

Η δράση της ADP στη μορφολογία του αιμοπεταλίου και ο ρόλος των θειενοπυριδινών

Λέξεις ευρητηρίου

ADP

Θειενοπυριδίνες

Μορφολογία και αιμοπετάλιο

Την απόρριψη του ενδοθηλίου του αγγειακού τοιχώματος, που προκαλείται από διάφορους παράγοντες, όπως είναι η οξειδωση, η υποξία, οι ενδοτοξίνες και τα συμπλέγματα αντιγόνου-αντισώματος που κυκλοφορούν στο αίμα, ακολουθεί η έκθεση του υπενδοθηλιακού κολλαγόνου και της βασικής μεμβράνης. Μετά τη δημιουργία του ενδοθηλιακού χάσματος λαμβάνει χώρα η διορθωτική διαδικασία αποκατάστασης αυτού, την οποία αναλαμβάνουν να διεκπεραιώσουν μόνο τους τα αιμοπετάλια. Αυτή περιλαμβάνει (α) την αντιστρεπτή προσκόλληση, (β) τη μεταβολή του σχήματος του αιμοπεταλίου, (γ) τη μη αντιστρεπτή προσκόλληση (spreading) και (δ) την εκκριτική απάντηση και τη συγκόλληση των αιμοπεταλίων, με αποτέλεσμα το σχηματισμό του πρωτογενούς (αιμοπεταλιακού) αιμοστατικού θρόμβου, που έχει ως στόχο τη διακοπή της αιμορραγίας του αιμορραγούντος αγγείου. Πρέπει να τονισθεί ιδιαίτερα ότι η «ακούσια» συρροή των αιμοπεταλίων γίνεται λόγω ενεργοποίησης των πέριξ της βλάβης αιμοπεταλίων. Είναι σήμερα γνωστό ότι η ενεργοποίηση του αιμοπεταλίου δεν περιλαμβάνει μόνο τη μεταβολή του σχήματος αυτού (που μπορεί μερικές φορές να ελλείπει) και την εκκριτική απάντηση μαζί με το φαινόμενο της συγκόλλησης των αιμοπεταλίων (platelet aggregation), αλλά και τη μη αντιστρεπτή προσκόλληση ή επέκταση των αιμοπεταλίων.¹

Η ADP είναι ένας ασθενής, φυσικός αιμοπεταλιακός αγωνιστής, που παίζει δύο ρόλους, οι οποίοι συνεργάζονται μεταξύ τους στην πρόκληση της *in vitro* ενεργοποίησης του αιμοπεταλίου. Η ADP σε χαμηλές συγκεντρώσεις (0,1–0,5 μM) προκαλεί μεταβολή του σχήματος του αιμοπεταλίου από δισκοειδές σε σφαιροειδές με ψευδοποδικές προεκβολές (φιλοπόδια), που ακολου-

Α.Γ. Καθηλιακμάνης

Παθολογικό Τμήμα,
3ο Νοσοκομείο ΙΚΑ Αθηνών

The effect of ADP
on blood platelet morphology
and the role of thienopyridines

Abstract at the end of the article

θείται από αντιστρεπτή συγκόλληση των αιμοπεταλίων, ενώ σε υψηλές συγκεντρώσεις (2,0–5,0 μM) παρατηρούνται ελευθέρωση του περιεχομένου των πυκνών και ακοκκίων και δευτερογενής μη αντιστρεπτή συγκόλληση των αιμοπεταλίων.²

Μετά την προσθήκη ADP σε πλάσμα πλούσιο σε αιμοπετάλια (PRP) ή σε ολικό αίμα θα προκύψουν, σε όλα τα αιμοπετάλια ή σ' ένα μέρος από αυτά, ανάλογα με την τελική συγκέντρωση της ADP στο PRP ή στο ολικό αίμα, (α) μορφολογικές μεταβολές και (β) βιοχημικές και φυσιολογικές μεταβολές.

Οι μορφολογικές αυτές μεταβολές αφορούν είτε το κάθε αιμοπετάλιο ξεχωριστά με τη μεταβολή του σχήματος αυτού, είτε πολλά αιμοπετάλια μαζί με το *in vitro* φαινόμενο της συγκολλητικότητας των αιμοπεταλίων. Το άρθρο αυτό περιλαμβάνει μια βραχεία ανασκόπηση της δράσης της ADP μόνο στη μορφολογία του αιμοπεταλίου και του ρόλου των θειενοπυριδινών, μιας κατηγορίας φαρμάκων με γνωστή αντιαιμοπεταλιακή δράση.

Μεταβολή του σχήματος

Η μεταβολή του σχήματος του αιμοπεταλίου παρατηρείται σε πολύ αρχικό στάδιο της ενεργοποίησης αυτού από την ADP. Επισυμβαίνει στα πρώτα δευτερόλεπτα της ενεργοποίησης του αιμοπεταλίου και χαρακτηρίζεται από μια μεταβολή στην εμφάνιση του πλούσιου σε αιμοπετάλια πλάσματος (PRP). Τα αιμοπετάλια μεταβάλλουν τη δισκοειδή μορφή, με την οποία βρίσκονται στο αίμα σε κατάσταση ηρεμίας, σε σφαιροειδή μορφή και, μετά την προσεκβολή των φιλοποδίων (λεπτά και μακριά

ψευδοπόδια), σε εκινειδί μορφή. Η παραγωγή των φιλοποδίων αυξάνει σημαντικά την επιφάνεια της μεμβράνης και έτσι προάγει τις κυτταρικές αλληλεπιδράσεις. Σημαντικές επίσης μεταβολές συμβαίνουν και στο κυτταρόπλασμα, όπου τα κοκκία συγκεντρώνονται στο κέντρο του κυττάρου και περιβάλλονται από μικροσωληνάρια και μικρονημάτια (δομικές μονάδες του κυτταρικού σκελετού). Η συγκέντρωση της ADP, που απαιτείται για να προκαλέσει μεταβολή του σχήματος του αιμοπεταλίου, είναι μικρότερη από εκείνη που απαιτείται για τη συγκολλητικότητα των αιμοπεταλίων. Η μεταβολή του σχήματος, που προκαλείται από την ADP, καταναλώνει ενέργεια και φαίνεται να εξαρτάται από τη φωσφορυλίωση της μυοσίνης, η οποία είναι ανεξάρτητη από την εξωκυττάρια συγκέντρωση του ασβεστίου. Είναι γνωστό ότι μικρές συγκεντρώσεις της κυτταροχάλασίνης Β (cytochalasin Β) αναστέλλουν τη μεταβολή του σχήματος, ενώ δεν επιδρούν στον πολυμερισμό της ακτίνης. Δεν μπορούν, επομένως, να μεταβάλουν τη συγκολλητικότητα των αιμοπεταλίων. Το τελευταίο υποστηρίζει ότι η μεταβολή του σχήματος του αιμοπεταλίου δεν είναι προαπαιτούμενο για την εμφάνιση της συγκολλητικότητας των αιμοπεταλίων. Η προκαλούμενη από την ADP μεταβολή του σχήματος του αιμοπεταλίου δεν αναστέλλεται μετά την επίδραση μιας από τις θειενοπυριδίνες (πίν. 1).

Εκκριτική απάντηση και συγκολλητικότητα των αιμοπεταλίων

Στον ίδιο χρόνο με τη συγκόλλησή τους τα αιμοπετάλια εκκενώνουν το περιεχόμενο των κοκκίων τους, που είναι συγκεντρωμένα στους διαύλους του συστήματος των ανοικτών και συνδεδεμένων με την επιφάνεια σωληναρίων. Αυτό επιτρέπει την επικοινωνία τους με το περιβάλλον μέσω. Τα πυκνά κοκκία εκκενώνουν ADP, ασβέστιο και σεροτονίνη, ενώ τα α-κοκκία ελευθερώνουν ινωδογόνο και θρομβοσπονδίνη, που συμμετέχουν επίσης στην ενεργοποίηση του αιμοπεταλίου. Η ADP, αμέσως μετά την ελευθέρωσή της από τα πυκνά κοκκία, ισχυροποιεί τη δράση των παραγόντων που διεγείρουν την έκκριση, όπως είναι το κολλαγόνο, η θρομβίνη και το πεπτιδίο που ενεργοποιεί τον υποδοχέα της θρομβίνης. Επίσης, ένας μεγάλος αριθμός υποστρωμά-

των ελευθερώνονται κατά τη διάρκεια της εκκριτικής απάντησης: η θρομβοξάνη A_2 (TxA_2), άλλα παράγωγα του αραχιδονικού οξέος, η Ρ-σελεκτίνη, η ισταμίνη, η αδρεναλίνη, αμινοξέα, λιποπρωτεΐνες, βλεννοπολυσακχαρίτες, όξινη φωσφατάση, β-γλυκουρονιδάση, ο αιμοπεταλιακός παράγοντας 4 (PF_4), η αδενυλική κυκλάση, η φιμπρονεκτίνη, ο παράγοντας von Willebrand (vWf), ο παράγοντας V, η β-θρομβοσφαιρίνη, ο αιμοπεταλιακός αυξητικός παράγοντας (PDGF) και ο νεοπλασματικός αυξητικός παράγοντας β (TGFβ).³ Η ελευθέρωση του περιεχομένου των α-κοκκίων, κατά τη διάρκεια της ενεργοποίησης του αιμοπεταλίου στη θέση του ενδοθηλιακού τραύματος του αγγείου, παίζει σημαντικό ρόλο στην αιμόσταση, στην τελική αποκατάσταση του τραύματος και στην παθογένεια της αθηροσκλήρωσης. Οι θειενοπυριδίνες, ενδεχομένως, να είναι περισσότερο δραστικοί αναστολείς σε σχέση με το ακετυλοσαλικυλικό οξύ στην πρόληψη του σχηματισμού θρόμβου σε αγγεία με ενδοθηλιακό τραυματισμό.

Τα αιμοπετάλια ορισμένων ζώων, όπως των ανθρωποειδών πιθήκων, του χοίρου της Γουϊνέας και της γάτας, που έχουν χρησιμοποιηθεί σε διάφορα εργαστήρια, όταν διεγείρονται από ADP, σ' ένα μέσο απ' όπου λείπει ασβέστιο, μπορούν να εκκρίνουν το περιεχόμενο των κοκκίων τους. Αυτό φαίνεται να οφείλεται στην ενεργοποίηση της κυκλοοξυγενάσης του αιμοπεταλίου, που είναι δυνατή μόνο εάν η συγκέντρωση του ασβεστίου είναι χαμηλή. Επίσης, τα ενδοϋπεροξειδία και η θρομβοξάνη A_2 , που αποτελούν συγκολλητικούς παράγοντες, παράγονται με την ενεργοποίηση της κυκλοοξυγενάσης και μετά την παραγωγή τους ενεργοποιούν το αιμοπετάλιο και διεγείρουν την εκκριτική του λειτουργία. Σ' αυτή την περίπτωση, η συγκολλητικότητα των αιμοπεταλίων, που είναι φυσιολογικά αντιστρεπτή, συνεχίζεται με μια δεύτερη μη αντιστρεπτή φάση, που αναστέλλεται μετά τη θεραπεία με ακετυλοσαλικυλικό οξύ. Έχει διαπιστωθεί ότι η τικλοπιδίνη αναστέλλει την εκκριτική απάντηση των α-κοκκίων του αιμοπεταλίου και, κατά συνέπεια, τη μη αναστρέψιμη συγκόλληση των αιμοπεταλίων του ανθρώπου, όταν αυτά διεγείρονται από την ADP (πίν. 1).⁴ Επομένως, η εκκριτική απάντηση του αιμοπεταλίου εξαρτάται από τη δραστηριότητα της κυκλοοξυγενάσης. Πιστεύεται ότι αυτή δεν μπορεί φυσιολογικά να επιτελεστεί κατά τη διάρκεια της ενεργοποίησης με ADP.

Όταν ένας συγκολλητικός παράγοντας προστεθεί σε εναιώρημα αιμοπεταλίων, τότε αυτά συγκολλώνται μεταξύ τους, για να σχηματίσουν αθροίσματα διαφόρων μεγεθών. Η συγκολλητικότητα των αιμοπεταλίων λαμβάνει χώρα μέσα σε ένα λεπτό από την έναρξη της ενεργοποίησης. Κατά την αντιστρεπτή φάση της συγκόλλησης παρατηρείται σύνδεση του ινωδογόνου

Πίνακας 1. Δράσεις των θειενοπυριδινών στο αιμοπετάλιο.

Αναστολή της προσκόλλησης του αιμοπεταλίου στο αγγειακό υπενδοθήλιο
Αναστολή της ελευθέρωσης του περιεχομένου των α-κοκκίων
Αναστολή της έκθεσης του υποδοχέα του ινωδογόνου στο σύμπλεγμα GPIIb-IIIa
Αναστολή της ενεργοποίησης του αιμοπεταλίου κατά τη δυναμική ροή

με τα ενεργοποιημένα και συγκεντρωμένα συμπλέγματα GPIIb-IIIa, που βρίσκονται στην αιμοπεταλιακή μεμβράνη, και σχηματισμός «γεφυρών ινωδογόνου» μεταξύ δύο ή περισσοτέρων αιμοπεταλίων. Κάθε μόριο ινωδογόνου μπορεί να αναγνωρίσει δύο συμπλέγματα GPIIb-IIIa στην αιμοπεταλιακή μεμβράνη και επιτρέπει τη δημιουργία «γεφυρών» μεταξύ δύο γειτονικών αιμοπεταλίων. Η συγκολλητικότητα των αιμοπεταλίων στο PRP χαρακτηρίζεται από ελάττωση της οπτικής πυκνότητας, η οποία καταγράφεται με τη μορφή καμπύλης από το συγκολλητινόμετρο οπτικής πυκνότητας.² Όταν προκαλείται ή επισυμβαίνει πραγματικά *in vivo* ασθενής διέγερση, τα συγκολλημένα αιμοπετάλια διαχωρίζονται το ένα από το άλλο και η συγκολλητικότητα των αιμοπεταλίων ονομάζεται αντιστρεπτή.

Η συγκόλληση των αιμοπεταλίων είναι ένα πολυσταδιακό και πολυσυμπλεγματοειδές φαινόμενο, που καθοδηγείται από ένα μεγάλο αριθμό συνδεδεμένων μεταξύ τους αντιδράσεων, τόσο στην επιφάνεια της αιμοπεταλιακής μεμβράνης όσο και στο κυτταρόπλασμα.³ Οι θειενοπυριδίνες (τικλοπιδίνη και κλοπιδογρέλη, clopidogrel) αναστέλλουν τη συγκόλληση των αιμοπεταλίων, που προκαλείται από την ADP.⁵ Αυτή η αναστολή είναι δοσοεξαρτώμενη και δεν καταστέλλεται μετά από υπερβολική αύξηση της συγκέντρωσης του αγωνιστή, είναι δε ειδική για την ADP και το σταθερό ανάλογό της 2-μεθυλο-θειο-ADP (2-methyl-thio-ADP, 2-MeS-ADP). Επιπλέον, η αναστολή αυτή είναι μη αντιστρεπτή, με αποτέλεσμα τα αιμοπετάλια να παραμένουν ανθεκτικά στην ADP, ακόμη και μετά το πλύσιμο αυτών. Η αναστολή της συγκολλητικότητας των αιμοπεταλίων και οι άλλες αντιαιμοπεταλιακές δράσεις της τικλοπιδίνης επέρχονται μετά από λήψη αυτής από του στόματος για 4-5 ημέρες, παραμένουν περισσότερο από 10 ημέρες μετά τη διακοπή της και εξαφανίζονται παράλληλα με το χρόνο επιβίωσης του αιμοπεταλίου.⁶ Ο ρυθμός επανεμφάνισής τους σχετίζεται με το ρυθμό παραγωγής του αιμοπεταλίου. Η φαρμακοκινητική της κλοπιδογρέλης διαφέρει από αυτή της τικλοπιδίνης. Για την εμφάνιση της δράσης της απαιτείται η λήψη της για μερικές ώρες.

Επομένως, οι θειενοπυριδίνες, τικλοπιδίνη και κλοπιδογρέλη, μετά τη χορήγησή τους *in vivo* αναστέλλουν την προκαλούμενη από την ADP συγκόλληση των αιμοπε-

ταλίων, αλλά σε μικρότερη έκταση από αυτή που προκαλείται από άλλους αγωνιστές.^{5,6} Η αντιαιμοπεταλιακή τους δράση δεν προκαλείται ούτε με την αναστολή της κυκλοοξυγενάσης, όπως συμβαίνει με το ακετυλοσαλικυλικό οξύ και τη σουλφινπυραζόνη (sulfinpyrazone), ούτε με την αναστολή της συνθετάσης της θρομβοξάνης, όπως συμβαίνει με τη διαζοξυβαίνη (dazoxiben), ούτε με την αύξηση της βασικής ενδοαιμοπεταλιακής συγκέντρωσης της κυκλικής μονοφωσφορικής αδενοσίνης (cAMP) ούτε με την ενεργοποίηση της αδενολικής κυκλάσης, που επισυμβαίνει με την επίδραση της αδενοσίνης ή της προστακυκλίνης, ούτε με την αναστολή της φωσφοδιεστεράσης με την επίδραση της διπυριδαμόλης.⁶ Η αντιαιμοπεταλιακή τους δράση είναι όμως μη αναστρέψιμη, όμοια με αυτή που επισυμβαίνει με τη χορήγηση ακετυλοσαλικυλικού οξέος, το οποίο, ως γνωστό, προκαλεί ακετυλίωση της κυκλοοξυγενάσης. Είναι σήμερα γνωστό ότι οι θειενοπυριδίνες αναστέλλουν την έκφραση των γλυκοπρωτεϊνικών συμπλεγμάτων GPIIb-IIIa, που βρίσκονται πάνω στην αιμοπεταλιακή μεμβράνη, όταν αυτή προάγεται από την ADP και σε μικρότερη έκταση από άλλους αγωνιστές. Επίσης, είναι γνωστό ότι η προαγωγή της έκφρασης των συμπλεγμάτων GPIIb-IIIa σε συγκολλημένα αιμοπεταλίων ενισχύεται από την ADP του αιμοπεταλίου. Δεν είναι όμως γνωστό πώς επιτελείται η προαγωγή της έκφρασης των συμπλεγμάτων GPIIb-IIIa πάνω στην αιμοπεταλιακή μεμβράνη. Η πλέον παραδεκτική μέχρι σήμερα υπόθεση είναι ότι λαμβάνει χώρα σύνδεση της ADP με έναν υποδοχέα της, που βρίσκεται πάνω στο σύμπλεγμα GPIIb-IIIa (πίν. 1). Επίσης, η τικλοπιδίνη και η κλοπιδογρέλη αναστέλλουν την αιμοπεταλιακή προσκόλληση στο αγγειακό υπενδοθήλιο. Έχει, ακόμα, παρατηρηθεί μια σημαντική αναστολή της εκκριτικής απάντησης και της συγκόλλησης των αιμοπεταλίων από τη δυναμική ροή (shear stress) του αίματος μέσα στο αγγείο (πίν. 1).⁶ Δεν υπάρχει αντιαιμοπεταλιακή δραστηριότητα σε πλάσμα ελεύθερο κυτάρων, ενώ πλυμένα αιμοπετάλια παραμένουν ανεσταλμένα.

Τα ανωτέρω συνηγορούν για μεταβολές των ιδιοτήτων της αιμοπεταλιακής μεμβράνης ή για μια μη αναστρέψιμη σύνδεση του μεταβολίτη της τικλοπιδίνης με το αιμοπετάλιο.

ABSTRACT

The effect of ADP on blood platelet morphology and the role of thienopyridines

A. KALLIAKMANIS

Department of Internal Medicine, 3rd Hospital, ISS of Athens, Greece

Archives of Hellenic Medicine 2000, 17(2):157-160

ADP is a weak, natural platelet agonist. Its mechanism of action is not completely understood, but ultimately it acts via the GPIIb-IIIa complex where the fibrinogen receptor resides at the platelet surface. ADP plays t-

two roles which cooperate to produce platelet activation. ADP in low concentrations (0.1–0.5 μM) produces a change in shape from a discoid to a spherical form and then to an echinoid form (with the production of filopods), followed by reversible aggregation. ADP in higher concentrations (2.5–5.0 μM) produces release of dense, α -storage granular contents and secondary, irreversible aggregation. The thienopyridines, ticlopidine and clopidogrel, inhibit platelet adhesion to the vascular subendothelium. The ADP-induced change in shape is not inhibited by treatment with thienopyridines, but they inhibit ADP-induced α -granule secretion. The granules contain adhesive proteins, such as fibrinogen, mitogenic factors, P-selectin and others. Also, thienopyridines inhibit the ADP-induced exposure of the fibrinogen binding site (receptor), which resides on the GPIIb-IIIa complex. Overall, thienopyridines lead to inhibition of secondary, irreversible platelet aggregation and they are effective inhibitors of shear stress-induced platelet activation.

Key words: ADP, Morphology and blood platelet, Thienopyridines

Βιβλιογραφία

1. BICK R, MURANO G. Physiology of hemostasis. *Clin Lab Med* 1994; 677–707
2. BORN GVR. Aggregation of blood platelets by adenosine diphosphate and its reversal. *Nature (London)* 1962, 194:927–929
3. SIESS W. Molecular mechanisms of platelet activation. *Physiol Rev* 1989, 69:58–178
4. DAVID JL, MONFORT F, HERION F, RASKINET R. Compared effects of three dose-levels of ticlopidine on platelet function in normal subjects. *Thromb Res* 1979, 14:35–49
5. HERBERT JM, FREHEL D, VALLEE E, KIEFFER G, GOUY D. Clopidogrel, a novel antiplatelet and anti-thrombotic agent. *Cardiovasc Drug Res* 1993, 11:180–198
6. McTAVISH D, FAULDS D, GOA KL. Ticlopidine: an updated review of its pharmacology and therapeutic use in platelet dependent disorders. *Drugs* 1990, 40:238–259

Corresponding author:

A.G. Kalliakmanis, 10 Dion. Areopagitou street, GR-151 25 Athens, Greece