



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ

ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΟΣ ΤΟΜΕΑΣ
ΚΑΡΔΙΟΛΟΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ

ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΝΕΩΤΕΡΩΝ ΣΥΝΘΕΤΙΚΩΝ ΑΝΑΣΤΟΛΕΩΝ
ΤΗΣ ΣΥΣΣΩΡΕΥΣΗΣ ΤΩΝ ΑΙΜΟΠΕΤΑΛΙΩΝ ΜΕ
ΚΛΑΣΣΙΚΟΥΣ ΑΝΑΣΤΟΛΕΙΣ ΤΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΩΝ
ΓΛΥΚΟΠΡΩΤΕΪΝΙΚΩΝ ΥΠΟΔΟΧΕΩΝ IIb/IIIa.
ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ

ΒΑΣΙΛΙΚΗ Δ. ΡΟΥΣΣΑ
ΙΑΤΡΟΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2011

«Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από την Ιατρική Σχολή του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων δεν υποδηλώνει αποδοχή των γνώμων του συγγραφέα»

N. 5343/32, άρθρο 202, παράγραφος 2

Ημερομηνία αίτησης της κ. Ρούσσα Βασιλικής: 22-11-2002

Ημερομηνία ορισμού Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής: 489^α/4-2-2003

Μέλη Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής:

Επιβλέπων

Μιχάλης Λάμπρος Αναπληρωτής Καθηγητής Καρδιολογίας

Μέλη

Σιδεράς Δημήτριος Καθηγητής Καρδιολογίας

Γουδέβενος Ιωάννης Αναπληρωτής Καθηγητής Καρδιολογίας

Ημερομηνία ορισμού θέματος: 17-3-2003

«Σύγκριση νεότερων συνθετικών αναστολέων της συσώρευσης των αιμοπεταλίων με κλασσικούς αναστολείς της έκφρασης των γλυκοπρωτεϊνικών υποδοχέων ΙΙβ/IIIα. Πειραματική μελέτη»

ΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΕΠΤΑΜΕΛΟΥΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ : 721^α/11-10-2011

1. Γουδέβενος Ιωάννης Καθηγητής Παθολογίας-Καρδιολογίας Ιατρικής Σχολής Παν/μίου Ιωαννίνων
2. Μιχάλης Λάμπρος Καθηγητής Καρδιολογίας Ιατρικής Σχολής Παν/μίου Ιωαννίνων
3. Σιδεράς Δημήτριος ομ. Καθηγητής Καρδιολογίας Ιατρικής Σχολής Παν/μίου Ιωαννίνων
4. Τσελέπης Αλέξανδρος Καθηγητής Βιοχημείας Τμήματος Χημείας Παν/μίου Ιωαννίνων
5. Κωλέττης Θεόφιλος Αναπληρωτής Καθηγητής Καρδιολογίας Ιατρικής Σχολής Παν/μίου Ιωαννίνων
6. Νάκα Αικατερίνη Επίκουρη Καθηγήτρια Καρδιολογίας Ιατρικής Σχολής Παν/μίου Ιωαννίνων
7. Κοραντζόπουλος Παναγιώτης Λέκτορας Καρδιολογίας Ιατρικής Σχολής Παν/μίου Ιωαννίνων

Έγκριση Διδακτορικής Διατριβής με βαθμό «ΑΡΙΣΤΑ» στις 9-11-2011

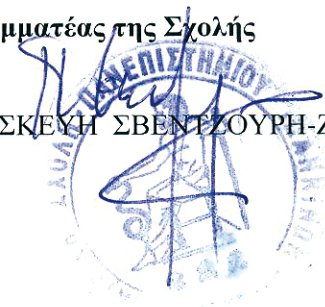
ΠΡΟΕΔΡΟΣ ΤΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΣΧΟΛΗΣ

Τζαφλίδου Μαργαρίτα

Καθηγήτρια Ιατρικής Φυσικής

Η Γραμματέας της Σχολής

ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΣΒΕΝΤΣΟΥΡΗ-ΖΩΗ



Την αφιερώνω στον μπαμπά μου Δημήτρη

*...και τη χαρίζω στη μαμά μου Ιουλέττα, στην αδερφή μου Παναγιώτα και
στον Κωνσταντίνο μου*

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η μελέτη που θα παρουσιαστεί διεξάχθηκε στην Ιατρική σχολή και στο τμήμα Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων στην εξαετία 2003-2009.

Δεν υπάρχουν λόγια για να ευχαριστήσω τον καθηγητή Καρδιολογίας κ. Λάμπρο Μιχάλη από τη μία πλευρά, για την έμπνευσή του, την καθοδήγησή του αλλά και την συμπαράστασή του, και τον Καθηγητή Χημείας κ. Αλέξανδρο Τσελέπη από την άλλη, για τον καταλυτικό του ρόλο στο σχεδιασμό και την πραγματοποίηση όλου αυτού του έργου.

Από την αρχή όλη η πειραματική εργασία στηρίχθηκε αμεσα από τους αξιόλογους συνεργάτες μου Νίκο Παπαμιχαήλ και Άννα Κότσια καθώς και τον Δημήτρη Νίκα και στη συνέχεια και μέχρι τέλους τον Κώστα Εγγλεζόπουλο. Ευχαριστώ, επίσης, θερμά τους συνεργάτες από το τμήμα χημείας Λουκά Τσιρώνη και Ελένη Σταθοπούλου. Ευχαριστώ πολύ την Επ. Καθηγήτρια Καρδιολογίας Αικατερίνη Νάκα που με εμπύχωσε όταν κάποιες φορές η συνέχιση της διδακτορικής διατριβής μου φαινόταν αδύνατη.

Τέλος ευχαριστώ ιδιαίτερα τον Καθηγητή Βιοχημείας κύριο Τσίκαρη Βασιλειο χάρη στον οποίο συντέθηκε η ουσία που μελέτησα.

Η διατριβή αυτή υποστηρίχθηκε μερικώς από το ερευνητικό πρόγραμμα ΕΤΑΝ (υγεία- βιοϊατρική) ΥΒ/88.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. Αιμόσταση

1.1 Αιμοπετάλια

1.1.1 Δομή και μορφολογία των αιμοπεταλίων

1.2 Λειτουργία αιμοπεταλίων και αιμόσταση

1.3 Αγγειακό τοίχωμα και ενδοθηλιακά κύτταρα

1.4 Προσκόλληση, ενεργοποίηση και συσώρευση των αιμοπεταλίων

1.5 Αιμοπετάλια και δευτερογενής αιμόσταση

2. Η Ιντεγκρίνη $\alpha_{iib}\beta_3$

2.1 Οι ιντεγκρίνες

2.2 Γενικά χαρακτηριστικά της $\alpha_{iib}\beta_3$

2.3 Συναρμολόγηση και ενδοκυττάρια μεταφορά των ετεροδιμερών της $\alpha_{iib}\beta_3$

2.4 Δομή $\alpha_{iib}\beta_3$

2.5 Δομή ινωδογόνου

3. RGD ανάλογα και μη RGD ανάλογα με αντιαιμοπεταλιακή δράση

3.1 Η RGD αλληλουχία

3.2 Νέα αντιαιμοπεταλιακά φάρμακα. Η αλληλουχία CDC

4. Μελέτη νέων αντιαιμοπεταλικών παραγόντων με τη βοήθεια πειραματικών μοντέλων

4.1 Τεχνικές δημιουργίας θρόμβου στα πειραματικά μοντέλα

4.2 Φαρμακολογικοί παράγοντες που δοκιμάζονται στα πειραματικά μοντέλα

4.2.1 Αντιθρομβωτικά φάρμακα που δοκιμάστηκαν σε πειραματικά μοντέλα

4.2.2 Αντισταμοπεταλιακά φάρμακα που δοκιμάστηκαν σε πειραματικά μοντέλα

5. Ομοιότητες και διαφορές μεταξύ των αιμοπεταλίων ανθρώπου και κουνελιού

5.1 Γενικά χαρακτηριστικά των αιμοπεταλίων του κουνελιού

5.1.1 Διαφορές και ομοιότητες της $\alpha_{IIb}\beta_3$ ανθρώπου και κουνελιού

5.1.2 Συσώρευση των αιμοπεταλίων κουνελιού

5.2 Το πεπτιδίο (S,S) PSRCDCR-NH₂

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

6 Υλικά - μέθοδος

6.1 Πειραματικό μοντέλο - γενικά

6.1.1 Προετοιμασία πειραματόζων

6.1.2 Ουσίες που εξετάστηκαν

6.1.3 Επαγωγή δημιουργίας θρόμβου

6.1.4 Εκτίμηση δημιουργούμενου θρόμβου

6.1.5 Βάρος του θρόμβου

6.1.6 Αξιολόγηση της ασφάλειας

6.2 Σύνθεση του πεπτιδίου

6.3 Ex vivo και in vitro συσσωρευομετρία αιμοπεταλίων

6.3.1 Συσσωρευομετρία σε πλάσμα πλούσιο σε αιμοπετάλια κουνελιού

6.4 Στατιστική ανάλυση

7. Αποτελέσματα

- 7.1 Μελέτη της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων *in vitro*
- 7.2 Ομάδες πειραματόζωων
 - 7.2.1 Ομάδα ελέγχου (*control*)
 - 7.2.2 Ομάδα ηπαρίνης
 - 7.2.3 Ομάδα επιπιμπατίδης σε δόση 180 $\mu\text{g}/\text{kg}$ *bolus* και έγχυση με ρυθμό 2 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$ (χαμηλή δόση)
 - 7.2.4 Ομάδα επιπιμπατίδης σε δόση 900 $\mu\text{g}/\text{kg}$ *bolus* και συνεχή έγχυση με ρυθμό 10 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$ (υψηλή δόση)
 - 7.2.5 Ομάδα πεπτιδίου *CDC* σε δόση 3 mg/kg
 - 7.2.6 Ομάδα πεπτιδίου *CDC* σε δόση 6 mg/kg
 - 7.2.7 Ομάδα πεπτιδίου *CDC* σε δόση 12 mg/kg
- 7.3 Επίδραση των ουσιών στη ροή της καρωτίδας
- 7.4 Επίδραση στην *ex vivo* συσσώρευση των αιμοπεταλίων
- 7.5 Βάρος του σχηματισθέντος θρόμβου
- 7.6 Αξιολόγηση της ασφάλειας

8. Συζήτηση

Περίληψη

Summary

Βιβλιογραφικές αναφορές

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1 Αιμόσταση

Το αίμα πρέπει να παραμένει υπό ρευστή μορφή μέσα στο καρδιαγγειακό σύστημα και μόνο σε περίπτωση διακοπής της συνέχειας του αγγείου, πρέπει να δραστηριοποιούνται μηχανισμοί που οδηγούν στην κατάπαυση της αιμορραγίας. Το σύνολο των δραστηριοποιούμενων μηχανισμών αποτελεί την ΑΙΜΟΣΤΑΣΗ. Η αιμόσταση αποτελεί φυσιολογική αμυντική διαδικασία, η οποία οδηγεί σε αναστολή της αιμορραγίας που προκλήθηκε από τη ρήξη ενός αιμοφόρου αγγείου και εξελίσσεται σε 2 φάσεις, την πρωτογενή αιμόσταση και στη συνέχεια την πήξη του αίματος (δευτερογενής αιμόσταση). Η ΘΡΟΜΒΩΣΗ είναι η παθολογική μορφή της αιμόστασης (2) η οποία λαμβάνει χώρα: α) εκεί όπου υπάρχει τοπική βλάβη του αγγειακού ενδοθηλίου (αρτηριακή θρόμβωση εξαιτίας τραυματισμού του ενδοθηλίου ή παρουσίας προσθετικών καρδιακών βαλβίδων) και β) εκεί όπου παρατηρείται ελάττωση της ροής του αίματος (φλεβική θρόμβωση εξαιτίας στάσης του αίματος στις φλέβες). Η θρόμβωση μπορεί να προκαλέσει σοβαρές κλινικές καταστάσεις, όπως εγκεφαλικά επεισόδια, έμφραγμα του μυοκαρδίου, θρομβοεμβολισμό, πνευμονική εμβολή κλπ.

Στο μηχανισμό της αιμόστασης συμμετέχουν τρία "βιολογικά συστήματα", τα ΑΙΜΟΠΕΤΑΛΙΑ, το ΑΓΓΕΙΑΚΟ ΤΟΙΧΩΜΑ και οι ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΠΗΞΗΣ του αίματος. Οποιαδήποτε διαταραχή στα συστήματα αυτά συνεπάγεται και διαταραχή του μηχανισμού της αιμόστασης

Είναι φανερό ότι οι μηχανισμοί πήξης του αίματος πρέπει να ρυθμίζονται με ακρίβεια. Η διαχωριστική γραμμή ανάμεσα στην αιμορραγία και τη θρόμβωση είναι πάρα πολύ λεπτή. Η πήξη του αίματος πρέπει να λαμβάνει χώρα αμέσως μετά την τοπική βλάβη αλλά και να περιορίζεται στην περιοχή της βλάβης, κάτι που επιτυγχάνεται με:

α) τον βραχύ χρόνο ημιζωής των ενεργοποιημένων παραγόντων πήξης του αίματος,

β) την αραίωσή τους στο αίμα,

γ) την απομάκρυνσή τους από το ήπαρ και την αποδόμησή τους από τις πρωτεάσες αλλά και

δ) την ενεργοποίηση του μηχανισμού της ινωδογονόλυσης.

Τα στάδια σχηματισμού ενός θρόμβου στο αγγειακό τοίχωμα ταξινομούνται ανάλογα με τη χρονική στιγμή στην οποία συμβαίνουν και είναι τα εξής :

- πρωτογενής αιμόσταση
- δευτερογενής αιμόσταση
- ινωδόλυση

πρωτογενής αιμόσταση

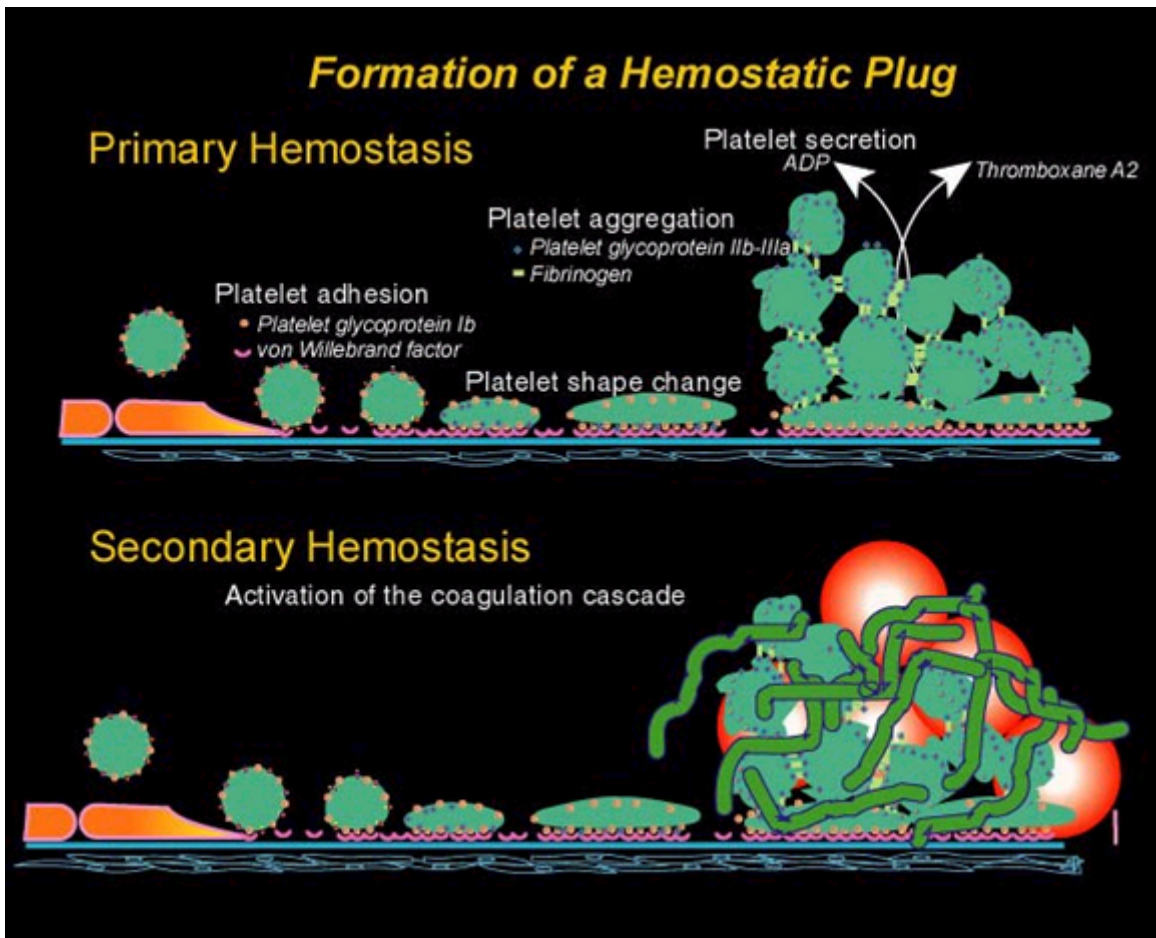
Κατά την πρωτογενή αιμόσταση τα αιμοπετάλια προσκολλώνται στο υποενδοθήλιο (στην περιοχή του τραυματισμού του αγγειακού τοιχώματος) και σχηματίζουν τον πρωτογενή αιμοστατικό θρόμβο μέσω αλληλεπιδράσεων με άλλα αιμοπετάλια (συσσώρευση).(31) Αυτός ο πρωτογενής θρόμβος είναι πλούσιος σε αιμοπετάλια και εμποδίζει προσωρινά την αιμορραγία όμως είναι εύθραυστος και αποκολλάται εύκολα από την περιοχή τραυματισμού του αγγειακού τοιχώματος(1)

Η συσώρευση των αιμοπεταλίων κατά την πρωτογενή αιμόσταση είναι γενικά ασταθής και απαιτεί τη σταθεροποίηση του πλούσιου σε αιμοπετάλια θρόμβου (platelet-rich thrombus). Αυτό γίνεται κατά τη δευτερογενή αιμόσταση

δευτερογενής αιμόσταση

Αυτή αρχίζει με την ενεργοποίηση του μηχανισμού πήξης και το σχηματισμό της θρομβίνης και του ινώδους. Η ενεργοποιημένη επιφάνεια των αιμοπεταλίων παίζει αποφασιστικό ρόλο στην ενεργοποίηση του μηχανισμού αυτού (61). Ο σχηματισμός μόνιμου θρόμβου επιτυγχάνεται με την μετατροπή του ινωδογόνου του πλάσματος σε ινώδες, που είναι αδιάλυτο και την παγίδευση ερυθροκυττάρων σε αυτό. Ο πηκτικός μηχανισμός που είναι υπεύθυνος για το σχηματισμό του ινώδους περιλαμβάνει σειρά αλυσιδωτών αντιδράσεων, που μετατρέπουν ανενεργά ένζυμα σε ενεργά και αυτά, με τη σειρά τους, άλλα ανενεργά ένζυμα σε ενεργά (2). Οι πρωτεΐνες αυτές του πλάσματος εκτός από την ιδιαίτερη ονομασία που έχει η καθεμιά, είναι γνωστές και σαν παράγοντες πήξης με έναν λατινικό αριθμό δίπλα. Όλες οι πρωτεΐνες, εκτός από το ινωδογόνο, είναι πρωτεολυτικά ένζυμα, κυρίως σερινοπρωτεάσες στην ανενεργό τους μορφή ή συνένζυμα. Κατά την πήξη αυτές οι πρωτεάσες ενεργοποιούνται διαδοχικά ή μια μετά την άλλη.

Η κύρια αντίδραση στον μηχανισμό της πήξης του αίματος είναι η μετατροπή της διαλυτής πρωτεΐνης του πλάσματος ινωδογόνου, στο αδιάλυτο ινώδες



Εικόνα 1 Πρωτογενής και δευτερογενής αιμόσταση

ινωδόλυση

Η τάση του αίματος να πήξει εξισορροπείται *in vivo* από μια σειρά μηχανισμών που αφενός εμποδίζουν την πήξη του αίματος μέσα στα αγγεία και αφετέρου καταστρέφουν όποιο θρόμβο σχηματιστεί. Στους μηχανισμούς αυτούς μπορούμε να συμπεριλάβουμε :1) την απομάκρυνση των ενεργοποιημένων παραγόντων από το ήπαρ, 2) την παρουσία της ηπαρίνης στο αίμα η οποία απενεργοποιεί τον παράγοντα ΙΧ του μηχανισμού πήξης και η οποία ενώνεται με την αντιθρομβίνη ΙΙΙ (πρωτεϊνικός αναστολέας που ενώνεται με τη θρομβίνη και αναστέλλει τη δράση της) και έτσι διευκολύνεται η δράση της, 3) τη δράση της πρωτεΐνης C. Η πρωτεΐνη C είναι αναστολέας του συστήματος πήξης. Ενεργοποιείται όταν η θρομβίνη ενώνεται με τη θρομβομοντουλίνη

(πρωτεΐνη της επιφάνειας των ενδοθηλιακών κυττάρων). Η ενεργοποιημένη πρωτεΐνη απενεργοποιεί την παραγωγή των Va και VIIIa και 4) την παρουσία ενός ινωδολυτικού συστήματος που περιορίζει την πήξη.

Ο κύριος παράγοντας αυτού του συστήματος είναι η πλασμίνη (πρωτεϊνολυτικό ένζυμο με υπόστρωμα το ινώδες). Η πλασμίνη προέρχεται από μια αδρανή, διαλυτή πρωτεΐνη, το πλασμινογόνο, το οποίο με τη σειρά του ενεργοποιείται από έναν ειδικό ενεργοποιητή, την πλασμινολίνη. Η πλασμίνη διασπά τόσο το ινώδες όσο και το ινωδογόνο και τα προϊόντα διάσπασης του ινωδογόνου αναστέλλουν τη θρομβίνη. Η ενεργοποιημένη πρωτεΐνη αναστέλλει τον ενεργοποιητή του πλασμινογόνου (πλασμινολίνη) και έτσι διευκολύνει την μετατροπή του πλασμινογόνου σε πλασμίνη (32. .61).

1.1. Αιμοπετάλια

1.1.1 Δομή και μορφολογία των αιμοπεταλίων

Τα αιμοπετάλια, τα μικρότερα κυττάρα του αίματος, είναι τεμάχια του κυτταροπλάσματος των μεγακαρυοκυττάρων, τα οποία είναι κύτταρα του μυελού των οστών [3]. Η ανάπτυξη των μεγακαρυοκυττάρων και η παραγωγή των αιμοπεταλίων είναι μοναδικές διαδικασίες, αφού η ωρίμανση μεγακαρυοκυττάρων περιλαμβάνει τον πυρηνικό διπλασιασμό χωρίς κυτταροδιαίρεση, με συνέπεια το σχηματισμό των γιγαντιαίων κύτταρων. Κυτταροπλασματικά οργανύλλια οργανώνονται στις περιοχές που αντιπροσωπεύουν τα σχηματιζόμενα αιμοπετάλια, οριοθετούμενα το καθένα από ένα δίκτυο οι μεμβράνων. Ο τεμαχισμός του κυτταροπλάσματος μεγακαρυοκυττάρων σε μεμονωμένα αιμοπετάλια προκύπτει έπειτα από τις δυνάμεις ροής της κυκλοφορίας του αίματος, ίσως κατά ένα μεγάλο μέρος στην πνευμονική κυκλοφορία.

Η θρομβοποιητίνη είναι η κυρίαρχη ορμόνη που ρυθμίζει την ανάπτυξη των μεγακαρυοκυττάρων αλλά και πολλές άλλες κυτοκίνες και ορμόνες συμμετέχουν, συμπεριλαμβανομένων των ιντερλευκινών 3, 6, και 11. Η θρομβοποιητίνη αναγνωρίστηκε αρχικά ως προσδέτης σε έναν υποδοχέα των μεμβρανών επιφάνειας των μεγακαρυοκυττάρων και των αιμοπεταλίων, που ονομαστική: c-mpl. (4)

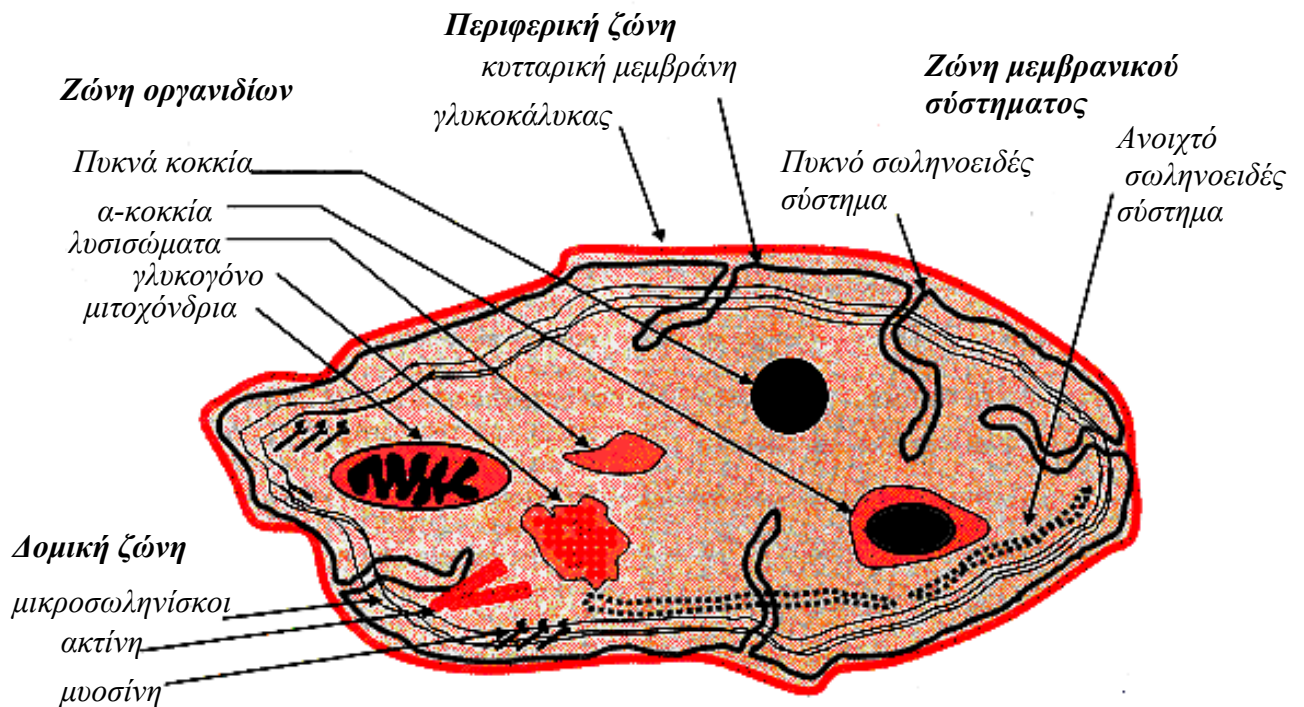
Ο φυσιολογικός αριθμός των αιμοπεταλίων σε περιφερικό αίμα κυμαίνεται μεταξύ 150.000 και 450.000 ανά μl αίματος και η φυσιολογική διάρκεια ζωής τους μεταξύ 7-10 ημερών [5]. Τα αιμοπετάλια είναι τα μικρότερα κύτταρα του αίματος και το μέγεθός τους ποικίλει μεταξύ διαφόρων ατόμων (υπερβολικά μικρά ή μεγάλα αιμοπετάλια παρατηρούνται μόνο σε παθολογικές καταστάσεις.). Τα αιμοπετάλια έχουν όγκο 7,06

+/- 4,85 μm^3 , διάμετρο 3,6 +/- 0,7 μm και πυκνότητα 0,9 +/- 0,3 μm [6]. Σε αντίθεση με τα ευκαρυωτικά κύτταρα, δεν έχουν πυρήνα με αποτέλεσμα να έχουν ελάχιστη ή και καθόλου ικανότητα για πρωτεϊνική σύνθεση και για αυτό ονομάζονται και "απύρνηνα κύτταρα". Αν και τα αιμοπετάλια είναι απύρνηνα, περιέχουν στο κυτόπλάσμα τους έναν αριθμό ποικίλων οργανιδίων απαραίτητων για τη διατήρηση της φυσιολογικής αιμόστασης (7) Τα αιμοπετάλια επίσης δεν έχουν ενδοπλασματικό δίκτυο και συσκευή Golgi, ενώ έχουν μιτοχόνδρια, λυσοσωμάτια και δυο ειδών κοκκία: α) τα α -κοκκία, που περιέχουν ινωδογόνο, αυξητικούς παράγοντες, παράγοντα von Willebrand, β -θρομβοσφαιρίνη, αιμοπεταλιακό παράγοντα 4 (PF4) και άλλες ενώσεις και β) τα πυκνά κοκκία τα οποία περιέχουν ADP, Ca^{+2} και σεροτονίνη.

Επίσης, η κυτταρική μεμβράνη των αιμοπεταλίων περιέχει πολλές γλυκοπρωτεΐνες (γλυκοκάλυκας) που παίζουν σημαντικό ρόλο στις διάφορες λειτουργίες τους.

Τα αιμοπετάλια έχουν έντονα εγκολπωμένη μεμβράνη που σχηματίζει ένα εκτεταμένο σύστημα σωληνίσκων το οποίο βρίσκεται σε επαφή με τον εξωκυττάριο χώρο. Τα αιμοπετάλια έχουν περιφερειακά μικροσωληνίσκους που περιέχουν ακτίνη και μυοσίνη[7].

Τα αιμοπετάλια εμφανίζουν 4 μορφολογικά διακριτές περιοχές: α) Περιφερική ζώνη, β) Δομική ζώνη, γ) Ζώνη οργανιδίων και δ) Ζώνη μεμβρανικού συστήματος [8,9] (εικ.3)



Εικόνα 2 Δομή μη ενεργοποιημένου αιμοπεταλίου.

α) Περιφερική ζώνη

Γλυκοκάλυκας

Η κυτταρική μεμβράνη καλύπτεται στην εξωτερική πλευρά της από τον γλυκοκάλυκα, μια λεπτή στοιβάδα που αποτελείται από γλυκοπρωτεΐνες, γλυκολιπίδια, πρωτεογλυκάνες και προσροφημένες πρωτεΐνες του πλάσματος[10,11]. Ο γλυκοκάλυκας είναι φορτισμένος αρνητικά εξαιτίας της ύπαρξης σιαλικών οξέων συνδεδεμένων στις πρωτεΐνες και τα λιπίδια. Αυτό το αρνητικό φορτίο εμποδίζει την προσκόλληση των κυκλοφορούντων αιμοπεταλίων μεταξύ τους [12]. Στον γλυκοκάλυκα βρίσκονται επίσης τα υδατανθρακικά τμήματα των γλυκοπρωτεϊνών της κυτταρικής μεμβράνης, οι

οποίες στη συντριπτική τους πλειοψηφία αποτελούν υποδοχείς ή διαδραματίζουν ρόλο υποδοχέα.

Κυτταρική Μεμβράνη

Η κυτταρική μεμβράνη των αιμοπεταλίων εμφανίζει δομή τυπικής φωσφολιπιδικής διπλοστοιβάδας στην οποία βρίσκονται βυθισμένες αρκετές γλυκοπρωτεΐνες, γλυκολιπίδια και χοληστερόλη [10,11,13].

Τα φωσφολιπίδια της κυτταρικής μεμβράνης είναι ασύμμετρα τοποθετημένα, με την φωσφατιδυλοχολίνη και την φωσφατιδυλοαιθανολαμίνη να στρέφονται προς το εξωτερικό του κυττάρου και την φωσφατιδυλοινωσιτόλη, την φωσφατιδυλοσερίνη και την σφιγγομυελίνη να στρέφονται προς το εσωτερικό του κυττάρου. Αυτή η μη συμμετρική κατανομή διατηρείται με τη βοήθεια μιας αμινοφωσφολιπιδικής τρανσλοκάσης η οποία βρίσκεται στην κυτταρική μεμβράνη του αιμοπεταλίου και είναι σημαντική γιατί βοηθά στο να αποφευχθεί η πήξη υπό φυσιολογικές συνθήκες [14]. Η κυτταρική μεμβράνη επίσης περιέχει αντλίες Na^{2+} και Ca^{2+} , (ATP-άσες) οι οποίες είναι σημαντικές για την ιοντική ομοίωση του κυττάρου.

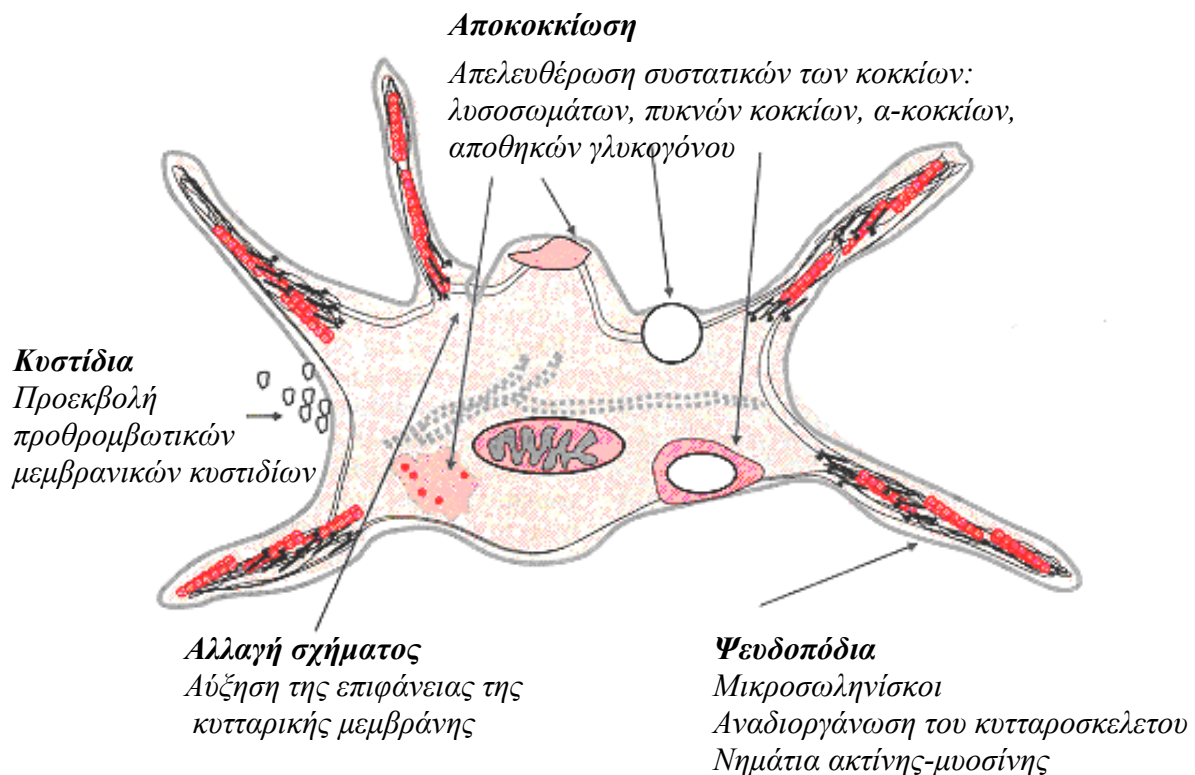
β) Δομική ζώνη

Τα συστατικά της δομικής ζώνης διατηρούν το δισκοειδές σχήμα των μη ενεργοποιημένων αιμοπεταλίων και συμμετέχουν ενεργά στην αλλαγή σχήματος των ενεργοποιημένων αιμοπεταλίων. Ο κυτταροσκελετός αποτελείται από δομικές πρωτεΐνες το 15-20% των οποίων είναι ακτίνη [15].

Ο υπομεμβρανικός κυτταροσκελετός βρίσκεται κάτω από την κυτταρική μεμβράνη, στην περιφέρεια του αιμοπεταλίου, και αποτελείται από κοντά νημάτια ακτίνης που συνδέονται μεταξύ τους με κυτταροσκελετικές πρωτεΐνες. Ο υπομεμβρανικός κυτταροσκελετός υποστηρίζει την εσωτερική επιφάνεια της κυτταρικής μεμβράνης [16] και μαζί με την σπείρα

μικροσωληνίσκων σταθεροποιεί το δισκοειδές σχήμα των αιμοπεταλίων. Ο υπομεμβρανικός κυτταροσκελετός συνδέεται με τα κυτοπλασματικά πεδία των διαμεμβρανικών γλυκοπρωτεϊνών, μεσολαβεί στην παράλληλη κατανομή τους επί της κυτταρικής μεμβράνης [17] και διευκολύνει την σύνδεση του κυτταροσκελετού με την κυτταρική μεμβράνη [18]. Δυο κύριες γλυκοπρωτεΐνες της κυτταρικής μεμβράνης των αιμοπεταλίων η GPIIb/IX [19] και η GPIIb/IIIa (ιντεγκρίνη $\alpha_{IIb}\beta_3$) [18,20] συνδέονται με τον υπομεμβρανικό κυτταροσκελετό.

Ο κεντρικός κυτταροσκελετός των αιμοπεταλίων, συνδέεται με τον υπομεμβρανικό και αποτελείται από μακριά νημάτια ακτίνης συνδεόμενα μεταξύ τους με διάφορες κυτταροσκελετικές πρωτεΐνες. Ο κεντρικός κυτταροσκελετός είναι τεράστιος, μεγαλύτερος από κάθε άλλο οργανίδιο, γεμίζει το κυττόςολιο με νημάτια ακτίνης και περιβάλλει τα οργανίδια του αιμοπεταλίου [21] (σχ.4).



Εικόνα 3 Δομή ενεργοποιημένου αιμοπεταλίου.

γ) Ζώνη οργανιδίων

Η ζώνη οργανιδίων βρίσκεται στο κυτόπλασμα και αποτελείται από τρεις τύπους αποθηκευτικών κοκκίων, τα α-κοκκία, τα πυκνά κοκκία και τα λυσοσώματα καθώς και από μιτοχόνδρια, αποθηκευτικά κοκκία γλυκογόνου, μικροϋπεροξεισώματα και επικαλυμμένα κυστίδια (εικ.4).

α-κοκκία

Τα α-κοκκία αποτελούν τον κύριο τύπο κοκκίων των αιμοπεταλίων. Έχουν σχήμα ωοειδές και διάμετρο 300-500nm. Περιέχουν πρωτεΐνες προσκόλλησης όπως ινωδογόνο, φιβρονεκτίνη, παράγοντα vWF, θρομβοσπονδίνη, γλυκοπρωτεΐνη $\alpha_{IIb}\beta_3$ και P-σελεκτίνη. Ακόμη περιέχουν ένζυμα (α_1 -αντιθριψίνη, α_2 -μακροσφαιρίνη,), αυξητικούς παράγοντες (PDGF, platelet derived growth factor), πρωτεΐνες ομοιάζουσες των κυτοκινών (ιντερλευκίνη-1, αιμοπεταλιακό παράγοντα-4) και παράγοντες πήξης (HMWK, πλασμινογόνο, PAI-1, παράγοντα V και XI, πρωτεΐνη S) [22]. Η ιντεγκρίνη $\alpha_{IIb}\beta_3$ βρίσκεται στη μεμβράνη των α-κοκκίων αλλά και στην μεμβράνη του ανοιχτού πολυκάναλου συστήματος [23] ενώ η P-σελεκτίνη βρίσκεται αποκλειστικά στην μεμβράνη των α-κοκκίων [24]. Κατά την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων η $\alpha_{IIb}\beta_3$ και η P-σελεκτίνη μετατοπίζονται από την μεμβράνη των α-κοκκίων στην κυτταρική μεμβράνη του αιμοπεταλίου.

Πυκνά κοκκία

Τα πυκνά κοκκία έχουν μια χαρακτηριστική εμφάνιση η οποία χαρακτηρίζεται από μια πυκνή κεντρική περιοχή που περιβάλλεται από μια διαφανή ζώνη. Έχουν διάμετρο 200-300nm. Τα κοκκία αυτά περιέχουν μια μη μεταβολική δεξαμενή νουκλεοτιδίων της αδενίνης (ATP, ADP). Επίσης περιέχουν ιόντα ασβεστίου, μαγνησίου και ανόργανα φωσφορικά καθώς και σεροτονίνη (5-υδροξυτρυπταμίνη) [25]. Το ADP περιέχεται σε μεγαλύτερα ποσά από το ATP

[26]. Τόσο το ATP όσο και το ADP κατά την υδρόλυσή τους μετατρέπονται σε AMP στο πλάσμα, το οποίο αποφωσφορυλιώνεται προς αδενοσίνη που τελικά σχηματίζει κυκλικό AMP (cAMP) το οποίο εμποδίζει την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων. Τέλος η μεμβράνη των πυκνών κοκκίων περιέχει Ρ-σελεκτίνη και κοκκιοφυσίνη [27].

Λυσοσώματα

Πρόκειται για πυκνά κυστίδια διαμέτρου 175-200nm. Τα λυσοσώματα περιέχουν όξινες υδρολάσες (ένζυμα με βέλτιστη ενεργότητα σε pH 3,5-5,5) όπως αρυλσουλφατάση, όξινη φωσφατάση και καθεψίνη D. Η λειτουργία των λυσοσωμάτων έχει υποτεθεί ότι είναι η αποικοδόμηση των συστατικών του θρόμβου (αιμοπετάλια, ινώδες, φλεγμονώδη κύτταρα) από τις όξινες υδρολάσες, μια διαδικασία απαραίτητη για την επούλωση τραυμάτων.

Μιτοχόνδρια

Τα μιτοχόνδρια των αιμοπεταλίων είναι παρόμοια με αυτά των άλλων κυττάρων με τη διαφορά ότι είναι μικρότερα σε μέγεθος (100-200nm). Κάθε αιμοπετάλιο περιέχει περίπου 7 μιτοχόνδρια.

Μικροϋπεροξεισώματα

Τα μικροϋπεροξεισώματα είναι πολύ μικρά κοκκία με διάμετρο περίπου 90nm και απαντούν σε μικρό αριθμό στα αιμοπετάλια. Το ένζυμο που είναι υπεύθυνο για την δραστηριότητα υπεροξειδάσης στα υπεροξεισώματα είναι η καταλάση και η λειτουργία της είναι να αποικοδομεί το H_2O_2 [28].

Επικαλυμμένα Κυστίδια

Τα επικαλυμμένα κυστίδια είναι οργανίδια διαμέτρου 80-90nm, και το περίβλημά τους περιέχει σε μεγάλη ποσότητα κλαθρίνη, μια πρωτεΐνη 180kDa, που αποτελείται από ελαφριές και βαριές αλυσίδες. Τα επικαλυμμένα

αυτά κυστίδια μεταφέρουν συστατικά του πλάσματος στα κοκκία των αιμοπεταλίων και ο αριθμός τους αυξάνει κατά τη διάρκεια της ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων με ADP [29].

δ) Ζώνη μεμβρανικού συστήματος

Πολυκάνναλο Σύστημα (SCCS, surface connected canalicular system)

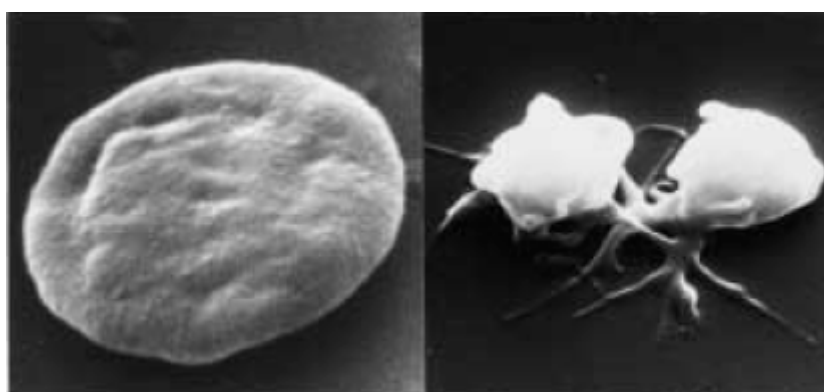
Στο κυττάρωμα βρίσκεται επίσης ένα πολύπλοκο σωληνοειδές πολυκάνναλο σύστημα που αποτελείται από διακλαδισμένους σωληνίσκους, είναι συνδεδεμένο με την κυτταρική μεμβράνη του αιμοπεταλίου και ονομάζεται ανοιχτό σωληνοειδές σύστημα. Το σύστημα αυτό ουσιαστικά αποτελεί συνέχεια της κυτταρικής μεμβράνης [30] και επικοινωνεί με τον εξωκυττάρωμα χώρο με αποτέλεσμα τη σημαντική αύξηση της επιφάνειας του αιμοπεταλίου που έρχεται σε επαφή με το πλάσμα. Διαμέσου του συστήματος αυτού γίνεται η είσοδος μορίων από το πλάσμα στα αιμοπετάλια καθώς και η εξωκύτωση. Επίσης το σύστημα αυτό διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην εξάπλωση του αιμοπεταλίου κατά την προσκόλληση του και στο σχηματισμό ψευδοποδίων. Τέλος αποτελεί τόπο αποθήκευσης μεμβρανικών γλυκοπρωτεϊνών οι οποίες εμφανίζονται στην επιφάνεια κατά την ενεργοποίηση του κυττάρου [23]. Από πλευράς σύστασης το μεμβρανικό αυτό σύστημα μοιάζει με την κυτταρική μεμβράνη.

Πυκνό Σωληνοειδές Σύστημα(DTS, dense tubular system)

Σε αντίθεση με το SCCS το οποίο συνδέεται με την κυτταρική μεμβράνη, το DTS είναι ένα κλειστό διαυλικό σύστημα που αποτελείται από λεπτούς σωληνίσκους διαμέτρου 400-600^Α [10]. Θεωρείται ότι αποτελεί υπόλειμμα του λείου ενδοπλασματικού δικτύου των μεγακαρυοκυττάρων. Το DTS είναι κατανεμημένο παντού στα αιμοπετάλια και είναι στενά συνδεδεμένο με το SCCS. Αυτό το ενδομεμβρανικό σύστημα έχει βρεθεί ότι είναι τοποθετημένο

γειτονικά των μικροσωληνίσκων και ότι περιβάλλει τα οργανίδια. Αποτελεί τη σημαντικότερη ενδοκυττάρια αποθήκη ιόντων ασβεστίου των αιμοπεταλίων τα οποία απελευθερώνονται μετά από ενεργοποίηση του κυττάρου [28]. Η συγκέντρωση των ιόντων ασβεστίου στο κυτοσόλιο έχει κύριο ρυθμιστικό ρόλο στον μεταβολισμό και την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων. Έτσι, όταν η συγκέντρωση των ιόντων ασβεστίου στο κυτόπλασμα υπερβεί κάποιο όριο τότε το αιμοπετάλιο υφίσταται αλλαγή σχήματος με τον σχηματισμό ψευδοποδίων και αποκοκκιώνεται.

Τα μη ενεργοποιημένα αιμοπετάλια έχουν δισκοειδές σχήμα με επιφάνεια $8\mu\text{m}^2$. Η ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων από διαλυτούς αγωνιστές ή μέσω της προσκόλλησης (η προσκόλληση είναι συνυφασμένη και ταυτόχρονη με την ενεργοποίηση άρα μάλλον είναι η επαφή αντί της προσκόλλησης) τους στο υποενδοθήλιο, τα οδηγεί σε αλλαγή σχήματος που χαρακτηρίζεται από την εμφάνιση ψευδοποδίων τα οποία είναι προεκτάσεις της κυτταρικής τους μεμβράνης (εικ.4). Με τον τρόπο αυτό η επιφάνειά τους αυξάνει έως τα $13\mu\text{m}^3$ [8].



Εικόνα 4 (ΑΡΙΣΤΕΡΑ μη ενεργοποιημένο αιμοπετάλιο ΔΕΞΙΑ ενεργοποιημένο αιμοπετάλιο) (Wong PC, JPET. 2000;295:212-218.)

1.2 Λειτουργία αιμοπεταλίων και αιμόσταση

Η κυτταρική μεμβράνη (PF3: platelet factor 3) των αιμοπεταλίων περιέχει ποικιλία υποδοχέων (υποδοχείς για τους παράγοντες πήξης και για τους παράγοντες συγκόλλησης των αιμοπεταλίων, όπως τις γλυκοπρωτεΐνες Iba-IX και IIb - IIIa για την προσκόλληση των αιμοπεταλίων μέσω του vWF στο κολλαγόνο, ενώ η θέση σύνδεσης των γλυκοπρωτεϊνών IIb - IIIa αποτελεί και τον υποδοχέα του ινωδογόνου και οδηγεί σε συγκόλληση των αιμοπεταλίων μεταξύ τους) (Πίνακας 1). Οι υποδοχείς αυτοί λειτουργούν ως «αισθητήρες», ανταποκρινόμενοι στα χημικά μηνύματα που λαμβάνει η κυτταρική μεμβράνη από το πλάσμα.

Πίνακας 1: Γλυκοπρωτεϊνικοί υποδοχείς της μεμβράνης των αιμοπεταλίων οι οποίοι εμπλέκονται άμεσα στις διαδικασίες προσκόλλησης των αιμοπεταλίων.

ΥΠΟΔΟΧΕΑΣ	ΟΥΣΙΕΣ ΜΕ ΤΙΣ ΟΠΟΙΕΣ ΠΡΟΣΔΕΝΕΤΑΙ (ΠΡΟΣΔΕΜΑ)	ΑΡΙΘΜΟΣ ΥΠΟΔΟΧΕΩΝ ΑΝΑ ΑΙΜΟΠΕΤΑΛΙΟ	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑ ΣΥΝΔΕΣΗΣ ΥΠΟΔΟΧΕΑ-ΠΡΟΣΔΕΜΑΤΟΣ
ΙΝΤΕΓΚΡΙΝΕΣ			
$\alpha_2\beta_1$ (GPIa/IIa)	Κολλαγόνο I, III	1000	Προσκόλληση
$\alpha_5\beta_1$ (GPIc/IIa)	Ινωδογόνο, Φιβρονεκτίνη	1000	Προσκόλληση
$\alpha_6\beta_1$	Λαμινίνη	1000	Προσκόλληση
$\alpha_{IIb}\beta_3$ (GPIIb/IIIa)	Ινωδογόνο, φιβρονεκτίνη, βιτρονεκτίνη, Vwf	60.000 100.000	- Συσώρευση
$\alpha_v\beta_3$ (Υποδοχέας βιτρονεκτίνης)	Ινωδογόνο, φιβρονεκτίνη, βιτρονεκτίνη, vWF	100	Προσκόλληση
ΜΗ ΙΝΤΕΓΚΡΙΝΕΣ			
ΓΛΥΚΟΠΡΩΤΕΪΝΕΣ ΠΛΟΥΣΙΕΣ ΣΕ ΛΕΥΚΙΝΗ			
GPIb - V - IX	vWF	25.000	Προσκόλληση

GP1V (GPIIIb)	Θρομβοσπονδίνη, Κολλαγόνο	15.000 - 25.000	Προσκόλληση
ΣΕΛΕΚΤΙΝΕΣ			
P ΣΕΛΕΚΤΙΝΗ	- PSGL-1, IL-1, TNF-α	12.000	Προσκόλληση
ΥΠΟΔΟΧΕΙΣ ΠΡΟΣΚΟΛΗΣΗΣ ΑΝΟΣΟΣΦΑΙΡΙΝΙΚΟΥ ΤΥΠΟΥ			
ICAM - 1	IL-1, TNF-α	5000	Προσκόλληση
PECAM - 2	C57BL/6, FVB/n	3000	Προσκόλληση
ΛΥΣΟΣΩΜΙΚΕΣ ΜΕΜΒΡΑΝΙΚΕΣ ΠΡΩΤΕΪΝΕΣ			
GP 53		3000	Προσκόλληση

Τα μηνύματα αυτά διακρίνονται: α) σε αυτά που ενεργοποιούν τα αιμοπετάλια και οδηγούν στην συσσώρευση αιμοπεταλίων, και β) σε αυτά που αναστέλλουν την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων.

Σε φυσιολογικές συνθήκες τα αιμοπετάλια δεν αλληλεπιδρούν με τα ενδοθηλιακά κύτταρα που αποτελούν την εσωτερική επιφάνεια των αγγείων. Τα ενδοθηλιακά κύτταρα σχηματίζουν δηλαδή ένα είδος φραγμού ανάμεσα στα αιμοπετάλια και τους παράγοντες πήξης του αίματος και τον υποενδοθηλιακό συνδετικό ιστό.

1.3 Αγγειακό τοίχωμα - ενδοθηλιακά κύτταρα

Τα αγγειακά ενδοθηλιακά κύτταρα παράγουν μια ποικιλία ουσιών με αντικρουόμενες δράσεις. Κάτω από φυσιολογικές συνθήκες επικρατεί ο προστατευτικός τους ρόλος (αγγειοδιασταλτικός, αντιθρομβωτικός και αντιαθηρογόνος). Αναφορικά με την πήξη του αίματος, τα ενδοθηλιακά κύτταρα παράγουν ουσίες οι οποίες είτε εμποδίζουν την αιμόσταση αναστέλλοντας την συσώρευση-συγκόλληση των αιμοπεταλίων είτε ενεργοποιούν την ινωδογονόλυση.

Τα αγγειακά ενδοθηλιακά κύτταρα εκκρίνουν:

1) Προστακυκλίνη (PGI_2). Η PGI_2 είναι μια προσταγλανδίνη, που ανταγωνίζεται την θρομβοξάνη, (προσταγλανδίνη που συντίθεται κυρίως στα μεγακαρυοκύτταρα και αποθηκεύεται στα αιμοπετάλια). Μικρή ποσότητα PGI_2 εκκρίνεται και από τις λείες μυϊκές ίνες του αγγειακού τοιχώματος. Η PGI_2 στο άθικτο ενδοθήλιο συντίθεται μέσω του συστήματος της κυκλοοξυγενάσης (COX), απελευθερώνεται στο πλάσμα και συνδέεται με υποδοχείς της επιφάνειας των αιμοπεταλίων, προκαλώντας σύνθεση cAMP και αναστολή της αντίδρασης απελευθέρωσης των αιμοπεταλίων. Η προστακυκλίνη προκαλεί αγγειοδιαστολή και ελαττώνει την προσκόλληση και συσώρευση των αιμοπεταλίων;

2) NO (οξειδίο του αζώτου). Το NO προκαλεί χάλαση των αγγειακών λείων μυϊκών ινών μέσω ενεργοποίησης της διαλυτής μορφής της γουανυλικής κυκλάσης και επομένως αύξησης του cGMP. Το NO αναστέλλει την προσκόλληση και τη συσώρευση των αιμοπεταλίων, ενώ αναστέλλει και την προσκόλληση των λευκοκυττάρων στο αγγειακό ενδοθήλιο.

3) Ενδοθηλίνη 1 (ET-1). Η ET-1 έχει ισχυρή αγγειοσπαστική δράση, συμβάλλοντας στη διατήρηση του ενδογενούς αγγειακού τόνου;

4) Μετατρεπτικό ένζυμο της αγγειοτασίνης (ΜΕΑ). Το ΜΕΑ ενεργοποιεί τη μετατροπή της αγγειοτασίνης I σε II, η οποία συνδεδεμένη με υποδοχείς της στα ενδοθηλιακά κύτταρα διεγείρει την παραγωγή της ενδοθελίνης 1_αλλά και του αναστολέα του ενεργοποιητή του πλασμινογόνου (TPA inhibitor, PAI-1), ελαττώνοντας έτσι την ενδογενή ινωδολυτική δραστηριότητα (άρα αναστέλλουν την ινωδόλυση)

5) Παράγοντα von Willebrand (vWF). Ο vWF είναι απαραίτητος για την προσκόλληση των αιμοπεταλίων στο εκτεθειμένο, μετά από βλάβη του αγγειακού τοιχώματος, κολλαγόνο και στα μικροϊνίδια, ενώ παράλληλα λειτουργεί ως φορέας του παράγοντα FVIII, αυξάνοντας το t_{1/2} από λίγα λεπτά σε 10-12 ώρες; ο vWF βρίσκεται αποθηκευμένος στα κοκκία Weibel-Palade των ενδοθηλιακών κυττάρων, ενώ η σύνθεση και η έκκρισή του βρίσκονται κάτω από αυστηρό έλεγχο

6) Θεϊϊκή ηπαρίνη. Η Θεϊϊκή ηπαρίνη είναι ένας συμπαράγοντας της αντιθρομβίνης III, η οποία σχηματίζει σύμπλοκο 1:1 με τη θρομβίνη και εμποδίζει έτσι το σχηματισμό ινικής (στο σημείο αυτό δρά και η ηπαρίνη ως αντιπηκτικό, ενισχύοντας τη δράση της αντιθρομβίνης κατά 2.000 φορές);

7) TPA (tissue plasminogen activator: ιστικός ενεργοποιητής του πλασμινογόνου). Ο TPA είναι πρωτεάση της σερίνης, η οποία είναι ανενεργής μέχρι να εκτεθεί στο ινώδες, οπότε διασπά το πλασμινογόνο αναγεννώντας την πλασμίνη; ο ελεύθερος TPA συνδέεται με την επιφάνεια των ενδοθηλιακών κυττάρων και έτσι προστατεύεται από το φυσικό αναστολέα του,

8) Αναστολέα του ενεργοποιητή του πλασμινογόνου (PAI-1). Ο PAI-1 που συντίθεται στο ήπαρ, τα μεγακαρυωκύτταρα και τα μονοκύτταρα;

9) Θρομβίνη. Η θρομβίνη αντιδρά με τη θρομβομοντουλίνη των ενδοθηλιακών κυττάρων και έτσι ενεργοποιείται η πρωτεΐνη C που συντίθεται στο ήπαρ. Η ενεργοποιημένη πρωτεΐνη C διασπά και αδρανοποιεί τους

παράγοντες πήξης FVa και FVIIIa, μέσω σύνδεσης με την πρωτεΐνη S που συντίθεται από το ήπαρ, το ενδοθήλιο και τα μεγακαρυωκύτταρα, αναστέλλοντας την πήξη του αίματος:

10) τον αναστολέα της οδού του ιστικού παράγοντα (TFPI), ο οποίος αναστέλλει το σύμπλοκο FVIIa/TF του εξωγενούς (εναρκτήριου) συστήματος των παραγόντων πήξης μέσω του σχηματισμού του FXa/FVIIa/TF/TFPI, το οποίο και βάζει τέλος στην αντίδραση. Το τετραμερές αυτό στη συνέχεια ενδοκυτταρώνεται από κύτταρα για ακόλουθη διάσπαση των επιμέρους συστατικών του.

Θα πρέπει να αναφερθεί ότι το αγγειακό ενδοθήλιο ευνοεί και την αποδόμηση του ADP που απελευθερώνεται από τα ενεργοποιημένα αιμοπετάλια σε AMP, αναστέλλοντας τη συσσώρευση των αιμοπεταλίων. Αποτέλεσμα όλων των ανωτέρω παραγόντων και δράσεων είναι ότι το υγιές ενδοθήλιο διατηρεί μια κατάσταση ισορροπίας που ευνοεί τη διατήρηση του κυκλοφορούντος αίματος σε ρευστή μορφή και αποτρέπει τη θρόμβωση.

Το αγγειακό τοίχωμα παίζει πολλούς ρόλους στην αιμόσταση. Πρόκληση βλάβης κάποιου αιμοφόρου αγγείου οδηγεί, ως πρώτη αντίδραση, σε σύσπαση του αγγείου με συνέπεια ελάττωση της αιματικής ροής.

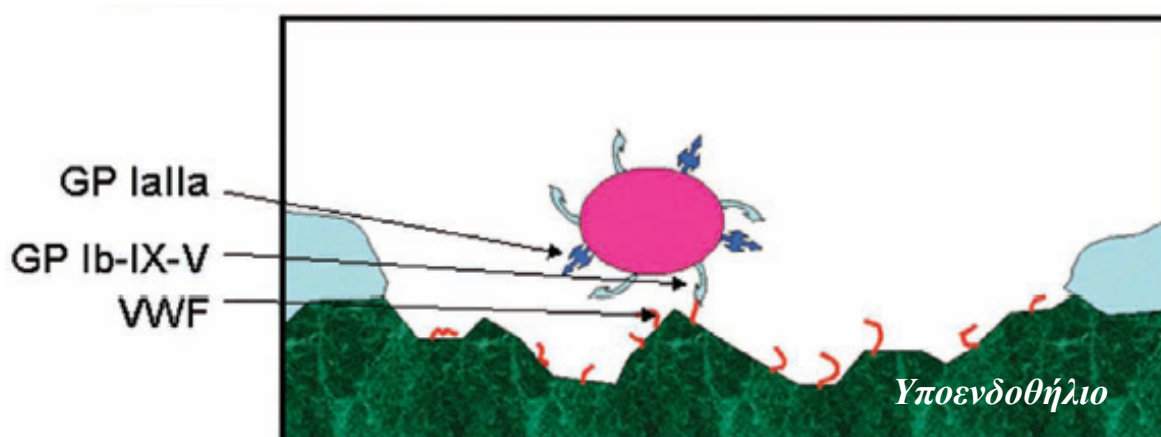
Από την άλλη, η λύση της συνέχειας του ενδοθηλίου φέρνει σε επαφή τα αιμοπετάλια και τους παράγοντες πήξης του πλάσματος με τις πρωτεΐνες του υποενδοθηλιακού ιστού. Οι πρωτεΐνες αυτές είναι το κολλαγόνο (I και III), τα μικροϊνίδια, η θρομβοπλασίνη, η φιβρονεκτίνη, η ελαστίνη, οι οποίες συντίθενται από τα ενδοθηλιακά κύτταρα και στη συνέχεια οργανώνονται στην υπο-ενδοθηλιακή στοιβάδα, οπότε δεν έρχονται σε επαφή με τα συστατικά του αίματος. Ο εκτειθέμενος στα συστατικά του αίματος συνεκτικός ιστός προκαλεί προσκόλληση και ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων καθώς και ενεργοποίηση των μηχανισμών πήξης.

1.4 Προσκόλληση, ενεργοποίηση και συσσώρευση των αιμοπεταλίων

Προσκόλληση αιμοπεταλίων

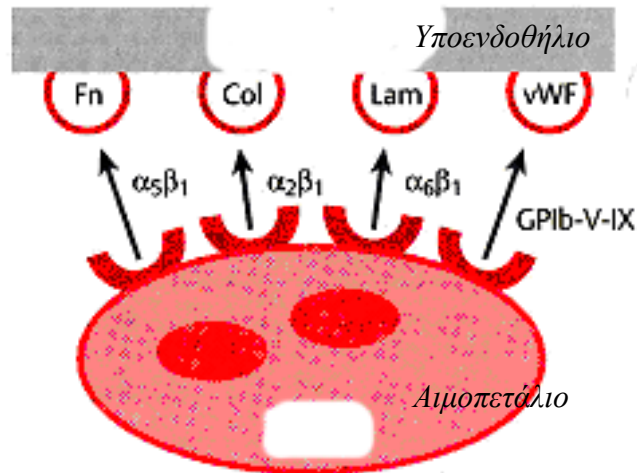
Η προσκόλληση των εν ηρεμία αιμοπεταλίων στο τραυματισμένο αγγειακό τοίχωμα είναι το πρώτο βήμα της πρωτογενούς αιμόστασης [31].

Η προσκόλληση οδηγεί στην ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων και στην αλλαγή σχήματος με επακόλουθο την έκκριση των κοκκίων τους και τον σχηματισμό συσσωρευμάτων. Η διαδικασία προσκόλλησης ρυθμίζεται από γλυκοπρωτεΐνες της επιφάνειας του αιμοπεταλίου. Τα αιμοπετάλια διαθέτουν έναν αριθμό μεμβρανικών υποδοχέων προσκόλλησης οι οποίοι αναγνωρίζουν τα συστατικά του υποενδοθηλίου του αγγείου. Η πρώτη επαφή μεταξύ των κυκλοφορούντων αιμοπεταλίων και του υπενδοθηλίου της τραυματισμένης περιοχής του αγγειακού τοιχώματος γίνεται μέσω του αιμοπεταλιακού υποδοχέα Ib-V-IX (γλυκοπρωτεΐνη Ib-V-IX), ο οποίος αναγνωρίζει τον vWF [32,33] (εικ.5). Η αλληλεπίδραση του vWF με την GP Ib-V-IX χαρακτηρίζεται από υψηλή συγγένεια η οποία κάνει εφικτή την προσκόλληση των αιμοπεταλίων στο αγγειακό τοίχωμα.



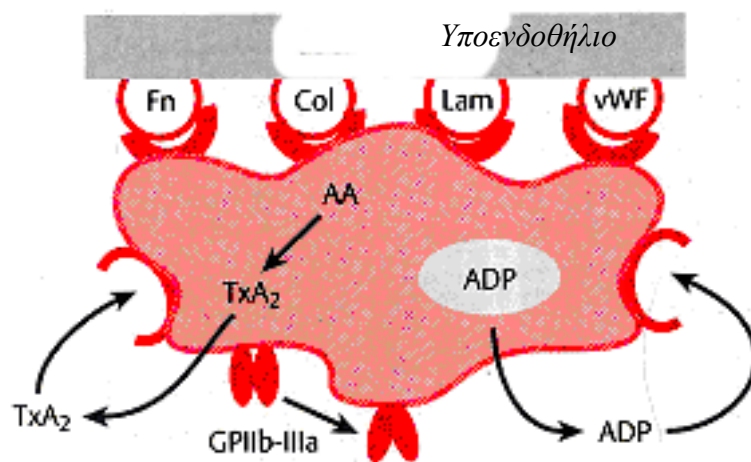
Εικόνα 5 Προσκόλληση των αιμοπεταλίων (vWF:παράγοντας vWF, GPIb-V-IX: γλυκοπρωτεΐνη, υποδοχέας του παράγοντα vWF)(MAYO CLINIC)

Η σταθεροποίηση της προσκόλλησης των αιμοπεταλίων (εικ.6) γίνεται μέσω άλλων υποδοχέων της μεμβράνης του αιμοπεταλίου (υποδοχέων του κολλαγόνου, της φιβρονεκτίνης και της λαμινίνης) οι οποίοι ανήκουν στην οικογένεια των ιντεγκρινών [34].



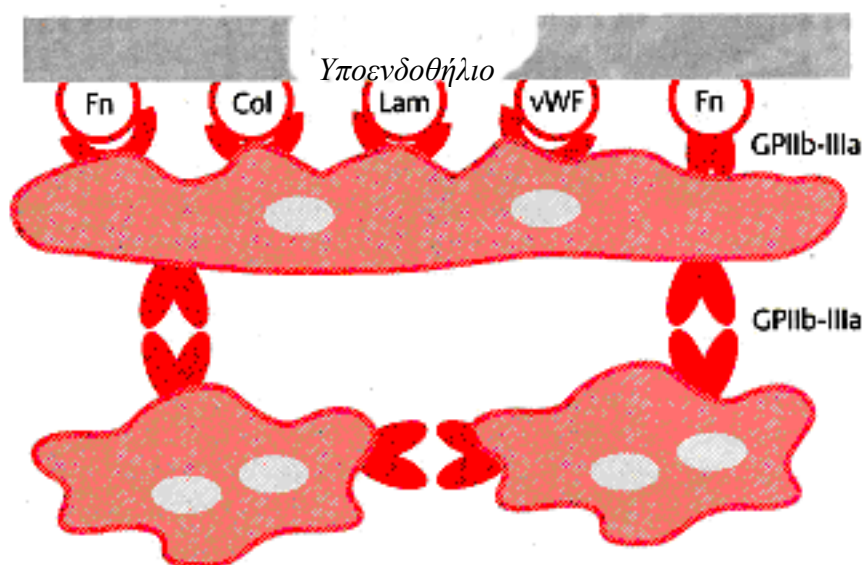
Εικόνα 6 Σταθεροποίηση προσκόλλησης των αιμοπεταλίων (Fn: φιβρονεκτίνη, Col: κολλαγόνο, vWF:παράγοντας vWF, Lam: λαμινίνη, $\alpha_5\beta_1$: υποδοχέας φιβρονεκτίνης, $\alpha_6\beta_1$:υποδοχέας λαμινίνης, GPIb-V-IX: υποδοχέας του παράγοντα vWF)

Η δέσμευση του υποδοχέα του κολλαγόνου των αιμοπεταλίων με το κολλαγόνο, οδηγεί στην ενεργοποίηση και στην αλλαγή σχήματος των προσκολλημένων αιμοπεταλίων (εικ.7).



Εικόνα 7 Ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων (TxA_2 : Θρομβοξανίο A_2 , AA: αραχιδονικό οξύ, ADP: διφωσφορική αδενοσίνη, GPIIbIIIa: υποδοχέας ινωδογόνου)

Τα προσκολλημένα και ενεργοποιημένα πλέον αιμοπετάλια σχηματίζουν από το αραχιδονικό οξύ της κυτταρικής τους μεμβράνης, το Θρομβοξάνιο A_2 (T_xA_2). Το T_xA_2 απελευθερώνεται στον εξωκυττάριο χώρο και στην συνέχεια δεσμεύεται από τον ειδικό υποδοχέα των αιμοπεταλίων ενισχύοντας έτσι περαιτέρω τη διαδικασία ενεργοποίησης τους [35]. Ακόμη τα συστατικά των κοκκίων που απελευθερώνονται κατά την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων ενισχύουν την διαδικασία προσκόλλησης όχι μόνο μέσω ενός "αυτοκρινικού" μηχανισμού, δηλαδή με την ενεργοποίηση του ίδιου του αιμοπεταλίου που τα παράγαγε, αλλά και μέσω ενός "παρακρινικού" μηχανισμού, δηλαδή μέσω διέγερσης και στρατολόγησης αιμοπεταλίων της κυκλοφορίας που είναι ακόμη ανενεργά. Η αλληλεπίδραση των ανενεργών αιμοπεταλίων της κυκλοφορίας με τα ήδη προσκολλημένα αιμοπετάλια συμβαίνει μέσω των ενεργοποιημένων $\alpha_{IIb}\beta_3$ υποδοχέων (εκτός από το ρόλο της στη συσσώρευση, η ιντεγκρίνη $\alpha_{IIb}\beta_3$ έχει κύριο ρόλο και στην συγκεντρωση των αιμοπεταλίων στην τραυματισμένη περιοχή του αγγείου). Το τελικό στάδιο της προσκόλλησης συμβαίνει όταν τα αιμοπετάλια κατανέμονται κατά μήκος του υποενδοθηλίου (εικ.8) και στεγανοποιούν την εκτεθειμένη περιοχή του ενδοθηλίου από τη ροή του αίματος.



Εικόνα 8 Προσκόλληση, εξάπλωση και συσσώρευση των αιμοπεταλίων.

Ενεργοποίηση αιμοπεταλίων

Εκτός από την διαδικασία της προσκόλλησης και της συσώρευσης, τα αιμοπετάλια υφίστανται μορφολογικές καθώς και λειτουργικές αλλαγές οι οποίες επάγονται από διαλυτούς αγωνιστές όπως το ADP και η Θρομβίνη και αυτές οι αλλαγές είναι γνωστές ως ενεργοποίηση. Ένας πρωτογενής αιμοστατικός θρόμβος μπορεί να σχηματιστεί πλήρως μόνο μετά από την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων. Η διαδικασία της ενεργοποίησης είναι περίπλοκη και ρυθμίζεται από

- 1) αλλαγές στους μεταβολικούς και βιοχημικούς μηχανισμούς,
- 2) την αλλαγή σχήματος,
- 3) τις αλλαγές στον προσανατολισμό των μεμβρανικών φωσφολιπιδίων και
- 4) την ενεργοποίηση των μεμβρανικών υποδοχέων[37].

1) Μεταβολικοί και βιοχημικοί μηχανισμοί

Πολλές ουσίες μπορούν να ενεργοποιήσουν τα αιμοπετάλια και να επάγουν μεταβολικές αλλαγές σε αυτά. Τα αιμοπετάλια μπορούν να σχηματίσουν ή και να εκκρίνουν μέρος αυτών των ουσιών (αγωνιστές) ενώ οι υπόλοιποι αγωνιστές σχηματίζονται στους περιβάλλοντες ιστούς ή στο πλάσμα. Κάθε αγωνιστής (πρώτος αγγελιαφόρος) - δεσμεύεται στον ειδικό υποδοχέα του στην επιφάνεια των αιμοπεταλίων και επηρεάζει τον ενδοκυττάριο σχηματισμό σηματοδοτικών μορίων (δευτεροί αγγελιαφόροι). Κατόπιν, οι δευτεροί αγγελιαφόροι επάγουν μια σειρά μεταβολικών ενδοκυττάρων αλλαγών.

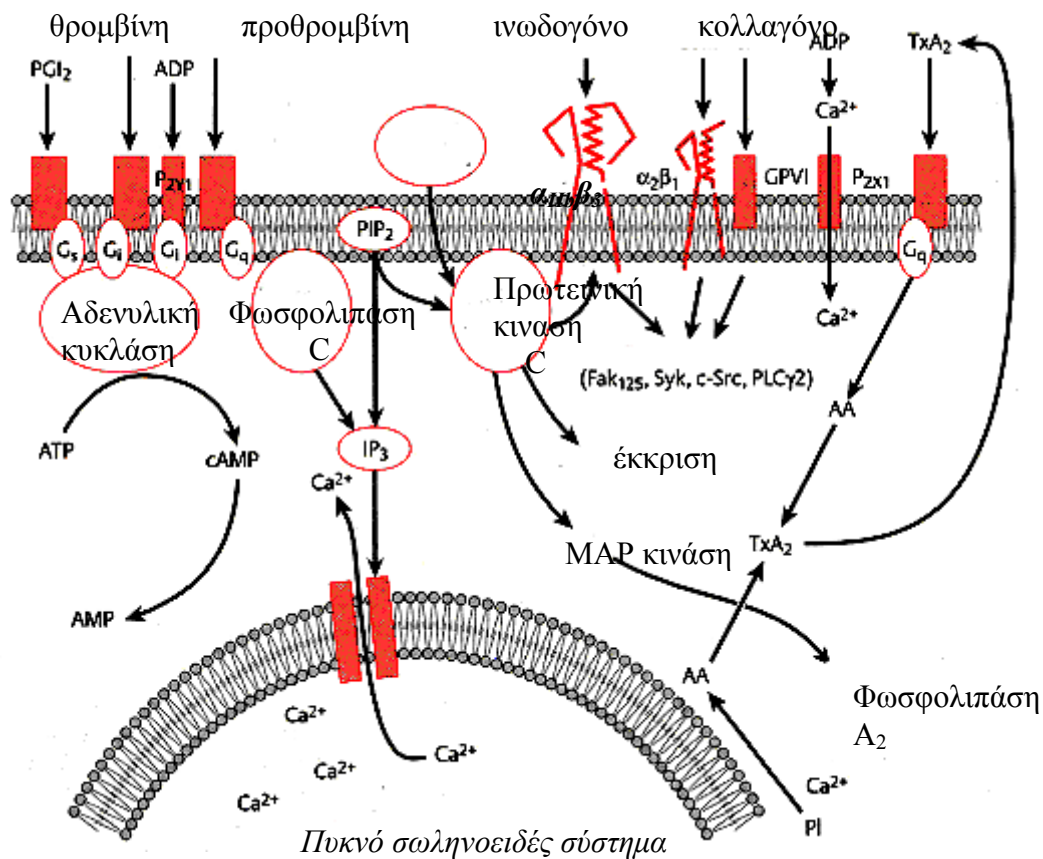
Τρία ενζυμικά συμπλέγματα διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στον σχηματισμό των δευτερων αγγελιαφόρων: η φωσφολιπάση C (PLC), η

φωσφολιπάση A_2 (PLA_2) και η αδενυλική κυκλάση. Καθένα από τα ένζυμα αυτά συμμετέχει στη ρύθμιση των επιπέδων των ελεύθερων ενδοκυττάριων ιόντων Ca^{2+} [37] (εικ.13). Συνεπώς, υπάρχει άμεση σχέση μεταξύ της συγκέντρωσης ενδοκυττάριου Ca^{2+} και του βαθμού διέγερσης των αιμοπεταλίων.

Η φωσφολιπάση C υδρολύει την 4,5 διφωσφο-φωσφατιδυλοϊννοσιτόλη (PIP_2) της κυτταρικής μεμβράνης για να σχηματιστεί η 1,4,5-τριφωσφορική ιννοσιτόλη (IP_3) και η διακυλογλυκερόλη (DAG). Η IP_3 επάγει την απελευθέρωση Ca^{2+} από το πυκνό σωληνοειδές σύστημα (DTS), ενώ η DAG ενεργοποιεί ένα άλλο ένζυμο, την πρωτεϊνική κινάση C (PKC) η οποία φωσφορυλιώνει μια σειρά σηματοδοτικών πρωτεϊνών που ελέγχουν την έκκριση των κοκκίων και την ενεργοποίηση της $\alpha_{IIb}\beta_3$ (εικ.12).

Η φωσφολιπάση A_2 ενεργοποιείται από την αύξηση της συγκέντρωσης του ελεύθερου Ca^{2+} στο κυτοσόλιο και καταλύει την απελευθέρωση αραχιδονικού οξέος (AA) από τα μεμβρανικά φωσφολιπίδια. Το AA είναι η πρόδρομη ένωση πολλών εικοσανοειδών όπως του TXA_2 . Το TXA_2 σχηματίζεται στα αιμοπετάλια από την κυκλοοξυγονάση ($COX-1$) και από την συνθετάση του θρομβοξανίου και μετά από την απελευθέρωσή του, διεγείρει την έκκριση των συστατικών των κοκκίων μέσω σύνδεσής του στον υποδοχέα του στη μεμβράνη των αιμοπεταλίων.

Η αδενυλική κυκλάση διεγείρεται από ανταγωνιστές της ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων όπως η προστακυκλίνη, και οδηγεί στον σχηματισμό του $cAMP$ που έχει ανασταλτική δράση στην ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων(εικ.13).



Εικόνα 13 Σηματοδότηση κατά την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων

2) Αλλαγή σχήματος

Όταν η ενδοκυττάρια συγκέντρωση Ca^{2+} υπερβεί ένα συγκεκριμένο όριο, τα αιμοπετάλια υφίστανται αλλαγή σχήματος και εκβάλλουν ψευδοπόδια. Η αλλαγή σχήματος απαιτεί μεταβολές στη δομική ζώνη των αιμοπεταλίων καθώς και εμπλουτισμό των ψευδοποδίων με μικροσωληνίσκους. Η αλλαγή σχήματος οδηγεί στην αύξηση της επιφάνειας των αιμοπεταλίων έτσι ώστε να έχουν εκτεταμένη αλληλεπίδραση με τον περιβάλλοντα χώρο [38].

3) Προσανατολισμός μεμβρανικών φωσfolιπιδίων

Οι αλλαγές στον προσανατολισμό των φωσfolιπιδίων της κυτταρικής μεμβράνης επιτρέπουν την σύνδεση των παραγόντων πήξης και τον σχηματισμό του καταλυτικού συμπλόκου της προθρομβινάσης στην

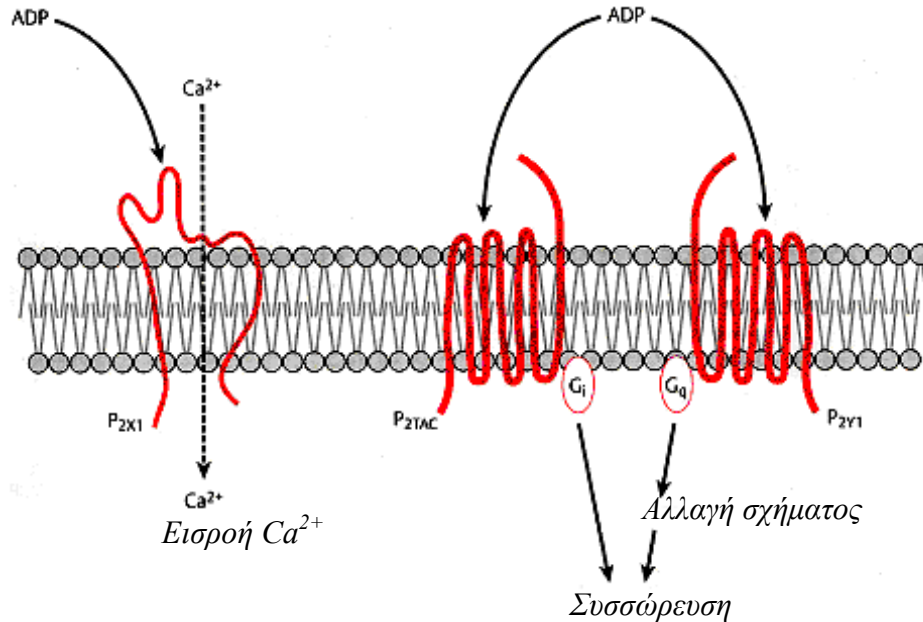
ενεργοποιημένη επιφάνεια των αιμοπεταλίων. Αυτό οδηγεί στην αυξημένη παραγωγή θρομβίνης στην περιοχή ενός συσσωρεύματος αιμοπεταλίων και έτσι στην σταθεροποίηση του αιμοστατικού θρόμβου μέσω σταυροσυνδέσεων ινώδους [38].

4) Μεμβρανικοί υποδοχείς

A Υποδοχείς του ADP

Το ADP είναι ένας αγωνιστής μικρού μοριακού βάρους (MB) που εκκρίνεται από τα πυκνά κοκκία και προκαλεί ενεργοποίηση και συσώρευση αιμοπεταλίων. [39,40]. Συγκεκριμένα, βρίσκεται αποθηκευμένο στα πυκνά κοκκία των αιμοπεταλίων και είναι ένας από τους πιο σημαντικούς αγωνιστές δεδομένου ότι ασθενείς με ελαττωματική αποθήκευση ADP παρουσιάζουν αιμορραγική διάθεση [41,42]. Η ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων από το ADP ακολουθεί μια συγκεκριμένη αλληλουχία. Αρχικά συμβαίνει αλλαγή σχήματος των μη ενεργοποιημένων δισκοειδών αιμοπεταλίων προς ακανθοειδείς σφαίρες, ακολουθεί συσώρευση και έκκριση κοκκίων κατά την οποία απελευθερώνεται περισσότερο ADP καθώς και άλλες ουσίες [43]. Δρώντας εξωκυττάρια, το ADP προκαλεί μια σειρά ενδοκυττάρων γεγονότων όπως η ραγδαία εισροή ιόντων Ca^{2+} [44,45] η κινητοποίηση των ενδοκυττάρων αποθηκών ιόντων Ca^{2+} [46] και η αναστολή της αδενυλικής κυκλάσης [47]. Επιπρόσθετα, το αραχιδονικό οξύ που απελευθερώνεται από την κυτταρική μεμβράνη λόγω της δράσης της φωσφολιπάσης A_2 , μετατρέπεται σε θρομβοξανίνο A_2 , έναν ισχυρό αγωνιστή. Οι υποδοχείς στους οποίους δεσμεύονται εξωκυττάρια νουκλεοτίδια (ADP κλπ) ονομάζονται P_2 υποδοχείς και χωρίζονται σε α) P_{2x} , πυλωτοί διάλυτοι ιόντων και β) P_{2y} , συζευγμένοι με G-πρωτεΐνες [48]. Στα αιμοπετάλια υπάρχουν 3 διαφορετικά είδη υποδοχέων του ADP (1 που ανήκει στην κατηγορία P_{2x} και 2 που ανήκουν κατηγορία P_{2y}). 1) P_{2x1} (πυλωτός διάλυτος ιόντων Ca^{2+}), μεσολαβεί στη ραγδαία εισροή

ιόντων Ca^{2+} , 2) P_{TAC} (συζευγμένος με G -πρωτεΐνη), αναστέλλει την αδενυλική κυκλάση και 3) $P_{2\gamma 1}$ (συζευγμένος με G -πρωτεΐνη), ενεργοποιεί την φωσφολιπάση C (εικ.14) [49,50,51].



Εικόνα 14 Υποδοχείς του ADP.

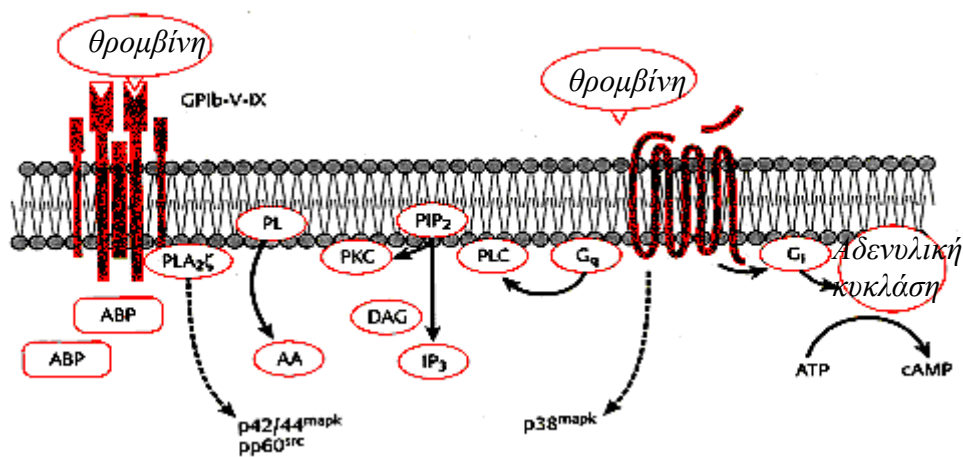
Β Υποδοχείς της Θρομβίνης και του TRAP

Η θρομβίνη αναγνωρίζει ως υπόστρωμα κυρίως το ινωδογόνο και με την πρωτεολυτική της δράση οδηγεί στον σχηματισμό ινώδους [52]. Όμως η θρομβίνη, εκτός από την ενζυμική της δράση, προκαλεί και μεγάλο εύρος άλλων βιολογικών δράσεων σε διάφορους τύπους κυττάρων συμπεριλαμβανομένων των αιμοπεταλίων.

Η θρομβίνη θεωρείται "ισχυρός" αγωνιστής εφόσον η συσώρευση αιμοπεταλίων που προκαλεί δεν εξαρτάται από την έκκριση των περιεχομένων των κοκκίων. Προκαλεί αλλαγή σχήματος καθώς και έκκριση των περιεχομένων των κοκκίων.

Η ανθρώπινη α -θρομβίνη αποτελείται από μια Α και μια Β αλυσίδα που συνδέονται μεταξύ τους με δισουλφιδικές γέφυρες. Η α -θρομβίνη αποικοδομεί

τον συζευγμένο με G πρωτεΐνη υποδοχέα υδρολύοντας τον πεπτιδικό δεσμό μεταξύ των αμινοξέων αργινίνη και λυσίνη (εικ.15). Στα αιμοπετάλια υπάρχουν τρεις περιοχές δέσμευσης της θρομβίνης, υψηλής, μέτριας και χαμηλής συγγένειας με τιμές Kd 0.3 nM, 111 nM και 2.9 μM αντιστοίχα. Οι περιοχές μέτριας και χαμηλής συγγένειας σχετίζονται με τους επταδιαμεμβρανικούς, συζευγμένους με G πρωτεΐνες, υποδοχείς PAR-1 και PAR-4 αντίστοιχα, ενώ οι περιοχές υψηλής συγγένειας σχετίζονται με το σύμπλεγμα GPIb-IX-V στην περιοχή της γλυκοπρωτεΐνης Ib η οποία είναι μέρος του υποδοχέα GPIb-V-IX όπου δεσμεύεται ο vWF [54-57] (εικ.15).



Εικόνα 15 Οι αιμοπεταλιακοί υποδοχείς της θρομβίνης.

Η δέσμευση της θρομβίνης στον υποδοχέα GPIb-V-IX επάγει την ενεργοποίηση μιας ισομορφής της φωσφολιπάσης A₂, ενώ η δέσμευση στον επταδιαμεμβρικό υποδοχέα (PAR-1) ενεργοποιεί διεγερτικές Gs πρωτεΐνες (ενεργοποίηση της φωσφολιπάσης C) και ανασταλτικές Gi πρωτεΐνες (ενεργοποίηση αδενυλικής κυκλάσης).

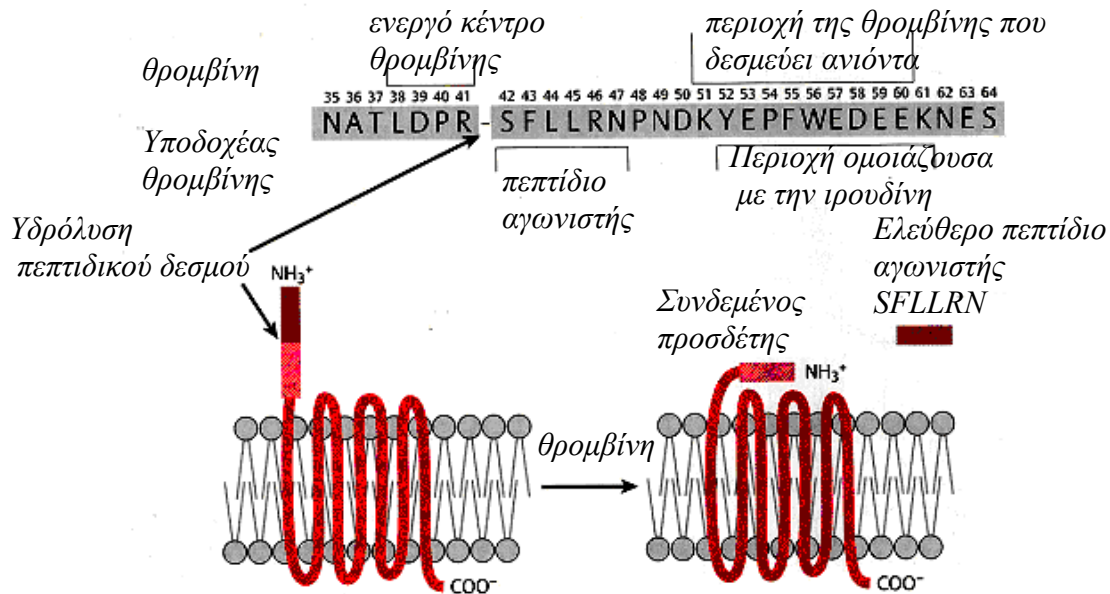
Η θρομβίνη δεσμεύεται στο αμινοτελικό εξωκυττάριο άκρο του υποδοχέα PAR-1 και αλληλεπιδρά με τουλάχιστον δύο περιοχές του υποδοχέα:

- το ενεργό κέντρο της θρομβίνης (S1-S4) αλληλεπιδρά με την εξωκυττάρια περιοχή στο αμινοτελικό πεδίο LDPR/S του υποδοχέα ενώ

b) η περιοχή της θρομβίνης που δεσμεύει ανιόντα, δεσμεύεται στο πεδίο του υποδοχέα που μοιάζει με την ιρουδίνη.

Μετά, η θρομβίνη σχάζει τον υποδοχέα στο αμινοξύ Arg 41(LDPR/S) και αποκαλύπτει έτσι ένα νέο αμινοτελικό άκρο το οποίο λειτουργεί ως συνδεδεμένος προσδέτης. Πεπτίδια που περιέχουν τουλάχιστον τα 5 πρώτα αμινοξέα της αλληλουχίας του συνδεδεμένου προσδέτη μπορούν να δράσουν παρόμοια με την θρομβίνη.

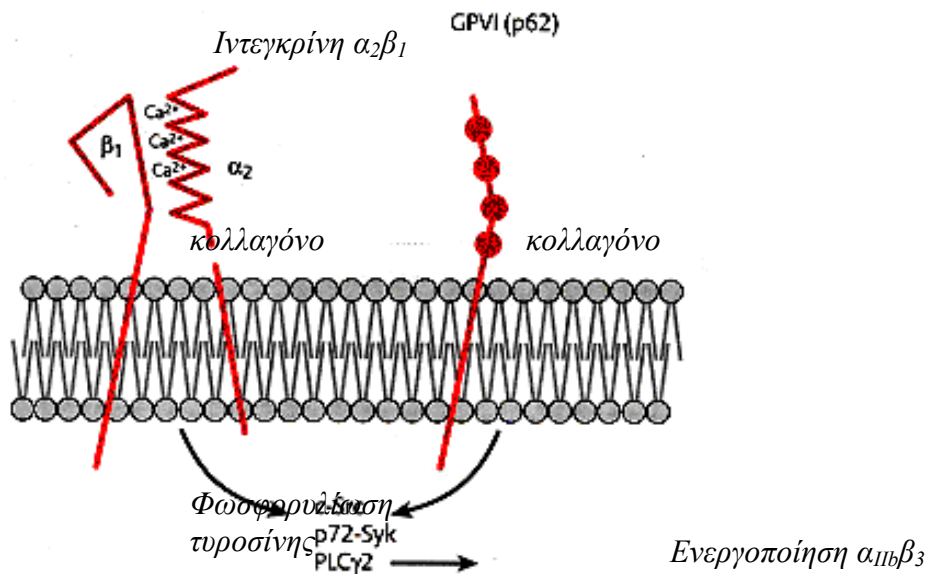
Ο συνδεδεμένος προσδέτης που αποκαλύπτεται μετά από τη σχάση του υποδοχέα PAR-1 ενεργοποιεί τον υποδοχέα. Αν και ο συνδεδεμένος προσδέτης θα μπορούσε να ενεργοποιήσει έναν γειτονικό υποδοχέα θρομβίνης, ο ενδομοριακός προσδετικός μηχανισμός είναι ο κύριος τρόπος της ενεργοποίησης του υποδοχέα και επομένως ενεργοποιείται ο υποδοχέας που έχει υποστεί σχάση. Έχειδειχθεί ότι ο συνδεδεμένος προσδέτης, αλλά και πεπτίδια του υποδοχέα της θρομβίνης (TRAPs, thrombin receptor activating peptides) που περιέχουν αμινοξέα της αλληλουχίας του συνδεδεμένου προσδέτη, δεσμεύονται στην δεύτερη εξωκυττάρια θηλιά καθώς και στα αμινοξέα Glu 83 ως Ser 93 του αμινοτελικού εξωκυττάριου άκρου της πρώτης διαμεμβρανικής περιοχής και η δέσμευση αυτή εκκινεί τη μεταγωγή σήματος (εικ.16).



Εικόνα 16 Πρωτεολυτική σχέση των υποδοχέων της θρομβίνης.

Γ Υποδοχείς κολλαγόνου

Το κολλαγόνο είναι η μεγαλύτερη σε συγκέντρωση πρωτεΐνη του υποενδοθηλίου που εκτίθεται στις περιοχές αγγειακού τραύματος. Αρχικά, τα αιμοπετάλια αλληλεπιδρούν με τα μόρια vWF που είναι συνδεδεμένα με το κολλαγόνο του υποενδοθηλίου μέσω της GPIb. Κατόπιν τα αιμοπετάλια αλληλεπιδρούν με το κολλαγόνο μέσω της α2β1 ή/και μέσω της GPVI και ενεργοποιούνται με επακόλουθο τη συσσώρευση και την έκκριση των περιεχομένων των κοκκίων τους. Η δέσμευση των αιμοπεταλίων στο κολλαγόνο προκαλεί την ενεργοποίηση των κινασών της τυροσίνης src και syk με αποτέλεσμα την ενεργοποίηση μιας ισομορφής της φωσφολιπάσης C (εικ.17) [58,59].



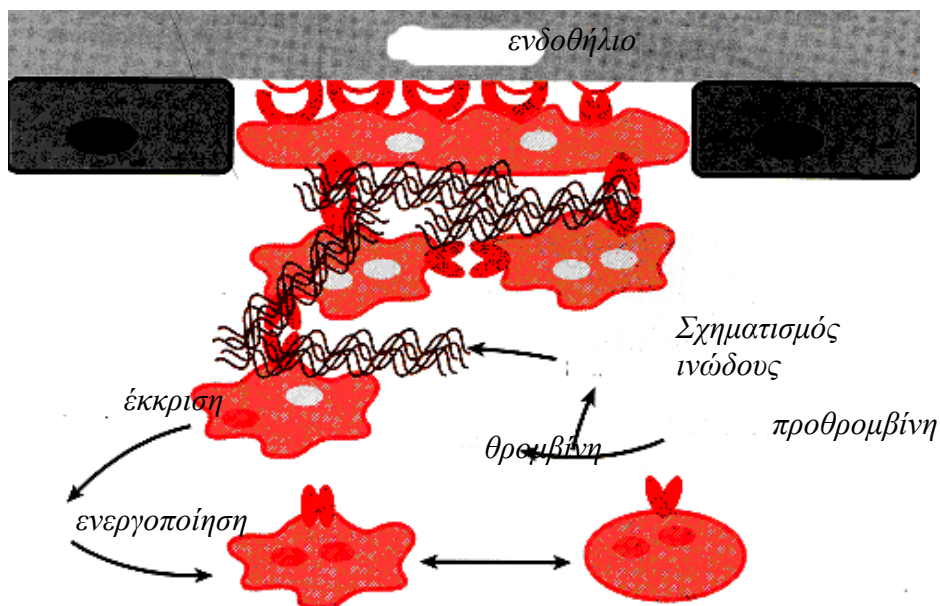
Εικόνα 17 Οι αιμοπεταλιακοί υποδοχείς του κολλαγόνου

Έκκριση αιμοπεταλίων

Κατά την προσκόλληση και την αλλαγή σχήματος το αιμοπετάλιο αρχίζει να εκκρίνει ουσίες στο άμεσο περιβάλλον του. Η διαδικασία αυτή είναι γνωστή ως έκκριση, απελευθέρωση ή αποκοκκίωση. Η έκκριση των κοκκίων ενισχύει τη διαδικασία της ενεργοποίησης και εκκινεί την δευτερογενή, μη αντιστρεπτή φάση της συσώρευσης.

Η έκκριση των κοκκίων είναι μια διαδικασία που χρειάζεται ενέργεια και συνεπώς καταναλώνει ATP. Η έκκριση εξαρτάται από την ενδοκυττάρια συγκέντρωση ιόντων Ca^{2+} και προχωρά με την εξής σειρά, πυκνά κοκκία, α-κοκκία και λυσισώματα. Τα συστατικά των κοκκίων εκκρίνονται μόνο υπό ορισμένη κυτοπλασμική συγκέντρωση ιόντων Ca^{2+} και μάλιστα φαίνεται ότι υπάρχει συγκεκριμένο όριο για κάθε τύπο κοκκίου. Η έκκριση των συστατικών των κοκκίων συμβαίνει πριν και μετά τη δευτερογενή συσώρευση και οδηγεί στην περαιτέρω ενεργοποίηση και την συσώρευση επιπλέον κυκλοφορούντων αιμοπεταλίων αλλά και στην σταθεροποίηση του

αιμοπεταλιακού θρόμβου ενισχύοντας τον σχηματισμό του ινώδους [22] (εικ.18).



Εικόνα 18 Συσσώρευση κυκλοφορούντων αιμοπεταλίων και σχηματισμός ινώδους.

Τα πυκνά κοκκία περιέχουν κυρίως ADP, ATP, σεροτονίνη και Ca^{2+} . Η απελευθέρωση ADP από τα αιμοπετάλια είναι βασικής σημασίας για την ενεργοποίηση και την στρατολόγηση των εν ηρεμία αιμοπεταλίων στο ήδη σχηματισμένο συσώρευμα των αιμοπεταλίων. Παράλληλα, το ADP απελευθερώνεται από το τραυματισμένο αγγειακό τοίχωμα, τα ενδοθηλιακά κύτταρα και τα ερυθροκύτταρα.

Εκτός από τα νουκλεοτίδια της αδενίνης και την σεροτονίνη, τα πυκνά κοκκία εκκρίνουν επίσης υψηλές συγκεντρώσεις Ca^{2+} στον εξωκυττάριο χώρο. Αυτό ευνοεί τη δέσμευση του ινωδογόνου στην $\alpha_{IIb}\beta_3$ αλλά και άλλους φυσιολογικούς μηχανισμούς της πήξης που εξαρτώνται από Ca^{2+} .

Τα α -κοκκία περιέχουν πρωτεΐνες μερικές εκ των οποίων βρίσκονται μόνο στα αιμοπετάλια ενώ άλλες βρίσκονται επίσης στο πλάσμα καθώς και σε άλλα κύτταρα. Η θρομβοσπονδίνη βρίσκεται επίσης στα α -κοκκία και συμμετέχει στην προσκόλληση και την δευτερογενή συσώρευση. Ακόμη,

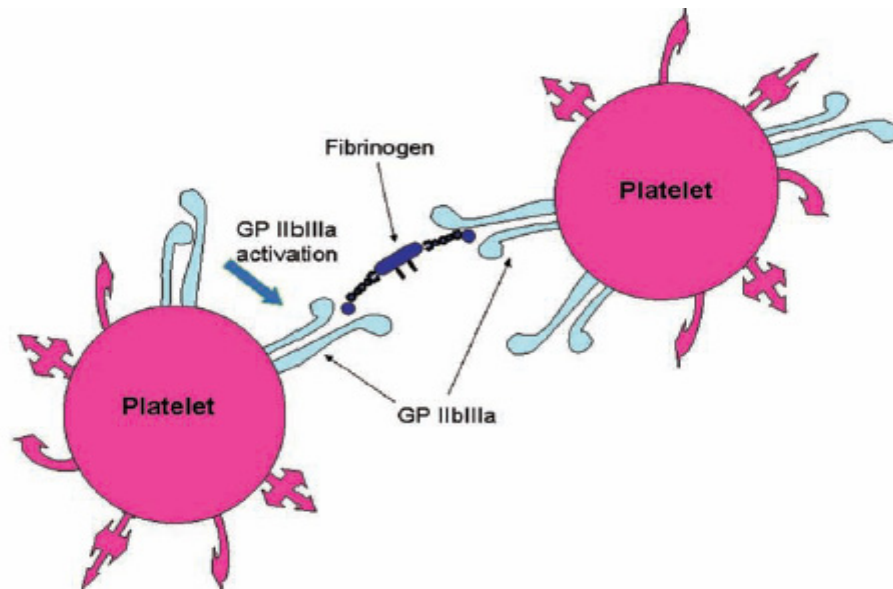
προφλεγμονώδεις παράγοντες όπως η IL-1 και ο προσδέτης CD40 απελευθερώνονται από τα ενεργοποιημένα αιμοπετάλια. Οι παράγοντες αυτοί προκαλούν σημαντικές αλλαγές στις προσκολλητικές και τις χημειοτακτικές ιδιότητες των κυττάρων του αγγειακού τοιχώματος. Η γλυκοπρωτεΐνη των α-κοκκίων P-σελεκτίνη μετατοπίζεται κατά την έκκριση προς την κυτταρική μεμβράνη. Η P-σελεκτίνη είναι ο σημαντικός προσδέτης για την προσκόλληση των αιμοπεταλίων στα λευκοκύτταρα και εκκινεί φλεγμονώδεις αντιδράσεις στα λευκοκύτταρα. Ακόμη, οι ενεργοποιητές της πήξης όπως ο vWF, το ινωδογόνο ή ο παράγοντας V υπάρχουν στα α-κοκκία και έχουν προθρομβωτική δράση [22,60].

Agonist	Platelet Receptor
ADP	P2Y1 P2Y12 P2X1
ATP	P2X1
Collagen	GP1a/IIa GPIIb/IIIa GPIV GPVI
Ephrin	Ephrin receptor
Gas6	Axl Tyro-3 Mer
Adrenaline	α_2
Platelet activator factor	PAF Receptor
von Willebrand Factor	GPIb α (complex GPIb-V-IX) GPIIb/IIIa α v β 3
Fibrinogen	GPIIb/IIIa
Fibronectin	GPIc/IIa GPIIb/IIIa
Laminin	GPIc/IIa
Serotonin	5-HT ₂
Thrombin	PAR-1 PAR-4 GPIb α
Thrombospondin	Vitronectin receptor GPIIb/IIIa
Thromboxane A ₂	TP
Vasopressin	V1
Vitronectin	Vitronectin receptor

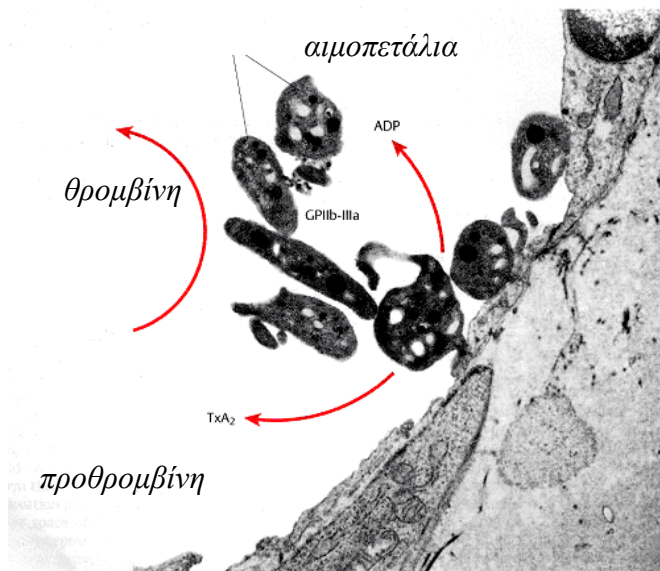
Οι αγωνιστές και οι υποδοχείς των αιμοπεταλίων

Συσσώρευση αιμοπεταλίων

Η συσώρευση ορίζεται ως η διαδικασία της προσκόλλησης μεταξύ δύο αιμοπεταλίων. Τα αιμοπετάλια ενεργοποιούνται κατά την συσώρευσή τους και εκκρίνουν τα συστατικά των κοκκίων τους με αποτέλεσμα την περαιτέρω ενεργοποίησή τους [36] (εικ.9).



ΕΙΚΟΝΑ ΑΠΟ MAYO CLINIC



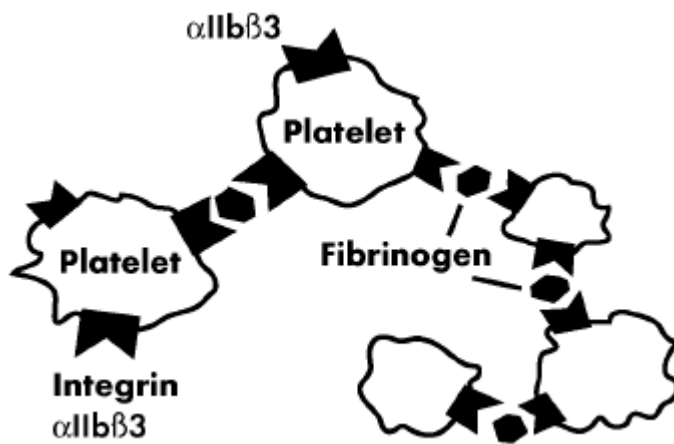
Εικόνα 9 Προσκόλληση και συσώρευση αιμοπεταλίων σε περιοχή τραυματισμού του ενδοθηλίου.

Τα μη ενεργοποιημένα αιμοπετάλια δεν είναι ικανά να δεσμεύουν ινωδογόνο. Μετά από ενεργοποίηση εκφράζονται περιοχές στους υποδοχείς $\alpha_{IIb}\beta_3$ στις οποίες δεσμεύεται το ινωδογόνο με αποτέλεσμα την συσσώρευση των αιμοπεταλίων μέσω του σχηματισμού γεφυρών ινωδογόνου μεταξύ τους (αναστρέψιμη φάση). Κατόπιν τα αιμοπετάλια υφίστανται αποκκοκίωση και η δέσμευση του ινωδογόνου στα αιμοπετάλια γίνεται ισχυρότερη (μη αναστρέψιμη φάση).

Διακρίνονται δυο φάσεις συσσώρευσης, η πρωτογενής και η δευτερογενής συσσώρευση. Κατά την πρωτογενή συσσώρευση τα αιμοπετάλια διασυνδέονται χαλαρά με γέφυρες ινωδογόνου. Αυτή η διαδικασία είναι αναστρέψιμη. Η δευτερογενής συσσώρευση ξεκινά όταν τα αιμοπετάλια έχουν εκκρίνει τα συστατικά των κοκκίων τους. Τρεις παράγοντες είναι σημαντικοί για την φυσιολογική διαδικασία συσσώρευσης, η διατμητική τάση (που αυξάνει την πιθανότητα να έρθουν σε επαφή δύο αιμοπετάλια), η συγκέντρωση ιόντων Ca^{2+} και η συγκέντρωση του ινωδογόνου. Όταν ένας από τους τρεις παράγοντες είναι σε έλλειψη, τότε τα αιμοπετάλια δεν μπορούν να συσσωρευτούν. Το φυσιολογικό πλάσμα περιέχει επαρκείς συγκεντρώσεις Ca^{2+} και ινωδογόνου για τη συσσώρευση. Υψηλές συγκεντρώσεις Ca^{2+} και ινωδογόνου είναι αποθηκευμένες στα κοκκία των αιμοπεταλίων και απελευθερώνονται στον περιβάλλοντα χώρο του αναπτυσσόμενου συσσωρεύματος αιμοπεταλίων κατά την συσσώρευση.

Η $\alpha_{IIb}\beta_3$ έχει κεντρικό ρόλο στη συσώρευση των αιμοπεταλίων. (εικ.10).

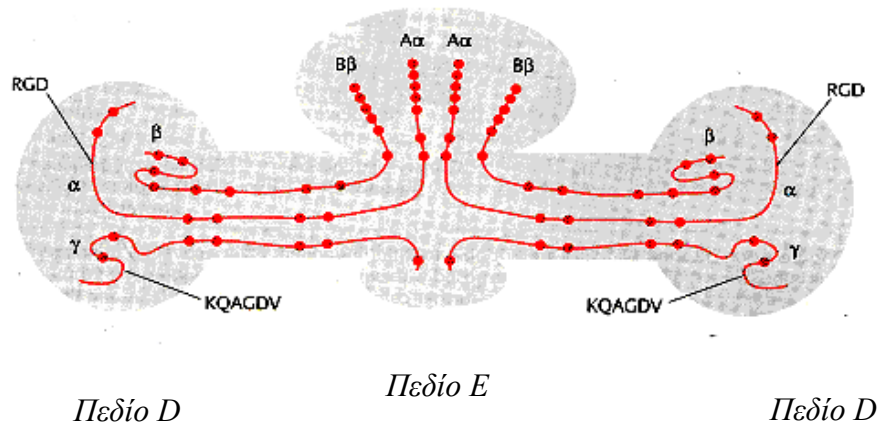
Υπό την ανενεργή κατάσταση της $\alpha_{IIb}\beta_3$ το διαλυτό ινωδογόνο του πλάσματος δεν μπορεί να δεσμευτεί στην επιφάνεια των αιμοπεταλίων. Οι περιοχές δέσμησης του ινωδογόνου επί της $\alpha_{IIb}\beta_3$ γίνονται προσβάσιμες μόνο μετά την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων. Η δέσμευση του ινωδογόνου στην $\alpha_{IIb}\beta_3$ εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από τα Ca^{2+} και δεν συμβαίνει καθόλου απουσία αυτών.



Εικόνα 10

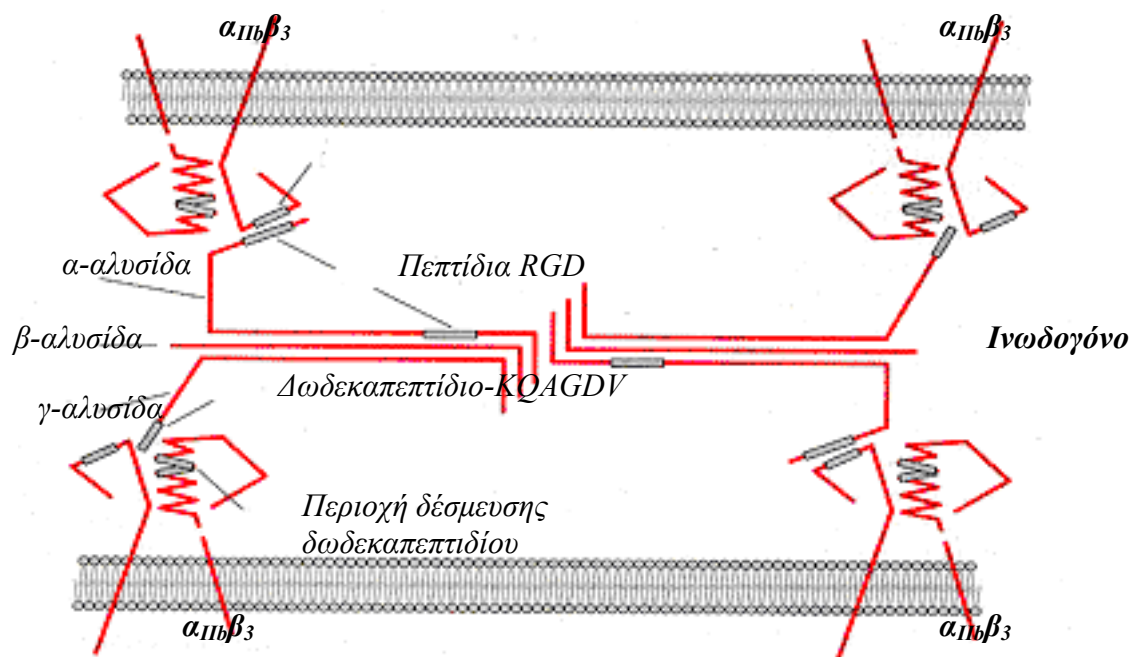
Το ινωδόγONO

Το ινωδόγONO είναι ένα πολυσθενές μόριο προσκόλλησης και αποτελείται από δυο α , δυο β και δυο γ αλυσίδες που συζευγνύονται για να σχηματίζουν ένα ομοδιμερές (εικ.11).



Εικόνα 11 Δομή ινωδογόνου

Και οι 6 αλυσίδες συναντώνται στο κέντρο του μορίου του ινωδογόνου και σχηματίζουν το πεδίο E. Οι δυο εξωτερικές περιοχές καλούνται πεδία D. Μέσω ειδικών περιοχών που βρίσκονται στις α και γ αλυσίδες, ένα μόριο ινωδογόνου μπορεί να δεσμευτεί σε δύο μόρια $\alpha_{IIb}\beta_3$ διαφορετικών αιμοπεταλίων (εικ.12). Το καρβοξυτελικό άκρο της γ αλυσίδας και δυο αλληλουχίες της α αλυσίδας έχουν αναγνωριστεί ως περιοχές που αναγνωρίζει η $\alpha_{IIb}\beta_3$. Η αρχική δέσμευση του ινωδογόνου στην $\alpha_{IIb}\beta_3$ είναι μια αντιστρεπτή διαδικασία που ακολουθείται από μια μη αντιστρεπτή σταθεροποίηση της δέσμευσης του ινωδογόνου στην $\alpha_{IIb}\beta_3$ [35].



Εικόνα 12 Γέφυρες ινωδογόνου μεταξύ δυο μορίων α_{11b}β₃.

1.5 Αιμοπετάλια και δευτερογενής αιμόσταση

Φυσιολογία της πήξης

Το πρωτογενές συσώρευμα των αιμοπεταλίων είναι σχετικά ασταθές και η επαρκής αιμόσταση χρειάζεται τη σταθεροποίηση του αιμοπεταλιακού θρόμβου (δευτερογενής αιμόσταση) [61].

ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΠΗΞΗΣ

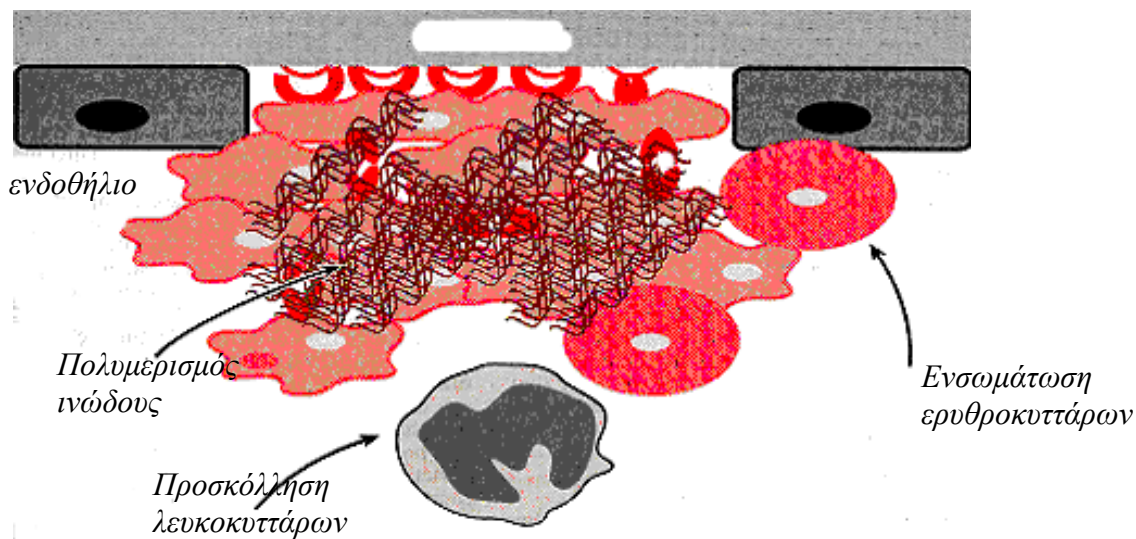
Παράλληλα με την αντίδραση απελευθέρωσης, ενεργοποιούνται οι παράγοντες πήξης του αίματος. Οι παράγοντες πήξης κατά την επαφή τους με το αγγειακό τοίχωμα που έχει υποστεί βλάβη και σε συνδυασμό

α) με την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων, την αντίδραση απελευθέρωσης και την αντιστροφή (flip-flop) των φωσφολιποειδών της κυτταρικής επιφάνειας (PF3) των αιμοπεταλίων και

β) με την απελευθέρωση τη ιστικής θρομβοπλαστίνης (TF), πυροδοτούν την αλυσίδα των αντιδράσεων της πήξης, η οποία κορυφώνεται με την παραγωγή ινών ινικής που συμβάλλουν στη μηχανική σταθερότητα του "πήγματος-θρόμβου" (clot). Σε διαταραχές των παραγόντων πήξης, η αρχική αιμόσταση, λόγω δράσης αιμοπεταλίων είναι φυσιολογική, λόγω όμως της ανεπαρκούς δημιουργίας ινικής, ο θρόμβος αποικοδομείται και έτσι παρατείνεται η αιμορραγία (δευτεροπαθής) για ώρες ή και μέρες μετά τη βλάβη.

Η δευτερογενής αιμόσταση ξεκινά με την ενεργοποίηση της αλληλουχίας της πήξης και τον σχηματισμό θρομβίνης και ινώδους. Η ενεργοποιημένη επιφάνεια των αιμοπεταλίων έχει σημαντικό ρόλο στην ενεργοποίηση της αλληλουχίας της πήξης (προθρομβωτική δράση) [62]. Η απόθεση ινώδους στο συσώρευμα των αιμοπεταλίων οδηγεί στην σταθεροποίηση του θρόμβου. Η μάζα των αιμοπεταλίων με το ινώδες

συστέλλεται (συστολή θρόμβου) και έτσι ισχυροποιεί περαιτέρω τον αιμοστατικό θρόμβο (εικ.19).



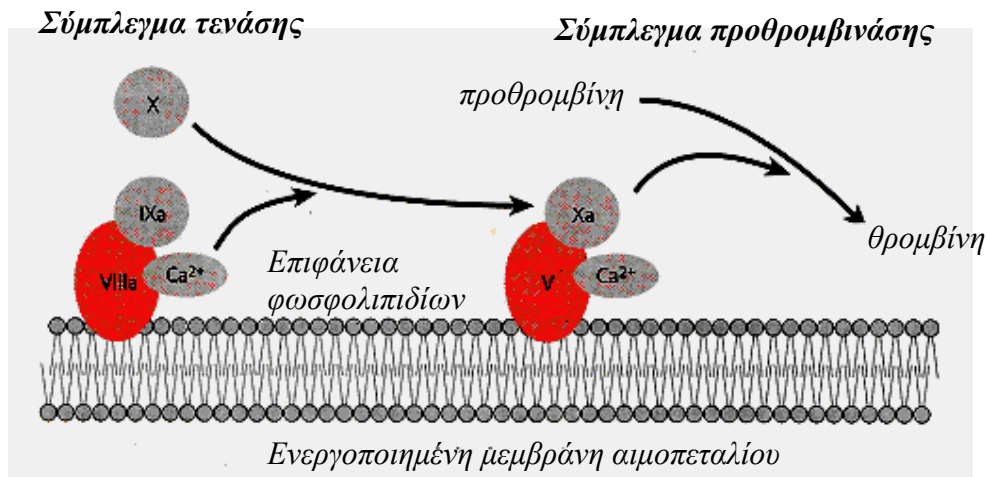
Εικόνα 19 Δευτερογενής αιμόσταση και συστολή θρόμβου.

Η πήξη του αίματος χωρίζεται στην ενδογενή και την εξωγενή οδό οι οποίες συγκλίνουν σε ένα κοινό τελικό στάδιο κατά το οποίο σχηματίζεται θρομβίνη και ινώδες [63].

Η ενεργοποίηση της πήξης προχωρά μέσω μιας πολύπλοκης ενζυμικής αλληλουχίας. Τα συστατικά του ενδογενούς συστήματος υπάρχουν στο πλάσμα και περιλαμβάνουν τους εξής παράγοντες πήξης, XII, XI, IX, VIII, ΗΜWΚ (υψηλού μοριακού βάρους κινινογόνο) και την προκαλλικρεΐνη [62,64]. Η ενδογενής οδός πήξης ενεργοποιείται από τη δέσμευση τεσσάρων παραγόντων πήξης (παράγοντας XII, XI, προκαλλικρεΐνη, ΗΜWΚ) σε αρνητικά φορτία επί του υποενδοθηλίου και επί της επιφάνειας των αιμοπεταλίων. Αυτή η ενεργοποίηση εξ επαφής οδηγεί στην ενεργοποίηση του παράγοντα X, του πρώτου παράγοντα του κοινού τελικού σταδίου. Ο παράγοντας X ενεργοποιείται επίσης μέσω του εξωγενούς συστήματος το οποίο περιέχει τον παράγοντα VII και έναν συμπάργοντα τον ιστικό παράγοντα. Ο ιστικός παράγοντας είναι μια ενσωματωμένη στη μεμβράνη

πρωτεΐνη που βρίσκεται κυρίως στα κύτταρα του αγγειακού τοιχώματος και στα μονοκύτταρα [65]. Σε σχέση με την ενδογενή οδό η ενεργοποίηση της πήξης μέσω της εξωγενούς οδού προχωρά ραγδαία και έχει σημαντικό ρόλο στους θρομβωτικούς μηχανισμούς κοντά σε τραυματισμένα αγγεία. Το κοινό τελικό στάδιο της αλληλουχίας της πήξης μπορεί να χωριστεί σε 3 τμήματα : την ενεργοποίηση του παράγοντα X, τον σχηματισμό θρομβίνης από προθρομβίνη και την αποικοδόμηση του ινωδογόνου προς σχηματισμό ινώδους. Η πορεία της αλληλουχίας της πήξης ρυθμίζεται από αναστολείς (αντιθρομβίνη III, πρωτεΐνες C και S) που εμποδίζουν τη δράση ειδικών παραγόντων πήξης [65,66]. Η διαδικασία της πήξης προχωρά αισθητά γρηγορότερα σε πλάσμα πλούσιο σε αιμοπετάλια παρά σε πλάσμα φτωχό σε αιμοπετάλια. Ο αιμοπεταλιακός παράγοντας 3 είναι καθοριστικός για την προθρομβωτική δράση των αιμοπεταλίων [66,67]. Κατά την ενεργοποίηση, τα αρνητικά φορτισμένα φωσφολιπίδια όπως η φωσφατιδυλοσερίνη εκφράζονται στην επιφάνεια των αιμοπεταλίων και παρουσιάζουν αυξημένη δεσμευτική δράση για τους παράγοντες πήξης του πλάσματος όπως οι V, VIIIa, IXa και Xa.

Τα αιμοπετάλια αποθηκεύουν περίπου το 25% του συνολικού ποσού του παράγοντα V του αίματος στα κοκκία τους τα οποία απελευθερώνονται κοντά στα ενεργοποιημένα αιμοπετάλια. Ο παράγοντας V δεσμεύεται στα φωσφολιπίδια της μεμβράνης των ενεργοποιημένων αιμοπεταλίων (αιμοπεταλιακός παράγοντας 3) και σχηματίζει το σύμπλεγμα της προθρομβινάσης (Xa, V, Ca^{2+} , PF3) με τον παράγοντα Xa και την προθρομβίνη (II) παρουσία ιόντων Ca^{2+} (εικ.20). Ακόμη, η ενεργοποιημένη επιφάνεια των αιμοπεταλίων καταλύει ένα ακόμη σύμπλεγμα της ενδογενούς οδού, το σύμπλεγμα της τενάσης (IXa, VIIIa, Ca^{2+} , PF3).



Εικόνα 20 Σχηματισμός των συμπλεγμάτων θρομβινάσης και τενάσης στην ενεργοποιημένη επιφάνεια των αιμοπεταλίων.

Τα ενεργοποιημένα αιμοπετάλια καταλύουν την ενεργοποίηση της θρομβίνης μέσω της αλληλεπίδρασης τους με παράγοντες πήξης. Έτσι, σχηματίζεται ινώδες κοντά στο συσώρευμα των αιμοπεταλίων οδηγώντας έτσι στην ενίσχυση του συσσωρεύματος.

Το ενδογενές και το εξωγενές σύστημα είναι εξίσου απαραίτητα *in vitro*.

Σήμερα, το εξωγενές σύστημα (Extrinsic pathway or Tissue Factor or Initiation pathway) θεωρείται το πιο σημαντικό *in vivo*, έχοντας κεντρικό ρόλο στην ενεργοποίηση του σχηματισμού της θρομβίνης τόσο κατά τη φυσιολογική διαδικασία της αιμόστασης όσο και κατά τη θρόμβωση, ενώ το ενδογενές σύστημα (Intrinsic pathway or Contact System or Amplification or Propagating pathway) παίζει ρόλο στην ενίσχυση της απόκρισης του ήδη ενεργοποιημένου συστήματος.

Έχει δείχτει ότι έλλειψη του παράγοντα FXII, της προ-καλλικρεΐνης (prekallikrein) και του HMWK (high molecular weight kininogen) του ενδογενούς συστήματος δεν οδηγεί σε σοβαρά προβλήματα αιμορραγίας.

Αντίθετα, έλλειψη των παραγόντων που μετέχουν στο εξωγενές σύστημα (TF, FVII, FX, FV) οδηγούν σε θανάσιμες νεογνικές αιμορραγίες.

Τραύμα στα αγγεία οδηγεί σε έκθεση στην επιφάνεια των κατεστραμμένων ενδοθηλιακών κυττάρων μιας λιποπρωτεΐνης, της ιστικής θρομβοπλαστίνης (TF: tissue thromboplastin factor ή παράγοντα III), η οποία δρα ως ενεργοποιητής του εξωγενούς συστήματος.

Ο παράγοντας TF δεν βρίσκεται στο πλάσμα αλλά αποτελεί συστατικό των ενδοθηλιακών, σε ηρεμία, κυττάρων και των μονοκυττάρων.

Στη συνέχεια, ο TF αλληλεπιδρά με τον παράγοντα FVII ή την ενεργοποιημένη του μορφή FVIIa, η οποία όμως είναι λιγότερο του 1% της ολικής ποσότητας του FVII στο πλάσμα. Το σύμπλοκο FVII/TF αυτοκαταλύεται και το FVIIa/TF καταλύει την ενεργοποίηση του παράγοντα FX αλλά και του παράγοντα FIX του ενδογενούς συστήματος.

Βλάβη του αγγειακού τοιχώματος και απελευθέρωση της ιστικής θρομβοπλαστίνης (TF) στο αίμα οδηγεί σε ενεργοποίηση σχηματισμού της θρομβίνης μέσω του εξωγενούς συστήματος. Η θρομβίνη μέσω μηχανισμού θετικής ανάδρασης ενεργοποιεί τα αιμοπετάλια (platelet activation) και άλλους παράγοντες πήξης. Τα ενεργοποιημένα αιμοπετάλια παρέχουν την απαραίτητη επιφάνεια των φωσφολιποειδών (PL) που ευνοεί το σχηματισμό των ενζυμικών συμπλόκων. Τα αιμοπετάλια προσκολλώνται στο κατεστραμμένο αγγειακό ενδοθήλιο μέσω του vWF.

Οι ενεργοποιημένοι παράγοντες FXa και FIXa είτε παραμένουν συνδεδεμένοι πάνω στα κύτταρα που φέρουν τον παράγοντα TF είτε διαχέονται στο αίμα και συνδέονται με τα αρνητικώς φορτισμένα φωσφολιποειδή (PL) των ενεργοποιημένων αιμοπεταλίων στην περιοχή της αγγειακής βλάβης. Πιο συγκεκριμένα, μόρια φωσφατιδυλσερίνης ("κρυμμένα" πριν) εκτίθενται στην επιφάνεια των ενεργοποιημένων αιμοπεταλίων και διεγείρουν το σχηματισμό του συμπλόκου της 'προθρομβινάσης' (FXa-PL-Ca⁺⁺-

FVa) που οδηγεί τελικά στο σχηματισμό του θρόμβου μέσω της θρομβίνης. Η ύπαρξη του φυσικού αναστολέα του ιστικού παράγοντα TFPI (tissue factor pathway inhibitor) παρεμποδίζει το σχηματισμό της θρομβίνης μέσω αυτής της οδού για όσο διάστημα απαιτείται για την αποκατάσταση της αγγειακής βλάβης. Τα πρώτα, όμως, λίγα μόρια θρομβίνης, μέσω μηχανισμού θετικής ανάδρασης, ενεργοποιούν περαιτέρω τα αιμοπετάλια, τον FV σε FVa αλλά και τον FXI σε FXIa και τον FVIII σε FVIIIa, αφού πρώτα αποσπάσει τον FVIII από τον vWF. Οι αντιδράσεις αυτές διευκολύνουν το σχηματισμό του Xase (Tenase) συμπλόκου (FIXa-PL-Ca⁺⁺-FVIIIa), το οποίο ενεργοποιεί περαιτέρω την ενεργοποίηση του FX σε FXa μέσω του ενδογενούς συστήματος. Αυξημένες ποσότητες FXa και FVa αυξάνουν το ρυθμό και την έκταση σχηματισμού της θρομβίνης μέσω του συμπλόκου της προθρομβινάσης.

Η απομόνωση και ο χαρακτηρισμός του αναστολέα του ιστικού παράγοντα TFPI, του μοναδικού ενδογενούς αναστολέα του συμπλόκου TF/factor VIIa, επιτρέπει νέες θεραπευτικές προσεγγίσεις αναφορικά με την προφύλαξη ή/και τη θεραπεία διαφόρων διαταραχών (καρδιαγγειακών, πήξεως αίματος). Οι ηπαρίνες ασκούν την αντιπηκτική τους δράση ευνοώντας και την απελευθέρωση του TFPI και εμποδίζοντας τη σύνδεση του απελευθερούμενου TFPI με πρωτεΐνες του πλάσματος, ενισχύοντας την ανασταλτική δράση του TFPI.

In Vitro, το ενδογενές σύστημα ξεκινά με την ενεργοποίηση του παράγοντα XII (Hageman factor), όταν αυτός έλθει σε επαφή με αρνητικά φορτισμένες επιφάνειες [φωσφολιποειδείς μεμβράνες των αιμοπεταλίων (PF3) αναμεμειγμένες με μη φυσιολογικές αρνητικά φορτισμένες ενώσεις, όπως η κεφαλίνη ή η καολίνη]. Τουλάχιστον 2 πρωτεΐνες, το κινινογόνο και η καλλικρεΐνη, συμμετέχουν στην ενεργοποίηση του παράγοντα XII. Ακολουθεί "αλυσιδωτή" ενεργοποίηση άλλων παραγόντων, μέχρι τον παράγοντα X, οπότε

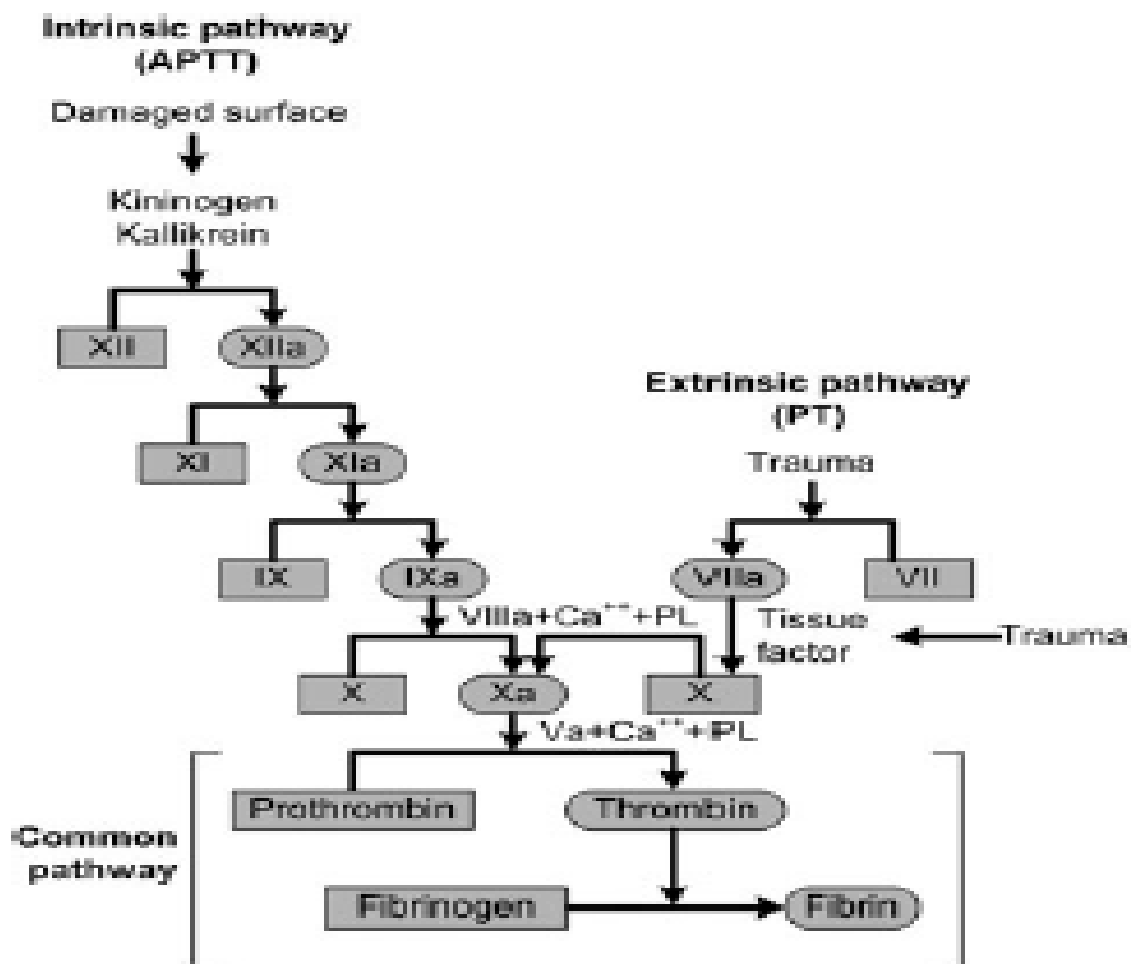
από εκεί και πέρα, τα δύο συστήματα ακολουθούν κοινή πορεία. Το σύμπλοκο της προθρομβινάσης διασπά στη συνέχεια τη προθρομβίνη, η δε θρομβίνη που σχηματίζεται μετατρέπει το διαλυτό ινωδογόνο σε ινική.

Το καλύτερα χαρακτηρισμένο τμήμα της διαδικασίας αυτής είναι η μετατροπή του ινωδογόνου σε ινική μέσω της θρομβίνης, η οποία κόβει 4 πεπτιδικούς δεσμούς αργινίνης-γλυκίνης στην κεντρική σφαιρική περιοχή του ινωδογόνου, με απελευθέρωση των Α και Β πεπτιδίων. Έτσι έχουμε τη δημιουργία των μονομερών της ινικής, τα οποία σε αντίθεση με τα αρχικά μόρια του ινωδογόνου κάνουν συσσωματώματα. Αυτό οφείλεται στο ότι τα πεπτίδια Α και Β έχουν μεγάλο αρνητικό φορτίο. Όταν αυτά απομακρυνθούν από την κεντρική περιοχή του μορίου, έχουμε μια αλλαγή στο επιφανειακό φορτίο, το οποίο τώρα στην κεντρική περιοχή είναι θετικό (+5), ενώ στις τελικές σφαιρικές μονάδες είναι αρνητικό (-4), με συνέπεια την εμφάνιση ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων που πιθανά σταθεροποιούν τη δομή της ινικής.

Η δομή αυτή σταθεροποιείται ακόμη περισσότερο με τη δημιουργία ομοιοπολικών διασταυρωμένων (cross-links) δεσμών μεταξύ των πλευρικών αλύσεων των μορίων της ινικής. Έχουμε δηλαδή μια τρανσαμιδική αντίδραση μεταξύ γλουταμίνης και λυσίνης, η οποία καταλύεται από τον παράγοντα FXIIIa, που ενεργοποιείται από τη θρομβίνη. Άτομα που έχουν έλλειψη του παράγοντα αυτού έχουν αυξημένη τάση για αιμορραγία. Ο παράγοντας αυτός συνδέεται επίσης με την α₂-αντιπ्लाσμίνη, η οποία είναι ένας φυσιολογικός παρεμποδιστής της ινωδογονόλυσης.

Όλοι σχεδόν οι παράγοντες πήξης του αίματος προϋπάρχουν ως ζυμογόνα (προένζυμα), τα οποία αποκτούν πλήρη ενεργοποίηση με την ενζυμική απομάκρυνση ενός ή μερικωνπεπτιδικωνδεσμων. Στην "αλυσιδωτή" αυτή ενεργοποίηση που παρατηρείται κατά την πήξη του αίματος (ΕΙΚ 21), η ενεργοποιημένη μορφή του ενός παράγοντα καταλύει την ενεργοποίηση του

επόμενου παράγοντα. Πολύ μικρές ποσότητες των αρχικών παραγόντων επαρκούν για να ξεκινήσει η αλυσίδα των αντιδράσεων, επειδή η καταλυτική φύση της διαδικασίας ενεργοποίησης οδηγεί, μέσω των πολλαπλών σταδίων, σε μια σημαντική ενίσχυση, επιτρέποντας την ταχεία απόκριση στο τραύμα



Εικόνα 21 Ο καταράκτης της πήξης

2 Ιντεγκρίνη $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$

2.1 Οι ιντεγκρίνες

Οι ιντεγκρίνες βρίσκονται σε όλα τα κύτταρα και παίζουν ρόλο σε πολλές φυσιολογικές απαντήσεις. Οι σημαντικότερες ιντεγκρίνες βρίσκονται στην επιφάνεια των αιμοπεταλίων και έχει αποδειχθεί ότι παίρνουν μέρος στη διαδικασία της προσκόλλησης των αιμοπεταλίων.

Οι ιντεγκρίνες αντιπροσωπεύουν μια μεγάλη οικογένεια υποδοχέων που εκφράζονται στην επιφάνεια όλων των εμπύρηνων κυττάρων του σώματος. Τα μεσολαβούμενα από ιντεγκρίνες σήματα, ρυθμίζουν τις αλληλεπιδράσεις κυττάρου-κυττάρου και κυττάρου-εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας, οι οποίες είναι σημαντικές για βιολογικές διαδικασίες όπως η εμβρυονική ανάπτυξη, η μορφογένεση, η αιμόσταση, η θρόμβωση, η επούλωση τραύματος, η λειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος και η μετάσταση [31].

Οι ιντεγκρίνες είναι ετεροδιμερή αποτελούμενα από μια α -υπομονάδα μη ομοιοπολικά συνδεδεμένη με μια β -υπομονάδα. Και οι δύο υπομονάδες είναι διαμεμβρανικές γλυκοπρωτεΐνες που διαπερνούν την κυτταρική μεμβράνη μια φορά. Προς το παρόν, έχουν χαρακτηριστεί 17 α και 8 β υπομονάδες [68] οι οποίες συνδυάζονται σχηματίζοντας περισσότερα από 22 διαφορετικά διμερή κάθε ένα εκ των οποίων παρουσιάζει ένα διακριτό προφίλ δέσμευσης προσδέτη.

Το μεγαλύτερο μέρος κάθε υπομονάδας της ιντεγκρίνης είναι εξωκυττάριο και περιέχει μια, εξαρτώμενη από ενεργοποίηση, περιοχή δέσμευσης προσδέτη για εξωκυττάρια πρωτεΐνες της θεμέλιας ουσίας,

διαλυτά μακρομόρια ή άλλους υποδοχείς που βρίσκονται στην επιφάνεια γειτονικών κυττάρων [69,70].

Πίνακας 1. Οι ιντεγκρίνες (integrins) των αιμοπεταλίων.

Όνομασία	Κατάταξη Ηλεκτροφορητικά	Αριθμός υποδοχέων ανά αιμοπετάλιο
ΙΝΤΕΓΚΡΙΝΕΣ		
$\alpha_2\beta_1$	GP Ia/IIa	1000
$\alpha_5\beta_1$	GP Ic/IIa	1000
$\alpha_6\beta_1$	GP I'c/IIa	1000
$\alpha\text{IIb}\beta_3$	GP IIb/IIIa	80.000 - 100.000
$\alpha_v\beta_3$	GPav/IIIa	100

2.2 Γενικά χαρακτηριστικά της $\alpha_{IIb}\beta_3$

Η γλυκοπρωτεΐνη $GPIIbIIIa$ ($\alpha_{IIb}\beta_3$, CD41CD61) είναι μέλος της οικογένειας των ιντεγκρινών και είναι ένα εξαρτώμενο από ιόντα ασβεστίου ετεροδιμερές του οποίου η έκφραση περιορίζεται στα αιμοπετάλια και στα μεγακαρυοκύτταρα.

Η $\alpha_{IIb}\beta_3$ είναι η κυριότερη πρωτεΐνη στην επιφάνεια των αιμοπεταλίων. Τα εν ηρεμία αιμοπετάλια φέρουν περίπου 80.000 αντίγραφα της $\alpha_{IIb}\beta_3$ στην κυτταρική τους επιφάνεια, με επιπρόσθετες δεξαμενές $\alpha_{IIb}\beta_3$ στις μεμβράνες των α -κοκκίων και του ανοιχτού πολυκάναλου συστήματος [71] οι οποίες μπορούν να μετατεθούν προς την επιφάνεια μετά από ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων.

Η $\alpha_{IIb}\beta_3$ αποτελείται από μια α υπομονάδα δυο αλυσίδων συνδεδεμένη μη ομοιοπολικά με μια β υπομονάδα μιας αλυσίδας. Κάθε υπομονάδα διαπερνά την κυτταρική μεμβράνη μια φορά. Το αμινοτελικό άκρο και το μεγαλύτερο μέρος κάθε υπομονάδας είναι εξωκυττάριο ενώ το τμήμα των υπομονάδων που διαπερνά τη μεμβράνη συνδέεται με ένα μικρό καρβοξυτελικό κυτοπλασμικό άκρο [72].

Η υπομονάδα α_{IIb} (γλυκοπρωτεΐνη IIb , $GPIIb$, CD41) αποτελείται από μια βαριά και μια ελαφριά αλυσίδα που συνδέονται με δισουλφιδικό δεσμό. Η βαριά αλυσίδα (123kDa) είναι εξωκυττάρια αποτελείται από 871 αα ενώ η ελαφριά αλυσίδα (23kDa) [73] που αποτελείται από συνολικά 137 αα διασχίζει την κυτταρική μεμβράνη και διαθέτει ένα μικρό εξωκυττάριο τμήμα 91 αα, ένα διαμεμβρανικό 26 αα και ένα μικρό κυτοπλασμικό τμήμα 20 αα. Η υπομονάδα φέρει 8 ενδομοριακούς δισουλφιδικούς δεσμούς και 1 διαμοριακό [74].

Η υπομονάδα β_3 (γλυκοπρωτεΐνη $IIIa$, $GPIIIa$, CD61) είναι ένα πολυπεπτίδιο μονής αλυσίδας (105 kDa) [73] με 762 αα και αποτελείται από

ένα μεγάλο εξωκυττάριο τμήμα 692 αα, από ένα διαμεμβρανικό 23 αα και ένα κυτοπλασμικό τμήμα 47 αα.. Η υπομονάδα χαρακτηρίζεται από την παρουσία 5 πλούσιων σε κυστεΐνη περιοχών που είναι εσωτερικά συνδεδεμένες με δισουλφιδικούς δεσμούς (η μια βρίσκεται στο αμινοτελικό άκρο και οι άλλες 4 κοντά στην κυτταρική μεμβράνη στην περιοχή 437-603). Η υπομονάδα φέρει 28 ενδομοριακούς δισουλφιδικούς δεσμούς. Οι πολλοί δισουλφιδικοί δεσμοί αποδίδουν μια σφιχτή και σφαιρική δομή στην πρωτεΐνη [75].

2.3 Συναρμολόγηση και ενδοκυττάρια μεταφορά των ετεροδιμερών της $\alpha_{IIb}\beta_3$

Η α_{IIb} και η β_3 είναι προϊόντα διαφορετικών γονιδίων που βρίσκονται στο χρωμόσωμα 17 (q21-22) και συναρμολογούνται προς ετεροδιμερή στο πλούσιο σε ασβέστιο περιβάλλον του ενδοπλασματικού δικτύου. Όπως πολλές ολιγομερείς πρωτεΐνες, ούτε η α_{IIb} ούτε η β_3 μπορούν να εξέλθουν από το ενδοπλασματικό δίκτυο πριν σχηματίσουν ετεροδιμερές. Συνεπώς, μεταλλάξεις που βλάπτουν τη σύνθεση είτε της α_{IIb} είτε της β_3 εμποδίζουν την έκφραση του ετεροδιμερούς οδηγώντας στην θρομβασθενία Glanzman. Εντούτοις ο σχηματισμός του ετεροδιμερούς δεν εγγυάται από μόνος του την έξοδο της $\alpha_{IIb}\beta_3$ από το ενδοπλασματικό δίκτυο διότι αυτό το οργανίδιο έχει την ικανότητα να αναγνωρίζει, να κατακρατά και να αποικοδομεί δύσμορφα ετεροδιμερή.

Σε πολλές περιπτώσεις θρομβασθένειας Glanzman έχει αποδειχθεί ότι κατακράτηση της $\alpha_{IIb}\beta_3$ στο ενδοπλασματικό δίκτυο γίνεται κυρίως εξαιτίας στοχευμένων μεταλλάξεων ή μικρών απωλειών αμινοξέων στην α_{IIb} παρά εξαιτίας παρόμοιων μεταλλάξεων στην β_3 .

Οι μεταλλάξεις στην α_{IIb} εμποδίζουν την έκφραση των ετεροδιμερών $\alpha_{IIb}\beta_3$ στην επιφάνεια των αιμοπεταλίων ενώ οι μεταλλάξεις στην β_3 οδηγούν στην έκφραση μη λειτουργικών ετεροδιμερών [76].

2.4 Δομή $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$

Υπομονάδα α_{IIb}

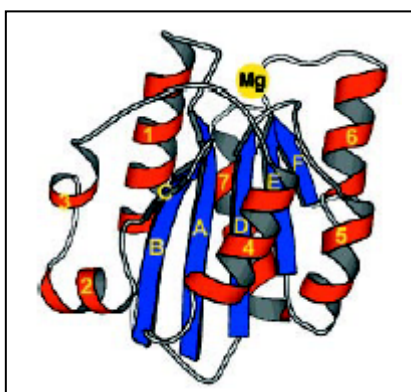
Το αμινοτελικό άκρο της α_{IIb} υπομονάδας περιέχει 7 ομόλογα, επαναλαμβανόμενα πεδία τα οποία αποτελούνται από περίπου 50 αμινοξέα.

Μεταξύ των επαναλαμβανόμενων πεδίων 4-7 υπάρχουν αλληλουχίες που δεσμεύουν κατιόντα, παρόμοιες του EF hand πεδίου των πρωτεϊνών που δεσμεύουν Ca^{2+} , όπως η καλμοδουλίνη [77].

Μεταξύ του δεύτερου και τρίτου επαναλαμβανόμενου πεδίου περιέχεται ένα I πεδίο περίπου 200 αμινοξέων. Αυτό το πεδίο είναι ομόλογο σε αλληλουχία με τα A πεδία του vWF όπου δεσμεύεται το κολλαγόνο και εμπλέκεται στη δέσμευση του προσδέτη [78] και έχει δειχθεί ότι περιέχει ένα πεδίο δέσμευσης ασβεστίου [79-81].

Το I πεδίο περιέχει ένα πεδίο δέσμευσης μετάλλου MIDAS (metal-ion-dependent adhesion site, εξαρτώμενο από το ιόν του μετάλλου στο πεδίο προσκόλλησης) στην κορυφή του β-φύλλου και τα οποίο είναι σημαντικό για την δεσμευτική ικανότητα της υπομονάδας α_{IIb} [83]. Στο πεδίο MIDAS, 4 ξεχωριστά κατάλοιπα συμπληρώνουν την οκταεδρική γεωμετρία του δισθενούς κατιόντος. Τα πρώτα 3 είναι διατεταγμένα εντός ενός μοτίβου DXSXS (το ασπαρτικό και οι δυο σερίνες συντονίζονται με ιόν μετάλλου, ενώ X: οποιοδήποτε αμινοξύ), το τέταρτο είναι μια θρεονίνη που χωρίζεται από το DXSXS από περίπου 70 κατάλοιπα, στην πρωτοταγή δομή, και το πέμπτο κατάλοιπο ένα ασπαρτικό περίπου 100 κατάλοιπα μακριά από το μοτίβο DXSXS επίσης στην πρωτοταγή δομή. Τα ιόντα μετάλλου που είναι δεσμευμένα στο MIDAS μπορούν να προσδεθούν με καρβοξύλια τα οποία προέρχονται από μια άλλη πρωτεΐνη [84]. Η ιδέα ενός ιόντος μετάλλου να αποτελεί αλυσίδα μεταξύ προσδέτη και ιντεγκρίνης έχει υποστηριχθεί ευρύτατα [85,86]. Μπορεί να υποτεθεί ότι ο δεσμός μετάλλου με

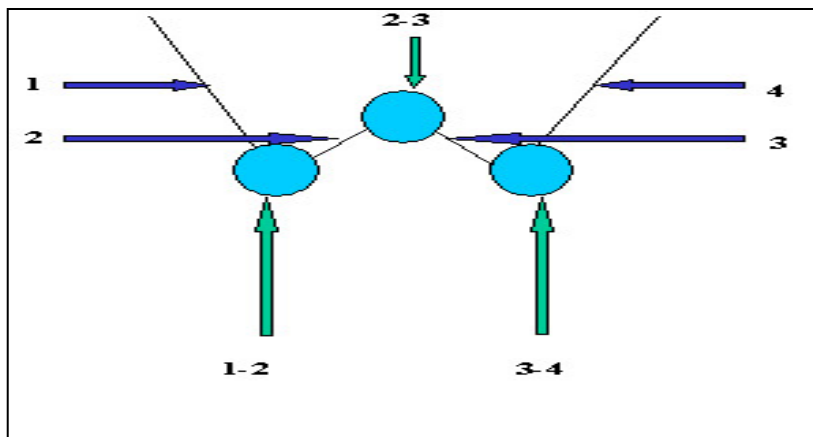
γλουταμινικό ή ασπαραγινικό αποδίδει περίπου τη μισή από την ενέργεια που χρειάζεται για τη δέσμευση, ενώ η υπόλοιπη ενέργεια αλλά και η εξειδίκευση προκύπτουν από επιπρόσθετες αλληλεπιδράσεις (ιοντικές, πολικές, υδροφοβικές) μεταξύ συμπληρωματικών επιφανειών της ιντεγκρίνης και του προσδέτη. Αυτό συμφωνεί με το γεγονός ότι όλοι οι προσδέτες των ιντεγκρινών περιέχουν ένα σημαντικό κατάλοιπο ασπαραγινικού ή γλουταμινικού ως στοιχείο κλειδί στις αλληλουχίες τους που αναγνωρίζουν οι ιντεγκρίνες. Μετάλλαξη οποιουδήποτε καταλοίπου που συμπληρώνει την οκτεδρική γεωμετρία του μετάλλου στο I πεδίο [79,87] οδηγεί στην απώλεια της ικανότητας δέσμευσης της ιντεγκρίνης με τον προσδέτη.



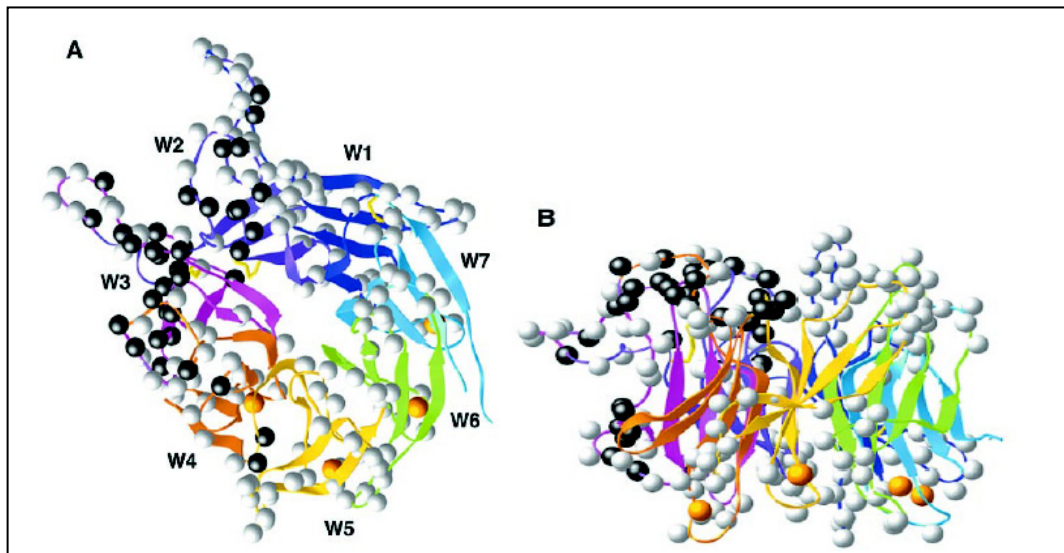
Εικόνα 22 Δομή αντιπροσωπευτικού I πεδίου στις υπομοναδες α. Το κατιόν Mg είναι δεσμευμένο σε πεδίο MIDAS στο πάνω μέρος του I πεδίου.

Πρόσφατα, προτάθηκε ένα υποθετικό ατομικό μοντέλο για τα 7 επαναλαμβανόμενα πεδία των α υπομονάδων [88]. Το δίπλωμα της α υπομονάδας προβλέφθηκε ότι είναι β προπέλα, μια κυκλική δομή που αποτελείται από 7 ακτινικά διατεταγμένα β-φύλλα που καλούνται μονάδες W. Κάθε μονάδα W αποτελείται από 4 αντιπαράλληλα β-φύλλα και 3 συνδετικές θηλιές (εικ.22) [89]. Τα σημεία επαφής του προσδέτη βρίσκονται στην πάνω επιφάνεια της προπέλας και ίσως περιλαμβάνουν θηλιές από περισσότερες από μια μονάδες W αλλά και τον άξονα της προπέλας. Είναι ενδιαφέρον το ότι

τα EF hand πεδία δέσμευσης Ca^{2+} των α υπομονάδων βρίσκονται στην κατώτερη επιφάνεια της προπέλας μακριά από τα σημεία επαφής του προσδέτη (εικ.24). Είναι πιθανό ότι αυτά παίζουν δομικό ρόλο και όχι ρόλο στη δέσμευση του προσδέτη, δηλαδή συνδέουν την προπέλα με το υπόλοιπο τμήμα της υπομονάδας. Εναλλακτικά αυτά ίσως εμπλέκονται σε αλληλεπιδράσεις με την β υπομονάδα [82].



Εικόνα 23 1,2,3,4: β -φύλλα, 1-2, 2-3, 3-4:συνδετικές θηλιές



Εικόνα 24 Μοντέλο της β προπέλας. Δεξιά: κάτοψη, Αριστερά: πλάγια όψη (τα δεσμευμένα ιόντα Ca είναι σημειωμένα με κίτρινο χρώμα)

Αλληλουχία αμινοξέων της υπομονάδας α_{IIb} [74]

Εξωκυττάριο τμήμα:

L¹N²L³D⁴P⁵V⁶Q⁷L⁸T⁹F¹⁰Y¹¹A¹²G¹³P¹⁴N¹⁵G¹⁶S¹⁷Q¹⁸F¹⁹G²⁰F²¹S²²L²³D²⁴F²⁵H²⁶K²⁷D²⁸S²⁹H³⁰G³¹R³²V³³A³⁴I³⁵V³⁶V³⁷G³⁸A³⁹P⁴⁰R⁴¹T⁴²L⁴³G⁴⁴P⁴⁵S⁴⁶Q⁴⁷E⁴⁸E⁴⁹T⁵⁰G⁵¹G⁵²V⁵³F⁵⁴L⁵⁵C⁵⁶P⁵⁷W⁵⁸R⁵⁹A⁶⁰E⁶¹G⁶²G⁶³Q⁶⁴C⁶⁵P⁶⁶S⁶⁷L⁶⁸L⁶⁹F⁷⁰D⁷¹L⁷²R⁷³D⁷⁴E⁷⁵T⁷⁶R⁷⁷N⁷⁸V⁷⁹G⁸⁰S⁸¹Q⁸²T⁸³L⁸⁴Q⁸⁵T⁸⁶F⁸⁷K⁸⁸A⁸⁹R⁹⁰Q⁹¹G⁹²L⁹³G⁹⁴A⁹⁵S⁹⁶V⁹⁷V⁹⁸S⁹⁹W¹⁰⁰S¹⁰¹D¹⁰²V¹⁰³I¹⁰⁴V¹⁰⁵A¹⁰⁶C¹⁰⁷A¹⁰⁸P¹⁰⁹W¹¹⁰Q¹¹¹H¹¹²W¹¹³N¹¹⁴V¹¹⁵L¹¹⁶E¹¹⁷K¹¹⁸T¹¹⁹E¹²⁰E¹²¹A¹²²E¹²³K¹²⁴T¹²⁵P¹²⁶V¹²⁷G¹²⁸S¹²⁹C¹³⁰F¹³¹L¹³²A¹³³Q¹³⁴P¹³⁵E¹³⁶S¹³⁷G¹³⁸R¹³⁹R¹⁴⁰A¹⁴¹E¹⁴²Y¹⁴³S¹⁴⁴P¹⁴⁵C¹⁴⁶R¹⁴⁷G¹⁴⁸N¹⁴⁹T¹⁵⁰L¹⁵¹S¹⁵²R¹⁵³I¹⁵⁴Y¹⁵⁵V¹⁵⁶E¹⁵⁷N¹⁵⁸D¹⁵⁹F¹⁶⁰S¹⁶¹W¹⁶²D¹⁶³K¹⁶⁴R¹⁶⁵Y¹⁶⁶C¹⁶⁷E¹⁶⁸A¹⁶⁹G¹⁷⁰F¹⁷¹S¹⁷²S¹⁷³V¹⁷⁴V¹⁷⁵T¹⁷⁶Q¹⁷⁷A¹⁷⁸G¹⁷⁹E¹⁸⁰L¹⁸¹V¹⁸²L¹⁸³G¹⁸⁴A¹⁸⁵P¹⁸⁶G¹⁸⁷G¹⁸⁸Y¹⁸⁹Y¹⁹⁰F¹⁹¹L¹⁹²G¹⁹³L¹⁹⁴L¹⁹⁵A¹⁹⁶Q¹⁹⁷A¹⁹⁸P¹⁹⁹V²⁰⁰A²⁰¹D²⁰²I²⁰³F²⁰⁴S²⁰⁵S²⁰⁶Y²⁰⁷R²⁰⁸P²⁰⁹G²¹⁰I²¹¹L²¹²L²¹³W²¹⁴H²¹⁵V²¹⁶S²¹⁷S²¹⁸Q²¹⁹S²²⁰L²²¹S²²²F²²³D²²⁴S²²⁵S²²⁶N²²⁷P²²⁸E²²⁹Y²³⁰F²³¹D²³²G²³³Y²³⁴W²³⁵G²³⁶Y²³⁷S²³⁸V²³⁹A²⁴⁰V²⁴¹G²⁴²E²⁴³F²⁴⁴D²⁴⁵G²⁴⁶D²⁴⁷L²⁴⁸N²⁴⁹T²⁵⁰T²⁵¹E²⁵²Y²⁵³V²⁵⁴V²⁵⁵G²⁵⁶A²⁵⁷P²⁵⁸T²⁵⁹W²⁶⁰S²⁶¹W²⁶²T²⁶³L²⁶⁴G²⁶⁵A²⁶⁶V²⁶⁷E²⁶⁸I²⁶⁹L²⁷⁰D²⁷¹S²⁷²Y²⁷³Y²⁷⁴Q²⁷⁵R²⁷⁶L²⁷⁷H²⁷⁸R²⁷⁹L²⁸⁰R²⁸¹A²⁸²E²⁸³Q²⁸⁴M²⁸⁵A²⁸⁶S²⁸⁷Y²⁸⁸F²⁸⁹G²⁹⁰H²⁹¹S²⁹²V²⁹³A²⁹⁴V²⁹⁵T²⁹⁶D²⁹⁷V²⁹⁸N²⁹⁹G³⁰⁰D³⁰¹G³⁰²R³⁰³H³⁰⁴D³⁰⁵L³⁰⁶L³⁰⁷V³⁰⁸G³⁰⁹A³¹⁰P³¹¹L³¹²Y³¹³M³¹⁴E³¹⁵S³¹⁶R³¹⁷A³¹⁸D³¹⁹R³²⁰K³²¹L³²²A³²³E³²⁴V³²⁵G³²⁶R³²⁷V³²⁸Y³²⁹L³³⁰F³³¹L³³²Q³³³P³³⁴R³³⁵G³³⁶P³³⁷H³³⁸A³³⁹L³⁴⁰G³⁴¹A³⁴²P³⁴³S³⁴⁴L³⁴⁵L³⁴⁶L³⁴⁷T³⁴⁸G³⁴⁹T³⁵⁰Q³⁵¹L³⁵²Y³⁵³G³⁵⁴R³⁵⁵F³⁵⁶G³⁵⁷S³⁵⁸A³⁵⁹I³⁶⁰A³⁶¹P³⁶²L³⁶³G³⁶⁴D³⁶⁵L³⁶⁶D³⁶⁷R³⁶⁸D³⁶⁹G³⁷⁰Y³⁷¹N³⁷²D³⁷³I³⁷⁴A³⁷⁵V³⁷⁶A³⁷⁷A³⁷⁸P³⁷⁹Y³⁸⁰G³⁸¹G³⁸²P³⁸³S³⁸⁴G³⁸⁵R³⁸⁶G³⁸⁷Q³⁸⁸V³⁸⁹L³⁹⁰V³⁹¹F³⁹²L³⁹³G³⁹⁴Q³⁹⁵S³⁹⁶E³⁹⁷G³⁹⁸L

399R 400S 401R 402P 403S 404Q 405V 406L 407D 408S 409P 410F 411P 412T 413G 414S
415A 416F 417G 418F 419S 420L 421R 422G 423A 424V 425D 426I 427D 428D 429N 430G
431Y 432P 433D 434L 435I 436V 437G 438A 439Y 440G 441A 442N 443Q 444V 445A
446V 447Y 448R 449A 450Q 451P 452V 453V 454K 455A 456S 457V 458Q 459L 460L
461V 462Q 463D 464S 465L 466N 467P 468A 469V 470K 471S 472C 473V 474L 475P
476Q 477T 478K 479T 480P 481V 482S 483C 484F 485N 486I 487Q 488M 489C 490V
491G 492A 493T 494G 495H 496N 497I 498P 499Q 500K 501L 502S 503L 504N 505E
506A 507L 508Q 509L 510D 511R 512Q 513K 514P 515R 516Q 517G 518R 519R 520V 521L
522L 523L 524G 525S 526Q 527Q 528A 529G 530T 531T 532L 533N 534L 535D
536L 537G 538G 539K 540H 541S 542P 543I 544C 545H 546T 547T 548M 549A 550F 551L
552R 553D 554E 555A 556D 557F 558R 559D 560K 561L 562S 563P 564I 565V 566L 567S
568L 569N 570V 571S 572L 573P 574P 575T 576E 577A 578G 579M 580A 581P 582A 583V
584V 585L 586H 587G 588D 589T 590H 591V 592Q 593E 594Q 595T 596R 597I 598V 599
L 600D 601C 602G 603E 604D 605D 606V 607C 608V 609P 610Q 611L 612Q 613L 614T
615A 616S 617V 618T 619G 620S 621P 622L 623L 624V 625G 626A 627D 628N 629V 630L
631E 632L 633Q 634M 635D 636A 637A 638N 639E 640G 641E 642G 643A 644Y 645E
646A 647E 648L 649A 650V 651H 652L 653P 654Q 655G 656A 657H 658Y 659M 660R
661A 662L 663S 664N 665V 666E 667G 668F 669E 670R 671L 672I 673C 674N 675Q
676K 677K 678E 679N 680E 681T 682R 683V 684V 685L 686C 687E 688L 689G 690N 691P
692M 693K 694K 695N 696A 697Q 698I 699G 700I 701A 702M 703L 704V 705S 706V
707G 708N 709L 710E 711E 712A 713G 714E 715S 716V 717S 718F 719Q 720L 721Q 722I
723R 724S 725K 726N 727S 728Q 729N 730P 731N 732S 733K 734I 735V 736L 737L
738D 739V 740P 741V 742R 743A 744E 745A 746Q 747V 748E 749L 750R 751G 752N
753S 754F 755P 756A 757S 758L 759V 760V 761A 762A 763E 764E 765G 766E 767R 768E
769Q 770N 771S 772L 773D 774S 775W 776G 777P 778K 779V 780E 781H 782T 783Y
784E 785L 786H 787N 788N 789G 790P 791G 792T 793V 794N 795G 796L 797H 798L 799
S 800I 801H 802L 803P 804G 805Q 806S 807Q 808P 809S 810D 811L 812L 813Y 814I
815L 816D 817I 818Q 819P 820Q 821G 822G 823L 824Q 825C 826F 827P 828Q 829P 830P

831V 832N 833P 834L 835K 836V 837D 838W 839G 840L 841P 842I 843P 844S 845P 846S
847P 848I 849H 850P 851A 852H 853H 854K 855R 856D 857R 858R 859Q 860I 861F
862L 863P 864E 865P 866E 867Q 868P 869S 870R 871L 872Q 873D 874P 875V 876L 877V
878S 879C 880D 881S 882A 883P 884C 885T 886V 887V 888Q 889C 890D 891L 892Q
893E 894M 895A 896R 897G 898Q 899R 900A 901M 902V 903T 904V 905L 906A 907F
908L 909W 910L 911P 912S 913L 914Y 915Q 916R 917P 918L 919D 920Q 921F 922V 923L
924Q 925S 926H 927A 928W 929F 930N 931V 932S 933S 934L 935P 936Y 937A 938V 939
P 940P 941L 942S 943L 944P 945R 946G 947E 948A 949Q 950V 951W 952T 953Q 954L
955L 956R 957A 958L 959E 960E 961R 962

Διαμεμβρανικό τμήμα :

A 963I 964P 965I 966W 967W 968V 969L 970V 971G 972V 973L 974G 975G 976L 977L
978L 979L 980T 981I 982L 983V 984L 985A 986M 987W 988

Ενδοκυττάριο τμήμα

K 989V 990G 991F 992F 993K 994R 995N 996R 997P 998P 999L 1000E 1001E 1002D 1003D
1004E 1005E 1006G 1007E 1008

Στοιχεία αλληλουχίας [74]

- * βαριά αλυσίδα
- * ελαφριά αλυσίδα
- 7 αμινοτελικές επαναλήψεις :
 - 1) 16-76
 - 2) (δεν έχει προσδιοριστεί)
 - 3) (δεν έχει προσδιοριστεί)

- 4) 232-285
- 5) 286-353
- 6) 354-413
- 7) 414-466
- Πιθανά πεδία δέσμευσης ιόντων Ca^{2+} :
 - 1) 243-251
 - 2) 297-305
 - 3) 365-373
 - 4) 426-434
- Μοτίβο GFFKR :
991-995
- Δισουλφιδικοί δεσμοί :
 - 1) 56-65
 - 2) 107-130
 - 3) 146-167
 - 4) 473-484
 - 5) 490-545
 - 6) 602-608
 - 7) 674-687
 - 8) 826-880 (διαμοριακός)
 - 9) 885-890
- Γλυκοζυλίωση :
 - 1) 15, N-linked (GlcNAc...)
 - 2) 249, N-linked (GlcNAc...)
 - 3) 570, N-linked (GlcNAc...)
 - 4) 680, N-linked (GlcNAc...)
 - 5) 847, O-linked (GalNAc...)
 - 6) 931, N-linked (GlcNAc...)

- Πολυμορφισμοί:

- 1) 9, TPI
- 2) 145, PIA [στην θρομβασθένεια Glanzman(GT) βλάπτει την επιφανειακή έκφραση της $\alpha_{IIb}\beta_3$ και προκαλεί απώλεια της δέσμευσης προσδέτη στην ενεργοποιημένη ιντεγκρίνη]
- 3) 145, PIL [στην θρομβασθένεια Glanzman(GT), βλάπτει την επιφανειακή έκφραση της $\alpha_{IIb}\beta_3$]
- 4) 242, GID [στην θρομβασθένεια Glanzman(GT), αλλάζει την διαμόρφωση της $\alpha_{IIb}\beta_3$ βλάπτοντας έτσι την ενδοκυττάρια μεταφορά]
- 5) 289, FIS [στην θρομβασθένεια Glanzman(GT)τύπου I, βλάπτει την επιφανειακή έκφραση της $\alpha_{IIb}\beta_3$]
- 6) 324, EIK [στην θρομβασθένεια Glanzman(GT)τύπου I, βλάπτει την επιφανειακή έκφραση της $\alpha_{IIb}\beta_3$]
- 7) 327, PIH [στην θρομβασθένεια Glanzman(GT)τύπου II]
- 8) 418, GID [στην θρομβασθένεια Glanzman(GT)τύπου I]
- 9) 747, QIP [στην θρομβασθένεια Glanzman(GT)τύπου II]
- 10) 843, FIS
- 11) 937, YIN

Υπομονάδα β_3

Στο εξωκυττάριο τμήμα της β_3 υπομονάδας, κοντά στο αμινοτελικό άκρο, βρίσκεται ένα διατηρημένο, μεταξύ των β υπομονάδων, πεδίο. Το διατηρημένο πεδίο, αποτελείται από περίπου 250 αμινοξέα, η δομή του σχετίζεται με τη δομή του I πεδίου της α_{IIb} υπομονάδας [90] και εμπλέκεται στη δέσμευση κατιόντων και προσδέτη και έχει έτσι σημαντικό ρόλο στη λειτουργία της ιντεγκρίνης. Η προταθείσα περιοχή αυτού του συντηρημένου πεδίου αντιστοιχεί στα κατάλοιπα 95-400 [91].

Ισχυρές ενδείξεις για τη σημασία αυτής της περιοχής της β_3 στη δέσμευση του προσδέτη προέρχονται από παρατηρήσεις ότι, α) τα RGD περιέχοντα πεπτίδια συνδέονται σε αυτήν την περιοχή, β) μεταλλάξεις σε αυτή την περιοχή οδηγούν σε απώλεια της ικανότητας δέσμευσης προσδέτη και γ) αρκετά αντισώματα που αναστέλλουν την δέσμευση προσδέτη χαρτογραφούνται σε αυτήν την περιοχή [92].

Εντός του συντηρημένου πεδίου οι διακριτές περιοχές της β_3 που εμπλέκονται στη λειτουργία δέσμευσης προσδέτη είναι οι εξής:

1) Περιοχή $D^{109}-E^{171}$

Στην περιοχή $D^{109}-E^{171}$ [93] συνδέονται τα πεπτίδια που περιέχουν την αλληλουχία RGD. Ακόμη μονοκλωνικά αντισώματα ειδικά για την περιοχή $D^{109}-E^{171}$ αναστέλλουν τη δέσμευση προσδέτη και την συσσώρευση των αιμοπεταλίων [94,95]. Αντικατάσταση του D^{109} από Tyr οδηγεί στην πλήρη απώλεια ικανότητας δέσμευσης προσδέτη [86,96] η οποία θεωρείται ότι οφείλεται σε απώλεια δεσμευμένου κατιόντος λόγω της αντικατάστασης [96]. Η παρατήρηση αυτή οδηγεί στην υπόθεση ότι αυτή η περιοχή ίσως είναι μέρος ενός πεδίου δέσμευσης κατιόντος [86]. Το κατάλοιπο D^{109} είναι απολύτως διατηρημένο μεταξύ των β υπομονάδων και ίσως παίζει ρόλο στην δέσμευση προσδέτη. Ακόμη, η αντικατάσταση αυτού του καταλοίπου εξασκεί αρνητικές επιδράσεις που αναστέλλουν την δέσμευση προσδετών που περιέχουν ή δεν περιέχουν την αλληλουχία RGD κάτι που σημαίνει ότι αυτό το κατάλοιπο ίσως έχει ρόλο και σε ένα γενικότερο μηχανισμό δέσμευσης προσδέτη.

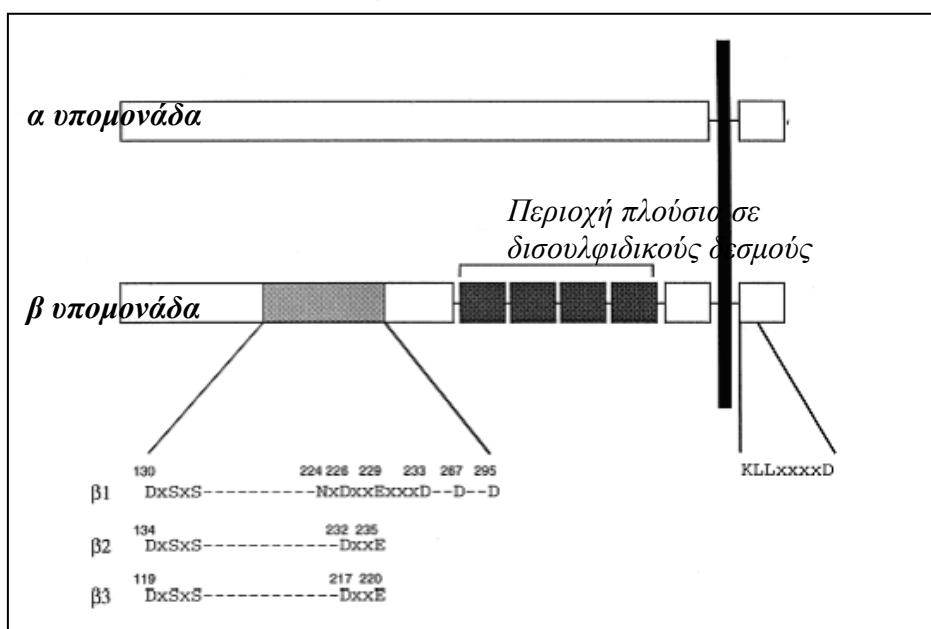
2) Περιοχή $S^{211}-G^{222}$

Η περιοχή $S^{211}-G^{222}$ πιθανώς αλληλεπιδρά με προσδέτη. Πεπτίδια με αυτή την αλληλουχία δεσμεύουν το ινωδογόνο και αναστέλλουν την δέσμευση αυτού στην $\alpha_{IIb}\beta_3$ [97]. Ακόμη δυο φυσικές μεταλλάξεις του υποδοχέα που περιέχουν αντικαταστάσεις της R^{214} , παρουσιάζουν απώλεια της ικανότητας

δέσμευσης προσδέτη [98,99] κάτι που σημαίνει ότι αυτή η περιοχή εμπλέκεται στη λειτουργία του υποδοχέα.

3) Το μέσο τμήμα της β_3

Το μέσο τμήμα της β_3 είναι διατηρημένο μεταξύ των β υπομονάδων και εμφανίζει μερικά δομικά και λειτουργικά χαρακτηριστικά ενός I πεδίου των α υπομονάδων [80,100-102]. Επιπρόσθετα, το DXSXS μοτίβο βρίσκεται σε όλες τις γνωστές β υπομονάδες και υπάρχουν στοιχεία για την πιθανή συμμετοχή του σε πεδίο MIDAS και για τη λειτουργική σημασία αυτού στην δέσμευση προσδέτη [80,103-106].

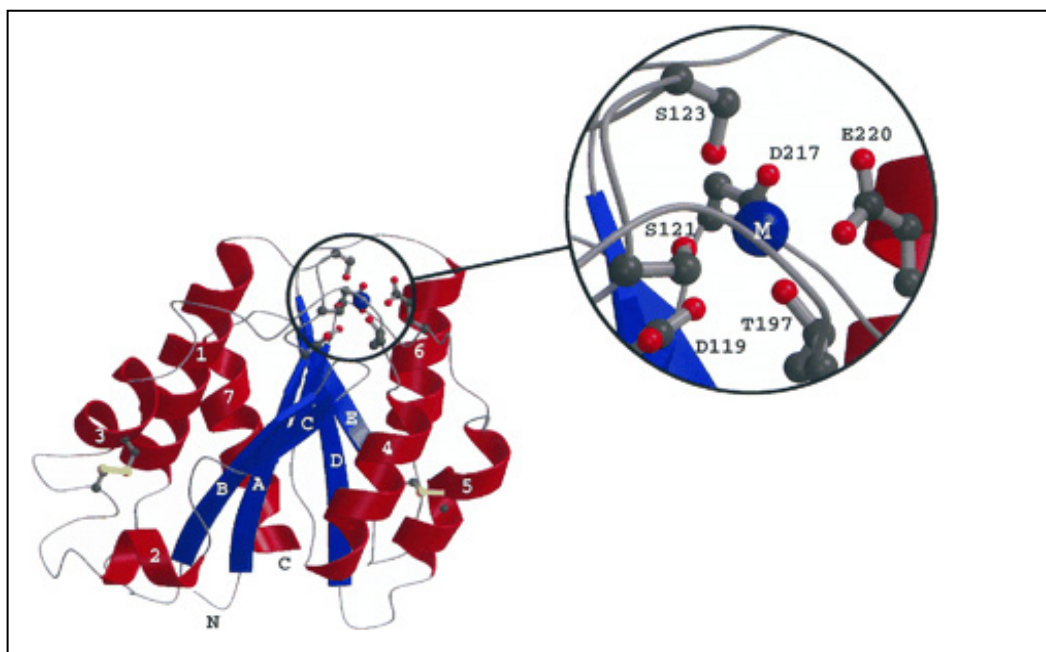


Εικόνα 25 Τα κατάλοιπα που σημειώνονται στην εξωκυττάρια β υπομονάδα θεωρείται ότι σχηματίζουν το πεδίο MIDAS. Τα κατάλοιπα που σημειώνονται στην ενδοκυττάρια β υπομονάδα σχηματίζουν γέφυρα άλατος με γειτονικά κατάλοιπα της α υπομονάδας κάτι που φαίνεται ότι σταθεροποιεί την λανθάνουσα ανενεργή κατάσταση της ιντεγκρίνης.

Η asp119, ser121 και η ser123 της β_3 συνθέτουν μια αλληλουχία DSXSXS η οποία είναι απολύτως διατηρημένη μεταξύ των β υπομονάδων. Η εξάρτηση της λειτουργίας της ιντεγκρίνης από τα δισθενή κατιόντα μαζί με

την συντήρηση αυτών των λειτουργικά σημαντικών κατάλοιπων αποτελεί βάση ώστε να υποθέσουμε ότι οι προσδέτες αλληλεπιδρούν με δισθενή κατιόντα που είναι δεσμευμένα σε αυτό το υψηλά συντηρημένο πεδίο των β υπομονάδων [86].

Η αλληλουχία $^{119}\text{DSXSXS}$ αποτελεί μέρος του θεωρούμενου πεδίου MIDAS (εικ.26) [80,81]. Σημειώνεται ότι υπάρχουν σημαντικές διαφορές μεταξύ των καταλοίπων που συμπληρώνουν την οκταεδρική γεωμετρία των κατιόντων των μετάλλων στις υπομονάδες α_{IIb} και β_3 στο πεδίο MIDAS της πρώτης και το θεωρούμενο πεδίο MIDAS της δεύτερης. Ενώ η πρώτη και τρίτη ομάδα καταλοίπων είναι η ίδια εντούτοις δεν υπάρχει περιοχή της β_3 όμοια με τη δεύτερη ομάδα καταλοίπων της α_{IIb} . Σημειώνεται ότι η β_3 περιέχει στο θεωρούμενο πεδίο MIDAS δυο δισουλφιδικούς δεσμούς οι οποίοι δεν υπάρχουν στην α_{IIb} . [107].



Εικόνα 26 Απεικόνιση μοτίβου MIDAS εντός της περιοχής 105-325 της β_3 υπομονάδας. Η μεγεθυμένη εικόνα αντιπροσωπεύει το μοτίβο MIDAS, τα μόρια οξυγόνου είναι σημειωμένα με κόκκινο χρώμα και τα δισθενή κατιόντα δεσμεύονται στην κυκλική περιοχή (M) που είναι σημειωμένη με μπλε χρώμα

4) Κάθε β υπομονάδα περιέχει την αλληλουχία ²¹⁷DXPE. Το E της αλληλουχίας θεωρείται ότι παίζει ρόλο στη διαμόρφωση της ιντεγκρίνης. Η αλληλουχία θεωρείται σημαντική και θεωρείται τμήμα περιοχής στην οποία δεσμεύεται προσδέτης κάτι που ενισχύεται από το ότι τα πεπτίδια 211-222 και 217-231 αναστέλλουν τη δέσμευση προσδέτη στην ιντεγκρίνη [108,109].

Συνοπτικά, οι αλληλουχίες DXPE και DXSXS ίσως σχηματίζουν πεδίο δέσμευσης μετάλλου το οποίο να αποτελεί τμήμα περιοχής στην οποία δεσμεύεται προσδέτης.

Το μέσο τμήμα της β3 (95-400) περιέχει δυο κατηγορίες πεδίων δέσμευσης ιόντος μετάλλου [86,107,110]. Στην μια κατηγορία (ligand competent site, LC site) το πεδίο πρέπει να φέρει δεσμευμένο ιόν μετάλλου ώστε να δεσμευτεί ο προσδέτης ενώ στην άλλη κατηγορία (inhibitory site, I site) το πεδίο όταν φέρει δεσμευμένο ιόν Ca^{2+} εμποδίζει τη δέσμευση προσδέτη. Αυτά τα δυο πεδία επιδεικνύουν εξειδίκευση για κατιόντα, το πρώτο(LC) για Ca^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} ενώ το δεύτερο(I) μόνο για Ca^{2+} [111].

Τα κατάλοιπα D¹¹⁹ και D²¹⁷ βρίσκονται σε LC πεδία. Το LC πεδίο περιέχει την DXSXS και το D²¹⁷ και το I πεδίο περιέχει το τμήμα 301-373. Τα LC πεδία υποστηρίζουν τη δέσμευση προσδέτη ενώ τα I πεδία την αναστέλλουν. Έτσι, ο συντονισμός μεταξύ των δυο τάξεων πεδίων δέσμευσης κατιόντων ρυθμίζει τη δέσμευση του προσδέτη [91].

Αλληλουχία αμινοξέων της υπομοναδας β₃ [75]

Εξωκυττάριο τμήμα:

G¹P²N³I⁴C⁵T⁶T⁷R⁸G⁹V¹⁰S¹¹S¹²C¹³Q¹⁴Q¹⁵C¹⁶L¹⁷A¹⁸V¹⁹S²⁰P²¹M²²C²³A²⁴W²⁵C²⁶S²⁷D²⁸E²⁹A³⁰L³¹P³²L³³G³⁴S³⁵P³⁶R³⁷C³⁸D³⁹L⁴⁰K⁴¹E⁴²N⁴³L⁴⁴L⁴⁵K⁴⁶D⁴⁷N⁴⁸C⁴⁹A⁵⁰P⁵¹E⁵²S⁵³I⁵⁵E⁵⁵F⁵⁶P⁵⁷V⁵⁸S⁵⁹E⁶⁰A⁶¹R⁶²V⁶³L⁶⁴E⁶⁵D⁶⁶R⁶⁷P⁶⁸L⁶⁹S⁷⁰D⁷¹K⁷²G⁷³S⁷⁴G⁷⁵D⁷⁶S⁷⁷S⁷⁸Q⁷⁹V⁸⁰T⁸¹Q⁸²V⁸³S⁸⁴P⁸⁵Q⁸⁶R⁸⁷I⁸⁸A⁸⁹L⁹⁰R⁹¹L⁹²R⁹³P⁹⁴D⁹⁵D⁹⁶S⁹⁷K⁹⁸N⁹⁹F¹⁰⁰S¹⁰¹I¹⁰²Q¹⁰³V¹⁰⁴R¹⁰⁵Q¹⁰⁶V¹⁰⁷E¹⁰⁸D¹⁰⁹Y¹¹⁰P¹¹¹V¹¹²D¹¹³I¹¹⁴Y¹¹⁵Y¹¹⁶L¹¹⁷M¹¹⁸D¹¹⁹L¹²⁰S¹²¹Y¹²²S¹²³M¹²⁴K¹²⁵D¹²⁶D¹²⁷L¹²⁸W¹²⁹S¹³⁰I¹³¹Q¹³²N¹³³L¹³⁴G¹³⁵T¹³⁶K¹³⁷L¹³⁸A¹³⁹T¹⁴⁰Q¹⁴¹M¹⁴²R¹⁴³K¹⁴⁴L¹⁴⁵T¹⁴⁶S¹⁴⁷N¹⁴⁸L¹⁴⁹R¹⁵⁰I¹⁵¹G¹⁵²F¹⁵³G¹⁵⁴A¹⁵⁵F¹⁵⁶V¹⁵⁷D¹⁵⁸K¹⁵⁹P¹⁶⁰V¹⁶¹S¹⁶²P¹⁶³Y¹⁶⁴M¹⁶⁵Y¹⁶⁶I¹⁶⁷S¹⁶⁸P¹⁶⁹P¹⁷⁰E¹⁷¹A¹⁷²L¹⁷³E¹⁷⁴N¹⁷⁵P¹⁷⁶C¹⁷⁷Y¹⁷⁸D¹⁷⁹M¹⁸⁰K¹⁸¹T¹⁸²T¹⁸³C¹⁸⁴L¹⁸⁵P¹⁸⁶M¹⁸⁷F¹⁸⁸G¹⁸⁹Y¹⁹⁰K¹⁹¹H¹⁹²V¹⁹³L¹⁹⁴T¹⁹⁵L¹⁹⁶T¹⁹⁷D¹⁹⁸Q¹⁹⁹V²⁰⁰T²⁰¹R²⁰²F²⁰³N²⁰⁴E²⁰⁵E²⁰⁶V²⁰⁷K²⁰⁸K²⁰⁹Q²¹⁰S²¹¹V²¹²S²¹³R²¹⁴N²¹⁵R²¹⁶D²¹⁷A²¹⁸P²¹⁹E²²⁰G²²¹G²²²F²²³D²²⁴A²²⁵I²²⁶M²²⁷Q²²⁸A²²⁹T²³⁰V²³¹C²³²D²³³E²³⁴K²³⁵I²³⁶G²³⁷W²³⁸R²³⁹N²⁴⁰D²⁴¹A²⁴²S²⁴³H²⁴⁴L²⁴⁵L²⁴⁶V²⁴⁷F²⁴⁸T²⁴⁹T²⁵⁰D²⁵¹A²⁵²K²⁵³T²⁵⁴H²⁵⁵I²⁵⁶A²⁵⁷L²⁵⁸D²⁵⁹G²⁶⁰R²⁶¹L²⁶²A²⁶³G²⁶⁴I²⁶⁵V²⁶⁶Q²⁶⁷P²⁶⁸N²⁶⁹D²⁷⁰G²⁷¹Q²⁷²C²⁷³H²⁷⁴V²⁷⁵G²⁷⁶S²⁷⁷D²⁷⁸N²⁷⁹H²⁸⁰Y²⁸¹S²⁸²A²⁸³S²⁸⁴T²⁸⁵T²⁸⁶M²⁸⁷D²⁸⁸Y²⁸⁹P²⁹⁰S²⁹¹L²⁹²G²⁹³L²⁹⁴M²⁹⁵T²⁹⁶E²⁹⁷K²⁹⁸L²⁹⁹S³⁰⁰Q³⁰¹K³⁰²N³⁰³I³⁰⁴N³⁰⁵L³⁰⁶I³⁰⁷F³⁰⁸A³⁰⁹V³¹⁰T³¹¹E³¹²N³¹³V³¹⁴V³¹⁵N³¹⁶L³¹⁷Y³¹⁸Q³¹⁹N³²⁰Y³²¹S³²²E³²³L³²⁴I³²⁵P³²⁶G³²⁷T³²⁸T³²⁹V³³⁰G³³¹V³³²L³³³S³³⁴M³³⁵D³³⁶S³³⁷S³³⁸N³³⁹V³⁴⁰L³⁴¹Q³⁴²L³⁴³I³⁴⁴V³⁴⁵D³⁴⁶A³⁴⁷Y³⁴⁸G³⁴⁹K³⁵⁰I³⁵¹R³⁵²S³⁵³K³⁵⁴V³⁵⁵E³⁵⁶L³⁵⁷E³⁵⁸V³⁵⁹R³⁶⁰D³⁶¹L³⁶²P³⁶³E³⁶⁴E³⁶⁵L³⁶⁶S³⁶⁷L³⁶⁸S³⁶⁹F³⁷⁰N³⁷¹A³⁷²T³⁷³C³⁷⁴L³⁷⁵N³⁷⁶N³⁷⁷E³⁷⁸V³⁷⁹I³⁸⁰P³⁸¹G³⁸²L³⁸³K³⁸⁴S³⁸⁵C³⁸⁶M³⁸⁷G³⁸⁸L³⁸⁹K³⁹⁰I³⁹¹G³⁹²D³⁹³T³⁹⁴V³⁹⁵S³⁹⁶F³⁹⁷S³⁹⁸I³⁹⁹E⁴⁰⁰A⁴⁰¹K⁴⁰²V

403R 404G 405C 406P 407Q 408E 409K 410E 411K 412S 413F 414T 415I 416K 417P 418V
419G 420F 421K 422D 423S 424L 425I 426V 427Q 428V 429T 430F 431D 432C 433D
434C 435A 436C 437Q 438A 439Q 440A 441E 442P 443N 444S 445H 446R 447C 448N
449N 450G 451N 452G 453T 454F 455E 456C 457G 458V 459C 460R 461C 462G 463P 464G
465W 466L 467G 468S 469Q 470C 471E 472C 473S 474E 475E 476D 477Y 478R 479P
480S 481Q 482Q 483D 484E 485C 486S 487P 488R 489E 490G 491Q 492P 493V 494C 495S
496Q 497R 498G 499E 500C 501L 502C 503G 504Q 505C 506V 507C 508H 509S 510S 511D
512F 513G 514K 515I 516T 517G 518K 519Y 520C 521E 522C 523D 524D 525F 526S 527C
528V 529R 530Y 531K 532G 533E 534M 535C 536S 537G 538H 539G 540Q 541C 542S
543C 544G 545D 546C 547L 548C 549D 550S 551D 552W 553T 554G 555Y 556Y 557C
558N 559C 560T 561T 562 563T 564D 565T 566C 567M 568S 569S 570N 571G 572L 573L
574C 575S 576G 577R 578G 579K 580C 581E 582C 583G 584S 585C 586V 587C 588I 589Q
590P 591G 592S 593Y 594G 595D 596T 597C 598E 599K 600C 601P 602T 603C 604P 605D
606A 607C 608T 609F 610K 611K 612E 613C 614V 615E 616C 617K 618K 619F 620D 621R
622G 623A 624L 625H 626D 627E 628N 629T 630C 631N 632R 633Y 634C 635R 636D
637E 638I 639E 640S 641V 642K 643E 644L 645K 646D 647T 648G 649K 650D 651A 652V
653N 654C 655T 656Y 657K 658N 659E 660D 661D 662C 663V 664V 665R 666F 667Q
668Y 669Y 670E 671D 672S 673S 674G 675K 676S 677I 678L 679Y 680V 681V 682E 683E
684P 685E 686C 687P 688K 689G 690P 691D 692

Διαμεμβρανικό τμήμα :

I 693L 694V 695V 696L 697L 698S 699V 700M 701G 702A 703I 704L 705L 706I 707G
708L 709A 710A 711L 712L 713I 714W 715

Ενδοκυττάριο τμήμα :

K⁷¹⁶ L⁷¹⁷ L⁷¹⁸ I⁷¹⁹ T⁷²⁰ I⁷²¹ H⁷²² D⁷²³ R⁷²⁴ K⁷²⁵ E⁷²⁶ F⁷²⁷ A⁷²⁸ K⁷²⁹ F⁷³⁰ E⁷³¹ E⁷³² E⁷³³ R⁷³⁴ A⁷³⁵ R⁷³⁶ A⁷³⁷ K⁷³⁸ W⁷³⁹ D⁷⁴⁰ T⁷⁴¹ A⁷⁴² N⁷⁴³ N⁷⁴⁴ P⁷⁴⁵ L⁷⁴⁶ Y⁷⁴⁷ K⁷⁴⁸ E⁷⁴⁹ A⁷⁵⁰ T⁷⁵¹ S⁷⁵² T⁷⁵³ F⁷⁵⁴ T⁷⁵⁵ N⁷⁵⁶ I⁷⁵⁷ T⁷⁵⁸ Y⁷⁵⁹ R⁷⁶⁰ G⁷⁶¹ T⁷⁶²

Στοιχεία αλληλουχίας [75]

- * συντηρημένη περιοχή των β υπομοναδων
- * με πράσινο υποδεικνύεται η περιοχή 437-603 που είναι πλούσια σε ΚΥΣΤΕΙΝΕΣ
- 4 επαναλήψεις διαταγμένες σε σειρά, πλούσιες σε κυστεΐνη :
 - 1) 437-485
 - 2) 486-527
 - 3) 528-566
 - 4) 567-603
- 28 δισουλφιδικό δεσμοί:
 - 1) 5-435
 - 2) 13-23
 - 3) 16-49
 - 4) 26-38
 - 5) 177-184
 - 6) 232-273
 - 7) 374-386
 - 8) 406-655
 - 9) 433-437
 - 10) 448-460
 - 11) 457-495

12)462-471

13)473-486

14)501-506

15)503-536

16)508-521

17)523-528

18)542-547

19)544-575

20) 549-558

21)560-567

22) 581-595

23) 583-631

24) 588-598

25) 601-6074

26) 608-617

27) 614-687

28) 635-663

- Γλυκοζυλίωση:

1) 99, N-linked (GLCNAC...)

2) 320, N-linked (GLCNAC...)

3) 371, N-linked (GLCNAC...)

4) 452, N-linked (GLCNAC...)

5) 559, N-linked (GLCNAC...)

6) 654, N-linked (GLCNAC...)

- Φωσφορυλίωση

1) 747

2) 759

- Πολυμορφισμοί:

- 1) 33, L P
- 2) 117, L W [στην θρομβασθένεια Glanzman(GT)]
- 3) 119, D Y [στην θρομβασθένεια Glanzman(GT) τύπου Β]
- 4) 143, R Q
- 5) 162, S L [στην θρομβασθένεια Glanzman(GT) τύπου ΙΙ]
- 6) 214, R Q [στην θρομβασθένεια Glanzman(GT) τύπου Β]
- 7) 214, R W [στην θρομβασθένεια Glanzman(GT), strasbourg-1]
- 8) 280, H P [στην θρομβασθένεια Glanzman(GT)]
- 9) 374, C Y [στην θρομβασθένεια Glanzman(GT)]
- 10) 407, P A
- 11) 427, V I
- 12) 489, R Q
- 13) 542, C R [στην θρομβασθένεια Glanzman(GT) τύπου Ι]
- 14) 560, C F [στην θρομβασθένεια Glanzman(GT)]
- 15) 572, G S [στην θρομβασθένεια Glanzman(GT)]
- 16) 579, G S [στην θρομβασθένεια Glanzman(GT) τύπου ΙΙ]
- 17) 636, R C
- 18) 752, S P [στην θρομβασθένεια Glanzman(GT), strasbourg-1]

2.5 Δομή ινωδογόνου

Το ινωδογόνο, ο κύριος φυσιολογικός προσδέτης της $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ είναι ένα διμερές μόριο αποτελούμενο από ζεύγη Αα, Ββ και γ αλυσίδων οι οποίες είναι διπλωμένες σε τρία κομβικά πεδία. Το κεντρικό πεδίο περιέχει το δισουλφιδικά συνδεδεμένο αμινοτελικό άκρο όλων των 6 αλυσίδων και κάθε πλευρικό πεδίο περιέχει το καρβοξυτελικό άκρο της μιας Ββ και της μιας γ αλυσίδας. Ακόμη, το καρβοξυτελικό άκρο της Αα εκτείνεται από κάθε πλευρικό πεδίο και διπλώνει πίσω και πάνω στον κεντρικό κόμβο [112].

Τα πεπτίδια που αντιστοιχούν στα καρβοξυτελικά 10-15 αμινοξέα της γ αλυσίδας του ινωδογόνου ή που περιέχουν την αλληλουχία RGD (arg-gly-asp) η οποία βρίσκεται σε δυο σημεία στην α αλυσίδα του ινωδογόνου, αναστέλλουν τη συσσώρευση των αιμοπεταλίων καθώς και την αλληλεπίδραση της $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ με καθένα από τους πρωτεϊνικούς προσδέτες [113,114]. Και η α και η β υπομονάδα συνεισφέρουν στην ικανότητα δέσμησης προσδέτη της ιντεγκρινης $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ [83].

Η ετεροδιμερής ιντεγκρίνη $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$, αλλά όχι η κάθε υπομονάδα της ξεχωριστά, περιέχει πεδία δέσμησης για το ινωδογόνο τα οποία εκφράζονται μετά την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων [115,116]. Η συσσώρευση των αιμοπεταλίων πιστεύεται ότι συμβαίνει όταν το ινωδογόνο δεσμεύεται στην $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ γειτονικών ενεργοποιημένων αιμοπεταλίων συνδέοντας τα αιμοπετάλια προς σχηματισμό συσσωρεύματος.

Η πρώτη αλληλουχία του ινωδογόνου που αναγνωρίζεται εξειδικευμένα από την α υπομονάδα και η οποία έχει εξέχουσα σημασία για τη λειτουργία της GPIIbIIIa είναι το καρβοξυτελικό άκρο της γ αλυσίδας του ινωδογόνου [117].

Η δεύτερη αλληλουχία του ινωδογόνου που αναγνωρίζεται εξειδικευμένα από την β υπομονάδα είναι η RGD

Κάθε αλληλουχία περιέχει ένα αμινοξύ D το οποίο είναι σημαντικό για την αναγνώριση από την ιντεγκρίνη, μάλλον μέσω αλληλεπίδρασης με κατιόν ήδη δεσμευμένο στην ιντεγκρίνη [86].

Στην πράξη, όλοι οι προσδέτες των ιντεγκρινών περιέχουν ένα σημαντικό καρβοξύλιο (συνήθως από ένα ασπαρτικό ή γλουταμινικό) ως χαρακτηριστικό-κλειδί στα μοτίβα τους με τα οποία δεσμεύονται στις ιντεγκρίνες. Πιστεύεται ότι, κατά τη δέσμευση το σημαντικό καρβοξύλιο του προσδέτη συμπληρώνει την οκταεδρική γεωμετρία ενός ιόντος μετάλλου στο πεδίο δέσμευσης προσδέτη του υποδοχέα. Εντούτοις, ο δεσμός κατιόντος-καρβοξυλίου ίσως δεν ευθύνεται για την ολική ενέργεια δέσμευσης. Η υπόλοιπη ενέργεια αλλά και η εξειδίκευση του προσδέτη ίσως προκύπτει από επιπρόσθετες αλληλεπιδράσεις μεταξύ συμπληρωματικών επιφανειών της ιντεγκρίνης και του προσδέτη [83].

Η δέσμευση του ινωδογόνου στην $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ περιλαμβάνει τα αμινοξέα του καρβοξυτελικού άκρου της γ αλυσίδας και την μια εκ των δυο περιοχών της Aα αλυσίδας που περιέχουν την αλληλουχία αμινοξέων RGD [114,116]. Το καρβοξυτελικό άκρο της γ αλυσίδας του ινωδογόνου (HHLGGAKQAGDV) βρίσκεται στο απομακρυσμένο κομβικό πεδίο [118], ενώ οι αλληλουχίες RGD στην Aα αλυσίδα βρίσκονται στις περιοχές 95-97 (κεντρικό κομβικό πεδίο) και 572-574 (καρβοξυτελικό πεδίο της Aα αλυσίδας) [119]. Υπάρχουν στοιχεία ότι ινωδογόνο χωρίς την αλληλουχία 572-574 διατηρεί την ικανότητα να αλληλεπιδρά με την $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ [120]. Επομένως, η αλληλεπίδραση της $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ με το ινωδογόνο συμβαίνει κυρίως μέσω της καρβοξυτελικής αλληλουχίας του ινωδογόνου.

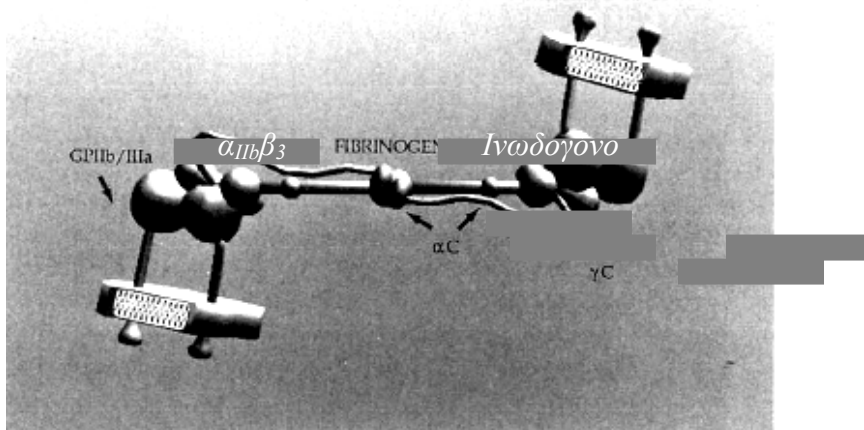
Το καρβοξυτελικό άκρο της γ αλυσίδας του ινωδογόνου είναι απαραίτητο για την αρχική δέσμευση του διαλυτού προσδέτη στην $\alpha_{\text{IIB}}\beta_3$ [121,122] αλλά μια ή και οι δύο αλληλουχίες RGD στην Aα αλυσίδα μπορούν να παρέχουν δευτερογενή σημεία σύνδεσης που χρειάζονται για την δυνατότερη δέσμευση στην $\alpha_{\text{IIB}}\beta_3$.

Σημειώνεται ότι, η αλληλεπίδραση των πεπτιδίων της γ αλυσίδας και των πεπτιδίων RGD με την $\alpha_{\text{IIB}}\beta_3$ είναι αμοιβαία αποκλειστική, δηλαδή εάν η μια τάξη πεπτιδίων δεσμευτεί στην $\alpha_{\text{IIB}}\beta_3$ τότε η άλλη τάξη δεν μπορεί να δεσμευτεί [123]. Αυτό ίσως οφείλεται στο ότι τα πεπτίδια αυτά αλληλεπιδρούν με το ίδιο ή ένα αλληλεπικαλυπτόμενο πεδίο δέσμευσης επί της ιντεγκρίνης ή ίσως δεσμεύονται σε διαφορετικά αλλά, αλλοστερικά συνδεδεμένα, πεδία [124,125].

Έτσι, το πεδίο δέσμευσης προσδέτη στην $\alpha_{\text{IIB}}\beta_3$ ίσως είναι μια επιφάνεια που περιέχει τμήματα και της α_{IIB} και της β_3 . Σε συμφωνία με τα παραπάνω, είναι πιθανό ότι το ινωδογόνο χρησιμοποιεί τις αλληλουχίες στην γ αλυσίδα παρά τις αλληλουχίες RGD για να δεσμευτεί στην $\alpha_{\text{IIB}}\beta_3$ διότι οι πρώτες είναι διαθέσιμες στην επιφάνεια του μορίου του ινωδογόνου ενώ οι δεύτερες όχι [76].

Όταν δυο μόρια $\alpha_{\text{IIB}}\beta_3$ δεσμεύονται σε ένα μόριο ινωδογόνου τότε βρίσκονται σε έναν άξονα συμμετρίας με κέντρο το κέντρο του ινωδογόνου και καθένα μόριο $\alpha_{\text{IIB}}\beta_3$ σχηματίζει γωνία 98° με το μόριο του ινωδογόνου με αποτέλεσμα η περιστροφή κατά 180° γύρω από τον άξονα συμμετρίας να φέρει το ένα μόριο $\alpha_{\text{IIB}}\beta_3$ στη θέση του άλλου [118,126]. Ακόμη, όταν το ινωδογόνο είναι δεσμευμένο στην $\alpha_{\text{IIB}}\beta_3$ του ενός αιμοπεταλίου τότε το πεδίο του ινωδογόνου που δεσμεύεται στην $\alpha_{\text{IIB}}\beta_3$ ενός άλλου αιμοπεταλίου βρίσκεται στην αντίθετη πλευρά του μορίου του ινωδογόνου και μακριά από την κυτταρική μεμβράνη του πρώτου αιμοπεταλίου. Αυτός ο προσανατολισμός του

μορίου του ινωδογόνου σε σχέση με την $\alpha_{IIb}\beta_3$ και συμφωνεί με την εκτιμηθείσα απόσταση μεταξύ των αιμοπεταλίων σε συσώρευμα η οποία είναι 25-50 nm [127,128]. Η $\alpha_{IIb}\beta_3$ εκτείνεται 18-20 nm πάνω από την κυτταρική μεμβράνη [129] ενώ το μόριο του ινωδογόνου έχει μήκος περίπου 47 nm.



Εικόνα 27 Αναπαράσταση της αλληλεπίδρασης της $\alpha_{IIb}\beta_3$ με το ινωδογόνο. Ένα μόριο ινωδογόνου φέρει δεσμευμένα δυο μόρια $\alpha_{IIb}\beta_3$. Τα κυτοπλασμικά άκρα των μορίων $\alpha_{IIb}\beta_3$ είναι βυθισμένα στην κυτταρική μεμβράνη των αιμοπεταλίων. Το καρβοξυτελικό άκρο των δυο γ αλυσίδων του ινωδογόνου βρίσκεται στα δυο άκρα του μορίου. Οι αμινοτελικές RGD αλληλουχίες των $A\alpha$ αλυσίδων βρίσκονται στο κεντρικό πεδίο του ινωδογόνου. Οι καρβοξυτελικές RGD αλληλουχίες των $A\alpha$ αλυσίδων (αC) βρίσκονται στην προέκταση των $A\alpha$ αλυσίδων που είναι γειτονική με το κεντρικό πεδίο του ινωδογόνου.

Τα παραπάνω επιβεβαιώνουν ότι το πεδίο δέσμευσης προσδέτη αποτελείται από τμήματα και των δυο υπομονάδων της $\alpha_{IIb}\beta_3$ και ακόμη την αντίληψη ότι η δέσμευση μακρομοριακών προσδετών περιλαμβάνει πολλαπλά σημεία επαφής με τον υποδοχέα τους [84].

Ρόλος δισθενών κατιόντων

Η λειτουργία των ιντεγκρινών αναστέλλεται πλήρως, παρουσία EDTA, υποδεικνύοντας ότι τα δισθενή κατιόντα είναι απαραίτητα για τη λειτουργία τους. Είναι ξεκάθαρο το ότι η δέσμευση κατιόντος και η δέσμευση προσδέτη συνδέονται στενά λόγω του ότι όλες οι περιοχές της ιντεγκρίνης που εμπλέκονται στην αναγνώριση του προσδέτη βρίσκονται είτε πάνω είτε κοντά στα πεδία δέσμευσης κατιόντων [146].

Μια εξήγηση για τον σημαντικό ρόλο των κατιόντων στη λειτουργία των ιντεγκρινών είναι ότι ο προσδέτης και το δισθενές κατιόν μοιράζονται το ίδιο πεδίο δέσμευσης επί της ιντεγκρίνης. Έτσι προτάθηκε το μοντέλο εκτοπισμού, κατά το οποίο οι περιέχοντες RGD προσδέτες αρχικά σχηματίζουν ένα τριμερές σύμπλεγμα με το δεσμευμένο στην ιντεγκρίνη δισθενές κατιόν και με την ιντεγκρίνη. Μετά, όταν σταθεροποιηθούν οι επαφές μεταξύ ιντεγκρίνης και RGD, το δισθενές κατιόν μπορεί να εκτοπιστεί [84]. Έτσι σε αυτό το μοντέλο το δισθενές κατιόν μπορεί να δράσει ως γέφυρα μεταξύ προσδέτη και ιντεγκρίνης [80,147]. Ακόμη προτείνεται ότι ο ρόλος των δισθενών κατιόντων είναι να επάγουν άμεσα μια αλλαγή διαμόρφωσης η οποία χρειάζεται για τη έκθεση των περιοχών δέσμευσης των προσδετών, επί των ιντεγκρινών, και ως εκ τούτου για την μετατόπιση μιας ισορροπίας διαμόρφωσης μεταξύ ανενεργούς και ενεργούς κατάστασης, που ευνοεί την ενεργό κατάσταση.

Στις ιντεγκρίνες υπάρχουν τουλάχιστον δυο, δομικά διακριτοί, τύποι πεδίων δέσμευσης ιόντων, EF-hand like πεδία (α_{IIB} υπομονάδα) και πεδίο προσκόλλησης εξαρτώμενο από ιόν μέταλλου (MIDAS, metal ion dependent adhesion site) (α_{IIB} υπομονάδα και ίσως β_3 υπομονάδα).

EF-hand like πεδία

Τα EF-hand-like πεδία των ιντεγκρινών δεν έχουν γλουταμινικό (E) το οποίο βρίσκεται στη 12η θέση όλων των άλλων EF-hand-like πεδίων και το οποίο είναι ένας από τους προσδέτες του ασβεστίου. Η απουσία αυτού του καταλοίπου μπορεί να εξηγήσει την χαμηλότερη συγγένεια των ιντεγκρινών καθώς και την επιλεκτικότητά τους για τα δισθενή κατιόντα. Η αρχική παρατήρηση ότι οι αλληλουχίες που δεσμεύουν κατιόντα στην αIIb υπομονάδα διαφέρουν από τις κλασσικές EF hand αλληλουχίες, οδήγησε στην υπόθεση ότι ένα ασπαραγινικό (D) στις αλληλουχίες των προσδετών που αναγνωρίζουν οι ιντεγκρίνες όπως τις RGD και LDV, μπορούν να παρέχουν αυτό το κατάλοιπο που λείπει ώστε να συμπληρωθεί η οκταεδρική γεωμετρία του δισθενούς κατιόντος [85,148].

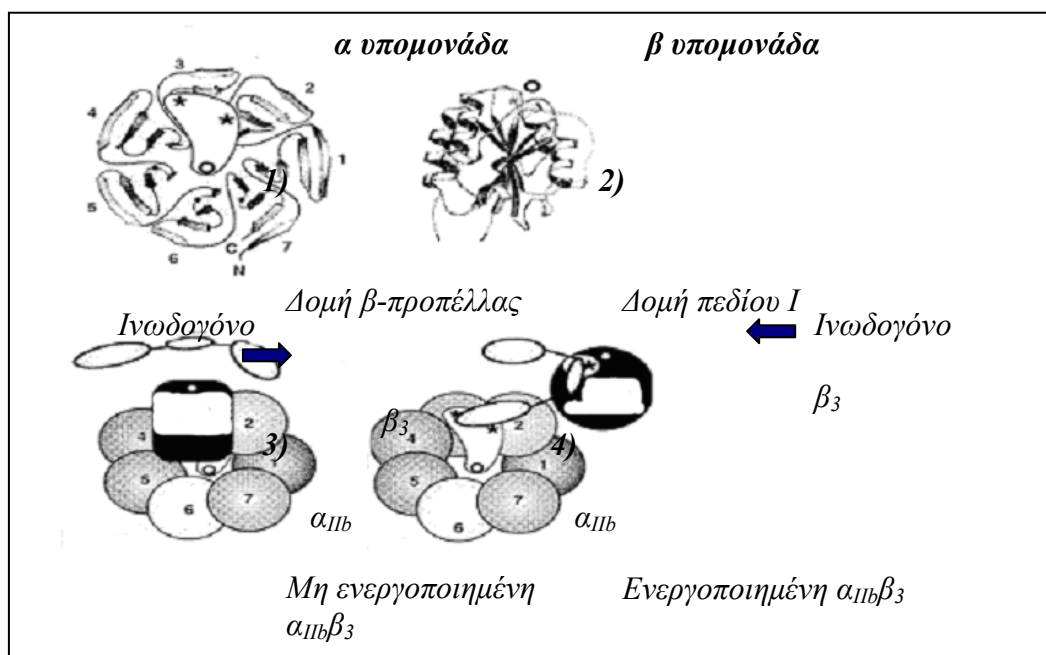
Πεδίο προσκόλλησης εξαρτώμενο από ιόν μετάλλου (MIDAS, metal ion dependent adhesion site).

Τα ιόντα μετάλλου που είναι δεσμευμένα στο MIDAS μπορούν να προσδεθούν με καρβοξύλια τα οποία προέρχονται από μια άλλη πρωτεΐνη και αυτό συμφωνεί με το μοντέλο εκτοπισμού. Το εύρημα αυτό οδήγησε στην διαπίστωση ότι οι ιντεγκρίνες δεσμεύονται με τους προσδέτες τους μέσω αλληλεπίδρασης με ένα ασπαραγινικό (D) [149].

Ενεργοποίηση της $\alpha_{IIb}\beta_3$

Στα εν ηρεμία αιμοπετάλια η περιοχή της β_3 υπομονάδας που μοιάζει με I πεδίο είναι ανίκανη να δεσμεύσει προσδέτη και παρεμποδίζει στερικά την πρόσβαση των προσδετών στο πεδίο δέσμευσης προσδέτη της α_{IIb} υπομονάδας [82]. Η ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων επάγει τη δέσμευση προσδέτη ως εξής :

- 1) προκαλώντας αλλαγή διαμόρφωσης στο I πεδίο της β_3 ώστε να εκθέσει το πεδίο δέσμευσης προσδέτη (αλλαγή τριτοταγούς δομής)
- 2) αλλάζοντας τον προσανατολισμό των υπομονάδων ώστε να αποκαλυφθεί το πεδίο δέσμευσης προσδέτη στην α_{IIb} υπομονάδα (αλλαγή τεταρτοταγούς δομής) [150,151].



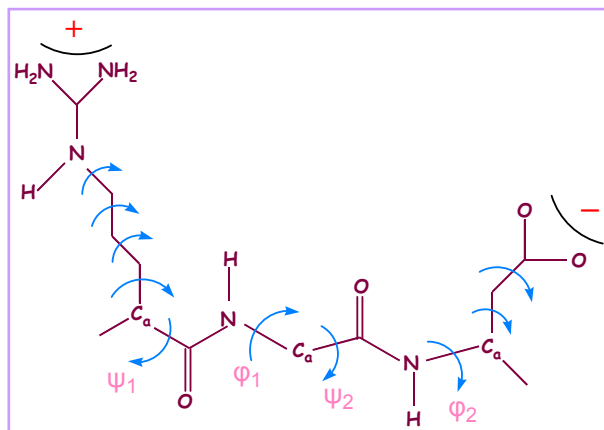
Εικόνα 28 Απεικόνιση των πιθανών αλλαγών στα εξωκυττάρια πεδία των α_{IIb} και β_3 υπομονάδων κατά την ενεργοποίηση της ιντεγκρίνης $\alpha_{IIb}\beta_3$. **1)** κάτοψη του πεδίου β προπέλας που βρίσκεται στο αμινοτελικό τμήμα της α_{IIb} . **2)** κρυσταλλική δομή I πεδίου, ένα ομόλογο του οποίου βρίσκεται στο αμινοτελικό τμήμα της β_3 . Ο : θέση δισθενών κατιόντων, * : περιοχές που πιθανώς αποτελούν περιοχές δέσμευσης προσδέτη, κορδέλες: β -πτυχωτή επιφάνεια, περιελιγμένες κορδέλες: α -έλικες [150]. Τα σχήματα **3)** και **4)** απεικονίζουν αλλαγές αυτών των πεδίων καθώς η $\alpha_{IIb}\beta_3$ μετατρέπεται από την εν ηρεμία κατάσταση στην ενεργοποιημένη κατάσταση [153].

3 RGD ανάλογα και μη RGD ανάλογα με αντιαιμοπεταλιακή δράση

3.1 Η RGD Αλληλουχία

Είναι γνωστό ότι η RGD αλληλουχία αναγνωρίζεται από τις μισές περίπου ιντεγκρίνες μέσω περιοχών πρόσδεσης και λαμβάνει μέρος σε ένα πλήθος βιολογικών διεργασιών, φυσιολογικών και παθολογικών καταστάσεων, όπως η θρόμβωση, ο καρκίνος κ.α.

Τα τελευταία χρόνια γίνεται μεγάλη προσπάθεια σχεδίασης και ανάπτυξης θεραπευτικών προϊόντων με βάση την RGD αλληλουχία (σχήμα 1). Τα μόρια αυτά μπορεί να είναι πεπτιδικά ή πεπτιδομιμητικά και μπορούν να χρησιμοποιηθούν δρώντας ως αγωνιστές ή ως ανταγωνιστές.



Σχήμα 1: Η RGD αλληλουχία

Είναι εμφανές ότι η ανάπτυξη ενός εξειδικευμένου προσδέματος στις ιντεγκρίνες είναι μία περίπλοκη διαδικασία, αφού μία ιντεγκρίνη μπορεί να προσδεθεί σε παραπάνω από μία εξωκυττάρια πρωτεΐνη και αντιστρόφως μία πρωτεΐνη μπορεί να προσδεθεί σε περισσότερες από μία ιντεγκρίνη. Στην τελευταία περίπτωση όταν η πρόσδεση είναι RGD εξαρτώμενη, περισσότερες

από μία ιντεγκρίνες χρησιμοποιούν την ίδια περιοχή πρόσδεσης μιας πρωτεΐνης, την RGD περιοχή, π.χ. οι ιντεγκρίνες $\alpha_5\beta_1$ και $\alpha_v\beta_1$ αναγνωρίζουν την ίδια περιοχή στην αλυσίδα της φιβρονεκτίνης. Έτσι, για να επιτευχθεί η εξειδίκευση ως προς τις ιντεγκρίνες χρησιμοποιούνται δύο βασικές αρχές σχεδιασμού:

α) η χρήση κυκλικών πεπτιδίων τα οποία παρέχουν δυνατότητα διαμορφωτικών περιορισμών, και

β) τα αμινοξέα, τα οποία πλαισιώνουν την RGD αλληλουχία επιλέγονται έτσι ώστε να επιτυγχάνεται η καλύτερη δυνατή συγγένεια και εξειδίκευση.

Αξίζει να σημειωθεί επίσης ότι όλες οι αλληλουχίες αναγνώρισης από τις ιντεγκρίνες περιέχουν το Asp και ότι πολλές από αυτές παρουσιάζουν σημαντικές ομοιότητες με το RGD μοτίβο. Κλασικό παράδειγμα αποτελεί η KGD αλληλουχία αναγνώρισης, η οποία υπάρχει στη δισιντεγκρίνη μπαρμπουρίνη και αναγνωρίζει εξειδικευμένα τον ενεργοποιημένο υποδοχέα GPIIb/IIIa. Οι δισιντεγκρίνες είναι ένα σύνολο πρωτεϊνών που περιέχει το RGD μοτίβο στο ενεργό τους κέντρο. Είναι πρωτεΐνες πλούσιες σε κυστεΐνες, οι οποίες βρίσκονται στο δηλητήριο των φιδιών. Ανάλογα με το μέγεθός τους χωρίζονται σε τέσσερις κατηγορίες. Κοινό χαρακτηριστικό των δισιντεγκρινών είναι ότι παρουσιάζουν μεγάλη ομολογία μεταξύ τους και προσδένονται με υψηλή συγγένεια τόσο στον ενεργοποιημένο όσο και στον μη ενεργοποιημένο υποδοχέα GPIIb/IIIa [154]. Η δράση τους ως προς την αναστολή της συσσώρευσης των ενεργοποιημένων με ADP αιμοπεταλίων είναι από 100 έως 1000 φορές μεγαλύτερη από αυτή των δραστικών ευθύγραμμων αναλόγων που περιέχουν την RGD αλληλουχία [155]. Δεν αναγνωρίζουν μόνο την ιντεγκρίνη $\alpha_{IIb}\beta_3$, αλλά προσδένονται μέσω της RGD αλληλουχίας τους και σε άλλους υποδοχείς, όπως στους υποδοχείς της βιτρονεκτίνης ($\alpha_v\beta_3$ και $\alpha_v\beta_5$) και τον υποδοχέα της φιβρονεκτίνης ($\alpha_5\beta_1$) [156].

Εκτός από την KGD αλληλουχία υπάρχει ένας μεγάλος αριθμός αλληλουχιών, οι οποίες αναγνωρίζονται από ιντεγκρίνες και πολλές απ' αυτές παρουσιάζουν μικρές διαφορές από την RGD αλληλουχία. Έχουν βρεθεί αλληλουχίες στις οποίες η θέση της Gly έχει καταληφθεί από διαφορετικά αμινοξέα ή ακόμα και από δύο αμινοξικά κατάλοιπα, τόσο σε πρωτεΐνες όσο και σε διαμορφωτικά περιορισμένα πεπτίδια, με διατήρηση της δράσης τους [157,158]. Η αλληλουχία NGR είναι άλλη μια αλληλουχία η οποία μιμείται την RGD και είναι ικανή να προσδένεται σε ιντεγκρίνες. Έχει παρατηρηθεί επίσης ότι και το πεπτίδιο SDGR (όπου η αλληλουχία RGD είναι ανεστραμμένη) αναστέλλει την κυτταρική πρόσδεση με τρόπο παρόμοιο με αυτό των RGD πεπτιδίων [159]. Παράλληλα έχει δειχθεί ότι τα πεπτίδια που περιέχουν την DGR [160] αλληλουχία δεν παρουσιάζουν κάποια δράση, αν η αμινομάδα του Asp δεν λαμβάνει μέρος σε πεπτιδικό δεσμό. Μια άλλη αλληλουχία, η KQAGDV, φαίνεται να μιμείται το RGD μοτίβο [161] καθώς προσδένεται στην $\alpha_{IIb}\beta_3$ ιντεγκρίνη, για την οποία είναι ιδιαίτερα εξειδικευμένη, ενώ η πρόσδεσή της αναστέλλεται από RGD πεπτίδια [162].

Τρόπος δράσης των RGD ανάλογων

Η ύπαρξη της RGD αλληλουχίας ως περιοχή πρόσδεσης του ινωδογόνου στον υποδοχέα GPIIb/IIIa έχει οδηγήσει πολλούς ερευνητές στο σχεδιασμό, τη σύνθεση και τη μελέτη RGD αναλόγων, πολλά από τα οποία παρουσιάζουν ισχυρή ανασταλτική δράση. Για το λόγο αυτό η RGD αλληλουχία έχει διερευνηθεί εκτενώς. Όπως προκύπτει από τη βιβλιογραφία, υπάρχει μία μεγάλη ποικιλία RGD αναλόγων που έχουν μελετηθεί.

Το μικρό μέγεθος της RGD αλληλουχίας έχει ως συνέπεια τη μεγάλη ευκινησία του μορίου της σε διαλύματα. Η ευκινησία αυτή σε συνδυασμό με το γεγονός ότι η RGD αλληλουχία αναγνωρίζεται τουλάχιστον από τις μισές ιντεγκρίνες, που έχουν ταυτοποιηθεί μέχρι σήμερα, καθιστούν πολύ δύσκολο

το σχεδιασμό ισχυρών και εξειδικευμένων αναστολέων του υποδοχέα GRIIb/IIIa.

Σήμερα γνωρίζουμε ότι:

1) Ένα υδρόφοβο αμινοξύ μετά το Asp συμβάλει σημαντικά στην αύξηση της βιολογικής δράσης [163, 164].

2) Ένα αμινοξύ με θετικά φορτισμένη παράπλευρη αλυσίδα αμέσως μετά το υδρόφοβο αμινοξύ αυξάνει τη συγγένεια του πεπτιδίου για τον υποδοχέα [200].

Η αλληλουχία R-G-D-Arg-R (Arg: Αρωματικό αμινοξύ), είναι σημαντική για τη βιολογική της δράση [165].

Πολλές προσπάθειες έχουν γίνει για τη μείωση της ευκινησίας των RGD πεπτιδίων. Ένας τρόπος είναι η εισαγωγή αμινοξέων με κυκλική δομή όπως η Pro [166].

Συγκεκριμένα, η ύπαρξη της Pro πριν την RGD αλληλουχία έχει αποδειχθεί ότι βοηθάει στην αύξηση της βιολογικής της δράσης. Η Pro επίσης φαίνεται ότι μπορεί να αντικαταστήσει την Arg τόσο της RGD αλληλουχίας όσο και αυτή στην μεθεπόμενη από το Asp θέση [167].

Τα περισσότερα δραστικά RGD, πεπτιδικά ή μη ανάλογα, χαρακτηρίζονται από μία διαμόρφωση παραμορφωμένης β-στροφής τύπου II. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί το γραμμικό τετραπεπτίδιο RGDW, στο οποίο η β-στροφή σταθεροποιείται με δεσμό υδρογόνου μεταξύ του καρβονυλίου της Arg και του αμιδικού πρωτονίου της Trp [168]. Σε συνδυασμό με τα αποτελέσματα της σχέσης διαμόρφωσης-βιολογικής δράσης, που προέκυψαν από ισχυρούς μη πεπτιδικούς αναστολείς [169] της πρόσδεσης του ινωδογόνου στον GRIIb/IIIa, έχει προταθεί ότι, το μοντέλο της β-στροφής αποτελεί γενικό χαρακτηριστικό, η οποία αποτελεί περιορισμό για τη χωροταξική διεύθυνση των δραστικών πλευρικών αλυσίδων.

3.2 Νέα αντιαιμοπεταλιακά φάρμακα. Η αλληλουχία CDC

- 1) Όπως ήδη αναφέρθηκε, κατά την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων οι IIb/IIIa υποδοχείς υφίστανται διαμορφωτικές αλλαγές που οδηγούν στην αποκάλυψη των σημείων σύνδεσης με τα προσδετικά σε αυτούς μόρια [159]. Η σύνδεση των μορίων αυτών και κυρίως του ινωδογόνου επιτυγχάνεται μέσω της RGD αμινοξικής ακολουθίας [74]. Η σύνδεση του ινωδογόνου με τον ενεργοποιημένο υποδοχέα του αιμοπεταλίου έχει ως αποτέλεσμα την δημιουργία γεφυρών ινωδογόνου με τον ενεργοποιημένο υποδοχέα με συνέπεια την συσσώρευση των αιμοπεταλίων και τη δημιουργία θρόμβου [203, 170]. Με βάση τις παρατηρήσεις αυτές ξεκίνησε μια μεγάλη ερευνητική προσπάθεια με στόχο την ανάπτυξη νέων αντιαιμοπεταλικών παραγόντων οι οποίοι θα αναστέλλουν την σύνδεση του ενεργοποιημένου υποδοχέα του αιμοπεταλίου με τα προσδετικά σε αυτόν μόρια και κυρίως την σύνδεσή του με το ινωδογόνο [170]. Την πρώτη προσπάθεια προς αυτή την κατεύθυνση αποτέλεσε η αμπσιξιμάμπη (abciximab) που όπως ήδη αναφέρθηκε αποτελεί μονοκλωνικό αντίσωμα έναντι του ενεργοποιημένου IIb/IIIa υποδοχέα και αποδείχθηκε αποτελεσματική σε μοντέλα αρτηριακής θρόμβωσης και επαναστένωσης σε σκύλους και πρωτεύοντα θηλαστικά [234, 235]. Σχεδόν ταυτόχρονα με την abciximab αναπτύχθηκαν και φυσικοί αναστολείς των IIb/IIIa υποδοχέων με κύριο εκπρόσωπο την barbourin που απομονώθηκε στο δηλητήριο ενός είδους κροταλία με καλά αποτελέσματα σε πειραματικό μοντέλο θρόμβωσης σε στεφανιαία αγγεία σκύλων [242]. Στη συνέχεια αναπτύχθηκε ένας μεγάλος αριθμός φαρμακολογικών παραγόντων οι οποίοι ήταν α) πεπτιδικά RGD ανάλογα [243-247], β) πεπτιδομιμητικά RGD ανάλογα με κύριο

εκπρόσωπο την επιφιμπατίδη (eptifibatide) [244-] και γ) μη πεπτιδικά ανάλογα με κύριο εκπρόσωπο την tirofiban [245]. Όλοι οι παραπάνω φαρμακολογικοί παράγοντες που παρουσίασαν μεγάλη αποτελεσματικότητα και ασφάλεια σε πειραματικά μοντέλα και κλινικές μελέτες έχουν ένα κοινό γνώρισμα: το σημείο-στόχο δράσης τους στον ενεργοποιημένο IIb/IIIa υποδοχέα, την RGD ακολουθία. Η χημική δομή των παραπάνω αναστολέων, αν και διαφέρει ανάλογα με την κατηγορία στην οποία ο καθένας από αυτούς ανήκει, είναι τέτοια ώστε να ανταγωνίζεται την πρόσδεση του ινωδογόνου στην επιφάνεια του ενεργοποιημένου αιμοπεταλιακού υποδοχέα που επιτυγχάνεται μέσω της RGD αλληλουχίας, αναστέλλοντας έτσι την συσσώρευση των αιμοπεταλίων. Η έρευνα λοιπόν, τα τελευταία χρόνια έχει επικεντρωθεί στην σύνθεση μορίων με μεγαλύτερη συγγένεια και ειδικότητα για τον IIb/IIIa υποδοχέα. Όλα τα μόρια όμως που έχουν συντεθεί μέχρι τώρα συνεχίζουν να στοχεύουν στον ανταγωνισμό της σύνδεσης του ινωδογόνου με την ιντεγκρίνη $\alpha_{IIb}\beta_3$ μέσω της RGD αλληλουχίας.

Τα κυκλικά (S,S) -CDC- ανάλογα **δεν περιέχουν το RGD μοτίβο**, ενώ το αμινοξικό κατάλοιπο της Gly έχει αντικατασταθεί από μια Cys. Τα πεπτίδια αυτά παρουσιάζουν μεγαλύτερη ανασταλτική δράση από τα RGD ανάλογα. Για το λόγο αυτό, κρίθηκε αναγκαία η μελέτη του μηχανισμού δράσης τους. Μια εκτενής μελέτη πραγματοποιήθηκε σε πεπτιδικά ανάλογα τα οποία ανήκουν στη νέα αυτή κατηγορία αναστολέων και περιέχουν το (S,S) -CDC- και το (S,S) -CRC- μοτίβο [170]. Όπως αναμενόταν η εισαγωγή του δισουλφιδικού δεσμού και η στερεοχημεία της Cys υπήρξαν δυο πολύ σημαντικοί παράγοντες για τη σταθεροποίηση του κατάλληλου προσανατολισμού των παράπλευρων αλυσίδων της Arg και του Asp. Οι ισχυρές διαμορφωτικές αλλαγές που

επιβλήθηκαν στα ανάλογα επηρέασαν τη βιολογική δράση τους. Η διαμορφωτική μελέτη των ανάλογων έδειξε ότι δεν ικανοποιούν το κριτήριο της β-στροφής, αντίθετα οι παράπλευρες αλυσίδες της Arg και του Asp προσανατολίζονται προς την ίδια πλευρά του πεπτιδικού σκελετού. Το συμπέρασμα αυτό αντιτίθεται στα αποτελέσματα μιας άλλης έρευνας, από την οποία προέκυψε ότι η εξειδίκευση των RGD ανάλογων οφείλεται στη μεγάλη απόσταση μεταξύ των αντίθετα φορτισμένων παράπλευρων αλυσίδων. Από τη μελέτη της βιολογικής δράσης των (S,S)-CDC- ανάλογων έχει αποδειχθεί ότι παρουσιάζουν πολύ καλή αναστολή της πρόσδεσης του ινωδογόνου στον υποδοχέα $\alpha_{IIb}\beta_3$ και της έκφρασης της P-σελεκτίνης, ενώ δεν αναστέλλουν την πρόσδεση του PAC-1. Το γεγονός αυτό, μαζί με το ότι τα RGD ανάλογα έχουν ασθενέστερη ανασταλτική δράση και αντίθετα με τα κυκλικά (S,S)-CDC- πεπτίδια, αναστέλλουν την πρόσδεση του PAC-1 και αδυνατούν να αναστείλουν την έκφραση της P-σελεκτίνης, οδήγησε στο συμπέρασμα ότι τα δυο είδη των αναστολέων δρουν με διαφορετικό τρόπο.

4 Μελέτη νέων αντιαιμοπεταλικών παραγόντων με τη βοήθεια πειραματικών μοντέλων

Τα πειραματικά μοντέλα θρόμβωσης έχουν διαδραματίσει βασικό ρόλο στην ανακάλυψη και στην ανάπτυξη ουσιών οι οποίες χρησιμοποιούνται ήδη επιτυχώς στη θεραπεία και την πρόληψη θρομβωτικών επεισοδίων. Παρέχουν πολύτιμες πληροφορίες όσον αφορά τον τρόπο δράσης, την αποτελεσματικότητα την φαρμακοκινητική και την ασφάλεια, οι οποίες μπορούν να χρησιμοποιηθούν για το μετέπειτα σχεδιασμό κλινικών μελετών. Προκύπτει συνεπώς, η ανάγκη χρήσης των κατάλληλων πειραματικών μοντέλων για την μελέτη και την ανάπτυξη νέων φαρμάκων [172]. Το κατάλληλο πειραματικό μοντέλο πρέπει να αναπαριστά και να μιμείται τον τρόπο δημιουργίας θρόμβου όπως ακριβώς αυτός σχηματίζεται στον ανθρώπινο οργανισμό, ανάλογα με τις τοπικές συνθήκες που επικρατούν.

Τα πειραματόζωα που συνήθως χρησιμοποιούνται είναι μικρού μεγέθους ζώα, όπως κουνέλια, ποντίκια κτλ. Τα παραπάνω έχουν το πλεονέκτημα της εύκολης φύλαξης και εκτροφής στο εργαστήριο, της δυνατότητας πολλαπλών αιμολησιών χωρίς δυσκολία και του απλού χειρισμού τους, λόγω του μικρού τους μεγέθους. Αντίθετα ζώα μεγάλου μεγέθους (πχ πίθηκοι, γουρούνια, σκύλοι) απαιτούν περισσότερο χώρο, περισσότερο δαπανηρή συντήρηση και εκτροφή και κυρίως μεγαλύτερες ποσότητες, των υπό διερεύνηση, ουσιών για να μελετηθεί η δράση τους [171, 172].

Αναφέρεται ότι οι ιδανικές ιδιότητες που πρέπει να έχει ένα πειραματικό μοντέλο, ώστε τα αποτελέσματα των πειραμάτων που θα προκύψουν από αυτό, να έχουν κλινική σημασία και αντιστοιχία με την δημιουργία θρόμβου σε ανθρώπινα αγγεία, είναι οι εξής: α) κατάλληλη διάμετρος αυλού του αγγείου, β) σταδιακή δημιουργία του θρόμβου μέσω της

εναπόθεσης αιμοπεταλίων και ινικής, γ) μόνιμη αγγειακή διαμόρφωση ώστε να αποτελεί συνεχή θρομβογόνο περιοχή και δ) δημιουργία θρόμβου με εύκολο, επαναλήψιμο, αξιόπιστο και προβλέψιμο τρόπο [173-175].

4.1 Τεχνικές δημιουργίας Θρόμβου στα πειραματικά μοντέλα

Έχουν περιγραφεί διάφορα πειραματικά μοντέλα αρτηριακής Θρόμβωσης.

Ανάλογα με τον τρόπο δημιουργίας Θρόμβου, τα μοντέλα αυτά διακρίνονται σε:

ηλεκτρικά

φωτοχημικά

βιοχημικά

μηχανικά

χειρουργικά

Model	Experimental animal and vessel	Thrombosis rate (sample size)	Time to thrombosis	Thrombus components	Tested thrombolytic drug
Electrical [17]	Rabbit; femoral a.	35% (7/20)	110 ± 49 min	Platelets, fibrin, RBCs	rt-PA
Photochemical [18]	Guinea pig; femoral a.	100% (5/5)	10.5 ± 1.2 min	Platelets	None
Biochemical Acetic acid [19]	Rat; carotid a.	N/A	45–50 min	Platelets	Nattokinase, plasmin, elastase
Ferric Chloride [20]	Rat; carotid a.	Conc. dependent	14 ± 1–56 ± 4 min	Platelets, fibrin, RBCs	None
Thrombin [21]	Dog; coronary a.	100% (20/20)	N/A	Erythrocyte-rich	rt-PA
Mechanical Copper coil [22]	Dog; femoral a.	N/A	12 ± 1 min	Platelet-rich	rt-PA, SK
Polyethylene tubing [23]	Rabbit aorta	77.8% (7/9)	72 h (autopsy)	Fibrin, platelets	None
	Rat; aorta	80.0% (8/10)	72 h (autopsy)	Fibrin, platelets	None
Crush-avulsion-reanastomosis [24]	Rat; femoral a.	75% (9/12)	2 days follow-up	N/A	Heparin
Crush and microvascular anastomosis [25]	Rat; femoral a.	91% (20/22)	Within 30 min	N/A	Topical heparin
Surgical Deendothelialized arterial graft [26]	Rat; femoral a.	85% (17/20)	2 h follow-up	Platelets, fibrin, RBCs	Aspirin, heparin
Tuck model [15]	Rabbit; femoral a.	66% (10/15)	5–15 min	Fibrin, platelets	None
Double-tuck model [27]	Swine; Carotid a.	50% (5/10)	1–2 h	Platelet-rich, fibrin	None
Arterial inversion graft [5,10]	Rabbit; femoral a.				
	Graft length (2 mm)	30% (6/20)	1 h follow-up		
	(5 mm)	80% (16/20)	1 h follow-up		
	(10 mm)	100% (20/20)	1 h follow-up	Platelets, fibrin	rt-PA [5], none [10]
Double-opposing inverted-sutures model (this study)	Rabbit; femoral a.	91% (20/22)	21.8 ± 9.8 min	Platelet-rich	rt-PA, SK-HPIg

Δημιουργία Θρόμβου με εφαρμογή ηλεκτρικού ρεύματος

Εκείνος που πρότεινε αρχικά το μοντέλο αρτηριακής Θρόμβωσης με εφαρμογή ηλεκτρικού ρεύματος στο εξωτερικό τοίχωμα του αγγείου, με τη σημερινή του μορφή, ήταν ο Guarini το 1996 [176] και τα πρώτα πειραματόζωα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν ποντίκια. Πριν από αυτόν ο Hladovec το 1971, ήταν ο πρώτος που ανακάλυψε ότι η εφαρμογή ηλεκτρικού ρεύματος στο εξωτερικό τοίχωμα καρωτίδας ποντικού προκαλεί την δημιουργία Θρόμβου και διακοπή της αιματικής ροής στον αυλό του αγγείου [177].

Ευρύτατα διαδεδομένη στις μέρες μας αποτελεί μια παραλλαγή του μοντέλου αυτού, η οποία εφαρμόζεται σε κουνέλια και αφορά την καρωτίδα. Πιο αναλυτικά: το πειραματόζωο αναισθητοποιείται με ενδομυϊκή ένεση μείγματος κεταμίνης και ξυλαζίνης. Η προσπέλαση της καρωτίδας επιτυγχάνεται μέσω μιας μέσης τραχηλικής τομής και ακολουθεί η χειρουργική παρασκευή της καρωτίδας, όπου αυτή αποκολλάται και απομονώνεται από τους γύρω ιστούς. Στη συνέχεια τοποθετείται ροόμετρο για συνεχή καταγραφή της ροής στο εξωτερικό τοίχωμα του αγγείου. Εγγύτερα του ροόμετρου προσαρμόζονται ηλεκτρόδια με τα οποία εφαρμόζεται συνεχές ηλεκτρικό ρεύμα σταθερής έντασης 4mA, για τρία λεπτά. Η καταγραφή της ροής δείχνει σταδιακή μείωση της ροής και τελικά πλήρη απόφραξη του αγγείου σε 20 με 30 λεπτά. Παράλληλα η μηριαία φλέβα χρησιμοποιείται για την χορήγηση των προς εξέταση ουσιών, ενώ η ωπιαία φλέβα για λήψη δειγμάτων αίματος [178].

Μοντέλα σαν αυτό χρησιμοποίησαν ηλεκτρικό ρεύμα έντασης 2,5mA για τρία λεπτά στην εξωτερική επιφάνεια της καρωτίδας κουνελιών με αποτέλεσμα πλήρη απόφραξη του αγγείου [179], ενώ σε άλλα μοντέλα η επαγωγή θρόμβου γίνεται με την εισαγωγή βελόνας-ηλεκτροδίου μέσα στον αυλό της καρωτίδας κουνελιού και τοποθέτησή της μέσα στον αυλό του αγγείου παράλληλα με το τοίχωμά του. Εφαρμόζεται, λοιπόν, ηλεκτρικό ρεύμα έντασης 150μΑ, έως να επιτευχθεί μείωση της ταχύτητας της ροής κατά 50% (η οποία μετράται με Doppler ροόμετρο, τοποθετημένου άπω του σημείου της εφαρμογής ρεύματος). Με το μοντέλο αυτό επιτυγχάνεται η μείωση της ροής κατά 50% σε 40 περίπου λεπτά και η πλήρης απόφραξη του αυλού του αγγείου σε 40 με 50 λεπτά (180, 181).

Παρόμοιο πρωτόκολλο χρησιμοποιήθηκε και σε καρωτίδες ποντικών, που η εφαρμογή ηλεκτρικού ρεύματος, σταθερής έντασης 1mA για 90 δευτερόλεπτα, είχε ως αποτέλεσμα τη δημιουργία θρόμβου σε 7 με 8 λεπτά

με σταθερό και επαναλήψιμο τρόπο [182]. Αλλά και μοντέλα θρόμβωσης σε καρωτίδες σκύλων έχουν χρησιμοποιηθεί για την μελέτη διαφόρων φαρμακολογικών παραγόντων. Στα μοντέλα αυτά ηλεκτρόδιο βελόνα εισέρχεται στον αυλό της καρωτίδας και τοποθετείται παράλληλα με το ενδοθήλιο του αγγείου. Μέσω του ηλεκτροδίου, συνεχές ηλεκτρικό ρεύμα έντασης 250 μ A εφαρμόζεται στον έσω χιτώνα του αγγείου μέχρι την πλήρη απόφραξη, η οποία επιτυγχάνεται σε 50 περίπου λεπτά [183]. Άλλοι ερευνητές χρησιμοποίησαν ρεύμα έντασης 300 μ A επιτυγχάνοντας απόφραξη σε 40 με 45 λεπτά [184,185].

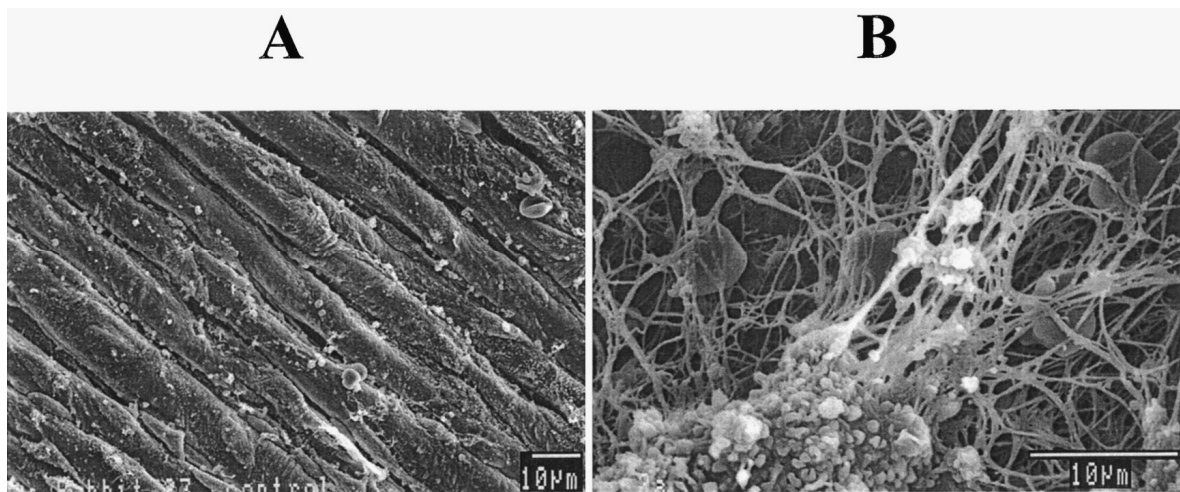
Χρήση του μοντέλου αρτηριακής θρόμβωσης, με εφαρμογή ηλεκτρικού ρεύματος, έχει γίνει και σε στεφανιαία αγγεία σκύλων. Στο συγκεκριμένο πρωτόκολλο μετά από αριστερή θωρακοτομή αποκαλύπτεται η καρδιά του ζώου και στη συνέχεια παρασκευάζεται η περισπωμένη στεφανιαία αρτηρία, πάνω στην οποία εφαρμόζεται Doppler-ροόμετρο. Εγγύτερα του ροόμετρου, ηλεκτρόδιο-βελόνα τοποθετείται στον αυλό του αγγείου παράλληλα με το ενδοθήλιο του αγγείου και εφαρμόζεται ηλεκτρικό ρεύμα έντασης 150 μ A, για 40 με 60 λεπτά, με αποτέλεσμα την απόφραξη του αγγείου [184, 186].

Επιπρόσθετα τέτοια μοντέλα χρησιμοποιήθηκαν ακόμη και σε πρωτεύοντα θηλαστικά, όπως σε πιθήκους, όπου μετά από χειρουργική παρασκευή της μηριαίας του ζώου και αποκόλληση της από τους γύρω ιστούς, η επαγωγή του θρόμβου επιτυγχάνεται με εφαρμογή συνεχούς ηλεκτρικού ρεύματος έντασης 150 μ A, μέσω βελόνας-ηλεκτροδίου, τοποθετημένου ενδοαυλικά και παράλληλα με τον έσω χιτώνα της μηριαίας. Η πλήρης απόφραξη του αγγείου επέρχεται σε 50 με 80 λεπτά [187].

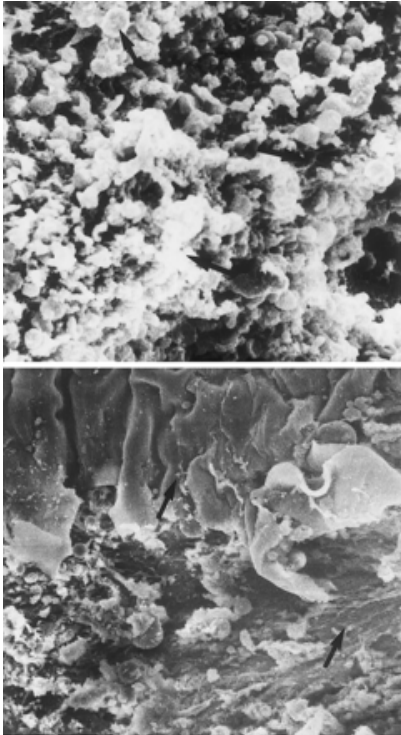
Φωτογραφίες με χρήση ηλεκτρονικού μικροσκοπίου, βοήθησαν στην κατανόηση του τρόπου σχηματισμού του θρόμβου σε αυτά τα μοντέλα και κατά συνέπεια στην ορθολογικότερη χρήση τους για την εξομοίωση των συνθηκών που επικρατούν στον αυλό και το ενδοθήλιο του στεφανιαίου αγγείου κατά τη

διάρκεια οξέων στεφανιαίων συνδρόμων [181]. Δείχθηκε, λοιπόν ότι η εφαρμογή ηλεκτρικού ρεύματος, είτε στην εξωτερική επιφάνεια του αγγείου, είτε ενδοαυλικά σε επαφή με τον έσω χιτώνα αυτού, επάγει την δημιουργία ενός πλούσιου σε αιμοπετάλια θρόμβου πάνω σε ένα κατεστραμμένο ενδοθηλιακό τοίχωμα με ταυτόχρονη συνύπαρξη ινωδογόνου, ινώδους και ινικής [178, 182].

Οι παρακάτω εικόνες από ηλεκτρονικό μικροσκόπιο αναδεικνύουν τον εκτεταμένο τραυματισμό του ενδοθηλίου που προκαλεί το ηλεκτρικό ρεύμα και την επαγόμενη συσσώρευση αιμοπεταλίων και ινικής, με αποτέλεσμα τη δημιουργία θρόμβου (Εικόνες 2 και 3)



Εικόνα 2: Α: Φυσιολογική δομή ενδοθηλίου καρωτίδας κουνελιού. Β: Ενδοθήλιο του αγγείου μετά από τρία λεπτά εφαρμογής ηλεκτρικού ρεύματος έντασης 4mA. Ξεχωρίζει η καταστροφή της αρχιτεκτονικής του ενδοθηλίου με εναπόθεση σε αυτό πυκνού δικτύου ινικής και αιμοπεταλίων ΕΙΚΟΝΑ ΑΠΟ JPET. 2000;295:212-218.



Εικόνα 3: Πάνω: Αντιπροσωπευτικός θρόμβος μετά από εφαρμογή ηλεκτρικού ρεύματος, πλούσιος σε αιμοπετάλια. Κάτω: Μετά την απομάκρυνση του θρόμβου με το κάτω βέλος απεικονίζεται ο υπενδοθηλιακός χώρος, ενώ με το πάνω βέλος η παρακείμενη περιοχή του κατεστραμμένου ενδοθηλίου. JPET. 2000;295:212-218.

Στην παρούσα διατριβή χρησιμοποιήθηκε το μοντέλο αρτηριακής θρόμβωσης με εφαρμογή ηλεκτρικού ρεύματος στο εξωτερικό τοίχωμα του αγγείου.

Το φωτοχημικό μοντέλο

Ο Saniabadi και συνεργάτες [188] κατάφεραν να επάγουν την δημιουργία αρτηριακού θρόμβου, στη μηριαία αρτηρία γουρουνιού, αφού πρώτα του χορήγησαν Rose Bengal και στην συνέχεια εξέθεσαν τους ιστούς σε πράσινο φως (μήκος κύματος περίπου 500 nm). Η διαδικασία αυτή, φαίνεται ότι, μετά από 10 λεπτά έκθεσης σε πράσινο φως, προκαλεί αποκόλληση των κυττάρων του ενδοθηλίου του αγγείου και παράλληλη καταστροφή της κυτταρικής μεμβράνης, με αποτέλεσμα τη καταστροφή του ενδοθηλίου και δημιουργία ενός, πλούσιου σε αιμοπετάλια θρόμβου. Παρόμοιο πείραμα πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας την κοινή καρωτίδα κουνελιού, με έκθεση σε πράσινο φως (μήκος κύματος 562 nm). Ραδιοσημασμένα με ¹¹¹In αιμοπετάλια, απέδειξαν την καταστροφή του ενδοθηλίου του αγγείου με συσσώρευση σωρών αιμοπεταλίων στο τραυματισμένο τοίχωμα του αγγείου [189].

Το βιοχημικό μοντέλο

Εξίσου αποτελεσματικό αποδείχθηκε και το «βιοχημικό» μοντέλο δημιουργίας αρτηριακού θρόμβου, το οποίο πρωτοπεριγράφηκε από τον Kurz και συνεργάτες το 1990 [190]. Στο μοντέλο αυτό, το οποίο εφαρμόστηκε κυρίως σε καρωτίδες ποντικών, η καρωτίδα του ζώου παρασκευάζεται χειρουργικά και στη συνέχεια ένα φύλλο διηθητικού χαρτιού το οποίο είναι εμποτισμένο με FeCl₃ εφαρμόζεται στην εξωτερική επιφάνεια του αγγείου και αφήνεται εκεί για χρονικό διάστημα που ποικίλλει ανάλογα με το μοντέλο [197-199]. Φαίνεται ότι εφαρμογή 15-20 λεπτών του FeCl₃ αρκεί για την δημιουργία του θρόμβου [190, 191]. Μελέτη με ηλεκτρονικό μικροσκόπιο του παραπάνω μοντέλου απέδειξε ότι το τοίχωμα του αγγείου απογυμνώνεται από το ενδοθήλιό του, ενώ στις περιοχές αυτές εμφανίζονται σωροί αιμοπεταλίων προσκολλημένων στο τοίχωμα. Στην πλήρη απόφραξη του αγγείου

αναδεικνύεται και η παρουσία ερυθρών αιμοσφαιρίων (RBCs) μαζί με αιμοπετάλια μέσα σε ένα πλέγμα ινικής [190]. Κατά συνέπεια το «βιοχημικό» μοντέλο αποτελεί μοντέλο αρτηριακής θρόμβωσης με πλούσιο σε αιμοπετάλια θρόμβο [191, 192].

Τα προηγούμενα δύο μοντέλα είναι και τα δύο λιγότερο διαδεδομένα σήμερα

Το μηχανικό μοντέλο

Η επαγωγή θρόμβου με μηχανικά μέσα, περιλαμβάνει: α) μια ποικιλία τεχνικών, β) πραγματοποιείται σε διάφορα είδη ζώων και γ) δεν επάγει αποκλειστικά αρτηριακή θρόμβωση, αλλά και φλεβική θρόμβωση. Στον παρακάτω πίνακα φαίνονται οι διάφορες χειρουργικές τεχνικές, το είδος των ζώων, το αγγείο εφαρμογής και το είδος της θρόμβωσης (πίνακας 1).

Πίνακας 1: Μηχανικά μοντέλα πειραματικής Θρόμβωσης.

Χειρουργική τεχνική	Είδος ζώου	Αγγείο	Είδος Θρόμβωσης	
Εξωτερική εφαρμογή ραμμάτων	Σκύλος	Στεφανιαία	Αρτηριακή	[193]
Εξωτερική εφαρμογή δακτυλίου	Σκύλος Κουνέλι	Στεφανιαία Καρωτίδα	Αρτηριακή	[194, 195]
Αρτηριοφλεβώδης shunt	Ποντίκι Κουνέλι	Καρωτίδα Σφαγίτιδα Μηριαία αρτηρία και φλέβα	Αρτηριακή και φλεβική	[196-201]
Εξωτερική εφαρμογή ραμμάτων	Ποντίκι	Σφαγίτιδα	Φλεβική	[202]
Απόφραξη του αγγείου αιμοστατική λαβίδα	Κουνέλι	Καρωτίδα	Αρτηριακή	[203]
Εφαρμογή ανάστροφων ραμμάτων προς τον αυλό του αγγείου	Κουνέλι	Μηριαία αρτηρία	Αρτηριακή	[207]
Τοποθέτηση θρομβογόνου μοσχεύματος στην κάτω κοίλη	Κουνέλι	Κάτω κοίλη φλέβα	Φλεβική	[204]
Χάλκινα ελάσματα ενδοαγγειακά	Σκύλος	Μηριαία	Αρτηριακή	[205]
Πίεση με αιμοστατική λαβίδα και δακτύλιος	Κουνέλι	Καρωτίδα	Αρτηριακή	[206]

Από τα παραπάνω μοντέλα, δύο από αυτά παρουσιάζουν κλινικό ενδιαφέρον καθώς είναι εκείνα που οδηγούν στην δημιουργία θρόμβου πλούσιου σε αιμοπετάλια, παρόμοιου με εκείνον που δημιουργείται στο τοίχωμα των αγγείων κατά τη διάρκεια ενός οξέος στεφανιαίου συνδρόμου [207]. Είναι τα εξής.

Θεωρείται ότι η αρχική εφαρμογή πίεσης στην εξωτερική επιφάνεια του αγγείου με λαβίδα, αρχικά προκαλεί καταστροφή του ενδοθηλίου στο σημείο πίεσης και κατά συνέπεια δημιουργεί το προθρομβωτικό περιβάλλον στο οποίο, ο επακόλουθος περιορισμός της ροής με την εφαρμογή ενός δακτυλίου γύρω από το αγγείο οδηγεί στην δημιουργία αιμοπεταλιακού θρόμβου καθώς τα αιμοπετάλια προσπαθούν να επουλώσουν το κατεστραμμένο τοπικά ενδοθήλιο [206].

Από την άλλη, η παρουσία ραμμάτων και εν γένει οποιοδήποτε ξένου σώματος, στον αυλό του αγγείου οδηγεί και αυτή σε δημιουργία πλούσιου σε αιμοπετάλια θρόμβου.

4.2 Φαρμακολογικοί παράγοντες που δοκιμάζονται στα πειραματικά μοντέλα

Υπάρχουν δύο γενικές κατηγορίες φαρμάκων που χρησιμοποιούνται στην κλινική πράξη για την πρόληψη και θεραπεία των οξέων στεφανιαίων συνδρόμων: α) τα αντιθρομβωτικά-αντιπηκτικά φάρμακα, που αναστέλλουν είτε τη δημιουργία, είτε τη δράση της θρομβίνης, και β) τα αντιαιμοπεταλιακά φάρμακα που αναστέλλουν την ενεργοποίηση ή τη συσσώρευση των αιμοπεταλίων [208].

Τα ήδη γνωστά αντιπηκτικά φάρμακα, όπως η κλασική ηπαρίνη, οι ηπαρίνες χαμηλού μοριακού βάρους και τα κουμαρινικά αντιπηκτικά παρουσιάζουν μία σειρά περιορισμών. Η κλασική ηπαρίνη, ως έμμεσος αναστολέας της θρομβίνης, αναστέλλει μεν τη δράση της θρομβίνης, πριν από τη σύνδεση και ενεργοποίησή της στο σύμπλεγμα με την προθρομβίνη και την δημιουργία θρόμβου. Από τη στιγμή που θα σχηματιστεί θρόμβος, η ηπαρίνη δεν αναστέλλει πλέον την συνδεδεμένη θρομβίνη στο σύμπλεγμα θρομβίνης-προθρομβίνης, μέσα στον θρόμβο, αλλά μόνο τα μόρια της θρομβίνης που κυκλοφορούν ελεύθερα και δεν έχουν συνδεθεί με την προθρομβίνη. Επιπρόσθετα, η ηπαρίνη απαιτεί στενή παρακολούθηση των πηκτικών δοκιμασιών, ώστε να επιτευχθούν και να διατηρηθούν σε θεραπευτικά επίπεδα. Τα κουμαρινικά αντιπηκτικά, παρουσιάζουν δύο μεγάλους περιορισμούς, α) στενό θεραπευτικό παράθυρο και β) μη προβλεψιμότητα, όσον αφορά την σχέση δόσης-αποτελέσματος [208].

Όσον αφορά τα αντιαιμοπεταλιακά φάρμακα που χρησιμοποιούνται σήμερα, είναι γνωστό ότι η ασπιρίνη ασκεί την αντιαιμοπεταλιακή της δράση μέσω της αναστολής της θρομβοξανής A_2 , χωρίς να μπορεί να αναστέλλει την ενεργοποίηση και συσσώρευση των αιμοπεταλίων που επάγεται από άλλους αγωνιστές, όπως η θρομβίνη, το κολλαγόνο ή το ADP. Αυτό οδήγησε στην

ανάπτυξη των νεότερων αντιαιμοπεταλικών φαρμάκων, τικλοπιδίνη και κλοπιδογρέλη, που αναστέλλουν την ενεργοποίηση και συσσώρευση των αιμοπεταλίων που επάγεται από το ADP. Επιπρόσθετα η συγχορήγηση των φαρμάκων αυτών με την ασπιρίνη παρουσιάζει συνεργικά αποτελέσματα, αλλά δεν αναστέλλει την συσσώρευση αιμοπεταλίων που προκαλούν αγωνιστές σαν την θρομβίνη. Κατά συνέπεια, η έρευνα οδήγησε στην ανάπτυξη νέων αντιαιμοπεταλιακών φαρμάκων, που θα αναστέλλουν την ενεργοποίηση και τη συσσώρευση των αιμοπεταλίων, που επάγουν και οι άλλοι αγωνιστές τους. Οι αναστολείς των γλυκοπρωτεϊνικών IIb/IIIa υποδοχέων, αναστέλλουν την συσσώρευση έναντι όλων των αγωνιστών, καθώς, ανταγωνίζονται το ινωδογόνο στις θέσεις πρόσδεσης του με τον IIb/IIIa υποδοχέα [208].

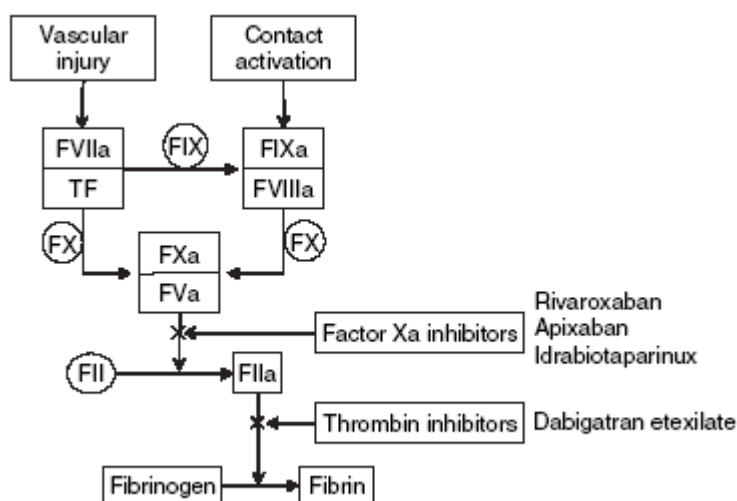
Ακόμη και αυτοί, όμως δεν στερούνται παρενεργειών. Η αμπσιξιμάμπη (abciximab), ένα ανασυνδυασμένο χιμαιρικό αντίσωμα, όπως αναφέρθηκε παραπάνω παρουσιάζει μη ειδική δράση, αναστέλλοντας όχι μόνο τον IIb/IIIa υποδοχέα των αιμοπεταλίων, αλλά και τον υποδοχέα $\alpha_v\beta_3$ της βιτρονεκτίνης στα ενδοθηλιακά κύτταρα. Επιπλέον, η abciximab έχει μεγάλη διάρκεια δράσης με αποτέλεσμα μεγάλο ποσοστό αιμορραγιών. Οι υπόλοιποι αναστολείς των IIb/IIIa υποδοχέων, η επιφιμπατίδη (eptifibatide, πεπτιδικό KGD ανάλογο), η τιροφιμπάνη (tirofiban) και η λαμιφιμπάνη (lamifiban), (μη πεπτιδικά μιμητικά της RGD αλληλουχίας), παρουσιάζουν εξειδίκευση στην σύνδεση με τον IIb/IIIa υποδοχέα και έχουν αποδειχθεί αποτελεσματικοί σε ασθενείς με οξεία στεφανιαία σύνδρομα [208].

4.2.1 Αντιθρομβωτικά φάρμακα που δοκιμάστηκαν σε πειραματικά μοντέλα

Τα τελευταία χρόνια λοιπόν, η βασική έρευνα έχει στραφεί στην ανάπτυξη φαρμακολογικών παραγόντων, με εξειδικευμένη δράση, σε ειδικά σημεία στόχους του καταρράκτη της πήξης, με ευρύ θεραπευτικό παράθυρο, ώστε να

παρουσιάζουν τις λιγότερες δυνατές παρενέργειες και να αναστέλλουν με ειδικό τρόπο τη δημιουργία θρόμβου. Επιπλέον κλινικές και παθολογοανατομικές παρατηρήσεις, μας έχουν βοηθήσει να καταλάβουμε τον ακριβή τρόπο δημιουργίας του θρόμβου κατά τη διάρκεια ενός οξέος στεφανιαίου συνδρόμου [209].

Από τη στιγμή λοιπόν που εμφανίζεται ένα θρομβογόνο «ερέθισμα», έως τη δημιουργία του θρόμβου, ένα πλήθος παραγόντων ενεργοποιούνται και αλληλεπιδρούν συμμετέχοντας στον καταρράκτη της πήξης του οξέος στεφανιαίου συνδρόμου (Σχήμα 2).



Σχήμα 2: Ο καταρράκτης της πήξης. Πιθανά σημεία παρέμβασης.

Σήμερα επομένως, έχουν αναγνωρισθεί, νέες θέσεις κλειδιά στο πολύπλοκο μονοπάτι της πήξης, που μπορούν να αποτελέσουν στόχους δράσης νέων φαρμάκων, με αποτέλεσμα την αναστολή της δημιουργίας θρόμβου, με ένα τρόπο πιο ασφαλή και πιο ειδικό σε σχέση με τα κλασικά αντιθρομβωτικά φάρμακα. Στο σχήμα 2, σημειώνονται πιθανοί στόχοι δράσης φαρμάκων που τα τελευταία χρόνια έχουν οδηγήσει στην ανάπτυξη ενός πλήθους νέων αντιθρομβωτικών παραγόντων. Η ασφάλεια και η αποτελεσματικότητα των νέων αυτών αντιθρομβωτικών παραγόντων, προτού

αυτοί περάσουν στην φάση των αρχικών κλινικών μελετών, μπορεί να αξιολογηθεί μόνο με την βοήθεια πειραματικών μοντέλων θρόμβωσης. Έχουν δοκιμαστεί μια πληθώρα φαρμακολογικών παραγόντων, με ποικιλία τρόπων δράσης, σε διάφορα πειραματόζωα, που όλοι τους όμως έχουν σαν κοινό χαρακτηριστικό την αναστολή της δημιουργίας θρόμβου. (Πίνακας 2).

Πίνακας 2: Φαρμακολογικοί παράγοντες και πειραματόζωα στα οποία δοκιμάστηκαν.

Αντιθρομβωτικοί παράγοντες	Πειραματόζωο
Κλασική ηπαρίνη	Κουνέλι Ποντικός
Ηπαρίνη χαμηλού μοριακού βάρους Epochararine Fraxiparine Nadroparine Dalteparine	Κουνέλι
Άμεσοι Αναστολείς Χα Rivaroxaban Fondaparinux PD0313052 C921-78 SK549 DPC423 ZK-807834 rNAP5 YM-80829 DX-9065a	Κουνέλι Ποντικός Σκύλος Πίθηκος
Άμεσοι αναστολείς θρομβίνης Ιρουδίνη Ανάλογο ιρουδίνης (BCH-2763, CX-397) Hirulog(Bivalirudin) Argatoban Melagratan Inogratan Dup 714 L-370,518 LB-30067	Κουνέλι Ποντικός Σκύλος

Αναστολέας VIIa	Ανασυνδυσασμένος ανθρώπινος VIIa PHA-927F	Κουνέλι Πίθηκος
Θρομβολυτικά (rTPA)	Actilyse Μονοκλωνικό αντίσωμα έναντι στον TF TNK-TPA	Κουνέλι
Πολυσακχαρίτες	Maltodapoh SR 90107A SR 80027A SanOrg123781A	Κουνέλι Ποντικός
Αναστολέας IXa	Μονοκλωνικό αντίσωμα έναντι στον παράγοντα IX	Ποντικός
Πρωτεΐνη C Θρομβομοδουλίνη	LY203638	Σκύλος Ποντικός

Από τους παραπάνω αντιθρομβωτικούς παράγοντες, οι άμεσοι αναστολείς του ενεργοποιημένου παράγοντα X (Xa) και οι άμεσοι αναστολείς της θρομβίνης παρουσιάζουν αυξημένο ενδιαφέρον, και παρατηρείται συνεχής ανάπτυξη νέων ουσιών με βελτιωμένη δράση και αυξημένη ασφάλεια.

Ο παράγοντας Xa, έχει ένα κεντρικό ρόλο στο μονοπάτι της πήξης, καθώς αποτελεί την κατάληξη, τόσο της εξωγενούς, όσο και της ενδογενούς οδού του καταρράκτη της πήξης. Είναι γνωστό ότι ο Xa μαζί με τον παράγοντα Va, δημιουργούν το σύμπλεγμα της προθρομβινάσης, η οποία μετατρέπει (ενεργοποιεί) την προθρομβίνη σε θρομβίνη. Ο παράγοντας Xa και η θρομβίνη, συνδέονται μέσα στον θρόμβο, ενώ παραμένουν ενζυμικά ενεργοί. Οι έμμεσοι αναστολείς της θρομβίνης, όπως η κλασική ηπαρίνη, οι ηπαρίνες χαμηλού μοριακού βάρους και, οι συνθετικοί πεντασακχαρίτες, δρουν μέσω της αντιθρομβίνης III, η οποία είναι ένα μεγάλο μόριο που δεν μπορεί να εισχωρήσει σε έναν ήδη σχηματισμένο θρόμβο. Οι άμεσοι αναστολείς του Xa, μπορούν να αναστέλουν τον Xa ακόμη και αν είναι συνδεδεμένος με την θρομβίνη μέσα σε σχηματισμένο θρόμβο. Μελέτες έχουν

δείξει ότι η αναστολή του Χα μπορεί να είναι περισσότερο αποτελεσματική από την αναστολή άλλων παραγόντων, επειδή φαίνεται ότι ένα μόριο του παράγοντα Χα οδηγεί στην δημιουργία πολλαπλών μορίων θρομβίνης, γεγονός πολύ σημαντικό, καθώς φαίνεται ότι απαιτείται ένας ελάχιστος αριθμός μορίων θρομβίνης για την έναρξη της πρωτογενούς αιμόστασης [226].

Τέτοιος παράγοντας είναι το Rivanoxaban (άμεσος αναστολέας του Χα), ο οποίος αποδείχθηκε εξίσου δραστικός με την ηπαρίνη χαμηλού μοριακού βάρους Nadroparine, και τον πεντασακχαρίτη fondaparinux, όταν χορηγήθηκε από το στόμα και πιο δραστικός μετά από ενδοφλέβια χορήγηση σε πειραματικό μηχανικό μοντέλο φλεβικής θρόμβωσης σε κουνέλια [202]. Επιπρόσθετα ένας παράγοντας της ίδιας κατηγορίας, ο C921-78, αποδείχθηκε εξαιρετικά δραστικός, χωρίς να επηρεάζει τις πηκτικές δοκιμασίες. Σε αντίθεση κλασικά αντιθρομβωτικά όπως η κλασική ηπαρίνη και η ενοξαπαρίνη, προκειμένου να πετύχουν το ίδιο αντιθρομβωτικό αποτέλεσμα είτε παρατείνουν τους χρόνους πήξης, είτε αυξάνουν την πιθανότητα αιμορραγίας σε μηχανικό μοντέλο φλεβικής θρόμβωσης σε κουνέλια [198]. Παρόμοια αποτελέσματα παρουσίασε και ο παράγοντας SK549 σε σχέση με κλασικά φάρμακα στο ίδιο πειραματικό μοντέλο σε κουνέλια [199]. Ο Wong και συνεργάτες έδειξαν ισάξια αντιθρομβωτική δράση του DPC423 (χορήγηση από το στόμα) σε σχέση με την ενοξαπαρίνη με μεγάλη ασφάλεια όσον αφορά την αιμορραγία σε μοντέλο αρτηριακής θρόμβωσης σε κουνέλια [212]. Μοντέλα αρτηριακής θρόμβωσης σε στεφανιαία αγγεία μεγαλύτερων πειραματόζωων (σκύλοι), έδειξαν ότι άμεσοι αναστολείς του Χα, όπως ο ZK-807834, μπορούν να είναι αποτελεσματικοί σε συνδυασμό με θρομβόλυση και αρκετά ασφαλείς, μετά από ενδοφλέβια χορήγηση [213]. Ακόμη όμως και η υποδόρια χορήγηση αναστολέων Χα, (rNAP5), έχει ως αποτέλεσμα την μείωση του μεγέθους του θρόμβου στα στεφανιαία σκύλων [193]. Μερικοί από

τους παραπάνω παράγοντες έχουν εγκριθεί ακόμη και για κλινική χρήση [197].

Εκτεταμένη, όμως έρευνα έχει γίνει και για τους άμεσους αναστολείς της Θρομβίνης, μία νέα ομάδα αντιθρομβωτικών φαρμάκων, που συνδέονται άμεσα με τη Θρομβίνη και αναστέλλουν την αλληλεπίδρασή της με τα ενζυμικά της υποστρώματα. Η Θρομβίνη μετατρέπει το ινωδογόνο σε ινική και ενεργοποιεί τους παράγοντες V, VIII και XI, γεγονός που οδηγεί στην παραγωγή περισσότερης Θρομβίνης, με συνέπεια την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων. Επιπλέον η ενεργοποίηση του παράγοντα XIII, σταθεροποιεί τις συνδέσεις μεταξύ των μορίων της ινικής και κατά συνέπεια τον σχηματισμένο Θρόμβο. Η δράση της Θρομβίνης ρυθμίζεται-αναστέλλεται από τις πρωτεΐνες C και S και την αντιθρομβίνη [227].

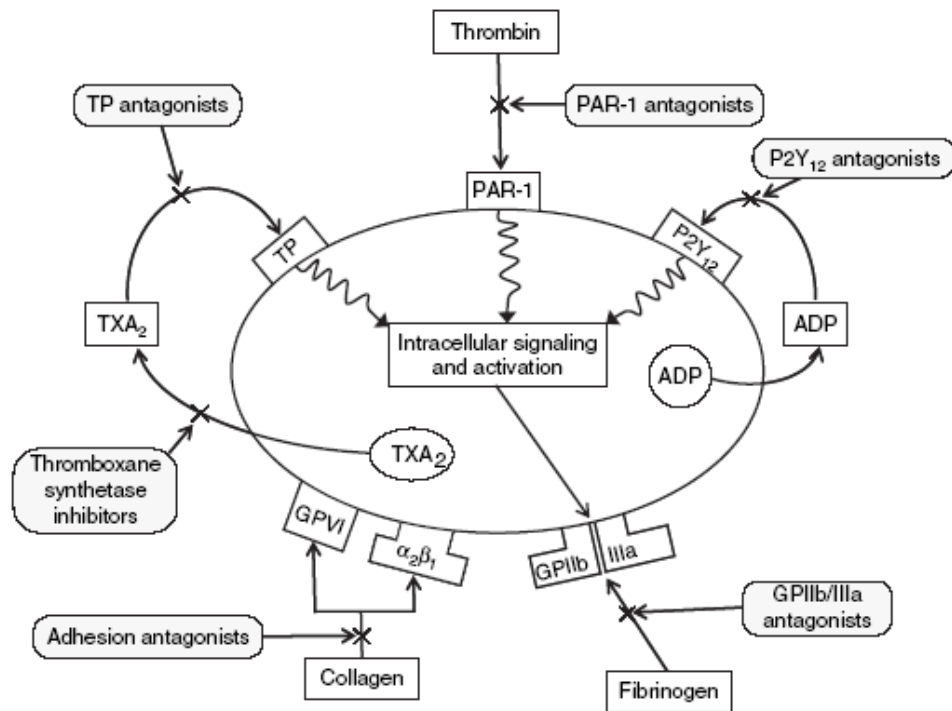
Σε αντίθεση με τις ηπαρίνες, που συνδέονται με την αντιθρομβίνη III, αυξάνοντας την ικανότητα δέσμευσής της με την Θρομβίνη (έμμεση αναστολή), οι άμεσοι αναστολείς της Θρομβίνης, συνδέονται και αλληλεπιδρούν άμεσα με το μόριο της Θρομβίνης, προκαλώντας αναστολή της λειτουργίας της ακόμη και όταν αυτή είναι συνδεδεμένη με την ινική μέσα στο Θρόμβο (άμεση αναστολή), πράγμα που δεν μπορούν να κάνουν οι ηπαρίνες [227].

Η ιρουδίνη και το ανασυνδυσασμένο μόριο r-hirulog (bivalirudin), είναι περισσότερο αποτελεσματικά από την fraxiparine, όσον αφορά το μέγεθος του θρόμβου σε μοντέλο φλεβικής θρόμβωσης σε σφαγίτιδες κουνελιών, με το μόριο r-hirulog να παρουσιάζει σημαντικά μεγαλύτερη διάρκεια δράσης [215]. Η Lyle και συνεργάτες απέδειξαν ότι ο άμεσος αναστολέας της Θρομβίνης, L-370,518, ήταν εξίσου αποτελεσματικός σε μοντέλο φλεβικής και αρτηριακής θρόμβωσης σε ποντικούς, σε σχέση με γνωστούς αναστολείς (ιρουδίνη, r-hirulog), ενώ το ίδιο αντιθρομβωτικό αποτέλεσμα με την ηπαρίνη προκαλεί τουλάχιστον δεκαπλάσια αύξηση του χρόνου μερικής θρομβοπλαστίνης (aPTT) [210]. Νεότεροι αναστολείς της Θρομβίνης (LB-30067)

αποδεικνύονται εξίσου αποτελεσματικοί με παλαιότερους (Inogratam), σε μοντέλα φλεβικής θρόμβωσης της κάτω κοίλης φλέβας κουνελιών, με σημαντικά μικρότερη επίδραση στις πηκτικές δοκιμασίες [203]. Ακόμη πιο δραστικά από του κλασσικούς αναστολείς της θρομβίνης, έχουν αποδειχθεί ανάλογα ιρουδίνης, όπως το BCH-2763, το οποίο είχε ισχυρότερη αντιθρομβωτική δράση από την ιρουδίνη, το r-hirulog και το Inogratam, σε μοντέλα φλεβικής (κάτω κοίλη φλέβα, λαγόνια φλέβα) και αρτηριακής θρόμβωσης (καρωτίδα) σε ποντικούς [216]. Ανάλογα ιρουδίνης έχουν δοκιμαστεί και σε σκύλους [217], όπου το CX-397, αποδείχθηκε σημαντικά ισχυρότερος και σημαντικά ασφαλέστερος αντιθρομβωτικός παράγοντας σε σχέση με την κλασική ηπαρίνη.

Οι αναστολείς της θρομβίνης έχουν μελετηθεί σε καλά σχεδιασμένες τυχαιοποιημένες μελέτες, όπου δείχθηκε η υπεροχή τους σε σχέση με την κλασική αγωγή σε ασθενείς με οξεία στεφανιαία σύνδρομα που υποβλήθηκαν σε αγγειοπλαστική. Δεν αποδείχθηκαν όμως, αποτελεσματικοί και ασφαλείς για μακροχρόνια χορήγηση σε ασθενείς με στεφανιαία νόσο, αλλά ούτε και παρείχαν αποτελεσματική θρομβοπροφύλαξη σε ασθενείς που θα υποβάλλονταν σε ορθοπεδική επέμβαση σε σχέση με τις χαμηλού μοριακού βάρους ηπαρίνες, ενώ αντίθετα υπερείχαν σε σχέση με τα κουμαρινικά αντιπηκτικά. Τα πρώτα αποτελέσματα σε ασθενείς με κοιλιακή μαρμαρυγή είναι πολλά υποσχόμενα, [227].

4.2.2 Αντιαιμοπεταλιακά φάρμακα που δοκιμάστηκαν σε πειραματικά μοντέλα.



Τα αντιαιμοπεταλιακά φάρμακα, αποτελούν τα τελευταία χρόνια, μια ομάδα φαρμακολογικών παραγόντων με έντονο ερευνητικό ενδιαφέρον, καθώς η ενεργοποίηση και η συσσώρευσή τους με αποτέλεσμα τη δημιουργία θρόμβου, αποτελεί το τελευταίο-κοινό στάδιο και των δύο οδών πήξης (ενδογενούς και εξωγενούς), παίζοντας σημαντικό ρόλο στην παθοφυσιολογία των αγγειακών εγκεφαλικών επεισοδίων, της ανάπτυξης περιφερικής αγγειοπάθειας και των οξέων στεφανιαίων συνδρόμων. Κατά συνέπεια η αναστολή της ενεργοποίησης και συσσώρευσης των αιμοπεταλίων αποτελεί στόχο-κλειδί για την ανάπτυξη νέων φαρμακολογικών παραγόντων για την πρόληψη και θεραπεία των παραπάνω συνδρόμων [179].

Όπως ήδη αναφέρθηκε, αν και η ασπιρίνη προκαλεί την αναστολή της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων μέσω της αναστολής της θρομβοξάνης A₂ (TXA₂), δεν είναι δραστική σε άλλους αγωνιστές των αιμοπεταλίων όπως το

ADP [208]. Η ασπιρίνη, όμως παρολαυτά αποτελεί αντιαιμοπεταλικό παράγοντα αναφοράς για την αντιμετώπιση των οξέων στεφανιαίων συνδρόμων. Οι πληροφορίες από πειραματικά μοντέλα είναι αντικρουόμενες. Από τη μία φαίνεται ότι η ασπιρίνη σε δόση 100 mg/kg βάρους, δεν μπορεί να αναστείλει τη δημιουργία θρόμβου σε φωτοχημικό μοντέλο αρτηριακής θρόμβωσης σε ποντικούς, καθώς φαίνεται ότι δεν αναστέλλει μόνο την TXA_2 των αιμοπεταλίων, αλλά και την προσταγλαδίνη I_2 των ενδοθηλιακών κυττάρων του τοιχώματος των αγγείων, η οποία ασκεί αντιθρομβωτική δράση [228]. Παρόμοια η ασπιρίνη σε ηλεκτρικό μοντέλο, αρτηριακής θρόμβωσης καρωτίδας κουνελιού, ενώ παρουσιάζει ισχυρή αναστολή των αιμοπεταλίων με αγωνιστή το ινωδογόνο και διατηρεί τη ροή του αγγείου μετά την επαγωγή θρόμβου, δεν προκαλεί στατιστικά σημαντική μείωση του βάρους του σχηματισθέντος θρόμβου [179]. Από την άλλη, πειραματικά μοντέλα αρτηριακής θρόμβωσης της καρωτίδας χοίρων, έδειξαν ότι η ασπιρίνη σε δόση 160 mg την ημέρα, αποδείχθηκε αποτελεσματική στην πρόληψη δημιουργίας θρόμβου σε σχέση με το placebo. Το μέγεθος του θρόμβου και η ροή στο αγγείο, ήταν στατιστικά σημαντικά μικρότερη σε σχέση με την ομάδα ελέγχου στην ομάδα της ασπιρίνης. Ακόμη όμως καλύτερα αποτελέσματα, στο συγκεκριμένο μοντέλο αρτηριακής θρόμβωσης, σε σχέση με την ασπιρίνη παρουσίασαν άλλοι παράγοντες, όπως η ιρουδίνη [229].

Η αδυναμία λοιπόν, των αναστολέων της TXA_2 και ειδικότερα της ασπιρίνης, οδήγησαν από νωρίς στην ανάπτυξη άλλων αντιαιμοπεταλιακών παραγόντων που αναστέλλουν την ενεργοποίηση και την συσσώρευση των αιμοπεταλίων που επάγονται από άλλους αγωνιστές. Κυριότερος εκπρόσωπος της κατηγορίας αυτής των φαρμάκων αποτελεί η κλοπιδογρέλη. Η κλοπιδογρέλη αποτελεί ένα προ-φάρμακο, καθώς η ίδια δεν είναι δραστική, αλλά μετά τον μεταβολισμό της στο ήπαρ δημιουργείται ο δραστικός μεταβολίτης της. Αυτός συνδέεται στους υποδοχείς $P2Y_{12}$ της κυτταρικής

μεμβράνης των αιμοπεταλίων, οι οποίοι είναι υποδοχείς του ADP. Η σύνδεση της με τον υποδοχέα, ανταγωνίζεται τη σύνδεση του ADP, προκαλώντας αναστολή της ενεργοποίησης και της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων [230].

Παλαιότερα πειραματικά πρωτόκολλα αρτηριακής θρόμβωσης (ηλεκτρικό μοντέλο σε καρωτίδα κουνελιού), έδειξαν ότι η κλοπιδογρέλη σε δόση 100 mg/kg βάρους, προκαλεί αναστολή της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων κατά 68% και 80% με αγωνιστές το ADP και το κολλαγόνο αντίστοιχα, με σημαντική μείωση του βάρους του θρόμβου και διατήρηση της βατότητας του αγγείου, σε σχέση με την ομάδα ελέγχου (placebo) [179]. Τα πειραματικά δεδομένα αυτά επιβεβαιώθηκαν και από νεότερες εργασίες, οι οποίες απέδειξαν ότι αρκούν και μικρότερες δόσεις κλοπιδογρέλης για να μειώσουν το βάρος του θρόμβου σε μοντέλο αρτηριακής θρόμβωσης καρωτίδας κουνελιού (1-30 mg/kg βάρους), ενώ ακόμη μικρότερες δόσεις επαρκούσαν για τη διατήρηση της ροής του αγγείου (0,3 mg/kg βάρους). Η αναστολή των αιμοπεταλίων ξεκινούσε από χαμηλές δόσεις και αυξανόταν με δοσοεξαρτώμενο τρόπο [230].

Η αναστολή της συσσώρευσης και ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων, μπορεί όμως να επιτευχθεί, και με εκλεκτικότερο τρόπο. Στην κυτταρική μεμβράνη των αιμοπεταλίων υπάρχουν διάφοροι τύποι υποδοχέων του ADP, οι P2Y και οι P2T. Οι P2Y υποδοχείς απαντώνται, μεταξύ άλλων και στα λεία μυϊκά κύτταρα, ενώ οι P2T απαντώνται αποκλειστικά στα αιμοπετάλια. Ο ειδικός ανταγωνιστής των P2T υποδοχέων AR-C69931MX, προκάλεσε στατιστικά σημαντική μείωση του θρόμβου σε ηλεκτρικό μοντέλο θρόμβωσης καρωτίδας σκύλων, μέσω της στατιστικά σημαντικής αναστολής της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων, εξασφαλίζοντας την βατότητα του αγγείου, σε σχέση με την ομάδα ελέγχου. Χαρακτηριστικό είναι ότι η αντιαιμοπεταλιακή δράση του φαρμάκου εξαφανίζεται σχεδόν σε μία ώρα από τη διακοπή της χορήγησης, καθώς η συσσώρευση των αιμοπεταλίων ζώων, που έλαβαν την

ουσία, γίνεται παρόμοια με της ομάδας ελέγχου μετά από τη διακοπή χορήγησης της ουσίας για μία ώρα [185].

Παρά την θρομβολυτική αγωγή μετά από έμφραγμα του μυοκαρδίου, η παρατήρηση, ότι σημαντικός αριθμός ασθενών, εμφανίζει και πάλι συμπτώματα ή αναπτύσσει νέο οξύ στεφανιαίο σύνδρομο ακόμη και παρά τη λήψη ενός ή και περισσότερων αντιαιμοπεταλιακών παραγόντων, όπως η ασπιρίνη και η κλοπιδογρέλη, καθώς και η ανάγκη έντονης αιμοπεταλιακής αναστολής σε ασθενείς που θα υποβληθούν σε επαναγγείωση, οδήγησε στην ανάπτυξη μιας σημαντικής ομάδας φαρμάκων, που συνδέονται με την ιντεγκρίνη $\alpha_{IIb}\beta_3$ της κυτταρικής μεμβράνης των αιμοπεταλίων (αναστολείς των IIb/IIIa υποδοχέων) [206].

Οι IIb/IIIa υποδοχείς, είναι αυτοί που κυρίως συμμετέχουν και ρυθμίζουν την ενεργοποίηση και συσσώρευση των αιμοπεταλίων, μέσω της σύνδεσής τους με το ινωδογόνο και τον vWf. Η αναστολή των υποδοχέων αυτών είναι πολύ σημαντική καθώς προκαλεί αναστολή της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων που επάγεται από οποιοδήποτε αγωνιστή τους, είτε είναι το αραχιδονικό οξύ (ασπιρίνη), είτε το ADP (τικλοπιδίνη ή κλοπιδογρέλη) [231].

Οι αναστολείς των IIb/IIIa υποδοχέων, διακρίνονται σε τρεις (3) μεγάλες κατηγορίες:

- 1) τις δισιντεγκρίνες,
- 2) τα μονοκλωνικά αντισώματα και
- 3) τα RGD ανάλογα που ανάλογα με την χημική τους σύνθεση

διακρίνονται σε πεπτιδικά, πεπτιδομιμητικά και μη πεπτιδικά ανάλογα.

Δισιντεγκρίνες

Οι δισιντεγκρίνες είναι οι μόνοι φυσικοί αναστολείς των IIb/IIIa υποδοχέων. Το πρώτο από αυτήν την κατηγορία των φαρμάκων είναι η *trigramin*: ένα πεπτίδιο που αποτελείται από 72 αμινοξέα και απομονώθηκε

στο δηλητήριο Ινδικής οχιάς. Η ουσία αυτή προκαλεί ισχυρή αναστολή των αιμοπεταλίων σε πειραματικά μοντέλα *in vitro*. Συγκεκριμένα η *trigargin* αναστέλλει με δόσοεξαρτώμενο τρόπο την συσσώρευση ανθρώπινων αιμοπεταλίων σε ελάχιστες συγκεντρώσεις (13-200 nM) [232]. Ακολούθως ένας μεγάλος αριθμός μορίων με παρόμοια δράση ανακαλύφθηκε. Ένα από αυτά η *barbourin*, που απομονώθηκε στο δηλητήριο κροταλία (*Sistrurus m. Barbouri*). Η *barbourin*, φαίνεται ότι περιέχει την KGD ακολουθία, μέσω της οποίας προκαλεί την αναστολή των αιμοπεταλίων. Η αναστολή γίνεται με πολύ ειδικό τρόπο, καθώς η *barbourin* δεσμεύεται μόνο με την ιντεγκρίνη $\alpha_{IIb}\beta_3$ και όχι με την $\alpha_{v}\beta_3$ της βιτρονεκτίνης των ενδοθηλιακών κυττάρων [233]. Η μελέτη της *barbourin*, βοήθησε στην πρώτη σύνθεση κυκλικών πεπτιδίων που την μιμούταν και περιείχαν την RGD ακολουθία. Ένα τέτοιο πεπτίδιο η *bitistatin*, βοήθησε στην μείωση του βάρους του θρόμβου, στην αναστολή της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων με αγωνιστή το ADP, επιτάχυνε την δράση των θρομβολυτικών και διατήρησε την βατότητα και τη ροή του αγγείου, μαζί με την ηπαρίνη και την θρομβόλυση, σε πειραματικό ηλεκτρικό μοντέλο θρόμβωσης στεφανιαίων αγγείων σε σκύλους. Η δράση της όσον αφορά την αναστολή της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων ουσιαστικά εξαφανίζεται μία ώρα μετά τη διακοπή χορήγησης της ουσίας [234]. Για διάφορους λόγους η περαιτέρω ανάπτυξη των φαρμάκων αυτών δεν προχώρησε [231].

Μονοκλωνικά αντισώματα

Σχεδόν ταυτόχρονα με την ανακάλυψη των δισιντεγκρινών, γεννήθηκε η ιδέα ανάπτυξης αντισωμάτων έναντι των IIb/IIIa υποδοχέων. Η έρευνα σε αυτόν τον τομέα οδήγησε στην ανάπτυξη του χιμαιρικού αντισώματος c7E3-Fab (*abciximab*). Η *abciximab* δεν είναι ειδικό αντίσωμα για τον IIb/IIIa υποδοχέα καθώς αλληλεπιδρά και με υποδοχείς άλλων κυττάρων [231]. Η δραστηριότητα της επιβεβαιώθηκε σε πειραματικά μοντέλα πιθήκων. Σε ένα

τέτοιο μοντέλο η λαγόνια αρτηρία του ζώου καθετηριάστηκε ενώ το ενδοθήλιο του αγγείου τραυματίστηκε με απόσυρση καθετήρα Fogarty 3F. Παράλληλα, τοποθετήθηκε stent στην αριστερή υποκλειδία αρτηρία. Η abciximab, πέρα από την στατιστικά σημαντική αναστολή της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων, είχε ευνοϊκή επίδραση στην δημιουργία θρόμβου στην λαγόνια αρτηρία, αλλά και στη διατήρηση της βατότητας του stent και της μείωσης της ενδοθηλιακής υπερπλασίας στο τοίχωμα της υποκλειδίου [235]. Αποτελεσματική όμως ήταν και σε μοντέλο ηλεκτρικής θρόμβωσης σε καρωτίδες πιθήκων [236]. Η abciximab μείωσε σημαντικά το βάρος του θρόμβου στην καρωτίδα, διατήρησε την ροή και τη βατότητα του αγγείου με δοσοεξαρτώμενο τρόπο και ανέστειλε στατιστικά σημαντικά την συσσώρευση των αιμοπεταλίων σε σχέση με την ασπιρίνη, την ηπαρίνη ή τον συνδυασμό και των δύο.

RGD ανάλογα

Πεπτιδικά ανάλογα: Η σύνδεση του ινωδογόνου μέσω της RGD αλληλουχίας, αποτέλεσε τη βάση της πρώτης προσπάθειας δημιουργίας πεπτιδίων που θα περιέχουν την ακολουθία αυτή και θα αποτελούν αναστολείς της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων [231]. Ένα τέτοιο μόριο το SC-46749, έδειξε αναστολή της συσσώρευσης ανθρώπινων αιμοπεταλίων *in vitro*, σε πλούσιο σε αιμοπετάλια πλάσμα (PRP), με IC_{50} στα 32 nM. Σε πειραματικό ηλεκτρικό μοντέλο θρόμβωσης καρωτίδας ποντικού, το SC-46749, μείωσε το βάρος του θρόμβου, κράτησε βατό το αγγείο και ανέστειλε στατιστικά σημαντικά τη συσσώρευση των αιμοπεταλίων. Επιπρόσθετα, όταν η ουσία χορηγήθηκε σε σκύλους πέτυχε *ex vivo* αναστολή της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων με αγωνιστή το κολλαγόνο [237]. Το πεπτίδιο αυτό όμως δεν αποδείχθηκε τελικά ισχυρά δραστικό για τους ανθρώπους καθώς συγκριτικές *in vitro* μελέτες συσσώρευσης αιμοπεταλίων σε PRP, το πεπτίδιο

αποδείχθηκε κατά σειρά δραστικότερο σε πιθήκους, σε σκύλους, στον άνθρωπο, σε ινδικά χοιρίδια και τέλος σε ποντικούς [238]. Σημαντική πρόοδος επετεύχθη με τη σύνθεση του πεπτιδίου SC-52012, το οποίο *in vitro* αποδείχθηκε ότι συνδέεται ισχυρά και εκλεκτικά με τον IIb/IIIa υποδοχέα προκαλώντας αναστολή της συσσώρευσης αιμοπεταλίων [239].

Ένας άλλος τρόπος προσέγγισης για τη σύνθεση πεπτιδίων RGD-ανάλογων, αποτέλεσε η σύνθεση κυκλικών πεπτιδίων που θα περιέχουν την RGD ή την KGD ή κατάλληλα τροποποιημένες ακολουθίες [231]. Μόρια που η κυκλική δομή του πεπτιδίου επιτυγχάνεται μέσω δισουλφιδικού δεσμού, όπως το SK&F 106760, έδειξαν ισχυρή αναστολή της συσσώρευσης αιμοπεταλίων και μείωση του βάρους θρόμβου σε ηλεκτρικό μοντέλο θρόμβωσης στεφανιαίων σε σκύλους [230]. Το κυκλικό μόριο TP-9201, που περιέχει την RGD ακολουθία, ανέστειλε την συσσώρευση των ανθρώπινων αιμοπεταλίων *in vitro* με IC_{50} 220 nM [230], ενώ και σε πειραματικά μοντέλα αρτηριακής θρόμβωσης καρωτίδας σκύλων με την εφαρμογή ηλεκτρικού ρεύματος [231], το κυκλικό πεπτίδιο αυτό μείωσε στατιστικά σημαντικά το βάρος του θρόμβου, μέσω της αναστολής της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων και διατήρησε τη ροή του αγγείου σε συνδυασμό με θρομβόλυση σε μεγαλύτερο βαθμό συγκριτικά με την ηπαρίνη ή την ασπιρίνη. Ερευνητικό ενδιαφέρον παρουσίασε και το κυκλικό μόριο G4120 που χρησιμοποιεί την RGD ακολουθία με θειοαιθέρες και σουλφοξειδικούς δεσμούς. Και αυτό δοκιμάστηκε σε ηλεκτρικό μοντέλο θρόμβωσης στεφανιαίων σε σκύλους, σε συνδυασμό με θρομβόλυση και ηπαρίνη. Και το μόριο αυτό ανέστειλε την συσσώρευση των αιμοπεταλίων, με αποτέλεσμα την μείωση του βάρους του θρόμβου και τη βατότητα του αγγείου [232].

Πεπτιδομιμητικά RGD ανάλογα: Τα φάρμακα αυτά προέκυψαν από την αντικατάσταση της RGD με άλλες τροποποιημένες ακολουθίες. Παράλληλα λοιπόν με τη σύνθεση και ανάπτυξη των παραπάνω μορίων, άλλοι ερευνητές απέδειξαν την αποτελεσματικότητα RGD αναλόγων, στα οποία η ακολουθία Arg-Gly, αντικαταστάθηκε από ομάδα πιπεριδίνης αρχικά, και από κατάλληλα τροποποιημένες ομάδες στην συνέχεια, με σκοπό την ισχυρότερη και εκλεκτικότερη σύνδεση με τον IIb/IIIa υποδοχέα. Τέτοιο μόριο αποτελεί το Ro 43-5054, το οποίο δοκιμάστηκε πειραματικά σε ηλεκτρικό μοντέλο θρόμβωσης στεφανιαίων αγγείων σκύλων. Το μόριο αυτό μείωσε το βάρος του θρόμβου, διατήρησε ανοικτό το αγγείο και ανέστειλε στατιστικά σημαντικά την συσσώρευση των αιμοπεταλίων [233]. Η αντικατάσταση της RGD ακολουθίας όμως δεν οδηγεί πάντα στη σύνθεση δραστικών μορίων.

Τη μεγάλη διαφορά στην κατηγορία αυτή των IIb/IIIa αναστολέων, έκανε όμως ένα εππταπεπίδιο, που είναι πεπτιδικό ανάλογο της barbourin και περιέχει και την ακολουθία KGD, όπου η Arg έχει αντικατασταθεί από Lys. Η ακολουθία αυτή παρουσιάζει υψηλή εξειδίκευση για τον IIb/IIIa υποδοχέα, προκαλώντας αναστολή της συσσώρευσης ανθρώπινων αιμοπεταλίων σε ανθρώπινο PRP με τιμή $IC_{50}=140$ nM [231]. Το μόριο αυτό είναι η eptifibatide, Integrilin®, πολύ γνωστός και ευρέως χρησιμοποιούμενος κλινικά IIb/IIIa αναστολέας [231]. Οι ερευνητές που συνέθεσαν και ανέπτυξαν το μόριο της επιφιμπατίδης, αναφέρουν ότι το πεπτίδιο προκαλεί αναστολή της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων σε μοντέλα αρτηριακής θρόμβωσης σε σκύλους και πιθήκους. Πιο συγκεκριμένα, η επιφιμπατίδη παρουσίασε αναστολή της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων σε μοντέλο αρτηριακής θρόμβωσης σε σκύλους, σε δόση 4 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$, ενώ παρουσίασε ολική αναστολή της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων σε μοντέλο αρτηριακής θρόμβωσης σε πιθήκους, μέσα σε 25 λεπτά σε δόσεις 5 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$ και 10 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$. Παράλληλα η συσσώρευση των αιμοπεταλίων

επανήλθε στο φυσιολογικό μετά από 15 με 30 λεπτά μετά τη διακοπή του φαρμάκου [244]. Πεπτίδιο μιμητικό της RGD αλληλουχίας με ισχυρή αντισταθμιστική δράση, αποτελεί και το DMP 728. Το πεπτίδιο έχει δείξει ισχυρή αναστολή της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων, σε μικρές δόσεις (0,1 mg/kg βάρους bolus), ενώ παρουσιάζει παρατεταμένη αναστολή, έως και 100%, ακόμη και 6 ώρες μετά από την bolus δόση (1,0 mg/kg βάρους) σε σκύλους. Το μόριο (DMP 728), διατήρησε, στα ίδια πειραματόζωα, την βατότητα του αγγείου, σε μοντέλο μηχανικής θρόμβωσης στεφανιαίων αγγείων και ηλεκτρικής θρόμβωσης μηριαίας αρτηρίας των ίδιων ζώων [245].

Μη πεπτιδικά RGD ανάλογα: Η φαρμακευτική εταιρεία Merck KGaA ανακάλυψε και συνέθεσε, ένα μη-πεπτιδικό RGD ανάλογο το MK-0383, αργότερα γνωστό ως tirofiban. Η tirofiban είναι ένα μόριο με αμινικές και καρβοξυλικές ιδιότητες, με δομή παρόμοια με την RGD ακολουθία ενώ επιπλέον η δομή του μορίου της είναι τέτοια που μπορεί να υποστεί εύκολα επεξεργασία με σκοπό την βελτιστοποίηση των ιδιοτήτων της, σε σχέση με πεπτίδια που φέρουν την RGD ακολουθία [231]. Η tirofiban, παρουσίασε ισχυρή αναστολή της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων σε δόσεις από 0,1 έως 10 μg/kg/min. Η συσσώρευση των αιμοπεταλίων επανέρχεται στο φυσιολογικό μετά από 30 με 90 λεπτά από την διακοπή χορήγησης του φαρμάκου. Η tirofiban, μείωσε το βάρος του θρόμβου σε συνδυασμό με την θρομβόλυση σε μοντέλο αρτηριακής θρόμβωσης στεφανιαίων αγγείων σκύλων, ενώ στη μεγάλη δόση κατάφερε να διατηρήσει τη ροή στο αγγείο [194].

Το μόριο CRL42796, ένα άλλο μη πεπτιδικό ανάλογο, παρουσίασε ευνοϊκά αποτελέσματα σε μοντέλα αρτηριακής θρόμβωσης στεφανιαίων σκύλων [184, 186]. Το μόριο αυτό ήταν αποτελεσματικό είτε μόνο του [184], είτε σε συνδυασμό με θρομβόλυση [186], σε ηλεκτρικό μοντέλο θρόμβωσης στεφανιαίων αγγείων σκύλων μειώνοντας το βάρος του σχηματιζόμενου

θρόμβου και αναστέλλοντας την συσσώρευση των αιμοπεταλίων σε σχέση με την ομάδα ελέγχου και διατηρώντας την ροή στο αγγείο.

Η έρευνα για την σύνθεση μη-πεπτιδικών ανάλογων, οδήγησε στη σύνθεση μιας σειράς μονοκυκλικών παραγόντων που χορηγούνται από το στόμα, εκτός από την ενδοφλέβια χορήγηση. Ένα τέτοιο παράδειγμα είναι η roxifiban (DMP 754), η οποία είναι ένα προφάρμακο, ενώ η δράση της ασκείται από τον ενεργό της μεταβολίτη, τον XV 459. Το φάρμακο έχει αποδειχθεί αποτελεσματικό σε μοντέλο ηλεκτρικής θρόμβωσης σε καρωτίδα σκύλου και σε μοντέλο μηχανικής θρόμβωσης σε μηριαία αρτηρία του ίδιου ζώου. Ο ενεργός μεταβολίτης XV 459, μείωσε το βάρος του θρόμβου και στα δύο πειραματικά μοντέλα με δόση 0,4 mg/kg per os και δόση 0,1 mg/kg ενδοφλέβια bolus, σε σχέση με την ομάδα ελέγχου. Η βατότητα των αγγείων διατηρήθηκε, ενώ η αναστολή της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων, παρέμεινε υψηλή και παρόμοια και στις δύο ομάδες, (80% και 90% αντίστοιχα). Παρόμοια αποτελέσματα παρουσίασε όμως και η χορήγηση του προφαρμάκου roxifiban. Στις παραμέτρους, ροή των αγγείων, βάρος θρόμβου και αναστολή των αιμοπεταλίων, η roxifiban παρουσίασε στατιστικά σημαντικά αποτελέσματα σε δόση 0,1 mg/kg ενδοφλέβια bolus και 0,3 mg/kg per os [292].

Ο αναστολέας xemilofiban (SC-54684A), αποτελεί ένα μη πεπτιδικό ανάλογο με ισχυρή αντιαιμοπεταλιακή δράση. Είναι το προφάρμακο του ενεργού μεταβολίτη SC-54701A, ο οποίος είναι υπεύθυνος για την δράση του. Αποδείχθηκε αρκετά ισχυρός αναστολέας της ex vivo συσσώρευσης των αιμοπεταλίων με ικανοποιητική βιοδιαθεσιμότητα σε σκύλους [246]. Οι ίδιοι ερευνητές, στην προσπάθεια να βελτιώσουν τις φαρμακολογικές ιδιότητες της xemilofiban, συνέθεσαν ένα νέο αναστολέα την orbofiban, με αυξημένη δραστηριότητα και βελτιωμένη βιοδιαθεσιμότητα [231].

Μόρια που περιέχουν πιπεριδίνες, αποδείχθηκαν δραστικά σε μοντέλα αρτηριακής θρόμβωσης σε πειραματόζωα. Το L-734,217 αποδεικνύεται ισχυρός αναστολέας των αιμοπεταλίων σε μοντέλο θρόμβωσης στεφανιαίων σκύλων, που μειώνει το βάρος του θρόμβου και διατηρεί τη βατότητα της ροής του αγγείου με σημαντική αναστολή της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων, σε δόση 3mg/kg βάρους από το στόμα με βιοδιαθεσιμότητα 8% με 16%. Το μόριο δοκιμάστηκε και σε μοντέλο αρτηριακής θρόμβωσης σε αγγεία ποντικών και ινδικών χοιριδίων με καλά αποτελέσματα [247].

Με την πρόοδο της έρευνας συντέθηκε ένας μεγάλος αριθμός μη πεπτιδικών μορίων, που μπορούν να χορηγηθούν από το στόμα. Τα μόρια αυτά μελετήθηκαν διεξοδικά όσον αφορά την αναστολή της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων που επάγεται από διάφορους αγωνιστές. Επίσης εκτεταμένη έρευνα σε διάφορα είδη ζώων έγινε και για τη μελέτη της βιοδιαθεσιμότητας των παραγόντων αυτών, χωρίς όμως τα μόρια αυτά να δοκιμαστούν σε μοντέλα πειραματικής αρτηριακής θρόμβωσης. Μόρια λοιπόν όπως η lamifiban, η sibrfiban, η lefradafiban, το μόριο ZD 2486, το UR-12947, μελετήθηκαν εκτεταμένα, σε διάφορα είδη ζώων, όσον αφορά την αναστολή της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων και τη βιοδιαθεσιμότητα χωρίς όμως να αξιολογηθούν σε μοντέλα θρόμβωσης [231].

Σημαντικό μονοκυκλικό μη πεπτιδικό RGD ανάλογο αποτελεί και το SR 121787, το οποίο μείωσε στατιστικά σημαντικά το βάρος του θρόμβου, ανέστειλε τη συσσώρευση των αιμοπεταλίων και διατήρησε ροή στην καρωτίδα κουνελιού, που ο θρόμβος δημιουργήθηκε με την εφαρμογή ηλεκτρικού ρεύματος [179].

Από τη συνεχή ανάπτυξη νέων μορίων και την έρευνα που αφορά την τρτοταγή και στερεοτακτική δομή, μη πεπτιδικών RGD-αναλόγων, προέκυψαν μια σειρά δικυκλικών και σπειροκυκλικών μορίων για από του στόματος χορήγηση με διαφορετικές βιοδιαθεσιμότητες και ισχύ αιμοπεταλιακής

αναστολής, σε διάφορα είδη πειραματοζώων. Μόρια όπως το G6788, το SK&F 107260 ή Iotrafiban (SB-214857), το L-746,223, το L-738,167, το L-739,758, το L-734,217, τα GR 144053 και TAK-029 κ.α. παρουσίασαν σύμφωνα με τους μελετητές διαφορετική βιοδιαθεσιμότητα από είδος σε είδος διατηρώντας σε υψηλά ποσοστά την αναστολή της συσώρευσης των αιμοπεταλίων (>60%), αλλά με διάρκεια δράση και χρόνους ημιζωής που διέφεραν κατά πολύ μεταξύ τους [231]. Στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 3) αναφέρονται οι IIb/IIIa αναστολείς ανάλογα με την οδό χορήγησης και τη δομή τους.

Παρά όμως τα αρχικά ενθαρρυντικά πειραματικά αποτελέσματα, οι από του στόματος αναστολείς των IIb/IIIa δεν αποδείχθηκαν αποτελεσματικοί σε κλινικές μελέτες. Χαρακτηριστικά, η *per os* χορήγηση xemilofiban σε δόσεις των 10 ή 20mg τρεις φορές την ημέρα σε ασθενείς που είχαν υποβληθεί σε αγγειοπλαστική δεν μείωσε την συχνότητα του πρωτογενούς σύνθετου τριπλού σημείου θανάτου, εμφράγματος του μυοκαρδίου ή ανάγκης για επαναγγείωση σε σχέση με την ομάδα ελέγχου [248]. Παρόμοια η sibrafiban όταν χορηγήθηκε σε ασθενείς μετά από οξύ στεφανιαίο σύνδρομο χωρίς ανόσπασση του ST διαστήματος, δεν κατάφερε να μειώσει τη συχνότητα επανεμφάνισης μυοκαρδιακής ισχαιμίας, εμφράγματος του μυοκαρδίου ή θανάτου 90 ημέρες μετά το επεισόδιο [249]. Η χορήγηση τέλος orbofiban παρουσίασε αυξημένα ποσοστά θνησιμότητας σε ασθενείς με οξύ στεφανιαίο σύνδρομο 30 ημέρες και 7 μήνες μετά το επεισόδιο [250]

Πίνακας 3: Αναστολείς των IIb/IIIa υποδοχέων, που έχουν δοκιμαστεί σε πειραματικά μοντέλα, ανάλογα με τη δομή τους και την οδό χορήγησής τους.

	IIb/IIIa αναστολείς για χορήγηση ενδοφλέβια	IIb/IIIa αναστολείς και για per os χορήγηση
Δισιντεγκρίνες	Trigramin Barbourin Bitistatin Antistatin Echistatin	
Μονοκλωνικά αντισώματα	Abciximab	
RGD ανάλογα		
Πεπτιδικά ανάλογα	SC-46749 SK&F 106760 G4120	
Πεπτιδομιμητικά ανάλογα	Eptifibatide Ro 43-5054 FK633 DMP 728	
Μη πεπτιδικά ανάλογα	Tirofiban (MK-0383) Lamifiban CRL42796	DMP 754 Xemilofiban (SC-54684A) Orbofiban L-734,217 Lamifiban Sibrfiban Lefradafiban ZD 2486 UR-12947 SR 121787 G6788 SK&F 107260 Lotrafiban (SB-214857) L-746,223

		L-738,167 L-739,758 L-734,217, GR 144053 TAK-029
--	--	--

5 Ομοιότητες και διαφορές μεταξύ των αιμοπεταλίων ανθρώπου και κουνελιού

5.1 Γενικά χαρακτηριστικά των αιμοπεταλίων του κουνελιού

Τα αιμοπετάλια του κουνελιού είναι μικρότερα σε μέγεθος από τα αιμοπετάλια του ανθρώπου. Ο μέσος όγκος των αιμοπεταλίων κουνελιού κυμαίνεται από 3,3 έως 5,1 fl [251-254] ενώ των αιμοπεταλίων ανθρώπου από 6 έως 8 fl [251,253-255]. Σε συμφωνία με το μικρότερο μέγεθός τους, τα αιμοπετάλια κουνελιού έχουν μικρότερο πρωτεϊνικό περιεχόμενο καθώς και μικρότερο περιεχόμενο σε σιαλικό οξύ.

Ο αριθμός των αιμοπεταλίων κουνελιού κυμαίνεται από 430.000 έως 645.000 ανά μl [278-281] και είναι σημαντικά μεγαλύτερος από τον αριθμό των αιμοπεταλίων ανθρώπου που κυμαίνεται από 150.000 έως 450.000 ανά μl [282, 283]. Έτσι, η συνολική μάζα των αιμοπεταλίων (μέγεθος x αριθμός αιμοπεταλίων) ανά μl αίματος είναι παρόμοια μεταξύ των δυο ειδών.

Η διάρκεια ζωής των αιμοπεταλίων κουνελιού στη κυκλοφορία του αίματος είναι πολύ μικρότερη από αυτή των αιμοπεταλίων ανθρώπου. Η διάρκεια ζωής των αιμοπεταλίων κουνελιού κυμαίνεται από 60 έως 77 h [260-264] ενώ των αιμοπεταλίων ανθρώπου από 176 έως 228 h [284-286].

Τέλος, ο αιματοκρίτης του ανθρώπινου αίματος είναι περίπου 45%, ενώ του αίματος κουνελιού είναι 36-38% [287, 288].

Η μορφολογία των αιμοπεταλίων κουνελιού είναι παρόμοια με αυτή των αιμοπεταλίων ανθρώπου. Τα αιμοπετάλια και των δυο ειδών έχουν δισκοειδές σχήμα, είναι απύρρηνα και περιέχουν πυκνά κοκκία, α-κοκκία, λυσισώματα, μιτοχόνδρια, γλυκογόνο, πυκνό σωληνοειδές σύστημα, πολυκάναλο σύστημα, μικροσωληνίσκους και κυτταροσκελετό [289 290].

Οι αξιοσημείωτες διαφορές στα περιεχόμενα των πυκνών κοκκίων των αιμοπεταλίων κουνελιού είναι η υψηλότερη συγκέντρωση ATP, Mg²⁺, σεροτονίνης και ισταμίνης και η χαμηλότερη συγκέντρωση ADP και Ca²⁺ (Πίνακας 1). Ακόμη, παρά την παρόμοια συγκέντρωση σε ινωδογόνο μεταξύ των δυο ειδών αιμοπεταλίων, τα πλυμένα αιμοπετάλια κουνελιού εκκρίνουν στο τεχνητό μέσο περισσότερο ινωδογόνο (8,2 μg/10⁹ αιμοπετάλια) σε σχέση με τα πλυμένα αιμοπετάλια ανθρώπου (1.0 μg/10⁹ αιμοπετάλια) και ως εκ τούτου δεν χρειάζονται εξωγενές ινωδογόνο για να συσσωρευτούν σε αντίθεση με τα αιμοπετάλια ανθρώπου [252].

Πίνακας 1: Διαφορές των συστατικών των αιμοπεταλίων κουνελιού και ανθρώπου.

Συστατικό	Κουνέλι	Άνθρωπος	
Πρωτεΐνη (mg/10 ⁹ αιμοπετάλια)	1,44 ± 0,20	1,72 ± 0,05	[253]
Ασβέστιο (μmol/10 ¹¹ αιμοπετάλια)	6,8±1,8	15,1±1,4	[278]
Μαγνήσιο (μmol/10 ¹¹ αιμοπετάλια)	7,2±2,4	6,4±1,0	[278]
Σεροτονίνη (μmol/10 ¹¹ αιμοπετάλια)	4,0	0,3	[278]
ATP (μmol/10 ¹¹ αιμοπετάλια)	7,1±3,0	5,5±1,0	[278]
ADP (μmol/10 ¹¹ αιμοπετάλια)	1,1±0,4	3,0±0,6	[278]
Ισταμίνη (μmol/10 ¹¹ αιμοπετάλια)	3,8	0,2	[253]

Ινωδογόνο ($\mu\text{g}/10^9$ αιμοπετάλια)	61,5 \pm 12,3	63,7 \pm 14,4	[254]
Σιαλικό οξύ ($\mu\text{g}/10^9$ αιμοπετάλια)	9,78 \pm 0,45	12,93 \pm 0,84	[253]
Δραστικότητα φωσφολιπάσης A2 (mU /mg)	10-35	0,1-1,0	[255]

Στην κυτταρική μεμβράνη των αιμοπεταλίων κουνελιού και ανθρώπου βρίσκονται 5 κύρια φωσφολιπίδια στις εξής αναλογίες (Πίνακας 2):

Πίνακας 2: Φωσφολιπίδια κυτταρικής μεμβράνης αιμοπεταλίων κουνελιού και ανθρώπου [238-241].

Φωσφολιπίδιο	Κουνέλι	Άνθρωπος
		ς
Φωσφατιδυλοχολίνη	31%	38%
Φωσφατιδυλοαιθανολαμίνη	32%	27%
Φωσφατιδυλοσερίνη	12%	10%
Φωσφατιδυλοινοσιτόλη	3%	5%
Σφιγγομυελίνη	22%	17%

Τα επίπεδα των διαφόρων λιπαρών οξέων στα φωσφολιπίδια των αιμοπεταλίων αντικατοπτρίζουν τη σύσταση της διαίτας του είδους. Τα κουνέλια είναι χορτοφάγα και ως εκ τούτου δεν προσλαμβάνουν αραχιδονικό οξύ από τη διαίτά τους με αποτέλεσμα το αραχιδονικό οξύ των κουνελιών να σχηματίζεται από επιμήκυνση του λινολείκου οξέος που προσλαμβάνουν με την τροφή. Αντίθετα, ο άνθρωπος είναι σαρκοφάγο και προσλαμβάνει αραχιδονικό οξύ από τη διαίτά του [256]. Εντούτοις η συγκέντρωση του αραχιδονικού οξέος δεν καθορίζει το ποσό του θρομβοξανθίνης που παράγεται

κατά την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων κουνελιού, διότι ο ορός των κουνελιών περιέχει 10 φορές περισσότερο θρομβοξάνη B_2 σε σχέση με τον ανθρώπινο ορό [257].

Σε αντίθεση με τα αιμοπετάλια ανθρώπου, τα αιμοπετάλια κουνελιού δεν εκφράζουν Fc υποδοχείς για την IgG [258]. Οι Fc υποδοχείς βρίσκονται στα αιμοπετάλια ανθρώπου και είναι τύπου $Fc_{\gamma}RII$ οι οποίοι δεσμεύουν την IgG υπό μορφή συμπλεγμάτων και με χαμηλή συγγένεια [239]. Τα αιμοπετάλια κουνελιού έχουν υποδοχείς για το C3b συστατικό του συμπληρώματος ενώ τα αιμοπετάλια ανθρώπου δεν διαθέτουν τέτοιους υποδοχείς [258].

5.1.1 Διαφορές και ομοιότητες της $\alpha_{IIb}\beta_3$ ανθρώπου και κουνελιού.

Βάσει μελετών, οι γλυκοπρωτεΐνες των αιμοπεταλίων κουνελιού α_{IIb} και β_3 έχουν MW 132 και 108 kDa [240] ενώ των αιμοπεταλίων ανθρώπου 146 kDa και 105 kDa αντίστοιχα [261]. Ακόμη, οι γλυκοπρωτεΐνες της μεμβράνης των αιμοπεταλίων κουνελιού έχουν πολύ υψηλότερη συγκέντρωση σε σάκχαρα σε σχέση με τα αιμοπετάλια ανθρώπου [257].

Αλληλουχία αμινοξέων της υπομονάδας α_{11b} κουνελιού [262].

L¹N²L³D⁴P⁵V⁶Q⁷L⁸T⁹I¹⁰Y¹¹T¹²G¹³L¹⁴N¹⁵G¹⁶S¹⁷H¹⁸F¹⁹G²⁰F²¹S²²
 L²³D²⁴F²⁵Y²⁶K²⁷D²⁸S²⁹H³⁰G³¹S³²V³³A³⁴I³⁵V³⁶V³⁷G³⁸A³⁹P⁴⁰R⁴¹
 T⁴²L⁴³G⁴⁴L⁴⁵G⁴⁶Q⁴⁷K⁴⁸E⁴⁹T⁵⁰G⁵¹G⁵²V⁵³F⁵⁴L⁵⁵C⁵⁶P⁵⁷W⁵⁸K⁵⁹A⁶⁰
 E⁶¹G⁶²S⁶³P⁶⁴C⁶⁵S⁶⁶L⁶⁷L⁶⁸S⁶⁹F⁷⁰N⁷¹L⁷²S⁷³D⁷⁴E⁷⁵Y⁷⁶R⁷⁷K⁷⁸T⁷⁹
 S⁸⁰S⁸¹Q⁸²L⁸³F⁸⁴Q⁸⁵T⁸⁶F⁸⁷R⁸⁸A⁸⁹R⁹⁰Q⁹¹G⁹²L⁹³G⁹⁴A⁹⁵S⁹⁶V⁹⁷V⁹⁸
 S⁹⁹W¹⁰⁰N¹⁰¹D¹⁰²I¹⁰³I¹⁰⁴V¹⁰⁵A¹⁰⁶C¹⁰⁷A¹⁰⁸P¹⁰⁹W¹¹⁰Q¹¹¹Q¹¹²W¹¹³N¹¹⁴
 V¹¹⁵L¹¹⁶E¹¹⁷K¹¹⁸A¹¹⁹A¹²⁰E¹²¹A¹²²E¹²³K¹²⁴T¹²⁵P¹²⁶V¹²⁷G¹²⁸G¹²⁹C¹³⁰F¹³¹
 V¹³²A¹³³H¹³⁴L¹³⁵P¹³⁶S¹³⁷G¹³⁸R¹³⁹R¹⁴⁰A¹⁴¹E¹⁴²Y¹⁴³S¹⁴⁴P¹⁴⁵C¹⁴⁶R¹⁴⁷
 G¹⁴⁸N¹⁴⁹T¹⁵⁰M¹⁵¹S¹⁵²H¹⁵³V¹⁵⁴Y¹⁵⁵E¹⁵⁶K¹⁵⁷M¹⁵⁸Y¹⁵⁹L¹⁶⁰R¹⁶¹D¹⁶²L¹⁶³
 R¹⁶⁴S¹⁶⁵C¹⁶⁶E¹⁶⁷A¹⁶⁸G¹⁶⁹F¹⁷⁰S¹⁷¹S¹⁷²V¹⁷³I¹⁷⁴T¹⁷⁵Q¹⁷⁶E¹⁷⁷G¹⁷⁸E¹⁷⁹
 L¹⁸⁰V¹⁸¹L¹⁸²G¹⁸³A¹⁸⁴P¹⁸⁵G¹⁸⁶G¹⁸⁷Y¹⁸⁸Y¹⁸⁹Y¹⁹⁰L¹⁹¹G¹⁹²F¹⁹³L¹⁹⁴V¹⁹⁵
 R¹⁹⁶A¹⁹⁷P¹⁹⁸I¹⁹⁹A²⁰⁰N²⁰¹I²⁰²I²⁰³S²⁰⁴S²⁰⁵Y²⁰⁶S²⁰⁷P²⁰⁸G²⁰⁹V²¹⁰L²¹¹
 L²¹²W²¹³T²¹⁴V²¹⁵P²¹⁶N²¹⁷Q²¹⁸N²¹⁹F²²⁰T²²¹F²²²D²²³Y²²⁴S²²⁵N²²⁶R²²⁷
 K²²⁸Y²²⁹F²³⁰D²³¹G²³²Y²³³R²³⁴G²³⁵Y²³⁶S²³⁷V²³⁸A²³⁹V²⁴⁰G²⁴¹E²⁴²
 F²⁴³D²⁴⁴G²⁴⁵D²⁴⁶L²⁴⁷S²⁴⁸T²⁴⁹T²⁵⁰E²⁵¹Y²⁵²V²⁵³L²⁵⁴G²⁵⁵A²⁵⁶P²⁵⁷
 T²⁵⁸W²⁵⁹S²⁶⁰W²⁶¹T²⁶²M²⁶³G²⁶⁴A²⁶⁵V²⁶⁶E²⁶⁷I²⁶⁸L²⁶⁹D²⁷⁰S²⁷¹Y²⁷²
 F²⁷³Y²⁷⁴R²⁷⁵L²⁷⁶H²⁷⁷R²⁷⁸L²⁷⁹Q²⁸⁰G²⁸¹E²⁸²Q²⁸³M²⁸⁴A²⁸⁵S²⁸⁶Y²⁸⁷
 F²⁸⁸G²⁸⁹H²⁹⁰S²⁹¹V²⁹²A²⁹³V²⁹⁴T²⁹⁵D²⁹⁶V²⁹⁷N²⁹⁸G²⁹⁹D³⁰⁰G³⁰¹R³⁰²
 H³⁰³D³⁰⁴L³⁰⁵L³⁰⁶V³⁰⁷G³⁰⁸A³⁰⁹P³¹⁰L³¹¹F³¹²M³¹³A³¹⁴S³¹⁵Q³¹⁶A³¹⁷D³¹⁸
 H³¹⁹K³²⁰L³²¹A³²²E³²³V³²⁴G³²⁵R³²⁶V³²⁷Y³²⁸L³²⁹F³³⁰L³³¹Q³³²L³³³
 Q³³⁴G³³⁵P³³⁶H³³⁷L³³⁸L³³⁹G³⁴⁰A³⁴¹P³⁴²S³⁴³L³⁴⁴L³⁴⁵L³⁴⁶T³⁴⁷G³⁴⁸T³⁴⁹
 Q³⁵⁰L³⁵¹Y³⁵²G³⁵³R³⁵⁴F³⁵⁵G³⁵⁶S³⁵⁷A³⁵⁸I³⁵⁹A³⁶⁰P³⁶¹L³⁶²G³⁶³D³⁶⁴L³⁶⁵
 N³⁶⁶R³⁶⁷D³⁶⁸G³⁶⁹Y³⁷⁰N³⁷¹D³⁷²V³⁷³A³⁷⁴V³⁷⁵A³⁷⁶A³⁷⁷P³⁷⁸Y³⁷⁹G³⁸⁰
 380
 G³⁸¹P³⁸²S³⁸³G³⁸⁴R³⁸⁵G³⁸⁶Q³⁸⁷V³⁸⁸L³⁸⁹V³⁹⁰Y³⁹¹L³⁹²G³⁹³Q³⁹⁴S³⁹⁵E³⁹⁶
 G³⁹⁷L³⁹⁸N³⁹⁹P⁴⁰⁰H⁴⁰¹P⁴⁰²S⁴⁰³Q⁴⁰⁴V⁴⁰⁵L⁴⁰⁶D⁴⁰⁷S⁴⁰⁸P⁴⁰⁹F⁴¹⁰P⁴¹¹

411 A 412 G 413 S 414 A 415 F 416 G 417 F 418 C 419 L 420 R 421 G 422 A 423 T 424 D 425 I 426 D
 427 D 428 N 429 G 430 Y 431 P 432 D 433 L 434 L 435 V 436 G 437 A 438 Y 439 G 440 A 441 D
 442 K 443 V 444 V 445 V 446 Y 447 R 448 A 449 Q 450 P 451 V 452 V 453 M 454 A 455 D 456 V 457
Q 458 L 459 L 460 V 461 Q 462 D 463 S 464 L 465 N 466 P 467 A 468 V 469 K 470 N 471 C 472 V
 473 L 474 H 475 Q 476 T 477 N 478 T 479 P 480 V 481 S 482 C 483 F 484 N 485 I 486 Q 487 M
 488 C 489 V 490 G 491 V 492 T 493 G 494 H 495 N 496 I 497 P 498 Q 499 G 500 L 501 Y 502 L
 503 Q 504 A 505 E 506 L 507 Q 508 L 509 D 510 R 511 Q 512 K 513 P 514 R 515 Q 516 G 517 R 518 R
 519 V 520 L 521 L 522 L 523 G 524 S 525 Q 526 Q 527 A 528 S 529 T 530
T 531 L 532 S 533 M 534 D 537 L 538 G 537 G 538 R 539 Q 540 S 541 R 542 L 543 C 544 H 545 N
 546 T 547 T 548 A 549 F 550 L 551 R 552 D 553 E 554 A 555 D 556 F 557 R 558 D 559 K 560 L
 561 S 562 P 563 I 564 V 565 L 566 S 567 F 568 N 569 V 570 S 571 L 572 Q 573 P 574 K 575 E 576 A
 577 G 578 V 579 A 580 P 581 A 582 V 583 V 584 L 585 H 586 G 587 N 588 T 589 H 590 V 591 Q
 592 E 593 Q 594 T 595 R 596 I 597 I 598 L 599 E 600 C 601 G 602 E 603 D 604 D 605 V 606 C 607 V
 608 P 609 Q 610 L 611 H 612 L 613 T 614 A 615 S 616 L 617 K 618 G 619 S 620 P 621 L 622 L 623 I
 624 G 625 A 626 D 627 N 628 V 629 L 630 E 631 L 632 Q 633 M 634 V 635 A 636 A 637 N 638 D
 639 G 640 E 641 G 642 A 643 Y 644 E 645 A 646 E 647 L 648 V 649 V 650 H 651 L 652 P 653 L 654 G
 655 A 656 H 657 Y 658 M 659 R 660 A 661 V 662 S 663 T 664 M 665 E 666 G 667 L 668 E 669 R
 670 L 671 I 672 C 673 N 674 Q 675 R 676 K 677 E 678 N 679 Q 680
T 681 K 682 A 683 V 684 L 685 C 686 E 687 L 688 G 689 N 690 P 691 M 692 K 693 Q 694 A 695 R
 696 I 697 G 698 I 699 T 700 M 701 L 702 V 703 S 704 V 705 G 706 N 707 L 708 E 709 D 710 A 711 G
 712 E 713 S 714 V 715 S 716 F 717 Q 718 L 719 Q 720 I 721 R 722 S 723 K 724 N 725 S 726 Q 727 N
 728 P 729 N 730 S 731 E 732 A 733 V 734 L 735 L 736 A 737 V 738 P 739 V 740 R 741 A 742 A 743 A
 744 Q 745 V 746 E 747 L 748 R 749 G 750 N 751 S 752 F 753 P 754 A 755 S 756 L 757 V 758 L 759 A
 760 E 761 E 762 G 763 D 764 Q 765 E 766 Q 767 N 768 S 769 L 770 D 771 L 772 K 773 V 774 E
 775 H 776 T 777 Y 778 E 779 L 780 H 781 N 782 N 783 G 784 P 785 G 786 T 787 V 788 R 789 G 790 L
 791 H 792 L 793 T 794 I 795 H 796 L 797 P 798 G 799 Q 800 S 801 Q 802 P 803 S 804 D 805 L
 806 L 807 Y 808 I 809 L 810 G 811 I 812 E 813 P 814 Q 815 G 816 G 817 L 818 Q 819 C 820 S 821 P
 822 Q 823 P 824 S 825 P 826 N 827 P 828 L 829 K 830 I 831 N 832 W 833 R 834 L 835 P 836 T 837 P

838 S 839 P 840 S 841 P 842 M 843 H 844 P 845 G 846 Y 847 R 848 R 849 E 850 R 851 R 852 H 853 A
 854 D 855 L 856 L 857 E 858 P 859 Q 860 P 861 S 862 S 863 A 864 A 865 G 866 P 867 R 868 D 869 P
 870 V 871 L 872 V 873 S 874 C 875 D 876 S 877 A 878 P 879 C 880 T 881 V 882 V 883 Q 884 C 885 E
 886 L 887 Q 888 E 889 M 890 A 891 R 892 G 893 Q 894 R 895 A 896 M 897 V 898 T 899 V 900 L
 901 A 902 L 903 L 904 G 905 L 906 S 907 S 908 L 909 R 910 E 911 R 912 P 913 L 914 D 915 Q 916 F
 917 V 918 L 919 Q 920 S 921 Q 922 A 923 W 924 F 925 N 926 V 927 S 928 S 929 L 930 P 931 Y
 932 A 933 V 934 P 935 A 936 L 937 S 938 L 939 P 940 S 941 G 942 E 943 A 944 L 945 V 946 Q 947 I
 948 Q 949 L 950 L 951 R 952 V 953 L 954 E 955 E 956 K 957 A 958 V 959 P 960 I 961 W 962 W
 963 V 964 L 965 V 966 G 967 A 968 L 969 G 970 G 971 L 972 L 973 L 974 L 975 I 976 L 977 L 978 V
 979 L 980 A 981 M 982 W 983 K 984 V 985 G 986 F 987 F 988 K 989 R 990 N 991 R 992 L 993 P
 994 L 995 E 996 E 997 E 998 D 999 E 1000 D 1001 E 1002 E 1003

Στοιχεία αλληλουχίας

- 1) Η υπομονάδα α_{IIb} κουνελιού έχει χωριστεί αυθαίρετα σε εξωκυττάριο, διαμεμβρανικό και ενδοκυττάριο τμήμα κατά αντιστοιχία με την υπομονάδα α_{IIb} ανθρώπου.
- 2) Οι υπογραμμισμένες αλληλουχίες είναι πανομοιότυπες με τις αλληλουχίες της υπομονάδας α_{IIb} ανθρώπου και διαφέρουν όμως ως προς τη θέση των αμινοξέων (μετατόπιση αλληλουχιών)
- 3) Τα σημειωμένα με κόκκινο χρώμα αμινοξέα είναι διαφορετικά από τα αμινοξέα της υπομονάδας α_{IIb} ανθρώπου
- 4) Η υπομονάδα α_{IIb} κουνελιού (1003 αμινοξέα) φέρει 5 αμινοξέα λιγότερα από την υπομονάδα α_{IIb} ανθρώπου (1008 αμινοξέα)

Αλληλουχία αμινοξέων της υπομονάδας β₃ κουνελιού [263].

G¹P²N³I⁴C⁵T⁶T⁷R⁸G⁹V¹⁰S¹¹S¹²C¹³Q¹⁴L¹⁵C¹⁶L¹⁷A¹⁸V¹⁹S²⁰P²¹M²²C²³A²⁴W²⁵C²⁶S²⁷D²⁸E²⁹A³⁰L³¹P³²V³³G³⁴S³⁵P³⁶R³⁷C³⁸D³⁹L⁴⁰R⁴¹E⁴²N⁴³L⁴⁴L⁴⁵Q⁴⁶D⁴⁷N⁴⁸C⁴⁹A⁵⁰P⁵¹E⁵²S⁵³I⁵⁴E⁵⁵F⁵⁶P⁵⁷V⁵⁸S⁵⁹E⁶⁰A⁶¹Q⁶²I⁶³L⁶⁴E⁶⁵A⁶⁶R⁶⁷P⁶⁸L⁶⁹S⁷⁰D⁷¹K⁷²G⁷³S⁷⁴G⁷⁵D⁷⁶S⁷⁷S⁷⁸Q⁷⁹V⁸⁰I⁸¹Q⁸²V⁸³S⁸⁴P⁸⁵Q⁸⁶R⁸⁷I⁸⁸A⁸⁹L⁹⁰R⁹¹L⁹²R⁹³P⁹⁴D⁹⁵D⁹⁶S⁹⁷K⁹⁸T⁹⁹F¹⁰⁰S¹⁰¹I¹⁰²Q¹⁰³V¹⁰⁴R¹⁰⁵Q¹⁰⁶V¹⁰⁷E¹⁰⁸D¹⁰⁹Y¹¹⁰P¹¹¹V¹¹²D¹¹³I¹¹⁴Y¹¹⁵Y¹¹⁶L¹¹⁷M¹¹⁸D¹¹⁹L¹²⁰S¹²¹Y¹²²S¹²³M¹²⁴K¹²⁵D¹²⁶D¹²⁷L¹²⁸R¹²⁹S¹³⁰I¹³¹Q¹³²N¹³³L¹³⁴G¹³⁵T¹³⁶K¹³⁷L¹³⁸A¹³⁹S¹⁴⁰Q¹⁴¹M¹⁴²R¹⁴³K¹⁴⁴L¹⁴⁵T¹⁴⁶S¹⁴⁷N¹⁴⁸L¹⁴⁹R¹⁵⁰I¹⁵¹G¹⁵²F¹⁵³G¹⁵⁴A¹⁵⁵F¹⁵⁶V¹⁵⁷D¹⁵⁸K¹⁵⁹P¹⁶⁰V¹⁶⁰S¹⁶²P¹⁶³Y¹⁶⁴M¹⁶⁵Y¹⁶⁶I¹⁶⁷S¹⁶⁸P¹⁶⁹P¹⁷⁰E¹⁷¹A¹⁷²L¹⁷³R¹⁷⁴N¹⁷⁵P¹⁷⁶C¹⁷⁷Y¹⁷⁸D¹⁷⁹M¹⁸⁰K¹⁸¹T¹⁸²T¹⁸³C¹⁸⁴L¹⁸⁵P¹⁸⁶M¹⁸⁷F¹⁸⁸G¹⁸⁹Y¹⁹⁰K¹⁹¹H¹⁹²V¹⁹³L¹⁹⁴T¹⁹⁵L¹⁹⁶T¹⁹⁷D¹⁹⁸Q¹⁹⁹V²⁰⁰T²⁰¹R²⁰²F²⁰³N²⁰⁴E²⁰⁵E²⁰⁶V²⁰⁷K²⁰⁸K²⁰⁹Q²¹⁰N²¹¹V²¹²S²¹³R²¹⁴N²¹⁵R²¹⁶D²¹⁷A²¹⁸P²¹⁹E²²⁰G²²¹G²²²F²²³D²²⁴A²²⁵I²²⁶M²²⁷Q²²⁸A²²⁹T²³⁰V²³¹C²³²D²³³E²³⁴K²³⁵I²³⁶G²³⁷W²³⁸R²³⁹N²⁴⁰D²⁴¹A²⁴²S²⁴³H²⁴⁴L²⁴⁵L²⁴⁶V²⁴⁷F²⁴⁸T²⁴⁹T²⁵⁰D²⁵¹A²⁵²K²⁵³T²⁵⁴H²⁵⁵I²⁵⁶A²⁵⁷L²⁵⁸D²⁵⁹G²⁶⁰R²⁶¹L²⁶²A²⁶³G²⁶⁴I²⁶⁵V²⁶⁶R²⁶⁷P²⁶⁸N²⁶⁹D²⁷⁰G²⁷¹Q²⁷²C²⁷³H²⁷⁴I²⁷⁵G²⁷⁶G²⁷⁷D²⁷⁸N²⁷⁹H²⁸⁰Y²⁸¹S²⁸²A²⁸³S²⁸⁴T²⁸⁵T²⁸⁶M²⁸⁷D²⁸⁸Y²⁸⁹P²⁹⁰S²⁹¹L²⁹²G²⁹³L²⁹⁴M²⁹⁵T²⁹⁶E²⁹⁷K²⁹⁸L²⁹⁹S³⁰⁰Q³⁰¹K³⁰²N³⁰³I³⁰⁴N³⁰⁵L³⁰⁶I³⁰⁷F³⁰⁸A³⁰⁹V³¹⁰T³¹¹E³¹²N³¹³V³¹⁴F³¹⁵N³¹⁶L³¹⁷Y³¹⁸Q³¹⁹N³²⁰Y³²¹S³²²E³²³L³²⁴I³²⁵P³²⁶G³²⁷T³²⁸T³²⁹V³³⁰G³³¹V³³²L³³³S³³⁴T³³⁵N³³⁶S³³⁷S³³⁸N³³⁹I³⁴⁰L³⁴¹Q³⁴²L³⁴³I³⁴⁴V³⁴⁵D³⁴⁶A³⁴⁷Y³⁴⁸G³⁴⁹K³⁵⁰I³⁵¹R³⁵²S³⁵³K³⁵⁴V³⁵⁵E³⁵⁶L³⁵⁷E³⁵⁸V³⁵⁹R³⁶⁰D³⁶¹L³⁶²P³⁶³E³⁶⁴E³⁶⁵L³⁶⁶S³⁶⁷L³⁶⁸S³⁶⁹F³⁷⁰N³⁷¹A³⁷²T³⁷³C³⁷⁴L³⁷⁵N³⁷⁶N³⁷⁷E³⁷⁸V³⁷⁹I³⁸⁰P³⁸¹G³⁸²L³⁸³K³⁸⁴S³⁸⁵C³⁸⁶V³⁸⁷G³⁸⁸L³⁸⁹K³⁹⁰I³⁹¹G³⁹²D³⁹³T³⁹⁴V³⁹⁵S³⁹⁶F³⁹⁷S³⁹⁸I³⁹⁹E⁴⁰⁰A⁴⁰¹K⁴⁰²V⁴⁰³R⁴⁰⁴G⁴⁰⁵C⁴⁰⁶P⁴⁰⁷Q⁴⁰⁸E⁴⁰⁹K⁴¹⁰E⁴¹¹K⁴¹²S⁴¹³F⁴¹⁴T⁴¹⁵I⁴¹⁶K⁴¹⁷P⁴¹⁸V⁴¹⁹G⁴²⁰F⁴²¹K⁴²²D⁴²³S⁴²⁴L⁴²⁵T⁴²⁶V⁴²⁷Q

428V 429T 430F 431D 432C 433D 434 C 435A 436C 437Q 438A 439H 440A 441E 442P
443H 444S 445H 446R 447C 448N 449N 450G 451N 452G 453T 454F 455E 456C 457G
458V 459C 460R 461C 462G 463P 464G 465W 466L 467G 468S 469Q 470C 471E 472C
473S 474E 475E 476D 477Y 478S 479P 480S 481Q 482Q 483D 484Q 485C 486S 487P
488K 489E 490G 491Q 492P 493I 494C 495S 496Q 497R 498G 499E 500C 501L 502C 503G
504Q 505C 506V 507C 508H 509S 510S 511D 512F 513G 514K 515I 516T 517G 518K 519Y
520C 521E 522C 523D 524D 525F 526S 527C 528V 529R 530Y 531K 532G 533E 534M
535C 536S 537G 538H 539G 540Q 541C 542S 543C 544G 545D 546C 547L 548C 549D
550S 551D 552W 553T 554G 555Y 556Y 557C 558N 559C 560T 561T 562R 563T 564D
565T 566C 567M 568S 569S 570N 571G 572L 573L 574C 575S 576G 577R 578G 579K
580C 581E 582C 583G 584S 585C 586V 587C 588I 589Q 590P 591G 592S 593Y 594G
595D 596T 597C 598E 599K 600C 601P 602T 603C 604P 605D 606A 607C 608T 609F 610K
611K 612E 613C 614V 615E 616C 617K 618K 619F 620E 621R 622G 623V 624L 625H 626E
627E 628N 629T 630C 631S 632R 633Y 634C 635R 636D 637E 638M 639E 640S 641V
642K 643E 644L 645R 646D 647T 648G 649K 650D 651A 652V 653N 654C 655T 656Y
657K 658N 659E 660D 661D 662C 663V 664V 665R 666F 667Q 668Y 669Y 670E 671D
672S 673S 674G 675K 676S 677I 678L 679Y 680V 681V 682E 683E 684P 685E 686C 687P
688K 689G 690P 691D 692I 693L 694V 695V 696L 697L 698S 699V 700M 701G 702A 703I
704L 705L 706I 707G 708F 709A 710L 711L 712L 713I 714W 715K 716L 717L 718I 719T
720I 721H 722D 723R 724K 725E 726F 727A 728K 729F 730E 731E 732E 733R 734A 735R
736A 737K 738W 739D 740T 741A 742N 743N 744P 745L 746Y 747K 748E 749A 750T
751S 752T 753F 754T 755N 756I 757T 758Y 759R 760G 761T 762

Στοιχεία αλληλουχίας

1) Η υπομονάδα β_3 του κουνελιού έχει χωριστεί αυθαίρετα σε εξωκυττάριο, διαμεμβρανικό και ενδοκυττάριο τμήμα κατά αντιστοιχία με την υπομονάδα β_3 ανθρώπου.

2) Δεν παρατηρείται μετατόπιση αλληλουχιών.

3) Τα σημειωμένα με κόκκινο χρώμα αμινοξέα είναι διαφορετικά από τα αμινοξέα της υπομονάδας β_3 ανθρώπου (διαφορές σε 35 αμινοξέα, Q¹⁵ L, L³³ V, K⁴¹ R, K⁴⁶ Q, R⁶² Q, V⁶³ I, D⁶⁶ A, T⁸¹ I, N⁹⁹ T, W¹²⁹ R, T¹⁴⁰ S, E¹⁷⁴ R, S²¹¹ N, V²⁷⁵ I, S²⁷⁷ G, V³¹⁵ F, M³³⁵ T, D³³⁶ N, V³⁴⁰ I, M³⁸⁷ V, I⁴²⁶ T, Q⁴⁴⁰ H, N⁴⁴⁴ H, R⁴⁷⁹ S, E⁴⁸⁵ Q, R⁴⁸⁹ K, V⁴⁹⁴ I, D⁶²¹ E, A⁶²⁴ V, D⁶²⁷ E, N⁶³² S, I⁶³⁹ M, K⁶⁴⁶ R, L⁷⁰⁹ F, A⁷¹⁰ L).

4) Η υπομονάδα β_3 κουνελιού φέρει τον ίδιο αριθμό αμινοξέων με την υπομονάδα β_3 ανθρώπου (762 αμινοξέα).

Άλλη μια διαφορά των αιμοπεταλίων κουνελιού και ανθρώπου αφορά τη β_3 υπομονάδα. Η δέσμευση του αντισώματος D₃ δεν ενεργοποιεί την $\alpha_{IIb}\beta_3$ κουνελιού ενώ ενεργοποιεί την $\alpha_{IIb}\beta_3$ ανθρώπου [219] (Το D₃ είναι ένα μονοκλωνικό αντίσωμα κατά της β_3 υπομονάδας της ιντεγκρίνης $\alpha_{IIb}\beta_3$ ανθρώπου που προκαλεί ενεργοποίηση της $\alpha_{IIb}\beta_3$, επάγει την πρόσδεση του ινωδογόνου και προκαλεί την συσσώρευση των αιμοπεταλίων ανθρώπου χωρίς αυτά να ενεργοποιηθούν [264-266]. Μετά τη δέσμευση RGDs πεπτιδίων ή ινωδογόνου στην $\alpha_{IIb}\beta_3$ ανθρώπου, η $\alpha_{IIb}\beta_3$ υφίσταται αλλαγή διαμόρφωσης και η δέσμευση του D₃ στην β_3 αυξάνει [264-268].

5.1.2 Συσσώρευση των αιμοπεταλίων κουνελιού

Κατά την συσσώρευση των αιμοπεταλίων, το ινωδογόνο δεσμεύεται στα αιμοπετάλια κουνελιού και στα αιμοπετάλια ανθρώπου και σχηματίζει γέφυρες μεταξύ των γειτονικών αιμοπεταλίων [269, 270].

Στο ανθρώπινο ινωδογόνο, 2 RGD αλληλουχίες σε κάθε Αα αλυσίδα (συνολικά 4 αλληλουχίες RGD) και η καρβοξυτελική αλληλουχία ΗΗΛΓΓΑΚQAGDV (γ-12 πεπτίδιο) στην γ αλυσίδα (συνολικά 2 αλληλουχίες ΗΗΛΓΓΑΚQAGDV) έχουν χαρακτηριστεί ως πεδία δέσμησης για την $\alpha_{IIb}\beta_3$ βάσει παρατηρήσεων ότι η δέσμηση του ινωδογόνου στα αιμοπετάλια και η ακόλουθη συσσώρευση των αιμοπεταλίων αναστέλλονται από RGD πεπτίδια και από το γ-12 πεπτίδιο [144, 146, 271-273]. Μελέτες αναφέρουν ότι τα RGD πεπτίδια και το γ-12 πεπτίδιο αλληλεπιδρούν με την $\alpha_{IIb}\beta_3$ με αμοιβαία αποκλειόμενο τρόπο [74, 292, 280].

Η δέσμηση του ινωδογόνου στα ενεργοποιημένα ανθρώπινα αιμοπετάλια καθώς και η συσσώρευση, αναστέλλονται ισχυρά από πεπτίδια που περιέχουν την αλληλουχία RGD [274, 275]. Εντούτοις, το πεπτίδιο RGDS επηρεάζει ελάχιστα τη συσσώρευση των αιμοπεταλίων κουνελιού υπό συγκέντρωση 50 μ M, η οποία αναστέλλει κατά 80-90% τη συσσώρευση των ανθρώπινων αιμοπεταλίων που επάγεται από ADP παρουσία ινωδογόνου, ή από θρομβίνη [276].

Στα αιμοπετάλια ανθρώπου ο υποδοχέας $\alpha_{IIb}\beta_3$ αλληλεπιδρά περισσότερο με τα RGD πεπτίδια παρά με το γ-12 πεπτίδιο ενώ στα αιμοπετάλια κουνελιού συμβαίνει το αντίθετο. Η ανθρώπινη $\alpha_{IIb}\beta_3$ έχει ελαφρώς υψηλότερη συγγένεια για τα πεπτίδια RGD από ότι για το γ-12 πεπτίδιο [144, 146, 148, 271-273] ενώ προτείνεται ότι η $\alpha_{IIb}\beta_3$ κουνελιού έχει υψηλότερη συγγένεια για το γ-12 πεπτίδιο από ότι για τα πεπτίδια RGD [277]. Εικάζεται ότι η δραματική μείωση της συγγένειας της $\alpha_{IIb}\beta_3$ του

κουνελιού για τα RGD πεπτίδια σε σχέση με την $\alpha_{\text{ITb}}\beta_3$ του ανθρώπου οφείλεται σε διαφορές μεταξύ των δυο ιντεγκρινών. Αντίθετα, η ανασταλτική δράση του γ -12 πεπτιδίου στη δέσμευση του ινωδογόνου (κουνελιού) στα αιμοπετάλια κουνελιού και στην συσσώρευση των αιμοπεταλίων κουνελιού υποδεικνύει ότι υπάρχουν και ομοιότητες μεταξύ των δυο ιντεγκρινών [277].

Από μελέτες του γ -12 πεπτιδίου σε αιμοπετάλια κουνελιού έχουν προκύψει τα εξής:

- 1) Το γ -12 πεπτίδιο αναστέλλει τη συσσώρευση των αιμοπεταλίων κουνελιού (ίδια δράση έχει και στα αιμοπετάλια ανθρώπου) [74, 277, 293].
- 2) Συνδυασμένη προσθήκη του γ -12 πεπτιδίου και του RGDS πεπτιδίου δεν μειώνει την ανασταλτική δράση του πρώτου επί της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων κουνελιού (το γ -12 πεπτίδιο ευθύνεται για την κύρια δέσμευση στην ιντεγκρίνη και δεν παρατηρείται αμοιβαία αποκλειόμενη δράση με το RGDS να υπερισχύει) [277].
- 3) Αλλαγή του AGVD προς AGVE στο γ -12 πεπτίδιο προκαλεί πλήρη απώλεια της ανασταλτικής δράσης του πεπτιδίου στην συσσώρευση των αιμοπεταλίων κουνελιού (η αλληλουχία AGDV είναι απαραίτητη για τη δράση του γ -12 πεπτιδίου, παρόμοια συμπεριφορά παρατηρείται και σε αιμοπετάλια ανθρώπου) [277].
- 4) Το γ -12 πεπτίδιο αναστέλλει την πρόσδεση του ινωδογόνου σε αιμοπετάλια κουνελιού κατά 50% (ενώ το ίδιο πεπτίδιο με AGVE αντί AGVD κατά 16%, η αλληλουχία AGDV είναι απαραίτητη για τη δράση του γ -12 πεπτιδίου) [309]. "αλυσιδωτή" αυτή ενεργοποίηση που παρατηρείται κατά την πήξη του αίματος, η Σε αιμοπετάλια ανθρώπου το γ -12 πεπτίδιο αναστέλλει μεν την πρόσδεση του ινωδογόνου αλλά σε μικρότερο βαθμό (περίπου 5 φορές λιγότερο) [75].

5) Από πειράματα χρωματογραφίας συγγένειας προκύπτει ότι η β_3 υπομονάδα της $\alpha_{IIb}\beta_3$ ιντεγκρίνης του κουνελιού συνδέεται με το γ -12 πεπτίδιο και όχι με το RGDS πεπτίδιο και ότι η α_{IIb} υπομονάδα του κουνελιού δεν συνδέεται ούτε με το γ -12 πεπτίδιο ούτε με το RGDS πεπτίδιο [277].

5.2 Το πεπτίδιο (S,S) PSRCD CR-NH₂

Η ενεργοποίηση και η συσσώρευση των αιμοπεταλίων αποτελεί το τελευταίο κοινό βήμα της ενδογενούς και εξωγενούς οδού της πήξης και διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην παθοφυσιολογία των οξέων στεφανιαίων συνδρόμων.

Η αναστολή της ενεργοποίησης και συσσώρευσης των αιμοπεταλίων αποτελεί στόχο-κλειδί για την ανάπτυξη νέων φαρμακολογικών παραγόντων για την θεραπεία των παραπάνω συνδρόμων.

Το ενδιαφέρον λοιπόν, των ερευνητών, τα τελευταία χρόνια να στραφεί στην ανάπτυξη νέων αντ αιμοπεταλιακών φαρμάκων [296].

Παρά το γεγονός ότι η ασπιρίνη αποτελεί το φάρμακο αναφοράς για την αντιμετώπιση των οξέων στεφανιαίων συνδρόμων [297], προκαλεί αναστολή της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων που επάγεται από το αραχιδονικό οξύ, μέσω της αναστολής της θρομβοξάνης A₂ (TxA₂), χωρίς να αναστέλλει τη συσσώρευση των αιμοπεταλίων που επάγεται από άλλους αγωνιστές των αιμοπεταλίων όπως το ADP. Η αδυναμία αυτή της ασπιρίνης οδήγησε αρχικά στην ανάπτυξη νεότερων αντ αιμοπεταλιακών φαρμάκων με κυριότερο εκπρόσωπο την κλοπιδογρέλη, η οποία συνδέεται στους υποδοχείς P₂Y της κυτταρικής μεμβράνης των αιμοπεταλίων και αναστέλλει την συσσώρευση των αιμοπεταλίων που επάγεται από το ADP [298]. Η κλινική παρατήρηση ότι ένα σημαντικό ποσοστό ασθενών με έμφραγμα του μυοκαρδίου, παρά τη θρομβολυτική αγωγή και την επακόλουθη διπλή αντ αιμοπεταλιακή αγωγή με ασπιρίνη και κλοπιδογρέλη, αναπτύσσουν νέο οξύ στεφανιαίο σύνδρομο από τη μια και η ανάγκη έντονης αντ αιμοπεταλιακής αναστολής που έχουν αυτοί (αλλά και γενικότερα) οι ασθενείς που πρόκειται να υποβληθούν σε επαναγγείωση με τοποθέτηση stents από την άλλη, οδήγησε στην ανάπτυξη νέων φαρμακολογικών παραγόντων με ισχυρή αντ αιμοπεταλική δράση, των

αναστολέων των γλυκοπρωτεϊνικών IIb/IIIa υποδοχέων των αιμοπεταλίων [299].

Η αποτελεσματικότητα των IIb/IIIa αναστολέων στην αντιμετώπιση των οξέων στεφανιαίων συνδρόμων έχει μελετηθεί με τυχαιοποιημένες μελέτες σε ένα μεγάλο αριθμό ασθενών.

Η αποτελεσματικότητα της αμπσιξιμάμπης αξιολογήθηκε από μεγάλες κλινικές μελέτες. Σε ασθενείς που έλαβαν αμπσιξιμάμπη για 18 με 24 ώρες προ της οποιαδήποτε επαναγγείωσης και για μία ώρα μετά από αυτή, η αμπσιξιμάμπη μείωσε την συχνότητα του σύνθετου τελικού σημείου θανάτου, εμφράγματος και ανάγκης για νέα επαναγγείωση τις πρώτες 30 ημέρες σε σχέση με την ομάδα ελέγχου. Το ευνοϊκό αυτό αποτέλεσμα για την αμπσιξιμάμπη χάθηκε όμως στους 6 μήνες, αφού δεν εμφάνισε καμία διαφορά με την ομάδα ελέγχου.

Η επιτιμιπατίδη μείωσε τη συχνότητα θανάτου ή έμφραγματος σε ασθενείς με οξύ στεφανιαίο σύνδρομο χωρίς ανόσπωση του ST. Το αποτέλεσμα αυτό διατηρήθηκε και στους 6 μήνες (12,1% έναντι 13,6%, $p=0,021$) [300].

Η τιροφιμπάνη χορηγούμενη αρχικά μόνη της σε ασθενείς με NSTEMI, μείωσε τη συχνότητα του σύνθετου πρωτεύοντος σημείου θανάτου, έμφραγμα ή μυοκαρδιακή ισχαιμία, σε σχέση με την ομάδα ελέγχου, τις πρώτες 48 ώρες σε σχέση με την ομάδα ελέγχου αλλά δεν κατάφερε να διατηρήσει το αποτέλεσμα αυτό ούτε στις 7, ούτε στις 30 ημέρες. Όταν όμως συγχρηγήθηκε με ηπαρίνη και συγκρίθηκε με την ομάδα ελέγχου που έλαβε ηπαρίνη και placebo, η ομάδα της τιροφιμπάνης κατάφερε να μειώσει τη συχνότητα του πρωτεύοντος τελικού σημείου έναντι της μονοθεραπείας με ηπαρίνη, τόσο στις 7, όσο και στις 30 ημέρες [300].

Αναμφισβήτητη, όμως είναι η αποτελεσματικότητα των αναστολέων των IIb/IIIa υποδοχέων σε ασθενείς που θα υποβληθούν σε διαδερμική

επαναγγείωση. Επτά τουλάχιστον μεγάλες τυχαιοποιημένες μελέτες έχουν δείξει σημαντικό όφελος για τους ασθενείς αυτής της κατηγορίας. Τα αποτελέσματα που προέκυψαν από αυτές τις μελέτες έδειξαν ότι η θεραπεία με αναστολείς των IIb/IIIa υποδοχέων ήταν εξίσου αποτελεσματική για όλους τους παράγοντες που χρησιμοποιήθηκαν, αφού σε κάθε μία από τις μελέτες αυτές μειώθηκε η συχνότητα του σύνθετου τριπλού σημείου: θάνατος, έμφραγμα ή ανάγκη για νέα επείγουσα επαναγγείωση στις 30 ημέρες. Το αποτέλεσμα αυτό, όχι μόνο ήταν σταθερά εμφανιζόμενο για όλες τις υποομάδες των ασθενών, αλλά διατηρήθηκε και στους 6 μήνες [301].

Βέβαια, οι αναστολείς των IIb/IIIa υποδοχέων εμφανίζουν μειονεκτήματα. Για παράδειγμα, η αμπσιξιμάμπη δεσμεύεται και στον ενεργοποιημένο και στον μη ενεργοποιημένο υποδοχέα αIIbβ3 αλλά έχει μεγαλύτερη συγγένεια με την ενεργοποιημένη μορφή του υποδοχέα [209]. Ως συνέπεια της ισχυρής και μη αναστρέψιμης δέσμευσης αIIbβ3-αμπσιξιμάμπης [210], η αναστολή της λειτουργίας των αιμοπεταλίων μετά την έναρξη θεραπείας με αμπσιξιμάμπη είναι άμεση και δοσοεξαρτώμενη ενώ μετά το τέλος της θεραπείας, η διακοπή της αντιαιμοπεταλιακής δράσης της αμπσιξιμάμπης είναι αργή γεγονός που αυξάνει τον κίνδυνο αιμορραγίας (για χρονικό διάστημα μεγαλύτερο των 12 ωρών) [211, 212]. Το ακριβές σημείο δράσης της αμπσιξιμάμπης δεν είναι γνωστό. Η αμπσιξιμάμπη δεν είναι εξειδικευμένη ως προς τη δέσμευσή της. Επιπρόσθετα στην αIIbβ3, η αμπσιξιμάμπη δεσμεύεται επίσης και στον υποδοχέα της βιτρονεκτίνης (ιντεγκρίνη αVβ3) με παρόμοια συγγένεια ο οποίος είναι σημαντικός για την προσκόλληση των αιμοπεταλίων στο υπενδοθήλιο [214]. Εφόσον οι δυο ιντεγκρίνες φέρουν την ίδια β υπομονάδα είναι λογικό να υποτεθεί ότι η β3 υπομονάδα μεσολαβεί κατά τη δέσμευση της αμπσιξιμάμπης και στους δυο υποδοχείς χωρίς αυτό να έχει διαπιστωθεί πειραματικά.

Η επιφιμπρατίνη είναι ένα κυκλικό επταπεπτίδιο, το οποίο περιέχει την Lys-Gly-Asp (KGD) αλληλουχία και έχει πολύ μεγάλη εξειδίκευση στο GPIIb/IIIa υποδοχέα αφού δεν προσδένεται σε υποδοχείς άλλων ιντεγκρινών. Η επιφιμπρατίνη δεσμεύεται εξειδικευμένα στον ενεργοποιημένο υποδοχέα αIIbβ3 των ανθρώπινων αιμοπεταλίων κοντά στην περιοχή αναγνώρισης RGD και αναστέλλει αντιστρεπτά την συσσώρευσή τους με το να εμποδίζει ανταγωνιστικά τη δέσμευση του ινωδογόνου, του vWF και άλλων προσκολλητικών προσδετών στην αIIbβ3 [216, 217]. Η αναστολή της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων αντιστρέφεται γρήγορα μετά την διακοπή της χορήγησης επιφιμπρατίνης λόγω της μικρότερης συγγένειας της επιφιμπρατίνης για την αIIbβ3 (231) σχέση με την αμψιζιμάμπη και αυτό πιστεύεται ότι προκύπτει από την αποδέσμευση της επιφιμπρατίνης από τα αιμοπετάλια.

Τα παραπάνω οδήγησαν πολλές ερευνητικές ομάδες στο να αναζητήσουν νέους φαρμακολογικούς παράγοντες, με κοινό θεραπευτικό στόχο την αναστολή των IIb/IIIa υποδοχέων. Η ανάπτυξη των φαρμάκων αυτών γέννησε την ανάγκη δημιουργία πειραματικών μοντέλων για την αξιολόγηση, αλλά και τη διερεύνηση του ακριβούς μηχανισμού δράσης των νέων αυτών φαρμάκων. Από την άλλη η προσπάθεια των ερευνητών να δημιουργήσουν εξειδικευμένα μόρια με μεγάλη χημική συγγένεια προς τον IIb/IIIa υποδοχέα, έχει ως αποτέλεσμα να συνεχίζουν να συντίθεται νέοι φαρμακολογικοί παράγοντες των οποίων το σημείο στόχος παραμένει η RGD αλληλουχία μέσω της οποίας οι IIb/IIIa υποδοχείς αναγνωρίζουν και συνδέονται με το ινωδογόνο.

Όπως ήδη αναφέρθηκε, κατά την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων οι IIb/IIIa υποδοχείς υφίστανται διαμορφωτικές αλλαγές που οδηγούν στην αποκάλυψη των σημείων σύνδεσης με τα προσδετικά σε αυτούς μόρια [159]. Η έρευνα λοιπόν, τα τελευταία χρόνια έχει επικεντρωθεί στην σύνθεση μορίων

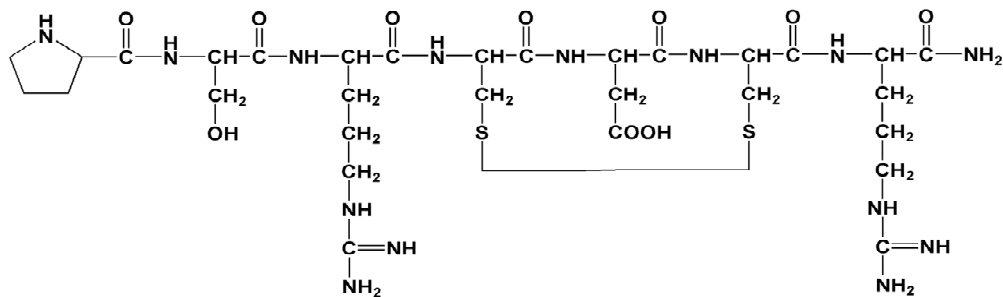
με μεγαλύτερη συγγένεια και ειδικότητα για τον IIb/IIIa υποδοχέα. Όλα τα μόρια όμως που έχουν συντεθεί μέχρι τώρα συνεχίζουν να στοχεύουν στον ανταγωνισμό της σύνδεσης του ινωδογόνου με την ιντεγκρίνη $\alpha_{IIb}\beta_3$ μέσω της RGD αλληλουχίας.

Από την ανασκόπηση της ερευνητικής προσπάθειας έως τώρα προκύπτει το εξής ερώτημα:

Υπάρχουν άλλα σημεία-στόχοι πάνω στον IIb/IIIa υποδοχέα εκτός από την RGD αλληλουχία;

Τα κυκλικά (S,S) -CDC- ανάλογα δεν περιέχουν το RGD μοτίβο ενώ το αμινοξικό κατάλοιπο της Gly έχει αντικατασταθεί από μια Cys. Τα πεπτιδία αυτά παρουσιάζουν μεγαλύτερη ανασταλτική δράση από τα RGD ανάλογα. Για το λόγο αυτό, κρίθηκε αναγκαία η μελέτη του μηχανισμού δράσης τους. Μια εκτενής μελέτη πραγματοποιήθηκε σε πεπτιδικά ανάλογα τα οποία ανήκουν στη νέα αυτή κατηγορία αναστολέων και περιέχουν το (S,S) -CDC- και το (S,S) -CRC- μοτίβο [170]. Όπως αναμενόταν η εισαγωγή του δισουλφιδικού δεσμού και η στερεοχημεία της Cys υπήρξαν δυο πολύ σημαντικοί παράγοντες για τη σταθεροποίηση του κατάλληλου προσανατολισμού των παράπλευρων αλυσίδων της Arg και του Asp. Οι ισχυρές διαμορφωτικές αλλαγές που επιβλήθηκαν στα ανάλογα επηρέασαν τη βιολογική δράση τους. Η διαμορφωτική μελέτη των ανάλογων έδειξε ότι δεν ικανοποιούν το κριτήριο της β-στροφής, αντίθετα οι παράπλευρες αλυσίδες της Arg και του Asp προσανατολίζονται προς την ίδια πλευρά του πεπτιδικού σκελετού. Το συμπέρασμα αυτό αντιτίθεται στα αποτελέσματα μιας άλλης έρευνας, από την οποία προέκυψε ότι η εξειδίκευση των RGD ανάλογων οφείλεται στη μεγάλη απόσταση μεταξύ των αντίθετα φορτισμένων παράπλευρων αλυσίδων. Από τη μελέτη της βιολογικής δράσης των (S,S) -CDC- ανάλογων έχει αποδειχθεί ότι παρουσιάζουν πολύ καλή αναστολή της πρόσδεσης του ινωδογόνου στον

υποδοχέα $\alpha_{IIb}\beta_3$ και της έκφρασης της P-σελεκτίνης, ενώ δεν αναστέλλουν την πρόσδεση του PAC-1. Το γεγονός αυτό, μαζί με το ότι τα RGD ανάλογα έχουν ασθενέστερη ανασταλτική δράση και αντίθετα με τα κυκλικά (S,S) - CDC- πεπτιδία, αναστέλλουν την πρόσδεση του PAC-1 ενώ αδυνατούν να αναστείλουν την έκφραση της P-σελεκτίνης, οδήγησε στο συμπέρασμα ότι τα δυο είδη των αναστολέων δρουν με διαφορετικό τρόπο.



ΤΟ ΠΕΠΤΙΔΙΟ (S,S) PSRCDCR-NH₂

Στην παρούσα διατριβή μελετήθηκε η αποτελεσματικότητα του κυκλικού πεπτιδίου (S,S) PSRCDCR-NH₂, ενός από τα πιο δραστικά στις IN VITRO μελετες πεπτιδία με αλληλουχία -CDC- σε πειραματικό μοντέλο αρτηριακής θρόμβωσης σε κουνελια.(302)

Ο σκοπος της μελέτης ήταν

- Αξιολόγηση της δραστικότητας του πεπτιδίου (Εκτίμηση βατότητας αγγείου, αναστολή δημιουργίας θρόμβου)
- Αξιολόγηση της ανασταλτικής δράσης του πεπτιδίου στην συσσώρευση των αιμοπεταλίων (αναστολή συσσώρευσης αιμοπεταλίων σε διάφορους αγωνιστές)
- Αξιολόγηση της ασφάλειας της ουσίας (αιμορραγία)

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

6 Υλικά - Μέθοδος

6.1 Πειραματικό μοντέλο - Γενικά

Στην παρούσα διατριβή το πειραματικό μοντέλο που χρησιμοποιήθηκε ήταν το πειραματικό μοντέλο αρτηριακής θρόμβωσης κουνελιού με ηλεκτρικό ρεύμα.

Το κουνέλι επιλέχθηκε ως πειραματόζωο στην παρούσα μελέτη γιατί σε αντίθεση με ότι συμβαίνει στα ανθρώπινα αιμοπετάλια, τα αιμοπετάλια του κουνελιού συσσωρεύονται χωρίς τη μεσολάβηση της RGD αλληλουχίας [276]. Αυτό το χαρακτηριστικό καθιστά το κουνέλι κατάλληλο πειραματόζωο για την αξιολόγηση του πεπτιδίου CDC, ενός πεπτιδίου που η δράση του δεν εξαρτάται από την μεσολάβηση της RGD ακολουθίας. Από τα αποτελέσματα της πειραματικής αυτής μελέτης μπορούν να εξαχθούν ασφαλή συμπεράσματα αναφορικά με τη πιθανή μελλοντική χρήση του πεπτιδίου σε ανθρώπους

Η εφαρμογή ηλεκτρικού ρεύματος έντασης είτε 2,5mA [288] ή 4mA [174-195], στην εξωτερική επιφάνεια της καρωτίδας επάγει την δημιουργία θρόμβου με τέτοιο τρόπο ώστε ο μηχανισμός δημιουργίας του να μιμείται εκείνον που εμφανίζεται κατά την εκδήλωση ενός οξέος στεφανιαίων συνδρόμων. Εικόνες από το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο δείχνουν απογύμνωση του αγγείου από το ενδοθήλιο του και έκθεση της υπενδοθηλιακής ουσίας με το υπενδοθηλιακό κολλαγόνο στην αιματική ροή, που ασκεί ισχυρές διατμητικές δυνάμεις. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την δημιουργία του θρόμβου λόγω της ενεργοποίησης και συσώρευσης των αιμοπεταλίων που επάγεται από την αρχική προσκόλληση στην εκτεθειμένη υπενδοθηλιακή στοιβάδα. Επιπρόσθετα, η απελευθέρωση του ιστικού παράγοντα ενεργοποιεί και τους μηχανισμούς πήξης. Το εύρημα αυτό επιβεβαιώνεται και με τη σύσταση του σχηματισθέντος θρόμβου που προκύπτει, καθώς αποδεικνύεται ότι αυτός αποτελείται από αιμοπετάλια με δίκτυο ινικής [177]. Έτσι, αν και το ερέθισμα

που δημιουργεί το Θρόμβο δεν είναι η ρήξη της αθηρωματικής πλάκας, ο περαιτέρω μηχανισμός δημιουργίας του Θρόμβου μιμείται εκείνον που δημιουργείται σε ένα οξύ στεφανιαίο σύνδρομο [176].

Τα πειραματικά αυτά μοντέλα έχουν χρησιμοποιηθεί για την αξιολόγηση της αποτελεσματικότητας των αναστολέων των IIb/IIIa υποδοχέων

6.1.1 Προετοιμασία πειραματόζων

Χρησιμοποιήθηκαν 29 λευκά κουνέλια Νέας Ζηλανδίας, βάρους 3,2-3,6 κιλών.

Τα κουνέλια υποβλήθηκαν σε αναισθησία με τη χρήση ενδομυϊκής ένεσης μείγματος κεταμίνης και ξυλαζίνης (35 mg/kg και 15 mg/kg αντίστοιχα). Θεωρήθηκε ότι τα ζώα ήταν αναισθητοποιημένα, όταν επήλθε η κατάργηση του αντανακλαστικού του κερατοειδούς. Το αποτέλεσμα αυτό διατηρήθηκε με επανάληψη των παραπάνω δόσεων ανά μία ώρα. Στη συνέχεια, μέσω μέσης τραχηλικής τομής, αποκαλύφθηκε η αριστερή κοινή καρωτίδα, η οποία παρασκευάστηκε χειρουργικά (αποκολλήθηκε και απελευθερώθηκε από τους γύρω ιστούς). Γύρω από την χειρουργικά παρασκευασμένη καρωτίδα τοποθετήθηκε ηλεκτρομαγνητικός καταγραφέας ροής (probe), διαμέτρου 1,5mm (Quickfit 1,5mm, Medistim S.A.), με τον οποίο επιτυγχάνονταν η συνεχής καταγραφή της ροής, που αποτυπώθηκε στη βάση καταγραφής σε ml/min (Medistim S.A.). Παράλληλα παρασκευάστηκε και η μηριαία φλέβα και καθετηριάστηκε για να χρησιμοποιηθεί για την χορήγηση των προς εξέταση ουσιών. Αφού ολοκληρώθηκαν οι παραπάνω διαδικασίες, γινόταν αιμοληψία από την μέση ωτιαία αρτηρία για τον καθορισμό της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων προ και μετά της χορήγησης της ουσίας

6.1.2 Ουσίες που εξετάσθηκαν

Τα πειραματόζωα, στη συνέχεια χωρίστηκαν σε (7) επτά ομάδες με (5) κουνέλια στις 4 πρώτες και (3) κουνέλια στις 3 τελευταίες ομάδες. Σε κάθε ομάδα κουνελιών χορηγήθηκε μία από τις παρακάτω ουσίες:

- 1) Φυσιολογικός ορός (placebo), ομάδα ελέγχου (control), ο ρυθμός έγχυσης ήταν 6 ml/kg/h.
- 2) Κλασική ηπαρίνη σε δόση 100 IU/kg/h.
- 3) Ertifibatide σε δόση 180 µg/kg bolus και στη συνέχεια με συνεχή έγχυση με ρυθμό 2µg/kg/min.
- 4) Ertifibatide σε δόση 900 µg/kg bolus και στη συνέχεια με συνεχή έγχυση με ρυθμό 10µg/kg/min.
- 5) CDC 1,5 mg/kg bolus, την οποία ακολούθησε έγχυση με ρυθμό 1 mg/kg/h έως το τέλος του πειράματος, συνολική δόση του πεπτιδίου 3 mg/kg.
- 6) CDC 3 mg/kg bolus, την οποία ακολούθησε έγχυση με ρυθμό 2 mg/kg/h έως το τέλος του πειράματος, συνολική δόση του πεπτιδίου 6 mg/kg.
- 7) CDC 6 mg/kg bolus, την οποία ακολούθησε έγχυση με ρυθμό 4 mg/kg/h έως το τέλος του πειράματος, συνολική δόση του πεπτιδίου 12 mg/kg.

Ο ρυθμός έγχυσης του φυσιολογικού ορού (6 ml/kg/h) ήταν ανάλογος με αυτόν που χρησιμοποιήθηκε σε προηγούμενα πειραματικά μοντέλα αρτηριακής θρόμβωσης που χρησιμοποίησαν κουνέλια [199, 178]. Η κλασική ηπαρίνη, ένα πολύ γνωστό και ευρέως χρησιμοποιούμενο αντιθρομβωτικό φάρμακο, που έχει χρησιμοποιηθεί σε προηγούμενα πειραματικά μοντέλα με κουνέλια [199], έπαιξε το ρόλο του θετικού control για το παρόν πειραματικό

μοντέλο. Η δόση που επιλέχθηκε 100 IU/kg/h, έχει αποδειχθεί πολύ δραστική και ασφαλής σε σχέση με άλλες δοσολογίες [178]. Για την άμεση σύγκριση του πεπτιδίου χρησιμοποιήθηκε η επιτιφιμπατίδη (Ertifibatide). Η επιτιφιμπατίδη είναι γνωστός IIb/IIIa αναστολέας της συσώρευσης των αιμοπεταλίων και στην παρούσα μελέτη χορηγήθηκε σε δύο δόσεις: α) στη δόση που χρησιμοποιείται στην κλινική πράξη (180 µg/ kg bolus και στη συνέχεια με συνεχή έγχυση με ρυθμό 2 µg/kg/min) [294] και β) σε δόση 5 φορές μεγαλύτερη από την προηγούμενη (900 µg/kg bolus και στη συνέχεια με συνεχή έγχυση με ρυθμό 10 µg/kg/min). Οι δόσεις του πεπτιδίου καθορίστηκαν από προκαταρκτικές μελέτες, όπου βρέθηκε ότι το CDC σε συνολική δόση μικρότερη των 3 mg/kg δεν παρουσίαζε καμιά δραστηριότητα, ενώ σε δοσολογίες μεγαλύτερες των 12 mg/kg το πεπτίδιο δεν παρουσίαζε περαιτέρω αύξηση της δραστηριότητας του. Ο όγκος των διαλυμάτων που χρησιμοποιήθηκαν ήταν τέτοιος ώστε ο συνολικός τους όγκος να αντιστοιχεί στο ρυθμό έγχυσης του φυσιολογικού ορού (6 ml/kg/h).

Σε όλες τις ομάδες η έγχυση της κάθε ουσίας ξεκινούσε 60 λεπτά πριν την δημιουργία θρόμβου (πριν την δημιουργία θρόμβου ή πριν την έναρξη του ερεθίσματος για την δημιουργία θρόμβου) και συνεχιζόταν για άλλα 90 λεπτά μετά την δημιουργία του, που σηματοδοτούσε και το τέλος του πειράματος.

6.1.3 Επαγωγή δημιουργίας θρόμβου

Η επαγωγή του θρόμβου γινόταν ως εξής. Εγγύτερα της θέσης τοποθέτησης του ροόμετρου εφαρμόζονταν parafilm (3M), ώστε η καρωτίδα να απομονωθεί από τους γύρω ιστούς και στο σημείο εκείνο τοποθετούνταν ηλεκτρόδια στην εξωτερική επιφάνεια του αγγείου που συνδέονταν με τροφοδοτικό συνεχούς ηλεκτρικού ρεύματος σταθερής έντασης (QL564, Thurlby Thandar Instruments Ltd.). Η επαγωγή του θρόμβου γίνονταν με

την εφαρμογή συνεχούς (dc) ηλεκτρικού ρεύματος σταθερής έντασης 4mA για 3 λεπτά. Η επαγωγή του θρόμβου έπονταν κατά 60 λεπτά της έναρξης χορήγησης της κάθε ουσίας. Προ της επαγωγής του θρόμβου, λαμβάνονταν δεύτερο δείγμα αίματος για τον καθορισμό της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων και την πιθανή επίδραση της ουσίας στους παράγοντες πήξης.

6.1.4 Εκτίμηση δημιουργούμενου θρόμβου

Ροή αγγείου

Καθώς το μέγεθος του επαγόμενου θρόμβου μέσα στο αγγείο μεγάλωνε σε μέγεθος, η ροή που καταγράφονταν περιφερικά του σημείου αυτού, από το ροόμετρο έπεφτε. Πλήρη απόφραξη του αγγείου από θρόμβο είχαμε όταν το ροόμετρο δεν κατέγραφε πια ροή στον αυλό του αγγείου. Υπολογίζονταν, λοιπόν, ο χρόνος που μεσολαβούσε μέχρι την πλήρη απόφραξη του αγγείου. Αν το αγγείο παρέμενε βατό μετά από 90 λεπτά από την δημιουργία θρόμβου σταματούσε η καταγραφή και το πείραμα τελείωνε.

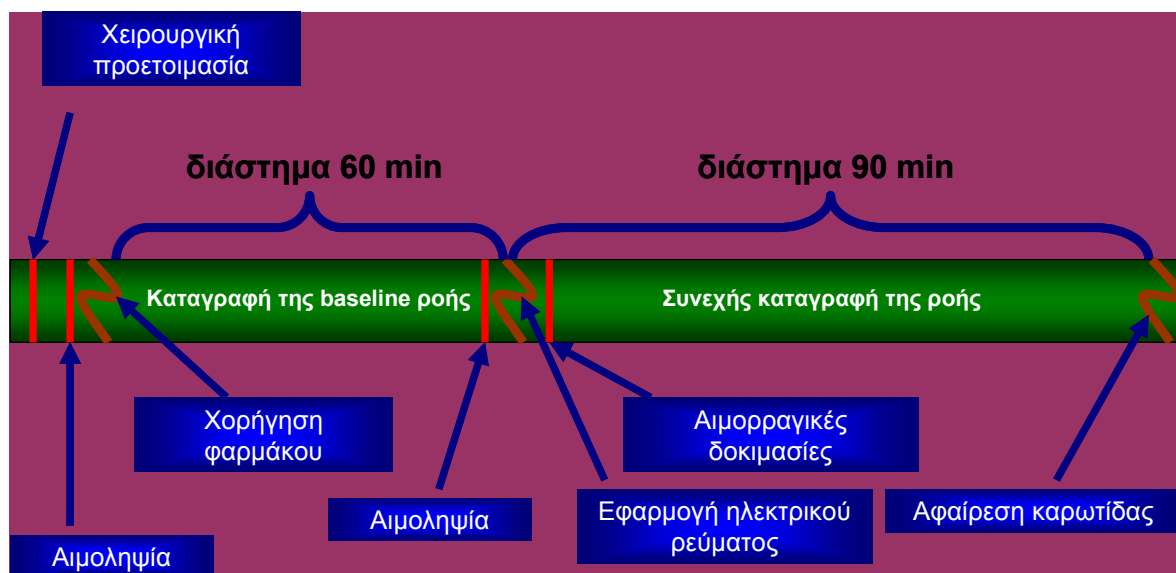
6.1.5 Βάρος του θρόμβου

Στο τέλος του πειράματος, 90 λεπτά μετά την έναρξη επαγωγής θρόμβου, η καρωτίδα απολιωνόταν και αφαιρούνταν το τμήμα της στο οποίο είχε δημιουργηθεί ο θρόμβος. Στη συνέχεια με τομή κατά μήκος του αγγείου, ο θρόμβος αφαιρούνταν και τοποθετούνταν σε προζυγισμένο κομμάτι διηθητικού χαρτιού, όπου με νέα ζύγιση υπολογιζόταν το βάρος του.

6.1.6 Αξιολόγηση της ασφάλειας

Η αξιολόγηση της ασφάλειας των προς εξέταση ουσιών έγινε με τις δύο παρακάτω δοκιμασίες: α) 60 λεπτά μετά την έναρξη έγχυσης της ουσίας μια σταθερή τομή μήκους 4cm και βάθους 0,5cm πραγματοποιούνταν στο πρόσθιο κοιλιακό τοίχωμα του ζώου. Στην τομή τοποθετούνταν προζυγισμένη γάζα 5X5 cm που αφαιρούνταν 20 λεπτά αργότερα. Αφού ξαναζυγίζονταν υπολογιζόταν με αυτόν τον τρόπο η απώλεια αίματος του ζώου. β) πραγματοποιούνταν τομή μήκους 10mm και βάθους 1mm στην εσωτερική επιφάνεια του αυτιού. Στα χείλη της τομής τοποθετούνταν διηθητικό χαρτί. Καταγράφεται ο χρόνος που χρειαζότανε ώστε να μην προσροφάται πλέον αίμα στο διηθητικό χαρτί. Ο χρόνος αυτός αντιστοιχεί με τον χρόνο αιμορραγίας (bleeding time).

Στο παρακάτω σχήμα (Σχήμα 1), απεικονίζεται η συνολική διαδικασία του πειραματικού πρωτόκολλου.



Σχήμα 1: Απεικόνιση των χρόνων του πειράματος.

6.2 Σύνθεση του πεπτιδίου

Το κυκλικό πεπτίδιο, (S,S) PSRCDCR-NH₂ συντέθηκε (στο βιοχημικό εργαστήριο του τμήματος Χημείας του πανεπιστημίου Ιωαννίνων) με τη διαδικασία στερεής φάσης σε ρητίνη Rink συμφωνά με τη μέθοδο Fmoc. Η καθαρότητα των πεπτιδίων ελέγχθηκε με HPLC [295.302]

6.3 Ex Vivo και In Vitro συσσωρευομετρία των αιμοπεταλίων

Η μέθοδος για τη εκτίμηση της λειτουργίας των αιμοπεταλίων πραγματοποιούνταν στο βιοχημικό εργαστήριο του τμήματος Χημείας του πανεπιστημίου Ιωαννίνων με προσδιορισμό της συσσώρευσής τους βάσει της νεφελομετρικής μεθόδου κατά Born. Η μέθοδος βασίζεται στην αρχή ότι η οπτική πυκνότητα ενός εναιωρήματος σωματιδίων εξαρτάται από τον αριθμό των σωματιδίων και όχι από το μέγεθός τους.

Το συσσωρευόμετρο ήταν ένα φασματοφωτόμετρο σταθερού μήκους κύματος με δύο θέσεις δειγμάτων που θερμαίνονταν στους 37 (προς μίμηση των in vivo συνθηκών). Τα δείγματα αναδεύονταν διότι η επαφή μεταξύ των αιμοπεταλίων είναι απαραίτητη για την in vitro συσσώρευσή τους. Η διαδικασία της συσσώρευσης καταγράφονταν φωτομετρικά και αναπαρίστατο ως κατερχόμενη καμπύλη και η συσσωρευτική ικανότητα των αιμοπεταλίων κρινόταν βάσει των αλλαγών στην εκπομπή του φωτός.

Μια ακτίνα υπέρυθρου φωτός περνούσε μέσα από τις κυψελίδες που περιείχαν πλάσμα πλούσιο σε αιμοπετάλια και πλάσμα φτωχό σε αιμοπετάλια. Φωτοδίοδοι σιλικόνης ανίχνευαν το φως που πέρασε μέσα από τις δυο κυψελίδες. Αυθαίρετα, το φως που πέρασε από την κυψελίδα με πλάσμα πλούσιο σε αιμοπετάλια (πριν την προσθήκη αγωνιστή) θεωρούνταν 0% διαπερατότητα ή 0% συσσώρευση και το φως που πέρασε από την κυψελίδα

με πλάσμα φτωχό σε αιμοπετάλια θεωρείται 100% διαπερατότητα ή 100% συσσώρευση.

Όταν ένας διεγέρτης προσθέτονταν σε πλάσμα πλούσιο σε αιμοπετάλια, τα αιμοπετάλια αντιδρούσαν και συνέβαιναν αλλαγές στην διαπερατότητα του φωτός.

Όταν τα αιμοπετάλια υφίσταντο αλλαγή σχήματος ανταποκρινόμενα σε έναν διεγέρτη, το αυξημένο τους μέγεθος επέτρεπε σε λιγότερο φως να περάσει από την κυψελίδα και αυτό καταγράφονταν ως μικρότερη διαπερατότητα. Κατόπιν τα αιμοπετάλια προσκολλώνταν το ένα στο άλλο και σχημάτιζαν συσσωρεύματα και έτσι περνούσε περισσότερο φως από την κυψελίδα κάτι που καταγράφονταν ως μεγαλύτερη διαπερατότητα.

Η καταγραφή της *ex vivo* συσσώρευσης χαρακτηριζόταν από :

- 1) την αλλαγή σχήματος των αιμοπεταλίων (μικρή ανερχόμενη καμπύλη, μείωση διαπερατότητας).
- 2) την μέγιστη αύξηση στη διαπερατότητα του φωτός που προκαλούνταν από τον αγωνιστή (%συσσώρευση).
- 3) τον ρυθμό της συσσώρευσης (% μεταβολή συσσώρευσης ανά min).
- 4) την πρωτογενή συσσώρευση (κατερχόμενη καμπύλη, αύξηση διαπερατότητας) η οποία οδηγούσε είτε σε αποσυσσώρευση (ανερχόμενη καμπύλη, μείωση διαπερατότητας) είτε σε ένα σταθερό πλατώ (ευθεία γραμμή, σταθερή διαπερατότητα) είτε στην δευτερογενή συσσώρευση (δεύτερη φάση της συσσώρευσης).
- 5) την δευτερογενή συσσώρευση, που συνέβαινε όταν τα αιμοπετάλια εξέκριναν τα συστατικά των κοκκίων τους τα οποία προκαλούσαν επιπρόσθετη συσσώρευση (δεύτερη κατερχόμενη καμπύλη, επιπρόσθετη αύξηση διαπερατότητας) [28].

6.3.1 Συσσωρευομετρία σε πλάσμα πλούσιο σε αιμοπετάλια κουνελιού

Χρησιμοποιήθηκαν τα παρακάτω όργανα και αντιδραστήρια

Αντιδραστήρια-Όργανα

Κιτρικό οξύ ($C_6H_8O_7$, M.B. : 192,13, Merck)

Κιτρικό νάτριο ($C_6H_5Na_3O_7 \cdot H_2O$, M.B. : 294,10, Merck)

D(+) Γλυκόζη [$(HOCH_2CH(CHOH)_4O$, M.B.:180,16, Fluka]

Οξαλικό αμμώνιο [$(NH_4)_2C_2O_4 \cdot H_2O$, M.B. :142,11 Mallinckrodt]

Διφωσφορική αδενοσίνη (ADP, Chrono-Log)

Κολλαγόνο [(collagen, Chrono-Log, διάλυμα stock 1 mg/ml)]

Αραχιδονικό οξύ (AA, Chrono-Log, σε μορφή ελαίου)

Φυγόκεντρος πάγκου (Hermle, Z 320)

Αιματοκυτόμετρο (Neubauer)

Μικροσκόπιο (Olympus)

Συσσωρευόμετρο (Aggregometer, CHRONO-LOG)

Καταγραφικό (CHRONO-LOG)

Γυάλινες κυψελίδες συσσώρευσης (CHRONO-LOG)

Ειδικά μαγνητάκια συσσώρευσης (CHRONO-LOG)

Χρησιμοποιήθηκαν τα παρακάτω διαλύματα εργασίας

Αντιπηκτικό διάλυμα κιτρικών αλάτων (ACD): 0,8 gr κιτρικού οξέος, 2,2 gr κιτρικού νατρίου και 2,5 gr D(+) γλυκόζης διαλύονταν σε 100 ml απεσταγμένου ύδατος. Το διάλυμα αποθηκεύονταν στους 4 °C.

Διάλυμα οξαλικού αμμωνίου: 1 gr οξαλικού αμμωνίου διαλύονταν σε 100 ml απεσταγμένου ύδατος. Το διάλυμα αποθηκεύονταν στους 4 °C

Διάλυμα 20mM διφωσφορικής αδενοσίνης (ADP): 50 mg λυοφιλοποιημένου ADP διαλύονταν σε 5 ml φυσιολογικού ορού. Το διάλυμα αποθηκεύονταν στους -80°C σε κλάσματα των 50μl.

Διάλυμα 50mM αραχιδονικού οξέος (AA): 10 mg διαλύονταν σε 700 μl αλβουμίνης αραιωμένης με φυσιολογικό ορό. Το διάλυμα αποθηκεύονταν στους -80°C σε κλάσματα των 50 μl.

Πειραματική διαδικασία

Παρασκευή PRP

1. Συλλέγονταν 8,9 ml αίματος σε σωληνάκι πολυπροπυλενίου που περιέχει αντιπηκτικό διάλυμα ACD (αναλογία: 9 μέρη αίματος /1 μέρος διαλύματος ACD). Στην συνέχεια γινόταν ήπια ανάμιξη.
2. Το αίμα φυγοκεντρώνταν στις 1400-1500 rpm για 15 min
3. Λαμβάνονταν 2-3 ml υπερκείμενου πλάσματος (πλάσμα πλούσιο σε αιμοπετάλια, platelet rich plasma-PRP) και τοποθετούνταν σε σωληνάκι πολυπροπυλενίου με καπάκι για να μην μεταβληθεί το pH (7,2-7,4). Σε υψηλότερο pH μειώνεται η αντιδραστικότητα των αιμοπεταλίων (σε pH 6 αναστέλλεται πλήρως η συσώρευσή τους) ενώ σε υψηλότερο pH αυξάνει (σε pH 8 μπορεί να συμβεί αυθόρμητη συσώρευση).
4. Το υπόλοιπο παρασκεύασμα φυγοκεντρώνταν στις 3500 rpm για 15min
5. Λαμβάνονταν το υπερκείμενο πλάσμα (πλάσμα φτωχό σε αιμοπετάλια, platelet poor plasma-PPP) και τοποθετούνταν σε σωληνάκι πολυπροπυλενίου με καπάκι.
6. Μετρούνταν ο αριθμός των αιμοπεταλίων στο PRP: 10 μl PRP αναμιγνύονταν ήπια με 190 μl διαλύματος οξαλικού αμμωνίου. Από το προκύπτον μείγμα, 10 μl τοποθετούνταν σε αιματοκυτόμετρο Neubauer και αφήνονταν σε υγρό περιβάλλον ενός τρυβλίου Petri για 15 min. Η μέτρηση αιμοπεταλίων στο μικροσκόπιο γινόταν ως εξής: Μετρούνταν 5 μέτριοι

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

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

7. Βάσει του αριθμού αιμοπεταλίων ανά μl γινόταν αρραίωση του PRP με το ομόλογο PPP ώστε να ρυθμιστεί η συγκέντρωση των αιμοπεταλίων στα 250.000 αιμοπετάλια / μl .

Συσσωρευομετρία ex vivo.

8. Προσθέτονταν 500 μl αραιωμένου PRP σε γυάλινη κυψελίδα. Το PRP προέκυπτε από το δείγμα αίματος που είχε ληφθεί πριν από τη χορήγηση οποιασδήποτε ουσίας. Οι κυψελίδες τοποθετούνταν στο συσσωρευόμετρο και μετά από αναμονή ακριβώς 1 min προστίθετο ο αγωνιστής στην κυψελίδα του PRP και γινόταν καταγραφή της συσσώρευσης για 3 min. Με τον τρόπο αυτό γινόταν η λήψη μέτρησης αρχικής συσσώρευσης, πριν την χορήγηση της ουσίας (control).

9. Προσθέτονταν σε γυάλινη κυψελίδα 500 μl αραιωμένου PRP που είχε προκύψει από δείγμα αίματος που έχει ληφθεί 60 λεπτά μετά την έναρξη χορήγησης της εκάστοτε ουσίας. Η κυψελίδα τοποθετούνταν στο συσσωρευόμετρο και μετά από αναμονή ακριβώς 1 min προστίθετο ο αγωνιστής στην κυψελίδα του PRP και γινόταν καταγραφή της συσσώρευσης για 3 min. Με τον τρόπο αυτό γινόταν η λήψη μέτρησης δείγματος μετά από την χορήγηση της εκάστοτε ουσίας.

10. Η% αναστολή της συσσώρευσης υπολογίζονταν βάσει του εξής τύπου:

%αναστολή=(συσσώρευση δείγματος control-συσσώρευση δείγματος μετά από έγχυση για 60 λεπτά/συσσώρευση control)× 100.

Συσσωρευομετρία in vitro.

Επαναλαμβάνονταν τα βήματα 8 και 9 με την παρακάτω διαδικασία:

8. Προσθέτονταν 500 μl PRP σε γυάλινη κυψελίδα που αποτελούνταν από 450μl αραιωμένου PRP και 50μl ορού σε γυάλινη κυψελίδα. Οι κυψελίδες τοποθετούνταν στο συσσωρευόμετρο και μετά από αναμονή ακριβώς 1 min προστίθετο ο αγωνιστής στην κυψελίδα του PRP. Γινόταν καταγραφή της συσσώρευσης για 3 min και με τον τρόπο αυτό λαμβάνονταν η μέτρηση τυφλού δείγματος.

9. Προσθέτονταν 500 μl PRP σε γυάλινη κυψελίδα που αποτελούνταν από 450μl αραιωμένου PRP και 50μl διαλυμένης σε όρο της υπό εξέταση ουσίας. Οι κυψελίδες τοποθετούνταν στο συσσωρευόμετρο και μετά από αναμονή ακριβώς 1 min προστίθετο ο αγωνιστής στην κυψελίδα του PRP. Γινόταν καταγραφή της συσσώρευσης για 3 min και με τον τρόπο αυτό λαμβάνονταν η μέτρηση για την εκάστοτε ουσία.

10. Η αναστολή της in vitro συσσώρευσης των αιμοπεταλίων και σε αυτή την περίπτωση, υπολογίζονταν με παρόμοιο τρόπο με τον τύπο:

%αναστολή=(πλάτος συσσώρευσης τυφλού δείγματος- πλάτος συσσώρευσης δείγματος παρουσία πεπτιδίου/ πλάτος συσσώρευσης τυφλού δείγματος)× 100.

6.4 Στατιστική Ανάλυση

Για την στατιστική ανάλυση μεταξύ των υποομάδων χρησιμοποιήθηκε το στατιστικό τεστ ANOVA με post hoc ανάλυση. Χρησιμοποιήθηκε το στατιστικό πρόγραμμα SPSS 13.0 (SPSS Inc, Chicago Illinois). Τα αποτελέσματα κρίθηκαν στατιστικά σημαντικά όταν $p < 0,05$.

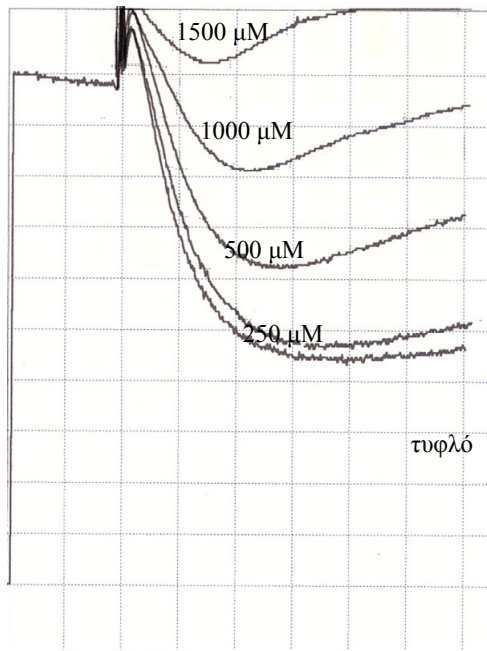
7 Αποτελέσματα

7.1 Μελέτη της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων in vitro

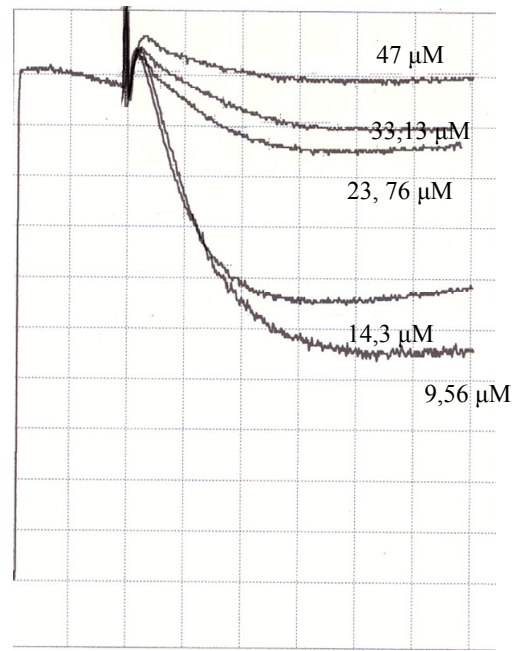
Πριν τη χορήγηση των ουσιών στα πειραματόζωα, μελετήθηκε η in vitro δραστικότητα του πεπτιδίου, της επιφιμπατίδης και της ηπαρίνης. Το πεπτίδιο προκαλεί μέγιστη αναστολή της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων στα $81 \pm 2\%$, με αγωνιστή το PAF σε συγκέντρωση 2-5 nM, με $IC_{50}=30 \mu M$, ενώ η επιφιμπατίδη προκαλεί αναστολή της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων με $IC_{50}=21 \mu M$, ενώ η ηπαρίνη σε συγκεντρώσεις 150, 200, 300, και 400 IU/μl, δεν παρουσίασε αναστολή της in vitro συσσώρευσης των αιμοπεταλίων.. Οι μετρήσεις αντιστοιχούσαν στο μέσο όρο τριών επαναλήψεων της κάθε μέτρησης.

Τα παραπάνω αποτελέσματα δείχνουν ότι το πεπτίδιο (S,S) PSRCDCR-NH2 είναι αρκετά δραστικό. Στις υψηλές συγκεντρώσεις αναστέλλει πλήρως την συσσώρευση των αιμοπεταλίων του κουνελιού in vitro ($IC_{50}=30 \mu M$). Το ίδιο επιτυγχάνεται και με την επιφιμπατίδη σε βέβαια μικρότερες συγκεντρώσεις. Αντίθετα η ηπαρίνη, όπως άλλωστε αναμενόταν, δεν αναστέλλει in vitro ($IC_{50}=21 \mu M$) την συσσώρευση των αιμοπεταλίων του κουνελιού.

Στο σχήμα 1 απεικονίζεται η in vitro αναστολή της συσσώρευσης αιμοπεταλίων κουνελιού σε ADP 20 μM , για την επιφιμπατίδη και το πεπτίδιο (S,S) PSRCDCR-NH2 σε διάφορες συγκεντρώσεις. Στο σχήμα 2 απεικονίζονται αντιπροσωπευτικές καμπύλες της in vitro συσσώρευσης αιμοπεταλίων κουνελιού.



(S,S) PSRCDCR-NH2



Επταφιμπατίδη

Σχήμα 2: Αντιπροσωπευτικές καμπύλες συσώρευσης αιμοπεταλίων κουνελιού για το πεπτίδιο(S,S) PSRCDCR-NH2 και την επταφιμπατίδη.

7.2 Ομάδες πειραματόζων

7.2.1. Ομάδα ελέγχου (control). Συνολικά χρησιμοποιήθηκαν 5 πειραματόζωα

Πείραμα 1°

Χρησιμοποιήθηκε πειραματόζωο βάρους 3,1 kg.

1) Επίδραση του placebo στη ροή της καρωτίδας: Η αρχική ροή στην καρωτίδα του πειραματόζωου ήταν 19 ml/min. Μετά την επαγωγή της δημιουργίας του θρόμβου με την εφαρμογή ηλεκτρικού ρεύματος η ροή του αγγείου μηδενίστηκε σε χρόνο 24 λεπτών.

2) Επίδραση του placebo στην *ex vivo* συσώρευση των αιμοπεταλίων: Η χορήγηση του placebo για 60 λεπτά προκάλεσε αναστολή της *ex vivo* συσώρευσης των αιμοπεταλίων, με αγωνιστή ADP σε τελική συγκέντρωση 20 μΜ, κατά 6%, ενώ με αγωνιστή AA σε τελική συγκέντρωση 500 μΜ, κατά 16%.

3) Επίδραση του placebo στο βάρος του θρόμβου: Το βάρος του θρόμβου που αφαιρέθηκε από την καρωτίδα του πειραματόζωου ήταν 6,5 mg.

4) Επίδραση του placebo στο μέγεθος της αιμορραγίας: Η ποσότητα του αίματος που συγκεντρώθηκε στην προζυγισμένη γάζα ήταν 383 mg.

5) Επίδραση του placebo στο χρόνο αιμορραγίας: Ο χρόνος αιμορραγίας 60 λεπτά μετά την χορήγηση του placebo ήταν 30 sec.

Πείραμα 2°

Χρησιμοποιήθηκε πειραματόζωο βάρους 3,3 kg.

1) Επίδραση του placebo στη ροή της καρωτίδας: Η αρχική ροή στην καρωτίδα του πειραματόζωου ήταν 26 ml/min. Μετά την επαγωγή της δημιουργίας του θρόμβου με την εφαρμογή ηλεκτρικού ρεύματος η ροή του αγγείου μηδενίστηκε σε χρόνο 21 λεπτών.

2) Επίδραση του placebo στην *ex vivo* συσσώρευση των αιμοπεταλίων: Η χορήγηση του placebo για 60 λεπτά προκάλεσε αναστολή της *ex vivo* συσσώρευσης των αιμοπεταλίων, με αγωνιστή ADP σε τελική συγκέντρωση 20 μM , κατά 10%, ενώ με αγωνιστή AA σε τελική συγκέντρωση 500 μM , κατά 14%.

3) Επίδραση του placebo στο βάρος του θρόμβου: Το βάρος του θρόμβου που αφαιρέθηκε από την καρωτίδα του πειραματόζωου ήταν 4,5 mg.

4) Επίδραση του placebo στο μέγεθος της αιμορραγίας: Η ποσότητα του αίματος που συγκεντρώθηκε στην προζυγισμένη γάζα ήταν 256 mg.

5) Επίδραση του placebo στο χρόνο αιμορραγίας: Ο χρόνος αιμορραγίας 60 λεπτά μετά την χορήγηση του placebo ήταν 30 sec.

Πείραμα 3^ο

Χρησιμοποιήθηκε πειραματόζωο βάρους 3,2 kg.

1) Επίδραση του placebo στη ροή της καρωτίδας: Η αρχική ροή στην καρωτίδα του πειραματόζωου ήταν 26 ml/min. Μετά την επαγωγή της δημιουργίας του θρόμβου με την εφαρμογή ηλεκτρικού ρεύματος η ροή του αγγείου μηδενίστηκε σε χρόνο 19 λεπτών.

2) Επίδραση του placebo στην *ex vivo* συσσώρευση των αιμοπεταλίων: Η χορήγηση του placebo για 60 λεπτά προκάλεσε αναστολή της *ex vivo* συσσώρευσης των αιμοπεταλίων, με αγωνιστή ADP σε τελική συγκέντρωση 20 μM , κατά 14%, ενώ με αγωνιστή AA σε τελική συγκέντρωση 500 μM , κατά 15%.

3) Επίδραση του placebo στο βάρος του θρόμβου: Το βάρος του θρόμβου που αφαιρέθηκε από την καρωτίδα του πειραματόζωου ήταν 5,4 mg.

5) Επίδραση του placebo στο χρόνο αιμορραγίας: Ο χρόνος αιμορραγίας 60 λεπτά μετά την χορήγηση του placebo ήταν 30 sec.

Πείραμα 4°

Χρησιμοποιήθηκε πειραματόζωο βάρους 3,1 kg.

- 1) Επίδραση του placebo στη ροή της καρωτίδας: Η αρχική ροή στην καρωτίδα του πειραματόζωου ήταν 23 ml/min. Μετά την επαγωγή της δημιουργίας του θρόμβου με την εφαρμογή ηλεκτρικού ρεύματος η ροή του αγγείου μηδενίστηκε σε χρόνο 26 λεπτών.
- 2) Επίδραση του placebo στην *ex vivo* συσσώρευση των αιμοπεταλίων: Η χορήγηση του placebo για 60 λεπτά προκάλεσε αναστολή της *ex vivo* συσσώρευσης των αιμοπεταλίων, με αγωνιστή ADP σε τελική συγκέντρωση 20 μM , κατά 7%, ενώ με αγωνιστή AA σε τελική συγκέντρωση 500 μM , κατά 2%.
- 3) Επίδραση του placebo στο βάρος του θρόμβου: Το βάρος του θρόμβου που αφαιρέθηκε από την καρωτίδα του πειραματόζωου ήταν 6,6 mg.
- 4) Επίδραση του placebo στο μέγεθος της αιμορραγίας: Η ποσότητα του αίματος που συγκεντρώθηκε στην προζυγισμένη γάζα ήταν 212 mg.
- 5) Επίδραση του placebo στο χρόνο αιμορραγίας: Ο χρόνος αιμορραγίας 60 λεπτά μετά την χορήγηση του placebo ήταν 30 sec.

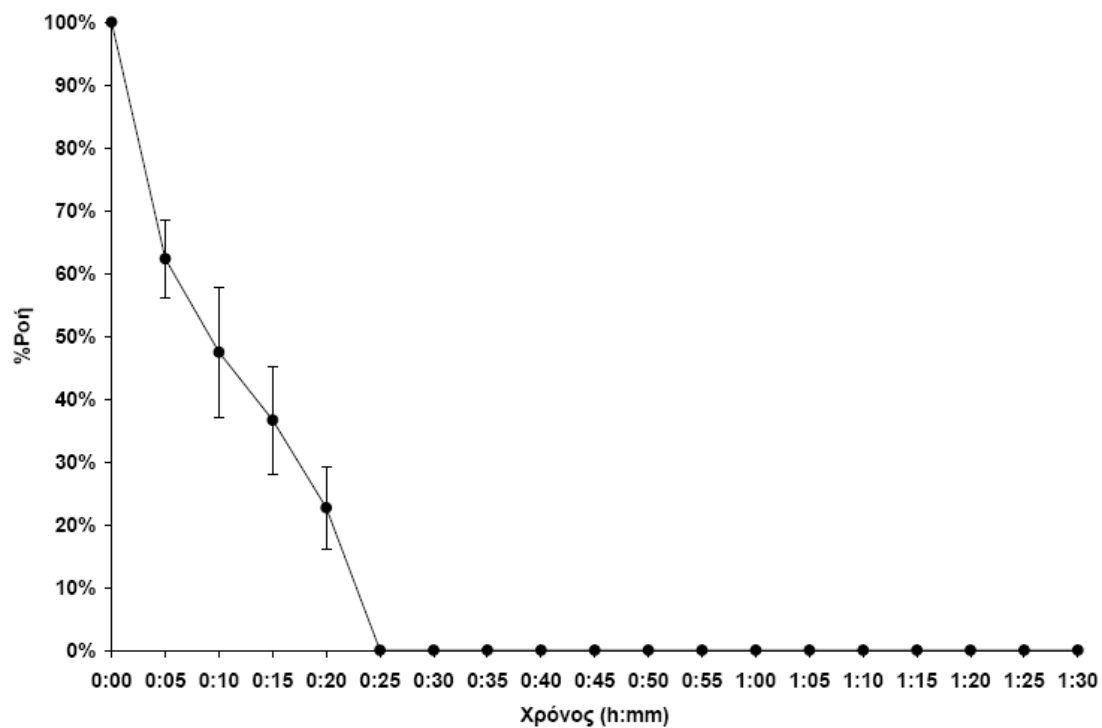
Πείραμα 5°

Χρησιμοποιήθηκε πειραματόζωο βάρους 3,0 kg.

- 1) Επίδραση του placebo στη ροή της καρωτίδας: Η αρχική ροή στην καρωτίδα του πειραματόζωου ήταν 24 ml/min. Μετά την επαγωγή της δημιουργίας του θρόμβου με την εφαρμογή ηλεκτρικού ρεύματος η ροή του αγγείου μηδενίστηκε σε χρόνο 26 λεπτών.
- 2) Επίδραση του placebo στην *ex vivo* συσσώρευση των αιμοπεταλίων: Η χορήγηση του placebo για 60 λεπτά προκάλεσε αναστολή της *ex vivo* συσσώρευσης των αιμοπεταλίων, με αγωνιστή ADP σε τελική συγκέντρωση 20 μM , κατά 9%, ενώ με αγωνιστή AA σε τελική συγκέντρωση 500 μM , κατά 10%.

- 3) Επίδραση του placebo στο βάρος του θρόμβου: Το βάρος του θρόμβου που αφαιρέθηκε από την καρωτίδα του πειραματόζωου ήταν 5,6 mg.
- 4) Επίδραση του placebo στο μέγεθος της αιμορραγίας: Η ποσότητα του αίματος που συγκεντρώθηκε στην προζυγισμένη γάζα ήταν 286 mg.
- 5) Επίδραση του placebo στο χρόνο αιμορραγίας: Ο χρόνος αιμορραγίας 60 λεπτά μετά την χορήγηση του placebo ήταν 30 sec.

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

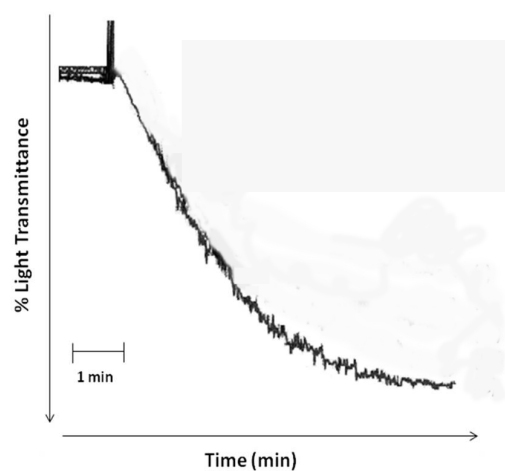


Σχήμα 3: % Μεταβολή της ροής στην καρωτίδα της ομάδας placebo με την πάροδο του χρόνου (ξεκινώντας άμεσα μετά την εφαρμογή του ηλεκτρικού ρεύματος έως 90 λεπτά μετά την εφαρμογή του, τέλος του πειράματος).

Ο φυσιολογικός ορός προκάλεσε μέση αναστολή της συσώρευσης με αγωνιστή ADP και AA κατά $9,2\pm 3,1\%$ και $11,4\pm 5,7$ αντίστοιχα (Πίνακας 10, σχήμα 4).

Πίνακας 10: Αναστολή της ex vivo συσώρευσης των αιμοπεταλίων στην ομάδα ελέγχου.

	%Αναστολή ADP	%Αναστολή AA
Πείραμα 1	6	16
Πείραμα 2	10	14
Πείραμα 3	14	15
Πείραμα 4	7	2
Πείραμα 5	9	10
Μέση τιμή ± σταθερά απόκλισης	$9,2\pm 3,1$	$11,4\pm 5,7$



Σχήμα 4: Αντιπροσωπευτική καταγραφή της συσώρευσης των αιμοπεταλίων της ομάδας ελέγχου.

Το μέσο βάρος του θρόμβου που προέκυψε ήταν $5,72 \pm 0,86$ mg (Πίνακας 11).

Πίνακας 11: Βάρος του θρόμβου στην ομάδα placebo

	Βάρος θρόμβου (mg)
Πείραμα 1	6,5
Πείραμα 2	4,5
Πείραμα 3	5,4
Πείραμα 4	6,6
Πείραμα 5	5,6
Μέση τιμή ± σταθερά απόκλισης	$5,72 \pm 0,86$

Η ποσότητα του αίματος που συγκεντρώθηκε στην προζυγισμένη γάζα ήταν $256,4 \pm 88,4$ mg (Πίνακας 13). Ο μέσος χρόνος αιμορραγίας της ομάδας ελέγχου ήταν $30,0 \pm 0,0$ sec (Πίνακας 13).

Πίνακας 13: Ποσότητα και χρόνος αιμορραγίας της ομάδας ελέγχου.

	Ποσό αιμορραγίας (mg)	Χρόνος αιμορραγίας (sec)
Πείραμα 1	383	30
Πείραμα 2	256	30
Πείραμα 3	145	30
Πείραμα 4	212	30
Πείραμα 5	286	30
Μέση τιμή ± σταθερά απόκλισης	$256,4 \pm 88,4$	$30,0 \pm 0,0$

7.2.2 Ομάδα ηπαρίνης. Συνολικά χρησιμοποιήθηκαν 5 πειραματόζωα

Πείραμα 1^ο

Χρησιμοποιήθηκε πειραματόζωο βάρους 3,4 kg.

- 1) Επίδραση της ηπαρίνης στη ροή της καρωτίδας: Η αρχική ροή στην καρωτίδα του πειραματόζωου ήταν 26 ml/min. Μετά την επαγωγή της δημιουργίας του θρόμβου με την εφαρμογή ηλεκτρικού ρεύματος η ηπαρίνη διατήρησε την ροή στην καρωτίδα. Η τελική ροή (90 λεπτά μετά την δημιουργία του θρόμβου) στην καρωτίδα ήταν 4 ml/min (15,3% της αρχικής)
- 2) Επίδραση της ηπαρίνης στην *ex vivo* συσσώρευση των αιμοπεταλίων: Η χορήγηση της ηπαρίνης για 60 λεπτά προκάλεσε αναστολή της *ex vivo* συσσώρευσης των αιμοπεταλίων, με αγωνιστή ADP σε τελική συγκέντρωση 20 μΜ, κατά 3%, ενώ με αγωνιστή AA σε τελική συγκέντρωση 500 μΜ, κατά 66%.
- 3) Επίδραση της ηπαρίνης στο βάρος του θρόμβου: Το βάρος του θρόμβου που αφαιρέθηκε από την καρωτίδα του πειραματόζωου ήταν 4,6 mg.
- 4) Επίδραση της ηπαρίνης στο μέγεθος της αιμορραγίας: Η ποσότητα του αίματος που συγκεντρώθηκε στην προζυγισμένη γάζα ήταν 181 mg.
- 5) Επίδραση της ηπαρίνης στο χρόνο αιμορραγίας: Ο χρόνος αιμορραγίας 60 λεπτά μετά την χορήγηση της ηπαρίνης ήταν 60 sec.

Πείραμα 2^ο

Χρησιμοποιήθηκε πειραματόζωο βάρους 3,6 kg.

- 1) Επίδραση της ηπαρίνης στη ροή της καρωτίδας: Η αρχική ροή στην καρωτίδα του πειραματόζωου ήταν 19 ml/min. Μετά την επαγωγή της δημιουργίας του θρόμβου με την εφαρμογή ηλεκτρικού ρεύματος η ηπαρίνη διατήρησε την ροή στην καρωτίδα. Η τελική ροή (90 λεπτά μετά την δημιουργία του θρόμβου) στην καρωτίδα ήταν 5 ml/min (26,3% της αρχικής)

- 2) Επίδραση της ηπαρίνης στην *ex vivo* συσσώρευση των αιμοπεταλίων: Η χορήγηση της ηπαρίνης για 60 λεπτά προκάλεσε αναστολή της *ex vivo* συσσώρευσης των αιμοπεταλίων, με αγωνιστή ADP σε τελική συγκέντρωση 20 μM , κατά 10%, ενώ με αγωνιστή AA σε τελική συγκέντρωση 500 μM , κατά 63%.
- 3) Επίδραση της ηπαρίνης στο βάρος του θρόμβου: Το βάρος του θρόμβου που αφαιρέθηκε από την καρωτίδα του πειραματόζωου ήταν 3,1 mg.
- 4) Επίδραση της ηπαρίνης στο μέγεθος της αιμορραγίας: Η ποσότητα του αίματος που συγκεντρώθηκε στην προζυγισμένη γάζα ήταν 270 mg.
- 5) Επίδραση της ηπαρίνης στο χρόνο αιμορραγίας: Ο χρόνος αιμορραγίας 60 λεπτά μετά την χορήγηση της ηπαρίνης ήταν 30 sec.

Πείραμα 3°

Χρησιμοποιήθηκε πειραματόζωο βάρους 3,2 kg.

- 1) Επίδραση της ηπαρίνης στη ροή της καρωτίδας: Η αρχική ροή στην καρωτίδα του πειραματόζωου ήταν 22 ml/min. Μετά την επαγωγή της δημιουργίας του θρόμβου με την εφαρμογή ηλεκτρικού ρεύματος η ηπαρίνη διατήρησε την ροή στην καρωτίδα. Η τελική ροή (90 λεπτά μετά την δημιουργία του θρόμβου) στην καρωτίδα ήταν 5 ml/min (22,7% της αρχικής)
- 2) Επίδραση της ηπαρίνης στην *ex vivo* συσσώρευση των αιμοπεταλίων: Η χορήγηση της ηπαρίνης για 60 λεπτά προκάλεσε αναστολή της *ex vivo* συσσώρευσης των αιμοπεταλίων, με αγωνιστή ADP σε τελική συγκέντρωση 20 μM , κατά 7%, ενώ με αγωνιστή AA σε τελική συγκέντρωση 500 μM , κατά 62%.
- 3) Επίδραση της ηπαρίνης στο βάρος του θρόμβου: Το βάρος του θρόμβου που αφαιρέθηκε από την καρωτίδα του πειραματόζωου ήταν 3,4 mg.
- 4) Επίδραση της ηπαρίνης στο μέγεθος της αιμορραγίας: Η ποσότητα του αίματος που συγκεντρώθηκε στην προζυγισμένη γάζα ήταν 389 mg.
- 5) Επίδραση της ηπαρίνης στο χρόνο αιμορραγίας: Ο χρόνος αιμορραγίας 60 λεπτά μετά την χορήγηση της ηπαρίνης ήταν 30 sec.

Πείραμα 4°

Χρησιμοποιήθηκε πειραματόζωο βάρους 3,2 kg.

- 1) Επίδραση της ηπαρίνης στη ροή της καρωτίδας: Η αρχική ροή στην καρωτίδα του πειραματόζωου ήταν 23 ml/min. Μετά την επαγωγή της δημιουργίας του θρόμβου με την εφαρμογή ηλεκτρικού ρεύματος η ηπαρίνη διατήρησε την ροή στην καρωτίδα. Η τελική ροή (90 λεπτά μετά την δημιουργία του θρόμβου) στην καρωτίδα ήταν 11 ml/min (47,8% της αρχικής)
- 2) Επίδραση της ηπαρίνης στην *ex vivo* συσσώρευση των αιμοπεταλίων: Η χορήγηση της ηπαρίνης για 60 λεπτά προκάλεσε αναστολή της *ex vivo* συσσώρευσης των αιμοπεταλίων, με αγωνιστή ADP σε τελική συγκέντρωση 20 μ M, κατά 12%, ενώ με αγωνιστή AA σε τελική συγκέντρωση 500 μ M, κατά 55%.
- 3) Επίδραση της ηπαρίνης στο βάρος του θρόμβου: Το βάρος του θρόμβου που αφαιρέθηκε από την καρωτίδα του πειραματόζωου ήταν 3,7 mg.
- 4) Επίδραση της ηπαρίνης στο μέγεθος της αιμορραγίας: Η ποσότητα του αίματος που συγκεντρώθηκε στην προζυγισμένη γάζα ήταν 115 mg.
- 5) Επίδραση της ηπαρίνης στο χρόνο αιμορραγίας: Ο χρόνος αιμορραγίας 60 λεπτά μετά την χορήγηση της ηπαρίνης ήταν 30 sec.

Πείραμα 5°

Χρησιμοποιήθηκε πειραματόζωο βάρους 3,1 kg.

- 1) Επίδραση της ηπαρίνης στη ροή της καρωτίδας: Η αρχική ροή στην καρωτίδα του πειραματόζωου ήταν 26 ml/min. Μετά την επαγωγή της δημιουργίας του θρόμβου με την εφαρμογή ηλεκτρικού ρεύματος η ηπαρίνη διατήρησε την ροή στην καρωτίδα. Η τελική ροή (90 λεπτά μετά την δημιουργία του θρόμβου) στην καρωτίδα ήταν 5 ml/min (26,2% της αρχικής)
- 2) Επίδραση της ηπαρίνης στην *ex vivo* συσσώρευση των αιμοπεταλίων: Η χορήγηση της ηπαρίνης για 60 λεπτά προκάλεσε αναστολή της *ex vivo* συσσώρευσης των αιμοπεταλίων, με αγωνιστή ADP σε τελική συγκέντρωση 20

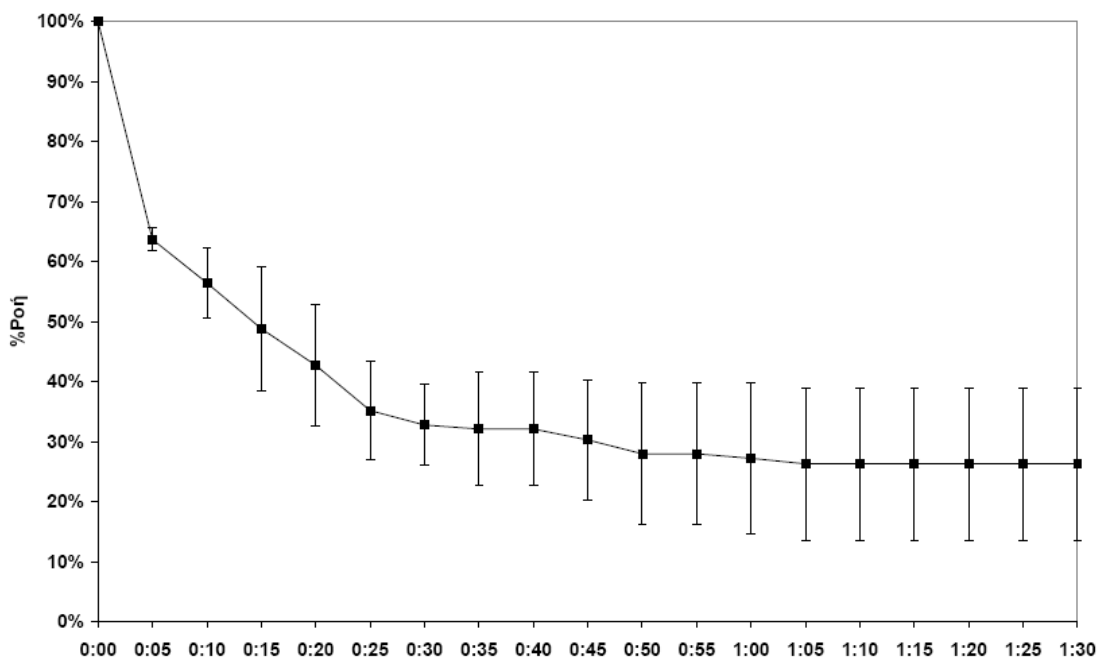
μΜ, κατά 10%, ενώ με αγωνιστή ΑΑ σε τελική συγκέντρωση 500 μΜ, κατά 62%.

3) Επίδραση της ηπαρίνης στο βάρος του θρόμβου: Το βάρος του θρόμβου που αφαιρέθηκε από την καρωτίδα του πειραματόζωου ήταν 4,8 mg.

4) Επίδραση της ηπαρίνης στο μέγεθος της αιμορραγίας: Η ποσότητα του αίματος που συγκεντρώθηκε στην προζυγισμένη γάζα ήταν 234 mg.

5) Επίδραση της ηπαρίνης στο χρόνο αιμορραγίας: Ο χρόνος αιμορραγίας 60 λεπτά μετά την χορήγηση της ηπαρίνης ήταν 30 sec.

Συνολικά στην ομάδα της ηπαρίνης, η μέση αρχική ροή στην καρωτίδα ήταν $23,2 \pm 2,9$ ml/min. Μετά την επαγωγή του θρόμβου η ροή στην καρωτίδα του πειραματόζωου στο τέλος του πειράματος ήταν $26,3 \pm 12,7\%$ της αρχικής (Σχήμα 5).

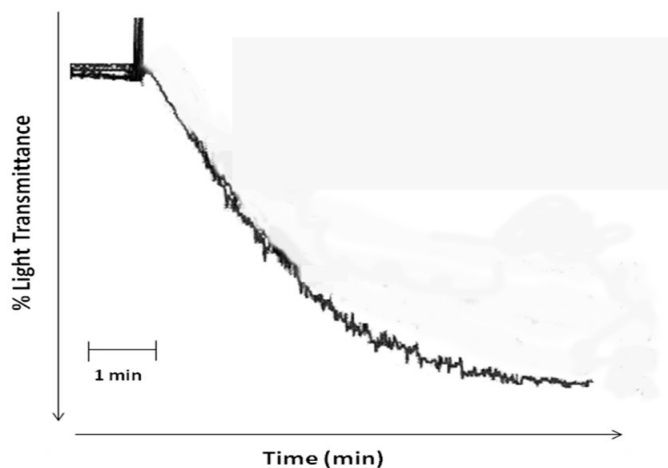


Σχήμα 5: % Μεταβολή της ροής στην καρωτίδα της ομάδας της ηπαρίνης με την πάροδο του χρόνου (ξεκινώντας άμεσα μετά την εφαρμογή του ηλεκτρικού ρεύματος έως 90 λεπτά μετά την εφαρμογή του, τέλος του πειράματος).

Η ηπαρίνη προκάλεσε μέση αναστολή της συσώρευσης με αγωνιστή ADP και AA κατά $8,3\pm 3,5\%$ και 61.6 ± 4.0 αντίστοιχα (Πίνακας 14, σχήμα 6).

Πίνακας 14: Αναστολή της ex vivo συσώρευσης των αιμοπεταλίων στην ομάδα της ηπαρίνης.

	%Αναστολή ADP	%Αναστολή AA
Πείραμα 1	3	66
Πείραμα 2	10	63
Πείραμα 3	7	62
Πείραμα 4	12	55
Πείραμα 5	10	62
Μέση τιμή ± σταθερά απόκλισης	$8,3\pm 3,5$	61.6 ± 4.0



Σχήμα 6: Αντιπροσωπευτική καταγραφή της συσώρευσης των αιμοπεταλίων της ομάδας της ηπαρίνης.

Το μέσο βάρος του θρόμβου που προέκυψε ήταν $3,92 \pm 0,74$ mg (Πίνακας 15).

Πίνακας 15: Βάρος του θρόμβου στην ομάδα της ηπαρίνης

	Βάρος θρόμβου (mg)
Πείραμα 1	4,6
Πείραμα 2	3,1
Πείραμα 3	3,4
Πείραμα 4	3,7
Πείραμα 5	4,8
Μέση τιμή ± σταθερά απόκλισης	$3,92 \pm 0,74$

Η ποσότητα του αίματος που συγκεντρώθηκε στην προζυγισμένη γάζα ήταν $237,8 \pm 102,7$ mg (Πίνακας 16). Ο μέσος χρόνος αιμορραγίας της ομάδας της ηπαρίνης ήταν $36,2 \pm 13,4$ sec (Πίνακας 16).

Πίνακας 16: Ποσότητα και χρόνος αιμορραγίας της ομάδας της ηπαρίνης.

	Ποσό αιμορραγίας (mg)	Χρόνος αιμορραγίας (sec)
Πείραμα 1	181	60
Πείραμα 2	270	30
Πείραμα 3	389	30
Πείραμα 4	115	30
Πείραμα 5	234	30
Μέση τιμή ± σταθερά απόκλισης	$237,8 \pm 102,7$	$36,2 \pm 13,4$

7.2.3 Ομάδα επιφιμπατίδης σε δόση 180 µg/kg bolus και έγχυση με ρυθμό 2µg/kg/min (χαμηλή δόση). Συνολικά χρησιμοποιήθηκαν 5 πειραματόζωα

Πείραμα 1°

Χρησιμοποιήθηκε πειραματόζωο βάρους 3,1 kg.

1) Επίδραση της επιφιμπατίδης σε χαμηλή δόση στη ροή της καρωτίδας: Η αρχική ροή στην καρωτίδα του πειραματόζωου ήταν 21 ml/min. Μετά την επαγωγή της δημιουργίας του θρόμβου με την εφαρμογή ηλεκτρικού ρεύματος η επιφιμπατίδη διατήρησε την ροή στην καρωτίδα. Η τελική ροή (90 λεπτά μετά την δημιουργία του θρόμβου) στην καρωτίδα ήταν 9 ml/min (42,8% της αρχικής)

2) Επίδραση της επιφιμπατίδης στην ex vivo συσσώρευση των αιμοπεταλίων: Η χορήγηση της επιφιμπατίδης για 60 λεπτά προκάλεσε αναστολή της ex vivo συσσώρευσης των αιμοπεταλίων, με αγωνιστή ADP σε τελική συγκέντρωση 20 µM, κατά 30%, ενώ με αγωνιστή AA σε τελική συγκέντρωση 500 µM, κατά 64%.

3) Επίδραση της επιφιμπατίδης στο βάρος του θρόμβου: Το βάρος του θρόμβου που αφαιρέθηκε από την καρωτίδα του πειραματόζωου ήταν 1,2 mg.

4) Επίδραση της επιφιμπατίδης στο μέγεθος της αιμορραγίας: Η ποσότητα του αίματος που συγκεντρώθηκε στην προζυγισμένη γάζα ήταν 116 mg.

5) Επίδραση της επιφιμπατίδης στο χρόνο αιμορραγίας: Ο χρόνος αιμορραγίας 60 λεπτά μετά την χορήγηση της επιφιμπατίδης ήταν 30 sec.

Πείραμα 2°

Χρησιμοποιήθηκε πειραματόζωο βάρους 3,4 kg.

1) Επίδραση της επιφιμπατίδης σε χαμηλή δόση στη ροή της καρωτίδας: Η αρχική ροή στην καρωτίδα του πειραματόζωου ήταν 24 ml/min. Μετά την

επαγωγή της δημιουργίας του θρόμβου με την εφαρμογή ηλεκτρικού ρεύματος η επιφιμπατίδη διατήρησε την ροή στην καρωτίδα. Η τελική ροή (90 λεπτά μετά την δημιουργία του θρόμβου) στην καρωτίδα ήταν 9 ml/min (37,5% της αρχικής)

2) Επίδραση της επιφιμπατίδης στην ex vivo συσσώρευση των αιμοπεταλίων: Η χορήγηση της επιφιμπατίδης για 60 λεπτά προκάλεσε αναστολή της ex vivo συσσώρευσης των αιμοπεταλίων, με αγωνιστή ADP σε τελική συγκέντρωση 20 μM , κατά 21%, ενώ με αγωνιστή AA σε τελική συγκέντρωση 500 μM , κατά 44%.

3) Επίδραση της επιφιμπατίδης στο βάρος του θρόμβου: Το βάρος του θρόμβου που αφαιρέθηκε από την καρωτίδα του πειραματόζωου ήταν 1,4 mg.

4) Επίδραση της επιφιμπατίδης στο μέγεθος της αιμορραγίας: Η ποσότητα του αίματος που συγκεντρώθηκε στην προζυγισμένη γάζα ήταν 234 mg.

5) Επίδραση της επιφιμπατίδης στο χρόνο αιμορραγίας: Ο χρόνος αιμορραγίας 60 λεπτά μετά την χορήγηση της επιφιμπατίδης ήταν 30 sec.

Πείραμα 3°

Χρησιμοποιήθηκε πειραματόζωο βάρους 3,2 kg.

1) Επίδραση της επιφιμπατίδης σε χαμηλή δόση στη ροή της καρωτίδας: Η αρχική ροή στην καρωτίδα του πειραματόζωου ήταν 27 ml/min. Μετά την επαγωγή της δημιουργίας του θρόμβου με την εφαρμογή ηλεκτρικού ρεύματος η επιφιμπατίδη διατήρησε την ροή στην καρωτίδα. Η τελική ροή (90 λεπτά μετά την δημιουργία του θρόμβου) στην καρωτίδα ήταν 8 ml/min (29,6% της αρχικής)

2) Επίδραση της επιφιμπατίδης στην ex vivo συσσώρευση των αιμοπεταλίων: Η χορήγηση της επιφιμπατίδης για 60 λεπτά προκάλεσε αναστολή της ex vivo συσσώρευσης των αιμοπεταλίων, με αγωνιστή ADP σε τελική

συγκέντρωση 20 μM , κατά 34%, ενώ με αγωνιστή AA σε τελική συγκέντρωση 500 μM , κατά 34%.

3) Επίδραση της επιφιμπατίδης στο βάρος του θρόμβου: Το βάρος του θρόμβου που αφαιρέθηκε από την καρωτίδα του πειραματόζωου ήταν 1,8 mg.

4) Επίδραση της επιφιμπατίδης στο μέγεθος της αιμορραγίας: Η ποσότητα του αίματος που συγκεντρώθηκε στην προζυγισμένη γάζα ήταν 272 mg.

5) Επίδραση της επιφιμπατίδης στο χρόνο αιμορραγίας: Ο χρόνος αιμορραγίας 60 λεπτά μετά την χορήγηση της επιφιμπατίδης ήταν 50 sec.

Πείραμα 4^ο

Χρησιμοποιήθηκε πειραματόζωο βάρους 3,3 kg.

1) Επίδραση της επιφιμπατίδης σε χαμηλή δόση στη ροή της καρωτίδας: Η αρχική ροή στην καρωτίδα του πειραματόζωου ήταν 25 ml/min. Μετά την επαγωγή της δημιουργίας του θρόμβου με την εφαρμογή ηλεκτρικού ρεύματος η επιφιμπατίδη διατήρησε την ροή στην καρωτίδα. Η τελική ροή (90 λεπτά μετά την δημιουργία του θρόμβου) στην καρωτίδα ήταν 10 ml/min (40,0% της αρχικής)

2) Επίδραση της επιφιμπατίδης στην ex vivo συσσώρευση των αιμοπεταλίων: Η χορήγηση της επιφιμπατίδης για 60 λεπτά προκάλεσε αναστολή της ex vivo συσσώρευσης των αιμοπεταλίων, με αγωνιστή ADP σε τελική συγκέντρωση 20 μM , κατά 21%, ενώ με αγωνιστή AA σε τελική συγκέντρωση 500 μM , κατά 53%.

3) Επίδραση της επιφιμπατίδης στο βάρος του θρόμβου: Το βάρος του θρόμβου που αφαιρέθηκε από την καρωτίδα του πειραματόζωου ήταν 1,5 mg.

4) Επίδραση της επιφιμπατίδης στο μέγεθος της αιμορραγίας: Η ποσότητα του αίματος που συγκεντρώθηκε στην προζυγισμένη γάζα ήταν 367 mg.

5) Επίδραση της επιφιμπατίδης στο χρόνο αιμορραγίας: Ο χρόνος αιμορραγίας 60 λεπτά μετά την χορήγηση της επιφιμπατίδης ήταν 30 sec.

Πείραμα 5°

Χρησιμοποιήθηκε πειραματόζωο βάρους 3,5 kg.

1) Επίδραση της επιφιμπατίδης σε χαμηλή δόση στη ροή της καρωτίδας: Η αρχική ροή στην καρωτίδα του πειραματόζωου ήταν 26 ml/min. Μετά την επαγωγή της δημιουργίας του θρόμβου με την εφαρμογή ηλεκτρικού ρεύματος η επιφιμπατίδη διατήρησε την ροή στην καρωτίδα. Η τελική ροή (90 λεπτά μετά την δημιουργία του θρόμβου) στην καρωτίδα ήταν 9 ml/min (34,6% της αρχικής)

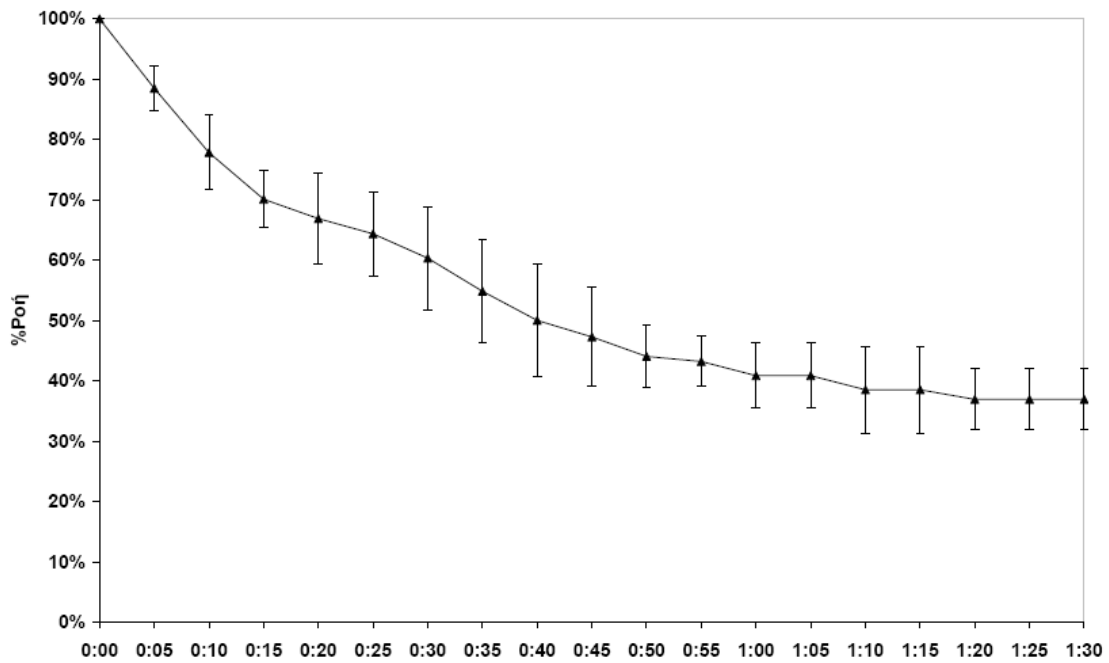
2) Επίδραση της επιφιμπατίδης στην *ex vivo* συσσώρευση των αιμοπεταλίων: Η χορήγηση της επιφιμπατίδης για 60 λεπτά προκάλεσε αναστολή της *ex vivo* συσσώρευσης των αιμοπεταλίων, με αγωνιστή ADP σε τελική συγκέντρωση 20 μM , κατά 34%, ενώ με αγωνιστή AA σε τελική συγκέντρωση 500 μM , κατά 53%.

3) Επίδραση της επιφιμπατίδης στο βάρος του θρόμβου: Το βάρος του θρόμβου που αφαιρέθηκε από την καρωτίδα του πειραματόζωου ήταν 2,7 mg.

4) Επίδραση της επιφιμπατίδης στο μέγεθος της αιμορραγίας: Η ποσότητα του αίματος που συγκεντρώθηκε στην προζυγισμένη γάζα ήταν 398 mg.

5) Επίδραση της επιφιμπατίδης στο χρόνο αιμορραγίας: Ο χρόνος αιμορραγίας 60 λεπτά μετά την χορήγηση της επιφιμπατίδης ήταν 60 sec.

Συνολικά στην ομάδα της επιπιμπατίδης σε χαμηλή δόση, η μέση αρχική ροή στην καρωτίδα ήταν $24,6 \pm 2,3$ ml/min. Μετά την επαγωγή του θρόμβου η ροή στην καρωτίδα του πειραματόζωου στο τέλος του πειράματος ήταν $36,9 \pm 5,0\%$ της αρχικής (Σχήμα 7).

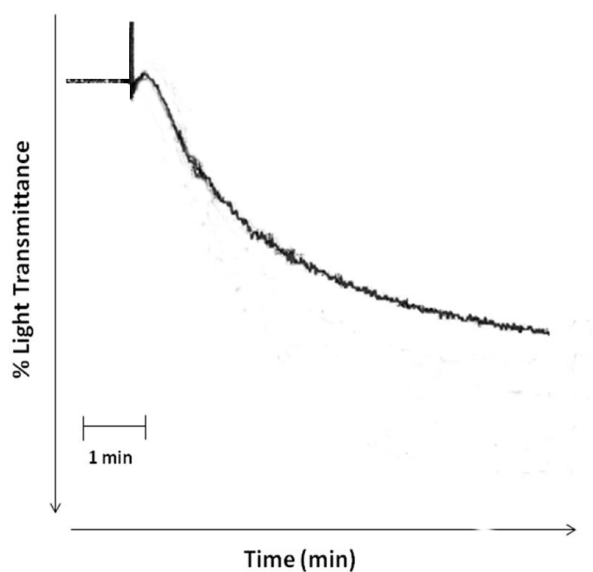


Σχήμα 7: % Μεταβολή της ροής στην καρωτίδα της ομάδας της επιπιμπατίδης με την πάροδο του χρόνου (ξεκινώντας άμεσα μετά την εφαρμογή του ηλεκτρικού ρεύματος έως 90 λεπτά μετά την εφαρμογή του, τέλος του πειράματος).

Η επιφιμπατίδη σε χαμηλή δόση προκάλεσε μέσες αναστολές της συσσώρευσης με αγωνιστή ADP και AA κατά $28,0 \pm 6,6\%$ και 50.2 ± 11.5 αντίστοιχα (Πίνακας 17, σχήμα 8).

Πίνακας 17: Αναστολή της ex vivo συσσώρευσης των αιμοπεταλίων στην ομάδα της επιφιμπατίδης (χαμηλή δόση).

	%Αναστολή ADP	%Αναστολή AA
Πείραμα 1	30	64
Πείραμα 2	21	44
Πείραμα 3	34	34
Πείραμα 4	21	53
Πείραμα 5	34	56
Μέση τιμή ± σταθερά απόκλισης	28,0±6,6	50.2±11.5



Σχήμα 8: Αντιπροσωπευτική καταγραφή της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων της ομάδας της επιφιμπατίδης (χαμηλή δόση).

Το μέσο βάρος του θρόμβου που προέκυψε ήταν $1,72 \pm 0,58$ mg (Πίνακας 18).

Πίνακας 18: Βάρος του θρόμβου στην ομάδα της επιπιμπατίδης (χαμηλή δόση).

	Βάρος θρόμβου (mg)
Πείραμα 1	1,2
Πείραμα 2	1,4
Πείραμα 3	1,8
Πείραμα 4	1,5
Πείραμα 5	2,7
Μέση τιμή \pm σταθερά απόκλισης	$1,72 \pm 0,58$

Η ποσότητα του αίματος που συγκεντρώθηκε στην προζυγισμένη γάζα ήταν $277,4 \pm 112,4$ mg (Πίνακας 19). Ο μέσος χρόνος αιμορραγίας της ομάδας της επιπιμπατίδης (χαμηλή δόση) ήταν $40,0 \pm 14,1$ sec (Πίνακας 19).

Πίνακας 19: Ποσότητα και χρόνος αιμορραγίας της ομάδας της επιπιμπατίδης (χαμηλή δόση).

	Ποσό αιμορραγίας (mg)	Χρόνος αιμορραγίας (sec)
Πείραμα 1	116	30
Πείραμα 2	234	30
Πείραμα 3	272	50
Πείραμα 4	367	30
Πείραμα 5	398	60
Μέση τιμή ± σταθερά απόκλισης	$277,4 \pm 112,4$	$40,0 \pm 14,1$

7.2.4 Ομάδα επιφιμπατίδης σε δόση 900 µg/kg bolus και συνεχή έγχυση με ρυθμό 10µg/kg/min (υψηλή δόση). Συνολικά χρησιμοποιήθηκαν 5 πειραματόζωα

Πείραμα 1°

Χρησιμοποιήθηκε πειραματόζωο βάρους 3,3 kg.

1) Επίδραση της επιφιμπατίδης σε υψηλή δόση στη ροή της καρωτίδας: Η αρχική ροή στην καρωτίδα του πειραματόζωου ήταν 24 ml/min. Μετά την επαγωγή της δημιουργίας του θρόμβου με την εφαρμογή ηλεκτρικού ρεύματος η επιφιμπατίδη διατήρησε την ροή στην καρωτίδα. Η τελική ροή (90 λεπτά μετά την δημιουργία του θρόμβου) στην καρωτίδα ήταν 9 ml/min (37,5% της αρχικής)

2) Επίδραση της επιφιμπατίδης στην *ex vivo* συσσώρευση των αιμοπεταλίων: Η χορήγηση της επιφιμπατίδης για 60 λεπτά προκάλεσε αναστολή της *ex vivo* συσσώρευσης των αιμοπεταλίων, με αγωνιστή ADP σε τελική συγκέντρωση 20 µM, κατά 36%, ενώ με αγωνιστή AA σε τελική συγκέντρωση 500 µM, κατά 38%.

3) Επίδραση της επιφιμπατίδης στο βάρος του θρόμβου: Το βάρος του θρόμβου που αφαιρέθηκε από την καρωτίδα του πειραματόζωου ήταν 1,0 mg.

4) Επίδραση της επιφιμπατίδης στο μέγεθος της αιμορραγίας: Η ποσότητα του αίματος που συγκεντρώθηκε στην προζυγισμένη γάζα ήταν 280 mg.

5) Επίδραση της επιφιμπατίδης στο χρόνο αιμορραγίας: Ο χρόνος αιμορραγίας 60 λεπτά μετά την χορήγηση της επιφιμπατίδης ήταν 30 sec.

Πείραμα 2°

Χρησιμοποιήθηκε πειραματόζωο βάρους 3,5 kg.

1) Επίδραση της επιφιμπατίδης σε υψηλή δόση στη ροή της καρωτίδας: Η αρχική ροή στην καρωτίδα του πειραματόζωου ήταν 24 ml/min. Μετά την

επαγωγή της δημιουργίας του θρόμβου με την εφαρμογή ηλεκτρικού ρεύματος η επιφιμπατίδη διατήρησε την ροή στην καρωτίδα. Η τελική ροή (90 λεπτά μετά την δημιουργία του θρόμβου) στην καρωτίδα ήταν 8 ml/min (33,3% της αρχικής)

2) Επίδραση της επιφιμπατίδης στην ex vivo συσσώρευση των αιμοπεταλίων: Η χορήγηση της επιφιμπατίδης για 60 λεπτά προκάλεσε αναστολή της ex vivo συσσώρευσης των αιμοπεταλίων, με αγωνιστή ADP σε τελική συγκέντρωση 20 μM , κατά 51%, ενώ με αγωνιστή AA σε τελική συγκέντρωση 500 μM , κατά 42%.

3) Επίδραση της επιφιμπατίδης στο βάρος του θρόμβου: Το βάρος του θρόμβου που αφαιρέθηκε από την καρωτίδα του πειραματόζωου ήταν 2,1 mg.

4) Επίδραση της επιφιμπατίδης στο μέγεθος της αιμορραγίας: Η ποσότητα του αίματος που συγκεντρώθηκε στην προζυγισμένη γάζα ήταν 234 mg.

5) Επίδραση της επιφιμπατίδης στο χρόνο αιμορραγίας: Ο χρόνος αιμορραγίας 60 λεπτά μετά την χορήγηση της επιφιμπατίδης ήταν 70 sec.

Πείραμα 3°

Χρησιμοποιήθηκε πειραματόζωο βάρους 3,1 kg.

1) Επίδραση της επιφιμπατίδης σε υψηλή δόση στη ροή της καρωτίδας: Η αρχική ροή στην καρωτίδα του πειραματόζωου ήταν 17 ml/min. Μετά την επαγωγή της δημιουργίας του θρόμβου με την εφαρμογή ηλεκτρικού ρεύματος η επιφιμπατίδη διατήρησε την ροή στην καρωτίδα. Η τελική ροή (90 λεπτά μετά την δημιουργία του θρόμβου) στην καρωτίδα ήταν 6 ml/min (35,2% της αρχικής)

2) Επίδραση της επιφιμπατίδης στην ex vivo συσσώρευση των αιμοπεταλίων: Η χορήγηση της επιφιμπατίδης για 60 λεπτά προκάλεσε αναστολή της ex vivo συσσώρευσης των αιμοπεταλίων, με αγωνιστή ADP σε τελική

συγκέντρωση 20 μM , κατά 28%, ενώ με αγωνιστή AA σε τελική συγκέντρωση 500 μM , κατά 60%.

3) Επίδραση της επιφιμπατίδης στο βάρος του θρόμβου: Το βάρος του θρόμβου που αφαιρέθηκε από την καρωτίδα του πειραματόζωου ήταν 3,2 mg.

4) Επίδραση της επιφιμπατίδης στο μέγεθος της αιμορραγίας: Η ποσότητα του αίματος που συγκεντρώθηκε στην προζυγισμένη γάζα ήταν 245 mg.

5) Επίδραση της επιφιμπατίδης στο χρόνο αιμορραγίας: Ο χρόνος αιμορραγίας 60 λεπτά μετά την χορήγηση της επιφιμπατίδης ήταν 30 sec.

Πείραμα 4^ο

Χρησιμοποιήθηκε πειραματόζωο βάρους 3,3 kg.

1) Επίδραση της επιφιμπατίδης σε υψηλή δόση στη ροή της καρωτίδας: Η αρχική ροή στην καρωτίδα του πειραματόζωου ήταν 17 ml/min. Μετά την επαγωγή της δημιουργίας του θρόμβου με την εφαρμογή ηλεκτρικού ρεύματος η επιφιμπατίδη διατήρησε την ροή στην καρωτίδα. Η τελική ροή (90 λεπτά μετά την δημιουργία του θρόμβου) στην καρωτίδα ήταν 7 ml/min (37,1% της αρχικής)

2) Επίδραση της επιφιμπατίδης στην ex vivo συσσώρευση των αιμοπεταλίων: Η χορήγηση της επιφιμπατίδης για 60 λεπτά προκάλεσε αναστολή της ex vivo συσσώρευσης των αιμοπεταλίων, με αγωνιστή ADP σε τελική συγκέντρωση 20 μM , κατά 48%, ενώ με αγωνιστή AA σε τελική συγκέντρωση 500 μM , κατά 53%.

3) Επίδραση της επιφιμπατίδης στο βάρος του θρόμβου: Το βάρος του θρόμβου που αφαιρέθηκε από την καρωτίδα του πειραματόζωου ήταν 0,9 mg.

4) Επίδραση της επιφιμπατίδης στο μέγεθος της αιμορραγίας: Η ποσότητα του αίματος που συγκεντρώθηκε στην προζυγισμένη γάζα ήταν 229 mg.

5) Επίδραση της επιφιμπατίδης στο χρόνο αιμορραγίας: Ο χρόνος αιμορραγίας 60 λεπτά μετά την χορήγηση της επιφιμπατίδης ήταν 40 sec.

Πείραμα 5°

Χρησιμοποιήθηκε πειραματόζωο βάρους 3,2 kg.

1) Επίδραση της επιφιμπατίδης σε υψηλή δόση στη ροή της καρωτίδας: Η αρχική ροή στην καρωτίδα του πειραματόζωου ήταν 26 ml/min. Μετά την επαγωγή της δημιουργίας του θρόμβου με την εφαρμογή ηλεκτρικού ρεύματος η επιφιμπατίδη διατήρησε την ροή στην καρωτίδα. Η τελική ροή (90 λεπτά μετά την δημιουργία του θρόμβου) στην καρωτίδα ήταν 8 ml/min (32,4% της αρχικής)

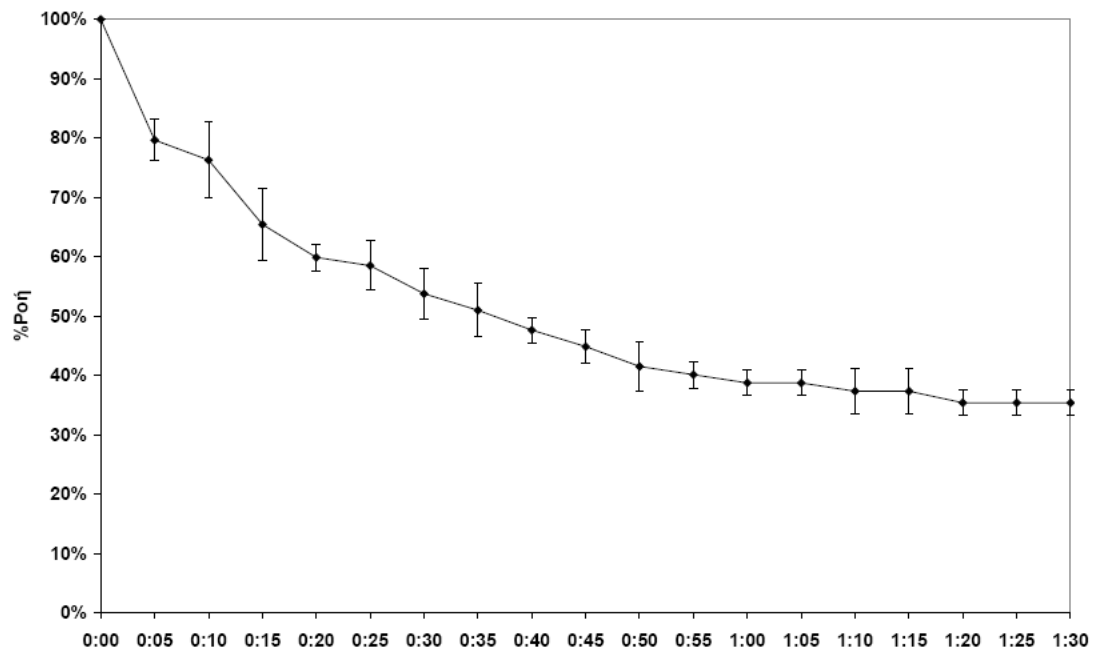
2) Επίδραση της επιφιμπατίδης στην *ex vivo* συσσώρευση των αιμοπεταλίων: Η χορήγηση της επιφιμπατίδης για 60 λεπτά προκάλεσε αναστολή της *ex vivo* συσσώρευσης των αιμοπεταλίων, με αγωνιστή ADP σε τελική συγκέντρωση 20 μM , κατά 29%, ενώ με αγωνιστή AA σε τελική συγκέντρωση 500 μM , κατά 55%.

3) Επίδραση της επιφιμπατίδης στο βάρος του θρόμβου: Το βάρος του θρόμβου που αφαιρέθηκε από την καρωτίδα του πειραματόζωου ήταν 3,3 mg.

4) Επίδραση της επιφιμπατίδης στο μέγεθος της αιμορραγίας: Η ποσότητα του αίματος που συγκεντρώθηκε στην προζυγισμένη γάζα ήταν 277 mg.

5) Επίδραση της επιφιμπατίδης στο χρόνο αιμορραγίας: Ο χρόνος αιμορραγίας 60 λεπτά μετά την χορήγηση της επιφιμπατίδης ήταν 30 sec.

Συνολικά στην ομάδα της επιφιμπατίδης σε υψηλή δόση, η μέση αρχική ροή στην καρωτίδα ήταν $21,6 \pm 4,0$ ml/min. Μετά την επαγωγή του θρόμβου η ροή στην καρωτίδα του πειραματόζωου στο τέλος του πειράματος ήταν $36,9 \pm 5,0\%$ της αρχικής (Σχήμα 9).

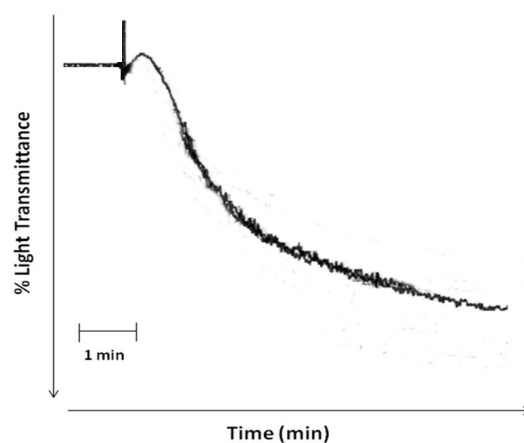


Σχήμα 9: % Μεταβολή της ροής στην καρωτίδα της ομάδας της επιφιμπατίδης με την πάροδο του χρόνου (ξεκινώντας άμεσα μετά την εφαρμογή του ηλεκτρικού ρεύματος έως 90 λεπτά μετά την εφαρμογή του, τέλος του πειράματος).

Η επιφιμπατίδη σε υψηλή δόση προκάλεσε μέσες αναστολή της συσσώρευσης με αγωνιστή ADP και AA κατά $35,3\pm 2,0\%$ και 49.6 ± 9.23 αντίστοιχα (Πίνακας 20, σχήμα 10).

Πίνακας 20: Αναστολή της ex vivo συσσώρευσης των αιμοπεταλίων στην ομάδα της επιφιμπατίδης (υψηλή δόση)

	%Αναστολή ADP	%Αναστολή AA
Πείραμα 1	36	38
Πείραμα 2	51	42
Πείραμα 3	28	60
Πείραμα 4	48	53
Πείραμα 5	29	55
Μέση τιμή ± σταθερά απόκλιση	$35,3\pm 2,0$	49.6 ± 9.23



Σχήμα 10: Αντιπροσωπευτική καταγραφή της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων της ομάδας της επιφιμπατίδης (υψηλή δόση).

Το μέσο βάρος του θρόμβου που προέκυψε ήταν $2,10 \pm 1,10$ mg (Πίνακας 21).

Πίνακας 21: Βάρος του θρόμβου στην ομάδα της επιπιμπατίδης (υψηλή δόση).

	Βάρος θρόμβου (mg)
Πείραμα 1	1,0
Πείραμα 2	2,1
Πείραμα 3	3,2
Πείραμα 4	0,9
Πείραμα 5	3,3
Μέση τιμή \pm σταθερά απόκλισης	$2,10 \pm 1,10$

Η ποσότητα του αίματος που συγκεντρώθηκε στην προζυγισμένη γάζα ήταν $253,0 \pm 24,0$ mg (Πίνακας 22). Ο μέσος χρόνος αιμορραγίας της ομάδας της επιφιμπατίδης (υψηλή δόση) ήταν $40,1 \pm 17,3$ sec (Πίνακας 22).

Πίνακας 22: Ποσότητα και χρόνος αιμορραγίας της ομάδας της επιφιμπατίδης.

	Ποσό αιμορραγίας (mg)	Χρόνος αιμορραγίας (sec)
Πείραμα 1	280	30
Πείραμα 2	234	70
Πείραμα 3	245	30
Πείραμα 4	229	40
Πείραμα 5	277	30
Μέση τιμή ± σταθερά απόκλισης	$253,0 \pm 24,0$	$40,1 \pm 17,3$

7.2.5 Ομάδα πεπτιδίου CDC σε δόση 3 mg/kg. Συνολικά χρησιμοποιήθηκαν 3 πειραματόζωα

Πείραμα 1°

Χρησιμοποιήθηκε πειραματόζωο βάρους 3,6 kg.

- 1) Επίδραση του πεπτιδίου σε δόση 3 mg/kg στη ροή της καρωτίδας: Η αρχική ροή στην καρωτίδα του πειραματόζωου ήταν 20 ml/min. Μετά την επαγωγή της δημιουργίας του θρόμβου με την εφαρμογή ηλεκτρικού ρεύματος η ροή στην καρωτίδα μηδενίστηκε σε 24 min.
- 2) Επίδραση του πεπτιδίου στην *ex vivo* συσσώρευση των αιμοπεταλίων: Η χορήγηση του πεπτιδίου για 60 λεπτά προκάλεσε αναστολή της *ex vivo* συσσώρευσης των αιμοπεταλίων, με αγωνιστή ADP σε τελική συγκέντρωση 20 μM, κατά 11%, με αγωνιστή AA σε τελική συγκέντρωση 500 μM, κατά 12%.
- 3) Επίδραση του πεπτιδίου στο βάρος του θρόμβου: Το βάρος του θρόμβου που αφαιρέθηκε από την καρωτίδα του πειραματόζωου ήταν 6.1 mg.
- 4) Επίδραση του πεπτιδίου στο μέγεθος της αιμορραγίας: Η ποσότητα του αίματος που συγκεντρώθηκε στην προζυγισμένη γάζα ήταν 309 mg.
- 5) Επίδραση του πεπτιδίου στο χρόνο αιμορραγίας: Ο χρόνος αιμορραγίας 60 λεπτά μετά την χορήγηση του πεπτιδίου ήταν 30 sec.

Πείραμα 2°

Χρησιμοποιήθηκε πειραματόζωο βάρους 3,2 kg.

- 1) Επίδραση του πεπτιδίου σε δόση 3 mg/kg στη ροή της καρωτίδας: Η αρχική ροή στην καρωτίδα του πειραματόζωου ήταν 18 ml/min. Μετά την επαγωγή της δημιουργίας του θρόμβου με την εφαρμογή ηλεκτρικού ρεύματος η ροή στην καρωτίδα μηδενίστηκε σε 23 min.
- 2) Επίδραση του πεπτιδίου στην *ex vivo* συσσώρευση των αιμοπεταλίων: Η χορήγηση του πεπτιδίου για 60 λεπτά προκάλεσε αναστολή της *ex vivo*

συσσώρευσης των αιμοπεταλίων, με αγωνιστή ADP σε τελική συγκέντρωση 20 μM , κατά 6%, με αγωνιστή AA σε τελική συγκέντρωση 500 μM , κατά 9%

3) Επίδραση του πεπτιδίου στο βάρος του θρόμβου: Το βάρος του θρόμβου που αφαιρέθηκε από την καρωτίδα του πειραματόζωου ήταν 5,1 mg.

4) Επίδραση του πεπτιδίου στο μέγεθος της αιμορραγίας: Η ποσότητα του αίματος που συγκεντρώθηκε στην προζυγισμένη γάζα ήταν 337 mg.

5) Επίδραση του πεπτιδίου στο χρόνο αιμορραγίας: Ο χρόνος αιμορραγίας 60 λεπτά μετά την χορήγηση του πεπτιδίου ήταν 40 sec.

Πείραμα 3°

Χρησιμοποιήθηκε πειραματόζωο βάρους 3,2 kg.

1) Επίδραση του πεπτιδίου σε δόση 3 mg/kg στη ροή της καρωτίδας: Η αρχική ροή στην καρωτίδα του πειραματόζωου ήταν 19 ml/min. Μετά την επαγωγή της δημιουργίας του θρόμβου με την εφαρμογή ηλεκτρικού ρεύματος η ροή στην καρωτίδα μηδενίστηκε σε 23 min

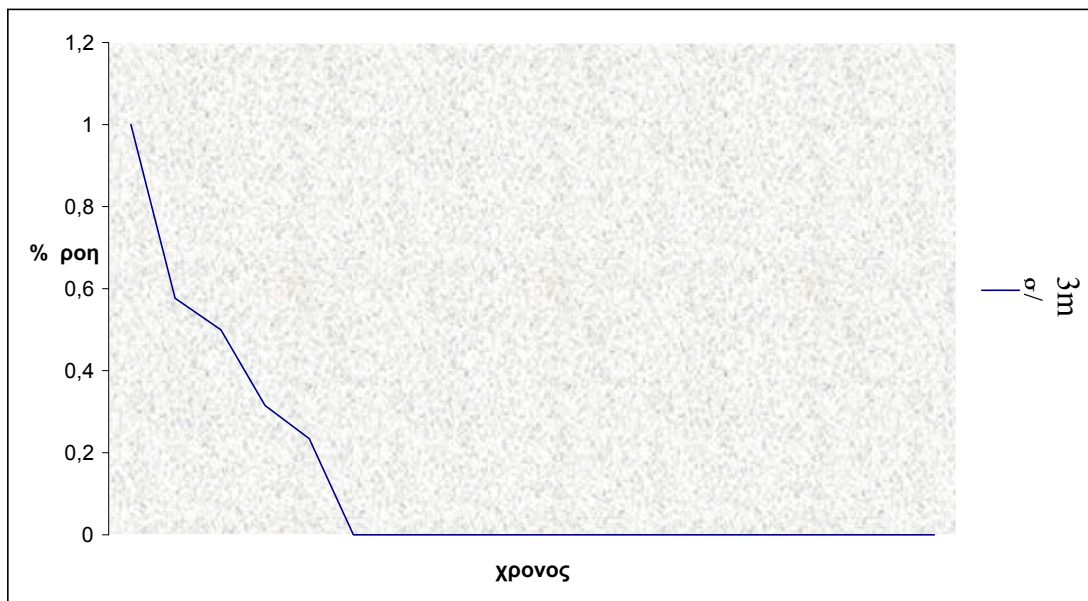
2) Επίδραση του πεπτιδίου στην ex vivo συσώρευση των αιμοπεταλίων: Η χορήγηση του πεπτιδίου για 60 λεπτά προκάλεσε αναστολή της ex vivo συσώρευσης των αιμοπεταλίων, με αγωνιστή ADP σε τελική συγκέντρωση 20 μM , κατά 9%, ενώ με αγωνιστή AA σε τελική συγκέντρωση 500 μM , κατά 9%

3) Επίδραση του πεπτιδίου στο βάρος του θρόμβου: Το βάρος του θρόμβου που αφαιρέθηκε από την καρωτίδα του πειραματόζωου ήταν 5 mg.

4) Επίδραση του πεπτιδίου στο μέγεθος της αιμορραγίας: Η ποσότητα του αίματος που συγκεντρώθηκε στην προζυγισμένη γάζα ήταν 300 mg.

5) Επίδραση του πεπτιδίου στο χρόνο αιμορραγίας: Ο χρόνος αιμορραγίας 60 λεπτά μετά την χορήγηση του πεπτιδίου ήταν 40 sec.

Συνολικά στην ομάδα του πεπτιδίου σε δόση 3 mg/kg, η μέση αρχική ροή στην καρωτίδα ήταν $19 \pm 1,41$ ml/min. Μετά την επαγωγή του θρόμβου η καρωτίδα του πειραματόζωου αποφράχθηκε πλήρως σε χρόνο 23.3 ± 2.0 min (Σχήμα 11).

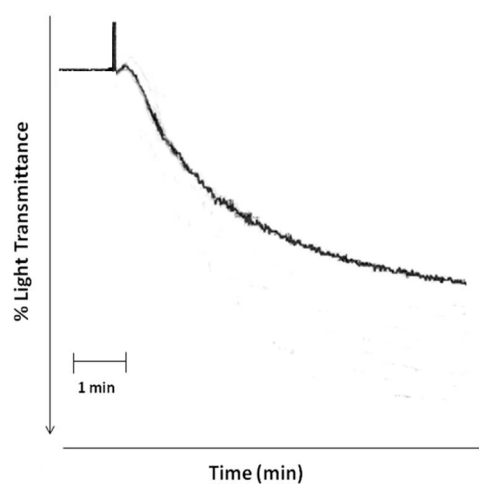


Σχήμα 11: % Μεταβολή της ροής στην καρωτίδα της ομάδας του πεπτιδίου με την πάροδο του χρόνου (ξεκινώντας άμεσα μετά την εφαρμογή του ηλεκτρικού ρεύματος έως 90 λεπτά μετά την εφαρμογή του, τέλος του πειράματος).

Το πεπτιδίο σε δόση 3 mg/kg προκάλεσε μέση αναστολή της συσσώρευσης με αγωνιστή ADP και AA κατά $8.5 \pm 2.1\%$ και $10.5 \pm 0.7\%$ αντίστοιχα (Πίνακας 23, σχήμα 12).

Πίνακας 23: Αναστολή της ex vivo συσσώρευσης των αιμοπεταλίων στην ομάδα του πεπτιδίου (3 mg/kg).

	%Αναστολή ADP	%Αναστολή AA
Πείραμα 1	11	12
Πείραμα 2	6	9
Πείραμα 3	9	9
Μέση τιμή ± σταθερά απόκλισης	8.5 ± 2.1	10.5 ± 0.7



Σχήμα 12: Αντιπροσωπευτική καταγραφή της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων της ομάδας του πεπτιδίου (3 mg/kg).

Το μέσο βάρος του θρόμβου που προέκυψε ήταν 5.4 ± 0.68 mg (Πίνακας 24).

Πίνακας 24: Βάρος του θρόμβου στην ομάδα του πεπτιδίου (3 mg/kg).

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

Η ποσότητα του αίματος που συγκεντρώθηκε στην προζυγισμένη γάζα ήταν $315.33 \pm 19.29 \text{ mg}$ (Πίνακας 25). Ο μέσος χρόνος αιμορραγίας της ομάδας του πεπτιδίου (3 mg/kg) ήταν $43.33 \pm 5.77 \text{ sec}$ (Πίνακας 25).

Πίνακας 25: Ποσότητα και χρόνος αιμορραγίας της ομάδας του πεπτιδίου.

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

7.2.6 Ομάδα πεπτιδίου CDC σε δόση 6 mg/kg. Συνολικά χρησιμοποιήθηκαν 3 πειραματόζωα

Πείραμα 1°

Χρησιμοποιήθηκε πειραματόζωο βάρους 3,0 kg.

- 1) Επίδραση του πεπτιδίου σε δόση 6 mg/kg στη ροή της καρωτίδας: Η αρχική ροή στην καρωτίδα του πειραματόζωου ήταν 15 ml/min. Μετά την επαγωγή της δημιουργίας του θρόμβου με την εφαρμογή ηλεκτρικού ρεύματος το πεπτίδιο διατήρησε την ροή στην καρωτίδα. Η τελική ροή (90 λεπτά μετά την δημιουργία του θρόμβου) στην καρωτίδα ήταν 5 ml/min (33.3% της αρχικής).
- 2) Επίδραση του πεπτιδίου στην *ex vivo* συσσώρευση των αιμοπεταλίων: Η χορήγηση του πεπτιδίου για 60 λεπτά προκάλεσε αναστολή της *ex vivo* συσσώρευσης των αιμοπεταλίων, με αγωνιστή ADP σε τελική συγκέντρωση 20 μM, κατά 31%, ενώ με αγωνιστή AA σε τελική συγκέντρωση 500 μM, κατά 30%
- 3) Επίδραση του πεπτιδίου στο βάρος του θρόμβου: Το βάρος του θρόμβου που αφαιρέθηκε από την καρωτίδα του πειραματόζωου ήταν 2.8 mg.
- 4) Επίδραση του πεπτιδίου στο μέγεθος της αιμορραγίας: Η ποσότητα του αίματος που συγκεντρώθηκε στην προζυγισμένη γάζα ήταν 237 mg.
- 5) Επίδραση του πεπτιδίου στο χρόνο αιμορραγίας: Ο χρόνος αιμορραγίας 60 λεπτά μετά την χορήγηση του πεπτιδίου ήταν 30 sec.

Πείραμα 2°

Χρησιμοποιήθηκε πειραματόζωο βάρους 3,2 kg.

- 1) Επίδραση του πεπτιδίου σε δόση 6 mg/kg στη ροή της καρωτίδας: Η αρχική ροή στην καρωτίδα του πειραματόζωου ήταν 16 ml/min. Μετά την επαγωγή της δημιουργίας του θρόμβου με την εφαρμογή ηλεκτρικού ρεύματος

το πεπτιδίο διατήρησε την ροή στην καρωτίδα. Η τελική ροή (90 λεπτά μετά την δημιουργία του θρόμβου) στην καρωτίδα ήταν 5 ml/min (31.2% της αρχικής).

2) Επίδραση του πεπτιδίου στην *ex vivo* συσσώρευση των αιμοπεταλίων: Η χορήγηση του πεπτιδίου για 60 λεπτά προκάλεσε αναστολή της *ex vivo* συσσώρευσης των αιμοπεταλίων, με αγωνιστή ADP σε τελική συγκέντρωση 20 μM , κατά 22%, ενώ με αγωνιστή AA σε τελική συγκέντρωση 500 μM , κατά 40%

3) Επίδραση του πεπτιδίου στο βάρος του θρόμβου: Το βάρος του θρόμβου που αφαιρέθηκε από την καρωτίδα του πειραματόζωου ήταν 3,1 mg.

4) Επίδραση του πεπτιδίου στο μέγεθος της αιμορραγίας: Η ποσότητα του αίματος που συγκεντρώθηκε στην προζυγισμένη γάζα ήταν 337 mg.

5) Επίδραση του πεπτιδίου στο χρόνο αιμορραγίας: Ο χρόνος αιμορραγίας 60 λεπτά μετά την χορήγηση του πεπτιδίου ήταν 40 sec.

Πείραμα 3°

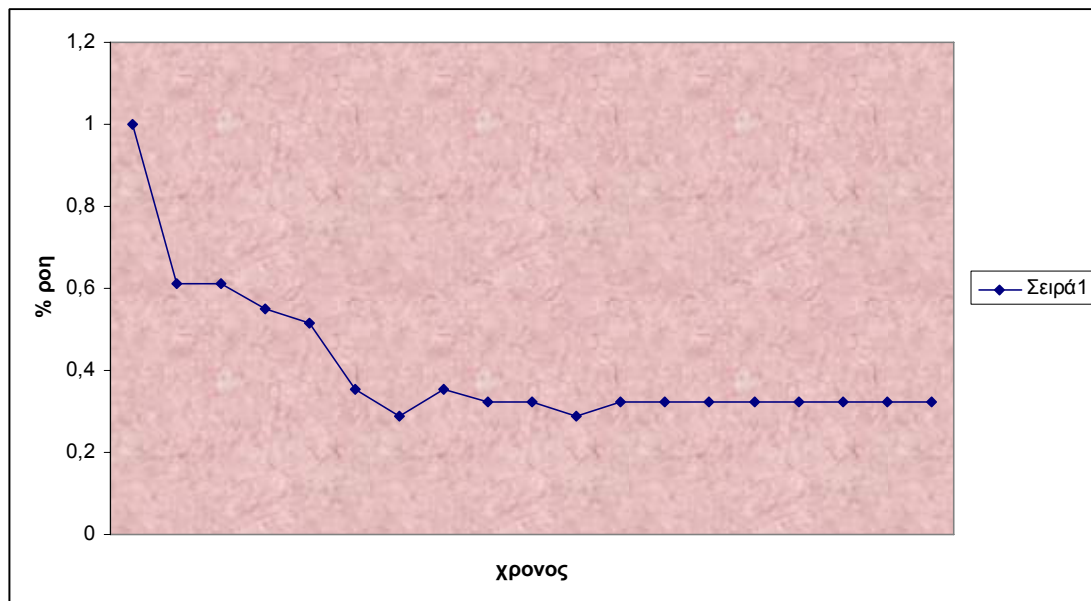
Χρησιμοποιήθηκε πειραματόζωο βάρους 3,2 kg.

1) Επίδραση του πεπτιδίου σε δόση 6 mg/kg στη ροή της καρωτίδας: Η αρχική ροή στην καρωτίδα του πειραματόζωου ήταν 16 ml/min. Μετά την επαγωγή της δημιουργίας του θρόμβου με την εφαρμογή ηλεκτρικού ρεύματος το πεπτιδίο διατήρησε την ροή στην καρωτίδα. Η τελική ροή (90 λεπτά μετά την δημιουργία του θρόμβου) στην καρωτίδα ήταν 5 ml/min (31.2% της αρχικής).

2) Επίδραση του πεπτιδίου στην *ex vivo* συσσώρευση των αιμοπεταλίων: Η χορήγηση του πεπτιδίου για 60 λεπτά προκάλεσε αναστολή της *ex vivo* συσσώρευσης των αιμοπεταλίων, με αγωνιστή ADP σε τελική συγκέντρωση 20 μM , κατά 22%, ενώ με αγωνιστή AA σε τελική συγκέντρωση 500 μM , κατά 32%

- 3) Επίδραση του πεπτιδίου στο βάρος του θρόμβου: Το βάρος του θρόμβου που αφαιρέθηκε από την καρωτίδα του πειραματόζωου ήταν 3 mg.
- 4) Επίδραση του πεπτιδίου στο μέγεθος της αιμορραγίας: Η ποσότητα του αίματος που συγκεντρώθηκε στην προζυγισμένη γάζα ήταν 330 mg.
- 5) Επίδραση του πεπτιδίου στο χρόνο αιμορραγίας: Ο χρόνος αιμορραγίας 60 λεπτά μετά την χορήγηση του πεπτιδίου ήταν 40 sec.

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

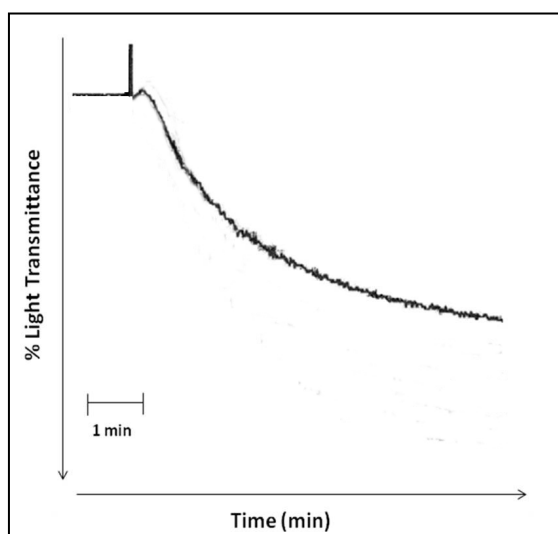


Σχήμα 13: % Μεταβολή της ροής στην καρωτίδα της ομάδας του πεπτιδίου με την πάροδο του χρόνου (ξεκινώντας άμεσα μετά την εφαρμογή του ηλεκτρικού ρεύματος έως 90 λεπτά μετά την εφαρμογή του, τέλος του πειράματος).

Το πεπτιδίο σε δόση 6 mg/kg προκάλεσε μέση αναστολή της συσσώρευσης με αγωνιστή ADP και AA κατά $24.3 \pm 5.85\%$ και 34 ± 5.29 (Πίνακας 26, σχήμα 14)

Πίνακας 26: Αναστολή της ex vivo συσσώρευσης των αιμοπεταλίων στην ομάδα του πεπτιδίου (6 mg/kg).

	%Αναστολή ADP	%Αναστολή AA
Πείραμα 1	31	30
Πείραμα 2	22	40
Πείραμα 3	20	32
Μέση τιμή ± σταθερά απόκλισης	24.3 ± 5.85	34 ± 5.29



Σχήμα 14: Αντιπροσωπευτική καταγραφή της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων της ομάδας του πεπτιδίου (6 mg/kg).

Το μέσο βάρος του θρόμβου που προέκυψε ήταν 2.95 ± 0.2 mg (Πίνακας 27).

Πίνακας 27: Βάρος του θρόμβου στην ομάδα του πεπτιδίου (6mg/kg).

	Βάρος θρόμβου (mg)
Πείραμα 1	2.8
Πείραμα 2	3.1
Πείραμα 3	3
Μέση τιμή \pm σταθερά απόκλισης	2.95 \pm 0.2

Η ποσότητα του αίματος που συγκεντρώθηκε στην προζυγισμένη γάζα ήταν 287 ± 70.7 mg (Πίνακας 29). Ο μέσος χρόνος αιμορραγίας της ομάδας του πεπτιδίου (6 mg/kg) ήταν $40,0 \pm 7,0$ sec (Πίνακας 28).

Πίνακας 28: Ποσότητα και χρόνος αιμορραγίας της ομάδας του πεπτιδίου.

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

7.2.7 Ομάδα πεπτιδίου CDC σε δόση 12 mg/kg

Πείραμα 1°

Χρησιμοποιήθηκε πειραματόζωο βάρους 3,5 kg.

1) Επίδραση του πεπτιδίου σε δόση 12 mg/kg στη ροή της καρωτίδας: Η αρχική ροή στην καρωτίδα του πειραματόζωου ήταν 21 ml/min. Μετά την επαγωγή της δημιουργίας του θρόμβου με την εφαρμογή ηλεκτρικού ρεύματος το πεπτίδιο διατήρησε την ροή στην καρωτίδα. Η τελική ροή (90 λεπτά μετά την δημιουργία του θρόμβου) στην καρωτίδα ήταν 10 ml/min (47.6% της αρχικής).

2) Επίδραση του πεπτιδίου στην *ex vivo* συσσώρευση των αιμοπεταλίων: Η χορήγηση του πεπτιδίου για 60 λεπτά προκάλεσε αναστολή της *ex vivo* συσσώρευσης των αιμοπεταλίων, με αγωνιστή ADP σε τελική συγκέντρωση 20 μΜ, κατά 42%, ενώ με αγωνιστή AA σε τελική συγκέντρωση 500 μΜ, κατά 85%

3) Επίδραση του πεπτιδίου στο βάρος του θρόμβου: Το βάρος του θρόμβου που αφαιρέθηκε από την καρωτίδα του πειραματόζωου ήταν 1.4 mg.

4) Επίδραση του πεπτιδίου στο μέγεθος της αιμορραγίας: Η ποσότητα του αίματος που συγκεντρώθηκε στην προζυγισμένη γάζα ήταν 252 mg.

5) Επίδραση του πεπτιδίου στο χρόνο αιμορραγίας: Ο χρόνος αιμορραγίας 60 λεπτά μετά την χορήγηση του πεπτιδίου ήταν 30 sec.

Πείραμα 2°

Χρησιμοποιήθηκε πειραματόζωο βάρους 3,1 kg.

1) Επίδραση του πεπτιδίου σε δόση 12 mg/kg στη ροή της καρωτίδας: Η αρχική ροή στην καρωτίδα του πειραματόζωου ήταν 20 ml/min. Μετά την επαγωγή της δημιουργίας του θρόμβου με την εφαρμογή ηλεκτρικού ρεύματος το πεπτίδιο διατήρησε την ροή στην καρωτίδα. Η τελική ροή (90 λεπτά μετά

την δημιουργία του θρόμβου) στην καρωτίδα ήταν 9 ml/min (45% της αρχικής).

2) Επίδραση του πεπτιδίου στην *ex vivo* συσώρευση των αιμοπεταλίων: Η χορήγηση του πεπτιδίου για 60 λεπτά προκάλεσε αναστολή της *ex vivo* συσώρευσης των αιμοπεταλίων, με αγωνιστή ADP σε τελική συγκέντρωση 20 μΜ, κατά 45%, ενώ με αγωνιστή AA σε τελική συγκέντρωση 500 μΜ, κατά 62%

3) Επίδραση του πεπτιδίου στο βάρος του θρόμβου: Το βάρος του θρόμβου που αφαιρέθηκε από την καρωτίδα του πειραματόζωου ήταν 2. mg.

4) Επίδραση του πεπτιδίου στο μέγεθος της αιμορραγίας: Η ποσότητα του αίματος που συγκεντρώθηκε στην προζυγισμένη γάζα ήταν 302 mg.

5) Επίδραση του πεπτιδίου στο χρόνο αιμορραγίας: Ο χρόνος αιμορραγίας 60 λεπτά μετά την χορήγηση του πεπτιδίου ήταν 40 sec.

Πείραμα 3°

Χρησιμοποιήθηκε πειραματόζωο βάρους 3,4 kg.

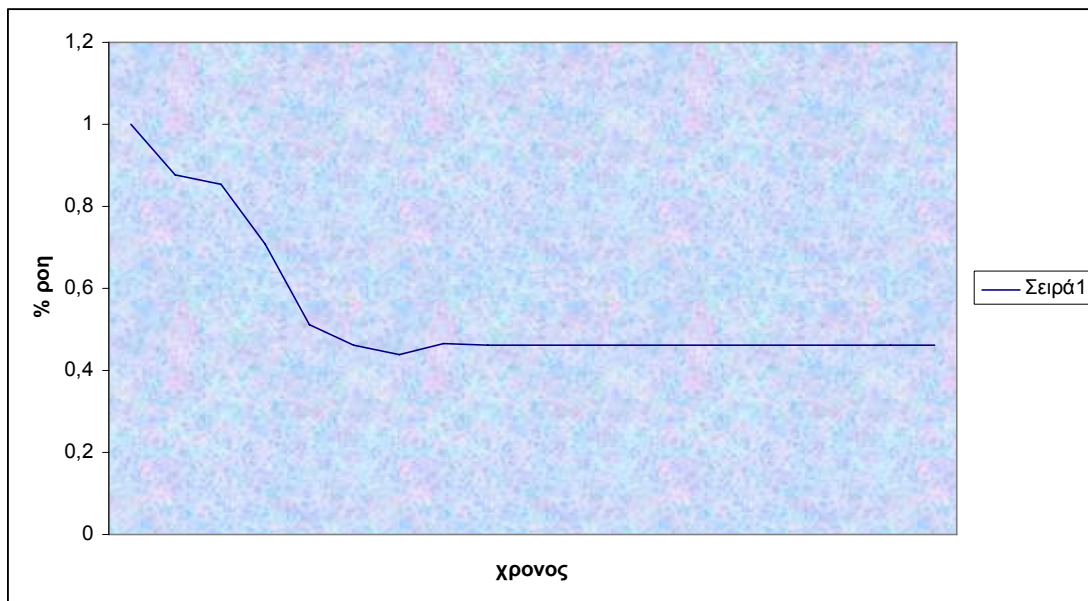
1) Επίδραση του πεπτιδίου σε δόση 12 mg/kg στη ροή της καρωτίδας: Η αρχική ροή στην καρωτίδα του πειραματόζωου ήταν 22 ml/min. Μετά την επαγωγή της δημιουργίας του θρόμβου με την εφαρμογή ηλεκτρικού ρεύματος το πεπτίδιο διατήρησε την ροή στην καρωτίδα. Η τελική ροή (90 λεπτά μετά την δημιουργία του θρόμβου) στην καρωτίδα ήταν 11 ml/min (50% της αρχικής).

2) Επίδραση του πεπτιδίου στην *ex vivo* συσώρευση των αιμοπεταλίων: Η χορήγηση του πεπτιδίου για 60 λεπτά προκάλεσε αναστολή της *ex vivo* συσώρευσης των αιμοπεταλίων, με αγωνιστή ADP σε τελική συγκέντρωση 20 μΜ, κατά 45%, με αγωνιστή AA σε τελική συγκέντρωση 500 μΜ, κατά 62%

3) Επίδραση του πεπτιδίου στο βάρος του θρόμβου: Το βάρος του θρόμβου που αφαιρέθηκε από την καρωτίδα του πειραματόζωου ήταν 3 mg.

- 4) Επίδραση του πεπτιδίου στο μέγεθος της αιμορραγίας: Η ποσότητα του αίματος που συγκεντρώθηκε στην προζυγισμένη γάζα ήταν 305 mg.
- 5) Επίδραση του πεπτιδίου στο χρόνο αιμορραγίας: Ο χρόνος αιμορραγίας 60 λεπτά μετά την χορήγηση του πεπτιδίου ήταν 40 sec.

Συνολικά στην ομάδα του πεπτιδίου σε δόση 12 mg/kg, η μέση αρχική ροή στην καρωτίδα ήταν 20.5 ± 0.6 ml/min. Μετά την επαγωγή του θρόμβου η ροή στην καρωτίδα του πειραματόζωου στο τέλος του πειράματος ήταν στο τέλος του πειράματος ήταν 46.3% της αρχικής. (Σχήμα 16)

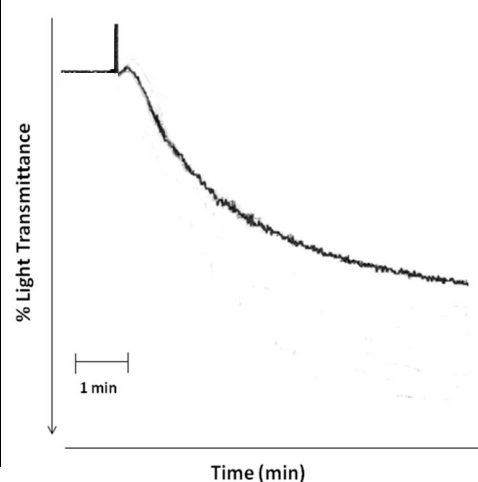


Σχήμα 16: % Μεταβολή της ροής στην καρωτίδα της ομάδας του πεπτιδίου με την πάροδο του χρόνου (ξεκινώντας άμεσα μετά την εφαρμογή του ηλεκτρικού ρεύματος έως 90 λεπτά μετά την εφαρμογή του, τέλος του πειράματος).

Το πεπτιδίο σε δόση 6 mg/kg προκάλεσε μέσες αναστολές της συσώρευσης με αγωνιστή ADP και AA κατά $42\pm 3\%$ $72.3\pm 12.5\%$ αντίστοιχα (Πίνακας 29, σχήμα 17).

Πίνακας 29: Αναστολή της ex vivo συσώρευσης των αιμοπεταλίων στην ομάδα του πεπτιδίου (12 mg/kg)

	%Αναστολή ADP	%Αναστολή AA
Πείραμα 1	42	85
Πείραμα 2	39	60
Πείραμα 3	45	72
Μέση τιμή ± σταθερά απόκλισης	42 ± 3	72.3 ± 12.5



Σχήμα 17: Αντιπροσωπευτική καταγραφή της συσώρευσης των αιμοπεταλίων της ομάδας του πεπτιδίου (12 mg/kg).

Το μέσο βάρος του θρόμβου που προέκυψε ήταν 2.13 ± 0.8 mg (Πίνακας 30).

Πίνακας 30: Βάρος του θρόμβου στην ομάδα του πεπτιδίου (12mg/kg).

	Βάρος θρόμβου (mg)
Πείραμα 1	1.4
Πείραμα 2	2.0
Πείραμα 3	3
Μέση τιμή \pm σταθερά απόκλισης	2.13 \pm 0.8

Η ποσότητα του αίματος που συγκεντρώθηκε στην προζυγισμένη γάζα ήταν 277 ± 35.3 mg (Πίνακας 32). Ο μέσος χρόνος αιμορραγίας της ομάδας του πεπτιδίου (12 mg/kg) ήταν $42,3 \pm 5.77$ sec (Πίνακας 31).

Πίνακας 31: Ποσότητα και χρόνος αιμορραγίας της ομάδας του πεπτιδίου.

	Ποσό αιμορραγίας (mg)	Χρόνος αιμορραγίας (sec)
Πείραμα 1	302	40
Πείραμα 2	252	50
Πείραμα 3	305	50
Μέση τιμή \pm σταθερά απόκλισης	277 ± 35.3	$42,3 \pm 5.77$

7.3 Επίδραση των ουσιών στη ροή της καρωτίδας

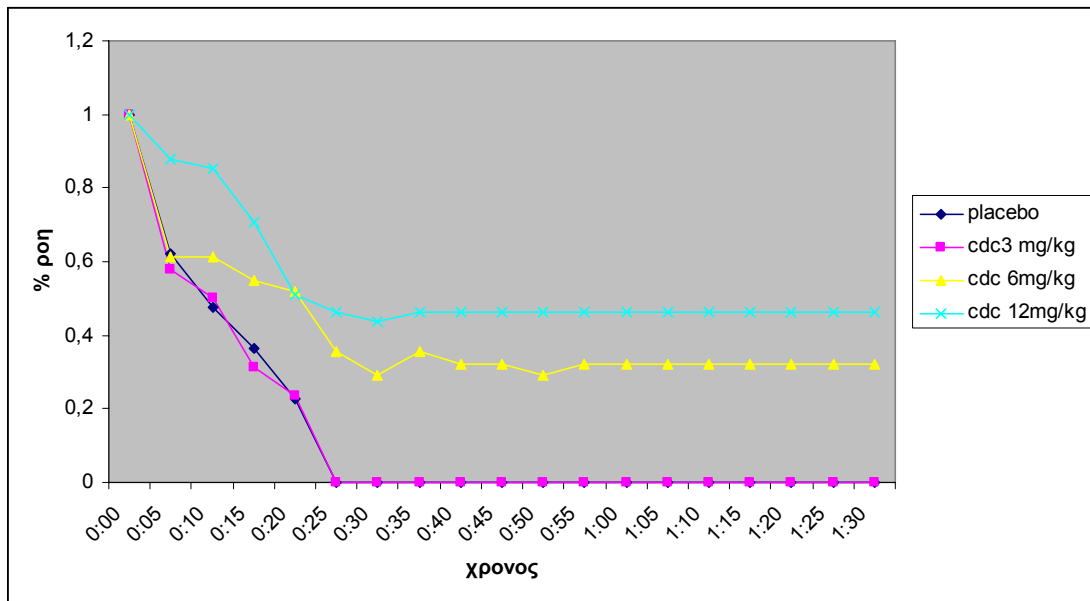
Η μέση τιμή της αρχικής ροής στην καρωτίδα των πειραματόζων της ομάδας ελέγχου (placebo) ήταν $23,6 \pm 2,9$ ml/min. Μετά την επαγωγή της δημιουργίας του θρόμβου με την εφαρμογή του ηλεκτρικού ρεύματος, σε όλα τα πειραματόζα της ομάδας ελέγχου (placebo, n=5), η ροή του αγγείου μηδενίστηκε (πλήρης απόφραξη του αυλού του αγγείου) σε χρόνο $23,3 \pm 3,2$ λεπτά. Σε δόση 3 mg/kg (n=3) το πεπτιδίο CDC δεν διατήρησε τη ροή του αγγείου όπως και η ομάδα ελέγχου). Αντίθετα σε δόση 6 mg/kg (n=3) το πεπτιδίο διατήρησε τη ροή στο 32% της αρχικής ροής στο τέλος του πειράματος (p=0,05, σε σχέση με την ομάδα ελέγχου), ενώ σε δόση 12 mg/kg (n=3), η ροή στην καρωτίδα διατηρήθηκε στο 46.7% 90 λεπτά μετά την εφαρμογή του ηλεκτρικού ρεύματος (p=0,001, σε σχέση με την ομάδα ελέγχου).

Στην ομάδα της ηπαρίνης (100 IU/kg/h, n=5), η καρωτίδα παρέμεινε βατή 90 λεπτά μετά την εφαρμογή του ηλεκτρικού ρεύματος (τέλος πειράματος). Η ροή της καρωτίδας στο τέλος του πειράματος στην ομάδα της ηπαρίνης ήταν $26,3\% \pm 12,7\%$ της αρχικής (p<0,001 σε σχέση με την ομάδα ελέγχου). Παρόμοια στην ομάδα της επιφιμπατίδης σε δόση 180 μg/kg bolus και στη συνέχεια συνεχής έγχυση με ρυθμό 2μg/kg/min (χαμηλή δόση, n=5), η ροή του αγγείου στο τέλος του πειράματος ήταν $36,9\% \pm 5,0\%$ της αρχικής (p<0,001 σε σχέση με την ομάδα ελέγχου). Η επιφιμπατίδη σε δόση 900 μg/kg bolus και στη συνέχεια με συνεχή έγχυση με ρυθμό 10 μg/kg/min (υψηλή δόση, n=5) διατήρησε τη ροή της καρωτίδας στο $35,3\% \pm 2,1\%$ της αρχικής στο τέλος του πειράματος (p<0,001 σε σχέση με την ομάδα ελέγχου, σχήμα 20). Οι ομάδες του πεπτιδίου σε δόση 12 mg/kg διατήρησαν τη ροή σε επίπεδα σημαντικά υψηλότερα σε σχέση με την επιφιμπατίδη σε δόση (p=0,005).

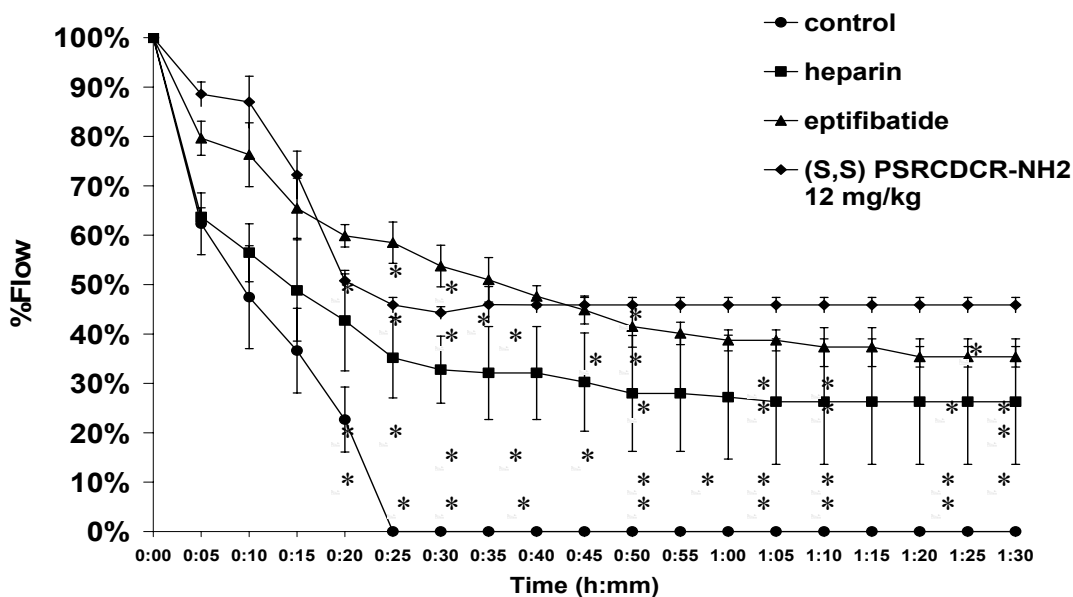
Χρησιμοποιώντας ANOVA βρέθηκε ότι υπήρχαν διαφορές στην διατήρηση της ροής στην καρωτίδα μεταξύ των 7 διαφορετικών ομάδων. Post hoc ανάλυση με t-test έδειξαν ότι διέφεραν στατιστικά σημαντικά η ομάδα ελέγχου με την ηπαρίνη την Επτιφιμπατίδη και το πεπτιδίιο.

Πίνακας 33: Ροή στην καρωτίδα του ζώου στο τέλος του πειράματος (90 λεπτά μετά την εφαρμογή του ηλεκτρικού ρεύματος, *στατιστική σημαντικότητα σε σχέση με την ομάδα ελέγχου).

Φαρμακευτική ουσία	% της αρχικής ροής	p
Placebo (n=5)	0	
Ηπαρίνη 100 IU/kg/h, (n=5)	26,3±12,7*	<0,001
Επτιφιμπατίδη 180 µg/kg bolus + 2 µg/kg/min (n=5)	36,9±5,0*	<0,001
Επτιφιμπατίδη 900 µg/kg bolus + 10 µg/kg/min (n=5)	35,3±2,1*	<0,001
(S,S) PSRCDCR-NH2 3mg/kg (n=3)	0	
(S,S) PSRCDCR-NH2 6mg/kg (n=3)	32±0.01*	<0,05
(S,S) PSRCDCR-NH2 12mg/kg (n=3)	46.3±0.01*	<0,001

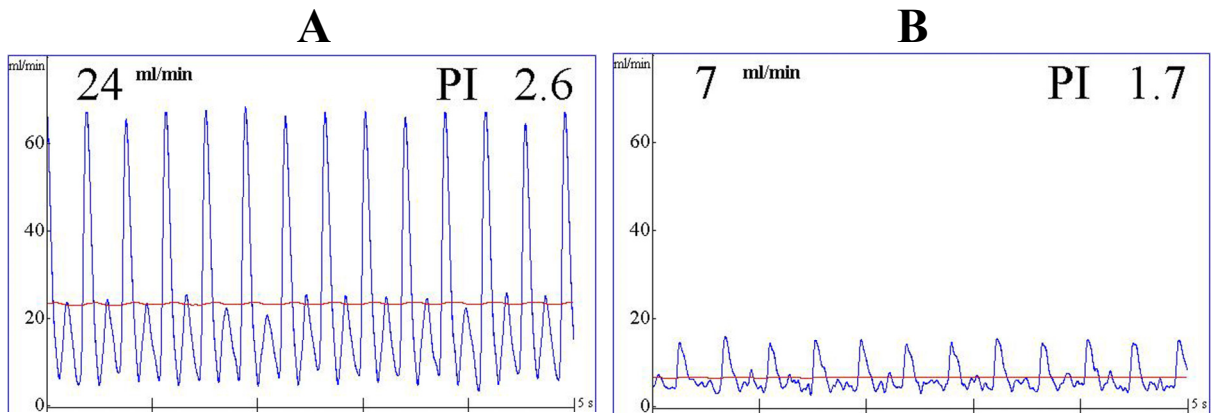


Σχήμα 19: Επίδραση των δόσεων του πεπτιδίου (S,S) PSRCDCR-NH₂ στην % μεταβολή της ροής στην καρωτίδα του ζώου σε σχέση με το χρόνο (άμεσα μετά την εφαρμογή ηλεκτρικού ρεύματος και έως 90 λεπτά μετά την εφαρμογή του, placebo=ομάδα ελέγχου, *στατιστική σημαντικότητα σε σχέση με την ομάδα ελέγχου).



Σχήμα 20: Επίδραση της ηπαρίνης, των ομάδας της επτιφιμπατίδης και του (S,S) PSRCDR-NH2 στα 12 mg/kg στην % μεταβολή της ροής στην καρωτίδα του ζώου σε σχέση με το χρόνο (άμεσα μετά την εφαρμογή ηλεκτρικού ρεύματος και έως 90 λεπτά μετά την εφαρμογή του, τέλος πειράματος, *στατιστική σημαντικότητα σε σχέση με την ομάδα ελέγχου).

Το πεπτιδίιο στις δυο μεγαλύτερες δόσεις που δοκιμάστηκαν (από 6 έως 12 mg/kg κατάφερε να διατηρήσει τη βατότητα την καρωτίδα του κουνελιού ως στο τέλος του πειράματος (90 λεπτά μετά την επαγωγή του θρόμβου με εφαρμογή ηλεκτρικού ρεύματος) ενώ η ροή στην καρωτίδα στην ομάδα του CDC στα 3 mg/kg δεν διατήρησε βατό το αγγείο. Η επτιφιμπατίδη και στις δύο δόσεις που δοκιμάστηκε διατήρησε την ροή Στο σχήμα 21 απεικονίζονται αντιπροσωπευτικές καταγραφές της ροής.



Σχήμα 21: Αντιπροσωπευτικές καταγραφές της ροής από πείραμα της ομάδας ελέγχου.

A: Καταγραφή της baseline ροής

B: Καταγραφή της ροής από το ίδιο πειραματόζωο 10 λεπτά μετά την εφαρμογή του ηλεκτρικού ρεύματος.

7.4. Επίδραση στην *ex vivo* συσσώρευση των αιμοπεταλίων

Για την μελέτη της *ex vivo* συσσώρευσης των αιμοπεταλίων χρησιμοποιήθηκαν δείγματα αίματος από τα πειραματόζωα τα οποία είχαν ληφθεί πριν από τη χορήγηση και 60 λεπτά μετά από την έναρξη της χορήγησης της κάθε ουσίας. Από τα δείγματα αίματος παρασκευαζόταν το PRP και η *ex vivo* συσσώρευση επαγόταν με αγωνιστή το ADP σε τελική συγκέντρωση 20 μM . και το AA σε τελική συγκέντρωση 500 μM . Από την αρχική και τελική συσσώρευση των αιμοπεταλίων υπολογιζόταν το επί τοις εκατό ποσοστό της αναστολής της συσσώρευσης. Στην ομάδα ελέγχου (placebo, n=5), παρατηρήθηκε αναστολή της συσσώρευσης μετά από 60 λεπτά συνεχούς έγχυσης κατά $9,2 \pm 3,1\%$. Το πεπτιδίο σε δόση 3 mg/kg (n=3) μετά από 60 λεπτά χορήγησης ανέστειλε την *ex vivo* συσσώρευση των αιμοπεταλίων κατά $8,5 \pm 2,1\%$ ($p=0,45$), σε σχέση με την ομάδα ελέγχου). Η αντίστοιχη αναστολή στην ομάδα που έλαβε 6mg/kg (n=3) ήταν $24,3 \pm 5,85\%$ ($p=0,01$, σε σύγκριση με το placebo). Σε δόση 12 mg/kg (n=3) το πεπτιδίο προκάλεσε αναστολή της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων κατά $42,0 \pm 3\%$ ($p=0,001$, σε σχέση με την ομάδα ελέγχου) (Πίνακα 34).

Αντίστοιχα στην ομάδα της ηπαρίνης (n=5) η αναστολή της συσσώρευσης, στο ίδιο χρονικό σημείο, ήταν $8,3 \pm 3,5\%$, ($p=0,998$, σε σχέση με την ομάδα ελέγχου). Στην ομάδα που έλαβε την χαμηλή δόση της επιπιμιπατίδης, (180 $\mu\text{g}/\text{kg}$ bolus και στη συνέχεια συνεχής έγχυση με ρυθμό 2 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$, n=5) η αναστολή της συσσώρευσης μετά από 60 λεπτά χορήγησης ήταν $28 \pm 6,6\%$ ($p=0,001$, σε σχέση με την ομάδα ελέγχου). Στα ζώα που έλαβαν την υψηλή δόση της επιπιμιπατίδης, (900 $\mu\text{g}/\text{kg}$ bolus και στη συνέχεια με συνεχή έγχυση με ρυθμό 10 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$, n=5) η αναστολή της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων στα 60 λεπτά χορήγησης ήταν $38,3 \pm 11,6\%$ ($p=0,001$, σε σχέση με την ομάδα ελέγχου) (Πίνακας 34).

Πίνακας 34: Επί τοις εκατό (%), αναστολές της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων (ex vivo), στις υποομάδες των ουσιών που μελετήθηκαν με αγωνιστή το ADP 20 μΜ. ΚΑΙ AA 500 μΜ

*στατιστική σημαντικότητα σε σχέση με την ομάδα ελέγχου.

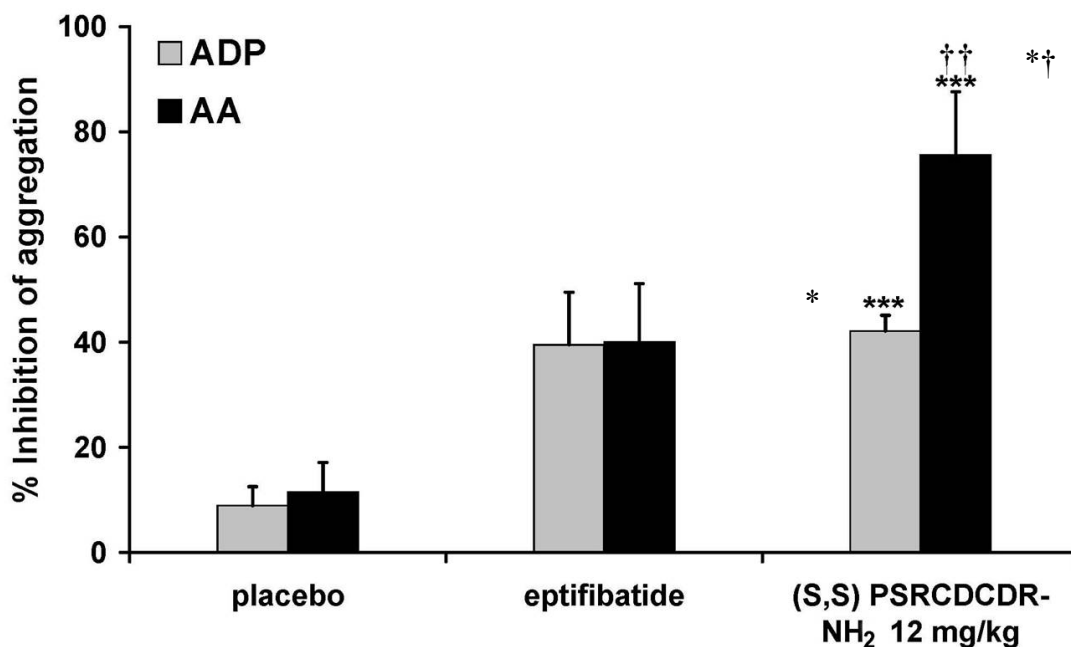
Φαρμακευτική ουσία	% αναστολή (ex vivo) ADP 20 μΜ	p
Placebo (n=5)	9,2±3,1	
Ηπαρίνη 100 IU/kg/h, (n=5)	8,3±3,5	0,998
Επτιφιμπατίδη 180 μg/kg bolus + 2 μg/kg/min (n=5)	28,0±6,6*	0,001
Επτιφιμπατίδη 900 μg/kg bolus + 10 μg/kg/min (n=5)	38,3±11,0*	0,001
(S,S) PSRCDCR-NH2 3mg/kg (n=3)	8.5±2.1	0,45
(S,S) PSRCDCR-NH2 6mg/kg (n=3)	24.3±5.85*	0,01
(S,S) PSRCDCR-NH2 12mg/kg (n=3)	42±3*	0,001

Φαρμακευτική ουσία	% αναστολή (ex vivo) AA 500 μM	p
Placebo (n=5)	9,2±3,1	
Ηπαρίνη 100 IU/kg/h, (n=5)	61.6±4.0*	0,05
Επτιφιμπατίδη 180 μg/kg bolus + 2 μg/kg/min (n=5)	50.2±11.5*	0,001
Επτιφιμπατίδη 900 μg/kg bolus + 10 μg/kg/min (n=5)	49.6±9.23*	0,001
(S,S) PSRCDCR-NH2 3mg/kg (n=3)	10.5±0.7	0,16
(S,S) PSRCDCR-NH2 6mg/kg (n=3)	34±5.29*	0,01
(S,S) PSRCDCR-NH2 12mg/kg (n=3)	72.3±12.5*	0,001

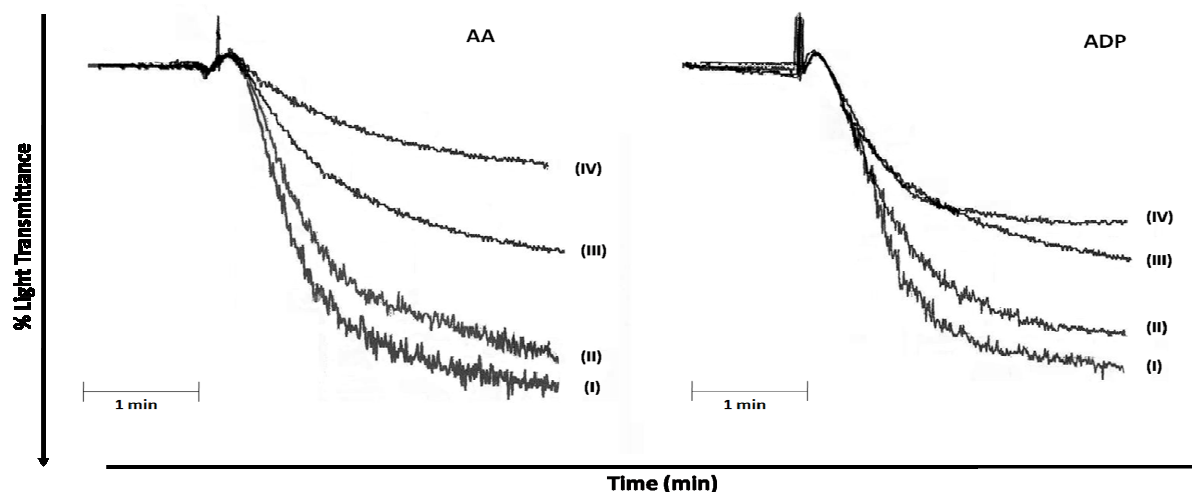
Το πεπτίδιο στις δόσεις των 6 και 12 mg/kg προκάλεσε στατιστικά σημαντική αναστολή της ex vivo συσσώρευσης των αιμοπεταλίων σε ADP έναντι του placebo και της ομάδας της ηπαρίνης (p=0,001 για την ομάδα των 12 mg/kg και p=0,01 για την ομάδα των 6 mg/kg, σχήμα 25), ενώ οι ομάδες των πειραματόζων που έλαβαν το πεπτίδιο σε δόσεις 3 mg/kg δεν παρουσίασαν στατιστικά σημαντική αναστολή σε σχέση με την ομάδα ελέγχου ή με την ομάδα της ηπαρίνης. Επιπλέον η ομάδα των πειραματόζων που έλαβαν το πεπτίδιο στη δόση των 12 mg/kg διέφερε στατιστικά σημαντικά, όσον αφορά την αναστολή της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων σε AA σε σχέση με την ομάδα που έλαβε το πεπτίδιο στη δόση των 3 mg/kg.

Σχηματικά, οι παραπάνω ex vivo αναστολές της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων που παρουσίασαν τα πειραματόζωα που έλαβαν το πεπτίδιο (S,S) PSRCDCR-NH2 σε δόσεις από 3 έως 12 mg/kg απεικονίζονται στο

σχήμα 22. Στο σχήμα 23 απεικονίζονται αντιπροσωπευτικές καμπύλες συσσώρευσης που έδωσαν οι ίδιες ομάδες πειραματόζων.



Σχήμα 22: Επίδραση στην *ex vivo* αναστολή της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων, που επάγεται με αγωνιστή ADP και AA, στις ομάδες των πειραματόζων που έλαβαν το πεπτίδιο, 60 λεπτά μετά την έναρξη χορήγησής του. (placebo=ομάδα ελέγχου, *στατιστικά σημαντικό σε σχέση με την ομάδα ελέγχου, † στατιστικά σημαντικό σε σχέση με την ομάδα του 3 mg/kg).



Σχήμα 23: Αντιπροσωπευτικές καμπύλες της *ex vivo* συσσώρευσης των αιμοπεταλίων στις διάφορες δόσεις του πεπτιδίου που δοκιμάστηκαν με αγωνιστή ADP και σε AA { I= placebo II= (S,S) PSRCD CR-NH₂ 3mg/kg III=(S,S) PSRCD CR-NH₂ 6 mg/kg IV=(S,S) PSRCD CR-NH₂ 12mg/kg

Ανακεφαλαιώνοντας τα παραπάνω ευρήματα διαπιστώνουμε ότι το πεπτίδιο(S,S) PSRCD CR-NH₂ στις δόσεις των 6 mg/kg, προκάλεσε στατιστικά σημαντική αναστολή της *ex vivo* συσσώρευσης των αιμοπεταλίων, παρόμοια με εκείνη που εμφάνισαν οι ομάδες των ζώων που έλαβαν επιφιμπατίδη και στις δύο δόσεις ενώ στις δόσεις των 12 mg/kg, προκάλεσε στατιστικά σημαντική αναστολή της *ex vivo* συσσώρευσης των αιμοπεταλίων, μεγαλύτερη από εκείνη που εμφάνισαν οι ομάδες των ζώων που έλαβαν επιφιμπατίδη Αντίθετα η ηπαρίνη δεν επηρέασε καθόλου την συσσωρευτική ικανότητα των αιμοπεταλίων *ex vivo* σε ADP

7.5. Βάρος του σχηματισθέντος θρόμβου

Στην ομάδα ελέγχου (n=5), το βάρος του θρόμβου που αφαιρέθηκε από την καρωτίδα ήταν $5,72 \pm 0,86$ mg. Στη δόση των 3 mg/kg το(S,S) PSRCD CR-NH2 (n=3) ο θρόμβος που αφαιρέθηκε ήταν $5,4 \pm 0,8$ mg (p=0,442 σε σχέση με την ομάδα ελέγχου). Το βάρος του θρόμβου στη δόση 6mg/kg (n=3) του πεπτιδίου ήταν $2,95 \pm 0,2$ mg (p=0,261 έναντι του placebo). Το S,S) PSRCD CR-NH2 στις δόσεις των 12 mg/kg (n=3) μείωσε το βάρος του θρόμβου στα $2,13 \pm 0,08$ mg (p=0,033 έναντι του control) (πίνακας 44). Παράλληλα το βάρος του σχηματισθέντος θρόμβου στις υπόλοιπες υποομάδες ήταν στην ομάδα της ηπαρίνης (n=5) $3,92 \pm 0,74$ mg (p=0,015 σε σχέση με την ομάδα ελέγχου), της επιφιμπατίδης σε χαμηλή δόση (180 μg/kg bolus + 2 μg/kg/min, n=5) $1,72 \pm 0,58$ mg (p=0,003 σε σχέση με την ομάδα ελέγχου) και στην ομάδα της επιφιμπατίδης σε υψηλή δόση (900 μg/kg bolus + 10 μg/kg/min, n=5) $2,1 \pm 1,1$ mg (p=0,031 σε σχέση με την ομάδα ελέγχου).

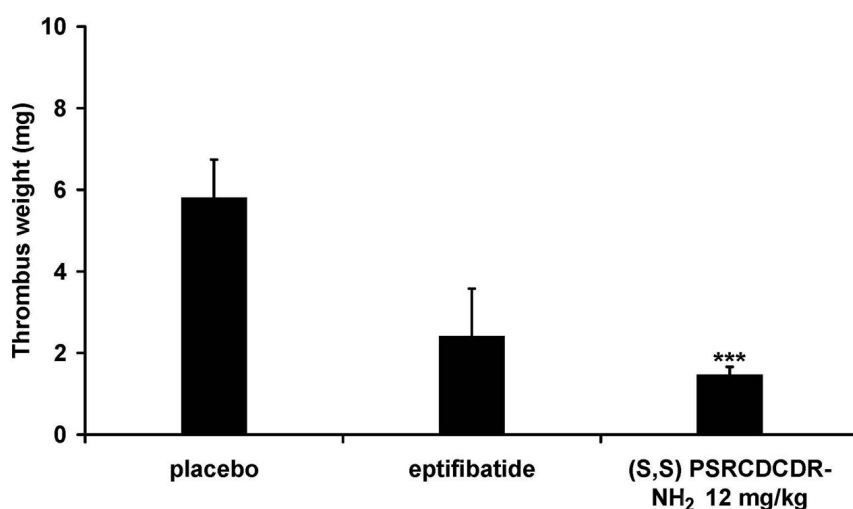
Στον παρακάτω πίνακα (πίνακας 35), συνοψίζονται τα αποτελέσματα.

Πίνακας 35: Επίδραση των ουσιών που μελετήθηκαν στο βάρος του σχηματισθέντος θρόμβου. (*στατιστική σημαντικότητα σε σχέση με την ομάδα ελέγχου).

Φαρμακευτική ουσία	Βάρος θρόμβου (mg)	p
Placebo	5,72±0,86	
Ηπαρίνη 100 IU/kg/h,	3,92±0,74*	0,015
Επτιφιμπατίδη 180 µg/kg bolus + 2 µg/kg/min	1,72±0,58*	0,003
Επτιφιμπατίδη 900 µg/kg bolus + 10 µg/kg/min	2,1±1,1*	0,031
S,S) PSRCDCR-NH2 3 mg/kg	5.4±0.08	0,261
S,S) PSRCDCR-NH2 6 mg/kg	2.95±0.2*	0,05
S,S) PSRCDCR-NH2 12 mg/kg	2.13±0.08*	0.001

Στις ομάδες της επτιφιμπατίδης καταγράφηκε σημαντική μείωση του βάρους του θρόμβου σε σχέση με την ομάδα ελέγχου. Στην ομάδα της χαμηλής δόσης το βάρος του θρόμβου ήταν 1,72±0,58 mg, που αντιστοιχεί σε μείωση 70% σε σχέση με την ομάδα ελέγχου (p=0,003). Αντίστοιχα το βάρος του θρόμβου στην ομάδα που έλαβε την υψηλή δόση της επτιφιμπατίδης ήταν 2,1±1,1 mg, που αντιστοιχεί σε μείωση 64% σε σχέση με την ομάδα ελέγχου (p=0,031). Οι μειώσεις αυτές δεν διέφεραν στατιστικά σημαντικά σε σχέση με τις δόσεις 6 mg/kg του πεπτιδίου. Η ηπαρίνη προκάλεσε στατιστικά σημαντική μείωση του

βάρους του θρόμβου: $3,92 \pm 0,74$ mg, που αντιστοιχεί σε μείωση 32% σε σχέση με την ομάδα ελέγχου ($p=0,015$, σχήμα 28). Το (S,S) PSRCDCR-NH₂ όμως, σε δόση 12 mg/kg προκάλεσε στατιστικά σημαντικότερη μείωση του βάρους του θρόμβου σε σχέση με την ομάδα της ηπαρίνης ($p=0,031$, σχήμα 28).



Σχήμα 28: Γραφική παράσταση του βάρους του θρόμβου στις διάφορες υποομάδες φαρμάκων που μελετήθηκαν (placebo=ομάδα ελέγχου, ept=επτιφιμπατίδη, *στατιστικά σημαντικό σε σχέση με την ομάδα ελέγχου, † στατιστικά σημαντικό σε σχέση με την επτιφιμπατίδη).

Το πεπτιδίο (S,S) PSRCDCR-NH₂ στις δόσεις των 6 και 12 mg/kg κατάφερε να μειώσει σημαντικά το βάρος του θρόμβου σε σχέση με την ομάδα ελέγχου. Επιπλέον η μείωση του βάρους του θρόμβου που προκλήθηκε από την χορήγηση του πεπτιδίου σε δόση 12 mg/kg είχε τάση χωρίς να είναι στατιστικά σημαντική να μειώνει πιο πολύ το βάρος του θρόμβου σε σχέση και με εκείνη της επτιφιμπατίδης. Δεν παρουσιάστηκαν διαφορές αναφορικά με τη δόση του πεπτιδίου (6 mg/kg) σε σχέση με τις ομάδες των πειραματόζωων που έλαβαν επτιφιμπατίδη σε οποιαδήποτε δόση.

7.6 Αξιολόγηση της ασφάλειας

Ποσότητα αιμορραγίας

Το ποσό της αιμορραγίας υπολογίστηκε από το βάρος του αίματος που συσσωρεύτηκε σε προζυγισμένη γάζα από τομή που είχε πραγματοποιηθεί στο πρόσθιο κοιλιακό τοίχωμα του πειραματόζωου, 60 λεπτά μετά την έναρξη χορήγησης της κάθε ουσίας. Στην ομάδα ελέγχου (n=5), το ποσό του αίματος που συσσωρεύτηκε στην γάζα ήταν $256,4 \pm 88,4$ mg. Στη δόση των 3 mg/kg το πεπτιδίο (S,S) PSRCDCR-NH2 (n=3) το ποσό του αίματος ήταν 315.33 ± 19.29 mg (p=0,436) σε σχέση με την ομάδα ελέγχου).

Αντίστοιχα το ίδιο ποσό στη δόση 6 mg/kg (n=3) του πεπτιδίου ήταν $301.33 \pm 55,82$ mg (p=0,417 έναντι του placebo). Το πεπτιδίο (S,S) PSRCDCR-NH2 στη δόσεις των 12 (n=3) προκάλεσε απώλεια αίματος από την τομή της τάξης των $277 \pm 35,3$ mg (p=0,345) έναντι του control

Παράλληλα το ποσό του αίματος που συσσωρεύτηκε στην γάζα στις υπόλοιπες υποομάδες ήταν: στην ομάδα της ηπαρίνης (n=5) $237,8 \pm 102,7$ mg (p=0,697 σε σχέση με την ομάδα ελέγχου), της επτιφιμπατίδης σε χαμηλή δόση (180μg/ kg bolus + 2 μg/kg/min, n=5) $277,4 \pm 112,4$ mg (p=0,661 σε σχέση με την ομάδα ελέγχου) και στην ομάδα της επτιφιμπατίδης σε υψηλή δόση (900 μg/kg bolus + 10 μg/kg/min, n=5) $253,0 \pm 24,0$ mg (p=0,950 σε σχέση με την ομάδα ελέγχου).

Στον παρακάτω πίνακα (πίνακας 36), συνοψίζονται τα αποτελέσματα.

Φαρμακευτική ουσία	Βάρος γάζας (mg)	p
Placebo	256.4±88,4	
Ηπαρίνη 100 IU/kg/h,	237.8±102,7	0,697
Επτιφιμπατίδη 180 µg/kg bolus + 2 µg/kg/min	277.4±112.4	0,661
Επτιφιμπατίδη 900 µg/kg bolus + 10 µg/kg/min	253±24	0,950
S,S) PSRCDCR-NH2 3 mg/kg	315.33±19.29	0,436
S,S) PSRCDCR-NH2 6 mg/kg	301.33±55.82	0,417
S,S) PSRCDCR-NH2 12 mg/kg	277±35.3	0.345

Όσον αφορά την ποσότητα του αίματος που συγκεντρώθηκε στην προζυγισμένη γάζα δεν εμφανίστηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές σε σχέση με την ομάδα ελέγχου στις ομάδες των ζώων που έλαβαν διάφορες δόσεις του πεπτιδίου S,S) PSRCDCR-NH2. Παρόμοια η ηπαρίνη και η επτιφιμπατίδη (και στις δύο δόσεις της) δεν προκάλεσαν στατιστικά σημαντική αύξηση της αιμορραγίας σε σχέση με την ομάδα ελέγχου αλλά ούτε και με τις ομάδες των πειραματόζων στα οποία χορηγήθηκε το πεπτίδιο (σε οποιαδήποτε δόση).

Χρόνος αιμορραγίας

Ο χρόνος αιμορραγίας υπολογίστηκε ως εξής: Πραγματοποιείται τομή μήκους 10mm και βάθους 1mm στην εσωτερική επιφάνεια του αυτιού. Στα χείλη της τομής τοποθετείται διηθητικό χαρτί. Καταγράφεται ο χρόνος που χρειάζεται ώστε να μην προσροφάται πλέον αίμα στο διηθητικό χαρτί, ο οποίος αντιστοιχεί στον χρόνο αιμορραγίας (bleeding time). Στην ομάδα ελέγχου (n=5) ο χρόνος αιμορραγίας ήταν $30,0 \pm 0,0$ sec. Στην ομάδα του CDC 3 mg/kg (n=3) ο χρόνος αιμορραγίας, μετά από 60 λεπτά χορήγησης ήταν $43,33 \pm 5,77$ sec (p=0,322 έναντι του placebo). Στις ομάδες των 6 mg/kg (n=3), 12 mg/kg (n=3) οι αντίστοιχες τιμές ήταν $43,3 \pm 5,77$ sec (p=0,177 έναντι του placebo), $42,3 \pm 5,77$ sec (p=0,766 σε σχέση με την ομάδα ελέγχου) Στην ομάδα της ηπαρίνης (n=5) ο χρόνος αιμορραγίας ήταν $36,0 \pm 13,4$ sec (p=0,731, έναντι του placebo). Στην ομάδα της επιφιμπατίδης σε χαμηλή δόση (180 μg/kg bolus + 2 μg/kg/min, n=5) η αντίστοιχη τιμή ήταν $40,0 \pm 14,1$ sec (p=0,434 έναντι του placebo). Στην ομάδα της επιφιμπατίδης σε υψηλή δόση (900 μg/kg bolus + 10 μg/kg/min, n=5) ο χρόνος αιμορραγίας ήταν $40,1 \pm 17,3$ sec (p=0,351 έναντι του control), (πίνακας 37)

Φαρμακευτική ουσία	Χρόνος αιμορραγίας	p
Placebo	30±0	
Ηπαρίνη 100 IU/kg/h,	36.2±13.4	0,731
Επτιφιμπατίδη 180 µg/kg bolus + 2 µg/kg/min	40 ±14.1	0,434
Επτιφιμπατίδη 900 µg/kg bolus + 10 µg/kg/min	40.1±17,3	0,351
S,S) PSRCDCR-NH2 3 mg/kg	43,3±5,77	0,322
S,S) PSRCDCR-NH2 6 mg/kg	43,3±5,77	0,177
S,S) PSRCDCR-NH2 12 mg/kg	42,3±5,7	0.766

Συμπερασματικά το πεπτίδιο (S,S) PSRCDCR-NH₂ διατήρησε την βατότητα στην καρωτίδα των πειραματόζων στα οποία χορηγήθηκε σε οποιαδήποτε δόση. Η δράση αυτή του πεπτιδίου ασκήθηκε μέσω της *ex vivo* αναστολής της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων, η οποία για τις δόσεις 6 και 12 mg/kg ήταν στατιστικά σημαντική σε σχέση με την ομάδα ελέγχου. Η αναστολή που προκλήθηκε από αυτές τη δόση των 6 mg/kg του πεπτιδίου δεν διέφερε σε σχέση με την αναστολή που προκάλεσε η επιπιμιπατίδη ενώ η δόση των 12mg/kg είχε πιο ισχυρή δράση στη διατήρηση της ροής και στην αναστολή της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων. Επιπλέον, το πεπτίδιο σε δόσεις 6 και 12 mg/kg, μείωσε στατιστικά σημαντικά το βάρος του θρόμβου σε σχέση με την ομάδα ελέγχου. Παράλληλα το πεπτίδιο (S,S) PSRCDCR-NH₂, σε όλες τις δόσεις δεν αύξησε την αιμορραγία.

8 Συζήτηση

Αν και έχουν γίνει σημαντικά βήματα στη μελέτη των αντιαιμοπεταλιακών παραγόντων για τη θεραπεία και πρόληψη των καρδιαγγειακών νοσημάτων τα ήδη χρησιμοποιούμενα φάρμακα έχουν πολλούς περιορισμούς καθώς αρκετοί ασθενείς όπως προκύπτει από τις κλινικές μελέτες δεν προστατεύονται, ενώ τα φάρμακα αυτά στις χορηγούμενες δόσεις έχουν αιμορραγικές επιπλοκές. Οι τρέχουσες προσπάθειες εστιάζουν όχι μόνο στη βελτίωση της αποτελεσματικότητας και της ασφάλειας των εν χρήσει αντιαιμοπεταλιακών αλλά και στην ανάπτυξη καινούριων παραγόντων που θα μπορούσαν να αποτελέσουν εναλλακτικές λύσεις ή και συμπλήρωμα των υπάρχοντων φαρμάκων.

Έχει αποδειχθεί ότι η ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων και κατά συνέπεια η συσσώρευσή τους παίζουν ένα πολύ σημαντικό ρόλο στην παθογένεια τόσο των οξέων στεφανιαίων συνδρόμων, όσο και των αγγειακών εγκεφαλικών επεισοδίων και του συνόλου των περιφερικών αγγειοπαθειών. Ως εκ τούτου η συγκόλληση και η συσσώρευση των αιμοπεταλίων αποτελούν τους στόχους δράσης των σύγχρονων αντιθρομβωτικών φαρμάκων.

Στο παρελθόν έχει δοκιμαστεί μεγάλο εύρος αντιθρομβωτικών ουσιών με άλλοτε άλλα αποτελέσματα. Οι αναστολείς των γλυκοπρωτεϊνικών υποδοχέων IIβ/IIIα της επιφάνειας των αιμοπεταλίων αποτελούν μία ομάδα ισχυρών αντιθρομβωτικών ουσιών που αναστέλλουν τον τελικό κοινό δρόμο ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων μέσω της παρεμπόδισης του σχηματισμού γεφυρών ινωδογόνου-αιμοπεταλίων.

Η προσπάθεια των ερευνητών να δημιουργήσουν εξειδικευμένα μόρια με μεγάλη χημική συγγένεια προς τον IIb/IIIα υποδοχέα, έχει ως αποτέλεσμα να συνεχίζουν να συντίθεται νέοι φαρμακολογικοί παράγοντες

των οποίων το σημείο στόχος παραμένει η RGD αλληλουχία μέσω της οποίας οι IIb/IIIa υποδοχείς αναγνωρίζουν και συνδέονται με το ινωδογόνο. Νέα πρόκληση αποτελεί η ανεύρεση μικρού μεγέθους μορίων τα οποία θα μπορούν να παρεμβαίνουν στον μηχανισμό αλληλεπίδρασης του IIb/IIIa υποδοχέα με τα προσδετικά σε αυτόν μόρια και να τον διαταράσσουν. Η μέσα-έξω και έξω-μέσα σηματοδότηση, που αναλύθηκαν παραπάνω είναι πολύ σημαντικές για την ενεργοποίηση και την αλλαγή της διαμόρφωσης του IIb/IIIa υποδοχέα ώστε αυτός να αυξήσει τη χημική του συγγένεια με τα προσδετικά του μόρια, ligands. Η ενεργοποίηση και η αλλαγή της διαμόρφωσης του υποδοχέα αIIbβ3 επάγουν την συσσώρευση των αιμοπεταλίων [166]. Μόρια τα οποία θα μπορούσαν να δράσουν στη διαδικασία ενεργοποίησης των υποδοχέων και να αναστείλουν την μέσα-έξω ή έξω-μέσα σηματοδότηση διατηρώντας έτσι τον υποδοχέα αIIbβ3 στην ανενεργή του μορφή, θα παρουσίαζαν συγκριτικό πλεονέκτημα σε σχέση με τους έως τώρα χρησιμοποιούμενους αναστολείς των IIb/IIIa υποδοχέων, οι οποίοι είναι RGD ανάλογα.

Τα πειραματικά *in vitro* δεδομένα, έδειξαν ότι το πεπτίδιο (S,S) PSRCDCR-NH₂ παρουσιάζει αντιαιμοπεταλιακή δράση στα αιμοπετάλια κουνελιού, αφού η μελέτη συσσωρευομετρίας έδειξε αναστολή της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων κουνελιού. Παράλληλα η αντίστοιχη *in vitro* μελέτη συσσώρευσης αιμοπεταλίων κουνελιού σε PRP, για την επιφιμπρατίνη, έδειξε ότι αυτή αποτελεί ισχυρό αντιαιμοπεταλιακό παράγοντα *in vitro* για το κουνέλι, αφού προκαλεί αναστολή της συσσώρευσης *in vitro* των αιμοπεταλίων σε PRP κουνελιού σε μικρές σχετικά συγκεντρώσεις.

Το πεπτίδιο (S,S) PSRCDCR-NH₂ στο μοντέλο αρτηριακής θρόμβωσης καρωτίδας κουνελιού παρουσίασε αντιαιμοπεταλική-αντιθρομβωτική δράση. Ενώ λοιπόν, στα πειραματόζωα που έλαβαν placebo, η ροή στην καρωτίδα του κουνελιού μηδενίστηκε, γεγονός που σημαίνει πλήρη απόφραξη του αυλού του αγγείου από τον επαγόμενο από τον ηλεκτρικό ρεύμα θρόμβο, σε όλες ομάδες

των πειραματόζων που έλαβαν το πεπτίδιο (S,S) PSRCDCR-NH₂ σε συγκεκριμένη δόση, διατηρήθηκε η βατότητα της καρωτίδας του ζώου. Ανιχνευόταν λοιπόν ροή περιφερικότερα του σημείου δημιουργίας θρόμβου έως το τέλος του πειράματος, που αντιστοιχεί στα 90 λεπτά μετά την δημιουργία του θρόμβου.

Η διατήρηση της βατότητας του αγγείου, στις μεγαλύτερες δόσεις του πεπτιδίου, φαίνεται να επιτυγχάνεται κυρίως μέσω της αναστολής της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων στο σημείο δημιουργίας του θρόμβου. Το πεπτίδιο σε δόσεις 12 mg/kg παρουσίασε σημαντική αναστολή της *ex vivo* συσσώρευσης των αιμοπεταλίων του κουνελιού, 60 λεπτά μετά την έναρξη ενδοφλέβιας χορήγησής του σε σχέση με την ομάδα ελέγχου. Η αναστολή αυτή δεν διέφερε σημαντικά σε σχέση με εκείνη που προκάλεσε η επιπιμπατίδη για τη δόση 6. mg/kg ενώ ήταν καλύτερη από την επιπιμπατίδη για τη δόση 12 mg/kg. Χαρακτηριστικό είναι ότι η επιπιμπατίδη παρουσίασε παρόμοια αναστολή της *ex vivo* συσσώρευσης των αιμοπεταλίων, είτε χρησιμοποιήθηκε σε δόση που χορηγείται στην αντιμετώπιση οξέων στεφανιαίων συνδρόμων με αγγειοπλαστική (180 μg/kg bolus και εν συνεχεία έγχυση με ρυθμό 2 μg/kg/min, χαμηλή δόση), είτε χορηγήθηκε στην πενταπλάσια δόση (900 μg/kg bolus και στη συνέχεια 10 μg/kg/min). Το γεγονός αυτό πιθανότατα αποδεικνύει ότι η επιπιμπατίδη παρουσιάζει σε αυτές τις δόσεις ένα μέγιστο δράσης, χωρίς να αναστέλλει περαιτέρω σημαντικά την συσσώρευση των αιμοπεταλίων.

Η αναστολή της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων, που διαπιστώθηκε με την *ex vivo* συσσωρευομετρία, αντανakλάται και στο βάρος του επαγόμενου από το ηλεκτρικό ρεύμα, θρόμβου. Το πεπτίδιο (S,S) PSRCDCR-NH₂ στις δόσεις των 6 και 12 mg/kg, μείωσε σημαντικά το βάρος του θρόμβου έναντι του placebo. Επίσης πρέπει να τονισθεί ότι το πεπτίδιο (S,S) PSRCDCR-NH₂ σε όλες τις δόσεις που χρησιμοποιήθηκε είναι σχετικά ασφαλές καθώς δεν

αύξησε την αιμορραγική διάθεση των πειραματόζων. Στο συγκεκριμένο πρωτόκολλο η αιμορραγική διάθεση εκτιμήθηκε με τις δύο δοκιμασίες: α) υπολογισμός απώλειας αίματος του ζώο μετά την έναρξη έγχυσης της ουσίας με τοποθέτηση προζυγισμένη γάζας σε τομή στο πειραματόζωο β) με υπολογισμό χρόνου αιμορραγίας.

Στην παρούσα μελέτη δεν μελετήθηκε ο μηχανισμός δράσης του πεπτιδίου (S,S) PSRCDCR-NH₂, με αποτέλεσμα ο ακριβής μηχανισμός δράσης καθώς και οι φαρμακοδυναμικές και φαρμακοκινητικές ιδιότητες του πεπτιδίου να πρέπει να αποτελέσουν αντικείμενο μελλοντικής ερευνάς.

Παρόλα αυτά μπορούμε να υποθέσουμε ότι ένας πιθανός μηχανισμός δράσης των (S,S) -CDC- ανάλογων είναι η πρόσδεσή τους στα ενεργά τμήματα του ινωδογόνου οπότε εμποδίζεται η αλληλεπίδραση του με τον υποδοχέα α_{IIb}β₃. Ένας δεύτερος πιθανός μηχανισμός δράσης είναι μια μη RGD αλληλεπίδραση με τον υποδοχέα, η οποία τον κρατάει σε μια ανενεργή, χαμηλής συγγένειας κατάσταση.

Η σύνθεση αυτών των μη RGD εξωκυτταριων αναστολέων πιθανώς εμφανίζει περισσότερα πλεονεκτήματα από τους RGD αγωνιστές μια και οι πρώτοι αναστέλλουν την συσσώρευση των αιμοπεταλίων χωρίς να αλληλεπιδρούν με τον υποδοχέα και συνεπώς αποτυγχάνοντας να επαγουν τη μέσω του υποδοχέα από έξω προς τα μέσα σηματοδότηση.

Αποδεικνύεται λοιπόν ότι το πεπτιδίο (S,S) PSRCDCR-NH₂ εμφανίζει ισχυρή αντιαιμοπεταλιακή δράση σε πειραματικό μοντέλο αρτηριακής θρόμβωσης σε κουνέλια. Περαιτέρω μελέτες θα μπορούσαν να αποκαλύψουν τις ακριβείς του φαρμακολογικές ιδιότητες.

Σκοπός της παρούσας μελέτης

Η αξιολόγηση της αποτελεσματικότητας και της ασφάλειας συνθετικών πεπτιδίων που αναστέλλουν τη συσσώρευση των αιμοπεταλίων σε πειραματικό μοντέλο αρτηριακής θρόμβωσης καρωτίδων κουνελιών.

Περίληψη

Στην παθοφυσιολογία των οξέων στεφανιαίων συνδρόμων και συνεπώς στη φαρμακολογική έρευνα για την αντιμετώπισή τους σημαντικό ρόλο έχει αποδειχθεί ότι διαδραματίζει η αναστολή της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων.

Το πεπτίδιο(S,S) PSRCDCR-NH₂ αναστέλλει τη συσσώρευση των αιμοπεταλίων και την πρόσδεση του ινωδογόνου στα ανθρώπινα αιμοπετάλια *in vitro*.

Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν να μελετηθεί η δράση του πεπτιδίου σε πειραματικό μοντέλο αρτηριακής θρόμβωσης σε κουνέλια.

Τα πειραματόζωα χωρίστηκαν σε ομάδες και έλαβαν ενδοφλέβια α. φυσιολογικό ορό (ομάδα ελέγχου), β. πεπτίδιο(S,S) PSRCDCR-NH₂ σε δόσεις 3, 6, 12 mg/kg, γ) ηπαρίνη σε δόση 100 IU/kg/h και δ) εππιφιμπατίδη σε δόσεις 180 μg/kg εφάπαξ και εν συνεχεία 2 μg/kg/min (χαμηλή δόση) και 900 μg/kg εφάπαξ και στη συνέχεια 10 μg/kg/min (υψηλή δόση). Η δημιουργία θρόμβου επετεύχθη με εφαρμογή συνεχούς ηλεκτρικού ρεύματος στην κοινή καρωτίδα (υπό συνεχή καταγραφή της ροής του αγγείου). Ελήφθησαν δείγματα αίματος για τον προσδιορισμό της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων στο ADP και στο AA *ex vivo* Επιπρόσθετα υπολογίστηκαν, το βάρος του θρόμβου (90 λεπτά μετά την εφαρμογή του ηλεκτρικού ρεύματος) και το ποσό απώλειας αίματος από δεδομένη τομή στο πρόσθιο κοιλιακό τοίχωμα.

Στην ομάδα ελέγχου το αγγείο αποφράχθηκε πλήρως σε 23,3±3,2 min. Αντίθετα στις ομάδες του(S,S) PSRCDCR-NH₂ 6 και 12mg/kg), της ηπαρίνης και της εππιφιμπατίδης η ροή στην καρωτίδα (90 λεπτά μετά την εφαρμογή ρεύματος) μειώθηκε στο 32±0,01%, 46.3 ±0.01% 26,3%±12,7%,

36,9±5,0% (χαμηλή δόση), 35,3±5,1% (υψηλή δόση) της αρχικής, αντίστοιχα ($p < 0,001$ σε σχέση με την ομάδα ελέγχου). Το βάρος του θρόμβου ήταν σημαντικά μειωμένο στις ομάδες: (S,S) PSRCDCR-NH2 6 και 12 mg/kg, της ηπαρίνης και της επιπιμιπατίδης έναντι της ομάδας ελέγχου: 2.95±0.2mg, 2.13±0.08, 3,92±0,74mg και 1,72±0,58 mg (χαμηλή δόση) και 2,1±1,1 mg (υψηλή δόση) έναντι 5,72±0,86mg αντίστοιχα, $p < 0,01$).

Δεν παρατηρήθηκε αναστολή της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων στην ομάδα ελέγχου προ και 60 min μετά την χορήγηση της ουσίας. Αντίθετα παρατηρήθηκε αναστολή κατά 42±0.3% και 28,0±6,6% (χαμηλή δόση) και 38,3±11,0% (υψηλή δόση) στις ομάδες του (S,S) PSRCDCR-NH2 12 mg/kg, και της επιπιμιπατίδης αντίστοιχα, ($p < 0,004$). Το πεπτιδίο : (S,S) PSRCDCR-NH2, περιορίζει περισσότερο από την επιπιμιπατίδη την δημιουργία θρόμβου μέσω της αναστολής της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων σε πειραματικό μοντέλο αρτηριακής θρόμβωσης σε κουνέλια, χωρίς να αυξάνει την αιμορραγία.

Summary

Inhibition of platelet aggregation is indispensable for the treatment of acute arterial thrombotic episodes. We have previously reported the synthesis of a highly constrained cyclic peptide, that incorporates the -CDC- sequence, the (S,S)PSRCDCR-NH₂, that potently inhibits aggregation and fibrinogen binding to human platelets in vitro. We have tested the peptide's safety and efficacy on the electrically induced carotid artery thrombosis experimental rabbit model. The peptide's effects on carotid blood flow, thrombus weight, in vitro and ex vivo platelet aggregation and bleeding and haemostatic parameters were evaluated. The peptide was administered via the femoral vein. Carotid blood flow was continuously monitored for 90 min after electrical thrombus formation. The animals were divided in groups receiving intravenously a. Normal saline, 6 ml/kg/h (control group), b. the (S,S) PSRCDCR-NH₂ to doses of 3,6 and 12 mg/kg, c. Heparin 100 IU/kg/h and d. eptifibatide in two different doses: 180 µg/kg bolus plus 2 µg/kg/min (low dose) and 900 µg/kg bolus plus 10 µg/kg/min (high dose). Carotid artery thrombus formation (under continuous blood flow monitoring) was induced by electrical stimulation. Ex vivo platelet aggregation to 20 ADP and AA in platelet rich plasma (PRP) levels) were determined before (baseline) and at 60 min after the initiation of drug administration (instantly prior to electrical stimulation). Ninety minutes after electrical stimulation the carotid thrombus was removed and weighed. Blood loss was calculated by the amount of blood, gathered on a pre-weighed gauge, positioned on a standardized incision, performed on the anterior abdominal wall. In the control group, carotid artery was

totally occluded within 23.3 ± 3.2 min after electrical stimulation. By contrast, in the (S,S)PSRCDCR-NH₂ (6 and 12 mg), heparin and eptifibatide groups, carotid artery blood flow at 90 min after electrical stimulation, was reduced to $32 \pm 0.01\%$, $46.3 \pm 0.01\%$, $26.3\% \pm 12.7\%$, $36.9 \pm 5.0\%$ (low dose), $35.3 \pm 5.1\%$ (high), respectively ($p < 0.001$ over control).

Similarly, thrombus weight was significantly reduced in animals receiving (S,S) PSRCDCR-NH₂ (6 and mg/kg), heparin or eptifibatide over control: 2.95 ± 0.2 mg, 2.13 ± 0.08 , 3.92 ± 0.74 mg and 1.72 ± 0.58 mg (low dose) and 2.1 ± 1.1 mg (high dose) over 5.72 ± 0.86 mg respectively, $p < 0.01$). Platelet maximum aggregation to ADP and AA in the control group, 60 min after electrical stimulation, was not altered compared to baseline, whereas it was significantly reduced by $42 \pm 3\%$, $28.0 \pm 6.6\%$ (low dose), $38.3 \pm 11.0\%$ (high dose) in the (S,S) PSRCDCR-NH₂ (12 mg/kg) and eptifibatide groups respectively, ($p < 0.004$). There were no significant variations regarding blood loss and bleeding times in the eptifibatide and the (S,S)PSRCDCR-NH₂ groups compared to control group. The peptide, at 12 mg/kg, prevented total artery occlusion and significantly preserved carotid artery's patency compared with placebo and eptifibatide. Furthermore, (S,S) PSRCDCR-NH₂ administration at 12 mg/kg reduced thrombus weight, whereas it inhibited ex vivo ADP, arachidonic acid (AA). Moreover the (S,S) PSRCDCR-NH₂ at 12 mg/kg presented significantly higher inhibitory effects on AA ex vivo platelet aggregation compared to eptifibatide. The peptide at any dose, did not affect the bleeding times and the haemostatic response of the animals. Thus highly constrained cyclic peptides like (S,S) PSRCDCR-NH₂ that incorporate the -CDC- motif and fulfil certain conformational criteria represent novel

compounds that potently inhibit thrombus formation, *ex vivo* platelet aggregation and carotid artery occlusion superiorly to other non-RGD peptides without causing haemorrhagic complications in a rabbit model of arterial thrombosis.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΑΝΑΦΟΡΕΣ

1. *Giovanni Davi, M.D., Carlo Patrono, M.D. Platelet Activation and Atherothrombosis N Engl J Med 2007;357:2482-94.*
2. *Bruce Furie, M.D., and Barbara C. Furie, Ph.D. Mechanisms of Thrombus Formation N Engl J Med 2008;359:938-49.*
3. *Wright, J., The histogenesis of the blood platelets. J Morphol, 1910. 21 p263.*
4. *Platelets James N George THE LANCET • Vol 355 • April 29, 2000*
5. *Hoffman, R., Benz, E.J., Shattil, S.J., Furie, B., Cohen, H.J., Silberstein, L.E., McGlove, P., Hematology: Basic principles and practice, 3rd ed. 2000.: Churchill and Livingstone.*
6. *Frojmovic, M., Panjwani, R., Geometry of normal mammalian platelets by quantitative microscopic studies. Biophys J, 1976. 16: p. 1071-1089.*
7. *White, J.G., A search for the platelet secretory pathway using electron dense tracers. Am J Pathol, 1976. 83: p. 590-614.*
8. *White, J.G., Colman, R.W., Hirsh J., Marder, V.J., Salzman, E.W., Hemostasis and Thrombosis: Basic Principles and Clinical Practice. Anatomy and structural organization of the platelet. 2nd edn ed. 1994, Philadelphia: JB Lippincott Co.*
9. *Morgenstern, E., Bruchhausen, F., Walter, U., Platelets morphology/ultrastructure. In: Platelets and their Factors. Handbook of experimental pharmacology. 1997, Heidelberg: Springer Verlag. 27-52.*
10. *Behnke, O., The morphology of blood platelet systems. Ser Haematol, 1970. 3: p. 3-16.*
11. *White, J.G., Clawson, G.C., Overview article: Biostructure of blood platelets. Ultrastruct Pathol, 1980. 1: p. 533-588.*

12. *Coller, B.S., Biochemical and electrostatic considerations in primary platelet aggregation. Ann NY Acad Sci, 1984. 416: p. 693-708.*
13. *White, J.G., Identification of platelet secretion in the electron microscope. Ser Haematol, 1973. 6: p. 429-459.*
14. *Comfurius, P., Senden, J.M.G., Tilly, R.H.J., Loss of membrane phospholipid asymmetry in platelets and red cells maybe associated with calcium-induced shedding of plasma membrane and inhibition of aminophospholipid translocase. Biochim Biophys Acta, 1990. 1026: p. 153-160.*
15. *Hartwig, J.H., Barkalow, K., Azim, A., The elegant platelet: signals controlling actin assembly. J. Thromb Haemost, 1999. 82: p. 392-398.*
16. *Fox, J.E.B., Boyles, J.K., Berndt, M.C., Identification of a membrane skeleton in platelets. J Cell Biol, 1988. 106: p. 1525-1538.*
17. *Fox, J.E.B., Regulation of platelet function by the cytoskeleton. Adv Exp Med Biol, 1993. 344: p. 175-185.*
18. *Fox, J.E.B., Lipfert, L., Clark, E.A., On the role of the platelet membrane skeleton in mediating signal transduction. Association of GPIIb/IIIa, pp60c-src, pp62c-yes, and the p21ras GTPase-activating protein with the membrane skeleton. J Biol Chem, 1993. 268: p. 25973-25984.*
19. *Fox, J.E.B., Linkage of a membrane skeleton to integral membrane glycoproteins in human platelets. Identification of one of the glycoproteins as glycoprotein Ib. J Clin Invest, 1985. 76: p. 1673-1683.*
20. *Phillips, D.R., Jennings, L.K., Edwards, H.H., Identification of membrane proteins mediating the interaction of human platelets. J Cell Biol, 1980. 86: p. 77-86.*

21. Nakata, T., Hirokawa, N., *Cytoskeletal reorganization of human platelets after stimulation revealed by quick-freeze deep-etch technique. J Cell Biol, 1987. 105: p. 1771-1780.*
22. Gawaz, M., *Blood Platelets, Physiology, pathology, membrane receptors, antiplatelet principles, and therapy for atherothrombotic diseases. 2001, Verlag: Georg Thieme.*
23. Suzuki, H., Nakamura, S., Itoh, Y., *Immunocytochemical evidence for the translocation of α -granule membrane glycoprotein IIb/IIIa (integrin α IIb β 3) of human platelets to the surface membrane during the release reaction. Histochem, 1992. 97: p. 381-388.*
24. Stenberg, P.E., McEver, R.P., Shuman, M.A., *A platelet α -granule membrane protein (GMP-140) is expressed on the plasma membrane after activation. J Cell Biol, 1985. 101: p. 880-886.*
25. Da Prada, M., Richards, J.G., Kettler, R., *Amine storage organelles in platelets. In: Gorgon JL, ed. Platelets in Biology and Pathology. 1981, Cambridge: Elsevier/North Holland Biomedical Press. 107-145.*
26. Daimon, T., David, H., *Precursors of monoamine-storage organelles in developing megacaryocytes in the rat. Histochem, 1983. 77: p. 353-363.*
27. Israels, S.J., Gerrard, J.M., Jacques, Y.V., *Platelet dense granule membranes contain both granulophysin and p-selectin (GMP-140). Blood, 1992. 80: p. 143-152.*
28. Cutler, L., Rodan, G., Feinstein, M.B., *Cytochemical localization of adenylate cyclase and of calcium ion, magnesium ion-activated ATPases in the dense tubular system of human platelets. Biochim Biophys Acta, 1978. 542: p. 283-298.*
29. Klinger, M.H.F., Kluter, H., *Immunocytochemical colocalization of adhesive proteins with clathrin in human blood platelets: further evidence for coated vesicle mediated transport of von*

- Willebrand factor, fibrinogen and fibronectin. Cell Tissue Res, 1995. 279: p. 453-457.*
30. *White, J.G., Clawson, C.C., The surface connected canalicular system of blood platelets-A fenestrated membrane system. Am J Pathol, 1980. 101: p. 353-364.*
 31. *Schwartz, M.A., Schaller, M.D., Ginsberg, M.H., Integrins: Emerging paradigms of signal transduction. Annu Rev Cell Dev Biol, 1995. 11: p. 549-599.*
 32. *Kefalides, N.A., Colman, R.W., Hirsch, J., Marder, V.J., Salzman, E.W., Biochemical aspects of the vessel wall. In: Hemostasis and Thrombosis: Basic principles and clinical practice. 2nd edn. 1987, Philadelphia: JB Lippincott Co.*
 33. *Nurden, A., Bloom, A., Forbes, C.D., Human platelet glycoproteins. In: Haemostasis and Thrombosis. 3rd edn. 1994, New York: Churchill Livingstone. 259-285.*
 34. *Ruggeri, Z.M., New insights into mechanisms of platelet adhesion and aggregation. Sem Hematol, 1994. 31: p. 229-239.*
 35. *Sixma, J.J., Bloom, A., Forbes, C.D., Interaction of blood platelets with the vessel wall. In: Haemostasis and Thrombosis. 3rd edn. 1994, New York: Churchill Livingstone. 254-285.*
 36. *Ruf, A., Frojmovic, M.M., Patscheke, H., Von Bruchhausen, F., Walter, U., Platelet aggregation. In: Platelets and their Factors. Handbook of experimental pharmacology. 1997, Heidelberg: Springer Verlag. 101-116.*
 37. *Siess, W., Molecular mechanisms of platelet activation. Physiol Rev, 1989. 69: p. 50-178.*
 38. *Gawaz, M., Blood platelets. 2001, Stuttgart-New York: Georg Thieme Verlag.*
 39. *Hellem, A., Scand J Clin Invest, 1960. 12: p. 1-17.*

40. Gaarder, A., Jonsen, A., Laland, S., Hellem, A.J., Owren, P., *Nature*, 1961. 192: p., 531-532.
41. Holmsen, H., Weiss, H.J., *Annu.Rev.Med*, 1979. 30: p. 119-134.
42. Holmsen, H., Weiss, H.J., *Br.J.Haematol*, 1970. 19: p. 643-649.
43. Mills, D.C.B., Robb, L.A., Roberts, G.C.K., *J.Physiol.*, 1968. 195: p. 715-729.
44. Sage, S.C., Rink, T.J., *BBRC*, 1986. 136: p. 1124-1129.
45. MacKenzie, A.B., Mahaut-Smith, M.P., Sage, S.O., *J.Biol.Chem*, 1996. 271: p. 2879-2881.
46. Hallam, T.J., Rink, T.J., *J.Physiol.*, 1985. 368: p. 131-146.
47. Mills, D.C.B., Smith, J.B., *Ann.N.Y.Acad.Sci.*, 1972. 201: p. 391-399.
48. Fredholm, B.B., Abbracchio, M.P., Burnstock, G., Daly, J.W., Harden, T.K., Jacobson, K.A., Leff, P., Williams, M., *Pharmacol.Rev.*, 1994. 46: p. 143-156.
49. Daniel, J.L., Dangelmaier, C., Jin, J., Ashby, B., Smith, J.B., Kunapuli, S.P., *J.Biol.Chem*, 1998(273): p. 2024-2029.
50. Jin, J., Daniel, J.L., Kunapuli, S.P., *J.Biol.Chem*, 1998. 273: p. 2030-2034.
51. Jin, J., Kunapuli, S.P., *PNAS USA*, 1998. 95: p. 8070-8074.
52. Coughlin, S., *Thrombin signalling and protease-activated receptors. Nature*, 2000. 407: p. 258-264.
53. Coughlin, S., *How the protease thrombin talks to cells. Proc Natl Acad Sci USA*, 1999. 96: p. 11023-11027.
54. Greco, N.J., Jamieson, G.A., *high and moderate affinity pathways for α -thrombin induced platelet activation. Proc Soc Exp Biol Med*, 1991. 198: p. 792-799.

55. *Harmon, J.T., Jamieson, G.A., Thrombin binds to a high-affinity 900.000-dalton site on human platelets. Biochemistry, 1985. 24: p. 58-64.*
56. *Harmon, J.T., Jamieson, G.A., the glycolalicin portion of platelet glycoprotein Ib expresses both high and moderate affinity receptor sites for thrombin. A soluble radioreceptor assay for the interaction of thrombin with platelets. J Biol Chem, 1986. 261: p. 13224-13229.*
57. *Harmon, J.T., Jamieson, G.A., Platelets activation by thrombin in the absence of the high affinity thrombin receptor. Biochemistry, 1988. 27: p. 2151-2157.*
58. *Watson, S.P., Berlanga, O., Best, D., Frampton, J., Update on collagen receptor interactions in platelets: is the two-state model still valid? Platelets, 2000. 11: p. 252-258.*
59. *Watson, S.P., Collagen receptor signalling in platelets and megacaryocytes. Thromb Haemost, 1999. 82: p. 365-376.*
60. *Holt, J.C., Niewarowski, S., Biochemistry of α -granule proteins. Semin Hematol, 1985. 22: p. 151.*
61. *Colman, R.W., Hirsch, J., Mader, V.J., Salzman, E.W., Hemostasis and thrombosis. 1982, Philadelphia: JB Lippincott Co.*
62. *Flier, J.S., Underhill, L.H., Molecular and cellular biology of blood coagulation. N Engl J Med, 1992. 326: p. 800.*
63. *McKenzie, S.B., Textbook of hematology. 2nd edn. 1999: Williams & Wilkins.*
64. *Hiller, E., Riess, H., Hämorrhagische Diathese und Thrombose. 2nd edn (with cooperation of K. Auberger),. 1998, Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft.*
65. *Edgington, T.S., Dickinson, C.D., Ruf, W., The structural basis of function of the TF-VIIa complex in the cellular*

- initiation of coagulation. Thrombosis and Hemostasis, 1997. 78: p. 401-405.*
66. *Bevers, E.M., Comfurius, P., Zwaal, R.F., Mechanisms involved in platelet procoagulant response. Adv Exp Med Biol, 1993. 344: p. 195-207.*
 67. *Bevers, E.M., Comfurius, P., Zwaal, R.F., Changes in membrane phospholipid distribution during platelet activation. Biochim Biophys Acta, 1983. 736: p. 57-66.*
 68. *Camper L, H.U., Lundgren-Akerlund E, Isolation, cloning, and sequence of the integrin subunit $\alpha 10$, a $\beta 1$ -associated collagen binding integrin expressed on chondrocytes. J Biol Chem, 1998. 273: p. 20383-20389.*
 69. *Calvete JJ, On the structure and function of platelet integrin $\alpha \text{IIb} \beta 3$, the fibrinogen receptor. Proc Soc Exp Biol Med, 1995. 208: p. 346-360.*
 70. *De Fougerolles A, S.T., Ideas crystallized on immunoglobulin superfamily-integrin interactions. Chem Biol, 1995. 2: p. 639-643.*
 71. *Wagner, C.L., Mascelli, M.M., Neblock, D.S., Weisman, H.F., Collier, B.S., Jordan, R.E., Analysis of GPIIb/IIIa receptor number by quantification of 7E3 binding to human platelets. Blood, 1996. 88: p. 907-914.*
 72. *Shattil SJ Kashiwagi H, P.N., Integrin signalling: The platelet paradigm. Blood, 1997. 91(8): p. 2645-2657.*
 73. *Phillips DR Agin PP, Platelet plasma membrane glycoproteins. Evidence for presence of non-equivalent disulfide bonds using non-reduced two dimensional electrophoresis. J Biol Chem, 1977. 352: p. 2121.*
 74. *ExpASy, <http://au.expasy.org/cgi-bin/niceprot.pl?P08514>.*
 75. *ExpASy, <http://au.expasy.org/cgi-bin/niceprot.pl?P05106>.*

76. Bennett JS, *Structural biology of glycoprotein IIb-IIIa. Trends Cardiovasc Med*, 1996. 6: p. 31-37.
77. Tuckwell, D.S., Brass, A., Humphries, M.J., *Biochem J*, 1992. 285: p. 325-331.
78. Dickeson, S.K., Santoro, S.A.,, *Ligand recognition by the I domain-containing integrins. Cell Mol Life Sci*, 1998. 54: p. 556-566.
79. Michisita, M., Videm, V., Arnaout, M.A.,, *A novel divalent-cation binding site in the A domain of the β 2 integrin CR3 (CD11b/CD18) is essential for ligand binding. Cell Mol Life Sci*, 1993. 72: p. 857-867.
80. Lee, O.J., Rieu, P., Arnaout, M.A., Liddington, R., *Crystal structure of the A-domain from the α subunit of the integrin CR3 (CD11/CD18). Cell*, 1995a. 80: p. 631-638.
81. Qu, A., Leahy, D.J.,, *Crystal structure of the I domain from the CD11/CD18 (LFA-1, α L β 2) integrin. Proc Nat Acad Sci USA*, 1995. 92: p. 10277-10281.
82. Loftus, J.C., Liddington, R.C.,, *Perspectives Series: cell adhesion in vascular biology. New insights into integrin-ligand interaction. J Clin Inv*, 1997. 99(10): p. 2302-2306.
83. Calvette, J.J., *Platelet integrin GPIIb/IIIa: Structure-function correlations. An update and lessons from other integrins. P.S.E.B.M*, 1999. 222: p. 29-38.
84. Plow, E.F., Haast, T.A., Zhang, L., Loftus, J., Smith, J.W.,, *Ligand binding to integrins. J Biol Chem*, 2000. 275(29): p. 21785-21788.
85. Corbi, A.L., Miller, L.J., O'Connor K., Larson, R.S., Springer T.A.,, *cDNA cloning and complete primary structure of the α subunit of a leukocyte adhesion protein. EMBO J*, 1987. 6: p. 4023-4028.

86. Loftus, J.C., O'Toole, T.E., Plow, E.F., Glass, A., Frelinger A., Ginsberg, M.H., A $\beta 3$ integrin mutation abolishes ligand binding and alters divalent-cation dependent conformation. *Science*, 1990. 249: p. 915-918.
87. Kamata, T., Wright, R., Takada, Y., Critical threonine and aspartic residues within the I domains of $\beta 2$ integrins for interactions with the intercellular adhesion molecule 1(ICAM-1) and C3bi. *J Biol Chem*, 1995. 270: p. 12531-12535.
88. Springer, T.A., Folding of the N-terminal, ligand binding region of integrin α subunits into a β -propeller domain. 1997. *Proc Natl Acad Sci USA*(94).
89. Kamata, T., Tieu, K.K., Irie, A., Springer T.A., Takada, Y., Amino acid residues in the α IIB subunit that are critical for ligand binding to integrin α IIB $\beta 3$ are clustered in the β -propeller model. *J Biol Chem*, 2001. 276(47): p. 44275-44283.
90. Tuckwell, D., Humphries, M.J., A structure prediction for the ligand-binding region of the integrin β subunit: Evidence for the presence of a von Willebrand factor A domain. *FEBS Lett*, 1997. 400: p. 297-303.
91. Cierniewska-Cieslak, A., Cierniewski, C.S., Blecka, K., Papierak, M., Michalec, L., Zhang, L., Haas, T.A., Plow, E.F., Identification and characterization of two cation binding sites in the integrin $\beta 3$ subunit. *J Biol Chem*, 2002. 277(13): p. 11126-11134.
92. Loftus, J.C., Smith, J.W., Ginsberg, M.H., Integrin-mediated cell adhesion:the extracellular face. *J Biol Chem*, 1994. 269: p. 25235-25238.
93. D'Souza, S., Ginsberg, M., Burke, T., Lam, S., Plow E., *Science*, 1988. 242: p. 91-93.
94. Calvette, J., Aria, S.J., Alvarez, M., Lopez M., Henschen, A., Gonzalez-Rodriguez, J., *J Biol Chem*, 1991. 274: p. 457-463.

95. *Andrieux, A., Rabiet, M.J., Chapel, A., Concord, E., Marguerie, G., J Biol Chem, 1991. 266: p. 14202-14207.*
96. *Ginsberg, M., Lightsey, A., Kunicki, T., Kaufman, A, Marguerie, G., Plow, E., J Clin Inv, 1986. 78: p. 1103-1111.*
97. *Charo, I.F., Nannizzi, L, Phillips, D.R., Hsu, M.A., Scarborough, R.M., J Biol Chem, 1991. 266: p. 1415-1421.*
98. *Lanza, F., Stierle, A., Fournier, D., Morales, M., Andre, G., Nurden, A., Cazenave, J.P., J Clin Inv, 1992. 89: p. 1995-2004.*
99. *Bajt, M.L., Ginsberg, M., Frelinger, A., Berndt, M., Loftus, J.C., J Biol Chem, 1992. 267: p. 3789-3794.*
100. *Oxvig, C., Lu, C., Springer, T.A., Proc Nat Acad Sci USA, 1999. 96: p. 2215-2220.*
101. *Goodman, T.G., Bajt, M.L., J Biol Chem, 1996. 271: p. 23729-23736.*
102. *Puzon-McLaughlin, W., Takada, Y., J Biol Chem, 1996. 271: p. 20436-20443.*
103. *Santoro, S., Lawing, W., Competition for related but nonidentical binding sites on the glycoprotein IIb-IIIa complex by peptides derived from platelet adhesive proteins. Cell, 1987. 48: p. 867-873.*
104. *Ginsberg, M.H., Frelinger, A.L., Lam, S.C., Forsyth, J., McMillan, R, Plow, E.F., Shattil, S.J., Blood, 1990. 76: p. 2017-2023.*
105. *O'Toole, T.E., Loftus, J.C., Du, X., Glass, A.A., Ruggeri, Z.M., Shattil, S.J., Plow, E.F., Ginsberg, M.H., Cell Regul, 1990. 1: p. 883-893.*
106. *Kamata, T., Puzon, W., Takada, Y., J Biol Chem, 1994. 269: p. 9659-9663.*

107. Lin, E.C.K., Ratnikov, B.I., Tsai, P.M., Gonzalez, E.R., McDonald, S., Pelletier A.J., Smith, J.W., Evidence that the integrin $\beta 3$ and $\beta 5$ subunits contain a metal ion-dependent adhesion site-like motif but lack an I domain. *J Biol Chem*, 1997. 272(22): p. 14236-14243.
108. Cook, J.J., Trybulec, M., Lasz, E.C., Khan, S., Niewiarowski, S., *Biochim Biophys Acta*, 1992. 1119: p. 312-321.
109. Charo, I.F., Nannizzi, L, Phillips, D.R., Hsu, M.A., Scarborough, R.M., *Biochim Biophys Acta*, 1991. 1119: p. 312-321.
110. Tozer, E.C., Liddington R.C., Sutcliffe, M.J., Smeeton, A.H., Loftus, J.C., *J Biol Chem*, 1996. 271: p. 21978-21984.
111. Hu, D.D., Barbas, C.F., Smith, J.W., *J Biol Chem*, 1996. 271: p. 21745-21751.
112. Veklich, Y., Gorkun, O, Medved, L., Nieuwenhuizen, W., Weisel, J., Carboxyl-terminal portions of the alpha chains of fibrinogen and fibrin:localization by electron microscopy and the effects of isolated alpha C fragments on polymerization. *J Biol Chem*, 1993. 268(13): p. 577-585.
113. Kloczewiak, M., Timmons, S., Lukas, T.J., Hawiger, J., Platelet receptor recognition site on human fibrinogen: synthesis and structure-function relationships of peptides corresponding to the carboxy-terminal segment of the gamma chain. *Biochemistry*, 1984. 23: p. 17677-1774.
114. Gartner, T.K., Bennett, J.S., The tetrapeptide analogue of the cell attachment site of fibronectin inhibits platelet aggregation and fibrinogen binding to activated platelets. *J Biol Chem*, 1985. 260(11): p. 891-894.
115. Phillips, D.R., Charo, I. F., Parise, L. V., and Fitzgerald, L. A., *Blood*, 1988. 71: p. 831-843.

116. Pytela, R., Pierschbacher, M. D., Ginsberg, M. H., Plow, E. F., Ruos- and E. lahti, *Science*, 1986. 231: p. 1559-1562.
117. Kloczewiak, M., Timmons, S., and Hawiger, J., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1982. 107: p. 181-187.
118. Weisel, J.W., Stauffacher, C. V., Bullitt, E., and Cohen, C., *Science*, 1985. 230: p. 1388-1391.
119. Rudee, M.L., and Price, T. M., *Ultramicroscopy*, 1981. 17: p. 193-196.
120. Peerschke, E.I.B., and Galanakis, D. K., *Blood*, 1987(69): p. 950-952.
121. Farrell, D.H., Thiagarajan, P., Chung, D.W., Davie, E.W., Role of fibrinogen α and gamma chain sites in platelet aggregation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992. 89: p. 10729.
122. Rooney MM, P.L., Lord ST:, Dissecting clot retraction and platelet aggregation—Clot retraction does not require an intact fibrinogen gamma chain. *J Biol Chem*, 1996. 271: p. 8553.
123. Bennett, J.S., Shattil, S.J., Poer, J.W., Gartner, T.K.,, Interaction of fibrinogen with its platelet receptor:differential effects of alpha and gamma chain fibrinogen peptides on the glycoprotein IIb-IIIa complex. *J Biol Chem*, 1988. 263(12): p. 948-953.
124. Hu, D.D., White, C. A., Panzer-Knodle, S., Page, J. D., Nicholson, N., and and J.W. Smith, *J Biol Chem*, 1999. 274: p. 4633-4639.
125. Cierniewski, C.S., Byzova, T., Papierak, M., Haas, T. A., Niewiarowska, J., and L. Zhang, Cieslak, M., and Plow, E. F., *J Biol Chem*, 1999. 274: p. 16923-16932.
126. Rao, S.P.S., Poojary, M. D., Elliott, B. W., Melanson, L. A., Oriol, B., and and C. Cohen, *J. Mol. Biol*, 1991. 222: p. 89-98.

127. Moon, D.G., Shainoff, J. R., and Gonda, S. R. (1990), *Am. J. Physiol.*, 1990. 259(C): p. 611-618.
128. Skaer, R.J., Emmines, J. P., and Skaer, H. le B., *J. Ultrastruct. Res.*, 1979(69): p. 28-42.
129. Parise, L.V., and Phillips, D. R., *J. Biol. Chem.*, 1985. 260: p. 1750-1756.
130. harfenist, 1984 anafora 43.
131. harfenist, 1984 anafora 44.
132. harfenist, 1984 anafora 15.
133. harfenist, 1984 anafora 16.
134. harfenist, 1984 anafora 17.
135. harfenist, 1984 anafora 18.
136. Harfenist, E.J., Packham, M.A., Mustard, J.F, *Effects of variant γ chains and sialic acid content of fibrinogen upon it's interactions with ADP-stimulated human and rabbit platelets. Blood*, 1984. 64(6): p. 1136-1168.
137. Rand, M.L., Packham, M.A., Taylor, D.M., Yeo, E.L., Gemmell, C.H., Patil, S., Lam, S.C-T.,, *The fibrinogen gamma chain dodecapeptide inhibits agonist-induced aggregation of rabbit platelets and fibrinogen binding to rabbit glycoprotein IIb-IIIa. Thromb Haemost*, 1999. 82: p. 1680-1686.
138. Kirschbaum, N.E., Mosesson, M.W., Amrani, D.L., *Characterization of the gamma chain platelet binding site on fibrinogen fragment D. Blood*, 1992. 79: p. 2643-2648.
139. harfenist, 1984 anafora 12.
140. harfenist, 1984 anafora 13.
141. harfenist, 1984 anafora 14.

142. Farrell, D.H., Thiagarajan P, :, Binding of recombinant fibrinogen mutants to platelets. *J Biol Chem*, 1994. 269: p. 226-231.
143. Lam, S.C.-T., Plow, E.F., D'Soyza, S.E., Cheresh, D.A., Frelinger, A.L.III, Ginsberg, M.H., Isolation and characterization of a platelet membrane protein related to the vitronectin receptor. *J Biol Chem*, 1989. 264: p. 3742-3749.
144. Smith, J.W., Ruggeri, Z.M., Kunicki, T.J., Ceresh, D.A, Interaction of integrins $\alpha v\beta 3$ and glycoprotein IIb-IIIa with fibrinogen. Differential peptide recognition accounts for distinct binding sites. *J Biol Chem*, 1990. 265: p. 12267-12271.
145. Cheresh, D.A., Berliner, S.A., Vicente, V., Ruggeri, Z.M., Recognition of distinct adhesive sites on fibrinogen by related integrins on platelets and endothelial cells. *Cell*, 1989. 58: p. 945-953.
146. Mould, A.P., Getting integrins into shape: recent insights into how integrin activity is regulated by conformational changes. *Journal of Cell Science*, 1996. 109: p. 2613-2618.
147. D'Souza, S.E., Haas, T. A., Piotrowicz, R. S., Byers-Ward, V., McGrath, D. and S. E., H. R., Cierniewski, C., Plow, E. F. and Smith, J. W., Ligand and cation binding are dual functions of a discrete segment of the integrin $\beta 3$ subunit: cation displacement is involved in ligand binding. *Cell*, 1994. 79: p. 659-667.
148. Humphries, M.J., The molecular basis and specificity of integrin-ligand interactions. *J. Cell Sci*, 1990. 97: p. 585-592.
149. Bergelson, J.M., and Hemler, M. E., *Curr. Biol*, 1995(5): p. 615-617.
150. Shattil, S.J., Kashiwagi, H., Pampori, N., Integrin signalling: The platelet paradigm. *Blood*, 1997. 91(8): p. 2645-2657.

151. Sims, P.J., Ginsberg, M.H., Plow, E.F., Shattil, S.J., Effect of platelet activation on the conformation of the plasma membrane glycoprotein IIb-IIIa. *J Biol Chem*, 1991. 266: p. 7345-7352.
152. *Annual Review of Biochemistry*, by Annual Reviews Inc. 1997. Volume 66.
153. *The Journal of Clinical Investigation*, 1997. Vol. 99: p. 2302.
154. Ingeborg H, Jose D, Pieter L, et al. Inhibition of platelet integrin α IIb β 3 by peptides that interfere with protein kinases and the β 3 tail. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2000;20:1651-1660.
155. Carey F, Menashi S, and Crawford N. Localization of cyclo-oxygenase and thromboxane synthetase in human platelet intracellular membranes. *Biochem. J*. 1982;68:847-851.
156. Sixma JJ, Lips, P.M. Isolation of platelet membranes. A review. *Thromb. Haemost.* 1978;39:328-337.
157. Collier BS. The role of platelets in arterial thrombosis and the rationale for blockage of platelets GPIIb/IIIa receptors as antithrombotic therapy. *Eur. Heart J*. 1995;16:11-15.
158. Price DT, and Loscalzo, J. Cellular adhesion molecules and atherogenesis. *Am. J. Med*. 1999;107:85-97.
159. Scharf RE, Tomer A, Marzec, U.M, Teirstein, P.S, Ruggeri, Z.M., Harker, L.A. Activation of platelets in blood perfusing angioplasty-damaged coronary arteries. Flow cytometric detection. *Arterioscler Thromb*. 1992;12:1475-1487.
160. Gasperetti CM, Gonias SL, Gimple LW, et al. Platelet activation during coronary angioplasty in humans. *Circulation*. 1993;88:2728-2734.
161. Hynes R, O. Integrins: a family of cell surface receptors. *Cell*. 1987;48:549-554.

162. Hynes RO. *Integrins: Versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. Cell. 1992;69:11-25.*
163. Ruoslati E, and Pierschbacher, M.D. *New perspectives in cell adhesion: RGD and Integrin. Science. 1987;238:491-497.*
164. Fitzgerald LA, Steiner B, Rall SC, Jr, et al. *Protein sequence of endothelial glycoprotein IIIa derived from a cDNA clone. Identity with platelet glycoprotein IIIa and similarity to integrin. J. Biol. Chem. 1987;262:3936-3939.*
165. Zimrin AB, Gidwitz, S, Lord, S, Schwartz, E, Bennett, J.S, White, G.C. II., Poncz, M. *The genomic organization of platelet glycoprotein IIIa. J. Biol. Chem. 1990;265:8590-8595.*
166. Glanzmann E. *Hereditare haemorrhagische Thrombasthenie: ein Beitrag zur pathologie der blutplattchen. Jahrb Kinderheilk. 1998;88:113-114.*
167. Phillips DR, Agin, P.P. *Platelet membrane defects in Glanzmann's thrombasthenia. Evidence for decreased amounts of two major glycoproteins. J. Clin. Invest. 1977;60:535-545.*
168. Phillips D.R CIF, Parise L.V, Fitzeraland LA. *The platelet membrane glycoprotein IIb/IIIa complex. Blood. 1988;71:831-843.*
169. Nurden AT. *Polymorphisms of human platelet membrane glycoproteins: structure and clinical significance. Thromb. Haemost. 1995;74:345-351.*
170. A. KOUKI, et al *Highly constrained cyclic (S,S) -CXaaC-peptides as inhibitors of fibrinogen binding to platelets J Thromb Haemost 2005; 3: 2324-30.*
171. Johnson J, Griggs TR, and Badimon L. *The utility of animal models in the preclinical study interventions to prevent human coronary artery restenosis: analysis and recommendations. Thromb Haemost. 1999;81:835-843.*

172. Leadley R, Chi L, Rebello S, et al. Contribution of *in vivo* models of thrombosis to the discovery and development of novel antithrombotic agents. *J Pharm and Toxic Methods*. 2000;43:101-106.
173. Kersh RA, Handren J, Hergrueter C, et al. Microvascular surgical experimental thrombosis model: rationale and design. *Plast Reconstr Surg*. 1989;83:866-874.
174. Andre P, Sollier CB, Bonneau M, et al. Which experimental model to choose to study arterial thrombosis and evaluate potentially useful therapeutics? *Haemostasis*. 1996;26:55-69.
175. Stepnick DW, Hayden, R.E, Hogikyan, N.D. Development of thrombosis models in the rabbit. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*. 1994;120:997-1002.
176. Wong PC, Crain, E.J, Watson, C.A, et al. Nonpeptide factor Xa inhibitors III: Effects of DPC423 an orally-active pyrazole antithrombotic agent, on arterial thrombosis in rabbits. *JPET*. 2002;303:993-
177. Wong PC, Crain, E.J, Knabb, R. M, et al. Non-peptide factor Xa inhibitors II. Antithrombotic evaluation in a rabbit model pf electrically induced carotid artery thrombosis. *JPET*. 2000;295:212-218.
178. Wong PC, Crain, E.J, Knabb, R. M, et al. Non-peptide factor Xa inhibitors II. Antithrombotic evaluation in a rabbit model of electrically induced carotid artery thrombosis. *JPET*. 2000;295:212-218.
179. Hoffmann P, Bernat A, Savi P, et al. Prevention of thrombosis and enhancement of thrombolysis in rabbits by SR 121787, a glycoprotein II/III antagonist. *JPET*. 1998;286:670-675.
180. Thiagarajan P, Benedict, C.R. Inhibition of arterial thrombosis by recombinant annexin V in a rabbit carotid artery injury model. *Circulation*. 1997;96:2339-2347.

181. Pakala R, Liang, C.T, Benedict, C.R. Inhibition of arterial thrombosis by a peptide ligand of the thrombin receptor. *Thromb Res.* 2000;100:86-96.
182. Lorraine J, Lechaire I, Gauffeny C, et al. Effects of Sanorg 123781A, a synthetic hexadecasaccharide in a mouse model of electrically induced carotid artery injury: Synergism with the antiplatelet agent clopidogrel. *JPET.* 2004;309:235-240.
183. Mousa SA, Kapil, R, Mu, D.X. Intravenous and oral antithrombotic efficacy of the novel platelet GPIIb/IIIa antagonist roxifiban (DMP754) and its free acid form, XV459. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1999;19:2535-2541.
184. Hennan JK, Hong TT, and Willens DE. Prevention of experimental carotid and coronary artery thrombosis by the glycoprotein IIb/IIIa receptor antagonist CRL42796. *Br J Pharmacol.* 2002;136:927-937.
185. Huang J, Driscoll EM, and Gonzales ML. Prevention of arterial thrombosis by intravenously administered platelet P2T receptor antagonist AR-C69931MX in a canine model. *JPET.* 2000;295:492-499.
186. Hong TT, Driscoll EM, White A, et al. Glycoprotein IIb/IIIa receptor antagonist (2S)-2-[(2-Naphthyl-sulfonyl)amino]-3-[[2-[(4-(4-piperidiny)-2-[2-(4-piperidiny)ethyl]butanoyl]amino)acetyl]amino]propanoic acid dihydrochloride (CRL42796), in combination with aspirin and/or enoxaparin, prevents coronary artery rethrombosis after successful thrombolytic treatment by recombinant tissue plasminogen activator. *JPET.* 2003;306:616-623.
187. Suleymanov OD, Szalony, J.A, Salyers, A.K, et al. Pharmacological interruption of acute thrombus formation with minimal hemorrhagic complications by a small molecule tissue factor/factor VIIa inhibitor: comparison to factor Xa and

- thrombin inhibition in a nonhuman primate thrombosis model. JPET. 2003;306:1115-1121.*
188. *Saniabadi AR, Umemura, K, Matsumoto, N, Sakuma, S, Nakashima, M. Vessel wall injury and arterial thrombosis induced by a photochemical reaction. Thromb Haemostasis. 1995;73:868-872.*
189. *Dietrich DW, Miller LP, Prado R, et al. Acadesine reduces Indium-labelled platelet deposition after photothrombosis of the common carotid artery in rats. Stroke. 1995;26:111-116.*
190. *Kurz KD, B.W M, and Sandusky GE. Rat model of arterial thrombosis induced by ferric chloride. Thrombosis Research. 1990;60:269-280.*
191. *Ishii H, Yoshida M, Hiraoka M, et al. Recombinant Annexin II modulates impaired fibrinolytic activity in vitro and in rat carotid artery. Circ Res. 2001;89:1240-1245.*
192. *Smyth S, Reis, E, Vaananen, H, et al. Variable protection of β 3-integrin-deficient mice from thrombosis initiated by different mechanisms. Blood. 2001;98:1005-1062.*
193. *Rebello S, Blank, H, Rote, W, et al. Antithrombotic efficacy of a recombinant nematode anticoagulant peptide (rNAP5) in canine models of thrombosis after single subcutaneous administration. JPET. 1997;183:91-99.*
194. *Lynch J, Cool J, Sitko G, et al. Non-peptide glycoprotein IIb/IIIa inhibitors. Antithrombotic effects of MK-0383. JPET. 1995;272:20-32.*
195. *Ragni M, Golino, P, Cirillo, P, et al. Endogenous tissue factor pathway inhibitor modulates thrombus formation in an in vivo model of rabbit carotid artery stenosis and endothelial injury. Circulation. 2000;102:113-117.*

196. Wong PC, Crain, E.J, Nguan, O, et al. Antithrombotic actions of selective inhibitors of blood coagulation factor Xa in rat model of thrombosis. *Thromb Res.* 1996;83:117-126.
197. Manesh R. Patel, M.D., Kenneth W. Mahaffey, M.D., Jyotsna Garg, M.S., Guohua Pan, Ph.D., Daniel E. Singer, M.D., Werner Hacke, M.D., Ph.D., Günter Breithardt, M.D., Jonathan L. Halperin, M.D., Graeme J. Hankey, M.D., Jonathan P. Piccini, M.D., Richard C. Becker, M.D., Christopher C. Nessel, M.D., John F. Paolini, M.D., Ph.D., Scott D. Berkowitz, M.D., Keith A.A. Fox, M.B., Ch.B., Robert M. Califf, M.D., and the ROCKET AF Steering Committee for the ROCKET AF Investigators August 10, 2011 (10.1056/NEJMoa1009638)
198. Could WB, Mclanahan TB, Welch KM, et al. Inhibitors of blood coagulation factor Xa and IIa synergize to reduce thrombus weight and thrombin generation in vivo and in vitro. *J Thromb Haemost.* 2006;4:834-841.
199. Wong PC, Quan, M.L, Crain, E.J, et al. Non-peptide factor Xa inhibitors I: Studies with SF303 and SK549, a new class of potent antithrombotics. *JPET.* 2000;292:351-357.
200. Ji H, Li SP, Cheng X, et al. Antithrombotic effects of low-molecular-weight heparin calcium (LMWH-Ca) in experimental models. *Gen Pharmacol* 1999;33:207-211.
201. Pruitt JR, Pinto, D. J, Estrella, M.J, et al. Isoxazolines and isoxazoles as factor Xa inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett.* 2000;10:685-689.
202. Biemond B, Pezborn E, Friedrich PW, et al. Prevention and treatment of experimental thrombosis in rabbits with rivaroxaban (BAY 597939) - an oral, direct factor Xa inhibitor. *Thromb Haemost.* 2007;97:471-477.

203. Golino P, Ragni M, Cirillo P, et al. Antithrombotic effects of recombinant human active site-blocked factor VIIa in a rabbit model of recurrent arterial thrombosis. *Circ Res.* 1998;82:39-46.
204. Chi L, Mertz TE, Rogers KL, et al. Antithrombotic effect of LB-30057 (CI-1028), a new synthetic thrombin inhibitor, in a rabbit model of thrombosis comparison with inogran. *J Thromb Thrombolysis.* 2001;11:19-31.
205. Bush LR, Mellott MJ, Kanovsky SM, et al. A model of femoral artery thrombolysis in dogs. *Fibrinolysis.* 1989;3:107- 114.
206. Ragni M, Cirillo, P, Pascucci, I, et al. Monoclonal antibody against tissue factor shortens Tissue Plasminogen activator lysis time and prevents reocclusion in a rabbit model carotid artery thrombosis. *Circulation.* 1996;93:1913-1918.
207. Shieh SJ, Chiu, H.Y, Shi, G.Y, et al,. A Novel Platelet-Rich Arterial Thrombosis Model in Rabbits Simple, Reproducible, and Dynamic Real-Time Measurement by Using Double-Opposing Inverted-Sutures Model. *Thromb Res.* 2001;103:363-376.
208. Hirsh J and Weitz J. New antithrombotic agents. *Lancet.* 1999;353:1431-1436.
209. Badimon L. Atherosclerosis and thrombosis: Lessons from animal models. *Thromb Haemost.* 2001;86:356-365.
210. Lyle EM, Lewis SD, Lehman ED, et al. Assessment of a thrombin inhibitor efficacy in a novel rabbit of simultaneous arterial and venous thrombosis. *Thromb Haemost.* 1998;79:656-662.
211. Berry CN, Lassalle G, Lunven C, et al. SSR182289A, a novel, orally active thrombin inhibitor: in vitro profile and ex vivo anticoagulant activity. *JPET.* 2002;303:1189-1198.
212. Wong PC, Crain, E.J, Watson, C.A, et al. Nonpeptide factor Xa inhibitors III: Effects of DPC423 an orally-active pyrazole

- antithrombotic agent, on arterial thrombosis in rabbits. JPET. 2002;303:993-1000.*
213. *Abendschein DR, Baum PK, Verhallen P, et al. A novel synthetic inhibitor of factor Xa decreases early reocclusion and improves 24-h patency after coronary fibrinolysis in dogs. JPET. 2001;296:576-572.*
214. *Kawasaki T, Sato K, Sakai Y, et al. Comparative studies of an orally- active factor Xa inhobitor YM60828, with other antithrombotic agrnts in a rat model of arterial thrombosis. Thormb Haemost. 1998;79:410-416.*
- 215 *Biemond BJ, Friedrich PW, Levi M, et al. Comparison of sustained antithrombotic effects of inhibitors of thrombin and factor Xa in experimental thrombosis. Circulation. 1996;93:153-160.*
216. *Finkle CD, St Pierre A, Leblond L, et al. BCH-2763, a novel potent parenteral thrombin inhibitor, is an effective antithrombotic agent in rodent models pf arterial and venous thrombosis - comparisons witm heparine, r-hirudin, hirulog, inogatran, and argatoban. Thromb Haemost. 1999;79:431-438.*
217. *Ohyama T, Hori, T, Moriike, M, et al. Anti-thrombotic effects of CX-397, recombinant hirudin analog in a canine model of coronary artery thrombosis. Thromb Haemost 1998;79:423-430.*
218. *Fattortutto M, Turreau-Pham S, Mazoyer E, et al. Recombinant activated factor VII decreases bleeding without increasing arterial thrombosis in rabbits. Can J Anesth. 2004;51:672-679.*
219. *Cirillo P, Golino P, Ragni M, et al. Long-lasting antithrombotic effects of a single dose of human recombinant, active side-blocked factor VII: insights into possible mechanism(s) of action. J Thromb Haemost. 2003;1:992-998.*

220. *Benedict CR, Canio J, Refino BS, et al. New variant of human tissue plasminogen activator (TPA) with enhanced efficacy and lower incidence of bleeding compared with recombinant human TPA. Circulation. 1995;92:3032-3040.*
221. *Martin DJ, Toce JA, Anevski PJ, et al. Anticoagulant and antithrombotic activity of Maltodapoh, a novel sulphated tetrasaccharide. JPET. 1999;288:516-521.*
222. *Caranobe CC, Saivin S, Houin G, et al. Pharmacokinetic and antithrombotic properties of two pentasaccharides with high affinity to antithrombin III in the rabbit: Comparison with CY216. Blood. 1994;84:2571-2577.*
223. *Feuerstein G, Patel A, Toomey JR, et al. Antithrombotic efficacy of a novel murine antihuman factor IX antibody in rats. Arterioscler Thromb. 1999;19:2554-2562.*
224. *Jacson CV, Bailey BD, and Shetler TJ. Pharmacological profile of recombinant, human activated protein C (LY203638) in a canine model of coronary artery thrombosis. JPET. 2000;295:967-971.*
225. *Gomi K, Zushi M, Honda G, et al. Antithrombotic effect of recombinant human thrombomodulin on thrombin-induced thromboembolism in mice. Blood. 1990;75:1396-1399.*
226. *Kontogiorgis C and Hadjipavlou-Litina D. Current trend in quantitative structure activity relationships on Fxa inhibitors: Evaluation and comparative analysis. Med Res Rev. 2004;24:687-747.*
227. *Stuart J. Connolly, M.D., Michael D. Ezekowitz, M.B., Ch.B., D.Phil., Salim Yusuf, F.R.C.P.C., D.Phil., John Eikelboom, M.D., Jonas Oldgren, M.D., Ph.D., Amit Parekh, M.D., Janice Pogue, M.Sc., Paul A. Reilly, Ph.D., Ellison Themeles, B.A., Jeanne Varrone, M.D., Susan Wang, Ph.D., Marco Alings, M.D., Ph.D., Denis Xavier, M.D., Jun Zhu, M.D., Rafael Diaz, M.D., Basil S. Lewis, M.D., Harald Darius, M.D., Hans-*

- Christoph Diener, M.D., Ph.D., Campbell D. Joyner, M.D., Lars Wallentin, M.D., Ph.D., and the RE-LY Steering Committee and Investigators N Engl J Med 2009; 361:1139-1151*
228. *Belougne E, Aguejof O, Doutremepuiche F, et al. Aspirin fails to prevent experimental arterial thrombosis induced by oxygen free radicals. Throb Res. 1996;84:207-212.*
229. *Zaman AG, Osende, J.I, Chesebro, J.H, et al. In vivo dynamic real-time monitoring and quantification of platelet-thrombus formation. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2000;20:860-865.*
230. *Wong PC, Crain, E.J, Watson, C.A, et al. Platelet aggregometry and receptor binding to predict the magnitude of antithrombotic and bleeding time effects of clopidogrel in rabbits. J Cardiovasc Pharmacol. 2007;49:316-324.*
231. *Scarborough RM, and Gretler, D.D. Platelet glycoprotein IIb-IIIa antagonists as prototypical integrin blockers: novel parenteral and potential oral antithrombotic agents. J. Med. Chem. 2000;43:3453 -3473.*
232. *Huang TF, Holt JC, Lukasiewicz H, et al. Trigramin. J Biol Chem. 1987;262:16157-16163.*
233. *Scarborough RM, Rose, J.W, Hsu, M.A, et al. Barbourin. A GPIIb-IIIa-specific integrin antagonist from the venom of *Sistrurus m. barbouri*. J. Biol. Chem. 1991;266:9359-9362.*
234. *Shebuski RJ, Stabilito, I.J, Sitko, G.R, et al. Acceleration of recombinant tissue-type plasminogen activator-induced thrombolysis and prevention of reocclusion by the combination of heparin and the Arg-Gly-Asp-containing peptide bitistatin in a canine model of coronary thrombosis. Circulation. 1990;82:169-177.*
235. *Deitch JS, Williams JK, Adams MR, et al. Effects of β 3-Integrin blockade (c7E3) on the response to angioplasty and*

- intra-arterial stenting in atherosclerotic nonhuman primates. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 1998;18:1730-1737.*
236. Rote WE, Nedelman, M.A, Mu, D.X, et al. Chimeric 7E3 prevents carotid artery thrombosis in cynomolgus monkeys. *Stroke. 1994;25:1223-1232.*
237. Nicholson NS, Panzer-Knodle SG, Salyers AK, et al. Antiplatelet and antithrombotic effects of platelet glycoprotein IIb/IIIa (GPIIb/IIIa) inhibition by arginine-glycine-aspartic acid-serine (RGDS) and arginine-glycine-aspartic acid (RGD) (O-me)Y (SC-46749). *JPET. 1991;256:876-882.*
238. Panzer-Knodle S, Taite, B.B, Mehrotra, D.V, et al. Species variation in the effect of glycoprotein IIb/IIIa antagonists on inhibition of platelet aggregation. *JPET. 1993;30:47-53.*
239. Hu DD, White, C.A, Panzer-Knodle, S, et al. A new model of dual interacting ligand binding sites on integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$. *J Biol Chem. 1999;274:4633-4639.*
240. Nichols AJ, Vasko JA, Koster PF, et al. The in vivo pharmacological profile of the novel glycoprotein IIb/IIIa antagonist, SK&F 106760. *JPET. 1994;270:614-621.*
241. Rebello SS, Driscoll, E.M, and Lucchesi, B.R. TP-9201, a glycoprotein IIb/IIIa platelet receptor antagonist, prevents rethrombosis after successful arterial thrombolysis in the dog. *Stroke. 1997;28:1789-1796.*
242. Yasuda T, Gold, H.K, Kohmura, C, et al. Intravenous and endobronchial administration of G4120, a cyclic Arg-Gly- Asp-containing platelet GPIIb/IIIa receptor-blocking pentapeptide, enhances and sustains coronary arterial thrombolysis with rt-PA in a canine preparation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol. 1993;13:738-747.*
243. Roux SP, Tschopp, T.B, Kuhn, H, et al. Effects of heparin, aspirin and a synthetic platelet glycoprotein IIb- IIIa receptor antagonist (Ro 43-5054) on coronary artery reperfusion and

- reocclusion after thrombolysis with tissue-type plasminogen activator in the dog. JPET. 1993;264:501-508.*
244. Scarborough RM. Development of Eptifibatide. *Am Heart J. 1999;138:1093-1104.*
245. Mousa SA, Bozarth JM, Forsythe MS, et al. Antiplatelet and antithrombotic efficacy of DMP 728, a novel platelet GPIIb/IIIa receptor antagonist. *Circulation. 1994;89:3-12.*
246. Szalony JA, Haas, N.F, Salyers, A.K, et al. Extended inhibition of platelet aggregation with the orally active platelet inhibitor SC-54684A. *Circulation. 1995;91:411-416.*
247. Cook JJ, Holahan, M.A, Lyle, E.A, et al. Nonpeptide glycoprotein IIb/IIIa inhibitors. 8. Antiplatelet activity and oral antithrombotic efficacy of L-734,217. *JPET. 1996;278:62-73.*
248. Ferguson JJ. Meeting Highlights. Highlights of the 48th Scientific Session of the American College of Cardiology. *Circulation. 1999;100:570-575.*
249. Newby LK. Long-term Oral Platelet Glycoprotein IIb/IIIa Receptor Antagonism with Sibrafiban After Acute Coronary Syndromes: Study Design of the Sibrafiban Versus Aspirin to Yield Maximum Protection from Ischemic Heart Events Post-acute Coronary Syndromes (SYMPHONY) Trial. *Am Heart J. 1999;138:210-218.*
250. Chew DP, Bhatt DL, and Topol EJ. Increased Mortality With Oral Glycoprotein IIb/IIIa Antagonists: A Pooled Analysis of the Large Scale Oral Glycoprotein IIb/IIIa Trials. *JACC.35 (Suppl. A):393A (Abstr. 881-4).*
251. White JG, Anatomy and structural organization of the platelet, in *Hemostasis and Thrombosis. Basic Principles and Clinical Practice. 2nd ed, RW Colman, Hirsh, J., Marder, V.J., Salzman, E.W., Editor. 1987, L.B. Lippincott: Philadelphia, PA. p. 537-544.*

252. Harfenist EJ, Packham, M.A, Mustard, J.F. Expression of fibrinogen on the surface of ADP-stimulated platelets: comparison of human and rabbit platelets. *Thromb Haemost.* 1988a;59:319-322.
253. Toor B, McGregor, J.L, McGregor, L, Clemetson, K.J. Comparison of the major membrane glycoproteins and proteins of human, rabbit and rat platelets. *Thromb Res.* 1982;26:317-328.
254. Harfenist EJ, Wrana JL, Packham MA, et al. Measurement of fibrinogen concentrations in suspensions of washed rabbit and human platelets by radioimmunoassays. *Thromb Haemost.* 1985;53:110-115.
255. Aarsman AJ, Leunissen-Bijvelt J, Van den Koedijk CDMA, et al. Phospholipase A2 activity in platelets. Immunopurification and localization of the enzyme in rat platelets. *J Lipid Mediators.* 1989;1:49-61.
256. Hwang DH, Species variation in platelet aggregation, in *The Platelets: Physiology and Pharmacology*, GL Longenecker, Editor. 1985, Academic Press: Orlando, FL. p. 289-305.
257. Packham MA, Rand, M.L, Kinlough-Rathbone, R.L. Similarities and differences between rabbit and human platelet characteristics and functions. *Comp Biochem Physiol.* 1992;103A:35-54.
258. Pfueller SL, Immunology of the platelet surface, in *Platelets membrane Glycoproteins*, JN George, Nurden, A.T., Phillips, D.R., Editor. 1985, Plenum Press: New York. p. 327-355.
259. Fridman WH. Fc receptors and immunoglobulin binding factors. *FASEB J.* 1991;5:2684-2690.
260. Nurden AT, Butcher, P.D, Hawkey, C.M. Comparative studies on the glycoprotein composition of mammalian platelets. *Comp Biochem Physiol.* 1977;56B:407-413.

261. Phillips D, and Agin, P. Platelet plasma membrane glycoproteins. Evidence for the presence of nonequivalent disulfide bonds using nonreduced-reduced two-dimensional gel electrophoresis. *J Biol Chem.* 1977;252:2121-2126.
262. ExPASy. <http://au.expasy.org/cgi-bin/niceprot.pl?Q9TUN4>. [cited].
263. ExPASy. <http://au.expasy.org/cgi-bin/niceprot.pl?Q9TUN3>. [cited].
264. Kouns WC, Wall CD, White MM, et al. A conformation-dependent epitope of human glycoprotein IIIa. *J Biol Chem.* 1990;265:20594-20601.
265. Kouns WC, Jennings, L.K. Activation-independent exposure of the GPIIbIIIa fibrinogen receptor. *Thromb Res.* 1991;63:343-354.
266. Kouns WC, Newman, P.J, Puckett, K.L, Miller, A.A, Wall, C.D, Fox, C.F, Seyer, J.M, Jennings, L.K. Further characterization of the loop structure of platelet glycoprotein IIIa: Partial mapping of functionally significant epitopes. *Blood.* 1991;78:3215-3223.
267. Frelinger III AL, Lam C-T, Plow EF, et al. Occupancy of an adhesive glycoprotein receptor modulates expression of an antigenic site involved in cell adhesion. *J Biol Chem.* 1988;263:12397-12402.
268. Frelinger III AL, Cohen, I, Plow, E.F, Smith, M.A, Roberts, J, Lam, C-T, Ginsberg, M.H. Selective inhibition of integrin function by antibodies specific for ligand-occupied receptor conformers. *J Biol Chem.* 1990;265:6346-6352.
269. Mustard JF, Packham MA, Kinlough-Rathbone RL, et al. Fibrinogen and ADP-induced platelet aggregation. *Blood.* 1978;52:453-466.

270. Plow EF, Ginsberg, M.H., *Cellular adhesion: GPIIbIIIa as a prototypic adhesion receptor*, in *Progress in Hemostasis and Thrombosis Vol. 9*, BS Coller, Editor. 1989, Grune and Stratton: New York. p. 117-156.
271. Gartner TK and Bennett JS. *The tetrapeptide analogue of the cell attachment site of fibronectin inhibits platelet aggregation and fibrinogen binding to activated platelets. J Biol Chem. 1985;260:891-894.*
272. Andrieux A, Hudry-Clergeon G, Ryckewaert J-J, et al. *Amino acid sequences in fibrinogen mediating its interaction with its platelet receptor, GPIIbIIIa. J Biol Chem. 1989;264:9258-9265.*
273. Plow EF, Srouji, A.H, Meyer, D, Marguerie, G, Ginsberg, M.H. *Evidence that three adhesive proteins interact with a common recognition site on activated platelets. J Biol Chem. 1984;259:5388-5391.*
274. Plow EF, Piersch, M.D, Ruoslanti, E, Marguerie, G.A, Ginsberg, M.H. *The effect of Arg-Gly-Asp-containing peptides on fibrinogen and von Willebrand factor binding to platelets. PNAS USA. 1985;82:8057-8061.*
275. Cook JJ, Huang T-F, Rucinski B, et al. *Inhibition of platelet hemostatic plug formation by trigramin, a novel RGD-peptide. Am J Physiol. 1989;256:H1038-H1043.*
276. Harfenist EJ, Packham, M.A, Mustard, J.F. *Effects of the cell adhesion peptide Arg-Gly-Asp-Ser, on responses of washed platelets from humans, rabbits and rats. Blood. 1988 b;71:132-136.*
277. Rand ML, Packham, M.A, Taylor, D.M, Yeo, E.L, Gemmell, C.H, Patil, S, Lam, S.C-T. *The fibrinogen gamma chain dodecapeptide inhibits agonist-induced aggregation of rabbit platelets and fibrinogen binding to rabbit glycoprotein IIb-IIIa. Thromb Haemost. 1999;82:1680-1686.*

278. Meyers KK, Holmsen H, and Seachord CL. Comparative study of platelet dense granule constituents. *Am J Physiol.* 1982;243:R454-R461.
279. Roswell HC, Mustard, J.F. Blood coagulation in some common laboratory animals. *Lab Anim Care.* 1963;13:752-762.
280. Gross PL, Rand ML, Barrow DV, et al. Platelet function in Watanabe heritable hyperlipidemic rabbits: decreased sensitivity to thromboxane A₂. *Arterioscl Thromb.* 1991;11:610-616.
281. Gross PL, Rand, M.L, Barrow, D.V, Packham, M.A. Platelet hypersensitivity in cholesterol-fed rabbits: enhancement of thromboxane A₂-dependent and thrombin-induced, thromboxane A₂-independent platelet responses. *Atherosclerosis.* 1991b;88:77-86.
282. Bessman D. Determination of platelet volume and number. *Methods Enzymol.* 1989;169A:164-172.
283. Wintrobe MM, *Clinical hematology.* 8th ed. 1981, Philadelphia, PA: Lea and Febiger.
284. Heaton WH, Heyns A, and Joist JH. Measurement of in vivo platelet turnover and organ distribution using ¹¹¹In-labeled platelets. *Methods Enzymol.* 1989;169A:172-187.
285. Harker LA, *Platelet survival time: its measurement and use, in Progress in Hemostasis and Thrombosis Vol. 4, TH Spaet, Editor.* 1978, Grune and Stratton: New York. p. 321-347.
286. Weidinger F, Glogar, D, Sochor, H, Sinzinger, H. Platelet survival in patients with dilated cardiomyopathy. *Thromb Haemost.* 1991;66:400-405.
227. Mills DCB. Platelet aggregation and platelet nucleotide concentration in different species. *Symp Zool Soc Lond.* 1970;27:99-107.

288. Meyers KM, *Species differences, in Platelet responses and Metabolism Vol. I Responses, H Holmsen, Weiss, H.J., Editor. 1986, CRC Press: Boca Raton, FL. p. 209-234.*
289. Ardlie NG, Packham MA, and Mustard JF. *Adenosine diphosphate-induced platelet aggregation in suspensions of washed rabbit platelets. Br.J.Haematol. 1970;79:7-17.*
290. Reimers H-J, Packham, M.A, Kinlough-Rathbone, R.L, Mustard, J.F. *Effect of repeated treatment of rabbit platelets with low concentrations of thrombin on their function, metabolism and survival. Br.J.Haematol. 1973;25:675-689.*
291. Jennings LK, White MM, and Mandrel TD. *Interspecies comparison of platelet aggregation, LIBS expression and clot retraction: observed differences in GPIIbIIIa functional activity Thromb Haemost. 1996;74:1551-1556*
292. Panchenko MP, Saxena, K, Li, Y, Charnecki, S, Sternweis, P.M
293. Gilman, A.G, K257. Rand ML, Packham, M.A, Taylor, D.M, Yeo, E.L, Gemmell, C.H, Patil, S, Lam, S.C-T. *The fibrinogengamma chain dodecapeptide inhibits agonist-induced aggregation of rabbit platelets and fibrinogen binding to rabbit glycoprotein IIb-IIIa. Thromb Haemost. 1999;82:1680-1686.*
294. RxList. <http://www.rxlist.com/integrilin-drug.htm>
295. Stavrakoudis A *three-residue cyclic scaffold of non-RGD containing peptide analogues as platelet aggregation inhibitors: Design, synthesis, and structure-function relationships Biopolymers, Vol. 56, 20-26 (2001)*
296. Hoffmann P, Bernat A, Savi P, et al. *Prevention of thrombosis and enhancement of thrombolysis in rabbits by SR 121787, a glycoprotein II/III antagonist. JPET.*

297. *Belougne E, Aguejof O, Doutremepuiche F, et al. Aspirin failsto prevent experimental arterial thrombosis induced by oxygenfree radicals. Throb Res. 1996;84:207-21298;286:670-675.*
298. *Wong PC, Crain, E.J, Watson, C.A, et al. Platelet aggregometry and receptor binding to predict the magnitude of antithrombotic and bleeding time effects of clopidogrel in rabbits. J CardiovascPharmacol. 2007;49:316-324.*
299. *Hong TT, Driscoll EM, White A, et al. Glycoprotein IIb/IIIa receptor antagonist (2S)-2- [(2-Naphthyl-sulfonyl)amino]-3- [[2-([4-(4-piperidiny)-2-[2-(4-piperidiny)ethyl] butanoyl]amino)acetyl]amino]propanoic acid dihydrochloride (CRL42796), in combination with aspirin and/or enoxaparin, prevents coronary artery rethrombosis after successfulthrombolytic treatment by recombinant tissue plasminogen activator. JPET. 2003;306:616-623.*
300. *Gowda RM, Khan IA, Vasavada BC, et al. Therapeutics of platelet glycoprotein IIb/IIIa receptor anatagonism. Am JTherap. 2004;11:302-307.*
301. *Lincoff MA, Califf RM, and Topol EJ. Platelet glycoprotein IIb/IIIa receptor blockade in coronary artery disease. JACC. 2000;35:1103-1115.*
302. *Roussa Vassiliki D. Stathopoulou Eleni M.; Papamichael, Nikolaos D. Englezopoulos, Constantinos V. Rousouli, Kleopatra I. Trypou, Paraskevi; Moussis, Vassilios Tellis, Constantinos C. Katsouras, Christos S. Tsikaris, Vassilios Tselepis, Alexandros D. Michalis, Lampros K. A highly constrained cyclic (S,S)-CDC-peptide is a potent inhibitor of carotid artery thrombosis in rabbits Volume 22, Number 5, August 2011, pp. 361-370(10)*

