



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗΣ
ΑΙΜΟΠΕΤΑΛΙΩΝ-ΛΕΥΚΟΚΥΤΤΑΡΩΝ:
ΡΟΛΟΣ ΣΤΗΝ ΑΘΗΡΟΘΡΟΜΒΩΣΗ

ΗΡΑΚΛΗΣ Χ. ΜΟΣΧΟΝΑΣ

Χημικός, MSc

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2025

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

Ορισμός Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής από τη Γ.Σ.Ε.Σ.: Γ.Σ. 905^A/27-03-15

Μέλη Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής:

Επιβλέπων:

Αλέξανδρος Τσελέπης, Ομότιμος Καθηγητής Βιοχημείας-Κλινικής Χημείας
Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Μέλη:

Ανδρέας Τζάκος, Καθηγητής Οργανικής Χημείας Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Δημήτριος Στάκος, Καθηγητής Καρδιολογίας Δημοκριτείου Πανεπιστημίου Θράκης

Ημερομηνία ορισμού θέματος: 18-03-15

Θέμα: «Μηχανισμοί αλληλεπίδρασης αιμοπεταλίων-λευκοκυττάρων: Ρόλος στην
αθηροθρόμβωση»

ΟΡΙΣΜΟΣ ΕΠΤΑΜΕΛΟΥΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ από τη Γ.Σ.Ε.Σ.:
1145/30-06-25

1. Αλέξανδρος Τσελέπης, Ομότιμος Καθηγητής Βιοχημείας-Κλινικής Χημείας
Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
2. Ανδρέας Τζάκος, Καθηγητής Οργανικής Χημείας Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
3. Δημήτριος Στάκος, Καθηγητής Καρδιολογίας Δημοκριτείου Πανεπιστημίου
Θράκης
4. Καλλιρρόη Καλαντζή, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Ιατρικής Πανεπιστημίου
Ιωαννίνων
5. Ελευθερία Χατζημιχαήλ, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Αιματολογίας
Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
6. Πασχάλης-Θωμάς Δούλιας, Αναπληρωτής Καθηγητής Βιοχημείας Πανεπιστημίου
Ιωαννίνων
7. Μαργαρίτα Τενοπούλου, Επίκουρη Καθηγήτρια Βιοχημείας Πανεπιστημίου
Ιωαννίνων

**Στην οικογένειά μου, στον άνθρωπό μου
και στον αείμνηστο φίλο, Λεωνίδα Παπαγεωργίου**

Ευχαριστίες

Η παρούσα Διδακτορική Διατριβή εκπονήθηκε στο Ερευνητικό Κέντρο Αθηροθρόμβωσης/Εργαστήριο Βιοχημείας του Τομέα Οργανικής Χημείας και Βιοχημείας του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον Επιβλέποντα Καθηγητή μου, τον Ομότιμο Καθηγητή Βιοχημείας-Κλινικής Χημείας, κ. Αλέξανδρο Τσελέπη, για την καθοδήγησή του όλα αυτά τα χρόνια, για το χρόνο που μου αφιέρωσε και για την εμπιστοσύνη του, που με έκαναν να αγαπήσω ακόμα περισσότερο το γνωστικό μου αντικείμενο και με έκαναν καλύτερο επιστήμονα μέρα με τη μέρα.

Θα ήθελα, επίσης, να ευχαριστήσω τα Μέλη της Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής, τον Καθηγητή Οργανικής Χημείας, κ. Ανδρέα Τζάκο, και τον Καθηγητή Καρδιολογίας, κ. Δημήτριο Στάκο, για την άψογη συνεργασία μας κατά τη διάρκεια εκπόνησης της Διατριβής μου.

Ακόμη, θα ήθελα να ευχαριστήσω τα υπόλοιπα Μέλη της Επταμελούς Εξεταστικής, τον Αναπληρωτή Καθηγητή Βιοχημείας, κ. Πασχάλη-Θωμά Δούλια, την Επίκουρη Καθηγήτρια Βιοχημείας, κα. Μαργαρίτα Τενοπούλου, την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Ιατρικής, κα. Καλλιρόη Καλαντζή, και την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Αιματολογίας, κα. Ελευθερία Χατζημιχαήλ, που δέχτηκαν να συμμετέχουν στην αξιολόγησή μου.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω την ερευνητική ομάδα του Εργαστηρίου Μοριακής Αιματολογίας του Δημοκριτείου Πανεπιστημίου Θράκης, τον Καθηγητή Παθολογίας, κ. Κωνσταντίνο Ρίτη, τον Κωνσταντίνο Καμπά και την Ακριβή Χρυσανθοπούλου, για την πολύτιμη βοήθειά τους κατά τα πρώτα στάδια οργάνωσης των τεχνικών απομόνωσης ουδετεροφίλων και παραγωγής των NETs.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω την κυρία Ελένη Ρηγανά και τον κύριο Παγκάκη, του Ι.ΙΒ.Ε.Α.Α., για τη βοήθειά τους κατά την πραγματοποίηση της τεχνικής της συνεστιακής μικροσκοπίας.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τους γονείς μου, που όλα αυτά τα χρόνια στάθηκαν ακλόνητα στο πλευρό μου, τόσο σε ευχάριστες όσο και σε δυσάρεστες στιγμές, για την απόλυτη εμπιστοσύνη και την άνευ όρων στήριξή τους, όχι μόνο σε ηθικό επίπεδο, αλλά και σε οικονομικό.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τη σύντροφό μου, Μαρία Καρακούση, για την αγάπη της, τη στήριξή της, την εμπιστοσύνη της και τις υπέροχες στιγμές που περνάμε μαζί.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένεια της συντρόφου μου, Βασίλειο Καρακούση, Πολυνίκη Καρακούση και Δημήτριο Καρακούση, που με δέχτηκαν με την πιο θερμή αγκαλιά, σα μέλος της οικογένειας, και που μου δείχνουν έμπρακτα και σε καθημερινή βάση την αγάπη τους.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τα υπόλοιπα μέλη του Ερευνητικού Κέντρου Αθηροθρόμβωσης, νυν και πρώην, την Αικατερίνη Τσούκα, τον Ιωάννη Κουτσαλιάρη, το Στυλιανό Παπαδόπουλο, τη Σοφία Σιδηροπούλου, την Αλεξία Τσαπίνου, τη Λουίζα Πεχλιβάνη, τον Αλέξανδρο Γιαννάκη, την Κωνσταντίνα Καραβασίλη, την Αλεξία Γκουρογιάννη και το Φωτάκη Λέζο, για το υπέροχο συναδελφικό κλίμα που υπήρχε και υπάρχει όλα αυτά τα χρόνια, για την πολύτιμη φιλία τους και για τις όμορφες στιγμές που περάσαμε και συνεχίζουμε να περνάμε μαζί.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τα μέλη ΕΔΙΠ του Ερευνητικού Κέντρου Αθηροθρόμβωσης, Δρ. Κωνσταντίνο Τέλλη και Δρ. Δέσποινα Πανταζή, για το άψογο κλίμα συνεργασίας, τις συμβουλές τους και τις όμορφες κουβέντες μας.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω έναν πολύ στενό φίλο, έναν από τους πιο αξιόλογους ανθρώπους που είχα την τιμή να γνωρίσω στη ζωή μου, και ο οποίος, δυστυχώς, έφυγε πολύ νωρίς και ξαφνικά, το Λεωνίδα Παπαγεωργίου. Παρά το γεγονός ότι δεν είναι πλέον κοντά μας, η βαθιά φιλία που μας ένωνε, το χαμόγελό του, η τεράστια όρεξη για ζωή που είχε και η αισιοδοξία του θα με συντροφεύουν για πάντα.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω την παρέα μας στην Κατερίνη, τον Άκη, το Ρωμανό, τη Φιλιώ, την Ελένη, την Αναστασία και τη Νένα.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τους φίλους, Κοσμά Οικονόμου, Χρήστο Φανίτσιο, Αχιλλέα Παπαδημητρίου, Τάσο Παπαρούνα, Ξένια Λαζαρίδου, Βίκτωρα Νταμπάκη και Παναγιώτη Νταμπάκη, για την υπέροχη φιλία τους όλα αυτά τα χρόνια.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον πολύ στενό φίλο, Χαράλαμπο Οικονομίδη, για τις ατελείωτες ώρες επιστημονικών συζητήσεων, για την ισχυρή φιλία που μας ενώνει, και γιατί είναι μία από τις πιο ευγενείς ψυχές που γνώρισα ποτέ μου.

Συντμήσεις

5-HT	5-υδροξυτρυπταμίνη
11-dehydro-TxB₂	11-δεϋδροθρομβοξάνιο B ₂
AA	Αραχιδονικό οξύ
ACS	Οξύ στεφανιαίο σύνδρομο
ADO	Αδενοσίνη
ADP	Διφωσφορική αδενοσίνη
AMI	Οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου
ApoE	Απολιποπρωτεΐνη E
ASA	Ακετυλοσαλικυλικό οξύ
ATP	Τριφωσφορική αδενοσίνη
CAD	Στεφανιαία νόσος
CAM	Ενεργός μεταβολίτης της κλοπιδογρέλης
cAMP	Κυκλική μονοφωσφορική αδενοσίνη
CD	Σύμπλεγμα διαφοροποίησης
CEACAM1	Carcinoembryonic Ag cell adhesion molecule 1
cfDNA	Ελεύθερα κυκλοφορούν DNA
cGMP	Κυκλική μονοφωσφορική γουανοσίνη
CitH3	Κιτρουλλινοποιημένη ιστόνη H3
COVID-19	Νόσος προκαλούμενη από τον κορωνοϊό 2019
COX-1	Κυκλοξυγονάση-1
COX-2	Κυκλοξυγονάση-2
CVD	Καρδιαγγειακή νόσος

CYP450	Κυτόχρωμα P450
DMSO	Διμεθυλοσουλφοξείδιο
DTS	Πυκνό σωληνοειδές σύστημα
DVT	Εν τω βάθει φλεβική θρόμβωση
ECs	Ενδοθηλιακά κύτταρα
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
ENT-1	Equilibrative nucleoside transporter-1
ERK	Εξωκυττάρια σηματορρυθμιζόμενη κίνηση
EVs	Εξωκυττάρια κυστίδια
fMLP	N-φορμυλο-μεθειονυλο-λευκυλο-φαινυλαλανίνη
GPs	Γλυκοπρωτεΐνες
GPCRs	Υποδοχείς που συζευγνύονται με πρωτεΐνες G
HDACi	Histone deacetylase inhibitor
HDL	Λιποπρωτεΐνη υψηλής πυκνότητας
HIT	Επαγόμενη από ηπαρίνη θρομβοπενία
HMGB1	Πλαίσιο ομάδας υψηλής κινητικότητας 1
HTB	2-ακετυλοξυ-4-τριφθορομεθυλο-βενζοϊκό οξύ
HTPR	Υψηλή υπό θεραπεία αντιδραστικότητα των αιμοπεταλίων
IL	Ιντερλευκίνη
LDGs	Κοκκιοκύτταρα χαμηλής πυκνότητας
LDL	Λιποπρωτεΐνη χαμηλής πυκνότητας
LOX-1	Λιποξυγονάση-1
LPS	Λιποπολυσακχαρίδιο

LTA	Συσσωρευομετρία οπτικής διαπερατότητας
MFI	Μέση ένταση φθορισμού
MI	Έμφραγμα του μυοκαρδίου
MPO	Μυελοϋπεροξειδάση
MPV	Μέσος όγκος αιμοπεταλίων
mTOR	Mammalian target of rapamycin
NADPH	Φωσφορικό νικοτιναμίδο-αδένινο δινουκλεοτίδιο
NE	Ουδετεροφιλική ελαστάση
NETs	Ουδετεροφιλικά δίκτυα χρωματίνης
NLRP3	NOD-like receptor family pyrin domain containing 3
NSAIDs	Μη στεροειδή αντιφλεγμονώδη φάρμακα
NSTEMI	Έμφραγμα του μυοκαρδίου χωρίς ανάσπαση του διαστήματος ST
OCS	Ανοικτό καναλοειδές σύστημα
oxLDL	Οξειδωμένη λιποπρωτεΐνη χαμηλής πυκνότητας
PAD	Περιφερική αρτηριακή νόσος
PAD4	Απιδιμάση της πεπτιδυλο-αργινίνης 4
PAM	Ενεργός μεταβολίτης της πρασουγρέλης
PARs	Υποδοχείς ενεργοποιούμενοι από πρωτεάσες
PBMCs	Μονοκύτταρα περιφερικού αίματος
pDCs	Πλασματοειδή δένδριτικά κύτταρα
PDE-3	Φωσφοδιεστεράση-3
PG	Προσταγλανδίνη

PKC	Πρωτεϊνική κινάση C
PMA	Οξική μυριστική φορβόλη
PMNs	Πολυμορφοπύρρηνα λευκοκύτταρα
PMPs	Μικροσωματίδια των αιμοπεταλίων
PRP	Πλάσμα πλούσιο σε αιμοπετάλια
PPIs	Αναστολείς της αντλίας πρωτονίων
PPP	Πλάσμα πτωχό σε αιμοπετάλια
PS	Πολυστυρένιο
PSGL-1	Γλυκοπρωτεϊνικό πρόσδεμα της P-σελεκτίνης-1
ROS	Δραστικές μορφές οξυγόνου
SMCs	Λεία μυϊκά κύτταρα
sPLA₂	Εκκρινόμενη φωσφολιπάση A ₂
STEMI	Έμφραγμα του μυοκαρδίου με ανάσπαση του διαστήματος ST
TF	Ιστικός παράγοντας
TIA	Παροδικό ισχαιμικό εγκεφαλικό επεισόδιο
TLRs	Υποδοχείς τύπου toll
TSP-1	Θρομβοσπονδίνη-1
TxA₂	Θρομβοξανίο A ₂
TxB₂	Θρομβοξανίο B ₂
VTE	Φλεβική θρομβοεμβολική νόσος
vWF	Παράγοντας von Willebrand

Περίληψη

Θεωρητικό Υπόβαθρο: Τα ουδετερόφιλα λευκοκύτταρα συνιστούν αναπόσπαστο τμήμα της γενικής ανοσίας, στρατολογούμενα κατά την παρουσία παθογόνων μικροοργανισμών, αλλά και σε συνθήκες ασηπτικής φλεγμονής. Τα ουδετερόφιλα, κατά την ενεργοποίησή τους, παράγουν ουδετεροφιλικά δίκτυα χρωματίνης (neutrophil extracellular traps, NETs), δηλαδή γενετικό υλικό εμπλουτισμένο σε πρωτεΐνες των ουδετεροφίλων, το οποίο απελευθερώνεται, παγιδεύει και εξουδετερώνει τα παθογόνα. Παρά το γεγονός αυτό, τα τελευταία 20 χρόνια, σωρεία μελετών έχουν παράσχει ισχυρές ενδείξεις ότι τα NETs συμβάλλουν στην παθοφυσιολογία πληθώρας νόσων, όπως είναι τα αυτοάνοσα νοσήματα, ο καρκίνος, ο σακχαρώδης διαβήτης, αλλά και η αθηροσκλήρωση και η θρόμβωση. Ανάμεσα στους παράγοντες που πυροδοτούν την παραγωγή των NETs είναι και τα αιμοπετάλια, των οποίων ο ρόλος στην αθηροθρόμβωση είναι γνωστός εδώ και δεκαετίες. Αν και στη διεθνή βιβλιογραφία έχει περιγραφεί μέχρι σήμερα, ως ένα βαθμό, η συνεργατική δράση των αιμοπεταλίων, των ουδετεροφίλων και των NETs ως προς τους παθοφυσιολογικούς μηχανισμούς της αθηροθρόμβωσης, η σχέση αυτή δεν έχει αποσαφηνιστεί πλήρως.

Σκοπός: Σκοπός της παρούσας Διδακτορικής Διατριβής ήταν η διαλεύκανση των μοριακών μηχανισμών που διέπουν την αλληλεπίδραση των αιμοπεταλίων και των λευκοκυττάρων, με έμφαση στα ουδετερόφιλα, στο πλαίσιο της παθοφυσιολογίας της αθηροθρόμβωσης.

Υλικά και Μέθοδοι: Στο πλαίσιο της παρούσας Διατριβής, πραγματοποιήθηκε απομόνωση ανθρώπινων ουδετεροφίλων από ολικό αίμα υγιών εθελοντών, τα οποία ενεργοποιήθηκαν παρουσία ή απουσία διαφόρων διεγερτικών παραγόντων, όπως είναι τα ενεργοποιημένα αιμοπετάλια, τα PMPs, καθώς και κλασσικοί αγωνιστές των ουδετεροφίλων. Ταυτόχρονα, η ενεργοποίηση των ουδετεροφίλων ανεστάλη παρουσία ή απουσία ανασταλτικών παραγόντων όπως είναι η τικαγρελόρη. Διερευνήθηκε, ακόμη, ο ρόλος των υποδοχέων CD162 και TLR-4 των ουδετεροφίλων, στην επαγόμενη από αιμοπετάλια και PMPs ενεργοποίηση των ουδετεροφίλων. Πραγματοποιήθηκε δοκιμασία χημειοτακτισμού με το θάλαμο Boyden, ανοσοφθορισμός για τον ημιποσοτικό προσδιορισμό των NETs και την οπτικοποίησή τους, ενώ ο ποσοτικός προσδιορισμός τους πραγματοποιήθηκε με τη

χρήση ELISA έναντι της συζευγμένης στο DNA μυελοϋπεροξειδάσης των ουδετεροφίλων και των NETs. Σε άλλα πειράματα, αντίστροφα, τα NETs ενεργοποίησαν τα αιμοπετάλια, και η ενεργοποίηση αυτή ανεστάλη παρουσία τικαγρελόρης. Στα πειράματα αυτά, παρασκευάστηκαν πλυμένα αιμοπετάλια και πραγματοποιήθηκε συσσωρευομετρία οπτικής διαπερατότητας.

Αποτελέσματα: Το fMLP προκάλεσε ισχυρή επαγωγή του χημειοτακτισμού των ουδετεροφίλων. Ακόμη, τα ενεργοποιημένα αιμοπετάλια προκάλεσαν ισχυρή επαγωγή του χημειοτακτισμού των ουδετεροφίλων, είτε αυτά είχαν προενεργοποιηθεί εντός του συσσωρευομέτρου είτε είχαν ενεργοποιηθεί *in situ*. Η τικαγρελόρη ανέστειλε στατιστικά σημαντικά τόσο τον επαγόμενο από το fMLP χημειοτακτισμό των ουδετεροφίλων όσο και τον επαγόμενο από τα ενεργοποιημένα αιμοπετάλια χημειοτακτισμό των ουδετεροφίλων, είτε εντός του συσσωρευομέτρου είτε *in situ*. Μεταξύ όλων των αγωνιστών που δοκιμάστηκαν, μόνο το PMA και το AA προκάλεσαν ισχυρή επαγωγή των NETs. Επιπλέον, τα ενεργοποιημένα αιμοπετάλια προκάλεσαν ισχυρή επαγωγή των NETs, είτε αυτά είχαν προενεργοποιηθεί εντός του συσσωρευομέτρου είτε είχαν ενεργοποιηθεί *in situ*. Η τικαγρελόρη ανέστειλε στατιστικά σημαντικά την επαγόμενη από τα ενεργοποιημένα αιμοπετάλια νέτωση, είτε εντός του συσσωρευομέτρου είτε *in situ*, αλλά δεν είχε επίδραση στην επαγόμενη από το PMA ή το AA νέτωση. Τα PMPs προκάλεσαν ισχυρή επαγωγή των NETs, και η νέτωση αυτή επίσης ανεστάλη στατιστικά σημαντικά από την τικαγρελόρη. Η χρήση των αντισωμάτων κατά των υποδοχέων CD162 και TLR-4 προκάλεσε εξασθένηση της επαγόμενης από ενεργοποιημένα αιμοπετάλια και PMPs, νέτωσης. Τέλος, τα NETs προκάλεσαν στατιστικά σημαντική συσσώρευση των αιμοπεταλίων, η οποία ανεστάλη στατιστικά σημαντικά από την τικαγρελόρη. Σε όλα τα παραπάνω πειράματα, η βιωσιμότητα των ουδετεροφίλων, καθώς και η καθαρότητα του δείγματος ήταν > 95%.

Συμπεράσματα: Τα παραπάνω αποτελέσματα καταδεικνύουν έναν κεντρικό ρόλο των αιμοπεταλίων και των PMPs στην παθοφυσιολογία της αθηροθρόμβωσης, καθώς διαμεσολαβούν την ενεργοποίηση των ουδετεροφίλων και τη νέτωση διαμέσου των υποδοχέων CD162 και TLR-4 των ουδετεροφίλων.

Abstract

Background: Neutrophil leukocytes are among the first lines of host defense in the presence of pathogens, as well as in sterile inflammatory conditions. During their activation, neutrophils produce neutrophil extracellular traps (NETs), i.e. genetic material which is enriched in proteins that derive from all types of neutrophil granules. Upon their release, NETs entrap and eliminate pathogens. However, during the last 20 years, a vast number of papers has demonstrated that NETs are implicated in the pathophysiology of various diseases, such as, but not limited to, autoimmune disorders, cancer, diabetes mellitus, as well as atherosclerosis and thrombosis. Among the factors that trigger NET formation are platelets, the role of which in the pathophysiology of atherothrombosis has been extensively studied during the last decades. Despite the fact that in the scientific literature the cooperative action of platelets, neutrophils and NETs, regarding the pathophysiological mechanisms of atherothrombosis, has been described up to a point, the interaction between them has not yet been fully deciphered.

Aim: The aim of the present Doctoral Thesis was to elucidate in greater detail the molecular mechanisms regarding the interaction between platelets and leukocytes, with emphasis given to neutrophils, in the context of the pathophysiology of atherothrombosis.

Materials and Methods: In the context of the present dissertation, we isolated human neutrophils from whole blood of healthy volunteers, which were subsequently activated in the presence or absence of various stimuli, such as activated platelets, PMPs, as well as traditional neutrophil agonists. Simultaneously, the activation of neutrophils was inhibited in the presence or absence of inhibitory factors, such as ticagrelor. Furthermore, the role of neutrophil CD162 and TLR-4 receptors, in the context of platelet- and PMP-induced neutrophil activation, was investigated. The Boyden chamber chemotaxis assay was also performed, as was performed immunofluorescence staining for the semi-quantification and visualization of neutrophils and NETs, while for the quantification of neutrophils and NETs we performed ELISA for the determination of DNA-myeloperoxidase complexes. In other experiments, in reverse, NETs were shown to activate platelets, while this activation was inhibited in the presence of ticagrelor. In these experiments, washed

platelets were prepared and light transmittance aggregometry was subsequently performed.

Results: The agonist, fMLP, induced the robust chemotaxis of neutrophils. Furthermore, activated platelets induced the robust chemotaxis of neutrophils, either when pre-activated in the aggregometer or when activated *in situ*. Ticagrelor inhibited neutrophil chemotaxis, both induced by fMLP or activated platelets, in a statistically significant manner. Among all agonists tested, only PMA and AA induced a potent NETosis. Moreover, activated platelets induced a potent NETosis, either when pre-activated in the aggregometer or activated *in situ*. Ticagrelor inhibited activated platelet-induced NETosis in a statistically significant manner, although it did not prevent NETosis induced by PMA or AA. PMPs induced a potent NETosis, which was inhibited by ticagrelor in a statistically significant manner. When used as antagonists, the antibodies against CD162 and TLR-4 inhibited platelet- and PMP-induced NET formation in a statistically significant manner. In all the above experiments, neutrophil viability and sample purity were above 95%.

Discussion: The above results point towards a central role of PMPs and platelets in the pathophysiology of atherothrombosis, since they mediate the activation of neutrophils and the subsequent NETosis, through the neutrophil receptors, CD162 and TLR-4.

ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1. Αιμοπετάλια

Τα αιμοπετάλια συνιστούν απύρηντα, δισκοειδή κυτταροπλασματικά θραύσματα των μεγακαρυοκυττάρων του μυελού των οστών. Η διάμετρός τους κυμαίνεται μεταξύ 2 και 5 μm , ο μέσος όγκος τους (mean platelet volume, MPV) μεταξύ 6 και 10 fL, ενώ ο χρόνος ζωής τους στην αιματική κυκλοφορία είναι 7-10 ημέρες. Οι τιμές αναφοράς του αριθμού των αιμοπεταλίων στον άνθρωπο κυμαίνονται μεταξύ 150.000 και 450.000/ μL . Τα αιμοπετάλια διαδραματίζουν εξέχοντα ρόλο στην αιμόσταση και τη θρόμβωση [1], την αθηροσκλήρωση [2], καθώς και στη φλεγμονώδη και ανοσολογική απόκριση [3]. Τα αιμοπετάλια συμμετέχουν καθοριστικά στην εκδήλωση των οξέων στεφανιαίων συνδρόμων (acute coronary syndromes, ACS) [2]. Ταυτόχρονα, αποτελούν πηγή φλεγμονωδών παραγόντων [4] και η διέγερσή τους από τέτοιους παράγοντες πιθανότατα συμβάλλει με κρίσιμο τρόπο στην αθηροθρόμβωση [5]. Τα αιμοπετάλια ενεργοποιούνται από διάφορους αγωνιστές διαμέσου των αντίστοιχων υποδοχέων τους. Οι αγωνιστές αυτοί επάγουν κυτταρικές μεταβολές, οι οποίες ευθύνονται για το πλήθος των λειτουργιών που επιτελούν τα αιμοπετάλια. Ειδικότερα, η ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων οδηγεί στην προσκόλλησή τους, την αλλαγή του σχήματός τους, τη συσσώρευση, την αποκοκκίωση/έκκριση και τη μεμβρανική έκφραση μορίων, όπως είναι προσκολλητικά μόρια που χρησιμεύουν στη διακυτταρική επικοινωνία (π.χ. η P-σελεκτίνη) και υποδοχείς (π.χ. η ιντεγκρίνη $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$). Παρ' όλα αυτά, όπως αναφέρεται και παρακάτω, άλλοι αγωνιστές [π.χ. το λιποπολυσακχαρίδιο (lipopolysaccharide, LPS), ένα μεμβρανικό συστατικό των αρνητικών κατά Gram βακτηρίων] δεν προκαλούν την προαναφερθείσα, κλασσική αιμοπεταλιακή ενεργοποίηση [6], αλλά μάλλον προάγουν τη διεπικοινωνία αιμοπεταλίων-λευκοκυττάρων, ώστε τα τελευταία να προβούν στην καταστροφή των μικροοργανισμών [7]. Συνεπώς, σχετικά πρόσφατα εισήχθησαν 2 νέοι όροι που περιγράφουν αυτήν τη διεπικοινωνία, ο όρος «ανοσοθρόμβωση» (immunothrombosis) [8] και ο όρος «θρομβοφλεγμονή» (thromboinflammation) [9, 10]. Ο πρώτος όρος περιγράφει το σχηματισμό μικροθρόμβων ως κομμάτι της ανοσολογικής απόκρισης, προκειμένου αυτοί οι μικροθρόμβοι να παγιδεύσουν μικροοργανισμούς, περιορίζοντας τη διασπορά τους στον οργανισμό [8]. Ο δεύτερος όρος περιγράφει την αλληλεπίδραση μεταξύ αιμοπεταλίων, λευκοκυττάρων και παραγόντων πήξης σε σημεία αγγειακής φλεγμονής [9]. Μετά το πέρας της ζωής τους, τα αιμοπετάλια απομακρύνονται στο

σπλήνα και το ήπαρ [11]. Την τελευταία δεκαετία, νεότερα δεδομένα υποστηρίζουν την ύπαρξη διαφορετικών υποπληθυσμών αιμοπεταλίων, τα οποία εμφανίζουν δομική ετερογένεια, που σχετίζεται με το μέγεθός τους, την πυκνότητά τους (δηλαδή το ενδοκυττάριο περιεχόμενό τους), το προφίλ της πρωτεϊνικής τους έκφρασης (χαμηλή ή υψηλή ικανότητα σηματοδότησης, καθώς και μικρό ή μεγάλο πλήθος/χαμηλή ή υψηλή πυκνότητα γλυκοπρωτεϊνών στην επιφάνειά τους) και την ηλικία τους (νεαρά ή γηρασμένα αιμοπετάλια) [12].

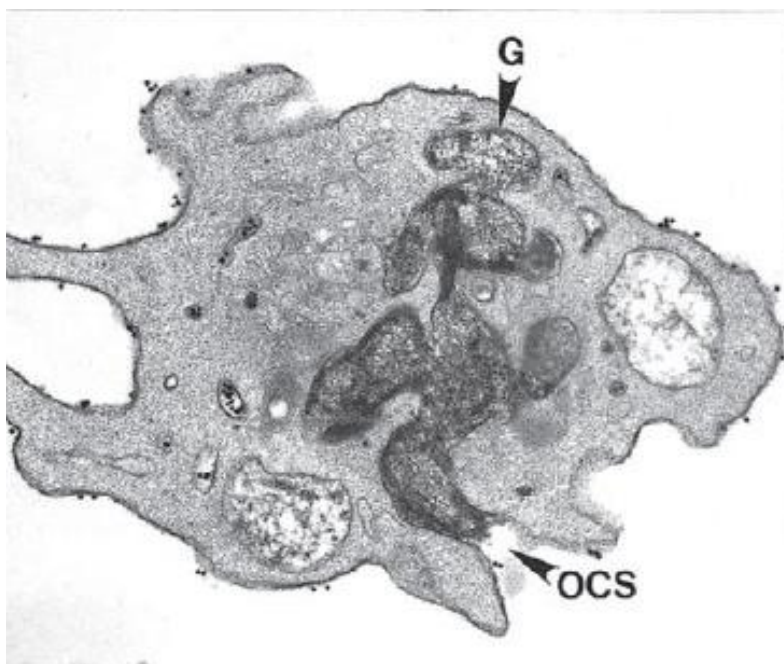
1.1. Δομικά χαρακτηριστικά των αιμοπεταλίων

1.1.1. Κυτταρική μεμβράνη και ανοικτό καναλοειδές σύστημα

Όπως συμβαίνει σε όλα τα κύτταρα, η κυτταρική μεμβράνη των αιμοπεταλίων αποτελείται από μία φωσφολιπιδική διπλοστοιβάδα, η οποία εμπεριέχει μόρια χοληστερόλης, αντλίες Na^+ και Ca^{2+} , γλυκολιπίδια και γλυκοπρωτεΐνες (glycoproteins, GPs). Ορισμένες από αυτές τις GPs, όπως είναι η GPIb-IX-V, είναι υποδοχείς που διευκολύνουν την αιμοπεταλιακή προσκόλληση, συμβάλλουν στην ολοκλήρωση της ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων, προάγουν τη συσώρευση και την αλληλεπίδρασή τους με άλλα κύτταρα και επιταχύνουν τη διαδικασία συρρίκνωσης του θρόμβου. Η κυτταρική μεμβράνη των αιμοπεταλίων παίζει, ακόμη, ρόλο στον καταρράκτη της πήξης. Πράγματι, η ασύμμετρη κατανομή των φωσφολιπιδίων ανάμεσα στην ενδοκυττάρια και την εξωκυττάρια μοίρα της λιπιδικής διπλοστοιβάδας ρυθμίζει την πήξη, καθώς αρνητικά φορτισμένα φωσφολιπίδια, όπως είναι η φωσφατιδυλοσερίνη και η φωσφατιδυλοϊνσιτόλη, διατηρούνται κατά προτίμηση στην ενδοκυττάρια πλευρά της κυτταρικής μεμβράνης, ώστε η επιφάνεια των εν ηρεμία αιμοπεταλίων να μην έχει προπηκτικές ιδιότητες. Στα ενεργοποιημένα αιμοπετάλια όμως, η μετατροπή της προθρομβίνης σε θρομβίνη από το σύμπλοκο των παραγόντων πήξης Xa και Va προϋποθέτει την έκθεση της φωσφατιδυλοσερίνης στην αιμοπεταλιακή επιφάνεια. Ακόμη, ιστικός παράγοντας (tissue factor, TF), ο οποίος πυροδοτεί τον καταρράκτη της πήξης, εντοπίζεται «κρυμμένος» σε λιπιδικές νησίδες πλούσιες σε σφινγγολιπίδια και χοληστερόλη, που ονομάζονται λιπιδικές σχεδίες [13]. Όταν τα αιμοπετάλια ενεργοποιηθούν, ο TF τους εκφράζεται μεμβρανικά και μπορεί να συμβάλει στην πήξη.

Το ανοικτό καναλοειδές σύστημα (open canalicular system, OCS) των αιμοπεταλίων αποτελεί αναπόσπαστο κομμάτι της κυτταρικής μεμβράνης και

συνίσταται σε εγκολπώσεις που φτάνουν έως το εσωτερικό του κυττάρου [14-16]. Τα κανάλια του OCS αποτελούν ελικοειδείς περιπτύξεις κυτταρικής μεμβράνης που διασχίζουν το κυτταρόπλασμα με οφιοειδή τρόπο. Τα κανάλια αυτά επεκτείνουν σε μεγάλο βαθμό τη συνολική κυτταρική επιφάνεια των αιμοπεταλίων [17] και παρέχουν μία οδό ώστε χημικές ουσίες και σωματίδια να φτάνουν έως το βαθύτερο εσωτερικό του κυττάρου [18]. Συνεπώς, το OCS ίσως συνιστά την κύρια οδό πρόσληψης και μεταφοράς προϊόντων, όπως είναι το ινωδογόνο, από το πλάσμα στα α-κοκκία των αιμοπεταλίων [19, 20]. Επιπρόσθετα, διαμέσου των καναλιών αυτών εκκρίνεται το περιεχόμενο των κοκκίων τους κατά την αιμοπεταλιακή ενεργοποίηση [21]. Ακόμη, τα κανάλια του OCS επιτελούν σπουδαίο ρόλο στην αιμόσταση: μετά την προσκόλληση στα σημεία ενδοθηλιακής βλάβης, τα αιμοπετάλια προεκβάλλουν ψευδοπόδια τα οποία προσδένονται ισχυρά στην τραυματισμένη περιοχή, γεγονός που ακολουθείται από την ταχεία συγκρότηση της κυτταροπλασματικής ακτίνης και την εξάπλωση του αιμοπεταλίου προκειμένου να καλύψουν τη μέγιστη δυνατή περιοχή. Το αποτέλεσμα είναι η αύξηση της αιμοπεταλιακής επιφάνειας έως και 420%. Αντιπροσωπευτική απεικόνιση του OCS, ληφθείσα με τη χρήση ηλεκτρονικής μικροσκοπίας, φαίνεται στην Εικόνα 1.

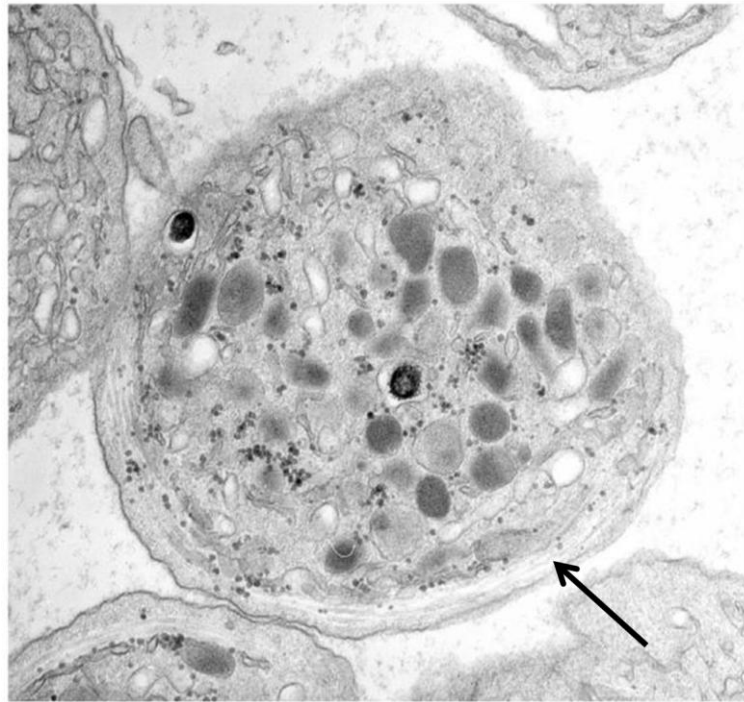


Εικόνα 1. Διακλαδώσεις του OCS σε αιμοπετάλιο που έχει ενεργοποιηθεί με 5 U/mL θρομβίνης. Με G συμβολίζεται ένα α -κοκκίο που έχει συντηχθεί με το OCS και απελευθερώνει το περιεχόμενό του στον εξωκυττάριο χώρο διαμέσου του δεύτερου. Σύντμηση: OCS, ανοικτό καναλοειδές σύστημα.

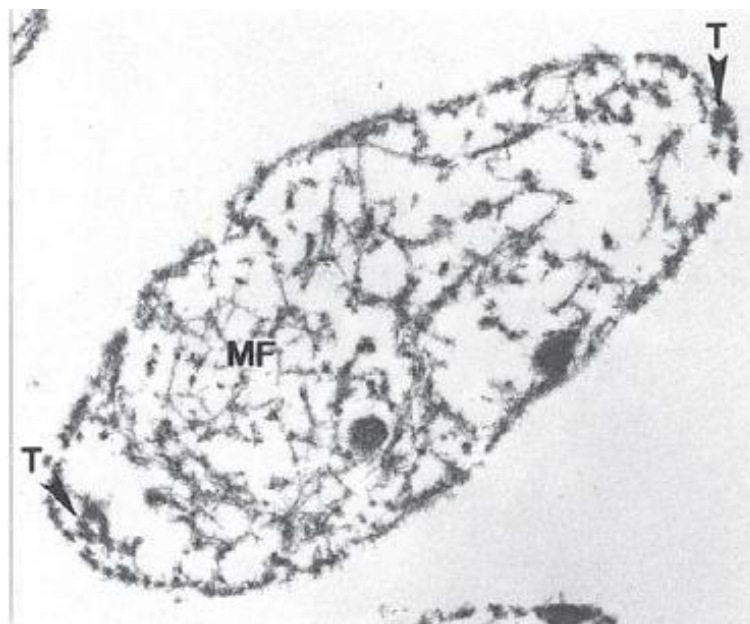
1.1.2. Κυτταροσκελετός

Ο κυτταροσκελετός των αιμοπεταλίων παίζει σπουδαίο ρόλο στην αλλαγή του σχήματός τους και τη μεμβρανική έκφραση των υποδοχέων τους. Ο κυτταροσκελετός των αιμοπεταλίων βοηθάει στη διατήρηση του δισκοειδούς σχήματός τους. Τα δύο μείζονα συστήματα ινιδίων των αιμοπεταλίων είναι το σύστημα των μικροσωληνίσκων και το σύστημα ινιδίων της ακτινομυοσίνης. Το σύστημα των μικροσωληνίσκων επιτελεί υποστηρικτική λειτουργία για το κύτταρο, ενώ το σύστημα της ακτινομυοσίνης εμπλέκεται σε διαδικασίες όπως είναι η αλλαγή σχήματος και η συρρίκνωση του θρόμβου [22]. Η πρωτεΐνη των μικροσωληνίσκων, η οποία υπάρχει πάντα σε πολυμερισμένη μορφή, είναι η τουμπουλίνη [23]. Στα εν ηρεμία αιμοπετάλια, μόλις το 50% των μορίων της ακτίνης βρίσκονται στην πολυμερισμένη μορφή των ινιδίων. Ένα μέρος αυτών συνδέεται με το εσωτερικό της πλασματικής μεμβράνης και αποτελεί το υπομεμβρανικό συσπαστικό κυτταροσκελετό, αλλά το μεγαλύτερο μέρος της πολυμερισμένης ακτίνης αποτελεί τον κυτταροπλασματικό κυτταροσκελετό που στα εν ηρεμία αιμοπετάλια αποτελεί μία βάση επάνω στην οποία επικάθονται και παραμένουν διαχωρισμένα όλα τα

οργανίδια. Κατά την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων, τα πολυμερή ακτίνης του κυτταροπλάσματος «συσφίγγουν» τους μικροσωληνίσκους, με αποτέλεσμα τα πυκνά και τα α-κοκκία να μεταφέρονται στο κέντρο του αιμοπεταλίου και να εκκρίνουν το περιεχόμενό τους διαμέσου των καναλιών του OCS [21, 22, 24]. Αντιπροσωπευτικές απεικονίσεις ηλεκτρονικής μικροσκοπίας των μικροσωληνίσκων, καθώς και του συστήματος της ακτινομυοσίνης, φαίνονται στις Εικόνες 2 και 3, αντίστοιχα.



Εικόνα 2. Φωτογραφία ηλεκτρονικής μικροσκοπίας που απεικονίζει τους μικροσωληνίσκους ενός αιμοπεταλίου (βέλος).



Εικόνα 3. Φωτογραφία ηλεκτρονικής μικροσκοπίας που απεικονίζει το σύστημα ινιδίων της ακτινομυοσίνης σε ένα αιμοπετάλιο. Με MF [microfilaments (μικροϊνίδια)] συμβολίζεται το δίκτυο των ινιδίων που πλαισιώνει το αιμοπετάλιο, ενώ με T (tubules) συμβολίζονται υπολείμματα των μικροσωληνίσκων.

1.1.3. Εκκριτικά κοκκία

Τα αιμοπετάλια εμπεριέχουν τρία διακριτά είδη κοκκίων, τα οποία εκκρίνουν το περιεχόμενό τους κατά την αιμοπεταλιακή ενεργοποίηση: τα α-κοκκία, τα οποία αποτελούν τις κύριες «αποθήκες» πρωτεϊνών των αιμοπεταλίων, τα πυκνά ή δ-κοκκία, ή πυκνά σώματα, τα οποία αποτελούν την κύρια πηγή μικρομοριακών ουσιών και τα λυσοσώματα, τα οποία αποθηκεύουν κυρίως όξινες υδρολάσες [25].

Τα α-κοκκία αποτελούν τον πολυπληθέστερο πληθυσμό κοκκίων των αιμοπεταλίων. Το σχήμα τους είναι σφαιρικό ή οβάλ, ο αριθμός τους εξαρτάται από το μέγεθος του κυττάρου, έχοντας εύρος 40-80 α-κοκκία/αιμοπετάλιο και έχουν διάμετρο 200-500 nm. Στα εν ηρεμία αιμοπετάλια, τα α-κοκκία παραμένουν ξεχωριστά το ένα από το άλλο. Τα α-κοκκία περιέχουν πλήθος πρωτεϊνών (άνω των 300), όπως είναι η Ρ-σελεκτίνη και ο παράγοντας von Willebrand (von Willebrand Factor, vWF), αλλά και πρωτεΐνες που συντίθενται από άλλα κύτταρα και προσλαμβάνονται από τα αιμοπετάλια, όπως είναι το ινωδογόνο. Κατά την αιμοπεταλιακή ενεργοποίηση, η μεμβράνη των α-κοκκίων συντήκεται με την κυτταρική μεμβράνη των αιμοπεταλίων και το περιεχόμενό τους απελευθερώνεται, έτσι, εξωκυττάρια. Μελέτες έχουν αποδείξει ότι τα α-κοκκία δεν αποτελούν έναν

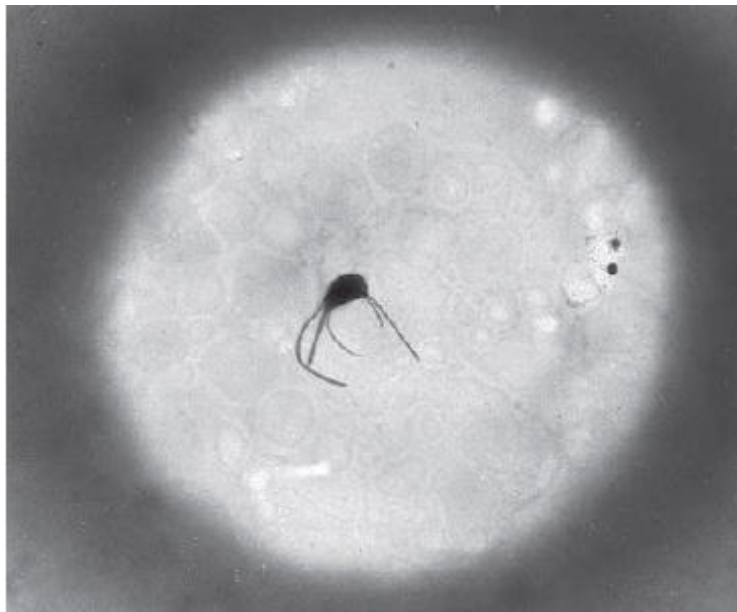
ενιαίο πληθυσμό, αλλά διακριτούς υποπληθυσμούς, οι οποίοι όχι μόνο διαφοροποιούνται ως προς ορισμένες, τουλάχιστον, πρωτεΐνες που φέρουν, αλλά ο κάθε υποπληθυσμός εκκρίνει το περιεχόμενό του εκλεκτικά προς απόκριση σε διαφορετικούς αγωνιστές. Αντιπροσωπευτική φωτογραφία ηλεκτρονικής μικροσκοπίας που απεικονίζει ένα α-κοκκίο στο εσωτερικό ενός αιμοπεταλίου φαίνεται στην Εικόνα 4.

Τα πυκνά κοκκία είναι μικρότερα σε μέγεθος και αριθμητικά λιγότερα από τα α-κοκκία, ενώ εμφανίζουν μεγάλη μορφολογική ετερογένεια [26]. Τα πυκνά κοκκία είναι πλούσια σε διφωσφορική (adenosine diphosphate, ADP) και τριφωσφορική αδενοσίνη (adenosine triphosphate, ATP), σεροτονίνη, πυροφωσφορικό, Ca^{2+} και Mg^{2+} . Τα πυκνά κοκκία παίζουν σπουδαίο ρόλο στην ενίσχυση της αιμοπεταλιακής συσσώρευσης, καθώς περιέχουν ουσίες [ADP, σεροτονίνη ή 5-υδροξυτρυπταμίνη (5-hydroxytryptamine, 5-HT)] που δρουν ως δευτερεύοντες αγωνιστές-ενισχυτές. Αντιπροσωπευτική φωτογραφία ηλεκτρονικής μικροσκοπίας που απεικονίζει ένα πυκνό κοκκίο στο εσωτερικό ενός αιμοπεταλίου φαίνεται στην Εικόνα 5.

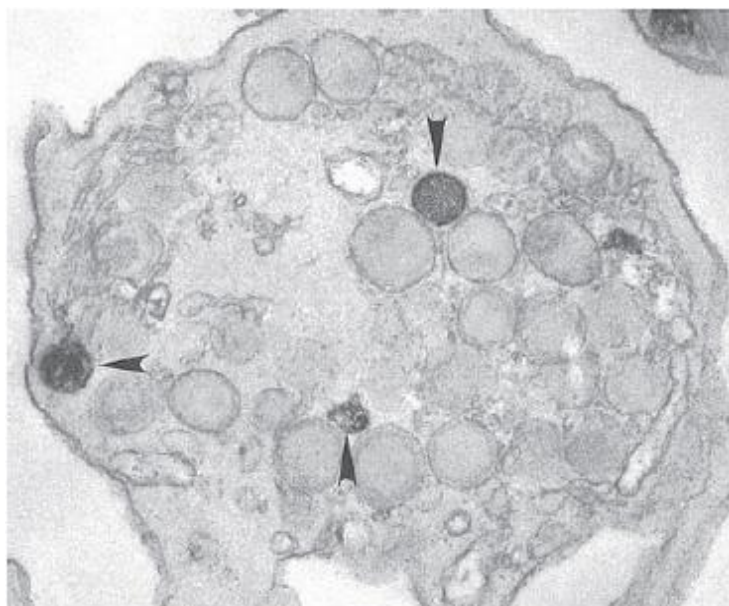
Τα λυσοσώματα είναι σφαιρικά και ελαφρώς μικρότερα από τα α-κοκκία. Τα λυσοσώματα περιέχουν τουλάχιστον 13 όξινες υδρολάσες, μαζί με άλλα μόρια, όπως π.χ. CD63. Ο ρόλος των λυσοσωμάτων στην αιμόσταση δεν έχει διαλευκανθεί. Το περιεχόμενό τους, μαζί με το περιεχόμενο των α- και των πυκνών κοκκίων, μπορεί να εκκριθεί κατά τη μέγιστη ενεργοποίηση *in vitro*, αλλά οι όξινες υδρολάσες ενδέχεται να μην εκκρίνονται σε σημεία αγγειακής βλάβης *in vivo*. Αντιπροσωπευτική φωτογραφία ηλεκτρονικής μικροσκοπίας που απεικονίζει λυσοσώματα στο εσωτερικό ενός αιμοπεταλίου φαίνεται στην Εικόνα 6.



Εικόνα 4. Αντιπροσωπευτική φωτογραφία ηλεκτρονικής μικροσκοπίας που απεικονίζει ένα α-κοκκίο στο εσωτερικό ενός αιμοπεταλίου (βέλος).



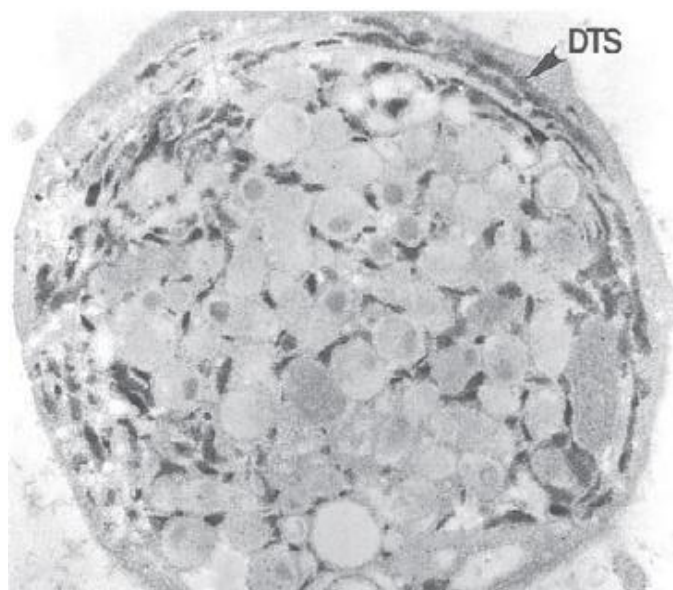
Εικόνα 5. Αντιπροσωπευτική φωτογραφία ηλεκτρονικής μικροσκοπίας που απεικονίζει ένα πυκνό κοκκίο στο εσωτερικό ενός αιμοπεταλίου με πέντε προεκβολές.



Εικόνα 6. Αντιπροσωπευτική φωτογραφία ηλεκτρονικής μικροσκοπίας που απεικονίζει ένα αιμοπετάλιο με τρία λυσοσώματα στο εσωτερικό του (βέλη).

1.1.4. Πυκνό σωληνοειδές σύστημα

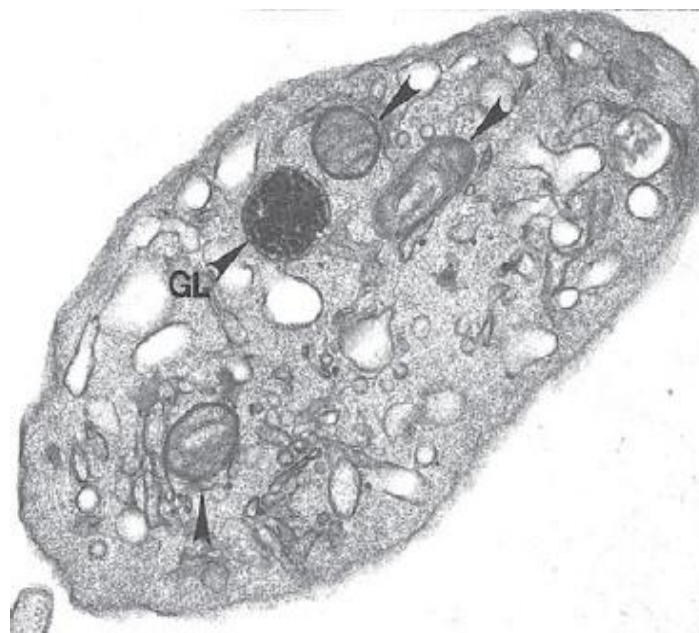
Το πυκνό σωληνοειδές σύστημα (dense tubular system, DTS) αποτελεί το ανάλογο του σαρκοπλασματικού δικτύου στα αιμοπετάλια και συνεπώς την ενδοκυττάρια αποθήκη Ca^{2+} των αιμοπεταλίων, η εισροή των οποίων στο κυτταρόπλασμα και η άνοδος της συγκέντρωσής τους είναι κρίσιμης σημασίας στην αιμοπεταλιακή ενεργοποίηση, καθώς, όπως και στα υπόλοιπα κύτταρα, λειτουργούν ως δεύτεροι αγγελιοφόροι της αιμοπεταλιακής σηματοδότησης. Όπως συμβαίνει και με το OCS, τα κανάλια του DTS είναι τυχαία διασκορπισμένα στο αιμοπεταλιακό κυτταρόπλασμα. Επιπροσθέτως, 1 ή 2 κανάλια του DTS κάθε αιμοπεταλίου συνήθως βρίσκονται στενά συνδεδεμένα με τους μικροσωληνίσκους. Το DTS προκύπτει από το αδρό ενδοπλασματικό δίκτυο των μεγακαρυοκυττάρων και αποτελεί, συνεπώς, λείο ενδοπλασματικό δίκτυο. Μεταξύ του OCS και του DTS δεν υπάρχει καμία επικοινωνία. Συνεπώς, τα αιμοπετάλια φέρουν 2 διακριτά συστήματα ενδοκυττάρων δικτύων: το OCS, που προκύπτει από την κυτταρική μεμβράνη των μεγακαρυοκυττάρων και το DTS, που αποτελεί κατάλοιπο του λείου ενδοπλασματικού δικτύου του γονικού κυττάρου. Αντιπροσωπευτική φωτογραφία ηλεκτρονικής μικροσκοπίας που απεικονίζει το DTS φαίνεται στην Εικόνα 7.



Εικόνα 7. Αντιπροσωπευτική φωτογραφία ηλεκτρονικής μικροσκοπίας που απεικονίζει το δίκτυο του DTS σε ένα αιμοπετάλιο. Σύντμηση: DTS, πυκνό σωληνοειδές σύστημα.

1.1.5. Μιτοχόνδρια

Τα μιτοχόνδρια των αιμοπεταλίων είναι αριθμητικά λίγα και δομικά απλά. Τα αιμοπεταλιακά μιτοχόνδρια είναι σε θέση να υποστηρίζουν μόνα τους τις ενεργειακές απαιτήσεις του κυττάρου, καθώς η αναστολή της αναερόβιας γλυκόλυσης δεν προκαλεί πτώση της ενδοκυττάριας συγκέντρωσης του ATP, ούτε παρεμποδίζει τη φυσιολογική αιμοπεταλιακή λειτουργία. Κατά την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων, η ηλεκτρονιακή πυκνότητα των μιτοχονδρίων αυξάνεται, γεγονός που υποδηλώνει τη μεταβολή της ενεργειακής τους κατάστασης. Αντιπροσωπευτική φωτογραφία ηλεκτρονικής μικροσκοπίας που απεικονίζει μιτοχόνδρια στο εσωτερικό ενός αιμοπεταλίου φαίνεται στην Εικόνα 8.



Εικόνα 8. Αντιπροσωπευτική φωτογραφία ηλεκτρονικής μικροσκοπίας που απεικονίζει 2 μιτοχόνδρια στο εσωτερικό ενός αιμοπεταλίου (βέλη). Ακόμη, παρατηρείται ένα γλυκόσωμα (glycosome), που συμβολίζεται με GL.

1.1.6. Γλυκογόνο και γλυκοσώματα

Το κυτταρόπλασμα των αιμοπεταλίων είναι πλούσιο σε γλυκογόνο. Μεμονωμένα σωματίδια, ή μάζες σωματιδίων γλυκογόνου εμφανίζονται τυχαία καταναμεμημένα στο κυτταρόπλασμα και οι μάζες αυτές συχνά περιέχουν μεμβρανικά τμήματα, τα οποία απομονώνουν ένα μέρος των σωματιδίων γλυκογόνου από άλλα. Το γεγονός αυτό προτείνει έναν τρόπο σχηματισμού των αιμοπεταλιακών γλυκοσωμάτων [27]. Τα γλυκοσώματα των αιμοπεταλίων είναι σφαιρικά ή οβάλ και παρόμοια σε μέγεθος με τα α-κοκκία, ή άλλα αιμοπεταλιακά οργανίδια. Τα γλυκοσώματα περιβάλλονται από μεμβράνη και περικλείουν σωματίδια γλυκογόνου ίδια με τα τυχαίως καταναμεμημένα μεμονωμένα σωματίδια ή τις μάζες σωματιδίων γλυκογόνου. Αντιπροσωπευτική φωτογραφία ηλεκτρονικής μικροσκοπίας που απεικονίζει μία μάζα γλυκογόνου στο εσωτερικό ενός αιμοπεταλίου, καθώς και περιοχές που περικλείονται εντός της μάζας και αποτελούν πιθανότατα πρώιμες μορφές γλυκοσωμάτων φαίνεται στην Εικόνα 9.



Εικόνα 9. Αντιπροσωπευτική φωτογραφία ηλεκτρονικής μικροσκοπίας που απεικονίζει τη συσσώρευση γλυκογόνου στο εσωτερικό ενός αιμοπεταλίου [συμβολίζεται με GL (glycogen)]. Οι περιοχές που περικλείονται εντός της περιοχής συσσώρευσης πιθανότατα αποτελούν πρώιμες μορφές γλυκοσωμάτων.

1.1.7. Καταληκτικά

Προηγμένες τεχνικές, όπως είναι η κρυο-ηλεκτρονική μικροσκοπία, έχουν επιτρέψει την απεικόνιση της τρισδιάστατης δομής ενός κυττάρου υπό συνθήκες που προσομοιάζουν τις φυσιολογικές, σε αντίθεση με τη συμβατική ηλεκτρονική μικροσκοπία, με την οποία πραγματοποιείται καταστρεπτική ανάλυση του δείγματος [28]. Κατ' αυτόν τον τρόπο, μπορούν να μελετηθούν οι κυτταροσκελετικές μεταβολές που λαμβάνουν χώρα κατά την ενεργοποίηση κυττάρων, όπως είναι τα αιμοπετάλια [28]. Άλλη μία τεχνική, η μικροσκοπία ατομικής δύναμης, μπορεί να λειτουργήσει αλληλοσυμπληρωματικά με την κρυο-ηλεκτρονική μικροσκοπία και να παράσχει πληροφορίες σχετικά με τις μηχανικές ιδιότητες των αιμοπεταλίων, αλλά και άλλων κυττάρων [28].

1.2. Αγωνιστές των αιμοπεταλίων, υποδοχείς και μεταγωγή σήματος

Όπως προαναφέρθηκε, τα αιμοπετάλια, όπως όλα τα κύτταρα, διεγείρονται με τη δράση διαφόρων αγωνιστών, οι οποίοι επάγουν κυτταρικές μεταβολές διαμέσου των αντίστοιχων υποδοχέων τους. Ανάλογα με την ισχύ τους, οι αγωνιστές μπορούν

να διακριθούν σε πρωτεύοντες ή ισχυρούς και σε δευτερεύοντες ή ασθενείς αγωνιστές. Τους πρωτεύοντες ή ισχυρούς αγωνιστές απαρτίζουν το κολλαγόνο, η θρομβίνη και το θρομβοξανίο A_2 (thromboxane A_2 , TxA_2), ενώ τους δευτερεύοντες ή ασθενείς αγωνιστές απαρτίζουν το ADP, η σεροτονίνη και η επινεφρίνη (αδρεναλίνη). Ενώ το ADP αποτελεί ασθενή αγωνιστή *in vivo* και στερείται της ικανότητας να επάγει πλήρη και μη αντιστρεπτή συσώρευση από μόνο του, υπό τεχνητές, *in vitro* συνθήκες, στις οποίες χρησιμοποιούνται ρυθμιστικά διαλύματα κιτρικών ιόντων ως αντιπηκτικά, τα οποία ελαττώνουν τεχνητά τη συγκέντρωση των Ca^{2+} , θα έπρεπε να αναμένουμε μη αντιστρεπτή συσώρευση, επαγόμενη από το ADP, σε συγκεντρώσεις άνω των 10 μM . Στην Εικόνα 10 απεικονίζονται οι κυριότεροι υποδοχείς των αιμοπεταλίων, με τους αγωνιστές τους.

1.2.1. Κολλαγόνο

Οι διάφοροι τύποι κολλαγόνου αποτελούν τις πολυπληθέστερες πρωτεΐνες του υπενδοθηλιακού χώρου (20-40% των συνολικών πρωτεϊνών της αορτής). Το κολλαγόνο, εκτός του ότι προσδίδει μηχανική αντοχή στο αγγειακό τοίχωμα, είναι απαραίτητο για την αιμοπεταλιακή πρόσδεση και το συνεπακόλουθο σχηματισμό του θρόμβου. Παρ' όλο που τα αιμοπετάλια φέρουν πολλούς υποδοχείς κολλαγόνου, η ιντεγκρίνη $\alpha_2\beta_1$ και η GPVI θεωρούνται οι πιο σημαντικοί [29].

Η GPVI συνιστά μία διαμεμβρανική πρωτεΐνη με μοριακό βάρος 63 kDa, που απαρτίζεται από δύο εξωκυττάρειες επικράτειες ανοσοσφαιρινικού τύπου, οι οποίες συνδέονται με ένα γλυκοζυλιωμένο συνδέτη, μία διαμεμβρανική επικράτεια και μία κυτταροπλασματική ουρά. Η GPVI εκφράζεται αποκλειστικά στα αιμοπετάλια και τα μεγακαρυοκύτταρα, όπου συνδέεται με τη διαμεμβρανική πρωτεΐνη-προσαρμοστή $FcR\gamma$. Η μεμβρανική έκφραση της GPVI εξαρτάται από τη σταθερότητα της $FcR\gamma$, που επιτυγχάνεται διαμέσου μία γέφυρας άλατος ανάμεσα στο κατάλοιπο R^{272} της διαμεμβρανικής επικράτειας της GPVI και σε κατάλοιπα ασπαραγινικού οξέος της $FcR\gamma$. Η αλυσίδα α_2 της $\alpha_2\beta_1$ έχει μοριακό βάρος 150 kDa, ενώ η αλυσίδα β_1 έχει μοριακό βάρος 130 kDa. Η αρχική πρόσδεση των αιμοπεταλίων στο κολλαγόνο είναι ασθενής και πραγματοποιείται διαμέσου της GPVI, ενώ ισχυρότερη πρόσδεση πραγματοποιείται διαμέσου της $\alpha_2\beta_1$, ύστερα από ρύθμιση με «από τα μέσα προς τα έξω σηματοδότηση».

1.2.2. Θρομβίνη

Η θρομβίνη θεωρείται ο ισχυρότερος αιμοπεταλιακός αγωνιστής εδώ και δεκαετίες [30], αλλά ο υποδοχέας ή οι υποδοχείς διαμέσου των οποίων δρα δεν ήταν γνωστοί. Το 1991, τα κομψά πειράματα του S. R. Coughlin και των συνεργατών του οδήγησαν στην ταυτοποίηση του πρώτου υποδοχέα της θρομβίνης [31]. Διαπιστώθηκε ότι ο υποδοχέας αυτός ανήκει στους υποδοχείς που συζευγνύονται με πρωτεΐνες G (G protein-coupled receptors, GPCRs) και ότι μπορεί να ενεργοποιηθεί από υπονανομοριακές συγκεντρώσεις θρομβίνης, διαμέσου ενός μηχανισμού που είναι μοναδικός στη φύση: η θρομβίνη δεν προσδένεται στον υποδοχέα, αλλά καταλύει την υδρόλυση του πεπτιδικού δεσμού ανάμεσα στα αμινοξικά κατάλοιπα R⁴¹ και S⁴² του N-τελικού άκρου του, με αποτέλεσμα να προκύπτει ένα νέο N-τελικό άκρο, το οποίο ξεκινάει πλέον με την αλληλουχία S⁴²FLLRN... . Το νέο άκρο λειτουργεί ως «ενσωματωμένο πρόσδεμα», στρέφεται προς τον υποδοχέα και τον ενεργοποιεί [31]. Λόγω αυτού του ιδιαίτερου μηχανισμού «αυτενεργοποίησης», συνθετικά, εξωγενώς προστιθέμενα πεπτίδια που ξεκινούν με την αλληλουχία SFLRN... (ή παραλλαγές της, ύστερα από σημειακές αντικαταστάσεις ή απαλοιφές αμινοξέων) μπορούν να αντικαταστήσουν τη θρομβίνη και να δράσουν όχι μόνο ως αγωνιστές, αλλά και ως ανταγωνιστές. Πράγματι, τέτοια συνθετικά πεπτίδια έχουν χρησιμοποιηθεί κατά κόρον σε πολυάριθμες μελέτες και έχουν παράσχει ανεκτίμητες πληροφορίες ως προς τον τρόπο συμπεριφοράς του υποδοχέα ή/και των κυτταρικών δράσεων που συνεπάγεται η ενεργοποίησή του. Επειδή εκτός της θρομβίνης ο υποδοχέας αυτός ενεργοποιείται και από άλλες (σερινο)πρωτεάσες, ονομάστηκε υποδοχέας ενεργοποιούμενος από πρωτεάσες (protease-activated receptor, PAR) -1.

Στα χρόνια που ακολούθησαν, ανακαλύφθηκαν άλλοι τρεις PARs, που ονομάστηκαν με τη σειρά τους PAR-2 [32], -3 [33] και -4 [34, 35]. Παρ' όλο που, όπως στην περίπτωση του PAR-1, όλοι αυτοί οι υποδοχείς ενεργοποιούνται από σειρά πρωτεασών [36], ο PAR-2 ενεργοποιείται κυρίως από θρυψίνη, ο PAR-3 κυρίως από θρομβίνη, ενώ ο PAR-4 ενεργοποιείται ισάξια από θρομβίνη και θρυψίνη. Και οι τέσσερεις PARs μοιράζονται πρακτικά σε όλα τα κύτταρα των θηλαστικών και η ενεργοποίησή τους συνεπάγεται πλήθος κυτταρικών δράσεων.

Τα ανθρώπινα αιμοπετάλια εκφράζουν στην επιφάνειά τους τους PAR-1 και -4 [37]. Ο PAR-1 εμφανίζει μεγαλύτερη συγγένεια για τη θρομβίνη συγκριτικά με τον PAR-4 εξ' αιτίας μίας περιοχής του που δεσμεύει ισχυρά τη θρομβίνη και ονομάζεται

«επικράτεια ομοιάζουσα της ιρουδίνης», την ...K⁵¹YEPF⁵⁵..., και ενός ανιοντικού συμπλέγματος, του ...E⁵⁷DEE⁶⁰... [38]. Παρόμοιες επικράτειες εμφανίζει και ο PAR-4, προκειμένου να συγκρατεί τη θρομβίνη κατά τη διάρκεια της πρωτεόλυσης: ένα ανιοντικό σύμπλεγμα και ένα ζεύγος προλινών. Οι δύο υποδοχείς συμπλέκονται με πρωτεΐνες G_{12/13} και G_q, χωρίς να έχει επιβεβαιωθεί η σύζευξή τους με πρωτεΐνες G_i. Εργαστηριακά ευρήματα προτείνουν ότι η θρομβίνη προκαλεί την έκφραση των δύο υποδοχέων ως ετεροδιμερή [39, 40] και η δομική αυτή σχέση εξυπηρετεί τη λειτουργία τους και την ορθή απόκριση στη θρομβίνη από τα αιμοπετάλια: όταν η θρομβίνη προσδεθεί στον PAR-1 και τον αποκόψει δεν αποχωρεί αμέσως, αλλά παραμένει προσδεδεμένη για αρκετό χρόνο ώστε να αποκόψει το γειτονικό PAR-4 του ετεροδιμερούς, όντας προσδεδεμένη στον PAR-1. Με άλλα λόγια, ο PAR-1 δρα ως συμπαράγοντας στην πρωτεόλυση που υφίσταται ο PAR-4.

1.2.3. TxA₂

Το TxA₂, εκτός από ισχυρό αιμοπεταλιακό αγωνιστή, αποτελεί και αγγειοσυσταλτικό παράγοντα. Το TxA₂ προκύπτει όταν κατά την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων απελευθερωθεί αραχιδονικό οξύ (arachidonic acid, AA) από τα φωσφολιπίδια της κυτταρικής μεμβράνης, διαμέσου της δράσης μίας ασβεστιο-εξαρτώμενης κυτοσολικής φωσφολιπάσης A₂. Το ένζυμο κυκλοοξυγονάση-1 (cyclooxygenase-1, COX-1) καταλύει τη μετατροπή του AA στα ενδοϋπεροξειδία των προσταγλανδινών (prostaglandin, PG) G₂/H₂ (PGG₂/H₂), τα οποία στη συνέχεια μετατρέπονται σε PGI₂ (προστακυκλίνη) και PGE₂ κυρίως στα ενδοθηλιακά κύτταρα και σε TxA₂ στα αιμοπετάλια, διαμέσου των αντίστοιχων συνθασών. Αμέσως μετά, το TxA₂ απελευθερώνεται από τα αιμοπετάλια και προσδένεται στον υποδοχέα του, TPα, ενισχύοντας την ενεργοποίησή τους με αυτοκρινή και παρακρινή τρόπο. Δηλαδή, το TxA₂ δρα ως παράγοντας θετικής ανάδρασης της αιμοπεταλιακής ενεργοποίησης, αλλά η δράση του περιορίζεται τοπικά λόγω του μικρού χρόνου ζωής του στο πλάσμα. Οι ανθρώπινοι υποδοχείς TP απαντούν σε δύο ισομορφές, τις TPα και TPβ, οι οποίοι διαφέρουν ως προς το ενδοκυττάριο C-τελικό άκρο τους και προκύπτουν από εναλλακτικό μάτισμα. Αν και τα αιμοπετάλια φέρουν mRNA και για τους 2 υποδοχείς, μόνο ο TPα εκφράζεται σε αυτά, ενώ ο TPβ εκφράζεται στα ενδοθηλιακά κύτταρα. Οι TP ανήκουν στην υπεροικογένεια των GPCRs και μετάγουν σήμα διαμέσου πρωτεϊνών που περιλαμβάνουν τις G_{12/13} και G_q.

1.2.4. ADP

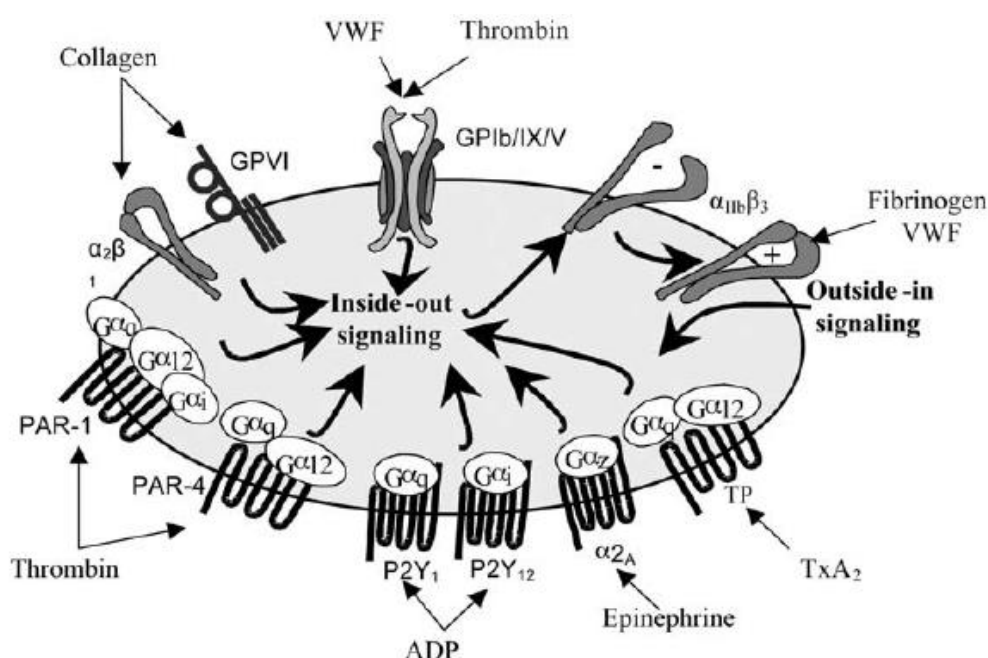
Ένας από τους σημαντικότερους αγωνιστές των αιμοπεταλίων είναι ο δινουκλεοτιδικός αγωνιστής ADP. Αν και πρόκειται για ασθενή αγωνιστή, η σημασία του έγκειται στο γεγονός ότι ενισχύει και σταθεροποιεί τη συσσώρευση που επάγεται από άλλους αγωνιστές, όπως είναι η θρομβίνη. Η δράση του ADP διαμεσολαβείται στα αιμοπετάλια από τους πουρινεργικούς υποδοχείς $P2Y_1$ και $P2Y_{12}$ [41-43], οι οποίοι ανήκουν στους GPCRs. Εξ' αυτών των υποδοχέων, ο $P2Y_1$ συζευγνύεται με πρωτεΐνες G_q , ενώ ο $P2Y_{12}$ συζευγνύεται με πρωτεΐνες G_i . Η πρόσδεση του ADP στον $P2Y_1$ συνεπάγεται την αλλαγή σχήματος και την έναρξη της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων, ενώ η πρόσδεση στον $P2Y_{12}$ συνεπάγεται την ενίσχυση της συσσώρευσης, την καθιστά μη αντιστρεπτή, ενώ ταυτόχρονα οδηγεί στην έκκριση των αιμοπεταλίων [44-46]. Συνεπώς, η αποτελεσματική ενεργοποίηση διαμέσου του ADP προϋποθέτει τη σύγχρονη ενεργοποίηση και των δύο παραπάνω υποδοχέων.

Το γονίδιο που κωδικοποιεί τον $P2Y_{12}$ εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 3q21-q25 [47]. Ο ανθρώπινος $P2Y_{12}$ αποτελείται από 342 αμινοξικά κατάλοιπα, συμπεριλαμβανομένων 4 κυστεϊνικών καταλοίπων που βρίσκονται στην εξωκυττάρια μοίρα του υποδοχέα. 2 από αυτά τα κατάλοιπα, τα C^{97} και C^{175} , σχηματίζουν δισουλφιδική γέφυρα και είναι σημαντικά για την έκφραση του υποδοχέα. 2 πιθανές θέσεις *N*-γλυκοζυλίωσης στο εξωκυττάριο *N*-τελικό άκρο τους ενδέχεται να μεταβάλλουν τη δραστηριότητά του [48]. Οι $P2Y_{12}$ εκφράζονται κυρίως ως ομο-ολιγομερή που εδράζονται σε λιπιδικές σχεδίες. Η θεραπεία με τον ενεργό μεταβολίτη του αντιαιμοπεταλιακού φαρμάκου κλοπιδογρέλη (βλ. παρακάτω) καταστρέφει αυτόν τον ομο-ολιγομερισμό, με συνέπεια να προκύπτουν μη λειτουργικά μονομερή και διμερή του υποδοχέα, που εκτοπίζονται από τις λιπιδικές σχεδίες [49]. Πρόσφατα, επιλύθηκε η τρισδιάστατη δομή των $P2Y_1$ και $P2Y_{12}$, σε σύζευξη με αγωνιστές και ανταγωνιστές, αποκαλύπτοντας πολλά δομικά χαρακτηριστικά και συμπεριφορές των υποδοχέων αυτών, υπό συνθήκες παρουσίας του προσδέματος [50-52]. Η δομή του $P2Y_{12}$ εμφανίζει διαφορές από τους άλλους υποδοχείς με 7 διαμεμβρανικές έλικες. Ο $P2Y_{12}$ έχει δύο διαθέσιμες θήκες πρόσδεσης, γεγονός που σημαίνει πως μπορεί να προσδένει δύο προσδέματα ταυτόχρονα [53]. Δεδομένα προσομοίωσης υποδεικνύουν ότι οι ενεργοί μεταβολίτες των φαρμάκων πιθανώς καταλαμβάνουν τη δεύτερη θήκη, δρώντας ως αλλοστερικοί

ρυθμιστές του υποδοχέα. Αυτή η αλλοστερική πρόσδεση μπορεί να πραγματοποιηθεί και από τον αγωνιστή ADP.

1.2.5. Σεροτονίνη και επινεφρίνη

Εκτός από το ADP, η σεροτονίνη και η επινεφρίνη αποτελούν ακόμη 2 δευτερεύοντες αγωνιστές που δρουν αυτοκρινώς και παρακρινώς προκειμένου να ενισχύσουν τη δράση των πρωτεύοντων αγωνιστών. Η σεροτονίνη, όπως και το ADP, αποτελεί άφθονο συστατικό των πυκνών κοκκίων των αιμοπεταλίων και, όπως προαναφέρθηκε, εκκρίνεται κατά την ενεργοποίησή τους. Οι υποδοχείς της σεροτονίνης και της επινεφρίνης στα αιμοπετάλια είναι οι 5-HT_{2A} και α_{2A}-αδρενεργικός υποδοχέας, αντίστοιχα.



Εικόνα 10. Οι κυριότεροι υποδοχείς των αιμοπεταλίων και οι αγωνιστές τους. Συντμήσεις: ADP, διφωσφορική αδενοσίνη. GP, γλυκοπρωτεΐνη. PAR, υποδοχείς ενεργοποιούμενοι από πρωτεάσες. TP, υποδοχείς TxA₂. TxA₂, θρομβοξανίνο A₂. VWF, παράγοντας von Willebrand.

1.3. Αλληλουχία γεγονότων στη συσσώρευση των αιμοπεταλίων και το σχηματισμό του θρόμβου

Στο φλεβικό σύστημα, η βραδεία αιματική ροή και η στάση που παρατηρείται, οδηγούν στην υψηλή τοπική συγκέντρωση ενεργοποιημένων παραγόντων πήξης και

την παραγωγή θρομβίνης, χωρίς σημαντική συνεισφορά από τα αιμοπετάλια. Ενώ λοιπόν οι φλεβικοί θρόμβοι περιέχουν αιμοπετάλια, το κύριο κυτταρικό συστατικό τους είναι παγιδευμένα ερυθροκύτταρα, γεγονός που τους δίνει και το όνομα «ερυθροί θρόμβοι» [1]. Αντίθετα, η ταχύτερη αιματική ροή των αρτηριών δεν επιτρέπει την τοπική συσσώρευση παραγόντων πήξης και το σχηματισμό του ινώδους απουσία αιμοπεταλίων. Συνεπώς, η αιμόσταση στην αρτηριακή κυκλοφορία προϋποθέτει την επιτάχυνση της ενεργοποίησης της προθρομβίνης από τα αιμοπετάλια, τη δημιουργία ενός φυσικού φραγμού από τα τελευταία και την παροχή της βάσης επάνω στην οποία συγκεντρώνεται το ινώδες. Οι αιμοστατικοί θρόμβοι που σχηματίζονται στο αρτηριακό σύστημα είναι πλούσιοι σε αιμοπετάλια και ινώδες και είναι διαφορετικοί εμφανισιακά από τους ερυθρούς θρόμβους, γεγονός που τους δίνει το όνομα «λευκοί θρόμβοι» [1].

Τα αιμοπετάλια κινούνται περιμετρικά του αυλού των αγγείων, ούτως ώστε να ανιχνεύουν ασυνέχειες του ενδοθηλίου και να αποκρίνονται ασκώντας την αιμοστατική τους λειτουργία. Είναι σημαντικό, μετά το σχηματισμό του θρόμβου να συρρικνώνεται ο θρόμβος για να μην υπάρχουν παρενέργειες. Η θρόμβωση αποκλίνει από τη φυσιολογική αιμόσταση, όταν πραγματοποιείται ανεξέλεγκτος σχηματισμός του θρόμβου. Η ρήξη ή η διάβρωση της αθηρωματικής πλάκας έχει ως αποτέλεσμα την έκθεση στον αυλό του αγγείου στοιχείων του υπενδοθηλιακού χώρου, όπως είναι το κολλαγόνο και την προσκόλληση των αιμοπεταλίων, είτε απ' ευθείας στο κολλαγόνο, υπό συνθήκες χαμηλών διατμητικών τάσεων, είτε στο vWF αρχικά, υπό συνθήκες υψηλότερων διατμητικών τάσεων, ώστε να υποβοηθηθεί ακολούθως η προσκόλλησή τους στο κολλαγόνο. Ο σχηματισμός θρόμβων έχει ως συνέπεια την εμφάνιση των κλινικών εκφάνσεων της καρδιαγγειακής νόσου (cardiovascular disease, CVD), όπως είναι το έμφραγμα του μυοκαρδίου (myocardial infarction, MI), το ισχαιμικό αγγειακό εγκεφαλικό επεισόδιο και η περιφερική αρτηριακή νόσος (peripheral arterial disease, PAD).

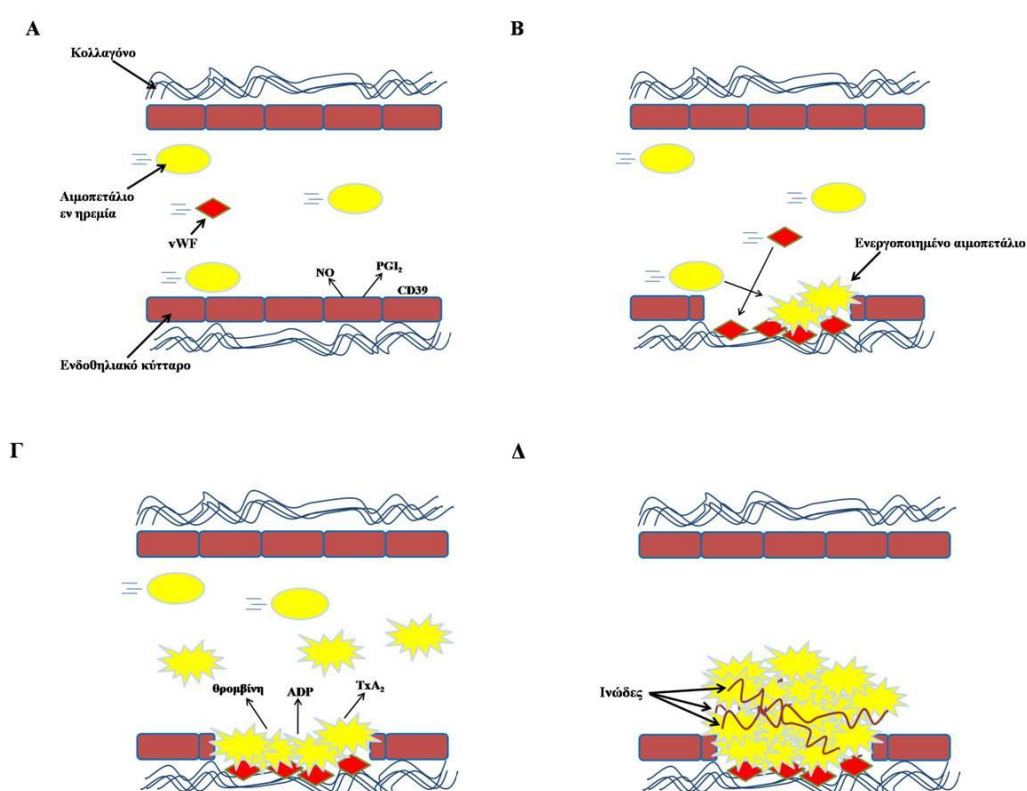
Τόσο ο υποδοχέας GPIIb-IIIa, όσο και ο $\alpha_{IIb}\beta_3$, μπορούν να μετατοπίζονται κατά μήκος της κυτταρικής επιφάνειας, ένα χαρακτηριστικό ιδιαίτερης αξίας για την αποτελεσματική έναρξη σχηματισμού του θρόμβου, καθώς έτσι το αιμοπετάλιο μπορεί να εστιάζει «κατά βούληση» προς την κατεύθυνση του vWF και του κολλαγόνου ώστε να αγκυροβοληθεί ταχέως και ορθώς.

Μία πρόσφατη μελέτη απέδειξε η απώλεια πρωτεϊνών του πλάσματος συνεχίζεται ακόμη και μετά το σχηματισμό του αιμοστατικού θρόμβου και αφού

σταματήσει η απώλεια ερυθροκυττάρων [54]. Ακόμη, στην ίδια μελέτη φάνηκε ότι η αναστολή αυτής της πρωτεϊνικής απώλειας πραγματοποιείται από τη συσσώρευση των αιμοπεταλίων και όχι από το σχηματισμό του ινώδους [54].

Τα βήματα που οδηγούν στο σχηματισμό ενός σταθεροποιημένου αιμοπεταλιακού συσσωρεύματος και, τελικά, στο σχηματισμό του θρόμβου, μπορούν να διακριθούν σε τρεις επιμέρους φάσεις: (1) τη φάση της έναρξης, (2) τη φάση της διάδοσης και (3) τη φάση της σταθεροποίησης. Η φάση της έναρξης προκύπτει όταν τα αιμοπετάλια προσκολληθούν και ενεργοποιηθούν από συμπλέγματα κολλαγόνου/vWF, εντός του τραυματισμένου αγγειακού τοιχώματος. Στη φάση αυτή δημιουργείται μία αιμοπεταλιακή μονοστοιβάδα, η οποία αποτελεί τη βάση για την πρόσδεση ολοένα και περισσότερων αιμοπεταλίων σε αυτήν, αλλά και μεταξύ τους. Η φάση της διάδοσης προκύπτει όταν επιπρόσθετα αιμοπετάλια προσκολλώνται στην αρχική μονοστοιβάδα και ενεργοποιούνται. Στη φάση αυτή παίζουν σπουδαίο ρόλο οι αγωνιστές θρομβίνη, ADP και TxA_2 , οι οποίοι, διαμέσου της σηματοδότησής τους ενεργοποιούν τελικώς την ιντεγκρίνη $\alpha_{IIb}\beta_3$, προκειμένου να συνενωθούν τα αιμοπετάλια μεταξύ τους διαμέσου γεφυρών ινωδογόνου. Στη φάση της σταθεροποίησης πραγματοποιείται μετατροπή του ινωδογόνου σε ινώδες, διαμέσου της δράσης της θρομβίνης (Εικόνα 11). Παρ' όλα αυτά, η διάκριση της διαδικασίας της συσσώρευσης και του σχηματισμού του θρόμβου στις 3 παραπάνω φάσεις δεν είναι απόλυτη, καθώς στην πραγματικότητα παρατηρείται χωροχρονική διαφοροποίηση στην ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων. Ακόμη, δεν ενεργοποιούνται όλα τα αιμοπετάλια στον ίδιο βαθμό. Μάλιστα, μελέτες στις οποίες μετρήθηκε η μεμβρανική έκφραση της P-σελεκτίνης σε μοντέλο αιμόστασης ποντικού, έχουν υποδείξει ότι πιθανώς υπάρχουν τρεις διακριτές ζώνες διαφορετικής ενεργοποίησης εντός του θρόμβου, με τα πιο ισχυρώς ενεργοποιημένα αιμοπετάλια να βρίσκονται στον πυρήνα του θρόμβου, τα μετρίως ενεργοποιημένα αιμοπετάλια να βρίσκονται στην αμέσως επόμενη ζώνη του θρόμβου και τέλος τα ασθενώς ενεργοποιημένα αιμοπετάλια να ανιχνεύονται στην εξωτερική στοιβάδα του θρόμβου. Τέλος, το μέγεθος των αιμοπεταλίων παίζει ρόλο στο βαθμό ενεργοποίησής τους. Τα αιμοπετάλια, ως κυτταροπλασματικά θραύσματα, εμφανίζουν ανομοιογένεια ως προς το μέγεθός τους. Μεγαλύτερα σε μέγεθος αιμοπετάλια είναι πιο επιρρεπή σε ενεργοποίηση, έχουν μεγαλύτερο προθρομβωτικό δυναμικό και παρουσιάζουν μεγαλύτερη αντίσταση στην αναστολή από τα αντιαιμοπεταλιακά φάρμακα, ασπιρίνη και κλοπιδογρέλη [1]. Τα μεγαλύτερα αιμοπετάλια θεωρούνται άωρα και η αύξηση του πληθυσμού τους

οφείλεται σε παράγοντες που επηρεάζουν την αιμοπεταλιακή ανακύκλωση. Πρόσφατες μελέτες προτείνουν ότι η αύξηση του MPV συσχετίζεται με αυξημένο κίνδυνο MI και εν τω βάθει φλεβικής θρόμβωσης (deep vein thrombosis, DVT) [1]. Ακόμη, μία μετα-ανάλυση προτείνει ότι ο MPV είναι ένας χρήσιμος προγνωστικός δείκτης καρδιαγγειακής νόσου (cardiovascular disease, CVD) [1]. Πράγματι, ο MPV ήταν στατιστικά σημαντικά αυξημένος σε ασθενείς με οξύ MI (acute MI, AMI) ή σε ασθενείς που υποβλήθηκαν σε στεφανιαία αγγειοπλαστική [55], ενώ ταυτοποιήθηκε ακόμη ως δείκτης πρόβλεψης θρομβοεμβολικής νόσου (venous thromboembolism, VTE), ειδικά VTE αγνώστου αιτιολογίας [56].



Εικόνα 11. Οι φάσεις σχηματισμού ενός θρόμβου. **Α.** Ακέραιο ενδοθήλιο. Τα ενδοθηλιακά κύτταρα εκκρίνουν NO, PGI₂, την ADPάση CD39 και σχηματίζουν φυσικό φραγμό που αποτρέπει την επαφή των αιμοπεταλίων με τον υπενδοθηλιακό χώρο. **Β.** Φάση έναρξης. Με τον τραυματισμό του ενδοθηλίου εκτίθενται στον αυλό του αγγείου κυρίως κολλαγόνο και vWF. Τα αιμοπετάλια προσκολλώνται στους δύο αυτούς παράγοντες, αλλάζουν σχήμα και δομούν μία αρχική μονοστοιβάδα. **Γ.** Φάση διάδοσης. Τα αιμοπετάλια της αρχικής μονοστοιβάδας προσελκύουν περαιτέρω αιμοπετάλια εκκρίνοντας θρομβίνη, ADP και TxA₂. **Δ.** Φάση σταθεροποίησης. Τα

αιμοπετάλια συνδέονται μεταξύ τους με γέφυρες ινωδογόνου, ενώ εδράζουν σε ένα πλέγμα ινώδους που προκύπτει από τον καταρράκτη της πήξης.

1.4. Αντιαιμοπεταλιακή φαρμακολογία

1.4.1. Αναστολείς της COX-1

1.4.1.α. Ασπιρίνη

Η ασπιρίνη (ακετυλοσαλικυλικό οξύ) ακετυλιώνει μη αντιστρεπτά την υδροξυλομάδα του καταλοίπου Ser529 της COX-1, παρεμποδίζοντας την πρόσβαση του AA στο ενεργό κέντρο της και το συνεπακόλουθο μεταβολισμό του σε TxA_2 . Η ασπιρίνη απορροφάται ταχέως από το στομάχι και το δωδεκαδάκτυλο και πολύ γρήγορα υδρολύεται από εστεράσες του γαστρεντερικού βλεννογόνου και του ήπατος. Εξαιτίας της μη αντιστρεπτής δράσης της, η αντιαιμοπεταλιακή δράση της ασπιρίνης διαρκεί καθ' όλη τη διάρκεια ζωής του αιμοπεταλίου. Η συνιστώμενη ημερήσια δόση ασπιρίνης στους ασθενείς με αθηροθρόμβωση (75-325 mg) είναι 3-10 φορές μεγαλύτερη από την ελάχιστη δόση που απαιτείται για την πλήρη αναστολή της COX-1 (20-30 mg). Με δεδομένο ότι η πλήρης αναστολή της επαγόμενης από το TxA_2 ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων απαιτεί την πλήρη σχεδόν αναστολή της COX-1 [57], συνιστάται η καθημερινή χορήγηση ασπιρίνης σε σχέση με τη χορήγησή της κάθε δεύτερη ημέρα [58-60]. Η ασπιρίνη σε μικρές δόσεις δεν επηρεάζει τη νεφρική λειτουργία και την αντιϋπερτασική δράση των διουρητικών και των αναστολέων του μετατρεπτικού ενζύμου της αγγειοτασίνης. Αντίθετα, η αντιαιμοπεταλιακή δράση της ασπιρίνης μειώνεται όταν συγχορηγηθεί με ουσίες που αναστέλλουν την COX-1. Έτσι, φάρμακα που αναστέλλουν αντιστρεπτά την COX-1, όπως είναι τα μη στεροειδή αντιφλεγμονώδη φάρμακα (non-steroidal anti-inflammatory drugs, NSAIDs) ιβουπροφαίνη και ναπροξένη, επηρεάζουν τη δράση της ασπιρίνης, αφού προσδένονται στην ίδια θέση της COX-1. Τέτοια αλληλεπίδραση δεν παρατηρείται με τις κοξίμπες, ή άλλα NSAIDs τα οποία εμφανίζουν εξειδίκευση κυρίως για την κυκλοξυγονάση-2 (cyclooxygenase-2, COX-2). Πρόσφατες μελέτες υποστηρίζουν τον ωφέλιμο ρόλο των μικρών δόσεων ασπιρίνης στην πρόληψη του ορθοκολικού, αλλά και άλλων τύπων καρκίνου καθώς και της θνητότητας από καρκίνο [61, 62]. Η δράση αυτή της ασπιρίνης αποδίδεται σε διάφορους μηχανισμούς, κυρίως στην αναστολή της αιμοπεταλιακής ενεργοποίησης σε σημεία

αλλοιώσεων του γαστρεντερικού βλεννογόνου [63]. Κλινικές μελέτες που βρίσκονται σε εξέλιξη αναμένεται να αποδείξουν την πιθανή χρησιμότητα της ασπιρίνης στην πρόληψη του καρκίνου. Πρέπει να σημειωθεί ότι ένα ποσοστό (5-65%) των ασθενών που λαμβάνουν ασπιρίνη εμφανίζουν «υψηλή υπό θεραπεία αντιδραστικότητα των αιμοπεταλίων» (high on-treatment platelet reactivity, HTPR), ένα φαινόμενο που είναι γνωστό και ως «αντίσταση στην ασπιρίνη». Το μεγάλο εύρος του παραπάνω ποσοστού οφείλεται στην ετερογένεια των μεθοδολογιών που χρησιμοποιούνται στις διάφορες μελέτες για τον προσδιορισμό της HTPR, τα αποτελέσματα των οποίων δε συμφωνούν πάντα. Η HTPR συσχετίζεται με αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης ενός νέου θρομβωτικού επεισοδίου. Πιθανά αίτια της HTPR είναι η μη συμμόρφωση του ασθενούς, η ηλικία, το σωματικό βάρος, η χαμηλή εντερική απορρόφηση, η αλληλεπίδραση με τα NSAIDs καθώς και γενετικοί πολυμορφισμοί ενζύμων που σχετίζονται με το μεταβολισμό του AA [58].

1.4.1.β. Τριφλουζάλη

Η τριφλουζάλη (2-ακετυλοξυ-4-τριφθορομεθυλο-βενζοϊκό οξύ) εμφανίζει δομική ομοιότητα με την ασπιρίνη, φέροντας μία πρόσθετη τριφθορομεθυλομάδα στη θέση 4. Ομοίως με την ασπιρίνη, η τριφλουζάλη αναστέλλει μη αντιστρεπτά την COX-1, αποτελώντας φάρμακο εναλλακτικό της ασπιρίνης [64]. Η τριφλουζάλη απορροφάται από το λεπτό έντερο, εμφανίζοντας βιοδιαθεσιμότητα 83-100% [65]. Δεσμεύεται σχεδόν πλήρως στις πρωτεΐνες του πλάσματος και έχει χρόνο ημιζωής περίπου 30 min. Σε αντίθεση με την ασπιρίνη, ο μεταβολίτης της οποίας είναι ανενεργός, η τριφλουζάλη απακετυλιώνεται στο ήπαρ προς έναν ενεργό μεταβολίτη, το 2-υδροξυ-4-τριφθορομεθυλο-βενζοϊκό οξύ (2-hydroxy-4-trifluoromethyl-benzoic acid, HTB), ο οποίος αναστέλλει επίσης την COX-1 [66] και έχει χρόνο ημιζωής περίπου 40 h. Εκτός από την αναστολή της COX-1, τόσο η τριφλουζάλη, όσο και ο HTB αναστέλλουν επιπρόσθετα τις φωσφοδιεστεράσες των αιμοπεταλίων με αποτέλεσμα να αυξάνεται η ενδοκυττάρια συγκέντρωση της κυκλικής μονοφωσφορικής αδενοσίνης (cyclic adenosine monophosphate, cAMP) και της κυκλικής μονοφωσφορικής γουανοσίνης (cyclic guanosine monophosphate, cGMP) που έχουν ισχυρή αντιαιμοπεταλιακή δράση. Η τριφλουζάλη έχει ευνοϊκότερο προφίλ ασφάλειας συγκριτικά με την ασπιρίνη, καθώς σχετίζεται με λιγότερες ενδοκράνιες ή γαστρεντερικές αιμορραγίες. Η απέκκριση τόσο της τριφλουζάλης όσο και του HTB είναι κυρίως νεφρική. Η προαναφερθείσα πρόσδεση της τριφλουζάλης στις πρωτεΐνες

του πλάσματος δεν επηρεάζεται σημαντικά από τη θεοφυλλίνη, την εναλαπρίλη, την καφεΐνη, ή τη βαρφαρίνη, αλλά μειώνεται παρουσία των NSAIDs δικλοφενάκη, ιβουπροφαίνη, ναπροξένη και πιροξικάμη με αποτέλεσμα την αύξηση του ελεύθερου κλάσματος του φαρμάκου [64]. Υψηλές συγκεντρώσεις του HTB ενδέχεται να μειώνουν τη σύνδεση στις πρωτεΐνες του πλάσματος φαρμάκων όπως είναι τα NSAIDs και η βαρφαρίνη, με συνέπεια να αυξάνεται το ελεύθερο κλάσμα τους και συνεπώς να απαιτείται μειωμένη δοσολογία [64].

1.4.2. Ανταγωνιστές του υποδοχέα P2Y₁₂

1.4.2.α. Κλοπιδογρέλη

Η κλοπιδογρέλη αποτελεί θειενοπυριδίνη δεύτερης γενεάς και συνιστά προφάρμακο, δηλαδή προϋποθέτει ηπατικό μεταβολισμό προκειμένου να δράσει. Ο ενεργός μεταβολίτης της κλοπιδογρέλης (clopidogrel active metabolite, CAM) είναι ισχυρός, εκλεκτικός και μη αντιστρεπτός ανταγωνιστής του P2Y₁₂, ο οποίος τροποποιεί τη θέση πρόσδεσης του ADP, σχηματίζοντας δισουλφιδικό δεσμό με κυστεϊνικά κατάλοιπα της εξωκυττάριας μοίρας του υποδοχέα. Η κλοπιδογρέλη απορροφάται στο έντερο και ο CAM παράγεται σε δύο διαδοχικά οξειδωτικά μεταβολικά μονοπάτια, διαμέσου της δράσης διαφόρων ισομορφών του κυτοχρώματος P450 (cytochrome P450, CYP450), κυρίως του CYP2C19, αλλά και των CYP3A4, CYP3A5, CYP1A2, CYP2B6 και CYP2C9 [67]. Πρέπει να σημειωθεί πως το 85% της χορηγούμενης κλοπιδογρέλης υδρολύεται μετά την απορρόφησή της από τις εστεράσες του εντερικού βλεννογόνου και του πλάσματος προς έναν ανενεργό μεταβολίτη. Συνεπώς, μόλις το εναπομένει 15% της αρχικής, ληφθείσας δόσης του φαρμάκου μεταβολίζεται στον CAM. Η ανάγκη μεταβολικής ενεργοποίησης της κλοπιδογρέλης έχει ως συνέπεια την καθυστέρηση της δράσης της. Η μέγιστη αναστολή της επαγόμενης από ADP συσσώρευσης των αιμοπεταλίων μετά τη χορήγηση 75 mg κλοπιδογρέλης επέρχεται ύστερα από 4-5 ημέρες. Το παραπάνω αντιμετωπίζεται με τη χορήγηση δόσης φόρτισης του φαρμάκου (300-600 mg), η οποία οδηγεί στη μείωση του χρόνου έναρξης της δράσης του σε μόλις 2-5 h ύστερα από τη χορήγηση [68, 69]. Με δεδομένο τη μη αντιστρεπτή δράση, η ανασταλτική δράση της κλοπιδογρέλης στα αιμοπετάλια διαρκεί περίπου 7-10 ημέρες, όσο δηλαδή και ο μέγιστος χρόνος παραμονής των αιμοπεταλίων στην κυκλοφορία [70]. Διάφορες φαρμακοδυναμικές, αλλά και κλινικές μελέτες έδειξαν

διοφορούμενα αποτελέσματα ως προς τη μείωση της αντιαιμοπεταλιακής δράσης της κλοπιδογρέλης όταν συγχορηγηθεί με αναστολείς της αντλίας πρωτονίων (proton pump inhibitors, PPIs), κυρίως με την ομεπραζόλη. Συνεπώς, η συγχορήγησή τους συνιστάται μόνο στους ασθενείς με κίνδυνο γαστρεντερικών επιπλοκών [71]. Όπως συμβαίνει με την ασπιρίνη, ένα ποσοστό των ασθενών εμφανίζει HTPR στην κλοπιδογρέλη, που οφείλεται σε σημαντικές διακυμάνσεις ως προς τη μεταβολική ενεργοποίηση του φαρμάκου και την παραγωγή του CAM [72, 73]. Η σημαντικότερη αιτία εμφάνισης HTPR στην κλοπιδογρέλη είναι η ύπαρξη πολυμορφισμών διαφόρων ισοενζύμων του CYP450, οι οποίοι προκαλούν μείωση ή αύξηση της ενεργότητας των ισοενζύμων αυτών (όπως είναι οι πολυμορφισμοί CYP2C19*2 και CYP2C19*17, αντίστοιχα), επηρεάζοντας σημαντικά την παραγωγή του CAM και, συνεπώς, το φαρμακοδυναμικό προφίλ της κλοπιδογρέλης. Άλλα αίτια εμφάνισης HTPR στην κλοπιδογρέλη είναι η μειωμένη απορρόφηση του φαρμάκου, το κάπνισμα, η διακύμανση της ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων από το ADP, η ηλικία, το σωματικό βάρος, η συμμόρφωση του ασθενούς καθώς και ο σακχαρώδης διαβήτης [72, 73].

1.4.2.β. Πρασουγρέλη

Η πρασουγρέλη αποτελεί θειενοπυριδίνη τρίτης γενεάς και, ομοίως με την κλοπιδογρέλη, συνιστά προφάρμακο που προϋποθέτει ηπατικό μεταβολισμό προκειμένου να δράσει. Η πρασουγρέλη υφίσταται μεταβολική ενεργοποίηση, διαμέσου των κυτοχρωμάτων CYP3A, CYP2B6, CYP2C9 και CYP2C19, προς τον ενεργό της μεταβολίτη (prasugrel active metabolite; PAM), ο οποίος είναι εκλεκτικός και μη αντιστρεπτός ανταγωνιστής του αιμοπεταλιακού υποδοχέα P2Y₁₂ [74-77]. Η πρασουγρέλη εμφανίζει ισχυρότερη και ταχύτερη δράση συγκριτικά με την κλοπιδογρέλη, γεγονός που οφείλεται στην ταχύτερη μεταβολική ενεργοποίησή της στο ήπαρ και την ταχύτερη εμφάνιση υψηλότερων συγκεντρώσεων του PAM σε σχέση με τον CAM [78]. Η πρασουγρέλη έχει διαφορετική δομή από την κλοπιδογρέλη, η οποία επιτρέπει την ταχύτερη και αποτελεσματικότερη μετατροπή της στον PAM διαμέσου ενός μόνο μεταβολικού μονοπατιού, στο οποίο συμμετέχουν λιγότερα ισοένζυμα CYP450 σε σχέση με την κλοπιδογρέλη [79-81]. Ο κυριότερος παράγων που επηρεάζει τη δραστηριότητα της πρασουγρέλης είναι το σωματικό βάρος. Δεν έχουν αναφερθεί μέχρι σήμερα κλινικά σχετιζόμενες ανεπιθύμητες ενέργειες του φαρμάκου, εκτός από τα αιμορραγικά συμβάντα. Επίσης, δεν έχουν

παρατηρηθεί κλινικά σημαντικές αλληλεπιδράσεις φαρμάκων με την πρασουγρέλη, συμπεριλαμβανομένων των PPIs [82, 83]. Μικρός αριθμός μελετών έχει αναφέρει την ύπαρξη HTPR στην πρασουγρέλη, όμως ο επιπολασμός της είναι πολύ μικρότερος συγκριτικά με αυτόν της κλοπιδογρέλης. Πράγματι, διάφορες μελέτες απέδειξαν ότι η ανεπαρκής απόκριση στην κλοπιδογρέλη μπορεί να ξεπεραστεί αποτελεσματικότερα με την αντικατάσταση του φαρμάκου από την πρασουγρέλη, παρά με τη χορήγηση υψηλών δόσεων κλοπιδογρέλης. Η μεγαλύτερη φαρμακοδυναμική ομοιογένεια που παρατηρείται στην πρασουγρέλη σε σχέση με την κλοπιδογρέλη οφείλεται στην αποτελεσματικότερη βιομετατροπή της στον PAM (η οποία δεν επηρεάζεται από τους πολυμορφισμούς των ισοενζύμων CYP) και όχι στη μεγαλύτερη ισχύ του PAM από τον CAM.

1.4.2.γ. Τικαγρελόρη

Η τικαγρελόρη είναι μία κυκλοπεντυλο-τριαζολο-πυριμιδίνη, η οποία αποτελεί ισχυρό, εκλεκτικό και αντιστρεπτό ανταγωνιστή του P2Y₁₂. Σε αντίθεση με τις θειενοπυριδίνες, η τικαγρελόρη δεν αποτελεί προφάρμακο και συνδέεται στον P2Y₁₂ μη ομοιοπολικά σε θέση διαφορετική από τη θέση πρόσδεσης του ADP, συνεπώς δεν επηρεάζει την πρόσδεσή του στον υποδοχέα. Η τικαγρελόρη αποικοδομείται στο ήπαρ διαμέσου της δράσης των ισομορφών του CYP450, CYP3A4 και CYP3A5 προς αδρανείς, αλλά και ενεργούς μεταβολίτες, όπως είναι ο AR-C124910XX, ο οποίος ευθύνεται για το 30-40% της συνολικής αντιαιμοπεταλιακής δράσης της τικαγρελόρης [84]. Η τικαγρελόρη, στις δόσεις που χορηγείται (180 mg δόση φόρτισης, ακολουθούμενη από 90 mg δις ημερησίως), επιτυγχάνει μεγαλύτερη αναστολή της ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων συγκριτικά με την κλοπιδογρέλη (600 mg δόση φόρτισης, ακολουθούμενη από 75 mg ημερησίως), ενώ η δράση της αντιστρέφεται ταχύτερα σε σχέση με αυτήν της κλοπιδογρέλης μετά τη διακοπή χορήγησης του φαρμάκου [85, 86]. Η τικαγρελόρη δεν εμφανίζει HTPR, συνεπώς το φαρμακοδυναμικό της αποτέλεσμα δεν εξαρτάται από την ύπαρξη πολυμορφισμών των ισοενζύμων CYP450 και συνιστάται να χορηγείται αντί της κλοπιδογρέλης σε ασθενείς που εμφανίζουν HTPR στην κλοπιδογρέλη [71], [86]. Ο χρόνος ημιζωής μπορεί να παραταθεί, αν συγχορηγηθεί με αναστολείς του CYP3A4, όπως είναι η κετοконаζόλη και η διλτιαζέμη, συνεπώς αντενδείκνυται η συγχορήγησης της με κετοконаζόλη [71]. Επιπλέον, ο χρόνος ημιζωής του φαρμάκου μπορεί να παραταθεί, αν συγχορηγηθεί με υποστρώματα του

CYP3A4, όπως είναι η σιμβαστατίνη, συνεπώς δε συνιστάται η συγχορήγησή του με υψηλή δόση (40 mg) σιμβαστατίνης [71].

1.4.3. Ανταγωνιστές του υποδοχέα PAR-1

Η σημαντικότητα της θρομβίνης ως αιμοπεταλιακού αγωνιστή οδήγησε στην ανάγκη ανάπτυξης ανταγωνιστών των PARs. Εξ' αιτίας της υψηλότερης συγγένειας που εμφανίζει το ένζυμο αυτό για τον PAR-1, δόθηκε προτεραιότητα στην ανάπτυξη ανταγωνιστών αυτού του υποδοχέα. Παρ' όλο που στα χρόνια που ακολούθησαν την ανακάλυψη του PAR-1 έγινε προσπάθεια ανάπτυξης πολλών ανταγωνιστών, λίγοι από αυτούς δοκιμάστηκαν κλινικά. Οι κλινικά δοκιμαζόμενοι ανταγωνιστές του PAR-1 είναι το atropaxar και το vorapaxar.

1.4.3.α. Atropaxar

Το atropaxar είναι ένας από του στόματος χορηγούμενος, ισχυρός και εκλεκτικός ανταγωνιστής του PAR-1 [87]. Η αποτελεσματικότητα και ασφάλεια του atropaxar αξιολογήθηκαν σε δύο κλινικές μελέτες φάσης II, τις J-LANCELOT και LANCELOT ACS. Παρ' όλα αυτά, ανεπιθύμητες ενέργειες όπως η αύξηση των ηπατικών ενζύμων και η παράταση του διαστήματος QTc, σε συνδυασμό με τη χαμηλή κλινική αποτελεσματικότητα, ανέστειλαν την περαιτέρω μελέτη του ανταγωνιστή αυτού [38].

1.4.3.β. Vorapaxar

Το vorapaxar είναι ένα συνθετικό 3-φαινυλοπυριδινικό ανάλογο του αλκαλοειδούς himbacine, το οποίο έχει τροποποιηθεί ως κρυσταλλικό άλας προκειμένου να χρησιμοποιηθεί ως φάρμακο. Το vorapaxar εμφανίζει υψηλή συγγένεια για τον PAR-1 και συνεπώς αποτελεί ισχυρό και συναγωνιστικό ανταγωνιστή του υποδοχέα αυτού. Το vorapaxar αναστέλλει την επαγόμενη από θρομβίνη αιμοπεταλιακή ενεργοποίηση, χωρίς να επηρεάζει τη μετατροπή του ινωδογόνου σε ινώδες, με αποτέλεσμα να αφήνει άθικτο τον καταρράκτη της πήξης και το χρόνο ροής. Το vorapaxar είναι εκλεκτικό για τον PAR-1, αναστέλλοντας την επαγόμενη από TRAP αιμοπεταλιακή συσσώρευση, αλλά όχι τη συσσώρευση που επάγεται από ADP, U46619 (ένα ανάλογο του TxA₂), κολλαγόνο, ή το ενεργοποιητικό πεπτίδιο του PAR-4. Ύστερα από την από του στόματος χορήγηση, το vorapaxar απορροφάται ταχέως και εμφανίζει βιοδιαθεσιμότητα >90%. Ο χρόνος

ημιζωής για την αποσύνδεση του vorapaxar από τον PAR-1 είναι περίπου 20 h, ενώ ο χρόνος ημιζωής του φαρμάκου στο πλάσμα είναι 159-311 h. Αυτά τα χαρακτηριστικά ευθύνονται για την παρατεταμένη αντιαιμοπεταλιακή δράση του vorapaxar και μπορούν να εξηγηθούν λόγω της ισχυρής πρόσδεσης του φαρμάκου σε μία θήκη του υποδοχέα, η οποία δεν αντιστρέφεται εύκολα.

Το vorapaxar μεταβολίζεται αργά, αλλά εκτενώς, στο ήπαρ προς δύο κύριους μεταβολίτες, έναν άμινο- και έναν ύδροξυ- μεταβολίτη που ονομάζονται αντίστοιχα M19 και M20. Το κυτόχρωμα CYP3A4 είναι υπεύθυνο για τη μετατροπή του vorapaxar στο M19, ενώ τα CYP3A4 και CYP2J2 είναι υπεύθυνα για τη μετατροπή στο M20. Ο M19 είναι ανενεργός μεταβολίτης και αποβάλλεται, ενώ ο M20 είναι φαρμακοδυναμικά ισοδύναμος με το vorapaxar και κυκλοφορεί στο αίμα έως ότου μετατραπεί και αυτός σταδιακά στο M19 και αποβληθεί εξ' ίσου. Το vorapaxar αποβάλλεται σε ποσοστό >95% διαμέσου των κοπράνων. Από τα παραπάνω δεδομένα εξάγεται ότι η συγχορήγηση του vorapaxar με φάρμακα που επίσης μεταβολίζονται από το CYP3A4 θα μπορούσε να επηρεάσει την αντιαιμοπεταλιακή του δράση. Αντίθετα, η βαρφαρίνη ή άλλα φάρμακα που μεταβολίζονται από τα κυτοχρώματα CYP2C9/CYP2C19 δεν εμπλέκονται με το μεταβολισμό του vorapaxar και συνεπώς μπορούν να συγχορηγηθούν. Τέλος, η πρόσληψη τροφής δεν επηρεάζει την αποτελεσματικότητα του φαρμάκου.

Η ασφάλεια και η αποτελεσματικότητα του vorapaxar έχουν αξιολογηθεί σε δύο κλινικές μελέτες φάσης III, τις TRA-CER και TRA 2°P-TIMI50 [88, 89]. Στην TRA-CER στρατολογήθηκαν ασθενείς με ACS, οι οποίοι ελάμβαναν την καθιερωμένη αντιαιμοπεταλιακή αγωγή (κυρίως συνδυασμό ασπιρίνης-κλοπιδογρέλης) και τυχαιοποιήθηκαν σε vorapaxar (40 mg δόση φόρτισης, ακολουθούμενη από 2,5 mg ημερησίως) ή εικονικό φάρμακο. Αντίθετα, στην TRA 2°P-TIMI 50 στρατολογήθηκαν ασθενείς οι οποίοι δεν είχαν κάποιο οξύ επεισόδιο, αλλά είχαν ιστορικό αθηροθρομβωτικής νόσου (ιστορικό MI, PAD ή εγκεφαλικού επεισοδίου) και συνεπώς δεν έλαβαν δόση φόρτισης, αλλά μόνο δόση συντήρησης με 2,5 mg vorapaxar (ή εικονικό φάρμακο), σε συνδυασμό με την καθιερωμένη αγωγή (ασπιρίνη ή/και κλοπιδογρέλη). Στην TRA-CER δε σημειώθηκε σημαντική μείωση του πρωτεύοντος καταληκτικού σημείου αποτελεσματικότητας από τους ασθενείς που ελάμβαναν vorapaxar συγκριτικά με το εικονικό φάρμακο. Αντίθετα, στην TRA 2°P-TIMI50 σημειώθηκε μείωση του σύνθετου πρωτεύοντος καταληκτικού σημείου αποτελεσματικότητας (MI, καρδιαγγειακός θάνατος ή εγκεφαλικό επεισόδιο).

Επιπρόσθετα, όταν αναλύθηκαν στατιστικά περαιτέρω οι υποομάδες των ασθενών της TRA 2°P-TIMI50 με ιστορικό MI ή PAD, αποδείχθηκε πως το vorapaxar εμφανίζει ιδιαίτερη όφελος στους ασθενείς αυτούς. Συνεπώς, το vorapaxar έχει λάβει έγκριση για χορήγηση στους ασθενείς αυτούς, σε συνδυασμό με την καθιερωμένη αντιαιμοπεταλιακή αγωγή, τόσο από τον αμερικανικό FDA, όσο και από τον ευρωπαϊκό EMA. Αξίζει να σημειωθεί πως νεότερα δεδομένα υποστηρίζουν πως, από τους ασθενείς της TRA 2°P-TIMI50 που έχουν ιστορικό MI, όσοι έχουν σακχαρώδη διαβήτη ίσως ωφελούνται ιδιαίτερα από τη χορήγηση του vorapaxar [90]. Τα δεδομένα αυτά αναμένεται να επαληθευτούν με περισσότερους ασθενείς.

Παρά το σημαντικό ρόλο του PAR-4 στη σταθεροποίηση του θρόμβου που σηματοδοτεί η θρομβίνη και αρχίζει ο PAR-1, ο υποδοχέας αυτός ήταν για χρόνια φαρμακολογικά παραμελημένος με συνέπεια την καθυστέρηση της ανάπτυξης ανταγωνιστών του. Παρ' όλα αυτά, νεότερες προσπάθειες από ερευνητές που πιστεύουν στη σημαντικότητα του PAR-4 ως στόχου αντιαιμοπεταλιακής θεραπείας, απέφεραν καρπούς στην αναζήτηση αυτή.

1.4.4. Αναστολείς των φωσφοδιεστερασών

1.4.4.α. Σιλοσταζόλη

Η σιλοσταζόλη (2-οξοκινολόνη) αναστέλλει αντιστρεπτά τη φωσφοδιεστεράση-3 (phosphodiesterase-3, PDE-3) της cAMP, με συνέπεια την αναστολή της αιμοπεταλιακής συσσώρευσης και ενεργοποίησης από τους αγωνιστές ADP, AA και κολλαγόνο [91-93]. Στην αντιαιμοπεταλιακή δράση της σιλοσταζόλης συμβάλλει επίσης η πρόσδεσή της στον υποδοχέα equilibrative nucleoside transporter-1 (ENT-1), η οποία έχει ως αποτέλεσμα την αναστολή της επαναπρόσληψης της αδενοσίνης (adenosine, ADO) διαμέσου του παραπάνω υποδοχέα και συνεπώς την αύξηση της συγκέντρωσής της στο πλάσμα και την αύξηση των βιολογικών της δράσεων [91-96]. Η σιλοσταζόλη δεσμεύεται σχεδόν πλήρως στις πρωτεΐνες του πλάσματος και κυρίως στην αλβουμίνη, ενώ η μέγιστη συγκέντρωσή της επιτυγχάνεται εντός 2,4 h μετά την από του στόματος χορήγησή της. Ο μέσος χρόνος ημιζωής της σιλοσταζόλης είναι περίπου 10 h. Η σιλοσταζόλη μεταβολίζεται στο ήπαρ από τα ισοένζυμα CYP3A5 και CYP2C19 και η απέκκρισή της πραγματοποιείται διαμέσου των νεφρών (κατά 74%) και των κοπράνων (κατά 20%). Η φαρμακοκινητική της σιλοσταζόλης δεν επηρεάζεται σημαντικά από την

ηλικία ή το φύλο σε υγιή άτομα ηλικίας μέχρι 80 ετών. Εκτός από την αντιαιμοπεταλιακή της δράση, η σιλοσταζόλη εμφανίζει πλειοτροπικές δράσεις, όπως είναι η αγγειοδιαστολή και η αναστολή του πολλαπλασιασμού των λείων μυϊκών κυττάρων (smooth muscle cells, SMCs), οι οποίες οφείλονται τόσο στην αναστολή της PDE-3 όσο και στην αύξηση των επιπέδων της ADO [94, 95]. Η σιλοσταζόλη δεν πρέπει να χορηγείται σε ασθενείς με καρδιακή ανεπάρκεια [96]. Επιπρόσθετα, η δράση της σιλοσταζόλης μπορεί να επηρεαστεί από φάρμακα που μεταβολίζονται διαμέσου των ισοενζύμων CYP3A5 και CYP2C19, όπως είναι η ερυθρομυκίνη και η ομεπραζόλη [96].

1.4.4.β. Διπυριδαμόλη

Η διπυριδαμόλη συνιστά πυριμιδοπυριμιδινικό παράγωγο που αναστέλλει την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων διαμέσου διαφόρων μηχανισμών: αναστέλλει τη φωσφοδιεστεράση 5 των αιμοπεταλίων, αυξάνοντας έτσι την ενδοκυττάρια συγκέντρωση της cGMP, αυξάνει τη συγκέντρωση αδενοσίνης στο αίμα και επάγει τη βιοσύνθεση PGI_2 . Ταυτόχρονα, η διπυριδαμόλη εμφανίζει πλειοτροπικές δράσεις, όπως είναι η αγγειοδιαστολή, οι αντιοξειδωτικές και αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες και η αναστολή του πολλαπλασιασμού των SMCs.

Η ορθή απορρόφηση της από του στόματος χορηγούμενης διπυριδαμόλης προϋποθέτει τη χαμηλή οξύτητα του στομάχου. Η έναρξη της αντιαιμοπεταλιακής δράσης της διπυριδαμόλης παρατηρείται εντός 1-2 h από τη λήψη, ενώ ο χρόνος ημιζωής της είναι 10 h. Η κύρια οδός απέκκρισης της διπυριδαμόλης είναι από το γαστρεντερικό ως γλυκουρονικό σύζευγμα, ενώ σε ποσοστό 5% αποβάλλεται από τους νεφρούς.

Στον Πίνακα 1 παρουσιάζονται συγκεντρωτικά τα φαρμακοκινητικά και φαρμακοδυναμικά χαρακτηριστικά των από του στόματος χορηγούμενων αντιαιμοπεταλιακών φαρμάκων.

Πίνακας 1. Φαρμακοκινητικά και φαρμακοδυναμικά χαρακτηριστικά των από του στόματος χορηγούμενων αντιαιμοπεταλιακών φαρμάκων.

	Ασπιρίνη	Τριφλουζάλη	Κλοπιδογρέλη	Πρασουγρέλη	Τικαγρελόρη	Σιλοσταζόλη
Χημική ένωση/κατηγορία φαρμάκου	Ακετυλοσαλικυλικό οξύ	2-ακετυλοξυ-4-τριφθορομεθυλο-βενζοϊκό οξύ	Θειενοπυριδίνη	Θειενοπυριδίνη	Κυκλοπεντυλο-τριαζολο-πυριμιδίνη	2-οξοκινολόνη
Φαρμακευτικός στόχος	Αναστολέας της COX-1	Αναστολέας της COX-1	Μη αντιστρεπτός ανταγωνιστής του P2Y ₁₂	Μη αντιστρεπτός ανταγωνιστής του P2Y ₁₂	Αντιστρεπτός ανταγωνιστής του P2Y ₁₂	Αντιστρεπτός αναστολέας της PDE-3
Προφάρμακο	Όχι	Όχι	Ναι	Ναι	Όχι	Όχι
Βιοδιαθεσιμότητα	40-50%	83-100%	50%	80%	36%	-
Χρόνος έναρξης δράσης	1 h	1 h	2-5 h*	30 min-4 h**	30 min-4 h**	1-2 h
Χρόνος ημιζωής στο πλάσμα	15-20 min	~30 min	8 h	2-15 h	7-8 h	10 h
Χρόνος τερματισμού δράσης	7-10 ημέρες	7-10 ημέρες	7-10 ημέρες	7-10 ημέρες	3-5 ημέρες	-
Δραστικότητα μεταβολιτών	Ανενεργός μεταβολίτης	Ενεργός μεταβολίτης	Ανενεργό φάρμακο/δραστικός μεταβολίτης	Ανενεργό φάρμακο/δραστικός μεταβολίτης	Δραστικό φάρμακο/δραστικοί μεταβολίτες	Δραστικό φάρμακο/δραστικοί μεταβολίτες
Οδός απέκκρισης	Νεφρική	Νεφρική	Νεφρική	Νεφρική (70%)	Γαστρεντερική (99%), νεφρική (1%)	Νεφρική (74%), Γαστρεντερική (20%),
Αντίσταση	Ναι	Όχι	Ναι	Όχι/Ναι	Όχι	Όχι

*Με δόση φόρτισης. **Ανάλογα με τις κλινικές συνθήκες. Σύντμηση: COX-1, κυκλοοξυγονάση-1.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2. Μικροσωματίδια των αιμοπεταλίων

Τα κυστίδια που προκύπτουν από την κυτταρική μεμβράνη των ενεργοποιημένων κυττάρων, ή των κυττάρων που υφίστανται απόπτωση, ονομάζονται συνολικά εξωκυττάρια κυστίδια (extracellular vesicles, EVs) και περιλαμβάνουν τα μικροκυστίδια, που ονομάζονται αλλιώς και μικροσωματίδια (microparticles), τα εξωσώματα (exosomes) και τα αποπτωτικά σώματα (apoptotic bodies) [97]. Τα EVs διαφοροποιούνται βάσει της κυτταρικής τους προέλευσης, του μεγέθους τους, των μορίων που φέρουν και του μηχανισμού που οδήγησε στην παραγωγή τους [97].

Μικροσωματίδια σχηματίζουν διάφοροι κυτταρικοί τύποι, όπως είναι τα αιμοπετάλια, τα ενδοθηλιακά κύτταρα, τα λευκοκύτταρα (πιο συγκεκριμένα τα ουδετερόφιλα, τα μονοκύτταρα, τα λεμφοκύτταρα και τα κύτταρα φυσικοί φονείς) και τα ερυθροκύτταρα [97, 98].

Τα ενεργοποιημένα αιμοπετάλια απελευθερώνουν 2 είδη μεμβρανικών κυστιδίων, *in vitro*: Τα μικροσωματίδια (platelet-derived microparticles, PMPs), τα οποία «εκβλαστάνουν» από την κυτταρική μεμβράνη των αιμοπεταλίων, και τα εξωσώματα, τα οποία βρίσκονται αποθηκευμένα στα α-κοκκία και τα πολυκυστιδικά σώματα (multivesicular bodies) των αιμοπεταλίων [99] και απελευθερώνονται κατά την έκκριση του περιεχομένου τους. Τα PMPs περιγράφηκαν για πρώτη φορά από το Wolf, ο οποίος χαρακτήρισε ως «αιμοπεταλιακή σκόνη» το υλικό που προερχόταν από τα αιμοπετάλια, έφερε φωσφολιπίδια και μπορούσε να επάγει την πήξη [100, 101]. Τα PMPs αποτελούν τον πολυπληθέστερο πληθυσμό μικροσωματιδίων στο αίμα (70-90% του συνόλου των μικροσωματιδίων), ενώ το μέγεθός τους κυμαίνεται από 0,1-1,0 μm, σύμφωνα με παρατηρήσεις ηλεκτρονικής μικροσκοπίας [102].

2.1. Δομή των μικροσωματιδίων των αιμοπεταλίων

Το κύριο δομικό χαρακτηριστικό των PMPs είναι η έκφραση της φωσφατιδυλοσερίνης στην επιφάνειά τους. Τα PMPs φέρουν μία σειρά πρωτεϊνών που προέρχονται από τα αιμοπετάλια, στις οποίες συμπεριλαμβάνονται οι αIIb/β3, η P-σελεκτίνη, η LAMP-1 και η γλυκοπρωτεΐνη 55 (CD63) [103].

2.2. Μηχανισμός παραγωγής των μικροσωματιδίων των αιμοπεταλίων

Τα PMPs είναι δυνατό να παραχθούν διαμέσου της ενεργοποίησης, της γήρανσης και της καταστροφής των αιμοπεταλίων, διαμέσου της αποικοδόμησης των θρόμβων, ενώ μπορούν να παραχθούν και από τα μεγακαρυοκύτταρα.

Τα PMPs παράγονται κατά την αιμοπεταλιακή ενεργοποίηση που επάγεται από φυσιολογικούς, αλλά και άλλους αγωνιστές.

Η σειρά ενεργοποίησης από διεγέρτες των αιμοπεταλίων είναι: ιονοφόρο Ca^{2+} (A23187) > σύμπλεγμα C5b9 του συστήματος συμπληρώματος > συνδυασμός θρομβίνης και κολλαγόνου > θρομβίνη ή κολλαγόνο > επινεφρίνη ή ADP [104].

Ο μηχανισμός παραγωγής των PMPs βασίζεται στην αναδιοργάνωση της κυτταρικής μεμβράνης και σε μεταβολές του κυτταροσκελετού των αιμοπεταλίων, που έχουν ως αποτέλεσμα τη μεμβρανική έκφραση της φωσφατιδυλοσερίνης και την απελευθέρωση κυστιδίων από τη μεμβράνη των αιμοπεταλίων, τα οποία στη συνέχεια κυκλοφορούν ως PMPs. Σημαντικό ρόλο στο σχηματισμό των PMPs παίζει η εισροή Ca^{2+} από τον εξωκυττάριο χώρο στο κυτταρόπλασμα των αιμοπεταλίων, ενώ δευτερεύοντα ρόλο παίζει η αύξηση της συγκέντρωσης των Ca^{2+} που προέρχονται από τα ενδοκυττάρια διαμερίσματά τους.

Έχει αποδειχθεί ότι η συγκέντρωση των PMPs στο αίμα αυξάνεται ύστερα από το σχηματισμό θρόμβων *in vivo* [105]. Συνεπώς, τουλάχιστον ένα κλάσμα των PMPs που κυκλοφορούν στο αίμα πιθανώς σχετίζεται με την αποικοδόμηση των θρόμβων αυτών και όχι με καθ' εαυτό παραγωγή PMPs.

Η κάθαρση των PMPs από την κυκλοφορία του αίματος διευκολύνεται από την έκθεση της φωσφατιδυλοσερίνης, η οποία λειτουργεί ως σήμα τύπου «φάε με», ύστερα από την πρόσδεσή της σε υποδοχείς φαγοκυττάρων, τα οποία παίζουν εκκαθαριστικό ρόλο [106].

2.3. Ο ρόλος των μικροσωματιδίων των αιμοπεταλίων στη φυσιολογία και την παθοφυσιολογία της αθηροθρομβωτικής νόσου, του καρκίνου και της φλεγμονής

Η φωσφατιδυλοσερίνη και οι πρωτεΐνες που φέρουν τα PMPs που, όπως προαναφέρθηκε, προέρχονται από τα αιμοπετάλια, καθορίζουν το φυσιολογικό και παθοφυσιολογικό τους ρόλο.

Τα PMPs συμβάλλουν στη θρόμβωση και, συνεπώς, στη CVD, ενώ συνιστούν μεταφορείς πρωτεϊνών που προέρχονται από τα αιμοπετάλια. Ακόμη, μελέτες

προτείνουν ότι τα PMPs προάγουν την έκφραση μορίων προσκόλλησης σε διάφορα κύτταρα, επάγουν την έκκριση κυτταροκινών, μεταβάλλουν την απόκριση του ενδοθηλίου, προκαλούν φλεγμονή και αγγειογένεση και εμπλέκονται στις μεταστάσεις του καρκίνου [107, 108]. Επιπρόσθετα, τα PMPs υποβοηθούν την προσκόλληση των ουδετεροφίλων και των μονοκυττάρων στο ενδοθήλιο και διεγείρουν την πρωτεϊνική έκφραση της COX-2 στα μονοκύτταρα και τα ενδοθηλιακά κύτταρα [109]. Τα PMPs επάγουν επίσης το σχηματισμό αφρωδών κυττάρων [102], συμβάλλοντας στην αθηρογένεση.

Τα PMPs έχουν μελετηθεί κυρίως για τις προπηκτικές τους ιδιότητες. Πράγματι, η αρνητικά φορτισμένη μεμβράνη τους, λόγω της εκφραζόμενης φωσφατιδυλοσερίνης, δημιουργεί το κατάλληλο υπόστρωμα για την πρόσδεση παραγόντων πήξης στην επιφάνεια των αιμοπεταλίων διαμέσου Ca^{2+} , επιτρέποντας κατ' αυτόν τον τρόπο το σχηματισμό των συμπλόκων της τενάσης (tenase) και της προθρομβινάσης. Σε δεδομένα που αφορούν σε απομονωμένα κύτταρα, υποστηρίζεται ότι τα PMPs εκφράζουν φωσφατιδυλοσερίνη ως αποτέλεσμα μεμβρανικής τυχαιοποίησης. Η μετάθεση της φωσφατιδυλοσερίνης και η απελευθέρωση των PMPs είναι ελαττωματικές ως προς την απόκριση σε προπηκτικούς παράγοντες στο σύνδρομο του Scott, υποδηλώνοντας ότι η μετάθεση της φωσφατιδυλοσερίνης είναι προϋπόθεση για την απελευθέρωση των PMPs. Ακόμη, τα PMPs εκφράζουν ιστικό παράγοντα TF, ο οποίος επάγει το σχηματισμό θρομβίνης, πυροδοτώντας και κατ' αυτόν τον τρόπο τον καταρράκτη της πήξης.

Ο ρόλος των PMPs στην εξέλιξη του καρκίνου δεν έχει διαλευκανθεί, αν και δεδομένα υποστηρίζουν ότι η συγκέντρωση των PMPs εμφανίζει υψηλή συσχέτιση με την ύπαρξη επιθετικών όγκων, με τον αριθμό των αιμοπεταλίων, καθώς και με αρνητική κλινική έκβαση [110].

Τα PMPs ενδέχεται να έχουν ωφέλιμο ρόλο στην ιστική αναγέννηση, όπως φάνηκε σε ένα μοντέλο ισχαιμικού αγγειακού εγκεφαλικού επεισοδίου σε αρουραίους, όπου η έγχυση PMPs προκάλεσε την αγγειογένεση, τη νευρογένεση, τη νευροπροστασία και μείωσε το νευρολογικό έλλειμμα που προκλήθηκε μετά την εγκεφαλική ισχαιμία [111, 112].

Σήμερα, τα PMPs αποτελούν ενδιαφέροντες βιοδείκτες με πιθανή προγνωστική αξία, καθώς το περιεχόμενό τους (πρωτεΐνες, ενεργά λιπίδια, microRNAs) μεταβάλλεται ανάλογα με τον ενεργοποιητή που προκάλεσε την παραγωγή τους και τη βαρύτητα της ασθένειας. Πολλές μελέτες έχουν επιβεβαιώσει

ότι τα EVs αποτελούν σημαντικούς διαμεσολαβητές τόσο της διακυτταρικής επικοινωνίας, όσο και της μεταφοράς μορίων. Επομένως, τα EVs αποτελούν αναπόσπαστο κομμάτι του διακυτταρικού μικροπεριβάλλοντος και δρουν ως ρυθμιστές της διακυτταρικής επικοινωνίας.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3. Ουδετερόφιλα λευκοκύτταρα

3.1. Λευκοκύτταρα

Τα λευκοκύτταρα συνιστούν κύτταρα του αίματος απαραίτητα για την ανοσολογική απόκριση. Παράγονται στο μυελό των οστών και, ανάλογα με το σχήμα του πυρήνα τους και την ύπαρξη ή την απουσία κοκκίων, ταξινομούνται σε κοκκιώδη λευκοκύτταρα, ή κοκκιοκύτταρα, και σε άκοκκα λευκοκύτταρα (Α. Δ. Τσελέπης, Δ. Κ. Τσουκάτος, «Στοιχεία φυσιολογίας του ανθρώπου», Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων, Τμήμα Χημείας, Ιωάννινα 1997). Τα κοκκιοκύτταρα χαρακτηρίζονται από σύνθετο, πολυλοβώδη πυρήνα και για το λόγο αυτό ονομάζονται πολυμορφοπύρηνα λευκοκύτταρα (polymorphonuclear leukocytes, PMNs). Τα PMNs, ανάλογα με την εμφάνιση των κοκκίων τους στο μικροσκόπιο ύστερα από χρώση, κατηγοριοποιούνται περαιτέρω σε ουδετερόφιλα, ηωσινόφιλα και βασεόφιλα (Α. Δ. Τσελέπης, Δ. Κ. Τσουκάτος, «Στοιχεία φυσιολογίας του ανθρώπου», Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων, Τμήμα Χημείας, Ιωάννινα 1997). Τα άκοκκα λευκοκύτταρα χαρακτηρίζονται από έναν απλό, μη λοβώδη πυρήνα και, συνεπώς, καλούνται μονοπύρηνα λευκοκύτταρα. Τα μονοπύρηνα, ανάλογα με την εμφάνιση του πυρήνα και του κυτταροπλάσματός τους ύστερα από χρώση, διακρίνονται σε λεμφοκύτταρα και μονοκύτταρα (Α. Δ. Τσελέπης, Δ. Κ. Τσουκάτος, «Στοιχεία φυσιολογίας του ανθρώπου», Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων, Τμήμα Χημείας, Ιωάννινα 1997). Οι τιμές αναφοράς του αριθμού των λευκοκυττάρων στον άνθρωπο κυμαίνονται μεταξύ 7.000-10.000/μL. Η εκατοστιαία αναλογία με την οποία απαντώνται τα διάφορα είδη λευκοκυττάρων στο αίμα ονομάζεται λευκοκυτταρικός τύπος. Ο φυσιολογικός λευκοκυτταρικός τύπος των ενηλίκων είναι 50-70% ουδετερόφιλα, 1-5% ηωσινόφιλα, 0-1% βασεόφιλα, 20-30% λεμφοκύτταρα και 1-6% μονοκύτταρα (Α. Δ. Τσελέπης, Δ. Κ. Τσουκάτος, «Στοιχεία φυσιολογίας του ανθρώπου», Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων, Τμήμα Χημείας, Ιωάννινα 1997).

3.2. Ουδετερόφιλα λευκοκύτταρα

Τα ουδετερόφιλα λευκοκύτταρα, ή, απλώς, ουδετερόφιλα, αποτελούν μία από τις πρώτες αμυντικές γραμμές κατά των παθογόνων μικροοργανισμών και των ιστικών βλαβών [113].

Τα ουδετερόφιλα μεταναστεύουν σε σημεία εισβολής των μικροοργανισμών καθώς και σε σημεία ιστικής βλάβης, όπου επιστρατεύουν διάφορους μηχανισμούς αντιμετώπισης, όπως είναι η φαγοκυττάρωση, η απελευθέρωση δραστικών μορφών οξυγόνου (reactive oxygen species, ROS) και αντιμικροβιακών πεπτιδίων και ο σχηματισμός ουδετεροφιλικών δικτύων χρωματίνης (neutrophil extracellular traps, NETs). Ο τελευταίος μηχανισμός είναι κρίσιμης σημασίας για τη βιωσιμότητα του ξενιστή και περιγράφεται αναλυτικότερα στο παρακάτω κεφάλαιο.

Τα ουδετερόφιλα εμπεριέχουν τρεις τύπους κοκκίων, που ονομάζονται αζουρόφιλα ή πρωτεύοντα, ειδικά ή δευτερεύοντα και τριτογενή κοκκία.

Τα ουδετερόφιλα πραγματοποιούν φαγοκυττάρωση, δηλαδή ενεργητική πρόσληψη μικροοργανισμών, ξένων σωματιδίων και κυτταρικών υπολειμμάτων, τα οποία καταστρέφονται ενδοκυττάρια με τη δράση των λυσοσωμικών ενζύμων των κοκκίων τους και των ελευθέρων ριζών. Η έξοδος των λυσοσωμικών ενζύμων από τα κοκκία και η παραγωγή του H_2O_2 και των ελευθέρων ριζών, όπως είναι το ανιόν του υπεροξειδίου και η ρίζα του υδροξυλίου, πραγματοποιείται ύστερα από διέγερση των κυττάρων αυτών. Τα ουδετερόφιλα έχουν τη δυνατότητα να μετακινούνται με αμοιβαδοειδείς κινήσεις και, περνώντας μέσα από το τοίχωμα των τριχοειδών αγγείων, να μεταναστεύουν στο σημείο της βλάβης προκειμένου να πραγματοποιήσουν τη φαγοκυττάρωση. Η μετακίνηση αυτή διεγείρεται από διάφορες χημικές ουσίες που εκκρίνονται στο σημείο της βλάβης και για το λόγο αυτό καλείται χημειοτακτισμός (Α. Δ. Τσελέπης, Δ. Κ. Τσουκάτος, «Στοιχεία φυσιολογίας του ανθρώπου», Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων, Τμήμα Χημείας, Ιωάννινα 1997).

Τα ουδετερόφιλα φαγοκυτταρώνουν και καταστρέφουν τους παθογόνους μικροοργανισμούς όταν τα αντιμικροβιακά τους κοκκία συντηχθούν με το φαγόσωμα [114]. Κατά τη φλεγμονώδη απόκριση, τα ουδετερόφιλα μεταναστεύουν από την κυκλοφορία του αίματος στους μολυσμένους ιστούς, όπου προσδένουν, φαγοκυτταρώνουν και αδρανοποιούν τους παθογόνους μικροοργανισμούς [114]. Τα μικρόβια που έχουν φαγοκυτταρωθεί καταστρέφονται ταχέως με τη δράση πρωτεολυτικών ενζύμων, αντιμικροβιακών πρωτεϊνών και δραστικών μορφών οξυγόνου ROS [114]. Επιπρόσθετα, τα ουδετερόφιλα αποκοκκιώνονται, απελευθερώνοντας αντιμικροβιακούς παράγοντες στον εξωκυττάριο χώρο [114].

Ο χρόνος ζωής των ουδετεροφίλων αυξάνεται σημαντικά υπό λοιμώδεις και φλεγμονώδεις συνθήκες [115]. Τα ουδετερόφιλα, εκτός από την απ' ευθείας απόκριση στους παθογόνους μικροοργανισμούς, αποκρίνονται επίσης στα μακροφάγα

των διαφόρων ιστών, καθώς και σε άλλα στοιχεία του ανοσοποιητικού συστήματος [115]. Η ανοσολογική απόκριση των ουδετεροφίλων είναι δυνατό να προκαλέσει εκτενή βλάβη στον ξενιστή. Συνεπώς, η επιστράτευση και η ενεργοποίησή τους ρυθμίζεται σε διάφορα επίπεδα [115].

Η αυτοφαγία αποτελεί αναπόσπαστο κομμάτι της φυσιολογικής λειτουργίας των ουδετεροφίλων. Πράγματι, έχει περιγραφεί πως ουδετερόφιλα που δεν μπορούν να προβούν σε αυτοφαγία εμφανίζουν ανεπαρκή ανοσολογική απόκριση [116]. Επιπλέον, η αυτοφαγία είναι απαραίτητη για τη διαφοροποίηση των ουδετεροφίλων. Η ωρίμανση των ουδετεροφίλων προϋποθέτει τη στρατολόγηση της μιτοχονδριακής αναπνοής, σε συνδυασμό με την άρση της γλυκόλυσης, καθώς και τη β-οξείδωση ελεύθερων λιπαρών οξέων, η οποία παρέχει την απαιτούμενη ενέργεια ώστε να λάβει χώρα η ωρίμανση [117]. Οι παραπάνω μεταβολικές διεργασίες πραγματοποιούνται διαμέσου της αυτοφαγίας [117]. Αντίθετα, διαγονιδιακά ποντίκια που στερούνται της ικανότητας της αυτοφαγίας εμφανίζουν συσσώρευση άωρων ουδετεροφίλων με υψηλή ενδοκυττάρια συγκέντρωση λιπαρών οξέων, που αποτελεί ένδειξη ελαττωματικής λιπόλυσης [117]. Τα ευρήματα αυτά προτείνουν νέες θεραπευτικές προσεγγίσεις ως προς την αντιμετώπιση της μυελοειδούς λευχαιμίας και της ουδετεροπενίας [117]. Όπως θα αναφερθεί στο επόμενο κεφάλαιο, η αυτοφαγία είναι κρίσιμη στο μηχανισμό παραγωγής των NETs.

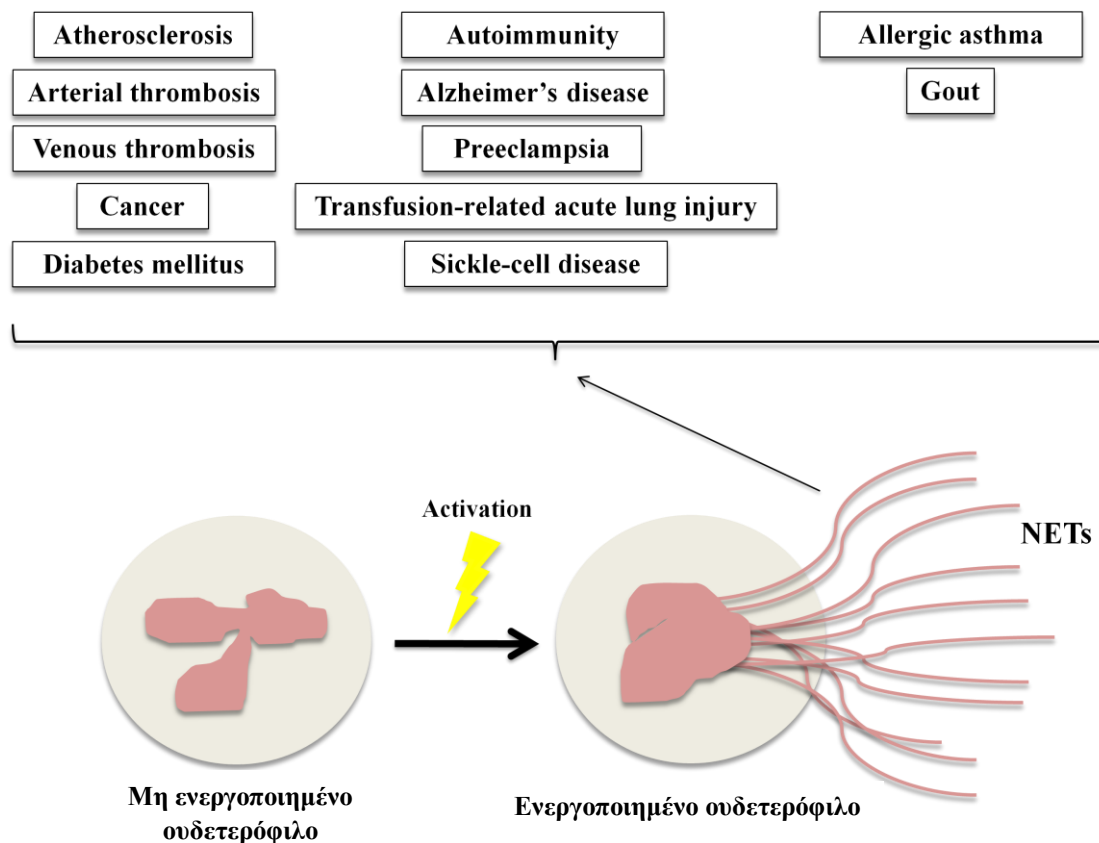
Πιθανότατα τα ουδετερόφιλα δεν αποτελούν έναν ενιαίο πληθυσμό, αλλά ένα σύνολο υποπληθυσμών με διακριτά χαρακτηριστικά. Για παράδειγμα, ένα κλάσμα των ουδετεροφίλων απαντά ως κοκκιόκυτταρα χαμηλής πυκνότητας (low density granulocytes, LDGs), τα οποία εμφανίζουν άλλα λειτουργικά χαρακτηριστικά από τα υπόλοιπα ουδετερόφιλα και κατά τη φυγοκέντρωση βαθμίδωσης πυκνότητας (βλ. ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5^ο: Υλικά και μέθοδοι) απομονώνονται στη στοιβάδα των μονοκυττάρων.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4. Ουδετεροφιλικά δίκτυα χρωματίνης

4.1. Εισαγωγή

Τα NETs συνιστούν νηματοειδείς προεκβολές γενετικού υλικού, οι οποίες απελευθερώνονται κατά την ενεργοποίηση των ουδετεροφίλων [114]. Η διαδικασία παραγωγής των NETs ονομάζεται «νέτωση» (NETosis). Τα NETs αποτελούνται από ένα υπόστρωμα χρωματίνης, επάνω στο οποίο βρίσκεται διασκορπισμένη μία πληθώρα πρωτεϊνών με διαφορετικές ιδιότητες. Οι πρωτεΐνες αυτές προέρχονται από όλους τους προαναφερθέντες τύπους κοκκίων των ουδετεροφίλων, καθώς και από το κυτταρόπλασμα και τον κυτταροσκελετό τους [114, 118, 119]. Παρ' όλα αυτά, τα NETs δεν αντιπροσωπεύουν πάντα ένα ομοιογενές υλικό, όσον αφορά στο πρωτεϊνικό τους περιεχόμενο, γεγονός που πιθανώς αντικατοπτρίζει την ύπαρξη διακριτών υποπληθυσμών ουδετεροφίλων [120], όπως αναφέρθηκε και στο προηγούμενο κεφάλαιο.

Αρχικά, η νέτωση θεωρήθηκε ένας μηχανισμός άμυνας των ουδετεροφίλων που δεν είχε περιγραφεί έως τότε, εξ' αιτίας της ικανότητας των NETs να παγιδεύουν και μάλλον να εξολοθρεύουν ένα ευρύ φάσμα μικροοργανισμών, συμπεριλαμβανομένων των θετικών και αρνητικών κατά Gram βακτηρίων, καθώς και των τοξινών τους [114], των μυκήτων [121], των πρωτοζώων [122] και των ιών [123]. Παρά ταύτα, ολοένα περισσότερα δεδομένα υποστηρίζουν την εμπλοκή των NETs σε σωρεία παθοφυσιολογικών καταστάσεων, όπως είναι τα αυτοάνοσα νοσήματα [124], ο καρκίνος [125], ο σακχαρώδης διαβήτης [126] και η νόσος Alzheimer [127]. Επιπροσθέτως, η παρουσία των NETs σχετίζεται με ενδοθηλιακή και ιστική καταστροφή [7, 128, 129]. Η δράση αυτή ίσως οφείλεται στις διάφορες πρωτεάσες που φέρουν τα NETs, καθώς και στις κυτταροτοξικές ιδιότητες των ιστονών [129, 130]. Ιδιαίτερη σημασία έχει η συμβολή των NETs στην αθηρογένεση, καθώς και στην αρτηριακή και φλεβική θρόμβωση [131, 132]. Σε αυτό το πλαίσιο, έχει προταθεί πως τα NETs και τα επιμέρους συστατικά τους συμμετέχουν ενεργά στην παθοφυσιολογία της αθηροσκλήρωσης και της θρόμβωσης, ενώ ταυτόχρονα είναι δυνατό να χρησιμοποιηθούν ως βιοδείκτες, έχοντας πιθανή προγνωστική αξία για τη βαρύτητα της αθηρωμάτωσης, τον καρδιαγγειακό κίνδυνο, την έκταση του MI, τα ισχαιμικά αγγειακά εγκεφαλικά επεισόδια κλπ [133-135]. Η σχέση των NETs με πολυάριθμες νόσους απεικονίζεται στην Εικόνα 12.



Εικόνα 12. Η συμμετοχή των NETs σε πληθώρα νόσων. Σύντμηση: NETs, ουδετεροφιλικά δίκτυα χρωματίνης.

4.2. Ενδοκυττάρια γεγονότα κρίσιμα για το σχηματισμό των NETs

Η νέτωση θεωρείται ένα είδος κυτταρικού θανάτου, που διαφοροποιείται από την απόπτωση, τη νέκρωση ή τη νεκρόπτωση [136, 137]. Εντούτοις, έχει παρατηρηθεί ότι η νέτωση δε συνοδεύεται πάντα από κυτταρικό θάνατο, καθώς μη λυτική νέτωση έχει περιγραφεί προς απόκριση στο βακτήριο *Staphylococcus aureus* [138, 139].

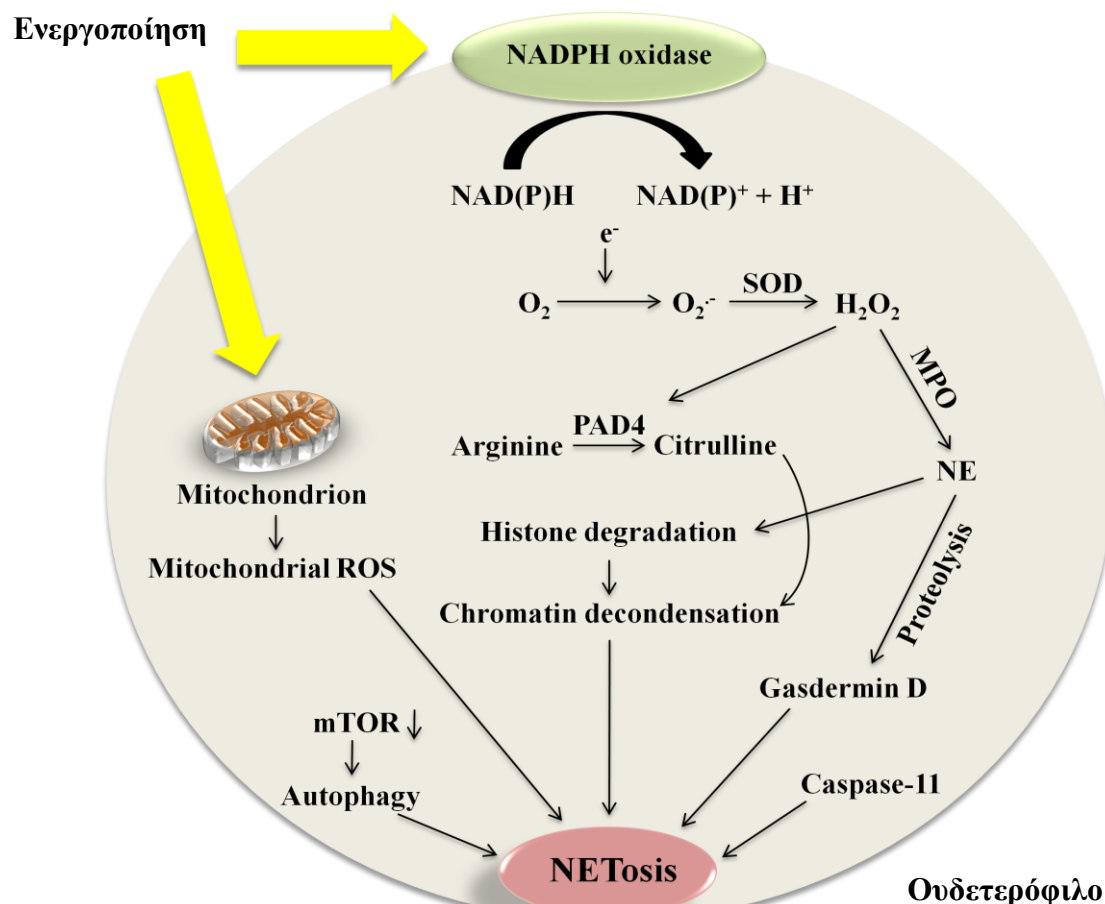
Η λυτική νέτωση προϋποθέτει τη σύντηξη των λοβών του ουδετεροφιλικού πυρήνα, την αποσυμπύκνωση της χρωματίνης και τη διάσπαση της μεμβράνης του πυρήνα και των κοκκίων [136]. Στη συνέχεια, ακολουθεί η ανάμειξη της χρωματίνης με το περιεχόμενο των κοκκίων και του κυτταροπλάσματος. Τέλος, η κυτταρική μεμβράνη των ουδετεροφύλων διαρρηγνύεται και τα NETs «εκβλάστανουν» αφήνοντας πίσω τα νεκρά κύτταρα [136]. Η νέτωση βασίζεται στην παραγωγή ROS, όπως είναι το ανιόν σουπεροξειδίου ($O_2^{\cdot-}$) και το υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2), διαμέσου της δράσης της οξειδάσης του φωσφορικού νικοτιναμιδο-αδένινο δινουκλεοτιδίου (nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, NADPH). Πράγματι,

ουδετερόφιλα ασθενών που πάσχουν από χρόνια κοκκιωματώδη νόσο και, συνεπώς, στερούνται της δράσης της οξειδάσης του NADPH, λόγω μεταλλάξεων στο γονίδιο του ενζύμου, δεν υφίστανται νέτωση [136]. Παρά το γεγονός αυτό, η διέγερση των ουδετεροφίλων από ενεργοποιητές που δε χρησιμοποιούν την οξειδάση του NADPH, όπως είναι τα ανοσοσυμπλέγματα και η ιονομυκίνη, εξαρτάται πρωτίστως από ROS των μιτοχονδρίων [140, 141].

Η ουδετεροφιλική ελαστάση (neutrophil elastase, NE) και η μυελοϋπεροξειδάση (myeloperoxidase, MPO), εκτός της αντιμικροβιακής τους δράσης [114, 142], διαδραματίζουν σπουδαίο ρόλο στην ίδια τη διαδικασία της νέτωσης [143-145]. Καθοδικά των ROS, η MPO, η οποία αποτελεί μέρος ενός πρωτεϊνικού συμπλέγματος που καλείται αζουρόσωμα, προάγει την απελευθέρωση της NE από τα αζουρόφιλα κοκκία [145]. Εν συνεχεία, η NE μεταφέρεται από τα κοκκία αυτά στον πυρήνα, όπου αποικοδομεί εν μέρει τις ιστόνες, συμβάλλοντας κατ' αυτόν τον τρόπο στην αποσυμπύκνωση της χρωματίνης και τη συνεπακόλουθη δημιουργία των NETs [143, 145]. Επιπλέον, κατά τη διάρκεια της νέτωσης, λαμβάνει χώρα η απίμινωση ορισμένων καταλοίπων αργινίνης των ιστονών, διαμέσου της δράσης της απιμινάσης της πεπτιδυλο-αργινίνης 4 (peptidyl arginine deiminase 4, PAD4), που έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή κιτρουλλίνης [146, 147]. Κατά συνέπεια, η χρωματίνη των NETs εμπεριέχει κιτρουλλινοποιημένες ιστόνες [146]. Η κιτρουλλινοποίηση των ιστονών οδηγεί στην απώλεια των ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων και των δεσμών υδρογόνου που υπάρχουν ανάμεσα στις ιστόνες και το DNA, καταλήγοντας ξανά στην αποσυμπύκνωση της χρωματίνης και τη νέτωση [146-149]. Η κιτρουλλινοποίηση των ιστονών διαμέσου της δράσης της PAD4 εξαρτάται από Ca^{2+} , αφού τα Ca^{2+} είναι κρίσιμα για μεταβολές στη στερεοδιάταξη του ενζύμου, που επιτρέπουν τον ορθό προσανατολισμό του ενεργού κέντρου της PAD4. Επομένως, προκειμένου να επιτευχθεί η δράση της PAD4, απαιτείται η ενδοκυττάρια αύξηση της συγκέντρωσης των Ca^{2+} , τουλάχιστον *in vitro* [148, 149]. Έχει αναφερθεί ότι διαφορετικά ισοένζυμα της πρωτεϊνικής κινάσης C (protein kinase C, PKC) εμφανίζουν αντίθετη λειτουργία ως προς τον έλεγχο της απιμίνωσης των ιστονών διαμέσου της PAD4 και της επερχόμενης νέτωσης. Πιο συγκεκριμένα, το ισοένζυμο PKC α αναστέλλει την απιμίνωση των ιστονών, ενώ το ισοένζυμο PKC ζ επάγει την απιμίνωση των ιστονών και, συνεπώς, τη νέτωση [150]. Η κιτρουλλινοποίηση των ιστονών λαμβάνει χώρα καθοδικά των ROS [151].

Μία ακόμη προϋπόθεση για την επίτευξη της νέτωσης είναι η αυτοφαγία. Η αυτοφαγία προκύπτει ανεξαρτήτως της παραγωγής των ROS [152] και περιλαμβάνει την καταστολή της οδού του mammalian target of rapamycin (mTOR) [153]. Νεότερα δεδομένα αποκαλύπτουν ένα σημαντικό ρόλο της gasdermin D, μίας πρωτεΐνης που σχετίζεται με τη μορφή του κυτταρικού θανάτου που ονομάζεται πυρόπτωση, στο σχηματισμό των NETs [154, 155]. Σύμφωνα με αυτά τα δεδομένα, η gasdermin D ενεργοποιείται πρωτεολυτικά από τη NE και, μαζί με την κασπάση-11, διαμεσολαβούν τη λυτική νέτωση [154, 155].

Συνολικά, τα ουδετερόφιλα επιστρατεύουν διάφορες ενδοκυττάριας σηματοδοτικές πορείες προκειμένου να προβούν σε νέτωση, οι οποίες απεικονίζονται συγκεντρωτικά στην Εικόνα 13.



Εικόνα 13. Ενδοκυττάρια σηματοδοτικά γεγονότα που οδηγούν σε νέτωση. Συντμήσεις: MPO, μυελοϋπεροξειδάση. mTOR, mammalian target of rapamycin. NAD(P)H, (φωσφορικό) νικοτιναμίδο-αδένινο δινουκλεοτίδιο. NE, ουδετεροφιλική ελαστάση. PAD4, απιμινάση της πεπτιδυλο-αργινίνης 4. ROS, δραστικές μορφές οξυγόνου. SOD, δισμουτάση του σουπεροξειδίου.

4.3. Ο ρόλος των NETs στην αθηροσκλήρωση και τη θρόμβωση

4.3.1. Ο ρόλος των NETs στην αθηροσκλήρωση

Τα NETs εντοπίζονται σε θέσεις αθηρωματικών αλλοιώσεων, όπως φάνηκε από πειράματα ενδοβιολογικής μικροσκοπίας διπλής δέσμης φωτονίων και ανοσοϊστοχημικής ανάλυσης αθηρωμάτων σε δείγματα ανθρώπου και ποντικού [156]. Τα NETs δημιουργούνται εντός των αρτηριών διαμέσου διαφόρων μηχανισμών, στους οποίους σημαντικό ρόλο πιθανώς διαδραματίζει η οξειδωμένη λιποπρωτεΐνη χαμηλής πυκνότητας (oxidized low-density lipoprotein, oxLDL) και οι κρύσταλλοι χοληστερόλης. Ακόμη, σε προχωρημένη αθηροσκλήρωση, κρύσταλλοι χοληστερόλης

είναι δυνατό να σχηματίσουν θρόμβους μαζί με αιμοπετάλια, ινώδες και εξωκυττάριο DNA [157]. Επιπρόσθετα, από τη στιγμή της παραγωγής τους, τα NETs συμμετέχουν στην παθοφυσιολογία της αθηρογένεσης.

Υπό αυτό το πρίσμα, η oxLDL επάγει την παραγωγή των NETs διαμέσου των ROS, κατά τρόπο που εξαρτάται από τη συγκέντρωση και το χρόνο [158]. Πιστεύεται ότι η oxLDL επάγει την παραγωγή των NETs διαμέσου των υποδοχέων τύπου toll (toll-like receptors, TLRs) -2 και -6 [158]. Επιπλέον, η PKC, οι interleukin-1 receptor associated kinases, η extracellular signal-regulated kinase (ERK)1/2 και η mitogen-activated protein kinase σηματοδοτούν την επαγόμενη από oxLDL νέτωση. Τα συστατικά της oxLDL που είναι υπεύθυνα για τη νέτωση είναι ορισμένα οξειδωμένα φωσφολιπίδια, όπως είναι η λυσοφωσφατιδυλοχολίνη και η οξειδωμένη 1-παλμιτοϋλο-2-αραχιδονυλο-sn-γλυκερο-3-φωσφορυλοχολίνη (oxidized 1-palmitoyl-2-arachidonoyl-sn-glycero-3-phosphorylcholine) [158].

Άλλος ένας παράγοντας που επάγει τη νέτωση είναι οι κρύσταλλοι χοληστερόλης, που ανιχνεύονται σε περιοχές αθηρωματικών πλακών πλούσιες σε χοληστερόλη, όπως αποδείχθηκε από ένα μοντέλο ποντικού που στερούνταν της απολιποπρωτεΐνης E (apolipoprotein E, ApoE) [159]. Ποντίκια που στερούνται όχι μόνο της ApoE, αλλά και της NE και της πρωτεΐνης 3 και, συνεπώς, δεν μπορούν να παράξουν NETs λόγω απαλοιφής των δύο τελευταίων γονιδίων, εμφανίζουν μειωμένη αθηρωμάτωση συγκριτικά με μάρτυρες στους οποίους έχει απαλειφθεί μόνο το γονίδιο της ApoE [159]. Τα NETs που προκύπτουν ύστερα από ενεργοποίηση των ουδετεροφίλων με κρυστάλλους χοληστερόλης, προάγουν τη σύνθεση της πρώιμης μορφής της προφλεγμονώδους ιντερλευκίνης (interleukin, IL)-1β από μακροφάγα. Ταυτόχρονα, κρύσταλλοι χοληστερόλης φαγοκυτταρώνονται από τα μακροφάγα αυτά, με αποτέλεσμα την παραγωγή της ώριμης μορφής της IL-1β, η οποία με τη σειρά της επάγει την αυξορρύθμιση της παραγωγής μιας άλλης προφλεγμονώδους κυτταροκίνης, της IL-17, από T-λεμφοκύτταρα. Η παραγόμενη IL-17 ενισχύει τη στρατολόγηση ανοσοποιητικών κυττάρων σε θέσεις αθηρωμάτωσης [159], συμβάλλοντας έτσι στην έξαρση της αθηρογένεσης. Πολύ πρόσφατα, φάνηκε ότι η απαλοιφή του γονιδίου της PAD4 (η οποία, όπως προαναφέρθηκε, είναι σημαντική για τη διεκπεραίωση της νέτωσης), σε ποντίκια που στερούνται της ApoE, σχετίζεται με μειωμένο σχηματισμό των NETs και μείωση της αορτικής φλεγμονής, οδηγώντας σε εξασθένιση της αθηρογένεσης [160].

Επιπροσθέτως, η ανεπάρκεια του ATP-binding cassette transporter A1/G1 σε μυελοειδή κύτταρα ποντικών, που φυσιολογικά διαμεσολαβεί την εκροή χοληστερόλης στην HDL, οδηγεί σε υπέρμετρη συσσώρευση χοληστερόλης, στην ενεργοποίηση του NOD-like receptor family pyrin domain containing 3 (NLRP3) inflammasome, στη συνεπακόλουθη επιστράτευση των ουδετεροφίλων στις αθηρωματικές πλάκες και τελικά σε νέτωση, πιθανότατα κατά τη διάρκεια των αρχικών σταδίων της αθηρογένεσης [161]. Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι η τροποποιημένη από την εκκρινόμενη φωσφολιπάση A₂ (secretory phospholipase A₂, sPLA₂) HDL αναστέλλει την ουδετεροφιλική ενεργοποίηση και τη νέτωση [162]. Η αναστολή αυτή πιθανώς οφείλεται στην αυξημένη ικανότητα εκροής χοληστερόλης της τροποποιημένης από την sPLA₂ HDL, που μειώνει το περιεχόμενο χοληστερόλης των ουδετεροφίλων, καθώς και στην καταστολή της ενδοκυττάριας συγκέντρωσης Ca²⁺ [162]. Παρ' όλα αυτά, μία άλλη μελέτη απέδειξε ότι η μείωση του περιεχομένου της χοληστερόλης στα ουδετερόφιλα ενισχύει τη νέτωση [163]. Συνεπώς, η αναστολή της νέτωσης από την τροποποιημένη από την sPLA₂ HDL ίσως να μην οφείλεται στη μείωση της χοληστερόλης των ουδετεροφίλων, αλλά στη μείωση της ενδοκυττάριας συγκέντρωσης Ca²⁺. Τα αντικρουόμενα αποτελέσματα των δύο τελευταίων μελετών χρήζουν περαιτέρω διερεύνησης, προκειμένου να εξακριβωθεί ο ρόλος της συγκέντρωσης χοληστερόλης των ουδετεροφίλων στη νέτωση.

Εκτός από το γεγονός ότι τα NETs σχηματίζονται σε ένα προαθηρογόνο περιβάλλον, υπάρχουν ισχυρές ενδείξεις ότι τα ίδια τα NETs συμβάλλουν καθοριστικά στην αθηρογένεση. Υπό αυτήν τη σκοπιά, ενώ η oxLDL επάγει τη νέτωση, ένζυμα που εμπεριέχονται στα NETs, όπως είναι η συνθάση του μονοξειδίου του αζώτου, η οξειδάση της NADPH και η MPO, οξειδώνουν την HDL, μειώνοντας την αντίστροφη μεταφορά χοληστερόλης από τους ιστούς, που, ως γνωστόν, έχει ευεργετική, αντιαθηρογόνο δράση [164].

Το DNA των NETs, σε συνδυασμό με αυξημένα επίπεδα του αντιμικροβιακού πεπτιδίου LL37 στις αθηρωματικές πλάκες, ενδέχεται να πυροδοτεί ένα μονοπάτι αυτοανοσίας, στο οποίο εμπλέκονται τα πλασματοειδή δενδριτικά κύτταρα (plasmacytoid dendritic cells, pDCs), οδηγώντας στην παραγωγή αυτοαντισωμάτων κατά της διπλής έλικας του DNA των NETs, τα οποία συμμετέχουν στα αρχικά στάδια της αθηρογένεσης [165]. Επιπλέον, η ύπαρξη των pDCs έχει εξακριβωθεί τόσο σε ανθρώπινες αθηρωματικές πλάκες, όσο και σε αθηρωματικές πλάκες

ποντικών, ενώ υψηλά επίπεδα των παραπάνω αυτοαντισωμάτων έχουν ανιχνευθεί σε άτομα με συμπτωματική, αλλά όχι με ασυμπτωματική καρωτιδική στένωση [165].

Μία από τις πρώτες εκφάνσεις της αθηρογένεσης είναι η ενδοθηλιακή δυσλειτουργία και βλάβη. Στο πλαίσιο αυτό, έχει αποδειχθεί ότι τα ουδετερόφιλα και τα NETs συσσωρεύονται κατά προτίμηση σε αθηρωματικές πλάκες πλούσιες σε SMCs, όπου επάγουν οξειδωτικό στρες και απόπτωση των ενδοθηλιακών κυττάρων διαμέσου του TLR2, καθιστώντας τις πλάκες πιο επιρρεπείς στην επιφανειακή διάβρωση [166]. Η PAD4 πιθανώς εμπλέκεται στις θρομβωτικές επιλοκές που λαμβάνουν χώρα στις επιφανειακά διαβρωμένες πλάκες [167]. Σύμφωνα με αυτούς τους ερευνητές, τα NETs επάγουν την απόπτωση ενδοθηλιακών κυττάρων καρωτιδικών αρτηριών, μία δράση που ενισχύεται παρουσία συμπληρώματος [167]. Ακόμη, υπό συνθήκες επιφανειακής διάβρωσης, τα NETs σχετίζονται με ενδοθηλιακή ενεργοποίηση διαμέσου της ταυτόχρονης δράσης της IL-1α και της καθεψίνης G [168]. Σε μία άλλη, πρόσφατη μελέτη, αποδείχθηκε ότι η αναστολή της νέτωσης σχετίζεται με μειωμένη ενδοθηλιακή δυσλειτουργία λόγω παχυσαρκίας σε ποντίκια [169].

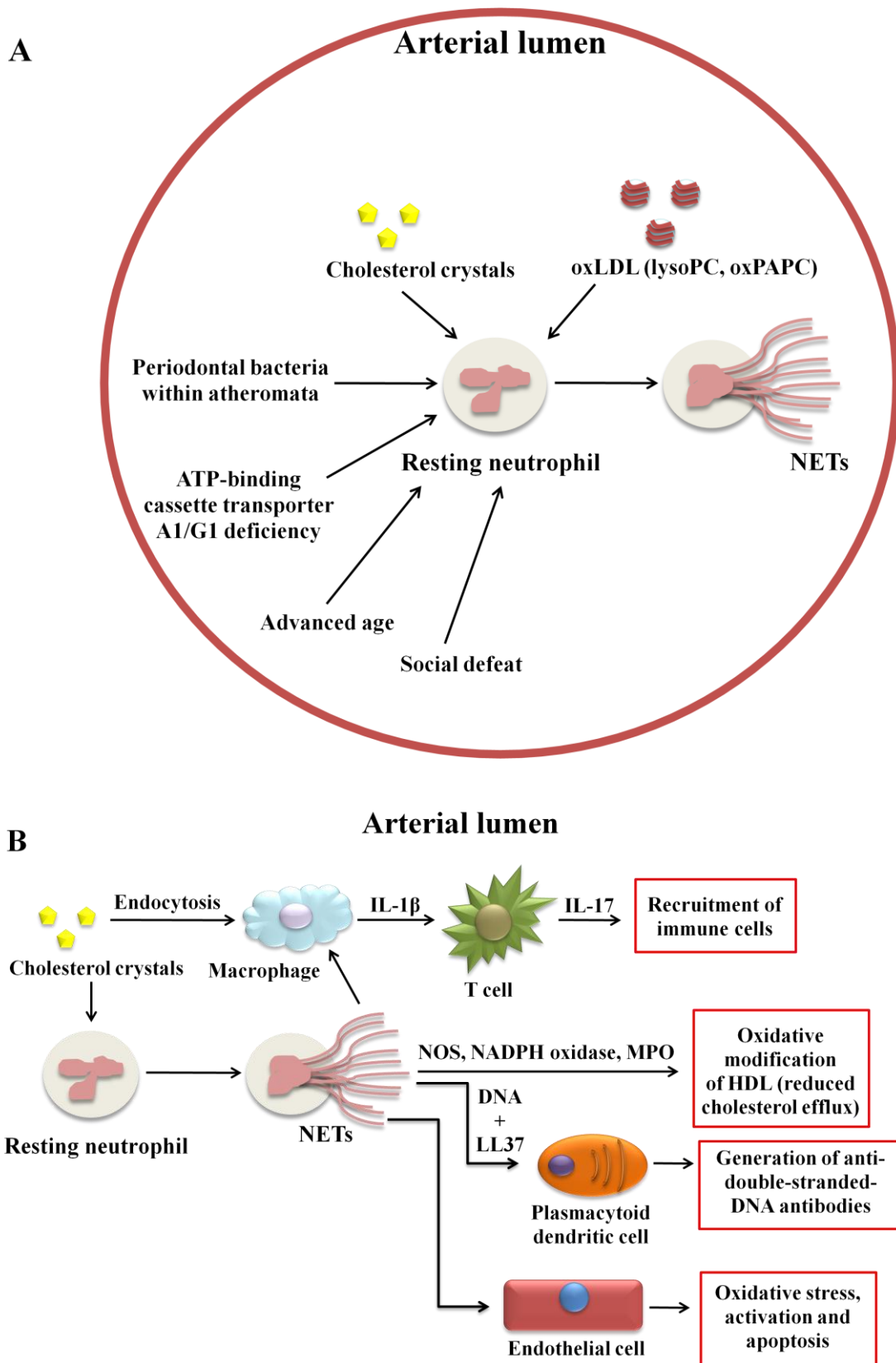
Ένας άλλος παράγοντας που συνδέει την αθηροσκλήρωση με τη νέτωση είναι η προχωρημένη ηλικία. Συνεπώς, έχει διαπιστωθεί ότι η αθηροσκλήρωση και η νέτωση προάγονται σε γηρασμένα ποντίκια [170]. Κοινωνικοί παράγοντες συνεισφέρουν επίσης στην ανάπτυξη της αθηροσκλήρωσης. Υπ' αυτήν τη σκοπιά, παρουσιάζει ενδιαφέρον το γεγονός ότι κοινωνικά ηττημένα ποντίκια εμφανίζουν υψηλότερα επίπεδα νέτωσης εντός των αθηρωματικών πλακών, κάτι που οδηγεί αυξημένη αθηρογένεση [171].

Σε μία πολύ πρόσφατη μελέτη, στην οποία χρησιμοποιήθηκαν αθηρωματικά ποντίκια, φάνηκε ότι η ενεργοποίηση των SMCs των αθηρωματικών πλακών επάγει το χημειοτακτισμό των ουδετεροφίλων, τα οποία με τη σειρά τους παράγουν NETs [172]. Στη συνέχεια, η ιστόνη H4 των NETs προκαλεί τη λύση των παραπάνω SMCs, με αποτέλεσμα την αποσταθεροποίηση της πλάκας [172]. Τα παραπάνω δεδομένα ισχυροποιούνται από το γεγονός ότι η χορήγηση αντισώματος κατά της ιστόνης H4 στα ποντίκια αναστέλλει την καταστροφή των SMCs και τη συνεπακόλουθη αστάθεια της πλάκας [172].

Δεδομένα μελετών υποστηρίζουν σθεναρά τη συμμετοχή των NETs στην παθογένεση της αθηρωματικής νόσου και στον άνθρωπο, αφού, όπως προαναφέρθηκε, η αυξημένη συγκέντρωση δεικτών της νέτωσης σχετίζονται με

βεβαρημένη αθηρωμάτωση σε ασθενείς με αθηροσκλήρωση [133]. Σε μία μικρή μελέτη, δίκτυα χρωματίνης εντοπίστηκαν εντός του λιπιδικού πυρήνα προχωρημένων αθηρωματικών αλλοιώσεων σε καρωτίδες [173]. Επιπρόσθετα, τα ουδετερόφιλα πιθανώς υφίστανται νέτωση προς απόκριση βακτηρίων που προκαλούν περιοδοντίτιδα και βρίσκονται σε αθηρωματικές πλάκες καρωτίδων που αιμορραγούν και άρα είναι ασταθείς [174]. Πιο πρόσφατα, αποδείχθηκε ότι τα NETs ίσως έχουν διαγνωστική αξία στην αθηροσκλήρωση [175]. Στη μελέτη αυτή στρατολογήθηκαν ασθενείς με ρευματοειδή αρθρίτιδα και εξετάστηκαν νετωτικοί δείκτες ως προς την πρόιμη αθηρωμάτωση, συγκριτικά με υγιείς εθελοντές. Σύμφωνα με τη μελέτη, τα εξωκυττάρια νουκλεοσώματα, ως δείκτης νέτωσης, ήταν δυνατό να ανιχνεύσουν τη ρευματοειδή αρθρίτιδα με 84% ευαισθησία και 86% εξειδίκευση, συγκριτικά με υγιείς εθελοντές. Επίσης, τα εξωκυττάρια νουκλεοσώματα ήταν δυνατό να ανιχνεύσουν την πάχυνση του καρωτιδικού έσω-μέσου χιτώνα, ενός δείκτη πρόιμης αθηρωμάτωσης, με 68% ευαισθησία και 72% εξειδίκευση, σε ασθενείς με ρευματοειδή αρθρίτιδα συγκριτικά με υγιή άτομα, δείχνοντας ότι τα νουκλεοσώματα θα μπορούσαν να είναι ένας χρήσιμος δείκτης ανάπτυξης της αθηροσκλήρωσης [175]. Σε μία επιπλέον μελέτη φάνηκε ότι αθηρωματικές πλάκες ασθενών που υπέστησαν κάποιο ACS, οι οποίες εμφάνισαν επιπλοκές όπως επιφανειακή διάβρωση ή αιμορραγία, εμφάνισαν σημαντικά περισσότερα NETs συγκριτικά με αθηρωματικές πλάκες χωρίς επιπλοκές [176]. Τα δείγματα των αθηρωμάτων με επιπλοκές περιείχαν NETs στην περιοχή του θρόμβου και της αιμορραγίας, καθώς και στην περιοχή του περιαγγειακού ιστού [176].

Συνολικά, τα παραπάνω ευρήματα παρέχουν ισχυρές ενδείξεις ότι τα NETs συμμετέχουν ενεργά στην εξέλιξη της αθηρωμάτωσης διαμέσου διαφόρων μηχανισμών, που απεικονίζονται στην Εικόνα 14.



Εικόνα 14. Α. Παράγοντες που επάγουν τη νέτωση υπό συνθήκες αθηρωμάτωσης. **Β.** Τα NETs συμμετέχουν στην αθηρογένεση διαμέσου διαφόρων μηχανισμών. Συντμήσεις: IL, ιντερλευκίνη. lysoPC, λυσοφωσφατιδυλοχολίνη. MPO,

μυελοϋπεροξειδάση. NADPH, νικοτιναμίδο-αδένινο δινουκλεοτίδιο. NETs, ουδετεροφιλικά δίκτυα χρωματίνης. NOS, συνθάση του μονοξειδίου του αζώτου. oxLDL, οξειδωμένη λιποπρωτεΐνη χαμηλής πυκνότητας. oxPAPC, .

4.3.2. Ο ρόλος των NETs στη θρόμβωση

Πρόσφατα δεδομένα τεκμηριώνουν πειστικά την εμπλοκή των NETs στην αρτηριακή και φλεβική θρόμβωση. Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, τα αιμοπετάλια επιτελούν πρωτεύοντα ρόλο στην αιμόσταση και τη θρόμβωση. Πλήθος ενδείξεων προτείνουν ότι υφίσταται μία περίπλοκη αλληλεπίδραση μεταξύ αιμοπεταλίων, ουδετεροφίλων και NETs (Εικόνα 15).

Τα NETs αποτελούν υπόστρωμα για την προσκόλληση, την ενεργοποίηση και τη συσσώρευση των αιμοπεταλίων, την προσκόλληση των ερυθροκυττάρων, αλλά και την πρόσδεση προθρομβωτικών μορίων, όπως είναι ο vWF και το ινωδογόνο, το οποίο μπορεί στη συνέχεια να μετατραπεί σε ινώδες [177]. Παρ' όλα αυτά, ακόμα και απουσία ινώδους, τα NETs προάγουν το σχηματισμό του θρόμβου [177]. Επιπλέον, το DNA και η ιστόνη H4 των NETs προάγουν τη γονιδιακή έκφραση ορισμένων παραγόντων πήξης [178]. Η αιμοπεταλιακή συσσώρευση, καθώς και η πρόσδεση προθρομβωτικών μορίων στα NETs, αποδίδονται πιθανώς στις ιστόνες των NETs, καθώς η επίδραση των αιμοπεταλίων αποκλειστικά με ιστόνες επαρκεί για τη συσσώρευσή τους [177]. Παρά ταύτα, νεότερα δεδομένα υποστηρίζουν ότι μάλλον η καθεψίνη G, και όχι το DNA και οι ιστόνες των NETs, ευθύνεται για την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων [179]. Πράγματι, μία παλαιότερη μελέτη απέδειξε ότι τα αιμοπετάλια ενεργοποιούνται από την ουδετεροφιλική καθεψίνη G διαμέσου του PAR-4 [180]. Η επαγόμενη από τα NETs αιμοπεταλιακή ενεργοποίηση φαίνεται πως σχετίζεται με τον P2Y₁₂, τον υποδοχέα-ιντεγκρίνη $\alpha_{IIb}\beta_3$ και την κινάση Syk [179]. Υπάρχουν ενδείξεις ότι NETs ασθενών με σπληναιμία ή ασθενών που υπέστησαν MI φέρουν TF [181, 182]. Από τη στιγμή της έκθεσής του στην αιματική κυκλοφορία, ο TF μπορεί να ενεργοποιήσει τον καταρράκτη της πήξης και να οδηγήσει στην παραγωγή θρομβίνης, η οποία με τη σειρά της ενεργοποιεί τα αιμοπετάλια.

Ένα πρόσφατο άρθρο υποστήριξε πως τα NETs παίζουν ρυθμιστικό ρόλο ως προς την παραγωγή και τη δομική ακεραιότητα της θρομβοσπονδίνης-1 (thrombospondin-1, TSP-1), μίας πρωτεΐνης που εκκρίνεται τόσο από τα αιμοπετάλια όσο και από τα ενδοθηλιακά κύτταρα και, μεταξύ άλλων, συμμετέχει στην αιμόσταση

[183]. Οι NE και καθεψίνη G των ουδετεροφίλων επάγουν την πρωτεόλυση της TSP-1 από μία ισομορφή των 185 kDa προς μία ισομορφή των 160 kDa, η οποία εμφανίζει ισχυρότερη αιμοστατική δράση συγκριτικά με το πρόδρομο μόριο [183]. Τα NETs ενισχύουν την παραγωγή της TSP-1 και ταυτόχρονα παρεμποδίζουν τον πλήρη κατακερματισμό της ύστερα από την έκθεση σε μεγάλες συγκεντρώσεις των παραπάνω πρωτεασών [183].

Πέραν του σπουδαίου ρόλου που διαδραματίζουν τα NETs στην ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων, έχει προταθεί ότι, αντίστροφα, τα ενεργοποιημένα αιμοπετάλια επάγουν τη νέτωση, ενοχοποιώντας την αλληλεπίδραση αιμοπεταλίων-ουδετεροφίλων όχι μόνο στη θρόμβωση, αλλά και στη φλεγμονή και σε άλλες σχετιζόμενες διαταραχές. Μία από τις πρώτες εργασίες που ασχολήθηκε με το ζήτημα αυτό, υποστήριξε ότι τα αιμοπετάλια ασθενών με σηψαιμία ενεργοποιούνται διαμέσου του TLR4 και στη συνέχεια προσδένονται σε ουδετερόφιλα που βρίσκονται ακινητοποιημένα στο ενδοθήλιο, τα οποία με τη σειρά τους προβαίνουν σε νέτωση [7]. Η διαδικασία αυτή λαμβάνει χώρα στη μικροκυκλοφορία του ήπατος και των πνευμόνων, πιθανώς για να αυξηθεί η αποτελεσματικότητα της βακτηριακής παγίδευσης [7]. Τα αιμοπετάλια παίζουν σημαντικό ρόλο στην παραπάνω διεργασία, καθώς απουσία τους δεν πραγματοποιείται νέτωση [7]. Σε μία άλλη μελέτη, τα ενεργοποιημένα αιμοπετάλια φάνηκε να πυροδοτούν τη νέτωση υπό συνθήκες οξείας πνευμονικής βλάβης ύστερα από μετάγγιση αίματος [184]. Συνεπώς, φαίνεται πως η ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων είναι σημαντική για τη νέτωση, τόσο υπό μη στείρες, όσο και υπό στείρες φλεγμονώδεις συνθήκες. Πράγματι, μία πιο πρόσφατη μελέτη υποστήριξε ότι τα ουδετερόφιλα αναζητούν τα ενεργοποιημένα αιμοπετάλια προκειμένου να ξεκινήσουν τη φλεγμονώδη απόκριση [185].

Αιμοπετάλια που έχουν ενεργοποιηθεί από κλασσικούς αγωνιστές, όπως είναι το κολλαγόνο, το ADP, η θρομβίνη και το AA, επάγουν τη νέτωση κατά τρόπο που είναι ευθέως ανάλογος του αριθμού των αιμοπεταλίων [186, 187]. Στη νέτωση που επάγεται από αιμοπετάλια τα οποία έχουν ενεργοποιηθεί με τους παραπάνω αγωνιστές, συμμετέχουν τόσο μεμβρανosύνδετοι, όσο και εκκρινόμενοι διαμεσολαβητές. Όπως προαναφέρθηκε, το κλασσικό πρόσδεμα των αιμοπεταλίων που διαμεσολαβεί την αλληλεπίδρασή τους με τα λευκοκύτταρα είναι η P-σελεκτίνη, που προσδένεται στον PSGL-1 των τελευταίων. Αν και η P-σελεκτίνη φαίνεται να διαμεσολαβεί τη νέτωση στα ποντίκια [185, 188, 189], ορισμένες δημοσιεύσεις υποστηρίζουν ότι δε συμβαίνει το ίδιο στον άνθρωπο [186, 187]. Ακόμη, έχει βρεθεί

πως η GPIb των αιμοπεταλίων, το CD18 των ουδετεροφύλων, καθώς και η έκκριση του vWF και του αιμοπεταλιακού παράγοντα 4, επίσης διαμεσολαβούν την αιμοπεταλιοεπαγόμενη νέτωση [187]. Στα σηματοδοτικά μονοπάτια που οδηγούν στην επαγόμενη από αιμοπετάλια νέτωση πιθανώς εμπλέκονται η ERK, η κινάση 3 της φωσφατιδυλοϊνositόλης και οι κινάσες Src, αλλά δε συμμετέχει η παραγωγή ROS διαμέσου της οξειδάσης της NADPH [187]. Η προερχόμενη από τα αιμοπετάλια πρωτεΐνη high mobility group box 1 (HMGB1), μία πυρηνική, μη ιστονική πρωτεΐνη, η οποία εξωκυττάρια δρα ως damage-associated molecular pattern με προφλεγμονώδεις ιδιότητες [190], επάγει τη νέτωση διαμέσου της αυτοφαγίας [186]. Η HMGB1 προσδένεται στον υποδοχέα τελικών προϊόντων προχωρημένης γλυκίωσης (receptor for advanced glycation end products) ή/και στον TLR4 [186, 191, 192].

Πολύ πρόσφατα αποδείχθηκε ότι τα PMPs προκαλούν νέτωση τόσο σε υγιή άτομα (I. Moschonas et al. EAS 2018), όσο και σε ασθενείς που πάσχουν από σκληροδερμία [193]. Τα PMPs των δεύτερων πιθανώς εκφράζουν HMGB1 [193]. Μερικοί ερευνητές ταυτοποίησαν ανόργανα πολυφωσφορικά ιόντα που εκκρίνονται από τα αιμοπετάλια, ως έναν ακόμη διαμεσολαβητή της αιμοπεταλιοεπαγόμενης νέτωσης, σε ενεργοποιημένα με θρομβίνη αιμοπετάλια ασθενών που υπέστησαν STEMI [194]. Η παραγωγή των NETs διαμέσου των πολυφωσφορικών προϋποθέτει αναστολή του μονοπατιού της mTOR και της αυτοφαγίας [194]. Η επαγόμενη διαμέσου των πολυφωσφορικών νέτωση αναστέλλεται από την IL-29, η οποία αναστέλλει επίσης το χημειοτακτισμό των ουδετεροφύλων [194].

Εν κατακλείδι, τα αιμοπετάλια, τα ουδετερόφιλα και τα NETs αποτελούν μέρος ενός φαύλου κύκλου, σύμφωνα με τον οποίο τα ενεργοποιημένα αιμοπετάλια προκαλούν το σχηματισμό των NETs, που με τη σειρά τους ενεργοποιούν περισσότερα αιμοπετάλια, είτε διαμέσου της απ' ευθείας επαφής των αιμοπεταλίων με τα NETs, είτε έμμεσα, διαμέσου της παραγόμενης από τον TF θρομβίνης.

Τα NETs συμμετέχουν τόσο στην αρτηριακή, όσο και στη φλεβική θρόμβωση. Ως προς την αρτηριακή θρόμβωση, δεδομένα υποστηρίζουν ότι τα NETs εντοπίζονται στις αρτηρίες που έχουν υποστεί MI και ότι στεφανιαίοι θρόμβοι από τέτοιους ασθενείς αποτελούνται κυρίως από ενεργοποιημένα αιμοπετάλια, ουδετερόφιλα, καθώς και NETs, που βρίσκονται σε στενή επαφή με τα αιμοπετάλια [182, 186]. NETs ανιχνεύθηκαν σε θρόμβους ηλικίας κάτω της 1 ημέρας (fresh thrombi) και ηλικίας μεταξύ 1 και 5 ημερών (lytic thrombi), αλλά όχι σε θρόμβους

ηλικίας άνω των 5 ημερών (organized thrombi) [176, 195]. Πρόσφατα προτάθηκε ότι δίκτυα χρωματίνης προερχόμενα από μακροφάγα, μαστοκύτταρα, ηωσινόφιλα και ουδετερόφιλα, είναι παρόντα σε όλα τα στάδια εξέλιξης της στεφανιαίας αθηροθρόμβωσης, ενώ τα NETs και τα δίκτυα χρωματίνης των μακροφάγων παίζουν το σπουδαιότερο ρόλο στην παθογένεση της νόσου, συγκριτικά με τα δίκτυα χρωματίνης των μαστοκυττάρων και των ηωσινοφίλων [196]. Επιπλέον, σε μία μεγάλη, πολυκεντρική μελέτη στην οποία μελετήθηκε η σύσταση θρόμβων που απομονώθηκαν από επεισόδια θρόμβωσης του stent, διαπιστώθηκε ότι τα ουδετερόφιλα ήταν το κύριο λευκοκυτταρικό συστατικό τους, ενώ NETs βρέθηκαν περίπου σε ποσοστό 25% των συνολικών δειγμάτων [197]. Πολύ πρόσφατα, τα NETs σχετίστηκαν με την παθογένεση της αορτικής στένωσης [198]. Στη μελέτη αυτή, η συγκέντρωση δεικτών νέτωσης, όπως είναι η κιτρουλλινοποιημένη ιστόνη H3, η MPO και η NE, εντός των αορτικών βαλβίδων, ήταν σημαντικά μεγαλύτερη στο πλάσμα ασθενών που έπασχαν από αορτική στένωση, συγκριτικά με υγιείς δότες [198]. Επιπλέον, οι παραπάνω δείκτες συσχετίστηκαν με παραμέτρους, όπως είναι η περιοχή της αορτικής βαλβίδας και η μέση διαβαλβιδική κλίση πίεσης [198]. Σε ένα πολύ πρόσφατο άρθρο, προτάθηκε ότι η νέτωση μπορεί να παραχθεί από διατμητικές τάσεις, σε τιμές που ευρίσκονται στις αρτηρίες, αλλά όχι στις φλέβες [199]. Σύμφωνα με αυτούς τους ερευνητές, ουδετερόφιλα παγιδευμένα εντός θρομβωτικών αποφράξεων μπορούν να διεγερθούν φυσικά διαμέσου των διατμητικών τάσεων, απουσία αιμοπεταλιακών και ουδετεροφιλικών αγωνιστών και διαμεσολαβητών [199]. Μία επόμενη δουλειά της ίδιας ερευνητικής ομάδας απέδειξε ότι η προκαλούμενη από διατμητική τάση νέτωση αναστέλλεται παρουσία ινώδους, ενώ αντίστροφα η παρουσία ινώδους προάγει τη νέτωση [200]. Σε ένα μικρό δείγμα ασθενών με στεφανιαία εκτασία παρατηρήθηκε αύξηση της νέτωσης συγκριτικά με ασθενείς που έπασχαν από στεφανιαία νόσο (coronary artery disease, CAD) ή υγιή άτομα [201].

Η προσκόλληση των ερυθροκυττάρων στα NETs οδηγεί στο σχηματισμό ενός ερυθρού θρόμβου, εμφανισιακά όμοιου με τους φλεβικούς θρόμβους [177]. Πράγματι, πολλές μελέτες συνδέουν τα NETs με τη φλεβική θρόμβωση, τόσο σε ζωικά μοντέλα [177, 202-205], όσο και στον άνθρωπο [206, 207]. Παράγοντες όπως ο vWF, ο TF και η GPIb των αιμοπεταλίων συμμετέχουν στην επαγόμενη από τα NETs φλεβική θρόμβωση [202, 203]. Επιπρόσθετα, η συνεργατική σηματοδότηση διαμέσου των υποδοχέων των ουδετεροφίλων, PSGL-1 και CXCR2, έχει ως

αποτέλεσμα τη νέτωση, γεγονός που προάγει την εν τω βάθει φλεβική θρόμβωση σε ποντίκια [208]. Όπως συμβαίνει και με τους στεφανιαίους θρόμβους, τα NETs είναι παρόντα σε θρόμβους 0-5 ημερών, αλλά όχι σε NETs ηλικίας άνω των 5 ημερών [207]. Η PAD4, αλλά όχι η NE, φαίνεται να διαδραματίζει κρίσιμο ρόλο στη νέτωση που λαμβάνει χώρα σε ποντίκια με εν τω βάθει φλεβική θρόμβωση [204, 205]. Ακόμη, η προερχόμενη από τα αιμοπετάλια HMGB1 και η συνεπακόλουθη νέτωση που αυτή επάγει έχει εμπλακεί στη φλεβική θρόμβωση σε μοντέλα ποντικών [209, 210]. Η παρουσία του TF στα NETs, η οποία έχει αναφερθεί παραπάνω, (αναφορές [181, 182]), είναι δυνατό να συνεισφέρει στην παθογένεση της προκαλούμενης από τα NETs φλεβικής θρόμβωσης διαμέσου της πυροδότησης του καταρράκτη της πήξης. Επίσης έχει προταθεί ότι η αιμοπεταλιοεπαγόμενη νεκρόπτωση των ουδετεροφίλων επίσης συμβάλλει στη φλεβική θρόμβωση [211]. Επιπλέον, έχει φανεί ότι η ιντερφερόνη γ που προέρχεται από τα κύτταρα φυσικοί φονείς προκαλεί νέτωση που ίσως συνεισφέρει στη φλεβική θρόμβωση ποντικών [212]. Τα NETs φαίνεται επίσης να συμμετέχουν στη φλεβική θρόμβωση που εμφανίζεται στην επαγόμενη από ηπαρίνη θρομβοπενία (heparin-induced thrombocytopenia, HIT) [213]. Σε ένα μοντέλο HIT σε ποντίκια, φάνηκε ότι τα ουδετερόφιλα προσδένονται στο φλεβικό ενδοθήλιο και ενσωματώνονται στους σχηματιζόμενους θρόμβους. Τα NETs που παράγονται από τα ουδετερόφιλα αυτά συμπλοκοποιούνται με τον αιμοπεταλιακό παράγοντα 4 και με αντισώματα HIT και γίνονται ανθεκτικά στη λύση, ενισχύοντας έτσι τη διάδοση των σχηματιζόμενων θρόμβων [213]. Υπό αυτές τις συνθήκες, η αναστολή της νέτωσης διαμέσου της αναστολής της PAD4, σταματά την παραπάνω θρόμβωση [213]. Τέλος, μελέτες συνδέουν τη νέτωση με την κατάσταση υπερπηκτικότητας που χαρακτηρίζει τον καρκίνο και τη δευτεροπαθή φλεβική θρόμβωση που είναι δυνατό να προκαλέσει [214-216]. Πιο συγκεκριμένα, ουδετερόφιλα ασθενών που πάσχουν από ορισμένους τύπους καρκίνου, όπως είναι το ακανθοκυτταρικό καρκίνωμα του στόματος και ο καρκίνος του παγκρέατος, είναι πιο επιρρεπή σε νέτωση συγκριτικά με υγιή άτομα [214-216]. Τα NETs αυτά οδηγούν σε αυξημένη παραγωγή θρομβίνης και ινώδους συγκριτικά με άτομα ελέγχου [214-216]. Αντίστροφα, η απαλοιφή των ουδετεροφίλων, καθώς και η καταστροφή της δομής των NETs αναστέλλει την παραπάνω υπερπηκτικότητα [214, 215]. Σε μία άλλη μελέτη βρέθηκε ότι αποτρέποντας τα NETs να φέρουν το carcinoembryonic Ag cell adhesion molecule 1 (CEACAM1), ή η απαλοιφή του αντίστοιχου γονιδίου σε ένα μοντέλο ποντικού, οδήγησε σε σημαντική μείωση της προσκόλλησης, μετανάστευσης

και μετάστασης κυττάρων καρκίνου του παχέος εντέρου [217]. Σε μία ακόμη μελέτη φάνηκε πως η νέτωση σχετίζεται με καλύτερη κλινική έκβαση ασθενών που πάσχουν από καρκίνο των ωοθηκών [218]. Δεδομένα υποστηρίζουν επίσης ότι μικροσωματίδια που εκφράζουν φωσφατιδυλοσερίνη, καθώς και NETs, αυξάνουν τον προπηκτικό κίνδυνο σε ασθενείς με καρκίνο του παγκρέατος [219].

Ο histone deacetylase inhibitor (HDACi) μειώνει την επαγόμενη από ενεργοποιημένα αιμοπετάλια νέτωση, τροποποιώντας εν μέρει την έκκριση των αιμοπεταλίων [220]. Ένα από τα συστατικά των NETs, η κιτρουλλινοποιημένη ιστόνη H3 (citruullinated histone H3, CitH3), μπορεί να αποτελέσει φαρμακευτικό στόχο για την άρση της νέτωσης, όπως φάνηκε από πειράματα ενδοτοξικού σοκ σε ποντίκια, η οποία έχει καταστρεπτικές ιδιότητες για τον ξενιστή [221] και ίσως μπορεί να χρησιμοποιηθεί και σε άλλες καταστάσεις. Παρά το γεγονός ότι, όπως προαναφέρθηκε, τα NETs μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως προγνωστικοί και διαγνωστικοί βιοδείκτες, μία μελέτη πρότεινε ότι αυτό δε συμβαίνει όσον αφορά στη σηψαιμία των νεογνών, πιθανώς διότι τα ουδετερόφιλα των νεογνών δεν μπορούν να κάνουν NETs, ή υφίστανται μεν νέτωση, αλλά καθυστερημένα [222]. Τα αιμοπετάλια δεν τροποποιούν το σχηματισμό των NETs μόνο, αλλά και το σχηματισμό δικτύων χρωματίνης από ηωσινόφιλα, μονοκύτταρα και μακροφάγα [223].

Σε μία μελέτη στην οποία στρατολογήθηκαν 79 ασθενείς με PAD και προσδιορίστηκε η συγκέντρωση των δεικτών νέτωσης, H3Cit και ελεύθερα κυκλοφορούν DNA (cell-free DNA, cfDNA), στην κυκλοφορία ύστερα από περιφερική αγγειοπλαστική με τοποθέτηση stent, φάνηκε ότι το 43% των ασθενών εμφάνισε το πρωτεύον καταληκτικό σημείο (προσδιορισμένο ως μη θανατηφόρο MI, εγκεφαλικό επεισόδιο ή παροδικό ισχαιμικό εγκεφαλικό επεισόδιο (transient ischemic attack, TIA), καρδιαγγειακός θάνατος και επαναστένωση του αγγείου-στόχου άνω του 80%) ενώ η συγκέντρωση των παραπάνω δεικτών συσχετίστηκε στατιστικά σημαντικά με αυτό ($p = 0,019$ και $p = 0,028$, αντίστοιχα), εντός διετούς follow-up. Η συγκέντρωση του cfDNA συσχετίστηκε σημαντικά με την επαγόμενη από AA μεμβρανική έκφραση της P-σελεκτίνης ($p = 0,006$) και την ενεργοποίηση του υποδοχέα α_{IIb}/β_3 ($p < 0,001$) στα αιμοπετάλια των ασθενών, ενώ η συγκέντρωση της H3Cit επίσης συσχετίστηκε σημαντικά με την επαγόμενη από TRAP ή AA μεμβρανική έκφραση της P-σελεκτίνης ($p = 0,048$ και $p = 0,032$, αντίστοιχα). Συνεπώς, οι παραπάνω δείκτες νέτωσης πιθανώς προβλέπουν τα ισχαιμικά

συμβάματα ύστερα από περιφερική αγγειοπλαστική με τοποθέτηση stent και συσχετίζονται με αιμοπεταλιακή ενεργοποίηση υπό θεραπεία σε σταθερή PAD [224].

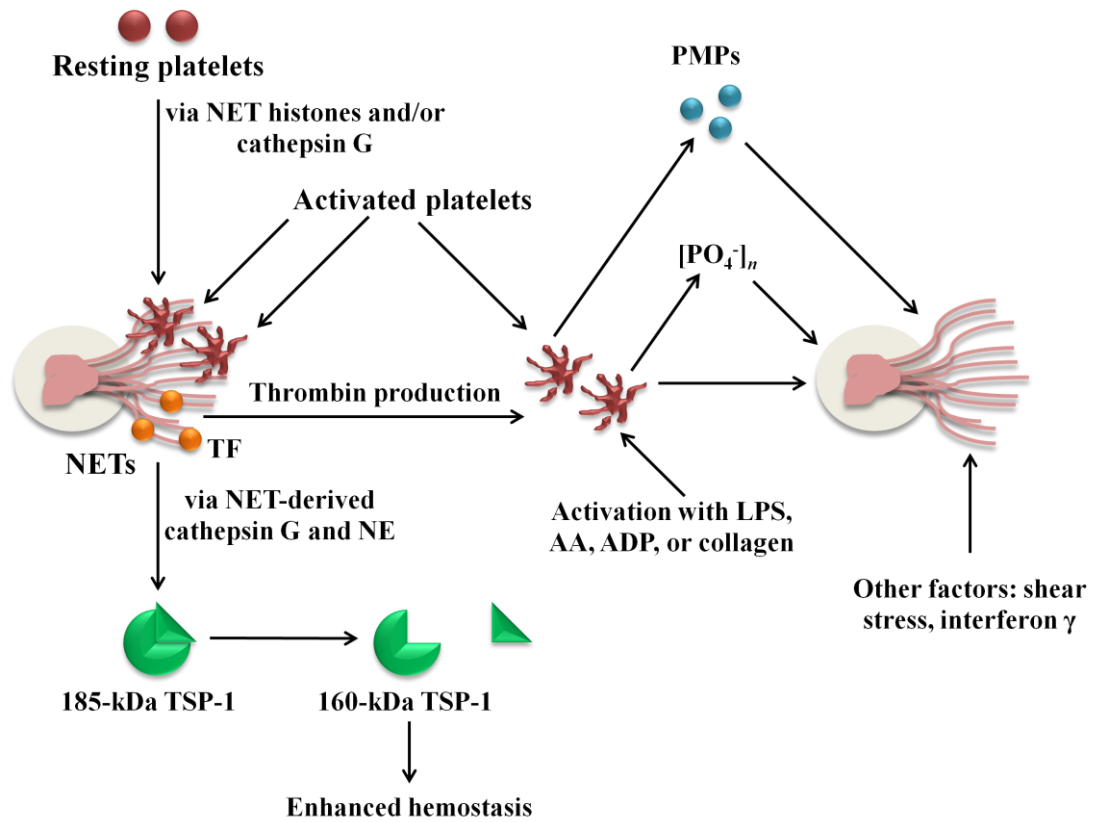
Νεότερα δεδομένα αποδεικνύουν ότι η πρωτεΐνη S100A8/A9 όχι μόνο ενεργοποιεί τα ουδετερόφιλα, αλλά συνιστά δείκτη νέτωσης [225]. Μία άλλη μελέτη απέδειξε ότι ο σχηματισμός των NETs προϋποθέτει την ανακατανομή της ακτίνης στον κυτταροσκελετό των ουδετεροφύλων [226]. Μία πρόσφατη μελέτη απέδειξε ότι η επαγόμενη από θρομβίνη ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων προκαλεί την ενεργοποίηση του μεταγραφικού παράγοντα NFAT στα αιμοπετάλια, γεγονός που προκαλεί παρατεταμένη νέτωση υπό συνθήκες σηψαιμίας [227]. Σε μία άλλη, πρόσφατη μελέτη, φάνηκε ότι ψυχοκοινωνικοί παράγοντες σχετίζονται με αυξημένη πιθανότητα εμφάνισης αρτηριακής θρόμβωσης, λόγω αυξημένης νέτωσης επαγόμενης από ενεργοποιημένα αιμοπετάλια, διαμέσου ενεργοποίησης του ουδετεροφιλικού CD11b [228]. Η αυθόρμητη νέτωση που υφίστανται τα ουδετερόφιλα εξαρτάται από το γήρας τους. Τα γηρασμένα ουδετερόφιλα εμφανίζουν αυξημένη τάση για αυτοφαγία, η οποία οδηγεί σε νέτωση [229]. Σε ασθενείς που υπέστησαν οξύ εγκεφαλικό επεισόδιο, η σύσταση των θρόμβων είναι ετερογενής. Ακόμη, το μοτίβο κατανομής των θρόμβων από εγκεφαλικό επεισόδιο διαφοροποιείται σε σχέση με το αντίστοιχο από καρδιακή ή αρτηριακή θρόμβωση και η αποτελεσματικότητα της θρομβεκτομής εξαρτάται από την κατανομή αυτή. Επίσης, η ηλικία του θρόμβου σχετίζεται με την αποτελεσματικότητα της επαναγγείωσης. Τα ουδετερόφιλα και τα NETs συμμετέχουν στο σχηματισμό του θρόμβου και στην αντίσταση στη θεραπεία επαναγγείωσης [230]. Η καθυστερημένη αγγειακή αναστόμωση ασθενών που υπέστησαν οξύ ισχαιμικό εγκεφαλικό επεισόδιο πιθανώς οδηγεί σε μεταβολές στη σύσταση των θρόμβων, με αποτέλεσμα τη μειωμένη πιθανότητα επιτυχίας της θρομβεκτομής. Οι αλλαγές στη σύσταση περιλαμβάνουν το αυξημένο περιεχόμενο σε NETs, λευκοκύτταρα, ινώδες και vWF [231]. Σε ασθενείς με COVID-19, η αυξημένη νέτωση που παρατηρείται οδηγεί σε αυξημένη θρομβογένεση [232, 233]. Τα NETs συσχετίζονται με χειρότερη έκβαση καρδιαγγειακών ασθενών. Πράγματι, η παρουσία NETs στους στεφανιαίους θρόμβους 406 ασθενών με STEMI συσχετίστηκε με χειρότερη έκβαση αμέσως μετά το σύμβαμα, κυρίως λόγω αυξημένης πιθανότητας καρδιακού θανάτου και θρόμβωσης του stent. Σε επιλεγμένους ασθενείς, τα NETs θα ήταν δυνατό να αποτελέσουν θεραπευτικό στόχο, ώστε να αποφευχθεί κάποια επαναθρόμβωση [234]. Η ανεπάρκεια στο γονίδιο *Lnk* προωθεί τη νέτωση και την αρτηριακή θρόμβωση, με τρόπο εξαρτώμενο από τα oxPLs. Η μετάλλαξη

LNK(R262W) μειώνει τη δράση της LNK στα ανθρώπινα αιμοπετάλια και ουδετερόφιλα, προωθώντας έτσι τη νέτωση και αυξάνει τον κίνδυνο εμφάνισης στεφανιαίας νόσου σε ασθενείς που φέρουν τη μετάλλαξη *Jak2^{VF}*. Θεραπείες που στοχεύουν τα oxPLs μπορεί να αποδειχθούν χρήσιμες σε γενετικά κατάλληλους ασθενείς [235]. Η σύσταση των θρόμβων καθορίζει τη δομή τους, τη μηχανική τους αντοχή και, συνεπώς, την κλινική έκβαση των ασθενών με CAD, οξύ ισχαιμικό εγκεφαλικό επεισόδιο και PAD. Το ινώδες αποτελεί τη βάση των θρόμβων, μαζί με DNA που προέρχεται από τα NETs και vWF που «γεφυρώνει» το DNA με τα αιμοπετάλια. Αναλύθηκε η σύσταση θρόμβων 18 ασθενών με CAD, 17 ασθενών με οξύ ισχαιμικό εγκεφαλικό επεισόδιο και 19 ασθενών με PAD. Βρέθηκε ότι ο λόγος της συγκέντρωσης του ινώδους προς τη συγκέντρωση του vWF είναι ευθέως ανάλογος της συγκέντρωσης βιοδεικτών φλεγμονής στο πλάσμα, καθώς και του εξωκυττάρου DNA [236]. Τα αιμοπετάλια ασθενών με STEMI αυξάνουν το περιεχόμενό τους στις πρωτεΐνες S100A8 και S100A9 κατά τη διάρκεια του συμβάματος, γεγονός που συμπίπτει με τον αυξημένο αριθμό ουδετεροφίλων. Πράγματι, όταν απομονωμένα αιμοπετάλια και ουδετερόφιλα συνεπωάστηκαν εν ηρεμία, ή υπό συνθήκες ενεργοποίησης, τα ουδετερόφιλα εξέκριναν S100A8, η οποία προσελήφθη από τα αιμοπετάλια. Τα ουδετερόφιλα απελευθερώνουν τις δύο παραπάνω πρωτεΐνες ως ελεύθερο διμερές και όχι εντός κυστιδίων ή δεσμευμένες με NETs [237]. Μία μελέτη απέδειξε ότι τα NETs αύξησαν σημαντικά την έκφραση των μορίων IL-1 β , παράγοντας νέκρωσης όγκων- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) και IL-6 σε M1 μακροφάγα, υπό νορμοξικές συνθήκες, αλλά ανέστειλαν την έκφρασή τους στα παραπάνω μακροφάγα υπό συνθήκες υποξίας. Τα NETs αύξησαν τον αριθμό των oxLDL-θετικών M1 και M2 μακροφάγων, τόσο σε ανθρώπους, όσο και σε ποντίκια, υπό νορμοξικές συνθήκες, αλλά δεν επηρέασαν το σχηματισμό αφρωδών κυττάρων σε ποντίκια, υπό συνθήκες υποξίας. Η πρόσληψη της oxLDL δε σχετίστηκε με την έκφραση του υποδοχέα της LDL, CD36, αλλά, παρουσία των NETs, τα μακροφάγα εξέφρασαν και εξέκριναν την MMP-9, γεγονός που ανεστάλη όταν τα NETs καλλιεργήθηκαν υπό συνθήκες υποξίας. Τα αποτελέσματα αυτά προτείνουν ότι τα NETs πιθανώς ευνοούν το σχηματισμό αφρωδών κυττάρων και την αστάθεια της αθηρωματικής πλάκας, αλλά εμφανίζουν αντίθετη δράση στη φλεγμονώδη απόκριση των M1 μακροφάγων, στον άνθρωπο και τα ποντίκια. Τέλος, η επίδραση των NETs στο φαινότυπο των μακροφάγων μεταβάλλεται υπό συνθήκες υποξίας [238]. Μία πρόσφατη μελέτη απέδειξε ότι η φαρμακευτική ρύθμιση της συγκέντρωσης του

κυτταρικού NAD^+ στα ουδετερόφιλα (και άρα της ικανότητάς τους να παράγουν NETs) πιθανώς αναστέλλει την πνευμονική εμβολή σε ποντίκια που φέρουν καρκινικούς όγκους, γεγονός που ίσως συμβάλλει στην αντιμετώπιση της θρόμβωσης που σχετίζεται με καρκίνο [238]. Σε ασθενείς που υποβάλλονται σε αιμοκάθαρση ή χημειοθεραπεία παρατηρούνται φλεβικοί θρόμβοι, σχετιζόμενοι με τους χρησιμοποιούμενους καθετήρες, οι οποίοι οδηγούν σε στένωση κεντρικών φλεβών. Οι θρόμβοι αυτοί περιλαμβάνουν NETs, τα οποία σχηματίζονται λόγω παροδικής βακτηριαιμίας στα σημεία εισόδου του καθετήρα. Πράγματι, στο 78% των περιστατικών ανιχνεύθηκε η παρουσία βακτηρίων, κυρίως *Staphylococcus aureus* (στο 69% των περιπτώσεων). Με τη χρήση DNάσης I τα προαναφερθέντα NETs διαλύθηκαν, εξηγώντας πιθανώς ότι η επαγόμενη από παροδική βακτηριαιμία νέτωση οδηγεί σε θρόμβωση σχετιζόμενη σε καθετήρα [238]. Τα ουδετερόφιλα, καθώς και τα NETs που αυτά σχηματίζουν, συμβάλλουν στην ίνωση, ως μέσο επιδιόρθωσης, ύστερα από ένα AMI. Παρουσιάζει ενδιαφέρον το γεγονός ότι, NETs έχουν ανευρεθεί σε κοιλικά ανευρύσματα ασθενών που υπέστησαν AMI, ενώ οι ασθενείς αυτοί εμφανίζουν επίσης αυξημένη συγκέντρωση NETs στην κυκλοφορία του αίματος. Τα NETs ενεργοποιούν τη μετανάστευση των ινοβλαστών και ενισχύουν τη διαφοροποίησή τους σε καρδιακούς μυοϊνοβλάστες διαμέσου των σηματοδοτικών μονοπατιών Smad, MAPK και RhoA. Τα αποτελέσματα αυτά συνηγορούν υπέρ ενός προϊνωτικού ρόλου των NETs στη χρόνια καρδιακή ίνωση και τα κοιλικά ανευρύσματα [239]. Τα ευρήματα μίας νεότερης μελέτης προτείνουν ότι η υπεροξειδωση των φωσφολιπιδίων, διαμέσου της ενζυμικής δράσης της MPO, παίζει σημαντικό ρόλο στη νέτωση που λαμβάνει χώρα τόσο *in vitro* (με αγωνιστές PMA ή ανοσοσυμπλέγματα), όσο και *in vivo* (με LPS). Αντίθετα, η NE δε συμμετέχει στην υπεροξειδωση των φωσφολιπιδίων, αλλά συνεισφέρει στην αποσυμπύκνωση της χρωματίνης και τη διόγκωση του πυρήνα [240]. Η ανάλυση στεφανιαίων θρόμβων από 26 ασθενείς με STEMI απέδειξε την ύπαρξη NETs σε αυτούς, όπως φάνηκε από την ύπαρξη CitH3 και MPO, ενώ στα NETs βρέθηκαν προσδεμένα ερυθροκύτταρα και σίδηρος, προτείνοντας μία σύνδεση ανάμεσα στα NETs, τα ερυθροκύτταρα και τα προϊόντα των δεύτερων [241].

Όλα τα παραπάνω δεδομένα επισφραγίζουν το σημαντικό ρόλο των NETs στις διάφορες εκφάνσεις της θρόμβωσης, η οποία οφείλεται ως επί το πλείστον στην αλληλεπίδραση των αιμοπεταλίων με τα ουδετερόφιλα και τα NETs. Μηχανισμοί

διαμέσου των οποίων τα αιμοπετάλια αλληλεπιδρούν με τα ουδετερόφιλα και τα NETs απεικονίζονται στην Εικόνα 15.



Εικόνα 15. Μηχανισμοί διαμέσου των οποίων τα αιμοπετάλια αλληλεπιδρούν με τα ουδετερόφιλα και τα NETs. Συντμήσεις: AA, αραχιδονικό οξύ. ADP, διφωσφορική αδενοσίνη. LPS, λιποπολυσακχαρίδιο. NE, ουδετεροφιλική ελαστάση. NETs, ουδετεροφιλικά δίκτυα χρωματίνης. PMPs, μικροσωματίδια των αιμοπεταλίων. TF, ιστικός παράγοντας. TSP-1, θρομβοσπονδίνη-1.

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5. Υλικά και μέθοδοι

Στην παρούσα Διδακτορική Διατριβή μελετήθηκαν δύο παράμετροι του φάσματος λειτουργίας των ουδετεροφίλων, ο χημειοτακτισμός και η νέτωση.

5.1. Απομόνωση PMNs με βαθμίδωση πυκνοτήτων

5.1.1. Αρχή της μεθόδου

Η τεχνική αυτή βασίζεται στη διαφορετική κατανομή των έμμορφων συστατικών του αίματος και του πλάσματος σε στοιβάδες, ανάλογα με την πυκνότητά τους, όταν ολικό αίμα επιστοιβάζεται σε δύο υπέρτονα διαλύματα πολυσακχαριτών (φικόλες), που έχουν, με τη σειρά τους, διαφορετική πυκνότητα.

5.1.2. Υλικά, αντιδραστήρια και όργανα

- ✚ Σύριγγες και βελόνες τύπου «πεταλούδα» 21G
- ✚ Ηπαρίνη αρχικής συγκέντρωσης 5.000 U/mL (LEO). Συντηρείται στους 4°C.
- ✚ Σωλήνες πολυπροπυλενίου (polypropylene, PP), με κωνικό πυθμένα, των 15 mL (Sarstedt, αρ. καταλόγου 62.554.502)
- ✚ Εμπορικά διαθέσιμος, αποστειρωμένος φυσιολογικός ορός (Omega Pharma International nv, σειρά ClinoFar). Συντηρείται σε θερμοκρασία δωματίου (room temperature, RT).
- ✚ Αποστειρωμένες πλαστικές πιπέτες παστέρ των 3 mL (Sarstedt)
- ✚ Histopaque®-1119, πυκνότητας 1,119 g/mL (Sigma-Aldrich, αρ. καταλόγου 11191-100ML). Συντηρείται στους 4°C.
- ✚ Ficoll-Paque PLUS, πυκνότητας 1,077 g/mL (Cytiva, αρ. καταλόγου 17144002). Συντηρείται στους 4°C.
- ✚ Φυγόκεντρος πάγκου (Hermle, μοντέλο Z 320)
- ✚ Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (phosphate-buffered saline, PBS) 12,5 mM (1X). Αρχικά παρασκευάζεται πυκνό PBS (10X), με pH = 6,8, προσθέτοντας 80 g NaCl, 2 g KCl, 17,8 g Na₂HPO₄ και 2,7 g KH₂PO₄ σε 1 L δις απεσταγμένου ύδατος (double-distilled water, ddH₂O). Στη συνέχεια, το πυκνό PBS αποστειρώνεται και φυλάσσεται σε RT. Το PBS (1X) παρασκευάζεται με αραίωση 1:10 v/v του πυκνού PBS, με ddH₂O.

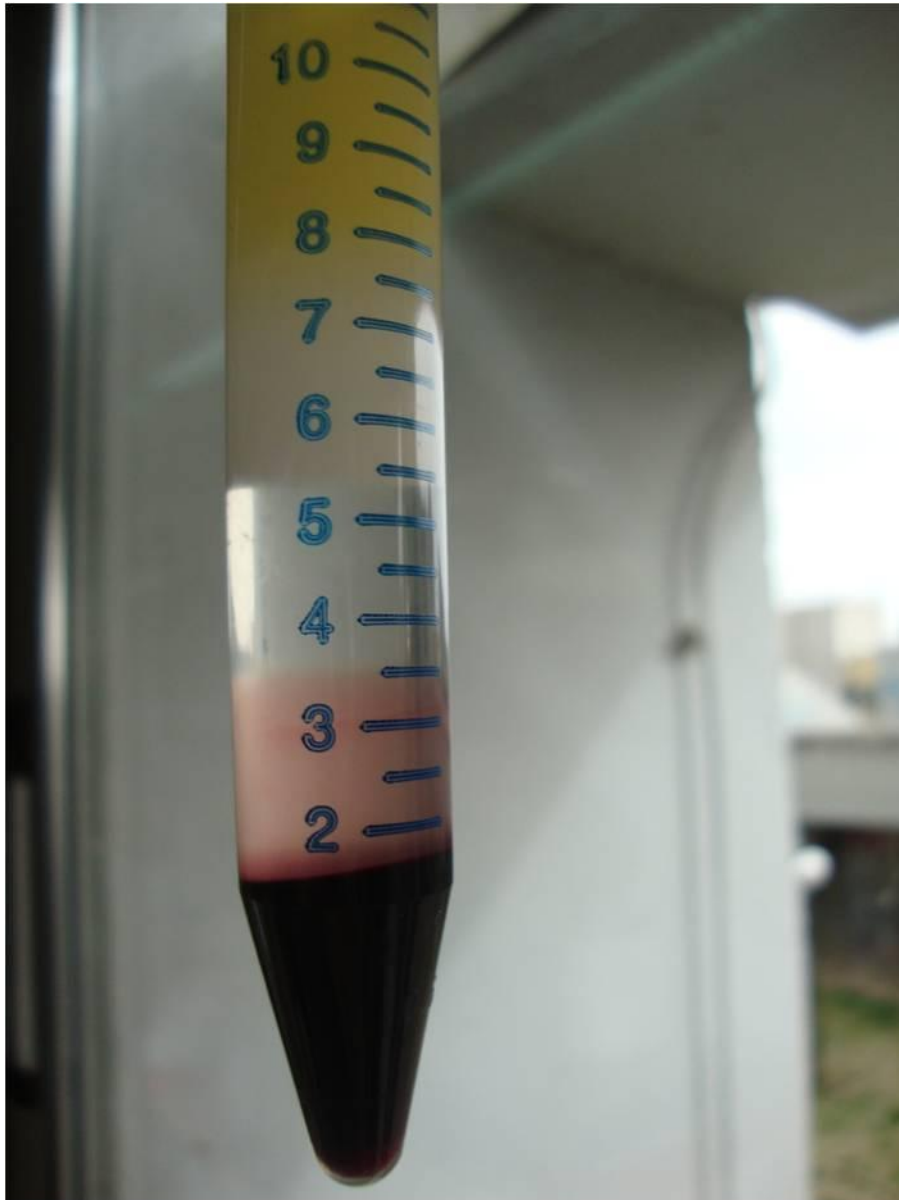
- ✚ Θρεπτικό υλικό Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640, χωρίς L-γλουταμίνη (Gibco, αρ. καταλόγου 31870025)
- ✚ Θερμικά απενεργοποιημένος ανθρώπινος ορός, από πηγμένο ολικό αίμα αρσενικού δότη με ομάδα αίματος AB (Sigma-Aldrich, αρ. καταλόγου H5667)

5.1.3. Πειραματική πορεία

- ✚ «Ηπαρινίζεται» το εσωτερικό της σύριγγας με 1 mL ηπαρίνης, το οποίο στη συνέχεια αποχύνεται και λαμβάνονται ολικό, περιφερικό αίμα από φαινομενικά υγιείς δότες, ύστερα από δωδεκάωρη νηστεία, οι οποίοι δεν έλαβαν αντιφλεγμονώδη και αντιθρομβωτική αγωγή για 2 εβδομάδες πριν την αιμοληψία και δεν κατανάλωσαν αλκοόλ για 3 ημέρες πριν από αυτήν. Εναλλακτικά, το αίμα μπορεί να ληφθεί με μη «ηπαρινισμένη» σύριγγα και να προστεθεί σε σωλήνες PP, παρουσία 20 U/mL ηπαρίνης (αντιστοιχούν σε 40 μ L ηπαρίνης, αρχικής συγκέντρωσης 5.000 U/mL, ανά 10 mL αίματος).
- ✚ Το αίμα αραιώνεται με αποστειρωμένο φυσιολογικό ορό, σε αναλογία 2:1 v/v, αντίστοιχα, ώστε να μειωθεί το ιξώδες του αίματος και να επιτευχθεί ευκολότερα ο διαχωρισμός των συστατικών του.
- ✚ Προστίθενται 3 mL Histopaque® ανά σωλήνα PP και επιστοιβάζονται με προσοχή 3 mL Ficoll-Paque PLUS. Η προσθήκη της Ficoll-Paque PLUS πρέπει να γίνεται ήπια και κοντά στην επιφάνεια του υγρού, ώστε να αποφεύγεται η ανάμειξη των 2 φικολών. Δεν αφήνουμε τις φικόλες να έρθουν σε RT, αλλά τις χρησιμοποιούμε απ' ευθείας από τους 4°C, ώστε να έχουν μειωμένο ιξώδες, γεγονός που αποτρέπει την ανάμειξή τους κατά την επιστοίβαξη.
- ✚ Επιστοιβάζονται με προσοχή 6 mL αραιωμένου αίματος. Όπως και παραπάνω, η προσθήκη του αραιωμένου αίματος πρέπει να γίνεται ήπια και κοντά στην επιφάνεια του υγρού, ώστε να αποφεύγεται η ανάμειξή του με τη Ficoll-Paque PLUS.
- ✚ Ακολουθεί φυγοκέντρηση στα $700 \times g$ για 30 min. Η φυγοκέντρηση πρέπει να γίνεται σε θερμοκρασιακό εύρος 18 έως 26°C, ώστε να αποφεύγεται ο σχηματισμός συσσωματωμάτων PMNs, που έχει ως αποτέλεσμα την απώλεια κυττάρων.
- ✚ Μετά το πέρας της φυγοκέντρωσης έχουν σχηματισθεί 4 διακριτές στοιβάδες: η στοιβάδα των ερυθροκυττάρων, η στοιβάδα των PMNs, η οποία είναι

πλούσια σε ουδετερόφιλα, η στοιβάδα των PBMCs και των αιμοπεταλίων και τη στοιβάδα του πλάσματος (Εικόνα 16).

- ✚ Αναρροφώνται με πλαστική πιπέτα παστέρ όλες οι στοιβάδες μέχρι τη στοιβάδα των PMNs, με κυκλικές κινήσεις.
- ✚ Στη συνέχεια, με νέα πιπέτα παστέρ, λαμβάνεται η στοιβάδα των PMNs από τα 2,5 έως τα 3,5 mL και μεταφέρεται σε νέο σωλήνα.
- ✚ Συμπληρώνεται ο όγκος του σωλήνα μέχρι τα 10 mL με 12,5 mM PBS (1X) και πραγματοποιείται ήπια ανάδευση, ώστε να ομογενοποιηθεί το εναίωρημα.
- ✚ Ακολουθεί φυγοκέντρηση στα $200 \times g$ για 10 min, σε RT.
- ✚ Μετά το πέρας της φυγοκέντρησης, απορρίπτεται το υπερκείμενο και το ίζημα των PMNs επαναδιασπείρεται με RPMI, παρουσία 2% v/v θερμικά απενεργοποιημένου ανθρώπινου ορού.
- ✚ Ακολουθεί δοκιμασία βιωσιμότητας των κυττάρων, καθώς και μέτρησή τους και προσαρμογή στον επιθυμητό αριθμό.



Εικόνα 16. Στοιβάδες που σχηματίζονται κατόπιν φυγοκέντρωσης, όταν ολικό αίμα επιστοιβάζεται σε βαθμίδωση πυκνότητας φικολών. Από τον πυθμένα του σωλήνα και προς τα επάνω, οι παρατηρούμενες στοιβάδες είναι οι εξής: στοιβάδα των ερυθροκυττάρων, στοιβάδα των PMNs, στοιβάδα των PBMCS και των αιμοπεταλίων και στοιβάδα του πλάσματος. Συντμήσεις: PBMCS, μονοπύρρηνα κύτταρα περιφερικού αίματος. PMNs, πολυμορφοπύρρηνα λευκοκύτταρα.

5.2. Δοκιμασία χημειοτακτισμού με τη μέθοδο του θαλάμου Boyden

5.2.1. Αρχή της μεθόδου

Η παρούσα τεχνική βασίζεται στην ικανότητα μετανάστευσης των ουδετεροφίλων διαμέσου πολυανθρακικής μεμβράνης, με πόρους κατάλληλης διαμέτρου, προς απόκριση σε βαθμίδωση συγκέντρωσης ενός χημειοτακτικού παράγοντα.

5.2.2. Υλικά, αντιδραστήρια και όργανα

- ✚ Ταπήτια 24 βοθρίων (Sarstedt, αρ. καταλόγου 83.3922)
- ✚ Φίλτρα με πολυανθρακική μεμβράνη, με πόρους διαμέτρου 3 μm (Millicell®, Merck Millipore Ltd., αρ. καταλόγου P1TP01250)
- ✚ Λαβίδα τιτανίου με λεπτές άκρες (Dumont, 7, αρ. καταλόγου 0302-7-PO)
- ✚ Θρεπτικό υλικό RPMI 1640, χωρίς L-γλουταμίνη (Gibco, αρ. καταλόγου 31870025)
- ✚ Θερμικά απενεργοποιημένος ανθρώπινος ορός, από πηγμένο ολικό αίμα αρσενικού δότη με ομάδα αίματος AB (Sigma-Aldrich, αρ. καταλόγου H5667)
- ✚ N-φορμυλο-μεθειονυλο-λευκυλο-φαινυλαλανίνη (N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine, fMLP) (Sigma-Aldrich, αρ. καταλόγου F3506-10MG)
- ✚ PBS 12,5 mM (1X). Το διάλυμα αυτό παρασκευάζεται και φυλάσσεται όπως περιγράφηκε παραπάνω.
- ✚ Υδατικό διάλυμα φορμαλδεΐδης, με περιεκτικότητα τουλάχιστον 37% σε φορμαλδεΐδη (Merck, αρ. καταλόγου 1039991000)
- ✚ Απόλυτη μεθανόλη, με περιεκτικότητα μεγαλύτερη ή ίση με 99,9% (Sigma-Aldrich, αρ. καταλόγου 34860-2.5L-R)
- ✚ Βαφή Giemsa
- ✚ Βαφή May-Grünwald
- ✚ Εμπορικά διαθέσιμες μπατονέτες
- ✚ Οπτικό μικροσκόπιο (Olympus, μοντέλο BX41)

5.2.3. Πειραματική πορεία

- ✚ Με τη χρήση της λαβίδας, τοποθετείται ένα φίλτρο ανά βοθρίο του ταπητίου 24 βοθρίων, που αντιστοιχεί σε 1 συνθήκη. Κάθε φίλτρο απαρτίζεται από 2

«διαμερίσματα», το άνω και το κάτω. Το άνω «διαμέρισμα» βρίσκεται επάνω από τη μεμβράνη του φίλτρου, ενώ το κάτω «διαμέρισμα» βρίσκεται κάτω από τη μεμβράνη και αποτελεί, ουσιαστικά, το υγρό του βοθρίου, μέσα στο οποίο εμβαπτίζεται το φίλτρο.

- ✚ Σε τελικό όγκο 500 μL RPMI, παρουσία 2% v/v θερμικά απενεργοποιημένου ανθρώπινου ορού, προστίθενται 200.000 ουδετερόφιλα στο άνω «διαμέρισμα» του φίλτρου.
- ✚ Σε τελικό όγκο 500 μL RPMI, παρουσία 2% v/v θερμικά απενεργοποιημένου ανθρώπινου ορού, προστίθεται ο επιθυμητός χημειοτακτικός παράγοντας στο κάτω «διαμέρισμα» του φίλτρου.
- ✚ Το ταπήτιο επωάζεται για 1 h σε θερμοκρασία 37°C και ατμόσφαιρα 5% CO₂.
- ✚ Μετά το πέρας της επώασης, τα φίλτρα αφαιρούνται από το ταπήτιο, με τη βοήθεια της λαβίδας και αναρροφάται και απορρίπτεται το υγρό του άνω «διαμερίσματος».
- ✚ Στη συνέχεια, πραγματοποιείται έκπλυση των φίλτρων, με την εμβάπτιση του κάθε φίλτρου σε 12,5 mM PBS εις διπλούν και την αποτίναξη της περίσσειας PBS.
- ✚ Προστίθενται 500 μL 4% v/v παραφορμαλδεύδης σε κάθε «διαμέρισμα» του φίλτρου και ακολουθεί επώαση για 2 min σε θερμοκρασία δωματίου, ούτως ώστε τα κύτταρα να μονιμοποιηθούν. Η παρασκευή του διαλύματος παραφορμαλδεύδης πραγματοποιείται 30 min πριν τη χρήση της, με την αραιώση της φορμαλδεύδης περιεκτικότητας τουλάχιστον 37% σε 4% με δις απεσταγμένο ύδωρ, χρόνος που απαιτείται ώστε να πολυμεριστεί η φορμαλδεύδη σε παραφορμαλδεύδη.
- ✚ Μετά το πέρας της επώασης, αναρροφάται και απορρίπτεται η παραφορμαλδεύδη και πραγματοποιείται έκπλυση των φίλτρων, όπως περιγράφηκε παραπάνω.
- ✚ Ακολουθεί προσθήκη 500 μL απόλυτης μεθανόλης σε κάθε «διαμέρισμα» του φίλτρου και επώαση για 20 min σε θερμοκρασία δωματίου, ούτως ώστε τα κύτταρα να καταστούν διαπερατά και οι μεμβράνες των φίλτρων να καταστούν διαφανείς, γεγονός που υποβοηθά τη μικροσκόπηση των φίλτρων.
- ✚ Αναρροφάται και απορρίπτεται η μεθανόλη και πραγματοποιείται έκπλυση των φίλτρων, όπως περιγράφηκε παραπάνω.

- ✚ Αραιώνεται η πυκνή βαφή Giemsa σε αναλογία 1:10 v/v με δις απεσταγμένο ύδωρ και ακολουθεί προσθήκη 500 μL της αραιωμένης Giemsa σε κάθε «διαμέρισμα» του φίλτρου και επώαση για 15 min σε θερμοκρασία δωματίου.
- ✚ Αναρροφάται και απορρίπτεται η Giemsa και πραγματοποιείται έκπλυση των φίλτρων, όπως περιγράφηκε παραπάνω.
- ✚ Ακολουθεί προσθήκη 500 μL βαφής May-Grünwald σε κάθε «διαμέρισμα» του φίλτρου και επώαση για 10 min σε θερμοκρασία δωματίου.
- ✚ Αναρροφάται και απορρίπτεται η May-Grünwald και πραγματοποιείται έκπλυση των φίλτρων, όπως περιγράφηκε παραπάνω.
- ✚ Με μία μπατονέτα καθαρίζεται το άνω «διαμέρισμα» του φίλτρου, ούτως ώστε να απομακρυνθούν τα κύτταρα που δε μετανάστευσαν.
- ✚ Τέλος, πραγματοποιείται μικροσκόπηση των φίλτρων στο οπτικό μικροσκόπιο και σε φακό μεγέθυνσης $\times 40$. Μετρώνται τα ουδετερόφιλα που μετανάστευσαν σε 5 αντιπροσωπευτικά πεδία κάθε φίλτρου και υπολογίζεται η % αύξηση της μετανάστευσης από τη συνθήκη των κυττάρων «εν ηρεμία».

5.3. Ενεργοποίηση ουδετεροφίλων και προσδιορισμός των NETs με φθοριστική και συνεστιακή μικροσκοπία

5.3.1. Αρχή της μεθόδου

Η παρούσα τεχνική βασίζεται στην ενεργοποίηση ουδετεροφίλων που έχουν προσκολληθεί σε καλυπτρίδες πολυ-L-λυσίνης, ούτως ώστε τα NETs να οπτικοποιηθούν με τη χρήση φθοριστικής ή/και συνεστιακής μικροσκοπίας, ύστερα από την πραγματοποίηση ανοσοφθορισμού.

5.3.2. Υλικά, αντιδραστήρια και όργανα

- ✚ Ταπήτια 24 βοθρίων (Sarstedt, αρ. καταλόγου 83.3922)
- ✚ Υάλινες καλυπτρίδες διαμέτρου 12 mm, BioCoat™, επικαλυμμένες με πολυ-L-λυσίνη (Corning, αρ. καταλόγου 354085)
- ✚ Λαβίδα τιτανίου με λεπτές άκρες (Dumont, 7, αρ. καταλόγου 0302-7-PO)
- ✚ Θρεπτικό υλικό RPMI 1640, χωρίς L-γλουταμίνη (Gibco, αρ. καταλόγου 31870025)
- ✚ Θερμικά απενεργοποιημένος ανθρώπινος ορός, από πηγμένο ολικό αίμα αρσενικού δότη με ομάδα αίματος AB (Sigma-Aldrich, αρ. καταλόγου H5667)

- ✚ Οξική μυριστική φορβόλη (phorbol 12-myristate 13-acetate, PMA) (Sigma-Aldrich, αρ. καταλόγου P8139-1MG)
- ✚ Υδατικό διάλυμα φορμαλδεΐδης, με περιεκτικότητα τουλάχιστον 37% σε φορμαλδεΐδη (Merck, αρ. καταλόγου 1039991000)
- ✚ PBS 12,5 mM (1X). Το διάλυμα αυτό παρασκευάζεται και φυλάσσεται όπως περιγράφηκε παραπάνω.
- ✚ Απορρυπαντικό Triton™ X-100. Παρασκευάζεται διάλυμα 0,5% Triton™ X-100, με προσθήκη 5 μ L πυκνού Triton™ X-100 σε 1 mL ddH₂O. Λόγω μεγάλου ιξώδους, το πυκνό Triton™ X-100 λαμβάνεται αργά και προστίθεται επίσης αργά στο ddH₂O, κοντά στα τοιχώματα του σωλήνα. Ακολουθεί ισχυρή ανάδευση, έως ότου διαλυθεί πλήρως το απορρυπαντικό. Η προθέρμανση του απορρυπαντικού διευκολύνει τη διάλυσή του.
- ✚ Ορός αίγας (Gibco, αρ. καταλόγου PCN5000)
- ✚ Πρωτογενές αντίσωμα κατά της MPO, 266-6K1 (Santa Cruz Biotechnology, αρ. καταλόγου sc-52707)
- ✚ Διάλυμα 4', 6-διαμιδινο-2-φαινυλινδόλη (4', 6-diamidino-2-phenylindole, DAPI) (Sigma-Aldrich, αρ. καταλόγου D9542-10MG), συγκέντρωσης 10 μ g/mL. Η στερεή DAPI διαλύεται σε 1 mL ddH₂O, ούτως ώστε να προκύψει διάλυμα συγκέντρωσης 10 μ g/mL, μοιράζεται σε κλάσματα και φυλάσσεται στους -20°C. Με το διάλυμα της DAPI πραγματοποιείται η χρώση και μικροσκοπική οπτικοποίηση του DNA των NETs και του πυρήνα των ουδετεροφίλων, καθώς η DAPI προσδένεται σε περιοχές του DNA που είναι πλούσιες σε ζεύγη βάσεων αδεΐνης-θυμίνης.
- ✚ Δευτερογενές αντίσωμα goat anti-rabbit IgG (H + L), συζευγμένο με Alexa Fluor® 488 (molecular probes®, Life Technologies Corp., αρ. καταλόγου A11034)
- ✚ Διάλυμα Mowiol. Για την παρασκευή του διαλύματος Mowiol χρησιμοποιούνται τα εξής αντιδραστήρια: 2,4 g αντιδραστηρίου Mowiol® 4-88 (Sigma-Aldrich, αρ. καταλόγου 81381-50G), 6 g γλυκερόλης, 6 mL ddH₂O και 12 mL διαλύματος 0,2 M Tris, pH = 8,5 [Για την παρασκευή του διαλύματος Tris αναμειγνύονται 2,4 g Tris (Invitrogen, αρ. καταλόγου 15504-020) σε 100 mL ddH₂O και το pH ρυθμίζεται στο 8,5]. Η πορεία παρασκευής του διαλύματος Mowiol είναι η εξής: προστίθεται η γλυκερόλη σε σωλήνα PP, με κωνικό πυθμένα, των 50 mL, προστίθεται το αντιδραστήριο Mowiol® 4-88

και ακολουθεί έντονη ανάδευση. Προστίθεται το ddH₂O και το διάλυμα αφήνεται για 2 h σε RT. Στη συνέχεια, προστίθεται το διάλυμα Tris και το όλον θερμαίνεται περίπου στους 53°C, έως ότου διαλυθεί το Mowiol® 4-88, με περιστασιακή ανάδευση. Όταν διαλυθεί το Mowiol® 4-88, ακολουθεί φυγοκέντρωση στις 4.000 στροφές ανά λεπτό (revolutions per minute, RPM) για 20 min, σε RT, συλλέγεται το υπερκείμενο και μοιράζεται σε κλάσματα, τα οποία αποθηκεύονται στους -20°C. Όταν αποψυχθεί ένα κλάσμα, φυλάσσεται στη συνέχεια στους 4°C.

🔧 Φθοριστικό μικροσκόπιο (Olympus, μοντέλο BX41). Χρησιμοποιείται επίσης κάμερα, προσαρτημένη στο μικροσκόπιο (Olympus, μοντέλο DP70) και λογισμικό λειτουργίας της κάμερας.

🔧 Συνεστιακό μικροσκόπιο Olympus PL APON Leica

5.3.3. Πειραματική πορεία

🔧 Τοποθετείται, με τη λαβίδα τιτανίου, από μία υάλινη καλυπτρίδα σε κάθε βοθρίο του ταπήτιου 24 βοθρίων και προστίθενται, σε τελικό όγκο 500 μ L, θρεπτικό υλικό RPMI, παρουσία 2% v/v θερμικά απενεργοποιημένου ανθρώπινου ορού και 100 μ L ουδετεροφίλων, με τον τελικό αριθμό των τελευταίων να είναι 200.000 ανά βοθρίο.

🔧 Το ταπήτιο των 24 βοθρίων αφήνεται για 1 h στους 37°C και σε ατμόσφαιρα 5% CO₂, ούτως ώστε τα ουδετερόφιλα να προσκολληθούν στην επιφάνεια της καλυπτρίδας.

🔧 Στη συνέχεια, πραγματοποιούνται όλες οι επιθυμητές επιδράσεις στα ουδετερόφιλα, με ανταγωνιστές και αγωνιστές και το ταπήτιο των 24 βοθρίων αφήνεται να επωαστεί για 3,5 h στους 37°C και σε ατμόσφαιρα 5% CO₂, προκειμένου να σχηματισθούν τα NETs. Σε ορισμένα προκαταρκτικά πειράματα, προκειμένου να διαπιστωθεί το βέλτιστο χρονικό διάστημα πλήρους σχηματισμού των NETs, τα ουδετερόφιλα επώαστηκαν με τους αγωνιστές, PMA και AA, για 1 h ή 2 h, εκτός του χρονικού διαστήματος των 3,5 h.

🔧 30 min πριν το τέλος της παραπάνω επώασης, αραιώνεται η φορμαλδεΐδη από τουλάχιστον 37% σε 8%, με ddH₂O και αφήνεται μέχρι το τέλος της παραπάνω επώασης να πολυμεριστεί σε παραφορμαλδεΐδη.

- ✚ Μετά το πέρας της παραπάνω επώασης, προστίθενται 500 μL παραφορμαλδεύδης σε κάθε βοθρίο του ταπητίου των 24 βοθρίων, ούτως ώστε η τελική συγκέντρωση παραφορμαλδεύδης να είναι 4% και το ταπήτιο επωάζεται για 1 h στους 4°C.
- ✚ Μετά το πέρας της τελευταίας επώασης, αναρροφάται το 1 mL υγρού από το κάθε βοθρίο, απορρίπτεται, προστίθενται 12,5 mM PBS σε κάθε βοθρίο και το ταπήτιο επωάζεται overnight στους 4°C, προκειμένου οι καλυπτρίδες με τα προσκολλημένα NETs και εναπομείναντα ουδετερόφιλα να συντηρηθούν μέχρι την επόμενη ημέρα, οπότε και πραγματοποιείται η διαδικασία του ανοσοφθορισμού.
- ✚ Την επόμενη ημέρα, παρασκευάζεται blocking buffer, αραιώνοντας τον ορό αίγας με 12,5 mM PBS, σε τελική συγκέντρωση 5% v/v.
- ✚ Κόβονται μεγάλα τμήματα parafilm και κολλώνται σε καθαρό πάγκο, με κολλητική ταινία στις γωνίες τους. Επάνω σε αυτά τα τμήματα θα πραγματοποιηθεί ο ανοσοφθορισμός.
- ✚ Αναρροφώνται και απορρίπτονται τα 12,5 mM PBS του κάθε βοθρίου, λαμβάνεται προσεκτικά η κάθε υάλινη καλυπτρίδα με τη λαβίδα τιτανίου και τοποθετείται με το επάνω μέρος της προς τα κάτω σε 150 μL 12,5 mM PBS, τα οποία έχουν προτοποθετηθεί στο parafilm, ούτως ώστε να αρχίσουν οι εκπλύσεις των καλυπτρίδων.
- ✚ Πραγματοποιούνται 3 τέτοιες εκπλύσεις με 150 μL PBS, 5 min η καθεμία.
- ✚ Στη συνέχεια, οι καλυπτρίδες επωάζονται για 1 min με 100 μL 0,5% Triton™ X-100.
- ✚ Ακολουθούν 3 εκπλύσεις, για 1 min η καθεμία, με 100 μL ddH₂O.
- ✚ Στη συνέχεια, οι καλυπτρίδες επωάζονται για 30 min με 150 μL blocking buffer.
- ✚ Το πρωτογενές αντίσωμα anti-MPO αραιώνεται 1:500 με blocking buffer και οι καλυπτρίδες επωάζονται με 150 μL αραιωμένου πρωτογενούς αντισώματος για 1 h στο σκοτάδι.
- ✚ Ακολουθούν 3 εκπλύσεις με 150 μL PBS για 5 min.
- ✚ Το δευτερογενές αντίσωμα Alexa Fluor® 488 αραιώνεται 1:200 με blocking buffer και οι καλυπτρίδες επωάζονται με 150 μL αραιωμένου δευτερογενούς αντισώματος για 1 h στο σκοτάδι.
- ✚ Ακολουθούν 3 εκπλύσεις με 150 μL PBS για 5 min.

-  Το διάλυμα 10 $\mu\text{g/mL}$ DAPI αραιώνεται αρχικά 1:10 σε ddH₂O, με την προσθήκη 10 μL διαλύματος 10 $\mu\text{g/mL}$ DAPI σε 90 μL ddH₂O και, στη συνέχεια, το διάλυμα που προκύπτει αραιώνεται περαιτέρω 1:5.000 σε 12,5 mM PBS, με την προσθήκη 2 μL του τελευταίου διαλύματος σε 10 mL 12,5 mM PBS (τελική συγκέντρωση 600 nM). Οι καλυπτρίδες επωάζονται με 150 μL του τελικού, αραιωμένου διαλύματος DAPI, συγκέντρωσης 600 nM, για 10 min στο σκοτάδι. Το διάλυμα των 600 nM DAPI μπορεί να συντηρηθεί στους 4°C για μελλοντική χρήση.
-  Ακολουθεί έκπλυση με 150 μL ddH₂O για 30 sec.
-  Λαμβάνονται οι καλυπτρίδες με τη λαβίδα, στεγνώνονται πολύ προσεκτικά, από το πλάι σε στεγνό, απορροφητικό χαρτί και τοποθετούνται πολύ προσεκτικά σε 5 μL διαλύματος mowiol, το οποίο έχει προτοποθετηθεί σε αντικειμενοφόρες πλάκες. Στη διεπιφάνεια των καλυπτρίδων και του mowiol δεν πρέπει να υπάρχουν υγρασία και φυσαλίδες. Οι καλυπτρίδες αφήνονται να μονιμοποιηθούν στο mowiol για 1,5 h σε RT. Το mowiol σταθεροποιεί τις καλυπτρίδες στις αντικειμενοφόρες πλάκες και κάνει τα ουδετερόφιλα και τα NETs πιο ευδιάκριτα.
-  10 min πριν ολοκληρωθεί η παραπάνω επώαση, τίθεται σε λειτουργία ο λαμπτήρας παραγωγής υπεριώδους ακτινοβολίας που είναι συνδεδεμένος με το φθοριστικό μικροσκόπιο, ούτως ώστε να προθερμανθεί και να είναι δυνατή η μικροσκόπηση των καλυπτρίδων.
-  Η μικροσκόπηση των καλυπτρίδων γίνεται χρησιμοποιώντας το μπλε φίλτρο DAPI, για την ομώνυμη χρώση και το πράσινο φίλτρο για την MPO. Μετρώνται τα κύτταρα που σχημάτισαν, ή δε σχημάτισαν NETs, από 5 αντιπροσωπευτικά πεδία κάθε συνθήκης και μετρώνται τουλάχιστον 200 κύτταρα. Υπολογίζεται, σε κάθε συνθήκη, το ποσοστό των κυττάρων που σχημάτισαν NETs. Ταυτόχρονα, λαμβάνονται αντιπροσωπευτικές φωτογραφίες από κάθε συνθήκη.

5.4. Ενεργοποίηση ουδετεροφύλων και προσδιορισμός των NETs με ELISA DNA-MPO

5.4.1. Αρχή της μεθόδου

Η παρούσα τεχνική βασίζεται στον προσδιορισμό των NETs που απελευθερώνονται από τα ουδετερόφιλα, με τη χρήση εξειδικευμένης enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), που αναγνωρίζει τα συμπλέγματα DNA-MPO. Στην τεχνική αυτή, χρησιμοποιείται ένα εμπορικά διαθέσιμο kit, το οποίο προσδιορίζει ολιγονουκλεοτίδια και το οποίο έχει τροποποιηθεί για να προσδιορίζει την MPO που εδράζει στα ολιγονουκλεοτίδια αυτά, σύμφωνα με τη δημοσίευση των Caudrillier και συν.

5.4.2. Υλικά, αντιδραστήρια και όργανα

- ✚ Ταπήτιο 6 βοθρίων
- ✚ Θρεπτικό υλικό RPMI 1640
- ✚ Θερμικά απενεργοποιημένος ανθρώπινος ορός, από πηγμένο ολικό αίμα αρσενικού δότη με ομάδα αίματος AB (Sigma-Aldrich, αρ. καταλόγου H5667)
- ✚ Ταπήτιο 96 βοθρίων, από crystal clear πολυστυρένιο (polystyrene, PS), F-bottom, επικαλυμμένο με MICROLON® 600, high-binding (greiner bio-one, αρ. καταλόγου 655061)
- ✚ Cell Death Detection ELISA^{PLUS} [Roche (το προϊόν αυτό διατίθεται από τη Sigma-Aldrich), αρ. καταλόγου 11774425001]. Από το περιεχόμενο του kit, χρησιμοποιούνται τα συστατικά anti-DNA-POD, Incubation Buffer, Substrate Buffer, ABTS Stop Solution, καθώς και οι αναβράζουσες παστίλιες ABTS Substrate Tablets.
- ✚ Μονοκλωνικό αντίσωμα κατά της MPO 266-6K1 (Hycult Biotech Inc., αρ. καταλόγου HM2164-100UG)
- ✚ Micro-ELISA reader (Tecan, μοντέλο M200 Pro)

5.4.3. Πειραματική πορεία

- ✚ Η πειραματική πορεία προετοιμασίας των δειγμάτων για ELISA DNA-MPO είναι ακριβώς ίδια με την προετοιμασία των δειγμάτων για ανοσοφθορισμό, με τις εξής διαφορές: χρησιμοποιείται ταπήτιο 6 βοθρίων, δε

χρησιμοποιούνται καλυπτρίδες, αντί για 500 μL ο τελικός όγκος σε κάθε βοθρίο είναι 1.200 μL , αντί για 100 μL προστίθενται 200 μL ουδετεροφίλων, αντί για 10 μL προστίθενται 24 μL θερμικά απενεργοποιημένου ανθρώπινου ορού και αντί για 3,5 h ο χρόνος επώασης είναι 4 h. Από εκεί και έπειτα, όλες οι επιδράσεις πραγματοποιούνται όπως στην προετοιμασία των δειγμάτων για ανοσοφθορισμό.

- ✚ Μετά το πέρας των 4 h αφαιρείται 1 mL πολύ προσεκτικά, από ψηλά και από το πλάι.
- ✚ Προστίθεται 1 mL RPMI, για έκπλυση, χωρίς ανάδευση και αφαιρείται αμέσως (από το πλάι το tip της πιπέτας). Σε αυτό το βήμα, το RPMI πρέπει να βρίσκεται σε θερμοκρασία δωματίου.
- ✚ Προστίθενται 300 μL RPMI και πραγματοποιείται έντονη ανάδευση του ταπητίου για 2 min. Στη συνέχεια, πραγματοποιούνται σταυρωτές κινήσεις και συλλέγονται 350 μL , τα οποία τοποθετούνται σε σωλήνες πολυπροπυλενίου.
- ✚ Ακολουθεί φυγοκέντρωση στα $20 \times g$ για 5 min, σε θερμοκρασία δωματίου (αντιστοιχεί σε 400 RPM στη φυγόκεντρο Hermle Z 320)
- ✚ Το πλούσιο σε NETs υπερκείμενο μοιράζεται σε aliquots, τα οποία φυλάσσονται στους -80°C μέχρι να πραγματοποιηθεί η ELISA.
- ✚ Παρασκευάζεται, από την προηγούμενη ημέρα, αντίσωμα εργασίας anti-MPO 5 $\mu\text{g/mL}$, με αραίωση 1:20 του αρχικού αντισώματος με 12,5 mM PBS. Προστίθενται 50 μL του αραιωμένου αντισώματος σε κάθε βοθρίο του ταπητίου 96 βοθρίων και το ταπήτιο επωάζεται overnight στους 4°C , αφού τοποθετηθεί ένα sealing tape από πάνω του και σκεπαστεί με αλουμινόχαρτο.
- ✚ Την επόμενη ημέρα, τα NETs αφήνονται να αποψυχθούν σταδιακά σε παγόλουτρο. Όλη η παρούσα πειραματική πορεία πραγματοποιείται σε θερμοκρασιακό εύρος $15-25^\circ\text{C}$.
- ✚ Πραγματοποιείται έκπλυση της περίσσειας του παραπάνω αντισώματος εις τριπλούν με 300 μL 12,5 mM PBS ανά βοθρίο.
- ✚ Προστίθενται 20 μL δείγματος ανά βοθρίο. Πριν την προσθήκη, τα δείγματα των NETs δεν πρέπει να υποστούν βίαιη ανάδευση σε vortex, αλλά πρέπει να ομογενοποιηθούν ήπια και πολύ προσεκτικά με pipetting.
- ✚ Παρασκευάζεται αντίσωμα εργασίας anti-DNA-POD, με αραίωση 1:25 του αρχικού αντισώματος με Incubation Buffer. Προστίθενται 80 μL του αραιωμένου αντισώματος σε κάθε βοθρίο και το ταπήτιο επωάζεται για 2 h

στους 15-25°C, στο σκοτάδι, υπό ανάδευση 300 RPM, αφού τοποθετηθεί ένα sealing tape από πάνω του και σκεπαστεί με αλουμινόχαρτο.

- ✚ Ακολουθεί έκπλυση εις τριπλούν με 200 μL Incubation Buffer ανά βοθρίο.
- ✚ Παρασκευάζεται ABTS Solution, με προσθήκη 1 αναβράζουσας παστίλιας ABTS Substrate Tablet σε 5 mL Substrate Buffer, σε σωλήνα πολυπροπυλενίου (το διάλυμα αυτό δεν πρέπει να εκτίθεται απ' ευθείας στο φως). Προστίθενται 100 μL του διαλύματος αυτού σε κάθε βοθρίο και το ταπήτιο επωάζεται για 20 min στους 15-25°C, στο σκοτάδι, υπό ανάδευση 250 RPM, αφού τοποθετηθεί ένα sealing tape από πάνω του και σκεπαστεί με αλουμινόχαρτο. Ακόμη, προστίθενται 100 μL ABTS Solution σε ένα κενό βοθρίο για τη μέτρηση blank.
- ✚ Η αντίδραση τερματίζεται με την προσθήκη 100 μL ABTS Stop Solution. Ακόμη, προστίθενται 100 μL ABTS Stop Solution στο παραπάνω κενό βοθρίο. Πριν τη χρήση του, το ABTS Stop Solution χρειάζεται να προθερμανθεί για αρκετή ώρα στους 37°C και να αναδευθεί ήπια, ώστε να εξαφανισθεί η θολρότητα που εμφανίζει.
- ✚ Στο micro-ELISA reader Tecan επιλέγεται "Absorbance" και το plate "greiner bio-one 96 flat transparent [MAG-GRE96ft]". Το ταπήτιο φωτομετρείται, χωρίς sealing tape, αμέσως μετά το πέρας των 20 min στα 405 nm, χρησιμοποιώντας τα 490 nm ως μήκος κύματος αναφοράς (reference wavelength).
- ✚ Αφαιρείται η μέτρηση blank από όλες τις μετρήσεις. Οι τιμές που λαμβάνονται εκφράζονται ως ποσοστό επί τοις εκατό αύξησης της τιμής της μέτρησης "Resting".

5.5. Απομόνωση PMPs, χαρακτηρισμός τους με κυτταρομετρία ροής και επίδρασή τους στα ουδετερόφιλα

5.5.1. Αρχή της μεθόδου

Η τεχνική αυτή βασίζεται στην παραγωγή PMPs από ενεργοποιημένα με θρομβίνη πλυμένα αιμοπετάλια, τον προσδιορισμό του πρωτεϊνικού τους περιεχομένου με χρήση της τεχνικής του δισινchonινικού οξέος (bicinchoninic acid, BCA) και το χαρακτηρισμό τους με τη χρήση κυτταρομετρίας ροής, με την οποία

πραγματοποιείται ο ποσοτικός προσδιορισμός της μεμβρανικής έκφρασης της P-σελεκτίνης και της ενεργοποίησης του υποδοχέα $\alpha_{IIb}\beta_3$ στα PMPs.

5.5.2. Υλικά, αντιδραστήρια και όργανα

- ✚ Αντιπηκτικό διάλυμα κιτρικών ιόντων (ACD). Το διάλυμα αυτό παρασκευάζεται με την προσθήκη 2,2 g κιτρικού οξέος, 2,5 g D(+)-γλυκόζης και 0,8 g κιτρικού νατρίου σε 100 mL ddH₂O. Το διάλυμα φυλάσσεται στους 4°C για 1 μήνα.
- ✚ Απυράση από πατάτες, 100 U (Sigma-Aldrich, αρ. καταλόγου A6535-100UN). Η απυράση διαλύεται σε 1 mL ddH₂O, ούτως ώστε να προκύψει διάλυμα συγκέντρωσης 100 U/mL. Το διάλυμα μοιράζεται σε κλάσματα και φυλάσσεται στους -80°C.
- ✚ Προσταγλανδίνη E₁ (prostaglandin E₁, PGE₁) σε στερεή μορφή (Sigma-Aldrich, αρ. καταλόγου P5515-1MG). Η PGE₁ διαλύεται σε απόλυτη αιθανόλη, ούτως ώστε να προκύψει διάλυμα συγκέντρωσης 2 mM. Το διάλυμα μοιράζεται σε κλάσματα και φυλάσσεται στους -80°C.
- ✚ Διάλυμα έκπλυσης των αιμοπεταλίων, pH = 6,5. Αρχικά παρασκευάζεται το πυκνό διάλυμα έκπλυσης (10X), το οποίο περιέχει 6% w/v χλωριούχο νάτριο, 0,373% w/v χλωριούχο κάλιο, 0,9% w/v D(+)-γλυκόζη, 7,56% w/v ένυδρο κιτρικό οξύ, 0,294% w/v ένυδρο χλωριούχο ασβέστιο και 0,203% w/v ένυδρο χλωριούχο μαγνήσιο. Το διάλυμα αυτό μοιράζεται σε κλάσματα των 10 mL και φυλάσσεται στους -20°C. Για να παρασκευαστεί το διάλυμα εργασίας, το πυκνό διάλυμα αποψύχεται, αραιώνεται 1:10 v/v με ddH₂O και το pH του ρυθμίζεται στο 6,5. Το διάλυμα εργασίας μπορεί να διατηρηθεί για 2 εβδομάδες στους 4°C.
- ✚ Διάλυμα εναιώρησης των αιμοπεταλίων, pH = 7,35. Αρχικά παρασκευάζεται το πυκνό διάλυμα εναιώρησης (10X), το οποίο περιέχει 8,18% w/v χλωριούχο νάτριο, 0,22% w/v χλωριούχο κάλιο, 1,8% w/v γλυκόζη, 0,1% w/v ένυδρο χλωριούχο μαγνήσιο, 2,38% w/v HEPES και 0,42% w/v όξινο ανθρακικό νάτριο. Το διάλυμα αυτό μοιράζεται σε κλάσματα των 5 mL και φυλάσσεται στους -20°C. Για να παρασκευαστεί το διάλυμα εργασίας, το πυκνό διάλυμα αποψύχεται, αραιώνεται 1:10 v/v με ddH₂O και το pH του ρυθμίζεται στο 7,35. Το διάλυμα εργασίας μπορεί να διατηρηθεί για 2 εβδομάδες στους 4°C.
- ✚ Διάλυμα 1 M CaCl₂. Το διάλυμα παρασκευάζεται και φυλάσσεται στους 4°C.

- ✚ Διάλυμα 1% w/v οξαλικού αμμωνίου. Διαλύεται 1 g οξαλικού αμμωνίου σε 100 mL ddH₂O και το προκύπτον διάλυμα φυλάσσεται στους 4°C.
- ✚ Θρομβίνη από ανθρώπινο πλάσμα (Sigma-Aldrich, αρ. καταλόγου T6884)
- ✚ Οπτικό μικροσκόπιο (Olympus, μοντέλο CX41)
- ✚ Διάλυμα 10% w/v Na₂EDTA. Το διάλυμα παρασκευάζεται και φυλάσσεται στους 4°C.
- ✚ Σωλήνες PP των 12 mL, με στρογγυλό πυθμένα
- ✚ Σουκρόζη
- ✚ Σωλήνες PS για υπερφυγοκέντρωση
- ✚ Ρότορας ανοιχτής γωνίας (Beckmann, μοντέλο Sw-41)
- ✚ Υπερφυγόκεντρος (Beckmann, μοντέλο L-70)
- ✚ Kit ποσοτικού προσδιορισμού πρωτεϊνών, με την τεχνική του BCA (Pierce™ Rapid Gold BCA Protein Assay Kit, αρ. καταλόγου A53225)
- ✚ Micro-ELISA reader (Tecan, μοντέλο M200 Pro)
- ✚ Κυτταρόμετρο ροής (Becton Dickinson, μοντέλο FACSCalibur)
- ✚ Αντίσωμα κατά της P-σελεκτίνης, συζευγμένο με το φθοριόχρωμα, φυκοερυθρίνη [phycoerythrin, PE (anti-CD62P-PE, BD Biosciences, αρ. καταλόγου 555524)]
- ✚ Αντίσωμα κατά του υποδοχέα α_{IIb}β₃, συζευγμένο με το φθοριόχρωμα, πρωτεϊνικό σύμπλοκο της χλωροφυλλο-περιδινίνης [peridinin chlorophyll protein complex, PerCP (anti-CD61-PerCP, BD Biosciences, αρ. καταλόγου 347408)]

5.5.3. Πειραματική πορεία

- ✚ Λαμβάνεται ολικό, περιφερικό αίμα από φαινομενικά υγιείς εθελοντές, ύστερα από δωδεκάωρη νηστεία, οι οποίοι δεν έχουν λάβει αντιφλεγμονώδη και αντιθρομβωτική αγωγή για τουλάχιστον 2 εβδομάδες πριν την αιμοληψία. Η αιμοληψία πραγματοποιείται με βελόνα τύπου «πεταλούδα», 21G, ήπια, χωρίς να δημιουργείται στάση και αφρισμός του ληφθέντος αίματος και τοποθετείται, επίσης ήπια, διαμέσου του τοιχώματος του σωλήνα, στους σωλήνες PP, σε αναλογία αντιπηκτικού προς αίματος, 1:9 v/v, αντίστοιχα.
- ✚ Στο αίμα προστίθενται 0,1 U/mL απυράσης και 1 μM PGE₁ και ακολουθεί ήπια ανάδευση με αντιστροφή των σωλήνων.

- ✚ Το αίμα φυγοκεντρείται στα $126 \times g$ για 15 min σε RT, για την παρασκευή πλάσματος πλούσιου σε αιμοπετάλια (platelet-rich plasma, PRP).
- ✚ Το PRP μεταφέρεται ποσοτικά σε καθαρό σωλήνα PP και συμπληρώνεται ο όγκος του σωλήνα έως τα 10 mL με διάλυμα έκπλυσης των αιμοπεταλίων.
- ✚ Στο αραιωμένο PRP προστίθενται 0,015 U/mL απυράσης και 0,1 μM PGE₁.
- ✚ Το αραιωμένο PRP φυγοκεντρείται στα $975 \times g$ για 12 min σε RT.
- ✚ Το υπερκείμενο απορρίπτεται και το ίζημα των αιμοπεταλίων επαναδιασπείρεται με διάλυμα έκπλυσης, στο οποίο έχουν προστεθεί εκ των προτέρων 0,015 U/mL απυράσης και 0,1 μM PGE₁.
- ✚ Το εναιώρημα φυγοκεντρείται για δεύτερη φορά στα $975 \times g$ για 12 min σε RT.
- ✚ Το υπερκείμενο απορρίπτεται και το ίζημα των αιμοπεταλίων αναδιασπείρεται με 1 έως 2 mL διαλύματος εναιώρησης των αιμοπεταλίων.
- ✚ Ακολουθεί μέτρηση των αιμοπεταλίων σε πλάκα (αιματοκυτόμετρο) Neubauer, με τη χρήση του οπτικού μικροσκοπίου, αραιώνοντας 1:20 v/v το εναιώρημα των αιμοπεταλίων με διάλυμα 1% οξαλικού αμμωνίου (190 μL διαλύματος 1% οξαλικού αμμωνίου + 10 μL εναιωρήματος αιμοπεταλίων), επωάζοντας για 12-15 min και τοποθετώντας 10 μL του αραιωμένου εναιωρήματος σε κάθε πλευρά της πλάκας Neubauer.
- ✚ Τα αιμοπετάλια τοποθετούνται σε σωλήνα που εμβαπτίζεται σε υδρόλουτρο 37°C και ενεργοποιούνται με την προσθήκη 0,2 U/mL θρομβίνης για 30 min σε RT, ούτως ώστε να παραχθούν PMPs.
- ✚ Μετά το πέρας των 30 min, η αντίδραση σταματά με την προσθήκη διαλύματος 10% Na₂EDTA, ούτως ώστε η τελική συγκέντρωση Na₂EDTA να είναι 0,01% και την απ' ευθείας τοποθέτηση του σωλήνα σε παγόλουτρο.
- ✚ Το εναιώρημα των αιμοπεταλίων φυγοκεντρείται στα $1.000 \times g$ για 15 min σε RT, ούτως ώστε να καταβυθιστούν τα κυτταρικά υπολείμματα των αιμοπεταλίων.
- ✚ Λαμβάνεται το πλούσιο σε PMPs υπερκείμενο και επιστοιβάζεται σε διάλυμα 20% σουκρόζης, σε αναλογία όγκων 1:1.
- ✚ Ακολουθεί φυγοκέντρωση στα $2.000 \times g$ για 10 min σε RT, ούτως ώστε να ληφθεί ακόμη πιο καθαρό πλούσιο σε PMPs υπερκείμενο.
- ✚ Ακολουθεί υπερφυγοκέντρωση στα $100.000 \times g$ για 2 h, στους 4°C, ούτως ώστε να καταβυθιστούν τα PMPs.

- ✚ Το υπερκείμενο απορρίπτεται και το ίζημα των PMPs επαναδιασπείρεται με PBS.
- ✚ Ακολουθεί εκτέλεση της τεχνικής BCA για τον πρωτεϊνικό προσδιορισμό των PMPs.
- ✚ Την επόμενη ημέρα πραγματοποιείται κυτταρομετρία ροής για τον ποιοτικό χαρακτηρισμό των PMPs, βάσει της μεμβρανικής έκφρασης της P-σελεκτίνης και της ενεργοποίησης του υποδοχέα $\alpha_{\text{IIB}}\beta_3$.

5.6. Συσσωρευομετρία οπτικής διαπερατότητας σε PRP και πλυμένα αιμοπετάλια

5.6.1. Αρχή της μεθόδου

Στην παρούσα τεχνική, χρησιμοποιείται ένα ειδικό όργανο, το συσσωρευόμετρο, το οποίο αποτελεί ένα νεφελόμετρο-φασματοφωτόμετρο. Η τεχνική βασίζεται στη διέλευση μίας δέσμης φωτός μέσα από ένα εναιώρημα ή διάλυμα αναφοράς και στη συνέχεια μέσα από το δείγμα. Το διάλυμα/εναιώρημα αναφοράς ορίζεται ως 100% διαπερατότητα ή 100% συσσώρευση, ενώ το δείγμα ορίζεται ως 0% διαπερατότητα ή 0% συσσώρευση. Όσο μεγαλύτερη είναι η συσσώρευση των αιμοπεταλίων στο δείγμα τόσο μεγαλύτερο είναι το ποσοστό της δέσμης φωτός που διέρχεται μέσα από αυτό, το οποίο ανιχνεύεται από τον καταγραφέα του οργάνου και αποδίδεται ως ποσοστό συσσώρευσης.

5.6.2. Υλικά, αντιδραστήρια και όργανα

- ✚ Πλαστικοί σωλήνες PP
- ✚ Αντιπηκτικό διάλυμα ACD
- ✚ Σύριγγες των 10 ή 20 mL με βελόνες τύπου πεταλούδα.
- ✚ Υάλινες κυψελίδες των 450 μL (Chrono-Log Corporation, αρ. καταλόγου 312)
- ✚ Μαγνητάκια από σιλικόνη (Chrono-Log Corporation, αρ. καταλόγου 311)
- ✚ Συσσωρευόμετρο 4 καναλιών (Chrono-Log Corporation, μοντέλο 700), το οποίο λειτουργεί με το λογισμικό AGGRO/LINK® 8.

5.6.3. Πειραματική πορεία

- ✚ Παρασκευάζονται πλυμένα αιμοπετάλια, όπως περιγράφηκε παραπάνω, στο υποκεφάλαιο 5.5.

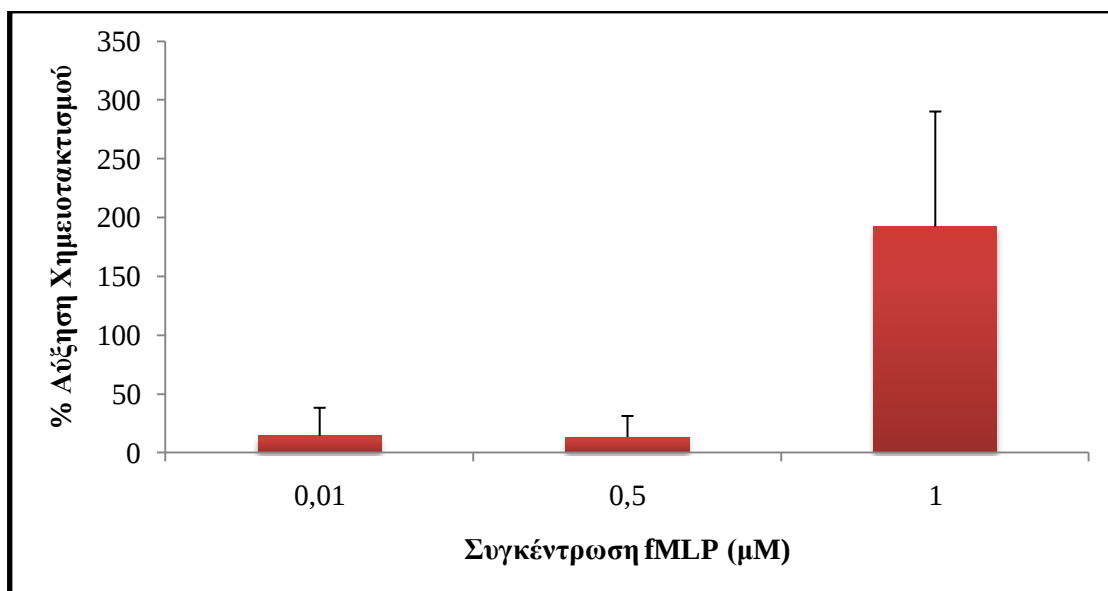
- ✚ Λαμβάνεται ολικό, περιφερικό αίμα, που πληροί τις παραπάνω προϋποθέσεις.
- ✚ Το αίμα φυγοκεντρείται στα $126 \times g$ για 15 min, για την παρασκευή PRP.
- ✚ Τα 2/3 του PRP μεταφέρονται σε καθαρό σωλήνα PP.
- ✚ Το εναπομείναν PRP επαναφυγοκεντρείται στα $1.500 \times g$ για 20 min, για την παρασκευή πλάσματος πτωχού σε αιμοπετάλια (platelet-poor plasma, PPP).
- ✚ Ο αριθμός των αιμοπεταλίων μετρείται όπως και παραπάνω και προσαρμόζεται στα 250.000 αιμοπετάλια/ μL με PPP.
- ✚ Το διάλυμα/εναιώρημα αναφοράς, καθώς και το δείγμα τοποθετούνται σε υάλινες κυψελίδες, Chrono-Log, σε τελικό όγκο 500 μL PRP, χρησιμοποιώντας ως εναιώρημα αναφοράς 500 μL PPP, ενώ για τα πλυμένα αιμοπετάλια χρησιμοποιείται διάλυμα εναιώρησης ως διάλυμα αναφοράς.
- ✚ Καταγράφεται η συσσώρευση των αιμοπεταλίων, υπό συνεχή ανάδευση, στις 1.200 RPM.
- ✚ Παρουσία ανταγωνιστών, οι ανταγωνιστές επωάζονται με τα αιμοπετάλια υπό ανάδευση και, στη συνέχεια, προστίθεται ο επιθυμητός αγωνιστής. Η καταγραφή της συσσώρευσης πραγματοποιείται για 5-60 min, ή έως ότου σταθεροποιηθεί η καμπύλη συσσώρευσης.
- ✚ Ο υπολογισμός του ποσοστού συσσώρευσης πραγματοποιείται χρησιμοποιώντας το λογισμικό του συσσωρευομέτρου, αφού ορισθούν τα χρονικά όρια εντός των οποίων έχει λάβει χώρα η συσσώρευση.
- ✚ Το ποσοστό συσσώρευσης ταυτίζεται με το ποσοστό amplitude της καμπύλης συσσώρευσης.
- ✚ Επιπροσθέτως, το σχήμα της καμπύλης συσσώρευσης δίνει πληροφορίες σχετικά με τη συμπεριφορά των αιμοπεταλίων μέσα στην κυψελίδα, προς απόκριση των ανταγωνιστών και αγωνιστών. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η δευτερογενής συσσώρευση που προκαλούν αγωνιστές, όπως είναι το ADP, ή άλλοι ασθενείς αγωνιστές. Ισχυροί αγωνιστές, όπως είναι η θρομβίνη και το αραχιδονικό οξύ, δεν προκαλούν την εμφάνιση δευτερογενούς συσσώρευσης στα αιμοπετάλια.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6. Αποτελέσματα

Σε όλα τα παραπάνω πειράματα, η βιωσιμότητα των ουδετεροφίλων ήταν $\geq 95\%$. Ταυτόχρονα, η καθαρότητα του δείγματος σε ουδετερόφιλα ήταν σταθερά $\geq 95\%$.

6.1. Τα ουδετερόφιλα μεταναστεύουν με την επίδραση του χημειοτακτικού παράγοντα fMLP

Εκ του εύρους των συγκεντρώσεων που δοκιμάστηκαν, μόνο η συγκέντρωση του 1 μM fMLP προκάλεσε αξιόλογο χημειοτακτισμό των ουδετεροφίλων (Εικόνα 16). Συνεπώς, τα επόμενα πειράματα πραγματοποιήθηκαν με τη χρήση της συγκέντρωσης αυτής.

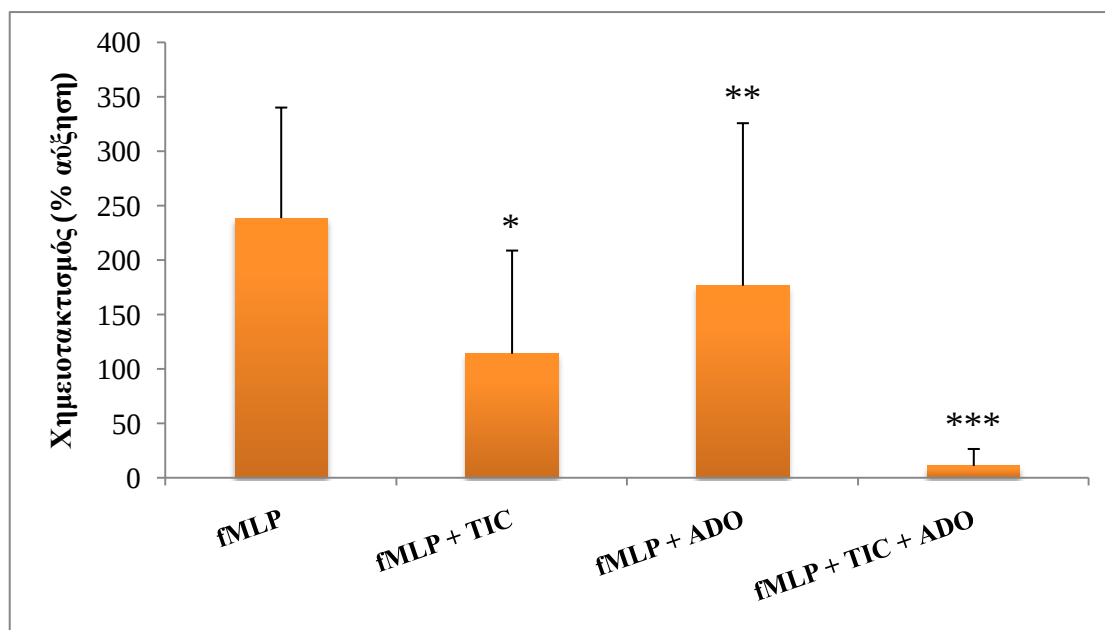


Εικόνα 16. Η επίδραση διαφόρων συγκεντρώσεων fMLP στο χημειοτακτισμό των ουδετεροφίλων. Το παρόν ραβδόγραμμα αναπαριστά το μέσο όρο (MO) $\pm$ standard deviation (SD) από 4 ανεξάρτητες παρασκευές ουδετεροφίλων. Σύντμηση: fMLP, N-φορμυλομεθειονυλο-λευκυλο-φαινυλαλανίνη.

6.2. Η επαγόμενη από fMLP μετανάστευση των ουδετεροφίλων αναστέλλεται από την τικαγρελόρη, την ADO, ή το συνδυασμό τους

Η προεπώαση του εναιωρήματος των ουδετεροφίλων με 4 μM τικαγρελόρης ανέστειλε σημαντικά τον επαγόμενο από 1 μM fMLP χημειοτακτισμό των

ουδετεροφίλων, κατά $46 \pm 35\%$, $p < 0,05$ (Εικόνα 17). Ομοίως, η προεπώαση του εναιωρήματος των ουδετεροφίλων με 20 μM ADO ανέστειλε σημαντικά τον επαγόμενο από 1 μM fMLP χημειοτακτισμό τους, κατά $25 \pm 10\%$, $p < 0,05$ (Εικόνα 17). Επιπροσθέτως, η προεπώαση του εναιωρήματος με το συνδυασμό 4 μM τικαγρελόρης και 20 μM ADO ανέστειλε σημαντικά τον επαγόμενο από 1 μM fMLP χημειοτακτισμό των ουδετεροφίλων, κατά $90 \pm 15\%$, $p < 0,05$ (Εικόνα 17).

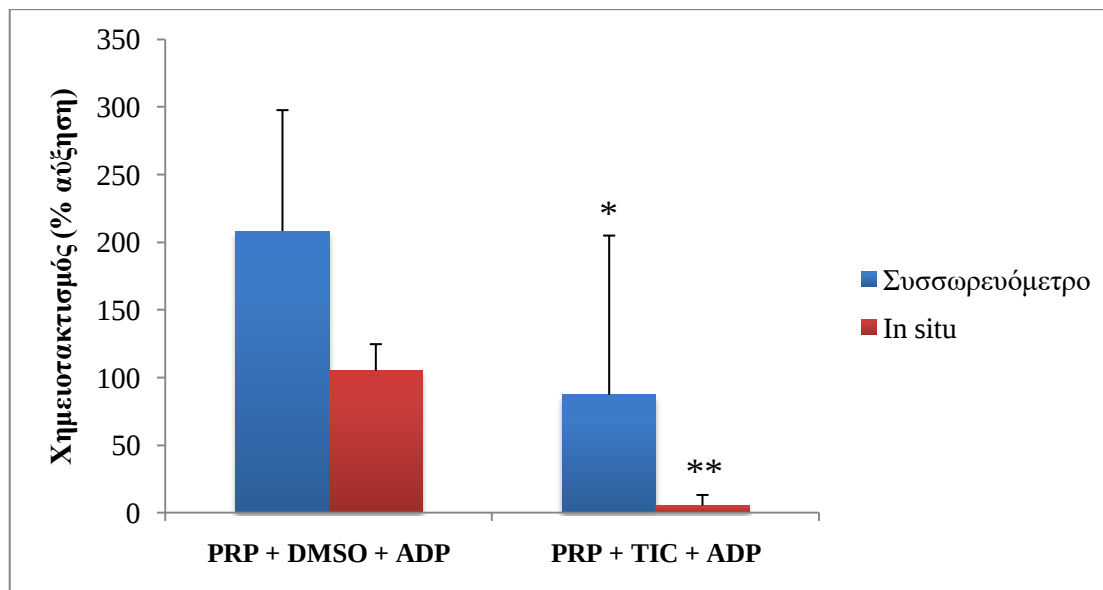


Εικόνα 17. Η επίδραση 4 μM τικαγρελόρης, 20 μM ADO και του συνδυασμού τους στον επαγόμενο από 1 μM fMLP χημειοτακτισμό των ουδετεροφίλων. Το παρόν ραβδόγραμμα αναπαριστά το $\text{MO} \pm \text{SD}$ από τουλάχιστον 3 ανεξάρτητες παρασκευές ουδετεροφίλων (*, **, *** $p < 0,05$, συγκριτικά με fMLP). Συντμήσεις: ADO, αδενοσίνη. fMLP, N-φορμυλομεθειονυλο-λευκυλο-φαινυλαλανίνη. TIC, τικαγρελόρη.

6.3. Τα ουδετερόφιλα μεταναστεύουν με την επίδραση ενεργοποιημένων αιμοπεταλίων και η μετανάστευση αυτή αναστέλλεται από την τικαγρελόρη

Το ενεργοποιημένο με ADP PRP προκάλεσε το χημειοτακτισμό των ουδετεροφίλων τόσο όταν τα αιμοπετάλια προενεργοποιήθηκαν σε συσσωρευόμετρο όσο και όταν τα αιμοπετάλια ενεργοποιήθηκαν *in situ*, κατά $208 \pm 89\%$ και $105 \pm 20\%$, αντίστοιχα (Εικόνα 18). Η τικαγρελόρη ανέστειλε σημαντικά το

χημειοτακτισμό των ουδετεροφίλων και στις 2 παραπάνω πειραματικές συνθήκες, κατά $66 \pm 35\%$ και $96 \pm 6\%$, $p < 0,03$ και στις 2 συνθήκες, αντίστοιχα (Εικόνα 18).

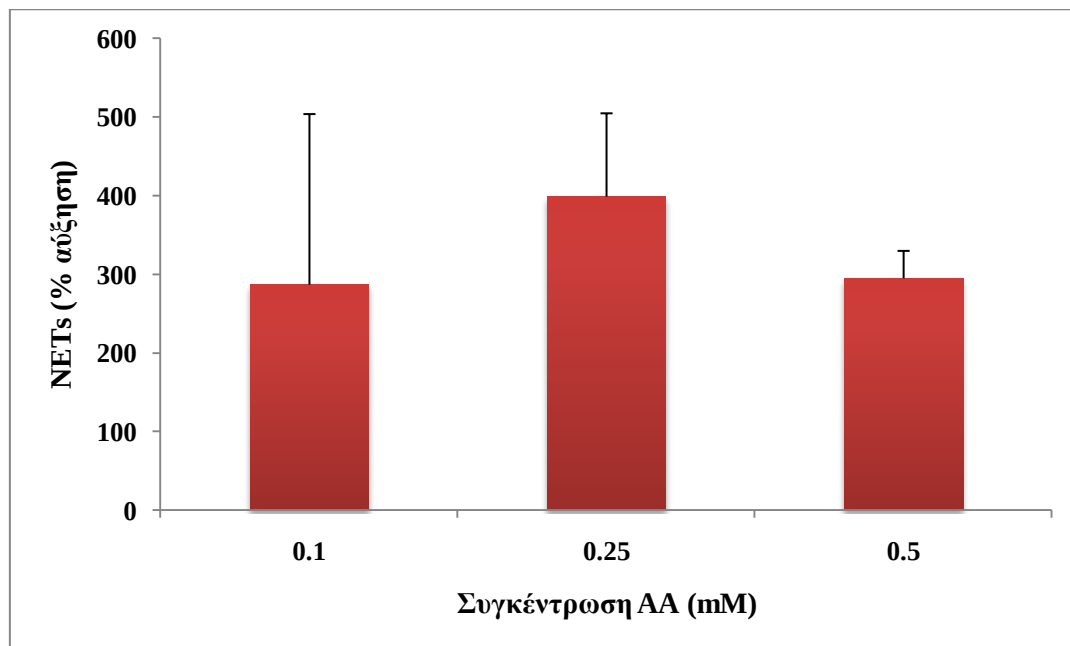


Εικόνα 18. Η επίδραση του ενεργοποιημένου με ADP PRP, όταν προενεργοποιήθηκε σε συσσωρευόμετρο (με 20 μM ADP) ή ενεργοποιήθηκε *in situ* (με 50 μM ADP), στο χημειοτακτισμό των ουδετεροφίλων και η ανασταλτική δράση της τικαγρελόρης (1,25 μM). Το παρόν ραβδόγραμμα αντιπροσωπεύει το $\text{MO} \pm \text{SD}$ από τουλάχιστον 3 διαφορετικά παρασκευάσματα ουδετεροφίλων και αυτόλογου PRP (*, ** $p < 0,03$, συγκριτικά με τη συνθήκη [PRP + DMSO + ADP]). Συντμήσεις: ADP, διφωσφορική αδενοσίνη. DMSO, διμεθυλοσουλφοξείδιο. PRP, πλάσμα πλούσιο σε αιμοπετάλια. TIC, τικαγρελόρη.

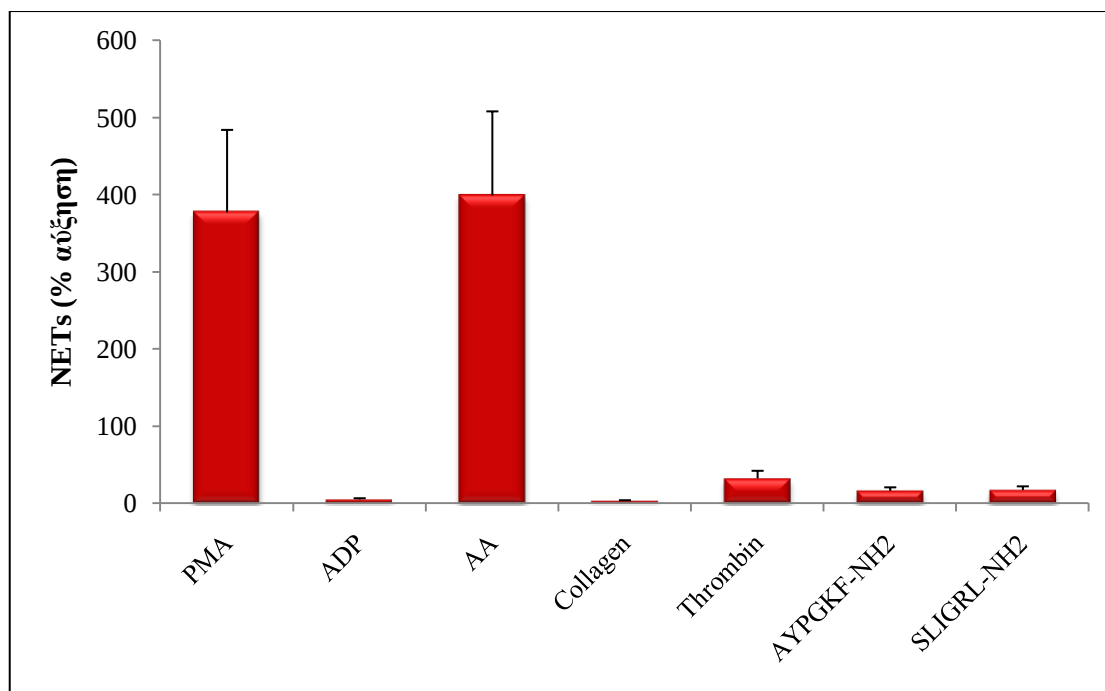
6.4. Το PMA και το AA επάγουν τη νέτωση των ουδετεροφίλων

Η συγκέντρωση κατωφλιού του PMA που προκάλεσε πλήρη νέτωση των ουδετεροφίλων ήταν η συγκέντρωση των 25 nM. Ακόμη, μεταξύ των χρονικών διαστημάτων που δοκιμάστηκαν, το PMA προκάλεσε πλήρη νέτωση των ουδετεροφίλων μόνο ύστερα από επώαση 3,5 h. Επιπρόσθετα, εκ των αγωνιστών των αιμοπεταλίων που δοκιμάστηκαν, στη συγκέντρωση κατωφλιού, μόνο το AA προκάλεσε αξιόλογη νέτωση των ουδετεροφίλων (Εικόνα 19). Πιο συγκεκριμένα, η επαγόμενη από PMA (25 nM), ADP (100 μM), AA (0,25 mM), κολλαγόνο (15 $\mu\text{g/mL}$), θρομβίνη (8 U/mL), AYPGKF-NH₂ (100 μM) ή SLIGRL-NH₂ (100 μM) αύξηση της νέτωσης ήταν $377 \pm 107\%$, $5 \pm 1\%$, $399 \pm 109\%$, $3 \pm 1\%$, $32 \pm 10\%$, $16 \pm$

4% και $17 \pm 5\%$, αντίστοιχα (Εικόνα 20). Η συγκέντρωση κατωφλιού του AA που προκάλεσε πλήρη νέτωση των ουδετεροφίλων ήταν η συγκέντρωση των 0,25 mM (Εικόνα 19). Όπως και με το PMA, μεταξύ όλων των χρονικών διαστημάτων που δοκιμάστηκαν, το AA προκάλεσε πλήρη νέτωση των ουδετεροφίλων μόνο ύστερα από επώαση 3,5 h. Φαίνονται στις Εικόνες 19, 20. Βάσει των παραπάνω αποτελεσμάτων, οι συγκεντρώσεις των 25 nM PMA και 0,25 mM AA χρησιμοποιήθηκαν στα επόμενα πειράματα.



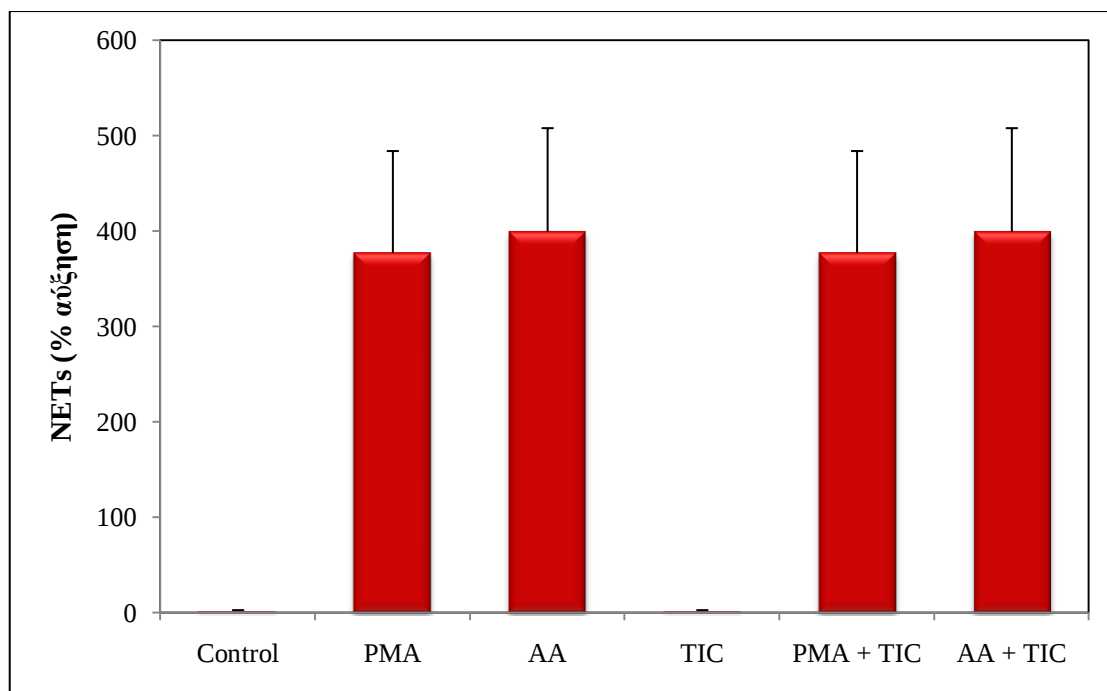
Εικόνα 19. Δοσοεξαρτώμενη νέτωση ουδετεροφίλων, προκαλούμενη από AA. Το παρόν ραβδόγραμμα αντιπροσωπεύει το $MO \pm SD$ από 3 ανεξάρτητες παρασκευές ουδετεροφίλων. Σύντμηση: AA, αραχιδονικό οξύ.



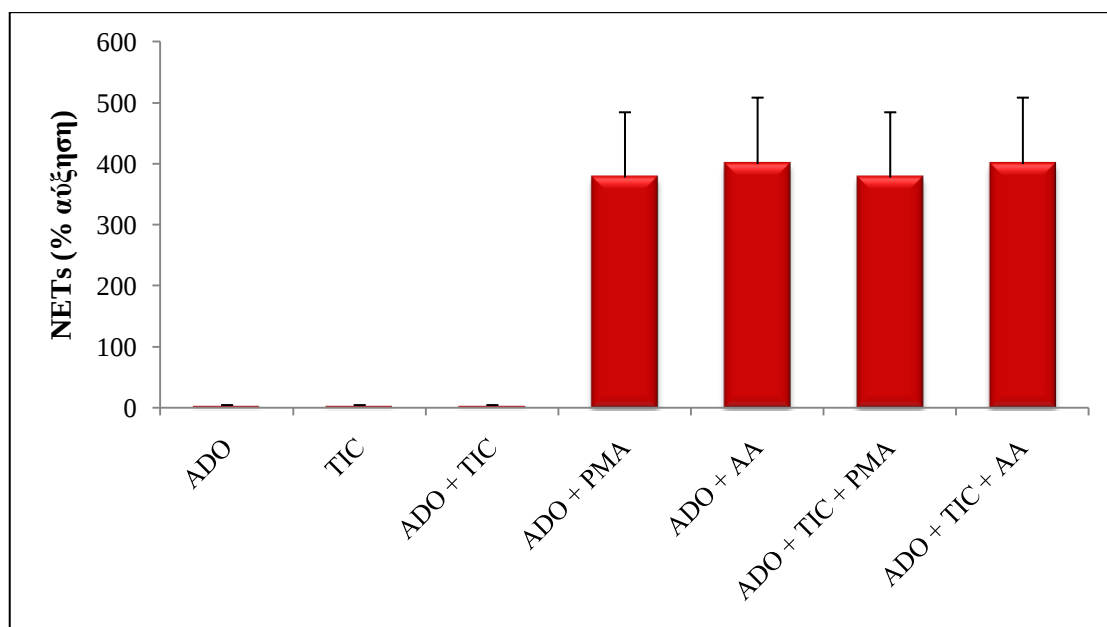
Εικόνα 20. Νέτωση που επάγεται από 100 nM PMA, 100 μ M ADP, 0,25 mM AA, 15 μ g/mL κολλαγόνου, 8 U/mL θρομβίνης, 100 μ M AYPGKF-NH₂ και 100 μ M SLIGRL-NH₂ (συγκεντρώσεις κατωφλίου για μέγιστη νέτωση). Το παρόν ραβδόγραμμα αντιπροσωπεύει το MO $\pm$ SD από 3 ανεξάρτητες παρασκευές ουδετεροφίλων.

6.5. Η τικαγρελόρη και η ADO δεν αναστέλλουν την επαγόμενη από PMA ή AA νέτωση

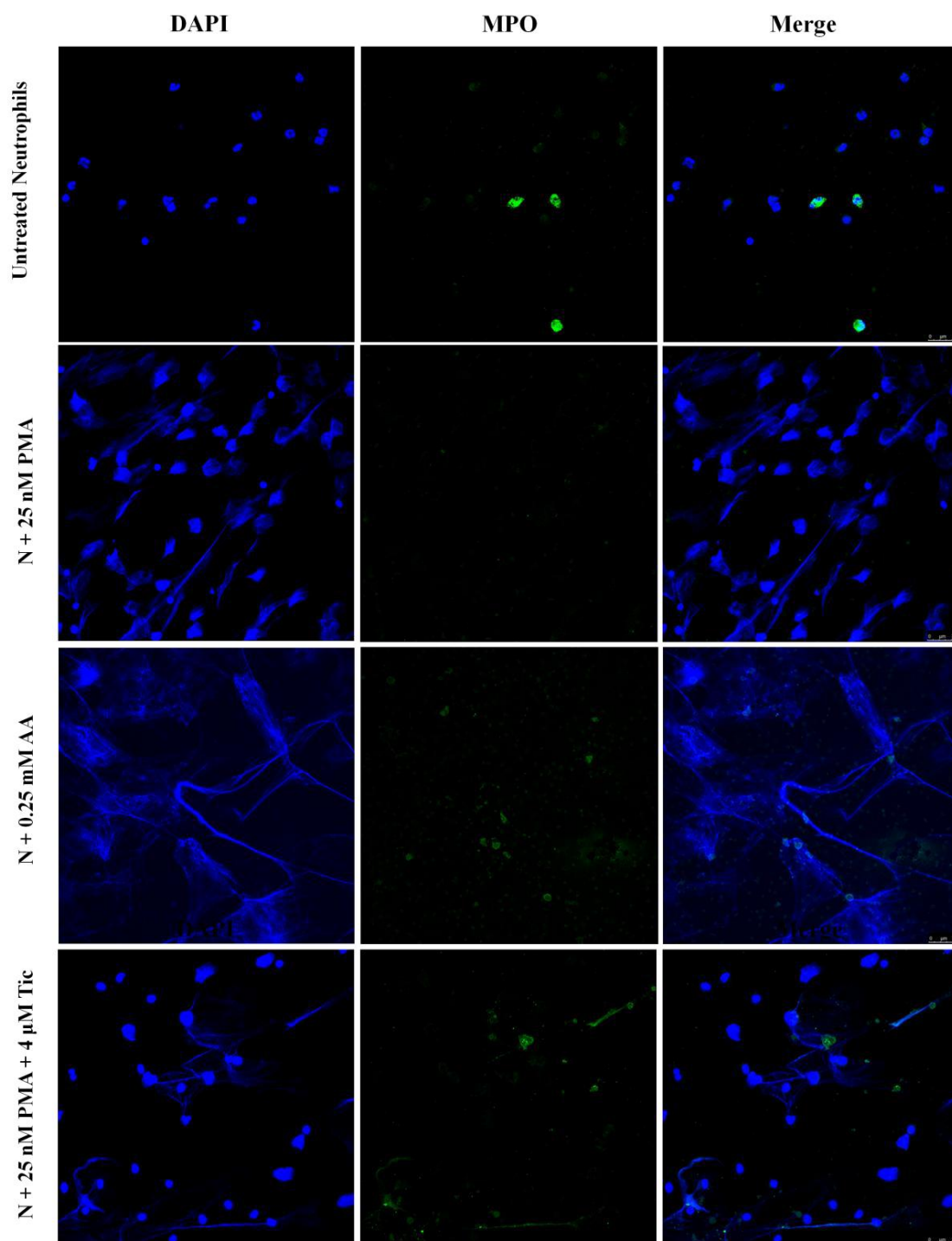
Η προεπώαση των ουδετεροφίλων με 4 μ M τικαγρελόρης ή/και 20 μ M ADO δεν αναστέλλει την επαγόμενη από PMA ή AA νέτωση (Εικόνες 21 και 22). Η επώαση των ουδετεροφίλων με 4 μ M τικαγρελόρης ή/και 20 μ M ADO, απουσία PMA ή AA, δεν προκάλεσε νέτωση (Εικόνες 21 και 22).



Εικόνα 21. Η επίδραση της τικαγρελόρης στην επαγόμενη από PMA ή AA νέτωση. Το παρόν ραβδόγραμμα αντιπροσωπεύει το $MO \pm SD$ από 4 ανεξάρτητες παρασκευές ουδετεροφύλων. Συντμήσεις: AA, αραχιδονικό οξύ. PMA, αδενοσίνη. TIC, τικαγρελόρη.



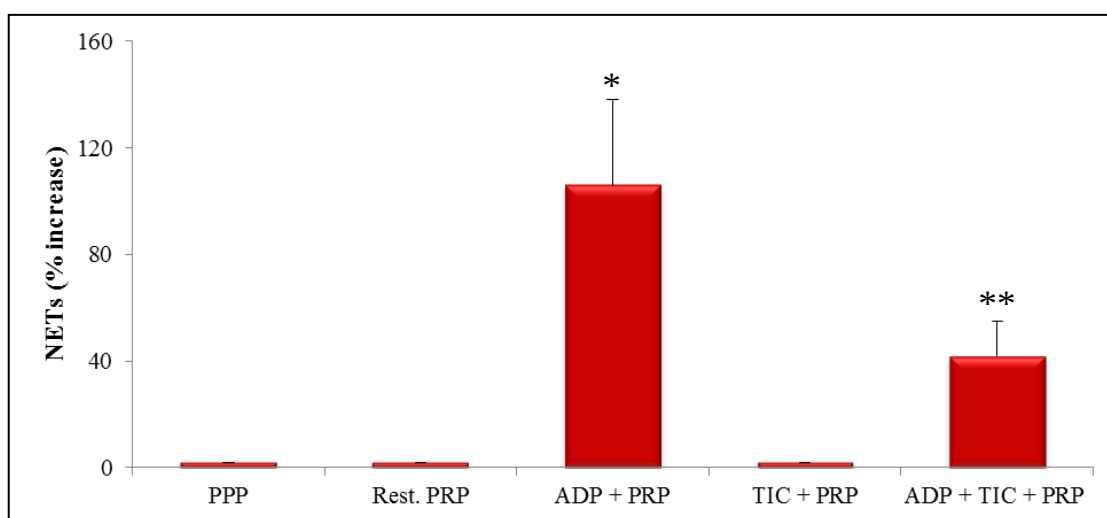
Εικόνα 22. Η επίδραση της τικαγρελόρης ή/και της ADO στην επαγόμενη από PMA ή AA νέτωση. Το παρόν ραβδόγραμμα αντιπροσωπεύει το $MO \pm SD$ από 4 ανεξάρτητες παρασκευές ουδετεροφύλων. Συντμήσεις: AA, αραχιδονικό οξύ. ADO, αδενοσίνη. PMA, οξική μυριστική φορβόλη. TIC, τικαγρελόρη.



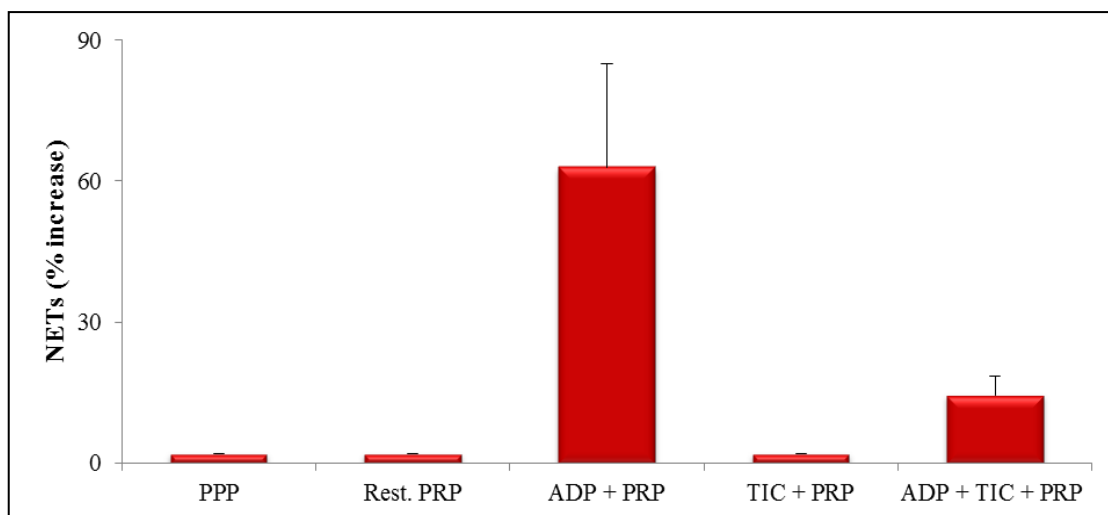
Εικόνα 23. Αντιπροσωπευτικές εικόνες συνεστιακής μικροσκοπίας ουδετεροφύλων εν ηρεμία και NETs επαγόμενων από 25 nM PMA και 0,25 mM AA. Η τικαγρελόρη, στη συγκέντρωση των 4 μM, δεν αναστέλλει τη νέτωση που προκαλείται είτε από τον έναν είτε από τον άλλον αγωνιστή (στην παρούσα εικόνα, παρουσιάζεται μόνο η συνθήκη τικαγρελόρης έναντι PMA). Μεγέθυνση 63×. Συντμήσεις: N, ουδετερόφιλα. Tic, τικαγρελόρη.

6.6. Παρουσία αιμοπεταλίων, το ADP και το TRAP επάγουν τη νέτωση, η οποία αναστέλλεται από την τικαγρελόρη

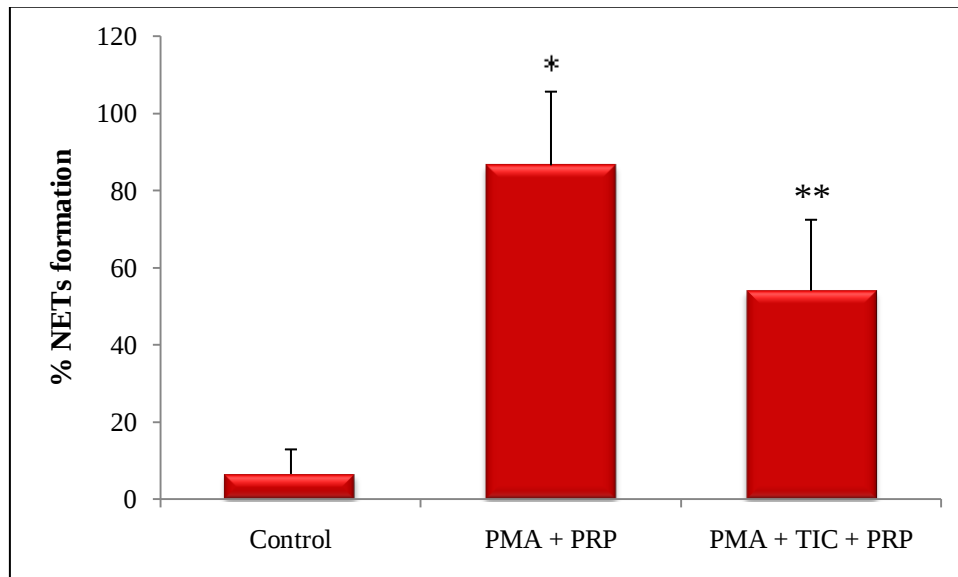
Αν και το ADP και το TRAP δεν προκάλεσαν τη νέτωση των ουδετεροφίλων από μόνα τους, παρουσία αιμοπεταλίων προκάλεσαν τη νέτωση, τόσο όταν το PRP προενεργοποιήθηκε σε συσσωρευόμετρο, όσο και όταν το PRP ενεργοποιήθηκε *in situ*, κατά $106\% \pm 32\%$ ($p = 0,03$) και $63\% \pm 22\%$ ($p = 0,011$), αντίστοιχα (Εικόνες 24 και 25). Όταν το PRP προεπώσθη με $1,25 \mu\text{M}$ τικαγρελόρης, η νέτωση που προκλήθηκε από τα ενεργοποιημένα με ADP αιμοπετάλια ανεστάλη και στις 2 παραπάνω πειραματικές συνθήκες, κατά $60\% \pm 10\%$ ($p = 0,028$) και $77\% \pm 15\%$ ($p = 0,012$), αντίστοιχα (Εικόνες 24 και 25). Επιπλέον, το προενεργοποιημένο με PMA PRP προκάλεσε τη νέτωση των ουδετεροφίλων, η οποία ανεστάλη με την προεπώαση των ουδετεροφίλων με τικαγρελόρη (Εικόνα 26). Αντιπροσωπευτικές φωτογραφίες συνεστιακής μικροσκοπίας από όλες τις παραπάνω συνθήκες φαίνονται στην Εικόνα 27.



Εικόνα 24. Νέτωση επαγόμενη από αιμοπετάλια, προενεργοποιημένα με $20 \mu\text{M}$ ADP σε συσσωρευόμετρο και η ανασταλτική δράση της τικαγρελόρης ($1,25 \mu\text{M}$). Το παρόν ραβδόγραμμα αντιπροσωπεύει το $\text{MO} \pm \text{SD}$ από 3 ανεξάρτητες παρασκευές ουδετεροφίλων και αυτόλογων αιμοπεταλίων (* $p = 0,03$ συγκριτικά με [Rest. PRP], ** $p = 0,028$ συγκριτικά με [ADP + PRP]). Συντμήσεις: ADP, διφωσφορική αδενοσίνη. PRP, πλάσμα πλούσιο σε αιμοπετάλια. TIC, τικαγρελόρη.

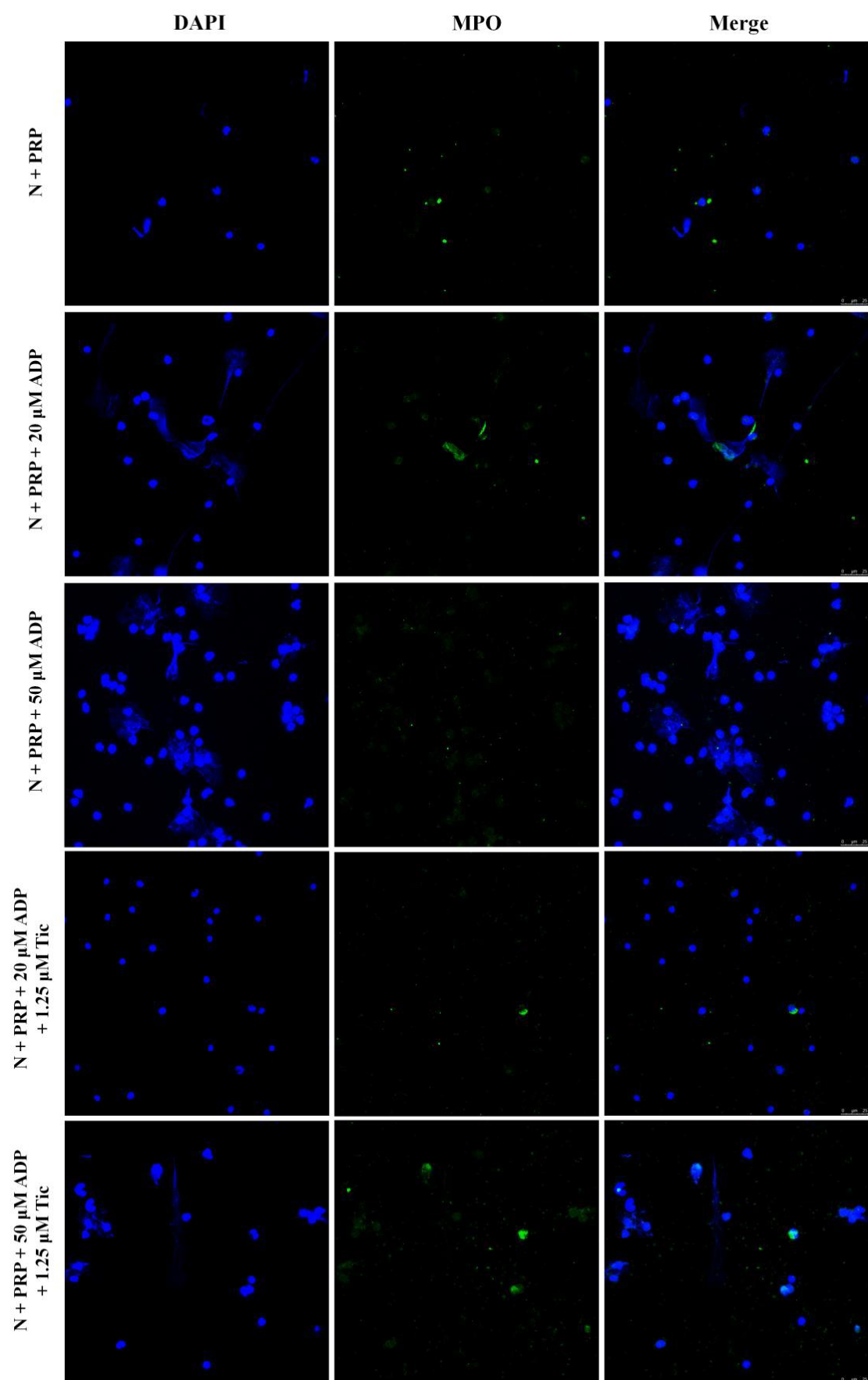


Εικόνα 25. Νέτωση επαγόμενη από αιμοπετάλια, προενεργοποιημένα με 50 μ M ADP *in situ* και η ανασταλτική δράση της τικαγρελόρης (1,25 μ M). Το παρόν ραβδόγραμμα αντιπροσωπεύει το $MO \pm SD$ από 3 ανεξάρτητες παρασκευές ουδετεροφίλων και αυτόλογων αιμοπεταλίων (* $p = 0,011$ συγκριτικά με [Rest. PRP], ** $p = 0,012$ συγκριτικά με [ADP + PRP]). Συντμήσεις: ADP, διφωσφορική αδενοσίνη. PRP, πλάσμα πλούσιο σε αιμοπετάλια. TIC, τικαγρελόρη.



Εικόνα 26. Νέτωση επαγόμενη από αιμοπετάλια, προενεργοποιημένα με 25 nM PMA και η ανασταλτική δράση της τικαγρελόρης (4 μ M). Το παρόν ραβδόγραμμα αντιπροσωπεύει το $MO \pm SD$ από τουλάχιστον 4 ανεξάρτητες παρασκευές ουδετεροφίλων και αυτόλογων αιμοπεταλίων (* $p = 0,001$ συγκριτικά με το control,

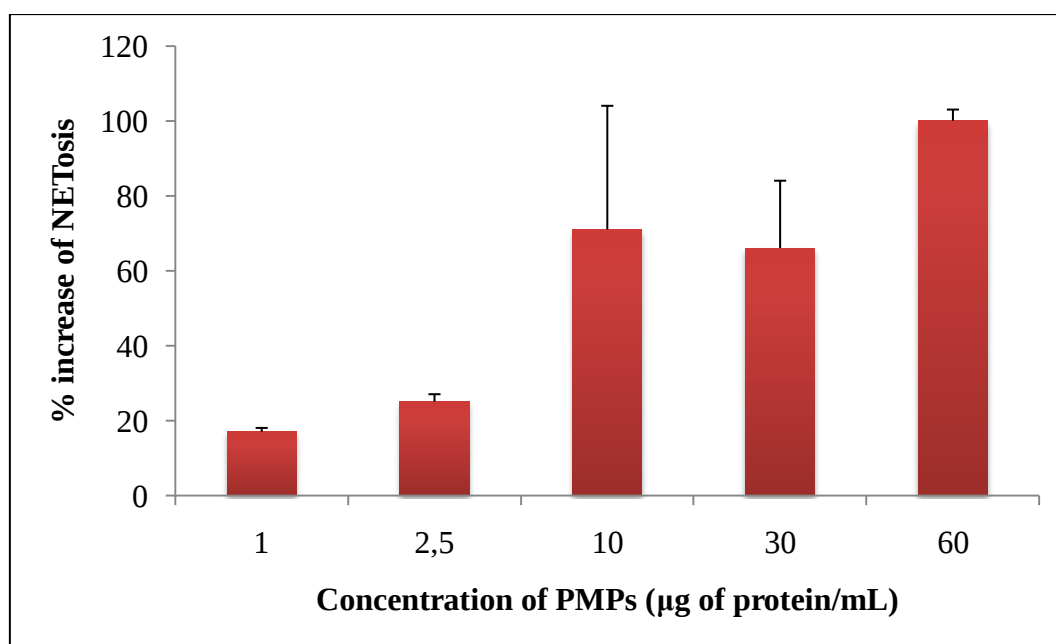
**** $p = 0,01$** συγκριτικά με τη συνθήκη [PMA + PRP]). Συντμήσεις: PMA, οξική μυριστική φορβόλη. PRP, πλάσμα πλούσιο σε αιμοπετάλια.



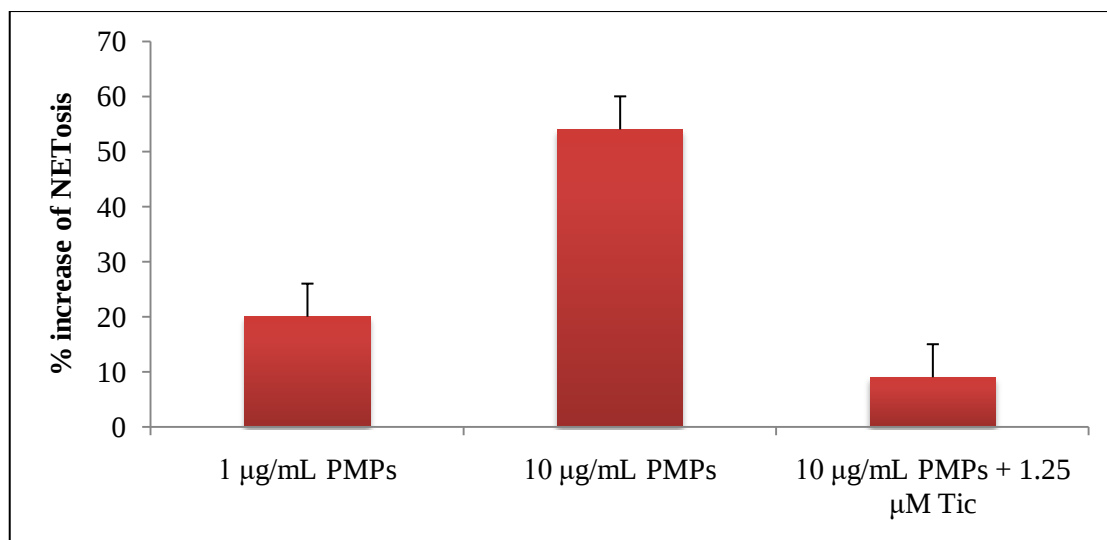
Εικόνα 27. Αντιπροσωπευτική φωτογραφία συνεστιακής μικροσκοπίας ουδετεροφίλων που έχουν επισδρασθεί με αιμοπετάλια εν ηρεμία ή αιμοπετάλια ενεργοποιημένα με 20 μM ADP εντός συσσωρευομέτρου ή αιμοπετάλια ενεργοποιημένα με 50 μM ADP *in situ*. Η προεπώαση των αιμοπεταλίων με 1,25 μM τικαγρελόρης σε κάθε μία από τις παραπάνω συνθήκες ενεργοποίησης είχε ως αποτέλεσμα την αναστολή της επαγόμενης από ενεργοποιημένα αιμοπετάλια νέτωσης. Μεγέθυνση 63 $\times$. Συντμήσεις: N, ουδετερόφιλα. Tics, τικαγρελόρη.

6.7. Τα PMPs επάγουν τη νέτωση των ουδετεροφίλων

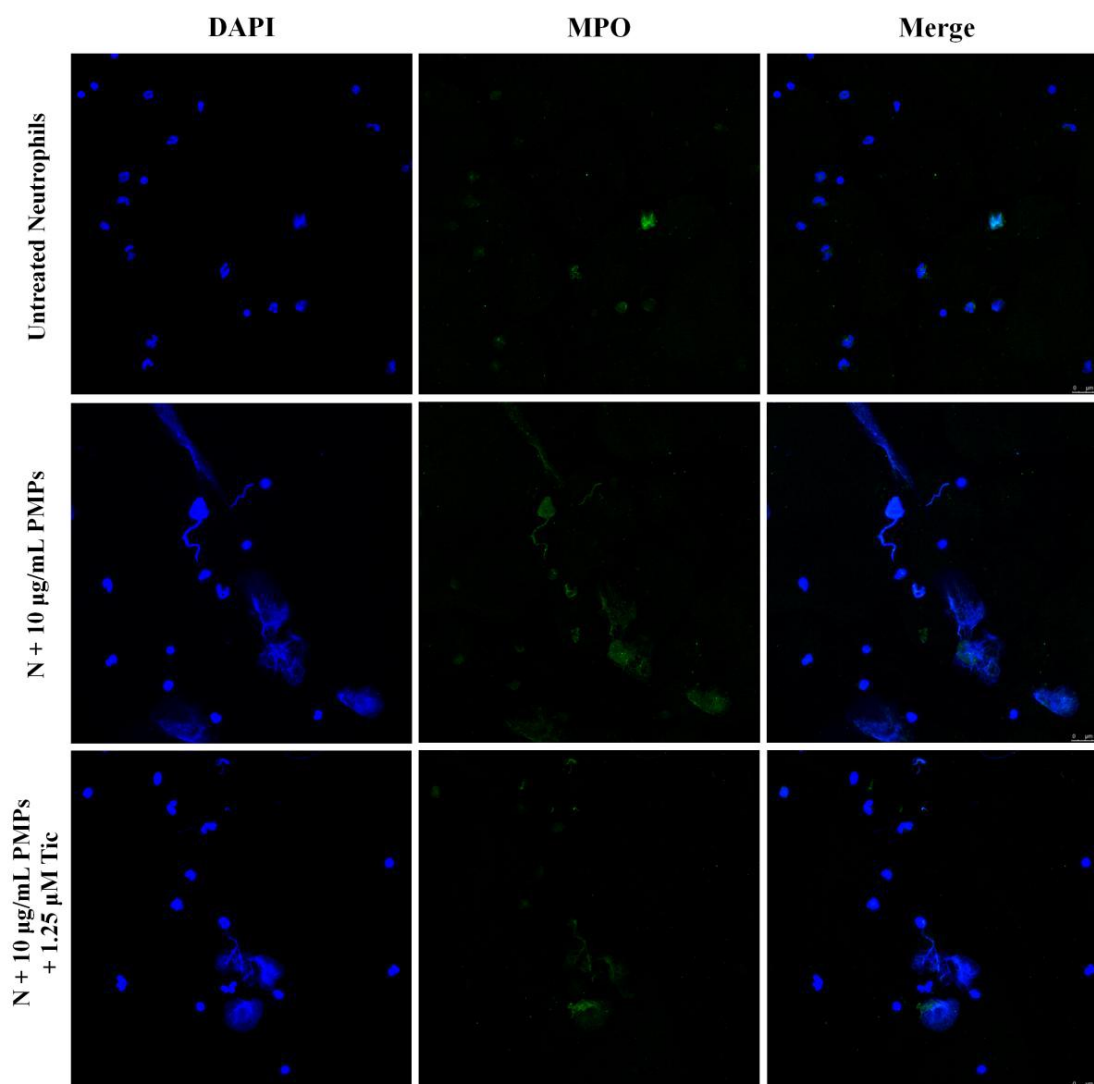
Τα PMPs επάγουν δοσοεξαρτώμενα τη νέτωση των ουδετεροφίλων, όπως φαίνεται στην Εικόνα 28. Η συγκέντρωση κατωφλιού της μέγιστης ενεργοποίησης είναι τα 10 $\mu\text{g/mL}$ PMPs, ενώ η απαιτούμενη συγκέντρωση για να επιτευχθεί το ήμισυ της μέγιστης επαγόμενης δράσης (half-maximal effective concentration, EC_{50}) είναι 9,4 $\mu\text{g/mL}$ (Εικόνα 28).



Εικόνα 28. Ραβδόγραμμα $\text{MO} \pm \text{SD}$ της % αύξησης της νέτωσης των ουδετεροφίλων εξαρτώμενη από τη συγκέντρωση των PMPs. Το ραβδόγραμμα αναπαριστά το $\text{MO} \pm \text{SD}$ από 4 παρασκευές PMPs. Συντμήσεις: PMPs, μικροσωματίδια των αιμοπεταλίων.



Εικόνα 29. Ραβδόγραμμα επίδρασης των PMPs στην αύξηση της νέτωσης, σε συγκεντρώσεις PMPs 1 µg/mL και 10 µg/mL. Η τικαγρελόρη, στη συγκέντρωση των 1,25 µM, ανέστειλε την επαγόμενη από 10 µg/mL PMPs αύξηση της νέτωσης. Το παραπάνω ραβδόγραμμα αντιπροσωπεύει το $MO \pm SD$ 3 ανεξάρτητων παρασκευασμάτων ουδετεροφίλων και PMPs. Συντμήσεις: PMPs, αιμοπεταλιακά μικροσωματίδια. Tic, τικαγρελόρη.



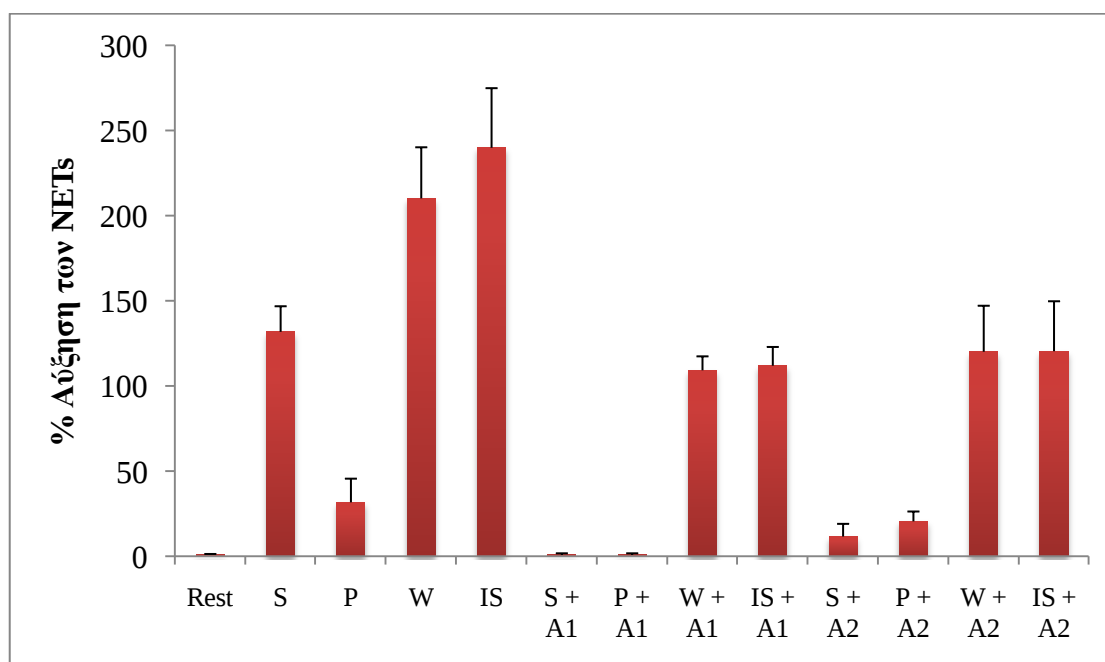
Εικόνα 30. Αντιπροσωπευτική φωτογραφία συνεστιακής μικροσκοπίας, στην οποία φαίνεται η επίδραση 10 $\mu\text{g/mL}$ PMPs στην αύξηση της νέτωσης, καθώς και η ανασταλτική δράση των 1,25 μM τικαγρελόρης. Μεγέθυνση 63 $\times$. Συντμήσεις: PMPs, αιμοπεταλιακά μικροσωματίδια. Tic, τικαγρελόρη.

6.8. Η χρήση αντισωμάτων που παρεμποδίζουν την πρόσδεση στους υποδοχείς PSGL-1 και TLR4 των ουδετεροφίλων αναστέλλει την επαγόμενη από πλυμένα αιμοπετάλια και PMPs παραγωγή των NETs.

Προκειμένου να διερευνηθεί ο μοριακός μηχανισμός διαμέσου του οποίου τα αιμοπετάλια και τα PMPs ενεργοποιούν τα ουδετερόφιλα και επάγουν τη νέτωση, χρησιμοποιήθηκαν 2 αντισώματα που προσδένονται στους ουδετεροφιλικούς

υποδοχείς PSGL-1 και TLR-4. Τα αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν τα Mouse Anti-Human CD162, Clone: KPL-1 (BD PharmingenTM, CAT# 556053) και Monoclonal Antibody (HTA125), CD284 (TLR4) (eBioscienceTM, Invitrogen, CAT# 14-9917-82), αντίστοιχα.

Παρασκευάστηκαν πλυμένα αιμοπετάλια και ενεργοποιήθηκαν είτε στο συσσωρευόμετρο είτε *in situ* με 0,2 U/mL θρομβίνης. Στη συνέχεια, μέρος του εναιωρήματος των αιμοπεταλίων που είχαν ενεργοποιηθεί εντός του συσσωρευομέτρου διαχωρίστηκε σε υπερκείμενο και ίζημα συσσωρευμένων αιμοπεταλίων. Κατόπιν, ουδετερόφιλα από τον ίδιο δότη απομονώθηκαν και επιδράσθηκαν με υπερκείμενο, ίζημα ή το σύνολο του ενεργοποιημένου εναιωρήματος συσσώρευσης, καθώς και με ενεργοποιημένα *in situ* αιμοπετάλια, παρουσία ή απουσία 1,25 µg/mL αντισωμάτων anti-CD162 ή anti-TLR-4. Το υπερκείμενο, το ίζημα, το όλον, καθώς και τα *in situ* αιμοπετάλια προκάλεσαν αύξηση της νέτωσης κατά 132%, 32%, 210% και 240%, αντίστοιχα. Η προεπώαση των ουδετεροφύλων με anti-CD162 ανέστειλε την επαγόμενη από τις παραπάνω συνθήκες νέτωση κατά 100%, 100%, 48% και 53%, αντίστοιχα. Η προεπώαση των ουδετεροφύλων με anti-TLR-4 ανέστειλε την επαγόμενη από τις παραπάνω συνθήκες νέτωση κατά 91%, 35%, 43% και 50%, αντίστοιχα (Εικόνα 31).



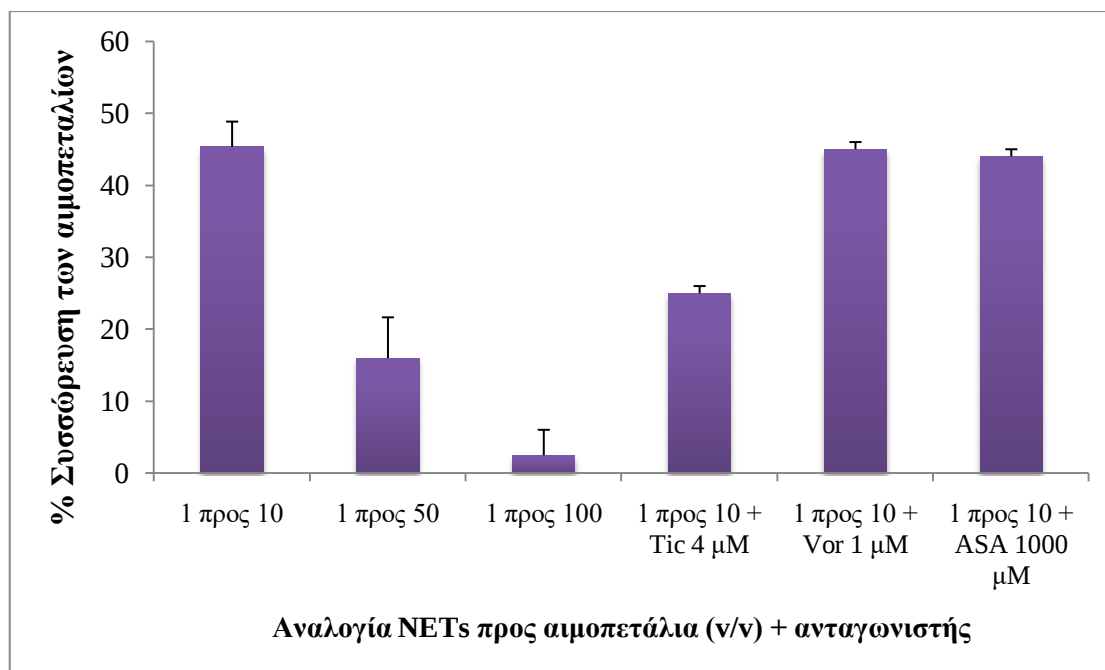
Εικόνα 31. Ραβδόγραμμα % αύξησης της νέτωσης, όταν ουδετερόφιλα επιδράσθηκαν με υπερκείμενο (S), ίζημα (P), συνολικό εναιώρημα (W) ή *in situ* αιμοπετάλια, τα

οποία είχαν διεγερθεί με 0,2 U/mL θρομβίνης, παρουσία ή απουσία 1,25 µg/mL anti-CD162 (αντίσωμα 1, A1) ή anti-TLR-4 (A2). Το ραβδόγραμμα αντιπροσωπεύει το $MO \pm SD$ 3 ανεξάρτητων παρασκευασμάτων ουδετεροφίλων και αιμοπεταλίων.

6.9. Τα NETs επάγουν τη συσσώρευση των πλυμένων αιμοπεταλίων, η οποία αναστέλλεται από την τικαγρελόρη

Σε άλλα πειράματα, παρασκευάσαμε πλυμένα αιμοπετάλια και πραγματοποιήσαμε συσσωρευομετρία οπτικής διαπερατότητας (light trasmittance aggregometry, LTA), επιδρώντας με NETs από τον ίδιο δότη, παρασκευασμένα την ίδια πειραματική ημέρα, σε διάφορες αναλογίες όγκου NETs προς αιμοπεταλίων. Έτσι, δοκιμάστηκαν οι αναλογίες 1:10 (50 µL διαλύματος NETs + 450 µL εναιωρήματος πλυμένων αιμοπεταλίων), 1:50 (10 µL διαλύματος NETs + 490 µL εναιωρήματος πλυμένων αιμοπεταλίων) και 1:100 (5 µL διαλύματος NETs + 495 µL εναιωρήματος πλυμένων αιμοπεταλίων). Ταυτόχρονα, εξετάστηκε η ανταγωνιστική δράση ορισμένων κλασσικών αντιαιμοπεταλιακών παραγόντων (4 µM τικαγρελόρης, 1 µM voraparaxar και 1000 µM ασπιρίνης) στην επαγόμενη από την αναλογία 1:10 συσσώρευση των αιμοπεταλίων, αναλογία η οποία έδωσε τη μέγιστη συσσώρευση.

Συνεπώς, τα NETs προκάλεσαν δοσοεξαρτώμενη συσσώρευση των πλυμένων αιμοπεταλίων [η αναλογία 1:10 προκάλεσε συσσώρευση κατά $45\% \pm 4\%$ ($p < 0,05$, συγκριτικά με αιμοπετάλια εν ηρεμία), η 1:50 προκάλεσε συσσώρευση κατά $16\% \pm 6\%$ και η 1:100 προκάλεσε συσσώρευση κατά $3\% \pm 4\%$], ενώ, από τους ανταγωνιστές που δοκιμάστηκαν, μόνο η τικαγρελόρη ανέστειλε την επαγόμενη από NETs (αναλογία 1:10) συσσώρευση των αιμοπεταλίων, κατά $48\% \pm 2\%$ ($p < 0,05$, συγκριτικά με τη συσσώρευση που επάγεται από την αναλογία 1:10), ενώ το voraparaxar και η ασπιρίνη δεν είχαν καμία επίδραση στην επαγόμενη από NETs, αναλογίας 1:10, συσσώρευση των αιμοπεταλίων (Εικόνα 31).



Εικόνα 32. Ραβδόγραμμα $MO \pm SD$ της % συσσώρευσης πλυμένων αιμοπεταλίων, ύστερα από την επίδραση NETs σε διάφορες αναλογίες προς τα αιμοπετάλια, καθώς και η επίδραση ορισμένων κλασσικών αιμοπεταλιακών ανταγωνιστών στη συσσώρευση αυτή. Το παραπάνω ραβδόγραμμα αντιπροσωπεύει το $MO \pm SD$ από τουλάχιστον 3 ανεξάρτητες παρασκευές NETs και αυτόλογων αιμοπεταλίων. Συντμήσεις: ASA, ασπιρίνη. Tic, τικαγρελόρη. Vor, voraparaxar.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7. Συζήτηση

Στην παρούσα Διδακτορική Διατριβή, πραγματοποιήθηκε, για πρώτη φορά στο Ερευνητικό Κέντρο Αθηροθρόμβωσης/Εργαστήριο Βιοχημείας του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, η εκτέλεση τεχνικών που αφορούν στην απομόνωση, το χαρακτηρισμό, την ενεργοποίηση, καθώς και την αναστολή της ενεργοποίησης ανθρώπινων ουδετερόφιλων λευκοκυττάρων. Ταυτόχρονα, τα αιμοπετάλια φάνηκε να ενεργοποιούνται από τα NETs, ενώ η τικαγρελόρη ανέστειλε αυτήν την ενεργοποίηση. Τα παραπάνω αποτελέσματα παρέχουν ισχυρές ενδείξεις που αφορούν στην αλληλεπίδραση ουδετερόφιλων και αιμοπεταλίων, είτε πρόκειται για ουδετερόφιλα που ενεργοποιούνται διαμέσου των αιμοπεταλίων είτε για αιμοπετάλια που ενεργοποιούνται διαμέσου των ουδετερόφιλων.

Αρχικά, εξετάστηκε η επίδραση της τικαγρελόρης, της αδενοσίνης ή του συνδυασμού τους στο χημειοτακτισμό των ουδετεροφίλων που επάγεται από τον κλασσικό χημειοτακτικό αγωνιστή, fMLP. Τόσο η τικαγρελόρη όσο η αδενοσίνη, καθώς και ο συνδυασμός τους ανέστειλαν στατιστικά σημαντικά τον επαγόμενο από fMLP χημειοτακτισμό των ουδετεροφίλων. Στη συνέχεια, φάνηκε ότι τα ενεργοποιημένα αιμοπετάλια επάγουν το χημειοτακτισμό των ουδετεροφίλων, ο οποίος αναστέλλεται στατιστικά σημαντικά από την τικαγρελόρη.

Στη συνέχεια, εξετάστηκε μικροσκοπικά η επίδραση διαφόρων κλασσικών αιμοπεταλιακών αγωνιστών στη νέτωση. Φάνηκε ότι, μεταξύ των αγωνιστών που δοκιμάστηκαν, μόνο το PMA και το AA προκάλεσαν τη νέτωση των ουδετερόφιλων, και μάλιστα στο μέγιστο χρονικό διάστημα επώασης των ουδετερόφιλων. Παρά το γεγονός ότι το ADP δεν προκάλεσε από μόνο του τη νέτωση, ακόμη και στη μέγιστη συγκέντρωση στην οποία δοκιμάστηκε, παρουσία αιμοπεταλίων φάνηκε ότι προκαλείται στατιστικά σημαντική νέτωση. Η επαγόμενη από τα ενεργοποιημένα με ADP αιμοπετάλια, νέτωση, φάνηκε να αναστέλλεται στατιστικά σημαντικά από την τικαγρελόρη, ενώ η τικαγρελόρη δεν αναστέλλει την επαγόμενη από PMA ή AA νέτωση. Τα αποτελέσματα αυτά επιβεβαιώθηκαν και ποσοτικά, με τη χρήση της ELISA DNA-MPO. Όλα αυτά τα ευρήματα έχουν καταγραφεί και στη διεθνή βιβλιογραφία, ισχυροποιώντας τα αποτελέσματά μας.

Θέλοντας να εμβαθύνουμε ως προς τους μηχανισμούς διαμέσου των οποίων τα αιμοπετάλια επάγουν την παραγωγή των NETs, παρασκευάσαμε PMPs και επιδράσαμε με αυτά στα ουδετερόφιλα. Τα αποτελέσματά μας δείχνουν πως τα PMPs

επάγουν τη νέτωση δοσοεξαρτώμενα, ενώ η τικαγρελόρη αναστέλλει την επαγόμενη από PMPs νέτωση. Ακόμη, προκειμένου να προσδιορίσουμε σε μοριακό επίπεδο την αλληλεπίδραση αιμοπεταλίων-ουδετερόφιλων, χρησιμοποιήσαμε 2 αντισώματα που παρεμποδίζουν την πρόσδεση στους υποδοχείς CD162 και TLR-4 των ουδετερόφιλων. Με την προεπάση των ουδετερόφιλων με κάθε ένα από τα αντισώματα αυτά, φάνηκε ότι αναστέλλεται η επαγόμενη νέτωση τόσο από αιμοπετάλια όσο και από PMPs, προτείνοντας με αυτόν τον τρόπο ότι η ενεργοποίηση των ουδετερόφιλων από τα αιμοπετάλια προκαλείται, τουλάχιστον εν μέρει, διαμέσου αυτών των υποδοχέων. Σε μία πρόσφατη μελέτη, στην οποία στρατολογήθηκαν ασθενείς με σήψη και, ακόμη, επιστρατεύθηκε ένα μοντέλο σήψης σε ποντίκια, φάνηκε ότι η συγκέντρωση εξωκυττάρων κυστιδίων προερχόμενων από αιμοπετάλια συσχετίζεται με τη συγκέντρωση δεικτών νέτωσης [Jiang M et al. Platelet-driven extracellular vesicles promote endothelial dysfunction in sepsis by enhancing neutrophil extracellular traps. BMC Immunol 2023; 24: 22], γεγονός που συμφωνεί και με τα δικά μας ευρήματα. Επιπροσθέτως, στη μελέτη αυτή ταυτοποιήθηκε ο παράγοντας HMGB1 ως ένας διαμεσολαβητής της ενεργοποίησης των ουδετεροφίλων διαμέσου των εξωκυττάρων κυστιδίων προερχόμενων από αιμοπετάλια [Jiang M et al. Platelet-driven extracellular vesicles promote endothelial dysfunction in sepsis by enhancing neutrophil extracellular traps. BMC Immunol 2023; 24: 22]. Είναι γνωστό ότι ο HMGB1 προσδένεται στον υποδοχέα TLR-4, επάγοντας τη νέτωση. Συνεπώς, το εύρημα αυτό, επίσης συμφωνεί με τα δικά μας αποτελέσματα, καθώς από τα πειράματά μας φάνηκε ότι η επαγόμενη από PMPs νέτωση αναστάλη όταν παρεμποδίστηκε η ενεργοποίηση του TLR-4 των ουδετεροφίλων.

Αντίστροφα, εκτός από την επίδραση των αιμοπεταλίων στα ουδετερόφιλα, εξετάστηκε και η επίδραση των NETs στα αιμοπετάλια. Η προσθήκη NETs σε πλυμένα αιμοπετάλια του ίδιου δότη είχε ως αποτέλεσμα τη δοσοεξαρτώμενη συσσώρευση των αιμοπεταλίων, η οποία αναστάλη από την τικαγρελόρη, προτείνοντας ότι ο ανταγωνιστής αυτός εμπλέκεται στο μηχανισμό συσσώρευσης των αιμοπεταλίων από τα NETs.

Όλα τα παραπάνω αποτελέσματα συνηγορούν στο ότι τα ενεργοποιημένα αιμοπετάλια και τα PMPs συμβάλλουν στην ενεργοποίηση των ουδετεροφίλων, το χημειοτακτισμό, τη νέτωση και τον προαθηροθρομβωτικό τους χαρακτήρα διαμέσου μονοπατιών που εμπλέκουν τους υποδοχείς CD162, TLR-4 και P2Y₁₂.

Βιβλιογραφία

1. Koupenova, M., et al., *Thrombosis and platelets: an update*. Eur Heart J, 2017. **38**(11): p. 785-791.
2. Davi, G. and C. Patrono, *Platelet activation and atherothrombosis*. N Engl J Med, 2007. **357**(24): p. 2482-94.
3. Nording, H.M., P. Seizer, and H.F. Langer, *Platelets in inflammation and atherogenesis*. Front Immunol, 2015. **6**: p. 98.
4. Wagner, D.D. and P.C. Burger, *Platelets in inflammation and thrombosis*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2003. **23**(12): p. 2131-7.
5. Ruggeri, Z.M., *Platelets in atherothrombosis*. Nat Med, 2002. **8**(11): p. 1227-34.
6. Ward, J.R., et al., *Agonists of toll-like receptor (TLR)2 and TLR4 are unable to modulate platelet activation by adenosine diphosphate and platelet activating factor*. Thromb Haemost, 2005. **94**(4): p. 831-8.
7. Clark, S.R., et al., *Platelet TLR4 activates neutrophil extracellular traps to ensnare bacteria in septic blood*. Nat Med, 2007. **13**(4): p. 463-9.
8. Stark, K. and S. Massberg, *Interplay between inflammation and thrombosis in cardiovascular pathology*. Nat Rev Cardiol, 2021. **18**(9): p. 666-682.
9. van der Meijden, P.E.J. and J.W.M. Heemskerk, *Platelet biology and functions: new concepts and clinical perspectives*. Nat Rev Cardiol, 2019. **16**(3): p. 166-179.
10. Rayes, J., et al., *The dual role of platelet-innate immune cell interactions in thrombo-inflammation*. Res Pract Thromb Haemost, 2020. **4**(1): p. 23-35.
11. Quach, M.E., W. Chen, and R. Li, *Mechanisms of platelet clearance and translation to improve platelet storage*. Blood, 2018. **131**(14): p. 1512-1521.
12. Baaten, C., et al., *Platelet populations and priming in hematological diseases*. Blood Rev, 2017. **31**(6): p. 389-399.
13. Del Conde, I., et al., *Tissue-factor-bearing microvesicles arise from lipid rafts and fuse with activated platelets to initiate coagulation*. Blood, 2005. **106**(5): p. 1604-11.
14. Behnke, O., *Electron microscopic observations on the membrane systems of the rat blood platelet*. Anat Rec, 1967. **158**(2): p. 121-37.

15. Behnke, O., *An electron microscope study of the megakaryocyte of the rat bone marrow. I. The development of the demarcation membrane system and the platelet surface coat.* J Ultrastruct Res, 1968. **24**(5): p. 412-33.
16. Breton-Gorius, J., *Development of two distinct membrane systems associated in giant complexes in pathological megakaryocytes.* Ser Haematol, 1975. **8**(1): p. 49-67.
17. Frojmovic, M.M., T. Wong, and J.G. White, *Platelet plasma membrane is equally distributed between surface and osmotically-evaginable surface-connecting membrane, independent of size, subpopulation or species.* Nouv Rev Fr Hematol, 1992. **34**(1): p. 99-110.
18. White, J.G., *Uptake of latex particles by blood platelets: phagocytosis or sequestration?* Am J Pathol, 1972. **69**(3): p. 439-58.
19. White, J.G. and G. Escolar, *The blood platelet open canalicular system: a two-way street.* Eur J Cell Biol, 1991. **56**(2): p. 233-42.
20. Escolar, G. and J.G. White, *The platelet open canalicular system: a final common pathway.* Blood Cells, 1991. **17**(3): p. 467-85; discussion 486-95.
21. White, J.G. and M. Krumwiede, *Further studies of the secretory pathway in thrombin-stimulated human platelets.* Blood, 1987. **69**(4): p. 1196-203.
22. Escolar, G., M. Krumwiede, and J.G. White, *Organization of the actin cytoskeleton of resting and activated platelets in suspension.* Am J Pathol, 1986. **123**(1): p. 86-94.
23. Pipeleers, D.G., M.A. Pipeleers-Marichal, and D.M. Kipnis, *Physiological regulation of total tubulin and polymerized tubulin in tissues.* J Cell Biol, 1977. **74**(2): p. 351-7.
24. White, J.G., *Fine structural alterations induced in platelets by adenosine diphosphate.* Blood, 1968. **31**(5): p. 604-22.
25. Yadav, S. and B. Storrie, *The cellular basis of platelet secretion: Emerging structure/function relationships.* Platelets, 2017. **28**(2): p. 108-118.
26. Berger, G., J.M. Masse, and E.M. Cramer, *Alpha-granule membrane mirrors the platelet plasma membrane and contains the glycoproteins Ib, IX, and V.* Blood, 1996. **87**(4): p. 1385-95.
27. White, J.G., *Platelet glycosomes.* Platelets, 1999. **10**(4): p. 242-6.
28. Sorrentino, S., et al., *Toward correlating structure and mechanics of platelets.* Cell Adh Migr, 2016. **10**(5): p. 568-575.

29. Nuyttens, B.P., et al., *Platelet adhesion to collagen*. Thromb Res, 2011. **127 Suppl 2**: p. S26-9.
30. Coughlin, S.R., *Protease-activated receptors in hemostasis, thrombosis and vascular biology*. J Thromb Haemost, 2005. **3**(8): p. 1800-14.
31. Vu, T.K., et al., *Molecular cloning of a functional thrombin receptor reveals a novel proteolytic mechanism of receptor activation*. Cell, 1991. **64**(6): p. 1057-68.
32. Nystedt, S., et al., *Molecular cloning of a potential proteinase activated receptor*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. **91**(20): p. 9208-12.
33. Ishihara, H., et al., *Protease-activated receptor 3 is a second thrombin receptor in humans*. Nature, 1997. **386**(6624): p. 502-6.
34. Xu, W.F., et al., *Cloning and characterization of human protease-activated receptor 4*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(12): p. 6642-6.
35. Kahn, M.L., et al., *A dual thrombin receptor system for platelet activation*. Nature, 1998. **394**(6694): p. 690-4.
36. Adams, M.N., et al., *Structure, function and pathophysiology of protease activated receptors*. Pharmacol Ther, 2011. **130**(3): p. 248-82.
37. Kahn, M.L., et al., *Protease-activated receptors 1 and 4 mediate activation of human platelets by thrombin*. J Clin Invest, 1999. **103**(6): p. 879-87.
38. Moschonas, I.C., J.A. Goudevenos, and A.D. Tselepis, *Protease-activated receptor-1 antagonists in long-term antiplatelet therapy. Current state of evidence and future perspectives*. Int J Cardiol, 2015. **185**: p. 9-18.
39. Leger, A.J., L. Covic, and A. Kuliopulos, *Protease-activated receptors in cardiovascular diseases*. Circulation, 2006. **114**(10): p. 1070-7.
40. Arachiche, A., et al., *Protease-activated receptor 1 (PAR1) and PAR4 heterodimers are required for PAR1-enhanced cleavage of PAR4 by alpha-thrombin*. J Biol Chem, 2013. **288**(45): p. 32553-32562.
41. Jin, J., J.L. Daniel, and S.P. Kunapuli, *Molecular basis for ADP-induced platelet activation. II. The P2Y1 receptor mediates ADP-induced intracellular calcium mobilization and shape change in platelets*. J Biol Chem, 1998. **273**(4): p. 2030-4.
42. Jin, J. and S.P. Kunapuli, *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): p. 8070-4.

43. Daniel, J.L., et al., *Molecular basis for ADP-induced platelet activation. I. Evidence for three distinct ADP receptors on human platelets*. J Biol Chem, 1998. **273**(4): p. 2024-9.
44. Storey, R.F., et al., *The central role of the P(2T) receptor in amplification of human platelet activation, aggregation, secretion and procoagulant activity*. Br J Haematol, 2000. **110**(4): p. 925-34.
45. Hechler, B., et al., *The P2Y1 receptor is necessary for adenosine 5'-diphosphate-induced platelet aggregation*. Blood, 1998. **92**(1): p. 152-9.
46. Hechler, B., 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): p. 858-66.
47. Cattaneo, M., *The platelet P2Y(1)(2) receptor for adenosine diphosphate: congenital and drug-induced defects*. Blood, 2011. **117**(7): p. 2102-12.
48. Zhong, X., et al., *N-linked glycosylation of platelet P2Y12 ADP receptor is essential for signal transduction but not for ligand binding or cell surface expression*. FEBS Lett, 2004. **562**(1-3): p. 111-7.
49. Savi, P., et al., *The active metabolite of Clopidogrel disrupts P2Y12 receptor oligomers and partitions them out of lipid rafts*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(29): p. 11069-74.
50. Zhang, D., et al., *Two disparate ligand-binding sites in the human P2Y1 receptor*. Nature, 2015. **520**(7547): p. 317-21.
51. Zhang, K., et al., *Structure of the human P2Y12 receptor in complex with an antithrombotic drug*. Nature, 2014. **509**(7498): p. 115-8.
52. Zhang, J., et al., *Agonist-bound structure of the human P2Y12 receptor*. Nature, 2014. **509**(7498): p. 119-22.
53. Lu, M. and B. Wu, *Structural studies of G protein-coupled receptors*. IUBMB Life, 2016. **68**(11): p. 894-903.
54. Welsh, J.D., et al., *A systems approach to hemostasis: 4. How hemostatic thrombi limit the loss of plasma-borne molecules from the microvasculature*. Blood, 2016. **127**(12): p. 1598-605.
55. Chu, S.G., et al., *Mean platelet volume as a predictor of cardiovascular risk: a systematic review and meta-analysis*. J Thromb Haemost, 2010. **8**(1): p. 148-56.

56. Braekkan, S.K., et al., *Mean platelet volume is a risk factor for venous thromboembolism: the Tromso Study, Tromso, Norway*. J Thromb Haemost, 2010. **8**(1): p. 157-62.
57. Santilli, F., et al., *Platelet cyclooxygenase inhibition by low-dose aspirin is not reflected consistently by platelet function assays: implications for aspirin "resistance"*. J Am Coll Cardiol, 2009. **53**(8): p. 667-77.
58. Papathanasiou, A., J. Goudevenos, and A.D. Tselepis, *Aspirin resistance in cardiovascular disease: pathogenesis, diagnosis and clinical impact*. Curr Pharm Des, 2009. **15**(10): p. 1085-94.
59. Patrono, C., *Aspirin as an antiplatelet drug*. N Engl J Med, 1994. **330**(18): p. 1287-94.
60. Patrono, C., et al., *Expert consensus document on the use of antiplatelet agents. The task force on the use of antiplatelet agents in patients with atherosclerotic cardiovascular disease of the European society of cardiology*. Eur Heart J, 2004. **25**(2): p. 166-81.
61. Patrignani, P. and C. Patrono, *Aspirin and Cancer*. J Am Coll Cardiol, 2016. **68**(9): p. 967-76.
62. Patrono, C., et al., *Antiplatelet Agents for the Treatment and Prevention of Coronary Atherothrombosis*. J Am Coll Cardiol, 2017. **70**(14): p. 1760-1776.
63. Thun, M.J., E.J. Jacobs, and C. Patrono, *The role of aspirin in cancer prevention*. Nat Rev Clin Oncol, 2012. **9**(5): p. 259-67.
64. Anninos, H., et al., *Triflusal: an old drug in modern antiplatelet therapy. Review of its action, use, safety and effectiveness*. Hellenic J Cardiol, 2009. **50**(3): p. 199-207.
65. Ramis, J., et al., *Pharmacokinetics of triflusal and its main metabolite HTB in healthy subjects following a single oral dose*. Eur J Drug Metab Pharmacokinet, 1991. **16**(4): p. 269-73.
66. Murdoch, D. and G.L. Plosker, *Triflusal: a review of its use in cerebral infarction and myocardial infarction, and as thromboprophylaxis in atrial fibrillation*. Drugs, 2006. **66**(5): p. 671-92.
67. Savi, P., et al., *Identification and biological activity of the active metabolite of clopidogrel*. Thromb Haemost, 2000. **84**(5): p. 891-6.

68. Helft, G., et al., *Acute antithrombotic effect of a front-loaded regimen of clopidogrel in patients with atherosclerosis on aspirin*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2000. **20**(10): p. 2316-21.
69. Hochholzer, W., et al., *Time dependence of platelet inhibition after a 600-mg loading dose of clopidogrel in a large, unselected cohort of candidates for percutaneous coronary intervention*. *Circulation*, 2005. **111**(20): p. 2560-4.
70. Tsoumani, M.E., et al., *Clopidogrel generic formulations in the era of new antiplatelets: a systematic review*. *Curr Vasc Pharmacol*, 2014. **12**(5): p. 766-77.
71. Kalantzi, K.I., et al., *Pharmacodynamic properties of antiplatelet agents: current knowledge and future perspectives*. *Expert Rev Clin Pharmacol*, 2012. **5**(3): p. 319-36.
72. Cattaneo, M., *New P2Y₁₂ inhibitors*. *Circulation*, 2010. **121**(1): p. 171-9.
73. Bonello, L., et al., *Consensus and future directions on the definition of high on-treatment platelet reactivity to adenosine diphosphate*. *J Am Coll Cardiol*, 2010. **56**(12): p. 919-33.
74. Sugidachi, A., et al., *The in vivo pharmacological profile of CS-747, a novel antiplatelet agent with platelet ADP receptor antagonist properties*. *Br J Pharmacol*, 2000. **129**(7): p. 1439-46.
75. Sugidachi, A., et al., *Antiplatelet action of R-99224, an active metabolite of a novel thienopyridine-type G(i)-linked P2T antagonist, CS-747*. *Br J Pharmacol*, 2001. **132**(1): p. 47-54.
76. Niitsu, Y., et al., *Pharmacology of CS-747 (prasugrel, LY640315), a novel, potent antiplatelet agent with in vivo P2Y₁₂ receptor antagonist activity*. *Semin Thromb Hemost*, 2005. **31**(2): p. 184-94.
77. Jakubowski, J.A., et al., *Prasugrel: a novel thienopyridine antiplatelet agent. A review of preclinical and clinical studies and the mechanistic basis for its distinct antiplatelet profile*. *Cardiovasc Drug Rev*, 2007. **25**(4): p. 357-74.
78. Wiviott, S.D., et al., *Prasugrel compared with high loading- and maintenance-dose clopidogrel in patients with planned percutaneous coronary intervention: the Prasugrel in Comparison to Clopidogrel for Inhibition of Platelet Activation and Aggregation-Thrombolysis in Myocardial Infarction 44 trial*. *Circulation*, 2007. **116**(25): p. 2923-32.

79. Hagihara, K., et al., *Biotransformation of prasugrel, a novel thienopyridine antiplatelet agent, to the pharmacologically active metabolite*. Drug Metab Dispos, 2010. **38**(6): p. 898-904.
80. Williams, E.T., et al., *The biotransformation of prasugrel, a new thienopyridine prodrug, by the human carboxylesterases 1 and 2*. Drug Metab Dispos, 2008. **36**(7): p. 1227-32.
81. Rehm, J.L., et al., *Interactions of two major metabolites of prasugrel, a thienopyridine antiplatelet agent, with the cytochromes P450*. Drug Metab Dispos, 2006. **34**(4): p. 600-7.
82. Small, D.S., et al., *Effect of intrinsic and extrinsic factors on the clinical pharmacokinetics and pharmacodynamics of prasugrel*. Clin Pharmacokinet, 2010. **49**(12): p. 777-98.
83. Jakubowski, J.A., et al., *TRITON and beyond: new insights into the profile of prasugrel*. Cardiovasc Ther, 2012. **30**(4): p. e174-82.
84. Teng, R. and K. Butler, *Pharmacokinetics, pharmacodynamics, tolerability and safety of single ascending doses of ticagrelor, a reversibly binding oral P2Y₁₂ receptor antagonist, in healthy subjects*. Eur J Clin Pharmacol, 2010. **66**(5): p. 487-96.
85. Gurbel, P.A., et al., *Randomized double-blind assessment of the ONSET and OFFSET of the antiplatelet effects of ticagrelor versus clopidogrel in patients with stable coronary artery disease: the ONSET/OFFSET study*. Circulation, 2009. **120**(25): p. 2577-85.
86. Storey, R.F., et al., *Inhibitory effects of ticagrelor compared with clopidogrel on platelet function in patients with acute coronary syndromes: the PLATO (PLATElet inhibition and patient Outcomes) PLATELET substudy*. J Am Coll Cardiol, 2010. **56**(18): p. 1456-62.
87. White, H.D., *Oral antiplatelet therapy for atherothrombotic disease: current evidence and new directions*. Am Heart J, 2011. **161**(3): p. 450-61.
88. Morrow, D.A., et al., *Evaluation of a novel antiplatelet agent for secondary prevention in patients with a history of atherosclerotic disease: design and rationale for the Thrombin-Receptor Antagonist in Secondary Prevention of Atherothrombotic Ischemic Events (TRA 2 degrees P)-TIMI 50 trial*. Am Heart J, 2009. **158**(3): p. 335-341 e3.

89. Morrow, D.A., et al., *Vorapaxar in the secondary prevention of atherothrombotic events*. N Engl J Med, 2012. **366**(15): p. 1404-13.
90. Moschonas, I.C. and A.D. Tselepis, *Increased Benefit With Vorapaxar Use in Patients With a History of Myocardial Infarction and Diabetes Mellitus: What the Data Show Us*. J Cardiovasc Pharmacol Ther, 2017. **22**(2): p. 133-141.
91. Gresele, P., S. Momi, and E. Falcinelli, *Anti-platelet therapy: phosphodiesterase inhibitors*. Br J Clin Pharmacol, 2011. **72**(4): p. 634-46.
92. Kariyazono, H., et al., *Inhibition of platelet aggregation and the release of P-selectin from platelets by cilostazol*. Thromb Res, 2001. **101**(6): p. 445-53.
93. Igawa, T., et al., *Potentiation of anti-platelet aggregating activity of cilostazol with vascular endothelial cells*. Thromb Res, 1990. **57**(4): p. 617-23.
94. Tanaka, T., et al., *Effects of cilostazol, a selective cAMP phosphodiesterase inhibitor on the contraction of vascular smooth muscle*. Pharmacology, 1988. **36**(5): p. 313-20.
95. Takahashi, S., et al., *Effect of cilostazol, a cyclic AMP phosphodiesterase inhibitor, on the proliferation of rat aortic smooth muscle cells in culture*. J Cardiovasc Pharmacol, 1992. **20**(6): p. 900-6.
96. Tsoumani, M.E. and A.D. Tselepis, *Antiplatelet Agents and Anticoagulants: From Pharmacology to Clinical Practice*. Curr Pharm Des, 2017. **23**(9): p. 1279-1293.
97. Ridger, V.C., et al., *Microvesicles in vascular homeostasis and diseases. Position Paper of the European Society of Cardiology (ESC) Working Group on Atherosclerosis and Vascular Biology*. Thromb Haemost, 2017. **117**(7): p. 1296-1316.
98. Nomura, S., Y. Ozaki, and Y. Ikeda, *Function and role of microparticles in various clinical settings*. Thromb Res, 2008. **123**(1): p. 8-23.
99. Heijnen, H.F., et al., *Multivesicular bodies are an intermediate stage in the formation of platelet alpha-granules*. Blood, 1998. **91**(7): p. 2313-25.
100. Hargett, L.A. and N.N. Bauer, *On the origin of microparticles: From "platelet dust" to mediators of intercellular communication*. Pulm Circ, 2013. **3**(2): p. 329-40.
101. Wolf, P., *The nature and significance of platelet products in human plasma*. Br J Haematol, 1967. **13**(3): p. 269-88.

102. Wang, Z.T., Z. Wang, and Y.W. Hu, *Possible roles of platelet-derived microparticles in atherosclerosis*. *Atherosclerosis*, 2016. **248**: p. 10-6.
103. Flaumenhaft, R., et al., *Megakaryocyte-derived microparticles: direct visualization and distinction from platelet-derived microparticles*. *Blood*, 2009. **113**(5): p. 1112-21.
104. Horstman, L.L. and Y.S. Ahn, *Platelet microparticles: a wide-angle perspective*. *Crit Rev Oncol Hematol*, 1999. **30**(2): p. 111-42.
105. Ramacciotti, E., et al., *Leukocyte- and platelet-derived microparticles correlate with thrombus weight and tissue factor activity in an experimental mouse model of venous thrombosis*. *Thromb Haemost*, 2009. **101**(4): p. 748-54.
106. Lee, K.D., K. Hong, and D. Papahadjopoulos, *Recognition of liposomes by cells: in vitro binding and endocytosis mediated by specific lipid headgroups and surface charge density*. *Biochim Biophys Acta*, 1992. **1103**(2): p. 185-97.
107. Kim, H.K., et al., *Platelet microparticles induce angiogenesis in vitro*. *Br J Haematol*, 2004. **124**(3): p. 376-84.
108. Baj-Krzyworzeka, M., et al., *Platelet-derived microparticles stimulate proliferation, survival, adhesion, and chemotaxis of hematopoietic cells*. *Exp Hematol*, 2002. **30**(5): p. 450-9.
109. Varon, D. and E. Shai, *Platelets and their microparticles as key players in pathophysiological responses*. *J Thromb Haemost*, 2015. **13 Suppl 1**: p. S40-6.
110. Helley, D., et al., *Platelet microparticles: a potential predictive factor of survival in hormone-refractory prostate cancer patients treated with docetaxel-based chemotherapy*. *Eur Urol*, 2009. **56**(3): p. 479-84.
111. Varon, D., et al., *Involvement of platelet derived microparticles in tumor metastasis and tissue regeneration*. *Thromb Res*, 2012. **130 Suppl 1**: p. S98-9.
112. Hayon, Y., et al., *Platelet microparticles induce angiogenesis and neurogenesis after cerebral ischemia*. *Curr Neurovasc Res*, 2012. **9**(3): p. 185-92.
113. de Oliveira, S., E.E. Rosowski, and A. Huttenlocher, *Neutrophil migration in infection and wound repair: going forward in reverse*. *Nat Rev Immunol*, 2016. **16**(6): p. 378-91.

114. Brinkmann, V., et al., *Neutrophil extracellular traps kill bacteria*. Science, 2004. **303**(5663): p. 1532-5.
115. Ley, K., et al., *Neutrophils: New insights and open questions*. Sci Immunol, 2018. **3**(30).
116. Sidaway, P., *Neutrophils: Neutrophil differentiation is autophagy dependent*. Nat Rev Immunol, 2017. **17**(11): p. 662.
117. Riffelmacher, T., et al., *Autophagy-Dependent Generation of Free Fatty Acids Is Critical for Normal Neutrophil Differentiation*. Immunity, 2017. **47**(3): p. 466-480 e5.
118. Urban, C.F., et al., *Neutrophil extracellular traps contain calprotectin, a cytosolic protein complex involved in host defense against Candida albicans*. PLoS Pathog, 2009. **5**(10): p. e1000639.
119. Dwyer, M., et al., *Cystic fibrosis sputum DNA has NETosis characteristics and neutrophil extracellular trap release is regulated by macrophage migration-inhibitory factor*. J Innate Immun, 2014. **6**(6): p. 765-79.
120. Welin, A., et al., *The human neutrophil subsets defined by the presence or absence of OLFM4 both transmigrate into tissue in vivo and give rise to distinct NETs in vitro*. PLoS One, 2013. **8**(7): p. e69575.
121. Urban, C.F. and J.E. Nett, *Neutrophil extracellular traps in fungal infection*. Semin Cell Dev Biol, 2019. **89**: p. 47-57.
122. Chang, Z., et al., *The TatD-like DNase of Plasmodium is a virulence factor and a potential malaria vaccine candidate*. Nat Commun, 2016. **7**: p. 11537.
123. Schonrich, G. and M.J. Raftery, *Neutrophil Extracellular Traps Go Viral*. Front Immunol, 2016. **7**: p. 366.
124. Gupta, S. and M.J. Kaplan, *The role of neutrophils and NETosis in autoimmune and renal diseases*. Nat Rev Nephrol, 2016. **12**(7): p. 402-13.
125. Cools-Lartigue, J., et al., *Neutrophil extracellular traps in cancer progression*. Cell Mol Life Sci, 2014. **71**(21): p. 4179-94.
126. Wong, S.L., et al., *Diabetes primes neutrophils to undergo NETosis, which impairs wound healing*. Nat Med, 2015. **21**(7): p. 815-9.
127. Zenaro, E., et al., *Neutrophils promote Alzheimer's disease-like pathology and cognitive decline via LFA-1 integrin*. Nat Med, 2015. **21**(8): p. 880-6.

128. Gupta, A.K., et al., *Activated endothelial cells induce neutrophil extracellular traps and are susceptible to NETosis-mediated cell death*. FEBS Lett, 2010. **584**(14): p. 3193-7.
129. Saffarzadeh, M., et al., *Neutrophil extracellular traps directly induce epithelial and endothelial cell death: a predominant role of histones*. PLoS One, 2012. **7**(2): p. e32366.
130. Allen, C., et al., *Neutrophil cerebrovascular transmigration triggers rapid neurotoxicity through release of proteases associated with decondensed DNA*. J Immunol, 2012. **189**(1): p. 381-92.
131. Doring, Y., O. Soehnlein, and C. Weber, *Neutrophil Extracellular Traps in Atherosclerosis and Atherothrombosis*. Circ Res, 2017. **120**(4): p. 736-743.
132. Van Avondt, K., L. Maegdefessel, and O. Soehnlein, *Therapeutic Targeting of Neutrophil Extracellular Traps in Atherogenic Inflammation*. Thromb Haemost, 2019. **119**(4): p. 542-552.
133. Borissoff, J.I., et al., *Elevated levels of circulating DNA and chromatin are independently associated with severe coronary atherosclerosis and a prothrombotic state*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2013. **33**(8): p. 2032-2040.
134. Mangold, A., et al., *Coronary neutrophil extracellular trap burden and deoxyribonuclease activity in ST-elevation acute coronary syndrome are predictors of ST-segment resolution and infarct size*. Circ Res, 2015. **116**(7): p. 1182-92.
135. Valles, J., et al., *Neutrophil extracellular traps are increased in patients with acute ischemic stroke: prognostic significance*. Thromb Haemost, 2017. **117**(10): p. 1919-1929.
136. Fuchs, T.A., et al., *Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps*. J Cell Biol, 2007. **176**(2): p. 231-41.
137. Kenny, E.F., et al., *Diverse stimuli engage different neutrophil extracellular trap pathways*. Elife, 2017. **6**.
138. Pilsczek, F.H., et al., *A novel mechanism of rapid nuclear neutrophil extracellular trap formation in response to Staphylococcus aureus*. J Immunol, 2010. **185**(12): p. 7413-25.
139. Yipp, B.G., et al., *Infection-induced NETosis is a dynamic process involving neutrophil multitasking in vivo*. Nat Med, 2012. **18**(9): p. 1386-93.

140. Lood, C., et al., *Neutrophil extracellular traps enriched in oxidized mitochondrial DNA are interferogenic and contribute to lupus-like disease*. Nat Med, 2016. **22**(2): p. 146-53.
141. Doua, D.N., et al., *SK3 channel and mitochondrial ROS mediate NADPH oxidase-independent NETosis induced by calcium influx*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2015. **112**(9): p. 2817-22.
142. Parker, H., et al., *Myeloperoxidase associated with neutrophil extracellular traps is active and mediates bacterial killing in the presence of hydrogen peroxide*. J Leukoc Biol, 2012. **91**(3): p. 369-76.
143. Papayannopoulos, V., et al., *Neutrophil elastase and myeloperoxidase regulate the formation of neutrophil extracellular traps*. J Cell Biol, 2010. **191**(3): p. 677-91.
144. Metzler, K.D., et al., *Myeloperoxidase is required for neutrophil extracellular trap formation: implications for innate immunity*. Blood, 2011. **117**(3): p. 953-9.
145. Metzler, K.D., et al., *A myeloperoxidase-containing complex regulates neutrophil elastase release and actin dynamics during NETosis*. Cell Rep, 2014. **8**(3): p. 883-96.
146. Neeli, I., S.N. Khan, and M. Radic, *Histone deimination as a response to inflammatory stimuli in neutrophils*. J Immunol, 2008. **180**(3): p. 1895-902.
147. Wang, Y., et al., *Histone hypercitrullination mediates chromatin decondensation and neutrophil extracellular trap formation*. J Cell Biol, 2009. **184**(2): p. 205-13.
148. Leshner, M., et al., *PAD4 mediated histone hypercitrullination induces heterochromatin decondensation and chromatin unfolding to form neutrophil extracellular trap-like structures*. Front Immunol, 2012. **3**: p. 307.
149. Rohrbach, A.S., et al., *Activation of PAD4 in NET formation*. Front Immunol, 2012. **3**: p. 360.
150. Neeli, I. and M. Radic, *Opposition between PKC isoforms regulates histone deimination and neutrophil extracellular chromatin release*. Front Immunol, 2013. **4**: p. 38.
151. Li, P., et al., *PAD4 is essential for antibacterial innate immunity mediated by neutrophil extracellular traps*. J Exp Med, 2010. **207**(9): p. 1853-62.

152. Remijnsen, Q., et al., *Neutrophil extracellular trap cell death requires both autophagy and superoxide generation*. Cell Res, 2011. **21**(2): p. 290-304.
153. Itakura, A. and O.J. McCarty, *Pivotal role for the mTOR pathway in the formation of neutrophil extracellular traps via regulation of autophagy*. Am J Physiol Cell Physiol, 2013. **305**(3): p. C348-54.
154. Sollberger, G., et al., *Gasdermin D plays a vital role in the generation of neutrophil extracellular traps*. Sci Immunol, 2018. **3**(26).
155. Chen, K.W., et al., *Noncanonical inflammasome signaling elicits gasdermin D-dependent neutrophil extracellular traps*. Sci Immunol, 2018. **3**(26).
156. Megens, R.T., et al., *Presence of luminal neutrophil extracellular traps in atherosclerosis*. Thromb Haemost, 2012. **107**(3): p. 597-8.
157. Shi, C., et al., *Crystal Clots as Therapeutic Target in Cholesterol Crystal Embolism*. Circ Res, 2020. **126**(8): p. e37-e52.
158. Awasthi, D., et al., *Oxidized LDL induced extracellular trap formation in human neutrophils via TLR-PKC-IRAK-MAPK and NADPH-oxidase activation*. Free Radic Biol Med, 2016. **93**: p. 190-203.
159. Warnatsch, A., et al., *Inflammation. Neutrophil extracellular traps license macrophages for cytokine production in atherosclerosis*. Science, 2015. **349**(6245): p. 316-20.
160. Liu, Y., et al., *Myeloid-Specific Deletion of Peptidylarginine Deiminase 4 Mitigates Atherosclerosis*. Front Immunol, 2018. **9**: p. 1680.
161. Westerterp, M., et al., *Cholesterol Efflux Pathways Suppress Inflammasome Activation, NETosis, and Atherogenesis*. Circulation, 2018. **138**(9): p. 898-912.
162. Curcic, S., et al., *Neutrophil effector responses are suppressed by secretory phospholipase A2 modified HDL*. Biochim Biophys Acta, 2015. **1851**(2): p. 184-93.
163. Neumann, A., et al., *Lipid alterations in human blood-derived neutrophils lead to formation of neutrophil extracellular traps*. Eur J Cell Biol, 2014. **93**(8-9): p. 347-54.
164. Smith, C.K., et al., *Neutrophil extracellular trap-derived enzymes oxidize high-density lipoprotein: an additional proatherogenic mechanism in systemic lupus erythematosus*. Arthritis Rheumatol, 2014. **66**(9): p. 2532-2544.

165. Doring, Y., et al., *Auto-antigenic protein-DNA complexes stimulate plasmacytoid dendritic cells to promote atherosclerosis*. *Circulation*, 2012. **125**(13): p. 1673-83.
166. Quillard, T., et al., *TLR2 and neutrophils potentiate endothelial stress, apoptosis and detachment: implications for superficial erosion*. *Eur Heart J*, 2015. **36**(22): p. 1394-404.
167. Franck, G., et al., *Roles of PAD4 and NETosis in Experimental Atherosclerosis and Arterial Injury: Implications for Superficial Erosion*. *Circ Res*, 2018. **123**(1): p. 33-42.
168. Folco, E.J., et al., *Neutrophil Extracellular Traps Induce Endothelial Cell Activation and Tissue Factor Production Through Interleukin-1alpha and Cathepsin G*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2018. **38**(8): p. 1901-1912.
169. Wang, H., et al., *Obesity-induced Endothelial Dysfunction is Prevented by Neutrophil Extracellular Trap Inhibition*. *Sci Rep*, 2018. **8**(1): p. 4881.
170. Wang, Y., et al., *Mitochondrial Oxidative Stress Promotes Atherosclerosis and Neutrophil Extracellular Traps in Aged Mice*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2017. **37**(8): p. e99-e107.
171. Yamamoto, K., et al., *Augmented neutrophil extracellular traps formation promotes atherosclerosis development in socially defeated apoE(-/-) mice*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2018. **500**(2): p. 490-496.
172. Silvestre-Roig, C., et al., *Externalized histone H4 orchestrates chronic inflammation by inducing lytic cell death*. *Nature*, 2019. **569**(7755): p. 236-240.
173. Oklu, R., et al., *Extracellular traps in lipid-rich lesions of carotid atherosclerotic plaques: implications for lipoprotein retention and lesion progression*. *J Vasc Interv Radiol*, 2014. **25**(4): p. 631-4.
174. Range, H., et al., *Periodontal bacteria in human carotid atherothrombosis as a potential trigger for neutrophil activation*. *Atherosclerosis*, 2014. **236**(2): p. 448-55.
175. Perez-Sanchez, C., et al., *Diagnostic potential of NETosis-derived products for disease activity, atherosclerosis and therapeutic effectiveness in Rheumatoid Arthritis patients*. *J Autoimmun*, 2017. **82**: p. 31-40.

176. Pertiwi, K.R., et al., *Neutrophil Extracellular Traps Participate in All Different Types of Thrombotic and Haemorrhagic Complications of Coronary Atherosclerosis*. Thromb Haemost, 2018. **118**(6): p. 1078-1087.
177. Fuchs, T.A., et al., *Extracellular DNA traps promote thrombosis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. **107**(36): p. 15880-5.
178. Reyes-Garcia, A.M.L., et al., *Neutrophil extracellular trap components increase the expression of coagulation factors*. Biomed Rep, 2019. **10**(3): p. 195-201.
179. Elaskalani, O., N.B. Abdol Razak, and P. Metharom, *Neutrophil extracellular traps induce aggregation of washed human platelets independently of extracellular DNA and histones*. Cell Commun Signal, 2018. **16**(1): p. 24.
180. Sambrano, G.R., et al., *Cathepsin G activates protease-activated receptor-4 in human platelets*. J Biol Chem, 2000. **275**(10): p. 6819-23.
181. Kambas, K., et al., *Autophagy mediates the delivery of thrombogenic tissue factor to neutrophil extracellular traps in human sepsis*. PLoS One, 2012. **7**(9): p. e45427.
182. Stakos, D.A., et al., *Expression of functional tissue factor by neutrophil extracellular traps in culprit artery of acute myocardial infarction*. Eur Heart J, 2015. **36**(22): p. 1405-14.
183. Seif, K., et al., *Neutrophil-Mediated Proteolysis of Thrombospondin-1 Promotes Platelet Adhesion and String Formation*. Thromb Haemost, 2018. **118**(12): p. 2074-2085.
184. Caudrillier, A., et al., *Platelets induce neutrophil extracellular traps in transfusion-related acute lung injury*. J Clin Invest, 2012. **122**(7): p. 2661-71.
185. Sreeramkumar, V., et al., *Neutrophils scan for activated platelets to initiate inflammation*. Science, 2014. **346**(6214): p. 1234-8.
186. Maugeri, N., et al., *Activated platelets present high mobility group box 1 to neutrophils, inducing autophagy and promoting the extrusion of neutrophil extracellular traps*. J Thromb Haemost, 2014. **12**(12): p. 2074-88.
187. Carestia, A., et al., *Mediators and molecular pathways involved in the regulation of neutrophil extracellular trap formation mediated by activated platelets*. J Leukoc Biol, 2016. **99**(1): p. 153-62.
188. Etulain, J., et al., *P-selectin promotes neutrophil extracellular trap formation in mice*. Blood, 2015. **126**(2): p. 242-6.

189. Panicker, S.R., et al., *Circulating soluble P-selectin must dimerize to promote inflammation and coagulation in mice*. Blood, 2017. **130**(2): p. 181-191.
190. Erlandsson Harris, H. and U. Andersson, *Mini-review: The nuclear protein HMGB1 as a proinflammatory mediator*. Eur J Immunol, 2004. **34**(6): p. 1503-12.
191. Tadie, J.M., et al., *HMGB1 promotes neutrophil extracellular trap formation through interactions with Toll-like receptor 4*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2013. **304**(5): p. L342-9.
192. Andersson, U. and K.J. Tracey, *HMGB1 is a therapeutic target for sterile inflammation and infection*. Annu Rev Immunol, 2011. **29**: p. 139-62.
193. Maugeri, N., et al., *Platelet microparticles sustain autophagy-associated activation of neutrophils in systemic sclerosis*. Sci Transl Med, 2018. **10**(451).
194. Chrysanthopoulou, A., et al., *Interferon lambda1/IL-29 and inorganic polyphosphate are novel regulators of neutrophil-driven thromboinflammation*. J Pathol, 2017. **243**(1): p. 111-122.
195. de Boer, O.J., et al., *Neutrophils, neutrophil extracellular traps and interleukin-17 associate with the organisation of thrombi in acute myocardial infarction*. Thromb Haemost, 2013. **109**(2): p. 290-7.
196. Pertiwi, K.R., et al., *Extracellular traps derived from macrophages, mast cells, eosinophils and neutrophils are generated in a time-dependent manner during atherothrombosis*. J Pathol, 2019. **247**(4): p. 505-512.
197. Riegger, J., et al., *Histopathological evaluation of thrombus in patients presenting with stent thrombosis. A multicenter European study: a report of the prevention of late stent thrombosis by an interdisciplinary global European effort consortium*. Eur Heart J, 2016. **37**(19): p. 1538-49.
198. Kopytek, M., et al., *NETosis is associated with the severity of aortic stenosis: Links with inflammation*. Int J Cardiol, 2019. **286**: p. 121-126.
199. Yu, X., J. Tan, and S.L. Diamond, *Hemodynamic force triggers rapid NETosis within sterile thrombotic occlusions*. J Thromb Haemost, 2018. **16**(2): p. 316-329.
200. Yu, X. and S.L. Diamond, *Fibrin Modulates Shear-Induced NETosis in Sterile Occlusive Thrombi Formed under Haemodynamic Flow*. Thromb Haemost, 2019. **119**(4): p. 586-593.

201. Guo, Y., et al., *Neutrophil activation and neutrophil derived neutrophil extracellular trap formation in patients with coronary artery ectasia*. BMC Cardiovasc Disord, 2020. **20**(1): p. 101.
202. Brill, A., et al., *Neutrophil extracellular traps promote deep vein thrombosis in mice*. J Thromb Haemost, 2012. **10**(1): p. 136-44.
203. von Bruhl, M.L., et al., *Monocytes, neutrophils, and platelets cooperate to initiate and propagate venous thrombosis in mice in vivo*. J Exp Med, 2012. **209**(4): p. 819-35.
204. Martinod, K., et al., *Neutrophil histone modification by peptidylarginine deiminase 4 is critical for deep vein thrombosis in mice*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2013. **110**(21): p. 8674-9.
205. Martinod, K., et al., *Neutrophil elastase-deficient mice form neutrophil extracellular traps in an experimental model of deep vein thrombosis*. J Thromb Haemost, 2016. **14**(3): p. 551-8.
206. van Montfoort, M.L., et al., *Circulating nucleosomes and neutrophil activation as risk factors for deep vein thrombosis*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2013. **33**(1): p. 147-51.
207. Savchenko, A.S., et al., *Neutrophil extracellular traps form predominantly during the organizing stage of human venous thromboembolism development*. J Thromb Haemost, 2014. **12**(6): p. 860-70.
208. Yago, T., et al., *Cooperative PSGL-1 and CXCR2 signaling in neutrophils promotes deep vein thrombosis in mice*. Blood, 2018. **132**(13): p. 1426-1437.
209. Stark, K., et al., *Disulfide HMGB1 derived from platelets coordinates venous thrombosis in mice*. Blood, 2016. **128**(20): p. 2435-2449.
210. Dyer, M.R., et al., *Deep vein thrombosis in mice is regulated by platelet HMGB1 through release of neutrophil-extracellular traps and DNA*. Sci Rep, 2018. **8**(1): p. 2068.
211. Nakazawa, D., et al., *Activated platelets induce MLKL-driven neutrophil necroptosis and release of neutrophil extracellular traps in venous thrombosis*. Cell Death Discov, 2018. **4**: p. 6.
212. Bertin, F.R., et al., *Natural killer cells induce neutrophil extracellular trap formation in venous thrombosis*. J Thromb Haemost, 2019. **17**(2): p. 403-414.
213. Gollomp, K., et al., *Neutrophil accumulation and NET release contribute to thrombosis in HIT*. JCI Insight, 2018. **3**(18).

214. Li, B., et al., *Neutrophil extracellular traps enhance procoagulant activity in patients with oral squamous cell carcinoma*. J Cancer Res Clin Oncol, 2019. **145**(7): p. 1695-1707.
215. Hisada, Y., et al., *Neutrophils and neutrophil extracellular traps enhance venous thrombosis in mice bearing human pancreatic tumors*. Haematologica, 2019.
216. Jung, H.S., et al., *Cancer cell-induced neutrophil extracellular traps promote both hypercoagulability and cancer progression*. PLoS One, 2019. **14**(4): p. e0216055.
217. Rayes, R.F., et al., *Neutrophil Extracellular Trap-Associated CEACAM1 as a Putative Therapeutic Target to Prevent Metastatic Progression of Colon Carcinoma*. J Immunol, 2020. **204**(8): p. 2285-2294.
218. Muqaku, B., et al., *Neutrophil Extracellular Trap Formation Correlates with Favorable Overall Survival in High Grade Ovarian Cancer*. Cancers (Basel), 2020. **12**(2).
219. Yu, M., et al., *Phosphatidylserine-exposing blood cells, microparticles and neutrophil extracellular traps increase procoagulant activity in patients with pancreatic cancer*. Thromb Res, 2020. **188**: p. 5-16.
220. Chen, Z., et al., *HDAC Inhibitor Attenuated NETs Formation Induced by Activated Platelets In Vitro, Partially Through Downregulating Platelet Secretion*. Shock, 2020. **54**(3): p. 321-329.
221. Deng, Q., et al., *Citrullinated Histone H3 as a Therapeutic Target for Endotoxic Shock in Mice*. Front Immunol, 2019. **10**: p. 2957.
222. Stiel, C.U., et al., *Markers of NETosis Do Not Predict Neonatal Early Onset Sepsis: A Pilot Study*. Front Pediatr, 2019. **7**: p. 555.
223. Gomez, R.M., A.O. Lopez Ortiz, and M. Schattner, *Platelets and extracellular traps in infections*. Platelets, 2021. **32**(3): p. 305-313.
224. Demyanets, S., et al., *Surrogate Markers of Neutrophil Extracellular Trap Formation are Associated with Ischemic Outcomes and Platelet Activation after Peripheral Angioplasty and Stenting*. J Clin Med, 2020. **9**(2).
225. Sprenkeler, E.G.G., et al., *S100A8/A9 Is a Marker for the Release of Neutrophil Extracellular Traps and Induces Neutrophil Activation*. Cells, 2022. **11**(2).

226. Sprenkeler, E.G.G., et al., *Formation of neutrophil extracellular traps requires actin cytoskeleton rearrangements*. Blood, 2022.
227. Poli, V., et al., *Inhibition of transcription factor NFAT activity in activated platelets enhances their aggregation and exacerbates gram-negative bacterial septicemia*. Immunity, 2021.
228. Sugimoto, T., et al., *Repeated Social Defeat Exaggerates Fibrin-Rich Clot Formation by Enhancing Neutrophil Extracellular Trap Formation via Platelet-Neutrophil Interactions*. Cells, 2021. **10**(12).
229. Guo, Y., et al., *Spontaneous formation of neutrophil extracellular traps is associated with autophagy*. Sci Rep, 2021. **11**(1): p. 24005.
230. Heo, J.H., et al., *Pathophysiologic and Therapeutic Perspectives Based on Thrombus Histology in Stroke*. J Stroke, 2020. **22**(1): p. 64-75.
231. Abbasi, M., et al., *Diverse thrombus composition in thrombectomy stroke patients with longer time to recanalization*. Thromb Res, 2022. **209**: p. 99-104.
232. Yaqinuddin, A., *Neutrophil extracellular traps and thrombogenesis in COVID-19 patients*. J Res Med Sci, 2021. **26**: p. 96.
233. Moschonas, I.C. and A.D. Tselepis, *SARS-CoV-2 infection and thrombotic complications: a narrative review*. J Thromb Thrombolysis, 2021. **52**(1): p. 111-123.
234. Blasco, A., et al., *Prognostic Implications of Neutrophil Extracellular Traps in Coronary Thrombi of Patients with ST-Elevation Myocardial Infarction*. Thromb Haemost, 2021.
235. Dou, H., et al., *Oxidized Phospholipids Promote NETosis and Arterial Thrombosis in LNK(SH2B3) Deficiency*. Circulation, 2021. **144**(24): p. 1940-1954.
236. Toth, E., et al., *Fibrin to von Willebrand factor ratio in arterial thrombi is associated with plasma levels of inflammatory biomarkers and local abundance of extracellular DNA*. Thromb Res, 2022. **209**: p. 8-15.
237. Joshi, A., et al., *Neutrophil-Derived Protein S100A8/A9 Alters the Platelet Proteome in Acute Myocardial Infarction and Is Associated With Changes in Platelet Reactivity*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2022. **42**(1): p. 49-62.
238. Conforti, A., T. Wahlers, and A. Paunel-Gorgulu, *Neutrophil extracellular traps modulate inflammatory markers and uptake of oxidized LDL by human and murine macrophages*. PLoS One, 2021. **16**(11): p. e0259894.

- 239. He, L., et al., *NETs promote pathogenic cardiac fibrosis and participate in ventricular aneurysm formation after ischemia injury through the facilitation of perivascular fibrosis*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2021. **583**: p. 154-161.
- 240. Tokuhiro, T., et al., *Oxidized Phospholipids and Neutrophil Elastase Coordinately Play Critical Roles in NET Formation*. *Front Cell Dev Biol*, 2021. **9**: p. 718586.
- 241. Chilingaryan, Z., et al., *Erythrocyte interaction with neutrophil extracellular traps in coronary artery thrombosis following myocardial infarction*. *Pathology*, 2022. **54**(1): p. 87-94.