

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ  
ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ  
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗΣ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑΣ  
ΔΙΕΥΘΥΝΤΗΣ: ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΓΕΩΡΓΙΟΣ ΚΑΛΛΙΣΤΡΑΤΟΣ

Η ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΟΥ ΡΟΛΟΥ ΤΩΝ ΕΛΕΥΘΕΡΩΝ ΡΙΖΩΝ ΣΤΗ ΣΥΣΣΩΡΕΥΣΗ  
ΤΩΝ ΑΙΜΟΠΕΤΑΛΙΩΝ

ΓΕΩΡΓΙΟΣ Δ. ΣΟΦΗΣ  
ΦΥΣΙΚΟΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ  
1992



ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ  
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ



026000345911



Πρόλογος

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Αφιέρωση

Πρόλογος

Πρόλογος

**Αφιερώνεται  
στη μνήμη του Δημητρίου Ε. Σόφη  
και στην Αντιγόνη Σόφη**

Εισαγωγή

Μεταφράσεις

Βασικά στοιχεία της ιστορίας του κράτους

Αρχαία ιστορία

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Υπόμνημα

Αναμνηστική

Σύνοψη

Επισημαίνεται ότι ο παρών τόμος αποτελεί μέρος της συλλογής των έργων του Δημητρίου Ε. Σόφη

Προβλεπόμενα

(Σ. Σόφη Σόφη Σόφη Σόφη Σόφη)

Αναμνηστική

3

Επισημαίνεται



**"Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από το Ιατρικό Τμήμα δεν υποδηλώνει αποδοχή των γνώμων του συγγραφέα"**

**(Νόμος 5343/32, άρθρο 202 παρ.2)**



## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

	σελίδα
Εισαγωγή .....	1
<b>ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ</b>	
Αιμοπετάλια .....	3
Ο ρόλος των αιμοπεταλίων στην αιμόσταση .....	10
Συσσώρευση των αιμοπεταλίων .....	16
Ελεύθερες ρίζες .....	27
Μέθοδοι επισήμανσης και μελέτης ελευθέρων ριζών .....	67
Βασικά χαρακτηριστικά των ουσιών που χρησιμοποιήθηκαν στη μελέτη .....	72
Αιμοπετάλια και ελεύθερες ρίζες .....	88
<b>ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ</b>	
Υλικό και μέθοδοι .....	90
Αποτελέσματα .....	106
Συζήτηση .....	141
Συμπεράσματα .....	161
Περίληψη .....	162
Abstract .....	165
Βιβλιογραφία .....	171



## Συντμήσεις

AA	Αραχιδονικό οξύ
ABP	Πρωτεϊνη σύνδεσης με την ακτίνη
ADP	Διφωσφορική αδενοσίνη
BHA	Βουτυλική υδροξυανισόλη
BHT	Βουτυλικό υδροξυτολουένιο
CP	Φωσφοκρεατίνη
CPK	Κινάση της φωσφοκρεατίνης
CDP-DG	Κυτιδυλο-διφωσφο-διακυλγλυκερόλη
DAG	Διακυλγλυκερόλη
DMPO	5,5-διμεθυλοπυρολινο-N-οξειδίο
DMSO	Διμεθυλοσουλφοξείδιο
D-P	D-Πενικιλλαμίνη
DPPH	Διφαινυλοπικριλυδραζόλιο
EDTA	Αιθυλενοδιαμινοξικό δινάτριο
EGTA	Αιθυλενο-γλυκολ-δισ(2-αμινοαιθυλαιθέρ)-N,N- -τετραοξείκιο οξύ
EPR	Ηλεκτρονικός παραμαγνητικός συντονισμός
ESR	Ηλεκτρονικός συντονισμός Spin
GII, GIII	Γλυκοπρωτείνες, II, III
GSH	Αναθείσα γλουταθειόνη
GTP	Τριφωσφορική γουανοσίνη
GSSG	Οξειδωθείσα γλουταθειόνη
HETE	Υδροξυεικοσιτετραενοϊκό οξύ
HPETE	Υδροξυπεροξυεικοσιτετραενοϊκό οξύ
5-HT	5-υδροξυτρυπταμίνη
LO	Λιποξυ-ρίζα
LOO	Λιπουπερόξυ-ρίζα
LT	Λευκοτριένιο
LX	Λιποξίνες
MAG	Μονοακυλγλυκερόλη
MDA	Μαλονική διαλδεύδη
2-MPG	2-(ή α-) Μερκαπτοπροπιονύλ-γλυκίνη
N-AC	N-Ακετυλ-κυστεΐνη
NAD	Νικοτιναμίδιο-Αδενινο-Νουκλεοτίδιο
NADH	Αναθέν NAD
NADP	Φωσφορικό NAD
NADPH	Αναθέν NADP
NDGA	Νορ-διυδρο-γουαιαρετικό οξύ



PA	Φωσφορικό οξύ
PAF	Παράγοντας ενεργοποίησης αιμοπεταλίων
PBN	Φαινύλ-βουτύλ-νιτρόνιο
PC	Φωσφατιδυλοχολίνη
PG	Προσταγλανδίνες
PGI <sub>2</sub>	Προσταγλανδίνη I <sub>2</sub> ή Προστακυκλίνη
PI	Φωσφονοσιπόλη
PK	Σταθερά αντίδρασης
PL	Φωσφολιπάση
4-POBN	α(4-πυριδυλο-1-οξειδίο)-N-tert-βουτυλονιτρόνιο
Sens	Φωτοευαίσθητοποιητής
Singlet	Μονήρες
SOD	Δισμουτάση του υπεροξειδίου
Spin trap	Παγιδευτής Spin
TG	Διάλυμα γλυκόζης-tyrode
TG-Ca	TG-ασβέστιο
THIOLA	Φαρμακευτική ονομασία της 2-MPG
tNB ή NtB	Νιτροζοβουτάνιο
Triplet	Τριπλό

## ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η συσσώρευση των αιμοπεταλίων είναι μια από τις βασικότερες συνιστώσες της αιμοστατικής διαδικασίας, αλλά και παράμετρος πολλών παθολογικών καταστάσεων, όταν δε διενεργείται φυσιολογικά. Τα τελευταία χρόνια πολλοί ερευνητές έχουν προσπαθήσει να διευκρινίσουν τους λεπτούς μηχανισμούς και τις μεταξύ τους σχέσεις, που συμβάλλουν στη συσσώρευση των αιμοπεταλίων. Ακόμη η αντίληψή μας γύρω από το ρόλο των αιμοπεταλίων έχει διευρυνθεί, έτσι ώστε τα αιμοπετάλια να θεωρούνται πλέον και ως κύτταρα των φλεγμονωδών διαδικασιών. Στο πλαίσιο αυτό του ρόλου τους διαπιστώθηκε ότι τα αιμοπετάλια παράγουν, όταν διεγερθούν με κατάλληλους αγωνιστές, ελεύθερες ρίζες, των οποίων ο φυσιολογικός ρόλος για τη λειτουργία του αιμοπεταλίου δεν έχει πλήρως διευκρινιστεί.

Με βάση τα παραπάνω έγινε, στην παρούσα εργασία, προσπάθεια να διευκρινιστεί ο ρόλος των ελευθέρων ριζών στη συσσώρευση των αιμοπεταλίων, με εστίαση στη σημασία τους για τη φυσιολογία και φυσιοπαθολογία της αιμόστασης.

Η παρούσα μελέτη έρχισε το Σεπτέμβριο του 1988, ολοκληρώθηκε το Μάρτιο του 1992 και εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Πειραματικής Φυσιολογίας του Ιατρικού Τμήματος του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων.

Θεωρώ υποχρέωσή μου να ευχαριστήσω θερμά το Διευθυντή του Εργαστηρίου, Καθηγητή κ. Γεώργιο Καλλίστρατο για την καρποφόρα επίβλεψη και την εύστοχη καθοδήγησή του, όσο και για την εξασφάλιση των απαραίτητων μέσων και υλικών για την εκπόνηση της παρούσας διδακτορικής διατριβής. Τον Επίκουρο Καθηγητή της Ιατρικής Φυσικής κ. Κωνσταντίνο Ρήγα ευχαριστώ για την προθυμία με την οποία μου παρείχε κάθε απαιτούμενη βοήθεια.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες οφείλω στους συνεργάτες και φίλους κ. κ Δρ. Αγγελο Ευαγγέλου, Επίκουρο Καθηγητή του Εργαστηρίου Πειραματικής Φυσιολογίας και Δρ. Σπύρο Καρκαμπούνα, συνεργάτη του Εργαστηρίου, για την αμέριστη βοήθεια και στενή υποστήριξη που μου πρόσφεραν σε όλα τα στάδια της εκπόνησης της μελέτης, τόσο σε πρακτικό όσο και σε θεωρητικό επίπεδο. Η επίμονη προσπάθεια που κατέβαλαν μαζί μου, η ενθάρυνση και στήριξη που μου παρείχαν κατά τις δύσκολες φάσεις της εργασίας μου, συνέβαλαν ουσιαστικά στην ολοκλήρωσή της. Τον Δρ. Καρκαμπούνα ευχαριστώ επίσης για την καλλιτεχνική του συμβολή και τον Δρ. Ευαγγέλου για τις εύστοχες παρεμβάσεις και υποδείξεις του κατά τη συγγραφή της εργασίας.

Τελειώνοντας θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Επίκουρο Καθηγητή





Βιολογικής Χημείας Δρ. Δημήτριο Γαλάρη για τη βοήθεια που μου πρόσφερε με τις συζητήσεις και υποδείξεις του στο θέμα των ελευθέρων ριζών, την ακούραστη κ. Κατερίνα Μπόλη που με επιμέλεια και υπομονή δακτυλογράφησε και επεξεργάστηκε τα κείμενα και τον Βιολόγο κ. Παναγιώτη Στεφάνου που μου προσέφερε τη βοήθειά του όποτε την εξήτησα.

Τον Επίκουρο Καθηγητή Χημείας κ. Αντώνιο Ζαρκάδη ευχαριστώ για τις ακούραστες προσπάθειες που κατέβαλε μαζί μας για τον εντοπισμό και την καταγραφή των ελευθέρων ριζών με Ηλεκτρονικό Παραμαγνητικό Συντονισμό Spin (ESR).

Ακόμη ευχαριστώ το υπόλοιπο επιστημονικό και βοηθητικό προσωπικό του Εργαστηρίου Φυσιολογίας, που πολλαπλά συνέβαλε με την υπομονή και την προθυμία του στην υπέρβαση κάθε δυσκολίας κατά την εκπόνηση της διδακτορικής μου διατριβής.



## ΑΙΜΟΠΕΤΑΛΙΑ

Το 1906 ο Bockmeyer διαπίστωσε ότι τα αιμοπετάλια είναι μονίμα στοιχεία του αίματος των υγιών ενήλικων. Ήταν όμως πολύ δύσκολο να εφευριστούν στα μικροσκοπικά παρασκευάσματα, γιατί είναι πολύ ευαίσθητα στις κλασικές μεθόδους παρασκευής και απαιτείται ιδιαίτερη προσοχή για την απομόνωσή τους.

Από τις πρώτες σοβαρές έρευνες προέκυψε ότι τα αιμοπετάλια σχετίζονται με τη διαδικασία πήξης του αίματος. Σήμερα είναι γνωστό ότι τα αιμοπετάλια συμμετέχουν στη θρομβογένεση, στη διαδικασία της αρτηριοσκληρώσεως και στη διαδικασία της μετάστασης καρκινικών κυττάρων.

### 1. Παραγωγή και Καταστροφή των Αιμοπεταλίων

Τα αιμοπετάλια ανήκουν στα ερυθρά στοιχεία του αίματος των ανιέρων ζώων. Δημιουργούνται από το μεγακαρυκάριο και φαίνεται ότι έχουν κοινό πρόδρομο με τα κύτταρα της μαύρης και ερυθράς σειράς (1,2,3).

Σε χρονική διαφορά από τα ερυθρά στοιχεία το πρόδρομικό κύτταρο διαφοροποιείται ποσοτικά και ποιοτικά σε μαύρα και ερυθρά. Η ρίζα του κυττάρου αυξάνεται σταδιακά και οι μαύρες και ερυθρές αιμοπετάλιες. Τα αιμοπετάλια που αποκρίνονται από το αίμα των μεγακαρυοκυττάρων περιέχουν ριβονουκλεϊκά και RNA.

Στον άνθρωπο ο αριθμός των αιμοπεταλίων είναι  $2 \times 10^8$  /ml αίματος. Ο αριθμός προσωνόως τους είναι  $3.5 \times 10^7$  αιμοπετάλια /ml αίματος την ημέρα και ο μέσος χρόνος ζωής τους είναι 10 μέρες.

Τα υψρασμένα αιμοπετάλια καταστρέφονται στο ήπαρ και τα σπλήνα και ανηλεάζονται από τη μειωμένη τους λειτουργικότητα. Επειδή η περιεκτικότητά τους στο αίμα είναι σταθερή, είναι προφανές ότι παράγεται τόσος αριθμός αιμοπεταλίων όσος καταστρέφεται.

### 2. Δομή Αιμοπεταλίων

Σε παρατήρηση με οπτικό μικροσκόπιο (3,4) στα αιμοπετάλια διακρίνονται δύο μέρη: α) το εξωτερικό και μεγαλύτερο σε όγκο υαλόμερο και β) το χρωμόμερο ή κοκκίομερο στο εσωτερικό.

Το υαλόμερο είναι διαλυτής βασικού χημικού χαρακτήρα ουσία και στις φυσιολογικές χρωματικές του αίματος παίρνει σπλή κίτρινη χροιά. Το κοκκίομερο αποτελείται από ερυθρόμοιο ή πορφυρό και εμφανίζει κοκκώδη όψη.

Είναι δυνατόν να παρατηρηθούν διαφορές στην εικόνα μεταξύ νέων και υψρασμένων αιμοπεταλίων. Διαφορές μπορεί να παρατηρηθούν επίσης λόγω των



## ΑΙΜΟΠΕΤΑΛΙΑ

Το 1906 ο Buckmaster διαπίστωσε ότι τα αιμοπετάλια είναι μόνιμα στοιχεία του αίματος των υγιών ενηλίκων. Ήταν όμως πολύ δύσκολο να εμφανιστούν στα μικροσκοπικά παρασκευάσματα, γιατί είναι πολύ ευαίσθητα στις κλασικές μεθόδους παρασκευής και απαιτείται ιδιαίτερη προσοχή για την απομόνωσή τους.

Από τις πρώτες σοβαρές έρευνες προέκυψε ότι τα αιμοπετάλια σχετίζονται με τη διαδικασία πήξης του αίματος. Σήμερα είναι γνωστό ότι τα αιμοπετάλια συμμετέχουν στη θρομβογένεση, στη διαδικασία της αρτηριοσκλήρυνσης και στη διαδικασία της μετάστασης καρκινικών κυττάρων.

### 1. Παραγωγή και Καταστροφή των Αιμοπεταλίων

Τα αιμοπετάλια ανήκουν στα έμμορφα στοιχεία του αίματος των ανωτέρων ζώων. Δημιουργούνται μετά από τα μεγακαρυοκύτταρα και φαίνεται ότι έχουν κοινό πρόδρομο με τα κύτταρα της μυελικής και ερυθράς σειράς (1,2,3).

Σε χρονική διάρκεια 70 ωρών περίπου, κατά την οποία το προδρομικό κύτταρο διαφοροποιείται προς μεγακαρυοκύτταρο και ωριμάζει, η μάζα του κυττάρου αυξάνεται σημαντικά και παράγει μερικές εκατοντάδες αιμοπεταλίων. Τα αιμοπετάλια που αποκόβονται από το σώμα των μεγακαρυοκυττάρων περιέχουν ριβοσώματα και RNA.

Στον άνθρωπο ο αριθμός των αιμοπεταλίων είναι  $2 \times 10^8$  /ml αίματος. Ο ρυθμός παραγωγής τους είναι  $3.5 \times 10^7$  αιμοπετάλια /ml αίματος την ημέρα και ο μέσος χρόνος ζωής τους είναι 10 μέρες.

Τα γηρασμένα αιμοπετάλια καταστρέφονται στο ήπαρ και το σπλήνα και αναγνωρίζονται από τη μειωμένη τους λειτουργικότητα. Επειδή η περιεκτικότητά τους στο αίμα είναι σταθερή, είναι προφανές ότι παράγεται τόσος αριθμός αιμοπεταλίων όσος καταστρέφεται.

### 2. Δομή Αιμοπεταλίων

Σε παρατήρηση με οπτικό μικροσκόπιο (3,4) στα αιμοπετάλια διακρίνονται δύο μέρη: α) το εξωτερικό και μεγαλύτερο σε όγκο υαλόμερο και β) το χρωμόμερο ή κοκκιόμερο στο εσωτερικό.

Το υαλόμερο είναι διαυγής βασικού χημικού χαρακτήρα ουσία και στις συνήθεις χρωστικές του αίματος παίρνει αχνή κυανή χροιά. Το κοκκιόμερο αποτελείται από έγχρωμο υλικό μπλε ή πορφυρό και εμφανίζει κοκκιώδη υφή.

Είναι δυνατόν να παρατηρηθούν διαφορές στην εικόνα μεταξύ νέων και γηρασμένων αιμοπεταλίων. Διαφορές μπορεί να παρατηρηθούν επίσης λόγω των



συνθηκών λήψης και επεξεργασίας των αιμοπεταλίων.

Συνοπτικά η σύγχρονη αντίληψη για τα αιμοπετάλια είναι η εξής:

1. Έχουν σχήμα κόκκου φακής που παρουσιάζει μεταβολές εξαρτώμενες από τη λειτουργική τους κατάσταση.
2. Αποτελούνται από τρεις βασικές ζώνες:
  - α) Περιφερική ζώνη
  - β) Ζώνη Sol & Gel
  - γ) Ζώνη οργανυλίων.

#### **A. Περιφερική Ζώνη**

Αποτελείται από τρεις στοιβάδες: α) Εξωτερικό επικάλυμα, β) Μεμβρανική μονάδα και γ) Υπομεμβρανική περιοχή (5, 6).

Το εξωτερικό επικάλυμα της μεμβράνης των αιμοπεταλίων αποτελείται από βλενοπολυσακχαρίτες, γλυκοπρωτείνες, ΑΤΡάσες και πρωτείνες και συμμετέχει στην πρόσφυση και στη συσώρευση των αιμοπεταλίων. Αξιζει να σημειωθεί ότι το εξωτερικό επικάλυμα φέρει αρνητικά ηλεκτρικά φορτία.

Κάτω από το επικάλυμα βρίσκεται η μεμβρανική μονάδα, που αποτελείται από δύο πρωτεϊνικά στρώματα και ένα λιπιδικό ανάμεσά τους (3,6).

Η υπομεμβρανική περιοχή χαρακτηρίζεται από μια δέσμη περιφερικών μικροσωλήνων. Στη στεφανιαία περιφερική διάταξη των σωληνίσκων αυτών οφείλεται το σχήμα των αιμοπεταλίων (3, 6, 7). Οι μικροσωλήνες αυτοί διαπερνούν τις δύο εξωτερικές στοιβάδες και συνδέουν τον εξωτερικό χώρο (συστατικά αίματος) με τα κοκκία των αιμοπεταλίων. Η ύπαρξη των μικροσωλήνων καθιστά δυνατή την επικοινωνία του εξωτερικού χώρου με το εσωτερικό των αιμοπεταλίων, με αποτέλεσμα ουσίες του πλάσματος να περνούν στο εσωτερικό των αιμοπεταλίων και συστατικά των κοκκίων να περνούν στο περιβάλλον (ενεργοποίηση άλλων αιμοπεταλίων).

#### **B. Ζώνη Sol - Gel**

Λεπτόρευστο - πυκνόρευστο κυτταρόπλασμα

Είναι ένα ινώδες δίκτυο που σχηματίζει ένα είδος σκελετού, ο οποίος μέσα στις θηλές του συγκρατεί σωματίδια γλυκογόνου, δέσμες μικροσωλήνων, υπομεμβρανικά νημάτια και μικρονημάτια. Τα νημάτια αυτά κατανέμονται σε δύο ομάδες:

1. Στα νημάτια που έχουν ρόλο σκελετού και είναι υπεύθυνα για το σχήμα των αιμοπεταλίων και τη διατήρηση της θέσης διαφόρων οργανυλίων, όταν το κύτταρο είναι σε ηρεμία.
2. Στα νημάτια που ευθύνονται για τις δυναμικές μεταβολές των αιμοπεταλίων και προκαλούν κύματα συστολών, με αποτέλεσμα το περιεχόμενο των κοκκίων να χύνεται



μέσω των μικροσωλήνων στο περιβάλλον (Αντίδραση έκλυσης). Οι μεταβολές αυτές συμβαίνουν κατά την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων.

Είναι γνωστό ότι στις ινώδεις αυτές δομές συμμετέχουν και ορισμένες πρωτεΐνες, όπως ακτίνη και μυοσίνη, των οποίων η ενεργοποίηση ρυθμίζεται από ένα σύμπλεγμα τύπου τροπονίνης - τροπομυοσίνης, αντίστοιχο των λείων μυικών ινών (8).

### **Γ. Ζώνη Οργανυλλίων**

Στο εσωτερικότερο μέρος των αιμοπεταλίων υπάρχουν: Κοκκία, πυκνωτικά σωμάτια, μιτοχόνδρια, αδρό σωληναριακό σύστημα και σχηματισμοί Golgi. Η κατά Schulz ταξινόμηση είναι: άλφα, βήτα, γάμμα, δέλτα, έψιλον κοκκία.

#### **1. Αλφα Κοκκία**

Έχουν σχήμα ωσειδές και διάμετρο 0.2 - 0.3 μ. Η μεμβράνη τους αποτελείται από 3 στοιβάδες. Περιέχουν μικροσωληνίσκους, φωσφολιπίδια, θειούχους βλενοπολυσακχαρίτες, κατιονικές πρωτεΐνες, υδρολυτικά ένζυμα, όξινη φωσφατάση, θρομβοσθενίνη, ινωδογόνο, 5-υδροξυτρυπαμίνη (5-HT), τριφωσφορική αδενοσίνη (ATP), διφωσφορική αδενοσίνη (ADP) και ATPάση. Ο αριθμός άλφα κοκκίων κυμαίνεται από 20-200/αιμοπετάλιο.

#### **2. Πυκνωτικά Σωμάτια**

Αποταμιεύουν σεροτονίνη, ADP, ATP, κατεχολαμίνες και αιμοπεταλιακό παράγοντα 4 (PF-4). Ο αριθμός τους μεταβάλλεται ανάλογα με την ποσότητα σεροτονίνης που περιέχουν.

#### **3. Μιτοχόνδρια (Βήτα κοκκία)**

Παρατηρούνται σε λεπτές τομές στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο. Παράγουν ενέργεια με μορφή ATP, όπως σε όλα τα κύτταρα. Παρατηρούνται 2-3/αιμοπετάλιο.

#### **4. Σύστημα Σωλήνων και Φυσαλίδων**

Αποτελείται από κενοτόπια που συνδέονται μεταξύ τους. Διαιρείται σε δύο μέρη. Το πρώτο μέρος συνδέεται με την επιφάνεια της πλασματικής μεμβράνης και ονομάστηκε σύστημα σύνδεσης με την επιφάνεια. Το δεύτερο μέρος ονομάζεται πυκνό σωληναριακό δίκτυο, γιατί οι μεμβρανώδεις μικροσωληνίσκοι του αποτελούνται από ένα υλικό μέτριας ηλεκτρονικής πυκνότητας (5). Το σύστημα αυτό προέρχεται από τις συσκευές Golgi του μεγαλοκυττάρου, από το οποίο παρήχθη το αιμοπετάλιο.

#### **5. Σιδηροσώματα**

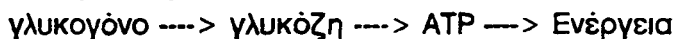
Είναι φυσαλιδωτοί σχηματισμοί με διαυγές περιεχόμενο. Απαντώνται σπάνια στα



αιμοπετάλια και η λειτουργία τους δεν είναι σαφής.

### 6. Κοκκία Γλυκογόνου

Βρίσκονται στο κυτταρόπλασμα του αιμοπεταλίου σε ομάδες ή και σε συσσωματώματα. Ο ρόλος τους είναι σημαντικός στις αντιδράσεις ενεργοποίησης, έκλυσης και συσώρευσης των αιμοπεταλίων, γιατί ακολουθείται η διαδικασία:



### 7. Ριβοσώματα

Συνήθως δεν υπάρχουν στα αιμοπετάλια. Μερικές φορές όμως, ιδίως σε νεαρά αιμοπετάλια, παρατηρούνται μεμονωμένα ριβοσώματα ή θραύσματά τους.

### 8. Κυτταρική μεμβράνη

Αποτελείται από λιποπρωτείνες με ιδιαιτερότητες, που ανταποκρίνονται στο λειτουργικό ρόλο των αιμοπεταλίων (πρότυπο Singler - Nicholson).

## 3. Συστατικά των Αιμοπεταλίων

### Λιπίδια

Το 70% των λιπιδίων των αιμοπεταλίων αποτελείται από φωσφολιπίδια, ενώ το υπόλοιπο 30% από ουδέτερα λίπη (ελεύθερη χοληστερόλη και γλυκολιπίδια).

Στη μεμβράνη υπάρχουν 5 βασικά φωσφολιπίδια:

φωσφατιδυλχολίνη	37%
φωσφατιδυλαιθανολαμίνη	27%
σφιγγομυελίνη	17%
φωσφατιδυλσερίνη	10%
φωσφατιδυλινοσιτόλη	5%

Είναι γνωστό ότι μία μικρή υδρόλυση των φωσφολιπιδίων της χολίνης στην επιφάνεια των αιμοπεταλίων από την φωσφολιπάση  $A_2$  είναι αρκετή για την πυροδότηση της αντίδρασης έκλυσης. Είναι επίσης γνωστό ότι ορισμένα γλυκολιπίδια φαίνεται ότι χρησιμεύουν σαν υποδοχείς για την πυροδότηση της αιμοστατικής λειτουργίας των αιμοπεταλίων, ενώ τα φωσφοινοσιπίδια συμμετέχουν στη μεταβολή του σχήματος και στη λειτουργία συσώρευσης (13,14).

### Σεροτονίνη

Η ουσία αυτή υπάρχει στα αιμοπετάλια σε σχετικά ψηλές ποσότητες. Συγκεντρώνεται στα πυκνωτικά και στα Α κοκκία. Σχηματίζει σύμπλοκα με τα



νουκλεοτίδια της αδενίνης και με ιόντα, όπως το ασβέστιο.

Η σεροτονίνη συγκεντρώνεται στα αιμοπετάλια με ενεργό μεταφορά, που συνδέεται με τη διακίνηση του  $\text{Na}^+$ . Μπορεί να διαχέεται από τα αιμοπετάλια προς το περιβάλλον και να ανταλλάσσεται με την σεροτονίνη του περιβάλλοντος. Όταν τα αιμοπετάλια ενεργοποιηθούν, οι αμίνες των κοκκίων καθώς και η σεροτονίνη αποδεσμεύονται στο περιβάλλον και μεγεθύνουν την ενεργοποίηση κατά διάφορους τρόπους:

1. Μία ποσότητα σεροτονίνης δεσμεύεται από τους υποδοχείς πρόσληψης των μεμβρανών και δεσμεύεται ξανά από το αιμοπετάλιο.

2. Η ενεργοποίηση βοηθείται από τη σεροτονίνη μέσω ενός  $5\text{HT}_2$  υποδοχέα της μεμβράνης των αιμοπεταλίων. Ο τύπος αυτός υποδοχέα  $5\text{HT}_2$  είναι διαφορετικός από τον υποδοχέα πρόσληψης σεροτονίνης ( $62$ ). Εκλεκτικός αναστολέας της  $5\text{-HT}$  είναι η ουσία κετανσερίνη.

3. Αυξάνει τη δράση του κολλαγόνου της επινεφρίνης - νορεπινεφρίνης, ADP, καθώς και άλλων ουσιών. Η δράση εξαρτάται από τις ποσότητες και το χρόνο.

### **Πρωτείνες των Αιμοπεταλίων**

Στα αιμοπετάλια απαντώνται δύο κατηγορίες πρωτεϊνών που παίρνουν μέρος στις βασικές λειτουργίες τους. Είναι οι δομικές και οι συσταλτές πρωτείνες και οι πρωτείνες που αποδεσμεύονται από τα αιμοπετάλια κατά την αντίδραση έκλυσης.

Οι δομικές και οι συσταλτές πρωτείνες είναι:

1. Ακτίνη
2. Μυοσίνη
3. Πρωτεΐνη σύνδεσης με την ακτίνη (ABP).

Οι πρωτείνες που αποδεσμεύονται κατά την αντίδραση έκλυσης είναι:

1. Ινωδογόνο
2. Θρομβοσπονδίνη
3. Ινονεκτίνη
4. Ο παράγοντας Von Willebrandt
5. Πρωτεΐνη πλούσια σε ιστιδίνη

### **Ασβέστιο - Νάτριο: pH**

Ο ρόλος του ασβεστίου στα αιμοπετάλια είναι σημαντικός. Έχει δείχθει ότι, όταν το υγρό που χρησιμοποιείται ως μέσον διασποράς των αιμοπεταλίων έχει χαμηλότερες ποσότητες ασβεστίου από τις φυσιολογικές, τότε τα αιμοπετάλια δεν παρουσιάζουν αντίδραση συσώρευσης, αν και διατηρούν την ικανότητα να μεταβάλλουν το σχήμα τους.



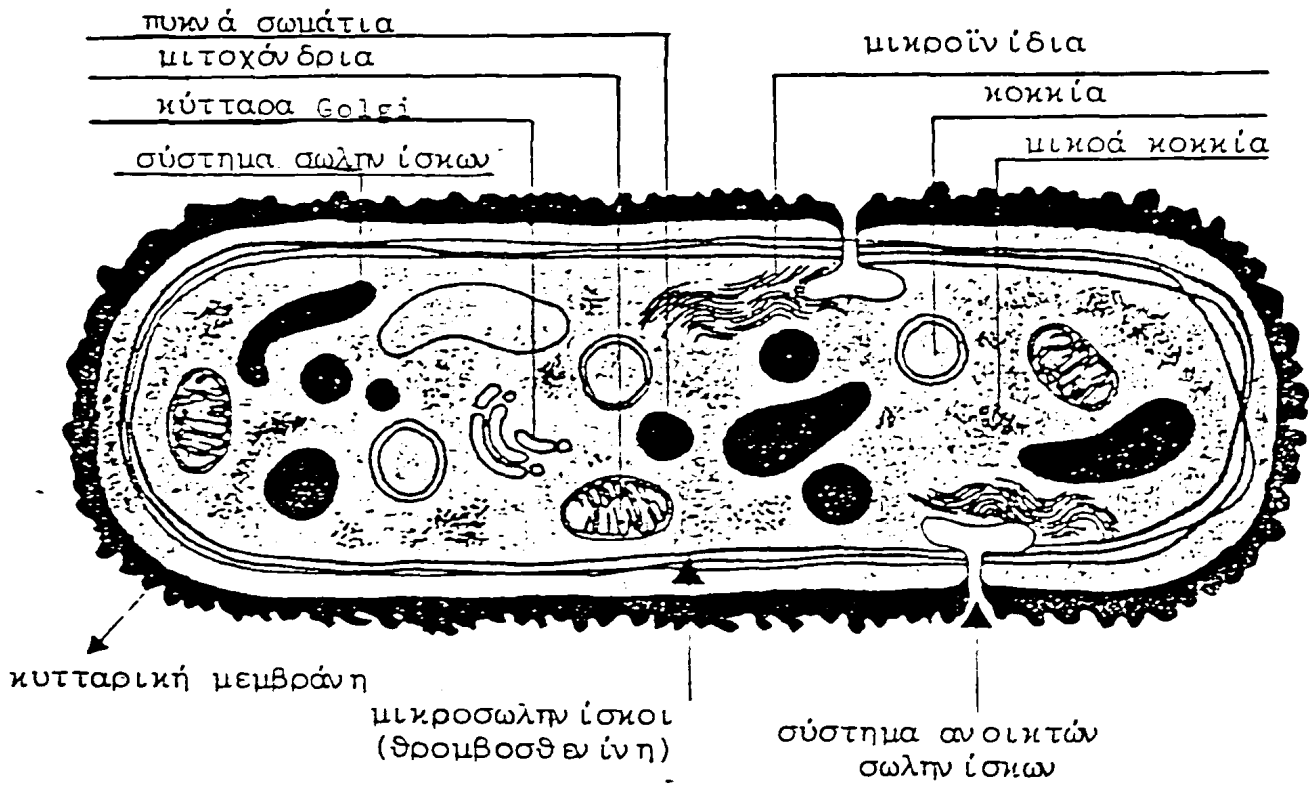
Στο επίπεδο της μεμβράνης του αιμοπεταλίου το  $\text{Ca}^{2+}$  συμμετέχει στη διατήρηση της δομής του γλυκοπρωτεϊνικού συμπλέγματος IIb/IIIa. Το σύμπλεγμα αυτό είναι απαραίτητο για την αλληλεπίδραση με το ινωδογόνο και την ενσωμάτωση του ινωδογόνου στο "ενεργοποιημένο" γλυκοπρωτεϊνικό σύμπλεγμα IIb/IIIa, με αποτέλεσμα τα γειτονικά αιμοπετάλια να συγκρατούνται μεταξύ τους κατά τη διάρκεια της συσώρευσης.

Στο εσωτερικό των αιμοπεταλίων το ασβέστιο συμμετέχει σε πολλές βιοχημικές αντιδράσεις, που ενισχύουν τα φαινόμενα που σχετίζονται με τη συσώρευση, την αντίδραση έκλυσης και τη συστολή του λευκού και του πλήρους αιματικού θρόμβου. Η σύσπαση των συστατών πρωτεϊνών του σκελετού των αιμοπεταλίων απαιτεί ασβέστιο (9). Το ασβέστιο στα αιμοπετάλια βρίσκεται μαζί με τα αδενικά νουκλεοτίδια, τη σεροτονίνη και τα πυροφωσφορικά στα πυκνωτικά κοκκία. Έχει επίσης εντοπιστεί στο εσωτερικό του πυκνού σωληναρικού δικτύου (10).

Σημαντική θέση στην αλλαγή του σχήματος των αιμοπεταλίων έχουν οι μεταβολές του ενδοκυττάριου νατρίου και του pH. Με την επίδραση ερεθίσματος στη μεμβράνη του αιμοπεταλίου μεταβάλλεται το ηλεκτρικό της δυναμικό, με αποτέλεσμα να μεταβάλλονται το ενδοκυτταρικό pH και τα ιόντα  $\text{Na}^{1+}$  και  $\text{Ca}^{2+}$ . Τα αιμοπετάλια διατηρούν ψηλότερες τις συγκεντρώσεις νατρίου από τις αντίστοιχες του πλάσματος. Όταν διεγείρονται, απουσία ιόντων νατρίου, παρουσιάζουν μειωμένη συσώρευση. Η θρομβίνη και το ADP αυξάνουν κατά τρεις φορές την περιεκτικότητα σε νάτριο και κατά 0.3 μονάδες την τιμή του ενδοκυττάριου pH. Η αύξηση των ιόντων του νατρίου στο εσωτερικό των αιμοπεταλίων δε συνοδεύεται με αύξηση των ιόντων χλωρίου  $\text{Cl}^-$ . Αυτό δείχνει ότι υπάρχει ένας εκλεκτικός μηχανισμός μεταφοράς νατρίου και όχι χλωριούχου νατρίου (11, 12).







Σχηματική παρουσίαση της δομής του αιμοπεταλίου  
 (Από: B. Angelkort: *Essentialia*, 2(2):3, 1981)



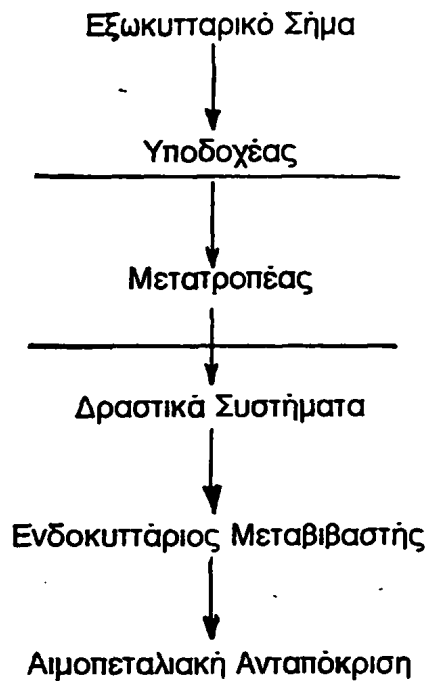
## Ο ΡΟΛΟΣ ΤΩΝ ΑΙΜΟΠΕΤΑΛΙΩΝ ΣΤΗΝ ΑΙΜΟΣΤΑΣΗ

Οι αιμοστατικές αντιδράσεις που συντελούνται για την προστασία του οργανισμού από την απώλεια αίματος, μπορεί σχηματικά να ταξινομηθούν σε πέντε διαφορετικά αλλά επικαλυπτόμενα φαινόμενα: την τοπική αγγειοσύσπασση, την αιμοπεταλιακή πρόσφυση, τον αιμοπεταλιακό θρόμβο, την ενίσχυση του αιμοπεταλιακού θρόμβου με ινική και τελικά την απομάκρυνση των εναποτεθέντων υλικών μέσω ινωδωλυτικών και άλλων μηχανισμών. Κάθε ένα από τα φαινόμενα αυτά εμπεριέχει μία πολύπλοκη σειρά αλληλεπιδράσεων, μεταξύ του αίματος και των αγγειακών τοιχωμάτων, στην οποία τα αιμοπετάλια παίζουν πρωτεύοντα ρόλο (15).

Τα αιμοπετάλια εμφανίζουν *in vivo* τις εξής διαδικασίες με τις οποίες μετέχουν στην αιμόσταση: Πρόσφυση, μεταβολές σχήματος, συσσώρευση και έκλυση. Αν και τα ερεθίσματα και η ανταπόκριση των αιμοπεταλίων είναι ποικίλα, εν τούτοις η ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων ρυθμίζεται από ένα ορισμένο αριθμό μηχανισμών. Κοινή διαδικασία όλων των φυσιολογικών ερεθισμάτων των αιμοπεταλίων είναι η πρόσδεσή τους σε ειδικούς υποδοχείς της επιφάνειας της μεμβράνης. Το σήμα το οποίο "εκπέμπεται" από τους ενεργοποιημένους υποδοχείς μεταβιβάζεται μετά στην πλασματική μεμβράνη μέσω ειδικών πρωτεϊνών, που δεσμεύουν το GTP. Αυτοί οι διαβιβαστικοί μετατρεπτικοί μηχανισμοί διεγείρουν και ρυθμίζουν ειδικά δραστικά συστήματα, όπως η φωσφολιπάση-C, η οποία υδρολύει τα φωσφολιπιδίδια και τα κανάλια  $Ca^{2+}$ . Τα δραστικά αυτά συστήματα τροποποιούν τα επίπεδα ειδικών ενδοκυττάρων μεσολαβητών, όπως την τριφωσφορική 1,4,5-ινοσιτόλη, το  $Ca^{2+}$  και την διακυγλυκερόλη, οι οποίοι στη συνέχεια πυροδοτούν τη φυσιολογική ανταπόκριση του κυττάρου με μεταβολές της φωσφορυλίωσης, μεταβολές της δραστηριότητας των κυτταρικών ενζύμων και των δομικών ιδιοτήτων των πρωτεϊνών. Είναι προφανές ότι τα μοριακά αυτά φαινόμενα, που πυροδοτούνται από την ενεργοποίηση των υποδοχέων, πραγματώνονται με υψηλές ταχύτητες και εμφανίζουν πολλαπλές αλληλεπιδράσεις. Ενίσχυση π.χ. ή αναστολή του σήματος που εκπέμπεται από την ενεργοποίηση του υποδοχέα μπορεί να συμβεί σε κάθε φάση της διαδικασίας αυτής. Επιπλέον το αιμοπετάλιο διαθέτει δύο μεγάλα αναδραστικά κυκλώματα (παλίνδρομης ρύθμισης): το σχηματισμό ενδοπεροξειδίων, θρομβοξάνης  $A_2$  και την έκλυση ADP. Οι ουσίες αυτές απελευθερούμενες από τα αιμοπετάλια δρουν σαν τοπικές ορμόνες, καθώς προσδένονται στους ειδικούς μεμβρανικούς υποδοχείς και πυροδοτούν μία παρόμοια αλυσίδα μοριακών φαινομένων, όπως και οι υπόλοιποι φυσιολογικοί διεγέρτες (αγωνιστές).

Σχηματικά η μετατροπή εξωκυτταρικών "σημάτων" σε κυτταρική ανταπόκριση (ενεργοποίηση) μπορεί να δοθεί όπως παρακάτω:





### α. Τοπική Αγγειοσύσπαση

Η αρχική σύσπαση των αγγείων σε περίπτωση τοπικής βλάβης οφείλεται στη διέγερση των νευρικών απολήξεων του συμπαθητικού των λείων μυϊκών ινών των αγγείων με αντανακλαστικό μηχανισμό. Η αγγειοσύσπαση επιτείνεται με την επακολουθούσα ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων και την έκλυση από αυτά σεροτονίνης, αλλά και θρομβοξάνης  $A_2$ , που είναι και ισχυρή αγγειοσυσπαστική ουσία. Το αγγειακό ενδοθήλιο μπορεί να μεταβολίσει τα παραγόμενα από την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων κυκλικά ενδοπεροξειδία σε προστακυκλίνη (προσταγλανδίνη  $I_2$  -  $PGI_2$ ). Η προστακυκλίνη είναι ισχυρός αναστολέας της αιμοπεταλιακής συσσώρευσης, αλλά και ισχυρή αγγειοδιασταλτική ουσία. Έτσι στην αντίδραση μεταξύ αίματος - αγγείων στην αιμοστατική διαδικασία εμπλέκονται νευρικοί και χημικοί μηχανισμοί που καθορίζουν τη συμπεριφορά του αγγείου (16,17).

### β. Αιμοπεταλιακή Πρόσφυση

Η αιμοπεταλιακή πρόσφυση είναι το πρώτο βήμα του σχηματισμού του αιμοπεταλιακού θρόμβου. Για να γίνει πρόσφυση των αιμοπεταλίων, απαιτείται



αποκάλυψη των υπενδοθηλιακών στοιβάδων των αγγείων, που συμβαίνει λόγω τραυματισμού ή αγγειακής βλάβης. Στους υπενδοθηλιακούς αυτούς σχηματισμούς γίνεται η πρόσφυση των αιμοπεταλίων με τη βοήθεια άλλων παραγόντων, όπως ο παράγοντας Von Willebrand (VWF), ο οποίος, εκτός από το πλάσμα, απαντάται τόσο στα αιμοπετάλια, όσο και στα ενδοθηλιακά κύτταρα. Εκτός από τον VWF, ένα άλλο σημαντικό στοιχείο της αιμοπεταλιακής πρόσφυσης είναι τα ερυθρά αιμοσφαίρια. Πιστεύεται ότι τα ερυθρά συμβάλλουν στην αιμοπεταλιακή πρόσφυση με δύο τρόπους: Ο ένας είναι μηχανικός και οφείλεται στην άπωση των αιμοπεταλίων από τα βαρύτερα κύτταρα στην περιφέρεια των αγγείων κατά τη ροή του αίματος και την πίεσή τους πάνω στα αγγειακά τοιχώματα (15,17,18,19).

Ο δεύτερος αφορά την έκλυση ADP από τα καταστρεφόμενα ερυθρά στην περιοχή της αγγειακής βλάβης, το οποίο διεγείρει την αιμοπεταλιακή πρόσφυση (20). Και στο φαινόμενο της αιμοπεταλιακής πρόσφυσης οι αλληλεπιδράσεις αγγειακών τοιχωμάτων και στοιχείων του αίματος είναι βασικής σημασίας.

#### γ. Σχηματισμός Αιμοπεταλιακού Θρόμβου

Όταν τα αιμοπετάλια προσφύονται στα αγγειακά τοιχώματα ή ενεργοποιούνται από συσσωρευτικούς παράγοντες, πολύ γρήγορα μεταβάλλουν το δισκοειδές (φακοειδές) σχήμα τους και διασπείρονται στην αγγειακή επιφάνεια. Σε πολύ σύντομο χρόνο νέα αιμοπετάλια προσκολλώνται στα άλλα αιμοπετάλια που έχουν προσκολληθεί στο αγγειακό τοίχωμα και σχηματίζεται ο αιμοπεταλιακός θρόμβος (21).

Η διαδικασία της διασποράς των αιμοπεταλίων και ο σχηματισμός επιμήκων ψευδοποδίων αποδίδεται στην ενεργοποίηση μίας συσταλτικής διαδικασίας. Η διαδικασία της προσκόλλησης κυκλοφορούντων αιμοπεταλίων σ' αυτά που έχουν ήδη προσφυθεί στο αγγειακό τοίχωμα αποδίδεται σε ουσίες "διαβιβαστές", όπως η θρομβοξάνη  $A_2$  και το ADP, που περιέχονται στα κοκκία των αιμοπεταλίων (21,22). Τρία είναι τα βασικά φαινόμενα της φάσης σχηματισμού του αιμοπεταλιακού θρόμβου:

1. Η αιμοπεταλιακή συστολή και χάλαση
2. Η σύνθεση θρομβοξάνης και
3. Η έκλυση του περιεχομένου των αιμοπεταλιακών κοκκίων.

#### 1. Αιμοπεταλιακή Σύσπαση και Χάλαση

Οι περισσότεροι φυσιολογικά απαντώμενοι αγωνιστές της αιμοπεταλιακής συσώρευσης, όπως το κολλαγόνο, η θρομβίνη, το ADP κ.α., προκαλούν μία αντίδραση συστολής των αιμοπεταλίων. Αυτή αποδίδεται στην απελευθέρωση ιόντων



$\text{Ca}^{2+}$  από τις αποθηκευτικές δεξαμενές του αιμοπεταλίου και στην ενεργοποίηση του  $\text{Ca}^{2+}$ , της  $\text{Ca}^{2+}$  εξαρτώμενης ΑΤΡάσης της αιμοπεταλιακής ακτομοσίνης και θρομβοσθενίνης. Παρόμοιο αποτέλεσμα μπορεί να προκαλέσουν και άλλες ουσίες που προάγουν την είσοδο εξωκυττάριου ασβεστίου στο αιμοπετάλιο, όπως π.χ. τα ιονοφόρα  $\text{Ca}^{2+}$ . Η σύσπαση οδηγεί στη μεταβολή του σχήματος της μεμβράνης και την αλλαγή των φυσικοχημικών χαρακτηριστικών της. Αποτέλεσμα αυτής της μεταβολής είναι η "κολλώδης" σύσταση της μεμβράνης, που ευνοεί τη συγκόλληση και η αποκάλυψη των μεμβρανικών υποδοχέων για άλλους φυσιολογικά απαντώμενους διεγέρτες της αιμοπεταλιακής συσσώρευσης, που εδράζονται στις μεμβρανικές γλυκοπρωτείνες, όπως του Vwf, του κολλαγόνου, της θρομβίνης, του ADP, του ινωδογόνου κ.α. (15,21).

Μία μεμβρανική γλυκοπρωτείνη θεωρείται επίσης απαραίτητη για την αιμοπεταλιακή συσσώρευση, η απουσία της οποίας σε θρομβασθενικά άτομα εξηγεί τις διαταραχές της αιμοπεταλιακής συγκόλλησης στη νόσο.

Η μεταβολή της μεμβράνης των ενεργοποιημένων αιμοπεταλίων οδηγεί στην εμφάνιση ιδιοτήτων που προάγουν την πήξη και αναφέρονται σαν αιμοπεταλιακός παράγοντας - 3 ( $\text{PF}_3$ ). Ο  $\text{PF}_3$  αντιστοιχεί στις μεμβρανικές μεταβολές που προάγουν την προσρόφηση από το αιμοπετάλιο παραγόντων πήξης και ευνοούν τις αλληλεπιδράσεις τους, κυρίως του παράγοντα  $\text{X}_a$ , V, και της προθρομβίνης. Με τη δράση του  $\text{PF}_3$  εκτίθενται στη μεμβρανική επιφάνεια νέα φωσφολιπίδια, τα οποία μέχρι τότε παρέμεναν "κρυμμένα". Τη δράση αυτή μπορεί να την εμφανίσει και η θρομβίνη (15). Εκτός από την σύσπαση τα αιμοπετάλια μπορούν επίσης και χαλάνται. Η χάλαση αποδίδεται στην επαναποθήκευση του ενδοκυττάριου  $\text{Ca}^{2+}$ . Η επαναποθήκευση αποδίδεται στη φωσφορυλίωση μέσω της C-AMP εξαρτώμενης φωσφορικής κινάσης, μίας φωσφοπρωτείνης (16), η οποία δεσμεύει το  $\text{Ca}^{2+}$ . Για το λόγο αυτό η αύξηση του κυκλικού -AMP στο κύτταρο ενισχύει τη φωσφορυλίωση της πρωτεΐνης αυτής και οδηγεί μέσω της δέσμευσης του κυτταροπλασματικού  $\text{Ca}^{2+}$  στην αιμοπεταλιακή χάλαση και αποσυσσώρευση. Στην ενεργοποίηση της αδενυλικυκλάσης και την ενδοαιμοπεταλιακή αύξηση του C-AMP αποδίδεται κατά μεγάλο μέρος η αντισυσσωρευτική δράση της προστακυκλίνης ( $\text{PGI}_2$ ) στα αιμοπετάλια (23). Όπως προαναφέρθηκε, τα υγιή αγγειακά ενδοθήλια μετατρέπουν τα κυκλικά ενδουπεροξειδία που παράγονται από τα ενεργοποιημένα αιμοπετάλια σε  $\text{PGI}_2$  και έτσι ελέγχεται κατά σημαντικό μέρος η έκταση του αιμοπεταλιακού θρόμβου (15,23).

## 2. Σύνθεση της Θρομβοξάνης - $A_2$ ( $\text{TXA}_2$ )

Η σύνθεση της θρομβοξάνης  $A_2$  είναι μία σύνθετη βιοχημική διαδικασία, που επιτελείται στα αιμοπετάλια συντελείται μέσω του αραχιδονικού οξέος και θα



αναπτυχθεί στους μηχανισμούς συσσώρευσης των αιμοπεταλίων. Η  $TxA_2$  είναι ένας ισχυρός συσσωρευτικός παράγοντας των αιμοπεταλίων, ο οποίος πιθανότατα ασκεί τη δράση του προάγοντας την έκλυση του περιεχομένου των αιμοπεταλιακών κοκκίων (24).

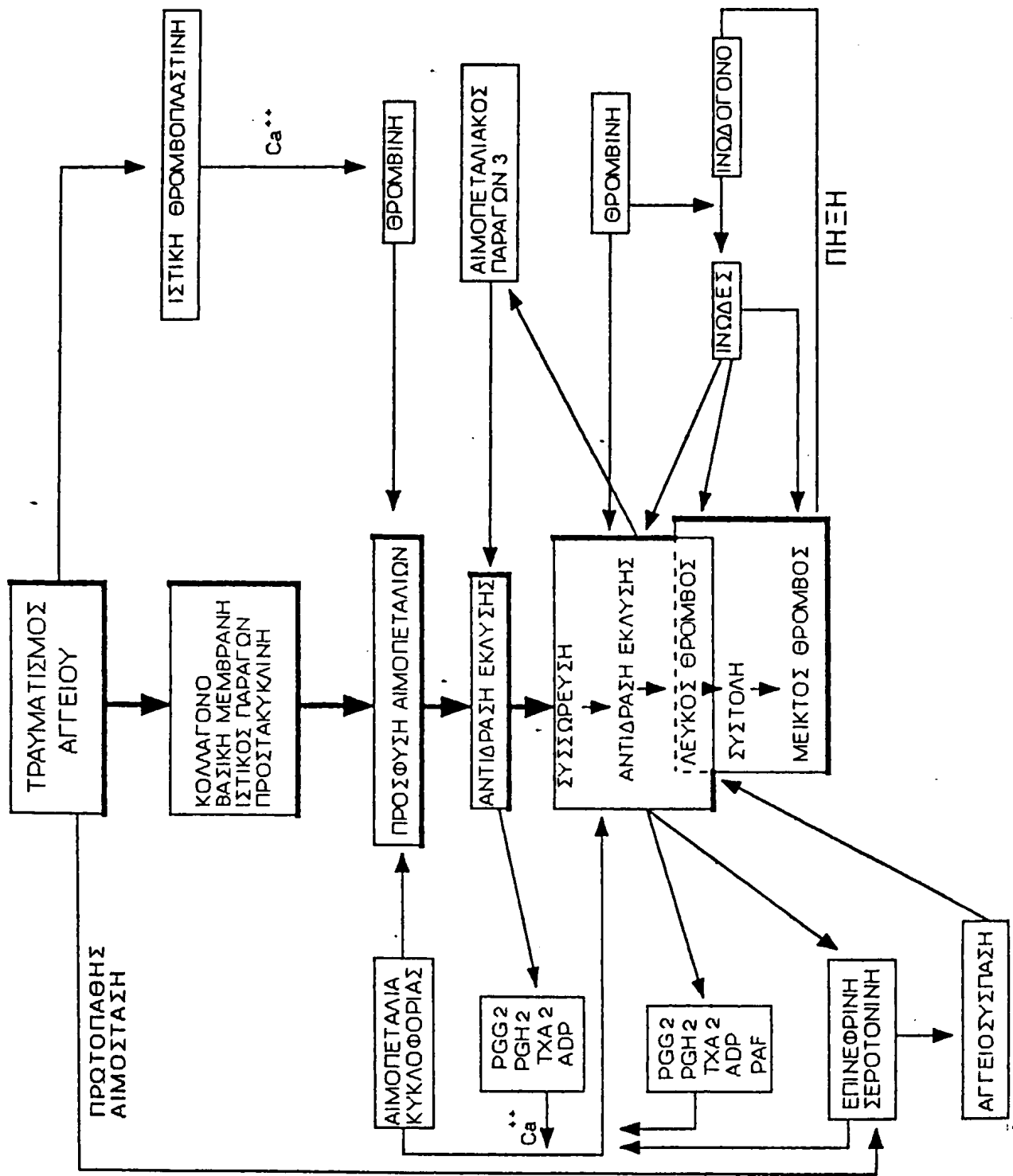
### 3. Έκλυση του Περιεχομένου των Αιμοπεταλιακών Κοκκίων

Η έκλυση του περιεχομένου των αιμοπεταλιακών κοκκίων μπορεί να προκληθεί τόσο μέσω της δράσης της  $TxA_2$ , όσο και ανεξάρτητα, όπως έχει αποδειχθεί ότι συμβαίνει με τη δράση της θρομβίνης σε ασπιρινισμένα αιμοπετάλια. Τα αιμοπεταλιακά κοκκία με τη σειρά τους απελευθερώνουν παράγοντες, οι οποίοι προκαλούν ή ενισχύουν τη συσσώρευση, μεταξύ των οποίων, όπως προαναφέρθηκε, οι σημαντικότεροι είναι: Η ADP, η σεροτονίνη, ο αιμοπεταλιακός παράγων 4 ( $PF_4$ ), η β-θρομβοσφαιρίνη, ο μιτογόνος παράγων και λυσοσωματικά ένζυμα (22). Με την αντίδραση έκλυσης ολοκληρώνεται η ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων με την απελευθέρωση των παραπάνω ουσιών στον περιαιμοπεταλιακό χώρο και την πραγματοποίηση των παρακάτω παράλληλων φαινομένων (15).

- Κεντρική διάταξη σωματιδίων με αναδιάταξη του κυτταρικού σκελετού.
- Πολυμερισμός της ακτίνης σε ακτίνη F και σχηματισμός περιφερικών μικροϊδίων.
- Πολυμερισμός μυοσίνης και σύνδεσή της με τα ινίδια της ακτίνης, που σχηματίζουν κύκλο γύρω από τα σωματίδια.
- Σύνδεση της ABP με πολυμερισμένα μυοϊνίδια ακτίνης και με ακτίνη A της μεμβράνης, η οποία είναι ήδη συνδεδεμένη με το σύμπλεγμα γλυκοπρωτεϊνών της μεμβράνης (GIIb - GIIIa), όπου εδράζονται και οι περισσότεροι υποδοχείς αγωνιστών (διεγερτών) της συσσώρευσης.
- Συστολή ακτίνης-μυοσίνης.
- Εκκρίση των ενδοαιμοπεταλιακών ουσιών (25).

Με την έκλυση, εκτός από τη μεγιστοποίηση της συσσώρευσης, ολοκληρώνεται η αιμοστατική διαδικασία με το σχηματισμό της θρομβίνης ( $PF_3$ , FV, FVIII, FI), η οποία θα υδρολύσει το ινωδογόνο και θα σχηματισθεί ο θρόμβος. (Εικόνα 1).





ΕΙΚΟΝΑ 1: Σχηματική παράσταση του ρόλου των Αιμοπεταλίων στην ΑΙΜΟΣΤΑΣΗ  
 (Από: B. Anselkort: Essential la. 2(2): 3. 1981)



## ΣΥΣΣΩΡΕΥΣΗ ΤΩΝ ΑΙΜΟΠΕΤΑΛΙΩΝ

Η συσσώρευση των αιμοπεταλίων *in vitro* θεωρείται ότι επιτυγχάνεται με την ενεργοποίηση τριών διαφορετικών ανεξάρτητων μεταβολικών οδών, που μέσω της καθεμιάς μπορεί να συσσωρευθούν τα αιμοπετάλια, ακόμη και αν με διάφορες ουσίες αποκλείσουμε την ενεργοποίηση των δύο άλλων οδών. Όταν η διαδικασία συσσώρευσης συντελείται *in vivo* χωρίς τη συμμετοχή εξωγενών αναστολέων, τότε στην αιμοπεταλιακή συσσώρευση εμπλέκονται και συμμετέχουν διαδοχικά ή ταυτόχρονα και οι τρεις αυτές μεταβολικές διαδικασίες. Οι "οδοί" αυτοί ή "δρόμοι" ονομάζονται συνήθως δρόμος του ADP, του Αραχιδονικού (ή κυκλοξυγονάσης) και του PAF (ή λιποξυγονάσης), γιατί κλασικά ενεργοποιούνται απ' αυτούς τους τρεις παράγοντες (αγωνιστές) (26,27,44,50).

Τόσο *in vitro*, όσο και *in vivo* η ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων με οποιονδήποτε αγωνιστή οδηγεί σε μία αρχική περιορισμένη απάντηση, που ονομάζεται αναστρέψιμη συσσώρευση, ενώ η μέγιστη απάντηση οδηγεί στη μη αναστρέψιμη συσσώρευση. Στη μη αναστρέψιμη συσσώρευση συμμετέχει και η αντίδραση έκλυσης, κατά την οποία η απελευθέρωση των ενδοαιμοπεταλιακών παραγόντων ολοκληρώνει τη συσσώρευση και επεκτείνει την ενεργοποίηση *in vivo* σε νέα αιμοπετάλια, που προσέρχονται στο σημείο της βλάβης με την κυκλοφορία (26).

Ανεξάρτητα από τη διέγερση που πυροδοτεί την αναστρέψιμη συσσώρευση, αυτή μπορεί να οδηγηθεί με αύξηση της δόσης του αγωνιστή σε μη αναστρέψιμη με τρεις κυρίως τρόπους:

- Με την απελευθέρωση ενδοαιμοπεταλιακού ADP
- Με την παραγωγή θρομβοξάνης  $A_2$  και
- Με την απελευθέρωση ενδοαιμοπεταλιακού PAF (29,31,60)

Οι τρεις προαναφερθέντες δρόμοι μπορεί σε πειραματικά *in vitro* μοντέλα συγκόλλησης να αποκλειστούν:

- Ο δρόμος του ADP με επώαση των αιμοπεταλίων με CP/CPK, που υδρολύει την διφωσφορική αδενοσίνη (27).
- Ο δρόμος του Αραχιδονικού οξέος με ασπιρίνη, που αναστέλλει, δεσμεύοντας μη αντιστρεπτά, την κυκλοξυγονάση (28,29) και
- Ο δρόμος του PAF με αναστολείς των υποδοχέων του ή με αναστολείς της λιποξυγονάσης (BW755 C) (30).

Έχει ακόμη δειχθεί ότι η αναστολή των δρόμων ανά δύο δεν εμποδίζει τη συσσώρευση με αγωνιστές που ενεργοποιούν τον τρίτο δρόμο που παραμένει ελεύθερος.





### Ο Ρόλος του $\text{Ca}^{2+}$ στη Συσσώρευση των Αιμοπεταλίων

Η συσώρευση των αιμοπεταλίων από όλες τις γνωστές οδούς προϋποθέτει την ενδοκυττάρια αύξηση των ιόντων  $\text{Ca}^{2+}$ . Για το λόγο αυτό περιγράφεται περιληπτικά ο ρόλος του  $\text{Ca}^{2+}$  στη διαδικασία συσώρευσης.

- Το  $\text{Ca}^{2+}$  διεγείρει την ATPάση  $\text{Ca}^{2+}$ - $\text{Mg}^{2+}$  στο σύστημα πυκνών σωληναρίων του αιμοπεταλίου αυξάνοντας την κινητοποίηση - απελευθέρωση των ενδοαιμοπεταλιακών ιόντων  $\text{Ca}^{2+}$ .
- Ενεργοποιεί τη φωσφολιπάση  $-\text{A}_2$ .
- Ενεργοποιεί την πρωτεϊνική κινάση C, που φωσφορυλιώνει περισσότερα μόρια της πρωτεΐνης P40 KDalton, η οποία αποτελεί το κύριο βήμα της λύσης των μεμβρανών των αιμοπεταλιακών κοκκίων.
- Ενεργοποιεί μαζί με την καλμοδουλίνη την κινάση των ελαφρών αλύσεων της μυοσίνης, που είναι το κύριο βήμα για τη συστολή της ακτινομυοσίνης.
- Συνδέει την γλυκοπρωτεΐνη  $\text{III}_\beta$  (GPIII $\beta$ ) με την GPIIIa σχηματίζοντας το σύμπλεγμα GPIII $\beta$ -IIIa των μεμβρανικών γλυκοπρωτεϊνών, πάνω στις οποίες εδράζεται το μεγαλύτερο μέρος των υποδοχέων των αγωνιστών συσώρευσης (31,32).

### Ο Δρόμος του ADP (Διφωσφορική Αδενοσίνη)

Το ADP προκαλεί συσώρευση αιμοπεταλίων με μηχανισμούς, οι οποίοι δεν είναι πλήρως διευκρινισμένοι. Σε μικρές δόσεις η συσώρευση είναι αντιστρεπτή, ενώ σε μεγαλύτερες είναι διφασική, λόγω της συμμετοχής και της αντίδρασης έκλυσης (27).

Όταν η συσώρευση γίνεται απουσία αντίδρασης έκλυσης, τότε το ADP συνδέεται πιθανώς με τη μορφή αδενοσίνης με ένα ειδικό υποδοχέα της αιμοπεταλιακής μεμβράνης. Το σύμπλεγμα αυτό προκαλεί την αναστολή μιάς ATPάσης, που είναι συνδεδεμένη με μία συσταλή πρωτεΐνη της κυτταρικής μεμβράνης. Ο ρόλος της πρωτεΐνης αυτής συνδέεται άμεσα με τη διατήρηση των αιμοπεταλίων σε κατάσταση μη-συγκόλλησης. Η αναστολή της ATPάσης αυτής επιφέρει την αντιστρεπτή αποσύζευξη της συσταλής πρωτεΐνης, η οποία σε κατάσταση ηρεμίας είναι ενσωματωμένη στο σύμπλεγμα ακτίνης-μυοσίνης. Όταν η πρωτεΐνη αυτή αποσυζεύγνυται, τότε τα συμπλέγματα ακτίνης-μυοσίνης των αιμοπεταλίων συνδέονται μεταξύ τους συσσωρεύοντας τα αιμοπετάλια.

Όταν το ADP χορηγείται εξωγενώς, θεωρείται πιθανόν ότι το παραπάνω φαινόμενο γίνεται μέσω ενός άλλου ενζύμου της κυτταρικής επιφάνειας, της νουκλεοσιδιοδιφωσφορικής κινάσης, το οποίο φωσφορυλιώνοντας το ADP σε ATP



προκαλεί πιθανώς μείωση του C-AMP, το οποίο αυξάνει την ενδοαίμοπεταλιακή απελευθέρωση  $Ca^{2+}$  και μέσω αυτού αποσυνζεύγνυται η προαναφερθείσα συστατική πρωτεΐνη. Αν και η υπόθεση αυτή έχει αμφισβητηθεί, δεν μπορεί εν τούτοις να αποκλεισθεί (32,33,44,46).

Έχει προταθεί ακόμα ότι η αντίδραση αυτή επηρεάζει την ανταλλαγή των φωσφορικών ομάδων της φωσφατιδυλνινοσιτόλης και μεταβάλλει τη μεταφορά ιόντων  $Ca^{2+}$  δια μέσου των μεμβρανών των αιμοπεταλίων. Η διαδικασία αυτή φαίνεται ότι γίνεται μέσω της ενεργοποίησης της φωσφολιπάσης C και πιθανόν μέσω αναστολής της σύνθεσης της 4,5-διφωσφορικής ινοσιτόλης (34,35,36,37) και χωρίς την ενεργοποίηση της οδού του αραχιδονικού και την αντίδραση έκλυσης.

Τέλος έχει προταθεί ότι το ADP "εκτρέπει" το ATP από διάφορα σημεία της κυτταρικής μεμβράνης εκεί όπου αυτό χρησιμοποιείται για τη διατήρηση της συστατικής πρωτεΐνης σε κατάσταση μη συστολής και οδηγεί έτσι στη συσσώρευση (38,39).

Όταν οι δόσεις ή η έκλυση ADP είναι υψηλές, τότε το φαινόμενο συμπληρώνεται με το δεύτερο κύμα, που οφείλεται στην αντίδραση έκλυσης των αιμοπεταλίων και οδηγεί στη μη αντιστρεπτή συσσώρευση (39,43,45,47). (βλέπε Σχ.1).

### Ο Δρόμος του Αραχιδονικού Οξέος.

Για να γίνει κατανοητός ο μηχανισμός της δράσης αγωνιστών της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων μέσω αυτής της οδού, απαιτείται μία παράθεση του ρόλου του αραχιδονικού οξέος στα αιμοπετάλια.

Το αραχιδονικό οξύ, εφόσον δεν προστίθεται εξωγενώς για πειραματικούς λόγους αυξάνεται στα αιμοπετάλια με την ενεργοποίηση μίας ομάδας μεμβρανικών φωσφολιπασών, από τις οποίες οι πιο σημαντικές είναι κυρίως η φωσφολιπάση  $A_2$  ( $PLA_2$ ) και η φωσφολιπάση C (PLC). Αυτό γίνεται με την ενεργοποίηση του συμπλέγματος διεγέρτη (αγωνιστή) - υποδοχέα στην κυτταρική μεμβράνη. Οι φωσφολιπάσες αυτές καταβολίζουν τα μεμβρανικά φωσφολιπίδια οδηγώντας στην απελευθέρωση αραχιδονικού οξέος. Το αραχιδονικό οξύ στη συνέχεια μεταβολίζεται με τη δράση δύο ενζύμων της κυκλοξυγονάσης και της λιποξυγονάσης. Με την κυκλοξυγονάση η μεταβολική οδός οδηγείται στη βιοσύνθεση προσταγλανδινών και θρομβοξανής  $A_2$ , ενώ με τη λιποξυγονάση σε ΗΡΕΤΕ, ΗΕΤΕ και Λευκοτριένια (40,41,42). (Σχ. 2).

Αναλυτικότερα η διαδικασία βιοσύνθεσης των προσταγλανδινών έχει ως ακολούθως:

Από το αραχιδονικό οξύ με τη δράση του ενζύμου κυκλοξυγονάση των λιπαρών

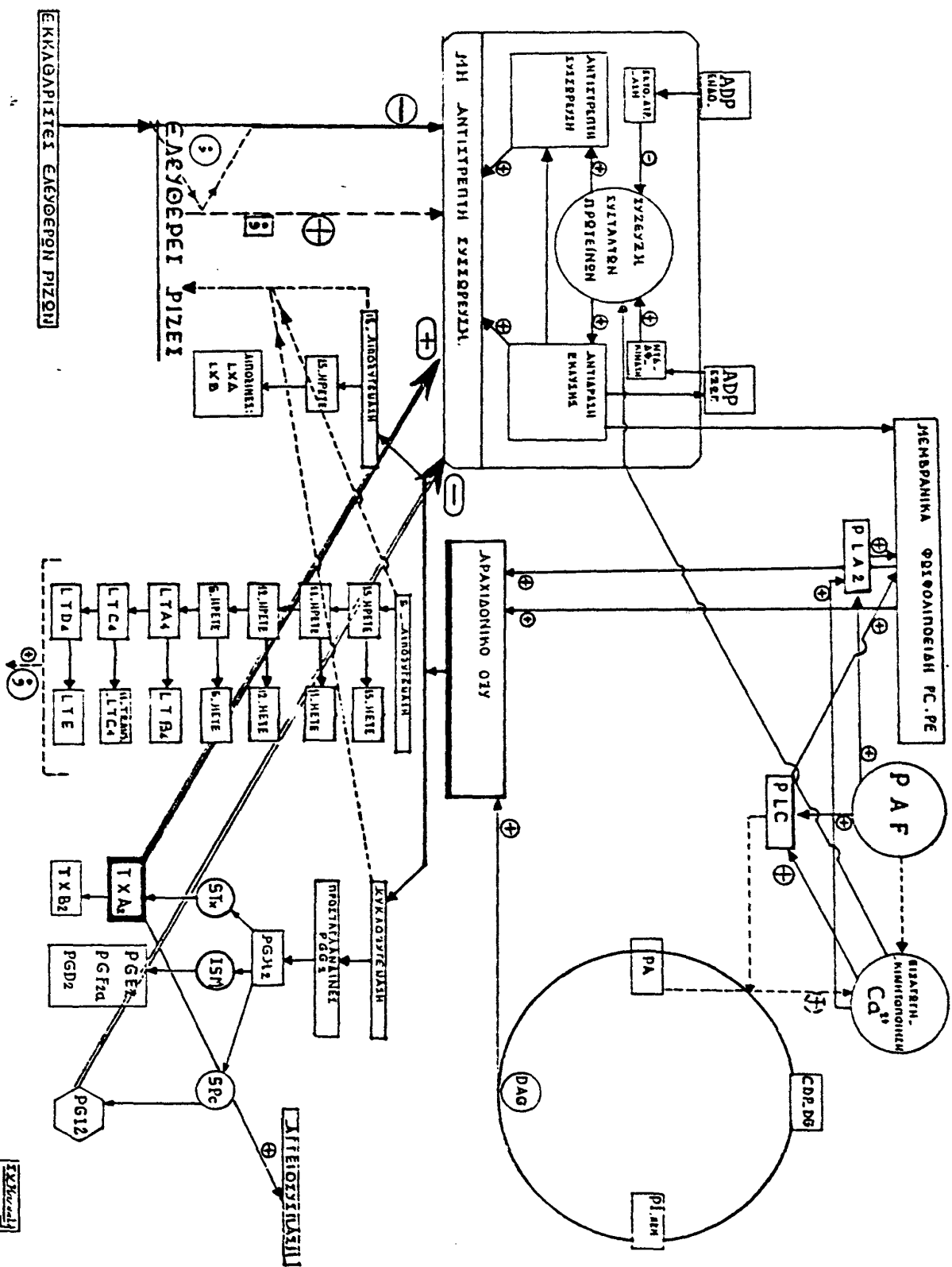


οξέων σχηματίζεται προσταγλανδίνη  $G_2$  ( $PG\ G_2$ ) με ενδοπεροξειδική δομή (κυκλικό ενδοπεροξειδίο). Από εκεί με τη δράση της υπεροξειδάσης σχηματίζεται η προσταγλανδίνη  $H_2$  ( $PGH_2$ ) και με τη δράση ενδοπεροξειδικών ισομερασών, η 15-υδροξυπεροξυ-προσταγλανδίνη  $E_2$ . Και τα δύο ένζυμα, ενδοπεροξειδική ισομεράση και υπεροξειδάση, φαίνεται ότι διεγείρονται από την αναχθείσα γλουταθειόνη και η υπεροξειδάση θεωρείται ταυτόσημη με την υπεροξειδάση της γλουταθειόνης. Με τη βοήθεια των δύο ενζύμων, τα οποία καταλύουν τώρα αντίστροφα τα προϊόντα της  $PGG_2$  και τα δύο προϊόντα μπορεί να μετατραπούν σε προσταγλανδίνη  $E_2$  ( $PGE_2$ ) (42,43,49). (Σχ.3).

Το αραχιδονικό οξύ, όταν επάξεται με αιμοπετάλια, μετατρέπεται σχεδόν αποκλειστικά σε προϊόντα διαφορετικά από τις κλασικές προσταγλανδίνες (βλέπε Σχ.4).

Η σημαντική διαφορά από την κλασική οδό βιοσύνθεσης προσταγλανδινών είναι ότι στα αιμοπετάλια τα κυκλικά ενδοπεροξειδία  $PGG_2$  (και  $PGH_2$ ) μετατρέπονται σχεδόν πλήρως σε μη προστανοϊκές ενώσεις. Με την κυκλοξυγονάση σχηματίζονται τα ενδοπεροξειδία  $PGG_2$ ,  $PGH_2$  και με αφαίρεση της μαλονδιαλδεύδης (MDA), τα ενδοπεροξειδία μετατρέπονται σε θρομβοξάνη  $A_2$  ( $TXA_2$ ), που αρχικά είχε ονομασθεί ΗΗΤ. Η θρομβοξάνη  $A_2$  είναι ένα πολύ ασταθές μεταβολικό προϊόν με βιολογικό χρόνο ημιζωής 32 δευτερόλεπτα, το οποίο στη συνέχεια μετατρέπεται σε 8-(1-υδροξυ-3οξυπροπυλ)-9,12L-διυδροξυ-5,10-επταδεκαδιενοϊκό οξύ, που ονομάζεται θρομβοξάνη  $B_2$ . Με την λιποξυγονάση το αραχιδονικό οξύ οδηγείται, όπως προαναφέρθηκε στο υδροξυεικοσιτετραενοϊκό οξύ (HETE) και στη σύνθεση Λευκοτριενίων (42,43,44,61). (βλέπε Σχ. 5)





ΕΚΚΑΘΑΡΙΣΤΕΣ ΕΛΕΥΘΕΡΩΝ ΡΙΖΩΝ

ΕΛΕΥΘΕΡΗ ΕΞΙΣΡΕΥΣΗ

ΕΛΕΥΘΕΡΗ ΕΞΙΣΡΕΥΣΗ

ΜΕΜΒΡΑΝΙΚΑ ΦΙΛΟΔΟΙΜΕΙΑ PC.PE

PAF

ΚΙΝΗΤΟΠΟΙΗΣΗ Cd

PLC

CD2.D6

PL.AM

ΑΡΧΑΙΟΛΟΓΙΚΟ ΟΥΤ

ΑΠΕΙΘΥΝΑΣΤΗ

ΣΥΝΘΕΤΙΚΑ ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗ ΔΕΥΚΟΤΑΤΑΝ

TXA1

TXB2

PG12

PG11

ST

ISM

SPC

PG12

PGFzd

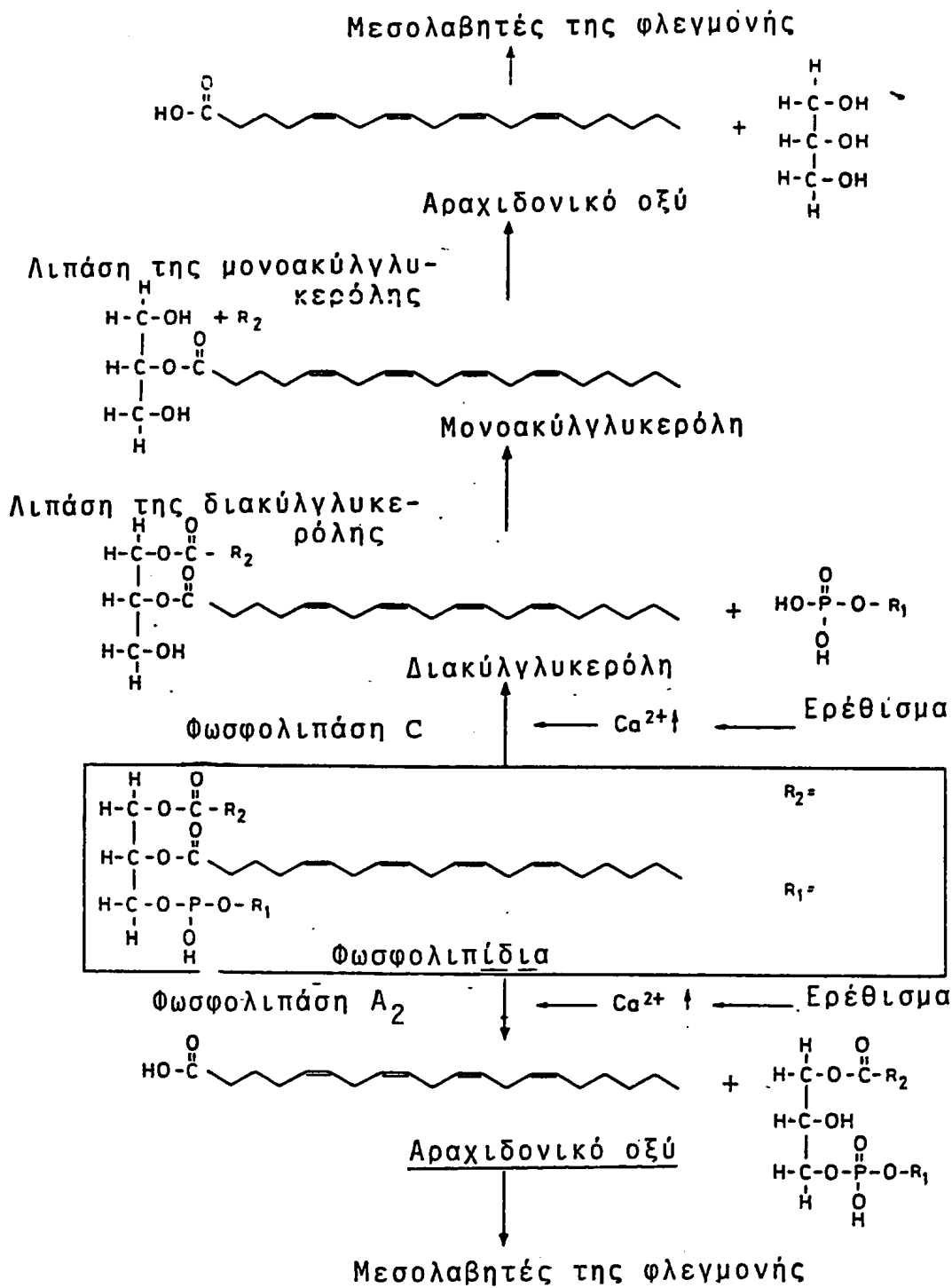
PGD2

PG12

ΣΧΗΜΑ 1: Σχηματική παρουσίαση της ενεργοποίησης αμμοπεταλιών από τον PAF, το ADP και το Αρχαιολογικό

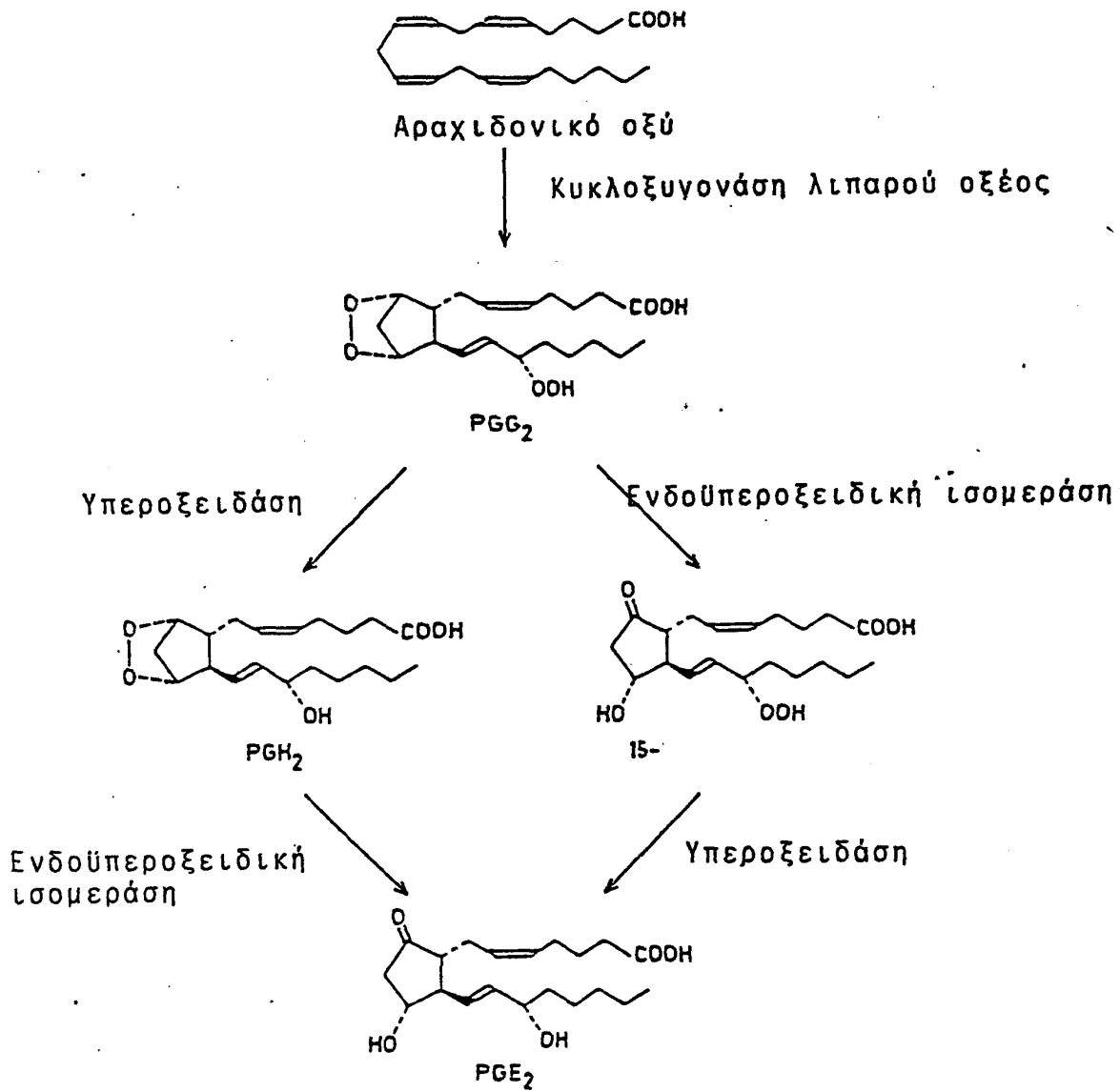
PAF, το ADP και το Αρχαιολογικό





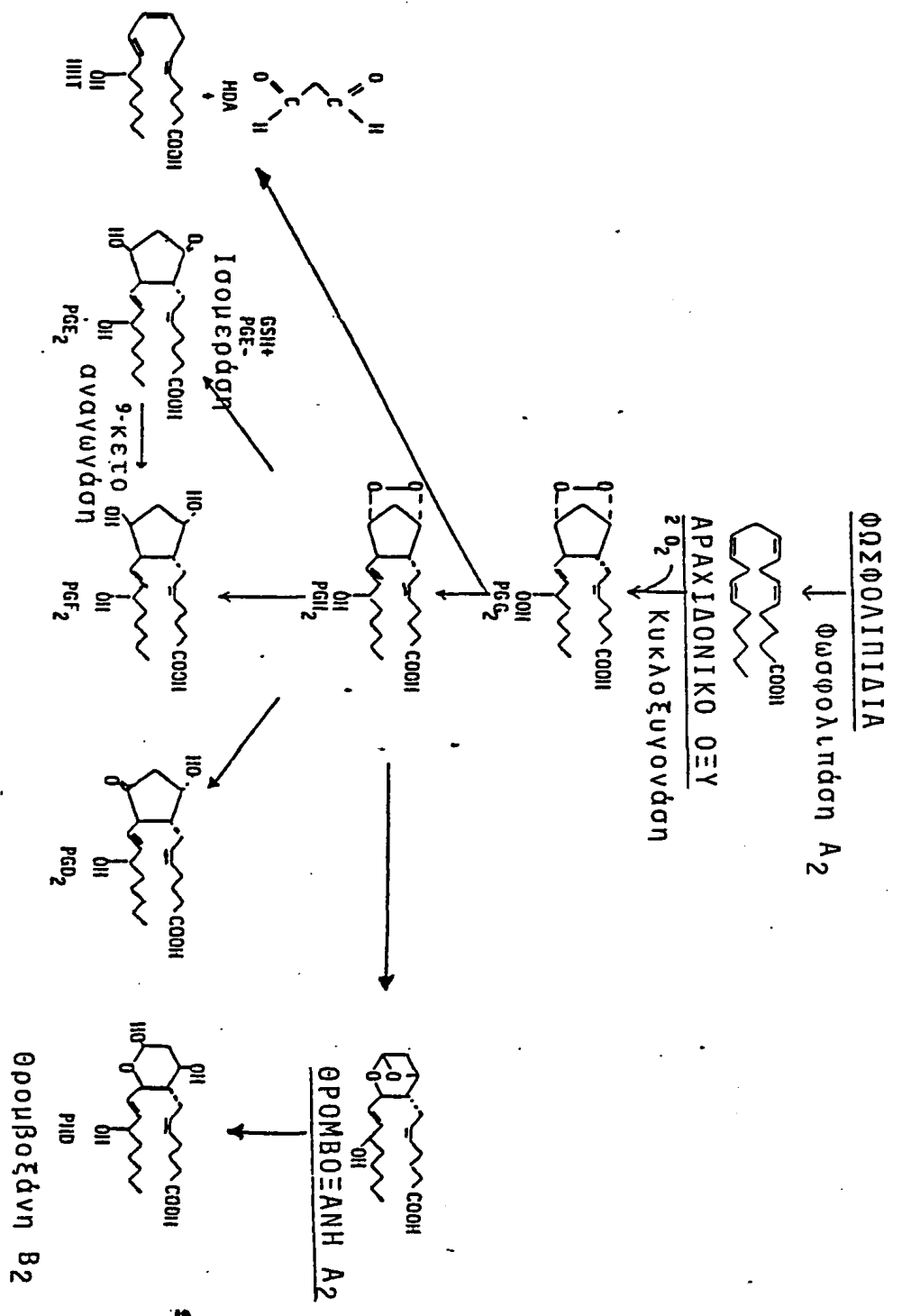
Σχήμα 2:  
 Βιοχημικές διαδικασίες ενεργοποίησης του "καταρράκτη" του αραχιδονικού οξέος.  
 (Από Sies H: Oxidative stress: Academic Press, p.408, 1985)



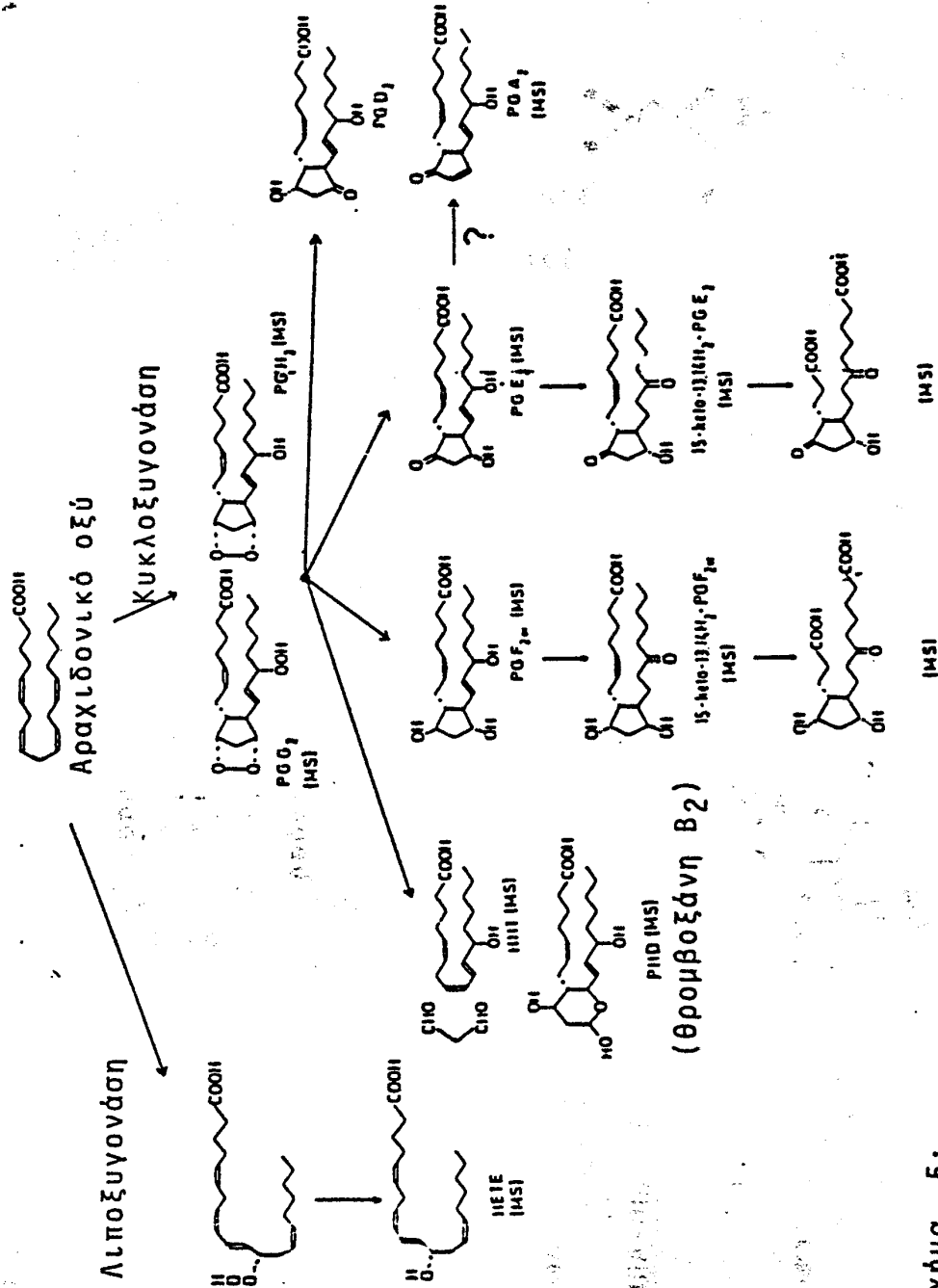


Σχήμα 3:  
Οδός βιοσύνθεσης της προσταγλανδίνης E<sub>2</sub> από το αραχιδονικό οξύ.





**Σχήμα 4:**  
 Μεταβολική οδός σύνθεσης προσταγλανδινών και θρομβοξανών από τα μεμβρανικά φωσφολιπείδη.



Σχήμα 5:

Συνοπτική παρουσίαση του μεταβολισμού του αραχιδονικού οξέος στον άνθρωπο.





### Ο Δρόμος του PAF

Η ικανότητα του PAF να προκαλεί συσσώρευση ήταν γνωστή πριν αποκαλυφθεί η χημική δομή του. Σε μικρές συγκεντρώσεις  $10^{-9}$  έως  $10^{-8}$  M, ο PAF, σε ανθρώπινο PRP, προκαλεί αντιστρεπτή συσσώρευση, ενώ σε μεγαλύτερες ( $10^{-8}$ - $10^{-7}$  M) μη αντιστρεπτή. Τα αιμοπετάλια του κουνελιού είναι πιο ευαίσθητα από του ανθρώπου και είναι δυνατό να συσσωρεύονται και in vivo μετά από ενδοφλέβια χορήγηση PAF (51,52).

Ο PAF εκτός από τη συσσώρευση προκαλεί μεταβολή του σχήματος των αιμοπεταλίων και έκκριση β-θρομβοσφαιρίνης, σεροτονίνης και  $PF_4$ , που οφείλονται στην έκλυση των πυκνών σωματιδίων των αιμοπεταλίων. Η δράση του PAF στα αιμοπετάλια απαιτεί την εξωκυττάρια ή ενδοκυττάρια κινητοποίηση του  $Ca^{2+}$ . Το σύμπλεγμα PAF-υποδοχέα ενεργοποιεί την φωσφολιπάση C της αιμοπεταλιακής μεμβράνης, με αποτέλεσμα τη διάσπαση των φωσφατιδιλινοσιτολών της μεμβράνης και το σχηματισμό διακυλγλυκερόλης και φωσφατιδικού οξέος (βλέπε Σχ.1).

Τα δύο αυτά προϊόντα αυξάνουν το ελεύθερο ενδοαιμοπεταλιακό  $Ca^{2+}$ , είτε εισάγοντάς το (δράση ιονοφόρου) είτε απελευθερώνοντάς το από τις ενδοκυττάρια αποθήκες. Στην αύξηση αυτή του  $Ca^{2+}$  δρουν ενισχυτικά η αναστολή της αδενύλ-κυκλάσης και η διέγερση της φωσφοδιεστεράσης που προκαλεί ο PAF, με αποτέλεσμα τη μείωση του 3,5-κυκλικού AMP, το οποίο προκαλεί δέσμευση του ενδοκυττάρια  $Ca^{2+}$ . Η ενδοαιμοπεταλιακή αύξηση του  $Ca^{2+}$  προκαλεί αυξημένη φωσφορυλίωση με διέγερση των φωσφορυλασών, της καλμοδουλίνης, μίας πρωτεΐνης της ελαφράς αλυσού της μυοσίνης 20 KD, και μίας πρωτεΐνης 40 KD, η οποία ενέχεται στην αντίδραση έκλυσης. Ταυτόχρονα ενεργοποιείται η φωσφολιπάση  $A_2$ , με αποτέλεσμα την αύξηση του αιμοπεταλιακού αραχιδονικού οξέος, το οποίο στη συνέχεια μέσω κυκλο-και λιποξυγονάσης ακολουθεί τις πορείες που περιγράφηκαν (53,54,55). (βλέπε Σχ.4 και 5).

Έχει διαπιστωθεί ότι τόσο τα κυκλικά ενδοπεροξειδία ( $PGG_2$ ,  $PGH_2$ ), όσο και η  $TxA_2$  είναι ισχυροί αγωνιστές της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων. Με τη χρήση αναστολέων της κυκλοξυγονάσης (ασπιρίνη, ινδομεθακίνη) έχει διαπιστωθεί ότι ο PAF δεν αναστέλλει τη συσσωρευτική του δράση στα αιμοπετάλια, αν και αναστέλλεται η παραγωγή προσταγλανδινών και θρομβοξανίων. Έτσι σήμερα είναι παραδεκτό ότι ο PAF εισάγει τη συσσώρευση των αιμοπεταλίων και μέσω της λιποξυγονάσης (τρίτος δρόμος) και την παραγωγή αυξημένων ποσοτήτων HETE, όταν η κυκλοξυγονάση είναι ανεσταλμένη. Η αύξηση ιδίως των 12-HETE έχει διαπιστωθεί ότι αυξάνει την ενδοαιμοπεταλιακή συγκέντρωση του C-GMP, το οποίο θεωρείται υπεύθυνο για τη μη αντιστρεπτή συσσώρευση που προκαλείται από τον PAF. Είναι επίσης γνωστό ότι η αύξηση του C-GMP οδηγεί σε αύξηση του GTP, το οποίο



αυξάνει την είσοδο  $\text{Ca}^{2+}$  στα αιμοπετάλια και αποτελεί το υπόστρωμα μίας πρωτεΐνης που συνδέεται με την φωσφολιπάση C (55,56,57,58,59,60,63).

Συνοπτικά οι διαδικασίες με τις οποίες προκαλείται συσσώρευση με το δρόμο του PAF είναι:

- Διέγερση της φωσφολιπάσης C και σχημασμός διακυλγλυκερόλης και φωσφατιδικού οξέος, τα οποία αυξάνουν το ελεύθερο αιμοπεταλιακό ασβέστιο  $\text{Ca}^{2+}$ , είτε εισάγοντάς το είτε προκαλώντας απελευθέρωσή του από τις ενδοαιμοπεταλιακές αποθήκες.
- Διέγερση, στη συνέχεια, της φωσφολιπάσης  $\text{-A}_2$  και ενεργοποίηση του μεταβολισμού του Αραχιδονικού οξέος προς παραγωγή θρομβοξανίων και 12-HETE.
- Ενεργοποίηση αναστρέψιμης και μη συσσώρευσης, ακόμη και όταν έχει αποκλεισθεί η μεταβολική οδός της κυκλοξυγονάσης στα αιμοπετάλια (τρίτος δρόμος).



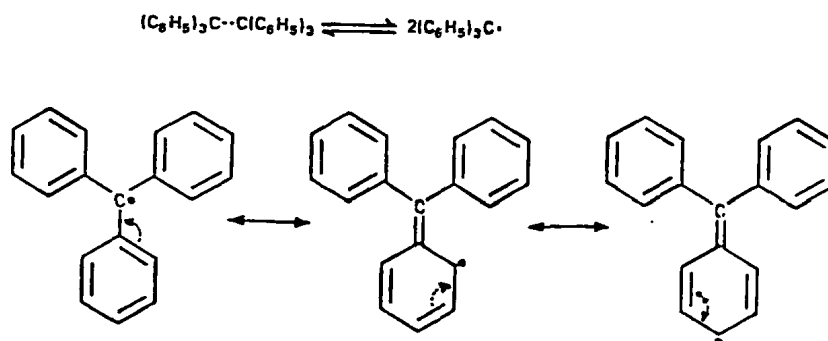
## ΕΛΕΥΘΕΡΕΣ ΡΙΖΕΣ

### 4.1 Γενικά Χαρακτηριστικά των Ελευθέρων Ριζών

Οι πρώτοι οργανικοί χημικοί ονόμασαν "ρίζα" το τμήμα διαφόρων οργανικών ενώσεων που προκύπτει από την αφαίρεση κάποιου στοιχείου από το μόριο ενός υδρογονάνθρακα. Για παράδειγμα, στα παράγωγα του μεθανίου  $\text{CH}_3\text{Cl}$ ,  $\text{CH}_3\text{J}$ ,  $\text{CH}_3\text{F}$  το τμήμα του μορίου  $\text{CH}_3$  ονομάστηκε "ρίζα μεθυλίου" ή "ομάδα μεθυλίου" με τη σύγχρονη ονοματολογία. Ορίστηκαν δηλαδή ως ρίζες οργανικές ενώσεις που περιέχουν ένα σθένος ελεύθερο στο μόριό τους.

Έρευνες κατά το πρώτο τέταρτο του 20<sup>ου</sup> αιώνα επιβεβαίωσαν την ύπαρξη ελευθέρων ριζών, αλλά το ενδιαφέρον εξέλιπε μέχρι το τέλος της δεκαετίας του 1950. Την εποχή εκείνη η κατάκτηση του διαστήματος ενεργοποίησε έρευνες για ισχυρά προωθητικά πυραύλων. Παράλληλα η ανάπτυξη των πλαστικών υλικών που συντίθενται με ριζικές αλυσιδωτές αντιδράσεις αναζωπύρωσε το ενδιαφέρον για έρευνες στις ελεύθερες ρίζες. Το 1960 μερικοί βιοχημικοί και ιδιαίτερα ο Αμερικανός Irvine Fridovich άρχισαν να διερωτώνται μήπως οι ριζικές διεργασίες παρεμβαίνουν στις αντιδράσεις της ζώσας ύλης με το οξυγόνο (65).

Το 1990 ο Γερμανός M. Gomberg συνέθεσε την ελεύθερη ρίζα τριφαινυλμεθύλιο στην οποία ένα από τα σθένη του άνθρακα μένει κενό (2), όπως φαίνεται στην παρακάτω εικόνα:



Τρεις διαφορετικές καταστάσεις της ελεύθερης ρίζας  
Τριφαινυλμεθύλιο.

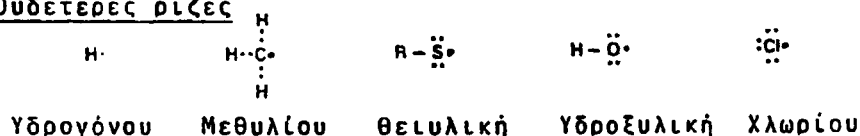


Ως ελεύθερες ρίζες θεωρούνται εξ ορισμού σήμερα άτομα ή μόρια που περιέχουν μονό αριθμό ηλεκτρονίων. Έχουν δηλαδή στην εξωτερική τους στοιβάδα ένα ασύζευκτο ηλεκτρόνιο. Επειδή η μαγνητική ροπή αυτού του ηλεκτρονίου δεν αντισταθμίζεται από αντίθετη ροπή άλλου ηλεκτρονίου, οι ελεύθερες ρίζες αποκτούν παραμαγνητικές ιδιότητες και είναι παραμαγνητικά υλικά. Συμβολίζονται με τον χημικό τους τύπο, που ακολουθείται από μία τελεία (·). Η τελεία αυτή δείχνει συμπεριφορά - ύπαρξη ελεύθερης ρίζας (66,67,68).

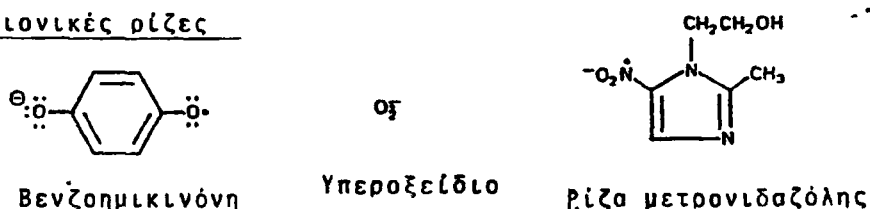
Το φορτίο τους είναι θετικό ή αρνητικό ή μπορεί να είναι ηλεκτρικά ουδέτερες.

Παραδείγματα ελευθέρων ριζών δίνονται παρακάτω:

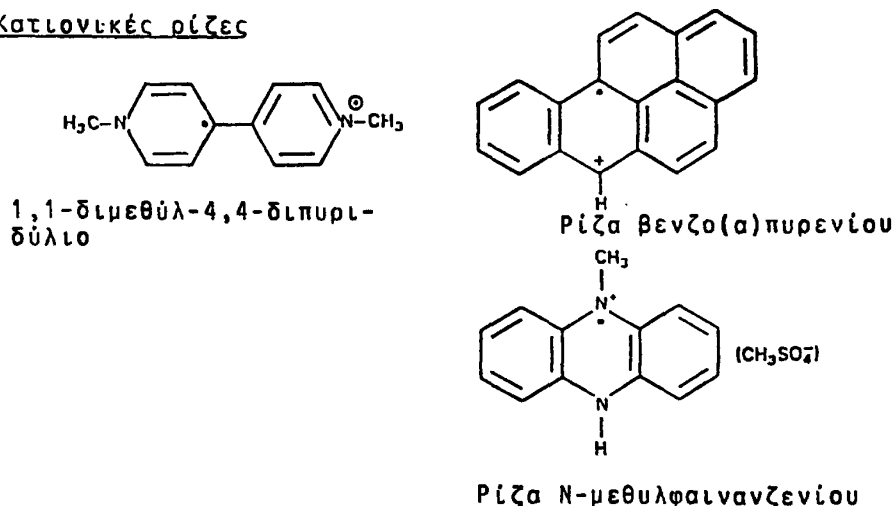
Ουδέτερες ρίζες



Ανιονικές ρίζες



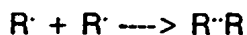
Κατιονικές ρίζες



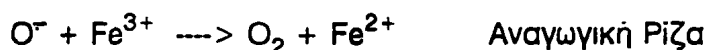
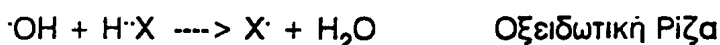
Παραδείγματα διαφόρων ειδών ελευθέρων ριζών



Από χημική άποψη οι ελεύθερες ρίζες είναι εξαιρετικά δραστικές, επειδή τείνουν να συζεύξουν το ασύζευκτο ηλεκτρόνιό τους με ένα άλλο ηλεκτρόνιο αντιθέτου spin. Έτσι συμβαίνουν συζεύξεις γενικά μεταξύ διαφόρων ριζών



Εκτός όμως από τις αντιδράσεις μεταξύ τους, οι ελεύθερες ρίζες μπορούν να προκαλέσουν αντιδράσεις μεταφοράς ηλεκτρονίων και να γίνουν δέκτες (οξειδωτικές) ή δότες ηλεκτρονίων (αναγωγικές).



Παρατηρούμε ότι στην πρώτη αντίδραση η οξειδωτική ρίζα αποσπά ένα άτομο υδρογόνου από την ένωση HX, η οποία οξειδώνεται. Στη δεύτερη αντίδραση η ρίζα του ανιόντος υπεροξειδίου  $\text{O}_2\cdot^-$  δρα αναγωγικά δίνοντας ένα ηλεκτρόνιο στο τρισθενές ιόν του σιδήρου  $\text{Fe}^{3+}$  μετατρέποντάς το σε δισθενές  $\text{Fe}^{2+}$ .

Ο χρόνος ζωής των ελευθέρων ριζών ποικίλει. Για παράδειγμα η ρίζα μεθύλιο ( $\text{CH}_3\cdot$ ), έχει χρόνο ζωής μερικά τρισεκατομμυριοστά του δευτερολέπτου (nsec), το υπεροξειδίο ( $\text{O}_2\cdot^-$ ) έχει χρόνο ζωής μερικά χιλιοστά του δευτερολέπτου (msec), σε φυσιολογικό pH. Άλλες ρίζες είναι σταθερές για μεγαλύτερα χρονικά διαστήματα, επειδή έχουν συντονιζόμενες δομές, που τους επιτρέπουν τη διασπορά του ασύζευκτου ηλεκτρονίου τους. Για παράδειγμα τα παράγωγα τοκοφερόλη και ασκορβύλη των βιταμινών E και C αντίστοιχα είναι σταθερές ελεύθερες ρίζες και η παρουσία τους στους οργανισμούς είναι σημαντική.

Ο σχηματισμός των ελευθέρων ριζών προκύπτει από τη διάσπαση ενός ομοιοπολικού δεσμού. Όπως είναι γνωστό, ο ομοιοπολικός δεσμός δημιουργείται από αμοιβαία συνεισφορά δύο αντιθέτου spin ηλεκτρονίων, των ατόμων που συνδέονται (67,68). Η διάσπαση του δεσμού μπορεί να γίνει κατά δύο τρόπους:

α. Ετερολυτική Διάσπαση

Τα ηλεκτρόνια του δεσμού μένουν στο ένα άτομο, οπότε σχηματίζονται δύο ιόντα αντιθέτου φορτίου.

β. Ομολυτική Διάσπαση

Ο δεσμός θραύεται κατά τέτοιο τρόπο ώστε το ένα ηλεκτρόνιο του δεσμού

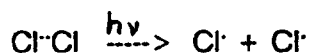


μένει στο πρώτο άτομο και το άλλο στο δεύτερο. Έτσι σχηματίζονται δύο ελεύθερες ρίζες.



Ομοιοπολικός δεσμός

Ένα κλασικό παράδειγμα σχηματισμού ελευθέρων ριζών είναι ο μετασχηματισμός του μοριακού χλωρίου σε ατομικό από τη δράση φωτεινής ακτινοβολίας  $h\nu$ .



Σε αντιδράσεις οξειδοαναγωγής προκύπτουν ελεύθερες ρίζες από την αλληλεπίδραση ενός υποστρώματος με ένα μεταλλικό ιόν, όταν στην αντίδραση εμπλέκεται μόνο ένα ηλεκτρόνιο. Το πιο γνωστό παράδειγμα είναι το αντιδραστήριο "Fenton" που προκύπτει από την αντίδραση διαλύματος  $H_2O_2$  και ιόντων  $Fe^{2+}$ :



Το ιόν  $Fe^{2+}$  γίνεται  $Fe^{3+}$  και συγχρόνως απελευθερώνεται μία ρίζα υδροξυλίου  $OH\cdot$  που αποτελεί τον ουσιαστικό οξειδωτικό παράγοντα του συστήματος.

Στη ζώσα ύλη η δημιουργία ελευθέρων ριζών γίνεται κατά κανόνα με σύλληψη ατόμων υδρογόνου (ηλεκτρόνιο και πρωτόνιο) σε βάρος γειτονικών μορίων. Έχουμε έτσι ρήξη ενός ομοιοπολικού δεσμού μεταξύ ενός ατόμου άνθρακα και ενός ατόμου υδρογόνου, που παρουσιάζει τη μεγαλύτερη ευκολία στη διάσπασή του. Προκαλούνται λοιπόν αφυδρογονώσεις που δημιουργούν νέες ρίζες, που δεσμεύουν με τη σειρά τους άλλα ηλεκτρόνια. Η αλυσίδα αυτή διακόπτεται αρκετά γρήγορα με το συνδυασμό δύο ελευθέρων ριζών, που συνεισφέρουν από κοινού τα μη συζευγμένα ηλεκτρόνια τους, σχηματίζοντας έναν ομοιοπολικό δεσμό (70).

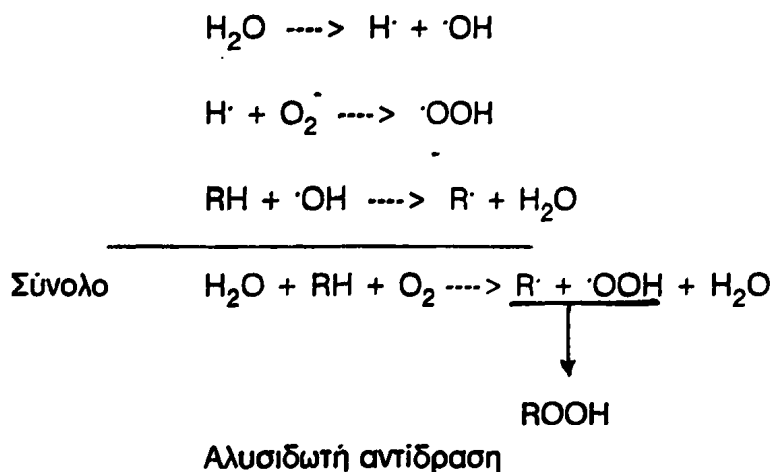


#### 4.2 Μορφές Αντιδράσεων Ήλευθέρων Ριζών (Αλυσιδωτές Ριζικές Αντιδράσεις)

Οι ελεύθερες ρίζες είναι γενικά πολύ δραστικές, ικανές να προκαλέσουν "Αλυσιδωτές Αντιδράσεις". Οι αντιδράσεις αυτές είναι μια σειρά καταστάσεων σε καθεμιά από τις οποίες δημιουργείται μία ελεύθερη ρίζα, που ενεργοποιεί την επόμενη κατάσταση. Έτσι έχουμε τρεις φάσεις: Αρχή, Διάδοση, Τερματισμός (68).

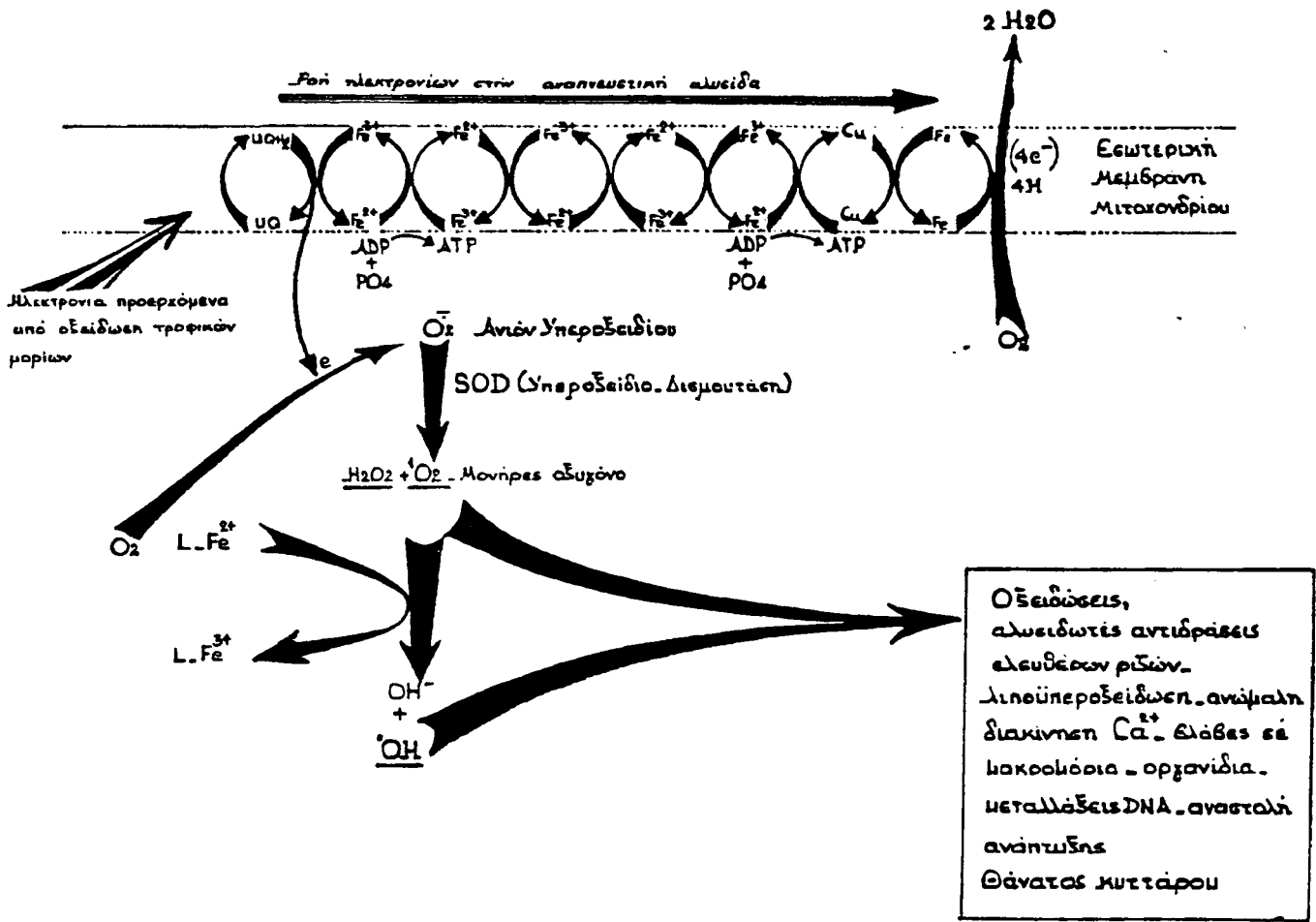
Στην πρώτη φάση, στην Αρχή, απορροφάται ενέργεια από το μόριο και μέσω της ομολυτικής διάσπασης σχηματίζεται το δραστικό σωματίδιο, δηλαδή η ελεύθερη ρίζα. Στη δεύτερη φάση, στη Διάδοση, έχουμε αντιδράσεις στις οποίες καταναλίσκεται μία ελεύθερη ρίζα και σχηματίζεται μία άλλη, χωρίς καθαρή κατανάλωση ριζών. Τέλος, στη φάση του Τερματισμού της "αλυσιδωτής αντίδρασης" καταναλώνονται οι ελεύθερες ρίζες χωρίς να δημιουργούνται άλλες, γιατί στη φάση αυτή οι ρίζες συνδέονται μεταξύ τους (66,67).

Μπορούμε να παρατηρήσουμε ότι οι αλυσιδωτές αντιδράσεις των ελευθέρων ριζών αυτοδιατηρούνται με τη δημιουργία νέων ριζών κατά το στάδιο της διάδοσης. Έτσι μία ρίζα σχηματισμένη στο αρχικό στάδιο μπορεί να προκαλέσει τη δημιουργία χιλιάδων μορίων προϊόντος:



### 4.3 Δράση Ελευθέρων Ριζών στα Βιολογικά Συστήματα

Στα στάδια εξέλιξης πολλών βιολογικών αντιδράσεων σχηματίζονται διαφόρων τύπων ελεύθερες ρίζες. Ο σχηματισμός και η εξουδετέρωση των ριζών αυτών ακολουθεί τη φυσιολογική διαδικασία εξέλιξης των αντιδράσεων, με αποτέλεσμα να ελέγχεται η παραγωγή ελευθέρων ριζών. Παραδείγματα του τύπου αυτού είναι οι μεταφορικές αλυσίδες ηλεκτρονίων των μιτοχονδρίων και των χλωροπλαστών. (Εικ.2).



Εικόνα 2: Σχηματική Παρουσίαση της μεταφοράς ηλεκτρονίων στην αναπνευστική αλυσίδα των μιτοχονδρίων.





Στην περίπτωση όμως που οι ελεύθερες ρίζες δεν αποτελούν φυσιολογικό βήμα της αντίδρασης, αλλά είναι ελεύθερες ρίζες εξωγενούς προέλευσης (από χημικές ουσίες, φάρμακα κ.λ.π) ή ρίζες που σχηματίζονται εξαιτίας αλλοιώσεων, παρεκκλίσεων ή απορρύθμισης του φυσιολογικού μεταβολισμού, τότε οι ρίζες αυτές αντιδρούν αδιάκριτα με τα βιολογικά μόρια και μετατρέπονται σε παράγοντες επικίνδυνους για την ακεραιότητα του κυττάρου (65,66).

Ένα σημαντικό παράδειγμα της δράσης των ελευθέρων ριζών στα βιολογικά συστήματα είναι η καταστροφή των κυτταρικών μεμβρανών από παράγωγα οξυγόνου (70).

Όταν τα κύτταρα στερηθούν οξυγόνου για ένα μεγάλο χρονικό διάστημα και στη συνέχεια επανοξυγονώνονται, έχουμε το φαινόμενο ανοξοεπανοξυγόνωσης. Κατά τη διάρκεια έλλειψης οξυγόνου διακόπτεται ένας ουσιαστικός μηχανισμός για τη ζωή του κυττάρου. Είναι ο μηχανισμός μεταφοράς ηλεκτρονίων δια μέσου της μιτοχονδριακής αναπνευστικής αλυσίδας. Τα μιτοχόνδρια είναι οι μονάδες παραγωγής ενέργειας του κυττάρου. Στις μεμβράνες τους περιέχουν μία σειρά πρωτεΐνες (κυττοχρώματα) που είναι μεταφορείς ηλεκτρονίων. Στη διάρκεια της αναπνοής οι πρωτεΐνες μεταφέρουν ηλεκτρόνια, μέχρις ότου ανάγουν σε νερό ένα μόριο οξυγόνου, τελικό αποδέκτη ηλεκτρονίων της αναπνοής. Η μεταφορά αυτή των ηλεκτρονίων και η αναγωγή του οξυγόνου επιτρέπει το σχηματισμό μορίων τριφωσφορικής αδενοσίνης ATP και επομένως συντελεί στη δέσμευση και αποθήκευση ενέργειας στο κύτταρο. Όταν διακοπεί η παροχή οξυγόνου, διακόπτεται και η μεταφορά ηλεκτρονίων. Κατά την επανοξυγόνωση το σύστημα των κυττοχρωμάτων δεν επανατίθεται στιγμιαία σε λειτουργία και το οξυγόνο δεν ανάγεται σε νερό, αλλά σε ανιόν υπεροξειδίου  $O_2^-$ . Στη συνέχεια παράγονται υπεροξειδίου του υδρογόνου  $H_2O_2$  και υδροξυλική ρίζα  $OH\cdot$ . Οι ισχυροί αυτοί οξειδωτικοί παράγοντες (ελεύθερες ρίζες) που δημιουργούνται στο εσωτερικό του κυττάρου προσβάλλουν τις πρωτεΐνες, το DNA και τα λιπίδια της μεμβράνης. Οι βλάβες αυτές που αρχίζουν στα μιτοχόνδρια, επεκτείνονται στο σύνολο του κυττάρου μέσω της NADPH - οξειδάσης, της οποίας η δράση διεγείρεται έμμεσα από την είσοδο ασβεστίου στο κύτταρο (66,67).

Η διακοπή της αναπνευστικής αλυσίδας σταματά την παραγωγή ATP και οι μεμβρανικές αντλίες, που συντηρούν μία χαμηλή συγκέντρωση ασβεστίου μέσα στα κύτταρα, παύουν να λειτουργούν, με αποτέλεσμα μία ανεξέλεγκτη αύξηση του ενδοκυτταρικού ασβεστίου, που ενεργοποιεί την ξανθίνη-οξειδάση. Η ενεργοποίηση αυτή έχει σαν αποτέλεσμα την παραγωγή ανιόντος υπεροξειδίου  $O_2^-$  και το σχηματισμό ελευθέρων ριζών ( $RO\cdot$ ,  $ROO\cdot$ ,  $OH\cdot$ ), που προκαλούν λιπυπεροξειδωση στα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα της κυτταρικής μεμβράνης. Η λιπυπεροξειδωση αυτή προκαλεί την καταστροφή των μεμβρανών και τελικά το θάνατο του κυττάρου.

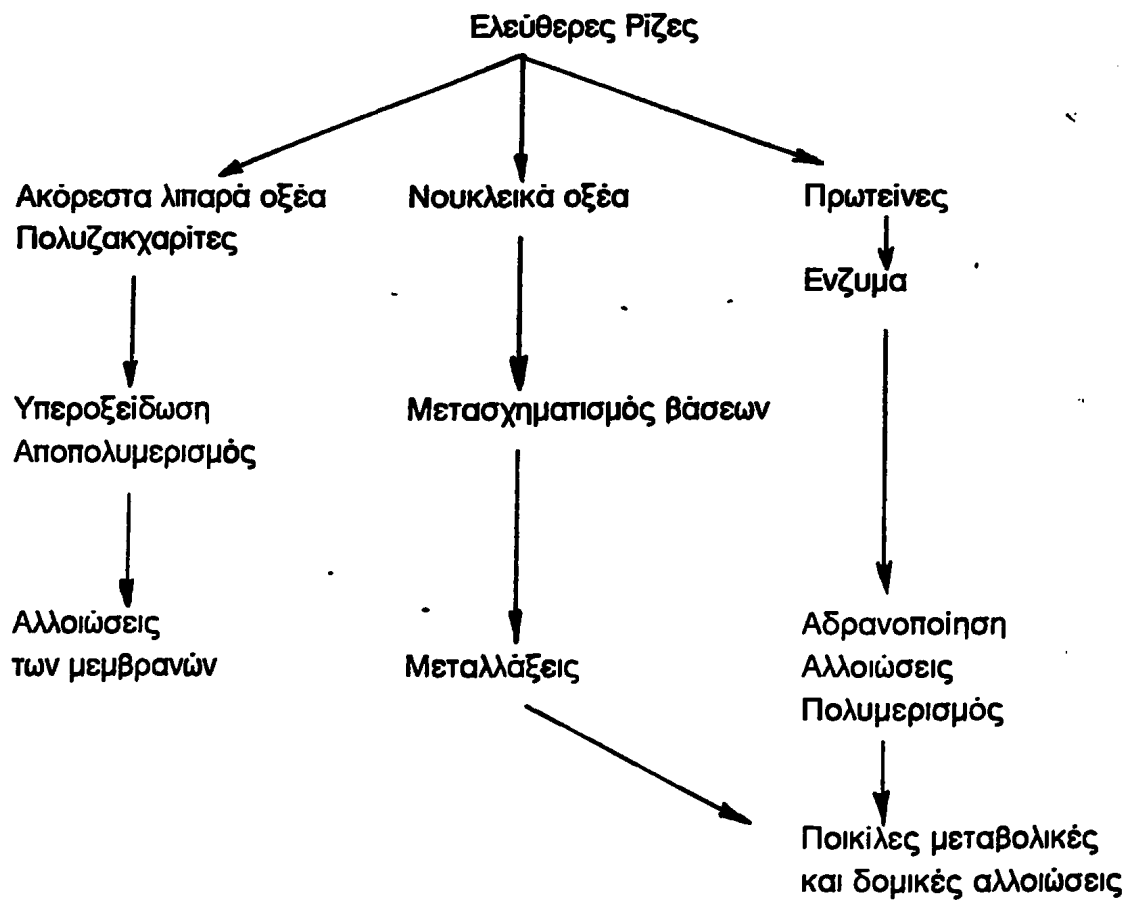


Εκτός από τις βλάβες των μεμβρανών, η λιπουπεροξειδωση ελευθερώνει στο κύτταρο ρίζες που μπορούν να προσβάλλουν και διάφορες άλλες μοριακές δομές, ιδίως νουκλεϊκά οξέα. Στην περίπτωση αυτή είναι δυνατόν να προκαλέσουν αλλοιώσεις του γενετικού υλικού, μεταλλάξεις. Αυτός σύμφωνα και με τον Maneghini και συν. 1988, είναι ο τρόπος με τον οποίο οι ελεύθερες ρίζες συμμετέχουν στην καρκινογένεση (65,72,73,74).

Οι ανεξέλεγκτες ελεύθερες ρίζες συμμετέχουν και σε πολλές άλλες βιολογικές αντιδράσεις, με δυσάρεστα (τοξικά) αποτελέσματα για τον οργανισμό. Παίρνουν μέρος α) στην ανοξία - επανοξυγόνωση στο σύνδρομο ισχαιμίας - επαναιμάτωσης προκαλώντας λιπουπεροξειδώσεις, αλλοιώσεις κυττάρων και νέκρωση της ισχαιμικής περιοχής (75,76,77,78). Η ίδια διαδικασία ισχύει και στον πρώιμο εκφυλισμό μεταμοσχευθέντων οργάνων και όχι στην ανοσολογική απόρριψη, η οποία εκδηλώνεται δεκαπέντε ημέρες μετά την μεταμόσχευση β) στη γήρανση των κυττάρων. Οι τελευταίες θεωρίες σχετικά με το γήρας είναι: 1. Ο D. Harman 1956 θεωρεί ότι η γήρανση είναι προοδευτική συσσώρευση βιοχημικών αλλαγών στον οργανισμό. Η συσσώρευση αυτή οφείλεται σε ριζικές αντιδράσεις. 2. Ο R.G. Cytler θεωρεί ότι ο κυτταρικός εκφυλισμός είναι συνέπεια μίας προοδευτικής αλλοίωσης των γονιδίων, σε εξαιρετικά διαφοροποιημένα κύτταρα, που επιτελούν πολύ εξειδικευμένες και αναντικατάστατες λειτουργίες (65). Η προοδευτική αλλοίωση οφείλεται στη συμμετοχή ελευθέρων ριζών (79,80,81,82).



Οι παθολογικές αλλοιώσεις σε μοριακό επίπεδο που προκαλούνται από ελεύθερες ρίζες στα συστατικά του κυττάρου σχηματίζονται ως εξής:



### **Προϊόντα Αναγωγής του Οξυγόνου**

**Υπεροξειδίο, Οξυγονούχο ύδωρ, Ρίζα υδροξύλιο, Οξυγόνο Singlet**

#### **4.4 Τοξική Δράση του Οξυγόνου στους Οργανισμούς**

Το οξυγόνο αν και είναι αναγκαίο για τη ζωή των αερόβιων οργανισμών, αποδεικνύεται τοξικό όταν η συγκέντρωσή του υπερβαίνει ακόμη και ελάχιστα τη συγκέντρωση του Οξυγόνου στον ατμοσφαιρικό αέρα (21%). Οργανισμοί που βρίσκονται σε ατμόσφαιρα που περιέχει μεγαλύτερη συγκέντρωση οξυγόνου από την ατμοσφαιρική παθαίνουν βλάβες στους πνεύμονες και στον αμφιβληστροειδή. Το οξυγόνο μόνο του δεν είναι ιδιαίτερα δραστικό και τοξικό. Γίνεται δραστικό εξαιτίας των ενδιάμεσων μορφών της αναγωγής του, που είναι πολύ πιο δραστικές από τη μοριακή του μορφή. Η τοξικότητα του οξυγόνου εκδηλώνεται όχι μόνο σε επίπεδο οργανισμών σε σύνολο, αλλά και σε κυτταρικές και υποκυτταρικές καλλιέργειες (μιτοχόνδρια, χλωροπλάστες). Οι αερόβιοι οργανισμοί διαθέτουν ένα περίπλοκο αμυντικό σύστημα για προστασία από το οξυγόνο. Όταν όμως η συγκέντρωση του οξυγόνου ξεπεράσει τις κανονικές τιμές, οι άμυνες αυτές του οργανισμού είναι ανεπαρκείς και αρχίζουν να εκδηλώνονται τα τοξικά φαινόμενα που οφείλονται στην υπεροξία. (67,79,80,81,83,84,85).

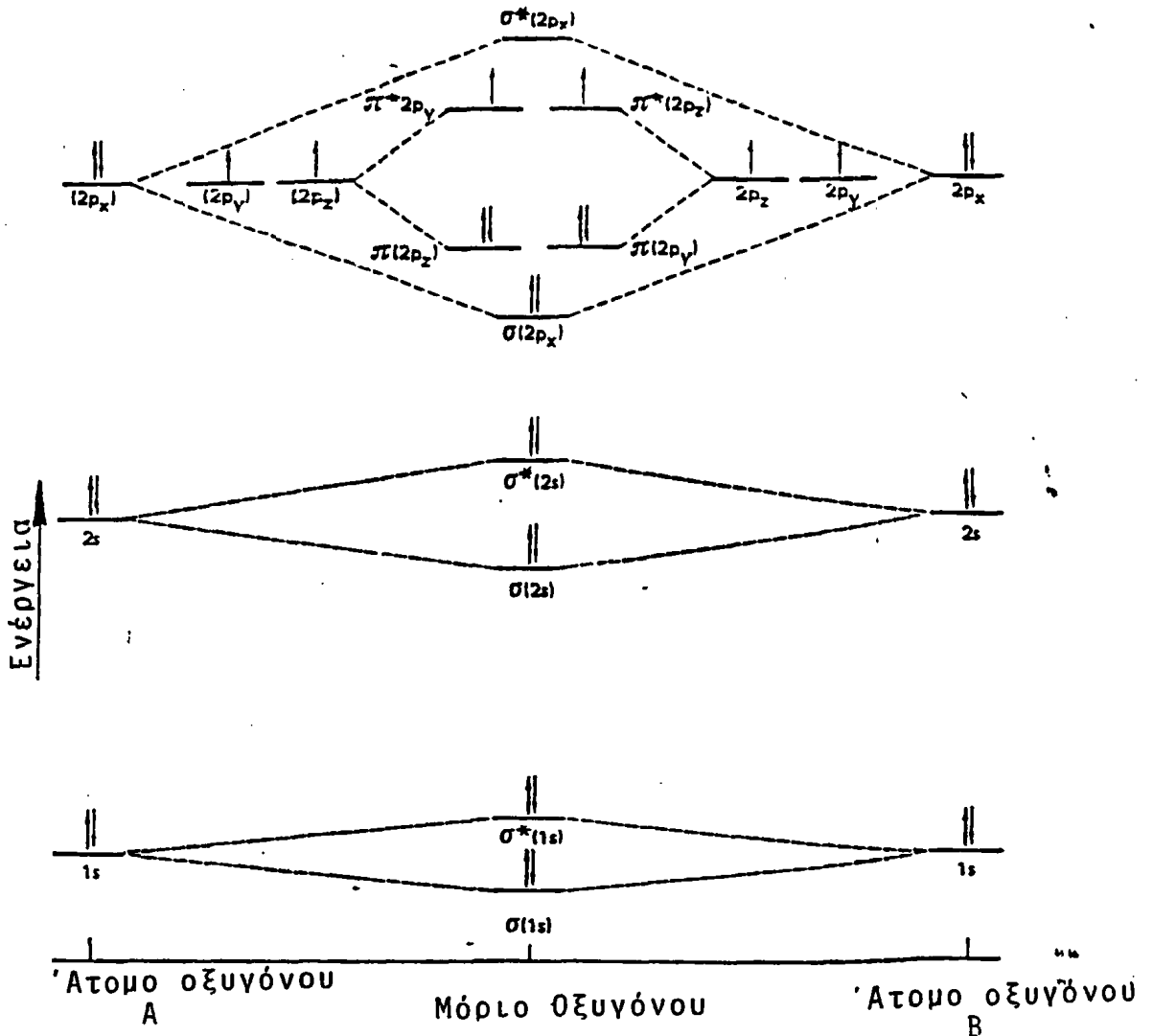
#### **4.5 Χημικές Ιδιότητες του Μορίου του Οξυγόνου**

Στη θεμελιώδη κατάσταση το οξυγόνο έχει δύο ασύζευκτα ηλεκτρόνια τοποθετημένα σε διαφορετικά τροχιακά. Η κατάσταση αυτή του οξυγόνου λέγεται triplet και συμβολίζεται  $^3\text{O}_2$ . Στην εικόνα 3 φαίνεται η δημιουργία των μοριακών τροχιακών του οξυγόνου. Παρατηρούμε ότι τα ηλεκτρόνια ισοκατανέμονται μεταξύ των δύο ατόμων του μορίου.

Τα τροχιακά  $2s$  και  $2p_x$  αλληλοεπικαλύπτονται σχηματίζοντας  $\sigma$  δεσμούς, ενώ τα τροχιακά  $2p_y$  και  $2p_z$  αλληλοεπικαλύπτονται σχηματίζοντας δεσμούς  $\pi$ . Αν τα ατομικά τροχιακά αλληλοεπικαλύπτονται εν φάσει, σχηματίζουν μοριακά τροχιακά Δεσμού ( $\sigma, \pi$ ), ενώ, αν αλληλοεπικαλύπτονται σε αντίθετες φάσεις, τότε σχηματίζουν μοριακά τροχιακά αντιδεσμού ( $\sigma^*, \pi^*$ ). Μόνο δύο ηλεκτρόνια των τροχιακών  $2p_x$  είναι διαθέσιμα για σχηματισμό δεσμού  $\sigma$ . Τα άλλα ηλεκτρόνια των τροχιακών  $2p_x, 2p_y, 2p_z$  κατανέμονται στα μοριακά τροχιακά  $\pi$  και  $\pi^*$  που έχουν μικρότερη ενέργεια από τα ηλεκτρόνια του αντιδεσμού  $\sigma^*$  (66,67,69).

Στην εικόνα 3 παρατηρούμε επίσης ότι τα τροχιακά του αντιδεσμού  $\pi^*$  καταλαμβάνονται το καθένα τους από ένα ηλεκτρόνιο με παράλληλα spin. Η ενεργειακή τακτοποίηση των ηλεκτρονίων στο μόριο του οξυγόνου είναι αυτή της ελάχιστης ενέργειας και δίνει στο μόριο τη μεγαλύτερη δυνατή σταθερότητα.





Εικόνα 3:  
Σχηματισμός των μοριακών τροχιακών του μορίου του οξυγόνου που προκύπτουν από την υπέρθεση των ατομικών τροχιακών των μεμονωμένων ατόμων οξυγόνου.

Τα δύο ασύζευκτα ηλεκτρόνια του οξυγόνου, που έχουν παράλληλα spin, δεν μπορούν να σχηματίσουν ζεύγος, λόγω της απαγορευτικής αρχής του Pauli. Κατά την αρχή αυτή της κβαντομηχανικής, δεν επιτρέπεται να υπάρχουν στην ίδια ενεργειακή κατάσταση περισσότερα από ένα ηλεκτρόνια, να έχουν δηλαδή ίδιους όλους τους κβαντικούς αριθμούς. Αυτός ο περιορισμός κάνει το οξυγόνο λιγότερο δραστικό και μπορεί να ξεπεραστεί με τους εξής τρόπους:

α. Το spin ενός ηλεκτρονίου στο οξυγόνο triplet είναι δυνατόν να αντιστραφεί και

5)

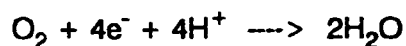


δημιουργείται η δραστική μορφή οξυγόνο siglett.

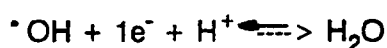
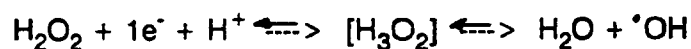
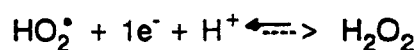
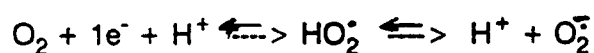
β. Το οξυγόνο triplet μπορεί να αντιδράσει με μέταλλα μεταπτώσεως που έχουν ένα ασύζευκτο ηλεκτρόνιο με ιοντικό και όχι με ριζικό μηχανισμό.

γ. Ο περιορισμός του spin μπορεί να ξεπεραστεί με πρόσθεση ενός ηλεκτρονίου κάθε φορά στο μόριο του οξυγόνου.

Η πλήρης αναγωγή του οξυγόνου σε νερό απαιτεί 4 ηλεκτρόνια:



Η ίδια διαδικασία μπορεί να γίνει μέσω τεσσάρων σταδίων



Όπως φαίνεται από τις αντιδράσεις δημιουργούνται 3 ενδιάμεσα μόρια:

Η ρίζα ανιόντος υπεροξειδίου  $\text{O}_2^-$

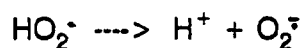
Το οξυγονούχο ύδωρ  $\text{H}_2\text{O}_2$

Η ρίζα υδροξυλίου  $\bullet\text{OH}$

Από τα προϊόντα αυτά το οξυγονούχο ύδωρ είναι σταθερό.

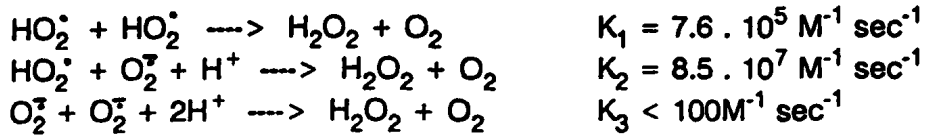
#### 4.6 Η ρίζα Ανιόν Υπεροξειδίου $\text{O}_2^-$

Το οξυγόνο που ανάγεται μονοσθενώς είναι μία ελεύθερη ρίζα, που ονομάζεται ανιόν υπεροξειδίου στην ιονισμένη μορφή  $\text{O}_2^-$  και υδρουπεροξειδίου στην πρωτονιωμένη μορφή  $\text{HO}_2^\bullet$ . Το υδρουπεροξειδίου είναι ένα ασθενές οξύ, του οποίου η pK αντιστοιχεί στο 4.88:



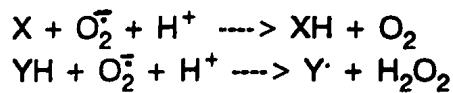
Το υπεροξειδίου υφίσταται μία διαμοριακή οξειδοαναγωγική αντίδραση (δισμεταλλαγή), που εξαρτάται από το pH και περιγράφεται από τις αντιδράσεις:





Η δισμεταλλαγή είναι ταχεία σε όξινα και ελαφρώς όξινα διαλύματα, ενώ γίνεται προοδευτικά πιο βραδεία με την αύξηση του pH πάνω από 4.8. Η βραδύτητα της αντίδρασης σε βασικά διαλύματα οφείλεται στην ηλεκτροστατική άπωση μεταξύ όμοιων φορτίων (66,67).

Το υπεροξειδίο μπορεί να συμπεριφερθεί τόσο σαν αναγωγικός, όσο και σαν οξειδωτικός παράγοντας κατά τις αντιδράσεις:

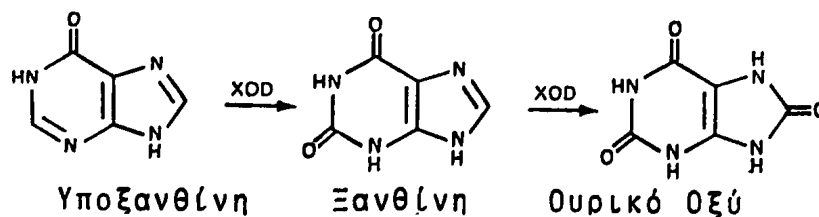


#### α. Βιολογικές Πηγές Ρίζας Υπεροξειδίου $\text{O}_2$

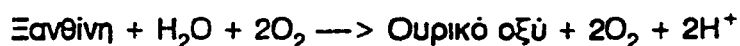
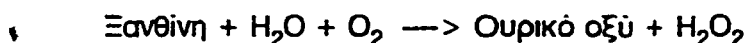
Στο κανονικό κύτταρο ένα μικρό σταθερό ποσοστό του ολικά καταναλισκόμενου οξυγόνου χρησιμοποιείται για τη δημιουργία ρίζας υπεροξειδίου. Το ποσοστό αυτό είναι δυνατόν να αυξηθεί σε ειδικές παθολογικές συνθήκες ή από την παρουσία ξένων ενώσεων (86).

Η ρίζα υπεροξειδίου μπορεί να παραχθεί από αυτοοξειδωση αναχθεισών φλαβινών, υδροκινονών, αναχθείσης γλουταθειόνης, κατεχολαμινών, τετραυδροπτερίνης, ρουμπρεδοξίνης και αναχθεισών αιμοπρωτεϊνών (67).

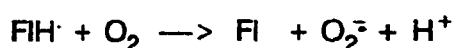
Οξειδωτικά ένζυμα, όπως η διυδροοροτική αφυδρογονάση, η αλδεύδη οξειδάση και η ξανθίνη-οξειδάση παράγουν ρίζες υπεροξειδίου. Η ξανθίνη-οξειδάση (XOD) είναι ένα ένζυμο που περιέχει μολυβδένιο, σίδηρο όχι σε μορφή αίμης, και FAD σαν προσθετικές ομάδες. Μετατρέπει την υποξανθίνη σε ξανθίνη και την ξανθίνη σε ουρικό οξύ, όπως φαίνεται παρακάτω:



Η Ξανθίνη προκαλεί δισθενή και μονοσθενή αναγωγή του οξυγόνου παράγοντας αντίστοιχα οξυγονούχο ύδωρ και υπεροξειδίο (66).



Η τριπποφαναφοξυγονάση του εντέρου αναστέλλεται από την υπεροξειδιοδισμουτάση. Για την ερμηνεία του φαινομένου έχει προταθεί η υπόθεση ότι η ρίζα υπεροξειδίου αποτελεί ένα ενδιάμεσο παράγωγο αυτής της αντίδρασης.



Στη δημιουργία υπεροξειδίου από φλαβοπρωτείνες σημαντική θέση κατέχουν τα μέταλλα που υπάρχουν στο ενεργό κέντρο των ενζύμων.

Ανιόν υπεροξειδίου παράγεται στα λευκοκύτταρα κατά τη φαγοκύτωση στις μιτοχονδριακές και μικροσωματικές αλυσίδες μεταφοράς ηλεκτρονίων και στους χλωροπλάστες κατά τη φωτοσύνθεση.

### **β. Παραγωγή Υπεροξειδίου σε Βιολογικά Συστήματα από Εξωγενείς Ουσίες**

Κάθε ουσία που μπορεί να δημιουργήσει υπεροξειδίο είναι δυνητικά τοξική. Το αντιβιοτικό Στρεπτογρίνη δρα μέσω παραγωγής υπεροξειδίου. Η στρεπτογρίνη είναι μία Ρ-κινόνη, που όταν έρθει σε επαφή με ένα βακτήριο, ανάγεται από τα αναγωγικά συστήματα του βακτηρίου και επανοξειδώνεται διαδοχικά από το ατμοσφαιρικό οξυγόνο, παράγοντας υπεροξειδίο. Τα αντιβιοτικά αδριαμικίνη και daunorubicine, που χρησιμοποιούνται σαν αντικαρκινικά, αναφέρεται ότι δρουν και μέσω παραγωγής υπεροξειδίου (87,88,89). Η διαβητογόνος ουσία Αλλοξάνη, που καταστρέφει εκλεκτικά τα β - κύτταρα του παγκρέατος αυτοοξειδούμενη παράγει υπεροξειδίο. Το βενζοπυρένιο είναι ένα καρκινογόνο, που μετατρέπεται στα μικροσώματα σε βενζοπυρένιο-διόνη. Οι διόνες αυτές οξειδώνονται και ανάγονται με παραγωγή υπεροξειδίου, το οποίο συμμετέχει στην καταστροφή του DNA. Το φυτοκτόνο Paraquat, τοξικό σε φυτά και ζώα, δρα τοξικά μέσω παραγωγής





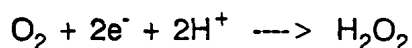
υπεροξειδίου. Αλληλεπιδρά με την αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων των μικροσωμάτων και ανάγεται. Η αναχθείσα μορφή μετατρέπει το οξυγόνο σε υπεροξειδίο.

#### γ. Ο Κίνδυνος από το Υπεροξειδίο

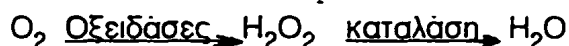
Το ανιόν υπεροξειδίο αντιδρά με πρωτεΐνες, λιπίδια, πολυσακχαρίτες και νουκλεικά οξέα. Η δραστηριότητά του χαρακτηρίζεται χαμηλή, αν συγκριθεί με τη δραστηριότητα των άλλων ριζών του οξυγόνου. Η τοξικότητα του υπεροξειδίου φαίνεται ότι εξαρτάται από την αλληλεπίδραση με οξυγονούχο ύδωρ. Προϊόν αυτής της αντίδρασης είναι η άκρως οξειδωτική ρίζα υδροξύλιο  $\text{OH}^\cdot$  (66).

#### 4.7 Οξυγονούχο Ύδωρ $\text{H}_2\text{O}_2$

Το οξυγονούχο ύδωρ είναι το σταθερότερο προϊόν των ενδιάμεσων μορίων που σχηματίζονται από τη διαδοχική αναγωγή του οξυγόνου. Μπορεί να δημιουργηθεί απευθείας με δισθενή αναγωγή του οξυγόνου:



Το οξυγονούχο ύδωρ παράγεται στα κύτταρα σαν πρωτογενές προϊόν της αναγωγής του οξυγόνου από πολυάριθμες οξειδάσες, οι οποίες υπάρχουν στα υπεροξεισώματα. Ακολούθως το  $\text{H}_2\text{O}_2$  ανάγεται σε νερό από την καταλάση.

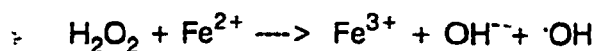


Το οξυγονούχο ύδωρ παράγεται στα υπεροξεισώματα των ανώτερων θηλαστικών και του ανθρώπου από αμινοξυοξειδάσες, από την ξανθίνη οξειδάση και άλλα ένζυμα.

Η παραγωγή οξυγονούχου ύδατος αποδείχθηκε ότι συμβαίνει και στα μικροσώματα, στα μιτοχόνδρια και στους φωτιζόμενους χλωροπλάστες, αλλά προέρχεται στο μεγαλύτερο ποσοστό από τη δισμεταλλαγή του υπεροξειδίου.

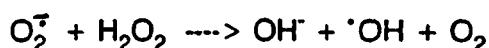
Το οξυγονούχο ύδωρ προκαλεί την οξειδωση πολυάριθμων ουσιών, μεταξύ των οποίων οι σουλφυδρυλικές ομάδες και τα μεθειονιλικά υπολείμματα των πρωτεϊνών. Οι οξειδώσεις αυτές συμβαίνουν σε συγκεντρώσεις μεγαλύτερες από αυτές που υπάρχουν in vivo. Θεωρείται επομένως ότι το  $\text{H}_2\text{O}_2$  είναι τοξικό όχι εξαιτίας μίας κατευθείαν αντίδρασης με διάφορα τμήματα του κυττάρου, αλλά γιατί μπορεί να δημιουργήσει την ελεύθερη ρίζα υδροξύλιο, μέσω αντίδρασης με το υπεροξειδίο ή με δισθενή ιόντα σιδήρου (αντιδραστήριο Fenton): (90).



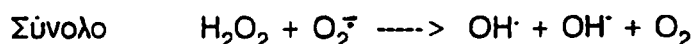
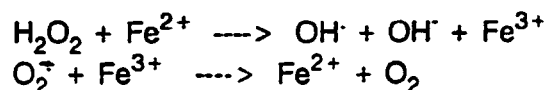


#### 4.8 Ρίζα Υδροξυλίου

Το ανιόν υπεροξειδίου και το οξυγονούχο ύδωρ μπορούν να αντιδράσουν μεταξύ τους σύμφωνα με την αντίδραση που προτάθηκε το 1934 από τους Haber και Weiss:



Η αντίδραση αυτή, παρ' ότι έχει συζητηθεί πάρα πολύ, τελικά αποδείχθηκε ότι αυτή καθ' αυτή η αντίδραση του  $\text{H}_2\text{O}_2$  με το  $\text{O}_2^-$  γίνεται με πάρα πολύ μικρή ταχύτητα σε βιολογικά συστήματα. Αντ' αυτής έχει προταθεί η αντίδραση Fenton που καταλύεται παρουσία ιόντων δισθενούς σιδήρου  $\text{Fe}^{2+}$ , οπότε συμβαίνουν οι αντιδράσεις:



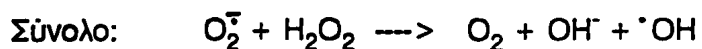
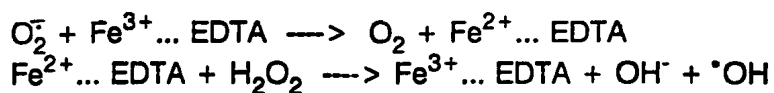
Στις αντιδράσεις αυτού του τύπου σχηματίζεται η ρίζα υδροξύλιο  $\cdot\text{OH}$  που είναι άκρως οξειδωτική και αντιδρά με πολλές οργανικές ουσίες με πολύ υψηλές ταχύτητες (66,67,70).

Ρίζα υδροξύλιου παράγεται κατά τη διάσπαση του νερού από ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία και για το λόγο αυτό είναι υπεύθυνη για τα αποτελέσματα των ιονιζουσών ακτινοβολιών πάνω στα βιολογικά συστήματα.

Λόγω της εντονότατης δραστηρότητάς του το υδροξύλιο εξουδετερώνεται όταν σχηματίζεται, γιατί αντιδρά με το πρώτο μόριο με το οποίο έρχεται σε επαφή. Πολλές φορές η αντίδραση του υδροξύλιου μπορεί να δημιουργήσει άλλες ρίζες μεγαλύτερης διάρκειας ζωής που μπορούν να διαχυθούν σε κυτταρικές περιοχές προκαλώντας ζημιές σε αρκετή απόσταση.

Έχει παρατηρηθεί ότι όταν σε ένα σύστημα που παράγει ρίζα υπεροξειδίου προστεθεί μεταλλικό σύμπλοκο (π.χ.  $\text{Fe}^{3+}$  ...EDTA) επιταχύνεται ο σχηματισμός ριζών υδροξύλιου με τον μηχανισμό:





Η αντίδραση αυτή των δύο σταδίων είναι δυνατό να συμβεί σε βιολογικά συστήματα, τα οποία είναι πλούσια σε μέταλλα συνεζευγμένα με πρωτεΐνες, νουκλεοτίδια κ.λ.π. Για παράδειγμα η τρανσφερίνη που είναι πρωτεΐνη του πλάσματος και περιέχει σίδηρο, είναι πιο δραστική από το σύμπλοκο  $\text{Fe}^{3+} \dots \text{EDTA}$ , στην κατάλυση της σειράς των παραπάνω αντιδράσεων. Όταν τα βιολογικά συστήματα παράγουν ρίζα υπεροξειδίου και οξυγονούχο ύδωρ πάνω από μία ορισμένη συγκέντρωση, τότε αλληλεπιδρούν η ρίζα υπεροξειδίου και το οξυγονούχο ύδωρ και παράγουν ρίζα υδροξυλίου  $\cdot\text{OH}$ . Τα ένζυμα υπεροξειδίου-δισμουτάση, που εξουδετερώνει τη ρίζα υπεροξειδίου και η καταλάση με τις υπεροξειδάσες, που διασπούν το οξυγονούχο ύδωρ, διατηρούν χαμηλές τις συγκεντρώσεις  $\text{O}_2^-$  και  $\text{H}_2\text{O}_2$  με αποτέλεσμα η παραγωγή ρίζας υδροξυλίου  $\cdot\text{OH}$  να είναι αμελητέα (91).



#### 4.9 Οξυγόνο Singlet (Μονήρες Οξυγόνο)

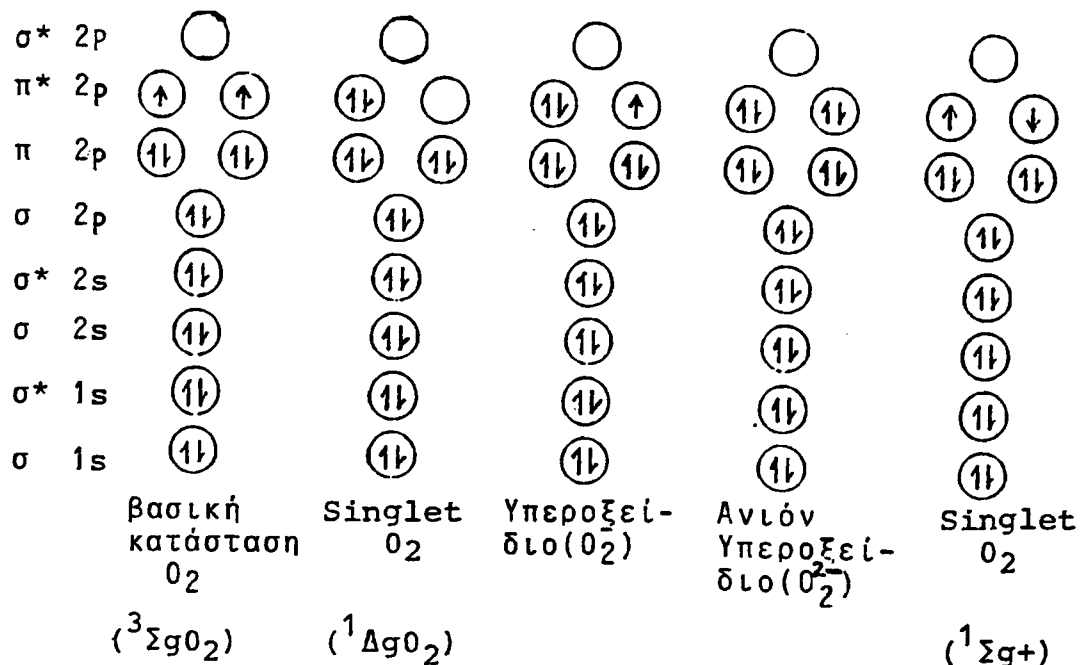
Το μόριο του Οξυγόνου εκτός από τη θεμελιώδη κατάσταση μπορεί να έχει δύο ακόμη ενεργειακές διεγερμένες καταστάσεις. Η θεμελιώδης κατάσταση λέγεται κατάσταση triplet, και ενεργειακά συμβολίζεται με  $^3\Sigma_g$ . Οι διεγερμένες καταστάσεις λέγονται καταστάσεις Singlet συμβολίζονται με  $^1O_2$  ή  $O_2^*$  και είναι:

α. Η ανώτερη κατάσταση, που συμβολίζεται με  $^1\Sigma_g$ , έχει ενέργεια 37 Kcal/mol ανώτερη της θεμελιώδους κατάστασης και είναι εξαιρετικά βραχύβια (66,67).

β. Η κατώτερη κατάσταση συμβολίζεται με  $^1\Delta_g$  και έχει ενέργεια κατά 23 Kcal/mol ανώτερη της θεμελιώδους κατάστασης. Η διάρκεια ζωής αυτής της κατάστασης είναι μεγαλύτερη της ανώτερης και θεωρείται ότι η μορφή αυτή είναι η μόνη που προκαλεί αντιδράσεις (92).

Όταν προκύπτει η ανώτερη κατάσταση  $^1\Sigma_g$ , μεταπίπτει αμέσως στην  $^1\Delta_g$ , πριν προλάβει να δώσει αντιδράσεις. Για το λόγο αυτό σε υδατικά διαλύματα ως οξυγόνο Singlet εννοείται πάντοτε η ενεργειακή κατάσταση  $^1\Delta_g$ .

Στις εικόνες 4 και 5 δίνονται τα τροχιακά και οι ενεργειακές καταστάσεις των μορφών του μορίου του οξυγόνου.

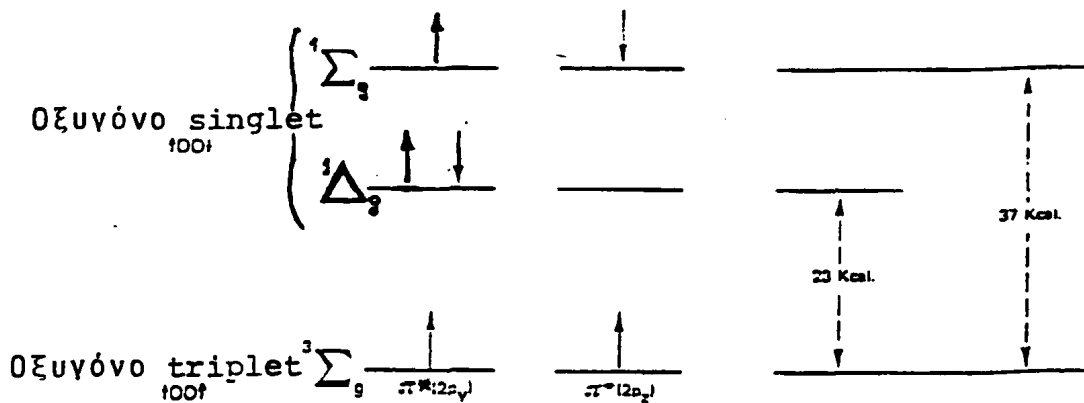


Εικόνα 4: Δεσμοί του μορίου του διατομικού οξυγόνου.

Από Free radicals in biology and medicine

B.Halliwell, J.Gutteridge.

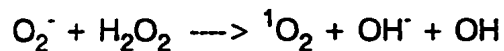
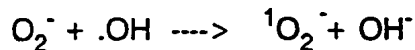
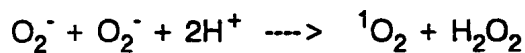




Εικόνα 5:

Διαφορές των ενεργειακών καταστάσεων των τροχιακών του οξυγόνου singlet και triplet

Σε βιολογικά συστήματα το οξυγόνο Singlet σχηματίζεται με αυθόρμητη δισμεταλλαγή του ανιόντος υπεροξειδίου με ρίζα υδροξυλίου ή με οξυγονούχο ύδωρ.



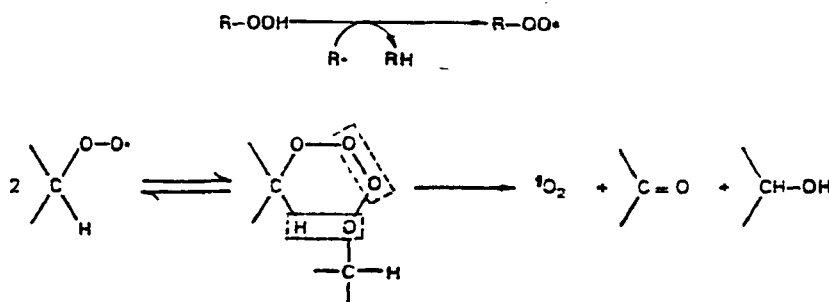
Παρατήρηση: Στην τοξικότητα του ανιόντος υπεροξειδίου πρέπει να υπολογιστεί και η δυνατότητα δράσης του ως προδρόμου στην παραγωγή οξυγόνου Singlet, που είναι επίσης τοξικό.

Οξυγόνο Singlet παράγεται και κατά τη διάρκεια της υπεροξειδωσης των λιπιδίων όταν υπάρχουν δύο ενδιάμεσες υπεροξυλικές ρίζες ROO.

Οι υπεροξυλικές ρίζες αντιδρούν μεταξύ τους και σχηματίζουν ένα τεταρτοξειδίο που αποσυντίθεται και παράγει οξυγόνο Singlet.

Μία άλλη δυνατότητα σχηματισμού οξυγόνου Singlet, σημαντική για τις επιπτώσεις σε φυσιολογικό και παθολογικό επίπεδο, είναι από η Φωτοχημική Δράση. Η φωτοχημική δράση οφείλεται στο γεγονός ότι οι ζωντανοί οργανισμοί, παρουσία φωτός, οξυγόνου και ορισμένων ειδικών ουσιών, ενδογενών ή εξωγενών, που λέγονται φωτοευαίσθητοποιητές, παθαίνουν μία σειρά από οξειδωτικές βλάβες, που μπορεί να είναι θανατηφόρες (93).



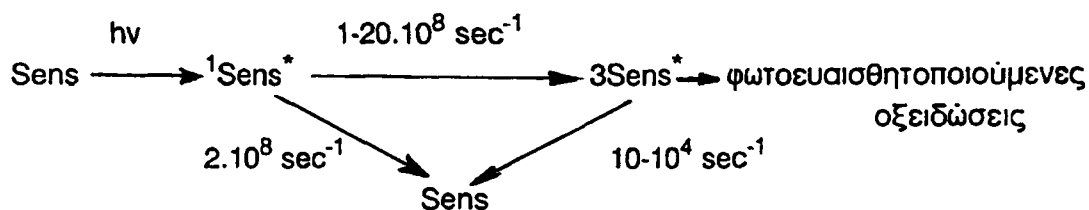


Σχηματισμός του οξυγόνου singlet με την συμμετοχή υπεροξυλικής ρίζας (μηχανισμός του Russel)

### Μηχανισμός Φωτοχημικής Δράσης

Η ενέργεια της ορατής περιοχής του φάσματος της ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας θα αρκούσε για να ανεβάσει το οξυγόνο από τη θεμελιώδη στις ενεργοποιημένες του καταστάσεις. Το οξυγόνο όμως δεν απορροφά ενέργεια σ' αυτή την περιοχή συχνοτήτων. Αν συνέβαινε το αντίθετο, οι αερόβιοι οργανισμοί δε θα μπορούσαν να επιβιώσουν παρουσία φωτός. Οι φωτοευαίσθητοποιητές όμως έχουν την ικανότητα να απορροφούν ενέργεια στις συχνότητες του ορατού φωτός. Η ενέργεια αυτή διοχετεύεται στο μοριακό οξυγόνο και το διεγείρει σε οξυγόνο Singlet (66,67,94).

Οι φωτοευαίσθητοποιητές που ονομάζονται sens παρουσιάζουν δύο διεγερμένες καταστάσεις, την Singlet  $^1\text{Sens}^*$  και την triplet  $^3\text{Sens}^*$ . Η κατάσταση triplet  $^3\text{Sens}^*$  έχει χρόνο ζωής μεγαλύτερο από την κατάσταση singlet  $^1\text{Sens}^*$ . Η κατάσταση singlet  $^1\text{Sens}^*$  είναι το αρχικό προϊόν της απορρόφησης φωτός. Οι φωτοευαίσθητες οξειδώσεις ενεργοποιούνται συνήθως από ευαίσθητοποιητή που βρίσκεται στην κατάσταση triplet  $^3\text{Sens}^*$ . Ισχύει η αντίδραση:

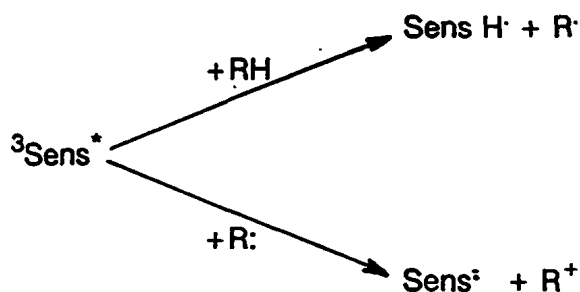


Οι πιο αποτελεσματικοί φωτοευαίσθητοποιητές είναι σε κατάσταση triplet με μεγάλο χρόνο ζωής. Στην κατηγορία αυτή ανήκουν: 1) χρωστικές (μπλέ του μεθυλίου, ερυθρό της Βεγγάλης, ηωσίνη) 2) φυσικές χρωστικές (χλωροφύλλη, αιμοτοπορφυρίνη, φλαβίνες κ.α.). 3) αρωματικοί υδρογονάνθρακες (ερυθρένιο και μερικά ανθρακένια). Το μεγαλύτερο μέρος των ουσιών αυτών απορροφά στο



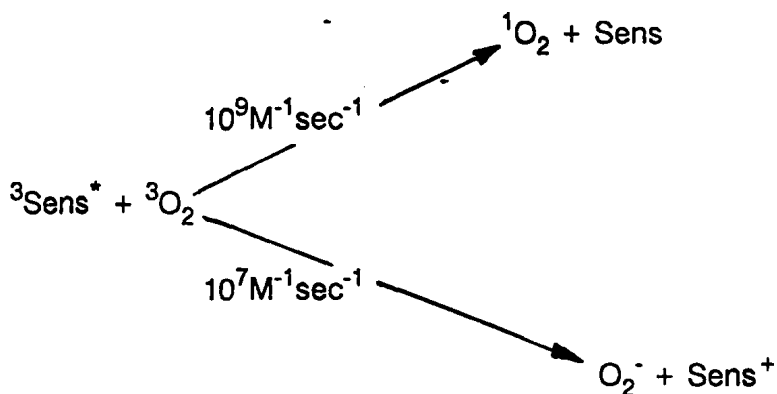
ορατό ή στο κοντινό υπεριώδες φάσμα.

Οι φωτοευαισθητοποιητές στην κατάσταση triplet  $^3\text{Sens}^*$  μπορούν να αντιδράσουν κατευθείαν με ένα άλλο μόριο προσλαμβάνοντας ένα ηλεκτρόνιο ή ένα άτομο υδρογόνου π.χ.



Αντίδραση μεταξύ φωτοευαισθητοποιητή και ενός οποιουδήποτε μορίου με μεταφορά ενός υδρογόνου ή ενός ηλεκτρονίου.

Οι ρίζες που σχηματίζονται αντιδρούν με οξυγόνο ή άλλα μόρια. Μία άλλη κατηγορία αντιδράσεων των φωτοευαισθητοποιητών στην κατάσταση triplet  $^3\text{Sens}^*$  είναι η αντίδραση των φωτοευαισθητοποιητών κατευθείαν με οξυγόνο, όπως παρακάτω:



Απευθείας αντίδραση μεταξύ φωτοευαισθητοποιητή και του οξυγόνου.

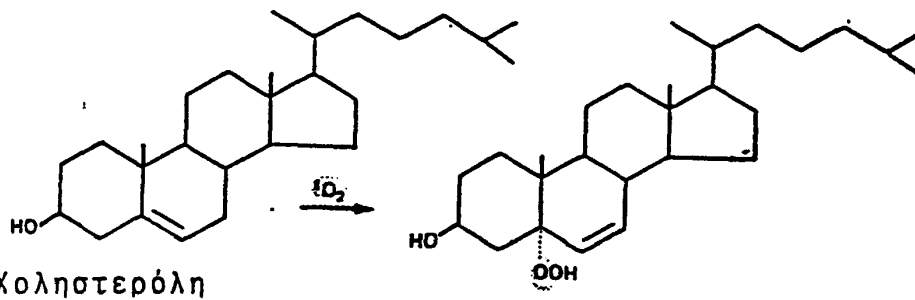
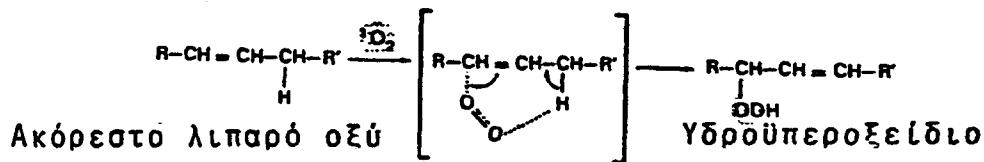
Στη δεύτερη περίπτωση αντιδράσεων παράγεται οξυγόνο Singlet  $^1\text{O}_2$ . Η αντίδραση είναι ταχύτερη. Με μικρότερη απόδοση της αντίδρασης (περίπου στο 1/100) είναι δυνατόν να συμβεί μεταφορά ενός ηλεκτρονίου από τον φωτοευαισθητοποιητή στο οξυγόνο το οποίο μετατρέπεται σε ρίζα υπεροξειδίου, ενώ ο φωτοευαισθητοποιητής οξειδώνεται.



### Αντιδράσεις του Οξυγόνου Singlet

Το Οξυγόνο Singlet αντιδρά με αρκετές κατηγορίες ενώσεων που έχουν βιολογικό ενδιαφέρον (66,67). Τέτοιες κατηγορίες είναι:

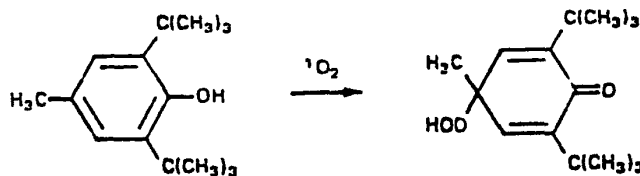
1. Ολεφίνες: Οι ολεφίνες αντιδρούν με το οξυγόνο Singlet και σχηματίζουν υδρουπεροξειδία. Παράδειγμα αντιδράσεων αυτού του τύπου είναι ο σχηματισμός υδρουπεροξειδίων από τα ακόρεστα λιπαρά οξέα και τη χοληστερίνη, όπως φαίνεται στην εικόνα 6.



Εικόνα 6:

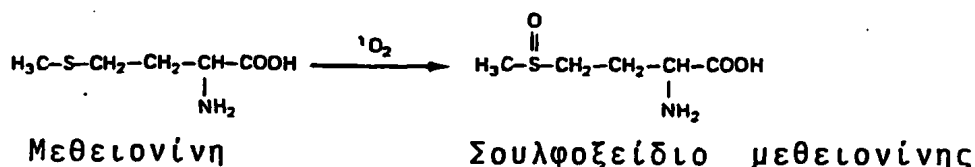
Σχηματισμός του υδρουπεροξειδίου, μέσω του οξυγόνου singlet, από πολυακόρεστο λιπαρό οξύ και χοληστερόλη.

2. Φαινόλες: Η ΒΗΤ (2,6-δι-τερβουτυλ-4-μεθυλφαινόλη) οξειδώνεται από το οξυγόνο Singlet σύμφωνα με την αντίδραση:

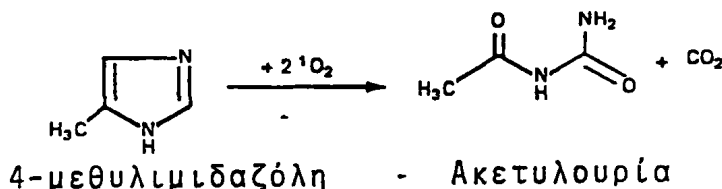




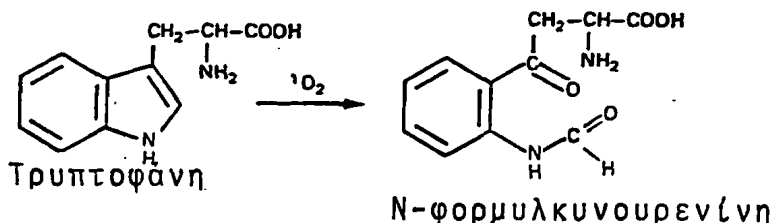
3. Αμινοξέα: Το οξυγόνο Singlet αν και δεν μπορεί ενεργειακά να σπάσει τον καρβοαμιδικό και τον δισουλφουρικό δεσμό, εν τούτοις αντιδρά με πολυάριθμα αμινοξέα, όπως: μεθειονίνη, ιστιδίνη, τρυπτοφάνη, τυροσίνη, κυστεΐνη. Για παράδειγμα η αντίδραση μεθειονίνης με οξυγόνο Singlet, ακολουθεί τον παρακάτω δρόμο και οδηγεί στην παραγωγή σουλφοξειδίου της μεθειονίνης:



Στην ιστιδίνη το οξυγόνο Singlet προκαλεί θραύση του ιμιδαζολικού δακτυλίου. Για παράδειγμα η 4-μεθυλ-ιμιδαζόλη μετατρέπεται σε ακετυλουρία.



Η τρυπτοφάνη αντιδρά με οξυγόνο Singlet σύμφωνα με την αντίδραση:



Η τυροσίνη αντιδρά με το οξυγόνο Singlet κατά ανάλογο τρόπο με τις φαινόλες. Η κυστεΐνη μετατρέπεται βραδέως σε κυστεϊνικό οξύ.

4. Νουκλειικά Οξέα: Οι πουρινικές και πυριμιδινικές βάσεις των νουκλειικών οξέων οξειδώνονται από το οξυγόνο Singlet με αποτέλεσμα το άνοιγμα του δακτυλίου.



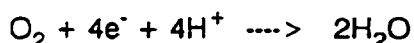
### **Βιοπαθολογικές Συνέπειες**

Η παραγωγή ελευθέρων ριζών μέσω του μηχανισμού φωτοχημικής αντίδρασης μπορεί να είναι αποτέλεσμα φωτοδυναμικών αντιδράσεων στον ανθρώπινο οργανισμό και σ' αυτό οφείλεται ένα μέρος των βλαβών που προκαλούνται σε ασθενείς που πάσχουν από πορφυρίες, νεογνικό ίκτερο (βρεφικό), απλό έρπητα, καθώς και σε άτομα που έχουν προσλάβει φωτοενεργοποιητικές ουσίες ποικίλης προέλευσης (π.χ. χρωστικές τροφών) και ορισμένα φάρμακα (66).

### **Βιολογικές Άμυνες στις Ελεύθερες Ρίζες και τα Παράγωγά τους**

#### **4.10 Βιολογικές Άμυνες στις Ενεργές Μορφές Οξυγόνου.**

Η επικινδυνότητα του οξυγόνου εξαρτάται από τις μορφές και τα προϊόντα του,  $O_2$ ,  $H_2O_2$ ,  $\cdot OH$ ,  $^1O_2$ , υδρουπεροξειδία  $ROOH$ , υπεροξυλικές ρίζες  $ROO\cdot$  και αλκοξυλικές ρίζες  $RO\cdot$ . Η άμυνα των κυτταρικών συστημάτων συνίσταται στην εξουδετέρωση και τον περιορισμό των ζημιογόνων μορίων, που προκύπτουν από ανεξέλεκτες αντιδράσεις μορφών οξυγόνου και προϊόντων του με άλλα μόρια του κυττάρου. Για παράδειγμα, η κυτοχρωμοξειδάση της μιτοχονδριακής αναπνευστικής αλυσίδας καταλύει την τετρασθενή αναγωγή του οξυγόνου σε νερό. Τα ηλεκτρόνια μεταφέρονται διαδοχικά, χωρίς οι ενδιάμεσες μερικώς αναχθείσες μορφές του οξυγόνου να αποσπώνται από το ένζυμο πριν την ολοκλήρωση της διαδικασίας κατά την αντίδραση.



Αλλα ένζυμα που πραγματοποιούν αυτή την αναγωγή του οξυγόνου είναι η τυροσινάση, η λακτάση και η ασκορβικοξειδάση.

Η χρησιμοποίηση του οξυγόνου εκ μέρους των αεροβίων οργανισμών ενέχει κίνδυνο δημιουργίας ενδιάμεσων τοξικών μορφών. Ένα σύνολο όμως ενζύμων και άλλων παραγόντων των οργανισμών αντιτίθεται στην τοξική δράση των μορφών αυτών, εξουδετερώνοντάς τες, καθώς παράγονται, ή διορθώνοντας τις βλάβες που προκαλούνται (66,67).

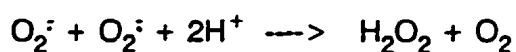
Η πρώτη άμυνα του οργανισμού επιτυγχάνεται από την Υπεροξειδίο Δισμουτάση (SOD), που εξουδετερώνει τη ρίζα υπεροξειδίο, και την καταλάση και τις υπεροξειδάσες που αποτοξινώνουν τα κύτταρα από το οξυγονούχο ύδωρ. Η δεύτερη άμυνα γίνεται από τα Αντιοξειδωτικά που καταστέλλουν τις αλυσιδωτές αντιδράσεις των ριζών και διακόπτουν την εξέλιξή τους (66,67,95).



#### 4.11 Υπεροξειδίο Δισμουτάση SOD

Το 1938 απομονώθηκε στο αίμα μια πρωτεΐνη που περιέχει χαλκό (Cu) και ονομάσθηκε αιμοκουπρείνη ή ερυθροκουπρείνη. Τότε η λειτουργία της δεν ήταν γνωστή. Τα επόμενα χρόνια απομονώθηκαν ανάλογες πρωτεΐνες, που περιέχουν χαλκό, σε διάφορα όργανα και ανάλογα με την προέλευσή τους ονομάσθηκαν ηπατοκουπρείνη, εγκεφαλοκουπρείνη κ.λ.π. Το 1969 ο Fridovich και άλλοι ερευνητές ανακάλυψαν ότι οι πρωτεΐνες αυτές έχουν την κοινή ιδιότητα να μετασχηματίζουν, με αντίδραση δισμεταλλαγής, το ανιόν υπεροξειδίο ( $O_2^-$ ) σε οξυγονούχο ύδωρ. Οι πρωτεΐνες αυτές καταχωρήθηκαν σε μία ομάδα με τον κοινό τίτλο Υπεροξειδίο Δισμουτάση (SOD). (96,97,98).

Η αντίδραση που καταλύει η SOD ομοιάζει με την αυθόρμητη δισμεταλλαγή του υπεροξειδίου (95,98).



Όμως, ενώ στην αυθόρμητη δισμεταλλαγή σχηματίζεται οξυγόνο Singlet, που είναι τοξικό, στην αντίδραση που καταλύει η SOD σχηματίζεται οξυγόνο triplet μη τοξικό. Η SOD αυξάνει κατά παράγοντα  $10^4$  την ταχύτητα δισμεταλλαγής. Επειδή η SOD υπάρχει στα κύτταρα σε συγκεντρώσεις πολύ μεγαλύτερες από τις φυσιολογικές συγκεντρώσεις του ανιόντος υπεροξειδίου  $O_2^-$  η πιθανότητα αντίδρασης μεταξύ δύο ανιόντων υπεροξειδίων είναι πολύ μικρότερη από την πιθανότητα αντίδρασης ανιόντος υπεροξειδίου και SOD. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα την παραγωγή μη τοξικού οξυγόνου triplet (99).

Η SOD βρίσκεται σε όλους τους αερόβιους οργανισμούς, φυτικούς και ζωικούς. Στα ζωικά κύτταρα εντοπίζεται στο κυτοσόλ και στα μιτοχόνδρια, απουσιάζει όμως από τα υπεροξεισώματα (66,67).

Η περιεκτικότητα ανθρωπίνων ιστών σε SOD (66) είναι:

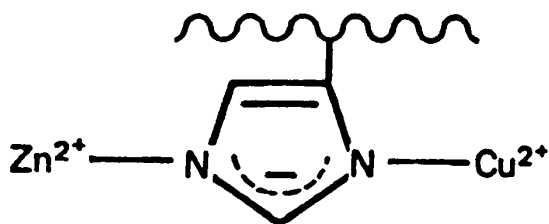
Ήπαρ	500 μg/gr
Ερυθρά αιμοσφαίρια	100 μg/ml
Πλάσμα αίματος	0.7 μg/ml
Εγκεφαλονωτιαίο υγρό	0.2 μg/ml
Αρθρικό υγρό	1.7 μg/ml
Υδατώδες σώμα	0.8 μg/ml

#### Κυτταροπλασματική SOD

Στο κυτταρόπλασμα του ευκαρυωτικού κυττάρου υπάρχει μία SOD με μοριακό βάρος 32.000 D. Αποτελείται από δύο όμοιες υπομονάδες, από τις οποίες η μία περιέχει ένα ιόν χαλκού  $Cu^{2+}$  και η άλλη ένα ιόν ψευδαργύρου  $Zn^{2+}$ . Τα δύο

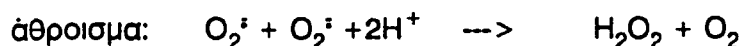
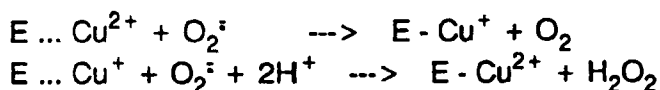


αυτά ιόντα συγκρατούνται με ένα ημιδαζολικό δακτύλιο μιάς ιστιδίνης της πρωτεϊνικής αλυσίδας (95), όπως φαίνεται στο παρακάτω σχήμα:



Το ιόν του χαλκού  $\text{Cu}^{2+}$  μπορεί να αντικατασταθεί από άλλα μέταλλα, ενώ το ιόν του ψευδαργύρου  $\text{Zn}^{2+}$  μπορεί να αντικατασταθεί από το  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Hg}^{2+}$  ή  $\text{Cd}^{2+}$  χωρίς απώλεια ιδιοτήτων της πρωτεΐνης.

Η SOD στο κυτταρόπλασμα αναστέλλεται από το κυάνιο που συνδέεται με το ιόν του χαλκού  $\text{Cu}^{2+}$ . Ο χαλκός δρα στη μεταφορά ηλεκτρονίων, ενώ ο ψευδάργυρος ενεργεί ως σταθεροποιητής του ενζύμου. Το ιόν του χαλκού που βρίσκεται στο ενεργό κέντρο της SOD ( $\text{E-Cu}^{2+}$ ) ανάγεται και οξειδώνεται διαδοχικά κατά τις αλληλεπιδράσεις με το ανιόν υπεροξειδίου, σύμφωνα με την αντίδραση (66,95):

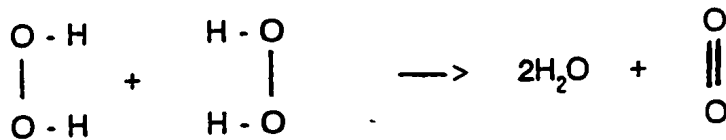


Η πρώτη αντίδραση οδηγεί στην οξείδωση του ανιόντος υπεροξειδίου σε οξυγόνο. Η δεύτερη το ανάγει σε οξυγονούχο ύδωρ.

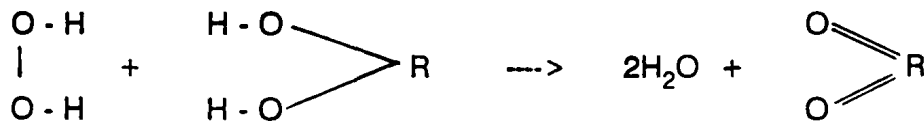
#### 4.12 Καταλάση - Υπεροξειδάσες

Η Καταλάση και η Υπεροξειδάση είναι ένζυμα που δεσμεύουν το οξυγονούχο ύδωρ. Η Καταλάση είναι μία πρωτεΐνη με μοριακό βάρος 250.000 και περιέχει 4 ομάδες αίμης με το σίδηρο στην τρισθενή του μορφή  $\text{Fe}^{3+}$ . Η δράση της είναι εμφανής στα ζωικά και στα φυτικά κύτταρα και στους μικροοργανισμούς με εξαίρεση τους αναερόβιους οργανισμούς. Έχει υψηλότερη ταχύτητα ανταλλαγής αντίδρασης με το οξυγονούχο ύδωρ ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) 44.000 moles  $\text{H}_2\text{O}_2$ , ανά sec, ανά mole ενζύμων, και εμποδίζει τη συγκέντρωσή του στο κύτταρο. Η διάσπαση του  $\text{H}_2\text{O}_2$  γίνεται με δύο μόρια, εκ των οποίων το ένα λειτουργεί σαν αναγωγικό υπόστρωμα και το άλλο σαν δέκτης ηλεκτρονίων (66,67):





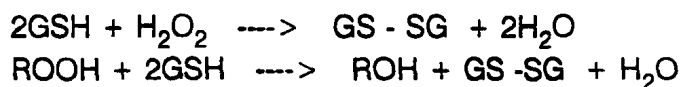
Ο μηχανισμός αυτός είναι όμοιος μ' εκείνον που έχει περιγραφεί για την υπεροξειδωση, όπου στο μέρος ενός μορίου  $\text{H}_2\text{O}_2$  υπάρχει ένα αναχθέν υπόστρωμα που δίνει τα αναγωγικά ισοδύναμα για το σχηματισμό ύδατος:



Η Καταλάση, παρά την έντονη αποτελεσματικότητα που εμφανίζει για την αποικοδόμηση υψηλών ποσοτήτων οξυγονούχου ύδατος ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), είναι αναποτελεσματική στην περίπτωση χαμηλών συγκεντρώσεων  $\text{H}_2\text{O}_2$ , εξ αιτίας της μεγάλης σταθεράς  $K$  για το  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Όταν υπάρχουν μεγάλες συγκεντρώσεις ορισμένων μεταβολιτών, όπως είναι η φορμαλδεύδης, οι αλκοόλες μικρού μοριακού βάρους ή μικρές συγκεντρώσεις υπεροξειδίων, η καταλάση δρα σαν υπεροξειδάση (100). Οι υπεροξειδάσες ενεργούν το ίδιο αποτοξινωτικά με την Καταλάση, αλλά είναι λιγότερο διαδεδομένες στους ζωικούς ιστούς.

### Υπεροξειδάσες

Μεταξύ των υπεροξειδασών σημαντική θέση έχει η Γλουταθειόνη υπεροξειδάση. Αυτή αδρανοποιεί το  $\text{H}_2\text{O}_2$  καθώς και άλλα υπεροξειδία, κατά την αντίδραση που ακολουθεί έχοντας σαν υπόστρωμα την αναχθείσα γλουταθειόνη (GSH):

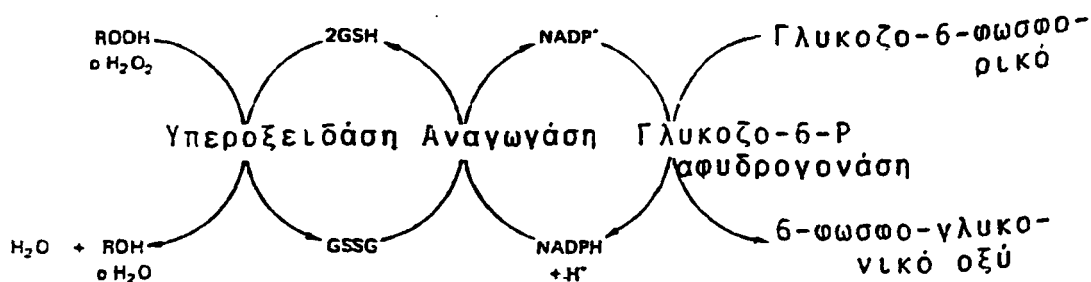


Η οξειδωθείσα γλουταθειόνη (GS-SG) μετατρέπεται σε αναχθείσα γλουταθειόνη GSH, μέσω ενός άλλου ενζύμου της NADPH- εξαρτημένης αναγωγάσης της γλουταθειόνης, όπως φαίνεται στην αντίδραση:



Η NADPH προέρχεται από την οξείδωση της 6-φωσφορικής γλυκόζης (G-6-P) εκ μέρους της γλυκοζο-6-P-αφυδρογονάσης. Οι αλληλεπιδράσεις των διαφόρων παραγόντων που παίρνουν μέρος στην αντίδραση φαίνονται στην εικόνα 7.





Εικόνα 7:

Σχέσεις μεταξύ της υπεροξειδάσης και της αναγωγάσης της γλουταθειόνης με την γλυκόζο-6-αφυδρογονάση, κατά την αποσύνθεση του υδροξυπεροξειδίου και του οξυγονούχου ύδατος.

Η Υπεροξειδάση της Γλουταθειόνης είναι ευρύτατα κατανεμημένη στα κύτταρα των θηλαστικών και είναι πιο ευέλικτο αποτοξινωτικό από την Καταλάση. Αυτό αποδεικνύεται από το γεγονός ότι άτομα που στερούνται γενετικά της Καταλάσης ζουν φυσιολογικά λόγω της παρουσίας της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης στα ερυθροκύτταρά τους. Η έλλειψη της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης στα ερυθροκύτταρα προδιαθέτει για αιμολυτική αναιμία, ενώ η απουσία του ενζύμου αυτού στα αιμοπετάλια προξενεί την θρομβοκυττοπενία του Glanzmann (67,101).

Η γλουταθειόνη υπεροξειδάση έχει μοριακό βάρος 84.000 D. Αποτελείται από 4 όμοιες υπομονάδες, κάθε μία από τις οποίες περιέχει ένα άτομο σελήνιου, συνδεδεμένο ομοιοπολικά με το αποένζυμο, ως σελήνιο-κυστείνη. Το σελήνιο είναι απαραίτητο για τη δραστηριότητα του ενζύμου. Έχει αποδειχθεί ότι επίμυες που τρέφονται με μία δίαιτα στερούμενη σελήνιου, παρουσιάζουν ελαττωμένη υπεροξειδική δραστηριότητα, που προξενεί μία σειρά συμπτωμάτων οφειλομένων στην υπεροξειδωση των ακορέστων λιπιδίων των κυτταρικών μεμβρανών (ευθραυστότητα των ερυθροκυττάρων, αιμόλυση) (101,102).

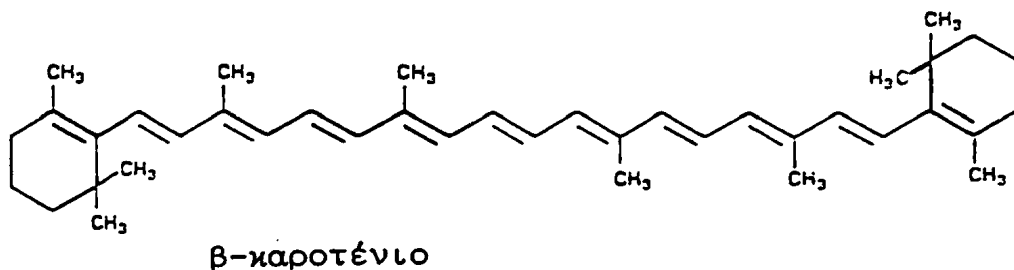
Στους φυτικούς ιστούς υπάρχουν πολυάριθμες υπεροξειδάσεις που ανιχνεύονται με τεχνητά υποστρώματα, όπως η Ο-διανισιδίνη και η γουαιακόλη. Για παράδειγμα, η υπεροξειδάση του ραφανίου, μοριακού βάρους 44.000, χρησιμοποιεί μία σειρά από φυσικά (NADH) και τεχνητά υποστρώματα (διυδροξυφουμαρικό, διθειοτροπόλη) με έναν μηχανισμό που οδηγεί ενδιάμεσα σε μια ελεύθερη ρίζα.



#### 4.13 Αμυντικοί Παράγοντες στο Οξυγόνο Singlet

Η άμυνα και στο οξυγόνο Singlet είναι δύο κατηγοριών. Συστήματα που εμποδίζουν τη δημιουργία του και συστήματα που το εξουδετερώνουν

Τα καροτινοειδή, που βρίσκονται στα φυτά, αλληλεπιδρούν αποτελεσματικά με το οξυγόνο Singlet. Η β καροτίνη μπορεί να απενεργοποιήσει το οξυγόνο Singlet με εξαιρετικά μεγάλη ταχύτητα  $K = 3 \cdot 10^{10} \text{M}^{-1} \text{sec}^{-1}$  χωρίς να τροποποιηθεί πρακτικά. Η διαδικασία περιορίζεται ουσιαστικά μόνο από τη διάχυση (67). Η ταχύτητα αποδιέγερσης "quenching" πολλών καροτενοειδών εξαρτάται από το μήκος της ανθρακικής αλυσίδας των καροτενοειδών και είναι μέγιστη όταν έχουμε στο μόριο έναν αριθμό διπλών δεσμών που εναλλάσσονται με απλούς δεσμούς μεταξύ των 11 και 19 ατόμων άνθρακα. Για μικρότερους αριθμούς εναλλαγών διπλών με απλούς δεσμούς, η ταχύτητα ελαττώνεται σημαντικά.



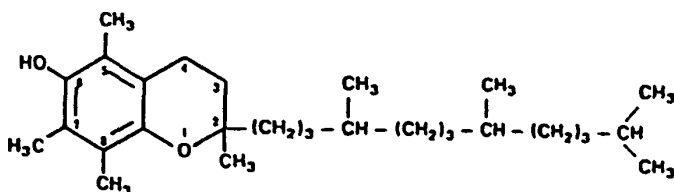
Η β - καροτίνη χορηγείται δια του στόματος σε ασθενείς, που παρουσιάζουν πορφυρίες από φωτοευαισθησία, και τους παρέχει αποτελεσματική προστασία. In vitro η β - καροτίνη αναστέλλει την φωτοαιμόλυση από διμεθυλγλωροτετρακυκλίνη και χλωροπρομαζίνη (66).

Η α-τοκοφερόλη (βιταμίνη E) καθώς και οι άλλες τοκοφερόλες έχουν αποτοξινωτική δράση έναντι του οξυγόνου Singlet. Η δράση της βιταμίνης E είναι διπλή. Μπορεί να αντιδράσει κατευθείαν με το οξυγόνο Singlet ή μπορεί να το απενεργοποιήσει χωρίς αντίδραση "quenching". Στην περίπτωση αντίδρασης της βιταμίνης E με το οξυγόνο Singlet σχηματίζεται μία υδρουπεροξυδιενόνη, που αποικοδομείται στη συνέχεια σε άλλα προϊόντα (103,104).

#### 4.14 Φυσικά Αντιοξειδωτικά

Η υπεροξειδίο-δισμουτάση, η καταλάση και οι υπεροξειδάσεις διατηρούν χαμηλές τις συγκεντρώσεις της ρίζας υπεροξειδίου και οξυγονούχο ύδατος. Γι' αυτό το λόγο τα ένζυμα αυτά θεωρούνται σαν η πρώτη άμυνα του οργανισμού. Τα αντιοξειδωτικά λειτουργούν σα δεύτερη άμυνα, μειώνοντας τη βλάβη που προκαλείται από υδροξυλικές και άλλες ρίζες ενδογενούς και εξωγενούς προέλευσης. Αντιδρούν με τις ελεύθερες ρίζες και σχηματίζουν προϊόντα που διακόπτουν τις αλυσιδωτές ριζικές αντιδράσεις.

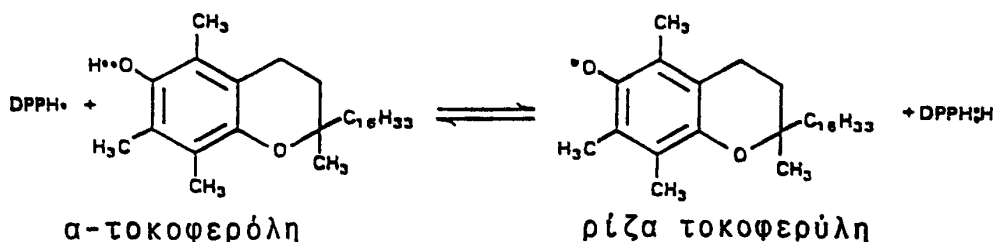
Οι τοκοφερόλες, που βρίσκονται κυρίως στις κυτταρικές μεμβράνες, αποτελούν τα κύρια φυσιολογικά αντιοξειδωτικά. Η πιο διαδεδομένη είναι η α-τοκοφερόλη με συντακτικό χημικό τύπο: (103,104).



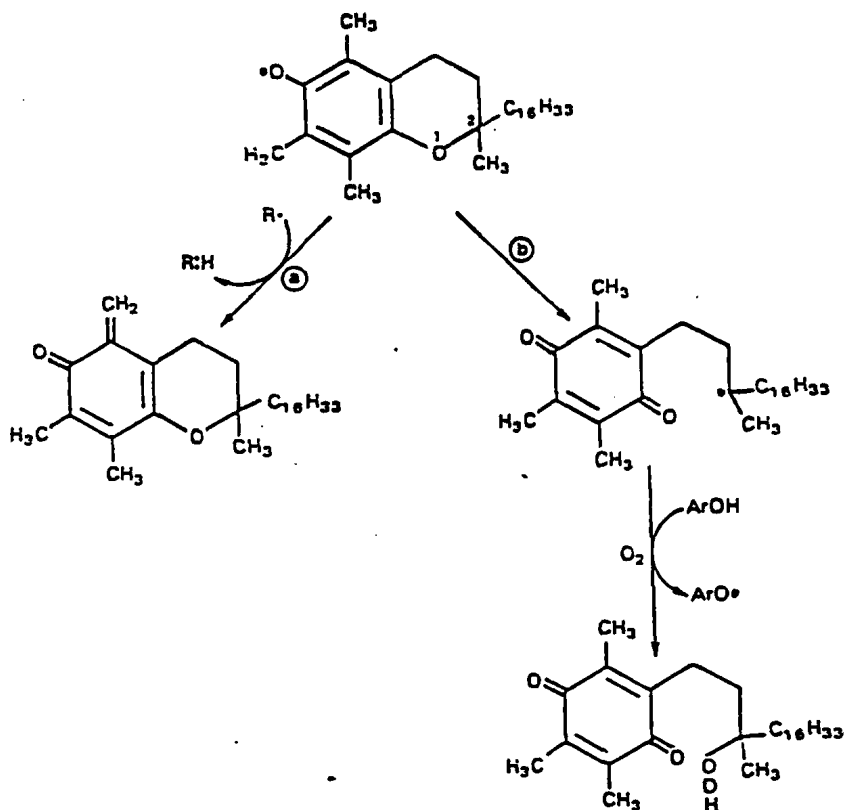
α - τοκοφερόλη (Βιτ. Ε)

#### Δράση "Scavenger" Βιταμίνης Ε

Σε αντιδράσεις με ελεύθερες ρίζες οι τοκοφερόλες είναι δότες ηλεκτρονίων. Για παράδειγμα η οξείδωση με την ελεύθερη ρίζα διφαινυλ-πικρυλ-υδραζίνη (DPPH) ή η φωτόλυση με υπέρυθρο φως, καθαρών ή διαλυμένων τοκοφερολών, δίνουν χαρακτηριστικά σήματα καταγράψιμα με φασματοσκοπία ESR. Τα σήματα αυτά προκύπτουν από τις τοκοφερυλικές ρίζες, που δημιουργούνται από την απόμάκρυνση ενός υδρογόνου από το υδροξύλιο της 6ης θέσης, και έχουν χρόνο ζωής σε θερμοκρασία δωματίου περίπου 10 min (66,67).

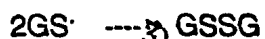
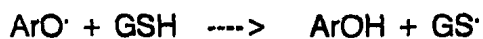






Εικόνα 8: Αντιδράσεις της τοκοφερυλικής ρίζας

Στην εικόνα 8 φαίνονται οξειδώσεις της τοκοφερυλικής ρίζας με άλλη ρίζα (R·) ή θραύση του δακτυλίου, οπότε σχηματίζεται ελεύθερη ρίζα στη θέση 2. Ακολούθως παρουσία οξυγόνου και υδρογόνου μετατρέπεται σε υδρουπεροξειδίο. Οι αντιδράσεις αυτές της τοκοφερυλικής ρίζας στους οργανισμούς περιορίζονται από αναγωγικά συστήματα, όπως αναχθείσα γλουταθειόνη και ασκορβικό οξύ και μετατρέπουν την τοκοφερυλική ρίζα σε τοκοφερόλη.



όπου ArO· η τοκοφερυλική ρίζα.



**Συνθετικά Αντιοξειδωτικά**

Είναι συνθετικές ουσίες με αντιοξειδωτική δράση. Χρησιμοποιούνται συνήθως σα συντηρητικά για διατήρηση λιπών, ελαίων, κονσερβών, φαρμάκων, προστασία βιταμίνης C, E και άλλων ουσιών που οξειδώνονται εύκολα. Μερικές από τις γνωστές συνθετικές αντιοξειδωτικές ουσίες είναι οι παρακάτω (66):

Βουτυλικό Υδροξυτολουένιο (BHT)  
 Βουτυλική Υδροξυανισόλη (BHA)  
 Νορ-διυδρο-γουαιαρετικό οξύ (NDGA)  
 Γαλλικό Προπύλιο  
 N-N -διφαινυλ-P-φαινυλένο-διαμίνη (DPPD)  
 6-διυδροξυ, 1-4-διμεθυλκαρβαζόλη

**4.15 Υπεροξειδωση Ακόρεστων Λιπιδίων και Αλλοιώσεις Βιολογικών Μembrανών****Γενικά χαρακτηριστικά της διαδικασίας της Λιπιδικής Υπεροξειδωσης**

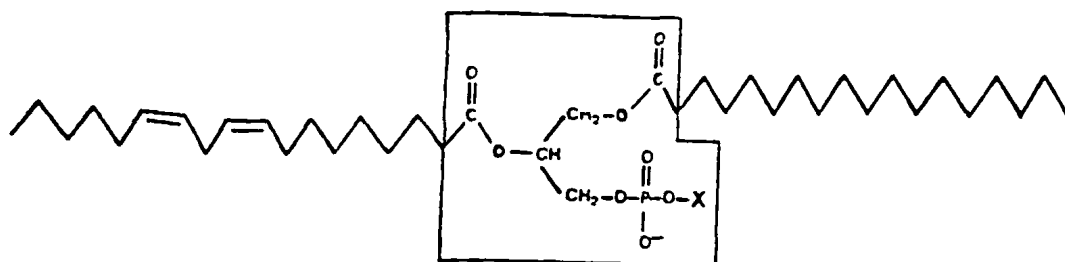
Το μοριακό οξυγόνο παίρνει μέρος στις αντιδράσεις μεταβολισμού κατά διάφορους τρόπους (105):

- α. Στην οξειδωση υδατανθράκων, λιπιδίων και ορισμένων αμινοξέων, το μοριακό οξυγόνο δρα σαν τελικός αποδέκτης ηλεκτρονίων, αντιδρώντας με την κυττοχρωμο-οξειδάση της μιτοχονδριακής αναπνευστικής αλυσίδας. Σ' αυτή την αντίδραση το οξυγόνο δημιουργεί νερό και δεν ενσωματώνεται σε ενδιάμεσους μεταβολίτες.
- β. Σε κατευθείαν αντιδράσεις με μεταβολίτες, φάρμακα ή ξένες ουσίες. Οι αντιδράσεις αυτές καταλύονται από τις δυοξυγονάσες, που δεσμεύουν δύο άτομα οξυγόνου και τις μονοξυγονάσες, που δεσμεύουν ένα άτομο οξυγόνου.
- γ. Σε βιολογικές ουσίες που οξειδώνονται εύκολα.

Τα φωσfolιπίδια των βιολογικών μεμβρανών είναι μόρια που αποτελούνται από ένα πολικό και ένα μη πολικό τμήμα. Υπάρχουν τέσσερις οικογένειες ακόρεστων λιπαρών οξέων, αντιπρόσωποι των οποίων είναι το παλμιτικό, το ολεικό, το λινολεϊκό και το λινολενικό οξύ.

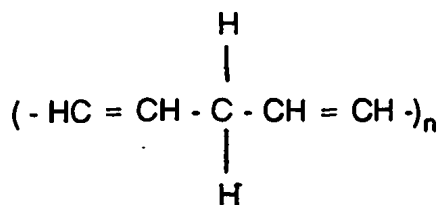
Στην παρακάτω εικόνα 9 φαίνεται η δομή ενός φωσfolιπιδίου. Η περιοχή μέσα στο τετράγωνο είναι το πολικό τμήμα (67).





Εικόνα 9: Γενική δομή ενός φωσφολιπιδίου στο οποίο διακρίνεται η πολική (τετράγωνο) από τη μη πολική περιοχή

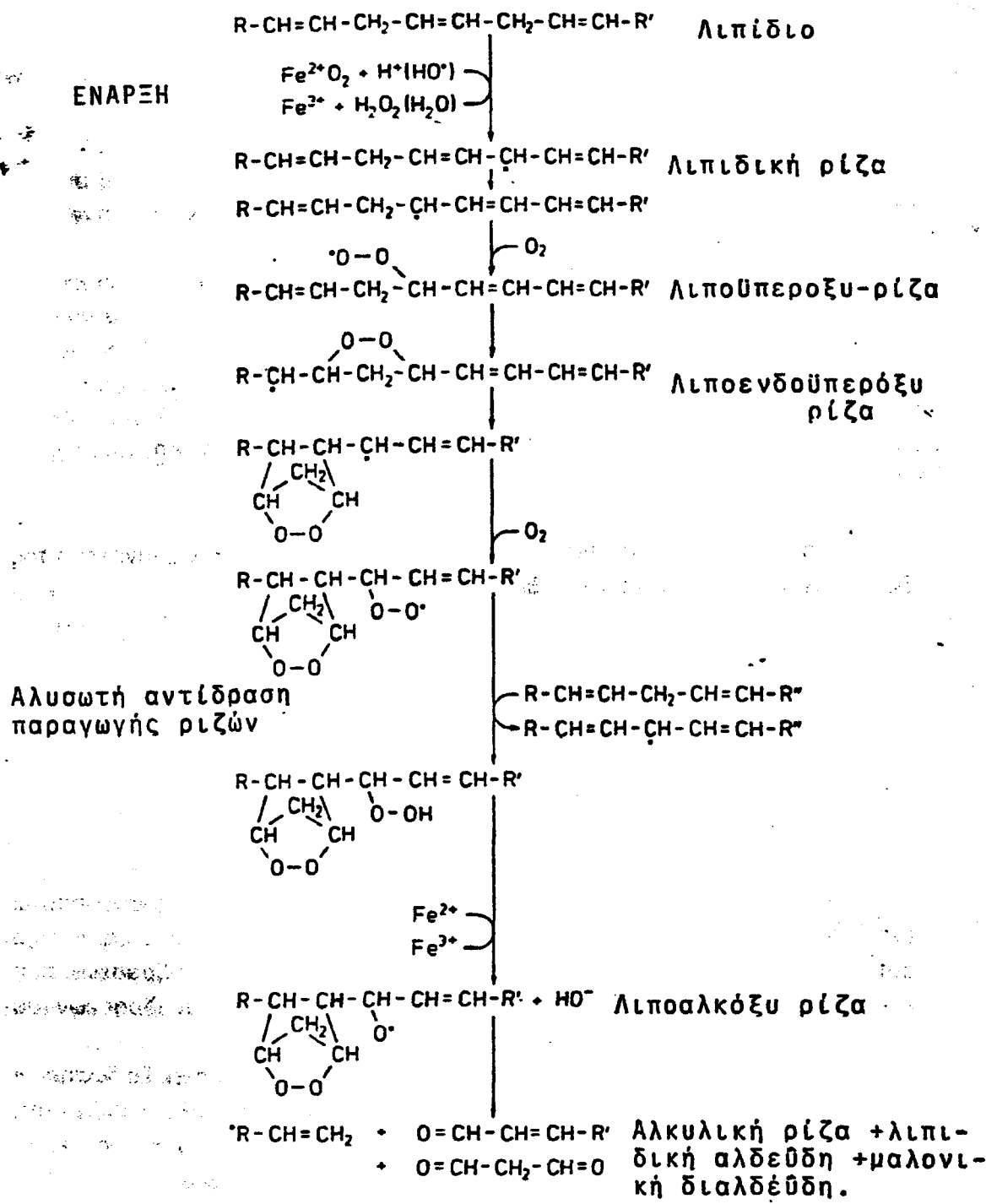
Τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα χαρακτηρίζονται από την επανάληψη της δομής *sis-cis* 1,4 πενταδιενικό ή διβινυλ-μεθάνιο:



Από τη μεθυλενική ομάδα της δομής αυτής είναι εύκολο να αποσπαστεί ένα άτομο υδρογόνου και να δημιουργηθεί μία ασταθής ελεύθερη ρίζα. Η ρίζα αυτή, παρουσία οξυγόνου, πυροδοτεί μία περίπλοκη αλυσίδα αντιδράσεων, που λέγεται λιπουπεροξειδωση (106). Χαρακτηριστικά παραδείγματα αντιδράσεων του τύπου αυτού φαίνονται στις εικόνες 10 και 11.

Στην εικόνα 12 φαίνεται ο γενικός μηχανισμός της λιπουπεροξειδωσης. Η σειρά αντιδράσεων αρχίζει από μία ελεύθερη ρίζα πυροδότη ( $R^{\cdot}$ ) Η ρίζα αυτή αποσπά ένα άτομο υδρογόνου και σχηματίζει μία ρίζα του λιπιδίου. Το λιπίδιο μετασχηματίζεται σε συνεζευγμένο διένιο και αντιδρά με μοριακό οξυγόνο. Από αυτή την αντίδραση σχηματίζεται μία υπεροξυλική ρίζα, που με τη σειρά της αντιδρά με ένα άλλο μόριο ακόρεστου λιπαρού οξέος, για να ακολουθήσει η ίδια διαδικασία. Τελικά σχηματίζονται ένα υδρουπεροξειδίο και μία νέα ρίζα του πολυακόρεστου λιπαρού οξέος που συνεχίζει την ίδια αλυσίδα των αντιδράσεων (105).



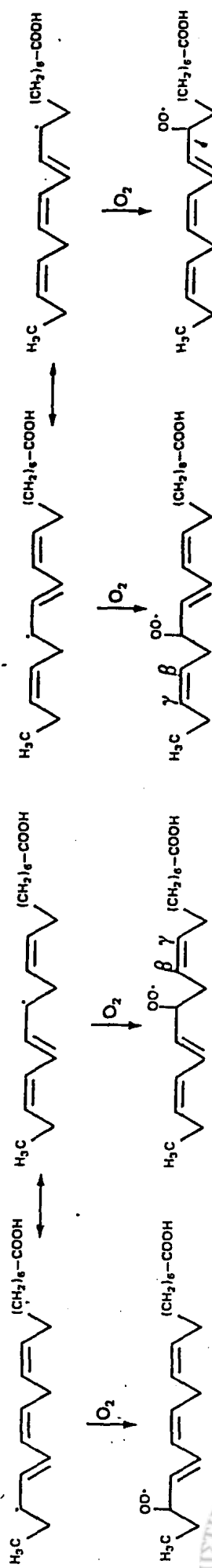
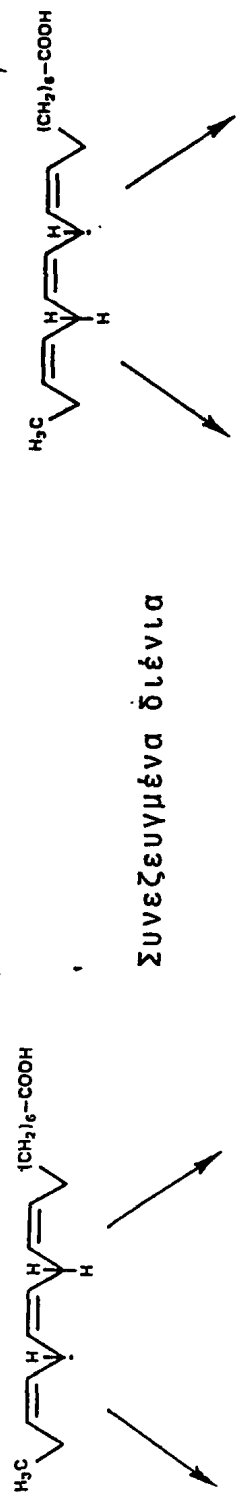
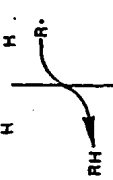
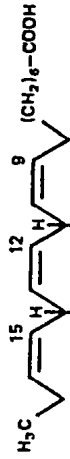


Εικόνα 10

Σχηματική παρουσίαση των αντιδράσεων σχηματισμού μαλονικής διαλδεϋδης κατά την υπεροξειδωση των λιπών.  
 (Από Sies H: Oxidative stress. Academic Press, p.280, 1985)



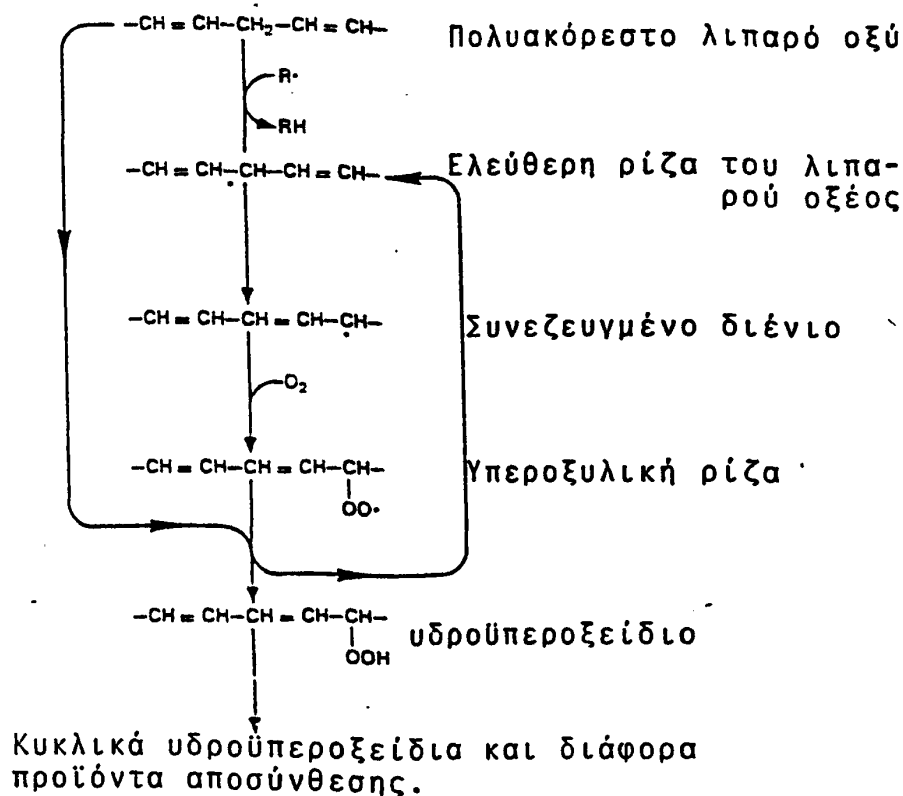
ΛΙΝΟΛΕΝΙΚΟ ΟΞΥ



Εικόνα 11:

Σχηματισμός υπεροξυλικών ριζών κατά την αυτοξειδωση του λινολενικού οξέος





Εικόνα 12:

Αλυσίδα αντιδράσεων παραγωγής ριζών στην λιπιδική υπεροξειδωση

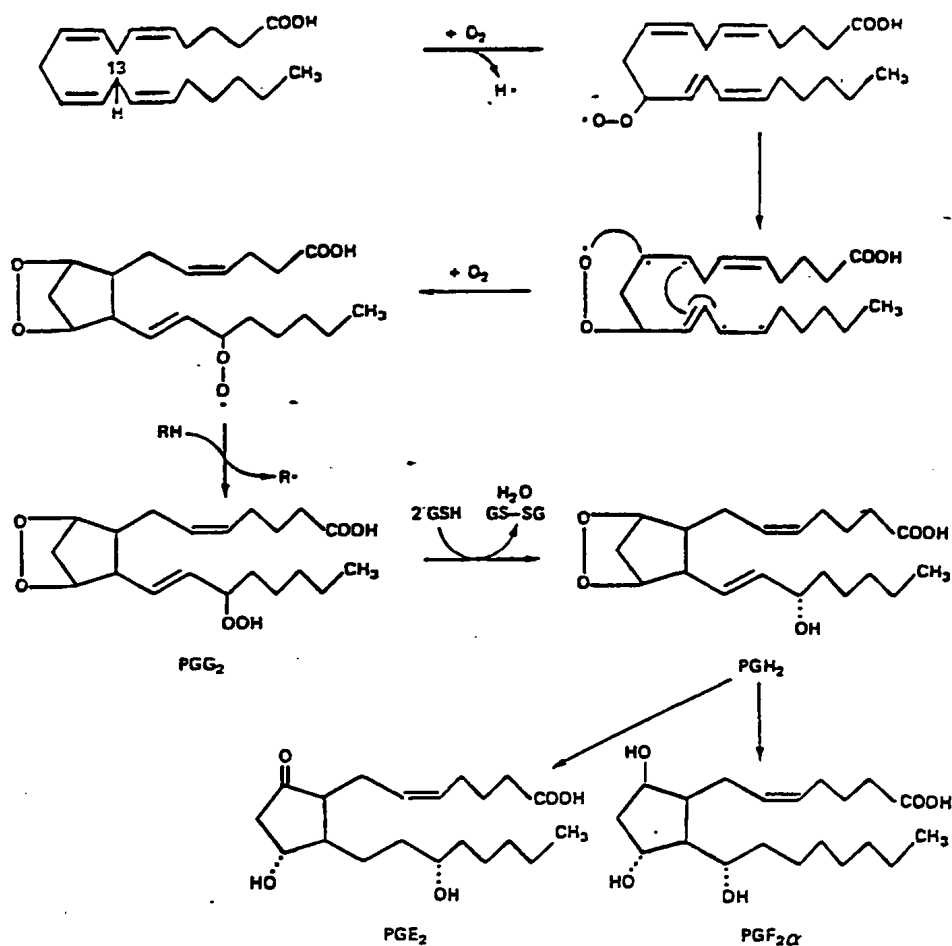
**Ενζυματική Λιπυπεροξειδωση (Σχηματισμός Προσταγλανδινών)**

Μία κατηγορία ενώσεων που προκύπτουν από λιπυπεροξειδωση ακόρεστων λιπαρών οξέων είναι οι Προσταγλανδίνες. Το εικοσιτριενικό οξύ είναι ο πρόδρομος των προσταγλανδινών  $\text{PGE}_1$  και  $\text{PGF}_{1a}$ . Το αραχιδονικό οξύ (AA) είναι ο πρόδρομος των  $\text{PGE}_2$  και  $\text{PGF}_{2a}$  και το εικοσιπεντενικό οξύ των  $\text{PGE}_3$  και  $\text{PGF}_{3a}$ . Η σύνθεση των προσταγλανδινών καταλύεται από ένα σύμπλεγμα ενζύμων που βρίσκεται στις μεμβράνες των μικροσωμάτων και ονομάζεται Συνθετάση-Προσταγλανδινών (107,108,109).

Η αντίδραση ξεκινά με την απόσπαση ενός ατόμου υδρογόνου από τη θέση 13 της αλυσίδας του αραχιδονικού οξέος. Η ελεύθερη ρίζα που



σχηματίζεται αντιδρά με μοριακό οξυγόνο και σχηματίζεται μία υπεροξυλική ρίζα. Η ρίζα αυτή κυκλοποιείται και σχηματίζεται ένα ενδοπεροξειδίο, που ονομάζεται  $\text{PGG}_2$ . Το ένζυμο του συμπλέγματος προσταγλανδίνη-συνθετάση, που καταλύει την αντίδραση μέχρι το σχηματισμό του ενδοπεροξειδίου  $\text{PGG}_2$  λέγεται κυκλοξυγονάση. Το ενδοπεροξειδίο  $\text{PGG}_2$ , παρουσία Γλουταθειόνης (GSH) μετατρέπεται σε  $\text{PGH}_2$  με τελικά προϊόντα τις προσταγλανδίνες  $\text{PGE}_2$  και  $\text{PGF}_{2\alpha}$ . Η αντίδραση φαίνεται στο παρακάτω σχήμα (110):



### Μηχανισμός βιοσύνθεσης προσταγλανδινών



### **Παραγωγή Ελευθέρων Ριζών στον Ανθρώπινο Οργανισμό**

Τα κύτταρα του ανθρώπινου οργανισμού μπορούν να παράγουν ελεύθερες ρίζες με πολλούς τρόπους.

Οι συχνότερες πηγές παραγωγής ελευθέρων ριζών στον ανθρώπινο οργανισμό φαίνονται στον παρακάτω πίνακα:

#### Ενδογενείς Πηγές

- Αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων στα μιτοχόνδρια
- Αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων στα μικροσωμάτια
- Αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων στους χλωροπλάστες
- Οξειδωτικά ένζυμα

Οξειδάση της ξανθίνης  
διοξυγονάση της τρυπτοφάνης  
διοξυγονάση της ινδολεαμίνης  
κυκλοξυγονάση  
λιποξυγονάση  
μονοαμινοξειδάσεις

- Κύτταρα που φαγοκυττώνουν
  - ουδετερόφιλα
  - μονοκύτταρα και μακροφάγα
  - ηωσινόφιλα
  - ενδοθηλιακά κύτταρα
- Αυτοξειδωτικές αντιδράσεις (π.χ.  $Fe^{2+}$ , επινεφρίνη)

#### Εξωγενείς Παράγοντες

- Ουσίες ανακύκλωσης του Redox (π.χ. Paraquat, Diquat, αλλοξάνη, δοξορουμπίνη).
- Οξειδώσεις φαρμάκων (π.χ. Παρακεταμόλη,  $CCl_4$ )
- Κάπνισμα
- Ιονίζουσα ακτινοβολία
- Ηλιακή ακτινοβολία
- Θερμικό Shock
- Ουσίες που οξειδώνουν τη γλουταθειόνη

(Από Cross C.E. και συν. Annals of Int. Med. p 528, 1987)



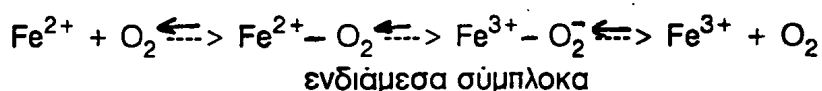


### Μέταλλα Μετάπτωσης

Όλα τα μέταλλα της πρώτης σειράς του συμπλέγματος d του Περιοδικού Συστήματος περιέχουν ασύζευκτα ηλεκτρόνια και μπορούν επομένως να θεωρηθούν σα ρίζες, εκτός από τον ψευδάργυρο (66).

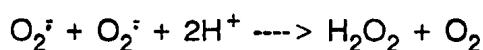
Το πιο σημαντικό χαρακτηριστικό, από την άποψη της ρίζας, των μετάλλων αυτών είναι το ποικίλο σθένος τους, το οποίο τους επιτρέπει να υφίστανται μεταβολές της οξειδωτικής τους κατάστασης με τη συμμετοχή ενός ηλεκτρονίου.

Για παράδειγμα ο Fe έχει δύο κοινά σθένη Fe(II) και Fe(III). Σε διαλύματα παρουσία αέρα η κατάσταση Fe(III) είναι πιό σταθερή, ενώ τα άλατα Fe(II) είναι ασθενώς αναγωγικά και οι φερυλικές ενώσεις είναι ισχυρά οξειδωτικά. Εάν ένα διάλυμα άλατος Fe(II), π.χ. θειικός σίδηρος ( $\text{FeSO}_4$ ) εκτεθεί στον αέρα, οξειδώνεται βραδέως σε Fe(III). Αυτή είναι μία οξειδωση ενός ηλεκτρονίου και το ηλεκτρόνιο μέσα στο διάλυμα ανάγεται σε ρίζα υπεροξειδίου  $\text{O}_2^-$ . (67,111,112,113).



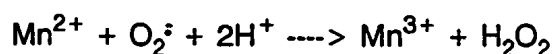
Ο χαλκός (Cu) έχει δύο κοινά σθένη Cu(I) και Cu(II). Αυτή η διαφορά ενός ηλεκτρονίου μεταξύ των δύο καταστάσεων, επιτρέπει στο χαλκό να παίρνει μέρος σε αντιδράσεις παραγωγής ριζών. Υπό κατάλληλες συνθήκες τα άλατα του χαλκού μπορούν είτε να δέχονται είτε να δίνουν ηλεκτρόνια στη ρίζα υπεροξειδίου ( $\text{O}_2^-$ ) (66,114).

Η συνήθης αντίδραση είναι:



στην οποία ο χαλκός λειτουργεί ως καταλύτης που επιταχύνει την αντίδραση. Όπως ο χαλκός, έτσι και άλλα μέταλλα μετάπτωσης καταλύουν πολλές οξειδο-αναγωγικές αντιδράσεις και γι' αυτό αποτελούν συχνά τα ενεργά κέντρα πολλών ενζύμων που καταλύουν τέτοιες αντιδράσεις.

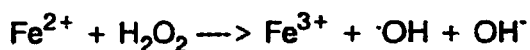
Το μαγγάνιο (Mn) εμφανίζει τη σταθερότερη κατάστασή του σε υδατικά διαλύματα σαν  $\text{Mn}^{2+}$  [Mn(II)]. Πιο οξειδωτικές καταστάσεις του θεωρούνται οι Mn(III), Mn(IV) και Mn(VII) (66). Το μαγγάνιο συμμετέχει σε αντιδράσεις παραγωγής ριζών, π.χ.



Αντιθέτως ο ψευδάργυρος, που έχει μόνο ένα σθένος ( $Zn^{2+}$ ), δεν προάγει αντιδράσεις ριζών και επιπλέον ο ψευδάργυρος θεωρείται ότι μπορεί να αναστείλει μερικές αντιδράσεις ριζών, in vivo, εκτοπίζοντας άλλα μέταλλα μετάπτωσης, όπως το σίδηρο από θέσεις που προάγουν τέτοιες αντιδράσεις.

### Αντίδραση Fenton

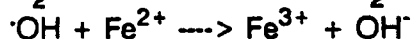
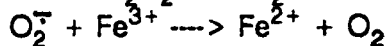
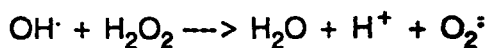
Ο Fenton το 1894 διαπίστωσε ότι ένα μίγμα υπεροξειδίου του υδρογόνου και αλάτων  $Fe(II)$  μπορεί να αντιδράσει με πολλά οργανικά μόρια, μέσω της παραγωγής κυρίως ρίζας υδροξυλίου: (90,111,66,67).



Ιχνη  $Fe^{3+}$  μπορεί στη συνέχεια να αντιδράσουν με  $H_2O_2$

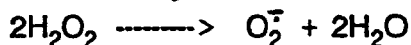


Επιπλέον μπορεί να συμβούν οι παρακάτω αντιδράσεις

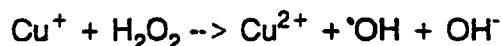


Έτσι αυτό το απλό μίγμα αλάτων σιδήρου και υπεροξειδίου του υδρογόνου, το οποίο δημιουργείται υπό ορισμένες συνθήκες στα βιολογικά συστήματα μπορεί να προκαλέσει μια σειρά ριζικών αντιδράσεων. Το τελικό αποτέλεσμα αυτών των αντιδράσεων, εάν δεν προστεθεί κάποιο αντιδοτο, είναι μια σιδηροκαταλυόμενη διάσπαση του υπεροξειδίου του υδρογόνου.

άλας Fe



Αλλα στοιχεία, όπως π.χ. ο  $Cu(I)$ , εάν είναι παρόντα, μπορεί να αντιδράσουν με ποικίλες ρίζες και να μεταβάλουν το μηχανισμό της αντίδρασης π.χ.



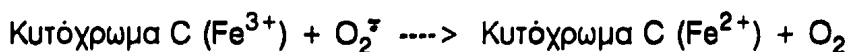
## ΜΕΘΟΔΟΙ ΕΠΙΣΗΜΑΝΣΗΣ ΚΑΙ ΜΕΛΕΤΗΣ ΕΛΕΥΘΕΡΩΝ ΡΙΖΩΝ

Υπάρχουν ουσίες που δεσμεύουν ελεύθερες ρίζες και αναστέλλουν τις αντιδράσεις τους. Οι ουσίες αυτές λέγονται "Αναστολείς", "Δεσμευτές" ή "Εκκαθαριστές" ελευθέρων ριζών (traps, scavengers). Αν χρησιμοποιήσουμε αναστολείς σε μία χημική αντίδραση και διαπιστώσουμε ότι μειώνεται η ταχύτητά της, συμπεραίνουμε ότι η αντίδραση εξελίσσεται με συμμετοχή ελευθέρων ριζών, στα διάφορα στάδιά της. Ορισμένοι αναστολείς έχουν την ικανότητα να δεσμεύουν επιλεκτικά ορισμένες ρίζες. Οι ειδικοί αυτοί αναστολείς θα μας δώσουν συμπεράσματα για το συγκεκριμένο είδος των ριζών που επιλεκτικά δεσμεύουν (66,67).

Ενας άλλος τρόπος προσδιορισμού ορισμένων ελευθέρων ριζών είναι η φασματοφωτομετρία. Ορισμένες ελεύθερες ρίζες είναι έγχρωμες και αποχρωματίζονται από τη δράση άλλων ελευθέρων ριζών. Έτσι μπορούμε με το φασματοφωτόμετρο να δούμε τη μεταβολή του χρώματος και να συμπεράνουμε για το είδος της χημικής αντίδρασης (115,116,117). Για παράδειγμα, το Διφαινυλπικρυλυδραζόλιο (DPPH) είναι μία σταθερή ρίζα και σε οργανικούς διαλύτες δίνει ένα έντονο βιολετί χρώμα. Όταν το DPPH δεσμεύει μία άλλη ρίζα, ελαττώνεται η ένταση του χρώματος και αυτό μπορεί να μετρηθεί με το φασματοφωτόμετρο στα 517 nm.

Μία μέθοδος προσδιορισμού του ανιόντος υπεροξειδίου  $O_2^{\cdot -}$  είναι η μέθοδος αναγωγής του κυτόχρωματος C, που μελετάται φωτομετρικά στα 550 nm.

Ισχύει η αντίδραση:



Αν αυξάνει η απορρόφηση έχουμε αναγωγή του κυτόχρωματος C και επομένως παραγωγή ανιόντος υπεροξειδίου. (Για να αποκλειστεί αναγωγή του κυτόχρωματος C από οτιδήποτε άλλο, στην ίδια αντίδραση προστίθεται δισμουτάση του υπεροξειδίου SOD, η οποία πρέπει να αναστείλει την αναγωγή από το ανιόν υπεροξειδίου).

Η κατεξοχήν μέθοδος προσδιορισμού και μελέτης των ελευθέρων ριζών είναι η μέθοδος του ηλεκτρονικού παραμαγνητικού συντονισμού (E.P.R) γνωστή και σαν μέθοδος ηλεκτρονικού συντονισμού σπιν (E.S.R). Η μέθοδος αυτή στηρίζεται στις παραμαγνητικές ιδιότητες των ελευθέρων ριζών λόγω του ασύζευκτου ηλεκτρονίου τους (118,119,120,121,122,123,124,125,126,127).



### Φασματοσκοπία Ηλεκτρονικού Παραμαγνητικού Συντονισμού ESR

Κάθε φορτισμένο σωματίδιο που περιφέρεται σε τροχιά συμπεριφέρεται σε μαγνήτης με τους πόλους κατά μήκος του άξονα περιστροφής και εμφανίζει μαγνητική ροπή. Αυτό ισχύει και για τα ηλεκτρόνια στα άτομα και τα μόρια. Στις τροχιές τους τα ηλεκτρόνια σχηματίζουν ζεύγη με αντίθετα spin και τα μαγνητικά τους διπολα αλληλοσυναιρούνται. Τα μόρια αυτά δεν εμφανίζουν μαγνητικές ιδιότητες (Διαμαγνητικά υλικά). Όταν όμως το μόριο περιέχει περιττό αριθμό ηλεκτρονίων (π.χ. NO, NO<sub>2</sub>) ή ασύζευκτο ηλεκτρόνιο (ελεύθερη ρίζα), τότε εμφανίζεται μαγνητική ροπή και το μόριο είναι παραμαγνητικό. Τις ιδιότητες των παραμαγνητικών μορίων μπορούμε να τις μελετήσουμε με τη φασματοσκοπία ηλεκτρονικού παραμαγνητικού συντονισμού, ESR, που ονομάζεται και φασματοσκοπία ηλεκτρονικού συντονισμού του spin, ESR.

Με τη φασματοσκοπία αυτή παρατηρούμε μεταβάσεις, μεταξύ των διαφόρων κβαντικών ενεργειακών καταστάσεων, της μαγνητικής ροπής ενός ασύζευκτου ηλεκτρονίου, μέσα σ' ένα εφαρμοζόμενο εξωτερικό μαγνητικό πεδίο. Το προς εξέταση δείγμα φέρεται σε αντηχείο μικροκυμάτων εντός του εφαρμοζόμενου εξωτερικού μαγνητικού πεδίου. Κατά την εξέταση γίνεται σάρωση της έντασης του μαγνητικού πεδίου και οι ενεργειακές μεταβάσεις των ηλεκτρονίων καταγράφονται ως η πρώτη παράγωγος της έντασης απορρόφησης των μικροκυμάτων.

Το μέτρο  $\mu$  της τροχιακής διπολικής μαγνητικής ροπής είναι ίσο με το γινόμενο του κυκλοφορούντος ρεύματος επί την επιφάνεια της κυκλικής τροχιάς (118,119,120,121) και για το ηλεκτρόνιο είναι:  $\mu_L = (e/2m) \cdot L$

όπου  $e$  το φορτίο,  $m$  η μάζα και  $L$  η στροφορμή του ηλεκτρονίου.

Όταν το ηλεκτρόνιο βρεθεί σε μαγνητικό πεδίο έντασης  $H$ , θα έχει ενέργεια

$$E = g\beta HS$$

όπου  $\beta = (e/2m) \cdot (h/2\pi) = 9.27 \times 10^{-24}$  Joules/Tesla είναι η μαγνητόνη του Bohr

$h = 6.63 \times 10^{-34}$  Joules.sec είναι η σταθερά Planck

$S = \pm 1/2$  είναι ο κβαντικός αριθμός του spin

$g = 1 + [J(j+1) + S(S+1) - I(I+1)] / [2j(j+1)]$  είναι ο παράγοντας Lande με τιμή κοντά στο 2.

$j$  είναι ο κβαντικός αριθμός της ολικής στροφορμής

$I$  είναι ο κβαντικός αριθμός της στροφορμής.

Από τα πειραματικά αποτελέσματα υπολογίζεται η ακριβής τιμή του  $g$ , η οποία μας δίνει πληροφορίες για το είδος της ελεύθερης ρίζας που ανιχνεύθηκε.

Το ασύζευκτο ηλεκτρόνιο της ελεύθερης ρίζας θα βρίσκεται είτε στην ενεργειακή κατάσταση  $E_{1/2} = g\beta H/2$  είτε στην κατάσταση  $E_{-1/2} = -g\beta H/2$ .

Στις δύο αυτές καταστάσεις τα ηλεκτρόνια κατανέμονται κατά Boltzmann (121,122) και για τους δύο πληθυσμούς ισχύει η έκφραση



$$N_{1/2}/N_{-1/2} = e^{-h\nu/KT} = 1 - h\nu/KT$$

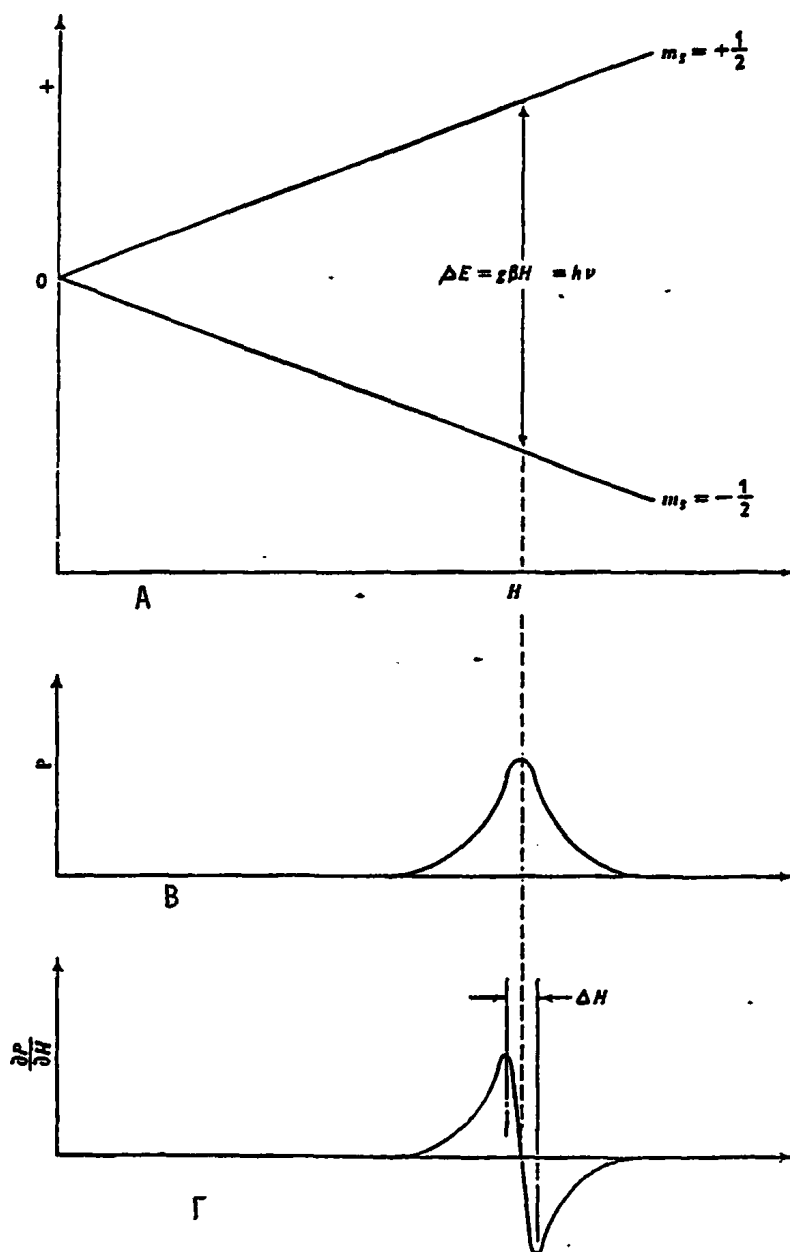
όπου  $N$  είναι ο αριθμός ασύζευκτων ηλεκτρονίων σε κάθε κατάσταση,

$K$  είναι η σταθερά Boltzmann και  $T$  είναι η απόλυτη θερμοκρασία.

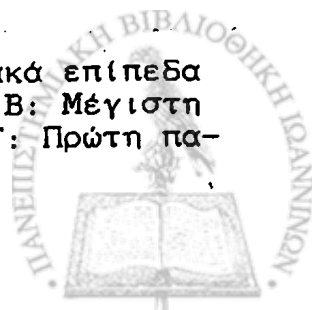
Στην περίπτωση συντονισμού έχουμε μετάβαση από τη μία ενεργειακή κατάσταση στην άλλη με απορρόφηση ενέργειας

$$\Delta E = E_{1/2} - E_{-1/2} \Rightarrow \Delta E = g\beta H = h\nu$$

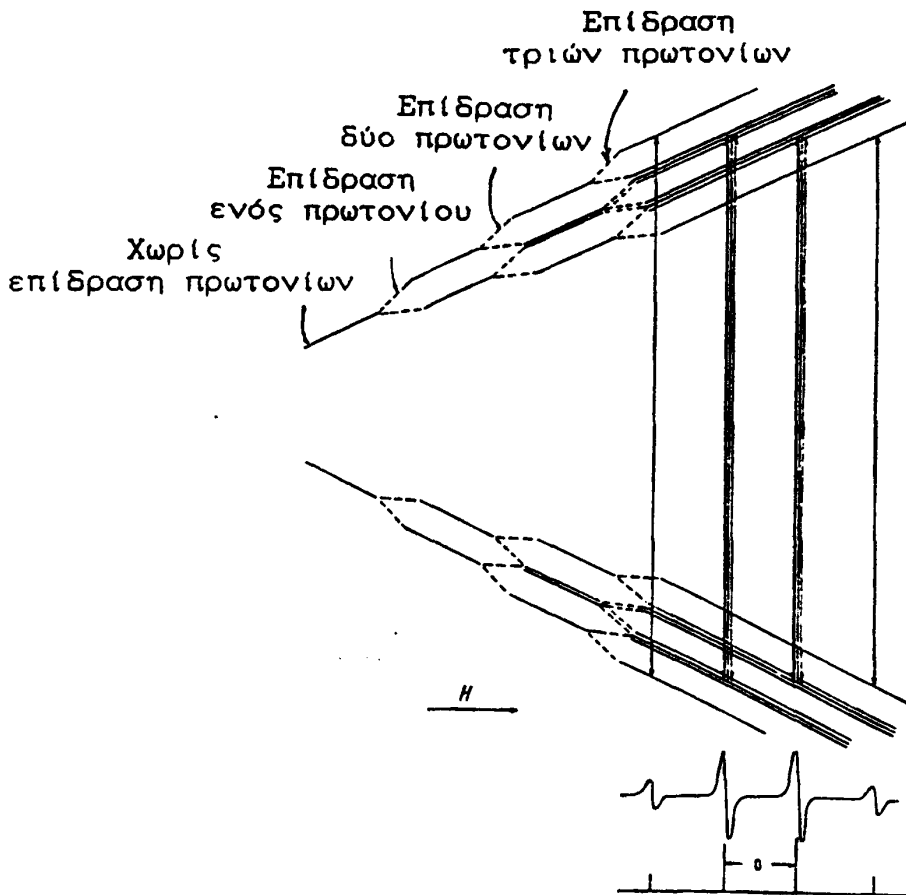
Η ενεργειακή μετάβαση του ηλεκτρονίου καθώς και το αντίστοιχο καταγραφόμενο σήμα φαίνονται στην εικόνα που ακολουθεί.



Ενεργειακά επίπεδα και φάσματα ESR. Α: Ενεργειακά επίπεδα ενός ασύζευκτου ηλεκτρονίου σε μαγνητικό πεδίο. Β: Μέγιστη ένταση απορρόφησης στην κατάσταση συντονισμού. Γ: Πρώτη παράγωγος της έντασης απορρόφησης.



Εκτός όμως από τη μετάβαση του ηλεκτρονίου από τη μία στην άλλη ενεργειακή κατάσταση, στο καταγραφόμενο σήμα παρατηρούμε περισσότερες από μία φασματικές γραμμές, που οφείλονται είτε στην αλληλεπίδραση του εσωτερικού μαγνητικού πεδίου του ατόμου με το spin του ηλεκτρονίου (Λεπτή, Υπέρλεπτη υφή), είτε σε επίδραση ασθενούς εξωτερικού πεδίου με την ολική μαγνητική διπολική ροπή του ατόμου (φαινόμενο Zeeman) (118,120,121). Ένα τέτοιο παράδειγμα φαίνεται στο παρακάτω σχήμα.



Ενεργειακά επίπεδα μιας ελεύθερης ρίζας με επίδραση τριών ισοδυνάμων πρωτονίων. Κάθε πρωτόνιο διαιρεί το ενεργειακό επίπεδο σε δύο. Οι κάθετες γραμμές δείχνουν τις ενεργειακές μεταπτώσεις στην κατάσταση συντονισμού.

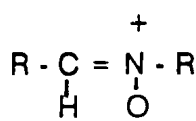
### **Εφαρμογές του Ηλεκτρονικού Παραμαγνητικού Συντονισμού ESR στα Βιολογικά Συστήματα**

Η μέθοδος ανίχνευσης - καταγραφής του ηλεκτρονικού παραμαγνητικού

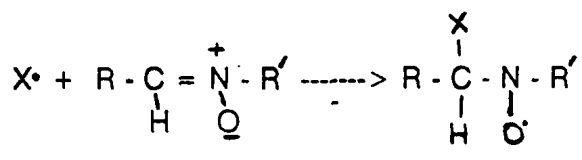


συντονισμού έχει βρει μεγάλη εφαρμογή σε έρευνες στη βιολογία (120). Χρησιμοποιείται με αρκετή επιτυχία για τον έλεγχο της παραγωγής ελεύθερων ριζών και τον καθορισμό του είδους τους από διάφορα κύτταρα, ιστούς και ενζυμικές αντιδράσεις (123,124,125,126,296).

Για τον έλεγχο αυτό δεδομένου ότι οι ελεύθερες ρίζες έχουν συνήθως πολύ μικρή διάρκεια ζωής χρησιμοποιούνται κυρίως διάφορες χημικές ουσίες, οι οποίες έχουν την ιδιότητα να παγιδεύουν τις φευγαλέες ελεύθερες ρίζες (spin trappers) και να σχηματίζουν με τους "παγιδευτές" αυτούς νέες ρίζες, οι οποίες είναι μακρόβιες και έχουν χαρακτηριστικά φάσματα ανίχνευσης. Οι πιο χρήσιμοι για τα βιολογικά συστήματα παγιδευτές ελεύθερων ριζών είναι ουσίες που διαθέτουν τη δράση των νιτρονών (το N-οξειδίο μιάς ιμίνης) (123) και έχουν το γενικό τύπο



Η αντίδραση των ουσιών αυτών με μία ελεύθερη ρίζα (X) σχηματίζει μία νιτροξυλική (αμινοξυλική) ρίζα, στην οποία το ασύζευκτο ηλεκτρόνιο σταθεροποιείται από την ικανότητα συντονισμού της λειτουργίας της νιτροξυλικής ρίζας:



Η μακροβιότητα της νέας ρίζας οφείλεται στις ιδιότητες συντονισμού της νιτροξυλικής ομάδας και δίνει έτσι τη δυνατότητα ανίχνευσης με ESR. Με τη χρήση των παγιδευτών spin επιτεύχθηκε η ανίχνευση και ο καθαρισμός του είδους των ελεύθερων ριζών τόσο in vivo, όσο και in vitro, καθώς και η μελέτη των μηχανισμών, μέσω των οποίων αναισθητικά αέρια, τοξικές ουσίες ή ακτινοβολίες προκαλούν οξειδωτικές βλάβες στους οργανισμούς (124,125,126). Με την εφαρμογή του ESR στα βιολογικά συστήματα έγινε επίσης δυνατό να ανιχνευθούν και να καθοριστούν τα είδη των ελεύθερων ριζών που παράγονται από διάφορα κύτταρα, όπως τα ουδετερόφιλα (127), τα αιμοπετάλια (194,195) κ.α., τα είδη των ελεύθερων ριζών που παράγονται και ενεργοποιούν ενζυμικές βιοχημικές αντιδράσεις (296,297,300), καθώς και να μελετηθούν οι μηχανισμοί, μέσω των οποίων εγκαθίστανται στους οργανισμούς βλάβες μέσω ξеноβιοτικών παραγόντων (123).

Η αυξανόμενη εφαρμογή του ESR στα βιολογικά συστήματα και η διευρυνόμενη συνεργασία μεταξύ επιστημόνων που ασχολούνται με τα φαινόμενα της ζωής και αυτών που ενέχονται με τις φυσικές επιστήμες αναμένεται να δώσει απαντήσεις σε ουσιαστικά ερωτήματα για τους μηχανισμούς δράσης των ελεύθερων ριζών, τα οποία μέχρι σήμερα παραμένουν αδιευκρίνιστα.



## ΒΑΣΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΤΩΝ ΟΥΣΙΩΝ ΠΟΥ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΗΘΗΚΑΝ ΣΤΗΝ ΠΑΡΟΥΣΑ ΜΕΛΕΤΗ

Η δομή των ουσιών που χρησιμοποιήθηκαν φαίνεται στις εικόνες 13,14 και 15. Τα κυριότερα χαρακτηριστικά και οι βιοχημικές ιδιότητες των ουσιών αυτών είναι τα παρακάτω:

### 1. Αναχθείσα Γλουταθειόνη GSH

#### α. Γενικά Χαρακτηριστικά

Η αναχθείσα Γλουταθειόνη (GSH) ή γ-L-γλουταμύλ-L-κυστεινύλ-γλυκίνη, με μοριακό τύπο  $\text{HO}_2\text{CCH}(\text{NH}_2)\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CONHCH}(\text{CH}_2\text{SH})\text{CONHCH}_2\text{CO}_2\text{H}$  και μοριακό βάρος 307.33 και σημείο τήξεως  $192-195^\circ \text{C}$ , είναι ένα βιολογικά δραστικό τριπεπτίδιο και είναι η πιο διαδεδομένη θειόλα των ζωντανών κυττάρων. Η γλουταθειόνη σε συγκεντρώσεις mM απαντάται σε διάφορους ιστούς είτε σαν θειολο-αναχθείσα (GSH) ή σα δισουλφιδοοξειδωμένη μορφή (GSSG). Το μεγαλύτερο ποσοστό της ελεύθερης γλουταθειόνης in vivo απαντάται σαν αναχθείσα (GSH) παρά σαν οξειδωμένη (GSSG), αν και το 1/3 περίπου της συνολικής γλουταθειόνης των κυττάρων απαντάται με μορφή μικτών δισουλφιδικών ενώσεων, οι οποίες περιέχουν ομάδες -SH, όπως κυστεΐνη, συνένζυμο A ή σουλφυδρυλικές ομάδες κυστεϊνικών υπολειμμάτων διαφόρων πρωτεϊνών. Η γλουταθειόνη είναι ειδικό υπόστρωμα για το ένζυμο υπεροξειδάση της γλουταθειόνης και S-τρανφεράση της γλουταθειόνης (128,129). Είναι συμπαραγοντας διαφόρων ενζύμων με ποικιλία διαφορετικών μεταβολικών οδών, όπως η γλυκοξυλάση, η μαλαινική ακετοακετυλική ισομεράση, η ισομεράση του προσταγλανδινικού ενδοπεροξειδίου, η DDT - δευδροχλωρίναση και ίσως συμμετέχει στη σύνθεση των θυρεοειδικών ορμονών. Παίζει ακόμη ρόλο στην αποδόμηση της ινσουλίνης στα ζώα, καθώς και στο μεταβολισμό ζιζανιοκτόνων, εντομοκτόνων και "ξένων" ουσιών στους ιστούς ζώων και φυτών. Για παράδειγμα, στο ήπαρ των ζώων πολλές "ξένες" ουσίες μεταβολίζονται σε μερκαπτουρικό οξύ, το οποίο στην συνέχεια απεκκρίνεται. Το πρώτο στάδιο της διαδικασίας αυτής είναι η σύζευξη της ουσίας με την GSH, από το ένζυμο GSH-S- τρανφεράση (130,131). Μεταξύ τέτοιων ουσιών που μεταβολίζονται σε μερκαπτουρικό οξύ σε ποντικού είναι το χλωροφόρμιο, το βρωμοβενζένιο, η ναφθαλίνη και η παρακεταμόλη.



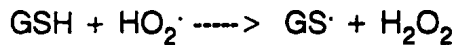


### **β. Γλουταθειόνη και Ελεύθερες Ρίζες**

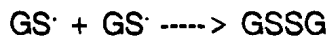
Οι πιο σοβαρές βλάβες των βιολογικών συστημάτων από ελεύθερες ρίζες οφείλονται στις υδροξυλικές ρίζες. Η γλουταθειόνη θεωρείται σαν κύριος εκκαθαριστής ριζών υδροξυλίου,  $\cdot\text{OH}$ , Οξυγόνου Singlet, ανιόντος υπεροξειδίου κ.α. (128,133).

Οι αντιδράσεις της γλουταθειόνης και των υπεροξειδικών ριζών έχουν ερευνηθεί από τους Wefers και Sies (132). Σύμφωνα με τους ερευνητές, η γλουταθειόνη μειώνει την οξειδωση του κυτοχρώματος C, που διαμεσολαβείται από υπεροξειδικές ρίζες. Το κύριο προϊόν αυτής της δράσης βρέθηκε ότι είναι η οξειδωθείσα γλουταθειόνη (GSSG) και κατά ένα ποσοστό (6-15%) η σουλφονική γλουταθειόνη.

Ο σχηματισμός GSSG και σουλφονικής GSH βρέθηκε ότι μειώνεται από την υπεροξειδιο-δισμουτάση και δεν επηρεάζεται από την καταλάση. Αυτό δείχνει ότι στην αντίδραση ενέχονται άμεσα μόνο ρίζες υπεροξειδίου ή υδροξυπεροξειδίου και δεν λαμβάνουν μέρος άλλα "είδη", όπως υδρογονουπεροξειδία ή υδροξυλικές ρίζες. Ο μηχανισμός (αντίδραση) που έχει προταθεί είναι:



Αντίδραση 1



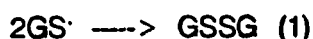
Αν και ο μηχανισμός αυτός δεν εξηγεί το σχηματισμό σουλφονικής GSH, είναι εν τούτοις συμβατός με άλλες έρευνες που αφορούν στην οξειδωση των θειολών από διάφορους οξειδωτικούς παράγοντες και καταλήγουν στην παραγωγή προϊόντων, όπως δισουλφίδια, σουλφίνια και σουλφόνια (66).

Η γλουταθειόνη θεωρείται σημαντικός παράγοντας προστασίας των κυτταρικών μεμβρανών από οξειδωτική βλάβη (εξ αιτίας ελευθέρων ριζών), μέσω της δραστηριότητας της υπεροξειδάσης και της S-τρανσφεράσης της γλουταθειόνης (130). Οι περισσότερες μελέτες που αφορούν αυτή τη δράση της γλουταθειόνης και άλλων θειολικών παραγώγων αφορούν κυρίως τις επιδράσεις της ιονίζουσας ακτινοβολίας στα έμβια όντα και το σχηματισμό μιάς θειολικής ρίζας, σαν αποτέλεσμα της αντίδρασης της GSH με τις ελεύθερες ρίζες. Οι πιθανές αντιδράσεις συνοψίζονται ως εξής:



Η θειλική ρίζα δε θεωρείται αδρανής, γιατί μπορεί να αντιδράσει με νουκλεόφιλες ουσίες. Ομως μπορεί να υποστεί διαριζική εκκαθάριση με αποτέλεσμα το σχηματισμό οξειδωθείσας γλουταθειόνης (GSSG), κατά την αντίδραση





Μπορεί επίσης να αντιδράσει με οξυγόνο και να σχηματίσει μία υπερόξυ-ρίζα ως εξής:



Η ρίζα αυτή (GSOO·) είναι δυνατό στη συνέχεια να γίνει πηγή παραγωγής μονήρους οξυγόνου (Singlet), κατά την αντίδραση:



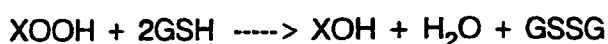
Ομως η πιθανότερη εξέλιξη της αντίδρασης στα βιολογικά συστήματα είναι ο τερματισμός της αντίδρασης με παραγωγή οξειδωθείσας γλουταθειόνης, όπως προαναφέρθηκε (αντίδραση 1).

Μέσω των αντιδράσεων εκκαθάρισης ελευθέρων ριζών η αναχθείσα γλουταθειόνη (GSH) μετατρέπεται σε οξειδωθείσα (GSSG). Για την σωστή προστασία των κυττάρων η σχέση GSH/GSSG είναι απαραίτητο να διατηρείται φυσιολογική. Η GSSG μπορεί να αδρανοποιήσει έναν αριθμό ενζύμων σχηματίζοντας μαζί τους μικτά δισουλφιδια. Τα μικτά δισουλφιδια με πρωτείνες, καθώς και με μόρια όπως το συνένζυμο-A, συσσωρεύονται σε ιστούς που υπέστησαν "stress" ριζών οξυγόνου. Η GSSG αδρανοποιεί την πρωτεϊνική σύνθεση στα κύτταρα και τα ένζυμα αδενυλική κυκλάση, φωσφοφρουκτοκινάση και φωσφορυλασική-φωσφατάση. Για το λόγο αυτό τα κύτταρα προσπαθούν να διατηρούν τις συγκεντρώσεις της GSSG χαμηλές και έτσι αποδεικνύεται, πως η περίσσεια οξυγόνου μπορεί να μετατρέψει έναν προστατευτικό μηχανισμό σε βλαπτικό (128).

### γ. Ενζυμα της Γλουταθειόνης

Η Γλουταθειόνη αποτελεί υπόστρωμα των ενζύμων υπεροξειδάση της γλουταθειόνης και τρανσφεράσες της γλουταθειόνης.

Η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης είναι ένα σελήνιο εξαρτώμενο ένζυμο που καταλύει την αντίδραση εξουδετέρωσης του  $\text{H}_2\text{O}_2$  ή οργανικών υδρουπεροξειδίων ( $\text{XOOH}$ ) που σχηματίζονται ενδοκυττάρια, κατά την αντίδραση:



Εχει ανακαλυφθεί ακόμη μία μη σεληνιοεξαρτώμενη υπεροξειδάση της γλουταθειόνης. Το ένζυμο αυτό δεν μπορεί να χρησιμοποιήσει σαν υπόστρωμα το



$H_2O_2$ , γιατί πιθανώς είναι πολύ υδρόφιλο (128,129,134).

Οι τρανσφεράσες της γλουταθειόνης έχουν την ικανότητα να δεσμεύουν έναν αριθμό υδρόφοβων ενώσεων, να καταλύουν την αντίδραση της GSH με μερικές ενώσεις που έχουν χαρακτηριστικά ηλεκτρόφιλων ομάδων και να σχηματίζουν προϊόντα GSH. Ο ρόλος των ενζύμων αυτών είναι να προστατεύουν τα κύτταρα από επικίνδυνα ξενοβιοτικά που δρούν μέσω του κυτοχρώματος  $P_{450}$  (128,129,135).

#### **δ. Γλουταθειόνη και Αιμοπετάλια**

Ανάλογα με τις μεθόδους μέτρησης η γλουταθειόνη των αιμοπεταλίων κυμαίνεται από 0.8 - 1.85  $\mu\text{moles}/10^9$  κύτταρα. Το 85% περίπου βρίσκεται σαν αναχθείσα μορφή (GSH) που διατηρείται με την αναγωγή της γλουταθειόνης και το NADPH, το οποίο αποτελεί το 80% του ολικού κυτταρικού NADP (136,137,138). Το NADPH προκαλεί ισχυρή αναστολή της δραστηριότητας του ενζύμου γλυκοζο-6-φωσφατασο-αφυδρογονάση, περιορίζοντας τη δραστηριότητά του πάνω από 99%. Αυτή η κατάσταση κάνει τα αιμοπετάλια ιδανικά να αντεπεξέρχονται σε οξειδωτικά "stress" (139). Έχει έτσι μετρηθεί ταχεία μείωση, σε λιγότερο από ένα λεπτό, της GSH και του NADPH κατά τη διέγερση των αιμοπεταλίων με αραχιδονικό οξύ, μέσω έντονης διέγερσης του κυκλώματος των μονοφωσφορικών εξοζών. Έχει δειχθεί ότι το 70% της οξειδωσης της GSH καταναλίσκεται κατά τη διέγερση του κυκλώματος αυτού με αραχιδονικό οξύ, και μπορεί να ανασταλεί με ακετυλοσαλκυλικό οξύ, το οποίο σε κατάλληλες συγκεντρώσεις επιλεκτικά δεσμεύει την συνθετάση των προσταγλανδινών (140). Στη διαδικασία αυτή, η οξειδωση της GSH οφείλεται στην προσταγλανδινική υπεροξειδάση, η οποία καταλύει τη μετατροπή της  $PGG_2$  σε  $PGH_2$ . Με διάφορους αγωνιστές ή αναστολείς έχει δειχθεί η άμεση συμμετοχή της GSH στο σχηματισμό της  $PGH_2$ , παρά της θρομβοξανής- $A_2$ , κατά τη διέγερση με αραχιδονικό οξύ. Η οξειδωση του 30% της αιμοπεταλιακής GSH οφείλεται στην αντίδραση μετατροπής των 12-HETE σε 12-HETE, που καταλύεται από την υπεροξειδάση της γλουταθειόνης, μέσω του δρόμου της λιποξυγονάσης (141,142). Η διέγερση του κυκλώματος μονοφωσφορικών εξοζών, που προκαλείται από το αραχιδονικό οξύ, μπορεί πλήρως να ανασταλεί, αν το αιμοπετάλιο "εκπλυθεί" από την γλουταθειόνη, μέσω του 1-χλωρο-2-4-δινιτροβενζενίου, το οποίο μέσω μίας αντίδρασης που καταλύεται από την τρανσφεράση-S-GSH σχηματίζει 2,4-δινιτροφαινύλ-S-GSH (143). Αυτό δείχνει ότι ο σχηματισμός GSSG εξαρτάται από την οξειδωση του NADPH, μέσω της υδρουπεροξειδάσης των προσταγλανδινών και της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης. Μέσω του μεταβολισμού του αραχιδονικού οξέος η σχέση GSH/GSSG μπορεί να επηρεάσει άλλες αντιδράσεις που ενέχονται στην ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων, όπως για παράδειγμα, τη συμβολή των



προσταγλανδικών ενδοπεροξειδίων στη διάσπαση των πολυφωσφοινοσιτιδίων, με ταχεία σύνθεση ινσοιτολο-1,4,5, τριφωσφορικής διαδιακυλ-γλυκερόλης και φωσφατιδικού οξέος, την έκλυση του ADP και ινωδογόνου και την αποκάλυψη των μεμβρανικών υποδοχών ινωδογόνου (144). Επιπλέον ο λόγος GSH/GSSG σχετίζεται με την σχέση σουλφυδρυλίων/ δισουλφιδίων των αιμοπεταλιακών πρωτεϊνών, οι οποίες συμμετέχουν στην αιμοπεταλιακή διέγερση, όπως για παράδειγμα τη συμμετοχή της CYS-374 στον πολυμερισμό της ακτίνης. Ακόμη έχει δειχθεί ότι όχι μόνο η μείωση, αλλά και η αύξηση της σχέσης σουλφυδρυλίων/δισουλφιδίων μπορεί να αναστείλει την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων (136).

## 2. α - Μερκαπτοπροπιονύλ - γλυκίνη (THIOLA ή 2-MPG)

Η α-Μερκαπτοπροπιονύλ-γλυκίνη ή N-(2-Μερκαπτοπροπιονύλ)-γλυκίνη, (2-MPG) με μοριακό τύπο  $\text{CH}_3\text{CH}(\text{SH})\text{CONHCH}_2\text{CO}_2\text{H}$ , μοριακό βάρος 163.20 και σημείο τήξεως  $98-100^\circ\text{C}$  είναι μία σουλφυδρυλική θειολική ένωση, που έχει κυρίως χρησιμοποιηθεί για τη θεραπεία της κυστινουρίας, της ρευματοειδούς αρθρίτιδας, των ηπατοπαθειών κ.α. (145,146,147,148). Η χρησιμοποίησή της στην κυστινουρία οφείλεται στην ιδιότητά της να αντιδρά με την L-κυστίνη και να την μετατρέπει σε L-κυστεΐνη (διαλυτή στα ούρα), κατά την αντίδραση ανταλλαγής θειόλας-δισουλφιδίου (145,146,147):



Η α-μερκαπτοπροπιονύλ-γλυκίνη όμως θεωρείται και μία ισχυρή αναγωγική ουσία, η οποία μπορεί να διαπεράσει τις κυτταρικές μεμβράνες, να ανάγει τους δισουλφιδικούς δεσμούς και να προφυλάξει τα κύτταρα από την οξειδωση των σουλφυδρυλικών (-SH) ομάδων, πολλών μεμβρανικών και ενδοκυτταρικών πρωτεϊνών (149,150).

Εκτός από τις παραπάνω ιδιότητες η α-μερκαπτοπροπιονύλ-γλυκίνη έχει και ιδιότητες εκκαθαριστή (Scavenger) ελευθέρων ριζών (151). Ηδη από το 1980 οι Wilson R.C και Slater T.F. διαπίστωσαν ότι η 2-MPG μπορεί να εκκαθαρίσει ρίζες υπεροξειδίου  $\text{O}_2^{\cdot-}$ , υδροξυλίου  $\cdot\text{OH}$  καθώς και ρίζες που παράγονται από τις αντιδράσεις του υπεροξειδίου του υδρογόνου ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ). Στις ιδιότητες αυτές έχουν αποδοθεί οι ευνοϊκές επιδράσεις της ουσίας στη ρευματοειδή αρθρίτιδα, τις ηπατικές βλάβες και την καρδιακή ισχαιμία (148,149,150,151). Έχει αναφερθεί ότι η 2-MPG έχει ένα ουδετεροφιλοεξαρτώμενο προστατευτικό αποτέλεσμα στην ισχαιμική νέκρωση. Η δράση αυτή έχει αποδοθεί, στην ικανότητα των



σουλφιδρυλίων να εκκαθαρίζουν ελεύθερες ρίζες, παραγόμενες κυρίως από τα ουδετερόφιλα κατά την ισχαιμική νέκρωση. Προτάθηκε ακόμη ότι η 2-MPG εισερχόμενη στα ενδοκυττάρια διαμερίσματα, προστατεύει τις μιτοχονδριακές μεμβράνες από την τοξική δράση των ριζών οξυγόνου (151,152,153). Μια επίσης σπουδαία ιδιότητα που έχει αναφερθεί για την 2-MPG, είναι ότι απενεργοποιεί την κυτταρική λιποξυγονάση και την προσταγλανδινική σύνθεση (PGH-σύνθεση) στα αιμοπετάλια, με την αναγωγική της δράση στις σουλφιδρυλικές ομάδες των ενεργών κέντρων των ενζύμων αυτών (149,150).

### 3. N - Ακετυλκυστεΐνη (N-AC)

Η N- Ακετυλκυστεΐνη είναι μία θειολική ένωση με μοριακό τύπο  $\text{HSCH}_2\text{CH}(\text{NHCOCH}_3)\text{CO}_2\text{H}$ , μοριακό βάρος 163.2 και σημείο τήξεως  $109-111^\circ\text{C}$ . Έχει χρησιμοποιηθεί πειραματικά για την αντιμετώπιση βλαβών που προκαλούνται από ουσίες που προάγουν την παραγωγή ελεύθερων ριζών, όπως η ακεταμινοφαΐνη, η αδριαμυκίνη κ.α. (154).

Έχει διαπιστωθεί ότι στα ηπατοκύτταρα προάγει τη σύνθεση αλλά και τη διατήρηση των επιπέδων γλουταθειόνης (155). Η διέγερση της βιοσύνθεσης της γλουταθειόνης που προκαλείται από την N-ακετυλ-κυστεΐνη είναι ισχυρή, φτάνοντας τα επίπεδα της γλουταθειόνης μερικές φορές πάνω από τα φυσιολογικά αναμενόμενα. Ακόμη η N-ακετυλ-κυστεΐνη σαν αναγωγική ουσία μπορεί να διατηρήσει ή να αυξήσει την αναχθείσα μορφή της γλουταθειόνης σε επίπεδα κατάλληλα για την αντιμετώπιση οξειδωτικών βλαβών (156,157). Τέλος, η ίδια ουσία συμμετέχει σε ενδοκυττάριας αντιδράσεις τύπου γλουταθειόνης και ως θειολική ένωση έχει την ικανότητα εκκαθάρισης ελευθέρων ριζών (66).

### 4. D - Πενικιλλαμίνη (D-P)

Η D-Πενικιλλαμίνη ή D-β-β διμεθυλ-κυστεΐνη έχει μοριακό τύπο  $(\text{CH}_3)_2\text{C}(\text{SH})\text{CH}(\text{NH}_2)\text{CO}_2\text{H}$ , μοριακό βάρος 149.21, σημείο τήξεως  $210^\circ\text{C}$  και κατατάσσεται στα θειολικά παράγωγα. Απομονώθηκε για πρώτη φορά από τα ούρα ηπατοπαθών που έπαιρναν πενικιλίνη (158). Σήμερα χρησιμοποιείται κυρίως σαν χημικός παράγοντας στη θεραπεία της ρευματοειδούς αρθρίτιδας και της κυστινουρίας (159). Συμμετέχει σε αντιδράσεις ανταλλαγής δισουλφιδίου, σαν αυτή που αναφέρθηκε στην α-μερκαπτοπροπιονύλ-γλυκίνη και έχει παρόμοια μ' αυτή δράση στις -SH ομάδες των κυτταρικών πρωτεϊνών (160).

Λόγω της χημικής δράσης της η πενικιλλαμίνη θεωρείται ότι μπορεί να προστατεύσει από αντιδράσεις παραγωγής ελευθέρων ριζών στις οποίες



συμμετέχουν Fe (αντίδραση Fenton) και μέταλλα μετάπτωσης (159). Επί πλέον η D-πενικιλλαμίνη θεωρείται και εκκαθαριστής ελευθέρων ριζών, τόσο λόγω πιθανής δράσης σαν SOD (υπεροξειδιοδισμουτάση), όσο και σαν θειολική ένωση (159,160,161).

## 5. Ασκορβικό Οξύ (Vit C) και Δευδροασκορβικό Οξύ

Το Ασκορβικό οξύ με μοριακό τύπο  $C_6H_8O_6$ , μοριακό βάρος 176.2 και σημείο τήξεως  $193^\circ C$  είναι κρυσταλλικής μορφής, διαλυτό στο νερό (158). Τα φυτά και πολλά ζώα μπορούν να το συνθέτουν από τη γλυκόζη. Ο άνθρωπος και άλλα πρωτεύοντα, όπως το ινδικό χοιρίδιο, οι νυχτερίδες κ.λ.π έχουν χάσει (κατά τη διάρκεια της εξέλιξης) τα απαραίτητα ένζυμα για τη συνθεσή του και έτσι πρέπει να το προσλάβουν εξωγενώς από τις τροφές σαν βιταμίνη C (162).

Το ασκορβικό οξύ είναι απαραίτητο για τα ένζυμα υδροξυλάση της προλίνης και της λυσίνης, που συμμετέχουν στη σύνθεση του κολλαγόνου και περιέχουν σίδηρο στα ενεργά κέντρα τους. Είναι επίσης απαραίτητο για τη δραστηριότητα του χαλκοενζύμου υδροξυλάση της β-ντοπαμίνης, που μετατρέπει την ντοπαμίνη σε αδρεναλίνη. Η ισχυρότερη όμως χημική δράση του ασκορβικού οξέως είναι η ικανότητά του να δρα σαν αναγωγική ουσία (δότης ηλεκτρονίων) (162). Με την αναγωγική του δράση ανάγει τον Fe(III) σε Fe(II) και προάγει την απορρόφησή του από το έντερο. Στην αναγωγική του δράση έχει μερικώς αποδοθεί η δράση του ως αναστολέας της καρκινογένεσης από νιτροζοκαρκινογόνα και βενζο(α)πυρένιο (163,164). Η αντικαρκινογόνος δράση του ασκορβικού θα μπορούσε ακόμα να αποδοθεί στην αδρανοποίηση των ελευθέρων ριζών που συμμετέχουν δραστικά στην καρκινογένεση. Με την αναγωγική της ιδιότητα η βιταμίνη C μπορεί να εξουδετερώσει ελεύθερες ρίζες in vivo με τον παρακάτω μηχανισμό:

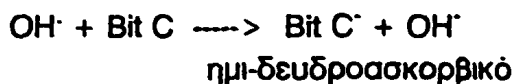
Η χορήγηση ενός ηλεκτρονίου από την ελεύθερη ρίζα στο ασκορβικό οξύ το μετατρέπει σε ημι-δευδροασκορβικό οξύ, το οποίο στη συνέχεια οξειδώνεται σε δευδροασκορβικό. Το ημι-δευδροασκορβικό είναι μία μη σημαντικά δραστική ρίζα, η οποία στη συνέχεια υφίσταται την παρακάτω μετατροπή (αντίδραση).



Το δευδροασκορβικό με μοριακό τύπο  $C_6H_6O_6$ , μοριακό βάρος 174.11 και σημείο τήξεως  $228^\circ C$  είναι ασταθές και διασπάται ταχέως με έναν πολύπλοκο τρόπο σε δικετο-L-γλυκουρονικό οξύ, το οποίο στη συνέχεια μετατρέπεται σε L-θρεονικό οξύ.

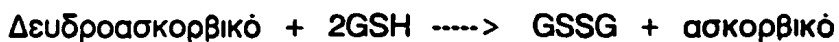


Η εξουδετέρωση οξυγόνου Singlet και ριζών  $O_2^{\cdot -}$  και  $HO_2^{\cdot}$  και  $OH^{\cdot}$  από το ασκορβικό οξύ είναι ταχεία. Ένα παράδειγμα εξουδετέρωσης είναι η παρακάτω αντίδραση.



Με τον τρόπο αυτό το ασκορβικό οξύ λειτουργεί προστατευτικά, *in vivo*, από διάφορα είδη ριζών, που προέρχονται από το οξυγόνο (66,67,165).

Σημαντικό τέλος είναι ότι στα φυτά και στα ζώα έχουν αναπτυχθεί μηχανισμοί που μετατρέπουν την οξειδωμένη μορφή του ασκορβικού σε αναχθείσα. Από τους ιστούς, και του ανθρώπου, έχει απομονωθεί το ένζυμο αναγωγή του δευδροασκορβικού, το οποίο καταλύει την παρακάτω αντίδραση.



Οι δράσεις όμως της βιταμίνης C δεν είναι πάντοτε ευνοϊκές για τον οργανισμό. Όπως οι ρίζες  $O_2^{\cdot -}$ , το ασκορβικό οξύ μπορεί να ανάγει τον  $Fe(III)$  σε  $Fe(II)$ , ο οποίος παρουσία υπεροξειδίου του υδρογόνου μπορεί να οδηγήσει μέσω αντίδρασης Fenton, σε παραγωγή ριζών  $OH^{\cdot}$ . Τέτοια παραγωγή θεωρείται πιθανή σε ασθενείς με αιμοσιδήρωση, όταν χορηγείται βιταμίνη C. Το ασκορβικό οξύ μπορεί επίσης να διεγείρει την σιδηροεξαρτώμενη υπεροξειδωση των λιπιδίων των μεμβρανών, κάτω από ορισμένες συνθήκες (66).

Τα αιμοπετάλια περιέχουν υψηλές ποσότητες βιταμίνης C σε σύγκριση με άλλα κύτταρα του οργανισμού (Πίνακας 1).



### ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΕΙΣ ΑΣΚΟΡΒΙΚΟΥ ΟΞΕΟΣ ΣΕ ΑΝΘΡΩΠΙΝΟΥΣ ΙΣΤΟΥΣ

Ιστός	Συγκέντρωση (mM)
Πλάσμα	0.045 ± 0.022
Ερυθρά Αιμοσφαίρια	0.043 ± 0.016
Αιμοπετάλια	1.900 ± 0.800
Κοκιοκύτταρα	1.200 ± 0.300
Μονοκύτταρα	3.800 ± 1.000
Επινεφρίδια	1.900 - 2.500
Υπόφυση	2.500 - 3.200
Ήπαρ	0.600 - 1.000
Σπλήν	0.600 - 0.900
Πνεύμονες	0.400
Νεφροί	0.300 - 0.900
Ορχεις	0.200
Θυρεοειδής Αδένας	0.100
Καρδιακός Μύς	0.300 - 0.900
Σκελετικοί Μύες	0.200 - 0.300
Εγκέφαλος	0.800 - 0.900
Πάγκρεας	0.600 - 0.900
Φακοί	1.600 - 2.000
Σιελογόνοι Αδένες	0.004 - 0.005

(Από Moser B. et al Ann. N.Y. Acad. Sci 498:201, 1987)





## 6. Βουτυλικό Υδροξυτολουένιο (BHT)

Το Βουτυλικό Υδροξυτολουένιο με μοριακό τύπο  $C_{15}H_{24}O$ , μοριακό βάρος 220.34, όπως αναφέρθηκε και σε προηγούμενη παράγραφο, κατατάσσεται στα συνθετικά αντιοξειδωτικά (170). Η δράση των ουσιών αυτών γίνεται μέσω προσφοράς ηλεκτρονίου (αναγωγική). Τα αντιοξειδωτικά αυτά χρησιμοποιούνται για προστασία πολυμερών και τροφών από οξειδωτική δράση, που μπορεί για παράδειγμα να προκληθεί κατά την αποστείρωση των τροφών με ιονίζουσες ακτινοβολίες και για τη θεραπεία ασθενών που κατανάλωσαν ουσίες που μπορεί να προκαλέσουν λιπυπεροξειδωση *in vivo* (166). Το BHT δεν είναι τοξικό, αν και υπάρχουν κάποιες ενδείξεις μεταβολισμού του από το ηπατικό κυτόχρωμα  $P_{450}$ . Προερχόμενο από τροφές, το BHT έχει ανιχνευθεί στον λιπώδη ιστό, κατοίκων των ΗΠΑ (166,167). Πειραματικά σε υψηλές δόσεις σε ποντίκια μπορεί να προκαλέσει ηπατική βλάβη.

Το BHT προστατεύει, *in vivo*, από την παραγωγή διαφόρων ριζών, κυρίως όμως υδροξυλίου, οι οποίες προέρχονται από λιπυπεροξειδωση. Αναστέλλει την υπεροξειδωση των λιπών, μέσω της σύλληψης ριζών  $LIPO-OO\cdot$  και  $LIPO-O\cdot$  (166,167,168). Διαπιστώθηκε επίσης ότι εξουδετερώνει ρίζες  $O_2\cdot^-$  και  $OH\cdot$ , αν και όχι τόσο αποτελεσματικά όπως οι εκκαθαριστές ελευθέρων ριζών (67,168). Στην αναγωγική δράση των αντιοξειδωτικών ουσιών, όπως το BHT, έχει αποδοθεί και η πιθανή αντικαρκινογόνος δράση τους.

## 7. Τριμεταζιδίνη (TMZ)

Η τριμεταζιδίνη (TMZ) ή 1(2,3,4 Τριμεθοξυφαινυλ-μεθυλ) πιπεραζίνη, με μοριακό τύπο  $C_{14}H_{22}N_2O_3$ , μοριακό βάρος 266.33 και σημείο ζέσεως 200-205°C είναι μία φαρμακευτική ουσία που χρησιμοποιείται κυρίως για τη θεραπεία των ισχαιμικών νόσων (169).

Οι πρώτες δράσεις της TMZ που μελετήθηκαν αφορούσαν το αντνικωτικό αποτέλεσμα και την επίδρασή της στην έξοδο του ενδοκυττάριου καλίου (169). Διαπιστώθηκε ακόμη ότι στην καρδιά η TMZ ασκεί αρνητική ινóτροπη και χρονóτροπη δράση, μειώνει τη διάρκεια του δυναμικού ενέργειας και προκαλεί αγγειοδιαστολή στα στεφανιαία αγγεία (170,171,172,173)).

Πρόσφατα έχει αποδειχθεί ότι εκτός των παραπάνω η τριμεταζιδίνη είναι ισχυρός εκκαθαριστής ελευθέρων ριζών, που παράγονται *in vitro* και *in vivo*, με χημικούς και βιοχημικούς κυτταρικούς μηχανισμούς (174,175,176). Η TMZ έχει την ικανότητα να εκκαθαρίζει ρίζες  $O_2\cdot^-$ ,  $OH\cdot$  και ρίζες προερχόμενες από τη δράση του οξυγόνου και αλκυλ-υπεροξυλ-ελεύθερες ρίζες (177,178).



Ο πιθανός μηχανισμός εκκαθάρισης των ριζών  $O_2^{\cdot -}$  που έχει προταθεί είναι ότι αυτές οι ρίζες αντιδρούν με μερικές λειτουργικές ομάδες του μορίου της τριμεταζιδίνης, όπως π.χ. με τις μεθοξυλικές ομάδες του αζώτου και σχηματίζουν σταθερές ρίζες ή άλλα προϊόντα.

Για τις ρίζες  $OH^{\cdot}$  φαίνεται ότι παρόμοιες αντιδράσεις λαμβάνουν χώρα στην βενζυλική ομάδα του μορίου της TMZ και σχηματίζουν υδροξυλικά προϊόντα (174,175).

Τέλος η TMZ μπορεί να προστατεύει τα κύτταρα από την απώλεια  $K^+$  και να διορθώνει την ενδοκυτταρική οξέωση που προκαλείται in vivo από τη δράση των ελευθέρων ριζών (178). Η εκκαθαριστική δράση της TMZ στις ελεύθερες ρίζες, έχει διαπιστωθεί ότι ασκείται σε σχετικά χαμηλές συγκεντρώσεις της τάξης των 100  $\mu M$  έως 1mM (174,175).

## 8. Παγιδευτές Spin (Spin Trappers)

Οι παγιδευτές spin αναπτύχθηκαν για την καλύτερη ανίχνευση των ελευθέρων ριζών με τη μέθοδο ESR. Χρησιμοποιούνται κυρίως για την ανίχνευση ριζών ανιόντος υπεροξειδίου  $O_2^{\cdot -}$  και υδροξυλίου  $OH^{\cdot}$  στα βιολογικά συστήματα, καθώς και για την ανίχνευση του σχηματισμού οργανικών ριζών κατά τη διάρκεια υπεροξειδωσής των λιπιδίων (66).

Οι πιο εύχρηστοι παγιδευτές είναι νιτροζοπαράγωγα, από τα οποία οι συνηθέστεροι στην έρευνα ελευθέρων ριζών είναι (66,179):

1. α-Φαινύλ-tert-Βουτυλικό νιτρόνιο (PBN)
2. 5,5 Διμεθυλοπυρρολίνο-N-οξειδίο (DMPO)
3. tert-Νιτροζοβουτάνιο (tNB ή NtB)
4. tert-Βουτυλονιτροζοβενζένιο (BNB) και
5. α(4-Πυριδυλο-Ι-οξειδίο)-N-tert-Βουτυλονιτρόνιο (4-POBN)

Σ' αυτή τη μελέτη χρησιμοποιήθηκαν οι παγιδευτές PBN και DMPO

Είναι δύο παγιδευτές spin με την ευρύτερη χρήση από όλα τα νιτροζοπαράγωγα (179,180,181).

Το PBN είναι στερεό, λευκού χρώματος με σημείο τήξης  $73^{\circ} - 74^{\circ} C$ , μοριακό τύπο  $C_8H_5CH = N(O)C(CH_3)_3$  και μοριακό βάρος 177.25. Είναι σταθερό και δεν απαιτεί ιδιαίτερες συνθήκες φύλαξης. Σταθερά είναι επίσης τα υδατικά του διαλύματα με pH 7.2 -11.8, ενώ τα όξινα υδρολύονται εύκολα (179).

Το DMPO είναι παρόμοιας υφής με το PBN και έχει μοριακό τύπο  $C_8H_{11}NO$  και μοριακό βάρος 113.16. Συνήθως περιέχει προσμίξεις, που δίνουν στα διαλύματά του μία πορτοκαλί ή πορτοκαλοκαφέ χροιά. Ο καθαρισμός του, εφ'



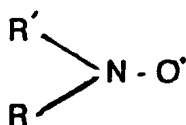
όσον απαιτείται, γίνεται κυρίως με ενεργό άνθρακα ή με απόσταξη εν κενώ. Το PBN και το DMPO μπορούν να παγιδεύσουν ρίζες υδροξυλίου .OH, υπεροξειδίου  $O_2^{\cdot -}$  αλλά και άλλες ρίζες, σχηματίζοντας σταθερές ρίζες που ανιχνεύονται με φασματοσκοπία ESR. Οι πιο συχνές μορφές ριζών των PBN και DMPO και τα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά ανίχνευσής τους με ESR είναι οι παρακάτω:

Πίνακας 2: Χαρακτηριστικά ανίχνευσης διαφόρων ριζών νιτροζοπαραγώγων με ηλεκτρονικό παραμαγνητικό συντονισμό (ESR)

	g	$A_N/G$	$A_B^H/G$	$A_E^H/G$
DMPO/OH	2.0060	14.9	14.9	
PBN/OH	2.006	15.6	2.7	
DMPO/OOH	2.0060	14.2	11.2	1.25
PBN/OOH	2.0057	14.8	2.75	
DMPO/ $CH_3CHOH$	2.0068	15.8	22.8	
PBN/ $CH_3CHOH$	2.0056	16.10	3.35	
DMPO/ $CO_3^{\cdot -}$	2.0054	15.79	18.79	

Οι βραχύβιες και υψηλής δραστηριότητας ρίζες των βιολογικών συστημάτων, αντιδρώντας με ένα από τα Νιτροζοπαραγώγα ( $R.NO$ ), μπορεί να σχηματίσουν σταθερές ρίζες Νιτροξειδίου με μεγάλη διάρκεια ζωής.

Για παράδειγμα:



Δραστική Ρίζα

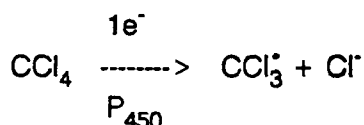
Ρίζα νιτροξειδίου σταθερή



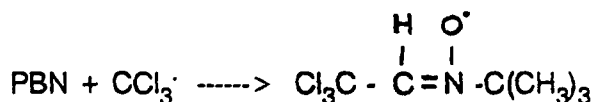
Τα νιτρονία ( $R = N^+ - O^-$ ), όπως PBN και DMPO σχηματίζουν επίσης ρίζες νιτροξειδίου με παρόμοιες αντιδράσεις. Το DMPO για παράδειγμα αντιδρά με  $^{\circ}OH$  και  $O_2^{\cdot-}$ , για να σχηματίσει νιτροξειδία, με ιδιαίτερα παραμαγνητικά χαρακτηριστικά (Πίνακας 2). Δυστυχώς οι ρίζες του DMPO με  $O_2^{\cdot-}$  είναι ασταθείς και "αποσυντίθεται" σχηματίζοντας το ίδιο προϊόν που προέρχεται από την αντίδρασή του με ρίζες  $OH^{\cdot}$  (180,182).



Για να διαπιστωθεί εάν το σήμα στην φασματοσκοπία ESR προέρχεται από παγίδευση ριζών  $O_2^{\cdot-}$  ή  $OH^{\cdot}$  με DMPO, πρέπει στο διάλυμα να προστεθεί αιθανόλη. Εάν το "σήμα" είναι προϊόν αντίδρασης με  $OH^{\cdot}$ , τότε η αιθανόλη "εκκαθαρίζει" αυτές τις ρίζες και το σήμα χάνεται. Επιπλέον η αντίδραση της αιθανόλης με ρίζες  $OH^{\cdot}$  παράγει υδροξυμεθυλική ρίζα, η οποία αντιδρώντας με το DMPO παράγει μία νέα ρίζα (DMPO/ $CH_2CHOH$ ), με διαφορετικά χαρακτηριστικά ανίχνευσης (διαφορετικό φάσμα) στη φασματοσκοπία ESR (Πίνακα 2). Εάν το "σήμα" προέρχεται από αντίδραση του DMPO με ρίζες  $O_2^{\cdot-}$ , τότε το σήμα δεν εξαφανίζεται, επειδή η αιθανόλη δεν "εκκαθαρίζει" τέτοιες ρίζες (66). Όπως προαναφέρθηκε, τα PBN και DMPO παγιδεύουν και άλλες ρίζες στα βιολογικά συστήματα. Είναι για παράδειγμα γνωστό ότι το τετραχλωρομεθάνιο μεταβολίζεται από το κυτόχρωμα  $P_{450}$  και παράγει τριχλωρομεθυλικές ρίζες ( $CCl_3^{\cdot}$ ) κατά την αντίδραση:



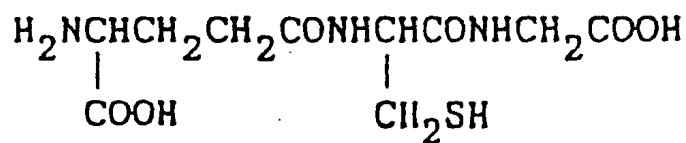
Το PBN μπορεί να παγιδεύσει τέτοιες ρίζες κατά την αντίδραση:



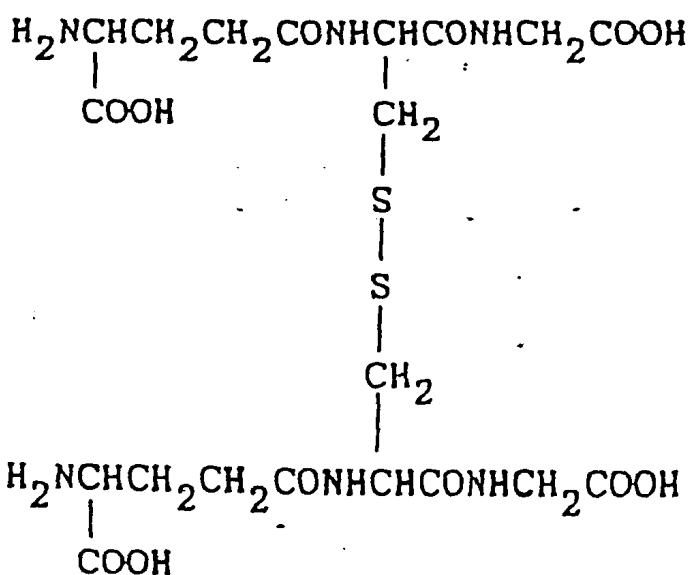
Σταθερή νιτριξυλική ρίζα

Παρόμοιες παγιδεύσεις ριζών από PBN συμβαίνουν στην περίπτωση παραγωγής ρίζας  $F_3C - C^{\cdot}HCl$ , που μπορεί να παραχθεί από το αναισθητικό αέριο αλοθάνιο μέσω του κυτοχρώματος  $P_{450}$ . (66,67).

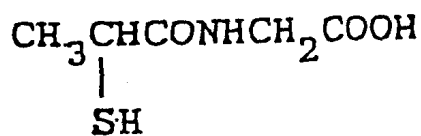




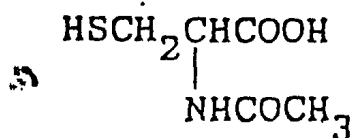
Αναχθείσα Γλουταθειόνη (GSH)



Δισουλφιδοξειδωμένη Γλουταθειόνη (GSSG)



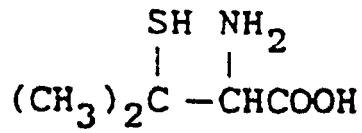
α - Μερκαπτοπροπιονύλ - γλυκίνη (2 - MPG)



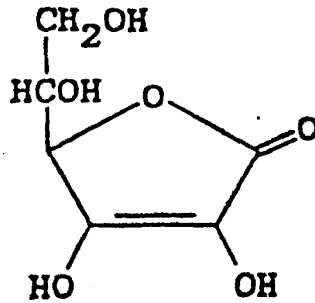
N - Ακετυλκυστεΐνη (N - AC)

Εικόνα 13: ΣΥΝΤΑΚΤΙΚΟΪ ΤΪΠΟΙ

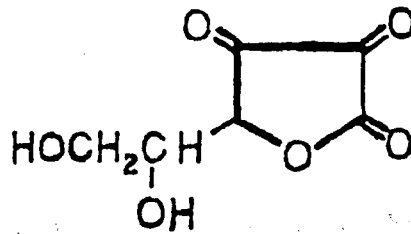




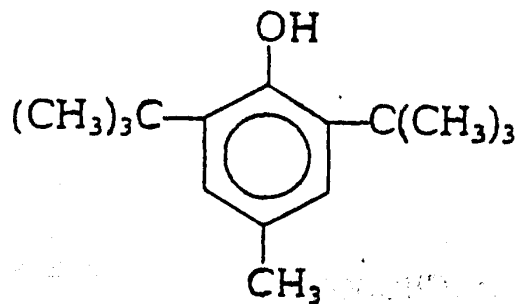
D - Πενικιλλαμίνη (D - P)



Ασκορβικό οξύ (Βιτ. C)



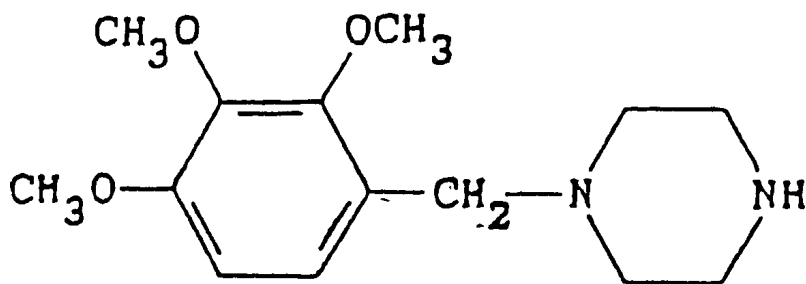
Δευδροασκορβικό οξύ



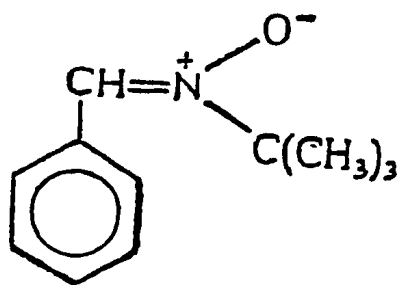
Βουτυλικό Υδροξυτολουένιο (BHT)

Εικόνα 14: Συντακτικοί τύποι

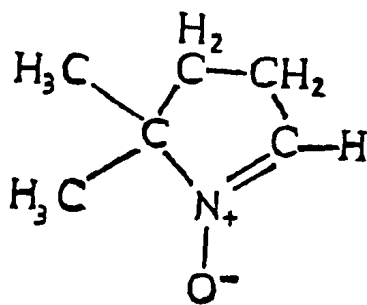




Τριμεταζιδίνη (TMZ)



α-φαινυλ-tert-βουτυλικό Νιτρόνιο (PBN)



5,5 Διμεθυλοπυρρολίνιο-N-Οξείδιο (DMPO)

Εικόνα 15: Συντακτικοί τύποι



## ΑΙΜΟΠΕΤΑΛΙΑ ΚΑΙ ΕΛΕΥΘΕΡΕΣ ΡΙΖΕΣ

Θεωρείται πλέον βέβαιο ότι τα αιμοπετάλια συμμετέχουν στις φλεγμονώδεις αντιδράσεις. Κατά την αιμοπεταλιακή διέγερση η παραγωγή και έκλυση ουσιών, όπως η σεροτονίνη, ο αιμοπεταλιακός παράγοντας 4 ( $PF_4$ ), ο PAF, η θρομβοξάνη  $A_2$  και άλλα εικοσανοειδή (183,184,185,186,187,188), μπορεί να επηρεάσουν πολλές λειτουργίες άλλων κυττάρων, όπως την αύξηση, την συσταλτικότητα και την έκλυση μεσολαβητών που τροποποιούν τη φλεγμονώδη αντίδραση. Είναι ακόμη γνωστό ότι τα αιμοπετάλια έχουν την ικανότητα να φαγοκυττώνουν διάφορα σωματίδια όπως το Latex, την φερρίνη, τη σιλικόνη και το thoriotrast (189).

Αυτή η διαδικασία συνοδεύεται από αλλαγές του μεταβολισμού των αιμοπεταλίων, αν και δεν είναι πλήρως διευκρινισμένο σε ποιο ποσοστό οι μεταβολές αυτές οφείλονται στη φαγοκύτωση και στην επακολουθούσα αιμοπεταλιακή συσσώρευση (190). Έχει ακόμα αναφερθεί ότι τα αιμοπετάλια ασθενών που πάσχουν από άσθμα εκλυόμενο με ασπιρίνη (aspirin-sensitive), εμφανίζουν, in vivo, κυτταροτοξική δράση (191).

Οι δράσεις αυτές των αιμοπεταλίων προϋποθέτουν την ικανότητα παραγωγής ελεύθερων ριζών. Ήδη από το 1976 έχει δείχθει ότι τα αιμοπετάλια παράγουν υψηλής δραστηριότητας ελεύθερες ρίζες  $O_2^{\cdot-}$  και  $OH^{\cdot}$ , ανιχνευόμενες στο υπερκείμενο των αναιωρημάτων τους (190,192,193). Σύμφωνα με την άποψη των Marcus και συν. (193) η παραγωγή ελεύθερων ριζών  $O_2^{\cdot-}$  είναι ένα συνεχές φαινόμενο χωρίς ποσοστικές διαφορές ανίχνευσης στο υπερκείμενο, μεταξύ συγκολλούμενων με θρομβίνη και κολλαγόνο και μη ενεργοποιημένων αιμοπεταλίων. Ακόμη δε διαπιστώθηκε επίδραση της ασπιρίνης στην παραγωγή ελεύθερων ριζών  $O_2^{\cdot-}$ , ενδεικτικό του ότι αυτή είναι ανεξάρτητη του δρόμου της κυκλοξυγονάσης - θρομβοξάνης  $A_2$ .

Εν τούτοις οι Mills και συν. πρότειναν ότι η ενεργοποίηση της αιμοπεταλιακής κυκλοξυγονάσης από λιπελαϊκό οξύ μπορεί να παράγει ηλεκτρονιακά διεγερμένα είδη (ελεύθερες ρίζες), ικανά να προκαλέσουν χημειοφωταύγεια (192). Νεώτερες έρευνες έδειξαν τελικά ότι τα διεγερμένα αιμοπετάλια παράγουν ελεύθερες ρίζες υπεροξειδίου και υδροξυλίου που ανιχνεύονται τόσο με τη μέθοδο ESR, όσο και με άλλες, όπως για παράδειγμα την αναγωγή του κυτοχρώματος C (194,195).

Οι Krinsky και συν. διαπίστωσαν την παραγωγή  $H_2O_2$  κατά τη φαγοκύτωση σωματιδίων latex από αιμοπετάλια. Την απέδωσαν όμως στη "μόλυνση" των παρασκευασμάτων τους με μικρό, αλλά ικανό αριθμό πολυμορφοπυρήνων (190).

Σύμφωνα με πρόσφατα δεδομένα, η παραγωγή ριζών  $O_2^{\cdot-}$  και υδροξυλίου  $OH^{\cdot}$  απαιτεί ελεύθερο αραχιδονικό οξύ και ακολουθεί διαφορετική μεταβολική οδό





από αυτήν της παραγωγής τους στα πολυμορφοπύρρηνα (194,195). Η παραγωγή των ριζών αυτών γίνεται κατά το μεταβολισμό των εικοσανοειδών και κατά κύριο ποσοστό μέσω της λιποξυγονάσης, δεδομένου ότι αναστολείς της λιποξυγονάσης (ασπιρίνη, ινδομεθακίνη) δεν επηρεάζουν σημαντικά την ποσότητά τους. Αναστολή της φωσφολιπάσης  $-A_2$  μπορεί επίσης να μειώσει την παραγωγή ελευθέρων ριζών  $O_2^{\cdot}$ , φαινόμενο που δεν αποκλείει όμως την παραγωγή υπεροξειδίου κατά τη διάσπαση των φωσφολιπιδίων από το ένζυμο αυτό. Φαίνεται ακόμη ότι η παραγωγή  $O_2^{\cdot}$  σχετίζεται και με τον ενδοκυττάριο κύκλο της γλουταθειόνης. Πρέπει τέλος να τονισθεί ότι σύμφωνα με τις πρόσφατες έρευνες η παραγωγή ελευθέρων ριζών  $O_2^{\cdot}$  και  $OH^{\cdot}$  μέσω της κυκλοξυγονάσης και θρομβοξάνης  $-A_2$  δεν έχει αποκλεισθεί. Θεωρείται όμως ότι οι ποσότητες τέτοιων ριζών μέσω της οδού αυτής είναι μικρότερες του 10-20% του συνόλου των παραγομένων. Η σημασία των ελευθέρων ριζών  $O_2^{\cdot}$  και  $OH^{\cdot}$  που παράγονται από τα αιμοπετάλια δεν έχει ακόμη διευκρινισθεί.

Οι Worner και συν. το 1979 έδειξαν ότι ελεύθερες ρίζες  $O_2^{\cdot}$ , οξυγόνου Singlet, υδροξυλίου και  $H_2O_2$ , μπορεί να προκαλέσουν αιμοπεταλιακή συσσώρευση, εφ' όσον παραχθούν στα εναιωρήματα αιμοπεταλίων (196).

Τέλος οι Καρκαμπούνας και συν. (165,197) έχουν πρόσφατα προτείνει τη συμμετοχή των ελευθέρων ριζών στη συγκόλληση αιμοπεταλίων κατά τη διέγερσή τους με PAF.





## ΥΛΙΚΟ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Οι δοκιμασίες έγιναν σε πλυμένα αιμοπετάλια κουνελιού και σε ανθρώπινο πλάσμα πλούσιο σε αιμοπετάλια (η PRP). Ως αγωνιστές (διεγέρτες) της συσώρευσης χρησιμοποιήθηκαν το Αδενοσινοδιφωσφορικό οξύ (ADP), το Αραχιδονικό οξύ (AA) και ο Παράγοντας Ενεργοποίησης Αιμοπεταλίων (PAF). Οι συντακτικοί τύποι των αγωνιστών αυτών φαίνονται στην εικόνα 16.

### A. Συσώρευση Πλυμένων Αιμοπεταλίων Κουνελιού

#### 1. Αιμοληψία από Πειραματόζωα. Χρησιμοποιηθέντα Ζώα

Χρησιμοποιήθηκαν 10 αρρενα κουνέλια ηλικίας 6-8 μηνών, βάρους 1,5-2,5 Kgr. Εγιναν τρεις αιμοληψίες, μία ανά 20 ημέρες σε κάθε πειραματόζωο. Η αιμοληψία γινόταν από τις φλέβες των αυτιών του κουνελιού με κατάλληλη βελόνα, με ελεύθερη ροή από το στόμιο της βελόνας, σε ειδικό πλαστικό σωλήνα. Σε κάθε αιμοληψία λαμβάνονταν 40ml αίματος. Το χρησιμοποιούμενο αντιπηκτικό ήταν διάλυμα 0,2% άλατος EDTA με K και σε αναλογία 1ml αντιπηκτικό/9ml αίματος. Στη διάρκεια της αιμοληψίας το αίμα αναδεύονταν ήπια με κυκλικές κινήσεις του σωλήνα. Στο τέλος της αιμοληψίας το αίμα έμπαινε στη φυγόκεντρο για διαχωρισμό σε 1500 στροφές. Από το διαχωρισμό προέκυπτε το πλούσιο σε αιμοπετάλια πλάσμα PRP (198,199).

#### 2. Διαλύματα Εκπλυσης και Συσώρευσης Αιμοπεταλίων

Για πλυμένα αιμοπετάλια κουνελιού χρησιμοποιούμε δύο ρυθμιστικά διαλύματα. Το διάλυμα έκπλυσης (TG-EGTA) και το διάλυμα συσώρευσης (TG -  $Ca^{2+}$ ). Με την έκπλυση των αιμοπεταλίων απομακρύνονται όλες οι διαλυτές ουσίες του πλάσματος, που θα μπορούσαν να αλληλεπιδράσουν με τους δοκιμαζόμενους αγωνιστές και τους αναστολείς.

##### α. Διάλυμα Εκπλυσης

Το διάλυμα έκπλυσης TG - EGTA χρησιμοποιείται για να απομακρύνει τα στοιχεία του πλάσματος και να διατηρήσει ζωντανά και λειτουργικά τα αιμοπετάλια, εμποδίζοντας μία ανεπιθύμητη αυτόματη ενεργοποίηση κατά τη διάρκεια της έκπλυσης και της αναδιασποράς. Για να μην ενεργοποιηθούν τα αιμοπετάλια, το διάλυμα έκπλυσης (TG - EGTA) δεν περιέχει ιόντα ασβεστίου, που είναι απαραίτητα για τη συσώρευση. Η ουσία EGTA δεσμεύει το ιονισμένο ασβέστιο ( $Ca^{2+}$ ). Το pH του διαλύματος TG - EGTA ρυθμίζεται στο 6,5 πριν τη



χρήση, με μικρές ποσότητες διαλυμάτων HCl και NaOH. Σ' αυτό το pH η λειτουργικότητα των αιμοπεταλίων είναι χαμηλή, επειδή πολλά ένζυμα τους υπολειπουργούν ή είναι ανεσταλμένα (200).

Η σύνθεση του διαλύματος TG -EGTA είναι:

KCl: 195 mgr	EGTA: 1 ml διαλύματος 0,2 M
MgCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O: 212,5 mgr	(76,02 gr/l H <sub>2</sub> O)
NaCl: 8 gr	Ενυδρη γλυκόζη: 1 gr
NaHCO <sub>3</sub> : 1,015 gr	Ζελατίνη 10% (25 ml)
Tris: 0	Απεσταγμένο νερό: 800 ml
CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O: 0	

Για την επιτυχή παρασκευή του διαλύματος, η ζελατίνη διαλύεται σε θερμό απεσταγμένο νερό και το διάλυμα αυτό προστίθεται αργά υπό συνεχή σταθερή ανάδευση στο παρασκευαζόμενο διάλυμα.

### **β. Διάλυμα Συσσώρευσης (TG - Ca<sup>2+</sup>)**

Το διάλυμα συσσώρευσης είναι το μέσον μέσα στο οποίο αναδιασπείρονται τα αιμοπετάλια, για να ενεργοποιηθούν κατά τη διαδικασία συσσώρευσης. Συμβολίζεται συντομογραφικά ως TG - Ca<sup>2+</sup>. Διαφέρει από το διάλυμα έκπλυσης στα εξής:

- α. Περιέχει ιόντα ασβεστίου
- β. Δεν περιέχει NaHCO<sub>3</sub>
- γ. Δεν περιέχει EGTA
- δ. Περιέχει Tris
- ε. Το pH ρυθμίζεται στο 7,4, τιμή στην οποία είναι άριστη η λειτουργία των αιμοπεταλίων.

Η σύνθεση του διαλύματος συσσώρευσης είναι:

KCl: 195 mgr	CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O: 191 mgr
MgCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O: 212,5 mgr	EGTA: 0
NaCl: 8 gr	Ανυδρη γλυκόζη: 1 gr
NaHCO <sub>3</sub> : 0	Ζελατίνη 10% (25 ml)
Tris: 1,21 gr	Απεσταγμένο νερό: 800 ml

Τα δύο διαλύματα έκπλυσης και συσσώρευσης παρασκευάζονται με άσηπτο τρόπο, διότι τα μικρόβια καταστρέφουν τα υποστρώματα που περιέχουν και προκαλούν απευαισθητοποίηση των αιμοπεταλίων. Οι ποσότητες που παρασκευάζονται φυλάσσονται στους -20°C (200).



### 3. Διαλύματα Αγωνιστών και Αναστολέων

α) Για τη διάλυση του PAF χρησιμοποιούμε διάλυμα Λευκωματινής βοδινού ορού σε φυσιολογικό ορό (BSA - Saline) περιεκτικότητας 2,5 mgr/ml.

Παρασκευή διαλύματος Λευκωματινής: Σε 50 ml φυσιολογικού ορού (NaCl: 0,9%) διαλύονται με ήπια ανάδευση 250 mgr BSA (της Sigma) και ακολουθεί αιώρηση στα 100 ml φυσιολογικού ορού (NaCl: 0,9%). Το διάλυμα διατηρείται στους  $-20^{\circ}\text{C}$ . (200).

β) Παρασκευή διαλύματος PAF σε BSA - saline: Το μητρικό διάλυμα του PAF είναι 10  $\mu\text{g}$  P/ml (170  $\mu\text{g}$  PAF/ml) σε  $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}$  2:1 v/v και φυλάσσεται σε  $-20^{\circ}\text{C}$ . Από το διάλυμα αυτό λαμβάνονται 2ml και εξατμίζονται μέχρι πλήρους ξήρανσης σε ρεύμα αζώτου. Στο δοκιμαστικό σωλήνα που υπάρχει το ξηρό υπόλειμμα του PAF προστίθενται 2 ml του διαλύματος BSA - Saline (2 mgr/ml) και τον αφήνουμε 15 min σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για πλήρη διάλυση (201).

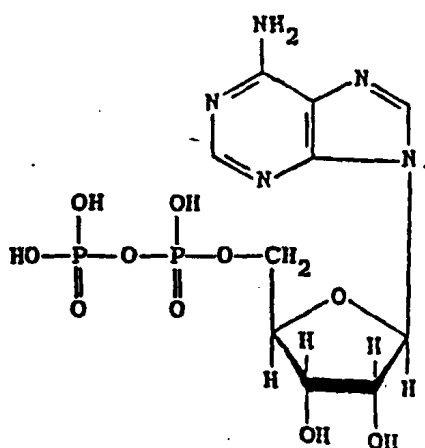
Από το διάλυμα αυτό με διαδοχικές αραιώσεις στο διάλυμα βόειας λευκωματινής λαμβάνονται τα εξής διαλύματα:

1. 2.5 $\mu\text{g}$ P/ml ή 42.5 $\mu\text{g}$ PAF/ml	αραίωση 1:4 του αρχικού
2. 0.63 $\mu\text{g}$ P/ml ή 10.6 $\mu\text{g}$ PAF/ml	αραίωση 1:4 του προηγούμενου
3. 0.16 $\mu\text{g}$ P/ml ή 2.7 $\mu\text{g}$ PAF/ml	αραίωση 1:4 του προηγούμενου
4. 0.04 $\mu\text{g}$ P/ml ή 0.68 $\mu\text{g}$ PAF/ml	αραίωση 1:4 του προηγούμενου
5. 0.004 $\mu\text{g}$ P/ml ή 0.068 $\mu\text{g}$ PAF/ml	αραίωση 1:4 του προηγούμενου

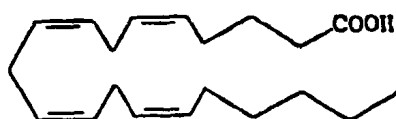
γ) Παρασκευή του Αραχιδονικού Οξέος (AA): Διαλύονται 10 mgr αραχιδονικού οξέος [(AA) MB: 304,5] σε 1 ml απόλυτης αιθανόλης 100%. Το διάλυμα αυτό είναι συγκέντρωσης 33mM, και διατηρείται στους  $-40^{\circ}\text{C}$  σε ατμόσφαιρα αζώτου. Για να χρησιμοποιηθεί το Αραχιδονικό οξύ στα πειράματα γίνονται οι εξής αραιώσεις: το αρχικό διάλυμα αραιώνεται 1/100 σε αιθανόλη 60%. Η συγκέντρωση του αραχιδονικού οξέος είναι τώρα 330  $\mu\text{M}$ . Το προηγούμενο διάλυμα αραιώνεται 1/1 επίσης σε αιθανόλη 60% και έτσι η τελική συγκέντρωση του AA είναι 165  $\mu\text{M}$ . Κατά τη διάρκεια του πειράματος το διάλυμα του AA τίθεται σε παγόλουτρο και από αυτό γίνονται οι κατάλληλες αραιώσεις με αιθανόλη (202).

δ) Παρασκευή ADP: Το ADP εμπεριέχεται υπό μορφή υδροδιαλυτής σκόνης στα αντιδραστήρια της μεθόδου ελέγχου συγκόλλησης των αιμοπεταλίων της SIGMA. Σε κάθε φιαλίδιο η διάλυση του ADP με απεσταγμένο νερό δίνει τελική συγκέντρωση 6.5  $\mu\text{M}$ . Από το διάλυμα αυτό που μπορεί να διατηρηθεί επί

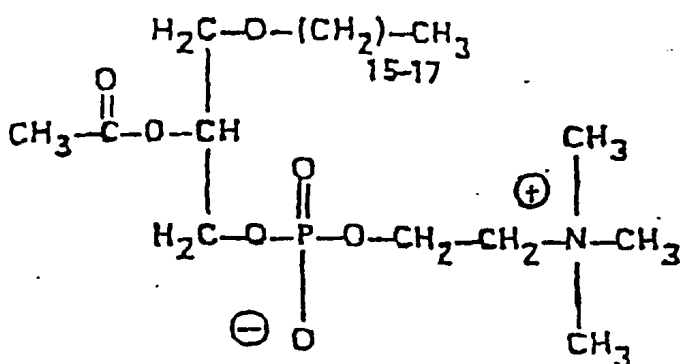




Αδενοσινοδιφωσφορικό οξύ (ADP)



Άραχιδονικό οξύ (AA)



Παράγοντας Ενεργοποίησης Αιμοπεταλίων (PAF)

Εικόνα 16:

Συντακτικοί τύποι των Αγωνιστών συσσώρευσης αιμοπεταλίων.



15νθήμερο τουλάχιστον σε 4° C, χρησιμοποιείται το ADP στην κατάλληλη ποσότητα.

ε) Παρασκευή του διαλύματος CP - CPK: 100 mgr CP (creatin-phosphate) διαλύονται σε 2.8 ml φυσιολογικού ορού. 500 U.I. CPK (creatin-phosphokinase) διαλύονται στα 300ml φυσιολογικού ορού (203).

#### 4. Δοκιμασθείσες Ουσίες

Οι ουσίες που δοκιμάσθηκαν στην παρούσα μελέτη παρασκευάσθηκαν ως εξής:

1. Αναχθείσα γλουταθειόνη, GSH, σε υδατικό διάλυμα μητρικής συγκέντρωσης  $10^{-1}$  M.
2. α- Μερκαπτοπροπιονύλ-γλυκίνη (2-MPG), υδατικό διάλυμα μητρικής συγκέντρωσης  $10^{-1}$  M
3. Ν-Ακετυλ-κυστεΐνη (NAC), σε υδατικό διάλυμα μητρικής συγκέντρωσης  $10^{-1}$  M.
4. D-Πενικιλλαμίνη, σε υδατικό διάλυμα μητρικής συγκέντρωσης  $10^{-1}$  M.
5. Ασκορβικό Οξύ (L-ασκορβικό - Βιταμίνη C), σε υδατικό διάλυμα μητρικής συγκέντρωσης  $2 \times 10^{-1}$  M.
6. Βουτυλικό υδροξυτολουένιο (BHT) διαλυμένο σε DMSO σε μητρική συγκέντρωση  $10^{-1}$  M.
7. Τριμεταζιδίνη (TMZ) (Servie) σε υδατικό διάλυμα μητρικής συγκέντρωσης  $8 \times 10^{-2}$  M.
8. Φαινυλ-Βουτυλ-νιτρόνιο (PBN) διαλυμένο σε DMSO μητρικής συγκέντρωσης  $10^{-1}$  M.
9. Δευδροασκορβικό Οξύ σε υδατικό διάλυμα μητρικής συγκέντρωσης  $2 \times 10^{-1}$  M.

Οι διαλύσεις των παραπάνω ουσιών γίνονταν καθημερινά προ του πειράματος και από τα μητρικά διαλύματα με περαιτέρω αραιώση γίνονταν οι μεγαλύτερες αραιώσεις για τις ανάγκες των πειραμάτων.

#### 5. Εκπλυση Αιμοπεταλίων (Αιμοπετάλια Κουνελιού)

Μετά την αιμοληψία ακολουθεί ήπια ανάδευση του σωλήνα που περιέχει το αίμα, για να επιτευχθεί καλή ανάμιξη του αίματος με το αντιπηκτικό (EGTA) και φυγοκέντριση στις 1500 στροφές για 20 λεπτά (min) . Μετά τη φυγοκέντριση λαμβάνεται με αυτόματη πιπέτα το υπερκείμενο πλάσμα με προσοχή, ώστε να μην



αναρροφώνται ερυθρά αιμοσφαίρια. Το πλάσμα αυτό έχει μεγάλη περιεκτικότητα σε αιμοπετάλια και λέγεται PRP (Plasma Rich Platelets). Το PRP τίθεται σε φυγοκέντριση στις 3100 στροφές επί 15 λεπτά (min). Στη φυγοκέντριση αυτή το μεγαλύτερο ποσοστό των αιμοπεταλίων κατακρημνίζεται στον πυθμένα σχηματίζοντας ένα λευκωπό στρώμα. Το υπερκείμενο πλάσμα γίνεται αρκετά διαυγές, έχει πολύ μικρή περιεκτικότητα σε αιμοπετάλια, συντομογραφικά συμβολίζεται ως PPP (Plasma Poor Platelets) και χρησιμοποιείται για τη ρύθμιση του συσσωρευομέτρου. Το PPP αφαιρείται με προσοχή από το σωλήνα φυγοκέντρισης, έτσι ώστε να μην αποσπώνται τεμάχια από το στρώμα των κατακρημνισθέντων αιμοπεταλίων. Μετά την απομάκρυνση του PPP και τη φύλαξή του (για ρύθμιση του συσσωρευομέτρου) τίθενται στο σωλήνα φυγοκέντρισης 10 ml διάλυμα έκπλυσης (TG - EGTA) με pH = 6.5. Με αυτόματη πιπέτα γίνεται μία σειρά από ήπιες αναρροφήσεις και εκτινάξεις του διαλύματος, ώστε τα αιμοπετάλια να αποκολληθούν από τον πυθμένα του σωλήνα και να διασπαρούν στο διάλυμα έκπλυσης χωρίς να σχηματίζουν συσσωματώματα. Μετά τη διαδικασία διασποράς ο σωλήνας συμπληρώνεται με το διάλυμα έκπλυσης μέχρι τα 40 ml και αναδεύεται με ήπιες ανατροπές. Ακολουθεί ολιγόλεπτη επώαση και φυγοκέντριση στις 3100 στροφές για 15 λεπτά, οπότε τα αιμοπετάλια κατακρημνίζονται στον πυθμένα του σωλήνα σχηματίζοντας ένα λευκωπό στρώμα.

Αφαιρείται το υπερκείμενο στρώμα και τα αιμοπετάλια αναδιασπείρονται, όπως και προηγουμένως, σε καθαρό διάλυμα έκπλυσης. Ο σωλήνας συμπληρώνεται μέχρι 40 ml και φυγοκεντρείται ξανά στις 3100 στροφές για 15 λεπτά. Επαναλαμβάνεται η ίδια διαδικασία για μία ακόμη φορά. Αφαίρεση υπερκείμενου, πρόσθεση νέου διαλύματος έκπλυσης, αναδιασπορά αιμοπεταλίων και συμπλήρωση του σωλήνα με διάλυμα έκπλυσης μέχρι τα 40 ml (204).

Από το διάλυμα (εναιώρημα) αυτό λαμβάνονται με αυτόματη πιπέτα 20 ml διαλύματος για αρίθμηση των αιμοπεταλίων στο μικροσκόπιο. Η διαδικασία παρουσιάζεται αναλυτικά στο τέλος της παραγράφου.

Στο διάλυμα των αιμοπεταλίων ακολουθούνται οι εξής διαδικασίες:

A. Για τη συσώρευση με PAF το εναιώρημα των αιμοπεταλίων επωάζεται με ακετυλοσαλικυλικό οξύ (ASA) 1nM και με συνδυασμό CP, 5nM και CPK 40U/ml για 15 λεπτά και 1 λεπτό αντιστοίχως πριν τη δοκιμασία στο συσσωρευόμετρο. Με την επεξεργασία αυτή αποκλείονται:

1. Με την ασπιρίνη (ASA) ο δρόμος συσώρευσης με αραχιδονικό οξύ (αναστολή της κυκλοξυγονάσης) (205,206).
2. Με το CP/CPK κλείνεται ο δρόμος του ADP (υδρόλυση του ADP) και έτσι τα αιμοπετάλια συσσωρεύονται αποκλειστικά με ενεργοποίηση του δρόμου του PAF (207,208).





Β. Για τη συσσώρευση με ADP τα αιμοπετάλια επωάζονται μόνο με ακετυλοσαλικιλικό οξύ (ASA).

Γ. Για τη συσσώρευση με αραχιδονικό οξύ (AA) τα αιμοπετάλια απωάζονται μόνο με CP/CPK.

Τα αιμοπετάλια, μετά την αντίστοιχη επώαση, υποβάλλονται σε φυγοκέντριση στις 3100 στροφές για 15 λεπτά και καθιζάνουν στον πυθμένα του σωλήνα. Τα αιμοπετάλια αναδιασπείρονται ξανά σε τόση ποσότητα διαλύματος έκπλυσης, ώστε να έχουμε συγκεκριμένο αριθμό αιμοπεταλίων ανά ml εναιωρήματος. Η ποσότητα αυτή δίνεται από την έκφραση  $X = 212.000 \times 3.4/N$

N είναι ο αριθμός αιμοπεταλίων ανά ml αίματος

X είναι τα ζητούμενα ml διαλύματος έκπλυσης

Το τελικό αυτό εναιώρημα είναι το Standard PRP που χρησιμοποιείται για τα πειράματα συσσώρευσης στο συσσωρευόμετρο.

#### **Αρίθμηση Αιμοπεταλίων**

Τα 20 ml εναιωρήματος αιμοπεταλίων που λαμβάνονται μετά τη δεύτερη αναδιασπορά αναμειγνύονται με 380 ml διαλύματος οξαλικού αμμωνίου 1%. Το οξαλικό αμμώνιο έχει την ικανότητα να καθιστά διπλοθλαστικά τα αιμοπετάλια, ώστε να φαίνονται σα χάνδρες στο οπτικό πεδίο του μικροσκοπίου. Το εναιώρημα που προκύπτει ανακινείται με ήπιες κινήσεις για λίγα λεπτά (γίνεται συγχρόνως επώαση). Μία μικρή ποσότητα του εναιωρήματος χρησιμοποιείται για την επιστροφή πλάκας Newbauer (Αιμοκυτόμετρο), πάνω στην οποία έχει τοποθετηθεί καλυπτρίδα. Μετά την επιστροφή η πλάκα μεταφέρεται σε τριβλίο Pietri, στο οποίο υπάρχει τεμάχιο βρεγμένου βαμβακιού, για να διατηρείται υγρή η ατμόσφαιρα. Το τριβλίο σκεπάζεται κατά το δυνατότερο στεγανά και τοποθετείται σε χώρο σταθερής θερμοκρασίας. Τα αιμοπετάλια καθιζάνουν και σταθεροποιούνται στο σταυρό της πλάκας σε διάστημα 30 λεπτών. Μετά τη σταθεροποίηση η καταμέτρηση των αιμοπεταλίων γίνεται με κοινό μικροσκόπιο με μεγέθυνση 40X. Μετρούνται τα αιμοπετάλια 5 τετραγώνων, 80 μικρών, του κεντρικού τετραγώνου της πλάκας. Το συνολικό άθροισμα πολλαπλασιάζεται επί 1000 και δίνει τον αριθμό των αιμοπεταλίων ανά ml αίματος. Το σφάλμα της μεθόδου είναι 11-15% (μέθοδος Brecher - Cronkite). Τα αιμοπετάλια διακρίνονται καθαρά λόγω της διπλοθλαστικότητας και δε συγχέονται με λευκοκύτταρα (209).

Η αρίθμηση έγινε επίσης με τη χρήση Coulter Counter (D. Industrial με αραιωτή D.D.III).



## 6. Ανθρώπινα Αιμοπετάλια

### α. Αιμοληψία από Ανθρώπους

Ελήφθη αίμα από 10 άρρενες εθελοντές ηλικίας 25-40 ετών. Σε κάθε άτομο έγιναν δύο αιμοληψίες σε διάστημα 15 ημερών. Οι δότες ήταν υγιείς, μη καπνιστές, και δεν έκαναν χρήση φαρμακευτικών ουσιών τις δύο τελευταίες εβδομάδες πριν τις αιμοληψίες. Οι αιμοληψίες έγιναν από το φλεβικό σκέλος της κυκλοφορίας, τη μεσοβασίλική φλέβα, με χρήση κατάλληλης βελόνας, 19G, και με ελεύθερη ροή από το στόμιο της βελόνας. Το αίμα συγκεντρώθηκε σε ειδικούς πλαστικούς σωλήνες των 50 ml. Σε κάθε αιμοληψία ελήφθησαν 36ml αίματος. Για αντιπηκτικό διάλυμα χρησιμοποιήθηκε η ουσία EDTA 0.2 % σε αναλογία 1ml ανά 9ml αίματος. Έτσι σε κάθε αιμοληψία η συνολική ποσότητα ήταν 36 ml αίμα + 4 ml EDTA = 40 ml (210).

### β. Παρασκευή Ανθρώπινου PRP

Μετά την αιμοληψία το αίμα αναδεύεται ήπια και φυγοκεντρείται για 20 λεπτά στις 1500 στροφές. Μετά την φυγοκέντριση λαμβάνονται με προσοχή τα υπερκείμενα 2/3, που αποτελούν το PRP. Από αυτό 20 ml χρησιμοποιούνται για αρίθμηση των αιμοπεταλίων στο μικροσκόπιο με τη μέθοδο που προαναφέρθηκε ή με τη χρήση του Coulter Counter.

Το υπόλοιπο υπερκείμενο φυγοκεντρείται στις 3100 για 15 λεπτά και τα αιμοπετάλια κατακρημνίζονται στον πυθμένα του σωλήνα. Αφαιρείται το υπερκείμενο που αποτελεί το PPP. Τα αιμοπετάλια διασπείρονται σε τόση ποσότητα PPP, όση απαιτείται από τη μαθηματική έκφραση που προαναφέρθηκε ( $X = 212.000 \times 3.4/N$ ).

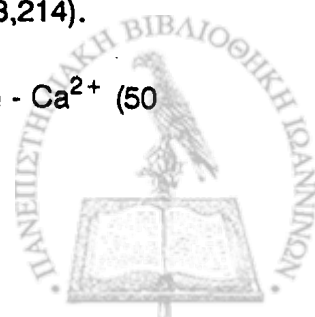
Όταν τελειώσει η διασπορά το PRP είναι έτοιμο για χρήση.

Κατά την πειραματική διαδικασία χρησιμοποιούνται 100 μl PRP και 400 μl PPP. Μετά την αραιώση σε PPP για τα ανθρώπινα αιμοπετάλια ή σε TG -  $Ca^{2+}$  για τα πλυμένα αιμοπετάλια κουνελιού ο αριθμός των αιμοπεταλίων είναι  $2.9 \times 10^9$  κύτταρα/ml (210,211,212).

## 7. Μέτρηση Συσσώρευσης των Αιμοπεταλίων στο Συσσωρευόμετρο

Το συσσωρευόμετρο είναι μάρκας Chronolog και χρησιμοποιείται γυάλινη κυβέτα 0.5 ml. Το μετρούμενο διάλυμα βρίσκεται εντός της συσκευής υπό συνεχή ανάδευση με ειδικό μαγνήτη και σε σταθερή θερμοκρασία 37°C (213,214).

Ρύθμιση (βαθμολόγηση του οργάνου): Το διάλυμα συσσώρευσης TG -  $Ca^{2+}$  (50



ml) ρυθμίζεται σε pH = 7.4 και διατηρείται σε σταθερή θερμοκρασία 37°C.

Στην κυβέτα του συσσωρευομέτρου τοποθετούνται:

1. ένας μικρός μαγνήτης επενδεδυμένος με πλαστικό ή εμβαπτισμένος σε σιλκόνη.
2. 400 μl διαλύματος TG - Ca<sup>2+</sup>.

Η κυβέτα τοποθετείται στη σχισμή υποδοχής. Με το διακόπτη που έχει ένδειξη PRP φέρεται η γραφίδα του καταγραφικού στην ένδειξη 10 πάνω στο καταγραφικό χαρτί. Αφαιρείται η κυβέτα αυτή και στο συσσωρευόμετρο τοποθετείται δεύτερη κυβέτα που περιέχει:

1. επενδεδυμένο ή σιλικοναρισμένο μαγνήτη
2. 400 μl διαλύματος TG - Ca<sup>2+</sup>
3. 100 μl πλάσμα πλούσιο σε αιμοπετάλια (PRP)

Με το διακόπτη που έχει την ένδειξη PRP φέρεται η γραφίδα του καταγραφικού στην ένδειξη 100 πάνω στο καταγραφικό χαρτί.

Μετά από τις ρυθμίσεις αυτές αρχίζουν οι μετρήσεις συσσώρευσης ως εξής:

Κάθε κυβέτα περιέχει:

1. επενδεδυμένο μαγνήτη
2. 395 μl διαλύματος TG - Ca<sup>2+</sup>
3. 5 μl διαλύματος "αγωνιστή"

Η κυβέτα τοποθετείται στο συσσωρευόμετρο και ελέγχεται αν η γραφίδα του καταγραφικού είναι στην ένδειξη 10. Από την κατάλληλη σχισμή του συσσωρευομέτρου παρατηρείται αν η ανάδευση γίνεται ομαλά χωρίς φυσαλίδες ή αιωρούμενα στερεά. Κατόπιν προστίθενται στην κυβέτα 100μl PRP με αυτόματη πιπέτα και με ήπια εκκένωση. Αν τα αιμοπετάλια είναι λειτουργικά, αρχίζει η συσσώρευσή τους και γράφεται στο καταγραφικό χαρτί με μορφή σιγμοειδούς καμπύλης.

Η διαδικασία επαναλαμβάνεται με αυξομειούμενες συγκεντρώσεις "αγωνιστή", για να προσδιοριστούν οι ποσότητες που προκαλούν μέγιστη συσσώρευση, 50% της μέγιστης και ελάχιστη συσσώρευση. Η διαδικασία επαναλαμβάνεται για να διαπιστωθεί η επαναληψιμότητα του πειράματος και δίνει τις καμπύλες των "μαρτύρων" 100%, 50%, ελάχιστης συσσώρευσης. Μετά τον προσδιορισμό των "μαρτύρων" στις κυβέτες προστίθενται οι "προς εξέταση" ουσίες στις απαιτούμενες συγκεντρώσεις σε όγκους διαλύματος τέτοιους, ώστε ο συνολικός όγκος του εντός της κυβέτας υγρού να είναι 500 μl, και εκτελούνται οι αντίστοιχες καταγραφές.

Αν η εξεταζόμενη ουσία είναι αδρανής, τότε οι καμπύλες συσσώρευσης είναι όμοιες με τους αντίστοιχους μάρτυρες. Στην περίπτωση που η εξεταζόμενη ουσία προκαλεί αναστολή της δράσης του αγωνιστή, οι καμπύλες συσσώρευσης είναι χαμηλότερες ή διαφορετικής μορφής από τους μάρτυρες ή δε σχηματίζονται



καθόλου. Τέλος αν η εξεταζόμενη ουσία προκαλεί αύξηση της δράσης του "αγωνιστή", η καταγραφόμενη καμπύλη είναι μεγαλύτερη από του αντίστοιχου μάρτυρα.

Όλες οι εξετασθείσες ουσίες δοκιμάσθηκαν από 10 φορές στην κάθε συγκέντρωση και καταγράφηκε η δράση τους για κάθε αγωνιστή σε επί τοις εκατό αναστολή της μέγιστης συσώρευσης ή της συσώρευσης της συγκέντρωσης ελέγχου του αγωνιστή. Οι μετρήσεις σε κάθε συγκέντρωση επεξεργάσθηκαν στατιστικά και υπολογίσθηκε η μέση τιμή, η σταθερά απόκλιση (SD) και το σταθερό σφάλμα (SE). Οι συγκεντρώσεις των υπό εξέταση ουσιών αυξάνονταν μέχρι το επίπεδο όπου καταγράφονταν η μέγιστη αναστολή της συσώρευσης, πέραν της οποίας ο αναστολέας δεν εμφάνιζε μεγαλύτερη αύξηση της ανασταλτικής του δράσης (μέγιστη αναστολή), παρά την αύξηση της συγκέντρωσής του.

#### 8. Δοκιμασίες Ελέγχου Λειτουργικής και Ανατομικής Ακεραιότητας των Αιμοπεταλίων

Για να αποκλεισθεί η πιθανή μείωση της λειτουργικότητας των αιμοπεταλίων από "τοξική" δράση των μελετηθέντων ουσιών, 100μl πλυμένων αιμοπεταλίων ( $2.9 \times 10^9$  κυττ/ml) διεσπάρησαν σε 400μl διαλύματος συσώρευσης TG- $Ca^{2+}$ . Εν συνεχεία μέσα στις κυβέτες πρόστέθηκαν στις μέγιστες συγκεντρώσεις οι υπό δοκιμή ουσίες, οι οποίες δοκιμάσθηκαν στην παρούσα εργασία (σε πέντε κυβέτες για κάθε ουσία) δηλαδή:

GSH: $10^{-2}$ M	2-MPG: $4 \times 10^{-3}$ M	N-AC: $1.5 \times 10^{-3}$ M
Bit C: $10^{-2}$ M	Δευδροασκορβικό οξύ: $4 \times 10^{-2}$ M	TMZ: $6 \times 10^{-3}$ M
BHT: $4 \times 10^{-3}$ M	PBN: $8 \times 10^{-3}$ M	D-P: $1 \times 10^{-3}$ M

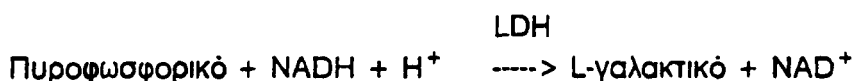
Στη συνέχεια τα δείγματα μαζί με πέντε κυβέτες που περιείχαν μόνο TG- $Ca^{2+}$  και 100μl αιμοπετάλια επώασθηκαν στους  $37^\circ C$  επί δύο ώρες και μετρήθηκε η Γαλακτική αφυδρογονάση (LDH) στο υπερκείμενο διάλυμα, όπως περιγράφεται παρακάτω:

##### α. Μέτρηση της Γαλακτικής Αφυδρογονάσης (LDH)

Για τη μέτρηση της γαλακτικής αφυδρογονάσης (LDH) χρησιμοποιήθηκε φωτομετρική μέθοδος, όπως περιγράφεται (215,216) με τη χρήση του Monotest LDH ott (Boehringer).

Η βασική αρχή της μεθόδου συνίσταται στην αντίδραση:





Στο δείγμα χρησιμοποιήθηκε το υπερκείμενο του εναιωρήματος των αιμοπεταλίων TG-Ca<sup>2+</sup>.

Σαν αντιδραστήρια χρησιμοποιήθηκαν:

Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικού:	50 mmol/l.	pH=7.5
Πυροφωσφορικό:	0.6 mmol/l	
NADH:	0.18 mmol/l	

Στη συνέχεια στις κυβέτες του φωτομέτρου, σε θερμοκρασία 37°C προστίθενται σε τελικό όγκο 0.995ml των αντιδραστηρίων και 0.05 ml του υπό μέτρηση δείγματος. Το περιεχόμενο αναδεύεται και μετριέται η απορρόφηση στα 340 nm, ως μέση απορρόφηση στο 1,2,3,0 λεπτό. Για την εκτίμηση της δραστηριότητας της LDH η μέση τιμή της απορρόφησης (ΔΑ 340/min) του δείγματος υπολογίζεται με τον τύπο: U/l (37°C) = 9683xΔΑ340/min.

### **β. Μικροσκοπικός Έλεγχος Αιμοπεταλίων**

Από τις κυβέτες αυτές μετά από ανάδευση έγινε επιστροφή αιμοπεταλίων σε αντικειμενοφόρες πλάκες. Εν συνεχεία έγινε χρώση των αιμοπεταλίων με αιματοξυλίνη-ηωσίνη, όπως περιγράφεται παρακάτω:

#### **Μέθοδος Χρώσης Αιματοξυλίνης-ηωσίνης (Eosin-Hematoxylene Technique)**

Τα αιμοπετάλια μονιμοποιούνται με ακετόνη (2-4 λεπτά), εκπλύνονται με απεσταγμένο νερό και στη συνέχεια επωάζονται για ένα λεπτό με διάλυμα αιματοξυλίνης. (Haccis Hematoxylene solution -MERCCK). Στη συνέχεια, αφού γίνει έκπλυση για 5 λεπτά με νερό βρύσης και με 0.25% όξινης αλκοόλης και εκπλυθούν με νερό βρύσης (5 λεπτά) και 95% αλκοόλης, χρωματίζονται με διάλυμα ηωσίνης για 30 δευτερόλεπτα (Eosin G for microscopy MERC). Στη συνέχεια, μετά από δύο διαδοχικές εμβαπτίσεις των 2 λεπτών σε αλκοόλη 95%, 4 διαδοχικές εμβαπτίσεις των 2 λεπτών σε απόλυτη αλκοόλη και 4 διαδοχικές εμβαπτίσεις των 2 λεπτών σε ξυλόλη, τα πλακίδια είναι έτοιμα για μικροσκόπηση.

Τα αιμοπετάλια ελέγχθηκαν σε οπτικό μικροσκόπιο, για να διαπιστωθεί η ανατομική τους ακεραιότητα ή μεταβολές του σχήματός τους (209).



## 9. Πειράματα Αναστολής της Συσσώρευσης με Ειδικές Συνθήκες

Σε PRP ανθρώπου προστέθηκαν στις κυβέτες του συσσωρευομέτρου διαδοχικές συγκεντρώσεις D-πενικιλλαμίνης  $1 \times 10^{-3}$  M,  $2 \times 10^{-3}$  M,  $3 \times 10^{-3}$  M και  $4 \times 10^{-3}$  M και σε άλλες N-Ακετυλ-κυστεΐνη σε όμοιες συγκεντρώσεις όπως παραπάνω. Χρησιμοποιήθηκαν πέντε κυβέτες για κάθε συγκέντρωση και ουσία. Σε πέντε κυβέτες επίσης προστέθηκε μόνο PRP. Όλες οι κυβέτες επώασθηκαν σε υδατόλουτρο επί μία ώρα σε θερμοκρασία  $37^{\circ}$  C και μετά έγινε δοκιμασία συσώρευσης των αιμοπεταλίων με ADP τελικής συγκέντρωσης 2  $\mu$ M.

## 10. Πειράματα Αποσυσώρευσης Αιμοπεταλίων

Αφού υπολογίσθηκε με τη βοήθεια του συσσωρευομέτρου η συγκέντρωση με την οποία οι χρησιμοποιηθέντες αγωνιστές AA, ADP και PAF προκαλούν μέγιστη μη αναστρέψιμη συσώρευση πλυμένων αιμοπεταλίων κουνελιού, δοκιμάσθηκαν οι αναστολείς της συγκόλλησης ως πιθανοί αποσυσσωρευτές των αιμοπεταλίων, *in vitro*, με την ακόλουθη διαδικασία.

α. Στην κυβέτα του συσσωρευομέτρου ετέθη το διάλυμα συσώρευσης (TG- $\text{Ca}^{2+}$ ), 100 μl πλυμένα αιμοπετάλια κουνελιού ( $2.9 \times 10^4$  κύτταρα/ml), και αγωνιστής (AA, ADP, PAF) στη συγκέντρωση μέγιστης συσώρευσης σε τελικό όγκο 500 μl. Ακολούθως έγινε η καταγραφή της συσώρευσης για 5 min.

β. Στο παραπάνω μείγμα της κυβέτας προστίθετο σε διάφορους χρόνους μετά την έναρξη της συσώρευσης (1 και 4 λεπτά) ο αναστολέας σε συγκέντρωση ίση με αυτή που επετύγχανε τη μέγιστη αναστολή του αγωνιστή στα πειράματα συσώρευσης, σε τελικό όγκο 500 μl. Σε όλη τη διάρκεια της διαδικασίας γινόταν καταγραφή της εξέλιξης της συσώρευσης - αποσυσώρευσης.

Στα πειράματα αυτά ο PAF χρησιμοποιήθηκε σε τελική συγκέντρωση 100  $\mu$ M, το αραχιδονικό οξύ (AA) σε 65  $\mu$ M και το ADP σε 2  $\mu$ M.

Οι ουσίες που δοκιμάσθηκαν για αποσυσσωρευτική δράση προστίθεντο σε τελικές συγκεντρώσεις GSH:  $10^{-3}$  M, 2-MPG:  $10^{-3}$  M, N-Ακετυλ-κυστεΐνη  $5 \times 10^{-3}$  M, Βιταμίνη C:  $10^{-2}$  M, Τριμεταζιδίνη:  $6 \times 10^{-3}$  M, BHT:  $4 \times 10^{-3}$  M και PBN:  $8 \times 10^{-3}$  M.

## 11. Πειράματα Αναστολής της Συγκόλλησης Αιμοπεταλίων με Υπεροξειδίο-δισμουτάση (SOD)

Στο εναιώρημα πλυμένων αιμοπεταλίων κουνελιού (100 μl), σε διάλυμα συσώρευσης (400 μl) στις κυβέτες του συσσωρευομέτρου προστέθηκε



Υπεροξειδιο-δισμουτάση (SOD), σε συγκεντρώσεις 10u/ml, 20u/ml, 50u/ml, 100u/ml, 200u/ml, 300u/ml, 500u/ml. Στη συνέχεια δοκιμάσθηκε η δυνατότητα αναστολής της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων από τους αγωνιστές ADP, PAF και αραχιδονικό οξύ, τόσο σε συγκεντρώσεις μέγιστης συσσώρευσης (ADP:2  $\mu\text{M}$ , PAF:100  $\mu\text{M}$ , AA:65  $\mu\text{M}$ ), όσο και σε συγκεντρώσεις που προκαλούν αναστρέψιμες συσσωρεύσεις (ADP:1 mM, PAF:50  $\mu\text{M}$  και AA:30  $\mu\text{M}$ ).

## 12. Πειράματα Οξειδωσης Βιταμίνης C

Η οξείδωση του Ασκορβικού Οξέος (Βιταμίνη C) μετρήθηκε φασματοφωμετρικά ως μεταβολή της απορρόφησης στα 265 nm, ( $\epsilon_{265} = 14500 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) σε συγκεντρώσεις  $\mu\text{M}$  και pH=7.4 (165).

Χρησιμοποιήθηκε το φασματοφωτόμετρο Hitachi Mod 100-406. Οι μετρήσεις έγιναν στις κυβέτες του φασματοφωτομέτρου ως εξής:

1. Σε μία κυβέτα που περιείχε 2 ml διαλύματος συσσώρευσης ( $\text{TG-Ca}^{2+}$ ) και βιταμίνης C τελικής συγκέντρωσης  $10^{-7} \text{ M}$ .
2. Σε μία κυβέτα που περιείχε 2 ml διαλύματος συσσώρευσης, Βιταμίνης C ( $10^{-7} \text{ M}$ ) και αιμοπετάλια  $5.8 \times 10^6$  κύτταρα.
3. Σε μία κυβέτα που περιείχε 2 ml διαλύματος συσσώρευσης, Βιταμίνης C, ( $10^{-7}$ ) και PAF ( $10^{-7} \text{ M}$ ).
4. Σε μία κυβέτα που περιείχε 2 ml διαλύματος συσσώρευσης, αιμοπετάλια ( $5.8 \times 10^6$  κύτταρα), Βιταμίνη C ( $10^{-7} \text{ M}$ ) και PAF ( $10^{-7} \text{ M}$ ).

Η φασματοφωμετρική καταγραφή του φάσματος απορρόφησης της Βιταμίνης C σε κάθε κυβέτα έγινε σε μήκος κύματος διέγερσης 265 nm ανά 30 δευτερόλεπτα επί 5 λεπτά (300 sec). Τα αποτελέσματα καταγράφηκαν ως μεταβολή απορρόφησης ( $\Delta\text{mA}$ ) του φάσματος του ασκορβικού οξέος στους αντίστοιχους χρόνους. Έγινε επίσης φυγοκέντριση επί 1 min στις 2000 στροφές ανά λεπτό, του περιεχομένου κάθε κυβέτας, και το υπερκείμενο μετρήθηκε με την παραπάνω διαδικασία.

Τα αποτελέσματα των παραπάνω μετρήσεων με εύρεση μέσης τιμής και σταθεράς απόκλισης φαίνονται στους πίνακες 30,31,32,33 και στο σχήμα 9.

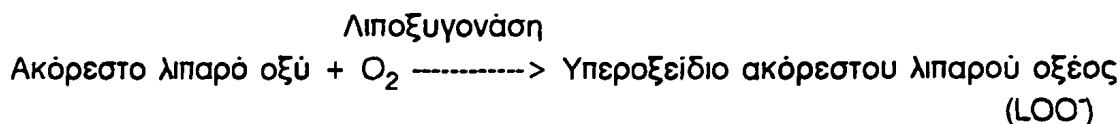
## 13. Δοκιμασία Πρόκλησης Συσσώρευσης των Αιμοπεταλίων με Υπεροξειδιο του Υδρογόνου ( $\text{H}_2\text{O}_2$ )



Σε κυβέτες που περιείχαν 100 μl πλυμένων αιμοπεταλίων κουνελιού ( $2.9 \times 10^9$  κύτταρα/ml) διεσπαρμένων σε 400 μl διαλύματος συσσώρευσης (TG- $\text{Ca}^{2+}$ ) με pH=7.4 υπό συνεχή ανάδευση (1200 r.p.m) και θερμοκρασία 37° C, στο συσσωρευόμετρο προστέθηκαν διάφορες ποσότητες υδατικού διαλύματος υπεροξειδίου του υδρογόνου 30% (MERCK) σε τελικές συγκεντρώσεις 1%,2%,3%,4% και 5% και ελέγχθησαν επί πέντε λεπτά το κάθε δείγμα (σε τριπλές μετρήσεις) για συσσώρευση των αιμοπεταλίων.

#### 14. Αντίδραση Λιποξυγονάσης

Η αντίδραση αυτή είναι μία ενζυματική δοκιμή που βασίζεται στη "Μέθοδο χαμηλού περιεχομένου στην αιθανόλη". Η λιποξυγονάση (ή λιποξειδάση ή ένζυμο EC 1.13.11.12) καταλύει την ακόλουθη αντίδραση:



Κατά την εργαστηριακή εκτέλεση της αντίδρασης αυτής χρησιμοποιήθηκαν τα εξής αντιδραστήρια:

##### 1. Ρυθμιστικό διάλυμα Βορικού Οξέος 0.2 M pH 9 (Αντιδραστήριο Α)

Βορικό Οξύ:  $\text{H}_3\text{BO}_3$  MB:61.83.

Σε 300ml δισαπεσταγμένου ύδατος διαλύονται 6.18 gr βορικού οξέος (Sigma). Κατά τη διάλυση ρυθμίζεται το pH αρχικά στην τιμή 8 με διάλυμα NaOH (50%) και στη συνέχεια με διάλυμα NaOH (10%) το pH φέρεται στην τελική τιμή 9. Στο διάλυμα αυτό προστίθεται δισαπεσταγμένο νερό, έτσι ώστε το τελικό διάλυμα να έχει όγκο 500 ml και κανονικότητα 0.2 M.

##### 2. Διάλυμα υποστρώματος (Αντιδραστήριο Β).

Λινελαϊκό Οξύ:  $\text{CH}_3(\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH})_3(\text{CH}_2)_7\text{CO}_2\text{H}$  MB:278.44.

Σε ογκομετρική φιάλη 50 ml τοποθετούνται 0.05 ml Λινολεικού οξέος (Sigma) και 0.05 ml μη μετουσιωμένης αιθανόλης 95%. Το μείγμα αναδεύεται ήπια και προκύπτει ένα γαλάκτωμα. Στο μείγμα αυτό και ενώ συνεχίζεται η ανάδευση, προστίθεται δισαπεσταγμένο νερό μέχρι τα 50 ml. Για να χρησιμοποιηθεί το διάλυμα αυτό στην αντίδραση, αραιώνονται 5 ml του διαλύματος αυτού σε 30 ml του αντιδραστήριου Α.





### 3. Διάλυμα Λιποξυγονάσης (Διάλυμα Γ).

Σε ορισμένη ποσότητα ρυθμιστικού διαλύματος βορικού οξέος (Αντιδραστήριο Α) διάλυεται ποσότητα Λιποξυγονάσης σε αναλογία 10.000 μονάδες Λιποξυγονάσης ανά 1 ml Αντιδραστηρίου Α. Στις πειραματικές μετρήσεις χρησιμοποιούνται 500 μονάδες Λιποξυγονάσης ανά 3 ml (χωρητικότητα κυψελίδας) αντιδρώντος μείγματος. Ως μονάδα Λιποξυγονάσης (1 Unit) ορίζεται η ποσότητα της Λιποξυγονάσης που προκαλεί αύξηση της απορρόφησης στα 234 nm, κατά 0.001 ανά λεπτό, σε pH 9, και θερμοκρασία 25°C, με υπόστρωμα Λινελαικό Οξυ.

#### Διαδικασία Μέτρησης

Το φωτόμετρο που χρησιμοποιήθηκε είναι Hitachi model 100-40 spectrophotometer.

Σε κάθε δοκιμή χρησιμοποιούνται δύο κυψελίδες από χαλαζία. Στην πρώτη τίθεται η ένδειξη "έλεγχος", στη δεύτερη η ένδειξη "δοκιμή" και προστίθενται τα εξής αντιδραστήρια:

Αντιδραστήριο	Έλεγχος	Δοκιμή	Δοκιμή Αναστολέα
Ρυθμιστικό διάλυμα (Αντιδραστήριο Α)	1 ml	0.95 ml	0.950 ml
Διάλυμα υποστρώματος ( " Β)	2 ml	2.00 ml	2.000 ml
Διάλυμα Λιποξυγονάσης ( " Γ)	0	0.05 ml	0.050 ml
Διάλυμα Αναστολέα	0	0	0.003 ml
<b>Αθροισμα</b>	<b>3 ml</b>	<b>3 ml</b>	<b>3.003 ml</b>

Όταν προστεθεί το διάλυμα της Λιποξυγονάσης, οι κυψελίδες τοποθετούνται ταχέως στο φωτόμετρο και καταγράφεται η μεταβολή της απορρόφησης στα 234 nm. Ο ρυθμός αντίδρασης είναι ταχύς στα πρώτα 3 min. Μετά επιβραδύνεται μέχρι τελικής σταθεροποίησης. Ο προσδιορισμός της μεταβολής της απορρόφησης ( $\Delta A_{234}$ ) στο χρονικό διάστημα των τριών πρώτων λεπτών χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό της ειδικής δραστηριότητας του ενζύμου. Τα φαινόμενα αναστολής της δραστηριότητας της Λιποξυγονάσης από τις δοκιμασθείσες ουσίες εξάγονται συγκρίνοντας την καμπύλη απορρόφησης της ουσίας με την καμπύλη απορρόφησης της Λιποξυγονάσης.

Για τη μελέτη της δράσης των ουσιών που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη ακολουθήθηκε η παρακάτω διαδικασία:



α. Στην κυβέτα του φασματοφωτομέτρου με τα αντιδραστήρια Α και Β προστέθηκαν σε όγκο 3 ml διάφορες συγκεντρώσεις των ουσιών αυτών. Στη συνέχεια προστέθηκε το διάλυμα της Λιποξυγονάσης και έγινε επί 3 λεπτά καταγραφή του φάσματος απορρόφησης.

β. Κατά τη διάρκεια της αντίδρασης στην κυβέτα του φασματοφωτομέτρου κατά το 2ο λεπτό μετά την έναρξη της αντίδρασης γίνονταν πρόσθεση 3 ml των υπό μελέτη ουσιών σε συγκέντρωση  $10^{-4}$  M.

Οι ουσίες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν: Μία σουλφωδρυλική ένωση η αναχθείσα γλουταθειόνη, μία αντιοξειδωτική-αναγωγική, η βιταμίνη C, ένας εκκαθαριστής ριζών, η τριμεταζιδίνη και ένας παγιδευτής sπρή, το φαινυλ-βουτυλ-νιτρόνιο.

Όλες οι ουσίες χρησιμοποιήθηκαν σε συγκεντρώσεις  $10^{-4}$ M,  $10^{-5}$ M,  $10^{-6}$ M. Για κάθε συγκέντρωση της ουσίας έγιναν πέντε μετρήσεις. Για τον έλεγχο η αντίδραση Λιποξυγονάσης καταγράφηκε δέκα φορές.

Στα αποτελέσματα έγινε στατιστική επεξεργασία και η καταγραφή τους έγινε υπό μορφή καμπύλης μεταβολής απορρόφησης - χρόνου.



## ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης είναι τα ακόλουθα:

### 1: Αποτελέσματα Ελέγχου Λειτουργικής και Ανατομικής Ακεραιότητας των Αιμοπεταλίων

Οι τιμές της LDH στο διάλυμα συσώρευσης των αιμοπεταλίων, μετά από επώαση δύο ωρών σε 37° C με τις μέγιστες συγκεντρώσεις των ουσιών που δοκιμάστηκαν φαίνονται στον Πίνακα που ακολουθεί (Πίνακας 1).

LDH U/L

α/α	Ελεγχος	GSH	2MPG	NAC	D-P
1	18	19	21	22	22
2	19	18	20	24	19
3	21	22	23	20	23
4	20	20	19	23	21
5	17	18	21	20	24
MT±SD	19±1.6	19.4±1.6	20.8±1.5	21.8±1.8	21.8±1.9

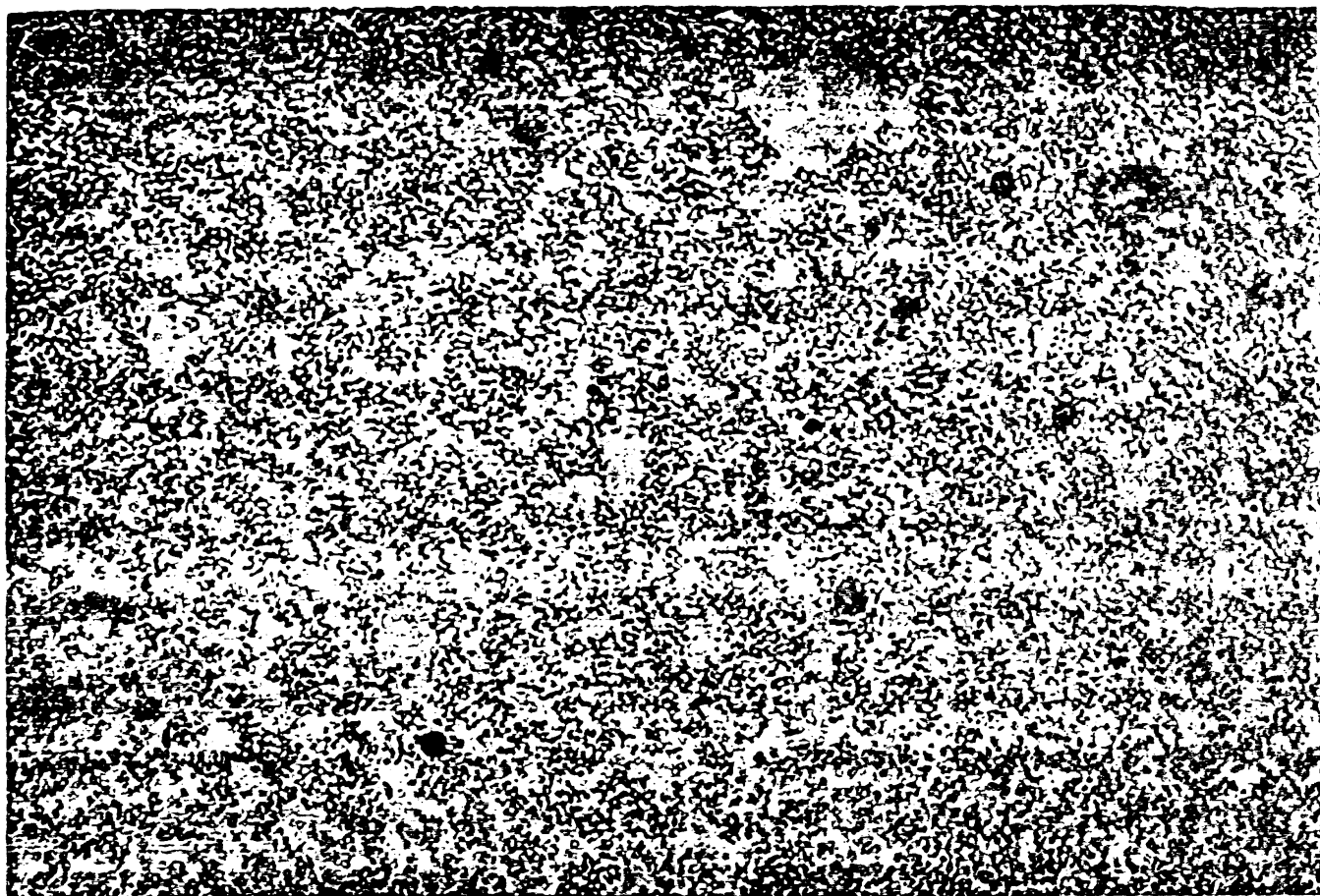
α/α	Bit C	Δευδρο-ασκορβικό	TMZ	BHT	PBN
1	18	22	23	21	23
2	20	21	19	24	22
3	19	18	22	18	21
4	18	23	20	19	20
5	21	22	24	23	22
MT±SD	19.2±1.3	21.2±1.6	21.6±2	21±2.5	21.6±1.1

Πίνακας 1: Τιμές LDH αιμοπεταλίων (100μl, 2X10<sup>9</sup>κυττ/ml) σε TG-Ca<sup>2+</sup> μετά από επώαση 2 ωρών με μέγιστες συγκεντρώσεις των ουσιών που εξετάστηκαν.

Η σύγκριση των μέσων τιμών LDH κάθε ουσίας με αυτές των τιμών ελέγχου έδειξαν ότι δεν υπήρξε στατιστικά σημαντική διαφορά μετά την δίωρη επώαση των αιμοπεταλίων με τις ουσίες που δοκιμάστηκαν.



Ο μικροσκοπικός έλεγχος των αιμοπεταλίων, μετά από διώρη επώαση με τις ουσίες που χρησιμοποιήθηκαν, έδειξε ότι δεν υπήρξαν μεταβολές του σχήματος ή της χρώσης των αιμοπεταλίων ή διαφορές των μικροσκοπικών εικόνων πριν και μετά την επώαση.



### Φωτόγραφια 1

Μικροσκοπική εικόνα αιμοπεταλίων σε TG-Ca<sup>2+</sup> μετά από επώαση 2 ωρών στους 37° C (μεγέθυνση X40, χρώση αιματοξυλίνης-ηωσίνης).





**Φωτογραφία 2**

Μικροσκοπική εικόνα αιμοπεταλίων σε TG-Ca<sup>2+</sup> με PBN μετά από επώαση 2 ωρών στους 37° C (μεγέθυνση X40, χρώση αιματοξυλίνης-ηωσίνης).



**Φωτογραφία 3**

Συσσωρευμένα αιμοπετάλια με PAF (μεγέθυνση X40, χρώση αιματοξυλίνης-ηωσίνης)



## 2. Αποτελέσματα αναστολής της συσσώρευσης αιμοπεταλίων από τις ουσίες που δοκιμάστηκαν:

Οι ουσίες που χρησιμοποιήθηκαν για την αναστολή της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων της προκαλούμενης από τους τρεις αγωνιστές (διεγέρτες) ADP, αραχιδονικό και PAF, προκάλεσαν δόσοεξαρτώμενη αναστολή της συσσώρευσης. Λεπτομερώς η ποσοστιαία αναστολή που επιτεύχθηκε από κάθε ουσία στις αντίστοιχες συγκεντρώσεις φαίνεται στους παρακάτω πίνακες και σχήματα.

### A. Αναχθείσα Γλουταθειόνη (GSH)

#### Πίνακας 2

Ποσοστά αναστολής συσσώρευσης αιμοπεταλίων κουνελιού από Αραχιδονικό οξύ (AA 65  $\mu\text{M}$ ) με διάφορες συγκεντρώσεις (τελικές) αναχθείσας γλουταθειόνης (GSH).

Γλουταθειόνη (GSH)	Αναστολή συσσώρευσης %
$2 \times 10^{-4}$ M	$15.2 \pm 2.8$
$4 \times 10^{-4}$ M	$28.4 \pm 3.1$
$6 \times 10^{-4}$ M	$56.2 \pm 1.8$
$8 \times 10^{-4}$ M	$83.5 \pm 2.9$
$1 \times 10^{-3}$ M	$99.1 \pm 1.3$

#### Πίνακας 3

Ποσοστά αναστολής συσσώρευσης αιμοπεταλίων κουνελιού από PAF (100  $\mu\text{M}$ ) με διάφορες συγκεντρώσεις (τελικές) αναχθείσας γλουταθειόνης (GSH).

Γλουταθειόνη (GSH)	Αναστολή συσσώρευσης %
$2 \times 10^{-4}$ M	$33.3 \pm 2.4$
$3 \times 10^{-4}$ M	$45.0 \pm 3.1$
$4 \times 10^{-4}$ M	$91.6 \pm 2.7$
$6 \times 10^{-4}$ M	$99.4 \pm 1.7$



**Πίνακας 4**

Ποσοστά αναστολής συσσώρευσης αιμοπεταλίων ανθρώπου από ADP (0.2μM) με διάφορες συγκεντρώσεις (τελικές) αναχθείσας γλουταθειόνης (GSH).

Γλουταθειόνη (GSH)	Αναστολή συσσώρευσης %
2X10 <sup>-3</sup> M	24.5 ± 1.3
6X10 <sup>-3</sup> M	73.3 ± 1.6
8X10 <sup>-3</sup> M	85.7 ± 2.2

**B. α-Μερκαπτοπροπιονυλ-γλυκίνη (2-MPG)****Πίνακας 5**

Ποσοστά αναστολής συσσώρευσης αιμοπεταλίων κουνελιού από αραχιδονικό οξύ (AA 65 μM) με διάφορες συγκεντρώσεις α-Μερκαπτοπροπιονυλ-γλυκίνης (2-MPG).

α-Μερκαπτοπροπιονυλ-γλυκίνη(2-MPG)	Αναστολή συσσώρευσης %
2X10 <sup>-4</sup> M	23.5 ± 1.8
4X10 <sup>-4</sup> M	55.1 ± 2.4
6X10 <sup>-4</sup> M	82.0 ± 2.1
8X10 <sup>-4</sup> M	99.8 ± 1.0

**Πίνακας 6**

Ποσοστά αναστολής συσσώρευσης αιμοπεταλίων κουνελιού από PAF (100 μM) με διάφορες συγκεντρώσεις α-Μερκαπτοπροπιονυλ-γλυκίνης (2-MPG).

α-Μερκαπτοπροπιονυλ-γλυκίνη(2-MPG)	Αναστολή συσσώρευσης %
2X10 <sup>-4</sup> M	6.0 ± 1.2
4X10 <sup>-4</sup> M	54.0 ± 3.2
6X10 <sup>-4</sup> M	86.0 ± 5.1
1X10 <sup>-3</sup> M	99.2 ± 1.9



**Πίνακας 7**

Ποσοστά αναστολής συσσώρευσης αιμοπεταλίων από ADP (0.2  $\mu\text{M}$ ) με διάφορες συγκεντρώσεις  $\alpha$ -Μερκαπτοπροπιονυλ-γλυκίνης (2-MPG).

$\alpha$ -Μερκαπτοπροπιονυλ-γλυκίνη(2-MPG)	Αναστολή συσσώρευσης %
$1 \times 10^{-3}$ M	$20 \pm 5$
$2 \times 10^{-3}$ M	$68 \pm 4$
$4 \times 10^{-3}$ M	$75 \pm 6$
$6 \times 10^{-3}$ M	$86 \pm 5$

**Γ. Ν-Ακετυλ-Κυστεΐνη (NAC)****Πίνακας 8**

Ποσοστά αναστολής συσσώρευσης αιμοπεταλίων κουνελιού από Αραχιδονικό Οξύ (AA 65  $\mu\text{M}$ ) με διάφορες συγκεντρώσεις Ν-ακετυλ-κυστεΐνης (NAC).

Ν-ακετυλ-κυστεΐνη (NAC)	Αναστολή συσσώρευσης %
$1 \times 10^{-3}$ M	$14.8 \pm 3.1$
$1.5 \times 10^{-3}$ M	$66.6 \pm 2.5$
$2 \times 10^{-3}$ M	$85.2 \pm 3.3$
$4 \times 10^{-3}$ M	$89.8 \pm 2.9$
$5 \times 10^{-3}$ M	$95.6 \pm 3.1$

**Πίνακας 9**

Ποσοστά αναστολής συσσώρευσης αιμοπεταλίων κουνελιού από PAF (100  $\mu\text{M}$ ) με διάφορες συγκεντρώσεις Ν-ακετυλ-κυστεΐνης (NAC).

Ν-ακετυλ-κυστεΐνη (NAC)	Αναστολή συσσώρευσης %
$2 \times 10^{-4}$ M	$6.8 \pm 1.5$
$4 \times 10^{-4}$ M	$45.0 \pm 2.1$
$6 \times 10^{-4}$ M	$97.1 \pm 2.4$





**Πίνακας 10**

Ποσοστά αναστολής συσσώρευσης αιμοπεταλίων κουνελιού από ADP (2  $\mu$ M) με διάφορες συγκεντρώσεις N-ακετυλ-κυστεΐνης (NAC).

<b>N-ακετυλ-κυστεΐνη (NAC)</b>	<b>Αναστολή συσσώρευσης %</b>
4X10 <sup>-4</sup> M	21.0 $\pm$ 2.2
6X10 <sup>-4</sup> M	75.0 $\pm$ 3.2
1X10 <sup>-3</sup> M	83.3 $\pm$ 2.1
1.5X10 <sup>-3</sup> M	86.6 $\pm$ 2.4

**Δ. D-Πενικιλλαμίνη****Πίνακας 11**

Ποσοστά αναστολής συσσώρευσης αιμοπεταλίων κουνελιού από αραχιδονικό οξύ (AA 65  $\mu$ M) με διάφορες συγκεντρώσεις D-Πενικιλλαμίνης (D-P).

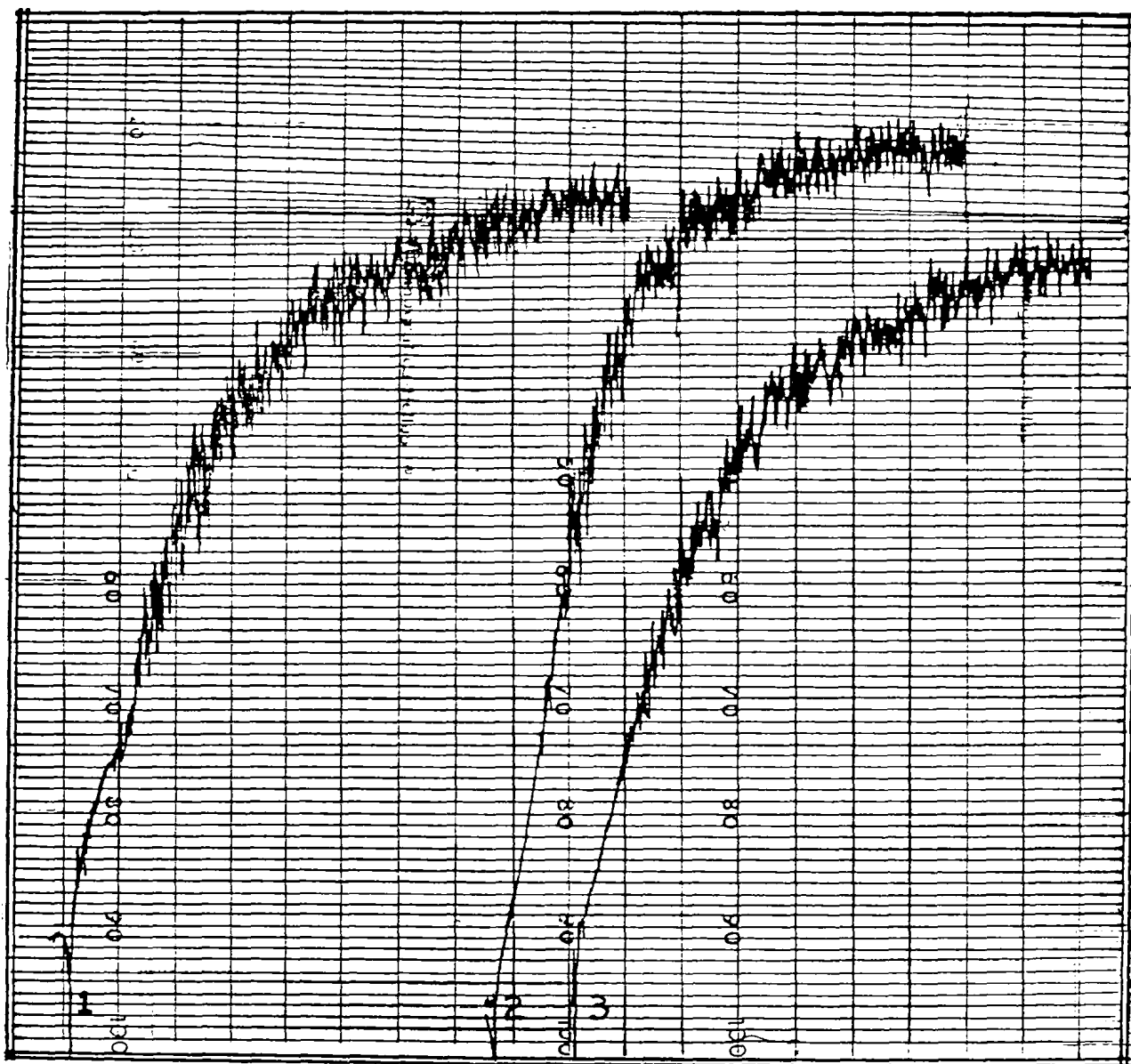
<b>D-Πενικιλλαμίνη (D-P)</b>	<b>Αναστολή συσσώρευσης %</b>
6X10 <sup>-4</sup> M	12.5 $\pm$ 3.2
1X10 <sup>-3</sup> M	31.2 $\pm$ 2.1
2X10 <sup>-3</sup> M	75.0 $\pm$ 4.2
3X10 <sup>-3</sup> M	87.5 $\pm$ 2.4
4X10 <sup>-3</sup> M	94.2 $\pm$ 2.3
5X10 <sup>-3</sup> M	96.0 $\pm$ 3.8

**Πίνακας 12**

Ποσοστά αναστολής συσσώρευσης αιμοπεταλίων κουνελιού από PAF (100  $\mu$ M) με διάφορες συγκεντρώσεις D-Πενικιλλαμίνης (D-P).

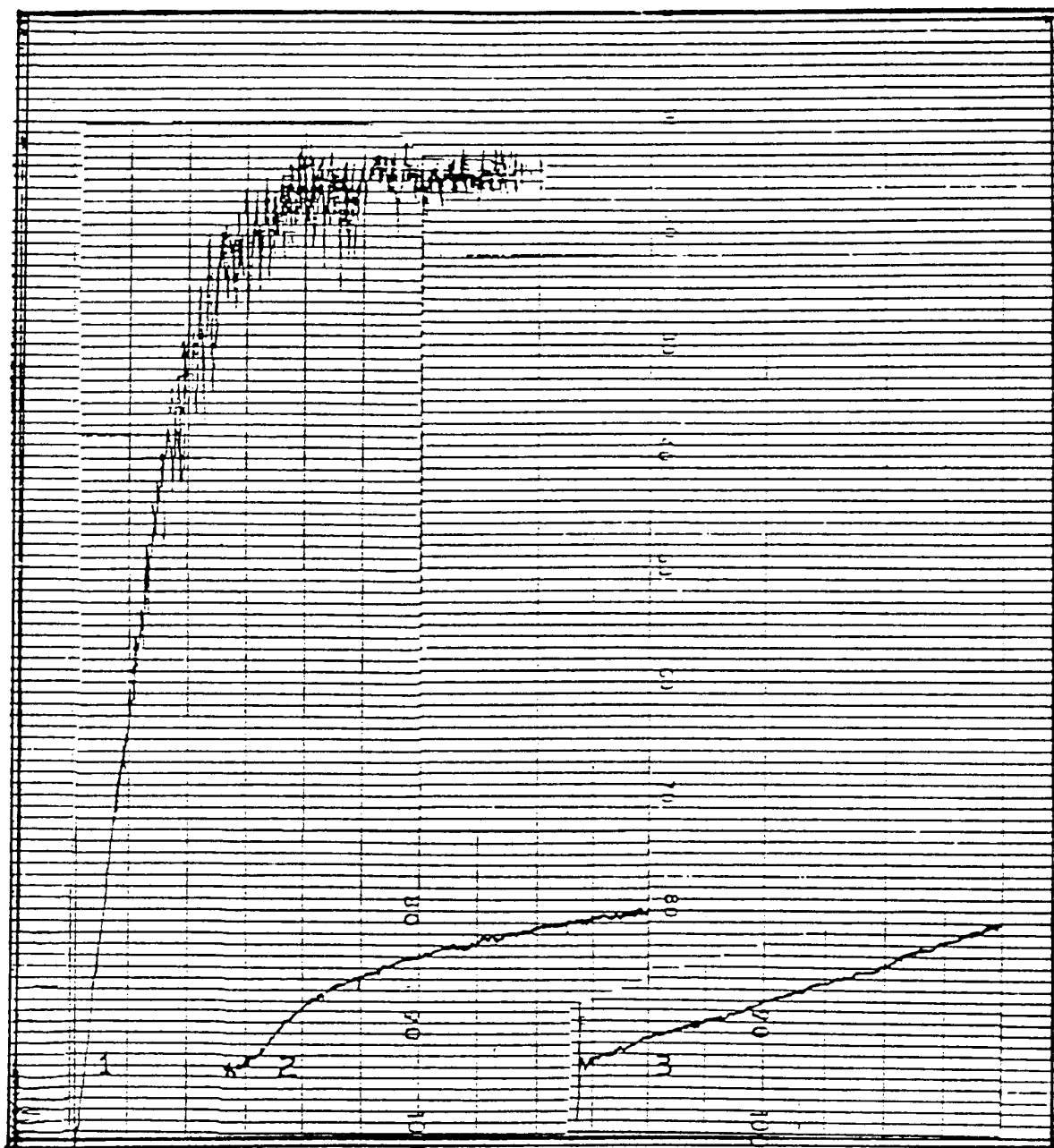
<b>D-Πενικιλλαμίνη (D-P)</b>	<b>Αναστολή συσσώρευσης %</b>
2X10 <sup>-4</sup> M	6.3 $\pm$ 1.2
4X10 <sup>-4</sup> M	52.0 $\pm$ 4.3
6X10 <sup>-4</sup> M	80.2 $\pm$ 2.3
8X10 <sup>-4</sup> M	98.0 $\pm$ 1.8





Εικόνα 17: Αποτυχία της D-πενικιλλαμίνης (D-P) να αναστείλει τη συσσώρευση αιμοπεταλίων ανθρώπου που προκαλείται από ADP (2  $\mu$ M) μετά από επώαση 1h.

1. Καμπύλη συσσώρευσης με ADP (2 $\mu$ M - έλεγχος)
2. ADP + D-P ( $10^{-3}$ M)
3. ADP + D-P ( $3 \times 10^{-3}$ M)



Εικόνα 18:

1. Συσσώρευση αιμοπεταλίων απο Αραχιδονικό οξύ ( $65 \mu\text{M}$ ).
2. Ανασταλτική δράση της D-Πενικιλλαμίνης ( $3 \times 10^{-3} \text{ M}$ ) στην συσσώρευση με Αραχιδονικό οξύ.
3. Ανασταλτική δράση της D- Πενικιλλαμίνης ( $4 \times 10^{-3} \text{ M}$ ) στην συσσώρευση με Αραχιδονικό οξύ.

**Πίνακας 13**

Ποσοστά αναστολής συσσώρευσης αιμοπεταλίων κουνελιού από ADP (2  $\mu$ M) με διάφορες συγκεντρώσεις D-Πενικιλλαμίνης (D-P).

D-Πενικιλλαμίνη (D-P)	Αναστολή συσσώρευσης %
$3 \times 10^{-4}$ M	$19.0 \pm 2.1$
$6 \times 10^{-4}$ M	$60.0 \pm 3.2$
$1.5 \times 10^{-3}$ M	$84.3 \pm 3.1$

**Ε. Τριμεταζιδίνη (TMZ)****Πίνακας 14**

Ποσοστά αναστολής συσσώρευσης αιμοπεταλίων κουνελιού από Αραχιδονικό οξύ (AA 65  $\mu$ M) με διάφορες συγκεντρώσεις τριμεταζιδίνης (TMZ).

Τριμεταζιδίνη (TMZ)	Αναστολή συσσώρευσης %
$1.5 \times 10^{-4}$ M	$12.0 \pm 2.1$
$3 \times 10^{-4}$ M	$21.2 \pm 1.8$
$4.5 \times 10^{-4}$ M	$48.4 \pm 1.9$
$7 \times 10^{-4}$ M	$68.0 \pm 1.8$
$1.5 \times 10^{-3}$ M	$91.2 \pm 2.1$
$2 \times 10^{-3}$ M	$98.1 \pm 2.4$

**Πίνακας 15**

Ποσοστά αναστολής συσσώρευσης αιμοπεταλίων κουνελιού από Paf (100  $\mu$ M) με διάφορες συγκεντρώσεις τριμεταζιδίνης (TMZ).

Τριμεταζιδίνη (TMZ)	Αναστολή συσσώρευσης %
$1.5 \times 10^{-4}$ M	$38.3 \pm 1.8$
$3 \times 10^{-4}$ M	$61.7 \pm 2.1$
$4.5 \times 10^{-4}$ M	$80.9 \pm 4.2$
$7 \times 10^{-4}$ M	$89.4 \pm 2.6$
$1.5 \times 10^{-3}$ M	$99.0 \pm 0.8$



**Πίνακας 16**

Ποσοστά αναστολής συσσώρευσης αιμοπεταλίων ανθρώπου από ADP (0.2  $\mu\text{M}$ ) με διάφορες συγκεντρώσεις τριμεταζιδίνης (TMZ).

Τριμεταζιδίνη (TMZ)	Αναστολή συσσώρευσης %
$1.5 \times 10^{-3} \text{ M}$	$28.5 \pm 2.1$
$3 \times 10^{-3} \text{ M}$	$62.0 \pm 1.8$
$4.5 \times 10^{-3} \text{ M}$	$71.4 \pm 2.3$
$6 \times 10^{-3} \text{ M}$	$85.8 \pm 1.6$

**ΣΤ. Ασκορβικό Οξύ (Βιταμίνη C)****Πίνακας 17**

Ποσοστά αναστολής συσσώρευσης αιμοπεταλίων κουνελιού από Αραχιδονικό οξύ (AA 65  $\mu\text{M}$ ) με διάφορες συγκεντρώσεις Ασκορβικού οξέος (Βιταμίνη C).

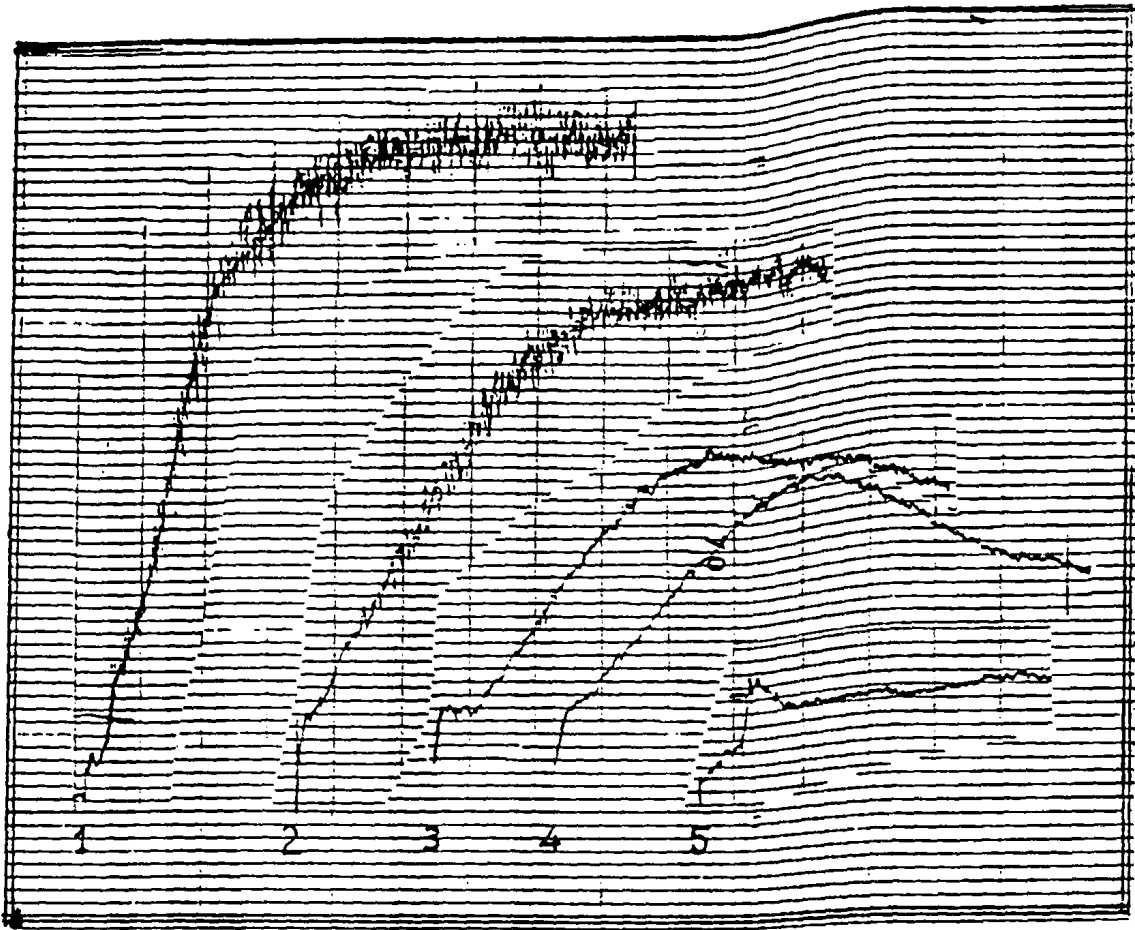
Βιταμίνη C	Αναστολή συσσώρευσης %
$2 \times 10^{-4} \text{ M}$	$10.1 \pm 1.2$
$6 \times 10^{-4} \text{ M}$	$23.2 \pm 2.1$
$1 \times 10^{-3} \text{ M}$	$35.8 \pm 1.5$
$2 \times 10^{-3} \text{ M}$	$83.2 \pm 3.8$
$3 \times 10^{-3} \text{ M}$	$98.9 \pm 2.9$

**Πίνακας 18**

Ποσοστά αναστολής συσσώρευσης αιμοπεταλίων κουνελιού από PAF (100  $\mu\text{M}$ ) με διάφορες συγκεντρώσεις Ασκορβικού οξέος (Βιταμίνης C).

Βιταμίνη C	Αναστολή συσσώρευσης %
$4 \times 10^{-4} \text{ M}$	$17.0 \pm 2.4$
$6 \times 10^{-4} \text{ M}$	$30.0 \pm 2.1$
$1.1 \times 10^{-3} \text{ M}$	$61.2 \pm 3.1$
$1.2 \times 10^{-3} \text{ M}$	$89.8 \pm 2.3$
$1.5 \times 10^{-3} \text{ M}$	$99.1 \pm 0.8$





Εικόνα 19: Αναστολή της συσώρευσης των αιμοπεταλίων ανθρώπου που προκαλείται από ADP (2 $\mu$ M) παρουσία διαφόρων συγκεντρώσεων Τριμεταζιδίνης.

1. Καμπύλη συσώρευσης αιμοπεταλίων με ADP (2 $\mu$ M-έλεγχος)
2. ADP + TMZ  $1.5 \times 10^{-3}$  M
3. ADP + TMZ  $3 \times 10^{-3}$  M
4. ADP + TMZ  $4.5 \times 10^{-3}$  M
5. ADP + TMZ  $6 \times 10^{-3}$  M

**Πίνακας 19**

Ποσοστά αναστολής συσσώρευσης αιμοπεταλίων ανθρώπου από ADP (0.2  $\mu$ M) με διάφορες συγκεντρώσεις Ασκορβικού οξέος (Vit C).

<b>Βιταμίνη C</b>	<b>Αναστολή συσσώρευσης %</b>
$2 \times 10^{-3}$ M	$20.8 \pm 1.9$
$4 \times 10^{-3}$ M	$36.2 \pm 1.5$
$6 \times 10^{-3}$ M	$59.2 \pm 2.3$
$8 \times 10^{-3}$ M	$67.8 \pm 2.4$
$1 \times 10^{-2}$ M	$85.7 \pm 3.2$

**Z. Βουτυλικό Υδροξυτολουένιο (BHT)****Πίνακας 20**

Ποσοστά αναστολής συσσώρευσης αιμοπεταλίων κουνελιού από Αραχιδονικό οξύ (AA 65  $\mu$ M) με διάφορες συγκεντρώσεις Βουτυλικού-Υδροξυτολουένιου (BHT).

<b>Βουτυλικό-Υδροξυτολουένιο (BHT)</b>	<b>Αναστολή συσσώρευσης %</b>
$2 \times 10^{-4}$ M	$18.2 \pm 3.1$
$4 \times 10^{-4}$ M	$31.3 \pm 1.8$
$6 \times 10^{-4}$ M	$69.4 \pm 1.9$
$8 \times 10^{-4}$ M	$85.9 \pm 4.8$

**Πίνακας 21**

Ποσοστά αναστολής συσσώρευσης αιμοπεταλίων κουνελιού από PAF (100  $\mu$ M) με διάφορες συγκεντρώσεις Βουτυλικού-Υδροξυτολουένιου (BHT) N=15.

<b>Βουτυλικό-Υδροξυτολουένιο (BHT)</b>	<b>Αναστολή συσσώρευσης %</b>
$2 \times 10^{-4}$ M	$30.8 \pm 2.1$
$3 \times 10^{-4}$ M	$35.8 \pm 1.9$
$4 \times 10^{-4}$ M	$71.3 \pm 2.1$
$6 \times 10^{-4}$ M	$98.2 \pm 1.7$



**Πίνακας 22**

Ποσοστά αναστολής συσσώρευσης αιμοπεταλίων ανθρώπου από ADP (0.2  $\mu$ M) με διάφορες συγκεντρώσεις Βουτυλικού-Υδροξυτολουένιου (BHT).

Βουτυλικό-Υδροξυτολουένιο (BHT)	Αναστολή συσσώρευσης %
$1 \times 10^{-3}$ M	$10 \pm 3$
$2 \times 10^{-3}$ M	$60 \pm 7$
$4 \times 10^{-3}$ M	$76 \pm 3$
$6 \times 10^{-3}$ M	$83 \pm 2$

**Η. Φαινυλ-Βουτυλ-Νιτρόλιο (PBN)****Πίνακας 23**

Ποσοστά αναστολής συσσώρευσης αιμοπεταλίων κουνελιού από Αραχιδονικό οξύ (AA 65  $\mu$ M) με διάφορες συγκεντρώσεις Φαινυλ-Βουτυλ-Νιτρόλιου (PBN).

Φαινυλ-Βουτυλ-Νιτρόλιο (PBN)	Αναστολή συσσώρευσης %
$1 \times 10^{-3}$ M	$14.2 \pm 2.4$
$2 \times 10^{-3}$ M	$33.0 \pm 1.9$
$3 \times 10^{-3}$ M	$50.0 \pm 3.1$
$4 \times 10^{-3}$ M	$61.2 \pm 2.3$
$5 \times 10^{-3}$ M	$72.0 \pm 1.9$
$8 \times 10^{-3}$ M	$90.1 \pm 2.5$

**Πίνακας 24**

Ποσοστά αναστολής συσσώρευσης αιμοπεταλίων κουνελιού από PAF με διάφορες συγκεντρώσεις Φαινυλ-Βουτυλ-Νιτρόλιου (PBN).

Φαινυλ-Βουτυλ-Νιτρόλιο (PBN)	Αναστολή συσσώρευσης %
$2 \times 10^{-4}$ M	$8.0 \pm 1.2$
$6 \times 10^{-4}$ M	$19.4 \pm 2.1$
$1 \times 10^{-3}$ M	$30.3 \pm 1.2$
$1.5 \times 10^{-3}$ M	$88.5 \pm 1.8$
$2 \times 10^{-3}$ M	$93.8 \pm 3.2$





**Πίνακας 25**

Ποσοστά αναστολής συσσώρευσης αιμοπεταλίων ανθρώπου από ADP (0.2 μΜ) με διάφορες συγκεντρώσεις Φαινύλ-Βουτυλ-Νιτρόνιο (PBN).

Φαινύλ-Βουτυλ-Νιτρόνιο (PBN)	Αναστολή συσσώρευσης %
$2 \times 10^{-3}$ M	$20.0 \pm 3.1$
$4 \times 10^{-3}$ M	$33.3 \pm 2.1$
$6 \times 10^{-3}$ M	$58.8 \pm 1.8$
$8 \times 10^{-3}$ M	$70.2 \pm 2.3$

Από τα αποτελέσματα των πειραμάτων αναστολής της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων κουνελίου και ανθρώπου διαπιστώθηκαν:

1. Στη μέγιστη αναστολή της συσσώρευσης από τον PAF δραστικότερη ουσία φαίνεται να είναι η αναχθείσα γλουταθειόνη και "ασθενέστερη" το PBN. Έτσι η κατάταξη των ουσιών που δοκιμάστηκαν, όσον αφορά στην αντισυσσωρευτική δράση τους, φαίνεται στον παρακάτω πίνακα.

Ουσία	Συγκέντρωση	Μέγιστο ποσοστό αναστολής %
GSH	$6 \times 10^{-4}$ M	$99.4 \pm 1.7$
BHT	$6 \times 10^{-4}$ M	$97.1 \pm 2.4$
2MPG	$6 \times 10^{-4}$ M	$86.0 \pm 5.1$
D-P	$6 \times 10^{-4}$ M	$80.2 \pm 2.3$
Bit C	$1.5 \times 10^{-3}$ M	$99.1 \pm 0.8$
TMZ	$1.5 \times 10^{-3}$ M	$99.0 \pm 0.8$
PBN	$1.5 \times 10^{-3}$ M	$88.5 \pm 1.8$

**Πίνακας 26:** Σύγκριση της αντισυσσωρευτικής δράσης των ουσιών που δοκιμάστηκαν στη μέγιστη συσσώρευση των αιμοπεταλίων που προκαλείται από PAF.



2. Στη μέγιστη αναστολή της συσσώρευσης από το Αραχιδονικό οξύ, δραστικότερη ουσία φαίνεται να είναι η 2-MPG και ασθενέστερη το PBN, όπως φαίνεται στον πίνακα που ακολουθεί:

Ουσία	Συγκέντρωση	Μέγιστο ποσοστό αναστολής %
2-MPG	$8 \times 10^{-4}$ M	$99.8 \pm 1.0$
BHT	$8 \times 10^{-4}$ M	$85.9 \pm 4.8$
GSH	$1 \times 10^{-3}$ M	$99.1 \pm 1.3$
TMZ	$2 \times 10^{-3}$ M	$98.1 \pm 2.4$
Bit C	$2 \times 10^{-3}$ M	$83.2 \pm 3.8$
D-P	$5 \times 10^{-3}$ M	$96.0 \pm 3.8$
NAC	$5 \times 10^{-3}$ M	$95.6 \pm 3.1$
PBN	$5 \times 10^{-3}$ M	$72.0 \pm 1.9$

Πίνακας 27: Σύγκριση της αντισυσσωρευτικής δράσης των ουσιών που δοκιμάστηκαν στη μέγιστη συσσώρευση από το Αραχιδονικό οξύ.

3. Στη μέγιστη αναστολή της συσσώρευσης από το ADP, δραστικότερη ουσία φαίνεται να είναι η NAC και ασθενέστερη το PBN, όπως φαίνεται από τον πίνακα που ακολουθεί:

Ουσία	Συγκέντρωση	Μέγιστο ποσοστό αναστολής %
NAC	$1.5 \times 10^{-3}$ M	$86.6 \pm 2.4$
D-P	$1.5 \times 10^{-3}$ M	$84.3 \pm 3.1$
BHT	$6 \times 10^{-3}$ M	$83.2 \pm 2.0$
TMZ	$6 \times 10^{-3}$ M	$85.8 \pm 1.6$
2-MPG	$6 \times 10^{-3}$ M	$85.9 \pm 5.0$
GSH	$6 \times 10^{-3}$ M	$73.3 \pm 1.6$
Bit C	$6 \times 10^{-3}$ M	$59.2 \pm 2.3$
PBN	$6 \times 10^{-3}$ M	$58.8 \pm 1.8$

Πίνακας 28: Σύγκριση της αντισυσσωρευτικής δράσης των ουσιών που δοκιμάστηκαν στη μέγιστη συσσώρευση που προκαλείται από το ADP.



### 3. Αποτελέσματα των Πειραμάτων Αναστολής της Συσσώρευσης με Ειδικές Συνθήκες

Τα αποτελέσματα της επώασης του ανθρώπινου PRP με N-ακετυλ-κυστεΐνη και D-πενικιλλαμίνη στη μέγιστη συσσώρευση από ADP, φαίνονται στον παρακάτω Πίνακα 29 και στην εικόνα 17.

#### Αναστολή της Μέγιστης Συσσώρευσης %

Συγκεντρώσεις	D-Πενικιλλαμίνη	N-Ακετυλ-Κυστεΐνη
$1 \times 10^{-3}$ M	$0.3 \pm 0.2$	$1.1 \pm 0.5$
$2 \times 10^{-3}$ M	$1.0 \pm 0.7$	$1.7 \pm 0.3$
$3 \times 10^{-3}$ M	$1.2 \pm 0.4$	$2.0 \pm 0.6$
$4 \times 10^{-3}$ M	$1.5 \pm 0.5$	$2.1 \pm 0.4$

**Πίνακας 29:** Η επί τοις εκατό αναστολή της μέγιστης συσσώρευσης PRP αιμοπεταλίων ανθρώπου (ομάδας ελέγχου) από ADP μετά από επώαση με D-πενικιλλαμίνη και N-ακετυλ-κυστεΐνη.

Από τις δοκιμασίες βρέθηκε ότι τόσο η D-Πενικιλλαμίνη όσο και η N-ακετυλ-κυστεΐνη δεν προκάλεσαν αναστολή της συσσώρευσης του ανθρώπινου PRP στις δοκιμασθείσες συγκεντρώσεις. Έτσι έγινε επώαση των αιμοπεταλίων με διάφορες συγκεντρώσεις των ουσιών αυτών, όπως περιγράφεται στη μέθοδο και μετά προστέθηκε το ADP. Διαπιστώθηκε ότι η πρόσθεση ADP (2  $\mu$ M) στις κυβέτες του συσσωρευομέτρου με τα επωασθέντα με τις ουσίες αιμοπετάλια προκάλεσε συσσώρευση των αιμοπεταλίων, η οποία δε διέφερε στατιστικά σημαντικά από αυτή που το ADP προκάλεσε στις κυβέτες "μάρτυρες" (μόνο ανθρώπινο PRP επωάσθηκε για μία ώρα σε 37° C). (P>0.05).

Διαπιστώθηκε δηλαδή ότι:

1. Σε αιμοπετάλια ανθρώπου η D-Πενικιλλαμίνη δεν ανέστειλε τη συσσώρευση από ADP, ούτε και μετά από επώαση 1h με συγκεντρώσεις D-P, μέχρι  $4 \times 10^{-3}$  M.
2. Σε αιμοπετάλια ανθρώπου η N-ακετυλ-κυστεΐνη (NAC) δεν ανέστειλε τη συσσώρευση από ADP, ούτε και μετά από επώαση 1h με συγκεντρώσεις NAC,

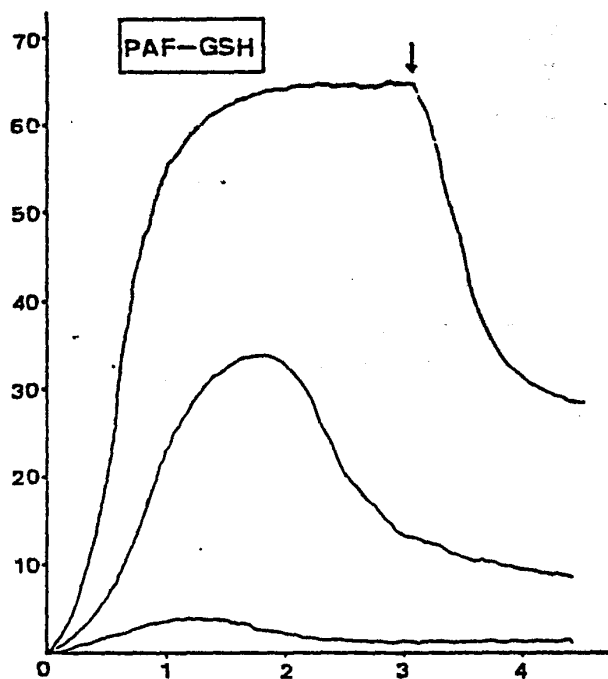
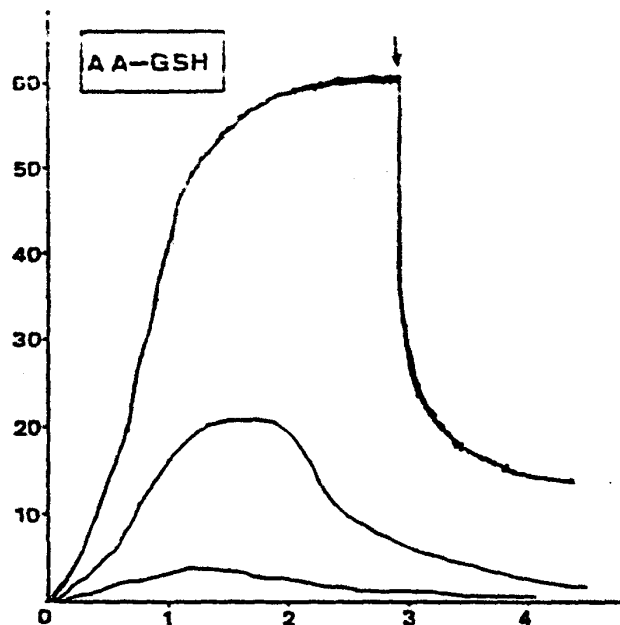
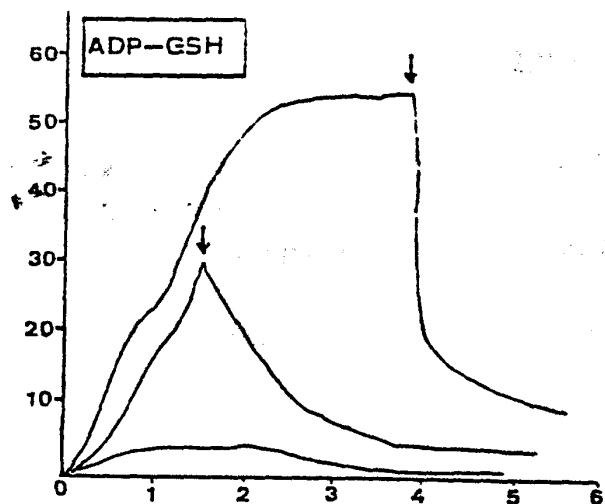


μέχρι  $4 \times 10^{-3}$  M.

#### 4. Αποτελέσματα Δοκιμασίας Αποσυσώρευσης των Αιμοπεταλίων

Από τις ουσίες που δοκιμάστηκαν η αναχθείσα γλουταθειόνη (GSH), η α-Μερκαπτοπροπιονύλ-γλυκίνη (2-MPG), η βιταμίνη C, του βουτυλικό υδροξυτολουένιο (BHT) και η τριμεταζιδίνη (TMZ), αποσυσώρευσαν τα πλυμένα αιμοπετάλια κουνελιού, τα οποία συσσωρεύθηκαν με μέγιστες συγκεντρώσεις ADP, Αραχιδονικού Οξέος και PAF, όταν προστέθηκαν στις κυβέτες 3-4 min μετά την έναρξη της συσώρευσης. Η αποσυσωρευτική δράση των ουσιών αυτών φαίνεται στα σχήματα 6,7 και 8 και στις εικόνες 20,21 και 22.

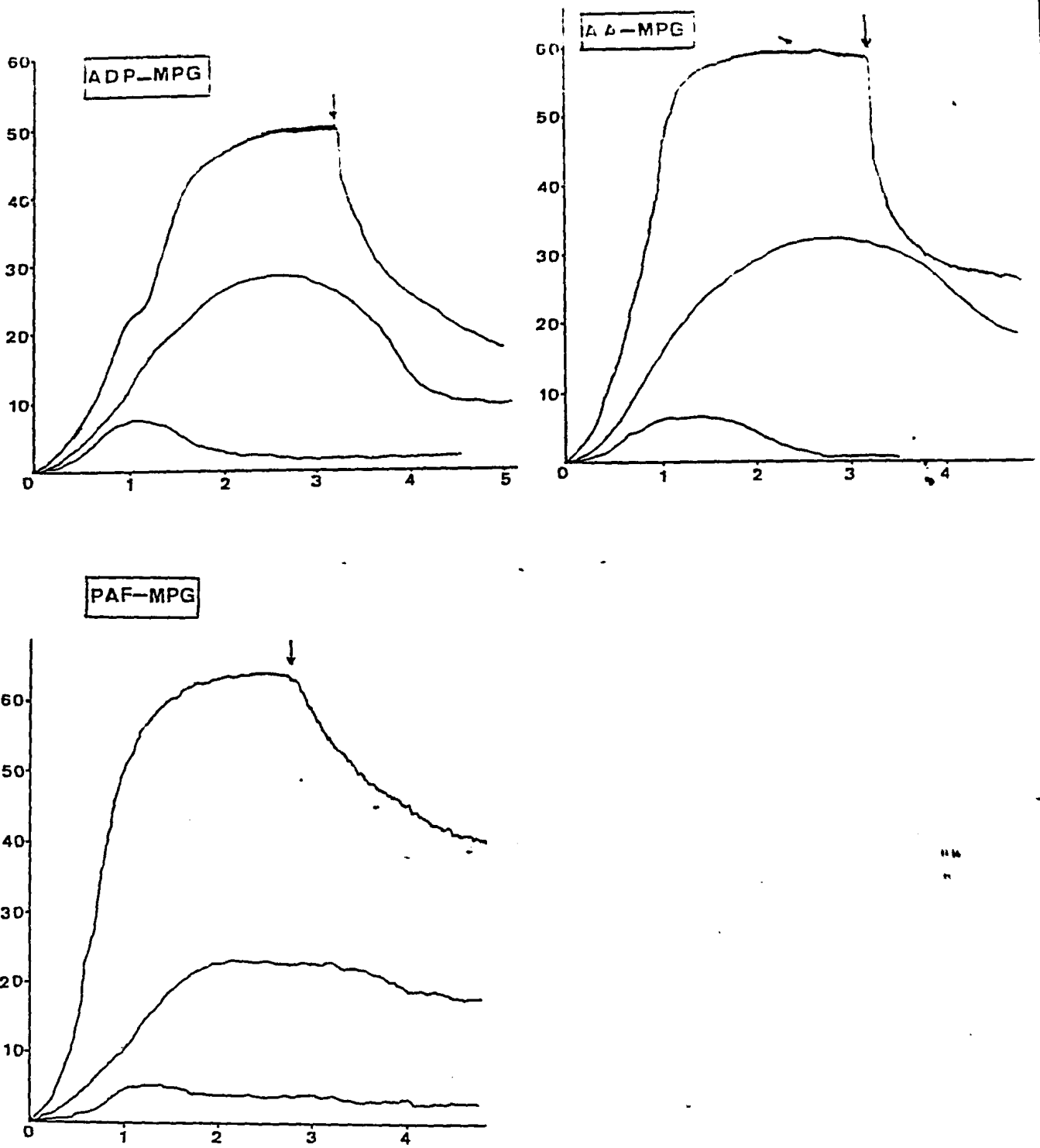




Σχήμα 6:

Αποσυσώρευση των αιμοπεταλίων που συσσωρεύθηκαν με τους τρεις αγωνιστές (ADP, Αραχιδονικό Οξύ και PAF), με την πρόσθεση GSH (↓), (τελική συγκέντρωση  $10^{-3}$  M), 4 λεπτά μετά από μη αναστρέψιμη συσώρευση.

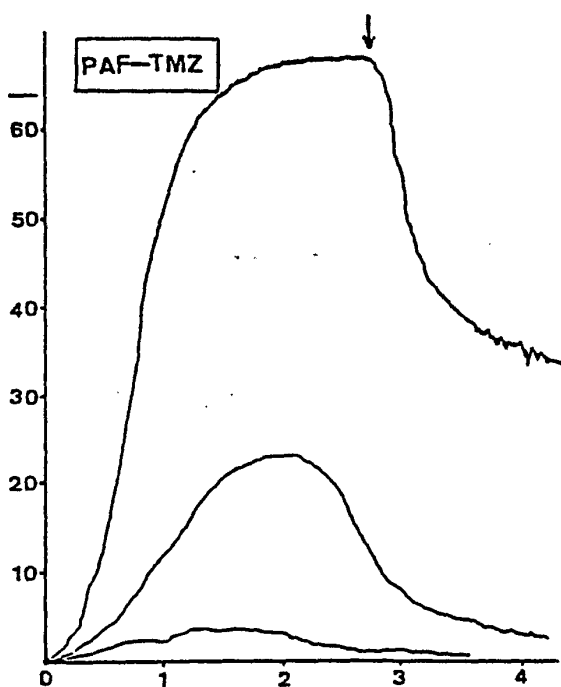
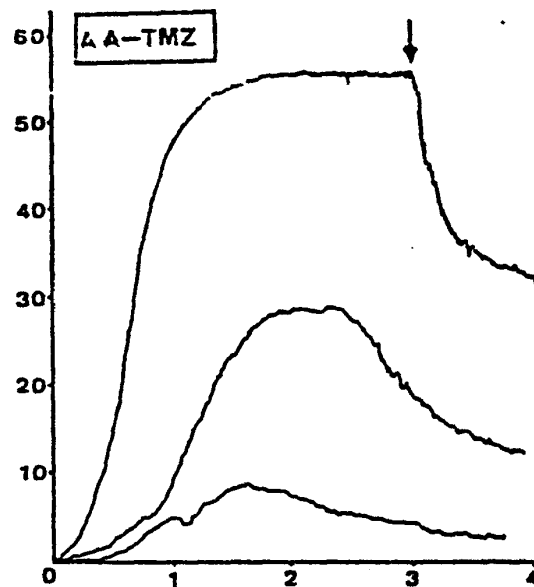
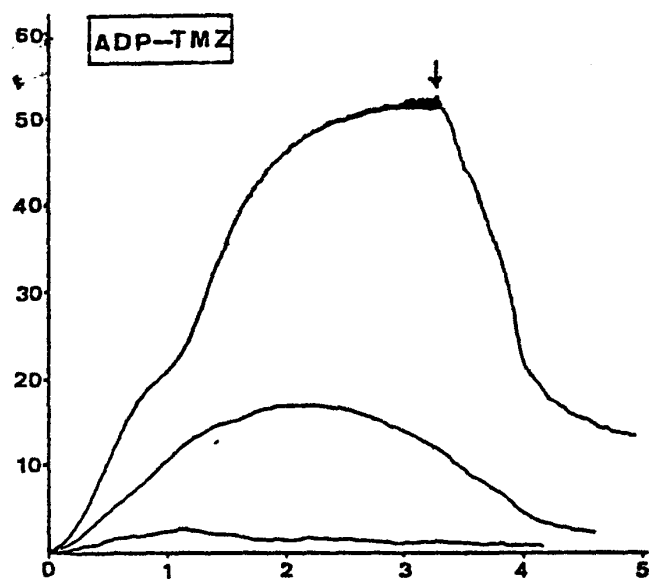




Σχήμα 7:

Αποσυσσώρευση των αιμοπεταλίων που συσσωρεύθηκαν με τους τρεις αγωνιστές (ADP, Αραχιδονικό Οξύ και PAF), με την πρόσθεση 2 - MPG (↓), (τελική συγκέντρωση  $10^{-5}$  M), 4 λεπτά μετά από μη αναστρέψιμη συσσώρευση.

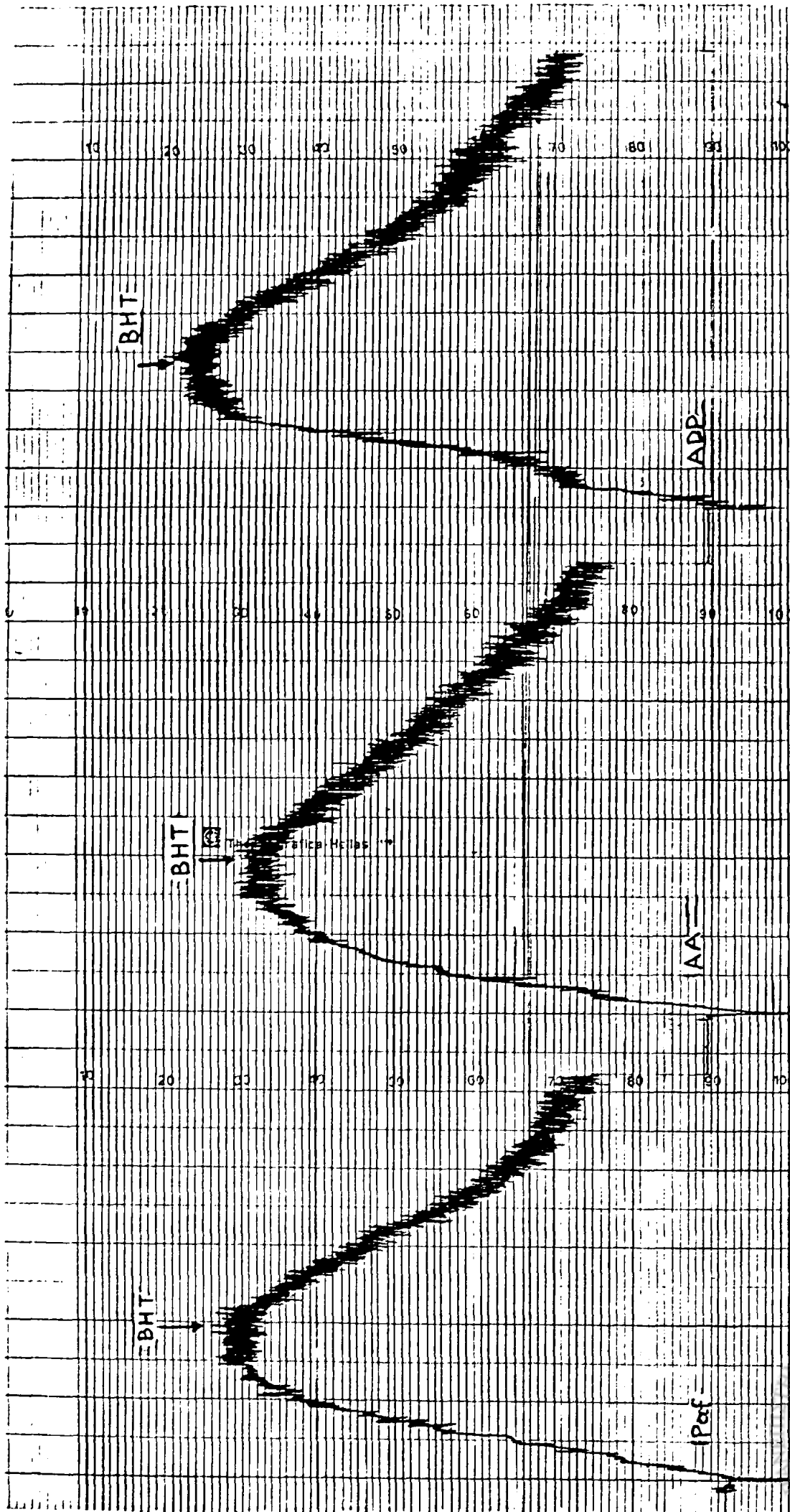




Σχήμα 8:

Αποσυσσώρευση των αιμοπεταλίων που συσσωρεύθηκαν με τους τρεις αγωνιστές (ADP, Αραχιδονικό Οξύ και PAF), με την πρόσθεση Τριμεταζιδίνης (↓), (τελική συγκέντρωση  $10^{-3}$  M), 4 λεπτά μετά απο μη αναστρέψιμη συσσώρευση.





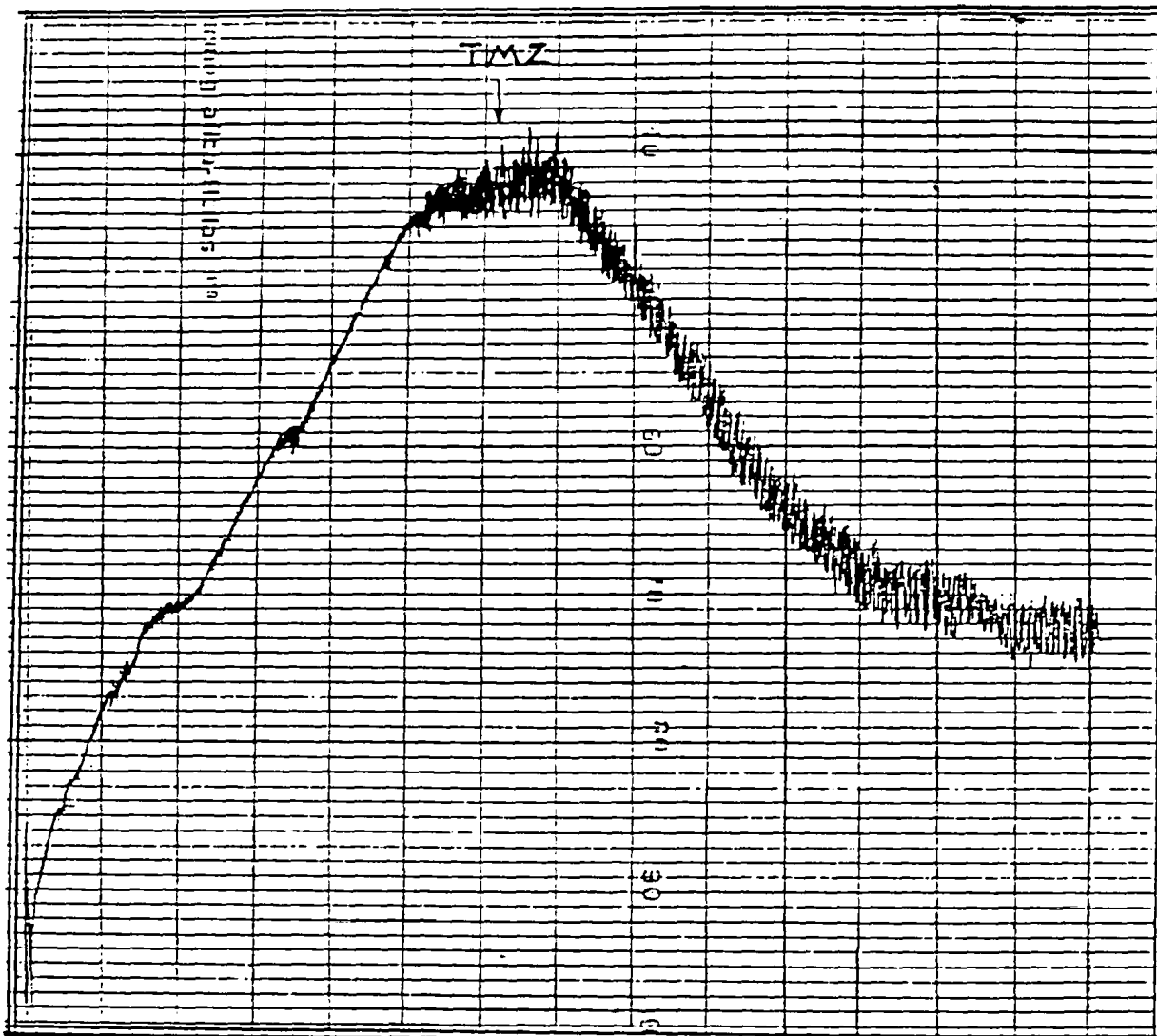
Εικόνα 20: Αποσυσώρευση πλυμένων αιμοπεταλίων κουνελιού απο PAF, Αραχιδονικό και ADP, με την προσθήκη Βιταμίνης C (10 M), 3-4 min μετά την έναρξη της συσώρευσης απο τους αγωνιστές.







Εικόνα 21: Αποσώρευση πλυμένων αιμοεταδίων κουνελιού, από PAF, Αραχιδονικό και ADP με την προσθήκη Βιταμίνης C ( $10^{-3}M$ ), 3-4 min μετά την έναρξη της συσώρευσης από τον αγωνιστή.



Εικόνα 22:

Αναστροφή της συσσώρευσης αιμοπεταλίων από ADP ( $2\mu\text{M}$ ) με την προσθήκη Τριμεταζιδίνης (TMZ) ( $6 \times 10^{-3} \text{ M}$ ), δυο λεπτά μετά την έναρξη της συγκόλλησης. (Αποσυσσώρευση).



### 5. Αποτελέσματα Πειραμάτων Οξειδωσης της Βιταμίνης C

Τα αποτελέσματα της οξειδωσης της Βιταμίνης C κατά την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων με PAF φαίνονται στους πίνακες που ακολουθούν και στο Σχήμα 9.

**Πίνακας 30.** Μεταβολή του φάσματος απορρόφησης του ασκορβικού οξέως (Βιταμίνης C) σε διάφορους χρόνους στο μίγμα 1 (TG-Ca<sup>2+</sup> + Bit C).

t (sec)	Αριθμός Μετρήσεων					MT±SD
	1	2	3	4	5	
30	5	7	3	5	8	6.2±2.2
60	8	6	4	5	7	6.0±1.6
90	7	5	6	6	9	6.6±1.5
120	5	7	6	6	8	6.4±1.1
150	7	8	4	6	7	6.4±1.5
180	8	8	5	7	8	7.2±1.3
210	8	9	6	8	7	7.6±1.1
240	9	8	7	9	8	7.6±1.2
270	10	9	6	11	10	9.2±1.9
300	10	8	8	10	9	9.0±1.0



**Πίνακας 31.** Μεταβολή του φάσματος απορρόφησης της Βιταμίνης C σε διάφορους χρόνους στο μίγμα 2 (TG-Ca<sup>2+</sup>, Αιμοπετάλια, Βιταμίνη C).

t (sec)	Αριθμός Μετρήσεων					MT±SD
	1	2	3	4	5	
30	25	12	10	15	18	16.0±5.9
60	23	14	15	15	19	17.2±3.8
90	20	13	14	16	12	17.0±4.5
120	25	15	16	15	14	17.0±4.3
150	25	16	18	15	16	18.0±4.0
180	26	16	17	16	14	17.8±4.7
210	26	14	18	17	16	18.2±4.6
240	28	15	18	18	19	19.6±5.0
270	30	15	17	15	18	19.0±6.2
300	31	16	17	16	19	19.8±6.4



Πίνακας 32. Μεταβολή του φάσματος απορρόφησης της Βιταμίνης C σε διάφορους χρόνους στο μίγμα 3 (TG-Ca<sup>2+</sup>, Βιταμίνη C, PAF).

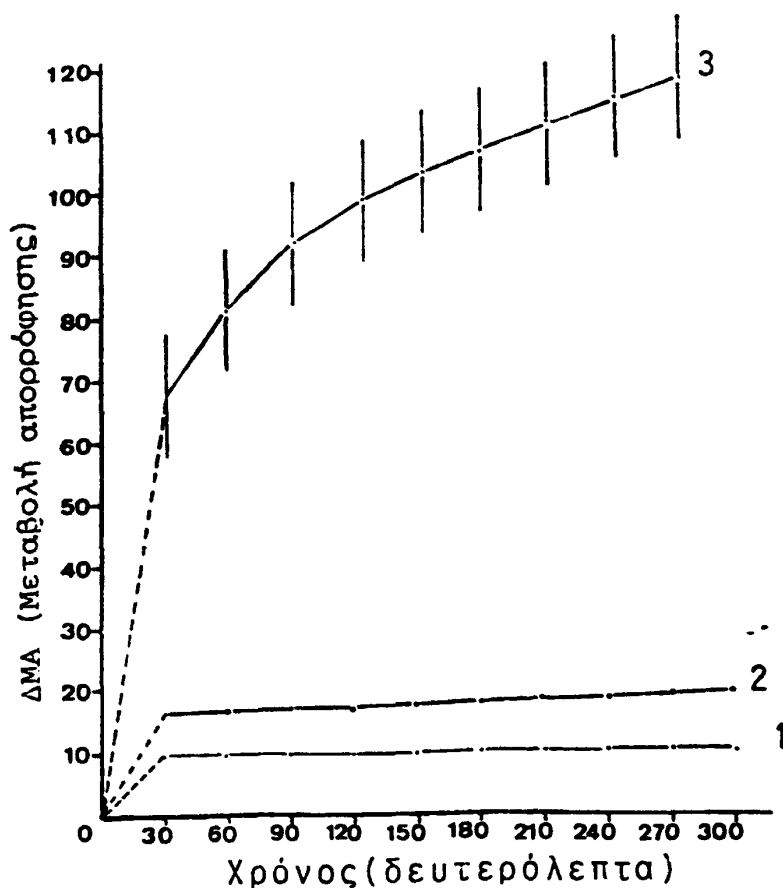
t (sec)	Αριθμός Μετρήσεων					MT±SD
	1	2	3	4	5	
30	10	8	12	8	5	8.6±2.6
60	9	10	12	7	6	8.8±2.4
90	10	11	8	9	5	8.6±2.3
120	11	10	10	8	6	9.0±2.0
150	12	11	12	9	7	10.2±2.2
180	12	10	10	10	5	9.8±2.9
210	10	9	12	10	8	9.8±1.5
240	11	10	8	7	9	9.0±1.6
270	13	12	9	8	10	10.4±2.0
300	14	13	12	9	10	11.6±2.1



**Πίνακας 33.** Μεταβολή του φάσματος απορρόφησης της Βιταμίνης C σε διάφορους χρόνους στο μίγμα 4 (TG-Ca<sup>2+</sup>, Αιμοπετάλια, Βιταμίνη C, PAF).

t (sec)	Αριθμός Μετρήσεων					MT±SD
	1	2	3	4	5	
30	60	80	55	72	67	66.8±9.8
60	75	110	63	82	74	80.8±17.7
90	89	121	73	91	88	92.4±17.5
120	94	130	78	96	97	99.0±18.9
150	98	134	85	100	101	103.6±18.2
180	98	135	88	103	102	105.2±17.7
210	105	140	93	109	108	111.0±17.4
240	105	142	96	115	112	114.0±17.3
270	108	145	97	117	112	115.8±18.0
300	110	145	97	118	113	116.6±17.6





Σχήμα 9: Οξειδωση του ασκορβικού οξέος (Βιταμίνη C) κατά τη διάρκεια αναστολής της συσσώρευσης πλυμένων αιμοπεταλίων κουνελιού από PAF.

1. Ασκορβικό οξύ ( $10^{-7}$  M) + TG-Ca<sup>2+</sup> + PAF ( $10^{-7}$  M).
2. Ασκορβικό οξύ ( $10^{-7}$  M) + TG-Ca<sup>2+</sup> + Αιμοπετάλια ( $5.8 \times 10^6$  κύτταρα/ml).
3. Ασκορβικό οξύ ( $10^{-7}$  M) + TG-Ca<sup>2+</sup> + Αιμοπετάλια ( $5 \times 10^6$  κύτταρα/ml) + PAF ( $10^{-7}$  M).

Από τα αποτελέσματα είναι εμφανές ότι κατά την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων με PAF καταγράφεται μεταβολή του φάσματος απορρόφησης της βιταμίνης C χαρακτηριστική της οξειδωσής της. Οι μεταβολές που καταγράφηκαν στα δείγματα με PAF και βιταμίνη C χωρίς αιμοπετάλια ή βιταμίνη C και αιμοπετάλια χωρίς PAF ή στα δείγματα μόνο με βιταμίνη C δεν ήταν στατιστικά σημαντικές, ενδεικτικό της μη μεταβολής της κατάστασης της βιταμίνης C στα διαλύματα.



### 6. Αποτελέσματα Δοκιμασιών Πρόκλησης Συσσώρευσης των Αιμοπεταλίων με Υπεροξειδίο του Υδρογόνου ( $H_2O_2$ )

Η πρόσθεση υπεροξειδίου του υδρογόνου στις κυβέτες του συσσωρευομέτρου που περιείχαν πλυμένα αιμοπετάλια κουνελιού σε διάλυμα συσσώρευσης δεν προκάλεσε αντίδραση συσσώρευσης των αιμοπεταλίων σε καμία από τις συγκεντρώσεις του υπεροξειδίου του υδρογόνου που δοκιμάσθηκαν. ( $H_2O_2$  μέχρι 5% στο διάλυμα).

### 7. Αποτελέσματα Πειραμάτων Αναστολής της Συγκόλλησης Αιμοπεταλίων με Υπεροξειδίο-Δισμουτάση (SOD).

Η προσθήκη υπεροξειδίο-δισμουτάσης σε συγκεντρώσεις από 10 U/ml έως 500 U/ml στο εναιώρημα αιμοπεταλίων σε διάλυμα συσσώρευσης TG- $Ca^{2+}$  δεν ανέστειλε τη συσσώρευση που προκάλεσαν οι αγωνιστές σε συγκεντρώσεις αναστρέψιμης και μη συσσώρευσης (ADP: 1 και 2  $\mu M$ , PAF: 50 και 100  $\mu M$  και AA: 30 και 65  $\mu M$ ).

### 8. Αποτελέσματα της Αντίδρασης Λιποξυγονάσης

Τα αποτελέσματα της αντίδρασης Λινελαϊκού Οξέος-Λιποξυγονάσης παρουσία GSH, Βιταμίνης C, TMZ και PBN φαίνονται στα σχήματα 11,12,13 και 14 και στους πίνακες 34,35,36,37.

Από τα αποτελέσματα φαίνεται ότι όλες οι δοκιμασθείσες ουσίες αναστέλλουν την αντίδραση, όταν βρίσκονται σε συγκέντρωση  $10^{-4} M$ . Η αναστολή αυτή είναι στατιστικά σημαντική μετά το 30ο sec της αντίδρασης ( $P < 0.01$  και  $P < 0.001$ ) σε σύγκριση με την καμπύλη ελέγχου. Στατιστικά σημαντική αναστολή εμφανίζεται επίσης για την GSH, τη βιταμίνη C και την TMZ μετά το 1ο min της αντίδρασης, σε συγκεντρώσεις  $10^{-5} M$  ( $P < 0.005$ ), ενώ για το PBN η αναστολή στην ίδια συγκέντρωση δεν είναι στατιστικά σημαντική ( $P > 0.5$ ).

Σε συγκεντρώσεις  $10^{-6} M$  το PBN και η TMZ δεν επηρεάζουν την αντίδραση. Παρατηρείται μόνο μία αύξηση της μεταβολής της απορρόφησης με τις αναγωγικές ουσίες GSH και βιταμίνη C, η οποία όμως δεν είναι στατιστικά σημαντική μέχρι τα 90 sec ( $P > 0.01$ ) και γίνεται σημαντική μετά τα 90 sec ( $P < 0.05$ ). Από τα αποτελέσματα φαίνεται ακόμη ότι η TMZ και το PBN ασκούν σε συγκεντρώσεις  $10^{-4} M$  ισχυρότερη αναστολή από την GSH και τη Βιταμίνη C. Η πρόσθεση των υπό μελέτη ουσιών (GSH, Βιταμίνη C, TMZ και PBN) σε συγκέντρωση  $10^{-4} M$  2 min μετά την έναρξη της αντίδρασης δεν αποκατέστησε τις μεταβολές της απορρόφησης, ανέστειλε όμως την πορεία της αντίδρασης (εικόνα 23).





Πίνακας 34 : Μεταβολές της απορρόφησης του φάσματος της Αντίδρασης Λιποξυγονάσης (Έλεγχος)

Χρόνος	
x15 sec	Λιποξυγονάση
1	43.5 ± 9.4
2	83.1 ± 8.7
3	120.4 ± 12.5
4	159.0 ± 13.6
5	197.5 ± 21.0
6	229.7 ± 23.1
7	253.1 ± 21.1
8	273.1 ± 18.0
9	289.1 ± 17.1
10	301.7 ± 14.9
11	311.1 ± 13.1
12	319.0 ± 14.2

Πίνακας 35 : Μεταβολές της απορρόφησης του φάσματος της Αντίδρασης Λιποξυγονάσης με διάφορες συγκεντρώσεις Τριμεταζιδίνης

Χρόνος	Συγκεντρώσεις		
	TMZ 10 <sup>-4</sup> M	TMZ 10 <sup>-5</sup> M	TMZ 10 <sup>-6</sup> M
x 15sec			
1	30.2 ± 4.6	36.0 ± 4.3	45.2 ± 16.4
2	56.5 ± 9.2	72.5 ± 14.1	89.6 ± 29.8
3	78.3 ± 14.4	100.5 ± 17.7	134.2 ± 4.0
4	92.2 ± 17.7	120.0 ± 24.3	172.4 ± 48.9
5	103.2 ± 20.3	137.5 ± 31.0	206.6 ± 54.9
6	115.3 ± 23.2	152.7 ± 35.3	236.6 ± 56.7
7	126.3 ± 22.7	168.7 ± 40.6	258.2 ± 55.6
8	136.3 ± 23.1	182.5 ± 39.8	279.6 ± 56.8
9	145.2 ± 23.5	194.7 ± 39.8	297.6 ± 58.0
10	152.2 ± 23.1	204.7 ± 39.3	311.0 ± 56.8
11	158.0 ± 21.9	214.0 ± 39.1	322.2 ± 55.2
12	162.2 ± 20.7	220.5 ± 39.5	332.0 ± 52.9



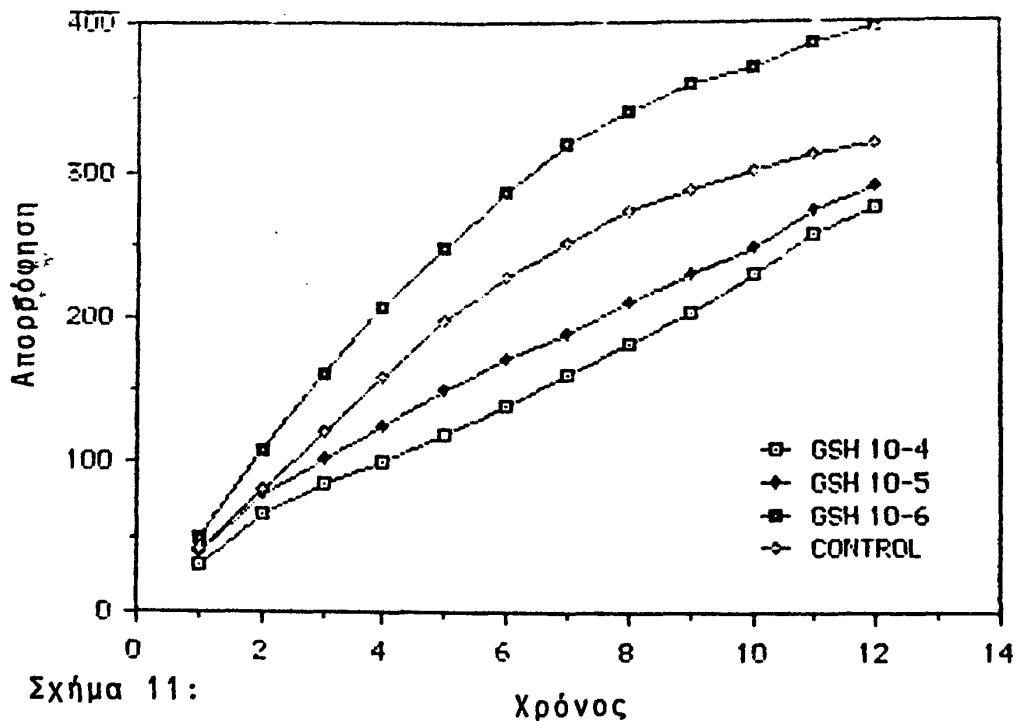
Πίνακας 36 : Μεταβολές της απορρόφησης του φάσματος της Αντίδρασης Λιποξυγονάσης, παρουσία διαφόρων συγκεντρώσεων Βιταμίνης C

Χρόνος	Συγκεντρώσεις		
	Βιτ. C $10^{-4}$ M	Βιτ. C $10^{-5}$ M	Βιτ. C $10^{-6}$ M
x15 sec			
1	30.1 ± 3.5	38.3 ± 4.5	50.0 ± 5.0
2	65.0 ± 7.3	75.7 ± 7.3	106.6 ± 6.6
3	85.4 ± 9.3	100.2 ± 9.3	159.6 ± 1.1
4	98.1 ± 10.2	121.8 ± 10.2	204.6 ± 3.8
5	121.0 ± 9.3	140.7 ± 9.8	244.0 ± 4.0
6	139.8 ± 12.1	165.2 ± 13.4	283.0 ± 5.6
7	158.4 ± 11.7	182.0 ± 12.2	313.3 ± 6.6
8	180.0 ± 12.4	204.1 ± 10.4	336.0 ± 5.6
9	200.5 ± 9.3	221.2 ± 9.8	351.6 ± 6.1
10	227.2 ± 10.6	239.4 ± 12.1	363.3 ± 7.4
11	251.3 ± 14.1	252.2 ± 8.9	375.0 ± 7.8
12	270.0 ± 10.2	274.8 ± 12.1	383.6 ± 7.8

Πίνακας 37 : Μεταβολές της απορρόφησης του φάσματος της Αντίδρασης Λιποξυγονάσης με διάφορες συγκεντρώσεις PBN

Χρόνος	Συγκεντρώσεις		
	PBN $10^{-4}$ M	PBN $10^{-5}$ M	PBN $10^{-6}$ M
x 15sec			
1	34.3 ± 3.9	48.0 ± 4.5	50.0 ± 3.5
2	62.1 ± 7.1	73.2 ± 5.8	75.2 ± 5.2
3	84.0 ± 10.6	117.6 ± 9.3	123.3 ± 12.8
4	103.3 ± 14.8	138.4 ± 3.9	171.4 ± 14.7
5	116.7 ± 15.7	224.6 ± 9.8	212.6 ± 14.2
6	129.3 ± 16.8	250.7 ± 9.5	248.2 ± 15.4
7	139.6 ± 16.8	272.0 ± 8.9	278.0 ± 13.8
8	149.1 ± 17.3	298.5 ± 10.2	303.7 ± 12.2
9	157.6 ± 16.6	315.7 ± 3.4	324.4 ± 10.7
10	164.4 ± 15.9	325.0 ± 7.0	340.0 ± 11.8
11	169.3 ± 15.6	335.3 ± 12.4	353.2 ± 10.0
12	172.0 ± 15.5	348.7 ± 5.8	363.6 ± 9.0

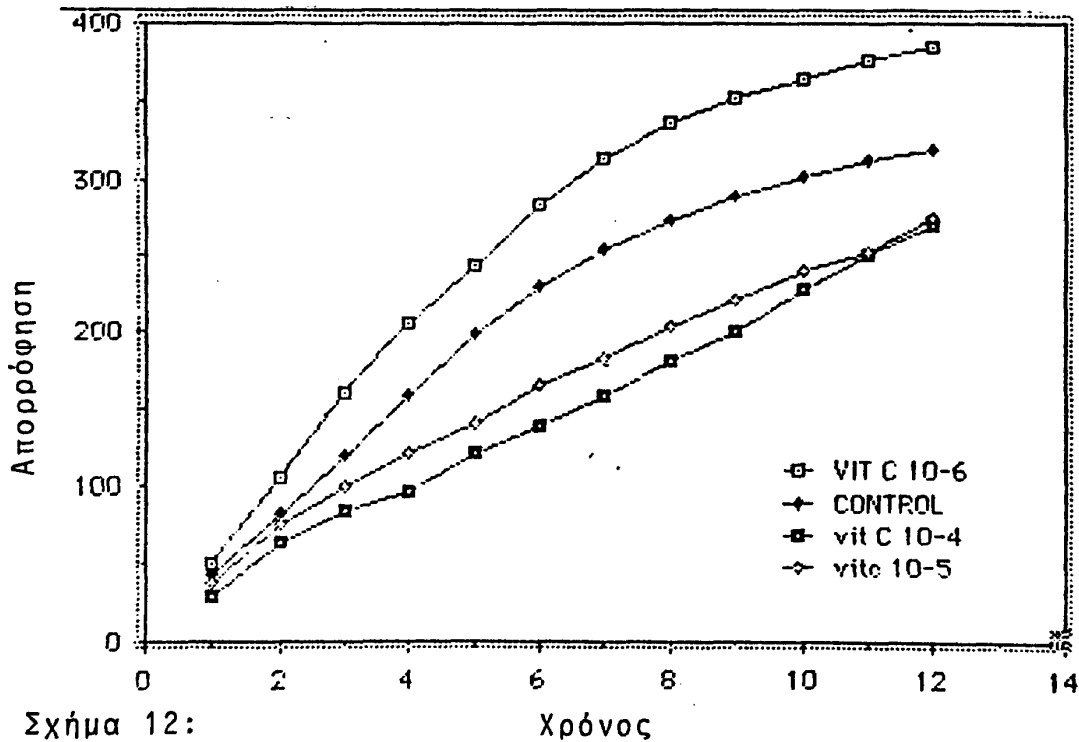




Σχήμα 11:

Χρόνος

Γραφική παράσταση των μεταβολών της αντίδρασης λιπελαϊκού-λιποξυγονάσης, παρουσία διαφόρων συγκεντρώσεων αναχθείσας γλουταθειόνης (GSH) (Οι αριθμοί στον άξονα του χρόνου αντιστοιχούν σε 30 δ/λεπτα)

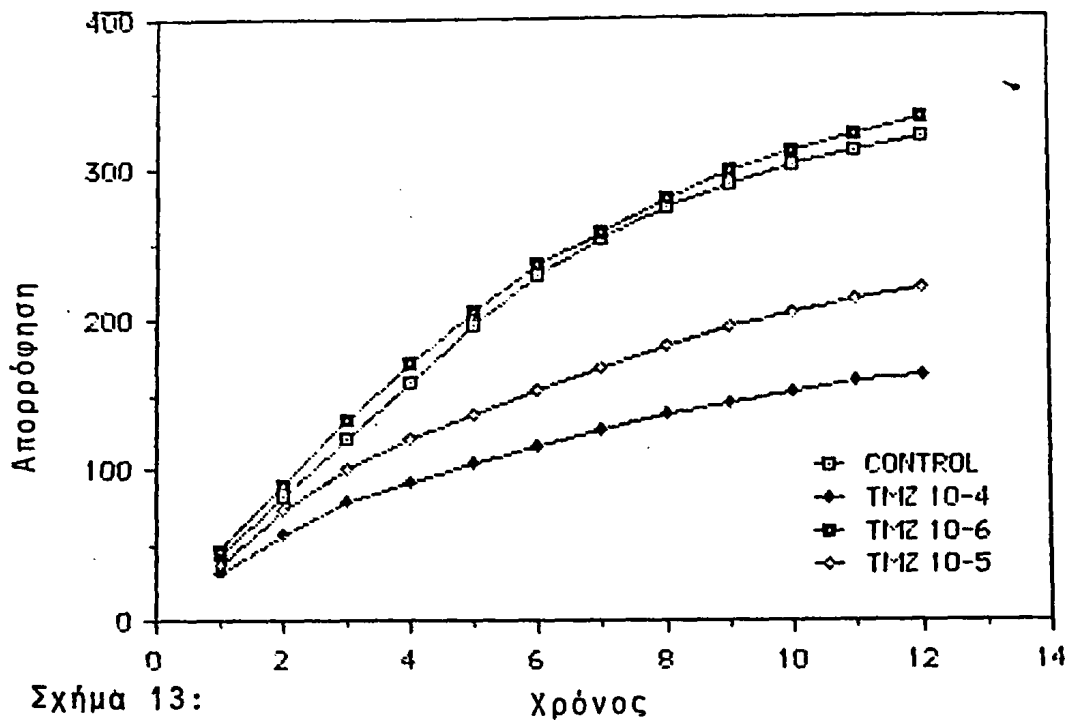


Σχήμα 12:

Χρόνος

Γραφική παράσταση των μεταβολών της αντίδρασης λιπελαϊκού-λιποξυγονάσης, παρουσία διαφόρων συγκεντρώσεων βιταμίνης C (Vit.C) (Οι αριθμοί στον άξονα του χρόνου αντιστοιχούν σε 30 δ/λεπτα)

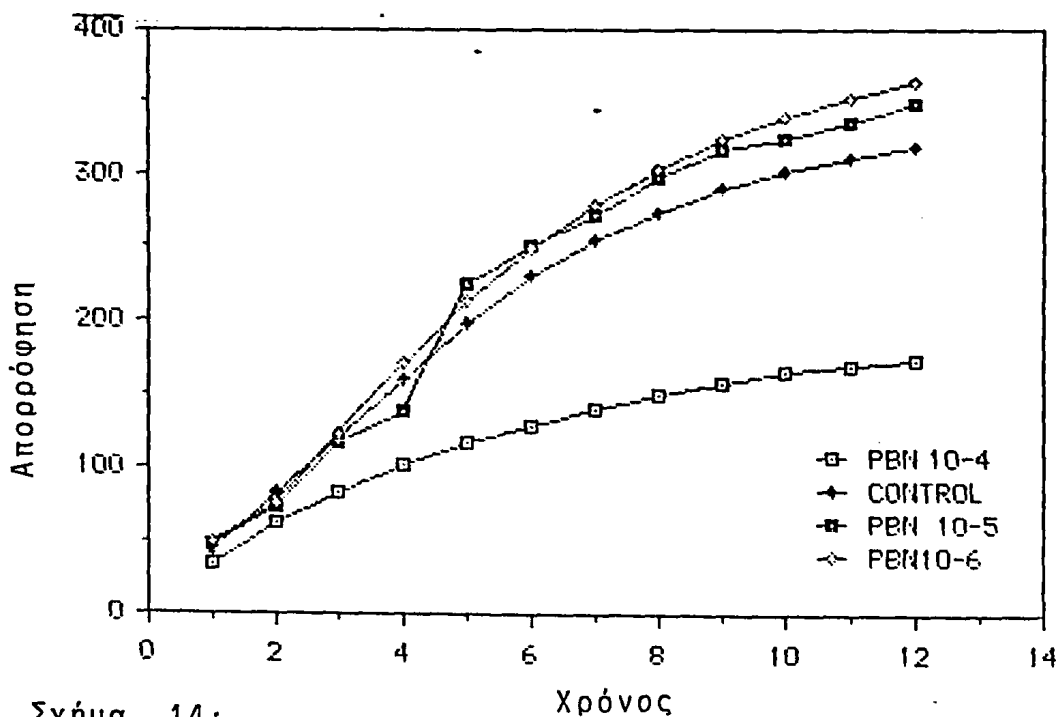




Σχήμα 13:

Χρόνος

Γραφική παράσταση των μεταβολών της αντίδρασης λινελαϊκού-λιποξυγονάσης, παρουσία διαφόρων συγκεντρώσεων τριμεταζιδίνης (TMZ)  
(Οι αριθμοί στον άξονα του χρόνου αντιστοιχούν σε 30 δ/λεπτα)

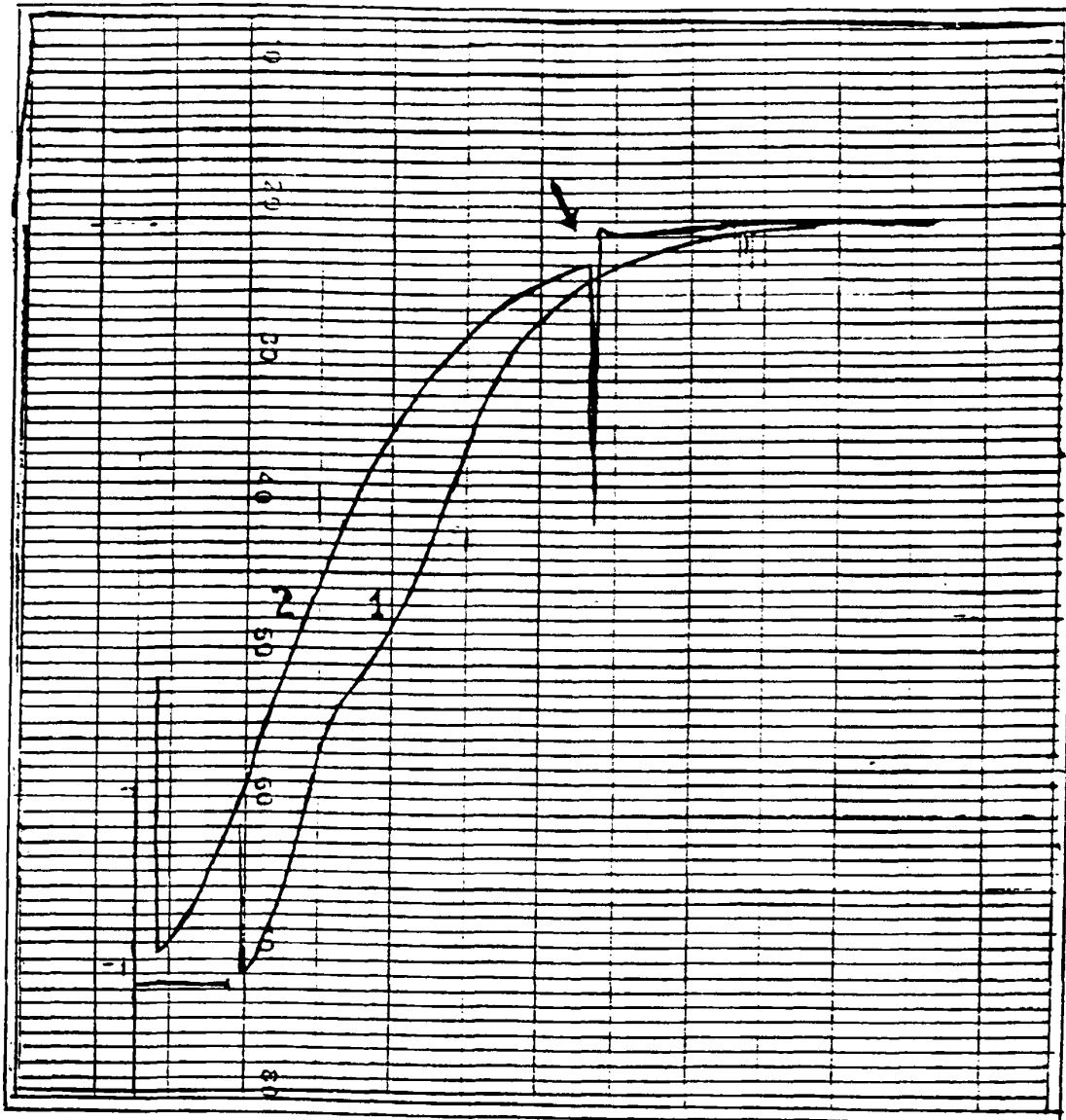


Σχήμα 14:

Χρόνος

Γραφική παράσταση των μεταβολών της αντίδρασης λινελαϊκού-λιποξυγονάσης, παρουσία διαφόρων συγκεντρώσεων φαινύλ-βουτύλ-νιτρονίου (PBN)  
(Οι αριθμοί στον άξονα του χρόνου αντιστοιχούν σε 30 δ/λεπτα)





Εικόνα 23: Αντίδραση Λινελαϊκού Λιποξυγονάσης.

1. Καταγραφή της μεταβολής απορρόφησης κατά την αντίδραση Λινελαϊκού Λιποξυγονάσης.
2. Πρόθεση Τριμεταζιδίνης ( $10^{-4}$  M) στο δεύτερο λεπτό της αντίδρασης Λινελαϊκού Λιποξυγονάσης (↓).

Παρατηρείται αναστολή της μεταβολής της απορρόφησης και διακοπή της αντίδρασης.



## ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Από τα αποτελέσματα της πειραματικής εργασίας φαίνεται ότι οι ουσίες που δοκιμάσθηκαν δεν προκαλούν στα αιμοπετάλια λειτουργικές ή μορφολογικές αλλοιώσεις. Αυτό αποδεικνύεται πρώτον από τη μη στατιστικά σημαντική αύξηση της γαλακτικής αφυδρογονάσης (LDH) του εναιωρήματος των αιμοπεταλίων, μετά από δίωρη επώαση με υψηλές συγκεντρώσεις των υπό έλεγχο ουσιών (252,253) και δεύτερον από το μικροσκοπικό έλεγχο των αιμοπεταλίων μετά από τη δίωρη επώαση (Φωτογραφίες 1,2)).

Μερικές από τις ουσίες αυτές (GSH, Bit C) αποτελούν επίσης φυσικά συστατικά των αιμοπεταλίων, απαραίτητα για τη σωστή λειτουργία τους και η 2-MPG έχει χρησιμοποιηθεί για τη διατήρηση της λειτουργικότητας των αιμοπεταλίων μετά την απόψυξή τους (149).

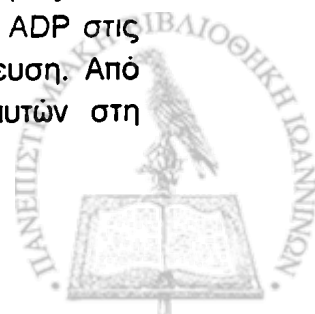
Είναι προφανές ότι η επίδραση των ουσιών αυτών στην αιμοπεταλιακή συσσώρευση δεν μπορεί να αποδοθεί σε λειτουργική αδρανοποίηση ή μορφολογική αλλοίωση των αιμοπεταλίων.

Όλες οι ουσίες που δοκιμάσθηκαν ανέστειλαν σε πολύ σημαντικό βαθμό, έως πλήρως, τη συσσώρευση των αιμοπεταλίων που προκαλείται και από τις τρεις οδούς, μέσω των οποίων προκαλείται η συσσώρευση. Ειδικότερα:

#### 1. Αναστολή της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων που προκαλείται με ADP.

Είναι εμφανές από τα πειραματικά αποτελέσματα ότι όλες οι ουσίες που δοκιμάσθηκαν, εκτός από το δευδροασκορβικό οξύ αναστέλλουν σημαντικά τη συσσώρευση που προκαλείται από το ADP. Είναι γνωστό ότι το ADP προκαλεί διφασικού τύπου συσσώρευση των αιμοπεταλίων, το πρώτο κύμα της οποίας οφείλεται στην ενεργοποίησή τους από τον αγωνιστή και το δεύτερο στην αντίδραση έκλυσης, που ολοκληρώνει τη συσσώρευση και την κάνει μη αντιστρεπτή (221,222,223,224).

Τα πειραματικά αποτελέσματα έδειξαν ότι η ανασταλτική δράση των ουσιών που δοκιμάσθηκαν στη μέγιστη συσσώρευση που προκάλεσε το ADP δεν έφθανε για καμία από τις ουσίες σε πλήρη αναστολή. Η μέγιστη αναστολή δεν υπερέβη το 86% της μέγιστης συσσώρευσης, ακόμα και σε συγκεντρώσεις όπου οι ουσίες αυτές ανέστειλαν πλήρως τις συσσωρεύσεις από τους άλλους αγωνιστές (βλέπε αποτελέσματα). Οι μέγιστες συγκεντρώσεις των ουσιών αυτών δεν κατάφεραν να αναστείλουν το αρχικό κύμα συσσώρευσης από ADP, η συσσώρευση όμως αυτή ήταν αναστρέψιμη, σε αντίθεση με τις δοκιμασίες ελέγχου, όπου το ADP στις προηγούμενες δόσεις προκάλεσε μέγιστη μη αναστρέψιμη συσσώρευση. Από αυτά γίνεται προφανές ότι η ανασταλτική δράση των ουσιών αυτών στη



συσσώρευση των αιμοπεταλίων από ADP αφορά κυρίως στην αντίδραση έκλυσης. Όπως προαναφέρεται, κατά την αντίδραση έκλυσης των αιμοπεταλίων απελευθερώνεται στον περιαιμοπεταλιακό χώρο το περιεχόμενο των κοκκίων, το οποίο αποτελείται από αδρεναλίνη, ADP, σεροτονίνη, β-θρομβοσφαιρίνη,  $PF_4$  κ.α. (221,237).

Οι ουσίες αυτές επιδρούν με τη σειρά τους στους μεμβρανικούς υποδοχείς, κινητοποιώντας στα αιμοπετάλια τις άλλες οδούς συσσώρευσης, κυρίως αυτή του αραχιδονικού οξέος. Ταυτόχρονα η είσοδος ασβεστίου στα κύτταρα, που προκαλείται από την ενεργοποίησή τους με το ADP, αλλά και από τα προϊόντα της έκλυσης προάγει την ταχεία σύνθεση από τα αιμοπετάλια του παράγοντα ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων (225), ο οποίος με τη σειρά του επενεργεί στο αιμοπετάλιο επεκτείνοντας τη συσσώρευση. Αν και η παραγωγή PAF από τα αιμοπετάλια κουνελιού, όταν αυτά διεγείρονται με ADP, αμφισβητείται, εν τούτοις αυτό είναι γνωστό ότι συμβαίνει για τα αιμοπετάλια του ανθρώπου (225) στα οποία έγιναν οι περισσότερες δοκιμασίες συσσώρευσης με ADP στην παρούσα μελέτη. Είναι ακόμη γνωστό ότι με τη δράση του ADP αποκαλύπτονται στην κυτταρική μεμβράνη οι υποδοχείς για τη δράση των άλλων φυσιολογικών ανταγωνιστών της συσσώρευσης (226,227,238,239).

Η ανασταλτική αυτή δράση των ουσιών που δοκιμάσθηκαν δεν μπορεί να αποδοθεί σε αποκλεισμό ή ανταγωνισμό αυτών των ουσιών για τους υποδοχείς του ADP στο αιμοπετάλιο, για τους εξής λόγους:

1. Γιατί όλες οι ουσίες που δοκιμάσθηκαν έχουν διαφορετική στερεοχημική δομή, αλλά και φυσικοχημικές ιδιότητες, αν εξαιρέσει κανείς τις σουλφυδρυλικές ενώσεις (GSH, 2-MPG, N-AC, και D-P), που χαρακτηρίζονται από κοινές ιδιότητες, όσον αφορά τη δράση τους στις -SH ομάδες που βρίσκονται στις κυτταρικές πρωτεΐνες.
2. Γιατί η πρόσθεση των ουσιών αυτών στα διαλύματα συσσώρευσης μετά την έναρξη της συσσωρευτικής διαδικασίας από τον αγωνιστή (ADP), προκάλεσε αποσυσσώρευση των αιμοπεταλίων (Σχήματα 6,7,8 και Εικόνες 20,21,22) σε φάσεις όπου ο αγωνιστής είχε ήδη "προσδεθεί" στον υποδοχέα και είχε ασκήσει τη δράση του (228,229,230,231,232).

Από τα πειραματικά δεδομένα και τη βιβλιογραφική διερεύνηση δε φαίνεται πιθανό η ανασταλτική δράση των ουσιών αυτών να οφείλεται στη δέσμευση του εξωκυττάριου  $Ca^{2+}$  (χηλική δράση) ούτε στην αναστολή της ενδοκυττάριας απελευθέρωσής του (233,234). Εάν μία τέτοια δράση ήταν πιθανή, τότε θα ανεμένετο οι ουσίες αυτές να αναστείλουν και το πρώτο κύμα συσσώρευσης των αιμοπεταλίων από ADP, δεδομένου ότι το  $Ca^{2+}$  είναι βασικός μεσολαβητής της συσσώρευσης, ανεξαρτήτως οδού μέσω της οποίας αυτή πυροδοτείται (31).



Έχει εν τούτοις προταθεί ότι μερικές από τις μεμβρανικές πρωτείνες με σουλφυδρυλικές ομάδες (θειολικές πρωτείνες) είναι σημαντικές συστατικές των μοριακών μηχανισμών, που είναι υπεύθυνοι για τη διαμεμβρανική μεταφορά ιόντων  $\text{Ca}^{2+}$  από τα μιτοχόνδρια και τα μικροσωμάτια (233,234,235). Μεταβολές αυτών των πρωτεϊνών μπορεί να προκαλέσουν αύξηση του κυτταροπλασματικού  $\text{Ca}^{2+}$  (236). Η πιθανότητα οι χρησιμοποιηθείσες θειολικές ενώσεις (GSH, 2-MPG, D-P, N-AC) να άσκησαν μία τέτοια προστατευτική δράση στις -SH ομάδες, εμποδίζοντας τη μετακίνηση εξωκυττάριου και απελευθέρωση ενδοκυττάριου ασβεστίου δεν μπορεί να αποκλεισθεί από την παρούσα μελέτη. Όμως μία τέτοια δράση δεν είναι γνωστό ότι ασκείται από τις υπόλοιπες ουσίες (TMZ, Bit C, PBN, BHT), που άσκησαν επίσης ανασταλτική δράση στη συσσώρευση των αιμοπεταλίων από ADP, σε συγκεντρώσεις παρόμοιες με αυτές τουλάχιστον της GSH και 2-MPG (βλέπε πίνακα 4 σελ. 110 και πίνακα 7, σελ. 111).

Εκτός απ' αυτό έχει δειχθεί ότι το ADP μπορεί σε υψηλές συγκεντρώσεις να ασκήσει τη δράση του απουσία  $\text{Ca}^{2+}$  (237). Η ανασταλτική δράση τέλος της 2-MPG στη συσσώρευση των αιμοπεταλίων από ADP έχει ακόμη αποδοθεί και στην ικανότητά της να εκκαθαρίζει ελεύθερες ρίζες (149,150,151).

Από τα παραπάνω είναι προφανές ότι η ανασταλτική δράση των ουσιών αυτών στη συσσώρευση από ADP οφείλεται σε δράση των ουσιών στους μηχανισμούς που ενεργοποιούν τον κύκλο του αραχιδονικού οξέος και των οδών κυκλο- και λιποξυγονάσης. Οι δράσεις αυτές θα συζητηθούν παρακάτω.

## **2. Αναστολή της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων που προκαλείται από το Αραχιδονικό Οξύ (AA)**

Όλες οι ουσίες που δοκιμάσθηκαν, εκτός από το δευδροασκορβικό οξύ ανέστειλαν ισχυρά, μέχρι πλήρως τη συσσώρευση των αιμοπεταλίων που προκάλεσε το αραχιδονικό οξύ. Στα πειράματά μας η συσσώρευση με αραχιδονικό οξύ έγινε, αφού στα αιμοπετάλια αποκλείσθηκε με CP/CPK ο δρόμος συσσώρευσης του ADP, ο οποίος μπορούσε να ενεργοποιηθεί μέσω της αντίδρασης έκλυσης (203). Επομένως η συσσώρευση που επακολούθησε μετά τη χορήγηση του AA, προκλήθηκε με την ενεργοποίηση του μεταβολισμού του αραχιδονικού οξέος μέσω κυρίως της κυκλοξυγονάσης και δευτερευόντως της λιποξυγονάσης. Όπως έχει προαναφερθεί, ο μεταβολισμός του αραχιδονικού οξέος στα αιμοπετάλια, οδηγείται κυρίως στη σύνθεση μη προστανοικών παραγόντων, δηλαδή στη σύνθεση κυρίως  $\text{TxA}_2$ , (βλέπε Σχ.5) και λιγότερο προσταγλανδινών και λευκοτριενίων (240,241,242,243,244,245).

Αναστολή της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων, που προκαλείται από το AA με μερικές από τις ουσίες που χρησιμοποιήσαμε, αναφέρονται και από άλλους ερευνητές. Συγκεκριμένα αναστολή της συσσώρευσης από AA έχει επιτευχθεί με





τη χορήγηση σε ανθρώπινο PRP αναχθείσας γλουταθειόνης (GSH) και α-Μερκαπτοπροπιονυλ-γλυκίνης (2-MPG) (246,247).

Η αναστολή της συσσώρευσης από το αραχιδονικό με την αναχθείσα γλουταθειόνη έχει μέχρι σήμερα αποδοθεί στο σημαντικό της ρόλο στον μεταβολισμό του αραχιδονικού οξέος σε προσταγλανδίνες, δεδομένου ότι η προσταλαγδινική Ε-ισομεράση, η οποία μετατρέπει τα ενδοπεροξειδία  $PGG_2$  και  $PGH_2$  σε PGE και απαιτεί ως συμπράγοντα (co factor) την γλουταθειόνη. Σύμφωνα με την άποψη αυτή η γλουταθειόνη συμμετέχει στην αναγωγή των υδρουπεροξειδίων στο κύτταρο και κατά τη διαδικασία αυτή οξειδώνεται από τα προσταγλανδινικά υδρουπεροξειδία στη θειλική ελεύθερη ρίζα της, η οποία έχει ανιχνευθεί με ESR. (274). Μέσω της δράσης αυτής η αναχθείσα γλουταθειόνη θεωρείται ως αναστολέας της κυκλοξυγονάσης υπό φυσιολογικές συνθήκες, αλλά και σαν αναγωγικός συμπράγοντας της υπεροξειδάσης των προσταγλανδινών (246,247).

Εν τούτοις ο ρόλος της αναχθείσας γλουταθειόνης στη συγκόλληση των αιμοπεταλίων παραμένει ακόμη αντιφατικός. Ερευνες σε αιμοπετάλια στα οποία η γλουταθειόνη είχε εκπλυθεί με 1-χλωρι-2, 4-δινιτροβενζένιο έδειξαν ότι τα αιμοπετάλια ανταποκρίνονται με αυξημένη συσσώρευση στο AA, ενώ αντιθέτως με μειωμένη στο κολλαγόνο (248). Αντιφατικά για το AA είναι τα αποτελέσματα σε αιμοπετάλια "εκπλυθέντα" από γλουταθειόνη με διαμίδιο (247). Χαρακτηριστικό των αιμοπεταλίων αυτών είναι η αυξημένη ποσότητα οξειδωθεισής γλουταθειόνης (GSSG) από το διαμίδιο, η οποία είναι απαραίτητη για την οξειδωση του NADP. Η GSSG θεωρείται υπεύθυνη για την αδυναμία του αιμοπεταλίου να ανταποκριθεί στο AA καθώς και για την αποσυσώρευση των αιμοπεταλίων, φαινόμενα που αποδόθηκαν σε οξειδωτικό πολυμερισμό κυτταροσκελετικών πρωτεϊνών των αιμοπεταλίων (248). Αντιθέτως το 1-χλωρι-2,4-δινιτροβενζένιο αποστερεί τα αιμοπετάλια από GSH και κατά τη διαδικασία της συσσώρευσης δεν παράγεται GSSG.

Τέλος έχει προταθεί ότι η GSH αντί να δράσει αναγωγικά, θα μπορούσε να δράσει σαν ενδοαιμοπεταλιακός "εκκαθαριστής" ελευθέρων ριζών ( $O_2$ ) προφυλάσσοντας την κυκλοξυγονάση από αυτο-αδρανοποίηση και ενισχύοντας τη σύνθεση της  $PGH_2$ , αυξάνοντας έτσι τη συσσώρευση των αιμοπεταλίων (243,249). Βρέθηκε επίσης ότι η αναχθείσα γλουταθειόνη αυξάνει την παραγωγή των 12-HETE στα αιμοπετάλια του μυός μέσω της 12-HPETE υπεροξειδάσης, η οποία είναι γλουταθειονο-εξαρτώμενη και είναι γνωστό ότι η κυκλοξυγονάση αναστέλλεται από την αύξηση των 12-HPETE (243,244,245). Με την ταχύτατη μετατροπή των 12-HPETE σε 12-HETE η ανασταλτική δράση των 12-HPETE στην κυκλοξυγονάση είναι προφανές ότι μειώνεται, αυξάνοντας περισσότερο την ανταπόκριση των αιμοπεταλίων στο αραχιδονικό οξύ.

Τελικά η αντισυσσωρευτική δράση της αναχθείσας γλουταθειόνης στη

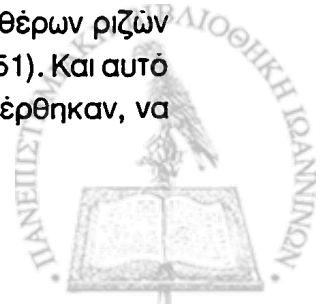


διέγερση από το αραχιδονικό οξύ φαίνεται ότι αποδίδεται τόσο στην αναστολή της κυκλοξυγονάσης που ασκεί, όσο και στην ενδοκυττάρια οξειδωσή της και μετατροπή της σε οξειδωθείσα γλουταθειόνη (GSSG) από τις ελεύθερες ρίζες, μεταβάλλοντας έτσι τη σχέση GSH/GSSG στο αιμοπετάλιο (132,245).

Η 2-MPG θεωρείται ότι δρα και αυτή ως αναστολέας του μεταβολισμού του αραχιδονικού οξέος στην οδό της κυκλοξυγονάσης. Έχει διαπιστωθεί ότι με τη χορήγηση της 2-MPG, ταυτόχρονα με την αναστολή της συσσώρευσης από AA, παρατηρείται μείωση της MDA (Μαλονική διαλδεύδη), καθώς και του σχηματισμού της  $TxA_2$  από τα αιμοπετάλια (149). Η ενεργοποίηση της κυκλοξυγονάσης αποδίδεται και στην οξειδωση -SH ομάδων στο ενεργό κέντρο του ενζύμου και η αδρανοποίησή της από την 2-MPG θεωρείται ότι μπορεί να οφείλεται στην αναγωγή των δισουλφιδίων, που προκαλείται από τηθειόλα. Έχει ακόμη δειχθεί ότι η 2-MPG μπορεί να ανάγει την οξειδωθείσα γλουταθειόνη (GSSG) και τα πρωτεϊνικά πολυμερή στα αιμοπετάλια σε GSH (149), εμπλεκόμενη έτσι σε μηχανισμούς αναστολής της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων από την αναχθείσα γλουταθειόνη (GSH). Οι υπόλοιπεςθειόλες (D-P, N-AC) θα μπορούσαν να ασκήσουν παρόμοιες με την 2-MPG δράσεις στα αιμοπετάλια (154,156,159, 161), αλλά όλες αυτές οι δράσεις εμπεριέχουν τις αντιφάσεις των μηχανισμών που αφορούν την GSH, που προαναφέρθηκαν.

Όσον αφορά τη βιταμίνη C, η ανασταλτική δράση της στην συγκόλληση των αιμοπεταλίων από το αραχιδονικό οξύ, δε θα μπορούσε εύκολα να αποδοθεί στη συμμετοχή της στους μηχανισμούς αναγωγής της οξειδωθείσας γλουταθειόνης (GSSG) σε αναχθείσα (GSH) (166,167). Και αυτό γιατί, όπως προαναφέρθηκε, η αύξηση της ενδοαιμοπεταλιακής GSSG θεωρείται σημαντική συνιστώσα της ανασταλτικής δράσης της γλουταθειόνης στη συσσώρευση των αιμοπεταλίων από το αραχιδονικό οξύ. Από την άλλη μεριά η διατήρηση υψηλών ποσοτήτων αναχθείσας GSH στο αιμοπετάλιο θα μπορούσε να συμβάλει στην αναστολή της κυκλοξυγονάσης. Μια τέτοια δράση δεν θεωρείται προφανής δεδομένου ότι η βιταμίνη C ανέστειλε και τη συσσωρευτική δράση και του PAF σε ασπιρινισμένα αιμοπετάλια, στα οποία η κυκλοξυγονάση είχε ανασταλεί και ο μεταβολισμός του αραχιδονικού οξέος γινόταν μέσω της λιποξυγονάσης και της παραγωγής 12-HETE λευκοτριενίων. Όπως προαναφέρθηκε, η αναχθείσα GSH αυξάνει στα αιμοπετάλια την παραγωγή 12-HETE μέσω της λιποξυγονάσης και επομένως επιτείνει τη σύνθεση λευκοτριενίων (250).

Η ανασταλτική δράση στη συσσώρευση από αραχιδονικό οξύ, τόσο της TMZ και του PBN, όσο και του αντιοξειδωτικού (αναγωγικού) BHT δεν μπορεί ικανοποιητικά να αποδοθεί σε μηχανισμούς που αφορούν στη δράση της GSH ή ακόμα στην αναστολή της συσσώρευσης μέσω δέσμευσης των ελευθέρων ριζών οξυγόνου που παράγονται κατά τη λειτουργία της κυκλοξυγονάσης(251). Και αυτό γιατί μία τέτοια δράση θα μπορούσε, και σύμφωνα με όσα προαναφέρθηκαν, να



ενισχύσει την επίδραση του AA στα αιμοπετάλια, αναστέλλοντας την αυτο-αδρανοποίηση της κυκλοξυγονάσης. Μόνο η πιθανή προστασία από τις ουσίες αυτές της οξειδωσης των -SH ομάδων του ενεργού κέντρου του ενζύμου κυκλοξυγονάση θα μπορούσε να ερμηνεύσει κατά ένα βαθμό την ανασταλτική δράση των ουσιών αυτών στη συσσώρευση των αιμοπεταλίων.

Τέλος η πιθανή δράση των ουσιών αυτών ως αναστολέων πιθανών υποδοχέων AA στην αιμοπεταλιακή μεμβράνη θα πρέπει να αποκλεισθεί για τους ίδιους λόγους που αναφέρθηκαν και για το ADP.

### 3. Αναστολή της Συσσώρευσης Αιμοπεταλίων που Προκαλείται από PAF

Όλες οι ουσίες που χρησιμοποιήθηκαν, εκτός από το δευδροασκορβικό, ανέστειλαν σημαντικά τη συσσώρευση των αιμοπεταλίων που προκαλείται από PAF. Η ανασταλτική τους δράση ασκήθηκε σε αιμοπετάλια, στα οποία η χορήγηση CP/CPK και ακετυλοσαλικυλικού πριν από τη δοκιμασία είχε αποκλείσει τους άλλους δύο μηχανισμούς συσσώρευσής τους, δηλαδή μέσω του ADP και του αραχιδονικού. Έτσι η μόνη οδός συσσώρευσης των αιμοπεταλίων μέσω της οποίας ο PAF ασκούσε τη δράση του ήταν η ενεργοποίηση του μεταβολισμού του αραχιδονικού μέσω της λιποξυγονάσης (51,52,55,56).

Αναστολή της συγκόλλησης των αιμοπεταλίων από τον PAF, με τις ουσίες που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία, δε διαπιστώθηκε να έχει αναφερθεί από άλλους ερευνητές, εκτός από εργασίες που εκπονήθηκαν στο Εργαστήριο Φυσιολογίας (254,255,256). Μία αποσπασματική αναφορά ότι η συγκόλληση από PAF μπορεί να ανασταλεί από το 2-MPG, χωρίς παράθεση πειραματικών αποδείξεων, ή συζήτηση πιθανών μηχανισμών, αναφέρεται από την Bergman και συν. το 1988 (150).

Όσον αφορά τις θειολικές ενώσεις (GSH, 2-MPG, D-P και N-AC) έχει αναφερθεί, όπως συζητείται και προηγουμένως στην παρούσα εργασία, ότι μπορεί να αναστείλουν τη συσσώρευση των αιμοπεταλίων που προκαλείται από άλλους αγωνιστές εκτός του PAF (257,265). Μεταξύ των μηχανισμών αναστολής της συσσώρευσης που έχουν προταθεί για τις θειολικές ενώσεις αναφέρεται και η ενδοαιμοπεταλιακή αύξηση του C-GMP, που προκαλείται από τις ουσίες αυτές (138). Όμως ένας τέτοιος μηχανισμός όχι μόνο δε θα ανέστειλε τη συγκόλληση των αιμοπεταλίων από PAF, αλλά πιθανώς θα την επέτεινε, δεδομένου ότι μία από τις δράσεις του αγωνιστή αυτού είναι η αύξηση του C-GMP στο αιμοπέταλιο. Είναι επί πλέον γνωστό ότι η δράση του PAF στα αιμοπετάλια αναστέλλεται από ουσίες που μειώνουν το C-GMP, αποκλείοντας τους α-μεμβρανικούς υποδοχείς των αιμοπεταλίων (258).

Η προαναφερθείσα αναστολή της δραστηριότητας της κυκλοξυγονάσης

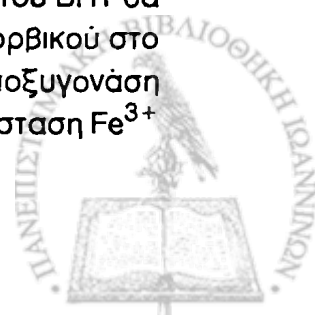


από θειολικές ενώσεις, όπως η γλουταθειόνη και το 2-MPG, είναι προφανές ότι δεν μπορεί να θεωρηθεί σαν ένας από τους μηχανισμούς αναστολής της συγκόλλησης αιμοπεταλίων που προκαλείται από τον PAF, δεδομένου ότι αφ' ενός η κυκλοξυγονάση στο πειραματικό μας πρότυπο είχε ήδη ανασταλεί και μάλιστα μη αντιστρεπτά από το σαλικυλικό οξύ και αφ' ετέρου ο PAF, όπως προαναφέρθηκε, λειτουργεί και χωρίς τη συμμετοχή του ενζύμου αυτού, διεγείροντας τη μεταβολική οδό της λιποξυγονάσης.

Είναι γνωστό ότι οι θειολικές ενώσεις συμμετέχουν στις αντιδράσεις ανταλλαγής θειόλης-δισουλφυδίου (147,259). Είναι επίσης γνωστό ότι οι μεμβρανικές πρωτείνες των αιμοπεταλίων διαθέτουν ελεύθερες σουλφυδρικές και δισουλφιδικές ομάδες (260). Έχει προταθεί ότι η ανασταλτική δράση θειολικών παραγώγων στη συγκόλληση των αιμοπεταλίων από ADP μπορεί να οφείλεται στις αντιδράσεις των παραγώγων αυτών με τις δισουλφιδικές ομάδες των μεμβρανικών πρωτεϊνών των αιμοπεταλίων μεταβάλλοντας τη στερεοχημική δομή τους. Στις πρωτείνες αυτές θεωρείται ότι εντοπίζονται τόσο οι υποδοχείς του ADP (261) και του Αραχιδονικού (262), αλλά πιθανώς και του PAF (263). Μία τέτοια δράση των θειολικών παραγώγων στην αναστολή της συγκόλλησης των αιμοπεταλίων από τον PAF δε θα μπορούσε να αποκλεισθεί, σύμφωνα με τα πειραματικά μας δεδομένα. Εν τούτοις η αποσυσσωρευτική δράση μέσω της GSH όσο και της 2-MPG στη μη αντιστρεπτή συσσώρευση των αιμοπεταλίων, που έχει ήδη προκαλέσει ο PAF, όταν αυτές προστέθηκαν στην κυβέτα του συσσωρευομέτρου μέχρι και 4 λεπτά μετά την έναρξη της συσσώρευτικής διαδικασίας, κάνει μία τέτοια υπόθεση λιγότερο πιθανή. Αυτό συμβαίνει γιατί ο PAF συνδέεται ταχέως με τους υποδοχείς του στα αιμοπετάλια, (σε χρόνο nsec), εντός msec αρχίζει η πυροδότηση και εντός 20 sec έχει ήδη ολοκληρωθεί η διαδικασία συσσώρευσης των αιμοπεταλίων (263). Επομένως η πιθανή τροποποίηση των μεμβρανικών υποδοχέων από τις σουλφυδρικές ενώσεις, σε λεπτά μετά την ολοκλήρωση της συσσώρευσης, δε θεωρείται πιθανό να αναστέλλει τη δράση του με το μηχανισμό που προαναφέρθηκε.

Σχετικά με την ανασταλτική δράση των άλλων ουσιών που δοκιμάστηκαν (Bit C, BHT, TMZ, PBN), που είναι ενώσεις με ισχυρή αντιοξειδωτική δράση και ιδιότητες εκκαθαριστή ελευθέρων ριζών, καμία από τις παραπάνω πιθανές ερμηνείες που συζητήθηκαν για τις σουλφυδρικές ενώσεις δε φαίνεται πιθανή.

Έχει αναφερθεί ότι η Βιταμίνη C μπορεί να αναστείλει τη συσσώρευση των αιμοπεταλίων, *in vivo*, σε κουνέλια (266) καθώς και σε ασθενείς με ισχαιμική καρδιοπάθεια (267), στους οποίους η συγκολλητικότητα των αιμοπεταλίων στον PAF είναι αυξημένη (268). Η ανασταλτική δράση της Βιταμίνης C και του BHT θα μπορούσε να αποδοθεί στη διαπιστωμένη αναγωγική δράση του ασκορβικού στο  $Fe^{3+}$  που τον ανάγει σε  $Fe^{2+}$ , δεδομένου ότι είναι γνωστό ότι η λιποξυγονάση λειτουργεί με τον αιμικό Fe του ενεργού κέντρου του ενζύμου σε κατάσταση  $Fe^{3+}$



και ότι η αναγωγή του σε  $Fe^{2+}$  αναστέλλει τη δράση του ενζύμου. Παρόμοιες με τη Βιταμίνη C και τη BHT αναγωγικές ιδιότητες διαθέτουν και η GSH, η 2-MPG και η N-AC. Μία τέτοια δράση των ουσιών αυτών στην αναστολή της αιμοπεταλιακής συσσώρευσης από τον PAF, δεν μπορεί να αποκλεισθεί από τα δεδομένα της παρούσας μελέτης. Είναι εξ' άλλου γνωστό ότι τα αιμοπετάλια είναι από τα πλουσιότερα κύτταρα του αίματος σε γλουταθειόνη και βιταμίνη C (Πίνακας 1). Παρόλα αυτά η ανασταλτική δράση της τριμεταζιδίνης και φαινύλ-βουτυλ-νιτρονίου (PBN) στη συσσώρευση των αιμοπεταλίων από τον PAF, δεν είναι δυνατό να αποδοθεί σε κανέναν από τους παραπάνω μηχανισμούς, δεδομένου ότι δε διαθέτουν καμία από τις προαναφερθείσες ιδιότητες. Το κοινό χαρακτηριστικό των ουσιών με τις προαναφερθείσες, είναι η ικανότητά τους να εκκαθαρίζουν ή να παγιδεύουν ελεύθερες ρίζες (66,67,128,133,151,152,154,159,160,161,165,168,174,175,176,177,178,179,180,181). Κατά πόσο αυτή η κοινή ιδιότητα των ουσιών που χρησιμοποιήθηκαν σαν αναστολείς της συγκόλλησης από PAF μπορεί να ερμηνεύσει την αντισυσσωρευτική τους δράση θα συζητηθεί παρακάτω.

Τελειώνοντας θα πρέπει να τονισθεί ότι για τους λόγους που έχουν προαναφερθεί στην παρούσα συζήτηση η ανασταλτική δράση των ουσιών αυτών στη συγκόλληση των αιμοπεταλίων από PAF δεν είναι πιθανό να αποδοθεί σε αποκλεισμό ή ανταγωνισμό των ουσιών αυτών με τους υποδοχείς του παράγοντα ενεργοποίησης αιμοπεταλίων ούτε στη δέσμευση του εξωκυττάριου ή ενδοκυττάριου  $Ca^{2+}$  (269).

#### 4. Αποσυσώρευση των Αιμοπεταλίων

Από τα πειραματικά αποτελέσματα είναι προφανές ότι η γλουταθειόνη (GSH), η α-Μερκαπτοπροπιονύλ-γλυκίνη (2-MPG), η Βιταμίνη C, το Βουτυλικό-υδροξυτυλουένιο (BHT) και η Τριμεταζιδίνη (TMZ) λειτουργούν αποσυσσωρευτικά στη συγκόλληση των αιμοπεταλίων και από τους τρεις αγωνιστές (ADP, AA και PAF), σε δόσεις που προκαλούν μη ανιστρέψιμη συσσώρευση. Η αποσυσσωρευτική δράση των παραπάνω ουσιών ασκείται και όταν η διαδικασία της συσσώρευσης έχει ήδη προχωρήσει σημαντικά (μερικά λεπτά από την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων).

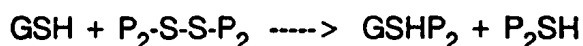
Πρόσφατες μελέτες (136,140,143) αποδίδουν τη μη αναστρέψιμη συσσώρευση στις δομικές και συσταλτές πρωτείνες του αιμοπεταλίου. Ειδικότερα, θεωρείται ότι κατά τη διαδικασία της ενεργοποίησης το μεγαλύτερο ποσοστό της ακτινής πολυμερίζεται και μετατρέπεται σε ινίδια νηματοειδούς ακτινής (ακτινή-F). Τα ακτινικά αυτά μονομερή συνενώνονται σχηματίζοντας νηματοειδή πολυμερή, που συμβάλλουν στη μη αναστρέψιμη συσσώρευση (304,305). Στο μηχανισμό αυτό



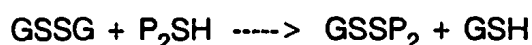
σημαντική είναι η συμμετοχή της πρωτεΐνης σύνδεσης με την ακτίνη (ABP), η οποία λειτουργεί ως στήριγμα (πυρήνας) προσκόλλησης των μονομερών της ακτίνης κατά την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων. Το μήκος των ινιδίων κατά τον πολυμερισμό της ακτίνης έχει αποδειχθεί ότι ρυθμίζεται από το P<sub>230</sub>. Ο πολυμερισμός της ακτίνης έχει αποδοθεί σε οξειδωτικές διαδικασίες, οι οποίες αφορούν και άλλες κυτταροσκελετικές πρωτεΐνες που διαθέτουν -SH ομάδες. Θεωρείται ότι η εκλεκτική οξείδωση των πρωτεϊνών αυτών εμποδίζει επίσης την έξοδο ψευδοποδίων και την τήξη των αιμοπεταλίων, διαδικασίες απαραίτητες για τη μη αναστρέψιμη συσσώρευση (143). Στις διαδικασίες αυτές θεωρείται σημαντική η συμμετοχή της αναχθείσας γλουταθειόνης (GSH). Έχει υποστηριχθεί ότι η οξείδωση της γλουταθειόνης και η αύξηση της GSSG στο αιμοπετάλιο είναι βασική παράμετρος της αποσυσσωρευτικής διαδικασίας (143).

Η οξείδωση αυτή θεωρείται ότι λειτουργεί αποσυσσωρευτικά, αφ' ενός γιατί στερεί το αιμοπετάλιο από αναχθείσα γλουταθειόνη (GSH), η οποία θα προστάτευε τις -SH πρωτεϊνικές ομάδες της μεμβράνης από οξειδωτικό αποπολυμερισμό και αφ' ετέρου γιατί η οξειδωμένη γλουταθειόνη (GSSG) θεωρείται ότι προάγει τον οξειδωτικό αποπολυμερισμό τόσο των ινιδίων της ακτίνης την οποία και πολυμερίζει, όσο και την οξείδωση των -SH πρωτεϊνικών ομάδων και τη μετατροπή τους σε S-S δεσμούς (δισουλφιδικούς δεσμούς), ούτως ώστε το αιμοπετάλιο να αδυνατεί να προσεκβάλλει ψευδοπόδια, αλλά και να τακεί με άλλα (136,140).

Από τα παραπάνω είναι εμφανές ότι η αποσυσσωρευτική δράση των ουσιών της μελέτης μας δεν μπορεί να αποδοθεί σε παρόμοιους μηχανισμούς. Σε χαρακτηριστική αντίθεση με τα παραπάνω έρχονται τα ευρήματά μας, σύμφωνα με τα οποία η αναχθείσα GSH και η 2-MPG ασκούν αποσυσσωρευτική δράση, ενώ είναι γνωστό ότι δρά ανάγοντας τις δισουλφιδικές γέφυρες των πρωτεϊνών προστατεύοντας τις σουλφυδρυλικές ομάδες (-SH). Έχει μάλιστα προταθεί ο παρακάτω χαρακτηριστικός κύκλος της αντίδρασης αυτής με την GSH. Εάν P<sub>2</sub>-S-S-P<sub>2</sub> είναι πρωτεΐνες συνδεδεμένες με δισουλφιδικές γέφυρες, τότε:



και η σουλφυδρυλική πρωτεΐνη είναι δυνατό να αντιδράσει με την οξειδωμένη γλουταθειόνη μεταβάλλοντάς την σε αναχθείσα κατά την αντίδραση:



και ο κύκλος συνεχίζεται (306). Παρόμοια αναγωγική δράση θα μπορούσε ακόμη να αποδοθεί και στο BHT και τη Βιταμίνη C, η οποία εκτός των άλλων συμμετέχει στην αναγωγή της GSSG σε GSH (66).



Τέλος ο οξειδωτικός αποπολυμερισμός της ακτίνης, που έχει προταθεί ως μηχανισμός αποσυσσώρευσης, αποδίδεται και σε υδροξειδία του Αραχιδονικού οξέος (AA-υδροξειδία) που σχηματίζονται από την λιποξυγονάση με την έκπλυση της GSH. Αλλά στα δικά μας πειράματα η GSH λειτουργεί αποσυσσωρευτικά και στη συσσώρευση με PAF, όταν η ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων γίνεται μέσω κυρίως της οδού της λιποξυγονάσης και η εξωγενής προσφορά γλουταθειόνης (GSH) θα πρέπει να περιορίζει το σχηματισμό υπεροξειδίων του αραχιδονικού.

Εκτός των ανωτέρω η αποσυσσωρευτική δράση της τριμεταζιδίνης που θεωρείται κλασικός εκκαθαριστής ελευθέρων ριζών (174,175,177,178) δεν μπορεί να αποδοθεί σε καμία από τις προαναφερθείσες διαδικασίες.

Από τα πειραματικά μας δεδομένα προκύπτουν ενδείξεις ότι για τη διατήρηση των αιμοπεταλίων σε μη αναστρέψιμη συσσώρευση, *in vitro*, είναι απαραίτητο να διατηρούνται σε λειτουργία οι ενεργοποιητικοί μηχανισμοί των αιμοπεταλίων και κυρίως η μεταβολική οδός του αραχιδονικού με τους δρόμους της κυκλο- και λιποξυγονάσης. Είναι πιθανόν υποπροϊόντα των βιοχημικών μεταβολικών οδών σ' αυτή τη διαδικασία να είναι απαραίτητα για τη διατήρηση των αιμοπεταλίων σε συσσώρευση, μέχρι τη δράση προϊόντων της πήξης που θα ολοκληρώσουν το σχηματισμό του θρόμβου.

Η αναστολή των οδών αυτών με τους πιθανούς μηχανισμούς που περιγράφηκαν και θα αναλυθούν παρακάτω, φαίνεται ότι στερούν από τα αιμοπετάλια τα απαραίτητα προϊόντα για να διατηρούνται συσσωρευμένα. Μιά τέτοια υπόθεση πάντως, φαίνεται να αντιφάσκει με δεδομένα της παρούσας μελέτης, εφ' όσον και άλλες ουσίες με ανασταλτική δράση στη συσσώρευση (N-ακετυλ-κυστεΐνη, Φαινυλ-βουτυλ-νιτρόνιο, D-Πενικιλλαμίνη) δεν άσκησαν αποσυσσωρευτική δράση. Είναι πάντως προφανές ότι περαιτέρω έρευνα είναι απαραίτητη για να διασαφηνιστούν οι μηχανισμοί της αποσυσσωρευτικής δράσης των ουσιών που δοκιμάσθηκαν στην παρούσα μελέτη.

## 5. Οξειδωση Βιταμίνης C

Τα αποτελέσματα του ελέγχου του φάσματος απορρόφησης της βιταμίνης C κατά την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων με PAF είναι ενδεικτικά του ότι η βιταμίνη C υφίσταται έντονη οξειδωση κατά την άσκηση αναστολής της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων.

Η οξειδωση της βιταμίνης C κατά τη διαδικασία αυτή πρέπει να αποδοθεί στην πιθανή επίδραση ελευθέρων ριζών, κυρίως οξυγόνου στην ουσία αυτή (301,302). Το παραπάνω είναι πιθανό, δεδομένου ότι, όπως προκύπτει από τα αποτελέσματά μας, καμία σημαντική μεταβολή της απορρόφησης του φάσματος της βιταμίνης C δεν καταγράφηκε στα διαλύματα στα οποία τα αιμοπετάλια δεν ήταν διεγερμένα, ενδεικτικό του ότι αυτά σε κατάσταση ηρεμίας δεν οξειδώνουν τη βιταμίνη C. Ακόμη φαίνεται ότι ο PAF δεν ασκεί οξειδωτική δράση στη βιταμίνη



C απουσία αιμοπεταλίων. Τέλος χωρίς αιμοπεταλιακή ενεργοποίηση η βιταμίνη C δεν αυτοοξειδώνεται, δεδομένου ότι καμία σημαντική μεταβολή του φάσματος της δεν καταγράφηκε στα αντίστοιχα διαλύματα και είναι γνωστό ότι η αυτοοξείδωση της βιταμίνης C είναι πάρα πολύ βραδεία σε υδατικά διαλύματα με pH αλκαλικό (Δ7), όπως αυτά χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη (pH=7.4) (165).

Τα αιμοπετάλια είναι γνωστό ότι παράγουν ρίζες οξυγόνου ( $O_2^-$  και  $OH^\cdot$ ), όταν διεγερθούν με αραχιδονικό (194,195) και PAF (197,254). Οι ρίζες αυτές αποδίδονται κυρίως στη δραστηριότητα του ενζύμου λιποξυγονάσης, και είναι γνωστό ότι ο PAF ασκεί τη συσσωρευτική του δράση μέσω αυτής της οδού μεταβολισμού του αραχιδονικού (53,54,55).

Τα αποτελέσματά μας συνηγορούν ότι η δέσμευση ελευθέρων ριζών από τη βιταμίνη C είναι ένας πιθανός μηχανισμός αναστολής της αιμοπεταλιακής συσσώρευσης που πραγματοποιείται μέσω της λιποξυγονάσης. Η μεγάλη περιεκτικότητα των αιμοπεταλίων σε βιταμίνη C (66), με το δεδομένο ότι η ουσία αυτή ανάγει ενδοκυττάρια την GSSG, επαναποκαθιστώντας την κυτταρική περιεκτικότητα σε αναχθείσα γλουταθειόνη (GSH) είναι ενδεικτική του ρυθμιστικού ρόλου της βιταμίνης C στη συσσώρευση των αιμοπεταλίων.

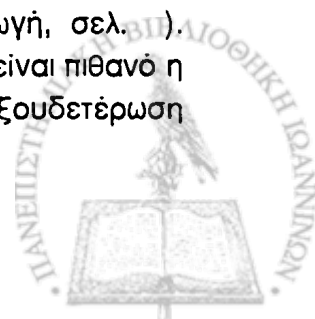
## 6. Υπεροξειδίο του Υδρογόνου ( $H_2O_2$ ) και Υπεροξειδίο-δισμουτάση (SOD)

Η εξωγενής χορήγηση υπεροξειδίου υδρογόνου ( $H_2O_2$ ) στα εναιωρήματα των αιμοπεταλίων σε διάλυμα  $TG-Ca^{2+}$  δεν προκάλεσε συσσώρευση των αιμοπεταλίων στα πειράματά μας. Επίσης η χορήγηση Υπεροξειδίο-δισμουτάσης (SOD) σε διάφορες συγκεντρώσεις δεν κατάφερε να αναστείλει τη συσσώρευση που προκαλούν οι τρεις αγωνιστές ADP, AA, PAF.

Έχει εν τούτοις αναφερθεί στη βιβλιογραφία ότι η εξωγενής χορήγηση ουσιών, όπως η ξανθίνη που προκαλεί την παραγωγή ριζών ανιόντος υπεροξειδίου  $O_2^-$  (270) και το τετραυπεροξυχρωμικό κάλιο που παράγει υπεροξειδίο του υδρογόνου ( $H_2O_2$ ), ρίζες υδροξυλίου ( $OH^\cdot$ ), ανιόντος υπεροξειδίου ( $O_2^-$ ) και οξυγόνου Singlet (271) προκάλεσαν in vitro συσσώρευση των αιμοπεταλίων.

Είναι γνωστό ότι το οξυγονούχο ύδωρ  $H_2O_2$  αντιδρά στα κυτταρικά συστήματα και τα διαλύματα είτε με το ανιόν υπεροξειδίου  $O_2^-$  είτε με τα δισθενή ιόντα  $Fe^{2+}$  και σχηματίζει ελεύθερη ρίζα υδροξυλίου  $OH^\cdot$  (αντίδραση Haber-Weiss και Fenton) (βλέπε εισαγωγή), η οποία είναι δραστική.

Η παραγωγή τέτοιων ριζών ( $OH^\cdot$ ) στα κύτταρα αντιμετωπίζεται με τα ένζυμα υπεροξειδίο-δισμουτάση (SOD), που εξουδετερώνει τη ρίζα υπεροξειδίου και με την καταλάση που διασπά το οξυγονούχο ύδωρ (βλέπε εισαγωγή, σελ. ). Δεδομένου ότι τα αιμοπετάλια περιέχουν και τα δύο αυτά ένζυμα, είναι πιθανό η αδυναμία του  $H_2O_2$  να προκαλέσει συσσώρευση να οφείλεται στην εξουδετέρωση





των ριζών που παρήχθησαν από τα προαναφερθέντα ενζυμικά συστήματα, δεδομένου ότι και οι χρησιμοποιηθείσες συγκεντρώσεις  $H_2O_2$  στα πειράματά μας, (5% μέγιστη τελική συγκέντρωση  $H_2O_2$ ) είναι μικρές σε σύγκριση με την ποσότητα και τη διάρκεια της αντίδρασης παραγωγής  $H_2O_2$  από το τετραπεροξυχρωμικό κάλιο (271). Η υπεροξειδίο-δισμουτάση είναι ένα μεγαλομόριο, το οποίο δεν εισέρχεται στο αιμοπετάλιο (100). Γι' αυτό είναι προφανές ότι στα πειράματά μας η εξουδετέρωση των ελευθέρων ριζών ανιόντος υπεροξειδίου, που παράγονται κατά την ενεργοποίηση της αραχιδονικής οδού από τους αγωνιστές της συσσώρευσης μέσω της υπεροξειδίο-δισμουτάσης έγινε μόνο για όσες από τις ρίζες αυτές διοχετεύονται στον εξωκυττάριο χώρο.

Από τα δύο προαναφερθέντα πειράματα φαίνεται ότι για να προκληθεί συσσώρευση από ελεύθερες ρίζες  $\cdot OH$  ή ανιόντος υπεροξειδίου ( $O_2^-$ ) απαιτούνται πιθανώς υψηλές εξωκυττάρειες συγκεντρώσεις, ούτως ώστε να ασκηθεί ενδοκυττάρια ενζυματική ενεργοποίηση. Δεν είναι, από όσο διερευνήθηκε, γνωστό αν τέτοια φαινόμενα αιμοπεταλιακής συσσώρευσης μπορεί να προκληθούν *in vitro* κατά τη διέγερση των πολυμορφοπύρηνων από μεσολαβητές της φλεγμονής ή άλλους αγωνιστές, τα οποία παράγουν υψηλές ποσότητες ελευθέρων ριζών, κυρίως ανιόντος υπεροξειδίου (272,273). Πρόσφατα δεδομένα συνηγορούν ότι οι ελεύθερες ρίζες μπορεί να αυξήσουν τη δραστηριότητα της φωσφολιπάσης  $A_2$  των βιολογικών μεμβρανών (276,277,278,279, 280,281) διαφόρων κυττάρων και έχει έτσιδειχθεί ότι η ισχαιμία της χοληδόχου αυξάνει τη δραστηριότητα της  $PLA_2$  και το περιεχόμενο των λιπιδικών υπεροξειδίων ( $LO\cdot$ ,  $LOO\cdot$ ) και αυτό έχει αποδοθεί στην παραγωγή ελευθέρων ριζών (275). Ακόμη διαπιστώθηκε ότι η ισχαιμία και η επαναιμάτωση του λεπτού εντέρου αυξάνουν τη μαλονική διαλδεύδη (MAD) και τη δραστηριότητα της φωσφολιπάσης  $A_2$  ( $PLA_2$ ) και είναι γνωστός ο ρόλος της επαναιμάτωσης μετά από ισχαιμία στην παραγωγή ελευθέρων ριζών (276). Η πρόσθεση εξωγενών συστημάτων παραγωγής ελευθέρων ριζών σε απομονωμένα τριχοειδή αγγεία του εγκεφάλου αυξάνουν τη δραστηριότητα της  $PLA_2$  (277,281). Ακόμη η χορήγηση προσταγλανδίνης  $PGF_{2a}$ , η οποία προκαλεί αύξηση της παραγωγής ελευθέρων ριζών, αυξάνει τη δραστηριότητα της  $PLA_2$  της μεμβράνης του ωχρού σωματίου του μυός κατά τη φάση της υποστροφής και της ωχρόλυσης (278,279).

Ενεργοποίηση της φωσφολιπάσης  $-A_2$  από ελεύθερες ρίζες οξυγόνου έχει ακόμα διαπιστωθεί κατά την πειραματική οξεία παγκρεατίτιδα στα ποντίκια (280).

Τέλος τα ανθρώπινα ουδετερόφιλα, όταν διεγερθούν με ακετοξεικό εστέρα της μυριστικής φορβόλης, αυξάνουν την παραγωγή της φωσφατιδυλινοσιτόλης και του φωσφατιδικού οξέος, που είναι προϊόντα δραστηριότητας της  $PLA_2$ , μετά την παραγωγή ελευθέρων ριζών ανιόντος υπεροξειδίου ( $O_2^-$ ) (282).

Από τα παραπάνω είναι προφανές ότι ελεύθερες ρίζες, κυρίως είδη ελευθέρων ριζών οξυγόνου, μπορεί να προκαλέσουν ενεργοποίηση της  $PLA_2$  και



μία τέτοια δράση, παρά το ότι δεν έχει μελετηθεί, δεν μπορεί να αποκλεισθεί στα αιμοπετάλια. Πιθανότατα η εξωγενής χορήγηση υψηλών συγκεντρώσεων ελευθέρων ριζών σε πλυμένα αιμοπετάλια να προκαλεί συσσώρευση των αιμοπεταλίων μέσω ενός παρόμοιου μηχανισμού ενεργοποίησης της μεμβρανικής φωσφολιπάσης -A<sub>2</sub> και καταβολισμού των φωσφολιποειδών προς αραχιδονικό οξύ αλλά και άλλα προϊόντα (φωσφατιδυλινοσιτόλη - φωσφατιδικό οξύ), που ενέχονται στους μηχανισμούς συσσώρευσης των αιμοπεταλίων.

### 7. Αντίδραση Λινελαϊκού-Λιποξυγονάσης

Η πρόσθεση μίας σουλφυδρυλικής ένωσης (αναχθείσα γλουταθειόνη), μίας αντιοξειδωτικής (βιταμίνη C), ενός εκκαθαριστή ελευθέρων ριζών (τριμεταζιδίνη) και ενός παγιδευτή spin (φαινυλ-βουτυλ-νιτρόνιο) στα διαλύματα της αντίδρασης της λιποξυγονάσης, ανέστειλαν σε σημαντικό βαθμό τη μεταβολή του φάσματος απορρόφησής της.

Κατά τη διαδικασία αυτή η λιποξυγονάση καταλύει την αντίδραση μεταξύ του λινελαϊκού οξέος και του οξυγόνου και παράγει σαν προϊόντα το 13-(S)-υπεροξυ-9(Z),11-(E)-οκταδεκαδιενικό οξύ (13-HPOD) (285,289,290).

Η αντίδραση αυτή φαίνεται ότι ενεργοποιείται μέσω της παραγωγής από την αντίδραση του ενζύμου ορισμένων ειδών ελευθέρων ριζών, οι οποίες έχουν ανιχνευθεί με ESR και προτείνεται ότι είναι μία πενταδιενυλική και μία λιπουπερόξη ρίζα (288,290,296).

Τα πειραματικά αποτελέσματα της αναστολής της αντίδρασης από τις ουσίες που δοκιμάστηκαν είναι δυνατόν να αποδοθούν στους παρακάτω μηχανισμούς:

α) Πιθανή εξουδετέρωση από τις ουσίες του προϊόντος της αντίδρασης (13-HPOD) και μείωση της απορρόφησης.

β) Πιθανή αναγωγική δράση των ουσιών στο Fe<sup>3+</sup> της αίμης, του ενεργού κέντρου του ενζύμου και αναστολή της δραστηρότητάς του, λόγω της αναγωγής του Fe<sup>3+</sup> σε Fe<sup>2+</sup> (283,284,287,288).

γ) Εξουδετέρωση από τις ουσίες των πενταδιενυλικών και λιπουπερόξυ ριζών, οι οποίες είναι απαραίτητες για την ενεργοποίηση του ενζύμου και τη συντέλεση της αντίδρασης.

Η πιθανότητα αντίδρασης των ουσιών με το 13-HPOD δε φαίνεται πιθανή, δεδομένων των διαφορετικών χημικών δομών των ουσιών που χρησιμοποιήθηκαν. Παράλληλα, αν οι ουσίες εξουδετέρωναν το παραγόμενο προϊόν, θα αναμένετο κάποιου βαθμού αποκατάσταση του φάσματος απορρόφησης. Πρόσθεση όμως των ουσιών αυτών κατά τη διάρκεια της αντίδρασης (2ο λεπτό) επιβράδυνε την ταχύτητα απορρόφησης, χωρίς να αποκαταστήσει το φάσμα.



Η πιθανότητα αναγωγικής δράσης στον  $Fe^{3+}$  του ενζύμου δεν μπορεί να αποκλεισθεί για τη βιταμίνη C και τη γλουταθειόνη. Έχει εξάλλου αναφερθεί αναστολή της λιπο και κυκλο-οξυγονάσης από την 2-MPG (149,150) και αναστολή από την αναχθείσα γλουταθειόνη της 12-λιποξυγονάσης, ex vivo, σε αιμοπετάλια ποντικών (303). Μία παρόμοια δράση όμως δε φαίνεται πιθανή για τις άλλες δύο ουσίες, τριμεταζιδίνη και φαινυλ-βουτυλ-νιτρόνιο, δεδομένου ότι δε διαθέτουν αξιόλογες αναγωγικές ιδιότητες. Έχει αντίθετα αναφερθεί ότι παγιδευτές spin που ανήκουν, όπως το PBN, στα νιτροζοπαράγωγα μπορούν να αναστείλουν την αντίδραση της λιποξυγονάσης δεσμεύοντας λιπο-υπεροξυ-ρίζες (286).

Από τα παραπάνω είναι πιθανόν η αναστολή της αντίδρασης από τις χρησιμοποιηθείσες ουσίες να οφείλεται σε μία τέτοια δράση, δηλαδή εκκαθάριση ή δέσμευση της πενταδιενυλικής και της λιπο-υπεροξυ ρίζας, που θεωρούνται υπεύθυνες για τη δραστηριότητα του ενζύμου, δεδομένου ότι όλες διαθέτουν την ικανότητα εκκαθάρισης - δέσμευσης ελευθέρων ριζών.

#### **8. Προτεινόμενος Πιθανός Μηχανισμός Δράσης των Ελευθέρων Ριζών στη Συσσώρευση των Αιμοπεταλίων και της Αναστολής της από Εκκαθαριστές Ελευθέρων Ριζών**

Από πολλά βιβλιογραφικά δεδομένα προκύπτει ότι κατά το μεταβολισμό του αραχιδονικού οξέος, τόσο μέσω της κυκλοξυγονάσης, όσο και της λιποξυγονάσης, παράγονται διάφορα είδη ελευθέρων ριζών (66,92,192,193,194,284,287,288,289,290,291,292,293,295,297,298). Από τα παραγόμενα είδη μερικά, κυρίως ρίζες ανιόντος υπεροξειδίου ( $O_2^-$ ) και υδροξυλίου ( $OH^\cdot$ ), μπορεί να ανιχνευθούν στο εξωαιμοπεταλιακό περιβάλλον. Η πλειονότητά τους αποδίδεται κυρίως στην ενεργοποίηση του δρόμου της λιποξυγονάσης (194,195). Όμως υπάρχει πληθώρα δεδομένων που συνηγορεί υπέρ του ότι άλλα είδη ριζών, που είναι βραχύβια, αποτελούν ενδιάμεσα προϊόντα της δραστηριότητας των δύο οξυγονασών (66,285,287,290,292,293,296). Φαίνεται ότι ο ρόλος των "φευγαλέων" ενδιάμεσων αυτών ριζών και των ριζών υδροξυλίου, ανιόντος υπεροξειδίου και οξυγόνου Singlet είναι διαφορετικός, όσον αφορά στην ενζυματική δραστηριότητα των οξυγονασών. Από το ένα μέρος οι ενδιάμεσες ρίζες φαίνεται να λειτουργούν ως ενεργοποιητές του ενζύμου με μία θετική ανατροφοδότηση και από το άλλο οι ρίζες οξυγόνου λειτουργούν ως ρυθμιστές καταστρέφοντας ορισμένες ποσότητες του ενζύμου (αρνητική ανατροφοδότηση).

Ειδικότερα είναι γνωστό ότι για την κυκλοξυγονάση και τη σύνθεση των προσταγλανδινών απαιτείται μία ελάχιστη ποσότητα ενδουπεροξειδίου PGG<sub>2</sub>, ώστε να γίνει η πλήρης ενεργοποίηση του ενζύμου και να προχωρήσει η αντίδραση. Φαίνεται ότι ίχνη υπεροξειδίου απαιτείται να αντιδράσουν με τον  $Fe^{3+}$  της αίμης



της κυκλοξυγονάσης, για να σχηματίσουν μία υπεροξυ-ρίζα, η οποία στη συνέχεια αφαιρεί ένα άτομο υδρογόνου από το αραχιδονικό οξύ για να πυροδοτηθεί η διαδικασία. Στη συνέχεια η  $PGG_2$  μετατρέπεται σε  $PGH_2$  με τη δράση μίας υπεροξειδάσης, η οποία απομονώνεται (καθαρίζεται) μαζί με την κυκλοξυγονάση και φαίνεται να αποτελεί τμήμα της ίδιας πρωτεΐνης. Κατά τη διάρκεια αυτής της αναγωγής απελευθερώνεται μία υψηλής δραστηριότητας ρίζα, η οποία μπορεί να ανιχνευθεί στο ESR σε χαμηλές θερμοκρασίες (290,296). Η ρίζα αυτή, αν και έχει πολλές ιδιότητες της υδροξυλικής, είναι γνωστό ότι δεν ανήκει σ' αυτό το είδος και συνήθως παρίσταται σαν  $[OX]$ . Οι Cadenas και συν (92) έχουν δείξει ακόμη ότι κατά την ενζυματική αναγωγή της  $PGG_2$  σε  $PGH_2$  παράγεται οξυγόνιο Singlet ( $O_2$ ). Ακόμη υδρουπεροξειδία, όπως τα ΗΡΕΤΕ, που είναι προϊόντα της λιποξυγονάσης, μπορεί να λειτουργήσουν ως υποστρώματα της υδρουπεροξειδάσης των προσταγλανδινών και να αποτελέσουν την πηγή παραγωγής ριζών  $OH\cdot$  και  $^1O_2$  (297). Είναι πιθανό οι παραπάνω ρίζες να λειτουργούν περιοριστικά ως προς τη δραστηριότητα του ενζύμου ρυθμίζοντας με οξειδωτική καταστροφή του την ποσότητά του, επομένως και την ταχύτητα και ποσότητα των παραγομένων προϊόντων. Σε μία τέτοια δράση είναι επίσης πιθανό να οφείλεται και η αναστολή της δραστηριότητας της κυκλοξυγονάσης που προκαλείται από τα ΗΡΕΤΕ (245,299).

Συνοψίζοντας, είναι πιθανό τόσο το κυκλικό ενδοπεροξειδίο  $PGG_2$ , όσο και οι υπερόξυ-ρίζες, να λειτουργούν σαν ενεργοποιητές της κυκλοξυγονάσης, ενώ ρίζες οξυγόνου ( $[OX]$ ,  $OH\cdot$ ,  $O_2$ ,  $O_2$ ) να λειτουργούν σαν αναστολείς της δραστηριότητάς της προκαλώντας την καταστροφή της. Στη λειτουργική αυτή σχέση πρέπει να αποδοθεί η παρατήρηση ότι χαμηλές συγκεντρώσεις αντιοξειδωτικών φαίνεται να ευοδώνουν τη δραστηριότητα του ενζύμου, ενώ υψηλές την περιορίζουν ή την αναστέλλουν (66). Στην παρούσα μελέτη βρέθηκε ότι η GSH και η βιταμίνη C σε μικρές συγκεντρώσεις ασκούν μία μικρή αύξηση της ταχύτητας της αντίδρασης λινελαικού-λιποξυγονάσης μετά το 90ο sec της αντίδρασης, γεγονός που υποστηρίζει τα παραπάνω. Στο γεγονός αυτό μπορεί να αποδοθεί το εύρημα τόσο της παρούσας μελέτης, όσο και προγενεστέρων (197,198), ότι η δράση των αντιοξειδωτικών ουσιών στα αιμοπετάλια, σε δόσεις μέγιστης (μη αναστρέψιμης) ή αναστρέψιμης συσσώρευσης, αρχίζει από μία ορισμένη συγκέντρωση και πάνω, περίπου ίδια για κάθε διεγέρτη. Η μέγιστη αναστολή παρατηρούνταν στην ίδια περίπου συγκέντρωση για κάθε διεγέρτη, ανεξαρτήτως της χορηγούμενης δόσης του διεγέρτη. Επειδή οι χρησιμοποιηθείσες ουσίες έχουν ικανότητα "εκκαθάρισης" κατά πρώτον ριζών οξυγόνου και μετά άλλων ριζών, είναι πιθανό σε μικρές συγκεντρώσεις να εξουδετερώνουν μόνο ρίζες οξυγόνου, που είναι υπεύθυνες για τον περιορισμό της δραστηριότητας του ενζύμου, ενώ σε υψηλότερες δόσεις εξουδετερώνουν και τις ενδιάμεσες ρίζες που είναι υπεύθυνες για την ενεργοποίησή του.



Όσον αφορά τη λιποξυγονάση, έχει προταθεί ότι η δράση του ενζύμου πραγματοποιείται μέσω της οξειδωσης από τον  $Fe^{3+}$  στο ενεργό κέντρο του ενζύμου της 1,4-διένης, μονάδας του υποστρώματος (αραχιδονικού), ώστε να μετατραπεί σε μία πενταδιενυλική ρίζα. Η ρίζα αυτή αντιδρά κατευθείαν με το  $O_2$  και παράγει μία υπερόξυ-ρίζα, η οποία στη συνέχεια ανάγει τον  $Fe^{3+}$  σε  $Fe^{2+}$  με παραγωγή ριζών ανιόντος υπεροξειδίου ( $O_2^-$ ) (βλέπε σχήμα 24 ) (66,285,288,290,296)

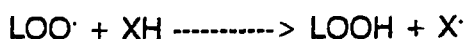
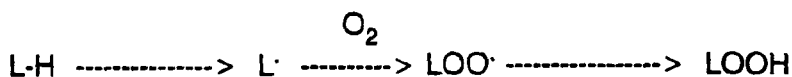
Στην αντίδραση αυτή αποδίδεται και η ανίχνευση δοσοεξαρτώμενων ποσοτήτων ριζών ανιόντος υπεροξειδίου ( $O_2^-$ ) από τα ασπιρινισμένα αιμοπετάλια, όταν διεγείρονται με διάφορες ποσότητες αραχιδονικού.

Τόσο η πενταδιενυλική ρίζα, όσο και η υπερόξυ-ρίζα, έχουν ανιχνευθεί και ταυτοποιηθεί με φασματοσκοπία ESR τα τελευταία χρόνια, κατά την *in vitro* και *in vivo* ενεργοποίηση της αντίδρασης της λιποξυγονάσης (288,290,296).

Επομένως αναστολή της μεταβολικής οδού της λιποξυγονάσης είναι δυνατόν να συμβεί θεωρητικά με δύο τρόπους. Είτε δεσμεύοντας την πενταδιενυλική ρίζα είτε ανάγοντας τον  $Fe^{3+}$  στο ενεργό κέντρο του ενζύμου σε  $Fe^{2+}$ .

Μερικοί αναστολείς της λιποξυγονάσης δρουν ανάγοντας το σίδηρο του ενζύμου αυτού (66,285,287,288,289). Στις δύο παραπάνω δράσεις πρέπει να αποδώσουμε την αναστολή της συσώρευσης από τον PAF που προκάλεσαν οι χρησιμοποιηθείσες ουσίες στην παρούσα μελέτη. Πιο συγκεκριμένα η γλουταθειόνη, η βιταμίνη C, το βουτυλικό υδροξυτολουένιο, η α-Μερκαπτοπροπυονύλ-γλυκίνη και η Ν-Ακετύλ-κυστεΐνη διαθέτουν ισχυρές αναγωγικές ιδιότητες, πέρα από τις ικανότητες δέσμευσης ελευθέρων ριζών.

Οι υπόλοιπες ουσίες φέρονται κυρίως σαν εκκαθαριστές ελευθέρων ριζών και η δράση τους σαν αναστολείς πρέπει να αποδοθεί σε πιθανή εκκαθάριση, στις κατάλληλες συγκεντρώσεις, της πενταδιενυλικής ρίζας και ως εκ τούτου σε διακοπή της μεταβολικής οδού της λιποξυγονάσης στα πρώτα βήματα. Εδώ πρέπει να αναφέρουμε πως έχει διαπιστωθεί ότι η φυτική λιποξυγονάση καταλύει αντιδράσεις λιπαρών οξέων, μέσω των οποίων παράγονται ρίζες 13- και 9-υδροπεροξειδίων, (υδροπεροξυ-ρίζες). Αυτές φυσιολογικά ανάγονται σε υδροπεροξειδίο. Όμως αν αυτό δεν συμβεί, μπορεί να αλληλεπιδράσουν με ευοξειδωτά υποστρώματα και να προκαλέσουν οξειδωτικές αντιδράσεις. Ο πιθανός μηχανισμός τέτοιων αντιδράσεων, αν L-H είναι το λιπαρό οξύ και XH το οξειδούμενο μόριο, είναι:



$X + O_2 \longrightarrow$  Προϊόν οξειδωτικής αντίδρασης (66)

Στο αιμοπετάλιο οι 12-υδρουπερόξυ-ρίζες που προκύπτουν από τη δράση της λιποξυγονάσης ανάγονται σε 12-υδρουπεροξυ-5,8,11,14, εικοσιτετρανοϊκό οξύ (12-HPETE), το οποίο είναι πολύ ασταθές και ανάγεται με την υπεροξειδάση της γλουταθειόνης παρουσία GSH σε 12-υδροξυπαράγωγο (12-HETE). Είναι πιθανό μία αναστολή της μεταβολικής οδού της λιποξυγονάσης από τους εκκαθαριστές ελευθέρων ριζών να οφείλεται στη δέσμευση αυτών των 12-υδρουπεροξυ-ρίζων και τη διακοπή της σύνθεσης HPETE και HETE.

Είναι προφανές ότι τα παραπάνω αποτελούν υποθέσεις που προέκυψαν και υποστηρίζονται από τα πειραματικά μας αποτελέσματα και τα δεδομένα της επιστημονικής βιβλιογραφίας.

Τα πειραματικά μας δεδομένα που ενισχύουν την παραπάνω υπόθεση μπορεί να συνοψιστούν ως εξής:

1. Οι ουσίες που χρησιμοποιήθηκαν άσκησαν ανασταλτική δράση στη συσσώρευση των αιμοπεταλίων που ενεργείται και από τις τρεις κλασικές οδούς ενεργοποίησης. Η ανασταλτική δράση ήταν ισχυρότερη για τους αγωνιστές που η ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων διενεργείται κυρίως μέσω του μεταβολισμού του αραχιδονικού οξέος με τα ένζυμα κυκλο- και λιποξυγονάση. Η αναστολή αυτή δεν μπορεί να αποδοθεί σε ανταγωνισμό υποδοχέων, μεταβολές της στεροχημικής δομής των αιμοπεταλιακών μεμβρανών ή διαταραχές της διακίνησης του ασβεστίου.
2. Κατά την ενεργοποίηση της μεταβολικής οδού του αραχιδονικού μέσω της λιποξυγονάσης από τον PAF καταγράφηκε η οξειδωση της βιταμίνης C, η οποία αναστέλλει τη συσσώρευση που προκαλείται από τον αγωνιστή αυτό στα αιμοπετάλια. Παράλληλα η οξειδωμένη μορφή της βιταμίνης C δεν ασκεί αντισυσσωρευτική δράση σε κανέναν από τους αγωνιστές που χρησιμοποιήθηκαν. Από τα δεδομένα αυτά είναι προφανές ότι είναι απαραίτητη η δυνατότητα της ουσίας να ασκεί αντιοξειδωτική και εκκαθαριστική δράση στις ελεύθερες ρίζες, για να αναστείλλει την αιμοπεταλιακή συσσώρευση.
3. Ουσίες με αντιοξειδωτική δράση και ιδιότητες εκκαθαριστή ελευθέρων ριζών, όχι μόνο αναστέλλουν την αιμοπεταλιακή συσσώρευση που διενεργείται μέσω των τριών οδών, αλλά ασκούν αποσυσσωρευτική δράση *in vitro*, (λύση του λευκού θρόμβου).
4. Ουσίες με αντιοξειδωτική δράση και ικανότητες εκκαθαριστή ελευθέρων ριζών αναστέλλουν *in vitro* την αντίδραση λινελαικού-λιποξυγονάσης πιθανώς μέσω της

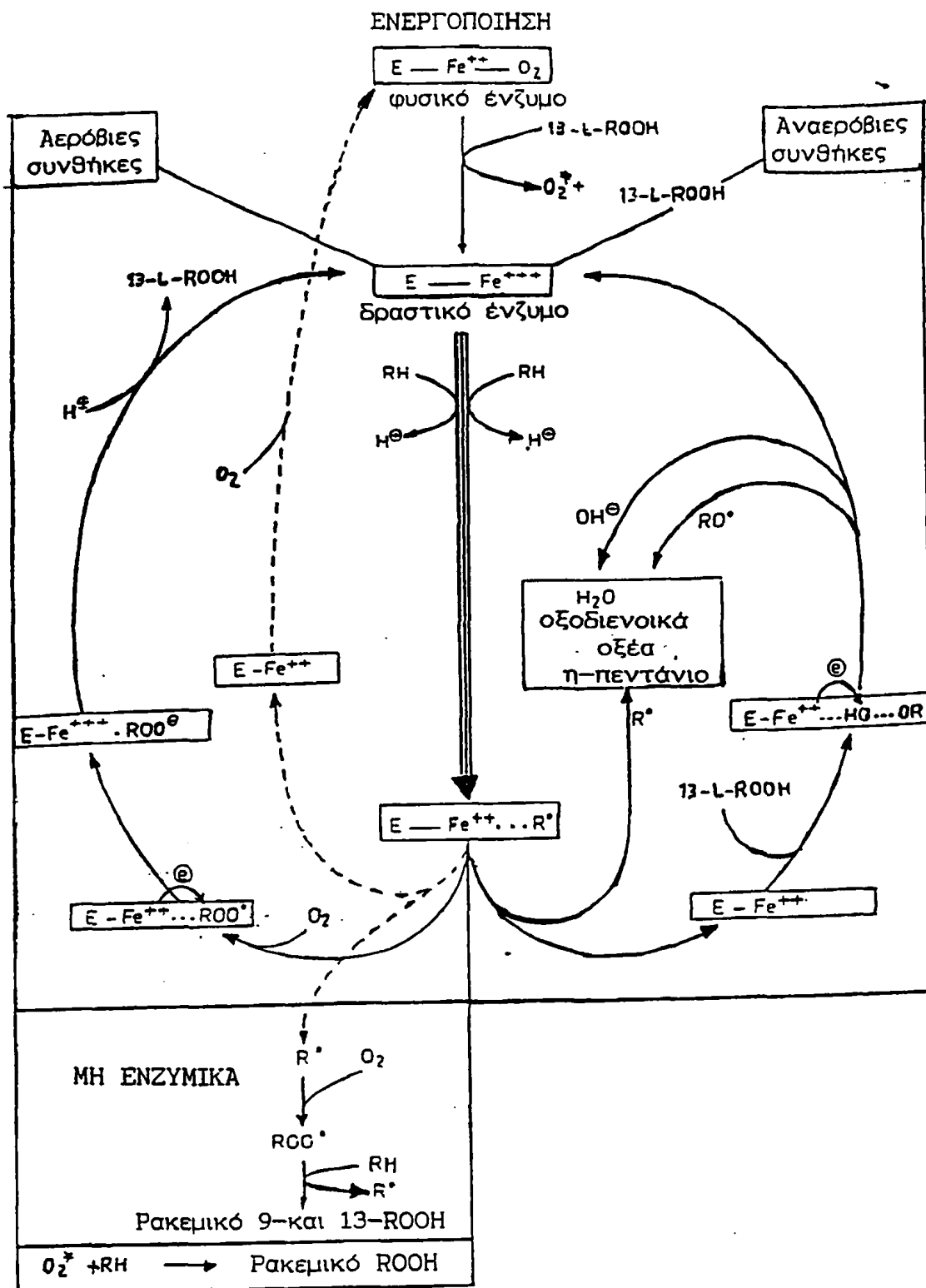


δέσμευσης των ελευθέρων ριζών ή των υπεροξειδικών προϊόντων της λιπυπεροξειδωσης. Παρόμοιες δράσεις έχουν επίσης αναφερθεί και για την κυκλοξυγονάση.

5. Τέλος η δέσμευση εξωκυττάρων ελευθέρων ριζών από την SOD δεν ανέστειλαν τη συσσώρευση. Η πρόσθεση επίσης ελευθέρων ριζών οξυγόνου στα διαλύματα εναιώρησης, σε μικρές ποσότητες δε φαίνεται να ασκεί συσσωρευτική δράση στα αιμοπετάλια. Τα παραπάνω είναι ενδεικτικά ότι οι ελεύθερες ρίζες, που πιθανώς ρυθμίζουν την αιμοπεταλιακή συσσώρευση, παράγονται και καταναλίσκονται στο εσωτερικό του αιμοπεταλίου.

Από την παρούσα μελέτη προέκυψαν σαφείς ενδείξεις ότι στους μηχανισμούς συσσώρευσης των αιμοπεταλίων οι ελεύθερες ρίζες παίζουν σημαντικό ρόλο. Η πλήρης διευκρίνηση του ρόλου αυτού των ελευθέρων ριζών απαιτεί πρόσθετη έρευνα που είναι σε εξέλιξη στο Εργαστήριο Πειραματικής Φυσιολογίας. Προέκυψε επίσης ότι ουσίες με ιδιότητες εκκαθαριστή ελευθέρων ριζών και ισχυρή αντιοξειδωτική (αναγωγική) δράση μπορεί να αναστείλουν πλήρως, σε κατάλληλες συγκεντρώσεις, τη συσσώρευση των αιμοπεταλίων.





Σχήμα 24:

Προτεινόμενο σχήμα ενεργοποίησης της Λιποξυγονάσης -1 και των καταλυτικών δραστηριοτήτων της σε pH 9.0, υπό αερόβιες και αναερόβιες συνθήκες. RH=λιπαρό οξύ. (Απο de Groot J.J.M-C συν Biochim.et Biophysica Acta 377: 77.1975).







## ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Από την παρούσα μελέτη προέκυψαν τα παρακάτω συμπεράσματα:

1. Ουσίες που λειτουργούν σαν εκκαθαριστές ελευθέρων ριζών (scavengers) ή/και έχουν ισχυρή αντιοξειδωτική δράση αναστέλλουν, *in vitro*, τη συσσώρευση των αιμοπεταλίων την προκαλούμενη από την ενεργοποίηση και των τριών γνωστών οδών συγκόλλησής τους.
2. Ουσίες με ιδιότητες αναγωγικές και εκκαθαριστή ελευθέρων ριζών, εκτός από την αναστολή της συσσώρευσης, λειτουργούν και αποσυσσωρευτικά στα αιμοπετάλια, ακόμη και όταν η συσσώρευση έχει εισέλθει στη μη αναστρέψιμη φάση της.
3. Στις ουσίες αυτές περιλαμβάνονται και συνθέσεις που χρησιμοποιούνται στην κλινική πράξη, όπως η βιταμίνη C, η α-Μερκαπτοπροπιονύλ-γλυκίνη και η Τριμεταζιδίνη,, γεγονός που θα μπορούσε να οδηγήσει στην αξιοποίησή τους, για την αγωγή σε καταστάσεις όπου επιβάλλεται μείωση της συγκολλητικότητας των αιμοπεταλίων (Ισχαιμικά σύνδρομα, εμφράγματα, χρόνιες αγγειοπάθειες κ.α.). Ακόμη λόγω της αποσυσσωρευτικής τους δράσης θα μπορούσαν να δοκιμαστούν ως πιθανά θρομβολυτικά.
4. Προέκυψαν σοβαρές πειραματικές ενδείξεις ότι στους μηχανισμούς της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων οι ελεύθερες ρίζες παίζουν σημαντικό ρόλο τόσο για την πυροδότηση, όσο και τον έλεγχο των βιοχημικών αντιδράσεων, αποτελώντας πιθανώς τον κοινό μεσολαβητή των διαφορετικών οδών συσσώρευσης.
5. Από την παρούσα εργασία δημιουργήθηκαν οι προϋποθέσεις που μπορούν να κατευθύνουν την έρευνα πάνω στους μηχανισμούς της συγκόλλησης των αιμοπεταλίων σε πεδία που μέχρι σήμερα δεν έχουν διερευνηθεί επαρκώς, αλλά και να επεκτείνουν τις γνώσεις μας για το ρόλο των ελευθέρων ριζών στη φυσιολογία της αιμόστασης.



## Π Ε Ρ Ι Λ Η Ψ Η

Ο ρόλος των αιμοπεταλίων στην αιμόσταση είναι θεμελιώδους σημασίας. Τα αιμοπετάλια επιτελούν το φυσιολογικό αυτό ρόλο με τη συσσώρευσή τους όταν διεγείρονται με τους κατάλληλους ενδογενείς αγωνιστές. Πρόσφατα τα αιμοπετάλια θεωρείται ότι συμμετέχουν ενεργά και στις φλεγμονώδεις διαδικασίες και έχει αρχίσει εκτεταμένη έρευνα για τη διασαφήνιση του ρόλου των ελευθέρων ριζών που παράγονται κατά την ενεργοποίησή τους. Στα πλαίσια των παραπάνω επιχειρήθηκε στην παρούσα μελέτη η διερεύνηση της σημασίας των ελευθέρων ριζών στην αιμοπεταλιακή συσσώρευση.

Οι δοκιμασίες έγιναν σε πλυμένα αιμοπετάλια κουνελιού (in vitro) και σε πλάσμα πλούσιο σε αιμοπετάλια (PRP-ex vivo) ανθρώπου. Σαν δότες αιμοπεταλίων χρησιμοποιήθηκαν θήλας κουνέλια τύπου New-Zeland και υγιείς ενήλικες.

Για τις δοκιμασίες συσσώρευσης επιλέχθηκαν τρεις αγωνιστές, η διφωσφορική αδενοσίνη (ADP), το αραχιδονικό οξύ (AA) και ο παράγοντας ενεργοποίησης αιμοπεταλίων (PAF), σε συγκεντρώσεις που προκαλούν μέγιστη (μη αντιστρεπτή) συσσώρευση. Πριν από κάθε δοκιμασία τα αιμοπετάλια επεξεργάστηκαν με CP/CPK ή/και με ακετυλοσαλικυλικό οξύ, ούτως ώστε κάθε αγωνιστής να ενεργοποιεί τη "δική του" βιοχημική οδό συσσώρευσης.

Για τη διερεύνηση του ρόλου των ελευθέρων ριζών στη συσσώρευση χρησιμοποιήθηκαν:

1) Οι κάτωθι ουσίες με αντιοξειδωτικές και εκκαθαριστικές ιδιότητες στις ελεύθερες ρίζες:

Αναχθείσα Γλουταθειόνη (GSH), α-Μερκαπτοπροπιονύλ-γλυκίνη (2-MPG), Ν-Ακετύλ-κυστείνη (N-AC), D-Πενικιλλαμίνη (D-P), Βιταμίνη C, Βουτυλικό Υδροξυτολουένιο (BHT), Τριμεταζιδίνη (TMZ) και ο παγιδευτής Spin Φαινύλ-Βουτύλ-Νιτρόνιο (PBN).

2) Η οξειδωμένη μορφή του ασκορβικού, το δευδροασκορβικό οξύ.

3) Μελετήθηκε φασματομετρικά η οξείδωση της βιταμίνης C κατά τη συσσώρευση των αιμοπεταλίων με PAF.

4) Στα εναιωρήματα αιμοπεταλίων προστέθηκαν εξωγενώς διάφορες συγκεντρώσεις  $H_2O_2$  και δοκιμάστηκε η δισμουτάση του υπεροξειδίου (SOD) ως αναστολέας της συσσώρευσης.



5) Ελέγχθηκε η αντίδραση, *in vitro*, της λιποξυγονάσης - λινελαικού οξέος παρουσία Τριμεταζιδίνης, Βιταμίνης C, Γλουταθειόνης και PBN..

Οι αντιοξειδωτικές ουσίες και οι εκκαθαριστές ελευθέρων ριζών δοκιμάστηκαν ως αναστολείς της συσσώρευσης και ως αντισυσσωρευτικές, προστιθέμενες στα εναιωρήματα των αιμοπεταλίων, πριν και μετά τις δοκιμασίες συσσώρευσης από τους διάφορους αγωνιστές.

Τα αιμοπετάλια τέλος επωάσθησαν με τις μέγιστες χρησιμοποιηθείσες συγκεντρώσεις των ουσιών που δοκιμάστηκαν και ελέγχθηκε η λειτουργική τους ακεραιότητα με τον προσδιορισμό της γαλακτικής αφυδρογονάσης (LDH) στο εναιώρημα και η ανατομική τους με μικροσκοπικό έλεγχο, μετά από χρώση αιματοξυλίνης-ηωσίνης.

Όλες οι δοκιμασθείσες ουσίες, πλην του δευροασκορβικού οξέος, ανέστειλαν τη μέγιστη συσσώρευση των αιμοπεταλίων από ADP, AA και PAF.

Οι μέγιστες τελικές συγκεντρώσεις των ουσιών που προκάλεσαν αναστολή της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων (από 83% έως 99%) φαίνονται παρακάτω:

	AA	PAF	ADP
1. GSH	$1 \times 10^{-3}$ M	$6 \times 10^{-4}$ M	$8 \times 10^{-3}$ M
2. 2-MPG	$8 \times 10^{-4}$ M	$1 \times 10^{-3}$ M	$6 \times 10^{-3}$ M
3. N-AC	$5 \times 10^{-3}$ M	$6 \times 10^{-4}$ M	$1.5 \times 10^{-3}$ M
4. D-P	$5 \times 10^{-3}$ M	$8 \times 10^{-4}$ M	$1.5 \times 10^{-3}$ M
5. Vit C	$3 \times 10^{-3}$ M	$1.5 \times 10^{-3}$ M	$1 \times 10^{-2}$ M
6. TMZ	$2 \times 10^{-3}$ M	$1.5 \times 10^{-3}$ M	$6 \times 10^{-3}$ M
7. BHT	$8 \times 10^{-4}$ M	$6 \times 10^{-4}$ M	$6 \times 10^{-3}$ M
8. PBN	$8 \times 10^{-3}$ M	$2 \times 10^{-3}$ M	$8 \times 10^{-3}$ M

Η πρόσθεση  $H_2O_2$  μέχρι 5% δεν προκάλεσε συσσώρευση των αιμοπεταλίων, ενώ η προσθήκη SOD μέχρι 500  $\mu$ /ml δεν ανέστειλε καθόλου τη συσσώρευση από τους τρεις αγωνιστές.

Τέλος διαπιστώθηκε αναστολή της ταχύτητας της αντίδρασης λιποξυγονάσης, *in vitro*, παρουσία αντιοξειδωτικών και εκκαθαριστών ελευθέρων ριζών.

Τα πειραματικά μας αποτελέσματα συνηγορούν υπέρ του ότι η ενδοαιμοπεταλιακή παραγωγή ελευθέρων ριζών παίζει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση του βαθμού ανταπόκρισης των αιμοπεταλίων σε διεγέρτες της συσσώρευσης. Πιθανότατα οι ριζες οξυγόνου ασκούν αρνητική παλίνδρομη



ρύθμιση στα ένζυμα λιπο- και κυκλοξυγονάση της αραχιδονικής οδού ενώ οι λιποξυ-και πενταδιενυλικές ρίζες θετική. Η δέσμευση ή εξουδετέρωση όλων των ελεύθερων ριζών, κυρίως των τελευταίων, οδηγεί σε αδρανοποίηση του μεταβολισμού του αραχιδονικού με αποτέλεσμα την αδυναμία συσσώρευσης των αιμοπεταλίων.

Η πιθανότητα να ανταγωνίζονται οι ουσίες που χρησιμοποιήθηκαν τους υποδοχείς του αγωνιστή (ADP, AA, PAF) ή να τροποποιούν -SH ομάδες των θειολικών πρωτεϊνών της μεμβράνης πρέπει να αποκλεισθεί δεδομένων των παρακάτω:

- α) της διαφορετικής στερεοχημικής δομής των ουσιών που χρησιμοποιήθηκαν,
- β) της διαφορετικής φύσης των υποδοχέων των τριών αγωνιστών που χρησιμοποιήθηκαν,
- γ) της αδυναμίας πολλών από τις ουσίες να συμμετέχουν σε αντιδράσεις θειόλης-δισουλφιδίου.

Τέλος η αναγωγή του  $Fe^{3+}$  στα δραστικά κέντρα των ενζύμων (κύκλο-και λιποξυγονάση) σε  $Fe^{2+}$  από μερικές από τις ουσίες με ισχυρή αναγωγική δράση, με αποτέλεσμα την αδρανοποίηση των ενζύμων, δεν μπορεί να αποκλεισθεί.

Συμπερασματικά φαίνεται ότι οι ελεύθερες ρίζες, πιθανόν αποτελούν κοινό διαβιβαστή των τριών διαφορετικών βιοχημικών οδών που προκαλούν ενεργοποίηση και συσσώρευση αιμοπεταλίων.



## A B S T R A C T

## Investigation on Free Radicals Involvement to Platelet Aggregation

George Sofis

Lab. of Exp. Psysiology, Faculty of Medicine, University of Ioannina, 451 10 IOA, Greece.

Introduction

Platelets play a fundamental role in hemostasis and aggregation is the major step of their contribution to the process. Platelets are also considered now inflammatory cells as well free radicals producers, when activated by various stimulators

However since the role of free radicals produced by platelets in relation to their physiology and physiopathology is speculated as a very important, the present study is encountered with the involvement of free radicals into platelet aggregation.

Materials and Methods

Female New Zeland white rabbits and healthy male human volunteers aging 30-40 years old, were used as platelet sources.

Substances tested: Reduced Glutathione (GSH),  $\alpha$ -Mercaptopropionyl-glycine (2-MPG), N-Acetyl-custeine (NAC), D-Penicillamine (D-P), Ascorbic Acid and dehydroascorbic Acid, Butyl-Hydroxy-Toluene (BHT), Trimetazidine (TMZ) and Phenyl-Butyl-Nitrone (PBN).

Buffers and reagents: The following buffers and reagents were used:

- Tyrode's - gelatin - EGTA buffer solution (TG-EGTA): KCl 2.6 nM,  $MgCl_2$  1 nM, NaCl 137 nM,  $NaHCO_3$  12 mM, glucose 1g/L, gelatin (Merck) 0.25% and ethyleneglycol-tetraacetic acid 0.2 nM, pH 6.5.
- Tyrode's -gelatin -  $Ca^{2+}$  buffer solution (TG- $Ca^{2+}$ ) pH 7.4.
- TG-EGTA buffer without  $NaHCO_3$ , and
- EGTA with  $CaCl_2$  12 nM, and Tris hydroxymethyl-aminomethane (Fluka) 33 10 nM.



-Creatine phosphate (CP), creatine phosphokinase (CPK), adenosine diphosphate (ADP), arachidonic acid (AA) diluted in saline, purchased from Sigma and acetylsalicylic acid (ASA) as a lysine soluble salt (Egicalm) from Galenica.

-EDTA (Merck) 0.2 M solution in saline, pH 7.2 and ACD solution (citric acid, trisodium citrate, D-glucose 0.1 M each one) were used as anticoagulants. Synthetic PAF (Bachem) diluted in BSA saline (2.5 mg/ml).

### Platelet preparations

#### **a. Washed rabbit platelets**

Whole blood collected from rabbits into polyethylene tubes with EDTA (1:10v/v) was centrifuged at 375 g for 20 min at room temperature, to obtain PRP (Platelet Rich Plasma). Then PRP is centrifuged at 1400 g for 15 min at room temperature for PPP (Platelet Poor Plasma) collection. The remaining is restored to 40 ml volume with TG-EGTA buffer solution and by successive centrifugations and dilutions, according to the method of Ardlie et al., modified by Benveniste et al., washed rabbit platelets were obtained. Platelet counts were determined in a Coulter Counter (Coulter Electronics, Ltd) and the washed platelets were suspended in the appropriate volume of TG-EGTA to yield a concentration of  $2.5 \times 10^9$  cells/ml.

#### **b. Human platelet Rich Plasma (hPRP)**

Human whole blood was collected into polyethylene tubes ACD (1:9v/v) and centrifuged at 164 g for 10 min at room temperature to obtain hPRP. The 2/3 of the upper phase platelet rich plasma were removed and the remaining was centrifuged at 3000 g for 30 min at room temperature to obtain hPPP (platelet poor plasma). Platelet count of hPRP was estimated and the latest was adjusted with homologous PPP to yield a concentration of  $2.9 \times 10^9$  cells/ml.

### Platelet Aggregometry

Platelet aggregation was monitored by a Chronolog single channel aggregometer (model 330), under constant stirring of 1200 rpm, at 37<sup>0</sup> C. PRP was treated with ASA, 1 nM (cyclooxygenase blocker) and a combination of CP 5 mM, CPK 40 u/ml (ADP scavenger), 15 min and 1 min correspondingly before aggregation test with synthetic PAF.

For studies with AA, PRP was treated only with CP/CPK. Final concentrations of ADP were 0.2  $\mu$ M to 2  $\mu$ M of PAF were 50  $\mu$ M to 100  $\mu$ M and AA 65  $\mu$ M.



Aggregation of washed rabbit platelets was performed as follows: 100  $\mu$ l of platelet suspensions were transferred into the aggregometer cuvettes and diluted 1:5 with TG-Ca<sup>2+</sup> buffer solution. In this buffer, CP 0.7 nM and CPK 13.9 u/ml were added for PAF and AA aggregometry.

Human platelet aggregation was measured in aliquots 0.5 ml of PRP. For the determination of PAF induced aggregation, PRP was previously treated with ASA and CP/CPK as described above, while for AA measurements only with CP/CPK. All substances, except PAF, and AA, were added as TG-Ca<sup>2+</sup> solutions at pH 7.4 to final volumes of 500  $\mu$ l.

**Disaggregation test** of platelet aggregated by ADP, PAF and AA, was performed, by addition of the tested substances into the cuvettes of the aggregometer, 3 to 4 minutes after initiation of aggregation.

**Lactic dehydrogenase determination** of platelet suspension and platelet microscopy after incubation for 1 h with the maximum concentrations of the tested substances was, as well, performed.

**Oxidation of Vitamin C** during platelet activation by PAF, was being monitored by spectrophotometric method, as previously described.

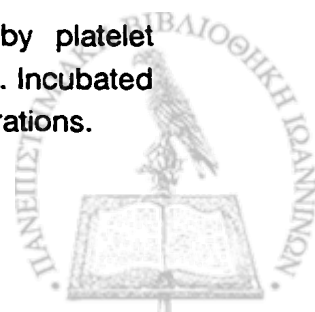
**Platelet suspensions** in TG-Ca<sup>2+</sup> were tested for aggregation, by addition to the cuvettes of the aggregometer of various concentrations of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 30%.

**Superoxide dismutase (SOD)** in various concentrations was also added into platelet suspensions and tests for possible inhibition of aggregation induced by ADP, AA and PAF, were performed.

**Lipoxygenase-linoleic acid** reaction was performed spectrophotometrically and inhibition of its activity was tested in presence of various concentrations of GSH, TMZ, Vit. C and PBN.

## Results

Lactic dehydrogenase (LDH) levels were not influenced by platelet incubation with the maximum concentrations of the tested substances. Incubated platelets examined microscopically manifested no morphological alterations.





All substances tested, except dehydroascorbic, inhibited platelet aggregation induced by ADP, AA and PAF. GSH, 2-MPG, BHT, Vitamin C and TMZ disaggregated platelets when added 3 to 4 minutes after initiation of aggregation by each agonist.

Final concentrations exerting maximal inhibition (from 83% to 99%) of aggregation induced by ADP, AA and PAF, for each substance were as following:

	AA	PAF	ADP
1. GSH	$1 \times 10^{-3}$ M	$6 \times 10^{-4}$ M	$8 \times 10^{-3}$ M
2. 2-MPG	$8 \times 10^{-4}$ M	$1 \times 10^{-3}$ M	$6 \times 10^{-3}$ M
3. N-AC	$5 \times 10^{-3}$ M	$6 \times 10^{-4}$ M	$1.5 \times 10^{-3}$ M
4. D-P	$5 \times 10^{-3}$ M	$8 \times 10^{-4}$ M	$1.5 \times 10^{-3}$ M
5. Vit C	$3 \times 10^{-3}$ M	$1.5 \times 10^{-3}$ M	$1 \times 10^{-2}$ M
6. TMZ	$2 \times 10^{-3}$ M	$1.5 \times 10^{-3}$ M	$6 \times 10^{-3}$ M
7. BHT	$8 \times 10^{-4}$ M	$6 \times 10^{-4}$ M	$6 \times 10^{-3}$ M
8. PBN	$8 \times 10^{-3}$ M	$2 \times 10^{-3}$ M	$8 \times 10^{-3}$ M

Desaggregation of platelets by the above mentioned compounds was succeeded at final concentrations of: GSH: $10^{-3}$  M, Vit C: $10^{-2}$  M, BHT: $4 \times 10^{-3}$  M, TMZ: $6 \times 10^{-3}$  M, for all the agonists.

Addition of  $H_2O_2$  to platelet suspensions did not provoke any aggregation at concentrations up to 5%.

SOD did not inhibit platelet aggregation induced by any of the agonists at concentrations up to 500 units/ml.

Oxidation of Vitamin C was registered when platelets were activated by PAF.

Lipoxygenase-linoleic acid reaction was inhibited by GSH, TMZ, Vit. C and PBN at final concentrations of  $10^{-5}$  M.

### Discussion

Platelets were not affected by the tested substances, since no alteration in LDH levels was observed, after incubation for 1 h at  $37^{\circ}$  C, with maximum concentrations of the substances. Microscopic examination was also normal.

All substances tested except dehydroascorbic acid, inhibited significantly



platelet aggregation induced by ADP, AA and PAF, when these agonists acted through their own biochemical pathway.

Reduced glutathione,  $\alpha$ -Mercaptopropionyl-glycine, Butyl-hydroxy-toluene, Vitamin C and Trimetazidine provoked platelet disaggregation when added to the cuvettes 3 to 4 minutes after initiation of aggregation induced by each agonist.

Results are not favoring either interaction of substances with -SH groups of platelet surface proteins or receptor antagonism since most of them caused platelet disaggregation, independently to applied agonist and their stereochemical structure reveals no many features in common to prevent aggregation.

Inability of dehydroascorbic acid (oxidized ascorbic) and oxidation of vitamin C during inhibition of PAF-induced aggregation, as well as, the common property of all substances tested to scavenge free radicals, are indicative of such an inhibitory action on platelet aggregation.

According to bibliographic data and our results, the following explanation is proposed as a tentative mechanism of platelet aggregation inhibitory effect by free radical scavengers.

Oxygen species of free radicals produced by activation of lipo- and cyclooxygenase, during arachidonate metabolism, control the activity of the enzymes by a negative feed back. These enzymes are, activated (positive feed back) by radical species classified as  $LO\cdot$ ,  $LOO\cdot$  and pentadienyl radicals coming from arachidonic acid lipoperoxidation. Oxygen radicals may activate, as well, phospholipase  $A_2$ .

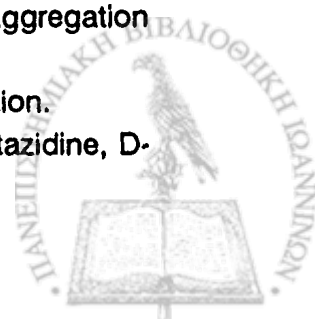
Low concentrations of free radical scavengers inactivate, mainly oxygen species and may stimulate arachidonate metabolism, while at high concentrations scavenging of lipoperoxide species may inhibit the enzymes responsible for  $PGG_2$ ,  $PGH_2$ ,  $TxA_2$  and leucotrienes formation that provoke platelet aggregation.

Reduction of  $Fe^{3+}$  at the active sites of the enzymes by some of the substances (GSH, Vit C, BHT) and inhibition of their activity can not, as well, be excluded.

## Conclusions

Our investigation indicates that:

- Free radical scavengers and antioxidants can inhibit, in vitro, platelet aggregation induced by ADP, AA and PAF.
- Some of those compounds can as well provoke platelet disaggregation.
- Substances such as vitamin C,  $\alpha$ - mercaptopropionyl-glycine, Trimetazidine, D-



Penicillamine, which are in clinical use, could be tested as antiplatelet drugs in various diseases, where thrombosis is a serious pathologic parameter.

- Free radicals probably control platelet aggregation by activating or inhibiting cyclo-oxygenase and lipoxygenase and probably are the common messengers of the different biochemical pathways leading to platelet aggregation.

- Finally, our findings are leading to investigations that may enrich our knowledge on the role of free radicals in physiology and pathophysiology of hemostasis.

**Key words:** Platelet Aggregation, ADP, Arachidonate, PAF, Reduced Glutathione, Trimetazidine, 2-MPG, PBN, Vit. C, Antioxidants, Free Radicals Scavengers, Spin Trappers, Lipoxygenase.



## ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Bastida E, Nacamura K, Hullin F, Admirall L, Buchaman MR: *Biochem Biophys Acta* 961 (2) 153-159, 1988.
2. Becker AJ, MacCultogh EA and Till JE: *Nature* 197-452, 1963.
3. Bell RL and Majerus PM: Throbin - induced hydrolysis of phosphatidyl inositol in human platelets. *J Biol Chem* 255:1790-1795, 1980.
4. Buckmaster GA: *Sci Progress* 1:73-76, 1906.
5. Ham AW: "Piastrine e Meccanismo emostatico" Capitolo 14, pp 296-305, *Istologia* (ed) USES, 1972.
6. Σταυριδης Ι: Αιματολογία. Θεσσαλονικη, 1980.
7. White JG and Gerard JM: Platelet Morfology and the mechanisms involved in Platelet activation in *Platelets: A multidiscriplinary Approach* (G de Gaetano and Garattinis eds). Raven Press New York, 1978.
8. Gordon JL and Milner AJ: Gordon (ed): *Platelets in biology and pathology*, Elsevier, North Holland, Biomedical Press, 1976.
9. Goldberg ND, Haddox MK, Dunham E, Lopetz C and Haddox JW: In the cold spring harbor symposium on the regulation of proliferation of animals cells. pp 609-675. Ed. Clarkson B and Baserja R, Cold Spring Harbor Lalovatomy, N.Y., 1974..
10. Gerrard JM, Peterson DA and White JG: in "Platelets in Biology and Pathology", vol.2 (Gordon JL ed) p. 407, Elsevier, North Holland, Amsterdam, 1981.
11. Brass LF: The effect of  $\text{Na}^+$  on  $\text{Ca}^{2+}$  homeostasis in unstimulated platelets. *J Biol Chem* 259:12571, 1984.
12. Moake JL, Ahmed K, Bachus HR and Gerfreund DE: *Biochem Biophys Acta* 211:3, 1970.
13. Clemetson KJ and MacGregor JL: McIntyre and Gordon (eds) in "Platelets in Biology and Pathology III", Elsevier Science Publishers BV (Biomedical Division), N.Y., 1987.
14. Kinlough-Rathbone RL and Mustard JF: in "Platelets in Biology and Pathology III" pp 239-266, Elsevier Science Publishers BV (Biomedical Division), 1987.
15. Vermynlen J: Physiology of Hemostasis In: *Platelets: A Multidisciplinary Approach*. Ed. by G. Gaestano and S. Garatinni. Raven Press, New York, pp 3-15, 1978.
16. Zahavi J, Jones NAG, Leyton J, Dubiel M and Kakkar VV: Enhanced in vivo platelet "release reaction" in old healthy individuals. *Throbosis Res* 17:329-



- 236, 1980.
17. Gaarder A, Jonsen J, Lalands. Hellen AJ, Owren PA: Adenosine diphosphate in red cells as a factor in the adhesiveness of human blood platelets. *Nature*: 192:531-532, 1961.
  18. Joseph R, Nelch KAM, Andrea GD, Riddle JN: Platelet-activating-factor and red blood cells. *Thromb Res* 53:629-633, 1989.
  19. Born GVR, Berguist Dand, Azfors KE: Evidence for inhibition of platelet activation in blood by a drug effect on erythrocyte. *Nature* 259:233-235, 1976.
  20. Born GVR, Gross MJ: Effects of adenosine diphosphate on the concentration of platelets in circulating blood. *Nature* 19:974-976, 1963.
  21. Honor AJ, Mitchell JRA: Platelet clumping in vivo. *Nature* 197:1019-1020, 1967.
  22. Kaplan KL and Owen J: Plasma levels of a  $\beta$ -thromboglobulin and platelet factor 4 as indices of platelet activation in vivo. *Blood* 199-202, 1981.
  23. Blair R, Barrow SE, Waddell K, Alewis PJ and Dollerty CT: Prostacyclin is not a circulating hormone in man. *Prostaglandins* 23:579-589, 1982.
  24. Siegel Mil, McConnel RT, Abrahams SL, Porter NA and Quatrecasas P. Regulation of Arachidonate Metabolism via lipoxygenase and cyclooxygenase by 12-HPETE, the product of human platelet lipoxygenase. *Bioch and Biophys Res Commun* 89:1273-1280, 1979.
  25. Fox JEB: The platelet cytoskeleton. In: "Thrombosis and Haemostasis 1987" ed. by Verstraete M, Vermynen J, Lijen R, Arnout J, Leuven Univ. Press, pp 175-275, 1987.
  26. Vargaftig BB, Chignard M, Benveniste J: Present concepts on the mechanism for platelet aggregation. *Bioch Pharmacology* 30:263-371, 1981.
  27. Mustard JF, Perry BW, Kinglough Rathboue RL and Packman MA: Factors responsible for ADP induced and release reaction of human platelets. *Am J Physiol* 228:1757-1763, 1975.
  28. Lauri D, Cerletti C, De Gaetano G: Amplification of primary response of human platelet to paf. Aspirin sensitive and aspirin insensitive pathways. *J Lab Clin Med* 105:653-658, 198.
  29. Garevane JP, Benveniste J, Mustard JF: Aggregation of rabbit platelets by PAF is independed of the release reaction and the arachidonate pathway and inhibited by membraneactive drugs. *J Lab Invest* 41:275-285, 1979.
  30. Chignard M, Goeffier E and Benveviste J: Role of Paf-acether and related Ether. Lipid Metabolism in Platelets. In: "Mechanisms of stimulus Response Coupting in Platelets". Ed. by Westwick J, Scully MF, MacIntyre DE and Kakkar VV, Plenum Publishing Co, pp 309-323, 1985.



31. Μακρής ΠΕ: "PAF" Τρίτος δρόμος Ενεργοποίησης των Αιμοπεταλίων: Σχέσεις με το Δρόμο της Λιποξυγονάσης. 1η Πανελλήνια Ημερίδα για τον PAF. 28/11/87. Ιωάννινα, Πρακτικά σελ. 72-81, 1987.
32. Benveniste J and Pertolani M: Paf-acether (platelet - Activating Factor). Its Role in Inflammation. In: *Advances in Inflammation Research*. Ed. by Russo-Mane et al. Raven Press, New York, Vol 10, pp 7-19, 1985.
33. Haslam RJ and Cusack NJ: In *Purinergic Receptors (Receptors and Recognition) Ser. B Vol 12* Burnstock G (ed) p 223, Chapman and Hall-London, 1983.
34. Haslam RJ and Taylor A: In: *Platelet Aggregation* Caen J (ed) p 81, Masson, Paris, 1971.
35. Chan LY and Tai HH: *Biol Biochem Biophys Acta* 713:344, 1982.
36. Manco G, Chap H and Dousty-Blazy L: Characterizations and properties of A phosphatidyl inositol phosphodiesterase (phospholipase C) from platelet cytosol. *FEBS Lett* 100:367, 1979.
37. Manco G, Chap H and Dousty-Blazy L: Platelet activating factor (PAF- acether) promotes an early degradation of phosphatidyl inositol-4,5-biphosphate in rabbit platelets. *FEBS Lett* 153:361, 1979.
38. Peerschke GL, Zucker MB, Grant RA, Egan JJ and Johnson MM: *Blood* 55: 841, 1980.
39. Born GVR: Aggregation of blood platelets by ADP and its reversal. *Nature* 194:27-31, 1962.
40. Granstrom E: Biosynthesis of prostaglandins. In: "Prostaglandins and Thromboxanes". Ed by Beri F, Samuelson B, Velo GP, Plenum Press, New York, pp 65-74, 1977.
41. Serham CN, Hamberg M and Samuelson B: Novel mechanisms in the arachidonic acid cascade, relating to inflammation III. *Int Congr Inflamm*, Paris, 1984.
42. Reilly IAG and FitzGerald GA: Eicosenoid Biosynthesis and Platelet Functions with Advancing Age. *Thromb Res* 41:545-554, 1986.
43. Nachman RL and Ferris B: Binding of ADP by isolated membranes from human platelets. *J Biol Chem* 249:704-708, 1974.
44. Halsam RJ and Rosson GM: Effect of ADP on levels of C-AMP in human blood platelets in relation to adenosine incorporation and platelet aggregation. *Molec Pharm* 11:528-533, 1975.
45. Holmsen H, Day HJ and Storm E: Adenine nucleotide metabolism of blood platelets via Subcellular localization of nucleotide pools with different functions in the platelet release reaction. *Bioch Bioph Acta* 186:254-259,



1969.

46. Cooper DMF and Rodbell M: ADP is a potent inhibitor of human platelet plasma membrane adenylyl-cyclase. *Nature* 282:517-521, 1979.
47. Holmsen H: Secretable storage pools in platelets. *Ann Rev Med* 30:119-134, 1979.
48. Vargatig BB, Chignard M, Le Couedic JP and Benveniste J: One, two, three or more pathways for platelet aggregation. *Acta Med Scand* 642:23-29, 1980.
49. Hamberg M, Sevansson J, Wakabayashi Tand, Samuelson B: Isolation and structure of two prostaglandin peroxides that cause platelet aggregation. *Proc Natl Acad Sci USA* 71:345-349, 1974.
50. Vermylen J: Physiology of haemostasis In: "Platelets. A Multidisciplinary Approach". Ed by de Daetano G and Garattini S, Raven Press, New York, pp 3-16, 1977.
51. Marcus AJ, Safier LB, Ullman HC, Wong KTH, Broekman MJ, Weiksier BB and Kaplan KL: Effects of acety glyceryl ether phosphorylcholine on human platelet function in vitro. *Blood* 58:1027-1029, 1981
52. Cargill DI, Cohen DS, Van Allen RG, Klimec JJ and Levin RP: Aggregation, release and desensitization induced in platelets from five species, by platelet activating factor (PAF). *Thromb Haemost* 49:204-210, 1983.
53. Shaw JD, Prinz MP, Hirabayshi K and Henson PM: Role of prostaglandin synthesis in rabbit platelet activation induced by basophil-derived platelet activating factor. *J Immunol* 121:1939-1942, 1978.
54. Shaw JD, Klusick SJ and Hanahan DJ: Activation of rabbit platelet phospholipase and thromboxane synthesis by Platelet Activating Factor. *Bioch Bioph Acta* 51: 313-317, 1981.
55. Chignard M, Le Conedic JP, Tence M, Vargatig BB, Benveniste G: The role of platelet activating factor in platelet aggregation. *Nature (Lond)* 179:799-800, 1979.
56. Klopogge E, DeHall GH, Gorter C, Akkerman JNN: Stimulus response loading in human platelets. Evidence against a role of paf-acether in the "third pathway". *Thromb Res* 30:107-112, 1983.
57. Sturk A, Schaap MCL, Ten Gate JW, Heymans HSA, Schutgens RBH, Borst B: Platelet activating factor: Mediator of the third pathway of platelet aggregation. *J Clin Inv* 79:344-350, 1987.
58. Makris PE, Papadopoulos A, Tsakiris DA: Lipoxygenase products changes "in vitro" and "in vivo" aspirinated platelets under the influence of paf and epinephrine. *Thromb Haemost* 58(1), 548, 1987 (Abstr).



59. Snyder F: Chemical and Biochemical Aspects of Platelet Activating Factor: A novel Class of Acetylated Ether-Linked Choline Phospholipids. *Medical Research Reviews* vol 5(1) pp 107-140, 1985.
60. Τσελέπης ΑΔ: Μελέτη της επίδρασης του παf στο κυκλοφορικό σύστημα των επίμυων και στη ρύθμιση της μεταφοράς ιόντων στο πρωτόζωο. *Tetrahymena Pyriformis*. Διδακτορική Διατριβή. Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων, 1985.
61. Siegel MI, McConnell I, Abrahams SL, Porter NA and Quatrecasas: Regulation of Arachidonate Metabolism via lipoxygenase and cyclo-oxygenase by 12-HPETE, the product of human platelet lipoxygenase. *Bioch Bioph Res Commun* 89:1273-1280, 1979.
62. De Clerck F, David JL and Janssen PA: In *S-Hydroxytryptamine Peripheral Reactions*. De Clerck F and Vayhoutte MP (eds) p 83, Raven Press, New York, 1982.
63. Siess W: Molecular Mechanisms of platelet Activation. *Physiological Reviews* 69:58-178, 1989.
64. Macfarlane, DE and Mills DCB: The effect of ATP on platelets evidence against the central role of released ADP in primary aggregation. *Blood* 46:309-320, 1975.
65. Deby C: Βιοχημεία του Οξυγόνου. Περισκόπιο της Επιστήμης. 138:49-57, 1991.
66. Halliwell B and Gutteridge JMC: *Free radicals in biology and medicine*. Clarendon Press, Oxford, 1985.
67. Bindoli A and Cavallini L: *I Radicali Liberi*. Aspetti Biochimici e Medici Piccin Editore, Padova, 1980.
68. Morrison and Boyd: *Οργανική Χημεία (Μετάφραση Σακαρέλλος Κ, Πηλίδης Γ, Γεροθανάσης Ι)* Έκδοση Γραφείο εκτυπώσεων Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, σελ. 50, 1991.
69. Miquel J, Quintanilha A, Weber H: Aging and Increased Oxidation of the Sulfur Pool. In: *Glutathione Metabolism and Biological Functions*. Vina J (ed) CRC Press, pp 187-206, 1990.
70. Vigo - Pelfrey C: *Membrane Lipid Oxidation Vol I*. CRC Press Florida, 1990.
71. Greenwald RA: *CRC Handbook of Methods for Oxygen Radical Research*. CRS Press, Florida, 1985.
72. Borek C: In vitro cells cultures as tools in the study of free radicals and free radicals modifiers in carcinogenesis. In: *Methods in Enzymology, Volume on Oxygen Radicals in Biological Systems*. Colowick CP, et al (eds) p 465, Academic Press, New York 1984.

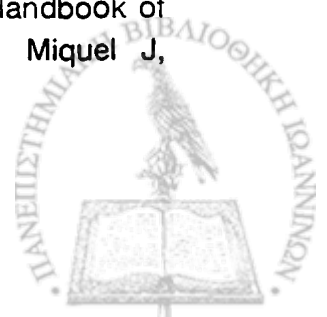




73. Borek C and Troll W: Modifiers of free radicals inhibit in vitro, the oncogenic actions of x-rays, bleomycin, and the tumor promoter, 12-o-tetradecanoyl acetylphorbol 13-acetate. *Proc Natl Acad Sci USA*, 80, 5749.
74. Oberly L: Free Radical Biology: A Paradox in cancer research. *Journal of the NCI*, vol 82, No 11, June 6, 1990.
75. Hess ML, Manson NH, Okabe E: Involvement of free radicals in the pathophysiology of ischemic heart disease. *Can J Physiol Pharmacol* 60:1382-1389, 1982.
76. Parks D, Bulkley G, Granger D, Hamilton S, MacCord J: Ischemic injury in the cat small intestine: Role of superoxide radicals. *Gastroenterology* 82:9-15, 1982.
77. Parks D, Granger D, Townsley M, Taylor A: The role of oxygen derived free radicals in Ischemia-induced increases in canine skeletal muscle vascular permeability. *Circ Res* 57:599-609, 1985.
78. Nauta R, Tsimoyiannis E, Uribe M, Walsh D, Miller D, Butterfield A: Role of the oxygen - derived free radicals in hepatic ischemia/reperfusion injury in the rat. *Surg Gynecol Obstet* 171:120-125, 1990.
79. Del Maestro R: An approach to free radicals in medicine and biology. *Acta Physiol Scand* 492 (supp):153-168, 1980.
80. Bulkley GB: The role of oxygen free radicals in human disease processes. *Surgery* 94:407-411, 1983.
81. Slater TF: Free radical mechanisms in tissue injury. *Biochem J* 222:1-15, 1984.
82. Τσιμογιάννης Ε, Τσιμογιάννης Ι: Η παθογένεια της ισχαιμίας των ιστών. *Ιατρική* 55:566-574, 1989.
83. Fracica JP, Piantadosi AC, Crapo DJ: Oxygen Toxicity. In: *The Lung*. Crystal GR, West BJ (eds), vol II, p 2155-2161, Raven Press, 1991.
84. Fisher BA: Pulmonary Oxygen Toxicity In: *Pulmonary Diseases and Disorders*, Fishman PA (ed), Vol III, pp 2331-2338, McGraw Hill, 1988.
85. Slater TF, Riley PH: Free radical damage in retrolental fibroplasia. *Lancet* 2:467, 1970.
86. Slater TK: Free radical mechanism in tissue injury. *Biochem J* 222:1-15, 1984.
87. Goodman J et al: Generation of free radicals and lipid peroxidation by redox cycling to Adriamycin and Daunomycin. *Biochem. Biophys Res Commun* 77(2):797-803, 1977.
88. Henderson CA: Adriamycin and daunomycin generate reactive oxygen compounds in erythrocytes. *Blood* 52:878-885, 1978.
89. Myers GE: Adriamycin: the role of lipid peroxidation in cardiac toxicity and tumor response. *Science*, 197:165-169, 1979.



90. Cohen G: The Fenton Reaction. In: "CRC Handbook of Methods for Oxygen Radical Research". Ed by Greenwald RA, CRC Press, Florida, pp 55-64, 1985.
91. Cederbaum AI and Cohen G: Microsomal Oxidation of Hydroxyl Radicals Scavenging Agents. In: "CRC Handbook of Methods for Oxygen Radical Research". Ed by Greenwald RA. CRC Press, Florida, pp 81-87, 1985.
92. Youngman RJ and Elstner EF: Generation of active-oxygen species by simple enzymatic redox systems. In: "CRC Handbook of Methods for Oxygen Radical Research". Ed by Greenwald RA. CRC Press, Florida pp 105-110, 1985.
93. Cadenas E and Sies H: Detecting singlet oxygen by low-level chemiluminescence. In: "CRC Handbook of Methods for Oxygen Radical Research". Ed by Greenwald RA. CRC Press, Florida, pp 191-195, 1985
94. Betts WH: Detecting oxygen radicals by chemiluminescence. In: "CRC Handbook of Methods for Oxygen Radical Research". Ed by Greenwald RA. CRC Press, Florida, pp 197-201, 1985.
95. Deby C and Goutier R: New perspectives on the Biochemistry of superoxide anion and the efficiency of superoxide dismutases. *Bioch Pharmacology* 39(3): 399-405, 1990.
96. McCord JM and Fridovich I: Superoxide dismutase. An enzyme function for erythrocyte (hemocuprein). *J Biol Chem* 244:6049-6055, 1969.
97. Cohen G: Defense of Haber-Weiss In: Superoxide and Superoxide Dismutases. Michaelson MA, McCord JM and Fridovich I (eds). Academic Press, New York, pp 317-321, 1977.
98. Crapo JD and Tierny DF: Superoxide dismutase and pulmonary oxygen toxicity. *Am J Physiol* 226:1401-1402, 1974.
99. Corey EJ, Mehrotra MM and Khan AV: Water induced dismutation of superoxide anion generates singlet molecular oxygen. *Biochem Biophys Res Commun* 145:842-846, 1987.
100. Bergsland JL, Balsamo L, Lajos P and Mookerjee B: Post-anoxic hemodynamic performance. The effect of allopurinol and superoxide dismutase/catalase. *Transplant Proc* 19:4165-4166, 1987.
101. Lynch RE and Fridovich I: Effects of superoxide on the erythrocyte membrane. *J Biol Chem* 253:1838-1845, 1978.
102. Goldberg B and Stern A: Superoxide anion as a mediator of drug induced oxidative hemolysis. *J Biol Chem* 251:6468-6478, 1976.
103. Makoto Mino: Analysis of Tocopherol in Blood and Liver. In: Handbook of Free Radicals and Antioxidants in Biomedicine, Vol III. Miquel J,



- Quintanilha AI, Weber H (eds). CRC Press, Florida, pp 239-245, 1989.
104. Desai ID: Methods for the analysis of Vitamine E in animals tissues. In: Handbook of Free Radicals and Antioxidants in Biomedicine, Vol III. Miquel J, Quintanilha AI, Weber H (eds), CRC Press, Florida pp 247-252, 1989.
  105. Porter NA: Autoxidation of polyunsaturated fatty acids: Initiation, propagation, and product distribution (basic chemistry). In: Membrane lipid Oxidation, Vol I. Vigo-Pelfrey C (ed), CRC Press, Florida, pp 33-62, 1990.
  106. Forni LG: Free radical reactions involving fatty acids: The pulse radiolysis approach In: Membrane Lipid Oxidation, Vol I. Vigo-Pelfrey C (ed), CRC Press, Florida, pp 15-32, 1990.
  107. Martin RA, Richard C and Rousseau-Richard C: Oxidation of linoleic acid and related or similar compounds. In: Membrane Lipid Oxidation, Vol I. Vigo-Pelfrey C (ed), CRC Press, Florida, pp 63-69, 1990.
  108. Granstrom E: Metabolism of Prostaglandins. In: Prostaglandins and Thromboxanes. Berti F, Samuelsson B and Velo GP (eds), Plenum Press, New York, pp 75-83, 1977.
  109. Frankel EM: Lipid Oxidation. Prog Lipid Res 19:1-22, 1980.
  110. Granstrom E: Chemistry of Prostaglandins and Thromboxanes. In: Prostaglandins and Thromboxanes. Berti F, Samuelsson B and Velo GP (eds), Plenum Press, New York, pp 1-8, 1977.
  111. Walling C: Fenton's reagent revisited. ACC Chem Res 6:125-131, 1975.
  112. Braugher JM, Duncan LA and Chase RL: The involvement of iron in lipid peroxidation. J Biol Chem 261:10282-10289, 1986.
  113. Thomas CE, Morehouse LA and Aust SD: Ferritin and superoxide dependent lipid peroxidation. J Biol Chem 260:3275-3280, 1985.
  114. Valentine JS and Curtis AB: A convenient preparation of solutions of superoxide anion and the reaction of superoxide anion with a copper (II) complex. J Am Chem Soc 97:224-226, 1975.
  115. Kiyomi Kikugawa: Chromogenic determination of lipid hydroperoxides by sesamol dimer. In: Handbook of free radicals and antioxidants in biomedicine, Vol III. Miquel J, Quintanilha AT and Weber H (eds), CRC Press, Florida, pp 219-222, 1989.
  116. Pryor WA and Castle L: Chemical methods for the detection of lipid hydroperoxides, Methods Enzymol 105, 293, 1984.
  117. Ohishi N, Ohkawa H, Miike A, Tatano T and Yagi K: A new assay method for lipid peroxides using a methylene blue derivative. Biochem Int 10, 205, 1985.
  118. Ανδρισόπουλος ΓΙ: Εισαγωγή στην κβαντομηχανική. Εκδόσεις



- Πανεπιστημίου Πατρών σελ. 434-570, 1984.
119. Μαργωμένου-Λεωνιδοπούλου Γ: Ηλεκτρονικός Παραμαγνητισμός Συντονισμός και ορισμένοι εφαρμογαι αυτού. Χημ Χρονικά, 35: σελ. 76-88, 1970.
  120. Forman A and Borg DC: Electron Spin Resonance in Biology. In: Handbook of Free Radicals and Antioxidants in Biomedicine. Miquel J, Quintanilha AT, Weber H (eds), CRC Press Vol III, pp 167-186, 1989.
  121. Βαλαβανίδης Α: Βασικές Αρχές Μοριακής Φασματοσκοπίας και Εφαρμογές στην Οργανική Χημεία. Εκδ. Σύγχρονα Θέματα, σελ. 319-340, 1990.
  122. Ουνουφρίου ΠΧ: Μελέτη Παραμαγνητικών Κέντρων που δημιουργήθηκαν με ακτίνες Χ σε Μονοκρυστάλλους  $Ni, Zn(NH_4)_2(SO_4)_2 \cdot 6H_2O$ . Διδακτορική διατριβή. Ιωάννινα, 1976.
  123. McCay PB and Poyer JL: General Mechanisms of spin trapping in vitro and in vivo. In: Handbook of Free Radicals and Antioxidants in Biomedicine. Miquel J, Quintanilha AJ, Weber H (eds) CRC Press, Vol III, pp 187-191, 1989.
  124. Janrer EG, Stronks HJ, Dubose CM, Poyer JL and McCay PB: Chemistry and Biology of spin trapping radicals, associated with halocarbon metabolism in vitro and in vivo. Env Health Prospect, 64:151-159, 1985.
  125. McCay PB, Lai EK, Poyer JL, Dubose CM and Janren EG: Oxygen and carbon centered free radical formation during carbon tetrachloride metabolism. Observation of lipid radicals in vivo and in vitro. J Biol Chem 259:2135-2142, 1984.
  126. Lai EK, Crossley C, Shildar R, Mirsa HP, Janren EG and McCray PB: In: Vivo spin trapping of free radicals generating in brain, spleen and liver during, gamma radication of mice. Arch Bioch Biophys, 244:156-163, 1986.
  127. Britigan BE, Rosen GM, Chai Yand Cohen MS: Do human neutrophils make hydroxy radicals? Determination of free radicals generated by human neutrophils activated with a soluble or particulate stimuluw using electron paragnetic resonance spectrometry. J Biol Chem, 261:4426-4431, 1986.
  128. Saer GT, Banister WH and Banister JV: Free Radicals and Thiol Compounds: The Role of Glutathione Agonist Free Radical Toxicity. In: Gloutathione: Metabolism and Physiological Functions". Jose Vina (ed), CRC Press, USA, pp 237-254, 1990.
  129. Galaris D: Studies on the Mechanism of Daunorubicine - Mediated Toxicity in cultured Heart Cells, with special Reference to Free Radicals. University of Stockholm, pp 13-14 and 15-16, 1986.
  130. Wefers H and Sies H: Hepatic lowered chemiluminescence during redox



- cycling of menadione and the menadione-glutathione conjugate, relation to glutathione and NAD(P)H: quinone reductase (DT-diaphorase) activity. *Arch Biochem Biophys* 224:568-574, 1983.
131. Joselyn PC: The Biochemistry of -SH group. Academic Press, London, pp 10-12, 1972.
132. Wefers H and Sies H: Oxidation of glutathione by the superoxide radical to the disulphide and the sulfonate yielding singlet oxygen. *Eur J Biochem* 137:29-35, 1983.
133. Finley JM, Wheeler EL and Witt SC: Oxidation of glutathione by hydrogen peroxide and other oxidizing agents. *J Agric Food Chem* 29:494-500, 1981.
134. Meister A and Anderson ME: Glutathione. *Annu Rev Biochem* 52:711-722, 1983.
135. Kaplowitz N: Physiological significance of glutathione -S- transferases. *Am J Physiol G* 439-450, 1980.
136. Till U, Bosia A, Losche W, Spangenberg P and Pescarmona GP: Role of Glutathione in Platelet Function. *Folia Haematol Leipzig* 115(45):415-419, 1988.
137. Hofmann J, Hofmann B, Arese P and Till U: Eine Methode zur Bestimmung von Glutathion und Saureloshichen Supfhydrylgruppen in Blutplattchen und Plasma. *Z Med Lab Diagn* 24:108-118, 1983.
138. Matsuda S, Ikeda Y, Aok M, Toyama K, Watanabe K and Ando Y: Role of reduced glutathione in platelet function. *Thromb Haemost* 42:1324-1331, 1979.
139. Hofmann J, Bosia A, Arese P, Losche W, Percarmona GP, Tazartes O and Till U: Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency in human platelets and its effects on platelet aggregation. *Acta Biol Med Ger* 40:1707-1714, 1980.
140. Bosia A, Chigo D, Bussolino F, Treves S, Pescarmona GP, Spangenberg P and Till U: Redox metabolism regulation in normal and metabolically altered human platelets. *Adv Prostaglandin Thromboxane Leublotrene Res* 13:23-26, 1985.
141. Percarmona GP, Bosia A, Hofmann W, Losche W, Arese P and Till U: The effect of arachidonic acid on the hexosemonophosphate shunt and related conenzymes in human blood platelets. *Acta Biol Med Ger* 40:k7-k14, 1981.
142. Bosia A, Spangenberg P, Ghigo D, Heller R, Losche W, Pescarmona GP and Till U: Regulation of arachidonic acid dependent  $Ca^{2+}$  - influx in Human Platelets. *Int Congr on Leukotrienes and Prostanoids in Health and Disease*, Tel-Aviv, October 20-25, Abst, p 5, 1984.
143. Bosia A, Spangenberg P, Ghigo D, Heller R, Losche W, Pescarmona GP and



- Till U: Effect of GSH depletion by 1-chloro-2,4-dinitrobenzene on human platelet aggregation, arachidonic acid oxidative metabolism and cytoskeletal proteins. *Thromb Res* 37:423-434, 1985.
145. Kallistratos G, Timmerman A: Uber die Wirkung von Thiola. *Naturwissenschaften* 55:648- 1968.
  146. Kallistratos G, Dimopoulos C, Kalfakakou V, Evangelou A, Stockidis D, Vezyraki P, Charalambopoulos C and Mita I: Familial cystinuria in Ioannina District. Diagnosis and Treatment. *Urol Res* 11:291-296, 1983.
  147. Kallistratos G, Kalfakakou V, Evangelou A and Mita I: Sulfhydryl compounds in the treatment of cystinuria. *Wolf J Urol* 4:122-126, 1986.
  148. Arubanelli U, Ferraccioli GF, Fietta P and Spisni A: Free Radical Scavenging Action of Tiopronin In: Recent advances in 2-MPG treatment of liver disease. Mita I (ed), Santen Pharm, Osaka, pp 79-81, 1981.
  149. Loesche W, Breddin K, Pescarmona GP, Bosia A, Spangenberg P, Michel E and Till U: Inhibition of Platelet activation by 2-Mercaptopropionyl-glycine, in vitro and in vivo. *Folia Haematol, Leipzig* 115(1-2)S:185-188, 1988.
  150. Bergmann I, Siepmann I, Kleiert P, Pescarmona G and Till U: The use of N-(2-mercaptopropionyl)-glycine (MPG) for preparation and storage of platelets. *Folia Haematol, Leipzig* 115(4) S:455-459, 1988.
  151. Cuocolo R, Ortolani O and Conti A: 2-mercaptopropionyl-glycine as a free radical scavenger in anesthesia and intensive care. In: Recent advances in 2-MPG treatment of liver disease. Mita I (ed), Santen Pharm, Osaka, pp 157-163, 1981.
  152. Mitsos SS, Askew TE, Fanton JC: Protective effects of N-2-mercaptopropionyl-glycine against myocardical reperfusion injury after neutrophil depletion in the dog: Evidence for the role of intiacellular derived free radicals. *Circulation* 73:1077-1082, 1986.
  153. Beyerdof F, Zimmer G, Fuchs J, Kraft H, Veit P and Satler P: Improvement of myocardial function after global hypoxia by protection of the inner mitochondrial membrane. *Arzneim Forch* 37:142-146, 1987.
  154. Wong BK and Corcoram GB: N-acetylcysteine stereoisomers as in vivo probes of the role of glutathione in drug detoxification. In: *Glutathione: Metabolism and Physiological Functions*. Vina JMD (ed), CRC Press, Florida, pp 255-262, 1990.
  155. Sheffner AL, Medler EM, Bailey KR, Gallo DG, Mueller AJ and Sarett HP: Metabolic studies with acetylkysteine. *Biochem Pharmacol* 15:1523-1528, 1966.
  156. Wong BK, Chan HC and Corrorad GB: Selective effects of N-acetylkysteine



- stereoisomers on hepatic glutathione and plasma sulfate in mice. *Toxicol Appl Pharmacol* 86:421-430, 1986.
157. Olson RD, Boerth RD, Garber JG and Nies AS: Adriamycin cardiotoxicity. Evidence for oxidative Stress. *Life. Sci* 29:1393-1397, 1981.
  158. Goodman and Gilman's: The pharmacological basis of therapeutics. Gilman AG, Goodman LS, Rall TW and Mural F (eds), 1985.
  159. Crawhall JC, Lecavalier Rand, Ryan B: Penicillamine its metabolism and therapeutic applications: A review. *Biophar Drug Dispos* 1:73-77, 1979.
  160. Ambanelli U, Ferraccioli GF, Fietta P, Guidicelli N and Giori C: Study of the effects of free radicals produced by means of UV illumination on the viscosity of human synovial fluid. *Methodological Statements. Boll Soc Ital Biol Sper* 56:97, 1980.
  161. Younes M and Weser U: Superoxide dismutase activity of cooper-penicillamine: Possible involvement of Cu(I) stabilized sulfur radical. *Biochem Biophys Res Commun* 78:1247-1250, 1977.
  162. Seib PA and Tolber BM (eds): Ascorbic acid: Chemistry, metabolism and uses. *Advances chemistry, series 200*, American Chemical Society, Washington DC, USA, 1982.
  163. Kallistratos G, Fasske E, Donos A, Evangelou A: The paradoxical effect of vitamin C on benzo(a)pyrene induced tumors and malignancy. *Die Naturwissenschaften* 71:160, 1984.
  164. Kallistratos G, Faskke E, Donos A and Evangelou A: Elucidation of the variable effect of vitamin C on experimental malignant tumors in Wistar rats. *Chimica Chronica, New Series* 13:173-184, 1984.
  165. Karkabounas S, Sofis G, Galaris D, Liveris K, Charalambopoulos K and Evangelou A: Inhibition of platelet aggregation by glutathione, Ascorbic Acid and other Free Radical Scavengers. *Kongress fur Thrombose und Hamostase. Forschung. Heidelberg, Germany*, 1992.
  166. Niki E: Antioxidants in relation to lipid peroxidation. *Chem Phys Lipids* 44:227-232, 1987.
  167. Yamamoto Y and Niki E: Role of antioxidants in lipid peroxidation. In: *Membrane Lipid Oxidation*. Vigo-Pelfrey C (ed), CRC Press, Florida, Vol I, pp 285-301, 1990.
  168. Slater TF: Mechanism of protection against the damage produced in biological systems by oxygen derived radicals. *Ciba Found Symposium. Excerpta Medica*, pp 142-148, 1979.
  169. Onlsnam I, Taylor AR, Ings B, and Campell B: *Clinical Pharmacology and*



- Pharmacokinetics of Trimetazidine. *Gazzete Medical* 12:71-77, 1984.
170. Nagata M, Imamura I, Fugono R and Sugimoto J: The actions of trimetazidine on isolated guinea pig atria. *Jap J Pharmacol* 21:337-343, 1971.
  171. Honore E, Adamantidis MM, Challice LE and Dupuis BA: Cardioprotection by calcium antagonists, piridoxilate and trimetazidine, *IRCS Med Sci* 14:938-939, 1986.
  172. Kiyoshe T, Nakamura S and Aota M: Effects of trimetazidine on action potentials and membrane currents of guinea-pig ventricular myocytes. *J Moll Cell Cardiol* 18: 1031-1311, 1986.
  173. Bourdarias JP and Grosogeat Y: Controlled trial of the antianginal activity of trimetazidine: double-blind crossover trial versus, a reference drug (prenylamine). *Int J Clin Pract* 1:31-36, 1987.
  174. Maridonneau-Parini I, Band L, Housset B and Harpey C: Trimetazidine et radicaux libres: *Le Concours Medicale* 18:1301-1311,
  175. Guarnier C and Muscari C: Antioxy-radical properties of trimetazidine. *Res Commun Chem Pathol and Pharmacol* 64(2):1135-1145, 1989.
  176. Tsimoyannis E, Lekkas E, Paizis J, Boulis S, Page P, Kotoulas O: Prevention of peritoneal adhesions in rats with trimetazidine. *Acta Chir. Scand* 156:771-774, 1990.
  177. Maridonneau-Parini I, and Harpey C: Effect of trimetazidine on membrane damage induced by oxygen free radicals in human red cells. *Br J Clin Pharmacol* 20:148-151, 1985.
  178. Guarnieri C and Muscari C: Beneficial effects of trimetazidine on mitochondrial function and superoxide production in the cardiac muscle of monocrotaline - treated rats. *Biochem Pharmacol* 37:4685-4688, 1988.
  179. Hamer J and Macluso A: Nitrones. *Chem Rev* 64: 673-678, 1964.
  180. Finkelstein E, Rosen GM and Kauckman EJ: Spin trapping of superoxide and hydroxyl radical practical aspects. *Arch Biochem Biophys* 200:1-6, 1980.
  181. Evans CA: Spin trapping. *Aldrichim Acta* 12:23-26, 1979.
  182. Buettner GR: Spin trapping of Hydroxyl Radicals In: *Handbook of Methods for Oxygen Radical Research*. Grenwald RA (ed), CRC Press, Florida, pp 151-155, 1985.
  183. Gordon JL: Platelets in perspective In: *Platelets in Biology and Pathology*. Gordon JL (ed), Elsevier, Amsterdam, Vol 2, pp 1-17, 1981.
  184. Deuel TF, Senior KM, Chang D, Griffin QL, Heinrickson RL, Kaiser ET: Platelet factor 4 is chemotactic for neutrophils and monocytes. *Proc Natl Acad Sci, USA*, 71:1207-1210, 1974.





185. Ross R, Glomset JA, Karys B, Harpor L: A platelet depended serum factor that stimulates the life pro-ration of arterial smooth muscle cells in vitro. Proc Natl Acad Sci, USA 71: 1207-1210, 1974.
186. Benveniste J, Chignard M: A role of paf-acether in platelet depended vascular disease. Circulation 72: 713-717, 1985.
187. Hambery M, Svensson J, Sammuelson B: Thromboxanes: A new group of biologically active compounds derived from prostaglandin endoperoxides. Proc Natl Acad Sci USA 72:2994, 1975.
188. Lagarde M: Roles of cyclooxygenase and lipoxygenase metabolites in platelets. In: Platelets in Biology and Pathology. MacIntyre DE, Gordon JL (eds), Amsterdam, Elsevier, pp 269-288, 1987.
189. Mustard JF, Packham MA: Platelet phagocytosis. Ser Haematol 1:168-171, 1968.
190. Krinsky NI, Scoon KL, Hardin JC and Levine PH: Source of Hydrogen peroxide and chemiluminescence observed in Activated Human Platelets. Blood 50(4):597-602, 1977.
191. Ameisen JC, Capron A, Joseph M, Maclouf J, Vorgn H, Pancre V, Fournier E, Wallaert B, Tonnel AB: Aspirin-sensitive asthma: Abnormal platelet response to drugs inducing asthma attacks. Int Allergy Appl Immunol 78:438-448, 1985.
192. Mills EL, Gerrard JM, Millipovich D, White JD, Quie PG: The chemiluminescence response of human platelets. J Clin Invest 61:807-814, 1978.
193. Marcus JA, Silk ST, Safier LB and Ullman HL: Superoxide production and Reducing Activity in Human platelets. J Clin Invest 59:149-158, 1977.
194. Singh D, Greenwald JE, Bianchine J, Metz EN, Sagone AI Jr: Evidence for the generation of hydroxyl radical during arachidonic acid metabolism by human platelets. Am J Haematol 11(3):2303-2340, 1981.
195. Jahn Band Hanse GM: Oxygen Radical Generation in Human Platelets: Dependence on 12-Lipoxygenase activity and on the Glutathione Cycle. Int Arch Allergy Appl Immunol 93:73-79, 1990.
196. Wurner P, Patscheke H, Paschen W: Response of platelets to potassium tetraperchromate, an extracellular source of singlet oxygen, hydroxyl radicals, superoxide anions and hydrogen peroxide. Hoppe Seyler's Z Physiol Chem 360:559-570, 1979.
197. Καρκαμπούνας Σ, Ευαγγέλου Α, Τσουκάτος Δ, Σόφης Γ, Καλλίστρατος Γ: Αναστολή της Συγκόλλησης Αιμοπεταλίων in vitro, με δεσμευτές ελευθέρων ριζών. Ε Βορειοελλαδικό Ιατρικό Συνέδριο, 16-18 Μαΐου, Θεσσαλονίκη 1991.



198. McManus LM, Hanahan DJ, Demopoulos CA, Pinckard RN: Pathobiology of intravenous infusion of acetylglyceryl ether phosphorylcholine (AGEPC). A synthetic platelet activating factor (PAF), in the rabbit. *J Immun* 124:2919, 1980.
199. Pinckard RN, McManus LM, Halonen M, Hanahan DJ: Biological activities of acetyl glyceryl ether phosphorylcholine, in experimental animals and in man. In: *Role of Chemical Mediator in the Pathophysiology of Acute Illness and Injury*. Mconn R (ed), New York, Raven Press, p 81, 1982a.
200. Pinckard RN, McManus LM, Hanahan DJ: Chemistry and biology of acetyl glyceryl ether phosphorylcholine (platelet-Activating-Factor). In: *Advances in Inflammation Research, Vol 4*, Weissman G (ed), New York, Raven Press, 1982b.
201. Demopoulos GA, Pinkard RN and Hanahan DJ: Platelet Activating Factor. Evidence for 1-O-Aketyl-2-acetyl-sn-glyceryl-3-phosphocycholine as the active component (a new class lipid mediator). *J Biol Chem* 254:9355-9360, 1979.
202. Born GVR: Aggregation of blood platelets by adenosine diphosphate and its reversal. *Nature, London* 194:927-929, 1962.
203. Linder B and Goodman DS: Studies on the mechanism of the inhibition of platelet aggregation and release induced by high levels of arachidonate. *Blood* 60:436-445, 1982
204. Καρκαμπούνας ΣΧ: Ενδογενείς αναστολεις της αιμοπεταλιακής συσσώρευσης από PAF. Διδακτορική Διατριβή, σελ. 126-129, Ιωάννινα, 1990.
205. Roth GJ and Majerus PW: The mechanism of the effect of aspirin of human platelets. I. Acetylation of a particulate fraction protein. *J Clin Invest* 56:624-632, 1975.
206. Smith JB and Willis AL: Aspirin selectively inhibits prostaglandin production in human platelets. *Nat Biol* 231:235-237, 1971.
207. Huang EM and Detwiler TC: Reassessment of the evidence of the role of secreted ADP in biphasic platelet aggregation. Mechanism of inhibition by creatine phosphate plus creatine phosphokinase. *J Lab Clin Med* 95:59-68, 1980.
208. Macfarlane DE and Mills DCB: The effect of ATP on platelets: Evidence against the central role of released ADP in primary aggregation. *Blood* 46:309-320, 1975.
209. Brecher G and Gronkite EP: Morphology and enumeration of human blood platelets. *J Appl Physiol* 3:365-370, 1950.



210. Mustard JF, Perry DW, Ardlie NG and Packman NA: Preparation of suspensions of washed platelets from humans. *Br J Haematol* 22:193-204, 1972.
211. Nichols AR and Bosmann HB: Platelet aggregation: newly quantified using non-empirical parameters. *Thromb Haemostasis* 42:679-693, 1979.
212. Pasqui AL, Capecchi PL, Ceccatelli L, Mazza S, Cistri A, Laghi Pasini F and Perri TD: Nitroprusside in vitro inhibits platelet aggregation and intracellular calcium translocation. Effect of haemoglobin. *Thr Res* 61:113-122, 1991.
213. Feinman RD: The lumi-aggregometer: A new instrument for simultaneous measurement of secretion and aggregation. *J Lab Clin Med* 90, 125, 1977.
214. Russell-Smith N, Flower RJ and Cardinal DC: Measuring platelet and leucocyte aggregation/adhesion in very small volumes of whole blood. *Pharmacol Meth* 6:315-333, 1981.
215. Anon Z *Klin chem u Klin Biochem* 10,182, 1972.
216. Weisshear HD: *Med Welt* 26, 387, 1975.
217. Theorell H, Bergstrom S and Keson A: *Pharm Acta Helv* 21, 318, 1946.
218. Tappel AL, Boyer PD and Lundberg WO: *Arch Biochem Biophys* 42, 293, 1953.
219. Halman RT: *Methods of Biochemical Analysis*, Interscience, Vol II, 113, N.Y., 1958.
220. Magge J: *Method of Enzymatic Analysis*. Bergmeyer HV (ed) pp 411-414, Academic Press, N.Y., 1965.
221. Haslam RJ: Interaction of the pharmacological receptors of blood platelets with adenylate cyclase. *Ser Haematol* 6:333-350, 1973.
222. Cooper DMF and Rodbell M: ADP is a potent inhibitor of human platelet plasma membrane adenylate cyclase. *Nature*, 282:517-518, 1979.
223. Colman RW: Platelet activation: role of an ADP receptor. *Semin Haematol* 23:119-128, 1986.
224. Macfarlane DEDCB, Mills and Srivastava PC: Binding of 2-azidoadenosine [b - P] -diphosphate to the receptor on intact human blood platelets which inhibits adenylate cyclase. *Biochemistry* 21:544-549, 1982.
225. Chignard M, Le Couedic JP, Vargaffig BB and Benveniste J: Platelet-activating factor (PAF-acether) secretion from platelets: Effect of Aggregation agents. *Br J Haematol* 46, 455, 1980.
226. Fugures WR, Niewiarowski S, Morinelli T, Colman RF and Colman RW: Affinity labeling of a human platelet membrane protein with 5-P-fluorosulfonyl-Benzoyl adenosine. Concomitant inhibition of ADP induced platelet aggregation and fibrinogen receptor exposure. *J Biol Chem*



- 256:7789-7795, 1981.
227. Mills DCB, Fugures WR, Searce LM, Stewart GJ, Colman RF and Colman RW: Two mechanisms for inhibition of ADP induced platelet shape change by 5-P-fluorosulfonyl-Benzoyl-adenosine. Conversion to adenosine and covalent modification at an ADP binding site distinct from that which inhibits adenylate cyclase. *J Biol Chem* 260:8078-8083, 1985.
228. Adler JR and Handin RI: Solubilization and characterization of a platelet membrane ADP-binding protein. *J Biol Chem* 254:3866-3872, 1979.
229. Cusack NJ and Hourani SMO: Adenosine 5-diphosphate antagonists and human platelets: No evidence that aggregation and inhibition of stimulated adenylate cyclase are mediated by different receptors. *Br J Pharmacol* 76:221-227, 1982.
230. Lips JPM, Sixma JJ and Schiphorst ME: Binding of adenosine diphosphate to human blood platelets and to isolated blood platelet membranes. *Biochem Biophys Acta* 628:451-467, 1980.
231. Macfarlane DE, Scriver PC and Mills DCB: 2-Methylthiadenosine-diphosphate. An agonist and radioligand for the receptor that inhibits the accumulation of cyclic AMP in intact blood platelets. *J Clin Invest* 71:420-428, 1983.
232. Nachman RL and Ferris B: Binding of adenosine diphosphate by isolated membranes human platelets. *J Biol Chem* 249:704-710, 1974.
233. Bellomo G, Mirabelli F, Richelmi P and Orrenius S: Critical role of sulphhydryl group (S) in ATP-dependent  $Ca^{2+}$  sequestration by the plasma membrane fraction from rat livers. *FEBS letters* 163:136-139, 1983.
234. Di Monte D, Bellow G, Thor H, Nicotera P and Orrenius S: Menadione-induced cytotoxicity associated with protein thiol oxidation and alteration in intracellular  $Ca^{2+}$  homeostasis. *Arch Biochem and Biophys* 235:343-350, 1984.
235. Leone G, Boni P and Vinceti A: Platelet aggregation by thimerosal, role of ADP and -SH groups. *Thromb Haemost* 35:249-257, 1976.
236. Comporti M, Maellato E, Del Bello B and Casini AF: Glutathione depletion its effects on other antioxidant systems and hepatocellular damage. *Xenobiotica* 21:1067-1076, 1991.
237. Mustard JF, Perry BW, Kinlough, Rathbone RL and Packman MA: Factors Responsible for ADP-induced release reaction of human platelets. *Am J Physiol* 228:1757-1764, 1975.
238. Plow EF, Marguene GA: Induction of the fibrinogen receptor on human



- platelets by epinephrine and the combination of epinephrine and ADP. *J Biol Chem* 252:10971-10977, 1980.
239. Benett JS, Vilaire G: Exposure of platelet fibrinogen receptor by ADP and epinephrine. *J Clin Invest* 64:1393-13401, 1979.
240. Hamberg M, Svensson J and Samuelsson B: Thromboxanes: a new group of biologically active compounds derived from prostaglandin endoperoxides. *Proc Natl Acad Sci USA* 72:2994-2998, 1975.
241. Hamberg M, Svensson J, Wakabayashi T and Samuelsson B: Isolation and structure of two prostaglandin endoperoxides. *Proc Natl Acad Sci USA* 71:345-349, 1974.
242. Nugteren DH and Hazelhof E: Isolation and properties of intermediates in prostaglandin biosynthesis. *Biochim Biophys Acta* 326:448-461, 1973.
243. Aharony DJ, Smith B and Silver MJ: Regulation of arachidonate-induced platelet aggregation by the lipoxygenase product, 12-hydroperoxyeicosatetraenoic acid. *Biochim Biophys Acta* 718:193-200, 1982.
244. Croset M and Lagarde M: Stereospecific inhibition of PGH<sub>2</sub>-induced platelet aggregation by lipoxygenase of icosanoic acids. *Biochem Biophys Res Commun* 112:878-883, 1983.
245. Siegel MI, McConnell RT, Abrahams SL, Porter NA and Cuatrecasas P: Regulation of arachidonate metabolism via lipoxygenase and cyclooxygenase by 12-HPETE, the product of human platelet lipoxygenase. *Biochem Biophys Res Commun* 89:1273-1280, 1979.
246. Bosia A, Spangenberg P, Losche W, Arese P and Till U: The role of GSH-Disulfide status in the reversible and irreversible aggregation of human platelets. *Thromb Res* 30:137-142, 1983.
247. Hoffman J, Loesche W, Hoffman B, Arese P, Bosia A, Percarmona GP and Till U: Effect of compounds causing reversible perturbation of the cellular thiol-disulfide status on the aggregation of human platelets. *Thromb Res* 30:137-142, 1983.
248. Bosia A, Spangenberg P, Glugo D, Heller R, Loesche W, Percarmona GP and Till U: Effect of GSH depletion by 1-chloro-2,4-dinitrobenzene on human platelet aggregation, arachidonic acid oxidative metabolism and cytoskeletal proteins. *Thromb Res* 37:423-434, 1985.
249. Armstrong RA, Jones RL and Wilson NH: ligand binding to thromboxane receptors on human platelets: correlation with biological activity. *Br J Pharmacol* 79:953-964, 1983.
250. Hoffman J, Loesche W, Till U, Bosia A, Arese P, Percarmona GP and Thiel-Maunk: Effect of decreased GSH level of human platelet function.



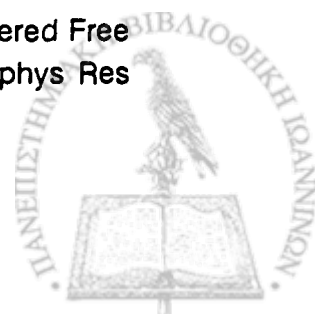
- Artery 8:431-436, 1980.
251. Dutieh GE, Haddeman E, Jouvchar GH, Ten Hoor F and Nusteren DH: Study of two pathways for arachidonate oxygenation in blood platelets. *Lipids* 14:241-246, 1979.
252. Wroblewski F and La Due JS: Lactic dehydrogenase activity in blood. *Proc Soc Exp Biol Med* 90:210-213, 1955.
253. Huang TF, Ouyang G: Action mechanism of the potent platelet aggregation inhibitor from trimeresurus gramineus snake venom. *Thromb Res* 33:125-135, 1984.
254. Karkabounas S, Sofis G, Galaris D, Liveris K, Charalambopoulos K and Evangelou A: Inhibition of platelet aggregation by glutathione ascorbic acid and other free radicals scavengers. 7th Congr. fur Thrombose und Hamostase Forshung, Heidelberg, Febr, 1992.
255. Karkabounas S, Evangelou A, Tsoukatos D, Sofis G and Kallistratos G: Biological Activity and Chemical Structures of Paf-inhibitors: In: Inhibition of Paf-induced platelet aggregation by sulfhydryl compounds, ex vivo. *Gior Ital di Patol Clin* (in Press).
256. Καρκαμπούνας Σ, Ευαγγέλου Α, Τσουκάτος Δ, Παπαιωαννίδης Δ, Λιβέρης Κ και Καλλίστρατος Γ: Πιθανή συμμετοχή των ελευθέρων ριζών στη συγκόλληση των αιμοπεταλίων από Paf. 2ο Πανελλήνιο Συμπόσιο για τον Paf, Αθήνα 1990, Πρακτικά σελ 239-248, 1990.
257. Stanley J, Medelson ME, Amarante P, Smith P, Andon N, Lvoke P and Lusalto J: N-Acetyl-cysteine potentiates platelet inhibition by Endothelium Derived Relaxing Factor. *Folia Bioch et Biol* 65:789-795, 1985.
- 258.
258. Chesney GM, Pifer DD and Hugh KM: Alpha-adrenergic Antagonists inhibit binding of Paf to human gel-filtered platelets. *J Pharm* 14:21-25, 1983.
259. Kalthoff M, Sticks W, Kapour R: Equilibrium constants of Exchange Reactions of Cystine with Glutathione and with Thioglycolic Acid, both in oxidized and reduced state. *J Am Med Soc* 77:4733-4736, 1955.
260. Andon Y and Steiner M: Distribution of free sulfhydryl and disulfide groups among platelet membrane proteins. *Bioch Biophys Acta* 419:51-62, 1976.
261. Bennett JS, Colman RF and Colman RW: Identification of adenine nucleotide binding proteins in human platelet membranes by affinity labeling with 5-P-fluorosulfonyl benzoyl adenosine. *J Biol Chem* 253:7346-7354, 1978.
262. Siek ST, Wong KTH and Marcus AJ: Arachidonic acid releasing activity in platelet membranes. Effects of sulfhydryl-modifying reagents. *Biochemistry*



- 20:391-397, 1981.
263. Braquet P, Goldfroid JJ: Conformational properties of Paf-acether receptor in platelets based on structure activity studies. In: Platelet Activating Factor. Snyder F (ed), Plenum Press, New York, pp 191-326, 1987.
264. MacFarlane DE and Mills DCB: The nature and ADP receptors on human blood platelets determined by/with a photo-affinity label. *Thromb Haemost* 38:241-245, 1977.
265. Thomas G, Skrinska VA and Lukas F: The influence of glutathione and other Thiols on human platelet aggregation. *Thromb Res* 44:854-866, 1986.
266. Bordia A, Verma SK, Mehta LK, Andreus AM: Comparative effect of vitamin C, ampla juice and ampla pulp in blood lipids, platelet aggregation and experimental atheroma in rabbit aorta. *Indian Heart J* 37:179-182, 1985.
267. Bordia A, Verma SK: Effect of vitamin C on platelet adhesiveness and platelet aggregation in coronary artery disease. *Clin Cardiol* 8:552-554, 1985.
268. Tselepis A, Tsoukatos D, Droudes C, Donos A and Evangelou A: Platelet response to the aggregatory effect of platelet activating factor (Paf), ex vivo, in patients with acute myocardial infraction. *Eur J Clin Invest* 21:490-496, 1991.
269. Feinstein BM and Walenga R: The role of calcium in platelet activation. In: *Biochemistry of Acute Allergic Reactions*. Alan Press (ed), NY, pp 272-293, 1991.
270. Patscheke H, Paschen W and Woerner P: Superoxide Independent platelet response to Xanthine Oxidase. *Hoppe-Seyler's Z Physiol Chem* 359:933-937, 1978.
271. Woerner P, Patscheke H and Paschen W: Response of platelets exposed to potassium tetraperoxochromate, an extracellular source of singlet oxygen, hydroxyl radicals, superoxide anions and hydrogen peroxide. *Hoppe-Seyler's z Physiol Chem* 360:559-570, 1979.
272. Li Xiao, Zhao Bow-lu, Hou liny-Wa and Xin wen-juan: Active oxygen radicals produced by leukocytes of malignant lymphoma. *Chinese Medical Journal* 103(11):899-905, 1990.
273. Petronk FW, English DK, Wong K and McCord JM: Free radicals and inflammation: Superoxide-dependent activation of a neutrophil chemostatic factor in plasma. *Proc Natl Acad Sci USA*, 77(2):1159-1163, 1980.
274. Eling ET, Curtis JF, Harman LS and Mason RP: Oxidation of Glutathione to its Thiyl Free Radical Metabolism by Prostaglandin H Synthase. *J Biol Chem* 261(11):5023-5028, 1986.
275. Taokel H: Experimental studies of the pathogenesis of acute acalculus



- cholecystitis with special reference to the role of microcirculatory disturbances, free radicals and membrane-bound phospholipase  $A_2$ . *Gastroenterology Jpn* 26:633-644, 1991.
276. Otamiri T, Tagesson C: Role of phospholipase  $A_2$  and oxygenated free radicals in mucosal damage after small intestine ischemia and reperfusion. *Am J Surg* 157:562-566, 1989.
277. Au AM, Chan PH, Fishman RA: Stimulation of phospholipase  $A_2$  activity by oxygen derived free radicals in isolated brain capillaries. *J Cell Biochem* 27:449-453, 1985.
278. Sawada M, Carlson JC: Rapid plasma membrane changes in superoxide mediated formation, fluidity and phospholipase  $A_2$  activity in the corpus luteus of the rat during induction of luteolysis. *Endocrinology* 128:2992-2998, 1991.
279. Sawada M, Carlson JC: Superoxide radical production in plasma membrane samples from regressing rat corpora lutea. *Can J Pharmacol* 67: 465-471, 1989.
280. Schoenberg MH, Buechler M, Scaedlich H, Younes M, Buelthmay B, Berger HG: Involvement of oxygen radicals and phospholipase- $A_2$  in acute pancreatitis of the rat. *Klin Wochenschr* 67:166-170, 1979.
281. Schwartz RP, Skolnick P, Paul SM: Regulation of gamma-aminobutyric acid barbiturate receptor-gated chloride ion flux, in brain vesicles by phospholipase  $A_2$ : Possible role of oxygen radicals. *J Neurochem* 50:565-571, 1988.
282. Serhan CN, Broekman MJ, Korchak HM, Smolen JE, Marcus AJ, Weissmann G: Changes in phosphatidylinositol and phosphatic acid in stimulated human neutrophils. Relationship to calcium mobilization, aggregation and superoxide radical generation. *Biochim Biophys Acta* 762:420-428, 1983.
283. Groot JJMC, Veldink GA, Vliegthart JFG, Boldingh J, Wever R and Gelder BF: Demonstration by EPR Spectroscopy of the Functional Role of Iron in Soybean Lipoxygenase-1. *Bioch Biophys Acta* 337:71-79, 1975.
284. Nelson JM, Batt DG, Thompson JS and Wright SW: Reduction of the Active site Iron by Potent Inhibitors. *J Biol Chem* 266(13):8225-8229, 1991.
285. Mansuy D, Cucurou C, Biatry B and Biatoni JP: Soybean lipoxygenase-catalyzed oxidations by linoleic acid hydroperoxide: Different Reducing Substrates and Dehydrogenation of Phenidone and BW 755C. *Bioch Biophys Res Commun* 151:339-346, 1988.
286. Connor DH, Feischer V and Mason RP: A search for Oxygen-Centered Free Radicals in the Lipoxygenase/Linoleic Acid System. *Bioch Biophys Res*





- Commun 141(2):614-621, 1986.
287. Kernel C, Flamberg PL, Krupinski-Olsen R and Shorter AL: Reductive Inactivation of Soybean Lipoxygenase-1 by Catechols: A Possible Mechanism for Regulation of Lipoxygenase Activity. *Biochemistry* 26:7064-7072, 1987.
288. Aishima H, Kajiwara J, Hatanaka A and Hatano H: Electron spin resonance studies on the lipoxygenase reaction by spin trapping and spin labelling methods. *J Biochem* 82:1559, 1977.
289. Clapp HC, Banerjee A and Rotenberg SA: Inhibition of Soybean Lipoxygenase-1 by N-Alkyhydroxylamines. *Biochem* 24:1826-1830, 1985.
290. Nelson JM, Seitz SP and Cowling RA: Enzyme-Bound Pentadienyl and Peroxyl Radicals in Purple Lipoxygenase. *Biochem* 29:6897-6903, 1990.
291. Borgeat P, De Lalos BF and MacLaif J: New Concepts in the Modulation of Leukotriene Synthesis. *Bioch Pharmac* 32:381-385, 1983.
292. Foeder CA, Klebanoff SJ and Sapiro BM: Hydrogen peroxide production, chemiluminescence and the respiratory burst of fertilisation. Inter-related events in early sea urchin development. *Proc Natl Acad Sci USA*, 75:3183-3186, 1978.
293. Galliard T: Lipolytic and lipoxygenase enzymes in plants and their action in wounded plant tissue. Ed by G. Kahl Walter de Gruyter and Co., Berlin, 1978.
294. Gutteridge JMC and Kerry PJ: Detection by fluorescence of peroxides and carbonyles in samples of arachidonic acid. *Br J Pharmacol* 76:459-465, 1982.
295. Shimizu T, Kondo K and Hayaishi O: Role of prostaglandin endoperoxides in the serum thiobarbituric acid reaction. *Arch. Biochem Biophys* 206:271-274, 1981.
296. Nelson MJ and Cowling RA: Observation of a Peroxyl Radical in Samples of "Purple" Lipoxygenase. *J Am Chem Soc* 112:2220-2221, 1989.
297. Schute-Herbrueggen T and Cadenas E: Formation of electronically excited states during the lipoxygenase-catalyzed oxidation of fatty acids with different degrees of unsaturation. In: *Proc 1st Int Meet. Free Radicals Liver Injuries*, Poli G (ed), IRL, Oxford, p 91, 1985.
298. Flohe L, Beckmann R, Giertz H and Loschen G: Oxygen-Centered Free Radicals as Mediators of Inflammation. In: *Oxidative Stress*. H. Sies (ed), Academic Press, London, pp 403-435, 1985.
299. Legarde M: Roles of cyclooxygenase and lipoxygenase metabolites in platelets. In: *Platelets in Biology and Pathology*. MacIntyre DE, Gordon IE



- (eds), Elsevier Publ, Amsterdam, pp 269-288, 1987.
300. Chamulitiat W and Mason RP: Lipid peroxy Radical Intermediates in the Peroxidation of Polyunsaturated fatty acids. Direct electron spin resonance investigations. *J Biol Chem* 35:20968-20973, 1989.
  301. Fong D, Etrek K, Lee PF, Lin Tym and Lam KW: Factors affecting ascorbate oxidation in aqueous humor. *Curr Eye Res* 6:357-361, 1987.
  302. Scarpa M, Stevanato R, Vigino P and Rigo A: Superoxide ion as active intermediate in the autoxidation of ascorbate by molecu.
  303. Chang WC, Nakao J, Orimo H, Murotas I: Effects of reduced glutathione on 12-lipoxygenase pathways in rat platelets. *Biochem J*, 202:771-776, 1982.
  304. Carlson L, Nystrom LE, Lindberg U, Kannan KK, Cid-Presdner H, Lovgrens and Jozvalih: *J Mod Biol* 105:103-108, 1976.
  305. Fox JEB and Phillips DR: *Semin Hematol* 20:243-247, 1983.
  306. Patscheke H and Woerner P: Sequential effects of the thiol-oxidizing agent, diamide on human platelets. *Thromb Res* 12:609-618, 1978.

