



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ  
ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ**

**ΤΟΜΕΑΣ ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΟΣ  
ΚΑΡΔΙΟΛΟΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ**

**ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΧΟΡΗΓΗΣΗΣ  
ΑΝΤΙΑΙΜΟΠΕΤΑΛΙΑΚΩΝ ΦΑΡΜΑΚΩΝ ΣΤΗ  
ΘΡΟΜΒΩΣΗ ΚΑΙ ΤΗ ΦΛΕΓΜΟΝΗ ΣΕ ΑΣΘΕΝΕΙΣ  
ΜΕ ΟΞΥ ΣΤΕΦΑΝΙΑΙΟ ΣΥΝΔΡΟΜΟ**

**ΚΑΛΛΙΡΡΟΗ Ι. ΚΑΛΑΝΤΖΗ  
ΙΑΤΡΟΣ**

**ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ**

**ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2012**



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





**Ημερομηνία αίτησης της κ Καλαντζή Καλλιρρόης: 11-11-2004**

**Ημερομηνία ορισμού Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής: 551<sup>α</sup>/29-3-2005**

**Μέλη Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής:**

Επιβλέπων

Γουδέβενος Ιωάννης Αναπληρωτής Καθηγητής Παθολογίας –Καρδιολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Μέλη

Ελισάφ Μουσής Καθηγητής Παθολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Τσελέπης Αλέξανδρος Αναπληρωτής Καθηγητής Βιοχημείας Τμήματος Χημείας Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

**Ημερομηνία ορισμού θέματος: 4-4-2005**

*«Επίδραση της χορήγησης αντιαιμοπεταλιακών φαρμάκων στη θρόμβωση και τη φλεγμονή σε ασθενείς με οξύ στεφανιαίο σύνδρομο»*

**ΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΕΠΤΑΜΕΛΟΥΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ : 725<sup>α</sup>/6-12-2011**

<b>Αλεξόπουλος Δημήτριος</b>	Καθηγητής Καρδιολογίας, Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Πατρών
<b>Γουδέβενος Ιωάννης</b>	Καθηγητής Παθολογίας –Καρδιολογίας, Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
<b>Ελισάφ Μουσής</b>	Καθηγητής Παθολογίας, Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
<b>Λάμπρος Μιχάλης</b>	Καθηγητής Καρδιολογίας, Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
<b>Τσελέπης Αλέξανδρος</b>	Καθηγητής Βιοχημείας, Τμήματος Χημείας Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
<b>Ματσάγκας Μιλτιάδης</b>	Αναπληρωτής Καθηγητής Αγγειοχειρουργικής, Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
<b>Κοραντζόπουλος Παναγιώτης</b>	Λέκτορας Καρδιολογίας, Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Έγκριση Διδακτορικής Διατριβής με βαθμό «ΑΡΙΣΤΑ» στις 22-11-2011

**ΠΡΟΕΔΡΟΣ ΤΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΣΧΟΛΗΣ**

**Μαργαρίτα Τζαφλίδου**

Καθηγήτρια Ιατρικής Φυσικής

Η Γραμματέας της Σχολής  
  
**ΜΑΡΙΑ ΚΑΠΙΤΟΠΟΥΛΟΥ**





**ΣΤΟΥΣ ΓΟΝΕΙΣ ΜΟΥ**



**ΣΤΟ ΣΥΖΥΓΟ ΜΟΥ**

**ΠΕΤΡΟ**



## ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα διατριβή εκπονήθηκε στην Καρδιολογική Κλινική του ΠΠΝ Ιωαννίνων και στο Εργαστήριο Βιοχημείας του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων από τον Απρίλιο του 2005 έως το Δεκέμβριο του 2011.

Θα ήθελα να εκφράσω μαζί με το σεβασμό, τις ειλικρινείς μου ευχαριστίες στους καθηγητές μου κ. Ιωάννη Γουδέβενο και κ. Αλέξανδρο Τσελέπη για την πολύτιμη συμβολή τους στην ευόδωση της προσπάθειάς μου να εκπονήσω την παρούσα διδακτορική διατριβή. Η επιστημονική καθοδήγησή τους αποτέλεσε το βασικό μου σύμμαχο σε αυτό το μικρό επιστημονικό μου εγχείρημα. Η ηθική δε συμπαράστασή τους καθόλη τη διάρκεια της προσπάθειάς μου με γέμισε δύναμη και με όπλισε με υπομονή και επιμονή προκειμένου να υπερβώ τις όποιες δυσκολίες.

Επίσης, αισθάνομαι την ανάγκη να ευχαριστήσω θερμά τον καθηγητή κ. Μωυσή Ελισάφ για τη σημαντική βοήθειά του καθώς και όλους, όσοι, από τη θέση του ο καθένας, συνέβαλαν παντοιοτρόπως στην προσπάθεια να ολοκληρώσω τη διδακτορική διατριβή μου.

Γνωρίζω ότι η επιτυχία πονημάτων, όπως το παρόν, εξαρτάται από την επιτυχία των στόχων που θέτουν. Δεν είμαι εγώ, βεβαίως, αυτή που θα κρίνει αν η εκπόνηση της παρούσας διδακτορικής διατριβής πέτυχε τους στόχους που απαρχής έθεσε. Έχω, όμως ισχυρή την πεποίθηση ότι προσπάθησα για το βέλτιστο και η εμπειρία μου αυτή προσέδωσε στην επαγγελματική μου ζωή, και όχι μόνο, νέο ενδιαφέρον.





# ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

<b>ΠΡΟΛΟΓΟΣ</b>	<b>xiii</b>
<b>ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ</b>	<b>xv</b>
<b>ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ</b>	<b>xix</b>
<b><u>ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ</u></b>	
<b>1. ΑΙΜΟΠΕΤΑΛΙΑ</b>	<b>3</b>
1.1 Γενικά	3
1.2. Ο ρόλος των αιμοπεταλίων στα καρδιαγγειακά νοσήματα	6
1.2.1. Ο ρόλος των αιμοπεταλίων στη θρόμβωση	7
1.2.1.1. Μονοπάτια ενεργοποίησης αιμοπεταλίων	9
1.2.1.2. Αλληλεπίδραση μεταξύ αιμοπεταλίων και του καταρράκτη της πήξης	12
1.2.2. Ρόλος των αιμοπεταλίων στη δημιουργία της αθηρωματικής πλάκας	13
1.2.3. Φλεγμονώδης απόκριση που επάγεται από τα αιμοπετάλια	14
1.2.3.1. Αλληλεπίδραση των αιμοπεταλίων με τα ενδοθηλιακά κύτταρα	16
1.2.3.2. Αλληλεπίδραση των αιμοπεταλίων με τα λευκοκύτταρα	18
<b>2. ΜΙΚΡΟΣΩΜΑΤΙΔΙΑ ΤΩΝ ΑΙΜΟΠΕΤΑΛΙΩΝ (PMPs)</b>	<b>23</b>
2.1. Ορισμός, γενικά χαρακτηριστικά και σύσταση	23
2.2. Μηχανισμός παραγωγής των μικροσωματιδίων	24
2.3. Ο ρόλος των PMPs στην αθηροθρόμβωση	26
2.3.1. Ο ρόλος των PMPs στην πήξη	26
2.3.2. Ο ρόλος των PMPs στη φλεγμονή	27
2.3.3. Ο ρόλος των PMPs στην αγγειογένεση	28
2.4. Ο ρόλος των PMPs στην καρδιαγγειακή νόσο	29
<b>3. ΦΛΕΓΜΟΝΩΔΕΙΣ ΔΕΙΚΤΕΣ ΣΤΗΝ ΚΑΡΔΙΑΓΓΕΙΑΚΗ ΝΟΣΟ</b>	<b>31</b>
<b>4. ΑΝΤΙΑΙΜΟΠΕΤΑΛΙΑΚΑ ΦΑΡΜΑΚΑ</b>	<b>35</b>
4.1 Γενικά	35

4.2 Αντιαιμοπεταλιακά φάρμακα που χρησιμοποιούνται σήμερα στην κλινική πράξη και μηχανισμοί δράσης τους	37
4.2.1 Ασπιρίνη	37
4.2.2. Τριφλουζάλη	39
4.2.3. Ανταγωνιστές του υποδοχέα P2Y <sub>12</sub> του ADP	39
4.2.3.1. Κλοπιδογρέλη	40
4.2.3.2. Πρασουγρέλη	43
4.2.3.3. Τικαγρελόρη	44
4.2.3.4. Καγκρελόρη	45
4.2.3.5. Ελινογρέλη	46
4.2.4. Διπυριδαμόλη	46
4.2.5. Αναστολείς του υποδοχέα GP IIb/IIIa	47
<b>5. ΑΝΤΙΣΤΑΣΗ ΣΤΗΝ ΑΝΤΙΑΙΜΟΠΕΤΑΛΙΑΚΗ ΘΕΡΑΠΕΙΑ</b>	<b>49</b>
5.1 Γενικά	49
5.2. Εργαστηριακές μέθοδοι διάγνωσης της αντίστασης στην αντιαιμοπεταλιακή αγωγή	51
5.2.1. Προσδιορισμός των μεταβολιτών του αραχιδονικού οξέος	51
5.2.2. Προσδιορισμός των επιπέδων των μεταβολιτών της κλοπιδογρέλης	51
5.2.3. Φωσφορυλίωση της φωσφοπρωτεΐνης VASP (vasodilator stimulated phosphoprotein)	52
5.2.4. Συσσωρευομετρία οπτικής διαπερατότητας (Light transmittance aggregometry, LTA)	52
5.2.5. Συσσωρευομετρία εμπέδησης (Impedence Aggregometry)	53
5.2.6. Κυτταρομετρία ροής (Flow Cytometry)	53
5.2.7. VerifyNow <sup>®</sup> (Acumetrics)	54
5.2.8. Σύστημα ανάλυσης της αιμοπεταλιακής λειτουργικότητας (Platelet function analysis system, PFA-100 <sup>®</sup> )	54
5.2.9. Φαρμακογενετικές Μέθοδοι	55
5.3. Αντίσταση στην κλοπιδογρέλη	55
5.3.1. Εργαστηριακές μέθοδοι διάγνωσης της αντίστασης στην κλοπιδογρέλη	56

5.3.2. Εργαστηριακά κριτήρια ορισμού της αντίστασης στην κλοπιδογρέλη	56
5.3.3. Μηχανισμοί αντίστασης στην κλοπιδογρέλη	57
5.3.3.1. Γενετικοί πολυμορφισμοί	57
5.3.3.2. Αλληλεπιδράσεις φαρμάκων	58
5.3.4. Κλινική σημασία της in vitro κακής απόκρισης στην κλοπιδογρέλη	59
5.3.5. Διαχείριση ασθενών με κακή απόκριση στην κλοπιδογρέλη	60
5.3.5.1. Προσαρμογή δόσης κλοπιδογρέλης	60
5.3.5.2. Πρασουγρέλη	62
5.3.5.3. Νέα φάρμακα	63
<b>6. ΚΛΟΠΙΔΟΓΡΕΛΗ ΚΑΙ ΚΑΡΔΙΑΓΓΕΙΑΚΗ ΝΟΣΟΣ</b>	<b>67</b>
6.1 Η κλοπιδογρέλη στα ΟΣΣ- διαδερμική αγγειοπλαστική	67
6.1.1 Προφόρτιση με κλοπιδογρέλη	72
6.1.2. Σύγκριση κλοπιδογρέλης με νεότερα αντιαιμοπεταλιακά φάρμακα	74
6.2. Σταθερή καρδιαγγειακή νόσος –δευτερογενής πρόληψη	77
6.3. Αγγειακή εγκεφαλική νόσος	79
6.4. Διαφορετικές δόσεις κλοπιδογρέλης-εξατομικευμένη θεραπεία	81
<b>7. ΤΟ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑ ΤΗΣ ΑΝΤΙΑΙΜΟΠΕΤΑΛΙΑΚΗΣ ΘΕΡΑΠΕΙΑΣ ΣΤΗ ΦΛΕΓΜΟΝΩΔΗ ΑΠΟΚΡΙΣΗ ΠΟΥ ΕΠΑΓΕΤΑΙ ΑΠΟ ΤΑ ΑΙΜΟΠΕΤΑΛΙΑ</b>	<b>83</b>
7.1. Ασπιρίνη	83
7.2. Θειενοπυριδίνες	83
7.3. Συνδυασμός θεραπείας	84
7.4. Ανταγωνιστές του υποδοχέα GPIIb/IIIa	85
<b>8. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ</b>	<b>89</b>
<b>9. ΥΛΙΚΟ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ</b>	<b>93</b>
9.1 Πληθυσμός μελέτης	93
9.2 Πειραματική διαδικασία	95
9.2.1 Προετοιμασία των δειγμάτων	95
9.2.2.Αναλύσεις βιοχημικών παραμέτρων	95

9.2.3. Μελέτη της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων με τη μέθοδο μετάδοσης φωτός (LTA: Light Transmission Aggregometry)	96
9.2.4. Μελέτη της μεμβρανικής έκφρασης της P-σελεκτίνης με κυτταρομετρία ροής (Flow cytometry)	100
9.2.5. Μελέτη της αλληλεπίδρασης των αιμοπεταλίων με τα μονοκύτταρα και τα ουδετερόφιλα με κυτταρομετρία ροής (Flow Cytometry)	104
9.2.6. Μελέτη της παραγωγής των PMPs και της έκφρασης του CD40L με κυτταρομετρία ροής (Flow cytometry)	107
9.2.7. Μελέτη της απόκρισης στην αντιαιμοπεταλιακή αγωγή (αντίσταση) με το VASP test	108
9.3. Στατιστική ανάλυση	110
<b>10. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ</b>	<b>111</b>
10.1 Χαρακτηριστικά του πληθυσμού της μελέτης	111
10.2 Απόκριση στην κλοπιδογρέλη	113
10.3 Μελέτη της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων	115
10.4 Μεμβρανική έκφραση του CD40L και της P-σελεκτίνης και παραγωγή των PMPs	118
10.5. Αλληλεπίδραση αιμοπεταλίων-λευκών αιμοσφαιρίων	124
10.6 Απόκριση στην κλοπιδογρέλη	130
10.7 Μελέτη της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων	132
10.8 Έκφραση P-σελεκτίνης και αλληλεπίδραση αιμοπεταλίων-λευκών αιμοσφαιρίων	134
<b>11. ΣΥΖΗΤΗΣΗ</b>	<b>137</b>
<b>12. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ</b>	<b>143</b>
<b>ΠΕΡΙΛΗΨΗ</b>	<b>145</b>
<b>SUMMARY</b>	<b>149</b>
<b>ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ</b>	<b>153</b>
<b>ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ</b>	<b>177</b>

## ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ

<b>AA</b>	Αραχιδονικό οξύ
<b>ABCA1</b>	Μεμβρανικός μεταφορέας A1
<b>ABCGs</b>	Μεμβρανικοί μεταφορείς G
<b>AC</b>	Αδενυλοκυκλάση
<b>AcLDL</b>	Ακετυλιωμένη LDL
<b>ADP</b>	Διφωσφορική αδενοσίνη
<b>AEE</b>	Αγγειακό Εγκεφαλικό Επεισόδιο
<b>APC</b>	Ενεργοποιημένη πρωτεΐνη C
<b>Arg, R</b>	Αργινίνη
<b>ATP</b>	Τριφωσφορική αδενοσίνη
<b>BSA</b>	Αλβουμίνη από ορό βοδιού
<b>[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub></b>	Συγκέντρωση του ενδοκυττάριου ασβεστίου
<b>cAMP</b>	Κυκλικό 3'5'-αδενοσινο-μονοφωσφορικό οξύ
<b>CD62P</b>	P-σελεκτίνη
<b>CD41a</b>	α <sub>IIb</sub> υπομονάδα του υποδοχέα α <sub>IIb</sub> β <sub>3</sub>
<b>CD61</b>	β <sub>3</sub> υπομονάδα του υποδοχέα α <sub>IIb</sub> β <sub>3</sub>
<b>CD36</b>	Υποδοχέας εκκαθαριστής
<b>CD54</b>	Μόριο της διακυτταρικής προσκόλλησης-1
<b>CD106</b>	Προσκολλητικό μόριο του αγγειακού τοιχώματος-1
<b>CD31</b>	Προσκολλητικό μόριο των αιμοπεταλίων και των ενδοθηλιακών κυττάρων
<b>CD40L</b>	Προσδέτης του CD40
<b>COX-1</b>	Κυκλοξυγονάση-1

<b>COX-2</b>	Κυκλοξυγονάσης-2
<b>Cu<sup>2+</sup></b>	Χαλκός
<b>Cys</b>	Κυστεΐνη
<b>DTNB</b>	5,5-διθεο-δισ-2-νιτροβενζοϊκό οξύ
<b>DTS</b>	Πυκνό σωληνοειδές σύστημα
<b>ECGS</b>	Αυξητικό συμπλήρωμα των ενδοθηλιακών κυττάρων
<b>EDG-1</b>	Γονίδιο διαφοροποίησης-1 των ενδοθηλιακών κυττάρων
<b>EDTA</b>	Αιθυλενοδιαμινοτετραοξικό οξύ
<b>EGF</b>	Ο επιδερμικός αυξητικός παράγοντας
<b>EE</b>	Ειδική Ενεργότητα
<b>EC</b>	Ενδοθηλιακά κύτταρα
<b>ELISA</b>	Ενζυμοσύνδετη ανοσοπροσοφητική τεχνική
<b>EMPs</b>	Μικροσωματίδια των ενδοθηλιακών κυττάρων
<b>EPCs</b>	Ενδοθηλιακά πρόδρομα κύτταρα
<b>ESI</b>	Ιονισμός μέσω ψεκασμού ηλεκτρονίων
<b>FC</b>	Κυτταρομετρία ροής
<b>Fg</b>	Ινωδογόνο
<b>FITC</b>	Fluorescein Isothiocyanate
<b>FnBPs</b>	Πρωτεΐνες συνδεδεμένες με την φιβρονεκτίνη
<b>FSC</b>	Πλάγια σκέδαση
<b>G-πρωτεΐνη</b>	Πρωτεΐνη που συνδέεται με νουκλεοτίδιο γουανίνης
<b>GDP</b>	Διφωσφορική γουανοσίνη
<b>Glu</b>	Γλουταμίνη
<b>GP</b>	Γλυκοπρωτεΐνες
<b>GTP</b>	Τριφωσφορική γουανοσίνη
<b>HDL</b>	Υψηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνης

<b>His</b>	Ιστιδίνη
<b>HOCl</b>	Υποχλωριώδες οξύ
<b>NaOCl</b>	Υποχλωριώδες νάτριο
<b>ICAM-1</b>	Μόριο της διακυτταρικής προσκόλλησης-1
<b>IFN-γ</b>	Ιντερφερόνη-γ
<b>IL-1</b>	Ιντερλευκίνη-1
<b>IL-10</b>	Ιντερλευκίνη-10
<b>IL-1β</b>	Ιντερλευκίνη-1β
<b>IL-6</b>	Ιντερλευκίνη-6
<b>IL-8</b>	Ιντερλευκίνη-8
<b>KDa</b>	κίλοDalton-μονάδα μοριακής μάζας x 10 <sup>3</sup>
<b>LDL</b>	Χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνη
<b>LFA-1</b>	Σχετιζόμενο με τη λειτουργία αντιγόνο-1 των λεμφοκυττάρων
<b>LIBS</b>	Περιοχές πρόσδεσης επαγόμενες από τον προσδέτη
<b>Lys</b>	Λυσίνη
<b>Lyso-PC</b>	Λυσοφωσφατιδυλοχολίνη
<b>MCP-1</b>	Χημειοτακτική πρωτεΐνη-1 των μονοκυττάρων
<b>MFI</b>	Μέση ένταση φθορισμού
<b>MLCK</b>	Κινάση της ελαφριάς αλυσίδας της μυοσίνης
<b>MMPs</b>	Μονοκυτταρικά μικροσωματίδια
<b>MPO</b>	Μυελοϋπεροξειδάση
<b>MPs</b>	Κυτταρικά μικροσωματίδια
<b>mRNA</b>	Αγγελιοφόρο ριβονουκλεϊκό οξύ
<b>NF-κB</b>	Πυρηνικός παράγοντας-κB
<b>NO</b>	Μονοξείδιο του αζώτου
<b>NO<sub>2</sub></b>	Διοξείδιο του αζώτου

<b>NOO<sup>-</sup></b>	Υπεροξυνιτρικό ανιόν
<b>O<sup>•</sup></b>	Ρίζες οξυγόνου
<b>O<sub>2</sub></b>	Οξυγόνο
<b>OEM</b>	Οξύ Έμφραγμα του Μυοκαρδίου
<b>ΟΣΣ</b>	Οξύ στεφανιαίο σύνδρομο
<b>oxLDL</b>	Οξειδωμένη LDL
<b>QPCR</b>	Ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης
<b>ΠΑΑΝ</b>	Περιφερική Αρτηριακή Νόσος
<b>ΡΑΑΡ</b>	Πρωτεΐνη σχετιζόμενη με την αιμοπεταλιακή συσσώρευση
<b>ΡΑΡ</b>	Παράγοντας ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων
<b>PAGE</b>	Πολυακρυλαμίδιο
<b>ΡΑΙ-1</b>	Αναστολέας του ενεργοποιητή του πλασμινογόνου
<b>ΡΑΡs</b>	Ενεργοποιημένοι υποδοχείς των πρωτεασών
<b>PBS</b>	Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών
<b>ΡC</b>	Φωσφατιδυλοχολίνη
<b>ΡCΙ</b>	Διαδερμική στεφανιαία αγγειοπλαστική
<b>ΡCΡ</b>	Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης
<b>ΡDGF</b>	Ο αυξητικός παράγοντας των αιμοπεταλίων
<b>ΡΕ</b>	Φωσφατιδυλοαιθανολαμίνη
<b>ΡΕCΑΜ-1</b>	Προσκολλητικό μόριο των αιμοπεταλίων και των ενδοθηλιακών κύτταρων
<b>ΡF4</b>	Αιμοπεταλιακός παράγοντας 4
<b>ΡGE<sub>2</sub></b>	Προσταγλανδίνη E <sub>2</sub>
<b>ΡGI<sub>2</sub></b>	Προσταγλαδίνη I <sub>2</sub>
<b>ΡI</b>	Φωσφατιδυλοϊνοσιτόλη
<b>ΡIP<sub>2</sub></b>	4,5-δισφωφορική-φωσφατιδυλοϊνοσιτόλη



<b>PKC</b>	Πρωτεϊνοκινάση C
<b>PL</b>	Φωσφολιπίδια
<b>PLA<sub>1</sub></b>	Φωσφολιπάση A <sub>1</sub>
<b>PLA<sub>2</sub></b>	Φωσφολιπάση A <sub>2</sub>
<b>PLC</b>	Φωσφολιπάση C
<b>PLSCR</b>	Αναδιοργανώση των φωσφολιπιδίων
<b>PMPs</b>	Μικροσωματίδια των αιμοπεταλίων
<b>PPAR</b>	Υποδοχέας πολλαπλασιαστής- ενεργοποιητής υπεροξυσώματος
<b>PPP</b>	Πλάσμα φτωχό σε αιμοπετάλια
<b>PRI</b>	Δείκτης αιμοπεταλιακής ενεργότητας
<b>Pro (P)</b>	Προλίνη
<b>PRP</b>	Πλάσμα πλούσιο σε αιμοπετάλια
<b>PS</b>	Φωσφατιδυλοσερίνη
<b>PSGL-1</b>	Ο γλυκοπρωτεϊνικός προσδέτης της P-σελεκτίνης
<b>PTK</b>	Πρωτεϊνοκινάση της τυροσίνης
<b>REM</b>	Σχετικής ηλεκτροφορητική κινητικότητα
<b>RT</b>	Αντίστροφη μεταγραφή
<b>RT-PCR</b>	Πραγματικού χρόνου αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης
<b>ΣΝ</b>	Στεφανιαία νόσος
<b>SDS</b>	Δωδεκυλοθειικό νάτριο
<b>Ser, S</b>	Σερίνη
<b>SM</b>	Σφιγγομυελίνη
<b>SMC</b>	Λεία μυϊκά κύτταρα
<b>-sn-</b>	Στερεοειδική αρίθμηση
<b>SOCE</b>	Σύστημα μεταφοράς Ca <sup>2+</sup>
<b>SPP-1</b>	Φωσφορική σφιγγοσίνη-1

<b>SR-BI</b>	Υποδοχέας εκκαθαριστής Β τύπου Ι
<b>SSC</b>	Πρόσθια σκέδαση
<b>TEΠ</b>	Τμήμα επειγόντων περιστατικών
<b>TCA</b>	Τριγλωροξικό οξύ
<b>TF</b>	Ιστικός παράγοντας
<b>TG</b>	Τριγλυκερίδια
<b>TGF-β</b>	Ο μετασχηματίζων αυξητικός παράγοντας-β
<b>TNF-α</b>	Παράγοντας νέκρωσης των όγκων-α
<b>Tpa</b>	Ιστικός ενεργοποιητής του πλασμινογόνου
<b>TRAP</b>	Πεπτίδιο ενεργοποίησης του υποδοχέα της θρομβίνης
<b>TS</b>	Συνθάση του θρομβοξαίνιου
<b>Tyr (Y)</b>	Τυροσίνη
<b>TxA<sub>2</sub></b>	Θρομβοξάνιο A <sub>2</sub>
<b>VCAM-1</b>	Προσκολλητικό μόριο του αγγειακού τοιχώματος-1
<b>VEGF</b>	Αυξητικός παράγοντας των ενδοθηλιακών κυττάρων του αγγείου
<b>vWF</b>	Παράγοντας von Willebrand
<b>X<sup>•</sup></b>	Ελεύθερη ρίζα

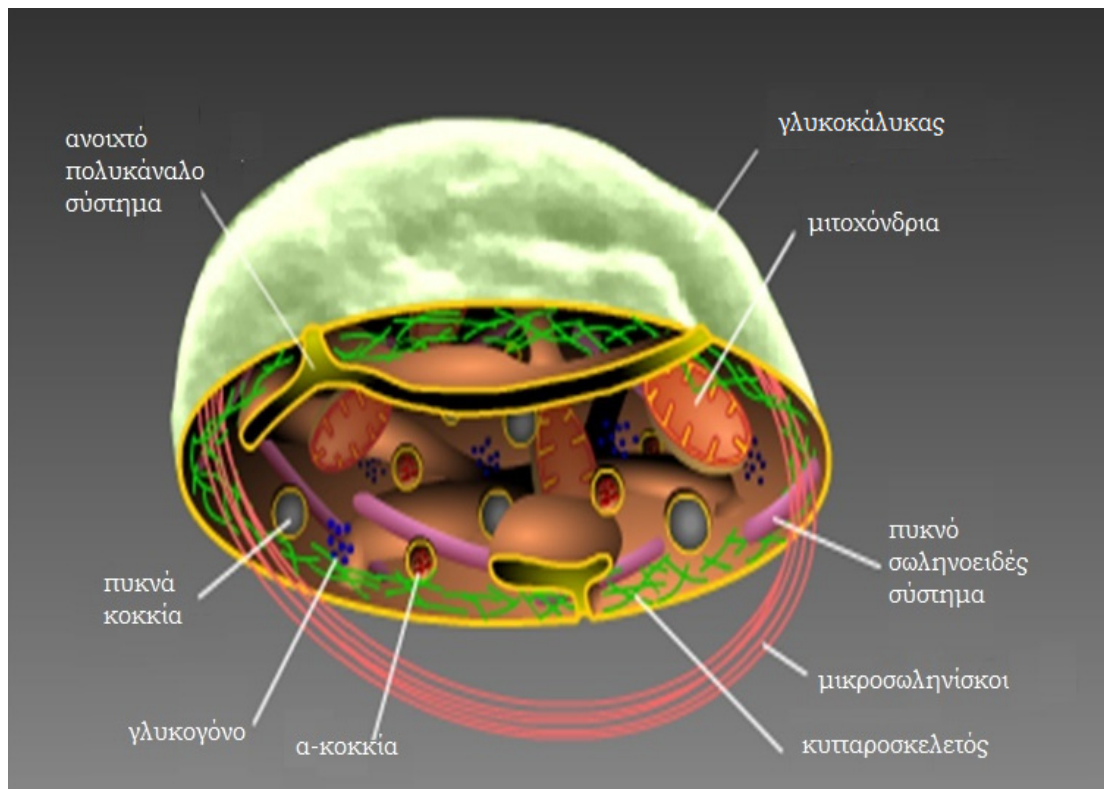
## **ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**



# 1. ΑΙΜΟΠΕΤΑΛΙΑ

## 1.1. Γενικά

Τα αιμοπετάλια είναι τα μικρότερα κύτταρα του αίματος και αποτελούν το 0.5% του όγκου αυτού. Παράγονται στο μυελό των οστών από το θρυμματισμό του κυτταροπλάσματος των μεγακαρυοκυττάρων και γι' αυτό το λόγο είναι απύρρηνα κύτταρα. Εκτός από πυρήνα, τα αιμοπετάλια δεν έχουν συσκευή Golgi, ενώ έχουν υπολείμματα του πυκνού ενδοπλασματικού δικτύου. Υπό φυσιολογικές συνθήκες, κάθε μεγακαρυοκύτταρο δίνει  $2 \times 10^{11}$  αιμοπετάλια καθημερινά. Τα αιμοπετάλια έχουν διάμετρο περίπου 2-5  $\mu\text{m}$ , κυτταρικό όγκο 10 fl και ο αριθμός τους κυμαίνεται από 150-450.000/ $\text{mm}^3$ <sup>1</sup>. Έχουν χρόνο ζωής στο αίμα 7-10 ημέρες και στη συνέχεια φαγοκυτταρώνονται και καταστρέφονται στα μακροφάγα του ήπατος και του σπλήνα. Παρόλο που είναι απύρρηνα κύτταρα περιέχουν αρκετά υποκυτταρικά οργανίδια, όπως είναι τα μιτοχόνδρια, τα ριβοσώματα, το mRNA διαφόρων πρωτεϊνών, ο κυτταροσκελετός, καθώς επίσης και πολλά κοκκία που χρησιμεύουν στη λειτουργία του αιμοπεταλίου και τη διατήρηση της φυσιολογικής αιμόστασης. Επίσης, τα αιμοπετάλια στο εσωτερικό τους περιέχουν ένα πολύπλοκο μεμβρανικό σωληνοειδές σύστημα το οποίο συνδέεται με την κυτταρική μεμβράνη<sup>2,3</sup>. Η δομή του αιμοπεταλίου μπορεί να διαχωριστεί σε τέσσερις μορφολογικά διακριτές περιοχές: α) την περιφερική ζώνη, β) τη δομική ζώνη, γ) τη ζώνη των οργανιδίων και δ) τη ζώνη του μεμβρανικού συστήματος<sup>4,5</sup> (Εικόνα 1).



**Εικόνα 1.** Το δισκοειδές σχήμα του αιμοπεταλίου και τα διάφορα συστατικά του

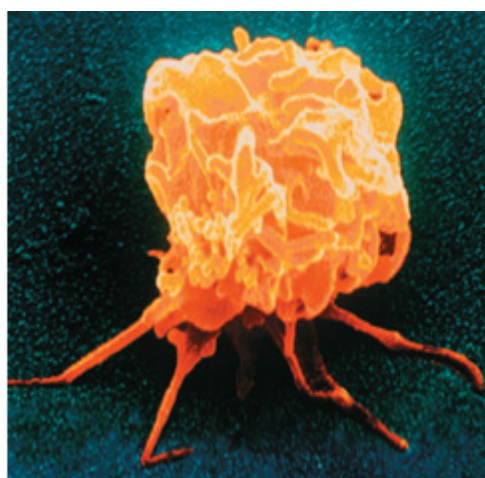
Σε κατάσταση ηρεμίας τα αιμοπετάλια έχουν δισκοειδές σχήμα, (η επιφάνεια δεν ξεπερνά τα  $8 \mu\text{m}^2$ ) το οποίο υποστηρίζεται από τα μικρονημάτια που βρίσκονται στην επιφάνειά τους. Κατά την ενεργοποίησή τους όμως αλλάζουν σχήμα, αποκτούν ψευδοπόδια (Εικόνα 2), τα οποία αποτελούν προεκτάσεις της κυτταρικής μεμβράνης των αιμοπεταλίων, η επιφάνειά τους αυξάνεται έως και  $13 \mu\text{m}^2$  <sup>6</sup> και απελευθερώνουν το περιεχόμενο των κοκκίων τους μέσω του συστήματος των μικροσωληνίσκων. Τα αιμοπετάλια ενεργοποιούνται από διάφορους αγωνιστές, οι κυριότεροι από τους οποίους είναι η διφωσφορική αδενοσίνη (ADP), η θρομβίνη, η επινεφρίνη, το θρομβοξάνιο  $A_2$  ( $TxA_2$ ), ο παράγοντας ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων (PAF) και το κολλαγόνο. Οι αγωνιστές αυτοί ενεργοποιούν τα αιμοπετάλια διαμέσου ειδικών υποδοχέων με αποτέλεσμα τη διέγερση διαφόρων ενδοκυττάρων μεταβολικών οδών, την αλλαγή

σχήματος των αιμοπεταλίων, τη μεταβολή της συγκέντρωσης του ενδοκυττάρου ασβεστίου, την αποκοκκίωση, καθώς επίσης και την ενεργοποίηση του υποδοχέα-ιντεγκρίνη  $\alpha_{IIb}\beta_3$ . Το τελικό αποτέλεσμα της ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων είναι η συσσώρευση και η προσκόλλησή τους στο ενεργοποιημένο ενδοθήλιο ή στον υπενδοθηλιακό χώρο.

A



B



**Εικόνα 2.** Χαρακτηριστικό σχήμα αιμοπεταλίων **A.** σε ηρεμία και **B.** μετά από ενεργοποίηση

Κατά την κυκλοφορία τους τα αιμοπετάλια τείνουν να συγκεντρώνονται στην περιφέρεια της αιματικής ροής και έτσι μπορούν να αναγνωρίσουν και να ανταποκριθούν γρήγορα σε οποιαδήποτε βλάβη του ενδοθηλίου. Η κύρια λειτουργία τους είναι η συσσώρευση η οποία γίνεται διάμεσου γεφυρών ινωδογόνου (Fg) παρουσία ιόντων  $Ca^{2+}$ . Με αυτό τον τρόπο σχηματίζονται συσσωρεύματα μεταξύ των αιμοπεταλίων τα οποία εμπλέκονται στη διαδικασία της αιμόστασης και της πήξης του αίματος<sup>7-9</sup>. Επιπρόσθετα, τα αιμοπετάλια εμπλέκονται σε διάφορες άλλες παθοφυσιολογικές καταστάσεις όπως είναι η φλεγμονή και η αθηροσκλήρωση<sup>4,5</sup>.

Τα αιμοπετάλια παίζουν πολύ σημαντικό ρόλο στην πρόληψη της απώλειας αίματος μετά από τραύμα, αλλά είναι επίσης υπεύθυνα για το σχηματισμό παθογόνου θρόμβου που προκαλεί οξείες εκδηλώσεις της αγγειακής αθηροθρομβωτικής νόσου, όπως τα οξέα στεφανιαία σύνδρομα (ΟΣΣ), συμπεριλαμβανομένης της ασταθούς στηθάγχης, του οξέος εμφράγματος του μυοκαρδίου (ΟΕΜ) με ή χωρίς ανάσπαση του διαστήματος ST (STE ΟΕΜ ή non STE ΟΕΜ), του ισχαιμικού μόνιμου ή παροδικού αγγειακού εγκεφαλικού επεισοδίου (ΑΕΕ) και της συμπτωματικής περιφερικής αρτηριακής νόσου (ΠΑΝ). Επιπρόσθετα, τα αιμοπετάλια, ως διαμεσολαβητές της φλεγμονής συνεισφέρουν στην αθηρογένεση και έχουν ανοσοτροποποιητική δραστηριότητα<sup>10</sup>.

## **1.2. Ο ρόλος των αιμοπεταλίων στα καρδιαγγειακά νοσήματα**

Η αθηροθρόμβωση αποτελεί τον κύριο υποκείμενο παθοφυσιολογικό μηχανισμό των καρδιαγγειακών νοσημάτων. Η καρδιαγγειακή νόσος είναι μια από τις κυριότερες αιτίες νοσηρότητας και θνητότητας στις σύγχρονες κοινωνίες. Στις χώρες της Ευρωπαϊκής Ένωσης περισσότερο από 2 εκατομμύρια άνθρωποι πεθαίνουν ετησίως από νοσήματα του καρδιαγγειακού συστήματος, που αντιστοιχούν περίπου σε 42% των συνολικών θανάτων<sup>11</sup>.

Σημαντικό ρόλο στην παθογένεια της αθηροθρόμβωσης διαδραματίζουν τα αιμοπετάλια. Οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ των αιμοπεταλίων, διαφόρων συστατικών της αθηρωματικής πλάκας και παραγόντων πήξης, αποτελούν τον κύριο υποκείμενο παθοφυσιολογικό μηχανισμό για την εκδήλωση ενός ΟΣΣ σε ασθενείς με ασυμπτωματική στεφανιαία νόσο (ΣΝ) ή σταθερή στηθάγχη<sup>12</sup>.



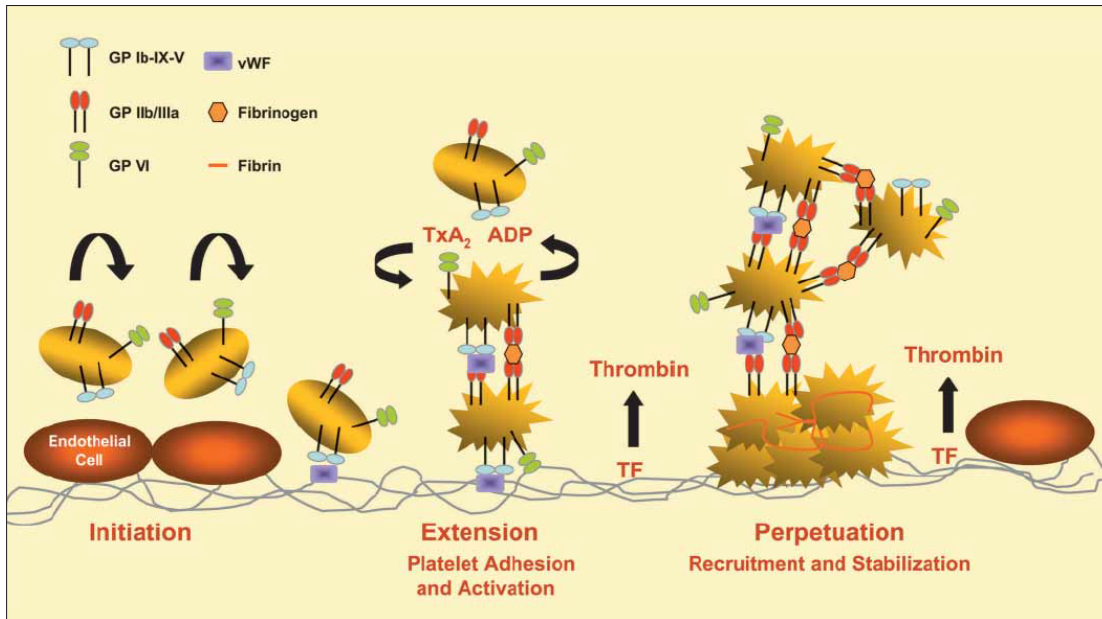
### 1.2.1. Ο ρόλος των αιμοπεταλίων στη θρόμβωση

Η λύση της συνέχειας του έσω χιτώνα του τοιχώματος μιας στεφανιαίας αρτηρίας, που μπορεί να συμβεί είτε αυτόματα κατά τη ρήξη μιας αθηρωματικής πλάκας, είτε ιατρογενώς κατά τη διάρκεια της διαδερμικής στεφανιαίας αγγειοπλαστικής, έχει ως αποτέλεσμα την έκθεση στον ενδαγγειακό χώρο συστατικών της υπενδοθηλιακής στιβάδας, όπως είναι ο παράγοντας von Willebrand (vWF) και το κολλαγόνο. Οι πρωτεΐνες αυτές αναγνωρίζονται από συγκεκριμένους υποδοχείς της αιμοπεταλιακής μεμβράνης, (όπως είναι οι γλυκοπρωτεϊνικοί υποδοχείς Ia/IIa, Ib/V/IX, IV, κλπ) με αποτέλεσμα την προσκόλληση των αιμοπεταλίων στα σημεία απώλειας της συνέχειας του ενδοθηλίου<sup>13</sup>.

Η προσκόλληση των αιμοπεταλίων επάγει με τη σειρά της την ενεργοποίηση ενός καταρράκτη ενδοκυττάρων μεταβολικών οδών, οδηγώντας στην ενεργοποίησή τους. Το αποτέλεσμα της ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων είναι η συσσώρευσή τους διαμέσου γεφυρών ινωδογόνου, το οποίο προσδέεται παρουσία  $Ca^{2+}$  στον ενεργοποιημένο αιμοπεταλιακό υποδοχέα-ιντεγκρίνη  $\alpha_{IIb}\beta_3$  (γλυκοπρωτεΐνη IIb/IIIa, GPIIb/IIIa). Παράλληλα, τα ενεργοποιημένα αιμοπετάλια εκκρίνουν βιολογικά δραστικούς παράγοντες μεταξύ των οποίων υπάρχουν και διεγέρτες των ίδιων των κυττάρων αυτών (ADP, αραχιδονικό οξύ (AA), σεροτονίνη, παράγοντας ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων; παράγοντας ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων (PAF), κλπ), οι οποίοι ενισχύουν ακόμα περισσότερο την αιμοπεταλιακή ενεργοποίηση και συσσώρευση. Κάποιοι από τους βιοδραστικούς αυτούς παράγοντες είναι αποθηκευμένοι σε ενδοκυττάρια κοκκία, ενώ άλλοι (AA, PAF, κλπ) σχηματίζονται κατά τη διάρκεια της αιμοπεταλιακής ενεργοποίησης<sup>13</sup>.

Η έκθεση προπηκτικών αρνητικά φορτισμένων φωσφολιπιδίων στην κυτταρική μεμβράνη των ενεργοποιημένων αιμοπεταλίων και η παράλληλη έκκριση προπηκτικών παραγόντων (π.χ. παράγοντας V) που είναι αποθηκευμένοι στα αιμοπεταλιακά κοκκία, μεγιστοποιούν τη διαδικασία της γένεσης θρομβίνης που έχει ήδη πυροδοτηθεί από τη έκθεση του ιστικού παράγοντα (TF) στον ενδαγγειακό χώρο κατά τη ρήξη της αθηρωματικής πλάκας. Ο TF προέρχεται είτε από τα ενεργοποιημένα μονοκύτταρα, είτε από τον υπενδοθηλιακό ιστό που εκτίθεται στον ενδαγγειακό χώρο κατά τη ρήξη της αθηρωματικής πλάκας. Η αυξημένη παραγωγή θρομβίνης κατά την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων, η οποία αποτελεί τον ισχυρότερο αγωνιστή των αιμοπεταλίων, εξηγεί, τουλάχιστον μερικώς, τόσο την εμφάνιση θρομβωτικών επεισοδίων σε ασθενείς που βρίσκονται σε αντιαιμοπεταλιακή αγωγή όσο και την ανάγκη χορήγησης αντιπηκτικής αγωγής σε ασθενείς με ΟΣΣ<sup>10,14</sup>.

Σημαντικό ρόλο στη μεγιστοποίηση της ενεργοποίησης και της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων διαδραματίζει το ADP, το οποίο ενεργοποιεί τα αιμοπετάλια συνδεδεμένο στους πουρινεργικούς υποδοχείς P2X1, P2Y1 και P2Y12 της αιμοπεταλιακής μεμβράνης. Οι υποδοχείς αυτοί δρουν συνεργικά στην ενεργοποίηση και στη συσσώρευση των αιμοπεταλίων. Πιο συγκεκριμένα, ο P2X1 συμμετέχει στην αλλαγή του σχήματος των αιμοπεταλίων, η ενεργοποίηση του P2Y1 συμμετέχει στην αρχική αναστρέψιμη ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων και η ενεργοποίηση του P2Y12 συμμετέχει στην παρατεινόμενη ενεργοποίηση και στη συσσώρευση των αιμοπεταλίων<sup>10,13</sup> (Εικόνα 3).



**Εικόνα 3.** Σχηματισμός αιμοπεταλιακού θρόμβου

### 1.2.1.1. Μονοπάτια ενεργοποίησης αιμοπεταλίων

Διάφορα μονοπάτια-μηχανισμοί συμβάλλουν στην ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων<sup>15-18</sup>. Το ADP αποθηκεύεται σε μεγάλες συγκεντρώσεις στα πυκνά κοκκία των αιμοπεταλίων και απελευθερώνεται από τα προσκολλημένα αιμοπετάλια κατά τη διάρκεια της ενεργοποίησής τους. Το ADP συμβάλλει στην ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων που εμφανίζεται τόσο κατά την αιμόσταση (π.χ. σχηματισμός της αρχικής αιμοπεταλιακής μονοστιβάδας) όσο και κατά τη διάρκεια του σχηματισμού του πλούσιου σε αιμοπετάλια θρόμβου. Η απελευθέρωση της θρομβοξάνης A<sub>2</sub> από τα προσκολλημένα αιμοπετάλια ευοδώνει την προσέλωση και τη συσσώρευσή τους στον πρωτογενή θρόμβο και τα ενεργοποιεί κατά τη διάρκεια και της αιμόστασης και του παθολογικού σχηματισμού του θρόμβου. Το κολλαγόνο είναι ένα ισχυρό θρομβογόνο υπόστρωμα. Κάτω από συνθήκες υψηλής διατμητικής τάσης η προσκόλληση των αιμοπεταλίων επάγεται από την πρόσδεση

του ακινητοποιημένου παράγοντα von Willebrand (vWF) στο κολλαγόνο ή στη γλυκοπρωτεΐνη Ib (GPIb) στην επιφάνεια των αιμοπεταλίων. Αυτή η αλληλεπίδραση οδηγεί στην ενεργοποίηση της γλυκοπρωτεΐνης IIb/IIIa (GP IIb/IIIa) και στη δημιουργία συσσωρευμάτων αιμοπεταλίων που επάγονται από το σταθερό vWF<sup>18</sup>. Παρόλα αυτά η σύνδεση μεταξύ της γλυκοπρωτεΐνης VI (GPVI) και του vWF είναι ανεπαρκής για σταθερή προσκόλληση. Η GPVI είναι ο βασικός υποδοχέας αιμοπεταλίου-κολλαγόνου που διαμεσολαβεί την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων η οποία είναι απαραίτητη για την προσκόλληση, τη συσσώρευση, την αποκοκκίωση και την πηκτική δράση στη θεμέλια ουσία<sup>18</sup>. Η γλυκοπρωτεΐνη Ia (GPIa) δρα συνεργικά με την GPVI και ενισχύει τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ της GPVI και του κολλαγόνου. Η θρομβίνη είναι ο πιο ισχυρός ενεργοποιητής των αιμοπεταλίων<sup>19,20</sup>. Η θρομβίνη ενεργοποιεί τα αιμοπετάλια σε εξαιρετικά χαμηλές συγκεντρώσεις (χαμηλότερες από αυτές που απαιτούνται για την ενεργοποίηση του καταρράκτη της πήξης)<sup>19,20</sup>. Η θρομβίνη προσδένεται στον υποδοχέα της ενεργοποιημένης πρωτεάσης PAR-1 στην επιφάνεια των αιμοπεταλίων, διαχωρίζοντας των υποδοχέα και εκθέτοντας έναν προεξέχοντα προσδέτη, ο οποίος τελικά προσδένεται και ενεργοποιεί τον υποδοχέα<sup>21-25</sup>. Τα αιμοπετάλια εκφράζουν επίσης τον υποδοχέα PAR-4 ο οποίος απαιτεί υψηλότερες συγκεντρώσεις θρομβίνης για να ενεργοποιηθεί. Η σηματοδότηση μέσω του PAR-4 είναι διαθέσιμη για την αιμόσταση όταν δημιουργούνται πολύ υψηλές συγκεντρώσεις θρομβίνης, παρέχοντας έτσι έναν προστατευτικό μηχανισμό σε καταστάσεις όπου αυτό το μονοπάτι μπορεί να συνεισφέρει στη διακοπή της αιμορραγίας, όπως σε κάποιο τραύμα. Ο υποδοχέας PAR-2 δεν εκφράζεται στα αιμοπετάλια και δεν ενεργοποιείται από τη θρομβίνη. Ο υποδοχέας PAR-3 μπορεί να συνδέσει τη θρομβίνη στα αιμοπετάλια, αλλά ο λειτουργικός ρόλος αυτού του υποδοχέα παραμένει ασαφής. Η θρομβίνη συνδέεται επίσης με τη GPIb, η οποία φαίνεται να ευοδώνει την ειδικότητα του διαχωρισμού της θρομβίνης από τον υποδοχέα PAR-1<sup>26</sup>.

Εκτός από τα αιμοπετάλια, οι υποδοχείς PAR εκφράζονται και σε άλλα κύτταρα, όπως τα λευκά αιμοσφαίρια, τα ενδοθηλιακά κύτταρα και τα λεία μυϊκά κύτταρα<sup>22</sup>. Στο αγγειακό τοίχωμα, οι υποδοχείς PAR-1 και PAR-2 επάγουν τη συσπαστικότητα, τη φλεγμονή, την αναπαραγωγή και τον επανασηματισμό. Ο υποδοχέας PAR-1 έχει επίσης αγγειοδιασταλτική δράση. Η ενεργοποίηση του υποδοχέα PAR-1 στο ενδοθήλιο φυσιολογικών αρτηριών προκαλεί παραγωγή νιτρικού οξέος και χαλάρωση των λείων μυϊκών ινών<sup>23</sup>. Στις αρτηρίες με σοβαρές αθηροσκληρωτικές βλάβες δεν προκαλείται χαλάρωση των λείων μυϊκών ινών από την ενεργοποίηση του PAR-1, ενώ μπορεί να παρατηρηθεί αύξηση της συσπαστικότητας<sup>23</sup>.

Η ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων επάγει επίσης την απελευθέρωση AA από τα φωσφολιπίδια της κυτταρικής μεμβράνης διαμέσου της δράσης μιας κυτοσολικής φωσφολιπάσης A<sub>2</sub>. Στα αιμοπετάλια το AA μεταβολίζεται κυρίως προς τις προσταγλανδίνες G<sub>2</sub>/H<sub>2</sub> με τη δράση του ενζύμου κυκλοοξυγονάση-1 (COX-1), από τις οποίες στη συνέχεια σχηματίζεται το θρομβοξάνιο A<sub>2</sub> (TxA<sub>2</sub>) με τη δράση του ενζύμου συνθετάση του TxA<sub>2</sub>. Το TxA<sub>2</sub> ενεργοποιεί περαιτέρω τα αιμοπετάλια διαμέσου του ειδικού υποδοχέα της μεμβράνης τους (TP), ενώ παράλληλα ασκεί διάφορες προφλεγμονώδεις δράσεις σε κύτταρα του αρτηριακού τοιχώματος. Αντίθετα, στα ενδοθηλιακά κύτταρα το AA μεταβολίζεται με τη δράση της COX-1 προς προσταγλανδίνη I<sub>2</sub> (PGI<sub>2</sub>) γνωστή και ως προστακυκλίνη.

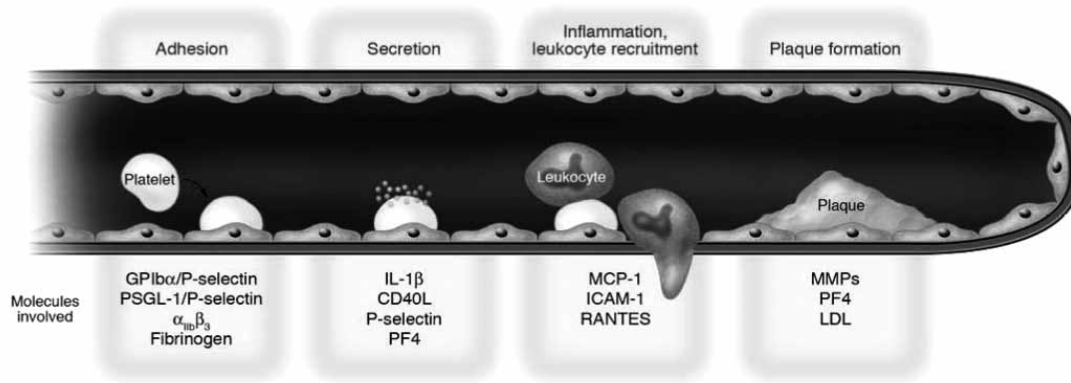
### 1.2.1.2. Αλληλεπίδραση μεταξύ αιμοπεταλίων και του καταρράκτη της πήξης

Η ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων και η ενεργοποίηση του καταρράκτη της πήξης είναι συμπληρωματικές διαδικασίες<sup>27,28</sup>. Οι παράγοντες της πήξης συνδέονται στα αιμοπετάλια είτε μέσω των υποδοχέων των γλυκοπρωτεϊνών, είτε μέσω των φωσφολιπιδίων τα οποία εκφράζονται στην εξωτερική στιβάδα της πλασματικής μεμβράνης των αιμοπεταλίων μετά την ενεργοποίησή τους. Για παράδειγμα, η σύνδεση του κολλαγόνου με την GPVI ενεργοποιεί τα αιμοπετάλια, εκφράζει τη φωσφατιδυλσερίνη και βοηθά το σχηματισμό και τη σταθεροποίηση της θρομβίνης<sup>29</sup>. Η αλληλεπίδραση κολλαγόνου-GPVI οδηγεί επίσης στην παραγωγή και απελευθέρωση στην κυκλοφορία μεμβρανικών κυστιδίων τα οποία παρέχουν προθρομβωτικά μικροκυτίδια. Για το σχηματισμό των κυστιδίων και την έκφραση της φωσφατιδυλσερίνης απαιτούνται μεγάλες αυξήσεις στο ενδοκυττάριο ασβέστιο, ένα κοινό τελικό αποτέλεσμα της ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων από το ADP, τη θρομβοξάνη A<sub>2</sub>, τη θρομβίνη και το κολλαγόνο<sup>28</sup>. Το ADP ενεργοποιεί επίσης την προπηκτική δράση των αιμοπεταλίων μέσω της αλληλεπίδρασης με τους υποδοχείς P2Y<sub>1</sub> και P2Y<sub>12</sub><sup>30</sup>. Τα προϊόντα της έκκρισης των αιμοπεταλίων συνεισφέρουν στην προπηκτική δράση των ενεργοποιημένων αιμοπεταλίων, παρέχοντας τους παράγοντες V και VIII και το ινωδογόνο<sup>17</sup>. Τα ενεργοποιημένα αιμοπετάλια βοηθούν στην αρχική φάση της πήξης παρέχοντας σημεία σύνδεσης για τον παράγοντα XI και την προθρομβίνη, Αυτές οι λειτουργίες αποκαλύπτουν το διπλό ρόλο των αιμοπεταλίων στην ενεργοποίηση και στην πήξη.

### 1.2.2. Ρόλος των αιμοπεταλίων στη δημιουργία της αθηρωματικής πλάκας

Εκτός από την τεκμηριωμένη συμμετοχή των αιμοπεταλίων στη θρόμβωση η οποία ακολουθεί τη ρήξη της αθηρωματικής πλάκας, τα αιμοπετάλια διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη δημιουργία της αθηρωματικής πλάκας. Τα αιμοπετάλια αλληλεπιδρούν με το αγγειακό ενδοθήλιο και συνδέουν τη φλεγμονή, τη θρόμβωση, και την αθηρογένεση που χαρακτηρίζονται από αλληλεπιδράσεις μεταξύ των αιμοπεταλίων, των ενδοθηλιακών κυττάρων και των λευκών αιμοσφαιρίων<sup>31-33</sup>. Πράγματι, πολλοί από τους υποδοχείς των αιμοπεταλίων παίρνουν μέρος στη διόρθωση της αγγειακής βλάβης και στη θρόμβωση, επιτρέποντας, επίσης στα αιμοπετάλια να έχουν ανοσοτροποποιητικές λειτουργίες (Εικόνα 4)<sup>34,35</sup>. Σύμφωνα με πρόσφατες μελέτες τα αιμοπετάλια προσκολλώνται στο ενδοθήλιο υπό συνθήκες ήπιας φλεγμονής και προσελκύουν μονοκύτταρα τα οποία στη συνέχεια περνούν στον υπενδοθηλιακό χώρο και μετατρέπονται σε μακροφάγα και αφρώδη κύτταρα, πυροδοτώντας έτσι τη δημιουργία της αθηρωματικής πλάκας. Σημαντικό ρόλο σε αυτές τις αλληλεπιδράσεις και γενικότερα στην ενίσχυση της φλεγμονώδους αντίδρασης στο αρτηριακό τοίχωμα διαδραματίζουν διάφορα μόρια προσκόλλησης, όπως η P-σελεκτίνη και το μόριο της διακυτταρικής προσκόλλησης-1 (ICAM-1), διάφορες χημειοκίνες, όπως η χημειοτακτική πρωτεΐνη-1 των μονοκυττάρων (MCP-1) και ο SDF-1, η ιντερλευκίνη-1β και η ιντερλευκίνη-8, το CD40L, το RANTES, το ENA-78, τα αιμοπεταλικά μικροσωματίδια (PMPs) κλπ. Πιο πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει ότι εκτός από τα μονοκύτταρα, τα προσκολλημένα στο ενδοθήλιο αιμοπετάλια προσελκύουν ενδοθηλιακά πρόδρομα κύτταρα (EPCs), τα οποία στη συνέχεια μπορεί να μετατραπούν είτε σε αφρώδη κύτταρα συμβάλλοντας στην αθηρογένεση, είτε σε ενδοθηλιακά κύτταρα οδηγώντας στην αναγέννηση του ενδοθηλίου. Οι συνθήκες κάτω υπό τις οποίες τα αιμοπετάλια μετατρέπουν τα EPCs σε αφρώδη κύτταρα (προαθηρογόνος

ρόλος) ή σε ώριμα ενδοθηλιακά κύτταρα (αντιαθηρογόνος δράση) χρειάζονται περαιτέρω διερεύνηση<sup>14</sup>.



**Εικόνα 4.** Συμβολή των αιμοπεταλίων στη δημιουργία αθηρωματικής πλάκας

### 1.2.3. Φλεγμονώδης απόκριση που επάγεται από τα αιμοπετάλια

Εκτός από την πολύ σημαντική συμμετοχή των αιμοπεταλίων στην αιμόσταση μέσω του σχηματισμού θρόμβου μετά από ενδοθηλιακή βλάβη, όλο και περισσότερα δεδομένα δείχνουν ότι τα αιμοπετάλια παίζουν πολύ σημαντικό ρόλο στη φλεγμονώδη αντίδραση που παρατηρείται στο αγγειακό τοίχωμα καθώς και στους επακόλουθους μηχανισμούς διόρθωσης του ιστού<sup>31,36</sup>. Τα ενεργοποιημένα αιμοπετάλια αλληλεπιδρούν με το ενδοθήλιο καθώς και με διάφορους άλλους τύπους κυττάρων του αίματος. Αυτές οι αλληλεπιδράσεις αφορούν σε άμεσες αλληλεπιδράσεις μεταξύ κυττάρων καθώς και σε αυτοκρινείς και παρακρινείς δρόμους που οδηγούν σε ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων<sup>31,36-38</sup>. Οι φλεγμονώδεις αλληλεπιδράσεις στις οποίες εμπλέκονται τα αιμοπετάλια οδηγούν σε πολλαπλές παθοφυσιολογικές διαδικασίες, όπως η αθηροσκλήρωση, η θρόμβωση και η επαναστένωση στο σημείο όπου έχει τοποθετηθεί stent κατά την αγγειοπλαστική.



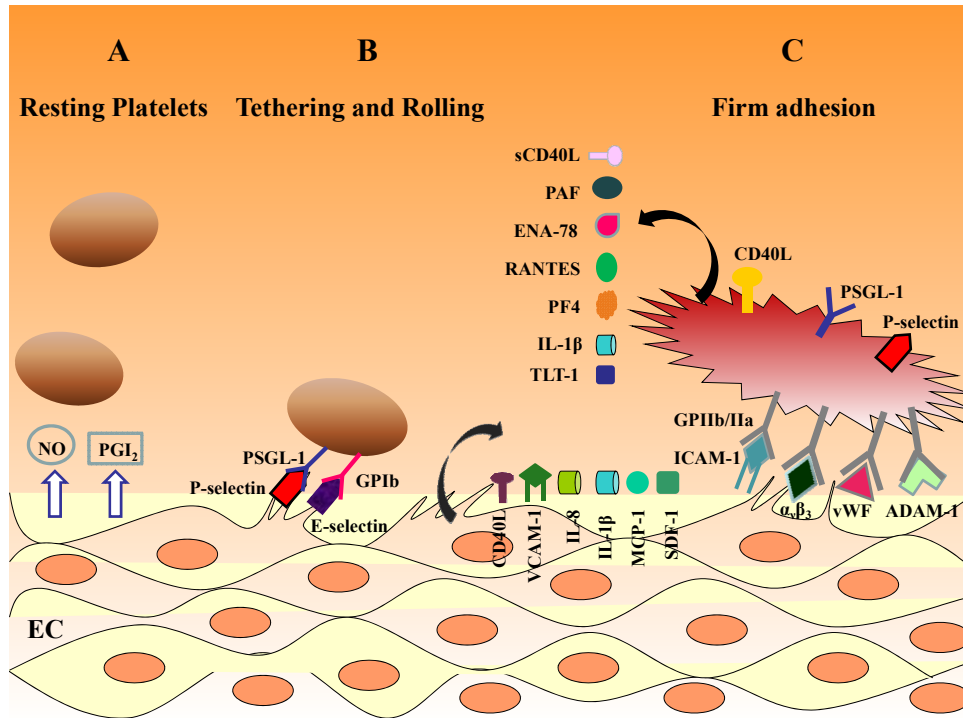
Επομένως, τα αιμοπετάλια μπορούν να συμμετέχουν ενεργά στην εμφάνιση σοβαρών καρδιαγγειακών επιπλοκών, όπως η ασταθής στηθάγχη, το STEMI, το non-STEMI ή η θρόμβωση του stent της αγγειοπλαστικής και να επηρεάσουν την έκβαση καρδιαγγειακών επεμβάσεων, όπως η αγγειοπλαστική ή η αορτοστεφανιαία παράκαμψη (CABG)<sup>39-41</sup>.

Τα αιμοπετάλια περιέχουν τρία διαφορετικά είδη κοκκίων (α-κοκκία, πυκνά κοκκία και λυσοσώματα) και έχουν πολύπλοκο μεμβρανώδες σύστημα το οποίο τους επιτρέπει να αποθηκεύει και να απελευθερώνει άμεσα μία ποικιλία βιολογικά ενεργών παραγόντων. Μεταξύ αυτών, τα αιμοπετάλια εκκρίνουν πρωτεΐνες προσκόλλησης, όπως το ινωδογόνο, η φμπρονεκτίνη και ο παράγοντας von Willebrand, εκκρίνουν P-σελεκτίνη και αυξητικούς παράγοντες, όπως ο αυξητικός παράγοντας των αιμοπεταλίων (PDGF), ο μετατρεπτικός αυξητικός παράγοντας (TGF)-β, χημοκίνες, RANTES, PF4, CXCL4, SDF-1, CXCL12, ENA-78, CXCL5 και IL-1β, sCD40L κλπ. Επίσης, η ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων έχει ως αποτέλεσμα τη σύνθεση του προφλεγμονώδη διαμεσολαβητή των λιπιδίων και του PAF, τη δομική αλλαγή των μεμβρανικών-ιντεγκρινικών υποδοχέων τους α<sub>IIb</sub>/β<sub>3</sub> (γλυκοπρωτεΐνες IIb/IIIa, GP IIb/IIIa) και τη μεμβρανική έκφραση του CD40L και της P-σελεκτίνης. Αυτές οι πρωτεΐνες επηρεάζουν τη λειτουργία διαφόρων κυττάρων του αίματος ή του αγγειακού τοιχώματος μέσω συγκεκριμένων μηχανισμών και εμπλέκονται σε διάφορες βιολογικές λειτουργίες, όπως η κυτταρική προσκόλληση, ο πολλαπλασιασμός και η χημειοταξία<sup>42,43</sup>. Επομένως, τα αιμοπετάλια μπορούν να αλληλεπιδράσουν με διάφορα άλλα κύτταρα της κυκλοφορίας, όπως τα ουδετερόφιλα, τα μονοκύτταρα ή EPCs μέσα στην αιματική ροή ή αφού προσκολληθούν στο ενδοθήλιο του αγγειακού τοιχώματος<sup>44-46</sup>.

### 1.2.3.1. Αλληλεπίδραση των αιμοπεταλίων με τα ενδοθηλιακά κύτταρα

Το ακέραιο, μη ενεργοποιημένο ενδοθήλιο φυσιολογικά αποτρέπει την προσκόλληση αιμοπεταλίων και άλλων φλεγμονωδών κυττάρων στο αγγειακό τοίχωμα. Επομένως, το ενδοθήλιο του υγιούς αρτηριακού τοιχώματος μπορεί να ελέγξει την αντιδραστικότητα των αιμοπεταλίων μέσω διαφόρων ανασταλτικών και τροποποιητικών μηχανισμών, όπως το νιτρικό οξύ (NO) και η προστακυκλίνη (PGI<sub>2</sub>)<sup>23,32,47</sup>. Παρόλα αυτά, τα ενεργοποιημένα φλεγμονώδη ενδοθηλιακά κύτταρα αναπτύσσουν ιδιότητες με τις οποίες γίνονται προσκολλητικά ως προς τα αιμοπετάλια. Πράγματι, μελέτες *in vivo* (25) και *in vitro*<sup>31,40-45</sup> έδειξαν ότι ακόμη και σε απουσία ενδοθηλιακής βλάβης, τα μη ενεργοποιημένα αιμοπετάλια μπορούν να αλληλεπιδράσουν άμεσα και να προσκολληθούν στο ανέπαφο ενδοθηλιακά κύτταρα με έναν πολύ καλά ελεγχόμενο μηχανισμό. Η P-σελεκτίνη και η E-σελεκτίνη στα ενδοθηλιακά κύτταρα επάγουν την αρχική χαλαρή επαφή μεταξύ των αιμοπεταλίων και του ενδοθηλίου και τα αιμοπετάλια κυλάνε μέσω της πρόσδεσης στη GPIb και στον γλυκοπρωτεϊνικό προσδέτη 1 της P-σελεκτίνης (PSGL-1)<sup>31-35,48,49</sup>. Αυτές οι αρχικές αλληλεπιδράσεις είναι πολύ αναστρέψιμες. Η σταθερή προσκόλληση επάγεται από τη GPIIb/IIIa και α<sub>v</sub>β<sub>3</sub> μέσω του ινοδωγόνου (*Εικόνα 5*)<sup>50,51</sup>. Η εμπλοκή της GPIIb/IIIa στη φλεγμονή υποστηρίζεται από μελέτες που δείχνουν ότι ο ανταγωνισμός της GPIIb/IIIa μειώνει την αύξηση των φλεγμονωδών δεικτών όπως η C-αντιδρώσα πρωτεΐνη (CRP) και η ιντερλευκίνη 6 (IL-6) μετά από παρεμβάσεις στα στεφανιαία αγγεία (35). Η προσκόλληση των αιμοπεταλίων στο ενδοθήλιο προκαλεί περαιτέρω ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων και των ενδοθηλιακών κυττάρων και οδηγεί στη μεμβρανική έκφραση και/ή έκκριση διαφόρων προφλεγμονωδών διαμεσολαβητών. Τα ενεργοποιημένα αιμοπετάλια απελευθερώνουν κυρίως τις χημοκίνες RANTES και ENA-78<sup>52,53</sup> και τα ενεργοποιημένα ενδοθηλιακά κύτταρα εκφράζουν στην επιφάνειά τους κυρίως ICAM-1, το αγγειακό

κυτταρικό μόριο προσκόλλησης -1 (VCAM-1) και εκκρίνουν τις χημοκίνες, χημειοτακτική πρωτεΐνη των μονοκυττάρων -1 (MCP-1), SDF-1, ιντερλευκίνη-8 (IL-8), και άλλα, ενώ τα ενεργοποιημένα αιμοπετάλια και ενδοθηλιακά κύτταρα εκκρίνουν IL-1b και sCD40L<sup>54,55</sup>. Πιο συγκεκριμένα, το CD40L προκαλεί τα ενδοθηλιακά κύτταρα να παράγουν δραστικές ρίζες οξυγόνου (ROS), μόρια προσκόλλησης, χημοκίνες και TF. Η αλληλεπίδραση μεταξύ CD40 στα ενδοθηλιακά κύτταρα και CD40L στα αιμοπετάλια οδηγεί στην απελευθέρωση της ιντερλευκίνης-8 (IL-8) και της χημειοελκώμενης πρωτεΐνης -1 των μονοκυττάρων (MPC-1) που προσελκύουν ουδετερόφιλα και μονοκύτταρα<sup>56</sup>. Αυτή η αλληλεπίδραση ενεργοποιεί την ενδοθηλιακή έκφραση μορίων προσκόλλησης (E-σελεκτίνη, VCAM-1 και ICAM-1), τα οποία βοηθούν στην προσκόλληση των μονοκυττάρων, των λεμφοκυττάρων και των ουδετεροφίλων στο ενδοθήλιο<sup>56</sup>. Επιπρόσθετα, τα ενεργοποιημένα αιμοπετάλια απελευθερώνουν TF πάνω στα ενδοθηλιακά κύτταρα με ένα τρόπο εξαρτώμενο από το CD40L, αυξάνοντας έτσι τη θρόμβωση<sup>57</sup>. Η πρόσδεση του CD40L έχει ως αποτέλεσμα την απελευθέρωση της μεταλλοπρωτεΐνάσης της θεμέλιας ουσίας (MMP-2 και -9) που βοηθά στην αποικοδόμηση της εξωκυττάριας ουσίας και στην αναδιαμόρφωση του φλεγμονώδους ιστού<sup>31</sup>. Εναλλακτικά, η MMP-2 επάγει την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων, ενώ η MMP-9 έχει ανασταλτική δράση<sup>58</sup> (Εικόνα 5).



Εικόνα 5. Αλληλεπίδραση αιμοπεταλίων με ενδοθηλιακά κύτταρα

### 1.2.3.2. Αλληλεπίδραση των αιμοπεταλίων με τα λευκοκύτταρα

Όπως αναφέρθηκε ήδη, εκτός από την τεκμηριωμένη συμμετοχή των αιμοπεταλίων στη θρόμβωση, διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη φλεγμονή. Τα αιμοπετάλια προσκολλώνται στο ενδοθήλιο υπό συνθήκες ήπιας φλεγμονής και αλληλεπιδρούν με αυτό και με τα λευκοκύτταρα με ποικίλους τρόπους. Τα αιμοπετάλια αρχικά σχηματίζουν συσσωματώματα με τα λευκοκύτταρα και στη συνέχεια βοηθούν τη στρατολόγηση των λευκοκυττάρων στο ενδοθήλιο. Εναλλακτικά, τα αιμοπετάλια αφού προσκολληθούν στο ενδοθήλιο μπορούν να προσελκύσουν χημειοτακτικά τα λευκοκύτταρα και να παρέχουν μια κολλώδη επιφάνεια για την προσκόλληση των λευκοκυττάρων στο ενδοθήλιο. Σημαντικό ρόλο σε αυτές τις αλληλεπιδράσεις και γενικότερα στην ενίσχυση της

φλεγμονώδους αντίδρασης στο αρτηριακό τοίχωμα και συνεπώς της αθηρογένεσης διαδραματίζουν διάφορα μόρια προσκόλλησης<sup>34,59</sup>.

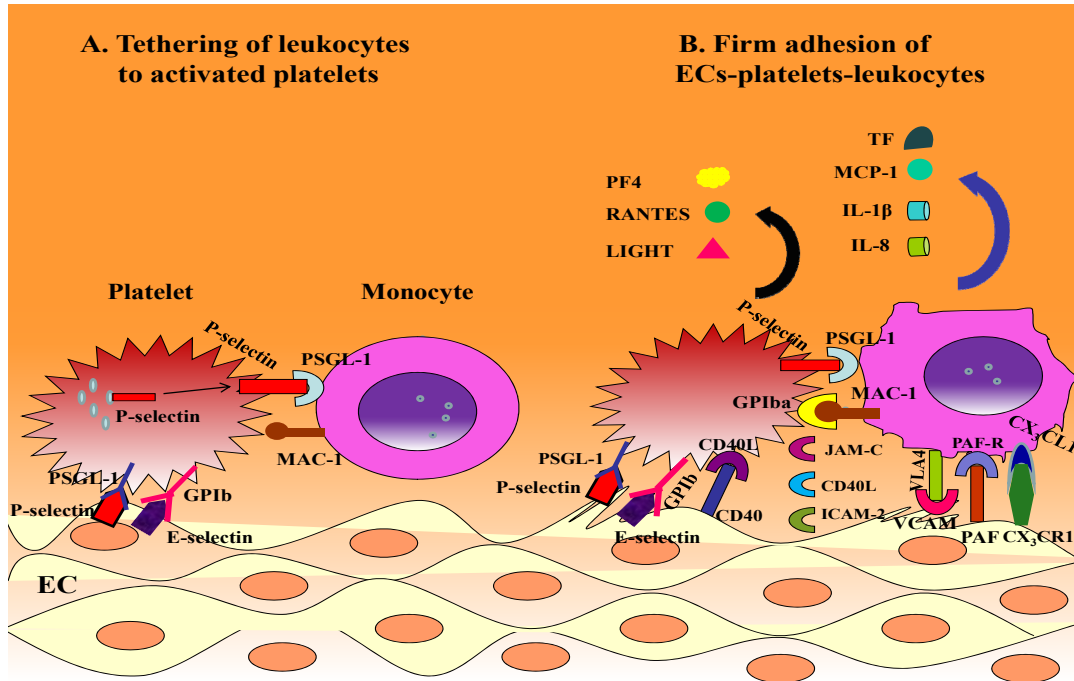
Στην αλληλεπίδραση με τα λευκοκύτταρα (cell to cell interaction) σημαντικό ρόλο διαδραματίζει η P-σελεκτίνη (CD62) η οποία είναι συστατικό των κοκκίων των αιμοπεταλίων και εκφράζεται στη μεμβράνη των αιμοπεταλίων όταν αυτά ενεργοποιούνται. Η P-σελεκτίνη αναγνωρίζει στην επιφάνεια των λευκοκυττάρων τον ειδικό υποδοχέα της, τον PSGL-1, συνδέοντας έτσι τα αιμοπετάλια με τα λευκοκύτταρα<sup>60</sup>. Τα μονοκύτταρα ή τα ουδετερόφιλα προσκολλώνται στα αιμοπετάλια μέσω CD11b/CD18 (Mac-1)<sup>61</sup>. Ο προσδέτης αυτός των λευκοκυττάρων αναγνωρίζει υποδοχείς και παράγοντες των αιμοπεταλίων όπως η ιντεγκρίνη GP Iba<sup>34</sup>, οι διαμεμβρανικές πρωτεΐνες JAM-C, JAM-3<sup>61-63</sup>, το CD40L<sup>64,65</sup>, και το ICAM-2<sup>66</sup>. Η ακριβής συνεισφορά κάθε υποδοχέα χρειάζεται περαιτέρω διερεύνηση. Σημαντικό ρόλο στην ισχυρή πρόσδεση των αιμοπεταλίων με τα λευκοκύτταρα παίζουν πρωτεΐνες- γέφυρες, όπως το ινωδογόνο, το οποίο προσδένεται στην ιντεγκρίνη GPIIb/IIIa<sup>67</sup> ή υψηλού μοριακού βάρους κινινογόνο (προσδένεται στην ιντεγκρίνη GPIIb)<sup>68</sup>. Η πρόσδεση της αιμοπεταλιακής P-σελεκτίνης στον υποδοχέα PSGL-1 των μονοκυττάρων επάγει την ενεργοποίηση των β1 και β2 ιντεγκρινών. Επίσης, ενισχύει τη στρατολόγηση των μονοκυττάρων στο ενεργοποιημένο ενδοθήλιο. Επιπλέον, τα περισσότερα μονοκύτταρα προσδένουν τη διαλυτή P-σελεκτίνη που προέρχεται από τα αιμοπετάλια, γεγονός που ενισχύει την προσκόλληση της α4β1 ιντεγκρίνης VLA-4 (Very-Late Antigen-4) στα μονοκύτταρα. Για αυτό το λόγο οι αλληλεπιδράσεις της P-σελεκτίνης με τον υποδοχέα της PSGL-1 πυροδοτούν την πρόσδεση του VLA-4 στο ενδοθηλιακό VCAM-1 κατά τη διάρκεια της επικείμενης προσκόλλησης των μονοκυττάρων στο ενδοθήλιο<sup>34</sup>.

Η P-σελεκτίνη επάγει διάφορες χημειοκίνες όπως η MCP-1, η ιντερλευκίνη-1β και η ιντερλευκίνη-8 ενώ ο TNF-α<sup>69,70</sup> ενεργοποιεί την οξειδωτική έκρηξη στα ουδετερόφιλα<sup>59</sup>.

Το CD40L και ο μεμβρανικός του υποδοχέας CD40 παίζει πολύ σημαντικό ρόλο στην αλληλεπίδραση μεταξύ των αιμοπεταλίων, των ενδοθηλιακών κυττάρων και των λευκοκυττάρων. Μετά την ενεργοποίησή τους, τα αιμοπετάλια εκφράζουν στην επιφάνειά τους το CD40L και επίσης εκκρίνουν τη διαλυτή του μορφή, το sCD40L. Το CD40L συνεισφέρει στην προσκόλληση των αιμοπεταλίων στο ενδοθήλιο ρυθμίζοντας την έκφραση της MCP-1, της E-σελεκτίνης, του VCAM-1 και του ICAM-1, μόρια που διαμεσολαβούν τη στρατολόγηση και την προσκόλληση των μονοκυττάρων και των λεμφοκυττάρων στο τραυματισμένο αρτηριακό τοίχωμα<sup>64,65</sup>. Επιπλέον, το sCD40L μπορεί να ασκήσει αντιφλεγμονώδη, αντιπηκτική και αντιθρομβωτική δράση μέσω της πρόσδεσής του στην ιντεγκρίνη των αιμοπεταλίων GPIIb/IIIa και στο ενδοθηλιακό CD40, αντίστοιχα. Η κυτοκίνη CXCL4 ή PF4 που βρίσκεται στη μεμβράνη των αιμοπεταλίων και απελευθερώνεται από τα ενεργοποιημένα αιμοπετάλια, ενισχύει τη στρατολόγηση των ουδετεροφίλων και των μονοκυττάρων στις αθηροσκληρωτικές περιοχές και επάγει τη διαφοροποίηση των μονοκυττάρων σε μακροφάγα<sup>52</sup>. Σημαντικό ρόλο παίζουν επίσης, το RANTES που εκκρίνεται από τα ενεργοποιημένα αιμοπετάλια, το TREM-1 που εκφράζεται στην επιφάνεια των ουδετεροφίλων και προσδένεται στο TREM-1 συνδέτη των αιμοπεταλίων<sup>71</sup>. Η αλληλεπίδραση αυτή επάγει την έκκριση της ιντερλευκίνης-8 στα ουδετερόφιλα<sup>71</sup>. Επίσης, τα ενεργοποιημένα αιμοπετάλια απελευθερώνουν μεγάλη ποσότητα της κυτοκίνης LIGHT, η οποία επάγει την φλεγμονώδη απόκριση των μονοκυττάρων και των ενδοθηλιακών κυττάρων μέσω της ρύθμισης της έκφρασης των μορίων προσκόλλησης και της απελευθέρωσης χημειοκινών όπως η φρακταλκίνη (CX<sub>3</sub>CL1)<sup>72,73</sup>.

Τέλος, σημαντικό ρόλο στην αλληλεπίδραση των κυττάρων παίζει ο PAF που συντίθεται και εκφράζεται στην επιφάνεια των αιμοπεταλίων. Η παραγωγή του PAF στα ενδοθηλιακά κύτταρα συνεισφέρει στην προσέλκυση των ουδετεροφίλων και των

μονοκυττάρων στο φλεγμονώδη ιστό καθώς επίσης επάγει την προσκόλληση των αιμοπεταλίων στο ενδοθήλιο παρουσία ενεργοποιημένων μονοκυττάρων και ουδετεροφίλων<sup>74</sup> (Εικόνα 6).



**Εικόνα 6.** Αλληλεπίδραση των αιμοπεταλίων με τα ενδοθηλιακά κύτταρα και τα λευκοκύτταρα **A.** Η μεταφορά της P-σελεκτίνης από τα α- κοκκία στην πλασματική μεμβράνη επιτρέπει στα λευκοκύτταρα να προσκολληθούν στα αιμοπετάλια μέσω του PSGL-1. **B.** Ισχυρή πρόσδεση μεταξύ των ενεργοποιημένων αιμοπεταλίων-ενδοθηλιακών κυττάρων και λευκοκυττάρων





## **2. ΜΙΚΡΟΣΩΜΑΤΙΔΙΑ ΤΩΝ ΑΙΜΟΠΕΤΑΛΙΩΝ (PMPs)**

Κυτταρικά μικροσωματίδια (MPs) παράγονται από διάφορα κύτταρα όπως τα μονοκύτταρα, τα ενδοθηλιακά κύτταρα, τα αιμοπετάλια, τα λεία μυϊκά κύτταρα κ.α. μετά από ενεργοποίησή τους μέσω αγωνιστών ή κατά την απόπτωση και εκφράζουν στην επιφάνειά τους αντιγόνα χαρακτηριστικά των κυττάρων προέλευσής τους. Βρίσκονται στην κυκλοφορία του αίματος υγείων ανθρώπων και τα επίπεδά τους αυξάνονται σε διάφορες παθολογικές καταστάσεις που σχετίζονται κυρίως με την πήξη και τη θρόμβωση. Μεταξύ των MPs που βρίσκονται στην κυκλοφορία του αίματος, τα PMPs αποτελούν το μεγαλύτερο ποσοστό. Εξαιτίας της σύστασής τους διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο σε πολλές παθοφυσιολογικές διαδικασίες όπως στη θρόμβωση, στη φλεγμονή, στην ενδοθηλιακή δυσλειτουργία και στην αγγειογένεση<sup>75</sup>.

### **2.1. Ορισμός, γενικά χαρακτηριστικά και σύσταση**

Τα μικροσωματίδια των αιμοπεταλίων (PMPs) είναι μικροσκοπικά μεμβρανικά κυστίδια που απελευθερώνονται από τα αιμοπετάλια κατά την ενεργοποίησή τους. Εξαιτίας του πολύ μικρού τους μεγέθους δεν ανιχνεύονται με τις κλασσικές μεθόδους που χρησιμοποιούνται στα αιμοπετάλια. Οι κυριότεροι τρόποι μελέτης των PMPs είναι η κυτταρομετρία ροής και ο ανοσοενζυμικό προσδιορισμό (μέθοδος ELISA). Τα PMPs έχουν σημαντική κλινική σημασία αφού εκφράζουν φωσφολιπίδια στην επιφάνειά τους τα οποία τους προσδίδουν έναν προθρομβωτικό χαρακτήρα<sup>75</sup>.

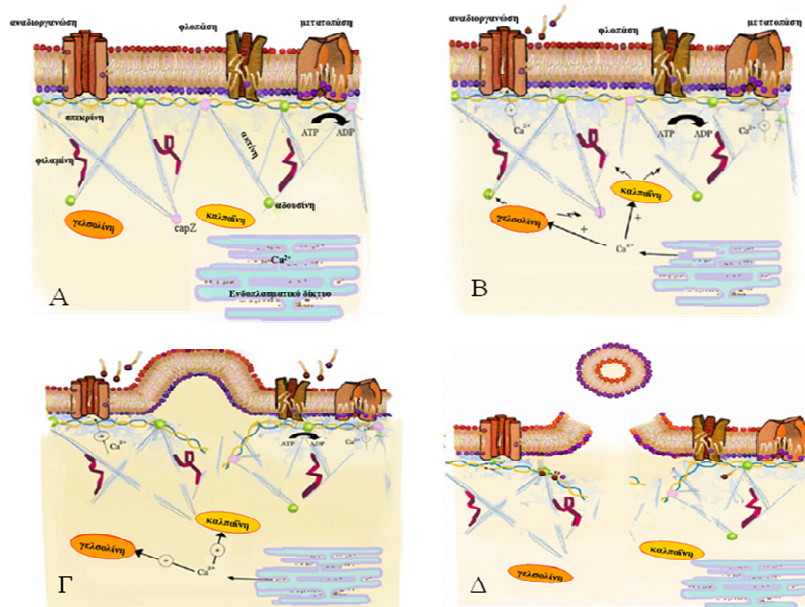
Τα PMPs αποτελούν το 70%-90% των MPs που βρίσκονται στην κυκλοφορία του αίματος<sup>76,77</sup>. Τα PMPs είναι ένας ετερογενής πληθυσμός κυστιδίων που ποικίλουν ως προς

το μέγεθος (0.1-1  $\mu\text{m}$ ), την πρωτεϊνική και λιπιδιακή τους σύσταση και έχουν αρνητικά φορτισμένα φωσφολιπίδια, κυρίως την PS, στην επιφάνειά τους<sup>78,79</sup>. Παράγονται κατά την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων με διάφορους αγωνιστές όπως το κολλαγόνο, τη θρομβίνη, το  $\text{Ca}^{2+}$ -ιονοφόρο (A23187) κ.λ.π<sup>80</sup>. Στην επιφάνεια των PMPs βρίσκονται μόρια που προέρχονται από τα ενεργοποιημένα αιμοπετάλια, όπως για παράδειγμα ο υποδοχέας-ιντεγκρίνη  $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ <sup>81</sup>, η P-σελεκτίνη<sup>82</sup>, το CD36<sup>83</sup>, το CD40L<sup>75,84</sup>, το CD31<sup>85</sup>, κ.τ.λ. Επίσης τα PMPs περιέχουν βιοδραστικά λιπίδια, όπως το AA, τη φωσφορική σφιγγοσίνη-1 (SPP-1) και τον PAF<sup>86</sup>.

## 2.2. Μηχανισμός παραγωγής των μικροσωματιδίων

Πέντε ένζυμα συμμετέχουν στην ρύθμιση της φωσφολιπιδιακής ασυμμετρίας των κυτταρικών μεμβρανών και συμμετέχουν στην παραγωγή των μικροσωματιδίων: η γελσολίνη (που βρίσκεται μόνο στα αιμοπετάλια), η αμινοφωσφολιπιδιακή μετατοπάση, η φλοπάση, η αναδιοργάνωση των λιπιδίων και η καλπαΐνη (*Εικόνες 7Α-7Δ*). Αυτά τα ένζυμα βοηθούν στη διατήρηση μιας δυναμικής ασύμμετρης σταθερής κατάστασης όπου η PC και η SM βρίσκονται στην εξωτερική πλευρά της μεμβράνης, ενώ η PS και η PE στην εσωτερική πλευρά της μεμβράνης. Όταν η συγκέντρωση του ασβεστίου στο κυτοσόλιο αυξηθεί, όπως για παράδειγμα κατά την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων, η σταθερή αυτή κατάσταση αλλάζει, το οποίο έχει ως αποτέλεσμα τα φωσφολιπίδια να μετακινηθούν στην έξω πλευρά της κυτταρικής μεμβράνης, ενώ την ίδια στιγμή τα αμινοφωσφολιπίδια κατευθύνονται στην έσω πλευρά της μεμβράνης<sup>85,87,88</sup>. Μετά την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων, ο κυτταροσκελετός υφίσταται διάφορες αλλαγές. Η σπεκτρίνη και η ακτίνη αποκολλώνται και η πρόσδεση των πρωτεϊνών με τον κυτταροσκελετό διαρρηγνύεται.

Έτσι παρατηρείται αύξηση του σχηματισμού των κυστιδίων και τα PMPs απελευθερώνονται στην κυκλοφορία.



**Εικόνα 7. Μηχανισμός παραγωγής PMPs** **A:** Σχηματική αναπαράσταση ενός ήρεμου κυτταροσκελετού. Τα  $\text{Ca}^{2+}$  είναι αποθηκευμένα στο ενδοπλασματικό δίκτυο. Η αναδιοργάνωση των λιπιδίων είναι ανενεργή ενώ η μετατόπιση των αμινοφωσfolιπιδίων είναι ενεργή. Η μετατόπιση μεταφέρει την PS και την PE από την εξωτερική πλευρά της μεμβράνης στην εσωτερική. Ένα μόριο ATP χρειάζεται για κάθε μόριο PS που μεταφέρεται. Η φλοπάση είναι μία ATP-εξαρτώμενη πρωτεΐνη που συμβάλει στη διατήρηση της φωσfolιπιδιακής ασυμμετρίας. **B:** Η ενεργοποίηση του αιμοπεταλίου. Τα  $\text{Ca}^{2+}$  απελευθερώνονται από το ενδοπλασματικό δίκτυο οδηγώντας στην ενεργοποίηση της καλπαΐνης και της γελσολίνης. Η καλπαΐνη διασπά τα μεγάλα νημάτια της ακτίνης και η γελσολίνη τις καλυπτήριες πρωτεΐνες της ακτίνης. Η αυξημένη συγκέντρωση του ενδοκυττάριου  $\text{Ca}^{2+}$  ενεργοποιεί επίσης την αναδιοργάνωση των λιπιδίων και απενεργοποιεί την μετατόπιση των αμινοφωσfolιπιδίων. Σε αυτό το σημείο ξεκινά η φωσfolιπιδιακή ασυμμετρία. **Γ:** Η διάσπαση του κυτταροσκελετού μετά την ενεργοποίηση του αιμοπεταλίου. Η σπεκτρίνη και η ακτίνη διασπώνται. Σε αυτό το σημείο η πρωτεϊνική πρόσφυση στον κυτταροσκελετό διαταράσσεται, επιτρέποντας την αναδιοργάνωση της μεμβράνης. **Δ:** Η παραγωγή ενός μικροσωματιδίου που εκφράζει την PS στην εξωτερική πλευρά της μεμβράνης του.

### 2.3. Ο ρόλος των PMPs στην αθηροθρόμβωση

Τόσο τα ενεργοποιημένα αιμοπετάλια όσο και τα PMPs διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη φυσιολογική αιμοστατική απόκριση στον αγγειακό τραυματισμό αφού επιδεικνύουν δραστηριότητα προθρομβινάσης<sup>89</sup>. Πολλές μελέτες δείχνουν ότι τα PMPs που παράγονται κατά την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων είναι προθρομβωτικά<sup>89-91</sup>. Τα PMPs σχετίζονται επίσης και με την αυξημένη παραγωγή θρομβίνης<sup>92</sup>. Ακόμη, είναι πιθανόν τα PMPs να συμβάλουν στην ανάπτυξη της αθηροσκλήρωσης και να συμμετέχουν στις αγγειακές βλάβες που παρατηρούνται σε διάφορες φλεγμονώδεις διαταραχές<sup>93,94</sup>.

#### 2.3.1. Ο ρόλος των PMPs στην πήξη

Τα PMPs συμμετέχουν στον μηχανισμό της πήξης με πολλούς και διαφορετικούς τρόπους. Τα MPs που εκφράζουν τον TF εκκινούν το μηχανισμό της πήξης. Επίσης, έχουν ένα ρόλο στη στρατολόγηση κυττάρων για το σχηματισμό θρόμβου. Η ύπαρξη ανιοντικών PL στην επιφάνεια των PMPs, κυρίως της PS, τους επιτρέπουν να δεσμεύουν τους παράγοντες πήξης με αποτέλεσμα την εξάπλωση της θρόμβωσης. Επίσης, αναστέλλουν την ινωδόλυση (φέροντας τον αναστολέα του ενεργοποιητή του πλασμινογόνου (PAI-1))<sup>95</sup>. και κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες, μπορούν να παρουσιάσουν και αντιπηκτικές ιδιότητες.

Πέραν της δημιουργίας του ινώδους, αρκετοί μηχανισμοί στους οποίους συμμετέχουν τα MPs ή συσσωρεύματα κυττάρων-MPs, είναι δυνατόν να συμβάλουν στη σταθεροποίηση του θρόμβου<sup>95</sup>.

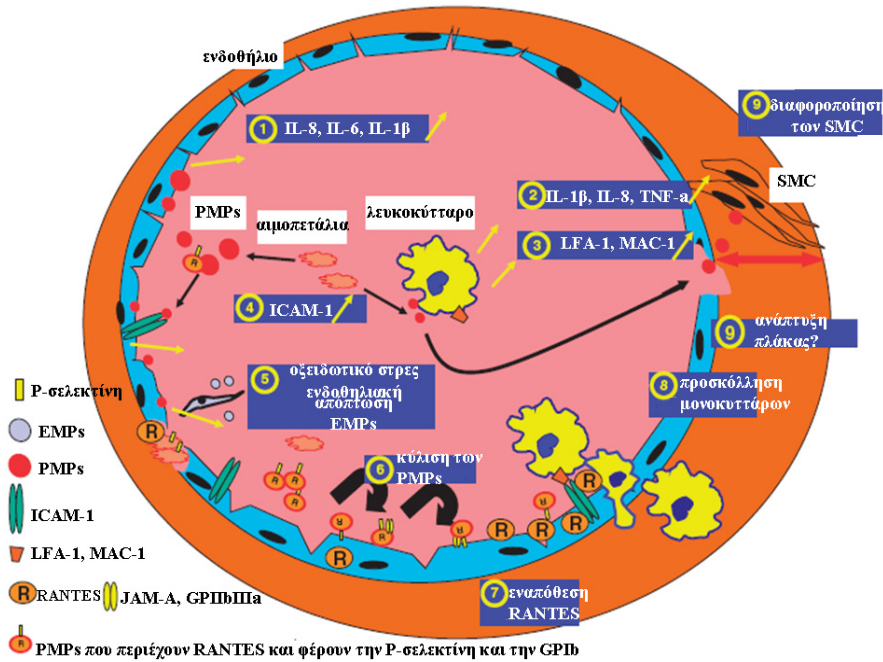
Τα PMPs εμφανίζουν επίσης αντιπηκτική δράση, αφού τα αμινοφωσφολιπίδια συνδέονται με την ενεργοποιημένη πρωτεΐνη C (APC) και αναστέλλουν τον παράγοντα Va *in vitro*.

Είναι πιθανόν αυτή η αντιπηκτική δραστηριότητα των PMPs να λειτουργεί ως ένας αρνητικός μηχανισμός ανάδρασης, αποτρέποντας την μη ελεγχόμενη εξάπλωση του μηχανισμού της πήξης.

### **2.3.2. Ο ρόλος των PMPs στη φλεγμονή**

Πέραν του ρόλου τους στην αιμόσταση και τη θρόμβωση, τα PMPs διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο και στη φλεγμονή. Έχει δειχθεί ότι τα PMPs προκαλούν ένα πλήθος από κυτταρικές αποκρίσεις στο μικροπεριβάλλον όπου παράγονται. Οι Barry et al. έδειξαν ότι τα PMPs ενεργοποιούν τα αιμοπετάλια, τα μονοκύτταρα και τα ενδοθηλιακά κύτταρα και επειδή ο αριθμός τους αυξάνει στη φλεγμονή, είναι δυνατόν να διευκολύνουν τις προσκολλητικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των μονοκυττάρων και των ενδοθηλιακών κυττάρων<sup>80,93</sup>.

Επίσης, τα PMPs πιθανώς να παίζουν ρόλο στην αθηρωμάτωση, καθώς προκαλούν τη μετανάστευση των λείων μυϊκών κυττάρων<sup>96</sup>. Ακόμη πρόσφατη μελέτη των Baj-Kryworzeka et al.<sup>84</sup> έδειξε ότι τα PMPs εκφράζουν το CD40L στην επιφάνεια τους όταν απομονώνονται από αιμοπετάλια ενεργοποιημένα με συνδυασμό θρομβίνης και κολλαγόνου, δίνοντας έτσι μια νέα διάσταση στο ρόλο του CD40L αλλά και των PMPs στην ανάπτυξη της αθηρωματικής πλάκας. (Εικόνα 8).



**Εικόνα 8. Η αλληλεπίδραση των PMPs με άλλα κύτταρα και ο ρόλος της στη φλεγμονή** Τα PMPs αυξάνουν την έκφραση του ICAM-1 των ενδοθηλιακών κυττάρων και επάγουν την απελευθέρωση διαφόρων κυτοκινών (IL-1β, IL-6, IL-8). Προωθούν την ενδοθηλιακή απόπτωση μέσω οξειδωτικού στρες, το οποίο οδηγεί στην απελευθέρωση EMPs. Κάτω από υψηλές διατμητικές δυνάμεις, τα PMPs αρχικά κυλούν πάνω στο φλεγμονώδες ενδοθήλιο μέσω της P-σελεκτίνης και/ή της GPIIb και μετά προσκολλώνται σταθερά μέσω του JAM-A και της GPIIb/IIIa και μεταφέρουν τη χημειοκίνη RANTES. Η εναπόθεση του RANTES διεγείρει την προσκόλληση και την διείσδυση των μονοκυττάρων στο φλεγμονώδες ενδοθήλιο. Διεγείρουν τη διαφοροποίηση των SMC και τη στρατολόγηση των μακροφάγων το οποίο οδηγεί στην ανάπτυξη της πλάκας.

### 2.3.3. Ο ρόλος των PMPs στην αγγειογένεση

Τα PMPs είναι πιθανό να προάγουν την αγγειογένεση, μια παθοφυσιολογική κατάσταση που σχετίζεται άμεσα με την αθηροσκλήρωση (μία χρόνια φλεγμονώδης νόσος του αρτηριακού τοιχώματος, η οποία προκύπτει από την αλληλεπίδραση μεταξύ των τροποποιημένων λιποπρωτεϊνών, των μονοκυττάρων-μακροφάγων, των λεμφοκυττάρων και άλλων κυττάρων<sup>97</sup>). Έτσι φαίνεται ότι τα PMPs μπορούν να συμμετέχουν στην ανάπτυξη της αθηρωματικής πλάκας διάμεσου της συμμετοχής τους στη διαδικασία της αγγειογένεσης<sup>94</sup>.

## 2.4. Ο ρόλος των PMPs στην καρδιαγγειακή νόσο

Σύμφωνα με διάφορα δεδομένα, τα επίπεδα των PMPs είναι αυξημένα σε ασθενείς με καρδιαγγειακή νόσο και διάφορους παράγοντες κινδύνου, όπως τα ΟΣΣ, το ΑΕΕ, η πνευμονική υπέρταση, ο σακχαρώδης διαβήτης, η υπέρταση, η υπερτριγλυκεριδαμία το μεταβολικό σύνδρομο κλπ (πίνακας 1)<sup>93,94,98-108</sup>.

**Πίνακας 1.** Μελέτες σχετικές με τα PMPs και την καρδιαγγειακή νόσο

<b>ΝΟΣΟΣ</b>		<b>ΑΝΑΦΟΡΑ</b>
<b>ΟΣΣ</b>	PMPs	Mallat Z et al Bernal-Mizrachi L et al
<b>ΥΠΕΡΤΑΣΗ</b>	PMPs	Preston R et al Nomura S et al
<b>ΜΕΤΑΒΟΛΙΚΟ ΣΥΝΔΡΟΜΟ</b>	PMPs	Agouni A et al
<b>ΔΙΑΒΗΤΗΣ ΤΥΠΟΥ I, II</b>	PMPs	Tan K et al Sabatier F et al
<b>ΠΑΝ</b>	PMPs	Van der Zee P et al
<b>ΠΝΕΥΜΟΝΙΚΗ ΕΜΒΟΛΗ</b>	PMPs	Inami N et al
<b>ΠΝΕΥΜΟΝΙΚΗ ΥΠΕΡΤΑΣΗ</b>	PMPs	Bakouboula B et al
<b>ΥΠΕΡΤΡΙΓΛΥΚΕΡΙΔΑΙΜΙΑ</b>	PMPs	Ferreira A et al
<b>ΑΕΕ</b>	PMPs	Cherian P et al





### 3. ΦΛΕΓΜΟΝΩΔΕΙΣ ΔΕΙΚΤΕΣ ΣΤΗΝ ΚΑΡΔΙΑΓΓΕΙΑΚΗ ΝΟΣΟ

Ο ρόλος κλειδί της φλεγμονής στην αθηρογένεση καταδεικνύει τη σημασία των φλεγμονωδών δεικτών ως προγνωστικά εργαλεία της καρδιαγγειακής νόσου<sup>14</sup>. Διάφοροι φλεγμονώδεις δείκτες, όπως το CD40L<sup>109,110</sup>, η CRP<sup>111,112</sup>, ο TNF-1<sup>113,114</sup>, ο MCP-1<sup>115</sup>, η IL-6<sup>111,113</sup>, ο ICAM-1<sup>111,116-118</sup> κλπ, σχετίζονται με αυξημένο κίνδυνο ισχαιμικών συμβάντων και αρνητική έκβαση της καρδιαγγειακής νόσου. Επίσης η αλληλεπίδραση αιμοπεταλίων και λευκών αιμοσφαιρίων μπορεί να έχει σημαντικά προφλεγμονώδη και αθηρογόνα αποτελέσματα<sup>119</sup>. Επομένως, τα κυκλοφορούντα συσσωματώματα αιμοπεταλίων-λευκών αιμοσφαιρίων είναι αυξημένα σε ασθενείς με ασταθή στηθάγχη, OEM, σε αυτούς που υποβάλλονται σε αγγειοπλαστική και σε ασθενείς με ΠΑΝ<sup>119-123</sup>. Τα αυξημένα επίπεδα CD40L έχουν συσχετισθεί με αυξημένο κίνδυνο καρδιαγγειακών συμβάντων σε ασθενείς με ΟΣΣ<sup>110</sup>. Αυξημένα επίπεδα CD40L και sCD40L έχουν παρατηρηθεί επίσης σε σταθερούς ασθενείς μετά από αγγειοπλαστική και ακόμα υψηλότερα επίπεδα σε ασθενείς με ασταθή στηθάγχη<sup>109</sup> και ΟΣΣ<sup>121</sup>. Τα επίπεδα του sICAM-1 είναι υψηλότερα σε υγιή άτομα που πρόκειται να αναπτύξουν συμπτωματική αρτηριακή νόσο σε σύγκριση με αυτούς που δεν πρόκειται να αναπτύξουν<sup>116,117</sup>. Ο MCP-1 είναι αυξημένος σε ασθενείς με ΠΑΝ και έχει σχετισθεί με αυξημένο κίνδυνο ΣΝ<sup>115</sup>. Τέλος, αυξημένα επίπεδα CRP υψηλής ευαισθησίας (hs CRP) σε ασθενείς με σταθερή και ασταθή στηθάγχη<sup>124</sup> φαίνεται να είναι ανεξάρτητος προγνωστικός παράγοντας μελλοντικών ισχαιμικών συμβάντων<sup>112</sup> (πίνακας 2).

**Πίνακας 2.** Φλεγμονώδεις δείκτες σε ασθενείς με καρδιαγγειακή νόσο

<b>Φλεγμονώδεις δείκτες</b>	<b>Πληθυσμός μελέτης</b>	<b>Έκβαση</b>
<b>CD40L</b>	Ασθενείς με ΟΣΣ	Αυξημένος κίνδυνος καρδιαγγειακών συμβάντων
<b>sCD40L</b>	Ασθενείς μετά από αγγειοπλαστική, ασθενείς με ασταθή στηθάγχη	Αυξημένος κίνδυνος καρδιαγγειακών συμβάντων
<b>ICAM-1</b>	Ασθενείς που υποβάλλονται σε στεφανιογραφικό έλεγχο	Αυξημένος κίνδυνος ΣΝ
<b>sICAM-1</b>	Υγιείς άνδρες	Αυξημένος κίνδυνος συμπτωματικής αρτηριακής νόσου
<b>MCP-1</b>	Ασθενείς με ΠΑΝ	Αυξημένος κίνδυνος ΣΝ
<b>HsCRP</b>	Ασθενείς με σταθερή και ασταθή στηθάγχη	Μελλοντικά ισχαιμικά επεισόδια
<b>IL-6</b>	Ασθενείς που υποβάλλονται σε στεφανιογραφικό έλεγχο  Ασθενείς με καρδιοεμβολικό ΑΕΕ	Αυξημένος κίνδυνος ΣΝ  Υψηλή ανοσολογική φλεγμονώδης αντίδραση της οξείας φάσης

<b>TNF-α</b>	Ασθενείς με ΣΝ	Αυξημένα επίπεδα TNF-α
	Ασθενείς με καρδιοεμβολικό ΑΕΕ	Υψηλή ανοσολογική φλεγμονώδης αντίδραση της οξείας φάσης της οξείας φάσης
<b>Συσσωματώματα αιμοπεταλίων και λευκών αιμοσφαιρίων</b>	Ασθενείς με ασταθή στηθάγχη, ασθενείς με OEM, ασθενείς που υποβάλλονται σε αγγειοπλαστική και ασθενείς με ΠΑΝ	Αυξημένα επίπεδα συσσωματωμάτων αιμοπεταλίων και λευκών αιμοσφαιρίων

---

ΟΣΣ: Οξύ Στεφανιαίο Σύνδρομο, ΑΕΕ: Αγγειακό Εγκεφαλικό Επεισόδιο, OEM: Οξύ Έμφραγμα του μυοκαρδίου, ΠΑΝ: Περιφερική Αρτηριακή Νόσος, ΣΝ: Στεφανιαία Νόσος



## 4. ΑΝΤΙΑΙΜΟΠΕΤΑΛΙΑΚΑ ΦΑΡΜΑΚΑ

### 4.1. Γενικά

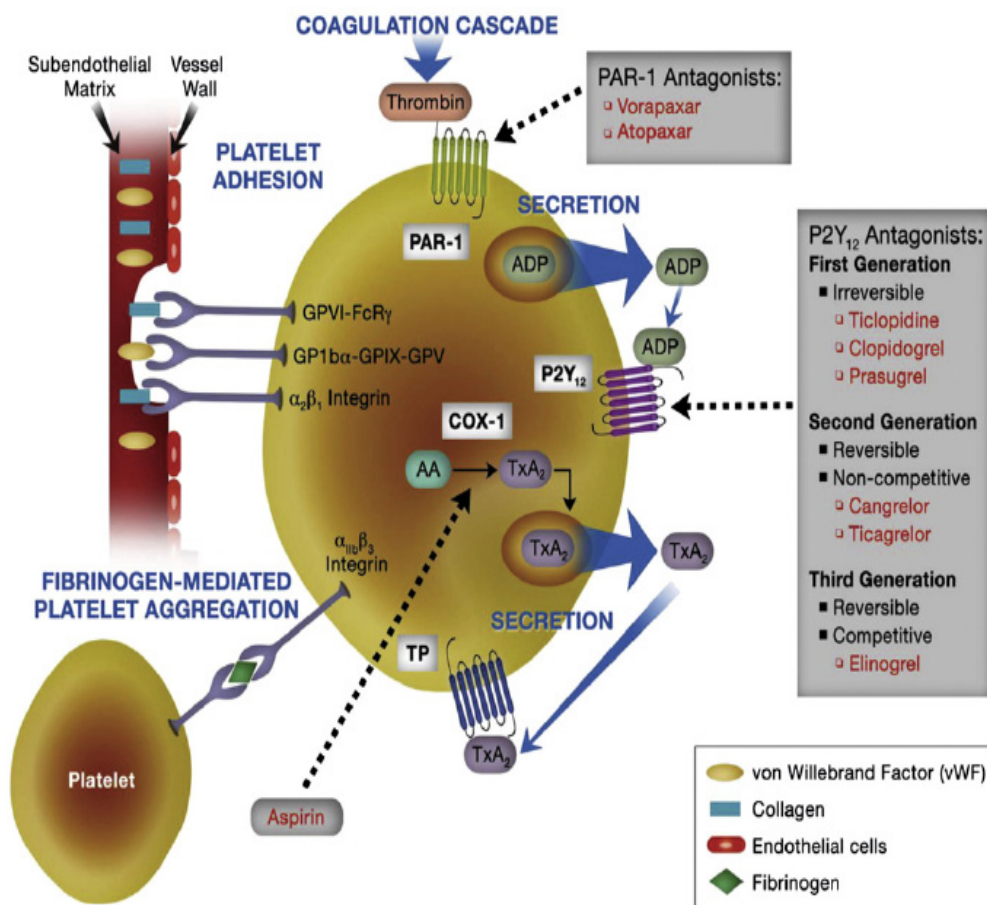
Με δεδομένο ότι η καρδιαγγειακή νόσος είναι μια εξελισσόμενη συστηματική νόσος, η μακροχρόνια αντιθρομβωτική θεραπεία, που τροποποιεί τους μηχανισμούς που οδηγούν στη δημιουργία του θρόμβου και αφορά όλο το αρτηριακό δίκτυο, είναι ουσιώδης για την έκβαση της νόσου. Η χορήγηση αντιθρομβωτικών φαρμάκων απαιτεί ιδιαίτερη προσοχή αφού θα πρέπει να διατηρηθεί μια κρίσιμη και λεπτή ισορροπία μεταξύ της αντιθρομβωτικής και αντισχαιμικής δράσης και του κινδύνου αιμορραγικών επιπλοκών.

Η αναστολή της ενεργοποίησης και της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων είναι δυνατόν να τροποποιήσει όλες τις παθοφυσιολογικές διαδικασίες στις οποίες συμμετέχουν τα αιμοπετάλια. Ένα ιδανικό αντιαιμοπεταλιακό φάρμακο θα πρέπει να έχει τα παρακάτω χαρακτηριστικά<sup>125</sup>:

1. Προβλέψιμο φαρμακοδυναμικό προφίλ, ώστε να μη χρειάζεται εργαστηριακή παρακολούθηση
2. Ισχυρή ανασταλτική δράση της ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων
3. Ταχεία έναρξη δράσης
4. Ταχεία παύση δράσης
5. Μικρό αιμορραγικό κίνδυνο
6. Εύκολη χορήγηση
7. Χαμηλό κόστος

## 8. Ελάχιστες κατά το δυνατό αλληλεπιδράσεις με άλλα συγχορηγούμενα φάρμακα

Για λόγους ασφάλειας, ένα φάρμακο με ταχεία παύση δράσης είναι προτιμότερο από ένα αντίστοιχο φάρμακο μακράς διάρκειας δράσης. Παρόλα αυτά θα πρέπει να λαμβάνεται υπόψη ότι η χρήση φαρμάκου με μεγάλη διάρκεια δράσης μπορεί, τουλάχιστον θεωρητικά, να ελαχιστοποιήσει τις αρνητικές συνέπειες μιας ελλιπούς συμμόρφωσης του ασθενούς στη θεραπεία<sup>125</sup>.



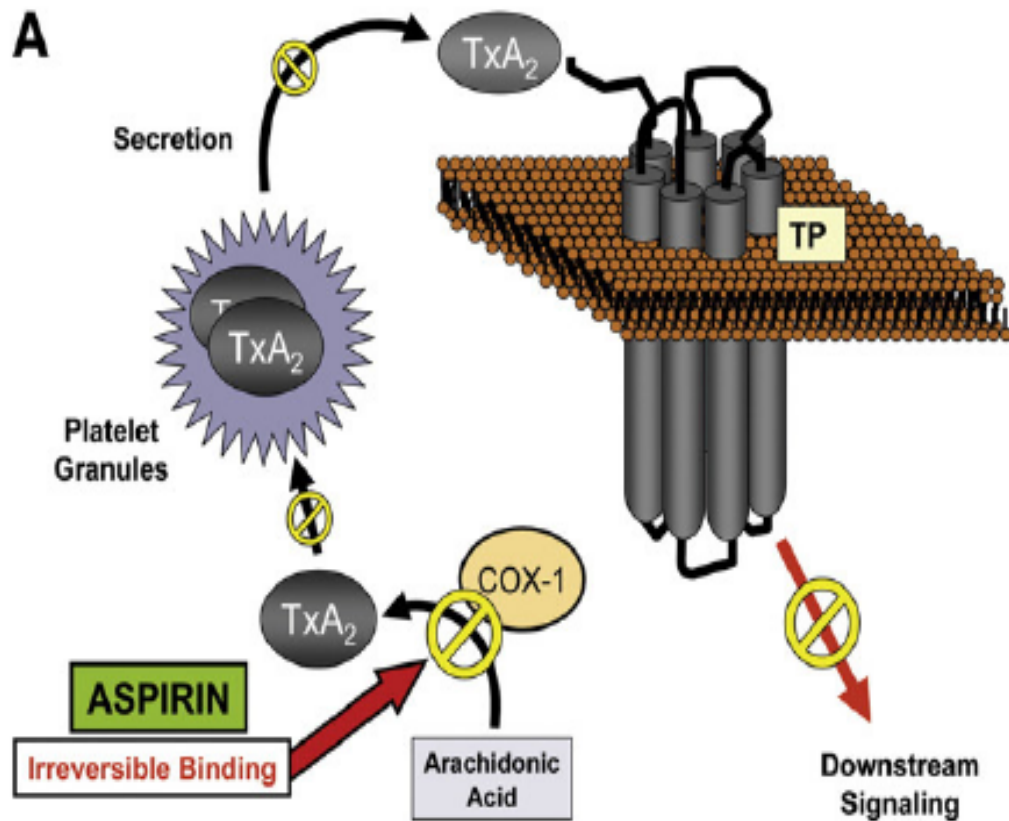
Εικόνα 9. Μηχανισμός δράσης αντιαιμοπεταλιακών φαρμάκων

## 4.2. Αντιαιμοπεταλιακά φάρμακα που χρησιμοποιούνται σήμερα στην κλινική πράξη και μηχανισμοί δράσης τους

### 4.2.1. Ασπιρίνη

Η ασπιρίνη (ακετυλοσαλικυλικό οξύ) απορροφάται ταχέως και σχεδόν πλήρως από το στομάχι και το δωδεκαδάκτυλο. Ο χρόνος ημιζωής της ασπιρίνης στο αίμα είναι μικρός (15-30 min), εξαιτίας της ταχείας υδρόλυσης του φαρμάκου από εστεράσες του εντερικού βλεννογόνου, του ήπατος και του αίματος. Για το λόγο αυτό η αντιαιμοπεταλιακή δράση του φαρμάκου αφορά κυρίως τα αιμοπετάλια της πυλαίας κυκλοφορίας. Η συνιστώμενη ημερήσια δόση ασπιρίνης σε ασθενείς με αθηροθρόμβωση (75 με 325 mg) είναι 3 με 10 φορές υψηλότερη σε σύγκριση με την ελάχιστη δόση που απαιτείται για την πλήρη αναστολή της COX-1 (20 με 30 mg)<sup>126</sup>. Η διαφορά αυτή εξηγεί την ελάχιστη διαφοροποίηση της απόκρισης στην ασπιρίνη η οποία παρατηρείται μεταξύ εξατομικευμένων ασθενών (inter-individual variability). Ο κύριος μηχανισμός της αντιαιμοπεταλιακής δράσης της ασπιρίνης, στις δόσεις που χορηγείται σε ασθενείς με καρδιαγγειακή νόσο, αφορά τη μη αντιστρεπτή αναστολή της COX-1 με ακετυλίωση της υδροξυλομάδας της σερίνης-529 του καταλυτικού της κέντρου. Αυτό οδηγεί στην αναστολή της δέσμευσης του AA στο καταλυτικό κέντρο του ενζύμου, με αποτέλεσμα την αναστολή σχηματισμού του TxA<sub>2</sub> και συνεπώς την αναστολή ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων διαμέσου του υποδοχέα (TP) (Εικόνες9, 10). Για την αποτελεσματική αναστολή της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων από την ασπιρίνη είναι απαραίτητο να ανασταλεί η παραγωγή TxA<sub>2</sub> σε ποσοστό >90%. Στους περισσότερους ασθενείς η δόση της ασπιρίνης που απαιτείται για την επίτευξη του παραπάνω στόχου είναι ως και 30 mg ημερησίως, ενώ δεν παρατηρείται μεγαλύτερη αντιαιμοπεταλιακή δράση της ασπιρίνης

εάν η δόση της αυξηθεί περισσότερο από 80-100 mg ημερησίως. Η ασπιρίνη σε υψηλές συγκεντρώσεις αναστέλλει το ένζυμο κυκλοοξυγονάση 2 (COX-2) με αποτέλεσμα την εκδήλωση αντιφλεγμονώδους δράσης. Επίσης, σε υψηλές συγκεντρώσεις δρα στα ενδοθηλιακά κύτταρα όπου αναστέλλει κυρίως την COX-1 και σε μικρότερο βαθμό την COX-2 προκαλώντας ελάττωση της σύνθεσης της PGI<sub>2</sub>, η οποία έχει σημαντική αντιαιμοπεταλιακή δράση, αναστέλλοντας τη συσσώρευση των αιμοπεταλίων που προκαλείται από πολλούς διεγέρτες των αιμοπεταλίων (θρομβίνη, κολλαγόνο, ADP)<sup>127,128</sup>.



Εικόνα 10. Μηχανισμός δράσης ασπιρίνης



#### 4.2.2. Τριφλουζάλη

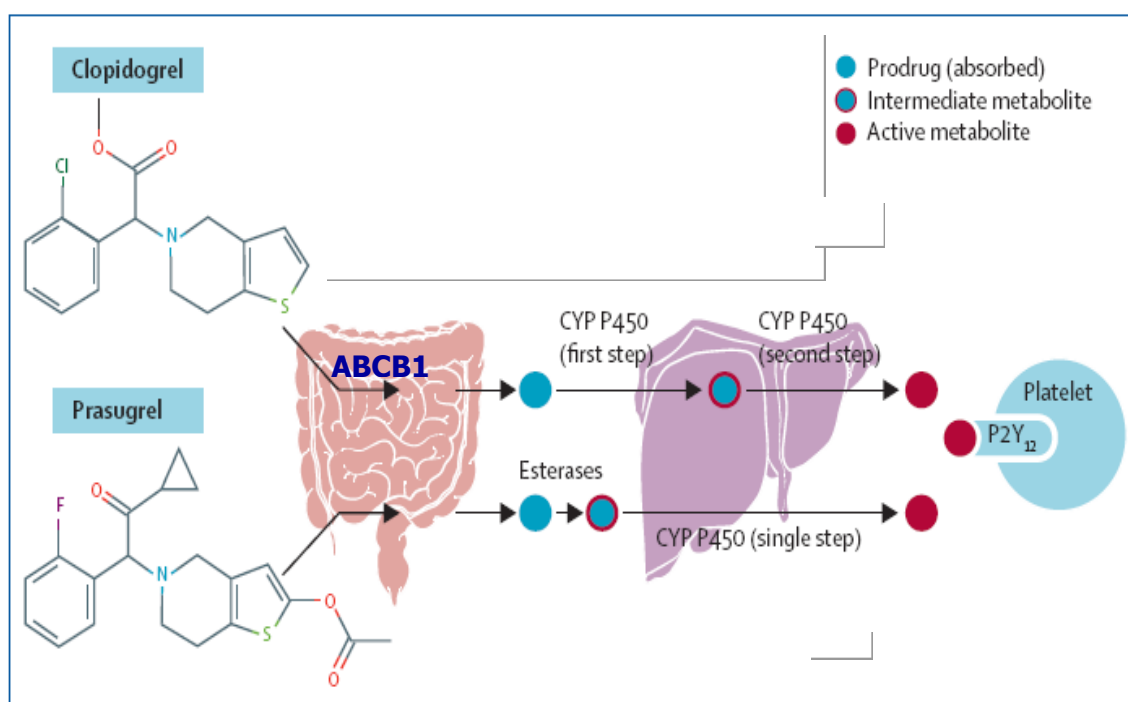
Μία εναλλακτική της ασπιρίνης φαρμακευτική ουσία είναι η τριφλουζάλη (2-acetyloxy-4-trifluoromethyl benzoic acid) η οποία έχει δομικές ομοιότητες με το ακετυλοσαλικυλικό οξύ και δρα αναστέλλοντας την COX-1 των αιμοπεταλίων και συνεπώς την παραγωγή του TxA<sub>2</sub> (Εικόνα 3). Επίσης, η τριφλουζάλη αναστέλλει τη φωσφοδιεστεράση των αιμοπεταλίων, αυξάνοντας έτσι τα επίπεδα των c-AMP και c-GMP που έχουν ισχυρή αντιαιμοπεταλιακή δράση. Είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι η τριφλουζάλη δεν επηρεάζει το σχηματισμό της PGI<sub>2</sub>. Ο μεταβολίτης της τριφλουζάλης (2-OH-4-trifluoromethyl benzoic acid, HTB) εξακολουθεί να εμφανίζει βιολογική δραστηριότητα και έχει μεγάλο χρόνο ημιζωής ( $34.3 \pm 5.3$  h)<sup>129</sup>.

#### 4.2.3. Ανταγωνιστές του υποδοχέα P2Y<sub>12</sub> του ADP

Οι ανταγωνιστές του υποδοχέα P2Y<sub>12</sub> του ADP είναι τα ευρύτερα χρησιμοποιούμενα, μαζί με την ασπιρίνη, αντιαιμοπεταλιακά φάρμακα. Ο υποδοχέας P2Y<sub>12</sub> διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στις βιοχημικές αντιδράσεις που προκαλούν την πλήρη μη αντιστρεπτή ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων από το ADP, η οποία οδηγεί τόσο στην αποκοκκίωση, όσο και στη συσσώρευση των αιμοπεταλίων. Γι' αυτό η χρήση των φαρμάκων αυτών έχει συμβάλει σημαντικά στην πρόληψη των θρομβωτικών επεισοδίων και στη συνολική μείωση της καρδιαγγειακής θνητότητας<sup>16</sup>. Οι ανταγωνιστές του υποδοχέα P2Y<sub>12</sub> που χρησιμοποιούνται σήμερα στην κλινική πράξη είναι η κλοπιδογρέλη, η πρασουγρέλη και η τικαγρελόρη. Ο πρώτος χρονικά ανταγωνιστής ήταν η τικλοπιδίνη της οποίας όμως η χρήση έχει σήμερα περιοριστεί εξαιτίας των επιπλοκών (Εικόνα 9)<sup>130</sup>.

#### 4.2.3.1. Κλοπιδογρέλη

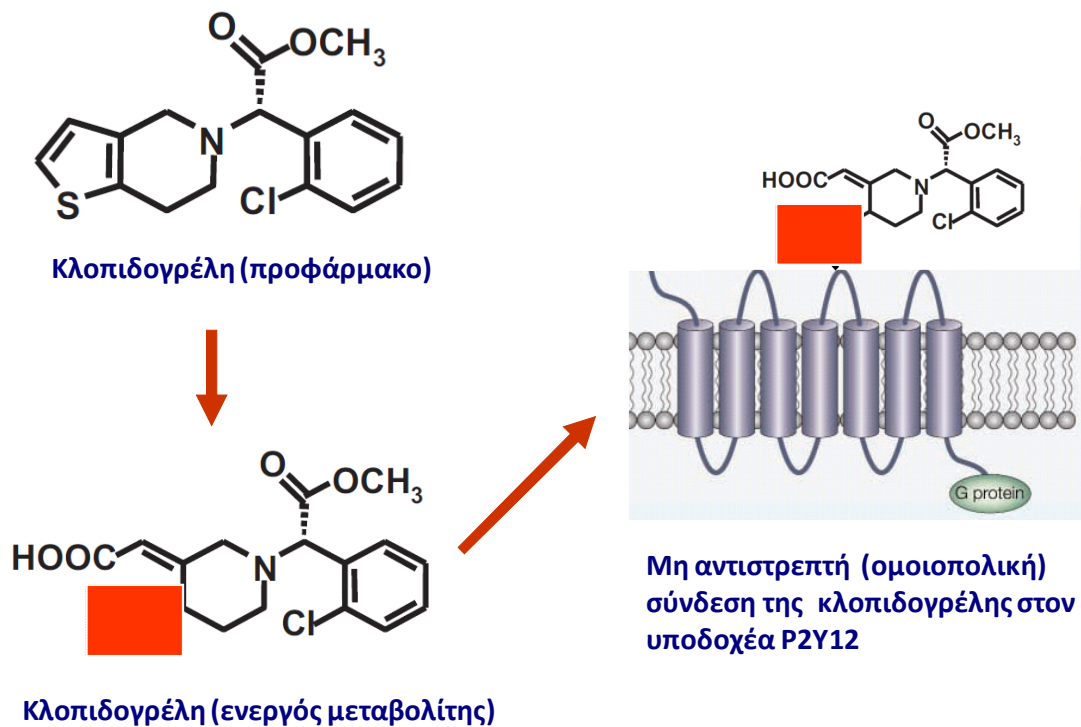
Η κλοπιδογρέλη ανήκει στην οικογένεια των θειενοπυρινιδών, στην οποία επίσης ανήκουν η τικλοπιδίνη και η πρασουγρέλη, και έχει ισχυρή αντιαιμοπεταλιακή δράση. Η κλοπιδογρέλη είναι ένα προ-φάρμακο που μετά τη χορήγησή της απορροφάται στο έντερο με μια διαδικασία στην οποία σημαντικό ρόλο διαδραματίζει ο πρωτεϊνικός μεταφορέας ABCB1/MDR1. Στη συνέχεια, η κλοπιδογρέλη μετατρέπεται στο ήπαρ στο φαρμακολογικά ενεργό μεταβολίτη της με τη δράση διαφόρων ισομορφών του κυτοχρώματος P450 (CYP450), κυρίως του CYP2C19 αλλά και των CYP3A4, CYP3A5, CYP1A2, CYP2B6 και CYP2C9<sup>131</sup> (Εικόνες 9,11).



**Εικόνα 11.** Μεταβολισμός κλοπιδογρέλης και πρασουγρέλης

Μέγιστα επίπεδα του ενεργού μεταβολίτη στο αίμα παρατηρούνται εντός 1 h από τη χορήγηση 600mg κλοπιδογρέλης από το στόμα. Πρέπει να σημειωθεί ότι το 85% της κλοπιδογρέλης που απορροφάται, υδrolύεται από τις εστεράσες του εντερικού

βλεννογόνου και του αίματος προς το σχηματισμό βιολογικά αδρανών προϊόντων. Ο χρόνος ημιζωής του ενεργού μεταβολίτη ύστερα από μεμονωμένη ή και επαναλαμβανόμενη χορήγηση κλοπιδογρέλης είναι 8 h. Ο ενεργός μεταβολίτης της κλοπιδογρέλης είναι ένας ισχυρός εκλεκτικός μη αντιστρεπτός αναστολέας του υποδοχέα P2Y<sub>12</sub> του ADP ο οποίος σχηματίζει δισουλφιδικούς δεσμούς με δύο κατάλοιπα σερίνης του μορίου του υποδοχέα, με αποτέλεσμα τη μη αντιστρεπτή αναστολή της σύνδεσης του ADP στο συγκεκριμένο υποδοχέα (*Εικόνα 12*)<sup>132</sup>. Η αναστολή της πρόσδεσης του ADP στον υποδοχέα P2Y<sub>12</sub> από τον μεταβολίτη της κλοπιδογρέλης έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση των επιπέδων του κυκλικού AMP (c-AMP) στο κυτόπλασμα των αιμοπεταλίων, η οποία μεταξύ των άλλων επάγει τη φωσφορυλίωση της φωσφοπρωτεΐνης VASP (vasodilator stimulated phosphoprotein), με τελικό αποτέλεσμα την αναστολή της ενεργοποίησης των υποδοχέων GPIIb/IIIa και συνεπώς την παρεμπόδιση της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων. Η μέγιστη ανασταλτική δράση της κλοπιδογρέλης επιτυγχάνεται σε 24 h μετά από χορήγηση 75mg, σε 6 h μετά από χορήγηση 300mg και σε 2 h μετά από δόση φόρτισης 600mg. Με δεδομένο ότι το 10% των αιμοπεταλίων του αίματος ανανεώνεται καθημερινά, σε 5 ημέρες μετά τη λήψη της τελευταίας δόσης της κλοπιδογρέλης το 50% των κυκλοφορούντων αιμοπεταλίων θα είναι πλήρως λειτουργικά και ικανά να εξασφαλίσουν αποτελεσματική αιμόσταση<sup>132</sup>.



**Εικόνα 12.** Μηχανισμός δράση κλοπιδογρέλης στο αιμοπετάλιο

Το τελικό αποτέλεσμα από την χορήγησης κλοπιδογρέλης (η αναστολή της διέγερσης των αιμοπεταλίων από το ADP) επηρεάζεται από πολλούς παράγοντες. Η απορρόφηση (εντερικός βλεννογόνος) και ο μεταβολισμός της κλοπιδογρέλης (εστεράσες, ισομορφές του CYP450) είναι μια αλληλουχία σταδίων που καθορίζουν την τελική ποσότητα του παραγόμενου ενεργού μεταβολίτη. Επίσης, υπάρχει στενή συσχέτιση μεταξύ της συγκέντρωσης του ενεργού μεταβολίτη στο πλάσμα και της ταχύτητας αλλά και του βαθμού αναστολής της ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων. Τέλος, παράγοντες που επηρεάζουν τη συγγένεια της κλοπιδογρέλης με τον υποδοχέα του ADP P2Y12 στη μεμβράνη των αιμοπεταλίων μπορούν να τροποποιήσουν τη δράση της. Η κλινική σημασία των παραπάνω παραγόντων που καθορίζουν το ρυθμό και την ποσότητα παραγωγής του ενεργού μεταβολίτη καθώς και την αλληλεπίδρασή του με τον υποδοχέα P2Y12 είναι μεγάλη με δεδομένο ότι στους παράγοντες που επηρεάζουν τις

φαρμακοκινητικές και φαρμακοδυναμικές ιδιότητες του φαρμάκου συμπεριλαμβάνονται και γονιδιακοί πολυμορφισμοί (ιδιαίτερα του *CYP2C19* και του *ABCB1*). Ασθενείς με τον πολυμορφισμό *CYP2C19\*2* ή *ABCB1 C3435T* έχουν χαμηλότερα επίπεδα του ενεργού μεταβολίτη της κλοπιδογρέλης στο πλάσμα, μικρότερη αναστολή των αιμοπεταλίων και συνεπώς μεγαλύτερο κίνδυνο ενός νέου θρομβωτικού επεισοδίου μετά από ένα ΟΣΣ ή αγγειοπλαστική<sup>131,133,134</sup>.

#### 4.2.3.2. Πρασουγρέλη

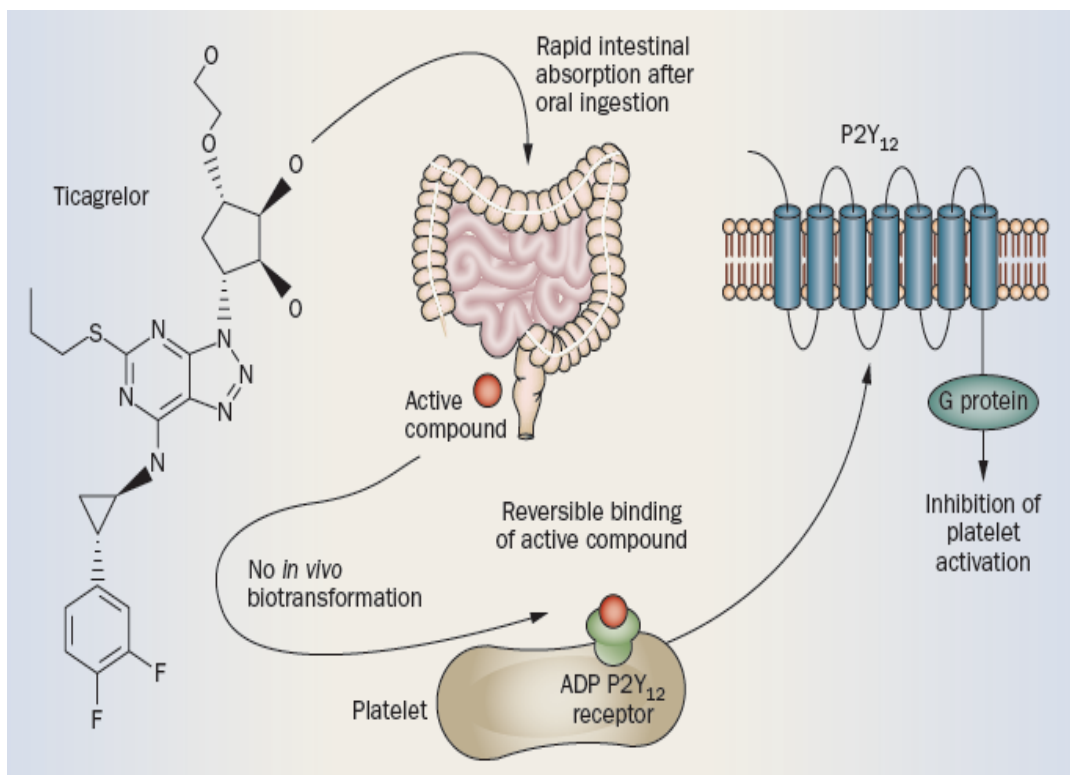
Η πρασουγρέλη είναι τρίτης γενιάς θειενοπυριδίνη και είναι επίσης προ φάρμακο. Έχει ισχυρότερη και ταχύτερη δράση από την κλοπιδογρέλη και αυτό οφείλεται κυρίως στο διαφορετικό φαρμακοκινητικό προφίλ της, δηλαδή την ταχύτερη μεταβολική ενεργοποίηση διαμέσου του *CYP450* στο ήπαρ και τη γρηγορότερη εμφάνιση υψηλότερων συγκεντρώσεων του δραστικού μεταβολίτη σε σχέση με την κλοπιδογρέλη. Το μέγιστο της συγκέντρωσης του ενεργού μεταβολίτη της πρασουγρέλης στο πλάσμα επιτυγχάνεται εντός 30 min από τη χορήγηση του φαρμάκου. Όπως συμβαίνει και με την κλοπιδογρέλη, ο ενεργός μεταβολίτης της πρασουγρέλης συνδέεται ομοιοπολικά με τον υποδοχέα του *ADP P2Y12* προκαλώντας μη αντιστρεπτή αναστολή της ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων από το *ADP* (Εικόνες 9,11)<sup>135</sup>. Είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι η ενεργοποίηση της πρασουγρέλης στο ήπαρ δεν επηρεάζεται από γονιδιακούς πολυμορφισμούς (πχ του *CYP2C19*) όπως συμβαίνει με την κλοπιδογρέλη και συνεπώς εμφανίζεται σπάνια το φαινόμενο της αντίστασης<sup>136</sup>. Επίσης σε κλινικές μελέτες όπου η πρασουγρέλη αντικατέστησε την κλοπιδογρέλη, παρατηρήθηκε καλύτερη αντιαιμοπεταλιακή δράση ακόμα και σε ασθενείς που εμφάνισαν αντίσταση στην κλοπιδογρέλη<sup>137,138</sup>. Η μελέτη TRITON-TIMI 38 έδειξε ότι η χορήγηση πρασουγρέλης σε

ασθενείς με ΟΣΣ που υποβάλλονται σε αγγειοπλαστική προκαλεί σημαντικά μεγαλύτερη ελάττωση των μειζόνων καρδιαγγειακών συμβάντων σε σχέση με την κλοπιδογρέλη, κυρίως κατά τον πρώτο μήνα μετά την επέμβαση. Ωστόσο, η χορήγηση πρασουγρέλης σχετίζεται με σημαντικά μεγαλύτερο κίνδυνο μειζόνων αιμορραγιών (με εξαίρεση τους ασθενείς με σακχαρώδη διαβήτη και τους ασθενείς με έμφραγμα μυοκαρδίου, οι οποίες παρατηρούνται κυρίως μετά τον πρώτο μήνα από την αγγειοπλαστική)<sup>139</sup>.

#### 4.2.3.3. Τικαγρελόρη

Η τικαγρελόρη (AZD6140) είναι ένας νέος, ισχυρός, εκλεκτικός μη συναγωνιστικός αναστολέας του υποδοχέα του ADP P2Y<sub>12</sub>. Πρόκειται για μέλος μιας νέας κατηγορίας αναστολέων του αιμοπεταλιακού υποδοχέα P2Y<sub>12</sub> (cyclo-pentyl-triazolo-pyrimidines, CPTP). Η τικαγρελόρη διαφοροποιείται από τις θειενοπυριδίνες ως προς τον μηχανισμό δράσης της, διότι προκαλεί αντιστρεπτή αναστολή του P2Y<sub>12</sub> συνδεδεμένη μη ομοιοπολικά σε διαφορετική θέση από αυτή στην οποία συνδέονται οι θειενοπυριδίνες, συνεπώς δεν επηρεάζει τη σύνδεση του ADP στον υποδοχέα (μη συναγωνιστική αναστολή) (*Εικόνες 9,13*). Η τικαγρελόρη χορηγείται από το στόμα σε ενεργό μορφή, απορροφάται γρήγορα από τον γαστρεντερικό σωλήνα και συνδέεται άμεσα στον αιμοπεταλιακό υποδοχέα χωρίς να χρειαστεί προηγούμενη ενεργοποίηση. Ο χρόνος ημιζωής της είναι 7-8h. Αποικοδομείται στο ήπαρ με τη δράση των ισομορφών του CYP450, CYP3A4/5. Απεκκρίνεται, κυρίως, διαμέσου της χοληφόρου οδού. Είναι ενδιαφέρον να τονιστεί ότι η αποικοδόμηση της τικαγρελόρης οδηγεί στην παραγωγή τόσο αδρανών όσο και ενεργών μεταβολιτών όπως είναι ο AR-C124910XX ο οποίος έχει χρόνο ημιζωής 10h και συμβάλει κατά 30-40% στη συνολική αντιαιμοπεταλιακή δράση της τικαγρελόρης<sup>140</sup>. Η κλινική αποτελεσματικότητα της τικαγρελόρης σε σχέση με αυτή της

κλοπιδογρέλης διερευνήθηκε στη μελέτη PLATO που συμπεριέλαβε ένα ευρύ φάσμα ασθενών με ΟΣΣ. Η μελέτη έδειξε ότι η τικαγρελόρη ήταν καλύτερη από την κλοπιδογρέλη ως προς τη μείωση της θνητότητας οποιασδήποτε αιτιολογίας καθώς και της καρδιαγγειακής θνητότητας<sup>141</sup>. Δεν παρατηρήθηκαν διαφορές ως προς τις μείζονες αιμορραγικές επιπλοκές μεταξύ των δυο φαρμάκων, με εξαίρεση τις αιμορραγίες που δεν οφείλονταν σε επεμβάσεις αορτοστεφανιαίας παράκαμψης (CABG)<sup>142</sup>.



**Εικόνα 13.** Μεταβολισμός και μηχανισμός δράση τικαγρελόρης

#### 4.2.3.4. Καγκρελόρη

Η καγκρελόρη είναι ένα τριφωσφορικό ανάλογο της αδενοσίνης, που έχει ισχυρή, άμεση και αντιστρεπτή αναστολή του υποδοχέα του ADP των αιμοπεταλίων P2Y<sub>12</sub>. Είναι ο

πρώτος αναστολέας του υποδοχέα P2Y<sub>12</sub> ο οποίος είναι διαθέσιμος σε ενδοφλέβια μορφή. Δρα άμεσα στον υποδοχέα P2Y<sub>12</sub> χωρίς την ανάγκη μετατροπής του στο ήπαρ σε ενεργό μεταβολίτη, σε αντίθεση με την κλοπιδογρέλη και την πρασουγρέλη. Έχει ταχεία έναρξη δράσης (μερικά δευτερόλεπτα) και μικρό χρόνο ημιζωής (6 min). Η ανασταλτική δράση της καγκρελόρης αναστρέφεται σε 60 min μετά τη διακοπή της έγχυσης του φαρμάκου. Αφού συνδεθεί με τον υποδοχέα P2Y<sub>12</sub> η καγκρελόρη απενεργοποιείται ταχέως από μία ADPάση που βρίσκεται στην επιφάνεια των ενδοθηλιακών κυττάρων των αγγείων (Εικόνα 9)<sup>143</sup>.

#### 4.2.3.5. Ελινογρέλη

Η ελινογρέλη είναι ένας νέος, άμεσος, αντιστρεπτός αναστολέας του υποδοχέα P2Y<sub>12</sub> ο οποίος βρίσκεται υπό διερεύνηση για την εφαρμογή του στη θεραπεία των ΟΣΣ. Είναι διαθέσιμος και σε ενδοφλέβια και σε από του στόματος μορφή και αυτό έχει πολύ σημαντικό όφελος, καθώς του προσδίδει τη δυνατότητα της εύκολης μετατροπής από βραχυχρόνια ενδοφλέβια σε μακροχρόνια από του στόματος αντιαιμοπεταλιακή θεραπεία. Ο μέσος όρος ημίσειας ζωής των 40 mg ελινογρέλης στο πλάσμα είναι περίπου 11 ώρες (Εικόνα 9)<sup>144</sup>.

#### 4.2.4. Διπυριδαμόλη

Η διπυριδαμόλη είναι ένα παράγωγο της πυριμιδοπυριδίνης με αντιαιμοπεταλιακή και αγγειοδιασταλτική δράση. Ο κύριος μηχανισμός δράσης της διπυριδαμόλης είναι η αναστολή της φωσφοδιεστεράσης των κυκλικών νουκλεοτιδίων c-AMP και c-GMP με αποτέλεσμα την αύξηση της ενδοαιμοπεταλιακής συγκέντρωσης των νουκλεοτιδίων αυτών



τα οποία αναστέλλουν την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων. Έχει προταθεί επίσης ότι η διπυριδαμόλη δρα αναστέλλοντας τη δέσμευση-μεταφορά της αδενοσίνης στα κύτταρα. Η απορρόφηση της κλασικής φαρμακοτεχνικής μορφής διπυριδαμόλης ποικίλλει, ενώ η βιοδιαθεσιμότητά της είναι χαμηλή. Ο χρόνος ημίσειας ζωής της διπυριδαμόλης είναι 10 h<sup>145</sup>.

#### 4.2.5. Αναστολείς του υποδοχέα GP IIb/IIIa

Οι αναστολείς της COX-1 καθώς και του υποδοχέα P2Y<sub>12</sub> του ADP, αναστέλλουν την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων που προκαλείται από το TXA<sub>2</sub> και το ADP αντίστοιχα, έχουν όμως μικρή επίδραση στην ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων από άλλους αιμοπεταλιακούς αγωνιστές όπως είναι η θρομβίνη και το κολλαγόνο. Αντίθετα, οι αναστολείς του υποδοχέα GPIIb/IIIa (αμπξισιμάμπη, επτιφιμπατίδη, τироφιμπάνη) αναστέλλουν την πρόσδεση του ινωδογόνου στον υποδοχέα GPIIb/IIIa αναστέλλοντας έτσι το κοινό μονοπάτι που οδηγεί στη συσσώρευση των αιμοπεταλίων και την περεταίρω ενεργοποίησή τους (Εικόνα 9)<sup>146</sup>. Κατά συνέπεια, οι αναστολείς του υποδοχέα GPIIb/IIIa είναι ισχυρά αντιαιμοπεταλιακά φάρμακα με καλή κλινική αποτελεσματικότητα αλλά αυξημένο κίνδυνο αιμορραγίας. Παρουσιάζουν σημαντικές δυσκολίες στην τιτλοποίηση της δόσης, χορηγούνται ενδοφλεβίως και η χρήση τους περιορίζεται, κατά κύριο λόγο, κατά τη διάρκεια και αμέσως μετά την αγγειοπλαστική σε ασθενείς με συγκεκριμένες ενδείξεις<sup>146</sup>.



## 5. ΑΝΤΙΣΤΑΣΗ ΣΤΗΝ ΑΝΤΙΑΙΜΟΠΕΤΑΛΙΑΚΗ ΘΕΡΑΠΕΙΑ

### 5.1. Γενικά

Η από του στόματος χορήγηση αντιαιμοπεταλιακών φαρμάκων στη δευτερογενή πρόληψη, έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση κατά 25% του κινδύνου OEM και κατά 20% των θανάτων καρδιαγγειακής αιτιολογίας. Επίσης, νοσηλεία εξαιτίας ενός νέου OEM ή ΑΕΕ ή θάνατος καρδιαγγειακής αιτιολογίας παρατηρείται σε 15% των ασθενών με στεφανιαία νόσο παρά τη συνεχή λήψη αντιαιμοπεταλιακής αγωγής<sup>147</sup>. Οι παραπάνω παρατηρήσεις οδηγούν στην ανάγκη διερεύνησης και κατανόησης των υποκείμενων μηχανισμών που είναι κυρίως υπεύθυνοι για την ανεπαρκή αποτελεσματικότητα (αντίσταση) των αντιαιμοπεταλιακών φαρμάκων σε ορισμένους ασθενείς, εγείρουν το ζήτημα της ανεύρεσης κατάλληλης μεθοδολογίας για την έγκαιρη διάγνωση της αντίστασης στην αντιαιμοπεταλιακή αγωγή και τέλος δημιουργούν την ανάγκη βελτίωσης της αποτελεσματικότητας της αντιαιμοπεταλιακής αγωγής.

Η αντίσταση στην αντιαιμοπεταλιακή αγωγή διακρίνεται στην **κλινική αντίσταση**, που αναφέρεται στο φαινόμενο εμφάνισης ενός νέου θρομβωτικού επεισοδίου σε ασθενείς που βρίσκονται υπό αντιαιμοπεταλιακή αγωγή και στην **εργαστηριακή αντίσταση**, η οποία αφορά στην αδυναμία της αντιαιμοπεταλιακής θεραπείας να προκαλέσει αναστολή της λειτουργικότητας των αιμοπεταλίων όπως αυτή προσδιορίζεται *ex vivo* με μία ή περισσότερες από τις υπάρχουσες εργαστηριακές μεθόδους<sup>147</sup>.

Με βάση τα μέχρι σήμερα δεδομένα, η αντίσταση στην αντιαιμοπεταλιακή αγωγή αφορά την ασπιρίνη και την κλοπιδογρέλη. Η αντίσταση στην ασπιρίνη είναι ανεξάρτητος

παράγοντας κινδύνου εμφάνισης μείζονος καρδιαγγειακού επεισοδίου. Εργαστηριακή αντίσταση στην ασπιρίνη έχει παρατηρηθεί στο 5-9% των ασθενών με ΣΝ, ενώ η συχνότητα εμφάνισης καρδιαγγειακών συμβάντων σε ασθενείς με κλινική αντίσταση στην ασπιρίνη είναι περίπου 40%<sup>147</sup>. Το μεγαλύτερο ενδιαφέρον σχετικά με την αντίσταση στην αντιαιμοπεταλιακή αγωγή έχει επικεντρωθεί τα τελευταία χρόνια στην κλοπιδογρέλη, ιδιαίτερα όταν αποδείχθηκε ότι έχει γενετικό υπόβαθρο<sup>147</sup>. Πράγματι, οι πολυμορφισμοί των γονιδίων που κωδικοποιούν είτε τον πρωτεϊνικό μεταφορέα ABCB1 που είναι υπεύθυνος για την απορρόφηση των θειενοπυρινιδών (κλοπιδογρέλης, πρασουγρέλης) στον εντερικό βλεννογόνο, είτε την ισομορφή CYP2C19 του κυτοχρώματος P450 που συμβάλλει στο μεταβολισμό της κλοπιδογρέλης και το σχηματισμό του ενεργού μεταβολίτη της, επηρεάζουν σημαντικά τις φαρμακοκινητικές και φαρμακοδυναμικές ιδιότητες της κλοπιδογρέλης<sup>131,148</sup>. Προοπτικές μελέτες σε ασθενείς που έλαβαν κλοπιδογρέλη μετά από αγγειοπλαστική έδειξαν ότι οι ασθενείς που έχουν μη λειτουργικά αλληλία των παραπάνω γονιδίων εμφανίζουν στατιστικά σημαντική αύξηση, έως και 4 φορές, του κινδύνου μείζονων καρδιαγγειακών επεισοδίων κατά τη διάρκεια 12 μηνών παρακολούθησης μετά την αγγειοπλαστική σε σύγκριση με τους ασθενείς που έχουν λειτουργικά αλληλία των παραπάνω γονιδίων<sup>149-151</sup>. Σε αντίθεση με την κλοπιδογρέλη, το φαινόμενο της αντίστασης παρουσιάζεται σπάνια στους ασθενείς που λαμβάνουν πρασουγρέλη, σύμφωνα με τα αποτελέσματα πρόσφατων μελετών όπως η μελέτη φάσης 2 SWAP (SWitching Anti Platelet)<sup>152</sup> και η φαρμακογενετική ανάλυση που έγινε σε ασθενείς που συμμετείχαν στη μελέτη TRITON-TIMI 38<sup>153</sup>. Επίσης, το φαινόμενο της αντίστασης δεν έχει παρουσιαστεί μέχρι σήμερα στους ασθενείς που λαμβάνουν τικαγρελόρη, σύμφωνα με τα αποτελέσματα πρόσφατων μελετών, όπως είναι η φαρμακογενετική ανάλυση που έγινε σε ασθενείς που συμμετείχαν στη μελέτη PLATO<sup>141</sup>.

## **5.2. Εργαστηριακές μέθοδοι διάγνωσης της αντίστασης στην αντιαιμοπεταλιακή αγωγή**

Υπάρχουν πολλές μέθοδοι διάγνωσης της αντίστασης στην ασπιρίνη ή στην κλοπιδογρέλη. Παρακάτω θα περιγραφούν σύντομα οι μέθοδοι που έχουν κυρίως χρησιμοποιηθεί σε κλινικές μελέτες

### **5.2.1. Προσδιορισμός των μεταβολιτών του αραχιδονικού οξέος**

Χρησιμοποιείται για τον έλεγχο της αποτελεσματικότητας της αντιαιμοπεταλιακής δράσης της ασπιρίνης, μετρώντας την παραγωγή του  $\text{TxA}_2$  από το αραχιδονικό οξύ. Η παραγωγή του  $\text{TxA}_2$  αυξάνεται κατά την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων και αναστέλλεται παρουσία της ασπιρίνης. Το  $\text{TxA}_2$  είναι ασταθές μόριο και μεταβολίζεται άμεσα στους σταθερούς μεταβολίτες  $\text{TxB}_2$  που προσδιορίζεται στον ορό και 11-διϋδρο- $\text{TxB}_2$  που προσδιορίζεται στα ούρα. Καθώς τα επίπεδα των παραπάνω μεταβολιτών καθορίζονται κυρίως από την COX-1 των αιμοπεταλίων, ο προσδιορισμός τους αποτελεί αξιόπιστο δείκτη της αποτελεσματικότητας ως προς την αντιαιμοπεταλιακή δράση χαμηλών δόσεων ασπιρίνης. Υψηλά επίπεδα  $\text{TxA}_2$  στον ορό ή 11-διϋδρο- $\text{TxB}_2$  στα ούρα σε ασθενείς που λαμβάνουν ασπιρίνη είναι ένδειξη αντίστασης στην ασπιρίνη και συνδυάζονται με αυξημένο καρδιαγγειακό κίνδυνο<sup>154</sup>.

### **5.2.2. Προσδιορισμός των επιπέδων των μεταβολιτών της κλοπιδογρέλης**

Για τον ποσοτικό προσδιορισμό των επιπέδων των μεταβολιτών της κλοπιδογρέλης χρησιμοποιείται η μέθοδος της υγρής χρωματογραφίας, συζευγμένης με φασματομετρία

μαζών (LC/MS). Το πλεονέκτημα της μεθόδου αυτής είναι ότι μπορεί να ανιχνεύσει και να ποσοτικοποιήσει πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις των μεταβολιτών της κλοπιδογρέλης<sup>155</sup>.

### **5.2.3. Φωσφορυλίωση της φωσφοπρωτεΐνης VASP (vasodilator stimulated phosphoprotein)**

Ο προσδιορισμός γίνεται με κυτταρομετρία ροής χρησιμοποιώντας ένα εξειδικευμένο μονοκλωνικό αντίσωμα που αναγνωρίζει τη φωσφορυλιωμένη μορφή της VASP. Η μέθοδος αυτή επιτρέπει την εκτίμηση της απόκρισης των αιμοπεταλίων στη δράση των θειενοπυριδινών η οποία ποσοτικοποιείται με τον δείκτη αιμοπεταλιακής δραστηριότητας (Platelet Reactivity Index, PRI)<sup>156</sup>. Η μέθοδος αυτή θεωρείται μέθοδος αναφοράς γιατί είναι πολύ αξιόπιστη και εύκολη στη χρήση της. Το κύριο μειονέκτημά της είναι ότι απαιτείται ακριβής οργανολογία (κυτταρόμετρο ροής).

### **5.2.4. Σύσσωρομετρία οπτικής διαπερατότητας (Light transmittance aggregometry, LTA)**

Είναι η πλέον χρησιμοποιημένη μέθοδος μελέτης της ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων και για το λόγο αυτό θεωρείται μέθοδος αναφοράς. Διενεργείται σε πλάσμα πλούσιο σε αιμοπετάλια (Platelet Rich Plasma, PRP). Η LTA χρησιμοποιείται για τη διάγνωση της αντίστασης είτε στην ασπιρίνη (χρησιμοποίηση αραχιδονικού οξέος ως αγωνιστή), είτε στην κλοπιδογρέλη (χρησιμοποίηση ADP ως αγωνιστή) Η μέθοδος αυτή είναι πολύ αξιόπιστη με ακρίβεια και επαναληψιμότητα, απαιτεί όμως υψηλή εξειδίκευση και εμπειρία του χειριστή. Για το λόγο αυτό η χρήση της μεθόδου LTA είναι δύσκολο να

εφαρμοστεί στην καθημερινή κλινική πράξη στις καρδιολογικές κλινικές και περιορίζεται σε εξειδικευμένα εργαστήρια.

### **5.2.5. Συσσωρευομετρία εμπέδησης (Impedence Aggregometry)**

Είναι μια μέθοδος που διενεργείται σε ολικό αίμα και εκτιμά την προσκόλληση/συσσώρευση των αιμοπεταλίων. Στηρίζεται στην αρχή της μέτρησης της αλλαγής της ηλεκτρικής αντίστασης του αίματος όταν τα αιμοπετάλια που ενεργοποιούνται από φυσιολογικούς διεγέρτες (π.χ. ADP ή αραχιδονικό οξύ) προσκολλώνται και συσσωρεύονται σε δύο ηλεκτρόδια που τοποθετούνται μέσα στο υπό εξέταση δείγμα. Σήμερα η τεχνική αυτή μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως μέθοδος point-of-care για τη διάγνωση της αντίστασης σε ασπιρίνη ή κλοπιδογρέλη χρησιμοποιώντας τον αναλυτή *Multiplate*<sup>®</sup> (*Dynabate*)<sup>157</sup>.

### **5.2.6. Κυτταρομετρία ροής (Flow Cytometry)**

Η τεχνική αυτή χρησιμοποιείται ευρέως για τη διερεύνηση της λειτουργικότητας των αιμοπεταλίων. Μερικές εφαρμογές της μεθόδου στα αιμοπετάλια είναι ο προσδιορισμός της μεμβρανικής έκφρασης πρωτεϊνών όπως η P-σελεκτίνη, ο υποδοχέας-ιντεγκρίνη α<sub>IIb</sub>β<sub>3</sub> GPIIb/IIIa), το CD40L, η ανίχνευση των κυκλοφορούντων συσσωματωμάτων λευκοκυττάρων-αιμοπεταλίων στο ολικό αίμα, κλπ. Η κυτταρομετρία ροής πλεονεκτεί στο ότι απαιτεί πολύ μικρή ποσότητα ολικού αίματος, μπορεί να εφαρμοστεί και σε ασθενείς με θρομβοπενία, επιτρέπει την ανάλυση πολλών παραμέτρων ταυτόχρονα με μεγάλη ακρίβεια και επαναληψιμότητα. Στα μειονεκτήματα της μεθόδου συγκαταλέγονται το

υψηλό κόστος της και το εξειδικευμένο προσωπικό που απαιτείται για τη σωστή λειτουργία του κυτταρομέτρου<sup>158</sup>.

### **5.2.7. VerifyNow<sup>®</sup>(Acumetrics)**

Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιεί ολικό αίμα και εκτιμά την συσσώρευση των αιμοπεταλίων που ενεργοποιούνται από φυσιολογικούς διεγέρτες (ADP, αραχιδονικό οξύ, κλπ). Τα ενεργοποιημένα αιμοπετάλια προσκολλώνται σε σφαιρίδια επικαλυμμένα με ινωδογόνο διαμέσου του ενεργοποιημένου υποδοχέα GPIIb/IIIa ο οποίος δεσμεύεται στα μόρια ινωδογόνου. Η μέτρηση της προσκόλλησης των αιμοπεταλίων στα σφαιρίδια γίνεται με βάση την αρχή της αλλαγής της οπτικής πυκνότητας του δείγματος ολικού αίματος. Τα αποτελέσματα εκφράζονται σε PRU (Platelet Reaction Units). Η μέθοδος VerifyNow<sup>®</sup> διενεργείται σε ολικό αίμα γεγονός που επιτρέπει τη χρησιμοποίησή της ως point-of-care για την εκτίμηση της θεραπείας με ασπιρίνη (VerifyNow Aspirin Assay), με θειενοπυριδίνες (VerifyNow<sup>®</sup> P2Y12 Test) και με τους αναστολείς του υποδοχέα GPIIb/IIIa (VerifyNow IIb/IIIa Assay)<sup>122,159</sup>.

### **5.2.8. Σύστημα ανάλυσης της αιμοπεταλιακής λειτουργικότητας (Platelet function analysis system, PFA-100<sup>®</sup>)**

Η PFA-100 είναι μια μέθοδος που διενεργείται σε ολικό αίμα, συνεπώς δεν απαιτείται ιδιαίτερη προετοιμασία των δειγμάτων μετά την αιμοληψία. Η μέθοδος αυτή προσδιορίζει την προσκόλληση των αιμοπεταλίων στο κολλαγόνο υπό συνθήκες ροής όταν αυτά ενεργοποιηθούν παρουσία διαφόρων αγωνιστών. Τα αντιδραστήρια της μεθόδου που είναι σήμερα διαθέσιμα στην αγορά επιτρέπουν την εκτίμηση της απόκρισης των αιμοπεταλίων



στην ασπιρίνη ή στις θεινοπυριδίνες (κλοπιδογρέλη, πρασουγρέλη). Η χρησιμότητα της μεθόδου σε κλινικό επίπεδο βρίσκεται υπό διερεύνηση<sup>157,160</sup>.

### 5.2.9. Φαρμακογενετικές Μέθοδοι

Χρησιμοποιούνται για τον έλεγχο ύπαρξης πολυμορφισμών γονιδίων που κωδικοποιούν πρωτεΐνες που εμπλέκονται στο μεταβολισμό των θεινοπυριδινών όπως είναι η πρωτεΐνη-μεταφορέας ABCB1 και ισομορφή *CYP2C19* του κυτοχρώματος P450. Οι μέθοδοι αυτές είναι χρήσιμες όχι μόνο για τη διερεύνηση της αντίστασης στην κλοπιδογρέλη, αλλά μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθούν στη διερεύνηση πολυμορφισμών που συσχετίζονται με αυξημένη αντιαμοπεταλιακή δράση της κλοπιδογρέλης. Η μέθοδος μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως point-of-care για την εκτίμηση της θεραπείας με θεινοπυριδίνες, η χρησιμότητά της όμως σε κλινικό επίπεδο βρίσκεται υπό διερεύνηση<sup>150,161</sup>.

### 5.3. Αντίσταση στην κλοπιδογρέλη

Η αντίσταση στην κλοπιδογρέλη είναι ένα φαινόμενο το οποίο έχει προκύψει σχετικά πρόσφατα στην καθημερινή ιατρική πρακτική<sup>162</sup>. Παρόλα αυτά ο όρος «κακή απόκριση» φαίνεται να είναι πιο κατάλληλος, μιας και οι ασθενείς διατηρούν ένα βαθμό απόκρισης στη φαρμακευτική αγωγή<sup>163,164</sup>. Η κακή απόκριση στην κλοπιδογρέλη ποικίλει σε ποσοστά μεταξύ 4% και 44% σε διαφορετικούς πληθυσμούς<sup>164,165</sup>. Με εργαστηριακούς όρους, ο ορισμός της αντίστασης της κλοπιδογρέλης ποικίλει ανάλογα με τη διαφορετική δοκιμασία που χρησιμοποιείται κάθε φορά για να ποσοτικοποιηθεί η υπολειπόμενη ενεργότητα των αιμοπεταλίων και την επιλογή των τιμών κατωφλίου.

### **5.3.1. Εργαστηριακές μέθοδοι διάγνωσης της αντίστασης στην κλοπιδογρέλη**

Έχουν αναφερθεί εκτενώς σε προηγούμενο σημείο.

### **5.3.2. Εργαστηριακά κριτήρια ορισμού της αντίστασης στην κλοπιδογρέλη**

Στην πρόσφατη συμφωνία ειδικών για την αντιαιμοπεταλιακή αγωγή καθορίστηκαν τα όρια της απόκρισης των αιμοπεταλίων στην αντιαιμοπεταλιακή αγωγή για τις περισσότερο χρησιμοποιούμενες εργαστηριακές μεθόδους. Σύμφωνα με τα συμπεράσματα αυτής της συμφωνίας, κακή απόκριση των αιμοπεταλίων στην ακολουθούμενη αντιαιμοπεταλιακή αγωγή με κλοπιδογρέλη συμβαίνει όταν υπάρχει ένα ή περισσότερα από τα παρακάτω κριτήρια<sup>166</sup>:

1. PRI >50%, με τη μέθοδο VASP
2. PRU >235-240, με τη συσκευή Verify Now P2Y12
3. MPA (Maximal Platelet Aggregation) >46% στα 5- $\mu\text{mol/l}$  ADP, με τη μέθοδο LTA
4. >468 units/min μετά από ενεργοποίηση με ADP με τη συσκευή Multiplate analyzer.

### 5.3.3. Μηχανισμοί αντίστασης στην κλοπιδογρέλη

#### 5.3.3.1. Γενετικοί πολυμορφισμοί

Έχουν προταθεί διάφοροι μηχανισμοί που θεωρούνται υπεύθυνοι για το φαινόμενο της αντίστασης στην κλοπιδογρέλη, με τους γενετικούς πολυμορφισμούς να είναι ο καλύτερα μελετημένος. Η κλοπιδογρέλη είναι ένα προ-φάρμακο και η δημιουργία του ενεργού μεταβολίτη της είναι μια διαδικασία 2 βημάτων που καταλύεται από τα ένζυμα P450 (CYP)<sup>148</sup>. Τα γονίδια που κωδικοποιούν αυτά τα ένζυμα φαίνεται να είναι πολύμορφα με ειδικά αλληλία τα οποία σχετίζονται με μειωμένη ενζυμική ενεργότητα και επομένως μειωμένη παραγωγή του ενεργού μεταβολίτη της κλοπιδογρέλης<sup>131</sup>. Ένα από τα ένζυμα κλειδιά στο μεταβολισμό της κλοπιδογρέλης είναι το CYP2C19, το οποίο εμπλέκεται και στα δύο στάδια της βιομετατροπής της κλοπιδογρέλης<sup>134,167</sup>. Έχει προταθεί ότι συνήθεις πολυμορφισμοί του ενζύμου CYP2C19, των οποίων η συχνότητα ποικίλει μεταξύ 30 και 55% του πληθυσμού, ανάλογα με την εθνική ομάδα και το γενετικό υπόβαθρο<sup>168</sup>, επηρεάζουν την εξατομικευμένη απόκριση στην κλοπιδογρέλη, τόσο φαρμακοκινητικά, όσο και φαρμακοδυναμικά<sup>133,136,138</sup>. Έχει περιγραφεί ότι φορείς τουλάχιστον ενός μειωμένης λειτουργικότητας αλληλίου του CYP2C19, έχουν μειωμένη παραγωγή του ενεργού μεταβολίτη της κλοπιδογρέλης στο πλάσμα έως 32,4% σε σύγκριση με φορείς του υγιούς αλληλίου<sup>136</sup>. Έτσι λοιπόν, το αλληλίο του CYP2C19\*2, το οποίο είναι ο πιο κοινός τύπος μεταξύ των μειωμένης λειτουργικότητας γονιδίων, φαίνεται να είναι ο κύριος δείκτης μειωμένης απόκρισης στην κλοπιδογρέλη σε πολλές μελέτες<sup>149,151,169-171</sup>. Σύμφωνα με πρόσφατα δεδομένα, τα αλληλία CYP2C19\*3 και CYP2C19\*4 μπορεί να επηρεάζουν το μεταβολισμό της κλοπιδογρέλης με παρόμοιο τρόπο όπως το CYP2C19\*2<sup>172,173</sup>. Οι πολυμορφισμοί σε ένζυμα άλλα από το CYP2C19 μπορεί επίσης να εμπλέκονται στο

μεταβολισμό της κλοπιδογρέλης, π.χ. σε φορείς των μειωμένης λειτουργικότητας γονιδίων CYP2C9 και CYP2CB6<sup>136</sup>.

### 5.3.3.2. Αλληλεπιδράσεις φαρμάκων

Ένα βασικό ζήτημα στην αντίσταση στην κλοπιδογρέλη είναι η αλληλεπίδραση με άλλα συγχορηγούμενα φάρμακα. Οι αναστολείς της αντλίας πρωτονίων (PPI) ήταν μεταξύ των πρώτων φαρμάκων που μελετήθηκαν για πιθανή αλληλεπίδραση με το μεταβολισμό της κλοπιδογρέλης. Οι Gilard και συνεργάτες έδειξαν ότι άτομα που θεραπεύτηκαν με ομεπραζόλη είχαν μειωμένη βιολογική δράση της κλοπιδογρέλης σύμφωνα με τη μέθοδο VASP<sup>174</sup>. Επίσης, οι Guisset και συνεργάτες περιέγραψαν ασθενείς, που υπεβλήθησαν σε αγγειοπλαστική για non-STEMI ΟΣΣ και πήραν ομεπραζόλη, να έχουν περισσότερο κακή απόκριση στην κλοπιδογρέλη από αυτούς που πήραν παντοπραζόλη (44% έναντι 23%,  $p=0,04$ )<sup>175</sup>. Μιας και οι PPIs μεταβολίζονται από το ίδιο CYP μεταβολικό δρόμο όπως και η κλοπιδογρέλη<sup>176</sup>, μια πιθανή εξήγηση για τη φτωχή απόκριση στην κλοπιδογρέλη ήταν η ανταγωνιστική δράση των PPIs στο ένζυμο CYP2C19. Αντίθετα με την αναφερόμενη, πιθανή αλληλεπίδραση ομεπραζόλης και κλοπιδογρέλης, η χρήση της παντοπραζόλης ή της εσομεπραζόλης δε φαίνεται να συνδέεται με μειωμένη απόκριση στην κλοπιδογρέλη<sup>177</sup>. Παρόλα αυτά, η συσσώρευση των αιμοπεταλίων ήταν σημαντικά υψηλότερη σε ασθενείς υπό ομεπραζόλη σε σύγκριση με αυτούς υπό παντοπραζόλη ή εσομεπραζόλη<sup>161</sup>. Παρατηρήθηκε, επίσης, αυξημένη υπολειπόμενη ενεργότητα των αιμοπεταλίων με τη χρήση της μεθόδου VerifyNow<sup>178</sup>. Σε αντίθεση με τα προηγούμενα, η μελέτη COGENT τυχαιοποίησε 3627 ασθενείς με ΟΣΣ και/ή τοποθέτηση stent σε κλοπιδογρέλη και κάθε ασθενής έλαβε συμπληρωματικά ομεπραζόλη ή placebo και παρακολούθηθηκε για μια περίοδο τουλάχιστον 4 μηνών. Σύμφωνα με τα ευρήματα

υπήρξαν 136 καρδιαγγειακά και 10 γαστρεντερικά συμβάντα. Δεν παρατηρήθηκε καμία διαφορά στα καρδιαγγειακά συμβάντα μεταξύ των 2 ομάδων, αλλά παρατηρήθηκαν σημαντικά λιγότερα γαστρεντερικά συμβάντα στην ομάδα της ομεπραζόλης, από ότι στην ομάδα του placebo<sup>179</sup>.

Διάφορες πρώιμες μελέτες πρότειναν ένα πιθανό αρνητικό αποτέλεσμα της χρήσης των στατινών στη δραστικότητα της κλοπιδογρέλης<sup>180-182</sup>, πιθανά λόγω του CYP3A4 ενζυματικού δρόμου που μοιράζεται μεταξύ των στατινών και της κλοπιδογρέλης. Εντούτοις, διάφορα δεδομένα, χρησιμοποιώντας νέες εύχρηστες μεθόδους για τον έλεγχο της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων στην καθημερινή κλινική πράξη, έχουν ξεκαθαρίσει μία σημαντική αλληλεπίδραση μεταξύ στατινών και κλοπιδογρέλης, συμπεραίνοντας ότι η συγχορήγηση αυτών των φαρμάκων είναι ασφαλής<sup>155,183-186</sup>.

#### **5.3.4. Κλινική σημασία της in vitro κακής απόκρισης στην κλοπιδογρέλη**

Διάφορες μελέτες έχουν δείξει ότι η ανεπαρκής αναστολή των αιμοπεταλίων οδηγεί σε ανεπιθύμητη κλινική έκβαση, όπως τα επαναλαμβανόμενα ισχαιμικά καρδιαγγειακά συμβάντα, η θρόμβωση του stent της αγγειοπλαστικής και το περιεγχειρητικό OEM. Αυτές οι μελέτες έχουν γίνει σε διαφορετικές υποομάδες ασθενών που υπέστησαν αγγειοπλαστική λόγω STEMI ΟΣΣ ή non STEMI, καθώς και σε ασθενείς που υπεβλήθησαν σε προγραμματισμένη αγγειοπλαστική. Ιδιαίτερη προσοχή έχει δοθεί στην πιο δραματική επιπλοκή, που είναι η θρόμβωση του stent<sup>187-190</sup>.

### **5.3.5. Διαχείριση ασθενών με κακή απόκριση στην κλοπιδογρέλη**

Υπάρχει ξεκάθαρη σχέση μεταξύ της κακής απόκρισης στην κλοπιδογρέλη και των καρδιαγγειακών συμβάντων. Κλινικές προσεγγίσεις για να ξεπερασθεί η κακή απόκριση στην κλοπιδογρέλη δεν έχουν καθιερωθεί ακόμη. Παρόλα αυτά, έχουν εφαρμοσθεί διάφορες μέθοδοι σε μια προσπάθεια να ξεπερασθεί η αντίσταση στην κλοπιδογρέλη. Αυτές περιλαμβάνουν υψηλότερες δόσεις φόρτισης ή συντήρησης ή αλλαγή σε άλλο αντιαιμοπεταλιακό φάρμακο.

#### **5.3.5.1. Προσαρμογή δόσης κλοπιδογρέλης**

Μια συνηθισμένη προσέγγιση για να υπερνικήσουμε την αντίσταση στην κλοπιδογρέλη είναι η προσαρμογή της δόσης. Σε ασθενείς που υποβάλλονται σε αγγειοπλαστική, μία δόση φόρτισης 600 mg κλοπιδογρέλη συσχετίστηκε με υψηλότερα επίπεδα αναστολής αιμοπεταλίων, μικρότερη μέση αντιδραστικότητα σε ADP μετά τη θεραπεία και μικρότερη επίπτωση κακής απόκρισης στην κλοπιδογρέλη, όταν συγκρίθηκε με τη δόση φόρτισης 300 mg.<sup>191-193</sup> Εντούτοις, στη μελέτη ISAR-CHOICE υπήρχε ένα πρόσθετο αποτέλεσμα σχετικά με τα επίπεδα των μεταβολιτών της κλοπιδογρέλης και της αναστολής των αιμοπεταλίων μεταξύ των 600 και των 900 mg δόσης φόρτισης<sup>194</sup>. Οι συγγραφείς συμπέραναν ότι μία μονή δόση κλοπιδογρέλης >600 mg δε σχετίζεται με πρόσθετη σημαντική καταστολή της λειτουργικότητας των αιμοπεταλίων. Αυτό μάλλον οφείλεται, μετά από ανάλυση του φαρμακοκινητικού προφίλ και των μεταβολιτών, σε μειωμένη απορρόφηση της κλοπιδογρέλης. Τα 600 mg φαίνεται να επιτυγχάνουν μέγιστη αναστολή πιο γρήγορα από τη δόση των 300 mg.

Η μελέτη OASIS-7 τυχαιοποίησε 25.087 ασθενείς με ασταθή στηθάγχη ή OEM σε υψηλές δόσεις κλοπιδογρέλης (600 mg δόση φόρτισης και ακολούθως 75 ημερησίως). Στις 30 ημέρες, το πρωτογενές καταληκτικό σημείο (θάνατος καρδιαγγειακής αιτιολογίας, OEM και ΑΕΕ) ήταν παρόμοιο και στους ασθενείς στην κλασική δόση (4,4%) και στους ασθενείς στην υψηλή δόση κλοπιδογρέλης (4,2%). Παρόλα αυτά, μεταξύ των 2/3 των ασθενών της μελέτης που υπεβλήθησαν σε αγγειοπλαστική ο κίνδυνος για θρόμβωση του stent ήταν μειωμένος κατά 30% και ο κίνδυνος για OEM μειωμένος κατά 22% στην ομάδα που έλαβε την υψηλή δόση, σε σύγκριση με την ομάδα που έλαβε την κλασική δόση. Η ομάδα της υψηλής δόσης είχε περισσότερες μείζονες αιμορραγίες, αλλά δεν παρατηρήθηκε αύξηση στις ενδοκράνιες ή τις θανατηφόρες αιμορραγίες. Επίσης, δεν παρατηρήθηκε όφελος στην ομάδα της υψηλής δόσης που δεν υπεβλήθη σε αγγειοπλαστική<sup>195</sup>.

Παρόλο που οι υψηλότερες δόσεις φόρτισης και συντήρησης με κλοπιδογρέλη οδήγησαν σε βελτίωση στην απόκριση στην κλοπιδογρέλη, υπάρχει ακόμη μεγάλη ποικιλομορφία στο βαθμό του αντιαιμοπεταλιακού αποτελέσματος που επιτυγχάνεται. Ο Bonello και συνεργάτες περιέγραψαν σε μια μικρή ομάδα ασθενών που υπεβλήθησαν σε αγγειοπλαστική την προσαρμογή της δόσης φόρτισης κλοπιδογρέλης σε σχέση με τον έλεγχο της λειτουργικότητας των αιμοπεταλίων, με βάση τη φωσφορυλίωση της πρωτεΐνης VASP<sup>156</sup>. Αυτή η προσαρμογή είναι ασφαλής και μπορεί να βελτιώσει σημαντικά την έκβαση μετά από αγγειοπλαστική σε ασθενείς με κακή απόκριση στην κλοπιδογρέλη, παρά την αρχική φόρτιση με 600 mg κλοπιδογρέλης. Η προσαρμογή της δόσης της αντιαιμοπεταλιακής θεραπείας σύμφωνα με τις *in vitro* μετρήσεις της λειτουργικότητας των αιμοπεταλίων φαίνεται να είναι μια υποσχόμενη προσέγγιση για την επίτευξη ενός ικανού αντιαιμοπεταλιακού αποτελέσματος. Παρόλα αυτά, στη μελέτη GRAVITAS, δε

φάνηκε υπεροχή των 150 mg έναντι των 75 mg κλοπιδογρέλης<sup>196</sup>. Αυτή είναι η πρώτη μεγάλη κλινική μελέτη που σχεδιάστηκε για να εξετάσει αν η προσαρμογή της δόσης της θεραπείας με κλοπιδογρέλη, με βάση της ανάλυση της λειτουργικότητας των αιμοπεταλίων χρησιμοποιώντας μία εύχρηστη μέθοδο για την κλινική πρακτική, βελτιώνει την έκβαση μετά από αγγειοπλαστική σε ασθενείς με κακή απόκριση στην κλοπιδογρέλη.

### 5.3.5.2. Πρασουγρέλη

Η πρασουγρέλη είναι μία καινούρια θειενοπυριδίνη για τη θεραπεία των ΟΣΣ. Όπως και η κλοπιδογρέλη, είναι ένα από του στόματος χορηγούμενο προ φάρμακο, το οποίο μετά την απορρόφησή του μετατρέπεται στον ενεργό μεταβολίτη ο οποίος δρα στον υποδοχέα του ADP των αιμοπεταλίων P2Y<sub>12</sub>. Σε αντίθεση με την κλοπιδογρέλη μεταβολίζεται κατά κύριο λόγο από τα ισοένζυμα των κυτοχρωμάτων CYP3A και CYP2B6, ενώ υπάρχει και μια μικρότερη συνεισφορά από τα CYP2C9 και CYP2C19. Τα τελευταία δύο κυτοχρώματα είναι δύο ένζυμα κλειδιά στο σχηματισμό του ενεργού μεταβολίτη της κλοπιδογρέλης. Αυτό θα μπορούσε να εξηγήσει γιατί διαταραχές της λειτουργικότητας αυτών των αλληλίων επηρεάζουν την κλοπιδογρέλη, ενώ έχουν πολύ μικρή επίδραση στο σχηματισμό του ενεργού μεταβολίτη της πρασουγρέλης<sup>136,138</sup>.

Η πρασουγρέλη φάνηκε πολύ γρήγορα ότι επιτυγχάνει μεγαλύτερη και πιο γρήγορη αναστολή της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων και μια σημαντική μείωση των ασθενών με κακή φαρμακοδυναμική απόκριση σε σύγκριση με την καθιερωμένη δόση των 75 mg κλοπιδογρέλης<sup>133,137,138</sup>. Σύμφωνα με μελέτες, η πρασουγρέλη παρουσιάζει μεγαλύτερη αναστολή της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων ακόμα και συγκρινόμενη με υψηλότερες δόσεις κλοπιδογρέλης. Ο Wiviott και συνεργάτες έδειξαν σε μια



τυχαιοποιημένη διασταυρούμενη μελέτη 201 ασθενών μετά από αγγειοπλαστική ότι 60 mg δόση φόρτισης πρασουγρέλης και 10 mg δόση συντήρησης πέτυχαν υψηλότερα και πιο σταθερά επίπεδα αναστολής αιμοπεταλίων από τα 600 mg δόση φόρτισης και 150 mg δόση συντήρησης με κλοπιδογρέλη<sup>153</sup>. Η πρόσφατη μελέτη ACAPULCO ενίσχυσε αυτήν την παρατήρηση, αποδεικνύοντας την υπεροχή της πρασουγρέλης ως προς την αναστολή των αιμοπεταλίων σε σύγκριση με υψηλές δόσεις φόρτισης (900 mg) ή συντήρησης (150 mg) με κλοπιδογρέλη<sup>197</sup>. Παρόμοια αποτελέσματα έχουν περιγραφεί σε ασθενείς με κακή απόκριση στην κλοπιδογρέλη σύμφωνα με τα οποία η ανωτερότητα της κλοπιδογρέλης ήταν περισσότερο εμφανής σε ασθενείς που έφεραν το μειωμένης δραστηριότητας αλληλίο CYP2C19\*2<sup>198</sup>. Σε μια μικρή αλλά ενδιαφέρουσα μελέτη ο Pena και συνεργάτες περιέγραψαν την απόκριση της κλοπιδογρέλης σε επτά ασθενείς με θρόμβωση στο stent. Η συνεχιζόμενη αύξηση της δόσης συντήρησης της κλοπιδογρέλης μέχρι 300 mg δεν μπορούσε να πετύχει τα επίπεδα αναστολής που επιτεύχθηκαν με την πρασουγρέλη. Και οι επτά ασθενείς, έξι από τους οποίους είχαν τουλάχιστον ένα μειωμένης λειτουργικότητας αλληλίο του CYP2C19, δεν ανταποκρίθηκαν στα 150 mg κλοπιδογρέλης και δύο από αυτούς διατηρούσαν την κακή απόκριση ακόμη και στα 300 mg κλοπιδογρέλης, ενώ η πρασουγρέλη παρουσίασε επαρκή αναστολή των αιμοπεταλίων σε όλους τους ασθενείς<sup>199</sup>.

### 5.3.5.3. Νέα φάρμακα

Η σιλοσταζόλη είναι ένας ισχυρός αναστολέας της φωσφοδιεστεράσης τόσο στα αιμοπετάλια όσο και στα λεία μυϊκά κύτταρα των αγγείων και θεωρείται αποτελεσματική στην πρόληψη της υποξείας θρόμβωσης του stent<sup>200</sup>. Η τριπλή αντιαιμοπεταλιακή θεραπεία με την προσθήκη σιλοσταζόλης έχει αποδειχθεί σε διάφορες μεγάλες μελέτες να είναι περισσότερο αποτελεσματική στην πρόληψη ανεπιθύμητων κλινικών συμβάντων,

όπως η θρόμβωση του stent, χωρίς όμως να αυξάνονται οι ανεπιθύμητες ενέργειες σε σύγκριση με την κλασική διπλή αντιαιμοπεταλιακή θεραπεία<sup>201-203</sup>. Από εργαστηριακής πλευράς, η σιλοσταζόλη έχει φανεί ότι αυξάνει την αναστολή των αιμοπεταλίων σε σύγκριση με την καθιερωμένη δόση κλοπιδογρέλης σε μελέτες που χρησιμοποίησαν VerifyNow<sup>204</sup>. Σύμφωνα με τη μελέτη ACCEL-RESISTANCE, η προσθήκη σιλοσταζόλης στην κλοπιδογρέλη φαίνεται, επίσης, να είναι περισσότερο αποτελεσματική στην αναστολή των αιμοπεταλίων, ακόμη και σε σύγκριση με υψηλές δόσεις κλοπιδογρέλης (150 mg/ημέρα)<sup>205</sup>. Επομένως, η σιλοσταζόλη είναι αναμφίβολα ένα φάρμακο το οποίο θα μπορούσε να αποδειχθεί χρήσιμο στην αντιμετώπιση της κακής απόκρισης στην κλοπιδογρέλη.

Η τικαγρελόρη είναι ένα από του στόματος φάρμακο που δρα άμεσα στον υποδοχέα της ADP P2Y12, όπως και οι θειενοπυριδίνες. Σε αντίθεση όμως με την κλοπιδογρέλη και την πρασουγρέλη η αναστολή του υποδοχέα είναι αναστρέψιμη<sup>206</sup>. Πρόσφατα, η μελέτη RESPOND έδειξε ότι η θεραπεία με τικαγρελόρη μπορεί να είναι μια κατάλληλη προσέγγιση για να υπερνικηθεί η κακή απόκριση στην κλοπιδογρέλη σε ασθενείς με σταθερή ΣΝ. Υπό θεραπεία με τικαγρελόρη, η αντιδραστικότητα των αιμοπεταλίων ήταν κάτω από τις τιμές κατωφλίου που είχαν συσχετισθεί προηγουμένως με ισχαιμικό κίνδυνο- μετρημένες με LTA, VerifyNowP2Y12 και VASP- σε 98-100% των ασθενών, σε σύγκριση με 44-76% των ασθενών μετά από θεραπεία με κλοπιδογρέλη. Επίσης, το αντιαιμοπεταλιακό αποτέλεσμα της τικαγρελόρης ήταν το ίδιο σε ασθενείς με καλή ή κακή απόκριση στην κλοπιδογρέλη<sup>207</sup>.

Η καγκρελόρη, ένας άλλος αντιστρεπτός μη θειενοπυριδινικός αναστολέας του υποδοχέα της ADP P2Y12, μελετήθηκε μετά από ενδοφλέβια χορήγησή του στις μελέτες CHAMPION-PLATFORM<sup>179</sup> και CHAMPION-PCI<sup>208</sup>. Και οι δύο μελέτες απέτυχαν στο

να δείξουν υπεροχή της καγκρελόρης σε σύγκριση με την κλοπιδογρέλη. Παρόλα αυτά η προσθήκη *in vitro* ακόμη και μιας υποθεραπευτικής δόσης καγκρελόρης σε πλάσμα πλούσιο με αιμοπετάλια ασθενών που είχαν ήδη πάρει κλοπιδογρέλη είχε ως αποτέλεσμα μια επιπρόσθετη μείωση της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων που επάγεται από το ADP. Επίσης η θεραπεία με καγκρελόρη ήταν ικανή να μειώσει την διακύμανση μεταξύ των ασθενών που παρατηρήθηκε στη συσσώρευση των αιμοπεταλίων υπό κλοπιδογρέλη<sup>209</sup>. Η καγκρελόρη είναι ένας ισχυρός ενδοφλέβιος ανταγωνιστής του υποδοχέα του ADP με γρήγορη έναρξη και λήξη δράσης, ιδιότητες πολύ σημαντικές που αξίζουν περαιτέρω διερεύνηση, προκειμένου να εφαρμοσθούν για την καταπολέμηση της αντίστασης στην κλοπιδογρέλη.



## 6. ΚΛΟΠΙΔΟΓΡΕΛΗ ΚΑΙ ΚΑΡΔΙΑΓΓΕΙΑΚΗ ΝΟΣΟΣ

### 6.1. Η κλοπιδογρέλη στα ΟΣΣ- διαδερμική αγγειοπλαστική

Τα ΟΣΣ κλινικά διακρίνονται σε εμφράγματα μυοκαρδίου (EM) με ή χωρίς ανάσπαση του διαστήματος ST (γνωστά ως STEMI και NSTEMI αντίστοιχα). Στη κατηγορία των Non STEMI υπάγεται και η ασταθής στηθάγχη επειδή έχει τον ίδιο τρόπο αντιμετώπισης. Καθώς η σύγχρονη αντιμετώπιση των ΟΣΣ περιλαμβάνει συχνά την διενέργεια διαδερμικής αγγειοπλαστικής και εμφύτευσης stent, το αποτέλεσμα της δράσης της κλοπιδογρέλης στις δύο αυτές κλινικές οντότητες εξετάζεται μαζί.

Η ασπιρίνη θεωρείται ο ακρογωνιαίος λίθος στην φαρμακευτική αντιμετώπιση των ΟΣΣ τόσο στη οξεία όσο και στη χρόνια φάση. Η αγγειοπλαστική με εμφύτευση stent αποτέλεσε επανάσταση στην επαναγγείωση του μυοκαρδίου και αποτελεί σήμερα μια από τις πιο δημοφιλείς καρδιολογικές επεμβάσεις. Το πρόβλημα, όμως, της οξείας και της απώτερης θρόμβωσης μέσα στο stent λύθηκε με τη χρήση των θειενοπυριδινών<sup>210</sup>.

Η μελέτη **CLASSICS (In the Clopidogrel Aspirin Stent Interventional Cooperative Study)** είναι αυτή που καθιέρωσε το ασφαλές «profil» της κλοπιδογρέλης έναντι της τικλοπιδίνης σε ασθενείς με επιτυχημένη αγγειοπλαστική<sup>130</sup>. Η θεραπεία με 75 mg κλοπιδογρέλης με ή χωρίς δόση φόρτισης συσχετίστηκε με λιγότερες σοβαρές αιμορραγικές και αιματολογικές επιπλοκές και μικρότερη πρόιμη διακοπή του φαρμάκου εξ αιτίας μη καρδιακών συμβάντων (4.6% έναντι 9.1%;  $P=0.005$ ). Η συχνότητα των ισχαιμικών συμβάντων που παρατηρήθηκε δε διέφερε μεταξύ των ομάδων. Τα αποτελέσματα της CLASSICS επηρέασαν αποφασιστικά τη χρήση της κλοπιδογρέλης ως τη θειενοπυριδίνη εκλογής μέχρι και σήμερα .

Η μελέτη **CURE** (Clopidogrel in Unstable angina to prevent Recurrent Events) καθιέρωσε τη διπλή (ασπιρίνη και κλοπιδογρέλη) αντιαιμοπεταλιακή αγωγή στα ΟΣΣ χωρίς ανάσπαση του διαστήματος ST<sup>211</sup>. Περιέλαβε 12.562 ασθενείς με έναρξη συμπτωμάτων <24 ώρες, που πέραν της αγωγής με ασπιρίνη (75-325 mg/ημέρα) τυχαιοποιήθηκαν σε placebo ή κλοπιδογρέλη (φόρτιση με 300mg και στη συνέχεια 75 mg /ημέρα). Άρα, επρόκειτο για μια σύγκριση αγωγής με ασπιρίνη έναντι του συνδυασμού ασπιρίνης και κλοπιδογρέλης. Η μέση διάρκεια θεραπείας ήταν 9 μήνες (3-12 μήνες). Το 44% των ασθενών υπεβλήθη σε στεφανιογραφία, το 16,5% σε CABG και το 21,2% σε αγγειοπλαστική, δηλαδή μια μελέτη συντηρητικής κατά βάση αντιμετώπισης. Το σύνθετο καταληκτικό σημείο της μελέτης ήταν καρδιαγγειακός θάνατος, ΕΜ και ΑΕΕ. Στην ομάδα της κλοπιδογρέλης παρατηρήθηκε μείωση της εμφάνισης του σύνθετου καταληκτικού σημείου κατά 20% (RR) και του απόλυτου κινδύνου κατά 2,1% (συχνότητα συμβάντων 9,3% έναντι 11,4%,  $p < 0,001$ ). Το όφελος προήλθε από τη μείωση του μη θανατηφόρου ΕΜ και όχι του καρδιαγγειακού θανάτου ή του ΑΕΕ. Το μέγεθος του οφέλους αντισταθμίσθηκε από την κατά 1% αύξηση του απόλυτου κινδύνου των μεγάλων αιμορραγιών (3,7% έναντι 2,7%,  $p = 0,001$ ). Στη μελέτη αυτή η επίπτωση μειζόνων και ελασσόνων αιμορραγιών με το συνδυασμό ασπιρίνης και κλοπιδογρέλης ήταν 3,7% και 5,1% αντίστοιχα χωρίς να καταγραφεί αύξηση των απειλητικών για τη ζωή αιμορραγιών σε σύγκριση μόνο με την ασπιρίνη. Η συχνότητα των αιμορραγιών ήταν ανάλογη με τη δόση της ασπιρίνης. Αυτά τα ευρήματα ενισχύουν την άποψη ότι οι ιδανική δόση της ασπιρίνης πρέπει να είναι μεταξύ 75 και 100 mg, ιδιαίτερα σε συγχορήγηση με κλοπιδογρέλη. Δεν παρατηρήθηκε διαφορά στις αιμορραγίες μεταξύ των ασθενών που υπεβλήθησαν σε CABG και είχαν διακόψει την κλοπιδογρέλη 5 ημέρες πριν την επέμβαση.

Η υποομάδα των 2.658 ασθενών που υποβλήθηκε σε αγγειοπλαστική αποτέλεσε το υλικό της μελέτης **PCI-CURE**<sup>212</sup>. Η αγγειοπλαστική έγινε μέσα σε 10 ημέρες (διάμεσος χρόνος 6 ημέρες) από την αρχική τυχαιοποίηση στην CURE και η απόφαση ήταν στη διακριτική ευχέρεια του θεράποντος ιατρού. Στο χρονικό διάστημα πριν την αγγειοπλαστική οι ασθενείς ελάμβαναν την καθορισμένη αγωγή της CURE (δηλαδή κλοπιδογρέλη ή placebo), ενώ στο χρονικό διάστημα από την αγγειοπλαστική μέχρι την συμπλήρωση 30 ημερών όλοι οι ασθενείς ελάμβαναν κλοπιδογρέλη (με ανοικτό τρόπο) και στη συνέχεια επανέρχονταν στην τυχαιοποιημένη διπλή-τυφλή αγωγή. Επομένως, επρόκειτο πρακτικά για μια σύγκριση προφόρτισης ή μη με κλοπιδογρέλη. Το σύνθετο καταληκτικό σημείο ήταν καρδιαγγειακός θάνατος, EM ή ανάγκη επαναγγείωσης στο αγγείο στόχος. Στην ομάδα της προφόρτισης παρατηρήθηκε μείωση του πρωτογενούς καταληκτικού στόχου κατά 30% (4,5% έναντι 6,4%,  $p=0,03$ ). Το όφελος άρχισε να φαίνεται από την δεύτερη ημέρα και συνέχισε μέχρι τις 30 ημέρες. Το όφελος διατηρήθηκε και μετά τους 8 μήνες παρακολούθησης καταδεικνύοντας την ευνοϊκή δράση της προφόρτισης με κλοπιδογρέλη. Δεν παρατηρήθηκε διαφορά στις μεγάλες αιμορραγίες μεταξύ των δύο ομάδων. Πρέπει να αναφερθεί ότι η μελέτη PCI -CURE δεν ήταν αμιγής μελέτη αγγειοπλαστικής και μάλιστα σε μια χρονική περίοδο με περιορισμένη χρήση stent.

Η μελέτη **CREDO** (Clopidogrel for the Reduction of Events During Observation) σχεδιάστηκε για να αξιολογήσει τη μακροχρόνια δράση της κλοπιδογρέλης και το ρόλο της προφόρτισης με κλοπιδογρέλη σε ασθενείς που θα υποβάλλονταν σε αγγειοπλαστική<sup>213</sup>. Από τους 2.116 ασθενείς που τυχαιοποιήθηκαν, οι 1.117 (53%) είχαν ασταθή στηθάγχη, οι 290 (14%) πρόσφατο EM και οι υπόλοιποι σταθερή στηθάγχη. Στη μια ομάδα προηγήθηκε προφόρτιση με 300mg κλοπιδογρέλης 3-24 ώρες πριν την αγγειοπλαστική και στην συνέχεια 75 mg ημερησίως για ένα χρόνο και στη άλλη ομάδα

δόση συντήρησης κλοπιδογρέλης για ένα μήνα. Φυσικά, μετά την αγγειοπλαστική και μέχρι την 28<sup>η</sup> ημέρα χορηγήθηκε ανοικτά σε όλους τους ασθενείς κλοπιδογρέλη (75 mg/ημέρα). Οι ασθενείς που τυχαιοποιήθηκαν σε placebo δεν έλαβαν δόση φόρτισης. Η δόση της ασπιρίνης ήταν 325 mg για τις πρώτες 28 ημέρες και 81-325 mg μέχρι τους 12 μήνες. Το σύνθετο καταληκτικό σημείο ήταν θάνατος, EM ή επείγουσα επαναγγείωση στην αρτηρία στόχος. Μετά από 4 εβδομάδες στην ομάδα με προφόρτιση κλοπιδογρέλης 6 ώρες τουλάχιστον πριν την αγγειοπλαστική παρατηρήθηκε μείωση του σχετικού κινδύνου κατά 38,6%. Αυτό ισοδυναμεί με μείωση του απόλυτου κινδύνου κατά 3% (από 9,4% σε 5,8%;  $p=0,051$ ). Σε αντίθεση, η προφόρτιση που έγινε νωρίτερα των 6 ωρών από την παρέμβαση δεν είχε προστατευτικό αποτέλεσμα. Μετά από 12 μήνες παρακολούθησης στην ομάδα της προφόρτισης με κλοπιδογρέλη παρατηρήθηκε σημαντική μείωση κατά 27% των ισχαιμικών επεισοδίων (8,5% έναντι 11,5%,  $p=0,02$ ) αλλά και πάλι παρατηρήθηκε αύξηση των μειζόνων αιμορραγιών (8,8% έναντι 6,7%,  $p=0,07$ ). Δεν παρατηρήθηκαν διαφορές στις θανατηφόρες ή τις ενδοκράνιες αιμορραγίες.

Ο σκοπός της μελέτης **CLARITY** (CLopidogrel as Adjunctive Reperfusion Therapy) ήταν να απαντήσει στο ερώτημα αν η προσθήκη κλοπιδογρέλης σε ασθενείς με STEMI που υποβάλλονται σε θρομβόλυση ωφελεί ή όχι<sup>214</sup>. Έτσι, 3.491 ασθενείς <75 ετών με έναρξη των συμπτωμάτων <12 ώρες, τυχαιοποιήθηκαν σε κλοπιδογρέλη (φόρτιση με 300 mg, και στη συνέχεια 75 mg την ημέρα) ή placebo επιπλέον της αγωγής με ασπιρίνη (150-325 mg την πρώτη ημέρα και 75-162 mg τις επόμενες). Η διάρκεια της θεραπείας ήταν μέχρι τη στεφανιογραφία. Όλοι οι ασθενείς υπεβλήθησαν σε στεφανιογραφία 2-8 ημέρες μετά την τυχαιοποίηση. Το τελικό καταληκτικό σημείο ήταν διαπίστωση αποφραγμένης αρτηρίας (ροή TIMI 0 ή 1), καρδιαγγειακός θάνατος, ή υποτροπή EM πριν τη στεφανιογραφία. Μετά από 30 ημέρες παρακολούθησης η συχνότητα του τελικού



σημείου ήταν σημαντικά μικρότερη κατά 36% στην ομάδα της κλοπιδογρέλης (21,7% έναντι 15%,  $p < 0,001$ ). Το μεγαλύτερο όφελος οφειλόταν στην διατήρηση ανοικτής αρτηρίας και το EM (4,1% έναντι 5,9%,  $p = 0,02$ ), ενώ δεν παρατηρήθηκε σημαντική διαφορά στον καρδιαγγειακό θάνατο (4,5% έναντι 4,4%). Στις 30 ημέρες, στην ομάδα που χορηγήθηκε η συνδυασμένη αγωγή παρατηρήθηκε μείωση κατά 26% του σχετικού κινδύνου για καρδιαγγειακό θάνατο, EM ή επείγουσα επαναγγείωση (14,1% έναντι 11,6%,  $p = 0,03$ ). Δεν παρατηρήθηκε διαφορά στις μείζονες αιμορραγίες μέχρι το χρόνο της στεφανιογραφίας (1,3% έναντι 1,1%) και στις 30 ημέρες (1,9% έναντι 1,7%). Κατά τη διάρκεια της νοσηλείας, το 6% των ασθενών υπεβλήθη σε CABG ενώ το 57% σε αγγειοπλαστική (εντός 8 ημερών από την εισαγωγή τους στη μελέτη). Η τελευταία αυτή ομάδα απετέλεσε το υλικό για τη μελέτη **PCI-CLARITY**<sup>215</sup>. Η προφόρτιση με κλοπιδογρέλη μείωσε σημαντικά (κατά 46%) τον καρδιαγγειακό θάνατο, το EM και το AEE (3,6% έναντι 6,2%,  $p = 0,08$ ). Δεν παρατηρήθηκε διαφορά μεταξύ των δύο ομάδων όσον αφορά στη συχνότητα των μειζόνων αιμορραγιών (0,5% έναντι 1,1%,  $p = 0,21$ ). Καθώς η διενέργεια αγγειοπλαστικής ήταν στη διακριτική ευχέρεια του θεράποντος ιατρού, η μελέτη δεν ήταν τυχαιοποιημένη.

Στη μελέτη **COMMIT** (Clopidogrel and Metoprolol in Myocardial Infarction Trial)<sup>216</sup> τυχαιοποιήθηκαν 45.852 ασθενείς με STEMI εντός 24 ωρών από την έναρξη των συμπτωμάτων (μέσος χρόνος 10 ώρες) σε κλοπιδογρέλη (75 mg την ημέρα) ή placebo ως προσθήκη στην ασπιρίνη (162 mg την ημέρα). Η μέση διάρκεια της θεραπείας ήταν 15 ημέρες. Η διάρκεια της μελέτης ήταν 30 ημέρες και το τελικό σημείο ήταν η συνολική θνητότητα. Το 26% των ασθενών είχε ηλικία >70 ετών και το 28% ήταν γυναίκες. Στους μισούς ασθενείς χορηγήθηκε θρομβόλυση (κυρίως ουροκινάση) και μόνο το 4% υπεβλήθη σε στεφανιογραφία. Ο συνδυασμός ασπιρίνης και κλοπιδογρέλης σε σύγκριση με την

ασπιρίνη ως μονοθεραπεία μείωσε την ολική θνητότητα κατά 7% (7,5% έναντι 8,1%  $p=0,029$ ) και το σύνθετο καταληκτικό σημείο (θάνατος, επανέμφραγμα ή ΑΕΕ) κατά 9% (από 10,1% σε 9,2%). Δεν παρατηρήθηκε διαφορά στις μείζονες αιμορραγίες (εγκεφαλικές και εξωκρανιακές, 0,6% έναντι 0,5%), αλλά υπενθυμίζεται ότι η πλειοψηφία των ασθενών ήταν <75 ετών.

### 6.1.1. Προφόρτιση με κλοπιδογρέλη

Ο πρώτος στόχος της μελέτης **CURRENT-OASIS 7** (Clopidogrel Optimal Loading Dose Usage to Reduce Recurrent Events- Optimal Antiplatelet Strategy for Interventions)<sup>195</sup> ήταν να προσδιορίσει τη βέλτιστη δόση της ασπιρίνης στην οξεία φάση των ΟΣΣ, καθώς στην Ευρώπη συνηθίζονται μικρές ενώ στις ΗΠΑ μεγάλες δόσεις ασπιρίνης. Ο δεύτερος στόχος ήταν να συγκρίνει τη διπλάσια δόση φόρτισης (600 mg) με κλοπιδογρέλη με την κλασική δόση φόρτισης (300 mg). 25.087 ασθενείς (71% NSTEMI, 29% STEMI) τυχαιοποιήθηκαν σε φόρτιση με 600 mg κλοπιδογρέλης (150 mg/ημέρα για 7 ημέρες και στην συνέχεια 75 mg/ημέρα) ή στην κλασική φόρτιση με 300 mg και στην συνέχεια 75 mg/ημέρα. Συγχρόνως οι ασθενείς τυχαιοποιήθηκαν σε μικρές (75-100 mg) ή μεγάλες δόσεις (300-325 mg) ασπιρίνης. Σε όλους τους ασθενείς χορηγήθηκαν 300 mg ασπιρίνης την πρώτη ημέρα ανεξάρτητα από την τυχαιοποίηση. Ο προγραμματισμός για όλους τους ασθενείς ήταν η διενέργεια πρώιμης στεφανιογραφίας (<24 ώρες) και στη συνέχεια αγγειοπλαστική (<72 ώρες). Το 99% των ασθενών υπεβλήθη σε στεφανιογραφία και το 70% σε αγγειοπλαστική. Τα καταληκτικά σημεία ήταν καρδιαγγειακός θάνατος, ΕΜ, ΑΕΕ ή θρόμβωση του stent (δευτερογενής στόχος) στις 30 ημέρες. Στο σκέλος της μελέτης που συγκρίθηκαν οι δόσεις της κλοπιδογρέλης δεν παρατηρήθηκαν διαφορές στο πρωτογενές καταληκτικό σημείο (4,4% με την κλασική φόρτιση έναντι 4,2% με τη διπλή φόρτιση,

$p=0,3$ ). Οι μείζονες αιμορραγίες σύμφωνα με τη κατάταξη CURRENT ήταν 2,0% και 2,5% αντίστοιχα ( $p<0.01$ ). Διαφορά στις μείζονες αιμορραγίες δεν παρατηρήθηκε ούτε μεταξύ των ομάδων με μικρές και υψηλές δόσεις ασπιρίνης (0.99;0.84 –1.17,  $p=0.9$ ).

Η ανάλυση της υποομάδας των 17.263 ασθενών που υπεβλήθη σε αγγειοπλαστική<sup>217</sup> έδειξε μείωση κατά 25% στο καταληκτικό σημείο (3,9% με τη διπλή φόρτιση έναντι 4,5% με την κλασική,  $p<0,0036$ ). Η μείωση αφορούσε κυρίως τα EM (2,0% έναντι 2,6%,  $p=0.017$ ). Η θρόμβωση του stent μειώθηκε σημαντικά κατά 32% στην ομάδα της διπλής φόρτισης (1,6% έναντι 2,3%,  $p= 0,002$ ) για τις σίγουρες ή πιθανολογούμενες θρομβώσεις. Οι μείζονες αιμορραγίες κατά CURRENT ήταν συχνότερες με τη διπλή δόση κλοπιδογρέλης (1,6% έναντι 1,1%,  $p=0,009$ ), αλλά δε διέφεραν σημαντικά με την κατά TIMI κατάταξη (1,0% έναντι 0.7%,  $p= 0,008$ ). Δεν υπήρχε ετερογένεια του αποτελέσματος ανάμεσα σε ασθενείς με STEMI και NSTEMI, ούτε μεταξύ των 3.844 διαβητικών ασθενών που υπεβλήθησαν σε αγγειοπλαστική (4.9% έναντι 5.6%). Δεν παρατηρήθηκε διαφορά στις μεγάλες αιμορραγίες στις ομάδες με μικρές (<100 mg) και μεγάλες δόσεις (>300 mg) ασπιρίνης. Οι 7.823 ασθενείς που δεν υπεβλήθησαν σε αγγειοπλαστική δεν ωφελήθηκαν από τη διπλή φόρτιση και είχαν τάση για περισσότερα συμβάντα (4,9% έναντι 4,3%,  $p=0.3$ , και αύξηση σχετικού κινδύνου κατά 14%).

Πληροφορίες για το ρόλο της φόρτισης με κλοπιδογρέλη σε ασθενείς με STEMI που υποβάλλονται σε πρωτογενή αγγειοπλαστική έχουμε από δευτερογενή ανάλυση της μελέτης **HORIZON AMI** (Harmonizing Outcomes With Revascularization and Stents in Acute Myocardial Infarction)<sup>218</sup>. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η προφόρτιση πριν τον καθετηριασμό με 600 mg κλοπιδογρέλης ( $n=2.216$ ) μείωσε σημαντικά τα ισχαιμικά επεισόδια (θάνατος, επανέμφραγμα, θρόμβωση stent) στις 30 ημέρες σε σύγκριση με τη

φόρτιση των 300 mg (n=1.213). Ο σχεδιασμός της μελέτης HORIZON-AMI ήταν να συγκρίνει την μπιβαλιρουδίνη έναντι της ηπαρίνης σε συνδυασμό με GP IIb/IIIa σε ασθενείς με STEMI και αντιμετώπιση με πρωτογενή αγγειοπλαστική (< 12 ώρες, διάμεσος χρόνος 2,1 ώρες). Η επιλογή της δόσης φόρτισης της κλοπιδογρέλης ήταν στη διακριτική ευχέρεια του θεράποντος ιατρού.

### **6.1.2. Σύγκριση κλοπιδογρέλης με νεότερα αντιαιμοπεταλιακά φάρμακα**

Η μελέτη **TRITON-TIMI 38** (TRial to assess Improvement in Therapeutic Outcomes by optimizing platelet InhibitioN with prasugrel– Thrombolysis In Myocardial Infarction 38) συνέκρινε την κλοπιδογρέλη με την πρασουγρέλη<sup>219</sup>. 13.608 μετρίου και υψηλού κινδύνου ασθενείς με ΟΣΣ (74% με Non STEMI και 26% με STEMI) που υπεβλήθησαν σε αγγειοπλαστική (στο 94% των ασθενών τοποθετήθηκε stent) τυχαιοποιήθηκαν σε κλοπιδογρέλη (300 mg φόρτιση και 75 mg/ημέρα) ή σε πρασουγρέλη (60 mg φόρτιση και 10 mg/ημέρα). Τα φάρμακα χορηγούνταν αφού είχε γίνει η στεφανιογραφία και είχε παρθεί η απόφαση για αγγειοπλαστική. Η διάρκεια της μελέτης ήταν 15 μήνες. Η δόση της ασπιρίνης ήταν 75-162 mg/ημέρα για όλους τους ασθενείς. Το καταληκτικό σημείο ήταν καρδιαγγειακός θάνατος, μη θανατηφόρο ΕΜ και ΑΕΕ. Στην ομάδα της πρασουγρέλης σημειώθηκαν λιγότερα συμβάντα έναντι της ομάδας της κλοπιδογρέλης (9,9% έναντι 12,1%, HR =0.81 p=0,001.) Το όφελος προήλθε από τη μείωση των ΕΜ. Σημαντική διαφορά σημειώθηκε και στη θρόμβωση ανεξάρτητα από το είδος του stent (2,4% έναντι 1,1%, p<0,001) και στην επείγουσα επαναγγείωση του αγγείου στόχος. Το όφελος από τη πρασουγρέλη αντισταθμίσθηκε από τις περισσότερες non CABG σοβαρές αιμορραγίες (2,4% έναντι 1,8%, p=0,03), καθώς επίσης και τις θανατηφόρες αιμορραγίες (1,4% έναντι 0,9%, p=0,01). Σε post-hoc ανάλυση της μελέτης, η θεραπεία με πρασουγρέλη σε

ηλικιωμένους ασθενείς >75 ετών, με σωματικό βάρος < 60 kg ή με ιστορικό ΑΕΕ δεν συνοδεύτηκε από κλινικό όφελος αλλά με μια τάση για μεγαλύτερο αιμορραγικό κίνδυνο. Το 97% των ασθενών με STEMI (n=3.487) υπεβλήθη σε αγγειοπλαστική (2.438 σε πρωτογενή και 2.438 σε δευτερογενή αγγειοπλαστική) και ποσοστό 92% έλαβαν τουλάχιστον ένα stent<sup>139</sup>. Στην ομάδα της πρασουγρέλης το πρωτογενές καταληκτικό σημείο μειώθηκε κατά 32% στις 30 ημέρες (6,5% έναντι 9,5%, p=0,017). Το αποτέλεσμα ήταν σταθερό και στους 15 μήνες (10% έναντι 12,4%, p=0,02), χωρίς παράλληλη αύξηση των μειζόνων αιμορραγιών (2,1% έναντι 2,4%, RR 21%). Στην υποομάδα των 3.146 διαβητικών ασθενών το όφελος με την πρασουγρέλη ήταν στατιστικά σημαντικό (συχνότητα συμβάντων 12,2% έναντι 17,2%, p<0,001) και χωρίς διαφορά στις αιμορραγίες που δε σχετίζονταν με CABG (2,5% έναντι 2,6% p=0,81)<sup>220</sup>. Η θεραπεία με πρασουγρέλη μείωσε σημαντικά και τη θρόμβωση στο stent (2,0 vs. 3,6%; HR 0.52; p = 0.007).

Στη μελέτη **PLATO** (Platelet Inhibition and Patient Outcomes)<sup>141</sup> η τικαγρελόρη (180 mg φόρτιση, και 90 mg δύο φορές την ημέρα) συγκρίθηκε με την κλοπιδογρέλη (300-600 mg φόρτιση, 75 mg/ημέρα) σε 18.624 ασθενείς με Non STEMI και ασταθή στηθάγχη (n=11.074, με πρόθεση συντηρητικής ή επεμβατικής αντιμετώπισης) ή STEMI (n=7.544 με πρόθεση πρωτογενούς αγγειοπλαστικής) εντός 24 ωρών από την έναρξη των συμπτωμάτων. Το 81,5% των ασθενών υπεβλήθη σε στεφανιογραφία, το 61% σε αγγειοπλαστική και το 10% σε CABG. Μετά 12 μήνες παρακολούθησης παρατηρήθηκε σημαντική μείωση του τελικού καταληκτικού σημείου (καρδιαγγειακός θάνατος, EM, ΑΕΕ) κατά 16% στη ομάδα της τικαγρελόρης (9,8% έναντι 11,7%, p<0,001). Από τις τρεις συνιστώσες του σύνθετου καταληκτικού σημείου παρατηρήθηκε σημαντική μείωση στην εμφάνιση EM (5,8% έναντι 6,9%, p=0,005) και στην καρδιαγγειακή θνητότητα (4,0%

έναντι 5,1%,  $p < 0.001$ ). Χωρίς να αποτελεί πρωτογενή στόχο, μειώθηκε και η ολική θνητότητα από 4,5% σε 5,9% ( $p < 0.01$ ) και η σίγουρη θρόμβωση στο stent από 1,9% σε 1,3% ( $p = 0,01$ ). Η ομάδα της τικαγρελόρης σχετιζόταν με συχνότερη εμφάνιση δύσπνοιας (13.8% έναντι 7.8%,  $p = 0.001$ ), παροδικής νεφρικής δυσλειτουργίας και βραδυκαρδίας. Στην ομάδα της τικαγρελόρης παρατηρήθηκαν συχνότερα μείζονες αιμορραγίες μη σχετιζόμενες με CABG (4,5% έναντι 3,8%,  $p = 0.03$ ) ενώ οι αιμορραγίες σχετιζόμενες με το CABG ήταν ίδιες (7,4% έναντι 7,9%,  $p = 0,32$ ). Οι θανατηφόρες ενδοκράνιες αιμορραγίες ήταν περισσότερες (11 έναντι 1) με την τικαγρελόρη, αλλά συνολικά οι θανατηφόρες αιμορραγίες ήταν τελικά, αριθμητικά λιγότερες (20 έναντι 23 δηλαδή 0,3% και στις δύο ομάδες). Παρόμοια αποτελέσματα παρατηρήθηκαν και στους 13.408 (72%) ασθενείς που δηλώθηκαν για επεμβατική στρατηγική<sup>221</sup>. Σύμφωνα με το πρωτόκολλο οι ασθενείς που θα υποβάλλονταν σε στεφανιογραφία έπρεπε να δηλωθούν έγκαιρα πριν την τυχαιοποίηση.

Στις μελέτες **CHAMPION PCI**<sup>208</sup> και **CHAMPION PLATFORM**<sup>179</sup> συγκρίθηκε η κλοπιδογρέλη με την καγκρελόρη. Η καγκρελόρη είναι αναστολέας του υποδοχέα P2Y12 και χορηγείται ενδοφλέβια. Ο χρόνος από την είσοδο στη μελέτη CHAMPION PCI (n:8716) μέχρι την αγγειοπλαστική ήταν 6,3 και για την CHAMPION PLATFORM (n:5.362) 7,9 ώρες. αντίστοιχα. Αντίθετα με τις υποθέσεις των μελετών, η καγκρελόρη δεν είχε σημαντική επίδραση στην επίπτωση του πρωτογενούς καταληκτικού σημείου.

Μετα-ανάλυση<sup>222</sup> που συνέκρινε την κλοπιδογρέλη με τα νεότερα αντιαιμοπεταλιακά φάρμακα σε ασθενείς που είχαν υποβληθεί σε αγγειοπλαστική έδειξε ότι τα νεότερα αντιαιμοπεταλιακά υπερτερούν της κλοπιδογρέλης στους ασθενείς με STEMI που υπεβλήθησαν σε αγγειοπλαστική και πρέπει να προτιμώνται στα ΟΣΣ που επιλέγεται η πρόιμη επεμβατική αντιμετώπιση.

## 6.2. Σταθερή καρδιαγγειακή νόσος –δευτερογενής πρόληψη

Η κλοπιδογρέλη έχει δοκιμασθεί σε ασθενείς με σταθερή και αποδεδειγμένη καρδιαγγειακή νόσο (ως αγωγή δευτερογενούς πρόληψης) σε δύο μεγάλες μελέτες. Στη μελέτη **CAPRIE** (Clopidogrel versus Aspirin in Patients at Risk of Ischemic Events)<sup>223</sup> συγκρίθηκε η κλοπιδογρέλη (75 mg/ημέρα) με την ασπιρίνη (325 mg/ημέρα) σε 19.185 ασθενείς με ιστορικό EM (< 36 ημέρες), AEE (>1 εβδομάδα, <6 μήνες) ή συμπτωματικής περιφερικής αρτηριακής νόσου (ΠΑΝ). Η μέση ηλικία των ασθενών ήταν 62,5 χρόνια, το 72% ήταν άνδρες, το 20% είχαν σακχαρώδη διαβήτη, το 52% υπέρταση, το 41% δυσλιπιδαιμία και το 30% ήταν ενεργείς καπνιστές. Το καταληκτικό σημείο ήταν αγγειακός θάνατος, ισχαιμικό AEE και EM. Μετά μια μέση χρονική περίοδο παρακολούθησης 1,9 ετών (1-3 έτη), στην ομάδα της κλοπιδογρέλης σε σύγκριση με την ομάδα της ασπιρίνης παρατηρήθηκε μικρή μείωση κατά 8,7% (9,78% έναντι 10,64%,  $p=0,043$ ) του τελικού καταληκτικού σημείου. Στην υποομάδα με AEE, η μείωση κατά 7.3% ήταν μη σημαντική, στην ομάδα με ΠΑΝ σημειώθηκε μείωση του σχετικού κινδύνου κατά 23,8%, ( $p=0,0028$ ), ενώ στην υποομάδα με EM η ομάδα της κλοπιδογρέλης είχε χειρότερη έκβαση συγκριτικά με την ομάδα της ασπιρίνης. Οι παρενέργειες ήταν ίδιες, με εξαίρεση τις αιμορραγίες που ήταν λιγότερες στην ομάδα της κλοπιδογρέλης (1,99% έναντι 2,66%,  $p=0,05$ ). Η συχνότητα των μειζόνων αιμορραγιών από το γαστρεντερικό ήταν μικρότερη στην ομάδα της κλοπιδογρέλης έναντι της ασπιρίνης (0,52% έναντι 0,72%,  $p< 0,05$ ). Ανάλυση των ασθενών με συμπτωματική ισχαιμική νόσο (ιστορικό AEE ή EM) έδειξε ότι αυτοί οι ασθενείς είχαν την μεγαλύτερη συχνότητα συμβάντων, αλλά συγχρόνως και το μεγαλύτερο όφελος από την κλοπιδογρέλη (μείωση σχετικού κινδύνου κατά 14,9%)<sup>224</sup>. Όφελος παρατηρήθηκε και στην υποομάδα των 3.866 (1.134 υπό

ινσουλίνη) διαβητικών ασθενών (15,6% έναντι 17,7%,  $p=0,042$ )<sup>225</sup> και σε 1.480 ασθενείς που είχαν υποβληθεί σε CABG<sup>226</sup>.

Στη μελέτη **CHARISMA** (The Clopidogrel for High Atherothrombotic Risk and Ischemic Stabilization, Management and Avoidance) συγκρίθηκε η διπλή αγωγή με ασπιρίνη και κλοπιδογρέλη έναντι της ασπιρίνης<sup>227</sup>. Οι δόσεις για την ασπιρίνη ήταν 75-162 mg και για την κλοπιδογρέλη 75 mg/ημέρα. Από τους 15.603 ασθενείς ηλικίας άνω των 45 ετών, οι 12.153 είχαν γνωστή καρδιαγγειακή νόσο (και χαρακτηρίστηκαν “συμπτωματικοί” με τα εξής κριτήρια: ΣΝ με ιστορικό ΕΜ τα προηγούμενα 5 έτη, στηθάγχη με επιβεβαιωμένη πολυαγγειακή νόσο, ιστορικό αγγειοπλαστικής ή CABG, ισχαιμικό ΑΕΕ παροδικό ή μόνιμο τα προηγούμενα 5 έτη ή ΠΑΝ με διαλείπουσα χωλότητα, ABI <85% ή ιστορικό ακρωτηριασμού ή επαναγγείωσης) και οι 3.284 είχαν παράγοντες κινδύνου για καρδιαγγειακή νόσο (και χαρακτηρίστηκαν «ασυμπτωματικοί»).

Ο μέσος χρόνος παρακολούθησης ήταν 28 μήνες (μέγιστος 3 χρόνια). Το πρωτογενές τελικό καταληκτικό σημείο ήταν καρδιαγγειακός θάνατος, ΕΜ ή ΑΕΕ και το δευτερογενές καταληκτικό σημείο ΕΜ, ΑΕΕ, νέα νοσηλεία για ασταθή στηθάγχη και επαναγγείωση. Συνολικά στη μελέτη παρατηρήθηκε μια μη στατιστικά σημαντική μείωση του σχετικού κινδύνου κατά 7% στο πρωτογενές (6,8% έναντι 7,3%,  $p=0,22$ ) και κατά 7,7% στο δευτερογενές καταληκτικό σημείο (16,7% έναντι 17,9%,  $p=0,04$ ). Στην ομάδα των συμπτωματικών ασθενών παρατηρήθηκε οριακή διαφορά με την κλοπιδογρέλη στο πρωτογενές καταληκτικό σημείο (6,9% έναντι 7,9%, μείωση σχετικού κινδύνου κατά 12%,  $p=0,046$ ) Στη μελέτη CHARISMA η συχνότητα των μέτριων ή σοβαρών αιμορραγιών ήταν 3,8% και των ενδοκράνιων 0,3%.

Από το σύνολο των ασθενών της μελέτης CHARISMA οι 9.478 ασθενείς πληρούσαν παρόμοια κριτήρια με αυτά της μελέτης CAPRIE<sup>228</sup>. Οι 3.846 είχαν ιστορικό



EM (διάμεσος χρόνος μέχρι την τυχαιοποίηση 23,6 μήνες), οι 3.245 ιστορικό AEE (διάμεσος χρόνος μέχρι την τυχαιοποίηση 3,5 μήνες) και 2.838 συμπτωματική ΠΑΝ (διάμεσος χρόνος από τη διάγνωση 23,6 μήνες). Οι υπόλοιποι 443 ασθενείς είχαν περισσότερα από ένα συμβάντα. Η συνολική συχνότητα των συμβάντων ήταν 8,8% στην ομάδα της ασπιρίνης και 7,3% στην ομάδα του συνδυασμού (μείωση σχετικού κινδύνου κατά 17,1%,  $p=0.01$ ). Η μείωση του σχετικού κινδύνου ήταν παρόμοια στις υποομάδες με EM και AEE, αλλά όχι και στην ομάδα 3096 ασθενών με ΠΑΝ (συχνότητα των συμβάντων 7,6% έναντι 8,9% ,  $p=0,18$ ). Από τη διπλή αντιαιμοπεταλιακή αγωγή δεν ωφελήθηκε ούτε η υποομάδα των 6.555 (42%) διαβητικών ασθενών. Υπο-ανάλυση των 3.284 ασυμπτωματικών (πρωτογενής πρόληψη) έδειξε ότι ο συνδυασμός ασπιρίνης/κλοπιδογρέλης σε σύγκριση με την ασπιρίνη συνοδεύτηκε από αύξηση των θανάτων κατά 42% (5,4% έναντι 3,8%,  $p=0,04$ ), και των καρδιαγγειακών θανάτων κατά 77% (3,9 % έναντι 2,2%,  $p=0.01$ ). Οι αιμορραγικές επιπλοκές, επίσης, ήταν περισσότερες με αύξηση τόσο των σοβαρών (2% έναντι 1,2%,  $p=0.07$ ) όσο και των ενδιάμεσης βαρύτητας (2,2% έναντι 1,4%,  $p=0.08$ ) αιμορραγιών.

### 6.3. Αγγειακή εγκεφαλική νόσος

Για την κλοπιδογρέλη στα AEE έχουμε δεδομένα, εκτός από αναλύσεις των υποομάδων των μελετών CAPRIE και CHARISMA, και από δυο μεγάλες κλινικές μελέτες.

Στη μελέτη **MATCH** (Management of ATherothrombosis with Clopidogrel in High-risk patients) συγκρίθηκε ο συνδυασμός ασπιρίνης (75 mg) και κλοπιδογρέλης (75 mg/ ημέρα) έναντι μόνης της κλοπιδογρέλης σε 7.599 ασθενείς<sup>229</sup>. Οι ασθενείς ήταν ηλικίας άνω των 40 ετών (68% με σακχαρώδη διαβήτη) με ιστορικό παροδικού ή μόνιμου ισχαιμικού

επεισοδίου τους προηγούμενους 3 μήνες. Η διάρκεια της μελέτης ήταν 18 μήνες. Ο σύνθετος τελικός στόχος ήταν αγγειακός θάνατος, ισχαιμικό ΑΕΕ, ΕΜ ή νέα νοσηλεία για ισχαιμικό ΑΕΕ. Ο συνδυασμός δε μείωσε την υποτροπή αγγειακών συμβάντων (15,8% στην ομάδα του συνδυασμού έναντι 16,7% στην ομάδα της κλοπιδογρέλης (  $p=0.244$ ), αλλά αύξησε τον απόλυτο κίνδυνο των απειλητικών για τη ζωή αιμορραγιών κατά 2,1% (2,55% έναντι 1,30%,  $p=0.001$ ) και ειδικά των ενδοκράνιων (1.1% έναντι 0.7%).

Η σύγκριση του συνδυασμού ασπιρίνης/ δυπιριδαμόλης (25/200 mg, 2 φορές την ημέρα) με την κλοπιδογρέλη (75 mg/ημέρα) αποτέλεσε το αντικείμενο εξέτασης της μελέτης **PRoFESS** (The Prevention Regimen for Effectively Avoiding Second Strokes)<sup>230</sup>. Υλικό της μελέτης αποτέλεσαν 20.332 σταθεροί ασθενείς άνω των 55 ετών με πρόσφατο ισχαιμικό ΑΕΕ (<90 ημέρες). Το 74% των ασθενών είχε υπέρταση, το 28,3% σακχαρώδη διαβήτη, το 6,7% ΕΜ και το 24,6% μόνιμο ή παροδικό ΑΕΕ (πριν το παρόν συμβάν). Μετά από 2 ½ χρόνια παρακολούθησης δεν παρατηρήθηκε διαφορά στο πρωτογενές καταληκτικό σημείο που ήταν η υποτροπή ΑΕΕ (9,0% στην ομάδα του συνδυασμού και 8,8% στην ομάδα της κλοπιδογρέλης). Η επίπτωση των ισχαιμικών ΑΕΕ ήταν η ίδια (7,7% έναντι 7,9%) και στις δύο ομάδες. Στην ομάδα του συνδυασμού παρατηρήθηκε αύξηση στις ενδοεγκεφαλικές αιμορραγίες (1,4% έναντι 1%), μικρή αύξηση στις μείζονες αιμορραγίες (4,1% έναντι 3,6%) και συχνότερη διακοπή της θεραπείας λόγω κεφαλαλγίας από τη διπυριδαμόλη. Ο συνολικός κίνδυνος για υποτροπή ΑΕΕ ή εμφάνιση μείζονος αιμορραγίας ήταν ίδιος και για τις δυο ομάδες (11,7% έναντι 11,4%).

#### 6.4. Διαφορετικές δόσεις κλοπιδογρέλης-εξατομικευμένη θεραπεία

Μία από τις πιο προφανείς μεθόδους επίτευξης σημαντικής αναστολής της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων είναι η αύξηση της δόσης της κλοπιδογρέλης. Μηχανιστικές μελέτες έχουν δείξει μεγαλύτερη αναστολή της συσσώρευσης με 900 και 600 mg δόση φόρτισης με κλοπιδογρέλη από ότι με την κλασική δόση φόρτισης (300 mg). Παρόλα αυτά η απορρόφηση μπορεί να κορεστεί με 600 mg δόση φόρτισης<sup>194,231</sup>. Η κλινική εφαρμογή της αυξημένης δόσης φόρτισης με κλοπιδογρέλη παρουσιάστηκε για πρώτη φορά στη μελέτη **ARMYDA-2** (Antiplatelet Therapy for Reduction of Myocardial damage During Angioplasty-2)<sup>232</sup>, στην οποία 255 ασθενείς με σταθερή ΣΝ που υπεβλήθησαν σε αγγειοπλαστική είχαν μικρότερη επίπτωση περιεπεμβατικού εμφράγματος όταν πήραν δόση φόρτισης 600 mg κλοπιδογρέλης, από ότι με 300 mg. Παρόμοια αποτελέσματα παρατηρήθηκαν σε μία άλλη μελέτη ασθενών με non-STEMI<sup>233</sup>. Δύο άλλες μελέτες έδειξαν ότι ο διπλασιασμός της δόσης συντήρησης σε 150 mg την ημέρα έχει ως αποτέλεσμα αυξημένη αναστολή της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων και μείωση της φλεγμονής και της ενδοθηλιακής δυσλειτουργίας<sup>234,235</sup>.

Η μελέτη **CURRENT-OASIS 7** (Clopidogrel Optimal Loading Dose Usage to Reduce Recurrent Events- Optimal Antiplatelet Strategy for Interventions) στην οποία επιπρόσθετα της ασπιρίνης οι ασθενείς τυχαιοποιήθηκαν σε φόρτιση με 600 mg κλοπιδογρέλης (150 mg/ημέρα για 7 ημέρες και στην συνέχεια 75 mg/ημέρα) ή στην κλασική φόρτιση με 300 mg και στην συνέχεια 75 mg/ημέρα αναφέρθηκε προηγουμένως.

Ένας άλλος τρόπος για την επίτευξη υψηλού επιπέδου αναστολής των αιμοπεταλίων είναι η εξατομίκευση της θεραπείας με δοκιμασίες λειτουργικότητας των αιμοπεταλίων. Μία μικρή μελέτη από τους Bonello και συνεργάτες έδειξε σημαντικό όφελος στην έκβαση με

επαναλαμβανόμενες δόσεις φόρτισης 600 mg κλοπιδογρέλης μέχρι να επιτευχθεί μία ιδανική αναστολή των αιμοπεταλίων σε ασθενείς με υψηλή υπό θεραπεία αντιδραστικότητα των αιμοπεταλίων.

Αρκετές μη τυχαιοποιημένες μελέτες με τουλάχιστον 3.000 ασθενείς έχουν δείξει ότι η υπολειπόμενη αντιδραστικότητα των αιμοπεταλίων (residual platelet reactivity), μετρημένη με διάφορες δοκιμασίες ελέγχου της λειτουργίας τους, σχετίζεται με πτωχή έκβαση μετά από αγγειοπλαστική<sup>166</sup>.

Η αποτελεσματικότητα και η ασφάλεια της προσαρμοσμένης θεραπείας με υψηλή δόση κλοπιδογρέλης σε άτομα με ανεπαρκή απόκριση στην κλοπιδογρέλη με τις συνήθεις δόσεις αξιολογήθηκε στη μελέτη **GRAVITAS** (Gauging Responsiveness With a Verify Now Assay: Impact on Thrombosis and Safety)<sup>196</sup>. Υλικό της μελέτης αποτέλεσαν 5.429 ασθενείς που είχαν υποβληθεί σε αγγειοπλαστική και ελέγχθηκαν 12- 24 ώρες μετά την παρέμβαση με τη δοκιμασία λειτουργίας των αιμοπεταλίων Verify Now. Από αυτούς οι 3.215 δεν είχαν υψηλή αντιδραστικότητα (PRU <230). Οι υπόλοιποι 2.214 με υψηλή αντιδραστικότητα τυχαιοποιήθηκαν σε χορήγηση μεγάλης δόσης κλοπιδογρέλης (600mg φόρτιση και 150/ημέρα) και χορήγηση κλασσική δόσης (600mg φόρτιση και 75 mg/ημέρα). Μετά 6 μήνες παρακολούθησης δεν παρατηρήθηκε διαφορά (2,35% έναντι 2.3%) στο τελικό καταληκτικό σημείο (καρδιαγγειακός θάνατος, μη θανατηφόρο ΕΜ, θρόμβωση στο stent). Επίσης, δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές όσον αφορά στις αιμορραγίες (με κατάταξη κατά GUSTO 12,1% έναντι 10,3%).

## **7. ΤΟ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑ ΤΗΣ ΑΝΤΙΑΙΜΟΠΕΤΑΛΙΑΚΗΣ ΘΕΡΑΠΕΙΑΣ ΣΤΗ ΦΛΕΓΜΟΝΩΔΗ ΑΠΟΚΡΙΣΗ ΠΟΥ ΕΠΑΓΕΤΑΙ ΑΠΟ ΤΑ ΑΙΜΟΠΕΤΑΛΙΑ**

### **7.1. Ασπιρίνη**

Σύμφωνα με όλο και περισσότερα δεδομένα, η αντιαιμοπεταλιακή θεραπεία μπορεί να μειώσει τα επίπεδα διαφόρων φλεγμονωδών δεικτών και επομένως έχει θετικό αποτέλεσμα όχι μόνο στη μείωση της ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων, αλλά και στη μείωση της φλεγμονής<sup>14</sup>. Μελέτες in vivo έχουν δείξει ότι η ασπιρίνη αναστέλλει τον πυρηνικό παράγοντα κΒ (NF-κΒ) στα ενδοθηλιακά κύτταρα και επομένως αναστέλλει την προσκόλληση των μονοκυττάρων<sup>236</sup>. Παρόλα αυτά, η ασπιρίνη δε φαίνεται να επηρεάζει την αλληλεπίδραση αιμοπεταλίων λευκοκυττάρων<sup>237</sup>. Σύμφωνα με δεδομένα διαφόρων κλινικών μελετών η ασπιρίνη επιδρά σε διάφορους εκκρινόμενους φλεγμονώδεις δείκτες. Η ασπιρίνη μειώνει τα επίπεδα της hsCRP στον ορό σε ασθενείς με σταθερή ΣΝ<sup>114,238</sup> και σε ασθενείς με ΟΣΣ<sup>239</sup>. Επίσης, μειώνει στον ορό τα επίπεδα της IL-6, του MCP-1, του TGF-β και του TNF-a (πίνακας 3)<sup>114,239</sup>.

### **7.2. Θεινοπυριδίνες**

Πειράματα in vitro σε ανθρώπινα αιμοπετάλια και ενδοθηλιακά κύτταρα δείχνουν ότι η κλοπιδογρέλη και η πρασουγρέλη αναστέλλουν την έκφραση του CD40L και της Ρ-σελεκτίνης, ενώ παράλληλα μειώνουν τη συσσώρευση των αιμοπεταλίων<sup>240-242</sup>. Επίσης, η κλοπιδογρέλη μειώνει τα συσσωματώματα αιμοπεταλίων-μονοκυττάρων και αιμοπεταλίων-ουδετεροφύλων σε ασθενείς με ΟΣΣ, 24 ώρες μετά από 300 mg δόση

φόρτισης του φαρμάκου<sup>243</sup>. Σε αυτούς τους ασθενείς, το CD40L της επιφάνειας των αιμοπεταλίων, τα επίπεδα της κυκλοφορούσας P-σελεκτίνης και το sCD40L στο πλάσμα ήταν σημαντικά μειωμένα 24 ώρες μετά τη φόρτιση με κλοπιδογρέλη<sup>243</sup>. Σε μία υποανάλυση της μελέτης ASpirin non-responsiveness and Clopidogrel Endpoint Trial (ASCET), ασθενείς με σταθερή ΣΝ είχαν συγκρίσιμες μειώσεις των φλεγμονωδών δεικτών CRP, TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-10, MCP-1, CD40L, P-σελεκτίνη και TGF- $\beta$  σε διάστημα ενός χρόνου, ανεξάρτητα από το πότε έλαβαν ασπιρίνη ή κλοπιδογρέλη<sup>114</sup>. Μία post-hoc ανάλυση της μελέτης CREDO μελέτησε το όφελος της κλοπιδογρέλης σε σχέση με τις αρχικές τιμές της hsCRP. Σε αυτή τη μελέτη, ο συνδυασμένος κίνδυνος θανάτου, OEM ή AEE στους 12 μήνες συσχετιζόταν σημαντικά με αυξημένα τεταρτημόρια hsCRP μεταξύ των υγιών εθελοντών. Η μακροχρόνια θεραπεία με κλοπιδογρέλη συσχετίστηκε με στατιστικά σημαντική μείωση του σχετικού κινδύνου για το ίδιο καταληκτικό σημείο κατά 44% σε ασθενείς που βρισκόταν στο υψηλότερο τεταρτημόριο της hsCRP. Είναι πολύ σημαντικό να αναφερθεί ότι το όφελος της κλοπιδογρέλης επιτεύχθηκε όχι μόνο αμέσως μετά την αγγειοπλαστική, αλλά ήταν πιο έντονο μετά από μακροχρόνια θεραπεία μεταξύ 28 ημερών και ενός έτους (πίνακας 3)<sup>244</sup>.

### 7.3. Συνδυασμός Θεραπείας

Σύμφωνα με διάφορες μελέτες, ο συνδυασμός αντιαιμοπεταλιακών φαρμάκων μειώνει τους φλεγμονώδεις δείκτες σε μεγαλύτερο βαθμό από τη μονοθεραπεία<sup>245-247</sup>. Σε ασθενείς με non-STEMI που είχαν πολύ ενεργοποιημένα αιμοπετάλια, τα επίπεδα της hsCRP και του CD40L ήταν μειωμένα μόνο σε ασθενείς που έλαβαν συνδυασμό ασπιρίνης με κλοπιδογρέλη<sup>247</sup>. Μία ανάλυση επτά ασθενών που υπεβλήθησαν σε αγγειοπλαστική με stent μετά από ΟΣΣ και οι οποίοι έλαβαν ασπιρίνη με πρασουγρέλη στα πλαίσια

συμμετοχής τους στη μελέτη Joint Utilization of Medications to Block Platelets Optimally (JUMBO) έδειξε ότι τα επίπεδα της P-σελεκτίνης και του CD40L ήταν σημαντικά μειωμένα στις 24 ώρες και στις 30 ημέρες σε σχέση με τις baseline τιμές<sup>248</sup>. Παρόμοια, σε μία τυχαιοποιημένη μελέτη 110 ασθενών με σταθερή ΣΝ που είχαν πάρει ήδη ασπιρίνη, αυτοί που έλαβαν πρασουγρέλη είχαν σημαντικά μειωμένα συσσωματώματα αιμοπεταλίων-λευκών αιμοσφαιρίων και σημαντικά μειωμένα επίπεδα P-σελεκτίνης 2 ώρες, 24 ώρες, 14 και 29 ημέρες μετά την έναρξη της πρασουγρέλης σε σχέση με αυτούς που έλαβαν κλοπιδογρέλη (πίνακας 3)<sup>249</sup>.

#### **7.4. Ανταγωνιστές του υποδοχέα GPIIb/IIIa**

Διάφορες μελέτες που χρησιμοποίησαν ανταγωνιστές του υποδοχέα GPIIb/IIIa αμπσιξιμάμπη, επιφιμπατίδη και τιροφιμπάνη έχουν δείξει, μολονότι όχι σταθερά, ότι αυτά τα φάρμακα μειώνουν επίσης τη φλεγμονώδη απόκριση μετά από στεφανιαία αγγειοπλαστική. Μία αναδρομική ανάλυση της μελέτης Evaluation of c7E3 for the Prevention of Ischemic Complications (EPIC) έδειξε ότι η αμπσιξιμάμπη καταστέλλει σημαντικά την αύξηση των hsCRP, IL-6 και TNF-α σε ασθενείς που υποβάλλονται σε αγγειοπλαστική<sup>250</sup>. Σε αντίθεση με τα ευρήματα της μελέτης EPIC, μία υπομελέτη της μελέτης Swedish Global Use of Strategies to Open Occluded arteries (GUSTO) IV-ACS έδειξε ότι η 24 με 48 ώρες έγχυση της αμπσιξιμάμπης δεν είχε καμία επίπτωση στους φλεγμονώδεις δείκτες CRP, IL-6 και στο ινωδογόνο<sup>251</sup>. Η έγχυση επιφιμπατίδης σε ασθενείς που υπεβλήθησαν σε αγγειοπλαστική μειώνει τα επίπεδα του sCD40L και του RANTES μετά από stent, ένα φαινόμενο το οποίο δεν παρατηρείται στην περίπτωση της αμπσιξιμάμπης<sup>252</sup>. Σε ασθενείς με non STEMI, μία 48ωρη έγχυση τιροφιμπάνης (σε συνδυασμό με ασπιρίνη, κλοπιδογρέλη, στατίνη και μη κλασματοποιημένη ηπαρίνη)

φαίνεται ότι αναστέλλει την αύξηση της hsCRP στις 48 και στις 72 ώρες μετά την έγχυση του φαρμάκου σε σύγκριση με την κλασική θεραπεία<sup>253</sup>. Αντίθετα, η χορήγηση τироφιμπάνης σε ασθενείς με σταθερή στηθάγχη που υπεβλήθησαν σε αγγειοπλαστική δεν μείωσαν σημαντικά τα επίπεδα διαφόρων δεικτών της οξείας φλεγμονώδους απόκρισης, καθώς και της hsCRP (πίνακας 3)<sup>254</sup>.



**Πίνακας 3.** Κλινικές μελέτες σχετικά με τη δράση των αντιαμιοπεπταλιακών φαρμάκων στους φλεγμονώδεις δείκτες

Αντιαμιοπεπταλιακό φάρμακο	Πληθυσμός μελέτης	Φλεγμονώδεις δείκτες	Σχεδιασμός μελέτης	Παρακολούθηση	Έκβαση σε σχέση με τη φλεγμονή
<b>Ασπιρίνη</b>	Ασθενείς με ΣΝ	hsCRP, IL-6, MCP-1,	Τυχαιοποιημένη	1-έτος	Μείωση
	Ασθενείς με ΟΣΣ	TGF-β, TNF-α			
	Ασθενείς με ΟΣΣ	CD40L, P-σελεκτίνη,	Case control	24- ώρες	Μείωση
<b>Κλοπιδογρέλη</b>		Συσσωματώματα αμιοπεπταλίων/λευκών αιμοσφαιρίων			
	Ασθενείς που υποβάλλονται σε αγγειοπλαστική	hsCRP	Post hoc ανάλυση	1-έτος†	Μείωση
<b>Πρασουγρέλη</b>	Ασθενείς που υποβάλλονται σε αγγειοπλαστική	CD40L, P-σελεκτίνη	Τυχαιοποιημένη	1-μήνας	Μείωση
<b>Ασπιρίνη + Κλοπιδογρέλη</b>	Ασθενείς με Non STEMI	hsCRP, sCD40L	Τυχαιοποιημένη	6-ημέρες	Μείωση
<b>Ασπιρίνη + Κλοπιδογρέλη versus</b>	Ασθενείς με ΣΝ	P-σελεκτίνη	Τυχαιοποιημένη	29-ημέρες	Μικρότερη μείωση στην ομάδα ασπιρίνης+κλοπιδογρέλης σε σχέση με την ομάδα ασπιρίνης+πρασουγρέλης
<b>Ασπιρίνη + Πρασουγρέλη</b>					

<b>Ασπιρίνη + Πρασουγρέλη</b>	Ασθενείς με ΟΣΣ	P-σελεκτίνη, CD40L	Τυχαιοποιημένη	I-έτος	Αναστολή
<b>Αμπεξιμάμπη</b>	Ασθενείς που υποβάλλονται σε αγγειοπλαστική	hsCRP, IL-6, TNF-α			Αναστολή
<b>Αμπεξιμάμπη</b>	Ασθενείς που υποβάλλονται σε αγγειοπλαστική	IL-6, CRP, ινοδόγONO	Τυχαιοποιημένη	72- ώρες	Κανένα αποτέλεσμα
<b>Επιφιμπρατίνη</b>	Ασθενείς που υποβάλλονται σε αγγειοπλαστική	sCD40L, RANTES	Τυχαιοποιημένη	24- ώρες	Μείωση
<b>Τιροφιμπάνη</b>	Ασθενείς με Non STEMI	hsCRP	Τυχαιοποιημένη	72- ώρες	Μείωση
<b>Τιροφιμπάνη</b>	Ασθενείς με ασταθή στηθάγχη	hsCRP	Case control	72-ώρες	Κανένα αποτέλεσμα

## 8. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Τα αιμοπετάλια παίζουν σημαντικό ρόλο στην παθογένεια και την έκβαση των οξέων στεφανιαίων συνδρόμων (ΟΣΣ)<sup>16</sup> και κατά συνέπεια τα αντιαιμοπεταλιακά φάρμακα αποτελούν τον ακρογωνιαίο λίθο στην πρόληψη και αντιμετώπιση των ΟΣΣ<sup>255</sup>. Η κλοπιδογρέλη είναι μία θειενοπυριδίνη που συνδέεται μη αντιστρεπτά με τον πουρινεργικό υποδοχέα της μεμβράνης των αιμοπεταλίων P2Y<sub>12</sub> και αναστέλλει την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων από τη διφωσφορική αδενοσίνη (ADP)<sup>256</sup>. Παρόλο που η ευεργετική δράση της κλοπιδογρέλης σε ασθενείς με ΟΣΣ έχει αποδειχθεί σε διάφορες μελέτες<sup>211,213,214,223</sup>, χρειάζονται περισσότερα δεδομένα για να κατανοήσουμε πλήρως όλο το φάσμα της δράσης της κλοπιδογρέλης κατά την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων.

Εκτός από τον πολύ σημαντικό ρόλο τους στη θρόμβωση, τα αιμοπετάλια εμπλέκονται ουσιωδώς στη φλεγμονή, που αποτελεί βασική συνιστώσα της αθηρογένεσης<sup>166,257</sup>, και συνεισφέρουν σημαντικά στην παθοφυσιολογία των ΟΣΣ<sup>10,33</sup>. Οι μηχανισμοί, όμως, με τους οποίους τα αιμοπετάλια επηρεάζουν τη φλεγμονώδη διαδικασία στο αρτηριακό τοίχωμα δεν είναι καλά μελετημένοι ακόμη. Ο CD40L, τα PMPs, η P-σελεκτίνη και οι κυτταρικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ αιμοπεταλίων και λευκών αιμοσφαιρίων και αιμοπεταλίων και ενδοθηλιακών κυττάρων που διαμεσολαβούνται μέσω διαφόρων προσδετών και υποδοχέων προσκόλλησης φαίνεται να έχουν σημαντική συμμετοχή στη φλεγμονή<sup>10,33</sup>. Αν και η αντιθρομβωτική δράση της κλοπιδογρέλης έχει μελετηθεί εκτενώς τόσο σε βιοχημικό-παθοφυσιολογικό, επίπεδο όσο και σε κλινικό επίπεδο σε πολλές κλινικές μελέτες<sup>211,223</sup>, η επίδραση της θεραπείας με κλοπιδογρέλη στη λειτουργία των αιμοπεταλίων ως προς τη φλεγμονή είναι συγκριτικά πολύ λιγότερο μελετημένη<sup>243,258-260</sup>.

Η διπλή αντιαιμοπεταλιακή αγωγή που συνδυάζει ασπιρίνη με κλοπιδογρέλη είναι η βασική θεραπεία ασθενών με ΟΣΣ ή αυτών που υποβάλλονται σε αγγειοπλαστική με βάση τις πρόσφατες Ευρωπαϊκές και Αμερικανικές κατευθυντήριες οδηγίες<sup>261-265</sup>. Παρά, όμως τη χορήγηση διπλής αντιαιμοπεταλιακής θεραπείας, κάποιοι ασθενείς αναπτύσσουν ξανά καρδιαγγειακά ισχαιμικά συμβάντα, με τη θρόμβωση του stent να αποτελεί το πιο καταστροφικό από αυτά<sup>266</sup>. Έχει αποδειχθεί ότι η αντιαιμοπεταλιακή απόκριση στην κλοπιδογρέλη ποικίλει μεταξύ των διαφόρων ασθενών<sup>164,165</sup>. Οι ασθενείς που εμφανίζουν μικρή αναστολή της αντιδραστικότητας των αιμοπεταλίων, ενώ βρίσκονται σε θεραπεία με κλοπιδογρέλη, χαρακτηρίζονται ως ασθενείς με «αντίσταση» ή με «κακή απόκριση» στην κλοπιδογρέλη<sup>147</sup>. Η κακή απόκριση στην κλοπιδογρέλη ποικίλει μεταξύ 4% και 44%<sup>164</sup>. Παρόλο λοιπόν που έχουν πραγματοποιηθεί πολλές μελέτες σχετικά με την αντίσταση στην κλοπιδογρέλη, η επίδραση της διαφορετικής απόκρισης των ασθενών στη θεραπεία με κλοπιδογρέλη στην αντιφλεγμονώδη δράση του φαρμάκου σε σύγκριση με την αντιθρομβωτική του δράση χρειάζεται περαιτέρω διερεύνηση.

Στην παρούσα μελέτη, διερευνήσαμε τους διάφορους προφλεγμονώδεις και προθρομβωτικούς παράγοντες των αιμοπεταλίων καθώς και την ικανότητα συσσώρευσης των αιμοπεταλίων σε ασθενείς με ΟΣΣ που λαμβάνουν κλοπιδογρέλη. Θελήσαμε να μελετήσουμε τη διαφοροποίηση της επίδρασης της κλοπιδογρέλης στη συσσώρευση των αιμοπεταλίων και σε κάθε έναν από τους προαναφερθέντες παράγοντες σε σχέση με το βαθμό αναστολής των αιμοπεταλίων και τη διάρκεια χορήγησης του φαρμάκου.

## **ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**



## 9. ΥΛΙΚΟ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

### 9.1. Πληθυσμός μελέτης

Σε αυτήν τη μελέτη συμμετείχαν συνολικά 61 ασθενείς, ηλικίας  $58,8 \pm 11,5$  έτη, (47 άνδρες και 14 γυναίκες), με ΟΣΣ (ΟΕΜ με ή χωρίς ανάσπαση του διαστήματος ST στο ηλεκτροκαρδιογράφημα ή ασταθής στηθάγχη) που προσήλθαν στο Τμήμα Επειγόντων Περιστατικών του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ιωαννίνων μέσα σε 24 ώρες από την έναρξη των συμπτωμάτων. Το ΟΣΣ ορίστηκε ως θωρακικό άλγος διάρκειας 5 ή περισσότερων λεπτών στην ηρεμία με την ταυτόχρονη παρουσία ισχαιμικού ST-T διαστήματος ή ως αύξηση των επιπέδων της τροπονίνης T στο αίμα). Ασθενείς με σακχαρώδη διαβήτη, χρόνια φλεγμονώδη νόσο ή νεοπλασία καθώς και ασθενείς που ελάμβαναν στατίνη ή κλοπιδογρέλη πριν την εμφάνιση του ΟΣΣ και την εισαγωγή τους στο νοσοκομείο αποκλείστηκαν από τη μελέτη.

Η μελέτη εγκρίθηκε από την επιστημονική επιτροπή του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ιωαννίνων και οι όλοι οι ασθενείς που συμμετείχαν στη μελέτη έδωσαν την ενυπόγραφη συγκατάθεσή τους για τη συμμετοχή τους, έπειτα από εκτενή ενημέρωση για το σκοπό και τη μεθοδολογία της μελέτης.

Κατά τη διάρκεια της νοσηλείας τους (μέση διάρκεια 7 ημέρες) όλοι οι ασθενείς έλαβαν 325 mg ασπιρίνης ως δόση φόρτισης ακολουθούμενη από 100 mg/ημέρα και δόση φόρτισης με 600 mg κλοπιδογρέλης (Plavix<sup>®</sup>) και στη συνέχεια 75 mg/ημέρα.. Χαμηλού μοριακού βάρους ηπαρίνη (ενοξαπαρίνη) δόθηκε υποδορίως σε δόση 1 mg/kg κάθε 12 ώρες και έγινε έναρξη ατορβαστατίνης 40 mg/ημέρα κατά την εισαγωγή στο νοσοκομείο. Δε χορηγήθηκε κανένα άλλο θρομβοενεργό φάρμακο, συμπεριλαμβανομένων των ανταγωνιστών της γλυκοπρωτεΐνης (GP) IIb/IIIa.

Όλοι οι ασθενείς υπεβλήθησαν σε διαγνωστική στεφανιογραφία των στεφανιαίων αγγείων μέσα σε 72 ώρες από την εισαγωγή τους στο νοσοκομείο. Στη συνέχεια οι ασθενείς υπεβλήθησαν σε διαδερμική αγγειοπλαστική με χρήση stent (n=48) εντός 4 ημερών από τη φόρτιση με κλοπιδογρέλη ή ακολούθησαν συντηρητική αντιμετώπιση (n=13), κάτι το οποίο ήταν στη διακριτική ευχέρεια του θεράποντα ιατρού, ανάλογα με την ανατομία των στεφανιαίων αγγείων και την καταλληλότητα των βλαβών για επαναγγείωση (ένοχες βλάβες).

Οι ασθενείς παρακολούθηθηκαν για διάστημα 30 ημερών από την εμφάνιση του ΟΣΣ και τη δόση φόρτισης με κλοπιδογρέλη. Δείγματα αίματος πάρθηκαν στις 5 ημέρες και στις 30 ημέρες από τη φόρτιση με κλοπιδογρέλη. Κατά τη διάρκεια της παρακολούθησης έπρεπε οπωσδήποτε να βρίσκονται σε αγωγή με ασπιρίνη 100 mg/ημέρα, κλοπιδογρέλη 75 mg/ημέρα και ατορβαστατίνη 40 mg/ημέρα. Η υπόλοιπη φαρμακευτική αγωγή [β-αποκλειστές, ανταγωνιστές του μετατρεπτικού ενζύμου της αγγειοτασίνης ( $\alpha$ -ΜΕΑ), ανταγωνιστές του υποδοχέα της αγγειοτασίνης II (ΑΤII), θειαζιδικά διουρητικά, ανταγωνιστές ασβεστίου] ήταν στην επιλογή των θεράποντων ιατρών τους.

Στους ασθενείς έγινε καταγραφή όλων των κλασικών παραγόντων κινδύνου για ΣΝ (αρτηριακή υπέρταση, κάπνισμα, κληρονομικό ιστορικό πρώιμης στεφανιαίας νόσου, υπερλιπιδαιμία και παχυσαρκία). Επίσης, προσδιορίστηκε το λιπιδαιμικό τους προφίλ, η hs CRP, ο απόλυτος αριθμός των λευκών αιμοσφαιρίων (και αναλυτικά ο απόλυτος αριθμός των μονοκυττάρων και των πολυμορφοκυττάρων ουδετεροφίλων) και των αιμοπεταλίων, καθώς και ο μέσος όγκος των αιμοπεταλίων (MPV) σε κάθε χρονική στιγμή της παρακολούθησης.



Ασθενείς που υπεβλήθησαν σε CABG είτε στη διάρκεια της νοσηλείας τους, είτε στη διάρκεια της περιόδου παρακολούθησης των 30 ημερών, καθώς και ασθενείς που διέκοψαν την αντιαιμοπεταλιακή ή υπολιπιδαιμική αγωγή για κάποιο λόγο (π.χ. αιμορραγία ή ηπατοπάθεια) αποκλείστηκαν, επίσης, από τη μελέτη.

## **9.2. Πειραματική διαδικασία**

### **9.2.1. Προετοιμασία των δειγμάτων**

Η αιμοληψία πραγματοποιήθηκε από φλέβα του αντιβραχίου των ασθενών με τη βοήθεια πεταλούδας με βελόνα 19 gauge. Η συλλογή έγινε με ελεύθερη ροή (χωρίς τη χρήση ελαστικής περίδεσης) ώστε να αποφευχθεί η ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων. Αφού αφαιρέθηκαν τα 2 πρώτα ml αίματος από την αιμοληψία, το αίμα συλλέχθηκε με αναλογία όγκων 9:1 (αίματος\ αντιπηκτικού) σε πλαστικά σωληνάρια που περιείχαν ACD ως αντιπηκτικό. Δείγματα αίματος πάρθηκαν στο τμήμα επειγόντων περιστατικών πριν την έναρξη οποιασδήποτε αγωγής, καθώς και 5 και 30 ημέρες μετά τη δόση φόρτισης με κλοπιδογρέλη.

### **9.2.2. Αναλύσεις βιοχημικών παραμέτρων**

Επιπρόσθετα, δείγματα περιφερικού αίματος πάρθηκαν από τους ασθενείς με ΟΣΣ πριν την έναρξη θεραπείας, καθώς και 5 και 30 ημέρες μετά τη δόση φόρτισης με κλοπιδογρέλη προκειμένου να πραγματοποιηθούν αναλύσεις γενικής αίματος, βιοχημικές αναλύσεις, όπως ο προσδιορισμός των επιπέδων της ολικής χοληστερόλης, HDL χοληστερόλης και

της LDL χοληστερόλης και των τριγλυκεριδίων και προσδιορισμός της hs CRP. Όλες οι αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν με τις καθιερωμένες και εμπορικά διαθέσιμες τεχνικές.

### **9.2.3. Μελέτη της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων με τη μέθοδο μετάδοσης φωτός (LTA: Light Transmission Aggregometry)**

#### **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]

Απεσταγμένο νερό ( $dH_2O$ )

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

Διφωσφορική αδενοσίνη (ADP, Chrono-Log)

Αραχιδονικό οξύ (Sigma- Aldrich)

Ethanol absolute (Pancreac)

Thrombin receptor activating peptide-14 (TRAP) (Sigma- Aldrich)

Φυγόκεντρος πάγκου (Hermle, Z 320)

Αιματοκυττόμετρο (Neubauer)

Μικροσκόπιο (Olympus)

Συσσωρευόμετρο (Aggregometer, μοντέλο 700-4DR, CHRONO-LOG)

Καταγραφικό (AggroLink, CHRONO-LOG)

Γυάλινες κυψελίδες συσσώρευσης (CHRONO-LOG)

Ειδικά μαγνητάκια συσσώρευσης (CHRONO-LOG)

## **Διαλύματα εργασίας**

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

**Διάλυμα οξαλικού αμμωνίου:** 1 g οξαλικού αμμωνίου διαλύεται σε 100 ml απεσταγμένου ύδατος. Το διάλυμα αποθηκεύεται στους 4 °C.

**Διάλυμα 1mM διφωσφορικής αδενosίνης (ADP):** 2,5 mg λυοφιλοποιημένου ADP διαλύονται σε 5 ml φυσιολογικού ορού. Το διάλυμα αποθηκεύεται στους -80°C σε κλάσματα των 50μl.

**Διάλυμα Αραχιδονικού οξέος (AA):** 10 mg αραχιδονικού οξέος διαλύονται σε 655 μl αιθανόλης

**Διάλυμα TRAP-14:** 1 mg διαλύματος TRAP-14 διαλύονται σε 100 μl φυσιολογικού ορού

## **Αρχή της μεθόδου**

Η αρχή της μεθόδου βασίζεται στην μέτρηση της αλλαγής της οπτικής διαπερατότητας του εναιωρήματος των αιμοπεταλίων στο πλάσμα κατά τη διάρκεια της συσσώρευσης, όταν αυτά ενεργοποιούνται από διάφορους αγωνιστές.

## **Πειραματική διαδικασία**

### ***Απομόνωση του PRP και PPP από αίμα***

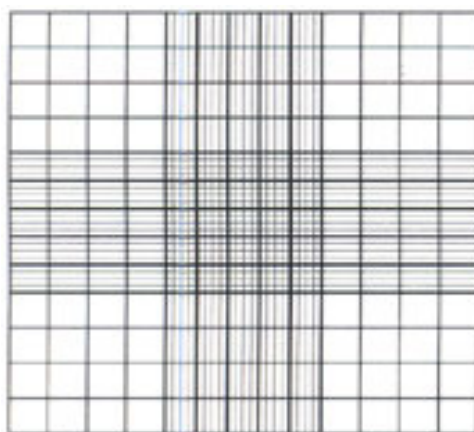
Η συλλογή του περιφερικού φλεβικού αίματος γίνεται σε πλαστικούς φυγοκεντρικούς σωλήνες πολυαιθυλενίου (χωρητικότητας 12 ml), στους οποίους έχει προστεθεί ACD. Η αναλογία αίματος-ACD σε κάθε πλαστικό σωλήνα είναι 9:1. Το αίμα υφίσταται ήπια

φυγοκέντρωση στις 1,000 rpm για 15 min σε θερμοκρασία δωματίου όπου και απομονώνεται με πιπέτα το 1/3 ml από το υπερκείμενο υγρό, το οποίο και αποτελεί το πλάσμα πλούσιο σε αιμοπετάλια (PRP). Στη συνέχεια γίνεται επαναφυγοκέντρωση του υπολειπόμενου πλάσματος μαζί με τα κύτταρα του αίματος στις 3,100 rpm για 15min σε θερμοκρασία δωματίου και απομονώνεται με πιπέτα το υπερκείμενο υγρό το οποίο αποτελεί το πλάσμα φτωχό σε αιμοπετάλια (PPP).

### ***Μέτρηση του αριθμού των αιμοπεταλίων***

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

$$(Μέση\ τιμή\ αιμοπεταλίων\ των\ 5\ τετραγώνων) \times 1\ mm^3 \times 20 / 0.004\ mm^3$$



Τα τελικά δείγματα όπου θα λάβει χώρα η μέτρηση της αναστολής της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων, παρασκευάζονται με κατάλληλη αραιώση, έτσι ώστε να έχουμε 250.000

αιμοπετάλια ανά  $\text{mm}^3$ . Ο απαιτούμενος όγκος  $V_{\text{PPP}}$  του πλάσματος φτωχού σε αιμοπετάλια που απαιτείται για την αραιώση, προκύπτει από τη σχέση:

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

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

### ***Ρύθμιση και χρήση του οργάνου***

Ανοίγουμε το συσσωρευόμετρο μισή ώρα πριν τη δοκιμή των πεπτιδίων για να φτάσει η θερμοκρασία του οργάνου στους  $37^{\circ}\text{C}$ . Ετοιμάζουμε μια σειρά από γυάλινες κυψελίδες συσσώρευσης όπου θα τοποθετηθούν τα δείγματά μας. Καθεμιά φέρει από ένα μαγνητάκι. Ετοιμάζουμε ένα δείγμα από 500  $\mu\text{l}$  πλάσματος φτωχό σε αιμοπετάλια (PPP) και το τοποθετούμε στη θέση 'reference' του οργάνου. Το δείγμα αυτό παραμένει στη θέση αυτή μέχρι να τελειώσει το πείραμα. Μετά την εισαγωγή του δείγματος (500  $\mu\text{L}$  PRP) στη κατάλληλη θέση του οργάνου εισάγουμε το διάλυμα του αγωνιστή μετά από ένα λεπτό. Χρησιμοποιήθηκε ως αγωνιστής το ADP σε τελικές συγκεντρώσεις 2.5, 5 και 10  $\mu\text{M}$ , το Αραχιδονικό οξύ σε τελική συγκέντρωση 10  $\mu\text{M}$  καθώς και το TRAP-14 σε τελική συγκέντρωση 10  $\mu\text{M}$ . Παρατηρούμε τη συσσώρευση του δείγματος για 4 λεπτά. Καταγράφουμε και τυπώνουμε την % συσσώρευση του δείγματος. Ξεπλένουμε τις κυψελίδες αρχικά με νερό και απορρυπαντικό και κατόπιν με χρωμοθειικό και απεσταγμένο νερό. Ξεπλένουμε τα μαγνητάκια με απεσταγμένο νερό και μεθανόλη.

**Υπολογισμός του ποσοστού (%) αναστολής της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων που προκαλεί η κλοπιδογρέλη**

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

$$\% \text{ Αναστολή} = (\text{Δείγμα Αναφοράς} - \text{Δείγμα μετά από χρονικό διάστημα} \alpha / \text{Δείγμα Αναφοράς}) \times 100$$

**9.2.4. Μελέτη της μεμβρανικής έκφρασης της P-σελεκτίνης με κυτταρομετρία ροής (Flow cytometry)**

**Αντιδραστήρια- Όργανα**

Φυγόκεντρος πάγκου (HermLe, Z 320)

Κιτρικό οξύ (C<sub>6</sub>H<sub>8</sub>O<sub>7</sub>, M.B. : 192,13, Merck)

Κιτρικό νάτριο(C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>Na<sub>3</sub>O<sub>7</sub> H<sub>2</sub>O, M.B. : 294,10, Merck)

D (+) Γλυκόζη [(HOCH<sub>2</sub>CH(CHOH)<sub>4</sub>O, M.B.:180,16, Fluka]

Χλωριούχο Αμμώνιο (NH<sub>4</sub>Cl, Merck)

K<sub>2</sub>- Αιθυλενοδιαμινοτετραοξικό οξύ (K<sub>2</sub>EDTA, Sigma)

Όξινο ανθρακικό κάλιο KHCO<sub>3</sub>

Anti-CD61-PerCP (Becton Dickinson, San Jose, CA)

Anti-CD62- PE (Becton Dickinson, San Jose, CA)

Σωληνάκια πολυστυρενίου (Becton Dickinson, San Jose, CA)

Κυτταρόμετρο ροής FACScalibur (Flow Cytometer, Becton Dickinson, San Jose, CA)

Cell Quest Software (Becton Dickinson, San Jose, CA)

Επωαστικός θάλαμος 37°C

Thrombin receptor activating peptide-14 (TRAP) (Sigma- Aldrich)

Διφωσφορική αδενοσίνη (ADP, Chrono-Log)

### **Διαλύματα εργασίας**

**Αντιπηκτικό διάλυμα κιτρικών (ACD):** Το υδατικό αντιπηκτικό διάλυμα ACD περιέχει 42 mM κιτρικού οξέος, 75 mM κιτρικού νατρίου και 139 mM D(+) γλυκόζη. Αναλυτικότερα ζυγίζουμε 0,8 g κιτρικό νάτριο, 2,2 g κιτρικό οξύ και 2,5 g D(+) γλυκόζη τα οποία διαλυτοποιούνται σε 100 ml H<sub>2</sub>O. Το διάλυμα διατηρείται στους 4<sup>0</sup>C.

**Διάλυμα λύσης των κυττάρων (lysis buffer):** Το διάλυμα αυτό περιέχει 0,834g NH<sub>4</sub>Cl, 0,0036g K<sub>2</sub>EDTA και 0,10g KHCO<sub>3</sub> τα οποία διαλυτοποιούνται σε dH<sub>2</sub>O. Το pH του διαλύματος ρυθμίζεται στο 7,4 και τοποθετείται σε ογκομετρική φιάλη των 100ml. Στη συνέχεια η ογκομετρική φιάλη συμπληρώνεται μέχρι τα 100ml με dH<sub>2</sub>O. Κατά τη διάρκεια του πειράματος φυλάσσεται σε πάγο. Το διάλυμα αυτό παρασκευάζεται λίγο πριν τη χρήση του.

**Διάλυμα 1mM διφωσφορικής αδενοσίνης (ADP):** Το διάλυμα της διφωσφορικής αδενοσίνης προέρχεται από 2.5mg λυοφιλοποιημένου ADP διαλυτοποιημένο σε 5ml φυσιολογικό ορό. Το διάλυμα διατηρείται στους -80<sup>0</sup>C σε κλάσματα των 50μL.

**Διάλυμα TRAP-14:** 1 mg διαλύματος TRAP-14 διαλύονται σε 100 μL φυσιολογικού ορού.

**Διάλυμα 10 mM PBS (pH 7,4):** 8.1816 g NaCl, 1.3800 g NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>•H<sub>2</sub>O και 1.7795 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>•2H<sub>2</sub>O διαλυτοποιούνται σε 800 ml H<sub>2</sub>O και αφού ρυθμιστεί το, pH στο 7.4, συμπληρώνεται ο όγκος στο 1 L με d H<sub>2</sub>O. Το διάλυμα διατηρείται σε θερμοκρασία δωματίου.

### **Αρχή της μεθόδου**

Η κυτταρομετρία ροής (Flow Cytometry, FC) είναι μια τεχνική αυτοματοποιημένης κυτταρικής ανάλυσης που επιτρέπει τη μέτρηση μεμονωμένων σωματιδίων (κυττάρων,

πυρήνων, χρωμοσωμάτων κ.λ.π.) καθώς διέρχονται σε νηματική ροή από ένα σταθερό σημείο όπου προσπίπτει ακτίνα laser. Τα πλεονεκτήματα της FC στηρίζονται κυρίως στη δυνατότητα να αναλύει με μεγάλη ταχύτητα, ακόμη και μικρά δείγματα, ταυτοχρόνως πολλαπλά φυσικά ή/ και χημικά χαρακτηριστικά του κυττάρου. Οι κυτταρομετρητές ροής λειτουργούν με ακτίνα φωτός από πηγή laser, η οποία προσπίπτει επάνω στα κύτταρα, καθώς ρέουν υδροδυναμικά εστιασμένα το ένα μετά το άλλο. Η σκεδαζόμενη από κάθε κύτταρο ακτινοβολία συλλέγεται από κατάλληλους ανιχνευτές και αξιολογείται μέσω λογισμικού, προσφέροντας πληροφορίες για το σχετικό μέγεθος, την κοκκίωση, την πολυπλοκότητα δομής, την παρουσία επιφανειακών ή ενδοκυττάρων αντιγόνων, το περιεχόμενο DNA και την ένταση φθορισμού. Το υπό εξέταση υλικό, το οποίο πρέπει να είναι υπό μορφή εναιωρήματος (αίμα, ή άλλο παρασκευασθέν εναιώρημα κυττάρων από ιστούς), υπόκειται σε επεξεργασία με ειδικά κατά περίπτωση μονοκλωνικά αντισώματα συζευγμένα με φθορίζουσες ουσίες ή με φθορίζουσες χρωστικές ανάλογες προς τη χημική παράμετρο που αναζητείται και εκπέμπουν σε ένα χαρακτηριστικό μήκος κύματος (FITC= 530nm/30, PE= 585nm/42, και PerCP= 650 nm). Στη συνέχεια ένα-ένα τα κύτταρα υπό την επίδραση ρυθμίσεων υδροδυναμικής εστίασης έρχονται σε επαφή με δύο έως τέσσερις ακτίνες laser διαφορετικού μήκους κύματος εκπεμπόμενης ακτινοβολίας και κατάλληλου για τη διέγερση των φθοριοχρωμάτων. Διάφοροι ειδικά διατεταγμένοι ανιχνευτές (έως και 18 βολταϊκές φωτοδιόδοι) μετρούν την ένταση του σκεδαζομένου φωτός που προκύπτει από τη διάχυση της προσπίπτουσας ακτινοβολίας μετά την πρόσκρουση της με τα κύτταρα προς όλες τις κατευθύνσεις στο χώρο. Λαμβάνονται κυρίως 4 φωτεινά σήματα: το απ' ευθείας σκεδαζόμενο φως (FSC), το υπό ορθή γωνία σκεδαζόμενο φως (SSC), ο παραγόμενος φθορισμός και η απορρόφηση μέρους της προσπίπτουσας ακτινοβολίας. Ο συνδυασμός αυτών των φωτεινών σημάτων παράγει ένα ρεύμα παλμού που ενισχύεται και εκφράζεται σαν μία σειρά εξειδικευμένων παλμών, τα αναλογικά σήματα, τα οποία στη



συνέχεια μετατρέπονται σε ψηφιακά με τους μετατροπείς αναλογικού σήματος σε ψηφιακό (ADC system). Τα σήματα αυτά καταχωρούνται, ταξινομούνται, δημιουργούνται οι κατανομές συχνότητας των υπό διερεύνηση κυτταρικών παραμέτρων και αναλύονται με την χρήση ειδικών προγραμμάτων ηλεκτρονικών υπολογιστών. Με αυτόν τον τρόπο μπορούν να εξετασθούν δεκάδες κυτταρικές παράμετροι μεγάλου αριθμού κυττάρων σε μικρό χρονικό διάστημα (>1000 κύτταρα/sec). Η τεχνολογία της κυτταρομετρίας ροής έχει ένα ευρύ πεδίο εφαρμογών όπως στην κλινική και μοριακή βιολογία, στην ανοσολογία, στη φυτολογία, στη θαλάσσια βιολογία. Στην ιατρική οι εφαρμογές της τεχνολογίας είναι πολλές και συνεχίζουν να προστίθενται νέες τόσο στο πεδίο της κλινικής πράξης όσο και στην βασική έρευνα.

## **Πειραματική διαδικασία**

### ***Πορεία***

Σε κάθε σωληνάκι κυτταρομέτρου τοποθετούμε 2μl από τα μονοκλωνικά αντισώματα διαφορετικού φθοριοχρώματος (διπλός φθορισμός). Για τον προσδιορισμό της P-σελεκτίνης χρησιμοποιήσαμε τα αντισώματα anti CD61-PE και CD62-PE και για τον προσδιορισμό του CD40L το αντίσωμα anti CD 154-PE. Προσθέτουμε 20 μl ολικού αίματος στο κέντρο από το κάθε σωληνάκι. Στο σωληνάκι που θέλουμε να αναλύσουμε τα μη ενεργοποιημένα αιμοπετάλια προσθέτουμε 2 μl διαλύματος PBS, 10 mM ενώ στο σωληνάκι για τα ενεργοποιημένα αιμοπετάλια προσθέτουμε 2 μl ADP ( $C_{\text{τελ}}=100\mu\text{M}$ ) και TRAP ( $C_{\text{τελ}}=100\mu\text{M}$ ). Ήπια ανάδευση με vortex σε χαμηλή ταχύτητα. Επωάζουμε για 10min στους 37°C. Προσθέτουμε 2ml διαλύματος λύσης των κυττάρων και τοποθετούμε τα δείγματα στον πάγο για 20min. Τα δείγματα φυγοκεντρώνται στις 2000rpm για 5min σε

φυγόκεντρο πάγκου. Το υπερκείμενο αποχύνεται και προσθέτουμε 500μL PBS, 10 mM. Ακολουθεί vortex και ανάλυση με κυτταρομετρία ροής.

### ***Επεξεργασία των αποτελεσμάτων***

Κατά την επεξεργασία των αποτελεσμάτων υπολογίζουμε την μέση ένταση φθορισμού του CD62-PE τόσο στα μη ενεργοποιημένα αιμοπετάλια όσο και στα ενεργοποιημένα αιμοπετάλια.

### **9.2.5. Μελέτη της αλληλεπίδρασης των αιμοπεταλίων με τα μονοκύτταρα και τα ουδετερόφιλα με κυτταρομετρία ροής (Flow Cytometry)**

#### **Αντιδραστήρια- Όργανα**

Φυγόκεντρος πάγκου (HermLe, Z 320)

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]

Χλωριούχο Αμμώνιο ( $NH_4Cl$ , Merck)

K<sub>2</sub>- Αιθυλενοδιαμινοτετραοξικό οξύ (K<sub>2</sub>EDTA, Sigma)

Όξινο ανθρακικό κάλιο ( $KHCO_3$ ,

Anti-CD42α-PerCP (Becton Dickinson, San Jose, CA)

Anti-CD45- PE (Becton Dickinson, San Jose, CA)

Anti-CD14-FITC (BD Pharmingen, San Jose, CA)

Σωληνάκια πολυστυρενίου (Becton Dickinson, San Jose, CA)

Κυτταρόμετρο ροής FACScalibur (Flow Cytometer, Becton Dickinson, San Jose, CA)

Cell Quest Software (Becton Dickinson, San Jose, CA)

Επωαστικός θάλαμος 37°C

Thrombin receptor activating peptide-14 (TRAP) (Sigma- Aldrich)

Διφωσφορική αδενοσίνη (ADP, Chrono-Log)

### **Διαλύματα εργασίας**

**Αντιπηκτικό διάλυμα κιτρικών (ACD):** Το υδατικό αντιπηκτικό διάλυμα ACD περιέχει 42 mM κιτρικού οξέος, 75 mM κιτρικού νατρίου και 139 mM D(+) γλυκόζη. Αναλυτικότερα ζυγίζουμε 0,8 g κιτρικό νάτριο, 2,2 g κιτρικό οξύ και 2,5 g D(+) γλυκόζη τα οποία διαλυτοποιούνται σε 100 ml H<sub>2</sub>O. Το διάλυμα διατηρείται στους 4<sup>0</sup>C.

**Διάλυμα λύσης των κυττάρων (lysis buffer):** Το διάλυμα αυτό περιέχει 0,834g NH<sub>4</sub>Cl, 0,0036g K<sub>2</sub>EDTA και 0,10g KHCO<sub>3</sub> τα οποία διαλυτοποιούνται σε dH<sub>2</sub>O. Το pH του διαλύματος ρυθμίζεται στο 7,4 και τοποθετείται σε ογκομετρική φιάλη των 100mL. Στη συνέχεια η ογκομετρική φιάλη συμπληρώνεται μέχρι τα 100mL με dH<sub>2</sub>O. Κατά τη διάρκεια του πειράματος φυλάσσεται σε πάγο. Το διάλυμα αυτό παρασκευάζεται λίγο πριν τη χρήση του.

**Διάλυμα 1mM διφωσφορικής αδενοσίνης (ADP):** Το διάλυμα της διφωσφορικής αδενοσίνης προέρχεται από 2.5mg λυοφιλοποιημένου ADP διαλυτοποιημένο σε 5mL φυσιολογικό ορό. Το διάλυμα διατηρείται στους -80°C σε κλάσματα των 50μL.

**Διάλυμα TRAP-14:** 1 mg διαλύματος TRAP-14 διαλύονται σε 100 μl φυσιολογικού ορού.

**Διάλυμα 10 mM PBS (pH 7,4):** 8.1816 g NaCl, 1.3800 g NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>•H<sub>2</sub>O και 1.7795 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>•2H<sub>2</sub>O διαλυτοποιούνται σε 800 ml H<sub>2</sub>O και αφού ρυθμιστεί το , pH στο 7.4, συμπληρώνεται ο όγκος στο 1 L με d H<sub>2</sub>O. Το διάλυμα διατηρείται σε θερμοκρασία δωματίου.

## **Πειραματική διαδικασία**

### ***Πορεία***

Για τη μελέτη της αλληλεπίδρασης των αιμοπεταλίων με τα λευκοκύτταρα χρησιμοποιούμε τα αντισώματα που χρησιμοποιούμε είναι 1<sup>ov</sup> το κοινό μονοκλωνικό αντίσωμα αντιγόνο λευκοκυττάρων/ποντικού, αντί-ανθρώπου αντι-CD45-PE το οποίο αντιδρά με όλες τις ισομορφές του κοινού λευκοκυτταρικού αντιγόνου (LCA) το οποίο βρίσκεται σε όλα τα λευκοκύτταρα συμπεριλαμβανομένων των ουδετεροφίλων στα οποία εκφράζεται περισσότερο. 2<sup>ov</sup> το αντι-CD14-FITC που αναγνωρίζει τα μονοκύτταρα αφού αντιδρά με την αλυσίδα της γλυκοπρωτεΐνης γλυκοσυλφωσφατιδυλοϊνοσιτόλης μεγέθους 53-55 kDa η οποία εκφράζεται σε υψηλά επίπεδα σε αυτά τα κύτταρα. 3<sup>ov</sup> το αντι- 42a το οποίο αναγνωρίζει τα αιμοπετάλια. Η αλληλεπίδραση των αιμοπεταλίων με τα μονοκύτταρα και τα ουδετερόφιλα χρησιμοποιείται ως δείκτης για τη φλεγμονώδη δράση των αιμοπεταλίων.

Σε κάθε σωληνάκι κυτταρομέτρου τοποθετούμε 2μl από τα μονοκλωνικά αντισώματα διαφορετικού φθοριοχρώματος (τριπλός φθορισμός). Προσθέτουμε 20 μl ολικού αίματος στο κέντρο από το κάθε σωληνάκι. Στη συνέχεια, στο σωληνάκι που θέλουμε να αναλύσουμε τα μη ενεργοποιημένα αιμοπετάλια προσθέτουμε 2 μl διαλύματος PBS, 10 mM ενώ στο σωληνάκι για τα ενεργοποιημένα αιμοπετάλια προσθέτουμε 2 μl ADP ( $C_{\text{τελ}}=100\mu\text{M}$ ) και TRAP ( $C_{\text{τελ}}=100\mu\text{M}$ ). Πραγματοποιείται ήπια ανάδευση με vortex σε χαμηλή ταχύτητα. Επιάζουμε για 10min στους 37°C. Προσθέτουμε 2mL διαλύματος λύσης των κυττάρων και τοποθετούμε τα δείγματα στον πάγο για 20min. Τα δείγματα φυγοκεντρώνται στις 2000rpm για 5min σε φυγόκεντρο πάγκου. Το υπερκείμενο αποχύνεται και προσθέτουμε 500μL PBS, 10 mM. Ακολουθεί vortex και ανάλυση με κυτταρομετρία ροής.

### ***Επεξεργασία των αποτελεσμάτων***

Κατά την επεξεργασία των δειγμάτων υπολογίζουμε το ποσοστό των κυττάρων που είναι θετικά για τα δύο αντισώματα (CD14 και CD42a για την αλληλεπίδραση των μονοκυττάρων-αιμοπεταλίων και CD45 και CD42a για την αλληλεπίδραση των ουδετεροφίλων-αιμοπεταλίων).

#### **9.2.6. Μελέτη της παραγωγής των PMPs και της έκφρασης του CD40L με κυτταρομετρία ροής (Flow cytometry)**

Η παραγωγή των PMPs και η μεμβρανική έκφραση του CD40L μελετήθηκε σε PRP μετά από ενεργοποίηση με ADP ( $C_{\text{τελ}}=100\mu\text{M}$ ) ή TRAP ( $C_{\text{τελ}}=100\mu\text{M}$ ) για 15 min στους  $37^{\circ}\text{C}$ , υπό επώαση. Στη συνέχεια, στο ενεργοποιημένο PRP προστέθηκαν 2  $\mu\text{L}$  anti-CD61-PerCP (αναγνωρίζει τη  $\beta_3$  υπομονάδα του υποδοχέα  $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ ), 2  $\mu\text{L}$  Annexin-V-FITC (αναγνωρίζει τα ανιονικά φωσφολιπίδια) και 2  $\mu\text{L}$  anti-CD154-PE (ειδικό για το CD40L). Τα αποτελέσματα αναλύθηκαν με κυτταρομετρία ροής. Τα PMPs χαρακτηρίστηκαν από την FSC και SSC εικόνα τους και ως θετικά σωματίδια σε CD61 και Annexin-V. Η παραγωγή των PMPs εκφράστηκε ως το % ποσοστό των συνολικών συμβάντων με τη μικρότερη FSC και SSC εικόνα (στο κάτω αριστερό τεταρτημόριο) που εκφράζουν μαζί CD61 και Annexin-V. Η μεμβρανική έκφραση CD40L εκφράστηκε ως το % ποσοστό των θετικών κυττάρων σε CD61 και CD154 τα οποία έχουν την τυπική FSC και SSC εικόνα των αιμοπεταλίων στο PRP.

### **9.2.7. Μελέτη της απόκρισης στην αντιαιμοπεταλιακή αγωγή (αντίσταση) με το VASP test**

#### **Αντιδραστήρια- Όργανα**

kit VASP/P2Y12 (BioCytex, Marseille, France)

Σωληνάκια πολυστυρενίου (Becton Dickinson, San Jose, CA)

Κυτταρόμετρο ροής FACScalibur (Flow Cytometer, Becton Dickinson, San Jose, CA)

Vortex

Χρονόμετρο

#### **Διαλύματα εργασίας**

**Διάλυμα** PGE1 και PGE1+ ADP διαλύονται σε 400 μl απεσταγμένου νερού.

#### **Πειραματική διαδικασία**

##### ***Πορεία***

Για κάθε δείγμα αίματος χρησιμοποιούνται τρία πλαστικά σωληνάκια πολυστυρενίου T1, T2 και T3 :

Στο σωληνάκι T1 τοποθετούμε 10 μL PGE1

Στα σωληνάκια T2 και T3 τοποθετούμε 10 μL PGE1+ ADP

Στα σωληνάκια T1, T2 και T3 προσθέτουμε 10 μL ολικού αίματος

Ομογενοποίηση για 1-2 δευτερόλεπτα χρησιμοποιώντας το vortex ρυθμισμένο σε χαμηλή ταχύτητα. Στη συνέχεια τα δείγματα επωάζονται για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.

Στα σωληνάκια T1, T2 και T3 προσθέτουμε 10 μL από το «fixative vial» που περιέχει 2% έως 5% παραφορμαλδεΐδη. Ομογενοποίηση με το vortex για 1-2 δευτερόλεπτα και

επώαση για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Στα σωληνάκια T1 και T2 προσθέτουμε 10  $\mu\text{L}$  από το αντι VASP-P μονοκλωνικό αντίσωμα ενώ στο σωληνάκι T3 προσθέτουμε 10  $\mu\text{L}$  από το αρνητικό ισοτυπικό control. Ομογενοποίηση με το vortex για 1-2 δευτερόλεπτα και επώαση για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Στα σωληνάκια T1, T2 και T3 προσθέτουμε 10  $\mu\text{L}$  αντι IgG-FITC + αντι CD61-PE + permeabilization agent. Τα δείγματα ομογενοποιούνται με το vortex για 1-2 δευτερόλεπτα και επωάζονται για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Τέλος, προστίθενται 2 ml διαλύματος αραίωσης σε κάθε σωληνάκι. Ακολουθεί κυτταρομετρική ανάλυση. Τα αποτελέσματα της κυτταρομετρικής ανάλυσης αξιολογούνται με τη χρήση του λογισμικού Cell Quest.

### **Αρχή της μεθόδου**

Με τη μέθοδο αυτή μετράται η ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων μετά από την επίδραση των αγωνιστών προσταγλανδίνη E1 (PGE1) ή ADP. Η πρόσδεση του ADP στον υποδοχέα P2Y<sub>12</sub> οδηγεί στην ενεργοποίηση της φωσφολιπάσης C (PLC), η οποία παράγει διακυλογλυκερόλη (DAG) και τριφωσφορική ινοσιτόλη (IP3) από διφωσφορική φωσφατιδυλινοσιτόλη (PIP2). Στη συνέχεια, ενεργοποιούνται ενδοκυττάρειες πρωτεΐνες οι οποίες οδηγούν στην αναστολή της αδενυλικής κυκλάσης (AC) με αποτέλεσμα τη μείωση των επιπέδων του c-AMP. Αυτό έχει ως συνέπεια τη μείωση της διαμεσολαβούμενης από το c-AMP φωσφορυλίωση της VASP (VASP-P) (Εικόνα 1). Η αποφωσφορυλίωση της VASP-P γίνεται μετά από την ενεργοποίηση του P2Y<sub>12</sub> υποδοχέα. Τα επίπεδα φωσφορυλίωσης/αποφωσφορυλίωσης της VASP αντανακλούν την αναστολή/ενεργοποίηση του υποδοχέα P2Y<sub>12</sub>

### **Επεξεργασία των αποτελεσμάτων**

Ο προσδιορισμός γίνεται με κυτταρομετρία ροής χρησιμοποιώντας ένα εξειδικευμένο μονοκλωνικό αντίσωμα που αναγνωρίζει τη φωσφορυλιωμένη μορφή της VASP. Η μέθοδος αυτή επιτρέπει την εκτίμηση της απόκρισης των αιμοπεταλίων στη δράση των θειενοπυριδινών η οποία ποσοτικοποιείται με τον δείκτη αιμοπεταλιακής δραστηριότητας (Platelet Reactivity Index, PRI). Ο δείκτης αυτός υπολογίζεται με την παρακάτω εξίσωση και συσχετίζεται αντιστρόφως ανάλογα με τη συσσώρευση των αιμοπεταλίων:

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

### **9.3. Στατιστική ανάλυση**

Οι παράμετροι εκφράστηκαν ως μέση τιμή  $\pm$  τυπική απόκλιση (mean  $\pm$  standard deviation), ως ενδιάμεση τιμή (median) –εύρος (range) ή ως αριθμός (ποσοστό %). Η δοκιμασία «Shapiro-Wilks» χρησιμοποιήθηκε για να εκτιμηθεί κατά πόσο μια μεταβλητή ακολουθούσε κανονική κατανομή. Οι συγκρίσεις μεταξύ συνεχών μεταβλητών στις δύο ομάδες ασθενών πραγματοποιήθηκαν με τη δοκιμασία «paired two-tailed Student's *t* test» για μεταβλητές που ακολουθούσαν κανονική κατανομή και με τη δοκιμασία «Wilcoxon» για μεταβλητές που δεν ακολουθούσαν κανονική κατανομή. Για τη στατιστική ανάλυση χρησιμοποιήθηκε, επίσης, η στατιστική δοκιμασία ANOVA για επαναλαμβανόμενες μεταβλητές και η δοκιμασία «LSD (least significant difference)» για συγκρίσεις μεταξύ των ξεχωριστών ομάδων. Το επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας καθορίστηκε σε  $p < 0,05$ . Η στατιστική επεξεργασία έγινε με τη βοήθεια του στατιστικού λογισμικού SPSS (Έκδοση 17.0).



## 10. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

### 10.1. Χαρακτηριστικά του πληθυσμού της μελέτης

Τα κλινικά και βιοχημικά χαρακτηριστικά των ασθενών πριν τη χορήγηση κλοπιδογρέλης φαίνονται στον πίνακα 4. Η συμμόρφωση στη χορήγηση της ασπιρίνης και της κλοπιδογρέλης σε όλη τη διάρκεια της μελέτης ήταν 100% και εκτιμήθηκε στις 30 ημέρες της παρακολούθησης με τη μέθοδο της μέτρησης των χαπιών που καταναλώθηκαν και με την προσωπική συνέντευξη των ασθενών<sup>267</sup>.

**Πίνακας 4.** Δημογραφικά, κλινικά και εργαστηριακά χαρακτηριστικά του πληθυσμού της μελέτης

Μεταβλητή	Ασθενείς με ΟΣΣ (n=61)
Ηλικία (έτη)	58,8±11,5
Άνδρες/Γυναίκες	47 / 14
Κάπνισμα, n (%)	35 (57.3)
Υπέρταση, n (%)	36 (59.0)
Υπερλιπιδαιμία, n (%)	25 (40.9)
Διαβήτης, n (%)	0 (0)
Οικογενειακό ιστορικό	
πρώιμης ΣΝ, n (%)	40 (65.5)
Λευκά αιμοσφαίρια (x 10 <sup>9</sup> /L)	11.07±3.01
Ουδετερόφιλα (x 10 <sup>9</sup> /L)	7.53±2.32
Μονοκύτταρα (x 10 <sup>9</sup> /L)	0.48±0.34

Αιμοπετάλια ( $\times 10^9/L$ )	263.8 $\pm$ 10.37
MPV (fl)	10.0 $\pm$ 3.4
Ολική χοληστερόλη (mg/dL)	193.2 $\pm$ 42.5
HDL-χοληστερόλη (mg/dL)	46.9 $\pm$ 12.4
Τριγλυκερίδια (mg/dL)	131 $\pm$ 80.1
LDL-χοληστερόλη (mg/dL)	130.1 $\pm$ 42.1
hsCRP	3.39 $\pm$ 1.82
Φαρμακευτική αγωγή	
<b><i>I. Αντιυπερτασική αγωγή (%)</i></b>	35 (57.3)
Θειαζιδικά διουρητικά (%)	23 (37.7)
B-αποκλειστές, n (%)	19 (31.1)
Ανταγωνιστές ασβεστίου, n (%)	19 (31.1)
$\alpha$ -MEA, n (%)	20 (32.8)
ARBs, n (%)	15 (24.6)
<b><i>II. Υπολιπιδαιμική αγωγή</i></b>	
Στατίνη πριν το ΟΣΣ, n (%)	0 (0)
Στατίνη μετά το ΟΣΣ, n (%)	61 (100)

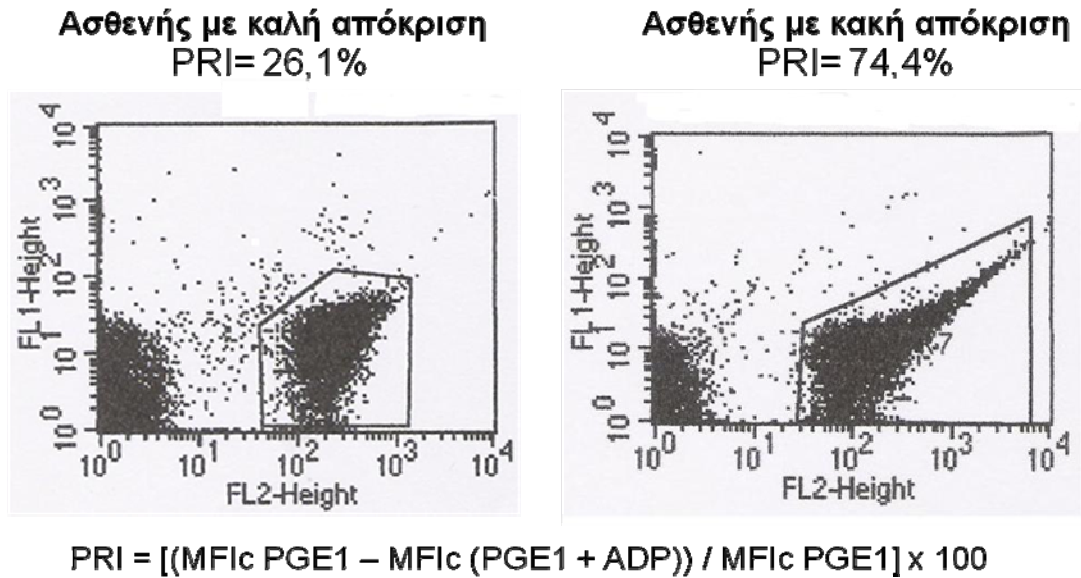
---

ΟΣΣ: οξύ στεφανιαίο σύνδρομο MPV: μέσος όγκος αιμοπεταλίων; hsCRP: high c-αντιδρώσα πρωτεΐνη υψηλής ευαισθησίας; HDL: λιποπρωτεΐνη υψηλής πυκνότητας; LDL: λιποπρωτεΐνη χαμηλής πυκνότητας;  $\alpha$ -MEA:ανταγωνιστές μετατρεπτικού ενζύμου αγγειοτασίνης ARBs: ανταγωνιστές αγγειοτασίνης II

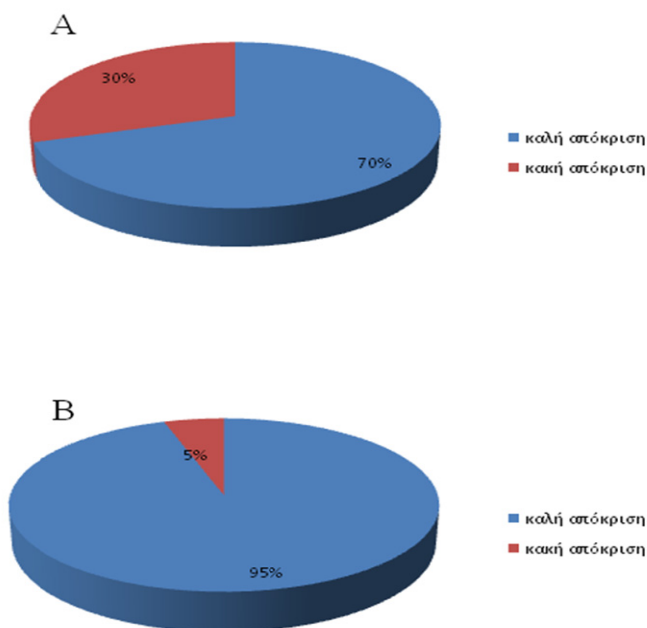
Από την ανάλυση των πρώτων 40 ασθενών, ηλικίας 57,6 $\pm$ 10,8 ετών, (28 άνδρες και 12 γυναίκες) που συμμετείχαν στη μελέτη προέκυψαν τα παρακάτω αποτελέσματα.

## 10.2. Απόκριση στην κλοπιδογρέλη

Η ανάλυση της φωσφορυλίωσης της πρωτεΐνης VASP (*Εικόνα 14*) την 5<sup>η</sup> ημέρα έδειξε μια μεγάλη ποικιλομορφία στις τιμές PRI μεταξύ των συμμετεχόντων από 24 έως 74%. Δώδεκα ασθενείς με ΟΣΣ (30% του συνόλου) παρουσίασαν τιμές PRI  $\geq 50\%$  (mean $\pm$ SD, 62.3 $\pm$ 12.1%). Σύμφωνα και με στοιχεία από προηγούμενες μελέτες<sup>156,187,233</sup>, αυτοί οι ασθενείς θεωρήθηκαν ως ασθενείς με κακή απόκριση στην κλοπιδογρέλη. Οι υπόλοιποι 28 ασθενείς είχαν τιμές PRI  $< 50\%$  (mean $\pm$ SD, 37.7 $\pm$ 10.6%) και θεωρήθηκαν ως ασθενείς με καλή απόκριση στην κλοπιδογρέλη (*Εικόνα 15 A*). Στις 30 ημέρες της παρακολούθησης οι τιμές PRI στους ασθενείς με κακή απόκριση στην κλοπιδογρέλη μειώθηκαν σημαντικά σε 44.2 $\pm$ 15.4% (p<0.01 σε σύγκριση με τις τιμές PRI στις 5 ημέρες) και μόνο 2 ασθενείς είχαν ακόμη τιμές PRI  $> 50\%$  (π.χ. 54,2% και 59,6%). Στους ασθενείς με καλή απόκριση στην κλοπιδογρέλη οι τιμές PRI στις 30 ημέρες ήταν πολύ λίγο και όχι σημαντικά μειωμένες στο 34.9 $\pm$ 13.1% σε σύγκριση με αυτές στις 5 ημέρες (*Εικόνα 15B*).



**Εικόνα 14.** Αντιπροσωπευτικές εικόνες κυτταρομετρίας ροής από ασθενή με ΟΣΣ και καλή ή κακή απόκριση στην κλοπιδογρέλη όπου φαίνεται ο πληθυσμός των αιμοπεταλίων, με τη βοήθεια των οποίων προσδιορίστηκε το PRI με τη μέθοδο της φωσφορυλίωσης της VASP πρωτεΐνης.

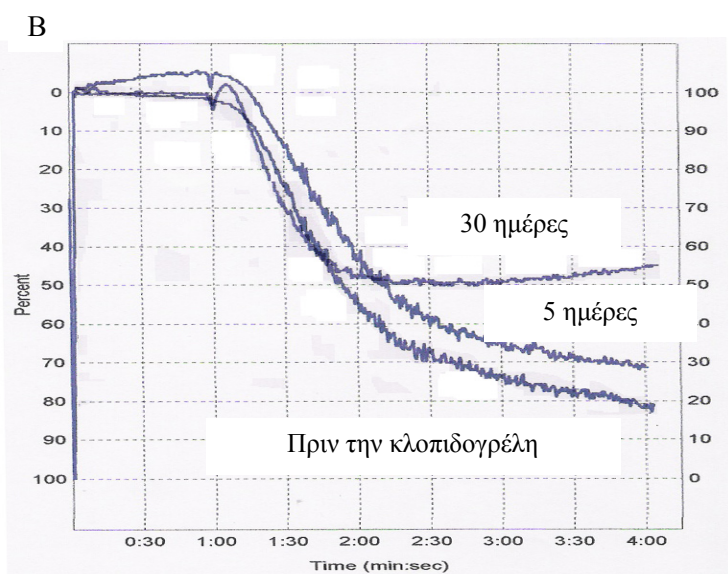
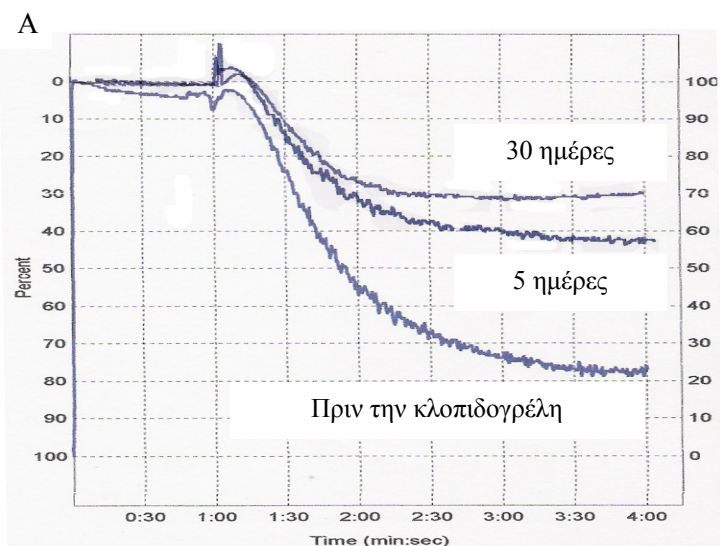


**Εικόνα 15.** Ποσοστά ασθενών με καλή και κακή απόκριση στην κλοπιδογρέλη **A.** 5 ημέρες μετά τη δόση φόρτισης, **B.** 30 ημέρες μετά τη δόση φόρτισης

### 10.3. Μελέτη της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων

Μελέτη συσσωρευομετρίας των αιμοπεταλίων πραγματοποιήθηκε πριν τη χορήγηση του φαρμάκου, στις 5 και στις 30 ημέρες από τη φόρτιση με κλοπιδογρέλη με τη χρήση των αγωνιστών ADP (2,5, 5,0 και 10,0  $\mu\text{M}$ ) και 10  $\mu\text{M}$  TRAP (Εικόνα 16 Α και Β). Πριν τη χορήγηση της κλοπιδογρέλης, οι ενδιάμεσες τιμές (εύρος) της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων που επάγεται από το ADP σε όλους τους ασθενείς ήταν 50% (23-64%) για συγκέντρωση 2,5 $\mu\text{M}$ , 63% (41-75%) για 5 $\mu\text{M}$  και 77% (67-89%) για συγκέντρωση 10 $\mu\text{M}$ . Επίσης, οι ενδιάμεσες τιμές (εύρος) της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων που επάγεται από συγκέντρωση 10 $\mu\text{M}$  TRAP ήταν 79% (65-90%). Όπως φαίνεται στον πίνακα 2, καμία διαφορά δεν παρατηρήθηκε στις τιμές της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων που επάγεται από το ADP ή το TRAP μεταξύ των ασθενών με καλή ή κακή απόκριση στην κλοπιδογρέλη πριν τη χορήγηση της κλοπιδογρέλης. Όπως αναμενόταν, στις 5 ημέρες μετά τη φόρτιση με κλοπιδογρέλη παρατηρήθηκε μια σημαντική μείωση στη συσσώρευση των αιμοπεταλίων που επάγεται από το ADP ή το TRAP μεταξύ των ασθενών με καλή απόκριση στην κλοπιδογρέλη, η οποία δεν μεταβλήθηκε περαιτέρω στις 30 ημέρες της παρακολούθησης (πίνακας 5). Στους ασθενείς με κακή απόκριση στην κλοπιδογρέλη, παρατηρήθηκε μία οριακά σημαντική μείωση στη συσσώρευση των αιμοπεταλίων που απάγεται από το ADP, αλλά όχι από το TRAP. Στις 30 ημέρες της παρακολούθησης, η συσσώρευση των αιμοπεταλίων από το ADP και το TRAP μειώθηκε σημαντικά σε σχέση με αυτή που παρατηρήθηκε στις 5 ημέρες (πίνακας 5). Και στις δύο ομάδες των ασθενών η ανασταλκτική δράση της κλοπιδογρέλης ήταν λιγότερο ισχυρή στη συσσώρευση των αιμοπεταλίων που επάγεται από το TRAP σε σύγκριση με αυτή που επάγεται από το ADP. Τελικά, πρέπει να αναφερθεί ότι η σωρευτική απάντηση των αιμοπεταλίων στο ADP ή στο TRAP σε ασθενείς με κακή απόκριση στην κλοπιδογρέλη ήταν σημαντικά υψηλότερη σε

σύγκριση με αυτή των ασθενών με καλή απόκριση στην κλοπιδογρέλη στις 5 ημέρες από τη φόρτιση του φαρμάκου.



**Εικόνα 16.** Αντιπροσωπευτικές καμπύλες συσσώρευσης των αιμοπεταλίων επαγόμενης από το ADP (10  $\mu$ M) πριν καθώς και 5 ή 30 ημέρες από τη χορήγηση της κλοπιδογρέλης σε ασθενείς με ΟΣΣ και **A.** καλή απόκριση στην κλοπιδογρέλη **B** κακή απόκριση στην κλοπιδογρέλη

**Πίνακας 5.** Συσσώρευση αιμοπεταλίων σε ασθενείς με ΟΣΣ πριν τη χορήγηση κλοπιδογρέλης καθώς και 5 και 30 ημέρες μετά τη δόση φόρτισης του φαρμάκου

	Συσσώρευση αιμοπεταλίων, %			
	ADP		TRAP	
	2,5μM	5μM	10μM	10μM
<b>Καλή απόκριση στην κλοπιδογρέλη (n=28)</b>				
<b>Πριν την κλοπιδογρέλη</b>	53 (24-64)	65 (42-75)	78 (69-89)	81 (70-90)
<b>5-ημέρες</b>	26 (15-40) <sup>a</sup>	35 (20-52) <sup>a</sup>	55 (35-70) <sup>a</sup>	62 (51-74) <sup>b</sup>
<b>30-ημέρες</b>	23 (12-35) <sup>a</sup>	32 (17-50) <sup>a</sup>	50 (31-65) <sup>a</sup>	59 (38-68) <sup>a</sup>
<b>Κακή απόκριση στην κλοπιδογρέλη (n=12)</b>				
<b>Πριν την κλοπιδογρέλη</b>	49 (23-60)	62 (41-70)	76 (67-81)	79 (65-86)
<b>5-ημέρες</b>	39 (17-50) <sup>b,e</sup>	54 (39-68) <sup>b,e</sup>	66 (58-75) <sup>b,e</sup>	72 (58-80) <sup>e</sup>
<b>30-ημέρες</b>	24 (10-30) <sup>a,c</sup>	37 (20-55) <sup>a,c</sup>	53 (33-62) <sup>a,c</sup>	62 (51-70) <sup>d</sup>

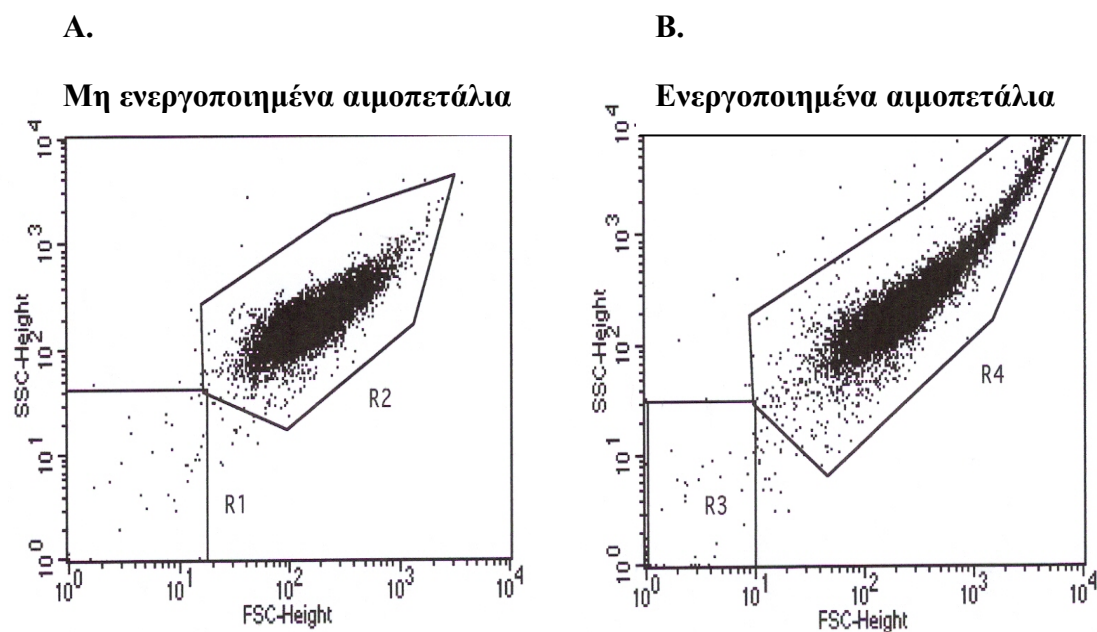
Οι παράμετροι εκφράστηκαν ως ενδιάμεση τιμή (εύρος). <sup>a</sup> p<0.001 και <sup>b</sup> p<0.05 σε σύγκριση με τις αντίστοιχες τιμές πριν τη χορήγηση κλοπιδογρέλης. <sup>c</sup>p<0.01 σε σύγκριση με τις αντίστοιχες τιμές συσσώρευσης στις 5 ημέρες, <sup>d</sup>p<0.02 σε σύγκριση με τις αντίστοιχες τιμές συσσώρευσης πριν τη χορήγηση κλοπιδογρέλης ή στις 5 ημέρες. <sup>e</sup>p<0.01 σε σύγκριση με τις αντίστοιχες τιμές στις 5 ημέρες στους ασθενείς με καλή απόκριση στην κλοπιδογρέλη

#### **10.4. Μεμβρανική έκφραση του CD40L και της P-σελεκτίνης και παραγωγή των PMPs**

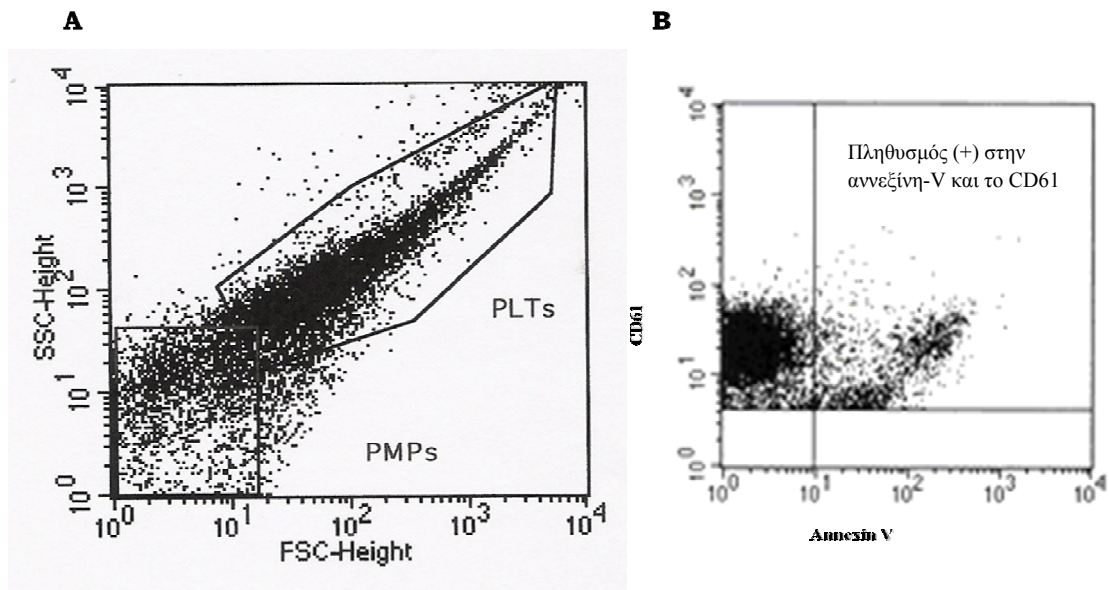
Μελετήθηκε η μεμβρανική έκφραση του CD40L (*Εικόνα 17 Α και Β*) και της P-σελεκτίνης (*Εικόνα 18 Α και Β*). Επίσης, εκτιμήθηκε η παραγωγή των PMPs από τα ενεργοποιημένα αιμοπετάλια (*Εικόνα 19 Α και Β*). Όπως φαίνεται στις *εικόνες 20Α και Β* ο πληθυσμός των PMPs σε μη ενεργοποιημένο PRP πριν τη χορήγηση της κλοπιδογρέλης αυξήθηκε σημαντικά μετά από ενεργοποίηση με ADP ή TRAP. Η μέγιστη αναστολή της παραγωγής των PMPs είτε σε μη ενεργοποιημένο PRP ή σε ενεργοποιημένα αιμοπετάλια από ADP ή TRAP σε ασθενείς με καλή απόκριση στην κλοπιδογρέλη παρατηρήθηκε στις 5 ημέρες (*εικόνα 20Α*), ενώ σε ασθενείς με κακή απόκριση στην κλοπιδογρέλη μία σημαντική μείωση στην παραγωγή των PMPs παρατηρήθηκε μόνο στις 30 ημέρες της παρακολούθησης (*εικόνα 20Β*). Πρέπει να αναφερθεί ότι η παραγωγή των PMPs σε ασθενείς με κακή απόκριση στην κλοπιδογρέλη στις 5 ημέρες μετά τη φόρτιση του φαρμάκου ήταν σημαντικά υψηλότερη σε σύγκριση με τους ασθενείς με καλή απόκριση στην κλοπιδογρέλη ( $p < 0.01$ ). Παρόμοια με τα παραπάνω ήταν και τα αποτελέσματα για τη μεμβρανική έκφραση του CD40L (*εικόνες 21Α και Β*). Είναι σημαντικό ότι η έκφραση της P-σελεκτίνης είτε σε μη ενεργοποιημένα αιμοπετάλια είτε μετά από ενεργοποίηση με ADP ή TRAP σε ασθενείς με καλή απόκριση στην κλοπιδογρέλη baseline αναστελλόταν προοδευτικά στις 5 και στις 30 ημέρες από τη φόρτιση με κλοπιδογρέλη με τη μέγιστη αναστολή να παρατηρείται στις 30 ημέρες (*εικόνες 22 Α και Β*). Αντίθετα, στους ασθενείς με κακή απόκριση στην κλοπιδογρέλη, μία σημαντική μείωση της έκφρασης της P-σελεκτίνης παρατηρήθηκε στις 30 ημέρες της παρακολούθησης (*εικόνες 22Α και Β*). Η έκφραση της P-σελεκτίνης στους ασθενείς με κακή απόκριση στην κλοπιδογρέλη στις 5 ημέρες μετά τη φόρτιση ήταν σημαντικά υψηλότερη σε σύγκριση με αυτούς με καλή



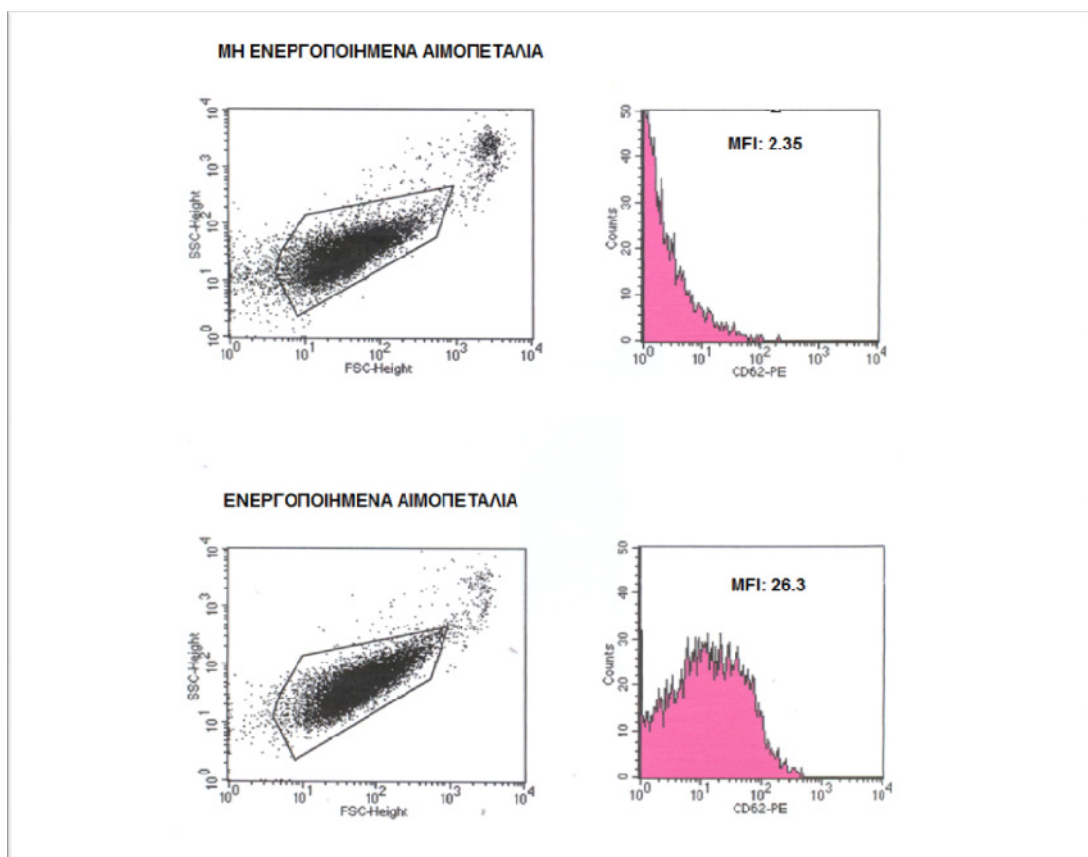
απόκριση ( $p < 0,01$ ). Και στις δύο ομάδες ασθενών, το ανασταλτικό αποτέλεσμα της κλοπιδογρέλης στην παραγωγή των PMPs και στην έκφραση του CD40L και της P-σελεκτίνης ήταν λιγότερο ισχυρή στα αιμοπετάλια που ενεργοποιήθηκαν από το TRAP από ότι από το ADP.



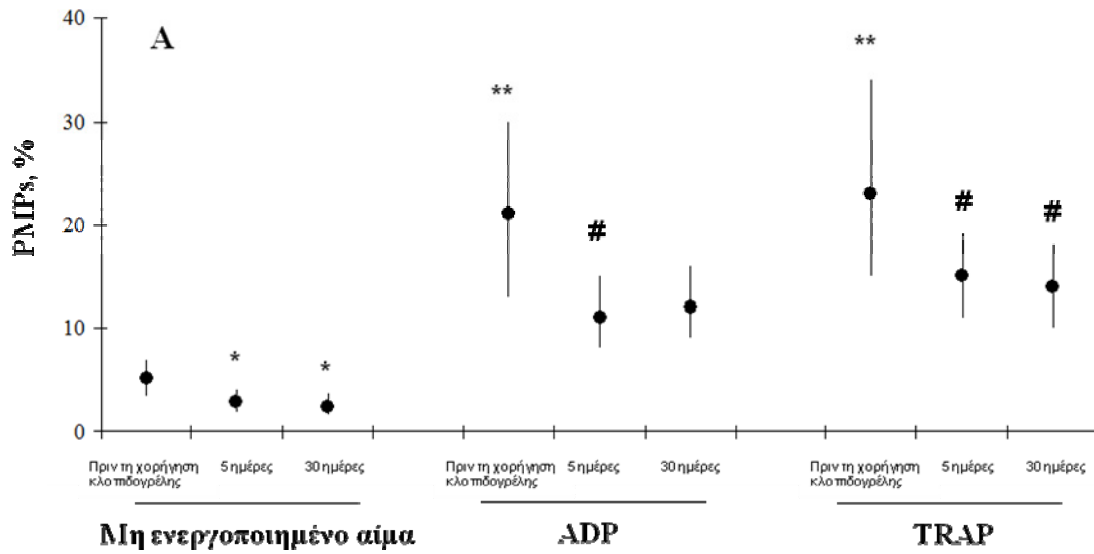
**Εικόνα 17.** Αντιπροσωπευτικές εικόνες κυτταρομετρίας ροής όπου φαίνεται η έκφραση CD40L A. σε μη ενεργοποιημένα αιμοπετάλια και B. σε ενεργοποιημένα αιμοπετάλια με ADP.



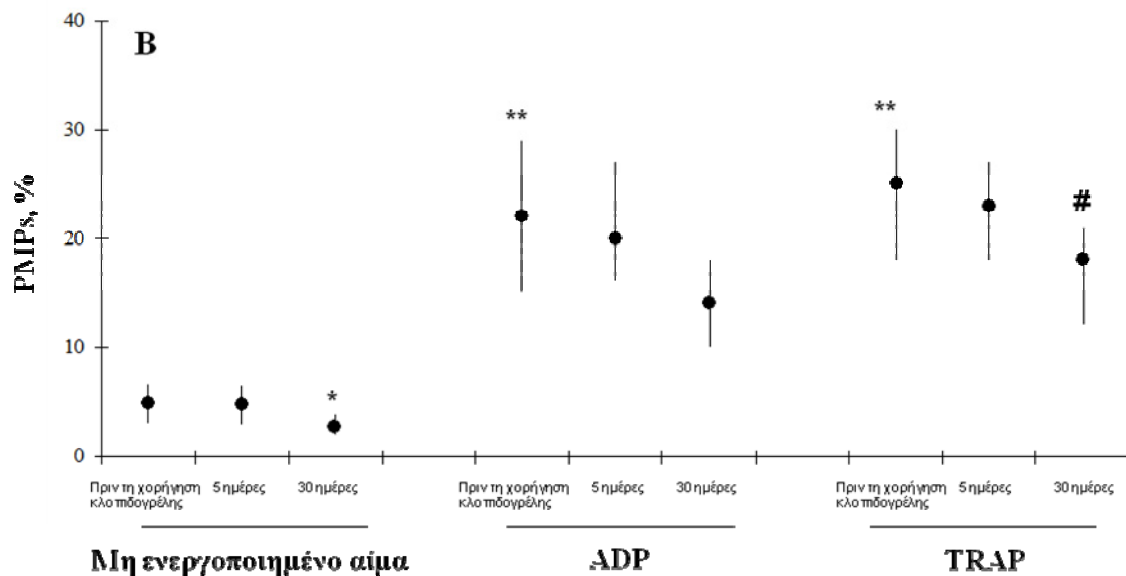
**Εικόνα 18.** Αντιπροσωπευτικές εικόνες κυτταρομετρίας ροής όπου φαίνεται ο πληθυσμός των αιμοπεταλίων και των PMPs (A) και τα θετικά προς Αννεξίνη-V PMPs στο άνω δεξί τεταρτημόριο (B).



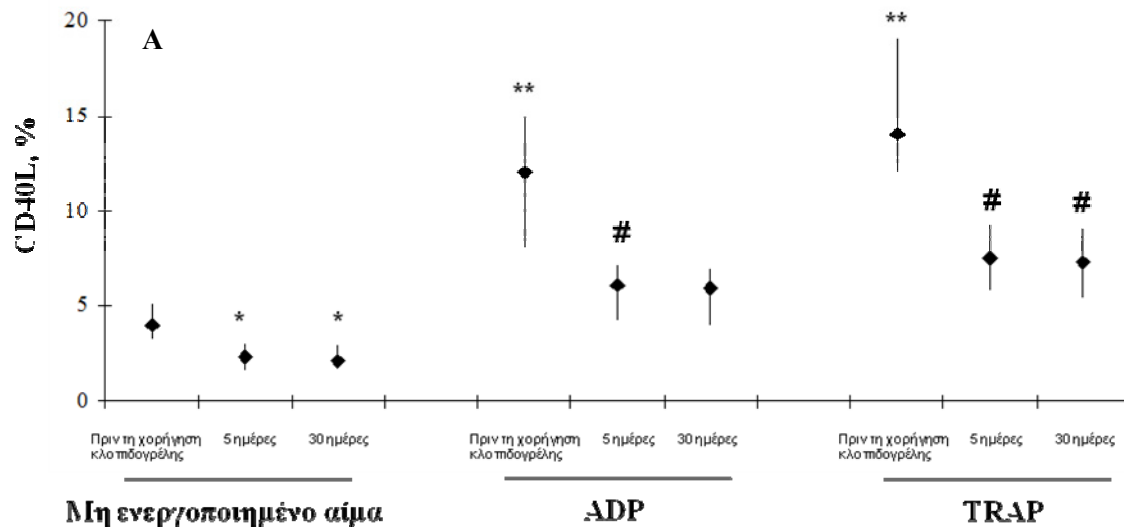
**Εικόνα 19** Αντιπροσωπευτικές εικόνες κυτταρομετρίας ροής όπου φαίνεται η έκφραση (MFI) της P-σελεκτίνης σε A. μη ενεργοποιημένα αιμοπετάλια και σε B. ενεργοποιημένα αιμοπετάλια με ADP.



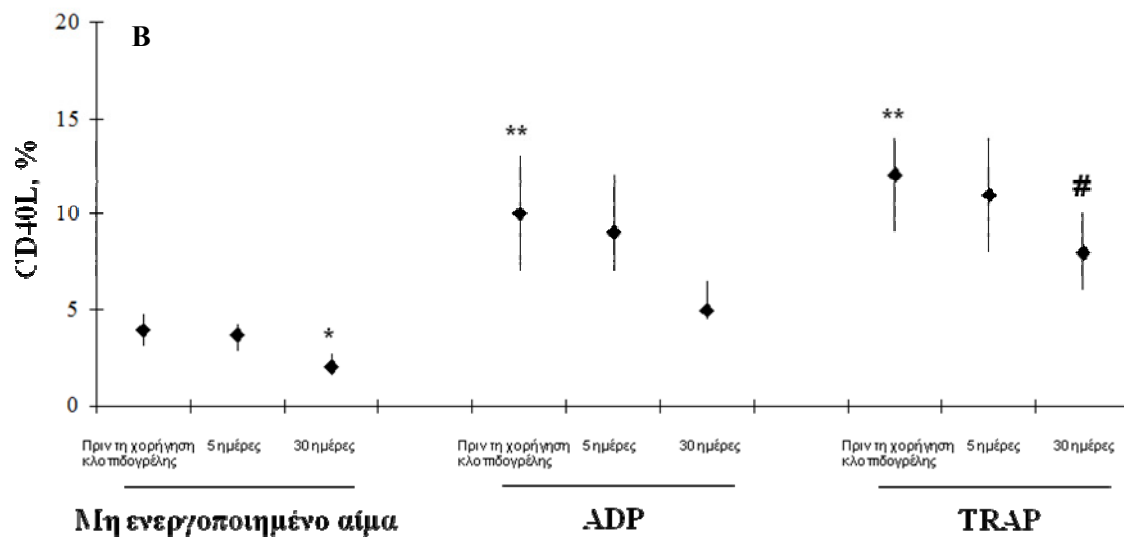
**Εικόνα 20Α.** Επίδραση της κλοπιδογρέλης στην παραγωγή των PMPs σε ασθενείς με ΟΣΣ και καλή απόκριση στην κλοπιδογρέλη. Οι παράμετροι εκφράστηκαν ως ενδιάμεσες τιμές (εύρος). \* $p<0.01$  και \*\* $p<0.001$  σε σύγκριση με τις τιμές των μη ενεργοποιημένων αιμοπεταλίων πριν τη χορήγηση του φαρμάκου και # $p<0.001$  σε σύγκριση με τις τιμές πριν τη χορήγηση του φαρμάκου και μετά την προσθήκη του αντίστοιχου αγωνιστή.



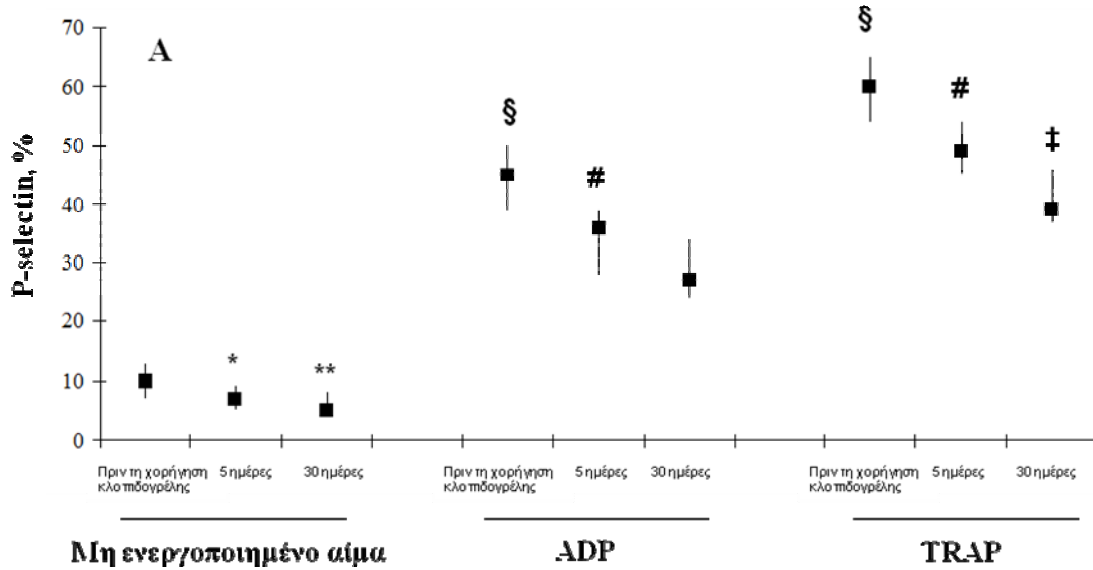
**Εικόνα 20Β.** Επίδραση της κλοπιδογρέλης στην παραγωγή των PMPs σε ασθενείς με ΟΣΣ και κακή απόκριση στην κλοπιδογρέλη. Οι παράμετροι εκφράστηκαν ως ενδιάμεσες τιμές (εύρος). \* $p<0.01$  και \*\* $p<0.001$  σε σύγκριση με τις τιμές των μη ενεργοποιημένων αιμοπεταλίων πριν τη χορήγηση του φαρμάκου και # $p<0.001$  σε σύγκριση με τις τιμές πριν τη χορήγηση του φαρμάκου και μετά την προσθήκη του αντίστοιχου αγωνιστή.



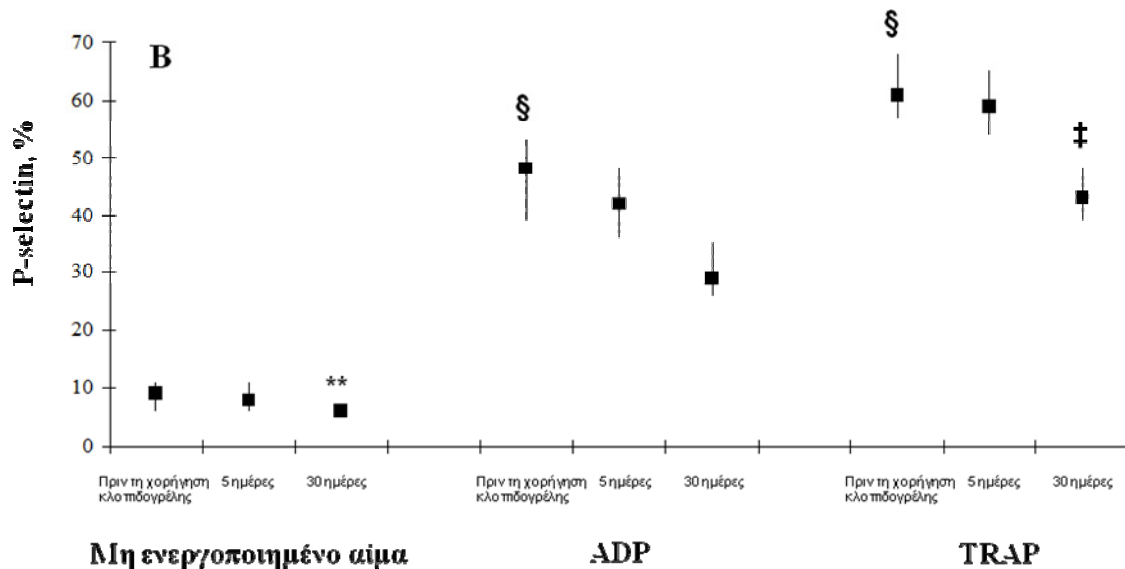
**Εικόνα 21A.** Επίδραση της κλοπιδογρέλης στη μεμβρανική έκφραση του CD40L σε ασθενείς με ΟΣΣ και καλή απόκριση στην κλοπιδογρέλη. Οι παράμετροι εκφράστηκαν ως ενδιάμεσες τιμές (εύρος). \* $p < 0.01$  και \*\* $p < 0.001$  σε σύγκριση με τις τιμές των μη ενεργοποιημένων αιμοπεταλίων πριν τη χορήγηση του φαρμάκου και # $p < 0.001$  σε σύγκριση με τις τιμές πριν τη χορήγηση του φαρμάκου και μετά την προσθήκη του αντίστοιχου αγωνιστή.



**Εικόνα 21B.** Επίδραση της κλοπιδογρέλης στη μεμβρανική έκφραση του CD40L σε ασθενείς με ΟΣΣ και κακή απόκριση στην κλοπιδογρέλη. Οι παράμετροι εκφράστηκαν ως ενδιάμεσες τιμές (εύρος). \* $p < 0.01$  και \*\* $p < 0.001$  σε σύγκριση με τις τιμές των μη ενεργοποιημένων αιμοπεταλίων πριν τη χορήγηση του φαρμάκου και # $p < 0.001$  σε σύγκριση με τις τιμές πριν τη χορήγηση του φαρμάκου και μετά την προσθήκη του αντίστοιχου αγωνιστή.



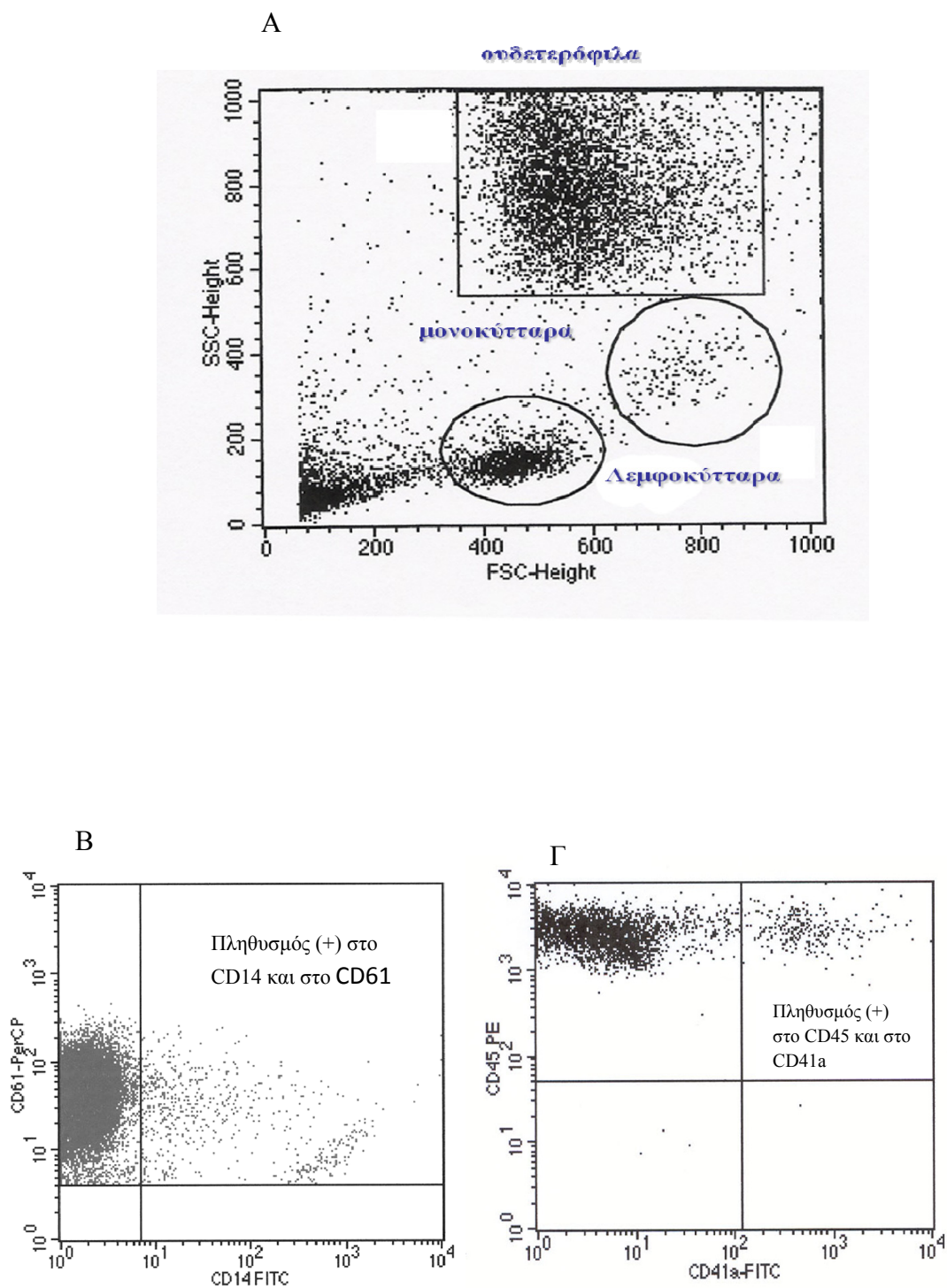
**Εικόνα 22Α.** Επίδραση της κλοπιδογρέλης στη μεμβρανική έκφραση της P-σελεκτίνης σε ασθενείς με ΟΣΣ και καλή απόκριση στην κλοπιδογρέλη. Οι παράμετροι εκφράστηκαν ως ενδιάμεσες τιμές (εύρος). \* $p<0.04$ , \*\* $p<0.01$  και § $p<0.001$  σε σύγκριση με τις τιμές των μη ενεργοποιημένων αιμοπεταλίων πριν τη χορήγηση του φαρμάκου και # $p<0.005$  and ‡ $p<0.001$  σε σύγκριση με τις τιμές πριν τη χορήγηση του φαρμάκου και μετά την προσθήκη του αντίστοιχου αγωνιστή.



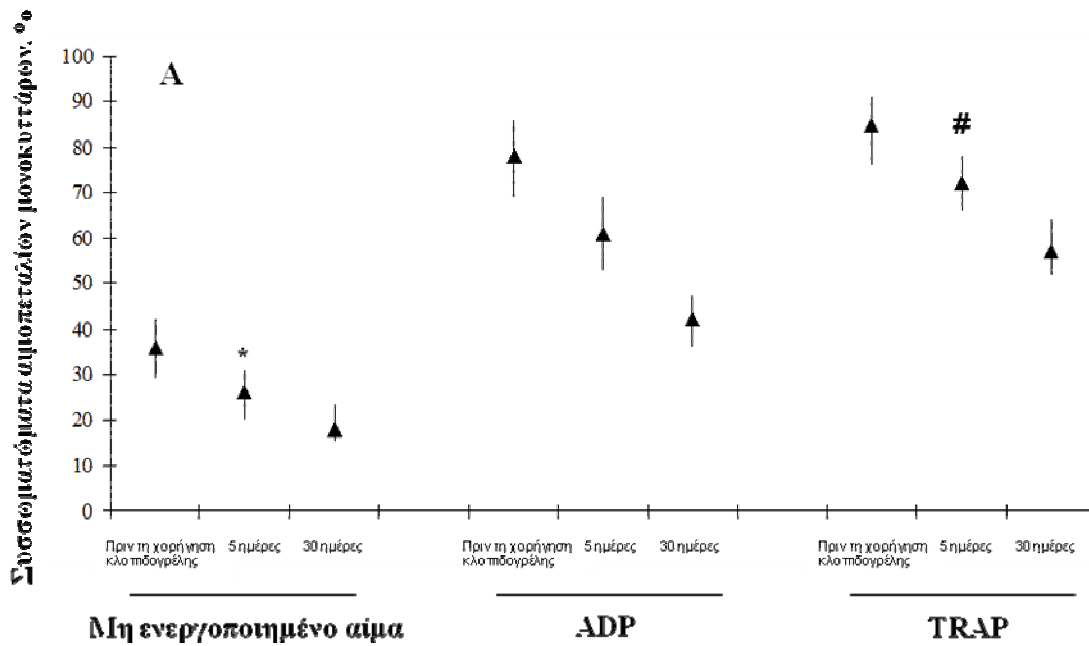
**Εικόνα 22Β.** Επίδραση της κλοπιδογρέλης στη μεμβρανική έκφραση της P-σελεκτίνης σε ασθενείς με ΟΣΣ και κακή απόκριση στην κλοπιδογρέλη. Οι παράμετροι εκφράστηκαν ως ενδιάμεσες τιμές (εύρος). \* $p<0.04$ , \*\* $p<0.01$  και § $p<0.001$  σε σύγκριση με τις τιμές των μη ενεργοποιημένων αιμοπεταλίων πριν τη χορήγηση του φαρμάκου και # $p<0.005$  and ‡ $p<0.001$  σε σύγκριση με τις τιμές πριν τη χορήγηση του φαρμάκου και μετά την προσθήκη του αντίστοιχου αγωνιστή.

### 10.5. Αλληλεπίδραση αιμοπεταλίων-λευκών αιμοσφαιρίων

Οι τιμές των αιμοπεταλίων και των λευκών αιμοσφαιρίων καθώς και του μέσου όγκου των αιμοπεταλίων (πίνακας 4) πριν τη χορήγηση της κλοπιδογρέλης δεν άλλαξαν σημαντικά στις 5 και στις 30 ημέρες από την έναρξη της θεραπείας με κλοπιδογρέλη. Το αποτέλεσμα της κλοπιδογρέλης στην αλληλεπίδραση αιμοπεταλίων και λευκών αιμοσφαιρίων μελετήθηκε με τη βοήθεια του καθορισμού των συσσωματωμάτων των αιμοπεταλίων με τα μονοκύτταρα και των αιμοπεταλίων με τα ουδετερόφιλα στο ολικό αίμα (Εικόνα 23 Α, Β, Γ). Όπως φαίνεται στις εικόνες, τα συσσωματώματα των αιμοπεταλίων-μονοκυττάρων και αιμοπεταλίων-ουδετεροφίλων σε μη ενεργοποιημένο ολικό αίμα πριν τη χορήγηση κλοπιδογρέλης αυξήθηκε σημαντικά μετά από ενεργοποίηση με ADP ή TRAP. Σε ασθενείς με καλή απόκριση στην κλοπιδογρέλη, αυτά τα συσσωματώματα σε μη ενεργοποιημένο καθώς και σε ενεργοποιημένο ολικό αίμα πριν τη χορήγηση της κλοπιδογρέλης μειώθηκαν προοδευτικά και σημαντικά στις 5 και 30 ημέρες, με τη μέγιστη αναστολή να παρατηρείται στις 30 ημέρες μετά τη φόρτιση με κλοπιδογρέλη (εικόνες 24 Α και Β, 25 Α και Β). Αντίθετα, στους ασθενείς με κακή απόκριση στην κλοπιδογρέλη, μία σημαντική μείωση των συσσωματωμάτων των αιμοπεταλίων-μονοκυττάρων και αιμοπεταλίων-ουδετεροφίλων είτε σε μη ενεργοποιημένο ολικό αίμα είτε σε ενεργοποιημένο με ADP ή TRAP παρατηρήθηκε μόνο στις 30 ημέρες της παρακολούθησης (εικόνες 24 Α και Β, 25 Α και Β). Και στις δύο ομάδες των ασθενών η ανασταλτική δράση της κλοπιδογρέλης στην αλληλεπίδραση αιμοπεταλίων και λευκών αιμοσφαιρίων ήταν λιγότερο ισχυρή στο αίμα που ήταν ενεργοποιημένο με TRAP από ότι με ADP.

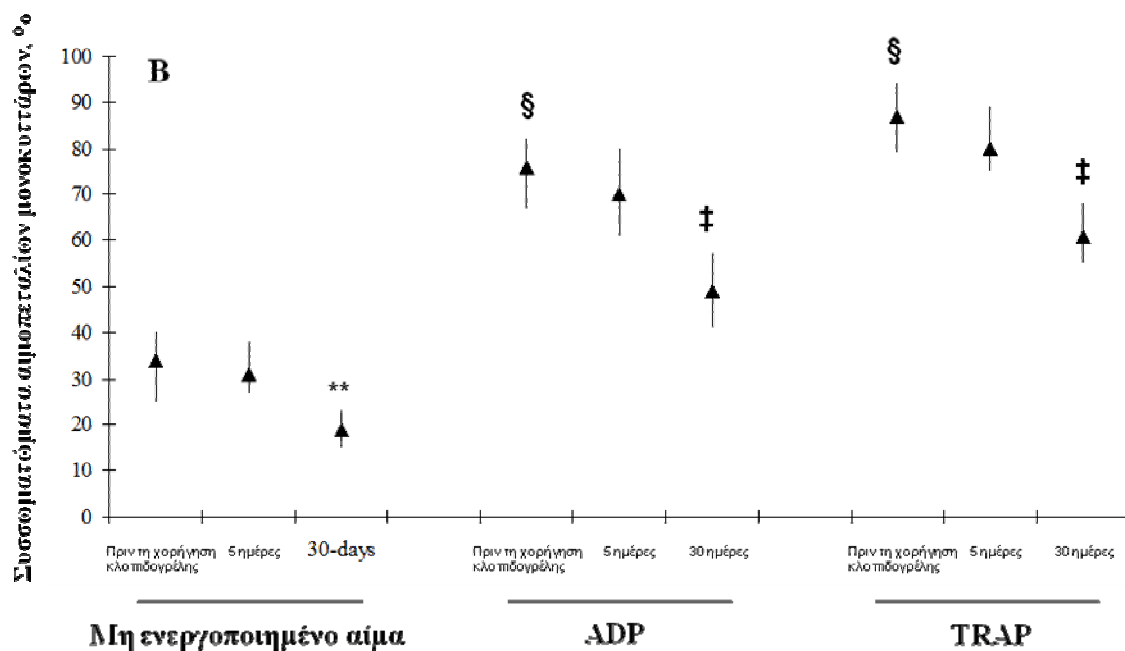


**Εικόνα 23** Αντιπροσωπευτικές εικόνες κυτταρομετρίας ροής όπου φαίνεται ο πληθυσμός των λευκοκυττάρων Α. η αλληλεπίδραση αιμοπεταλίων-μονοκυττάρων Β. και η αλληλεπίδραση αιμοπεταλίων-ουδετερόφιλων Γ. στο άνω δεξί τεταρτημόριο αντίστοιχα.

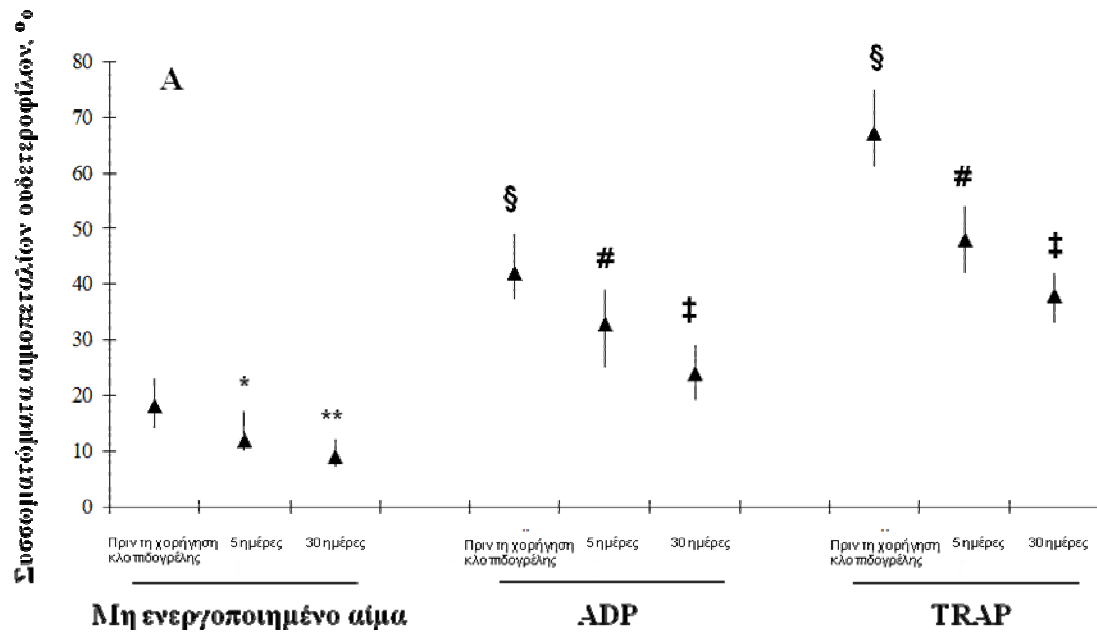


**Εικόνα 24.A.** Επίδραση της κλοπιδογρέλης στο σχηματισμό συσσωματωμάτων αιμοπεταλίων/μονοκυττάρων σε ασθενείς με ΟΣΣ και καλή απόκριση στην κλοπιδογρέλη. Οι παράμετροι εκφράστηκαν ως ενδιάμεσες τιμές (εύρος). \* $p < 0.04$ , \*\* $p < 0.01$  και § $p < 0.001$  σε σύγκριση με τις τιμές των μη ενεργοποιημένων αιμοπεταλίων πριν τη χορήγηση του φαρμάκου και # $p < 0.005$  and † $p < 0.001$  σε σύγκριση με τις τιμές πριν τη χορήγηση του φαρμάκου και μετά την προσθήκη του αντίστοιχου αγωνιστή.

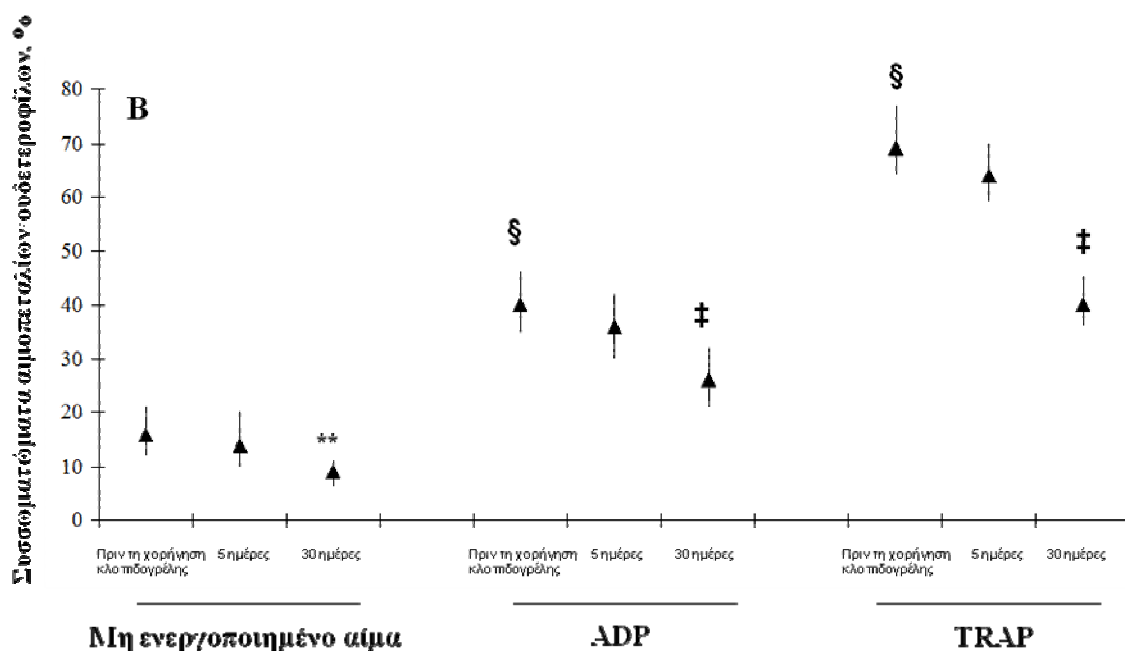




**Εικόνα 24.B.** Επίδραση της κλοπιδογρέλης στο σχηματισμό συσσωματωμάτων αιμοπεταλίων/μονοκυττάρων σε ασθενείς με ΟΣΣ και κακή απόκριση στην κλοπιδογρέλη. Οι παράμετροι εκφράστηκαν ως ενδιάμεσες τιμές (εύρος). \* $p < 0.04$ , \*\* $p < 0.01$  και § $p < 0.001$  σε σύγκριση με τις τιμές των μη ενεργοποιημένων αιμοπεταλίων πριν τη χορήγηση του φαρμάκου και # $p < 0.005$  and ‡ $p < 0.001$  σε σύγκριση με τις τιμές πριν τη χορήγηση του φαρμάκου και μετά την προσθήκη του αντίστοιχου αγωνιστή.



**Εικόνα 25.A.** Επίδραση της κλοπιδογρέλης στο σχηματισμό συσσωματωμάτων αιμοπεταλίων/ουδετεροφίλων σε ασθενείς με ΟΣΣ και καλή απόκριση στην κλοπιδογρέλη. Οι παράμετροι εκφράστηκαν ως ενδιάμεσες τιμές (εύρος). \* $p < 0.04$ , \*\* $p < 0.01$  και § $p < 0.001$  σε σύγκριση με τις τιμές των μη ενεργοποιημένων αιμοπεταλίων πριν τη χορήγηση του φαρμάκου και # $p < 0.005$  and ‡ $p < 0.001$  σε σύγκριση με τις τιμές πριν τη χορήγηση του φαρμάκου και μετά την προσθήκη του αντίστοιχου αγωνιστή.

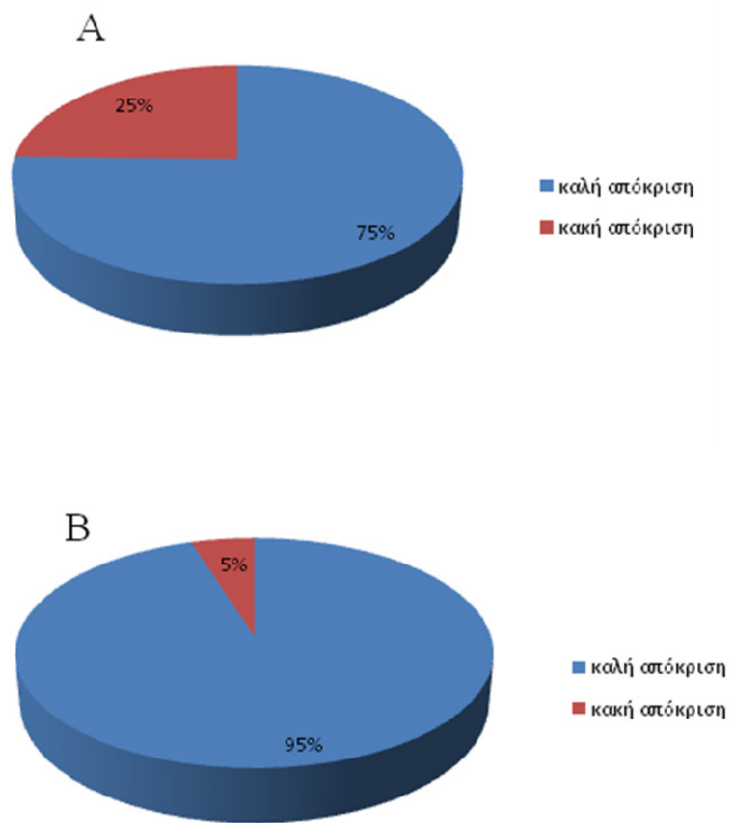


**Εικόνα 25.B.** Επίδραση της κλοπιδογρέλης στο σχηματισμό συσσωματωμάτων αιμοπεταλίων/ουδετεροφίλων σε ασθενείς με ΟΣΣ και κακή απόκριση στην κλοπιδογρέλη. Οι παράμετροι εκφράστηκαν ως ενδιάμεσες τιμές (εύρος). \* $p < 0.04$ , \*\* $p < 0.01$  και § $p < 0.001$  σε σύγκριση με τις τιμές των μη ενεργοποιημένων αιμοπεταλίων πριν τη χορήγηση του φαρμάκου και # $p < 0.005$  and ‡ $p < 0.001$  σε σύγκριση με τις τιμές πριν τη χορήγηση του φαρμάκου και μετά την προσθήκη του αντίστοιχου αγωνιστή.

Στη μελέτη συμμετείχαν συνολικά 61 ασθενείς οι οποίοι μελετήθηκαν τελικά σε δύο ομάδες (ανάλογα με τη θεραπευτική αντιμετώπιση που ακολούθησαν) χρησιμοποιώντας λιγότερες παραμέτρους. Η πρώτη ομάδα περιέλαβε 48 ασθενείς που υπεβλήθησαν σε PCI και η δεύτερη 13 ασθενείς που ακολούθησαν συντηρητική αντιμετώπιση του ΟΣΣ. Από την ανάλυση των 61 ασθενών προέκυψαν τα παρακάτω αποτελέσματα.

### 10.6. Απόκριση στην κλοπιδογρέλη

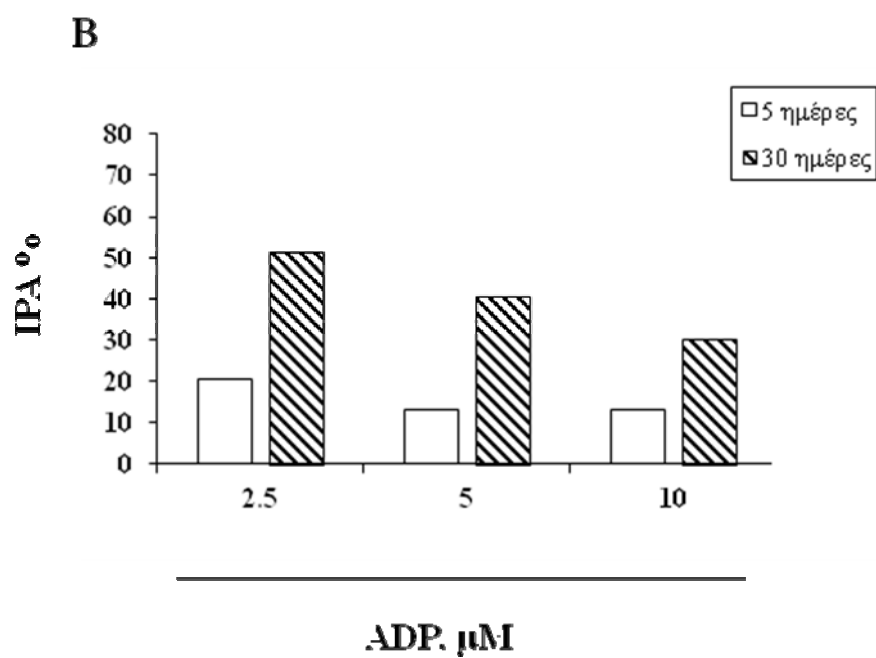
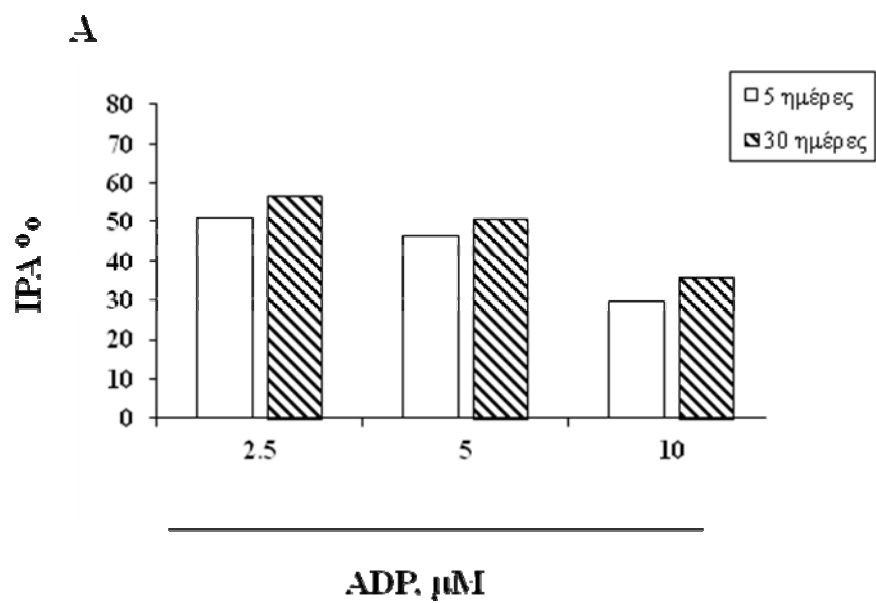
Η ανάλυση της φωσφορυλίωσης της πρωτεΐνης VASP την 5<sup>η</sup> ημέρα έδειξε μια μεγάλη ποικιλομορφία στις τιμές PRI μεταξύ των συμμετεχόντων από 19 έως 78%. Σαράντα έξι ασθενείς με ΟΣΣ (40 υπεβλήθησαν σε αγγειοπλαστική και 6 ακολούθησαν συντηρητική θεραπεία) είχαν τιμές PRI <50% (mean±SD, 34.4±15.2%) και θεωρήθηκαν ως ασθενείς με καλή απόκριση στην κλοπιδογρέλη, ενώ 15 ασθενείς (24,6% του συνόλου) (8 ασθενείς που υπεβλήθησαν σε αγγειοπλαστική και 7 ακολούθησαν συντηρητική θεραπεία) παρουσίασαν τιμές PRI ≥50% (mean±SD, 64.5±13.4%) και θεωρήθηκαν ως ασθενείς με κακή απόκριση στην κλοπιδογρέλη (*Εικόνα 26Α*). Στις 30 ημέρες της παρακολούθησης οι τιμές PRI στους ασθενείς με καλή απόκριση στην κλοπιδογρέλη ήταν παρόμοιες με αυτές στις 5 ημέρες, ενώ στους ασθενείς με κακή απόκριση στην κλοπιδογρέλη οι τιμές PRI μειώθηκαν σημαντικά σε 37,5.2±10.1% (p<0.01 σε σύγκριση με τις τιμές PRI στις 5 ημέρες) και μόνο 3 ασθενείς (ένας που υπεβλήθη σε αγγειοπλαστική και 2 που ακολούθησαν συντηρητική θεραπεία) είχαν ακόμη τιμές PRI >50% (π.χ. 64,5% και 54,2% και 59,4% αντίστοιχα) (*Εικόνα 26Β*).



**Εικόνα 26.** Ποσοστά ασθενών με καλή και κακή απόκριση στην κλοπιδογρέλη **A.** 5 ημέρες μετά τη δόση φόρτισης, **B.** 30 ημέρες από τη δόση φόρτισης

### 10.7. Μελέτη της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων

Πριν τη χορήγηση της κλοπιδογρέλης, οι ενδιάμεσες τιμές (εύρος) της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων που επάγεται από το ADP σε όλους τους ασθενείς ήταν 40% (20-65%) για συγκέντρωση 2,5μM, 60% (39-75%) για 5μM και 74% (63-89%) για συγκέντρωση 10μM. Καμία διαφορά δεν παρατηρήθηκε στις τιμές της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων που επάγεται από το ADP μεταξύ των ασθενών με καλή ή κακή απόκριση στην κλοπιδογρέλη καθώς και μεταξύ των ασθενών που υπεβλήθησαν σε αγγειοπλαστική ή ακολούθησαν συντηρητική θεραπεία. Στους ασθενείς με καλή απόκριση στην κλοπιδογρέλη, η αναστολή της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων έφτασε σε ένα κατώφλι 5 ημέρες μετά τη φόρτιση με κλοπιδογρέλη ( $p < 0,001$  σε σύγκριση με τις τιμές πριν τη χορήγηση της κλοπιδογρέλης) ενώ στους ασθενείς με κακή απόκριση στην κλοπιδογρέλη, παρατηρήθηκε μία οριακή αναστολή της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων στις 5 ημέρες ( $p < 0,05$  σε σύγκριση με τις τιμές πριν τη χορήγηση της κλοπιδογρέλης), η οποία έφτασε σε ένα κατώφλι στις 30 ημέρες της παρακολούθησης ( $p < 0,01$  σε σύγκριση με τις τιμές IPA στις 5 ημέρες) (εικόνα 27 A και B). Οι τιμές IPA ήταν παρόμοιες στις 5 και στις 30 ημέρες της παρακολούθησης μεταξύ των ασθενών που υπεβλήθησαν σε αγγειοπλαστική ή ακολούθησαν συντηρητική θεραπεία, είτε επρόκειτο για ασθενείς με καλή απόκριση στην κλοπιδογρέλη, είτε για ασθενείς με κακή απόκριση.



**Εικόνα 27** **A.** % αναστολή της συσώρευσης των αιμοπεταλίων που επάγεται από το ADP 5 και 30 ημέρες μετά τη φόρτιση με κλοπιδογρέλη σε ασθενείς με καλή απόκριση στο φάρμακο. **B.** σε ασθενείς με κακή απόκριση στο φάρμακο

### **10.8. Έκφραση P-σελεκτίνης και αλληλεπίδραση αιμοπεταλίων-λευκών αιμοσφαιρίων**

Οι τιμές της έκφρασης της P-σελεκτίνης και των συσσωματωμάτων των αιμοπεταλίων με τα μονοκύτταρα και των αιμοπεταλίων με τα ουδετερόφιλα, είτε σε μη ενεργοποιημένα αιμοπετάλια, είτε μετά από ενεργοποίηση με ADP ήταν παρόμοιες μεταξύ των ασθενών με καλή ή κακή απόκριση στην κλοπιδογρέλη πριν τη χορήγηση κλοπιδογρέλης (πίνακας 6). Στους ασθενείς με καλή απόκριση στην κλοπιδογρέλη οι τιμές αυτές μειώνονταν προοδευτικά στις 5 και στις 30 ημέρες από τη φόρτιση με κλοπιδογρέλη με τη μέγιστη αναστολή να παρατηρείται στις 30 ημέρες (πίνακας 6). Δεν παρατηρήθηκε καμία διαφορά στη φλεγμονώδη απάντηση μεταξύ των ασθενών που υπεβλήθησαν σε αγγειοπλαστική ή ακολούθησαν συντηρητική θεραπεία και στις δύο χρονικές στιγμές της παρακολούθησης

Αντίθετα, στους ασθενείς με κακή απόκριση στην κλοπιδογρέλη, η κλοπιδογρέλη δεν κατάφερε να μειώσει τα επίπεδα των παραπάνω φλεγμονωδών δεικτών στις 5 ημέρες της παρακολούθησης και στους ασθενείς που υπεβλήθησαν σε αγγειοπλαστική παρατηρήθηκαν σημαντικά υψηλότερες τιμές αυτών των δεικτών σε σύγκριση με τους ασθενείς που ακολούθησαν συντηρητική θεραπεία (πίνακας 6). Παρόλα αυτά στις 30 ημέρες της παρακολούθησης παρατηρήθηκε σημαντική αναστολή της φλεγμονής που επάγεται από τα αιμοπετάλια και στις δύο ομάδες ασθενών (αγγειοπλαστική ή συντηρητική αντιμετώπιση).



**Πίνακας 6.** Έκφραση P-σελεκτίνης και αλληλεπίδραση αιμοπεταλίων/λευκών αιμοσφαιρίων σε ασθενείς με ΟΣΣ πριν τη χορήγηση κλοπιδογρέλης καθώς και 5 και 30 ημέρες μετά τη φόρτιση

Παράμετρος	Καλή απόκριση στην κλοπιδογρέλη (n=46)			Κακή απόκριση στην κλοπιδογρέλη (n=15)		
	Πριν τη χορήγηση κλοπιδογρέλης	5-ημέρες	30-ημέρες	Πριν τη χορήγηση κλοπιδογρέλης	5-ημέρες	30-ημέρες
					PCI	C-T
					PCI	C-T
<b>Έκφραση P-σελεκτίνης</b>						
<i>(% θετικά κύτταρα)</i>						
Μη ενεργοποιημένα αιμοπετάλια	10 (7-13)	7 (4-9) <sup>c</sup>	5 (4-8) <sup>c</sup>	10 (6-15)	12 (8-16) <sup>c</sup>	7 (6-11)
ADP	45 (38-52) <sup>a</sup>	35 (26-39) <sup>a,c</sup>	27 (24-34) <sup>a,d</sup>	44 (39-47) <sup>a</sup>	51 (46-55) <sup>a,e</sup>	42 (36-48) <sup>a</sup>
Συσσωματώματα αιμοπεταλίων/μονοκυττάρων					29 (24-35) <sup>a,d</sup>	27 (22-32) <sup>a,d</sup>
<i>(% θετικά κύτταρα)</i>						

<b>Μη ενεργοποιημένα αιμοπετάλια</b>	37 (29-45)	25 (21-32) <sup>c</sup>	18 (14-24) <sup>d</sup>	35 (26-41)	41 (37-48) <sup>e</sup>	31 (27-38)	21 (19-28) <sup>d</sup>	19 (16-24) <sup>d</sup>
<b>ADP</b>	78 (64-87) <sup>a</sup>	63 (55-70) <sup>a,c</sup>	44 (37-49) <sup>a,d</sup>	75 (66-80) <sup>a</sup>	84 (71-90) <sup>a,e</sup>	71 (62-80) <sup>a</sup>	51 (45-60) <sup>a,d</sup>	49 (42-57) <sup>a,d</sup>
<b>Συσσωματώματα αιμοπεταλίων/ουδετεροφίλων (% θετικά κύτταρα)</b>								
<b>Μη ενεργοποιημένα αιμοπετάλια</b>	18 (13-24)	11 (7-17) <sup>c</sup>	8 (6-12) <sup>d</sup>	17 (13-23)	20 (12-25) <sup>e</sup>	13 (10-20)	10 (8-14) <sup>d</sup>	8 (6-12) <sup>d</sup>
<b>ADP</b>	43 (36-50) <sup>a</sup>	32 (22-39) <sup>a</sup>	23 (17-28) <sup>a,d</sup>	40 (34-47) <sup>a</sup>	43 (34-49) <sup>a,e</sup>	34 (30-41) <sup>a</sup>	26 (21-32) <sup>a,d</sup>	25 (21-32) <sup>a,d</sup>

Οι παράμετροι εκφράστηκαν ως ενδιάμεση τιμή (εύρος). <sup>a</sup> p<0.02 και <sup>b</sup> p<0.01 σε σύγκριση με τις αντίστοιχες τιμές σε μη ενεργοποιημένα αιμοπετάλια <sup>c</sup> p<0.01 και

<sup>d</sup> p<0.001 σε σύγκριση με τις αντίστοιχες τιμές πριν τη χορήγηση κλοπιδογρέλης, <sup>e</sup> p<0.02 σε σύγκριση με τις αντίστοιχες τιμές σε ασθενείς με συντηρητική θεραπεία.

PCI, αγγειοπλαστική, C-T, συντηρητικήθεραπεία

## 11. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Σύμφωνα με την παρούσα μελέτη, το ανασταλτικό αποτέλεσμα της κλοπιδογρέλης στην ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων σε ασθενείς με ΟΣΣ που λαμβάνουν δόση συντήρησης 75 mg/ημέρα διαφοροποιείται ανάλογα με α) τη διάρκεια της θεραπείας μέσα στον πρώτο μήνα χορήγησης, β) τη μέθοδο που χρησιμοποιείται για την εκτίμηση της λειτουργικότητας των αιμοπεταλίων, γ) τον τύπο του αγωνιστή των αιμοπεταλίων που χρησιμοποιείται δ) την ποικιλομορφία της απόκρισης στο φάρμακο και ε) τη θεραπευτική αντιμετώπιση που ακολουθεί ο ασθενής (αγγειοπλαστική ή συντηρητική αντιμετώπιση).

Έχουν περιγραφεί διάφοροι ορισμοί για την ποικιλομορφία της απόκρισης των αιμοπεταλίων στην κλοπιδογρέλη, ανάλογα με τη μεθοδολογία που χρησιμοποιείται για τον έλεγχο της αντιδραστικότητας των αιμοπεταλίων υπό θεραπεία. Ο όρος «κακή απόκριση των αιμοπεταλίων στην κλοπιδογρέλη» που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα μελέτη βασίστηκε στη μελέτη της φωσφορυλίωσης της πρωτεΐνης VASP, μία μέθοδος τυποποιημένη, αναπαράξιμη και ακριβής<sup>156</sup>.

Όπως έχει περιγραφεί προηγουμένως, οι τιμές PRI σχετίζονται αντιστρόφως ανάλογα με τη δραστικότητα της κλοπιδογρέλης<sup>156,187</sup>. Στην παρούσα μελέτη ταξινομήσαμε τους ασθενείς σε αυτούς με κακή απόκριση στην κλοπιδογρέλη χρησιμοποιώντας ένα κατώφλι PRI της τάξης του 50%, το οποίο αντιστοιχεί σε περίπου 90% αναστολή του υποδοχέα P2Y<sub>12</sub><sup>268</sup>. Τιμές PRI>50% σχετίζονται ισχυρά και αναδρομικά με υποξεία θρόμβωση του stent σε περίπτωση αγγειοπλαστικής των στεφανιαίων αγγείων<sup>156</sup>. Σε προοπτικές μελέτες, ένα κατώφλι 50% έδειξε πολύ υψηλή αρνητική προγνωστική αξία για μείζονα οξεία καρδιαγγειακά συμβάντα μετά από αγγειοπλαστική<sup>233</sup>.

Σε αυτή την κατεύθυνση, πρόσφατα δημοσιευμένη συμφωνία για τον ορισμό της υψηλής αιμοπεταλιακής ενεργότητας υπό θεραπεία στο ADP έχει προτείνει ότι σε περίπτωση αγγειοπλαστικής ένα από τα κριτήρια για να την ορίσεις είναι τιμές PRI >50%<sup>166</sup>. Σε συμφωνία με ήδη δημοσιευμένα στοιχεία<sup>257,269</sup>, τα αποτελέσματά μας δείχνουν ότι 30% των ασθενών που ελάμβαναν δόση συντήρησης κλοπιδογρέλης 75 mg/ημέρα είχαν τιμές PRI  $\geq$ 50% 5 ημέρες μετά τη φόρτιση με κλοπιδογρέλη.

Είναι πολύ σημαντικό να αναφερθεί ότι στις 30 ημέρες της παρακολούθησης οι τιμές PRI μειώθηκαν, όπως μειώθηκε και η μέγιστη συσσώρευση των αιμοπεταλίων σε όλες τις δόσεις των αγωνιστών ADP και TRAP. Για το λόγο αυτό πρέπει να σημειώσουμε ότι η υπολειπόμενη αιμοπεταλιακή ενεργότητα σε συγκέντρωση 5μM ADP στις 30 ημέρες της παρακολούθησης μειώθηκε στο 37%, ποσοστό μικρότερο από 46%. Πρόσφατα, η μέγιστη συσσώρευση των αιμοπεταλίων σε συγκέντρωση 5μM ADP >46% θεωρήθηκε ως ένα από τα κριτήρια για να ορισθεί η υψηλή αιμοπεταλιακή ενεργότητα σε περίπτωση αγγειοπλαστικής<sup>166</sup>.

Τα παραπάνω αποτελέσματα δείχνουν ότι σε ασθενείς με κακή απόκριση στην κλοπιδογρέλη, η κλασική δόση συντήρησης κλοπιδογρέλης 75 mg/ημέρα είναι αρκετή για να αναστρέψει την κακή απόκριση μέσα σε 30 ημέρες από την έναρξη της θεραπείας. Σύμφωνα με προηγούμενα δημοσιευμένα αποτελέσματα, σε αυτό το χρονικό διάστημα η απάντηση των αιμοπεταλίων στην κλοπιδογρέλη σταθεροποιείται<sup>258,259,269</sup>. Τα αποτελέσματά μας βρίσκονται σε συμφωνία με δημοσιευμένα στοιχεία τα οποία δείχνουν ότι 75 mg/ημέρα κλοπιδογρέλης βελτιώνουν το δείκτη VASP και τη σωρευτική απάντηση των αιμοπεταλίων (σε μικρότερο βαθμό και σε μεγαλύτερο χρονικό διάστημα) σε σύγκριση με υψηλότερη δόση συντήρησης κλοπιδογρέλης 150 mg/ημέρα<sup>235,257,270</sup>.

Εκτός από τη συμβολή τους στο σχηματισμό του θρόμβου, τα αιμοπετάλια διαδραματίζουν πολύ σημαντικό ρόλο στη φλεγμονή μετά από αγγειακή βλάβη. Τα ενεργοποιημένα αιμοπετάλια παράγουν PMPs<sup>79</sup> και εκφράζουν στην επιφάνειά τους ή εκκρίνουν διάφορους προθρομβωτικούς και προφλεγμονώδεις διαμεσολαβητές, όπως το CD40L και η P-σελεκτίνη<sup>34,271</sup>. Η ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων σχετίζεται με την προσκόλλησή τους στα λευκά αιμοσφαίρια (κυρίως στα μονοκύτταρα και στα ουδετερόφιλα), μία διαδικασία που διαμεσολαβείται κυρίως από τη σύνδεση της P-σελεκτίνης των αιμοπεταλίων στο συνδέτη-1 της γλυκοπρωτεΐνης (PSGL-1) στα λευκά αιμοσφαίρια<sup>10,34</sup>. Η αλληλεπίδραση μεταξύ αιμοπεταλίων και λευκών αιμοσφαιρίων μπορεί να εμφανισθεί είτε στην κυκλοφορία, είτε στο ενδοθήλιο του αγγειακού τοιχώματος<sup>10</sup>.

Τα κυκλοφορούντα συσσωματώματα αιμοπεταλίων και λευκών αιμοσφαιρίων αυξάνονται σε ασθενείς με ΟΣΣ και αποτελούν έναν ευαίσθητο δείκτη των αλληλεπιδράσεων μεταξύ φλεγμονής και θρόμβωσης<sup>119,123,272</sup>. Η αναστολή της λειτουργικότητας των αιμοπεταλίων από την κλοπιδογρέλη μπορεί να τροποποιήσει όλους τους παραπάνω, σχετιζόμενους με τα αιμοπετάλια, προθρομβωτικούς και προφλεγμονώδεις παράγοντες, παρόλο που υπάρχουν στοιχεία σύμφωνα με τα οποία η κλοπιδογρέλη μπορεί να μειώσει τη φλεγμονώδη απάντηση ανεξάρτητα από τα αιμοπετάλια<sup>14</sup>. Εντούτοις, λίγα στοιχεία αναφέρονται στην επίδραση που μπορεί να έχει η ποικιλομορφία της απόκρισης στην κλοπιδογρέλη στους προθρομβωτικούς και προφλεγμονώδεις παράγοντες που προέρχονται από τα αιμοπετάλια, καθώς και στην αλληλεπίδραση των αιμοπεταλίων με τα λευκά αιμοσφαίρια σε ασθενείς με ΟΣΣ.

Τα αποτελέσματα μας δείχνουν ότι σε ασθενείς με κακή απόκριση στην κλοπιδογρέλη, το ανασταλτικό αποτέλεσμα της κλοπιδογρέλης στις προαναφερθείσες

παραμέτρους στις 5 ημέρες της παρακολούθησης διαφοροποιείται σε σχέση με την ανασταλτική δράση στη συσσώρευση των αιμοπεταλίων, μιας και η κλοπιδογρέλη σημαντικά αν και οριακά μειώνει τη συσσώρευση των αιμοπεταλίων στο ADP, ενώ δεν επηρεάζει ούτε την αυθόρμητη ούτε την επαγόμενη από το ADP παραγωγή των PMPs ή τη μεμβρανική έκφραση του CD40L και της P-σελεκτίνης.

Επιπρόσθετα, στους ασθενείς με καλή απόκριση στην κλοπιδογρέλη, η μέγιστη αναστολή της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων που επάγεται από το ADP, καθώς και η αυθόρμητη ή η επαγόμενη από το ADP παραγωγή PMPs και CD40L παρατηρείται στις 5 ημέρες, ενώ η μέγιστη αναστολή, είτε της αυθόρμητης, είτε της επαγόμενης από το ADP έκφρασης της P-σελεκτίνης παρατηρείται στις 30 ημέρες της παρακολούθησης. Το αποτέλεσμα της κλοπιδογρέλης στην P-σελεκτίνη είναι παρόμοιο με αυτό στα συσσωματώματα των αιμοπεταλίων-λευκών αιμοσφαιρίων στους ασθενείς με καλή και κακή απόκριση στην κλοπιδογρέλη, κάτι το οποίο ενισχύει τον πολύ σημαντικό ρόλο της P-σελεκτίνης στην αλληλεπίδραση αιμοπεταλίων με λευκά αιμοσφαίρια<sup>10,34</sup>.

Γενικά, τα αποτελέσματα της μελέτης δείχνουν ότι η ανασταλτική ισχύς των 75mg κλοπιδογρέλης ημερησίως στους προθρομβωτικούς και προφλεγμονώδεις παράγοντες των αιμοπεταλίων μέσα στον πρώτο μήνα της χορήγησης της κλοπιδογρέλης σε ασθενείς με ΟΣΣ εξαρτάται από τον τύπο του δείκτη της ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων που μελετάται, την ποικιλομορφία της απόκρισης του ασθενούς στο φάρμακο, καθώς και από τη διάρκεια της θεραπείας.

Αυτή η ετερογενής απάντηση των δεικτών της ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων στην ανασταλτική δράση της κλοπιδογρέλης μπορεί να αποδοθεί στα διαφορετικά μονοπάτια που ακολουθούνται για τη μεμβρανική έκφραση ή την έκκριση κάθε δείκτη κατά τη διάρκεια της ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων, όπως και στις διαφορές στη σχέση

μεταξύ αυτών των μεταβολικών οδών και της σηματοδότησης που επάγεται από τον υποδοχέα P2Y<sub>12</sub><sup>211</sup>.

Επιπλέον, το ενδογενές ADP που εκκρίνεται κατά τη διάρκεια της ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων μέσω του υποδοχέα PAR-1 έχει σημαντικό ρόλο στην ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων που διαμεσολαβείται από αυτόν τον υποδοχέα<sup>273</sup>. Σύμφωνα με τα αποτελέσματά μας, η κλοπιδογρέλη αναστέλλει την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων που επάγεται από το TRAP σε μικρότερο βαθμό σε σύγκριση με την ενεργοποίηση που επάγεται από το ADP, το οποίο είναι σε συμφωνία με αποτελέσματα προηγούμενων μελετών<sup>243,274</sup>.

Η διαφοροποίηση της ανασταλτικής δράσης της κλοπιδογρέλης σε διάφορους σχετιζόμενους με τα αιμοπετάλια προθρομβωτικούς και προφλεγμονώδεις παράγοντες σε ασθενείς με ΟΣΣ μπορεί να έχει μεγάλη κλινική σημασία μιας και καθένας από αυτούς τους παράγοντες π.χ. PMPs, CD40L, P-σελεκτίνη εκφράζει διάφορες βιολογικές δραστηριότητες, οι οποίες συνεισφέρουν με διαφορετικό τρόπο στη θρόμβωση και στη φλεγμονή<sup>14</sup>.

Η θρόμβωση και η φλεγμονή αποτελούν ανεξάρτητους προγνωστικούς και αιτιολογικούς παράγοντες μειζόνων ανεπιθύμητων καρδιαγγειακών συμβάντων σε ασθενείς με ΟΣΣ<sup>14</sup>. Επομένως, η αποτυχία των 75mg κλοπιδογρέλης ημερησίως να μειώσουν τους παραπάνω φλεγμονώδεις διαμεσολαβητές των αιμοπεταλίων μέσα στις πρώτες ημέρες μετά από ΟΣΣ σε ασθενείς με κακή απόκριση στην κλοπιδογρέλη, και ειδικά σε αυτούς που έχουν υποβληθεί σε αγγειοπλαστική, μπορεί να είναι κλινικά σημαντική και μπορεί να εξηγήσει τουλάχιστον μερικώς την ικανότητα της επταήμερης χορήγησης 75 mg/ημέρα κλοπιδογρέλης να μειώσει τα καρδιαγγειακά συμβάντα και τη

θρόμβωση των stent σε σύγκριση με τη διπλή δόση κλοπιδογρέλης σε ασθενείς με ΟΣΣ που υποβάλλονται σε αγγειοπλαστική<sup>217</sup>.

Όπως αναφέρθηκε, όλοι οι ασθενείς της μελέτης έπαιρναν ατορβαστατίνη, η χορήγηση της οποίας θα μπορούσε να συνεισφέρει στις αντιφλεγμονώδεις δράσεις της κλοπιδογρέλης<sup>275</sup>. Η φυσική εξέλιξη της νόσου, η οποία χαρακτηρίζεται από μία βελτίωση της οξείας φάσης μπορεί να βοηθήσει στη μείωση της φλεγμονής 30 ημέρες μετά το ΟΣΣ. Ούτε όμως η ατορβαστατίνη, ούτε η φυσική πορεία της νόσου μπορούν να συνεισφέρουν στη βελτίωση των τιμών PRI στους ασθενείς με κακή απόκριση στην κλοπιδογρέλη στις 30 ημέρες της παρακολούθησης. Παρά το γεγονός ότι μία αλληλεπίδραση μεταξύ των λιποφιλικών στατινών και της κλοπιδογρέλης στις ισομορφές του κυτοχρώματος P450 έχει ήδη αναφερθεί<sup>182</sup>, προηγούμενα δημοσιευθέντα αποτελέσματά μας καταδεικνύουν ξεκάθαρα την έλλειψη παρενεργειών κατά τη συγχορήγηση κλοπιδογρέλης και ατορβαστατίνης<sup>185</sup>. Τα αποτελέσματά μας έχουν υποστηριχθεί από διάφορα πειραματικά και κλινικά δεδομένα<sup>276</sup>.



## 12. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Συμπερασματικά, η παρούσα μελέτη δείχνει ότι μία δόση συντήρησης 75 mg κλοπιδογρέλης επηρεάζει με διαφορετικό τρόπο τη συσσώρευση των αιμοπεταλίων και τους προθρομβωτικούς και προφλεγμονώδεις διαμεσολαβητές που προέρχονται από τα αιμοπετάλια σε ασθενείς με ΟΣΣ μέσα στον πρώτο μήνα θεραπείας. Σύμφωνα με τα αποτελέσματά μας, η ανασταλτική δράση της κλοπιδογρέλης επηρεάζεται πολύ σημαντικά 1. από το διαμεσολαβητή των αιμοπεταλίων που μελετήθηκε, 2. από την απόκριση στην κλοπιδογρέλη, 3. από το χρονικό διάστημα χορήγησης του φαρμάκου, 4. από τον τύπο του αγωνιστή των αιμοπεταλίων που χρησιμοποιείται, 5. από τη μέθοδο της θεραπευτικής αντιμετώπισης του ΟΣΣ που χρησιμοποιείται (συντηρητική ή επεμβατική).

Συγκεκριμένα, μία μέγιστη αναστολή της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων στους ασθενείς με καλή απόκριση στην κλοπιδογρέλη παρατηρήθηκε στις 5 ημέρες από τη φόρτιση του φαρμάκου, ενώ στους ασθενείς με κακή απόκριση παρατηρήθηκε στις 30 ημέρες ταυτόχρονα με μια σημαντική μείωση στις PRI τιμές. Παρόμοια αποτελέσματα παρατηρήθηκαν για τη μεμβρανική έκφραση του CD40L και την παραγωγή των PMPs. Αντίθετα, η μέγιστη αναστολή της έκφρασης της P-σελεκτίνης και του σχηματισμού των συσσωματωμάτων αιμοπεταλίων-λευκών αιμοσφαιρίων παρατηρήθηκε στις 30 ημέρες και για τις δύο ομάδες ασθενών. Πρέπει να σημειωθεί ότι στους ασθενείς με κακή απόκριση στην κλοπιδογρέλη, αυτοί που υπεβλήθησαν σε αγγειοπλαστική είχαν υψηλότερα επίπεδα έκφρασης P-σελεκτίνης και σχηματισμού των συσσωματωμάτων αιμοπεταλίων-λευκών αιμοσφαιρίων στις 5 ημέρες της παρακολούθησης σε σύγκριση με τους ασθενείς που ακολούθησαν συντηρητική αντιμετώπιση, ενώ στις 30 ημέρες η φλεγμονώδης απάντηση που διαμεσολαβείται από τα αιμοπετάλια ήταν σημαντικά μειωμένη και στους ασθενείς

που υπεβλήθησαν σε αγγειοπλαστική και σε αυτούς που ακολούθησαν συντηρητική θεραπεία.

Στους ασθενείς με καλή απόκριση στην κλοπιδογρέλη, αλλά και στους ασθενείς με κακή απόκριση η ανασταλτική δράση της κλοπιδογρέλης ήταν λιγότερο ισχυρή στη συσσώρευση των αιμοπεταλίων που επάγεται από το TRAP σε σύγκριση με αυτή που επάγεται από το ADP. Παρόμοια, το ανασταλτικό αποτέλεσμα της κλοπιδογρέλης στην παραγωγή των PMPs, στην έκφραση του CD40L και της P-σελεκτίνης, καθώς και στην αλληλεπίδραση αιμοπεταλίων και λευκών αιμοσφαιρίων ήταν λιγότερο ισχυρό στα αιμοπετάλια που ενεργοποιήθηκαν με TRAP από ότι με ADP.

Τέλος, είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι η βελτίωση των τιμών του δείκτη VASP και της επαγόμενης από την κλοπιδογρέλη αναστολής της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων και της φλεγμονής που διαμεσολαβείται από τα αιμοπετάλια στους ασθενείς με κακή απόκριση στην κλοπιδογρέλη μετά από 30 ημέρες θεραπείας θα μπορούσαν να αποδοθούν μερικώς σε μια προοδευτική βελτίωση του μεταβολισμού του φαρμάκου, καθώς και στη φυσική εξέλιξη της νόσου, η οποία χαρακτηρίζεται από μία ηπιότερη οξεία φάση 1 μήνα μετά τη διάγνωση του ΟΣΣ σε σύγκριση με την στιγμή της εισαγωγής, διαδικασίες οι οποίες διευκολύνουν τη δράση της κλοπιδογρέλης.

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τα αιμοπετάλια συμμετέχουν στο σχηματισμό του θρόμβου και στη φλεγμονή που ακολουθεί μια αγγειακή βλάβη, διαδραματίζοντας με τον τρόπο αυτό σημαντικό ρόλο στην παθογένεια και την έκβαση των οξέων στεφανιαίων συνδρόμων (ΟΣΣ). Επομένως, τα αντιαιμοπεταλιακά φάρμακα αποτελούν τον ακρογωνιαίο λίθο στην πρόληψη και αντιμετώπιση των ΟΣΣ. Η κλοπιδογρέλη, μία θειενοπυριδίνη που συνδέεται μη αντιστρεπτά με τον πουρινεργικό υποδοχέα της μεμβράνης των αιμοπεταλίων P2Y<sub>12</sub> και αναστέλλει την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων από τη διφωσφορική αδενοσίνη (ADP), είναι ένα ευρέως χρησιμοποιούμενο αντιαιμοπεταλιακό φάρμακο το οποίο παρουσιάζει αντιθρομβωτικές και αντιφλεγμονώδεις δράσεις.

Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν να μελετήσουμε διάφορους προθρομβωτικούς και προφλεγμονώδεις διαμεσολαβητές που επάγονται από τα αιμοπετάλια καθώς και τη συσσώρευση των αιμοπεταλίων σε ασθενείς με ΟΣΣ που λαμβάνουν κλοπιδογρέλη σε σχέση με την απόκριση των ασθενών στην αντιαιμοπεταλιακή θεραπεία.

Μελετήσαμε συνολικά 61 ασθενείς, ηλικίας  $58,8 \pm 11,5$  έτη, (47 άνδρες και 14 γυναίκες), ΟΣΣ [οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου (ΟΕΜ) με ή χωρίς ανάσπαση του διαστήματος ST στο ηλεκτροκαρδιογράφημα ή ασταθής στηθάγχη) που προσήλθαν στο Τμήμα Επειγόντων Περιστατικών του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ιωαννίνων μέσα σε 24 ώρες από την έναρξη των συμπτωμάτων. Δείγματα αίματος πάρθηκαν στο Τμήμα Επειγόντων Περιστατικών πριν την έναρξη οποιασδήποτε αγωγής, καθώς και 5 και 30 ημέρες μετά τη δόση φόρτισης με κλοπιδογρέλη (600 mg).

Για τον προσδιορισμό της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων χρησιμοποιήθηκε συσσωρευομετρία με μετάδοση φωτός σε πλάσμα πλούσιο σε αιμοπετάλια με τη βοήθεια

των αγωνιστών ADP (2,5, 5,0 και 10,0  $\mu$ M) και TRAP 10  $\mu$ M. Η % μέγιστη αναστολή της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων (IPA %) επιτεύχθηκε σε 3 min από την προσθήκη του αγωνιστή. Ο έλεγχος της απόκρισης στην αντιαιμοπεταλιακή αγωγή πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο VASP που βασίζεται στη φωσφορυλίωση της πρωτεΐνης VASP (vasodilator-stimulated protein). Η ανάλυση πραγματοποιήθηκε με κυτταρομετρία ροής και προσδιορίστηκε ο δείκτης PRI (platelet reactivity index). Η παραγωγή των μικροσωματιδίων των αιμοπεταλίων (PMPs) και η μεμβρανική έκφραση του CD40L μελετήθηκαν με τη βοήθεια κυτταρομετρίας ροής σε πλάσμα πλούσιο σε αιμοπετάλια πριν και μετά την ενεργοποίηση με ADP ή TRAP (50 $\mu$ M). Τα PMPs χαρακτηρίστηκαν ως θετικά σωματίδια σε CD61 και Annexin-V και η έκφραση του CD40L χαρακτηρίστηκε ως το ποσοστό των θετικών κυττάρων σε CD61 και CD154. Ο σχηματισμός των συσσωματωμάτων αιμοπεταλίων-μονοκυττάρων και αιμοπεταλίων-ουδετεροφίλων πριν και μετά την ενεργοποίηση με ADP ή TRAP (100  $\mu$ M) εκτιμήθηκε σε ολικό αίμα με κυτταρομετρία ροής, χρησιμοποιώντας τα αντισώματα anti-CD61-PerCP και anti-CD14-FITC για τα μονοκύτταρα και τα αντισώματα anti-CD41a-FITC και anti-CD45-PE για τα ουδετερόφιλα. Η έκφραση της P-σελεκτίνης αναλύθηκε με την ίδια μεθοδολογία χρησιμοποιώντας το αντίσωμα anti-CD62P-PE.

Δεκαπέντε ασθενείς (24,6% του συνόλου) παρουσίασαν τιμές PRI  $\geq$ 50% (mean $\pm$ SD, 64.5 $\pm$ 13.4%) σύμφωνα με την ανάλυση της φωσφορυλίωσης της πρωτεΐνης VASP στις 5 ημέρες της παρακολούθησης και θεωρήθηκαν ως ασθενείς με κακή απόκριση στην κλοπιδογρέλη. Μία μέγιστη αναστολή της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων που επάγεται από το ADP ή το TRAP στους 46 ασθενείς με καλή απόκριση στην κλοπιδογρέλη παρατηρήθηκε στις 5 ημέρες από τη φόρτιση του φαρμάκου, ενώ στους ασθενείς με κακή απόκριση παρατηρήθηκε στις 30 ημέρες, ταυτόχρονα με μια σημαντική μείωση στις PRI τιμές. Παρόμοια αποτελέσματα παρατηρήθηκαν για τη μεμβρανική

έκφραση του CD40L και την παραγωγή των PMPs, ανάλυση που έγινε στους πρώτους 40 ασθενείς της μελέτης. Αντίθετα, η μέγιστη αναστολή της έκφρασης της P-σελεκτίνης και του σχηματισμού των συσσωματωμάτων αιμοπεταλίων-λευκών αιμοσφαιρίων παρατηρήθηκε στις 30 ημέρες και για τις δύο ομάδες ασθενών. Πρέπει να σημειωθεί ότι στους ασθενείς με κακή απόκριση στην κλοπιδογρέλη, αυτοί που υπεβλήθησαν σε αγγειοπλαστική είχαν υψηλότερα επίπεδα έκφρασης P-σελεκτίνης και σχηματισμού των συσσωματωμάτων αιμοπεταλίων-λευκών αιμοσφαιρίων στις 5 ημέρες της παρακολούθησης σε σύγκριση με τους ασθενείς που ακολούθησαν συντηρητική αντιμετώπιση, ενώ στις 30 ημέρες η φλεγμονώδης απάντηση που διαμεσολαβείται από τα αιμοπετάλια ήταν σημαντικά μειωμένη και στους ασθενείς που υπεβλήθησαν σε αγγειοπλαστική και σε αυτούς που ακολούθησαν συντηρητική θεραπεία.

Συμπερασματικά, μία δόση συντήρησης 75 mg κλοπιδογρέλης επηρεάζει με διαφορετικό τρόπο τη συσσώρευση των αιμοπεταλίων και τους προθρομβωτικούς και προφλεγμονώδεις διαμεσολαβητές που επάγονται από τα αιμοπετάλια σε ασθενείς με ΟΣΣ μέσα στον πρώτο μήνα θεραπείας, ένα φαινόμενο το οποίο επηρεάζεται πολύ σημαντικά από την ποικιλομορφία της απόκρισης στο φάρμακο. Μιας και οι αναφερόμενοι διαμεσολαβητές των αιμοπεταλίων μπορεί να εμπλέκονται σε μείζονα ανεπιθύμητα καρδιαγγειακά συμβάντα σε ασθενείς με ΟΣΣ, και ειδικά σε αυτούς που υποβάλλονται σε PCI, η κλινική σημασία αυτών των αποτελεσμάτων πρέπει να διερευνηθεί περαιτέρω.



## SUMMARY

**The effect of antiplatelet drugs on thrombosis and inflammation in patients with acute coronary syndromes.**

Platelets are involved in thrombus formation and inflammation following vascular injury, playing a dominant role in the pathogenesis and outcome of acute coronary syndromes (ACS). Therefore, antiplatelet drugs represent a cornerstone intervention in the prevention and management of ACS. Clopidogrel, a thienopyridine that irreversibly binds to the purinergic P2Y<sub>12</sub> receptor of the platelet membrane and inhibits platelet activation by adenosine diphosphate (ADP), is a widely used antiplatelet agent that exerts antithrombotic and anti-inflammatory actions.

In the present study we investigated various platelet-derived prothrombotic and proinflammatory mediators as well as the platelet aggregatory response in patients with acute coronary syndromes (ACS) receiving clopidogrel, as a function of the patient responsiveness to drug treatment.

We studied 61 patients, aged  $58.8 \pm 11.5$  years, (47 men) with an ACS [acute myocardial infarction (AMI) with or without ST elevation or high risk unstable angina] presenting within 24 h from the onset of symptoms. Blood samples were obtained before clopidogrel loading 600 mg (followed by a maintenance dose of 75 mg/day) as well as 5-days and 30-days afterwards.

Light transmittance aggregometry in platelet-rich plasma was performed using ADP (2.5, 5 and 10  $\mu$ M) or TRAP (10  $\mu$ M) as an agonist. Percent inhibition of maximum platelet aggregation (IPA,%) achieved within 3 min after the addition of the agonist was

defined. Flow cytometric analysis of vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP) phosphorylation was performed for the drug response analysis and the platelet reactivity index (PRI) was calculated. The production of platelet-derived microparticles (PMPs) and the membrane expression of CD40L were studied in PRP activated with ADP or TRAP (50  $\mu$ M for either agonist) by flow cytometry. PMPs were characterized as the percentage of CD61 and Annexin-V positive particles. CD40L membrane expression was expressed as the percentage of CD61 and CD154 positive cells. Formation of platelet-monocyte and platelet-neutrophil conjugates before and after activation with 100 M of ADP or TRAP was assessed in whole blood by flow cytometry, using anti-CD61-PerCP and anti-CD14-FITC (for monocytes), or anti-CD41a-FITC and anti-CD45-PE (for neutrophils). The P-selectin membrane expression was evaluated under the above activation conditions using anti-CD62P-PE.

Fifteen patients exhibited platelet reactivity index (PRI) values higher than 50% (mean $\pm$ SD, 64.5 $\pm$ 13.4%) evaluated by the Vasodilator Stimulated Phosphoprotein (VASP) test at 5 days and were characterized as non responders. A maximum reduction of ADP- or TRAP-induced platelet aggregation in 46 clopidogrel responding patients was observed at 5 days postclopidogrel loading, whereas in nonresponders it was achieved at 30-days, along with a significant decrease in the PRI values. Similar results were obtained for the membrane expression of CD40L and the production of PMPs, in the analysis of the first 40 patients of the study. By contrast, the maximum inhibition of P-selectin expression and platelet-leukocyte conjugate formation was observed at 30-days in both patient groups. It should be mentioned that in non responders, at 5 days of follow-up, the PCI-treated patients exhibiting significantly higher levels of the above inflammatory markers compared with conservatively treated patients. However at 30 days, the platelet-mediated inflammation was significantly reduced in both PCI and conservatively treated patients



In conclusion, a maintenance dose of 75mg clopidogrel differentially affects the platelet aggregation and platelet-derived prothrombotic and proinflammatory mediators in ACS patients within the first month of the treatment, a phenomenon that is highly influenced by the drug response variability. Since these factors may be involved in the major adverse cardiovascular events in ACS patients, especially in those undergoing percutaneous coronary intervention (PCI), the above findings may be clinically important.



## ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. George JN. Platelets. *Lancet* 2000;355:1531-9.
2. Frojmovic MM, Panjwani R. Geometry of normal mammalian platelets by quantitative microscopic studies. *Biophys J* 1976;16:1071-89.
3. Rox JM, Bugert P, Muller J, et al. Gene expression analysis in platelets from a single donor: evaluation of a PCR-based amplification technique. *Clin Chem* 2004;50:2271-8.
4. Ni H, Freedman J. Platelets in hemostasis and thrombosis: role of integrins and their ligands. *Transfus Apher Sci* 2003;28:257-64.
5. Ruggeri ZM. Platelets in atherothrombosis. *Nat Med* 2002;8:1227-34.
6. White JG. The substructure of human platelet microtubules. *Blood* 1968;32:638-48.
7. Frojmovic MM, Milton JG, Duchastel A. Microscopic measurements of platelet aggregation reveal a low ADP-dependent process distinct from turbidometrically measured aggregation. *J Lab Clin Med* 1983;101:964-76.
8. Mustard JF, Packham MA, Kinlough-Rathbone RL, Perry DW, Regoeczi E. Fibrinogen and ADP-induced platelet aggregation. *Blood* 1978;52:453-66.
9. Peerschke EI. The platelet fibrinogen receptor. *Semin Hematol* 1985;22:241-59.
10. Jennings LK. Mechanisms of platelet activation: need for new strategies to protect against platelet-mediated atherothrombosis. *Thromb Haemost* 2009;102:248-57.
11. Reiner Z, Catapano AL, De Backer G, et al. ESC/EAS Guidelines for the management of dyslipidaemias: the Task Force for the management of dyslipidaemias of the European Society of Cardiology (ESC) and the European Atherosclerosis Society (EAS). *Eur Heart J* 2011;32:1769-818.
12. Ueno M, Kodali M, Tello-Montoliu A, Angiolillo DJ. Role of platelets and antiplatelet therapy in cardiovascular disease. *J Atheroscler Thromb* 2011;18:431-42.
13. Jennings LK. Role of platelets in atherothrombosis. *Am J Cardiol* 2009;103:4A-10A.
14. Muhlestein JB. Effect of antiplatelet therapy on inflammatory markers in atherothrombotic patients. *Thromb Haemost* 2010;103:71-82.
15. Brass LF. Thrombin and platelet activation. *Chest* 2003;124:18S-25S.
16. Davi G, Patrono C. Platelet activation and atherothrombosis. *N Engl J Med* 2007;357:2482-94.

17. Offermanns S. Activation of platelet function through G protein-coupled receptors. *Circ Res* 2006;99:1293-304.
18. Varga-Szabo D, Pleines I, Nieswandt B. Cell adhesion mechanisms in platelets. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2008;28:403-12.
19. Brummel KE, Paradis SG, Butenas S, Mann KG. Thrombin functions during tissue factor-induced blood coagulation. *Blood* 2002;100:148-52.
20. Mann KG. Thrombin formation. *Chest* 2003;124:4S-10S.
21. Coughlin SR. Protease-activated receptors in hemostasis, thrombosis and vascular biology. *J Thromb Haemost* 2005;3:1800-14.
22. Landis RC. Protease activated receptors: clinical relevance to hemostasis and inflammation. *Hematol Oncol Clin North Am* 2007;21:103-13.
23. Leger AJ, Covic L, Kuliopulos A. Protease-activated receptors in cardiovascular diseases. *Circulation* 2006;114:1070-7.
24. Martorell L, Martinez-Gonzalez J, Rodriguez C, Gentile M, Calvayrac O, Badimon L. Thrombin and protease-activated receptors (PARs) in atherothrombosis. *Thromb Haemost* 2008;99:305-15.
25. Vu TK, Hung DT, Wheaton VI, Coughlin SR. Molecular cloning of a functional thrombin receptor reveals a novel proteolytic mechanism of receptor activation. *Cell* 1991;64:1057-68.
26. De Candia E, Hall SW, Rutella S, Landolfi R, Andrews RK, De Cristofaro R. Binding of thrombin to glycoprotein Ib accelerates the hydrolysis of Par-1 on intact platelets. *J Biol Chem* 2001;276:4692-8.
27. Bouchard BA, Tracy PB. Platelets, leukocytes, and coagulation. *Curr Opin Hematol* 2001;8:263-9.
28. Heemskerk JW, Bevers EM, Lindhout T. Platelet activation and blood coagulation. *Thromb Haemost* 2002;88:186-93.
29. Siljander P, Farndale RW, Feijge MA, et al. Platelet adhesion enhances the glycoprotein VI-dependent procoagulant response: Involvement of p38 MAP kinase and calpain. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001;21:618-27.
30. Storey RF, Sanderson HM, White AE, May JA, Cameron KE, Heptinstall S. The central role of the P(2T) receptor in amplification of human platelet activation, aggregation, secretion and procoagulant activity. *Br J Haematol* 2000;110:925-34.
31. Gawaz M, Langer H, May AE. Platelets in inflammation and atherogenesis. *J Clin Invest* 2005;115:3378-84.

32. Langer HF, Gawaz M. Platelet-vessel wall interactions in atherosclerotic disease. *Thromb Haemost* 2008;99:480-6.
33. May AE, Seizer P, Gawaz M. Platelets: inflammatory firebugs of vascular walls. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2008;28:s5-10.
34. von Hundelshausen P, Weber C. Platelets as immune cells: bridging inflammation and cardiovascular disease. *Circ Res* 2007;100:27-40.
35. Weyrich AS, Zimmerman GA. Platelets: signaling cells in the immune continuum. *Trends Immunol* 2004;25:489-95.
36. Weber C. Platelets and chemokines in atherosclerosis: partners in crime. *Circ Res* 2005;96:612-6.
37. Cerletti C, Tamburrelli C, Izzi B, Gianfagna F, de Gaetano G. Platelet-leukocyte interactions in thrombosis. *Thromb Res* 2011.
38. May AE, Langer H, Seizer P, Bigalke B, Lindemann S, Gawaz M. Platelet-leukocyte interactions in inflammation and atherothrombosis. *Semin Thromb Hemost* 2007;33:123-7.
39. Chamorro A. Role of inflammation in stroke and atherothrombosis. *Cerebrovasc Dis* 2004;17 Suppl 3:1-5.
40. Gawaz M. Role of platelets in coronary thrombosis and reperfusion of ischemic myocardium. *Cardiovasc Res* 2004;61:498-511.
41. Palomo I, Toro C, Alarcon M. The role of platelets in the pathophysiology of atherosclerosis (Review). *Mol Med Report* 2008;1:179-84.
42. Gawaz M. Do platelets trigger atherosclerosis? *Thromb Haemost* 2003;90:971-2.
43. Gawaz M. Platelets in the onset of atherosclerosis. *Blood Cells Mol Dis* 2006;36:206-10.
44. Gawaz M, Brand K, Dickfeld T, et al. Platelets induce alterations of chemotactic and adhesive properties of endothelial cells mediated through an interleukin-1-dependent mechanism. Implications for atherogenesis. *Atherosclerosis* 2000;148:75-85.
45. Gawaz M, Neumann FJ, Dickfeld T, et al. Activated platelets induce monocyte chemotactic protein-1 secretion and surface expression of intercellular adhesion molecule-1 on endothelial cells. *Circulation* 1998;98:1164-71.
46. Stellos K, Gawaz M. Platelet interaction with progenitor cells: potential implications for regenerative medicine. *Thromb Haemost* 2007;98:922-9.

47. Egashira K. Clinical importance of endothelial function in arteriosclerosis and ischemic heart disease. *Circ J* 2002;66:529-33.
48. Subramaniam M, Frenette PS, Saffaripour S, Johnson RC, Hynes RO, Wagner DD. Defects in hemostasis in P-selectin-deficient mice. *Blood* 1996;87:1238-42.
49. Wegener KL, Partridge AW, Han J, et al. Structural basis of integrin activation by talin. *Cell* 2007;128:171-82.
50. Bombeli T, Schwartz BR, Harlan JM. Adhesion of activated platelets to endothelial cells: evidence for a GPIIb/IIIa-dependent bridging mechanism and novel roles for endothelial intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1), alpha5beta1 integrin, and GPIIb/IIIa. *J Exp Med* 1998;187:329-39.
51. Gawaz M, Neumann FJ, Dickfeld T, et al. Vitronectin receptor (alpha5beta1) mediates platelet adhesion to the luminal aspect of endothelial cells: implications for reperfusion in acute myocardial infarction. *Circulation* 1997;96:1809-18.
52. von Hundelshausen P, Koenen RR, Sack M, et al. Heterophilic interactions of platelet factor 4 and RANTES promote monocyte arrest on endothelium. *Blood* 2005;105:924-30.
53. von Hundelshausen P, Weber KS, Huo Y, et al. RANTES deposition by platelets triggers monocyte arrest on inflamed and atherosclerotic endothelium. *Circulation* 2001;103:1772-7.
54. Lindemann S, Tolley ND, Dixon DA, et al. Activated platelets mediate inflammatory signaling by regulated interleukin 1beta synthesis. *J Cell Biol* 2001;154:485-90.
55. von Hundelshausen P, Petersen F, Brandt E. Platelet-derived chemokines in vascular biology. *Thromb Haemost* 2007;97:704-13.
56. Henn V, Slupsky JR, Grafe M, et al. CD40 ligand on activated platelets triggers an inflammatory reaction of endothelial cells. *Nature* 1998;391:591-4.
57. Slupsky JR, Kalbas M, Willuweit A, Henn V, Kroczeck RA, Muller-Berghaus G. Activated platelets induce tissue factor expression on human umbilical vein endothelial cells by ligation of CD40. *Thromb Haemost* 1998;80:1008-14.
58. Santos-Martinez MJ, Medina C, Jurasz P, Radomski MW. Role of metalloproteinases in platelet function. *Thromb Res* 2008;121:535-42.
59. Zarbock A, Polanowska-Grabowska RK, Ley K. Platelet-neutrophil-interactions: linking hemostasis and inflammation. *Blood Rev* 2007;21:99-111.

60. Fernandes LS, Conde ID, Wayne Smith C, et al. Platelet-monocyte complex formation: effect of blocking PSGL-1 alone, and in combination with alphaIIb beta3 and alphaM beta2, in coronary stenting. *Thromb Res* 2003;111:171-7.
61. Santoso S, Sachs UJ, Kroll H, et al. The junctional adhesion molecule 3 (JAM-3) on human platelets is a counterreceptor for the leukocyte integrin Mac-1. *J Exp Med* 2002;196:679-91.
62. Rao RM, Yang L, Garcia-Cardena G, Luscinskas FW. Endothelial-dependent mechanisms of leukocyte recruitment to the vascular wall. *Circ Res* 2007;101:234-47.
63. Weber C, Fraemohs L, Dejama E. The role of junctional adhesion molecules in vascular inflammation. *Nat Rev Immunol* 2007;7:467-77.
64. Lievens D, Eijgelaar WJ, Biessen EA, Daemen MJ, Lutgens E. The multifunctionality of CD40L and its receptor CD40 in atherosclerosis. *Thromb Haemost* 2009;102:206-14.
65. Zirlik A, Maier C, Gerdes N, et al. CD40 ligand mediates inflammation independently of CD40 by interaction with Mac-1. *Circulation* 2007;115:1571-80.
66. Diacovo TG, deFougerolles AR, Bainton DF, Springer TA. A functional integrin ligand on the surface of platelets: intercellular adhesion molecule-2. *J Clin Invest* 1994;94:1243-51.
67. Dardik R, Shenkman B, Tamarin I, et al. Factor XIII mediates adhesion of platelets to endothelial cells through alpha(v)beta(3) and glycoprotein IIb/IIIa integrins. *Thromb Res* 2002;105:317-23.
68. Chavakis T, Santoso S, Clemetson KJ, et al. High molecular weight kininogen regulates platelet-leukocyte interactions by bridging Mac-1 and glycoprotein Ib. *J Biol Chem* 2003;278:45375-81.
69. Celi A, Pellegrini G, Lorenzet R, et al. P-selectin induces the expression of tissue factor on monocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994;91:8767-71.
70. Weyrich AS, Elstad MR, McEver RP, et al. Activated platelets signal chemokine synthesis by human monocytes. *J Clin Invest* 1996;97:1525-34.
71. Haselmayer P, Grosse-Hovest L, von Landenberg P, Schild H, Radsak MP. TREM-1 ligand expression on platelets enhances neutrophil activation. *Blood* 2007;110:1029-35.
72. Otterdal K, Smith C, Oie E, et al. Platelet-derived LIGHT induces inflammatory responses in endothelial cells and monocytes. *Blood* 2006;108:928-35.

73. Sandberg WJ, Halvorsen B, Yndestad A, et al. Inflammatory interaction between LIGHT and proteinase-activated receptor-2 in endothelial cells: potential role in atherogenesis. *Circ Res* 2009;104:60-8.
74. Takahashi T, Nishizawa Y, Hato F, et al. Neutrophil-activating activity and platelet-activating factor synthesis in cytokine-stimulated endothelial cells: reduced activity in growth-arrested cells. *Microvasc Res* 2007;73:29-34.
75. Horstman LL, Ahn YS. Platelet microparticles: a wide-angle perspective. *Crit Rev Oncol Hematol* 1999;30:111-42.
76. Diamant M, Tushuizen ME, Sturk A, Nieuwland R. Cellular microparticles: new players in the field of vascular disease? *Eur J Clin Invest* 2004;34:392-401.
77. George JN, Thoi LL, McManus LM, Reimann TA. Isolation of human platelet membrane microparticles from plasma and serum. *Blood* 1982;60:834-40.
78. Cauwenberghs S, Feijge MA, Harper AG, Sage SO, Curvers J, Heemskerk JW. Shedding of procoagulant microparticles from unstimulated platelets by integrin-mediated destabilization of actin cytoskeleton. *FEBS Lett* 2006;580:5313-20.
79. Morel O, Morel N, Freyssinet JM, Toti F. Platelet microparticles and vascular cells interactions: a checkpoint between the haemostatic and thrombotic responses. *Platelets* 2008;19:9-23.
80. Barry OP, Pratico D, Lawson JA, FitzGerald GA. Transcellular activation of platelets and endothelial cells by bioactive lipids in platelet microparticles. *J Clin Invest* 1997;99:2118-27.
81. Schwarz M, Katagiri Y, Kotani M, et al. Reversibility versus persistence of GPIIb/IIIa blocker-induced conformational change of GPIIb/IIIa (alphaIIb beta3, CD41/CD61). *J Pharmacol Exp Ther* 2004;308:1002-11.
82. George JN, Pickett EB, Saucerman S, et al. Platelet surface glycoproteins. Studies on resting and activated platelets and platelet membrane microparticles in normal subjects, and observations in patients during adult respiratory distress syndrome and cardiac surgery. *J Clin Invest* 1986;78:340-8.
83. Silverstein RL. Inflammation, atherosclerosis, and arterial thrombosis: role of the scavenger receptor CD36. *Cleve Clin J Med* 2009;76 Suppl 2:S27-30.
84. Baj-Krzyworzeka M, Majka M, Pratico D, et al. Platelet-derived microparticles stimulate proliferation, survival, adhesion, and chemotaxis of hematopoietic cells. *Exp Hematol* 2002;30:450-9.
85. Piccin A, Murphy WG, Smith OP. Circulating microparticles: pathophysiology and clinical implications. *Blood Rev* 2007;21:157-71.



86. Iwamoto S, Kawasaki T, Kambayashi J, Ariyoshi H, Monden M. Platelet microparticles: a carrier of platelet-activating factor? *Biochem Biophys Res Commun* 1996;218:940-4.
87. Connor J, Pak CH, Zwaal RF, Schroit AJ. Bidirectional transbilayer movement of phospholipid analogs in human red blood cells. Evidence for an ATP-dependent and protein-mediated process. *J Biol Chem* 1992;267:19412-7.
88. Fox JE, Austin CD, Boyles JK, Steffen PK. Role of the membrane skeleton in preventing the shedding of procoagulant-rich microvesicles from the platelet plasma membrane. *J Cell Biol* 1990;111:483-93.
89. Reininger AJ, Heijnen HF, Schumann H, Specht HM, Schramm W, Ruggeri ZM. Mechanism of platelet adhesion to von Willebrand factor and microparticle formation under high shear stress. *Blood* 2006;107:3537-45.
90. Miyazaki Y, Nomura S, Miyake T, et al. High shear stress can initiate both platelet aggregation and shedding of procoagulant containing microparticles. *Blood* 1996;88:3456-64.
91. Pontiggia L, Steiner B, Ulrichs H, Deckmyn H, Forestier M, Beer JH. Platelet microparticle formation and thrombin generation under high shear are effectively suppressed by a monoclonal antibody against GPIIb/IIIa. *Thromb Haemost* 2006;96:774-80.
92. Pereira J, Alfaro G, Goycoolea M, et al. Circulating platelet-derived microparticles in systemic lupus erythematosus. Association with increased thrombin generation and procoagulant state. *Thromb Haemost* 2006;95:94-9.
93. Nomura S, Tandon NN, Nakamura T, Cone J, Fukuhara S, Kambayashi J. High-shear-stress-induced activation of platelets and microparticles enhances expression of cell adhesion molecules in THP-1 and endothelial cells. *Atherosclerosis* 2001;158:277-87.
94. Tan KT, Lip GY. The potential role of platelet microparticles in atherosclerosis. *Thromb Haemost* 2005;94:488-92.
95. Horrevoets AJ. Plasminogen activator inhibitor 1 (PAI-1): in vitro activities and clinical relevance. *Br J Haematol* 2004;125:12-23.
96. Weber A, Koppen HO, Schror K. Platelet-derived microparticles stimulate coronary artery smooth muscle cell mitogenesis by a PDGF-independent mechanism. *Thromb Res* 2000;98:461-6.
97. Hansson GK. Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. *N Engl J Med* 2005;352:1685-95.

98. Agouni A, Lagrue-Lak-Hal AH, Ducluzeau PH, et al. Endothelial dysfunction caused by circulating microparticles from patients with metabolic syndrome. *Am J Pathol* 2008;173:1210-9.
99. Bakouboula B, Morel O, Faure A, et al. Procoagulant membrane microparticles correlate with the severity of pulmonary arterial hypertension. *Am J Respir Crit Care Med* 2008;177:536-43.
100. Bernal-Mizrachi L, Jy W, Fierro C, et al. Endothelial microparticles correlate with high-risk angiographic lesions in acute coronary syndromes. *Int J Cardiol* 2004;97:439-46.
101. Cherian P, Hankey GJ, Eikelboom JW, et al. Endothelial and platelet activation in acute ischemic stroke and its etiological subtypes. *Stroke* 2003;34:2132-7.
102. Ferreira AC, Peter AA, Mendez AJ, et al. Postprandial hypertriglyceridemia increases circulating levels of endothelial cell microparticles. *Circulation* 2004;110:3599-603.
103. Heloïre F, Weill B, Weber S, Batteux F. Aggregates of endothelial microparticles and platelets circulate in peripheral blood. Variations during stable coronary disease and acute myocardial infarction. *Thromb Res* 2003;110:173-80.
104. Inami N, Nomura S, Kikuchi H, et al. P-selectin and platelet-derived microparticles associated with monocyte activation markers in patients with pulmonary embolism. *Clin Appl Thromb Hemost* 2003;9:309-16.
105. Mallat Z, Benamer H, Hugel B, et al. Elevated levels of shed membrane microparticles with procoagulant potential in the peripheral circulating blood of patients with acute coronary syndromes. *Circulation* 2000;101:841-3.
106. Preston RA, Jy W, Jimenez JJ, et al. Effects of severe hypertension on endothelial and platelet microparticles. *Hypertension* 2003;41:211-7.
107. Sabatier F, Darmon P, Hugel B, et al. Type 1 and type 2 diabetic patients display different patterns of cellular microparticles. *Diabetes* 2002;51:2840-5.
108. van der Zee PM, Biro E, Ko Y, et al. P-selectin- and CD63-exposing platelet microparticles reflect platelet activation in peripheral arterial disease and myocardial infarction. *Clin Chem* 2006;52:657-64.
109. Aukrust P, Muller F, Ueland T, et al. Enhanced levels of soluble and membrane-bound CD40 ligand in patients with unstable angina. Possible reflection of T lymphocyte and platelet involvement in the pathogenesis of acute coronary syndromes. *Circulation* 1999;100:614-20.

110. Varo N, de Lemos JA, Libby P, et al. Soluble CD40L: risk prediction after acute coronary syndromes. *Circulation* 2003;108:1049-52.
111. Noto D, Cottone S, Baldassare Cefalu A, et al. Interleukin 6 plasma levels predict with high sensitivity and specificity coronary stenosis detected by coronary angiography. *Thromb Haemost* 2007;98:1362-7.
112. Ridker PM, Rifai N, Rose L, Buring JE, Cook NR. Comparison of C-reactive protein and low-density lipoprotein cholesterol levels in the prediction of first cardiovascular events. *N Engl J Med* 2002;347:1557-65.
113. Licata G, Tuttolomondo A, Di Raimondo D, Corrao S, Di Sciacca R, Pinto A. Immuno-inflammatory activation in acute cardio-embolic strokes in comparison with other subtypes of ischaemic stroke. *Thromb Haemost* 2009;101:929-37.
114. Solheim S, Pettersen AA, Arnesen H, Seljeflot I. No difference in the effects of clopidogrel and aspirin on inflammatory markers in patients with coronary heart disease. *Thromb Haemost* 2006;96:660-4.
115. Hoogeveen RC, Morrison A, Boerwinkle E, et al. Plasma MCP-1 level and risk for peripheral arterial disease and incident coronary heart disease: Atherosclerosis Risk in Communities study. *Atherosclerosis* 2005;183:301-7.
116. Albert MA, Glynn RJ, Buring JE, Ridker PM. Differential effect of soluble intercellular adhesion molecule-1 on the progression of atherosclerosis as compared to arterial thrombosis: a prospective analysis of the Women's Health Study. *Atherosclerosis* 2008;197:297-302.
117. Pradhan AD, Rifai N, Ridker PM. Soluble intercellular adhesion molecule-1, soluble vascular adhesion molecule-1, and the development of symptomatic peripheral arterial disease in men. *Circulation* 2002;106:820-5.
118. Ridker PM, Hennekens CH, Roitman-Johnson B, Stampfer MJ, Allen J. Plasma concentration of soluble intercellular adhesion molecule 1 and risks of future myocardial infarction in apparently healthy men. *Lancet* 1998;351:88-92.
119. Sarma J, Laan CA, Alam S, Jha A, Fox KA, Dransfield I. Increased platelet binding to circulating monocytes in acute coronary syndromes. *Circulation* 2002;105:2166-71.
120. Furman MI, Barnard MR, Krueger LA, et al. Circulating monocyte-platelet aggregates are an early marker of acute myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol* 2001;38:1002-6.
121. Garlich CD, Eskafi S, Raaz D, et al. Patients with acute coronary syndromes express enhanced CD40 ligand/CD154 on platelets. *Heart* 2001;86:649-55.

122. Michelson AD, Frelinger AL, 3rd, Furman MI. Current options in platelet function testing. *Am J Cardiol* 2006;98:4N-10N.
123. Ott I, Neumann FJ, Gawaz M, Schmitt M, Schomig A. Increased neutrophil-platelet adhesion in patients with unstable angina. *Circulation* 1996;94:1239-46.
124. Zebrack JS, Anderson JL, Maycock CA, Horne BD, Bair TL, Muhlestein JB. Usefulness of high-sensitivity C-reactive protein in predicting long-term risk of death or acute myocardial infarction in patients with unstable or stable angina pectoris or acute myocardial infarction. *Am J Cardiol* 2002;89:145-9.
125. Cattaneo M. Resistance to anti-platelet agents. *Thromb Res* 2011;127 Suppl 3:S61-3.
126. Patrono C, Collier B, FitzGerald GA, Hirsh J, Roth G. Platelet-active drugs: the relationships among dose, effectiveness, and side effects: the Seventh ACCP Conference on Antithrombotic and Thrombolytic Therapy. *Chest* 2004;126:234S-64S.
127. Awtry EH, Loscalzo J. Aspirin. *Circulation* 2000;101:1206-18.
128. Patrono C. Aspirin as an antiplatelet drug. *N Engl J Med* 1994;330:1287-94.
129. Anninos H, Andrikopoulos G, Pastromas S, Sakellariou D, Theodorakis G, Vardas P. Triflusal: an old drug in modern antiplatelet therapy. Review of its action, use, safety and effectiveness. *Hellenic J Cardiol* 2009;50:199-207.
130. Bertrand ME, Rupprecht HJ, Urban P, Gershlick AH. Double-blind study of the safety of clopidogrel with and without a loading dose in combination with aspirin compared with ticlopidine in combination with aspirin after coronary stenting : the clopidogrel aspirin stent international cooperative study (CLASSICS). *Circulation* 2000;102:624-9.
131. Kim KA, Park PW, Hong SJ, Park JY. The effect of CYP2C19 polymorphism on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of clopidogrel: a possible mechanism for clopidogrel resistance. *Clin Pharmacol Ther* 2008;84:236-42.
132. Hashemzadeh M, Goldsberry S, Furukawa M, Khoynzhad A, Movahed MR. ADP receptor-blocker thienopyridines: chemical structures, mode of action and clinical use. A review. *J Invasive Cardiol* 2009;21:406-12.
133. Brandt JT, Close SL, Iturria SJ, et al. Common polymorphisms of CYP2C19 and CYP2C9 affect the pharmacokinetic and pharmacodynamic response to clopidogrel but not prasugrel. *J Thromb Haemost* 2007;5:2429-36.
134. Kazui M, Nishiya Y, Ishizuka T, et al. Identification of the human cytochrome P450 enzymes involved in the two oxidative steps in the bioactivation of clopidogrel to its pharmacologically active metabolite. *Drug Metab Dispos* 2010;38:92-9.

135. Wallentin L, Varenhorst C, James S, et al. Prasugrel achieves greater and faster P2Y<sub>12</sub>receptor-mediated platelet inhibition than clopidogrel due to more efficient generation of its active metabolite in aspirin-treated patients with coronary artery disease. *Eur Heart J* 2008;29:21-30.
136. Mega JL, Close SL, Wiviott SD, et al. Cytochrome p-450 polymorphisms and response to clopidogrel. *N Engl J Med* 2009;360:354-62.
137. Jernberg T, Payne CD, Winters KJ, et al. Prasugrel achieves greater inhibition of platelet aggregation and a lower rate of non-responders compared with clopidogrel in aspirin-treated patients with stable coronary artery disease. *Eur Heart J* 2006;27:1166-73.
138. Varenhorst C, James S, Erlinge D, et al. Genetic variation of CYP2C19 affects both pharmacokinetic and pharmacodynamic responses to clopidogrel but not prasugrel in aspirin-treated patients with coronary artery disease. *Eur Heart J* 2009;30:1744-52.
139. Montalescot G, Wiviott SD, Braunwald E, et al. Prasugrel compared with clopidogrel in patients undergoing percutaneous coronary intervention for ST-elevation myocardial infarction (TRITON-TIMI 38): double-blind, randomised controlled trial. *Lancet* 2009;373:723-31.
140. Gurbel PA, Bliden KP, Butler K, et al. Randomized double-blind assessment of the ONSET and OFFSET of the antiplatelet effects of ticagrelor versus clopidogrel in patients with stable coronary artery disease: the ONSET/OFFSET study. *Circulation* 2009;120:2577-85.
141. Wallentin L, Becker RC, Budaj A, et al. Ticagrelor versus clopidogrel in patients with acute coronary syndromes. *N Engl J Med* 2009;361:1045-57.
142. Held C, Asenblad N, Bassand JP, et al. Ticagrelor versus clopidogrel in patients with acute coronary syndromes undergoing coronary artery bypass surgery: results from the PLATO (Platelet Inhibition and Patient Outcomes) trial. *J Am Coll Cardiol* 2011;57:672-84.
143. Akers WS, Oh JJ, Oestreich JH, Ferraris S, Wethington M, Steinhubl SR. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of a bolus and infusion of cangrelor: a direct, parenteral P2Y<sub>12</sub> receptor antagonist. *J Clin Pharmacol* 2010;50:27-35.
144. Ueno M, Rao SV, Angiolillo DJ. Elinogrel: pharmacological principles, preclinical and early phase clinical testing. *Future Cardiol* 2010;6:445-53.
145. Lenz T, Wilson A. Clinical pharmacokinetics of antiplatelet agents used in the secondary prevention of stroke. *Clin Pharmacokinet* 2003;42:909-20.

146. Lippi G, Montagnana M, Danese E, Favaloro EJ, Franchini M. Glycoprotein IIb/IIIa inhibitors: an update on the mechanism of action and use of functional testing methods to assess antiplatelet efficacy. *Biomark Med* 2011;5:63-70.
147. Papathanasiou A, Goudevenos J, Tselepis AD. Resistance to aspirin and clopidogrel: possible mechanisms, laboratory investigation, and clinical significance. *Hellenic J Cardiol* 2007;48:352-63.
148. Savi P, Combalbert J, Gaich C, et al. The antiaggregating activity of clopidogrel is due to a metabolic activation by the hepatic cytochrome P450-1A. *Thromb Haemost* 1994;72:313-7.
149. Geisler T, Schaeffeler E, Dippon J, et al. CYP2C19 and nongenetic factors predict poor responsiveness to clopidogrel loading dose after coronary stent implantation. *Pharmacogenomics* 2008;9:1251-9.
150. Hochholzer W, Trenk D, Fromm MF, et al. Impact of cytochrome P450 2C19 loss-of-function polymorphism and of major demographic characteristics on residual platelet function after loading and maintenance treatment with clopidogrel in patients undergoing elective coronary stent placement. *J Am Coll Cardiol* 2010;55:2427-34.
151. Shuldiner AR, O'Connell JR, Bliden KP, et al. Association of cytochrome P450 2C19 genotype with the antiplatelet effect and clinical efficacy of clopidogrel therapy. *JAMA* 2009;302:849-57.
152. Angiolillo DJ, Saucedo JF, Deraad R, et al. Increased platelet inhibition after switching from maintenance clopidogrel to prasugrel in patients with acute coronary syndromes: results of the SWAP (SWitching Anti Platelet) study. *J Am Coll Cardiol* 2010;56:1017-23.
153. Wiviott SD, Trenk D, Frelinger AL, et al. Prasugrel compared with high loading- and maintenance-dose clopidogrel in patients with planned percutaneous coronary intervention: the Prasugrel in Comparison to Clopidogrel for Inhibition of Platelet Activation and Aggregation-Thrombolysis in Myocardial Infarction 44 trial. *Circulation* 2007;116:2923-32.
154. Gurbel PA, Bliden KP, DiChiara J, et al. Evaluation of dose-related effects of aspirin on platelet function: results from the Aspirin-Induced Platelet Effect (ASPECT) study. *Circulation* 2007;115:3156-64.
155. Farid NA, Small DS, Payne CD, et al. Effect of atorvastatin on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of prasugrel and clopidogrel in healthy subjects. *Pharmacotherapy* 2008;28:1483-94.
156. Bonello L, Camoin-Jau L, Arques S, et al. Adjusted clopidogrel loading doses according to vasodilator-stimulated phosphoprotein phosphorylation index decrease

- rate of major adverse cardiovascular events in patients with clopidogrel resistance: a multicenter randomized prospective study. *J Am Coll Cardiol* 2008;51:1404-11.
157. Michelson AD. Methods for the measurement of platelet function. *Am J Cardiol* 2009;103:20A-6A.
  158. Rinder HM. Platelet function testing by flow cytometry. *Clin Lab Sci* 1998;11:365-72.
  159. van Werkum JW, Harmsze AM, Elsenberg EH, Bouman HJ, ten Berg JM, Hackeng CM. The use of the VerifyNow system to monitor antiplatelet therapy: a review of the current evidence. *Platelets* 2008;19:479-88.
  160. Harrison P, Frelinger AL, 3rd, Furman MI, Michelson AD. Measuring antiplatelet drug effects in the laboratory. *Thromb Res* 2007;120:323-36.
  161. Sibbing D, Morath T, Stegherr J, et al. Impact of proton pump inhibitors on the antiplatelet effects of clopidogrel. *Thromb Haemost* 2009;101:714-9.
  162. Vlachojannis GJ, Dimitropoulos G, Alexopoulos D. Clopidogrel resistance: current aspects and future directions. *Hellenic J Cardiol* 2011;52:236-45.
  163. Ben-Dor I, Kleiman NS, Lev E. Assessment, mechanisms, and clinical implication of variability in platelet response to aspirin and clopidogrel therapy. *Am J Cardiol* 2009;104:227-33.
  164. Gurbel PA, Tantry US. Clopidogrel resistance? *Thromb Res* 2007;120:311-21.
  165. Dupont AG, Gabriel DA, Cohen MG. Antiplatelet therapies and the role of antiplatelet resistance in acute coronary syndrome. *Thromb Res* 2009;124:6-13.
  166. Bonello L, Tantry US, Marcucci R, et al. Consensus and future directions on the definition of high on-treatment platelet reactivity to adenosine diphosphate. *J Am Coll Cardiol* 2010;56:919-33.
  167. Hulot JS, Bura A, Villard E, et al. Cytochrome P450 2C19 loss-of-function polymorphism is a major determinant of clopidogrel responsiveness in healthy subjects. *Blood* 2006;108:2244-7.
  168. Desta Z, Zhao X, Shin JG, Flockhart DA. Clinical significance of the cytochrome P450 2C19 genetic polymorphism. *Clin Pharmacokinet* 2002;41:913-58.
  169. Fontana P, Hulot JS, De Moerloose P, Gaussem P. Influence of CYP2C19 and CYP3A4 gene polymorphisms on clopidogrel responsiveness in healthy subjects. *J Thromb Haemost* 2007;5:2153-5.

170. Frere C, Cuisset T, Morange PE, et al. Effect of cytochrome p450 polymorphisms on platelet reactivity after treatment with clopidogrel in acute coronary syndrome. *Am J Cardiol* 2008;101:1088-93.
171. Jinnai T, Horiuchi H, Makiyama T, et al. Impact of CYP2C19 polymorphisms on the antiplatelet effect of clopidogrel in an actual clinical setting in Japan. *Circ J* 2009;73:1498-503.
172. Gladding P, Webster M, Zeng I, et al. The pharmacogenetics and pharmacodynamics of clopidogrel response: an analysis from the PRINC (Plavix Response in Coronary Intervention) trial. *JACC Cardiovasc Interv* 2008;1:620-7.
173. Lee JM, Park S, Shin DJ, et al. Relation of genetic polymorphisms in the cytochrome P450 gene with clopidogrel resistance after drug-eluting stent implantation in Koreans. *Am J Cardiol* 2009;104:46-51.
174. Gilard M, Arnaud B, Le Gal G, Abgrall JF, Bosch J. Influence of omeprazol on the antiplatelet action of clopidogrel associated to aspirin. *J Thromb Haemost* 2006;4:2508-9.
175. Cuisset T, Frere C, Quilici J, et al. Comparison of omeprazole and pantoprazole influence on a high 150-mg clopidogrel maintenance dose the PACA (Proton Pump Inhibitors And Clopidogrel Association) prospective randomized study. *J Am Coll Cardiol* 2009;54:1149-53.
176. Chong E, Ensom MH. Pharmacogenetics of the proton pump inhibitors: a systematic review. *Pharmacotherapy* 2003;23:460-71.
177. Siller-Matula JM, Spiel AO, Lang IM, Kreiner G, Christ G, Jilma B. Effects of pantoprazole and esomeprazole on platelet inhibition by clopidogrel. *Am Heart J* 2009;157:148 e1-5.
178. Price MJ, Nayak KR, Barker CM, Kandzari DE, Teirstein PS. Predictors of heightened platelet reactivity despite dual-antiplatelet therapy in patients undergoing percutaneous coronary intervention. *Am J Cardiol* 2009;103:1339-43.
179. Bhatt DL, Lincoff AM, Gibson CM, et al. Intravenous platelet blockade with cangrelor during PCI. *N Engl J Med* 2009;361:2330-41.
180. Clarke TA, Waskell LA. The metabolism of clopidogrel is catalyzed by human cytochrome P450 3A and is inhibited by atorvastatin. *Drug Metab Dispos* 2003;31:53-9.
181. Lau WC, Waskell LA, Watkins PB, et al. Atorvastatin reduces the ability of clopidogrel to inhibit platelet aggregation: a new drug-drug interaction. *Circulation* 2003;107:32-7.



182. Neubauer H, Gunesdogan B, Hanefeld C, Spiecker M, Mugge A. Lipophilic statins interfere with the inhibitory effects of clopidogrel on platelet function--a flow cytometry study. *Eur Heart J* 2003;24:1744-9.
183. Geisler T, Zurn C, Paterok M, et al. Statins do not adversely affect post-interventional residual platelet aggregation and outcomes in patients undergoing coronary stenting treated by dual antiplatelet therapy. *Eur Heart J* 2008;29:1635-43.
184. Hong SJ, Park JY, Kim KA, et al. Comparison of low vs moderate dose of atorvastatin in clopidogrel resistance after coronary stenting in Korean patients with acute coronary syndrome. *Circ J* 2009;73:1111-8.
185. Mitsios JV, Papathanasiou AI, Rodis FI, Elisaf M, Goudevenos JA, Tselepis AD. Atorvastatin does not affect the antiplatelet potency of clopidogrel when it is administered concomitantly for 5 weeks in patients with acute coronary syndromes. *Circulation* 2004;109:1335-8.
186. Riondino S, Petrini N, Donato L, et al. Effects of rosuvastatin on platelet inhibition by clopidogrel in cardiovascular patients. *J Thromb Thrombolysis* 2009;28:151-5.
187. Barragan P, Bouvier JL, Roquebert PO, et al. Resistance to thienopyridines: clinical detection of coronary stent thrombosis by monitoring of vasodilator-stimulated phosphoprotein phosphorylation. *Catheter Cardiovasc Interv* 2003;59:295-302.
188. Geisler T, Zurn C, Simonenko R, et al. Early but not late stent thrombosis is influenced by residual platelet aggregation in patients undergoing coronary interventions. *Eur Heart J* 2010;31:59-66.
189. Gurbel PA, Bliden KP, Samara W, et al. Clopidogrel effect on platelet reactivity in patients with stent thrombosis: results of the CREST Study. *J Am Coll Cardiol* 2005;46:1827-32.
190. Price MJ, Endemann S, Gollapudi RR, et al. Prognostic significance of post-clopidogrel platelet reactivity assessed by a point-of-care assay on thrombotic events after drug-eluting stent implantation. *Eur Heart J* 2008;29:992-1000.
191. Angiolillo DJ, Fernandez-Ortiz A, Bernardo E, et al. High clopidogrel loading dose during coronary stenting: effects on drug response and interindividual variability. *Eur Heart J* 2004;25:1903-10.
192. Gurbel PA, Bliden KP, Hayes KM, Yoho JA, Herzog WR, Tantry US. The relation of dosing to clopidogrel responsiveness and the incidence of high post-treatment platelet aggregation in patients undergoing coronary stenting. *J Am Coll Cardiol* 2005;45:1392-6.
193. Gurbel PA, Bliden KP, Zaman KA, Yoho JA, Hayes KM, Tantry US. Clopidogrel loading with eptifibatid to arrest the reactivity of platelets: results of the Clopidogrel

Loading With Eptifibatide to Arrest the Reactivity of Platelets (CLEAR PLATELETS) study. *Circulation* 2005;111:1153-9.

194. von Beckerath N, Taubert D, Pogatsa-Murray G, Schomig E, Kastrati A, Schomig A. Absorption, metabolization, and antiplatelet effects of 300-, 600-, and 900-mg loading doses of clopidogrel: results of the ISAR-CHOICE (Intracoronary Stenting and Antithrombotic Regimen: Choose Between 3 High Oral Doses for Immediate Clopidogrel Effect) Trial. *Circulation* 2005;112:2946-50.
195. Mehta SR, Bassand JP, Chrolavicius S, et al. Dose comparisons of clopidogrel and aspirin in acute coronary syndromes. *N Engl J Med* 2010;363:930-42.
196. Price MJ, Berger PB, Teirstein PS, et al. Standard- vs high-dose clopidogrel based on platelet function testing after percutaneous coronary intervention: the GRAVITAS randomized trial. *JAMA* 2011;305:1097-105.
197. Montalescot G, Sideris G, Cohen R, et al. Prasugrel compared with high-dose clopidogrel in acute coronary syndrome. The randomised, double-blind ACAPULCO study. *Thromb Haemost* 2010;103:213-23.
198. Alexopoulos D, Dimitropoulos G, Davlourous P, et al. Prasugrel overcomes high on-clopidogrel platelet reactivity post-stenting more effectively than high-dose (150-mg) clopidogrel: the importance of CYP2C19\*2 genotyping. *JACC Cardiovasc Interv* 2011;4:403-10.
199. Pena A, Collet JP, Hulot JS, et al. Can we override clopidogrel resistance? *Circulation* 2009;119:2854-7.
200. Ochiai M, Eto K, Takeshita S, et al. Impact of cilostazol on clinical and angiographic outcome after primary stenting for acute myocardial infarction. *Am J Cardiol* 1999;84:1074-6, A6, A9.
201. Douglas JS, Jr., Holmes DR, Jr., Kereiakes DJ, et al. Coronary stent restenosis in patients treated with cilostazol. *Circulation* 2005;112:2826-32.
202. Han Y, Li Y, Wang S, et al. Cilostazol in addition to aspirin and clopidogrel improves long-term outcomes after percutaneous coronary intervention in patients with acute coronary syndromes: a randomized, controlled study. *Am Heart J* 2009;157:733-9.
203. Lee SW, Park SW, Hong MK, et al. Triple versus dual antiplatelet therapy after coronary stenting: impact on stent thrombosis. *J Am Coll Cardiol* 2005;46:1833-7.
204. Kim JY, Lee K, Shin M, et al. Cilostazol could ameliorate platelet responsiveness to clopidogrel in patients undergoing primary percutaneous coronary intervention. *Circ J* 2007;71:1867-72.

205. Jeong YH, Lee SW, Choi BR, et al. Randomized comparison of adjunctive cilostazol versus high maintenance dose clopidogrel in patients with high post-treatment platelet reactivity: results of the ACCEL-RESISTANCE (Adjunctive Cilostazol Versus High Maintenance Dose Clopidogrel in Patients With Clopidogrel Resistance) randomized study. *J Am Coll Cardiol* 2009;53:1101-9.
206. Husted S, Emanuelsson H, Heptinstall S, Sandset PM, Wickens M, Peters G. Pharmacodynamics, pharmacokinetics, and safety of the oral reversible P2Y<sub>12</sub> antagonist AZD6140 with aspirin in patients with atherosclerosis: a double-blind comparison to clopidogrel with aspirin. *Eur Heart J* 2006;27:1038-47.
207. Gurbel PA, Bliden KP, Butler K, et al. Response to ticagrelor in clopidogrel nonresponders and responders and effect of switching therapies: the RESPOND study. *Circulation* 2010;121:1188-99.
208. Harrington RA, Stone GW, McNulty S, et al. Platelet inhibition with cangrelor in patients undergoing PCI. *N Engl J Med* 2009;361:2318-29.
209. Bouman HJ, van Werkum JW, Hackeng CM, Clappers N, Ten Berg JM. Cangrelor increases the magnitude of platelet inhibition and reduces interindividual variability in clopidogrel-pretreated subjects. *Neth Heart J* 2009;17:195-8.
210. Leon MB, Baim DS, Popma JJ, et al. A clinical trial comparing three antithrombotic-drug regimens after coronary-artery stenting. Stent Anticoagulation Restenosis Study Investigators. *N Engl J Med* 1998;339:1665-71.
211. Yusuf S, Zhao F, Mehta SR, Chrolavicius S, Tognoni G, Fox KK. Effects of clopidogrel in addition to aspirin in patients with acute coronary syndromes without ST-segment elevation. *N Engl J Med* 2001;345:494-502.
212. Mehta SR, Yusuf S, Peters RJ, et al. Effects of pretreatment with clopidogrel and aspirin followed by long-term therapy in patients undergoing percutaneous coronary intervention: the PCI-CURE study. *Lancet* 2001;358:527-33.
213. Steinhubl SR, Berger PB, Mann JT, 3rd, et al. Early and sustained dual oral antiplatelet therapy following percutaneous coronary intervention: a randomized controlled trial. *JAMA* 2002;288:2411-20.
214. Sabatine MS, Cannon CP, Gibson CM, et al. Addition of clopidogrel to aspirin and fibrinolytic therapy for myocardial infarction with ST-segment elevation. *N Engl J Med* 2005;352:1179-89.
215. Sabatine MS, Cannon CP, Gibson CM, et al. Effect of clopidogrel pretreatment before percutaneous coronary intervention in patients with ST-elevation myocardial infarction treated with fibrinolytics: the PCI-CLARITY study. *JAMA* 2005;294:1224-32.

216. Chen ZM, Jiang LX, Chen YP, et al. Addition of clopidogrel to aspirin in 45,852 patients with acute myocardial infarction: randomised placebo-controlled trial. *Lancet* 2005;366:1607-21.
217. Mehta SR, Tanguay JF, Eikelboom JW, et al. Double-dose versus standard-dose clopidogrel and high-dose versus low-dose aspirin in individuals undergoing percutaneous coronary intervention for acute coronary syndromes (CURRENT-OASIS 7): a randomised factorial trial. *Lancet* 2010;376:1233-43.
218. Dangas G, Mehran R, Guagliumi G, et al. Role of clopidogrel loading dose in patients with ST-segment elevation myocardial infarction undergoing primary angioplasty: results from the HORIZONS-AMI (harmonizing outcomes with revascularization and stents in acute myocardial infarction) trial. *J Am Coll Cardiol* 2009;54:1438-46.
219. Wiviott SD, Braunwald E, McCabe CH, et al. Prasugrel versus clopidogrel in patients with acute coronary syndromes. *N Engl J Med* 2007;357:2001-15.
220. Wiviott SD, Braunwald E, Angiolillo DJ, et al. Greater clinical benefit of more intensive oral antiplatelet therapy with prasugrel in patients with diabetes mellitus in the trial to assess improvement in therapeutic outcomes by optimizing platelet inhibition with prasugrel-Thrombolysis in Myocardial Infarction 38. *Circulation* 2008;118:1626-36.
221. Cannon CP, Harrington RA, James S, et al. Comparison of ticagrelor with clopidogrel in patients with a planned invasive strategy for acute coronary syndromes (PLATO): a randomised double-blind study. *Lancet* 2010;375:283-93.
222. Bellemain-Appaix A, Brieger D, Beygui F, et al. New P2Y12 inhibitors versus clopidogrel in percutaneous coronary intervention: a meta-analysis. *J Am Coll Cardiol* 2010;56:1542-51.
223. A randomised, blinded, trial of clopidogrel versus aspirin in patients at risk of ischaemic events (CAPRIE). CAPRIE Steering Committee. *Lancet* 1996;348:1329-39.
224. Ringleb PA, Bhatt DL, Hirsch AT, Topol EJ, Hacke W. Benefit of clopidogrel over aspirin is amplified in patients with a history of ischemic events. *Stroke* 2004;35:528-32.
225. Bhatt DL, Chew DP, Hirsch AT, Ringleb PA, Hacke W, Topol EJ. Superiority of clopidogrel versus aspirin in patients with prior cardiac surgery. *Circulation* 2001;103:363-8.

226. Bhatt DL, Marso SP, Hirsch AT, Ringleb PA, Hacke W, Topol EJ. Amplified benefit of clopidogrel versus aspirin in patients with diabetes mellitus. *Am J Cardiol* 2002;90:625-8.
227. Bhatt DL, Fox KA, Hacke W, et al. Clopidogrel and aspirin versus aspirin alone for the prevention of atherothrombotic events. *N Engl J Med* 2006;354:1706-17.
228. Bhatt DL, Flather MD, Hacke W, et al. Patients with prior myocardial infarction, stroke, or symptomatic peripheral arterial disease in the CHARISMA trial. *J Am Coll Cardiol* 2007;49:1982-8.
229. Diener HC, Bogousslavsky J, Brass LM, et al. Aspirin and clopidogrel compared with clopidogrel alone after recent ischaemic stroke or transient ischaemic attack in high-risk patients (MATCH): randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet* 2004;364:331-7.
230. Sacco RL, Diener HC, Yusuf S, et al. Aspirin and extended-release dipyridamole versus clopidogrel for recurrent stroke. *N Engl J Med* 2008;359:1238-51.
231. Montalescot G, Sideris G, Meuleman C, et al. A randomized comparison of high clopidogrel loading doses in patients with non-ST-segment elevation acute coronary syndromes: the ALBION (Assessment of the Best Loading Dose of Clopidogrel to Blunt Platelet Activation, Inflammation and Ongoing Necrosis) trial. *J Am Coll Cardiol* 2006;48:931-8.
232. Patti G, Colonna G, Pasceri V, Pepe LL, Montinaro A, Di Sciascio G. Randomized trial of high loading dose of clopidogrel for reduction of periprocedural myocardial infarction in patients undergoing coronary intervention: results from the ARMYDA-2 (Antiplatelet therapy for Reduction of MYocardial Damage during Angioplasty) study. *Circulation* 2005;111:2099-106.
233. Cuisset T, Frere C, Quilici J, et al. Benefit of a 600-mg loading dose of clopidogrel on platelet reactivity and clinical outcomes in patients with non-ST-segment elevation acute coronary syndrome undergoing coronary stenting. *J Am Coll Cardiol* 2006;48:1339-45.
234. Patti G, Grieco D, Dicuonzo G, Pasceri V, Nusca A, Di Sciascio G. High versus standard clopidogrel maintenance dose after percutaneous coronary intervention and effects on platelet inhibition, endothelial function, and inflammation results of the ARMYDA-150 mg (antiplatelet therapy for reduction of myocardial damage during angioplasty) randomized study. *J Am Coll Cardiol* 2011;57:771-8.
235. von Beckerath N, Kastrati A, Wiecek A, et al. A double-blind, randomized study on platelet aggregation in patients treated with a daily dose of 150 or 75 mg of clopidogrel for 30 days. *Eur Heart J* 2007;28:1814-9.

236. Weber C, Erl W, Pietsch A, Weber PC. Aspirin inhibits nuclear factor-kappa B mobilization and monocyte adhesion in stimulated human endothelial cells. *Circulation* 1995;91:1914-7.
237. Li N, Hu H, Hjemdahl P. Aspirin treatment does not attenuate platelet or leukocyte activation as monitored by whole blood flow cytometry. *Thromb Res* 2003;111:165-70.
238. Ikonomidis I, Andreotti F, Economou E, Stefanadis C, Toutouzas P, Nihoyannopoulos P. Increased proinflammatory cytokines in patients with chronic stable angina and their reduction by aspirin. *Circulation* 1999;100:793-8.
239. Solheim S, Arnesen H, Eikvar L, Hurlen M, Seljeflot I. Influence of aspirin on inflammatory markers in patients after acute myocardial infarction. *Am J Cardiol* 2003;92:843-5.
240. Evangelista V, Manarini S, Dell'Elba G, et al. Clopidogrel inhibits platelet-leukocyte adhesion and platelet-dependent leukocyte activation. *Thromb Haemost* 2005;94:568-77.
241. Frelinger AL, 3rd, Jakubowski JA, Li Y, et al. The active metabolite of prasugrel inhibits ADP-stimulated thrombo-inflammatory markers of platelet activation: Influence of other blood cells, calcium, and aspirin. *Thromb Haemost* 2007;98:192-200.
242. Judge HM, Buckland RJ, Sugidachi A, Jakubowski JA, Storey RF. The active metabolite of prasugrel effectively blocks the platelet P2Y12 receptor and inhibits procoagulant and pro-inflammatory platelet responses. *Platelets* 2008;19:125-33.
243. Xiao Z, Theroux P. Clopidogrel inhibits platelet-leukocyte interactions and thrombin receptor agonist peptide-induced platelet activation in patients with an acute coronary syndrome. *J Am Coll Cardiol* 2004;43:1982-8.
244. Steinhubl SR, Topol EJ. Risk reduction with long-term clopidogrel following percutaneous coronary intervention. *Eur Heart J* 2004;25:2169-70; author reply 70-1.
245. Klinkhardt U, Bauersachs R, Adams J, Graff J, Lindhoff-Last E, Harder S. Clopidogrel but not aspirin reduces P-selectin expression and formation of platelet-leukocyte aggregates in patients with atherosclerotic vascular disease. *Clin Pharmacol Ther* 2003;73:232-41.
246. Rao AK, Vaidyula VR, Bagga S, et al. Effect of antiplatelet agents clopidogrel, aspirin, and cilostazol on circulating tissue factor procoagulant activity in patients with peripheral arterial disease. *Thromb Haemost* 2006;96:738-43.
247. Vavuranakis M, Latsios G, Aggelis D, et al. Randomized comparison of the effects of ASA plus clopidogrel versus ASA alone on early platelet activation in acute

- coronary syndromes with elevated high-sensitivity C-reactive protein and soluble CD40 ligand levels. *Clin Ther* 2006;28:860-71.
248. Serebruany VL, Midei MG, Meilman H, Malinin AI, Lowry DR. Platelet inhibition with prasugrel (CS-747) compared with clopidogrel in patients undergoing coronary stenting: the subset from the JUMBO study. *Postgrad Med J* 2006;82:404-10.
  249. Braun OO, Johnell M, Varenhorst C, et al. Greater reduction of platelet activation markers and platelet-monocyte aggregates by prasugrel compared to clopidogrel in stable coronary artery disease. *Thromb Haemost* 2008;100:626-33.
  250. Lincoff AM, Kereiakes DJ, Mascelli MA, et al. Abciximab suppresses the rise in levels of circulating inflammatory markers after percutaneous coronary revascularization. *Circulation* 2001;104:163-7.
  251. James SK, Siegbahn A, Armstrong P, et al. Activation of the inflammation, coagulation, and fibrinolysis systems, without influence of abciximab infusion in patients with non-ST-elevation acute coronary syndromes treated with dalteparin: a GUSTO IV substudy. *Am Heart J* 2004;147:267-74.
  252. Steinhubl SR, Badimon JJ, Bhatt DL, Herbert JM, Luscher TF. Clinical evidence for anti-inflammatory effects of antiplatelet therapy in patients with atherothrombotic disease. *Vasc Med* 2007;12:113-22.
  253. Ercan E, Bozdemir H, Tengiz I, et al. Decreased soluble cell adhesion molecules after tirofiban infusion in patients with unstable angina pectoris. *Thromb J* 2004;2:4.
  254. Akbulut M, Ozbay Y, Gundogdu O, et al. Effects of tirofiban on acute systemic inflammatory response in elective percutaneous coronary interventions. *Curr Med Res Opin* 2004;20:1759-67.
  255. Bhatt DL. Role of antiplatelet therapy across the spectrum of patients with coronary artery disease. *Am J Cardiol* 2009;103:11A-9A.
  256. Gachet C. P2 receptors, platelet function and pharmacological implications. *Thromb Haemost* 2008;99:466-72.
  257. Palmerini T, Barozzi C, Tomasi L, et al. A randomised study comparing the antiplatelet and antiinflammatory effect of clopidogrel 150 mg/day versus 75 mg/day in patients with ST-segment elevation acute myocardial infarction and poor responsiveness to clopidogrel: results from the DOUBLE study. *Thromb Res* 2010;125:309-14.
  258. Antonino MJ, Mahla E, Bliden KP, Tantry US, Gurbel PA. Effect of long-term clopidogrel treatment on platelet function and inflammation in patients undergoing coronary arterial stenting. *Am J Cardiol* 2009;103:1546-50.

259. Saw J, Madsen EH, Chan S, Maurer-Spurej E. The ELAPSE (Evaluation of Long-Term Clopidogrel Antiplatelet and Systemic Anti-Inflammatory Effects) study. *J Am Coll Cardiol* 2008;52:1826-33.
260. Storey RF, Judge HM, Wilcox RG, Heptinstall S. Inhibition of ADP-induced P-selectin expression and platelet-leukocyte conjugate formation by clopidogrel and the P2Y<sub>12</sub> receptor antagonist AR-C69931MX but not aspirin. *Thromb Haemost* 2002;88:488-94.
261. Anderson JL, Adams CD, Antman EM, et al. ACC/AHA 2007 guidelines for the management of patients with unstable angina/non ST-elevation myocardial infarction: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines (Writing Committee to Revise the 2002 Guidelines for the Management of Patients With Unstable Angina/Non ST-Elevation Myocardial Infarction): developed in collaboration with the American College of Emergency Physicians, the Society for Cardiovascular Angiography and Interventions, and the Society of Thoracic Surgeons: endorsed by the American Association of Cardiovascular and Pulmonary Rehabilitation and the Society for Academic Emergency Medicine. *Circulation* 2007;116:e148-304.
262. King SB, 3rd, Smith SC, Jr., Hirshfeld JW, Jr., et al. 2007 Focused Update of the ACC/AHA/SCAI 2005 Guideline Update for Percutaneous Coronary Intervention: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines: 2007 Writing Group to Review New Evidence and Update the ACC/AHA/SCAI 2005 Guideline Update for Percutaneous Coronary Intervention, Writing on Behalf of the 2005 Writing Committee. *Circulation* 2008;117:261-95.
263. Kushner FG, Hand M, Smith SC, Jr., et al. 2009 focused updates: ACC/AHA guidelines for the management of patients with ST-elevation myocardial infarction (updating the 2004 guideline and 2007 focused update) and ACC/AHA/SCAI guidelines on percutaneous coronary intervention (updating the 2005 guideline and 2007 focused update) a report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines. *J Am Coll Cardiol* 2009;54:2205-41.
264. Silber S, Albertsson P, Aviles FF, et al. Guidelines for percutaneous coronary interventions. The Task Force for Percutaneous Coronary Interventions of the European Society of Cardiology. *Eur Heart J* 2005;26:804-47.
265. Van de Werf F, Bax J, Betriu A, et al. Management of acute myocardial infarction in patients presenting with persistent ST-segment elevation: the Task Force on the Management of ST-Segment Elevation Acute Myocardial Infarction of the European Society of Cardiology. *Eur Heart J* 2008;29:2909-45.



266. Pyrgakis VN, Goudevenos JA. Clopidogrel and cardiovascular diseases: recommendations for its correct use. *Hellenic J Cardiol* 2010;51:83-6.
267. Garber MC, Nau DP, Erickson SR, Aikens JE, Lawrence JB. The concordance of self-report with other measures of medication adherence: a summary of the literature. *Med Care* 2004;42:649-52.
268. Schumacher WA, Bostwick JS, Ogletree ML, et al. Biomarker optimization to track the antithrombotic and hemostatic effects of clopidogrel in rats. *J Pharmacol Exp Ther* 2007;322:369-77.
269. Gurbel PA, Bliden KP, Hiatt BL, O'Connor CM. Clopidogrel for coronary stenting: response variability, drug resistance, and the effect of pretreatment platelet reactivity. *Circulation* 2003;107:2908-13.
270. Aleil B, Jacquemin L, De Poli F, et al. Clopidogrel 150 mg/day to overcome low responsiveness in patients undergoing elective percutaneous coronary intervention: results from the VASP-02 (Vasodilator-Stimulated Phosphoprotein-02) randomized study. *JACC Cardiovasc Interv* 2008;1:631-8.
271. Antoniadou C, Bakogiannis C, Tousoulis D, Antonopoulos AS, Stefanadis C. The CD40/CD40 ligand system: linking inflammation with atherothrombosis. *J Am Coll Cardiol* 2009;54:669-77.
272. Mickelson JK, Lakkis NM, Villarreal-Levy G, Hughes BJ, Smith CW. Leukocyte activation with platelet adhesion after coronary angioplasty: a mechanism for recurrent disease? *J Am Coll Cardiol* 1996;28:345-53.
273. Trumel C, Payrastre B, Plantavid M, et al. A key role of adenosine diphosphate in the irreversible platelet aggregation induced by the PAR1-activating peptide through the late activation of phosphoinositide 3-kinase. *Blood* 1999;94:4156-65.
274. Smith SM, Judge HM, Peters G, Storey RF. Multiple antiplatelet effects of clopidogrel are not modulated by statin type in patients undergoing percutaneous coronary intervention. *Platelets* 2004;15:465-74.
275. Mitsios JV, Papathanasiou AI, Goudevenos JA, Tselepis AD. The antiplatelet and antithrombotic actions of statins. *Curr Pharm Des* 2010;16:3808-14.
276. Saw J, Brennan DM, Steinhubl SR, et al. Lack of evidence of a clopidogrel-statin interaction in the CHARISMA trial. *J Am Coll Cardiol* 2007;50:291-5.



## ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ

1. **K.I. Kalantzi**, A.A. Dimitriou, H.J. Milionis, I.A. Goudevenos, A.D. Tselepis. “Clopidogrel differentially affects platelet-mediated thrombosis and inflammatory response in patients with acute coronary syndromes” *J Thromb Haemost* 2011; 9: 875–8.
2. **K.I. Kalantzi**, A.A. Dimitriou, J.A. Goudevenos, A.D. Tselepis. “The platelet hyporesponsiveness to clopidogrel in acute coronary syndrome patients treated with 75mg/day clopidogrel may be overcome within 1 month of treatment”. *Platelets* 2011 Aug 2.