

UNIVERZITET U BEOGRADU
FARMACEUTSKI FAKULTET

Marija Darkovska-Serafimovska

**TIROFIBAN KAO POTENCIJALNI
RADIOFARMACEUTIK ZA DETEKCIJU
TROMBOEMOLIJSKIH
POREMEĆAJA: ANIMALNI MODEL**

doktorska disertacija

Beograd, 2016

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF PHARMACY

Marija Darkovska-Serafimovska

**TIROFIBAN AS POTENTIAL
RADIOPHARMACEUTIC FOR
DETECTION OF THROMBOEMBOLIC
DISORDERS: ANIMAL MODEL**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2016

Mentori

Dr Nenad Ugrešić, redovni profesor
Farmaceutskog fakulteta Univerziteta u
Beogradu

Dr Emilija Janevik Ivanovska, redovni profesor
Fakulteta Medicinskih nauka Univerziteta u Štipu

Član komisije

Dr Miroslav Savić, redovni profesor
Farmaceutskog fakulteta Univerziteta u
Beogradu

U Beogradu, _____

SKRAĆENICE I AKRONIMI

ACD – antikoagulantna citratna glukoza

ADP – adenzin difosfat

ANOVA – analiza varijanse (eng. analysis of variance)

CFR – plazma bez ćelija (eng. cell free plasma)

DTPA – dietilentriamin pentasilćetna kiselina

DVT – duboka venska tromboza

GP – glikoprotein

HPLC – tećna hromatografija pod visokim pritiskom

PCI – Perkutana koronarna intervencija

PRP – plazma bogata trombocitima (eng. platelet reach plasma)

RGD sekvenca – Arg-Gli-Asp sekvenca

TFA – triflor silćetna kiselina

TLC – tankoslojna hromatografija

VTE – venski tromboembolizam

Tirofiban kao potencijalni radiofarmaceutik za detekciju tromboembolijskih poremećaja: Animalni model

Rezime

Vaskularna oboljenja spadaju među vodeće uzročnike povećanog morbiditeta i mortaliteta kod ljudi koji žive u razvijenim zemljama. Duboka venska tromboza (DVT) i plućna embolija su ozbiljne komplikacije, pa je zato detekcija akutne i rane DVT-e veoma bitna, pre svega, zbog posledica koje one nosi sa sobom (rizik od plućne embolije, hronična venska insuficijencija). Kod ovih patoloških stanja uloga trombocita je suštinska, zbog njihove sposobnosti da formiraju agregate, koji nastaju kao posledica oštećenja krvnog suda.

Trombocitni glikoproteinski IIb/IIIa (GPIIb/IIIa) receptor je ključna komponenta u procesu trombocitne agregacije, a samim tim i ciljno mesto za terapijsku intervenciju.

Tirofiban (N-(butilsulfonil)-4-O-(4-(4-piperidil)-L-tirozin) je nepeptidni tirozinski derivat, visoko selektivni, kratkododelujući inhibitor fibrinogenkog vezivanja za trombocitni glikoproteinski receptor IIb/IIIa. Kao molekul sa malom molarnom masom tirofiban ima veliku prednost, kako u postupku za njegovo obeležavanje radioaktivnim izotopima, tako i pri njegovoj aplikaciji u organizam, bez opasnosti od pojave imunoloških reakcija nakon primene. Takođe, bitan parametar je i njegova brza eliminacija iz organizma. Tirofiban se vezuje za GPIIb/IIIa receptore na isti način kao što se vezuje i fibrinogen, a može se naći samo u aktivnom ugrušku. Ovaj fenomen pokazuje razliku između akutnog i hroničnog ugruška, pri upotrebi radiofarmaceutika.

Obeležavanjem tirofibana radioaktivnim izotopom tehnećijuma (^{99m}Tc), kao optimalnim gama emiterom podobnim za dijagnostičku upotrebu, pokazali smo da možemo detektovati patološke promene krvnih sudova, identifikovati lokalizaciju tromba i odrediti morfološke karakteristike tromba.

Vizuelizacione studije, rađene na eksperimentalnom animalnom modelu duboke venske tromboze, jasno su nam pokazale akumulaciju tirofibana u femoralnoj veni testiranih životinja.

Praćenjem koncentracija neradioaktivnog i radioaktivno obeleženog tirofibana u plazmi, 5, 15, 30, 45 i 60 min. nakon i.v. bolus injekcije, utvrdili smo da ^{99m}Tc -tirofiban-a ima identično ponašanje kao i neradioaktivni tirofiban. Uvođenjem tehnećijuma i promenom strukture molekula ne menja se, već poznati, farmakokinetički profil leka.

Procenat vezivanja radio-obebeženog tirofibana za humane trombocite i trombocite dobijene od pacova ne pokazuje značajnu razliku, što znači da se rezultati dobijeni u eksperimentalnom modelu DVT kod pacova, mogu očekivati i kod ljudi sa DVT-om.

Na osnovu naših rezultata, optimalna koncentracija radioaktivno obebeženog tirofibana za dijagnostiku, a koja nema terapijsku efikasnost, uz očuvani afinitet za GPIIb/IIIa receptore, manja je od 10 nM.

Biodistribucione studije pokazale su da postoje statistički značajne razlike u biodistribuciji ^{99m}Tc -tirofibana u različitim organima/tkivima posle 30 i 60 minuta, što takođe ukazuje na afinitet radioaktivno obebeženog tirofibana da se veže za tkivo gde postoje tromboembolijske promene.

Mi smatramo da je tirofiban, obebežen radioaktivnim izotopom ^{99m}Tc , po svojim karakteristikama primenjiv u humanim ispitivanjima, te da se, kao potencijalni radiofarmaceutik, može predložiti za kliničke studije, na definisanim grupama pacijenata u ranom stadijumu formiranja DVT-e.

Ključne reči: Tirofiban, Duboka venska tromboza (DVT), Tehnecijum-99m, GPIIb/IIIa, Eksperimentalni animalni model DVT

Naučna oblast: Farmacija

Uža naučna oblast: Farmakologija

UDK broj: 615.849:[616.14-005.6:616-092.9(043.3)]

Tirofiban as a potential radiopharmaceutical for detection of the thromboembolic disorders: Animal model

Abstract

Vascular diseases are one of the leading reasons for increased morbidity and mortality in people living in high-income countries. Deep venous thrombosis (DVT) and pulmonary embolism (PE) are very serious complications and initial detection of them is always very important. In these pathological conditions the role of platelets is very important, their ability to generate aggregates, which occur as a result of damaged blood vessels.

The platelet glycoprotein IIb/IIIa (GP IIb / IIIa) receptor is a key component in the process of platelet aggregation, and thus the target site for therapeutic action.

Tirofiban (N-(methylsulfonyl)-4-O-(4-(4-piperidiny)-L-tyrosine) is a non-peptide, derivative of tyrosine, highly selective, short-acting inhibitor of fibrinogen binding to the platelet glycoprotein IIb/IIIa receptor. As a molecule with a small molecular weight and simple chemical structure, tirofiban provide possibility to be used as radiolabeled potential radiopharmaceutical, to inject in the patient without the risk of the occurrence of immune reactions after administration. The size and structure also is an important parameter for its fast elimination from the body.

Tirofiban binds GPIIb/IIIa receptors in the same way as fibrinogen, and can be seen only in the active clot. This phenomenon indicates the difference between acute and chronic blood clot, and can be used as advantage for vizualization.

The idea to formulate radioactive Tirofiban using Technetium-99m as a radioisotope for labeling and use for diagnostic purpose, was following the demand to detect primary pathological deviations in the blood vessels, to identify the localization of the new fresh thromb and to define its morphological characteristics.

Imaging studies performed using experimental animal model of deep vein thrombosis, clearly showed the pathological accumulation of tirofiban in the femoral vein of the animal.

The concentration of non-radioactive and radiolabelled tirofiban in plasma 5, 15, 30, 45 and 60 min. observed after i.v. bolus injection, confirmed that ^{99m}Tc-Tirofiban has identical behavior as non-radioactive. The introduction of Technetium-99m inside of the structure of molecule of Tirofiban, does not change the regular pharmacokinetic profile of the drug.

The percentage of binding of radiolabeled tirofiban to the human platelets and platelets obtained from rats has no significant difference, which means that the results obtained from the experimental model of DVT in rats, will be expected in the individuals with DVT.

Based on the results, an optimal concentration of radiolabelled tirofiban for diagnostic purpose without any therapeutic effect, keeping the same affinity for the GPIIb/IIIa receptors is less than 10 nM.

Biodistribution studies have shown that there are statistically significant differences in the biodistribution of ^{99m}Tc-Tirofiban in various organs/tissues after 30 and 60 minutes, which also indicates the affinity radioactively labeled tirofiban to bind to the tissue where there are thromboembolic changes.

Tirofiban labeled with the radioactive isotope of Technetium-99m, according to all obtained results can be accepted as a potential radiopharmaceutical and can be proposed for clinical studies of the strongly defined groups of patients in the early stage of DVT.

Key words: Tirofiban, Deep venous thrombosis (DVT), GPIIb/IIIa, Experimental animal model DVT

Academic expertise: Pharmacy

Major in: Pharmacology

UDC N°: 615.849:[616.14-005.6:616-092.9(043.3)

SADRŽAJ

1.	UVOD	1
1.1.	Fiziologija hemostaze	2
1.2.	Trombociti	3
1.2.1.	Funkcije trombocita	5
1.3.	Trombocitni glikoproteinski receptori	6
1.3.1.	Integrini	8
1.3.2.	GP IIb/IIIa receptor	9
1.4.	Uloga trombocita u procesu koagulacije	11
1.4.1.	Sistem koagulacije	12
1.5.	Trombotična oboljenja	15
1.5.1.	Epidemiologija dubokih venskih tromboza i plućnog embolizma	15
1.6.	Dijagnoza dubokih venskih tromboza i plućnog embolizma	16
1.7.	Inhibitori GPIIb/IIIa receptora	20
1.8.	Tirofiban	20
1.8.1.	Mehanizam delovanja	21
1.8.2.	Farmakodinamski efekti	21
1.8.3.	Farmakokinetički podaci	21
1.8.4.	Predklinički podaci o bezbednosti leka	22
1.8.5.	Klinička efikasnost i bezbednost	22
2.	CILJ ISTRAŽIVANJA	25
3.	MATERIJAL I METODE	26
3.1.	Uvođenje metode za radioaktivno obeležavanje tirofibana sa ^{99m}Tc -Tehnetiuma	26
3.1.1.	Priprema radiofarmaceutskog preparata u obliku liofiliziranog kita za obeležavanje	26
3.1.2.	Obeležavanje tirofibana upotrebom radioaktivnog izotopa ^{99m}Tc -fehnecijuma	27
3.1.3.	Kontrola kvaliteta obeleženog radioaktivnog preparata (^{99m}Tc - tirofiban)	27
3.1.4.	Stabilnost obeleženog preparata	27
3.2.	<i>In vitro</i> agregacione studije na trombocitima	28
3.2.1.	Uzimanje krvi i izolacija trombocita iz krvi	28
3.2.2.	Određivanje sposobnosti indukovane agregacije pomoću agonista (ADP)	28
3.2.3.	Određivanje inhibitornog efekta tirofibana na agregaciju trombocita	29
3.2.4.	Određivanje efekta ADP-a na agregaciju trombocita	29
3.2.5.	Određivanje efekta tirofibana na agregaciju trombocita	30
3.2.6.	Određivanje optimalne koncentracije radioaktivno obeleženog tirofibana za dijagnostiku	31
3.3.	Postavljanje eksperimentalnog animalnog modela duboke venske tromboze	31

3.4.	Biološko ponašanje ^{99m}Tc -tirofibana	33
3.4.1.	Postavljanje i validacija analitičkog postupka za određivanje koncentracije neradioaktivnog tirofibana u plazmi kod eksperimentalnog modela DVT i u kontrolnoj grupi pacova	33
3.4.2.	Kalibracioni dijagram tirofibana	33
3.4.3.	Praćenje distribucije i eliminacije radioaktivnog tirofibana u krvi	35
3.5.	Vizuelizacione studije na eksperimentalnim životinjama.....	35
3.6.	Biodistribucione studije radioobeleženog tirofibana kod eksperimentalnih životinja nakon i.v. aplikacije	35
3.7.	Obrada rezultata	36
4.	REZULTATI	38
4.1.	Određivanje radionuklidne čistoće, radiohemijske čistoće i stabilnosti obeleženog preparata	38
4.2.	Obeležavanje trombocita radioaktivnim preparatom - humani trombociti i trombociti pacova	40
4.3.	Određivanje sposobnosti indukovane agregacije pomoću ADP i inhibitornog efekta tirofibana	43
4.4.	Određivanje optimalne koncentracije radioaktivno obeleženog tirofibana za dijagnostiku	54
4.5.	Eksperimentalni animalni model duboke venske tromboze	55
4.6.	Validacija analitičkog postupka	58
4.6.1.	Koncentracija neradioaktivnog tirofibana u plazmi	64
4.7.	Vizuelizacione i biodistribucione studije na eksperimentalnim životinjama	72
5.	DISKUSIJA	81
6.	ZAKLJUČAK	89
7.	LITERATURA	91

1. UVOD

Vaskularna oboljenja spadaju među vodeće uzročnike povećanog morbiditeta i mortaliteta kod ljudi koji žive u visoko razvijenim zemaljama (Davi i Patrono, 2007; Bonaca i Creager, 2015). Duboka venska tromboza (DVT) i plućna embolija su veoma ozbiljne komplikacije, koje nose visoki rizik po zdravlje pacijenata. DVT je produkt hiperkoagulabilnog stanja, pri čemu dolazi do formiranja tromba, koji je bogat fibrinom, trombocitima i eritrocitima. Tromboza može biti rezultat celog niza poremećaja u procesu koagulacije, nastale kao posledica naslednih poremećaja, ili pak kao rezultat prisutnih malignih promena. I mnogi drugi faktori mogu doprineti pojavi ili potenciranju venske tromboze, kao što su: oštećenje venskog endotela pri kateterizaciji, oralna kontracepcija, postoperativne staze, varikozni tromboflebitisi, srčana oboljenja, infarkt, trauma (Anderson i sar., 1991; Huisman, 1996; Creager i sar., 1997; Cines i sar., 1998; Kee, 1999; Emmerich 2001).

Detekcija akutne i rane DVT-e je veoma bitna, pre svega zbog posledica koje ona nosi sa sobom (rizik od plućne embolije, hronična venska insuficijencija). Kod ovih patoloških stanja uloga trombocita je veoma važna, zbog njihove sposobnosti da formiraju agregate, koji nastaju kao posledica oštećenja krvnog suda (Zaman i sar., 2000; Christie i sar., 2008; Brass 2010; Leslie 2010; Picker 2011).

1.1. Fiziologija hemostaze

Hemostaza je kaskadni proces zgrušavanja krvi, od aktivacije trombocita do vaskularnog oporavka. Nakon povrede krvnog suda (pri traumi, hirurškoj intervenciji, prskanju ili oštećenju endotela krvnog suda), krv dolazi u kontakt sa subendotelnim vezivnim tkivom. Hemostazni sistem angažuje mnoštvo vaskularnih i ekstravaskularnih receptora koji deluju u saradnji sa komponentama krvi da kupiraju poremećaj (Henri i sar, 2013). Proces stvaranja trombocitnog čepa na oštećenom mestu je primarna hemostaza (Loscaizo i Schafer, 1997), koja nastaje nekoliko sekundi nakon oštećenja i od vitalne je važosti za sprečavanje gubitka krvi iz kapilara, malih arteriola i venula. *Sekundarna hemostaza* predstavlja niz reakcija koagulacionog plazmatskog sistema, sve do nastajanje fibrina. Ceo process traje nekoliko minuta. Nastale fibrinske naslage učvršćuju primarni hemostatski čep. Ova reakcija je od posebnog značaja za velike krvne sudove, jer sprečava rekurentno krvarenje, koje bi trajalo satima ili danima nakon povrede, da nije ovog mehanizma.

Endotel krvnih sudova je jedan od osnovnih elemenata u hemostazi. On predstavlja prirodnu, zaštitnu barijeru između krvi i tkiva. Njegova ključna funkcija je održavanje tečnog stanja krvi, preko antitrombotične površine koja sprečava trombocitnu adheziju i agregaciju. Zdravi, intaktni endotel ima antitrombogenu ulogu (inhibira agregaciju trombocita), preko produkcije i sekrecije:

- inhibitora koagulacije i agregacije trombocita,
- aktivatora i inhibitora fibrinolize.

Pri povredi endotela, aktiviraju se sledeći zaštitni mehanizmi:

- jaka vazokonstrikcija,
- preusmeravanje krvi sa povređenog mesta,
- formiranje hemostatskog čepa (trombocitna adhezija i agregacija),
- inhibicija nekontrolisane, prekomerne koagulacije.

Prvi korak u procesu koagulacije je formiranje trombina. Trombin, kao serinska proteaza, ima više različitih funkcija pri koagulaciji kao: aktiviranje trombocita, povećanje koagulacionih enzima i kofaktora. Trombin, takođe, stimuliše i prokoagulacioni mehanizam vezan za endotelne ćelije (Dale, 1997; deGaetano i sar., 1999).

Cirkulišući trombociti normalno ne reaguju sa površinom endotela, koja ih odbija oslobađajući prostaglandin PGI₂ (prostaciklin), NO i ADP-aze (Kuwana i sar., 1998; Essex i Lee, 1999; Hansen i Balthasar, 2001 i 2002). Međutim, pri hemoragiji trombociti adheriraju i brzo se lepe na endotel, izazivajući pri tom produkciju endotelnih komponenti, koje se brzo aktiviraju. Cirkulišući trombociti reaguju na taj način što stvaraju hemostatsko začepljenje, koje dovodi do stvaranje trombina i formiranja stabilnog fibrinskog koaguluma.

1.2. Trombociti

Trombociti su ćelije koje imaju više bioloških funkcija. Njihova glavna uloga je u procesu hemostaze, ali takođe učestvuju u inflamaciji, antimikrobnoj aktivnosti, angiogenezi, rastu tumora i metastaza. (Labelle, 2011). Po strukturi su male, diskoidno-sverične, bezjedrene ćelije (nemaju DNA, ali imaju mitohondrije). Pluripotentne matične ćelije hematopoeze, prisutne u koštanoj srži, usmeravaju diferencijaciju trombocita u megakariocite. Trombociti se oslobađaju u cirkulaciji fragmentacijom megakariocita. Svaki megakariocit može da proizvede 1000-5000 trombocita. Različiti faktori utiču na proizvodnju trombocita, ali ceo proces je regulisan tako da je broj trombocita uvek između 150 i $450 \times 10^9/L$. Najznačajniji faktor u proliferaciji, diferencijaciji i sazrevanju megakariocita je trombopoietin (TPO). (Ramalingam i sar, 2015). Produkcija i oslobađanje iz koštane srži u cirkulaciji kontrolisana je preko dva "trombopoetina". Jedan reguliše količinu megakariocitnih matičnih ćelija (stem cells), a drugi modelira njihovo sazrevanje.

TPO-i proizvode se u jetri i bubrezima. Sposobnost proizvedenog TPO-a da stimuliše proizvodnju trombocita zavisi od broja cirkulišućih trombocita. Trombopoetinski receptori (c-MPL, CD 110) pripadaju porodici tirozinskih kinezi receptora, sa molekularnom težinom od 80-84 kDa. Oni regulišu odgovor trombocita na dejstvo agonista. Iako je broj trombopoetinskih receptora na trombocitima mali (25-224 na trombocitu), njihov afinitet za trombopoietin je veoma visok. (Kaushansky, 2008). TPO receptor, prisutan na površini trombocita, vezuje se za TPO i odstranjuje je iz plazme. Što je veći broj cirkulišućih trombocita, manje je TPO. Ali, ako je broj trombocita jako mali, onda će više TPO biti dostupno za stimulaciju proizvodnje trombocita. (Ramalingam i sar, 2015).

Osnovne trombocitne funkcije su održavanje vaskularnog integriteta i zaustavljanje krvarenja. Takođe, uključeni su i u fundamentalni biološki proces hronične inflamacije, povezan sa patologijom bolesti (Ghoshal i Bhattacharyya, 2014). Trombocitna površina igra ključnu ulogu u kontaktu sa drugim elementima. Glavnu ulogu igraju trombocitni glikoproteini (GP)

koje služe kao receptori za komponente koje započinju aktivaciju trombocita. Trombocitna membrana ne razlikuje se u odnosu na ostale biološke membrane; sadrži proteine i lipide od kojih su osnovni fosfolipidi i holesterol. Fosfolipidi su predstavljeni dvostranom površinom: spoljašnja koja je sastavljena od neutralnih fosfolipida i unutrašnja sastavljena od anjonskih fosfolipida. Oni su od velike važnosti, zato što služe kao površina na kojoj se aktiviraju faktori koagulacije iz plazme. Spoljašna strana trombocita je naročito bogata arahidonskom kiselinom, koja je početni supstrat za proizvodnju tromboksana A₂ (TxA₂), koji je agonista za agregaciju trombocita. Citoskelet trombocita predstavlja mrežu različitih tipova proteinskih filamenata od kojih su glavni: mikrotubuli (sastavljeni od tubulina i oni održavaju formu trombocita u mirovanju), mikrofilamenti (sastavljeni od aktina; glavna uloga je učestvovanje u aktivaciji trombocita pomoću ADP-a, trombina, adrenalina i kolagena) i intermedijerni filamenti (sastavljeni od insolubilnog proteina vimentina koji omogućavaju kontrakciju trombocita) (Abrams i Lawrence, 2001). Od sekretornih granula, trombociti sadrže četiri tipa citoplazmatskih granula, podeljenih prema strukturi, gustini i sadržaju :

- α -granule – najbrojnije, 50-80 u svakom trombocitu. Sadrže trombocitno-specifične proteine kojih nema u plazmi (β -TG i TF4) i proteine identične sa onima u plazmi (FN, TGF i β -TGF, vaskularni endotelni faktor rasta (VEGF), PC inhibitor, inhibitor kolagenaze, α_2 -MG, α_1 -AT, α_2 -AP i multimerin). Membrana α -granula sadrži specifične receptore za P-selektin, osteonektin i GMP 33 (markere za aktivirane trombocite).
- tamne granule – 5-7 u svakom trombocitu. Sadrže serotonin, kateholamine, Ca²⁺, Mg²⁺, nemetabolišući ADP i ATP. Na njihovoj membrani nalazi se specifični granulofizin (CD 63), čija funkcija još uvek nije poznata.
- lizozomi – samo nekoliko u trombocitu. Njihova uloga za vreme trombocitne aktivacije vezana je za interakciju sa zidovima krvnih sudova i digestiju komponenata iz matriksa. Na njihovoj površini nalazi se nekoliko receptora: GPs, LAMP-1, LAMP-2 i CD63.
- peroksizomi – sitne granule koje se boje katalazom i slične su sa onima u drugim tkivima.

Od eikosanoida, koji predstavljaju oksigenovane derivate arahidonske kiseline, u humanim trombocitama glavni su lipoksini i hidroksi-ekozatetra-enoične kiseline (HETEK). Oni imaju veliki značaj za vaskularnu hemostazu. Eikosanoidi ne deponuju su u ćeliji. Oni se uvek sintetišu kao odgovor na hemijsku i fiziološku aktivaciju. Nastaju od arahidonske kiseline, glavne masne kiseline u trombocitima, putem njene hidrolize. Tromboksan A₂ nastaje od

arahidonske kiseline u trombocitima koji su stimulirani sa različitim agonistima (trombin, ADP). On je jak aktivator trombocitne agregacije. Za razliku od TxA_2 , prostaciklin inhibira trombocitnu aktivaciju, stimulacijom adenil ciklaze i formiranjem cAMP (Abrams i Lawrence, 2001; Kostovska, 2003).

1.2.1. Funkcije trombocita

Trombociti učestvuju u sledećim reakcijama hemostaze:

- adhezija – lepljenje adheriranih trombocita na povređenu površinu endotela,
- agregacija – formiranje većih trombocitnih agregata i stabilizacija hemostatskog čepa,
- sekrecija komponenti deponovanih u trombocitima,
- koagulacijska aktivnost trombocita (FitzGerald i Moran, 2001; Kostovska, 2003).

Nakon vaskularne povrede, aktivirani trombociti lepe se na povređenu površinu endotela. U adheziji trombocita na adhezivne proteine utiče von Willebrandov faktor i kolagen, ili rastvorljivi agonisti trombocita, kao što su ADP, trombin i tromboksan A_2 . Ovi adhezivni proteini i rastvorljivi agonisti aktiviraju specifične receptore. Aktivacija trombocita dovodi do potenciranja funkcije ligand-vezujućih integrina $\alpha IIb\beta 3$. Povećanje fibrina/fibrinogena dovodi do aktivacije trombocita, zatim povećane adhezije trombocita i uvećanja trombocitnog čepa. Ligand koji se vezuje za integrin $\alpha IIb\beta 3$ posreduje u trombocitnoj adheziji i agregaciji, što rezultira povećavanjem trombocita, dodatnom sekrecijom a-granula, stabilizacijom lepljenja i agregacijom trombocita i kontrakturom ugruška (Barret sar., 2008; Brass, 2010; Zhenyu i sar., 2010; Yongzhi i sar., 2014).

Zbog sposobnosti da se trenutno aktiviraju na mestima vaskularne povrede, trombociti su ključni faktori u primarnoj hemostazi, ali i u nastanku arterijske tromboze. Iako je primarna adhezija trombocita na zidu suda uglavnom nezavisna od G-proteinom posredovane reakcije, kasnije regrutovanje dodatnih trombocita u rastući tromb zahteva medijatore poput ADP, tromboksana A_2 ili trombina, koji deluju preko G proteina. Aktivacija trombocita preko G proteina uključuje tri glavna G-proteinom posredovana puta: G_q , G_{13} i G_i (Offermanns, 2006).

Različiti testovi na bazi funkcije trombocita široko se koriste za dijagnozu poremećaja trombocita. U poslednjih nekoliko godina došlo je do sve većeg interesovanja o upotrebi ovih testova za praćenje efikasnosti antitrombocitne terapije (Hayward i Eikelboom, 2007; Furie i Furie, 2008).

1.3. Trombocitni glikoproteinski receptori

Glikoproteinski receptori na trombocitnoj membrani su veoma važan element za funkciju trombocita, zato što su odgovorni za mnogo ključnih bioloških procesa. Na prvom mestu, od njih počinje hemostaza. Deficitarnost ovih GP receptora je razlog za izraženi hemoragični sindrom.

Tokom druge polovine 20. veka mnogi istraživači su detaljno ispitivali agregaciju trombocita na subcelularnom i molekularnom nivou. Glavni protein na membrani trombocita - integrin $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$, posreduje u odgovoru sa brzim prelazom od neaktivnog u aktivno stanje trombocita, u kom služi kao receptor za ligande koji će povezati trombocite (Bledzka i sar., 2013). Prva ispitivanja GP receptora urađena su elektroforetskom separacijom na poliakrilamidnom gelu. Preciznija ispitivanja urađena su pomoću radioizotopski obeleženih trombocita. Na početku su bili detektovani površinski receptori, obeleženi ^{125}I ili ^3H . Zadnjih desetak godina predstavljaju pravu eksploziju saznanja o strukturi i funkciji trombocitnih glikoproteina. Skoro sva saopštenja odnose se za ispitivanje na molekularnom nivou. Danas su mnogi od njih klonirani, sekvencionisani i grupisani u veliku familiju gena (Kostovska, 2003; Saboor i sar., 2013).

Ovakva saznanja daju nam veliku mogućnost za ispitivanje novih agenasa koji će delovati terapijski kao antagonisti trombocitnih receptora. Ovo je naročito važno za proces tromboze.

Najčešći biološki procesi u kojima učestvuju gliko-proteini trombocita su:

- proces hemostaze (početak): specifični gliko-proteini izazivaju lepljenje trombocita na mesto povrede endotela krvnih sudova,
- proces agregacije trombocita: međusobno lepljenje i stvaranje trombocitnih agregata (trombocitni receptori ulaze u reakciju sa mnogo adhezivnih proteina),
- proces tromboze: patološki aktivirana hemostaza. GP receptori učestvuju u stvaranju velikih agregata trombocita u kombinaciji sa eritrocitima i fibrinom. Rezultat je okluzija manjih ili srednje velikih krvnih sudova,
- stvaranje ateromatoznog tromba: na mestu ruptore arteriosklerotično promenjenog endotela, stvaraju se trombi bogati trombocitima,
- inflamatorni odgovor: interakcija sa leukocitima u proizvodnji medijatora ovog procesa.

Glikoproteinski (GP) IIb/IIIa, Ca^{2+} - zavisni heterodimer, je glavni integrin trombocita, lociran na trombocitnoj membrani (Calvette, 1994). Struktura trombocitnih GP receptora je složena, ali je danas u celosti poznata i na osnovu nje GP receptori se mogu klasifikovati kao članovi jednog od pet familija gena:

- 1) Integrini su najzastupljenija grupa glikoproteina na trombocitima. Oni su nekovalentno vezani heterodimeri sastavljeni od α i β subjedinice. Trombociti imaju tri vrste integrina: $\beta 1$, $\beta 2$ i $\beta 3$ (Saboor i sar., 2013). Najzastupljeniji je kompleks GPIIb-IIIa, koji posreduje u trombocitnoj agregaciji.
- 2) Druga familija gena su glikoproteini bogati leucinom (GPBL), takođe veoma rasprostranjeni. Ovde pripadaju: kompleks GPIb-IX, koji posreduje u trombocitnoj adheziji i GPV, koji je supstrat trombina sa nepoznatom funkcijom. GPIb-IX-V kompleks je drugi najčešći receptor na trombocitima, posle integrine $\alpha\text{IIb}\beta 3$, sa oko 50.000 kopija na trombocitu. GPIb-IX-V kompleks ima značajnu ulogu u inicijaciji i propagiranju procesa hemostaze i tromboze (Andrews i sar., 2007).
- 3) Selektini su grupa glikoproteina na trombocitima sa tri receptora, koji imaju važnu ulogu u adheziji. Oni su medijatori interakcija trombocita sa endotelnim ćelijama i leukocitima. Selektin na trombocitima je GMP-140 i α -granularni membranski glikoprotein, koji se eksprimira na membrani nakon površinske aktivacije trombocita. Trombocitni receptor (CLEC-2) za rodocitin (protein iz zmijskog otrova, koji ima sposobnost da agregira trombocite) pripada ovoj familiji (Ozaki i sar., 2009).
- 4) Superfamilija imunoglobulina (PECAM) je gliko-protein koji je pronađen u trombocitima i u prostoru između endotelnih ćelija. Trombocitni receptor PECAM-1 ima veoma važnu ulogu kao regulator reaktivnosti trombocita i tromboze. Otprilike 8.000 PECAM-1 receptora prisutni su na površini trombocita (Newman i sar., 2001).
- 5) Grupa kvadraspanin sastoji se od proteina nepoznate funkcije. Ovde pripadaju: CD63, CD9, CD53, plazmatski membranski protein p24/CD9 i α -granularni membranski protein ME491. CD63 je najvažniji član ove porodice. On moduliše širenje trombocita i trombocitnu fosforilaciju posredovanu tirozinom na imobilisani fibrinogen (Israels i McMilan-Ward, 2005).

U značajnim količinama sekvencionisan je i trombocitni glikoprotein – GPIV, koji nije homologan ni jednoj grupi gena. Ono što treba naglasiti je da svaki GP ima svoju funkciju. (Kostovska, 2003).

1.3.1. Integrini

Otkriće superfamilije integrina (glikoproteinski receptori) otvorila je mogućnost za istraživanje i upoznavanje mehanizma trombocitne agregacije (Humphries, 2000). Oni su heterodimeri, široko rasprostranjeni u mnogo ćelija. Posreduju u interakciji ćelija-ćelija ili ćelija-adhezivni proteini (Cook i sar., 1997; Chadderdon i Cappello, 1999; Abumiya i sar., 2000). Jedan ili više proteina iz grupe integrina eksponiraju se na trombocitima, endotelnim ćelijama, glatkim mišićnim ćelijama, fibroblastima i leukocitima.

Integrini su sastavljeni od dve subjedinice, α i β , koje formiraju nekovalentni kompleks heterodimera u obliku transmembranskog kompleksa (Saboor i sar., 2013). Do sada su identifikovane 14 alfa subjedinica i 8 različitih, ali homolognih β subjedinica, imenovanih kao β_1 , β_2 , β_3 , β_4 , β_5 , β_6 , β_7 i β_8 . Svaka od njih ima različitu specifičnost vezivanja sa ligandima (Gottschalk i sar., 2002). Trombociti imaju tri vrste integrina β_1 , β_2 i β_3 . β_1 porodica ima tri člana: $2\beta_1$, $\alpha_5\beta_1$ i $\alpha_6\beta_1$ (Saboor i sar., 2013). Neke od α -subjedinica (α_v i α_6) mogu da formiraju komplekse sa više od jednom β -subjedinicom (Tabela 1). $\alpha_2\beta_1$ receptor ili GPIa-IIa je važan receptor na trombocitima za kolagen. Broj $\alpha_2\beta_1$ receptora prisutnih na trombocitnoj površini varira od 2000-4000. α_2 subjedinica sadrže I domen za Mg^{2+} jona što je od značaja za interakciju sa kolagenom (Clemetson, 2008). Još jedan, veoma važan, receptor je kompleks GPIIb/IIIa ($\alpha_{IIb}\beta_3$).

Tabela 1. Superfamilija integrina

	α_1	α_2	α_3	α_4	α_5	α_6	α_M	α_L	α_{150}	α_{IIb}	α_v
β_1	$\alpha_1\beta_1$	$\alpha_2\beta_1$	$\alpha_3\beta_1$	$\alpha_4\beta_1$	$\alpha_5\beta_1$	$\alpha_6\beta_1$					$\alpha_v\beta_1$
β_2							Mac-1	LFA-1	P ₁₅₀		
β_3										GPIIb-IIIa	$\alpha_v\beta_3$
β_4						$\alpha_6\beta_4$					
β_5											$\alpha_v\beta_5$
β_6											$\alpha_v\beta_6$
β_7				$\alpha_4\beta_7$							
β_8											

Integrini igraju veoma važnu ulogu pri adheziji u ćelijskom matriksu, kao i u transdukciji signala kroz ćelijske membrane. Vezivanje intracelularnih proteina za integrine izaziva veliku konformacionu promenu (Shatil i sar., 1985 i 1998; Deckelbaum i Sax, 1997). Konformacione promene omogućuju vezivanje fibrinogena sa aktivnim trombocitima, pri čemu dolazi do agregacije i formiranja tromba (Aggarwal i sar., 1996; Wilerson i Benedict, 1997; Bennett i sar., 1998; Wu i Wilerson, 2001).

Prenos signala putem sparenih integrina i G proteina kritičan je za kontrolu ponašanja ćelija. Opisana je uloga integrina u povećanju invazivnosti tumora za vreme metastaze, kao posledica aktiviranja G proteina (G α i) preko nerekptornog proteina - nukleotida razmenjujućeg faktora (GEF) GIV (poznatog još kao Girdin), koji predstavlja protein asociran sa metastazama (Leyme i sar, 2015).

1.3.2. GP IIb/IIIa receptor

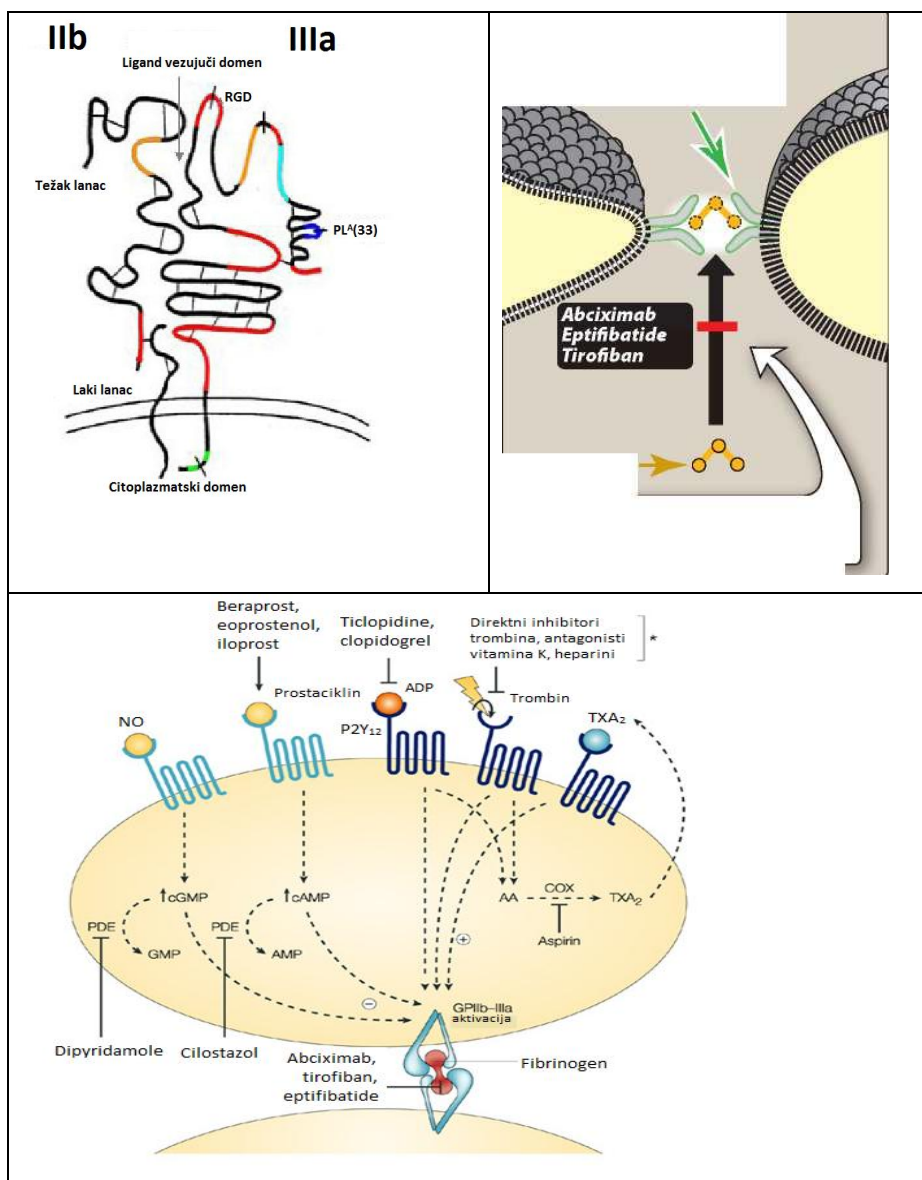
Trombocitni GPIIb/IIIa receptor ključna je komponenta u procesu trombocitne agregacije, a samim time je i cilj terapijske intervencije. Glikoproteinski trombocitni receptori GPIIb/IIIa blokiraju agregaciju trombocita i time smanjuju rizik za nastajanje tromboze kod akutnog koronarnog sindroma (Loredana i sar., 2013; King i sar., 2016). Kompleks GPIIb/IIIa predstavlja heterodimer, zavisian od kalcijuma. Sastoji se od dve nekovalentno vezane α (α_{IIb}) i β (β_3) subjedinice. Zastupljen je u 1 do 2% ukupnih proteina na trombocitima. Na površini jednog trombocita ima oko 50.000 kompleksa (Feng i sar., 1999; O'Shea i Tchong, 1999). Funkcioniše kao trombocitni receptor za: fibrinogen, fibronektin, vitronektin i faktor vW. (Barret i sar., 2008; Brass, 2010; Zhenyu i sar., 2010; Yonugzli i sar, 2014). Kompleks se raspada i gubi svoju funkciju kada opada koncentracija kalcijuma (Bledzka i sar., 2013).

Funkcija kompleksa GPIIb/IIIa zavisi od aktivacije trombocita, koja može da bude od agoniste trombina i kolagena ili slabijih agonista ADP i adrenalina. U procesu adhezije i agregacije trombocita, multifunkcionalni receptor povezuje gore spomenuta četiri proteina. Izuzetak je adrenalin koji ne izaziva promenu na ovoj formi trombocita, dok ostali agonisti menjaju formu trombocita od sferične do bodljikavo sferične forme. Na taj način omogućava se ekspresija receptora za Fg (fibrinogen) na površini trombocita. Vezivanje Fg-a neophodno je za agregaciju trombocita. Receptori za Fg nalaze se samo na kompleksu GPIIb/IIIa na stimulisanoj površini trombocita. Vezani Fg formira most između aktiviranih trombocita, ili je privremeni kofaktor za trombocitnu adheziju.

Identifikovani su različiti funkcionalni domeni kompleksa GPIIb/IIIa. Najbolje proučeni su domeni gde se vezuju adhezivni proteini. Sposobnost vezivanja kompleksa na sva četiri adhezivna proteina na aminokiselinskoj sekvenci za raspoznavanje, sastavljenoj od Arg-Gly-Asp-Ser (RGD-sekvenci), koja se preko fibrinogena vezuje za trombocite (Abraham i sar., 1997).

Kompleks GPIIb/IIIa, kao receptor, ima vezujuća svojstva samo za stimulisane trombocite. I pored toga što je glavni ligand za vezivanje za ovaj receptor fibrinogen, postoji više peptida koji sadrže ovu RGD sekvencu i na taj način sprečavaju vezivanje fibrinogena, a time onemogućavaju i formiranje tromba.

Na Slici 1. prikazan je mehanizam delovanja nekih blokatora glikoproteinskog (GP) Iib/IIIa receptora.



Slika 1. Mehanizam delovanja blokatora glikoproteinskog (GP) Iib/IIIa receptora. (Preuzeto iz: Jackson i Schoenwaelder, 2003).

1.4. Uloga trombocita u procesu koagulacije

Trombociti su najznačajnije i najmoćnije krvne ćelije uključene u fiziološku hemostazu i patološku trombozu. Oni adheriraju na mestu povrede (Shattil i sar., 1980; Levy-Toledano, 1999). Razumevanje *in vivo* regulatornih mehanizama i farmakološke modulacije generisanja trombina mogu da pomognu u kontroli krvarenja, bez potencijalnog povećanja rizika (Tanaka i sar., 2009). Trombocitna adhezija je posredovana plazma proteinima, vWF (von Willebrand-ov faktor), tako da formiraju most između specifičnih glikoproteinskih receptora GPIIb/GPIIc (Gawaz i sar., 1999), lociranih na aktiviranim trombocitima i subendotelu (Barret i sar., 2008; Brass, 2010; Zhenyu i sar., 2010; Yonugzli i sar., 2014).

Trombocitna adhezija praćena je trombocitnom aktivacijom, izazvana promenom konformacije receptora na trombocitnoj površini, za koju oni vezuju fibrinogen i druge adhezivne glikoproteine, sa visokim afinitetom. Vezivanje fibrinogena formira most između aktiviranih trombocita, čime se pomaže konsolidovanje trombotičnog čepa. Trombocitna aktivacija u stvari predstavlja redistribuciju negativno naelektrisanih fosfolipida na trombocitnoj površini. Ova prokoagulantna površina sadrži fosfatidilserin i fosfatidilinositol i vezuje vitamin K – zavisni koagulacioni faktor, kako i faktor X, preko kalcijumovih mostova za gama-karboksiglutaminske kiselinske rezidue locirane u ovim faktorima (Phillips i sar., 1997). Posle aktivacije, trombociti iz granula oslobađaju faktor V. Faktor V i faktor Va vezuju se direktno na trombocitnoj površini i predstavljaju visoko afinitetna vezivna mesta za faktor Xa. Aktivirani trombociti sekretuju ADP i formiraju tromboksan A_2 . To su dve supstance koje olakšavaju zgrušavanje, a samim tim i povećanje tromba.

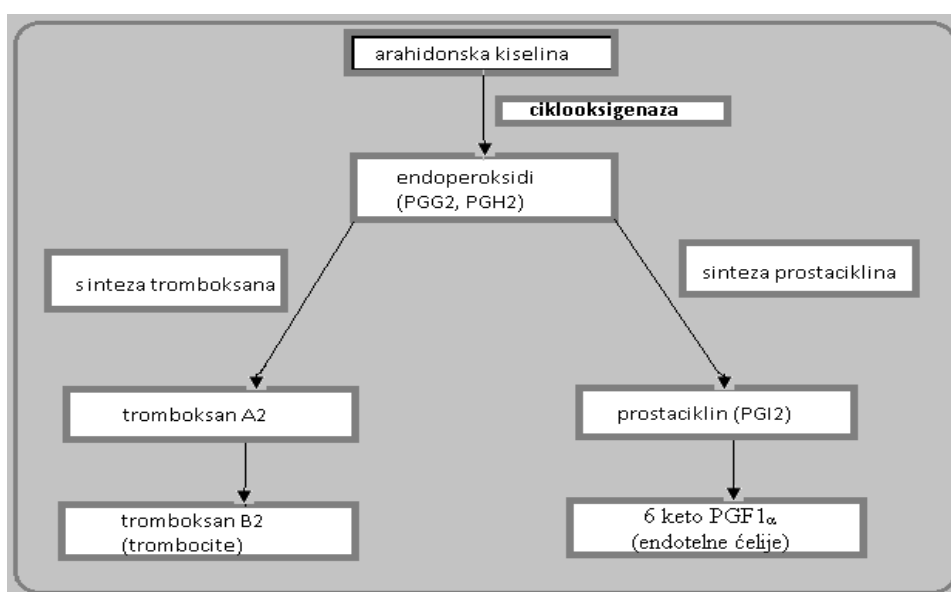
I kod trombocita, kao i kod ostalih ćelija, proces aktivacije i sekrecije regulisan je promenom nivoa cikličnih nukleotida, ulaskom kalcijuma, hidrolizom membranskih fosfolipida i fosforilacijom ključnih intracelularnih proteina (Hollenberg i Compoti, 2002). Vezivanje agonista, kao što su adrenalin, kolagen ili trombin (Harker i Hanson, 1997) na površini trombocita, odnosno vezivanje za trombocitne receptore (Macfarlane i sar., 2001), aktivira dva membranska enzima: fosfatidilinozitol i fosfatidilholin. Na početku, mala količina oslobođene arahidonske kiseline konvertuje se u tromboksan A_2 (TxA_2), koji dalje može da aktivira fosfolipazu C. Stvaranje TxA_2 iz arahidonske kiseline ide posredstvom enzima ciklooksigenaze (COX) (Slika 2).

Inhibicija sinteze TxA_2 smanjuje agregaciju trombocita, što predstavlja osnovu za terapijsku primenu acetilsalicilne kiseline, kao kardioprotektivnog leka. Hidroliza membranskog fosfolipida fosfatidilinozitol 4,5-bifosfata (PIP_2), proizvodi diacilglicerol (DAG) i inozitol

trifosfat (IP_3), koji imaju presudnu ulogu u metabolizmu trombocita. IP_3 pomaže prelazak kalcijuma u trombocitni citosol i potpomaže fosforilaciju miozinskih lakih lanaca.

DAG aktivira proteinsku kinazu C, koja takođe vrši fosforilaciju lakih lanaca miozinske kinaze i plekstrana (protein, 47.000-Da).

Nakon aktivacije, trombociti ispuštaju svoj sadržaj iz granula u plazmu (Fu i Longhurst, 2002). Oslobođeni ADP vezuje se za specifični purinergički receptor, koji, kada je aktiviran, menja konformaciju GP kompleksa IIb/IIIa tako što vezuje fibrinogen i na taj način se spajaju susedni trombociti i stvara se hemostatski trombo.



Slika 2. Stvaranje TxA₂ iz arahidonske kiseline je posredovano enzimom ciklooksigenaze

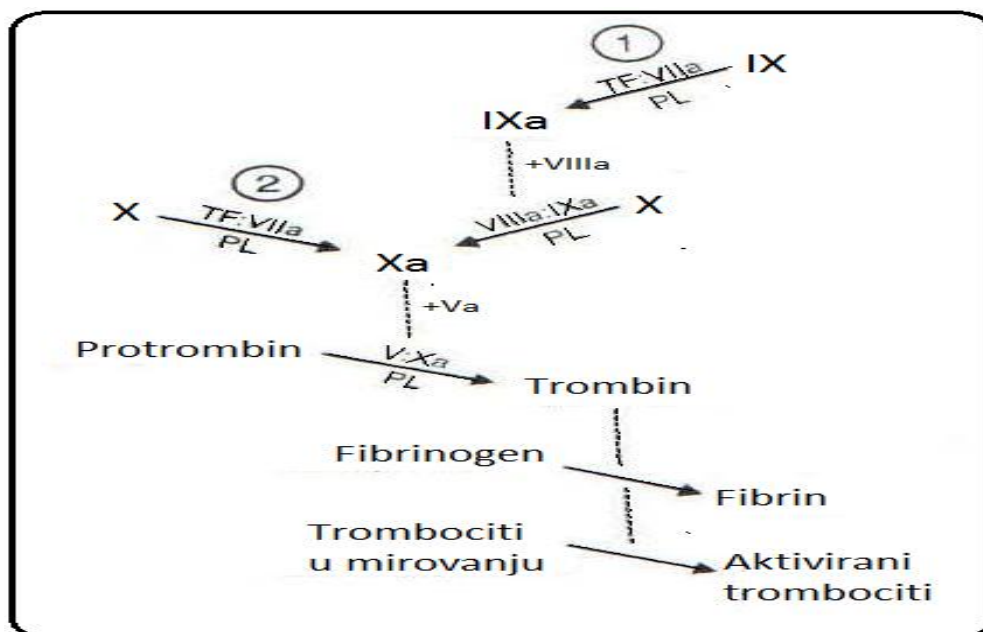
1.4.1. Sistem koagulacije

Sistem koagulacije je neophodan u fiziološkim uslovima, spasonosan pri povredi, a može biti fatalan u patološkim uslovima (Kostovska, 2003; Kenneth i sar., 2009; Tanaka i sar., 2009).

Spoljašnji put koagulacije

Na Slici 3. prikazana je simplifikovana shema koagulacijske kaskade, koja započinje od tkivnog faktora (TF-unutrašnji membranski protein). Sinteza tkivnog faktora u makrofagama i endotelnim ćelijama indukovana je endotoksinima i nekim citokinima (IL-1 i TNF). Glavna komponenta spoljašnjeg puta iz plazme je faktor VIIa. On pripada grupi vitamina K - zavisnih proteina, jer je za njegovu sintezu u hepatocitima neophodan vitamin K. Koagulacijska

kaskada započinje formiranjem kompleksa između TF i faktora VIIa (TF/VIIa). Komplex može da započne koagulaciju bilo faktorom IX (reakcija 1) ili faktorom X (reakcija 2). Obe reakcije formiraju faktor Xa, koji dalje produžava koagulaciju sa faktorom Va. Rezultat toga je formiranje protrombina, trombina itd. (Furie i Furie, 2008; Kenneth, 2009).



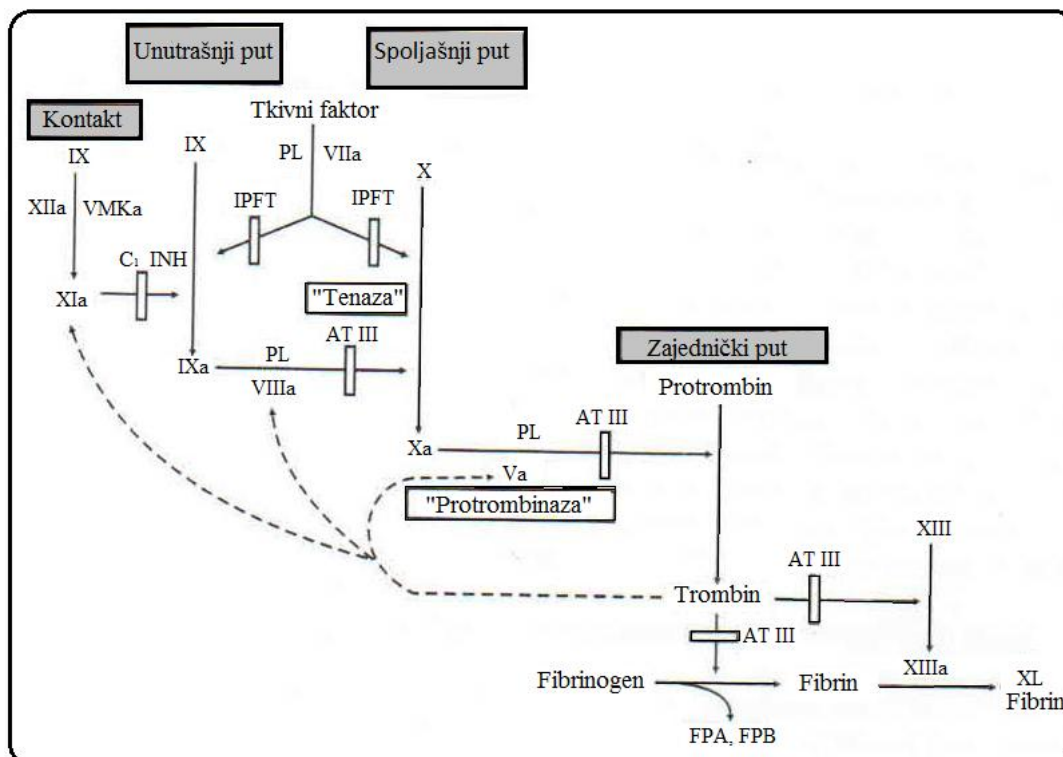
Slika 3. Simplificirana shema koagulacione kaskade. Formirani kompleks TF/VIIa započinje koagulaciju bilo sa f.IX (reakcija 1) ili sa f.X (reakcija 2). Pri obe reakcije formira se f.Xa koji dalje produžava put koagulacije sa f.Va, formiranje protrombina, trombina itd. PL-fosfolipid

Unutrašnji put koagulacije

Unutrašnji put koagulacije mogao bi se definisati kao koagulacija indukovana komponentama koje se nalaze u krvi. Na slici 4 prikazan je unutrašnji put koagulacije. Ovaj put počinje od faktora XIa (dimerna serin proteaza) koji aktivira faktor IX nezavisno od faktora VII. Aktivacija faktora IX od IXa traži samo prisustvo joniziranog kalcijuma (Ca^{2+}), dok aktivacija faktora IX od VIIa (spoljašnji put) pored jonizovanog kalcijuma traži i prisustvo TF-a, koji se u fiziološkim uslovima ne nalazi u krvi. Kada se krvni sud ošteti TF deluje zajedno sa f.VIIa i fosfolipidima (PL) i konvertira faktor IX u IXa. Unutrašnji put obuhvata i “kontaktnu” fazu aktivacijom f.XI (od kompleksa f.XIIa/VMka) u f.XIa. Faktor Xia, takođe konvertuje faktor IX u IXa, a f.IXa aktivira f.X u f.Xa. Faktor Xa je aktivna katalitička supstanca kompleksa “protrombinaza” (obuhvata i f.Va i PL) i konvertuje protrombin u trombin (Furie i Furie, 2008; Kenneth, 2009).

Zajednički put koagulacije

Spoljašnji i unutrašnji put ujedinjuju se stvaranjem faktora Xa. Jednom formirani faktor Xa od bilo kog sistema, konvertuje protrombin u trombin i produžava proces koagulacije. Trombin cepa fibrinogen i konvertuje f.XIII u f.XIIIa. Faktor XIIIa unakrsno vezuje fibrinski koagulum.



Slika 4. Koagulacijska kaskada: centralnu ulogu igra tkivni faktor (TF), koji se u fiziološkim uslovima ne nalazi u krvi. Kada se ošteti krvni sud, TF zajedno sa f.VIIa i fosfolipidima (PL), konvertuju f.IX u f.IXa. Unutrašnji put obuhvata i “kontaktnu” fazu aktivacijom f.XI (od kompleksa f.XIIa/VMKa) u f.XIa (*in vivo* kontakti sistem dovodi do fibrinolize i formiranja bradikininina – BK). Takođe, f.XIa konvertuje f.IX u f.IXa, a f.IXa aktivira f.X u f.Xa, zajedno sa faktorima VIIIa i PL (“tenase” kompleks). F.Xa je aktivna katalitička supstanca kompleksa “protrombinaza” (obuhvata f.Va i PL) i konvertuje protrombin u trombin. Trombin ubrzava procese obeležene isprekidanim linijama (Furie i Furie, 2008).

1.5. Trombotična oboljenja

Venske tromboze najčešće se javljaju na donjim ekstremitetima u dubokim venama, ali nisu retke i na gornjim ekstremitetima (nakon postavljanja venskih katetera, kanila). Venske tromboze u plućima obično su tihe (preko 50% pacijenata sa trombozom dubokih vena imaju pulmonalne tromboze), a iste se manifestuju ako se komplikuju inflamacijom ili embolizacijom.

Arterijske tromboze obično se javljaju kao posledica već postojećeg procesa na arterijama (arterioskleroza).

Tromb je sastavljen od fibrina i krvnih ćelija (eritrocita, leukocita i trombocita) (Previtali, i sar., 2011). Arterijski i venski trombovi razlikuju se po sastavu. Arterijski trombovi razvijaju se u uslovima brzog krvotoka, pa zato sadrže više fibrina i trombocita, dok su venski trombovi, koji se formiraju u uslovima sporijeg krvotoka, bogati eritrocitima, leukocitima, velikim količinama fibrina i malo trombocita (Kostovska, 2003; José i sar, 2009).

1.5.1. Epidemiologija dubokih venskih tromboza i plućnog embolizma

Venska tromboembolija (VTE) je najčešća vaskularna bolest nakon akutnog infarkta miokarda i šloga. Klinički se manifestiruje kao: duboka venska tromboza (DVT) i plućna embolija (PE) (Previtali i sar, 2011).

Postoji visoka povezanost između dubokih venskih tromboza na donjim ekstremitetima i plućnog embolizma. Ovo je potvrđeno u brojnim postmortem studijama. Plućni embolizam (PE) je čest i važan razlog iznenadne i neočekivane smrti, naročito kod hospitalizovanih pacijenata. DVT i PE su dve kliničke manifestacije, posledice jednog sistemskog procesa - *tromboze*.

Poznavanje mehanizma nastanka venskog tromboembolizma (VTE), važno je za njegovu prevenciju, brzu dijagnostiku i pravilno lečenje (José i sar., 2009; Tanaka i sar., 2009) Prevencija DVT-a u isto vreme znači i prevenciju PE-a (Reitsma i sar., 2012).

Detekcija akutne i rane DVT je bitna, pre svega zbog posledica koje ona nosi sa sobom (rizik od plućne embolije, hronične venske insuficijencije). Kod ovih patoloških stanja uloga trombocita je važna zbog njihove sposobnosti da formiraju agregate, koji nastaju kao posledica oštećenja krvnog suda.

Prema podacima Nacionalnog instituta za zdravlje (SAD), od 650.000 hospitalizovanih pacijenata godišnje sa DVT-om na donjim ekstremitetima, 200.000 umiru od PE-e. Najteže komplikacije nastupaju prvog sata posle embolije (Kostovska, 2003; Previtali i sar., 2011).

1.6. Dijagnoza dubokih venskih tromboza i plućnog embolizma

DVT i PE su relativno česta oboljenja koja reaguju na terapiju, ali sa potencijalnim fatalnim ishodom za PE-u, ako se ne dijagnostikuje i leči blagovremeno. Savremeni pristup za dijagnozu kliničke vidljive venske tromboze, koja se manifestuje velikim i okluzivnim venskim trombozama koji su lokalizovani na proksimalnim venama na donjim ekstremitetima, preporučuje egzosonografiju, kao neinvazivnu metodu. U drugim slučajevima, kada je u pitanju suspektna rekurentna venska tromboza na ekstremitetima, ista teško može da se dijagnosticira, zbog toga što kod preko 50% pacijenata odsustvuju simptomi. Često se postavlja i pogrešna dijagnoza, zbog slične kliničke slike koje daju neka stanja kao: srčani edem, ishijalgični bol ili bol u mišićima, limfedem... Dijagnoza je još teža kod rekurentne DVT-e, zbog distorzije ili opstrukcije dubokog venskog sistema od prethodnih trombotičnih stanja.

DVT je najčešće posledica poremećaja venskog sistema, ali se može javiti i kod drugih patoloških stanja venskog sistema, koja su takođe rezultat narušene hemostaze. Najteža komplikacija koja može da nastane kao rezultat stvaranja tromba u dubokom venskom sistemu je plućna embolija (Kistner i sar., 1972; van Beek i den Cate, 1996; Van der Haijdeni sar., 2000).

Da bi se napravio pravilan pristup dijagnozi, da bi se mogla uraditi tačna procena ozbiljnosti i obima nastale promene venskog sistema, a samim tim da bi se uradila pravilna procena za eventualnu primenu terapije, potrebno je da se tačno razgraniče svi tipovi oboljenja i promene koje se javljaju kao rezultat poremećene koagulacije kod pacijenta: hronična venska insuficijencija, pojava varikoznih vena, površinska venska tromboza (na veni safeni). Kod svih ovih stanja dijagnostički pristup je bitan zbog njihovog razgraničenja i diferencijacije. Glavni aspekt u dijagnozi venskih poremećaja je razgraničenje akutne od hronične promene, kao i promena koje nastaju u dubokom venskom sistemu od promena na površinskim krvnim sudovima.

Detekcija akutne/rane DVT-e bitna je zbog posledica koje ona nosi sa sobom.

Kod ovog patološkog stanja uloga trombocita važna je zbog njihove sposobnosti za formiranje agregata, kao posledica oštećenja krvnog suda.

Akutna DVT teško može da se dijagnostikuje na bazi kliničkih parametara, zbog toga što kod preko 50% pacijenata izostaju simptomi. Kod ostalih 20-50% pacijenata postoje venografski dokazano oboljenje. Često asimpomska manifestacija akutne DVT-e zahteva dopunska ispitivanja da bi se potvrdile kliničke pretpostavke. Kliničkoj dilemi ide u prilog i činjenica

da preko 90% plućnih embolija nastaje kao rezultat DVT-e, kao i da su u 70% slučajeva dijagnostikovane tek nakon autopsije, a bez prethodne kliničke slike.

Ranu dijagnozu DVT na potkolenici je teže postaviti zbog činjenice da je najčešće zahvaćena samo jedna od brojnih vena na potkolenici. To znači da se venska krv uredno vraća preko preostalih prohodnih vena. DVT na gornjim ekstremitetima nastaje ređe i to najčešće zbog učestale upotrebe katetera na subklavikularnim venama. Klinički znaci i komplikacije su identične sa onima kod DVT-e na donjim ekstremitetima.

Diferencijalna dijagnoza

Bol i otok u donjim ekstremitetima može da asocira na prisastvo DVT-e. Isti simptomi se javljaju i kod ljudi sa celulitisom, artritismom, limfedemom, varikoznim venama, površinskim tromboflebitisom i hroničnom venskom insuficijencijom.

Laboratorijske tehnike i analize

Postoji više laboratorijskih tehnika:

- dijagnoza idiopatske DVT-e, upotrebom visoko specifičnih testova. Na ovaj način mogu se detektovati i genetski nedostaci (PCR metoda),
- određivanje nivoa D-dimera, kao specifičnog dezintegracionog produkta fibrina, oslobođenog u cirkulaciju. Niske koncentracije D-dimera u cirkulaciji isključuju rizik pojave DVT-e, dok visoke koncentracije nisu uvek indikator tromboembolijskih oboljenja (osim vrednost iznad 500ng/ml) (Lee i sar., 1999),
- biohemijske analize [određivanje homocisteina, Lp (a)].

Vizuelizacione metode

Postoji više tehnika i metoda za vizuelizaciju DVT-e: kompresivni ultrazvuk (neinvazivna tehnika sa senzitivnošću od 95-99%), intravaskularni ultrazvuk (invazivna metoda, najčešće korišćena za vreme koronarne angiografije), Duplex ultrasonografija, agresivna kontrastna venografija (injektiranje kontrastnog sredstva u dorzalnu venu stopala predstavlja invazivan i bolan metod), venografija i venska ultrasonografija, magnetno rezonantna angiografija (ne spada u često primenjivane rutinske dijagnostičke metode) (Hirsh i Lee, 2002). Ultrazvuk je prepoznatljiv kao vrlo precizan dijagnostički metod, kada simptomatologija pacijenta sugeriše postojanje akutne venske tromboze donjih ekstremiteta (DiVittorio i sar., 2002).

Nuklearno medicinske tehnike

Nuklearna medicina, zajedno sa tehnikama za radionuklidnu vizuelizaciju, koristi visoko specifične molekule, obeležene radionuklidima, koji se, zbog povoljnih fiziko-hemijskih osobina, mogu primeniti u dijagnostičkim postupcima (Andrew i Heaton, 1987; Basse-Chathalinat i Tendero, 2001; Dixon i sar., 2001). Ona zauzima jedinstveno mesto u proceni različitih oboljenja zbog visoke senzitivnosti za detekciju malih količina biološki važnih supstanci. U metode koje se koriste za dijagnozu i detekciju DVT-a, mogu se ubrojiti:

- Vizuelizacija pomoću radioaktivno-obeležanog fibrinogena sa radioaktivnim jodom¹³¹, čija upotreba datira još od 60-tih godina prošlog veka (Schaible i Alavi, 1991).
- Perfuziona scintigrafija – najeksplozivniji metod u nuklearnoj medicini za vizuelizaciju plućne vaskularne mreže, koja koristi makroagregiran serum albumin (MAA) obeležen tehnecijumom-99m. Ona je još uvek jedini postupak koji se smatra urgentnim u nuklearnoj medicini i predstavlja prvi izbor kod akutnih embolija.
- Radionuklidna venografija - veoma eksploatirana metoda u nuklearnoj medicini, gde se kao radiofarmaceutik koristi isto tako MAA - tehnecijum-99m.
- Radionuklidna vizuelizacija aplikacijom nove generacije nuklearno-medicinskih tehnika. One se pre svega razvijaju u smeru da pokažu biološke osobine obolelog tkiva (Sampson, 1996; Kearon i sar., 1998; Ried, 2001; Schmitz i sar., 2001; Scherer i sar., 2002; Linnemann i sar., 2008; Hayward i sar., 2010; Tomiyama, 2014).

Radionuklidna vizuelizacija primenom radiofarmaceutika

Upotrebom radiofarmaceutika koji po sastavu mogu biti neorganskog ili organskog porekla, obeleženi i kompleksirani radioaktivnim izotopima (najčešće Indijum [¹¹¹In] ili Tehnecijum [^{99m}Tc]). Više od 15 godina radiofarmaci peptidnog porekla, mali peptidi, antitela u radioaktivnom obliku, koriste se za diferencijaciju promena kao i za razlikovanje malignih od benignih promena u plućnom regionu. Ovi preparati, preko praćenja nastalih specifičnih patofizioloških promena (ćelijska aktivacija, apoptoza, ekspresija receptora) daju informaciju o biohemijskom procesu koji želimo da pratimo (Wasser, 1989; Wasser i Pauwels, 1990).

U vreme pojave GPIIb/IIIa antagonista, kao lekova u kardiologiji, javio se interes da se oni i njima slični lekovi koriste kao potencijalni radiofarmaceutici, i da zamene metodu korišćenja radioaktivno obeležanih autolognih trombocita. Pojavili su se radioaktivni peptidi obeležavani Tehnecijumom (^{99m}Tc) kao apcicide – Diatide, pokušaji obeležavanja c7E3 Fab antitela (abciksimab), kao i malih peptidomimetika koji prepoznaju specifično mesto

vezivanja fibrinogena preko RGD sekvence (Arg-Gly-Asp), kao tirofiban i eptifibatid. Jedini komercijalni preparat – apticide nije mogao da pruži željene rezultate u detekciji tromboembolijskih promena verovatno zbog hemijskog sastava i poteškoća stvaranja stabilnog radioaktivnog kompleksa (Knigh i sar., 1999; Taillefer, 1999; Klem i sar., 2000; Mitchel i sar., 2000; Thakur i sar., 2000; Ciborowski i Tomasiak, 2009).

Upotrebom modifikovanog rekombinantnog tkivnog plazminogena, obeleženog tehnecijumom [^{99m}Tc rt-PA], može da se dijagnosticira akutna DVT-a i kod simptomatskih i kod nesimptomatskih pacijenata, naročito kod onih koji imaju takozvanu sekundarnu epizodu, posle 12 do 24 meseca od primarnog dijagnosticiranja (Janssen i sar., 2001). U isto vreme ovaj kompleks može biti i pokazatelj starosti tromba. Pozitivan nalaz ^{99m}Tc rt-PA pokazuje da tromb nije stariji od 30 dana.

Svi dosad korišćeni radioaktivni preparati za dijagnozu DVT-e dali su visok doprinos za što efikasnije i blagovremenije dijagnostikovanje ranih i akutnih faza ovog oboljenja. U isto vreme daju nam uvid i u biološke karaktersitike formiranog tromba. To je razlog zbog kojeg je sve aktuelnija potreba za proširenjem palete radioaktivnih preparata, koji svojim fiziko-hemijskim karaktersitikama odgovaraju za primenu kod ljudi u postavljanje dijagnoze rane DVT-e.

Strategija za proširenje grupe radioaktivnih preparata za detekciju DVT-e ide u smeru upotrebe radioaktivno obeleženih antagonista GPIIb/IIIa receptora, koji su visoko specifični za vezivanje za aktivirane trombocite, a time za detekciju rane DVT-e.

U prilog ovome postavljena je i hipoteza u upotrebi farmakološki aktivnih preparata, inhibitora GPIIb/IIIa receptora, u malim dozama, obeleženim radioaktivnim izotopima. Na ovaj način zadržava se visoki afinitet i specifičnost vezivanja za receptore, ali pri tom ne izazivaju antiagregacioni (terapijski) efekat. U tome je njihova prednost, jer se mogu upotrebiti samo za vizuelizaciju mesta gde je nastala promena (Lister-James i sar., 1996; Liu i sar., 1997).

1.7. Inhibitori GPIIb/IIIa receptora

Trombocitni glikoproteinski I Ib/IIIa (GPIIb/IIIa) receptor predstavlja ključnu komponentu u procesu trombocitne agregacije, a time i ciljno mesto za terapijsku intervenciju (Coller i Shattil, 2008; Lippi i sar., 2011; Coller, 2014).

Postoje nekoliko klasa inhibitora GPIIb/IIIa receptora (Fintel, 2001; Hirsh, 2001; Joel 2001) koji inhibiraju trombocitnu funkciju u fazi njihovog agregiranja, preko zauzimanja fibrinogenkih mesta za vezivanje (Coller, 1997; Neumann i sar., 2001; Seifferd i sar., 2002).

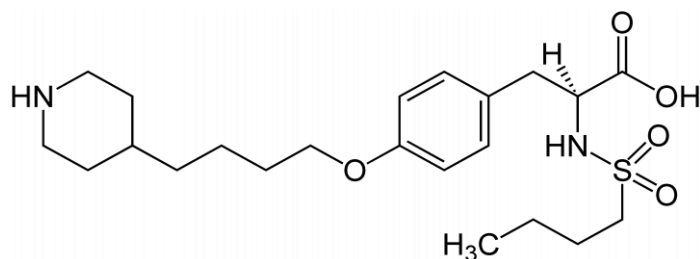
Ovde spadaju:

- 1) monoklonska antitela – *abciksimab* koja imaju Fab fragment čiji je varijabilni region od pacova, a konstantni region je humanog porekla (Ferguson i sar., 1998; Ferguson, 2002; Saltzman i sar., 2010)
- 2) RGD ciklični peptidi – *eptifibatid*
- 3) Nepeptidni inhibitori GPIIb/IIIa receptora (peptidomimetici) – *tirofiban* (Aggrastat, Merck)

Tirofiban, eptifibatid i abciksimab su tri GPIIb/IIIa inhibitora odobrena za upotrebu u SAD (King i sar., 2016).

1.8. Tirofiban

Tirofiban (N-(butilsulfoni)-4-O-(4-(4-piperidil)-L-tirozin), prikazan na Slici 5. To je nepeptidni tirozinski derivat, visoko selektivan, kratkodelujući inhibitor fibrinogenkog mesta vezivanja za trombocitni glikoproteinski receptor I Ib/IIIa. Kao molekul sa malom molarnom masom tirofiban ima veliku prednost, kako u postupku za njegovo obeležavanje radioaktivnim izotopima, tako i pri njegovoj aplikaciji u organizam, bez opasnosti od pojave imunoloških reakcija nakon primene. Takođe, bitan parametar je i njegova brza eliminacija iz organizma (Cook i sar., 1999; Cho, 2000; Ali i sar., 2000; Abulencia i sar., 2001; Jagroop i Mikhailidis, 2008; Fitzgerald i Fitzgerald, 2013).



Slika 5. Hemijska struktura tirofibana

1.8.1. Mehanizam delovanja tirofibana

Tirofiban-hidrochlorid (tirofiban) je nepeptidni antagonist GP IIb/IIIa receptora, najvažnijeg receptora na površini trombocita koji je uključen u proces agregacije trombocita. Tirofiban sprečava vezivanje fibrinogena za GP IIb/IIIa receptore i na taj način onemogućava agregaciju trombocita (Hiramatsu i sar., 1997; Sorensen i sar., 1998; Hirsh i Weitz, 1999; Ciborowski i sar., 2008; Chang i sar., 2015). Tirofiban koči funkcije trombocita što je dokazano njegovom sposobnošću da *ex vivo* inhibira agregaciju trombocita indukovanu ADP-om i da produži vreme krvarenja. Funkcija trombocita se vraća na normalu u periodu od 8 sati nakon prekida uzimanja leka (Vickers i sar., 1999). Inhibicija zavisi od koncentracije tirofibana u plazmi (Zhao i sar., 2008).

1.8.2. Farmakodinamski efekti

Pri primeni 0,4 mikrograma/kg/min infuzije tirofibana datog u kombinovanoj terapiji sa nefrakcionisanim heparinom i ASA-om, tirofiban je doveo do inhibicije *ex vivo* agregacije trombocita indukovane ADP-om za više od 70% (srednja vrednost od 89%) kod 93% lečenih pacijenata i produženja vremena krvarenja 2,9 puta tokom infuzije. Inhibicija je postignuta ubrzo nakon udarne doze infuzije u trajanju od 30 minuta i održavana je tokom trajanja infuzije. Primena bolus doze tirofibana od 25 mcg/kg (nastavljene 18-24 sata infuzijom održavanja brzinom 0,15 mcg/kg/min) u kombinaciji sa nefrakcionisanim heparinom i oralnim inhibitorima agregacije trombocita, dovela je do prosečne ADP-indukovane inhibicije maksimalne agregacije od 92% do 95% mereno svetlosnom agregometrijom (LTA), 15 do 60 minuta nakon početka primene. Obim ove inhibicije srazmeran je koncentraciji tirofibana u plazmi (Jayasundera i sar., 1999; Loredana i sar., 2013; King i sar., 2016). Kod pacijenata sa malim rizikom, koji loše reaguju na standardne oralne inhibitore trombocita (aspirin ili klopidogrel), inhibicije trombocita sa tirofibanom smanjuje učestalost infarkta miokarda nakon koronarne intervencije (Valgimigli i sar., 2009).

1.8.3. Farmakokinetički podaci

Distribucija

Tirofiban ne vezuje se u značajnoj meri za proteine plazme, a vezivanje za proteine je nezavisno od koncentracije leka u opsegu od 0,01 do 25 mcg/mL. Nevezani deo leka u plazmi čoveka iznosi 35%. Volumen distribucije tirofibana u ravnotežnom stanju je oko 30 litara. (Cook i sar., 1999; Kondo i Umemura, 2002).

Biotransformacija

Ispitivanja sa ^{14}C obeleženim tirofibanom pokazala su prisustvo radioaktivnosti u urini i fecesu, koje je uglavnom vodilo poreklo od nepromenjenog tirofibana. Radioaktivnost zabeležena u plazmi najvećim delom potiče od nepromenjenog tirofibana (do 10 sati nakon davanja leka). Ovi podaci ukazuju na ograničeni metabolizam tirofibana (Cook i sar., 1999; Kondo i Umemura, 2002).

Eliminacija

Nakon intravenske primene ^{14}C obeleženog tirofibana zdravim dobrovoljcima, 66% radioaktivnosti uočeno je u urini, a 23% u fecesu. Ukupno izlučivanje radioaktivnosti bilo je 91%. Izlučivanje putem bubrega i žuči značajno doprinosi eliminaciji tirofibana. Kod zdravih dobrovoljaca plazma klirens tirofibana je oko 250 mL/min. Bubrežni klirens iznosi 39-69% klirensa plazme. Poluvreme eliminacije je oko 1,5 sati (Cook i sar., 1999; Kondo i Umemura, 2002).

1.8.4. Predklinički podaci o bezbednosti leka

Predklinički podaci zasnovani na konvencionalnim ispitivanjima bezbednosne farmakologije, toksičnost posle ponovljenih doza i genotoksičnost nisu ukazali na postojanje posebne opasnosti od primene leka kod ljudi. Predklinička *in vivo* farmakologija tirofibana najobimnije je opisana kod psa (Cook i sar., 1999). Ispitivanja na ženkama i mužjacima pacova intravenskom primenom doza do 5 mg/kg/dan tirofiban-hidrohlorida, nisu pokazala uticaj na fertilitet i reproduktivnost. Ove doze su oko 22 puta više od maksimalno preporučene dnevne doze kod ljudi. Međutim, ispitivanja na životinjama nisu dovoljna da bi se izveo zaključak o reproduktivnoj toksičnosti leka kod ljudi. Tirofiban prolazi kroz placentu kod pacova i kunića. Na pacovima je tretirana optimalna koncentracija tirofibana za regulisanje stepena reperfuzije miokarda (Chang i sar., 2015).

1.8.5. Klinička efikasnost i bezbednost

Na bazi izvedenih šest kliničkih studija određena je efikasnost i bezbednost tirofibana kod pacijenata sa akutnim koronarnim sindromom (nestabilna angina/infarkt miokarda), kod kojih su glavne karakteristike produženi ili ponovljeni simptomi kardijalne ishemije (Kereiakes i sar., 1996, Chang i sar., 2015).

Primenu tirofibana u velikoj dozi (25 mg, bolus), tokom PCI-a, inicirao je Schneider. On je komparirao visoke doze bolus tirofibana sa dvostrukim preporučenim dozama eptifibatida i pokazao superiornost tirofibana (Schiariti i sar., 2011). Naredne studije pokazale su suboptimalanu inhibiciju trombocita u toku prva 2 sata nakon i.v. bolus administracije GP (Valgimigli i sar., 2012). Osnovne komplikacije ove terapije bili su krvarenje i trombocitopenija (Ji i Hou, 2011).

Na osnovu rezultata kliničkih ispitivanja može se zaključiti da je tirofiban klinički efikasan i veoma bezbedan u propisanim dozama, što nam daje za pravo da razmišljamo o njegovom markiranju radioaktivnim izotopima i upotrebom kao bezbednog radiofarmaceutika za vizuelizaciju DVT-e, u manjim dozama koje neće imati farmakoterapijski efekat (Zhenxian i sar., 2009; Yang i sar., 2015).

Tirofiban, po svom sastavu, je mala molekula koja podseća na tirozin. Zbog sličnosti sa tirozinskom molekulom, rodila se ideja za njegovo obeležavanje radioaktivnim izotopom, sa istim pristupom koji koristimo i za obeležavanje tirozina. Efikasnost obeležavanja tirofibana zavisi od niza faktora, pre svega od karakterisitika samog nuklida kojeg koristimo za obeležavanje, kao i načina njegovog inkorporiranja u proteinski molekul. Pored fizičkih faktora ($T_{1/2}$ i energije zračenja radionuklida), bitan faktor je i namena preparata. Ukoliko nam je cilj da dobijemo preparat namenjen za dijagnostiku, onda je potreban visoki fotonski denzitet da bi postigli visoku rezuluciju, neophodnu za vizuelizacione studije (gama emiter). Jačina fotonske energije upotrebljenog radionuklida treba da bude prilagođena sistemima za detekciju (gama kamera), dajući pri tome minimalnu tkivnu apsorpciju. Idealna energija gama emisije koja se efikasno detektuje gama kamerom je između 100 i 200 keV. Takođe, preparat namenjen za aplikaciju u živi organizam treba da ispunjava i druge kriterijume kao što su: osnovni kriterijumi za kvalitet, sterilnost, apirogenost, hemijsku i radiohemijsku čistoću, *in vitro* i *in vivo* stabilnost.

^{99m}Tc -Tehnecijum je jedan od najupotrebljivanih radionuklida u nuklearno-medicinskim vizuelizacionim studijama. Izvanredne karakteristike ovog radioaktivnog izotopa – čisti gama emiter sa energijom zračenja od 140 keV i vreme poluraspada od 6 sati (dovoljno dugo da bi se napravile potrebne studije sa minimalnom radijacionom dozom koja se aplikuje pacijentu), idu u prilog njegove upotrebe. Lako je dostupan u svakoj prilici, zato što se dobija svakodnevno koristeći molibden [^{99}Mo] generatorski sistem u niskim koncentracijama i visokom specifičnom radioaktivnošću.

Tirofiban se reverzibilno vezuje za GPIIb/IIIa receptore na isti način kao što se vezuje i fibrinogen, a može se videti samo u aktivnom ugrušku. Ovaj fenomen pokazuje razliku između akutnog i hroničnog ugruška, pri upotrebi radiofarmaceutika. Obeležavanjem tirofibana sa radioaktivnim izotopom ^{99m}Tc -Tehnecium-a, kao optimalnim gama emiterom, podobnim za dijagnostičku upotrebu, mogle bi se detektovati patološke promene krvnih sudova, identifikovati lokalizacija tromba i odrediti morfološke karakteristike tromba (Cook i sar., 1999).

2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Cilj ove doktorske disertacije je ispitivanje potencijala tirofibana (antagonist trombocitnih GPIIb/IIIa receptora) kao radiofarmaceutika i mogućnosti njegove primene za vizuelizaciju rane duboke venske tromboze.

Ovo bi se postiglo obeležavanjem tirofibana sa radioaktivnim izotopom ^{99m}Tc -tehnecijum, kako optimalnim gama emiterom podobnim za dijagnostičku upotrebu.

Upotrebom radioaktivno obeleženog tirofibana mogle bi se detektovati patološke promene krvnih sudova, identifikovati lokalizacija tromba i odrediti morfološke karakteristike tromba.

Tirofiban, kao nepeptidni GPIIb/IIIa antagonist, ima značajnu prednost u odnosu na ostale GPIIb/IIIa ligande, zbog specifičnih karakteristika.

Sa namerom da se ova dijagnostička metoda primenjuje u budućnosti kod humane populacije, sva ispitivanja su rađena na eksperimentalnom animalnom modelu, koji bi trebao da pomogne u određivanju i determinisanju osnovnih i važnih parametara, neophodnih i bitnih za uvođenje jedne nove dijagnostičke procedure.

Na osnovu priloženog, cilj našeg istraživanja je:

1. Uvođenje metode za radioaktivno obeležavanje tirofibana tehnecijumom- 99m , kao potencijalnog radiofarmaceutika za detekciju tromboembolijskih promena.
2. Određivanje limita detekcije, odnosno najmanje koncentracije tirofibana koja nema terapijsku efikasnost, uz očuvani afititet za GP IIb/IIIa receptore, koristeći *in vitro* agregacione studije na trombocitima.
3. Postavljanje eksperimentalnog animalnog modela duboke venske tromboze.

Praćenje farmakokinetike ^{99m}Tc -tirofibana nakon aplikacije, biodistribucione i vizuelizacione studije za njegovu potvrdu kao radiofarmaceutika za detekciju tromboembolijskih promena.

3. MATERIJAL I METODE

3.1. Uvođenje metode za radioaktivno obeležavanje tirofibana ^{99m}Tc-tehnecijumom

Tirofiban – GP IIb/IIIa inhibitor (Merck ser. 000700462-006X027)

^{99m}Tc-tehnecijum

^{99m}Tc-tehnecium dobili smo korišćenjem Mo⁹⁹/^{99m}Tc generatorskog sistema, ELUMATIC III, ^{99m}Tc-tehnecijum generator – CIS-bio (IBA – Francuska), 16 GBq, kao rastvor natrijum-pertehnetata u 0,9% natrijum hloridu, sa aktivnošću od 16 GBq (432mCi). Eluat koji je korišćen bio je u volumenu od 5 ml i specifičnom aktivnošću 370 – 555 MBq.

3.1.1. Priprema radiofarmaceutskog preparata u obliku liofilizovanog kita za obeležavanje

Metoda za pripremu i formulaciju preparata koji sadrži tirofiban kao radiofarmaceutik za obeležavanje sa ^{99m}Tc-tehnecijumom sastoji se u tome da se tirofiban kompleksira korišćenjem dietilen-triamin-pentasilicetne kiseline (DTPA) i stabilno ugradi u molekul (Lister-James i sar., 1996; Pearson i sar., 1996). Kalaj-hlorid (SnCl₂) korišćen je kao sredstvo za redukciju ^{99m}Tc-tehnecijuma. Molarni odnos tirofibana i kalaj-hlorida je 2:1 (20nmol:10nmol). Priprema radiofarmaceutskog preparata vršena je u atmosferi azota, procesom liofilizacije. Korišćen je liofilizator Labconco Free Zone Stoppering Tray Dryer, USA. Protokol za liofilizaciju koristio je direktno smrzavanje na početnoj temperaturi od -40°C. Vreme celog procesa liofilizacije bilo je 23 sata od početka, uključujući dijagram programa koji je imao primarno smrzavanje 1 sat na -40°C, porast temperature od -40°C do -15°C sa brzinom od 0,20°C/min, ponovno hladjenje na -40°C i zadržkom od 2 sata. Primarno sušenje je sprovedeno na temperaturi od -10°C sa brzinom zagrevanja od 0,15°C/min. Sekundarno sušenje na temperaturi od 25°C sa brzinom zagrevanja od 0,15°C/min i vakumom od 0,280 Torra.

Gotovi preparati zatvoreni čuvani su na temperaturi od 2-6°C u frižideru i bili su korišćeni za obeležavanje sa ^{99m}Tc-tehnecijumom.

3.1.2. Obeležavanje tirofibana upotrebom radioaktivnog izotopa ^{99m}Tc -tehnećijuma

Obeležavanje tirofibana sa tehnećijumom u obliku pertehnetata (NaTcO_4), rađeno je na liofiliziranom preparatu. Obeležavanje se izvodilo u sterilnim uslovima dodavanjem ^{99m}Tc -tehnećijuma u obliku pertehnetata [$^{99m}\text{TcO}_4^-$] sa aktivnošću od 10-15 mCi (370-555MBq). Inkubacija preparata bila je 15 minuta na sobnoj temperaturi sa povremenim mešanjem.

Nakon obeležavanja, a pre aplikacije preparata, bio je određen procenat vezivanja preko postupka za kontrolu radiohemijske čistoće, kao i eventualno prisustvo neželjenih, prapatnih kompleksa koji su nastali za vreme postupka za obeležavanje tirofibana.

3.1.3. Kontrola kvaliteta obeležanog radioaktivnog preparata (^{99m}Tc -tirofiban)

Kontrola je vršena upotrebom TLC traka (TLC Aluminum Sheets, EMD/Merck KGaA) od 20cm. Kao rastvarač (mobilna faza) korišćen je 95%-ni aceton. Nakon razvijanja i sušenja trake merili smo radioaktivnost pomoću skenera (Veenstra Instrument B.V. VCS-103 V1.06), programom za direktno očitavanje i vizuelizaciju hromatograma. Na taj način potvrđena je distribucija radioaktivnosti celom dužinom trake i definisana raspodela.

Određivanje radionuklidne čistoće radili smo pomoću doznog kalibratora (*Comecer*).

3.1.4. Stabilnost obeležanog preparata

Stabilnost obeležanog preparata praćena je i određivana je u periodu od obeležavanja do 6. časa nakon njegovog obeležavanja. Ovo je rađeno zbog kratkog poluživota izotopa ^{99m}Tc -tehnećijuma od 6 časova, a i zbog činjenice da preparat u tom vremenskom periodu podleže reakcijama oksidacije i hidrolize, stvarajući pri tome prapatne produkte, nepoželjne za aplikaciju. Stabilnost preparata praćena je korišćenjem metode za određivanje radiohemijske čistoće i frakcije slobodnog ^{99m}Tc -tehnećijuma pertehnetata, kao indikatora za stabilnost radioaktivnog kompleksa tirofibana.

3.2. *In vitro* agregacione studije na trombocitima

Određivanje najmanje koncentracije tirofibana bez terapijskog efekta, uz očuvani afinitet za GP IIb/IIIa receptore

In vitro agregacione studije radili smo sa neradioaktivnim tirofibanom na trombocitima, koristeći različite koncentracije ADP-a, kako bi odredili najmanju koncentraciju ADP-a koja će uzrokovati maksimalnu agregaciju trombocita i različite koncentracije tirofibana, kako bi odredili najmanju koncentraciju tirofibana koja neće imati terapijski efekat (antiagregaciona svojstva), a u isto vreme zadržaće afinitet da se veže za GP IIb/IIIa receptore.

3.2.1. *Uzimanje krvi i izolacija trombocita iz krvi*

U špric, u kome se nalaze ACD kao antikoagulans i Plasmasteril (6% hidroksietil skrob) kao sredstvo za sedimentaciju, pažljivo se uzima krv. Odnos ACD : Plasmasteril : krv treba da bude 1 : 0.5 : 5, da bi se postiglo efikasno odvajanje trombocita i sprečila koagulacija krvi za vreme tretiranja. Uzeta krv odmah se centrifugira 10 min na 180 g.

Nakon centrifugiranja od sedimentiranih eritrocita izdvaja se plazma bogata trombocitima (PRP – platelet rich plasma). U zasebnoj epruveti dodaje se ACD (1 volumen ACD na 10 volumena PRP) i centrifugira 10 minuta na 1000 g.

Posle centrifugiranja izdvaja se plazma oslobođena od ćelija (CFP – cell free plasma) i čuva se u zasebnoj epruveti, da bi se upotrebila ponovo pri resuspendovanju trombocita. Ovako dobijeni talog od trombocita (trombocitni koncentrat), sa tačno određenom koncentracijom (brojem trombocita u jedinici voluma) bio je korišćen za dalja *in vitro* ispitivanja. Broj trombocita koji je korišćen, bio je $360 \times 10^6/\text{ml}$ – $550 \times 10^6/\text{ml}$.

3.2.2. *Određivanje sposobnosti indukovane agregacije pomoću agoniste (ADP)*

(Kulkarni i sar., 2000; Louwes i sar., 2002)

Određivanje sposobnosti agregacije (spontana i indukovana) izvođena je na trombocitima dobijenim po prethodno opisanom protokolu za odvajanje i izolaciju trombocita. I pored činjenice da je najbolje kada se trombociti resuspenduju u CFP, a ne u nekom veštačkom medijumu, zato što CFP u sebi sadrži sve normalne plazma proteine i nema potrebe za dodavanjem nikakvih trombocitno aktivacionih faktora, ipak imajući u vidu da su

trombociti dobijeni iz krvi koja je uzeta u prisustvu ACD-a kao antikoagulansa, odlučili smo da ih prvo isperemo fiziološkim rastvorom i dalje da ih resuspendujemo u fiziološkom rastvoru, da bi sačuvali izotoničnost i sprečili eventualnu kontaminaciju. U isto vreme, trombocitnoj masi koja je izolovana koristeći ACD i PRP u odnosu 1:10, dodaje se 10% rastvor kalcijuma (CaCl_2), tako da finalna koncentracija kalcijuma u ispitivanim uzorcima bude 0,1 mol. Dodavanje kalcijuma je neophodno zbog toga što je on potpuno ili delimično imobiliziran zbog prisustva ACD-a.

Na 450-475 μl trombocitne mase dodavali smo 25 μl ADP rastvora sa različitim koncentracijama (1×10^{-6} mol/L, 2.5×10^{-6} mol/L, 5×10^{-6} mol/L, 7.5×10^{-6} mol/L, 5×10^{-5} mol/L i 1×10^{-4} mol/L). Proces agregacije pratili smo pomoću agregometra maksimalne voltaže od 25 mA. Postupak se odvijao u tri faze:

- 1) Dobijanje bazne linije, preko određivanja "0" tačke voltaže, merenjem CFR-a.
- 2) Merenje voltaže PRP-a, da bi dobili maksimalnu vrednost voltaže.
- 3) Određivanje agregacione sposobnosti izolovanih trombocita u prisustvu kalcijumovih jona, uz dodavanje različitih koncentracija ADP-a.

3.2.3. Određivanje inhibitornog efekta tirofibana na agregaciju trombocita

(Smith i sar., 1999; Holmes i sar., 2001; Simon i sar., 2001)

Određivanje inhibitornog efekta tirofibana na agregaciju trombocita odvijao se u istim uslovima i na isti način kao i postupak za određivanje sposobnosti agregacije trombocita u prisustvu različitih koncentracija ADP-a. U ovom slučaju koristili smo različite koncentracije tirofibana da bi utvrdili najmanju koncentraciju tirofibana koja nema antiagregatski efekat. Paralelno smo ponovili i ispitivanje uticaja različitih koncentracija ADP-a (1×10^{-6} mol/L, 2.5×10^{-6} mol/L, 5×10^{-6} mol/L, 7.5×10^{-6} mol/L, 5×10^{-5} mol/L i 1×10^{-4} mol/L) na sposobnost agregacije trombocita, da bi dobili krivu agregometara koja prikazuje inhibitorne efekte tirofibana.

3.2.4. Određivanje efekta ADP-a na agregaciju trombocita

Određivanje saturacionog vezivanja tirofibana za aktivirane trombocite od PRP izvedeno je na isti način kao i kod normalnih (inaktivnih) trombocita, sa prethodno radioaktivno obeležanim tirofibanom tehnecijumom-99m. Određivanje je rađeno na humanim trombocitima izolovanim na isti način po prethodno opisanom protokolu za odvajanje i izolaciju trombocita (Tačka 3.1.1). Aktivacija trombocita vršena je upotrebom

ADP-a i trombina u koncentracijama koje su dovoljne da se formira fibrinski ugrušak, pri inkubaciji od 30 minuta na 37°C u vodenom kupatilu. Nakon inkubacije, u reakcionu smešu dodaje se obeležani tirofiban (55MBq/05ml), 0.9% rastvor NaCl (0,5ml) i reakciona smeša ponovo se inkubira 5 minuta na 37°C u vodenom kupatilu. Posle inkubacije ugrušci se centrifugiraju 8 minuta na 1500g, odvajaju se od supernatanta i meri se radioaktivnost koristeći dozni kalibrator (Knight i sar., 1997; Hezard i sar., 2001).

Na bazi izmerene radioaktivnosti filtera, koja odgovara onoj za normalne (inaktivne) trombocite, i radioaktivnosti dodate na početku u reakcionu smešu, određuje se procenat vezivanja. Preko određivanja koncentracije dodatog i vezanog radioaktivnog tirofibana određuje se optimalna koncentracija za saturaciju receptora (Knežević i sar., 1996).

3.2.5. Određivanje efekta tirofibana na agregaciju trombocita

Određivanje saturacionog vezivanja tirofibana za trombocite iz PRP izvedeno je pomoću radioaktivno obeležanog tirofibana sa tehnecijumom-99m, na citratnu humanu krv, bez dodavanja drugih antikoagulansa (5ml krvi sa 0,5ml Na-citrata). Krv smo centrifugirali 10 minuta na 150g. PRP je bila odvojena u njoj je određen broj trombocita korišćenjem mikroskopa. Postupak određivanja saturacionog vezivanja tirofibana za trombocite iz PRP-a bio je takav da je u reakcionu epruvetu redom dodavano:

- 1) 810 µl 0.9% rastvora NaCl
- 2) 40 µl radioaktivnog tirofibana sa tačno izmerenom radioaktivnošću. Koncentracija je bila određena i sa specifičnom radioaktivnošću od 8MBq/ml i
- 3) 50 µl RPR (broj trombocita oko 2×10^8)

Smeša se inkubirala 10 minuta na sobnoj temperaturi (ne većoj od 22°C). Nakon inkubacije u reakcionu smešu dodavan je različiti volumen ADP-a (koncentracija 10µmol/L), posle čega se ponovo inkubira 10 minuta na sobnoj temperaturi.

Posle druge inkubacije trombociti se filtriraju kroz filter (Whatman No.1), prethodno potopljen i čuvan 30 minuta u 0.2% polietilenaminu. Filter se odmah ispira tri puta upotrebom 5 ml ledenog 0.9% rastvora NaCl i meri se radioaktivnost filtera pomoću doznog kalibratora.

Na bazi izmerene radioaktivnosti filtera, koja odgovara onoj za normalne (inaktivne) trombocite i radioaktivnosti dodate na početku u reakcionu smešu, određuje se procenat vezivanja. Preko određivanja koncentracije dodatog i vezanog radioaktivnog tirofibana određuje se optimalna koncentracija saturacije receptora (Knežević i sar., 1996).

3.2.6. Određivanje optimalne koncentracije radioaktivno obeleženog tirofibana za dijagnostiku

Optimalna koncentracija radioaktivno obeleženog tirofibana za dijagnostiku, bez terapijskog efekta, određena je tako što je rastvor obeleženog tirofibana sa tehnecijumom - 99m (u proseku 55MBq/05ml) bio inkubiran sa rastućom koncentracijom inaktivih (normalnih) trombocita (10^7 - 10^8 trombocita/ml)

Nakon inkubacije trombocitna suspenzija filtrira se kroz filter (Whatman No.1), prethodno potopljen i čuvan 30 minuta u 0.2% polietilenaminu. Filter se odmah ispira tri puta sa po 5 ml ledenog 0.9% rastvora NaCl i meri se radioaktivnost filtrera koristeći dozni kalibrator.

3.3. Postavljanje eksperimentalnog animalnog modela duboke venske tromboze

Formiranje tromba je komplikovani proces koji uključuje više mehanizama. Ceo niz stimulusa mogu aktivirati trombocite i/ili koagulacioni sistem i inicirati trombocitnu agregaciju (Lewis i Westwich, 1978; Barrett i sar., 1996; Lambrecht, 1996). Pri ovom procesu fibrinogen prolazi u nerastvorljivi fibrin i dovodi postepeno do stvaranja intravaskularnog ugruška (Herbert i sar., 1992; Jeske i sar., 1997; Shap i La Regime, 1998; Hennan i sar., 2002; Mapara i sar., 2012).

Prvi model tromboze je opisan 1856 godine (Robert Virchow). U tom modelu on je predložio tri kauzalna faktora koja vode do tromboze, sada poznate kao Virchow-a trijada:

- opstrukcija protoka krvi
- promene osobina krvnog sadržaja
- alteracije u unutrašnjosti krvnih sudova.

Ovi principi korišćeni su dosada od mnogih istraživača pri postavljanju i razvoju *in vivo* modela tromboze. Uglavnom su u modelima bili korišćeni najefikasniji mehanizmi koji vode do brzog formiranja tromba (Bednar i sar., 1999). Najčešće su korišćeni:

- indukovana tromboza oštećenjem unutrašnjosti krvnog suda (oštećenje endotela)
- staza krvnog suda za postavljanje hiperkoagulabilnih modela
- indukcija tromboze uvođenjem stranih tela/površine
- transgeni animalni modeli (Angelillo-Scherrer i sar., 2001).

Iako se u najvećem broju slučajeva kombinuje više od ovih trombogenih stimulusa, ipak se modeli u osnovi zasnivaju na primarnom faktoru koji dovodi do tromboze.

Modifikovanjem von Willebrandovog faktora (vWF 1326) miša razvijen je model koji je dobro korelirao sa humanom trombocitnom trombozom. Ovaj biološki model koristi se kao farmakodinamski biomarker za antitrombotičku terapiju (Magallon, 2011).

Eksperiment je bio izveden na zdravim mužjacima pacova Wistar soja. Sve planirane procedure odobrene su od strane Etičke komisije Prirodno matematičkog fakulteta Univerziteta „Sv. Kiril i Metodije“ u Skoplju za rad sa oglednim životinjama, a u saglasnosti sa Zakonom o zaštiti i blagostanju životinja (Sl. Glasnik RM, broj 149 od 13.10.2014) i Zakonom za ratifikaciju Evropske konvencije o zaštiti kičmenjaka koji se koriste za eksperimentalne i druge naučne svrhe (“Službeni glasnik RS – Međunarodni ugovori”, br. 1/2010 ili EEC Directive of 1986; 86/609/EEC). Koristili smo „međugrupni“ dizajn, odnosno, različite tretmane na različitim, nezavisnim grupama od po 6 životinja.

Eksperimentalni model DVT-a bio je postavljen ligaturom femoralne vene levog zadnjeg ekstremiteta, uz prethodnu intravensku aplikaciju 0,2 ml trombina u dorzalnu venu repa (Olfert, 1993; Schaffer 1995) mužjaka Wistar pacova, težine 180-230 g. Upotrebom ovog modela staze i izazvane hiperkoagulabilnosti, trombocitna aktivacija igra veliku ulogu u razvoju venske tromboze. Na ovako postavljeni eksperimentalni model aplikovali smo radioaktivni i neradioaktivni tirofiban putem i.v. bolus injekcije u volumenu od 0.1-0.2 ml, sa radioaktivnošću 2×10^6 imp/min. Uzorke krvi uzimali smo kardijalnom punkcijom, pomoću hepariniziranog šprica od 1 ml, na 5, 15, 30, 45 i 60 minuta nakon i.v. bolus injekcije.

Studije koje smo radili na eksperimentalnom modelu su:

- Praćenje koncentracije radioaktivnog i neradioaktivnog tirofibana u plazmi 5, 15, 30, 45 i 60 min. nakon i.v. bolus injekcije u dorzalnu venu repa (koncentracije tirofibana 0.6, 0.8 i 1mg/ml, volumen injektovanja 0.2 ml) koristeći HPLC metodu sa UV detekcijom,
- Vizuelizacija posle aplikacije radioaktivnog ^{99m}Tc -tirofibana, upotrebom gama kamere i
- Biodistribucione studije posle žrtvovanja eksperimentalne životinje, preko izolovanja kritičnih organa i merenja radioaktivnosti.

3.4. Kinetika ^{99m}Tc–tirofibana

3.4.1. Postavljanje i validacija analitičkog postupka za određivanje koncentracije neradioaktivnog tirofibana u plazmi kod eksperimentalnog modela DVT-e i kontrolnoj grupi pacova

Za određivanje koncentracije tirofibana u plazmi postavili smo i validirali HPLC metodu sa UV detekcijom. Uslovi u kojima su eksperimenti realizovani su:

- aparat Perkin Elmer Series 200, UV / VIS detektor i auto sampler,
- separacija na sobnoj temperaturi,
- kolona reverzo-fazna LiChrospher[®] 100 RP-18, 4 mm × 250 mm, veličina pora 5 μm,
- detekcija na 274 nm,
- mobilna faza 0,1 M KH₂PO₄ (pH = 5,0, sa 1,0 N NaOH) i acetonitril u volumenskom odnosu 70:30 % v/v, (RTT za tirofiban e 8,6, a za heparin 12,9)
- protok 1ml/min
- volumen injektovanja: 50 μl

3.4.2. Kalibracioni dijagram tirofibana

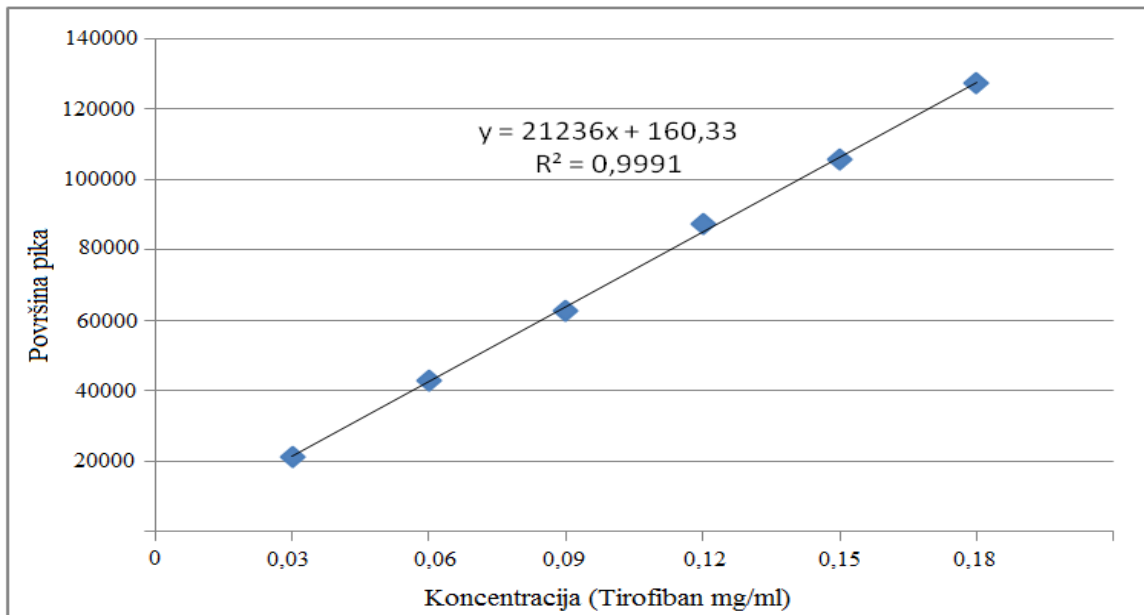
Primprema osnovnog standardnog rastvora tirofibana

Osnovni standardni rastvor tirofibana bio je pripremljen rastvaranjem 10 mg tirofibana HCl RS metanolom u odmerni sud od 50 ml.

Primprema standardnih rastvora tirofibana

Nakon odgovarajućeg razređivanja (1,5 ml; 3 ml; 4,5 ml; 6 ml; 7,5 ml i 9 ml osnovnog standardnog rastvora tirofibana do 10 ml metanolom u odmerni sud od 10 ml), koncentracija tirofibana u dobijenim rastvorima se kretala od 0,03–0,18 mg/ml. U svim rastvorima bio je dodat heparin (12500 i.j./ml).

Kalibraciona kriva za HPLC analizu bila je konstruisana kao odnos koncentracije tirofibana i dobijene površine pika, što je prikazano na Slici 6.



Slika 6. Kalibracioni dijagram tirofibana

Priprema analize - ekstrakcija tirofibana iz krvi

U uzorke humane krvi i krvi pacova, volumena 1 ml, dodavano je 30 μ l, 60 μ l, 90 μ l, 120 μ l, 150 μ l ili 180 μ l rastvora tirofibana u vodi, čija je koncentracija 3 mg/mL. Kao antikoagulans korišćen je heparin. Nakon zagrevanja u vodenom kupatilu 15 minuta sadržaj je centrifugiran 5 min na 3500 rpm/min.

Supernatant je pažljivo odvojen i dodat je metanol, u cilju precipitacije proteina, u odnosu plazma: metanol = 1:3. Zatim je sadržaj ponovo centrifugiran 5 min na 3500 rpm/min. Ovako dobijeni supernatant bio je korišćen za dalja ispitivanja. Koneentracija tirofibana u plazmi kretala se od 0,03–0,18 mg/mL.

Validacija metode urađena je preko praćenja i određivanja sledećih parametara:

- preciznost
- reproducibilnost
- selektivnost
- specifičnost
- tačnost
- linearnost
- limit detekcije
- limit kvantifikacije

3.4.3. Praćenje distribucije i eliminacije radioaktivnog tirofibana u krvi

Praćenje distribucije i eliminacije obeleženog preparata realizovano je merenjem radioaktivnosti svih uzoraka krvi uzimanih od eksperimentalnih životinja nakon aplikacije obeleženog tirofibana. Uzorci su uzimani svakih 5 minuta u prvih 30 minuta, svakih 15 minuta u narednih 2 sata i svakih 30 minuta u narednih 6 sati. Krvni uzorci uzimani su prepariranjem karotidne vene preko sistema direktnog ugrađivanja kanile. Koncentracija radioaktivnog tirofibana praćena je merenjem radioaktivnosti krvnog uzorka koji je direktno proporcionalan koncentraciji prisutnog tirofibana. Eksperimentalne životinje su sve vreme bile pod anestezijom.

3.5. Vizuelizacione studije na eksperimentalnim životinjama

Vizuelizacione studije radili smo na prethodno definisanom animalnom eksperimentalnom modelu, posle aplikacije radioaktivnog ^{99m}Tc -tirofibana, koristeći gama kameru sa visokom rezolucijom. Vremenski intervali bili su 1, 6 i 24 sata nakon injektiranja. Korišćena je "Sopha Medical" SPECT kamera sa jednim detektorom, (64 pozicija, 30 koraka, 64x64 bita i rotacija od 360°) (Hardoff i sar., 1993). Pacovi koji su bili uključeni u ispitivanju bili su pod anestezijom sa i.v. injekcijom Nesdonala (tiopenton-natrijum, vodeni rastvor 1g/100ml). Pre svakog snimanja pacov je dobijao Nesdonal u dozi 4mg na 100g telesne težine.

3.6. Biodistribucione studije radioobeležanog tirofibana kod eksperimentalnih životinja nakon i.v. aplikacije

Biodistribucione studije obeleženog tirofibana radene su na istim eksperimentalnim životinjama (Wistar pacovi) koje su bile korišćene za vizuelizacione studije (Stassen i sar., 1995; Stassen, 1997). Posle žrtvovanja životinja, izolovali smo sve kritične organe za tirofiban i radioaktivni tehnejum-99m (jetra, slezina, štitna žlezda, bubrezi i pluća), kao i krv (1 ml) i merili njihovu radioaktivnost pomoću doznog kalibratora (*Dose Calibrator – Comcer*).

Biodistribucija po organima bila je izračunata kao procenat injektovane doze (%ID/g) na gram tkiva ili izmerena aktivnost (imp/min/g tkiva). %ID/g predstavlja procenat injektovane aktivnosti koja se akumulira u gramu tkiva. Napravili smo i poređenje radioaktivnosti u trombotičnim tkivima u odnosu na radioaktivnost u ostalim tkivima, kako bi odredili realnu akumulaciju radioaktivnog tirofibana vezanog za trombocite na mestu indukovane eksperimentalne DVT-e (trombotično tkivo/ostali organi).

3.7. Obrada rezultata

Za obradu rezultata korišćeni su statistički kompjuterski programi koji su nam omogućili celokupnu obradu podataka.

Za obradu rezultata *in vitro* agregacionih ispitivanja koristili smo program "Microsoft Excel".

Dobijeni podaci iz ispitivanja ubačena su u kompjutersku bazu podataka, a zatim su statistički obrađeni pomoću sledećih statističkih metoda:

- Svi podaci od posebnog interesa za ovaj rad prikazani su i tabelarno i grafički;
- U serijama sa numeričkim oznakama, distribucija podataka testirana je Testom normalnosti (Test for normality): Kolmogorov-Smirnov test , Lilliefors - test i Shapiro-Wilks W test;
- Opis kvantitativnih podataka urađen je merama centralne tendencije (aritmetička sredina / prosek) i merama disperzije (standardna devijacija), a kod kvalitativnih podataka merama odnosa i proporcija;
- Da bi se odredila značajnost razlika između tri ili više aritmetičkih sredina kod zavisnih podataka korišćena je Friedmanova ANOVA;
- Da bi se odredila značajnost razlika između dve aritmetičke sredine kod zavisnih podataka korišćen je t-test zavisnih podataka za pravilnu distribuciju i Wilcoxon Matched Pairs test za nepravilnu distribuciju podataka;
- Da bi se odredila značajnost razlika između tri i više aritmetičkih sredina kod nezavisnih primeraka koristili smo jednofaktorijalnu analizu varijanse - One way ANOVA i Tukey (HSD) Test;
- Da bi se odredila značajnost razlika između dve aritmetičke sredine nezavisnih podataka korišćen je t-test za nezavisne primerke pri pravilnoj distribuciji i Mann-Whitney U Test kod nepravilne distribucije podataka;
- Analiza odnosa (korelacija) između numeričke statističke serije urađena je korišćenjem Pearson-og koeficijenta korelacije (r);
- Za značajne smatraju se rezultati gde je vrednost $p < 0,05$.

Slike dobijene iz vizualizacionih studija obrađene su kompjuterskim programom "Sopha Medical", koji je u sklopu gama kamere na kojoj su rađene slike eksperimentalnih životinja.

Materijal i metode

Za tumačenje rezultata biodistribucionih studija, gde smo merili radioaktivnost organa žrtvovanih životinja, koja je bila različita zbog specifičnosti distribucije, kao rezultat trombotičnih promena, koristili smo kompjuterske programe “Image-Pro Plus” i “Image-Pro Express”, firme Media Cybernetisc.

4. REZULTATI

4.1. Određivanje radionuklidne čistoće, radiohemijske čistoće i stabilnost obeležanog preparata

Liofilizirani oblici preparata gotovog za obeležavanje sa tehnecijumom-99m, pripremljeni na način opisan u Tački 3 (Materijal i metode), proveravani su organoleptički pre radioaktivnog obeležavanja. Obeležavanje je vršeno dodavanjem tehnecijuma-99m u obliku pertehnetata $[^{99m}\text{TcO}_4^-]$ sa aktivnošću od 10-15 mCi (370-555MBq). Inkubacija preparata trajala je 15 minuta na sobnoj temperaturi sa povremenim mešanjem.

Kvalitet i uspešnost obeležavanja pratili smo određivanjem radionuklidne čistoće (prisustvo neželjenih radionuklida - ^{99}Mo , kao prethodnik tehnecijuma-99m) i radiohemijske čistoće (prisustvo neželjenih, propratnih kompleksa nastalih tokom obeležavanja).

Određivanje radionuklidne čistoće

Određivanje radionuklidne čistoće vršena je pomoću doznog kalibratora. Praćeno je prisustvo molibdena [^{99}Mo], kao neželjenog, propratnog radionuklida, nakon svake elucije tehnecijumskog generatora, kao potvrda da pertehnetat, koji je korišćen za obeležavanje tirofibana, ne sadrži tragove molibdena.

Svi eluati imali su minimalno prisustvo molibdena, saglasno Evropskoj Farmakopeji, ne veće od 0.1% od aktivnosti ^{99m}Tc .

Određivanje radiohemijske čistoće

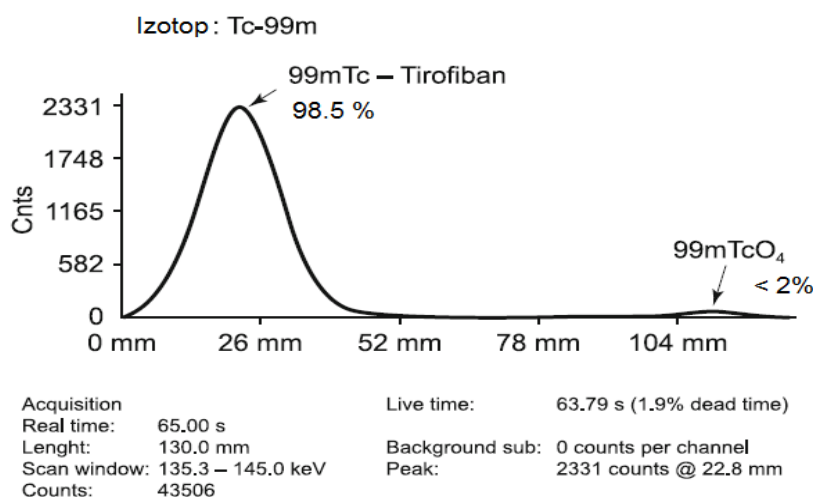
Radiohemijsku čistoću obeležanog tirofibana sa tehnecijumom-99m pratili smo upotrebom TLC traka (TLC Aluminum Sheets, EMD/Merck KGaA). Dobijeni rezultati, prikazani u Tabeli 1, predstavljaju prosečnu vrednost određivanja radiohemijske čistoće od 10 pojedinačnih obeležavanja. Na Slici 7 prikazan je hromatogram određivanja radiohemijske čistoće pomoću TLC metode.

Na osnovu rezultata koji su prikazani u Tabeli 2, kao i na Slici 7, možemo zaključiti da preparati dobijeni ovim načinom obeležavanja imaju visoku radiohemijsku čistoću (98,5%). RSD je 0.73%, što ukazuje na to da je postupak obeležavanja reproducibilan.

Tabela 2. Određivanje radiohemijske čistoće obeleženog tirofibana sa tehnecijumom-99m

Određivanje radiohemijske čistoće	
	TLC metoda (% vezanog ^{99m}Tc -tirofibana)
Obeležavanje 1	96.9
Obeležavanje 2	98.2
Obeležavanje 3	97.9
Obeležavanje 4	99.4
Obeležavanje 5	98.8
Obeležavanje 6	98.5
Obeležavanje 7	97.8
Obeležavanje 8	99.2
Obeležavanje 9	99.1
Obeležavanje 10	98.8
Prosečna vrednost	98.46
RSD	0,73

Slika 7 predstavlja jedan od hromatograma na kojem možemo da uočimo da je procenat nevezanog tehnecijuma u obliku pertehnetata $^{99m}\text{TcO}_4$ manji od 2%, što ukazuje na visoku efikasnost vezivanja u kompleks ^{99m}Tc -tirofiban.



Slika 7. Hromatogram određivanja radiohemijske čistoće obeleženog tirofibana sa tehnecijumom-99m, pomoću TLC metode (mobilna faza acetona).

Stabilnost obeleženog preparata

Stabilnost obeleženog preparata bila je praćena i određivana u periodu od 6 sati nakon obeležavanja koristeći isti naćin kontrole kvaliteta, odnosno određivanja radiohemijske ćistoće. Procenat vezanog ^{99m}Tc-pertehnetata, odnosno procenat frakcije slobodnog Tc-^{99m} pertehnetata korišćen je kao indikator za stabilnost radioaktivnog kompleksa tirofibana.

Dobijeni rezultati prikazani su u Tabeli 3.

Tabela 3. Određivanje frakcije slobodnog Tc-^{99m} pertehnetata i obeleženog tirofibana sa tehnećijumom-^{99m}

Određivanje radiohemijske ćistoće	
	TLC metoda (% slobodnog ^{99m}Tc-pertehnetata)
Odmah nakon obeležavanja	1.54
1 sat nakon obeležavanja	1.54
2 sata nakon obeležavanja	1.94
3 sata nakon obeležavanja	1.96
4 sata nakon obeležavanja	2.04
5 sati nakon obeležavanja	2.04
6 sati nakon obeležavanja	2.54

Od dobijenih rezultata koji predstavljaju srednju vrednost 10 obeležavanja možemo zaključiti da su preparati obeleženi na ovaj naćin stabilni i kao takvi mogu se koristiti i u periodu posle 6 sati nakon obeležavanja.

4.2. Obeležavanje trombocita radioaktivnim preparatom - humani trombociti i trombociti pacova

In vitro agregacione studije radili smo sa neradioaktivnim tirofibanom na humanim trombocitima i trombocitima pacova. Koristili smo različite koncentracije ADP-a, kako bi odredili najmanju koncentraciju ADP-a koja će uzrokovati maksimalnu agregaciju trombocita. Ispitali smo različite koncentracije tirofibana, kako bi odredili najmanju koncentraciju tirofibana koja neće imati terapijski efekat (antiagregaciona svojstva), a u isto vreme će zadržaće afinitet da se veže za GPIIb/IIIa receptore.

U prvom koraku hteli smo da proverimo da li je tirofiban i nakon njegove transformacije u radioaktivni kompleks sa tehnećijumom zadržao sposobnost da se vezuje za humane i animalne trombocite.

Tabela 4. Rezultati dobijeni nakon obeležavanja humanih trombocita i trombocita pacova sa radioaktivno obeleženim ^{99m}Tc -Tirofibanom

Trombociti dobijeni iz krvi pacova	dodata aktivnost (imp/min)	aktivnost nakon inkubacije i centrifugiranja (imp/min)	aktivnost nakon prvog ispiranja (imp/min)	aktivnost nakon drugog ispiranja (imp/min)
trombociti - pacov 1	174880	160132	120960	104432
trombociti - pacov 2	173785	156324	116342	109160
trombociti - pacov 3	180991	168735	126735	108151
trombociti - pacov 4	172249	160366	110366	104871
trombociti - pacov 5	176004	171514	121514	100363
trombociti - pacov 6	174072	247481	127481	100197
Trombociti dobijeni iz humane krvi	dodata aktivnost (imp/min)	aktivnost nakon inkubacije i centrifugiranja (imp/min)	aktivnost nakon prvog ispiranja (imp/min)	aktivnost nakon drugog ispiranja (imp/min)
humani trombociti 1	180820	158118	122481	100214
humani trombociti 2	171349	159960	119960	102027
humani trombociti 3	189105	178473	121473	108200
humani trombociti 4	182006	175106	109106	107536
humani trombociti 5	180674	164685	114685	101459
humani trombociti 6	178196	157152	117152	101093

Trombocitni koncentrat koji smo koristili za obeležavanje ^{99m}Tc -tirofibana dobili smo postupkom opisanim u odeljku Materijal i metod. Broj trombocita koji smo dobili nakon izolacije iz pune krvi, i brojanjem koristeći mikroskop, bio je $360 \times 10^6/\text{ml} - 550 \times 10^6/\text{ml}$. U Tabeli 4 prikazani su rezultati dobijeni nakon *in vitro* obeležavanja humanih trombocita i trombocita pacova sa ^{99m}Tc -tirofibanom i merili procenat vezivanja. Procenat vezanog ^{99m}Tc tirofibana određivali smo kao odnos dodate aktivnosti i izmerene aktivnosti nakon inkubacije, centrifugiranja i odstranjivanja plazme, kao i nakon dva ispiranja, koristeći fiziološki rastvor. Centrifugiranje, odstranjivanje plazme nakon centrifugiranja i oba ispiranja imali su cilj da odstranimo svu moguću radioaktivnost koja se nije vezala za trombocite, a bila je prisutna u rastvoru trombocita.

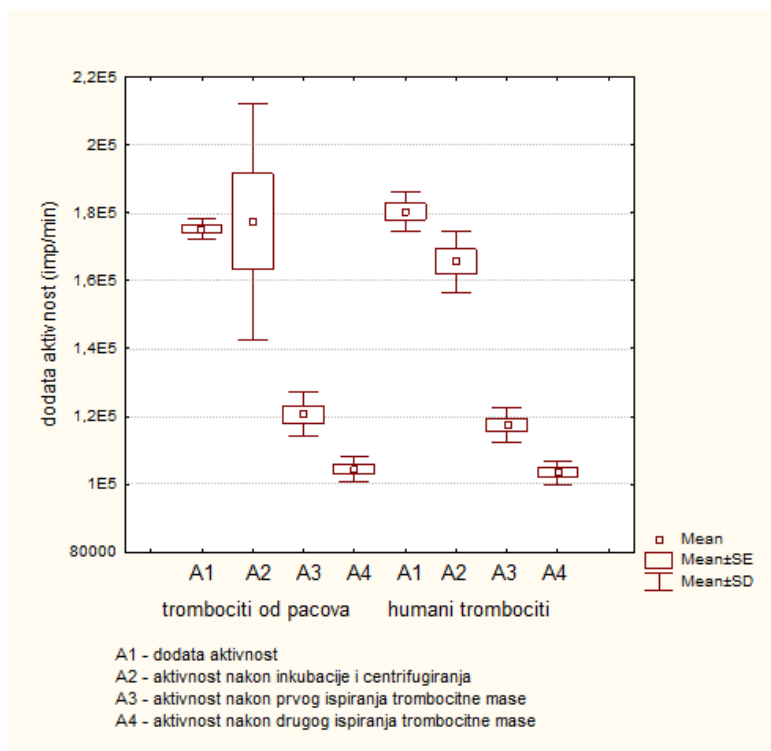
U Tabeli 5 i na Slici 8 prikazane su srednje vrednosti dodate aktivnosti (imp/min) kod humanih trombocita i trombocita dobijenih od pacova. Zbog toga što su podaci sa nepravilnom distribucijom, za određivanje značajnosti razlika u odnosu na srednje vrednosti na dodatu aktivnost (imp/min) između humanih trombocita i trombocita dobijenih od pacova, korišćen je neparametrski Mann-Whitneu U Test.

Rezultati

Tabela 5. Srednje vrednosti dodate aktivnosti (imp/min) kod humanih trombocita i trombocita dobijenih od pacova

Obeležavanje trombocita	Trombociti pacova		Humani trombociti	
	Srednja vrednost	SD	Srednja vrednost	SD
Dodata aktivnost - A1	175330,2	3038,6	180358,3	5751,1
Aktivnost posle inkubacije i centrifugiranja – A2	177425,3	34795,4	165582,3	9122,2
Aktivnost posle prvog ispiranja – A3	120566,3	6462,3	117476,2	5002,9
Aktivost posle drugog ispiranja – A4	104529,0	3763,3	103421,5	3500,5

Analiza je pokazala da nema značajnih razlika u odnosu na rezultate koje smo dobili obeležavanjem humanih trombocita i trombocita dobijenih od pacova, a što je prikazano u Tabelama 4 i 5, kao i na Slici 8.



Slika 8. Srednje vrednosti sa standardnim devijacijama i standardnim greškama dodate aktivnosti (imp/min) kod humanih trombocita i trombocita dobijenih od pacova

Određivanje značajnosti razlike između dodate aktivnosti (imp/min) kod humanih trombocita i trombocita iz krvi pacova prikazane su u Tabeli 6.

Tabela 6. Značajnost razlike između srednjih vrednosti dodate aktivnosti (imp/min) kod humanih trombocita i trombocita pacova

Obeležavanje trombocita	Mann-Whitneu U Test značajnost razlika a (p)
Dodata aktivnost - A1	Z = -1,44 p = 0,1495
Aktivnost posle inkubacije i centrifugiranja – A2	Z = 0,3202 p = 0,7487
Aktivnost posle prvog ispiranja – A3	Z = 9607 p = 0,3366
Aktivost posle drugog ispiranja – A4	Z = 0,7487 p = 0,3202

4.3. Određivanje sposobnosti indukovane agregacije pomoću ADP i inhibitornog efekta tirofibana

Određivanje sposobnosti indukovane agregacije pomoću agoniste ADP-a

Određivanje sposobnosti indukovane agregacije izvođena je na trombocitima dobijenim po već opisanom protokolu za odvajanje i izolaciju trombocita u delu Materijal i metode.

Na 450-475 μ l trombocitne mase dodavali smo 25 μ l rastvora ADP-a sa različitim koncentracijama (1×10^{-6} mol/L, 2.5×10^{-6} mol/L, 5×10^{-6} mol/L, 7.5×10^{-6} mol/L, 5×10^{-5} mol/L i 1×10^{-4} mol/L). Proces agregacije pratili smo koristeći agregometar i merenjem promene voltaže koja je bila indikator pojave agregata.

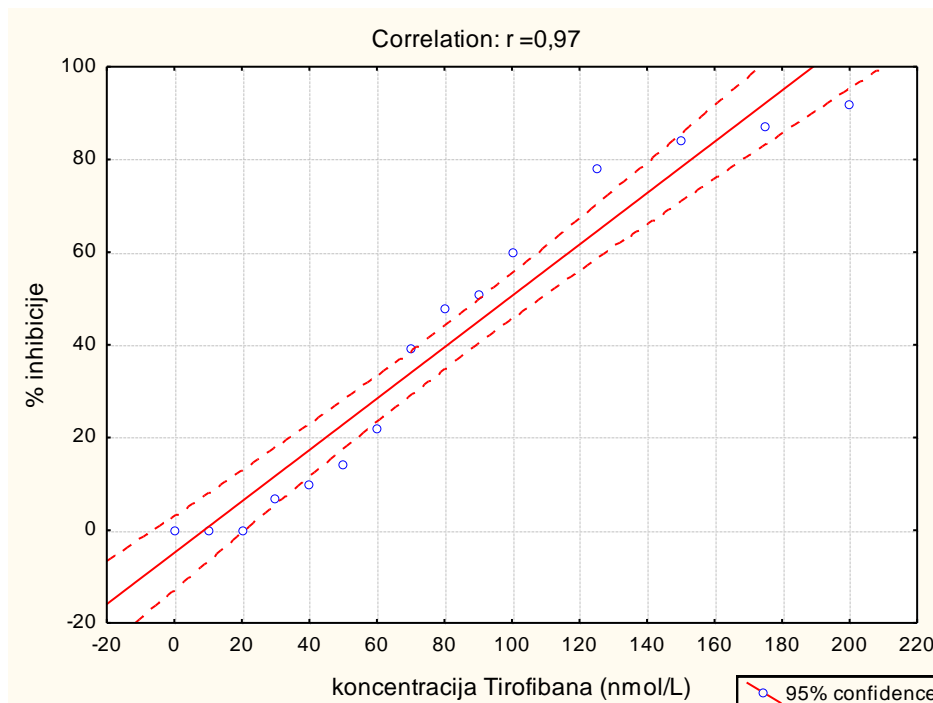
Određivanje inhibitornog efekta tirofibana na agregaciju trombocita

Određivanje inhibitornog efekta tirofibana na agregaciju trombocita odvijalo se u istim uslovima i na isti način kao i postupak za određivanje sposobnosti agregacije trombocita u prisustvu različitih koncentracija ADP-a. U ovom slučaju koristili smo različite koncentracije tirofibana da bi utvrdili najmanju koncentraciju tirofibana koja nema antiagregacijski efekat. Dobijeni rezultati prikazani su u Tabeli 7 i na Slici 9. Na osnovu prikazanih vredosti može se zaključiti da između koncentracije tirofibana (nmol/L) i procenta inhibicije humanih trombocita, postoji visoka pozitivna korelacija (Pearson – ov koeficient korelacije – $r = 0,97$).

Rezultati

Tabela 7. Koncentracije tirofibana i procenat inhibicije agregacije humanih trombocita

Koncentracija Tirofibana (nmol/L)	% inhibicije
0	0
10	0
20	0
30	7
40	10
50	14
60	22
70	39
80	48
90	51
100	60
125	78
150	84
175	87
200	92



Slika 9. Korelacija između koncentracije Tirofibana (nmol/L) i procenta inhibicije agregacije humanih trombocita

Određivanje sposobnosti indukovane agregacije trombocita pomoću agoniste ADP-a, u prisustvu konstantne koncentracije tirofibana (efekat ADP-a na agregaciju trombocita)

Na trombocitnu masu sa koncentracijom trombocita od $2.41 - 2.48 \times 10^8/\text{ml}$ dodali smo konstantnu koncentraciju tirofibana - $10 \mu\text{M}$ i različite koncentracije rastvora ADP-a i to od 1, 10 i $100 \mu\text{M}$.

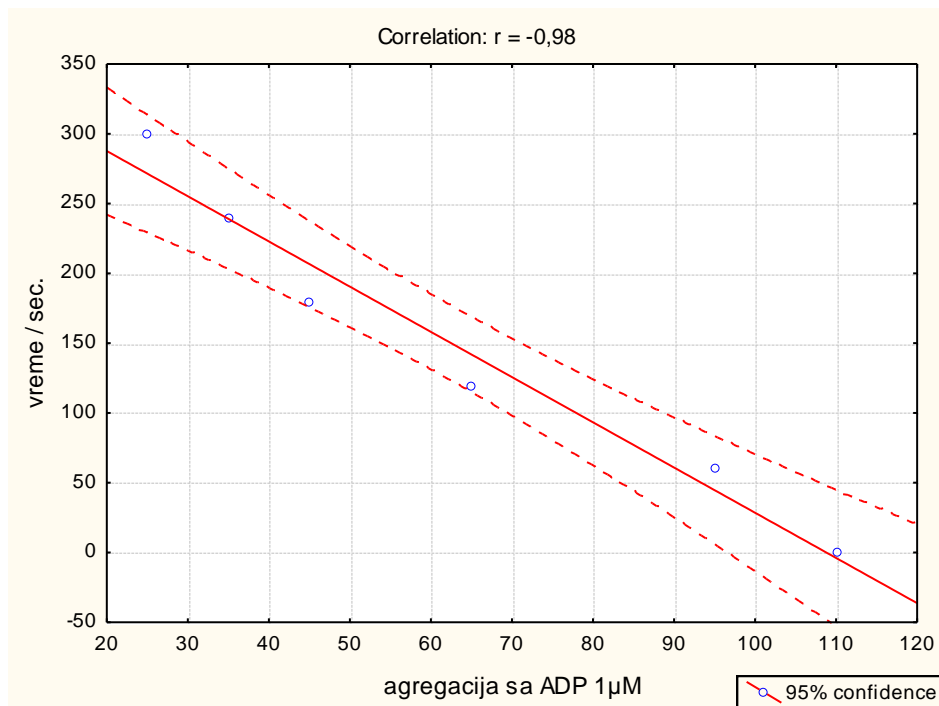
Cilj nam je bio da vidimo efekat iste koncentracije tirofibana na indukovanu agregaciju trombocita koristeći različite koncentracije ADP-a. Proces agregacije pratili smo merenjem promene voltaže na agregometaru (tablela 8).

Tabela 8. Efekat tirofibana ($10 \mu\text{M}$) na indukovanu trombocitnu agregaciju koristeći različite koncentracije ADP-a (1, 10 i $100 \mu\text{M}$)

Tirofiban $10 \mu\text{M}$, ADP-a $1 \mu\text{M}$	
Vreme (sekunde)	Agregacija (promena voltaže u %)
0	110
60	95
120	65
180	45
240	35
300	25
Tirofiban $10 \mu\text{M}$, ADP-a $10 \mu\text{M}$	
Vreme (sekunde)	Agregacija (promena voltaže u %)
0	100
60	100
120	55
180	45
240	35
300	20
Tirofiban $10 \mu\text{M}$, ADP-a $100 \mu\text{M}$	
Vreme (sekunde)	Agregacija (promena voltaže u %)
0	100
60	95
120	45
180	30
240	25
300	15

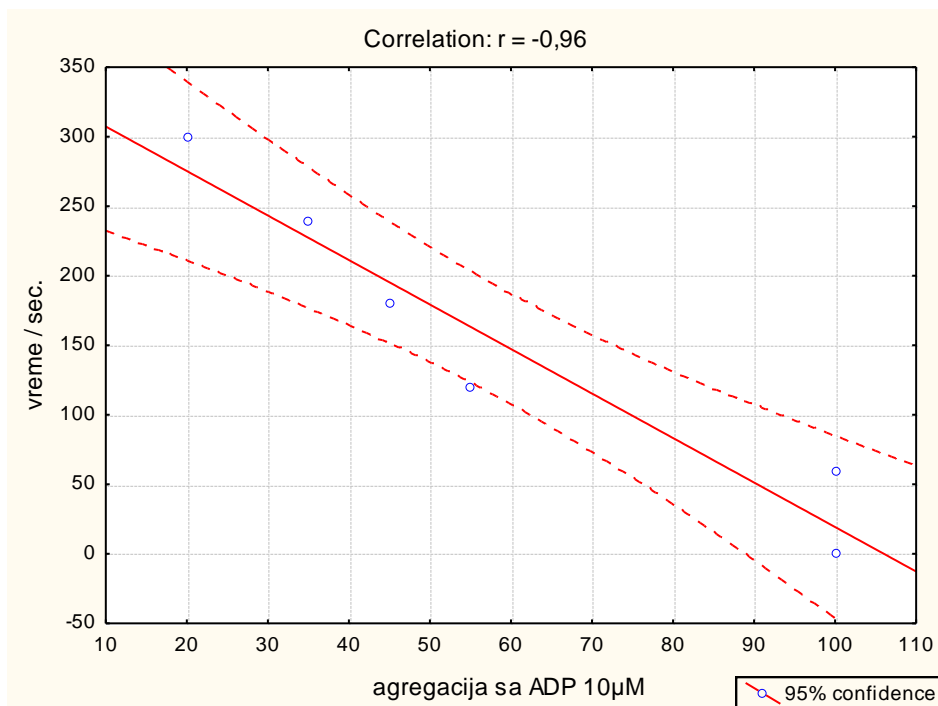
Rezultati

Kod koncentracije ADP-a od $1\mu\text{M}$, tirofiban za kratko vreme dovodi do smanjenja agregacije. Postoji visoka korelacija između vremena u sekundama i agregacije humanih trombocita (Pearson-ov koeficijent korelacije – $r = -0,98$), što je prikazano na Slici 10.



Slika 10. Efekat tirofibana na agregaciju humanih trombocita, u prisustvu $1\mu\text{M}$ ADP-a

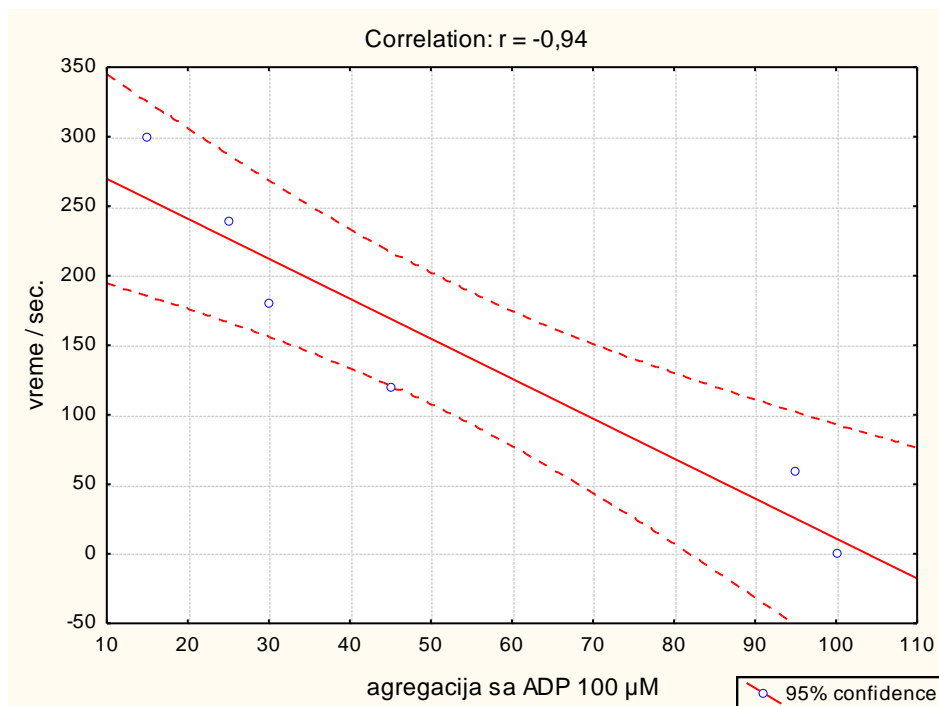
Ista koncentracija tirofibana u prisustvu $10\mu\text{M}$ ADP-a za kratko vreme dovodi do smanjenja agregacije. Postoji visoko negativna korelacija između vremena u sekundama i agregacije humanih trombocita (Pearson-ov koeficijent korelacije je – $r = -0,96$), što je prikazano u Tabeli 8 i na Slici 11.



Slika 11. Efekat tirofibana na agregaciju humanih trombocita, u prisustvu 10 µM ADP-a

Očigledno je da nema značajnijih razlika u agregaciji u odnosu na prisustvo različitih koncentracija ADP-a, odnosno korelacije dobijene sa koncentracijom od 1 µM i 10 µM su skoro jednake.

Povećanjem koncentracije ADP-a na 100 µM, tirofibana opet dovodi do smanjenja agregacije za kratko vreme, tako da i ovde dolazi do visoko negativne korelacije između vremena datog u sekundama i agregacije humanih trombocita, a što je prikazano u Tabeli 8 i na Slici 12.



Slika 12. Efekat tirofibana na agregaciju humanih trombocita, u prisustvu 100 μM ADP-a

U sva tri slučaja nema značajne razlike u agregaciji u odnosu na prisustvo različitih koncentracija ADP-a i efekta iste koncentracije tirofibana.

Određivanje sposobnosti inhibicije agregacije trombocita indukovane konstantnom koncentracijom agoniste ADP-a, koristeći različite koncentracije tirofibana (efekat tirofibana na agregaciju trombocita)

Na trombocitnu masu, sa koncentracijom trombocita od $2.41 - 2.48 \times 10^8/\text{ml}$, dodali smo konstantnu koncentraciju ADP-a (10 μM), da bi uzrokovali njihovu agregaciju *in vitro*. Potom smo dodavali različite koncentracije rastvora tirofibana (10, 20, 40, 60, 80, 100, 200 i 2000 nM).

Cilj nam je bio da vidimo inhibitorni efekat različitih koncentracija tirofibana na agregaciju indukovanu istom koncentracijom ADP-a. Proces agregacije pratili smo merenjem promene voltaže na agregometaru (Tablela 9).

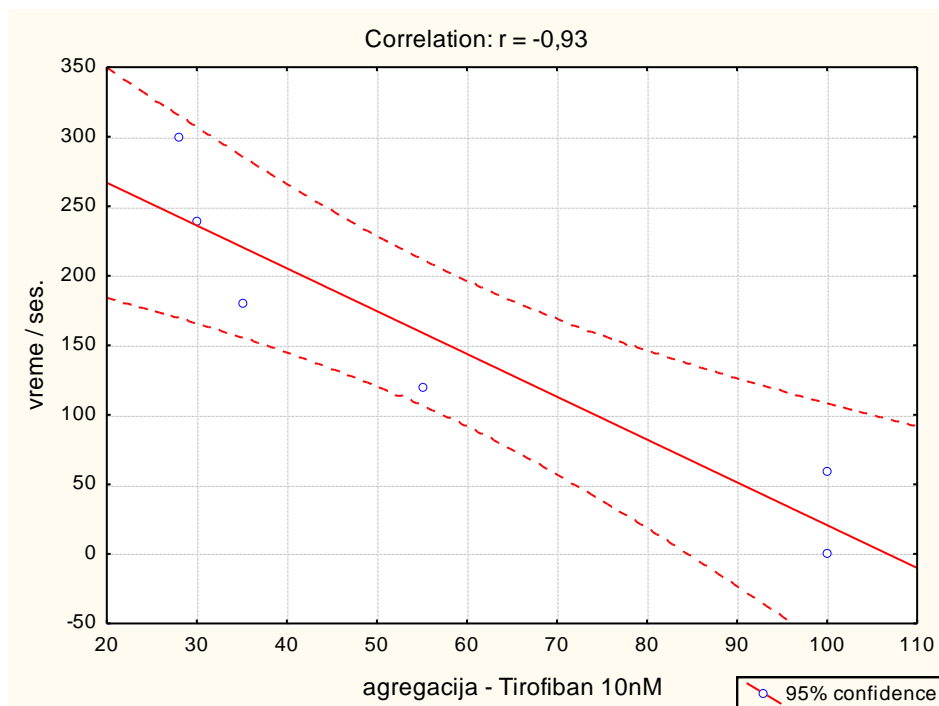
Rezultati

Tabela 9. Efekat različitih koncentracija tirofibana (10, 20, 40, 60, 80, 100, 200 i 2000 nM) na indukovanu trombocitnu agregaciju, koristeći konstantnu koncentraciju ADP-a (10 μ M)

Vreme (sekunde)	Agregacija (promena u voltaži u %)
ADP-10 μM , tirofiban 10 nM	
0	100
60	100
120	55
180	35
240	30
300	28
ADP-10 μM , tirofiban 20 nM	
0	100
60	100
120	55
180	35
240	30
300	28
ADP-10 μM , tirofiban 40 nM	
0	100
60	100
120	55
180	35
240	30
300	28
ADP-10 μM , tirofiban 60 nM	
0	100
60	100
120	55
180	35
240	30
300	25
ADP-10 μM , tirofiban 80 nM	
0	100
60	95
120	50
180	40
240	32
300	30
ADP-10 μM , tirofiban 100 nM	
0	100
60	100
120	68
180	52
240	50
300	55
ADP-10 μM , tirofiban 200 nM	
0	100
60	100
120	85
180	70
240	70
300	72
ADP-10 μM , tirofiban 2.000 nM	
0	100
60	100
120	98
180	95
240	95
300	92

Rezultati

Iz Tabele 9 i Slike 13 vidimo da postoji visoka negativna korelacija između vremena i agregacije humanih trombocita (Pearson-ov koeficijent korelacije je $-r = -0,93$) kad je korišćen tirofiban koncentracije od 10 nM u prisustvu indukovane agregacije koristeći ADP sa koncentracijom od 10 μmol .

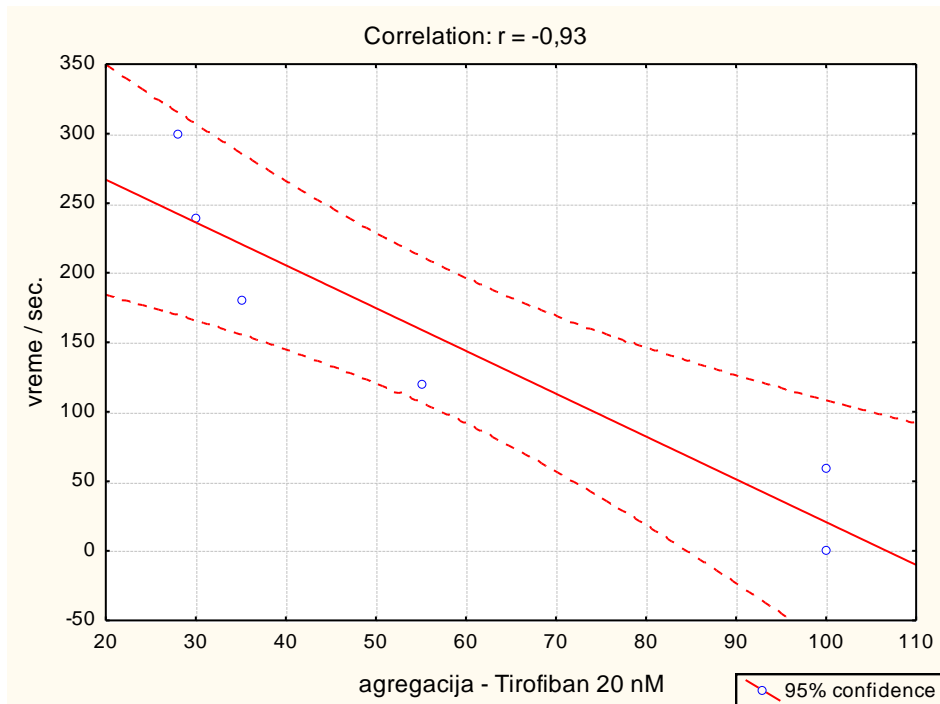


Slika 13. Efekat tirofibana sa koncentracijom od 10 nM u prisustvu indukovane agregacije humanih trombocita, koristeći ADP sa koncentracijom od 10 μmol

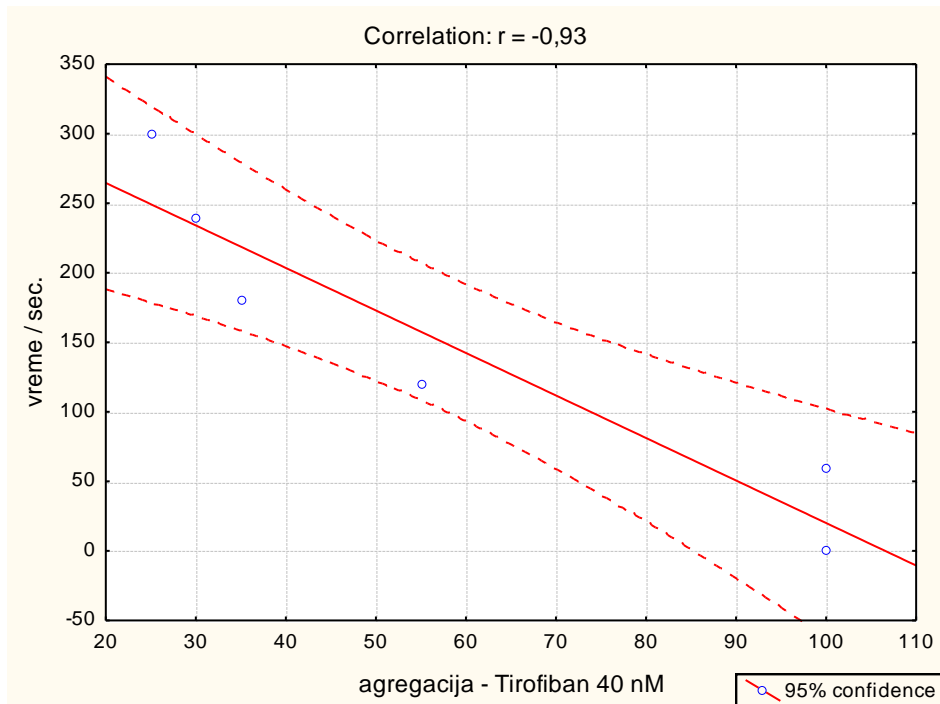
U svim ostalim analizama, u kojima smo koristili istu koncentraciju ADP-a za indukciju agregacije (10 μmol) i rasteće koncentracije tirofibana, vidimo da postoji visoka korelacija između vremena i agregacije trombocita, odnosno da je Pearson-ov koeficijent korelacije približno isti. Ovo možemo da vidimo na slikama 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, kao i na tabeli 10.

Tabela 10. Pearson-ov koeficijent korelacije kod indukovane agregacije humanih trombocita sa različitim koncentracijama tirofibana i konstantne koncentracije ADP-a

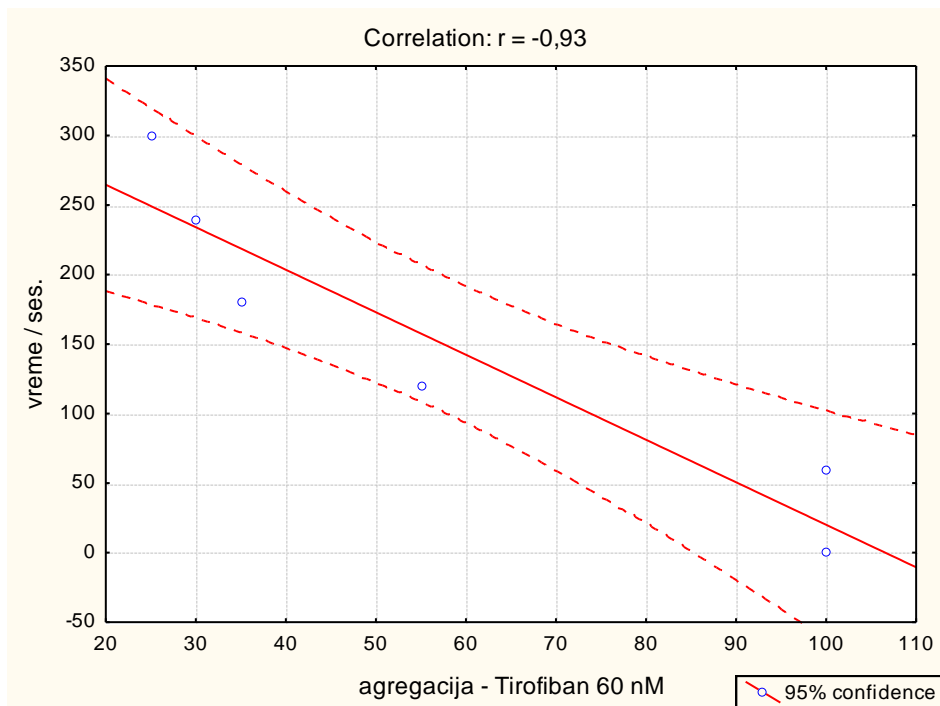
Pearson-ov koeficijent	Koncentracija tirofibana (nM) i konstantna koncentracija ADP-a od 10 μmol							
	10 nM	20 nM	40 nM	60 nM	80 nM	100 nM	200 nM	2 000 nM
	$r = -0,93$	$r = -0,93$	$r = -0,93$	$r = -0,89$	$r = -0,91$	$r = -0,96$	$r = -0,96$	$r = -0,96$



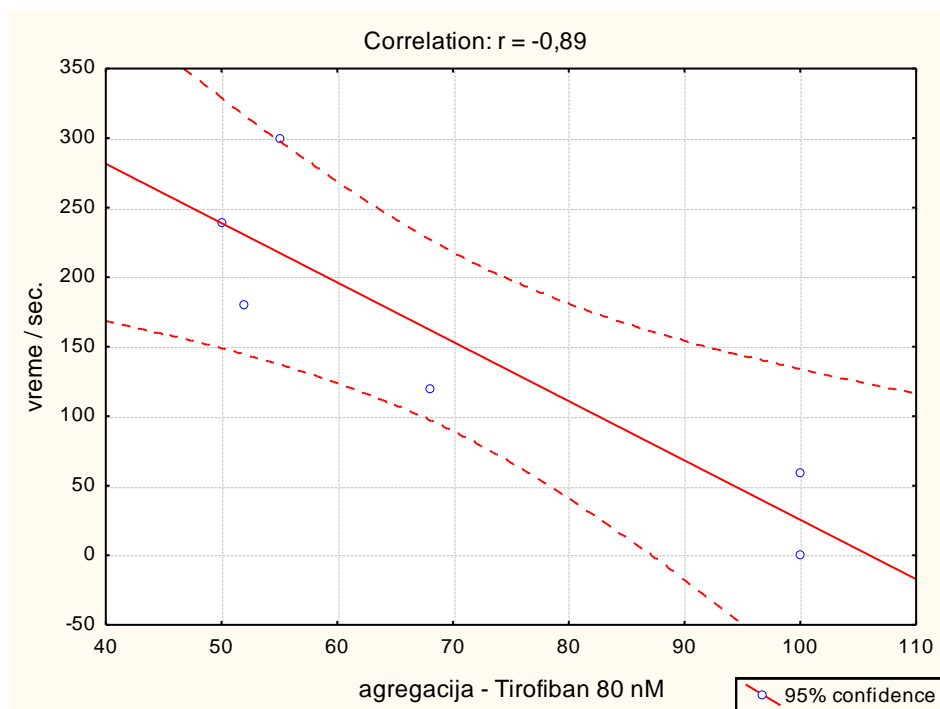
Slika 14. Efekat tirofibana sa koncentracijom od 20 nM u prisustvu indukovane agregacije humanih trombocita, koristeći ADP sa koncentracijom od 10 μ mol



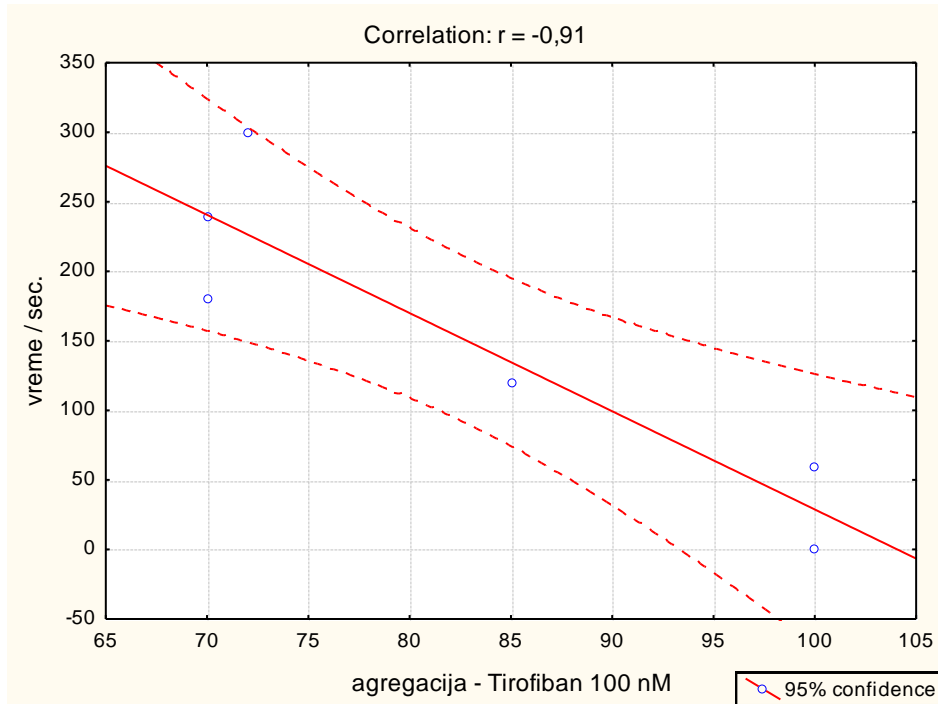
Slika 15. Efekat tirofibana sa koncentracijom od 40 nM u prisustvu indukovane agregacije humanih trombocita, koristeći ADP sa koncentracijom od 10 μ mol



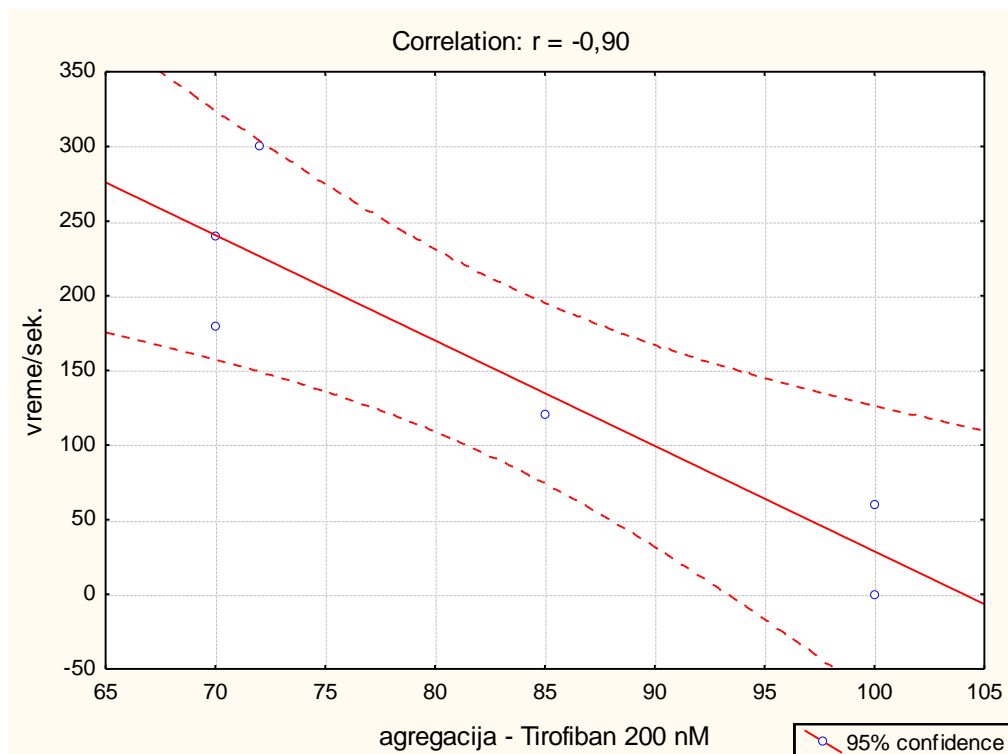
Slika 16. Efekat tirofibana sa koncentracijom od 60 nM u prisustvu indukovane agregacije humanih trombocita, koristeći ADP sa koncentracijom od 10 μ mol



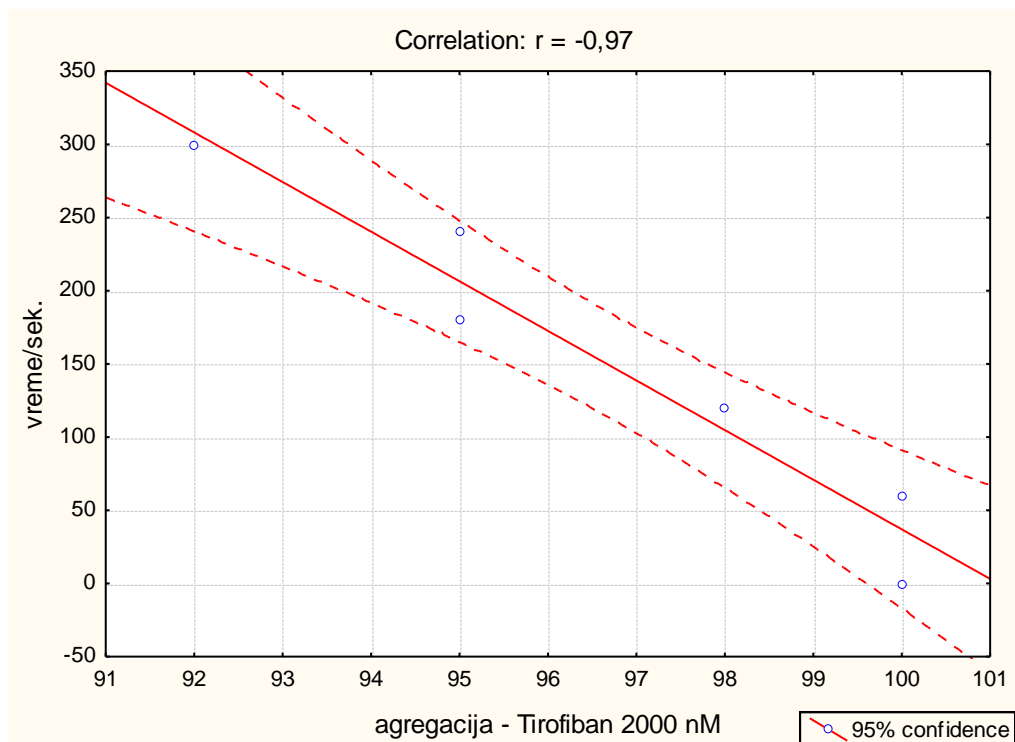
Slika 17. Efekat tirofibana sa koncentracijom od 80 nM u prisustvu indukovane agregacije humanih trombocita, koristeći ADP sa koncentracijom od 10 μ mol



Slika 18. Efekat tirofibana sa koncentracijom od 100 nM u prisustvu indukovane agregacije humanih trombocita, koristeći ADP sa koncentracijom od 10 μ mol



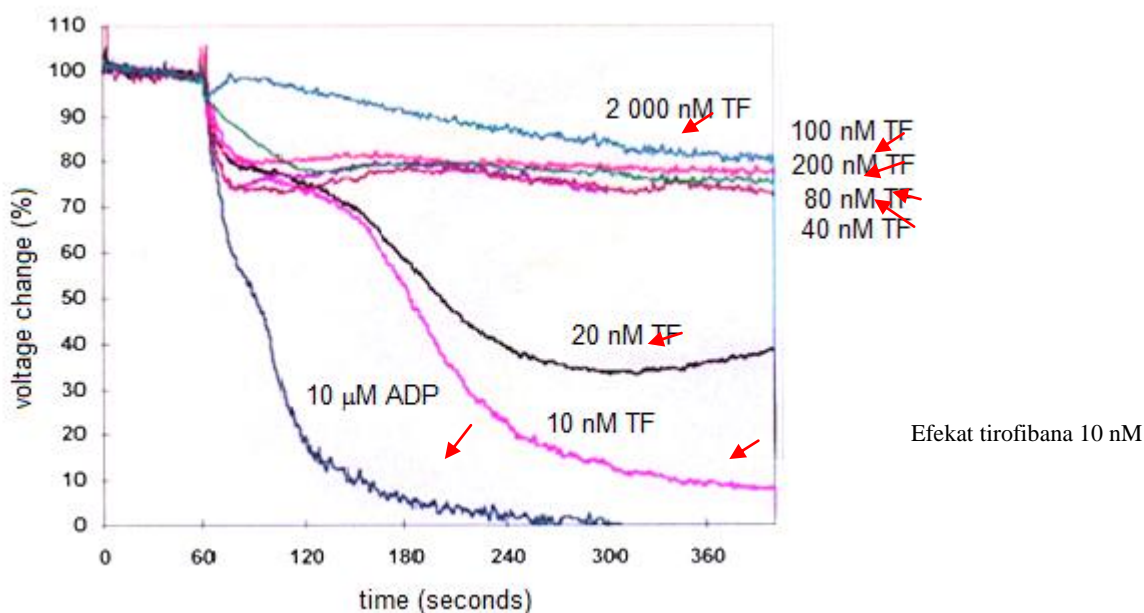
Slika 19. Efekat tirofibana sa koncentracijom od 200 nM u prisustvu indukovane agregacije humanih trombocita, koristeći ADP sa koncentracijom od 10 μ mol



Slika 20. Efekat tirofibana sa koncentracijom od 2 000 nM u prisustvu indukovane agregacije humanih trombocita, koristeći ADP sa koncentracijom od 10 μmol

4.4. Određivanje optimalne koncentracije radioaktivno obeleženog tirofibana za dijagnostiku

Na osnovu prethodnih rezultata može se zaključiti da je optimalna koncentracija radioaktivno obeleženog tirofibana za dijagnostiku, bez terapijskog efekta, manja od 10 nM. U svim našim ostalim ispitivanjima koristili smo tu koncentraciju tirofibana. Slika 21 pokazuje uticaj različitih koncentracija tirofibana na indukovanu agregaciju upotrebom konstantne koncentracije ADP-a od 10 μmol . Strelice pokazuju agregacionu krivu kod primene 10 nM tirofibana, čija je koncentracija uzeta kao minimalna vrednost ispod koje tirofiban nema vidljiv antiagregacioni efekt. Ova je koncentracija korišćena za formulaciju radiofarmaceutskog preparata i vizuelizaciju indukovane tromboze kod eksperimentalnog modela.



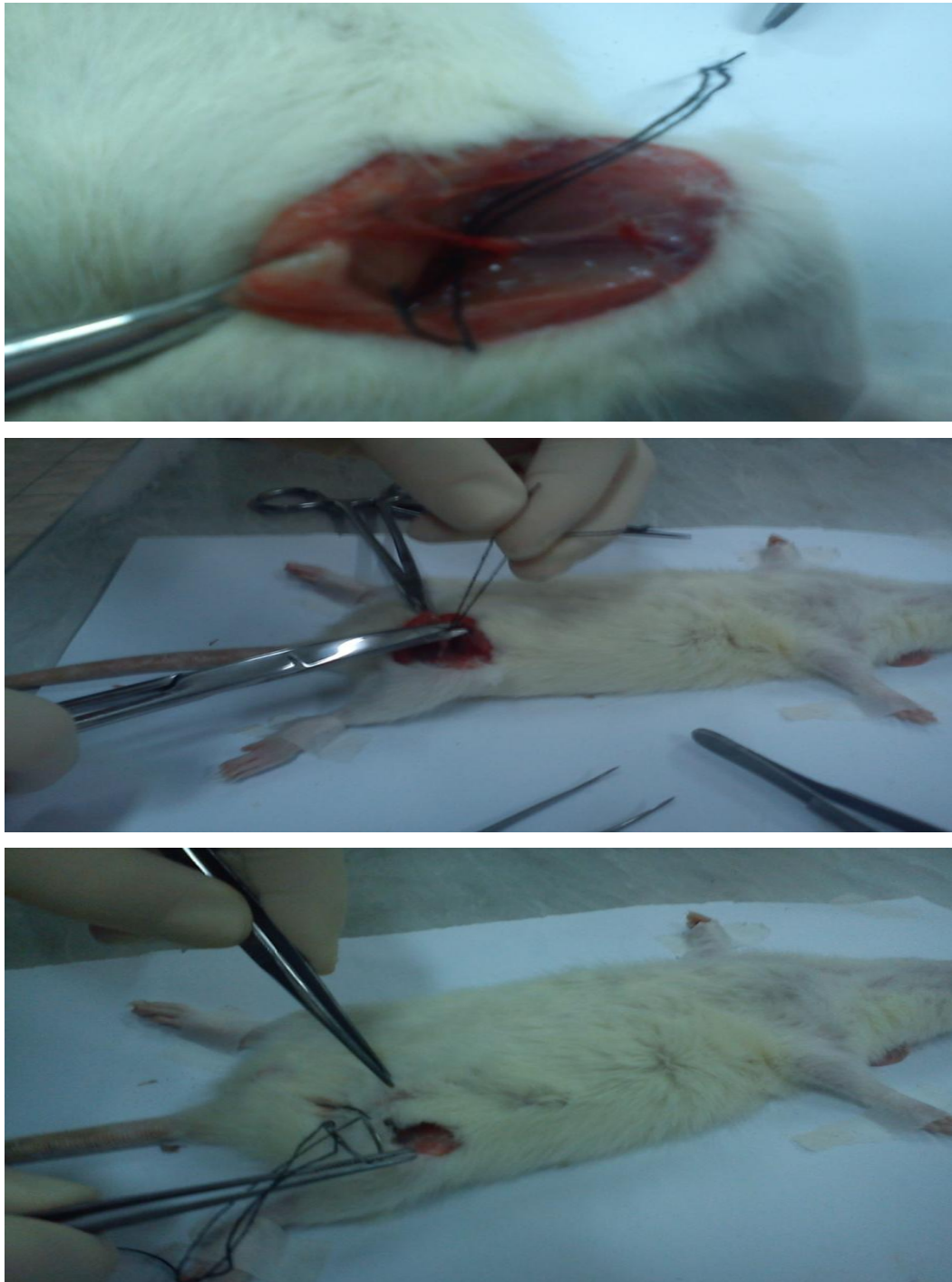
Slika 21. Agregacione krive humanih trombocita dobijene upotrebom konstantne koncentracije ADP-a i rastućih koncentracija tirofibana na proces agregacije.

4.5. Eksperimentalni animalni model duboke venske tromboze

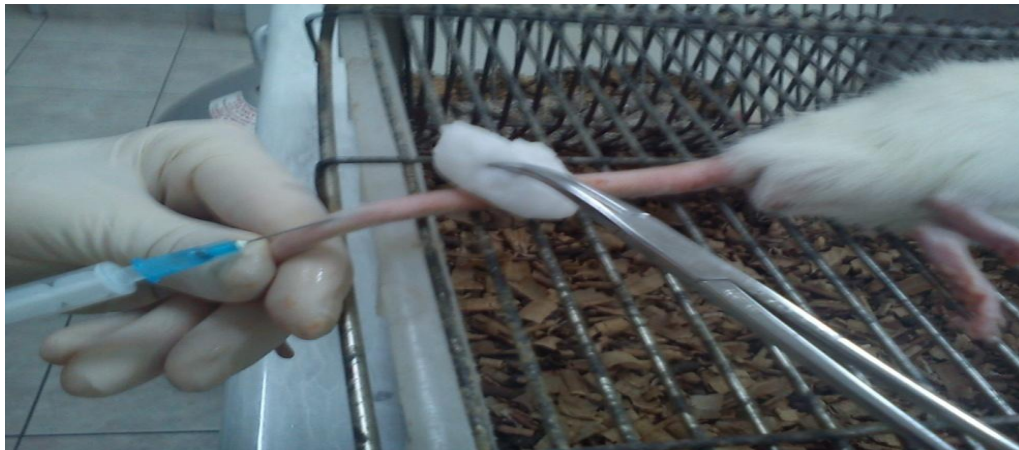
Eksperimentalni model DVT-e postavljen je ligaturom femoralne vene levog zadnjeg ekstremiteta (Slika 22), uz prethodnu intravensku aplikaciju 0,2 ml trombina u dorzalnu venu repa mužjaka Wistar pacova, težine 180-230 g. Na ovako postavljenom eksperimentalnom modelu injektovani smo radioaktivni (obeženi sa 99m -tehnecijumom) i neradioaktivni tirofiban putem i.v. bolus injekcije (Slika 23), u volumenu od 0.1-0.2 ml i radioaktivnošću 2×10^6 imp/min. Uzorke krvi uzimali smo kardijalnom punkcijom (Slika 24), pomoću hepariniziranog šprica od 1 ml, na 5, 15, 30, 45 i 60 minuta nakon i.v. bolus injekcije.

Na eksperimentalnom modelu određivali smo:

- koncentraciju neradioaktivnog tirofibana u plazmi 5, 15, 30, 45 i 60 min. nakon i.v. bolus injekcije u dorzalnu venu repa (koncentracija tirofibana 0.6, 0.8 i 1 mg/ml, volumen injektovanja 0.2 ml) koristeći HPLC metod sa UV detekcijom,
- krvnu distribuciju i eliminaciju radioaktivnog tirofibana u krvi u periodu od 24 sata merenjem krvnih uzoraka uzetih preko kanile u karotidnoj veni u periodu od 24 sata,
- vizuelizacija posle aplikacije radioaktivnog 99m Tc-tirofibana, upotrebom gama kamere i
- biodistribucione studije posle žrtvovanja eksperimentalne životinje, preko izolovanja kritičnih organa i merenja radioaktivnosti.



Slika 22. Eksperimentalni model DVT ligaturom femoralne vene levog zadnjeg ekstremiteta



Slika 23. Aplikacija radioaktivnog i neradioaktivnog tirofibana putem i.v. bolus injekcije



Slika 24. Uzimanje uzoraka krvi kardijalnom punkcijom

4.6. Validacija analitičkog postupka

Izbor rastvarača

Izbor rastvarača za pripremu standardnih rastvora i pripremu analize (ekstrakcija tirofibana iz krvi) urađen je u zavisnosti od rastorljivosti tirofibana. Tirofiban je lako rastvorljiv u metanolu. Metanol u odnosu 3:1 u krvi (krv : metanol = 1:3) precipitira proteine, tako da proteini ne ometaju dalji tok analize.

Izbor mobilne faze

Prema literaturnim podacima za identifikaciju i kvantifikaciju tirofibana koristi se reverzno-fazni hromatografski metod u kombinaciji sa acetonitrilom i fosfatnim puferom sa pH=5 (Oertel i sar., 2004). U cilju optimizacije uslova HPLC metode za određivanje tirofibana, u prisustvu heparina kao antikoagulansa, koristili smo mobilnu fazu acetonitrila i fosfatnog pufera sa pH=5, u različitom volumenskom odnosu.

Odnos acetonitrila i fosfatnog pufera sa pH=5, u volumenu od 70:30 % v/v, daje najbolje razdvajanje pikova, bez interferencije drugih komponenata iz plazme (RTT za tirofiban je 8.6, a za heparin 12.9).

Izbor talasne dužine

UV spektar tirofibana, snimljen za vreme elucije, pokazuje apsorpcioni maksimum oko 274nm, pa smo zbog toga, dalja ispitivanja radili na ovoj talasnoj dužini. Takođe, na 274nm detektuje se i heparin, koji nama nije od značaja, ali bilo je od značaja da ga razdvojimo od tirofibana, kako ne bi dalje smetao u kalkulaciji dobijenih rezultata.

Preciznost i reproducibilnost

Preciznost i reproducibilnost metode bili su potvrđeni metodom standardnih dodataka. Poznate koncentracije osnovnog standardnog rastvora tirofibana bile su dodate humanoј krvi i krvi pacova, a nakon ekstrakcije bila je određena koncentracija tirofibana. Preciznost i reproducibilnost metode bili su provereni u toku jednog dana, i ponovljena svaki naredni dan, u toku sledećih 15 dana, takođe injektovanjem istih rastvora tirofibana. Dobijeni rezultati izraženi su kao srednja vrednost za 5 injektovanja na 5 pojedinačno pripremljenih standardnih rastvora tirofibana, iste koncentracije. Relativna standardna devijacija korišćena je za potvrdu preciznosti i reproducibilnosti metode.

Tabela 11. Preciznost i reproducibilnost metode, u toku i između dana

Teorijska koncentracija (mg mL ⁻¹)	U metanolu				U plazmi pacova			
	Izmerena koncentracija u toku jednog dana (mg mL ⁻¹) ^a		Izmerena koncentracija nakon 72 časa (mg mL ⁻¹) ^b		Izmerena koncentracija u toku jednog dana (mg mL ⁻¹) ^a		Izmerena koncentracija nakon 72 časa (mg mL ⁻¹) ^b	
	Srednja vrednost	RSD%	Srednja vrednost	RSD%	Srednja vrednost	RSD%	Srednja vrednost	RSD%
0.06	0.0577	1.15	0.0564	1.27	0.0562	1.72	0.0573	1.55
0.15	0.1484	0.93	0.1475	1.33	0.1462	1.39	0.1458	1.91

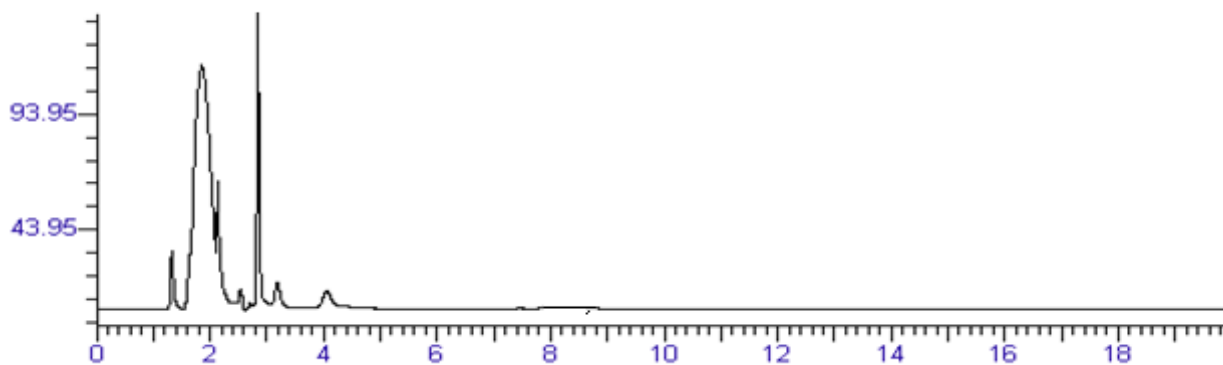
^a svaka vrednost izražena je kao srednja vrednost od 5 injektovanja na 5 pojedinačno pripremljenih standarda tirofibana. Koncentracija tirofibana merena je u istom danu

^b Stabilnost tirofibana u metanolu. Rastvoreni tirofiban u metanolu stabilan je 72 časa ako se čuva u frizideru na 4°C

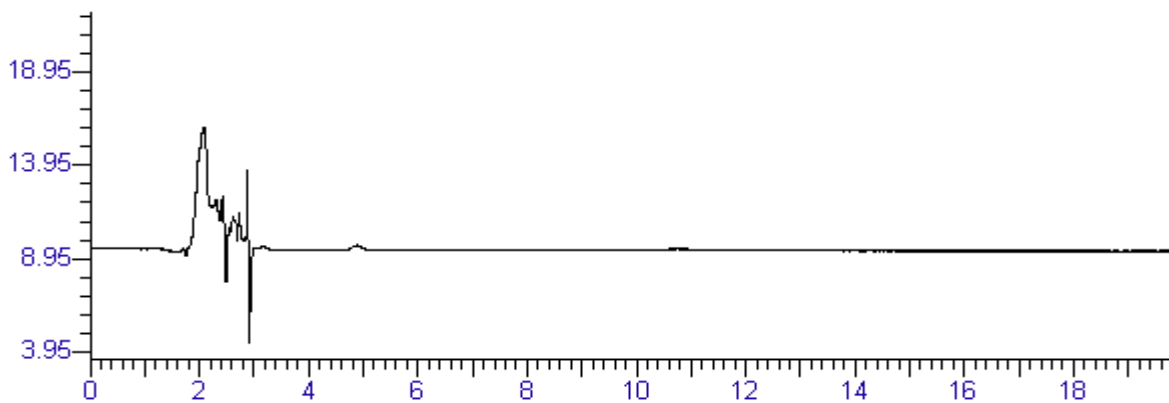
Selektivnost i specifičnost

Selektivnost i specifičnost metode potvrđene su injektovanjem slepe probe (plazma bez tirofibana) (Slika 25), rastvarača (metanol) (Slika 26), standardnog rastvora (tirofiban u metanolu, koncentracija 0,0675 mg/ml) (Slika 27), kombinovanog standardnog rastvora (tirofiban u metanolu, koncentracija 0,0675 mg/ml i heparin u metanolu 12500 i.j./ml) (Slika 28) i pomešana krv sa tirofibanom (koncentracija 0,0337 mg/ml) i heparinom (koncentracija 12500 i.j./ml) (Slika 29). Na hromatogramu analize (krv sa tirofibanom i heparinom) ne vide se ekstra pikovi koji bi mogli da potiču od endogenih supstanci u krvi (plazmi).

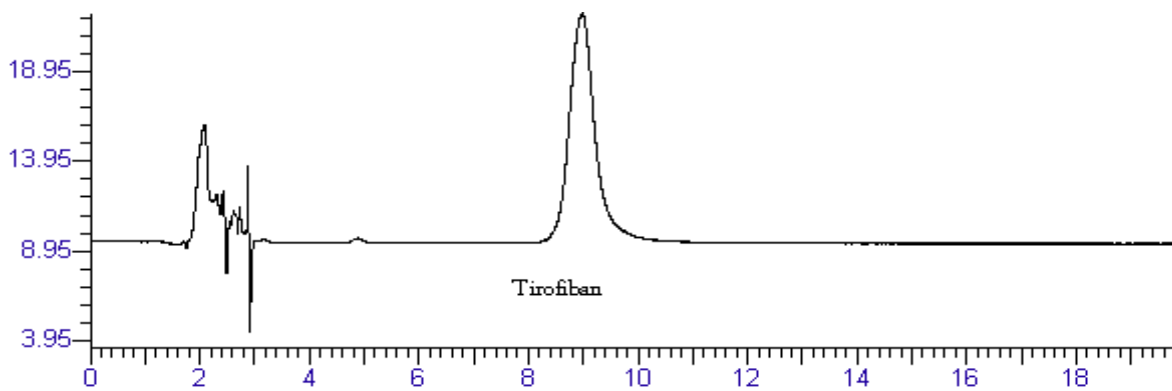
Rezultati



Slika 25. Hromatogram slepe probe (plazma bez tirofibana)

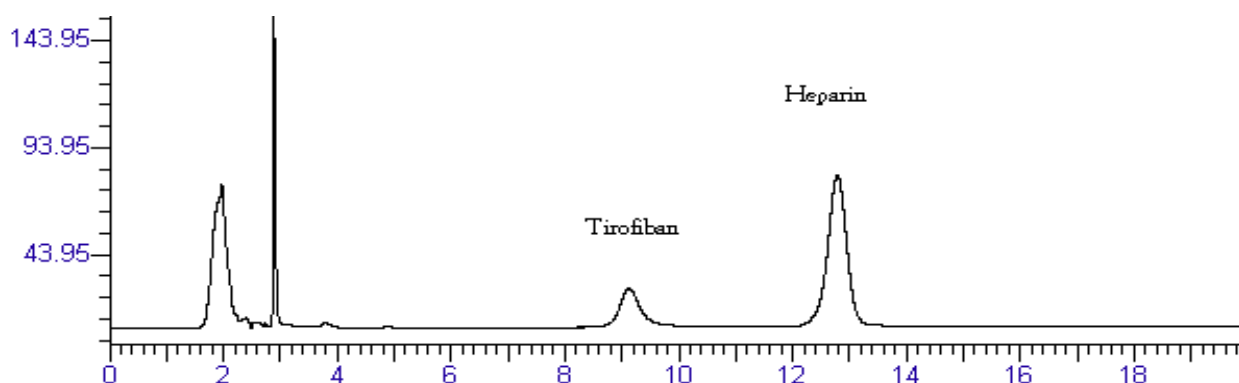


Slika 26. Hromatogram rastvarača (metanol)

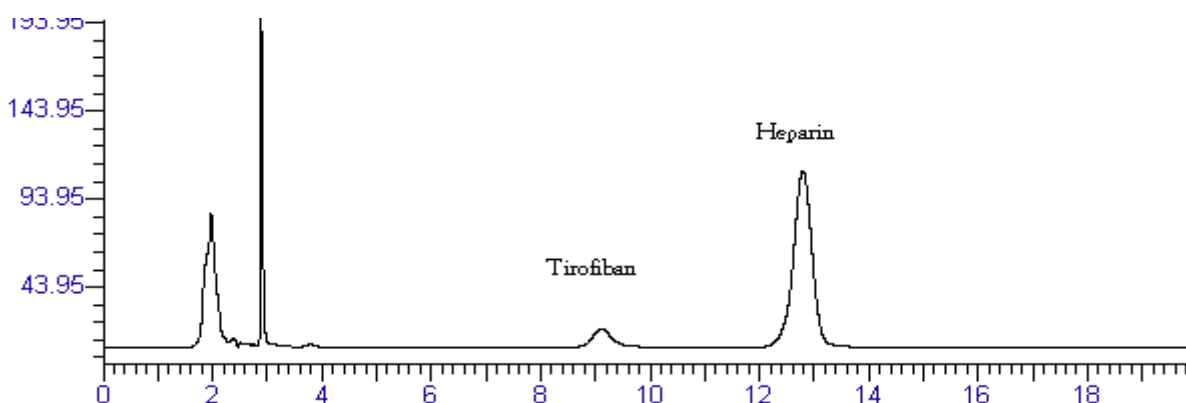


Slika 27. Hromatogram standardnog rastvora: tirofiban u metanolu, koncentracija 0,0675 mg/ml)

Rezultati



Slika 28. Hromatogram kombinovanog standardnog rastvora: tirofiban u metanolu, koncentracija 0,0675 mg/ml i heparin u metanolu koncentracija 12500 i.j./ml



Slika 29. Hromatogram pomešane krvi sa tirofibanom (koncentracija 0,0337 mg/ml) i heparinom (koncentracija 12500 i.j./ml)

Tačnost

Tačnost metode bila je potvrđena na uzorcima humane krvi i krvi pacova. Alikvoti od 1 ml humane krvi i krvi pacova bili su pomešani sa 30 μ l, 60 μ l, 90 μ l, 120 μ l, 150 μ l i 180 μ l rastvora tirofibana u vodi sa koncentracijom od 3 mg/mL i nakon ekstrakcije bila je određena koncentracija tirofibana.

Tabela 12. Rezultati određivanja tačnosti metode

Parametar	U plazmi pacova (mg/ml)	U humanoj plazmi (mg/ml)
Dodato tirofibana	0.03	0.06
Dobijena vrednost tirofibana ^a	0.029	0.058
Tačnost (%)	97.23	96.47
RSD (%)	1.55	1.75
Parametar	U plazmi pacova (mg/ml)	U humanoj plazmi (mg/ml)
Dodato tirofibana	0.09	0.12
Dobijena vrednost tirofibana ^a	0.088	0.11
Tačnost (%)	98.61	95.25
RSD (%)	1.23	1.87
Parametar	U plazmi pacova (mg/ml)	U humanoj plazmi (mg/ml)
Dodato tirofibana	0.15	0.18
Dobijena vrednost tirofibana ^a	1.40	1.69
Tačnost (%)	93.57	94.19
RSD (%)	1.62	1.93

^a srednja vrenost za 5 određivanja

Linearnost

Linearnost metode bila je potvrđena konstruisanjem kalibracione krive kao odnos koncentracije tirofibana u metanolu i pomešanoj krvi (plazmi) i dobijene površine pika. Kalibraciona kriva pokazala je linearnu zavisnost koncentracije tirofibana i dobijene površine pika u koncentraciskom opsegu od 0.03 – 0.18 mg/ml. Koeficient korelacije bio je veći od 0.99 u oba medija (tirofiban u metanolu i tirofiban u plazmi). U Tabeli 13 prikazani su rezultati.

Limit detekcije i limit kvantifikacije

Limit detekcije i limit kvantifikacije bili su određeni po formuli: $LOD = 3.3 SD/S$ i $LOQ = 10 SD/S$, gde je SD standardna devijacija odgovora (površina pika), a S je nagib kalibracione krive.

Tabela 13. Karakteristike linearne regresione analize tirofibana

	Metanol	Humana krv (plazma)	Krv od pacova (plazma)
Opseg linearnosti (mg/ml)	0.03–0.18	0.03–0.18	0.03 -0.18
Nagib	9200223	7942560	8795042
Intercept	2720.6	90750	23999
Koeficijent korelacije (r^2)	0.9999	0.9943	0.9949
SG ^a intercepta	5124.2	35082.2	36834.2
SG nagiba	43858.9	300276.9	315271.9
Limit detekcije (mg/ml)	0.0018	0.0146	0.0138
Limit kvantifikacije (mg/ml)	0.0056	0.0442	0.0419

^a SG – Standardna greška

Adekvatnost sistema

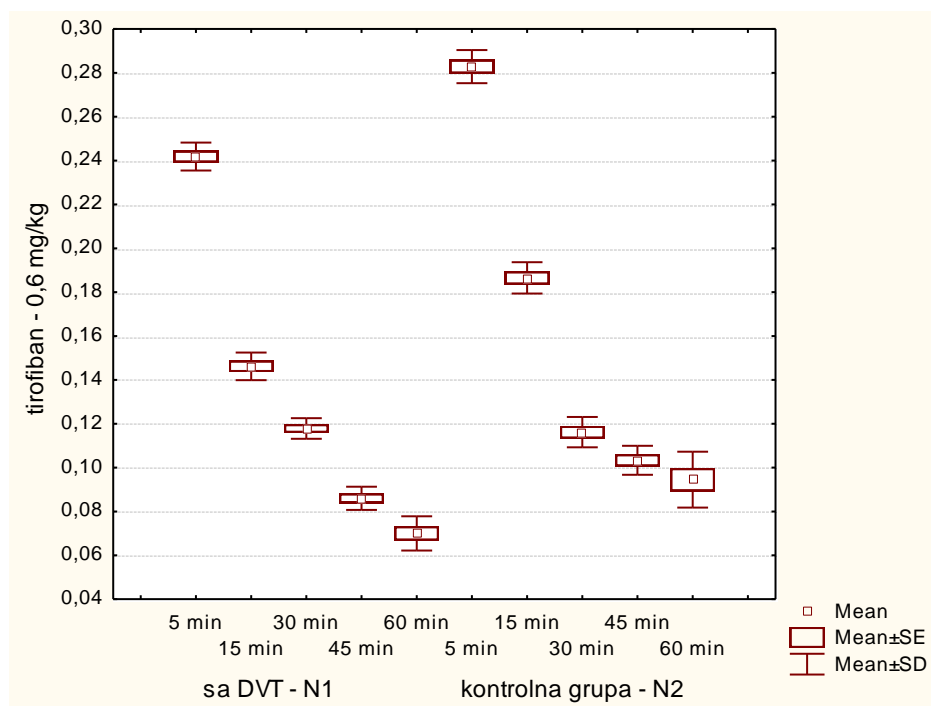
Adekvatnost sistema bila je proverena preko praćenja različitih parametara (vreme zadržavanja-retencije, faktor razvlačenja pika - tailing, faktor kapaciteta, rezolucije i selektivnosti). Za proveru adekvatnosti sistema koristili smo sveže pripremljeni standardni rastvor tirofibana u metanolu. Tailing faktor bio je 1.17, a faktor kapaciteta 2.41. Faktor rezolucije za tirofiban i heparin je bio 3.90. Retenciono vreme tirofibana u metanolu bilo je 9.1, u humanoj plazmi 9.2 i plazmi pacova 9.16. Varijacija vremena retencije između 5 injektovanja bila je veoma mala i iznosila je 0.61% za tirofiban u metanolu, 0.93% za tirofiban u humanoj plazmi i 0.82 za tirofiban u plazmi pacova.

4.6.1. Praćenje koncentracije neradioaktivnog tirofibana u plazmi

Koncentracije neradioaktivnog tirofibana u plazmi 5, 15, 30, 45 i 60 min. nakon i.v. bolus injekcije u dorzalnu venu repa (koncentracija tirofibana 0.6, 0.8 i 1 mg/ml, volumen injektovanja 0,2 ml), pratili smo koristeći HPLC metodu UV detekcijom.

Tabela 13. Srednje vrednosti koncentracije Tirofibana u serumu (mg/L) injektovanjem doze od 0,6 mg/kg kod grupe pacova sa DVT i kontrolnoj grupi u nulto vreme, posle 5,15, 30, 45 i 60 minuta

vreme/min.	Pacovi sa DVT (N1)		Kontrolna grupa (N2)	
	Prosek	SD	Prosek	SD
posle 0 min.	0,600	0,00	0,600	0,00
posle 5 min.	0,242	0,006	0,283	0,008
posle 15 min.	0,146	0,006	0,186	0,007
posle 30 min.	0,118	0,004	0,116	0,007
posle 45 min.	0,086	0,005	0,103	0,006
posle 60 min.	0,070	0,008	0,094	0,013



Slika 30. Srednje vrednosti sa standardnim devijacijama i standardnim greškama koncentracije tirofibana u serumu (mg/L) pri injektovanju doze od 0,6 mg/kg kod grupe pacova sa DVT i kontrolnoj grupi u nulto vreme, posle 5, 15, 30, 45 i 60 minuta.

Rezultati

U Tabeli 13 i Slici 30 prikazani su rezultati koncentracije neradioaktivnog tirofibana u plazmi 5, 15, 30, 45 i 60 min. nakon i.v. injekcije (0,6mg/kg).

Analiza varijanse zavisnih primeraka (u grupi) (Friedman ANOVA) pokazala je da između srednjih vrednosti koncentracije tirofibana u serumu (mg/L) pri injektovanoj dozi od 0,6 mg/kg kod grupe pacova sa DVT (N1) u zadatim vremenskim intervalima/tačkama postoje značajne razlike (ANOVA Chi Sqr.= 30,06 $p < 0,001$).

Normalno, u svakoj narednoj vremenskoj tački, koncentracija tirofibana u serumu opada. Prema t-testu zavisnih primeraka, sve međusobne razlike u odnosu na koncentraciju tirofibana u serumu u različitim merenjima, kod grupe pacova sa DVT (N1) su statistički značajne ($p < 0,001$) za razliku između koncentracije posle 45 i 60 minuta (Tabela 13 i Slika 30).

Između srednjih vrednosti koncentracije tirofibana u serumu (mg/L), pri injektovanoj dozi od 0,6 mg/kg, kod kontrolne grupe pacova (N2) u zadatim vremenskim intervalima postoje statistički značajne razlike (ANOVA Chi Sqr.= 28,38 $p < 0,001$).

Međusobne razlike u odnosu na koncentraciju tirofibana u serumu kod različitih merenja, kod kontrolne grupe pacova (N2) statistički su značajne u rasponu od $p < 0,001$ do $p = 0,0340$ za razlike između koncentracije posle 30 i 60 minuta (t-test zavisnih uzoraka).

Kod ove ispitivane grupe, ne postoji značajna razlika samo između koncentracije tirofibana u serumu (mg/L) pri injektovanoj dozi od 0,6 mg/kg posle 45 i 60 minuta ($p = 0,2736$). (Tabela 14 i Slika 30).

Prema t-testu nezavisnih uzoraka (između grupe N1 i N2), u odnosu na srednje vrednosti koncentracije tirofibana u serumu (mg/L), pri injektovanoj dozi od 0,6 mg/kg, međusobne razlike su statistički značajne posle 5 minuta, posle 15 minuta, posle 45 minuta i posle 60 minuta od injektiranja. Razlika nije značajna samo između izmerenih koncentracija posle 30 minuta ($p = 0,6359$) što vidimo u Tabeli 14.

Tabela 14. Značajnost razlika srednjih vrednosti koncentracije tirofibana u serumu (mg/L) pri injektovanoj dozi od 0,6 mg/kg kod grupe pacova sa DVT i kontrolnoj grupi u nulto vreme, posle 5,15, 30, 45 i 60 minuta

vreme/min.	Pacovi sa DVT (N1) / kontrolna grupa (N2)
	Student-ov t - test
posle 0 min.	1,0
posle 5 min.	$p < 0,001^*$
posle 15 min.	$p < 0,001^*$
posle 30 min.	$p = 0,6359$
posle 45 min.	$p < 0,001^*$
posle 60 min.	$p = 0,00244^*$

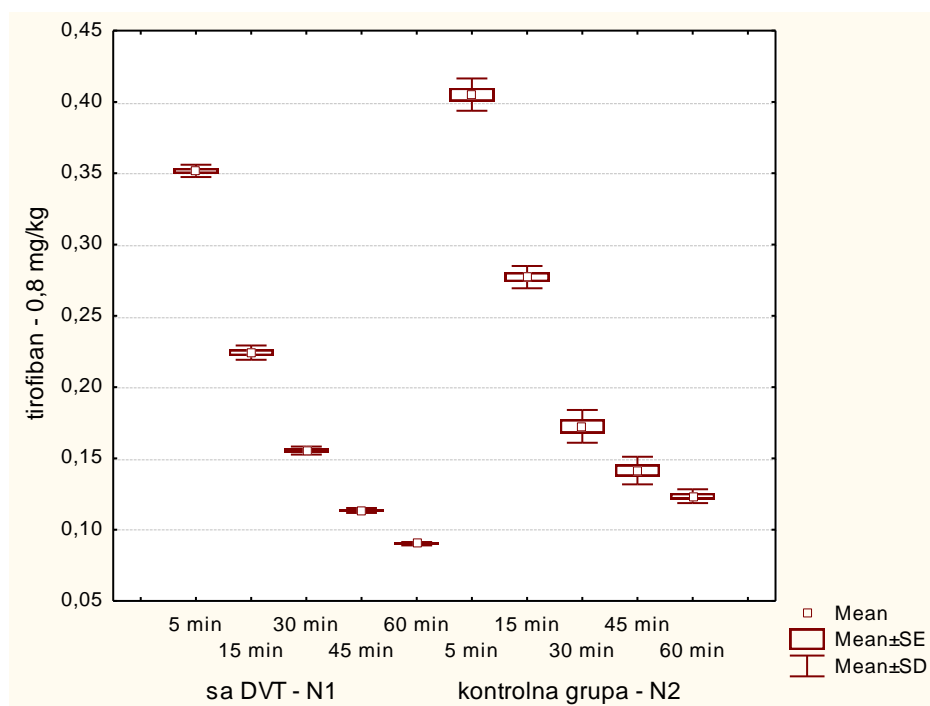
*statistički značajna razlika

Rezultati

U Tabeli 15 i Slici 31 prikazani su rezultati koncentracija neradioaktivnog tirofibana u plazmi 5, 15, 30, 45 i 60 min. nakon i.v. injekcije (0,8mg/kg).

Tabela 15. Srednje vrednosti koncentracije tirofibana u serumu (mg/L) pri injektovanoj dozi od 0,8 mg/kg kod grupe pacova sa DVT i kontrolnoj grupi u nulto vreme, posle 5,15, 30, 45 i 60 minuta

vreme/min.	Pacovi sa DVT (N1)		Kontrolna grupa (N2)	
	Prosek	SD	vreme/min.	prosek
posle 0 min.	0,800	0,00	0,800	0,00
posle 5 min.	0,352	0,004	0,405	0,011
posle 15 min.	0,224	0,005	0,277	0,007
posle 30 min.	0,155	0,003	0,172	0,011
posle 45 min.	0,113	0,002	0,141	0,009
posle 60 min.	0,090	0,001	0,123	0,005



Slika 31. Srednje vrednosti sa standardnim devijacijama i standardnim greškama koncentracije Tirofibana u serumu (mg/L) pri injektovanju doze od 0,8 mg/kg kod grupe pacova sa DVT i kontrolnoj grupi, u nulto vreme, posle 5,15, 30, 45 i 60 minuta

Analiza varijanse zavisnih primeraka (u grupi) (Friedman ANOVA), pokazala je da između srednjih vrednosti koncentracije Tirofibana u serumu (mg/L) pri injektovanoj dozi od 0,8 mg/kg kod grupe pacova sa DVT (N1) u ispitivanim vremenskim intervalima/tačkama postoje značajne razlike (ANOVA Chi Sqr.= 31,26 p<0,001).

Rezultati

U svakoj narednoj vremenskoj tački, koncentracija tirofibana u serumu opada. Prema t-test-u zavisnih primeraka, sve međusobne razlike u odnosu na koncentraciju tirofibana u serumu u različitim merenjama, kod grupe pacova sa DVT (N1) statistički su značajne ($p < 0,001$) (Tabela 15 i slika 31).

Između srednjih vrednosti koncentracije tirofibana u serumu (mg/L), pri injektovanju doze od 0,8 mg/kg, kod kontrolne grupe pacova (N2), u zadatim vremenskim intervalima postoje statistički značajne razlike (ANOVA Chi Sqr.= 30,89 $p < 0,001$).

Međusobne razlike u odnosu na koncentraciju tirofibana u serumu kod različitih merenja, kod kontrolne grupe pacova (N2) statistički su značajne u rasponu od $p < 0,001$ do $p = 0,0023$ za razlike između koncentracije posle 45 i 60 minuta (t-test zavisnih uzoraka).

Kod ove ispitivane grupe, sve razlike između koncentracije tirofibana u serumu (mg/L) pri injektovanoj dozi od 0,8 mg/kg u različitim vremenskim tačkama statistički su značajne (Tabela 16 i slika 31).

Prema t-test-u nezavisnih uzoraka (između grupe N1 i N2), u odnosu na srednje vrednosti koncentracije tirofibana u serumu (mg/L), pri injektovanoj dozi od 0,8 mg/kg, međusobne razlike su statistički značajne posle 5 minuta, posle 15 minuta, posle 45 minuta i posle 60 minuta od injektiranja. Značajna je razlika između izmerenih koncentracija u svim vremenskim tačkama što vidimo u tabeli 16.

Tabela 16. Značajne razlike srednjih vrednosti koncentracije tirofibana u serumu (mg/L) pri injektovanoj dozi od 0,8 mg/kg kod grupe pacova sa DVT i kontrolnoj grupi u nulto vreme, posle 5, 15, 30, 45 i 60 minuta

vreme/min.	Pacovi sa DVT (N1) / kontrolna grupa (N2)
	Student-ov t - test
posle 0 min.	1,0
posle 5 min.	$p < 0,001^*$
posle 15 min.	$p < 0,001^*$
posle 30 min.	$p = 0,00552^*$
posle 45 min.	$p < 0,001^*$
posle 60 min.	$p < 0,001^*$

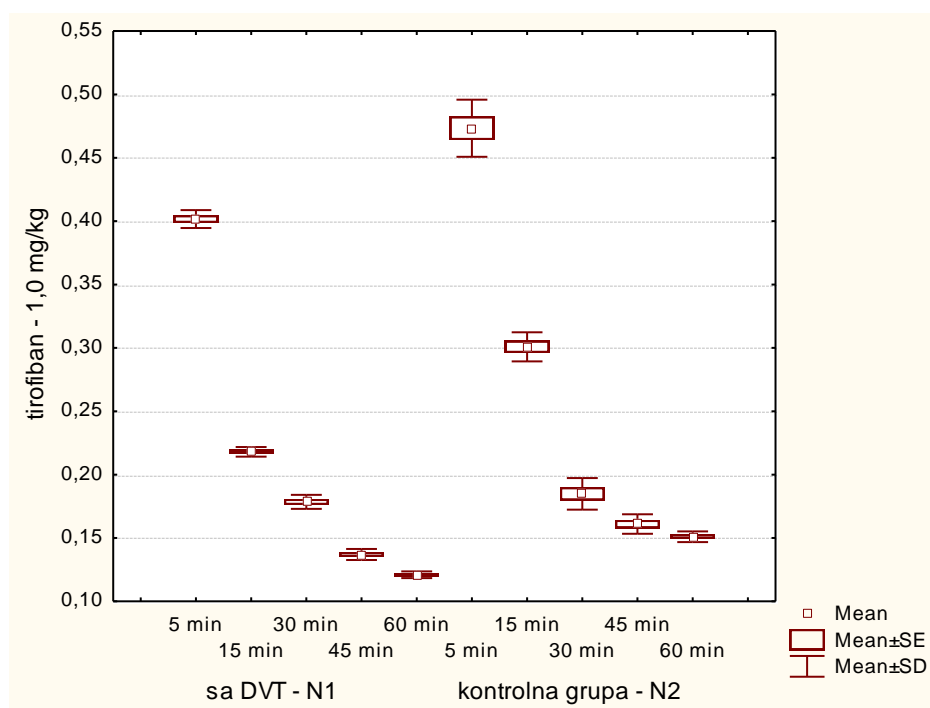
*statistički značajna razlika

U tabeli 17 i Slici 32 prikazane su koncentracije neradioaktivnog tirofibana u plazmi 5, 15, 30, 45 i 60 min. nakon i.v. injekcije (1,0 mg/kg).

Rezultati

Tabela 17. Srednje vrednosti koncentracije tirofibana u serumu (mg/L) pri injektovanoj dozi od 1,0 mg/kg kod grupe pacova sa DVT i kontrolnoj grupi u nulto vreme i posle 5,15, 30, 45 i 60 minuta

vreme/min.	Pacovi sa DVT (N1)		Kontrolna grupa (N2)	
	prosek	SD	prosek	SD
posle 0 min.	1,00	0,00	1,00	0,00
posle 5 min.	0,402	0,007	0,473	0,022
posle 15 min.	0,218	0,004	0,301	0,011
posle 30 min.	0,178	0,005	0,185	0,012
posle 45 min.	0,137	0,004	0,161	0,007
posle 60 min.	0,121	0,002	0,151	0,004



Slika 32. Srednje vrednosti sa standardnim devijacijama i standardnim greškama koncentracije tirofibana u serumu (mg/L), pri injektovanoj dozi od 1,0 mg/kg, kod grupe pacova sa DVT i kontrolnoj grupi, u nulto vreme i posle 5,15, 30, 45 i 60 minuta

Analiza varijanse zavisnih uzoraka (u grupi) (Friedman ANOVA) pokazala je da između srednjih vrednosti koncentracije tirofibana u serumu (mg/L), pri injektovanoj dozi od 1,0 mg/kg, kod grupe pacova sa DVT (N1), u ispitivanim vremenskim intervalima/tačkama postoje statistički značajne razlike (ANOVA Chi Sqr.= 30,19 $p < 0,001$).

Rezultati

U svakoj narednoj vremenskoj tački, koncentracija tirofibana u serumu opada. Prema t-test-u zavisnih uzoraka, sve međusobne razlike u odnosu na koncentraciju tirofibana u serumu u različitim merenjama, kod grupe pacova sa DVT (N1) statistički značajne su ($p < 0,001$) između koncentracije posle 45 i 60 minuta (tabela 17 i slika 32).

Između srednjih vrednosti koncentracije tirofibana u serumu (mg/L) pri injektovanju doze od 1,0 mg/kg kod kontrolne grupe pacova (N2) u zadatim vremenskim intervalima postoje statistički značajne razlike (ANOVA Chi Sqr.= 29,88 $p < 0,001$).

Međusobne razlike u odnosu na koncentraciju tirofibana u serumu kod različitih merenja, kod kontrolne grupe pacova (N2) statistički značajne su u rasponu od $p < 0,001$ do $p = 0,0295$ za razlike između koncentracije posle 45 i 60 minuta (t-test zavisnih uzoraka).

Kod ove ispitivane grupe, sve razlike između koncentracije tirofibana u serumu (mg/L) pri injektovanoj dozi od 1,0 mg/kg u različitim vremenskim tačkama statistički su značajne (Tabela 17 i Slika 32).

Prema t-test-u nezavisnih uzoraka (između grupe N1 i N2), u odnosu na srednje vrednosti koncentracije tirofibana u serumu (mg/L) pri injektovanoj dozi od 0,8 mg/kg, međusobne razlike statistički su značajne posle 5 minuta, posle 15 minuta, posle 45 minuta i posle 60 minuta od injektiranja. Razlika je značajna između izmerenih koncentracija u svim vremenskim tačkama i to je prikazano u tabeli 18.

Tabela 18. Značajnost razlika srednjih vrednosti koncentracije Tirofibana u serumu (mg/L) pri injektovanoj dozi od 1,0 mg/kg kod grupe pacova sa DVT i kontrolnoj grupi u nulto vreme, posle 5,15, 30, 45 i 60 minuta

vreme/min.	Pacovi sa DVT (N1) / kontrolna grupa (N2)
	Student-ov t - test
posle 0 min.	1,0
posle 5 min.	$p < 0,001^*$
posle 15 min.	$p < 0,001^*$
posle 30 min.	$p = 0,28241$
posle 45 min.	$p < 0,001^*$
posle 60 min.	$p < 0,001^*$

*statistički značajna razlika

Praćenje distribucije i eliminacije radioaktivnog tirofibana u periodu od 24 sata, merenjem krvnih uzoraka uzetih preko kanile u karotidnoj veni

Eliminacija radioaktivno obeleženog tirofibana od posebnog značaja je, jer ako lek u obliku radiofarmaceutskog preparata menja farmakokinetičke karakteristike, to bi moglo uticati na povećano zračenje pacijenata, zbog prisustva radioaktivnog izotopa.

Studije izvedene na leku, odnosno na neradioaktivnom obliku tirofibana, sa poznatim farmakokinetičkim svojstvima, pokazuju kratki poluživot u organizmu i brzu eliminaciju. Promena molekule nakon obeležavanja i prisustvo vezanog ^{99m}Tc -tehnećijuma moglo je dovesti i do promene farmakokinetičkih parametara.

Praćenje distribucije i eliminacije radioaktivno obeleženog ^{99m}Tc -tirofibana, uzimanje direktnih uzoraka od istog pacova u periodu od 24 sata preko kanile fiksirane u karotidnoj veni (Slika 33) i direktno merenje radioaktivnosti originalnih uzoraka omogućilo nam je da sagledamo njegovo ponašanje u organizmu ekperimentalnog pacova.



Slika 33. Uzimanje uzoraka krvi preko kanile fiksirane u karotidnoj veni kod ekperimentalnog modela pacova

U Tabeli 19 i Slici 34 prikazane su srednje vrednosti distribucije i eliminacije radioaktivno obeleženog ^{99m}Tc -tirofibana, u vremenskim razmacima (h), kod eksperimentalnih pacova.

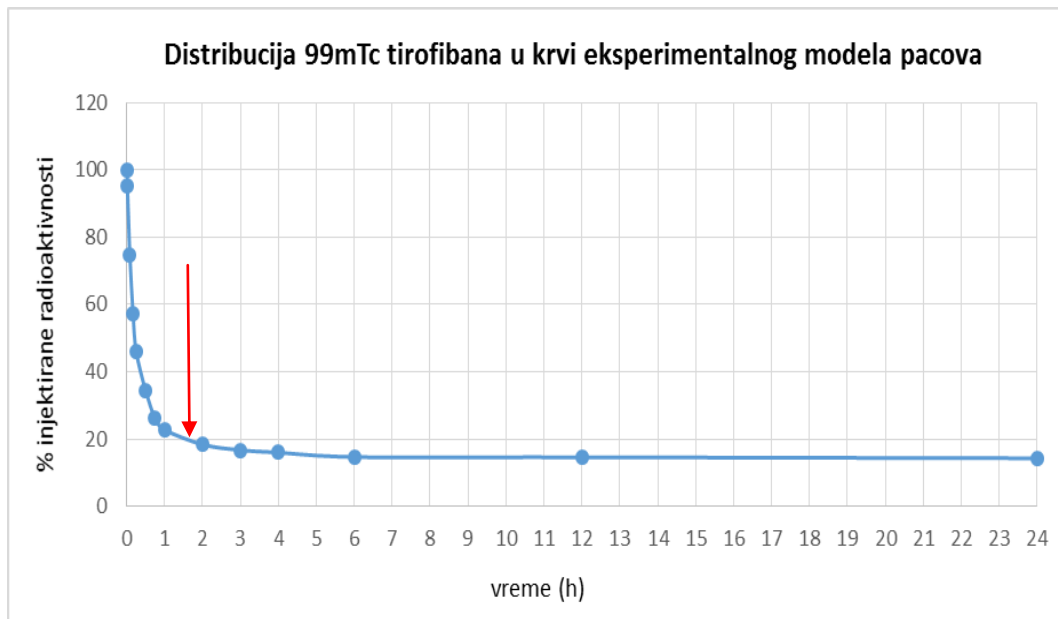
Tabela 19. Srednje vrednosti i procenat distribucije i eliminacije radioaktivno obeleženog ^{99m}Tc-tirofibana u vremenskim razmacima (h)

Vreme nakon injektovanja (h)	Srednja vrednost (imp/min)	SD (imp/min)	% vrednosti
0,017	33352,6	1241,6	95,29
0,083	26138,3	338,5	74,68
0,167	19973,3	119,6	57,07
0,25	16093,3	274,2	45,98
0,5	12046,7	173,2	34,42
0,75	9130,0	82,9	26,09
1	7965,7	105,6	22,76
2	6440,0	71,5	18,40
3	5856,7	24,8	16,73
4	5598,8	35,5	16,00
6	5135,0	39,9	14,67
12	5108,3	43,7	14,60
24	5001,7	40,3	14,29

Dobijene vrednosti koje su prikazane u Tabeli 19 pokazuju da je preko 70% radioaktivnosti eliminisano iz cirkulacije u periodu prvog sata, što nam je bio dovoljan parameter da možemo produžiti sa ispitivanjima na modelu pacova bez bojazni od farmakokinetičkog profila tirofibana.

Analiza varijanse dužeg zadržavanja radioaktivnosti, kao i da radioaktivno obeležavanje ne menja zavisne uzorke (Friedman ANOVA), pokazala nam je da između srednjih vrednosti klirensa ^{99m}-tirofibana, u zadatim vremenskim intervalima/tačkama postoje statistički značajne razlike (ANOVA Chi Sqr.= 69,91 $p < 0,001$).

Prema t-test –u zavisnih uzoraka međusobne razlike statistički su značajne u rasponu od $p < 0,001$ do $p = 0,0431$. Razlike nisu značajne između srednjih vrednosti klirensa tirofibana između 1. i 2. sata ($p = 0,0602$), između 2. i 3. sata ($p = 0,1187$), između 2. i 4. sata ($p = 0,0562$), između 3. i 4. sata ($p = 0,3183$), između 6. i 12. sata ($p = 0,9110$), između 6. i 24. sata ($p = 0,3241$) i između 12. i 24. sata ($p = 0,6521$).

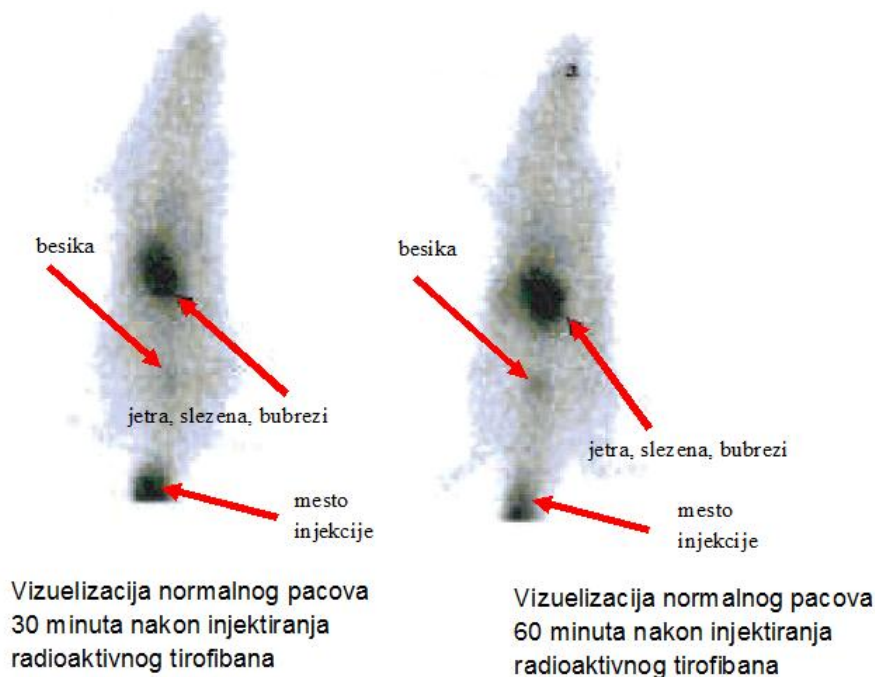


Slika 34. Srednje vrednosti distribucije i eliminacije radioaktivno obeleženog 99m Tc tirofibana u vremenskim razmacima (h)

4.7. Vizuelizacije i biodistribucione studije na eksperimentalnim životinjama

Vizuelizacije studije eksperimentalnih životinja, upotrebom gama kamere, posle aplikovanja obeleženog 99mTc-tirofibana

Vizuelizacije studije rađene su na normalnom pacovima i na eksperimentalnom modelu sa indukovanom DVT-om, a posle aplikovanja radioaktivnog 99mTc-tirofibana, pomoću gama kamere sa visokom rezolucijom, u vremenskim intervalima od 30 i 60 minuta nakon injektiranja.



Slika 35. Vizuelizacija normalne distribucije kod pacova 30 i 60 minuta nakon injektovanja ^{99m}Tc -tirofibana i njegovo vezivanje na kritičnim mestima

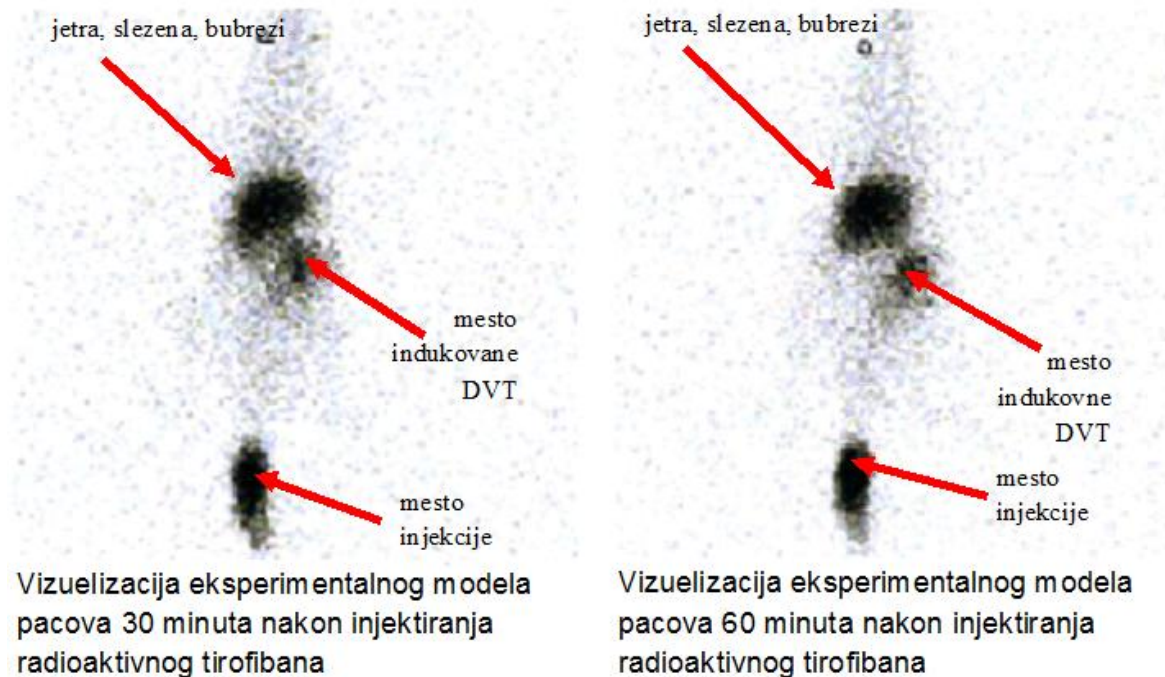
Na Slici 35 prikazana je normalna distribucija radioaktivnog tirofibana. Nakon 30 minuta od aplikovanja postoji jedno mesto visoke kumulacije radioaktivnosti u kompleksu u kom se superponiraju jetra, slezina i bubrezi, a to su organi odgovorni za metabolizam i eliminaciju tirofibana. Nazire se mala radioaktivnost u mokraćnoj bešici, a što je rezultat brze eliminacije tirofibana. Aktivnost u repu je zaostala radioaktivnost nakon injektiranja (dorzalna vena repa pacova).

Nakon 60 minuta distribucije radioaktivnost nije izmenjena, osim u mokraćnoj bešici gde uočavamo povećanu radioaktivnost, koja je posledica brze eliminacije nevezanog radioaktivnog tirofibana u prvom satu nakon aplikacije.

Na slici 36 prikazano je vezivanje tirofibana u kritičnim organima pacova sa DVT. Radioaktivnost je lokalizovana na mestu injektovanja (dorzalna vena repa pacova), u kompleksu jetra/slezina/bubrezi, kao i oko mesta ligature femoralne vene.

Na slikama 37.a i 37.b prikazana je distribucija radiomarkiranog tirofibana u organima, nakon žrtvovanja pacova. Vrednosti se u celini preklapaju sa slikama vizuelizacionih studija.

Normalno tkivo koje je uzeto sa suprotnog ekstremiteta od onog sa DVT-om (skeletni mišić) korišćeno je kao kontrola i predstavlja prisustvo radioaktivnog tirofibana u sistemskoj cirkulaciji.



Slika 36. Vizuelizacija eksperimentalnog modela pacova 30 i 60 minuta nakon injektovanja ^{99m}Tc -tirofibana i njegovo vezivanje na kritičnim mestima – mesto injektovanja, kompleks jetra/slezena/bubrezi i mesto indukovane duboke venske tromboze (DVT)

Biodistribucione studije na eksperimentalnim životinjama nakon aplikacije radioaktivno obeleženog tirofibana sa tehnecijumom [^{99m}Tc]

Biodistribucione studije obeleženog tirofibana rađene su na istim eksperimentalnim životinjama (Wistar pacovi) koje su bile korišćene za vizuelizacione studije, posle njihovog žrtvovanja, izolovanjem kritičnih organa i merenjem radioaktivnosti, pomoću doznog kalibratora (*Dose Calibrator – Comecer*).

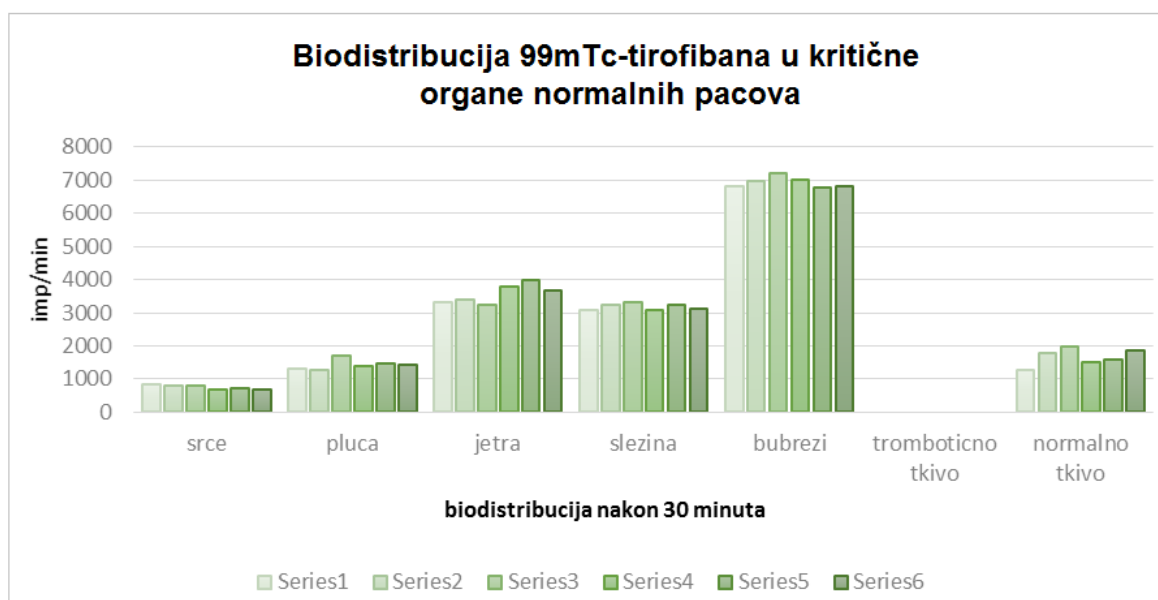
U tabeli 20. prikazane su srednje vrednosti biodistribucije pri injektovanoj dozi ^{99m}Tc tirofibana (4.15×10^4 imp/min / 50 ml). posle 30 i 60 minuta, kod normalnih pacova, što odgovara normalnoj biodistribuciji u kritičnim organima.

Rezultati

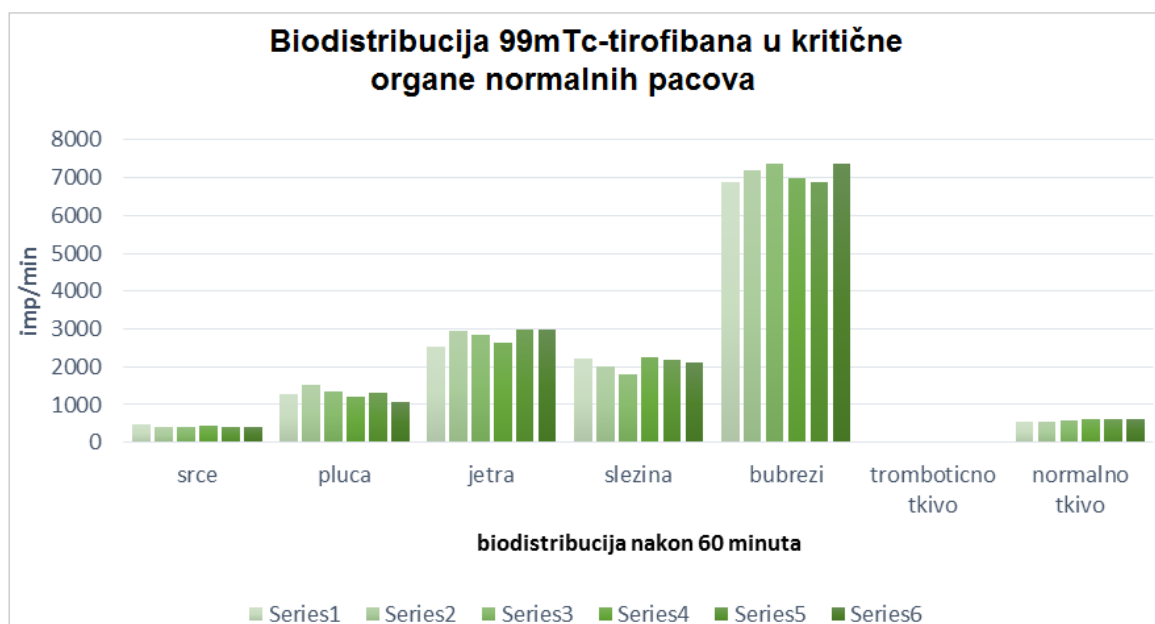
Tabela 20. Srednje vrednosti biodistribucije posle injektovanja 99m-tirofibana (4.15×10^4 imp/min / 50 ml) nakon 30 i 60 minuta kod normalnih pacova

Tkivo	posle 30 minuta				posle 60 minuta			
	prosek	SD	min.	max.	Prosek	SD	min.	max.
srce (1)	754,2	60,1	694	824	427,3	34,3	399	489
pluća (2)	1427,2	150,3	1284	1707	1289,8	140,8	1083	1508
jetra (3)	3564,2	294,2	3334	3983	2822,7	192,8	2539	2991
slezena (4)	3179,0	101,1	3074	3327	2090,5	167,9	1801	2227
bubrezi (5)	6927,5	169,0	6809	7206	7117,3	223,8	6984	7384
trombotično tkivo (6)	0	0	0	0	0	0	0	0
skeletni mišić (7)	1674,8	257,9	1290	1989	588,8	26,5	549	612

Na Slikama 37a i 37b prikazana je normalna biodistribucija posle 30 i 60 minuta kod normalnih pacova, koja odgovara vrednostima prikazanim u Tabeli 20. Na slikama 38a i 38b, prikazana je biodistribucija posle 30 i 60 minuta nakon injektiranja radioaktivnog tirofibana kod eksperimentalnog modela DVT, koja odgovara vrednostima iz Tabele 21.



Slika 37.a. Biodistribucija 99mTc-tirofibana u kritične organe normalnih pacova, 30 minuta nakon njegovog injektovanja

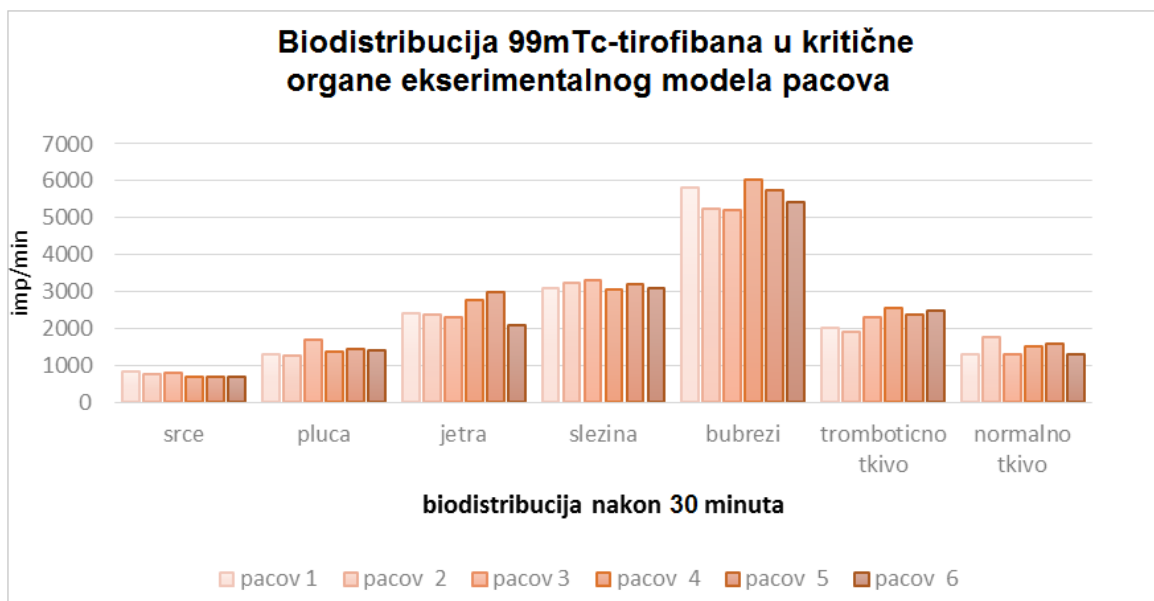


Slika 37.b. Biodistribucija 99mTc-tirofibana u kritične organe normalnih pacova, 60 minuta nakon njegovog injektovanja

Tabela 21 je prikaz vrednosti dobijenih merenjem radioaktivnosti organa u eksperimentalnom modelu pacova. Koristili smo 6 pacova kao i u prethodnim biodistribucionim studijama kod normalnih pacova. Aktivnost je izražena kao relativna, imp/min, 30 i 60 minuta nakon injektiranja i žrtvovanja pacova.

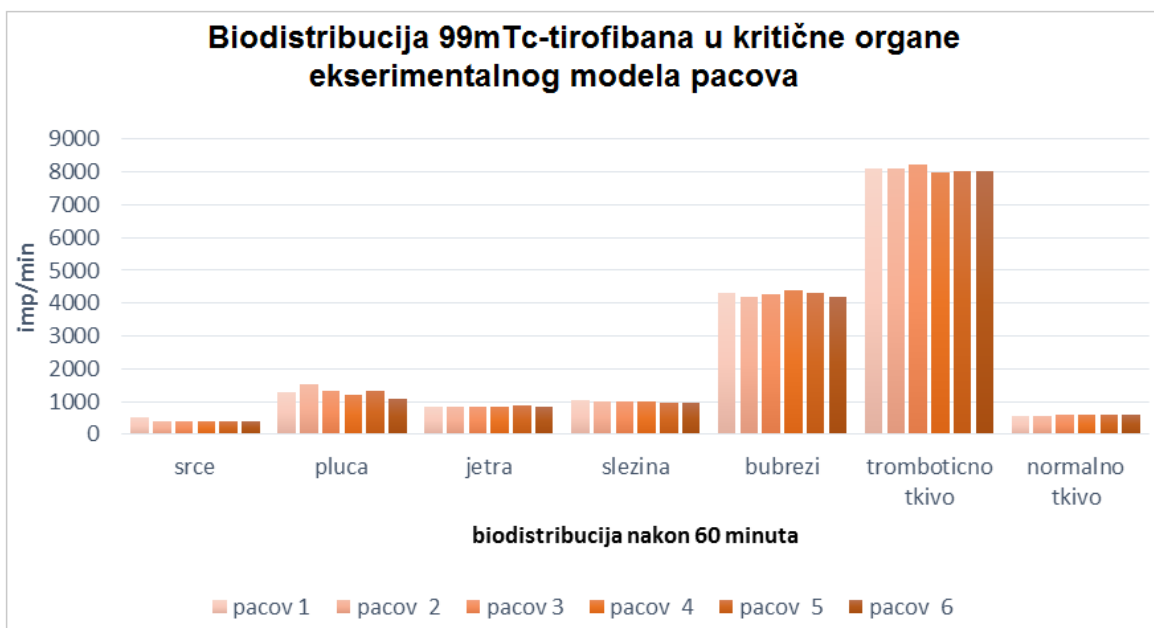
Tabela 21. Srednje vrednosti biodistribucije posle injektovanja 99m-tirofibana (4.15×10^4 imp/min / 50 ml) nakon 30 i 60 minuta kod eksperimentalnog modela

Tkivo	posle 30 minuta				posle 60 minuta			
	prosek	SD	min.	max.	Prosek	SD	min.	max.
srce (1)	754,2	60,1	694	824	416,3	44,4	389,0	506,0
pluća (2)	1427,2	150,3	1284	1707	1289,8	140,8	1083,0	1508,0
jetra (3)	2491,3	330,7	2091	2983	851,0	19,5	831,0	884,0
slezina (4)	3179,0	101,1	3074	3327	995,0	23,3	965,0	1027,0
bubrezi (5)	5577,5	331,3	5206	6019	4269,0	75,0	4184,0	4384,0
trombotično tkivo (6)	2277,7	267,2	1906	2566	8083,8	94,6	8001,0	8241,0
skeletni mišić (7)	1461,5	204,6	1289	1781	588,8	26,5	549,0	612,0



Slika 38.a. Biodistribucija 99mTc-tirofibana u kritične organe eksperimentalnog modela pacova, 30 minuta nakon njegovog injektovanja

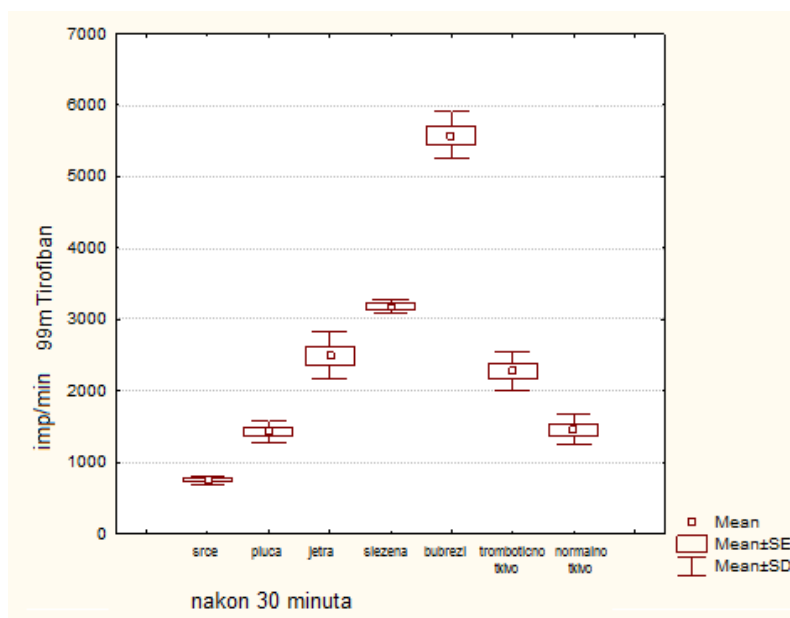
Nakon 30 minuta, najveća vrednost biodistribucije 99m-tirofibana registrovana je u bubrezi (5577,5 ±331,3) i slezini (3179,0±101,1), a najmanja u srcu (754,2 ± 60,1). Ovo je rezultat brzog klirensa radioaktivno obeleženog tirofibana koji se nije vezao za trombotično tkivo i koji se zbog male molarne mase brzo eliminiše. Prisustvo radioaktivnosti u slezini, koja je slična vrednostima u jetri, ali i u trombotičnom tkivu, je dokaz da se oštećeni trombociti koji su radioaktivni, odmah akumuliraju u svom kritičnom organu, a što je vidljivo na slikama 39.a i 39.b.



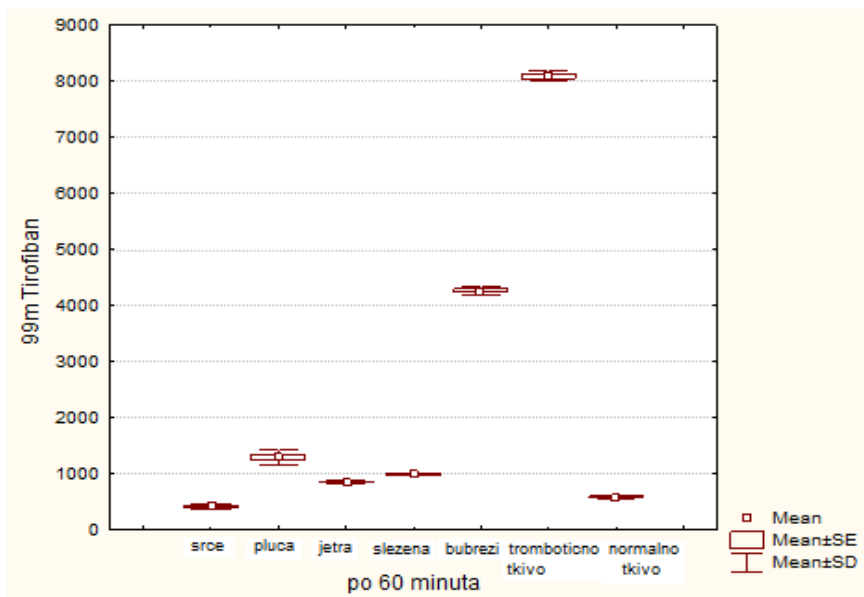
Slika 38.b. Biodistribucija 99mTc-tirofibana u kritične organe eksperimentalnog modela pacova 60 minuta nakon njegovog injektovanja

Rezultati

U studijama nakon 60 minuta, kako vidimo u Tabeli 20, najveće vrednosti su zabeležene u trombotičnom tkivu ($8083,8 \pm 94,6$) i bubrezima ($4269,0 \pm 75,0$), a najmanje u srcu ($416,3 \pm 44,4$). Ove vrednosti odgovaraju realnoj distribuciji nakon uravnotežavanja kinetike radioaktivno obeleženog tirofibana, što vidimo na slikama 38.a i 38.b, odnosno nakon maksimalne akumulacije radiofarmaka u oštećenom trombotičnom tkivu. Najmanje vrednosti i ovde, kao i nakon 30 minuta, nalaze se u srcu, što je dokaz da se radioaktivni tirofiban zadržava jako kratko u cirkulaciji. Visoke vrednosti u bubrezima pokazuju da se radioaktivni tirofiban brzo eliminiše iz organizma. Ostatak radioaktivnog preparata, odnosno sve što nije vezano ili je već razgrađeno, brzo se eliminiše.



Slika 39.a. Srednje vrednosti sa standardnim devijacijama i standardnim greškama biodistribucije ^{99m}Tc -tirofibana posle injektovane doze od 4.15×10^4 imp/min / 50 ml, nakon 30 minuta



Slika 39.b. Srednje vrednosti sa standardnim devijacijama i standardnim greškama biodistribucije 99mTc tirofibana posle injektovane doze od 4.15×10^4 imp/min / 50 ml, nakon 60 minuta

Analiza t-test-om za zavisne uzorke pokazala je da postoje statistički značajne razlike u biodistribuciji 99m-tirofibana u različitim organima/tkivima posle 30 i posle 60 minuta. U srcu, plućima, jetri, slezini, bubrezima i normalnom tkivu, vrednosti su značajno veće nakon 30 minuta. U trombotičnom tkivu vrednosti 99m-tirofibana nakon 60 minuta su značajno veće u odnosu na one dobijene nakon 30 minuta, a koje su prikazane u tabeli 20 i prethodnim slikama.

U Tabeli 22. prikazana je značajnost razlika između srednjih vrednosti 99m-tirofibana u tkivima/organima posle 30 i 60 minuta, što samo potvrđuje dobijene rezultate biodistribucionih studija.

Tabela 22. Značajnost razlika između srednjih vrednosti 99m-tirofibana u tkivima/organima posle 30 i 60 minuta

Tkivo	Značajnost razlika (p)
srce	t – 16,83 p < 0,001*
pluća	t – 1,57 p = 0,1752
Jetra	t – 12,43 p < 0,001*
slezina	t – 52,34 p < 0,001*
bubrezi	t – 11,88 p < 0,001*
trombotično tkivo	t – (- 43,29) p < 0,001*
skeletni mišić	t – 10,26 p < 0,001*

*statistički značajna razlika

Rezultati

Sa ciljem da utvrdimo da li je distribucija 99m-tirofibana značajno različita u ispitivanim organima/tkivima nakon 30 i posle 60 minuta, urađena je analiza varijansi (jednofaktorijalna ANOVA i Tukey (HSD) test), što je prikazano u Tabeli 23.

Tabela 23. Značajnost razlika između srednjih vrednosti 99m-tirofibana u različitim tkivima/organima nakon 30 i 60 minuta od injektiranja

tkiva / organi	posle 30 minuta	posle 60 minuta
srce – pluća	p < 0,001	p < 0,001
srce – jetra	p < 0,001	p < 0,001
srce – slezina	p < 0,001	p < 0,001
srce – bubrezi	p < 0,001	p < 0,001
srce – trombotično tkivo	p < 0,001	p < 0,001
srce – skeletni mišić	p < 0,001	p = 0,0046
pluća – jetra	p < 0,001	p < 0,001
pluća – slezina	p < 0,001	p < 0,001
pluća - bubrezi	p < 0,001	p < 0,001
pluća – trombotično tkivo	p < 0,001	p < 0,001
pluća – skeletni mišić	p = 0,9996	p < 0,001
jetra – slezina	p < 0,001	p = 0,0267
jetra – bubrezi	p < 0,001	p < 0,001
jetra – trombotično tkivo	p = 0,6756	p < 0,001
jetra – skeletni mišić	p < 0,001	p < 0,001
slezina – bubrezi	p < 0,001	p < 0,001
slezina – trombotično tkivo	p < 0,001	p < 0,001
slezina – skeletni mišić	p < 0,001	p < 0,001
bubrezi – trombotično tkivo	p < 0,001	p < 0,001
bubrezi – skeletni mišić	p < 0,001	p < 0,001
trombotično – skeletni mišić	p < 0,001	p < 0,001

Dobijeni rezultati su pokazali da je distribucija 99m-tirofibana u različitim tkivima značajno različita i posle 30 minuta ($F=289,26$ $p < 0,001$) i posle 60 minuta ($F=894,39$ $p < 0,001$).

Tukey (HSD) test nam pokazuje da nakon 30 minuta, razlike nisu značajne samo kod distribucije u plućima i normalnom tkivu (skeletni poprečno prugasti mišić) ($p = 0,9996$), kao i između jetre i trombotičnog tkiva ($p = 0,6756$).

Nakon 60 minuta, sve pojedinačne razlike u odnosu na distribuciju 99m-tirofibana u različitim tkivima statistički su značajne (Tabela 22).

5. DISKUSIJA

Tromboembolijske promene, kao što su duboka venska tromboza (DVT) i plućna embolija, su vaskularna oboljenja koja nose visoki rizik po zdravlje pacijenta i predstavljaju jedan od vodećih uzročnika povećanog morbiditeta i mortaliteta kod ljudi koji žive u srednje i visoko razvijenim zemljama (Davì i Patrono, 2007; Bonaca i Creager, 2015). Osnovni preduslov za uspešnu terapiju DVT-e, a sa tim i uspešnu prevenciju posledica koje ona nosi sa sobom, je rana, jednostavna i po mogućnosti, neinvazivna dijagnostika.

DVT je produkt hiperkoagulabilnog stanja, pri čemu dolazi do formiranja tromba koji je bogat fibrinom, trombocitima i eritrocitima (Henri i sar, 2013; Youngzli i sar, 2014). Patogeneza DVT-e prvobitno je formulisana Virchowom trijadom, koja uključuje oštećenja krvnih sudova. U novije vreme utvrđena je uloga aktiviranih trombocita u formiranju tromba (Tanaka i sar., 2009; Zhenyu i sar, 2010; Youngzli i sar., 2014). Ovo je iskorišćeno za uvođenje dijagnostičkih postupaka koji koriste radioaktivno obeležane male peptidne molekule radioaktivnim izotopima, pre svega tehnećijuma [^{99m}Tc]. Upotrebom modifikovanog rekombinantnog tkivnog plazminogena, obeležanog sa tehnećijumom [^{99m}Tc rt-PA], može da se dijagnostikuje akutna DVT i kod simptomatskih i kod nesimptomatskih pacijenata, naročito kod onih koji imaju takozvanu sekundarnu epizodu, posle 12 do 24 meseca od primarnog dijagnosticiranja (Janssen i sar., 2001). Pokušaji da se koriste obeleženi trombociti i na taj način omogući vizuelizacija tromboembolijskih promena (Janevic i Tadzer, 1989; Trajkovski i sar., 1989) i danas su predmet naučnog istraživanja.

Nuklearna medicina zajedno sa radionuklidnim vizuelizacionim tehnikama, zbog fakta što koriste visokospecifične agense, obeležene radionuklidima, koji se zbog povoljnih fiziko-hemijskih osobina mogu primeniti u dijagnostičkim postupcima, zauzima jedinstveno mesto u proceni različitih oboljenja, kao rezultat odlične senzitivnosti za detekciju krajnje malih količina biološki važnih supstanci (Andrew i Heaton, 1987; Basse-Cathalinat i Tendero, 2001; Dixon i sar., 2001).

Trombocitni glikoproteinski (GPIIb/IIIa) receptor predstavlja ključnu komponentu u procesu trombocitne agregacije, a time i ciljno mesto za terapijsku intervenciju. Postoji više klasa inhibitora GPIIb/IIIa receptora (Fintel, 2001; Hirsh, 2001; Joel, 2001; Hirsh i Lee, 2002), koji inhibiraju trombocitnu funkciju u fazi njihove agregacije preko okupacije fibrinogenskih mesta za vezivanje (Cook i sar., 1997; Chadderdon i Cappello, 1999; Abumiya i sar., 2000; 2002; Schneider, 2011).

U vreme pojave GPIIb/IIIa antagonista pojavila su se i monoklonska antitela (himerna ili mišija), kao abciksimab (Jordan i sar., 1997; Mousa i sar., 1997; Peterson i sar., 1998; Nurden i sar., 1999; Quinn i sar., 1999 i 2001), RGD peptidi, integrilin, kao i grupa pseudopeptida ili peptidomimetika, tirofiban (Thiagarajan i Benedict, 1997; Cook i sar., 1999; Ali i sar., 2000; Cho, 2000; Abulancia i sar., 2001; Tanaka i sar., 2004). Kasnije su se pojavili prvi radioaktivni peptidi obeleženi sa tehnecijumom (^{99m}Tc) kao apticid – Diatide, pokušaji obeležavanja c7E3 Fab antitela (abciksimab), kao i malih peptidomimetika koji prepoznaju specifično mesto vezivanja fibrinogena preko RGD sekvence (Arg-Gly-Asp) kao tirofiban i eptifibatid (Mahmud i sar., 2007; Serebruany i sar., 2007; van Rensburg i sar., 2012; Yeung i Holinstat, 2012).

Obeleženi peptidi i peptidomimetici koji spadaju u grupu trombocitnih GPIIb/IIIa antagonista stvarno mogu da zauzmu značajno mesto u nuklearno-medicinskim metodama, kao radiofarmaceutski preparati.

Prvi komercijalni radiofarmaceutik koji je upotrebljen za direktnu scintigrafsku vizuelizaciju aktiviranog trombocitnog kompleksa je Tc- 99m apticid (Taillefer i sar., 1999; Thakur i sar., 2000). Apticid nije mogao da pruži željene rezultate u detekciji tromboembolijskih promena zbog poteškoća u stvaranju stabilnog radioaktivnog kompleksa (Knigh i sar., 1999; Taillefer, 1999; Klem i sar., 2000; Mitchel i sar., 2000; Thakur i sar., 2000; Ciborowski i Tomasiak, 2009). On je po strukturi mali peptid sa visokim afinitetom za GPIIb/IIa receptore. U radioaktivno obeleženom obliku preparat daje scintigrafsku sliku akutnog tromba. Odatle se i ovaj novi dijagnostički modalitet generalno naziva trombosintigrafija. Za razliku od ostalih konvencionalnih metoda za procenu DVT-e, ova metoda potencira biološke karakteristike akutnog ugruška, na samom početku nastajanja tromba, odnosno pre definisanja njegovih morfoloških osobina.

U našoj studji, preko uvođenja radioaktivno obeleženog tirofibana sa ^{99m}Tc , za vizuelizaciju akutne DVT-e na eksperimentalnom životinjskom modelu, hteli smo da potvrdimo pretpostavke koje postoje za ovaj tip potencijalnih radiofarmaceutika.

Tirofiban, kao mali peptidomimetik, lako je obeležiti sa ^{99m}Tc , koji je najpogodniji gama emiter za dijagnostiku. Preparati dobijeni ovim načinom obeležavanja (Lister-James i sar., 1996; Pearson i sar., 1996), imaju visoku radiohemijsku čistoću (procenat vezivanja preko 98%) i radionuklidnu čistoću (prisustvo molibdena manje od 0,1%). Potvrdili smo da dobijeni kompleks pokazuje visoki procenat vezivanja (iznad 98.5%), pomoću instant

hromatografije upotrebom TLC traka (TLC Aluminum Sheets, EMD/Merck KGaA) i određivanja njegove radiohemijske čistoće (Slika 6).

Kompleks je stabilan i može se koristiti u periodu i posle 6 sati nakon obeležavanja (Tabela 3). Ovo je bilo bitno iz više razloga i to:

- Poluzivot ^{99m}Tc tehnecijuma je 6 sati; na ovaj način mogli bi da koristimo obeleženi preparat u periodu prvog vremena poluraspada i tačno izračunati specifičnu radioaktivnost.
- Možemo koristiti isto obeležavanje kod svih eksperimentalnih pacova bez bojazni da će se izmeniti kinetika preparata.
- Možemo koristiti isti preparat kod svih *in vitro* studija na trombocitima, uz mogućnost da dobijemo tačne rezultate radioaktivnog raspada, mereći uvek adekvatan i validan broj impulsa.

Tehnecijum - ^{99m}Tc , kao izotop iz izbora i jedan od najčešće korišćenih gama emitera u nuklearnoj medicini, povoljan je za dijagnostiku i vizuelizacione studije (Yong i Frey 2008). Ugradili smo ga u molekulu tirofibana, posredstvom kalaj-hlorida (Lister-James i sar., 1996; Pearson i sar., 1996), kao sredstva za redukciju. Tačan mehanizam njegovog kompleksiranja još uvek nije dovoljno poznat, ali na bazi teorijskog razmatranja, može se pretpostaviti da dva molekula tirofibana vezuju jedan tehnecijum [^{99m}Tc].

Nakon određivanja stabilnosti, odredili smo najmanju koncentraciju tirofibana koji nema terapijsku efikasnost, uz sačuvani afinitet za GPIIb/IIIa receptore, koristeći *in vitro* agregacione studije na trombocitima (Smith i sar., 1999; Holmes i sar., 2001; Simon i sar., 2001). Rezultati dobijeni iz agregacionih studija na humanim trombocitima i trombocitima pacova, preko afiniteta vezivanja, pokazuju da nema statistički značajnih razlika između dva entiteta.

Preko određivanja sposobnosti indukovane agregacije pomoću agoniste ADP-a (*Kulkarni i sar., 2000*) i određivanja inhibitornih efekata tirofibana na agregaciju trombocita odredili smo najnižu efektivnu koncentraciju tirofibana. Kako se vidi na Slici 15, optimalna koncentracija radioaktivno obeleženog tirofibana za dijagnostiku, bez terapijskog efekta, je manja od 10 nM. U svim našim daljim ispitivanjima koristili smo ovu koncentraciju tirofibana.

Diskusija

Prvi eksperimentalni model tromboze je opisan 1856 godine (Robert Virchow). U tom modelu on je predložio tri kauzalna faktora koja vode do tromboze, sada poznate kao Virchow-a trijada:

- opstrukcija protoka krvi,
- promene osobina krvnog sadržaja,
- alteracije u unutrašnjosti krvnih sudova.

Ovi principi su korišćeni dosada od mnogih istraživača pri postavljanju i razvoju *in vivo* modela tromboze. Uglavnom su u modelima bili korišćeni najefikasniji mehanizmi koji vode do brzog formiranja tromba.

Modifikovanjem von Willebrandovog faktora (vWF 1326) miša, razvijen je model koji je dobro korelirao sa humanom trombocitnom trombozom. Ovaj biološki model koristi se kao farmakodinamski biomarker za antitrombotičku terapiju (Magallon, 2011).

Naš eksperimentalni model bio je tako postavljen da nam pruži optimalne uslove koje bi mogli da iskoristimo za dalje kliničke studije (Lewis i Westwick, 1978; Barrett i sar., 1996). Razlozi zbog kojih smo odabrali ligaturu femoralne vene, a ne jugularne ili donje šuplje vene su sledeći:

- femoralna vena je najdostupnija za prepariranje,
- femoralna vena predstavlja najčešće mesto gde se nastaje DVT kod ljudi,
- u okolini femoralne vene nema drugih organa koji bi mogli vezati radiofarmaceutik i time uticati na pravilno tumačenje rezultata.

Sve eksperimente (praćenje koncentracije i eliminaciji radioaktivnog i neradioaktivnog tirofibana u plazmi, vizuelizacije i biodistribucione studije) rađene su na ovako postavljenom eksperimentalnom modelu.

Na osnovu dobijenih rezultata došli smo do zaključka da je odabrani model, iako je na eksperimentalnom pacovu, adekvatan i validan za potencijalne kliničke studije. Ovo je posebno potvrđeno praćenjem koncentracije neradioaktivnog tirofibana u plazmi pacova i na isti način u plazmi čoveka (Tabela 12). Adekvatnost sistema bila je proverena preko praćenja različitih parametara (vreme zadržavanja-retencije, faktor razvlačenja pika - tailing, faktor kapaciteta, rezolucija i selektivnost), što je jasno vidljivo u Tabeli 12.

Radioaktivno obeleženi tirofiban ima skoro identično ponašanje kao i neradioaktivni (Slika 34 i Tabela 19), što potvrđuje da je preko 70% radioaktivnosti eliminisano iz cirkulacije u periodu prvog sata posle aplikovanja i da radioaktivno obeležavanje ne menja farmakokinetički profil tirofibana.

Preko određivanja koncentracije dodatog i vezanog radioaktivnog tirofibana određuje se optimalna koncentracija saturacije receptora (Knežević i sar., 1996). Koristeći istu koncentraciju i istu aktivnost radioobeleženog tirofibana u svim *in vitro* studijama pokazali smo da procenat vezivanja radioobeleženog tirofibana za humane trombocite i trombocite pacova ne pokazuje značajnu razliku (69% kod humanih trombocita / 68.7% kod trombocita dobijenih od pacova). Ovo vezivanje bilo je stabilno i nakon dvojnog ispiranja, što je bio značajan pokazatelj za stabilnost kompleksa (58.6% kod humanih trombocita / 57.5% kod trombocita dobijenih od pacova). Ovo je dalo za pravo da potvrdimo pretpostavku da rezultati dobijeni u eksperimentalnom modelu DVT-e pacova, mogu biti validni i očekivani kod ljudi sa DVT-om.

Preko praćenja koncentracije radioaktivnog i neradioaktivnog tirofibana u krvi (5, 15, 30, 45 i 60 min., nakon i.v.bolus injekcije), kod eksperimentalnog modela DVT-e i kontrolnoj grupi pacova, istom HPLC metodom, potvrdili smo da se uvođenjem tehnećijuma i promenom strukture molekula, ne menja se već poznati farmakokinetički profil leka (Oertel i sar., 2004; Access data FDA, 2012; Access data FDA, 2014). Cilj injektovanja različite koncentracije tirofibana (i.v. bolus injekcije u dozi od 0.6 mg/kg; 0.8 mg/kg; 1 mg/kg), bio je da potvrdimo biodistribuciju i brzu eliminaciju leka kod modela sa DVT-om. Sve navedeno ukazuje na potencijalnu mogućnost primene radioaktivno obeleženog tirofibana za detekciju rane DVT-e (Darkovska Serafimovska i sar., 2014; 2015). Niske koncentracije tirofibana, na mestu gde postoje patološke promene, ne utiču na mogućnost fibrinogena da se veže za GPIIb/IIIa receptore, ali u isto vreme tirofiban je prisutan u dovoljnoj koncentraciji koja omogućava vizuelizaciju patoloških promena u cirkulaciji (Gibaldi i Perrier, 1982). Sa ciljem da uporedimo tri različite doze tirofibana (0.6 mg/kg; 0.8 mg/kg; 1 mg/kg), injektovane u kontrolnoj grupi i u eksperimentalnom modelu DVT-e, koristeći isti analitički metod, kalkulirali smo procenat tirofibana u funkciji vremena 5, 15, 30, 45 i 60 min., nakon i.v.bolus injekcije.

Na osnovu podataka za koncentraciju tirofibana u krvi nakon i.v. bolus injekcije, u dozi od 0.6 mg/kg, 0.8 mg/kg i 1 mg/kg, može se zaključiti da su serumske koncentracije tirofibana merene 5, 15, 30, 45 i 60 min. nakon aplikacije kod eksperimentalne grupe pacova sa DVT-om niže u odnosu na serumske koncentracije tirofibana kod kontrolne grupe pacova. Niža koncentracija tirofibana u serumu kod pacova sa DVT-om može se objasniti vezivanjem tirofibana za GPIIb/IIIa receptore (Herbert i sar., 1992). Na taj način smo potvrdili eksperimentalni životinjski model DVT-e.

Što se tiče eliminacije leka, rezultati su pokazali sličnost kod oba modela (eksperimentalni model DVT-e i kontrolna grupa). 15% injektovane doze prisutne u krvi 60 minuta nakon i.v. bolus injekcije kod kontrolne grupe pacova i vrednosti između 11.25-12% kod eksperimentalnog modela pacova sa DVT-om, pokazuju kratko $T_{1/2}$ (brza eliminacija) tirofibana iz krvi (Oertel i sar., 2004).

Sve navedene analize ujedno potvrđuju da je radioaktivna formulacija tirofibana, koristeći 99m tehnecijum, bila stabilna i pogodna za praćenje.

Savremeni pristup dijagnoze kliničke vidljive venske tromboze, koja se manifestuje velikim i okluzivnim venskim trombozama, koji su lokalizovani na proksimalnim venama na donjim ekstremitetima, preporučuje egzozonografiju, kao neinvazivnu metodu. Kompresivni ultrazvuk je neinvazivni test sa senzitivnošću od 95-99% prepoznatljiv kao vrlo precizan dijagnostički metod, kada simptomatologija pacijenta sugerise postojanje akutne venske tromboze donjih ekstremiteta (Clive, 1998, Shannon, 2004). U drugim slučajevima, kada je u pitanju suspektna, rekurentna venska tromboza na ekstremitetima, ista teško može da se dijagnosticira, zbog toga što u preko 50% pacijenata odsustvuju simptomi. Dijagnoza je još teža kod rekurentne DVT-e, zbog distorzije ili opstrukcije dubokog venskog sistema od prethodnih trombotičnih stanja.

Slike koje smo dobili vizuelizacijom normalnih pacova i eksperimentalnog modela DVT,-e kao i biodistribucione studije nakon žrtvovanja eksperimentalnih životinja, potvrđuju naša predviđanja do kojih smo došli nakon *in vitro* analiza (Darkovska Serafimovska i sar., 2015). Na mestu oko ligature, akumulacija radioaktivnosti je izrazita i u potpunosti odgovara procesu tromboze. Normalno tkivo (skeletni mišić kontralateralnog ekstremiteta) pokazuje nespecifično vezivanje, odnosno prisutnost radioaktivnosti u cirkulaciji nakon određenog vremena (Tabela 21).

Na Slici 35 dominira mesto akumulacije koje predstavlja superponiranje radioaktivnosti jetre, slezene i bubrega, a što odgovara i nalazima biodistribucionih studija. Nazire se mokraćna besika kao mesto brze eliminacije radioaktivnosti; posle 60 minuta bešika je jasno vidljiva.

Na slici 36, koja predstavlja vizuelizaciju eksperimentalnog modela pacova 30 i 60 minuta nakon injektovanja 99m Tc-tirofibana i njegovo vezivanje na kritičnim mestima, vidimo tri jake akumulacije : na mestu injektovanja, jaka zbirna aktivnost jetre, slezene i bubrega i mesto indukovane duboke venske tromboze (DVT).

Na osnovu upoređivanja odnosa različitih organa evidentna je razlika između trombotičnog i normalnog tkiva (Tabela 23).

Upotreba tehnecijuma - ^{99m}Tc , za radioaktivno obeležavanje, ima još jednu prednost, a to je mogućnost dobijanja slike u kraćim vremenskim intervalima. Stabilnost preparata nakon obeležavanja, a pre njegovog injektiranja, određivana je sa ciljem da nam pruži informaciju o stabilnosti kompleksa i mogućnost njegove upotrebe u dužem vremenskom periodu nakon obeležavanja (Darkovska Serafimovska i sar., 2015).

Slika 35 pokazuje akumulaciju markera u eksperimentalno prouzrokovanoj trombozi; radioaktivnost je dovoljno velika da bi se napravila statistička obrada rezultata, kao i za mogućnost merenja u biodistribucionim studijama, nakon žrtvovanja pacova (Tabela 20).

Rezultati iz Tabele 20 pokazuju distribuciju radioobeleženog tirofibana u razmacima od 30 i 60 minuta. Analiza t-test-om za zavisne uzorke pokazala je da postoje statistički značajne razlike u biodistribuciji 99m -tirofibana u različitim organima/tkivima posle 30 i posle 60 minuta. U srcu, plućima, jetri, slezini, bubrezima i mišićima, vrednosti su značajno veće nakon 30 minuta. U trombotičnom tkivu vrednosti 99m -tirofibana nakon 60 minuta su značajno veće u odnosu na one dobijene nakon 30 minuta (Darkovska Serafimovska i sar., 2015).

Postoji statistički značajna razlika u različitim tkivima posle 30 i 60 minuta (Tabela 21).

Distribucija 99m -tirofibana u različita tkiva je značajno različita i posle 30 minuta ($F=289,26$ $p < 0,001$) i posle 60 minuta ($F=894,39$ $p < 0,001$).

Tukey (HSD) Test pokazuje da nakon 30 minuta razlike nisu značajne samo kod distribucije u plućima i mišićima ($p = 0,9996$), kao i između jetre i trombotičnog tkiva ($p = 0,6756$).

Nakon 60 minuta, sve pojedinačne razlike u odnosu na distribuciju 99m -tirofibana u različitim tkivima su statistički značajne.

Na osnovu analize naših rezultata, kao i pregleda literature koja je obuhvatila područje detekcije i vizuelizacije tromboembolijskih promena, posebno akutne duboke venske tromboze, smatramo da je tirofiban, obeležen radioaktivnim izotopom 99m -tehnecijuma, primenjiv u humanim studijama, te da, kao potencijalni radiofarmaceutik, može da bude predložen za klinička ispitivanja u definisanim grupama pacijenata.

6. ZAKLJUČCI

Na osnovu izvedenih eksperimenata, dobijenih rezultata i literaturnog pregleda možemo zaključiti sledeće:

- 1) Tirofiban obeležen radioaktivnim izotopom tehnećijuma-99m predstavlja potencijalni radiofarmaceutik za ranu detekciju duboke venske tromboze (DVT). U prilog tome ide osobina tirofibana da se lako može obeležiti tehnećijumom-99m, koji je, kao izotop izbora, jedan od najčešće korišćenih gama emitera u nuklearnoj medicini, povoljan za dijagnostiku i vizuelizaciju trombotičnih promena. Upotreba tehnećijuma-99m za radioaktivno obeležavanje daje mogućnost dobijanja slike u kratkom vremenskom intervalu.
- 2) Postavljeni eksperimentalni model DVT-e pogodan je za predklinička ispitivanja. Niža koncentracija tirofibana u serumu kod eksperimentalnog modela ukazuje na postojanje DVT-e i potvrđuje adekvatnost modela. Slike dobijene nakon vizuelizacije gama kamerom prikazuju akumulaciju tirofibana u trombotičnoj femoralnoj veni pacova.
- 3) Radioaktivno obeleženi tirofiban ima gotovo identičan kinetički profil kao i neradioaktivni, što je utvrđeno praćenjem koncentracije neradioaktivnog i radioaktivnog obeleženog tirofibana u plazmi 5, 15, 30, 45 i 60 min. nakon i.v. bolus injekcije. Uvođenjem tehnećijuma i promenom strukture molekule, ne menja se već poznati farmakokinetički profil leka.
- 4) *In vitro*, procenat vezivanja radioobeleženog tirofibana za humane i animalne trombocite ne pokazuje značajnu razliku. Ovaj nalaz ide u prilog adekvatnosti animalnog modela DVT-e, kao i mogućnosti translacije naših rezultata na humanu populaciju.
- 5) Optimalna koncentracija radioaktivno obeleženog tirofibana za dijagnostiku DVT-e, bez terapijskog efekta, je manja od 10 nM. Niske koncentracije tirofibana na mestu gde postoje patološke promene ne utiču na sposobnost fibrinogena da se veže za GPIIb/IIIa receptore. Istovremeno, visoki afinitet vezivanja tirofibana za GPIIb/IIIa receptore omogućava vizuelizaciju patoloških promena u cirkulaciji.

- 6) Biodistribucione studije pokazale su da postoje statistički značajne razlike u biodistribuciji ^{99m}Tc -tirofibana u različitim organima/tkivima, 30 i 60 minuta posle aplikovanja radiomarkera. U srcu, plućima, jetri, slezini, bubrezima i mišićnom tkivu, vrednosti su značajno veće nakon 30 minuta. Obrnuto, u trombotičnom tkivu vrednosti ^{99m}Tc -tirofibana su značajno veće nakon 60 minuta, što ukazuje na kumuliranje radioaktivno obeleženog tirofibana na mestu tromboembolijske promene.
- 7) Smatramo da je tirofiban, obeležen radioaktivnim izotopom ^{99m}Tc -tehnećijuma, primenjiv u humanim studijama, te da, kao potencijalni radiofarmaceutik, može da bude predložen za klinička ispitivanja u definisanim grupama pacijenata sa ranim stadijumom DVT-e.

7. LITERATURA

- Abraham DG, Nutt EM, Bednar RA, Bednar B, Gould RJ, Duong L. et al. Arginine-Glycine-Aspartic Acid Mimics Can Identify a Transitional Activation State of Recombinant α IIb β 3 in Human Embryonic Kidney 293 Cells. *Molecular Pharmacology* 1997; 52: 227-36.
- Abrams SC, Lawrence FB. Platelet signal transduction. In: *Hemostasis and thrombosis, basic principles and clinical practice*. 4th ed, Colman RW et al eds, Lipincot, Williams & Wilkins, 2001, 541.
- Abulencia JP, Tien N, McCarty OJT, Plymire D, Mousa ShA. Comparative Antiplatelet Efficacy of a Novel, Nonpeptide GPIIb/IIIa Antagonist (XV454) and Abciximab (c7E3) in Flow Models of Thrombosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2001; 21: 149-56.
- Abumiya T, Fitridge R, Mazur C, Copeland BR. Integrin α IIb β 3 Inhibitor Preserves Microvascular Patency in Experimental Acute Focal Cerebral Ischemia, *Stroke* 2000; 31: 1402-10.
- http://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2012/020912s018,020913s017lbl.pdf, assessed on 14th of July, 2012.
- http://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2012/020912s018,020913s017lbl.pdf assessed on 24th of October, 2014.
- Aggarwal RK, Ireland DC, Azrin MA, Ezekowitz MD, de Bono DP, Gershlick AH. Antithrombotic Potential of Polymer-Coated Stents Eluting Platelet Glycoprotein IIb/IIIa Receptor Antibody. *Circulation* 1996; 94: 3311-7.
- Ali A, Patil S, Grady KJ, Schreiber TL. Diffuse Alveolar Hemorrhage Following Administration of Tirofiban or Abciximab: A nemesis of Platelet Glycoprotein Iib/IIIa Inhibitors. *Catheterization and Cardiovascular Interventions* 2000; 49: 181-4.
- Anderson F, Wheeler H, Goldberg R. A population-based perspective of the hospital incidence and case fatality rates of deep vein thrombosis pulmonary embolism: the Worcester DVT Study. *Arch Intern Med*. 1991; 151: 933-8.
- Andrew ME, Monagle P, deVeber G, Chan AKC. Thromboembolic Disease and Antithrombotic Therapy. In: *Newborns Hematology* 2001; 358-74.
- Andrews RK et al. The Glycoprotein Ib-IX-V Complex. In: *Platelets*. 2nd ed, Michelson AD ed, : Elsevier Academic Press, San Diego; 2007. pp. 145–65.

- Barret NE et al. Future innovations in anti-platelet therapies. *Br J Pharmacol* 2008; 154:918–39
- Bledzka K, Smyth SS, Plow EF. Integrin α IIB β 3: from discovery to efficacious therapeutic target. *Circ Res.* 2013; 112:1189-200.
- Bonaca PM, Creager AM. Pharmacological treatment and current Mmanagement of peripheral artery disease. *Circ Res* 2015;116:1579-98
- Brass L. Understanding and Evaluating Platelet Function. *ASH Education Book.* 2010;387-96.
- Calvete JJ. Clues for understanding the structure and function of a prototypic human integrin: the platelet glycoprotein IIB/IIIa complex. *Thrombosis and Haemostasis* 1994; 72:1-15.
- Chadderdon RC, Cappello M. The Hookworm Platelet Inhibitor: Functional Blockade of Integrins GPIIb/IIIa (α IIB β 3) and GPIa/IIa (α 2 β 1) Inhibits Platelet Aggregation and Adhesion In Vitro. *The Journal of Infectious Diseases* 1999; 179: 1235-41.
- Chang ST, Chung CM, Chu CM, Yang TY, Pan KL, Hsu JT, Hsiao JF. Platelet Glycoprotein IIB/IIIa Inhibitor Tirofiban Ameliorates Cardiac Reperfusion Injury. *Int Heart J.* 2015;13;56:335-40.
- Cho L. Clinical benefit of glycoprotein IIB/IIIa blockade with abciximab is independent of gender. Pooled analysis from EPIC, EPILOG and APISTENT trials. *J Am Coll Cardiol.* 2000; 36: 381-6.
- Christie DJ, Avari T, Carrington LR, et al. Platelet function testing by aggregometry: Approved Guideline. CLSI Guideline H58-A (ISBN 1-56238-683-2), Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA, 2008.
- Ciborowski M, Tomasiak M, Rusak T, Winnicka K, Dobrzycki S. The in-vitro effect of tirofiban, glycoprotein IIB/IIIa antagonist, on various responses of porcine blood platelets. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2008; 19:557-67.
- Ciborowski M, Tomasiak M. The in vitro effect of eptifibatide, a glycoprotein IIB/IIIa antagonist, on various responses of porcine blood platelets. *Acta Pol Pharm.* 2009; 66: 235-42.
- Cines DB, Pollak ES, Buck CA, Loscalzo J, Zimmerman GA, McEver RP. Endothelial Cells in Physiology and in the Pathophysiology of Vascular Disorders. *Blood* 1998; 91:3527-61.
- Clemetson KJ, Clemetson JM. Platelet GPIb complex as a target for anti-thrombotic drug development. *Thromb Haemost.* 2008;99:473–9

- Coller BS, Shattil SJ. The GPIIb/IIIa (integrin α IIb/ β 3) odyssey: a technology-driven saga of a receptor with twists, turns, and even a bend. *Blood* 2008; 112:301-8.
- Coller BS. Cell Adhesion in Vascular Biology: Platelet GPIIb/IIIa Antagonists: The First Anti-Integrin Receptor Therapeutics. *J Clin Invest.* 1997; 99: 1467-71.
- Coller BS. The platelet: life on the razor's edge between hemorrhage and thrombosis. *Transfusion* 2014; 54: 2137-46.
- Cook JJ et al. Tirofiban (Aggrastat). *Cardiovascular Drug Reviews* 1999; Vol. 17, No. 3: 199–224
- Cook JJ, Bednar B, Lynch JJ, Gould RJ, Ebbertson MS, Halczenko W, et al. Tirofiban (AggrastatTM). *Cardiovascular Drug Reviews* 1999; 17: 199-224.
- Cook JJ, Gardell SJ, Holahan MA, Sitko GR, Stump GL, Wallace AA, et al. Antithrombotic efficacy of thrombin inhibitor L-374,087: Intravenous activity in a primate model of venous thrombus extension and oral activity in a canine model of primary venous and coronary artery thrombosis. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 1999; 289:503-10.
- Cook JJ, Sitko GR, Holahan MA, Stranieri MT, Glass JD, Askerd BC, et al. Nonpeptide Glycoprotein IIb/IIIa Inhibitors. Antithrombotic Efficacy of L-738,167, a Long-Acting GPIIb/IIIa Antagonist, Correlates with Inhibition of Adenosine Diphosphate-Induced Platelet Aggregation but not with Bleeding Time Prolongation. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 1997; 281: 677-89.
- Creager MA, Dzau VJ, Bozic I. Bolesti krvnih žila ekstremiteta. U: Ivančević Z, Rumboldt Z, ured. *Harrison – Principi Interne Medicine*. Prvo hrvatsko izdanje. Zagreb: Placebo; 1997; 963-95.
- Dale GL. Platelet kinetics. *Current Opinion in Hematology* 1997; 4: 330-4.
- Darkovska Serafimovska M, Janevik-Ivanovska E, Djorgoski I, Ugresic N. Imaging of Deep Venous Thrombosis using Radioactive Labeled Tirofiban: Animal Model Evaluation. *IJIAR* 2014; 2 : 9-19.
- Darkovska Serafimovska M, Janevik-Ivanovska E, Ugresic N, Djorgoski I. Imaging of deep venous thrombosis using radioactive-labeled tirofiban. *Bratisl Med J* 2015; 116: 621-6
- Davi G, Patrono C (2007) Platelet activation and atherothrombosis. *N Engl J Med* 357:2482–94.

- Deckelbaum LI, Sax FL. Tirofiban, a Nonpeptide Inhibitor of the Platelet Glycoprotein IIb/IIIa Receptor. In: *New Therapeutic Agents in Thrombosis and Thrombolysis*. eds. Sasahara AA, Loscalzo JL. 1997; 355-65.
- deGaetano G, Cerletti C, Evangelista V. Recent Advances in Platelet-Polymorphonuclear Leucocyte Interaction. *Haemostasis* 1999; 29: 41-9.
- Deupree JD, Bylund DB. Basic Principles and Techniques for Receptor Binding. *Receptor Binding Tutorial, Torcis Reviews*. 2002; 18.
- DiVittorio R. et al. Deep Vein Thrombosis: Diagnosis of a Common Clinical Problem. *Ochsner J*. 2002; 4:14-7.
- Dixon AK, Couleden RAR, Peters AM. The non-invasive diagnosis of pulmonary embolus. The present probability helps determine the best imaging method. *BMJ* 2001; 323: 412-3.
- Emmerich J. Looking for deep venous thrombosis in suspected pulmonary embolism. *Seminars in Vascular Medicine* 2001; 1: 181-7.
- Essex DW, Li M. A Polyclonal Antibody to Protein Disulfide Isomerase Induced Platelet Aggregation and Secretion. *Thrombosis Research* 1999; 96: 445-50.
- Feng DL, Lindpaintner K, Larson MG, Rao VS, O'Donnell ChJ. Et al. Increased Platelet Aggregability Associated With Platelet GPIIIa P1A2 Polymorphism. The Framingham Offspring Study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1999; 19: 1142-7.
- Ferguson JJ, Kereiakes DJ, Adgey AA, Fox KA, Hillegass WB Jr, Pfisterer M, Vassanelli C. Safe use of platelet GP IIb/IIIa inhibitors. *Am Heart J*. 1998;135:77-89.
- Ferguson JJ. Low molecular weight heparins and glycoprotein IIb/IIIa antagonists. *J Interv Cardiol*. 2002;15:147-54.
- Fintel DJ. From bench to bedside: GPIIb/IIIa inhibitors. *Neurology* 2001; 57: 12-19.
- Fitzgerald DJ, Fitzgerald GA. Historical Lessons in Translational Medicine: Cyclooxygenase Inhibition and P2Y₁₂ Antagonism. *Circulation research* 2013; 112: 174-94.
- FitzGerald GA, Moran N. Molecular mechanism of platelet activation and inhibition. In: *Hemostasis and thrombosis, basic principles and clinical practices*. 4th ed, Colman RW et al eds, Lipincot, Williams & Wilkins, 2001; 1517
- Fu L-W, Longhurst JC. Activated Platelets Contribute to Stimulation of Cardiac Afferents During Ischaemia in Cats: Role of 5-HT₃ Receptors. *The Journal of Physiology*. 2002; 544:897-912
- Furie B, Furie BC. Mechanisms of thrombus formation. *N Eng J Med*. 2008; 359: 938-46

- Gawaz M, Neumann F-J, Schomig A. Evaluation of Platelet Membrane Glycoproteins in Coronary Disease – Consequences for Diagnosis and Therapy. *Circulation* 1999; 99: 1-11.
- Ghoshal K, Bhattacharyya M. Overview of Platelet Physiology: Its Hemostatic and Nonhemostatic Role in Disease Pathogenesis. *The Scientific World Journal* 2014; Article ID 781857
- Gibaldi M, Perrier D. Pharmacokinetics. 2nd ed, Marcel Dekker, Inc. New York, USA, 1982.
- Gottschalk KE, Adams PD, Brunger AT, Kessler H. Transmembrane signal transduction of the $\alpha_{IIb}\beta_3$ integrin. *Protein Science* 2002; 11: 1800-12.
- Hansen RJ, Balthasar JP. Effects of intravenous immunoglobulin on platelet count and antiplatelet antibody disposition in a rat model of immune thrombocytopenia. *Blood*. 2002; 100: 2087-93.
- Hansen RJ, Balthasar JP. Pharmacokinetics, Pharmacodynamics, and Platelet Binding of an Anti-Glycoprotein IIb/IIIa Monoclonal Antibody (7E3) in the Rat: A Quantitative Rat Model of Immune Thrombocytopenic Purpura. *J Pharm Exp Ther*. 2001; 298: 165-71.
- Hardoff R, Braegelman F, Zanzonico P, Herrold EM, Lees RS, Lees AM, et al. External imaging of atherosclerosis in rabbits using an ^{123}I -labeled synthetic peptide fragment. *J Clin Pharmacol* 1993; 33: 1039-47.
- Harker LA, Hanson SR, Kelly AB. Antithrombotic Strategies Targeting Thrombin Activities, Thrombin Receptors and Thrombin Generation. *Thrombosis and Haemostasis* 1997; 78: 736-41.
- Harker LA, Hanson SR. Experimental Strategies for Antithrombotic Benefits and Hemorrhagic Risk of Novel Antithrombotic Agents. In: *New Therapeutic Agents in Thrombosis and Thrombolysis*. eds. Sasahara AA, Loscalzo JL. 1997; 29-48.
- Hayward CP, Eikelboom J. Platelet function testing: quality assurance. *Seminars in Thrombosis and Hemostasis* 2007; 33:273-82
- Hayward CP, Moffat KA, Rab A et al. Development of North American consensus guidelines for medical laboratories that perform and interpret platelet function testing using light transmission aggregometry. *Am J Clin Pathol*. 2010; 134 : 955-63.
- Hennan JK, Hong T-T, Willens DE, Driscoll EM, Giboulot TA, Lucchesi BR. Prevention of experimental carotid and coronary artery thrombosis by the glycoprotein IIb/IIIa receptor antagonist CRL42796. *Br J Pharmacol* 2002; 136: 927-37.
- Henri H, Versteeg JWM, Heemskerk, ML, Pieter HR. New Fundamentals in Hemostasis. *Physiol Rev* 2013;93:327-58.

- Herbert JM, Bernat A, Maffrand JP. Importance of Platelets in Eksperimental Venous Thrombosis in Rat. *Blood* 1992; 80: 2281-6.
- Hézarard N, Metz D, Tassan-Mangina S, Potron G, Nguyễn P. Unexpected Flow Cytometric Results with two Small GPIIb/IIIa Blokera: Eptifibatide and Tirofiban. *Thromb Haemost.* 2001; 85: 561-2.
- Hiramatsu Y, Gikakis N, Anderson HL, Gorman JH, Marcinkiewicz C, Gould RJ, et al. Tirofiban provides “platelet anesthesia” during cardiopulmonary bypass in baboons. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1997; 113: 182-93.
- Hirsh J, Lee AYY. How we diagnose and treat deep vein thrombosis. *Blood* 2002; 99: 3102–10.
- Hirsh J, Weitz JI. New antithrombotic agents. *The Lancet* 1999; 353: 1431-36.
- Hirsh J. New Anticoagulants. *Am Heart J.* 2001; 142: 3-8.
- Holmes MB, Kubbani S, Terrien C, Sobel B, Schneider D. Quantification by flow cytometry of the efficacy and interindividual variation of platelet inhibition induced by treatment with tirofiban and abciximab. *Coron Artery Dis* 2001; 12: 245-53.
- Huisman MV. The natural History of Venous Thrombosis and Pulmonary Embolism. In: *Venous Thromboembolism: An Evidence-Based*, Hull R, Raskob G, Pineo G eds, 1996; 21-7.
- Humphries MJ. Integrin cell adhesion receptors and the concept of agonism. *TIPS* 2000; 21: 29-32.
- Israels SJ, McMillan–Ward EM. CD63 modulates spreading and tyrosine phosphorylation of platelets on immobilized fibrinogen. *Thromb Haemost.* 2005;93:311–8.
- Jackson SP, Schoenwaelder SM. Antiplatelet therapy: in search of the 'magic bullet'. *Nature Reviews Drug Discovery* 2003; 2: 775-89.
- Jagroop IA, Mikhailidis DP (2008) The effect of Tirofiban on fibrinogen/agonist-induced platelet shape change and aggregation. *Clin Appl Thromb Hemost.* 14, 295-302.
- Janevic E, Tadzer IS. Tc-99m labelling of platelets using diethyl-dithiocarbamate or 2,5-dihydroxy-benzoic acid. *Periodicum Biologorum* 1989; 91: 409-11.
- Janssen J, Brighton T, Butler SP. ^{99m}Tc labeled modified recombinant tissue plasminogen activator uptake in acute and chronic deep venous thrombosis. *Nuclear Medicine Communications* 2001; 22: 917-40.
- Jayasundera TG, Feldman DN, Marmur JD. Tirofiban-Induced Coronary Thrombosis. *J Invas Cardiol.* 1999; 11: 138-40.

- Jeske W, Callas DD, Fareed J. A Survey of Animal Models to Develop New and Novel Antithrombotic Agents. *In: New Therapeutic Agents in Thrombosis and Thrombolysis.* Sasahara AA, Loscalzo JL eds, 1997; 9-28.
- Ji X, Hou M. Novel agents for anti-platelet therapy. *J Hematol Oncol.* 2011;4:44-52
- Joel S. Novel Platelet Inhibitors. *Annu Rev Med.* 2001; 52: 161-84.
- Jordan RE, Mascelli MA, Nakada MT, Weisman HF. Pharmacology and Clinical Development of Abciximab (c7E3 Fab, ReoPro): A Monoclonal Antibody Inhibitor of GPIIb/IIIa and $\alpha_v\beta_3$. *In: New Therapeutic Agents in Thrombosis and Thrombolysis.* Sasahara AA, Loscalzo JL eds, 1997; 291-313.
- José RM, Lozano L, Navarro-Núñez L, Vicente . Platelet Receptors And Signaling In The Dynamics Of Thrombus Formation. *Haematologica* 2009; 94:700-11.
- Kaushansky K. Historical review: Megakaryopoiesis and thrombopoiesis. *Blood.* 2008;111:981-6.
- Kearon C, Julian J, Newman T, Ginsberg J. Noninvasive diagnosis of deep venous thrombosis: McMaster Diagnostic Imaging Practise Guidelines Initiative. *Ann Intern Med.* 1998; 128: 663-77.
- Kee F. Epidemiology of arterial and venous thrombosis. *In: Antithrombotics* eds. Uprichard ACG, Gallagher KP. (Handbook of experimental pharmacology; vol.132). 1999; 77-9.
- Kenneth, GM, Orfeo T, Butenas S, Undas A, Blumenthall K. Blood Coagulation Dynamics in Hemostasis. *Hamostaseologie* 2009; 29: 7-16.
- Kereiakes DJ, Kleiman NS, Ambrose J, Cohen M, Rodrigues S, Palabrica T, et al. Randomized, double-blind, placebo-controlled dose-ranging study of tirofiban (MK-383) platelet IIb/IIIa blockade in high risk patients undergoing coronary angioplasty. *J Am Coll Cardiol* 1996; 27: 536-42.
- King S et al. Glycoprotein IIb/IIIa inhibitors: The resurgence of tirofiban. *Vascul Pharmacol.* 2016;78:10-6.
- Kistner R, Ball J, Nordyke R, Freeman G. Incidence of pulmonary embolism in the course of thrombophlebitis of the lower extremities. *Am J Surg.* 1972; 124: 169-76.
- Klem JA, Schaffer JV, Crane PD, Barrett JA, Henry GA, Canestri L, et al. Detection of deep venous thrombosis by DMP 4444, a platelet IIb/IIIa antagonist: a preliminary report. *J Nucl Cardiol.* 2000; 7:359-64.
- Knežević I, Leisner TM, Lam SC-T. Direct binding of the platelet integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ (GPIIb/IIIa) to Talin. Evidence that interaction is mediated through the cytoplasmic domains of both α_{IIb} and β_3 . *The Journal of Biological Chemistry* 1996; 271: 1416-21.

- Knigh R, Bridwell R, Yong B, et al. The prevalence of positive Tc-99m apcitide scintigraphy in the early postoperative period following total hip and knee arthroplasty. *Radiology* 1999; 213:207.
- Knight CJ, Panesar M, Wright C, Clarke D, Butowski PS, Patel D, et al. Altered platelet function detected by flow cytometry effects of coronary arthtery disease and age. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology* 1997; 17: 2044-53.
- Kondo K, Umemura K. Clinical pharmacokinetics of tirofiban, a nonpeptide glycoprotein IIb/IIIa receptor antagonist: comparison with the monoclonal antibody abciximab. *Clin Pharmacokinet*. 2002; 41:187-95.
- Kostovska S. Fiziologija i patologija na hemostazata. Univerzitet Kiril i Metodij, Skopje, 2003
- Kulkarni S, Dopheide SM, Yap CL, Ravant C, Freund M, Mangin P, et al. A revised model of platelet aggregation. *J Chin Invest* 2000; 105: 783-91.
- Kuwana M, Kaburaki J, Ikeda Y. Autoreactive T Cells to Platelet GPIIb/IIIa in Immune Thrombocytopenic Purpura. Role in Production of Anti-Platelet Autoantibody *J Clin Invest*. 1998; 102: 1393-402.
- Labelle M, Begum S, Hynes RO. Direct signaling between platelets and cancer cells induces an epithelial-mesenchymal-like transition and promotes metastasis. *Cancer cell*. 2011;20:576–90.
- Lambrecht RM. Biological Models in Radiopharmaceutical Development. Kluwer Academic Publishers, 1996.
- Lee A, Julian J, Levine M. Clinical utility a rapid whole-blood D-dimer assay in patients with cancer who present with suspected acute venous thrombosis. *Ann Intern Med*. 1999; 131:417-23.
- Leslie M (2010) Cell biology. Beyond clotting: the powers of platelets. *Science* 328, 562-4.
- Levy-Toledano S. Platelet signal transduction pathways: could we organize them into a 'hierarchy'? *Haemostasis* 1999; 29: 4-15.
- Lewis GP, Westwick J. An in vivo model for studying arterial thrombosis. In: *Thromboembolism – A New Approach to Therapy*. ed Mitchell JRA, Domenet JG, 1978; 40-54.
- Leyme A et al. Integrins activate trimeric G proteins via the non-receptor protein GIV/Girdin. *JCB*. 2015;210:1165-84.

- Linnemann B, Schwonberg J, Mani H et al. Standardization of light transmittance aggregometry for monitoring antiplatelet therapy: an adjustment for platelet count is not necessary. *J Thromb Haemost.* 2008; 6:677-83.
- 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.
- Lister-James J, Knight LC, Maurer AH, Bush LR, Moyer BR, Dean RT. Thrombus imaging with a technetium-99m-labeled, activated platelet receptor-binding peptide. *J Nucl Med* 1996; 37:775-81.
- Lister-James J, Vallabhajosula S, Moyer BR, Pearson DA, McBride BJ, De Rosch MA, et al. Pre-clinical evaluation of technetium-99m platelet receptor-binding peptide. *J Nucl Med.* 1997; 38: 105-11.
- Liu S, Calderwood DA, Ginsberg MH. Integrin cytoplasmic domain-binding proteins. *Journal of Cell Science* 2000; 113: 3563-71.
- Loredana I et al. Is There Still a Role for Glycoprotein IIb/IIIa Antagonists in Acute Coronary Syndromes? *Cardiol Res*; 2013;4:1-7
- Mousa SA, Mu D-X, Lucchesi BR. Prevention of Carotid Artery Thrombosis by Oral Platelet GPIIb/IIIa Antagonist in Dog. *Stroke* 1997; 28: 830-6.
- Mousa SA. Antiplatelet therapies: from aspirin to GPIIb/IIIa-receptor antagonist and beyond. *Drug Discovery Today* 1999; 4: 552-61.
- Mousa SA, Kapil R, Mu D-X. Intravenous and Oral Antithrombotic Efficacy of the Novel Platelet GPIIb/IIIa Antagonist Roxifiban (DMP754) and Its Free Acid Form, XV459 *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1999; 19: 2535-41.
- Mousa SA, Khurana S, Forsythe MS. Comparative In Vitro Efficacy of Different Platelet Glycoprotein IIb/IIIa Antagonists on Platelet-Mediated Clot Strength Induced by Tissue Factor With Use of Thromboelastography Differentiation Among Glycoprotein IIb/IIIa Antagonists. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2000; 20: 1162-7.
- Neumann F, Hochholzer W, Pogatsa-Murray G, Schöming A, Gawaz M. Antiplatelet effects of abciximab, tirofiban and eptifibatid in patients undergoing coronary stenting. *J Am Coll Cardiol.* 2001; 37: 1323-8.
- Newman DK et al. Inhibition of antigen-receptor signaling by Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule-1 (CD31) requires functional ITIMs, SHP-2, and p56(lck). *Blood.* 2001;97:2351-7.

- Nurden P, Poujol Ch, Durrieu-Jais C, Winckler J, Combrie R, Macchi L, et al. Labeling of the Internal Pool of GPIIb/IIIa in Platelets by c7E3 Fab Fragments (abciximab): Flow and Endocytic Mechanism Contribute to the Transport. *Blood* 1999; 93: 1622-33.
- O'Shea C, Tchong JE. Platelet Glycoprotein IIb/IIIa Integrin Inhibition in Acute Myocardial Infarction. *J Invas Cardiol.* 1999; 11: 494-9.
- Oertel R, Köhler A, Koster A, Kirch W. Determination of Tirofiban in human plasma by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2004; 805:181-5.
- Offermanns S. Activation of Platelet Function Through G Protein-Coupled Receptors. *Circulation Research.* 2006; 99: 1293-04
- Olfert ED, Cross BM, McWilliam AA. eds. Guide to the care and use of experimental animals. Canadian Council on Animal Care. 2nd ed, 1993; Vol.1.
- Ozaki Y et al. Novel interactions in platelet biology: CLEC-2/podoplanin and laminin/GPVI. *Thromb Haemost.* 2009;7:191-4.
- Pearson DA, Lister-James J, McBride WJ, Wilson DM, Martel LJ, Civitello ER, Dean RT. Thrombus Imaging Using Technetium-99m-Labeled High-Potency GPIIb/IIIa Receptor Antagonists. Chemistry and Initial Biological Studies. *J Med Chem* 1996; 39: 1372-82.
- Peterson BJA, Visentin GP, Newman PJ, Aster RH. A Recombinant Soluble Form of the Integrin α IIb β 3 (GPIIb-IIIa) Assumes an Active, Ligand-Binding Conformation and Is Recognised by GPIIb-IIIa-Specific Monoclonal, Allo-, Auto-, and Drug-Dependent Platelet Antibodies. *Blood* 1998; 92:2053-63.
- Phillips DR, Teng W, Arfsten A, Nannizzi-Alaimo L, White M, Longhurst C, et al. Effect of Ca^{2+} on GP IIb/IIIa Interactions With Integrin Enhanced GP IIb/IIIa Binding and Inhibition of Platelet Aggregation by Reductions in the Concentration of Ionized Calcium in Plasma Anticoagulated With Citrate. *Circulation* 1997; 96: 1488-94.
- Picker SM (2011) In-vitro assessment of platelet function. *Transfus Apheresis Sci* 44, 305-19
- Previtali E, Bucciarelli P, Passamonti SM, Martinelli I. Risk factors for venous and arterial thrombosis. *Blood Transfus.* 2011; 9:120-38
- Quinn M, Deering A, Steward M, Cox D, Foley B, Fitzgerald D. Quantifying GPIIb/IIIa Receptor Binding Using 2 Monoclonal Antibodies. Discriminating Abciximab and Small Molecular Weight Antagonists. *Circulation* 1999; 99: 2231-8.

- Quinn MJ, Murphy RT, Dooley M, Foley JB, Fitzgerald DJ. Occupancy of the Internal and External Pools of Glycoprotein IIb/IIIa following Abciximab Bolus and Infusion. *J Pharm Exp Ther.* 2001; 297: 496-500.
- Ramalingam G, Jones N, Besser M. Platelets for anaesthetists - part 1: Physiology and pathology. *BJA Education.* 2015; 0:mkv027v1-mkv027
- Reitsma PH, Versteeg HH, Middeldorp S. Mechanistic view of risk factors for venous thromboembolism. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2012; 32: 563–8.
- Ried JH. Out of hours radiological diagnosis of pulmonary embolism and deep venous thrombosis. *Imaging* 2001; 13: 124-9.
- Saboor M et al. Platelet receptors; an instrumental of platelet physiology. *Pak J Med Sci.* 2013; 29: 891–6.
- Saltzman AJ, Mehran R, Hooper WC, Moses JW, Weisz G, Collins MB, Lansky AJ, Kreps EM, Leon MB, Stone GW, Dangas G. The relative effects of abciximab and tirofiban on platelet inhibition and C-reactive protein during coronary intervention. *J Invasive Cardiol.* 2010; 22:2-6.
- Sampson CB. Complications and difficulties in radiolabelling blood cells: A review. *Nuclear Medicine Communications* 1996; 17: 648-58.
- Schaffer LW, Davidson JT, Siegl PKS. Use of Radionuclide in Experimental Vascular Thrombosis. In: Burns H.D, Gibson R., Dannals R., Siegal P. eds. *Nuclear Imaging in Discovery, Development, and Approval.* 1995; 265-77.
- Schaible TF, Alavi A. Antifibrin scintigraphy in the diagnostic evaluation of acute deep venous thrombosis. *Seminars in Nuclear Medicine* 1991; 265-77.
- Scherer A, Siebler M, Aulich A. Virtual Arterial Endoscopy as a Diagnostic Aid in a Patient with Basilar Artery Fenestration and Thromboembolic Pontine Infarct. *Am J Neuroradiol.* 2002; 23:1237-39.
- Schiariti M, Saladini A, Cuturello D, Missiroli B, Puddu PE. Long-term efficacy of high-dose tirofiban versus double-bolus eptifibatid in patients undergoing percutaneous coronary intervention. *J Cardiovasc Med.* 2011;12:29-36.
- Schmitz SA, Winterhalter S, Schiffer S, Gust R, Wagner S, Kresse M et al. USPIO-enhanced direct MR imaging of thrombus: Preclinical evaluation in rabbits. *Radiology* 2001; 221:237-43.
- Schneider DJ. Anti-platelet therapy: glycoprotein IIb/IIIa antagonists. *Br J Clin Pharmacol.* 2011;72:672- 82.

- Seiffert D, Stern AM, Ebling W, Rossi RJ, Barrett YCh. Prospective testing for drug-dependent antibodies reduces the incidence of thrombocytopenia observed with the small molecule glycoprotein IIb/IIIa antagonist Roxifiban: Implications for the etiology of thrombocytopenia. *Blood*, DOI 10.1182/blood-2002-02-0471
- Serebruany V, Malinin A, Pokov A, Arora U, Atar D, Angiolillo D. Effects of escalating doses of tirofiban on platelet aggregation and major receptor expression in diabetic patients: hitting the TARGET in the TENACITY trial? *Thromb Res*. 2007;119:175-81.
- Shap PE, La Regime M. The laboratory rat. In: *The Laboratory Animal Pocket Reference Series*. Volume A, CRC. 1998.
- Shattil SJ, Hoxie JA, Cunningham M, Brass LF. Changes in the platelet membrane glycoprotein IIb/IIIa complex during platelet activation. *J Biol Chem*. 1985; 20: 1107-14.
- Shattil SJ, Kashiwagi H, Pampori N. Integrin signaling: the platelet paradigm. *Blood* 1998; 91: 2645-57.
- Shattil SJ, Kim C, Ginsberg MH. The final steps of integrin activation: the end game. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2010;11:288-300.
- Simon DI, Liu CB, Ganz P, Kirshenbaum JM, Piana RN, Rogers C, et al. A Comparative Study of Light Transmission Aggregometry and Automated Bedside Platelet Function Assay in Patients Undergoing Percutaneous Coronary Intervention and Receiving Abciximab, Eptifibrate, or Tirofiban. *Catheterization and Cardiovascular Interventions* 2001; 52: 425-32.
- Smith JW, Steinhubl SR, Lincoff AM, Coleman JC, Lee TT, Hillman RS, et al. Rapid Platelet-Function Assay – An Automated and Quantitative Cartridge-Based Method. *Circulation* 1999; 99: 620-5.
- Sorensen HT, Mellekjær L, Steffensen FH, Olsen JH, Nielsen GL. The risk of diagnosis of cancer after primary deep venous thrombosis or pulmonary embolism. *N Engl J Med*. 1998; 338: 1169-73.
- Stassen JM, Nystrom A, Hoylaerts M, Collen D. Antithrombotic effects of thrombolytic agents in a platelet-rich femoral vein thrombosis model in the hamster. *Circulation* 1995; 91: 1330-5.
- Stassen JM. Animal model to assess the safety and efficacy of thrombolytic agents. In: *New Therapeutic Agents in Thrombosis and Thrombolysis*. ed. Sasahara AA, Loscalzo JL. 1997; 451-74.

- Taillefer R, Therasse E, Turpin S, Lambert R, Robillard P, Soulez G. Comparison of Early and Delayed Scintigraphy with 99m Tc-Apticide and Correlation with Contrast-Enhanced Venography in Detection of Acute Deep Vein Thrombosis. *J Nucl Med.* 1999; 40: 2029-35.
- Tanaka KA, Katori N, Szlam F, Sato N, Kelly AB, Levy JH. Effects of tirofiban on haemostatic activation in vitro. *Br J Anaesth.* 2004; 93: 263-9.
- Tanaka, KA, Key, S. Levy, JH. Blood Coagulation: Hemostasis and Thrombin Regulation. *Anesthesia & Analgesia.* 2009;8:1433-46
- Thakur ML, Pallela VR, Consigny PM, Rao PS, Vessileva-Belnikolovska D, Shi R. Imaging vascular thrombosis with 99m-Tc-labeled fibrin alpha-chain peptide. *J Nucl Med.* 2000; 41: 161-8.
- Thiagarajan P, Benedict C.R. Platelet Procoagulant Activity. *In: New Therapeutic Agents in Thrombosis and Thrombolysis.* eds. Sasahara AA, Loscalzo JL. 1997; 419-34.
- Tomiyama Y. Eliminate dark side from antiplatelet therapy. *Blood* 2014; 123:2599-601.
- Trajkovski R, Milenkov V, Dukovski R, Janevic E, Tadžer IS. Obeležavanje humanih trombocita sa dietill-ditiokarbamat Tc-99m (DDC). *Bilten hemat transf.* 1989; 17: 21-5.
- Valgimigli M, Tebaldi M, Campo G, Gambetti S, Bristot L, Monti M, Parrinello G, et al. Prasugrel versus tirofiban bolus with or without short post-bolus infusion with or without concomitant prasugrel administration in patients with myocardial infarction undergoing coronary stenting: the FABOLUS PRO (Facilitation through Aggrastat By drOpping or shortening Infusion Line in patients with ST-segment elevation myocardial infarction compared to or on top of PRasugrel given at loading dose) trial. *JACC Cardiovasc Interv.* 2012;5:268- 77
- van Beek EJR, den Cate JW. The Diagnosis of Venous Thromboembolism: An Overview. *In: Venous Thromboembolism: An Evidence-Based Atlas.* eds. Hull R, Raskob G, Pineo G. 1996; 93-9.
- Van der Haijden JF, Prins MDM, Buller HR. Initial treatment of patients with venous thrombolism. *Educational book, Fifth Congress of the European Hematology Association, Birmingham, UK,* 2000; 123-7.
- van Rensburg WJ, Roodt JP, Lamprecht S, Meiring SM, Badenhorst PN. Tirofiban versus abciximab: tirofiban is administered at suboptimal dosages when evaluated in an arterial thrombosis model in non-human primates. *Clin Exp Med.* 2012; 12: 257-63.

- Valgimigli M et al. Intensifying Platelet Inhibition With Tirofiban in Poor Responders to Aspirin, Clopidogrel, or Both Agents Undergoing Elective Coronary Intervention. *Circulation*. 2009;119:3215-22
- Vickers S, Theoharides AD, Arison B, Balani SK, Cui D, Duncan CA, et al. In Vitro and in In Vivo Studies on the Metabolism of Tirofiban. *Drug Metabolism and Disposition* 1999; 27: 1360-6.
- Wasser MNJM, Cleyndert P, Camps JAJ, Feitsma RIJ, Nieuwenhuizen W, Pauwels EKJ. An in vitro model for the scintigraphic detection of thrombi using a 99mTc-labelled antifibrin monoclonal antibody. *Nucl Med Commun*. 1989; 10: 653-9.
- Wasser MNJM, Pauwels EKJ. Immunoscintigraphy of thrombosis. *Eur J Nucl Med*. 1990; 16:583-5.
- Wilerson JT, Benedict CR. Overview of Inhibition of Platelet Functions. In: *New Therapeutic Agents in Thrombosis and Thrombolysis*. eds. Sasahara AA, Loscalzo JL. 1997; 435-48.
- Wilerson JT. Development of unstable angina and myocardial infarction: Importance of platelets, platelet- and endothelium-derived mediators, and monocytes/macrophages in thrombosis, vasoconstriction, and neointimal proliferation. In *New Therapeutic Agents in Thrombosis and Thrombolysis*. eds. Sasahara AA, Loscalzo JL. 1997; 435-48.
- Wu KK, Wilerson JT. Monitoring Platelet Function in Glycoprotein IIb/IIIa Inhibitor Therapy. *Circulation* 2001; 103: 2528-30.
- Yang Lee, Hengliang Liu, Zhenxuan Hao, Guoying Geng, Qi Chen, Wenjie Han, Kailong Jia, Yuxin Zhou. Efficacy and safety of different doses of tirofiban combined with ticagrelor on diabetic patients with AMI receiving in emergency percutaneous coronary intervention (PCI). *Int J Clin Exp Med* 2015; 8: 1360-9.
- Yeung J, Holinstat M. Newer agents in antiplatelet therapy: a review. *J Blood Med*. 2012; 3: 33-42.
- Yong D, Frey E. Model-based downscatter compensation for simultaneous Tc-99m/In-111 dual-isotope SPECT imaging. *J Nucl Med* 2008; 49 Suppl 1, 152P
- Youngzli C et al. Platelet mechanism of substrate stiffness during clot formation mediates adhesion, spreading, and activation. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2014;111:14430-5
- Zaman AG, Osende JI, Chesebro JH, Fuster V, Padurean A, Gallo R, et al. In Vivo Dynamic Real-Time Monitoring and Quantification of Platelet-Thrombus Formation. Use of a Local Isotope Detector. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2000; 20: 860-5.

- Zhao JL, Yang YJ, Pei WD, Sun YH, Zhai M, Liu YX, Gao RL. Tirofiban Preserves Endothelial Junctions and Decreases Endothelin-1. *Sci Pharm.* 2008; 76: 171–183.
- Zhenxian Y, YuJie Z, Yingxin Z, Yueping L, Xiaomin N, Zhiming Z, Dean J. Efficacy and Safety of Tirofiban in High-Risk Patients With Non-ST-Segment Elevation Acute Coronary Syndromes. *Clin Cardiol.* 2009; 9:40-4.
- Zhenyu L et al. Signaling During Platelet Adhesion and Activation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2010;30:2341-9.

BIOGRAFIJA

Marija Darkovska-Serafimovska rođena je 1975. godine u Skoplju, Republika Makedonija. Na Farmaceutski fakultet Univerziteta u Skoplju upisala se školske 1993/94. godine, a diplomirala 1998 godine. U periodu od 2002-2005. godine na Farmaceutskom fakultetu Univerziteta u Skopju upisala je i završila specijalizaciju iz Ispitivanja i kontrole lekova. U periodu od 2013-2015. godine na Farmaceutskom fakultetu Univerziteta u Beogradu upisala je i završila Specijalističke akademske studije Puštanje leka u promet.

Na Farmaceutskom fakultetu Univerziteta u Beogradu upisala je doktorske akademske studije školske 2009/10. godine, modul Farmakologija.

Kao direktor kontrole kvaliteta i odgovorno lice za puštanje leka u promet, radila je u “Jaki 80” a.d. Radoviš, Srbolek a.d. Beograd i M.D. Nini Niš u periodu od 1999-2011. godine. Na Fakultetu Medicinskih nauka u Štipu izabrana je za asistenta 2011. godine. Učestvuje u realizaciji praktične nastave za studente osnovnih studija iz Farmakologije. Trenutno je direktor Makedonske agencije za lekove i medicinska sredstva (MALMED).

Marija Darkovska-Serafimovska uključena je u naučno istraživački rad na dva Univerzitetska projekata:

- 2015-2017. godine - Uspostavljanje i standardizacija tehnologije za dobijanje gotovih formulacija radiofarmaceutskih preparata, bazirano na konjugovanim kompleksima monoklonskih antitela i peptida; Fakultet Medicinskih nauka Univerziteta “Goce Delcev”-Štip

- 2015-2017. godine. - Građenje nacionalne strategije za borbu protiv falsifikovanih lekova; Farmaceutski fakultet Univerziteta “Sv. Kiril i Metodij” – Skoplje.

Koautor je udžbenika i praktikuma za studente osnovnih studija Farmakologija za *farmaceute* (glavni urednik Balkanov T, Fakultet Medicinskih nauka, Štip, 2014).