εικ. 17: στερεοδιάταξη του μοντέλου MIDAS. Ο προσδέτης (κίτρινο) συνδέεται στο κεντρικό δισθενές μέταλλο με ένα κατάλοιπο γλουταμικού (E). Κατάλοιπα από τις τρεις έλικες της I/A περιοχής συνδέονται με το μέταλλο είτε απευθείας, είτε μέσω μορίων νερού(86).



**Εικ. 18:** Μεγένθυση στην περιοχή MIDAS και στις αλλαγές που συμβαίνουν κατά την πρόσδεση του υποδοχέα. Το μπλε χρώμα αντιπροσωπεύει τη διάταξη μετά την πρόσδεση και το κίτρινο τη διάταξη πριν την πρόσδεση. Τα κόκκινα βέλη δείχνουν την κατεύθυνση των αλλαγών(86).



**Εικ. 19:** οι δομικές αλλαγές της περιοχής I/A της υπομονάδας  $\alpha 2$  κατά την πρόσδεση με τον υποδοχέα (εδώ το κολλαγόνο). Οι χρωματικοί κωδικοί είναι ίδιοι με την εικ 18. Φαίνεται η προς τα κάτω μετακίνηση της καρβοξυτελικής  $\alpha 7$  έλικας και η πλευρική μετακίνηση της έλικας  $\alpha 1$ (86).

Τι συμβαίνει όμως με τις ιντεγκρίνες οι οποίες δε διαθέτουν την I/A περιοχή στην  $\alpha$  υπομονάδα, όπως είναι η  $GP\alpha_{11b\beta 3}$ ; Πως συνδέονται με τον προσδέτη τους; Την απάντηση έδωσαν ο Xiong και οι συνεργάτες του το 2001, με την κρυσταλλική μελέτη του εξωκυττάριου τμήματος της ιντεγκρίνης  $\alpha_v\beta_3$ (97), η οποία δε διαθέτει την περιοχή I/A στην  $\alpha$  υπομονάδα. Τα συμπεράσματά τους ήταν ιδιαίτερης σημασίας στην

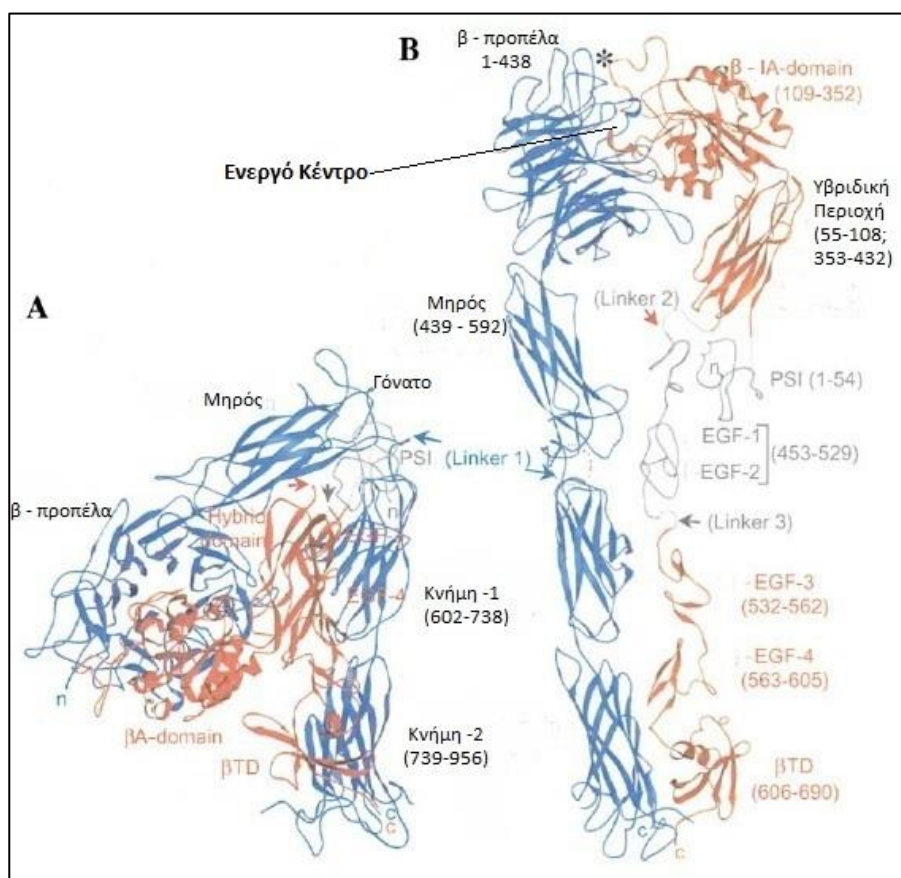
εξέλιξη της γνώσης τους γύρω από τις ιντεγκρίνες. Εκτός από την επιβεβαίωση του Lee στο γεγονός ότι υπάρχει μια περιοχή ομόλογη της I/A στη β υπομονάδα, έδειξε ότι υπάρχει επίσης μια περιοχή με δομή β-προπέλας μέσα στην α υπομονάδα. Η β προπέλα σχηματίζεται από 7 λεπίδες ( $W_1-W_7$ ), τις οποίες αποτελούν 7 ακτινικά διατεταγμένα β φύλλα. Κάθε λεπίδα αποτελείται από 4 αλυσίδες (4 β φύλλα) οι οποίες συνδέονται μεταξύ τους με τρεις θηλιές. Η τέταρτη αλυσίδα της κάθε λεπίδας συνδέεται με την πρώτη της επόμενης.

Απεδείχθη ότι η δομή της β-προπέλας της α υπομονάδας και η περιοχή που εμπεριέχει την I/A της β υπομονάδας περιπλέκονται για να σχηματίσουν την κεφαλή του υποδοχέα μέσα στην οποία γίνεται η σύνδεση του προσδέτη. Η κάθε υπομονάδα καταλήγει σε ένα άκρο το οποίο εισέρχεται στην κυτταρική μεμβράνη και αποτελεί το ενδοκυττάριο τμήμα του υποδοχέα. Όσον αφορά λοιπόν στην α υπομονάδα, η δομή β-προπέλας καταλήγει σε ένα επίμηκες άκρο δίκην ποδιού, το οποίο φέρει τρία τμήματα που έχουν ονομαστεί «μηρός», «κνήμη-1» και «κνήμη-2».

Η οργάνωση της β υπομονάδας είναι πιο περίπλοκη. Αν και η I/A περιοχή βρίσκεται στο πιο απομακρυσμένο σημείο σχετικά με το καρβοξυτελικό άκρο του ποδιού που εισέρχεται στην κυτταρική μεμβράνη, δε βρίσκεται στο αμινοτελικό άκρο της αλληλουχίας της υπομονάδας. Αυτό συμβαίνει γιατί η υπομονάδα β δημιουργεί σε κάποιο σημείο της πορείας της μία θηλιά, μέσα στην οποία βρίσκεται η I/A. Οι αλληλουχίες πριν και μετά την περιοχή I/A αποτελούν μία υβριδική περιοχή (εικ 20).

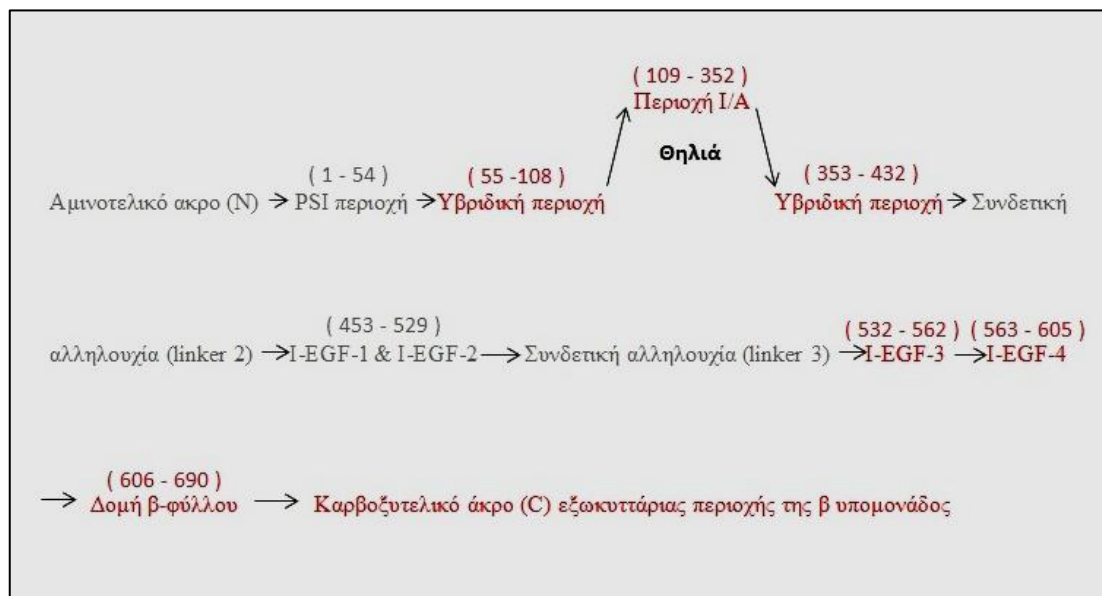
Το ενεργό κέντρο του υποδοχέα δημιουργείται ανάμεσα στην περιοχή I/A της β υπομονάδας και στη δομή β προπέλας της α υπομονάδας. Της υβριδικής περιοχής προηγείται μια αλληλουχία 54 αμινοξέων που ονομάζεται PSI και η οποία στην τρισδιάστατη δομή του υποδοχέα βρίσκεται κάτω από την υβριδική περιοχή. Πιθανολογείται ότι είναι συνδεδεμένη με δισουλφιδικούς δεσμούς με το πόδι της β υπομονάδος στην αλληλουχία EGF-1 που θα αναφερθεί αμέσως παρακάτω. Το άκρο της β υπομονάδος, αποτελείται από 4 διαδοχικές αλληλουχίες, οι οποίες είναι πλούσιες σε κυστεΐνη και είναι χαρακτηριστικές της β υπομονάδος. Η πρώτη και η δεύτερη δε φαίνονται αρκετά στην κρυσταλλική δομή για να μελετηθούν, η τρίτη και η τέταρτη όμως είναι ξεκάθαρα αναδιπλωμένες σε πτυχές τύπου EGF (Epidermal

Growth Factor – επιδερμικός αυξητικός παράγοντας). Η τέταρτη αλληλουχία ακολουθείται από ένα καρβοξυτελικό και συνδεδεμένο με δισουλφιδικό δεσμό β-φύλλο, το οποίο ονομάζεται δομή β-ουράς. Το 2002 αναλύθηκε και η δομή της δεύτερης αλληλουχίας με τεχνική πυρηνικής μαγνητικής φασματοσκοπίας (Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy – NMRS)(98) και φάνηκε ότι πρόκειται επίσης για πτυχή τύπου EGF. Από όσα αναλύθηκαν αλλά και από την εικ 20, γίνεται εύκολα αντιληπτό το πως αλλαγές στην I/A περιοχή επηρεάζουν άμεσα το ενεργό κέντρο του υποδοχέα.



**Εικ. 20:** **A.** Η τρισδιάστατη δομή της αδέσμευτης  $\alpha\beta_3$  ιντεγκρίνης. Με μπλε χρώμα η  $\alpha$  υπομονάδα και με κόκκινο η  $\beta_3$ . Στην κρυσταλλική μορφή, η ιντεγκρίνη κάμπτεται, δημιουργώντας ένα «γόνατο» σε γωνία  $135^\circ$  προς τα καρβοξυτελικά άκρα των δύο υπομονάδων της, τα οποία εισέρχονται στην κυτταρική μεμβράνη. Στη συγκεκριμένη δομή, είναι δύσκολο να διακριθούν οι αλληλουχίες που απαρτίζουν τις υπομονάδες. **B.** Το ευθειασμένο μόριο της ιντεγκρίνης, ύστερα από ευθυγράμμιση που έγινε στο «γόνατο», και περιστροφής του «μηρού» κατά  $120^\circ$  γύρω από τον άξονα του μορίου. Οι συνδετικές αλληλουχίες link-1, link-2, link-3, η περιοχή PSI και οι αλληλουχίες EGF-1 κι EGF-2 δεν έχουν ακόμα μελετηθεί επαρκώς. Εδώ είναι ξεκάθαρος ο διαχωρισμός του εξωκυττάριου τμήματος της ιντεγκρίνης σε πόδι και κεφαλή. Η κεφαλή αποτελείται από τη δομή της β-προπέλας της  $\alpha$  υπομονάδας

και από την περιοχή I/A της β υπομονάδας η οποία σχηματίζει θηλιά εισερχόμενη στην υβριδική περιοχή (για καλύτερη κατανόηση του σχηματισμού της θηλιάς, δεξ εικ 21). Σημειωτέον, ότι αν και στο πιο απομακρυσμένο σημείο από το καρβοξυτελικό άκρο, η I/A περιοχή δε βρίσκεται στο αμινοτελικό άκρο. Αυτό συμβαίνει χάρη στη θηλιά που αναφέραμε(97).

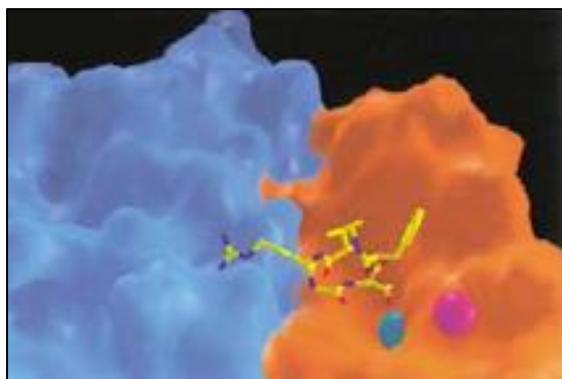


**Εικ. 21:** τα στοιχεία της β υπομονάδας του εξωκυττάριου τμήματος της ιντεγκρίνης, τοποθετημένα σε γραμμική σειρά για λόγους απλούστευσης και κατανόησης από τον αναγνώστη. Οι γκρίζες αλληλουχίες δεν έχουν ακόμη μελετηθεί επαρκώς. Οι αριθμοί αντιπροσωπεύουν τα αμινοξέα.

Ο Xiong και οι συνεργάτες του το 2001(97) δημιούργησαν ένα μοντέλο του εξωκυττάριου τμήματος του υποδοχέα σε περιβάλλον ρυθμιστικού διαλύματος ασβεστίου χωρίς προσδέτη, έτσι ώστε ο υποδοχέας να παραμείνει στην ανενεργή μορφή του. Δε βρέθηκε δισθενές κατιόν συνδεδεμένο στην περιοχή MIDAS, βρέθηκε όμως σε μια γειτονική περιοχή, την ADMIDAS (Adjacent to MIDAS), ενώ βρέθηκαν κι άλλα κατιόντα συνδεδεμένα σε άλλες περιοχές των δυο υπομονάδων. Ακολουθώντας, έγιναν μελέτες με ιόντα μαγγανίου και κυκλικά μόρια μιας αλληλουχίας Αργινίνης-Γλυκίνης-Ασπαρτικού (RGD αλληλουχία), τα cycloRGDF. Βρέθηκε ότι το κατάλοιπο αργινίνης προσδέεται στη δομή β-προπέλας της α υπομονάδας και το κατάλοιπο ασπαρτικού προσδέεται στο μεταλλικό σύμπλεγμα, που το Mn σχηματίζει στην περιοχή MIDAS(99). Οι αλλαγές που παρατηρήθηκαν περιελάμβαναν κι εδώ μετακίνηση των δομών θηλιάς στην κορυφή της περιοχής I/A (όπως παρατηρήθηκε στις περιοχές

I/A των  $\alpha$  υπομονάδων), όχι όμως την προς τα κάτω μετακίνηση της καρβοξυτελικής έλικας. Η εξήγηση που δόθηκε επάνω σε αυτό ήταν ότι η κίνηση της έλικας παρεμποδίστηκε από τα κρυσταλλικά πλέγματα. Στην κρυσταλλική δομή του ο υποδοχέας βρίσκεται σε κάμψη (εικ 20A), ενώ πολλά στοιχεία της  $\beta$  προπέλας της  $\alpha$  υπομονάδας κρύβονται από την αντιπαράθεση της  $\beta$  υπομονάδας(97).

Ήταν ήδη γνωστό από παλαιότερα ότι τα πεπτίδια RGD μπορούσαν να προσδένονται σε ιντεγκρίνες που δεν ήταν πλήρως ενεργοποιημένες. Αυτή η δυνατό-

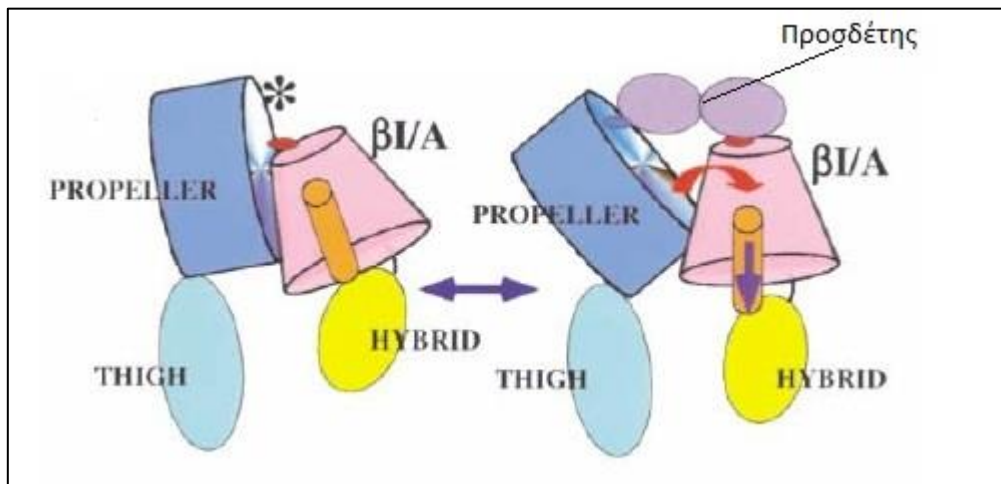


**Εικ. 22:** η κρυσταλλική δομή της κεφαλής του εξωκυττάριου τμήματος της ιντεγκρίνης ανβ3. Ξανά εδώ με μπλε χρώμα παρουσιάζεται η  $\alpha$  υπομονάδα και με κόκκινο η  $\beta$  (είναι εμφανής η απόκρυψη στοιχείων της  $\alpha$  υπομονάδας που αναφέρθηκε). Το κίτρινο μόριο είναι το cycloRGDF. Το κατάλοιπο αργινίνης προσδένει τη  $\beta$  προπέλα της  $\alpha$  υπομονάδας και το κατάλοιπο ασπαρτικού το μεταλλικό σύμπλεγμα

του Μαγγανίου (γαλάζιο). Με μωβ χρώμα φαίνεται ένα δεύτερο μόριο μαγγανίου συνδεδεμένο στην περιοχή ADMIDAS(99).

τητα δεν υπήρχε για μεγάλα πεπτίδια όπως το ινωδογόνο ή η ινονεκτίνη(100, 101). Προκειμένου να γίνει ο υποδοχέας ιντεγκρίνης πλήρως ενεργός, απαιτείται μια διεύρυνση της περιοχής ανάμεσα στην  $\alpha$  και τη  $\beta$  υπομονάδα. Διάφοροι ερευνητές παρατήρησαν κάποια απομάκρυνση της  $\beta$  προπέλας και της περιοχής I/A του GPIIb/IIIa υποδοχέα στην παρουσία RGD αλληλουχίας. Λόγω της σύνδεσης της καρβοξυτελικής έλικας (η οποία κατά τη σύνδεση με τον προσδέτη μετακινείται προς τα κάτω) με την υβριδική περιοχή που συνδέεται με την περιοχή PSI (η οποία είναι σταθεροποιημένη με δισουλφιδικό δεσμό στην EGF-1), συμβαίνει αλλαγή στη δομή της I/A. Αυτό οδηγεί σε απομάκρυνση από τη  $\beta$  προπέλα και το ενεργό κέντρο του υποδοχέα διευρύνεται (εικ 22). Έτσι είναι δυνατές περαιτέρω αλληλεπιδράσεις με

προσδέτες(86). Φαίνεται δηλαδή, ότι η RGD αλληλουχία προετοιμάζει την ιντεγκρίνη για να δεχτεί τον υποδοχέα της.

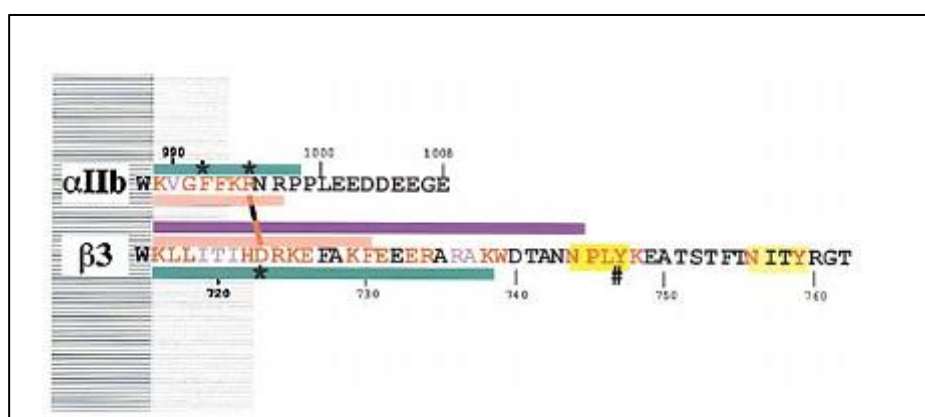


**Εικ. 22:** Ένας μικρός προσδέτης (αστερίσκος), όπως το cycloRGD, προσδένεται στην περιοχή μεταξύ της β προπέλας και της β-I/A περιοχής. Η καρβοξυτελική έλικα κινείται προς τα κάτω προκαλώντας την απομάκρυνση της I/A από τη β προπέλα διευρύνοντας το ενεργό κέντρο για να αλληλεπιδράσει με άλλους προσδέτες(86).

#### Η ΔΟΜΗ ΤΩΝ ΥΠΟΔΟΧΕΩΝ ΙΝΤΕΓΚΡΙΝΗΣ: ΕΝΔΟΚΥΤΤΑΡΙΟ ΤΜΗΜΑ

Τα ενδοκυττάρια τμήματα των δύο υπομονάδων των ιντεγκρινών είναι βραχύτερα (περίπου 50 αμινοξέα), αυτό όμως δε σημαίνει ότι είναι λιγότερο σημαντικά από τα εξωκυττάρια. Με αυτά γίνεται η σύνδεση της ιντεγκρίνης με τον κυτταροσκελετό, αλλά και η μεταγωγή του σήματος από τον υποδοχέα προς την πληθώρα των ενδοκυττάρων αποδεκτών του (εικ. 15). Επίσης, μπορούν να επηρεάσουν την κατάσταση ενεργοποίησης όλου του υποδοχέα, αλληλεπιδρώντας μεταξύ τους και επηρεάζοντας έτσι τη δομή και τη λειτουργία του εξωκυττάρια τμήματος. Ένας από τους υποδοχείς του οποίου τα ενδοκυττάρια τμήματα έχουν μελετηθεί διεξοδικά είναι ο αιμοπεταλιακός υποδοχέας GPIIb/IIIa. Έχει αποδειχθεί ότι το ενδοκυττάρια τμήμα της υπομονάδας  $\alpha_{IIb}$  αποτελεί έναν αρνητικό μηχανισμό ρύθμισης για τον υποδοχέα. Αναστολή της έκφρασης όλης της αλληλουχίας του ή απλώς της διατηρημένης αλληλουχίας GFFKR η οποία βρίσκεται κοντά στην κυτταρική

μεμβράνη, οδηγεί σε μόνιμη ενεργοποίηση του υποδοχέα(102). Η αλληλουχία της  $\beta_3$  υπομονάδας που βρίσκεται κοντά στην κυτταρική μεμβράνη είναι σημαντική για τον ίδιο λόγο(103). Επίσης, το αμινοξύ αργινίνης της θέσης 995 του ενδοκυττάριου τμήματος της  $\alpha_{IIb}$  σχηματίζει με το αμινοξύ ασπαρτικού οξέως της θέσης 723 της  $\beta_3$  υπομονάδος μια γέφυρα άλατος (εικ 23). Έτσι, οι δυο υπομονάδες διατηρούνται κοντά και ο υποδοχέας παραμένει σε ανενεργή κατάσταση. Η μετάλλαξη οποιουδήποτε από τα παραπάνω αμινοξέα σε αλανίνη οδηγεί σε μόνιμη ενεργοποίηση του υποδοχέα ενώ η επαναφορά των κατάλληλων αμινοξέων τον αδρανοποιεί και πάλι(104).

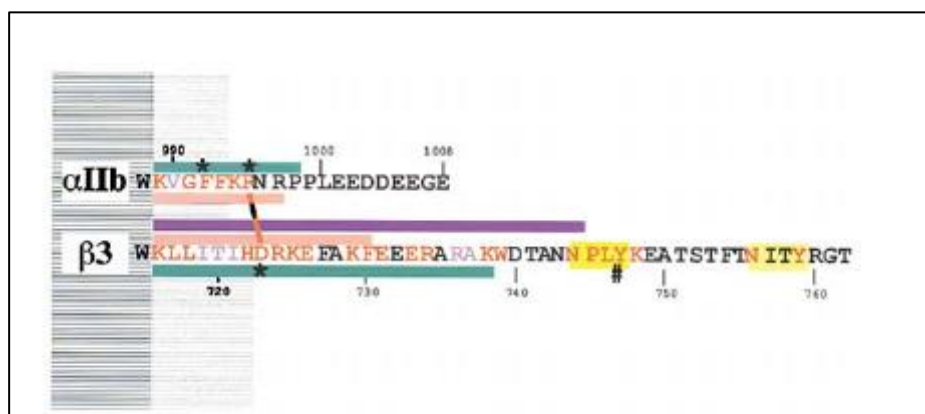


**Εικ. 23:** απλουστευμένη απεικόνιση των ενδοκυττάριων τμημάτων των υπομονάδων της ιντεγκρίνης  $\alpha_{IIb}\beta_3$ . Η γκρίζα διαγραμμισμένη ζώνη αντιπροσωπεύει την κυτταρική στοιβάδα. Τα αμινοξέα που απεικονίζονται με ροζ χρώμα έχουν διατηρηθεί στην πλειοψηφία των ιντεγκρινών, ενώ τα αμινοξέα με ανοιχτό μωβ χρώμα έχουν διατηρηθεί στις μισές περίπου. Τόσο η μετάλλαξη των αλληλουχιών της κάθε υπομονάδας που βρίσκονται κοντά στη μεμβράνη, όσο και η σημειακή μετάλλαξη των αμινοξέων που σημειώνονται με αστερίσκο, οδηγούν σε μόνιμη ενεργοποίηση του υποδοχέα. Με κόκκινη γραμμή η γέφυρα άλατος ανάμεσα στο R995 και το D723(86).

Πολλά μοντέλα αλληλεπίδρασης των ενδοκυττάριων τμημάτων των  $\alpha_{IIb}$  και  $\beta_3$  υπομονάδων προτάθηκαν κατά καιρούς τα οποία συμπεριελάμβαναν διαχωρισμό, συμπίεση και στροφή των δυο υπομονάδων. Μελέτες NMRS και κυτταρικής βιολογίας ανέδειξαν το μοντέλο διαχωρισμού ως το πιθανότερο. Ήταν γνωστό από το 1999, ότι η κεφαλή του μορίου της πρωτεΐνης ταλίνης, μπορούσε να προσδεθεί στο ενδοκυττάριο τμήμα της  $\beta_3$  υπομονάδας του  $\alpha_{IIb}\beta_3$  υποδοχέα, αλλά και στα ενδοκυττάρια τμήματα των  $\beta$  υπομονάδων των ιντεγκρινών γενικότερα. Το αμινοξύ



τυροσίνης της θέσης 747 (Y747), ήταν απαραίτητο για αυτή την αλληλεπίδραση(105, 106). Ο Vinogradova κι οι συνεργάτες του το 2002 προχώρησαν ακόμη παραπέρα και βρήκαν ότι η ταλίνη προσδένεται με την κεφαλή της επάνω στο ενδοκυττάριο τμήμα της  $\beta_3$  υπομονάδας, όχι όμως της  $\alpha_{IIb}$ . Η αλληλουχία αμινοξέων της  $\beta_3$  η οποία αλληλεπιδρά με την ταλίνη εμπεριέχει μέσα της το κρίσιμο κατάλοιπο Ασπαρτικού 723 το οποίο σχηματίζει τη γέφυρα με την υπομονάδα  $\alpha_{IIb}$ . Έτσι, η σύνδεση της ταλίνης στη  $\beta_3$  υπομονάδα καταστρέφει τη γέφυρα άλατος μεταξύ αυτής και της  $\alpha_{IIb}$ , χωρίζει τα ενδοκυττάρια τμήματα και ενεργοποιεί την ιντεγκρίνη(107).



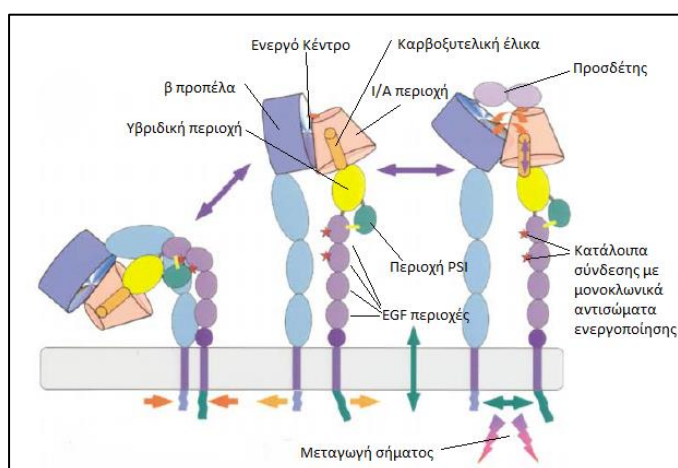
**Εικ. 24:** Η μωβ μπάρα δείχνει την αλληλουχία του ενδοκυττάριου τμήματος της  $\beta_3$  υπομονάδας που αλληλεπιδρά με την ταλίνη. Το κρίσιμο αμινοξύ D723 (το οποίο σχηματίζοντας γέφυρα με το R995 συντηρεί δεμένες τις δύο υπομονάδες μεταξύ τους και τον υποδοχέα σε ανενεργή μορφή) βρίσκεται μέσα σε αυτή την αλληλουχία. Η πρόσδεση της ταλίνης κατά μήκος αυτής αλληλουχίας αχρηστεύει τη γέφυρα και χωρίζει τις υπομονάδες, ενεργοποιώντας τον υποδοχέα(86).

### Η ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ ΥΠΟΔΟΧΕΩΝ ΙΝΤΕΓΚΡΙΝΗΣ

Αρχικά επικράτησε η ιδέα, ότι η κεκαμμένη κρυσταλλική μορφή του υποδοχέα (εικ 20A) είναι η ενεργός μορφή του(97, 99). Ωστόσο αυτό γρήγορα ανασκευάστηκε λόγω του επιχειρήματος ότι ο υποδοχέας κρυσταλλοποιήθηκε χωρίς προσδέτη. Έρευνες με ηλεκτρονικό μικροσκόπιο από τον Weisel και τον Du με τους συνεργάτες τους πάνω σε υποδοχείς που έφεραν τον προσδέτη τους, ανέδειξαν ως ενεργό την ευθειασμένη μορφή του υποδοχέα(108, 109). Επίσης, ο Beglova με τους συνεργάτες του παρατήρησαν ότι συγκεκριμένα κατάλοιπα των περιοχών EGF-2 και EGF-3 τα οποία

χρησιμοποιούνται για τη σύνδεση με μονοκλωνικά αντισώματα που έχουν ιδιότητες ενεργοποίησης, κρύβονται στην κεκαμμένη μορφή και εκτίθεντο μόνο στην ευθιασμένη. Επίσης, κατάλοιπα της περιοχής PSI που χρησιμοποιούνται για τον ίδιο λόγο είναι κρυμμένα κάτω από το «γόνατο» στην κεκαμμένη μορφή του υποδοχέα(98). Τα παραπάνω οδηγούν στο συμπέρασμα ότι η κεκαμμένη μορφή είναι η ανενεργής και ότι η ενεργοποίηση απαιτεί τον ευθιασμό και το διαχωρισμό των ποδιών.

Ως πιθανότερο θεωρείται λοιπόν το μοντέλο που συνδέει την ενεργοποίηση του υποδοχέα στο ενεργό του κέντρο (β προπέλα – I/A) από τον προσδέτη του, με τις αλλαγές που συμβαίνουν από τα «πόδια» του υποδοχέα (ευθιασμός και διαχωρισμός τους) μέχρι και τα διαμεμβρανικά και ενδοκυττάρια τμήματά τους τα οποία επίσης διαχωρίζονται. Έτσι επιτρέπεται η αλληλεπίδραση με κυτταροπλασματικές πρωτεΐνες και μόρια μεταγωγής σήματος. Αυτό ονομάζεται μεταγωγή σήματος από έξω προς τα μέσα (“Outside-in signaling”). Αυτή η σχέση είναι αμφίδρομη και πρέπει να θεωρείται ως μια δυναμική ισορροπία. Αντιστρόφως λοιπόν, ο διαχωρισμός των κυτταροπλασματικών τμημάτων των υπομονάδων α και β (π.χ από την ταλίνη όπως αναφέρθηκε ή άλλους ενεργοποιητές) θα ενεργοποιήσει την κεφαλή για να συνδεθεί με τον προσδέτη. Αυτό ονομάζεται μεταγωγή σήματος από μέσα προς τα έξω («Inside-out signaling»). Ένα παράδειγμα απεικονίζεται στην εικ 13, όπου η ταλίνη λόγω μεταγωγής σήματος από έξω προς τα μέσα που έγινε λόγω της πρόσδεσης του παράγοντα von Willebrand στον υποδοχέα του GPIIb-IX-V, ενεργοποιεί τον υποδοχέα GPIIbIIIa με μεταγωγή σήματος από μέσα προς τα έξω, έτσι ώστε να προσδέσει το ινωδογόνο. Τόσο η από έξω προς τα μέσα, όσο και η από



μέσα προς τα έξω μεταγωγή σήματος, αποτελούν τις δύο διαφορετικές πλευρές του ίδιου νομίσματος.

**Εικ. 25:** «Inside-out» και «outside-in» μεταγωγή σήματος. Η ενεργοποίηση του υποδοχέα μπορεί να

πραγματοποιηθεί και από τα έσω και από τα έξω του κυττάρου με αποτέλεσμα η μεταγωγή σήματος να είναι δυνητικά αμφίδρομη. Με τη σύνδεση του προσδέτη αλλάζει η σχέση της β προπέλας με την υβριδική περιοχή μέσω της προς τα κάτω μετακίνησης της καρβοξυτελικής έλικας. Λόγω της σύνδεσης της υβριδικής περιοχής με την PSI και της τελευταίας με την EGF-1 περιοχή, αυτό συνεπάγεται αλλαγή της σχέσης μεταξύ των ποδιών, διαχωρισμό των ενδοκυττάρων τμημάτων και μεταγωγή σήματος μέσω της δυνατής πλέον σύνδεσης με κυτταροπλασματικές πρωτεΐνες. Η διαδικασία μεταγωγής σήματος μπορεί να συμβεί και αντίστροφα.(86)

Η διαδικασία ενεργοποίησης των ιντεγκρινών που φέρουν I/A στην α υπομονάδα τους διαφέρει σε κάποια σημεία. Δε θα γίνει αναφορά σε αυτές καθώς ο υποδοχέας GPIIbIIIa που αποτελεί το αντικείμενο του παρόντος συγγράμματος, δεν ανήκει σε αυτή την κατηγορία.

### **Ο ΥΠΟΔΟΧΕΑΣ ΙΝΤΕΓΚΡΙΝΗΣ GPIIbIIIa**

Οι υποδοχείς GPIIbIIIa βρίσκονται μόνο στα μεγακαρυοκύτταρα και τα αιμοπετάλια(110) με περίπου 80.000(111) να εκφράζονται σε κάθε κύτταρο και να βρίσκονται στην κυτταρική μεμβράνη, το SCCS και τα α – κοκκία. Ο αριθμός των υποδοχέων της κυτταρικής μεμβράνης γίνεται ακόμα μεγαλύτερος κατά την ενεργοποίηση του αιμοπεταλίου, καθώς πρόσθετα μόρια GPIIbIIIa μεταναστεύουν από τα α-κοκκία στην επιφάνεια(112). Αποτελούν τους πολυπληθέστερους αιμοπεταλιακούς υποδοχείς. Όπως αναφέρθηκε, πρόκειται για ετεροδημερή με ευμεγέθη εξωκυττάρια τμήματα και μικρές ενδοκυττάρια ουρές, οι οποίες χρησιμεύουν στην ενδοκυττάρια μεταγωγή σήματος.

Οι υποδοχείς GPIIbIIIa ενεργοποιούνται αρχικά μέσω μεταγωγής σήματος από την πρόσδεση του von Willebrand στον υποδοχέα του GPIb-IX-V (εικ 13). Η κυριότερη λειτουργία τους είναι να συσσωρεύουν τα αιμοπετάλια, είτε με γέφυρες ινωδογόνου, είτε με πρόσδεση του παράγοντα von Willebrand σταθεροποιώντας τα νέα αιμοπετάλια επάνω στο σχηματιζόμενο θρόμβο. Προκειμένου όμως να επιτελέσουν αυτή τη λειτουργία, απαιτούνται αλλαγές της στερεοδιάταξής τους οι οποίες επάγονται κατά την ενεργοποίηση του αιμοπεταλίου(113) (εικ 13). Η συγγένεια των

υποδοχέων GPIIb/IIIa για τους προσδέτες τους είναι δυναμική. Σε κατάσταση ηρεμίας είναι πολύ μικρή, αυξάνεται όμως δραματικά κατά την ενεργοποίηση του αιμοπεταλίου. Αυτό συμβαίνει λόγω αλλαγών στη δομή του υποδοχέα που επάγονται είτε από τους αγωνιστές αιμοπεταλιακής συσσώρευσης (όπως το ADP και η θρομβίνη) μέσω των GPCRs υποδοχέων τους, είτε από προσκολλητικά μόρια όπως ο παράγοντας von Willebrand και το κολλαγόνο μέσω των υποδοχέων τους GPIIb-IX-V και GPVI. Αυτή η διαδικασία ονομάζεται όπως είπαμε μεταγωγή σήματος από τα έξω του κυττάρου προς τα έξω («inside-out», εικ 13). Αντιστρόφως, όταν ο προσδέτης προσδένεται στον υποδοχέα, τότε ξεκινά η μεταγωγή σήματος από έξω προς τα μέσα («outside-in») και εν συνεχεία όλες οι διαδικασίες ενεργοποίησης του αιμοπεταλίου που έχουν περιγραφεί. Η πρώτη υποψία ότι ο υποδοχέας GPIIb/IIIa εμπλέκεται στη δέσμευση του ινωδογόνου δημιουργήθηκε κατά τη μελέτη ασθενών με θρομβασθένεια Glanzman's, μια αιμορραγική διαταραχή κατά την οποία οι υποδοχείς αυτοί είτε απουσιάζουν από τα αιμοπετάλια, είτε είναι δυσλειτουργικοί(114-116).

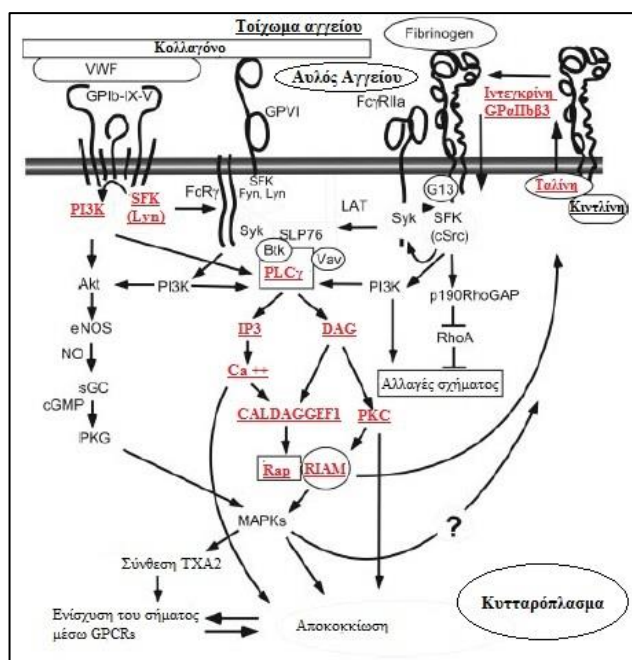
Ο υποδοχέας GPIIb/IIIa ή GP $\alpha_{IIb}\beta_3$  (από το όνομα των δύο υπομονάδων που τον αποτελούν), είναι ένα ετεροδιμερές και εκτός από το ινωδογόνο, αποτελεί επίσης υποδοχέα για τον παράγοντα von Willebrand (πρωτεΐνες προσκόλλησης οι οποίες προκαλούν τη συσσώρευση των αιμοπεταλίων) καθώς και την ινονεκτίνη και τη βιτρονεκτίνη (πρωτεΐνες οι οποίες τη ρυθίζουν). Συντίθεται στο ενδοπλασματικό δίκτυο των μεγακαρυοκυττάρων από τις πρόδρομες μορφές των δύο υπομονάδων(117), και μετά τη μετάφρασή του υφίσταται επεξεργασία στο σύμπλεγμα Golgi, όπου η υπομονάδα  $\alpha_{IIb}$  κόβεται σε βαριά κι ελαφριά αλυσίδα(118).

Η δομή του υποδοχέα είναι αναλύθηκε παραπάνω. Ο προσδέτης συνδέεται αφενώς στην I/A περιοχή της  $\beta_3$  κι αφετέρου στη  $\beta$  προπέλα της  $\alpha_{IIb}$  υπομονάδας(119), ενώ απαιτείται όπως αναφέρθηκε η παρουσία δισθενών κατιόντων(86). Τα σημεία στα οποία συνδέονται τα κατιόντα προσδιορίστηκαν στην κρυσταλλική δομή της  $\alpha_v\beta_3$  ιντεγκρίνης και είναι οκτώ: 4 εντοπίστηκαν στη  $\beta$  προπέλα της  $\alpha_v$  υπομονάδος, 1 βρέθηκε στο «γόνατο» της  $\alpha_v$  και 3 στην I/A περιοχή της  $\beta_3$  υπομονάδος(97, 99). Μόνο αυτά της  $\beta$  υπομονάδος φαίνεται να συμμετέχουν στη σύνδεση του προσδέτη. Όπως αναλύθηκε, απουσία του προσδέτη μόνο η ADMIDAS περιοχή της  $\beta$  υπομονάδος

καταλαμβάνεται από κατιόν. Παρουσία όμως του προσδέτη (π.χ cycloRGDF) και του Μαγγανίου, και τα τρία σημεία θα φέρουν κατιόντα. Ένα κατιόν καταλαμβάνει την περιοχή MIDAS και έρχεται όπως είπαμε σε απευθείας επαφή με τον προσδέτη αλλάζοντας τη στερεοδιάταξη του και επηρεάζοντας άμεσα το ενεργό κέντρο, ένα δεύτερο κατιόν βρίσκεται περίπου  $6 \text{ \AA}$  μακριά από τη MIDAS σε μια περιοχή που ονομάζεται LIMBS (ligand induced metal-binding site – περιοχή σύνδεσης μετάλλου που επάγεται από τον προσδέτη) χωρίς όμως να σχετίζεται με τον προσδέτη, ενώ το τρίτο βρίσκεται στην περιοχή ADMIDAS. Τα κατιόντα που συνδέονται στις περιοχές MIDAS και LIMBS χρησιμεύουν για τη σταθεροποίηση της δομής που προκύπτει όταν ο προσδέτης συνδεθεί στον υποδοχέα.

#### ΜΕΤΑΓΩΓΗ ΣΗΜΑΤΟΣ ΜΕΣΩ ΤΗΣ ΙΝΤΕΓΚΡΙΝΗΣ GRIbIIIa: ΑΠΟ ΜΕΣΑ ΠΡΟΣ ΤΑ ΕΞΩ («INSIDE-OUT»)

Όπως αναφέρθηκε σημαντικό ρόλο στην «inside-out» ενεργοποίηση του υποδοχέα GRIbIIIa αποτελεί η ταλίνη, η οποία προσδένεται στο ενδοκυττάριο τμήμα της  $\beta_3$  υπομονάδος και τη χωρίζει από την  $\alpha_{IIb}$ , ενεργοποιώντας τον υποδοχέα. Έρευνες επίσης αποκάλυψαν ότι πρωτεΐνες που ονομάζονται κιντλίνες, προσδένονται σε διαφορετικά σημεία του ενδοκυττάριου τμήματος της  $\beta_3$  υπομονάδος (αλληλουχίες NxxY 744-747 και 756-759, εικ 24), ρυθμίζουν την αλληλεπίδραση  $\beta_3$ -ταλίνης και συνεργάζονται με την ταλίνη στην «inside-out» μεταγωγή σήματος. Ωστόσο, η πρόσδεση της ταλίνης και μόνο στο ενδοκυττάριο τμήμα της  $\beta_3$  υπομονάδος είναι αρκετή για να ενεργοποιήσει τον υποδοχέα.



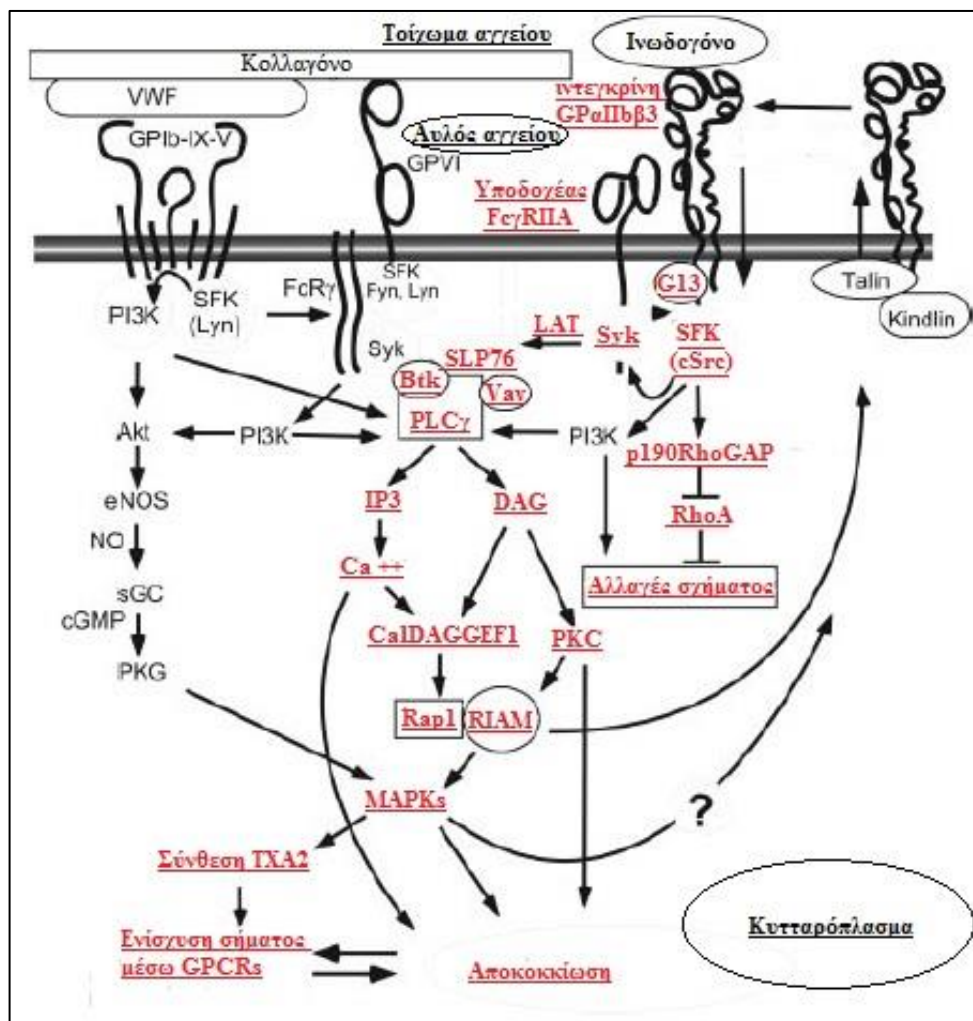
**Εικ. 26:** «Inside-out» μεταγωγή σήματος για την ενεργοποίηση του υποδοχέα GPIIbIIIa(85).

Επιπροσθέτως, το μόριο CalDAGGEF1 καθώς και το Rap1 που ενεργοποιείται από αυτό, παίζουν σημαντικό ρόλο στην «inside-out» μεταγωγή σήματος. Το μόριο Rap1 ανήκει στην οικογένεια Ras των GTPασών. Το CalDAGGEF1 μετατρέπει το Rap1 από την ανενεργή του μορφή (στην οποία προσδένει GDP) στην ενεργή (στην οποία προσδένει GTP). Η μορφή αυτή (Rap1-GTP) αλληλεπιδρά στη συνέχεια με το μόριο RIAM (Rap1-GTP-interacting adaptor molecule), το οποίο προάγει την αλληλεπίδραση της ταλίνης με το ενδοκυττάριο τμήμα της  $\beta_3$  υπομονάδος του GPIIbIIIa υποδοχέα(85) (εικ 26).

### ΜΕΤΑΓΩΓΗ ΣΗΜΑΤΟΣ ΜΕΣΩ ΤΗΣ ΙΝΤΕΓΚΡΙΝΗΣ GPIIbIIIa: ΑΠΟ ΕΞΩ ΠΡΟΣ ΤΑ ΜΕΣΑ («OUTSIDE-IN»)

Η σύνδεση του ινωδογόνου στον υποδοχέα GPIIbIIIa αρχικά πυροδοτεί τη σύνδεση της  $\alpha$  υπομονάδας της G πρωτεΐνης  $G_{13}$  στο κυτταροπλασματικό τμήμα της  $\beta_3$  υπομονάδας του υποδοχέα. Το γεγονός αυτό ενεργοποιεί την c-Src της οικογένειας των Src κινασών η οποία οδηγεί σε μία σειρά γεγονότων, αφού συνδεθεί στη  $\beta_3$  υπομονάδα:

1. Φωσφορυλιώνονται το κατάλοιπο τυροσίνης Y747 του κυτταροπλασματικού τμήματος της β3 υπονάδος το οποίο αναστέλει τη σύνδεση της ταλίνης με τον υποδοχέα και το κατάλοιπο τυροσίνης Y759 του κυτταροπλασματικού τμήματος της β3 υπομονάδος, γεγονός που την προστατεύει από τη διάσπαση από μία πρωτεάση εξαρτώμενη από το ασβέστιο, που ονομάζεται καλπαΐνη.
2. Η RhoA, είναι μία GTPάση, η οποία ρυθμίζει τη σύσπαση του κυττάρου μέσω της συσώρευσης των νηματίων ακτίνης. Αν και η παρατεταμένη ενεργοποίηση του υποδοχέα GPIIb/IIIa από το ινωδογόνο ενεργοποιεί τη RhoA, αρχικά αυτή αναστέλλεται προσωρινά, έτσι ώστε να επιτραπεί στο αιμοπετάλιο να επεκτείνει την επιφάνεια του οδηγόντας έτσι στην ανάπτυξη της θρομβογόνου επιφανείας. Μετά το σχηματισμό του θρόμβου και την πήξη του αίματος, η καλπαΐνη διασπά τη β3 υπομονάδα στο σημείο που συνδέεται με την c-Src, γεγονός το οποίο διακόπτει την προσωρινή αναστολή της RhoA. Έτσι ενεργοποιείται και οδηγεί στη σύσπαση του θρόμβου, η οποία οδηγεί στην επούλωση του τραυματισμένου αγγείου.
3. Οι κινάσες Src ενεργοποιούν την κινάση Syk. Στα ανθρώπινα αιμοπετάλια αυτό γίνεται μέσω φωσφορυλίωσης του υποδοχέα FcγRIIA, ο οποίος στρατολογεί τη Syk στη διαδικασία μεταγωγής σήματος. Η Syk κινάση προκαλεί τη συναρμολόγηση ενός συμπλέγματος που αποτελείται από τα μόρια SLP-76, LAT, Btk και VAV το οποίο εν συνεχεία ενεργοποιεί τη φωσφολιπάση γ και οδηγεί στην ενεργοποίηση του αιμοπεταλίου.

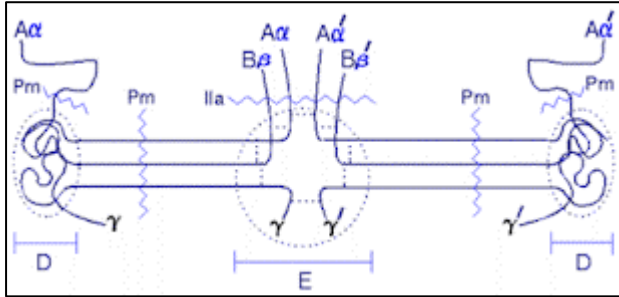


**Εικ. 27:** «outside-in» μετάγwgή σήματος, μέσω του υποδοχέα GPIIb/IIIa(85).

### ΤΟ ΙΝΩΔΟΓΟΝΟ

Ως το μόριο που δημιουργεί γέφυρες ανάμεσα στα αιμοπετάλια, το ινωδογόνο παίζει ζωτικό ρόλο στη διαδικασία της αιμόστασης. Τα μόρια ινωδογόνου είναι επιμήκεις κατασκευές που αποτελούνται από δύο σετ τριών πολυπεπτιδικών αλυσίδων: των Αα, Ββ και γ. Τα δύο σετ συναντώνται σε μια κεντρική Ε περιοχή και σταθεροποιούνται μέσω δισουλφιδικών δεσμών (εικ 28). Οι εξωτερικές περιοχές του ινωδογόνου στις οποίες και οι τρεις αλυσίδες περιπλέκονται μεταξύ τους ονομά-

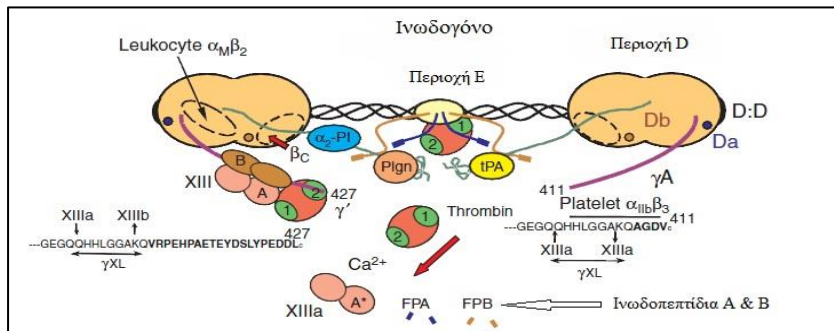




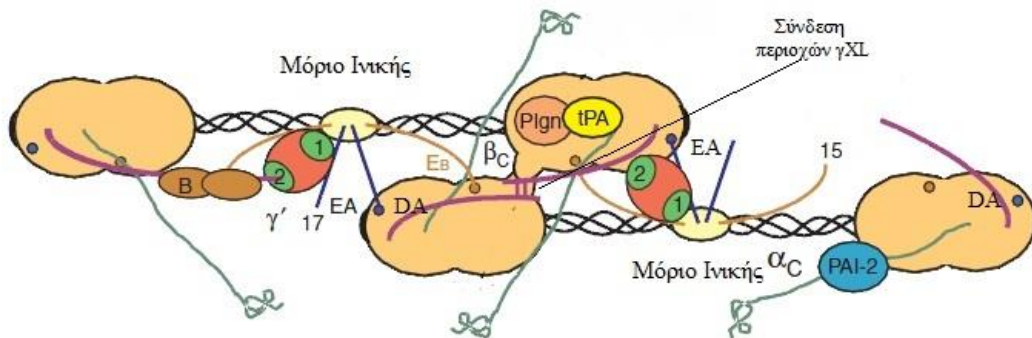
**Εικ. 28:** Μια απλουστευμένη απεικόνιση του ινωδογόνου.

ζονται περιοχές D. Οι Αα αλυσίδες αποτελούνται από 610 αμινοξέα, οι Ββ από 461 και η κυρίαρχη μορφή των γ αλυσίδων (υπάρχουν κάποιες σπάνιες παραλλαγές της γ αλυσίδας) από 41 αμινοξέα(120).

Στο αμινοτελικό άκρο της κάθε Αα αλυσίδας υπάρχει μια αλληλουχία που ονομάζεται ινωδοπεπτίδιο Α (Fibrinopeptide Α – FPA). Αυτή περικόπτεται από τη θρομβίνη (εικ 29) και ξεκινά έτσι η δημιουργία και η συνάθροιση της ινικής εκθέτοντας μια περιοχή πολυμερισμού που ονομάζεται Ε<sub>Α</sub>. Κάθε περιοχή Ε<sub>Α</sub> συνδέεται με μια περιοχή D<sub>Α</sub> στην D περιοχή δύο γειτονικών μορίων ινικής όπως φαίνεται στις εικ 30 και 31. Η σύνδεση Ε<sub>Α</sub> και D<sub>Α</sub> ευθυγραμμίζει τα μόρια ινικής σε ένα μοτίβο «κέντρο με άκρη», δημιουργώντας έτσι διπλά ινίδια ινικής(120) (εικ 30).

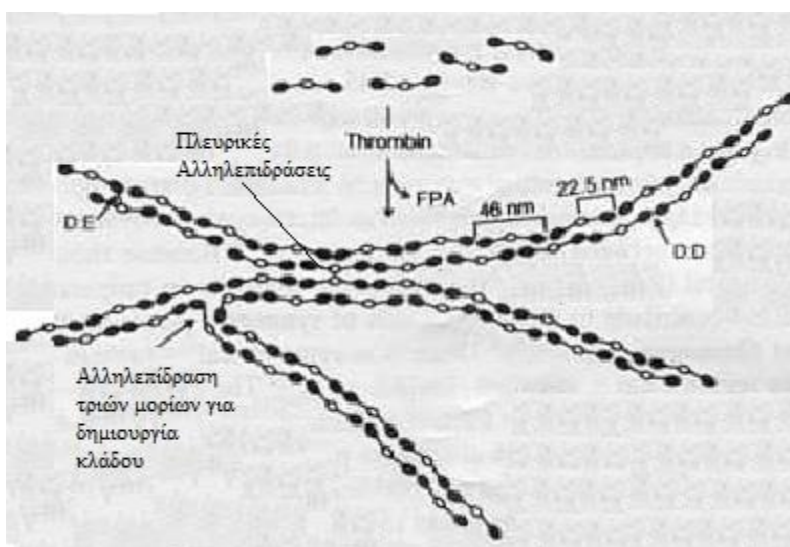


**Εικ. 29:** Το ινωδογόνο, η αλληλεπίδρασή του με διάφορα μόρια και η δράση της θρομβίνης η οποία περικόπτει τα FPA & FPB δημιουργώντας την ινική (120).



**Εικ. 30:** σύνδεση δύο γειτονικών μορίων ινικής για να σχηματίσουν ινίδια ινικής(120).

Τα σχηματισμένα ινίδια ινικής εν συνεχεία θα αλληλεπιδράσουν με δύο πιθανούς τρόπους: i) θα συγκλίνουν πλευρικά μεταξύ τους ως διπλά ινίδια ινικής για να σχηματίσουν ίνες ινικής τεσσάρων νημάτων σε μία αμφίπλευρη σύνδεση, είτε ii) θα σχηματίσουν μια διακλάδωση από την αλληλεπίδραση τριών μορίων ινικής μεταξύ τους (εικ 31). Η τελευταία αυτή σύνδεση γίνεται πιο συχνά όταν η περικοπή των ινωδοπεπτιδίων γίνεται αργά έτσι ώστε να σχηματίζει πιο σταθερές και πιο περίπλοκες-διακλαδισμένες δομές ινικής(120).



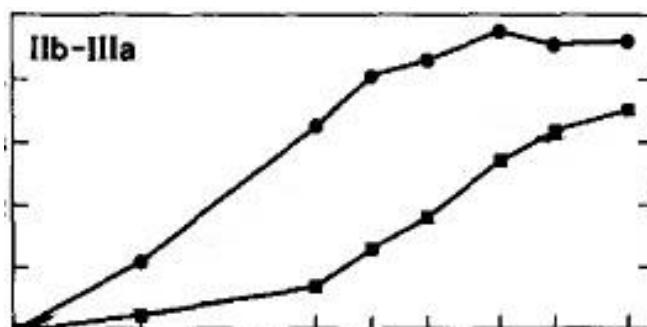
**Εικ. 31:** Η δημιουργία του θρόμβου ινικής μέσω αλληλεπιδράσεων ανάμεσα στα ινίδια ινικής.

Τα ινωδοπεπτιδία Β (fibrinopeptide Β – FPB) απελευθερώνονται πολύ πιο αργά από τα FPA. Το σημείο πολυμερισμού  $E_B$  που απελευθερώνεται αλληλεπιδρά με την περιοχή  $D_B$  που βρίσκεται πάνω στη Ββ αλυσίδα στην D περιοχή (εικ 30). Οι αλληλεπιδράσεις  $E_B:D_B$  είναι ασθενέστερες από τις  $E_A:D_A$ (121).

Στην περιοχή της  $\gamma$  αλυσίδας της κάθε D περιοχής, υπάρχει η  $\gamma_{CL}$  περιοχή. Δύο  $\gamma_{CL}$  περιοχές γειτονικών μορίων ινικής συνδέονται μεταξύ τους δημιουργώντας έτσι δεσμό ανάμεσα στις δύο  $\gamma$  αλυσίδες και συνεισφέροντας στη σύνδεση και την ευθυγράμμιση των μονομερών ινικής(120) (εικ. 30).

### ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΟΥ ΙΝΩΔΟΓΟΝΟΥ ΜΕ ΤΟΝ ΥΠΟΔΟΧΕΑ GPIIb/IIIa

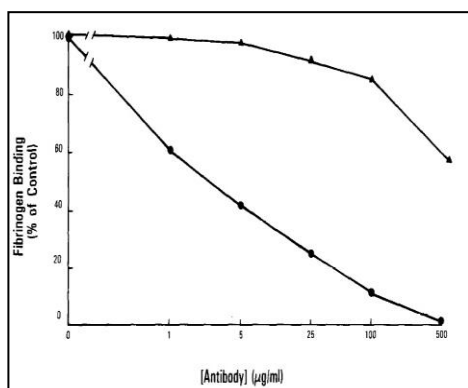
Όπως αναφέρθηκε, ο GPIIb/IIIa διαθέτει την ικανότητα δέσμευσης πεπτιδίων που περιέχουν την αλληλουχία RGD (Arg-Gly-Asp). Επίσης, η σύνδεση του με τους προσδέτες του μπορεί να ανασταλεί από τέτοια πεπτίδια. Εφόσον λοιπόν ο παράγοντας von Willebrand και το ινωδογόνο περιέχουν από μια τουλάχιστον RGD αλληλουχία στη δομή τους, θεωρείται ότι η αλληλεπίδραση ανάμεσα στον υποδοχέα και τους προσδέτες του γίνεται μέσω της RGD αλληλουχίας που περιέχουν.



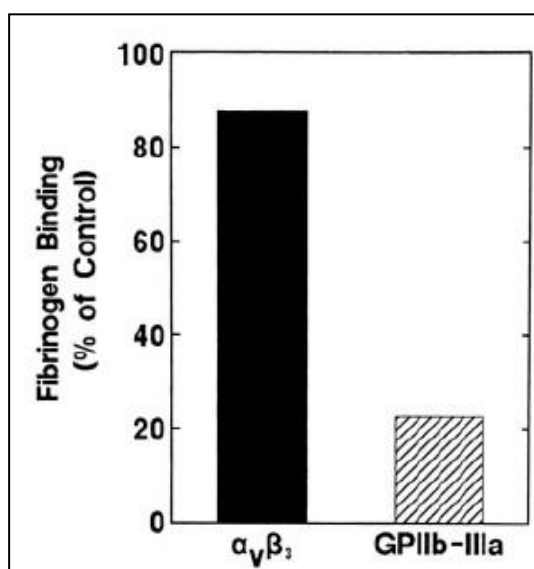
**Εικ. 32:** η σύνδεση του ινωδογόνου (κύκλος), κι ενός θραύσματος του ινωδογόνου από το οποίο έχει αφαιρεθεί η RGD Αλληλουχία 572-574 (τετράγωνο) στον υποδοχέα GPIIb/IIIa. Αν και με μικρότερη συγγένεια, το θραύσμα προσδένεται στον GPIIb/IIIa όπως το ινωδογόνο. Η RGD αλληλουχία 572-574 δεν είναι η μόνη περιοχή αλληλεπίδρασης του ινωδογόνου με τον GPIIb/IIIa(122).

Όσον αφορά στο ινωδογόνο, το μόριό του περιέχει δύο αλληλουχίες RGD στην Αα αλυσίδα του (93 έως 95 και 572 έως 574). Έχει αποδειχθεί ότι πεπτίδια ανάλογα των αλληλουχιών αυτών αλληλεπιδρούν με τον GPIIb/IIIa(123) και αναστέλλουν τη συσσώρευση των αιμοπεταλίων(124). Από την άλλη πλευρά, η αφαίρεση της RGD αλληλουχίας 572-574 από το μόριο του ινωδογόνου αν και μειώνει τη συγγένεια, δε φαίνεται να οδηγεί σε αναστολή της σύνδεσης με τον υποδοχέα GPIIb/IIIa και συνεπώς οι RGD αλληλουχίες δεν αποτελούν τις μόνες περιοχές αλληλεπίδρασης ανάμεσα στα δύο μόρια (εικ 32 και 33)(122). Πράγματι, ο GPIIb/IIIa αλληλεπιδρά με το ινωδογόνο και μέσω ενός δωδεκαπεπτιδίου το οποίο βρίσκεται κοντά στο καρβοξυτελικό άκρο της γ αλυσίδας και φέρει την αλληλουχία HHLGGAKQAGDV (γ400-411)(125-127). Συνθετικά πεπτίδια που περιέχουν αυτή την αλυσίδα των αμινοξέων 400 έως 411 αναστέλλουν τη δράση του ινωδογόνου στη συσσώρευση των αιμοπεταλίων, αν και δε διαθέτουν RGD αλληλουχία(127) (εικ 34). Το γεγονός

αυτό προσδίδει στην αλληλουχία του δωδεκαπεπτιδίου πρωταρχικό ρόλο στην αλληλεπίδραση GPIIb/IIIa – ινωδογόνου, συγκριτικά με τις RGD αλληλουχίες. Συνεπώς υπάρχουν τουλάχιστον τρεις περιοχές στο μόριο του ινωδογόνου με τις οποίες αλληλεπιδρά ο GPIIb/IIIa(125, 126, 128).



**Εικ. 33:** Η χρήση μονοκλωνικού αντισώματος για την αλληλουχία 566 – 580 SSTS~~YN~~RGDSTFESK της Αα αλυσίδας του ινωδογόνου, μόνο μερικώς αναστέλλει τη σύνδεση με τον GPIIb/IIIa (τρίγωνο). Αντιθέτως, η σύνδεση του GPAνβ3 (κύκλος) αναστέλλεται πλήρως. Συνεπώς, ο υποδοχέας GPAνβ3 συνδέεται στο ινωδογόνο χρησιμοποιώντας αποκλειστικά την RGD αλληλουχία 572-574 της Αα αλυσίδας, σε αντίθεση με τον GPIIb/IIIa υποδοχέα(122).



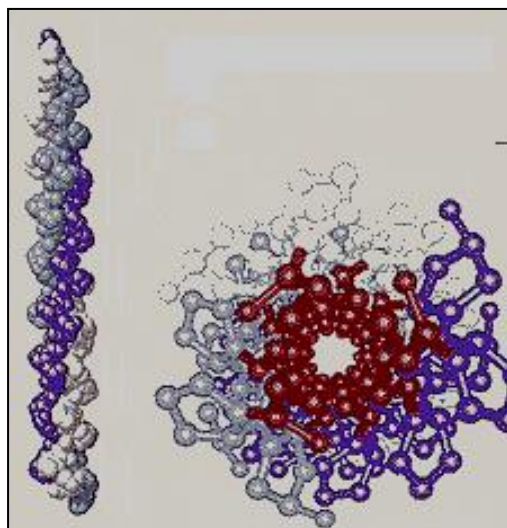
**Εικ. 34:** η ανασταλτική επίδραση του συνθετικού δωδεκαπεπτιδίου του καρβοξυτελικού άκρου της γ αλυσίδας του ινωδογόνου στην πρόσδεση του με τον GPIIb/IIIa, κάνει εμφανή τη μεγάλη του σημασία σε αυτή την αλληλεπίδραση. Αντιθέτως, η επίδραση του ίδιου πεπτιδίου στη σύνδεση με τον GPAνβ3 υποδοχέα είναι σχεδόν μηδενική, αποδεικνύοντας ότι η συγκεκριμένη ιντεγκρίνη δε χρησιμοποιεί το δωδεκαπεπτίδιο για να συνδεθεί με το ινωδογόνο, σε αντίθεση με τον GPIIb/IIIa(122).

### ΤΟ ΚΟΛΛΑΓΟΝΟ ΚΑΙ ΟΙ ΥΠΟΔΟΧΕΙΣ ΤΟΥ

Το κολλαγόνο είναι μία από τις κυρίαρχες πρωτεΐνες οι οποίες εκτίθενται στο υπενδοθήλιο κατά τον τραυματισμό του. Βρίσκεται στα θηλαστικά σε μεγαλύτερη ποσότητα από κάθε άλλη πρωτεΐνη αποτελώντας το 25-30% της ποσότητας των πρωτεϊνών του σώματος. Είναι το κύριο συστατικό του συνδετικού ιστού. Δύο είναι οι κυρίαρχοι υποδοχείς του: ο γλυκοπρωτεϊνικός υποδοχέας Ia1a ο οποίος είναι ένας υποδοχέας ιντεγκρίνης (GPA<sub>2</sub>β<sub>1</sub>) και ο γλυκοπρωτεϊνικός υποδοχέας VI (GPVI)(129).

Το κολλαγόνο συντίθεται από μία πληθώρα κυττάρων όπως τα ενδοθηλιακά κύτταρα, τα επιθηλιακά κύτταρα, τα μακροφάγα, τα λεία μυϊκά κύτταρα, τα κερατινοκύτταρα και κυρίως οι ινοβλάστες(130). Συνεισφέρει στη διατήρηση της ακεραιότητας και της ελαστικότητας των αιμοφόρων αγγείων, ενώ αποτελεί έναν ισχυρό ενεργοποιητή των αιμοπεταλίων σε *in vitro* μελέτες. Από τους 24 τύπους κολλαγόνου, τα κολλαγόνα τύπου I,III και IV είναι τα περισσότερο δραστικά, επάγουν την ενεργοποίηση αλλά και τη συσώρευση των αιμοπεταλίων και βρίσκονται στα αγγειακά τοιχώματα. Είναι επίσης παρόντα στο υπενδοθήλιο, αλλά και στα βαθύτερα στρώματα των αγγείων με αποτέλεσμα να εκτίθενται τόσο σε επιφανειακούς όσο και σε βαθύτερους τραυματισμούς. Μαζί με τους υποδοχείς τους, έχει αποδειχθεί ότι παίζουν σημαντικό ρόλο στην παθογένεση των θρομβώσεων.

Το κολλαγόνο αποτελείται από ινίδια τα οποία συντίθενται από τα μόρια του κολλαγόνου που ονομάζονται τροποκολλαγόνο. Το τροποκολλαγόνο έχει μήκος περίπου 300nm και διάμετρο περίπου 1,5 nm. Αποτελείται από τρεις πολυπεπτιδικές αλυσίδες. Η κάθε μία από αυτές είναι μια αριστερόστροφη έλικα, μαζί όμως περιπλέκονται σε μία δεξιόστροφη έλικα που σταθεροποιείται από διάφορους δεσμούς υδρογόνου (εικ 35). Η ακολουθία των αμινοξέων του παρουσιάζει πολύ συχνά τα πρότυπα Gly-Pro-x ή Gly-x-Hyr, όπου το «x» μπορεί να είναι οποιοδήποτε αμινοξύ. Τα μισά αμινοξέα περίπου στην αλληλουχία του κολλαγόνου είναι γλυκίνη, προλίνη ή υδροξυπρολίνη, με τη γλυκίνη συγκεκριμένα να αποτελεί το 1/3. Η γλυκίνη είναι ζωτικής σημασίας για τη δομή του κολλαγόνου καθώς το μικρό της μέγεθος την καθιστά ικανή να χωράει στο κέντρο της έλικας και να σταθεροποιεί το μόριο με



δεσμούς υδρογόνου (εικ 35). Η υδροξυλίωση της προλίνης σε υδροξυπρολίνη είναι επίσης σημαντική καθώς παρέχει περισσότερο υδρογόνο που θα χρησιμοποιηθεί για τη σταθεροποίηση της έλικας.

**Εικ. 35:** η δομή του κολλαγόνου. Με κόκκινο οι κεντρικές γλυκίνες.

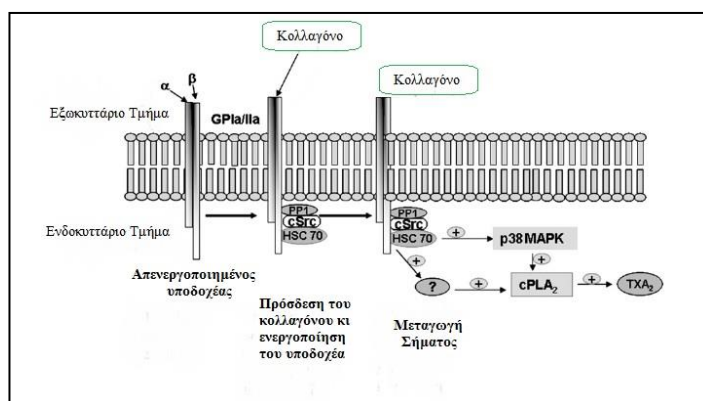
Η αλληλεπίδραση του κολλαγόνου με το αιμοπετάλιο εξαρτάται από τις διατμητικές δυνάμεις που ασκούνται επάνω σε αυτό. Κατά τον τραυματισμό του ενδοθηλίου σε συνθήκες ροών υψηλής ταχύτητα (αρτηριακό αγγειακό δίκτυο), το εκτεθειμένο κολλαγόνο χρησιμεύει στην αρχική σύλληψη και κύλιση του νέου αιμοπεταλίου πάνω στο τραυματισμένο ενδοθήλιο, προσδένοντας και εκθέτοντας μόρια παράγοντα von Willebrand τα οποία συνδέονται αντιστρεπτά με τον αιμοπεταλιακό υποδοχέα GPIb-IX-V(72). Επίσης χρησιμεύει στη σταθερή και μη αναστρέψιμη σύνδεση του αιμοπεταλίου στην περιοχή του τραυματισμού μέσω της πρόσδεσής του στον υποδοχέα GPVI. Σε συνθήκες ροών χαμηλής ταχύτητας (φλεβικό αγγειακό δίκτυο), το κολλαγόνο μπορεί να δεσμεύσει απευθείας τα αιμοπετάλια, προσδενόμενο απευθείας στον υποδοχέα ιντεγκρίνης GPIIb/IIIa και εν συνεχεία στον GPVI(131). Άλλες πρωτεΐνες που δεσμεύουν κολλαγόνο και βρίσκονται στην επιφάνεια του αιμοπεταλίου είναι οι GPIIb και GP61(132).

#### ΜΕΤΑΓΩΓΗ ΣΗΜΑΤΟΣ ΜΕΣΩ ΤΩΝ ΥΠΟΔΟΧΕΩΝ GPIIb/IIIa

Ο υποδοχέας GPIIb/IIIa ή  $\text{GP}\alpha_2\beta_1$  είναι ο πιο σημαντικός υποδοχέας που επάγει τη σύνδεση των αιμοπεταλίων στο τοιχωματικό κολλαγόνο και την ενεργοποίησή τους από αυτό. Περιέχεται επίσης στα ενδοθηλιακά κι επιθηλιακά κύτταρα(133). Η πρόσδεση του κολλαγόνου σε αυτούς τους υποδοχείς εξαρτάται από ιόντα  $\text{Mg}^{+2}$  (134). Η μεγάλη σημασία του για την αιμοπεταλιακή συσσώρευση και τη θρόμβωση φαίνεται από το ότι μειωμένη έκφραση των συγκεκριμένων υποδοχέων στην αιμοπεταλιακή μεμβράνη συνδέεται με παρατεταμένους χρόνους πήξης, βλεννογονικές αιμορραγίες και επηρεασμένη πρόσδεση του κολλαγόνου στο αιμοπετάλιο(135). Αντιθέτως, αυξημένη έκφρασή τους φαίνεται να σχετίζεται με αυξημένο κίνδυνο για οξέα στεφανιαία σύνδρομα κι εγκεφαλικά επεισόδια(136, 137).

Οι υποδοχείς αυτοί μέσω μεταγωγής σήματος επάγουν την αλλαγή του σχήματος και την εξάπλωση του αιμοπεταλίου επάνω στην αθηρογόνο επιφάνεια του τραυματισμένου ενδοθηλίου(132). Το κολλαγόνο συνδέεται στον υποδοχέα GPIIb/IIIa και επάγει διαδικασίες αιμοπεταλιακής ενεργοποίησης. Ενεργοποιείται έτσι η

φωσφολιπάση  $A_2$ , η οποία υδρολύει τα φωσφολιπίδια της κυτταρικής μεμβράνης για να παράγει αραχιδονικό οξύ. Το αραχιδονικό οξύ θα χρησιμοποιηθεί για να παράγει Θρομβοξάνη  $A_2$  ( $TxA_2$ ), η οποία επάγει την αύξηση του ενδοκυττάριου ασβεστίου και την ενεργοποίηση του αιμοπεταλίου που οδηγεί σε δομικές αλλαγές του υποδοχέα GPIIb/IIIa (inside-out signaling) και συσσώρευση (εικ 36).



**Εικ. 36:** Η πρόσδεση του κολλαγόνου στον υποδοχέα GPIIb/IIIa οδηγεί μέσω μεταγωγής σήματος στην παραγωγή θρομβοξάνης  $A_2$  που επάγει την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων. Για τη μεταγωγή σήματος προς αυτή την κατεύθυνση, στρατολογούνται διάφορα μόρια,

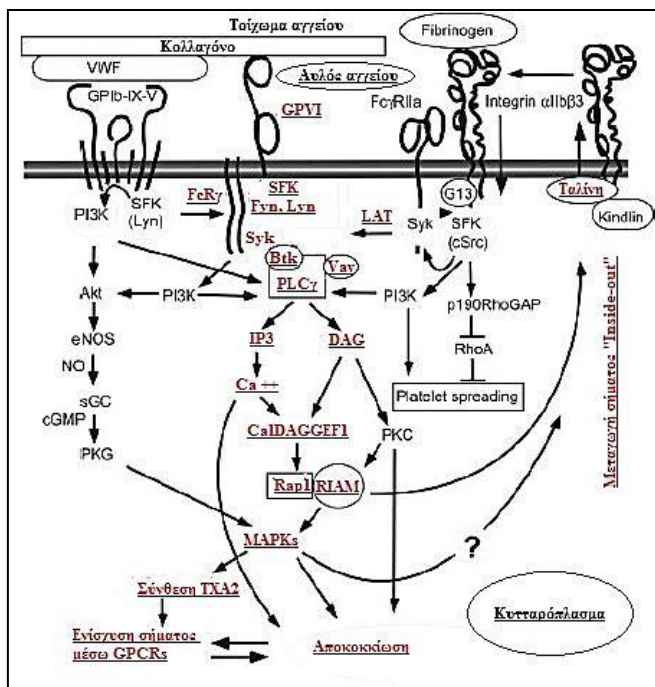
όπως πρωτεΐνες θερμικού σοκ (Heat shock proteins-HSPs) και κινάσες τυροσίνης όπως η src και η πρωτεϊνική φωσφατάση 1 (Protein Phosphatase 1-PP1)(138).

### ΜΕΤΑΓΩΓΗ ΣΗΜΑΤΟΣ ΜΕΣΩ ΤΟΥ ΥΠΟΔΟΧΕΑ GPVI

Ο υποδοχέας GPVI αλληλεπιδρά με τα κολλαγόνα τύπου III και IV. Σε αντίθεση με τον GPIIb/IIIa δεν είναι υποδοχέας ιντεγκρίνης, παίζει όμως επίσης σημαντικό ρόλο στην ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων, τη συσσώρευση και το σχηματισμό του θρόμβου(139). Ανωμαλίες στην έκφραση αυτών των υποδοχέων στα ανθρώπινα αιμοπετάλια προκαλεί ήπια παράταση των χρόνων πήξης(132), ενώ προστατεύει τέτοια ποντίκια από αρτηριακές θρομβώσεις(140).

Ο υποδοχέας GPVI είναι συνδεδεμένος με τη  $\gamma$  αλυσίδα του υποδοχέα Fc ( $Fc\gamma$ ). Όταν ο υποδοχέας προσδεθεί στο κολλαγόνο, ένα μοτίβο του κυτταροπλασματικού τμήματος του  $Fc\gamma$ , το οποίο ονομάζεται ITAM (immunorecptor tyrosine-based activation motif – μοτίβο ενεργοποιούμενο απο τυροσίνη) υφίσταται φωσφορυλίωση στη θέση μίας τυροσίνης, από κινάσες της οικογένειας Src (κυρίως τις Lyn και Fyn), οι οποίες είναι συνδεδεμένες στο κυτταροπλασματικό τμήμα του υποδοχέα GPVI. Η φωσφορυλίωση του ITAM οδηγεί στην πρόσδεση και

ενεργοποίηση της κινάσης Syk, η οποία εν συνεχεία φωσφορυλιώνει διάφορα μόρια όπως το LAT (Linker for activated T cells) και το SLP-76 (Src homology 2 domain-containing leukocyte phosphoprotein of 76-kDa). Έτσι σχηματίζεται το ίδιο σύμπλεγμα το οποίο συντήσαμε στην «outside-in» μεταγωγή σήματος μέσω του υποδοχέα GPIIb/IIIa: το LAT/SLP-76/BTK (κινάση τυροσίνης Bruton)/PLC $\gamma$ . Το σύμπλεγμα αυτό ενεργοποιεί την PLC $\gamma$ , γεγονός το οποίο οδηγεί στην παραγωγή TXA $_2$ , την αποκοκκίωση και την ενεργοποίηση του GPIIb/IIIa («inside-out» μεταγωγή σήματος) (εικ 37).



**Εικ. 37:** «outside-in» μεταγωγή σήματος μέσω του υποδοχέα GPIIb/IIIa.

### Η ΘΡΟΜΒΙΝΗ ΚΑΙ ΟΙ ΥΠΟΔΟΧΕΙΣ ΤΗΣ

Η θρομβίνη είναι μια πρωτεάση σερίνης η οποία παράγεται κατά την πήξη του αίματος, όταν η προθρομβίνη λύεται από το σύμπλεγμα προθρομβινάσης (σύμπλεγμα FXa+FVa+Ca). Η προθρομβίνη παράγεται στο ήπαρ με μια διαδικασία εξαρτώμενη από τη βιταμίνη K και αποτελεί τον κυρίαρχο ρυθμιστή της πήξεως. Μετατρέπει το ινωδογόνο σε ινική, ενεργοποιεί τον παράγοντα XIII, ενεργοποιεί γειτονικά αιμοπετάλια για να συνεισφέρουν στην πήξη του αίματος και ενεργοποιεί τους παράγοντες V και VIII με ένα μηχανισμό θετικής ανατροφοδότησης, για να ενισχυθεί περαιτέρω ο καταρράκτης της πήξης.



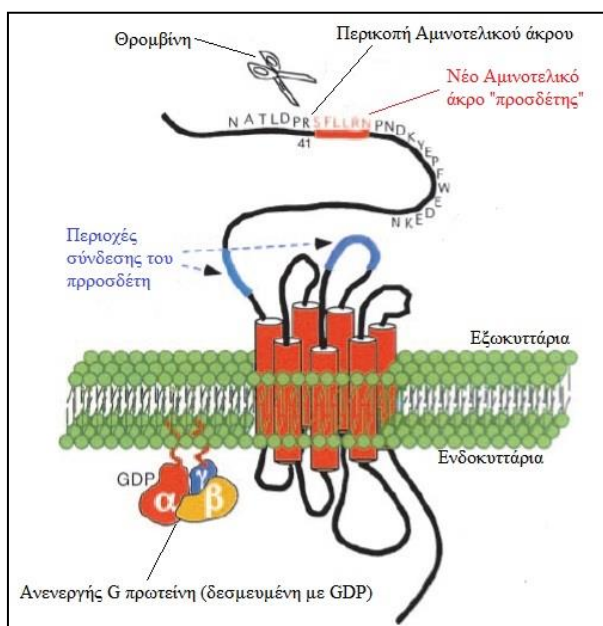
Όσον αφορά στα αιμοπετάλια, η θρομβίνη παίζει κυρίαρχο ρόλο στη στρατολόγηση τους σε περιοχές αγγειακού τραυματισμού. Επάγει την ενεργοποίηση και τη συσσώρευσή τους μέσω ενεργοποίησης υποδοχέων που ονομάζονται υποδοχείς ενεργοποιούμενοι από πρωτεάση (Protease Activated Receptors – PARs), οι οποίοι ανήκουν στην οικογένεια των GPCRs. Οι υποδοχείς αυτοί ενεργοποιούνται πρωτεολυτικά από τη θρομβίνη και εκκινούν διαδικασίες μεταγωγής σήματος που θα μετατρέψουν ανενεργά αιμοπετάλια σε κύτταρα τα οποία θα συμμετάσχουν στην ανάπτυξη του αιμοστατικού θρόμβου. Η προσθήκη της θρομβίνης σε αιμοπετάλια *in vitro*, προκαλεί αλλαγή στο σχήμα τους, αποκοκκίωση και συσσώρευσή τους.

Από τους 4 υποδοχείς PAR που έχουν αναγνωριστεί, οι PAR-1, PAR-3 και PAR-4 είναι υποδοχείς της θρομβίνης. Οι υποδοχείς PAR-3 και PAR-4 ανακαλύφθηκαν όταν τα αιμοπετάλια από διαγονιδιακά ποντίκια τα οποία δεν εξέφραζαν τον υποδοχέα PAR1, συνέχισαν να ανταποκρίνονται στη θρομβίνη(141-143). Ο υποδοχέας PAR-3 δεν εκφράζεται στα ανθρώπινα αιμοπετάλια. Οι υποδοχείς PAR-2 εκφράζονται από έναν αριθμό κυττάρων όπως τα ενδοθηλιακά όχι όμως από τα αιμοπετάλια, ενώ δεν ενεργοποιούνται από τη θρομβίνη(144-146). Ως υποδοχείς της οικογένειας GPCRs, αποτελούνται από ένα εξωκυττάριο αμινοτελικό άκρο, 7 διαμεμβρανικά τμήματα και ένα ενδοκυττάριο καρβοξυτελικό άκρο, ενώ για τη μεταγωγή σήματος αλληλεπιδρούν με G πρωτεΐνες. Η θρομβίνη ενεργοποιεί τα ανθρώπινα αιμοπετάλια μέσω των υποδοχέων PAR-1 και PAR-4(147). Ο πληθυσμός αυτών των υποδοχέων στην επιφάνεια του αιμοπεταλίου είναι 2000 και 1000 αντίστοιχα(148). Ταυτόχρονη αναστολή αυτών των υποδοχέων, είτε με αντισώματα είτε με ανταγωνιστικά για τη θρομβίνη μόρια, εξαλείφει εντελώς την απάντηση των αιμοπεταλίων σε αυτήν(149).

Ο PAR-1 είναι ο σημαντικότερος υποδοχέας θρομβίνης στα ανθρώπινα αιμοπετάλια και ανακαλύφθηκε το 1991(150, 151). Η ενεργοποίησή του ξεκινά όταν η θρομβίνη διασπά το τμήμα του αμινοτελικού άκρου έως και την Αργινίνη της θέσης 41. Δημιουργείται έτσι ένα νέο αμινοτελικό άκρο που λειτουργεί ως προσδέτης. Ο προσδέτης αυτός συνδέεται σε περιοχές των εξωκυττάρων θηλιών του υποδοχέα αλλάζοντας έτσι τη στερεοδιάταξη του. Αυτό είναι η αρχή για μία ριπή μεταγωγής σήματος δια της κυτταρικής μεμβράνης, μέσω ανταλλαγής του GDP που είναι δεσμευμένο στη σχετική G πρωτεΐνη (ανενεργός μορφή πρωτεΐνης) με GTP (ενεργός

μορφή πρωτεΐνης) (εικ 38). Εν συνεχεία ο υποδοχέας απευαισθητοποιείται και ενίοτε απομακρύνεται από την επιφάνεια του αιμοπεταλίου(152). Η διάσπαση του αμινοτελικού άκρου του υποδοχέα PAR-4 απαιτεί υψηλότερες συγκεντρώσεις θρομβίνης (10 έως 100 φορές περισσότερο(147)) και η ενεργοποίησή του είναι παρατεταμένη συγκριτικά με τον PAR-1. Το γεγονός αυτό προσδίδει ιδιαίτερη σημασία στον υποδοχέα PAR-1, ο οποίος θεωρείται ο επικρατών υποδοχέας σε συνθήκες χαμηλής συγκέντρωσης θρομβίνης(153, 154).

Οι G πρωτεΐνες είναι ετεροτριμερή που αποτελούνται από α,β και γ υπομονάδα. Η υπομονάδα α περιέχει μια περιοχή δέσμησης νουκλεοτιδίων γουανίνης. Όταν η πρωτεΐνη δεσμεύει τη διφωσφορική γουανοσίνη (GDP) είναι ανενεργής, ενώ όταν δεσμεύει την τριφωσφορική γουανοσίνη (GTP) ενεργοποιείται και μεταδίδει το σήμα. Η ενεργοποίηση γίνεται με την απόσπαση της α υπομονάδας που δεσμεύει το GTP, γεγονός που εκθέτει δραστικές περιοχές στις υπομονάδες β και γ(147). Η ενεργοποιημένη υπομονάδα Gα αλλά και το σύμπλεγμα Gβ/Γγ αλληλεπιδρούν με διάφορα μόρια και μεταδίδουν το σήμα(85). Υπάρχουν 4 οικογένειες G πρωτεϊνών. Τα ανθρώπινα αιμοπετάλια εκφράζουν τουλάχιστον μία από την οικογένεια G<sub>s</sub> και τέσσερις από την οικογένεια G<sub>i</sub> (G<sub>i1</sub>, G<sub>i2</sub>, G<sub>i3</sub> και G<sub>iz</sub>), οι οποίες όταν ενεργοποιούνται αναστέλλουν τη δημιουργία του κυκλικού AMP (γνωστός αναστολέας της αιμοπεταλιακής ενεργοποίησης). Εκφράζουν επίσης G πρωτεΐνες της οικογένειας G<sub>q</sub> οι οποίες ενεργοποιούν ισομορφές της φωσφολιπάσης C και 2 μέλη της οικογένειας G<sub>12</sub> ( G<sub>12</sub> και G<sub>13</sub>) οι οποίες ρυθμίζουν αλλαγές στον κυτταροσκελετό ακτίνης(85, 147).



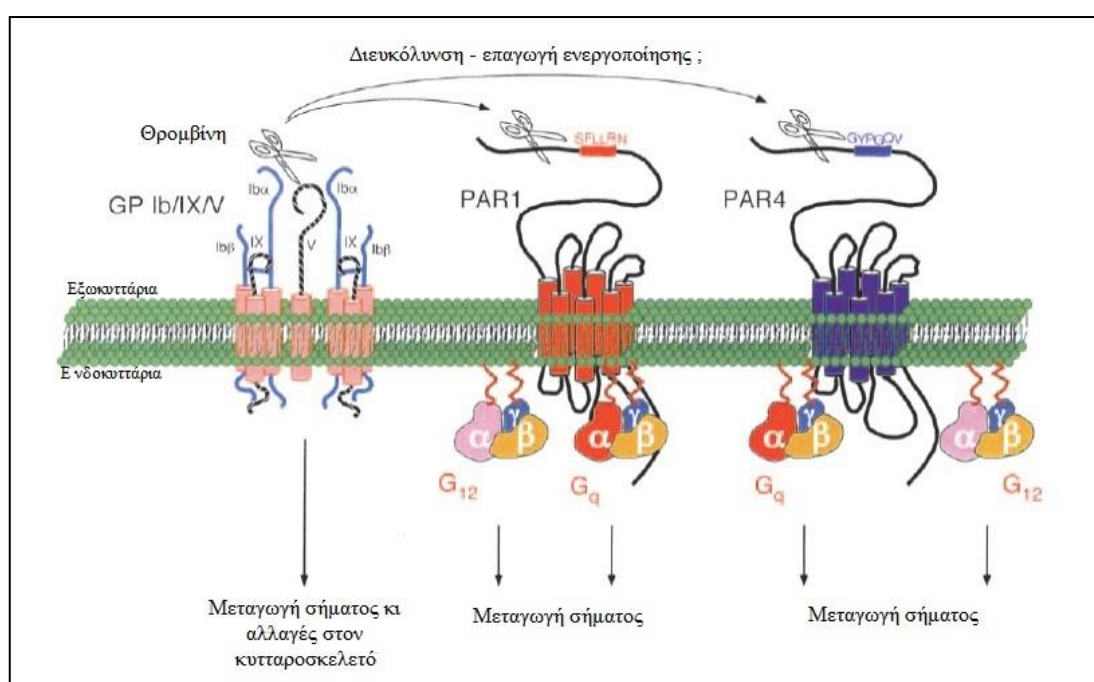
**Εικ. 38:** Η θρομβίνη περικόπτει το αμινοτελικό άκρο του υποδοχέα PAR-1 δημιουργώντας ένα νέο αμινοτελικό άκρο το οποίο δρα ως προσδέτης σε εξωκυττάρια περιοχές του υποδοχέα. Ξεκινά έτσι η μεταγωγή σήματος η οποία θα οδηγήσει σε ενεργοποίηση της σχετικής G με τον υποδοχέα ("G-coupled") πρωτεΐνης η οποία βρίσκεται σε ανενεργή μορφή δεσμεύοντας GDP(147).

Συνοψίζοντας, η περικοπή των εξωκυττάρων αμινοτελικών άκρων των PAR-1 και PAR-4, οδηγεί σε ενεργοποίηση των G πρωτεϊνών  $G_q$ ,  $G_{12}$  και ίσως και των  $G_i$  οι οποίες ενεργοποιούν τη φωσφολιπάση  $\beta$ , την κινάση PI-3 και τις μονομερείς G πρωτεΐνες Rho, Rac και Rap1, αυξάνουν το ενδοκυττάριο ασβέστιο και αναστέλουν το cAMP. Η ενεργοποίηση των ισομορφών της φωσφολιπάσης  $\beta$  από τις πρωτεΐνες  $G_q$  παίζει ιδιαίτερα σημαντικό ρόλο καθώς οδηγεί σε αύξηση των επιπέδων του ασβεστίου η οποία οδηγεί στην αποκοκκίωση του ADP από τα αιμοπεταλιακά κοκκία καθώς και στην παραγωγή T $\alpha_2$  μέσω της δράσης της φωσφολιπάσης 2. Το ADP και η T $\alpha_2$  εξωκυττάρωνονται, προσδένονται στους δικούς τους G-coupled υποδοχείς και ενισχύουν την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων(147).

Ο υποδοχέας GPIb-IX-V ο οποίος όπως αναφέρθηκε δεσμεύει τον παράγοντα von Willebrand, φαίνεται να διαθέτει μία περιοχή στην υπομονάδα GPIa (αλληλουχία των αμινοξέων 268-287) η οποία παρουσιάζει αυξημένη συγγένεια με τη θρομβίνη(155). Η αποκοπή του εξωκυττάρου τμήματος της υπομονάδος GPIa ή η δέσμευση και αναστολή της περιοχής που προαναφέρθηκε, μειώνουν κατά πολύ την απάντηση των αιμοπεταλίων στη θρομβίνη(156, 157). Έτσι, αν και είναι βέβαιο ότι οι PAR-1 και PAR-4 αποτελούν τα κύρια μέσα απάντησης του αιμοπεταλίου στη θρομβίνη, είναι πιθανό η αλληλεπίδραση της θρομβίνης με τον υποδοχέα GPIb-IX-V να προάγει την

ενεργοποίηση του PAR-1 από τη θρομβίνη, ρυθμίζοντας έτσι την απάντηση των αιμοπεταλίων σε αυτή (εικ 39)(147).

Η αναστολή των υποδοχέων PAR έχει αποτελέσει στόχο ερευνών με αντικείμενο αντιαιμοπεταλιακά φάρμακα. Ανταγωνιστές του PAR-1 έχουν δοκιμαστεί τόσο *in vitro* όσο και σε πειραματόζωα. Λόγω του ότι τα ανθρώπινα αιμοπετάλια εκφράζουν επίσης τον PAR-4, η πλήρης αναστολή της απάντησης τους στη θρομβίνη απαιτεί αποκλεισμό και των δύο υποδοχέων, ακόμα και εάν ο ρόλος του υποδοχέα PAR-4 θεωρείται δευτερεύων.



**Εικ. 39:** Η απάντηση των κυττάρων στη θρομβίνη γίνεται κυρίως από τους υποδοχείς PAR-1 και PAR-4. Πιθανή η ενίσχυση της ενεργοποίησής τους, από την αλληλεπίδραση της θρομβίνης με τον GPIIb-IX-V(147).

#### ΜΕΤΑΓΩΓΗ ΣΗΜΑΤΟΣ ΜΕΣΩ ΤΩΝ ΥΠΟΔΟΧΕΩΝ PAR1 ΚΑΙ PAR4

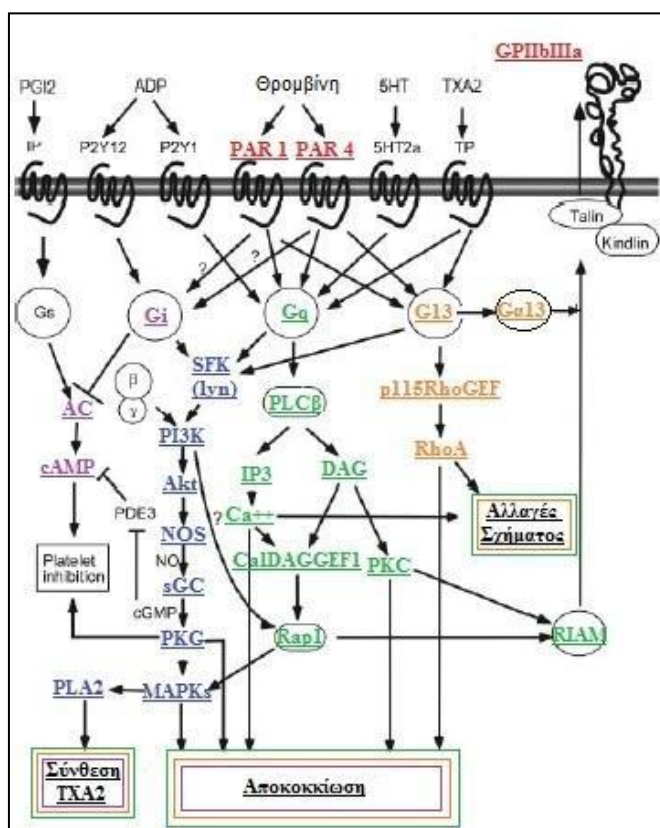
Οι υποδοχείς PAR1 και PAR4, οι οποίοι μετάγουν το σήμα της θρομβίνης για την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων, είναι άμεσα συζευγμένοι με τις G πρωτεΐνες G<sub>q</sub>, G<sub>12</sub>/G<sub>13</sub> και πιθανώς G<sub>i</sub>. Η G<sub>q</sub> μεταδίδει ενδοκυττάρια σήματα κυρίως μέσω

αλληλεπίδρασης και ενεργοποίησης της φωσφολιπάσης β (PLCβ). Το γεγονός αυτό είναι σημαντικό για την έναρξη της αποκοκκίωσης και την ενεργοποίηση του υποδοχέα GPIIb/IIIa, διαδικασίες οι οποίες οδηγούν σε αιμοπεταλιακή συσσώρευση(158). Δυσλειτουργία της  $G_q$  οδηγεί σε διαταραχές της αποκοκκίωσης και της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων σε περιβάλλον γνωστών αγωνιστών όπως η θρομβίνη, το ADP, η TXA<sub>2</sub> ακόμα και στο κολλαγόνο (πιθανώς διότι η μεταγωγή του σήματός του εξαρτάται από την TXA<sub>2</sub>)(85, 158). Επιπροσθέτως, οι  $G_q$  διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην αλλαγή του σχήματος των αιμοπεταλίων που επάγεται από το ADP.

Παρά το γεγονός ότι οι πρωτεΐνες  $G_q$  απαιτούνται για την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων η οποία επάγεται από τους GPCRs δεν αρκεί για την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων η οποία επάγεται από το ADP ή για τη βέλτιστη απάντησή τους στην TXA<sub>2</sub> ή σε χαμηλές συγκεντρώσεις θρομβίνης. Ο  $G_i$ PCR υποδοχέας του P<sub>2</sub>Y<sub>12</sub> για το ADP απαιτείται επίσης για την επαγόμενη από αυτό αιμοπεταλιακή ενεργοποίηση και επάγει την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων μέσω TXA<sub>2</sub> και σε χαμηλές δόσεις θρομβίνης(159, 160). Δεν είναι γνωστό εάν η πρωτεΐνη  $G_i$  είναι απευθείας συζευγμένη με τους υποδοχείς της θρομβίνης PAR1 και PAR4 ή εμμέσως δια του υποδοχέα P<sub>2</sub>Y<sub>12</sub>(159, 161). Η δράση των  $G_i$ PCRs στην επαγωγή της αιμοπεταλιακής ενεργοποίησης ασκείται μέσω της ανασταλτικής επίδρασής τους επάνω στη σύνθεση του cAMP. Επίσης, ο  $G_i$ PCR του ADP ενεργοποιεί την PI3K και έτσι ενεργοποιείται ένας σημαντικός διαμεσολαβητής του GPIIb/IIIa, η GTPάση RAP1b(85).

Τα αιμοπετάλια εκφράζουν την α υπομονάδα τόσο της G12 όσο και της G13 πρωτεΐνης. Τα αιμοπετάλια τα οποία δεν εκφράζουν την α υπομονάδα της G13 πρωτεΐνης παρουσιάζουν μειωμένη συσσώρευση και μεταβολή του σχήματός τους ως απάντηση σε χαμηλές συγκεντρώσεις θρομβίνης και σε ανάλογα της TXA<sub>2</sub>. Επίσης παρουσιάζουν ασθενή και ασταθή αποκοκκίωση ως απάντηση σε ανάλογα της TXA<sub>2</sub>. Η ενεργοποιημένη υπομονάδα  $G_{\alpha 13}$ , ενεργοποιεί εν συνεχεία τη GTPάση RhoA, η οποία με τη σειρά της επάγει την αποκοκκίωση κι αλλαγές στο σχήμα των αιμοπεταλίων(85). Οι αλλαγές του σχήματος επάγονται μέσω αναστολής της φωσφατάσης των ελαφρών αλύσεων της Μυοσίνης (MLC)(162). Επίσης, η ενεργοποιημένη υπομονάδα α της G<sub>13</sub> πρωτεΐνης προσδένεται στο

κυτταροπλασματικό τμήμα της υπομονάδας  $\beta_3$  του GPIIb/IIIa υποδοχέα διαδραματίζοντας έτσι πολύ σημαντικό ρόλο στη μεταγωγή σήματος από έξω προς τα μέσα («outside-in»)(163). Τα παραπάνω μεταφράζονται σε μια δραματική επίδραση της ανεπάρκειας της ενεργοποιημένης  $\alpha$  υπομονάδας της πρωτεΐνης G13 στη συγκόλληση των αιμοπεταλίων, την αιμόσταση και τη θρόμβωση in vivo(85).



**Εικ. 40:** μεταγωγή σήματος μέσω των υποδοχέων PAR1 και PAR4 της θρομβίνης. (Με μωβ χρώμα η οδός μεταγωγής σήματος της πρωτεΐνης Gi, με πράσινο χρώμα της Gq, με πορτοκαλί χρώμα της G13 και με μπλε χρώμα οι κοινές οδοί. Σημειώτεον ότι η πρωτεΐνη Gs είναι η μοναδική G πρωτεΐνη η οποία επάγει σήμα αναστολής της αιμοπεταλιακής ενεργοποίησης(85).

### ΥΠΟΔΟΧΕΙΣ ΝΟΥΚΛΕΟΤΙΔΙΩΝ ΑΔΕΝΙΝΗΣ

Τα εξωκυττάρια νουκλεοτίδια και οι υποδοχείς τους αποτελούν σημαντικά συστατικά του καρδιαγγειακού συστήματος. Εκτός από την ενεργοποίηση και τη συσσώρευση των αιμοπεταλίων ρυθμίζουν κι άλλες διεργασίες όπως ο αγγειακός τόνος και ο πολλαπλασιασμός των λείων μυικών κυττάρων. Το ADP παίζει ζωτικό ρόλο στη διαδικασία της αιμόστασης μέσω της ανάπτυξης και επέκτασης της αρτηριακής θρόμβωσης. Είναι ο πρώτος αγωνιστής μικρού μοριακού βάρους που

αναγνωρίστηκε(164). Συγκριτικά με αγωνιστές όπως η θρομβίνη ή το κολλαγόνο, το ADP είναι ένας ασθενής αλλά παρόλα αυτά σημαντικός αγωνιστής που ενισχύει τις περισσότερες από τις αποκρίσεις των αιμοπεταλίων σε άλλους αγωνιστές και συμμετέχει στη σταθεροποίηση του θρόμβου. Η προσθήκη ADP σε πλυμένα αιμοπετάλια οδηγεί σε αλλαγή σχήματος, αναστρέψιμη συσσώρευση (σε φυσιολογικές συγκεντρώσεις ασβεστίου 2 mM) μέσω αποκοκκίωσης και παραγωγής TxA<sub>2</sub>(165), ενώ τελικά απευαισθητοποιούνται(166). Το ADP ενεργοποιεί επίσης τον υποδοχέα του ινωδογόνου.

Οι υποδοχείς του ADP είναι δυο GPCRs, οι P2Y<sub>1</sub> και P2Y<sub>12</sub>. Η μεταγωγή του σήματος μέσω αυτών προκαλεί μία παροδική αύξηση των κυτταροπλασματικών επιπέδων ασβεστίου μέσω κινητοποίησης των ενδοκυττάρων αποθηκών με επακόλουθη αναστολή του cAMP(167). Ο υποδοχέας P2Y<sub>1</sub> εντοπίζεται σε περίπου 150 αντίγραφα στην επιφάνεια του αιμοπεταλίου(168). Η G πρωτεΐνη με την οποία σχετίζεται είναι η G<sub>q</sub>. Όταν ενεργοποιείται η α υπομονάδα της ως απάντηση στο ADP, ενεργοποιούνται ισομορφές της φωσφολιπάσης β. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση της ενδοκυττάριας συγκέντρωσης ασβεστίου μέσω κινητοποίησης των ενδοκυττάρων αποθηκών (εικ 41), αλλαγές στο σχήμα των αιμοπεταλίων, αποκοκκίωση του ADP, παραγωγή TxA<sub>2</sub>(147) και μια ασθενή αιμοπεταλιακή συσσώρευση(169). Ο υποδοχέας αυτός είναι απολύτως απαραίτητος για την απάντηση των αιμοπεταλίων στο ADP. Η αναστολή του ή η δυσλειτουργία του οδηγεί σε απώλεια αιμοπεταλιακής συσσώρευσης όταν ως αγωνιστής χρησιμοποιείται το ADP, λόγω αδυναμίας αύξησης των ενδοκυττάρων επιπέδων ασβεστίου. Συμμετέχει επίσης στην απάντηση των αιμοπεταλίων στο κολλαγόνο όταν δεν είναι δυνατή η παραγωγή TxA<sub>2</sub>(170). Συνεπώς, αν και ο υποδοχέας P2Y<sub>1</sub> σηματοδοτεί ασθενείς αιμοπεταλιακές ανταποκρίσεις στο ADP αποτελεί ένα κρίσιμο παράγοντα για την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων ως απάντηση στο ADP ή το κολλαγόνο. Το ADP είναι αγωνιστής και για τον υποδοχέα P2Y<sub>12</sub>, ενώ το ATP αποτελεί ανταγωνιστή του. Ο υποδοχέας αυτός αποτελεί το στόχο των αντιαιμοπεταλιακών φαρμάκων της κλοπιδογρέλης, της πρασουγρέλης και της τικαγρελόρης. Ολοκληρώνει την απάντηση του P2Y<sub>1</sub> στο ADP(171) και είναι επίσης υπεύθυνος για την ενίσχυση μέσω ADP της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων που προκαλούν άλλα μόρια όπως οι υποδοχείς

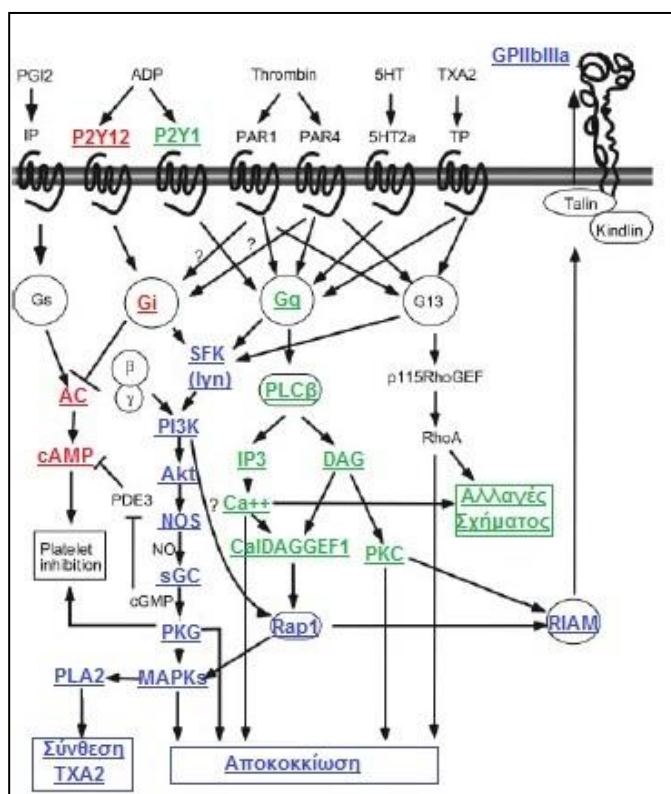
σεροτονίνης που είναι συνδεδεμένοι με την G πρωτεΐνη  $G_q$ , οι υποδοχείς PAR-1 καθώς και οι υποδοχείς της  $TXA_2$  που είναι συνδεδεμένοι με τις G πρωτεΐνες  $G_q$  και  $G_{12}$ - $G_{13}$ (169) (εικόνα 41). Επίσης ενισχύει τη συσσώρευση των αιμοπεταλίων ως απάντηση στο κολλαγόνο, μέσω της οδού GPVI-κινάση τυροσίνης-PLC $\gamma$ 2(172) ενώ επάγει και τη σταθεροποίηση των συσσωρευμένων από τη θρομβίνη αιμοπεταλίων(173-175). Παράταση των χρόνων πήξης παρατηρείται σε ασθενείς με σοβαρή ανεπάρκεια των συγκεκριμένων υποδοχέων(176). Λόγω ενεργοποίησης της  $G_{12}$  πρωτεΐνης με τη οποία είναι συνδεδεμένος ο υποδοχέας  $P2Y_{12}$ , προκαλείται αναστολή της δράσης της αδενυλικής κυκλάσης και μείωση των επιπέδων του cAMP(177). Πρέπει να σημειωθεί ότι ο υποδοχέας  $P2Y_{12}$  δεν είναι από μόνος του αρκετός για την πλήρη ενεργοποίηση του GPIIb/IIIa υποδοχέα.

Για τη φυσιολογική συσσώρευση των αιμοπεταλίων ως απάντηση στο ADP απαιτείται η ταυτόχρονη ενεργοποίηση των  $P2Y_1$  και  $P2Y_{12}$ . Όταν ενεργοποιείται μόνο ο ένας υποδοχέας παρατηρείται δραματική μείωση της συσσώρευσης(165, 171). Αιμοπετάλια ανεπαρκή είτε στον υποδοχέα  $P2Y_{12}$  είτε στην σχετιζόμενη με αυτόν  $G_i$  πρωτεΐνη δε συσσωρεύονται επαρκώς και αδυνατούν να αναστείλουν την αδενυλική κυκλάση ως απάντηση στο ADP (λειτουργία που αποδίδεται αποκλειστικά στον  $P2Y_{12}$ ), διατηρούν όμως την ικανότητα να αυξάνουν το ενδοκυττάριο ασβέστιο και να αλλάζουν το σχήμα τους (λόγω λειτουργικών  $P2Y_1$  και  $P2X_1$  υποδοχέων)(178, 179). Όσον αφορά στη συσσώρευση των αιμοπεταλίων που επάγεται από άλλους ισχυρότερους αγωνιστές, ο κάθε ένας από τους υποδοχείς του ADP παίζει διαφορετικό ρόλο. Ο  $P2Y_1$  αποτελεί έναν υποδοχέα που επάγει ασθενείς απαντήσεις των αιμοπεταλίων σε αυτούς (εκτός από τον υποδοχέα του κολλαγόνου όπου έχει ιδιαίτερα σημαντικό ρόλο στη μεταγωγή σήματος που επάγει την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων) ενώ ο  $P2Y_{12}$  ενισχύει αυτές τις απαντήσεις.

Ο υποδοχέας για το ATP είναι ένα κανάλι κατιόντων που ονομάζεται  $P2X_1$ . Η μεταγωγή του σήματος του προκαλεί αθρόα και ταχύτατη εισροή ασβεστίου από τον εξωκυττάριο χώρο. Έτσι προκαλούνται αλλαγές στο σχήμα του αιμοπεταλίου(180, 181). Ο συγκεκριμένος υποδοχέας αδυνατεί να προκαλέσει συσσώρευση αιμοπεταλίων από μόνος του. Ωστόσο, επάγει αλλαγές του σχήματος των



αιμοπεταλίων και συμμετέχει στη συσσώρευση που προκαλείται από το κολλαγόνο(169).



**Εικ. 41:** μεταγωγή σήματος μέσω των υποδοχέων του ADP. Ο P2Y<sub>1</sub> προκαλεί αύξηση της συγκέντρωσης ασβεστίου οδηγώντας σε ενεργοποίηση και συσσώρευση των αιμοπεταλίων. Ο P2Y<sub>12</sub> κυρίως ενισχύει το σήμα από άλλους, ισχυρότερους του ADP αγωνιστές, αλλά και ολοκληρώνει τη συσσώρευση των αιμοπεταλίων που επάγει το ADP μέσω του υποδοχέα P2Y<sub>1</sub>. Αυτό επιτυγχάνεται μέσω μείωσης του cAMP και περίπλοκων δρόμων μεταγωγής σήματος που καταλήγουν σε ενεργοποίηση του GPIIb/IIIa. Με πράσινο χρώμα η μεταγωγή σήματος της G<sub>q</sub>, με κόκκινο χρώμα της G<sub>i</sub> και με μπλε χρώμα οι κοινές οδοί(85, 169).

Για τον έλεγχο του θρόμβου και την αποτροπή της ανεξέλεγκτης επέκτασής του, τα αιμοπετάλια απευαισθητοποιούνται για 15-30 περίπου λεπτά μετά την έκθεση στο ADP. Ο μηχανισμός ο οποίος οδηγεί σε αυτή την απευαισθητοποίηση δεν είναι ακόμα εξακριβωμένος. Υπάρχουν δύο θεωρίες: η πρώτη υποστηρίζει ότι μόνο ο P2Y<sub>1</sub> υποδοχέας απευαισθητοποιείται και μεταφέρεται στο εσωτερικό του κυττάρου, με αποτέλεσμα το αιμοπετάλιο να μπορεί να ανταποκριθεί σε ερεθίσματα άλλων αγωνιστών μέσω του P2Y<sub>12</sub>. Η δεύτερη θεωρία υποστηρίζει ότι και οι δυο υποδοχείς απευαισθητοποιούνται. Τέλος, ο υποδοχέας P2X<sub>1</sub> απευαισθητοποιείται επίσης(169).

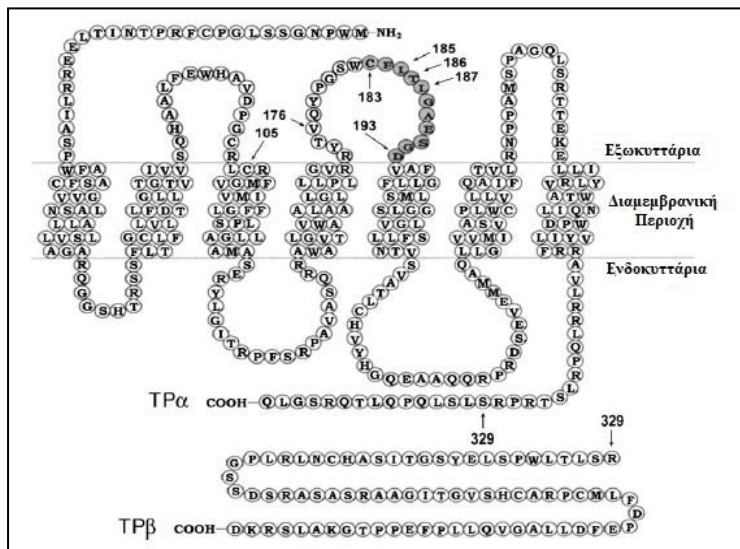
### Η ΘΡΟΜΒΟΞΑΝΗ ΚΑΙ Ο ΥΠΟΔΟΧΕΑΣ ΤΗΣ

Μέσω υδρόλυσης από τη φωσφολιπάση  $A_2$ , τα φωσφολιπίδια της κυτταρικής μεμβράνης (κυρίως η φωσφατίδυλοχολίνη) παράγουν το αραχιδονικό οξύ (Arachidonic Acid – AA), το οποίο αποτελεί πρόγονο των προσταγλαδινών. Μετά την απελευθέρωσή του το αραχιδονικό οξύ μεταβολίζεται μέσω της δράσης της κυκλοξυγενάσης-1 προς  $TxA_2$  (σε αυτό το στάδιο ασκείται η αντιαιμοπεταλιακή δράση της ασπιρίνης), η οποία μέσω των ομόνυμων υποδοχέων επάγει περαιτέρω την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων και την αγγειοσύσπαση (διαδικασία επίσης ζωτική για την αιμόσταση). Η δράση της φωσφολιπάσης  $A_2$  ενισχύεται από τους αγωνιστές ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων.

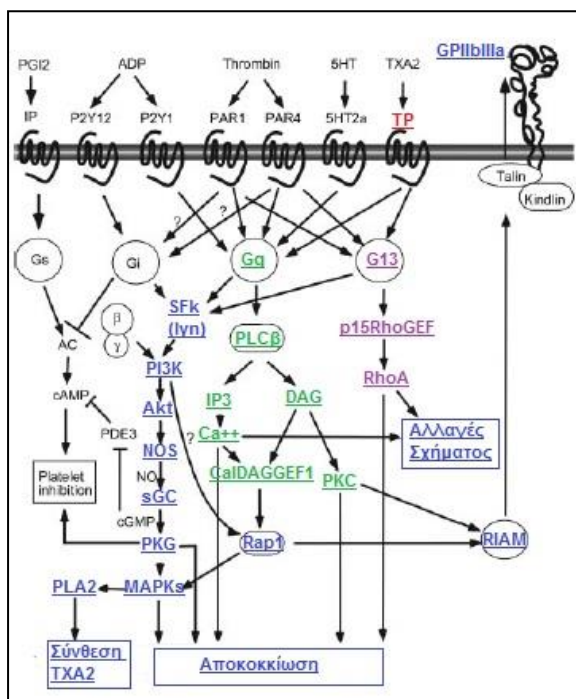
Η  $TxA_2$  είναι ένα μόριο κλειδί στη διαδικασία της αιμόστασης και οι διαταραχές της οδηγούν σε αιμορραγίες. Έχουν κλωνοποιηθεί δύο ισομορφές του υποδοχέα της  $TxA_2$ : μία από τον πλακούντα (TP $\alpha$ ) και μία από το ενδοθήλιο (TP $\beta$ ) (εικ 42). Κι οι δύο ισομορφές συνηπάρχουν στα ανθρώπινα αιμοπετάλια με παρόμοια επίδραση στην ενεργοποίηση της φωσφολιπάσης C (PLC), αντίθετη όμως όσον αφορά τη ρύθμιση της αδενυλικής κυκλάσης: ο υποδοχέας TP $\alpha$  ενεργοποιεί την αδενυλική κυκλάση ενώ ο TP $\beta$  την αναστέλλει(182). Ο υποδοχέας της  $TxA_2$  είναι ένας GPCR και συνδέεται με την G πρωτεΐνη της οικογένειας  $G_q$ (183, 184). Η ενεργοποίηση της παραπάνω G πρωτεΐνης, ενεργοποιεί την PLC(185). Η φωσφολιπάση υδρολύει τα φωσφοϊνοσιτίδια σε δύο διαβιβαστές: την 1,4,5-τριφωσφορική ινοσιτόλη (IP3)(186, 187) και τη διακυλογλυκερόλη(186), οι οποίοι επηρεάζουν διαφορετικά μονοπάτια της μεταγωγής σήματος. Η IP3 αυξάνει την κυτταροπλασματική συγκέντρωση ασβεστίου ενώ η διακυλογλυκερόλη ενεργοποιεί την πρωτεϊνική κινάση C(186, 187). Τέλος, η μεταγωγή του σήματος των TP υποδοχέων μέσω των G πρωτεϊνών έχει αποδειχθεί ότι ενεργοποιεί ένα σύνολο κινασών. Τέτοιες είναι οι Ras, Rho, Rac και MAPK, όπως επίσης και το σύστημα ασβεστίου/καλμοδουλίνης(188).

Συσχετισμός του υποδοχέα TP έχει επίσης αποδειχθεί και με τις G πρωτεΐνες  $G_{12}$  και  $G_{13}$ . Ωστόσο, φαίνεται ότι η μεταγωγή σήματος λαμβάνει χώρα κυρίως μέσω της  $G_{13}$ , ενώ ο ρόλος της  $G_{12}$  είναι κυρίως συμπληρωματικός. Η ενεργοποίηση των παραπάνω G πρωτεϊνών οδηγεί σε ενεργοποίηση του δρόμου της Rho κινάσης η

οποία οδηγεί σε αλλαγές στους σχηματισμούς ακτίνης και τον κυτταροσκελετό καθώς και από μέσα προς τα έξω («inside-out») μεταγωγή σήματος(188). Αναφέρονται επίσης μελέτες σύμφωνα με τις οποίες η μεταγωγή σήματος μέσω G<sub>12</sub> και G<sub>13</sub> επάγει τη συσώρευση των αιμοπεταλίων με ένα δρόμο ανεξάρτητο των Rho κινασών, αφού αυτή δε βρέθηκε να αναστέλεται από αναστολείς της Rho κινάσης(189). Επίσης οι υποδοχείς TP μπορούν να συσχετιστούν με ένα άλλο είδος G πρωτεΐνης, την G<sub>i</sub>. Ενεργοποίηση των G<sub>12</sub>,G<sub>13</sub> και G<sub>i</sub> φαίνεται να είναι αρκετή για να οδηγήσει σε ενεργοποίηση του GPIIb/IIIa(189, 190).



**Εικ. 42:** Οι δύο ισομορφές του υποδοχέα της θρομβοξάνης A<sub>2</sub>, οι οποίες ουσιαστικά διαφέρουν μόνο στο ενδοκυττάριο καρβοξυτελικό άκρο τους, το οποίο στην περίπτωση της TPβ είναι πιο εκτεταμένο(188).



**Εικ. 43:** μεταγωγή σήματος μέσω του υποδοχέα TP της θρομβοξάνης. Με μωβ χρώμα η μεταγωγή σήματος μέσω της G<sub>13</sub>, με πράσινο χρώμα της G<sub>q</sub> και με μπλε χρώμα οι κοινές οδοί(85).

### Η ρ-ΣΕΛΕΚΤΙΝΗ ΚΑΙ Ο ΡΟΛΟΣ ΤΗΣ ΣΤΟ ΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟ ΤΟΥ ΘΡΟΜΒΟΥ

Η ρ-σελεκτίνη βρίσκεται τόσο στα ενδοθηλιακά κύτταρα όσο και στα αιμοπετάλια. Αποθηκεύεται στα σωματίδια Weibel-Palade και στα α-κοκκία αντίστοιχα(191). Αναγνωρίστηκε πρώτα στα ενδοθηλιακά κύτταρα το 1989(192). Ο κυρίαρχος προσδέτης της είναι ο ρ-selectin glycoprotein ligand 1 (PSGL-1) και εκφράζεται σε όλα σχεδόν τα λευκοκύτταρα(193). Η ρ-σελεκτίνη και ο PSGL-1 αποτελούν μόρια κυτταρικής προσκόλλησης και πρωταγωνιστούν στη σύνδεση των ενδοθηλιακών κυττάρων και των αιμοπεταλίων με τα λευκά αιμοσφαίρια. Εκτός από τον σημαντικό ρόλο τους στη διαδικασία της φλεγμονής, το 1992 αποδείχθη και ο ρόλος τους στη θρόμβωση.

Η ρ-σελεκτίνη διαδραματίζει κυρίαρχο ρόλο στη στρατολόγηση των λευκών αιμοσφαιρίων στην περιοχή της βλάβης κατά τη διαδικασία της φλεγμονής. Όταν ενεργοποιούνται τα ενδοθηλιακά κύτταρα ως απάντηση σε φλεγμονώδεις κυτοκίνες (όπως οι IL-4 και IL-13), η ρ-σελεκτίνη μεταφέρεται και εκφράζεται στην επιφάνεια τους(191) επάγοντας έτσι την αλληλεπίδραση τους με τα λευκοκύτταρα τα οποία φέρουν τον προσδέτη PSGL-1. Έτσι η ρ-σελεκτίνη στην επιφάνεια των ενεργοποιημένων από τη φλεγμονή ενδοθηλιακών κυττάρων συλλαμβάνει τα λευκά αιμοσφαίρια από την κυκλοφορία, τα οποία κυλούν επάνω στο ενδοθήλιο και ακινητοποιούνται μέσω διαφορετικών προσκολλητικών μορίων. Ακολουθεί η μετανάστευση των λευκοκυττάρων διαμέσου του αγγειακού τοιχώματος προς τους φλεγμαίνοντες ιστούς.

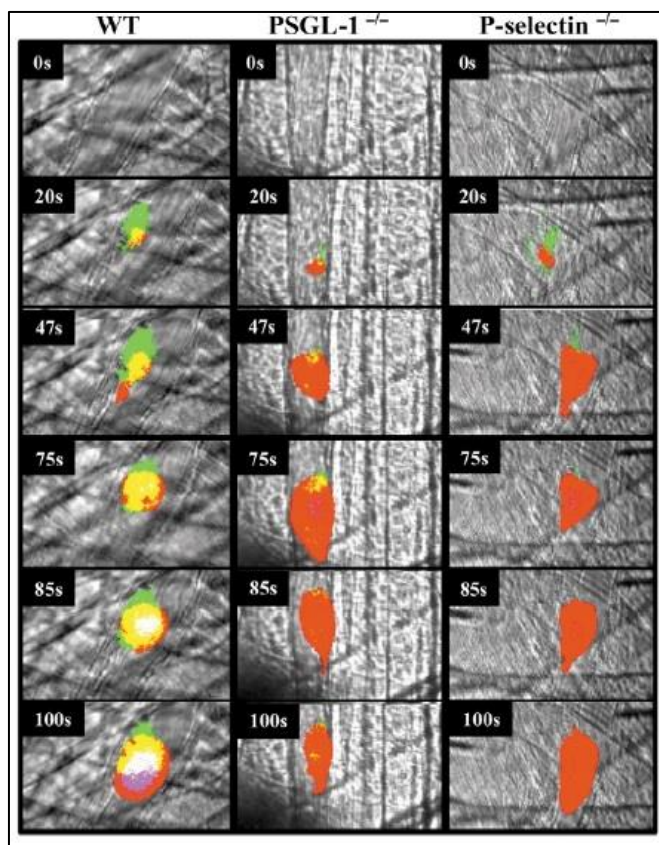
Η ρ-σελεκτίνη συνεισφέρει επίσης στη διαδικασία της πήξης στρατολογώντας και συσσωρεύοντας αιμοπετάλια στην περιοχή του αγγειακού τραυματισμού(194). Αυτό συμβαίνει μέσω ενεργοποίησης του υποδοχέα GPIIb/IIIa με δοσοεξαρτώμενο μηχανισμό. Τα ενεργοποιημένα αυτά αιμοπετάλια, τα οποία σχηματίζουν τον πλούσιο σε αιμοπετάλια θρόμβο (platelet-rich thrombus), εκφράζουν στην επιφάνειά τους την ρ-σελεκτίνη. Τα λευκά αιμοσφαίρια φέροντας τον PSGL-1 στην επιφάνειά τους δεσμεύονται από τα συσσωρευμένα αιμοπετάλια, γεγονός το οποίο οδηγεί σε λευκοκυτταρική συσσώρευση στην περιοχή του θρόμβου. Έχει παρατηρηθεί ότι η χρήση αντισωμάτων που δέσμευαν την ρ-σελεκτίνη οδήγησε όχι μόνο σε μειωμένη

λευκοκυτταρική συσσώρευση αλλά και σε μειωμένη εναπόθεση ινικής επάνω στον εξελισσόμενο θρόμβο. Έτσι επιβεβαιώθηκε ο ρόλος της αιμοπεταλιακής  $\beta$ -σελεκτίνης στην προσκόλληση των αιμοπεταλίων με τα λευκοκύτταρα του αίματος *in vivo*, και τεκμηριώθηκε η παρουσία των λευκοκυττάρων επάνω στο θρόμβο. Κυρίως όμως διαπιστώθηκε ότι υπάρχει και ένας δρόμος επαγωγής της πήξης του αίματος μέσω σχηματισμού ινικής, ο οποίος εξαρτάται από την  $\beta$ -σελεκτίνη(195).

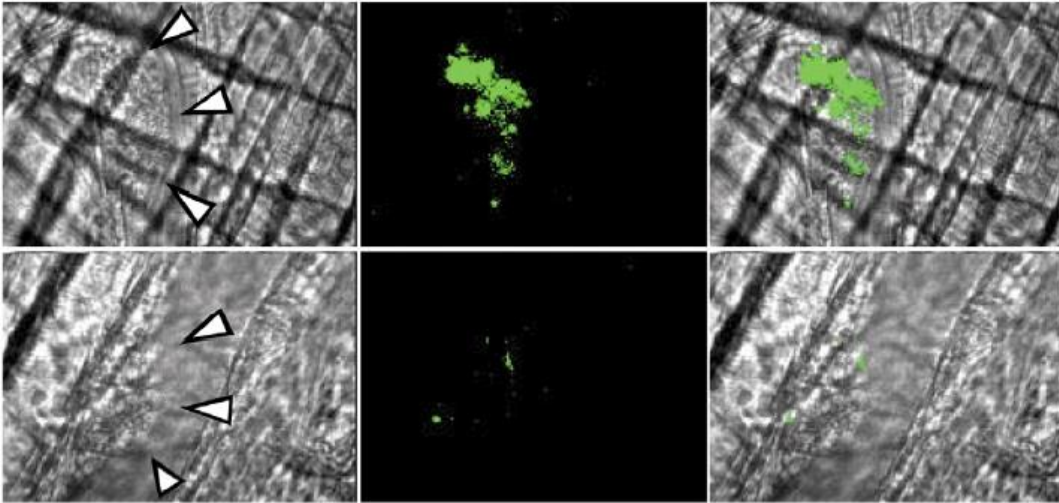
Έχει αποδειχθεί σε *in vitro* πειράματα ότι τα λευκοκύτταρα (ιδίως τα μονοκύτταρα) αργούν να εκφράσουν τον ιστικό παράγοντα στην επιφάνειά τους μετά την ενεργοποίηση με μόρια ενδοτοξινών, IL-1, TNF- $\alpha$  ή ανοσοσυμπλέγματα. Η διαδικασία αυτή απαιτεί αρκετές ώρες καθώς ο ιστικός παράγοντας πρέπει να συντεθεί *de novo*(196, 197). Επίσης, η  $\beta$ -σελεκτίνη οδήγησε στην έκφραση του ιστικού παράγοντα στην επιφάνεια των λευκών αιμοσφαιρίων προσδίδοντας της και ένα σηματοδοτικό ρόλο εκτός από τον ήδη γνωστό προσκολλητικό(198). Η έκφραση του ιστικού παράγοντα έγινε επίσης μετά από ώρες. Αντιθέτως, σε *in vivo* πειράματα τα οποία επήγαγαν θρόμβωση άνευ αγγειακού τραυματισμού (έτσι ώστε να μην υπάρξει έκθεση ιστικού παράγοντα από το ενδοθήλιο), βρέθηκε ότι η εναπόθεση ινικής συμβαίνει μέσα σε λεπτά. Συνεπώς, είτε τα λευκοκύτταρα μπορούν να συνθέσουν τον ιστικό παράγοντα πολύ ταχύτερα *in vivo* από ότι σε *in vitro*, είτε υπάρχει κάποιος άλλος υπεύθυνος μηχανισμός χάρη στον οποίο συσσωρεύεται ο ιστικός παράγοντας στην περιοχή του θρόμβου (δεδομένου ότι τα λευκοκύτταρα δεν έχουν προλάβει ακόμα να τον εκφράσουν). Την απάντηση έδωσε η ανίχνευση ιστικού παράγοντα που κυκλοφορεί στο αίμα και συσσωρεύεται στο σχηματιζόμενο θρόμβο(199). Πειράματα αρτηριακής θρόμβωσης μέσω ενδοθηλιακού τραυματισμού με χρήση laser έδειξαν ότι πειραματόζωα που δεν εξέφραζαν την  $\beta$ -σελεκτίνη ή τον PSGL-1 δημιούργησαν ένα πλούσιο σε αιμοπετάλια θρόμβο αλλά με πολύ μικρή εναπόθεση ινικής και ιστικού παράγοντα (εικ 44)(200). Αυτό αποδεικνύει ότι ο ιθαγενής ιστικός παράγοντας ο οποίος εκτίθεται κατά τον τραυματισμό δεν είναι αρκετός για να επάγει την πλήρη δημιουργία και εναπόθεση της ινικής. Επίσης επιβεβαιώνει την ύπαρξη ενός τρόπου παραγωγής ινικής εξαρτώμενου από τη δράση της  $\beta$ -σελεκτίνης. Απεδείχθη εν τέλει ότι ο ιστικός παράγοντας που κυκλοφορεί στο αίμα, φέρεται στις μεμβράνες μικροσωματιδίων (εικ 45) τα οποία προέρχονται από λευκοκύτταρα και

εκφράζουν επίσης στην επιφάνεια τους τον PSGL-1. Δεν έχει αποσαφηνιστεί ακόμα γιατί ο ιστικός αυτός παράγοντας δεν ενεργοποιεί τον καταρράκτη της πήξης (ίσως είναι πολύ μικρή η ποσότητά του ή κυκλοφορεί σε μια αδρανή μορφή). Η φωσφατιδυλοσερίνη, η οποία βρίσκεται στις μεμβράνες των μικροσωματιδίων, παρέχει την καταλυτική επιφάνεια για να δράσει το σύμπλεγμα προθρομβινάσης και να παραχθεί η ινική. Η  $\rho$ -σελεκτίνη στη μεμβράνη των ενεργοποιημένων αιμοπεταλίων αλληλεπιδρά με τον PSGL-1 των μικροσωματιδίων και έτσι ο ιστικός παράγοντας συσσωρεύεται στο σημείο του θρόμβου(198). Συνεπώς, αν και ο ιστικός παράγοντας του ενδοθηλίου επαρκεί για να γίνει η αρχική εναπόθεση ινικής, ο ιστικός παράγοντας που κυκλοφορεί στο αίμα (είτε στην επιφάνεια των λευκών αιμοσφαιρίων είτε των μικροσωματιδίων) είναι αυτός που επάγει και ολοκληρώνει την εξέλιξη του θρόμβου(198).

Η σημασία της  $\rho$ -σελεκτίνης στο σχηματισμό του θρόμβου μέσω της συσσώρευσης ιστικού παράγοντα αλλά και την ενεργοποίηση και συσσώρευση των αιμοπεταλίων την καθιστά πιθανό στόχο αντιθρομβωτικής αγωγής(194). Ένα τέτοιο σκεύασμα δε θα συνοδευόταν από τις αιμορραγικές επιπλοκές των γνωστών αντιαιμοπεταλιακών φαρμάκων (ασπιρίνη, κλοπιδογρέλη, πρασουγρέλη, τικαγρελόρη).



**Εικ. 44:** οι θρόμβοι πειραματοζώων με αδρανοποιημένη την έκφραση του PSGL-1 (μέση) ή της  $\rho$ -σελεκτίνης (δεξιά) αποτελούνται μόνο από αιμοπετάλια (κόκκινο), χωρίς εναπόθεση ιστικού παράγοντα (πράσινο) ή ινικής(198).



**Εικ. 45:** η καθοριστική συνεισφορά της p-σελεκτίνης στη συσσώρευση των μικροσωματιδίων. Ζώα τα οποία δεν εκφράζουν την p-σελεκτίνη (κάτω) παρουσιάζουν μειωμένη εναπόθεση μικροσωματιδίων και άρα και ιστικού παράγοντα στον σχηματιζόμενο θρόμβο. Επάνω ζώα που εκφράζουν κανονικά την p-σελεκτίνη. Με βέλη σημειώνεται η ενδοαυλική επιφάνεια του θρόμβου(198).

### Η ΕΠΙΝΕΦΡΙΝΗ

Η *επινεφρίνη* δρα στο αιμοπετάλιο μέσω  $\alpha_2$  αδρενεργικών υποδοχέων οδηγώντας σε αναστολή της δράσης της αδενυλικής κυκλάσης. Επάγει έτσι τη συσσώρευση των αιμοπεταλίων. Η μεταγωγή του σήματός της ωστόσο δεν έχει επίδραση στα ενδοκυττάρια επίπεδα ασβεστίου και έτσι δε προκαλεί μεταβολές του σχήματος των αιμοπεταλίων. Είναι επίσης γνωστή η συνεργική της δράση με άλλους αγωνιστές συσσώρευσης των αιμοπεταλίων. Ενισχύει την πρόσδεση του ινωδογόνου στα αιμοπετάλια τα οποία συσσωρεύονται υπό την επίδραση του ADP ή της θρομβίνης, μέχρι και 180% σε σύγκριση με αιμοπετάλια τα οποία συσσωρεύονται μόνο υπό ADP ή θρομβίνη(201). Παρόλα αυτά, η επινεφρίνη μπορεί μόνη της να επάγει την ενεργοποίηση των GPIIb/IIIa υποδοχέων και την αιμοπεταλιακή συσσώρευση, αλλά σε μικρότερα επίπεδα από ότι όταν δρα σε συνέργεια με το ADP(202).

## ΑΛΛΟΙ ΑΙΜΟΠΕΤΑΛΙΑΚΟΙ ΥΠΟΔΟΧΕΙΣ

Τα αιμοπετάλια περιέχουν επίσης τους:

1. ιντεγκρινικούς υποδοχείς
  - a.  $\alpha 5\beta 1$  (GPIcIIa) με προσκολλητική δράση, οι οποίοι προσδέσνουν κυρίως τη φιβρονεκτίνη(203) αλλά δύνανται να προσδέσουν και το ινωδογόνο(204),
  - b.  $\alpha 6\beta 1$  με προσκολλητική δράση, οι οποίοι προσδέσνουν τις λαμινίνες(205),
  - c.  $\alpha \nu\beta 3$  με προσκολλητική δράση οι οποίοι μπορούν να προσδέσουν τη βιτρονεκτίνη(206) αλλά και το ινωδογόνο, τη φιβρονεκτίνη(206) και τον παράγοντα von Willebrand(207),
2. μη ιντεγκρινικούς υποδοχείς GPIV με προσκολλητική δράση, οι οποίοι μπορούν να προσδέσουν τη θρομβοσπονδίνη(208) και το κολλαγόνο(209),
3. υποδοχείς προσκόλλησης ανοσοσφαιρινικού τύπου ICAM-1 και PECAM-2,
4. τους GPCRs 5-HT<sub>2A</sub>, οι οποίοι προσδέσνουν τη σεροτονίνη. Η σεροτονίνη αποκοκκιώνεται κατά την ενεργοποίηση από τα πυκνά κοκκία και σε συνέργεια με τη TXA<sub>2</sub> και το ADP, επάγει τη συσσώρευση των αιμοπεταλίων. Ο υποδοχέας 5-HT<sub>2A</sub> μετάγει το σήμα του μέσω της  $\alpha$  υπομονάδας της πρωτεΐνης G<sub>q</sub>. Έτσι ενεργοποιείται η φωσφολιπάση-C με αποτέλεσμα την απελευθέρωση δυακυλογλυκερόλης (DAG) και τριφωσφορικής ινοσιτόλης (IP<sub>3</sub>). Αυτές εν συνεχεία ενεργοποιούν την πρωτεϊνική κινάση C η οποία οδηγεί σε απελευθέρωση ασβεστίου(210). Τα δεδομένα στη βιβλιογραφία σχετικά με την αντιαιμοπεταλιακή δράση της αναστολής των συγκεκριμένων υποδοχέων είναι αντικρουόμενα. Υπάρχουν μελέτες οι οποίες υποστηρίζουν ότι η αναστολή τους δεν είναι αρκετή ώστε να αναστέλλει τη συσσώρευση των αιμοπεταλίων σε αγωνιστές όπως το κολλαγόνο και η θρομβίνη και ως εκ τούτου δε φαίνεται να αποτελεί ελπιδοφόρο στόχο αντιαιμοπεταλιακών φαρμάκων(211). Αντιθέτως, πειραματικές μελέτες αρτηριακής θρόμβωσης σε ζώα αναφέρουν ότι η αναστολή των υποδοχέων 5-HT<sub>2A</sub> παρουσιάζει ενθαρρυντικά αποτελέσματα χωρίς αύξηση των αιμορραγικών επιπλοκών(212).



## ΒΙΟΧΗΜΕΙΑ ΚΑΙ ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟΣ ΤΟΥ ΑΙΜΟΠΕΤΑΛΙΟΥ

Το αιμοπετάλιο είναι ένα κύτταρο με άφθονη μεταβολική δραστηριότητα με περιορισμένη δυνατότητα πρωτεϊνικής σύνθεσης, διότι περιέχει χαμηλά επίπεδα RNA και στερείται πυρήνα. Αποτελείται κατά 60% περίπου από πρωτεΐνη, 15% από λιπίδια και 8% από υδατάνθρακες. Περιέχει μέταλλα όπως μαγνήσιο, ασβέστιο, νάτριο, κάλιο και ψευδάργυρο. Η περιεκτικότητα του Καλίου και του Νατρίου είναι 138 και 39 χιλιοστοϊσοδύναμα αντίστοιχα. Αυτή η διαφορά συγκριτικά με τα επίπεδα του πλάσματος διατηρείται χάρη σε μια αντλία ιόντων, η οποία γεννά ενέργεια μέσω μιας μεμβρανικής ΑΤΡάσης τύπου Νατρίου – Καλίου(213). Τα αιμοπετάλια περιέχουν επίσης αρκετή ποσότητα βιταμίνης B<sub>12</sub>, φυλλικού και ασκορβικού οξέος. Όπως αναφέρθηκε, το αδρανές αιμοπετάλιο περιέχει χαμηλά επίπεδα ενδοκυττάρου ασβεστίου (περίπου 100 – 500nmol) και αυτό επιτυγχάνεται μέσω περιορισμένης μεταφοράς του από το πλάσμα αλλά και αυξημένης εκροής του από το κύτταρο. Στα αιμοπετάλια εντοπίζονται δύο δεξαμενές ασβεστίου: i) μία κυτταροπλασματική δεξαμενή με δυνατότητα ταχύτατης μεταβολής επιπέδων ασβεστίου, χάρη σε μια αντλία νατρίου – ασβεστίου που βρίσκεται στην κυτταρική τους μεμβράνη και ii) μία δεξαμενή με περιορισμένες δυνατότητες ανταλλαγής η οποία βρίσκεται απομονωμένη στο σύστημα πυκνών σωληναρίων(214). Συνεπώς, τα αιμοπετάλια δύνανται είτε να μεταφέρουν ασβέστιο από το κυτταρόπλασμα προς τον εξωκυττάριο χώρο είτε να το απομακρύνουν μέσω του συστήματος των πυκνών σωληναρίων.

## ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΓΛΥΚΟΖΗΣ

Ο μεταβολισμός του αιμοπεταλίου επιτελείται μέσω της γλυκόλυσης αλλά και της σύνθεσης και κατανάλωσης μεγάλων ποσοτήτων γλυκογόνου(215, 216). Μεγάλες ποσότητες ενέργειας δαπανώνται κατά την ενεργοποίηση και τη συσσώρευση των αιμοπεταλίων. Η κυρίαρχη πηγή ενέργειας είναι λοιπόν η γλυκόζη, η οποία απορροφάται ταχύτατα από το πλάσμα. Σε κατάσταση ηρεμίας, το 40% – 50% της γλυκόζης είτε χρησιμοποιείται για δραστηριότητες σύνθεσης είτε μετατρέπεται σε γλυκογόνο. Το γλυκογόνο μπορεί να είναι ορατό με το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο στο

κυτταρόπλασμα των αιμοπεταλίων. Ο δρόμος της γλυκόλυσης με τα ρυθμιστικά της ένζυμα (π.χ φωσφοφρουκτοκινάση), ο κύκλος του κιτρικού οξέος και των φωσφορικών πεντοζών και το σύστημα NAD – NADH, είναι όλα ενεργά στο αιμοπετάλιο. Ανευρίσκονται επίσης ένζυμα για οξειδωτική φωσφορυλίωση και μεταβολισμό των λιπαρών οξέων(217, 218). Στο πλάσμα, όλη η ποσότητα ATP η οποία παράγεται από την οξειδωτική φωσφορυλίωση, μπορεί να είναι παράγωγο του μεταβολισμού των λιπαρών οξέων.

### ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΝΟΥΚΛΕΟΤΙΔΙΩΝ

Τα νουκλεοτίδια αδενίνης αποτελούν το 90% των ελεύθερων νουκλεοτιδίων του αιμοπεταλίου και βρίσκονται συγκεντρωμένα σε 2 αποθήκες: i) μια μεταβολική ή αλλιώς κυτταροπλασματική αποθήκη που περιέχει το 40% των νουκλεοτιδίων αδενίνης. Είναι μεταβολικά ενεργή και χρησιμοποιείται για τη διατήρηση διαφόρων ενεργοβόρων κυτταρικών λειτουργιών(219). Στο μεγαλύτερο μέρος της αποτελείται από ATP, ενώ διατηρείται κατά την αποκοκκίωση. Στα ανενεργά αιμοπετάλια, το ένζυμο αδενυλική κινάση συντηρεί τα επίπεδα του AMP, ADP και ATP της αποθήκης αυτής, ii) μια αποθήκη η οποία βρίσκεται στο πυκνά κοκκία περιέχει τα 2/3 περίπου των ολικών νουκλεοτιδίων του αιμοπεταλίου κυρίως υπό τη μορφή του ATP και ADP. Είναι μεταβολικά αδρανής και δεν ενσωματώνει εξωγενή αδενίνη ή φώσφορο(219). Νουκλεοτίδια από αυτή την αποθήκη εξέρχονται από το αιμοπετάλιο κατά την αποκοκκίωση και δε μπορούν να αντικατασταθούν. Για τη μετατροπή της G-ακτίνης σε F-ακτίνη απαιτείται η υδρόλυση του ATP. Το ATP το οποίο διασπάται για να πραγματοποιηθεί η αποκοκκίωση δεν επαναφωσφορυλιώνεται, αντιθέτως μεταβολίζεται προς υποξανθίνη η οποία εξωκυτταρώνεται και από εκεί μπορεί να επανενσωματωθεί στα αιμοπετάλια και να δημιουργήσει AMP. Αυτός θεωρείται ένας τρόπος σύνθεσης νουκλεοτιδίων από τα αιμοπετάλια αν και τα ίδια φαίνεται να έχουν πολύ μικρή τέτοια ικανότητα. Περιέχουν επίσης νουκλεοτίδια γουανίνης και κυτοσίνης. Η ενεργοποίηση του αιμοπεταλίου σηματοδοτείται από αυξημένη παραγωγή ATP, το οποίο αποδομείται όπως είπαμε προς υποξανθίνη, και αυξημένη είσοδο φωσφόρου στο αιμοπετάλιο.

## ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΛΙΠΙΔΙΩΝ

Τα φωσφολιπίδια αποτελούν το 80% των λιπιδίων του αιμοπεταλίου. Τα ουδέτερα λιπίδια και τα γλυκολιπίδια αποτελούν τα υπόλοιπα. Οι κυρίαρχοι τύποι φωσφολιπιδίων που αναγνωρίζονται στα ανθρώπινα αιμοπετάλια είναι οι ακόλουθοι: φωσφατίδυλοχολίνη (PC – 38% των φωσφολιπιδίων), φωσφατίδυλοαιθανολαμίνη (PE – 27% των φωσφολιπιδίων), σφιγγομυελίνη (17% των φωσφολιπιδίων), φωσφατίδυλοσερίνη (PS - 10% των φωσφολιπιδίων) και φωσφατίδυλοϊννοσιτόλη (PI – 5% των φωσφολιπιδίων). Το 57% των φωσφολιπιδίων του αιμοπεταλίου ανευρίσκεται στην κυτταρική του μεμβράνη. Τα περισσότερα από τα αρνητικά φορτισμένα φωσφολιπίδια (π.χ PE, PI και PS) εντοπίζονται στην εσωτερική στοιβάδα. Η ανισοκατανομή αυτή βοηθά στην πρόληψη της ανώμαλης πήξης, απομακρύνοντας τα φωσφολιπίδια που επιταχύνουν την πήξη από την επιφάνεια του κυττάρου. Υπεύθυνη για την παραπάνω διάταξη είναι ένα ένζυμο με το όνομα φλιπάση(220, 221) η οποία βρίσκεται στην κυτταρική μεμβράνη του αιμοπεταλίου και ωθεί επιλεκτικά την PS και την PE από την έξω προς την έσω επιφάνεια της μεμβράνης, ενώ η PC ωθείται μέσω διάχυσης προς την εξωτερική επιφάνεια. Η παραπάνω ασυμμετρία καταρρέει κατά την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων. Τα φωσφολιπίδια τα οποία αλληλεπιδρούν με τους παράγοντες πήξης εκτίθενται πλέον στην επιφάνεια του κυττάρου για να προάγουν το σχηματισμό του θρόμβου(220), διαδικασία η οποία ρυθμίζεται από μια κατηγορία ενζύμων που ονομάζονται σκραμπλάσες(222).

Μέσω υδρόλυσης από τη Φωσφολιπάση A<sub>2</sub>, της οποίας η δραστικότητα αυξάνεται τόσο κατά την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων όσο και από τους αγωνιστές της, τα φωσφολιπίδια της κυτταρικής μεμβράνης (κυρίως η φωσφατίδυλοχολίνη) παράγουν το αραχιδονικό οξύ, πρόγονο των προσταγλαδινών. Μετά την απελευθέρωσή του, το αραχιδονικό οξύ οξυγονώνεται για να σχηματίσει ένα ενδιάμεσο μόριο, την προσταγλαδίνη H<sub>2</sub>, μέσω της δράσης της κυκλοξυγενάσης 1 που οδηγεί στο σχηματισμό της Θρομβοξανθής A<sub>2</sub>(223).

Όλα σχεδόν τα λιπαρά οξέα των αιμοπεταλίων εστεροποιούνται προς φωσφολιπίδια, αφήνοντας ελάχιστη ποσότητα στην ελεύθερη μορφή. Τα ουδέτερα

λιπίδια (αποτελούνται κυρίως από τη χοληστερόλη) αποτελούν κυρίαρχα συστατικά της κυτταρικής μεμβράνης. Συντίθενται από τα μεγακαρυοκύτταρα, όχι όμως από τα αιμοπετάλια. Εκτός από τα παραπάνω, στα αιμοπετάλια έχουν επίσης εντοπιστεί γλυκολιπίδια.

## Η ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΩΝ ΑΙΜΟΠΕΤΑΛΙΩΝ ΜΕ ΤΟΝ ΚΑΤΑΡΡΑΚΤΗ ΤΗΣ ΠΗΞΗΣ

Κυρίαρχος στόχος του μηχανισμού της πήξης είναι η διατήρηση της αγγειακής ακεραιότητας εξασφαλίζοντας ταυτόχρονα και την αγγειακή βατότητα. Η διαδικασία της πήξης χωρίζεται σε τρία τμήματα: i) Την ενδογενή οδό, ii) Την εξωγενή οδό και iii) την κοινή οδό.

i) Ενδογενής οδός: σε κατάσταση ηρεμίας το αίμα παραμένει ρευστό παρά το γεγονός ότι μέσα σε αυτό κυκλοφορεί μεγάλη ποσότητα παραγόντων πήξεως και αιμοπεταλίων. Αυτό οφείλεται σε δικλείδες ασφαλείας οι οποίες καταστέλλουν τον πηκτικό μηχανισμό: 1) κάθε παράγοντας πήξεως κυκλοφορεί στην ανενεργό μορφή του, 2) το ενδοθήλιο, σε αντίθεση με το υπενδοθήλιο, στερείται του θρομβογόνου ιστικού παράγοντα και του κολλαγόνου το οποίο απελευθερώνεται με τον τραυματισμό του αγγείου και 3) η ταχεία ροή του αίματος εξασφαλίζει ότι τυχόν ενεργοποιημένοι παράγοντες πήξης καταλήγουν γρήγορα στο ήπαρ για εξουδετέρωση.

Όταν η επιφάνεια του αγγείου διαβρωθεί, τότε ενεργοποιείται ο καταρράκτης της πήξεως με τον παράγοντα XII (Παράγοντας Hageman) να έρχεται σε επαφή με το υπενδοθήλιο και να ενεργοποιείται (Μορφή XIIa). Η δραστηριότητα πρωτεάσης που διαθέτει ενεργοποιεί την προκαλλικρεΐνη σε καλλικρεΐνη και τον παράγοντα XI (Θρομβοπλαστίνη) σε XIa. Η καλλικρεΐνη κι ο ενεργοποιημένος παράγοντας XI (XIa) αγκυροβολούν στο υπενδοθήλιο

λόγω σύνδεσης με το μεγάλο μοριακού βάρους κινινογόνο (Συμπαράγοντας Fitzgerald). Η καλλικρεΐνη συντελεί στην ενίσχυση της ενδογενούς οδού ενεργοποιώντας μόρια του παράγοντα XII τα οποία πλησιάζουν το σημείο του τραυματισμού. Στη συνέχεια, η δραστηριότητα πρωτεάσης του παράγοντα XIa μετατρέπει το υψηλού μοριακού βάρους κινινογόνο σε διαλυτό κινινογόνο με αποτέλεσμα αυτός να δύναται πλέον να αποκολληθεί από τον παράγοντα XIIa και να μετατραπεί στη διαλυτή μορφή του παράγοντα XIa. Έτσι δύναται πλέον να ενεργοποιήσει τον παράγοντα IX (αντιαιμοροφιλικός παράγοντας B) με τη βοήθεια του ασβεστίου. Ο IXa τότε σχηματίζει ένα σύμπλεγμα με τον ενεργοποιημένο παράγοντα VIII (αντιαιμοροφιλικός παράγοντας A ή αλλιώς αντιαιμοροφιλική σφαιρίνη) και το ασβέστιο, το οποίο προσδένεται στην πλούσια σε φωσφολιπίδια κυτταρική μεμβράνη των ενεργοποιημένων αιμοπεταλίων όπου και συμβαίνει η ενεργοποίηση του παράγοντα X (Παράγοντας Stuart – Prower) σε Xa. Το γεγονός αυτό σηματοδοτεί το τέλος της ενδογενούς οδού και την έναρξη της κοινής οδού του καταρράκτη της πήξεως.

ii) Εξωγενής οδός: σε αντίθεση με την ενδογενή οδό, η εξωγενής οδός χρειάζεται στοιχεία «εξωγενή» του αίματος για να εκκινήσει τη διαδικασία της πήξης. Ο τραυματισμός του ενδοθηλίου αποκαλύπτει το υπενδοθήλιο και εκθέτει τον ιστικό παράγοντα, ο οποίος τότε προσδένει τον παράγοντα VII (Προκονβερτίνη) από την κυκλοφορία και σχηματίζει ένα σύμπλεγμα παράγοντα VII – ιστικού παράγοντα, που προάγει την αυτόματη ενεργοποίηση του παράγοντα VII σε VIIa. Με την παρουσία ασβεστίου και φωσφολιπιδίων της κυτταρικής μεμβράνης των ενεργοποιημένων αιμοπεταλίων, το σύμπλεγμα ενεργοποιεί τον παράγοντα X (Παράγοντας Stuart – Prower) σε Xa. Έτσι λήγει η εξωγενής οδός και σηματοδοτείται η έναρξη της κοινής οδού.

iii) Κοινή οδός: η ενεργοποίηση του παράγοντα X στην κυτταρική μεμβράνη των ενεργοποιημένων αιμοπεταλίων είναι το σημείο στο οποίο η ενδογενής και η εξωγενής οδός συγκλίνουν. Η πήξη από εδώ και έπειτα ακολουθεί την κοινή οδό. Ο ενεργοποιημένος παράγοντας X δημιουργεί σύμπλεγμα με τον ενεργοποιημένο παράγοντα Va (Προαξελερίνη) με την

παρουσία του ασβεστίου, το οποίο προσδένει την προθρομβίνη (Παράγοντας II) και τη μετατρέπει σε θρομβίνη. Η θρομβίνη είναι ο κυρίαρχος ρυθμιστής της διαδικασίας της πήξεως. Αποκόπτει πεπτίδια από το ινωδογόνο δημιουργώντας έτσι διαλυτά μονομερή ινικής, τα οποία πολυμερίζονται για να σχηματίσουν έναν αδιάλυτο αλλά χαλαρό θρόμβο ινικής στο σημείο του τραυματισμού. Η θρομβίνη ενεργοποιεί επίσης τον κυκλοφορούντα παράγοντα XIII (Παράγοντας σταθεροποίησης της ινικής) σε XIIIa, ο οποίος επάγει το σχηματισμό δεσμών μεταξύ των μονομερών της ινικής σταθεροποιώντας το θρόμβο. Επίσης, η θρομβίνη ενεργοποιεί γειτονικά αιμοπετάλια τα οποία προσδένονται στο σταθεροποιημένο θρόμβο ινικής και σφραγίζουν το ρήγμα. Τέλος, η θρομβίνη ενεργοποιεί τους παράγοντες V και VIII αποτελώντας ένα μηχανισμό θετικής ανατροφοδότησης που ενισχύει περαιτέρω τον καταρράκτη της πήξης.

Όπως περιγράφηκε, η σύγκλιση των 2 οδών της πήξης συντελείται πάνω στις φωσφολιπιδικές κυτταρικές μεμβράνες των αιμοπεταλίων και οδηγεί στην εκρηκτική παραγωγή θρομβίνης. Η επιφάνεια των αιμοπεταλίων αποτελεί δηλαδή κυρίαρχη έδρα για τις αντιδράσεις της πήξεως. Τα ίδια τα αιμοπετάλια περιέχουν αρκετούς παράγοντες πήξης, είτε μέσα στο κυτταρόπλασμα τους είτε μέσα στα α κοκκία και τους απελευθερώνουν όταν ενεργοποιηθούν. Ο παράγοντας V, το ινωδογόνο και ο παράγοντας vW είναι η σημαντικότερη συνεισφορά των αιμοπεταλίων στη διαδικασία της πήξης. Το ινωδογόνο απορροφάται από το πλάσμα ενώ ο παράγοντας vW μπορεί να συντεθεί από αυτά. Ο παράγοντας V αποκτάται και μέσω απορρόφησης από το πλάσμα αλλά και μέσω de novo σύνθεσης και μαζί με τον παράγοντα V εντοπίζονται στα α κοκκία. Μια πλήρως δραστική υπομονάδα του παράγοντα XIII εντοπίζεται στο κυτταρόπλασμα των αιμοπεταλίων και αποτελεί το 50% της ποσότητας του παράγοντα XIII του αίματος. Τα αιμοπετάλια περιέχουν επίσης το 2.5% της πρωτεΐνης S του αίματος, η οποία συντίθεται από τα μεγακαρυοκύτταρα, αποθηκεύεται στα α κοκκία και εκκρίνεται από τα αιμοπετάλια κατά την ενεργοποίησή τους από τη θρομβίνη. Το υψηλού μοριακού βάρους κινινογόνο είναι παρόν στα α κοκκία των αιμοπεταλίων ενώ εκκρίνεται και

εκφράζεται στην κυτταρική μεμβράνη των αιμοπεταλίων ύστερα από την ενεργοποίηση.

Πρωτεΐνη	Ποσότητα	Εντόπιση
Ινωδογόνο	5 – 25 mg/10 <sup>11</sup> plts	α – κοκκία και κυτταρόπλασμα
Παράγοντας V	0.25 – 0.77 mg/10 <sup>11</sup> plts	α κοκκία
Παράγοντας vW	10 – 64 μονάδες/10 <sup>11</sup> plts	A κοκκία
Παράγοντας XI	1.2 – 6.1 μονάδες/10 <sup>11</sup> plts	Κυτ. μεμβράνη
Παράγοντας XIII	50% της ποσότητας του αίματος	κυτταρόπλασμα
Υψηλού Μ.Β κινινογόνο	60 μg/10 <sup>11</sup> plts	A κοκκία

**Πίνακας 4:** παράγοντες πήξεως που περιέχονται στα αιμοπετάλια.

# ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2<sup>ο</sup>:

ΜΕΛΕΤΗ ΑΝΤΙΘΡΟΜΒΩΤΙΚΩΝ  
ΠΑΡΑΓΟΝΤΩΝ ΜΕ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΑ  
ΜΟΝΤΕΛΑ ΑΡΤΗΡΙΑΚΗΣ ΘΡΟΜΒΩΣΗΣ



### ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΑ ΜΟΝΤΕΛΑ ΑΡΤΗΡΙΑΚΗΣ ΘΡΟΜΒΩΣΗΣ

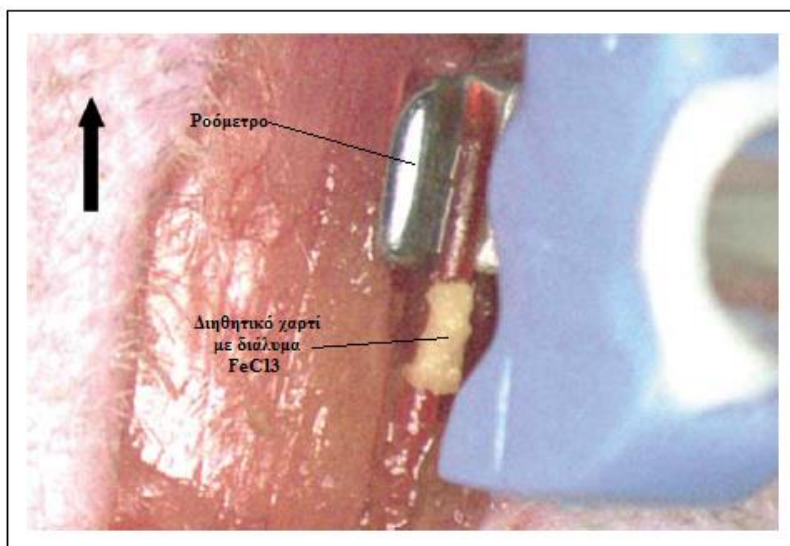
Η αναστολή της συσώρευσης των αιμοπεταλίων βρίσκεται εδώ και χρόνια στο επίκεντρο πειραματικών ερευνών. Στόχος είναι η σύνθεση αντιαιμοπεταλιακών φαρμάκων με εφαρμογή στην πρόληψη οξέων στεφανιαίων συνδρόμων και εγκεφαλικών επεισοδίων, με όσο το δυνατό λιγότερες αιμορραγικές επιπλοκές. Η βιβλιογραφία περιέχει πληθώρα πειραματικών μοντέλων in vivo που σκοπό έχουν την εκτίμηση της αντιαιμοπεταλιακής δράσης διαφόρων παραγόντων, μέσω επαγωγής θρόμβωσης σε αρτηρίες. Οι in vivo μελέτες πλεονεκτούν έναντι των in vitro καθώς εξομοιώνουν τη θρόμβωση υπό πραγματικές συνθήκες ροής χωρίς να χρησιμοποιούν στατικά αιμοπετάλια σε δοκιμαστικό σωλήνα. Παρόλα αυτά, αδυνατούν να εξομοιώσουν πλήρως τη θρόμβωση στον άνθρωπο, καθώς αυτή συμβαίνει σε νοσούντα από διάφορους καρδιαγγειακούς παράγοντες αγγεία (κάπνισμα, αρτηριακή υπέρταση, σακχαρώδης διαβήτης, δυσλιπιδαιμία), σε αντίθεση με τις υγιείς αρτηρίες που χρησιμοποιούνται στις μελέτες αυτές. Γενικά, θρόμβωση σε αρτηρίες πειραματοζώων έχει δημιουργηθεί με τους εξής τρόπους:

#### ΤΡΑΥΜΑΤΙΣΜΟΣ ΤΟΥ ΑΓΓΕΙΟΥ ΜΕ ΧΛΩΡΙΟΥΧΟ ΤΡΙΣΘΕΝΗ ΣΙΔΗΡΟ ( $FeCl_3$ )

Ο τραυματισμός του αγγείου με τοπική εφαρμογή  $FeCl_3$  έχει χρησιμοποιηθεί εκτενώς για τη μελέτη της θρομβογένεσης in vivo. Αποτελεί μοντέλο γνωστό για την ευαισθησία του τόσο σε αντιπηκτικά όσο και σε αντιαιμοπεταλιακά φάρμακα. Είναι ιδιαίτερα διαδεδομένος σε πειραματικές μελέτες που χρησιμοποιούν τρωκτικά, ενώ οι αρτηρίες που πρωταγωνιστούν σε αυτές είναι κυρίως οι καρωτίδες και οι μεσεντέριες. Ο Kurtz κι οι συνεργάτες του πρώτοι ανέφεραν ότι η εφαρμογή διαλύματος  $FeCl_3$  στην επιφάνεια μιας αρτηρίας οδηγεί ταχύτατα σε σχηματισμό θρόμβου που αποφράσσει τον αυλό της(224). Η διαδικασία επαγωγής της θρόμβωσης είναι απλή αφού δε χρειάζεται ειδικός εξοπλισμός για να προκληθεί. Ο  $FeCl_3$  διαχέεται διαμέσου του αρτηριακού τοιχώματος και απογυμνώνει τον αυλό από τα ενδοθηλιακά κύτταρα που τον προσλαμβάνουν μέσω ενδοκύττωσης(224, 225), χωρίς όμως να εκθέτει τις εν τω βάθει στοιβάδες, καθώς δε φθείρει την ελαστική μεμβράνη. Αυτό γίνεται λόγω του μεγάλου οξειδωτικού στρες που προκαλεί

μέσω απελευθέρωσης ελεύθερων ριζών, το οποίο καταλήγει στην καταστροφή των ενδοθηλιακών κυττάρων πυροδοτώντας τους γνωστούς μηχανισμούς δημιουργίας θρόμβου ο οποίος τελικά θα αποφράξει τον αυλό του αγγείου(226).

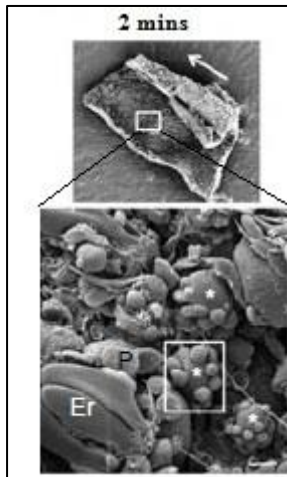
Η συγκέντρωση του  $\text{FeCl}_3$  μπορεί να ποικίλει (από 7.5% έως 20% συνήθως) όπως και ο χρόνος εφαρμογής του στο αγγείο (έως 5 λεπτά). Η εφαρμογή γίνεται με τη βοήθεια διηθητικού χαρτιού εμποτισμένου με το διάλυμα (εικ. 46). Μπορεί να γίνει είτε επάνω στο αγγείο είτε στο πλάι του, το οποίο συστήνεται καθώς επιτρέπει την παρακολούθηση της εξέλιξης του θρόμβου σε πραγματικό χρόνο μέσω κάμερας συνδεδεμένης σε φθορίζον μικροσκόπιο (Charged-couple device camera)(226). Η παρακολούθηση της ροής γίνεται εύκολα με ένα ροόμετρο. Η έκταση της καταστροφής του αγγείου ποικίλει ανάλογα με τη συγκέντρωση του  $\text{FeCl}_3$  που εφαρ-



**Εικ. 46:** Η αριστερή καρωτίδα του τρωκτικού όπου έχει γίνει εφαρμογή  $\text{FeCl}_3$  με διηθητικό χαρτί. Το βέλος δείχνει την κεφαλή του ζώου και τη φορά της ροής του αίματος(227).

μόζεται. Το μέγεθος του σχηματιζόμενου θρόμβου φαίνεται να αυξάνεται ευθέως ανάλογα για συγκεντρώσεις από 2.5% έως 10% (εικ. 50, 51). Υψηλότερες συγκεντρώσεις (10% έως 20%) προκαλούν αδιαφάνεια στο αγγείο και ο θρόμβος γίνεται μη ορατός. Γι' αυτό το λόγο προτιμάται η εφαρμογή του τρισθενούς σιδήρου στην πλαϊνή επιφάνεια του αγγείου. Συγκέντρωση 7,5% για 2 λεπτά (αυτός ο χρόνος χρησιμοποιείται στις περισσότερες μελέτες) προκαλεί μερική απόφραξη του αγγείου. Συγκέντρωση 20% προκαλεί σχεδόν πάντα ολική απόφραξη του αγγείου. Ο Eckly κι οι συνεργάτες του παρακολούθησαν την εξέλιξη του θρόμβου με ηλεκτρονικό

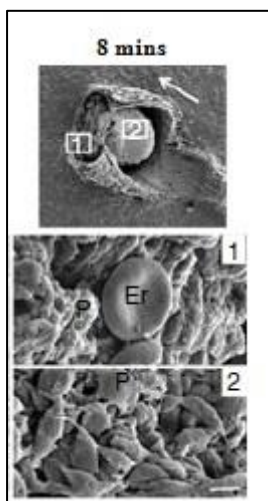
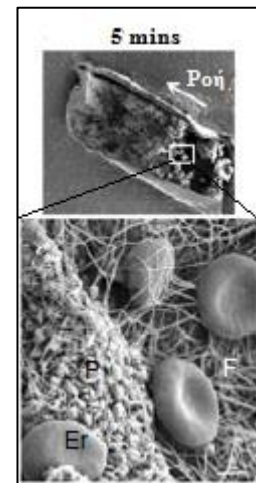
μικροσκόπιο στα δύο λεπτά (το σημείο της ελάχιστης βλάβης όπου και αφαιρείται το διηθητικό χαρτί, εικ. 47), στα πέντε λεπτα (όπου ο θρόμβος ακόμα εξελίσσεται, εικ. 48) και στα οκτώ λεπτα (εικ. 49) όπου κατέληξαν ότι ο θρόμβος βρίσκεται στο μέγιστο μέγεθός του(226):



**Εικ. 47:** *Επάνω:* επιμήκης διατομή καρωτίδας ποντικού στην οποία έχει γίνει τοπική εφαρμογή  $FeCl_3$  στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο. Ορατή η ενδοαυλική επιφάνεια. Το βέλος δείχνει τη φορά της ροής του αίματος.

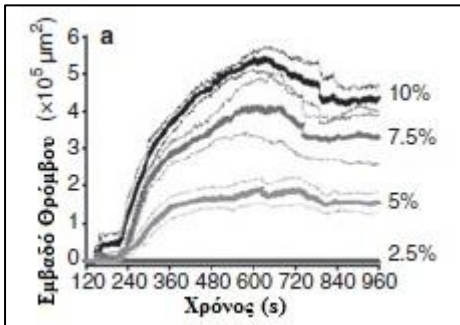
*Κάτω:* Μεγαλύτερη μεγέθυνση. Στο σημείο του τραυματισμού έχουν συσσωσιστεί δισκοειδή αιμοπετάλια (P) και λίγες ίνες ινικής. Er: ερυθροκύτταρο, (\*): κυστίδια που περιέχουν σίδηρο(226).

**Εικ. 48:** *Επάνω:* ο θρόμβος υπό εξέλιξη. *Κάτω:* Η μάζα των συσσωρευμένων αιμοπεταλίων τα οποία έχουν χάσει το δισκοειδές σχήμα τους (P), άφθονες ίνες ινικής (F) και ερυθροκύτταρα (Er)(226).

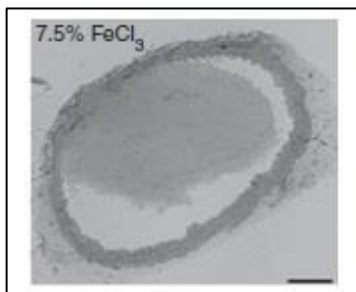


**Εικ. 49:** *Επάνω:* ο σχηματισμός του θρόμβου έχει σχηματιστεί και ο αυλός της αρτηρίας είναι πλέον αποφραγμένος.

*Κάτω:* 1) Τα αιμοπετάλια που αποτελούν το θρόμβο έχουν πιο εκτεταμένο σχήμα. Έτσι δημιουργείται μια μεγάλη αθηρογόνος επιφάνεια για τα επόμενα. 2) Τα αιμοπετάλια περιφερικά του θρόμβου δεν έχουν απολέσει εντελώς το δισκοειδές σχήμα τους, αναδεικνύοντας μια βαθμίδωση στο επίπεδο ενεργοποίησης(226).

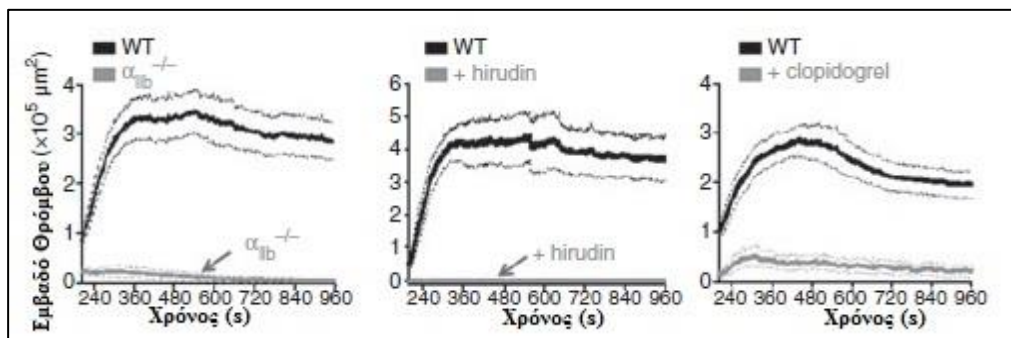


**Εικ. 50:** το εμβαδό των σχηματιζομενων θρόμβων σε συνάρτηση με το χρόνο, μετά την αρτηριακή βλάβη με ποικίλες συγκεντρώσεις  $\text{FeCl}_3$ (226).



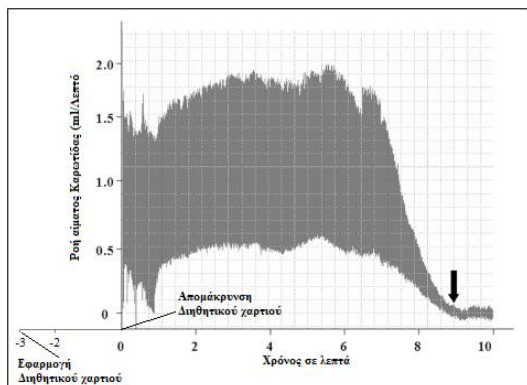
**Εικ. 51:** Διατομή της καρωτίδας δείχνοντας το σχηματισμένο θρόμβο μετά απο τραυματισμό της με  $\text{FeCl}_3$  7,5%.

Όσα περιγράφονται στις προηγούμενες φωτογραφίες μαρτυρούν έναν λειτουργικό καταρράκτη πήξεως και ένα περιβάλλον πλούσιο σε θρομβίνη (εικ 52). Άξιο αναφοράς είναι επίσης ότι τα ερυθρά αιμοσφαίρια τα οποία παρατηρήθηκαν με το μικροσκόπιο καθ' όλη τη διάρκεια της διαδικασίας είχαν φυσιολογικό σχήμα, γεγονός που αποδεικνύει ότι ο  $\text{FeCl}_3$  δεν έχει τοξικές επιδράσεις σε αυτά(226).



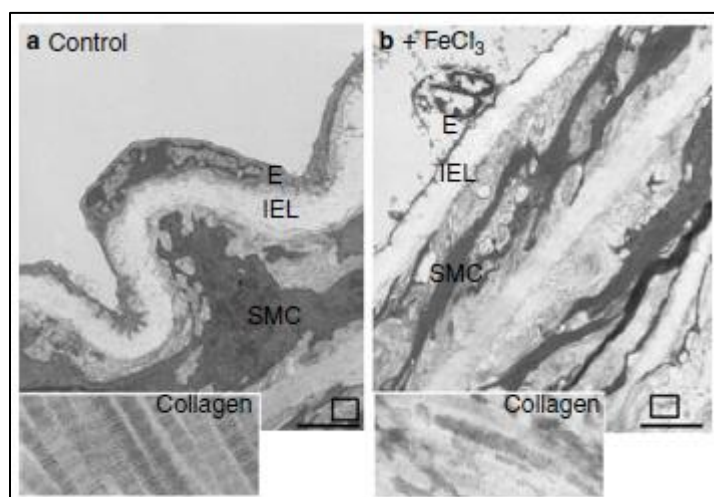
**Εικ. 52:** Το εμβαδό του σχηματιζόμενου θρόμβου μετά από τραυματισμό καρωτίδας με  $\text{FeCl}_3$  σε ζώα: i) διαγονιδιακά που δεν εκφράζουν τον υποδοχέα IIb/IIIa, ii) που τους είχε πρώτα γίνει ένεση με 20 mg/kg βάρους Hirudin (αναστολέας της θρομβίνης) και iii) που είχαν λάβει 50mg/kg βάρους κλοπιδογρέλη, συγκριτικά με τα φυσιολογικά ζώα των ομάδων ελέγχου (WD)(226).

Η Day SM με τους συνεργάτες της αναφέρουν ότι εφαρμογή διαλύματος 10% για 3 λεπτά σε καρωτίδες ποντικών δημιουργεί ένα σταθερό πλήρως αποφρακτικό θρόμβο σε 9 λεπτά μετά την απομάκρυνση του διηθητικού χαρτιού (δηλαδή 12 λεπτά μετά την εφαρμογή του, εικ 53)(227). Η εσωτερική ελαστική μεμβράνη παραμένει άθικτη, γε-



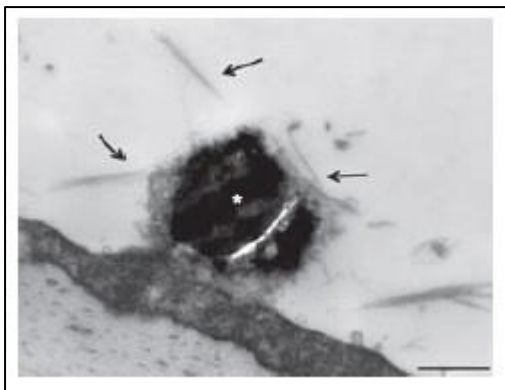
**Εικ. 53:** το σημείο μηδέν στον άξονα Χ αναφέρεται στην αφαίρεση του διηθητικού χαρτιού η οποία για το συγκεκριμένο πείραμα έγινε στα 3 λεπτά μετά την εφαρμογή του. 12 λεπτά μετά την εφαρμογή του διαλύματος  $\text{FeCl}_3$ , η Day SM κι οι συνεργάτες της αναφέρουν ολική απόφραξη του αγγείου(227).

γονός που σημαίνει ότι οι εσωτερικές στοιβάδες του αγγείου δεν έρχονται σε επαφή με τη ροή του αίματος. Το τοίχωμα του αγγείου παρουσιάζει απώλεια του κυματισμού του, ολική καταστροφή του ενδοθηλίου και διαταραχή της αρχιτεκτονικής του κολλαγόνου του υπενδοθηλίου. Τέλος, οι λείες μυϊκές ίνες επιπεδώνονται και δε συνδέονται πλέον μεταξύ τους.



**Εικ. 54:** a) το αρτηριακό τοίχωμα πριν την εφαρμογή του  $\text{FeCl}_3$  με τη φυσιολογική αρχιτεκτονική του κολλαγόνου και b) μετά από εφαρμογή επιθέματος με  $\text{FeCl}_3$ . Παραμένει άθικτη η ελαστική μεμβράνη (IEL). (E): ενδοθήλιο, (SMC): Λείες μυϊκές ίνες(226).

Κατά τη μελέτη του μοντέλου θρόμβωσης με εφαρμογή  $\text{FeCl}_3$  προκύπτει ένα εύλογο ερώτημα: εφόσον τόσο η ενδογενής όσο και η εξωγενής οδός του καταρράκτη της πήξης απαιτούν την έκθεση του υπενδοθηλίου, το οποίο όπως αναφέρθηκε δεν εκτίθεται, πως δημιουργείται ο θρομβος; Την απάντηση δίνουν σφαιρικά κυστίδια που παρατηρήθηκαν στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο και επισημαίνονται με αστερίσκο στην εικ. 47. Απεδείχθη ότι περιέχουν ιόντα σιδήρου ενώ το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο αποκάλυψε ότι διαθέτουν λεία επιφάνεια που αποτελείται από μία διπλοστοιβάδα με χαρακτηριστικές κυτταρικής μεμβράνης. Επίσης, στην επιφάνειά τους εκφράζουν τα μόρια PECAM-1 (Platelet endothelial cell adhesion molecule – Αιμοπεταλιακό-ενδοθηλιακό μόριο προσκόλλησης) αποδεικνύοντας ότι προέρχονται από το ενδοθήλιο. Άρα λοιπόν, τα κυστίδια αυτά τα σχηματίζει ο  $\text{FeCl}_3$  καθώς διαχέεται από την εξωτερική επιφάνεια προς τον αυλό της αρτηρίας. Το ενδιαφέρον είναι ότι επάνω σε αυτά τα σωματίδια βρέθηκαν προσκολλημένα ενεργοποιημένα αιμοπετάλια και ίνες ινικής (εικ 55), επιβεβαιώνοντας την υποψία ότι τελικά αυτά τα σωματίδια συνεισφέρουν στο σχηματισμό του θρόμβου. Με κατάλληλες χρώσεις απεδείχθη ότι τόσο στο εσωτερικό τους όσο και στην επιφάνειά τους υπήρχε άφθονος ιστικός παράγοντας. Έτσι πυροδοτείται η εξωγενής οδός του καταρράκτη της πήξης και εξηγείται η παραγωγή θρομβίνης και ινικής(226). Η θρομβίνη είναι συνεπώς ζωτικής σημασίας για αυτό το πειραματικό μοντέλο αρτηριακής θρόμβωσης ενώ γίνεται εύκολα κατανοητή η σχεδόν πλήρης αναστολή της δημιουργίας του θρόμβου που προκαλείται από το Hirudin (εικ. 52). Συνεπώς, το συγκεκριμένο μοντέλο είναι ιδιαίτερα ευαίσθητο για τη μελέτη αναστολέων θρομβίνης.



**Εικ. 55:** Ίνες ινικής σε άμεση επαφή με τα σφαιρικά κυστίδια σιδήρου στα 2 λεπτά μετά τον τραυματισμό(226).

Τι άλλο σημαίνει για το συγκεκριμένο μοντέλο πειραματικής θρόμβωσης η άθικτη ελαστική μεμβράνη; Εφόσον δεν εκτίθεται το υπενδοθήλιο (άρα ούτε το κολλαγόνο), οι υποδοχείς του κολλαγόνου δε συμμετέχουν στη θρομβογένεση. Πράγματι, ποντίκια τα οποία δεν εξέφραζαν τον υποδοχέα GPVI ή τη β1 υπομονάδα των ιντεγκρινικών υποδοχέων δε παρουσίασαν μείωση του σχηματιζόμενου θρόμβου σε αρτηρίες στις οποίες εφαρμόστηκε διάλυμα  $FeCl_3$  με συγκέντρωση 7.5%. Ομοίως και για συγκέντρωση 20%. Συνεπώς, η ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων μέσω κολλαγόνου και η συσσώρευσή τους μέσω της μεταγωγής του σήματος των υποδοχέων του δε παίζουν ιδιαίτερο ρόλο στα μοντέλα πειραματικής θρόμβωσης με  $FeCl_3$ . Συνεπώς το συγκεκριμένο πειραματικό μοντέλο δεν είναι κατάλληλο για τη μελέτη αναστολέων του κολλαγόνου. Αντιθέτως, ποντίκια τα οποία δεν εξέφραζαν τον παράγοντα von Willebrand, παρουσίασαν 50% μείωση στο σχηματιζόμενο θρόμβο αποδεικνύοντας ότι αυτός παίζει σημαντικό αλλά όχι καθοριστικό ρόλο στην εξέλιξη του θρόμβου υπό το συγκεκριμένο πειραματικό μοντέλο(226, 228).

	<b>Χαρακτήρας μελέτης</b>	<b>Αγγείο το οποίο θρομβώθηκε</b>	<b>Ουσία υπό μελέτη</b>
<b>Τρωκτικά</b>	1. Θρομβολυτικός: (229)	1. Καρωτίδα: (229, 231, 233, 234, 237, 238, 240-243, 246, 248-250, 254, 255, 257-260)	1. CD 151: (236) 2. Πολυσακχαρίτες: (229, 254) 3. Ηπαρίνη: (249, 254) 4. Ανταγωνιστές θρομβίνης: (239, 241, 249, 258) 5. Βαρφαρίνη: (241) 6. Αντισώματα για την HSP 60: (231)
(συνέχεια)	2. Μελέτη θρομβογένεσης: (230-238)	2. Μεσεντέριος: (232, 236, 245, 251, 256, 261)	7. Ανταγωνιστές υποδοχέων P2Y12: (245) 8. Ανταγωνιστές P2Y1: (251) 9. Αναστολείς Φωσφοδιεστεράσης: (245, 248)
	3. Αντιθρομβωτικός: (239-258)	3. Κοιλιακή Αορτή: (244, 252, 253)	10. Κινάσες:

		<p>4. Μηριαία αρτηρία: (230, 235)</p> <p>5. LAD: (262)</p>	<p>- Τυροσίνη: (234)</p> <p>- Συνθάσης Γλυκογόνου: (233)</p> <p>11. Ανταγωνιστές Χα: (239, 246, 258)</p> <p>12. Ανταγωνιστές IIbIIIa: (246)</p> <p>12. Υποδοχείς GPIIb-IX-V: (257)</p> <p>13. ρ-σελεκτίνη: (238, 256)</p> <p>14. Ανταγωνιστές GPVI: (250)</p> <p>15. Καλλικρεΐνη: (259)</p> <p>16. Ανδρογόνα: (253)</p> <p>17. Παράγοντας V. Leiden: (230, 235)</p> <p>18. Αναστολείς συνθετάσης TxA2: (244)</p> <p>19. Ανταγωνιστής υποδοχέα TxA2: (244)</p> <p>20. Ανάλογα Aρο A1: (252)</p> <p>21. Ιστικός Παράγοντας: (232)</p> <p>22. Κολλαγόνο: (232)</p> <p>23. Μαγνήσιο: (255)</p> <p>24. PECAM-1: (242)</p> <p>25. Υποδοχείς PAR-3: (261)</p> <p>26. Βιτρονεκτίνη: (243)</p> <p>27. Παράγοντας XI: (237)</p>
<b>Χοίροι</b>	Αντιθρομβωτικός (240, 247)	Καρωτίδα (240, 247)	<p>1. Ανταγωνιστές IIbIIIa: (240)</p> <p>2. Αναστολείς υποδοχέα PAR1: (247)</p>
<b>Κουνέλια</b>	Αντιθρομβωτικός (239)	Καρωτίδα (239)	1. Χαμηλού μοριακού βάρους ηπαρίνη: (239)

**Πίνακας 5:** Ένα αντιπροσωπευτικό δείγμα της βιβλιογραφίας όσον αφορά στην αρτηριακή θρόμβωση με χρήση FeCl<sub>3</sub>. Η ταξινόμηση γίνεται αρχικά με βάση τα πειραματόζωα που χρησιμοποιήθηκαν, εν συνεχεία με βάση το χαρακτήρα της μελέτης, τα αγγεία που θρομβώθηκαν και τέλος τις ουσίες που μελετήθηκαν.



Συνεπώς, το μοντέλο αρτηριακής θρόμβωσης με  $\text{FeCl}_3$  δε μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να μελετήσει τα πρώιμα στάδια της θρομβογένεσης (πρόσδεση του συνδεδεμένου με το κολλαγόνο παράγοντα  $\text{vW}$  στους υποδοχείς GPIIb-IX-V και GPIIbIIIa ή του κολλαγόνου στον GPVI), διότι το υπενδοθήλιο δεν εκτίθεται. Αντιθέτως είναι κατάλληλο για τη μελέτη διαλυτών αγωνιστών της συσσώρευσης και πρωτεϊνών του πλάσματος στο σχηματισμό του θρόμβου(226).

#### ΜΕ ΦΩΤΟΧΗΜΙΚΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ

Αυτή η μέθοδος μειονεκτεί συγκριτικά με την προηγούμενη στον θέμα της πολυπλοκότητας της εκτέλεσής της και του εξειδικευμένου εξοπλισμού που απαιτείται προκειμένου να εκτελεστεί. Αρχικά στο ζώο εγχύεται μία φωτοαντιδραστική ουσία που ονομάζεται ερυθρό της Βεγγάλης και ακολούθως ένα παρασκευασμένο τμήμα της επιλεγμένης αρτηρίας εκτίθεται σε φώς λάμπας Xenon μήκους κύματος 540 nm, η οποία έχει εξοπλιστεί με ένα φίλτρο απορρόφησης θερμότητας(227, 263). Το ερυθρό της Βεγγάλης συσσωρεύεται στη λιπιδική διπλοστοιβάδα των ενδοθηλιακών και άλλων κυττάρων(264). Η έκθεσή του στην παραπάνω ακτινοβολία προκαλεί μια φωτοχημική αντίδραση η οποία καταστρέφει το ενδοθήλιο με αποτέλεσμα να ξεκινά ο σχηματισμός του θρόμβου.

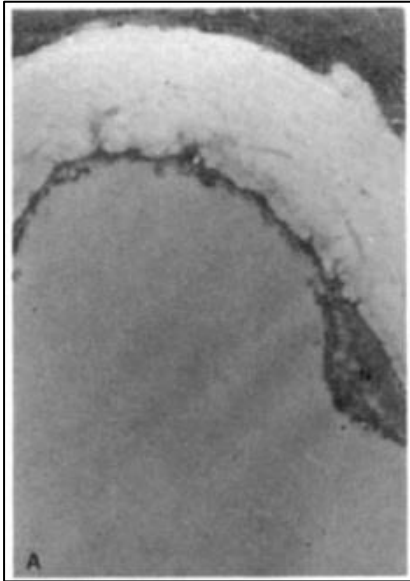
Η βλάβη που προκαλεί η μέθοδος αυτή στο αρτηριακό τοίχωμα είναι πιο διακριτική συγκριτικά με τον  $\text{FeCl}_3$ , που όπως είπαμε καταστρέφει όλες τις στοιβάδες του αγγείου (αν και δεν εκθέτει το υπενδοθήλιο στην κυκλοφορία του αίματος γιατί διατηρεί άθικτη τη βασική μεμβράνη). Αυτό έχει ως αποτέλεσμα να χρειάζεται περισσότερος χρόνος για τη δημιουργία του θρόμβου. Η Day SM κι οι συνεργάτες της αναφέρουν ότι ο χρόνος που χρειάζεται για να αναπτυχθεί ένας πλήρως αποφρακτικός θρόμβος στις καρωτίδες ποντικών στους οποίους πρώτα έγινε έγχυση 10 mg/kg βάρους ερυθρού της Βεγγάλης, είναι περίπου 40 λεπτά(227). Η δόση αυτή έχει διαπιστωθεί ως η ελάχιστη που προκαλεί ικανή βλάβη στο ενδοθήλιο έτσι ώστε να αποφραχθεί πλήρως το αγγείο. Μικρότερες δόσεις όπως π.χ. 3 mg/kg βάρους προκαλούν μεν βλάβη, όχι ικανή όμως για πλήρη απόφραξη του αγγείου. Δόση 1

mg/kg βάρους δεν επηρεάζει καθόλου τη ροή του αίματος διαμέσου της καρωτίδας(263).

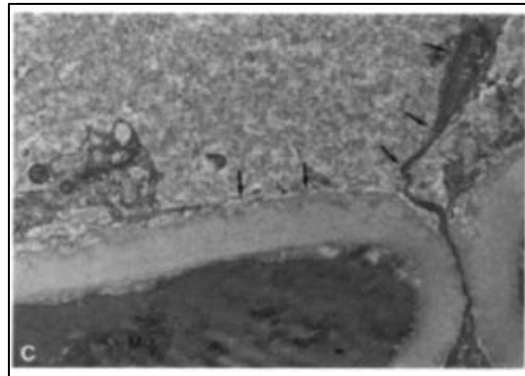
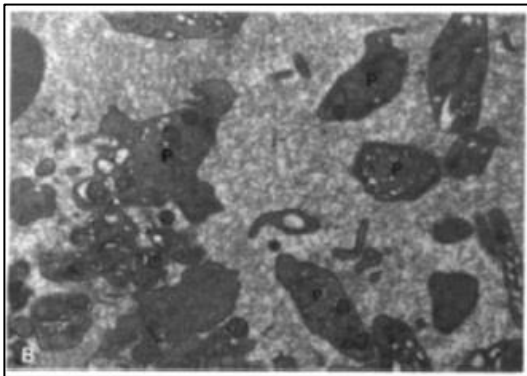
Το μοντέλο της φωτοχημικής αρτηριακής θρόμβωσης έχει υιοθετηθεί από αρκετούς ερευνητές οι οποίοι το χρησιμοποίησαν για τη μελέτη μιας πληθώρας αιμοστατικών και ινωδολυτικών παραγόντων. Ο Eitzman κι οι συνεργάτες του προχώρησαν ακόμη περισσότερο και χρησιμοποίησαν το μοντέλο αυτό σε καρωτίδες οι οποίες παρουσίαζαν αρτηριοσκλήρυνση, παράγοντας έτσι ένα μοντέλο που προσομοίαζε τη θρόμβωση λόγω ρήξης της αθηρωματικής πλάκας(265).

Όπως αναφέρθηκε το συγκεκριμένο μοντέλο μειονεκτεί στο θέμα της πολύπλοκη εκτέλεσης. Προκειμένου να είναι επιτυχές και τα αποτελέσματα από κάθε πειραματόζωο να είναι συγκρίσιμα μεταξύ τους, το ερυθρό της Βεγγάλης πρέπει να χορηγείται σε όλα τα ζώα που συμμετέχουν στο πείραμα από την ίδια οδό (π.χ σφαγίτιδα) και μέσα στον ίδιο χρόνο. Έτσι, προκειμένου να εξισωθούν οι χρόνοι χορήγησης της ουσίας σε όλα τα πειραματόζωα, χρησιμοποιείται η bolus χορήγηση. Επίσης, η λάμπα φθορισμού θα πρέπει να βρίσκεται σε όλα τα πειραματόζωα σε συγκεκριμένη απόσταση από το αγγείο, συνήθως 5-6 εκατοστά. Τέλος ο χρόνος ανάμεσα στη χορήγηση του ερυθρού της Βεγγάλης και της έκθεσης στο φως πρέπει να είναι σταθερός. Μια πιθανή λύση στο θέμα αυτό είναι να γίνεται η Bolus χορήγηση της ουσίας, ενώ το αγγείο ήδη εκτίθεται στο φως(227). Τέλος πρέπει να αναφερθεί, ότι το ερυθρό της Βεγγάλης έχει τοξικές ιδιότητες για τα πειραματόζωα(266). Το γεγονός περιπλέκει πειραματικές μελέτες αρτηριακής θρόμβωσης στις οποίες τα πειραματόζωα δε θανατώνονται αμέσως μετά την επαγωγή της θρόμβωσης αλλά επιθυμείται η ανάνηψή τους για διάφορους λόγους (π.χ παρακολούθηση).

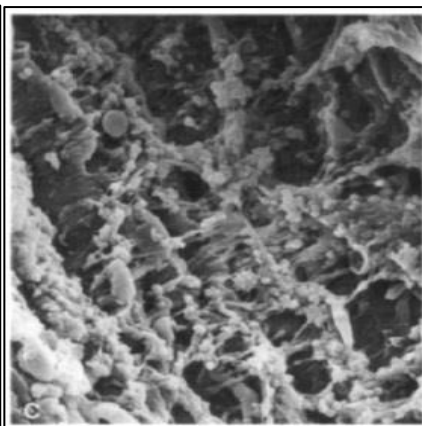
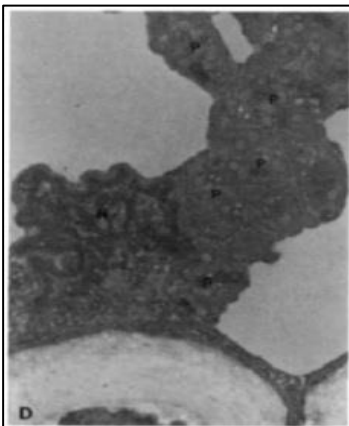
Ο Matsuno και οι συνεργάτες τους παρακολούθησαν την ιστοχημική παθολογία του φωτοχημικού μοντέλου με ηλεκτρονικό μικροσκόπιο(263). Οι παρατηρήσεις τους έγιναν επάνω σε εγκάρσιες και επιμήκεις τομές παρασκευασμένων μηριαίων αρτηριών ποντικών αμέσως πριν (εικ 56), 3 λεπτά (εικ 57) και 5 λεπτά (εικ 58) μετά την έγχυση του ερυθρού της Βεγγάλης υπό το φθορίζον φως.



**Εικ. 56:** ο άθικτος αυλός της μηριαία αρτηρίας, λίγο πριν την έγχυση ερυθρού της Βεγγάλης. Επί του παρόντος το αγγείο απλώς εκτίθεται στο φθορίζον φως. (N): ο πυρήνας ενός ενδοθηλιακού κυττάρου προπίπτει προς τον αυλό(263).



**Εικ. 57:** Εγκάρσιες διατομές. 3 λεπτά μετά την έγχυση του ερυθρού της Βεγγάλης υπό το φθορίζον φως. Ενεργοποιημένα αιμοπετάλια με εκτεταμένα ψευδοπόδια παρουσιάζονται στο σημείο της φθοράς (P) ενώ παρατηρείται αποκόλληση του ενδοθηλίου από τη βασική μεμβράνη (βέλη)(263).



**Εικ. 58:** 5 λεπτά μετά την έγχυση ερυθρού της Βεγγάλης υπό το φθορίζον φως. *Αριστερά:* Εγκάρσια διατομή. Η αποκόλληση του ενδοθηλίου είναι ακόμη πιο εμφανής και τα ενδοθηλιακά κύτταρα παρουσιάζονται

οιδηματώδη με διασταλμένο ενδοπλασματικό δίκτυο. *Δεξιά:* σε αυτή την επιμήκη διατομή ο θρόμβος έχει ξεπλυθεί με έγχυση φυσιολογικού ορού. Ενεργοποιημένα αιμοπετάλια με ψευδοπόδια φαίνονται προσκολλημένα στα ενδοθηλιακά κύτταρα(263).

Παρά το γεγονός ότι τα λεία μυϊκά κύτταρα παραμένουν άθικτα, τα μιτοχόνδριά τους παρουσιάζουν διασταλμένες και μη διακριτές αναδιπλώσεις της εσωτερικής μεμβράνης τους. Αυτό είναι αποτέλεσμα της ισχαιμίας λόγω διακοπής της ροής του αίματος στο αγγείο(263).

	<b>Χαρακτήρας μελέτης</b>	<b>Αγγείο το οποίο θρομβώθηκε</b>	<b>Ουσία υπο μελέτη</b>
<b>Τρωκτικά</b>	1. Αντιθρομβωτικός: (263, 267-279)	1. Μηριαία αρτηρία: (263, 271, 272, 276-278, 286-289)	1. Αναστολής PDE Milrinone: (286) 2. Ηπαρίνη:(263) 3. Ασπιρίνη: (287, 290)
	2. Θρομβογόνος: (270, 280-284)	2. Καρωτίδα: (267, 269, 275, 279-283, 285)	4. Κλοπιδογρέλη: (270, 287) 5. Παράγοντας VIII: (282) 6. Κιινογόνο: (283)
	3. Θρομβολυτικός: (263, 285)	3. Στεφανιαία: (270)	7. Αναστολή δράσης vW: (278)
	4. Μελέτη Υπερπλασίας ενδοθηλίου: (286-288)		8. Παράγοντας VI: (280) 9. Παράγοντας VII: (280) 10. Ανταγωνιστές IIb/IIIa: (274) 11. Αναστολέας 5-HT <sub>2</sub> υποδοχέων σεροτονίνης: Ketanserin (270) AT-1015 (271) 12. Ανταγωνιστές υποδοχέων TxA <sub>2</sub> : (270, 272, 290, 291)
(συνέχεια)			13. Αναστολείς θρομβίνης: (268) Ανάλογα hirudin: CX-397 (277) 14. Συνθετικά πεπτίδια Από κολλαγόνο III: ΚΟΓΕΟΓΡΚ (273) 15. Αντιαιμοπεταλιακοί παράγοντες: desethyl KBT-3022 (276)

			<p>16. Αναστολέας παράγοντα X: JTV-803 (268) Rivaroxaban (279)</p> <p>17. Ενεργοποιητής πλασμινογόνου: (263, 272)</p> <p>18. Συμπαράγοντας II ηπαρίνης: (269)</p> <p>19. Προσταγλαδίνη E1: (288)</p> <p>20. LMW ηπαρίνη M118: (267)</p> <p>21. Αναστολείς παράγοντα IX: (275)</p> <p>22. Αναστολείς COX-2: (289)</p> <p>23. Αντιφωσφολιπιδικά αντισώματα β2GPI: (281)</p> <p>24. Αναστολείς ενεργοποιητή πλασμινογόνου: (285)</p>
<b>Χοίροι</b>	<p>Αντιθρομβωτικός: (290-293)</p> <p>Θρομβογόνος: (264, 294)</p> <p>Μελέτη υπερπλασίας ενδοθηλίου: (295)</p>	<p>1. Μηριαία αρτηρία: (263, 264, 290, 294, 295)</p> <p>2. Καρωτίδα: (292)</p>	<p>1. Ενεργοποιητής πλασμινογόνου: Ιστικός (296) Τύπου Ουροκινάσης (296)</p> <p>2. Σταφυλοκινάση: (296)</p> <p>3. Ανταγωνιστές IIb/IIIa: (292, 293)</p> <p>4. Ανταγωνιστές υποδοχέων TxA2: (293)</p>
<b>Σκύλοι</b>	<p>1. Αντιθρομβωτικός: (278, 292)</p> <p>2. Θρομβογόνος: (297)</p> <p>3. Θρομβολυτική: (297)</p>	<p>3. LAD: (297)</p> <p>4. Μηριαία αρτηρία: (278)</p> <p>5. Καρωτίδα: (292)</p>	<p>1. Ενεργοποιητής πλασμινογόνου: (297)</p> <p>2. Αναστολή δράσης vW: (278)</p> <p>3. Αναστολή IIb/IIIa: (292)</p>
<b>Πίθηκοι</b>	<p>Αντιθρομβωτικός: (292)</p>	<p>Καρωτίδα: (292)</p>	<p>1. Αναστολή IIb/IIIa: (292)</p>

**Πίνακας 6:** Ένα αντιπροσωπευτικό δείγμα της βιβλιογραφίας όσον αφορά την αρτηριακή θρόμβωση με τη φωτοχημική μέθοδο του ερυθρού της Βεγγάλης. Η ταξινόμηση γίνεται αρχικά με βάση τα πειραματόζωα που χρησιμοποιήθηκαν, εν συνεχεία με βάση το χαρακτήρα της μελέτης, τα αγγεία που θρομβώθηκαν και τέλος τις ουσίες που μελετήθηκαν.

### ΜΕ ΧΑΛΚΙΝΟ ΣΠΕΙΡΑΜΑ

Πρόκειται για μια τεχνική ιδιαίτερα διαδεδομένη σε πειραματικές μελέτες με σκύλους. Χρησιμοποιήθηκε ιδίως κατά τις δεκαετίες του 1980 και 1990, αν και σποραδικά άρθρα από το 2000 και έπειτα εξακολουθούν να την αναφέρουν. Έχει χρησιμοποιηθεί εκτενώς κυρίως για θρομβολυτικές μελέτες σε στεφανιαίες αρτηρίες σκύλων (ως επί το πλείστον στον LAD και λιγότερο στην LcX). Σε μικρότερο βαθμό έχει χρησιμοποιηθεί και σε άλλες αρτηρίες αλλά και για αντιθρομβωτικές μελέτες και μελέτες της θρομβογένεσης κάποιων παραγόντων.

Πρόκειται για μια πολυπλοκότερη στην εκτέλεσή της τεχνική από τις δύο προηγούμενες, κατά την οποία η θρόμβωση προκαλείται με την είσοδο (μέσω καθετηριασμού) ενός σπειράματος-ελάσματος χαλκού στο αγγείο, προσαρμοσμένο στη διάμετρο του. Αυτό προκαλεί τη θρόμβωση. Η παρακολούθηση του σχηματισμού του θρόμβου γίνεται με αγγειογραφικά. Απαιτείται λοιπόν χώρος και εξοπλισμός αιμοδυναμικού εργαστηρίου. Το γεγονός αυτό καθιστά τη μέθοδο πολυέξοδη και δυσχερέστερη στην πραγματοποίησή της.

Ο πρώτος που περιέγραψε την τεχνική θρόμβωσης των στεφανιαίων αρτηριών με χάλκινο σπείραμα ήταν ο Kordenat με τους συνεργάτες του(298). Γίνεται θωρακοτομή στο 5<sup>ο</sup> μεσοπλεύριο διάστημα του ζώου, παρασκευάζεται το στεφανιαίο αγγείο το οποίο πρόκειται να θρομβωθεί και τοποθετείται ένα ροόμετρο περιφερικά του σημείου της βλάβης. Όπως αναφέρουν ο Saito και οι συνεργάτες του ο θρόμβος αναμένεται να έχει σχηματιστεί από 10 έως 20 λεπτά μετά την εφαρμογή του σπειράματος(299).

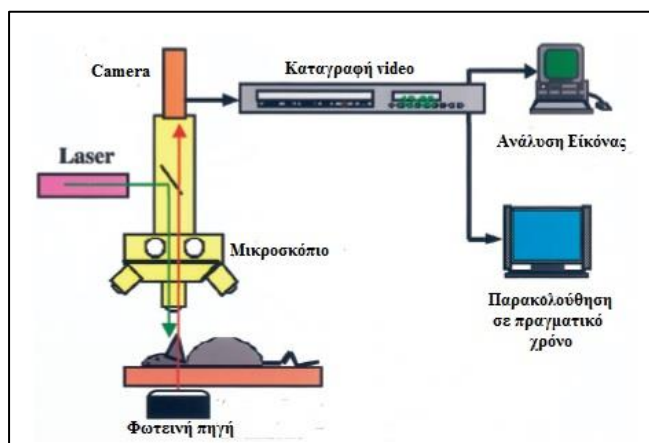
	<b>Χαρακτήρας μελέτης</b>	<b>Αγγείο το οποίο θρομβώθηκε</b>	<b>Ουσία υπό μελέτη</b>
<b>Σκύλοι</b>	1. Θρομβολυτικός: (299-309) 2. Μελέτη θρομβογέννεσης: (298) 3. Αντιθρομβωτικός: (310, 311)	1. LAD: (298, 299, 302-304, 308, 311) 2. LcX: (301, 307, 309) 3. Μηριαία αρτηρία: (300, 305, 306, 310) 4. Ιγνυακή: (298) 5. Έσω μαστική: (298) 6. Καρωτίδα: (311)	1. t-PA: (299, 300, 305-309) 2. Ανασυνδυσασμένη ανθρώπινη μικροπλασμίνη: (301) 3. Αναστολέας της συνθετάσης της TxA2 σε συνδυασμό + αναστολέας υποδοχέων TxA2: (303) 4. Ανταγωνιστής υποδοχέων TxA2 + Ανταγωνιστής 52 υποδοχέων σεροτονίνης: (302) 5. Ανταγωνιστής αιμοπεταλιακών υποδοχέων ινοδωγόνου: (310, 311) 6. Ηπαρίνη: (304)
<b>Χοίροι</b>	1. Θρομβολυτικός: (312, 313) 2. Αντιθρομβωτικός: (314)	1. LAD: (313, 314) 2. Λαγόνιος: (312, 314)	1. Αναστολείς θρομβίνης: Inogatran (313, 314) 2. Ηπαρίνη: (313) 3. Ασπιρίνη: (313) 4. P-selectin glycoprotein ligand-1: (312)
<b>Κουνέλια</b>	1. Θρομβολυτικός: (315) 2. Αντιθρομβωτικός: (316)	1. Καρωτίδα (316) 2. Λαγόνια: (315)	1. Ανάλογα προστακυκλίνης: Naxaposten: (316) 2. Αναστολείς Θρομβίνης: Ανασυνδυσασμένο Hirudin (315)

**Πίνακας 7:** Ένα αντιπροσωπευτικό δείγμα της βιβλιογραφίας όσον αφορά την αρτηριακή θρόμβωση με χρήση χάλκινου σπειράματος. Η ταξινόμηση γίνεται αρχικά με βάση τα πειραματόζωα που χρησιμοποιήθηκαν, εν συνεχεία με βάση το χαρακτήρα της μελέτης, τα αγγεία που θρομβώθηκαν και τέλος τις ουσίες που μελετήθηκαν.

Έχει επίσης χρησιμοποιηθεί για θρόμβωση μηριαίων αρτηριών κυρίως για θρομβολυτικές μελέτες. Ο Bush με τους συνεργάτες του(300) ήταν οι πρώτοι που περιέγραψαν το μοντέλο σύμφωνα με το οποίο η είσοδος σπειράματος χαλκού στην μηριαία αρτηρία σκύλων οδηγεί σε αποφρακτική θρόμβωση μέσα σε 12 περίπου λεπτά. Οι θρομβολυτικές μελέτες συνήθως αφήνουν το σπείραμα στη θέση του για πολύ περισσότερο χρόνο προκειμένου να σχηματιστεί επαρκής ποσότητα θρόμβου (Ο Suzuki N. κι οι συνεργάτες του αφαίρεσαν το σπείραμα μετά από μία ώρα(307)). Εν συνεχεία το σπείραμα αφαιρείται, ζυγίζεται για να προσδιοριστεί το βάρος του θρόμβου (διαφορά βάρους του σπειράματος πριν την είσοδο στο αγγείο και μετά την αφαίρεσή του) και επανατοποθετείται στη θέση του για τη μελέτη της θρομβόλυσης.

#### ΜΕ ΧΡΗΣΗ LASER

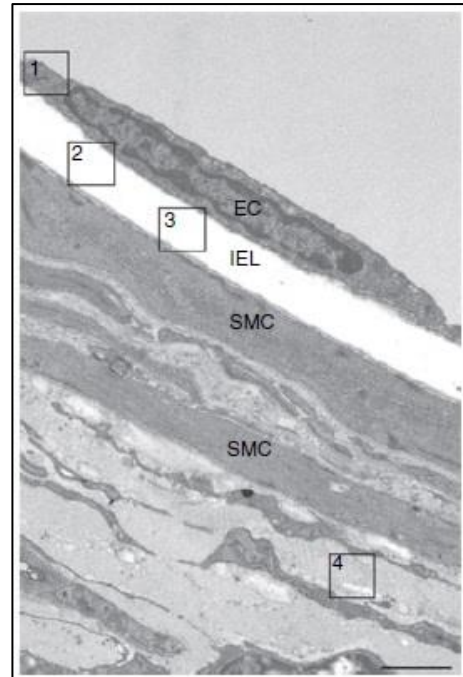
Πρόκειται για μια μέθοδο η οποία απαιτεί εξειδικευμένο εξοπλισμό προκειμένου να πραγματοποιηθεί. Η ακτίνα του laser μεταδίδεται προς το αγγείο στόχο μέσω του μικροσκοπίου, ενώ μια κάμερα συνδεδεμένη σε αυτό καταγράφει την εξέλιξη του θρόμβου και αποστέλλει τις εικόνες για ανάλυση (εικ 59).



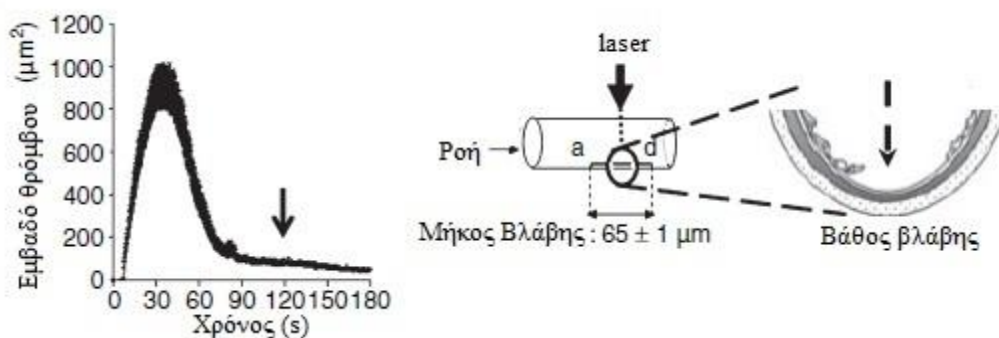
**Εικ. 59:** Εξοπλισμός εργαστηρίου που απαιτείται για την εκτέλεση αγγειακής θρόμβωσης με χρήση Laser.



Ο Hechler κι οι συνεργάτες του πραγματοποίησαν μια ιστολογική μελέτη επάνω σε αρτηρίες τρωκτικών και κατέληξαν σε ενδιαφέροντα συμπεράσματα όσον αφορά στις πρωτεΐνες που εμπλέκονται στο σχηματισμό του θρόμβου(317). Όπως φαίνεται δεξιά, μια υγιής μεσεντέριος αρτηρία αποτελείται από i) το ενδοθήλιο (EC) μέσα στο οποίο, στα σωματίδια Weibel Palade, βρίσκεται ο παράγοντας von Willebrand (1), ii) τη βασική μεμβράνη ανάμεσα στο ενδοθήλιο και την ελαστική μεμβράνη στην οποία εντοπίζεται κολλαγόνο τύπου IV (2) iii) την ελαστική μεμβράνη (IEL) στην οποία εντοπίζεται κολλαγόνο τύπου III (3), iii) τις λείες μυϊκές ίνες ( SMC-δύο στιβάδες) και iv) το συνδετικό ιστό με κολλαγόνο τύπου I (4).

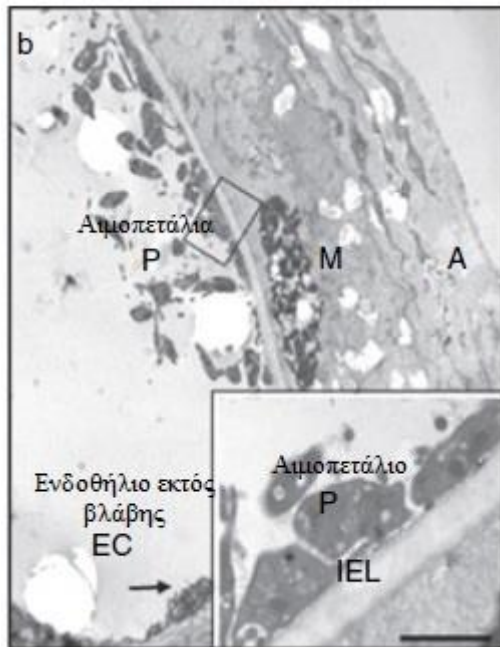


Ο Hechler και οι συνεργάτες του δημιούργησαν αρχικά επιφανειακούς τραυματισμούς στις αρτηρίες εστιάζοντας την ακτίνα Laser στο ενδοαυλικό τοίχωμα του αγγείου, έως ότου δουν μέσω της κάμερας ότι ένα μικρό κομμάτι αποσπάται από το ενδοθήλιο (εικ 61). Η τεχνική αυτή δημιουργεί ένα μικρό παροδικό θρόμβο ο οποίος λύεται μετά από περίπου 2 λεπτά. Παρατηρώντας με ηλεκτρονικό μικροσκόπιο την περιοχή της βλάβης μετά από αυτά τα 2 λεπτά, παρατήρησαν ότι σε ένα μήκος περίπου 65  $\mu\text{m}$  το αγγείο είχε απογυμνωθεί από το ενδοθήλιο. Αιμοπετά-



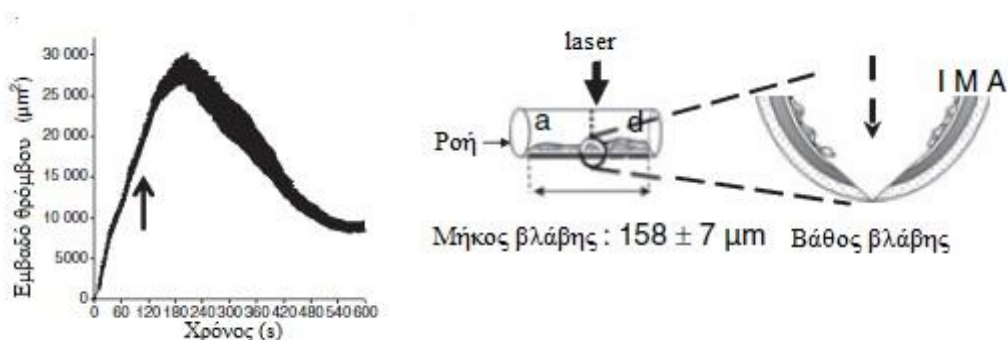
**Εικ. 60:** ο παροδικός θρόμβος μετά από επιφανειακή βλάβη της αρτηρίας με laser(317).

ποια βρέθηκαν προσκολλημένα στην έσω ελαστική μεμβράνη χωρίς να παρουσιάζουν αποκοκκίωση ή προχωρημένη ενεργοποίηση. Με ανοσοχημικές μελέτες εντοπίστηκαν στον αυλό του αγγείου κολλαγόνα τύπου III και IV σε στενή επαφή με αιμοπετάλια. Η λοιπή δομή του αγγείου ήτα φυσιολογική.



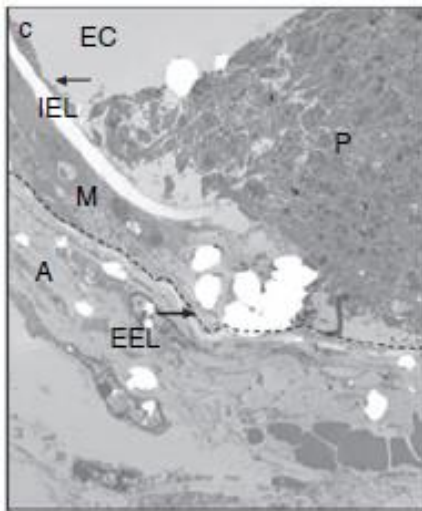
Εικ. 61: η επιφανειακή βλάβη της αρτηρίας(317).

Εν συνεχεία προσαρμόζοντας την ένταση και τη διάρκεια της ακτίνας laser, οι Hechler et al δημιούργησαν βαθύτερες βλάβες στις αρτηρίες, χωρίς όμως να προκαλέσουν ρήξη του αγγείου και αιμορραγίες. Δημιουργήθηκε ένας μόνιμος θρόμβος 40 φορές μεγαλύτερος συγκριτικά με την επιφανειακή βλάβη (εικ 62). Για να είναι συγκρίσιμα τα αποτελέσματα, η μελέτη έγινε πάλι στα 2 λεπτά, τα οποία αντιστοιχούσαν στη φάση ανάπτυξης του θρόμβου. Στην περιοχή της βλάβης, το ενδοθήλιο (EC), οι διάμεσες στοιβάδες και η εξωτερική ελαστική μεμβράνη (EEL)



Εικ. 62: μεγαλύτερος και μόνιμος θρόμβος δημιουργείται σε εν τω βάθει βλάβη με laser(317).

είχαν καταστραφεί εκθέτοντας τον συνδετικό ιστό (A) στη ροή του αίματος. Η περιοχή της βλάβης είχε έκταση 158 περίπου μm παρουσιάζοντας απλή απογύμνωση του ενδοθηλίου στα όριά της. Ο θρόμβος αποτελείτο από αιμοπετάλια (P) σταθερά προσκολλημένα στο συνδετικό ιστό, με αποκοκκιωμένα αιμοπετάλια στο κέντρο του και αιμοπετάλια με άθικτα κοκκία στην περιφέρειά του (εικ. 63). Ανοσοϊστοχημικές μελέτες αποκάλυψαν κολλαγόνα τύπου I, III και IV. Στη βάση αλλά όχι μέσα στο θρόμ-

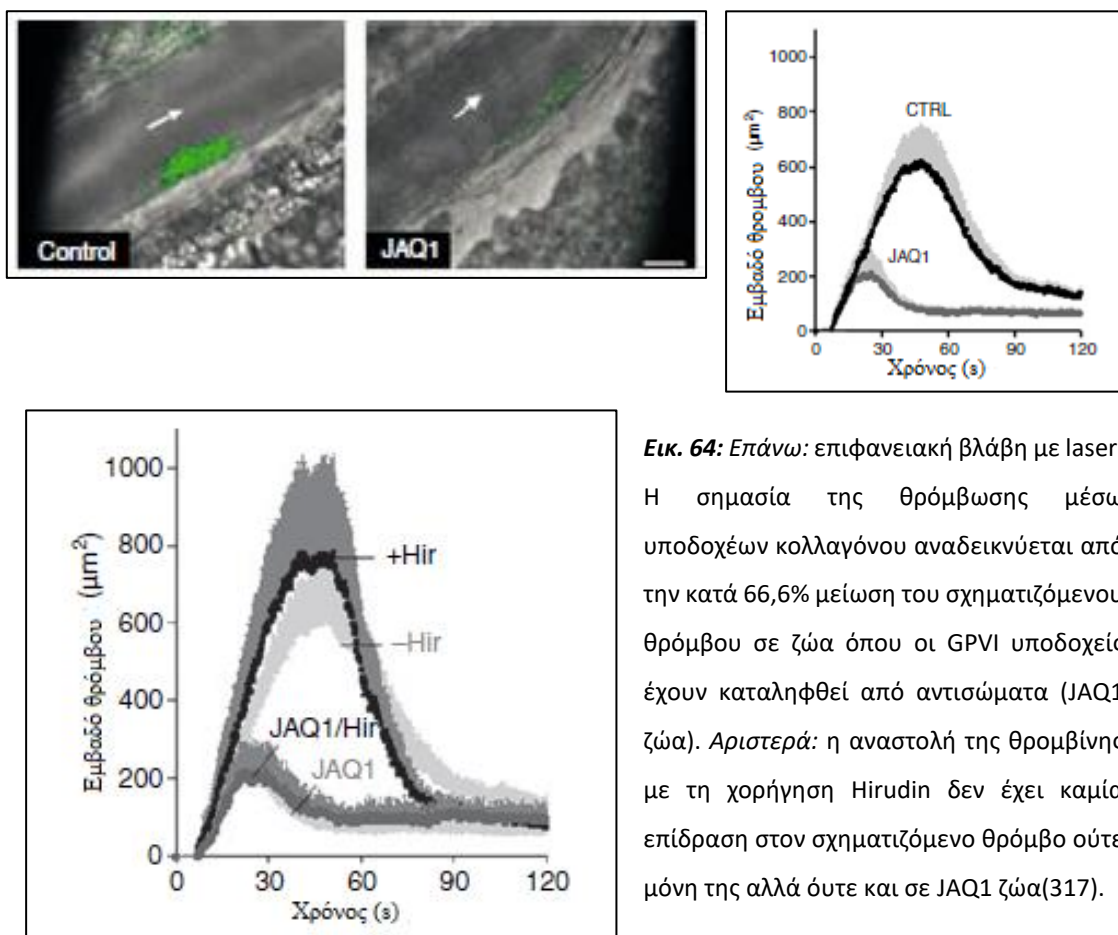


*Εικ. 63:* εν τω βάθει βλάβη αρτηρίας με laser(317).

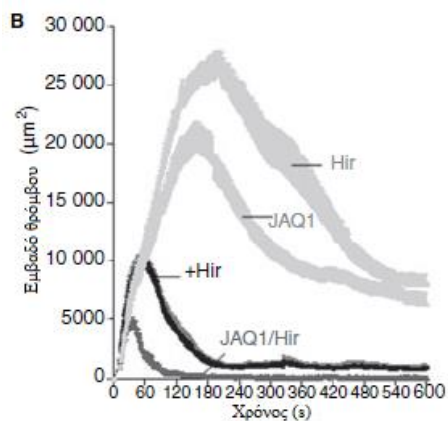
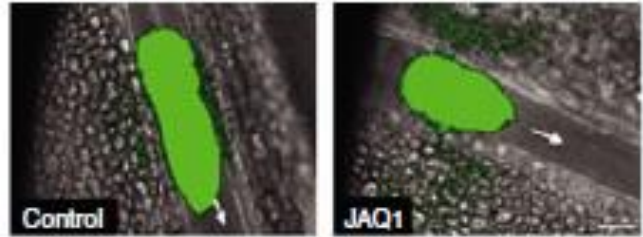
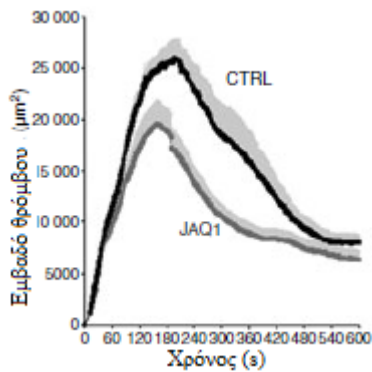
βο βρέθηκαν ίνες ινικής. Ιστικός παράγοντας εμφανίστηκε ταχέως στην περιοχή της βλάβης πριν τη συσσώρευση των αιμοπεταλίων (ανάμεσα στο τοίχωμα της αρτηρίας και το θρόμβο) ενώ εντοπιζόταν διάσπαρτα και μέσα στο θρόμβο.

Οι παραπάνω διαφορές σημαίνουν ότι τα ποικίλα μονοπάτια σχηματισμού του θρόμβου συνεισφέρουν διαφορετικά ανάλογα με το βάθος της βλάβης. Στην επιφανειακή βλάβη όπου όπως αναφέρθηκε εκτίθεται κολλαγόνο τύπου III και IV, η αναστολή των υποδοχέων GPVI αναμένεται να επηρεάσει σημαντικά τη θρόμβωση (εικ. 64). Αντιθέτως, ένας αναστολέας θρομβίνης δε θα είχε κανένα ανασταλτικό αποτέλεσμα αφού όπως είπαμε δε παρατηρείται εναπόθεση ινικής (εικ. 64). Αντιθέτως, αναστολή του GPVI στην εν τω βάθει βλάβη απλώς μειώνει το μέγεθος του σχηματιζόμενου θρόμβου (εικ. 65) γεγονός που σημαίνει ότι υπάρχει και κάποιο άλλο μονοπάτι με σημαντικό ρόλο στην παραπάνω διαδικασία. Αυτό είναι η θρομβίνη (αναφέρθηκε η έντονη παρουσία ινικής και ιστικού παράγοντα). Πράγματι, ένας συνδυασμός GPVI και χορήγησης hirudin (αναστολέας θρομβίνης) αναστέλλει

τη θρόμβωση ακόμα περισσότερο (εικ 65). Άξιο αναφοράς είναι το γεγονός ότι διαγονιδιακά ζώα με τέτοιες βλάβες τα οποία δεν εξέφραζαν τον παράγοντα von Willebrand δημιούργησαν ένα θρόμβο 25% του μεγέθους της ομάδας ελέγχου, γεγονός το οποίο σημαίνει ότι αν και τα αιμοπετάλια κατάφεραν να προσκολληθούν στο κολλαγόνο του τοιχώματος, δε μπόρεσαν να αναπτύξουν θρόμβο. Αυτό υποστηρίζει το σημαντικό ρόλο του παράγοντα von Willebrand στην ανάπτυξη του θρόμβου εκτός από τη σύλληψη των κυκλοφορούντων αιμοπεταλίων(317).



**Εικ. 64:** Επάνω: επιφανειακή βλάβη με laser. Η σημασία της θρόμβωσης μέσω υποδοχέων κολλαγόνου αναδεικνύεται από την κατά 66,6% μείωση του σχηματιζόμενου θρόμβου σε ζώα όπου οι GPVI υποδοχείς έχουν καταληφθεί από αντισώματα (JAQ1 ζώα). Αριστερά: η αναστολή της θρομβίνης με τη χορήγηση Hirudin δεν έχει καμία επίδραση στον σχηματιζόμενο θρόμβο ούτε μόνη της αλλά ούτε και σε JAQ1 ζώα(317).



**Εικ. 65:** Επάνω: εν τω βάθει βλάβη με laser. Μόλις 27% αναστολή της θρόμβωσης στα JAQ1 ζώα υποδεικνύει ότι ο ρόλος των GPVI στην αναστολή της θρόμβωσης είναι υπαρκτός, όχι όμως καθοριστικός. Αριστερά: η αναστολή της θρομβίνης με Hirudin μειώνει τη θρόμβωση κατά 58% και κατά 81% σε JAQ1 ζώα αποδεικνύοντας το ρόλο της θρόμβωσης μέσω του δρόμου της θρομβίνης στην εν τω βάθει βλάβη(317).

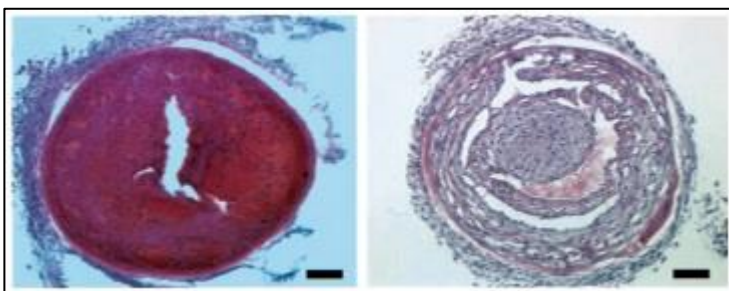
Συμπερασματικά, το μοντέλο θρόμβωσης με χρήση laser είναι ιδιαίτερα ευαίσθητο για τη μελέτη αναστολέων της θρομβίνης εάν χρησιμοποιηθούν εν τω βάθει αγγειακές βλάβες. Εάν όμως χρησιμοποιηθούν επιφανειακές αγγειακές βλάβες, το μοντέλο είναι ευαίσθητο για τη μελέτη αναστολέων των υποδοχέων κολλαγόνου. Επίσης μπορεί να χρησιμοποιηθεί και για τη μελέτη αναστολέων του παράγοντα von Willebrand και των GPIIb/IIIa.

## ΜΕ ΑΠΟΛΙΝΩΣΗ

Πρόκειται για ένα μοντέλο το οποίο διαφέρει σε δύο κύρια σημεία συγκριτικά με τα προηγούμενα: πρώτον, η αιμόσταση που προκαλείται δεν οδηγεί σε οξεία θρόμβωση. Αυτή δημιουργείται σε διάστημα μιας εβδομάδος. Δεύτερον, λόγω του παραπάνω χρονικού διαστήματος που μεσολαβεί έως τη μελέτη του αγγείου, εκτός

από θρόμβωση έχουμε και μια πληθώρα ιστικών αλλαγών στις απολινωμένες αρτηρίες. Την πρώτη ημέρα μετά την απολίνωση παρατηρούνται μικρά συσσωματώματα αιμοπεταλίων σε επαφή με το ενδοθήλιο, μερικά από τα οποία φέρουν επάνω τους προσκολλημένα λευκά αιμοσφαίρια. Όπως αναφέρθηκε, οι αλληλεπιδράσεις αυτές επάγονται από την αιμοπεταλιακή  $\rho$ -σελεκτίνη. Μετά από τρεις ημέρες τα παραπάνω συσσωματώματα αυξάνονται και επικαλύπτουν όλο το ενδοθήλιο. Γύρω από τα λευκά αιμοσφαίρια αρχίζει να παρατηρείται εναπόθεση ινικής με παρουσία ιστικού παράγοντα εντός αυτής. Με την πάροδο της πρώτης εβδομάδος (εικ 66), η ινική είναι παρούσα και μέσα στον αυλό της αρτηρίας όπως επίσης και θρόμβοι πλούσιοι σε αιμοπετάλια. Σε διαγονιδιακά ποντίκια τα οποία δεν εκφάζουν τον ενεργοποιητή του πλασιμονογόνου, η ινική εισβάλλει και ανάμεσα στις λείες μυικές ίνες. Δύο εβδομάδες μετά την απολίνωση (εικ 66) παρατηρείται εισβολή λείων μυικών ινών στον αυλό του αγγείου και σημαντική στένωση του αυλού λόγω αυξητικών παραγόντων που εκκρίνονται από τα προσκολλημένα αιμοπετάλια(318).

Πρόκειται για ένα μοντέλο το οποίο εξομοιώνει την επαναστένωση που δημιουργείται μετά από αγγειοπλαστικές με μεταλλικά ενδοαυλικά προσθέματα (Bare-metal Stents). Συνεπώς είναι ιδιαίτερα χρήσιμο στη μελέτη ουσιών που αναστέλλουν τις διαδικασίες της υπερπλασίας του ενδοθηλίου και των λείων μυικών ινών που οδηγούν σε αυτή.



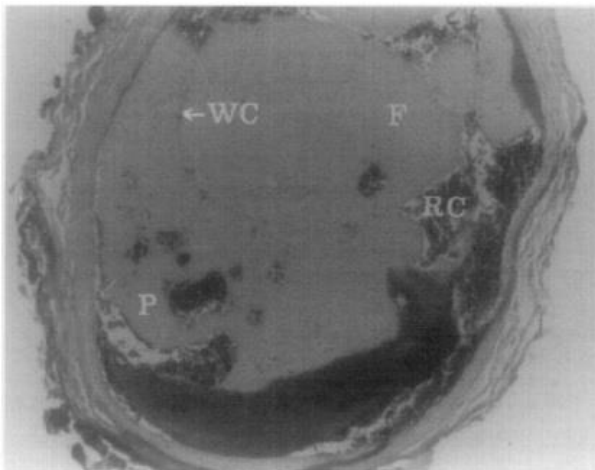
**Εικ. 66:** Η αρτηρία 1 εβδομάδα μετά την απολίνωση (αριστερά) με παρουσία θρόμβου πλούσιου σε αιμοπετάλια στον αυλό της και 2 εβδομάδες μετά με υπερπλασία και μετανάστευση λείων μυικών ινών στον αυλό της (δεξιά)(318).

### ΜΕ ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΗΛΕΚΤΡΙΚΟΥ ΡΕΥΜΑΤΟΣ

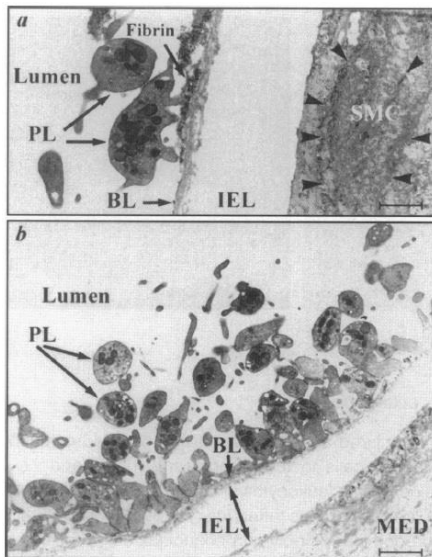
Από τη δεκαετία του 1970 ήταν γνωστό ότι η εφαρμογή ηλεκτρικού ρεύματος στο εξωτερικό τοίχωμα ενός αγγείου δύναται να θρομβώσει τον αυλό του(319). Εν συνεχεία διάφοροι ερευνητές ανέπτυξαν διάφορα μοντέλα, με το ηλεκτρικό ρεύμα

να εφαρμόζεται είτε μέσω ηλεκτροδίων στο εξωτερικό τοίχωμα του αγγείου (με την ελάχιστη μηχανική πίεση από μέρους του ερευνητή), είτε μέσω μιας αγωγίμης βελόνας η οποία εισέρχεται μέσα στο αγγείο παράλληλα με το ενδοθήλιο με αποτέλεσμα η εφαρμογή του ηλεκτρικού ρεύματος να γίνεται στον αυλό. Ο χρόνος που παρέρχεται μέχρι τη δημιουργία θρόμβωσης εξαρτάται από την ένταση του ηλεκτρικού ρεύματος καθώς και από το χρόνο εφαρμογής του. Οι περισσότερες μελέτες εφαρμόζουν ηλεκτρικό ρεύμα για συγκεκριμένο χρονικό διάστημα, υπάρχουν όμως και άλλες που το εφαρμόζουν μέχρι να παρατηρηθεί μείωση στη ροή του αίματος κατά 50%(320, 321). Η πτωτική πορεία της ροής του αίματος διαμέσου τις αρτηρίας παρατηρείται με ροόμετρο που τοποθετείται περιφερικά του σημείου της βάβης, ενώ μια μεγάλη φλέβα (συνήθως η μηριαία) παρασκευάζεται, καθετηριάζεται και χρησιμοποιείται για τη χορήγηση της υπό μελέτη ουσίας.

Η εφαρμογή του ηλεκτρικού ρεύματος προκαλεί καταστροφή των στοιβάδων των λείων μυικών ινών και απογύμνωση του αυλού από το ενδοθήλιο ξεκινώντας τις διαδικασίες που οδηγούν σε συσσώρευση των αιμοπεταλίων και θρόμβωση. Ο θρόμβος που προκαλείται είναι πλούσιος σε αιμοπετάλια και ινική (εικ 67).



**Εικ. 67:** ο θρόμβος στην καρωτίδα ενός αρουραίου μετά τη χορήγηση ρεύματος εντάσεως 2 mA για 5 λεπτά. WC: Λευκά αιμοσφαίρια, F: ινική, RC: Ερυθρά αιμοσφαίρια, P: αιμοπετάλια(319).



**Εικ. 68:** ρεύμα έντασης 1,6 mA και διάρκειας 2 δευτ. δεν είναι αρκετό για να προκαλέσει ολική απόφραξη του αγγείου. 2 ώρες μετά, προκαλεί όμως απογύμνωση του ενδοθηλίου, νέκρωση των λείων μυικών ινών (SMC) και προσκόλληση αιμοπεταλίων στη βλάβη (PL). Η βασική μεμβράνη (BL) και η έσω ελαστική μεμβράνη (IEL) διατηρούνται άθικτες. Παρατηρείται μικρή εναπόθεση ινικής (Fibrin)(322).

Ρεύμα μικρής έντασης και διάρκειας (εικ. 68) δε θα τραυματίσει αρκετά το αγγείο ώστε να δημιουργήσει οξεία αποφρακτική θρόμβωση. Θα δημιουργήσει ένα μικρό, μη αποφρακτικό και παροδικό θρόμβο. Οι αυξητικοί παράγοντες όμως που θα εκκριθούν από τα λίγα αιμοπετάλια τα οποία προσκολλώνται στο τραυματισμένο τοίχωμα, θα προκαλέσουν υπερπλασία των λείων μυικών ινών του αγγείου περίπου σε διάστημα μιας εβδομάδας μετά τον τραυματισμό. Σε δύο εβδομάδες, οι λείες μυικές ίνες μεταναστεύουν και καταλαμβάνουν το μεγαλύτερο μέρος του αυλού(322).

Οι μελέτες που χρησιμοποιούν το συγκεκριμένο μοντέλο αρτηριακής θρόμβωσης και στόχο έχουν τη μελέτη αντιαιμοπεταλιακών και αντιπηκτικών παραγόντων, στοχεύουν στην ανάπτυξη οξείας θρόμβωσης. Έτσι, απαιτείται η εφαρμογή ρεύματος κατάλληλης έντασης και διάρκειας έτσι ώστε να διασπαστεί η εσωτερική ελαστική μεμβράνη και να έρθουν σε επαφή το κολλαγόνο, ο παράγοντας vW και ο ιστικός παράγοντας του υπενδοθηλίου με το αίμα της κυκλοφορίας. Αντιθέτως, μελέτες οι οποίες επιθυμούν να μελετήσουν τη δημιουργία νεοϊστού (όπως αυτή που παρατηρείται για παράδειγμα μετά την αγγειοπλαστική με μεταλλικά ενδοαυλικά προσθέματα – bare-metal stents), χρησιμοποιούν ρεύμα μικρής έντασης και διάρκειας έτσι ώστε να δημιουργούνται παροδικές, μη αποφρακτικές θρομβώσεις οι



οποίες όμως θα καταλήξουν μετά από εβδομάδες στην επιθυμητή αντίδραση των λείων μυικών ινών του αγγειακού τοιχώματος.

	<b>Χαρακτήρας Μελέτης</b>	<b>Θρομβωθέν αγγείο</b>	<b>Ουσία/Μόριο υπό μελέτη</b>
<b>Τρωκτικά</b>	<p>1. Αντιθρομβωτική: (323-331)</p> <p>2. Θρομβογόνος: (332-340)</p> <p>3. Θρομβολυτική: (324, 341-344)</p> <p>4. Μελέτη υπερπλασίας ενδοθηλίου: (322)</p>	<p>1. Καρωτίδα: (323-327, 329, 330, 332-334, 336, 340-345)</p> <p>2. Μηριαία: (322, 339)</p> <p>3. Μεσεντέριες: (335, 337, 338)</p> <p>4. Κοιλιακή αορτή: (328)</p>	<p>1. Παράγωγα σταφυλοκινάσης: (344)</p> <p>2. Αγγειοτενσίνη-1(1-9): (333)</p> <p>3. Αγγειοτενσίνη-II: (332)</p> <p>4. Πολυσακχαρίδια: - SanOrg123781A: (325)</p> <p>5. Αναστολείς P2Y12: - Πρασουργέλη (327) - Κλοπιδογρέλη (325, 327) - Τικλοπιδίνη (324, 327)</p> <p>6. N-Μεθυλ-Νικοτιναμίδιο: (326)</p> <p>7. Ανασυνδυσασμένα μόρια: - SAK-RGD-K2-Hir (343)</p> <p>8. Αναστολείς G πρωτεϊνών: - Gq11: YM-254890: (342)</p> <p>9. Αναστολείς Χα: (324, 345)</p> <p>10. Αναστολείς IIbIIIa: (325, 334)</p> <p>11. Ασπιρίνη: (324, 329)</p> <p>12. Ηπαρίνη: (324, 334)</p> <p>13. t-PA: (341)</p> <p>14. Δινιτρικός ισοσορβίτης: (330)</p> <p>15. Οιστραδιόλη: (328)</p> <p>16. Παράγωγο χαμηλού μοριακού βάρους ηπαρίνης CV 216: (323)</p>
<b>Σκύλοι</b>	<p>1. Αντιθρομβωτική: (310, 320, 346-354)</p>	<p>1. Καρωτίδα: (346, 351, 352)</p>	<p>1. Αναστολείς IIbIIIa: - Roxifiban: (351) - MK-0852 (310) - DMP-728 (352, 356)</p>

	<p>2. Θρομβολυτική: (355-359)</p> <p>3. Θρομβογόνο: (360, 361)</p>	<p>2. LcX: (310, 320, 348, 350, 358)</p> <p>3. LAD (349, 355, 357, 359, 362)</p> <p>4. Μηριαία: (347, 356, 360)</p>	<p>2. Αναστολείς θρομβίνης: Melagatran: (349)</p> <p>3. t-PA: (357)</p> <p>4. Ηπαρίνη: (357)</p> <p>5. Αναστολέας FXIIIa: (358)</p> <p>6. Ασπιρίνη: (362)</p> <p>7. Πολυαμίνες(320)</p> <p>8.Συνθετικό πεπτιδιο ηπαρίνης χαμηλού μοριακού βάρους PK 10169: (350)</p> <p>9.Αναστολείς φωσφοδιεστεράσης: -NSP-513 (347) -Citostazol (347)</p> <p>10.Μονοξείδιο του Αζώτου: (359)</p> <p>11.Ανασυνδυασμένο Lys-πλασμινογόνο: (355)</p> <p>12.Καλρετικουλίνη: (348)</p> <p>13. Πολυαμίνες: (353)</p> <p>14. Αναστολέας συνθετάσης TXA2 FCE27262: (354)</p>
<b>Κουνέλια</b>	<p>1.Αντιθρομβωτική: (321, 363-370)</p>	<p>1. Καρωτίδα: (321, 363-370)</p>	<p>1. Αναστολείς IIbIIIa: Συνθετικά πεπτιδία: - (S,S) PSRCDRCR-NH2: (366) - Ymesradr:(365)</p> <p>2. Αναστολείς FVIIa: (369)</p> <p>3. Αναστολείς Χα: (367, 368, 370)</p> <p>3. Αναστολέας υποδοχέων θρομβίνης: (363, 364)</p> <p>4.Εναλαπρίλη:(363)</p> <p>5. Αννεξίνη V: (321)</p>
<b>Χοίροι</b> (συνέχεια)	<p>1. Αντιθρομβωτική: (371, 372)</p> <p>2. Θρομβογόνο: (361, 373)</p>	<p>1. Μεσεντέριος: (371)</p> <p>2. Μηριαία: (373)</p>	<p>1.Προσταγλαδίνη E1: (371)</p> <p>2. Αναστολέας υποδοχέας TXA2 BM 13.177: (372)</p>

**Πίνακας 8α:** ένα αντιπροσωπευτικό δείγμα της βιβλιογραφίας σχετικά με την αρτηριακή θρόμβωση με χρήση ηλεκτρικού ρεύματος. Η ταξινόμηση γίνεται αρχικά με βάση τα πειραματόζωα που χρησιμοποιήθηκαν, εν συνεχεία με βάση το χαρακτήρα της μελέτης, τα αγγεία που θρομβώθηκαν και τέλος τις ουσίες που μελετήθηκαν.

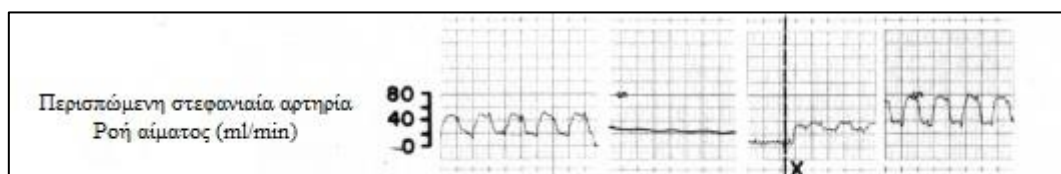
0,2 mA/1 λεπτό: (337, 338)	1,6 mA/2 λεπτά: (322) 2 mA/2 λεπτά: (363)	4 mA/3 λεπτά: (365-370) 5 mA/1 λεπτό: (324)
1 mA/1,5 λεπτό: (325)	2 mA/5 λεπτά: (343, 344)	10 mA/15 λεπτά: (360)
1 mA/5 λεπτά: (326)	3 mA/5 λεπτά: (327)	
1 mA/10 λεπτά: (333)	3 mA/1 λεπτό: (341, 342, 345)	
1 mA/12 λεπτά: (336)	4 mA/1.25 λεπτά: (340)	
1 mA/15 λεπτά: (332)		

**Πίνακας 8β:** παραλλαγές έντασης/χρόνου εφαρμογής ηλεκτρικού ρεύματος για αρτηριακή θρόμβωση

#### ΜΕ ΠΕΡΙΑΓΓΕΙΑΚΟ ΔΑΚΤΥΛΙΟ (ΜΕΘΟΔΟΣ FOLTS)

Ο Folts με τους συνεργάτες του ήταν οι πρώτοι που περιέγραψαν αυτό το μοντέλο σε στεφανιαίες αρτηρίες σκύλων, το 1971(374). Η τοποθέτηση ενός δακτυλίου γύρω από το αγγείο, κατασκευασμένου έτσι ώστε να προκαλέσει στένωση του αυλού περίπου κατά 70%, προκαλεί παροδικές αποφράξεις. Αυτές λύνονται αυτόματα επαναφέροντας τη ροή του αίματος στο αρχικό επίπεδό της. Ο Folts είχε αποδείξει ότι η τοποθέτηση δακτυλίων που προκαλούν στένωση περίπου 72% και άνω περιορίζουν ή εξαφανίζουν το φαινόμενο της αντιδραστική υπεραιμίας του μυοκαρδίου, δηλαδή την παροδική αύξηση της αιματικής ροής σε επίπεδα πάνω από τα αρχικά, λόγω της αρτηριακή απόφραξης και της μικρής περιόδου ισχαιμίας. Ένα ροόμετρο περιφερικά της στένωσης παρακολουθεί τη μείωση στη ροή του αγγείου, έως ότου αυτή μηδενιστεί. Αμέσως μετά την αποκατάσταση της αιματικής ροής στο αγγείο, το ίδιο μοτίβο ακολουθείται έως ότου η αρτηρία αποφραχθεί και πάλι, μόνο παροδικά βέβαια για να ακολουθήσει ένας νέος κύκλος της ίδια διαδικασίας. Το παραπάνω φαινόμενο ονομάστηκε «κυκλικές μειώσεις αιματικής ροής» (Cyclic Flow Reductions – CFRs).

Πως όμως αιτιολογείται η απόφραξη του αγγείου εφόσον δεν υπάρχει τραυματισμός του ενδοθηλίου; Ο Folts χρησιμοποίησε ασπιρίνη και ηπαρίνη σε μια προσπάθεια να αναστείλει τις CFRs και να καταλήξει έτσι στο ποιος παράγοντας τις προκαλεί: τα αιμοπετάλια ή το δίκτυο της ινικής; Διαπίστωσε ότι η ηπαρίνη αδυνατεί να αναστείλει τα CFRs, σε αντίθεση με την ασπιρίνη. Έτσι, κατέληξε στο συμπέρασμα ότι οι υψηλές διατμητικές δυνάμεις που αναπτύσσονται στο σημείο της στένωσης και οι συγκρούσεις που δημιουργούνται ανάμεσα στα αιμοπετάλια οδηγούν στην αποκοκκίωση και τη συσσώρευσή τους. Το γεγονός αυτό αποδείχθηκε περαιτέρω από το γεγονός ότι σκύλοι που παρουσίαζαν CFRs είχαν πολύ μεγαλύτερη ανταπόκριση των αιμοπεταλίων τους σε *ex vivo* συσσώρευση μέσω προσθήκης ADP, από αυτούς που δεν παρουσίαζαν CFRs(374). Τον καθοριστικό ρόλο των αιμοπεταλίων στα CFRs απέδειξαν και μικροσκοπικές μελέτες οι οποίες αποκάλυψαν συσσωρευμένα αιμοπετάλια σε αρτηρίες που μονιμοποιήθηκαν και μελετήθηκαν λίγο πριν την ολική απόφραξή τους. Αντιθέτως, δε βρέθηκαν συσσωρευμένα αιμοπετάλια στις αρτηρίες σκύλων οι οποίοι δεν έλαβαν ασπιρίνη. Η παροδικότητα της απόφραξης του αγγείου μπορεί να εξηγηθεί από το γεγονός ότι η σταδιακή αύξηση της αρτηριακή πίεσης στο σημείο της απόφραξης διαλύει το θρόμβο και προκαλεί τον εμβολισμό του περιφερικότερα. Κατά δεύτερον, παρατηρήθηκε ότι τα αιμοπετάλια του σκύλου αποσυσσωρεύονται *in vitro* μετά από 6 έως 10 λεπτά.



**Εικ. 69:** ένας δακτύλιος έχει τοποθετηθεί γύρω από την περισπώμενη στεφανιαία αρτηρία του σκύλου και στενεύει τον αυλό της κατά 70%. Ένα ροόμετρο περιφερικά της στένωσης παρακολουθεί και καταγράφει τη ροή του αίματος δια μέσω του αγγείου. Σταδιακά, η ημιτονοειδής κυματομορφή της χάνεται και η ροή μηδενίζεται. Στο σημείο X, η ροή του αίματος αποκαθίσταται αυτόματα. Τελικά ανέρχεται σε επίπεδα υψηλότερα των αρχικών (αντιδραστική υπεραϊμία)(374).

Το μοντέλο του Folts είναι ιδιαίτερα διαδεδομένο για τη μελέτη αντιαμοπεταλιακών παραγόντων. Εξελίχθηκε και εμπλουτίστηκε με ενδοθηλιακό τραυματισμό πριν την εφαρμογή του δακτυλίου. Ο τραυματισμός αυτός συνήθως προκαλείται με την ήπια πίεση της αρτηρίας μέσω μιας λαβίδας. Ο τραυματισμός του ενδοθηλίου κι η εμπλοκή της ινικής που αυτός προκαλεί επιτρέπει τη χρήση του μοντέλου και για τη μελέτη αντιπηκτικών παραγόντων, όπως για παράδειγμα την ηπαρίνη χαμηλού μοριακού βάρους(375). Η αποτελεσματικότητα της υπό μελέτη ουσίας προσδιορίζεται ανάλογα με τον αριθμό των CFRs που παρατηρούνται σε ένα δεδομένο χρονικό διάστημα, ο οποίος αναμένεται να είναι μικρότερος από αυτόν της ομάδας ελέγχου.

# ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

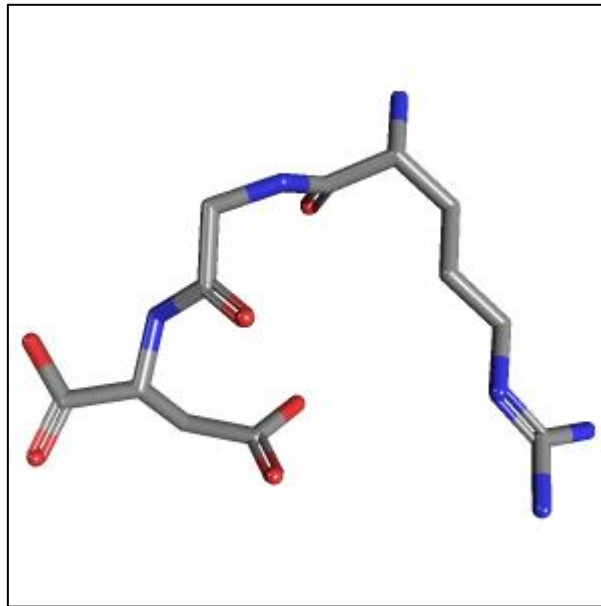
## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3<sup>ο</sup>:

### ΤΑ ΣΥΝΘΕΤΙΚΑ ΠΕΠΤΙΔΙΑ

(S,S) PSRCDCR-NH<sub>2</sub> ΚΑΙ YMESRADR

### Η RGD ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ

Όπως αναφέρθηκε, οι υποδοχείς GPIIb/IIIa αναγνωρίζουν μια αλληλουχία τριών αμινοξέων στο μόριο των προσδετών τους, μέσω της οποίας συνδέονται με αυτά. Η αλληλουχία αυτή είναι η Arg-Gly-Asp (RGD – εικ. 70). Κύριο χαρακτηριστικό της αποτελεί η β-στροφή του μορίου της η οποία προσανατολίζει τις αλυσίδες της αργινίνης και του ασπαρτικού σε αντίθετες πλευρές του σκελετού της.



**Εικ. 70:** Η τρισδιάστατη δομή της RGD αλληλουχίας. Με μπλε χρώμα τα μόρια αζώτου και με κόκκινο χρώμα τα μόρια οξυγόνου.

Η αλληλουχία αυτή αναγνωρίστηκε αρχικά στο μόριο της φιβρονεκτίνης ως περιοχή σύνδεσης με τον υποδοχέα της το 1984 από τους Pierschbacher και Ruoslahti(376). Εν συνεχεία εντοπίστηκε σε όλους τους προσδέτες των GPIIb/IIIa υποδοχέων, όπως το ινωδογόνο και ο παράγοντας von Willebrand. Η RGD αλληλουχία είναι μια ευκίνητη κατασκευή, χρησιμεύοντας σε πολλούς διαφορετικούς προσδέτες ως κλειδί της σύνδεσης τους με τον υποδοχέα. Εκτός από τον GPIIb/IIIa την αναγνωρίζουν τουλάχιστον οι μισές από τις έως σήμερα γνωστές ιντεγκρίνες. Η αλληλουχία RGD είναι μικρό μόριο. Το γεγονός αυτό καθιστά εύκολη την κατασκευή της. Όταν απλώνεται επάνω σε μια επιφάνεια, προάγει την προσκόλληση των κυττάρων επάνω σε αυτή. Αντιθέτως, όταν χρησιμοποιείται μέσα

σε διάλυμα δρα ως αναστολέας κυτταρικής προσκόλλησης αφού καταλαμβάνει και αχρηστεύει τους υπεύθυνους υποδοχείς.

Ωστόσο, η δράση και η εξειδίκευση του πεπτιδίου δεν εξαρτώνται μόνο από την ίδια την RGD αλληλουχία, αλλά και από τα αμινοξέα που την πλαισιώνουν προσδίδοντας στη στερεοδιάταξή της διαφορετικά χαρακτηριστικά. Για παράδειγμα, η φιμπρονεκτίνη συνδέεται με την ιντεγκρίνη  $\alpha_5\beta_1$ . Όταν το μόριο της περικόπτεται και μικραίνει τεχνητά διατηρώντας την RGD αλληλουχία γίνεται πιο εύκαμπτο, η συγγένειά του για την  $\alpha_5\beta_1$  μειώνεται, ενώ αυξάνεται η συγγένειά του για την ιντεγκρίνη  $\alpha_v\beta_3(377)$ . Επίσης, δεν έχουν όλα τα πεπτίδια που φέρουν την RGD αλληλουχία δράση αναστολής κυτταρικής προσκόλλησης. Αυτό συμβαίνει γιατί η στερεοδιάταξη του μορίου μπορεί να είναι τέτοια που να μη φέρει την RGD αλληλουχία στην επιφάνεια. Ακόμα όμως και αν τη φέρει, μπορεί να είναι σε στερεοδιάταξη μη συμβατή με ιντεγκρινική σύνδεση. Ένα παράδειγμα αποτελεί αυτό που έδειξαν οι Pierschbacher και Ruoslahti το 1987, ότι δηλαδή ένα πεπτίδιο στερείται της ικανότητάς του να συνδεθεί με τον υποδοχέα του, εάν το αμινοξύ που ακολουθεί την RGD αλληλουχία είναι η προλίνη(378).

Η αλληλουχία RGD χρησιμοποιείται για τη σύνθεση πεπτιδίων με αντιαμοπεταλιακή δράση. Το γεγονός όμως ότι περισσότερες της μιας πρωτεΐνες μπορούν να συνδεθούν στον ίδιο ιντεγκρινικό υποδοχέα δημιουργεί πρόβλημα στη μελέτη της δράσης των πεπτιδίων. Δημιουργήθηκε έτσι γρήγορα η ανάγκη για σύνθεση πεπτιδίων με υψηλή συγγένεια και εξειδίκευση για ένα και μόνο υποδοχέα. Είναι πλέον ευρέως αποδεκτό ότι η ειδικότητα ενός RGD πεπτιδίου για μια συγκεκριμένη ιντεγκρίνη εξαρτάται από τη στερεοδιάταξη της RGD αλληλουχίας και τα αμινοξέα που την πλαισιώνουν. Γι' αυτό και δύο βασικές αρχές διέπουν την κατασκευή τέτοιων εξειδικευμένων πεπτιδίων: i) η στερεοδιάταξη τους πρέπει να συγκρατείται κυκλοποιώντας το μόριο (π.χ με ένα δισουλφιδικό δεσμό) και ii) τα αμινοξέα που πλαισιώνουν την RGD αλληλουχία πρέπει να είναι τέτοια έτσι ώστε να προσδίδουν στο μόριο μεγάλη συγγένεια για τον υποδοχέα(379).

Δεν είναι όμως μόνο η RGD αλληλουχία που επάγει την προσκόλληση των πρωτεϊνών στους υποδοχείς τους. Πολλές πρωτεΐνες διαθέτουν διαφορετικές από την RGD αλληλουχίες, με πρωταγωνιστικό ρόλο στην πρόσδεσή με τους



ιντεγκρινικούς υποδοχείς. Πεπτίδια τα οποία φέρουν την KGD αλληλουχία αποτελούν προσδέτες με υψηλό βαθμό συγγένειας και εξειδίκευσης για τους υποδοχείς GPIIb/IIIa. Τέτοιες πρωτεΐνες βρίσκονται στο δηλητήριο φιδιών, είναι μη γραμμικά μόρια πλούσια σε κυστεΐνη και ανταγωνίζονται το ινωδογόνο για την πρόσδεση στον υποδοχέα GPIIb/IIIa. Εκτός από την KGD έχουν ανακαλυφθεί πολλές άλλες αλληλουχίες, κάποιες από τις οποίες με μικρές διαφορές από την RGD, που αναγνωρίζονται από ιντεγκρίνες(379).

### **ΣΥΝΘΕΤΙΚΑ ΠΕΠΤΙΔΙΑ ΠΟΥ ΑΝΑΣΤΕΛΟΥΝ ΤΗ ΣΥΝΔΕΣΗ ΤΟΥ ΙΝΩΔΟΓΟΝΟΥ ΜΕ ΤΟΝ ΥΠΟΔΟΧΕΑ GPIIb/IIIa**

Όπως αναφέρθηκε, ο GPIIb/IIIa προσδέεται με το ινωδογόνο αναγνωρίζοντας κυρίως το 12πεπτίδιο HHLGGAKQAGDV στη γ αλυσίδα του, αλλά και δύο RGD αλληλουχίες στις θέσεις 93-95 και 572-574 της Αα αλυσίδας. Από την ανακάλυψη της RGD αλληλουχίας έως σήμερα έχει γίνει μια πληθώρα ερευνών στον τομέα των συνθετικών πεπτιδίων που ενσωματώνουν το RGD μοτίβο. Στόχος είναι η αντιαιμοπεταλιακή δράση μέσω αναστολής της σύνδεσης του ινωδογόνου στον GPIIb/IIIa υποδοχέα. Η Αμπσιξιμάμπη (Abciximab) αποτελεί την πρώτη προσπάθεια που έγινε προς την κατεύθυνση αυτή και αποτελεί ένα χιμαϊρικό μονοκλωνικό αντίσωμα το οποίο αναγνωρίζει και προσδέεται στον υποδοχέα GPIIb/IIIa(380). Ακολούθησε μια πληθώρα προσπαθειών με τη σύνθεση μη πεπτιδικών αναλόγων (με κύριο εκπρόσωπο το tirofiban), και πεπτιδικών η πεπτιδομιμητικών RGD αναλόγων (με κύριο εκπρόσωπο των τελευταίων την επιφιμπατίδη, ένα κυκλικό RGD επταπεπτίδιο).

Τα RGD ανάλογα σε αντίθεση με το ινωδογόνο, δεν απαιτούν πρώτα την ενεργοποίηση του αιμοπεταλίου από αγωνιστές προκειμένου να συνδεθούν με τον GPIIb/IIIa υποδοχέα. Προσδέονται αυτομάτως σε αυτόν. Σημαντικό μειονέκτημα τους είναι ότι κατά την αυτόματη σύνδεσή τους στον υποδοχέα GPIIb/IIIa προκαλούν αλλαγές στη στερεοδιάταξή του οι οποίες αυξάνουν τη συγγένεια για το ινωδογόνο ενεργοποιώντας το αιμοπετάλιο με outside-inside μεταγωγή σήματος. Οδηγούν έτσι σε δευτερογενή συσσώρευση, παρά την αρχική ανασταλτική δράση(381).

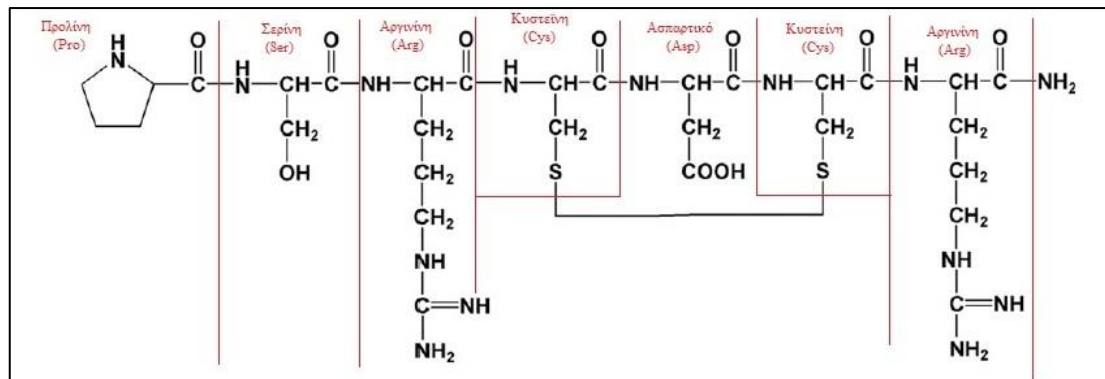
Λόγω πληθώρας RGD αναστολέων του υποδοχέα GPIIb/IIIa στη βιβλιογραφία καθώς και του μειονεκτήματος που αναφέρθηκε, είναι σκόπιμη η μελέτη της αλληλεπίδρασης συνθετικών πεπτιδίων με τον GPIIb/IIIa υποδοχέα ανεξάρτητα της αλληλουχίας RGD και των RGD τύπου αλληλεπιδράσεων. Για το λόγο αυτό το τμήμα Χημείας του πανεπιστημίου Ιωαννίνων συνέθεσε δύο πεπτίδια τα οποία: i) δε φέρουν στην αλληλουχία τους το μοτίβο RGD και ii) δεν ενεργοποιούν το αιμοπετάλιο με outside-inside μεταγωγή σήματος. Τα πεπτίδια αυτά είναι το (S,S) PSRCDCR-NH<sub>2</sub> και το YMESRADR.

#### ΤΟ ΣΥΝΘΕΤΙΚΟ ΠΕΠΤΙΔΙΟ (S,S) PSRCDCR-NH<sub>2</sub>

Κατά τη μελέτη συνθετικών πεπτιδίων με αντιαιμοπεταλιακή δράση που δεν έφεραν την αλληλουχία RGD, το τμήμα Χημείας του πανεπιστημίου Ιωαννίνων κατέληξε στο συμπέρασμα ότι πεπτίδια τα οποία έφεραν τη γενική δομή (S,S) CDC, είχαν in vitro αντιαιμοπεταλιακή δράση πολλές φορές ισχυρότερη από αυτή των πεπτιδικών RGD αναλόγων. Ο δισουλφιδικός δεσμός δημιουργείται μεταξύ δύο μορίων κυστεΐνης. Ανάμεσα στα πεπτίδια αυτά φάνηκε ότι τα ισχυρότερα είναι όσα έφεραν ένα θετικά φορτισμένο αμινοξύ (π.χ Αργινίνη ή Λυσίνη) στο καρβοξυτελικό άκρο της CDC αλληλουχίας. Το πεπτίδιο (S,S) PSRCDCR-NH<sub>2</sub> ξεχώρισε ως το πιο δραστικό. Σε in vitro μελέτες αναστολής αιμοπεταλιακής συσσώρευσης αποδείχθηκε έως και 250 φορές δραστικότερο από RGD ανάλογα και έως και 50 φορές δραστικότερο από άλλα συνθετικά πεπτίδια της οικογένειας του. Αυτό φάνηκε από τις IC<sub>50</sub> συγκεντρώσεις στις μελέτες αναστολής συσσώρευσης (πίνακας 9)(382). Η μεγάλη ανασταλτική δράση του πεπτιδίου οφείλεται στο δισουλφιδικό δεσμό και τη στερεοχημεία της κυστεΐνης, τα οποία προσανατολίζουν τις πλευρικές αλυσίδες του ασπαρτικού και της αργινίνης προς την ίδια πλευρά του πεπτιδικού σκελετού (εικ. 71). Επίσης οφείλεται στο θετικά φορτισμένο κατάλοιπο της αργινίνης μετά την αλληλουχία CDC. Με λίγα λόγια, το πεπτίδιο (S,S) PSRCDCR-NH<sub>2</sub> δε διαθέτει στο μόριό του τη β-στροφή που παρατηρείται στα RGD πεπτίδια και προσανατολίζει τις πλευρικές αλυσίδες προς αντίθετες πλευρές του πεπτιδικού σκελετού(382).

Πεπτιδικό Ανάλογο	Αριθμός Πεπτιδίου	Αναστολή Αιμοπεταλιακής Συσώρευσης Τιμές $Ic_{50}$ ( $\mu M$ )
Group A: RGD peptides		
RGDS	1	210 $\pm$ 30
Ac-RGD-NH <sub>2</sub>	2	500 $\pm$ 40
Ac-RGdD-NH <sub>2</sub>	3	Inactive
Group B: (S,S) -CDC- peptides		
(S,S) Ac-RCDC-NH <sub>2</sub>	4	105 $\pm$ 30
(S,S) Ac-RCDCR-NH <sub>2</sub>	5	4.3 $\pm$ 0.5
(S,S) Ac-KCDCR-NH <sub>2</sub>	6	39 $\pm$ 5
Ac-KC(Acm)DC (Acm)R-NH <sub>2</sub>	7	104 $\pm$ 24
(S,S) Ac-RCDPenR-NH <sub>2</sub>	8	8.2 $\pm$ 2.1
(S,S) PRCDRCR-NH <sub>2</sub>	9	6.2 $\pm$ 1.0
(S,S) PRCDCK-NH <sub>2</sub>	10	10.6 $\pm$ 2.0
<b>(S,S) PSRCDCR-NH<sub>2</sub></b>	<b>11</b>	<b>2.0 <math>\pm</math> 0.5</b>
(S,S) PSKCDRCR-NH <sub>2</sub>	12	1.7 $\pm$ 0.3
(S,S) PSKdCRCR-NH <sub>2</sub>	13	> 500
Group C: (S,S) -CRC- peptides		
(S,S) PCRCDNR-NH <sub>2</sub>	14	150 $\pm$ 50
(S,S) Ac-DCRCR-NH <sub>2</sub>	15	570 $\pm$ 180
(S,S) Ac-RWDCRC-NH <sub>2</sub>	16	100 $\pm$ 20
(S,S) Ac-RSDCRC-NH <sub>2</sub>	17	74 $\pm$ 15
(S,S) Ac-RVDCRC-NH <sub>2</sub>	18	430 $\pm$ 90

**Πίνακας 9:** Το πεπτιδίο (S,S) PSRCDCR-NH<sub>2</sub> είναι το δραστικότερο όχι μόνο ανάμεσα στα πεπτιδία της ίδιας κατηγορίας (Group B) αλλά και συγκριτικά με τα RGD ανάλογα (Group A)(382).



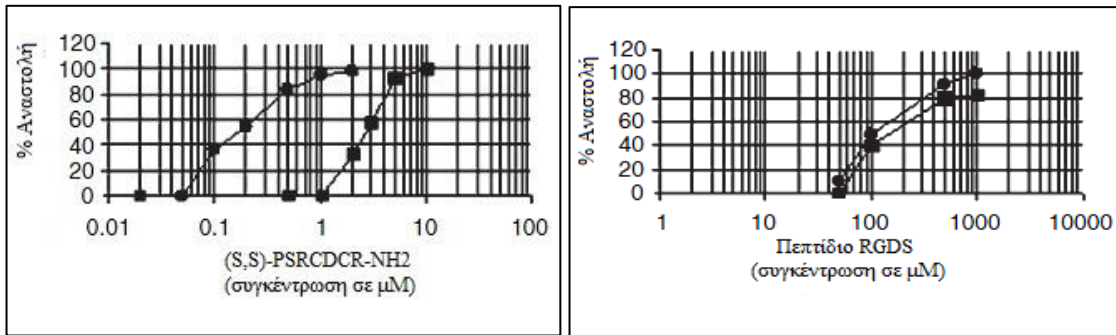
**Εικ. 71:** η δομή του (S,S) PSRCDCR-NH<sub>2</sub>. Χάρη στο δισουλφιδικό δεσμό, το Ασπαρτικό και η Αργινίνη είναι προσανατολισμένα προς την ίδια πλευρά του πεπτιδικού σκελετού<sup>(366)</sup>.

Ήταν απαραίτητο να αποδειχθεί ότι η δράση του πεπτιδίου ήταν ανεξάρτητη από RGD αλληλεπιδράσεις. Το (S,S) PSRCDCR-NH<sub>2</sub> περιέχει την αλληλουχία RCD, μια αλληλουχία που μοιάζει με την RGD. Μετρώντας την έκφραση της  $\rho$ -σελεκτίνης στην επιφάνεια των αιμοπεταλίων ως δείκτη αιμοπεταλιακής ενεργοποίησης με αγωνιστή το ADP, προέκυψαν ενδιαφέροντα συμπεράσματα. Τα RGD ανάλογα αναστέλλουν τη συσώρευση των αιμοπεταλίων μέσω πρόσδεσης στον GPIIb/IIIa υποδοχέα. Έτσι αχρηστεύεται η δυνατότητα σύνδεσής του με το ινωδογόνο. Όπως αναφέρθηκε όμως με τον τρόπο αυτό δευτερογενώς ενεργοποιούν τον υποδοχέα μέσω αλλαγών της στερεοδιάταξής του, με αποτέλεσμα την outside-inside μεταγωγή σήματος και την

ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων, αυξάνοντας την έκφραση της  $\rho$ -σελεκτίνης στην επιφάνειά τους. Το πεπτίδιο (S,S) PSRCDCR-NH<sub>2</sub> αναστέλλει την αιμοπεταλιακή ενεργοποίηση χωρίς να προκαλεί αύξηση της έκφρασης της  $\rho$ -σελεκτίνης, γεγονός που συνηγορεί υπέρ του ότι ίσως το πεπτίδιο να συνδέεται με τον GPIIb/IIIa υποδοχέα χωρίς να τον ενεργοποιεί δευτερογενώς, διατηρώντας τον σε μια ανενεργή κατάσταση. Έτσι, καθίσταται αδύνατη η δημιουργία γέφυρας του ινωδογόνου με τα αιμοπετάλια.

Σε αντίθεση με τα RGD ανάλογα, το (S,S) PSRCDCR-NH<sub>2</sub> απέτυχε σε χαμηλές συγκεντρώσεις να αναστείλει τη σύνδεση του αντισώματος PAC-1 (πρόκειται για ένα αντίσωμα που αναγνωρίζει την ενεργοποιημένη μορφή του υποδοχέα GPIIb/IIIa και προσδένεται σε αυτόν) με τον υποδοχέα, αν και στις ίδιες συγκεντρώσεις είχε ήδη αναστείλει τη σύνδεση του ινωδογόνου με αυτόν. Αυτό συνέβη ακόμα και σε συγκεντρώσεις που προκαλούν πλήρη αναστολή της σύνδεσης του ινωδογόνου με τον GPIIb/IIIa. Αυτό πιθανώς σημαίνει ότι ο βαθμός συγγένειας του πεπτιδίου με τον υποδοχέα είναι πολύ μικρός, καθώς το (S,S) PSRCDCR-NH<sub>2</sub> καταφέρνει να αναστείλει τελικά τη σύνδεση του PAC-1 σε συγκεντρώσεις 10πλάσιες από αυτές που επιτυγχάνουν την πλήρη αναστολή του ινωδογόνου (εικ 72)(382). Φαίνεται δηλαδή ότι σε χαμηλές τουλάχιστον συγκεντρώσεις, το πεπτίδιο (S,S) PSRCDCR-NH<sub>2</sub> αναστέλλει τον GPIIb/IIIa ανεξαρτήτως RGD τύπου αλληλεπιδράσεων. Περαιτέρω έρευνα απαιτείται προκειμένου να διαλευκανθεί πλήρως η δράση του πεπτιδίου.

Συνοψίζοντας, το πεπτίδιο (S,S) PSRCDCR-NH<sub>2</sub> είναι ένα κυκλικό μη RGD πεπτίδιο, το οποίο έχει ανασταλτική δράση στη συγκέντρωση των αιμοπεταλίων. Η *in vitro* δράση του είναι πολλές φορές ισχυρότερη συγκριτικά τόσο με αυτή των RGD αναλόγων καθώς και με αυτή άλλων CDC πεπτιδίων της οικογένειάς του.



**Εικ. 72:** το πεπτίδιο (S,S) PSRCDRCR-NH<sub>2</sub> σε συγκέντρωση 1μM in vitro αποτυγχάνει να αναστείλει τη σύνδεση του PAC-1 (τετράγωνο) στον GPIIb/IIIa, έχει όμως αναστείλει τη σύνδεση του ινωδογόνου (κύκλος) σε αυτό κατά 92%. Σε δεκαπλάσια συγκέντρωση επιτυγχάνεται τελικά η αναστολή του PAC-1. Ένα RGD ανάλογο, το πεπτίδιο RGDS, στις ίδιες συγκεντρώσεις που αναστέλλει την πρόσδεση του ινωδογόνου, αναστέλλει και την πρόσδεση του PAC-1. Αποδεικνύεται λοιπόν ότι το πεπτίδιο δρα με τρόπο διαφορετικό των RGD αναλόγων(382).

#### ΤΟ ΣΥΝΘΕΤΙΚΟ ΠΕΠΤΙΔΙΟ YMESRADR

Η σύνθεση του πεπτιδίου YMESRADR βασίστηκε σε μια διαφορετική προσέγγιση προκειμένου να επιτευχθεί η αναστολή της σύνδεσης του ινωδογόνου με τον υποδοχέα GPIIb/IIIa. Το σκεπτικό αρχικά ήταν ότι εάν χαρτογραφηθούν οι περιοχές του υποδοχέα GPIIb/IIIa που αλληλεπιδρούν με τον προσδέτη, τα πεπτίδια τα οποία θα συντίθεντο με βάση τις αλληλουχίες αυτών των περιοχών θα ανέστειλαν τη σύνδεση του GPIIb/IIIa με το ινωδογόνο. Η αλληλεπίδραση θα συνέβαινε ανάμεσα στο πεπτίδιο και το ίδιο το ινωδογόνο, όχι τον υποδοχέα. Το πεπτίδιο θα ανταγωνιζόταν τον ίδιο τον υποδοχέα για τον προσδέτη του, και όχι τον προσδέτη για τον υποδοχέα όπως συμβαίνει στα RGD ανάλογα. Ένα τέτοιο πεπτίδιο θα διέθετε το πλεονέκτημα του να αφήνει ανεπηρέαστο τον υποδοχέα και να μη προκαλεί αλλαγές στερεοδιάταξης που οδηγούν σε δευτερογενή ενεργοποίηση του αιμοπεταλίου(381). Έτσι θα δημιουργούνταν μόρια τα οποία θα συνδέονταν με το ινωδογόνο σε περιοχές που αναγνωρίζονταν από τον ενεργοποιημένο GPIIb/IIIa υποδοχέα.

Όπως αναφέρθηκε, η δέσμευση του ινωδογόνου γίνεται στο ενεργό κέντρο του υποδοχέα GPIIb/IIIa που βρίσκεται στο αμινοτελικό άκρο του εξωκυττάριου τμήματος. Το πανεπιστήμιο Ιωαννίνων σε συνεργασία με το τμήμα βιοχημείας του ελληνικού Ινστιτούτου Pasteur, χαρτογράφησε το εξωκυττάριο τμήμα της  $\alpha_{IIb}$  υπομονάδας του ενεργοποιημένου GPIIb/IIIa υποδοχέα. Εν συνεχεία, γνωρίζοντας πλέον την ακολουθία των 992 αμινοξέων του, τη διέσπασε σε εικοσαπεπτίδια. Το κάθε ένα από αυτά αλληλοκαλυπτόταν με το προηγούμενο και το επόμενο κατά 8 αμινοξέα. Προέκυψαν έτσι 82 εικοσαπεπτίδια τα οποία χρησιμοποιήθηκαν σε in vitro μελέτες της ανασταλτικής τους δράσης στη συσσώρευση των αιμοπεταλίων μετά την προσθήκη ADP(383).

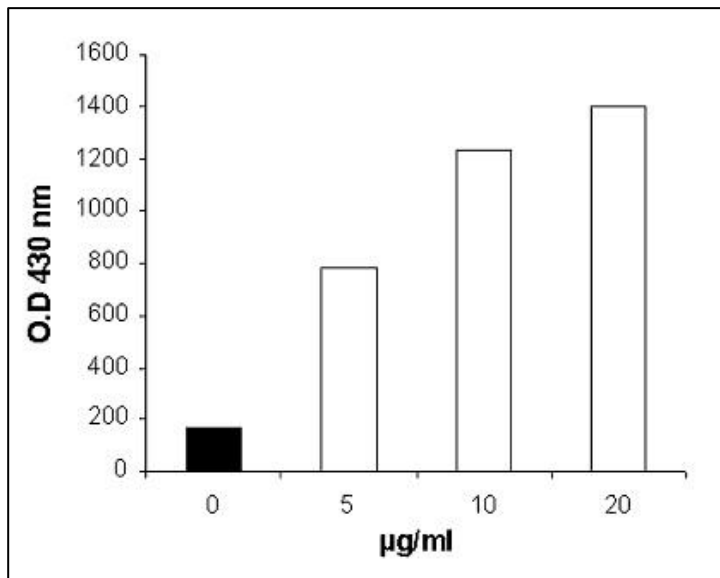
Ανάμεσα στα 82 εικοσαπεπτίδια ξεχώρισαν 5 προς περαιτέρω διερεύνηση, τα οποία μετά από in vitro προσθήκη ADP σε συγκέντρωση 5  $\mu$ M ανέστειλαν τη συσσώρευση των αιμοπεταλίων σε ποσοστό >40%. Τα πεπτίδια αυτά καθαρίστηκαν και συντέθηκαν σε μεγαλύτερες ποσότητες. Από αυτά το εικοσαπεπτίδιο YMESRADRKLAEVGRVYLFL (κατάλοιπα 313-332) ήταν ο πιο αποτελεσματικός αναστολέας επιτυγχάνοντας τις χαμηλότερες τιμές IC50 (πίνακας 10).

Πεπτιδικό Ανάλογο εξωκυττάριου τμήματος $\alpha_{IIb}$	Αιμοπεταλιακή συσσώρευση (Τιμές IC50 $\mu$ M)	Αναστολή πρόσδεσης ινωδογόνου (Τιμές IC50 $\mu$ M)	Αναστολή πρόσδεσης PAC-1 (%)
$\alpha_{IIb}$ 49-68	5623	3910	0
$\alpha_{IIb}$ 57-64	3451	1122	0
$\alpha_{IIb}$ 265-284	800	530	0
$\alpha_{IIb}$ 277-296	2844	2116	0
$\alpha_{IIb}$ 294-314 <sup>a</sup>	2510	1762	0
$\alpha_{IIb}$ 313-332	300	130	0
$\alpha_{IIb}$ 469-488	7490	4288	0
RGDS	210	113	78.0 $\pm$ 6.0 <sup>b</sup>

**Πίνακας 10:** το 20πεπτίδιο που αντιστοιχεί στα κατάλοιπα 313-332 του εξωκυττάριου τμήματος του GPIIb/IIIa υποδοχέα είναι το δραστικότερο όσον αφορά στην αναστολή της πρόσδεσης του ινωδογόνου με αυτό. Το εικοσαπεπτίδιο 294-314 έχει προταθεί από τον D'Souza και τους συνεργάτες του ως η αλληλουχία της  $\alpha_{IIb}$  υπομονάδας η οποία αλληλεπιδρά με το 12πεπτίδιο της  $\gamma$  αλυσίδας του ινωδογόνου(384) και για το λόγο αυτό εισήχθη επίσης στη μελέτη(383).

Προκειμένου να αποδειχθεί ο τρόπος δράσης του πεπτιδίου, χρησιμοποιήθηκε το αντίσωμα PAC-1, το οποίο όπως αναφέρθηκε προσδένεται στον ενεργοποιημένο

υποδοχέα GPIIb/IIIa. Το 20πεπτίδιο 313-332, όπως φαίνεται και στον πίνακα 10, αποτυγχάνει να ανταγωνιστεί το PAC-1 για τον υποδοχέα GPIIb/IIIa και να αναστείλει τη σύνδεσή του με αυτόν, σε αντίθεση με το πεπτίδιο RGDS. Επίσης, σε μελέτες πρόσδεσης στερεάς φάσης, μια πλάκα που έφερε μόρια ινωδογόνου στην επιφάνειά της, ήρθε σε επαφή με το 20πεπτίδιο και ένα αντίσωμα ειδικά κατασκευασμένο για αυτό. Το αντίσωμα αναγνώρισε το 20πεπτίδιο και ανιχνεύθηκε προσκολλημένο επάνω στην πλάκα. Συνεπώς το 20πεπτίδιο ήταν προσκολλημένο στο ινωδογόνο. Τα παραπάνω αποτελέσματα συνηγορούσαν υπέρ του ότι το 20πεπτίδιο δε δρα στον υποδοχέα αλλά ασκεί την αντιαιμοπεταλιακή του δράση συνδεδεμένο με τον προσδέτη(383).



**Εικ. 73:** στον άξονα x παρουσιάζονται 4 διαφορετικές συγκεντρώσεις του 20πεπτιδίου επάνω στην πλάκα που φέρει ινωδογόνο. Στον y, η ποσότητα του ανιχνευθέντος αντισώματος(384).

Το 20πεπτίδιο 313-332 καταλαμβάνει τη 2<sup>η</sup> (313-318) και την 3<sup>η</sup> (319-332) αλυσίδα της 5<sup>ης</sup> λεπίδας (W<sub>5</sub>) της δομής β-προπέλας της α υπομονάδας. Σε συμφωνία με το ζωτικό ρόλο του 20πεπτιδίου στη διαδικασία πρόσδεσης του ινωδογόνου στον υποδοχέα GPIIb/IIIa, είναι και το γεγονός ότι δύο σημειακές μεταλλάξεις που εμπεριέχονται στο 20πεπτίδιο αυτό, οι E324K και R327H, παρατηρούνται σε ασθενείς με Glanzmann θρομβασθένεια(385, 386).

Αρχικά θεωρήθηκε ότι η δράση του 20πεπτιδίου ασκείται μέσω RGD αλληλεπιδράσεων γιατί φέρει την RAD αλληλουχία η οποία φέρει δομικές ομοιότητες με την RGD. Μελέτες με το PAC-1 αντίσωμα απέδειξαν ότι τα RAD πεπτίδια δεν ανέστειλαν την πρόσδεσή του στον ενεργοποιημένο υποδοχέα σε αντίθεση με τα RGD αποδεικνύοντας ότι δρουν με μη RGD εξαρτώμενο τρόπο(384). Παρόλα αυτά θεωρείται ότι η προσκολλητική δράση του 20πεπτιδίου στο ινωδογόνο οφείλεται στις προσκολλητικές ιδιότητες της RAD ακολουθίας, η οποία αναγνωρίζει συμπληρωματικές αλληλουχίες στο ινωδογόνο και προσδένεται σε αυτές. Τέλος, αξιοσημείωτο είναι ότι το 20πεπτίδιο 313-332 είναι ακριβώς δίπλα στην αλληλουχία 294-314, την οποία είχε προτείνει ο D'Souza σαν περιοχή πρόσδεσης του GPIIb/IIIa με το 12πεπτίδιο της  $\gamma$  αλυσίδας του ινωδογόνου.

Σε μια προσπάθεια να αποσαφηνιστεί η βραχύτερη δυνατή αλληλουχία που απαιτείται για τη βιολογική δράση του 20πεπτιδίου, συντέθηκαν επτά οκταπεπτίδια και μελετήθηκε η δράση τους στη συσσώρευση των αιμοπεταλίων μέσω ADP (πίνακας 11). Όπως απεδείχθη, εκτός από το μητρικό 20πεπτίδιο, μόνο τα πεπτίδια

Αλληλουχία πεπτιδίου	Συσσώρευση αιμοπεταλίων	
	Αναστολή (%)	Τιμές IC50
313-332: YMESRADRKLAEVGRVYLPL	65 ± 11	0.30
313-320: YMESRADR-----	83 ± 15	0.25
315-322: --ESRADRKL-----	54 ± 12	0.40
317-324: ----RADRKLAE-----	40 ± 9	0.51
319-326: -----DRKLAEVG-----	7 ± 3	(-)
321-328: -----KLAEVGRV----	13 ± 8	(-)
323-330: -----AEVGRVYL--	10 ± 6	(-)
325-332: -----VGRVYLPL	15 ± 5	(-)

**Πίνακας 11:** τα 7 οκταπεπτίδια τα οποία προέκυψαν από την ανάλυση του 20πεπτιδίου 313-332(387).

με την ακολουθία RAD παρουσιάζουν δραστικότητα, ενώ η ακολουθία YMES μπροστά από την ακολουθία RAD ενισχύει σημαντικά την αποτελεσματικότητα του



πεπτιδίου. Ενδιαφέρον ήταν το γεγονός ότι το πεπτίδιο YMESRADR και τα υπόλοιπα δραστικά πεπτίδια, έγιναν ακόμη δραστικότερα όταν ως αγωνιστής συσώρευσης των αιμοπεταλίων χρησιμοποιήθηκε κολλαγόνο ή θρομβίνη(387).

Παρόμοια αποτελέσματα προέκυψαν και όταν εξετάσθηκε η ικανότητα των οκταπεπτιδίων στην αναστολή της πρόσδεσης του ινωδογόνου στον υποδοχέα. Το πεπτίδιο YMESRADR ανεδείχθη ξανά ως το ισχυρότερο (πίνακας 12), ενώ είχε παρόμοια δραστικότητα με το πεπτίδιο RGDS που εισήχθη στη μελέτη ως πεπτίδιο ελέγχου. Μελέτες με το αντίσωμα PAC-1 έδειξαν ότι η ικανότητα του να προσδένεται στον ενεργοποιημένο υποδοχέα δεν επηρεάζεται ιδιαίτερα από το YMESRADR σε αντίθεση με το RGDS το οποίο την αναστέλλει πλήρως. Θεωρήθηκε έτσι ξανά ότι το YMESRADR δεν αλληλεπιδρά με τον υποδοχέα αλλά με το ίδιο το ινωδογόνο, αναστέλλοντας τη σύνδεσή του σε αυτόν. Το τελευταίο επιβεβαιώθηκε και με μελέ-

Peptide Inhibition	Fibrinogen binding		PAC-1 binding (%)
	IC <sub>50</sub> values (%)	Inhibition (mM)	
313-332: YMESRADRKLAEVGRVYLFL	65 ± 11	0.13	0
313-320: YMESRADR-----	90 ± 5	0.09	8 ± 6
315-322: --ESRADRKL-----	57 ± 11	0.39	6 ± 4
317-324: ----RADRKLAE-----	48 ± 12	0.48	10 ± 5
319-326: -----DRKLAEVG-----	10 ± 5	-	0
321-328: -----KLAEVGRV----	13 ± 4	-	0
323-330: -----AEVGRVYL--	5 ± 4	-	0
325-332: -----VGRVYLFL	6 ± 6	-	0
RGDS	97 ± 3	0.11	78 ± 6

**Πίνακας 12:** το YMESRADR είναι το δραστικότερο από τα οκταπεπτίδια όσον αφορά στην αναστολή της πρόσδεσης του ινωδογόνου στον υποδοχέα GPIIb/IIIa και σχεδόν όσο δραστικό είναι το RGDS. Αντιθέτως, δεν επηρεάζει την ικανότητα πρόσδεσης του PAC-1 στον ενεργοποιημένο υποδοχέα IIb/IIIa(387).

τες πρόσδεσης στερεάς φάσης. Το οκταπεπτίδιο επωάστηκε επάνω σε μία πλάκα που έφερε στην επιφάνεια της μόρια ινωδογόνου και εν συνεχεία προστέθηκε ένα

αντίσωμα ειδικό για αυτό. Το αντίσωμα εν συνεχεία ανιχνεύθηκε επάνω στην πλάκα σε ποσά ανάλογα της συγκέντρωσης του οκταπεπτιδίου που χρησιμοποιήθηκε, επιβεβαιώνοντας ότι το οκταπεπτίδιο προσδέθηκε στο ινωδογόνο. Επιπροσθέτως, η επώαση του οκταπεπτιδίου μαζί με το πεπτίδιο ελέγχου RGDS, δεν ανέστειλε την ικανότητα πρόσδεσης του πρώτου στο ινωδογόνο γεγονός που επιβεβαιώνει ότι το YMESRADR δρα ανεξάρτητα από RGD αλληλεπιδράσεις(387). Η θεωρία ότι το πεπτίδιο YMESRADR δρα προσδεδεμένο στο ινωδογόνο και όχι στον ίδιο τον υποδοχέα κατερρίφθη αργότερα. Νεότερα δεδομένα απέδειξαν ότι το πεπτίδιο προσδέεται απεύθείας στην υπομονάδα β3 του υποδοχέα GPIIb/IIIa, αποτρέποντας τη μετάβασή του στην ενεργή μορφή και χωρίς να οδηγεί σε δευτερογενή αιμοπεταλιακή ενεργοποίηση.

#### Η ΣΥΝΘΕΣΗ ΤΩΝ ΠΕΠΤΙΔΙΩΝ

Η σύνθεση του πεπτιδίου YMESRADR έγινε σε ρητίνη Wang, ακολουθώντας την Fmoc στρατηγική. Οι αντιδράσεις πολυμερισμού των αμινοξέων πραγματοποιήθηκαν σε DMF, με μοριακή αναλογία του αμινοξέος, του 1,1,1,3-[1-βενζοτρίαζοϋλ] εξαφλουοροφωσφορικού τετραμεθυλουρόνιου, της 1 υδροξυβενζοτρίαζόλης, της διϊσοπροπυλεθυλαμίνης και της ρητίνης 3:3:3:6:1. Τα πεπτίδια καθαρίστηκαν με σύστημα Water PrepLC 4000, κολώνα αναστροφής φάσης Discovery C18 (25cm x 10mm), με ρυθμό ροής 4.7 ml/min. Η καθαρότητα των πεπτιδίων ελέγχθηκε φασματομετρικά με Micromass (Manchester, England) Platform II, τετραπολικό φασματόμετρο μάζας(365).

Το κυκλικό πεπτίδιο, (S,S) PSRCDCR-NH<sub>2</sub> συντέθηκε με τη διαδικασία στερεής φάσης σε ρητίνη Rink συμφωνά με τη μέθοδο Fmoc. Η καθαρότητα των πεπτιδίων ελέγχθηκε με HPLC(366, 388).

### Η ΕΠΙΛΟΓΗ ΛΕΥΚΩΝ ΚΟΥΝΕΛΙΩΝ ΝΕΑΣ ΖΗΛΑΝΔΙΑΣ

Η επιλογή των λευκών κουνελιών Νέας Ζηλανδίας ως τα πειραματόζωα που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη δεν έγινε τυχαία. Τα αιμοπετάλιά τους έχουν σημαντικές ομοιότητες με τα αιμοπετάλια των ανθρώπων. Έχουν δισκοειδές σχήμα και είναι προκαρυωτικά κύτταρα. Επίσης περιέχουν και τα δύο είδη εκκριτικών κοκκίων που περιέχουν τα ανθρώπινα αιμοπετάλια, όπως επίσης γλυκογόνο, μιτοχόνδρια, λυσοσώματα, μικροσωληνίσκους, κυτταροσκελετό, διαμεμβρανικό σύστημα αγωγών και πυκνά σωληνάκια. Αν και τα αιμοπετάλια στο αίμα αυτών των πειραματόζωων είναι μικρότερα από τα ανθρώπινα (3,3-5,1 fl ανάλογα με την ηλικία των αιμοπεταλίων, σε αντίθεση με 6-8 fl στον άνθρωπο(389, 390)), είναι επίσης περισσότερα (430.000-645.000(391) σε αντίθεση με 150.000-450.000 αιμοπετάλια στο περιφερικό αίμα του υγιούς ανθρώπου). Έτσι, η αιμοπεταλιακή μάζα (αριθμός αιμοπεταλίων x μάζα αιμοπεταλίων) των κουνελιών είναι παρεμφερής με αυτή του ανθρώπου. Τα ποσοστά των φωσfolιπιδίων της αιμοπεταλιακής κυτταρικής μεμβράνης είναι παρεμφερή και στα δύο είδη(392). Όσον αφορά στις διαφορές τους, οι σημαντικότερες είναι ότι φέρουν χαμηλότερες συγκεντρώσεις ADP και Ca στα πυκνά κοκκία τους. Για την ακρίβεια, 6,8  $\mu\text{mol}/10^{11}$  αιμοπετάλια είναι η μέση συγκέντρωση του Ca στα αιμοπετάλια των κουνελιών, ενώ 15,1  $\mu\text{mol}/10^{11}$  αιμοπετάλια είναι η μέση συγκέντρωση στα ανθρώπινα. Επίσης η μέση συγκέντρωση ADP στα αιμοπετάλια των κουνελιών είναι 1,1  $\mu\text{mol}/10^{11}$ , με την αντίστοιχη μέση τιμή στα ανθρώπινα να είναι 3  $\mu\text{mol}/10^{11}$ .

Η ηρεμία που διέπει το χαρακτήρα τους και το μικρό τους μέγεθος τα καθιστά ζώα εύκολα στο χειρισμό τους. Επίσης η αγορά τους δε κοστίζει πολύ συγκριτικά με άλλα μεγαλύτερα πειραματόζωα (σκύλους, χοίρους, πιθήκους). Η εκτροφή τους είναι επίσης οικονομική, καθώς δε καταναλώνουν μεγάλες ποσότητες τροφής και νερού. Το μικρό τους μέγεθος συνεπάγεται ότι οι δοσολογίες των φαρμάκων (εν προκειμένω των συνθετικών πεπτιδίων) που δοκιμάζονται σε αυτά, αλλά και των φαρμάκων που χρησιμοποιούνται για τη νάρκωση και την αναλγησία πριν τις χειρουργικές

επεμβάσεις (οι δοσολογίες καθορίζονται με βάση το βάρος σώματος) θα είναι επίσης σημαντικά μικρότερες συγκριτικά με άλλα πειραματόζωα.

Το μεγαλύτερο πλεονέκτημα όμως των κουνελιών, το οποίο τα καθιστά κατάλληλα για την παρούσα μελέτη σχετίζεται με τον τρόπο που συσσωρεύονται τα αιμοπετάλιά τους: αν και το πεπτίδιο RGDS αναστέλλει κατά 80-90% τη συσσώρευση των ανθρώπινων αιμοπεταλίων που επάγεται μέσω ADP παρουσία ινωδογόνου, ελάχιστα αναστέλλει τη συσσώρευση των αιμοπεταλίων των κουνελιών υπό τις ίδιες συνθήκες, χορηγούμενο στην ίδια συγκέντρωση(393). Αυτό συμβαίνει γιατί ενώ στον άνθρωπο το ινωδογόνο αλληλεπιδρά με τον GPIIb/IIIa υποδοχέα μέσω των 2 RGD αλληλουχιών που φέρει σε κάθε Αα αλυσίδα του (δηλαδή τέσσερις RGD αλληλουχίες στο σύνολο) και του 12 πεπτιδίου που φέρει στη γ αλυσίδα του, στα αιμοπετάλια των κουνελιών η συγγένεια του GPIIb/IIIa υποδοχέα για τις RGD αλληλουχίες είναι πολύ μικρότερη. Αυτό οφείλεται σε διαφορές που οι δύο υποδοχείς παρουσιάζουν στις αλληλουχίες τους. Έχει επίσης βρεθεί ότι η συγγένεια του 12πεπτιδίου για τον υποδοχέα GPIIb/IIIa είναι μεγαλύτερη στα κουνέλια από τον άνθρωπο. Από μελέτες επάνω στο 12πεπτίδιο του κουνελιού έχει προκύψει ότι αυτό μπορεί να αναστείλει τη συσσώρευση των αιμοπεταλίων του ζώου όπως και στον άνθρωπο(394), και ότι η δυνατότητά του αυτή δεν επηρεάζεται καθόλου από την ταυτόχρονη προσθήκη του πεπτιδίου RGDS. Φαίνεται λοιπόν ότι τα αιμοπετάλια του κουνελιού συσσωρεύονται κυρίως μέσω αλληλεπίδρασης του υποδοχέα GPIIb/IIIa με το 12πεπτίδιο του ινωδογόνου τους. Ο ισχυρισμός αυτός απεδείχθη με μελέτες χρωματογραφίας συγγένειας από όπου προκύπτει ότι η  $\beta_3$  υπομονάδα του υποδοχέα συνδέεται με το 12πεπτίδιο και όχι με το RGDS πεπτίδιο όπως επίσης και ότι η  $\alpha_{IIb}$  υπομονάδα του υποδοχέα δε συνδέεται ούτε με το RGDS πεπτίδιο ούτε με το 12πεπτίδιο. Φαίνεται λοιπόν ότι οι RGD αλληλουχίες δε συμμετέχουν καθόλου στην αναγνώριση του ινωδογόνου από τον υποδοχέα GPIIb/IIIa του κουνελιού. Το γεγονός αυτό καθιστά το συγκεκριμένο πειραματόζωο ιδανικό για τη μελέτη των πεπτιδίων (S,S) PSRCDCR-NH<sub>2</sub> και YMESRADR, τα οποία όπως αναφέραμε δρουν με RGD ανεξάρτητο τρόπο.

# ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

## Κεφάλαιο 1<sup>ο</sup>:

### Η ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

Η πειραματική διαδικασία αποτελείται από δύο επιμέρους τμήματα: i) το *in vivo* στο οποίο η αποτελεσματικότητα των χορηγούμενων ουσιών μελετάται σε ένα μοντέλο πειραματικής θρόμβωσης καρωτίδας σε λευκά κουνέλια Νέας Ζηλανδίας και ii) το *ex vivo* στο οποίο δύο δείγματα αίματος (1.αμέσως πριν και 2.Μία ώρα μετά τη χορήγηση των υπό μελέτη ουσιών) αποστέλλονται στο χημικό εργαστήριο για μελέτη συσσωρευομετρίας αιμοπεταλίων πριν και μετά την προσθήκη των αγωνιστών αιμοπεταλιακής συσώρευσης AA και ADP. Και στις δύο περιπτώσεις το δείγμα του αίματος μεταφέρεται από την αίθουσα του πειράματος στο χημικό εργαστήριο εντός ολίγων λεπτών.

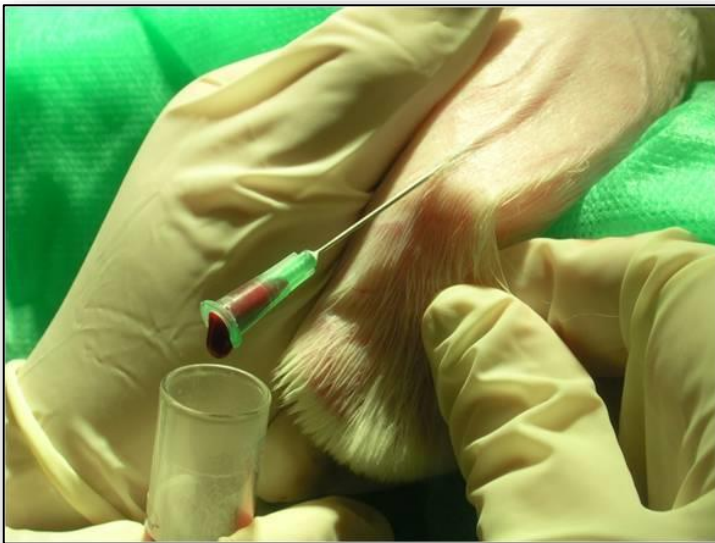
### **IN VIVO ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ**

#### **ΤΑ ΠΕΙΡΑΜΑΤΟΖΩΑ**

Χρησιμοποιήθηκαν λευκά κουνέλια Νέας Ζηλανδίας βάρους 2,8-3,2 κιλών. Οι χειρισμοί των ζώων έγιναν με ιδιαίτερη προσοχή και ευαισθησία, με πρωταρχικό μέλημα να μην αγωνιούν και να μην υποφέρουν. Για το λόγο αυτό, τα κουνέλια υπεβλήθησαν σε αναισθησία και αναλγησία πριν από την έναρξη του πειράματος με ενδομυϊκή χορήγηση μείγματος 35 mg/kg Κεταμίνης και 15 mg/kg Ξυλαζίνης. Η κατάργηση του αντανακλαστικού του κερατοειδούς χρησιμοποιήθηκε ως σημείο επιτυχίας της αναισθησίας. Το αποτέλεσμα συντηρείτο με την τακτική επανάληψη των ανωτέρω δόσεων.

Το πείραμα ξεκινά με την πρώτη αιμοληψία από τη μέση ωτιαία αρτηρία του ζώου (εικ. 74), πριν τη χορήγηση αναισθησίας ή αναλγησίας. Το φιαλίδιο με το δείγμα αποστέλλεται άμεσα στο χημικό εργαστήριο για τον *ex vivo* υπολογισμό της συσώρευσης των αιμοπεταλίων πριν τη χορήγηση της υπό μελέτη ουσίας. Το χειρουργικό μέρος του πειράματος αποτελείται από δύο τμήματα: i) με μία τομή στη βουβωνική περιοχή παρασκευάζεται η μηριαία φλέβα (εικ. 75) και καθετηριάζεται με την τοποθέτηση ενός ενδοφλέβιου καθετήρα Polyflon διαμέτρου 20G (1.1x32 mm) (εικ. 76). Από εκεί θα χορηγηθούν οι υπό μελέτη ουσίες, ii) μέσω μιας μέσης

τραχηλικής τομής, η αριστερή κοινή καρωτίδα αρτηρία αποκαλύπτεται και παρασκευάζεται, αποκολλάται δηλαδή και απελευθερώνεται από τους γύρω ιστούς (εικ. 77). Γύρω της, τοποθετείται η κεφαλή (probe) ενός ηλεκτρομαγνητικού καταγραφέα ροής διαμέτρου 1,5 mm (Quickfit 1,5 mm, Medistim S.A.) (εικ. 80). Έτσι επιτυγχάνεται η συνεχής καταγραφή της ροής του αίματος μέσα από το αγγείο, η οποία αναγράφεται στην οθόνη σε ml/λεπτό (εικ. 81).



**Εικ. 74:** αιμοληψία από τη μέση ωτιαία αρτηρία του κουνελιού. Ακόμα και χωρίς αναισθησία, το ζώο δε νιώθει πόνο και δε διαμαρτύρεται καν κατά τη διάρκεια της διαδικασίας.



**Εικ. 75:** Χειρουργική παρασκευή της μηριαίας φλέβας.



**Εικ. 76:** καθετηριασμός μηριαίας φλέβας. Ακολουθεί η bolus χορήγηση της υπό μελέτη ουσίας η οποία σηματοδοτεί και την έναρξη της στάγδην έγχυσης μέσω συσκευής ορού (βλέπε παρακάτω).

#### ΟΥΣΙΕΣ ΠΟΥ ΕΞΕΤΑΣΘΗΚΑΝ

Τα πειραματόζωα οργανώνονται σε ομάδες ανάλογα με την ουσία που θα τους χορηγηθεί. Έχουν ήδη στο παρελθόν μελετηθεί από την ομάδα μας οι παρακάτω κατηγορίες πειραματοζώων:

1. Φυσιολογικός ορός (placebo) με ρυθμό έγχυσης 6 ml/kg/h. Η ομάδα αυτή χρησιμοποιήθηκε ως ομάδα ελέγχου (control group).
2. YMESRADR 1,5 mg/kg bolus και στη συνέχεια έγχυση με ρυθμό χορήγησης 1 mg/kg/h έως το τέλος του πειράματος (συνολική δόση πεπτιδίου 3 mg/kg).
3. YMESRADR 3,75 mg/kg bolus και στη συνέχεια έγχυση με ρυθμό χορήγησης 2,5 mg/kg/h έως το τέλος του πειράματος (συνολική δόση πεπτιδίου 7,5 mg/kg).
4. YMESRADR 5,7 mg/kg bolus και στη συνέχεια έγχυση με ρυθμό χορήγησης 3,8 mg/kg/h έως το τέλος του πειράματος (συνολική δόση πεπτιδίου 12 mg/kg).
5. YMESRADR 7,5 mg/kg bolus και στη συνέχεια έγχυση με ρυθμό χορήγησης 5 mg/kg/h έως το τέλος του πειράματος (συνολική δόση πεπτιδίου 15 mg/kg).
6. (S,S) PSRCDCR-NH<sub>2</sub> 1,5 mg/kg bolus και στη συνέχεια έγχυση με ρυθμό 1 mg/kg/h έως το τέλος του πειράματος (συνολική δόση πεπτιδίου 3 mg/kg).



7. (S,S) PSRCDCR-NH<sub>2</sub> 3 mg/kg bolus και στη συνέχεια έγχυση με ρυθμό 2 mg/kg/h έως το τέλος του πειράματος (συνολική δόση πεπτιδίου 6 mg/kg).
8. (S,S) PSRCDCR-NH<sub>2</sub> 6 mg/kg bolus και στη συνέχεια έγχυση με ρυθμό 4 mg/kg/h έως το τέλος του πειράματος (συνολική δόση πεπτιδίου 12 mg/kg).

Ο ρυθμός έγχυσης των 6 mg/kg/h του φυσιολογικού ορού (placebo) έχει χρησιμοποιηθεί στο παρελθόν σε μοντέλα πειραματικής θρόμβωσης σε κουνέλια(367, 395). Προκαταρκτικές μελέτες καθόρισαν τις δόσεις των πεπτιδίων. Όσον αφορά στο YMESRADR, δόσεις μικρότερες των 3 mg/kg δεν παρουσίασαν καμία δραστικότητα, ενώ καμία αύξηση της δραστικότητας δε παρατηρήθηκε για δόσεις μεγαλύτερες των 15 mg/kg. Αντίστοιχα για το (S,S) PSRCDCR-NH<sub>2</sub>, οι δόσεις αυτές ήταν 3 mg/kg και 12 mg/kg. Ο όγκος των διαλυμάτων που χρησιμοποιήθηκαν ήταν τέτοιος ώστε να αντιστοιχεί στο ρυθμό χορήγησης του φυσιολογικού ορού (6 mg/kg/h). Η έγχυση της υπό μελέτη ουσίας ξεκινά με τη bolus χορήγηση της μισής από την εξεταζόμενη δόση. Η υπόλοιπη ποσότητα χορηγείται με συνεχή έγχυση εντός 90 λεπτών. Από το σημείο αυτό και έπειτα χορηγείτο φυσιολογικός ορός με τον ανωτέρω ρυθμό.

Έχοντας ήδη στα χέρια μας τα αποτελέσματα της δράσης των πεπτιδίων στις δόσεις που αναφέρθηκαν παραπάνω, κρίθηκε σκόπιμο αρχικά να μελετηθεί η συνδυασμένη δράση των πεπτιδίων YMESRADR και (S,S) PSRCDCR-NH<sub>2</sub>. Για το σκοπό αυτό, το τμήμα οργανικής Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων συνέθεσε το υβριδικό πεπτίδιο YMESRCDCR. Δυστυχώς το διάλυμα που προέκυπτε κατά τη διάλυση δεν ήταν ομοιογενές και διαυγές όπως ήταν αυτό των πεπτιδίων YMESRADR και (S,S) PSRCDCR-NH<sub>2</sub>. Ήταν αντιθέτως θολό με παρουσία ιζήματος. Όλες οι προσπάθειες που έγιναν για τη διάλυση του πεπτιδίου ήταν ανεπιτυχείς. Κρίθηκε συνεπώς αδύνατη όχι μόνο η ενδοφλέβια χορήγησή του στα ζώα, αλλά και η εξαγωγή ασφαλών συμπερασμάτων από τη μελέτη του. Συνεπώς η ιδέα αυτή εγκαταλείφθηκε.

Αποφασίσθηκε να μελετηθεί η συνδυασμένη χορήγηση των πεπτιδίων YMESRADR και (S,S) PSRCDCR-NH<sub>2</sub> με την ασπιρίνη. Προέκυψαν έτσι οι ακόλουθες ομάδες πειραματοζώων:

9. Ασπιρίνη 5 mg/kg και στη συνέχεια χορήγηση φυσιολογικού ορού με ρυθμό έγχυσης 6 mg/kg/h.
10. Ασπιρίνη 10 mg/kg και στη συνέχεια χορήγηση φυσιολογικού ορού με ρυθμό έγχυσης 6 mg/kg/h.
11. Ασπιρίνη 5 mg/kg σε συνδυασμό με χορήγηση YMESRADR 3,75 mg/kg bolus και στη συνέχεια έγχυση με ρυθμό χορήγησης 2,5 mg/kg/h έως το τέλος του πειράματος (συνολική δόση πεπτιδίου 7,5 mg/kg).
12. Ασπιρίνη 10 mg/kg σε συνδυασμό με χορήγηση YMESRADR 3,75 mg/kg bolus και στη συνέχεια έγχυση με ρυθμό χορήγησης 2,5 mg/kg/h έως το τέλος του πειράματος (συνολική δόση πεπτιδίου 7,5 mg/kg).
13. Ασπιρίνη 5 mg/kg σε συνδυασμό με χορήγηση YMESRADR 5,7 mg/kg bolus και στη συνέχεια έγχυση με ρυθμό χορήγησης 3,8 mg/kg/h έως το τέλος του πειράματος (συνολική δόση πεπτιδίου 12 mg/kg).
14. Ασπιρίνη 10 mg/kg σε συνδυασμό με χορήγηση YMESRADR 5,7 mg/kg bolus και στη συνέχεια έγχυση με ρυθμό χορήγησης 3,8 mg/kg/h έως το τέλος του πειράματος (συνολική δόση πεπτιδίου 12 mg/kg).
15. Ασπιρίνη 5 mg/kg σε συνδυασμό με χορήγηση (S,S) PSRCDCR-NH<sub>2</sub> 1,5 mg/kg bolus και στη συνέχεια έγχυση με ρυθμό χορήγησης 1 mg/kg/h έως το τέλος του πειράματος (συνολική δόση πεπτιδίου 3 mg/kg).
16. Ασπιρίνη 10 mg/kg σε συνδυασμό με χορήγηση (S,S) PSRCDCR-NH<sub>2</sub> 1,5 mg/kg bolus και στη συνέχεια έγχυση με ρυθμό χορήγησης 1 mg/kg/h έως το τέλος του πειράματος (συνολική δόση πεπτιδίου 3 mg/kg).
17. Ασπιρίνη 5 mg/kg σε συνδυασμό με χορήγηση (S,S) PSRCDCR-NH<sub>2</sub> 3 mg/kg bolus και στη συνέχεια έγχυση με ρυθμό 2 mg/kg/h έως το τέλος του πειράματος (συνολική δόση πεπτιδίου 6 mg/kg).
18. Ασπιρίνη 5 mg/kg σε συνδυασμό με χορήγηση (S,S) PSRCDCR-NH<sub>2</sub> 6 mg/kg bolus και στη συνέχεια έγχυση με ρυθμό 4 mg/kg/h έως το τέλος του πειράματος (συνολική δόση πεπτιδίου 12 mg/kg).

Χρησιμοποιήθηκε σκεύασμα ασπιρίνης με ταμπλέτες βάρους 120 mg και περιεκτικότητας 100 mg ακετυλοσαλικυλικού οξέος. Πριν από την έναρξη τω κάθε πειράματος, η επιθυμητή ποσότητα ασπιρίνης καθορίζεται με ζυγό

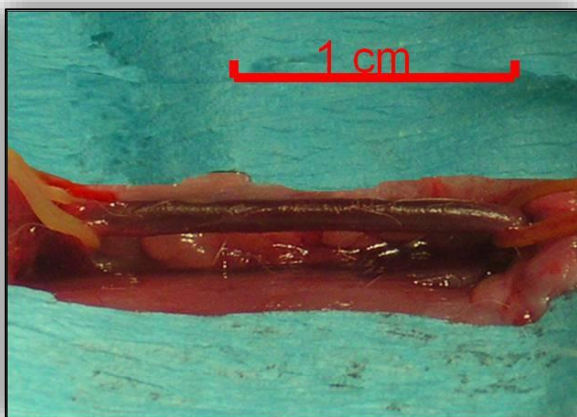
ακριβείας ανάλογα με το βάρος σώματος του πειραματοζώου. Προκειμένου τα αποτελέσματα των πειραμάτων να είναι συγκρίσιμα μεταξύ τους, στις ομάδες των πειραματοζώων όπου χορηγήθηκε συνδυασμός ασπιρίνης και πεπτιδίου ορίστηκε ένα σταθερό διάστημα 20 λεπτών από την p.os χορήγηση της ασπιρίνης, αρκετό για να αναισθητοποιηθεί το ζώο, να παρασκευασθεί χειρουργικά η μηριαία αρτηρία, να καθετηριαστεί και να χορηγηθεί η bolus ποσότητα της ουσίας. Εν συνεχεία το πείραμα ακολουθεί τη συνήθη διαδικασία. Η πειραματική διαδικασία ανάλογα με το αν χορηγείται δόση ασπιρίνης σε συνδυασμό με πεπτιδίο ή όχι, συνοψίζεται στις εικόνες 82 και 83.

#### ΔΗΜΙΟΥΡΓΙΑ ΘΡΟΜΒΟΥ ΚΑΙ ΡΟΗ ΑΙΜΑΤΟΣ

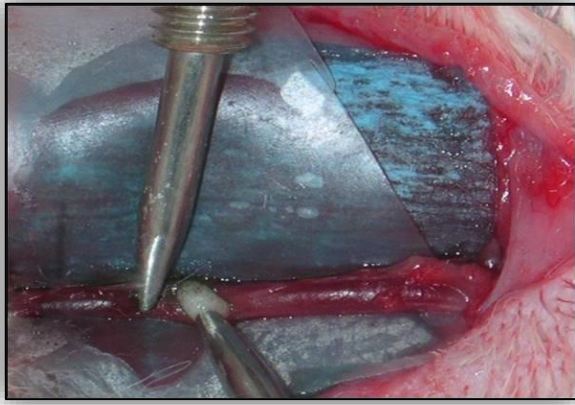
Ο θρόμβος δημιουργείται 60 λεπτά μετά τη bolus χορήγηση της μισής από τη συνολική δόση του υπό μελέτη πεπτιδίου. Αμέσως πριν τη δημιουργία του θρόμβου, λαμβάνεται το δεύτερο δείγμα αίματος για την ex vivo μέτρηση της αιμοπεταλιακής συσσώρευσης. Έτσι θα υπολογιστεί η αναστολής της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων, η οποία προκύπτει μετά από τη σύγκρισή των αποτελεσμάτων με τα αντίστοιχα που προκύπτουν από το δείγμα αίματος που ελήφθη με την έναρξη του πειράματος.

Κάτω από την καρωτίδα τοποθετείται ένα μικρό φύλλο parafilm έτσι ώστε να απομονωθούν ηλεκτρικά οι γύρω ιστοί. Δύο ηλεκτρόδια συνδεδεμένα με ένα τροφοδοτικό συνεχούς (dc) ηλεκτρικού ρεύματος (QL564, Thurlby Thandar Instruments Ltd), το οποίο ρυθμίστηκε ώστε να παρέχει ρεύμα σταθερής έντασης 4 mA (εναλλάσσοντας αυτόματα την τάση V αφού η αντίσταση R των ιστών παραμένει σταθερή), εφαρμόζονται επάνω στο εξωτερικό τοίχωμα του αγγείου (εικ. 78). Τα ηλεκτρόδια ακουμπούν μόνο με τη δύναμη του βάρους τους και χωρίς καμία πίεση από την πλευρά του χειριστή. Η πίεση επάνω στην καρωτίδα είναι ένας θρομβογόνος παράγοντας και αλλοιώνει το αποτέλεσμα του πειράματος το οποίο σκοπό έχει να μελετήσει τη δημιουργία θρόμβου που προκαλείται αποκλειστικά από την επίδραση

του ηλεκτρικού ρεύματος. Το ρεύμα εφαρμόζεται για 3 λεπτά. Η καταστροφή του ενδοθηλίου που δημιουργείται οδηγεί στην έναρξη σχηματισμού θρόμβου στον αυλό του αγγείου, ο οποίος με την πάροδο του χρόνου μεγαλώνει σε μέγεθος μέχρι να καταλάβει πλήρως τον αυλό σταματώντας τη ροή του αίματος ή να σταθεροποιηθεί σε κάποιο σημείο διατηρώντας έτσι μία μικρότερη ροή μέσα απ' το αγγείο, η οποία εκφράζεται ως ποσοστό της αρχικής. Η εξέλιξη του μεγέθους του θρόμβου και κατά συνέπεια η φθίνουσα πορεία της ροής του αίματος δια μέσω του αγγείου αντικατοπτρίζεται μέσω του ροόμετρου, η κεφαλή του οποίου έχει τοποθετηθεί περιφερικά από το σημείο της εφαρμογής του ηλεκτρικού ρεύματος. Στην πλήρη απόφραξη του αγγείου το ροόμετρο δεν ανιχνεύει ροή περιφερικά της βλάβης. Η ροή του αίματος καταγράφεται ανά πέντε λεπτά και για διάρκεια 90 λεπτών από την εφαρμογή του ηλεκτρικού ρεύματος. Εάν μετά την πάροδο του παραπάνω χρονικού διαστήματος το αγγείο παραμένει βατό, καταγράφεται η τελευταία μέτρηση και το πείραμα τερματίζεται. Σε αντίθετη περίπτωση που το αγγείο αποφράσσεται νωρίτερα, καταγράφεται ο χρόνος στον οποίο η ροή μηδενίζεται και το πείραμα σταματά στο χρονικό αυτό σημείο.

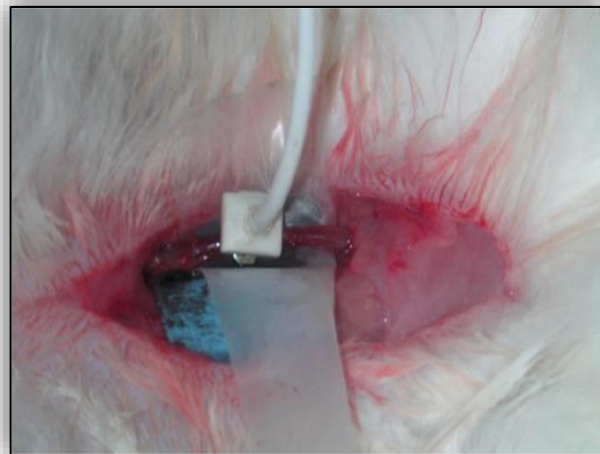
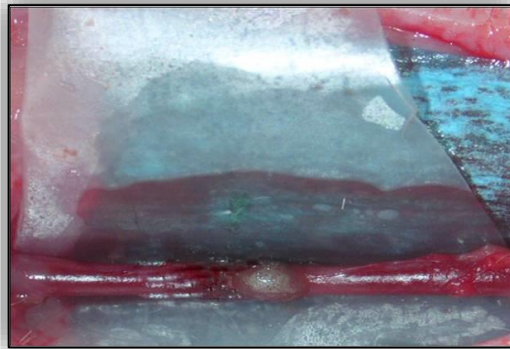


**Εικ. 77:** χειρουργική παρασκευή της αριστερής κοινής καρωτίδας του κουνελιού.

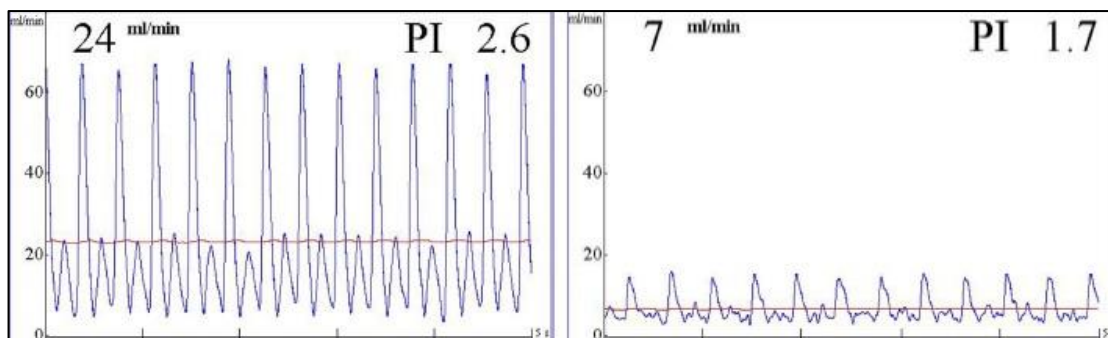


**Εικ. 78:** σχηματισμός θρόμβου με εφαρμογή ρεύματος 4 mA για 3 λεπτά μέσω ηλεκτροδίων. Ένα φύλλο parafilm απομονώνει ηλεκτρικά την καρωτίδα από τους γύρω ιστούς.

**Εικ. 79:** το αγγείο μετά τα 3 λεπτά της εφαρμογής του ηλεκτρικού ρεύματος. Είναι εμφανής η βλάβη.



**Εικ. 80:** Αριστερά: το ροόμετρο που καταγράφει τη ροή του αίματος μέσα στην καρωτίδα και δεξιά η κεφαλή του ροομέτρου (probe) η οποία είναι τοποθετημένη γύρω από την καρωτίδα περιφερικότερα του σημείου της βλάβης.



**Εικ. 81:** δύο μετρήσεις από ένα πείραμα από την ομάδα ελέγχου. Αριστερά η αρχική ροή της καρωτίδας (baseline) πριν την εφαρμογή ηλεκτρικού ρεύματος και δεξιά η ροή 10 λεπτά μετά την εφαρμογή του ηλεκτρικού ρεύματος.

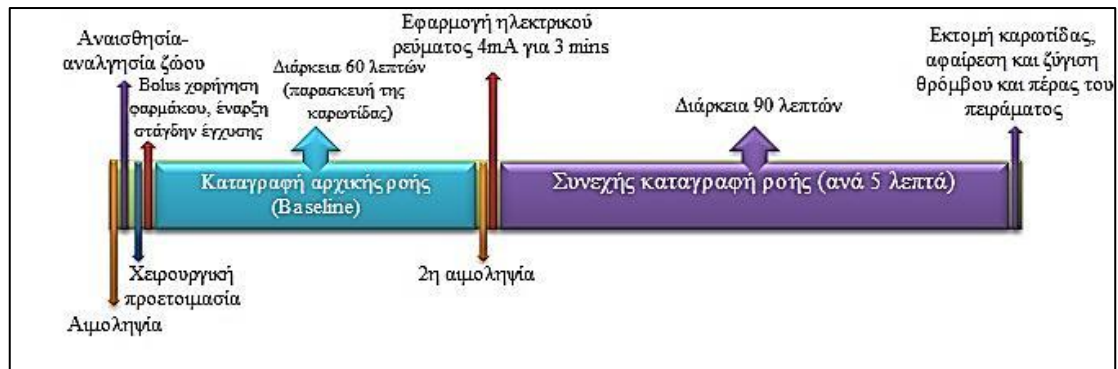
### ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΤΗΣ ΑΣΦΑΛΕΙΑΣ

Η αξιολόγηση των αιμορραγικών επιπλοκών των ουσιών που εξετάζονται γίνεται μία ώρα μετά τη bolus χορήγηση της μισής από τη συνολική δόση του πεπτιδίου που θα χορηγηθεί και αμέσως μετά την εφαρμογή του ηλεκτρικού ρεύματος στην καρωτίδα αρτηρία. Για το σκοπό αυτό, στο κοιλιακό τοίχωμα του ζώου πραγματοποιείται μία τομή μήκους 4 εκατοστών και βάθους 0,5 εκατοστού. Επάνω της τοποθετείται μια προζυγισμένη γάζα για 20 λεπτά. Μετά ζυγίζεται ξανά και η διαφορά του καθαρού βάρους της γάζας από το μικτό βάρος της εμποτισμένης με αίμα γάζας αποτελεί το ποσό της απώλειας αίματος.

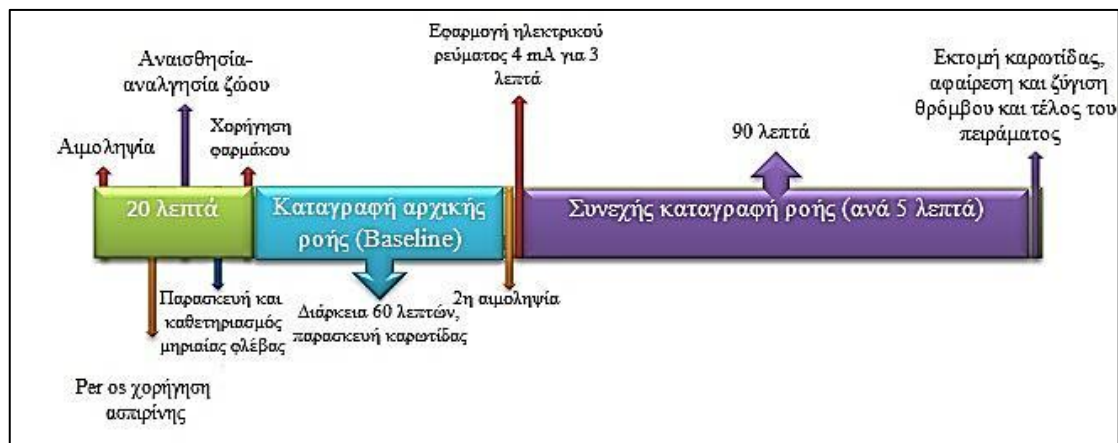
### ΒΑΡΟΣ ΤΟΥ ΘΡΟΜΒΟΥ

Στο τέλος του πειράματος (90 λεπτά μετά το σχηματισμό του θρόμβου εάν το αγγείο παραμένει βατό ή νωρίτερα εάν το αγγείο έχει αποφραχθεί) η καρωτίδα απολινώνεται περιφερικά και κεντρικά της βλάβης και εκτέμνεται. Ο θρόμβος αφαιρείται και τοποθετείται σε ένα κομμάτι προζυγισμένου διηθητικού χαρτιού. Εν συνεχεία ζυγίζεται και το βάρος του υπολογίζεται σα τη διαφορά του μεικτού βάρους μείον το καθαρό βάρος του διηθητικού χαρτιού.

Οι χρόνοι του πειράματος απεικονίζονται παρακάτω:



**Εικ. 82:** η πειραματική διαδικασία με χορήγηση πεπτιδίου.



**Εικ. 83:** η πειραματική διαδικασία όπως διαμορφώνεται για τη μελέτη συνδυασμένης χορήγησης ασπιρίνης και πεπτιδίου.

## EX VIVO ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

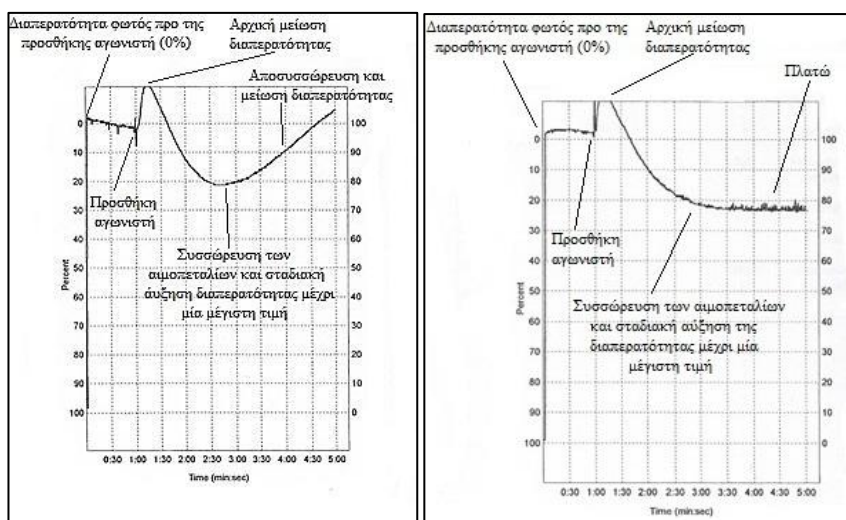
### ΣΥΣΣΩΡΕΥΟΜΕΤΡΙΑ ΑΙΜΟΠΕΤΑΛΙΩΝ

Η μέθοδος για τη μελέτη της λειτουργικότητας των αιμοπεταλίων είναι ο προσδιορισμός της συσσώρευσής τους βάσει της νεφελομετρικής μεθόδου κατά Born. Βασίζεται στην αρχή ότι η οπτική πυκνότητα ενός εναιωρήματος σωματιδίων εξαρτάται από τον αριθμό των σωματιδίων και όχι από το μέγεθός τους .

Το συσσωρευόμετρο είναι ένα φασματοφωτόμετρο σταθερού μήκους κύματος με δύο θέσεις δειγμάτων που θερμαίνεται στους 37 °C (για εξομοίωση των in vivo

συνθηκών). Τα δείγματα αναδεύονται διότι η επαφή μεταξύ των αιμοπεταλίων είναι απαραίτητη για την *in vitro* συσσώρευσή τους. Η διαδικασία της συσσώρευσης καταγράφεται φωτομετρικά και αναπαρίσταται ως κατερχόμενη καμπύλη ενώ η συσσωρευτική ικανότητα των αιμοπεταλίων κρίνεται βάσει των αλλαγών στη διαπερατότητα του διαλύματος από το φως.

Μια ακτίνα υπέρυθρου φωτός περνά μέσα από τις δύο κυψελίδες που περιέχουν πλάσμα πλούσιο σε αιμοπετάλια (Platelet Rich Plasma – PRP) και πλάσμα φτωχό σε αιμοπετάλια (Platelet Poor Plasma – PPP). Φωτοδίοδοι σιλικόνης ανιχνεύουν το φως που διαπερνά τις δυο κυψελίδες. Αυθαίρετα, το φως που διαπερνά την κυψελίδα που περιέχει PRP (πριν την προσθήκη αγωνιστή) θεωρείται ως 0% διαπερατότητα ή αλλιώς 0% συσσώρευση και το φως που διαπερνά την κυψελίδα που περιέχει PPP θεωρείται ως 100% διαπερατότητα ή αλλιώς 100% συσσώρευση. Όταν ένας διεγέρτης (αγωνιστής συσσώρευσης) προστίθεται σε PRP, τα αιμοπετάλια αντιδρούν όπως έχει περιγραφεί, με αποτέλεσμα αλλαγές στην διαπερατότητα του φωτός: αρχικά, το αυξημένο μέγεθος των αιμοπεταλίων το οποίο προκύπτει κατά την αλλαγή του σχήματός τους ως απάντηση στην προσθήκη του διεγέρτη, επιτρέπει σε λιγότερο φως να περάσει από την κυψελίδα και αυτό καταγράφεται ως μικρότερη διαπερατότητα. Κατόπιν τα αιμοπετάλια προσκολλώνται το ένα στο άλλο και σχηματίζουν συσσωρεύματα με αποτέλεσμα περισσότερο φως να διαπερνά την κυψελίδα, κάτι που καταγράφεται ως μεγαλύτερη διαπερατότητα (εικ. 84).



**Εικ. 84:**  
 παραδείγματα ex  
 vivo  
 συσσωρευομετρίας



Όπως φαίνεται στην εικόνα 84, η καταγραφή της ex vivo συσσώρευσης χαρακτηρίζεται από(396):

1. την αλλαγή σχήματος των αιμοπεταλίων (μικρή ανερχόμενη καμπύλη, μείωση διαπερατότητας).
2. τη μέγιστη αύξηση στη διαπερατότητα του φωτός που προκαλείται μετά την προσθήκη του αγωνιστή (% συσσώρευση).
3. τον ρυθμό της συσσώρευσης (% μεταβολή συσσώρευσης ανά min).
4. την πρωτογενή συσσώρευση (κατερχόμενη καμπύλη, αύξηση διαπερατότητας) η οποία οδηγεί είτε σε αποσυσσώρευση (ανερχόμενη καμπύλη, μείωση διαπερατότητας) είτε σε ένα σταθερό πλατώ (ευθεία γραμμή, σταθερή διαπερατότητα).
5. Ενίοτε τη δευτερογενή συσσώρευση (δεν καταγράφεται στις παραπάνω εικόνες), που συμβαίνει όταν τα αιμοπετάλια εκκρίνουν τα συστατικά των κοκκίων τους. Αυτά προκαλούν μία επιπρόσθετη συσσώρευση (δεύτερη κατερχόμενη καμπύλη, επιπρόσθετη αύξηση διαπερατότητας).

Για τη συσσωρευομετρία χρησιμοποιούνται τα παρακάτω όργανα και αντιδραστήρια:

- Κιτρικό οξύ (C<sub>6</sub>H<sub>8</sub>O<sub>7</sub>. M.B. : 192,13, Merck)
- Κιτρικό νάτριο(C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>Na<sub>3</sub>O<sub>7</sub> H<sub>2</sub>O, M.B. : 294,10, Merck)
- D(+) Γλυκόζη [(HOCH<sub>2</sub>CH(CHOH)<sub>4</sub>O, M.B.:180,16, Fluka]
- Οξαλικό αμμώνιο [(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>C<sub>2</sub>O<sub>4</sub> H<sub>2</sub>), M.B. :142,11 Mallinckrodt]
- Διφωσφορική αδενοσίνη (ADP, Chrono-Log)
- Κολλαγόνο [(collagen, Chrono-Log,διάλυμα stock 1 mg/ml)]
- Αραχιδονικό οξύ (AA, Chrono-Log, σε μορφή ελαίου)
- Φυγόκεντρος πάγκου (Hermle, Z 320)
- Αιματοκυτόμετρο (Neubauer)
- Μικροσκόπιο (Olympus)
- Συσσωρευόμετρο (Aggregometer, Chrono-Log)
- Καταγραφικό (Chrono-Log)
- Γυάλινες κυψελίδες συσσώρευσης (Chrono-Log)
- Ειδικά μαγνητάκια συσσώρευσης (Chrono-Log)

Χρησιμοποιούνται επίσης τα παρακάτω διαλύματα εργασίας:

- Αντιπηκτικό διάλυμα κιτρικών αλάτων (ACD): 0,8 gr κιτρικού οξέος, 2,2 gr κιτρικού νατρίου και 2,5 gr D(+) γλυκόζης διαλύονται σε 100 ml αποσταγμένου ύδατος. Το διάλυμα αποθηκεύεται στους 4 °C.
- Διάλυμα οξαλικού αμμωνίου: 1 gr οξαλικού αμμωνίου διαλύεται σε 100 ml αποσταγμένου ύδατος. Το διάλυμα αποθηκεύεται στους 4 °C.
- Διάλυμα 20 mM διφωσφορικής αδενοσίνης (ADP): 50 mg λυοφιλοποιημένου ADP διαλύονται σε 5 ml φυσιολογικού ορού. Το διάλυμα αποθηκεύεται στους -80 °C σε κλάσματα των 50μl.
- Διάλυμα 50 mM αραχιδονικού οξέος (AA): 10 mg διαλύονται σε 700 μl αλβουμίνης αραιωμένης με φυσιολογικό ορό. Το διάλυμα αποθηκεύεται στους -80 °C σε κλάσματα των 50 μl.

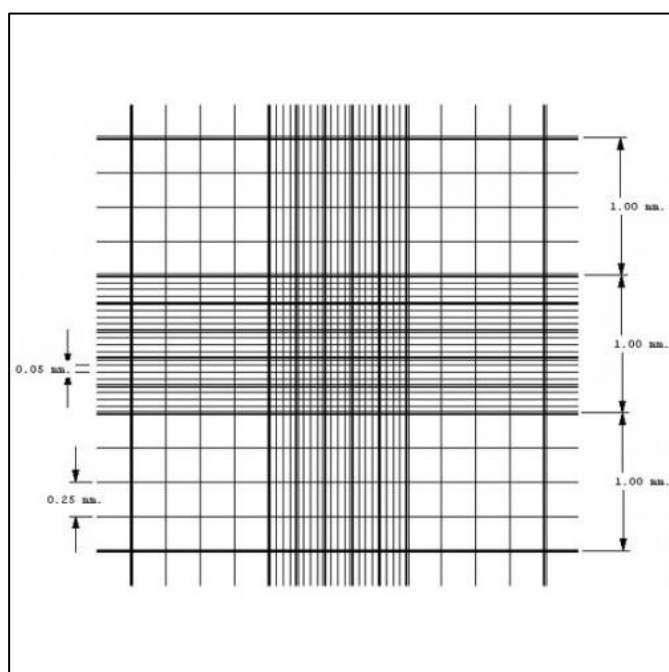
#### ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΣΥΣΣΩΡΕΥΟΜΕΤΡΙΑΣ

Η ex vivo διαδικασία ξεκινά με την παρασκευή των PRP και PPP. Κατά τις αιμοληψίες από τη μέση ωτιαία αρτηρία του ζώου, συλλέγονται 8,9 ml αίματος σε σωληνάκι πολυπροπυλενίου που περιέχει αντιπηκτικό διάλυμα ACD (9 μέρη αίματος /1 μέρος διαλύματος ACD). Το σωληνάκι αναδεύεται ήπια (προκειμένου να αποφευχθεί η αιμόλυση) για λίγα δευτερόλεπτα, με σκοπό την πλήρη ανάμειξη του αίματος με το αντιπηκτικό και την αποτροπή της πήξης. Το δείγμα φυγοκεντρείται στις 1400-1500 rpm για 15 λεπτά. Το υπερκείμενο πλάσμα είναι πλούσιο σε αιμοπετάλια (Platelet Rich Plasma – PRP). Λαμβάνονται 2-3 ml από αυτό και τοποθετούνται σε σωληνάκι πολυπροπυλενίου με καπάκι για να μη μεταβληθεί το pH (7,2-7,4). Σε διαφορετικές τιμές παρατηρείται διαταραχή της αντιδραστικότητας των αιμοπεταλίων. Πιο συγκεκριμένα, σε pH 6 αναστέλλεται πλήρως η συσσώρευσή τους, ενώ σε υψηλότερο pH αυξάνει (σε pH 8 μπορεί να συμβεί αυθόρμητη συσσώρευση). Το υπόλοιπο διάλυμα φυγοκεντρείται στις 3500 rpm για 15 λεπτά. Προκύπτει έτσι το PPP το οποίο λαμβάνεται και τοποθετείται σε σωληνάκι πολυπροπυλενίου με καπάκι.

Στη συνέχεια υπολογίζεται ο αριθμός των αιμοπεταλίων στο PRP: 10 μl PRP αναμιγνύονται ήπια με 190 μl διαλύματος οξαλικού αμμωνίου. Από το μείγμα που προκύπτει, 10 μl τοποθετούνται σε αιματοκυτόμετρο Neubauer (εικ. 85) και αφήνονται σε υγρό περιβάλλον ενός τρυβλίου Petri για 15 λεπτά. Η μέτρηση των

αιμοπεταλίων στο μικροσκόπιο γίνεται ως εξής: μετρώνται 5 μέτριου μεγέθους τετράγωνα του κεντρικού μεγάλου τετράγωνα του αιματοκυτομέτρου. Γνωρίζοντας ότι το καθένα από τα 5 τετράγωνα καταλαμβάνει όγκο  $0,004 \text{ mm}^3$  υπολογίζεται ο συνολικός αριθμός των αιμοπεταλίων στο PRP ανά  $\text{mm}^3$  ή ανά μl βάσει του εξής τύπου:

$$\frac{(\text{Μέση τιμή αιμοπεταλίων των 5 τετράγωνων}) \times 1 \text{ mm}^3 \times 20}{0.004 \text{ mm}^3}$$



**Εικ. 85:** το αιματοκυτόμετρο Neubauer

Βάσει του αριθμού αιμοπεταλίων ανά μl γίνεται αραιώση του PRP με το ομόλογο PPP ώστε να ρυθμιστεί η συγκέντρωση των αιμοπεταλίων στα 250.000 αιμοπετάλια/μl. Το αραιωμένο PRP που προκύπτει είναι αυτό που θα τοποθετηθεί στις κυψελίδες του συσσωρευομέτρου για να υπολογιστεί η συσσώρευση των αιμοπεταλίων από τις δύο αιμοληψίες: την πρώτη στην αρχή του πειράματος, και τη δεύτερη μία ώρα μετά τη bolus χορήγηση της μισής δόσης του πεπτιδίου (ή 80 λεπτά μετά την per os χορήγηση της ασπιρίνης εάν αναφερόμαστε σε πείραμα συνδυασμού ασπιρίνης-πεπτιδίου) και αμέσως πριν την εφαρμογή του ηλεκτρικού ρεύματος για το σχηματισμό του θρόμβου.

Συσσωρευομετρία ex vivo: αρχικά προστίθενται 500 μl αραιωμένου PRP το οποίο έχει προκύψει πριν τη χορήγηση οποιασδήποτε ουσίας (πρώτη αιμοληψία) σε γυάλινη κυψελίδα η οποία τοποθετείται στο συσσωρευόμετρο και μετά από αναμονή ακριβώς 1 min προστίθεται σε αυτήν ο αγωνιστής (Υπενθυμίζεται ότι στο συσσωρευόμετρο έχει τοποθετηθεί και δεύτερη κυψελίδα με PPP). Γίνεται τώρα καταγραφή της συσσώρευσης για 3 min. Με τον τρόπο αυτό γίνεται η λήψη μέτρησης της αρχικής συσσώρευσης, πριν την χορήγηση οποιασδήποτε ουσίας (control). Μετά τη δεύτερη αιμοληψία, προστίθενται σε γυάλινη κυψελίδα 500 μl αραιωμένου PRP που είχε προκύψει από αυτήν. Η κυψελίδα τοποθετείται στο συσσωρευόμετρο και μετά από αναμονή ακριβώς 1 min προστίθεται σε αυτήν ο αγωνιστής και γίνεται πάλι καταγραφή της συσσώρευσης για 3 min. Με τον τρόπο αυτό προκύπτει η μέτρηση δείγματος μετά από την χορήγηση της εκάστοτε ουσίας (60 λεπτά μετά τη bolus χορήγηση της ουσίας σε πειράματα με απλή χορήγηση πεπτιδίου και 80 λεπτά μετά την per os χορήγηση της ασπιρίνης σε πειράματα συνδυασμού). Η αναστολή της συσσώρευσης εκφράζεται σε ποσοστό % βάσει του εξής τύπου:

$$\% \text{ αναστολή} = \frac{\text{συσσώρευση δείγματος control} - \text{συσσώρευση δείγματος μετά από έγχυση για 60 λεπτά}}{\text{συσσώρευση control}} \times 100$$

### **ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ**

Για την στατιστική ανάλυση μεταξύ των υποομάδων χρησιμοποιήθηκε το στατιστικό τεστ ANOVA με post hoc ανάλυση (ειδικότερα χρησιμοποιήθηκαν τα Bonferroni και Tukey post hoc tests). Χρησιμοποιήθηκε το στατιστικό πρόγραμμα IBM SPSS statistics v.20.0. Τα αποτελέσματα κρίθηκαν στατιστικά σημαντικά για τιμές  $p < 0.05$ .

# ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2<sup>ο</sup>:

### ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

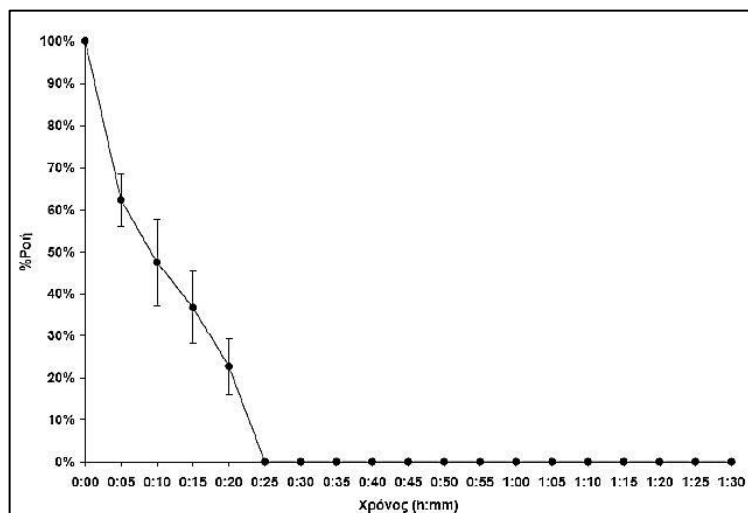
## ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΣΥΣΣΩΡΕΥΣΗΣ ΤΩΝ ΑΙΜΟΠΕΤΑΛΙΩΝ IN VIVO

### ΣΥΝΘΕΤΙΚΟ ΠΕΠΤΙΔΙΟ YMESRADR

Παρακάτω παρουσιάζονται συνοπτικά τα αποτελέσματα της μελέτης της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων in vivo για τις δόσεις του πεπτιδίου YMESRADR που μελετήθηκαν. Αποτελούν τα αποτελέσματα της έρευνας του Νικολάου Παπαμιχαήλ επάνω στα οποία βασίστηκε η παρούσα μελέτη. Έχουν δημοσιευθεί στη Διδακτορική του Διατριβή με τίτλο «Σύγκριση νεώτερων συνθετικών αναστολέων της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων με κλασικούς αναστολείς της έκφρασης των γλυκοπρωτεϊνικών υποδοχέων IIb/IIIa. Πειραματική μελέτη». Είναι επίσης δημοσιευμένα στο περιοδικό Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics(365). Οι παρακάτω ομάδες αποτελούνται από 5 πειράματα η κάθε μία.

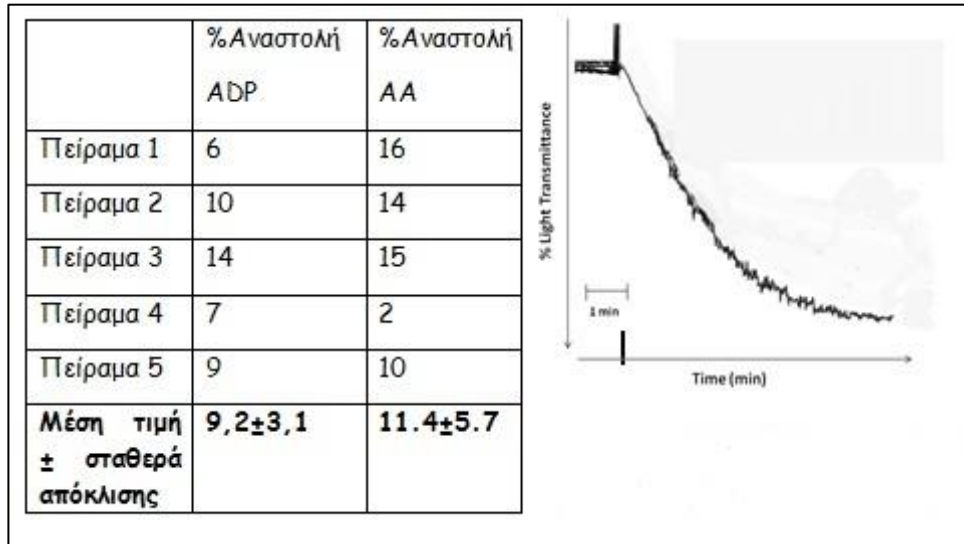
### ΟΜΑΔΑ ΕΛΕΓΧΟΥ (CONTROL)

Στην ομάδα ελέγχου (placebo), η μέση αρχική ροή στην καρωτίδα ήταν  $23,6 \pm 2,9$  ml/min. Μετά την επαγωγή του θρόμβου η καρωτίδα του πειραματόζωου αποφράχθηκε πλήρως σε χρόνο  $23,3 \pm 3,2$  λεπτά (εικ. 86).



**Εικ. 86:** η επί τοις εκατό μεταβολή της ροής του αίματος στην καρωτίδα για την ομάδα του placebo (control) με την πάροδο του χρόνου (ξεκινώντας άμεσα μετά την εφαρμογή του ηλεκτρικού ρεύματος έως την απόφραξη και το τέλος του πειράματος).

Ο φυσιολογικός ορός προκάλεσε μέση αναστολή της συσσώρευσης με αγωνιστές ADP και AA κατά  $9,2\pm 3,1\%$  και  $11.4\pm 5.7$  αντίστοιχα (εικ. 87). Το μέσο βάρος του θρόμβου που προέκυψε ήταν  $5,72\pm 0,86$  mg (πίνακας 13). Η ποσότητα του αίματος που συγκεντρώθηκε στην προζυγισμένη γάζα ήταν  $256,4\pm 88,4$  mg. Ο μέσος χρόνος αιμορραγίας της ομάδας ελέγχου ήταν  $30,0\pm 0,0$  sec (πίνακας 14).



**Εικ 87:** Αναστολή της ex vivo συσσώρευσης των αιμοπεταλίων του κουνελιού στην ομάδα του placebo (control).

	Βάρος θρόμβου (mg)
Πείραμα 1	6,5
Πείραμα 2	4,5
Πείραμα 3	5,4
Πείραμα 4	6,6
Πείραμα 5	5,6
<b>Μέση τιμή ± σταθερά απόκλισης</b>	<b><math>5,72\pm 0,86</math></b>

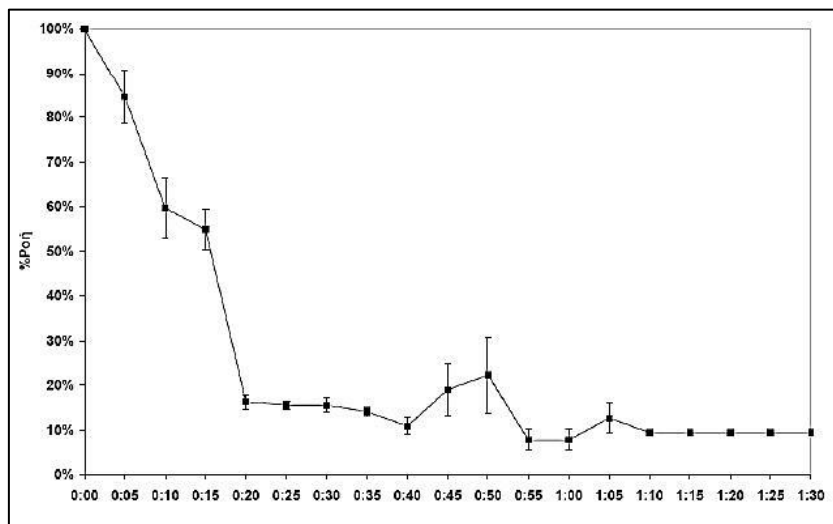
**Πίνακας 13:** Βάρος θρόμβου στην ομάδα του Placebo (control).

	Ποσό αιμορραγίας (mg)	Χρόνος αιμορραγίας (sec)
Πείραμα 1	383	30
Πείραμα 2	256	30
Πείραμα 3	145	30
Πείραμα 4	212	30
Πείραμα 5	286	30
<b>Μέση τιμή ± σταθερά απόκλισης</b>	<b>256,4±88,4</b>	<b>30,0±0,0</b>

**Πίνακας 14:** ποσότητα και χρόνος αιμορραγίας της ομάδας του placebo (control).

#### ΟΜΑΔΑ ΠΕΠΤΙΔΙΟΥ YMESRADR ΣΕ ΔΟΣΗ 3 mg/kg

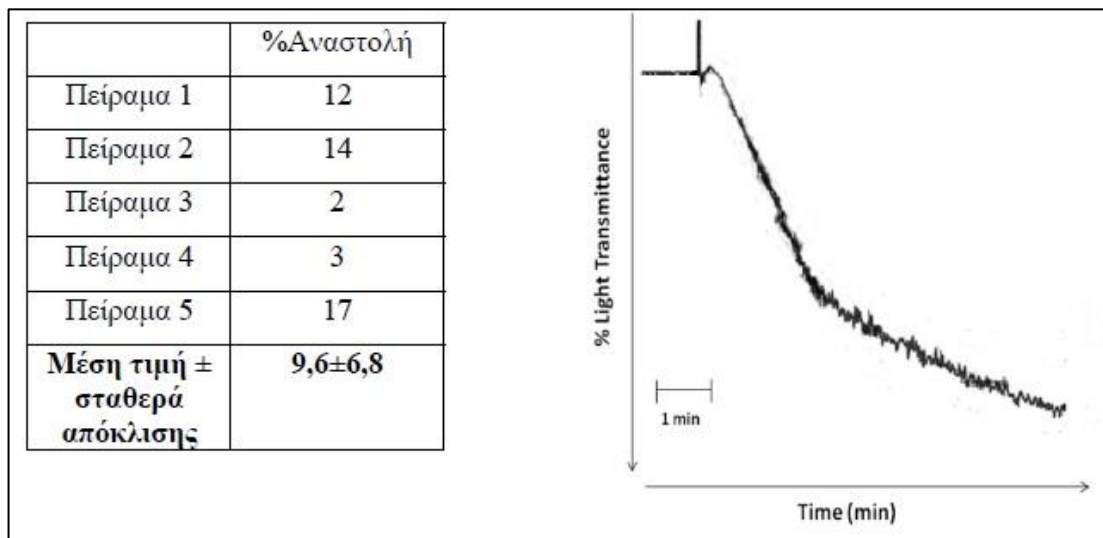
Στην ομάδα του πεπτιδίου σε δόση 3 mg/kg, η μέση αρχική ροή στην καρωτίδα ήταν 21,3±1,5 ml/min. Μετά την επαγωγή του θρόμβου η ροή στην καρωτίδα του πειραματόζωου στο τέλος του πειράματος ήταν 9,4±0,0% της αρχικής (εικ 88).



**Εικ. 88:** η επί τοις εκατό μεταβολή της ροής του αίματος στην καρωτίδα για την ομάδα του πεπτιδίου YMESRADR 3 mg/kg με την πάροδο του χρόνου (ξεκινώντας άμεσα μετά την εφαρμογή του ηλεκτρικού ρεύματος έως 90 λεπτά μετά την εφαρμογή του).



Το πεπτιδίο σε δόση 3 mg/kg προκάλεσε μέση αναστολή της συσσώρευσης κατά  $9,6 \pm 6,8\%$  (εικ 89). Το μέσο βάρος του θρόμβου που προέκυψε ήταν  $4,91 \pm 1,90$  mg (πίνακας 15). Η ποσότητα του αίματος που συγκεντρώθηκε στην προζυγισμένη γάζα ήταν  $224,7 \pm 61,2$  mg. Ο μέσος χρόνος αιμορραγίας της ομάδας του πεπτιδίου ήταν  $33,2 \pm 5,7$  sec (πίνακας 16).



**Εικ. 89:** αναστολή της ex vivo συσσώρευσης των αιμοπεταλίων για την ομάδα του πεπτιδίου Ymesradr 3 mg/kg.

	Βάρος θρόμβου (mg)
Πείραμα 1	3,0
Πείραμα 2	3,1
Πείραμα 3	6,9
Πείραμα 4	6,8
Πείραμα 5	4,8
<b>Μέση τιμή ± σταθερά απόκλισης</b>	<b>4,91±1,90</b>

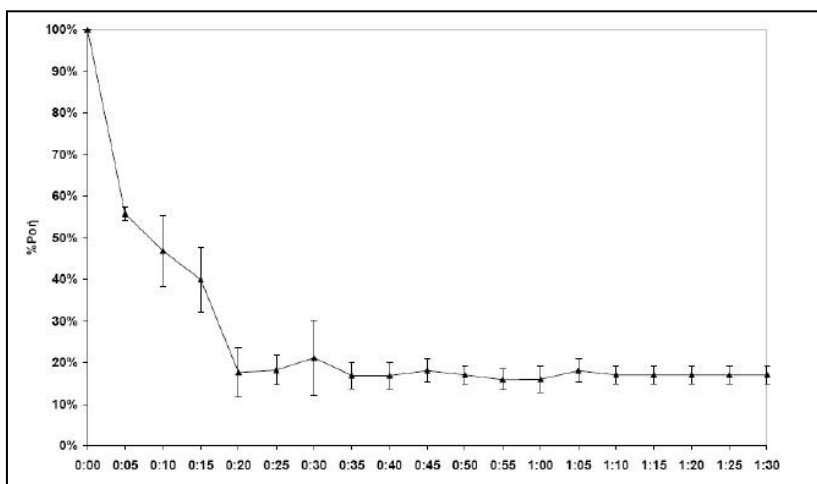
**Πίνακας 15:** βάρος του θρόμβου για την ομάδα του πεπτιδίου YMESRADR 3 mg/kg.

	Ποσό αιμορραγίας (mg)	Χρόνος αιμορραγίας (sec)
Πείραμα 1	185	30
Πείραμα 2	168	70
Πείραμα 3	212	30
Πείραμα 4	322	40
Πείραμα 5	237	30
<b>Μέση τιμή ± σταθερά απόκλισης</b>	<b>224,7±61.2</b>	<b>33,2±5,7</b>

**Πίνακας 16:** ποσότητα και χρόνος αιμορραγίας για την ομάδα του πεπτιδίου YMESRADR 3 mg/kg.

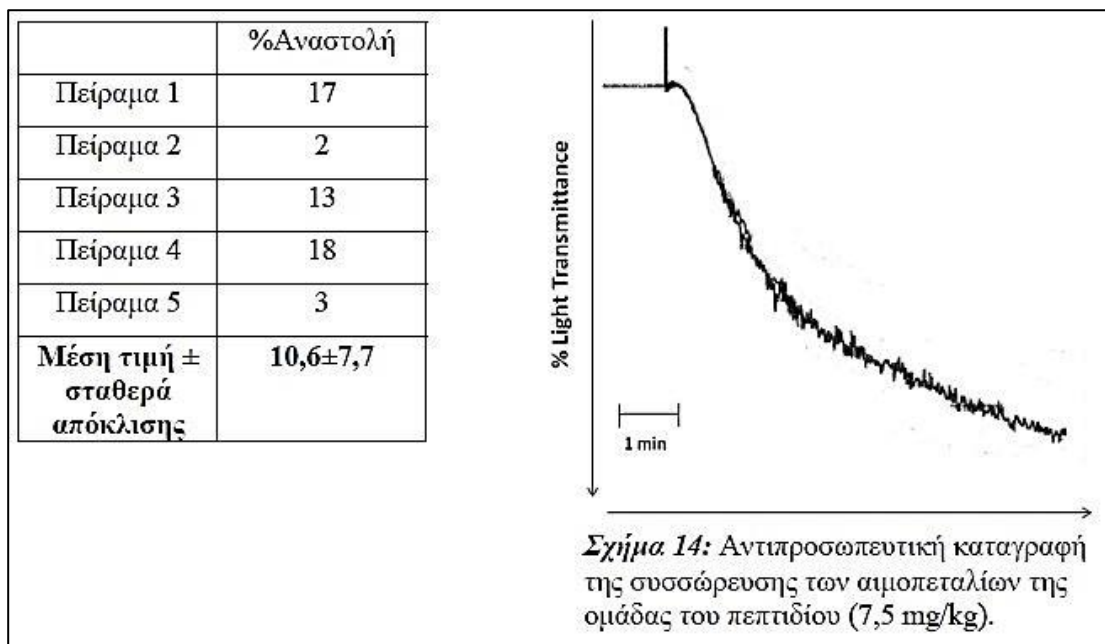
#### ΟΜΑΔΑ ΠΕΠΤΙΔΙΟΥ YMESRADRD ΣΕ ΔΟΣΗ 7,5 mg/kg

Στην ομάδα του πεπτιδίου σε δόση 7,5 mg/kg, η μέση αρχική ροή στην καρωτίδα ήταν  $21,0 \pm 1,4$  ml/min. Μετά την επαγωγή του θρόμβου η ροή στην καρωτίδα του πειραματόζωου στο τέλος του πειράματος ήταν  $17,0\% \pm 2,0\%$  της αρχικής (εικ. 90).



**Εικ. 90:** η επί τοις εκατό μεταβολή της ροής του αίματος στην καρωτίδα για την ομάδα του πεπτιδίου YMESRADRD 7,5 mg/kg με την πάροδο του χρόνου (ξεκινώντας άμεσα μετά την εφαρμογή του ηλεκτρικού ρεύματος έως 90 λεπτά μετά την εφαρμογή του).

Το πεπτιδίο σε δόση 7.5 mg/kg προκάλεσε μέση αναστολή της συσσώρευσης κατά  $10,6\pm 7,7\%$  (εικ. 91). Το μέσο βάρος του θρόμβου που προέκυψε ήταν  $4,67\pm 2,55$  mg (εικ. 17). Η ποσότητα του αίματος που συγκεντρώθηκε στην προζυγισμένη γάζα ήταν  $225,5\pm 42,3$  mg. Ο μέσος χρόνος αιμορραγίας της ομάδας του πεπτιδίου ήταν  $36,6\pm 5,7$  sec (πίνακας 18).



**Εικ. 91:** αναστολή της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων για την ομάδα του πεπτιδίου YMESRADR 7,5 mg/kg

	Βάρος θρόμβου (mg)
Πείραμα 1	3,2
Πείραμα 2	8,5
Πείραμα 3	3,7
Πείραμα 4	3,3
Πείραμα 5	4,6
<b>Μέση τιμή ± σταθερά απόκλισης</b>	<b>4,67±2,55</b>

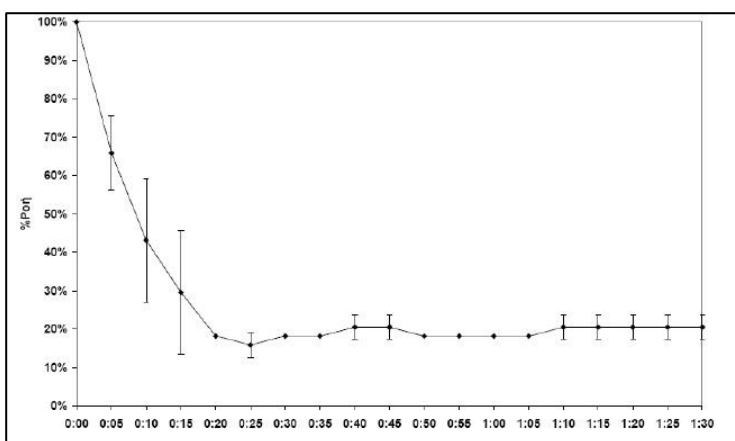
**Πίνακας 17:** Βάρος του θρόμβου για την ομάδα του YMESRADR 7,5 mg/kg.

	Ποσό αιμορραγίας (mg)	Χρόνος αιμορραγίας (sec)
Πείραμα 1	217	40
Πείραμα 2	181	40
Πείραμα 3	221	30
Πείραμα 4	283	30
Πείραμα 5	225	30
<b>Μέση τιμή ± σταθερά απόκλισης</b>	<b>225,5±42,3</b>	<b>36,6±5,7</b>

**Πίνακας 18:** ποσότητα και χρόνος της αιμορραγίας για την ομάδα του YMESRADR 7,5 mg/kg.

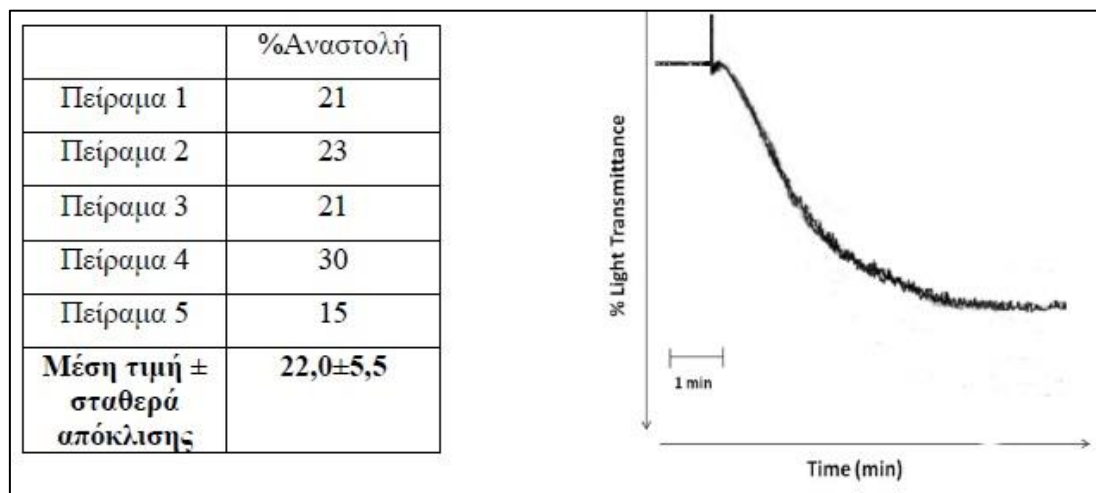
#### ΟΜΑΔΑ ΠΕΠΤΙΔΙΟΥ YMESRADR ΣΕ ΔΟΣΗ 12 mg/kg

Στην ομάδα του πεπτιδίου σε δόση 12 mg/kg, η μέση αρχική ροή στην καρωτίδα ήταν 22,0±2,0 ml/min. Μετά την επαγωγή του θρόμβου η ροή στην καρωτίδα του πειραματόζωου στο τέλος του πειράματος ήταν 20,4±3,2% της αρχικής (εικ. 92).



**Εικ. 92:** η επί τοις εκατό μεταβολή της ροής του αίματος στην καρωτίδα για την ομάδα του πεπτιδίου YMESRADR 12 mg/kg με την πάροδο του χρόνου (ξεκινώντας άμεσα μετά την εφαρμογή του ηλεκτρικού ρεύματος έως 90 λεπτά μετά την εφαρμογή του, τέλος του πειράματος).

Το πεπτιδίο σε δόση 12 mg/kg προκάλεσε μέση αναστολή της συσσώρευσης κατά  $22,0 \pm 5,5\%$  (εικ. 93). Το μέσο βάρος του θρόμβου που προέκυψε ήταν  $3,15 \pm 2,19$  mg (πίνακας 19). Η ποσότητα του αίματος που συγκεντρώθηκε στην προζυγισμένη γάζα ήταν  $208,2 \pm 32,4$  mg. Ο μέσος χρόνος αιμορραγίας της ομάδας του πεπτιδίου ήταν  $40,0 \pm 7,0$  sec (πίνακας 20).



**Εικ. 93:** αναστολή της ex vivo συσσώρευσης των αιμοπεταλίων για την ομάδα του YMESRADR 12 mg/kg.

	Βάρος θρόμβου (mg)
Πείραμα 1	3,2
Πείραμα 2	8,5
Πείραμα 3	3,7
Πείραμα 4	3,3
Πείραμα 5	4,6
<b>Μέση τιμή ± σταθερά απόκλισης</b>	<b>3,15±2,19</b>

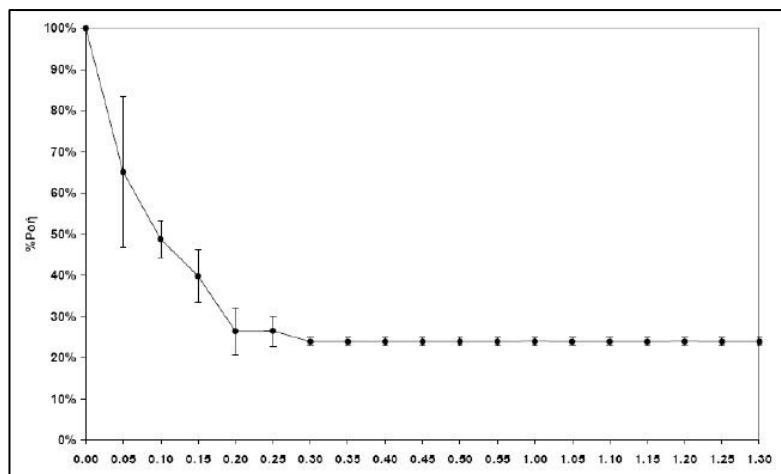
**Πίνακας 19:** βάρος του θρόμβου για την ομάδα του YMESRADR 12 mg/kg.

	Ποσό αιμορραγίας (mg)	Χρόνος αιμορραγίας (sec)
Πείραμα 1	188	50
Πείραμα 2	256	40
Πείραμα 3	201	30
Πείραμα 4	188	40
Πείραμα 5	208	40
<b>Μέση τιμή ± σταθερά απόκλισης</b>	<b>208,2±32,4</b>	<b>40,0±7,0</b>

**Πίνακας 20:** ποσότητα και χρόνος αιμορραγίας για την ομάδα του YMESRADR 12 mg/kg.

#### ΟΜΑΔΑ ΠΕΠΤΙΔΙΟΥ YMESRADR ΣΕ ΔΟΣΗ 15 mg/kg

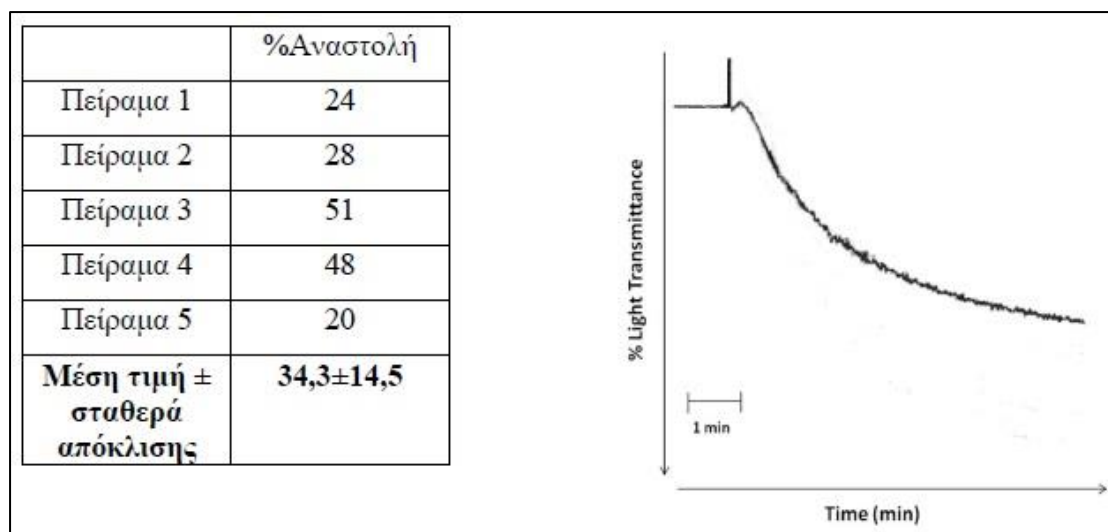
Στην ομάδα του πεπτιδίου σε δόση 15 mg/kg, η μέση αρχική ροή στην καρωτίδα ήταν 19,4±1,7 ml/min. Μετά την επαγωγή του θρόμβου, η ροή στην καρωτίδα του πειραματόζωου στο τέλος του πειράματος ήταν 25,8±0,9% της αρχικής (εικ. 94).



**Εικ. 94:** η επί τοις εκατό μεταβολή της ροής του αίματος στην καρωτίδα για την ομάδα του πεπτιδίου YMESRADR 15 mg/kg με την πάροδο του χρόνου (ξεκινώντας άμεσα μετά την εφαρμογή του ηλεκτρικού ρεύματος έως 90 λεπτά μετά την εφαρμογή του).

Το πεπτίδιο σε δόση 15 mg/kg προκάλεσε μέση αναστολή της συσσώρευσης κατά 34,3±14,5% (εικ. 95). Το μέσο βάρος του θρόμβου που προέκυψε ήταν 1,66±1,18 mg (πίνακας 21). Η ποσότητα του αίματος που συγκεντρώθηκε στην προζυγισμένη γάζα

ήταν  $224,7 \pm 61,2$  mg. Ο μέσος χρόνος αιμορραγίας της ομάδας του πεπτιδίου (15 mg/kg) ήταν  $40,0 \pm 7,0$  sec (πίνακας 22).



**Εικ. 95:** αναστολή της ex vivo συσώρευσης των αιμοπεταλίων στην ομάδα του YMESRADR σε δόση 15 mg/kg.

	Βάρος θρόμβου (mg)
Πείραμα 1	2,3
Πείραμα 2	0,3
Πείραμα 3	2,4
Πείραμα 4	0,6
Πείραμα 5	2,7
<b>Μέση τιμή ± σταθερά απόκλισης</b>	<b><math>1,66 \pm 1,18</math></b>

**Πίνακας 21:** το βάρος του θρόμβου για την ομάδα του YMESRADR 15 mg/kg.

	Ποσό αιμορραγίας (mg)	Χρόνος αιμορραγίας (sec)
Πείραμα 1	212	40
Πείραμα 2	237	50
Πείραμα 3	322	30
Πείραμα 4	185	40
Πείραμα 5	168	40
<b>Μέση τιμή ± σταθερά απόκλισης</b>	<b>224,7±61,2</b>	<b>40,0±7,0</b>

**Πίνακας 22:** Ποσότητα και χρόνος αιμορραγίας της ομάδας του YMESRADR σε δόση 15 mg/kg.

### ΣΥΝΟΛΙΚΗ ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΩΝ ΟΜΑΔΩΝ

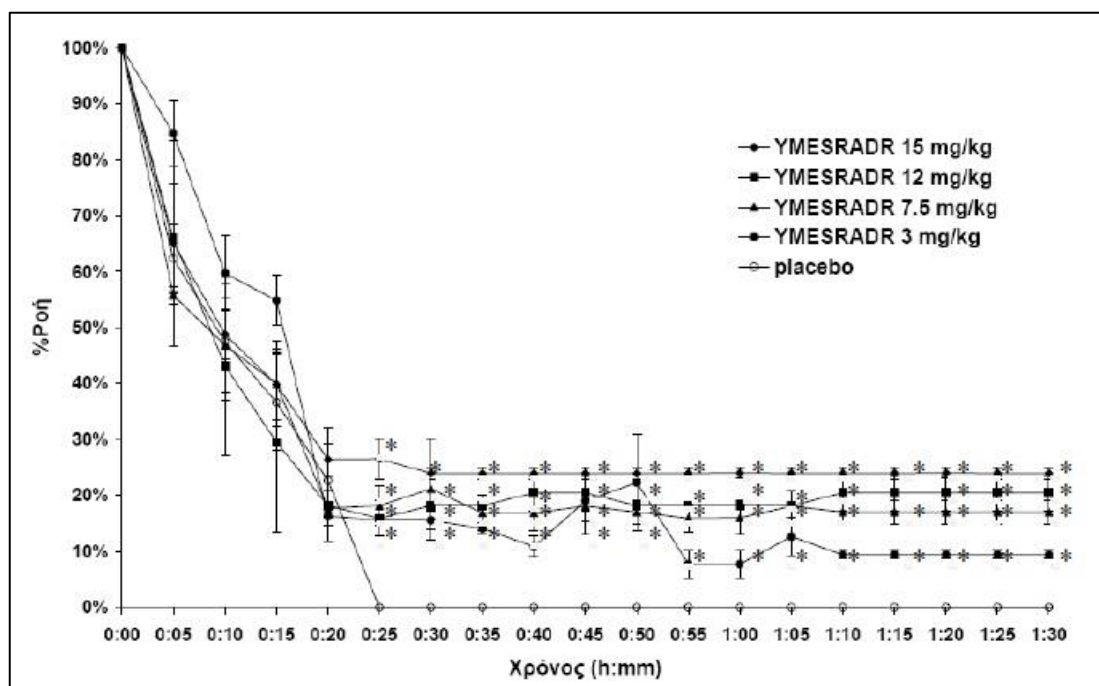
#### ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΣΤΗ ΡΟΗ ΤΟΥ ΑΓΓΕΙΟΥ:

Με εξαίρεση την ομάδα του placebo (φυσιολογικός ορός), που όπως είπαμε αποτυγχάνει να διατηρήσει τη βατότητα του αγγείου με αποτέλεσμα αυτό να αποφράσσεται σε χρόνο 23,3±3,2 λεπτά, όλες οι άλλες δοσολογίες του YMESRADR κατάφεραν να διατηρήσουν την καρωτίδα βατή έως και το τέλος του πειράματος (90 λεπτά μετά τη δημιουργία του θρόμβου) (πίνακας 23, εικ. 96).

Φαρμακευτική ουσία	% της αρχικής ροής	p
Placebo (n=5)		
YMESRADR 15 mg/kg (n=5)	25,8±0,9*	<0,001
YMESRADR 12 mg/kg (n=5)	20,4±3,2*	0,013
YMESRADR 7,5 mg/kg (n=5)	17,0±2,0*	0,009
YMESRADR 3 mg/kg (n=5)	9,4±0,0*	0,030

**Πίνακας 23:** Ροή του αίματος στην καρωτίδα του ζώου στο τέλος του πειράματος για το συνθετικό πεπτιδίο YMESRADR (90 λεπτά μετά την εφαρμογή του ηλεκτρικού ρεύματος, \*στατιστική σημαντικότητα σε σχέση με την ομάδα ελέγχου).





**Εικ. 96:** Επίδραση των δόσεων του πεπτιδίου YMESRADR στην επί τοις εκατό μεταβολή της ροής στην καρωτίδα του ζώου σε σχέση με το χρόνο (άμεσα μετά την εφαρμογή ηλεκτρικού ρεύματος και έως 90 λεπτά μετά την εφαρμογή του, placebo=ομάδα ελέγχου, \*στατιστική σημαντικότητα σε σχέση με την ομάδα ελέγχου).

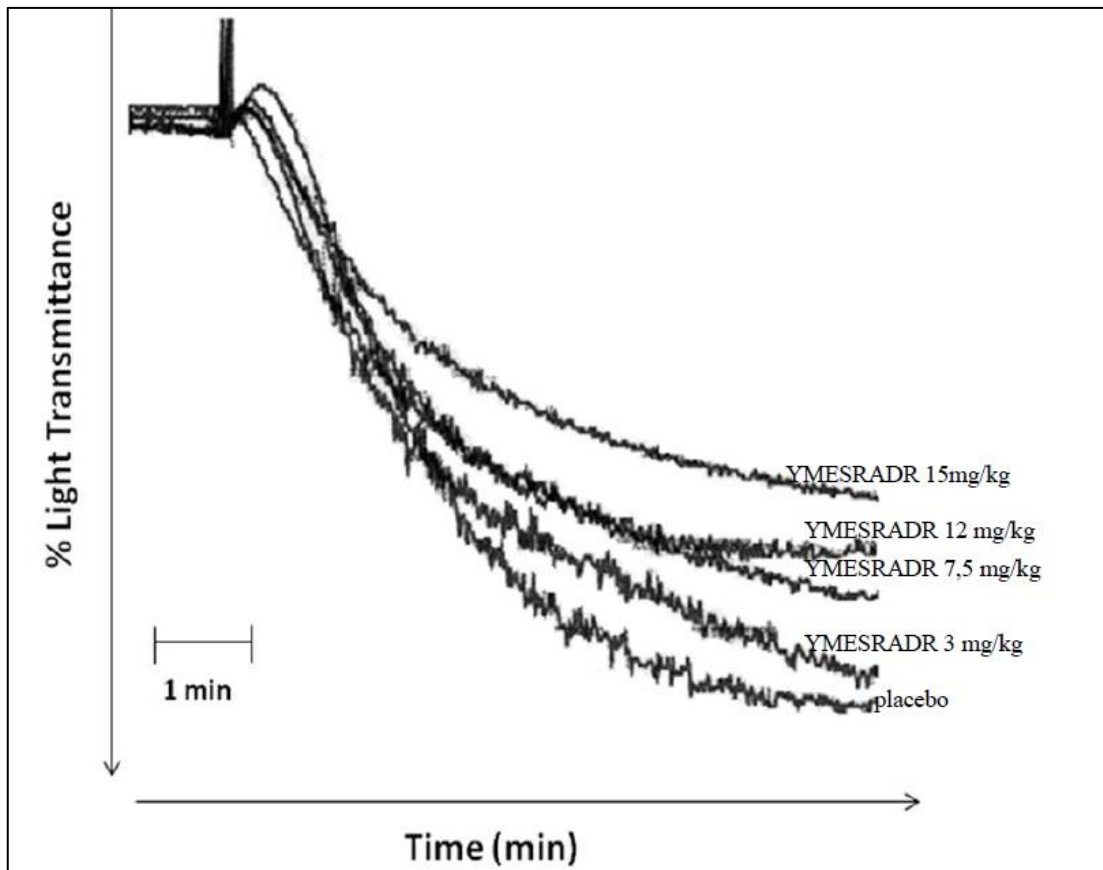
#### ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΣΤΗΝ ΕΧ VIVO ΣΥΣΣΩΡΕΥΣΗ ΤΩΝ ΑΙΜΟΠΕΤΑΛΙΩΝ:

Η επαγωγή της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων έγινε χρησιμοποιώντας το ADP ως αγωνιστή σε συγκέντρωση 20  $\mu$ M.

Φαρμακευτική ουσία	% αναστολή (ex vivo)	p
Placebo (n=5)	9,2 $\pm$ 3,1	
YMESRADR 15 mg/kg (n=5)	34,3 $\pm$ 14,5*	0,004
YMESRADR 12 mg/kg (n=5)	22,0 $\pm$ 5,5*	0,038
YMESRADR 7,5 mg/kg (n=5)	10,6 $\pm$ 7,7	1,000
YMESRADR 3 mg/kg (n=5)	9,6 $\pm$ 6,8	1,000

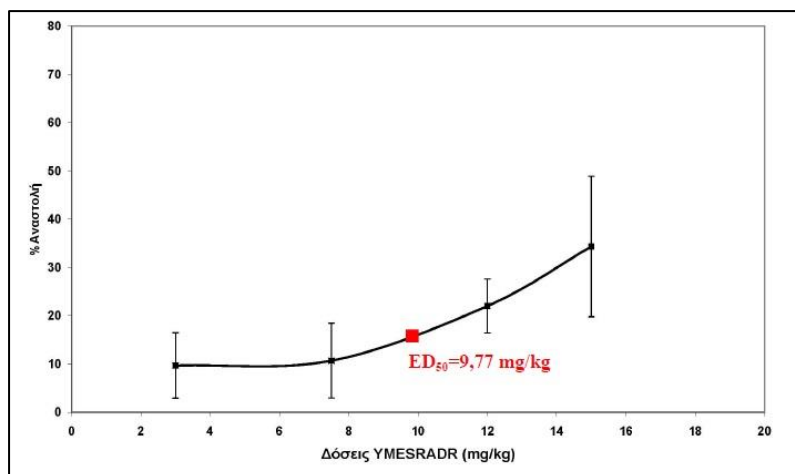
**Πίνακας 24:** οι επί τοις εκατό αναστολές της ex vivo συσσώρευσης των αιμοπεταλίων στις υποομάδες του πεπτιδίου YMESRADR με αγωνιστή το ADP 20  $\mu$ M. \*στατιστική σημαντικότητα σε σχέση με την ομάδα ελέγχου.

Το πεπτίδιο YMESRADR στις δόσεις των 12 και 15 mg/kg προκάλεσε στατιστικά σημαντική αναστολή της *ex vivo* συσσώρευσης των αιμοπεταλίων έναντι του placebo (πίνακας 24, εικ. 97), ενώ οι ομάδες των πειραματόζων που έλαβαν το πεπτίδιο σε δόσεις 3 και 7,5 mg/kg δεν παρουσίασαν στατιστικά σημαντική αναστολή σε σχέση με την ομάδα ελέγχου. Επιπλέον η ομάδα των πειραματόζων που έλαβαν το πεπτίδιο στη δόση των 15 mg/kg διέφερε στατιστικά σημαντικά, όσον αφορά στην αναστολή της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων σε σχέση με την ομάδα που έλαβε το πεπτίδιο στη δόση των 3 mg/kg. Οι αντίστοιχες αναστολές ήταν  $34,3 \pm 14,5\%$  έναντι  $9,6 \pm 6,8\%$ ,  $p=0,013$ .



**Εικ. 97:** Αντιπροσωπευτικές καμπύλες της *ex vivo* συσσώρευσης των αιμοπεταλίων στις διάφορες δόσεις του πεπτιδίου YMESRADR που δοκιμάστηκαν με αγωνιστή το ADP σε τελική συγκέντρωση 20μM.

Η δόση του πεπτιδίου YMESRADR, που αντιστοιχεί στο 50% της δραστικότητάς του, (ED50) στην *ex vivo* αναστολή της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων του κουνελιού, υπολογίστηκε στα 9,77 mg/kg (Εικ. 98).



**Εικ. 98:** Γραφική παράσταση της καμπύλης δραστηριότητας του YMESRADR και η δόση ED50.

Ανακεφαλαιώνοντας, το πεπτίδιο YMESRADR στις δόσεις των 12 και 15 mg/kg, προκάλεσε στατιστικά σημαντική αναστολή της *ex vivo* συσσώρευσης των αιμοπεταλίων.

#### ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΣΤΟ ΒΑΡΟΣ ΤΟΥ ΘΡΟΜΒΟΥ:

Το πεπτίδιο YMESRADR στη δόση των 12 mg/kg (βάρος θρόμβου  $3,15 \pm 2,19$  mg) μείωσε κατά 45% το βάρος του θρόμβου σε σχέση με την ομάδα ελέγχου ( $p=0,011$ ) (πίνακας 25). Αντίστοιχα, στη δόση των 15 mg/kg (το βάρος του θρόμβου ήταν  $1,66 \pm 1,18$  mg) το πεπτίδιο μείωσε κατά 70% το βάρος του θρόμβου σε σχέση με το placebo ( $p=0,011$ ). Στις μικρότερες δόσεις, το πεπτίδιο δεν προκάλεσε στατιστικά σημαντική μείωση του βάρους του θρόμβου.

Φαρμακευτική ουσία	Βάρος θρόμβου (mg)	p
Placebo (n=5)	$5,72 \pm 0,86$	
YMESRADR 15 mg/kg (n=5)	$1,66 \pm 1,18^*$	0,011
YMESRADR 12 mg/kg (n=5)	$3,15 \pm 2,19^*$	0,033
YMESRADR 7,5 mg/kg (n=5)	$4,67 \pm 2,55$	0,261
YMESRADR 3 mg/kg (n=5)	$4,91 \pm 1,90$	0,442

**Πίνακας 25:** Επίδραση των διαφόρων δόσεων του YMESRADR στο βάρος του σχηματισθέντος θρόμβου. (\*στατιστική σημαντικότητα σε σχέση με την ομάδα ελέγχου).

Συμπερασματικά το πεπτίδιο YMESRADR στις δόσεις των 12 και 15 mg/kg κατάφερε να μειώσει σημαντικά το βάρος του θρόμβου σε σχέση με την ομάδα ελέγχου.

**ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΣΤΗΝ ΠΟΣΟΤΗΤΑ ΚΑΙ ΤΟ ΧΡΟΝΟ ΤΗΣ ΑΙΜΟΡΡΑΓΙΑΣ (ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΤΗΣ ΑΣΦΑΛΕΙΑΣ):**

Όσον αφορά στην ποσότητα του αίματος που συγκεντρώθηκε στην προζυγισμένη γάζα (πίνακας 26) δεν εμφανίστηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές σε σχέση με την ομάδα ελέγχου στις ομάδες των ζώων που έλαβαν διάφορες δόσεις του πεπτίδιου YMESRADR.

Φαρμακευτική ουσία	Ποσότητα αιμορραγίας (mg)	p
Placebo (n=5)	256,4±88,4	
YMESRADR 15 mg/kg (n=5)	224,7±61,2	0,534
YMESRADR 12 mg/kg (n=5)	208,2±32,4	0,346
YMESRADR 7,5 mg/kg (n=5)	225,5±42,3	0,544
YMESRADR 3 mg/kg (n=5)	224,7±61,2	0,346

**Πίνακας 26:** Ποσότητα αιμορραγίας (mg) στις διάφορες ομάδες του YMESRADR.

Φαρμακευτική ουσία	Χρόνος αιμορραγίας (sec)	p
Placebo (n=5)	30,0±0,0	
YMESRADR 15 mg/kg (n=5)	40,0±7,0	0,274
YMESRADR 12 mg/kg (n=5)	40,0±7,0	0,274
YMESRADR 7,5 mg/kg (n=5)	36,6±5,7	0,768
YMESRADR 3 mg/kg (n=5)	33,2±5,7	0,892

**Πίνακας 27:** Επίδραση των διαφόρων δόσεων του YMESRADR που χορηγήθηκαν στο χρόνο αιμορραγίας (bleeding time).

Καμιά επίδραση δεν παρατηρήθηκε στο χρόνο αιμορραγίας 60 λεπτά μετά την συνεχή χορήγηση των προς εξέταση ουσιών (πίνακας 27). Το YMESRADR δεν προκάλεσε στατιστικά σημαντική επίδραση στο χρόνο αιμορραγίας.

Συνοψίζοντας, το πεπτίδιο YMESRADR διατήρησε την βατότητα στην καρωτίδα των πειραματόζωων στα οποία χορηγήθηκε σε οποιαδήποτε δόση. Η δράση αυτή του

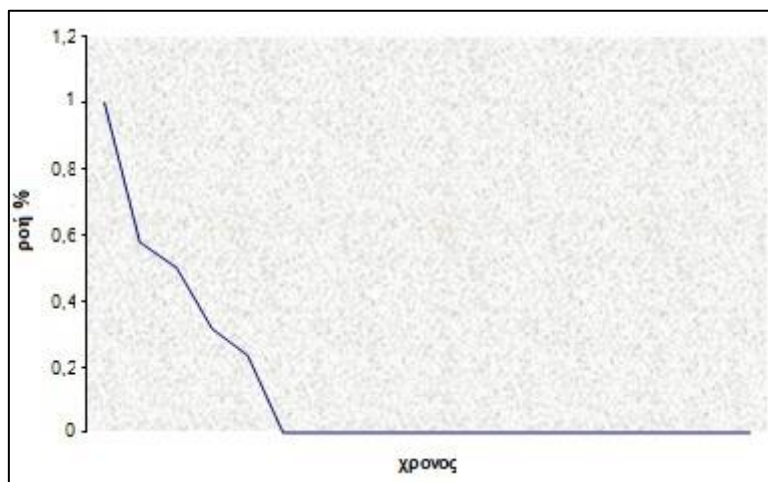
πεπτιδίου ασκήθηκε μέσω της αναστολής της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων, η οποία για τις δόσεις 12 και 15 mg/kg ήταν στατιστικά σημαντική σε σχέση με την ομάδα ελέγχου. Επιπλέον, το πεπτίδιο σε δόσεις 12 και 15 mg/kg, μείωσε στατιστικά σημαντικά το βάρος του θρόμβου σε σχέση με την ομάδα ελέγχου. Παράλληλα το πεπτίδιο YMESRADR σε όλες τις δόσεις που χορηγήθηκε αποδείχθηκε ασφαλές καθώς δεν επηρέασε στατιστικά σημαντικά το ποσό και το χρόνο της αιμορραγίας συγκριτικά με την ομάδα ελέγχου.

### **ΤΟ ΠΕΠΤΙΔΙΟ (S,S) PSRCDCR-NH<sub>2</sub>**

Παρακάτω παρουσιάζονται συνοπτικά τα αποτελέσματα της μελέτης της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων *in vivo* για τις δόσεις του πεπτιδίου (S,S) PSRCDCR-NH<sub>2</sub> που μελετήθηκαν. Αποτελούν τα αποτελέσματα της έρευνας της Βασιλικής Ρούσα. Επάνω σε αυτά καθώς και στα αποτελέσματα του Νικολάου Παπαμιχαήλ που παρουσιάστηκαν βασίστηκε η παρούσα μελέτη. Έχουν δημοσιευθεί στη Διδακτορική της Διατριβή με τίτλο «Σύγκριση νεώτερων συνθετικών αναστολέων της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων με κλασικούς αναστολείς της έκφρασης των γλυκοπρωτεϊνικών υποδοχέων IIb/IIIa. Πειραματική μελέτη». Είναι επίσης δημοσιευμένα στο περιοδικό Platelets(366). Οι παρακάτω ομάδες αποτελούνται από 3 πειράματα η κάθε μία.

#### **ΟΜΑΔΑ ΠΕΠΤΙΔΙΟΥ (S,S) PSRCDCR-NH<sub>2</sub> ΣΕ ΔΟΣΗ 3 mg/kg**

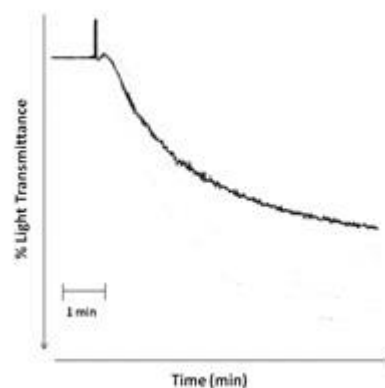
Στην ομάδα του πεπτιδίου σε δόση 3 mg/kg, η μέση αρχική ροή στην καρωτίδα ήταν 19±1,41 ml/min. Μετά την επαγωγή του θρόμβου η καρωτίδα του πειραματόζωου αποφράχθηκε πλήρως σε χρόνο 23.3±2.0 min (εικ. 99).



**Εικ. 99:** η επί τοις εκατό μεταβολή της ροής του αίματος στην καρωτίδα για την ομάδα του (S,S) PSRCDR-NH<sub>2</sub> 3 mg/kg με την πάροδο του χρόνου (ξεκινώντας άμεσα μετά την εφαρμογή του ηλεκτρικού ρεύματος έως 90 λεπτά μετά την εφαρμογή του).

Το πεπτιδίο σε δόση 3 mg/kg προκάλεσε μέση αναστολή της συσσώρευσης με αγωνιστή ADP και AA κατά  $8.5 \pm 2.1\%$  και  $10.5 \pm 0.7$  αντίστοιχα (Εικ. 100). Το μέσο βάρος του θρόμβου που προέκυψε ήταν  $5.4 \pm 0.68$  mg (πίνακας 28). Η ποσότητα του αίματος που συγκεντρώθηκε στην προζυγισμένη γάζα ήταν  $315.33 \pm 19.29$  mg. Ο μέσος χρόνος αιμορραγίας της ομάδας του πεπτιδίου ήταν  $43.33 \pm 5.77$  sec (πίνακας 29).

	%Αναστολή ADP	%Αναστολή AA
Πείραμα 1	11	12
Πείραμα 2	6	9
Πείραμα 3	9	9
<b>Μέση τιμή ± σταθερά απόκλισης</b>	<b><math>8.5 \pm 2.1</math></b>	<b><math>10.5 \pm 0.7</math></b>



**Εικ. 100:** αναστολή της ex vivo συσσώρευσης των αιμοπεταλίων για την ομάδα του (S,S) PSRCDR-NH<sub>2</sub> σε δόση 3 mg/kg.

	Βάρος θρόμβου (mg)
Πείραμα 1	6.1
Πείραμα 2	5.1
Πείραμα 3	5
<b>Μέση τιμή ± σταθερά απόκλισης</b>	<b>5.4±0.68</b>

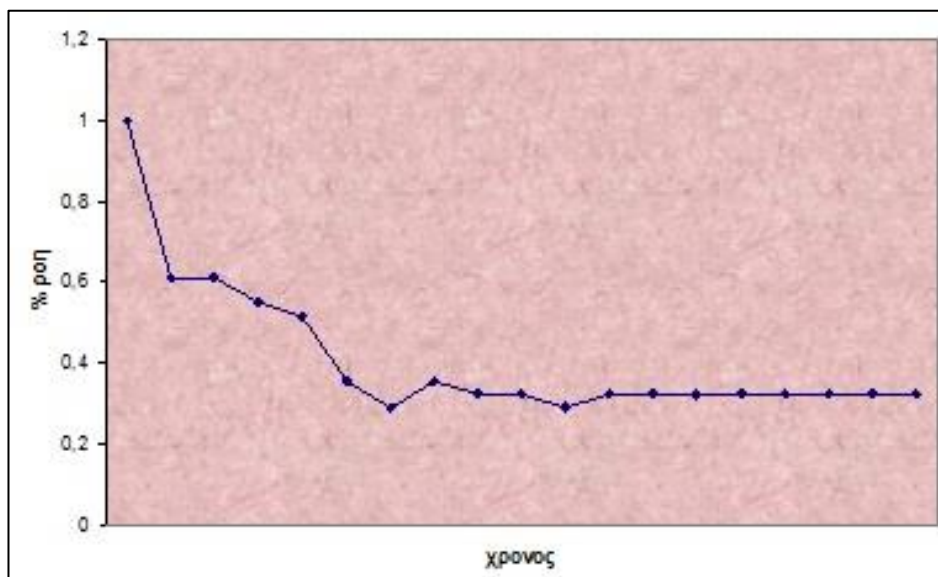
**Πίνακας 28:** το βάρος του θρόμβου για την ομάδα του (S,S) PSRCDCR-NH<sub>2</sub> σε δόση 3 mg/kg.

	Ποσό αιμορραγίας (mg)	Χρόνος αιμορραγίας (sec)
Πείραμα 1	309	40
Πείραμα 2	337	50
Πείραμα 3	300	40
<b>Μέση τιμή ± σταθερά απόκλισης</b>	<b>315.33±19.29</b>	<b>43.33±5.77</b>

**Πίνακας 29:** ποσότητα και χρόνος αιμορραγίας για την ομάδα του (S,S) PSRCDCR-NH<sub>2</sub> σε δόση 3 mg/kg.

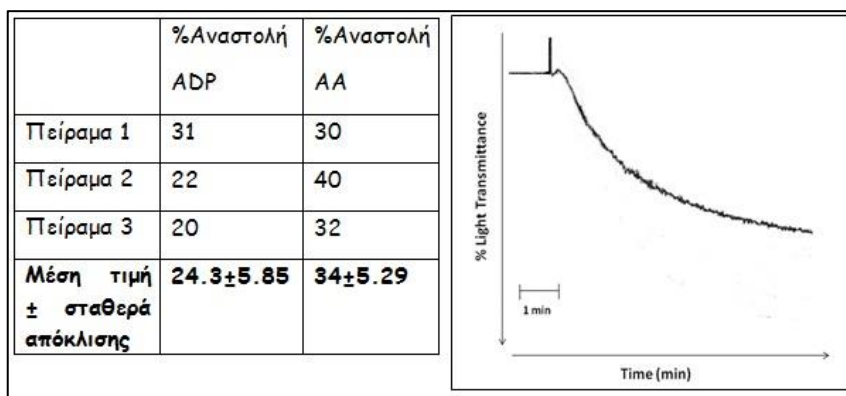
#### ΟΜΑΔΑ ΠΕΠΤΙΔΙΟΥ (S,S) PSRCDCR-NH<sub>2</sub> ΣΕ ΔΟΣΗ 6 mg/kg

Στην ομάδα του πεπτιδίου σε δόση 6 mg/kg, η μέση αρχική ροή στην καρωτίδα ήταν 15.5±0.7 ml/min. Μετά την επαγωγή του θρόμβου η ροή στην καρωτίδα του πειραματόζωου στο τέλος του πειράματος ήταν 32% της αρχικής (εικ. 101).



**Εικ. 101:** η επί τοις εκατό μεταβολή της ροής του αίματος στην καρωτίδα για την ομάδα του (S,S) PSRCD CR-NH<sub>2</sub> 6 mg/kg με την πάροδο του χρόνου (ξεκινώντας άμεσα μετά την εφαρμογή του ηλεκτρικού ρεύματος έως 90 λεπτά μετά την εφαρμογή του).

Το πεπτιδίο σε δόση 6 mg/kg προκάλεσε μέση αναστολή της συσσώρευσης με αγωνιστή ADP και AA κατά  $24.3 \pm 5.85\%$  και  $34 \pm 5.29$  (εικ. 102). Το μέσο βάρος του θρόμβου που προέκυψε ήταν  $2.95 \pm 0.2$  mg (πίνακας 30). Η ποσότητα του αίματος που συγκεντρώθηκε στην προζυγισμένη γάζα ήταν  $287 \pm 70.7$  mg. Ο μέσος χρόνος αιμορραγίας της ομάδας του πεπτιδίου ήταν  $40,0 \pm 7,0$  sec (πίνακας 31).



**Εικ. 102:** Αναστολή της ex vivo συσσώρευσης των αιμοπεταλίων για την ομάδα του (S,S) PSRCD CR-NH<sub>2</sub> 6 mg/kg.



	Βάρος θρόμβου (mg)
Πείραμα 1	2.8
Πείραμα 2	3.1
Πείραμα 3	3
<b>Μέση τιμή ± σταθερά απόκλισης</b>	<b>2.95 ± 0.2</b>

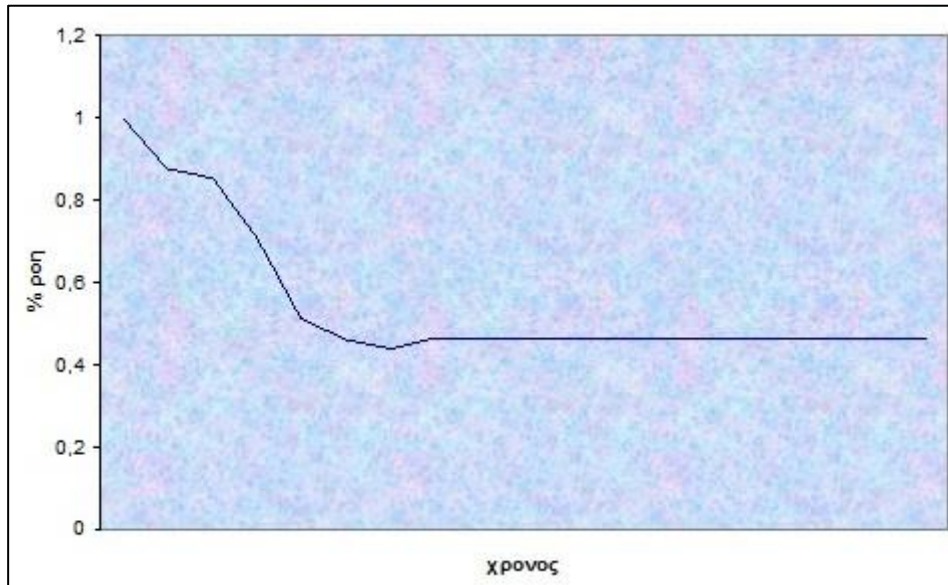
**Πίνακας 30:** το βάρος του θρόμβου για την ομάδα του (S,S) PSRCDCR-NH<sub>2</sub> 6 mg/kg.

	Ποσό αιμορραγίας (mg)	Χρόνος αιμορραγίας (sec)
Πείραμα 1	237	40
Πείραμα 2	337	50
Πείραμα 3	330	40
<b>Μέση τιμή ± σταθερά απόκλισης</b>	<b>301.33 ± 55.82</b>	<b>43.3 ± 5.77</b>

**Πίνακας 31:** ποσότητα και χρόνος της αιμορραγίας για την ομάδα του (S,S) PSRCDCR-NH<sub>2</sub> 6 mg/kg

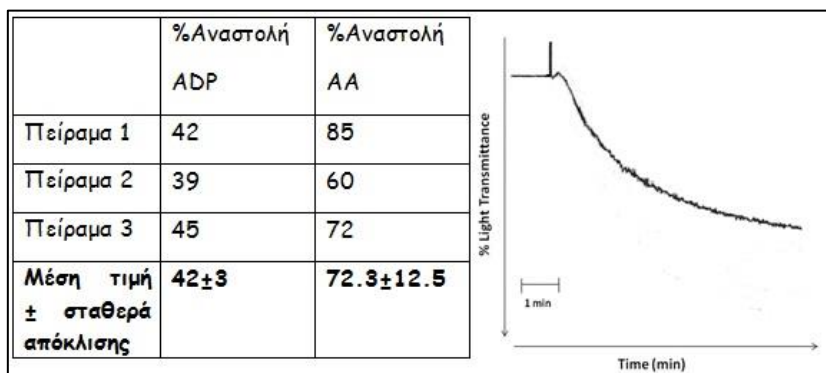
#### ΟΜΑΔΑ ΠΕΠΤΙΔΙΟΥ (S,S) PSRCDCR-NH<sub>2</sub> ΣΕ ΔΟΣΗ 12 mg/kg

Για την ομάδα του πεπτιδίου σε δόση 12 mg/kg, η μέση αρχική ροή στην καρωτίδα ήταν 20.5±0.6 ml/min. Μετά την επαγωγή του θρόμβου η ροή στην καρωτίδα του πειραματόζωου στο τέλος του πειράματος ήταν 46.3% της αρχικής (εικ. 103).



**Εικ. 103:** η % μεταβολή της ροής στην καρωτίδα για την ομάδα του (S,S) PSRCD CR-NH<sub>2</sub> 12 mg/kg με την πάροδο του χρόνου (ξεκινώντας άμεσα μετά την εφαρμογή του ηλεκτρικού ρεύματος έως 90 λεπτά μετά την εφαρμογή του).

Το πεπτιδίο σε δόση 6 mg/kg προκάλεσε μέσες αναστολές της συσσώρευσης με αγωνιστή ADP και AA κατά  $42 \pm 3\%$   $72.3 \pm 12.5\%$  αντίστοιχα (εικ. 104). Το μέσο βάρος του θρόμβου που προέκυψε ήταν  $2.13 \pm 0.8$  mg (πίνακας 32). Η ποσότητα του αίματος που συγκεντρώθηκε στην προζυγισμένη γάζα ήταν  $277 \pm 35.3$  mg. Ο μέσος χρόνος αιμορραγίας της ομάδας του πεπτιδίου (12 mg/kg) ήταν  $42,3 \pm 5.77$  sec (πίνακας 33).



**Εικ. 104:** η αναστολή της ex vivo συσσώρευσης των αιμοπεταλίων για την ομάδα του YMESRADR σε δόση 12 mg/kg.

	Βάρος θρόμβου (mg)
Πείραμα 1	1.4
Πείραμα 2	2.0
Πείραμα 3	3
<b>Μέση τιμή ± σταθερά απόκλισης</b>	<b>2.13 ± 0.8</b>

**Πίνακας 32:** το βάρος του θρόμβου για την ομάδα του (S,S) PSRCDRCR-NH<sub>2</sub> 12 mg/kg.

	Ποσό αιμορραγίας (mg)	Χρόνος αιμορραγίας (sec)
Πείραμα 1	302	40
Πείραμα 2	252	50
Πείραμα 3	305	50
<b>Μέση τιμή ± σταθερά απόκλισης</b>	<b>277±35.3</b>	<b>42,3± 5.77</b>

**Πίνακας 33:** ποσότητα και χρόνος της αιμορραγίας για την ομάδα του (S,S) PSRCDRCR-NH<sub>2</sub> 12 mg/kg.

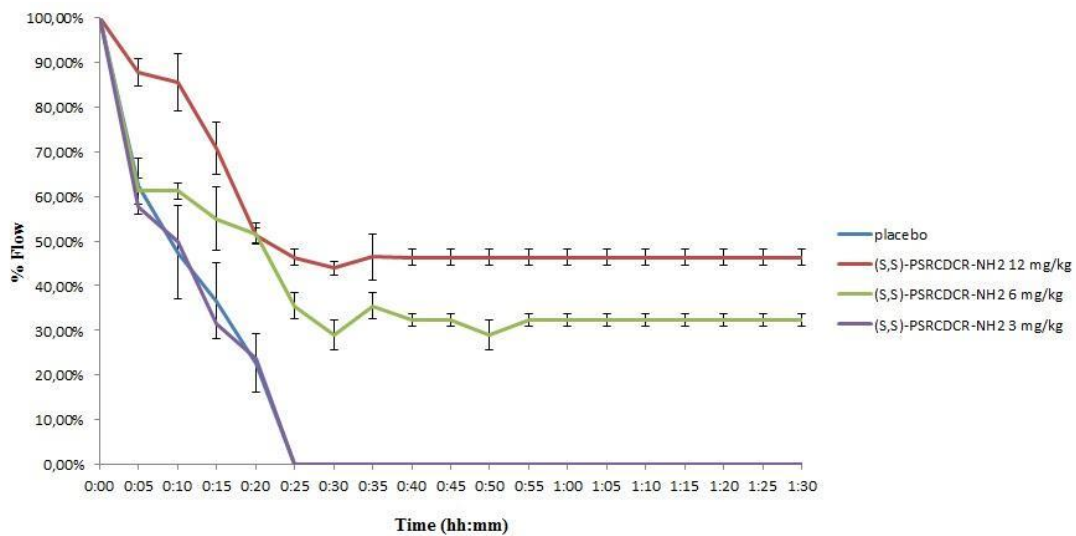
**ΣΥΝΟΛΙΚΗ ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΩΝ ΟΜΑΔΩΝ****ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΣΤΗ ΡΟΗ ΤΗΣ ΚΑΡΩΤΙΔΑΣ:**

Όπως αναφέρθηκε η μέση τιμή της αρχικής ροής στην καρωτίδα των πειραματόζων της ομάδας ελέγχου (placebo) ήταν  $23,6 \pm 2,9$  ml/min. Μετά την επαγωγή της δημιουργίας του θρόμβου με την εφαρμογή του ηλεκτρικού ρεύματος, σε όλα τα πειραματόζωα της ομάδας ελέγχου (placebo, n=5), η ροή του αγγείου μηδενίστηκε (πλήρης απόφραξη του αυλού του αγγείου) σε χρόνο  $23,3 \pm 3,2$  λεπτά. Ομοίως, σε δόση 3 mg/kg (n=3) το πεπτίδιο CDC δε κατάφερε να διατηρήσει ροή δια μέσω του αγγείου. Αντίθετα σε δόση 6 mg/kg το πεπτίδιο διατήρησε τη ροή στο 32% της αρχικής μέχρι το τέλος του πειράματος ( $p=0,05$ , σε σχέση με την ομάδα ελέγχου), ενώ σε δόση 12 mg/kg, η αντίστοιχη ροή ήταν 46,7% ( $p=0,001$ , σε σχέση με την ομάδα ελέγχου) (πίνακας 34, εικ. 105).

Φαρμακευτική ουσία	% της αρχικής ροής	p
Placebo (n=5)	0	
(S,S) PSRCDCR-NH <sub>2</sub> 3mg/kg (n=3)	0	
(S,S) PSRCDCR-NH <sub>2</sub> 6mg/kg (n=3)	$32 \pm 0.01^*$	<0,05
(S,S) PSRCDCR-NH <sub>2</sub> 12mg/kg (n=3)	$46.3 \pm 0.01^*$	<0,001

**Πίνακας 34:** η ροή στην καρωτίδα του ζώου στο τέλος του πειράματος (90 λεπτά μετά την εφαρμογή του ηλεκτρικού ρεύματος), \*στατιστική σημαντικότητα σε σχέση με την ομάδα ελέγχου.

Το πεπτίδιο (S,S) PSRCDCR-NH<sub>2</sub> στις δυο υψηλότερες δόσεις που δοκιμάστηκαν (6 και 12 mg/kg), κατάφερε να διατηρήσει τη βατότητα στην καρωτίδα του κουνελιού έως στο τέλος του πειράματος (90 λεπτά μετά την επαγωγή του θρόμβου με εφαρμογή ηλεκτρικού ρεύματος). Αντιθέτως η δόση 3 mg/kg δε διατήρησε τη βατότητα του αγγείου.



**Εικ. 105:** Επίδραση των ομάδων του control και του (S,S) PSRCDCR-NH<sub>2</sub> στις διάφορες δόσεις στις οποίες χορηγήθηκε, στην επί τοις εκατό μεταβολή της ροής του αίματος στην καρωτίδα του ζώου σε σχέση με το χρόνο (άμεσα μετά την εφαρμογή ηλεκτρικού ρεύματος και έως 90 λεπτά μετά την εφαρμογή του). Οι δόσεις των 6 και 12 mg/kg βάρους, πέτυχαν στατιστικά σημαντική διατήρηση της βατότητας του αγγείου συγκριτικά με το Placebo.

#### ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΣΤΗΝ ΕΧ VIVO ΣΥΣΣΩΡΕΥΣΗ ΤΩΝ ΑΙΜΟΠΕΤΑΛΙΩΝ:

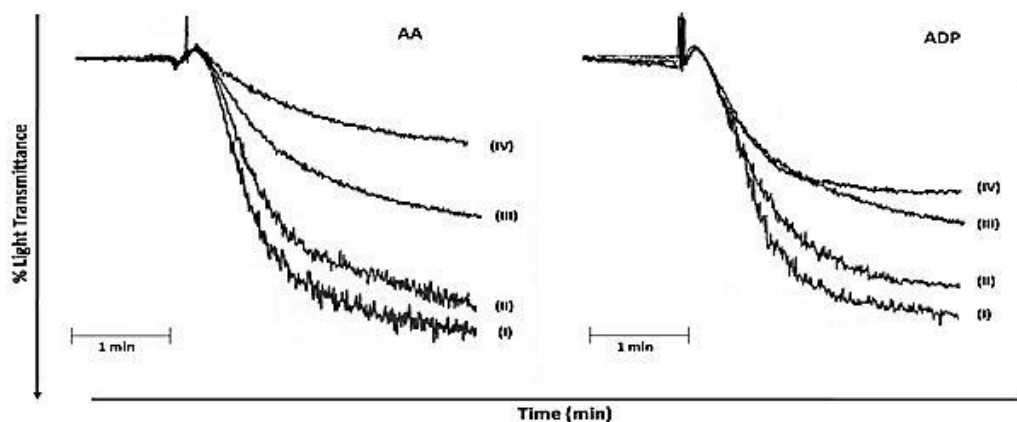
Η μελέτη της αναστολής της συσσώρευσης έγινε χρησιμοποιώντας ADP σε συγκέντρωση 20 μM και Αραχιδονικό οξύ (AA) σε συγκέντρωση 500 μM.

Φαρμακευτική ουσία	% αναστολή (ex vivo) ADP 20 μM	p	% αναστολή (ex vivo) AA 500 μM	p
Placebo (n=5)	9,2±3,1		9,2±3,1	
(S,S) PSRCDCR-NH <sub>2</sub> 3mg/kg (n=3)	8.5±2.1	0,45	10.5±0.7	0,16
(S,S) PSRCDCR-NH <sub>2</sub> 6mg/kg (n=3)	24.3±5.85*	0,01	34±5.29*	0,01
(S,S) PSRCDCR-NH <sub>2</sub> 12mg/kg (n=3)	42±3*	0,001	72.3±12.5*	0,001

**Πίνακας 35:** οι επί τοις εκατό (%) αναστολές της ex vivo συσσώρευσης των αιμοπεταλίων στις υποομάδες του (S,S) PSRCDCR-NH<sub>2</sub> που μελετήθηκαν με αγωνιστή το ADP 20 μM. ΚΑΙ AA 500 μM.

\*στατιστική σημαντικότητα σε σχέση με την ομάδα ελέγχου.

Το πεπτιδίο στις δόσεις των 6 και 12 mg/kg προκάλεσε στατιστικά σημαντική αναστολή της ex vivo συσσώρευσης των αιμοπεταλίων με αγωνιστή το ADP συγκριτικά με την ομάδα ελέγχου. Αντιθέτως, τα πειραματόζωα που έλαβαν το πεπτιδίο σε δόσεις 3 mg/kg δεν παρουσίασαν στατιστικά σημαντική αναστολή σε σχέση με την ομάδα ελέγχου (πίνακας 35). Επιπλέον η ομάδα των πειραματόζωων που έλαβε το πεπτιδίο στη δόση των 12 mg/kg διέφερε στατιστικά σημαντικά, όσον αφορά στην αναστολή της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων με αγωνιστή το AA σε σχέση με την ομάδα που έλαβε το πεπτιδίο στη δόση των 3 mg/kg.



**Εικ. 106:** αντιπροσωπευτικές καμπύλες της ex vivo συσσώρευσης των αιμοπεταλίων στις διάφορες δόσεις του πεπτιδίου που δοκιμάστηκαν με αγωνιστή το ADP και το AA: I= placebo, II= (S,S) PSRCDCR-NH<sub>2</sub> 3mg/kg, III=(S,S) PSRCDCR-NH<sub>2</sub> 6 mg/kg και IV=(S,S) PSRCDCR-NH<sub>2</sub> 12mg/kg.

#### ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΣΤΟ ΒΑΡΟΣ ΤΟΥ ΘΡΟΜΒΟΥ:

Στην ομάδα ελέγχου το βάρος του θρόμβου που αφαιρέθηκε από την καρωτίδα ήταν  $5,72 \pm 0,86$  mg. Στην ομάδα του (S,S) PSRCDCR-NH<sub>2</sub> 3 mg/kg το βάρος του θρόμβου που αφαιρέθηκε ήταν  $5.4 \pm 0.8$  mg ( $p=0,261$  σε σχέση με την ομάδα ελέγχου). Το βάρος του θρόμβου στη δόση 6mg/kg του πεπτιδίου ήταν  $2.95 \pm 0.2$  mg ( $p=0,05$  έναντι του placebo). Στη δόση των 12 mg/kg το (S,S) PSRCDCR-NH<sub>2</sub> μείωσε το βάρος του θρόμβου στα  $2.13 \pm 0.08$  mg ( $p=0,001$  έναντι του control) (πίνακας 36).

Συνοψίζοντας, το πεπτίδιο (S,S) PSRCDCR-NH<sub>2</sub> στις δόσεις των 6 και 12 mg/kg κατάφερε να μειώσει σημαντικά το βάρος του θρόμβου σε σχέση με την ομάδα ελέγχου.

Φαρμακευτική ουσία	Βάρος θρόμβου (mg)	p
Placebo	5,72±0,86	
(S,S) PSRCDCR-NH <sub>2</sub> 3 mg/kg	5.4±0.08	0,261
(S,S) PSRCDCR-NH <sub>2</sub> 6 mg/kg	2.95±0.2*	0,05
(S,S) PSRCDCR-NH <sub>2</sub> 12 mg/kg	2.13±0.08*	0.001

**Πίνακας 36:** επίδραση των ουσιών που μελετήθηκαν στο βάρος του σχηματισθέντος θρόμβου. (\*στατιστική σημαντικότητα σε σχέση με την ομάδα ελέγχου).

#### ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΣΤΗΝ ΠΟΣΟΤΗΤΑ ΚΑΙ ΤΟ ΧΡΟΝΟ ΤΗΣ ΑΙΜΟΡΡΑΓΙΑΣ (ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΤΗΣ ΑΣΦΑΛΕΙΑΣ):

Στην ομάδα ελέγχου, το ποσό του αίματος που συσσωρεύτηκε στην γάζα ήταν 256,4±88,4 mg. Στην ομάδα του πεπτιδίου (S,S) PSRCDCR-NH<sub>2</sub> το ποσό του αίματος ήταν 315.33±19.29 mg (p=0,436 σε συγκριτικά με την ομάδα ελέγχου). Αντίστοιχα, στη δόση 6 mg/kg του πεπτιδίου, το ποσό της απώλειας αίματος ήταν 301.33±55,82 mg (p=0,417 συγκριτικά με την ομάδα ελέγχου). Το πεπτίδιο (S,S) PSRCDCR-NH<sub>2</sub> στη δόσεις των 12 mg/kg προκάλεσε απώλεια αίματος από την τομή της τάξης των 277±35,3 mg (p=0,345 συγκριτικά με την ομάδα ελέγχου) (πίνακας 37).

Φαρμακευτική ουσία	Βάρος γάζας (mg)	p
Placebo	256.4±88,4	
(S,S) PSRCDCR-NH <sub>2</sub> 3 mg/kg	315.33±19.29	0,436
(S,S) PSRCDCR-NH <sub>2</sub> 6 mg/kg	301.33±55.82	0,417
(S,S) PSRCDCR-NH <sub>2</sub> 12 mg/kg	277±35.3	0.345

**Πίνακας 37:** η ποσότητα της αιμορραγίας για τις διάφορες ομάδες του πεπτιδίου (S,S) PSRCDCR-NH<sub>2</sub> που δοκιμάστηκαν.

Στην ομάδα ελέγχου ο χρόνος αιμορραγίας ήταν 30,0±0,0 sec. Στην ομάδα του (S,S) PSRCDCR-NH<sub>2</sub> 3 mg/kg ο χρόνος αιμορραγίας, μετά από 60 λεπτά χορήγησης ήταν 43.33±5,77 sec (p=0,322 συγκριτικά με την ομάδα ελέγχου). Στις ομάδες των 6 mg/kg και 12 mg/kg οι αντίστοιχες τιμές ήταν 43.3±5.77 sec (p=0,177 συγκριτικά με την ομάδα ελέγχου) και 42,3±5,77 sec (p=0,766 συγκριτικά με την ομάδα ελέγχου) (πίνακας 38).

Φαρμακευτική ουσία	Χρόνος αιμορραγίας	p
Placebo	30±0	
(S,S) PSRCDCR-NH <sub>2</sub> 3 mg/kg	43,3±5,77	0,322
(S,S) PSRCDCR-NH <sub>2</sub> 6 mg/kg	43,3±5,77	0,177
(S,S) PSRCDCR-NH <sub>2</sub> 12 mg/kg	42,3±5,7	0.766

**Πίνακας 38:** ο χρόνος της αιμορραγίας για τις διάφορες ομάδες του πεπτιδίου (S,S) PSRCDCR-NH<sub>2</sub> που δοκιμάστηκαν.



Συνοψίζοντας, το πεπτίδιο (S,S) PSRCDCR-NH<sub>2</sub> διατήρησε την βατότητα στην καρωτίδα των πειραματόζωων στις δόσεις των 6 mg/kg και 12 mg/kg. Αντιθέτως, στη δόση των 3 mg/kg δε κατάφερε να διατηρήσει βατό το αγγείο. Η δράση αυτή του πεπτιδίου ασκήθηκε μέσω της αναστολής της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων, η οποία για τις δόσεις των 6 mg/kg και 12 mg/kg ήταν στατιστικά σημαντική σε σχέση με την ομάδα ελέγχου. Επιπλέον, το πεπτίδιο στις δόσεις των 6 mg/kg και 12 mg/kg, μείωσε στατιστικά σημαντικά το βάρος του θρόμβου σε σχέση με την ομάδα ελέγχου. Παράλληλα το πεπτίδιο (S,S) PSRCDCR-NH<sub>2</sub> απεδείχθη ασφαλές κατά τις αιμορραγικές δοκιμασίες, καθώς καμία από τις δόσεις στις οποίες δοκιμάστηκε δεν αύξησε στατιστικά σημαντικά το ποσό ή το χρόνο αιμορραγίας συγκριτικά με την ομάδα ελέγχου.

### ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΠΑΡΟΥΣΑΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Στην κλινική πράξη η αναγκαιότητα αποτελεσματικής διπλής αντιαιμοπεταλιακής αγωγής με περιορισμένες αιμορραγικές επιπλοκές είναι καλά τεκμηριωμένη. Στην αντιμετώπιση ασθενών με οξεία στεφανιαία σύνδρομο με ή χωρίς ανάσπαση του διαστήματος ST, η ενδοφλέβια χορήγηση αναστολέων του υποδοχέα GPIIb/IIIa ενδείκνυται σε καταστάσεις διάσωσης (αγγειογραφική απεικόνιση θρόμβου ή/και φαινόμενο no-reflow) και σε συνδυασμό με τη χορήγηση διπλής αντιαιμοπεταλιακής αγωγής (ασπιρίνη και ανταγωνιστές του υποδοχέα P<sub>2</sub>Y<sub>12</sub>)(64, 65). Πρόσφατα δεδομένα υποστηρίζουν ότι σε συγκεκριμένους ασθενείς υπάρχει όφελος από την παράταση της διπλής αντιαιμοπεταλιακής αγωγής για έως και 30 μήνες(397). Βάσει των παραπάνω κρίθηκε σκόπιμο να μελετηθεί η συνδυαστική επίδραση κάθε ενός από τα πεπτίδια YMESRADR και (S,S) PSRCDCR-NH<sub>2</sub> με την από του στόματος χορήγηση ασπιρίνης. Αποφασίσθηκε να δοκιμαστούν ήδη γνωστές και δραστικές δόσεις από τα δύο πεπτίδια σε συνδυασμό με μη αποτελεσματικές δόσεις τις ασπιρίνης. Ο σκοπός ήταν να αποδειχθεί εάν η ασπιρίνη σε μια δόση με δραστηριότητα εφάμιλλη της ομάδας ελέγχου θα μπορούσε να οδηγήσει σε ενισχυμένα, συνεργικά αποτελέσματα συγκριτικά με την ομάδα του αντίστοιχου πεπτιδίου. Προκειμένου να καθοριστεί η δραστηριότητα της ασπιρίνης έγιναν in vitro πειράματα τα οποία οδήγησαν στις εξής δύο ομάδες πειραματοζώων για in vivo δοκιμή:

1. Ασπιρίνη 5 mg/kg με χορήγηση φυσιολογικού ορού με ρυθμό έγχυσης 6 mg/kg/h.
2. Ασπιρίνη 10 mg/kg με χορήγηση φυσιολογικού ορού με ρυθμό έγχυσης 6 mg/kg/h.

**ΟΜΑΔΕΣ ΑΣΠΙΡΙΝΗΣ****ΟΜΑΔΑ ΑΣΠΙΡΙΝΗΣ ΣΕ ΔΟΣΗ 5 mg/kg ΜΕ ΧΟΡΗΓΗΣΗ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΟΥ ΟΡΟΥ ΣΕ ΡΥΘΜΟ ΕΓΧΥΣΗΣ 6 mg/kg/h****ΠΕΙΡΑΜΑ 1<sup>ο</sup>:**

Χρησιμοποιήθηκε πειραματόζωο βάρους 3,1 kg.

1. Επίδραση της ασπιρίνης σε δόση 5 mg/kg με συγχορήγηση του placebo στη ροή της καρωτίδας: η αρχική ροή στην καρωτίδα ήταν 19 ml/min. Μετά τη επαγωγή της δημιουργίας του θρόμβου με εφαρμογή ηλεκτρικού ρεύματος, η ροή μηδενίστηκε σε χρόνο 24 λεπτών.
2. Επίδραση της ασπιρίνης σε δόση 5 mg/kg με συγχορήγηση του placebo στην ex vivo συσσώρευση των αιμοπεταλίων: προκλήθηκε αναστολή της ex vivo συσσώρευσης των αιμοπεταλίων με αγωνιστή το AA σε συγκέντρωση 500 μM κατά 14% και με αγωνιστή το ADP σε συγκέντρωση 20 μM κατά 7%.
3. Επίδραση της ασπιρίνης σε δόση 5 mg/kg με συγχορήγηση του placebo στο βάρος του θρόμβου: το βάρος του θρόμβου που αφαιρέθηκε από την καρωτίδα του πειραματοζώου ήταν 9,7 mg.
4. Επίδραση του placebo στο μέγεθος της αιμορραγίας: η ποσότητα του αίματος που συγκεντρώθηκε στην προζυγισμένη γάζα ήταν 356 mg.

**ΠΕΙΡΑΜΑ 2<sup>ο</sup>:**

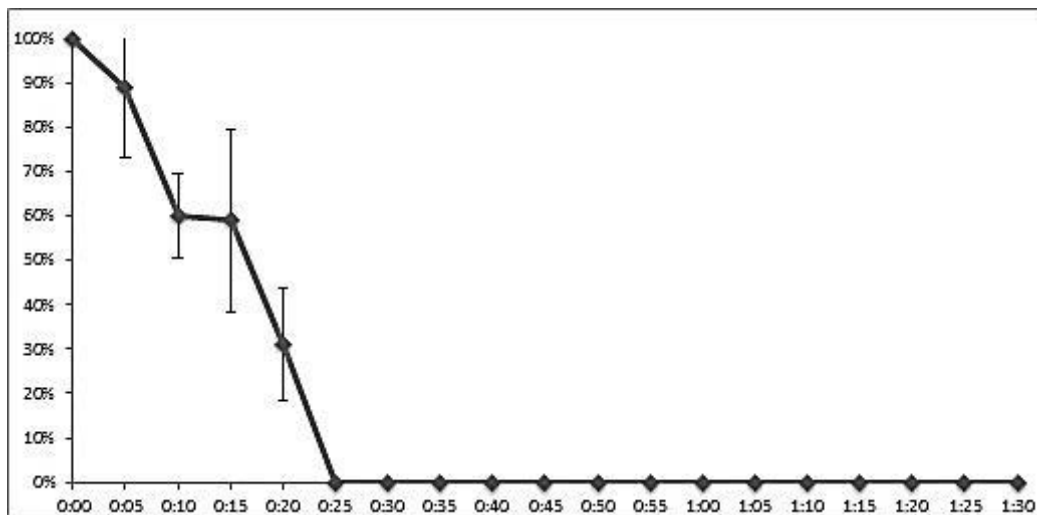
Χρησιμοποιήθηκε πειραματόζωο βάρους 2,9 kg.

1. Επίδραση της ασπιρίνης σε δόση 5 mg/kg με συγχορήγηση του placebo στη ροή της καρωτίδας: η αρχική ροή στην καρωτίδα ήταν 21 ml/min. Μετά τη επαγωγή της δημιουργίας του θρόμβου με εφαρμογή ηλεκτρικού ρεύματος, η ροή μηδενίστηκε σε χρόνο 25 λεπτών.

2. Επίδραση της ασπιρίνης σε δόση 5 mg/kg με συγχορήγηση του placebo στην ex vivo συσσώρευση των αιμοπεταλίων: προκλήθηκε αναστολή της ex vivo συσσώρευσης των αιμοπεταλίων με αγωνιστή το AA σε συγκέντρωση 500  $\mu$ M κατά 12% και με αγωνιστή το ADP σε συγκέντρωση 20  $\mu$ M κατά 11%.
3. Επίδραση της ασπιρίνης σε δόση 5 mg/kg με συγχορήγηση του placebo στο βάρος του θρόμβου: το βάρος του θρόμβου που αφαιρέθηκε από την καρωτίδα του πειραματοζώου ήταν 9,9 mg.
4. Επίδραση του placebo στο μέγεθος της αιμορραγίας: η ποσότητα του αίματος που συγκεντρώθηκε στην προζυγισμένη γάζα ήταν 254 mg.

#### ΣΥΝΟΛΙΚΑ:

Συνολικά για την ομάδα της ασπιρίνης σε δόση 5 mg/kg με συγχορήγηση του Placebo, η μέση αρχική ροή στην καρωτίδα ήταν  $20 \pm 1,41$  ml/min. Μετά την επαγωγή του θρόμβου η καρωτίδα του πειραματοζώου αποφράχθηκε πλήρως σε χρόνο  $24,5 \pm 0,7$  λεπτά (βλέπε εικόνα).



**Εικ 107:** η επί τοις εκατό μεταβολή της ροής του αίματος στην καρωτίδα για την ομάδα της ασπιρίνης 5 mg/kg σε συνδυασμό με φυσιολογικό ορό σε ρυθμό έγχυσης 6 mg/kg/h με την πάροδο του χρόνου ξεκινώντας άμεσα μετά την εφαρμογή του ηλεκτρικού ρεύματος έως τη διακοπή της ροής του αγγείου.

Η χορήγηση της ασπιρίνης σε δόση 5 mg/kg σε συνδυασμό με φυσιολογικό ορό σε ρυθμό έγχυσης 6 mg/kg/h προκάλεσε μέση αναστολή της συσσώρευσης με αγωνιστές το AA και το ADP κατά  $13 \pm 1,41\%$  και  $9 \pm 2,83\%$  (πίνακας 39). Το μέσο βάρος του θρόμβου που προέκυψε ήταν  $9,8 \pm 0,14$  mg (πίνακας 40). Η ποσότητα του αίματος που συγκεντρώθηκε στην προζυγισμένη γάζα ήταν  $305 \pm 72,12$  mg (πίνακας 41).

	% Αναστολή AA	% Αναστολή ADP
Πείραμα 1	14	7
Πείραμα 2	12	11
<b>Μέση τιμή ± σταθερά απόκλισης</b>	<b><math>13 \pm 1,41</math></b>	<b><math>9 \pm 2,83</math></b>

**Πίνακας 39:** Αναστολή της ex vivo συσσώρευσης των αιμοπεταλίων του κουνελιού για την ασπιρίνη 5 mg/kg σε συνδυασμό με φυσιολογικό ορό σε ρυθμό έγχυσης 6 mg/kg/h.

	Βάρος Θρόμβου (mg)
Πείραμα 1	9,7
Πείραμα 2	9,9
<b>Μέση τιμή ± σταθερά απόκλισης</b>	<b><math>9,8 \pm 0,14</math></b>

**Πίνακας 40:** βάρος θρόμβου στην ομάδα της ασπιρίνης σε δόση 5 mg/kg σε συνδυασμό με φυσιολογικό ορό σε ρυθμό έγχυσης 6 mg/kg/h.

	Ποσό αιμορραγίας (mg)
Πείραμα 1	356
Πείραμα 2	254
<b>Μέση τιμή ± σταθερά απόκλισης</b>	<b>305 ± 72,12</b>

**Πίνακας 41:** ποσότητα αιμορραγίας της ομάδας της ασπιρίνης σε δόση 5 mg/kg σε συδιασμό με φυσιολογικό ορό σε ρυθμί έγχυσης 6 mg/kg/h.

ΟΜΑΔΑ ΑΣΠΙΡΙΝΗΣ 10 mg/kg ΜΕ ΧΟΡΗΓΗΣΗ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΟΥ ΟΡΟΥ ΣΕ ΡΥΘΜΟ ΕΓΧΥΣΗΣ 6 mg/kg/h

ΠΕΙΡΑΜΑ 1<sup>ο</sup>:

Χρησιμοποιήθηκε πειραματόζωο βάρους 2,9 kg.

1. Επίδραση της ασπιρίνης σε δόση 10 mg/kg με συγχορήγηση του placebo στη ροή της καρωτίδας: η αρχική ροή στην καρωτίδα ήταν 12 ml/min. Μετά τη επαγωγή της δημιουργίας του θρόμβου με εφαρμογή ηλεκτρικού ρεύματος, η ροή διατηρήθηκε για 90 λεπτά σε ποσοστό 66,67% της αρχικής.
2. Επίδραση της ασπιρίνης σε δόση 10 mg/kg με συγχορήγηση του placebo στην ex vivo συσσώρευση των αιμοπεταλίων: προκλήθηκε αναστολή της ex vivo συσσώρευσης των αιμοπεταλίων με αγωνιστή το AA σε συγκέντρωση 500 μM κατά 52% και με αγωνιστή το ADP σε συγκέντρωση 20 μM κατά 16%.
3. Επίδραση της ασπιρίνης σε δόση 10 mg/kg με συγχορήγηση του placebo στο βάρος του θρόμβου: το βάρος του θρόμβου που αφαιρέθηκε απο την καρωτίδα του πειραματοζώου ήταν 3,4 mg.
4. Επίδραση του placebo στο μέγεθος της αιμορραγίας: η ποσότητα του αίματος που συγκεντρώθηκε στην προζυγισμένη γάζα ήταν 59 mg.

ΠΕΙΡΑΜΑ 2<sup>ο</sup>:

Χρησιμοποιήθηκε πειραματόζωο βάρους 3,0 kg.

1. Επίδραση της ασπιρίνης σε δόση 10 mg/kg με συγχορήγηση του placebo στη ροή της καρωτίδας: η αρχική ροή στην καρωτίδα ήταν 23 ml/min. Μετά τη επαγωγή της δημιουργίας του θρόμβου με εφαρμογή ηλεκτρικού ρεύματος, η ροή διατηρήθηκε για 90 λεπτά σε ποσοστό 60,87% της αρχικής.
2. Επίδραση της ασπιρίνης σε δόση 10 mg/kg με συγχορήγηση του placebo στην ex vivo συσσώρευση των αιμοπεταλίων: προκλήθηκε αναστολή της ex vivo συσσώρευσης των αιμοπεταλίων με αγωνιστή το AA σε συγκέντρωση 500 μM κατά 57% και με αγωνιστή το ADP σε συγκέντρωση 20 μM κατά 21%.
3. Επίδραση της ασπιρίνης σε δόση 10 mg/kg με συγχορήγηση του placebo στο βάρος του θρόμβου: το βάρος του θρόμβου που αφαιρέθηκε από την καρωτίδα του πειραματοζώου ήταν 4 mg.
4. Επίδραση του placebo στο μέγεθος της αιμορραγίας: η ποσότητα του αίματος που συγκεντρώθηκε στην προζυγισμένη γάζα ήταν 63 mg.

ΠΕΙΡΑΜΑ 3<sup>ο</sup>:

Χρησιμοποιήθηκε πειραματόζωο βάρους 3,2 kg.

1. Επίδραση της ασπιρίνης σε δόση 10 mg/kg με συγχορήγηση του placebo στη ροή της καρωτίδας: η αρχική ροή στην καρωτίδα ήταν 22 ml/min. Μετά τη επαγωγή της δημιουργίας του θρόμβου με εφαρμογή ηλεκτρικού ρεύματος, η ροή διατηρήθηκε για 90 λεπτά σε ποσοστό 77,27% της αρχικής.
2. Επίδραση της ασπιρίνης σε δόση 10 mg/kg με συγχορήγηση του placebo στην ex vivo συσσώρευση των αιμοπεταλίων: προκλήθηκε αναστολή της ex vivo συσσώρευσης των αιμοπεταλίων με αγωνιστή το AA σε συγκέντρωση 500 μM κατά 55% και με αγωνιστή το ADP σε συγκέντρωση 20 μM κατά 43%.
3. Επίδραση της ασπιρίνης σε δόση 10 mg/kg με συγχορήγηση του placebo στο βάρος του θρόμβου: το βάρος του θρόμβου που αφαιρέθηκε από την καρωτίδα του πειραματοζώου ήταν 3 mg.

4. Επίδραση του placebo στο μέγεθος της αιμορραγίας: η ποσότητα του αίματος που συγκεντρώθηκε στην προζυγισμένη γάζα ήταν 57,6 mg.

#### ΠΕΙΡΑΜΑ 4<sup>ο</sup>:

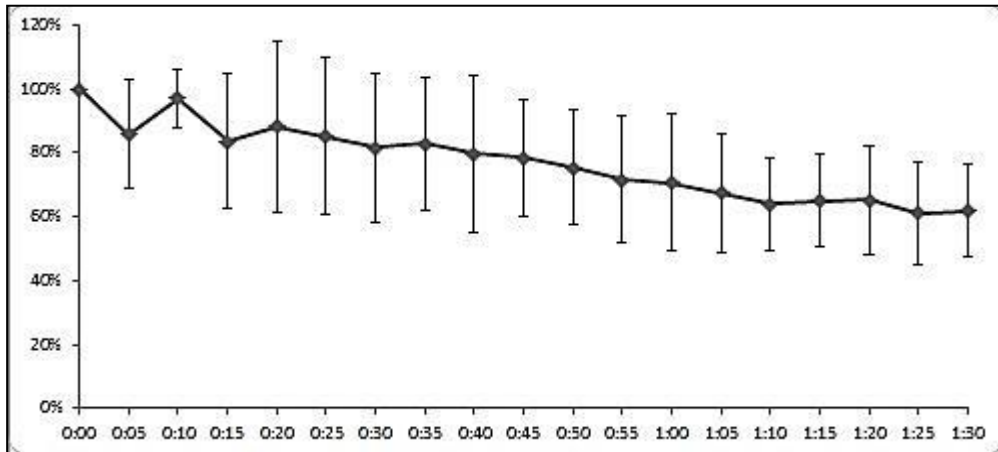
Χρησιμοποιήθηκε πειραματόζωο βάρους 3,0 kg.

1. Επίδραση της ασπιρίνης σε δόση 10 mg/kg με συγχορήγηση του placebo στη ροή της καρωτίδας: η αρχική ροή στην καρωτίδα ήταν 28 ml/min. Μετά τη επαγωγή της δημιουργίας του θρόμβου με εφαρμογή ηλεκτρικού ρεύματος, η ροή διατηρήθηκε για 90 λεπτά σε ποσοστό 42,86% της αρχικής.
2. Επίδραση της ασπιρίνης σε δόση 10 mg/kg με συγχορήγηση του placebo στην ex vivo συσσώρευση των αιμοπεταλίων: προκλήθηκε αναστολή της ex vivo συσσώρευσης των αιμοπεταλίων με αγωνιστή το AA σε συγκέντρωση 500 μM κατά 16% και με αγωνιστή το ADP σε συγκέντρωση 20 μM κατά 23%.
3. Επίδραση της ασπιρίνης σε δόση 10 mg/kg με συγχορήγηση του placebo στο βάρος του θρόμβου: το βάρος του θρόμβου που αφαιρέθηκε απο την καρωτίδα του πειραματοζώου ήταν 3,7 mg.
4. Επίδραση του placebo στο μέγεθος της αιμορραγίας: η ποσότητα του αίματος που συγκεντρώθηκε στην προζυγισμένη γάζα ήταν 58,3 mg.

#### ΣΥΝΟΛΙΚΑ:

Συνολικά στην ομάδα της ασπιρίνης σε δόση 10 mg/kg με συγχορήγηση φυσιολογικού ορού σε έγχυση 6 mg/kg/h, η μέση αρχική ροή στην καρωτίδα ήταν  $21,25 \pm 6,7$  ml/min. Μετά την επαγωγή του θρόμβου η καρωτίδα του πειραματοζώου παρέμεινε βατή για 90 λεπτά σε ποσοστό  $61,92\% \pm 14,41\%$  της αρχικής (εικ. 108).





**Εικ 108:** Η επί τοις εκατό μεταβολή της ροής στην καρωτίδα για την ομάδα της ασπιρίνης 10 mg/kg σε συνδυασμό με φυσιολογικό ορό σε ρυθμό έγχυσης 6 mg/kg/h με την πάροδο του χρόνου ξεκινώντας άμεσα μετά την εφαρμογή του ηλεκτρικού ρεύματος έως 90 λεπτά μετά την εφαρμογή του.

Η χορήγηση της ασπιρίνης σε δόση 10 mg/kg σε συνδυασμό με φυσιολογικό ορό σε ρυθμό έγχυσης 6 mg/kg/h προκάλεσε μέση αναστολή της συσσώρευσης με αγωνιστές το AA και το ADP κατά  $45 \pm 19,44\%$  και  $25,75 \pm 11,87\%$  (πίνακας 41). Το μέσο βάρος του θρόμβου που προέκυψε ήταν  $3,53 \pm 0,43$  mg (πίνακας 42). Η ποσότητα του αίματος που συγκεντρώθηκε στην προζυγισμένη γάζα ήταν  $59,48 \pm 2,42$  mg (πίνακας 43).

	% Αναστολή AA	% Αναστολή ADP
Πείραμα 1	52%	16%
Πείραμα 2	57%	21%
Πείραμα 3	55%	43%
Πείραμα 4	16%	23%
<b>Μέση τιμή ± σταθερά απόκλισης</b>	<b><math>45 \pm 19,44\% \ddagger^*</math></b>	<b><math>25,75 \pm 11,87\% \ddagger^*</math></b>

**Πίνακας 41:** Αναστολή της *ex vivo* συσσώρευσης των αιμοπεταλίων για την ομάδα της ασπιρίνης 10 mg/kg με φυσιολογικό ορό σε ρυθμό έγχυσης 6 mg/kg/h.  $\ddagger$  στατιστική σημαντικότητα συγκριτικά με την ομάδα της ασπιρίνης 5 mg/kg με χορήγηση φυσιολογικού ορού σε ρυθμό έγχυσης 6 mg/kg/h, \*στατιστική σημαντικότητα συγκριτικά με την ομάδα ελέγχου.

	Βάρος Θρόμβου (mg)
Πείραμα 1	3,4
Πείραμα 2	4
Πείραμα 3	3
Πείραμα 4	3,7
<b>Μέση τιμή ± σταθερά απόκλισης</b>	<b>3,53 ± 0,43</b>

**Πίνακας 42:** βάρος θρόμβου για την ομάδα της ασπιρίνης 10 mg/kg με φυσιολογικό ορό σε ρυθμό έγχυσης 6 mg/kg/h.

	Ποσό αιμορραγίας (mg)
Πείραμα 1	59
Πείραμα 2	63
Πείραμα 3	57,6
Πείραμα 4	58,3
<b>Μέση τιμή ± σταθερά απόκλισης</b>	<b>59,48 ± 2,42</b>

**Πίνακας 43:** ποσότητα αιμορραγίας για την ομάδα της ασπιρίνης 10 mg/kg σε συνδυασμό με φυσιολογικό ορό σε ρυθμό έγχυσης 6 mg/kg/h.

**IN VIVO ΔΟΚΙΜΗ ΤΟΥ ΠΕΠΤΙΔΙΟΥ (S,S) PSRCDCR-NH<sub>2</sub> ΜΕ ΤΗΝ ΑΣΠΙΡΙΝΗ**

(S,S) PSRCDCR-NH<sub>2</sub> ΣΕ ΔΟΣΗ 6 mg/kg ΣΕ ΣΥΝΔΥΑΣΜΟ ΜΕ ΑΣΠΙΡΙΝΗ 5 mg/kg.

**ΠΕΙΡΑΜΑ 1<sup>ο</sup>:**

Χρησιμοποιήθηκε πειραματόζωο βάρους 3,1 kg.

1. Επίδραση της ομάδας του (S,S) PSRCDCR-NH<sub>2</sub> σε δόση 6 mg/kg σε συνδυασμό με ασπιρίνη σε δόση 5 mg/kg στη ροή της καρωτίδας: η αρχική ροή στην καρωτίδα ήταν 34 ml/min. Μετά τη επαγωγή της δημιουργίας του θρόμβου με εφαρμογή ηλεκτρικού ρεύματος, η ροή διατηρήθηκε για 90 λεπτά σε ποσοστό 33,23% της αρχικής.
2. Επίδραση της ομάδας του (S,S) PSRCDCR-NH<sub>2</sub> σε δόση 6 mg/kg σε συνδυασμό με ασπιρίνη σε δόση 5 mg/kg στην ex vivo συσσώρευση των αιμοπεταλίων: προκλήθηκε αναστολή της ex vivo συσσώρευσης των αιμοπεταλίων με αγωνιστή το AA σε συγκέντρωση 500 μM κατά 51% ενώ με αγωνιστή το ADP σε συγκέντρωση 20 μM κατά 22%.
3. Επίδραση της ομάδας του (S,S) PSRCDCR-NH<sub>2</sub> σε δόση 6 mg/kg σε συνδυασμό με ασπιρίνη σε δόση 5 mg/kg στο βάρος του θρόμβου: το βάρος του θρόμβου που αφαιρέθηκε από την καρωτίδα του πειραματοζώου ήταν 3,09 mg.
4. Επίδραση της ομάδας του (S,S) PSRCDCR-NH<sub>2</sub> σε δόση 6 mg/kg σε συνδυασμό με ασπιρίνη σε δόση 5 mg/kg στο μέγεθος της αιμορραγίας: η ποσότητα του αίματος που συγκεντρώθηκε στην προζυγισμένη γάζα ήταν 250,45 mg.

**ΠΕΙΡΑΜΑ 2<sup>ο</sup>:**

Χρησιμοποιήθηκε πειραματόζωο βάρους 3,2 kg.

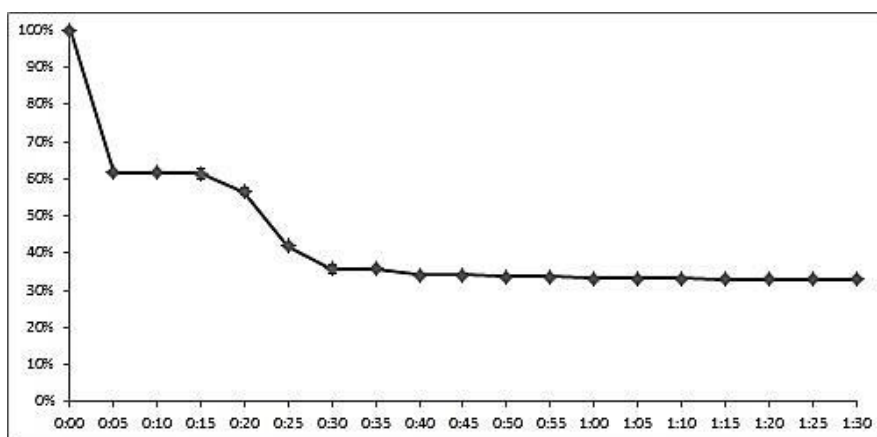
1. Επίδραση της ομάδας του (S,S) PSRCDCR-NH<sub>2</sub> σε δόση 6 mg/kg σε συνδυασμό με ασπιρίνη σε δόση 5 mg/kg στη ροή της καρωτίδας: η αρχική ροή στην

καρωτίδα ήταν 20 ml/min. Μετά τη επαγωγή της δημιουργίας του θρόμβου με εφαρμογή ηλεκτρικού ρεύματος, η ροή διατηρήθηκε για 90 λεπτά σε ποσοστό 32,80% της αρχικής.

2. Επίδραση της ομάδας του (S,S) PSRCDCR-NH<sub>2</sub> σε δόση 6 mg/kg σε συνδυασμό με ασπιρίνη σε δόση 5 mg/kg στην ex vivo συσσώρευση των αιμοπεταλίων: προκλήθηκε αναστολή της ex vivo συσσώρευσης των αιμοπεταλίων με αγωνιστή το AA σε συγκέντρωση 500 μM κατά 42% ενώ με αγωνιστή το ADP σε συγκέντρωση 20 μM κατά 37%.
3. Επίδραση της ομάδας του (S,S) PSRCDCR-NH<sub>2</sub> σε δόση 6 mg/kg σε συνδυασμό με ασπιρίνη σε δόση 5 mg/kg στο βάρος του θρόμβου: το βάρος του θρόμβου που αφαιρέθηκε από την καρωτίδα του πειραματοζώου ήταν 1,81 mg.
4. Επίδραση της ομάδας του (S,S) PSRCDCR-NH<sub>2</sub> σε δόση 3 mg/kg σε συνδυασμό με ασπιρίνη σε δόση 10 mg/kg στο μέγεθος της αιμορραγίας: η ποσότητα του αίματος που συγκεντρώθηκε στην προζυγισμένη γάζα ήταν 213,29 mg.

#### ΣΥΝΟΛΙΚΑ:

Συνολικά, στην ομάδα του (S,S) PSRCDCR-NH<sub>2</sub> σε δόση 6 mg/kg σε συνδυασμό με ασπιρίνη σε δόση 5 mg/kg, η μέση αρχική ροή στην καρωτίδα ήταν  $27 \pm 9,9$  ml/min. Μετά την επαγωγή του θρόμβου, Μετά την επαγωγή του θρόμβου, η καρωτίδα του πειραματοζώου παρέμεινε βατή για 90 λεπτά σε ποσοστό  $33,02 \pm 0,3\%$  (Εικ 109).



**Εικ 109:** η επί τοις εκατό μεταβολή της ροής στην καρωτίδα της ομάδας του (S,S) PSRCDCR-NH<sub>2</sub> 6 mg/kg σε συνδυασμό με ασπιρίνη σε δόση 5 mg/kg με την πάροδο του χρόνου ξεκινώντας άμεσα μετά την εφαρμογή του ηλεκτρικού ρεύματος έως και 90 λεπτά μετά την εφαρμογή του.

Η χορήγηση του (S,S) PSRCDCR-NH<sub>2</sub> σε δόση 6 mg/kg σε συνδυασμό με την ασπιρίνη σε δόση 5 mg/kg προκάλεσε μέση αναστολή της συσσώρευσης με αγωνιστές το AA και το ADP κατά  $46,5 \pm 4,95\%$  και  $29,5 \pm 7,78\%$  αντίστοιχα (πίνακας 44). Το μέσο βάρος του θρόμβου που προέκυψε ήταν  $2,45 \pm 0,64$  mg (πίνακας 45). Η ποσότητα του αίματος που συγκεντρώθηκε στην προζυγισμένη γάζα ήταν  $231,87 \pm 18,58$  mg (πίνακας 46).

	% Αναστολή AA	% Αναστολή ADP
Πείραμα 1	51%	22%
Πείραμα 2	42%	37%
<b>Μέση τιμή ± σταθερά απόκλισης</b>	<b><math>46,5 \pm 4,95\%</math></b>	<b><math>29,5 \pm 7,78\%</math></b>

**Πίνακας 44:** Αναστολή της *ex vivo* συσσώρευσης των αιμοπεταλίων στην ομάδα του (S,S) PSRCDCR-NH<sub>2</sub> σε δόση 6 mg/kg σε συνδυασμό με ασπιρίνη σε δόση 5 mg/kg.

	Βάρος Θρόμβου (mg)
Πείραμα 1	3,09
Πείραμα 2	1,81
<b>Μέση τιμή ± σταθερά απόκλισης</b>	<b><math>2,45 \pm 0,64</math></b>

**Πίνακας 45:** βάρος θρόμβου στην ομάδα του (S,S) PSRCDCR-NH<sub>2</sub> σε δόση 6 mg/kg σε συνδυασμό με ασπιρίνη σε δόση 5 mg/kg.

	Ποσό αιμορραγίας (mg)
Πείραμα 1	250,45
Πείραμα 2	213,29
<b>Μέση τιμή ± σταθερά απόκλισης</b>	<b>231,87 ± 18,58</b>

**Πίνακας 46:** ποσότητα αιμορραγίας της ομάδας του (S,S) PSRCDCR-NH<sub>2</sub> σε δόση 6 mg/kg σε συνδυασμό με ασπιρίνη σε δόση 5 mg/kg.

(S,S) PSRCDCR-NH<sub>2</sub> ΣΕ ΔΟΣΗ 12 mg/kg ΣΕ ΣΥΝΔΥΑΣΜΟ ΜΕ ΑΣΠΙΡΙΝΗ 5 mg/kg.

ΠΕΙΡΑΜΑ 1<sup>ο</sup>:

Χρησιμοποιήθηκε πειραματόζωο βάρους 3,2 kg.

1. Επίδραση της ομάδας του (S,S) PSRCDCR-NH<sub>2</sub> σε δόση 12 mg/kg σε συνδυασμό με ασπιρίνη σε δόση 5 mg/kg στη ροή της καρωτίδας: η αρχική ροή στην καρωτίδα ήταν 17 ml/min. Μετά τη επαγωγή της δημιουργίας του θρόμβου με εφαρμογή ηλεκτρικού ρεύματος, η ροή διατηρήθηκε για 90 λεπτά σε ποσοστό 46,97% της αρχικής.
2. Επίδραση της ομάδας του (S,S) PSRCDCR-NH<sub>2</sub> σε δόση 12 mg/kg σε συνδυασμό με ασπιρίνη σε δόση 5 mg/kg στην ex vivo συσσώρευση των αιμοπεταλίων: προκλήθηκε αναστολή της ex vivo συσσώρευσης των αιμοπεταλίων με αγωνιστή το AA σε συγκέντρωση 500 μM κατά 89% ενώ με αγωνιστή το ADP σε συγκέντρωση 20 μM κατά 36%.
3. Επίδραση της ομάδας του (S,S) PSRCDCR-NH<sub>2</sub> σε δόση 12 mg/kg σε συνδυασμό με ασπιρίνη σε δόση 5 mg/kg στο βάρος του θρόμβου: το βάρος του θρόμβου που αφαιρέθηκε από την καρωτίδα του πειραματοζώου ήταν 2,44 mg.

4. Επίδραση της ομάδας του (S,S) PSRCDCR-NH<sub>2</sub> σε δόση 12 mg/kg σε συνδυασμό με ασπιρίνη σε δόση 5 mg/kg στο μέγεθος της αιμορραγίας: η ποσότητα του αίματος που συγκεντρώθηκε στην προζυγισμένη γάζα ήταν 302,73 mg.

#### ΠΕΙΡΑΜΑ 2<sup>ο</sup>:

Χρησιμοποιήθηκε πειραματόζωο βάρους 2,9 kg.

1. Επίδραση της ομάδας του (S,S) PSRCDCR-NH<sub>2</sub> σε δόση 12 mg/kg σε συνδυασμό με ασπιρίνη σε δόση 5 mg/kg στη ροή της καρωτίδας: η αρχική ροή στην καρωτίδα ήταν 19 ml/min. Μετά τη επαγωγή της δημιουργίας του θρόμβου με εφαρμογή ηλεκτρικού ρεύματος, η ροή διατηρήθηκε για 90 λεπτά σε ποσοστό 73,1% της αρχικής.
2. Επίδραση της ομάδας του (S,S) PSRCDCR-NH<sub>2</sub> σε δόση 12 mg/kg σε συνδυασμό με ασπιρίνη σε δόση 5 mg/kg στην ex vivo συσσώρευση των αιμοπεταλίων: προκλήθηκε αναστολή της ex vivo συσσώρευσης των αιμοπεταλίων με αγωνιστή το AA σε συγκέντρωση 500 μM κατά 72% ενώ με αγωνιστή το ADP σε συγκέντρωση 20 μM κατά 65,23%.
3. Επίδραση της ομάδας του (S,S) PSRCDCR-NH<sub>2</sub> σε δόση 12 mg/kg σε συνδυασμό με ασπιρίνη σε δόση 5 mg/kg στο βάρος του θρόμβου: το βάρος του θρόμβου που αφαιρέθηκε από την καρωτίδα του πειραματοζώου ήταν 3,25 mg.
4. Επίδραση της ομάδας του (S,S) PSRCDCR-NH<sub>2</sub> σε δόση 12 mg/kg σε συνδυασμό με ασπιρίνη σε δόση 5 mg/kg στο μέγεθος της αιμορραγίας: η ποσότητα του αίματος που συγκεντρώθηκε στην προζυγισμένη γάζα ήταν 266,07 mg.

#### ΠΕΙΡΑΜΑ 3<sup>ο</sup>:

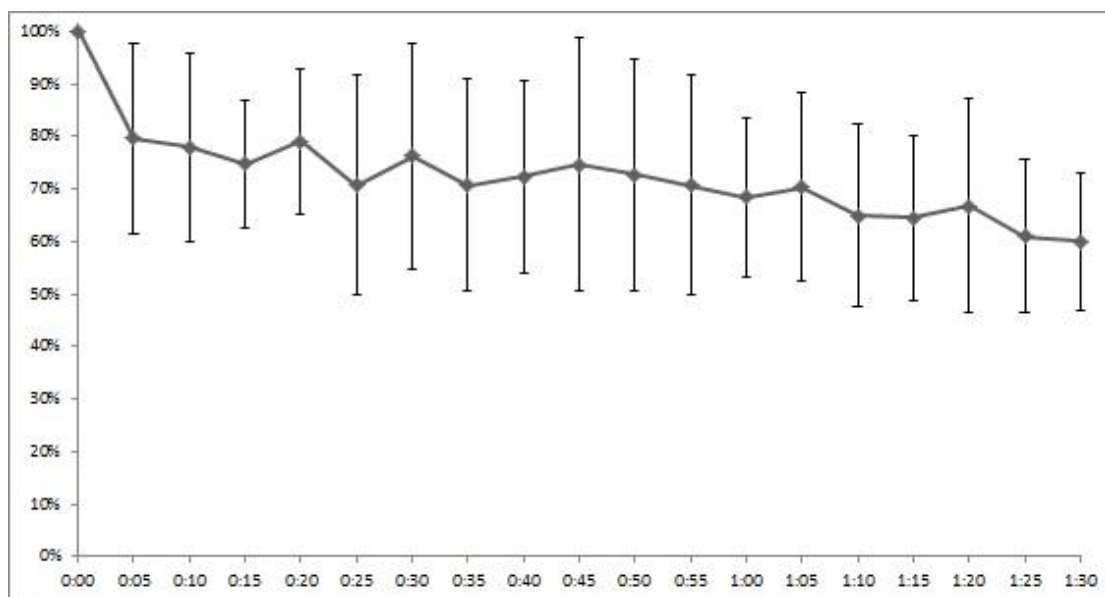
Χρησιμοποιήθηκε πειραματόζωο βάρους 3,1 kg.

1. Επίδραση της ομάδας του (S,S) PSRCDCR-NH<sub>2</sub> σε δόση 12 mg/kg σε συνδυασμό με ασπιρίνη σε δόση 5 mg/kg στη ροή της καρωτίδας: η αρχική ροή στην καρωτίδα ήταν 21 ml/min. Μετά τη επαγωγή της δημιουργίας του θρόμβου με εφαρμογή ηλεκτρικού ρεύματος, η ροή διατηρήθηκε για 90 λεπτά σε ποσοστό 60,04% της αρχικής.
2. Επίδραση της ομάδας του (S,S) PSRCDCR-NH<sub>2</sub> σε δόση 12 mg/kg σε συνδυασμό με ασπιρίνη σε δόση 5 mg/kg στην ex vivo συσσώρευση των αιμοπεταλίων: προκλήθηκε αναστολή της ex vivo συσσώρευσης των αιμοπεταλίων με αγωνιστή το AA σε συγκέντρωση 500 μM κατά 94% ενώ με αγωνιστή το ADP σε συγκέντρωση 20 μM κατά 50%.
3. Επίδραση της ομάδας του (S,S) PSRCDCR-NH<sub>2</sub> σε δόση 12 mg/kg σε συνδυασμό με ασπιρίνη σε δόση 5 mg/kg στο βάρος του θρόμβου: το βάρος του θρόμβου που αφαιρέθηκε από την καρωτίδα του πειραματοζώου ήταν 1,6 mg.
4. Επίδραση της ομάδας του (S,S) PSRCDCR-NH<sub>2</sub> σε δόση 3 mg/kg σε συνδυασμό με ασπιρίνη σε δόση 5 mg/kg στο μέγεθος της αιμορραγίας: η ποσότητα του αίματος που συγκεντρώθηκε στην προζυγισμένη γάζα ήταν 285,6 mg.

#### ΣΥΝΟΛΙΚΑ:

Συνολικά, στην ομάδα του (S,S) PSRCDCR-NH<sub>2</sub> σε δόση 12 mg/kg σε συνδυασμό με ασπιρίνη 5 mg/kg, η μέση αρχική ροή στην καρωτίδα ήταν  $19 \pm 2$  ml/min. Μετά την επαγωγή του θρόμβου, η καρωτίδα του πειραματοζώου παρέμεινε βατή για 90 λεπτά σε ποσοστό  $60,04 \pm 13,07\%$  (βλέπε εικόνα).





**Εικ 110:** η επί τοις εκατό μεταβολή της ροής στην καρωτίδα για την ομάδα του (S,S) PSRCD CR-NH<sub>2</sub> 12 mg/kg σε συνδυασμό με ασπιρίνη σε δόση 5 mg/kg με την πάροδο του χρόνου ξεκινώντας άμεσα μετά την εφαρμογή του ηλεκτρικού ρεύματος έως και 90 λεπτά μετά την εφαρμογή του.

Η χορήγηση του (S,S) PSRCD CR-NH<sub>2</sub> σε δόση 12 mg/kg σε συνδυασμό με την ασπιρίνη σε δόση 5 mg/kg προκάλεσε μέση αναστολή της συσσώρευσης με αγωνιστές το AA και το ADP κατά  $85 \pm 11,53\%$  και  $50,4 \pm 14,83\%$  (Πίνακας 47). Το μέσο βάρος του θρόμβου που προέκυψε ήταν  $2,43 \pm 0,85$  mg (πίνακας 48). Η ποσότητα του αίματος που συγκεντρώθηκε στην προζυγισμένη γάζα ήταν  $248,8 \pm 17,93$  mg (πίνακας 49).

	% Αναστολή AA	% Αναστολή ADP
Πείραμα 1	72%	65%
Πείραμα 2	89%	36%
Πείραμα 3	94%	50%
<b>Μέση τιμή ± σταθερά απόκλισης</b>	<b>85 ± 11,53%</b>	<b>50,4 ± 14,83%</b>

**Πίνακας 47:** Αναστολή της *ex vivo* συσσώρευσης των αιμοπεταλίων στην ομάδα του (S,S) PSRCD CR-NH<sub>2</sub> σε δόση 12 mg/kg σε συνδυασμό με ασπιρίνη σε δόση 5 mg/kg.

	Βάρος Θρόμβου (mg)
Πείραμα 1	3,25
Πείραμα 2	2,44
Πείραμα 3	1,6
<b>Μέση τιμή ± σταθερά απόκλισης</b>	<b>2,43 ± 0,85</b>

**Πίνακας 48:** βάρος θρόμβου στην ομάδα του (S,S) PSRCDCR-NH<sub>2</sub> σε δόση 12 mg/kg σε συνδυασμό με ασπιρίνη σε δόση 5 mg/kg.

	Ποσό αιμορραγίας (mg)
Πείραμα 1	266,07
Πείραμα 2	302,73
Πείραμα 3	285,6
<b>Μέση τιμή ± σταθερά απόκλισης</b>	<b>284,8 ± 17,93</b>

**Πίνακας 49:** ποσότητα αιμορραγίας της ομάδας του (S,S) PSRCDCR-NH<sub>2</sub> σε δόση 12 mg/kg σε συνδυασμό με ασπιρίνη σε δόση 5 mg/kg.

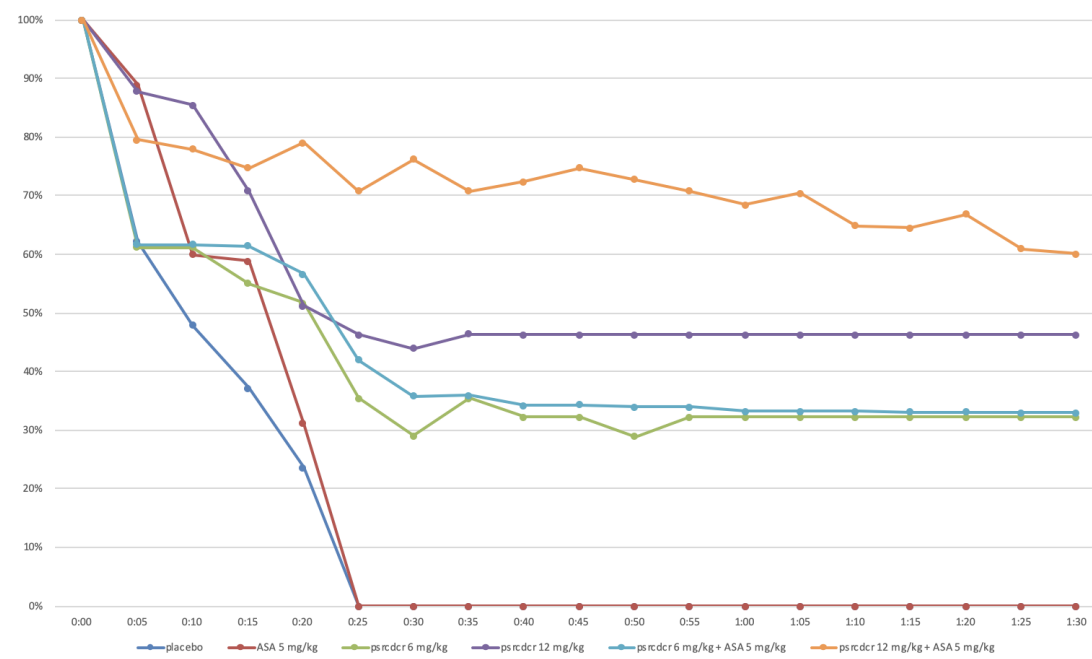
**ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΤΗΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΩΝ ΟΜΑΔΩΝ ΤΟΥ (S,S) PSRCDCR-NH<sub>2</sub>****ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΩΝ ΟΜΑΔΩΝ ΤΟΥ (S,S) PSRCDCR-NH<sub>2</sub> ΣΤΗ ΡΟΗ ΤΗΣ ΚΑΡΩΤΙΔΑΣ**

Η ομάδα του (S,S) PSRCDCR-NH<sub>2</sub> 6 mg/kg σε συνδυασμό με ασπιρίνη σε δόση 5 mg/kg διατήρησε βατό το αγγείο σε ποσοστό 33,02 ± 0,3% της αρχικής ροής του (p<0,004 σε σχέση με την ομάδα ελέγχου και την ομάδα της ασπιρίνης σε δόση 5 mg/kg και p<0,61 σε σχέση με την ομάδα του (S,S) PSRCDCR-NH<sub>2</sub> 6 mg/kg), ενώ η ομάδα του (S,S) PSRCDCR-NH<sub>2</sub> 12 mg/kg σε συνδυασμό με ασπιρίνη σε δόση 5 mg/kg εξασφάλισε μια τελική ροή αίματος σε ποσοστό 60,04 ± 13,07% της αρχικής (p<0,025 σε σχέση με την ομάδα ελέγχου, p<0,018 σε σχέση με την ομάδα της ασπιρίνης σε δόση 5 mg/kg και p<0,3 σε σχέση με την ομάδα του (S,S)-PSRCDCR-NH<sub>2</sub> 12 mg/kg) (πίνακας 50, εικ. 111).

Ουσίες που χορηγήθηκαν	Τελική ροή της καρωτίδας (σε ποσοστό της αρχικής ροής)	p
placebo (n=5)	0%	-
ασπιρίνη 5 mg/kg (n=2)	0%	*p<1
(S,S)-PSRCDCR-NH <sub>2</sub> 6 mg/kg (n=3)	32 ± 00,1%*	*p<0,05
(S,S)-PSRCDCR-NH <sub>2</sub> 12 mg/kg (n=3)	46,3 ± 0,01*	*p<0,001
(S,S)-PSRCDCR-NH <sub>2</sub> 6 mg/kg + ασπιρίνη 5 mg/kg (n=2)	33,02 ± 0,3%*†	*p<0,004 †p<0,004 ‡p<0,61
(S,S)-PSRCDCR-NH <sub>2</sub> 12 mg/kg + ασπιρίνη 5 mg/kg (n=3)	60,04 ± 13,07%*†	*p<0,025 †p<0,018 ‡p<0,3

**Πίνακας 50:** σύγκριση της επίδρασης των ομάδων του (S,S) PSRCDCR-NH<sub>2</sub> 6 mg/kg και 12 mg/kg σε συνδυασμό με ασπιρίνη 5 mg/kg στη ροή της καρωτίδας του ζώου 90 λεπτά μετά την εφαρμογή του ηλεκτρικού ρεύματος. (\*) στατιστική σημαντικότητα σε σχέση με την ομάδα ελέγχου, (†) στατιστική

σημαντικότητα σε σχέση με την ομάδα της αντίστοιχης δόσης της ασπιρίνης, ( $\ddagger$ ) στατιστική σημαντικότητα σε σχέση με την ομάδα της αντίστοιχης δόσης του (S,S) PSRCDCR-NH<sub>2</sub>.



**Εικ 111:** σύγκριση της επίδρασης των ομάδων συνδυασμού του πεπτιδίου (S,S) PSRCDCR-NH<sub>2</sub> με ασπιρίνη στη ροή της καρωτίδας του πειραματοζώου έως κι 90 λεπτά μετά την επαγωγή της δημιουργίας του θρόμβου με εφαρμογή ηλεκτρικού ρεύματος.

Συμπερασματικά, το πεπτίδιο (S,S) PSRCDCR-NH<sub>2</sub> 6 mg/kg και 12 mg/kg σε συνδυασμό με ασπιρίνη 5 mg/kg κατάφερε να διατηρήσει τη βατότητα της καρωτίδας του ζώου. Το αποτέλεσμα αυτό ήταν στατιστικά σημαντικό συγκριτικά με την ομάδα ελέγχου και την ομάδα της ασπιρίνης 5 mg/kg. Δεν ήταν στατιστικά σημαντικό συγκριτικά με τις αντίστοιχες ομάδες του πεπτιδίου.

#### ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΩΝ ΟΜΑΔΩΝ ΤΟΥ (S,S) PSRCDCR-NH<sub>2</sub> ΣΤΗΝ ΕΧ VIVO ΣΥΣΣΩΡΕΥΣΗ ΤΩΝ ΑΙΜΟΠΕΤΑΛΙΩΝ

Η ομάδα του (S,S) PSRCDCR-NH<sub>2</sub> 6 mg/kg σε συνδυασμό με την ασπιρίνη σε δόση 5 mg/kg προκάλεσε αναστολή της ex vivo συσσώρευσης των αιμοπεταλίων με αγωνιστή το AA κατά  $46,5 \pm 4,95\%$  ( $p < 0,001$  συγκριτικά με την ομάδα ελέγχου,

$p < 0,002$  συγκριτικά με την ομάδα της ασπιρίνης 5 mg/kg και  $p < 0,077$  συγκριτικά με την ομάδα του (S,S) PSRCDCR-NH<sub>2</sub> σε δόση 6 mg/kg) ενώ με αγωνιστή το ADP κατά  $29,5 \pm 7,78\%$  ( $p < 0,003$  συγκριτικά με την ομάδα ελέγχου,  $p < 0,019$  συγκριτικά με την ομάδα της ασπιρίνης σε δόση 5 mg/kg και  $p < 0,452$  συγκριτικά με την ομάδα του (S,S)-PSRCDCR-NH<sub>2</sub> σε δόση 6 mg/kg. Η ομάδα του (S,S) PSRCDCR-NH<sub>2</sub> σε δόση 12 mg/kg σε συνδυασμό με την ασπιρίνη σε δόση 5 mg/kg προκάλεσε αναστολή της ex vivo συσσώρευσης των αιμοπεταλίων με αγωνιστή το AA κατά  $85 \pm 11,53\%$  ( $p < 0,001$  συγκριτικά με την ομάδα ελέγχου,  $p < 0,001$  συγκριτικά με την ομάδα της ασπιρίνης σε δόση 5 mg/kg και  $p < 0,27$  συγκριτικά με την ομάδα του (S,S) PSRCDCR-NH<sub>2</sub> σε δόση 12 mg/kg) ενώ με αγωνιστή το ADP κατά  $50,4 \pm 14,83\%$  ( $p < 0,038$  συγκριτικά με την ομάδα ελέγχου,  $p < 0,003$  συγκριτικά με την ομάδα της ασπιρίνης σε δόση 5 mg/kg και  $p < 0,436$  συγκριτικά με την ομάδα του (S,S) PSRCDCR-NH<sub>2</sub> σε δόση 12 mg/kg) (πίνακας 51).

Ουσίες που χορηγήθηκαν	% αναστολή AA 500 μM	p	% αναστολή ADP 20 μM	p
placebo (n=5)	9,2 ± 3,1	-	9,2 ± 3,1	-
ασπιρίνη 5 mg/kg (n=2)	13 ± 1,41	*p<1	9 ± 2,83	*p<1
(S,S) PSRCDCR-NH <sub>2</sub> 6 mg/kg (n=3)	34 ± 5,29*	*p<0,01	24,3 ± 5,85*	*p<0,01
(S,S) PSRCDCR-NH <sub>2</sub> 12 mg/kg (n=3)	72,3 ± 12,5*	*p<0,001	42 ± 3*	*p<0,001
(S,S) PSRCDCR-NH <sub>2</sub> 6 mg/kg + ασπιρίνη 5 mg/kg (n=2)	46,5 ± 4,95*†	*p<0,001 †p<0,002 ‡p<0,077	29,5 ± 7,78*†	*p<0,003 †p<0,019 ‡p<0,452
(S,S) PSRCDCR-NH <sub>2</sub> 12 mg/kg + ασπιρίνη 5 mg/kg (n=3)	85 ± 11,53*†	*p<0,001 †p<0,001 ‡p<0,27	50,4 ± 14,83*†	*p<0,038 †p<0,003 ‡p<0,436

**Πίνακας 51:** Επί τοις εκατό (%) αναστολές της ex vivo συσσώρευσης των αιμοπεταλίων από τις ομάδες της ασπιρίνης, του (S,S) PSRCDCR-NH<sub>2</sub> και των συνδυασμών που μελετήθηκαν. \*στατιστική σημαντικότητα συγκριτικά με την ομάδα ελέγχου, †στατιστική σημαντικότητα συγκριτικά με την αντίστοιχη δόση της ασπιρίνης, ‡στατιστική σημαντικότητα συγκριτικά με την αντίστοιχη δόση του πεπτιδίου.

Συμπερασματικά, τόσο ο συνδυασμός του (S,S) PSRCDCR-NH<sub>2</sub> 6 mg/kg με ασπιρίνη 5 mg/kg όσο και ο συνδυασμός του (S,S) PSRCDCR-NH<sub>2</sub> 12 mg/kg με ασπιρίνη 5 mg/kg οδηγούν σε στατιστικά σημαντική βελτίωση της ex vivo αναστολής της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων συγκριτικά με την ομάδα ελέγχου και την ομάδα της ασπιρίνης 5 mg/kg. Δεν οδηγούν σε στατιστικά σημαντική ενίσχυση της αναστολής συγκριτικά με τις αντίστοιχες δόσεις των πεπτιδίων.

μόνο ο συνδυασμός του (S,S) PSRCDCR-NH<sub>2</sub> σε δόση 6 mg/kg με ασπιρίνη 5 mg/kg, έναντι του πεπτιδίου (S,S) PSRCDCR-NH<sub>2</sub> σε δόση 6 mg/kg, καταφέρνει μια στατιστικά σημαντική αύξηση της ex vivo αιμοπεταλιακής συσσώρευσης με αγωνιστή το AA, γεγονός βέβαιο το οποίο, όπως άλλωστε είναι αναμενόμενο, δε παρατηρείται με το ADP. Όσον αφορά το συνδυασμό του (S,S) PSRCDCR-NH<sub>2</sub> σε δόση 12 mg/kg με την ασπιρίνη σε δόση 5 mg/kg, αυτός φαίνεται να επιτυγχάνει στατιστικά σημαντική αναστολή της ex vivo συσσώρευσης είτε με αγωνιστή το AA είτε με το ADP, μόνο όμως συγκριτικά με την ασπιρίνη σε δόση 5 mg/kg ( $p < 0,001$  και για τους δύο αγωνιστές). Δεδομένου όμως ότι το (S,S) PSRCDCR-NH<sub>2</sub> σε δόση 12 mg/kg παρουσιάζει επίσης στατιστικά σημαντική αναστολή της ex vivo συσσώρευσης των αιμοπεταλίων με αγωνιστή το AA συγκρινόμενο με την ασπιρίνη σε δόση 5 mg/kg ( $p < 0,001$  για το AA,  $p < 0,2$  για το ADP), είναι αδύνατο να στοιχειοθετηθεί το όφελος της χορήγησης ενός συνδυασμού (πεπτίδιο συν ασπιρίνη) έναντι του πεπτιδίου μόνου.

#### ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΩΝ ΟΜΑΔΩΝ ΤΟΥ (S,S) PSRCDCR-NH<sub>2</sub> ΣΤΟ ΒΑΡΟΣ ΤΟΥ ΣΧΗΜΑΤΙΖΟΜΕΝΟΥ ΘΡΟΜΒΟΥ

Η ομάδα του συνδυασμού (S,S) PSRCDCR-NH<sub>2</sub> 6 mg/kg με ασπιρίνη σε δόση 5 mg/kg οδήγησε στο σχηματισμό ενός θρόμβου βάρους  $2,45 \pm 0,64$  mg ( $p < 1$  συγκριτικά με την ομάδα ελέγχου,  $p < 1$  συγκριτικά με την ομάδα της ασπιρίνης σε δόση 5 mg/kg και  $p < 1$

συγκριτικά με την ομάδα του πεπτιδίου σε δόση 6 mg/kg), ενώ η ομάδα του συνδυασμού (S,S) PSRCDCR-NH<sub>2</sub> 12 mg/kg με ασπιρίνη σε δόση 5 mg/kg προκάλεσε τη δημιουργία θρόμβου 2,43±0,85 mg (p<0,01 συγκριτικά με την ομάδα ελέγχου, p<0,002 συγκριτικά με την ομάδα της ασπιρίνης σε δόση 5 mg/kg και p<0,68 συγκριτικά με την ομάδα του πεπτιδίου σε δόση 12 mg/kg) (πίνακας 52).

Ουσίες που χορηγήθηκαν	Βάρος θρόμβου (mg)	p
placebo (n=5)	5,72±0,86	-
ασπιρίνη 5 mg/kg (n=2)	9,8±0,14	*p<1
(S,S) PSRCDCR-NH <sub>2</sub> 6 mg/kg (n=3)	2,95±0,2*	*p<0,05
(S,S) PSRCDCR-NH <sub>2</sub> 12 mg/kg (n=3)	2,13±0,08*	*p<0,001
(S,S) PSRCDCR-NH <sub>2</sub> 6 mg/kg + ασπιρίνη 5 mg/kg (n=2)	2,45±0,64	*p<1 †p<1 ‡p<1
(S,S) PSRCDCR-NH <sub>2</sub> 12 mg/kg + ασπιρίνη 5 mg/kg (n=3)	2,43±0,85	*p<0,01 †p<0,002 ‡p<0,68

**Πίνακας 52:** επίδραση των ουσιών που μελετήθηκαν στο βάρος του σχηματισθέντος θρόμβου. \*στατιστική σημαντικότητα σε σχέση με την ομάδα ελέγχου, † στατιστική σημαντικότητα σε σχέση με την αντίστοιχη ομάδα της ασπιρίνης, ‡ στατιστική σημαντικότητα σε σχέση με την αντίστοιχη δόση του πεπτιδίου.

Συμπερασματικά, καμία από τις δύο ομάδες συνδυασμών δε κατάφερε να μειώσει το βάρος του θρόμβου συγκριτικά με την αντίστοιχη ομάδα του πεπτιδίου. Αντιθέτως, η ομάδα του συνδυασμού (S,S) PSRCDCR-NH<sub>2</sub> 12 mg/kg με ασπιρίνη 5 mg/kg κατάφερε να μειώσει στατιστικά σημαντικά το βάρος του σχηματιζόμενου θρόμβου τόσο συγκριτικά με την ομάδα ελέγχου, όσο και με την ομάδα της ασπιρίνης 5 mg/kg.

ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΩΝ ΟΜΑΔΩΝ ΤΟΥ (S,S) PSRCDCR-NH<sub>2</sub> ΣΤΗΝ ΠΟΣΟΤΗΤΑ ΤΗΣ ΑΙΜΟΡΡΑΓΙΑΣ (ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΤΗΣ ΑΣΦΑΛΕΙΑΣ)

Το ποσό της αιμορραγίας υπολογίστηκε από το βάρος του αίματος που συσσωρεύτηκε σε προζυγισμένη γάζα από τομή που είχε πραγματοποιηθεί στο πρόσθιο κοιλιακό τοίχωμα του πειραματόζωου, 60 λεπτά μετά την έναρξη χορήγησης της κάθε ουσίας. Για την ομάδα του συνδυασμού (S,S) PSRCDCR-NH<sub>2</sub> σε δόση 6 mg/kg με την ασπιρίνη σε δόση 5 mg/kg ήταν 231,87 ± 18,58 mg (p<0,73 συγκριτικά με την ομάδα ελέγχου, p<0,3 συγκριτικά με την ομάδα της ασπιρίνης σε δόση 5 mg/kg και p<0,2 συγκριτικά με την ομάδα του (S,S) PSRCDCR-NH<sub>2</sub> σε δόση 6 mg/kg). Για την ομάδα του συνδυασμού του (S,S) PSRCDCR-NH<sub>2</sub> σε δόση 12 mg/kg με την ασπιρίνη σε δόση 5 mg/kg ήταν 248,8 ± 17,93 mg (p<0,52 για την ομάδα ελέγχου, p<0,76 για την ομάδα της ασπιρίνης σε δόση 5 mg/kg και p<0,94 για την ομάδα του (S,S)-PSRCDCR-NH<sub>2</sub> σε δόση 12 mg/kg) (πίνακας 53).

Ουσίες που χορηγήθηκαν	Ποσότητα της αιμορραγίας (mg)	p
placebo (n=5)	256,4±88,4	-
ασπιρίνη 5 mg/kg (n=2)	305±72,12	*p<1
(S,S) PSRCDCR-NH <sub>2</sub> 6 mg/kg (n=3)	301,33±55,82	*p<0,417
(S,S) PSRCDCR-NH <sub>2</sub> 12 mg/kg (n=3)	277±35,3	*p<0,345
(S,S) PSRCDCR-NH <sub>2</sub> 6 mg/kg + ασπιρίνη 5 mg/kg (n=2)	231,87 ± 18,58	*p<73 †p<0,3 ‡p<0,2
(S,S) PSRCDCR-NH <sub>2</sub> 12 mg/kg + ασπιρίνη 5 mg/kg (n=3)	284,8 ± 17,93	*p<0,52 †p<0,76 ‡p<0,94

**Πίνακας 53:** Ποσότητα αιμορραγίας (mg) στις υποομάδες των πειραματόζωων. \*στατιστική σημαντικότητα συγκριτικά με την ομάδα ελέγχου, †στατιστική σημαντικότητα συγκριτικά με την αντίστοιχη δόση της ασπιρίνης, ‡στατιστική σημαντικότητα συγκριτικά με την αντίστοιχη δόση του πεπτιδίου.



Συμπερασματικά ο συνδυασμός του (S,S) PSRCDCR-NH<sub>2</sub> με την ασπιρίνη απεδείχθη ασφαλής. Η χορήγηση του πεπτιδίου σε δόσεις 6 mg/kg και 12 mg/kg Δε προκάλεσε στατιστικά σημαντική αύξηση της αιμορραγίας στα πειραματόζωα συγκριτικά με τις αντίστοιχες ομάδες του πεπτιδίου, την ομάδα ελέγχου ή την ομάδα της ασπιρίνης 5 mg/kg.

### **IN VIVO ΔΟΚΙΜΗ ΤΟΥ ΠΕΠΤΙΔΙΟΥ YMESRADR ΜΕ ΤΗΝ ΑΣΠΙΡΙΝΗ**

YMESRADR ΣΕ ΔΟΣΗ 7,5 mg/kg ΣΕ ΣΥΝΔΥΑΣΜΟ ΜΕ ΑΣΠΙΡΙΝΗ 5 mg/kg.

#### **ΠΕΙΡΑΜΑ 1<sup>ο</sup>:**

Χρησιμοποιήθηκε πειραματόζωο βάρους 3,1 kg.

1. Επίδραση της ομάδας του YMESRADR σε δόση 7,5 mg/kg σε συνδυασμό με ασπιρίνη σε δόση 5 mg/kg στη ροή της καρωτίδας: η αρχική ροή στην καρωτίδα ήταν 14 ml/min. Μετά τη επαγωγή της δημιουργίας του θρόμβου με εφαρμογή ηλεκτρικού ρεύματος, η ροή διατηρήθηκε για 90 λεπτά σε ποσοστό 64,28% της αρχικής.
2. Επίδραση της ομάδας του YMESRADR σε δόση 7,5 mg/kg σε συνδυασμό με ασπιρίνη σε δόση 5 mg/kg στην ex vivo συσώρευση των αιμοπεταλίων: προκλήθηκε αναστολή της ex vivo συσώρευσης των αιμοπεταλίων με αγωνιστή το AA σε συγκέντρωση 500 μM κατά 36% ενώ με αγωνιστή το ADP σε συγκέντρωση 20 μM κατά 22%.
3. Επίδραση της ομάδας του YMESRADR σε δόση 6 mg/kg σε συνδυασμό με ασπιρίνη σε δόση 5 mg/kg στο βάρος του θρόμβου: το βάρος του θρόμβου που αφαιρέθηκε από την καρωτίδα του πειραματοζώου ήταν 5,98 mg.

4. Επίδραση της ομάδας του YMESRADR σε δόση 6 mg/kg σε συνδυασμό με ασπιρίνη σε δόση 5 mg/kg στο μέγεθος της αιμορραγίας: η ποσότητα του αίματος που συγκεντρώθηκε στην προζυγισμένη γάζα ήταν 237,49 mg.

#### ΠΕΙΡΑΜΑ 2<sup>ο</sup>:

Χρησιμοποιήθηκε πειραματόζωο βάρους 3,1 kg.

1. Επίδραση της ομάδας του YMESRADR σε δόση 7,5 mg/kg σε συνδυασμό με ασπιρίνη σε δόση 5 mg/kg στη ροή της καρωτίδας: η αρχική ροή στην καρωτίδα ήταν 25 ml/min. Μετά τη επαγωγή της δημιουργίας του θρόμβου με εφαρμογή ηλεκτρικού ρεύματος, η ροή διατηρήθηκε για 90 λεπτά σε ποσοστό 55,55% της αρχικής.
2. Επίδραση της ομάδας του YMESRADR σε δόση 7,5 mg/kg σε συνδυασμό με ασπιρίνη σε δόση 5 mg/kg στην ex vivo συσώρευση των αιμοπεταλίων: προκλήθηκε αναστολή της ex vivo συσώρευσης των αιμοπεταλίων με αγωνιστή το AA σε συγκέντρωση 500 μM κατά 25% ενώ με αγωνιστή το ADP σε συγκέντρωση 20 μM κατά 18%.
3. Επίδραση της ομάδας του YMESRADR σε δόση 6 mg/kg σε συνδυασμό με ασπιρίνη σε δόση 5 mg/kg στο βάρος του θρόμβου: το βάρος του θρόμβου που αφαιρέθηκε από την καρωτίδα του πειραματόζωου ήταν 5,4 mg.
4. Επίδραση της ομάδας του YMESRADR σε δόση 6 mg/kg σε συνδυασμό με ασπιρίνη σε δόση 5 mg/kg στο μέγεθος της αιμορραγίας: η ποσότητα του αίματος που συγκεντρώθηκε στην προζυγισμένη γάζα ήταν 245,72 mg.

#### ΠΕΙΡΑΜΑ 3<sup>ο</sup>:

Χρησιμοποιήθηκε πειραματόζωο βάρους 3 kg.

1. Επίδραση της ομάδας του YMESRADR σε δόση 7,5 mg/kg σε συνδυασμό με ασπιρίνη σε δόση 5 mg/kg στη ροή της καρωτίδας: η αρχική ροή στην καρωτίδα ήταν 18 ml/min. Μετά τη επαγωγή της δημιουργίας του θρόμβου

με εφαρμογή ηλεκτρικού ρεύματος, η ροή διατηρήθηκε για 90 λεπτά σε ποσοστό 46,15% της αρχικής.

2. Επίδραση της ομάδας του YMESRADR σε δόση 7,5 mg/kg σε συνδυασμό με ασπιρίνη σε δόση 5 mg/kg στην ex vivo συσώρευση των αιμοπεταλίων: προκλήθηκε αναστολή της ex vivo συσώρευσης των αιμοπεταλίων με αγωνιστή το AA σε συγκέντρωση 500 μM κατά 23% ενώ με αγωνιστή το ADP σε συγκέντρωση 20 μM κατά 46%.
3. Επίδραση της ομάδας του YMESRADR σε δόση 6 mg/kg σε συνδυασμό με ασπιρίνη σε δόση 5 mg/kg στο βάρος του θρόμβου: το βάρος του θρόμβου που αφαιρέθηκε από την καρωτίδα του πειραματοζώου ήταν 3,04 mg.
4. Επίδραση της ομάδας του YMESRADR σε δόση 6 mg/kg σε συνδυασμό με ασπιρίνη σε δόση 5 mg/kg στο μέγεθος της αιμορραγίας: η ποσότητα του αίματος που συγκεντρώθηκε στην προζυγισμένη γάζα ήταν 212,88 mg.

#### ΠΕΙΡΑΜΑ 4<sup>ο</sup>:

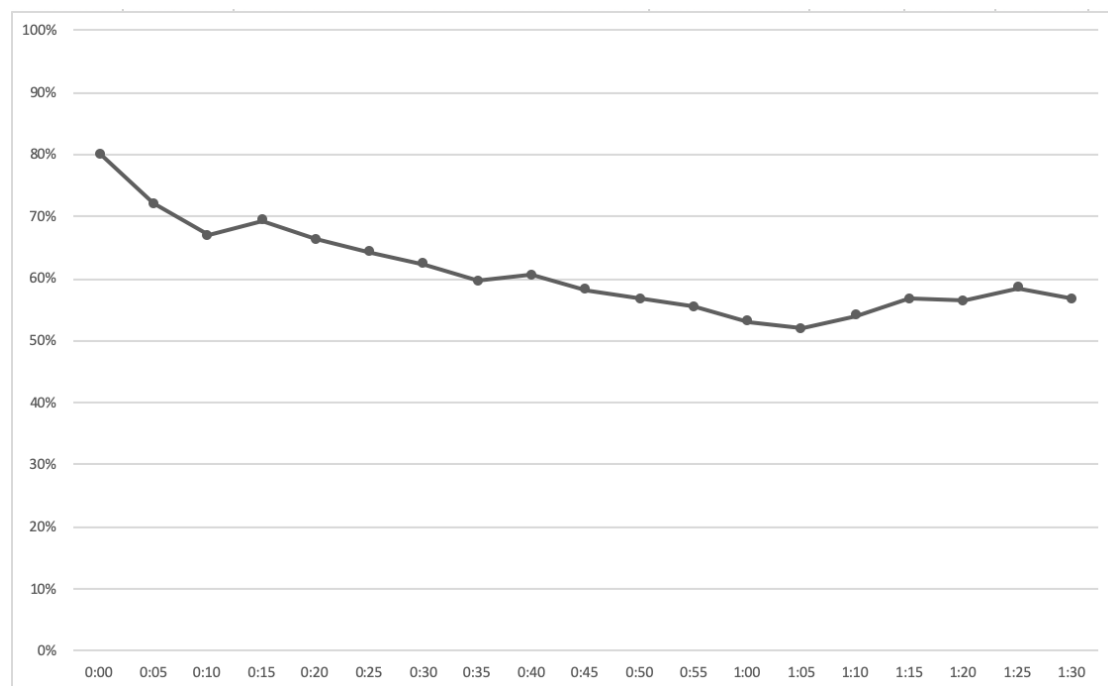
Χρησιμοποιήθηκε πειραματοζώο βάρους 2,9 kg.

1. Επίδραση της ομάδας του YMESRADR σε δόση 7,5 mg/kg σε συνδυασμό με ασπιρίνη σε δόση 5 mg/kg στη ροή της καρωτίδας: η αρχική ροή στην καρωτίδα ήταν 23 ml/min. Μετά τη επαγωγή της δημιουργίας του θρόμβου με εφαρμογή ηλεκτρικού ρεύματος, η ροή διατηρήθηκε για 90 λεπτά σε ποσοστό 61,11% της αρχικής.
2. Επίδραση της ομάδας του YMESRADR σε δόση 7,5 mg/kg σε συνδυασμό με ασπιρίνη σε δόση 5 mg/kg στην ex vivo συσώρευση των αιμοπεταλίων: προκλήθηκε αναστολή της ex vivo συσώρευσης των αιμοπεταλίων με αγωνιστή το AA σε συγκέντρωση 500 μM κατά 34,5% ενώ με αγωνιστή το ADP σε συγκέντρωση 20 μM κατά 42%.
3. Επίδραση της ομάδας του YMESRADR σε δόση 6 mg/kg σε συνδυασμό με ασπιρίνη σε δόση 5 mg/kg στο βάρος του θρόμβου: το βάρος του θρόμβου που αφαιρέθηκε από την καρωτίδα του πειραματοζώου ήταν 5,5 mg.

4. Επίδραση της ομάδας του YMESRADR σε δόση 6 mg/kg σε συνδυασμό με ασπιρίνη σε δόση 5 mg/kg στο μέγεθος της αιμορραγίας: η ποσότητα του αίματος που συγκεντρώθηκε στην προζυγισμένη γάζα ήταν 221,11 mg.

#### ΣΥΝΟΛΙΚΑ:

Συνολικά, στην ομάδα του YMESRADR σε δόση 7.5 mg/kg σε συνδυασμό με ασπιρίνη 5 mg/kg, η μέση αρχική ροή στην καρωτίδα ήταν  $19,8 \pm 4,32$  ml/min. Μετά την επαγωγή του θρόμβου, η καρωτίδα του πειραματοζώου παρέμεινε βατή για 90 λεπτά σε ποσοστό  $56,77 \pm 7,95\%$  (Εικ 110).



**Εικ 110:** η επί τοις εκατό μεταβολή της ροής στην καρωτίδα για την ομάδα του YMESRADR 7,5 mg/kg σε συνδυασμό με ασπιρίνη σε δόση 5 mg/kg με την πάροδο του χρόνου ξεκινώντας άμεσα μετά την εφαρμογή του ηλεκτρικού ρεύματος έως και 90 λεπτά μετά την εφαρμογή του.

Η χορήγηση του YMESRADR σε δόση 7,5 mg/kg σε συνδυασμό με την ασπιρίνη σε δόση 5 mg/kg προκάλεσε μέση αναστολή της συσσώρευσης με αγωνιστές το AA και το ADP κατά  $29,5 \pm 6,36\%$  και  $32 \pm 14,14\%$  (Πίνακας 54). Το μέσο βάρος του θρόμβου που προέκυψε ήταν  $4,51 \pm 1,47$  mg (πίνακας 55). Η ποσότητα του αίματος που συγκεντρώθηκε στην προζυγισμένη γάζα ήταν  $229,3 \pm 8,19$  mg (πίνακας 56).

	% Αναστολή AA	% Αναστολή ADP
Πείραμα 1	36	22
Πείραμα 2	25	17,86
Πείραμα 3	22,64	46,14
Πείραμα 4	34,5	42
<b>Μέση τιμή ± σταθερά απόκλισης</b>	<b>29.5±6.36</b>	<b>32±14.14%</b>

**Πίνακας 54:** Αναστολή της *ex vivo* συσσώρευσης των αιμοπεταλίων για την ομάδα του YMESRADR 7,5 mg/kg σε συνδυασμό με ασπιρίνη σε δόση 5 mg/kg.

	Βάρος Θρόμβου (mg)
Πείραμα 1	5,98
Πείραμα 2	5,4
Πείραμα 3	3,04
Πείραμα 4	5,5
<b>Μέση τιμή ± σταθερά απόκλισης</b>	<b>4.51±1.47</b>

**Πίνακας 55:** βάρος θρόμβου αιμοπεταλίων για την ομάδα του YMESRADR 7,5 mg/kg σε συνδυασμό με ασπιρίνη σε δόση 5 mg/kg

	Ποσό αιμορραγίας (mg)
Πείραμα 1	237,49
Πείραμα 2	245,72
Πείραμα 3	212,88
Πείραμα 4	221,11
<b>Μέση τιμή ± σταθερά απόκλισης</b>	<b>229,3±8,19</b>

**Πίνακας 56:** ποσότητα αιμορραγίας αιμοπεταλίων για την ομάδα του 7,5 mg/kg σε συνδυασμό με ασπιρίνη σε δόση 5 mg/kg

YMESRADR ΣΕ ΔΟΣΗ 12 mg/kg ΣΕ ΣΥΝΔΥΑΣΜΟ ΜΕ ΑΣΠΙΡΙΝΗ 5 mg/kg.

ΠΕΙΡΑΜΑ 1<sup>ο</sup>:

Χρησιμοποιήθηκε πειραματόζωο βάρους 2,9 kg.

1. Επίδραση της ομάδας του YMESRADR σε δόση 12 mg/kg σε συνδυασμό με ασπιρίνη σε δόση 5 mg/kg στη ροή της καρωτίδας: η αρχική ροή στην καρωτίδα ήταν 18 ml/min. Μετά τη επαγωγή της δημιουργίας του θρόμβου με εφαρμογή ηλεκτρικού ρεύματος, η ροή διατηρήθηκε για 90 λεπτά σε ποσοστό 51,85% της αρχικής.
2. Επίδραση της ομάδας του YMESRADR σε δόση 12 mg/kg σε συνδυασμό με ασπιρίνη σε δόση 5 mg/kg στην ex vivo συσώρευση των αιμοπεταλίων: προκλήθηκε αναστολή της ex vivo συσώρευσης των αιμοπεταλίων με αγωνιστή το AA σε συγκέντρωση 500 μM κατά 77% ενώ με αγωνιστή το ADP σε συγκέντρωση 20 μM κατά 31,4%.
3. Επίδραση της ομάδας του YMESRADR σε δόση 6 mg/kg σε συνδυασμό με ασπιρίνη σε δόση 5 mg/kg στο βάρος του θρόμβου: το βάρος του θρόμβου που αφαιρέθηκε από την καρωτίδα του πειραματοζώου ήταν 5,22 mg.

4. Επίδραση της ομάδας του YMESRDR σε δόση 6 mg/kg σε συνδυασμό με ασπιρίνη σε δόση 5 mg/kg στο μέγεθος της αιμορραγίας: η ποσότητα του αίματος που συγκεντρώθηκε στην προζυγισμένη γάζα ήταν 230,268 mg.

#### ΠΕΙΡΑΜΑ 2<sup>ο</sup>:

Χρησιμοποιήθηκε πειραματόζωο βάρους 3,1 kg.

1. Επίδραση της ομάδας του YMESRADR σε δόση 12 mg/kg σε συνδυασμό με ασπιρίνη σε δόση 5 mg/kg στη ροή της καρωτίδας: η αρχική ροή στην καρωτίδα ήταν 22,6 ml/min. Μετά τη επαγωγή της δημιουργίας του θρόμβου με εφαρμογή ηλεκτρικού ρεύματος, η ροή διατηρήθηκε για 90 λεπτά σε ποσοστό 51,85% της αρχικής.
2. Επίδραση της ομάδας του YMESRADR σε δόση 12 mg/kg σε συνδυασμό με ασπιρίνη σε δόση 5 mg/kg στην ex vivo συσώρευση των αιμοπεταλίων: προκλήθηκε αναστολή της ex vivo συσώρευσης των αιμοπεταλίων με αγωνιστή το AA σε συγκέντρωση 500 μM κατά 13.5% ενώ με αγωνιστή το ADP σε συγκέντρωση 20 μM κατά 20%.
3. Επίδραση της ομάδας του YMESRADR σε δόση 6 mg/kg σε συνδυασμό με ασπιρίνη σε δόση 5 mg/kg στο βάρος του θρόμβου: το βάρος του θρόμβου που αφαιρέθηκε από την καρωτίδα του πειραματόζωου ήταν 4,1 mg.
4. Επίδραση της ομάδας του YMESRDR σε δόση 6 mg/kg σε συνδυασμό με ασπιρίνη σε δόση 5 mg/kg στο μέγεθος της αιμορραγίας: η ποσότητα του αίματος που συγκεντρώθηκε στην προζυγισμένη γάζα ήταν 220,45 mg.

#### ΠΕΙΡΑΜΑ 3<sup>ο</sup>:

Χρησιμοποιήθηκε πειραματόζωο βάρους 3,1 kg.

1. Επίδραση της ομάδας του YMESRADR σε δόση 12 mg/kg σε συνδυασμό με ασπιρίνη σε δόση 5 mg/kg στη ροή της καρωτίδας: η αρχική ροή στην

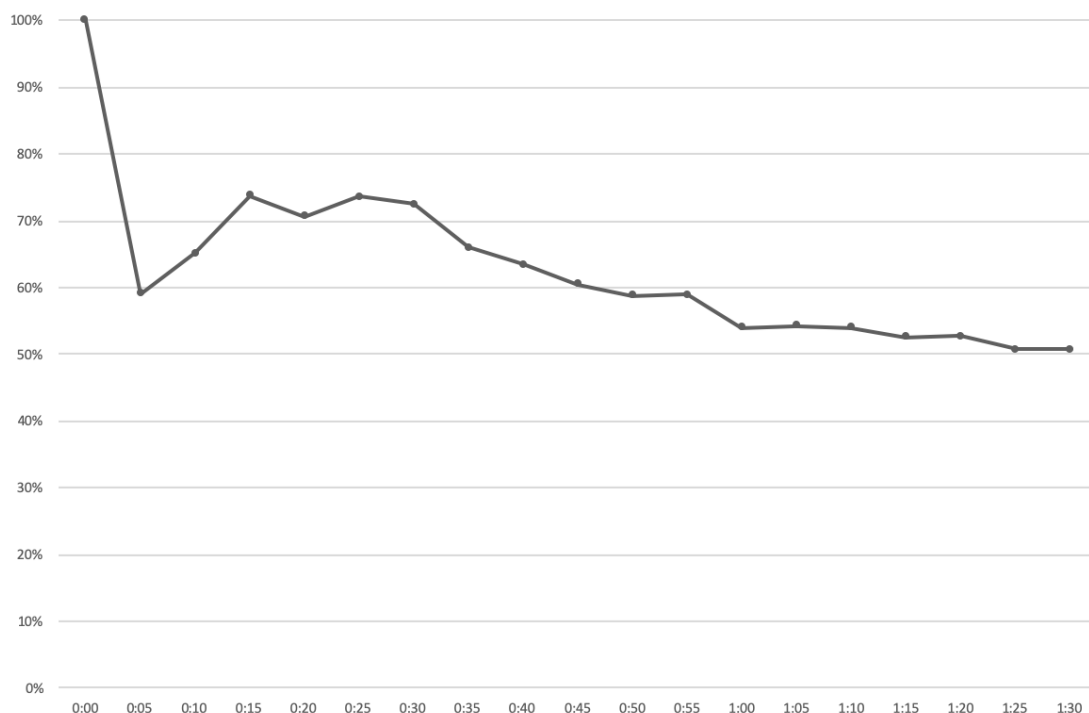
καρωτίδα ήταν 23 ml/min. Μετά τη επαγωγή της δημιουργίας του θρόμβου με εφαρμογή ηλεκτρικού ρεύματος, η ροή διατηρήθηκε για 90 λεπτά σε ποσοστό 51,85% της αρχικής.

2. Επίδραση της ομάδας του YMESRADR σε δόση 12 mg/kg σε συνδυασμό με ασπιρίνη σε δόση 5 mg/kg στην ex vivo συσώρευση των αιμοπεταλίων: προκλήθηκε αναστολή της ex vivo συσώρευσης των αιμοπεταλίων με αγωνιστή το AA σε συγκέντρωση 500  $\mu$ M κατά 26.5% ενώ με αγωνιστή το ADP σε συγκέντρωση 20  $\mu$ M κατά 48.3%.
3. Επίδραση της ομάδας του YMESRADR σε δόση 6 mg/kg σε συνδυασμό με ασπιρίνη σε δόση 5 mg/kg στο βάρος του θρόμβου: το βάρος του θρόμβου που αφαιρέθηκε από την καρωτίδα του πειραματοζώου ήταν 4,08 mg.
4. Επίδραση της ομάδας του YMESRDR σε δόση 6 mg/kg σε συνδυασμό με ασπιρίνη σε δόση 5 mg/kg στο μέγεθος της αιμορραγίας: η ποσότητα του αίματος που συγκεντρώθηκε στην προζυγισμένη γάζα ήταν 207,572 mg.

#### ΣΥΝΟΛΙΚΑ:

Συνολικά, στην ομάδα του YMESRADR σε δόση 12 mg/kg σε συνδυασμό με ασπιρίνη 5 mg/kg, η μέση αρχική ροή στην καρωτίδα ήταν  $21,2 \pm 2,17$  ml/min. Μετά την επαγωγή του θρόμβου, η καρωτίδα του πειραματοζώου παρέμεινε βατή για 90 λεπτά σε ποσοστό  $50.77 \pm 4.87\%$  (Εικ 111).





**Εικ 111:** η επί τοις εκατό μεταβολή της ροής στην καρωτίδα για την ομάδα του YMESRADR 12 mg/kg σε συνδυασμό με ασπιρίνη σε δόση 5 mg/kg με την πάροδο του χρόνου ξεκινώντας άμεσα μετά την εφαρμογή του ηλεκτρικού ρεύματος έως και 90 λεπτά μετά την εφαρμογή του.

Η χορήγηση του YMESRADR σε δόση 12 mg/kg σε συνδυασμό με την ασπιρίνη σε δόση 5 mg/kg προκάλεσε μέση αναστολή της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων με αγωνιστές το AA και το ADP κατά  $39,24 \pm 27,4\%$  και  $33,23 \pm 11,64\%$  (Πίνακας 57). Το μέσο βάρος του θρόμβου που προέκυψε ήταν  $4,47 \pm 0,53$  mg (πίνακας 58). Η ποσότητα του αίματος που συγκεντρώθηκε στην προζυγισμένη γάζα ήταν  $219,43 \pm 9,29$  mg (πίνακας 59).

	% Αναστολή AA	% Αναστολή ADP
Πείραμα 1	77	31,4
Πείραμα 2	13,5	20
Πείραμα 3	26,5	48,3
<b>Μέση τιμή ± σταθερά απόκλισης</b>	<b>39,24±27,4</b>	<b>33,23±11,64</b>

**Πίνακας 57:** Αναστολή της *ex vivo* συσσώρευσης των αιμοπεταλίων για την ομάδα του YMESRADR 12 mg/kg σε συνδυασμό με ασπιρίνη σε δόση 5 mg/kg.

	Βάρος Θρόμβου (mg)
Πείραμα 1	5,22
Πείραμα 2	4,1
Πείραμα 3	4,08
<b>Μέση τιμή ± σταθερά απόκλισης</b>	<b>4,47±0,53</b>

**Πίνακας 58:** βάρος θρόμβου αιμοπεταλίων για την ομάδα του YMESRADR 7,5 mg/kg σε συνδυασμό με ασπιρίνη σε δόση 5 mg/kg

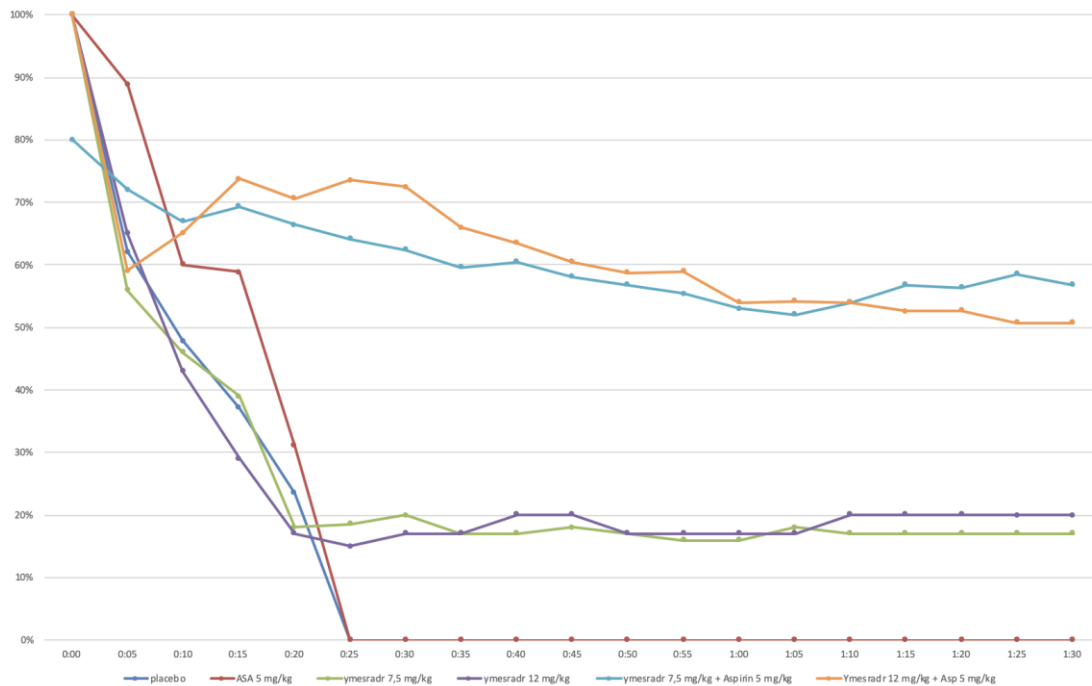
	Ποσό αιμορραγίας (mg)
Πείραμα 1	230,268
Πείραμα 2	220,45
Πείραμα 3	207,572
<b>Μέση τιμή ± σταθερά απόκλισης</b>	<b>219,43±9,29</b>

**Πίνακας 59:** ποσότητα αιμορραγίας αιμοπεταλίων για την ομάδα του 12 mg/kg σε συνδυασμό με ασπιρίνη σε δόση 5 mg/kg.

## ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΤΗΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΩΝ ΟΜΑΔΩΝ ΤΟΥ YMESRADR

### ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΩΝ ΟΜΑΔΩΝ ΤΟΥ YMESRADR ΣΤΗ ΡΟΗ ΤΗΣ ΚΑΡΩΤΙΔΑΣ

Η ομάδα του YMESRADR 7,5 mg/kg σε συνδυασμό με ασπιρίνη σε δόση 5 mg/kg διατήρησε βατό το αγγείο σε ποσοστό  $33,02 \pm 0,3\%$  της αρχικής ροής του ( $p < 0,004$  σε σχέση με την ομάδα ελέγχου και την ομάδα της ασπιρίνης σε δόση 5 mg/kg και  $p < 0,61$  σε σχέση με την ομάδα του (S,S) PSRCDCR-NH<sub>2</sub> 6 mg/kg), ενώ η ομάδα του (S,S) PSRCDCR-NH<sub>2</sub> 12 mg/kg σε συνδυασμό με ασπιρίνη σε δόση 5 mg/kg εξασφάλισε μια τελική ροή αίματος σε ποσοστό  $60,04 \pm 13,07\%$  της αρχικής ( $p < 0,025$  σε σχέση με την ομάδα ελέγχου,  $p < 0,018$  σε σχέση με την ομάδα της ασπιρίνης σε δόση 5 mg/kg και  $p < 0,3$  σε σχέση με την ομάδα του (S,S) PSRCDCR-NH<sub>2</sub> 12 mg/kg) (πίνακας 60, εικ. 112).



**Εικ 112:** σύγκριση της επίδρασης των ομάδων συνδυασμού του πεπτιδίου YMESRADR με ασπιρίνη στη ροή της καρωτίδας του πειραματοζώου έως κι 90 λεπτά μετά την επαγωγή της δημιουργίας του θρόμβου με εφαρμογή ηλεκτρικού ρεύματος.

Ουσίες που χορηγήθηκαν	Τελική ροή της καρωτίδας (σε ποσοστό της αρχικής ροής)	p
placebo (n=5)	0%	-
ασπιρίνη 5 mg/kg (n=2)	0%	*p<1
YMESRADR 7,5 mg/kg (n=5)	17±2*	*P=0.009
YMESADR 12 mg/kg (n=5)	20,4±3,2*	*P=0.013
YMESRADR 7,5 mg/kg + ασπιρίνη 5 mg/kg (n=4)	56.77±7.95%*†‡	*p<0.001 †p<0.001 ‡p<0.001
YMESRADR 12 mg/kg + ασπιρίνη 5 mg/kg (n=3)	50.77±4.87%*†‡	*p<0.001 †p<0.001 ‡p<0.001

**Πίνακας 60:** σύγκριση της επίδρασης των ομάδων του YMESRADR 7,5 mg/kg και 12 mg/kg σε συνδυασμό με ασπιρίνη 5 mg/kg στη ροή της καρωτίδα του ζώου 90 λεπτά μετά την εφαρμογή του ηλεκτρικού ρεύματος. (\*) στατιστική σημαντικότητα σε σχέση με την ομάδα ελέγχου, (†) στατιστική σημαντικότητα σε σχέση με την ομάδα της ασπιρίνης, (‡) στατιστική σημαντικότητα σε σχέση με την αντίστοιχη ομάδα του YMESRADR.

Συμπερασματικά, το πεπτιδίο YMESRADR σε συνδυασμό με ασπιρίνη 5 mg/kg τόσο σε δόση 7,5 mg/kg όσο και σε δόση 12 mg/kg κατάφερε να διατηρήσει τη βατότητα της καρωτίδας του ζώου. Το αποτέλεσμα αυτό ήταν στατιστικά σημαντικό τόσο συγκριτικά με την ομάδα ελέγχου όσο και με την ομάδα της ασπιρίνης 5 mg/kg αλλά και την αντίστοιχη ομάδα του πεπτιδίου.

ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΩΝ ΟΜΑΔΩΝ ΤΟΥ YMESRADR ΣΤΗΝ ΕΧ VIVO ΣΥΣΣΩΡΕΥΣΗ ΤΩΝ ΑΙΜΟΠΕΤΑΛΙΩΝ

Η ομάδα του YMESRADR 7,5 mg/kg σε συνδυασμό με την ασπιρίνη σε δόση 5 mg/kg προκάλεσε αναστολή της ex vivo συσσώρευσης των αιμοπεταλίων με αγωνιστή το AA κατά  $29,5 \pm 6,36\%$  ( $p < 0,01$  συγκριτικά με την ομάδα ελέγχου,  $p < 0,023$  συγκριτικά με την ομάδα της ασπιρίνης 5 mg/kg και  $p < 0,29$  συγκριτικά με την ομάδα του YMESRADR σε δόση 7,5 mg/kg) ενώ με αγωνιστή το ADP κατά  $32 \pm 14,14\%$  ( $p < 0,01$  συγκριτικά με την ομάδα ελέγχου,  $p < 0,013$  συγκριτικά με την ομάδα της ασπιρίνης σε δόση 5 mg/kg και  $p < 0,04$  συγκριτικά με την ομάδα του YMESRADR σε δόση 7,5 mg/kg). Η ομάδα του YMESRADR 12 mg/kg σε συνδυασμό με την ασπιρίνη σε δόση 5 mg/kg προκάλεσε αναστολή της ex vivo συσσώρευσης των αιμοπεταλίων με αγωνιστή το AA κατά  $39,24 \pm 27,4\%$  ( $p < 0,25$  συγκριτικά με την ομάδα ελέγχου,  $p < 0,15$  συγκριτικά με την ομάδα της ασπιρίνης σε δόση 5 mg/kg και  $p < 0,89$  συγκριτικά με την ομάδα του YMESRADR σε δόση 12 mg/kg) ενώ με αγωνιστή το ADP κατά  $33,23 \pm 11,64\%$  ( $p < 0,001$  συγκριτικά με την ομάδα ελέγχου,  $p < 0,002$  συγκριτικά με την ομάδα της ασπιρίνης σε δόση 5 mg/kg και  $p < 0,167$  συγκριτικά με την ομάδα του YMESRADR σε δόση 12 mg/kg) (πίνακας 61).

Ουσίες που χορηγήθηκαν	% αναστολή AA 500 μM	p	% αναστολή ADP 20 μM	p
placebo (n=5)	$9,2 \pm 3,1$	-	$9,2 \pm 3,1$	-
ασπιρίνη 5 mg/kg (n=2)	$13 \pm 1,41$	* $p < 1$	$9 \pm 2,83$	* $p < 1$
YMESRADR 7,5 mg/kg (n=5)	$14,5 \pm 9,9$	* $p = 1$	$10,6 \pm 7,7$	* $p = 1$
YMESRADR 12 mg/kg (n=5)	$36,5 \pm 19,5$	* $p < 0,04$	$22 \pm 5,5$	* $p = 0,038$
YMESRADR 7,5 mg/kg + ασπιρίνη	$29.5 \pm 6.36\% * \dagger$	* $p < 0,01$ $\dagger p < 0,023$ $\ddagger p < 0,29$	$32 \pm 14.14\% * \dagger \ddagger$	* $p < 0,01$ $\dagger p < 0,013$ $\ddagger p < 0,04$

5 mg/kg (n=4)				
YMESRADR 12 mg/kg + ασπιρίνη	39.24±27.40%	*p<0,25 †p<0,15	33.23±11.64%*†	*p<0,001 †p<0,002
5 mg/kg (n=3)		‡p<0,89		‡p<0,167

**Πίνακας 61:** Επί τοις εκατό (%) αναστολές της ex vivo συσσώρευσης των αιμοπεταλίων από τις ομάδες της ασπιρίνης, του YMESRADR και των συνδυασμών που μελετήθηκαν. \*στατιστική σημαντικότητα συγκριτικά με την ομάδα ελέγχου, †στατιστική σημαντικότητα συγκριτικά με την αντίστοιχη δόση της ασπιρίνης, ‡στατιστική σημαντικότητα συγκριτικά με την αντίστοιχη δόση του πεπτιδίου.

Συμπερασματικά, το συνθετικό πεπτιδίο YMESRADR τόσο στη δόση 7,5 mg/kg όσο και στη δόση 12 mg/kg συσχετίστηκε με ισχυρή ex vivo αναστολή των αιμοπεταλίων όταν χορηγήθηκε σε συνδυασμό με την ασπιρίνη σε δόση 5 mg/kg. Πρέπει να τονιστεί ότι για το συνδυασμό του YMESRADR 7,5 mg/kg με την ασπιρίνη 5 mg/kg, το αποτέλεσμα αυτό παρουσίασε στατιστική σημαντικότητα συγκριτικά όχι μόνο με την ομάδα ελέγχου και την αντίστοιχη ομάδα της ασπιρίνης, αλλά και με την ομάδα του πεπτιδίου YMESRADR 7,5 mg/kg, όταν ως αγωνιστής συσσώρευσης χρησιμοποιήθηκε το ADP. Όσον αφορά στην αναστολή της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων με αγωνιστή το AA, η ομάδα του YMESRADR 7,5 mg/kg σε συνδυασμό με ασπιρίνη 5 mg/kg παρουσίασε στατιστική σημαντικότητα μόνο συγκριτικά με την ομάδα ελέγχου και την ομάδα της ασπιρίνης 5 mg/kg.

Η αναστολή των αιμοπεταλίων που παρουσίασε η ομάδα του YMESRADR 12 mg/kg σε συνδυασμό με ασπιρίνη 5 mg/kg όταν ως αγωνιστής συσσώρευσης χορηγήθηκε το AA δε συνοδεύτηκε από στατιστική σημαντικότητα ούτε ως προς την ομάδα ελέγχου και την ομάδα της ασπιρίνης 5 mg/kg, αλλά και ούτε συγκριτικά με την ομάδα του πεπτιδίου 12 mg/kg. Η ομάδα του YMESRADR 12 mg/kg σε συνδυασμό με ασπιρίνη 5 mg/kg παρουσίασε στατιστικά σημαντική ενισχυμένη αναστολή της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων που επάγεται από το ADP συγκριτικά με την ομάδα ελέγχου και την ομάδα της ασπιρίνης 5 mg/kg, όχι όμως συγκριτικά με την ομάδα του YMESRADR 12 mg/kg.

ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΩΝ ΟΜΑΔΩΝ ΤΟΥ YMESRADR ΣΤΟ ΒΑΡΟΣ ΤΟΥ ΣΧΗΜΑΤΙΖΟΜΕΝΟΥ ΘΡΟΜΒΟΥ

Η ομάδα του συνδυασμού YMESRADR 7,5 mg/kg με ασπιρίνη σε δόση 5 mg/kg οδήγησε στο σχηματισμό ενός θρόμβου βάρους  $4,51 \pm 1,47$  mg ( $p < 0,17$  συγκριτικά με την ομάδα ελέγχου,  $p < 0,009$  συγκριτικά με την ομάδα της ασπιρίνης σε δόση 5 mg/kg και  $p < 0,9$  συγκριτικά με την ομάδα του πεπτιδίου σε δόση 7,5 mg/kg), ενώ η ομάδα του συνδυασμού YMESRADR 12mg/kg με ασπιρίνη σε δόση 5 mg/kg προκάλεσε τη δημιουργία θρόμβου  $4,47 \pm 0,53$  mg ( $p < 0,67$  συγκριτικά με την ομάδα ελέγχου,  $p < 0,001$  συγκριτικά με την ομάδα της ασπιρίνης σε δόση 5 mg/kg και  $p < 0,89$  συγκριτικά με την ομάδα του πεπτιδίου σε δόση 12 mg/kg) (πίνακας 62).

Ουσίες που χορηγήθηκαν	Βάρος θρόμβου (mg)	p
placebo (n=5)	$5,72 \pm 0,86$	-
ασπιρίνη 5 mg/kg (n=2)	$9,8 \pm 0,14$	* $p < 1$
YMESRADR 7,5 mg/kg (n=5)	$4,67 \pm 2,55$	* $p = 0,261$
YMESRADR 12 mg/kg (n=5)	$3,15 \pm 2,19$	* $p = 0,033$
YMESRADR 7,5 mg/kg + ασπιρίνη 5 mg/kg (n=4)	$4.51 \pm 1.47^\dagger$	* $P < 0,17$ $^\dagger p < 0,009$ $^\ddagger p < 0,9$
YMESRADR 12 mg/kg + ασπιρίνη 5 mg/kg (n=3)	$4.47 \pm 0.53^\dagger$	* $p < 0,67$ $^\dagger p < 0,001$ $^\ddagger p < 0,89$

**Πίνακας 62:** επίδραση των ομάδων του YMESRADR στο βάρος του σχηματισθέντος θρόμβου. \*στατιστική σημαντικότητα σε σχέση με την ομάδα ελέγχου, † στατιστική σημαντικότητα σε σχέση με την αντίστοιχη ομάδα της ασπιρίνης, ‡ στατιστική σημαντικότητα σε σχέση με την αντίστοιχη δόση του πεπτιδίου.

Συμπερασματικά, ο θρόμβος που δημιουργήθηκε μετά την εφαρμογή ηλεκτρικού ρεύματος στην καρωτίδα των ζώων διατηρήθηκε χάρη στη χορήγηση του συνθετικού πεπτιδίου YMESRADR σε δόσεις 7,5 mg/kg και 12 mg/kg σε παρόμοια επίπεδα τόσο συγκριτικά με την ομάδα ελέγχου όσο και συγκριτικά με τις αντίστοιχες ομάδες του

πεπτιδίου. Συγκριτικά με την ομάδα της ασπιρίνης οι δύο παραπάνω ομάδες συνδυασμού οδήγησαν σε στατιστικά σημαντικά ελαφρύτερο θρόμβο.

ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΩΝ ΟΜΑΔΩΝ ΤΟΥ YMESRADR ΣΤΗΝ ΠΟΣΟΤΗΤΑ ΤΗΣ ΑΙΜΟΡΡΑΓΙΑΣ (ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΤΗΣ ΑΣΦΑΛΕΙΑΣ)

Το ποσό της αιμορραγίας υπολογίστηκε από το βάρος του αίματος που συσσωρεύτηκε σε προζυγισμένη γάζα από τομή που είχε πραγματοποιηθεί στο πρόσθιο κοιλιακό τοίχωμα του πειραματόζωου, 60 λεπτά μετά την έναρξη χορήγησης της κάθε ουσίας. Για την ομάδα του συνδυασμού YMESRADR σε δόση 7,5 mg/kg με την ασπιρίνη σε δόση 5 mg/kg ήταν 229,3±8,19 mg ( $p < 0,57$  συγκριτικά με την ομάδα ελέγχου,  $p < 0,38$  συγκριτικά με την ομάδα της ασπιρίνης σε δόση 5 mg/kg και  $p < 0,84$  συγκριτικά με την ομάδα του YMESRADR σε δόση 7,5 mg/kg). Για την ομάδα του συνδυασμού του YMESRADR σε δόση 12 mg/kg με την ασπιρίνη σε δόση 5 mg/kg ήταν 219,43±9,29 mg ( $p < 0,51$  για την ομάδα ελέγχου,  $p < 0,11$  για την ομάδα της ασπιρίνης σε δόση 5 mg/kg και  $p < 0,54$  για την ομάδα του YMESRADR σε δόση 12 mg/kg) (πίνακας 63).

Ουσίες που χορηγήθηκαν	Ποσότητα της αιμορραγίας (mg)	p
placebo (n=5)	256,4±88,4	-
ασπιρίνη 5 mg/kg (n=2)	305±72,12	* $p < 1$
YMESRADR 7,5 mg/kg (n=5)	225,5±42,3	* $p = 0,544$
YMESRADR 12 mg/kg (n=5)	208,2±32,4	* $p = 0,346$
YMESRADR 7,5 mg/kg + ασπιρίνη 5 mg/kg (n=4)	229.3±8.19	* $p < 0,57$ † $p < 0,38$ ‡ $p < 0,84$
YMESRADR 12 mg/kg + ασπιρίνη 5 mg/kg (n=3)	219.43±9.29	* $p < 0,51$ † $p < 0,11$ ‡ $p < 0,54$



**Πίνακας 63:** Ποσότητα αιμορραγίας (mg) στις υποομάδες των πειραματόζων που έλαβαν το συνδυασμό ασπιρίνης 5 mg/kg με το συνθετικό πεπτιδίο YMESRADR σε δόσεις 7,5 mg/kg και 12 mg/kg. \*στατιστική σημαντικότητα συγκριτικά με την ομάδα ελέγχου, †στατιστική σημαντικότητα συγκριτικά με την αντίστοιχη δόση της ασπιρίνης, ‡στατιστική σημαντικότητα συγκριτικά με την αντίστοιχη δόση του πεπτιδίου.

Συμπερασματικά ο συνδυασμός του YMESRADR με την ασπιρίνη απεδείχθη ασφαλής. Ο συνδυασμός του σε δόσεις 7,5 mg/kg και 12 mg/kg με την ασπιρίνη σε δόση 5 mg/kg δε προκάλεσε στατιστικά σημαντική αύξηση της αιμορραγίας στα πειραματόζα συγκριτικά με τις αντίστοιχες ομάδες του πεπτιδίου, την ομάδα ελέγχου ή την ομάδα της ασπιρίνης 5 mg/kg.

**ΣΥΖΗΤΗΣΗ -**  
**ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ**

Η Στεφανιαία Νόσος αποτελεί το πρωταρχικό αίτιο νοσηρότητας και θνητότητας. Το 2015 ,σύμφωνα με τον παγκόσμιο οργανισμό υγείας 7,4 εκατομμύρια θάνατοι αποδόθηκαν σε αυτή. Υπολογίζεται ότι μέχρι το 2030 23,6 εκατομμύρια άνθρωποι θα πεθάνουν λόγω καρδιαγγειακών νοσημάτων, τα οποία αναμένεται ότι θα συνεχίσουν και στο μέλλον να πρωταγωνιστούν ως το κύριο αίτιο νοσηρότητας και θνητότητας. Η πιο συχνή έκφραση της Στεφανιαίας Νόσου είναι το οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου. Στο κέντρο της παθοφυσιολογίας του βρίσκεται η ασταθής αθηρωματική πλάκα, η οποία αιφνιδίως ρήγνυται ή διαβρώνεται. Η ρήξη της πλάκας δημιουργεί συνθήκες αγγειακού τραυματισμού, με αποτέλεσμα πρώτον να ενεργοποιούνται τα αιμοπετάλια που συσσωρεύονται στο σημείο της βλάβης και δεύτερον ο καταρράκτης της πήξης ο οποίος οδηγεί στο σχηματισμό του δικτύου της ινικής με σκοπό τη σταθεροποίηση του αιμοπεταλιακού θρόμβου.

Το πρώτο αιμοπετάλιο το οποίο θα προσκολληθεί επάνω στο υπενδοθήλιο που έχει εκτεθεί κατά τον τραυματισμό ενεργοποιείται και εκκρίνει μία πληθώρα αγωνιστών οι οποίοι θα ενεργοποιήσουν και θα συσσωρεύσουν επάνω του και άλλα αιμοπετάλια. Τέτοιοι παράγοντες εκκρίνονται είτε μέσω αποκοκκίωσης (π.χ ADP, ινωδογόνο), είτε μέσω σύνθεσης (π.χ θρομβοξάνη). Η διαδικασία της προσκόλλησης του αρχικού αιμοπεταλίου στο υπενδοθήλιο επιτελείται μέσω του παράγοντα Von Willebrand. Πρόκειται για ένα πολυμερές μόριο το οποίο εκτίθεται συνδεδεμένο στο κολλαγόνο του υπενδοθηλίου. Ο παράγοντας αυτός μέσω μιας εύκολα αντιστρεπτής σύνδεσης με τον υποδοχέα GPIV-IX-V της αιμοπεταλιακής επιφανείας δεσμεύει το ταχύτατα κινούμενο αιμοπετάλιο από την αρτηριακή κυκλοφορία και το επιβραδύνει. Η μόνιμη και μη αναστρέψιμη σύνδεση του αιμοπεταλίου με το υπενδοθήλιο γίνεται μέσω των υποδοχέων ιντεγκρίνης GPα<sub>11b</sub>β<sub>3</sub> και του GPVI, οι οποίοι όντας πλέον ενεργοποιημένοι μέσω inside-out μεταγωγής σήματος από τον ήδη ενεργοποιημένο GPIV-IX-V, προσδένουν τον παράγοντα von Willebrand και το κολλαγόνο του υπενδοθηλίου αντίστοιχα. Η μεταγωγή του σήματος της ενεργοποίησης των παραπάνω υποδοχέων οδηγεί στην έκκριση ADP, Θρομβοξάνης A<sub>2</sub> και Θρομβίνης από τα γειτονικά αιμοπετάλια τα οποία πλησιάζουν και προσκολλώνται στον αναπτυσσόμενο θρόμβο (μέσω του παράγοντα von Willebrand). Αυτά εκκρίνουν με τη σειρά τους αγωνιστές ενεργοποίησης κ.ο.κ.

Ο καταρράκτης της πήξεως ο οποίος ενεργοποιείται μετά την έκθεση του υπενδοθηλίου στην κυκλοφορία του αίματος, αποτελείται από δύο οδούς: την ενδογενή και την εξωγενή. Οι δύο αυτές οδοί συγκλίνουν στην κοινή οδό η οποία χαρακτηρίζεται από την ενεργοποίηση του παράγοντα X στην κυτταρική μεμβράνη των ενεργοποιημένων αιμοπεταλίων και οδηγεί στη δημιουργία του συμπλέγματος προαξελερίνης, το οποίο ενεργοποιεί την προθρομβίνη σε θρομβίνη. Η θρομβίνη αποτελεί κυρίαρχο ρυθμιστή της διαδικασίας της πήξεως και παράγοντα ενεργοποίησης αιμοπεταλίων. Δημιουργεί τα μονομερή ινικής διασπώντας το ινωδογόνο, τα οποία θα πολυμεριστούν σε δίκτυο ινικής και θα σταθεροποιήσουν τον ασταθή αιμοπεταλιακό θρόμβο.

Αν και απαιτούνται και οι δύο δρόμοι για τη δημιουργία ενός σταθερού θρόμβου, τα αιμοπετάλια είναι αυτά που τελικά θα αποφράξουν ή θα περιορίσουν το εύρος του αυλού του αγγείου σε ένα οξύ στεφανιαίο σύνδρομο. Έτσι, η ανάγκη ανάπτυξης αποτελεσματικών αντιαιμοπεταλιακών φαρμάκων με τις ελάχιστες δυνατές αιμορραγικές επιπλοκές παραμένει επίκαιρη. Κάτι τέτοιο προϋποθέτει την πλήρη κατανόηση της αλληλεπίδρασης όλων των παραπάνω θρομβογόνων μηχανισμών. Το πρώτο αντιαιμοπεταλιακό φάρμακο που αναπτύχθηκε και αποτελεί φάρμακο αναφοράς στην κατηγορία αυτή ήταν η ασπιρίνη, η οποία αναστέλλει το ένζυμο κυκλοξυγενάση-1 που εμπλέκεται στο μονοπάτι της παραγωγής της θρομβοξάνης A<sub>2</sub> από το Αραχιδονικό οξύ. Η θρομβοξάνη αποτελεί όπως αναφέρθηκε έναν από τους παράγοντες που ενισχύουν την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων. Τα αιμοπετάλια όμως δεν ενεργοποιούνται μόνο από τη θρομβοξάνη αλλά κ από άλλους παράγοντες όπως το ADP. Συνεπώς η ασπιρίνη μειονεκτεί όντας ικανή να αναστείλει μόνο το μονοπάτι δημιουργίας θρομβοξάνης A<sub>2</sub>. Τα θεμέλια της διπλής αντιαιμοπεταλιακής αγωγής έθεσε η μελέτη CURE (Clopidogrel in Unstable Angina to Prevent Recurrent Events) κατά τη διάρκεια της οποίας ασθενείς με οξεία στεφανιαία σύνδρομα χωρίς ανάσπαση του διαστήματος ST (NSTEMI) που αντιμετωπίστηκαν με ή χωρίς επαναγγείωση, τυχαιοποιήθηκαν να λάβουν συνδυασμό ασπιρίνης με κλοπιδογρέλη ή placebo. Η προσθήκη της κλοπιδογρέλης μείωσε σημαντικά το σύνθετο καταληκτικό σημείο του καρδιαγγειακού θανάτου, του εμφράγματος του μυοκαρδίου και του εγκεφαλικού με κόστος περισσότερες αιμορραγίες, όχι όμως εγκεφαλικές ή θανατηφόρες(398, 399). Η καθυστερημένη έναρξη της δράσης της

κλοπιδογρέλης, η ποικίλου βαθμού απάντηση των αιμοπεταλίων στη χορήγησή της και η ατελής πρόληψη των υποτροπών ισχαιμικών επεισοδίων οδήγησε στη δημιουργία ισχυρότερων αναστολέων του υποδοχέα P2Y<sub>12</sub>. Δύο τέτοιοι αναστολείς είναι η πρασουγρέλη και η τικαγρελόρη. Και τα δυο φάρμακα ελάττωσαν τα ισχαιμικά καταληκτικά σημεία, συμπεριλαμβανομένης της θρόμβωσης του stent, συγκριτικά με την κλοπιδογρέλη, με όχι σημαντική αύξηση των μειζόνων αιμορραγιών. Οι αιμορραγίες αυτές δε συσχετιζόνταν με επεμβάσεις αορτοστεφανιαίας παράκαμψης(400-403).

Στην κλινική πράξη, ο συνδυασμός διαφορετικών κατηγοριών αντιαιμοπεταλιακών φαρμάκων είναι καλά τεκμηριωμένος ως η ενδεδειγμένη θεραπεία για ασθενείς με οξεία στεφανιαία σύνδρομα, οι οποίοι υποβάλλονται σε διαδερμική αγγειοπλαστική των στεφανιαίων αρτηριών και χρειάζονται ισχυρή αιμοπεταλιακή αναστολή. Μετά την οξεία φάση του στεφανιαίου συνδρόμου και ανάλογα με τον ισχαιμικό και αιμορραγικό κίνδυνο του ασθενούς, ενδείκνυται η συνέχιση της διπλής αντιαιμοπεταλιακής αγωγής με συνδυασμό ασπιρίνης και αναστολέα του υποδοχέα P<sub>2</sub>Y<sub>12</sub> για ένα διάστημα από λίγους έως και 30 μήνες σύμφωνα με τις πρόσφατες οδηγίες(397).

Ακόμα και υπό διπλή αντιαιμοπεταλιακή αγωγή με ασπιρίνη και αναστολείς του υποδοχέα P<sub>2</sub>Y<sub>12</sub> κάποιοι ασθενείς θα παρουσιάσουν υποτροπή ενός θρομβωτικού συμβάντος, ενώ όπως αναφέρθηκε η αποτελεσματική αντιαιμοπεταλιακή αναστολή συνοδεύεται από αιμορραγικές επιπλοκές. Αυτό στρέφει την έρευνα προς άλλα μονοπάτια της ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων. Η αναστολή των ιντεγκρινικών υποδοχέων GPα<sub>IIb</sub>β<sub>3</sub> εξακολουθεί να αποτελεί αντικείμενο ερευνών. Οι υποδοχείς αυτοί σταθεροποιούν τα αρχικά αιμοπετάλια που παρουσιάζονται στο σημείο της βλάβης επάνω στο υπενδοθήλιο αλλά και τα επόμενα αιμοπετάλια επάνω στα πρώτα, μέσω αλληλεπιδράσεων με τον παράγοντα von Willebrand. Αποτελούν επίσης τα σημεία πρόσδεσης του Ινωδογόνου, που δημιουργεί έτσι γέφυρες μεταξύ αιμοπεταλίων. Έτσι δημιουργήθηκαν οι αναστολείς του υποδοχέα GPα<sub>IIb</sub>β<sub>3</sub>. Η ενδοφλέβια χορήγηση αυτών των αναστολέων έχει ένδειξη σε καταστάσεις διάσωσης (αγγειογραφική απεικόνιση θρόμβου, no-reflow φαινόμενο) σε ασθενείς που υποβάλλονται σε αγγειοπλαστική λόγω οξέος στεφανιαίου συνδρόμου, σε

συνδυασμό με διπλή αντιαιμοπεταλιακή αγωγή ασπιρίνης με αναστολέα του υποδοχέα P<sub>2</sub>Y<sub>12</sub>(64, 65).

Η αμπσιξιμάμπη, αξιολογήθηκε από μεγάλες κλινικές μελέτες. Σε ασθενείς που την έλαβαν 18 με 24 ώρες πριν από επαναγγείωση έως και μία ώρα μετά από αυτή, μειώθηκε η συχνότητα του σύνθετου καταληκτικού σημείου θανάτου, εμφράγματος του μυοκαρδίου και ανάγκης για νέα επαναγγείωση τις πρώτες 30 ημέρες, συγκριτικά με την ομάδα ελέγχου. Η ευνοϊκή αυτή επίδραση της αμπσιξιμάμπης υποχώρησε στους 6 μήνες (404). Αντιθέτως, άλλες μελέτες έδειξαν αυξημένη θνητότητα τις πρώτες 48 ώρες για τους ασθενείς που έπαιρναν αμπσιξιμάμπη συγκριτικά με την ομάδα ελέγχου (405), αν και η συχνότητα το σύνθετου καταληκτικού σημείου θανάτου ή εμφράγματος του μυοκαρδίου δε διέφερε στα δύο σκέλη. Στις 30 ημέρες η αμπσιξιμάμπη δεν παρουσίασε κανένα θεραπευτικό όφελος. Αυτό πιθανώς οφείλεται στην μη έγκαιρη επαναγγείωση αλλά και στη δόση του φαρμάκου που χρησιμοποιήθηκε στους συγκεκριμένους ασθενείς (406). Η επιτιφιματίδη, ένα άλλο φάρμακο της κατηγορίας των GPa<sub>11b</sub>β<sub>3</sub> αναστολέων, μείωσε τη συχνότητα θανάτου ή εμφράγματος σε ασθενείς με οξύ στεφανιαίο σύνδρομο χωρίς ανόσωση του ST (NSTEMI) στις 30 ημέρες όταν χορηγήθηκε μετά την έναρξη των συμπτωμάτων για ένα διάστημα 72 ωρών, σε συνδυασμό με ασπιρίνη και ηπαρίνη ανάλογα με τις ενδείξεις. Η ευνοϊκή επίδραση της επιτιφιματίδης ήταν ιδιαίτερα ισχυρή στους ασθενείς που υπεβλήθησαν πρώιμα σε στεφανιογραφικό έλεγχο (407). Το αποτέλεσμα αυτό διατηρήθηκε και στους 6 μήνες (406). Η τιροφιμπάνη, χορηγούμενη αρχικά μόνη της σε ασθενείς με NSTEMI, μείωσε τη συχνότητα του σύνθετου πρωτεύοντος καταληκτικού σημείου του θανάτου, του εμφράγματος του μυοκαρδίου ή της μυοκαρδιακής ισχαιμίας τις πρώτες 48 ώρες σε σχέση με την ομάδα ελέγχου αλλά δεν κατάφερε να διατηρήσει το αποτέλεσμα αυτό ούτε στις 7, ούτε στις 30 ημέρες. Όταν όμως χορηγήθηκε σε συνδυασμό με ηπαρίνη και συγκρίθηκε με την ομάδα ελέγχου που έλαβε ηπαρίνη και placebo, η ομάδα της τιροφιμπάνης κατάφερε να μειώσει τη συχνότητα του πρωτεύοντος καταληκτικού σημείου έναντι της μονοθεραπείας με ηπαρίνη, τόσο στις 7, όσο και στις 30 ημέρες(406).

Οι αναστολείς των υποδοχέων GPa<sub>11b</sub>β<sub>3</sub> δε στερούνται μειονεκτημάτων. Η αμπσιξιμάμπη για παράδειγμα, αν και έχει μεγαλύτερη συγγένεια για την

ενεργοποιημένη μορφή του υποδοχέα  $GP_{\alpha_{11b}\beta_3}$ , δεσμεύει και την ανενεργή μορφή του. Ως συνέπεια της ισχυρής πρόσδεσής της η αμψιξιμάμπη παρουσιάζει άμεσα και δόσοεξαρτώμενα αντιαιμοπεταλιακά αποτελέσματα, η δράση της όμως αργεί να παρέλθει αυξάνοντας πολύ τον κίνδυνο αιμορραγιών, ειδικά τις πρώτες 12 ώρες (408, 409). Τα παραπάνω μειονεκτήματα αντισταθμίζονται από την επιπιμπατίδη, η οποία δεσμεύεται εξειδικευμένα στον ενεργοποιημένο υποδοχέα  $GP_{\alpha_{11b}\beta_3}$  των ανθρώπινων αιμοπεταλίων κοντά στην περιοχή αναγνώρισης RGD (η επιπιμπατίδη φέρει την KGD αλληλουχία) και αναστέλλει αντιστρεπτά την συσσώρευσή τους με το να εμποδίζει ανταγωνιστικά τη δέσμευση του ινωδογόνου, του vWF και άλλων προσκολλητικών μορίων στον υποδοχέα. Λόγω μικρότερης συγγένειας με τον υποδοχέα, η πρόσδεση της επιπιμπατίδης είναι εύκολα αναστρέψιμη και παρέρχεται μετά τη διακοπή της χορήγησης, μειώνοντας έτσι τον κίνδυνο αιμορραγιών (410).

Τα παραπάνω οδηγούν στην ανάγκη ανακάλυψης νέων αναστολέων των υποδοχέων  $GP_{\alpha_{11b}\beta_3}$ , οι οποίοι πρέπει να πληρούν συγκεκριμένες προϋποθέσεις. Πρέπει να παρουσιάζουν ισχυρή αντιαιμοπεταλιακή δράση χωρίς να αυξάνουν τις αιμορραγίες, ενώ πρέπει να δρουν εξειδικευμένα στον υποδοχέα  $GP_{\alpha_{11b}\beta_3}$ . Η μελέτη των νέων αναστολέων απαιτεί τη δοκιμή της ασφάλειας και της αποτελεσματικότητάς τους. Για το σκοπό αυτό δημιουργήθηκαν μοντέλα πειραματικής θρόμβωσης που σκοπό έχουν την εξομοίωση της αρτηριακής θρόμβωσης στα ανθρώπινα αγγεία, δημιουργώντας με διάφορους τρόπους θρόμβο σε αρτηρίες πειραματοζώων (με εφαρμογή ηλεκτρικού ρεύματος, βιοχημικά, φωτοχημικά ή μηχανικά). Είναι αδύνατη βέβαια η πιστή εξομοίωση των συνθηκών που επικρατούν στα ανθρώπινα αγγεία. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι τα οξέα στεφανιαία συμβάματα εμφανίζονται σε αρτηρίες επιβαρυμένες με αθηρωματικές πλάκες και όχι σε υγιή αγγεία, όπως αυτά ενός πειραματοζώου.

Η έρευνα στον τομέα των αναστολέων του υποδοχέα  $GP_{\alpha_{11b}\beta_3}$  έχει κυρίως επικεντρωθεί στη δημιουργία μορίων που είναι RGD ανάλογα, φέρουν δηλαδή στο μόριό τους την RGD αλληλουχία, η οποία στον άνθρωπο διαδραματίζει σημαντικό ρόλο κατά την πρόσδεση του ινωδογόνου στον υποδοχέα  $GPIIb/IIIa$ . Τα μόρια αυτά συναγωνίζονται το ινωδογόνο για τον υποδοχέα του, δηλαδή αναστέλλουν τις γέφυρες ινωδογόνου ανάμεσα στα αιμοπετάλια προσδενόμενα στον υποδοχέα

GR $\alpha_{11b}\beta_3$  και αχρηστεύοντάς τον. Με τον τρόπο αυτό όμως επηρεάζουν τη στερεοδιάταξη του υποδοχέα. Έτσι, οδηγούν σε ενεργοποίηση της outside-in μεταγωγής σήματος μέσω του υποδοχέα και σε δευτερογενή ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων μετά την αρχική αναστολή (381).

Οι διάφοροι φαρμακολογικοί παράγοντες που έχουν κατά καιρούς δοκιμαστεί σε πειραματόζωα δεν παρουσιάζουν την ίδια δραστικότητα σε όλα τα είδη ζώων(411). Ο Cox και οι συνεργάτες του έδειξαν πρώτοι ότι η πενταμιδίνη, ένας μη πεπτιδικός αναστολέας των υποδοχέων GR $\alpha_{11b}\beta_3$  παρουσιάζει λίγο μικρότερη δραστικότητα σε *in vitro* δοκιμές αιμοπεταλίων πιθήκων και σκύλων, συγκριτικά με τα ανθρώπινα αιμοπετάλια. Αντιθέτως, η δραστικότητά τους σε *in vitro* δοκιμές αιμοπεταλίων ινδικών χοιριδίων, κουνελιών και ποντικών ήταν ελάχιστη(412). Στη συνέχεια ο Bostwick και οι συνεργάτες του έδειξαν με τη σειρά τους τις διαφορές που υπάρχουν στην συσσώρευση των αιμοπεταλίων ανάμεσα σε σκύλους, πιθήκους, ανθρώπους, χάμστερ, ποντικούς και χοιρίδια, αφού συγκεκριμένος αναστολέας των υποδοχέων GR $\alpha_{11b}\beta_3$ , προκάλεσε αναστολή της *in vitro* συσσώρευσης των αιμοπεταλίων με IC<sub>50</sub> 3.7, 4.6, 6.3, 126, 136 και 1600mM αντίστοιχα. Οι παρατηρήσεις αυτές οδήγησαν στη διάδοση της χρήσης μεγάλων ζώων για τη μελέτη της δραστικότητας παραγόντων με ανασταλτική δράση στους υποδοχείς GR $\alpha_{11b}\beta_3$  (411).

Η περιορισμένη δραστικότητα των αναστολέων των GR $\alpha_{11b}\beta_3$  υποδοχέων που έχουν σχεδιαστεί για ανθρώπους σε αιμοπετάλια κουνελιών οφείλεται στις διαφορές που έχουν οι υποδοχείς των δύο ειδών μεταξύ τους. Σε αντίθεση με τα ανθρώπινα αιμοπετάλια όπου η RGD αλληλουχίες του ινωδογόνου (μαζί με το δωδεκαπεπτιδίο της  $\gamma$  αλυσίδας) διαδραματίζουν πρωταγωνιστικό ρόλο στην αναγνώριση του από τον υποδοχέα GR $\alpha_{11b}\beta_3$ , τα αιμοπετάλια του κουνελιού δε χρησιμοποιούν αυτές τις αλληλουχίες για να συνδεθούν με το ινωδογόνο. Αντιθέτως μάλιστα έχουν πολύ χαμηλή συγγένεια για αυτές. Μόνο το δωδεκαπεπτιδίο της  $\gamma$  αλυσίδας του ινωδογόνου φαίνεται να παίζει ρόλο στην αναγνώριση του από τον υποδοχέα GR $\alpha_{11b}\beta_3$  του κουνελιού, ο οποίος έχει πολύ μεγάλο βαθμό συγγένειας για αυτό. Τα παραπάνω καθιστούν το κουνέλι ιδανικό πειραματόζωο για τη μελέτη αναστολέων της αιμοπεταλιακής ενεργοποίησης και συσσώρευσης που δρουν με RGD ανεξάρτητο τρόπο ή μορίων αναλόγων του δωδεκαπεπτιδίου. Η χαρτογράφηση της δομής της  $\alpha_{11b}$  υπομονάδας του υποδοχέα GR $\alpha_{11b}\beta_3$  οδήγησε στο συμπέρασμα ότι η κρίσιμη περιοχή



της αλληλουχίας της για την πρόσδεση του ινωδογόνου είναι το 20πεπτίδιο που αποτελείται από τα κατάλοιπα 313-332(383), ακριβώς δίπλα από την περιοχή των καταλοίπων 294-314 που όπως ο D' Souza είχε αποδείξει, είναι η περιοχή πρόσδεσης του δωδεκαπεπτιδίου του ινωδογόνου στην  $\alpha_{11b}$  υπομονάδα. Από την ακολουθία των 20 αμινοξέων αποδείχθηκε ότι η ακολουθία των 8 αμινοξέων 313-320 YMESRADR, προκαλεί σημαντική αναστολή της *in vitro* συσσώρευσης ανθρώπινων αιμοπεταλίων και αναστέλλει τη σύνδεση του υποδοχέα  $GP\alpha_{11b}\beta_3$  με το ινωδογόνο(387). Η αναστολή αυτή απεδείχθη ότι επιτυγχάνεται μέσω αλληλεπιδράσεων ανεξάρτητων της RGD αλληλουχίας, αφού η παρουσία του πεπτιδίου δεν ανέστειλε την σύνδεση του PAC-1 με τον ενεργοποιημένο υποδοχέα  $GP\alpha_{11b}\beta_3$  (το PAC-1 είναι ένα μονοκλωνικό αντίσωμα έναντι του ενεργοποιημένου υποδοχέα  $GP\alpha_{11b}\beta_3$ ), κάτι που αντίθετα πέτυχαν τα RGD ανάλογα. Εξήχθη έτσι αρχικά το συμπέρασμα ότι το πεπτίδιο YMESRADR προκαλεί αναστολή της *in vitro* συσσώρευσης των ανθρώπινων αιμοπεταλίων μέσω αλληλεπίδρασης με το ινωδογόνο και όχι με τον υποδοχέα, ο οποίος μένει άθικτος και δεν ενεργοποιείται. Η θεωρία αυτή κατερρίφθη από νεότερα δεδομένα, τα οποία προτείνουν ότι το YMESRADR αλληλεπιδρά απευθείας με τη  $\beta_3$  υπομονάδα του υποδοχέα  $GP\alpha_{11b}\beta_3$ , γεγονός που δεν επιτρέπει την ενεργοποίησή του στη μορφή που αναγνωρίζει το ινωδογόνο, ενώ δεν φαίνεται να επηρεάζει την πρόσδεση του PAC-1. Από τα αποτελέσματα αυτά συμπεραίνεται ότι η ανασταλτική δράση του YMESRADR εκφράζεται με διαφορετικό τρόπο από αυτή των RGD αναλόγων. Αυτό πιθανά να μην επάγει και την πυροδότηση της από έξω προς τα μέσα σηματοδότησης (που παρουσιάζουν τα RGD ανάλογα) και της δευτερογενούς αιμοπεταλιακής ενεργοποίησης.

Άρα λοιπόν, τα λευκά κουνέλια Νέας Ζηλανδίας είναι κατάλληλα πειραματόζωα για τη μελέτη του πεπτιδίου YMESRADR (και άλλων πεπτιδίων που δρουν ανεξαρτήτως RGD αλληλουχιών). Τα συμπεράσματα που προκύπτουν από τη μελέτη του μας δίνουν ασφαλείς πληροφορίες για τη δραστικότητα του πεπτιδίου σε ανθρώπους. Έχει ήδη δειχθεί ότι πεπτίδια που φέρουν τη συγκεκριμένη αλληλουχία παρουσιάζουν σημαντική αντιαιμοπεταλιακή δράση *in vitro* σε πλάσμα πλούσιο σε αιμοπετάλια (PRP) υγιών εθελοντών(387). Επίσης, τα πειραματικά *in vitro* δεδομένα, έδειξαν ότι το πεπτίδιο YMESRADR παρουσιάζει αντιαιμοπεταλιακή δράση και στα

αιμοπετάλια κουνελιού, αφού η μελέτη συσσωρευομετρίας έδειξε αναστολή της συσσώρευσής τους ως απάντηση στη χορήγηση του πεπτιδίου.

Το παραπάνω πεπτίδιο, δοκιμαζόμενο στο μοντέλο αρτηριακής θρόμβωσης καρωτίδας κουνελιού με εφαρμογή ηλεκτρικού ρεύματος, παρουσίασε ισχυρή αντιαιμοπεταλική δράση. Στα πειραματόζωα που έλαβαν placebo (ομάδα ελέγχου), η ροή στην καρωτίδα του κουνελιού μηδενίστηκε, γεγονός που σημαίνει πλήρη απόφραξη του αυλού του αγγείου από τον επαγόμενο από το ηλεκτρικό ρεύμα θρόμβο. Αντιθέτως, σε όλες τις ομάδες των πειραματόζωων που έλαβαν το πεπτίδιο YMESRADR, η βατότητα της καρωτίδας του ζώου διατηρήθηκε. Ανιχνεύθηκε δηλαδή ροή περιφερικά του σημείου δημιουργίας του θρόμβου έως και το τέλος του πειράματος, που αντιστοιχεί στα 90 λεπτά μετά την εφαρμογή του ηλεκτρικού ρεύματος.

Η διατήρηση της βατότητας του αγγείου, στις μεγαλύτερες δόσεις του πεπτιδίου, φαίνεται να επιτυγχάνεται κυρίως μέσω της αναστολής της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων στο σημείο δημιουργίας του θρόμβου. Το πεπτίδιο σε δόσεις 12 και 15 mg/kg παρουσίασε σημαντική αναστολή της *ex vivo* συσσώρευσης των αιμοπεταλίων του κουνελιού, 60 λεπτά μετά την έναρξη ενδοφλέβιας χορήγησής του σε σχέση με την ομάδα ελέγχου. Η αναστολή της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων που διαπιστώθηκε με *ex vivo*, αντανακλάται και στο βάρος του επαγόμενου από το ηλεκτρικό ρεύμα θρόμβου. Το πεπτίδιο YMESRADR στις δόσεις των 12 και 15 mg/kg, μείωσε σημαντικά το βάρος του θρόμβου έναντι του placebo. Η ασφάλεια του πεπτιδίου αποδείχθηκε και με τα αποτελέσματα των αιμορραγικών δοκιμασιών. Το ποσό απώλειας του αίματος από την τομή στο κοιλιακό τοίχωμα 60 λεπτά μετά την εφαρμογή του πεπτιδίου δεν διέφερε για καμία δόση σε σχέση την ομάδα ελέγχου(365). Πιθανώς το YMESRADR, εκτός της αναστολής της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων, να εμποδίζει την προσκόλληση τους στα σημεία ρήξης του ενδοθηλίου. Αυτό ίσως εξηγεί και την διατήρηση της ροής στις μικρότερες δόσεις του πεπτιδίου, παρά το ότι αυτές δε συνοδεύθηκαν από στατιστικά σημαντική ενίσχυση της *ex vivo* αναστολής των αιμοπεταλίων ή ελάττωση του βάρους του θρόμβου συγκριτικά με την ομάδα ελέγχου. Το γεγονός αυτό αποτελεί ακόμη αντικείμενο διερεύνησης.

Συμπερασματικά, το πεπτιδίο YMESRADR παρουσιάζει ικανοποιητική αντιαιμοπεταλιακή δράση, αναστέλλοντας την *ex vivo* συσσώρευση των αιμοπεταλίων σε μοντέλο αρτηριακής θρόμβωσης. Η πιθανή αναστολή της προσκόλλησης των αιμοπεταλίων στο τραυματισμένο αγγειακό τοίχωμα, η επίδραση του πεπτιδίου στη διαδικασία ενεργοποίησης του αιμοπεταλίου καθώς και οι φαρμακοδυναμικές και φαρμακοκινητικές ιδιότητες του χρήζουν περαιτέρω μελέτης και διερεύνησης στο μέλλον.

*In vitro* μελέτες έδειξαν επίσης ότι το πεπτιδίο (S,S) PSRCDCR-NH<sub>2</sub> παρουσιάζει αντιαιμοπεταλιακή δράση στα αιμοπετάλια κουνελιού, αφού οι μελέτες της συσσωρευομετρίας έδειξε αναστολή της *ex vivo* συσσώρευσης των αιμοπεταλίων του ζώου. Το πεπτιδίο (S,S) PSRCDCR-NH<sub>2</sub>, δοκιμαζόμενο στο μοντέλο αρτηριακής θρόμβωσης καρωτίδας κουνελιού με εφαρμογή ηλεκτρικού ρεύματος, παρουσίασε ισχυρή αντιαιμοπεταλική δράση. Στα πειραματόζωα που έλαβαν placebo (ομάδα ελέγχου), η ροή στην καρωτίδα του ζώου μηδενίστηκε. Το γεγονός αυτό σημαίνει πλήρη απόφραξη του αυλού του αγγείου από τον επαγόμενο από το ηλεκτρικό ρεύμα θρόμβο. Αντιθέτως, στις ομάδες των πειραματόζωων που έλαβαν το πεπτιδίο (S,S) PSRCDCR-NH<sub>2</sub> σε δόσεις 6 mg/kg και 12 mg/kg, η βατότητα της καρωτίδας του ζώου διατηρήθηκε. Ανιχνεύθηκε δηλαδή ροή περιφερικότερα του σημείου δημιουργίας του θρόμβου έως το τέλος του πειράματος, που αντιστοιχεί στα 90 λεπτά από την εφαρμογή του ηλεκτρικού ρεύματος. Στις παραπάνω δόσεις, παρουσιάστηκε σημαντική αναστολή της *ex vivo* συσσώρευσης των αιμοπεταλίων του κουνελιού, 60 λεπτά μετά την έναρξη ενδοφλέβιας χορήγησής του σε σχέση με την ομάδα ελέγχου.

Το βάρος του θρόμβου που σχηματίστηκε μετά την εφαρμογή του ηλεκτρικού ρεύματος αντανakλά επίσης την αναστολή της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων που επετεύχθη από τη χορήγηση του (S,S) PSRCDCR-NH<sub>2</sub>. Στις δόσεις των 6 και 12 mg/kg, το βάρος του σχηματισθέντος θρόμβου μειώθηκε σημαντικά συγκριτικά με την ομάδα ελέγχου. Επίσης πρέπει να τονισθεί ότι το πεπτιδίο (S,S) PSRCDCR-NH<sub>2</sub> σε όλες τις δόσεις που χρησιμοποιήθηκε είναι ασφαλές καθώς δεν αύξησε την αιμορραγική διάθεση των πειραματόζωων.

Ο μηχανισμός δράσης του πεπτιδίου (S,S) PSRCDCR-NH<sub>2</sub> δεν έχει μελετηθεί πλήρως. Ο ακριβής μηχανισμός δράσης καθώς και οι φαρμακοδυναμικές και φαρμακοκινητικές ιδιότητες του πεπτιδίου θα αποτελέσουν αντικείμενο μελλοντικής

ερευνάς. Παρόλα αυτά μπορούμε να υποθέσουμε ότι ο μηχανισμός δράσης των (S,S) CDC- ανάλογων, όπως και στη περίπτωση του YMESRADR είναι διαφορετικός από αυτόν των RGD αναλόγων. Το συμπέρασμα αυτό προέκυψε από πειράματα κατά τα οποία το πεπτίδιο (S,S) PSRCDCR-NH<sub>2</sub> κατάφερε να αναστείλει την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων χωρίς όμως να αυξήσει τα επίπεδα της ρ-σελεκτίνης στην επιφάνειά τους. Αντιθέτως, τα RGD ανάλογα ανέστειλαν την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων συνδεδεμένα με τον υποδοχέα GPα<sub>IIb</sub>β<sub>3</sub>. Με τον τρόπο αυτό όμως όπως αναφέρθηκε προκαλείται δευτερογενής ενεργοποίησή του υποδοχέα που οδηγεί στην αύξηση της ρ-σελεκτίνης στην επιφάνεια των αιμοπεταλίων. Επίσης, το συνθετικό πεπτίδιο (S,S) PSRCDCR-NH<sub>2</sub> απέτυχε να αναστείλει τη σύνδεση του αντισώματος PAC-1 με τον υποδοχέα GPα<sub>IIb</sub>β<sub>3</sub>, σε αντίθεση με τα RGD ανάλογα. Ένας δεύτερος πιθανός μηχανισμός δράσης είναι μια μη RGD αλληλεπίδραση με τον υποδοχέα, η οποία τον κρατάει σε μια ανενεργή, χαμηλής συγγένειας κατάσταση. Η σύνθεση αυτών των μη RGD αναστολέων του υποδοχέα GPα<sub>IIb</sub>β<sub>3</sub> πιθανώς εμφανίζει περισσότερα πλεονεκτήματα από τους RGD αναστολείς, καθώς οι πρώτοι αναστέλλουν την συσσώρευση των αιμοπεταλίων χωρίς πιθανά να επάγουν outside-in σηματοδότηση, η οποία οδηγεί σε μία δευτερογενή ενεργοποίηση του αιμοπεταλίου.

Όπως αναφέρθηκε, οι ασθενείς που παρουσιάζουν οξύ στεφανιαίο σύνδρομο αντιμετωπίζονται με χορήγηση διπλής αντιαιμοπεταλιακής αγωγής με ασπιρίνη σε συνδυασμό με έναν αναστολέα του υποδοχέα P<sub>2</sub>Y<sub>12</sub>. Το γεγονός αυτός οδήγησε στη μελέτη της δράσης της χορήγησης συνδυασμού των συνθετικών πεπτιδίων YMESRADR και (S,S) PSRCDCR-NH<sub>2</sub> με την ασπιρίνη. Αποφασίσθηκε να δοκιμαστούν γνωστές και δραστικές δόσεις των δύο πεπτιδίων σε συνδυασμό με μία δόση ασπιρίνης η οποία παρουσίαζε δραστικότητα εφάμιλλη της ομάδας ελέγχου. Η επιλογή αδρανούς δόσης της ασπιρίνης έγινε προκειμένου να μην αυξηθούν οι αιμορραγικές επιπλοκές και για να αποσαφηνιστεί εάν μπορεί να προκύψει συνεργική δράση τόσο στο κλινικό αποτέλεσμα (ροή του αίματος στην καρωτίδα του ζώου μετά την εφαρμογή ηλεκτρικού ρεύματος) όσο και στις ex vivo αναστολές των αιμοπεταλίων μετά από τη χορήγηση των αγωνιστών AA και ADP.

Μετά από in vitro πειράματα αποφασίσθηκε να δοκιμαστούν δύο δόσεις ασπιρίνης: 5 mg/kg και 10 mg/kg. Τα πειραματόζωα τα οποία έλαβαν p. os ασπιρίνη σε δόση 10

mg/kg παρουσίασαν ισχυρή αναστολή της αιμοπεταλιακής λειτουργικότητας. Η καρωτίδα του ζώου παρέμεινε βατή έως το τέλος του πειράματος διατηρώντας ροή αίματος σε ποσοστό  $61,92 \pm 14,41\%$  της αρχικής. Το αποτέλεσμα αυτό οφείλεται στην αναστολή της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων όπως απεδείχθη κατά την *ex vivo* συσσωρευομετρία. Παρατηρήθηκε  $45 \pm 19,44\%$  αναστολή όταν ως αγωνιστής χρησιμοποιήθηκε το AA και  $25,75 \pm 11,87\%$  όταν ως αγωνιστής χρησιμοποιήθηκε το ADP. Και οι δύο αναστολές ήταν στατιστικά σημαντικές συγκριτικά με την ομάδα ελέγχου. Αντιθέτως, τα πειραματόζωα τα οποία έλαβαν *p. os* ασπιρίνη σε δόση 5 mg/kg δεν παρουσίασαν αναστολή της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων ικανή να διατηρήσει τη βατότητα της καρωτίδας τους έως το τέλος του πειράματος. Πιο συγκεκριμένα, η ροή του αίματος μηδενίστηκε σε χρόνο  $24 \pm 0,7$  λεπτά, σχεδόν δηλαδή στον ίδιο χρόνο συγκριτικά με την ομάδα ελέγχου (στην ομάδα αυτή η ροή μηδενίστηκε σε χρόνο  $23.5 \pm 3$  λεπτά). Το κλινικό αυτό αποτέλεσμα επιβεβαιώθηκε από την *ex vivo* συσσωρευομετρία, όπου η αναστολή της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων του ζώου τόσο με αγωνιστή το AA όσο και το ADP ήταν χαμηλή και χωρίς στατιστικά σημαντική διαφορά συγκριτικά με την ομάδα ελέγχου. Έτσι, η δόση της ασπιρίνης η οποία επιλέχθηκε για να συγκριθεί με τα πεπτίδια ήταν 5 mg/kg.

Οι ομάδες των πειραματοζώων που δοκιμάστηκαν έλαβαν *p. os* ασπιρίνη σε δόση 5 mg/kg, σε συνδυασμό με το συνθετικό πεπτίδιο (S,S) PSRCDCR-NH<sub>2</sub> σε δόσεις 6 mg/kg και 12 mg/kg και το συνθετικό πεπτίδιο YMESRADR σε δόσεις 7,5 mg/kg και 12 mg/kg. Η χορήγηση του (S,S) PSRCDCR-NH<sub>2</sub> σε συνδυασμό με την ασπιρίνη οδήγησε σε τιμές, όσον αφορά στη ροή του αίματος στην καρωτίδα του ζώου 90 λεπτά μετά την εφαρμογή του ηλεκτρικού ρεύματος και στις αναστολές της *ex vivo* συσσώρευσης των αιμοπεταλίων με αγωνιστές το AA και το ADP, οι οποίες παρουσίασαν στατιστική σημαντική ενίσχυση συγκριτικά με την ομάδα που έλαβε μόνο ασπιρίνη 5 mg/kg και την ομάδα ελέγχου. Το βάρος του θρόμβου ήταν επίσης στατιστικά σημαντικά ελαφρύτερο συγκριτικά με τις προαναφερθείσες ομάδες. Δεν παρατηρήθηκε ωστόσο στατιστική σημαντικότητα στις ανωτέρω παραμέτρους, όταν η σύγκριση έγινε με τις αντίστοιχες ομάδες πειραματοζώων που έλαβαν μόνο το πεπτίδιο. Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης είναι σύμφωνα με τα αποτελέσματα της Roussa VD και των συνεργατών της, οι οποίοι κατέληξαν ότι το πεπτίδιο (S,S) PSRCDCR-NH<sub>2</sub> δρα κυρίως

μέσω αναστολής της συσσώρευσης που επάγεται από το AA και λιγότερο μέσω αναστολής της συσσώρευσης που επάγεται από το ADP(366). Ο συνδυασμός με τη χαμηλή, αδρανή δόση της ασπιρίνης δεν κατάφερε να ενισχύσει την αναστολή της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων όταν ως αγωνιστής χρησιμοποιήθηκε το AA. Αυτό πιθανώς οφείλεται στις φαρμακοκινητικές ιδιότητες της ασπιρίνης, η οποία ταχέως μετά την απορρόφηση κατανέμεται σε μία πληθώρα ιστών και σωματικών υγρών. Όσον αφορά στο πλάσμα, όταν η ασπιρίνη χορηγείται σε χαμηλές δόσεις, όλη η ποσότητα σαλικυλικών δεσμεύεται πλήρως από τις αλβουμίνες. Αυτό δε θεωρείται ότι επηρεάζει την αντιαιμοπεταλιακή της δράση γιατί αυτή φαίνεται να εξαρτάται από την ικανότητα ακετυλίωσης και όχι από τα σαλικυλικά(413). Μετά την από του στόματος λήψη, τα σαλικυλικά είναι ανιχνεύσιμα σε διάφορα σωματικά υγρά όπως στο αρθρικό(414) και στο εγκεφαλονωτιαίο(415), στο σιέλο ακόμα και στο ενδοφθάλμιο υγρό(416). Η συγκέντρωσή τους στα υγρά αυτά είναι κλάσμα της συγκέντρωσης που παρατηρείται στο πλάσμα. Μπορούν επίσης να ανιχνευθούν στα νεφρά, την καρδιά, τους πνεύμονες και τους φακούς των οφθαλμών(416, 417). Αυτή η ευρεία κατανομή πιθανώς να αποδυναμώνει την αντιαιμοπεταλιακή δράση της χαμηλής δόσης της ασπιρίνης, κάνοντάς τη κλινικά μη ανιχνεύσιμη στο πειραματικό μοντέλο αρτηριακής θρόμβωσης. Ο συνδυασμός του πεπτιδίου (S,S) PSRCDRCR-NH<sub>2</sub> με την ασπιρίνη απεδείχθη ασφαλής για το ζώο, καθώς ελάττωσε σημαντικά το βάρος του θρόμβου που δημιουργήθηκε μετά την εφαρμογή του ηλεκτρικού ρεύματος συγκριτικά με την ομάδα ελέγχου, χωρίς να αυξήσει στατιστικά σημαντικά την ποσότητα του αίματος που απορροφήθηκε από την προζυγισμένη γάζα. Η ασφάλεια της χορήγησης του παραπάνω συνδυασμού στα ζώα δε συνεπάγεται και ασφαλή χορήγηση στον άνθρωπο. Το θέμα αυτό απαιτεί περαιτέρω διερεύνηση. Αυτό το απέδειξαν οι μελέτες με την επιπιφιματίδη, η οποία αν και χαρακτηρίζεται από αιμορραγικές επιπλοκές στον άνθρωπο(418), δεν επηρέασε το ποσό της απώλειας αίματος ή τους αιμορραγικούς χρόνους όταν δοκιμάστηκε στο ίδιο μοντέλο πειραματικής αρτηριακής θρόμβωσης(366).

Όπως αναφέρθηκε, το συνθετικό πεπτίδιο YMESRADR στη δόση των 7,5 mg/kg κατάφερε να διατηρήσει τη βατότητα της καρωτίδας του ζώου έως και το τέλος του πειράματος, χωρίς ωστόσο να παρουσιάσει στατιστική σημαντικότητα όσον αφορά

στην αναστολή της *ex vivo* συσσώρευσης των αιμοπεταλίων όταν ως αγωνιστής χρησιμοποιήθηκε το ADP ή στη μείωση του βάρους του σχηματιζόμενου θρόμβου(365). Αυτό το θέμα είναι υπό διερεύνηση, όπως όμως ήδη αναφέρθηκε πιθανολογείται ότι η αναστολή του υποδοχέα  $GP_{\alpha_{IIb}\beta_3}$  δεν επιτρέπει την αγκυροβόληση των αιμοπεταλίων στο υπενδοθήλιο(419). Με αυτό τον τρόπο θα μπορούσε να εξηγηθεί η διατήρηση της ροής του αγγείου, χωρίς να συνοδεύεται από ισχυρή *ex vivo* συσσώρευση των αιμοπεταλίων. Συγκριτικά με την ομάδα των ζώων τα οποία έλαβαν το πεπτιδίο YMESRADR σε δόση 7,5 mg/kg, η ομάδα που έλαβε το συνδυασμό της αντίστοιχης δόσης του πεπτιδίου με ασπιρίνη σε δόση 5 mg/kg κατάφερε να διατηρήσει τη ροή δια της καρωτίδας μέχρι το τέλος του πειράματος. Η αναστολή της *ex vivo* συσσώρευσης των αιμοπεταλίων όταν ως αγωνιστής χρησιμοποιήθηκε το AA δεν ήταν στατιστικά σημαντική συγκριτικά με την αντίστοιχη δόση του πεπτιδίου. Αντιθέτως, ο συνδυασμός του YMESRADR σε δόση 7,5 mg/kg με την ασπιρίνη σε δόση 5 mg/kg παρουσίασε τιμές αναστολής της *ex vivo* συσσώρευσης των αιμοπεταλίων με αγωνιστή το ADP σημαντικά ενισχυμένες όταν συγκρίθηκαν με την ομάδα που έλαβε μόνο το πεπτιδίο YMESRADR σε δόση 7,5 mg/kg. Αυτό φαίνεται να μπορεί να εξηγηθεί από δεδομένα που υποστηρίζουν ότι η ασπιρίνη όταν χορηγείται σε δόσεις 500-1000 mg (υψηλότερες από τα 5 mg/kg που χρησιμοποιήθηκε στα πειράματα της παρούσας μελέτης) έχει μια ανασταλτική επίδραση στην ενεργοποίηση και τη συσσώρευση των αιμοπεταλίων ως απάντηση στον αγωνιστή ADP, εκτός από την ευρέως γνωστή επίδρασή της στην αναστολή της μετατροπής του AA σε Θρομβοξάνη A<sub>2</sub> μέσω της αδρανοποίησης της κυκλοξυγενάσης(420). Αυτό θα μπορούσε να εξηγήσει την ενισχυμένη αναστολή της *ex vivo* συσσώρευσης των αιμοπεταλίων με αγωνιστή το ADP. Σχετικά με το συγκεκριμένο ζήτημα, πρέπει επίσης να τονιστεί ότι η αντιδραστικότητα των αιμοπεταλίων στο ADP φαίνεται να ενισχύεται καθώς ο χρόνος από τη λήψη του αίματος μέχρι την ανάλυση αυξάνεται(421). Οι μετρήσεις πρέπει να γίνουν το πολύ εντός μίας ώρας μετά την παρακέντηση του αγγείου προκειμένου να αποφευχθούν ψευδή αποτελέσματα συσσωρευομετρίας. Κατά τη διάρκεια των πειραμάτων που έγιναν για τη συγκεκριμένη μελέτη, η μεταφορά του δείγματος του αίματος από τη χειρουργική αίθουσα στο χημικό εργαστήριο γινόταν άμεσα. Ωστόσο, οι δύο φυγοκεντρήσεις που απαιτούνταν για να παραχθεί το PRP και το PPP καθώς και η

απαραίτητη επώαση των αιμοπεταλίων σε περιβάλλον υγρασίας απαιτούσαν τουλάχιστον 55 λεπτά. Αυτό αρχικά θεωρήθηκε ότι μπορεί να αμφισβητήσει τα αποτελέσματα της μελέτης, αλλά η ενισχυμένη αυτή αναστολή της *ex vivo* συσσώρευσης των αιμοπεταλίων με αγωνιστή το ADP δεν παρατηρήθηκε στην ομάδα των ζώων που έλαβαν το συνδυασμό του πεπτιδίου YMESRADR σε δόση 12 mg/kg με την ασπιρίνη σε δόση 5 mg/kg. Παρά ταύτα, στη συγκεκριμένη ομάδα συνδυασμού ουσιών, η ροή του αίματος διατηρήθηκε σε επίπεδα στατιστικά σημαντικά υψηλότερα συγκριτικά με την ομάδα της αντίστοιχης δόσης του πεπτιδίου. Το θέμα αυτό είναι υπό διερεύνηση.

Στο τέλος του πειράματος, η ροή του αίματος διατηρήθηκε και για τις δύο ομάδες του YMESRADR σε επίπεδα στατιστικά σημαντικά υψηλότερα, τόσο συγκριτικά με την ομάδα ελέγχου και την ομάδα της ασπιρίνης, όσο και συγκριτικά με τις αντίστοιχες ομάδες των πεπτιδίων. Η αναστολή της *ex vivo* συσσώρευσης των αιμοπεταλίων με αγωνιστές το AA και το ADP ήταν στατιστικά σημαντικά ενισχυμένη συγκριτικά με την ομάδα ελέγχου και την ομάδα της ασπιρίνης. Όπως αναφέρθηκε, για την ομάδα του συνδυασμού του πεπτιδίου YMESRADR 7,5 mg/kg με την ασπιρίνη σε δόση 5 mg/kg, η αναστολή της *ex vivo* συσσώρευσης των αιμοπεταλίων με αγωνιστή το ADP ήταν στατιστικά σημαντικά ισχυρότερη συγκριτικά με την ομάδα της αντίστοιχης δόσης του πεπτιδίου. Αντίστοιχο αποτέλεσμα δεν παρατηρήθηκε για την ομάδα του συνδυασμού του πεπτιδίου YMESRADR 12 mg/kg με την ασπιρίνη σε δόση 5 mg/kg.

Συνοψίζοντας, η παρούσα μελέτη αποδεικνύει ότι η συγχορήγηση των συνθετικών πεπτιδίων YMESRADR και (S,S) PSRCDCR-NH<sub>2</sub> με την ασπιρίνη σε δόση 5 mg/kg είναι ασφαλής (δεν αυξήθηκε το ποσό απώλειας αίματος συγκριτικά με τις ομάδες των αντίστοιχων δόσεων των πεπτιδίων, την ομάδα ελέγχου ή την ομάδα των πειραματοζώων που θεραπεύθηκαν μόνο με την ασπιρίνη σε δόση 5 mg/kg). Ήταν επίσης αποτελεσματική, καθώς όλες οι ομάδες των πειραματοζώων διατήρησαν τη βατότητα της καρωτίδας μέχρι το τέλος του πειράματος. Τα ζώα τα οποία έλαβαν συνδυασμό του πεπτιδίου YMESRADR με την ασπιρίνη σε δόση 5 mg/kg ήταν τα μόνα τα οποία παρουσίασαν στατιστικά σημαντικά ενισχυμένο κλινικό αποτέλεσμα (ροή του αίματος στην καρωτίδα) συγκριτικά με τις ομάδες των αντίστοιχων δόσεων του πεπτιδίου. Από τις δύο αυτές ομάδες, μόνο ο συνδυασμός του YMESRADR 7,5 mg/kg



με την ασπιρίνη σε δόση 5 mg/kg συνοδεύτηκε από ένα σημαντικό *ex vivo* αποτέλεσμα στην αναστολή της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων με αγωνιστή το ADP, συγκριτικά με την ομάδα της αντίστοιχης δόσης του πεπτιδίου. Αρκετά θέματα τα οποία αφορούν τα δύο συνθετικά πεπτίδια και το συνδυασμό τους με την ασπιρίνη, ανάμεσα τους η ασφάλεια της χορήγησης στον άνθρωπο, απαιτούν περαιτέρω διερεύνηση.

# ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η ενεργοποίηση και συσσώρευση των αιμοπεταλίων αποτελούν τους υπεύθυνους μηχανισμούς για τα στεφανιαία σύνδρομα. Ο υποδοχέας  $\alpha_{IIb}\beta_3$  αποτελεί το τελικό μονοπάτι στην παθογένεσή τους. Συνεπώς, οι αναστολείς των υποδοχέων αυτών είναι μεγάλης θεραπευτικής σημασίας. Δύο συνθετικά πεπτιδία, το κυκλικό μόριο (S,S) PSRCDCR-NH<sub>2</sub> και το YMESRADR έχουν παρουσιάσει ισχυρά in vivo και ex vivo αντιαιμοπεταλιακά αποτελέσματα, δοκιμαζόμενα σε ένα μοντέλο πειραματικής αρτηριακής θρόμβωσης σε κουνέλια. Στην καθημερινή κλινική πρακτική, η ισχυρή αντιαιμοπεταλιακή αγωγή με τις ελάχιστες αιμορραγικές επιπλοκές, είναι μεγάλης θεραπευτικής σημασίας. Οι παράγοντες που χρησιμοποιούνται αυτή τη στιγμή είναι αποτελεσματικοί στη θεραπεία και την πρόληψη της αρτηριακής θρόμβωσης, παρουσιάζουν όμως αυξημένη επίπτωση αιμορραγίας. Στην παρούσα πειραματική μελέτη μελετήσαμε το αποτέλεσμα της συνδυασμένης χορήγησης του κάθε πεπτιδίου με την ασπιρίνη. Δραστικές δόσεις των πεπτιδίων (S,S) PSRCDCR-NH<sub>2</sub> και το YMESRADR χορηγήθηκαν σε συνδυασμό με μια αδρανή δόση ασπιρίνης (5 mg/kg), προκειμένου να διερευνηθούν πιθανές συνεργικές αντιαιμοπεταλιακές επιδράσεις καθώς και οι αιμορραγικές τους επιπλοκές.

Η μελέτη εγκρίθηκε από το Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων. Αρχικά γινόταν συλλογή αίματος από την ωτιαία αρτηρία του ζώου μέσα σε ένα δοκιμαστικό σωλήνα που περιείχε αντιπηκτικό κιτρικών. Εν συνεχεία, η ασπιρίνη χορηγούνταν p. os. Ακολουθούσε η χορήγηση του πεπτιδίου (μισή από την προς μελέτη δόση ως bolus και η υπόλοιπη ως συνεχής ενδοφλέβια έγχυση για 90 λεπτά) μέσω της μηριαίας φλέβας.

Οι συγκετρώσεις που μελετήθηκαν ήταν 7.5 mg/kg και 12 mg/kg για το YMESRADR, καθώς επίσης 6 mg/kg και 12 mg/kg για το (S,S) PSRCDCR-NH<sub>2</sub> (ομάδες A, B, C και D αντίστοιχα, μέση ηλικία ζώων  $82.55 \pm 1.66$  ημέρες). Εν συνεχεία η καρωτίδα απομονωνόταν χειρουργικά από τους γύρω ιστούς και γινόταν καταγραφή του αρχικού ρυθμού ροής του αίματος μέσα από αυτή. Μία ώρα μετά την έναρξη της έγχυσης του πεπτιδίου, ακολουθούσε η συλλογή ενός δεύτερου δείγματος αίματος. Εν συνεχεία, ξεκινούσε η διαδικασία επαγωγής της θρόμβωσης με την εφαρμογή ηλεκτρικού ρεύματος στην εξωτερική επιφάνεια του αγγείου. Το πείραμα τελείωνε είτε 90 λεπτά με την επαγωγή της θρόμβωσης εάν το αγγείο παρέμενε βατό, είτε τη στιγμή που ο ρυθμός ροής μηδενιζόταν. Η ασφάλεια της χορήγησης των πεπτιδίων

σε συνδυασμό με την ασπιρίνη στις δόσεις που προαναφέρθηκαν αξιολογήθηκε επίσης. Για τις *ex vivo* μετρήσεις της αναστολής της αιμοπεταλιακής συσώρευσης, γινόταν μελέτη συσσωρευομετρίας σε πλάσμα πλούσιο σε αιμοπετάλια για κάθε ένα από τα δύο δείγματα αίματος, χρησιμοποιώντας ως αγωνιστές συσώρευσης το αραχιδονικό οξύ και το ADP.

Η βατότητα της καρωτίδας διατηρήθηκε μέχρι το τέλος του πειράματος, σε στατιστικά σημαντικό βαθμό συγκριτικά με την ομάδα ελέγχου και την ομάδα της ασπιρίνης. Επιπροσθέτως, οι ομάδες A και B παρουσίασαν ροές στατιστικά σημαντικά διατηρημένες συγκριτικά με την ομάδα των ζώων που θεραπεύθηκε με τις αντίστοιχες δόσεις του πεπτιδίου μόνο. Το αποτέλεσμα αυτό δεν παρατηρήθηκε στις ομάδες C και D. Η αναστολή της αιμοπεταλιακής συσώρευσης ήταν στατιστικά σημαντικά ενισχυμένη για όλες τις ομάδες των ζώων συγκριτικά με την ομάδα ελέγχου και την ομάδα της ασπιρίνης. Ειδικότερα για την ομάδα A, η συσώρευση των αιμοπεταλίων με αγωνιστή το ADP παρουσίασε στατιστικά σημαντική αναστολή συγκριτικά με την ομάδα των ζώων που έλαβαν μόνο την αντίστοιχη δόση του πεπτιδίου, γεγονός το οποίο δε παρατηρήθηκε στις ομάδες B, C και D. Τα χορηγούμενα σχήματα ήταν ασφαλή καθώς η αιμορραγία δεν παρουσίασε στατιστικά σημαντική παράταση σε καμία από τις τέσσερις ομάδες.

Συμπερασματικά, ο συνδυασμός των δύο πεπτιδίων με ασπιρίνη στη δόση των 5 mg/kg απεδείχθη ασφαλής για τα πειραματόζωα και αποτελεσματικός. Μόνο οι ομάδες A και B παρουσίασαν ένα στατιστικά σημαντικά ενισχυμένο κλινικό αποτέλεσμα συγκριτικά με τα ζώα που θεραπεύθηκαν μόνο με τις αντίστοιχες δόσεις του πεπτιδίου YMESRADR. Ανάμεσά τους, μόνο η ομάδα A συνοδεύθηκε επίσης από ένα στατιστικά σημαντικό *ex vivo* αποτέλεσμα.

## **Effect of cyclic and hybrid peptide analogues of integrin $\text{IIbIII}\alpha$ receptor in an experimental model of arterial thrombosis in rabbits.**

**Englezopoulos V. Konstantinos**

Platelet activation and aggregation is the responsible mechanism for coronary syndromes. In this process, the  $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$  receptor is the final pathway. Consequently,  $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$  antagonists are of therapeutic importance. Two synthetic peptides, the highly constrained cyclic (S,S) PSRCDCR-NH<sub>2</sub> and YMESRADR have exhibited strong in vivo and ex vivo antiplatelet effects in an electrically-induced carotid artery thrombosis model in rabbits. In the clinical setting, potent antiplatelet therapy with minimal bleeding adverse events is of paramount importance. Agents currently in use are effective in treating and preventing arterial thrombotic events but present with increased bleeding rates. In the current experimental study, we investigated the effect of the combined administration of each peptide with aspirin. Previously studied effective doses of YMESRADR and (S,S) PSRCDCR-NH<sub>2</sub> were administrated in combination with an ineffective aspirin dose (5 mg/kg), to investigate their possible synergistic antiplatelet effect and bleeding side effects.

Ethics Committee of the University of Ioannina, Greece, approved this study. Initially, citrated blood was collected by the rabbit's ear artery. Aspirin was then administered per os. Subsequently, the peptide was infused (half of the studied dose as a bolus and the rest continuously over 90 min) through the femoral vein. Concentrations were 7.5 mg/kg and 12 mg/kg for YMESRADR, as well as 6 mg/kg and 12 mg/kg for (S,S) PSRCDCR-NH<sub>2</sub> (groups A, B, C and D respectively, mean age  $82.55 \pm 1.66$  days for all animals). Carotid artery was then surgically isolated and baseline blood flow was monitored. One hour after infusion initiation, another blood sample was collected from the animal. Thrombosis was then electrically induced through the external carotid surface, to initiate thrombus formation. The experiment ended 90 min after electrical stimulation if the artery remained patent. Bleeding parameters were evaluated, to assess compound safety. For ex vivo measurements, platelet aggregation in PRP was conducted for each blood sample using arachidonic acid and ADP. Its inhibition was calculated for each agonist separately.

Carotid's patency was significantly preserved until the end of the experiment for all groups compared to placebo's and aspirin's groups. Furthermore, groups A and B also presented with blood flows significantly preserved compared to the animals treated only with the respective peptide doses. This effect was not observed for groups C and D. Inhibition of platelet aggregation was significantly augmented for all four groups of animals compared to the placebo's and aspirin's groups. Importantly, for group A the ADP-induced platelet aggregation was also significantly inhibited compared to the animals treated only with the respective peptide dose, which was not observed for groups B, C and D. The administered compounds were safe as bleeding assays were not prolonged in any group.

In summary, combining the two peptides with 5 mg/kg aspirin is safe and effective. Only groups A and B presented with a significantly amplified clinical effect compared to the animals treated only with the respective YMESRADR dose. Among them, only group A was also escorted by a statistically significant ex vivo effect.

# **ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

1. Noetzli LJ, French SL, Machlus KR. New Insights Into the Differentiation of Megakaryocytes From Hematopoietic Progenitors. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2019;39(7):1288-300.
2. Rieger MA, Schroeder T. Hematopoiesis. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2012;4(12).
3. Wen Q, Goldenson B, Crispino JD. Normal and malignant megakaryopoiesis. *Expert Rev Mol Med.* 2011;13:e32.
4. Briddell RA, Brandt JE, Straneva JE, et al. Characterization of the human burst-forming unit-megakaryocyte. *Blood.* 1989;74(1):145-51.
5. Stasi R, Bosworth J, Rhodes E, et al. Thrombopoietic agents. *Blood Rev.* 2010;24(4-5):179-90.
6. Vainchenker W, Bouguet J, Guichard J, et al. Megakaryocyte colony formation from human bone marrow precursors. *Blood.* 1979;54(4):940-5.
7. Long MW, Gragowski LL, Heffner CH, et al. Phorbol diesters stimulate the development of an early murine progenitor cell. The burst-forming unit-megakaryocyte. *J Clin Invest.* 1985;76(2):431-8.
8. Lambert MP, Wang Y, Bdeir KH, et al. Platelet factor 4 regulates megakaryopoiesis through low-density lipoprotein receptor-related protein 1 (LRP1) on megakaryocytes. *Blood.* 2009;114(11):2290-8.
9. Kato T, Oda A, Inagaki Y, et al. Thrombin cleaves recombinant human thrombopoietin: one of the proteolytic events that generates truncated forms of thrombopoietin. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997;94(9):4669-74.
10. Carver-Moore K, Broxmeyer HE, Luoh SM, et al. Low levels of erythroid and myeloid progenitors in thrombopoietin-and c-mpl-deficient mice. *Blood.* 1996;88(3):803-8.
11. Kelemen E, Cserhati I, Tanos B. Demonstration and some properties of human thrombopoietin in thrombocythaemic sera. *Acta Haematol.* 1958;20(6):350-5.
12. Broudy VC, Lin NL, Kaushansky K. Thrombopoietin (c-mpl ligand) acts synergistically with erythropoietin, stem cell factor, and interleukin-11 to enhance murine megakaryocyte colony growth and increases megakaryocyte ploidy in vitro. *Blood.* 1995;85(7):1719-26.
13. Solar GP, Kerr WG, Zeigler FC, et al. Role of c-mpl in early hematopoiesis. *Blood.* 1998;92(1):4-10.
14. Fielder PJ, Gurney AL, Stefanich E, et al. Regulation of thrombopoietin levels by c-mpl-mediated binding to platelets. *Blood.* 1996;87(6):2154-61.
15. de Sauvage FJ, Hass PE, Spencer SD, et al. Stimulation of megakaryocytopoiesis and thrombopoiesis by the c-Mpl ligand. *Nature.* 1994;369(6481):533-8.
16. Kuter DJ, Rosenberg RD. The reciprocal relationship of thrombopoietin (c-Mpl ligand) to changes in the platelet mass during busulfan-induced thrombocytopenia in the rabbit. *Blood.* 1995;85(10):2720-30.
17. Matlashewski G, Lamb P, Pim D, et al. Isolation and characterization of a human p53 cDNA clone: expression of the human p53 gene. *EMBO J.* 1984;3(13):3257-62.
18. Quesenberry PJ, Ihle JN, McGrath E. The effect of interleukin 3 and GM-CSA-2 on megakaryocyte and myeloid clonal colony formation. *Blood.* 1985;65(1):214-7.



19. Segal GM, Stueve T, Adamson JW. Analysis of murine megakaryocyte colony size and ploidy: effects of interleukin-3. *J Cell Physiol.* 1988;137(3):537-44.
20. Williams N, Sparrow R, Gill K, et al. Murine megakaryocyte colony stimulating factor: its relationship to interleukin 3. *Leuk Res.* 1985;9(12):1487-96.
21. Farber L, Haus U, Fuchsel G, et al. Treatment of prolonged chemotherapy induced severe thrombocytopenia with recombinant human interleukin-3--a report on four cases. *Anticancer Drugs.* 1997;8(3):288-92.
22. Ganser A, Ottmann OG, Seipelt G, et al. Effect of long-term treatment with recombinant human interleukin-3 in patients with myelodysplastic syndromes. *Leukemia.* 1993;7(5):696-701.
23. Yonemura Y, Kawakita M, Masuda T, et al. Synergistic effects of interleukin 3 and interleukin 11 on murine megakaryopoiesis in serum-free culture. *Exp Hematol.* 1992;20(8):1011-6.
24. Carrington PA, Hill RJ, Stenberg PE, et al. Multiple in vivo effects of interleukin-3 and interleukin-6 on murine megakaryocytopoiesis. *Blood.* 1991;77(1):34-41.
25. Ishibashi T, Kimura H, Shikama Y, et al. Interleukin-6 is a potent thrombopoietic factor in vivo in mice. *Blood.* 1989;74(4):1241-4.
26. Zeidler C, Kanz L, Hurkuck F, et al. In vivo effects of interleukin-6 on thrombopoiesis in healthy and irradiated primates. *Blood.* 1992;80(11):2740-5.
27. Burstein SA, Downs T, Friese P, et al. Thrombocytopoiesis in normal and sublethally irradiated dogs: response to human interleukin-6. *Blood.* 1992;80(2):420-8.
28. Quesenberry PJ, McGrath HE, Williams ME, et al. Multifactor stimulation of megakaryocytopoiesis: effects of interleukin 6. *Exp Hematol.* 1991;19(1):35-41.
29. Kaser A, Brandacher G, Steurer W, et al. Interleukin-6 stimulates thrombopoiesis through thrombopoietin: role in inflammatory thrombocytosis. *Blood.* 2001;98(9):2720-5.
30. Quesniaux VF. Interleukin 11. *Leuk Lymphoma.* 1994;14(3-4):241-9.
31. Weich NS, Fitzgerald M, Wang A, et al. Recombinant human interleukin-11 synergizes with steel factor and interleukin-3 to promote directly the early stages of murine megakaryocyte development in vitro. *Blood.* 2000;95(2):503-9.
32. Yonemura Y, Kawakita M, Masuda T, et al. Effect of recombinant human interleukin-11 on rat megakaryopoiesis and thrombopoiesis in vivo: comparative study with interleukin-6. *Br J Haematol.* 1993;84(1):16-23.
33. Saitoh M, Taguchi K, Yasuda S, et al. Thrombopoietic activity of recombinant human interleukin-11 in nonhuman primates with ACNU-induced thrombocytopenia. *J Interferon Cytokine Res.* 2000;20(6):539-45.
34. Saitoh M, Taguchi K, Momose K, et al. Kinetic analysis of megakaryopoiesis induced by recombinant human interleukin 11 in myelosuppressed mice. *Cytokine.* 2001;13(5):287-94.
35. Yonemura Y, Kawakita M, Miyake H, et al. Effects of interleukin-11 on carboplatin-induced thrombocytopenia in rats and in combination with stem cell factor. *Int J Hematol.* 1997;65(4):397-404.
36. Lazzari L, Henschler R, Lecchi L, et al. Interleukin-6 and interleukin-11 act synergistically with thrombopoietin and stem cell factor to modulate ex vivo

- expansion of human CD41+ and CD61+ megakaryocytic cells. *Haematologica*. 2000;85(1):25-30.
37. Ishibashi T, Miller SL, Burstein SA. Type beta transforming growth factor is a potent inhibitor of murine megakaryocytopoiesis in vitro. *Blood*. 1987;69(6):1737-41.
  38. Kuter DJ, Gminski DM, Rosenberg RD. Transforming growth factor beta inhibits megakaryocyte growth and endomitosis. *Blood*. 1992;79(3):619-26.
  39. Gewirtz AM, Calabretta B, Rucinski B, et al. Inhibition of human megakaryocytopoiesis in vitro by platelet factor 4 (PF4) and a synthetic COOH-terminal PF4 peptide. *J Clin Invest*. 1989;83(5):1477-86.
  40. Sata M, Yano Y, Yoshiyama Y, et al. Mechanisms of thrombocytopenia induced by interferon therapy for chronic hepatitis B. *J Gastroenterol*. 1997;32(2):206-10.
  41. Rendu F, Brohard-Bohn B. The platelet release reaction: granules' constituents, secretion and functions. *Platelets*. 2001;12(5):261-73.
  42. Kaushansky K. Thrombopoietin: understanding and manipulating platelet production. *Annu Rev Med*. 1997;48:1-11.
  43. Stenberg PE, Levin J. Mechanisms of platelet production. *Blood Cells*. 1989;15(1):23-47.
  44. Radley JM, Haller CJ. Fate of senescent megakaryocytes in the bone marrow. *Br J Haematol*. 1983;53(2):277-87.
  45. McMillan R. Therapy for adults with refractory chronic immune thrombocytopenic purpura. *Ann Intern Med*. 1997;126(4):307-14.
  46. Rosenblit MD. [The study of platelet kinetics with <sup>51</sup>Cr labeled platelets (author's transl)]. *Rev Bras Pesqui Med Biol*. 1976;9(1):45-53.
  47. Escolar G, White JG. The platelet open canalicular system: a final common pathway. *Blood Cells*. 1991;17(3):467-85; discussion 86-95.
  48. White JG, Escolar G. The blood platelet open canalicular system: a two-way street. *Eur J Cell Biol*. 1991;56(2):233-42.
  49. Comfurius P, Smeets EF, Willems GM, et al. Assembly of the prothrombinase complex on lipid vesicles depends on the stereochemical configuration of the polar headgroup of phosphatidylserine. *Biochemistry*. 1994;33(34):10319-24.
  50. Majumder R, Quinn-Allen MA, Kane WH, et al. A phosphatidylserine binding site in factor Va C1 domain regulates both assembly and activity of the prothrombinase complex. *Blood*. 2008;112(7):2795-802.
  51. Majumder R, Weinreb G, Lentz BR. Efficient thrombin generation requires molecular phosphatidylserine, not a membrane surface. *Biochemistry*. 2005;44(51):16998-7006.
  52. Rosing J, van Rijn JL, Bevers EM, et al. The role of activated human platelets in prothrombin and factor X activation. *Blood*. 1985;65(2):319-32.
  53. McEver RP. The clinical significance of platelet membrane glycoproteins. *Hematol Oncol Clin North Am*. 1990;4(1):87-105.
  54. Kamath S, Blann AD, Lip GY. Platelet activation: assessment and quantification. *Eur Heart J*. 2001;22(17):1561-71.
  55. White JG, Clawson CC. The surface-connected canalicular system of blood platelets--a fenestrated membrane system. *Am J Pathol*. 1980;101(2):353-64.

56. Cramer EM, Lu H, Caen JP, et al. Differential redistribution of platelet glycoproteins Ib and IIb-IIIa after plasmin stimulation. *Blood*. 1991;77(4):694-9.
57. Cutler L, Rodan G, Feinstein MB. Cytochemical localization of adenylate cyclase and of calcium ion, magnesium ion-activated ATPases in the dense tubular system of human blood platelets. *Biochim Biophys Acta*. 1978;542(3):357-71.
58. Gonzalez-Utor AL, Sanchez-Aguayo I, Hidalgo J. Cytochemical localization of K(+)-dependent p-nitrophenyl phosphatase and adenylate cyclase by using one-step method in human washed platelets. *Histochemistry*. 1992;97(6):503-7.
59. Gerrard JM, White JG, Peterson DA. The platelet dense tubular system: its relationship to prostaglandin synthesis and calcium flux. *Thromb Haemost*. 1978;40(2):224-31.
60. Carlsson L, Markey F, Blikstad I, et al. Reorganization of actin in platelets stimulated by thrombin as measured by the DNase I inhibition assay. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1979;76(12):6376-80.
61. Hartwig JH. Mechanisms of actin rearrangements mediating platelet activation. *J Cell Biol*. 1992;118(6):1421-42.
62. Sixma JJ, Molenaar I. Microtubules and microfibrils in human platelets. *Thromb Diath Haemorrh*. 1966;16(1):153-62.
63. Wencel-Drake JD, Frelinger AL, 3rd, Dieter MG, et al. Arg-Gly-Asp-dependent occupancy of GPIIb/IIIa by applaggin: evidence for internalization and cycling of a platelet integrin. *Blood*. 1993;81(1):62-9.
64. Collet JP, Thiele H, Barbato E, et al. 2020 ESC Guidelines for the management of acute coronary syndromes in patients presenting without persistent ST-segment elevation. *Eur Heart J*. 2020.
65. Ibanez B, James S, Agewall S, et al. 2017 ESC Guidelines for the management of acute myocardial infarction in patients presenting with ST-segment elevation: The Task Force for the management of acute myocardial infarction in patients presenting with ST-segment elevation of the European Society of Cardiology (ESC). *Eur Heart J*. 2018;39(2):119-77.
66. Knuuti J, Wijns W, Saraste A, et al. 2019 ESC Guidelines for the diagnosis and management of chronic coronary syndromes. *Eur Heart J*. 2020;41(3):407-77.
67. Hackam DG, Spence JD. Antiplatelet Therapy in Ischemic Stroke and Transient Ischemic Attack. *Stroke*. 2019;50(3):773-8.
68. Kearon C, Akl EA, Ornelas J, et al. Antithrombotic Therapy for VTE Disease: CHEST Guideline and Expert Panel Report. *Chest*. 2016;149(2):315-52.
69. Kroll MH, Hellums JD, McIntire LV, et al. Platelets and shear stress. *Blood*. 1996;88(5):1525-41.
70. Alevriadou BR, Moake JL, Turner NA, et al. Real-time analysis of shear-dependent thrombus formation and its blockade by inhibitors of von Willebrand factor binding to platelets. *Blood*. 1993;81(5):1263-76.
71. Ruggeri ZM. von Willebrand factor. *J Clin Invest*. 1997;99(4):559-64.
72. Tomokiyo K, Kamikubo Y, Hanada T, et al. Von Willebrand factor accelerates platelet adhesion and thrombus formation on a collagen surface in platelet-reduced blood under flow conditions. *Blood*. 2005;105(3):1078-84.
73. Sugimoto M, Miyata S. Functional property of von Willebrand factor under flowing blood. *Int J Hematol*. 2002;75(1):19-24.

74. Sadler JE. Biochemistry and genetics of von Willebrand factor. *Annu Rev Biochem.* 1998;67:395-424.
75. Andrews RK, Gardiner EE, Shen Y, et al. Glycoprotein Ib-IX-V. *Int J Biochem Cell Biol.* 2003;35(8):1170-4.
76. Hickey MJ, Roth GJ. Characterization of the gene encoding human platelet glycoprotein IX. *J Biol Chem.* 1993;268(5):3438-43.
77. Wenger RH, Kieffer N, Wicki AN, et al. Structure of the human blood platelet membrane glycoprotein Ib alpha gene. *Biochem Biophys Res Commun.* 1988;156(1):389-95.
78. Yagi M, Edelhoff S, Disteché CM, et al. Structural characterization and chromosomal location of the gene encoding human platelet glycoprotein Ib beta. *J Biol Chem.* 1994;269(26):17424-7.
79. Cattaneo M. Inherited platelet-based bleeding disorders. *J Thromb Haemost.* 2003;1(7):1628-36.
80. Sandrock K, Knofler R, Greinacher A, et al. Novel Mutation in Bernard-Soulier Syndrome. *Transfus Med Hemother.* 2010;37(5):278-84.
81. Russell SD, Roth GJ. Pseudo-von Willebrand disease: a mutation in the platelet glycoprotein Ib alpha gene associated with a hyperactive surface receptor. *Blood.* 1993;81(7):1787-91.
82. Chow TW, Hellums JD, Moake JL, et al. Shear stress-induced von Willebrand factor binding to platelet glycoprotein Ib initiates calcium influx associated with aggregation. *Blood.* 1992;80(1):113-20.
83. Siedlecki CA, Lestini BJ, Kottke-Marchant KK, et al. Shear-dependent changes in the three-dimensional structure of human von Willebrand factor. *Blood.* 1996;88(8):2939-50.
84. Kuwahara M, Sugimoto M, Tsuji S, et al. Platelet shape changes and adhesion under high shear flow. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2002;22(2):329-34.
85. Li Z, Delaney MK, O'Brien KA, et al. Signaling during platelet adhesion and activation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2010;30(12):2341-9.
86. Hynes RO. Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell.* 2002;110(6):673-87.
87. Bouvard D, Brakebusch C, Gustafsson E, et al. Functional consequences of integrin gene mutations in mice. *Circ Res.* 2001;89(3):211-23.
88. Hynes RO. Targeted mutations in cell adhesion genes: what have we learned from them? *Dev Biol.* 1996;180(2):402-12.
89. Hynes RO. A reevaluation of integrins as regulators of angiogenesis. *Nat Med.* 2002;8(9):918-21.
90. Sheppard D. In vivo functions of integrins: lessons from null mutations in mice. *Matrix Biol.* 2000;19(3):203-9.
91. Schwartz MA, Ginsberg MH. Networks and crosstalk: integrin signalling spreads. *Nat Cell Biol.* 2002;4(4):E65-8.
92. Lee JO, Bankston LA, Arnaout MA, et al. Two conformations of the integrin A-domain (I-domain): a pathway for activation? *Structure.* 1995;3(12):1333-40.
93. Lee JO, Rieu P, Arnaout MA, et al. Crystal structure of the A domain from the alpha subunit of integrin CR3 (CD11b/CD18). *Cell.* 1995;80(4):631-8.
94. Qu A, Leahy DJ. The role of the divalent cation in the structure of the I domain from the CD11a/CD18 integrin. *Structure.* 1996;4(8):931-42.

95. Emsley J, King SL, Bergelson JM, et al. Crystal structure of the I domain from integrin alpha2beta1. *J Biol Chem.* 1997;272(45):28512-7.
96. Emsley J, Knight CG, Farndale RW, et al. Structural basis of collagen recognition by integrin alpha2beta1. *Cell.* 2000;101(1):47-56.
97. Xiong JP, Stehle T, Diefenbach B, et al. Crystal structure of the extracellular segment of integrin alpha Vbeta3. *Science.* 2001;294(5541):339-45.
98. Beglova N, Blacklow SC, Takagi J, et al. Cysteine-rich module structure reveals a fulcrum for integrin rearrangement upon activation. *Nat Struct Biol.* 2002;9(4):282-7.
99. Xiong JP, Stehle T, Zhang R, et al. Crystal structure of the extracellular segment of integrin alpha Vbeta3 in complex with an Arg-Gly-Asp ligand. *Science.* 2002;296(5565):151-5.
100. Beer JH, Springer KT, Collier BS. Immobilized Arg-Gly-Asp (RGD) peptides of varying lengths as structural probes of the platelet glycoprotein IIb/IIIa receptor. *Blood.* 1992;79(1):117-28.
101. Collier BS. Activation affects access to the platelet receptor for adhesive glycoproteins. *J Cell Biol.* 1986;103(2):451-6.
102. O'Toole TE, Mandelman D, Forsyth J, et al. Modulation of the affinity of integrin alpha IIb beta 3 (GPIIb-IIIa) by the cytoplasmic domain of alpha IIb. *Science.* 1991;254(5033):845-7.
103. Hughes PE, O'Toole TE, Ylanne J, et al. The conserved membrane-proximal region of an integrin cytoplasmic domain specifies ligand binding affinity. *J Biol Chem.* 1995;270(21):12411-7.
104. Hughes PE, Diaz-Gonzalez F, Leong L, et al. Breaking the integrin hinge. A defined structural constraint regulates integrin signaling. *J Biol Chem.* 1996;271(12):6571-4.
105. Calderwood DA, Yan B, de Pereda JM, et al. The phosphotyrosine binding-like domain of talin activates integrins. *J Biol Chem.* 2002;277(24):21749-58.
106. Calderwood DA, Zent R, Grant R, et al. The Talin head domain binds to integrin beta subunit cytoplasmic tails and regulates integrin activation. *J Biol Chem.* 1999;274(40):28071-4.
107. Vinogradova O, Velyvis A, Velyviene A, et al. A structural mechanism of integrin alpha(IIb)beta(3) "inside-out" activation as regulated by its cytoplasmic face. *Cell.* 2002;110(5):587-97.
108. Du X, Gu M, Weisel JW, et al. Long range propagation of conformational changes in integrin alpha IIb beta 3. *J Biol Chem.* 1993;268(31):23087-92.
109. Weisel JW, Nagaswami C, Vilaire G, et al. Examination of the platelet membrane glycoprotein IIb-IIIa complex and its interaction with fibrinogen and other ligands by electron microscopy. *J Biol Chem.* 1992;267(23):16637-43.
110. Bennett JS. Structure and function of the platelet integrin alphaIIbbeta3. *J Clin Invest.* 2005;115(12):3363-9.
111. Wagner CL, Mascelli MA, Neblock DS, et al. Analysis of GPIIb/IIIa receptor number by quantification of 7E3 binding to human platelets. *Blood.* 1996;88(3):907-14.
112. Niiya K, Hodson E, Bader R, et al. Increased surface expression of the membrane glycoprotein IIb/IIIa complex induced by platelet activation. Relationship to the binding of fibrinogen and platelet aggregation. *Blood.* 1987;70(2):475-83.

113. Bennett JS. Structural biology of glycoprotein IIb-IIIa. *Trends Cardiovasc Med.* 1996;6(1):31-6.
114. George JN, Caen JP, Nurden AT. Glanzmann's thrombasthenia: the spectrum of clinical disease. *Blood.* 1990;75(7):1383-95.
115. Kannan M, Saxena R. Glanzmann's thrombasthenia: an overview. *Clin Appl Thromb Hemost.* 2009;15(2):152-65.
116. Kato A. The biologic and clinical spectrum of Glanzmann's thrombasthenia: implications of integrin alpha IIb beta 3 for its pathogenesis. *Crit Rev Oncol Hematol.* 1997;26(1):1-23.
117. Duperray A, Berthier R, Chagnon E, et al. Biosynthesis and processing of platelet GPIIb-IIIa in human megakaryocytes. *J Cell Biol.* 1987;104(6):1665-73.
118. Kolodziej MA, Vilaire G, Gonder D, et al. Study of the endoproteolytic cleavage of platelet glycoprotein IIb using oligonucleotide-mediated mutagenesis. *J Biol Chem.* 1991;266(34):23499-504.
119. Xiao T, Takagi J, Collier BS, et al. Structural basis for allostery in integrins and binding to fibrinogen-mimetic therapeutics. *Nature.* 2004;432(7013):59-67.
120. Mosesson MW. Fibrinogen and fibrin structure and functions. *J Thromb Haemost.* 2005;3(8):1894-904.
121. Shainoff JR, Dardik BN. Fibrinopeptide B in fibrin assembly and metabolism: physiologic significance in delayed release of the peptide. *Ann N Y Acad Sci.* 1983;408:254-68.
122. Smith JW, Ruggeri ZM, Kunicki TJ, et al. Interaction of integrins alpha v beta 3 and glycoprotein IIb-IIIa with fibrinogen. Differential peptide recognition accounts for distinct binding sites. *J Biol Chem.* 1990;265(21):12267-71.
123. D'Souza SE, Ginsberg MH, Lam SC, et al. Chemical cross-linking of arginyl-glycyl-aspartic acid peptides to an adhesion receptor on platelets. *J Biol Chem.* 1988;263(8):3943-51.
124. Haverstick DM, Cowan JF, Yamada KM, et al. Inhibition of platelet adhesion to fibronectin, fibrinogen, and von Willebrand factor substrates by a synthetic tetrapeptide derived from the cell-binding domain of fibronectin. *Blood.* 1985;66(4):946-52.
125. Hawiger J, Kloczewiak M, Bednarek MA, et al. Platelet receptor recognition domains on the alpha chain of human fibrinogen: structure-function analysis. *Biochemistry.* 1989;28(7):2909-14.
126. Kloczewiak M, Timmons S, Lukas TJ, et al. Platelet receptor recognition site on human fibrinogen. Synthesis and structure-function relationship of peptides corresponding to the carboxy-terminal segment of the gamma chain. *Biochemistry.* 1984;23(8):1767-74.
127. Santoro SA, Lawing WJ, Jr. Competition for related but nonidentical binding sites on the glycoprotein IIb-IIIa complex by peptides derived from platelet adhesive proteins. *Cell.* 1987;48(5):867-73.
128. Andrieux A, Hudry-Clergeon G, Ryckewaert JJ, et al. Amino acid sequences in fibrinogen mediating its interaction with its platelet receptor, GPIIbIIIa. *J Biol Chem.* 1989;264(16):9258-65.
129. Sarratt KL, Chen H, Zutter MM, et al. GPVI and alpha2beta1 play independent critical roles during platelet adhesion and aggregate formation to collagen under flow. *Blood.* 2005;106(4):1268-77.

130. Plenz GA, Deng MC, Robenek H, et al. Vascular collagens: spotlight on the role of type VIII collagen in atherogenesis. *Atherosclerosis*. 2003;166(1):1-11.
131. Tomita A, Tamura N, Nanazawa Y, et al. Development of virtual platelets implementing the functions of three platelet membrane proteins with different adhesive characteristics. *J Atheroscler Thromb*. 2015;22(2):201-10.
132. Surin WR, Barthwal MK, Dikshit M. Platelet collagen receptors, signaling and antagonism: emerging approaches for the prevention of intravascular thrombosis. *Thromb Res*. 2008;122(6):786-803.
133. Heino J. The collagen receptor integrins have distinct ligand recognition and signaling functions. *Matrix Biol*. 2000;19(4):319-23.
134. Santoro SA. Identification of a 160,000 dalton platelet membrane protein that mediates the initial divalent cation-dependent adhesion of platelets to collagen. *Cell*. 1986;46(6):913-20.
135. Nieuwenhuis HK, Akkerman JW, Houdijk WP, et al. Human blood platelets showing no response to collagen fail to express surface glycoprotein Ia. *Nature*. 1985;318(6045):470-2.
136. Carlsson LE, Santoso S, Spitzer C, et al. The alpha2 gene coding sequence T807/A873 of the platelet collagen receptor integrin alpha2beta1 might be a genetic risk factor for the development of stroke in younger patients. *Blood*. 1999;93(11):3583-6.
137. Moshfegh K, Wuillemin WA, Redondo M, et al. Association of two silent polymorphisms of platelet glycoprotein Ia/IIa receptor with risk of myocardial infarction: a case-control study. *Lancet*. 1999;353(9150):351-4.
138. Gear AR, Simon CG, Polanowska-Grabowska R. Platelet adhesion to collagen activates a phosphoprotein complex of heat-shock proteins and protein phosphatase 1. *J Neural Transm (Vienna)*. 1997;104(10):1037-47.
139. Kato K, Kanaji T, Russell S, et al. The contribution of glycoprotein VI to stable platelet adhesion and thrombus formation illustrated by targeted gene deletion. *Blood*. 2003;102(5):1701-7.
140. Nieswandt B, Schulte V, Bergmeier W, et al. Long-term antithrombotic protection by in vivo depletion of platelet glycoprotein VI in mice. *J Exp Med*. 2001;193(4):459-69.
141. Kahn ML, Zheng YW, Huang W, et al. A dual thrombin receptor system for platelet activation. *Nature*. 1998;394(6694):690-4.
142. Ishihara H, Connolly AJ, Zeng D, et al. Protease-activated receptor 3 is a second thrombin receptor in humans. *Nature*. 1997;386(6624):502-6.
143. Xu WF, Andersen H, Whitmore TE, et al. Cloning and characterization of human protease-activated receptor 4. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998;95(12):6642-6.
144. Nystedt S, Emilsson K, Larsson AK, et al. Molecular cloning and functional expression of the gene encoding the human proteinase-activated receptor 2. *Eur J Biochem*. 1995;232(1):84-9.
145. Nystedt S, Emilsson K, Wahlestedt C, et al. Molecular cloning of a potential proteinase activated receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994;91(20):9208-12.
146. Nystedt S, Larsson AK, Aberg H, et al. The mouse proteinase-activated receptor-2 cDNA and gene. Molecular cloning and functional expression. *J Biol Chem*. 1995;270(11):5950-55.
147. Brass LF. Thrombin and platelet activation. *Chest*. 2003;124(3 Suppl):18S-25S.

148. Burkhart JM, Vaudel M, Gambaryan S, et al. The first comprehensive and quantitative analysis of human platelet protein composition allows the comparative analysis of structural and functional pathways. *Blood*. 2012;120(15):e73-82.
149. Kahn ML, Nakanishi-Matsui M, Shapiro MJ, et al. Protease-activated receptors 1 and 4 mediate activation of human platelets by thrombin. *J Clin Invest*. 1999;103(6):879-87.
150. Vu TK, Hung DT, Wheaton VI, et al. Molecular cloning of a functional thrombin receptor reveals a novel proteolytic mechanism of receptor activation. *Cell*. 1991;64(6):1057-68.
151. Vu TK, Wheaton VI, Hung DT, et al. Domains specifying thrombin-receptor interaction. *Nature*. 1991;353(6345):674-7.
152. O'Brien PJ, Molino M, Kahn M, et al. Protease activated receptors: theme and variations. *Oncogene*. 2001;20(13):1570-81.
153. Covic L, Gresser AL, Kuliopulos A. Biphasic kinetics of activation and signaling for PAR1 and PAR4 thrombin receptors in platelets. *Biochemistry*. 2000;39(18):5458-67.
154. Shapiro MJ, Weiss EJ, Faruqi TR, et al. Protease-activated receptors 1 and 4 are shut off with distinct kinetics after activation by thrombin. *J Biol Chem*. 2000;275(33):25216-21.
155. De Cristofaro R, De Candia E, Rutella S, et al. The Asp(272)-Glu(282) region of platelet glycoprotein Ibalph interacts with the heparin-binding site of alpha-thrombin and protects the enzyme from the heparin-catalyzed inhibition by antithrombin III. *J Biol Chem*. 2000;275(6):3887-95.
156. De Marco L, Mazzucato M, Masotti A, et al. Function of glycoprotein Ib alpha in platelet activation induced by alpha-thrombin. *J Biol Chem*. 1991;266(35):23776-83.
157. Mazzucato M, Marco LD, Masotti A, et al. Characterization of the initial alpha-thrombin interaction with glycoprotein Ib alpha in relation to platelet activation. *J Biol Chem*. 1998;273(4):1880-7.
158. Offermanns S, Toombs CF, Hu YH, et al. Defective platelet activation in G alpha(q)-deficient mice. *Nature*. 1997;389(6647):183-6.
159. Kim S, Foster C, Lecchi A, et al. Protease-activated receptors 1 and 4 do not stimulate G(i) signaling pathways in the absence of secreted ADP and cause human platelet aggregation independently of G(i) signaling. *Blood*. 2002;99(10):3629-36.
160. Paul BZ, Jin J, Kunapuli SP. Molecular mechanism of thromboxane A(2)-induced platelet aggregation. Essential role for p2t(ac) and alpha(2a) receptors. *J Biol Chem*. 1999;274(41):29108-14.
161. Coughlin SR. Protease-activated receptors in hemostasis, thrombosis and vascular biology. *J Thromb Haemost*. 2005;3(8):1800-14.
162. Klages B, Brandt U, Simon MI, et al. Activation of G12/G13 results in shape change and Rho/Rho-kinase-mediated myosin light chain phosphorylation in mouse platelets. *J Cell Biol*. 1999;144(4):745-54.
163. Gong H, Shen B, Flevaris P, et al. G protein subunit Galpha13 binds to integrin alphallbbeta3 and mediates integrin "outside-in" signaling. *Science*. 2010;327(5963):340-3.
164. Gaarder A, Jonsen J, Laland S, et al. Adenosine diphosphate in red cells as a factor in the adhesiveness of human blood platelets. *Nature*. 1961;192:531-2.



165. Jin J, Kunapuli SP. Coactivation of two different G protein-coupled receptors is essential for ADP-induced platelet aggregation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998;95(14):8070-4.
166. Mustard JF, Perry DW, Kinlough-Rathbone RL, et al. Factors responsible for ADP-induced release reaction of human platelets. *Am J Physiol*. 1975;228(6):1757-65.
167. Gachet C. ADP receptors of platelets and their inhibition. *Thromb Haemost*. 2001;86(1):222-32.
168. Baurand A, Raboisson P, Freund M, et al. Inhibition of platelet function by administration of MRS2179, a P2Y1 receptor antagonist. *Eur J Pharmacol*. 2001;412(3):213-21.
169. Hechler B, Gachet C. P2 receptors and platelet function. *Purinergic Signal*. 2011;7(3):293-303.
170. Mangin P, Ohlmann P, Eckly A, et al. The P2Y1 receptor plays an essential role in the platelet shape change induced by collagen when TxA2 formation is prevented. *J Thromb Haemost*. 2004;2(6):969-77.
171. Hechler B, Eckly A, Ohlmann P, et al. The P2Y1 receptor, necessary but not sufficient to support full ADP-induced platelet aggregation, is not the target of the drug clopidogrel. *Br J Haematol*. 1998;103(3):858-66.
172. Nieswandt B, Bergmeier W, Eckly A, et al. Evidence for cross-talk between glycoprotein VI and Gi-coupled receptors during collagen-induced platelet aggregation. *Blood*. 2001;97(12):3829-35.
173. Andre P, Delaney SM, LaRocca T, et al. P2Y12 regulates platelet adhesion/activation, thrombus growth, and thrombus stability in injured arteries. *J Clin Invest*. 2003;112(3):398-406.
174. Cattaneo M, Canciani MT, Lecchi A, et al. Released adenosine diphosphate stabilizes thrombin-induced human platelet aggregates. *Blood*. 1990;75(5):1081-6.
175. Remijn JA, Wu YP, Jenning EH, et al. Role of ADP receptor P2Y(12) in platelet adhesion and thrombus formation in flowing blood. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2002;22(4):686-91.
176. Cattaneo M. The platelet P2Y(1)(2) receptor for adenosine diphosphate: congenital and drug-induced defects. *Blood*. 2011;117(7):2102-12.
177. Ohlmann P, Laugwitz KL, Nurnberg B, et al. The human platelet ADP receptor activates Gi2 proteins. *Biochem J*. 1995;312 ( Pt 3):775-9.
178. Foster CJ, Prosser DM, Agans JM, et al. Molecular identification and characterization of the platelet ADP receptor targeted by thienopyridine antithrombotic drugs. *J Clin Invest*. 2001;107(12):1591-8.
179. Jantzen HM, Milstone DS, Gousset L, et al. Impaired activation of murine platelets lacking G alpha(i2). *J Clin Invest*. 2001;108(3):477-83.
180. Mahaut-Smith MP, Tolhurst G, Evans RJ. Emerging roles for P2X1 receptors in platelet activation. *Platelets*. 2004;15(3):131-44.
181. Rolf MG, Brearley CA, Mahaut-Smith MP. Platelet shape change evoked by selective activation of P2X1 purinoceptors with alpha,beta-methylene ATP. *Thromb Haemost*. 2001;85(2):303-8.
182. Hirata T, Ushikubi F, Kakizuka A, et al. Two thromboxane A2 receptor isoforms in human platelets. Opposite coupling to adenylyl cyclase with different sensitivity to Arg60 to Leu mutation. *J Clin Invest*. 1996;97(4):949-56.

183. Knezevic I, Borg C, Le Breton GC. Identification of Gq as one of the G-proteins which copurify with human platelet thromboxane A<sub>2</sub>/prostaglandin H<sub>2</sub> receptors. *J Biol Chem.* 1993;268(34):26011-7.
184. Shenker A, Goldsmith P, Unson CG, et al. The G protein coupled to the thromboxane A<sub>2</sub> receptor in human platelets is a member of the novel Gq family. *J Biol Chem.* 1991;266(14):9309-13.
185. Jhon DY, Lee HH, Park D, et al. Cloning, sequencing, purification, and Gq-dependent activation of phospholipase C-beta 3. *J Biol Chem.* 1993;268(9):6654-61.
186. Berridge MJ. Inositol trisphosphate and diacylglycerol as second messengers. *Biochem J.* 1984;220(2):345-60.
187. Brass LF, Shaller CC, Belmonte EJ. Inositol 1,4,5-triphosphate-induced granule secretion in platelets. Evidence that the activation of phospholipase C mediated by platelet thromboxane receptors involves a guanine nucleotide binding protein-dependent mechanism distinct from that of thrombin. *J Clin Invest.* 1987;79(4):1269-75.
188. Huang JS, Ramamurthy SK, Lin X, et al. Cell signalling through thromboxane A<sub>2</sub> receptors. *Cell Signal.* 2004;16(5):521-33.
189. Nieswandt B, Schulte V, Zywiets A, et al. Costimulation of Gi- and G12/G13-mediated signaling pathways induces integrin alpha IIb beta 3 activation in platelets. *J Biol Chem.* 2002;277(42):39493-8.
190. Dorsam RT, Kim S, Jin J, et al. Coordinated signaling through both G12/13 and G(i) pathways is sufficient to activate GPIIb/IIIa in human platelets. *J Biol Chem.* 2002;277(49):47588-95.
191. Woltmann G, McNulty CA, Dewson G, et al. Interleukin-13 induces PSGL-1/P-selectin-dependent adhesion of eosinophils, but not neutrophils, to human umbilical vein endothelial cells under flow. *Blood.* 2000;95(10):3146-52.
192. McEver RP, Beckstead JH, Moore KL, et al. GMP-140, a platelet alpha-granule membrane protein, is also synthesized by vascular endothelial cells and is localized in Weibel-Palade bodies. *J Clin Invest.* 1989;84(1):92-9.
193. Lorenzon P, Vecile E, Nardon E, et al. Endothelial cell E- and P-selectin and vascular cell adhesion molecule-1 function as signaling receptors. *J Cell Biol.* 1998;142(5):1381-91.
194. Theoret JF, Yacoub D, Hachem A, et al. P-selectin ligation induces platelet activation and enhances microaggregate and thrombus formation. *Thromb Res.* 2011;128(3):243-50.
195. Toombs CF, DeGraaf GL, Martin JP, et al. Pretreatment with a blocking monoclonal antibody to P-selectin accelerates pharmacological thrombolysis in a primate model of arterial thrombosis. *J Pharmacol Exp Ther.* 1995;275(2):941-9.
196. Imamura T, Kaneda H, Nakamura S. New functions of neutrophils in the arthus reaction: expression of tissue factor, the clotting initiator, and fibrinolysis by elastase. *Lab Invest.* 2002;82(10):1287-95.
197. Semeraro N, Biondi A, Lorenzet R, et al. Direct induction of tissue factor synthesis by endotoxin in human macrophages from diverse anatomical sites. *Immunology.* 1983;50(4):529-35.
198. Furie B, Furie BC. Role of platelet P-selectin and microparticle PSGL-1 in thrombus formation. *Trends Mol Med.* 2004;10(4):171-8.

199. Giesen PL, Rauch U, Bohrmann B, et al. Blood-borne tissue factor: another view of thrombosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999;96(5):2311-5.
200. Falati S, Liu Q, Gross P, et al. Accumulation of tissue factor into developing thrombi in vivo is dependent upon microparticle P-selectin glycoprotein ligand 1 and platelet P-selectin. *J Exp Med*. 2003;197(11):1585-98.
201. Peerschke EI. Effect of epinephrine on fibrinogen receptor exposure by aspirin-treated platelets and platelets from concentrates in response to ADP and thrombin. *Am J Hematol*. 1984;16(4):335-45.
202. Shattil SJ, Budzynski A, Scrutton MC. Epinephrine induces platelet fibrinogen receptor expression, fibrinogen binding, and aggregation in whole blood in the absence of other excitatory agonists. *Blood*. 1989;73(1):150-8.
203. Kasirer-Friede A, Kahn ML, Shattil SJ. Platelet integrins and immunoreceptors. *Immunol Rev*. 2007;218:247-64.
204. Podolnikova NP, Yakubenko VP, Volkov GL, et al. Identification of a novel binding site for platelet integrins alpha IIb beta 3 (GPIIb/IIIa) and alpha 5 beta 1 in the gamma C-domain of fibrinogen. *J Biol Chem*. 2003;278(34):32251-8.
205. Schaff M, Tang C, Maurer E, et al. Integrin alpha6beta1 is the main receptor for vascular laminins and plays a role in platelet adhesion, activation, and arterial thrombosis. *Circulation*. 2013;128(5):541-52.
206. Diaz C, Neubauer S, Rechenmacher F, et al. Recruitment of alphanubeta3 integrin to alpha5beta1 integrin-induced clusters enables focal adhesion maturation and cell spreading. *J Cell Sci*. 2020;133(1).
207. Kalagara T, Moutsis T, Yang Y, et al. The endothelial glycocalyx anchors von Willebrand factor fibers to the vascular endothelium. *Blood Adv*. 2018;2(18):2347-57.
208. Saelman EU, Kehrel B, Hese KM, et al. Platelet adhesion to collagen and endothelial cell matrix under flow conditions is not dependent on platelet glycoprotein IV. *Blood*. 1994;83(11):3240-4.
209. Tandon NN, Kralisz U, Jamieson GA. Identification of glycoprotein IV (CD36) as a primary receptor for platelet-collagen adhesion. *J Biol Chem*. 1989;264(13):7576-83.
210. Urban JD, Clarke WP, von Zastrow M, et al. Functional selectivity and classical concepts of quantitative pharmacology. *J Pharmacol Exp Ther*. 2007;320(1):1-13.
211. Bampalis VG, Dwivedi S, Shai E, et al. Effect of 5-HT<sub>2A</sub> receptor antagonists on human platelet activation in blood exposed to physiologic stimuli and atherosclerotic plaque. *J Thromb Haemost*. 2011;9(10):2112-5.
212. Przyklenk K, Frelinger AL, 3rd, Linden MD, et al. Targeted inhibition of the serotonin 5HT<sub>2A</sub> receptor improves coronary patency in an in vivo model of recurrent thrombosis. *J Thromb Haemost*. 2010;8(2):331-40.
213. Cooley MH, Cohen P. Potassium transport in human blood platelets. *J Lab Clin Med*. 1967;70(1):69-79.
214. Enouf J, Bredoux R, Bourdeau N, et al. Two different Ca<sup>2+</sup> transport systems are associated with plasma and intracellular human platelet membranes. *J Biol Chem*. 1987;262(19):9293-7.
215. Karpatkin S, Charmatz A, Langer RM. Glycogenesis and glyconeogenesis in human platelets. Incorporation of glucose, pyruvate, and citrate into platelet

- glycogen; glycogen synthetase and fructose-1,6-diphosphatase activity. *J Clin Invest.* 1970;49(1):140-9.
216. Aibibula M, Naseem KM, Sturmeijer RG. Glucose metabolism and metabolic flexibility in blood platelets. *J Thromb Haemost.* 2018;16(11):2300-14.
  217. Cohen P, Derksen A, Van den Bosch H. Pathways of fatty acid metabolism in human platelets. *J Clin Invest.* 1970;49(1):128-39.
  218. Doery JC, Hirsh J, Cooper I. Energy metabolism in human platelets: interrelationship between glycolysis and oxidative metabolism. *Blood.* 1970;36(2):159-68.
  219. Holmsen H. Nucleotide metabolism of platelets. *Annu Rev Physiol.* 1985;47:677-90.
  220. Lhermusier T, Chap H, Payrastre B. Platelet membrane phospholipid asymmetry: from the characterization of a scramblase activity to the identification of an essential protein mutated in Scott syndrome. *J Thromb Haemost.* 2011;9(10):1883-91.
  221. Tang X, Halleck MS, Schlegel RA, et al. A subfamily of P-type ATPases with aminophospholipid transporting activity. *Science.* 1996;272(5267):1495-7.
  222. Williamson P. Phospholipid Scramblases. *Lipid Insights.* 2015;8(Suppl 1):41-4.
  223. Smyth EM. Thromboxane and the thromboxane receptor in cardiovascular disease. *Clin Lipidol.* 2010;5(2):209-19.
  224. Kurz KD, Main BW, Sandusky GE. Rat model of arterial thrombosis induced by ferric chloride. *Thromb Res.* 1990;60(4):269-80.
  225. Tseng MT, Dozier A, Haribabu B, et al. Transendothelial migration of ferric ion in FeCl<sub>3</sub> injured murine common carotid artery. *Thromb Res.* 2006;118(2):275-80.
  226. Eckly A, Hechler B, Freund M, et al. Mechanisms underlying FeCl<sub>3</sub>-induced arterial thrombosis. *J Thromb Haemost.* 2011;9(4):779-89.
  227. Day SM, Reeve JL, Myers DD, et al. Murine thrombosis models. *Thromb Haemost.* 2004;92(3):486-94.
  228. Ni H, Denis CV, Subbarao S, et al. Persistence of platelet thrombus formation in arterioles of mice lacking both von Willebrand factor and fibrinogen. *J Clin Invest.* 2000;106(3):385-92.
  229. Min SK, Han SM, Kim HT, et al. Algal fucoidan, unlike heparin, has thrombolytic activity in a murine arterial thrombosis model. *Blood Coagul Fibrinolysis.* 2012;23(5):359-66.
  230. Cooley BC, Chen CY, Schmeling G. Increased venous versus arterial thrombosis in the Factor V Leiden mouse. *Thromb Res.* 2007;119(6):747-51.
  231. Dieude M, Gillis MA, Theoret JF, et al. Autoantibodies to heat shock protein 60 promote thrombus formation in a murine model of arterial thrombosis. *J Thromb Haemost.* 2009;7(4):710-9.
  232. Kuijpers MJ, Munnix IC, Cosemans JM, et al. Key role of platelet procoagulant activity in tissue factor- and collagen-dependent thrombus formation in arterioles and venules in vivo differential sensitivity to thrombin inhibition. *Microcirculation.* 2008;15(4):269-82.
  233. Li D, August S, Woulfe DS. GSK3beta is a negative regulator of platelet function and thrombosis. *Blood.* 2008;111(7):3522-30.

234. Liu J, Fitzgerald ME, Berndt MC, et al. Bruton tyrosine kinase is essential for botrocetin/VWF-induced signaling and GPIb-dependent thrombus formation in vivo. *Blood*. 2006;108(8):2596-603.
235. Nagai N, Lijnen HR, Cleuren AC, et al. Factor V Leiden mutation is associated with enhanced arterial thrombotic tendency in lean but not in obese mice. *Thromb Haemost*. 2007;98(4):858-63.
236. Orlowski 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(12):2074-84.
237. Rosen ED, Gailani D, Castellino FJ. FXI is essential for thrombus formation following FeCl<sub>3</sub>-induced injury of the carotid artery in the mouse. *Thromb Haemost*. 2002;87(4):774-6.
238. Yokoyama S, Ikeda H, Haramaki N, et al. Platelet P-selectin plays an important role in arterial thrombogenesis by forming large stable platelet-leukocyte aggregates. *J Am Coll Cardiol*. 2005;45(8):1280-6.
239. Chi L, Peng YW, Gibson G, et al. In vitro and in vivo antithrombotic activity of PD-198961, a novel synthetic factor Xa inhibitor. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2004;44(4):493-500.
240. Damiano BP, Mitchell JA, Giardino E, et al. Antiplatelet and antithrombotic activity of RWJ-53308, a novel orally active glycoprotein IIb/IIIa antagonist. *Thromb Res*. 2001;104(2):113-26.
241. Elg M, Gustafsson D, Carlsson S. Antithrombotic effects and bleeding time of thrombin inhibitors and warfarin in the rat. *Thromb Res*. 1999;94(3):187-97.
242. Falati S, Patil S, Gross PL, et al. Platelet PECAM-1 inhibits thrombus formation in vivo. *Blood*. 2006;107(2):535-41.
243. Fay WP, Parker AC, Ansari MN, et al. Vitronectin inhibits the thrombotic response to arterial injury in mice. *Blood*. 1999;93(6):1825-30.
244. Hanson J, Rolin S, Reynaud D, et al. In vitro and in vivo pharmacological characterization of BM-613 [N-n-pentyl-N'-[2-(4'-methylphenylamino)-5-nitrobenzenesulfonyl]urea], a novel dual thromboxane synthase inhibitor and thromboxane receptor antagonist. *J Pharmacol Exp Ther*. 2005;313(1):293-301.
245. Hu L, Fan Z, Du H, et al. BF061, a novel antiplatelet and antithrombotic agent targeting P2Y<sub>1</sub>(2) receptor and phosphodiesterase. *Thromb Haemost*. 2011;106(6):1203-14.
246. Iwatsuki Y, Kawasaki T, Hayashi K, et al. Combined effects of a factor Xa inhibitor YM466 and a GPIIb/IIIa antagonist YM128 on thrombosis and neointima formation in mice. *Thromb Haemost*. 2004;92(6):1221-8.
247. Kato Y, Kita Y, Hirasawa-Taniyama Y, et al. Inhibition of arterial thrombosis by a protease-activated receptor 1 antagonist, FR171113, in the guinea pig. *Eur J Pharmacol*. 2003;473(2-3):163-9.
248. Kim CW, Yun JW, Bae IH, et al. Evaluation of anti-platelet and anti-thrombotic effects of cilostazol with PFA-100(R) and Multiplate(R) whole blood aggregometer in vitro, ex vivo and FeCl<sub>3</sub>-induced thrombosis models in vivo. *Thromb Res*. 2011;127(6):565-70.
249. Komatsu Y, Inoue Y, Goto Y, et al. Pharmacological effects of a novel recombinant hirudin, CX-397, in vivo and in vitro: comparison with recombinant hirudin variant-1, heparin, and argatroban. *Thromb Haemost*. 1999;81(2):250-5.

250. Konstantinides S, Ware J, Marchese P, et al. Distinct antithrombotic consequences of platelet glycoprotein Ibalpha and VI deficiency in a mouse model of arterial thrombosis. *J Thromb Haemost.* 2006;4(9):2014-21.
251. Lenain N, Freund M, Leon C, et al. Inhibition of localized thrombosis in P2Y1-deficient mice and rodents treated with MRS2179, a P2Y1 receptor antagonist. *J Thromb Haemost.* 2003;1(6):1144-9.
252. Li D, Weng S, Yang B, et al. Inhibition of arterial thrombus formation by ApoA1 Milano. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1999;19(2):378-83.
253. Li S, Li X, Li J, et al. Experimental arterial thrombosis regulated by androgen and its receptor via modulation of platelet activation. *Thromb Res.* 2007;121(1):127-34.
254. Min SK, Kwon OC, Lee S, et al. An antithrombotic fucoidan, unlike heparin, does not prolong bleeding time in a murine arterial thrombosis model: a comparative study of *Undaria pinnatifida* sporophylls and *Fucus vesiculosus*. *Phytother Res.* 2012;26(5):752-7.
255. Mussoni L, Sironi L, Tedeschi L, et al. Magnesium inhibits arterial thrombi after vascular injury in rat: in vivo impairment of coagulation. *Thromb Haemost.* 2001;86(5):1292-5.
256. Oostingh GJ, Pozgajova M, Ludwig RJ, et al. Diminished thrombus formation and alleviation of myocardial infarction and reperfusion injury through antibody- or small-molecule-mediated inhibition of selectin-dependent platelet functions. *Haematologica.* 2007;92(4):502-12.
257. Strassel C, Nonne C, Eckly A, et al. Decreased thrombotic tendency in mouse models of the Bernard-Soulier syndrome. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2007;27(1):241-7.
258. Vogel GM, van Amsterdam RG, van Dinther TG, et al. Pre-clinical pharmacological profile of the novel glycoconjugate Org 36764 with both factor Xa and thrombin (IIa) inhibitory activities. *Thromb Haemost.* 2000;84(4):611-20.
259. Bird JE, Smith PL, Wang X, et al. Effects of plasma kallikrein deficiency on haemostasis and thrombosis in mice: murine ortholog of the Fletcher trait. *Thromb Haemost.* 2012;107(6):1141-50.
260. Wang X, Xu L. An optimized murine model of ferric chloride-induced arterial thrombosis for thrombosis research. *Thromb Res.* 2005;115(1-2):95-100.
261. Weiss EJ, Hamilton JR, Lease KE, et al. Protection against thrombosis in mice lacking PAR3. *Blood.* 2002;100(9):3240-4.
262. Dogne JM, Rolin S, Petein M, et al. Characterization of an original model of myocardial infarction provoked by coronary artery thrombosis induced by ferric chloride in pig. *Thromb Res.* 2005;116(5):431-42.
263. Matsuno H, Uematsu T, Nagashima S, et al. Photochemically induced thrombosis model in rat femoral artery and evaluation of effects of heparin and tissue-type plasminogen activator with use of this model. *J Pharmacol Methods.* 1991;25(4):303-17.
264. Saniabadi AR, Umemura K, Matsumoto N, et al. Vessel wall injury and arterial thrombosis induced by a photochemical reaction. *Thromb Haemost.* 1995;73(5):868-72.

265. Eitzman DT, Westrick RJ, Xu Z, et al. Hyperlipidemia promotes thrombosis after injury to atherosclerotic vessels in apolipoprotein E-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2000;20(7):1831-4.
266. Lee YC, Park CK, Kim MS, et al. In vitro study for staining and toxicity of rose bengal on cultured bovine corneal endothelial cells. *Cornea.* 1996;15(4):376-85.
267. Chakrabarti S, Beaulieu LM, Reyelt LA, et al. M118, a novel low-molecular weight heparin with decreased polydispersity leads to enhanced anticoagulant activity and thrombotic occlusion in ApoE knockout mice. *J Thromb Thrombolysis.* 2009;28(4):394-400.
268. Hayashi M, Matsuo A, Nakamoto H, et al. Antithrombotic effects of a synthetic inhibitor of activated factor X, JTV-803, in animals. *Eur J Pharmacol.* 2001;412(1):61-6.
269. He L, Vicente CP, Westrick RJ, et al. Heparin cofactor II inhibits arterial thrombosis after endothelial injury. *J Clin Invest.* 2002;109(2):213-9.
270. Hirata Y, Umemura K, Uematsu T, et al. An experimental myocardial infarction model in the rat and its properties. *Jpn J Pharmacol.* 1995;67(1):51-7.
271. Kihara H, Koganei H, Hirose K, et al. Antithrombotic activity of AT-1015, a potent 5-HT<sub>2A</sub> receptor antagonist, in rat arterial thrombosis model and its effect on bleeding time. *Eur J Pharmacol.* 2001;433(2-3):157-62.
272. Matsuno H, Uematsu T, Umemura K, et al. Effects of vapiprost, a novel thromboxane receptor antagonist, on thrombus formation and vascular patency after thrombolysis by tissue-type plasminogen activator. *Br J Pharmacol.* 1992;106(3):533-8.
273. Maurice P, Pires V, Amant C, et al. Antithrombotic effect of the type III collagen-related octapeptide (KOGEOGPK) in the mouse. *Vascul Pharmacol.* 2006;44(1):42-9.
274. Melis E, Bonnefoy A, Daenens K, et al.  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 antagonism vs. antiadhesive treatment to prevent platelet interactions with vascular subendothelium. *J Thromb Haemost.* 2004;2(6):993-1002.
275. Mizurini DM, Francischetti IM, Andersen JF, et al. Nitrophorin 2, a factor IX(a)-directed anticoagulant, inhibits arterial thrombosis without impairing haemostasis. *Thromb Haemost.* 2010;104(6):1116-23.
276. Shimazawa M, Takiguchi Y, Umemura K, et al. Antithrombotic effects in a rat model of aspirin-insensitive arterial thrombosis of desethyl KBT-3022, the main active metabolite of a new antiplatelet agent, KBT-3022. *Eur J Pharmacol.* 1997;328(2-3):183-9.
277. Takiguchi Y, Asai F, Wada K, et al. Antithrombotic effect of a novel recombinant hirudin analogue, CX-397, in a rat arterial thrombosis model. *Br J Pharmacol.* 1995;116(7):3056-60.
278. Takiguchi Y, Shimazawa M, Nakashima M. A comparative study of the antithrombotic effect of aurointricarboxylic acid on arterial thrombosis in rats and guinea pigs. *Br J Pharmacol.* 1996;118(7):1633-8.
279. Wagner NM, Dressel T, Schafer K, et al. Effect of the factor Xa inhibitor rivaroxaban on arterial thrombosis in wild-type and apolipoprotein E-deficient mice. *Thromb Res.* 2012;130(5):793-8.
280. Cheng Q, Tucker EI, Pine MS, et al. A role for factor XIIa-mediated factor XI activation in thrombus formation in vivo. *Blood.* 2010;116(19):3981-9.

281. Jankowski M, Vreys I, Wittevrongel C, et al. Thrombogenicity of beta 2-glycoprotein I-dependent antiphospholipid antibodies in a photochemically induced thrombosis model in the hamster. *Blood*. 2003;101(1):157-62.
282. Kawasaki T, Kaida T, Arnout J, et al. A new animal model of thrombophilia confirms that high plasma factor VIII levels are thrombogenic. *Thromb Haemost*. 1999;81(2):306-11.
283. Merkulov S, Zhang WM, Komar AA, et al. Deletion of murine kininogen gene 1 (mKng1) causes loss of plasma kininogen and delays thrombosis. *Blood*. 2008;111(3):1274-81.
284. Danenberg HD, Szalai AJ, Swaminathan RV, et al. Increased thrombosis after arterial injury in human C-reactive protein-transgenic mice. *Circulation*. 2003;108(5):512-5.
285. Kawasaki T, Dewerchin M, Lijnen HR, et al. Vascular release of plasminogen activator inhibitor-1 impairs fibrinolysis during acute arterial thrombosis in mice. *Blood*. 2000;96(1):153-60.
286. Kondo K, Umemura K, Miyaji M, et al. Milrinone, a phosphodiesterase inhibitor, suppresses intimal thickening after photochemically induced endothelial injury in the mouse femoral artery. *Atherosclerosis*. 1999;142(1):133-8.
287. Momi S, Pitchford SC, Alberti PF, et al. Nitroaspirin plus clopidogrel versus aspirin plus clopidogrel against platelet thromboembolism and intimal thickening in mice. *Thromb Haemost*. 2005;93(3):535-43.
288. Umemura K, Watanabe S, Kondo K, et al. Inhibitory effect of prostaglandin E1 on intimal thickening following photochemically induced endothelial injury in the rat femoral artery. *Atherosclerosis*. 1997;130(1-2):11-6.
289. Nagai N, Hoylaerts MF, Gallacher DJ, et al. Prothrombotic effect of Rofecoxib in a murine venous thrombosis model. *Thromb Res*. 2008;122(5):668-73.
290. Higo K, Karasawa A. Inhibitory effect of KW-3635, a new thromboxane A2-receptor antagonist, on arterial thrombosis in guinea pigs. *Jpn J Pharmacol*. 1993;63(4):521-3.
291. Kogushi M, Matsuoka T, Kawata T, et al. The novel and orally active thrombin receptor antagonist E5555 (Atopaxar) inhibits arterial thrombosis without affecting bleeding time in guinea pigs. *Eur J Pharmacol*. 2011;657(1-3):131-7.
292. Kawamura M, Tsuji N, Moriya N, et al. Effects of TAK-029, a novel GPIIb/IIIa antagonist, on arterial thrombosis in guinea pigs, dogs and monkeys. *Thromb Res*. 1997;86(4):275-85.
293. Takiguchi Y, Asai F, Wada K, et al. Comparison of antithrombotic effects of GPIIb-IIIa receptor antagonist and TXA2 receptor antagonist in the guinea-pig thrombosis model: possible role of TXA2 in reocclusion after thrombolysis. *Thromb Haemost*. 1995;73(4):683-8.
294. Takiguchi Y, Hirata Y, Wada K, et al. Arterial thrombosis model with photochemical reaction in guinea-pig and its property. *Thromb Res*. 1992;67(4):435-45.
295. Hirata Y, Umemura K, Kondoh K, et al. Experimental intimal thickening studies using the photochemically induced thrombosis model in the guinea-pig femoral artery. *Atherosclerosis*. 1994;107(1):117-24.
296. Hirata Y, Umemura K, Takiguchi Y, et al. A thrombosis model for evaluating thrombolytic agents in the guinea-pig: comparison of t-PA, scu-PA and a novel



- thrombolytic agent, staphylokinase, on thrombolytic activity. *Blood Coagul Fibrinolysis*. 1993;4(4):569-75.
297. Umemura K, Ishiye M, Araki S, et al. A canine coronary artery thrombosis model: application of photochemically induced thrombosis. *Arch Int Pharmacodyn Ther*. 1995;330(1):13-24.
298. Kordenat RK, Kezdi P, Stanley EL. A new catheter technique for producing experimental coronary thrombosis and selective coronary visualization. *Am Heart J*. 1972;83(3):360-4.
299. Saito M, Suzuki S, Yui Y, et al. A novel modified tissue-type plasminogen activator (t-PA), E6010, gradually increases coronary blood flow after thrombolysis compared with native t-PA, urokinase and balloon catheter occlusion-reperfusion. *Jpn J Pharmacol*. 1994;66(1):17-23.
300. Bush LR MM, Kanovsky SM, Holahan MA, Patrick DH. A Model of Femoral Artery Thrombolysis in Dogs. *Fibrinolysis*. 1989;6(3):257-63.
301. Dommke C, Turschner O, Stassen JM, et al. Thrombolytic efficacy of recombinant human microplasmin in a canine model of copper coil-induced coronary artery thrombosis. *J Thromb Thrombolysis*. 2010;30(1):46-54.
302. Golino P, Ashton JH, McNatt J, et al. Simultaneous administration of thromboxane A<sub>2</sub>- and serotonin 5<sub>2</sub>-receptor antagonists markedly enhances thrombolysis and prevents or delays reocclusion after tissue-type plasminogen activator in a canine model of coronary thrombosis. *Circulation*. 1989;79(4):911-9.
303. Golino P, Rosolowsky M, Yao SK, et al. Endogenous prostaglandin endoperoxides and prostacyclin modulate the thrombolytic activity of tissue plasminogen activator. Effects of simultaneous inhibition of thromboxane A<sub>2</sub> synthase and blockade of thromboxane A<sub>2</sub>/prostaglandin H<sub>2</sub> receptors in a canine model of coronary thrombosis. *J Clin Invest*. 1990;86(4):1095-102.
304. Jun L, Arnout J, Vanhove P, et al. Comparison of a low-molecular-weight heparin (nadroparin calcium) and unfractionated heparin as adjunct to coronary thrombolysis with alteplase and aspirin in dogs. *Coron Artery Dis*. 1995;6(3):257-63.
305. Mellott MJ, Holahan MA, Lynch JJ, et al. Acceleration of recombinant tissue-type plasminogen activator-induced reperfusion and prevention of reocclusion by recombinant antistasin, a selective factor Xa inhibitor, in a canine model of femoral arterial thrombosis. *Circ Res*. 1992;70(6):1152-60.
306. Mellott MJ, Stabilito, II, Holahan MA, et al. Vampire bat salivary plasminogen activator promotes rapid and sustained reperfusion without concomitant systemic plasminogen activation in a canine model of arterial thrombosis. *Arterioscler Thromb*. 1992;12(2):212-21.
307. Suzuki N, Suzuki S, Nagaoka N, et al. Thrombolysis of canine femoral artery thrombus by a novel modified tissue-type plasminogen activator (E6010). *Jpn J Pharmacol*. 1994;65(3):257-63.
308. Van de Werf F, Jang IK, Collen D. Thrombolysis with recombinant human single-chain urokinase-type plasminogen activator (rscu-PA): dose-response in dogs with coronary artery thrombosis. *J Cardiovasc Pharmacol*. 1987;9(1):91-3.
309. Witt W, Maass B, Baldus B, et al. Coronary thrombolysis with Desmodus salivary plasminogen activator in dogs. Fast and persistent recanalization by intravenous bolus administration. *Circulation*. 1994;90(1):421-6.

310. Ramjit DR, Lynch JJ, Jr., Sitko GR, et al. Antithrombotic effects of MK-0852, a platelet fibrinogen receptor antagonist, in canine models of thrombosis. *J Pharmacol Exp Ther.* 1993;266(3):1501-11.
311. Rubsamen K, Hornberger W, Kirchengast M. Inhibition of arterial thrombus formation in two canine models: comparison of ancrod, a fibrinogen-depleting agent, the thrombin-inhibitor r-hirudin, and the glycoprotein 11b/IIIa-receptor antagonist Ro 43-8857. *Thromb Haemost.* 1995;74(5):1353-60.
312. Kumar A, Villani MP, Patel UK, et al. Recombinant soluble form of PSGL-1 accelerates thrombolysis and prevents reocclusion in a porcine model. *Circulation.* 1999;99(10):1363-9.
313. Uriuda Y, Wang QD, Hatori N, et al. Coronary thrombosis/thrombolysis in pigs: effects of heparin, ASA, and the thrombin inhibitor inogatran. *J Pharmacol Toxicol Methods.* 1998;39(2):81-9.
314. Uriuda Y, Wang QD, Grip L, et al. Antithrombotic activity of inogatran, a new low-molecular-weight inhibitor of thrombin, in a closed-chest porcine model of coronary artery thrombosis. *Cardiovasc Res.* 1996;32(2):320-7.
315. Rubsamen K, Eschenfelder V. Effect of recombinant hirudin (LU 52369) on reocclusion rates after thrombolysis in rabbits. *Haemostasis.* 1991;21 Suppl 1:93-8.
316. Schneider J. Antithrombotic effects of the prostacyclin analogue naxaprostene after oral and intraduodenal application in rabbit carotid artery thrombosis. *Agents Actions Suppl.* 1992;37:176-82.
317. Hechler B, Nonne C, Eckly A, et al. Arterial thrombosis: relevance of a model with two levels of severity assessed by histologic, ultrastructural and functional characterization. *J Thromb Haemost.* 2010;8(1):173-84.
318. Kawasaki T, Dewerchin M, Lijnen HR, et al. Mouse carotid artery ligation induces platelet-leukocyte-dependent luminal fibrin, required for neointima development. *Circ Res.* 2001;88(2):159-66.
319. Hladovec J. Experimental arterial thrombosis in rats with continuous registration. *Thromb Diath Haemorrh.* 1971;26(2):407-10.
320. Pakala R. Inhibition of arterial thrombosis by polyamines in a canine coronary artery injury model. *Thromb Res.* 2003;110(1):47-51.
321. Thiagarajan P, Benedict CR. Inhibition of arterial thrombosis by recombinant annexin V in a rabbit carotid artery injury model. *Circulation.* 1997;96(7):2339-47.
322. Carmeliet P, Moons L, Stassen JM, et al. Vascular wound healing and neointima formation induced by perivascular electric injury in mice. *Am J Pathol.* 1997;150(2):761-76.
323. Kaiser B, Kuhnemuth G, Markwardt F. Pharmacological studies on the low molecular weight heparin derivative CY 216. *Pharmazie.* 1990;45(7):522-4.
324. Kawasaki T, Sato K, Sakai Y, et al. Comparative studies of an orally-active factor Xa inhibitor, YM-60828, with other antithrombotic agents in a rat model of arterial thrombosis. *Thromb Haemost.* 1998;79(2):410-6.
325. Lorrain J, Lechaire I, Gauffeny C, et al. Effects of SanOrg123781A, a synthetic hexadecasaccharide, in a mouse model of electrically induced carotid artery injury: synergism with the antiplatelet agent clopidogrel. *J Pharmacol Exp Ther.* 2004;309(1):235-40.
326. Mogielnicki A, Kramkowski K, Pietrzak L, et al. N-methylnicotinamide inhibits arterial thrombosis in hypertensive rats. *J Physiol Pharmacol.* 2007;58(3):515-27.

327. Niitsu Y, Sugidachi A, Ogawa T, et al. Repeat oral dosing of prasugrel, a novel P2Y<sub>12</sub> receptor inhibitor, results in cumulative and potent antiplatelet and antithrombotic activity in several animal species. *Eur J Pharmacol.* 2008;579(1-3):276-82.
328. Ohtsu A, Saitoh N, Okada N, et al. Estradiol suppresses electrically-induced arterial thrombosis by increasing prostaglandin biosynthesizing activity of the aorta in rats. *Thromb Res.* 1983;32(6):567-74.
329. Philp RB, Paul ML. Effects of aspirin dosage and time of administration on arterial prostacyclin production and platelet aggregation in rats. *Prostaglandins Leukot Med.* 1984;15(1):91-102.
330. Plotkine M, Allix M, Guillou J, et al. Oral administration of isosorbide dinitrate inhibits arterial thrombosis in rats. *Eur J Pharmacol.* 1991;201(1):115-6.
331. Kaiser B, Richter M, Hauptmann J, et al. Anticoagulant and antithrombotic action of the synthetic thrombin inhibitor D-phenylalanyl-L-prolyl-L-arginine nitrile. *Pharmazie.* 1991;46(2):128-31.
332. Kaminska M, Mogielnicki A, Stankiewicz A, et al. Angiotensin II via AT<sub>1</sub> receptor accelerates arterial thrombosis in renovascular hypertensive rats. *J Physiol Pharmacol.* 2005;56(4):571-85.
333. Kramkowski K, Mogielnicki A, Leszczynska A, et al. Angiotensin-(1-9), the product of angiotensin I conversion in platelets, enhances arterial thrombosis in rats. *J Physiol Pharmacol.* 2010;61(3):317-24.
334. Kusada A, Isogai N, Cooley BC. Electric injury model of murine arterial thrombosis. *Thromb Res.* 2007;121(1):103-6.
335. Maes L, Andries R, Bourgain RH. Endothelial injury and platelet thrombosis in mesenteric arteries of rats: a scanning electron microscopy study. *Blood Vessels.* 1986;23(1):1-8.
336. Massad L, Plotkine M, Capdeville C, et al. Electrically induced arterial thrombosis model in the conscious rat. *Thromb Res.* 1987;48(1):1-10.
337. Potvliege PR, Bourgain RH. Thrombosis induced in vivo in the mesenteric artery of rats. An electron microscopic study of the initial phases. *Br J Exp Pathol.* 1976;57(6):722-32.
338. Potvliege PR, Bourgain RH. Thrombosis induced in vivo in the mesenteric artery of normal and thrombocytopenic rats, an electron-microscopic study of the early arterial wall reaction. *Br J Exp Pathol.* 1977;58(6):670-7.
339. Potvliege PR, Bourgain RH. Thrombosis induced in vivo in the femoral artery of rats. An electron microscopic study of myointimal growth. *Br J Exp Pathol.* 1979;60(4):382-8.
340. Sturgeon SA, Jones C, Angus JA, et al. Adaptation of the Folts and electrolytic methods of arterial thrombosis for the study of anti-thrombotic molecules in small animals. *J Pharmacol Toxicol Methods.* 2006;53(1):20-9.
341. Kawasaki T, Kawamura S, Katoh S, et al. Experimental model of carotid artery thrombosis in rats and the thrombolytic activity of YM866, a novel modified tissue-type plasminogen activator. *Jpn J Pharmacol.* 1993;63(2):135-42.
342. Kawasaki T, Taniguchi M, Moritani Y, et al. Antithrombotic and thrombolytic efficacy of YM-254890, a G<sub>q</sub>/11 inhibitor, in a rat model of arterial thrombosis. *Thromb Haemost.* 2003;90(3):406-13.

343. Szemraj J, Stankiewicz A, Rozmyslowicz-Szerminska W, et al. A new recombinant thrombolytic and antithrombotic agent with higher fibrin affinity - a staphylokinase variant. An in-vivo study. *Thromb Haemost.* 2007;97(6):1037-45.
344. Szemraj J, Zakrzaska A, Brown G, et al. New derivative of staphylokinase SAK-RGD-K2-Hirul exerts thrombolytic effects in the arterial thrombosis model in rats. *Pharmacol Rep.* 2011;63(5):1169-79.
345. Kawasaki T, Sato K, Hirayama F, et al. Effect of a synthetic factor Xa inhibitor, YM-60828, on blood vessel patency in combination with a thrombolytic agent and on blood loss from the operation site in a rat model of arterial thrombosis. *Thromb Haemost.* 1998;79(4):859-64.
346. Fleming JS, Buyniski JP. A potent new inhibitor of platelet aggregation and experimental thrombosis, anagrelide (BL-4162A). *Thromb Res.* 1979;15(3-4):373-88.
347. Hirose H, Mashiko S, Kimura T, et al. Antithrombotic activity of NSP-513, a novel selective phosphodiesterase 3 inhibitor, on femoral arterial thrombosis induced by physical stenosis and electrical current: comparison of antithrombotic and hemodynamic effects. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2000;35(4):586-94.
348. Kuwabara K, Pinsky DJ, Schmidt AM, et al. Calreticulin, an antithrombotic agent which binds to vitamin K-dependent coagulation factors, stimulates endothelial nitric oxide production, and limits thrombosis in canine coronary arteries. *J Biol Chem.* 1995;270(14):8179-87.
349. Mehta JL, Chen L, Nichols WW, et al. Melagatran, an oral active-site inhibitor of thrombin, prevents or delays formation of electrically induced occlusive thrombus in the canine coronary artery. *J Cardiovasc Pharmacol.* 1998;31(3):345-51.
350. Mestre M, Clairefond P, Mardiguan J, et al. Comparative effects of heparin and PK 10169, a low molecular weight fraction, in a canine model of arterial thrombosis. *Thromb Res.* 1985;38(4):389-99.
351. Mousa SA, Kapil R, Mu DX. Intravenous and oral antithrombotic efficacy of the novel platelet GPIIb/IIIa antagonist roxifiban (DMP754) and its free acid form, XV459. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1999;19(10):2535-41.
352. Mousa SA, Mu DX, Lucchesi BR. Prevention of carotid artery thrombosis by oral platelet GPIIb/IIIa antagonist in dogs. *Stroke.* 1997;28(4):830-5; discussion 5-6.
353. Pakala R. Effect of polyamines on in vitro platelet aggregation and in vivo thrombus formation. *Cardiovasc Radiat Med.* 2002;3(3-4):213-20.
354. Vaghi F, Colombo M, Pierucci L, et al. Pharmacological characterization of FCE 27262, a combined thromboxane synthase inhibitor and PGH2/TXA2 receptor antagonist. *Drugs Exp Clin Res.* 1993;19(6):249-60.
355. Chen LY, Nichols WW, Saldeen TG, et al. Recombinant lys-plasminogen given before, but not after, recombinant tissue-type plasminogen activator markedly improves coronary thrombolysis in dogs: relationship of thrombolytic efficacy with parameters of fibrinolysis. *J Cardiovasc Pharmacol.* 1996;27(2):283-9.
356. Haskel EJ, Adams SP, Feigen LP, et al. Prevention of reoccluding platelet-rich thrombi in canine femoral arteries with a novel peptide antagonist of platelet glycoprotein IIb/IIIa receptors. *Circulation.* 1989;80(6):1775-82.
357. Nicolini FA, Nichols WW, Saldeen TG, et al. Adjunctive therapy with low molecular weight heparin with recombinant tissue-type plasminogen activator causes sustained reflow in canine coronary thrombosis. *Am Heart J.* 1992;124(2):280-8.

358. Shebuski RJ, Sitko GR, Claremon DA, et al. Inhibition of factor XIIIa in a canine model of coronary thrombosis: effect on reperfusion and acute reocclusion after recombinant tissue-type plasminogen activator. *Blood*. 1990;75(7):1455-9.
359. Yao SK, Akhtar S, Scott-Burden T, et al. Endogenous and exogenous nitric oxide protect against intracoronary thrombosis and reocclusion after thrombolysis. *Circulation*. 1995;92(4):1005-10.
360. Sedlarik K, Perlewitz J, Schilling B, et al. [A model of thromboembolism in the femoral artery of the dog]. *Z Exp Chir*. 1975;8(5):266-71.
361. Vollmar F, Bernstein K, Bottger W, et al. [Morphologic investigations on experimental coronary thromboses in pigs (author's transl)]. *Zentralbl Allg Pathol*. 1976;120(4):293-302.
362. Yao SK, Benedict CR, Rosolowsky M, et al. Effect of aspirin on local prostaglandin production and serotonin accumulation in a canine model with coronary cyclic flow variations or thrombosis. *J Mol Cell Cardiol*. 1991;23(4):473-82.
363. Chan CC, Ford-Hutchinson A. Potentiation of the inhibitory effect of a thromboxane A2 antagonist (L-640,035) on arterial thrombosis formation in rabbit by the angiotensin converting enzyme inhibitor enalapril. *Eur J Pharmacol*. 1985;110(3):323-8.
364. Pakala R, Liang CT, Benedict CR. Inhibition of arterial thrombosis by a peptide ligand of the thrombin receptor. *Thromb Res*. 2000;100(1):89-96.
365. Papamichael ND, Stathopoulou EM, Roussa VD, et al. Effect of a synthetic peptide corresponding to residues 313 to 320 of the alphaIIb subunit of the human platelet integrin alphaIIbbeta3 on carotid artery thrombosis in rabbits. *J Pharmacol Exp Ther*. 2009;329(2):634-40.
366. Roussa VD, Stathopoulou EM, Papamichael ND, et al. A highly constrained cyclic (S,S)-CDC- peptide is a potent inhibitor of carotid artery thrombosis in rabbits. *Platelets*. 2011;22(5):361-70.
367. Wong PC, Crain EJ, Knabb RM, et al. Nonpeptide factor Xa inhibitors II. Antithrombotic evaluation in a rabbit model of electrically induced carotid artery thrombosis. *J Pharmacol Exp Ther*. 2000;295(1):212-8.
368. Wong PC, Crain EJ, Watson CA, et al. Nonpeptide factor Xa inhibitors III: effects of DPC423, an orally-active pyrazole antithrombotic agent, on arterial thrombosis in rabbits. *J Pharmacol Exp Ther*. 2002;303(3):993-1000.
369. Wong PC, Luettgen JM, Rendina AR, et al. BMS-593214, an active site-directed factor VIIa inhibitor: enzyme kinetics, antithrombotic and antihaemostatic studies. *Thromb Haemost*. 2010;104(2):261-9.
370. Wong PC, Watson CA, Crain EJ. Arterial antithrombotic and bleeding time effects of apixaban, a direct factor Xa inhibitor, in combination with antiplatelet therapy in rabbits. *J Thromb Haemost*. 2008;6(10):1736-41.
371. Fujitani B, Watanabe M, Kuwashima J, et al. Effect of a prostaglandin E1 derivative (OP-1206) and acetylsalicylic acid on electrically induced thrombosis in guinea-pig mesenteric artery and its modification by an inhibitor of prostaglandin I2 synthetase, tranylcypromine. *Jpn J Pharmacol*. 1986;40(1):31-5.
372. van der Giessen WJ, Zijlstra FJ, Berk L, et al. The effect of the thromboxane receptor antagonist BM 13.177 on experimentally induced coronary artery thrombosis in the pig. *Eur J Pharmacol*. 1988;147(2):241-8.

373. Sedlarik K, Schilling B, Seelig G. The electrically induced thrombosis in the arteria femoralis of pig as a model for in-vivo studies. *Z Exp Chir.* 1977;10(1):23-9.
374. Folts JD, Crowell EB, Jr., Rowe GG. Platelet aggregation in partially obstructed vessels and its elimination with aspirin. *Circulation.* 1976;54(3):365-70.
375. Delaporte-Cerceau S, Samama CM, Riou B, et al. Ketorolac and enoxaparin affect arterial thrombosis and bleeding in the rabbit. *Anesthesiology.* 1998;88(5):1310-7.
376. Pierschbacher MD, Ruoslahti E. Cell attachment activity of fibronectin can be duplicated by small synthetic fragments of the molecule. *Nature.* 1984;309(5963):30-3.
377. Pytela R, Pierschbacher MD, Ruoslahti E. A 125/115-kDa cell surface receptor specific for vitronectin interacts with the arginine-glycine-aspartic acid adhesion sequence derived from fibronectin. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1985;82(17):5766-70.
378. Pierschbacher MD, Ruoslahti E. Influence of stereochemistry of the sequence Arg-Gly-Asp-Xaa on binding specificity in cell adhesion. *J Biol Chem.* 1987;262(36):17294-8.
379. Ruoslahti E. RGD and other recognition sequences for integrins. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 1996;12:697-715.
380. Investigators E. Use of a monoclonal antibody directed against the platelet glycoprotein IIb/IIIa receptor in high-risk coronary angioplasty. *N Engl J Med.* 1994;330(14):956-61.
381. Du XP, Plow EF, Frelinger AL, 3rd, et al. Ligands "activate" integrin alpha IIb beta 3 (platelet GPIIb-IIIa). *Cell.* 1991;65(3):409-16.
382. 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(10):2324-30.
383. Biris N, Abatzis M, Mitsios JV, et al. Mapping the binding domains of the alpha(IIb) subunit. A study performed on the activated form of the platelet integrin alpha(IIb)beta(3). *Eur J Biochem.* 2003;270(18):3760-7.
384. D'Souza SE, Ginsberg MH, Burke TA, et al. The ligand binding site of the platelet integrin receptor GPIIb-IIIa is proximal to the second calcium binding domain of its alpha subunit. *J Biol Chem.* 1990;265(6):3440-6.
385. Ambo H, Kamata T, Handa M, et al. Novel point mutations in the alphaIIb subunit (Phe289-->Ser, Glu324-->Lys and Gln747-->Pro) causing thrombasthenic phenotypes in four Japanese patients. *Br J Haematol.* 1998;102(3):829-40.
386. Ferrer M, Fernandez-Pinel M, Gonzalez-Manchon C, et al. A mutant (Arg327-->His) GPIIb associated to thrombasthenia exerts a dominant negative effect in stably transfected CHO cells. *Thromb Haemost.* 1996;76(3):292-301.
387. Mitsios JV, Tambaki AP, Abatzis M, et al. Effect of synthetic peptides corresponding to residues 313-332 of the alphaIIb subunit on platelet activation and fibrinogen binding to alphaIIbbeta3. *Eur J Biochem.* 2004;271(4):855-62.
388. Stavrakoudis A, Bizo G, Eleftheriadis D, et al. A three-residue cyclic scaffold of non-RGD containing peptide analogues as platelet aggregation inhibitors: design, synthesis, and structure--function relationships. *Biopolymers.* 2000;56(1):20-6.
389. Harfenist EJ, Wrana JL, Packham MA, et al. Measurement of fibrinogen concentrations in suspensions of washed rabbit and human platelets by radioimmunoassays. *Thromb Haemost.* 1985;53(1):110-5.

390. Toor B, McGregor JL, McGregor L, et al. Comparison of the major membrane glycoproteins and proteins of human, rabbit and rat blood platelets. *Thromb Res.* 1982;26(5):317-28.
391. Rowsell HC, Mustard JF. Blood Coagulation in Some Common Laboratory Animals. *Lab Anim Care.* 1963;13:752-62.
392. Nurden AT, Butcher PD, Hawkey CM. Comparative studies on the glycoprotein composition of mammalian platelets. *Comp Biochem Physiol B.* 1977;56(4):407-13.
393. Harfenist EJ, Packham MA, Mustard JF. Effects of the cell adhesion peptide, Arg-Gly-Asp-Ser, on responses of washed platelets from humans, rabbits, and rats. *Blood.* 1988;71(1):132-6.
394. Rand ML, Packham MA, Taylor DM, et al. The fibrinogen gamma chain dodecapeptide inhibits agonist-induced aggregation of rabbit platelets and fibrinogen binding to rabbit glycoprotein IIb-IIIa. *Thromb Haemost.* 1999;82(6):1680-6.
395. Wong PC, Quan ML, Crain EJ, et al. Nonpeptide factor Xa inhibitors: I. Studies with SF303 and SK549, a new class of potent antithrombotics. *J Pharmacol Exp Ther.* 2000;292(1):351-7.
396. Corporation C-L. Instruction manual for the whole blood lumi-ionized calcium aggregometers. . 1996.
397. Valgimigli M, Bueno H, Byrne RA, et al. 2017 ESC focused update on dual antiplatelet therapy in coronary artery disease developed in collaboration with EACTS: The Task Force for dual antiplatelet therapy in coronary artery disease of the European Society of Cardiology (ESC) and of the European Association for Cardio-Thoracic Surgery (EACTS). *Eur Heart J.* 2018;39(3):213-60.
398. Mehta SR, Yusuf S, Peters RJ, et al. Effects of pretreatment with clopidogrel and aspirin followed by long-term therapy in patients undergoing percutaneous coronary intervention: the PCI-CURE study. *Lancet.* 2001;358(9281):527-33.
399. Yusuf S, Zhao F, Mehta SR, et al. Effects of clopidogrel in addition to aspirin in patients with acute coronary syndromes without ST-segment elevation. *N Engl J Med.* 2001;345(7):494-502.
400. Cannon CP, Harrington RA, James S, et al. Comparison of ticagrelor with clopidogrel in patients with a planned invasive strategy for acute coronary syndromes (PLATO): a randomised double-blind study. *Lancet.* 2010;375(9711):283-93.
401. Montalescot G, Wiviott SD, Braunwald E, et al. Prasugrel compared with clopidogrel in patients undergoing percutaneous coronary intervention for ST-elevation myocardial infarction (TRITON-TIMI 38): double-blind, randomised controlled trial. *Lancet.* 2009;373(9665):723-31.
402. Wallentin L, Becker RC, Budaj A, et al. Ticagrelor versus clopidogrel in patients with acute coronary syndromes. *N Engl J Med.* 2009;361(11):1045-57.
403. Wiviott SD, Braunwald E, McCabe CH, et al. Prasugrel versus clopidogrel in patients with acute coronary syndromes. *N Engl J Med.* 2007;357(20):2001-15.

404. Randomised placebo-controlled trial of abciximab before and during coronary intervention in refractory unstable angina: the CAPTURE Study. *Lancet*. 1997;349(9063):1429-35.
405. Simoons ML, Investigators GI-A. Effect of glycoprotein IIb/IIIa receptor blocker abciximab on outcome in patients with acute coronary syndromes without early coronary revascularisation: the GUSTO IV-ACS randomised trial. *Lancet*. 2001;357(9272):1915-24.
406. Gowda RM, Khan IA, Vasavada BC, et al. Therapeutics of platelet glycoprotein IIb/IIIa receptor antagonism. *Am J Ther*. 2004;11(4):302-7.
407. Fintel DJ, Ledley GS. Management of patients with non-ST-segment elevation acute coronary syndromes: insights from the PURSUIT trial. *Clin Cardiol*. 2000;23 Suppl 5:V1-12.
408. Mascelli MA, Lance ET, Damaraju L, et al. Pharmacodynamic profile of short-term abciximab treatment demonstrates prolonged platelet inhibition with gradual recovery from GP IIb/IIIa receptor blockade. *Circulation*. 1998;97(17):1680-8.
409. Tcheng JE, Ellis SG, George BS, et al. Pharmacodynamics of chimeric glycoprotein IIb/IIIa integrin antiplatelet antibody Fab 7E3 in high-risk coronary angioplasty. *Circulation*. 1994;90(4):1757-64.
410. Harrington RA, Kleiman NS, Kottke-Marchant K, et al. Immediate and reversible platelet inhibition after intravenous administration of a peptide glycoprotein IIb/IIIa inhibitor during percutaneous coronary intervention. *Am J Cardiol*. 1995;76(17):1222-7.
411. Leadley RJ, Jr., Chi L, Rebello SS, et al. Contribution of in vivo models of thrombosis to the discovery and development of novel antithrombotic agents. *J Pharmacol Toxicol Methods*. 2000;43(2):101-16.
412. Cox D, Motoyama Y, Seki J, et al. Pentamidine: a non-peptide GPIIb/IIIa antagonist--in vitro studies on platelets from humans and other species. *Thromb Haemost*. 1992;68(6):731-6.
413. Ghahramani P, Rowland-Yeo K, Yeo WW, et al. Protein binding of aspirin and salicylate measured by in vivo ultrafiltration. *Clin Pharmacol Ther*. 1998;63(3):285-95.
414. Sholkoff SD, Eyring EJ, Rowland M, et al. Plasma and synovial fluid concentrations of acetylsalicylic acid in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*. 1967;10(4):348-51.
415. Bannwarth B, Netter P, Pourel J, et al. Clinical pharmacokinetics of nonsteroidal anti-inflammatory drugs in the cerebrospinal fluid. *Biomed Pharmacother*. 1989;43(2):121-6.
416. Cotlier E, Sharma YR, Niven T, et al. Distribution of salicylate in lens and intraocular fluids and its effect on cataract formation. *Am J Med*. 1983;74(6A):83-90.
417. Valeri P, Romanelli L, De Paolis L, et al. Ocular distribution of aspirin and salicylate following systematic administration of aspirin to rabbits. *J Pharm Pharmacol*. 1988;40(11):823-4.
418. Zeymer U, Wienbergen H. A review of clinical trials with eptifibatide in cardiology. *Cardiovasc Drug Rev*. 2007;25(4):301-15.
419. Taylor DB, Gartner TK. A peptide corresponding to GPIIb alpha 300-312, a presumptive fibrinogen gamma-chain binding site on the platelet integrin GPIIb/IIIa,



inhibits the adhesion of platelets to at least four adhesive ligands. *J Biol Chem.* 1992;267(17):11729-33.

420. Borgdorff P, Handoko ML, Wong YY, et al. COX-2 Inhibition by Use of Rofecoxib or High Dose Aspirin Enhances ADP-Induced Platelet Aggregation in Fresh Blood. *Open Cardiovasc Med J.* 2010;4:198-205.

421. Qi R, Yatomi Y, Ozaki Y. Effects of incubation time, temperature, and anticoagulants on platelet aggregation in whole blood. *Thromb Res.* 2001;101(3):139-44.