

ΣΠΥΡΟΣ Χ. ΚΑΡΚΑΜΠΟΥΝΑΣ
ΒΙΟΛΟΓΟΣ

ΕΝΔΟΓΕΝΕΙΣ ΑΝΑΣΤΟΛΕΙΣ ΤΗΣ ΑΙΜΟΠΕΤΑΛΙΑΚΗΣ
ΣΥΣΣΩΡΕΥΣΗΣ ΑΠΟ Ρ.Α.Φ.

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΙΑΤΡΙΚΟ ΤΜΗΜΑ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗΣ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑΣ
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
Δ/ντης καθ. Γ. Καλλίστρατος

Ιωάννινα 1990



ΣΤΑΘΕΡΟΤΗΤΑ ΚΑΙ ΕΝΩΣΙΣ

ΕΛΛΗΝΙΚΗ

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΤΩΝ ΕΡΓΩΝ ΤΗΣ ΕΚΔΟΣΗΣ

ΗΡΩΔΙΑΣ ΚΑΙ ΠΡΟΦΗΤΕΙΑΣ

ΕΡΓΟΝ ΤΗΣ ΕΚΔΟΣΗΣ

ΕΡΩΤΗΜΑΤΑ ΚΑΙ ΑΠΑΝΤΗΣΕΙΣ

ΕΡΩΤΗΜΑΤΑ ΚΑΙ ΑΠΑΝΤΗΣΕΙΣ

"Η έγκριση της Διδακτορικής Διατριβής από το Ιατρικό Τμήμα του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων δεν υποδηλώνει αποδοχή των γνώμων του Συγγραφέα (N. 5343/1932 Άρθρο 202 § 2).



ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

1. Η ΕΡΕΥΝΑ ΚΑΙ Η ΕΠΙΣΤΗΜΟΛΟΓΙΑ

13

2. Η ΕΡΕΥΝΑ ΚΑΙ Η ΕΠΙΣΤΗΜΟΛΟΓΙΑ ΚΑΙ ΕΝΔΕΙΚΝΥΣΗ ΤΩΝ

19

20

3. Η ΕΡΕΥΝΑ ΚΑΙ Η ΕΠΙΣΤΗΜΟΛΟΓΙΑ

23

4. Η ΕΡΕΥΝΑ ΚΑΙ Η ΕΠΙΣΤΗΜΟΛΟΓΙΑ

24

5. Η ΕΡΕΥΝΑ ΚΑΙ Η ΕΠΙΣΤΗΜΟΛΟΓΙΑ ΚΑΙ Η ΚΑΤΑΡΤΙΣΗ ΤΩΝ

27

6. Η ΕΡΕΥΝΑ ΚΑΙ Η ΕΠΙΣΤΗΜΟΛΟΓΙΑ

28

7. Η ΕΡΕΥΝΑ ΚΑΙ Η ΕΠΙΣΤΗΜΟΛΟΓΙΑ ΚΑΙ Η ΚΑΤΑΡΤΙΣΗ ΤΩΝ

Αφιερώνεται

8. Η ΕΡΕΥΝΑ ΚΑΙ Η ΕΠΙΣΤΗΜΟΛΟΓΙΑ

στην Αναστασία Μπέκα

9. Η ΕΡΕΥΝΑ ΚΑΙ Η ΕΠΙΣΤΗΜΟΛΟΓΙΑ

και στην Σοφία Καρκαμπούνα

10. Η ΕΡΕΥΝΑ ΚΑΙ Η ΕΠΙΣΤΗΜΟΛΟΓΙΑ

11. Η ΕΡΕΥΝΑ ΚΑΙ Η ΕΠΙΣΤΗΜΟΛΟΓΙΑ

12. Η ΕΡΕΥΝΑ ΚΑΙ Η ΕΠΙΣΤΗΜΟΛΟΓΙΑ

31

13. Η ΕΡΕΥΝΑ ΚΑΙ Η ΕΠΙΣΤΗΜΟΛΟΓΙΑ

34

14. Η ΕΡΕΥΝΑ ΚΑΙ Η ΕΠΙΣΤΗΜΟΛΟΓΙΑ ΚΑΙ Η ΚΑΤΑΡΤΙΣΗ ΤΩΝ

40

15. Η ΕΡΕΥΝΑ ΚΑΙ Η ΕΠΙΣΤΗΜΟΛΟΓΙΑ

43



ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

	Σελ.
ΠΡΟΛΟΓΟΣ	11
ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ	15
ΚΕΦΑΛΑΙΟ I	
ΑΙΜΟΠΕΤΑΛΙΑ Η ΘΡΟΜΒΟΚΥΤΤΑΡΑ	19
1. Γενικά	19
2. Σχηματισμός των αιμοπεταλίων και εναλλαγή τους	20
3. Δομή των αιμοπεταλίων	23
3.1. Περιφερική ζώνη	24
3.2. Η ζώνη Sol-Gel (λεπτόρευστου-πυκνόρευστου κυτταροπλάσματος	25
3.3. Ζώνη οργανυλλίων	26
3.4. Η κυτταρική μεμβράνη των αιμοπεταλίων	29
α. Λιπίδια	31
β. Γλυκοπρωτεΐνες	31
4. Λειτουργίες και αντιδράσεις των αιμοπεταλίων	34
4.1. Γενικά	34
4.2. Οι αντιδράσεις των αιμοπεταλίων	35
α. Μεταβολική ενέργεια	39
β. Η οδός του Αραχιδονικού οξέος	40
γ. Η οδός του ADP	43



δ. Η οδός του παράγονται ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων (P.A.F.)	45
ε. Σεροτονίνη	46
στ. Μεταβολισμός των φωσφοϊνοσιπιδίων-φωσφορυλίωση πρωτεϊνών	48
ζ. Ασβέστιο, Νάτριο, ενδοκυττάριο ΡΗ	52
η. Δομικές και συσταλτές πρωτεΐνες	56
θ. Πρωτεΐνες που αποδεσμεύονται από τα αιμοπετάλια στην αντίδραση έκλυσης	59

ΚΕΦΑΛΑΙΟ II

ΤΟ 2, 3 ΔΙΦΩΣΦΟΓΛΥΚΕΡΙΚΟ ΟΞΥ (2, 3 DPG)	65
1. Γενικά	65
2. Μοριακή αλληλεπίδραση του 2, 3 DPG με την αιμοσφαιρίνη και λειτουργικές συνέπειες	66
3. Αλληλεπιδράσεις των μεταβολών της συγκέντρωσης του 2, 3 DPG, φαινομένου Bohr και ισορροπίας Donan στο ερυθροκύτταρο	71
4. Συστημικές συνέπειες της μεταβολής της θέσης στην καμπύλη αποδέσμευσης οξυγόνου από την οξυαιμοσφαιρίνη-πειραματικά μοντέλα, κλινικές παρατηρήσεις και εφαρμογές	75
5. Βιοχημική ρύθμιση των επιπέδων του 2, 3 DPG στο ερυθροκύτταρο και in vitro χειρισμός τους	80
6. Η κλινική σημασία της ρύθμισης των επιπέδων του 2, 3 DPG	84
7. Το 2, 3 DPG και τα αιμοπετάλια	88



ΚΕΦΑΛΑΙΟ III

ΠΑΡΑΓΟΝΤΑΣ ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗΣ ΤΩΝ ΑΙΜΟΠΕΤΑΛΙΩΝ (P.A.F.)	89
1. Γενικά	89
2. Ο μεταβολισμός του P.A.F.	92
2.1. Βιοσύνθεση του P.A.F.	92
2.2. Ο ρόλος της φωσφολιπάσης A ₂	93
2.3. Δράση της ακετυλοτρανσφεράσης	95
2.4. Καταβολισμός του Παράγοντα Ενεργοποίησης Αιμοπεταλίων	95
α. Ακετυλοϋδρολάση	96
β. Ακυλτρανσφεράση ή τρανσακυλάση.	97
2.5. Ο κύκλος του P.A.F. και η ρύθμισή του	98
2.6. Άλλες πιθανές οδοί	100
3. Ο P.A.F. και η ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων	101
3.1. Συσσώρευση και έκλυση	101
3.2. Υπηρερχόμενοι Μηχανισμοί	103
α. Η ενσωμάτωση του ινωδογόνου	103
β. Ο μεταβολισμός του Ca ²⁺	104
γ. Ο φωσφολιπιδικός μεταβολισμός	107
4. Υποδοχείς P.A.F., ενσωμάτωση στα πλυμμένα αιμοπετάλια, συσχέτιση μεταξύ δράσης-ενσωμάτωσης στους υποδοχείς του.	109

ΚΕΦΑΛΑΙΟ IV

ΘΕΙΟΛΕΣ

115



ΚΕΦΑΛΑΙΟ V

ΥΛΙΚΑ - ΜΕΘΟΔΟΙ	121
A. ΠΕΙΡΑΜΑΤΑ ΣΥΣΣΩΡΕΥΣΗΣ ΠΛΥΜΜΕΝΩΝ ΑΙΜΟΠΕΤΑΛΙΩΝ ΚΟΥΝΕΛΙΟΥ ΣΤΟ ΣΥΣΣΩΡΕΥΟΜΕΤΡΟ	121
1. Χρησιμοποιηθέντα ζώα-αιμοληψία	121
2. Διαλύματα έκπλυσης και συσσώρευσης αιμοπεταλίων	121
3. Διαλύματα αγωνιστών και διαλύματα αναστολέων	123
4. Έκπλυση αιμοπεταλίων, μέτρηση, σταθεροποίηση του αριθμού τους	126
5. Μέτρηση της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων στο συσσωρευόμετρο	129
B. ΠΕΙΡΑΜΑΤΑ ΣΥΣΣΩΡΕΥΣΗΣ ΑΙΜΟΠΕΤΑΛΙΩΝ ΑΝΘΡΩΠΟΥ	130
1. Δότες-αιμοληψία	130
2. Παρασκευή PRP	131
Γ. ΠΕΙΡΑΜΑΤΑ ΑΝΑΣΤΟΛΗΣ-ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗΣ ΣΥΣΣΩΡΕΥΣΗΣ ΑΙΜΟΠΕΤΑΛΙΩΝ ΕΚΤΟΣ ΤΟΥ ΣΥΣΣΩΡΕΥΟΜΕΤΡΟΥ	131
1. Μέθοδος υπολογισμού γλυκόζης	131
2. Προσδιορισμός κατανάλωσης οξυγόνου σε αιμοπετάλια κουνελιού	132

ΚΕΦΑΛΑΙΟ VI

ΕΥΡΗΜΑΤΑ ΠΕΙΡΑΜΑΤΩΝ	135
A. Πειράματα στο συσσωρευόμετρο (αγгреγκόμετρο) με αναστολέα το 2, 3 DPG.	135



B.	Πειράματα στο συσσωρευόμετρο με αναστολέα το 3-Φωσφογλυκερικό οξύ (3-PGA).	138
Γ.	Πειράματα στο συσσωρευόμετρο (αγγρεγκόμετρο) με αναστολέα γλουταθειόνη (GSH).	140
Δ.	Αντιπροσωπευτικές εικόνες και διαγράμματα	142
E.	Πειράματα κατανάλωσης γλυκόζης από διηγημένα αμοιπετάλια κουνελιού με P.A.F.	156
	α. Πρώτη ομάδα πειραμάτων	156
	β. Δεύτερη ομάδα πειραμάτων	157
	γ. Τρίτη ομάδα πειραμάτων	159
	δ. Τέταρτη ομάδα πειραμάτων	161
	ε. Σχετικά διαγράμματα	162
	στ. Συντακτικοί τύποι των χρησιμοποιηθέντων αναστολέων	168
	ζ. Πειράματα κατανάλωσης οξυγόνου	173
	ΚΕΦΑΛΑΙΟ VII	
	ΣΥΖΗΤΗΣΗ	175
	ΠΕΡΙΛΗΨΗ	193
	SUMMARY	195
	ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ	
	ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	197
	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	201



ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Τα τελευταία χρόνια έχει δοθεί μεγάλη σημασία τόσο σε ερευνητικό όσο και σε κλινικό επίπεδο στον ρόλο ενός διαβιβαστή της αλλεργίας, του παράγοντα ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων (Platelet Activating Factor-P.A.F.) ο οποίος συμμετέχει σαν εκλυτικό αίτιο στην συσσώρευση των αιμοπεταλίων αλλά και σε μια πληθώρα φυσιοπαθολογικών μηχανισμών. Εξ'αιτίας της πολλαπλής αλλά και κρίσιμης δράσης του παράγοντα αυτού σε αρκετούς ιστούς, όργανα και συστήματα, έχει καταβληθεί μια τεράστια προσπάθεια ανεύρεσης ουσιών τόσο απαντώμενων φυσιολογικά στον οργανισμό, όσο και συνθετικών οι οποίες θα μπορούσαν να ανταγωνιστούν ή και να αναστείλουν την δράση του. Μέχρι σήμερα στην διεθνή βιβλιογραφία έχει αναφερθεί ένας μικρός αριθμός συνθετικά παρασκευασμένων ή φυτικής προέλευσης ουσιών, οι οποίες, σε πειραματικό επίπεδο, φαίνονται ικανές να αναστείλουν κάποιες από τις δράσεις του P.A.F. επί της αιμοπεταλιακής συσσώρευσης, ενώ είναι απόλυτα άγνωστη η ύπαρξη των φυσιολογικών αναστολέων του που λογικά πρέπει να διαθέτουν οι οργανισμοί των θηλαστικών, συμπεριλαμβανομένου και του ανθρώπου, για να ρυθμίζουν την δράση του P.A.F., έτσι ώστε αυτή να παραμένει μέσα σε όρια συμβατά με την εύρυθμη λειτουργία του οργανισμού.

Η ανακάλυψη τέτοιων αναστολέων φυσιολογικού χαρακτήρα, πέραν του ότι θα δημιουργούσε τις προϋποθέσεις παρασκευής ουσιών μη τοξικών για κλινική πλέον χρήση, θα βοηθούσε σημαντικά στην προσπάθεια να μελετηθεί και να διασφηνιστεί ο λειτουργικός ρόλος της δράσης του P.A.F. in vivo καθώς και οι φυσιολογικοί μηχανισμοί ρύθμισης της δράσης του.

Η παρούσα εργασία επιχειρήσε να καλύψει αυτό το κενό, εξετάζοντας ουσίες παραγόμενες φυσιολογικά στα ανώτερα θηλαστικά, μερικές από τις οποίες εμφανίζουν ανασταλτική δράση σε άλλους παράγοντες αιμοπεταλιακής συσσώρευσης και να διερευνήσει την επίδρασή τους πάνω στη συσσώρευση των αιμοπεταλίων την ενεργούμενη από τον P.A.F. Στην όλη αυτή προσπάθεια μελετήσαμε επί πλέον ουσίες οι οποίες δεν είχαν ξαναχρησιμοποιηθεί τόσο για



την αναστολή του P.A.F., όσο και για την αναστολή των υπολοίπων κεντρικών αγωνιστών της αιμοπεταλιακής συσσώρευσης.

Πράγματι, ακολουθώντας μια σειρά συλλογισμών, ανακαλύψαμε διάφορες φυσιολογικά απαντώμενες ουσίες οι οποίες είχαν την ικανότητα να συμπεριφέρονται ως ισχυροί αναστολείς της δράσης του P.A.F. επί της αιμοπεταλιακής συσσώρευσης. Εφ'όσον επιβεβαιώσαμε με πολλές πειραματικές επαναλήψεις την ανασταλτική ικανότητα των ουσιών αυτών επιχειρήσαμε την διαλεύκανση του μηχανισμού δράσης τους. Στην προσπάθεια αυτή χρησιμοποιήσαμε έναν αριθμό εξωγενών ουσιών (που δεν απαντώνται φυσιολογικά στον οργανισμό) των οποίων οι μηχανισμοί δράσης σε ορισμένα κυτταρικά φαινόμενα είναι γνωστοί και οι οποίες διαθέτουν κάποιες χημικές και λειτουργικές ιδιότητες ανάλογες με εκείνες των φυσιολογικών αναστολέων. Χρησιμοποιώντας τις συνθετικές αυτές ουσίες βρήκαμε ότι η πλειοψηφία τους ανέστειλε τον P.A.F., επιβεβαιώνοντας τις αρχικές μας υποθέσεις και δίνοντας έναυσμα για μια εμβάθυνση τόσο στην κατανόηση της λειτουργικής του φυσιογνωμίας, όσο και στην κατανόηση πολλών φυσιοπαθολογικών μηχανισμών στους οποίους ο P.A.F., εμφανίζεται να παίζει κάποιο ρόλο.

Η παρούσα μελέτη ξεκίνησε το 1986 και ολοκληρώθηκε στα τέλη του 1989 στο Εργαστήριο Πειραματικής Φυσιολογίας του Ιατρικού Τμήματος του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων. Μερικά σημαντικά τμήματά της έγιναν στο Εργαστήριο Βιοχημείας του Χημικού Τμήματος του Πανεπιστημίου των Ιωαννίνων. Καταθέτοντας την μελέτη αυτή θεωρώ αυθόρμητη υποχρέωσή μου να ευχαριστήσω θερμά τον Επίκουρο Καθηγητή της Φυσιολογίας και φίλο δρ. Άγγελο Ευαγγέλου τόσο για την πολύτιμη προσφορά ιδεών εργασίας και συζητήσεων όπως επίσης και για την εμπύχωση που μου έδωσε όχι λίγες φορές για την προώθηση της μελέτης, ειδικά σε κείνα τα δύσκολα σημεία στα οποία διάφοροι παράγοντες, επιστημονικού και μη χαρακτήρα, καθιστούσαν δυσχερή την συνέχιση της εργασίας. Ευχαριστώ με το ίδιο επίπεδο συναισθημάτων τον Επίκουρο Καθηγητή της Βιοχημείας και φίλο δρ. Δημόκριτο Τσουκάτο ο οποίος με την υπομονητική του παρουσία και συμμετοχή με βοήθησε τόσο στην απόκτηση της απαραίτητης τεχνικής κατάρτισης όσο και στην εκτέλεση πολλών σημαντικών και κρίσιμων πειραμάτων. Ευχαριστώ ακόμη τον καθηγητή της Φυσιολογίας δρ. Γεώργιο Καλλίστρατο ο οποίος μου έδωσε την δυνατότητα της συνολικής εκτέλεσης της διδακτορικής μου διατριβής και με υποστήριξε τόσο με ιδέες και γνώσεις, όσο και με παρατηρήσεις πάνω στα διάφορα προβλήματα



ανάλυσης που προέκυπταν κάθε φορά. Τον Επίκουρο Καθηγητή Βιολογικής Χημείας κ. Κων/νο Σεφερειάδη ευχαριστώ επίσης για την καθοδήγησή του και τις συμβουλές του στο βιοχημικό τμήμα της μελέτης. Ευχαριστώ τους φοιτητές του Ιατρικού Τμήματος και φίλους Δημήτρη Καραμπέτσο και Κώστα Λιβέρη για την σημαντική τους βοήθεια σε διάφορα προπαρασκευαστικά βήματα όπως και στην επεξεργασία των αποτελεσμάτων στον ηλεκτρονικό υπολογιστή. Τέλος ευχαριστώ ολόψυχα την νοσηλεύτρια Αναστασία Μπέκα η οποία με βοήθησε αφειδώλευτα τόσο στην τεχνική προπαρασκευής και εκτέλεσης όλων των πειραμάτων της εργασίας όπως επίσης και για την ενθάρρυνση και υποστήριξη που μου έδωσε κατά την διάρκεια της μελέτης χωρίς τις οποίες ο χρόνος εκτέλεσης θάχε αναπόφευκτα επιμηκυνθεί.



ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

AA = Αραχιδονικό οξύ

Alcyl-acyl-GPC = Αλκύλ-ακύλ-γλυκερύλ-φωσφορυλχολίνη

ADP = Διφωσφορική Αδενοσίνη

AMP = Μονοφωσφορική Αδενοσίνη

A 23187 = Ιονοφόρος του Ασβεστίου

BHT = Βουτυλικό υδροξυτολουένιο

BSA = Βόεια Λευκωματίνη

B(a)P = Βενζο(α)πυρένιο

cAMP = Κυκλικό AMP

-CP-CPK = Διάλυμα φωσφορικής κρεατίνης και κινάσης της φωσφορικής κρεατίνης

Ca²⁺ = Ιονισμένο ασβέστιο

cGMP = κυκλικό GMP

[¹⁴C] ADP = Ραδιοσημασμένο ADP με το ισότοπο 14 του άνθρακα

DNA = Δεσοξυριβονουκλεϊνικό οξύ

2, 3-DPG = 2, 3-Διφωσφογλυκερικό οξύ

1, 3-DPG= 1, 3-Διφωσφογλυκερικό οξύ

D-GA = D-γλυκερικό οξύ

2, 4-DNP = 2, 4-Δινιτροφαινόλη



1, 2-DG = 1, 2-Διακυλγλυκερόλη

EGTA = Αιθυλεν-γλυκολ-δισ-(2-αμινοαιθυλαιθήρ), N,N'-τετραοξικό οξύ

EDTA = Αιθυλεν-διαμινο-τετραοξικό δινάτριο

GSH = Αναχθείσα γλουταθειόνη

GS-SG = Οξειδωμένη γλουταθειόνη (διμερές)

GSH-ΥΠ. ΟΞ. = Γλουταθειόνη υπεροξειδάση

GPI = γλυκοπρωτεΐνη I

GPII = γλυκοπρωτεΐνη II

GPIII = γλυκοπρωτεΐνη III

GPV = γλυκοπρωτεΐνη V

GTP = Τριφωσφορική γουανοσίνη

5-HT = 5-υδροξυτροπταμίνη

Hb = Αιμοσφαιρίνη

12-HPETE = 12, 1-υδροούπεροξυ-5, 8, 10, 14-εικοσιτετραενοϊκό οξύ

12-HEETE = 12, 1-υδροξυ-5, 8, 10, 14-εικοσιτετραενοϊκό οξύ

HHT = 12, 1-υδροξυ-5, 8, 10-δεκαεπτατριενοϊκό οξύ

[³H] P.A.F. = Ραδιοσημασμένος P.A.F. με Τρίπιο

IgG = Ανοσοσφαιρίνες G

IgE = Ανοσοσφαιρίνες E

IgA = Ανοσοσφαιρίνες A

IgM = Ανοσοσφαιρίνες M

IPP = Διάλυμα Ινοσίνης, Πυροσταφυλικού οξέος, φωσφορικών αλάτων.

IRP-Πρωτεΐνη = Πρωτεΐνη πλούσια σε ιστιδίνη



INS = Ινοσιτόλη
IP = 1, 4, 5-Τριφωσφορική Ινοσιτόλη
IP = Μονοφωσφορική Ινοσιτόλη
KD = Χίλιοδάλτον
K.A.O. = Καμπύλη αποδέσμευσης οξυγόνου
L-PGL = L-α-φωσφογλυκερόλη
lyso-P.A.F. = Απακετυλιωμένο παράγωγο του P.A.F.
MPG = α-μερκαπτοπροπονύλ-γλυκίνη (Θειόλα)
MDA = Μαλονδιαλδεϋδη
MPPRM = Μερκαπτοπυριμιδίνη
MPRD = Μερκαπτοπυριδίνη
NDK = Νουκλεοσίδιο-διφωσφορική κινάση
P.A.F. = Παράγοντας Ενεργοποίησης Αιμοπεταλίων
PLS = Ουσίες ανάλογης δράσης προς τον P.A.F.
PF-4 = Αιμοπεταλιακός παράγοντας 4
PL-A₂ = Φωσφολιπάση A₂
PL-C = Φωσφολιπάση C
PMA = Οξικός εστέρας της μυριστικής φορβόλης
3-PGA = 3-φωσφογλυκερικό οξύ
2-PGA = 2-φωσφογλυκερικό οξύ
P₅₀ = Πίεση κορεσμού 50% της αιμοσφαιρίνης
PO₂ = Μερική πίεση οξυγόνου
PRP = Πλάσμα Πλούσιο σε Αιμοπετάλια



PPP = Πλάσμα Φτωχό σε Αιμοπετάλια

PMSF = Φθοριούχο φαινύλμεθυσουλφόνιο

[^{32}P] PO_4 = Ραδιοσημασμένη φωσφορική ρίζα με ^{32}P

PIP₂ = 2, 4-Διφωσφορική Ινοσιτόλη

PCMP = Μονοφωσφορική φωσφατιδύλ-κιτιδίνη

PA = Φωσφατιδικό οξύ

PGG₂ = Προσταγλανδίνη G₂

PGH₂ = Προσταγλανδίνη H₂

PGE₂ = Προσταγλανδίνη E₂

PGI₂ = Προσταγλανδίνη I₂ ή Προστακυκλίνη

PGD₂ = Προσταγλανδίνη D₂

PGF₂ = Προσταγλανδίνη F₂

QUIN 2 = Χρωστική QUIN 2

RNA = Ριβονουκλεϊνικό οξύ

TxA₂ = Θρομβοξάνη A₂

TxB₂ = Θρομβοξάνη B₂

TMZ = Τρμεταζιδίνη

Tris = Τρις-υδροξυμεθύλ-αμινομεθάνιο

TG-EGTA = Διάλυμα έκπλυσης αιμοπεταλίων κουνελιού

TG-Ca²⁺ = Διάλυμα συσσώρευσης αιμοπεταλίων κουνελιού

vWf = Παράγοντας von Willebrand



ΚΕΦΑΛΑΙΟ Ι

ΑΙΜΟΠΕΤΑΛΙΑ Η ΘΡΟΜΒΟΚΥΤΤΑΡΑ

1. Γενικά

Τα αιμοπετάλια (ή θρομβοκύτταρα) ανήκουν στα έμμορφα στοιχεία του αίματος των ανώτερων ζώων. Επειδή το μέγεθος τους είναι μικρό (2μπμ διαμέτρου) παραβλέφτηκαν από τους πρώτους ερευνητές της αιματολογικής μικροσκοπίας των οποίων το ενδιαφέρον είχε προσελκυστεί από τα πολύ μεγαλύτερα και πολυπληθέστερα ερυθροκύτταρα, όπως επίσης και από τα λευκά αιμοσφαίρια. Το 1906 ο Buckmaster συμπέρανε για πρώτη φορά στην ιστορία της αιματολογίας ότι τα αιμοπετάλια είναι υπαρκτά και μόνιμα στοιχεία του αίματος των υγιών ενηλίκων, αλλά είναι πολύ δύσκολο να εμφανιστούν στα μικροσκοπικά παρασκευάσματα γιατί είναι εξαιρετικά ευαίσθητα στις κλασσικές μεθόδους παρασκευής και απαιτείται ιδιαίτερη προσοχή για την απομόνωσή τους. Άλλοι ερευνητές της εποχής εκείνης θεώρησαν τα αιμοπετάλια σαν απλά τεχνήματα που οφείλονταν στις ατέλειες των μεθόδων παρασκευής κι όχι σαν πραγματικά και υπαρκτά στοιχεία του αίματος. Οι πρώτοι μελετητές που ασχολήθηκαν σοβαρά με τα αιμοπετάλια, διαπίστωσαν ότι τα σωματία αυτά συσχετιζόταν με την διαδικασία της πήξης του αίματος. Με την πάροδο των χρόνων σιγά-σιγά αναδύθηκαν κι άλλα δεδομένα σύμφωνα με τα οποία τα στοιχεία αυτά του αίματος φαινόταν πως συμμετείχαν, όχι μόνον στην πήξη και την θρομβογέννεση, αλλά και σε πολυάριθμες άλλες φυσιολογικές και παθολογικές διεργασίες επιδεικνύοντας μια πληθώρα κυτταρικών αντιδράσεων ευρέος φάσματος.

Αυτός ο πολύμορφος λειτουργικός χαρακτήρας των αιμοπεταλίων καθώς και η ευκολία απομόνωσής τους σε μεγάλους αριθμούς από το αίμα των ανώτερων ζώων σε συνδιασμό με την πολύωρη διατήρησή τους σε καλή κατάσταση αποτέλεσε μια θεμελιώδη αιτία για την χρησιμοποίησή τους σαν αξιόλογων μοντέλων για τη μελέτη των φαινομένων της ενεργού μεταφοράς, της έκκρισης και της κυτταρικής συγκόλλησης (105).



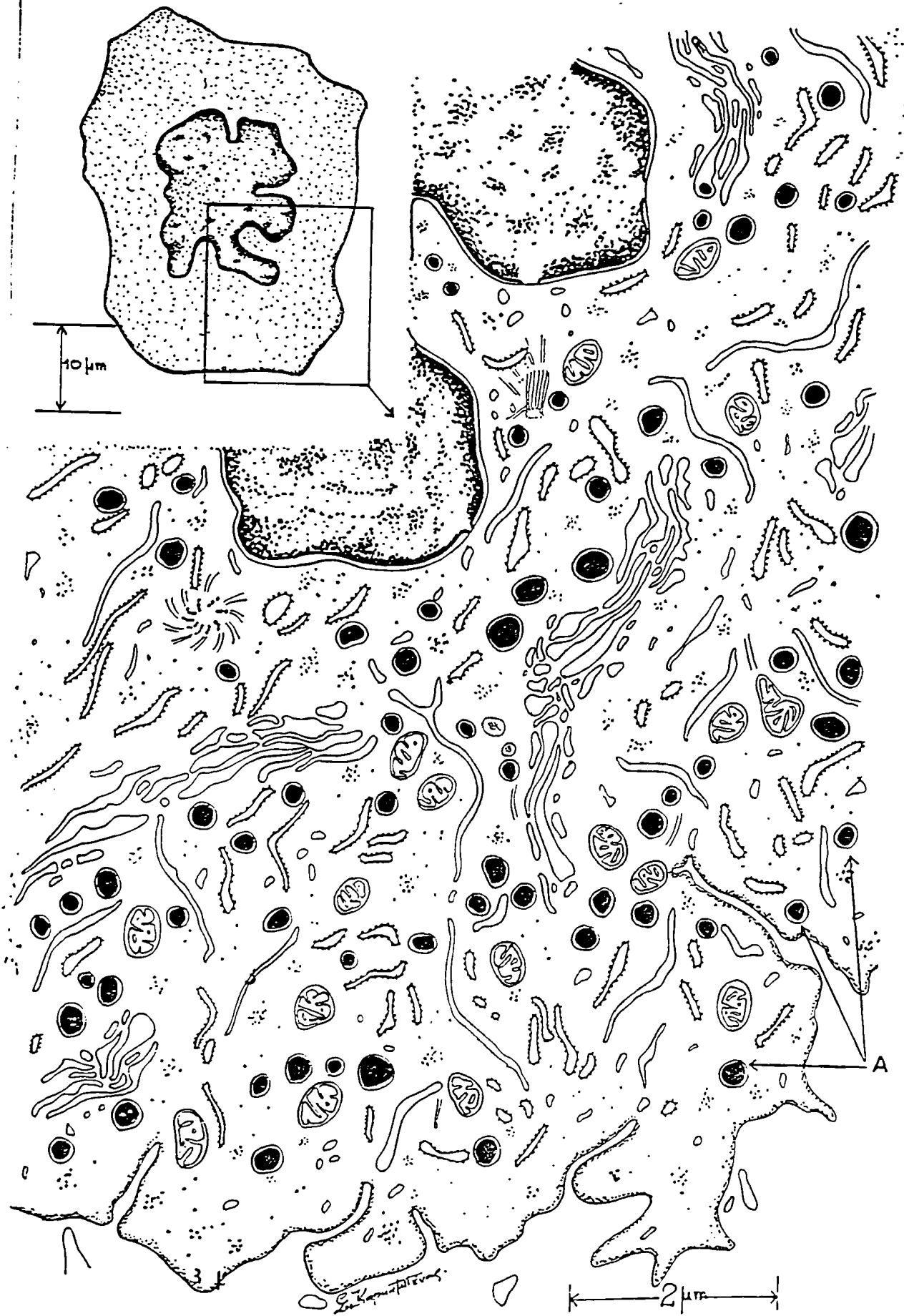
Τα αιμοπετάλια θεωρούνται σήμερα ότι συμμετέχουν με βεβαιότητα στην θρομβογένεση, στη διαδικασία της αρτηριοσκλήρυνσης και στη διαδικασία της μετάστασης των καρκινικών, κυττάρων οπότε η έρευνα για την εμφάνιση της κατανόησης των λειτουργιών τους και τον φαρμακολογικό τους χειρισμό θεωρείται σαν έρευνα αιχμής.

Στην παρούσα εργασία η ερευνητική προσοχή έχει στραφεί στην αλληλεπίδραση της ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων μέσω του "παράγοντα ενεργοποίησης αιμοπεταλίων (Platelet Activating Factor-P.A.F.) και ορισμένων ουσιών που απαντούν φυσιολογικά στο αίμα των ανώτερων θηλαστικών και του ανθρώπου. Ο απώτερος σκοπός της έρευνας είναι, αφ'ενός η ανακάλυψη μέσων για την παρεμπόδιση της θρομβοποιητικής δράσης του P.A.F. και αφ'ετέρου η εμφάνιση της κατανόησης των τρόπων λειτουργίας του παράγοντα αυτού, στη διαδικασία της αιμοπεταλιακής συσσώρευσης.

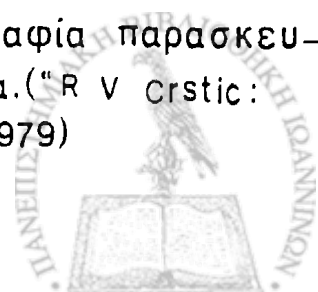
2. Σχηματισμός των αιμοπεταλίων και εναλλαγή τους

Τα αιμοπετάλια δημιουργούνται από τα μεγακαρυοκύτταρα τα οποία φαίνεται ότι έχουν κοινό πρόδρομο με τα κύτταρα της μυελικής και ερυθράς σειράς (5, 8, 11). Από την στιγμή που το πολυδύναμο αυτό προδρομικό κύτταρο (stem cell) έχει αρχίσει να διαφοροποιείται προς μεγακαρυοκύτταρο μέχρι την ωρίμανσή του παρεμβάλλεται ένα χρονικό διάστημα 70 περίπου ωρών, κατά τη διάρκεια του οποίου η μάζα του κυττάρου αυξάνεται σημαντικά ώστε να μπορεί να παράγει αρκετές εκατοντάδες αιμοπεταλίων (εικόνα αρ. 1). Κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης, η έντονη βιοσυνθετική δραστηριότητα του μεγακαρυοκυττάρου συνοδεύεται και από πολυπλοειδισμό. Κάθε ώριμο μεγακαρυοκύτταρο εμφανίζει ανώμαλη μορφή, σε αντίθεση με τους ανώριμους προδρόμους του οι οποίοι έχουν σφαιρικό σχήμα, ενώ το κυτταρόπλασμά του εμφανίζεται περιφερικά διαχωρισμένο σε σχηματισμούς, οι οποίοι θα δώσουν τα αιμοπετάλια. Τα νεαρά αιμοπετάλια που έχουν πρόσφατα αποκοπεί από το σώμα των μεγακαρυοκυττάρων, περιέχουν ριβοσώματα και RNA προερχόμενα από το πρωτόπλασμα του μητρικού κυττάρου τους κι ακόμη μετά απο μεγάλες αιμορραγίες κάνουν την εμφάνισή τους στο περιφερικό αίμα μεγάλες ποσότητες αιμοπεταλίων που παρουσιάζουν ριβοσώματα και RNA θεωρούμενα συνεπώς νεαρά. Η ύπαρξη των ριβοσωμάτων και του RNA δίνουν στα αιμοπετάλια μια περιορισμένου βαθμού βιοσυνθετική ικανότητα η οποία είναι πάρα πολύ ασθενής





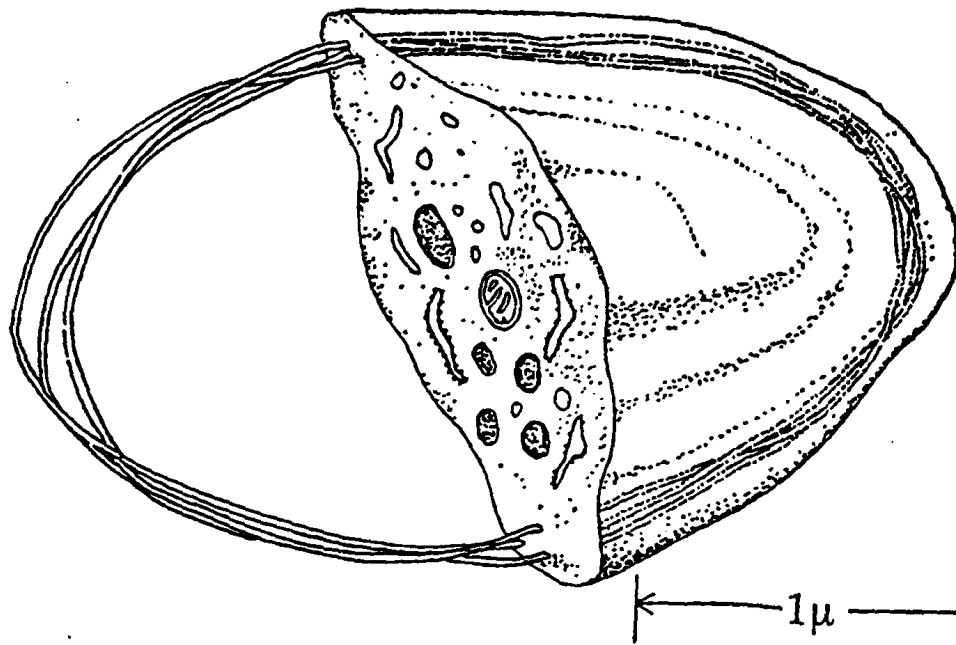
Εικ. 1 Σχέδιο ώριμου μεγακαρυοκυττάρου από φωτογραφία παρασκευάσματος στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο. A: αιμοπετάλια. ("R V Crstic: ultrastructure of the mammalia cell : BERLIN SPRINGER 1979)



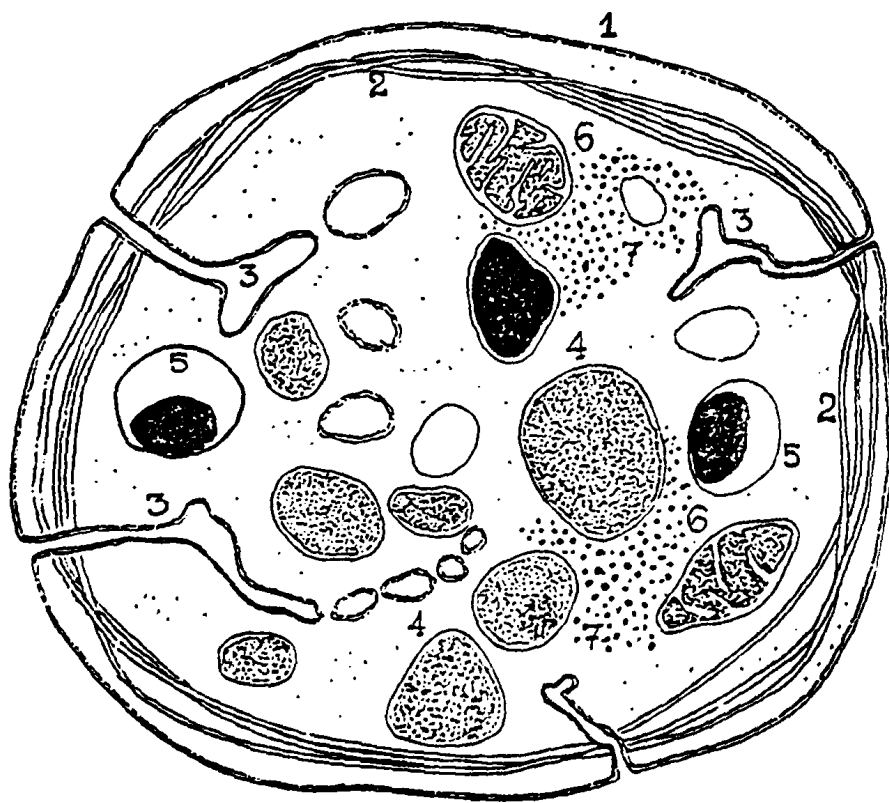
σε σύγκριση με την αντίστοιχη των εμπύρηνων κυττάρων και προφανώς δεν φαίνεται να παίζει κάποιο ρόλο στην ανανέωση της ενζυματικής τους παρακαταθήκης. Υπό την έννοια αυτή τα αιμοπετάλια μοιάζουν με τα ερυθρά αιμοσφαίρια, από τα οποία όμως διαφορίζονται σε πολυάριθμους άλλους παράγοντες. Τα κυκλοφορούντα αιμοπετάλια διαφέρουν ως προς το πλήθος τους ανά κυβικό εκατοστό αίματος από είδος σε είδος ξεκινώντας από τον άνθρωπο με 2×10^8 /ml και φθάνοντας στον επίμυα με 10^9 /ml. Για τον άνθρωπο ο ρυθμός παραγωγής τους ανέρχεται στα $3,5 \times 10^7$ αιμοπετάλια/ml την ημέρα. Είναι προφανές ότι για να διατηρείται σταθερός ο αριθμός τους μια ίση κατά προσέγγιση ποσότητα πρέπει να καταστρέφεται κυρίως στον σπλήνα και το ήπαρ. Η μέση ζωή των φυσιολογικών αιμοπεταλίων στον άνθρωπο δεν φαίνεται να υπερβαίνει τις 10 ημέρες και η καταστροφή τους λαμβάνει χώρα στο ήπαρ και τον σπλήνα όπου τα γηρασμένα θρομβοκύτταρα αναγνωρίζονται λόγω της μειωμένης τους λειτουργικότητας.

Ωστόσο μερικοί ερευνητές θεωρούν ότι ο μηχανισμός αναγνώρισης των γηρασμένων αιμοπεταλίων δεν έχει να κάνει με την λειτουργική τους υποβάθμιση, αλλά μάλλον με την μείωση κάποιων χαρακτηριστικών μορίων της κυτταρικής τους επιφάνειας, όπως είναι το σαλικό οξύ (107). Αν και δεν είναι απόλυτα γνωστή η φυσιολογία της αναγέννησης των αιμοπεταλίων από τα μεγακαρυοκύτταρα, έχει εν τούτοις βρεθεί ότι υπάρχει μια ορμόνη-η θρομβοποιητίνη-η οποία διαγείρει την παραγωγή αιμοπεταλίων από τον μυελό των οστών.



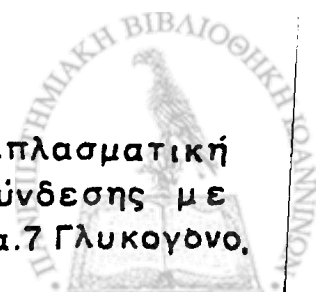


2α: Κάθετη τομή αιμοπεταλίου. Διακρίνεται η περιφερική στεφάνη των μικροσωληνίσκων.



Ε. Ζ. Καραφίτσος.

2β: Σχηματική παράσταση εγκάρσιας τομής αιμοπεταλίου. 1. πλασματική μεμβράνη. 2. Μικροσωληνίσκοι. 3. Τμήματα του συστήματος σύνδεσης με την επιφάνεια. 4. κοκκία. 5. Συμπαγή σωμάτια. 6. Μιτοχονδρία. 7. Γλυκογόνο.



3. Δομή των αιμοπεταλίων

Η αρχική παρατήρηση των αιμοπεταλίων με το οπτικό μικροσκόπιο (41) αποκάλυψε σ'αυτά δύο αδρά διακριτά μέρη (111): Το υαλόμερο, που καταλαμβάνει τον μεγαλύτερο όγκο και κείται στο εξωτερικό μέρος του αιμοπεταλίου και το χρωμόμερο ή κοκκίομερο που βρίσκεται συνήθως προς το κέντρο του. Το υαλόμερο είναι διαυγές και αποτελείται από μια βασική ουσία η οποία χρωματίζεται με τις συνήθεις χρωστικές του αίματος με αχνή κυανή χροιά, ενώ το κοκκίομερο αποτελείται από σαφώς έγχρωμο υλικό (μπλε ή πορφυρό) το οποίο εμφανίζει κοκκώδη υφή. Ενίοτε το κοκκίομερο παρουσιάζει την όψη ενός συμπαγούς συσσωματώματος, το οποίο όσον αφορά το φυσιολογικό αίμα μπορεί να οφείλεται σε αλλοίωση του αιμοπεταλίου, η οποία προκύπτει κατά την παρασκευή του υλικού μικροσκόπησης. Επίσης, κάτω από ανώμαλες συνθήκες λήψης και παρασκευής (δονήσει, μη τήρηση των χρόνων, ακατάλληλα υλικά, κακή χρήση φυγοκέντρου κ.λ.π.) τα αιμοπετάλια μπορεί να παρουσιάσουν διαφορετικές όψεις. Ακόμη είναι δυνατόν τα νεώτερα αιμοπετάλια να εμφανίζουν στο οπτικό μικροσκόπιο όψεις που απέχουν πολύ από εκείνες που επιδεικνύονται από τα γηραιότερα (111).

Η παρατήρηση με το κλασικό οπτικό μικροσκόπιο παρέχει εξαιρετικά λιγώτερες πληροφορίες για τη δομή των σωματίων αυτών σε σύγκριση με τις παρεχόμενες από το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο. Τα κύτταρα αυτά αποτέλεσαν ένα από τα πρώτα συστατικά των σωματιών των θηλαστικών που μελετήθηκαν στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο, εξ'αίτιας του γεγονότος πως μπορούσαν να διαταχθούν σε λεπτότατα στρώματα απολύτως διαπερατά από την δέσμη των ηλεκτρονίων των καθοδικών λυχνιών. Στις πρώτες εφαρμογές τα λεπτά αυτά επιστρώματα, τεμαχιζόταν σε υπέρλεπτες φέτες, από την εξέταση των οποίων πρέκυπταν περισσότερες λεπτομέρειες. Οι πρώτες μελέτες πραγματοποιήθηκαν σε παρασκευάσματα σταθεροποιημένα με τετροξειδίο του Οσμίου, μέθοδος η οποία επέτρεψε την εξαγωγή πολλών δεδομένων που αφορούσαν τη δομή των σωματιδίων αυτών. Ωστόσο μια νεώτερη τεχνική σταθεροποίησης των παρασκευασμάτων με γλουταραλδεϋδη ακολουθούμενη από τετροξειδίο του Οσμίου αποκάλυψε την ύπαρξη κι άλλων αιμοπεταλιακών συστατικών εμπλουτίζοντας τη δομική τους εικόνα.

Τέλος, άλλες μέθοδοι, περισσότερο εξειδικευμένες και εξελιγμένες επέτρεψαν την εξαγωγή δεδομένων σχετικών με την υπέρλεπτη υφή των συστατικών των αιμοπεταλίων (μεμβράνες, κοκκία, μικροσωληνίσκοι κ.λ.π.)



προσεγγίζοντας το βαθύτατο δομικό επίπεδο, δηλαδή εκείνο των μακρομοριακών συμπλεγμάτων (99). Τα δεδομένα αυτά έχουν ταξινομηθεί και σήμερα γίνεται προσπάθεια της συσχέτισης των δομών με τις λειτουργίες και τα βιοχημικά υποστρώματά τους (325). Προφανώς η λεπτομερειακή παρουσίαση αυτών των πληροφοριών εκφεύγει από τα πλαίσια της παρούσας μελέτης.

Κάνοντας μια σύνοψη των δεδομένων που προέρχονται από την μικροσκοπική οπτική και ηλεκτρονική παρατήρηση, μπορούμε να πούμε τα εξής σχετικά με την αιμοπεταλική οργάνωση:

- Τα αιμοπετάλια εμφανίζουν σχήμα κοκκίου φακής το οποίο παρουσιάζει δυναμικές μεταβολές εξαρτώμενες από την λειτουργική τους κατάσταση.
- Σε κάθε αιμοπετάλιο διακρίνουμε τρεις βασικές ζώνες: την περιφερική ζώνη, την ζώνη Sol (λεπτόρευστη) και Gel (πυκνόρευστη) και την ζώνη των οργανυλίων (εικόνες 2α και 2β).

3.1 Περιφερική ζώνη

Η περιφερική ζώνη αποτελείται από τρεις στοιβάδες: α) Το εξωτερικό επικάλυμμα, β) Την μεμβρανική μονάδα και γ) Την υπομεμβρανική περιοχή (111, 287). Το εξωτερικό επικάλυμμα επαλείφει την κυτταρική μεμβράνη και αποτελείται από βλενοπολυσακχαρίτες, γλυκοπρωτεΐνες, ΑΤΡάσες και προσροφηθείσες πρωτεΐνες. Στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο εμφανίζει χαμηλή ηλεκτρονική πυκνότητα. Η στοιβάδα αυτή, η οποία απαντάται και σε άλλα κύτταρα του σώματος, είναι αρνητικά φορτισμένη στο φυσιολογικό πλασματικό περιβάλλον του αίματος, παρουσιάζει αντιγονικούς προσδιοριστές και φέρει υποδοχείς διαφόρων ερεθισμάτων. Το περιφερικό σωληναριακό σύστημα, διαπερνά την στοιβάδα αυτή και εκβάλλει προς τα έξω. Το επικάλυμμα τέλος συμμετέχει τόσο στην πρόσφυση όσο και στην συσσώρευση των αιμοπεταλίων.

Η μεμβρανική μονάδα (πλασματική μεμβράνη) βρίσκεται ακριβώς κάτω από το εξωτερικό επικάλυμμα και αποτελείται από τρία στρώματα: δύο πρωτεϊνικά και ένα λιπιδικής φύσης που παρεμβάλεται μεταξύ τους. Η δομή της μεμβράνης ακολουθεί το κλασσικό υπόδειγμα των Singer και Nicolson (111, 287).

Η υπομεμβρανική περιοχή χαρακτηρίζεται από την παρουσία μιας στεφανιαίας δέσμης περιφερικών μικροσωληνίσκων που προσδίδουν στα εν ηρεμία



αιμοπετάλια το φακοειδές-δισκοειδές τους σχήμα (111, 325, 287). Η στεφάνη αυτή των μικροσωληνίσκων, διαπερνά τις δυο προαναφερθείσες στοιβάδες και συνδέει το εξωτερικό της μεμβράνης με τα αιμοπεταλιακά κοκκία, αποτελώντας ένα αγωγό σύστημα που θέτει σε αμοιβαία επικοινωνία το αιματικό πλάσμα με το εσωτερικό του αιμοπεταλίου. Η δομή αυτή των μικροσωληνίσκων επιτρέπει σε ουσίες του πλάσματος να περνούν στο εσωτερικό των αιμοπεταλίων όπως επίσης και στα συστατικά των κοκκίων να εξέρχονται στο αιματικό περιβάλλον, για να επάγουν την ενεργοποίηση και άλλων αιμοπεταλίων.

3.2 Η ζώνη Sol-Gel (λεπτόρευστου-πυκνόρευστου κυτταροπλάσματος)

Η ζώνη αυτή αποτελείται από ένα ανώμαλο τρισδιάστατο δίκτυο που παρουσιάζει ινώδη σύσταση. Το δίκτυο αυτό σχηματίζει ένα είδος σκελετού (ικρίωμα) και συγκρατεί μέσα στις θηλές του σωματίδια γλυκογόνου, περιφερικές δέσμες μικροσωληνίσκων, υπομεμβρανικά νημάτια και μικρονημάτια. Όλα αυτά τα νηματοειδή στοιχεία κατανέμονται σε δύο ομάδες:

- α) Σ'αυτά που παίζουν το ρόλο κυτταροσκελετού και είναι υπεύθυνα για την διατήρηση του σχήματος των αιμοπεταλίων και τη διατήρηση της θέσης των διαφόρων οργανυλλίων όταν το κύτταρο βρίσκεται σε "ηρεμία" και
- β) σε εκείνα που ευθύνονται για τις δυναμικές μεταβολές του αιμοπεταλίου και προκαλούν τα κύματα συστολής που προωθούν το περιεχόμενο των αιμοπεταλιακών κοκκίων στο αιματικό περιβάλλον (αντίδραση έκλυσης), εκπληρώνοντας έτσι ένα σημαντικό βήμα της λειτουργίας των θρομβοκυττάρων κατά την ενεργοποίησή τους.

Τα μικροϊνίδια του δικτύου αυτού θεωρούνται ότι είναι ανατομικά συνδεδεμένα με τους μικροσωληνίσκους. Το όλο σύμπλεγμα, σύμφωνα με την ερμηνεία που δίνουν αρκετοί σύγχρονοι κυτταρολόγοι, φαίνεται να παρουσιάζει μια δομή ανάλογη προς εκείνη του σαρκοπλάσματος των λείων μυϊκών κυττάρων, παρά το γεγονός πως η ομοιότητα δεν είναι εύκολο να καταστεί προφανής. Ωστόσο οι αναλογίες με το λείο μυϊκό κύτταρο αναδύονται κατά την μελέτη της λειτουργίας του αιμοπεταλίου, όπως επίσης κι από την βιοχημική ανάλυση των συστατικών που απαρτίζουν το ικρίωμα. Πράγματι, στις προαναφερθείσες δομές συμμετέχουν πρωτεΐνες όπως η ακτίνη και η μυοσίνη, οι οποίες είναι όμοιες με



εκείνες του λείου μυός, ενώ η ενεργοποίησή τους φαίνεται να ρυθμίζεται από ένα σύμπλεγμα τύπου τροπονίνης-τροπομυοσίνης (105).

3.3 Ζώνη οργανυλλίων

Στο βαθύτερο μέρος των αιμοπεταλίων απαντώνται τα διάφορα συστατικά του κοκκιομερούς της κλασσικής οπτικής μικροσκοπίας. Η ηλεκτρονική μικροσκοπία αποκάλυψε στην περιοχή αυτή μια ποικιλία δομών που περιγράφουμε κατωτέρω. Οι δομές αυτές αποτελούν τα οργανίδια του αιμοπεταλίου τα οποία είναι α) κοκκία, β) πυκνωτικά σωμάτια, γ) μιτοχόνδρια, δ) αδρό σωληναριακό σύστημα και σχηματισμούς τύπου της συσκευής Golgi. Ο Schulz και οι συνεργάτες του ταξινομούν τα κοκκία των αιμοπεταλίων σε άλφα κοκκία, βήτα κοκκία (μιτοχόνδρια), γάμμα κοκκία (μικροσωληνίσκοι), δέλτα κοκκία (σιδηροσώματα) και έψιλον κοκκία (γλυκογόνο).

- Τα άλφα κοκκία αποτελούνται από τριστοιβη μεμβράνη. Έχουν ωοειδές σχήμα, διάμετρο μεταξύ 0,2 και 0,3μ. Περιέχουν μικροσωληνίσκους, φωσφολιπίδια, θειούχους βλενοπολυσακχαρίτες, κατιονικές πρωτεΐνες, υδρολυτικά ένζυμα, όξινη φωσφατάση, θρομβοσθενίνη, ινωδογόνο, 5-υδροξυτριπταμίνη, (5-HT), τριφωσφορική αδενοσίνη (ATP), διφωσφορική αδενοσίνη (ADP) και ATPάση. Κάθε αιμοπετάλιο περιέχει 20 με 200 άλφα κοκκία.
- Τα πυκνωτικά σωμάτια αποτεμειύουν σεροτονίνη, ADP, ATP κατεχολαμίνες και τον αιμοπεταλιακό παράγοντα 4 (PF-4). Ο αριθμός των πυκνωτικών σωμάτων στα αιμοπετάλια των διαφόρων ειδών μεταβάλεται ανάλογα με την ποσότητα σεροτονίνης που αυτά τα κύτταρα περιέχουν. (Η σεροτονίνη μπορεί, ως γνωστόν, να προκαλέσει τη σύσπαση ή την χάλαση των μυϊκών ινών των αρτηριολίων και των αρτηριών). Τα αιμοπετάλια του ανθρώπινου είδους δεν περιέχουν μεγάλες ποσότητες σεροτονίνης και συνεπώς τα πυκνωτικά τους σωμάτια δεν είναι πολυάριθμα, όπως αντίθετα συμβαίνει στα αιμοπετάλια των κουνελιών (287). Στον άνθρωπο τα πυκνωτικά σωμάτια φαίνεται ότι μεταπίπτουν σε κοκκία άλφα αφού προηγουμένως προσλάβουν σεροτονίνη από το πλασματικό τους περιβάλλον μέσω του σωληναριακού συστήματος που συνδέει την επιφάνεια της εξωτερικής μεμβράνης με τον εσωτερικό χώρο του αιμοπεταλίου (287).



- Τα **μιτοχόνδρια** (βήτα κοκκία κατά την ταξινόμηση του Schulz) παρατηρούνται στις λεπτές τομές των αιμοπεταλίων στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο. Αποτελούν - όπως και σ'όλα τα κύτταρα γενικά - το κύριο μέρος του μηχανισμού παραγωγής ενέργειας υπό την μορφή της ATP. Είναι η δεξαμενή του μεταβολισμού των νουκλεοπιδίων και της αδενίνης και οπωσδήποτε η έδρα των φαινομένων της κυτταρικής αναπνοής. Στις περισσότερες λεπτές τομές των αιμοπεταλίων αντιστοιχούν 2 έως 3 μικρού μεγέθους μιτοχόνδρια τα οποία εμφανίζουν 2 έως 3 εσωτερικές πτυχές και συνεπώς σχετικά μικρή ποσότητα αναπνευστικών αλυσίδων, άρα όχι αυξημένη μεταβολική ένταση.
- Το σύστημα **σωλήνων και φυσαλίδων** περιγράφεται συνήθως ως αποτελούμενο από κενοτόπα συνδεδεμένα μεταξύ τους. Το σύστημα αυτό διαφεύγει σε δύο κύρια μέρη: Το πρώτο μέρος συνδέεται καθώς φαίνεται με την επιφάνεια της πλασματικής μεμβράνης και γι'αυτό ονομάστηκε **σύστημα σύνδεσης με την επιφάνεια**. Η εσωτερική επιφάνεια των μεμβρανών των κενοτοπίων του εν λόγω συστήματος παρουσιάζει τον ίδιο τύπο επιφανειακού επικαλύματος με εκείνον που απαντάται στην πλασματική μεμβράνη των αιμοπεταλίων. Δεδομένου ότι τα αιμοπετάλια παρουσιάζουν φαγοκυτταρική δραστηριότητα (105, 218, 9, 139) φαίνεται λογικό ότι το σύστημα αυτό συσχετίζεται με τη λειτουργία μεταφοράς ουσιών στο εσωτερικό του κυττάρου. Το δεύτερο μέρος ονομάζεται **πυκνό σωληναριακό δίκτυο**, γιατί οι μεμβρανώδεις μικροσωληνίσκοι του αποτελούνται από ένα υλικό μέτριας ηλεκτρονικής πυκνότητας (εικόνα αρ. 3), (111). Τα μέρη του συστήματος αυτού προέρχονται πιθανόν από τις συσκευές Golgi του μεγακαρυοκυττάρου απ'το οποίο παρήχθη το αιμοπετάλιο.
- **Σιδηροσώματα**. Πρόκειται για σφαιροειδείς, φυσαλιδωτούς σχηματισμούς, με διαυγές περιεχόμενο, εκτός της εσωτερικής επιφάνειας της μεμβράνης τους η οποία φαίνεται επενδυμένη με μικρά πυκνά κοκκία διαμέτρου 55Å. Δεδομένου ότι τα σωματίδια της φερριτίνης (που περιέχουν σίδηρο) έχουν αυτές τις διαστάσεις, οι φυσαλίδες που παρουσιάζουν τα πυκνά αυτά κοκκία ονομάστηκαν σιδηροσώματα. Γενικά είναι δομές που σπανίζουν μέσα στα αιμοπετάλια και η λειτουργική τους σημασία δεν είναι σαφής.
- **Κοκκία γλυκογόνου**. Είναι μικρά κοκκία που απαντώνται στο κυτταρόπλασμα του αιμοπεταλίου σε μικρές ομάδες ή, σπανιότερα σε



μεγαλύτερα συσσωματώματα που περιέχουν μερικές εκατοντάδες κοκκίων. Αποτελούν μια σημαντική ενεργειακή παρακαταθήκη της οποίας ο ρόλος γίνεται κρίσιμος κατά τη διάρκεια της εκτύλιξης της αιμοπεταλιακής λειτουργίας, όταν το γλυκογόνο αποικοδομείται προς γλυκόζη, η οποία με τη σειρά της μεταβολίζεται προς ATP για την παροχή της αναγκαίας ενέργειας για τις αντιδράσεις ενεργοποίησης, έκλυσης και συσσώρευσης των αιμοπεταλίων.

- **Ριβοσώματα.** Συνήθως δεν ανευρίσκονται στα αιμοπετάλια. Ωστόσο όταν τα αιμοπετάλια είναι νεαρά τότε πολλές φορές μέσα στο κυτταρόπλασμα τους παρατηρούνται κυρίως μεμονωμένα ριβοσώματα ή θραύσματά τους (104).

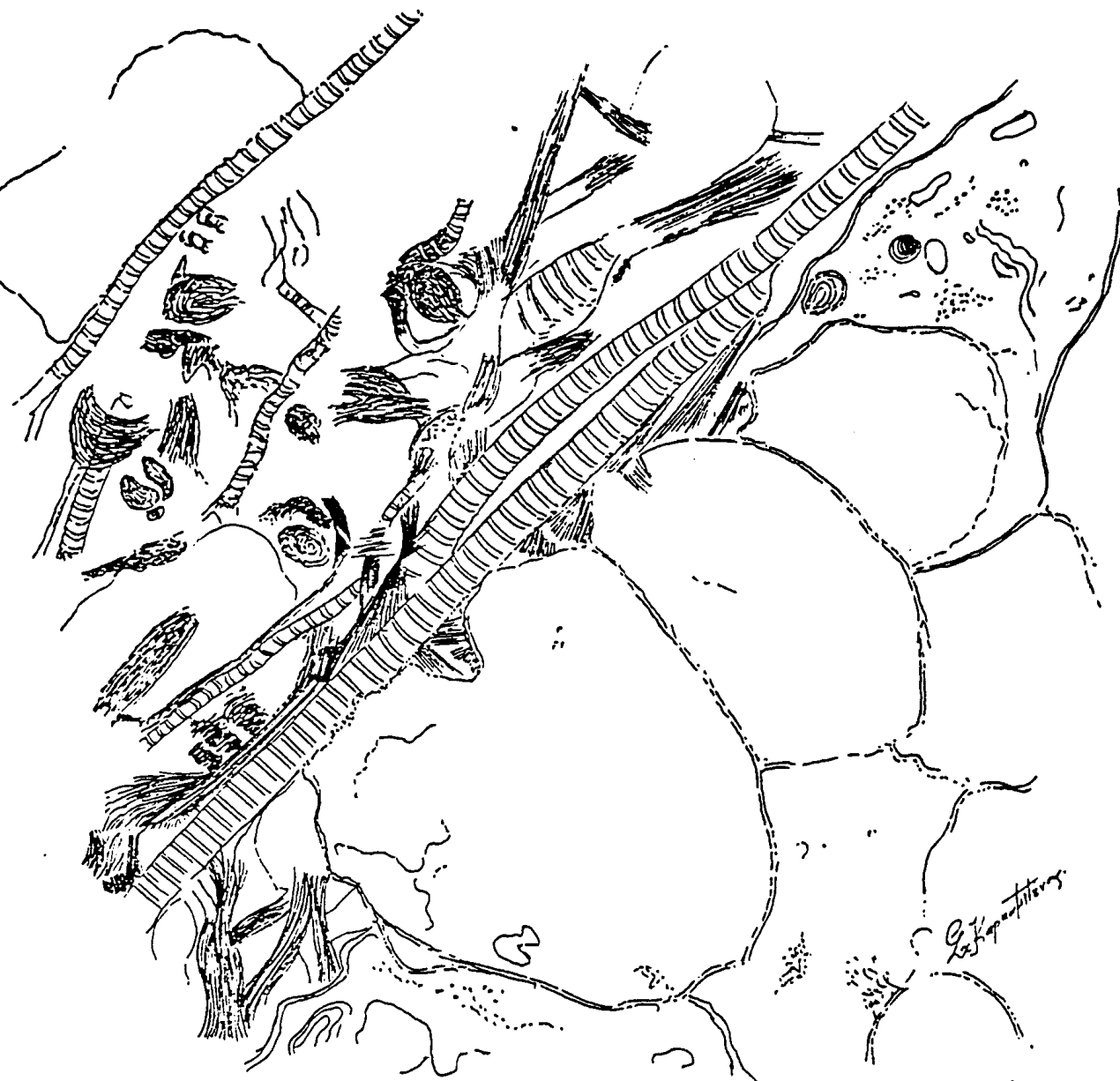
Γενικά ο μεταβολισμός των αιμοπεταλίων είναι δραστήριος. Μπορούν να παράγουν μέσα στα μιτοχόνδριά τους ATP σε αξιοσημείωτες ποσότητες. Η γλυκόλυση είναι παρούσα στα κύτταρα αυτά, αλλά φαίνεται ότι ο ρόλος της είναι δευτερεύουσας σημασίας για την παραγωγή ενέργειας. Στα νεαρά αιμοπετάλια έχει βρεθεί βιοσυνθετική ικανότητα γλυκογόνου, φωσφοπρωτεϊνών και γλυκοπρωτεϊνών. Παρουσιάζουν ιδιότητες αντιπλασμίνης, εμφανίζουν λιποσώματα ενώ τα κατάλοιπα των ριβοσωμάτων στο κυτταρόπλασμα συνηγορούν υπέρ μιας περιορισμένης πρωτεϊνοσυνθετικής ικανότητας για δύο τουλάχιστον πρωτεΐνες: του ινωδογόνου και του παράγοντα XIII. Φυσικά, η έλλειψη γενετικού υλικού, όπως και εμφανούς πρωτεϊνοσυνθετικού μηχανισμού καθιστούν τα αιμοπετάλια ευάλλωτα στις μεταβολές και ανίκανα να διορθώσουν τις συσσωρευόμενες μοριακές τους βλάβες, πράγμα που αν συνέβαινε, πιθανόν να έβλαπτε τις λειτουργίες τους που είναι μεταξύ των άλλων και ο σχηματισμός λευκών θρόμβων και η προστασία των αγγείων από τό αποτέλεσμα μικρών ή μεγάλων τραυματισμών. Γενικά η έλλειψη πυρήνα και ριβοσωμιακού συστήματος, κάνει τα αιμοπετάλια δομικά ανάλογα με τα ερυθρά αιμοσφαίρια, από τα οποία φυσικά διίστανται εξ'ατίας της λειτουργίας, της προέλευσης και του μεταβολισμού τους. Ωστόσο δεν αποκλείεται να υπάρχει ένας λειτουργικός δεσμός μεταξύ αιμοσφαιρίων (ερυθρών) και αιμοπεταλίων, σχετικός με την αναστολή της εξάπλωσης των θρόμβων πέραν ενός ορισμένου μεγέθους.



3.4 Η κυτταρική μεμβράνη των αιμοπεταλίων

Η σύσταση της μεμβράνης των αιμοπεταλίων είναι λιποπρωτεϊνική και το πρότυπο της αρχιτεκτονικής τους είναι, σε γενικές γραμμές, το κλασσικό των Singler-Nicholson. Ωστόσο η ειδική φύση και η οργάνωση των πρωτεϊνών και των λιπιδίων της πλασματικής μεμβράνης εμφανίζει ορισμένες ιδιαιτερότητες, που κατά τα φαινόμενα ανταποκρίνονται στο λειτουργικό ρόλο των εν λόγω κυττάρων.





Εικ.3 Σχεδιο απο ηλεκτρονικη μικροφωτογραφια (30.000 X) αιμοπεταλιων που εχουν προσφυθει σε ινες κολλαγονου. (Συλλογη J. F. MUSTARD)

α. Λιπίδια

Ένα ποσοστό 70% των αιμοπεταλιακών λιπιδίων είναι φωσφολιπίδια, ενώ το υπόλοιπο αποτελείται από ουδέτερα λίπη, ιδιαίτερα από ελεύθερη χοληστερόλη και κατά δεύτερο λόγο από γλυκολιπίδια. Το φωσφολιπιδικό δυναμικό της αιμοπεταλιακής μεμβράνης αντιπροσωπεύεται από πέντε βασικά είδη φωσφολιπιδίων: την φωσφατιδυλχολίνη (37%), την φωσφατιδυλαιθανολαμίνη (27%), την σφιγγομυελίνη (17%), την φωσφατιδυλσερίνη (10%) και την φωσφατιδυλινοσιτόλη (5%). Τα δύο φωσφολιπίδια της χολίνης, η φωσφατιδυλχολίνη και η σφιγγομυελίνη, απαντώνται κυρίως στο εξωτερικό φύλλο της μεμβρανικής διπλοστιβάδας, ενώ η φωσφατιδυλσερίνη και η φωσφατιδυλαιθανολαμίνη είναι πιο συχνές στο εσωτερικό φύλλο της διπλοστιβάδας, σε στενή επαφή με το κυτταρόπλασμα. Η ασύμμετρη αυτή διάταξη των φωσφολιπιδίων εκφράζει έναν συγκεκριμένο λειτουργικό ρόλο που συσχετίζεται με τις γενικότερες λειτουργίες των αιμοπεταλίων και είναι σαφώς διαφορετική από την διάταξη που παρουσιάζει η μεμβράνη των ερυθροκυττάρων. Είναι γνωστό ότι μια μικρού βαθμού υδρόλυση των φωσφολιπιδίων της χολίνης στην επιφάνεια των αιμοπεταλίων από την φωσφολιπάση A₂, είναι αρκετή για να πυροδοτηθεί η αντίδραση έκλυσης (64, 153).

Ακόμη, ορισμένα γλυκολιπίδια φαίνεται να χρησιμεύουν σαν υποδοχείς για την πυροδότηση της αιμοστατικής λειτουργίας των αιμοπεταλίων, ενώ τα φωσφοϊνοσιτίδια συμμετέχουν αποφασιστικά στη μεταβολή του σχήματος όπως επίσης και στη λειτουργία της συσώρευσης των κυττάρων αυτών (153).

β. Γλυκοπρωτεΐνες

Τα αιμοπετάλια - όπως και άλλα κύτταρα των θηλαστικών - παρουσιάζουν στην πλασματική τους μεμβράνη μια ποικιλία γλυκοπρωτεϊνών, οι οποίες ευθύνονται για πολλές από τις αλληλεπιδράσεις των κυττάρων αυτών με το εξωτερικό τους περιβάλλον. Η πλασματική μεμβράνη λειτουργεί σαν διαχωριστική γραμμή, ενώ οι μεμβρανικές γλυκοπρωτεΐνες ρυθμίζουν την ενεργό μεταφορά ιόντων και άλλων ουσιών. Ακόμη οι γλυκοπρωτεΐνες αυτές φαίνονται απαραίτητες για τη δημιουργία δεσμών μεταξύ των στοιχείων του κυτταροσκελετού και των διαφόρων ξένων επιφανειών (συμπεριλαμβανομένων και των άλλων αιμοπεταλίων) στις οποίες μπορεί να προσκολληθεί το αιμοπεταλιακό κύτταρο. Ένα χαρακτηριστικό των αιμοπεταλίων που αναδύεται από την διέγερσή τους μέσω



ενός ευρέος φάσματος φυσιολογικών και μη ερεθισμάτων, είναι η προεκβολή ψευδοποδίων που είναι ταυτόχρονη με την αλλαγή του σχήματος τους από δισκοειδές σε σφαιρικό και η παράλληλη πυροδότηση της αντίδρασης έκλυσης. Όταν τα αιμοπετάλια συσσωρευτούν τα ψευδοπόδια επανέλκονται προς τα πίσω οπότε το συσσωμάτωμα των κυττάρων αυτών μειώνεται και σε όγκο, πράγμα που συμβαίνει στη συστολή των θρόμβων. Τα τελευταία χρόνια έχει αυξηθεί το ποσό των παρατηρήσεων που αποδεικνύουν ότι οι μεμβρανικές γλυκοπρωτεΐνες έχουν και ρόλους υποδοχέων για τους αγωνιστές που ενεργοποιούν τις αιμοπεταλιακές λειτουργίες (64). Αρχικά περιγράφησαν τρεις βασικές γλυκοπρωτεΐνες ύστερα από διάλυση των αιμοπεταλιακών μεμβρανών με SDS και ηλεκτροφόρηση του υλικού σε πήκτη SDS - πολυακρυλαμιδίου. Τα ληφθέντα από την ηλεκτροφόρηση φάσματα χαρακτηρίστηκαν σαν κλάσμα I, κλάσμα II, κλάσμα III (334, 247, 229, 253).

Η γλυκοπρωτεΐνη I (GPI) διαθέτει το μικρότερο μοριακό βάρος (90.000 Daltons) ενώ οι γλυκοπρωτεΐνες II (GPII) και III (GPIII) διαθέτουν μεγαλύτερα μοριακά βάρη (μέχρι 150.000 Daltons). Με την χρησιμοποίηση τροποποιημένων ηλεκτροφορητικών τεχνικών, με μικρότερες ποσότητες πολυακρυλαμιδίου, διαπιστώθηκε ότι τα κλάσματα I, II, III είναι ανομοιογενή και ότι το καθένα τους διαχωρίζεται σε δύο επιμέρους κλάσματα I_a, I_b, II_a, II_b και III_a, III_b, ενώ εντοπίστηκε και η γλυκοπρωτεΐνη V (GPV). Η γλυκοπρωτεΐνη I_a (GPI_a) αποτελεί ένα μακρομόριο που βρίσκεται σε σχετικά μικρές ποσότητες στην πλασματική μεμβράνη του αιμοπεταλίου, παρουσιάζει μοριακή μάζα 153 KD και ισοηλεκτρικό σημείο (PI) μεταξύ 4,5 και 5,5. Περιέχει μια σειρά δισουλφιδικών γεφυρών και πιθανόν έχει το ρόλο του υποδοχέα για το κολλαγόνο δοθέντος ότι έχουν περιγραφεί ασθενείς οι οποίοι παρουσιάζουν αιμοπετάλια με ελαττωματική ανταπόκριση στο κολλαγόνο και ταυτοχρόνως ένα ποσοστό GPI_a ελαττωμένο στα 15-20% των φυσιολογικών επιπέδων της (64). Τα αιμοπετάλια των ασθενών αυτών εμφανίζουν επίσης αδράνεια στη διέγερση αγλουτινίνης από σπόρους σιταριού, πράγμα το οποίο αποτελεί ένδειξη ότι η GPI_a λειτουργεί και σαν υποδοχέας της εν λόγω αυτής λεκτίνης (234). Υπάρχουν αρκετές ενδείξεις οι οποίες υποδεικνύουν ότι η γλυκοπρωτεΐνη GPI_a μαζί με την GPI_b συνδέονται στον κυτταροσκελετό του αιμοπεταλίου μέσω μιας ειδικής πρωτεΐνης (actin binding protein) (93). Αυτά φανερώνουν ότι πιθανώς υπάρχει μια σχέση μεταξύ του σημείου πρόσδεσης του παράγοντα vW και του θεωρούμενου ως υποδοχέα του κολλαγόνου στην αιμοπεταλιακή πλασματική μεμβράνη και γενικά υποδεικνύουν



το μέγεθος της σημασίας της γλυκοπρωτεΐνης I_2 για την πρόσδεση του αιμοπεταλίου στους υπενδοθηλιακούς ιστούς.

Η γλυκοπρωτεΐνη $GP1_b$ αποτελεί τη μεγαλύτερη σιαλοπρωτεΐνη της πλασματικής μεμβράνης των αιμοπεταλίων και είναι γενικά παραδεκτό ότι αντιπροσωπεύει τον υποδοχέα του παράγοντα vW , ο οποίος υπεισέρχεται στη διαδικασία προσκόλλησης των αιμοπεταλίων, στον υπενδοθηλιακό ιστό των τραυματισμένων αγγείων. Οι αρχικές ενδείξεις για την κατανόηση του ρόλου της $GP1_b$ προήλθαν από την μελέτη των αιμοπεταλίων ασθενών πασχόντων από το σύνδρομο Bernard-Soulier στο οποίο συνυπάρχει ελάττωση της ικανότητας προσκόλλησης των αιμοπεταλίων και έλλειψη των γλυκοπρωτεϊνών $GP1_b$, GPV και $22KD_2$ (63, 30, 71, 237).

Οι πρωτεάσες που απομακρύνουν το εξωτερικό τμήμα της $GP1_b$ οδηγούν σε μια σχετική μείωση της συσσωρευτικής ικανότητας των αιμοπεταλίων που ενεργείται από τον παράγοντα vW , ενώ τα μονοκλωνικά και πολικλωνικά αντισώματα κατά της $GP1_b$ προκαλούν αναστολή της δράσης του vW στα αιμοπετάλια που έχουν υποστεί την επεξεργασία αυτή. Τα δεδομένα αυτά δείχνουν ότι η $GP1_b$ είναι ο υποδοχέας του παράγοντα vW . Η $GP1_b$ περιέχει επιπλέον ένα σημείο πρόσδεσης για την θρομβίνη, αλλά από διάφορες μελέτες φαίνεται ότι το σημείο αυτό δεν παίζει σημαντικό ρόλο για την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων από τη θρομβίνη (240, 241). Όπως και η $GP1_a$ έτσι και η $GP1_b$ φαίνεται πως διαθέτει αρκετές ενδομοριακές (253) δισουλφιδικές γέφυρες. Η $GP1_b$ συνδέεται με τον κυτταροσκελετό του αιμοπεταλίου και συγκεκριμένα με την εξειδικευμένη πρωτεΐνη πρόσδεσης της ακτίνης (actin binding protein), αλλά δεν είναι σαφές το κατά πόσον η σύνδεση αυτή γίνεται κατ'ευθείαν ή μέσω της παρεμβολής ενός άλλου παράγοντα. Κατά τη διάρκεια της αιμοπεταλιακής ενεργοποίησης, το απελευθερούμενο ιονισμένο ασβέστιο ενεργοποιεί κάποιες πρωτεάσες που υδρολύουν σε ένα βαθμό την πρωτεΐνη πρόσδεσης της ακτίνης, δίνοντας έτσι στην $GP1_b$ την δυνατότητα να κινείται πολύ πιο ελεύθερα στην αιμοπεταλιακή επιφάνεια και να έρχεται πιο εύκολα σε επαφή με τον παράγοντα vW , πράγμα που διευκολύνει τη συσσωρευτική ανταπόκριση των αιμοπεταλίων στον παράγοντα αυτό. Είναι ενδεχόμενο, οι στερεοτατικές αλλαγές του μορίου της $GP1_b$ που προκαλούνται από την διάσπαση των γεφυρών θείου να επιφέρουν και μεταβολές στη λειτουργία της εν λόγω πρωτεΐνης. Η γλυκοπρωτεΐνη $GP11_a$ έχει μοριακή μάζα $150KD_2$ και PI 4,1-4,8. Περιέχει κι αυτή δισουλφιδικές ομάδες, ενώ η λειτουργία της δεν έχει εξιχνιαστεί. Η $GP11_a$ εκτός



από τα αιμοπετάλια ανευρίσκεται και στο ενδοθήλιο των αγγείων. Έχει αναφερθεί ότι συμμετέχει στους υποδοχείς των IgG αντισωμάτων της αιμοπεταλιακής επιφάνειας.

Η γλυκοπρωτεΐνη GPII_b αποτελεί τη μοναδική από τις κύριες γλυκοπρωτεΐνες της αιμοπεταλιακής πλασματικής μεμβράνης της οποίας δεν έχει κατανοηθεί ο ρόλος. Έχει μοριακή μάζα ίση προς 95KD_a και ισοηλεκτρικό σημείο (PI) μεταξύ 4,5-5,7. Εμφανίζεται πολύ υδροφοβική και αντέχει εξαιρετικά στη δράση των πρωτεασών.

Η γλυκοπρωτεΐνη V έχει μοριακή μάζα 82KD_a και ισοηλεκτρικό σημείο μεταξύ 6,5-7,5. Θεωρείται ότι αποτελεί τον κύριο υποδοχέα της θρομβίνης στην αιμοπεταλιακή εξωτερική μεμβράνη, χωρίς ωστόσο η υπόθεση αυτή να είναι αναμφισβήτητα τεκμηριωμένη (252, 227).

Τέλος, στην πλασματική μεμβράνη των αιμοπεταλίων υπάρχουν κι άλλες γλυκοπρωτεΐνες σε μικρές ποσότητες των οποίων η λειτουργία δεν είναι προς το παρόν γνωστή. Είναι ωστόσο σαφές, ότι οι υποδοχείς για τους περισσότερους παράγοντες της ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων (μεταξύ των οποίων το ADP, η σεροτονίνη και η αδρεναλίνη) παραμένουν ακόμη άγνωστοι, οπότε είναι πιθανόν οι γλυκοπρωτεΐνες αυτές να παίζουν το ρόλο των υποδοχέων τους. Υπάρχει ακόμη η πιθανότητα οι εν λόγω γλυκοπρωτεΐνες να ασκούν τις ίδιες λειτουργίες και σε άλλους τύπους κυττάρων εκτός από τα αιμοπετάλια αλλά προς το παρόν η ύπαρξη διαφόρων τεχνικών προβλημάτων επιβραδύνει την ανάπτυξη της έρευνας στο χώρο αυτό. Η χρήση των μονοκλωνικών αντισωμάτων και των μεθόδων της μοριακής γενετικής υπόσχονται μια ταχεία εξέλιξη στην ανάπτυξη της έρευνας για την κατανόηση της λειτουργικής ταυτότητας των εν λόγω γλυκοπρωτεϊνών (63, 64).

4. Λειτουργίες και αντιδράσεις των αιμοπεταλίων

4.1 Γενικά

Η κατανόηση των λειτουργιών των αιμοπεταλίων αποτελεί μια σημαντική ανάγκη εξαιτίας των μεγάλων επιπτώσεων που μπορεί να έχει, τόσο στην καθημερινή κλινική πράξη, όσο και στην πρόληψη των νόσων οι οποίες σχετίζονται με την αρτηριοσκλήρυνση και την συνακόλουθη μερική ή ολική



απόφραξη των αγγείων. Γενικότερα η πήξη του αίματος είναι μια ιδιαίτερα περίπλοκη διαδικασία, της οποίας η κατανόηση και ο έλεγχος εκ μέρους του κλινικού γιατρού είναι κρίσιμης σημασίας για ένα μεγάλο φάσμα παθήσεων (καρδιαγγειακές παθήσεις), γύρω από τις οποίες συγκεντρώνεται ο μεγαλύτερος αριθμός θανάτων στην καθημερινή κλινική πράξη. Εκτός, π.χ., από το έμφραγμα του μυοκαρδίου και τα εμφράγματα που αφορούν άλλα όργανα, η λειτουργία της πήξης του αίματος φαίνεται να παίζει έναν σημαντικό ρόλο και στη διαδικασία της μετάστασης των καρκινικών κυττάρων από την έδρα του πρωτοπαθούς όγκου προς άλλες κατευθύνσεις μέσα στο σώμα (31). Εφ'όσον στην πήξη του αίματος τα αιμοπετάλια κατέχουν έναν ρόλο επιτελικό, είναι φανερό ότι η εμπάθυνση της γνώσης των λειτουργιών τους, αποτελεί έναν πολύ σημαντικό παράγοντα για την βελτίωση των παλιών και την επεξεργασία νέων θεραπευτικών σχημάτων που αφορούν τα προαναφερθέντα πεδία της παθολογίας. Αν και υπάρχουν αρκετά κενά στις γνώσεις μας τις σχετικές με το κυτταρικό σύστημα που είναι το αιμοπετάλιο, ωστόσο κατά την τελευταία δεκαπενταετία ο ρυθμός εξαγωγής πληροφοριών από την μελέτη του συστήματος αυτού είναι εντυπωσιακός και προφανώς οδηγεί σε μια όλο και ουσιαστικότερη διαλεύκανση των λειτουργικών ρόλων του στο φυσιολογικό και παθολογικό πεδίο.

4.2 Οι αντιδράσεις των αιμοπεταλίων

Τα αιμοπετάλια αντιδρούν σε μια πληθώρα ερεθισμάτων εμφανίζοντας τα εξής είδη αντιδράσεων: 1) Μεταβολή του σχήματός τους 2) Έκλυση του περιεχομένου των κοκκίων τους 3) Συσσώρευση αντιστρεπτή ή μη αντιστρεπτή (153).

Τα ερεθίσματα που μπορούν να προξενήσουν τις προαναφερθείσες αντιδράσεις τόσο *in vivo* όσο και *in vitro* είναι πολυάριθμα και μπορούν να καταταγούν σε δύο κατ'αρχάς κατηγορίες: Σε ερεθίσματα φυσιολογικά και (153) σε ερεθίσματα μη φυσιολογικά. Στην πρώτη κατηγορία ανήκουν το ADP, η σεροτονίνη, η αδρεναλίνη, η νορ-αδρεναλίνη, το κολλαγόνο, η θρομβίνη, διάφορα πρωτεολυτικά ένζυμα, η αντιδιουρητική ορμόνη (βαζοπρεσσίνη), διάφορα σύμπλοκα αντιγόνου-αντισώματος, αιμοπεταλιακά ισοαντισώματα, το αραχιδονικό οξύ και διάφορα μεταβολικά του παράγωγα και τέλος ο Παράγοντας Ενεργοποίησης Αιμοπεταλίων (P.A.F.). Αντίθετα στην κατηγορία των μη φυσιολογικών ερεθισμάτων ανήκουν διάφοροι προωθητές όγκων (π.χ. οξικός εστέρας της



μυριστικής φορβόλης), η ριστόσετίνη, η κονκαβαλίνη A, φυτοαιμαγλουπίνινες και άλλες λεκτίνες φυτικής προέλευσης, καπονικά πολυμερή (π.χ. πολυλυσίνη), ζυμοσάνη με τμήματα του συμπληρώματος, ρινίσματα καουτσούκ (latex) και άλλα κοκκιώδη υλικά, καρκινικά κύτταρα, βακτήρια, ιοί και τέλος ιονοφόροι διαφόρων δισθενών ιόντων όπως π.χ. η ιονοφόρος A23187 του ασβεστίου. Η δράση καθενός από τους προαναφερθέντες παράγοντες στα αιμοπετάλια έχει ως αποτέλεσμα την έναρξη μιας σειράς αντιδράσεων που λαμβάνουν χώρα στην πλασματική μεμβράνη, στην ζώνη του κυτταροπλάσματος και στο επίπεδο των κοκκίων. Κάθε ένας από τους αγωνιστές δρα μ'έναν συγκεκριμένο τρόπο κι έχει αποδειχθεί ότι το αποτέλεσμα της συνδιασμένης δράσης τους είναι μεγαλύτερο από το απλό άθροισμα των επιμέρους αποτελεσμάτων του καθενός (153).

Το φαινόμενο αυτό μπορεί εν μέρει να ερμηνευθεί από το γεγονός ότι, διαφορετικοί αγωνιστές ενεργοποιούν διαφορετικούς μηχανισμούς αντίδρασης των αιμοπεταλίων οι οποίοι συγκλίνουν σε έναν τελικό κοινό δρόμο. Εναλλακτικά προς την ερμηνεία αυτή θα μπορούσε να προταθεί ότι οι διαφορετικοί αγωνιστές αντιδρούν με διαφορετικούς υποδοχείς, οι οποίοι ενεργοποιούν μια κοινή οδό. Τα αιμοπετάλια ενεργοποιούνται από τα εξωγενή ερεθίσματα πριν σχηματισθούν ή απελευθερωθούν οι ενδογενείς μεσολαβητές. Τα εξωγενή αυτά ερεθίσματα φαίνεται ότι προέρχονται από αγγειακές βλάβες και τραυματισμούς που διαταράσσουν την συνέχεια των ιστών, όπως επίσης και από ιστικές βλάβες συμπεριλαμβανομένης και της αμόλυσης. Το ADP που απελευθερώνεται από τα κατεστραμμένα κύτταρα, οι ίνες του κολλαγόνου που εκτίθενται στην αιματική ροή κατά τους αγγειακούς τραυματισμούς, τα μικροϊνίδια της ελαστίνης που ενεργοποιούν τα αιμοπετάλια παρουσία του παράγοντα von Willebrand (vWf) και τέλος η θρομβίνη που δημιουργείται όταν το αίμα έρχεται σε επαφή με τους υπενδοθηλιακούς ιστούς αποτελούν κατ'αρχάς ένα σύνολο ερεθισμάτων που πυροδοτούν τις μετέπειτα αιμοπεταλιακές αντιδράσεις. Για την κατανόηση των ενδογενών μεσολαβητών της αιμοπεταλιακής ανταπόκρισης, είναι απαραίτητη η θεώρηση του τρόπου δράσης των διαφόρων εξωγενών ερεθισμάτων. Η πολυπλοκότητα της λειτουργίας των αιμοπεταλίων μπροστά στα διάφορα φυσιολογικά και μη ερεθίσματα που την διαγείρουν είναι εξαιρετικά μεγάλη, ωστόσο μπορεί κανείς σήμερα να κάνει μερικές σχηματοποιήσεις της όλης κατάστασης. Κατ'αρχάς, για την αιμοπεταλιακή ενεργοποίηση και τα διάφορα φαινόμενα που την ακολουθούν, είναι απαραίτητη η αύξηση της ενεργειακής παραγωγής, δηλαδή η αύξηση της σύνθεσης της τριφωσφορικής αδενοσίνης (ATP). Όταν καταληφθούν οι διάφοροι υποδοχείς των συγκεκριμένων αγωνιστών



της πλασματικής μεμβράνης, φαίνεται ότι επεμβαίνει μια πρωτεΐνη η οποία συζευγνύει την κατάληψη των υποδοχέων με την φωσφολιπάση C, την οποία ενεργοποιεί. Η ρυθμιστική αυτή πρωτεΐνη που μεταδίδει το "σήμα" της ενεργοποίησης από τον κατειλημένο υποδοχέα στη φωσφολιπάση C, λειτουργεί υδrolύοντας GTP. Η φωσφολιπάση C με τη σειρά της, αρχίζει και διασπά τα πολυφωσφοϊνοσπιδία του αιμοπεταλίου απελευθερώνοντας προϊόντα τα οποία κινητοποιούν το ασβέσπο και οδηγούν παράλληλα στη φωσφορυλίωση κάποιων πρωτεϊνών, οι οποίες υπεισέρχονται στην αντίδραση έκλυσης και στην αντίδραση συσσώρευσης των αιμοπεταλίων. Τόσο η αντίδραση έκλυσης όσο και η συσσώρευση, εξαρτώνται από την κατάσταση των πρωτεϊνών του αιμοπεταλιακού κυτταροσκελετού, και από την μεμβρανική ακτίνη και μυοσίνη. Όλες αυτές οι πρωτεΐνες ενεργούν μια συντονισμένη συστολή η οποία μεταβάλλει το σχήμα του αιμοπεταλιακού κυτάρου, επιβοηθώντας την αποδέσμευση του περιεχομένου των κοκκίων του στο αιματικό περιβάλλον, με τρόπο που θυμίζει τη λειτουργία της συσταλτής βακουόλης των πρωτοζώων, και τελικά οδηγεί στο φαινόμενο της συστολής των αιμοπεταλιακών θρόμβων. Το όλο σχήμα θα αναλυθεί εκτενέστερα στα κεφάλαια που περιγράφουν την συνολική αιμοπεταλιακή ενεργοποίηση.

Η αντίδραση των αιμοπεταλίων στα διάφορα ερεθίσματα ακολουθεί τρεις κύριους διακριτούς δρόμους. Αυτό σημαίνει ότι οι πολυπληθείς φυσιολογικοί και μη φυσιολογικοί αγωνιστές ενεργοποιούν την αιμοπεταλιακή λειτουργία ακολουθώντας ένα από τα τρία αυτά βασικά σχήματα. Η ενεργοποίηση του ενός δρόμου μπορεί να επισυμβεί ανεξάρτητα από τους άλλους δύο, αν και κατά τα φαινόμενα η διαδικασία της δημιουργίας θρόμβων *in vivo* κινητοποιεί όλες τις οδούς ταυτόχρονα. Ο πρώτος δρόμος είναι ο δρόμος του ADP που συμβαίνει και απουσία της αντίδρασης έκλυσης (314). Ο δεύτερος δρόμος είναι ο δρόμος του αραχιδονικού οξέος που καταλήγει στην παραγωγή θρομβοξανθής A₂, στην αντίδραση έκλυσης και την αιμοπεταλιακή συσσώρευση, ενεργοποιούμενος από διάφορους αγωνιστές όπως το κολλαγόνο, στο οποίο προσφύονται τα αιμοπετάλια. Ο τρίτος δρόμος είναι ο δρόμος του PAF και της θρομβίνης ο οποίος επίσης καταλήγει στην αντίδραση έκλυσης και τη συσσώρευση ανεξαρτήτως από την απελευθέρωση ADP και την παραγωγή θρομβοξανθής A₂. Όταν τα αιμοπετάλια συσσωρεύονται τη δράση του ADP απουσία της αντίδρασης έκλυσης του περιεχομένου των κοκκίων τους στο αιματικό περιβάλλον, τότε οι υποδοχές που περιέχουν το γλυκοπρωτεϊνικό σύμπλοκο IIb/IIIa ενσωματώνουν ινωδογόνο. Το ινωδογόνο ενσωματώνεται στους υποδοχείς αυτούς κατά την διάρκεια της συσσώρευσης και αποσπάται εν συνεχεία απ'την



αιμοπεταλιακή μεμβράνη κατά τη διάρκεια της αποσυσώρευσης των αιμοπεταλίων. Σε αρκετές μελέτες σχετικές με την δράση του ADP στην αιμοπεταλιακή λειτουργία είχε υποδειχθεί ότι ο αγωνιστής αυτός, δεν προκαλούσε φωσφορυλίωση των πρωτεϊνών 20KD_a και 40-47KD_a που συμμετέχουν στη διαδικασία συσώρευσης και έκλυσης, αλλά σχετικά πρόσφατα διαπιστώθηκε πως επισυμβαίνει μιας μικρής διάρκειας φωσφορυλίωση των εν λόγω πρωτεϊνών όταν τα αιμοπετάλια ενεργοποιούνται από ADP (45, 75). Το ADP διαγείρει επίσης τον μεταβολισμό των πολυφωσφοϊνοσιπιδίων μέσω της ενεργοποίησης της φωσφολιπάσης C και πιθανόν, μέσω αναστολής της σύνθεσης της 4,5 διφωσφορικής φωσφατιδυλινοσιτόλης (49, 192, 193, 264). Όλα αυτά τα φαινόμενα λαμβάνουν χώρα, χωρίς την ενεργοποίηση της οδού του αραχιδονικού οξέος και χωρίς ουσιαστικά αποδέσμευση του περιεχομένου των κοκκίων (αντίδραση έκλυσης).

Η συσώρευση και αντίδραση έκλυσης των αιμοπεταλίων από κολλαγόνο περιλαμβάνει δυο σημαντικά κι αναπόδραστα βήματα:

- α) Την πρόσφυση των αιμοπεταλίων στις ίνες του κολλαγόνου και
- β) Τη δράση παραγόντων όπως η θρομβοξάνη A₂, το ADP και η σεροτονίνη, οι οποίοι σχηματίζονται ή απελευθερώνονται από τα προσφυόμενα στις κολλαγονικές ίνες αιμοπετάλια και μεγεθύνουν την αντίδραση, διαγείροντας τα αιμοπετάλια του γύρω χώρου που είναι ακόμη ανέπαφα και αδρανή (121).

Η θρομβίνη και ο PAF προωθούν την αιμοπεταλική συσώρευση και έκλυση, ανεξάρτητα από τη δημιουργία προϊόντων του μεταβολισμού του αραχιδονικού οξέος και ανεξάρτητα της απελευθέρωσης ADP και σεροτονίνης. Η θρομβίνη προκαλεί ενεργοποίηση της φωσφολιπάσης C και τον συνακόλουθο σχηματισμό τριφωσφορικής ινοσιτόλης (IP₃) και 1,2 διακυλγλυκερόλης, με συνέπεια την φωσφορυλίωση των πρωτεϊνών 20 και 47KD_a, που ακολουθείται από την αντίδραση έκλυσης και την συσώρευση των αιμοπεταλίων. Στις παραγράφους που έπονται γίνεται μια συνοπτική παρουσίαση των χαρακτηριστικών της αιμοπεταλικής αντίδρασης, σε συνάρτηση με τις τρεις οδούς μέσω των οποίων μπορεί να πραγματοποιηθεί.



α. Μεταβολική ενέργεια

Τα αιμοπετάλια εκτός από την ενέργεια που απαιτούν για την διατήρησή τους στη ζωή, έχουν ανάγκη και ενός έκτακτου ενεργειακού ποσού υπό μορφή ATP για την πρόσληψη και αποδέσμευση σεροτονίνης, την ενεργό μεταφορά Καλίου, την εξαγωγή ψευδοποδίων και την μεταβολή του σχήματός τους, την αντίδραση έκλυσης του περιεχομένου των κοκκίων τους, την συσσώρευση και τέλος την συστολή τους, που οδηγεί στην συστολή του αιμοπεταλιακού θρόμβου (153, 188, 216, 217, 105, 218, 194, 72). Τα αιμοπετάλια εξάγουν την απαιτούμενη για τις λειτουργίες τους ενέργεια από το γλυκογόνο και τη γλυκόζη, μέσω της γλυκολυτικής αλυσίδας και της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης.

Τα νουκλεοτίδια της αδενίνης που αποτελούν το βασικό υπόστρωμα για την σύνθεση του ATP, βρίσκονται αποθηκευμένα μέσα σε δύο κύρια διαμερίσματα του αιμοπεταλιακού κυττάρου:

- α) Στα πυκνά κοκκία τα οποία περιέχουν κυρίως νουκλεοτίδια, τα οποία προορίζονται για αποδέσμευση στο αιματικό περιβάλλον και
- β) Στο κυτταρόπλασμα, στα μιτοχόνδρια και στο δίκτυο των μεμβρανών.

Το πρώτο διαμέρισμα θεωρείται αδρανές για την παραγωγή του ATP, ενώ το δεύτερο διαμέρισμα είναι εκείνο το οποίο συμμετέχει άμεσα στην παραγωγή του. Έχει δείχθει ότι μεταξύ των δύο αυτών διαμερισμάτων υπάρχει μια βραδεία ανταλλαγή αδενινικών νουκλεοτιδίων (134, 135). Όταν τα αιμοπετάλια διεγερθούν τότε το περιεχόμενό τους σε ATP μειώνεται σημαντικά, μέσα κίολας στα πρώτα δευτερόλεπτα από την στιγμή της ενεργοποίησής τους.

Ταυτόχρονα παρατηρείται μια μείωση του περιεχομένου τους σε γλυκογόνο, το οποίο, όπως έχουμε ήδη προαναφέρει, βρίσκεται αποθηκευμένο στα αντίστοιχα κοκκία. Αν τα αιμοπετάλια στερηθούν την γλυκόζη, τότε έχει αποδειχθεί ότι είναι ανίκανα να αντιδράσουν στη θρομβίνη (42, 154, 153).

Κατά την ενεργοποίησή τους τα αιμοπετάλια παρουσιάζουν το φαινόμενο της εκρηκτικής αναπνοής, πράγμα που δηλώνει ότι η κατανάλωση οξυγόνου εκ μέρους τους αυξάνεται (43, 154). Αν η οξειδωτική φωσφορυλίωση παρεμποδιστεί μέσω του αντιβιοτικού αντιμυκίνη που χορηγείται στο αιμοπεταλιακό εναιώρημα πριν από την προσθήκη της γλυκόζης, τότε η αντίδραση των αιμοπεταλίων είναι υποτονική ή λείπει εντελώς (43, 153, 154). Η γλυκολυτική αλυσίδα φαίνεται ότι



από μόνη της δεν μπορεί να παράγει την ποσότητα ενέργειας που απαιτείται για την αντίδραση έκλυσης και συσσώρευσης των αιμοπεταλίων.

Πράγματι, τα αιμοπετάλια στα οποία έχει ανασταλεί η οξειδωτική φωσφορύλιωση ενώ η γλυκόλυση είναι ανέπαφη, δεν είναι ικανά να αντιδράσουν φυσιολογικά στις δράσεις των διάφορων αγωνιστών. Συνεπώς η ενεργειακή συνιστώσα της αιμοπεταλιακής λειτουργίας βασίζεται κατά τα φαινόμενα κυρίως στα μιτοχόνδρια και είναι "conditio sine qua non" για την εκτύλιξη των φαινομένων, που απαρτίζουν την αντίδραση των κυττάρων αυτών στους διάφορους διεγέρτες τους. Προφανώς το ATP, είναι απαραίτητο και για το σχηματισμό των διαφόρων ενδογενών μεσολαβητών της αιμοπεταλιακής αντίδρασης (153).

β. Η οδός του αραχιδονικού οξέος

Όταν τα αιμοπετάλια έρθουν σε επαφή με ίνες κολλαγόνου ή αλληλεπιδράσουν με διάφορους άλλους αγωνιστές τους, όπως μικρές ποσότητες θρομβίνης, τότε ενεργοποιούνται και η ένταση της απάντησής τους βρίσκεται σε σχέση με τη συγκέντρωση του δρώντος αγωνιστή. Γενικότερα, όταν ένας αγωνιστής δράσει πάνω στο μεμβρανικό του υποδοχέα ενεργοποιούνται οι φωσφολιπάσες της μεμβράνης. Η φωσφολιπάση C είναι δυνατόν να ενεργοποιηθεί χωρίς την παρουσία ιόντων Ca^{2+} και να καταλύσει την υδρόλυση της 2, 4 διφωσφορικής φωσφατιδυλινοσιτόλης (PIP_2) προς 1, 4, 5 τριφωσφορική ινοσιτόλη (IP_3) και 1, 2 διακυγλυκερόλη. Η σχηματιζόμενη 1, 2 διακυγλυκερόλη, υφίσταται τη δράση μιας διγλυκερικής λιπάσης και κατόπιν μιας μονογλυκερικής λιπάσης οι οποίες απελευθερώνουν αραχιδονικό οξύ (46, 163, 10). Ταυτόχρονα η IP_3 προκαλεί μια αύξηση στο ενδοαιμοπεταλιακό ασβέστιο το οποίο ενεργοποιεί με τη σειρά του τη φωσφολιπάση A_2 , η οποία εξαγεί περαιτέρω αραχιδονικό οξύ από τα φωσφολιπίδια της μεμβράνης και ειδικότερα από τη φωσφατιδυλινοσιτόλη, τη φωσφατιδυλχολίνη και τη φωσφατιδυλαιθανολαμίνη (25, 24, 37, 265, 264).

Το αραχιδονικό οξύ που απελευθερώνεται υφίσταται τη δράση δύο ενζύμων:

- 1) Της λιποξυγενάσης, που το μετατρέπει σε 12 ΗΡΕΤΕ (12-1-υδροϋπεροξυ-5, 8, 10, 14-εικοσιτετραενοϊκό οξύ), το οποίο εν συνεχεία μετασχηματίζεται σε 12-ΗΕΤΕ (12-1-υδροξυ-5, 8, 10, 14-εικοσιτετραενοϊκό οξύ) και



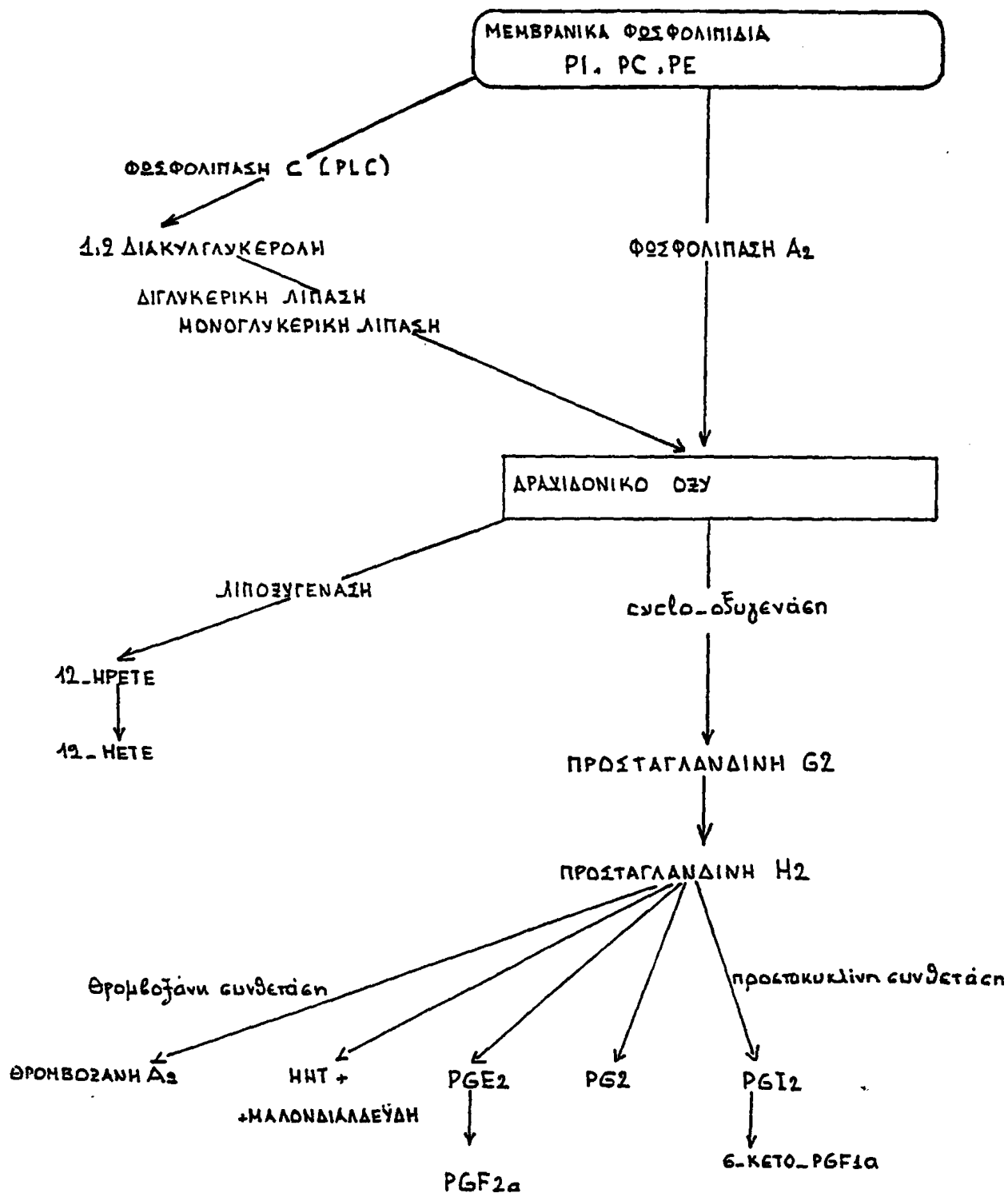
- 2) Της κυκλοξυγενάσης, η οποία μετατρέπει το αραχιδονικό οξύ σε δυο βραχύβιες προσταγλανδίνες (κυκλικά ενδοϋπεροξειδία), τις PGG₂ και PGH₂.

Όσον αφορά τα δυο προϊόντα της λιποξυγενάσης, το 12 HPETE και 12 HETE, δεν φαίνεται να εξασκούν κάποια συγκεκριμένη δράση με άμεσα αποτελέσματα πάνω στα αιμοπετάλια. Ωστόσο και τα δύο έχουν χημειοτακτικές ιδιότητες ενώ το 12 HPETE μπορεί και αναστέλλει την αιμοπεταλιακή κυκλοξυγενάση (274). Από την άλλη μεριά, τα δύο προϊόντα της κυκλοξυγενάσης, δηλαδή οι προσταγλανδίνες PGG₂ και PGH₂, μπορούν να μεταβολιστούν περαιτέρω από μια ποικιλία ενζύμων και να καταλήξουν σε άλλα προϊόντα. Για παράδειγμα τα δύο αυτά κυκλικά ενδοϋπεροξειδία, μπορούν να μετατραπούν από την θρομβοξάνη-συνθετάση σε θρομβοξάνη A₂ η οποία είναι πολύ ασταθής και βραχύβια και μετατρέπεται γρήγορα σ'ένα τελικό αδρανές προϊόν, την θρομβοξάνη B₂. Μπορούν ακόμη να μετατραπούν σε HHT (12, 1-υδροξυ-5, 8, 10-δεκαεπτατριενικό οξύ) και MDA (μαλονδιαλδεϋδη), σε PGE₂, PGF_{2a} και PGD₂. Στο ενδοθήλιο των αγγείων τα προσταγλανδινικά ενδοϋπεροξειδία που προέρχονται από το αραχιδονικό οξύ, μπορούν να μετατραπούν μέσω της προστακυκλίνη-συνθετάσης σε PGI₂ (προστακυκλίνη), η οποία είναι κι αυτή βραχύβια και μετατρέπεται γρήγορα σε 6-κετο-PGF_{1a} (213). Οι προσταγλανδίνες PGG₂ και PGH₂, μπορούν να προκαλέσουν τόσο την αντίδραση έκλυσης, όσο και την αντίδραση συσσώρευσης, ενώ η θρομβοξάνη A₂ είναι μια ισχυρότατη ουσία που συσσωρεύει τα αιμοπετάλια και προκαλεί αντίδραση έκλυσης, ενώ ταυτόχρονα συσπά τα αγγεία (193). Όλα τα προσταγλανδινικά ενδοϋπεροξειδία, όπως επίσης και η θρομβοξάνη A₂ έχουν έναν κοινό υποδοχέα στην πλασματική αιμοπεταλιακή μεμβράνη (171). Ωστόσο ο ρόλος των προσταγλαδινών δεν είναι μόνον ρόλος διεγέρτη. Έτσι η PGD₂, αναστέλλει τη συσσώρευση των αιμοπεταλίων ενεργοποιώντας την αδενολκυκλάση, η οποία αυξάνει τα επίπεδα του κυκλικού AMP, που με τη σειρά του αναστέλλει την ενεργούμενη από διάφορους αγωνιστές αιμοπεταλιακή συσσώρευση. Κατ'ανάλογο τρόπο δρα και η προστακυκλίνη PGI₂, η οποία σχηματίζεται στα ενδοθήλια του αγγειακού τοιχώματος (213).

Η αναστολή της αιμοπεταλιακής κυκλοξυγενάσης με τη χρήση μη στεροειδών αντι-φλεγμονωδών φαρμάκων (π.χ. ασπιρίνη ή ινδομεθακίνη), εμποδίζει τη μετατροπή του αραχιδονικού οξέος σε προσταγλανδινικά ενδοϋπεροξειδία και θρομβοξάνη A₂, προκαλώντας και αναστολή της αιμοπεταλιακής αντίδρασης συσσώρευσης έναντι διαφόρων αγωνιστών όπως π.χ. αραχιδονικό νάτριο,



κολλαγόνο, θρομβίνη ή επίνεφρίνη σε μικρές συγκεντρώσεις και ADP, σε μέσο που περιέχει χαμηλή συγκέντρωση ιόντων Ca^{2+} (221, 283). Η οδός του αραχιδονικού οξέος εκτίθεται σχηματικά στην παρακάτω εικόνα .



γ. Η οδός του ADP

Η οδός ενεργοποίησης της αιμοπεταλιακής συσσώρευσης από το ADP εμπεριέχει μια σειρά περίπλοκων φαινομένων που αφορούν κατ'αρχάς τη μεμβράνη των αιμοπεταλίων. Ήδη από τις αρχές της δεκαετίας του 1960 ο Haslam απέδειξε, ότι τα ενζυμικά συστήματα που αποσυνθέτουν το εξωκυττάριο ADP, όπως επίσης κι εκείνο που απελευθερώνεται από τα αιμοπεταλιακά κοκκία, προκαλούν αναστολή της συσσώρευσης της ενεργούμενης από διάφορους αγωνιστές, μέσα στους οποίους συγκαταλέγεται η θρομβίνη σε χαμηλές συγκεντρώσεις όπως επίσης και το κολλαγόνο, οδηγώντας στην υπόθεση ότι το ADP αποτελούσε το βασικό μεσολαβητή της δράσης των ουσιών αυτών. Σήμερα έχει γίνει σαφές ότι το ADP είναι ένας από τους παράγοντες που συνεισφέρουν στην αντίδραση των αιμοπεταλίων, η οποία πυροδοτείται από τους αγωνιστές αυτούς και ότι τα προσταγλανδινικά ενδοϋπεροξειδία όπως και η θρομβοξάνη A_2 , είναι απαραίτητοι παράγοντες για την ανάπτυξη της εν λόγω αντίδρασης (153). Ο Borst υπέδειξε, ότι υπάρχει ένας ειδικός υποδοχέας για το ADP στα αιμοπετάλια. Οι πρώτες μελέτες που έγιναν για την κατανόηση της λειτουργίας του υποτιθέμενου αυτού υποδοχέα με τη χρησιμοποίηση ραδιενεργού ADP υπέδειξαν, ότι το [^{14}C] ADP που προστίθεται σε PRP, μετατρέπεται πιθανώς σε [^{14}C] αδενοσίνη και η ραδιενέργεια που εμφανίζουν τα αιμοπετάλια, είναι αποτέλεσμα της πρόσληψης της ραδιενεργού αδενοσίνης απ'αυτά (230).

Η μελέτη της πρόσληψης του ραδιενεργού [^{14}C] ADP από τις μεμβράνες των αιμοπεταλίων επί 60 λεπτά, απέδειξε ότι η πρόσληψη της ραδιοσημασμένης ουσίας αναστέλεται από τη χορήγηση μορίων τα οποία είναι δομικά ανάλογα του ADP και συνεπώς μπορεί να ανταγωνίζονται για την κατοχή του κοινού μεμβρανικού υποδοχέα. Τα διάφορα μοντέλα που κατά καιρούς έχουν προταθεί για να ερμηνεύσουν τη δράση του ADP στα αιμοπετάλια βασίζονται κατά κύριο λόγο στην παρατήρηση ότι το ADP αναστέλει μια ATPάση συνδεδεμένη με κάποια συσταλή πρωτεΐνη της αιμοπεταλιακής μεμβράνης. Έτσι έχει δειχθεί ότι το ADP αναστέλει μια εκτοATP-άση της μεμβρανικής επιφάνειας (50), με αποτέλεσμα τα αιμοπετάλια να μην μπορούν να παραμείνουν ασυγκόλητα. Δηλαδή, η λειτουργία της πρωτεΐνης αυτής συνδέεται άμεσα με τη διατήρηση των αιμοπεταλίων σε κατάσταση μη συγκόλησης. Έχει ακόμη υποδειχθεί, ότι η αναστολή της εν λόγω ATPάσης από το ADP, επιφέρει την ανπιστρεπτή αποσύνδεση μιας συσταλής πρωτεΐνης, η οποία στα εν ηρεμία αιμοπετάλια ενσωματώνεται στο σύμπλεγμα ακτίνης και μυοσίνης. Όταν κατασταλεί η ATPάση,



τότε η συσταλή πρωτεΐνη αποσυζευγνύεται, με αποτέλεσμα οι ακτινο-μυοσίνες των εφαπτόμενων αιμοπεταλίων να συνδέονται μεταξύ τους για να δημιουργήσουν το συσταλτό υπερ-κυτταρικό συγκρότημα, που είναι ο λευκός θρόμβος (34). Εκτός από την προαναφερθείσα ΑΤΡάση, υπάρχει επίσης κι ένα άλλο ένζυμο - μια νουκλεοσίδιο-διφωσφορική-κινάση - το οποίο βρίσκεται στην εξωτερική επιφάνεια των αιμοπεταλίων και το οποίο φαίνεται να αλληλεπιδρά με το εξωγενές ADP. Η κατανόηση του ρόλου τού ενζύμου αυτού βρίσκεται ακόμη στο πεδίο της εικασίας. Το 1971 είχε βρεθεί ότι, όταν τα αιμοπετάλια επωαζόταν με [^{14}C] ADP τότε, μέσα σε 5-10 λεπτά περισσότερο από 20% της συνολικής ραδιενέργειας ανευρισκόταν σαν [^{14}C] ADP πράγμα που σήμαινε ότι λάμβανε χώρα μεταφορά μιας φωσφορικής ρίζας προς το ραδιενεργό ADP. Δοθέντος ότι στα πειράματα αυτά η μοναδική πηγή φωσφορικών ριζών ήταν τα αιμοπετάλια, διατυπώθηκε η εύλογη υπόθεση ότι, η μεταφορά της φωσφορικής ρίζας προς το ADP αποτελούσε μια αντίδραση μεγάλης σημασίας για τη διατήρηση κατ'αρχάς του φυσιολογικού σχήματος των αιμοπεταλίων, εφόσον το ADP μετατρέπόμενο σε ΑΤΡ, απέσυρε την αναστολή της μεμβρανικής ΑΤΡάσης. Μέσα στις πιθανές υποθέσεις που προτάθηκαν για τη σκιαγράφιση του όλου μηχανισμού θεωρήθηκαν και τα εξής σημεία (219, 221):

- 1) Η αντίδραση φωσφορυλίωσης του ADP προς ΑΤΡ έπρεπε κατά έναν τρόπο να συνδέεται με την παραγωγή του κυκλικού AMP και συνεπώς με τη διακίνηση του αιμοπεταλιακού ασβεστίου και τη λειτουργία της συσταλής αιμοπεταλιακής πρωτεΐνης που προαναφέρθηκε.
- 2) Η αντίδραση αυτή επηρεάζει την ανταλλαγή των φωσφορικών ομάδων της φωσφατιδυλινοσιτόλης και μεταβάλλει τη μεταφορά ιόντων και ειδικότερα Ca^{2+} διαμέσου των μεμβρανών των αιμοπεταλιακών κυττάρων.
- 3) Η εκτροπή του ΑΤΡ από διάφορα σημεία της μεμβράνης, όπου χρησιμοποιείται για τη διατήρηση της συσταλής αυτής πρωτεΐνης σε κατάσταση συστολής, φαίνεται ότι οδηγεί στη συσσώρευση των αιμοπεταλίων (51).

Η ύπαρξη της δραστηριότητας αυτής στις μεμβράνες των αιμοπεταλίων (πλασματικές κατ'αρχάς μεμβράνες), έχει αποδειχθεί από μια ομάδα ερευνητών και επιβεβαιώθηκε από άλλους, τόσο για τα ανθρώπινα αιμοπετάλια όσο και για εκείνα διαφόρων άλλων ανώτερων ειδών (90, 180).



Οι μελέτες αυτές όμως δεν έδωσαν μια τελική απόδειξη ότι η εν λόγω νουκλεοσιδίο-διφωσφορική κίνηση (NDK) αποτελεί, ή όχι, τον υποδοχέα μέσω του οποίου το ADP προκαλεί την αιμοπεταλιακή συσσώρευση. Η υπόθεση ότι η NDK αποτελεί τον υποδοχέα του ADP προσκρούει σε διάφορα επιχειρήματα, βασισμένα στα εξής δεδομένα:

- 1) Η NDK μπορεί να απομακρυνθεί από τα αιμοπετάλια μέσω έκπλυσης.
- 2) Η δραστηριότητα της NDK συνεχίζει να υπάρχει και μετά τη συσσώρευση των αιμοπεταλίων, όπως και κατά τη διάρκεια της αποσυσσώρευσής τους.
- 3) Το EDTA, παρά του ότι αναστέλει την επαγόμενη από το ADP συσσώρευση και τη δραστηριότητα της NDK, δεν εμποδίζει τη μεταβολή του σχήματος των αιμοπεταλίων.

Ωστόσο έχει βρεθεί ότι η επανάληψη των εκπλύσεων των αιμοπεταλίων, δεν απομακρύνει όλη την ποσότητα της NDK οπότε αφήνεται ανοιχτή η δυνατότητα μιας αρχικής αλληλεπίδρασης μεταξύ NDK και ADP, η οποία "πυροδοτεί" τη μετέπειτα αντίδραση. Επιπρόσθετα έχει βρεθεί ότι ακόμη και παρουσία του EDTA, η NDK εξακολουθεί να επιδεικνύει κάποια υπολλεψιατική δραστηριότητα.

Όσον αφορά την υπόθεση ότι το ADP προκαλεί την αιμοπεταλιακή συσσώρευση μειώνοντας τα επίπεδα του cAMP, υπάρχουν ακόμη ερωτηματικά. Το 1971 προτάθηκε ότι το ADP πιθανώς δρα αναστέλοντας την αιμοπεταλιακή αδενυλ-κυκλάση. Η υπόθεση αυτή βασίστηκε στην παρατήρηση ότι το ADP καταστέλει την αύξηση του cAMP που προκαλείται από την PGE₁. Ωστόσο η ίδια ομάδα ερευνητών τα επόμενα χρόνια, αλλά και άλλοι, δεν κατόρθωσαν να παρατηρήσουν κάποια σημαντική μείωση του περιεχομένου στα αιμοπετάλια cAMP κατόπιν διέγερσής τους με ADP, καταλήγοντας στο συμπέρασμα ότι το βασικό επίπεδο του cAMP στα αιμοπετάλια δεν κατέχει ρυθμιστικό ρόλο για τη συσσώρευσή τους, είτε από το ADP, είτε από άλλες συσσωρευτικές ουσίες (116, 115).

δ. Η οδός του παράγοντα ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων (PAF)

Ο παράγοντας ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων (PAF, PAF-acether, AGEPC), είναι ένα γλυκεριναιθερικό λιποειδές το οποίο αρχικά περιγράφηκε από τον Benveniste (1972) και τους συνεργάτες του. Οι ερευνητές αυτοί



παρατήρησαν ότι, όταν τα ευαισθητοποιημένα με IgE βασεόφιλα του κουνελιού διαγειρόταν από ένα αντιγόνο τότε αποδέσμευαν κάποια ουσία η οποία ενεργοποιούσε τα αιμοπετάλια. Κατόπιν βρέθηκε από διάφορους ερευνητές, ότι ο PAF παράγεται από τα μακροφάγα, από τα πολυμορφοπύρρηνα λευκοκύτταρα, από τα αιμοπετάλια και τα ηωσινόφιλα (33, 32, 56, 52, 172, 186, 293). Ο PAF δεν υπάρχει στα κύτταρα όταν αυτά βρίσκονται σε κατάσταση ηρεμίας, αλλά παράγεται όταν υποστούν μια κατάλληλη διέγερση. Τα αιμοπετάλια του κουνελιού παράγουν μεγάλες ποσότητες του παράγοντα όταν διεγερθούν από θρομβίνη, αλλά η αντίστοιχη παραγωγή των ανθρώπινων αιμοπεταλίων φαίνεται αρκετά μικρότερη. Οι Δημόπουλος, Benveniste και οι συνεργάτες τους ανέφεραν ότι ο PAF συντίθεται με βάση μια αλκύλ-ακύλ-γλυκερύλ-φωσφορυλχολίνη, πάνω στην οποία δρα η φωσφολιπάση A_2 και ακολουθεί ακετυλίωση μέσω του ακετύλ-συνενζύμου A. Η ικανότητα των αιμοπεταλίων να αντιδρούν στον PAF, εξαρτάται από το είδος από το οποίο προέρχονται τα αιμοπετάλια. Έτσι τα αιμοπετάλια του κουνελιού εμφανίζονται εξαιρετικά ευαίσθητα στον PAF, τα ανθρώπινα αιμοπετάλια είναι πολύ πιο ανθεκτικά και για να ενεργοποιηθούν απαιτούν πολύ μεγαλύτερες ποσότητες PAF, ενώ τα αιμοπετάλια των επιμύων εμφανίζονται "αδιάφορα" έναντι του εν λόγω αγωνιστή κατά μερικούς ερευνητές, αλλά κατ'άλλους συσσωρεύονται (92, 126, 245). Θάπρεπε ωστόσο να υπογραμμισθεί ότι ο PAF που χρησιμοποίησαν οι δεύτεροι περιείχε κάποιες προσμίξεις. Πρέπει να αναφερθεί ότι η ανταπόκριση των αιμοπεταλίων στον PAF είναι ανεξάρτητη από την απελευθέρωση του ADP και το σχηματισμό της θρομβοξάνης A_2 (12, 47, 127, 249, 273, 315). Σήμερα θεωρείται ότι ο δρόμος ενεργοποίησης που ακολουθεί το αιμοπετάλιο όταν διαγείρεται από τον PAF είναι ανεξάρτητος από τους δρόμους του αραχιδονικού οξέος και του ADP και ότι οι εμπλοκές των τριών αυτών οδών, είναι αποτέλεσμα εσωτερικών τους διασυνδέσεων που μπορούν να διακοπούν (315). Δεν είναι ακόμη σίγουρο αν ο PAF δρα σαν ενδογενής μεσολαβητής της αιμοπεταλιακής αντίδρασης, παρά το γεγονός ότι τα αιμοπετάλια φαίνεται ότι τον βιοσυνθέτουν κάτω από τη δράση κατάλληλων ερεθισμάτων (239, 128, 168, 269).

ε. Σεροτονίνη

Η σεροτονίνη ανευρίσκεται στα αιμοπετάλια σε σχετικά υψηλές ποσότητες. Η ουσία αυτή συγκεντρώνεται μέσα στα αιμοπεταλιακά κοκκία (κατά πρώτο λόγο στα πυκνωτικά και εν συνεχεία στα άλφα κοκκία), όπου σχηματίζει σύμπλοκα με



νουκλεοτίδια της αδενίνης όπως επίσης με ιόντα, σαν το ασβέσπο. Η σεροτονίνη συσσωρεύεται στα αιμοπετάλια - ενάντια σε κλίση συγκέντρωσης - με ενεργό μεταφορά, η οποία είναι συζευγμένη με τη διακίνηση του νατρίου και προφανώς καταναλώνει ενέργεια υπό μορφή ATP (122, 35, 285). Η σεροτονίνη μπορεί και διαχέεται από τα αιμοπετάλια προς το μέσο στο οποίο βρίσκονται εμβαπτισμένα, όπως επίσης ανταλλάσσεται ελεύθερα με τη σεροτονίνη του μέσου αυτού (34, 137, 196). Όταν τα αιμοπετάλια ενεργοποιηθούν, τότε οι περιεχόμενες στα κοκκία αμίνες όπως επίσης και η σεροτονίνη, αποδεσμεύονται στο αιματικό περιβάλλον και μεγενθύνουν τη διέγερση. Τα αιμοπετάλια ανταποκρίνονται στη σεροτονίνη κατά διαφόρους τρόπους:

- 1) Ένα τμήμα της σεροτονίνης που αποδεσμεύεται επιστρέφει πίσω στο αιμοπετάλιο, από τους υποδοχείς που ενεργούν την πρόσληψή της.
- 2) Τα αιμοπετάλια μπορούν να συσσωρευθούν από τη σεροτονίνη, αλλά ο βαθμός της συσσώρευσης εξαρτάται από το ζωικό είδος απ'το οποίο προέρχονται. Ο υποδοχέας της αιμοπεταλιακής μεμβράνης που υπεισέρχεται στην ενεργοποίηση από σεροτονίνη, είναι του τύπου 5HT₂ και διαφέρει από εκείνον ο οποίος ευθύνεται για την πρόσληψη της ουσίας αυτής (80).
- 3) Η σεροτονίνη πιθανόν παίζει κι έναν ρόλο μεγέθυνσης της αιμοπεταλιακής ανταπόκρισης στο κολλαγόνο, την επινεφρίνη, το ADP και την νορ-επινεφρίνη, αλλά αυτό εξαρτάται από τη συγκέντρωση των αγωνιστών και το χρονικό διάστημα μεταξύ των διαδοχικών διεγέρσεων.
- 4) Συμβαίνει, στα αιμοπετάλια ορισμένων ειδών να μην παρατηρείται συσσώρευση ακόμη κι όταν η σεροτονίνη χορηγείται σε μεγάλες συγκεντρώσεις, αλλά όταν η ουσία αυτή προστίθεται μαζί με άλλους αγωνιστές, όπως η επινεφρίνη, τότε επέρχεται έντονη συσσώρευση, πράγμα που δηλώνει ότι η συνέργεια των δύο ουσιών είναι απαραίτητη για την πραγματοποίηση διαφόρων αντιδράσεων των αιμοπεταλιακών κυττάρων (7).
- 5) Η φαρμακευτική ουσία κετανσερίνη που αποτελεί έναν εκλεκτικό ανταγωνιστή της 5-HT στον εγκεφαλικό ιστό, αναστέλει τη μεγεθυντική δράση της σεροτονίνης πάνω στην αιμοπεταλιακή αντίδραση που προκαλείται από κολλαγόνο, ADP, ή επινεφρίνη και επιφέρει πλήρη αναστολή της αιμοπεταλιακής συσσώρευσης, όταν αυτή πραγματοποιείται μόνο μέσω της σεροτονίνης. Η συνέργεια μεταξύ σεροτονίνης κι άλλων



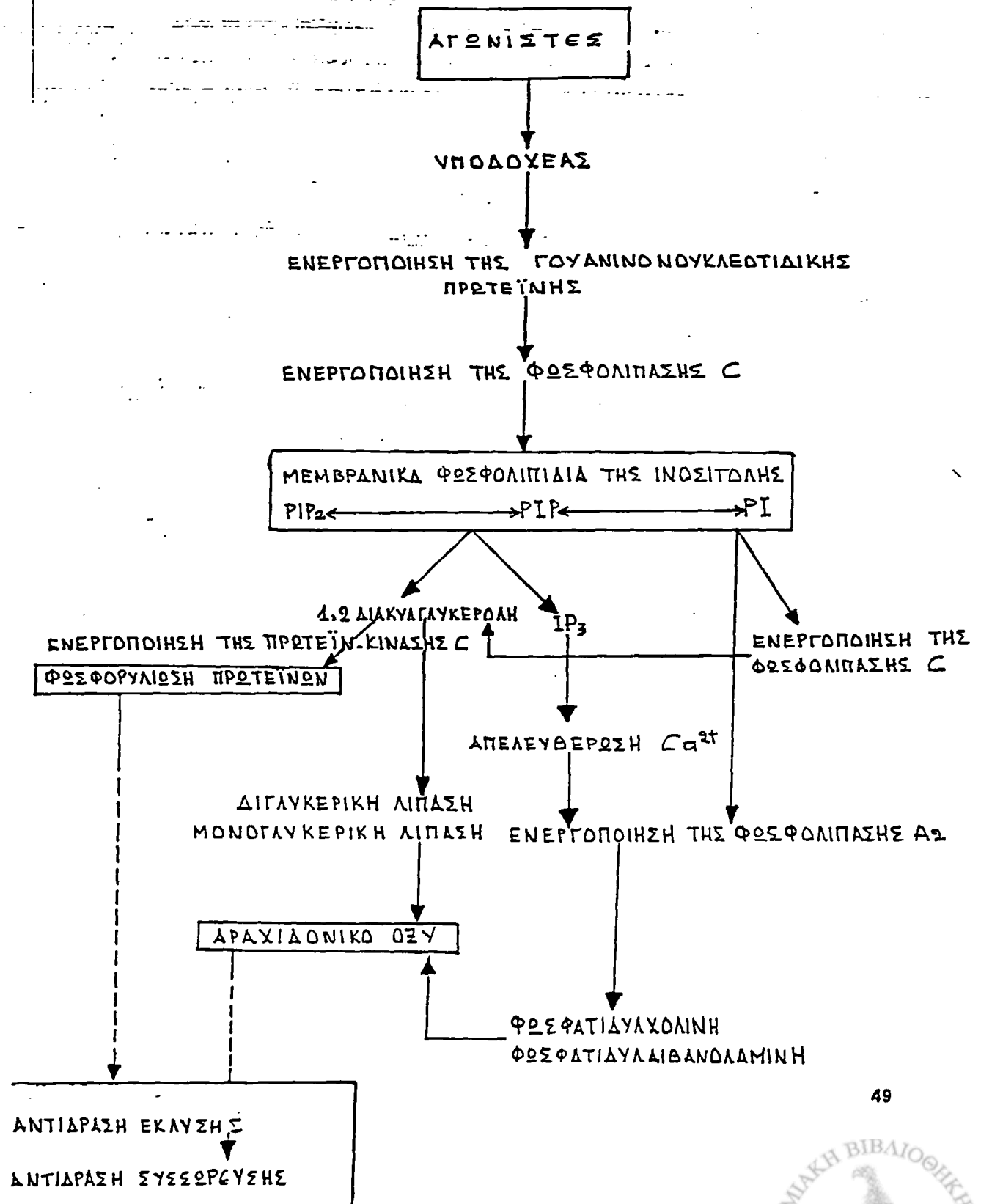
αγωνιστών είναι περίπλοκη. Τα αιμοπετάλια που έχουν κορεστεί με 5-ΗΤ, δεν ενεργοποιούνται από επινεφρίνη. Επιπλέον τα αιμοπετάλια που έχουν επωαστεί επί μακρόν με σεροτονίνη, παρουσιάζουν πτώση της ικανότητάς τους να ανταποκρίνονται σε άλλους αγωνιστές όπως τα προσταγλανδινικά ενδοϋπεροξειδία, το κολλαγόνο, το ADP, η θρομβίνη και η αντιδιουρητική ορμόνη (153).

στ. Ο μεταβολισμός των φωσφοϊνοσιπιδίων και η φωσφορυλίωση πρωτεϊνών

Ήδη από το 1953 είχε παρατηρηθεί ότι ο μεταβολισμός των φωσφολιπιδίων υπεισέρχεται στις αντιδράσεις των κυττάρων από τη δράση διαφόρων ερεθισμάτων (132). Είχε για παράδειγμα δειχθεί, ότι διάφοροι εκκριτικοί ιστοί, όπως το πάγκρεας όταν διαγείρονται από ακετυλχολίνη εμφανίζουν μια ταχεία αποικοδόμηση ακολουθούμενη από ανασύνθεση της φωσφατιδυλινοσιτόλης. Εφ'όσον η φωσφατιδολινοσιτόλη αποτελούσε το πλέον ανιχνευόμενο φωσφοϊνοσιτίδιο, οι περισσότερες από τις έρευνες αυτές στράφηκαν αρχικά προς τη μελέτη των μεταβολών του εν λόγω φωσφολιπιδίου. Μια σειρά άλλων ερευνών έδειξε ότι η επώαση ιστών ή κυττάρων με ραδιενεργό φωσφόρο ^{32}P , οδηγεί σε μια ταχεία εμφάνιση της ραδιενέργειας στο φωσφατιδικό οξύ (PA), στη φωσφατιδυλινοσιτόλη (PI), στη 4-φωσφορική φωσφατιδυλινοσιτόλη (PIP) και στην 4, 5 διφωσφορική φωσφατιδυλινοσιτόλη (PIP₂). Το φαινόμενο αποδόθηκε στην ταχεία ανταλλαγή των φωσφορικών τμημάτων των φωσφολιπιδίων αυτών (275, 175, 132, 133, 66, 147). Δοθέντος ότι η αύξηση της ραδιενέργειας που περνά στο PA και στην PI συμβαίνει όταν τα κύτταρα διαγείρονται, είναι λογικό να θεωρηθεί ότι οι αλλαγές του μεταβολισμού των φωσφολιπιδίων μπορεί να αντιπροσωπεύουν σημαντικά βήματα ενός αριθμού φυσιολογικών διεργασιών, όπως τα φαινόμενα έκκρισης, η αποπόλωση των νευρικών κυττάρων, η φαγοκυττάρωση εκ μέρους των λευκών αιμοσφαιρίων και η αντίδραση συσσώρευσης και έκλυσης των αιμοπεταλίων (66, 133, 181, 182, 183). Οι μεταβολές των πολυφωσφοϊνοσιπιδίων που συνυπάρχουν στις ποικίλες αυτές αντιδράσεις θεωρείται ότι συζευγνύονται με αλλαγές της μεμβρανικής διαπερατότητας στο νάτριο και το κάλιο, όπως επίσης και στην απόδοση του ασβεστίου (147, 87, 131, 208).

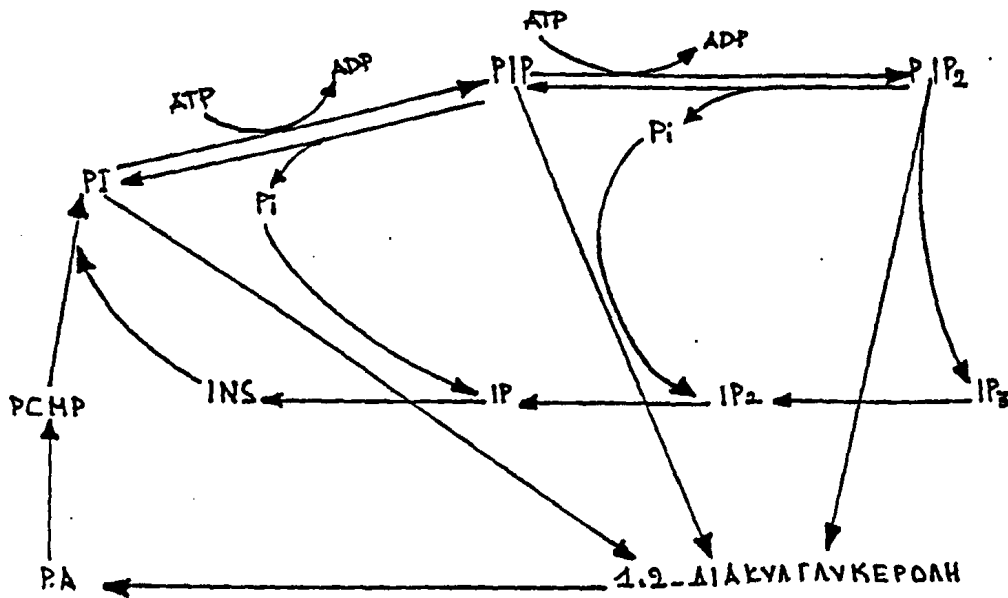


Σχήμα 1. Διάγραμμα ροής στο οποίο φαίνονται οι σχέσεις του μεταβολισμού των φωσφοϊνοσιτιδίων, της ενεργοποίησης της αραχιδονικής οδού και της φωσφορυλίωσης των πρωτεϊνών.



Σχήμα 2.

Δρόμοι του μεταβολισμού των πολυφωσφοϊνοσιπιδίων PI: Φωσφατιδυλινοσιτόλη, PIP: 4-Φωσφορική φωσφατιδυλινοσιτόλη, PIP₂: 4, 5-Διφωσφορική φωσφατιδυλινοσιτόλη, PA: Φωσφατιδικό οξύ, PCMP: Μονοφωσφορική φωσφατιδυλ-καπιδίνη, INS: ινοσιτόλη, IP: 1-Μονοφωσφορική ινοσιτόλη, IP₂: 1, 4-Διφωσφορική ινοσιτόλη, IP₃: 1, 4, 5 Τριφωσφορική ινοσιτόλη



Όσον αφορά τα αιμοπετάλια έχει δείχθει ότι, όταν αυτά συσσωρεύονται με ADP σε ένα μέσον που περιέχει ασβέστιο, χωρίς την αντίδραση έκλυσης, τότε η PIP_2 εμφανίζει ελάττωση μέσα στο αιμοπεταλιακό κύτταρο (176, 323, 176). Όμως όταν τα αιμοπετάλια συσσωρεύονται από ADP δεν εμφανίζουν αντίδραση έκλυσης (ή την εμφανίζουν πολύ περιορισμένη) και δεδομένου ότι η αποικοδόμηση της PIP_2 από την φωσφολιπάση C με συνακόλουθο σχηματισμό IP_3 και 1, 2-διακυλγλυκερόλης συνδέεται με την αντίδραση έκλυσης, είναι λογικό να υποθέσει κανείς ότι η μείωση της PIP_2 οφείλεται στη δράση μιας φωσφομονοεστεράσης και μιας PIP κινάσης, οι οποίες ρυθμίζουν την ανταλλαγή μεταξύ των PIP και PIP_2 (323). Η αποικοδόμηση της PIP_2 από την φωσφολιπάση C συνοδεύεται από σχηματισμό IP_3 , η οποία προκαλεί αύξηση του ελεύθερου ιονισμένου ασβεστίου μέσα στο κύτταρο και κατά συνέπεια διάφορες ενδοκυτταρικές αντιδράσεις όπως π.χ. την ενεργοποίηση του συσταλτού συστήματος του κυτταροσκελετού (324). Όταν τα αιμοπετάλια διαγείρονται κατά τρόπον ώστε να παρουσιάσουν την αντίδραση έκλυσης (όπως π.χ. με τη χορήγηση ADP σε PRP χωρίς ασβέστιο, ή μέσω χορήγησης θρομβίνης), τότε ενεργοποιείται η φωσφολιπάση C και διασπά τα πολυφωσφοϊνοσιτίδια σε 1, 2 διακυλγλυκερόλη και φωσφορικές ινοσιτόλες οι οποίες φαίνεται πως σχετίζονται με τη φωσφορυλίωση των πρωτεϊνών 20 και 47KDa. Οι υποδοχείς της αιμοπεταλιακής μεμβράνης συνδέονται λειτουργικά με τη φωσφολιπάση C μέσω μιας πρωτεΐνης που χρησιμοποιεί σαν υπόστρωμά της το GTP (65). Η σύνδεση ενός αγωνιστή με τον υποδοχέα του φαίνεται πως ενεργοποιεί την πρωτεΐνη αυτή η οποία δρα πάνω στη φωσφολιπάση C και τη θέτει σε λειτουργία, χωρίς να απαιτεί αύξηση του ενδοκυττάρου ελεύθερου ασβεστίου. Η ενεργοποιημένη φωσφολιπάση C με τη σειρά της διασπά την PIP_2 (ή άλλα φωσφολιπίδια της ινοσιτόλης) και παράγει 1, 2 διακυλγλυκερόλη και IP_3 . Η 1, 2-διακυλγλυκερόλη που σχηματίζεται, ενεργοποιεί την πρωτεϊνική κινάση C, η οποία οδηγεί στη φωσφορυλίωση και την αντίδραση έκλυσης. Παράλληλα, η IP_3 απελευθερώνει Ca^{2+} το οποίο επιτρέπει στη φωσφολιπάση C να διασπάσει την PI και PIP σε 1, 2-διακυλγλυκερόλη και τα αντίστοιχα ινοσιτίδια IP και IP_2 . Η 1, 2-διακυλγλυκερόλη μπορεί να διασπαστεί περαιτέρω από μια διγλυκερική λιπάση και μια μονογλυκερική λιπάση, αποδεσμεύοντας αραχιδονικό οξύ. Επίσης η φωσφολιπάση A_2 μπορεί να ενεργοποιηθεί από την αύξηση του ελεύθερου Ca^{2+} και να εξαγάγει αραχιδονικό οξύ από την PI ή άλλα φωσφολιπίδια, όπως την φωσφατιδυλχολίνη και φωσφατιδυλαιθανολαμίνη. Όλες αυτές οι αντιδράσεις εμφανίζονται υπό τη μορφή ενός διαγράμματος ροής στο σχήμα 1. Οι



αλληλοσχέσεις του μεταβολισμού των πολυφωσφοϊνοσιπιδίων συμπυκνώνονται στο σχήμα 2.

Όσον αφορά για τις πρωτεΐνες 20 και 47KDa συνοπτικά αναφέρουμε τα εξής. Το 1977 δείχτηκε ότι η ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων από θρομβίνη, με συνακόλουθη συσσώρευση και έκλυση των κοκκίων τους, συνδέεται με φωσφορυλίωση δύο πρωτεϊνών, μίας που εμφανίζει μοριακό βάρος 40-47KDa και μιας δεύτερης, που μοιάζει με τη μυσίνη και έχει βάρος 20KDa. Όταν τα αιμοπετάλια ενεργοποιούνταν από το ADP απουσία της αντίδρασης έκλυσης, οι δύο αυτές πρωτεΐνες φαινόταν να μην φωσφορυλιώνονται, με αποτέλεσμα την εξαγωγή του συμπεράσματος ότι η αντίδραση έκλυσης προϋποθέτει ή συνοδεύεται από την φωσφορυλίωση των εν λόγω πρωτεϊνών. Πολύ πρόσφατα δείχτηκε ότι το ADP προκαλεί κι αυτό φωσφορυλίωση των δύο πρωτεϊνών απουσία της αντίδρασης έκλυσης, μόνο που η φωσφορυλίωση είναι αντιστρεπτή και εξαιρετικά φευγαλέα (45, 75). Δείχτηκε επίσης ότι η φωσφορυλίωση της πρωτεΐνης των 20KDa έχει ως μεσολαβητές της το Ca^{2+} και μια πρωτεϊνική κινάση εξαρτώμενη από την καλμοδουλίνη, ενώ η φωσφορυλίωση της 47KDa πρωτεΐνης, διαμεσολαβείται από την πρωτεϊνική κινάση C την εξαρτώμενη από τα φωσφολιπίδια, που ενεργοποιείται από την 1, 2 διακυγλυκερόλη (153).

ζ. Ασβέστιο - Νάτριο - ενδοκυττάριο PH

Το ασβέστιο παίζει πρωτεύοντα ρόλο σε πάρα πολλές κυτταρικές λειτουργίες όλων των τύπων των κυττάρων των διαφόρων οργανισμών, τόσο στο ζωικό όσο και στο φυτικό βασίλειο. Όσον αφορά τα αιμοπετάλια έχει δειχθεί ότι, όταν τα μέσα που χρησιμοποιούνται για τη διασπορά τους έχουν χαμηλότερες του φυσιολογικού περιεκτικότητες σε Ca^{2+} ή το Ca^{2+} έχει δεσμευτεί μέσω EGTA ή EDTA, τότε δεν είναι σε θέση να παρουσιάσουν την αντίδραση συσσώρευσης, αν και διατηρούν την κανονότητά τους να μεταβάλουν σχήμα, διαγειρόμενα από αγωνιστές όπως το ADP, και ενίοτε να εκλύσουν το περιεχόμενο των κοκκίων τους στο μέσον διασποράς. Τα αιμοπετάλια διαφόρων ανώτερων ζώων όπως π.χ. του κουνελιού, παρουσιάζουν αλλαγή σχήματος ενεργοποιούμενα από διάφορους συσσωρευτικούς παράγοντες απουσία ασβεστίου, αλλά δεν παρουσιάζουν αντίδραση έκλυσης. Όσον αφορά τη δράση του ασβεστίου υπάρχουν διάφορα σημεία στο αιμοπεταλιακό κύτταρο, όπως και πολλά βήματα αρκετών βιοχημικών αντιδράσεων στα οποία το ασβέστιο παίζει καθοριστικό ρόλο. Κατ'αρχάς, στο



επίπεδο της αιμοπεταλιακής μεμβράνης (πλασματικής), το Ca^{2+} συμμετέχει στην διατήρηση της δομής του γλυκοπρωτεϊνικού συμπλέγματος IIb/IIIa, το οποίο είναι απαραίτητο για την αλληλεπίδραση με το ινωδογόνο αλλά επίσης και στην ενσωμάτωση του ινωδογόνου στο "ενεργοποιημένο" γλυκοπρωτεϊνικό σύμπλεγμα IIb/IIIa, ώστε τα γειπονικά αιμοπετάλια να μπορούν να συγκρατούνται μεταξύ τους κατά τη συσσώρευση. Επιπλέον το ασβέστιο συνεισφέρει στη σταθεροποίηση του αιμοπεταλιακού συσσωματώματος, γιατί επιβोधεί κάποιες εκρινόμενες πρωτεΐνες, όπως η θρομβοσπονδίνη, να προσδέχουν μεταξύ τους τα αιμοπετάλια μετά την αντίδραση έκλυσης. Εν συνεχεία, στο εσωτερικό των αιμοπεταλίων το ασβέστιο παίζει διάφορους ρόλους συμμετέχοντας σε ποικίλες βιοχημικές αντιδράσεις που ενισχύουν τα διάφορα φαινόμενα τα οποία σχετίζονται τόσο με τη συσσώρευση και την αντίδραση έκλυσης, όσο και με τη συστολή του λευκού θρόμβου και πλήρους αιματικού θρόμβου, π.χ. το Ca^{2+} είναι απαραίτητος παράγοντας για την ενεργοποίηση της φωσφολιπάσης A_2 και της φωσφολιπάσης C. Η φωσφολιπάση A_2 , εξάγει αραχιδονικό οξύ από την φωσφατιδυλχολίνη και την φωσφατιδυλαιθανολαμίνη, ενώ η φωσφολιπάση C, μπορεί μεν να ενεργοποιηθεί από την γουανοσιν-νουκλεϊτιδική πρωτεΐνη της μεμβράνης, αλλά η δραστηριότητά της μεγεθύνεται από την παρουσία του Ca^{2+} , οδηγώντας σε παραγωγή 1, 2 διακυγλυκερόλης και IP_3 . Η σύσπαση των συστατών πρωτεϊνών του αιμοπεταλιακού κυτταροσκελετού φαίνεται πως για την πραγματοποίησή της απαιτεί ασβέστιο, όπως συμβαίνει και για κάθε συστολή μυϊκού χαρακτήρα. Το αιμοπετάλιο, να μεν δεν είναι ένα αμιγές μυϊκό κύτταρο, αλλά εν τούτοις κατέχει μερικά λειτουργικά και δομικά χαρακτηριστικά τα οποία του προσδίδουν κάποιες αναλογίες με τα λεία μυϊκά κύτταρα (104). Το Ca^{2+} μέσα στα αιμοπετάλια προέρχεται από διάφορες πηγές. Σε πολλά είδη φαίνεται να βρίσκεται μαζί με τα αδενινικά νουκλεοτίδια, τη σεροτονίνη και τα πυροφωσφορικά, στα πυκνωτικά αιμοπεταλιακά κοκκία (104). Φαίνεται ότι το 60% του συνολικού αιμοπεταλιακού ασβεστίου βρίσκεται συγκεντρωμένο στα κοκκία αυτά, από τα οποία κινητοποιείται ευθύς μόλις το αιμοπεταλιακό κύτταρο διεγερθεί από αγωνιστές όπως η θρομβίνη (213, 216). Ωστόσο σε μερικά είδη όπως στα κουνέλια, τους ινδόχοιρους, τους χοίρους, τις γάτες και μερικές φορές στους αρουραίους, είναι πιθανό ότι το κύριο δισθενές μεταλλοϊόν δεν αντιπροσωπεύεται από το Ca^{2+} αλλά από το Μαγνήσιο (31, 155, 84, 255, 262).

Μια άλλη πηγή εσωτερικού ασβεστίου βρίσκεται στο πυκνό σωληναριακό δίκτυο. Έχει προταθεί ότι κατά την ενεργοποίηση του αιμοπεταλίου, το ασβέστιο απελευθερώνεται από διάφορα σημεία στα οποία βρίσκεται συγκεντρωμένο και



διοχετεύεται στο εσωτερικό του εν λόγω δικτύου, κατά τρόπο όμοιο με τον παρατηρούμενο στο σαρκοπλασματικό δίκτυο των μυϊκών ινών (103, 102).

Ο Gerrard και οι συνεργάτες του (102), υπογραμμίζουν ορισμένα σημεία τα οποία οδηγούν στο συμπέρασμα αυτό.

- 1) Το πυκνό σωληναριακό δίκτυο είναι το διαμέρισμα του αιμοπεταλιακού κυττάρου στο οποίο εντοπίζεται κατ'εξοχήν η ΑΤΡάση του ασβεστίου και του μαγνησίου, που θεωρείται υπεύθυνη για τη μετακίνηση του Ca^{2+} .
- 2) Οι μεμβράνες του πυκνού σωληναριακού δικτύου περιέχουν τμήματα εξαιρετικά πλούσια σε προσταγλανδίνη συνθετάση όπως και άλλα ένζυμα, τα οποία ανευρίσκονται άφθονα στο ενδοπλασματικό δίκτυο. Τα μεμβρανικά αυτά τμήματα έχουν την ικανότητα να αποδεσμεύουν πολύ περισσότερα ιόντα ασβεστίου σε σύγκριση με τα κλάσματα που είναι εμπλουτισμένα με ένζυμα απαντώμενα στις πλασματικές μεμβράνες και τα οποία παρουσιάζουν μια πολύ χαμηλή ικανότητα αποδέσμευσης Ca^{2+} (149).
- 3) Η μεταβολή του σχήματος των αιμοπεταλίων θεωρείται ότι είναι αποτέλεσμα της ανακατανομής μέσα στο κύτταρο των ιόντων του ασβεστίου. Η μεταβολή αυτή μπορεί να συμβεί ακόμη κι όταν τα πυκνωτικά κοκκία είναι άδεια από Ca^{2+} , τα μιτοχόνδρια είναι μη λειτουργικά, όπως επίσης όταν παροχή Ca^{2+} από το περιβάλλον είναι ελαχιστότατη (χρησιμοποίηση μέσω διασποράς χωρίς Ca^{2+}). Η μεταβολή του σχήματος επίσης, συμβαίνει κι όταν τα αιμοπετάλια έχουν αποκοκκιωθεί μέσω χορήγησης κατάλληλων ποσοτήτων θρομβίνης. Το συμπέρασμα από'όλα αυτά είναι ότι πρέπει να υπάρχει κάποια εναλλακτική πηγή Ca^{2+} , εφόσον η ύπαρξή του είναι απαραίτητη για την αλλαγή σχήματος και η πιθανότερη υποψήφια πηγή είναι ακριβώς το πυκνό σωληναριακό δίκτυο.

Στην αλλαγή του σχήματος των αιμοπεταλίων παίζουν ρόλο και οι μεταβολές του ενδοκυττάρου νατρίου, όπως και του ΡΗ. Όταν ένα ερέθισμα δρα επάνω στην αιμοπεταλιακή μεμβράνη τότε επισυμβαίνει μια άμεση αλλαγή του διαμεμβρανικού δυναμικού, η οποία συνοδεύεται από αλλοιώσεις του ενδοκυττάρου ΡΗ και της κατανομής των ιόντων νατρίου και ασβεστίου μέσα στο κύτταρο. Τα αιμοπετάλια έχουν τη δυνατότητα να διατηρούν κλίσεις συγκέντρωσης για το νάτριο και το κάλιο μέσω της πλασματικής τους μεμβράνης, κατά τρόπο ώστε το νάτριο να είναι ψηλότερο από εκείνο του αιματικού πλάσματος. Αυτές οι κλίσεις συγκέντρωσης διατηρούνται λόγω της



συνεχούς δράσης μιας εξαρτώμενης από το μαγνήσιο ATPάσης, που λειτουργεί σαν αντλία νατρίου-καλίου και είναι ευαίσθητη στην ουαμπαΐνη (213). Όταν τα αιμοπετάλια διαγιέρονται απουσία ιόντων νατρίου, τότε παρουσιάζουν μια μειωμένη ένταση και έκτασης συσώρευση, όπως επίσης και μια έντονα μειωμένη απελευθέρωση σεροτονίνης, στο μέσο διασποράς. Η ελάττωση της έκτασης και έντασης της συσώρευσης παρατηρείται στη διέγερση από επινεφρίνη, ADP και χαμηλής συγκέντρωσης θρομβίνη (69).

Οι Connolly και Limbird, εξετάζοντας την υφιστάμενη σχέση μεταξύ πτώσης της αιμοπεταλιακής ανταπόκρισης λόγω της απομάκρυνσης του εξωκυτταρικού νατρίου και της αντίστοιχης που παρατηρείται όταν επεξεργαστούμε τα αιμοπετάλια με ινδομεθακίνη, βρήκαν ότι υπάρχει ένας ισχυρός δεσμός μεταξύ της παρουσίας του έξωκυτταρικού νατρίου και των διάφορων λειτουργιών, των εν λόγω κυττάρων, που διαμεσολαβούνται από την οδό του αραχιδονικού οξέος. Οι ίδιοι ερευνητές βρήκαν ότι, η απομάκρυνση του εξωκυτταρικού νατρίου μειώνει την εκκοκίωση των αιμοπεταλίων την επαγόμενη από επινεφρίνη, υποδεικνύοντας ότι η ενδοαιμοπεταλιακή μείωση των επιπέδων του κυκλικού AMP, είναι μια διαδικασία μάλλον ανεξάρτητη από την ελάττωση του εξωκυτταρικού νατρίου (70).

Η θρομβίνη αυξάνει κατά τρεις φορές την περιεκτικότητα σε νάτριο των αιμοπεταλίων όπως επίσης και το ADP, πράγμα που φαίνεται από την αύξηση του φθορισμού της 3, 3-διπροπυλ-θειοκαρβοκυανίνης και δείχνει ότι η πλασματική μεμβράνη έχει εκπολωθεί. Μέσα στα πλαίσια των μεταβολών του δυναμικού της πλασματικής μεμβράνης βρέθηκε ότι και το PH του αιμοπεταλίου υφίσταται αλλαγές. Το ενδοκυτταρικό PH αυξάνεται περισσότερο από 0,3 μονάδες. Όταν το ενδοκυτταρικό νάτριο αυξάνει, π.χ. λόγω αδρανοποίησης της αντλίας $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ με ουαμπαΐνη, τα αιμοπετάλια γίνονται υπερευαίσθητα στο ADP. Έχει ακόμη δειχθεί ότι η αύξηση των ιόντων Na^+ στο εσωτερικό του αιμοπεταλίου δεν συνοδεύονται από αύξηση των ιόντων του Cl^- κατά τη διάρκεια της συσώρευσης με ADP, υποδεικνύοντας έτσι την ύπαρξη ενός εκλεκτικού μηχανισμού μεταφοράς του νατρίου κι όχι του NaCl , πράγμα που πιθανώτατα αποκλείει την μεταφορά μέσω μιας απλής ωσμωτικής προσρόφησης οφειλόμενης σε μια κλίση συγκέντρωσης. Γενικά φαίνεται ότι υπάρχει κάποια σχέση μεταξύ των κλίσεων συγκέντρωσης του νατρίου στην πλασματική αιμοπεταλιακή μεμβράνη και της ομοιόστασης του ασβεστίου στο αιμοπετάλιο (40).



Όταν η κλίση συγκέντρωσης του νατρίου αλλοιώνεται μέσω της ουαμπαίνης ή μέσω απομάκρυνσης του από το εξωκυττάριο μέσον, τότε παρατηρείται μια αύξηση του ανταλλάξιμου ασβεστίου του κυτταροπλάσματος, μια αύξηση του ανταλλάξιμου ασβεστίου που απάγεται από το πυκνό σωληναριακό δίκτυο και μια αύξηση της ροής των ιόντων ασβεστίου μέσω της πλασματικής μεμβράνης. Ωστόσο δεν υπάρχει αλλαγή στη συνολική ποσότητα του αιμοπεταλιακού ασβεστίου. Οι παρατηρήσεις αυτές μπορεί να δείχνουν ότι η κλίση συγκέντρωσης νατρίου της πλασματικής μεμβράνης επηρεάζει έντονα την ομοιοστασία του Ca^{2+} , αλλά η ανταλλαγή Ca^+/Ca^{++} δεν είναι η μόνη αναγκαία συνθήκη της εκροής Ca^{2+} από το αιμοπετάλιο (40).

η. Δομικές και συσταλτές πρωτεΐνες

1. Ακτίνη

Η ακτίνη ανευρίσκεται στα κύτταρα σε δύο μορφές: στη σφαιρική μορφή (G-ακτίνη), η οποία είναι συνήθως συνδεδεμένη με την προφιλίνη και τη νηματοειδή μορφή (F-ακτίνη). Τα αιμοπετάλια περιέχουν μεγάλη ποσότητα ακτίνης που ανέρχεται στο 15-20% των συνολικών τους πρωτεϊνών. Κατά τη διάρκεια της ενεργοποίησής τους το μεγαλύτερο ποσοστό της ακτίνης (70-80% ίσως και περισσότερο), λαμβάνει την νηματοειδή μορφή F. Τα ινίδια της νηματοειδούς ακτίνης φαίνονται να είναι συνδεδεμένα με μυοσίνη και ταυτόχρονα με μια ειδικευμένη πρωτεΐνη γνωστή με τον όρο "πρωτεΐνη συνδεδεμένη με την ακτίνη". Όσο τα αιμοπετάλια βρίσκονται εν ηρεμία το μέγιστο μέρος της ακτίνης τους αποπολυμερίζεται και φαίνεται ότι υπάρχουν συγκεκριμένοι μηχανισμοί οι οποίοι εμποδίζουν τον πολυμερισμό της πρωτεΐνης αυτής κατά τη διάρκεια της ήρεμης κατάστασης των αιμοπεταλιακών κυττάρων. Υπό την έννοια αυτή, η προφιλίνη λειτουργεί συνδεδεμένη με τα ακτινικά μονομερή ώστε να αποτρέπει την συνένωσή τους και τον σχηματισμό νηματοειδών πολυμερών (46, 94).

Εκτός από την προφιλίνη, πρέπει να υπάρχουν κι άλλες πρωτεΐνες που καταλαμβάνουν τα άκρα κάθε σωματιδίου σφαιρικής ακτίνης, εμποδίζοντας τον πολυμερισμό (94, 95).

Για τον σχηματισμό των ακτινικών νημάτων φαίνεται ότι συμβαίνουν τα εξής φαινόμενα:



- 1) Η "πρωτεΐνη σύνδεσης με την ακτίνη" λειτουργεί σαν πυρήνας ή σαν στήριγμα πάνω στο οποίο προσκολούνται τα μονομερή της ακτίνης, όταν ενεργοποιούνται τα αιμοπετάλια. Η πρωτεΐνη αυτή θα μπορούσε να παίζει το ρόλο της τροπομοσίνης που συγκρατεί τα μονομερή της ακτίνης στις μυϊκές ίνες. Η πρόσδεση αυτή οδηγεί σε πολυμερισμό της σφαιρικής μορφής.
- 2) Ο πολυμερισμός προάγεται ακόμη περισσότερο, μέσω απόρριψης των πρωτεϊνών που καλύπτουν τα άκρα ήδη υπαρχόντων νημαπιδίων ακτίνης. Οι πρωτεΐνες αυτές, όπως προαναφέρθηκε, εμποδίζουν την σύνδεση των μονομερών κατά την φάση ηρεμίας του αιμοπεταλίου και απορρίπτονται όταν το αιμοπετάλιο διαγείρεται.
- 3) Τα υπάρχοντα νημάτια ακτίνης αναδιοργανώνονται δομικά όταν τα αιμοπετάλια διαγείρονται (95) και συνδέονται μεταξύ τους.

Οι μεταβολές αυτές και κυριώτερα η επαγωγή του πολυμερισμού της ακτίνης, φαίνεται ότι συνδέεται με τον μεταβολισμό των πολυφωσφοϊνοσιπιδίων. Οι μελέτες που οδήγησαν στο συμπέρασμα αυτό ξεκίνησαν από την παρατήρηση πως ο πολυμερισμός της ακτίνης φαίνεται να λαμβάνει χώρα πάνω στην πλασματική μεμβράνη του αιμοπεταλίου και η πρόδρομη μορφή της ακτίνης βρίσκεται κοντά και πιθανόν να αλληλεπιδρά με την λιπιδική διπλοστοιβάδα. Η προφυλίνη και η προφυλακτίνη, συμπεριφέρονται σαν πρωτεΐνες μεμβράνης οπότε μπορεί να θεωρήσει κανείς ότι αλληλεπιδρούν άμεσα με τα φωσφολιπίδια (170, 197). Σχετικά πρόσφατα έχει δειχθεί ότι, τα φωσφολιπίδια της ινοσιτόλης και κυριώτερα η PIP_2 , μπορούν να αποσυνθέσουν το σύμπλεγμα της προφυλακτίνης (προφυλίνη+ακτίνη), επειδή σχηματίζουν δεσμούς με την προφυλίνη. Οι ισχυρότεροι δεσμοί σχηματίζονται μεταξύ προφυλίνης και PIP_2 , ενώ η PIP και η PI σχηματίζουν ασθενέστερους δεσμούς. Η σειρά δύναμης των δεσμών είναι $PIP_2 > PIP > PI$. Πιθανόν τα φωσφοϊνοσιπίδια να ανταγωνίζονται ένα σημείο πρόσδεσης πάνω στην προφυλίνη με την ακτίνη. Το απελευθερούμενο μονομερές της ακτίνης δεν φαίνεται να αλληλεπιδρά με τα φωσφολιπίδια. Έτσι η ακτίνη μπορεί πλέον να ανηδράσει και ν'αρχίσει τη διαδικασία του πολυμερισμού της. Η δράση της PIP_2 (ή της PIP) πάνω στο πρόδρομο των μικροϊνιδίων, δηλαδή στο σύμπλεγμα της προφυλακτίνης και συνεπώς η έναρξη της αύξησης της κυτταρικής κινητικότητας, μπορεί να ρυθμίζεται μέσω της αύξησης της ανταλλαγής του κύκλου των φωσφολιπιδίων της ινοσιτόλης (153). Δεδομένου ότι η αύξηση της ανταλλαγής των φωσφολιπιδίων της ινοσιτόλης συμβαίνει όταν τα



αιμοπετάλια ενεργοποιούνται από αγωνιστές όπως η θρομβίνη ή το ATP, είναι λογικό να δεχτεί κανείς ότι η αύξηση του πολυμερισμού της ακτίνης είναι ένα από τα πολλαπλά παρεπόμενα της δραστηριοποίησης του μεταβολισμού των φωσφοίνοσιπιδίων, που επισυμβαίνει από τη δράση των διαφόρων αγωνιστών και κατέχει έναν σπουδαίο ρόλο στην πυροδότηση πολλών ενζυμικών διαδικασιών, καίριας σημασίας για τις αιμοπεταλιακές λειτουργίες.

2. Μυοσίνη

Όταν τα αιμοπετάλια βρίσκονται εν ηρεμία τότε η μυοσίνη τους είναι διαχωρισμένη από την ακτίνη. Ευθύς μόλις τα αιμοπετάλια ενεργοποιηθούν, οι ελαφρές αλυσίδες των 20KDa της μυοσίνης φωσφορυλιώνονται ταχύτατα και κατόπιν αρχίζουν να αποφωσφορυλιώνονται (76, 117, 190). Η φωσφορυλίωσή τους καταλύεται από μια κινάση των ελαφρών αλυσίδων της μυοσίνης που εξαρτάται από το ασβέστιο και περιέχει καλμοδουλίνη (77, 123). Στα εν ηρεμία αιμοπετάλια είναι φωσφορυλιωμένο μόνο το 10% των ελαφρών αλυσίδων των 20KDa, αλλά μετά από διέγερσή τους φωσφορυλιώνεται σχεδόν το 100%. Διάφορες μελέτες έδειξαν ότι ο χρόνος που απαιτείται για τη φωσφορυλίωση των ελαφρών αλυσίδων της μυοσίνης, σε απάντηση σε ποικίλα και διαφορετικής φύσης συσσωρευτικά ερεθίσματα, είναι ίσος με αυτόν που απαιτείται για τη σύνδεση των νηματιδίων ακτίνης με τη μυοσίνη κι ότι η έκταση της φωσφορυλίωσης συσχετίζεται με το ποσοστό συνδεδεμένων νηματιδίων ακτίνης με τα σωματίδια μυοσίνης. Τα ευρήματα αυτά οδηγούν στο συμπέρασμα ότι η σύνδεση ακτίνης και μυοσίνης, ρυθμίζεται από τον βαθμό φωσφορυλίωσης των ελαφρών αλυσίδων της μυοσίνης (96).

Οι Fox και Phillips (96) έδειξαν επίσης ότι όταν τα αιμοπετάλια διαγείρονται με ADP υπό συνθήκες κατά τις οποίες δεν έχουμε αντίδραση έκλυσης, τότε η ακτίνη και η μυοσίνη τους δεν συζευγνύονται, παρά το γεγονός της εμφάνισης τόσο μεταβολής του αιμοπεταλιακού σχήματος, όσο και συσώρευσης των αιμοπεταλίων.

3. Πρωτεΐνη σύνδεσης με την ακτίνη (*actin binding protein*)

Η "πρωτεΐνη σύνδεσης με την ακτίνη" βρίσκεται κατανομημένη γενικά μέσα στα αιμοπετάλια, αλλά η συγκέντρωσή της είναι πολύ μεγάλη στα ψευδοπόδια μέσα στα οποία συνδέεται με την ακτίνη όταν τα αιμοπετάλια διεγερθούν.



Διάφορες in vitro μελέτες έδειξαν ότι, η οργάνωση των ινιδίων της ακτίνης επηρεάζεται σημαντικά από τη σύνδεσή τους με την πρωτεΐνη αυτή οδηγώντας τα σε μια κατάσταση πηκτής (94).

Το 1977 περιγράφηκε μια πρωτεάση εξαρτώμενη από το ασβέστιο, η οποία είχε σαν υποστρώματα την εν λόγω πρωτεΐνη και μια άλλη πρωτεΐνη, την P235 (254). Και οι δύο αυτές πρωτεΐνες δρουν πάνω στο πολυμερισμό και την οργάνωση των ινιδίων της ακτίνης, έχει δε αποδειχθεί σε in vitro πειράματα, ότι συνδέονται στον αιμοπεταλιακό κυτταροσκελετό, όταν τα αιμοπετάλια ενεργοποιούνται. Τα αποτελέσματα των πειραμάτων αυτών (που περιέλαβαν και τη δράση διαφόρων αναστολέων όπως το EGTA, ή την N-αιθυλμαλεϊμίδη, την λεπεπτίνη ή τη μερσαρλίη που αναστέλουν τη δράση της εν λόγω πρωτεάσης), οδήγησαν στα εξής συμπεράσματα:

- 1) Η ασβέστιο-εξαρτώμενη πρωτεάση ενεργοποιείται κατά τη διάρκεια της διέγερσης των αιμοπεταλίων από φυσιολογικά ερεθίσματα, όπως η θρομβίνη ή το κολλαγόνο και
- 2) Η πρωτεΐνη σύνδεσης με την ακτίνη (actin binding protein) υδρολύεται εκ μέρους της πρωτεάσης που προαναφέρθηκε, μειώνοντας την ικανότητα σύνδεσής της με τα ινίδια της ακτίνης.

Έχοντας υπόψιν τις δύο αυτές παρατηρήσεις έγινε η υπόθεση ότι η αύξηση του κυτταροπλασματικού ελεύθερου ασβεστίου, που συμβαίνει όταν τα αιμοπετάλια ενεργοποιούνται, προκαλεί μεταξύ των άλλων και την ενεργοποίηση της Ca^{2+} εξαρτώμενης πρωτεάσης, η οποία υδρολύει την πρωτεΐνη που συνδέεται με την ακτίνη, με αποτέλεσμα την αποσυναρμολόγηση του νηματοειδούς δικτύου της ακτίνης. Όμως τώρα άλλες πρωτεΐνες είναι σε θέση να ενσωματωθούν στα ινίδια και να αναδιοργανώσουν τη δομή τους (94).

θ. Πρωτεΐνες που αποδεσμεύονται από τα αιμοπετάλια στην αντίδραση έκλυσης

Γενικά

Όταν τα αιμοπετάλια ενεργοποιηθούν και υποστούν την αντίδραση έκλυσης τότε εξωκυτταρώνουν το περιεχόμενο των κοκκίων τους που περιλαμβάνει ADP, σεροτονίνη και μια ποικιλία αμινών, οι οποίες διαφέρουν από είδος σε είδος, λ.χ.



ισταμίνη και επινεφρίνη. Απελευθερώνεται το περιεχόμενο των α-κοκκίων, όπως επίσης και αυτό των λυσοσωμάτων. Μέσα στις ουσίες που αποδεσμεύονται από τα α-κοκκία συμπεριλαμβάνονται η θρομβοσπονδίνη, η φιβρονεκτίνη, το ινωδογόνο και μια γλυκοπρωτεΐνη πλούσια σε ιστιδίνη. Υπάρχουν όλο και περισσότερες ενδείξεις ότι κάθε μια από τις πρωτεΐνες αυτές συνεισφέρει στον σχηματισμό και τη σταθεροποίηση των αιμοπεταλιακών συσσωρευμάτων (153).

1. *Ινωδογόνο*

Το ινωδογόνο ενισχύει τη συσσώρευση των αιμοπεταλίων που προκαλείται από ADP και άλλους αγωνιστές (222). Η πρωτεΐνη αυτή ενσωματώνεται στα αιμοπετάλια κατά τη διάρκεια της αλλαγής του σχήματός τους και αποχωρίζεται απ'αυτά όταν έχουμε την αποσυσώρευσή τους (220).

Διάφορες μελέτες έδειξαν ότι το ADP προκαλεί μια αποκάλυψη των σημείων πρόσδεσης του ινωδογόνου στην εξωτερική επιφάνεια των αιμοπεταλίων, καθιστώντας έτσι δυνατή την ενσωμάτωσή του στους εξειδικευμένους του υποδοχείς. Το ADP, ως γνωστόν, προστίθεται είτε εξωγενώς, είτε απελευθερώνεται από τα ίδια τα αιμοπετάλια μεγεθύνοντας τις αντιδράσεις τους και διαδίδοντάς τες σε μεγαλύτερο αιμοπεταλιακό πληθυσμό. Ο υποδοχέας του ινωδογόνου είναι περίπλοκος και περιλαμβάνει στη δομή του το γλυκοπρωτεϊνικό σύμπλεγμα IIb και IIIa, όπως επίσης και ασβέστιο (153). Τα θρομβασθενικά αιμοπετάλια τα οποία εμφανίζουν ανωμαλίες στις γλυκοπρωτεΐνες IIb και IIIa, δεν ενσωματώνουν ινωδογόνο και δεν συσσωρεύονται από το ADP, παρά το γεγονός του ότι αλλάζουν μορφή (153).

Άτομα τα οποία παρουσιάζουν συγγενή έλλειψη ινωδογόνου, εμφανίζουν μείωση ή ακόμη και απουσία της αιμοπεταλιακής συσσώρευσης της επαγόμενης από το ADP και αυτή η λειτουργική ανεπάρκειά τους είναι δυνατόν να διορθωθεί μέσω της προσθήκης φυσιολογικού ινωδογόνου στο αιματικό τους πλάσμα (153, 224). Επίσης, όταν πλυμμένα αιμοπετάλια διασπείρονται σε ένα μέσο απουσία ινωδογόνου, τότε η αντίδρασή τους στο ADP είναι ασθενής (224). Οι παρατηρήσεις αυτές δείχνουν ότι το ινωδογόνο φαίνεται απαραίτητο, τουλάχιστον σε εκείνες τις περιπτώσεις κατά τις οποίες η αιμοπεταλιακή συσσώρευση λαμβάνει χώρα χωρίς την ταυτόχρονη ή πρότερη εμφάνιση και της αντίδρασης έκλυσης, κατά την οποία το ινωδογόνο προσφέρεται από τα ίδια τα αιμοπετάλια. Στα αιμοπετάλια του κουνελιού έχουμε την απελευθέρωση ινωδογόνου από τα α-κοκκία τους και την άμεση χρησιμοποίησή του για την



σταθεροποίηση του αιμοπεταλιακού θρόμβου, ενώ στον άνθρωπο η ποσότητα ινωδογόνου που εκλύεται από τα αιμοπετάλια φαίνεται να είναι μικρότερη (153, 224).

2. Θρομβοσπονδίνη

Η θρομβοσπονδίνη είναι μια γλυκοπρωτεΐνη μοριακού βάρους 420.000 Dalton, αποτελούμενη από τρεις πολυπεπτιδικές αλυσίδες συνδεδεμένες μεταξύ τους μέσω δισουλφιδικών γεφυρών (153, 179). Η θρομβοσπονδίνη, που καλείται επίσης γλυκοπρωτεΐνη G και "πρωτεΐνη ευαίσθητη στη θρομβίνη", αποτελεί το σημείο ενδογενούς λεκτινικής δραστηριότητας στην εξωτερική επιφάνεια των αιμοπεταλίων και είναι ικανή να ενσωματώνει ινωδογόνο και φμπρονεκτίνη (ινονεκτίνη) (99). Διάφοροι ερευνητές θεωρούν ότι η θρομβοσπονδίνη ενισχύει την σταθερότητα των αιμοπεταλιακών συσσωματωμάτων (99).

Έχει δειχθεί ότι αντισώματα ενάντια στην θρομβοσπονδίνη δεν επηρεάζουν την πρωτογενή συσσώρευση από ADP, αλλά προκαλούν ταχεία αποσυσσώρευση και καταργούν τη δεύτερη φάση συσσώρευσης από ADP. Τα δεδομένα αυτά συμβαδίζουν με την παρατήρηση των Gardner και συν. (99, 100), σύμφωνα με την οποία, τα αντισώματα ενάντια στο τμήμα (υπομονάδα) 23KDa της θρομβοσπονδίνης, που ενσωματώνει και την ηπαρίνη, αναστέλουν την αιμοπεταλιακή συσσώρευση την επαγόμενη από κολλαγόνο, θρομβίνη και ADP (υπό συνθήκες στις οποίες το ADP προκαλεί αντίδραση έκλυσης). Επιπλέον ο Leung έδειξε ότι τα αντιθρομβοσπονδινικά αντισώματα, ελαττώνουν την ικανότητα ενσωμάτωσης του ινωδογόνου στην εξωτερική επιφάνεια των ενεργοποιημένων αιμοπεταλίων. Ακόμη δοθέντος ότι, όταν επεξεργασθούν τα αιμοπετάλια με αντιθρομβοσπονδινικό ορό συμβαίνει εκτόπιση του σεσημασμένου ινωδογόνου εκ μέρους ινωδογόνου μη σεσημασμένου, ο Leung κατέληξε ότι η θρομβοσπονδίνη σταθεροποιεί την πρόσδεση του ινωδογόνου σε σημεία διαφορετικά του γλυκοπρωτεϊνικού IIa-IIIb υποδοχέα του και ενισχύει τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των αιμοπεταλίων, οδηγώντας στο σχηματισμό συσσωματωμάτων πιο σταθερών (153, 99).

3. Ινονεκτίνη (Φμπρονεκτίνη)

Η ινονεκτίνη είναι παρούσα στα α-κοκκία, ενώ δεν απαντάται στη μεμβρανική εξωτερική επιφάνεια των εν ηρεμία αιμοπεταλίων (101). Όταν τα αιμοπετάλια ενεργοποιηθούν, τότε η ινονεκτίνη απελευθερώνεται μαζί με άλλες πρωτεΐνες μέσω της αντίδρασης έκλυσης στο αιματικό πλάσμα και ταυτόχρονα



εμφανίζεται στην επιφάνεια της πλασματικής μεμβράνης των αιμοπεταλίων (153). Η ινονεκτίνη δεν είναι απαραίτητη για τη συσώρευση των αιμοπεταλίων την επαγόμενη από ADP και δεν ενσωματώνεται σ'αυτά, όταν ενεργοποιούνται και συσσωρεύονται από απουσία της αντίδρασης έκλυσης (334). Ωστόσο όταν τα αιμοπετάλια διαγείρονται από άλλους αγωνιστές όπως η θρομβίνη, τότε η ινονεκτίνη συνδέεται με την εξωτερική τους επιφάνεια (256). Αυτό δείχνει ότι υπάρχει κάποια σχέση μεταξύ ενσωμάτωσης της ινονεκτίνης και των απελευθερούμενων πρωτεϊνών από τα α-κοκκία, δηλαδή της θρομβοσπονδίνης, του ινωδογόνου, του παράγοντα von Willebrandt και της "πλούσιας σε ισπιδίνη πρωτεΐνης". Μολαταύτα οι πρωτεΐνες αυτές, δεν φαίνεται να αλληλεπιδρούν με ένα κοινό σημείο ενσωμάτωσης, αλλά ενσωματώνονται σε διάφορα σημεία και η μεταξύ τους αλληλεπίδραση φαίνεται πως συνεισφέρει στη σταθεροποίηση των αιμοπεταλιακών συσσωματωμάτων.

4. Ο παράγοντας von Willebrandt

Είναι μια μεγάλου μοριακού βάρους πρωτεΐνη που εναποθηκεύεται στα α-κοκκία και εκλύεται όταν τα αιμοπετάλια διαγείρονται από αγωνιστές όπως η θρομβίνη. Ο παράγοντας von Willebrandt (vWf) δεν παίζει σημαντικό ρόλο στην αιμοπεταλιακή συσώρευση, εφόσον ενσωματώνεται στα αιμοπετάλια και απουσία του ινωδογόνου. Πιθανόν ο ρόλος του να σχετίζεται με τη σταθεροποίηση των αιμοπεταλιακών συσσωματωμάτων, σε συνάρτηση πάντοτε με τις άλλες πρωτεΐνες που απελευθερώνονται κατά την αντίδραση έκλυσης, από τα α-κοκκία. Ο κύριος ρόλος του σαν ενδογενούς μεσολαβητή της αιμοπεταλιακής ενεργοποίησης πιθανόν σχετίζεται με την ικανότητά του να προωθεί την αιμοπεταλιακή σύνδεση με τους υπενδοθηλιακούς ιστούς.

5. Η "Πρωτεΐνη Πλούσια σε Ισπιδίνη" (I.R.P. πρωτεΐνη)

Η πρωτεΐνη αυτή είναι μια γλυκοπρωτεΐνη που εκκρίνεται από τα αιμοπετάλια κατά την αντίδραση έκλυσης και ο λειτουργικός της ρόλος είναι απροσδιόριστος. Δεδομένου ότι αλληλεπιδρά με το πλασμινογόνο και ενσωματώνει ηπαρίνη, πιθανόν να συνεισφέρει στη σταθεροποίηση των αιμοπεταλιακών θρόμβων, ρυθμίζοντας την ινωδόλυση και την τοπική δράση της ηπαρίνης (153).

Είναι σαφές ότι οι ενδογενείς πρωτεΐνες υπεισέρχονται στη συσώρευση των αιμοπεταλίων, στη σταθεροποίηση των αιμοπεταλιακών συσσωματωμάτων και στην εξάπλωση των αιμοπεταλίων στις επιφάνειες. Το γλυκοπρωτεϊνικό σύμπλεγμα IIb/IIIa φαίνεται να είναι η σημαντικότερη μεμβρανική γλυκοπρωτεΐνη για την



αντίδραση της συσσώρευσης, ενώ η γλυκοπρωτεΐνη Ib είναι μια σημαντική πρωτεΐνη για την πρόσδεση των αιμοπεταλίων στις επιφάνειες και την εξάπλωσή τους πάνω σ'αυτές.

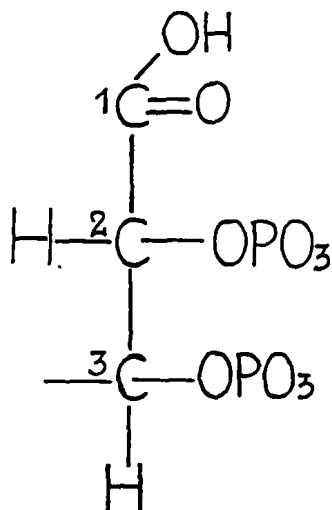


ΚΕΦΑΛΑΙΟ II

Το 2, 3 Διφωσφογλυκερικό Οξύ (2, 3 DPG)

1. Γενικά

Το 2, 3 Διφωσφογλυκερικό Οξύ (2, 3 DPG) είναι ένας φωσφορικός εστέρας με γλυκερινικό σκελετό που ανευρίσκεται σε μεγάλες ποσότητες μέσα στα ερυθρά αιμοσφαίρια. Η δομή του 2, 3 DPG είναι η ακόλουθη:



Επειδή οι ογκώδεις φωσφορικές ρίζες που φέρνουν αρνητικά φορτία βρίσκονται σε γειτονικές θέσεις, το μόριο αυτό έχει αναγκαστικά μια μεγάλη εσωτερική τάση και είναι ασταθές. Η ύπαρξη όλου αυτού του αρνητικού φορτίου παίζει κάποιο ρόλο στη λειτουργία του μορίου μέσα στο ερυθροκύτταρο (83).

Το 2, 3 DPG ανακαλύφθηκε το 1925 από τον Greenwald (107) στα ερυθρά αιμοσφαίρια του χοίρου. Ο ερευνητής αυτός έδειξε ότι το 2, 3 DPG απαντά στο ερυθροκύτταρο σε μεγάλες ποσότητες αλλά δεν υπέδειξε κάποια πρόταση για τον πιθανό φυσιολογικό του ρόλο. Εν συνεχεία οι Rapoport και



Guest (260) έδειξαν ότι ο εν λόγω φωσφορικός εστέρας απαντά σε μεγάλες επίσης ποσότητες στα ερυθροκύτταρα του ανθρώπου όπως επίσης και άλλων ειδών. Δείχτηκε μάλιστα ότι η ποσότητα του 2, 3 DPG είναι τριπλάσια εν σχέσει προς την ποσότητα της Τριφωσφορικής αδενοσίνης (ATP).

Η φυσιολογική σημασία του 2, 3 DPG παραμένει απροσδιόριστη έως τον Αύγουστο του 1967, οπότε οι R. Benesch και R.E. Benesch δημοσιεύουν ταυτόχρονα με τους A. Chauntin και R.R. Curmish δυο ανάλογες εργασίες στις οποίες αποσαφηνίζεται ότι το εν λόγω μόριο δρα πάνω στην αιμοσφαιρίνη αλλοιώνοντας αντιστρεπτά την ικανότητα δέσμευσης του οξυγόνου (19, 53).

Τα πειράματα των ερευνητών αυτών έγιναν σε διαλύματα αιμοσφαιρίνης μέσα σε τονομετρικές φιάλες, όμως πολύ σύντομα επεκτάθηκαν και στα ανέπαφα ερυθρά αιμοσφαίρια. Έτσι το 1968 οι K. Engel και G. Duc, αποδεικνύουν ότι η μείωση των επιπέδων του 2, 3 DPG στα ανθρώπινα ερυθροκύτταρα επιφέρει αλλαγές στην ικανότητα πρόσληψης και απόδοσης οξυγόνου από το ερυθρό αιμοσφαίριο, μεταθέτοντας την καμπύλη αποδέσμευσης της οξυαιμοσφαιρίνης προς τ'αριστερά πράγμα που σε φυσιολογικό επίπεδο σημαίνει ότι η μείωση του ερυθροκυττάρου 2, 3 DPG επιφέρει μίαν αύξηση της συγγένειας της αιμοσφαιρίνης προς το μοριακό οξυγόνο, οπότε απαιτούνται μεγαλύτερες μερικές πιέσεις για να εξασφαλισθεί η αποδέσμευσή του και η έξοδος προς τους ιστούς και μικρότερες μερικές πιέσεις για να επιτευχθεί η σύνδεση της αιμοσφαιρίνης με το O₂ στα τριχοειδή των πνευμονικών κυψελίδων (89).

Οι δυο προαναφερθέντες ερευνητές επέτυχαν τη μείωση των επιπέδων του 2, 3 DPG στα ερυθρά αιμοσφαίρια χρησιμοποιώντας ιωδιοξικό ή φθοριοξικό οξύ, που αναστέλλουν την γλυκόλυση από την οποία παράγεται ο εν λόγω φωσφορικός εστέρας. Την ίδια περίπου εποχή οι Benesch και Benesch έδειξαν ότι η αιμοσφαιρίνη και το 2, 3 DPG βρίσκονται στο ερυθροκύτταρο περίπου σε ισομοριακές ποσότητες υποδεικνύοντας έτσι μια οδό για την μοριακή ερμηνεία της δράσης του (20, 21).

2. Μοριακή αλληλεπίδραση του 2, 3 DPG με την αιμοσφαιρίνη και λειτουργικές συνέπειες

Η αιμοσφαιρίνη (Hb) είναι - ως γνωστόν - μια αιμοπρωτεΐνη αποτελούμενη από τέσσερες διακριτές πολυπεπτιδικές αλυσίδες οι οποίες συνδέονται μεταξύ



τους με δεσμούς υδρογόνου συναπαρτίζοντας ένα μεγαλομοριακό σύμπλεγμα με σφαιρικό περίγραμμα. Τα πολυπεπτιδικά μονομερή, που αποτελούν τις υπομονάδες του μορίου, είναι δύο άλφα και δύο βήτα αλυσίδες στα ώριμα φυσιολογικά άτομα. Ο γενικός τύπος της αιμοσφαιρίνης είναι $\alpha_2\beta_2$, όπου το χ αναπροσωπεύει τις μη άλφα αλυσίδες και ο αριθμός 2 το πλήθος τους. Το χ μπορεί να δηλώσει αλυσίδες β , γ , δ και ϵ ανάλογα με τη χρονική στιγμή της εξέλιξης του θεωρούμενου ατόμου από την εμβρυονική στην εμβρυϊκή και κατόπιν προς την μετεμβρυϊκή φάση της ανάπτυξής του. Η ποικιλομορφία των γονιδίων που παράγουν τις αιμοσφαιρίνες αντικατοπτρίζει τις διαφορετικές ανάγκες των ιστών σε οξυγόνο κατά τη διάρκεια της οντογένεσης (287).

Κάθε μόριο αιμοσφαιρίνης περιέχει τέσσερα δραστικά κέντρα που το καθένα τους απαρτίζεται από έναν πρωτοπορφυρινικό δακτύλιο συζευγμένο με ένα άτομο δισθενούς σιδήρου (αίμη). Κάθε δακτύλιος αίμης βρίσκεται τοποθετημένος σε μια από τις πολυπεπτιδικές αλυσίδες και ο σκοπός του είναι η μεταφορά ενός μορίου οξυγόνου. Γενικά, όλες οι πολυπεπτιδικές αλυσίδες παρουσιάζουν ανάλογη τρισδιάστατη όψη και διαφέρουν μεταξύ τους ως προς τον αριθμό και την αλληλουχία των αμινοξέων που τις αποτελούν. Οι β και γ αλυσίδες περιέχουν 146 αμινοξέα ενώ οι α περιέχουν 141. Καθένα από τα 4 πολυπεπτιδικά μονομερή λαμβάνει αυθόρμητα στον χώρο και σε φυσιολογικό pH και θερμοκρασία τη μορφή μιας αδρής δεξιόστροφης σπείρας (άλφα έλικας). Οι διάφοροι βραχίονες της σπείρας που σχηματίζονται από την αναδίπλωση του μορίου χαρακτηρίζονται με λατινικά κεφαλαία γράμματα (A, B, . . . , H - σχήμα 1). Σε όλα τα μονομερή, η αλληλουχία των πολικών και μη πολικών αμινοξέων είναι τέτοια ώστε η εξωτερική επιφάνεια της σπείρας να είναι ηλεκτρικά φορτισμένη ενώ η εσωτερική να είναι ηλεκτρικά ουδέτερη. Τα μη πολικά αμινοξέα επενδύουν συνεπώς ένα χώρο στο εσωτερικό του τετραμερούς προφυλάσσοντάς το με τις υδρόφοβες ομάδες τους από την είσοδο του νερού και των πολικών μορίων για να εξασφαλισθεί έτσι η ανενόχλητη είσοδος του οξυγόνου και η προστασία του κατά τη μεταφορά από τους πνεύμονες στους ιστούς εφόσον το οξυγόνο είναι ένα δραστικώτατο χημικό στοιχείο. Ταυτόχρονα όμως τα μη πολικά αμινοξέα αλληλεπιδρούν τόσο μεταξύ τους όσο και με τα αμινοξέα των παρακείμενων ελίκων καθώς επίσης και με τους δακτύλιους της αίμης σχηματίζοντας ένα είδος "σκελετού" που αποδίδει στο τετραμερές το γενικό σφαιρικό του σχήμα. Ο υδρόφοβος πυρήνας στο κέντρο του μορίου λέγεται και "εσωτερική τσέπη" της αιμοσφαιρίνης. Αντίθετα τα πολικά αμινοξέα που βρίσκονται στην εξωτερική επιφάνεια των αλυσίδων φέρουν σουλφυδρυλικές



ομάδες οι οποίες αλληλεπιδρούν με τα ιόντα του υδατικού περιβάλλοντος προσδένοντας το μόριο πρὸς αυτά και αναγκάζοντάς το να διατηρεί το σφαιρικό του σχήμα και συνεπώς τη λειτουργικότητά του, εφόσον η μορφή αυτή είναι θερμοδυναμικά η πλέον "συμφέρουσα". Οι ουσίες που μπορούν να οξειδώσουν τις σουλφυδρυλικές ομάδες σπάζουν τους δεσμούς πρόσδεσης της αιμοσφαιρίνης προς το υδατικό περιβάλλον της, αναγκάζοντάς την να βγει από την κατάσταση διαλύματος, να κρυσταλλοποιηθεί και να κατακρημνισθεί με απώλεια της λειτουργικής της ικανότητας και συνακόλουθη βλάβη της αιμοσφαιρικής μεμβράνης (σωμάτια Heinz-δρεπανοκυττάρωση) (287, 288).

Για την κατανόηση της λειτουργικότητας του αιμοσφαιρινικού μορίου πρέπει να λάβουμε υπόψιν μας ότι οι αλυσίδες των μονομερών συγκροτούνται μεταξύ τους από 17-19 δεσμούς υδρογόνου οι οποίοι αναπτύσσονται στις θέσεις $\alpha_1\beta_1$ και $\alpha_2\beta_2$, όπως επίσης και στις θέσεις $\alpha_1\beta_2$ και $\alpha_2\beta_1$. Ενώ το πρώτο ζεύγος δεσμών είναι εξαιρετικά σταθερό και δεν επηρεάζεται από τις αντιδράσεις σύνδεσης του O_2 με τις αίμες, αντίθετα το δεύτερο ζεύγος ($\alpha_1\beta_2$ και $\alpha_2\beta_1$) εμφανίζει δεσμούς μικρότερης έντασης και έκτασης οι οποίοι χαλαρώνουν όταν το O_2 συνδέεται με το μόριο της αίμης (δράση -I) και εντατικοποιούνται όταν το O_2 αποσυνδέεται. Αυτές οι μεταβολές έχουν σαν συνέπεια τη χαλάρωση της δομής του αιμοσφαιρινικού μορίου όταν το οξυγόνο συνδέεται με την αίμη και την απομάκρυνση των δύο ζευγών των μονομερών του, με ταυτόχρονο άνοιγμα των "ραφών" του μορίου και μεγαλύτερη έκθεση των πρωτοπορφυρινικών δακτυλίων· έτσι εξηγείται και η αύξηση της χημικής συγγένειας της Hb προς το οξυγόνο όταν αυτό αρχίζει και συνδέεται μαζί της. Η "χαλαρωμένη" μορφή Hb λέγεται μορφή R (= Tant = τεταμένη). Η σχέση $T/R = L$ αποτελεί έναν δείκτη που μας επιτρέπει να υπολογίσουμε ποιά από τις δυο μορφές επικρατεί σε ένα δεδομένο διάλυμα αιμοσφαιρίνης υπό συγκεκριμένες συνθήκες. Είναι προφανές ότι οποιαδήποτε χημική ουσία που δεν ανταγωνίζεται το οξυγόνο για την πρόσδεση με τον σίδηρο της αίμης αλλά δρα σε άλλες περιοχές του αιμοσφαιρινικού μορίου επιφέροντας μεταβολές στο συνολικό ηλεκτρικό φορτίο (δράσεις I^- και I^+), ευνοεί τη μετάπτωση του σχήματος της αιμοσφαιρίνης από τη μορφή R στη μορφή T και αντιστρόφως. Έτσι το 2, 3 DPG, το CO_2 , το Cl^- και τα ιόντα υδρογόνου ελαττώνουν τη χημική συγγένεια της Hb με το οξυγόνο προάγοντας τη μορφή T και αυξάνοντας το δείκτη $L = T/R$ χωρίς να μεταβάλλουν τη χημική σταθερά ισορροπίας του οξυγόνου προς τη μορφή R (K_R) ή προς τη μορφή T (K_T). Οι διάφοροι ιοντικοί δεσμοί (δεσμοί άλατος) που αναπτύσσονται μεταξύ θετικά φορτισμένων ατόμων αζώτου και αρνητικά



φορτισμένων ατόμων οξυγόνου (όπως στην περίπτωση των φορτισμένων οξυγόνων του 2, 3 DPG) σταθεροποιούν τη μορφή T μειώνοντας τη χημική συγγένειά της προς το O₂ και διευκολύνοντας την αποσύνδεσή του από τις αίμες. Κάθε μείωση του O₂ στους περιφερικούς ιστούς έχει σαν αποτέλεσμα την αύξηση της συγκέντρωσης του 2, 3 DPG μέσα στο ερυθρό αιμοσφαίριο. Στην κατάσταση αυτή πολλά από τα αιμοσφαιρινικά μόρια έχουν αποδώσει εν μέρει ή εν όλω τα οξυγόνα τους οπότε γενικά στο αιμοσφαίριο υπάρχει η τάση το ποσό της T μορφής της αιμοσφαιρίνης να είναι μεγαλύτερο εν σχέσει προς την R μορφή (287, 288).

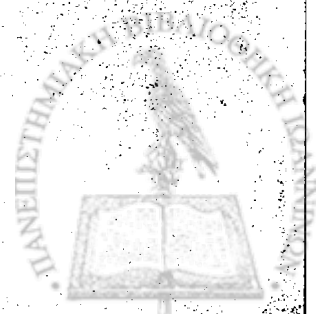
Η "εσωτερική τσέπη" της αιμοσφαιρίνης μπορεί να χωρέσει ένα μόριο 2, 3 DPG υπό την προϋπόθεση ότι η σφαιρίνη πρέπει να βρίσκεται στην κατάσταση T ώστε το άνοιγμα μεταξύ των ελίκων Η των βήτα αλυσίδων να είναι επαρκές. Η αυξημένη συγκέντρωση του 2, 3 DPG και η ελαττωμένη συγκέντρωση του O₂ ευνοούν την επικράτηση των μορφών T. Δεδομένου ότι η μετάπτωση από την μορφή T στην R και αντίστροφα, δεν είναι μια διαδικασία του τύπου "όλα ή τίποτα", οι ενδιάμεσες μορφολογικές καταστάσεις και η αυξημένη συγκέντρωση του 2, 3 DPG ευνοούν την είσοδό του στην "εσωτερική τσέπη" της αιμοσφαιρίνης και την πρόσδεσή του μέσω αλατούχων γεφυρών με τις αζωτελικές αμινομάδες (Val. NA₁, Lys. EF₆, και His. H₂₁) και τα εναπομείναντα μόρια O₂, σταθεροποιώντας έτσι την αναχθείσα μορφή T. Οι δεσμοί των β-αλυσίδων ισχυροποιούνται και έτσι το μόριο προάγεται προς τη μορφή T. Το 2, 3 DPG συνδέεται ασθενέστερα με την εμβρυϊκή αιμοσφαιρίνη HbF από,τι με την HbA και συνεπώς έχει μικρότερη σημασία για την σταθεροποίηση της μορφής T της εμβρυϊκής αιμοσφαιρίνης. Φυσικά οι στερικές αλληλεπιδράσεις που περιγράψαμε με αδρό τρόπο εδώ είναι πολύ πιο περίπλοκες αλλά η λεπτομερής τους παρουσίαση ξεφεύγει από τα όρια και τους σκοπούς της ανά χειρας εργασίας. Παρά την όλη περιπλοκότητα αυτό που βγαίνει σαν συμπέρασμα είναι το εξής: "Η ανεξαρτήτως αιτιολογίας αύξηση της συγκέντρωσης του 2, 3 DPG στο ερυθροκύτταρο ευνοεί τη μετάπτωση της αιμοσφαιρίνης από την μορφή R προς τη μορφή T χωρίς να αλλοιώνει τη σταθερά ισορροπίας μεταξύ O₂ και αιμοσφαιρινικού μορίου, πράγμα που σημαίνει ότι σε περιβάλλον αυξημένων μερικών πιέσεων οξυγόνου-όπως το περιβάλλον των κυψελιδικών τριχοειδών- η ικανότητα πρόσληψης οξυγόνου από την αιμοσφαιρίνη παραμένει αναλλοίωτη (εφόσον βρισκόμαστε στο "πλατώ" της σιγμοειδούς καμπύλης), οπότε το ερυθροκύτταρο φορτίζεται κανονικά με οξυγόνο το οποίο αποδεσμεύει



ευκολώτερα στους περιφερικούς ιστούς εξ'ατίας της αυξημένης ρύθμισης εκ μέρους του 2, 3 Διφωσφθγλυκερικού οξέος (85, 288).

...

...



3. Αλληλεπιδράσεις μεταξύ των μεταβολών της συγκέντρωσης του 2, 3 DPG, φαινομένου Bohr και ισορροπίας Donnan στο ερυθροκύτταρο

Οι μεταβολές του 2, 3 DPG δεν επηρεάζουν μόνο τη συγγένεια του οξυγόνου προς την αιμοσφαιρίνη αλλά και την ένταση του φαινομένου Bohr μέσα στο ερυθροκύτταρο (243, 85). Το γεγονός αυτό φαίνεται στην εικόνα 1 η οποία παρουσιάζει την συσχέτιση που υφίσταται μεταξύ της P₅₀ διαφόρων διαλυμάτων αιμοσφαιρίνης, οι οποίες προκαλούνται από ταυτόχρονες μεταβολές της πυκνότητάς τους σε 2, 3 DPG και παράλληλες αλλοιώσεις του PH (85, 83). Όπως εμφανίζεται στο διάγραμμα η P₅₀ αυξάνεται

- 1) με την αύξηση της συγκέντρωσης του 2, 3 DPG σε όλα τα μελετηθέντα PH και
- 2) με την ελάττωση του PH λόγω του φαινομένου Bohr σε όλες τις συγκεντρώσεις του 2, 3 DPG.

Ωστόσο, όπως φαίνεται από το διάγραμμα, η κατ'απόλυτον τιμή αύξηση της P₅₀ σε σχέση με την άνοδο του 2, 3 DPG σχετίζεται με μια αύξηση της κλίσης των ευθειών που καθορίζονται από τη σχέση P₅₀ και PH πράγμα που δεικνύει την ύπαρξη κάποιων μεταβολών του συντελεστή Bohr. Οι μεταβολές του συντελεστή Bohr ($\Delta \log P_{50} / \Delta PH$) σε συνάρτηση με την αύξηση της συγκέντρωσης του 2, 3 DPG φαίνονται στην εικόνα 2 στην οποία ο συντελεστής αυξάνει από την τιμή -0,22 που αντιστοιχεί σε μηδενική συγκέντρωση 2, 3 DPG έως την τιμή -0,47 που αντιστοιχεί σε συγκέντρωση 8mM 2, 3 DPG. Μια περαιτέρω αύξηση των ποσοτήτων του 2, 3 Διφωσφογλυκερικού οξέος δεν επιφέρει καμιά μεταβολή στον εν λόγω συντελεστή πράγμα που σημαίνει ότι η μέγιστη δράση του DPG εκδηλώνεται όταν ο λόγος 2, 3 DPG/τετράμερα αιμοσφαιρίνης είναι ίσος προς 2. Στα ανέπαφα ερυθροκύτταρα ωστόσο, η μεταβολή της χημικής συγγένειας μεταξύ O₂ και αιμοσφαιρίνης που οφείλεται στη δράση του 2, 3 DPG δεν καθορίζεται μονοσήμαντα από την άμεση αλληλεπίδραση του μορίου αυτού με την αιμοσφαιρίνη αλλά και με την παρεμβολή ενός έμμεσου μηχανισμού ο οποίος σχετίζεται με το PH του ερυθροκυττάρου.

Πράγματι, έχει αποδειχθεί ότι η αύξηση της συγκέντρωσης του 2, 3 DPG στο εσωτερικό του ερυθρού αιμοσφαιρίου έχει, μεταξύ των άλλων και σαν συνέπεια, τη γραμμική ελάττωση του ενδοκυτταρικού PH με ρυθμό 0,017 μονάδων ανά μμολ DPG (και PH πλάσματος = 7,4). Το φαινόμενο αυτό οφείλεται



στο γεγονός ότι το 2, 3 DPG είναι ένα ιονισμένο μόριο το οποίο δεν μπορεί να διέλθει από τους πόρους της ερυθροκυτταρικής μεμβράνης τόσο με διάχυση όσο και με ενεργό μεταφορά (83). Επειδή ο διφωσφορικός αυτός εστέρας φέρει 4 αρνητικά φορτία και δεν διέρχεται δια μέσου της μεμβράνης το αποτέλεσμα της αύξησης της συγκέντρωσής του είναι μια διαταραχή της ισορροπίας Donnan σε ότι αφορά την είσοδο των ανιόντων που έχουν ικανότητα διαμεμβρανικής κίνησης όπως επίσης και των υδρογονοκαπνόντων. Έτσι το ερυθροκύτταρο χάνει μια ποσότητα νερού ενώ ταυτόχρονα το ΡΗ του ελαττώνεται πράγμα το οποίο λειτουργεί ανασχετικά για τον ρυθμό ροής των αντιδράσεων της γλυκολυτικής αλυσίδας από την οποία παράγεται το 2, 3 DPG. Έτσι, η αύξηση του 2, 3 Διφωσφογλυκερικού οξέος οδηγεί σε μείωση του ΡΗ, η οποία ενισχύει την ένταση του φαινομένου Bohr και ταυτόχρονα αναστέλει την περαιτέρω παραγωγή του εν λόγω εστέρα θέτοντας ένα ανοδικό φράγμα στη δράση του επί της αιμοσφαιρίνης.

Συνοψίζοντας, μπορούμε να πούμε ότι οι μεταβολές της συγγένειας της αιμοσφαιρίνης προς το O_2 συναρτήσει της μεταβολής της συγκέντρωσης του 2, 3 DPG οφείλονται στην παρέμβαση των τριών ακόλουθων μηχανισμών:

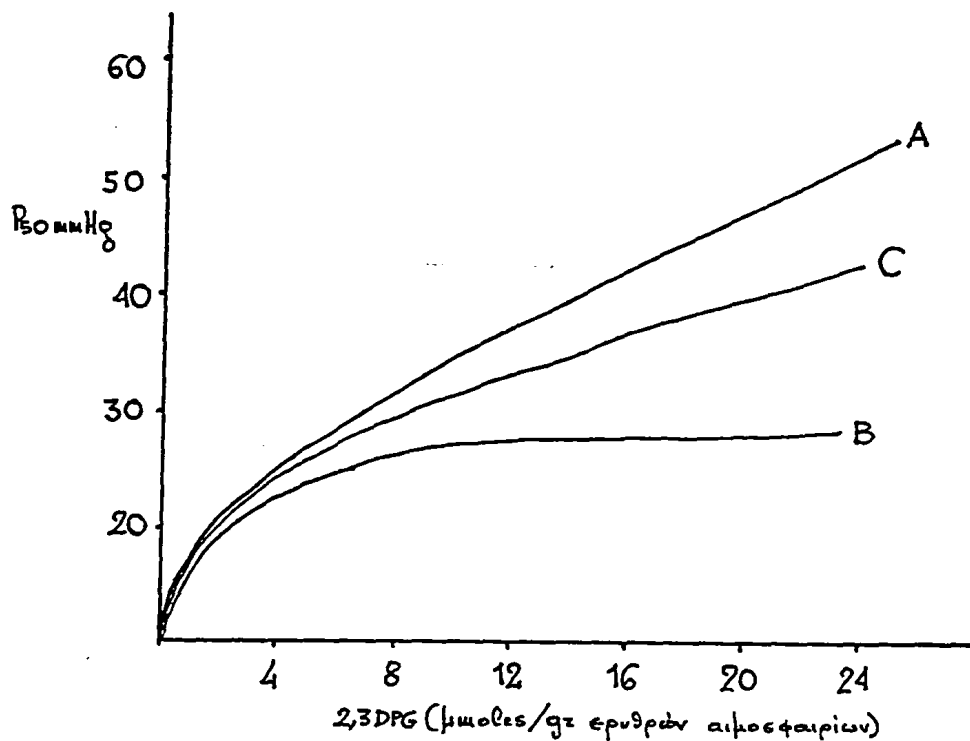
- 1) Της άμεσης δράσης του 2, 3 DPG στο αιμοσφαιρινικό μόριο.
- 2) Της δράσης του 2, 3 DPG πάνω στο φαινόμενο Bohr.
- 3) Της ελάττωσης του ΡΗ του ερυθροκυττάρου μέσω της αύξησης της συγκέντρωσης του 2, 3 DPG.

Η συνεισφορά των τριών αυτών μηχανισμών εμφανίζεται ποσοτικά στην εικόνα 3.



Εικόνα 3: Τριπλή δράση του 2, 3 DPG στην P₅₀ του ανθρώπινου αίματος.
(Επεξήγηση στο κείμενο).

2, 3 DPG (μmol/gr ερυθρών αιμοσφαιρίων)



Η καμπύλη Α της προηγούμενης εικόνας αναπαριστά τη σχέση μεταξύ της P_{50} και της συγκέντρωσης του 2, 3 DPG στο ερυθροκύτταρο όταν το PH του πλάσματος είναι 7,4. Η τιμή της P_{50} αυξάνεται από 15 σε 45 mmHg με μια παράλληλη αύξηση της ποσότητας του 2, 3 DPG από 0 σε 35 $\mu\text{moles/ανά gr}$ ερυθροκυττάρων.

Η καμπύλη Β προκύπτει από την Α αναπροσαρμόζοντας την P_{50} σε ένα σταθερό ενδοκυττάριο PH 7,25 μέσω της χρησιμοποίησης του συντελεστή Bohr που εξάγεται από την εικόνα 2. Πρέπει να σημειωθεί ότι το PH 7,25 αντιστοιχεί σε εκείνη την τιμή που θα είχαμε μέσα στο ερυθρό αιμοσφαίριο αν η συγκέντρωση του 2, 3 DPG ήταν μηδενική ή αμελητέα και το πλάσματικό PH ήταν ίσο προς 7,4 όπως και προηγουμένως (καμπύλη Α). Η απόσταση μεταξύ της καμπύλης Β και του άξονα των τετμημένων (άξονας τιμών συγκέντρωσης DPG) αποτελεί ένα μέτρο της άμεσης αλλοστερικής δράσης του 2, 3 Διφωσφογλυκερινικού οξέος στη χημική συγγένεια της αιμοσφαιρίνης με το O_2 . Η απόσταση μεταξύ των καμπυλών Α και Β αντικατοπτρίζει τις μεταβολές της P_{50} τις οφειλόμενες στις άλλες δύο δράσεις του 2, 3 DPG.

Η καμπύλη C προκύπτει από την αναπροσαρμογή της καμπύλης Β στο πραγματικό ενδοερυθροκυττάριο PH χρησιμοποιώντας τον συντελεστή Bohr στην τιμή -0,22 που αντιστοιχεί σε μηδενική συγκέντρωση 2, 3 DPG. Με τον τρόπο αυτό μπορούν να αποσβηστούν από την καμπύλη Α οι μεταβολές της P_{50} οι οφειλόμενες στη δράση του 2, 3 DPG πάνω στον συντελεστή του φαινομένου Bohr. Έτσι η απόσταση μεταξύ της καμπύλης Α και Β αντικατοπτρίζει τις αλλαγές της P_{50} που προκαλούνται από το 2, 3 DPG πάνω στο ενδοερυθροκυττάριο PH σε ένα σταθερό συντελεστή Bohr τιμής -0,22. Ταυτόχρονα η απόσταση μεταξύ των καμπυλών Α και C αντανάκλα τις μεταβολές της P_{50} που προκύπτουν από τη δράση του 2, 3 DPG στην ένταση με την οποία εκδηλώνεται το φαινόμενο Bohr.

Είναι προφανές ότι οι μεταβολές της χημικής συγγένειας του O_2 προς την αιμοσφαιρίνη μέσω του χειρισμού των επιπέδων του ερυθροκυττάρου DPG επιφέρουν αλλαγές στη λειτουργικότητα του αίματος σε μεταφορικό μέσου του οξυγόνου για την αναπνοή των ιστών. Ωστόσο τα συστημικά αποτελέσματα των μεταβολών αυτών δεν είναι δυνατόν, μέχρι στιγμής, να προσδιοριστούν με ακρίβεια με τη χρησιμοποίηση των κλασικών μαθηματικών μεθόδων επειδή το πρόβλημα της συμπεριφοράς του αίματος σε ρυθμιστή της ιστικής οξυγόνωσης δεν είναι ένα γραμμικό πρόβλημα, δοθέντος ότι υπάρχει μεγάλος βαθμός



ασυνέχειας κατά μήκος των διακλαδώσεων του κυκλοφορικού δέντρου και ειδικότερα στο τριχοειδικό δίκτυο. Η ασυνέχεια αυτή δεν είναι μόνο γεωμετρικού χαρακτήρα αλλά συσχετίζεται προφανώς τόσο με τις μεταβαλλόμενες μεταβολικές ανάγκες στα διάφορα τμήματα των ιστών, όσο και με την επιμέρους δυναμική της λειτουργίας των δομών του κυκλοφορικού (79, 329, 330).

Στον τομέα αυτό αναπτύσσεται τα τελευταία χρόνια σαν μαθηματικό εργαλείο τυποποίησης της περιγραφής των λειτουργιών η θεωρία του άριστου ελέγχου (291).

4. Συστημικές συνέπειες της μεταβολής της θέσης στην καμπύλη αποδέσμευσης οξυγόνου από την οξυαιμοσφαιρίνη-Πειραματικά μοντέλα κλινικές παρατηρήσεις και εφαρμογές

Είναι γενικά παραδεκτό ότι στον ενήλικα μια μετακίνηση προς τα δεξιά της καμπύλης αποδέσμευσης της οξυαιμοσφαιρίνης μέσω αύξησης των επιπέδων του ερυθροκυτταρικού 2, 3 Διφωσφογλυκερικού οξέος θα οδηγούσε σε μια ευκολότερη αποδέσμευση οξυγόνου και συνεπώς σε μια καλύτερη οξυγόνωση των περιφερικών ιστών. Το θέμα έχει μεγάλο κλινικό ενδιαφέρον εφ'όσον οι ισχαιμικές καταστάσεις αποτελούν τη σοβαρότερη και συχνά κρισιμότερη περίσταση την οποία καλείται να αντιμετωπίσει πολύ συχνά στην καθημερινή του πράξη ο γιατρός τόσο στο χώρο της εσωτερικής παθολογίας, όσο και στο χώρο της χειρουργικής (136).

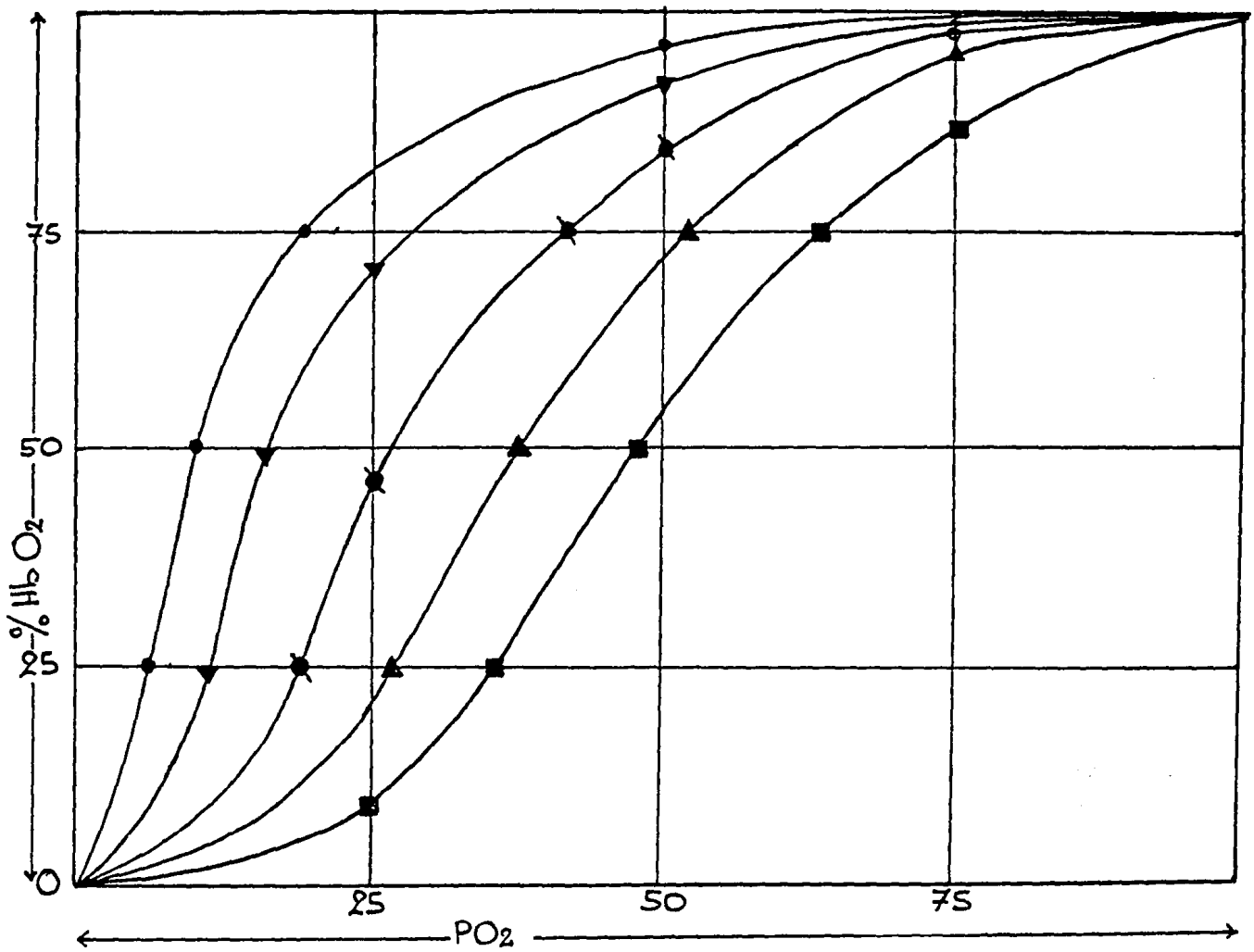
Διάφορες μελέτες έχουν γίνει για τον προσδιορισμό των μέγιστων μεταβολών που προκαλούνται

- 1) Στην απελευθέρωση οξυγόνου και
- 2) Στην PO_2 των τριχοειδών από μια μετατόπιση της καμπύλης αποδέσμευσης οξυγόνου της οξυαιμοσφαιρίνης μέσω χειρισμού των ερυθροκυτταρικών συγκεντρώσεων του 2, 3 Διφωσφογλυκερικού οξέος.

Τα πειραματικά δεδομένα που επιτρέπουν μια προσέγγιση του θέματος δόκιμη θεωρητικής επεξεργασίας, φαίνονται με τις αναγκαίες συμπληρώσεις και σχηματοποιήσεις στην εικόνα 4 (85). Μια προσεκτική εξέταση των δεδομένων



Εικόνα 4.



2,3DPG μmoles / gr ερυθρών : ● : 0.1, ▼ : 1.0, ● : 4.4, ▲ 11.5, ■ : 23.0



του διαγράμματος της 4. αποκαλύπτει ότι η μετατόπιση προς τα δεξιά της καμπύλης αποδέσμευσης οξυγόνου μπορεί να επηρεάσει:

- 1) Την ποσότητα του οξυγόνου που αποδεσμεύεται κάτω από μια δεδομένη μερική πίεση του αερίου αυτού στο αίμα και
- 2) Τη μερική πίεση του οξυγόνου (PO_2) μέσω μιας συγκεκριμένης τιμής αποδέσμευσής του.

Προφανώς είναι δυνατόν να επηρεαστούν ταυτόχρονα και οι δύο αυτές προαναφερθείσες παράμετροι.

Οι πειραματικές *in vitro* προσπελάσεις του προβλήματος έδειξαν ότι το εύρος των επιδράσεων που έχει στις δύο θεωρούμενες παραμέτρους η προκαλούμενη από το 2, 3 DPG προς τα δεξιά μετατόπιση της καμπύλης εξαρτάται από τη μερική πίεση PO_2 στην οποία φορτίζονται με O_2 τα ερυθροκύτταρα. Εξαρτάται δηλαδή από τη μερική τάση οξυγόνωσής τους. Η εξάρτηση αυτή εμφανίζεται στα σχεδιαγράμματα 5 και 6 για δύο συγκεκριμένες τιμές πιέσεων φόρπισης: την τιμή των 100 mmHg και την τιμή των 60 mmHg O_2 . Τα διαγράμματα των εικόνων αυτών δείχνουν ότι οι μεταβολές της αποδέσμευσης του O_2 και της PO_2 προκύπτουν από τις αυξομειώσεις του περιεχομένου στα ερυθροκύτταρα 2, 3 DPG πέρα από τη φυσιολογική τιμή των 4,4 μ moles DPG/gr ερυθρών αιμοσφαιρίων. Οι μεταβολές αυτές τελούνται σε *in vitro* πειράματα και υπό σταθερό PH, PCO_2 και θερμοκρασία. Δοθέντος ότι οι τελευταίοι αυτοί τρεις παράγοντες διαφέρουν σημαντικά στο επίπεδο των πνευμόνων και στο επίπεδο των τριχοειδών *in vivo*, συνεπάγεται ότι τα αποτελέσματα των εν λόγω υπολογισμών δεν μπορούν να επεκταθούν και στις *in vivo* συνθήκες χωρίς τις απαραίτητες επιφυλάξεις. Αναλυτικά, στα διαγράμματα της εικόνας 5 αναγράφεται η σχέση που υπάρχει μεταξύ των μεταβολών της απελευθέρωσης οξυγόνου από τα ερυθροκύτταρα και της μερικής πίεσης PO_2 του τριχοειδικού δικτύου όταν το περιεχόμενο των ερυθρών αιμοσφαιρίων σε DPG μεταβάλλεται από συγκεντρώσεις χαμηλότερες του φυσιολογικού σε συγκεντρώσεις πολλαπλάσιές του. Το πρώτο διάγραμμα αντιπροσωπεύει πειράματα που έγιναν υπό πίεση οξυγόνωσης των αιμοσφαιρίων ίση προς 100mmHg O_2 , ενώ στο δεύτερο η πίεση ήταν 60mmHg O_2 . Παρατηρούμε ότι στην περίπτωση της αυξημένης μερικής πίεσης οξυγόνωσης η αποδέσμευση O_2 από τα ερυθροκύτταρα είναι πολύ υψηλή και κυμαίνεται μεταξύ των 25 και 30% του συνολικού περιεχομένου σε οξυγόνο της οξυαιμοσφαιρίνης όταν το 2, 3 DPG

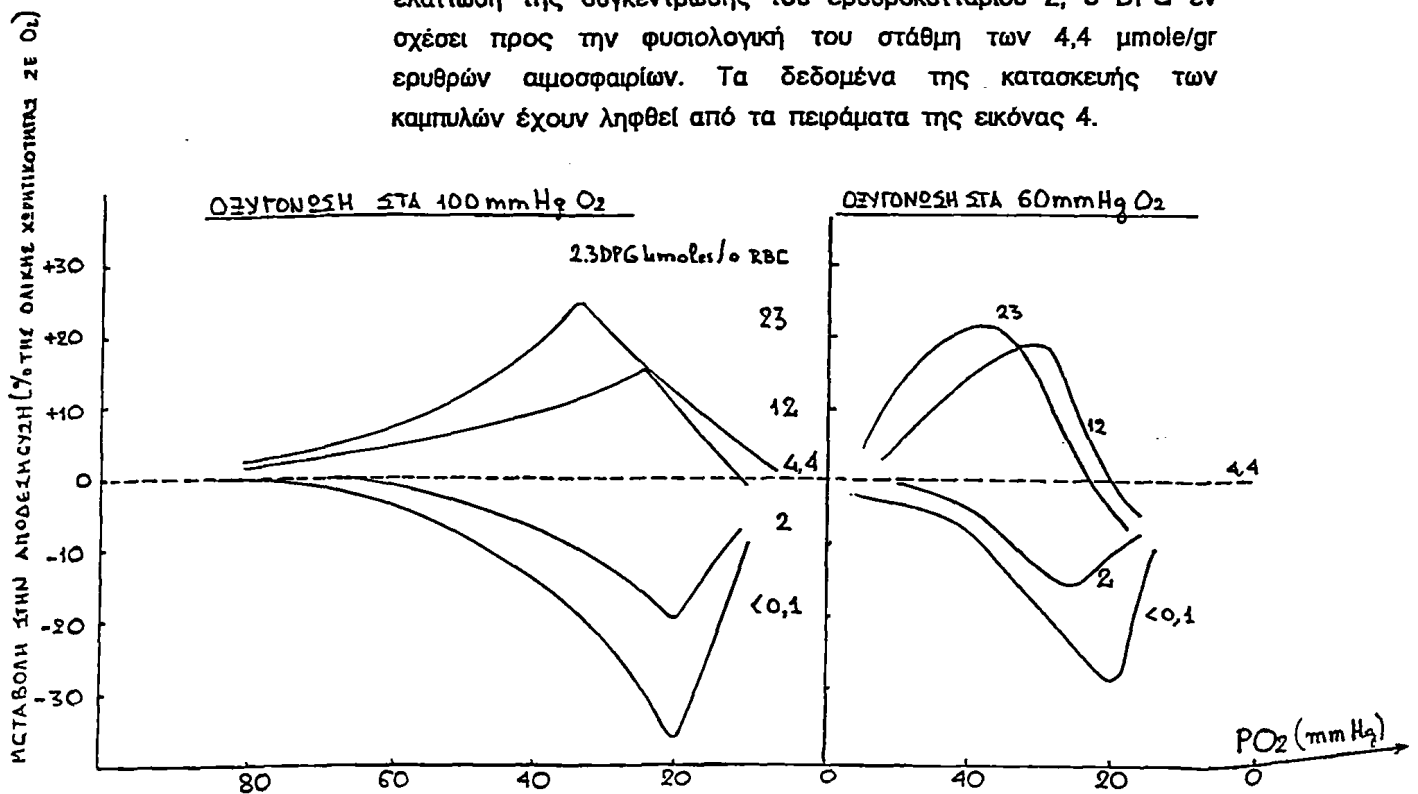


είναι ίσο προς 23 μμοles/gr ερυθροκυττάρων. Μια ανάλογη μέγιστη αποδέσμευση παρουσιάζεται όταν το 2, 3 DPG είναι ίσο προς 12 μμοles/gr ερυθρών. Αυτό που δημιουργεί εντύπωση είναι το εξής: Όταν το 2, 3 Διφωσφογλυκερικό οξύ κατέλθει χαμηλότερα από την φυσιολογική του συγκέντρωση (4,4 μμοles/gr ερυθροκυττάρων) τότε η αποδέσμευση του O₂ από το ερυθροκύτταρο μειώνεται αποφασιστικά λαμβάνοντας μια βαθύτερη (minimum) τιμή σε συνθήκες τριχοειδικής PO₂ μεταξύ 40 και 20mmHg. Αυτό σημαίνει ότι εκείνα τα ευθρά αιμοσφαίρια που εμφανίζουν συγκεντρώσεις 2, 3 DPG μικρότερες του φυσιολογικού είναι δυνατόν να δεσμεύουν (εξάγουν) οξυγόνο από τους ιστούς όταν η μερική πίεση του κατέρχεται στις προαναφερθείσες τιμές (40-20mmHg). Αντίθετα μετά από τις τιμές αυτές τα εν λόγω ευθρά αποδίδουν (αποδεσμεύουν) οξυγόνο, όπως φαίνεται κι από την πορεία των καμπυλών οι οποίες τείνουν να τμήσουν το επίπεδο της αποδέσμευσης σε οξυγόνο που αντιστοιχεί στα 4,4 μμοles DPG/gr RBC. Τα φαινόμενα αυτά υποδεικνύουν ότι αν οι εν λόγω αντιδράσεις των ερυθρών αιμοσφαιρίων διατηρούνται και in vivo, τότε η αύξηση των επιπέδων του 2, 3 DPG και η φόρτιση των ερυθροκυττάρων σε υψηλή μερική πίεση O₂ αποβαίνει θετική για την ιστική οξυγόνωση, ενώ αντιθέτως σ'όλες εκείνες τις περιπτώσεις που έχουμε ελάττωση της συγκέντρωσης του 2, 3 DPG κάτω του φυσιολογικού τα ερυθροκύτταρα είναι δυνατόν να εξάγουν οξυγόνο από τους ιστούς με μέγιστη ένταση στις κρίσιμες τιμές μεταξύ 40 και 20mmHg επιβαρύνοντας έτσι την ιστική οξυγόνωση και οδηγώντας σε ισχαιμία!

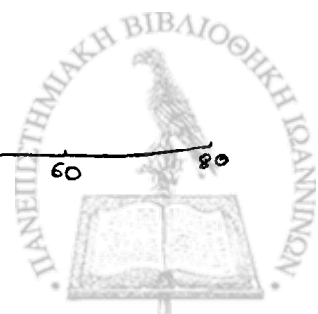
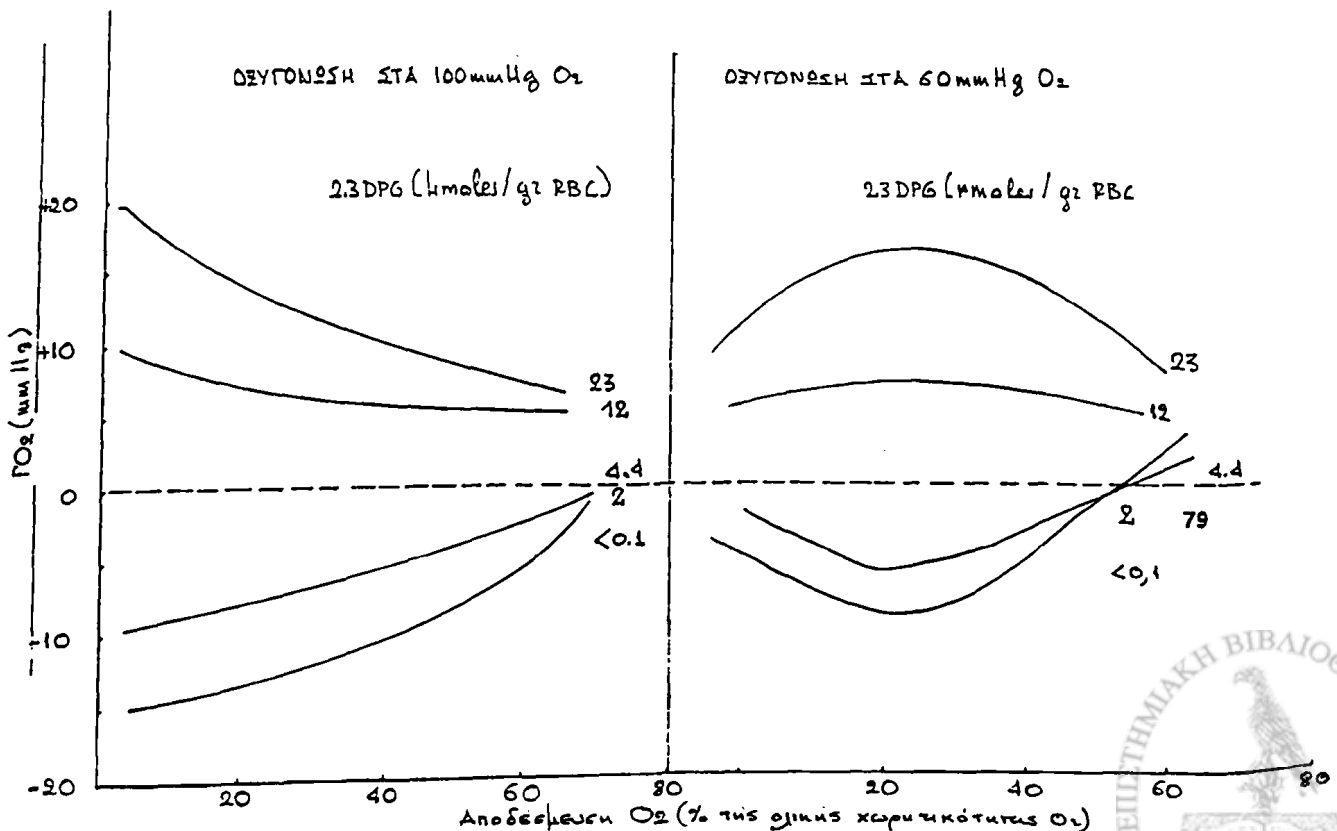
Αυτό σημαίνει ότι ορισμένες μεταβολικές δυσλειτουργίες όπως ο διαβήτης, η οξέωση και η συνακόλουθη αναστολή ή επιβράδυνση της γλυκόλυσης στο ερυθροκύτταρο μπορούν να αποβαίνουν κρίσιμες και να ευνοούν την ιστική ισχαιμία κατακρημνίζοντας τα επίπεδα του ερυθροκυττάρου DPG κάτω των φυσιολογικών τιμών τους. Τα φαινόμενα αυτά επαναλαμβάνονται και όταν η πίεση οξυγόνωσης είναι ίση προς 60mmHg μόνο που είναι λιγότερο έντονα.



Εικόνα 5: Αλλαγές της αποδέσμευσης O_2 οφειλόμενες στην αύξηση ή την ελάττωση της συγκέντρωσης του ερυθροκυττάριου 2, 3 DPG εν σχέσει προς την φυσιολογική του στάθμη των 4,4 μμολε/γρ ερυθρών αιμοσφαιρίων. Τα δεδομένα της κατασκευής των καμπυλών έχουν ληφθεί από τα πειράματα της εικόνας 4.



Εικόνα 6: Μεταβολές της PO_2 οφειλόμενες στην αύξηση και τη μείωση του περιεχομένου 2, 3 DPG στα ερυθροκύτταρα, σε σχέση με τη φυσιολογική απαντώσα ποσότητά του (4,4 μμολε/γρ ερυθρών)



Όσον αφορά τη σχέση μεταξύ PO_2 και αποδέσμευσης οξυγόνου σε ερυθρά αιμοσφαίρια διαφορετικού περιεχομένου σε DPG και υπό συνθήκες οξυγόνωσης 100mmHg και 60mmHg PO_2 αυξάνει όταν η αποδέσμευση O_2 κυμαίνεται μεταξύ 20-30% της συνολικής περιεκτικότητας της αιμοσφαιρίνης σε οξυγόνο. Η μέγιστη αυτή αποδέσμευση αντιστρέφεται όταν το 2, 3 DPG είναι χαμηλότερο των φυσιολογικών του επιπέδων. Τα πειράματα που αντιπροσωπεύονται στα διαγράμματα της εικόνας 6 δείχνουν ότι η μέγιστη αποδέσμευση O_2 μπορεί να προκαλέσει αύξηση της τιμής της PO_2 κατά 5mmHg η οποία, κατάρχας, φαίνεται μικρή για να επηρεάσει σημαντικά την ιστική οξυγόνωση. Ωστόσο δεν αποκλείεται να είναι σημαντική σε συνθήκες που έχει ήδη αποδεσμευθεί μεγάλη ποσότητα O_2 και οι μερικές ιστικές πιέσεις (PO_2) του αερίου αυτού διατηρούνται χαμηλές.

Κάτω από ποικίλες *in vivo* συνθήκες (υποξία, αναμία, καρδιοπνευμονικές νόσοι κ.λ.π.) οι μεταβολές του ερυθροκυτταρικού 2, 3 DPG είναι σχετικά μικρές εν συγκρίσει με τις μελετηθείσες εδώ και συνεπώς οι αλλαγές στην αποδέσμευση του O_2 και της τριχοειδικής PO_2 πρέπει να είναι κατά πολύ μετριώτερες εκείνων που παρουσιάζονται στα διαγράμματα των εικόνων 5 και 6. Μόλα ταύτα υπάρχουν κλινικές ενδείξεις όπως επίσης και πειραματικά μοντέλα που υποδεικνύουν ότι οι μεταβολές αυτές, καίτοι ποσοτικά μικρές, θα μπορούσαν να επηρεάσουν εν τούτοις θετικά την ιστική οξυγόνωση (325). Ωστόσο είναι σκόπιμο σύμφωνα με τα πειραματικά δεδομένα των διαγραμμάτων 5 και 6 να μην υπερεκτιμηθεί η υπόθεση αυτή χωρίς προηγούμενα να γίνει μια εκτεταμένη ανάλυση των υπέρ και των κατά της τόσο στο πειραματικό επίπεδο σε *in vivo* μελέτες, όσο και στον τομέα της κλινικής παρατήρησης προκειμένου να οριοθετηθεί η πρακτική εκμετάλευση των φαινομένων αυτών στην κλινική πράξη, στην προληπτική ιατρική και στον τομέα της αθλητιατρικής (85).

5. Βιοχημική ρύθμιση των επιπέδων του 2, 3 DPG στο ερυθροκύτταρο και *in vitro* χειρισμός τους

Τα ερυθροκύτταρα, ως γνωστόν, δεν διαθέτουν αερόβιο μεταβολισμό, δηλαδή μιτοχόνδρια για την παραγωγή της απαιτούμενης υπό μορφή ATP ενέργειας, προκειμένου να ασκήσουν τον λειτουργικό τους σκοπό.

Δεν γνωρίζουμε τους λόγους για τους οποίους η φυσική επιλογή επέλεξε την εξαφάνιση των μιτοχονδρίων από τα ώριμα ερυθρά αιμοσφαίρια, αλλά



λαμβάνοντας υπόψη τη γενική γραμμή της διαφοροποιητικής τους διεύθυνσης είναι λογικό να υποθέσουμε ότι το μιτοχόνδριο εξαφανίστηκε από το ερυθροκύτταρο γιατί απλούστατα θα κατανάλωνε ένα μεγάλο τμήμα του οξυγόνου που μεταφέρεται μέσω της αιμοσφαιρίνης οπότε θα μείωνε τη λειτουργική αξία του κυτταρικού αυτού τύπου ως μεταφορέα οξυγόνου προς τους περιφερικούς ιστούς.

Συνεπώς ο σταθμός ενεργοποίησης του ερυθροκυττάρου αντιπροσωπεύεται από τη γλυκολυτική αλυσίδα και συνεπικουρείται από την οδό των φωσφορικών πεντοζών, από την οποία παράγεται το μέγα μέρος του αναγωγικού δυναμικού που είναι επίσης αποφασιστικής σημασίας για τη βιωσιμότητα του ερυθρού αιμοσφαιρίου.

Η γλυκολυτική οδός στο ερυθροκύτταρο παρουσιάζει μια παράκαμψη η οποία ξαναεπιστρέφει στην κύρια κοίτη της ροής των γλυκολυτικών αντιδράσεων και η οποία είναι γνωστή με το όνομα "παρακύκλωμα Rapoport" από τον ερευνητή που επεσήμανε την παρουσία της (261). Το 2, 3 DPG αποτελεί το κύριο προϊόν του παρακυκλώματος αυτού το οποίο περιλαμβάνει δύο ένζυμα, ένα ένζυμο "εισόδου" και ένα ένζυμο "εξόδου". Το ένζυμο εισόδου είναι η Διφωσφογλυκερική μούταση που μετατρέπει το 1, 3 DPG σε 2, 3 DPG και το ένζυμο εξόδου είναι η διφωσφογλυκερική φωσφατάση που αποσπά τη φωσφορική ρίζα του δεύτερου άνθρακα της γλυκερινικής αλυσίδας του DPG σχηματίζοντας 3-φωσφογλυκερικό οξύ.

Οι ποσοτικές αναλύσεις των οργανοφωσφορικών ενώσεων του ερυθροκυττάρου δείχνουν ότι το 2, 3 DPG αποτελεί την πρώτη σε ποσότητα οργανοφωσφορική ουσία του κυτταροπλάσματος, ενώ η τριφωσφορική αδενοσίνη (ATP) είναι σχεδόν τέσσερις φορές λιγότερη απ'αυτό.

Παρά το γεγονός ότι η γλυκόλυση είναι μια βιοχημική οδός βαθειά μελετημένη εν τούτοις δεν είναι απόλυτα κατανοητός ο τρόπος με τον οποίο ρυθμίζεται η αύξηση της παραγωγής του 2, 3 DPG σε συνθήκες υποξίας, εφόσον έχει παρατηρηθεί ότι η υποξία αποτελεί ερέθισμα το οποίο μπορεί να καταλήξει σε ανύψωση των ενδοκυττάρων επιπέδων της ουσίας αυτής, εκτός κι αν ο έλεγχος αυτός εξασφαλίζεται από τον τελικό αποδέκτη, δηλαδή την αιμοσφαιρίνη.

Η αλληλουχία των βιοχημικών αντιδράσεων της γλυκολυτικής αλυσίδας και του ερυθροκυττάρου μεταβολισμού που εκμεταλευόμαστε για να προκαλέσουμε

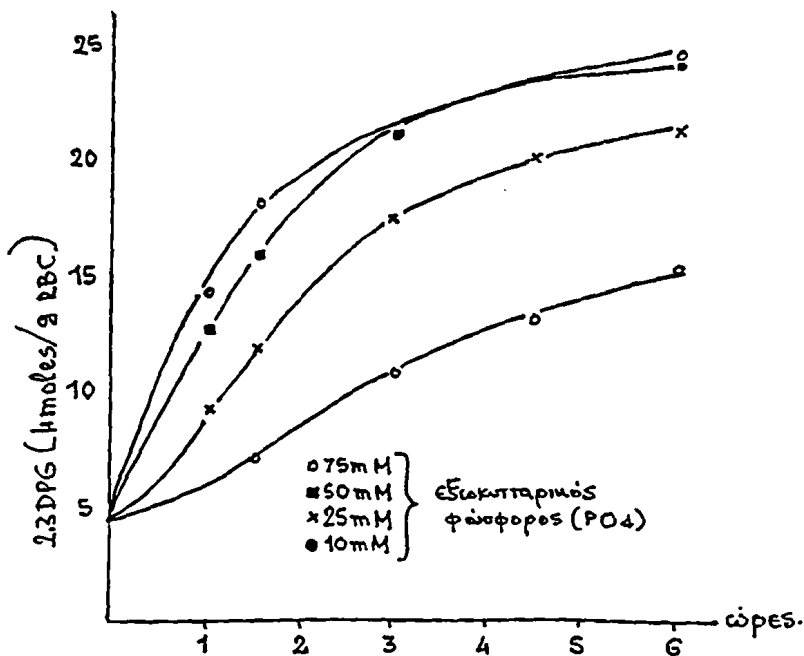


την άνοδο του 2, 3 DPG εμφανίζεται στο σχεδιάγραμμα. Η ποσότητα του 2, 3 DPG στα ερυθροκύτταρα παρά την φυσιολογικά χαμηλή τους χημική ανταλλαγή, υφίσταται σημαντικές αλλαγές κάτω από συγκεκριμένες πειραματικές και παθοφυσιολογικές συνθήκες. Έτσι αύξηση του 2, 3 DPG παρατηρείται in vivo κάτω από ποικίλες καταστάσεις που οδηγούν σε υποξία (87, 177, 187, 242, 290, 298, 232). Επιπλέον τα επίπεδα του 2, 3 DPG ανέρχονται αν τα ερυθροκύτταρα επωαστούν σε υψηλό PH (83) παρουσία νουκλεοπιδίων και ουσιών που αποδέχονται υδρογόνα (83). Ωστόσο, κάτω από τις προαναφερθείσες συνθήκες, αν κανείς εξαιρέσει ελάχιστες περιπτώσεις, οι ποσότητες του 2, 3 DPG δεν αυξάνονται πάνω από το διπλάσιο των φυσιολογικών επιπέδων. Παρατηρήθηκε ότι αν τα ερυθρά αιμοσφαίρια επωαστούν σε διαλύματα περιέχοντα ταυτοχρόνως ινοσίνη, πυροσταφυλικό οξύ και φωσφορικά άλατα, η συγκέντρωση του 2, 3 DPG μπορεί να αυξηθεί κατά πέντε φορές περισσότερο της φυσιολογικά απαντώμενης και μάλιστα μέσα σε βραχεία χρονικά διαστήματα. Η ακολουθούμενη βιοχημική οδός είναι η εξής:

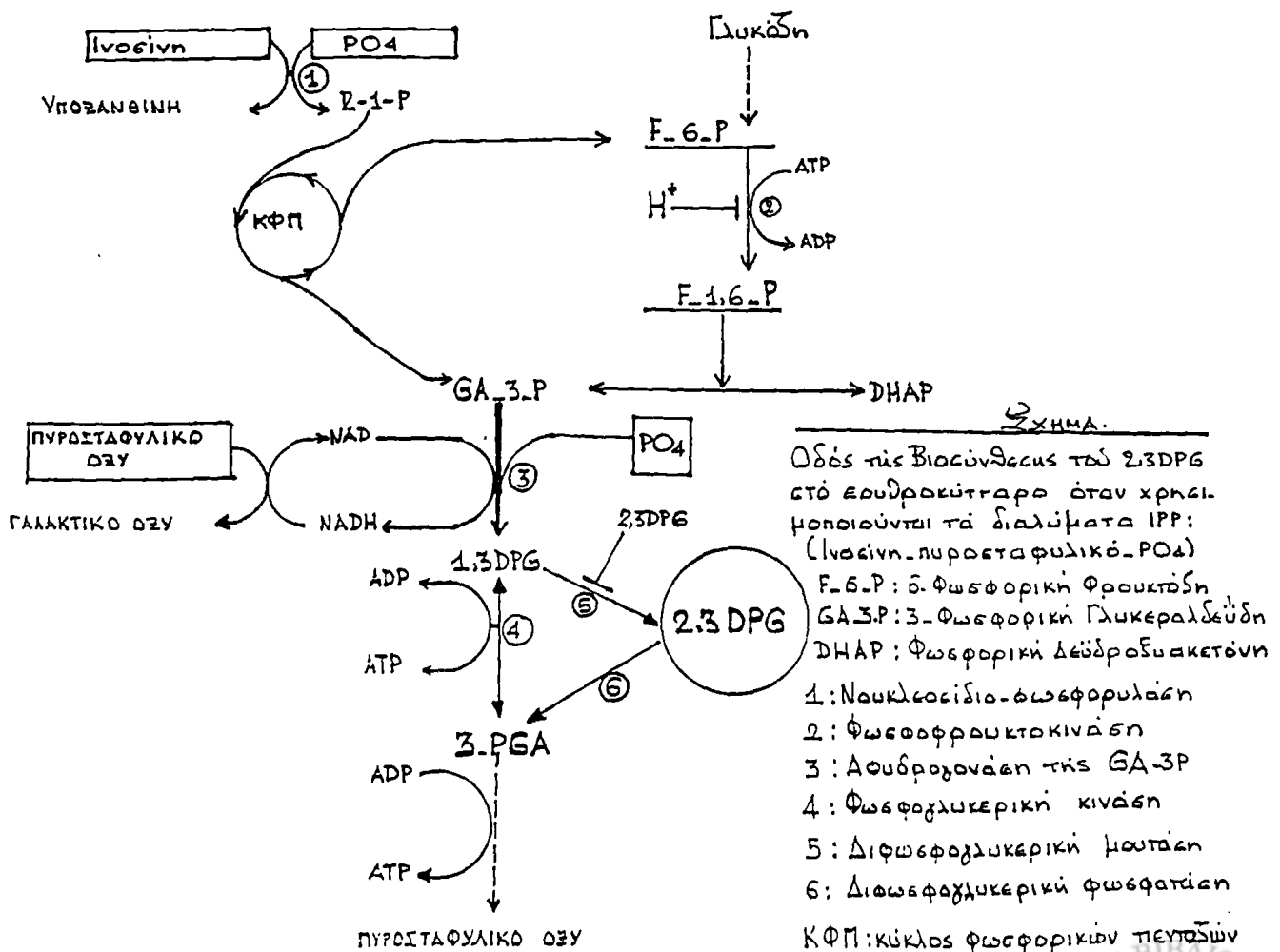
Η ινοσίνη μετατρέπεται σε υποξανθίνη και 1-φωσφορική ριβόζη. Η 1-φωσφορική ριβόζη μεταβολίζεται σε 6-φωσφορική φρουκτόζη και 3-φωσφορική γλυκεραλδεϋδη μέσω της οδού των φωσφορικών πεντοζών. Η αλληλουχία των αντιδράσεων αυτών βραχυκυκλώνει τα δύο σημαντικά ένζυμα τα οποία περιορίζουν τον ρυθμό φωσφορυλίωσης στα πρώτα βήματα της γλυκολυτικής αλυσίδας και τα οποία αποτελούν το "λαιμό της μπουτίλιας" για την γλυκόλυση οπότε είναι οι γενικοί ρυθμιστές της. Τα ένζυμα αυτά είναι η φωσφοφρουκτοκινάση και η εξοκινάση και η υπερπήδησή τους μέσω του κύκλου των φωσφορικών πεντοζών απολήγει στο σχηματισμό μεγάλων ποσοτήτων φωσφορυλιωμένων υδατανθράκων οι οποίοι μπορούν πλέον να μετασχηματιστούν σε 2, 3 DPG μέσω της αντίδρασης της γλυκεριναλδεϋδικής αφυδρογονάσης που μετατρέπει τη φωσφορική γλυκεριναλδεϋδη σε 1, 3 DPG. Η αντίδραση της φωσφογλυκερινικής αφυδρογονάσης μπορεί να επιταχυνθεί κατά πολύ μέσω της προσθήκης φωσφορικών ριζών και αποδεκτών υδρογόνου (πυροσταφυλικό οξύ ή κυανό του μεθυλενίου) για τη διαρκή επανοξειδωση του NADH. Έτσι, οι μεγάλες ποσότητες του σχηματισθέντος 1, 3 DPG μετατρέπονται στο ισομερές του 2, 3 DPG το οποίο συσσωρεύεται στο ερυθροκύτταρο εξ αιτίας του χαμηλού ρυθμού διάσπασής του από την 2, 3 DPG φωσφοδιεστεράση.

Οι αρχικοί ρυθμοί παραγωγής του 2, 3 DPG αυξάνονται μέσω της προσθήκης ανόργανων φωσφορικών αλάτων οπότε οι εξαρτώμενες από τα





Εικ. αρ 7 : Αύξηση των επιπέδων του 2,3DPG σε ανθρώπινα ερυθρά (RBC) επωασμένα σε διαλύματα IPP με διαφορετικές ποσότητες PO₄ (PH 7,35, 37°C)



φωσφορικά αντιδράσεις φαίνεται να αποτελούν τους ρυθμιστές της σύνθεσης του 2, 3 DPG υπό τις συνθήκες αυτές. Τα δύο ένζυμα που κάνουν την προσθήκη του φωσφόρου σ'όλη αυτή τη διαδικασία είναι η νουκλεοτίδιο-φωσφορυλάση με K_m για το φώσφορο ίση προς 0,32mM και η φωσφογλυκεριναλδεΐδική αφυδρογονάση με K_m για τις PO_4 ίση προς 3,4mM. οπότε το δεύτερο αυτό ένζυμο αποτελεί τη ρυθμιστική δικλειδα της συνολικής διαδικασίας. Πρέπει ακόμη να λεχθεί ότι το 2, 3 DPG δεν αυξάνεται πάνω από τα 24μMoles/gr ερυθροκυττάρων και το γεγονός αυτό φαίνεται να οφείλεται:

- 1) Στο ότι η σύνθεση του 2, 3 DPG αυτοπεριορίζεται μόλις η συγκέντρωσή του υπερβεί ένα κρίσιμο επίπεδο και
- 2) Ο ρυθμός αποικοδόμησης του μεγαλώνει καθώς η συγκέντρωσή του αυξάνεται. Τα φαινόμενα αυτά οφείλονται πιθανόν στη δράση δύο μηχανισμών:
 - α) Στο ότι το 2, 3 DPG αποτελεί έναν ισχυρό αναστολέα του ενζύμου DPG-μουτάση που μετατρέπει το 1, 3 DPG σε 2, 3 DPG και η αναστολή αυτή γίνεται πολύ έντονη όταν αυξάνονται τα επίπεδα του τελευταίου και
 - β) Ότι η μείωση του 3-φωσφογλυκερινικού οξέος συνεισφέρει στη μείωση της δράσης της DPG-μουτάσης διότι το 3-PG αποτελεί ένα απαραίτητο συν-υπόστρωμα μαζί με το 1, 3 DPG και τελικά έχουμε μια μείωση του 2, 3 DPG (83).

Πρέπει επίσης να αναφερθεί πως και ο ρυθμός της γλυκόλυσης ελαττώνεται καθώς τα επίπεδα του 2, 3 DPG αυξάνουν μέσω μιας μείωσης του ερυθροκυττάρου PH οφειλόμενης στα αποτελέσματα του φαινομένου Donnan εξ'αιτίας της μη διαβατότητας του εν λόγω φωσφορικού εστέρα διαμέσου της μεμβράνης του ερυθρού αιμοσφαιρίου.

Τα δεδομένα που υπάρχουν δείχνουν ότι το 2, 3 DPG κατέχει πολλαπλούς ρόλους οπότε είναι απαραίτητη η εμβάθυνση της μελέτης των δράσεων του προκειμένου να κατανοηθεί πλήρως η σημασία του για τη φυσιολογία του ανθρώπινου οργανισμού.



6. Η κλινική σημασία της ρύθμισης των επιπέδων του 2, 3 DPG

Η φυσιολογική σημασία του 2, 3 Διφωσφογλυκερικού οξέος σαν ρυθμιστή της χημικής συγγένειας της αιμοσφαιρίνης προς το O_2 αποδείχτηκε το 1967 (20, 21). Τα επόμενα χρόνια έγινε δυνατός ο *in vitro* χειρισμός των ενδοερυθροκυττάρων επιπέδων του διφωσφορικού αυτού εστέρα μέσω της επώασης πλυμένων ανθρώπινων αιμοσφαιρίων με κατάλληλους μεταβολίτες που εισέρχονται στη γλυκολυτική αλυσίδα. Σχεδόν ταυτοχρόνως επισημάνθηκε ότι τα ερυθρά αιμοσφαίρια των ανώτερων θηλαστικών που εξετάστηκαν ανταποκρίνονται ποικιλοτρόπως στη δράση των προαναφερθέντων μεταβολιτών ίσως διότι παρουσιάζουν διαφορετική διαπερατότητα απέναντι στους μεταβολικούς προδρόμους του 2, 3 Διφωσφογλυκερικού οξέος, όπως επίσης και διαφορετικούς βαθμούς δραστηριότητας του ενζύμου πουρίνη-νουκλεοσίδιο-φωσφορυλάση το οποίο είναι υπεύθυνο για την κατάλυση του πρώτου βήματος της μεταβολικής αλυσίδας που μετατρέπει τη ριβόζη της ινοσίνης σε πρόδρομο του DPG (85). Τα διαλύματα στα οποία επώασθηκαν τα πλυμένα ερυθρά αιμοσφαίρια των διαφόρων θηλαστικών είχαν διαφορετικές αναλογίες από μεταβολίτες που απαντούν μέσα στη γλυκολυτική αλυσίδα πριν και μετά το παρακύκλωμα Rapoport απ'το οποίο συντίθεται το 2, 3 DPG, όπως επίσης και διαφορετικά PH που κάλυπταν το φάσμα απ'την περιοχή της οξέωσης ως την αλκάλωση. Από τα διαλύματα αυτά καταδείχτηκε ότι τα λεγόμενα "διαλύματα IPP (IPP media)", τα περιέχοντα ινοσίνη, πυροσταφυλικό οξύ και φωσφορικά άλατα είναι τα πλέον αποτελεσματικά γιατί επάγουν με μεγάλη ταχύτητα και υψηλή απόδοση την αύξηση του 2, 3 Διφωσφογλυκερικού οξέος στα πλυμένα ερυθροκύτταρα.

Στην προηγούμενη παράγραφο έχουμε αναφέρει λεπτομερικά την όλη βιοχημεία της σύνθεσης του 2, 3 DPG σε συνάρτηση με τα διαλύματα IPP και άλλους μεταβολίτες. Από τα πειράματα αυτά καταδείχτηκε ότι τα ερυθρά αιμοσφαίρια του ανθρώπου, του μύου, του κουνελιού και του χοίρου συσσωρεύουν 2, 3 DPG σε μεγάλες ποσότητες όταν επωάζονται στους $37^{\circ}C$ και σε PH 7, 4 με διαλύματα IPP, πράγμα το οποίο δεν συμβαίνει για τα ερυθρά των επιψύων, των ινδοχοίρων, των σκύλων, των γάτων, των προβάτων και των αγελάδων. Τα ερυθροκύτταρα των πιθήκων αντιδρούν κατά τρόπο ανάλογο προς εκείνα του ανθρώπου. Μερικές από τις μεταβολές του 2, 3 DPG από τη δράση των διαλυμάτων IPP εμφανίζονται στο σχεδιάγραμμα της εικόνας 7. Η εν λόγω γραφική απεικόνιση έχει ληφθεί από την εργασία του J. Duham την οποία έχουμε προαναφέρει.



Εκτός από τα *in vitro* πειράματα έγιναν και προσπάθειες χειρισμού των επιπέδων του 2, 3 DPG σε ακέραια ζώα μέσω χορήγησης των προαναφερθέντων μεταβολιτών (85, 38, 297, 289).

Τα *in vivo* αυτά πειράματα άρχισαν ήδη από το 1969 αλλά είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι η εξέλιξή τους υπήρξε αρκετά βραδεία παρά το γεγονός του ότι στο μέγιστό τους ποσοστό σημείωσαν επιτυχίες. Από την επεξεργασία των δεδομένων που προέκυψαν από τους εν λόγω πειραματισμούς συνάγονται μεταξύ των άλλων και τα εξής συμπεράσματα:

- 1) Ότι τα επίπεδα του 2, 3 Διφωσφογλυκερικού οξέος μπορούν να ανέλθουν σημαντικά κατόπιν ενδοφλέβιας χορήγησης καταλλήλων ποσοτήτων διαλυμάτων IPP (Ινοσίνη, φωσφορικά άλατα, πυροσταφυλικό οξύ). Η άνοδος αυτή είναι σημαντική και στο αίμα των πιθήκων το οποίο συγγενεύει περισσότερο από δομική, λειτουργική, βιοχημική άποψη με το ανθρώπινο αίμα (289).
- 2) Στις χρησιμοποιηθείσες ποσότητες (20ml διαλύματος IPP ανά Kgr βάρους) τα επίπεδα του ερυθροκυττάριου 2, 3 DPG ανήλθαν σε ποσοστό 40% μέσα σε χρονικό διάστημα δύο ωρών από την ενδοφλέβια έγχυση του IPP (289).
- 3) Το μέγιστο της αύξησης των επιπέδων του 2, 3 DPG στους πιθήκους *in vivo* επήλθε μετά πάροδο έξι ωρών από την έγχυση του IPP. Τα επίπεδα του 2, 3 DPG παρέμειναν πολύ υψηλά σταθερώς επί 24 ώρες και επανήλθαν στη στάθμη εκκίνησης τους μετά από πάροδο τεσσάρων περίπου ημερών. Άρα η εφ'άπαξ έγχυση υπήρξε αποτελεσματική για σχετικά μεγάλο χρονικό διάστημα (289).
- 4) Η P₅₀ της καμπύλης αποδέσμευσης οξυγόνου στο αίμα των πιθήκων μετακινήθηκε μέσα στις πρώτες 6 ώρες προς τα δεξιά περνώντας από την τιμή των 30mmHg O₂ στην τιμή των 35mmHg πράγμα το οποίο είχε επισημανθεί και προβλεφθεί και από τα προαναφερθέντα *in vitro* πειράματα οδηγώντας έτσι σε μια κατ'αρχάς επιβεβαίωση του *in vitro* μοντέλου (289).
- 5) Ο αιματοκρίτης παρουσίασε μια μικρή και φευγαλέα πτώση της τάξης του 3% και αποκαταστάθηκε ταχέως. Τα επίπεδα του ουρικού οξέος στο αίμα διατηρήθηκαν χαμηλά πράγμα που ερμηνεύεται από την παρουσία του εζύμου ουρικήση το οποίο είναι παρόν στους πιθήκους και μετατρέπει το



ουρικό οξύ σε αλλαντοΐνη, αλλά η αύξησή του στον άνθρωπο θα μπορούσε να ρυθμιστεί μέσω της χορήγησης αλλοπουρινόλης. Σημειώθηκε επίσης μια μικρή αύξηση των φωσφορικών στο αίμα και μια αντίστοιχη ελάττωση των επιπέδων του Ca^{2+} η οποία όμως απείχε πολύ από του να υπερβεί τα κάτω όρια της φυσιολογικής συγκέντρωσης (289).

- 6) Η μέση αύξηση της P_{50} κατά την μετατόπιση της καμπύλης αποδέσμευσης οξυγόνου υπήρξε επί ένα εικοσιτετράωρο ίση προς 2,6mmHg O_2 .
- 7) Η γενική κατάσταση των πειραματοζώων παρέμεινε καλή και σταθερή καθ'όλη τη διάρκεια των πειραμάτων και παρά τις πολλαπλές επαναλήψεις των εγχύσεων του IPP (289).

Από τα ανωτέρω όπως και από άλλα ανάλογου χαρακτήρα πειράματα προκύπτει ότι τα διαλύματα IPP ενώ μεταβάλουν τα επίπεδα του 2, 3 DPG προς τα πάνω κι ενώ μεταθέτουν προς τα δεξιά την καμπύλη αποδέσμευσης οξυγόνου (Κ.Α.Ο.) δεν έχουν αρνητικές επιπτώσεις πάνω στη φυσική κατάσταση των πειραματοζώων στα οποία ενίονται (289, 297, 38).

Από τη μάζα των πειραμάτων αυτών υπάρχουν μερικά για τα οποία αξίζει να γίνει μια ιδιαίτερη μνεία επειδή απομμοούνται καταστάσεις που προσομοιάζουν με την οξεία και έντονη ισχαιμία που παρατηρείται στην κλινική.

Επί παραδείγματι αξίζει να αναφερθεί ένα in vivo πειραματικό μοντέλο που χρησιμοποιήθηκε από τους A. Pantely, A. Oyama κ.ά. για την μελέτη της δράσης της μείωσης της χημικής συγγένειας αιμοσφαιρίνης-οξυγόνου πάνω στην οξυγόνωση του ισχαιμούντος μυοκαρδίου. Οι ερευνητές αυτοί προκάλεσαν χειρουργικά έμφραγμα σε σκυλιά στα οποία είχαν χορηγήσει IPP και των οποίων το ερυθροκυττάριο DPG είχε ανέλθει ώστε να μετακινήσει προς τα δεξιά την καμπύλη αποδέσμευσης οξυγόνου από την οξυαιμοσφαιρίνη. Μετά τη λήξη των πειραμάτων έγινε ιστοπαθολογική μελέτη των μυοκαρδίων των πειραματοζώων η οποία έδειξε ότι τα πειραματοζώα στα οποία είχε ενεθεί το IPP εμφάνισαν σε λιγώτερο ποσοστό έμφραγμα (νεκρωτικές αλλοιώσεις) και μικρότερης έκτασης σε σύγκριση με τα ζώα που χρησιμοποιήθηκαν ως μάρτυρες. Τα ιστοπαθολογικά δεδομένα συμβάδισαν με τα δεδομένα της ηλεκτροκαρδιογραφικής παρακολούθησης των πειραματοζώων η οποία ήταν συνεχής καθ'όλη τη διάρκεια του πειράματος (244).



Αναλυτικότερα, όταν η αιματική ροή της περιδεθείσας στεφανιαίας αρτηρίας κατήλθε στο 40% του φυσιολογικού το ποσοστό εμφράγματος στα πειραματόζωα ελέγχου ήταν του ύψους του 55% ενώ στην ομάδα πειραματοζώων των οποίων είχε αυξηθεί η ικανότητα αποδέσμευσης οξυγόνου από τα ερυθροκύτταρά τους μέσω της χορήγησης του IPP το ποσοστό εμφράγματος κατήλθε στο 37%. Όταν η αιματική ροή της στεφανιαίας περιορίστηκε στο 20% της φυσιολογικής της τότε η ομάδα ελέγχου παρουσίασε έμφραγμα σε ποσοστό 79% ενώ η αντίστοιχη των ζώων με IPP παρουσίασε έμφραγμα μόνο σε ποσοστό 38%. Τέλος σε ποσοστό ροής 10% του φυσιολογικού το 94% των ομάδων ελέγχου έκανε έμφραγμα ενώ από την ομάδα του IPP μόνο το 56%. Τα ιστοπαθολογικά συμπεράσματα ήταν ρητά και το συμπέρασμα της μελέτης ήταν ότι: "Η μείωση της χημικής συγγένειας μεταξύ O_2 και αιμοσφαιρίνης μέσω του διαλύματος IPP μειώνει σημαντικά την έκταση της μυοκαρδιακής νέκρωσης για τον ίδιο βαθμό ισχαιμίας". Η μείωση της χημικής συγγένειας της αιμοσφαιρίνης προς το O_2 οδηγεί πιθανόν στην αύξηση της αποδέσμευσης οξυγόνου στην ισχαιμούσα ζώνη του μυοκαρδίου όταν η αιματική ροή περιοριστεί. Το δεδομένο αυτό συνηγείται υπέρ μιας προσπάθειας εφαρμογής της χρησιμοποίησης IPP στα εμφράγματα του μυοκαρδίου σαν θεραπευτικού μέσου ικανού να ελαττώσει το ποσοστό της νέκρωσης των ισχαιμούντων ιστών. Είναι λογικό να υποθέσουμε ότι αυτό που ισχύει για το μυοκάρδιο ισχύει προφανώς και για άλλους ιστούς που οδηγούνται στην ισχαιμία, οπότε η χορήγηση του IPP θα μπορούσε να γενικευτεί σε όλες αυτές τις περιπτώσεις σαν μέσο αποφυγής των εκτεταμένων νεκρώσεων. Προφανώς η μείωση της χημικής συγγένειας αιμοσφαιρίνης και O_2 οφείλεται στην αύξηση των ενδοερυθροκυττάρων επιπέδων του 2, 3 DPG κατόπιν της χορήγησης του διαλύματος Ινοσίνης-φωσφορικών αλάτων και πυροσταφυλικού οξέος.

Τα κλινικά δεδομένα που ισχυροποιούν την άποψη ότι η αύξηση του 2, 3 DPG είναι μεγάλης αξίας για την ανάταξη ασθενών που παρουσιάζουν εκτεταμένες οξείες αιμορραγίες, αιμορραγικό σοκ, έμφραγμα του μυοκαρδίου με συνακόλουθη πτώση της αντλητικής ικανότητας της καρδιάς και αναπνευστικά προβλήματα, είναι αρκετά.

Πράγματι έχει παρατηρηθεί ότι η χορήγηση αίματος το οποίο έχει χαμηλά ποσοστά 2, 3 Διφωσφογλυκερικού οξέος εξ'ατίας του τρόπου διατήρησής του και συνεπώς μειωμένη ικανότητα αποδέσμευσης οξυγόνου είναι δυνατόν να



επιβαρύνει την κατάσταση του ασθενούς πράγμα το οποίο ΔΕΝ συμβαίνει όταν χορηγείται φρέσκο αίμα με φυσιολογικά επίπεδα ερυθροκυτταρικού 2, 3 DPG (325, 199).

Τα σχετικά δεοδμένα που προέρχονται από τον κλινικό χώρο προς στήριξη των απόψεων αυτών πληθύνονται όλο και περισσότερο ενώ σε μερικές περιπτώσεις η πρακτική εφαρμογή μεθόδων που διατηρούν υψηλά τα επίπεδα του 2, 3 DPG είναι πλέον υπόθεση ρουτίνας για τις τράπεζες αίματος μονολόπι η κατοχύρωσή τους δεν έχει την αναμενόμενη έκταση στο διεθνές επίπεδο.

Έτσι στις εγχειρήσεις ανοικτής καρδιάς έχει δειχθεί ότι το αίμα που χορηγείται αν είναι εμπλουτισμένο σε 2, 3 DPG μειώνει κατά πολύ το ενδεχόμενο ισχαιμικών επεισοδίων με δυσχερή πρόγνωση (325, 199).

Είναι προφανές ότι τα Πανεπιστημιακά νοσοκομεία θεωρούμενα σαν χώροι στους οποίους υπάρχουν αντικειμενικές και υποκειμενικές δυνατότητες εφαρμογής πειραματικών πρωτοκόλων θεραπείας μπορούν να εμβαθύνουν την έρευνα για τη σκοπιμότητα χειρισμού των συγκεντρώσεων των ερυθροκυττάρων επιπέδων του 2, 3 DPG ώστε να εξαχθούν νέα θεραπευτικά σχήματα που να ενσωματώνουν τις θετικές δυνατότητες των μεθόδων αυτών και να επενδύουν έτσι τις αποκτούμενες γνώσεις προς όφελος του πάσχοντος ανθρώπου.

7. Το 2, 3 DPG και τα αιμοπετάλια

Κατά τα μέσα της δεκαετίας του 1970-80 μια ερευνητική ομάδα διαπίστωσε ότι το 2, 3 DPG αναστέλει τη συσσώρευση των αιμοπεταλίων την προκαλούμενη από θρομβίνη και ADP. Παρά το ενδιαφέρον του θέματος εν τούτοις η έρευνα στον τομέα αυτό είναι εξαιρετικά περιορισμένη και δεν υπάρχουν διαθέσιμες παρά μόνο τρεις εργασίες των ίδιων συγγραφέων μέσα στη διεθνή βιβλιογραφία (142).



ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΙΙΙ

Ο ΠΑΡΑΓΟΝΤΑΣ ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗΣ ΤΩΝ ΑΙΜΟΠΕΤΑΛΙΩΝ (P.A.F.)

1. Γενικά

Η ερευνητική ιστορία του Παράγοντα Ενεργοποίησης Αιμοπεταλίων (Platelet Activating Factor ή P.A.F.) χωρίζεται σε δύο μεγάλες περιόδους. Η πρώτη περίοδος αρχίζει 21 χρόνια πριν, το 1966, όταν δύο ερευνητές, οι Barbagο και Zvaifler παρατήρησαν ότι τα λευκοκύτταρα κουνελιού που έχει προσβληθεί από το *Schistostoma Mansoni* προκαλούν έκλυση ισταμίνης από τα αιμοπετάλια όταν εκτεθούν στο συγκεκριμένο αντιγόνο. Η παρατήρηση αυτή αποτέλεσε και την πρώτη ένδειξη της ύπαρξης του άγνωστου τότε P.A.F. Μέχρι το 1970 οι έρευνες που γίνονται δεν έχουν σαν συγκεκριμένο στόχο την επισήμανση και την απομόνωση του παράγοντα αυτού. Το 1970 η παρατήρηση των Barbagο και Zvaifler (82) γενικεύεται από τον Henson (62) ο οποίος διαπιστώνει σε πολλές περιπτώσεις ότι τα αιμοπετάλια ενός ευαισθητοποιημένου ζώου σε κάποιο αντιγόνο είναι δυνατόν να ενεργοποιηθούν από την έκλυση ενός παράγοντα εκ μέρους των λευκοκυττάρων του ζώου, όταν αυτά τα τελευταία διεγερθούν από το εν λόγω αντιγόνο. Το 1971-72 οι Benveniste, Henson και Cochrane (12) αποσαφηνίζουν ότι τα βασεόφιλα είναι υπεύθυνα για την έκλυση του παράγοντα αυτού, τον οποίο ονομάζουν Platelet Activating Factor (Παράγοντα Ενεργοποίησης Αιμοπεταλίων), δεδομένου ότι μέχρι εκείνη τη στιγμή δεν διέθεταν πληροφορίες για τη χημική φύση του και δομή προκειμένου να του αποδώσουν μια συστηματική χημική ονομασία. Το 1974 (14) ο Benveniste αποδεικνύει ότι ο P.A.F. είναι λιποειδικής φύσης εφ'όσον μπορεί να εκχυλιστεί με οργανικούς διαλύτες. Το 1977 οι Henson και Pinkard (128) αποδεικνύουν ότι ο παράγοντας αυτός εκλύεται από τα βασεόφιλα κατά τη διάρκεια αναφυλακτικών αντιδράσεων και ότι είναι σαφώς συνδεδεμένος με την υπερευαισθησία τύπου I. Το 1979, σε *in vivo* πειράματα, πιστοποιείται η ύπαρξη του P.A.F. στο αίμα κατά τη διάρκεια της υπερευαισθησίας τύπου I, απομονώνεται ο παράγοντας και μελετώνται οι φυσικοχημικές του ιδιότητες προκειμένου να αποσαφηνιστεί η δομή του (14). Τον



ίδιο χρόνο από τον Δημόπουλο και τους συνεργάτες του κατά τη μελέτη των βιολογικών δράσεων της ουσίας αυτής κατόπιν διάφορων χημικών επεξεργασιών εξάγεται έμμεσα η πιθανή δομή του P.A.F. και εν συνεχεία πραγματοποιείται η σύνθεσή του βάσει των αποκτηθέντων δεδομένων (128, 81). Λίγες εβδομάδες μετά την δημοσίευση της προταθείσας δομής του μορίου δημοσιεύεται μια εργασία (250) στην οποία αναφέρεται η σύνθεση του P.A.F., μέσα στα πλαίσια ενός γενικότερου προγράμματος σύνθεσης γλυκεριναιθερικών λιποειδών που αποσκοπούσε στην αποσαφήνιση της μοριακής αιτιολογίας μιας περιέργης βιολογικής δράσης την οποία εμφάνιζαν εκχυλίσματα νεφρικού ιστού (81). Λίγο αργότερα ο Benveniste και οι συνεργάτες του αναφέρουν σε πρόδρομη ανακοίνωσή τους τη δομή του P.A.F. η οποία συμπίπτει ακριβώς με την ήδη δημοσιευθείσα από τον Δημόπουλο (144). Στο σημείο αυτό μπορούμε να πούμε ότι τελειώνει η πρώτη περίοδος των μελετών πάνω στον P.A.F. Η γνώση της χημικής δομής του μορίου κάνει δυνατή τη συνθετική παρασκευή του οπότε από το 1980 και μετά διατίθεται συνθετικός P.A.F. κι έτσι διευρύνεται η δυνατότητα του πειραματισμού πάνω στις βιολογικές του δράσεις. Εφόσον άρθησαν οι περιορισμοί της σπανιότητας του υλικού, η δεύτερη αυτή περίοδος συνοδεύεται από μια εκθετική αύξηση της ενασχόλησης των ερευνητών με τον Παράγοντα Ενεργοποίησης Αιμοπεταλίων, πράγμα που φαίνεται στον αυξανόμενο αριθμό των σχετικών δημοσιεύσεων (27). Σύντομα, αποδεικνύεται ότι ο P.A.F. είναι μια ουσία με ισχυρότατες και πολλαπλές βιολογικές δράσεις ικανή να προκαλέσει ταχύτατες και σοβαρές παθολογικές μεταβολές συστημικού επιπέδου σ'όλα τα χρησιμοποιηθέντα πειραματόζωα, όπως επίσης και στον άνθρωπο. Μέσα στις αντιδράσεις αυτές - που εκλύονται και στα μη ευαίσθητοποιημένα ζώα - είναι η σύσπασση των στεφανιαίων αγγείων και η έντονη αρνητική ινότροπη δράση στο μυοκάρδιο με αποτέλεσμα τη σοβαρή πτώση της αντλητικής ικανότητας της καρδιάς, η πρόκληση καρδιογενούς καταπληξίας, η συγκόλληση των αιμοπεταλίων και η δραστική μείωση του αριθμού τους στη συστημική κυκλοφορία, η αποκοκκίωση των ουδετεροφίλων, η αύξηση της διαπερατότητας των αγγείων και η ισοοσμωτική απώλεια υγρών από την κυκλοφορία προς τους ιστούς με σχηματισμό οίδημάτων, η πρόκληση σοβαρής υπότασης, η πρόκληση ισχυρού βρογχόσπασμου σε συνδιασμό με την αιμοπεταλιακή ενεργοποίηση και η σοβαρή καταστολή του αναπνευστικού κέντρου (15).

Ταυτόχρονα με τις ανακαλύψεις αυτές γίνεται γνωστό ότι ο P.A.F. και οι ανάλογης χημικής δομής ουσίες εμφανίζουν μια εκτεταμένη διασπορά στους οργανισμούς των φυτών, των ζώων και βέβαια του ανθρώπου. Έτσι, αρχίζοντας



από το επίπεδο των διαφόρων κυττάρων του σώματος των θηλαστικών έχει αποδειχθεί ότι ο P.A.F. παράγεται στα αιμοπετάλια, στα μονοκύτταρα, στα βασεόφιλα, στα μακροφάγα, στα ουδετερόφιλα, στα ηωσινόφιλα, στα ενδοθηλιακά κύτταρα και στους νεφρούς (203). Βρίσκεται επίσης στο αίμα των φυσιολογικών ανθρώπων, στα ούρα, στο αμνιακό υγρό και στο σάλιο (112, 82). Έχει δειχθεί ότι βρίσκεται σε αυξημένες ποσότητες στο αίμα και στα ούρα ασθενών πασχόντων από καρκίνους του γαστρεντερικού συστήματος, από σπειραματονεφρίτιδα, θαλασσαιμία, αλλεργία, όπως επίσης και μετά από μεταγγίσεις αίματος. Ακόμη υπάρχουν ισχυρές ενδείξεις ότι ο P.A.F. βρίσκεται αυξημένος στο αίμα ασθενών με οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου, ειδικά τα πρώτα εικοσιτετράωρα που ακολουθούν την προσβολή (304). Οι ίδιοι ασθενείς παρουσιάζουν επίσης αυξημένη ευαισθησία των αιμοπεταλίων τους στον P.A.F. (304). Τέλος μπορούμε να πούμε ότι τόσο ο P.A.F. όσο και ουσίες οι οποίες του μοιάζουν δομικά και μιμούνται τη δράση του, αν και σε μικρότερη ένταση, βρίσκονται διασπαρμένες σε ευρύτερες ομάδες οργανισμών, σε διάφορα τυπικά αλλεργιογόνα, όπως η γύρη των πεύκων, σε πρωτόζωα, όπως η *Tetrahymena Piriformis*, αλλά και σε βακτήρια, όπως τα κολοβακτηρίδια, οι σταφυλόκοκκοι και οι στρεπτόκοκκοι. Η παραγωγή του μάλιστα είναι μεγαλύτερη στα Gram θετικά παρά στα Gram αρνητικά βακτήρια (82). Όλες αυτές οι διαπιστώσεις και ευρήματα, όπως επίσης και η αυξανόμενη τεκμηρίωση της συμμετοχής του P.A.F. σε πληθώρα παθολογικών καταστάσεων οδηγούν την έρευνα προς δύο τουλάχιστον κατευθύνσεις:

- α) Προς την εξακρίβωση των φυσιολογικών ρόλων του μορίου αυτού και την κατανόηση των ανωμαλιών που προκαλούνται από τη διαταραχή του μεταβολισμού του καθώς και των αιτίων της.
- β) Προς την διασαφήνιση των μηχανισμών ελέγχου του μεταβολισμού του και την ανακάλυψη των φυσικών αναστολέων ή και ενισχυτών της δράσης του με σκοπό τον φαρμακολογικό έλεγχο των παθολογικών καταστάσεων που εδράζονται στις μεταβολικές διαταραχές του.

Προφανώς μέσα στην ερευνητική αυτή προσπάθεια εγκλείεται και η μελέτη των φυσιολογικών του δομικών και λειτουργικών αναλόγων όπως επίσης και των φυσιολογικών αναστολέων της δράσης του. Η παρούσα διδακτορική διατριβή ασχολείται με τους φυσιολογικούς αναστολείς της δράσης του P.A.F. στα αιμοπετάλια του ανθρώπου και του κουνελιού.



2. Ο μεταβολισμός του P.A.F.

2.1 Βιοσύνθεση του P.A.F.

Όπως προαναφέρθηκε υπάρχουν πολλοί τύποι κυττάρων οι οποίοι βιοσυνθέτουν τον Παράγοντα Ενεργοποίησης Αιμοπεταλίων, μεταξύ των οποίων τα ουδετερόφιλα λευκά, τα περιτοναϊκά μακροφάγα, τα ενδοθηλιακά κύτταρα, τα ηωσινόφιλα, τα μακροφάγα των κυψελίδων, τα μαστοκύτταρα και τα αιμοπετάλια. Ο P.A.F. δεν φαίνεται να συντίθεται από τα λεμφοκύτταρα όλων των ειδών που υπάρχουν στον οργανισμό. Η διέγερση των κυττάρων αυτών που ενεργοποιεί την περαιτέρω βιοσυνθετική διαδικασία του εν λόγω μορίου αντιπροσωπεύεται:

- 1) Από το ανιγονικό ερέθισμα που εκλύει την αλλεργική αντίδραση
- 2) Από την προσθήκη ιονοφόρων ουσιών του ασβεστίου (π.χ. την A 23187) και
- 3) Από τη διαδικασία της φαγοκύττωσης (226).

Τα τρία αυτά διαφορετικά ερεθίσματα διεγείρουν τη διοσύνθεση του P.A.F. στα φλεγμονώδη κύτταρα των θηλαστικών. Στο πρωτόζωο *Tetrahymena Piriformis* έχει βρεθεί ότι ο P.A.F. συντίθεται χωρίς εξωγενή ενεργοποίηση και πιθανόν η βιοσυνθετική οδός να διαφέρει από εκείνη των προαναφερθέντων κυττάρων. Τέλος, φαίνεται ότι υπάρχει και μια τρίτη εναλλακτική οδός βιοσύνθεσης κατά την οποία ο P.A.F. παράγεται φυσιολογικά για την εκτύλιση κάποιων συγκεκριμένων λειτουργιών [π.χ. στους νεφρούς για την πιθανή του συμμετοχή στο γενικό σύστημα ελέγχου της αρτηριακής πίεσης (185)].

Στα πλυμένα αιμοπετάλια κουνελιού ο σχηματισμός του P.A.F. λαμβάνει χώρα μετά από διέγερση μέσω:

- 1) Της ιονοφόρου A 23187 του Ca^{2+} ,
- 2) της θρομβίνης, και
- 3) του κολλαγόνου.

Η κινητική της σύνθεσης επιβάλλεται πάνω στη διαδικασία της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων (57). Το 50% της παραγόμενης ουσίας απελευθερώνεται στο μέσο επώασης των αιμοπεταλίων. Στα χρησιμοποιηθέντα πειραματικά μοντέλα (57, 60, 58, 59, 232) ανευρέθησαν συγκεντρώσεις 2, 2nM



P.A.F. οι οποίες είναι κατά πολύ μικρότερες από εκείνες που απαιτούνται για την πρόκληση συσσώρευσης του 50% των αιμοπεταλίων.

Στα ανθρώπινα αιμοπετάλια έχει επίσης παρατηρηθεί σύνθεση P.A.F. ενεργοποιούμενη από την ιονοφόρο A 23187 του Ca^{2+} (57) ή την θρομβίνη, αν και ο ρόλος της τελευταίας είναι αμφιλεγόμενος. Η συγκέντρωση του P.A.F. που απομονώθηκε από αιμοπετάλια ανθρώπου ενεργοποιημένα με θρομβίνη ήταν της τάξης των $2,43 \pm 0,60nM$. Η ποσότητα της σχηματισθείσας ουσίας ήταν ανάλογη της συγκέντρωσης του χρησιμοποιηθέντος συσσωρευτικού παράγοντα και κυμαινόταν από 0,5 έως 2,5nM, από 0,25 έως 2,5IU ml⁻¹ και 1 έως 10ng. 1ml⁻¹ αντίστοιχα για την ιονοφόρο A 23187, τη θρομβίνη και το κολλαγόνο (17, 316).

Τα πλυμένα αιμοπετάλια κουνελιού που διαγειρόταν από ADP, Αραχιδονικό οξύ ή και P.A.F. δεν εμφάνισαν βιοσύνθεση P.A.F. (2, 201, 251, 299). Τα δεδομένα αυτά υποδεικνύουν ότι οι τρεις αγωνιστές (ιονοφόρος, κολλαγόνο, θρομβίνη) που επάγουν τη σύνθεση του στα αιμοπετάλια είναι όλοι τους ενεργοποιητές της φωσφολιπάσης A₂ (PLA₂) σε αντίθεση με τους αγωνιστές που δεν είναι ικανοί να προξενήσουν τη σύνθεση του παράγοντα. Το δεδομένο αυτό υποδεικνύει ότι η PLA₂ συμμετέχει στη βιοσύνθεση του P.A.F.

2.2 Ο ρόλος της φωσφολιπάσης A₂

Η παραγωγή του P.A.F. στα αιμοπετάλια κουνελιού ή ανθρώπου μετά από διέγερση μέσω των προαναφερθέντων αγωνιστών (ιονοφόρος, κολλαγόνο, θρομβίνη) συνοδεύτηκε και από παράλληλο σχηματισμό lyso-P.A.F. που είναι το αποακετυλιωμένο παράγωγο του P.A.F. Οι ποσότητες του παραγόμενου lyso-P.A.F. ήταν ωστόσο 60 έως 100 φορές υψηλότερες από εκείνες του P.A.F. (295, 233, 294).

Οι συγκεντρώσεις των δύο σχηματιζόμενων ουσιών ήταν ανάλογες της συγκέντρωσης του εκλυτικού ερεθίσματος. Η αξιολόγηση των δεδομένων αυτών οδήγησε στην υπόθεση ότι ο lyso-P.A.F. αποτελούσε μάλλον ένα πρόδρομο παρά ένα καταβολίτη του P.A.F. (17). Η υπόθεση αυτή επιβεβαιώθηκε από τη μελέτη του καταβολισμού ραδιοσημασμένου P.A.F. στα αιμοπετάλια. Πράγματι η αποσύνθεσή του δεν συσχετίστηκε καθόλου με αύξηση της ραδιενέργειας του lyso-P.A.F. (67, 68).



Η υπόθεση της συμμετοχής της φωσφολιπάσης A_2 στη διαδικασία βιοσύνθεσης του P.A.F. ενισχύθηκε και από την παρατήρηση ότι ο σχηματισμός P.A.F. λαμβάνει χώρα μόνο όταν τα αιμοπετάλια έχουν διεγερθεί από αγωνιστές οι οποίοι ενεργοποιούν τη φωσφολιπάση A_2 (ιονοφόρος, θρομβίνη και όχι ADP, Αραχιδονικό οξύ ή P.A.F.). Η συμμετοχή της PLA_2 στη βιοσύνθεση του P.A.F. επιβεβαιώθηκε μέσω της χρήσης αναστολέων του ενζύμου αυτού. Στα πλαίσια της κατανόησης του ρόλου της PLA_2 αναζητήθηκε και το φυσιολογικό της υπόστρωμα μέσα στους διάφορους τύπους των αιμοπεταλιακών φωσφολιπιδίων. Θεωρήθηκε ότι το υπόστρωμα αυτό έπρεπε να ήταν μια Αλκύλ-ακύλ-γλυκερYL-φωσφορυλχολίνη (αλκύλ ακύλ GPC), οπότε η μελέτη στράφηκε προς αυτή την κατεύθυνση με αποτέλεσμα να εντοπισθούν στο σύνολο των αιμοπεταλιακών φωσφολιπιδίων αιθέρες συνδεδεμένοι με GPC (300, 301). Ο Chignard διαπίστωσε ότι οι ποσότητες των προδρόμων αυτών ουσιών ήταν αρκετές ώστε να επιτρέπεται η σύνθεση του P.A.F. Συγκεκριμένα ο Chignard σε δυναμικά πειράματα με ακέραια αιμοπετάλια κουνελιών, έδειξε ότι κατά τη διάρκεια της ενεργοποίησης με θρομβίνη το προσεσημασμένο με ραδιενεργό τρίπο αλκύλ ακύλ GPC υδρολύεται με σχηματισμό ραδιενεργού lyso-P.A.F. (56, 57, 58, 59, 60, 61). Στο μόριο του αλκύλ ακύλ GPC ο αιθέρας βρίσκεται στη θέση 1 ενώ η θέση 2 είναι κατελλημένη από αραχιδονικό οξύ. Τα καθαρά εκχυλίσματα του αλκύλ ακύλ GPC που περιείχαν ραδιενεργό αραχιδονικό οξύ εστεροποιημένο στη θέση 2 του γλυκερινικού σκελετού έδειχναν διαφορετική συμπεριφορά όταν επεξεργάζονται με φωσφολιπάση A_2 (χοιρινής προέλευσης) από εκείνη που παρουσίαζαν όταν επεξεργάζονταν με φωσφολιπάση προερχόμενη από το Rhizopus arrhizus. Στην επεξεργασία με PLA_2 το μόριο του αλκύλ ακύλ GPC καταστρέφεται και η χρωματογραφία του προϊόντος έδειχνε ότι η ραδιενέργεια όδευε στο ίδιο σημείο με το ελεύθερο αραχιδονικό οξύ, ενώ στην επεξεργασία με τη φωσφολιπάση του Rhizopus το αλκύλ ακύλ δεν αλλοιωνόταν. Δοθέντος ότι η PLA_2 καταλύει την υδρόλυση εστερικών δεσμών στη θέση 2, ενώ η φωσφολιπάση του Rhizopus στη θέση 1 (στην οποία βρίσκεται όμως ο αιθέρας) συνάγεται το συμπέρασμα ότι ο αιθερικός δεσμός είναι στη θέση 1 και ο εστερικός δεσμός του αραχιδονικού στη θέση 2. Χρησιμοποιώντας αιμοπετάλια ραδιοσημασμένα με ραδιενεργό αραχιδονικό οξύ αποδείχτηκε ότι το αραχιδονικό απελευθερώνεται από το αιθερικό GPC όταν προηγηθεί ενεργοποίηση με θρομβίνη και ότι από το αιθερικό GPC προέρχονται δύο σημαντικοί πρόδρομοι της ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων:

- 1) το Αραχιδονικό οξύ και



2) ο Iyso-P.A.F. μέσω της δράσης της PLA_2 .

2.3 Δράση της ακετυλοτρανσφεράσης

Ο Char και οι συνεργάτες του (52) υπέδειξαν την ύπαρξη μιας ακετυλοτρανσφεράσης στη βιοσυνθετική οδό του P.A.F., για να ερμηνεύσουν την ενσωμάτωση μιας οξικής ραδιοσημασμένης ομάδας στη θέση 2 του μορίου του P.A.F. κατά την παραγωγή του από αιμοπετάλια κουνελιού διαγεγρόμενα μέσω της ιονοφόρου A 23187 του ασβεστίου. Η επώαση αιμοπεταλιακών ομογενοποιημάτων με συνθετικό Iyso-P.A.F. και ραδιοσημασμένο ακετύλ-συνένζιμο A οδηγούσε στην παραγωγή P.A.F., αποδεικνύοντας έτσι την ύπαρξη της θεωρούμενης μέχρι τότε ακετυλοτρανσφεράσης (28). Η ύπαρξη του βήματος αυτού στη βιοσυνθετική οδό του P.A.F. βρέθηκε αργότερα και στα ανθρώπινα αιμοπετάλια κατά τη διέγερση τους με θρομβίνη προς παραγωγή P.A.F. (159, 301). Η δραστηριότητα της ακετυλοτρανσφεράσης παρουσίαζε έντονη αύξηση όταν τα αιμοπετάλια ενεργοποιούνταν με θρομβίνη και έφτανε στο μέγιστο ύψος της δύο λεπτά μετά την έναρξη της ενεργοποίησης για να επιστρέψει κατόπιν στο βασικό της επίπεδο. Αυτή η παροδικότητα της διέγερσης της δραστηριότητας της ακετυλοτρανσφεράσης ερμηνεύει το γιατί μεγάλες ποσότητες Iyso-P.A.F. δεν ακετυλιώνονται στα διεγερμένα αιμοπετάλια, εξηγώντας έτσι και την παρατηρηθείσα διαφορά μεταξύ των ποσοτήτων παραγόμενου P.A.F. και Iyso-P.A.F. (ο δεύτερος είναι 60-100 φορές περισσότερος από τον πρώτο). Το δεδομένο αυτό υποδεικνύει επίσης ότι η διέγερση της ακετυλοτρανσφεράσης αποτελεί ένα βήμα κλειδί για τον έλεγχο της βιοσύνθεσης του P.A.F. εκ μέρους των αιμοπεταλίων. Η δραστηριότητα του ενζύμου αναστέλεται παρουσία χημικών παραγόντων που δεσμεύουν το Ca^{2+} , ενώ η αναστολή αίρεται με την προσθήκη ιόντων ασβεστίου.

2.4 Καταβολισμός του Παράγοντα Ενεργοποίησης Αιμοπεταλίων

Ο P.A.F. που δημιουργείται μέσα στα αιμοπετάλια κουνελιού μετά από την κατάλληλη διέγερσή τους αποικοδομείται προοδευτικά και μέσα στα δέκα πρώτα λεπτά ήδη η συγκέντρωσή του έχει μειωθεί στο 50% της μέγιστης συγκέντρωσης. Η αποικοδόμιση είναι πιο ταχεία απουσία της βόειας λευκωματίνης (BSA) η οποία έχει την ιδιότητα να τον δεσμεύει και να τον προστατεύει. Το



φαινόμενο αυτό παρατηρείται επίσης και στα ανθρώπινα αιμοπετάλια όπου, παρουσία της BSA το 100% του παραχθέντος P.A.F. χάνεται μέσα σε 60 λεπτά. Έχει αποδειχθεί ότι γενικά τα αιμοπετάλια παρουσιάζουν μια ισχυρή μείωση της αποικοδόμησης του P.A.F. που παράγουν αν επεξεργαστούν με φθοριούχο φαινυλμεθυλοσουλφόνιο (PMSF) το οποίο αποτελεί έναν αναστολέα της υδρολάσης της σερίνης.

Πράγματι σε επεξεργασμένα με PMSF αιμοπετάλια ανευρίσκεται ποσότητα P.A.F. δέκα έως δώδεκα φορές υψηλότερη όταν αυτά διεγερθούν με θρομβίνη σε σύγκριση με τα αιμοπετάλια που διεγείρονται χωρίς την προεπώαση με PMSF (28). Τα ανέπαφα αιμοπετάλια του κουνελιού αποικοδομούν τον P.A.F., σχηματίζοντας αλκύλ ακύλ GPC μέσω ενός μηχανισμού που περιλαμβάνει μια απακετυλίωση και μια ανακυλίωση του μορίου του. Στο μηχανισμό αυτό συμμετέχουν:

- α) μια υδρολάση και
- β) μια ακυλτρανσφεράση ή τρανσακυλάση.

α) Ακετυλοϋδρολάση

Μια ακετυλοϋδρολάση υπεύθυνη για την αποικοδόμηση του P.A.F. παρατηρήθηκε κατ'αρχάς στο κυτταροπλασματικό κλάσμα διάφορων ιστών προερχομένων από επίμυες (172). Μια όμοια ενζυμική δραστηριότητα παρατηρήθηκε σε ομογενοποιημένα αιμοπετάλια κουνελιού όπως και σε αντίστοιχα παρασκευάσματα ανθρώπινων αιμοπεταλίων (302) στα οποία καταγράφηκε η αποικοδόμηση του P.A.F. προς lyso-P.A.F. Η δραστηριότητα αυτή δεν οφειλόταν στην PLA₂ και ήταν ανεξάρτητη από το Ca²⁺. Η εν λόγω ενζυμική δραστηριότητα αναστελόταν από το PMSF και το φθοριφωσφορικό δισοπροπύλιο το οποίο αποτελεί αναστολέα της υδρολάσης της σερίνης αλλά όχι της φωσφολιπάσης A₂ (159). Ανάλογα με ό,τι συνέβη στην ακετυλοτρανσφεράση της βιοσυνθετικής οδού, η δραστηριότητα της ακετυλο-υδρολάσης αυξανόταν αρκετές φορές μετά την επεξεργασία των ουδετερόφιλων με A 23187 (301). Ωστόσο τα δεδομένα δείχνουν ότι δεν υπάρχει μια όμοια αύξηση της αποικοδόμησης του P.A.F. σε ενεργοποιημένα αιμοπετάλια (201).



β) Ακυλτρανσφεράση ή τρανσακυλάση.

Όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως ο παραγόμενος από τα αιμοπετάλια P.A.F. αποσυντίθεται και ανακυκλώνεται. Ωστόσο ο lyso-P.A.F. που είναι και το αναμενόμενο προϊόν της αντίδρασης της ακετυλοϋδρολάσης συναντάται σε πολύ μικρές ποσότητες σε ακέραια αιμοπετάλια επωαζόμενα με ραδιοσημασμένο P.A.F. Το δεδομένο αυτό υποδεικνύει ότι ο P.A.F. ενδέχεται να καταβολίζεται απ'ευθείας σε αλκύλ ακύλ GPC μέσω κάποιας τρανσακυλάσης, ερμηνεύοντας έτσι τη φαινομενική απουσία του lyso-P.A.F. Διάφορες ερευνητικές ομάδες απέδειξαν ότι ο lyso-P.A.F. αποτελεί ένα ενδιάμεσο-κλειδί για τον σχημασμό αλκύλ ακύλ GPC από P.A.F. Πράγματι οι Kramer (1984) και Malone (1985) έδειξαν ότι το παραγόμενο αλκύλ ακύλ GPC περιέχει αρχικά (80%) και μερικές φορές αποκλειστικά αραχιδονυλικές ομάδες στη θέση 2 του γλυκερινικού σκελετού και ότι το εν λόγω αραχιδονικό οξύ προέρχεται από ένα διακύλ GPC (159, 201).

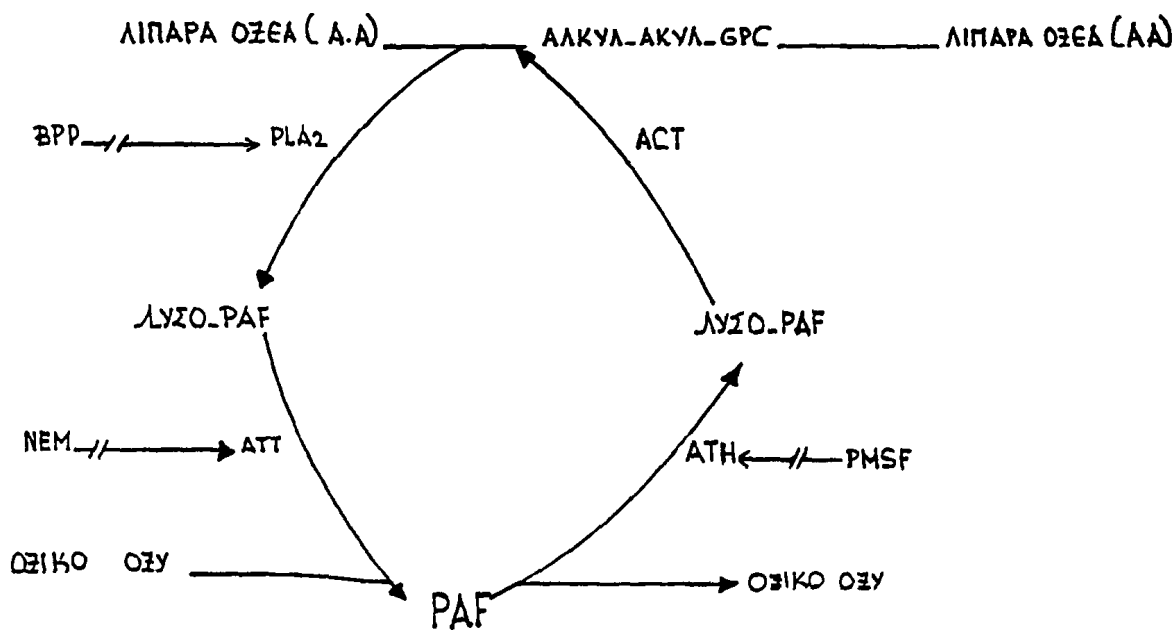
Μένει ωστόσο να εξακριβωθεί ποιός τύπος ενζύμου ελέγχει αυτή την αντίδραση. Πρόκειται δηλαδή για μια τρανσακυλάση που χρησιμοποιεί σαν υποστρώματα τον lyso-P.A.F. και το διακύλ GPC (335) ή για μια ακυλτρανσφεράση που έχει σαν υποστρώματα τον lyso-P.A.F. και το αραχιδονύλ-συνένζυμο A (335). Το δεδομένο πως μια ακυλική ομάδα (κυρίως αραχιδονικό οξύ) προερχόμενη από ένα διακύλ GPC, ενσωματώνεται στον lyso-P.A.F. ενισχύει την πρώτη υπόθεση. Η δεύτερη υπόθεση προϋποθέτει ότι το διακύλ GPC παρέχει μέσω φωσφολιπάσης A_2 το αραχιδονικό οξύ σε μια ακυλο-συνένζυμο A συνθετάση η οποία παράγει αραχιδονύλ-συνένζυμο A (219). Μονολόπι ο μηχανισμός της μεταφοράς της ακυλομάδας από το διακύλ GPC στον lyso-P.A.F. δεν είναι γνωστός, ωστόσο έχει καταδειχθεί η παρουσία μιας ακυλτρανσφεράσης στα αιμοπετάλια (153). Το ένζυμο αυτό βρίσκεται συνδεδεμένο στις μεμβράνες και δεν απαιτεί για τη λειτουργία του δισθενή καπόντα. Πράγματι το Ca^{2+} ή το Mg^{2+} είναι δυνατόν να το αναστείλουν ενώ το EDTA το διαγείρει ελαφρά. Η κινητική σχηματισμού του αλκύλ ακύλ GPC δείχνει ότι το μέγιστο της δραστηριότητας του ενζύμου επιτυγχάνεται με 150μM lyso-P.A.F. και 20μM εστεροποιημένου λιπαρού οξέος Συν A. Οι εστέρες του Συν A με λινολεϊκό και αραχιδονικό οξύ αποτελούν τα προτιμώμενα υποστρώματα (17). Η παρατήρηση αυτή εξηγεί γιατί το αλκύλ ακύλ GPC παρουσιάζει συνήθως αραχιδονικό οξύ στη θέση 2 του γλυκερινικού σκελετού (178). Το γεγονός αυτό επιβεβαιώνει επίσης ότι τα μόρια αυτά αποτελούν την πηγή του ελεύθερου αραχιδονικού οξέος κατά τη διάρκεια της ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων. Επειδή τα υποστρώματα και οι



συμπαράγοντες του εν λόγω ενζύμου είναι διαφορετικοί από τα αντίστοιχα της ακετυλοτρανσφεράσης καταλήγουμε στο συμπέρασμα ότι πρόκειται για ένζυμα διαφορετικά.

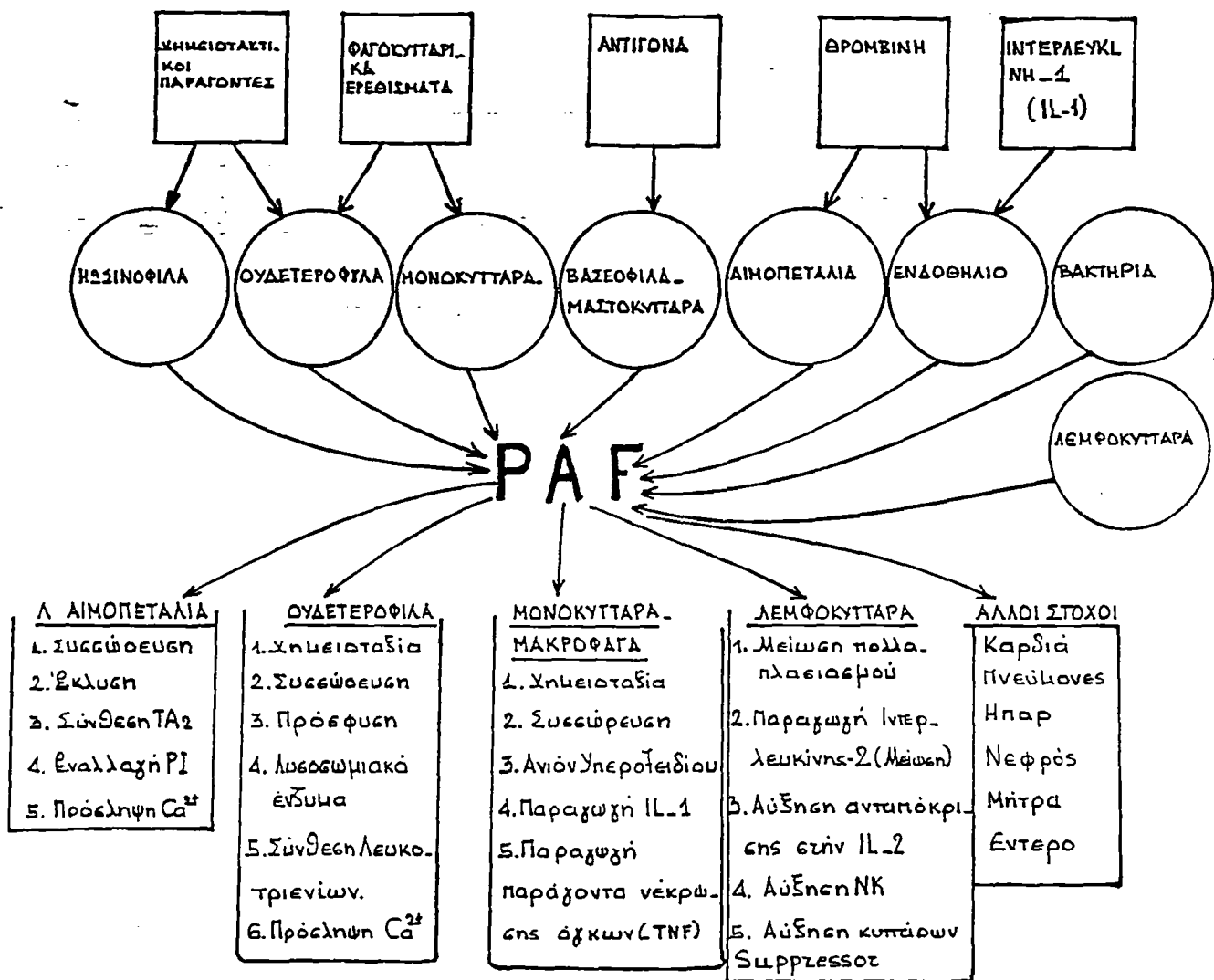
2.5 Ο κύκλος του P.A.F. και η ρύθμισή του

Τουλάχιστον τέσσερα διαφορετικά ένζυμα φαίνεται πως συμμετέχουν στο μεταβολισμό του P.A.F. (18, 17). Πρόκειται για την φωσφολιπάση A₂, την ακετυλο-υδρολάση, την ακετυλο-τρανσφεράση και πιθανότατα την ακυλ-τρανσφεράση (εικόνα αρ. 7.).



Ο ΚΥΚΛΟΣ ΤΟΥ ΡΑΦ : ΡΛΑ₂ Φωσφολιπάση A₂ , ΑΤΤ Ακετυλτρανσφεράση,
ΑΤΗ Ακετυλυδρολάση, ΑCΤ : Ακυλτρανσφεράση (Τραυσακυλάση)

ΒΡΒ: Βρωμιούχο Βρωμοφαινακύλιο, ΝΕΜ: Νετριδυλικαλείληδη, ΡΜSΦ: Φθοριοφωσφορικό παραμεθυλοσουλφόνιο



Σχήμα που παρουσιάζει τις σχέσεις των διεγερτών παραγωγής PAF, τα κύτταρα στόχους και τις αντιδράσεις τους, όπως και μερικά από τα όργανα στόχους. Η φαινομενολογία των δράσεων του PAF είναι εξαιρετικά περίπλοκη και πάρα πολύ εκτεταμένη

Η δραστηριότητα των ενζύμων αυτών μπορεί να ανασταλεί μέσω φαρμακευτικών ουσιών. Η φωσφολιπάση A_2 αναστέλεται από το Βρωμιούχο Βρωμοφαινακύλιο (17), η ακετυλοτρανσφεράση από την Ν-αιθυλμαλεϊμίδη (Alam 1984), ή από το φθοριούχο φαινυλ-μεθυλ-σουλφόνιο (301). Ωστόσο οι αναστολείς αυτοί δεν έχουν ειδική δράση και συνεπώς ο έλεγχος του μεταβολισμού του P.A.F. κάτω από φυσιολογικές συνθήκες είναι ακόμη αγνώστος (57). Ακόμη οι ενδεχόμενες σχέσεις μεταξύ του κύκλου του P.A.F. και των μεταβολικών οδών του αραχιδονικού οξέος πρέπει να μελετηθούν σε περισσότερες λεπτομέρειες προκειμένου να κατανοηθεί κατά πόσο τα δύο αυτά βιοχημικά λειτουργικά συστήματα ολοκληρώνονται μεταξύ τους και πώς.

2.6 Άλλες πιθανές οδοί

Θεωρητικά ο P.A.F. μπορεί να συντεθεί από 1-0-αλκύλ-2-ακετύλ-54-γλυκερόλη με προσθήκη φωσφοχολίνης μέσω της CDP-χολίνης-φωσφοτρανσφεράσης. Μια τέτοια δραστηριότητα έχει περιγραφεί στα μικροσώματα διαφόρων ιστών του επίμοος και συγκεκριμένα στον σπλήνα, στον πνεύμονα, στο νεφρό και στην καρδιά (263) όπως επίσης και σε ανθρώπινα πολυμορφοπύρηνια λευκά (153, 17, 18). Ακόμη δραστηριότητες του τύπου CDP-χολίνης-φωσφοτρανσφεράσης έχουν βρεθεί στα αιμοπετάλια και δύο ομάδες ερευνητών έχουν ήδη αναφέρει τη μετατροπή της 1-0-αλκύλ-2-ακετύλ-54-γλυκερόλης σε P.A.F. εκ μέρους των αιμοπεταλίων (270). Η μετατροπή αυτή παρατηρείται επίσης και απουσία του εξωκυτταρικού Ca^{2+} . Ατυχώς, η ενζυμική αυτή δραστηριότητα δεν έχει επιβεβαιωθεί σε ενεργοποιημένα αιμοπετάλια των οποίων το ενδοκυττάριο Ca^{2+} είναι αυξημένο σε σχέση με τα αιμοπετάλια εν ηρεμία. Μέσω μιας λογικής προέκτασης των αποτελεσμάτων του Goracci (1983) που έδειξε ότι το ένζυμο αυτό αναστέλεται από Ca^{2+} μπορεί να θεωρηθεί ότι η δραστηριότητά του θα πρέπει να μειώνεται (ή τουλάχιστον να μην αυξάνεται) μετά από κυτταρική διέγερση (153). Για να στηρίξουν την ιδέα αυτή οι Alonso και συνεργάτες του (1982) απέδειξαν ότι κατά τη διάρκεια της ενεργοποίησης των λευκοκυττάρων η δραστηριότητα της CDP-χολίνη-φωσφοτρανσφεράσης δεν αυξάνεται ενώ η ακετυλοτρανσφεράση ενεργοποιείται (3). Αυτό αποδεικνύει ότι η ακετυλοτρανσφεράση είναι το ένζυμο που ευθύνεται για τη σύνθεση του R.A.F (3). Από τότε που οι Benveniste και οι συνεργάτες του απέδειξαν ότι παρουσία χυλικών δεσμευτών του Ca^{2+} , τα αιμοπετάλια που ενεργοποιούνται μέσω θρομβίνης είναι ανάκατα να παράγουν R.A.F-acèthen φαίνεται πιθανόν ότι η οδός της χολίνης-φωσφοτρανσφεράσης δεν αναμιγνύεται στην παραγωγή του R.A.F-acèthen κατά τη διάρκεια της αιμοπεταλιακής ενεργοποίησης (17, 18). Συνεπώς



ο ρόλος της CDP-χολίνη-φωσφοτρανσφεράσης στο σχηματισμό του P.A.F. παραμένει ακόμη αδιευκρίνιστος εφόσον δεν έχει περιγραφεί με σαφήνεια μια οδός σύνθεσης του υποστρώματος, δηλαδή της 1-0-αλκύλ-2-ακετύλ-5, 4-γλυκερόλης (286). Μελέτες της δομής του έδειξαν την ύπαρξη μιας τριμεθυλαιθανολαμινικής ομάδας (χολίνη) στη θέση 3 της 5, 4-γλυκερόλης (Benveniste 1977-79, Δημόπουλος 1979). Η βιοσύνθεση της τριμεθυλαιθανολαμίνης μέσω διαδοχικών N-μεθυλίσεων της φωσφατιδυλαιθανολαμίνης περιγράφηκε για πρώτη φορά το 1960 (43). Έχει επίσης αποδειχθεί ότι τα αιμοπετάλια περιέχουν το ένζυμο φωσφολιπιδική μεθυλτρανσφεράση που είναι υπεύθυνο για την N-μεθυλίωση (178, 138). Ο σχηματισμός του P.A.F. και του lyso-P.A.F. από αιμοπετάλια ενεργοποιημένα με θρομβίνη μειώνεται παρουσία 3-ντεαζαδενοσίνης και L-ομοκυστεΐνης, ουσίες οι οποίες αναστέλουν τη φωσφολιπιδική μεθυλτρασφεράση (146). Μονολόπι η ενζυματική εξειδίκευση των αναστολέων αυτών δεν έχει ακόμη προσδιοριστεί, η εργασία αυτή υποδεικνύει τη συμμετοχή ενός εναλλακτικού μηχανισμού στη βιοσύνθεση του R.A.F-acethen.

3. Ο P.A.F. και η ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων

3.1 Συσσώρευση και έκλυση

Ο όρος Παράγοντας Ενεργοποίησης Αιμοπεταλίων (P.A.F.) χρησιμοποιήθηκε για πρώτη φορά από τον Benveniste και τους συνεργάτες του (1972) για να περιγράψει μια ουσία ικανή να συσσωρεύει τα αιμοπετάλια του κουνελιού και να απελευθερώνει αγγειοδραστικές αμίνες (12). Η ενεργοποίηση των ανθρώπινων αιμοπεταλίων από τον P.A.F. αναφέρθηκε για πρώτη φορά επίσης από τον Benveniste και τους συνεργάτες του το 1975 και εν συνεχεία επιβεβαιώθηκε μερικά χρόνια αργότερα από διαφορετικά εργαστήρια που χρησιμοποιούσαν καθορισμένα συνθετικά υλικά (14, 204, 200). Η ευαισθησία των αιμοπεταλίων στον P.A.F. ποικίλει από είδος σε είδος. Μελέτες που έγιναν σε PRP (πλάσμα πλούσιο σε αιμοπετάλια) έδειξαν ότι τα αιμοπετάλια που προερχόταν από ανθρώπους, σκύλους, γάτους, κουνέλια, ινδόχοιρους και ίππους εμφάνιζαν υψηλή ευαισθησία στον P.A.F., ενώ αντίθετα τα αιμοπετάλια των μυών, των επιμύων και των μη ανθρωποειδών πρωτεύοντων δεν ανταποκρινόταν στον παράγοντα αυτόν. Μια σχετικά πρώιμη ανακοίνωση που ανέφερε ότι τα πλυμένα αιμοπετάλια του επιμύος συσσωρεύονται από τον P.A.F. (92) δεν επιβεβαιώθηκε και η διαφορά αυτή δεν κατορθώθηκε να ερμηνευτεί. Τα ανθρώπινα αιμοπετάλια είναι λιγώτερο ευαίσθητα εν σχέσει προς τα αιμοπετάλια του κουνελιού και του ινδόχοιρου (60).



Τα πλυμένα αιμοπετάλια του κουνελιού συσσωρεύονται κατόπιν διέγερσης με δόσεις P.A.F. μικρότερες του 0,1nM (81, 294). Μελέτες που πραγματοποιήθηκαν με πλυμένα αιμοπετάλια δείχνουν ότι ο P.A.F. δεν απελευθερώνει ADP και δεν ενεργοποιεί την οδό του αραχιδονικού οξέος προκειμένου να προκαλέσει συσσώρευση. Ο P.A.F. συσσωρεύει τα αιμοπετάλια παρουσία ενζυμικών συστημάτων τα οποία απομακρύνουν το απελευθερούμενο ADP, αλλά ακόμη και εκείνα τα αιμοπετάλια στα οποία το ADP είχε αφαιρεθεί ή καταναλωθεί παρουσίασαν συσσώρευση από τη δράση του P.A.F. (47, 317). Φάρμακα όπως η ασπιρίνη, τα οποία αναστέλουν την κυκλοοξυγενάση, αποδείχτηκε ότι δεν παρεμποδίζουν την αιμοπεταλιακή συσσώρευση την ενεργούμενη από τον P.A.F. (47, 276) παρά το γεγονός ότι έχει περιγραφεί ενεργοποίηση της αραχιδονικής οδού μέσω του P.A.F. (277, 276). Ωστόσο απαιτούνται υψηλές ποσότητες P.A.F. προκειμένου να ενεργοποιηθεί η φωσφολιπάση A₂ και τελικά προκαλείται μόνον ελάχιστη πτώση της ραδιενέργειας της προερχόμενης από αιμοπετάλια σεσημασμένα με [¹⁴C] αραχιδονικό οξύ (47). Όλες οι μελέτες καταλήγουν στο συμπέρασμα ότι η ενεργούμενη από τον P.A.F. συσσώρευση και έκλυση στα αιμοπετάλια λαμβάνει χώρα ανεξάρτητα από τα παράγωγα της οδού της κυκλοοξυγενάσης (276, 47).

Σε αντίθεση με τα αποτελέσματα που επιτεύχθηκαν με αιμοπετάλια κουνελιού, υπάρχει μεγάλη ανπαράκτοτητα σχετικά με το ρόλο της απελευθέρωσης ADP και της ενεργοποίησης του δρόμου του αραχιδονικού οξέος στα ανθρώπινα αιμοπετάλια που διεγείρονται μέσω P.A.F. Όταν τα ανθρώπινα αιμοπετάλια διασπείρονται μέσα σε πλάσμα με προσθήκη κιτρικού ή σε ρυθμιστικό διάλυμα που περιέχει χαμηλές συγκεντρώσεις ιόντων ασβεστίου, τότε η διέγερσή τους μέσω του P.A.F. καταλήγει σε μερική ενεργοποίηση της αραχιδονικής οδού με συνακόλουθη παραγωγή θρομβοξάνης A₂ και μέτριου βαθμού απελευθέρωση του περιεχομένου των πυκνωτικών και λυσοσωματικών τους κοκκίων. Σε τέτοια μέσα, η επέκταση του δεύτερου κύματος της συσσώρευσης και η έκλυση του περιεχομένου των πυκνωτικών κοκκίων (που επάγονται από υπομέγιστες δόσεις P.A.F.) μπορούν να ανασταλούν από φάρμακα τα οποία καταστέλλουν την οξυγενάση ή από ουσίες που απομακρύνουν το απελευθερούμενο ADP (200). Όταν χρησιμοποιούνται υψηλές συγκεντρώσεις P.A.F., τα φάρμακα με δράση όμοια προς την ασπιρίνη δεν θίγουν την πρόοδο της συσσώρευσης αλλά ελαττώνουν την απελευθέρωση των αμινών που βρίσκονται στα αιμοπεταλιακά κοκκία (204, 200). Η αποκοκκιωτική αυτή αντίδραση μπορεί επίσης να ελαττωθεί (κατά 50%) μέσω αύξησης του Ca²⁺ σε 2mM (με 1mM Mg²⁺) ενώ η συσσώρευση θίγεται ελάχιστα (158). Αντίθετα σ'ένα μέσον που περιέχει φυσιολογικές



συγκεντρώσεις ιόντων Ca^{2+} , η συσσώρευση των αιμοπεταλίων από τον P.A.F. δεν συνοδεύεται από απελευθέρωση αραχιδονικού και εκλύεται μόνο ένα μικρό ποσοστό των ενδοαιμοπεταλιακών αμινών των αποθηκευμένων στα κοκκία. Επιπρόσθετα χρησιμοποιώντας ανθρώπινα αιμοπετάλια σε ηπαρινισμένο πλάσμα, η ασπιρίνη αποτυγχάνει στο να ελαττώσει την συσσώρευση της ενεργούμενη από P.A.F. αλλά καταστέλλει την αντίδραση έκλυσης (97). Οι αντιδράσεις αυτές μοιάζουν με την παρατηρούμενη αλληλεπίδραση μεταξύ ADP και ανθρώπινων αιμοπεταλίων. Η επαγόμενη αιμοπεταλιακή συσσώρευση από ADP παρουσιάζει φυσιολογικών συγκεντρώσεων Ca^{2+} δεν συνδέεται με την ενεργοποίηση του αραχιδονικού δρόμου ούτε με την αντίδραση έκλυσης. Αντίθετα όταν το ADP διαγείρει τα αιμοπετάλια σε πλάσμα με κιτρικό οξύ ή σε ένα μέσον που περιέχει Mg^{2+} αλλά όχι Ca^{2+} ή περιέχει Mg^{2+} , Ca^{2+} και κιτρικό οξύ (11-15mM) τότε η οδός του αραχιδονικού ενεργοποιείται και με τη σειρά της προκαλεί περαιτέρω συσσώρευση και αποκοκκίωση (219). Το γεγονός αυτό ερμηνεύει ίσως την παρατήρηση ότι η ασπιρίνη μπορεί να ελαττώσει την ενεργούμενη από P.A.F. συσσώρευση των ανθρώπινων αιμοπεταλίων μέσα σε πλάσμα με κιτρικό οξύ ακόμη και προσθέτοντας Ca^{2+} (3mM) (200). Αυτό το τεχνούργημα (artifact) που προκύπτει κατά τη μελέτη της αιμοπεταλιακής συσσώρευσης σε ένα μέσο που χαρακτηρίζεται από χαμηλότερες των φυσιολογικών συγκεντρώσεις σε Ca^{2+} δεν περιορίζεται στα πειράματα με ADP και P.A.F. Για παράδειγμα ανθρώπινα αιμοπετάλια συγκολλημένα με πολυλυσίνη ή ριστοκετίνη σ'ένα μέσον που παρουσιάζει το παραπάνω χαρακτηριστικό σχηματίζουν θρομβοξάνη A_2 και απελευθερώνουν το περιεχόμενο των κοκκίων τους, ενώ σε ένα μέσον που περιέχει αυξημένη συγκέντρωση Ca^{2+} λαμβάνει χώρα μόνο η συγκόλληση (156, 48, 109). Συνεπώς σε πολλές μελέτες επί των δράσεων του P.A.F. στα ανθρώπινα αιμοπετάλια τα επιτευχθέντα αποτελέσματα επηρεάστηκαν σαφώς από τη χρήση του κιτρικού οξέος ή των μέσων με χαμηλό Ca^{2+} .

3.2 Υπεισερχόμενοι Μηχανισμοί

α. Η ενσωμάτωση του ινωδογόνου

Η ενσωμάτωση του ινωδογόνου παίζει σημαντικώτατο ρόλο στη συσσώρευση των αιμοπεταλίων. Πράγματι όταν τα αιμοπετάλια διαγείρονται από συσσωρευτικούς παράγοντες, τότε οι υποδοχές του ινωδογόνου που βρίσκονται στην εξωτερική επιφάνεια της μεμβράνης τους αποκαλύπτονται και το ινωδογόνο αρχίζει να ενώνεται μαζί τους, με τρόπο εξειδικευμένο, μέχρι του σημείου κορεσμού τους (220, 22, 202, 246, 235). Ο P.A.F. όπως και άλλοι αιμοπεταλιακοί διεγέρτες, είναι ικανός να ενεργοποιήσει την ενσωμάτωση του



ινωδογόνου στην επιφάνεια των αιμοπεταλίων (202, 158). Υποδεικνύεται ότι κατά την αιμοπεταλιακή διέγερση από διάφορους ενεργοποιητές οι γλυκοπρωτεΐνες IIb και IIIa, σχηματίζουν σύμπλοκα τα οποία μαζί με το Ca^{2+} απαρτίζουν τον υποδοχέα του ινωδογόνου (231, 257). Εναλλακτικά ως προς την ερμηνεία αυτή, προτείνεται ότι προσχηματισμένα σύμπλοκα γλυκοπρωτεϊνών IIb και IIIa που περιέχουν Ca^{2+} , υφίστανται μεταβολές σχήματος και αποκαλύπτουν τα σημεία ενσωμάτωσης του ινωδογόνου (63, 64). Έχει ακόμη δειχθεί ότι χρησιμοποιώντας μονοκλωνικά αντισώματα ενάντια στα ειδικά επιτόπια των συμπλόκων των γλυκοπρωτεϊνών IIb και IIIa μπορούμε να αναστείλουμε τη συσσώρευση των αιμοπεταλίων και την εκ μέρους τους απελευθέρωση σεροτονίνης ραδιοσημασμένης με [^{14}C] όταν αυτά έχουν ενεργοποιηθεί με P.A.F. (127). Οι μελέτες αυτές αποδεικνύουν τη συμμετοχή της ενσωμάτωσης του ινωδογόνου στην αιμοπεταλιακή συσσώρευση την προκαλούμενη από P.A.F.

6. Ο μεταβολισμός του Ca^{2+}

Πολυάριθμες φαρμακολογικές μελέτες υποδεικνύουν ότι το Ca^{2+} εξωκυτταρικής και ενδοκυτταρικής προέλευσης είναι απαραίτητο για την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων από τον P.A.F. (57). Η απαραίτητη συμμετοχή του ασβεστίου (Ca^{2+}) στο σχηματισμό συμπλόκων μεταξύ των γλυκοπρωτεϊνών IIb και IIIa εξηγεί το γιατί τα αιμοπετάλια δεν συσσωρεύονται σ'ένα μέσον το οποίο περιέχει αρκετές ποσότητες EDTA ή EGTA για την χυλική δέσμευση των δισθενών ιόντων. Επιπλέον έχει δειχθεί με σαφήνεια ότι ένας από τους μηχανισμούς μέσω των οποίων οι διάφοροι αιμοπεταλικοί διεγέρτες προκαλούν συσσώρευση και αντίδραση έκλυσης, είναι η αύξηση του κυττοσολικού Ca^{2+} (91). Ακόμη έχει δειχθεί ότι και ο P.A.F. προκαλεί αύξηση της συγκέντρωσης του Ca^{2+} στο κυττοσόλ του αιμοπεταλίου.

Μελέτες στις οποίες χρησιμοποιήθηκε ραδιενεργό Ca^{2+} απέδειξαν ότι ο P.A.F. διεγείρει την πρόσληψή του από τα αιμοπετάλια, ενώ διάφορα άλλα χημικά του ανάλογα (συμπεριλαμβανομένων και των μη απαντώντων στο σώμα ισομερών του καθώς και των *lyso*-μορφών του) στερούνται ιονοφορητικής δράσης. Η παρατηρούμενη εισροή Ca^{2+} εξαρτάται από την εξωκυττάρια συγκέντρωση των ιόντων Ca^{2+} και αναστέλλεται από την Βεραπαμίλη η οποία αποκλείει τα κανάλια μεταφοράς του εν λόγω ιόντος. Η διέγερση της πρόσληψης του Ca^{2+} από τα αιμοπετάλια του κουνελιού μέσω P.A.F. είναι



ανεξάρτητη από την οδό του ADP και τους μεταβολίτες του αραχιδονικού οξέος που σχηματίζονται μέσω της κυκλοξυγενάσης. Ωστόσο οι αραχιδονικοί μεταβολίτες που παράγονται μέσω της λιποξυγενάσης πιθανώς υπεισέρχονται στην επαγόμενη από τον P.A.F. αύξηση της πρόσληψης Ca^{2+} , όπως αποδεικνύεται από πειράματα που πραγματοποιήθηκαν παρουσία αναστολέων της φωσφολιπάσης A_2 και της λιποξυγενάσης (174, 173). Ο P.A.F. προκαλεί επίσης πρόσληψη Ca^{2+} εκ μέρους των ανθρωπίνων αιμοπεταλίων, αλλά το γεγονός αυτό είναι μια μάλλον χωρίς προεκτάσεις αλληλεπίδραση μεταξύ απορρόφησης Ca^{2+} και έκλυσης νουκλεοτιδίων, εφόσον φαίνεται ότι η πρόσληψη Ca^{2+} δεν αποτελεί γεγονός ευρύτερων συνεπειών, τοποθετημένο κοντά στην έναρξη των φαινομένων που οδηγούν στην αρχική αιμοπεταλιακή συσσώρευση την ενεργούμενη από τον P.A.F. Μολαταύτα, στην δεύτερη φάση της συσσώρευσης η οποία παρατηρείται μέσω μεγαλύτερων δόσεων P.A.F., η προσθήκη αναστολέων της κυκλοοξυγενάσης όπως η ασπιρίνη μπορεί να επιφέρει μείωση της πρόσληψης Ca^{2+} και της έκλυσης νουκλεοτιδίων (62). Όμως, η μελέτη αυτή πραγματοποιήθηκε με ανθρώπινα αιμοπετάλια διασπαρμένα σε τεχνητό μέσο που περιείχε χαμηλές συγκεντρώσεις εξωτερικού Ca^{2+} (0,1-0,2mM) οπότε - όπως έχει ήδη προαναφερθεί - η αιμοπεταλιακή ανταπόκριση στον P.A.F. θα μπορούσε να οφείλεται, τουλάχιστον εν μέρει, σε μια ενεργοποίηση της οδού του αραχιδονικού οξέος προκαλούμενη κι από τη στενή αιμοπεταλιακή επαφή, πράγμα που εξ'άλλου παρατηρείται όταν χρησιμοποιούνται τέτοιου είδους μέσα διασποράς. Συνεπώς, παραμένει ακόμη αναπόδεικτο το κατά πόσον οι αραχιδονικοί μεταβολίτες που παράγονται από την κυκλοοξυγενάση παίζουν κάποιο ρόλο στην ενεργοποίηση της εισροής ιόντων ασβεστίου μέσω P.A.F. στα ανθρώπινα αιμοπετάλια υπό φυσιολογικές συνθήκες. Οι προκαλούμενες αλλαγές στα επίπεδα του κυτταροπλασματικού Ca^{2+} είναι επίσης μια άλλη αξιοσημείωτη πλευρά του θέματος της δράσης του P.A.F. Οι μεταβολές αυτές καταγράφονται με την χρησιμοποίηση του QUIN 2. Τα δεδομένα υποδεικνύουν ότι ο P.A.F. αυξάνει τις ενδοκυττάρειες συγκεντρώσεις ελεύθερου Ca^{2+} εν μέρει μέσω της κινητοποίησης των εσωτερικών αποθεμάτων ασβεστίου, κυρίως όμως μέσω της διέγερσης της εισροής ιόντων ασβεστίου (113). Πολλοί ερευνητές έχουν υποδείξει ότι η αιμοπεταλιακή ανταπόκριση εξαρτάται από την κινητοποίηση του Ca^{2+} που βρίσκεται εναποθετημένο σε ορισμένα σημεία μέσα στα αιμοπετάλια όπως λόγου χάριν στο πυκνό σωληναριακό δίκτυο και στο σύστημα των ανοιχτών καναλιών. Παρά ταύτα, η πηγή του εσωτερικού Ca^{2+} και οι βαθύτεροι μηχανισμοί της αποδέσμευσής του εκ μέρους του P.A.F. παραμένουν ακόμη αδιαλεύκαντοι. Διάφοροι ερευνητές έδειξαν ότι ο P.A.F. δεν ασκεί άμεση ιονόφορετική δράση



πάνω σε φωσφολιπιδικά λιποσώματα ή σε αιμοπεταλιακά μικροσώματα. Συνεπώς η επαγόμενη από τον P.A.F. αύξηση της συγκέντρωσης του ενδοκυττάριου Ca^{2+} είναι μάλλον μια συνέπεια της αλληλεπίδρασης του παράγοντα αυτού με κάποιον ειδικό μεμβρανικό υποδοχέα παρά το αποτέλεσμα μιας άμεσης ιονοφορητικής δράσης (327, 74, 78, 100). Πειράματα που πραγματοποιήθηκαν παρουσία ασπιρίνης απέδωσαν έναν ουσιαστικό ρόλο στην ενδογενή θρομβοξάνη A_2 και στα ενδοϋπεροξειδία όσον αφορά την εσωτερική αποδέσμευση Ca^{2+} την προκαλούμενη από P.A.F. (114, 113). Η αύξηση του εσωτερικού κυκλικού AMP αντίκειται στην αύξηση των επιπέδων του Ca^{2+} ίσως μέσω της προώθησης της απομάκρυνσης των ιόντων αυτών (100). Ο P.A.F. δυσχεραίνει τη συσσώρευση του AMP στα αιμοπετάλια, εν μέρει επαυξάνοντας τη δραστηριότητα της φωσφοδιεστεράσης του AMP και εν μέρει αναστέλοντας τη δραστηριότητα της αδενυλικής κυκλάσης (118). Η αναστολή της αδενυλικής κυκλάσης εκ μέρους του P.A.F. απαιτεί τριφωσφορική γουανοσίνη (GTP) και ενισχύεται από το NaCl (336). Δεν έχει ακόμη αποδειχθεί αν η μείωση του AMP είναι ένα έμμεσο φαινόμενο προκαλούμενο από μια αρχική αναστολή της αδενυλικής κυκλάσης ή αν συμβαίνει απ'ευθείας από τον P.A.F., αν και η τελευταία αυτή υπόθεση δεν φαίνεται ιδιαίτερα πιθανή. Γενικά οι συσσωρευτικοί παράγοντες δεν φαίνεται να προξενούν μια πρωτογενή ελάττωση των επιπέδων του AMP στα αιμοπετάλια (119).

Διάφορες μελέτες υποδεικνύουν ότι η αύξηση της συγκέντρωσης των ιόντων ασβεστίου δεν είναι ούτε αναγκαία, ούτε επαρκής συνθήκη για την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων εκ μέρους του P.A.F. Συγκεκριμένα:

- 1) Η ανασταλτική δράση της βεραπαμίλης στη συσσώρευση των αιμοπεταλίων που ενεργείται από P.A.F., όπως και η παρατηρηθείσα αναστολή των μεταβολών στις συγκεντρώσεις του Ca^{2+} μπορεί να οφείλεται όχι σε έναν άμεσο αποκλεισμό των καναλιών Ca^{2+} αλλά σε δράση απ'ευθείας επί του μεμβρανικού υποδοχέα του P.A.F. (55),
- 2) η πρόσληψη του Ca^{2+} δεν απαιτείται για την αρχική φάση της συσσώρευσης των ανθρώπινων αιμοπεταλίων όταν αυτά ενεργοποιούνται από τον P.A.F. (62) και
- 3) η αλλαγή σχήματος των αιμοπεταλίων και η αντίδραση έκλυσης μπορούν να επισυμβούν και κάτω από συνθήκες όπου το Ca^{2+} είναι ιδιαίτερα χαμηλό (112).



γ. Ο φωσφολιπιδικός μεταβολισμός

Διάφορες μελέτες πάνω σε αιμοπετάλια διηγεργμένα με αγωνιστές όπως το ADP, η θρομβίνη ή το κολλαγόνο, έχουν υποδείξει την ύπαρξη μιας σχέσης μεταξύ της αιμοπεταλιακής ενεργοποίησης και του μεταβολισμού των φωσφολιπιδίων της ινοσιτόλης (163, 37, 184, 24, 265, 165). Έχει αποδειχθεί ότι ο P.A.F. διαγείρει τις φωσφολιπάσες A₂ και C (231, 277) και επάγει τον μεταβολισμό των φωσφοϊνοσιπιδίων στα αιμοπετάλια του ίππου, του ανθρώπου και του κουνελιού (165, 26, 166, 205, 193, 155, 180). Η πιθανή σχέση μεταξύ της υδρόλυσης των φωσφοϊνοσιπιδίων και της ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων από τον P.A.F. προτάθηκε αρχικά από τον Lapetina (1982). Ο ερευνητής αυτός έδειξε ότι ο P.A.F. προξενεί σχηματισμό φωσφατιδικού οξέος σε αιμοπετάλια ραδιοσημασμένα με ³²P (σε ορθοφωσφορικής μορφή) και ¹⁴C ενσωματωμένο σε αραχιδονικό οξύ. Ο σχηματισμός του φωσφατιδικού οξέος στα ραδιοσημασμένα με ραδιενεργό αραχιδονικό οξύ αιμοπετάλια υπήρξε σαφής με συγκεντρώσεις αγωνιστή πολύ μικρότερες για το σχηματισμό αραχιδονικών μεταβολιτών. Επιπρόσθετα δείχτηκε ότι η τριφθοριοπεραζίνη η οποία ανταγωνίζεται την καλμοντουλίνη, αναστέλλει την απελευθέρωση αραχιδονικού οξέος εκ μέρους του P.A.F., αλλά δεν επηρεάζει το σχηματισμό φωσφατιδικού οξέος ή την έκλυση της αιμοπεταλιακής σεροτονίνης. Αν και ο μηχανισμός δράσης της τριφθοριοπεραζίνης είναι αμβίβολος (267) εν τούτοις τα αποτελέσματα αυτά, υποδεικνύουν ότι η διέγερση της υδρόλυσης των φωσφοϊνοσιπιδίων αποτελεί το βαθύτερα αρχικό γεγονός της προκαλούμενης από τον P.A.F. αιμοπεταλιακής διέγερσης και ότι αυτό συμβαίνει ανεξάρτητα από τον μεταβολισμό του αραχιδονικού οξέος (165). Την ίδια περίπου εποχή, οι Hanahan και Shulka (120) εργαζόμενοι με αιμοπετάλια κουνελιού έδειξαν ότι ο P.A.F. (και όχι ο lyso-P.A.F.) μπορεί να μειώσει κατά 15-20% τα επίπεδα της ενδοαιμοπεταλιακής φωσφατιδυλινοσιτόλης, ενώ ταυτόχρονα παρατηρείται μια αύξηση του επιπέδου του φωσφατιδικού οξέος. Μια λεπτομερής ανάλυση των παρατηρούμενων αλλαγών στα επιμέρους φωσφοϊνοσιπίδια κατά τη διάρκεια της αιμοπεταλιακής ενεργοποίησης σε ραδιοσημασμένα με [³²P] PO₄ αιμοπετάλια ίππου, έδειξε ότι ο P.A.F. επιφέρει μια ελάττωση της ραδιενεργού 4, 5 διφωσφορικής φωσφατιδυλινοσιτόλης μέσα σε 5 δευτερόλεπτα από την χορήγησή του. Ταυτόχρονα παρατηρήθηκε και ελάττωση δύο άλλων ραδιενεργών φωσφοϊνοσιπιδίων, δηλαδή της 4-μονοφωσφορικής φωσφατιδυλινοσιτόλης και της φωσφατιδυλινοσιτόλης αλλά σε ποσοστά μικρότερα σε σύγκριση με το προαναφερθέν μόριο (26). Ακόμη οι Mauchio και οι συνεργάτες του την ίδια



περίοδο έδειξαν ότι ο P.A.F. προξενεί ελάττωση της 4, 6 διφωσφορικής φωσφατιδυλινοσιτόλης στα αιμοπετάλια του κουνελιού και ότι η μείωση αυτή συνοδεύεται από σχημασμό 4-μονοφωσφορικής φωσφατιδυλινοσιτόλης, ενώ τα φαινόμενα αυτά δεν αναστέλλονται από φάρμακα τα οποία θεωρείται πως καταστέλλουν τη δράση των απελευθερούμενων εσωτερικών ιόντων ασβεστίου (193, 26). Οι παρατηρήσεις αυτές μπορούν να ερμηνευτούν και σαν ενδείξεις ότι μαζί με την αποικοδόμηση της φωσφατιδυλινοσιτόλης από την φωσφολιπάση C, λαμβάνει χώρα και η υδρόλυση της 4, 5 διφωσφορικής φωσφατιδυλινοσιτόλης από μια μονοφωσφοεστεράση (193, 26). Ωστόσο πρέπει να υπογραμμισθεί ότι η μείωση του ενός από τα μόρια αυτά (4, 5 διφωσφορική φωσφατιδυλινοσιτόλη) και η αύξηση της ποσότητας του άλλου (4-μονοφωσφορική φωσφατιδυλινοσιτόλη) δεν είναι στοιχειομετρικές (193). Από το γεγονός αυτό συμπεραίνουμε ότι η υπόθεση που θεωρεί πως η διέγερση του μεταβολισμού των φωσφολιπιδίων από τον P.A.F. διέρχεται από την αύξηση της δραστηριότητας μιας μονοφωσφοεστεράσης δεν φαίνεται ιδιαίτερα πιθανή. Αντίθετα φαίνεται ότι η φωσφολιπάση C μάλλον δρα στα δύο προαναφερθέντα φωσφατιδυλινοσιτίδια (4, 5 διφωσφορική και 4-μονοφωσφορική φωσφατιδυλινοσιτόλη). Πρέπει ακόμη να σημειωθεί ότι τα πολυφωσφοϊνοσιτίδια ανασυντίθενται ταχέως μέσω φωσφορυλίωσης της φωσφατιδυλινοσιτόλης η οποία με τη σειρά της ανασχηματίζεται από το φωσφατιδικό οξύ (208). Πράγματι, η αρχική μείωση του ραδιενεργού φωσφόρου των φωσφοϊνοσιτιδίων που προκαλείται από τη δράση του P.A.F., ακολουθείται από μια ανασύνθεση των φωσφοϊνοσιτιδίων η οποία καταφαίνεται από την πολύ πιο ταχεία ενσωμάτωση του ραδιενεργού φωσφόρου στην 4, 5 διφωσφορική φωσφατιδυλινοσιτόλη και στο μονοφωσφορικό της ανάλογο παρά στην απλή φωσφατιδυλινοσιτόλη (120, 26, 193). Η προστακυκλίνη δεν επηρεάζει την αρχική μείωση του ραδιενεργού φωσφόρου από τα πολυφωσφοϊνοσιτίδια (λόγω P.A.F.) αλλά αναστέλλει το σχημασμό του φωσφατιδικού οξέος και την ανασύνθεση των πολυφωσφοϊνοσιτιδίων. Αυτό, οδηγεί στην υπόθεση ότι η ταχεία αποικοδόμηση των πολυφωσφοϊνοσιτιδίων μπορεί να συνδέεται με την έναρξη της κυτταρικής ενεργοποίησης, πιθανόν με την απελευθέρωση του συνδεδεμένου με τις μεμβράνες ασβεστίου (26).

Υπάρχει μια σχέση μεταξύ φωσφορυλίωσης δύο ενδογενών αιμοπεταλιακών πρωτεϊνών με αντίστοιχα μοριακά βάρη 40.000 Da (P45, 97P, 40K) και 20.000 Da (P20, P9D και 20K) και της αντίδρασης έκλυσης των αιμοπεταλίων, η οποία προκαλείται από πολλούς διεγέρτες τους, συμπεριλαμβανομένου και του P.A.F. (191, 278). Η πρωτεΐνη P47 φωσφορυλιώνεται μέσω μιας πρωτεϊνικής κινάσης C



εξαρτώμενης από διγλυκερίδια, ενώ η φωσφορυλίωση της P20 εξαρτάται από μια αρχική αύξηση του ελεύθερου κυτταροπλασματικού ασβεστίου (236). Μια 1, 2 διακυγλυκερόλη είναι ένα από τα άμεσα, αλλά φευγαλέα προϊόντα της υδρόλυσης των λιπιδίων της ινοσιτόλης που καταλύεται από την φωσφολιπάση C, και που υπεισέρχεται στην φωσφορυλίωση της πρωτεΐνης P47 και την έναρξη της αντίδρασης έκλυσης την πυροδοτούμενη από αγωνιστές που επάγουν την υδρόλυση των φωσφοϊνοσιπιδίων (265). Ο P.A.F. δεν φαίνεται να ενεργοποιεί άμεσα την πρωτεϊνική κινάση C (144). Ο σχηματισμός της διγλυκερικής αυτής ουσίας παρατηρήθηκε σαφώς στη χορήγηση του P.A.F. σε αιμοπετάλια κουνελιού και η αντίδραση αυτή εμφανίστηκε να έχει παρόμοια χρονική διάρκεια και δοσολογικό καθορισμό (η ποσότητα του διαγείροντος P.A.F.) με την απελευθέρωση της σεροτονίνης (277). Η ταχεία μείωση της φωσφατιδυλινοσιτόλης και η φευγαλέα συσσώρευση της διακυγλυκερόλης φαίνεται να συσχετίζονται με την φωσφορυλίωση της P47 και την απελευθέρωση της σεροτονίνης που επάγονται από τον P.A.F.

Οι μεταβολές του σχήματος των ανθρωπίνων αιμοπεταλίων που ο P.A.F. προκαλεί μπορεί να συσχετίζονται με τη διέγερση της φωσφολιπάσης C, το σχηματισμό του φωσφατιδικού οξέος και τη φωσφορυλίωση της πρωτεΐνης με το μοριακό βάρος των 40.000 Daltons. Η φωσφορυλίωση της πρωτεΐνης αυτής παρατηρήθηκε χρησιμοποιώντας P.A.F. σε συγκεντρώσεις (0,1μM) που προκαλούν μικρή αλλά σημαντική απελευθέρωση σεροτονίνης (10%).

4. Υποδοχείς του P.A.F., ενσωμάτωσή του στα πλυμμένα αιμοπετάλια και συσχέτιση μεταξύ δράσης και ενσωμάτωσης στους υποδοχείς του.

Από πολλά πειραματικά δεδομένα προερχόμενα από τις εργασίες διαφόρων ερευνητικών ομάδων προκύπτει ότι η δράση του P.A.F. φαίνεται να περνά μέσα από εξειδικευμένους υποδοχείς στους οποίους ενσωματώνεται και "πυροδοτεί" έτσι την αλυσίδα των διαδικασιών που απαρτίζουν στο σύνολό τους τη δράση του στα αιμοπετάλια και στα ουδετερόφιλα λευκά. Φαίνεται ότι ο P.A.F. δημιουργεί ένα είδος κορεσμού των υποδοχέων του κατά τη διάρκεια μιας πρώτης έκθεσής τους σ'αυτόν. Ο πρωτογενής αυτός κορεσμός έχει σαν αποτέλεσμα μεταξύ των άλλων και την πρόκληση απευαισθητοποίησης του κυττάρου στόχου, το οποίο συμπεριφέρεται σαν μη επιδέξιμο διέγερσης σε μια



επόμενη έκθεσή του στον P.A.F. Αντίθετα, άλλοι αγωνιστές, όπως το ADP, το κολλαγόνο, η θρομβίνη, το αραχιδονικό οξύ δεν προκαλούν απευαισθητοποίηση των αιμοπεταλίων μετά από μια πρώτη "γνώριμία" τους μ'αυτά (130, 129, 128, 169).

Η τεχνική των διαδοχικών εκθέσεων με σκοπό την ειδική απευαισθητοποίηση σε έναν συγκεκριμένο αγωνιστή χρησιμοποιήθηκε για την κατανόηση των εξειδικευμένων αλληλεπιδράσεων του P.A.F. και των αναλόγων του με τα αιμοπετάλια και τα ουδετερόφιλα (270, 279, 296, 169, 39).

Οι μελέτες αυτές οδήγησαν στις διαπιστώσεις ότι η δράση του P.A.F. βασίζεται στα στερεοειδικά του χαρακτηριστικά τα οποία είναι:

- 1) Ο αιθέρας στη θέση 1 της 5, 4-γλυκερόλης
- 2) Η βραχεία ακυλική αλυσίδα στη θέση 2
- 3) Η τεταρτοταγής αμωνιακή βάση στη θέση 3.

Αυτά τα δομικά στοιχεία είναι απαραίτητα για την εξάσκηση της δράσης του P.A.F. και η κατάργηση ή η τροποποίησή τους επιφέρει μείωση ή και απώλεια της δραστηριότητας του μορίου του. Η ύπαρξη αυτών των δομικών προϋποθέσεων για την εξάσκηση δράσης οδήγησε στην υπόθεση της ύπαρξης εξειδικευμένων υποδοχέων στην πλασματική μεμβράνη για τον P.A.F. Η ανάλυση των υποδοχέων αυτών επιχειρήθηκε με τη χρήση τεχνικών ραδιοσήμανσής τους. Έτσι, πλυμένα αιμοπετάλια ανθρώπου επώαστηκαν με διαφορετικές συγκεντρώσεις ραδιενεργού [³H] P.A.F. σε ρυθμιστικό διάλυμα λευκωματίνης η οποία χρησιμεύει σαν μεταφορέας του λιπιδίου αυτού (158, 280). Επιπρόσθετα, οι μελέτες αυτές πραγματοποιήθηκαν σε συνθήκες στις οποίες δεν επιτυγχάνεται συσσώρευση (απουσία μηχανικής διατάραξης, απουσία ιωδογόνου και χαμηλό Ca²⁺). Η ολική ενσωμάτωση προσδιορίστηκε μέσω της διαφοράς της ειδικής ενσωμάτωσης (χωρίς περίσσεια μη ραδιοσημασμένου P.A.F.) και της μη ειδικής (παρουσία περίσσειας μη ραδιοσημασμένου P.A.F.). Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η σύνδεση του P.A.F. με τα αιμοπετάλια εξαρτάται από την συγκέντρωσή του (158, 310). Η ειδική σύνδεση παρουσιάζει κορεσμό και αναριχάται σ'ένα πλατώ μέσα σε 15-80 λεπτά ή σε 1, 2 λεπτά συναρτήσει της συγκέντρωσης του P.A.F. (320, 311, 145). Έχει δειχθεί ότι η ενσωμάτωση του P.A.F. στα κύτταρα-στόχους του εξαρτάται επίσης από τη θερμοκρασία και φθάνει σε μια μέγιστη τιμή στους 20°C περίπου. Τέλος η ειδική ενσωμάτωση φαίνεται να είναι ανεξάρτητη από το



εξωκυτταρικό ασβέσπο, αλλά παρουσιάζει ευαισθησία στη θερμική και στην πρωτεασική επεξεργασία των υποδοχέων [(μεμβράνες αιμοπεταλίων κουνελιού) (311, 140)]. Έχει ανακαλυφθεί ότι τα αιμοπετάλια παρουσιάζουν υποδοχείς με διαφορετικούς βαθμούς συγγένειας έναντι του P.A.F.

Έτσι, έχουν περιγραφεί δύο ή τρεις τύποι σημείων ενσωμάτωσης για τον P.A.F. πάνω στις αιμοπεταλιακές πλασματικές μεμβράνες (140, 320, 43, 145). Ένα από αυτά τα είδη υποδοχέων παρουσιάζει μια υψηλή συγγένεια επιδεικνύοντας τιμές K_d κυμαινόμενες μεταξύ 0,10 και 37 μ M (πίνακας I). Όσον αφορά για το πλήθος των υποδοχέων οι αναφορές δείχνουν ότι ποικίλει από 160 έως 19.386 ανά αιμοπετάλιο. Τα υπόλοιπα σημεία ενσωμάτωσης (υποδοχείς είτε είναι ακόρεστα ή κορέσιμα με χαμηλές ως ενδιάμεσες τιμές συγγένειας (320, 158).

Πίνακας I

Συγγραφέας	Έτος	K_d (nM)	Υποδοχείς ανά αιμοπετάλιο
Valoye και συν.	1982	37 \pm 13.0	1399 \pm 498
Hwang και συν.	1983	1.36 \pm 0.05 ^b	150-300 ^b
Winslow	1984	0.83	160
Klopprogge και Akkerman	1984	18.86 \pm 4.82	242 \pm 64
Bussolino και συν.	1984	20.86 \pm 6.3	1577 \pm 461
Inarrea και συν.	1984	1.58 \pm 0.36	1983 \pm 391
		0.90 \pm 0.50 ^a	\pm 6588 ^a
Tuffin	1985	0.259 \pm 0.033	245 \pm 30
Chesney και συν.	1985	0.10 \pm 0.20	320 \pm 38

Αποτελέσματα μελετών που έγιναν σε αιμοπετάλια

- 1) ανθρώπου (χωρίς δείκτη),
 - 2) κουνελιού (με δείκτη α) και
 - 3) μεμβράνες αιμοπεταλίων κουνελιού (δείκτης b).
- Τιμές και \pm S.D. (K_d =σταθερά ενσωμάτωσης).



Μερικές από τις διαφορές αυτές ερμηνεύονται από τη χρησιμοποίηση διαφορετικών μεθοδολογιών, -π.χ. τεχνικών απομόνωσης αιμοπεταλίων, πθέμενες συγκεντρώσεις ραδιοσημασμένου και "ψυχρού" P.A.F., θερμοκρασία και διάρκεια επώασης. Επιπρόσθετα η συγκέντρωση της λευκωματίνης σ'ένα μέσον μπορεί να αλλοιώσει τις τιμές της K_b μειώνοντας τον πραγματικό αριθμό ελεύθερων μορίων του λιποειδούς στο διάλυμα (321). Πολυάριθμες μελέτες έδειξαν ότι ουσίες οι οποίες είναι δομικά ανάλογες του P.A.F. παρουσιάζουν όμοια με αυτόν δράση στα κύτταρα-στόχους τους, με τη διαφορά ότι η ένταση αυτής της δράσης είναι μικρότερη σε σύγκριση με την αντίστοιχη του P.A.F. Αποδείχτηκε επίσης ότι οι ουσίες αυτές εμποδίζουν την ενσωμάτωση του P.A.F. στα χρησιμοποιούμενα κύτταρα και ότι λειτουργούν σαν αναστολείς του. Ωστόσο ο βαθμός της ανασταλτικής τους ικανότητας έναντι του P.A.F., είναι ανάλογος του βαθμού της δραστηότητάς τους σαν συσσωρευτικών για τα αιμοπετάλια παραγόντων, οπότε η χρησιμοποίησή τους δεν έχει παρά μόνον ερευνητική αξία. Επίσης αποδείχτηκε ότι πολλά βιολογικά "αδρανή" φωσφολιπίδια όπως η φωσφατιδυλαιθανολαμίνη, η λυσοφωσφατιδυλαιθανολαμίνη, η φωσφατιδυλσερίνη και η φωσφατιδυλχολίνη είναι αποτελεσματικά σαν αναστολείς της ενσωμάτωσης του P.A.F. στους κυτταρικούς υποδοχείς του (322, 320, 140, 158, 161, 313, 303). Όσον αφορά τις μορφολογικές και λειτουργικές μεταβολές των αιμοπεταλίων μετά την ενσωμάτωση του P.A.F. στα σημεία της εξωτερικής μεμβράνης τα θεωρούμενα ως υποδοχείς του έχει δειχθεί ότι:

Μετά την ενσωμάτωση στους υποδοχείς του, ο P.A.F. προκαλεί μεταβολή του σχήματος των αιμοπεταλίων, έκθεση των υποδοχέων του ινωδογόνου, μεταβολές στα αποθέματα των φωσφοϊνοσιπιδίων, απελευθέρωση σεροτονίνης, πρόσληψη ασβεστίου και συσσώρευση (158, 145). Οι μελέτες διάφορων ερευνητών (280, 140) υποδεικνύουν ότι για την πρόκληση της μέγιστης μορφολειτουργικής ανταπόκρισης δεν είναι αναγκαίο να καλυφθούν όλοι οι θεωρούμενοι υποδοχείς του P.A.F., ωστόσο οι Winslow και συνεργάτες του (1985) καταλήγουν στη διαπίστωση ότι απαιτείται πλήρης κατάληψη των υποδοχέων από τον P.A.F. προκειμένου να "πυροδοτηθούν" οι παρατηρούμενες αντιδράσεις. Αυτή η παρατήρηση είναι δύσκολο να συμβιβαστεί με την επιβεβαιωμένη εξάρτηση της επαγόμενης αιμοπεταλιακής συσσώρευσης από τη συγκέντρωση του χρησιμοποιούμενου P.A.F. Πολλές πρόσφατες εργασίες οι οποίες χρησιμοποιούν ειδικούς ανταγωνιστές των υποδοχέων του P.A.F., έρχονται να ενισχύσουν την υπόθεση της αναλογικής συσχέτισης μεταξύ ενσωμάτωσης του ραδιενεργού P.A.F. και της αιμοπεταλιακής ανταπόκρισης.



Ένα ακόμη στοιχείο της συμπεριφοράς των αιμοπεταλίων έναντι του P.A.F. που δημιουργεί εύλογα ερωτηματικά είναι και το εξής: τα αιμοπετάλια που επωάζονται στους 37°C με P.A.F., εμφανίζουν εν συνεχεία ανοχή στις επόμενες εκθέσεις τους σ'αυτόν. Ταυτόχρονα καταγράφεται και μια μείωση της ενσωμάτωσης του ραδιοσημασμένου [³H] P.A.F.. Το φαινόμενο αυτό θυμίζει αδρά τον μόνιμο αποκλεισμό της οδού του αραχιδονικού οξέος μέσω επεξεργασίας των αιμοπεταλίων με ασπιρίνη που ερμηνεύεται βέβαια από την καταστροφική ακετυλίωση της κυκλοοξυγενάσης της οποίας, ως γνωστό το αιμοπεταλιακό περιεχόμενο είναι σταθερό, διότι τα αιμοπετάλια δεν διαθέτουν ούτε πυρήνα, ούτε ριβοσώματα για να ανανεώνουν τα ένζυμά τους. Κάτι ανάλογο συμβαίνει πιθανόν και με τους υποδοχείς του P.A.F. Διάφοροι ερευνητές έδειξαν ότι η ελάττωση της ικανότητας ειδικής ενσωμάτωσης του P.A.F. στις αιμοπεταλιακές πλασματικές μεμβράνες είναι αποτέλεσμα είτε μιας μείωσης της συγγένειας του εν λόγω αγωνιστή με τους υποδοχείς του, είτε μιας μείωσης του αριθμού αυτών καθαυτών των υποδοχέων (320, 158, 145, 55). Η μείωση του αριθμού των υποδοχέων συνεισφέρει μεν στην απευαισθητοποίηση των αιμοπεταλίων αλλά δεν ερμηνεύει απόλυτα το όλο φαινόμενο. Πράγματι, η απευαισθητοποίηση στον P.A.F. μπορεί να συμβεί ακόμα κι όταν είναι διαθέσιμοι μόνον οι μισοί υποδοχείς της μεμβράνης (331, 320), ενώ φαίνεται ότι η απευαισθητοποίηση προκύπτει με την κατάληψη μόνο του 15% των συνολικών υποδοχέων εκ μέρους του P.A.F. Δεν είναι γνωστό αν το φαινόμενο αυτό έχει τη βάση του σε μεταβολικές αλλοιώσεις, σε αλλαγές της στερεοδομής των υποδοχέων του P.A.F. ή σε μεταφορά στο εσωτερικό του κυττάρου των συμπλόκων μεταξύ P.A.F. και υποδοχέα, ωστόσο έχει αναφερθεί ότι η ενσωμάτωση του P.A.F. σε γυμνές μεμβράνες αιμοπεταλίων κουνελιών είναι ανποστρέψιμη 15 λεπτά μετά την πραγματοποίησή της ενώ σε ανέπαφα αιμοπετάλια το σχηματιζόμενο σύμπλοκο δεν εμφανίζει αναστρεψιμότητα, οπότε ο υποδοχέας του P.A.F. εφ'όσον χρησιμοποιηθεί καταστρέφεται (140) είτε δομικά, είτε λειτουργικά. Μια τέτοια βιολογική δράση είναι δύσκολο να ερμηνευθεί και φέρνει στο νου δύο σκέψεις:

- 1) Ότι ένα αιμοπετάλιο που δέχτηκε τη δράση του P.A.F. υφίσταται εκ μέρους του μια διέγερση μη επαναλείψιμη από τον ίδιο παράγοντα ίσως γιατί ανεπιφύλακτα καταστρέφεται σε *in vivo* συνθήκες.
- 2) Ίσως όταν για οποιουσδήποτε λόγους ο P.A.F. κυκλοφορεί στον οργανισμό σε κάποιες συγκεντρώσεις που μπορούν να ενεργοποιήσουν μαζικά τα αιμοπετάλια, αυτά αμύνονται από ένα τέτοιο ενδεχόμενο με την



καταστροφή των υποδοχέων τους για τον P.A.F., ανεβάζοντας έτσι την "ουδό" ευαισθησίας τους απέναντί του. Η λειτουργικότητα των αιμοπεταλίων διατηρείται φυσικά μέσω της ύπαρξης των δύο οδών (του αραχιδονικού οξέος και του ADP) στο βαθμό που αποκλείεται η οδός του P.A.F. Σύμφωνα με τη λογική αυτή θάπρεπε να ελεγχθούν η ευαισθησία των αιμοπεταλίων των ασθενών σε όλες εκείνες τις παθολογίες στις οποίες τα αιματικά επίπεδα του P.A.F. είναι ανεβασμένα και να ελεγχθεί ο αριθμός των υποδοχέων του.



ΚΕΦΑΛΑΙΟ IV

ΘΕΙΟΛΕΣ

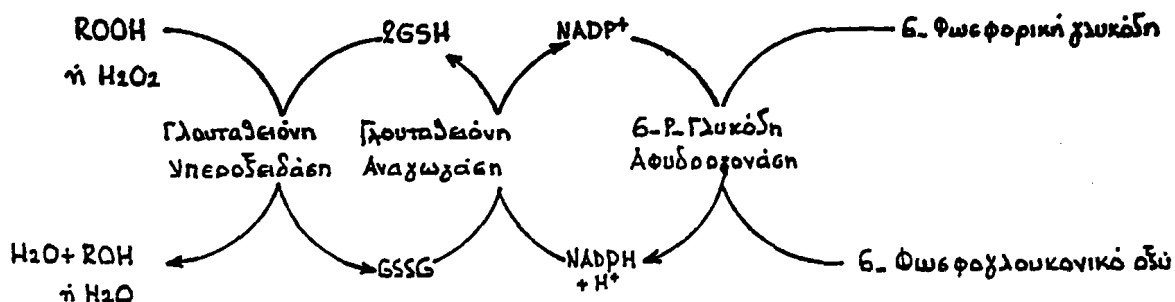
Οι θειόλες είναι μια μεγάλη κατηγορία οργανικών ενώσεων οι οποίες είναι ευρύτατα διαδεδομένες στον έμβιο κόσμο, GSH χαρακτηρίζονται από την ύπαρξη μιας ή περισσότερων θειούχων ή αλλιώς σουλφιδρυλικών ομάδων στο μόριό τους. Δύο από τα 20 αμινοξέα που υπεισέρχονται στην σύσταση των βιολογικών πρωτεϊνών - η μεθειονίνη και η κυστεΐνη - είναι θειόλες, ενώ ένα από τα σημαντικότερα αποτοξινωτικά μόρια που η φυσική επιλογή έχει εξαπλώσει σε μεγάλες φυτικές και ζωϊκές ταξονομικές ομάδες - η γλουταθειόνη (GSH) - συμπεριφέρεται σαν θεόλη εφόσον διαθέτει τη σουλφιδρυλική ρίζα στο κυστεϊνικό υπόλειμα που περικλείνει στη δομή της (εικόνα). Στο ανθρώπινο σώμα - όπως επίσης και στο σώμα των ανώτερων ζώων - η γλουταθειόνη (GSH), συμπεριφέρεται σαν αντιοξειδωτική ουσία η οποία προφυλάσσει τα κύτταρα από το οξειδωτικό stress (34). Βρίσκεται παρούσα σ'όλους τους ιστούς, ενώ τα κύτταρα τα οποία την περιέχουν σε μεγαλύτερες ποσότητες είναι τα ερυθρά αιμοσφαίρια του αίματος και αμέσως μετά τα κύτταρα του ηπατικού παρεγχύματος (34). Η γλουταθειόνη από χημική άποψη είναι τριπεπτιδίο αποτελούμενο από γλουταμινικό οξύ, γλυκίνη και κυστεΐνη. Στα ερυθρά αιμοσφαίρια η γλουταθειόνη ακολουθεί ένα κύκλο μεταξύ οξειδωσης και αναγωγής (σχήμα 1.). Κατ'αρχάς η αναχθείσα μορφή της μέσω του ενζύμου της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης (GSH - ΥΠ.ΟΞ) αποδίδει αναγωγικά ισοδύναμα (υδρογόνα) στο H_2O_2 διασπώντας το σε H_2O σύμφωνα με την παρακάτω αντίδραση:



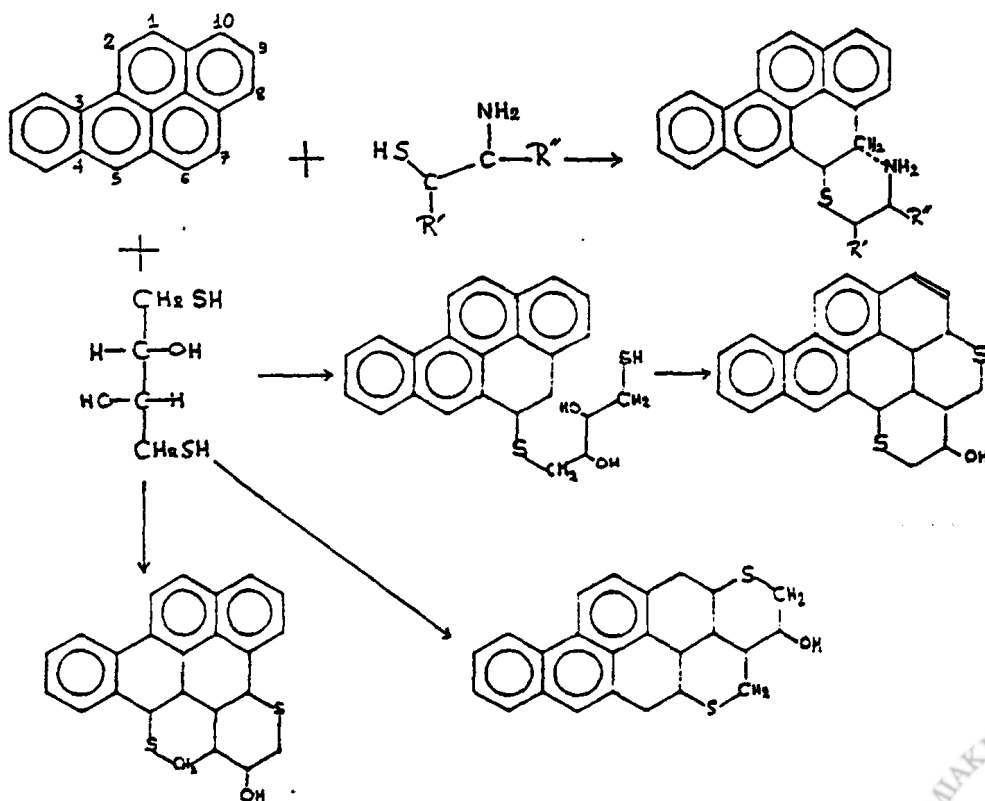
Το ένζυμο αυτό είναι επίσης σε θέση να διασπάσει διάφορα λιπιδικά υδροϋπεροξειδία τα οποία συσσωρεύονται στο στρώμα της πλασματικής μεμβράνης και την αποδιοργανώνουν. Η αλληλουχία των αντιδράσεων του οξειδαναγωγικού κύκλου της γλουταθειόνης στο ερυθρό αιμοσφαίριο φαίνεται στο σχήμα 1.



Σχήμα 1. Σύνδεση μεταξύ υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης, αναγωγής της γλουταθειόνης και αφυδρογονάσης της 6-φωσφορικής γλυκόζης στη λειτουργία της διάσπασης των υδρούπεροξειδίων και του οξειγονούχου ύδατος.



Σχήμα 2. Πιθανές αντιδράσεις των θειολών με την περιοχή K του 3, 4 βενζοπυρενίου (βενζο(α)πυρένιο). Η επιλεκτική αναγωγή του διπλού δεσμού Δ6 στο μόριο του Β(α)Ρ όπως και οι υποκαταστάσεις στους άνθρακες 6 ή/και 7 οδηγούν πιθανό σε μείωση της καρκινογόνου δράσης του εν λόγω μορίου.



Η γλουταθειόνη υπεροξειδάση είναι ευρέως διαδεδομένη στα κύτταρα των θηλαστικών και λειτουργεί σαν αποτοξινωτικό ένζυμο μεγαλύτερης σημασίας από την καταλάση εξ αιτίας της μικρότερης εξειδίκευσής του ως προς τα υπεροξειδικά υποστρώματα (34). Αυτό αποδεικνύεται από το γεγονός ότι άτομα τα οποία στερούνται συγγενώς της καταλάσης (ακαταλασεμικοί) ζουν φυσιολογικά χάρη στην ύπαρξη της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης στα κύτταρα των ιστών τους (34).

Όμως η συγγενής έλλειψη της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης σε ερυθροκυτταρικό επίπεδο, προδιαθέτει προς την αιμολυτική αναμία, ενώ η απουσία του ενζύμου αυτού από τα αιμοπετάλια προκαλεί τη θρομβοασθένεια του Glanzmann (34).

Οι θειόλες έχουν χρησιμοποιηθεί τόσο ερευνητικά όσο και φαρμακευτικά σε διάφορους τομείς εξ' αιτίας των ιδιοτήτων που παρουσιάζουν λόγω της χαρακτηριστικής τους ομάδας -SH. Έτσι έχει δείχθει ότι οι σουλφυδρυλικές ομάδες υπεισέρχονται στην διαδικασία της κυτταρικής διαίρεσης (148). Υπάρχουν επίσης πολλά και σημαντικά δεδομένα τα οποία υποδεικνύουν ότι οι σουλφυδρυλικές ομάδες παίζουν σημαντικό ρόλο στην πρόληψη της καρκινογένεσης. Έχει δείχθει ότι τα σουλφυδρυλικά παράγωγα μειώνουν την καρκινογόνο δράση του 1, 2, 5, 6-διβεζανθρακενίου σε πειραματόζωα, ενώ επίμυες των οποίων η διαίτα περιλαμβάνει συμπλήρωμα μεθειονίνης, κυστίνης ή καζεΐνης εμφανίζουν μικρότερη συχνότητα ηπατικών όγκων επαγομένων από 2-ακετυλ-αμινοφθοριένιο χορηγούμενου μέσω της τροφής του σε σύγκριση με τους μάρτυρες που λαμβάνουν τις ίδιες ποσότητες της καρκινογόνου ουσίας χωρίς το συμπλήρωμα των αναφερθεισών θειούχων ενώσεων (148). Ωστόσο, έχει παρατηρηθεί ότι ορισμένες σουλφιδικές ενώσεις είναι προαγωγοί της διαίρεσης των καρκινικών κυττάρων. Επί παραδείγματι, το θειοκτικό οξύ είναι σε θέση να αυξήσει θεαματικά το ρυθμό μίτωσης καρκινικών κυττάρων, σε εξαιρετικές περιπτώσεις σε ποσοστό μεγαλύτερο του 700% (148).

Η δράση αυτή του εν λόγω παραγώγου υποδεικνύει ότι ίσως είναι δυνατή η σύνθεση διαφόρων τροποποιημένων αναλόγων του τα οποία θα μπορούσαν να λειτουργήσουν και ως αναστολείς της αύξησης των κακοήθως όγκων συμπεριφερόμενα σαν ανταγωνιστές των αποτελεσμάτων των ουσιών που δρουν όπως το θειοκτικό οξύ.



Γενικά, οι ενδογενείς θειόλες του οργανισμού όπως η κυστεαμίνη, η L-κυστεΐνη και η γλουταθειόνη, επιδεικνύουν μέτρια ανασταλτική δράση της χημικής καρκινογένεσης από βενζο(α)πυρένιο (3, 4 βενζοπυρένιο ή B(a)P). Η δράση αυτή είναι δυνατόν να αυξηθεί αν χορηγηθούν στο πειραματόζωο μεγαλύτερες ποσότητες ενδογενών θειολών (148, 34). Η χρησιμοποίηση συνθετικών θειολών έδωσε καλύτερα αποτελέσματα στην αναστολή της καρκινογένεσης που προκαλείται από B(a)P σε σύγκριση με τις φυσιολογικά απαντώμενες θειόλες που προαναφέρθηκαν (148). Οι συνθετικές αυτές εξωγενείς θειόλες έχουν σαν χαρακτηριστικό την προσθήκη στα μορια τους ορισμένων ομάδων οι οποίες ενισχύουν τη δραστηριότητα της σουλφυδρυλικής ρίζας. Επίσης, η ύπαρξη δύο σουλφυδρυλίων στο μόριο μερικών ενώσεων έδειξε ενίσχυση της αντικαρκινογόνου δράσης τους σε σύγκριση πάντοτε με τις ενδογενείς μονοθειόλες (148, 34). Δεν είναι γνωστός ο ακριβής μηχανισμός με τον οποίο οι ενώσεις αυτές ασκούν τη δράση τους, ωστόσο δεδομένου ότι η επώασή τους με διάλυμα βενζο(α)πυρενίου μειώνει κατά πολύ την καρκινογόνο συμπεριφορά του τελευταίου, μπορούμε να υποθέσουμε ότι οι εν λόγω ουσίες τροποποιούν χημικά το μόριο του B(a)P και έτσι μειώνουν την ένταση της δράσης του (148). Η υπόθεση αυτή συνοψίζεται σχηματικά στην εικόνα 2 στην οποία μία θειόλα ανπδρά με την περιοχή K του μορίου του B(a)P - η οποία θεωρείται χημικά υπεύθυνη για την καρκινογόνο συμπεριφορά του - οδηγώντας στον σχηματισμό ενός παραγώγου που δεν διαθέτει την εν λόγω κρίσιμη μοριακή περιοχή. Ακόμη, δεδομένου ότι οι θειόλες είναι ισχυρές πυρηνόφιλες ουσίες και συμπεριφέρονται σαν δεσμευτές ελευθέρων ριζών, οι οποίες ως γνωστόν παράγονται σε μεγάλα ποσά από καρκινογόνες ουσίες όπως το B(a)P, είναι δυνατόν οι αντικαρκινογόνες τους ιδιότητες να οφείλονται στη δέσμευση των ελευθέρων ριζών πριν ακόμη αυτές οι τελευταίες προκαλέσουν βαθειές και μη αντιστρέψιμες αλλοιώσεις στο DNA των κυττάρων οδηγώντας τα προς την καρκινική εξαλλαγή (34).

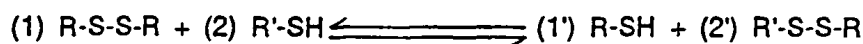
Εκτός από την αναστολή της χημικής καρκινογένεσης οι θειόλες έχουν χρησιμοποιηθεί και σαν ακτινοπροστατευτικοί παράγοντες τόσο *in vitro* όσο και *in vivo* (34). Η χορήγηση διαφόρων θειολών πριν την ακτινοβόληση εξασκεί κάποια προστασία στους ιστούς, ενώ η χορήγησή τους μετά την ακτινοβόληση είναι γενικά αναποτελεσματική. Οι ισχυρές ιονίζουσες ακτινοβολίες προκαλούν ραδιόλυση του ύδατος και σχηματίζουν ελεύθερες ρίζες οξυγόνου οι οποίες θεωρούνται κατά μέγα μέρος υπεύθυνες για τις τοξικές δράσεις της ακτινοβολίας (34). Οι ραδιοπροστατευτικές θειόλες πιθανόν να δρουν μέσω τριών μηχανισμών:



- 1) Δεσμεύοντας άμεσα τις ελεύθερες ρίζες,
- 2) αυξάνοντας τα επίπεδα των ενδογενών θειολών που εν συνεχεία δεσμεύουν τις ελεύθερες ρίζες,
- 3) επιβραδύνοντας τις μεταβολικές διαδικασίες και προκαλώντας υποθερμία, δοθέντος ότι υπάρχει μια συσχέτιση μεταξύ της πτώσης του μεταβολισμού και της μείωσης των βλαπτικών δράσεων της ιονίζουσας ακτινοβολίας (34).

Εκτός από τις προαναφερθείσες εφαρμογές οι θειόλες έχουν χρησιμοποιηθεί φαρμακευτικά σε συγκεκριμένες ασθένειες:

- 1) Η α-μερκαπτο-προπινούλ-γλυκίνη (MPG ή θειόλα) χρησιμοποιείται σαν θεραπευτικός και προληπτικός παράγοντας στην νεφρολιθίαση από λίθους κυστίνης, η οποία εμφανίζεται στους κυστινουρικούς ασθενείς. Ο μηχανισμός της δράσης της MPG ανακαλύφθηκε από τους Bersin και Steudel (1934) και είναι γνωστός σαν αντίδραση θειολικής-δισουλφιδικής ανταλλαγής (150).



(1)-κυστίνη ελάχιστα (2)-διαλυτή διαλυτή θειόλα (1') διαλυτή θειόλα (2') διαλυτό δισουλφίδιο

- 2) Η MPG έχει χρησιμοποιηθεί στην φαρμακευτική του καταράκτη (6)
- 3) Η D-πενικιλामीνη και η MPG χρησιμοποιούνται για την θεραπεία της ρευματοειδούς αρθρίτιδας σ'εκείνες τις μορφές της νόσου όπου η επώδυνη συμπτωματολογία δεν υποχωρεί με τα αντιφλεγμονώδη και τα κοινά αναλγητικά φάρμακα. Η D-πενικιλामीνη έχει χρησιμοποιηθεί και για τη θεραπεία της νεφρολιθίασης των κυστινουρικών αλλά εξ'αιτίας της τοξικότητάς της τείνει να αντικατασταθεί από την MPG.
- 4) Έχει βρεθεί ότι ορισμένες νιτροσοθειόλες που προέρχονται από την αντίδραση της ελεύθερης ρίζας του NO σχετίζονται με μια ενδοαίμοπεταλιακή αύξηση του GMP και με μείωση της συγκοιλυτικότητας των αιμοπεταλίων ανθρώπου από ADP (208).



ΚΕΦΑΛΑΙΟ V

ΥΛΙΚΑ - ΜΕΘΟΔΟΙ

A. ΠΕΙΡΑΜΑΤΑ ΣΥΣΣΩΡΕΥΣΗΣ ΠΛΥΜΕΝΩΝ ΑΙΜΟΠΕΤΑΛΙΩΝ ΚΟΥΝΕΛΙΟΥ ΣΤΟ ΣΥΣΣΩΡΕΥΟΜΕΤΡΟ

1. Χρησιμοποιηθέντα ζώα-αιμοληψία

Για τα πειράματα συσσώρευσης πλυμένων αιμοπεταλίων στο συσσωρευόμετρο χρησιμοποιήθηκαν 30 άρρενα κουνέλια ηλικίας 6-8 μηνών, τύπου New Zealand και βάρους 1,5-2,5 Kgr. Γινόταν τρεις διαδοχικές αιμοληψίες, μία ανά δεκαπέντε ημέρες για κάθε πειραματόζωο. Η αιμοληψία γινόταν από τις φλέβες των αυτιών του κουνελιού με τη χρήση κατάλληλης βελόνας και το δείγμα του αίματος συλλεγόταν με ελεύθερη ροή από το στόμιο της βελόνας σε πλαστικό σωλήνα χωρητικότητας 50ml. Το συνολικό αίμα του κάθε δείγματος ήταν 40ml και το χρησιμοποιούμενο αντιπηκτικό ήταν διάλυμα 0,2% άλατος EDTA με K. Η αναλογία αντιπηκτικού ήταν 1ml ανά 10ml αίματος. Κατά τη λήψη το αίμα αναδεύονταν ήπια με κυκλικές κινήσεις του σωλήνα. Μετά το πέρας της λήψης αναμιγνυόταν καλά με τρεις-τέσσερις ήπιες ανατροπές και αμέσως μετά έμπαινε στην φυγόκεντρο για τον διαχωρισμό τους πλούσιου σε αιμοπετάλια πλάσματος (PRP) (296, 297, 305).

2. Διαλύματα έκπλυσης και συσσώρευσης αιμοπεταλίων

Για τα *in vitro* πειράματα στα οποία είχαμε ως μοντέλο συσσώρευσης τα πλυμένα αιμοπετάλια κουνελιών, χρησιμοποιήσαμε δύο διαφορετικά ρυθμιστικά διαλύματα. Ένα διάλυμα έκπλυσης (TG-EGTA) και ένα διάλυμα συσσώρευσης (TG-Ca). Η λογική της έκπλυσης των αιμοπεταλίων βασίζεται στο γεγονός πως με τον τρόπο αυτό απομακρύνονται όλες οι διαλυτές ουσίες του αιματικού πλάσματος οι οποίες θα μπορούσαν να αλληλεπιδράσουν με τους δοκιμαζόμενους αγωνιστές και τους υπό δοκιμή αναστολείς τους, έτσι ώστε να μην προκύπτουν



επικαλυπτόμενα φαινόμενα που θα μπορούσαν να οδηγήσουν σε εσφαλμένα συμπεράσματα και παρερμηνείες. Απομακρύνοντας όλους τους φυσιολογικούς διεγέρτες των αιμοπεταλίων και δίνοντας σ'αυτά ένα μέσο που εξασφαλίζει την επαβίωση και την καλή τους λειτουργικότητα μπορεί κανείς να ελέγξει τη δράση μιας συγκεκριμένης ποσότητας ενός συγκεκριμένου παράγοντα ή ενός μίγματος παραγόντων των οποίων ζητείται η αλληλεπίδραση. Το πρώτο διάλυμα ή ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης (TG-EGTA buffer) που χρησιμοποιήσαμε είχε σαν σκοπό να απομακρύνει τα στοιχεία του αιματικού πλάσματος και να διατηρήσει ζωντανά και λειτουργικά τα αιμοπετάλια παρεμποδίζοντας την αυτόματη ενεργοποίησή τους κατά τη διάρκεια των χειρισμών έκπλυσης και αναδιασποράς. Για την εξασφάλιση της συνθήκης αυτής το διάλυμα TG-EGTA δεν περιέχει ιόντα ασβεστίου τα οποία παίζουν κεφαλειώδη ρόλο στην συσσώρευση, ενώ περιέχει EGTA, ουσία που δεσμεύει το ιονισμένο Ca^{2+} σχηματίζοντας μαζί του χυλικές ενώσεις. Ακόμη το PH του διαλύματος TG-EGTA ρυθμίζεται στο 6,5 τμή στην οποία η λειτουργικότητα των αιμοπεταλίων είναι χαμηλή επειδή πολλά ένζυμά τους είναι υπολειτουργικά ή ανεσταλμένα (305).

Η ρύθμιση του PH γίνεται με διαλύματα HCl και NaOH. Η σύνθεση του ρυθμιστικού διαλύματος έκπλυσης είναι η εξής: KCl: 195mg, $MgCl_2 \cdot 6H_2O$: 212,5mg, NaCl: 8gr, $NaHCO_3$: 1,015gr, Tris: 0, CaCl₂ · 2H₂O: 0, EGTA: 1ml διαλύματος 0,2M (76,02gr/l H₂O). Άνυδρη γλυκόζη: 1gr, Ζελατίνη 10% (25ml), νερό απεσταγμένο: 800ml, PH: 6,5. Για την επιτυχή παρασκευή του διαλύματος αυτού η ζελατίνη διαλύεται σε θερμό απεσταγμένο νερό και το διάλυμα αυτό προστίθεται αργά στο υπό παρασκευή Buffer, υπό σταθερή ανάδευση. Το τελικό PH του TG-EGTA ρυθμίζεται τη στιγμή της χρησιμοποίησής του.

Το δεύτερο χρησιμοποιούμενο διάλυμα ονομάζεται διάλυμα συσσώρευσης γιατί αποτελεί το μέσο στο οποίο αναδιασπείρονται τα αιμοπετάλια προκειμένου να ενεργοποιηθούν στο συσσωρευόμετρο και συμβολίζεται με τη συντομογραφία TG-Ca. Το TG-Ca έχει την ίδια ωσμωτικότητα με το προηγούμενο διάλυμα αλλά διαφέρει απ'αυτό στα εξής σημεία:

- 1) Περιέχει ιόντα ασβεστίου
- 2) Δεν περιέχει $NaHCO_3$
- 3) Δεν περιέχει EGTA
- 4) Περιέχει Tris και



- 5) Το ΡΗ του ρυθμίζεται στα 7,4 δηλαδή σε μια τιμή όπου η αιμοπεταλιακή λειτουργία μπορεί να είναι άριστη (305).

Η σύνθεση του διαλύματος αυτού είναι η εξής: KCl: 195mgr, MgCl₂ . 6H₂O: 212,5mgr, NaCl: 8gr, NaHCO₃: 0, Tris: 1,21gr, CaCl₂ . 2H₂O:191mgr, EGTA: 0, Άνυδρη γλυκόζη: 1gr, Ζελατίνη 10% (25ml). Απεσταγμένο νερό: 800ml, ΡΗ: 7,4. Η ρύθμιση του ΡΗ γίνεται με μικρές ποσότητες NaOH και HCl.

Τα δύο αυτά διαλύματα παρασκευάζονται κατά άσηπτο τρόπο διότι τα μικρόβια καταστρέφουν τα υποστρώματα που περιέχουν αλλά επίσης προξενούν και απευαισθητοποίηση των αιμοπεταλίων. Τα διαλύματα χωρίζονται σε ποσότητες 200ml και αποθηκεύονται στον καταψύκτη στους -20°C όπου παραμένουν σταθερά για χρονικό διάστημα, μεγαλύτερο του ενός έτους. Όταν πρόκειται να χρησιμοποιηθούν θερμαίνονται σε υδατόλουτρο θερμοκρασίας 37°C και ποτέ σε θερμοκρασίες μεγαλύτερες των 40°C οι οποίες μπορεί να επιφέρουν μεταβολές στα συστατικά τους. Παρασκευάζονται σε μεγάλες ποσότητες και αποθηκεύονται ώστε να μπορούν να χρησιμοποιηθούν ανάλογα με τις περιστάσεις (305).

3. Διαλύματα αγωνιστών και διαλύματα αναστολέων

- α) Για τη διάλυση του P.A.F. χρησιμοποιείται ένα διάλυμα Λευκωματίνης βοδινού ορού σε φυσιολογικό ορό (BSA-saline) περιεκτικότητας 2,5mgr/ml. Το διάλυμα αυτό παρασκευάζεται ως εξής: Σε 50ml φυσιολογικού ορού (NaCl: 0,9%) διαλύονται προσεκτικά με ήπια ανάδευση 250mgr BSA (Sigma) και ακολουθεί αραίωση στα 100ml με το διάλυμα NaCl 0,9%. Το διάλυμα διατηρείται στους -20°C στον καταψύκτη (305).
- β) Τα διαλύματα του P.A.F. σε BSA-saline παρασκευάζονται ως εξής: Από διάλυμα stock P.A.F. 10μg P/ml (170μg P.A.F./ml) σε CHCl₃: MeOH 2:1v/v που φυλάσσεται στον καταψύκτη στους -20°C, λαμβάνονται 2ml και εξατμίζονται μέχρι πλήρους ξήρανσης σε ρεύμα αζώτου. Στο δοκιμαστικό σωλήνα με το ξηρό υπόλλειμα προστίθενται 2ml του διαλύματος της βόειας αλβουμίνης (2mgr/ml) και τον αφήνουμε επί 15 λεπτά σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για την πλήρη διαλυτοποίησή του. Από το διάλυμα αυτό με διαδοχικές αραιώσεις στο διάλυμα της βόειας λευκωματίνης παίρνονται τα εξής διαλύματα:



- 1) 2,5μgr P/ml ή 42,5μg P.A.F./ml (αραίωση 1: 4 του αρχικού).
 - 2) 0,63μgr P/ml ή 10,6μg P.A.F./ml (αραίωση 1: 4 του προηγούμενου).
 - 3) 0,16μgr P/ml ή 2,7μg P.A.F./ml (αραίωση 1: 4 του προηγούμενου).
 - 4) 0,04μgr P/ml ή 0,68μg P.A.F./ml (αραίωση 1: 4 του προηγούμενου).
 - 5) 0,004μgr P/ml ή 0,068μg P.A.F./ml (αραίωση 1: 4 του προηγούμενου) (305).
- γ) Παρασκευή του ADP: 6,21mg ADP διαλύονται σε 3ml φυσιολογικού ορού. Το διάλυμα αυτό αραιώνεται στο 1/10 με φυσιολογικό ορό και η συγκέντρωση του ADP γίνεται 450μM. Τα διαλύματα αυτά διατηρούνται σε βαθειά ψύξη (>-20°). Στα πειράματα χρησιμοποιείται το δεύτερο διάλυμα (450μM) με το δοκιμαστικό σωλήνα που τον περιέχει τοποθετημένο σε παγόλουτρο για να μην αποσυντίθεται το ADP κατά την διάρκεια της εργασίας (305).
- δ) Παρασκευή διαλύματος αραχιδονικού οξέος: Διαλύονται 10mg αραχιδονικού οξέος [(A.A), μβ: 304,5] σε 1ml απόλυτης αιθανόλης (100%). Το διάλυμα αυτό αντιστοιχεί σε 33mM. Θέτουμε το διάλυμα σε ατμόσφαιρα αζώτου και το εναποθηκεύουμε σε βαθειά ψύξη (-40°C). Το διάλυμα αυτό αραιώνεται 1/100 σε αιθανόλη 60% (συγκέντρωση αραχιδονικού οξέος 330μM) και κατόπιν 1/1 σε αιθανόλη 60% (τελική συγκέντρωση A.A 165μM). Το τελικό διάλυμα με το οποίο δουλεύουμε τίθεται σε παγόλουτρο κατά τη διάρκεια του πειράματος (305).
- ε) Παρασκευή του διαλύματος CP-CPK: 100mg CP (creatin-phosphate) διαλύονται σε 2,8ml φυσιολογικού ορού. 500U.I. CPK (creatin-phosphokinase) διαλύονται στα 300μl φυσιολογικού ορού (305).
- στ) Παρασκευή διαλυμάτων αναστολέων:
- 1) 228mg 2, 3 DPG διαλύονται σε 1ml διαλύματος συσσώρευσης. Όταν 1μl του διαλύματος αυτού τοποθετείται στην κυβέτα του συσσωρευομέτρου (χωρητικότητας 0,5ml), η συγκέντρωση του 2, 3 DPG είναι ίση προς $3 \cdot 10^{-4}M$.



- 2) 67,06mg D-3 φωσφογλυκερικού οξέος (3PGA) διαλύονται σε 1ml διαλύματος συσσώρευσης, ώστε το προκύπτον διάλυμα να είναι ισομοριακό με το διάλυμα του 2, 3 DPG. Όταν 1μl του διαλύματος αυτού (3PGA) τίθεται στην κυβέτα του συσσωρευομέτρου η συγκέντρωσή του είναι περίπου ίση προς $3 \cdot 10^{-4}M$.
- 3) 55,69mg D(+)-2-φωσφογλυκερικού οξέος ζυγίζονται και διαλύονται σε 1ml διαλύματος συσσώρευσης όπως και ανωτέρω. Όταν 1μl του διαλύματος του 2-φωσφογλυκερικού οξέος (2PGA) τίθεται στην κυβέτα του συσσωρευομέτρου η συγκέντρωσή του γίνεται ίση προς $3 \cdot 10^{-4}M$.
- 4) 110,8mg L-α φωσφογλυκερόλης διαλύονται σε 1ml διαλύματος συσσώρευσης. Όταν 1μl του διαλύματος αυτού τίθεται στην κυβέτα του συσσωρευομέτρου η συγκέντρωση της ουσίας (L-PGL) γίνεται ίση προς $3 \cdot 10^{-4}M$.
- 5) 37,43mg D(+)-γλυκερικού οξέος διαλύονται σε 1ml διαλύματος συσσώρευσης. Όταν 1μl του διαλύματος του γλυκερικού οξέος (D-GA) τίθεται στην κυβέτα του ακρεγκομέτρου η συγκέντρωσή του γίνεται ίση προς $3 \cdot 10^{-4}M$.
- 6) 37,43mg D(±)-γλυκερικού οξέος παρασκευάζονται επίσης όπως ανωτέρω και χρησιμοποιούνται στην ίδια τελική συγκέντρωση ($3 \cdot 10^{-4}M$).
- 7) Διάλυμα αναχθείσας γλουταθειόνης (GSH): 91,969mg αναχθείσας γλουταθειόνης διαλύονται σε 1ml διαλύματος συσσώρευσης. Όταν 1μl του διαλύματος αυτού τίθεται στην κυβέτα του συσσωρευομέτρου η συγκέντρωσή του γίνεται ίση προς $3 \cdot 10^{-4}M$.
- 8) Διάλυμα κολχικίνης: 119,5mg κολχικίνης διαλύονται σε 1ml διαλύματος συσσώρευσης. Από αυτό, όταν 1μl τίθεται στην κυβέτα του συσσωρευομέτρου η συγκέντρωσή της κολχικίνης είναι $3 \cdot 10^{-4}M$.
- 9) Διάλυμα 2, 4 Δινιτροφαινόλης: Η 2, 4 Δινιτροφαινόλη στην παρούσα εργασία χρησιμοποιείται σαν μέσο καταστολής της αναπνευστικής λειτουργίας του αιμοπεταλίου. Διαλύονται 15mg Δινιτροφαινόλης



(DNP) σε 1ml διαλύματος συσσώρευσης. Επιάζουμε 1ml PRP με 20μl του διαλύματος αυτού. Το επωασμένο με DNP PRP χρησιμοποιείται κατόπιν χρόνων 10, 20, 30, 40 λεπτών από τη στιγμή της προσθήκης του αναπνευστικού αναστολέα για μέτρηση της συσσωρευτικής ικανότητας των αιμοπεταλίων στο συσσωρευόμετρο.

Όλα τα ανωτέρω διαλύματα παρασκευάζονται σε μικρές ποσότητες και εναποθηκεύονται στον ψύκτη στους -20°C . Οι πρώτες ύλες που χρησιμοποιήθηκαν αγοράστηκαν από την εταιρεία SIGMA. Αναλυτικά ήταν τα εξής προϊόντα του καταλόγου της εταιρείας:

- 1) 2, 3 DPG: 2, 3 DPG Pentacyclohexylammoyium salt-D 9134
- 2) 3 PGA: 3 Phosphoglyceric acid: P 8752
- 3) 2 PGA: 2 Phosphoglyceric acid: P 0257
- 4) L-PGL: L-a-Glycerophosphate Di (monocyclohexylammoyium) salt-G 7886
- 5) D-GA: D(+) Glyceric acid: Hemicalcium salt-G 8766
- 6) D±GA: DL-Glyceric acid. Hemicalcium salt- 61144
- 7) GSH: Glutathion-reduced form, crystalline-G 4251
- 8) Κολχικίνη: Colchicine (100%) crystalline C 9754
- 9) DNP: 2, 4 DNP Crystalline-D 7004.

4. Έκπλυση αιμοπεταλίων, μέτρηση, σταθεροποίηση του αριθμού τους (305)

Τα αιμοπετάλια του κουνελιού (που παρουσιάζουν ιδιαίτερα μεγάλη ευαισθησία έναντι του P.A.F. και συνεπώς αποτελούν ένα αξιόπιστο μοντέλο για την μελέτη των δράσεών του) παρασκευάζονται ως ακολούθως: Μετά τη λήψη του αίματος - που γίνεται όπως περιγράφηκε προηγουμένως - ο δοκιμαστικός σωλήνας ανατρέπεται ήπια μερικές φορές ώστε να έχουμε μια καλή ανάμιξη του περιεχομένου του και τίθεται σε φυγοκέντρηση στις 1.500 στροφές επί 20 λεπτά. Μετά τη φυγοκέντρηση λαμβάνεται με αυτόματη πιπέτα το υπερκείμενο πλάσμα κατά τρόπο ώστε να μην αναρροφώνται ερυθρά αιμοσφαίρια. Το πλάσμα



αυτό έχει μεγάλη περιεκτικότητα σε αιμοπετάλια και λέγεται PRP (Plasma Rich Platelets) όπως και στην περίπτωση του ανθρώπινου αίματος. Το PRP τίθεται σε φυγοκέντρηση στις 3.100 στροφές επί δεκαπεντάλεπτο οπότε το μεγαλύτερο ποσοστό των αιμοπεταλίων κατακρημνίζεται στον πυθμένα σχηματίζοντας ένα λευκωπό στρώμα ενώ το υπερκείμενο γίνεται αρκετά διαυγές και χρησιμοποιείται κατόπιν για τη ρύθμιση του συσσωρευομέτρου. Το πλάσμα αυτό έχει πολύ μικρή περιεκτικότητα σε αιμοπετάλια, συμβολίζεται με την συντομογραφία PPP (Plasma Poor Platelets) και αφαιρείται με πολύ προσοχή από τον σωλήνα ώστε να μην αποσπώνται τεμάχια από το λεπτό στρώμα των κατακρημισθέντων αιμοπεταλίων. Μετά την απομάκρυνση του PPP, τίθεται στο δοκιμαστικό σωλήνα 8010ml από το διάλυμα έκπλυσης (TG-EGTA), που προαναφέραμε, του οποίου το PH έχει ρυθμιστεί στα 6,5 ώστε να μην ενεργοποιούνται τα θρομβοκύτταρα από τις τυχούσες μηχανικές και χημικές διαταραχές τις οποίες υφίστανται. Χρησιμοποιώντας την αυτόματη πιπέτα κάνουμε μια σειρά διαδοχικών ήπιων αναρροφήσεων και εκπνάξεων του διαλύματος αυτού ώστε τα κατακρημισθέντα αιμοπετάλια να αποκολληθούν από τον πυθμένα του σωλήνα και να αναδιασπαρούν στο διάλυμα έκπλυσης που αντικαθιστά τώρα το πλάσμα. Μόλις διαπιστωθεί ότι όλα τα συσσωματώματα έχουν διαλυθεί και οφθαλμοφανώς τα αιμοπετάλια βρίσκονται εν αιωρήσει τότε ο σωλήνας συμπληρώνεται μέχρι του ορίου των 40ml και γίνονται διαδοχικές ανατροπές ώστε ακόμη και τα μη ορατά αιμοπεταλιακά συσσωματώματα να αποκοκκιωθούν και να αποδώσουν τα αιμοπετάλια στο εναιώρημα. Ακολουθεί λιγότερη επώαση και κατόπιν ανάδευση με ήπιες ανατροπές όπως και προηγούμενα. Στη συνέχεια, ο δοκιμαστικός σωλήνας τίθεται ξανά σε φυγοκέντρηση στις 3.100 στροφές επί δεκαπεντάλεπτο, οπότε και πάλι τα αιμοπετάλια κατακρημνίζονται σχηματίζοντας το γνωστό λευκωπό στρώμα στον πυθμένα του δοκιμαστικού σωλήνα. Το υπερκείμενο αφαιρείται προσεκτικά και η διαδικασία της αναδιασποράς των θρομβοκυττάρων επαναλαμβάνεται όπως προηγούμενως χρησιμοποιώντας το διάλυμα έκπλυσης. Μετά την αναδιασπορά ο σωλήνας ξαναφυγοκεντρείται στις 3.100 στροφές, πάλι επί δεκάπεντάλεπτο, το υπερκείμενο αφαιρείται, προστίθεται ποσότητα διαλύματος έκπλυσης, ακολουθεί νέα αναδιασπορά και επαναπλήρωση του σωλήνα στα 40ml. Όταν τα αιμοπετάλια αποχωρισθούν και βρεθούν σε πλήρη εναιώρηση (πράγμα το οποίο ελέγχεται με το μάτι τοποθετώντας τον σωλήνα ενάντια στο φως και ανακινώντας τον ελαφρά οπότε τα κύτταρα φαντάζουν σαν "νέφη σκόνης") τότε λαμβάνονται 20ml του εναιωρήματος τα οποία τίθενται σε 380ml διαλύματος οξαλικού αμμωνίου 1% το οποίο έχει την ικανότητα να καθιστά διπλοδιαθλαστικά τα αιμοπετάλια ώστε να φαντάζουν σαν πέρλες στο οπτικό



πεδίο του μικροσκοπίου. Αφού το νέο αυτό εναιώρημα ανακινηθεί καλώς με ήπιες κινήσεις και επωασθεί επί λίγα λεπτά μια μικρή ποσότητά του χρησιμοποιείται για την επίστρωση μιας πλάκας (αιμοκυτόμετρο) Newbawer πάνω στην οποία έχει τοποθετηθεί καλυπτρίδα. Το αιμοκυτόμετρο με την επίστρωση μεταφέρεται σε τριβλείο Pietri, στο οποίο υπάρχει ένα κομμάτι βρεγμένου βαμβακιού για να διατηρείται υγρή η ατμόσφαιρα. Το τριβλείο σκεπάζεται ώστε να είναι το δυνατότερο στεγανό και τίθεται σε χώρο στεθερής θερμοκρασίας, μακριά από δονήσεις και ρεύματα αέρα, ώστε τα αιμοπετάλια να αφεθούν να καθιζάνουν και να σταθεροποιηθούν πάνω στο σταυρό της πλάκας σε διάστημα μισής ώρας κατά τρόπο που η μετέπειτα αριθμότητά τους να αποδίδει τον πραγματικό τους αριθμό με τη μέγιστη δυνατή προσέγγιση. Μετά τη σταθεροποίηση η καταμέτρηση των αιμοπεταλίων γίνεται με κοινό μικροσκόπιο του οποίου το σύστημα Abbè βρίσκεται στην κατώτερη θέση χρησιμοποιώντας φακό μεγέθυνσης 40x. Μετριοούνται τα αιμοπετάλια 5 μετρίου μεγέθους τετραγώνων (80 μικρά) του κεντρικού μεγάλου τετραγώνου του αιμοκυτομέτρου. Το συνολικό άθροισμα πολλαπλασιάζεται επί 1.000 και δίνει τον αριθμό των αιμοπεταλίων ανά μί αίματος. Το σφάλμα της μεθόδου είναι 11-15% (μέθοδος Brecher-Cronkite). Τα αιμοπετάλια διακρίνονται καθαρά από τα λευκοκύτταρα εξαιτίας της διαθλαστικότητάς τους και δεν συγχέονται (305).

Παράλληλα με τη διαδικασία αριθμησης γίνεται και η ασπιρίνιση των αιμοπεταλίων ως εξής: Ζυγίζονται 16,2mgf ασπιρίνης και διαλύονται σε 500ml φυσιολογικού ορού. Εν συνεχεία λαμβάνονται τόσα μί διαλύματος ασπιρίνης όσα ml είναι ο όγκος του αιμοπεταλιακού εναιωρήματος και τοποθετούνται σ'αυτό. Αναδεύεται το περιεχόμενο του σωλήνα με ήπιες ανατροπές και τα αιμοπετάλια αφήνονται να επωαστούν επί μισή τουλάχιστον ώρα ώστε να αδρανοποιηθεί η οδός του αραχιδονικού οξέος με την ακετυλίωση της κυκλοξυγενάσης. Μετά την παρασκευή του διαλύματος ασπιρίνης-φυσιολογικού ορού φροντίζουμε να γίνει ταχέως η ασπιρίνιση των αιμοπεταλίων γιατί το σαλικυλικό οξύ υδρολύεται μέσα σε πέντε λεπτά από τη διάλυσή του στο νερό.

Μετά την επώασή τους με ασπιρίνη και την αριθμηση, τα αιμοπετάλια υποβάλλονται εκ νέου σε φυγοκέντρηση στις 3.100 στροφές επί δεκαπεντάλεπτο για να καθιζήσουν στον πυθμένα του σωλήνα και να αναδιασπαρούν σε μια συγκεκριμένη ποσότητα εκπλυστικού διαλύματος ώστε η πυκνότητά τους ν'αποκτήσει μια προκαθορισμένη τιμή η οποία αποτελεί και το standard αριθμό τους για τις ακόλουθες δοκιμασίες στο συσσωρευόμετρο. Η ποσότητα



διαλύματος έκπλυσης στην οποία αναδιασπείρονται τα αιμοπετάλια μετά την τελική φυγοκέντρηση εξάγεται από τον εξής απλό μαθηματικό τύπο: $X = 212.000 \times 3,4/N$, όπου N ο αριθμός των αιμοπεταλίων ανά ml αίματος και X τα ζητούμενα ml του διαλύματος έκπλυσης. Το τελικό αυτό εναιώρημα αποτελεί και το standard PRP που χρησιμοποιείται τόσο για τα πειράματα συσσώρευσης στο συσσωρευόμετρο, όσο και για τα λοιπά πειράματα της ανά χειράς διδακτορικής εργασίας (305).

5. Διαδικασία μέτρησης της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων στο συσσωρευόμετρο (305, 296)

Οι μετρήσεις συσσώρευσης των αιμοπεταλίων γίνονται ως εξής: Κατ'αρχάς χρησιμοποιούμε το διάλυμα συσσώρευσης, το οποίο έχει έλθει σε θερμοκρασία 37°C και το PH του έχει ρυθμιστεί στο 7,4. Μέσα σε ποσότητα περίπου 50ml του διαλύματος αυτού προστίθεται 1ml από το διάλυμα του CP-CPK για τον αποκλεισμό της οδού του ADP. Η συσκευή του συσσωρευομέτρου που περιγράφεται στο γενικό μέρος ρυθμίζεται στις σταθερές συνθήκες λειτουργίας της ως εξής: Εφόσον η θερμοκρασία της συσκευής φθάνει και σταθεροποιείται στους 37°C τίθεται στην κυβέτα 1) ένας μικρός μαγνήτης επενδυμένος με πλαστικό ή εμβαπτισμένος σε σλικόνη 2) 400ml ρυθμιστικού διαλύματος συσσώρευσης και η κυβέτα τοποθετείται στη σχισμή υποδοχής της. Μετά την τοποθέτηση της κυβέτας η γραφίδα του καταγραφικού ρυθμίζεται μέσω του κουμπιού που φέρει την συντομογραφία PPP στην ένδειξη 10 του καταγραφικού χάρτη. Κατόπιν η κυβέτα αφαιρείται και παρασκευάζεται μια δεύτερη κυβέτα κατά τον ίδιο τρόπο όπως προηγούμενα με τη διαφορά πως προστίθεται και μια ποσότητα 100ml PRP, οπότε η γραφίδα του καταγραφέα τοποθετείται μέσω του κουμπιού με τη συντομογραφία PRP στο σημείο 100 του καταγραφικού χάρτη. Αφού διαπιστώνεται ότι η ανάδευση του περιεχομένου της κυβέτας τελείται ακωλύτως, αφαιρείται η κυβέτα και προχωράμε στις δοκιμασίες της συσσώρευσης. Κάθε κυβέτα παρασκευάζεται με 400ml διαλύματος συσσώρευσης, μια συγκεκριμένη ποσότητα αγωνιστή και τοποθετείται στη σχισμή της συσκευής οπότε ελέγχεται η αντίδραση του καταγραφικού του οποίου η γραφίδα πρέπει να επιστρέφει στο σημείο 10 του χάρτη. Εφόσον η ανάδευση γίνεται χωρίς πρόβλημα και δεν υπάρχουν φυσαλίδες ή αιωρούμενα στερεά τότε προστίθεται στο εσωτερικό της κυβέτας 100ml του PRP μέσω αυτόματης πιπέτας και με ήπα εκκένωση. Αν τα αιμοπετάλια είναι λειτουργικά τότε φυσιολογικά αρχίζει η



συσσώρευσή τους που ελέγχεται με το μάτι από το παράθυρο της σχισμής και καταγράφεται από το καταγραφικό με τη μορφή μιας σιγμοειδούς καμπύλης. Επαναλαμβάνοντας τις δοκιμές με διαδοχικά αυξανόμενες ποσότητες αγωνιστή εξακριβώνεται η ποσότητα του τελευταίου που προκαλεί την μέγιστη αιμοπεταλιακή συσσώρευση στις συνθήκες του συσσωρευομέτρου. Εφόσον διαπιστώνεται η επαναληψιμότητα των δοκιμών - η οποία κατά χρονικά διαστήματα επανελέγχεται με μετρήσεις ρύθμισης, διότι η λειτουργική κατάσταση των αιμοπεταλίων εκπίπτει συναρτήσει του χρόνου - τοποθετούνται στην κυβέτα οι ίδιες ποσότητες αγωνιστή και αυξανόμενες διαδοχικά ποσότητες της υπό εξέταση ουσίας επαναλαμβάνοντας τους περιγραφέντες χειρισμούς προκειμένου να διαπιστωθεί ο τύπος δράσης της ουσίας έναντι του συγκεκριμένου αγωνιστή. Αν η ουσία είναι "αδρανής" τότε οι καμπύλες συσσώρευσης είναι όμοιες με εκείνες των αντίστοιχων μαρτύρων. Αντίθετα, αν η ουσία προκαλεί αναστολή της δράσης του αγωνιστή, τότε οι καμπύλες συσσώρευσης είναι χαμηλότερες, ή διαφορετικής μορφής, ή λείπουν εντελώς. Αν τέλος η πειραματιζόμενη ουσία προκαλεί επίταση της δράσης του αγωνιστή τότε το κύμα συσσώρευσης γίνεται πιο ψηλό ή και πιο απότομο από εκείνο του αντίστοιχου μάρτυρα. Λεπτομέρειες για την ερμηνεία των χαρακτηριστικών των κυματων συσσώρευσης δίνονται στα αντίστοιχα τμήματα του γενικού μέρους.

Β. ΠΕΙΡΑΜΑΤΑ ΣΥΣΣΩΡΕΥΣΗΣ ΑΙΜΟΠΕΤΑΛΙΩΝ ΑΝΘΡΩΠΟΥ

1. Δότες-αιμοληψία

Για τα πειράματα αυτά ελήφθη αίμα από 35 άρρενες εθελοντές ηλικίας 25-40 ετών στους οποίους έγιναν δύο αιμοληψίες σε διάστημα 15 ημερών. Οι εθελοντές ήσαν υγιείς, μη καπνιστές καθ'έξιν και δεν έκαναν χρήση καμμιάς φαρμακευτικής ουσίας τις τελευταίες δύο εβδομάδες πριν τη λήψη του αίματος. Η αιμοληψία γινόταν από το φλεβικό σκέλος της κυκλοφορίας (μεσοβασλική φλέβα) με την χρήση κατάλληλης βελόνας και η συλλογή του αίματος γινόταν σε πλαστικούς σωλήνες των 50ml, λαμβάνοντας με ελεύθερη ροή από το στόμιο



της βελόνας ποσότητα αίματος 40ml. Το χρησιμοποιούμενο αντιπηκτικό διάλυμα ήταν EDTA 0,2% και η αναλογία 1ml αντιπηκτικού ανά 10ml αίματος.

2. Παρασκευή PRP (296)

Για τους πειραματισμούς επί ανθρώπων δεν γίνεται έκπλυση των αιμοπεταλίων τους, στα πλαίσια της παρούσης εργασίας. Το ληφθέν αίμα τίθεται στη φυγόκεντρο και φυγοκεντρείται στις 1.500 στροφές επί 20 λεπτά. Μετά τη φυγοκέντρωση γίνεται αρίθμηση των αιμοπεταλίων με τον τρόπο που περιγράφεται και για τα αιμοπετάλια του κουνελιού. Αφαιρείται το υπερκείμενο και φυγοκεντρείται στις 3.100 επί δεκαπεντάλεπτο, οπότε τα αιμοπετάλια κατακρημνίζονται στον πυθμένα του σωλήνα. Αφαιρείται εκ νέου το υπερκείμενο που αποτελεί το PRP (Plasma Poor Platelets-πλάσμα φτωχό σε αιμοπετάλια) και τα κύτταρα επαναδιασπείρονται σε τόση ποσότητα PRP, όση απαιτείται βάσει του μαθηματικού τύπου που περιγράφηκε στο πρωτόκολλο για τα αιμοπετάλια του κουνελιού. Μετά το πέρας της αναδιασποράς το PRP είναι έτοιμο.

Στα πειράματα με το συσσωρευόμετρο τίθενται 100μl PRP και 400μl PRP στην κυβέτα. Όσον αφορά τους ελέγχους της συσκευής και τη λοιπή πειραματική διαδικασία όλα είναι πανομοιότυπα με τα περιγραφέντα για τα αιμοπετάλια του κουνελιού.

Γ. ΠΕΙΡΑΜΑΤΑ ΑΝΑΣΤΟΛΗΣ-ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗΣ ΣΥΣΣΩ- ΡΕΥΣΗΣ ΑΙΜΟΠΕΤΑΛΙΩΝ ΕΚΤΟΣ ΤΟΥ ΣΥΣΣΩ- ΡΕΥΟΜΕΤΡΟΥ

1. Μέθοδος υπολογισμού γλυκόζης (306)

Για τα πειράματα αυτά τα αιμοπετάλια του κουνελιού παρασκευάζονται όπως έχει ήδη περιγραφεί. Η θερμοκρασία του περιβάλλοντος διατηρείται στους 20°C. Χρησιμοποιούνται πλαστικοί σωλήνες προσδεδεμένοι σε σταθερό υπόστρωμα ώστε η βάση τους να μένει ελεύθερη και να εφάπτεται στην



επιφάνεια της συσκευής ανάδευσης. Στον πυθμένα του σωλήνα τίθεται μικρός μαγνήτης επενδυμένος με πλαστικό και η ταχύτητα περιστροφής του ρυθμίζεται ώστε να είναι επαρκώς μικρή και σταθερή καθ'όλη τη διάρκεια των δοκιμών.

Θέτουμε στο σωλήνα 4ml του διαλύματος συσσώρευσης και εν συνεχεία θέτουμε ένα ml PRP. Κατόπιν προστίθεται κατάλληλη ποσότητα P.A.F. και ταυτόχρονα αρχίζει η χρονομέτρηση. Κάθε πρώτο λεπτό λαμβάνεται ποσότητα του εναιωρήματος η οποία θερμαίνεται εντός δοκιμαστικού σωλήνα σε ζέον υδατόλουτρο επί 1 λεπτό της ώρας. Η θέρμανση έχει σαν σκοπό να καταστρέψει τα ένζυμα των αιμοπεταλίων και έτσι όλες οι μεταβολικές διαδικασίες να διακοπούν. Κατόπιν τα δείγματα χρησιμοποιούνται για τη μέτρηση της γλυκόζης που περιέχουν. Η αρχή της μεθόδου αυτής βασίζεται στην παρατήρηση ότι ο P.A.F. ενεργοποιεί τη γλυκογονόλυση εξάγοντας γλυκόζη, από τα κοκκία γλυκογόνου που εμπεριέχονται στα αιμοπετάλια, η οποία εν συνεχεία καταναλίσκεται στη γλυκολυτική αλυσίδα και οι μεταβολίτες της εισέρχονται στον κύκλο του Krebs για την παραγωγή ATP που απαιτείται για την αιμοπεταλιακή συσσώρευση και την αντίδραση έκλυσης.

Η γλυκόζη μετρείται με κιτ γλυκόζης στο φασματοφωτόμετρο.

Γίνεται προσδιορισμός της γλυκόζης:

- 1) Σε αιμοπετάλια χωρίς καμιά παρέμβαση αγωνιστών και αναστολέων (μάρτυρες 1),
- 2) Σε αιμοπετάλια διηγεργμένα από P.A.F.,
- 3) Σε αιμοπετάλια παρουσία P.A.F. και αναστολέα και
- 4) Σε αιμοπετάλια παρουσία μόνον του αναστολέα.

2. Προσδιορισμός κατανάλωσης οξυγόνου (308) σε αιμοπετάλια κουνελιού

Το PRP παρασκευάζεται όπως έχει περιγραφεί για τα πλυμένα αιμοπετάλια κουνελιού. Χρησιμοποιείται η πειραματική διάταξη που περιγράφηκε και προηγουμένως με τις κατάλληλες τροποποιήσεις (πλαστικού σωλήνες προσαρμοσμένου εύρους στο διαμέτρημα του ηλεκτροδίου του οξυγόνου). Η



συχνότητα περιστροφής του μαγνήτη που τίθεται στο εσωτερικό του κάθε χρησιμοποιούμενου δοκιμαστικού σωλήνα είναι τέτοια ώστε να αποτρέπει τις εσφαλμένες μετρήσεις της κατανάλωσης O_2 . Η θερμοκρασία του PRP είναι σταθεροποιημένη στους $20^{\circ}C$. Σε κάθε σωλήνα τοποθετούμε ποσότητα 1ml PRP και 4ml διαλύματος συσσώρευσης. Η ανάδευση αρχίζει μετά την τοποθέτηση. Εισάγεται το ηλεκτρόδιο οξυγόνου που έχει προηγουμένως ρυθμιστεί κατάλληλα και γίνεται μέτρηση του περιεχομένου στο εναίωρημα O_2 .

Εν συνεχεία τίθεται μέσω σύριγγας ο P.A.F. σε κατάλληλη ποσότητα και μετρείται το περιεχόμενο του O_2 του διαλύματος. Στα πειράματα αυτά προσδιορίστηκε η κατανάλωση O_2 στις εξής περιπτώσεις:

- 1) Αιμοπετάλια χωρίς την παρουσία καμμιάς διέγερσης ή αναστολής (μάρτυρες),
- 2) Αιμοπετάλια δηγημένα από P.A.F.
- 3) Αιμοπετάλια παρουσία P.A.F. και αναστολέων και
- 4) Αιμοπετάλια παρουσία μόνο του αναστολέα.

Το ηλεκτρόδιο οξυγόνου που χρησιμοποιήθηκε είναι το μοντέλο OXI 57 του οίκου KARL KOLB GmbH and Co K6 - Scientific Technical Supplies.



ΚΕΦΑΛΑΙΟ VI

ΕΥΡΗΜΑΤΑ ΠΕΙΡΑΜΑΤΩΝ

Α. ΠΕΙΡΑΜΑΤΑ ΣΤΟ ΣΥΣΣΩΡΕΥΟΜΕΤΡΟ (ΑΓΓΡΕΓΚΟΜΕΤΡΟ) ΜΕ ΑΝΑΣΤΟΛΕΑ ΤΟ 2, 3 DPG.

Από τα πειράματα αυτά προέκυψε ότι το 2, 3 DPG συμπεριφέρεται σαν ισχυρός αναστολέας της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων του κουνελιού (πλυμμένα αιμοπετάλια) και του ανθρώπου της προκαλούμενης από το P.A.F. Στους παραπθέμενους πίνακες φαίνονται τα ποσοστά της αναστολής που επιτυγχάνεται με τη χρησιμοποίηση συγκεκριμένων ποσοτήτων 2, 3 DPG σε συγκεκριμένες ποσότητες P.A.F.

Χρησιμοποιούμε ένα διάλυμα 2, 3 DPG συγκέντρωσης $5,9 \cdot 10^{-4} M$. Στον πίνακα που ακολουθεί εμφανίζεται η αναστολή της αιμοπεταλιακής συσσώρευσης σε πλυμμένα αιμοπετάλια κουνελιού διαγεγρόμενα από ποσότητα 25grg P.A.F.

Αρ. πειραμάτων 28

Αρ. πειραμάτων 28

14	10	15	16	18	16	11	28	25	28	22	21	26	25
16	14	15	13	14	14	14	24	31	30	29	23	25	2
13	16	14	15	15	14	15	29	26	22	26	21	23	2
11	14	16	16	14	16	15	27	25	31	24	25	22	20

Πίνακας αρ.1: Εκατοστιαία αναστολή της αιμοπεταλιακής συσσώρευσης της προκαλούμενης από 25grg P.A.F. μέσω 1μl διαλύματος 2, 3 DPG συγκέντρωσης $5,9 \cdot 10^{-4} M$.

Πίνακας αρ.2: Εκατοστιαία αναστολή της αιμοπεταλιακής συσσώρευσης της προκαλούμενης από 25grg P.A.F. μέσω 2μl διαλύματος 2, 3 DPG συγκέντρωσης $5,9 \cdot 10^{-4} M$.



52	57	55	51	54	50	60	67	74	66	68	68	66	63
54	54	54	50	51	57	51	63	68	78	69	68	67	65
55	53	51	57	52	61	53	69	67	74	71	69	69	72
50	56	53	55	50	52	52	72	64	72	70	72	64	65

Πίνακας αρ.3: Εκατοσπαία αναστολή της αιμοπεταλιακής συσσώρευσης της προκαλούμενης από 25prgr P.A.F. μέσω 3μl διαλύματος 2, 3 DPG συγκέντρωσης $5,9 \cdot 10^{-4}M$.

Πίνακας αρ.4: Εκατοσπαία αναστολή της αιμοπεταλιακής συσσώρευσης της προκαλούμενης από 25prgr P.A.F. μέσω 4μl διαλύματος 2, 3 DPG συγκέντρωσης $5,9 \cdot 10^{-4}M$.

80	81	77	79	80	80	81	88	98	97	100	98	100	100
77	82	74	75	77	76	79	100	95	99	100	89	100	100
80	83	78	75	79	81	80	100	100	100	100	97	98	100
82	80	80	79	78	81	82	100	88	100	100	95	98	99

Πίνακας αρ.5: Εκατοσπαία αναστολή της αιμοπεταλιακής συσσώρευσης της προκαλούμενης από 25prgr P.A.F. μέσω 5μl διαλύματος 2, 3 DPG συγκέντρωσης $5,9 \cdot 10^{-4}M$.

Πίνακας αρ.6: Εκατοσπαία αναστολή της αιμοπεταλιακής συσσώρευσης της προκαλούμενης από 25prgr P.A.F. μέσω 10μl διαλύματος 2, 3 DPG συγκέντρωσης $5,9 \cdot 10^{-4}M$.

Στους πίνακες που ακολουθούν εμφανίζεται σε εκατοσπαία ποσοστά η αναστολή της συσσώρευσης πλυμένων αιμοπεταλίων κουνελιού διαχειρόμενων



από ποσότητα 50ppg P.A.F. Η συγκέντρωση του χρησιμοποιούμενου διαλύματος του 2, 3 DPG είναι ίση προς $5,9 \cdot 10^{-4} M$.

6	6	3	5	6	4	6	14	12	13	10	12	13	14
4	6	4	3	6	6	4	12	10	11	14	12	12	11
5	5	3	7	5	5	4	13	14	14	14	14	14	12
2	6	6	6	6	6	6	11	14	12	13	12	14	14

Πίνακας αρ.7: Εκατοσπαία αναστολή της αιμοπεταλιακής συσσώρευσης της προκαλούμενης από 50ppg P.A.F. μέσω 0,5μl διαλύματος 2, 3 DPG συγκέντρωσης $5,9 \cdot 10^{-4} M$.

Πίνακας αρ.8: Εκατοσπαία αναστολή της αιμοπεταλιακής συσσώρευσης της προκαλούμενης από 50ppg P.A.F. μέσω 1μl διαλύματος 2, 3 DPG συγκέντρωσης $5,9 \cdot 10^{-4} M$.

52	51	53	49	51	50	57	82	81	80	81	78	81	79
48	54	50	47	50	50	50	83	78	80	82	79	80	80
50	48	51	52	52	48	52	79	82	82	79	82	82	78
49	47	49	52	53	49	51	80	83	87	77	82	82	83

Πίνακας αρ.9: Εκατοσπαία αναστολή της αιμοπεταλιακής συσσώρευσης της προκαλούμενης από 50ppg P.A.F. μέσω 3μl διαλύματος 2, 3 DPG συγκέντρωσης $5,9 \cdot 10^{-4} M$.

Πίνακας αρ.10: Εκατοσπαία αναστολή της αιμοπεταλιακής συσσώρευσης της προκαλούμενης από 50ppg P.A.F. μέσω 5μl διαλύματος 2, 3 DPG συγκέντρωσης $5,9 \cdot 10^{-4} M$.



100	100	100	100	100	100	100	100	98	100	100	100	100	100
100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100

Πίνακας αρ.11: Εκατοστιαία αναστολή της αιμοπεταλιακής συσσώρευσης της προκαλούμενης από 50ppg P.A.F. μέσω χορήγησης 10μl διαλύματος 2, 3 DPG συγκέντρωσης $5,9 \cdot 10^{-4}M$.

B. ΠΕΙΡΑΜΑΤΑ ΣΤΟ ΣΥΣΣΩΡΕΥΟΜΕΤΡΟ ΜΕ ΑΝΑΣΤΟΛΕΑ ΤΟ 3-ΦΩΣΦΟΓΛΥΚΕΡΙΚΟ ΟΞΥ (3-PGA).

Από τα πειράματα αυτά προέκυψε ότι το 3-φωσφογλυκερικό οξύ (3-PGA) συμπεριφέρεται σαν ισχυρός αναστολέας της συσσώρευσης των πλυμμένων αιμοπεταλίων του κουνελιού της ενεργούμενης από τον P.A.F. Στους παρακάτω πίνακες εμφανίζονται αναλυτικά τα αποτελέσματα των σχετικών πειραμάτων.

8	8	5	7	8	8	8	7	7	6	5	8	8	8
6	8	7	6	8	5	7	8	8	8	3	7	8	7

Πίνακας αρ.1: Εκατοστιαία αναστολή της συσσώρευσης πλυμμένων αιμοπεταλίων του κουνελιού της προκαλούμενης από 25ppg P.A.F. μέσω χορήγησης 1μl διαλύματος 3-PGA, συγκέντρωσης $5,9 \cdot 10^{-4}M$.



54	52	55	54	52	50	51	54	58	52	53	50	54	54
53	54	55	54	55	51	52	54	55	55	57	54	55	53

Πίνακας αρ.2: Εκατοσπαία αναστολή της συσσώρευσης πλυμένων αιμοπεταλίων κουνελιού, της προκαλούμενης από 25ppg P.A.F., μέσω χορήγησης 2μl διαλύματος 3-PGA, συγκέντρωσης $5,9 \cdot 10^{-4}M$.

77	78	80	75	77	76	78	75	76	57	79	78	78	78
78	76	77	78	78	76	76	80	78	77	75	76	78	79

Πίνακας αρ.3: Εκατοσπαία αναστολή της συσσώρευσης πλυμένων αιμοπεταλίων κουνελιού, της προκαλούμενης από 25ppg P.A.F., μέσω χορήγησης 3μl διαλύματος 3-PGA, συγκέντρωσης $5,9 \cdot 10^{-4}M$.

80	80	83	79	84	83	82	80	77	89	79	83	84	82
80	80	81	81	80	81	83	88	85	80	80	80	79	88

Πίνακας αρ.4: Εκατοσπαία αναστολή της συσσώρευσης πλυμένων αιμοπεταλίων κουνελιού, της προκαλούμενης από 25ppg P.A.F., μέσω χορήγησης 4μl διαλύματος 3-PGA συγκέντρωσης $5,9 \cdot 10^{-4}M$.

100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100

Πίνακας αρ.5: Εκατοσπαία αναστολή (πλήρης) της συσσώρευσης πλυμένων αιμοπεταλίων κουνελιού, της προκαλούμενης από 25ppg P.A.F., μέσω χορήγησης 5μl διαλύματος 3-PGA συγκέντρωσης $5,9 \cdot 10^{-4}M$.



Γ. ΠΕΙΡΑΜΑΤΑ ΣΤΟ ΣΥΣΣΩΡΕΥΟΜΕΤΡΟ (ΑΓΓΡΕΓΚΟΜΕΤΡΟ) ΜΕ ΑΝΑΣΤΟΛΕΑ ΤΗΝ ΓΛΟΥΤΑΘΕΙΟΝΗ (GSH).

Τα πειράματα αυτά έγιναν με μοντέλο τα πλυμμένα αιμοπετάλια του κουνελιού και έδειξαν ότι η αναχθείσα γλουταθειόνη συμπεριφέρεται σαν ισχυρός αναστολέας της αιμοπεταλιακής συσσώρευσης της προκαλούμενης από τον P.A.F. Το διάλυμα της γλουταθειόνης είχε συγκέντρωση ίση με τη συγκέντρωση του διαλύματος του 2, 3 DPG για τη σύγκριση της δραστηρότητάς τους ($5,9 \cdot 10^{-4} M$). Είναι σκόπιμο να υπογραμμιστεί ότι η ποσότητα της γλουταθειόνης που βρίσκεται σε 100ml ολικού αίματος είναι ίση περίπου προς 70mg. Στους πίνακες που ακολουθούν παρατίθενται οι ευρεθείσες τιμές αναστολής σε εκατοστιαίες μονάδες. Η ποσότητα του P.A.F. για κάθε μέτρηση ήταν 50prg.

33	30	29	31	32	35	28	30	30	29	29	32	33	30
32	30	33	28	33	35	32	30	32	34	30			

Πίνακας αρ.1: Αναστολή της συσσώρευσης πλυμμένων αιμοπεταλίων κουνελιού της προκαλούμενης από 50prg P.A.F. μέσω χορήγησης 1μl διαλύματος αναχθείσας γλουταθειόνης (GSH) συγκέντρωσης $5,9 \cdot 10^{-4} M$.

44	45	42	45	52	42	45	48	48	50	47	48	48	50
50	49	44	44	49	48	48	47	49	47	50			

Πίνακας αρ.2: Αναστολή της συσσώρευσης πλυμμένων αιμοπεταλίων κουνελιού της προκαλούμενης από 50prg P.A.F. μέσω χορήγησης 1,5μl διαλύματος αναχθείσας γλουταθειόνης (GSH) συγκέντρωσης $5,9 \cdot 10^{-4} M$.



70	70	75	69	71	73	70	70	68	72	68	75	73	74
70	72	73	71	70	74	73	72	72	70	70			

Πίνακας αρ.3: Αναστολή της συσσώρευσης πλυμμένων αιμοπεταλίων κουνελιού της προκαλούμενης από 50ppg P.A.F. μέσω χορήγησης 1,2μl διαλύματος GSH συγκέντρωσης $5,9 \cdot 10^{-4}M$.

98	100	100	95	100	100	100	100	98	100	100	100	100	100
100	88	100	100	98	100	100	100	100	100				

Πίνακας αρ.4: Αναστολή της συσσώρευσης πλυμμένων αιμοπεταλίων κουνελιού της προκαλούμενης από 50ppg P.A.F. μέσω χορήγησης 2μl GSH συγκέντρωσης $5,9 \cdot 10^{-4}M$.



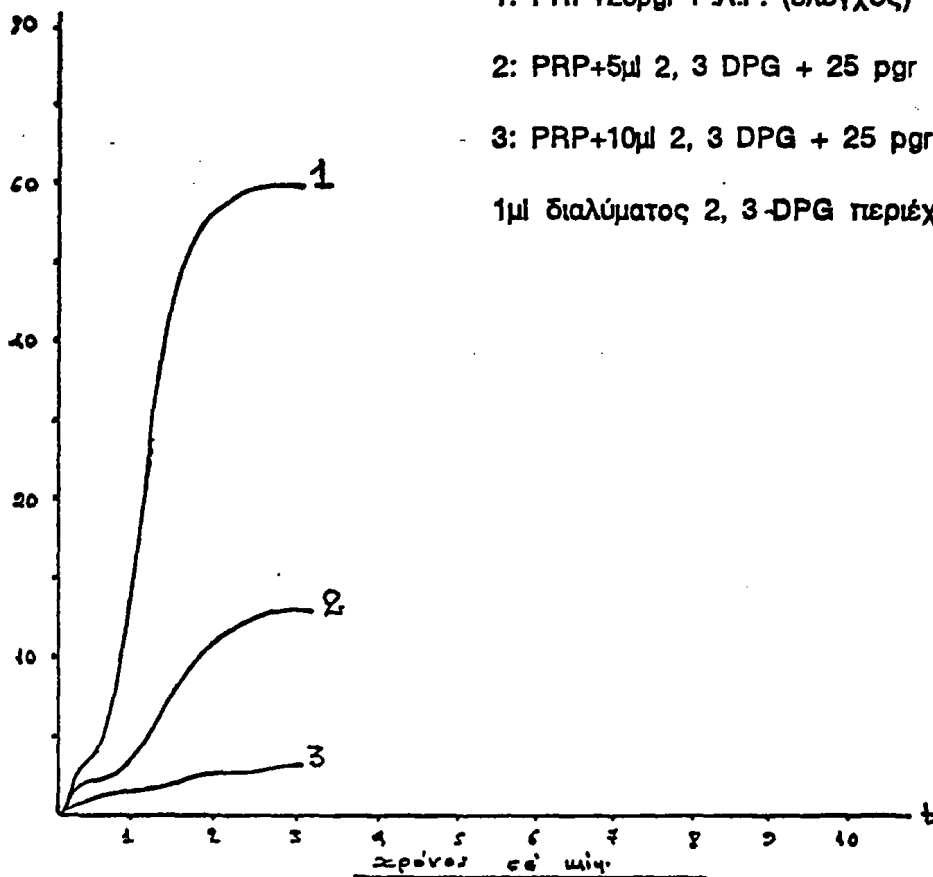
Δ. ΑΝΤΙΠΡΟΣΩΠΕΥΤΙΚΕΣ ΕΙΚΟΝΕΣ - ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΑ

1: PRP+25pgr P.A.F. (έλεγχος)

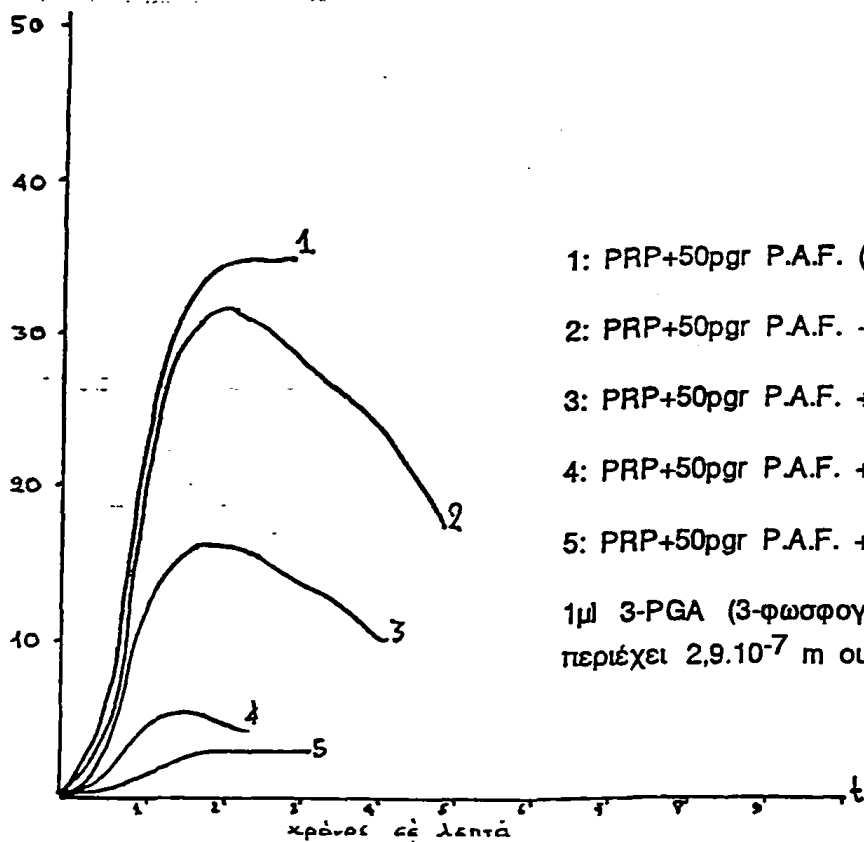
2: PRP+5μl 2, 3 DPG + 25 pgr P.A.F.

3: PRP+10μl 2, 3 DPG + 25 pgr P.A.F.

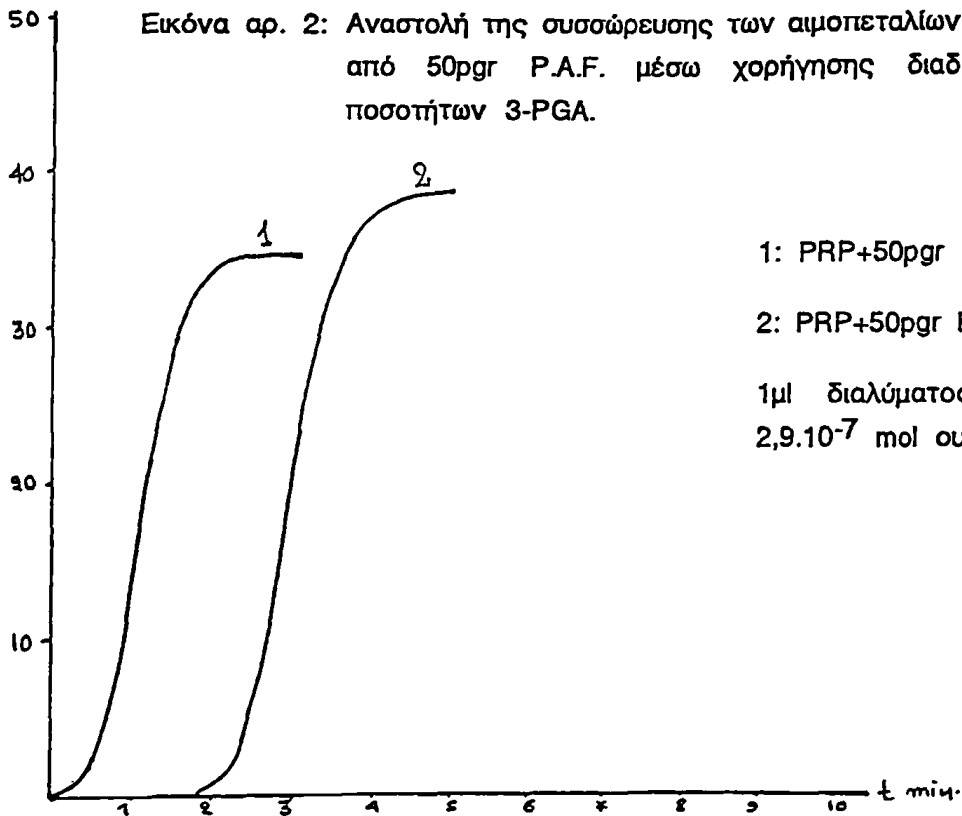
1μl διαλύματος 2, 3-DPG περιέχει $3 \cdot 10^{-7}$ mol 2, 3 DPG



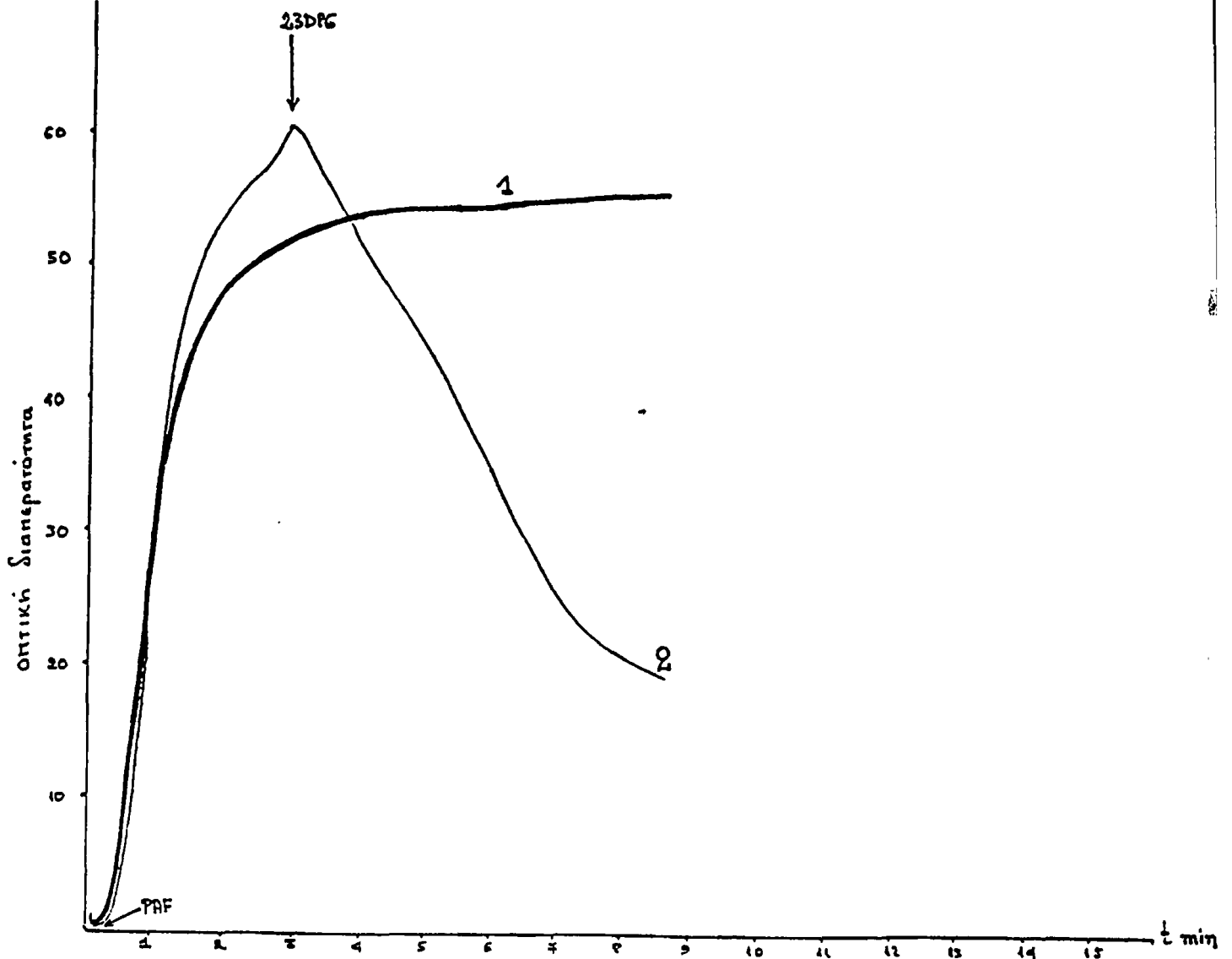
Εικόνα αρ. 1: Αναστολή της δράσης του P.A.F. στη συσσώρευση των πλυμένων αιμοπεταλίων κουνελιού μέσω χορήγησης διαδοχικά αυξανόμενων ποσοτήτων 2, 3 DPG. Η εικόνα είναι αντιγραφή της καταγραφής της συσσώρευσης στις τρεις διαφορετικές περιπτώσεις.



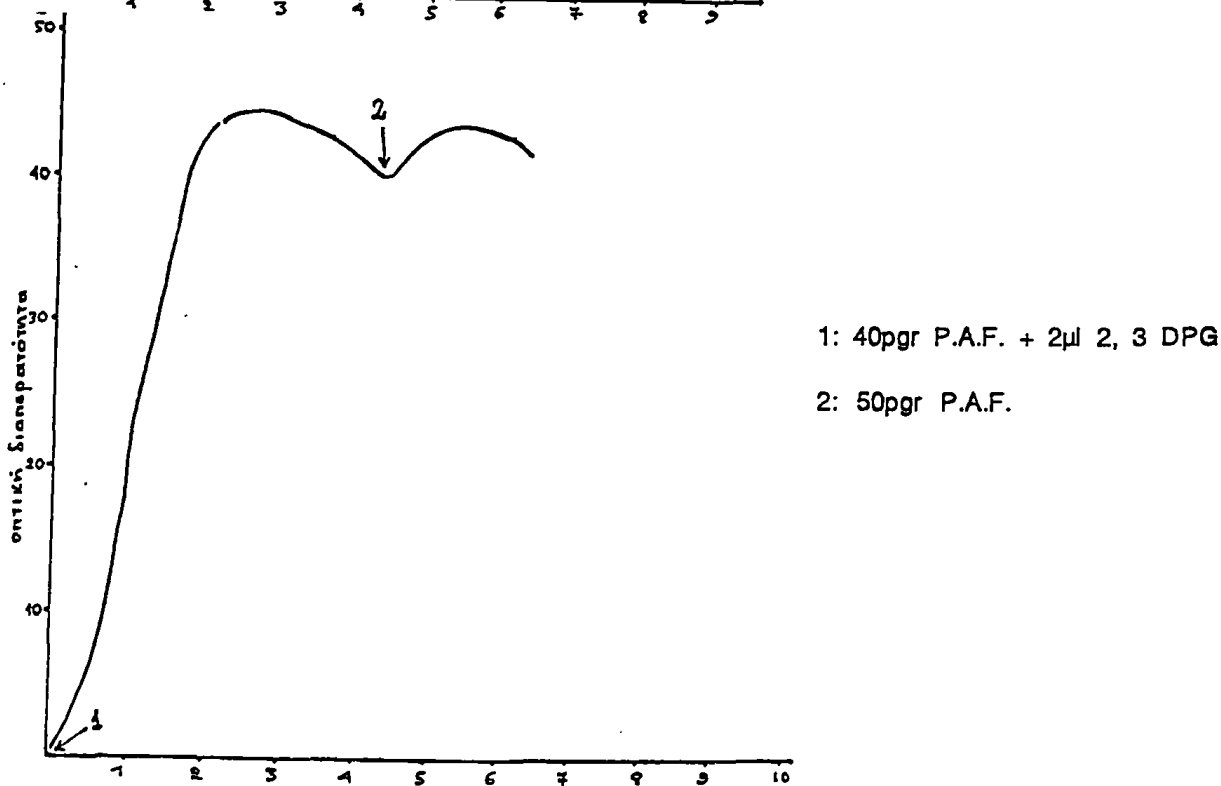
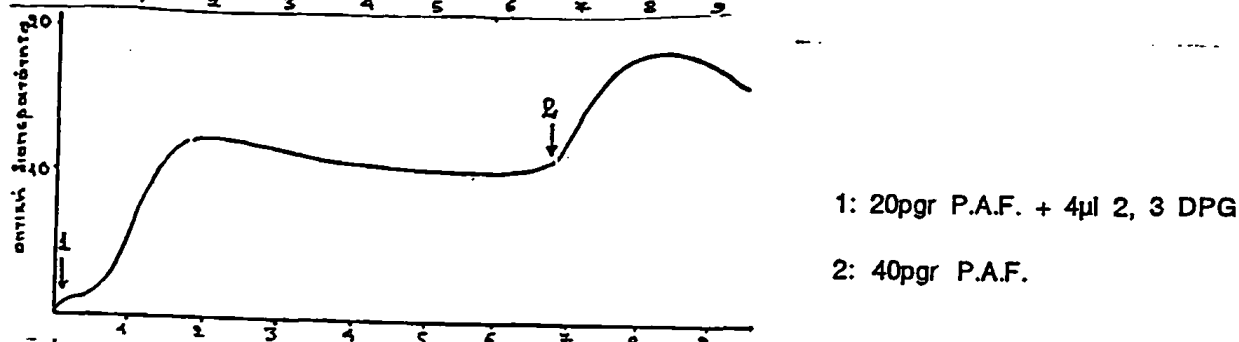
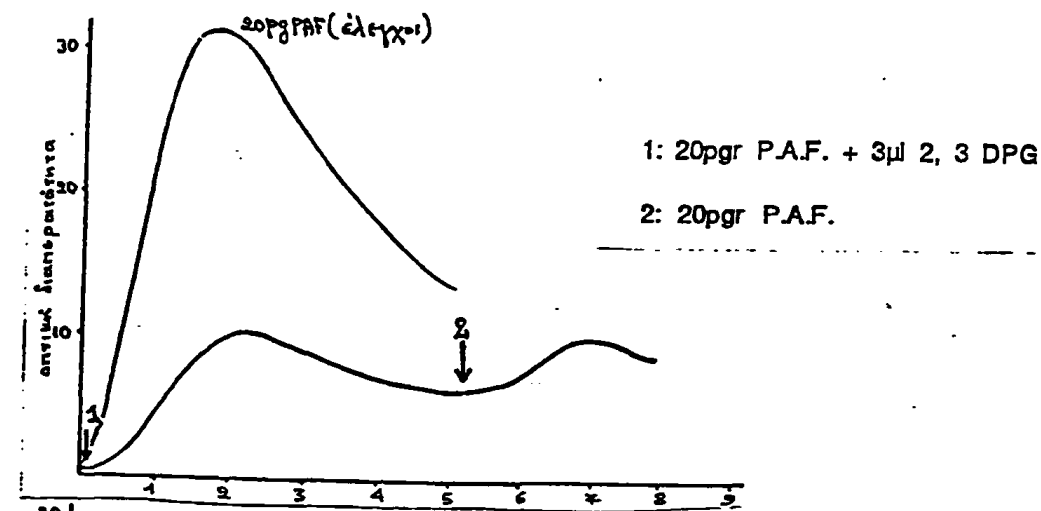
Εικόνα αρ. 2: Αναστολή της συσώρευσης των αιμοπεταλίων της προκαλούμενης από 50pgr P.A.F. μέσω χορήγησης διαδοχικά αυξανόμενων ποσοτήτων 3-PGA.



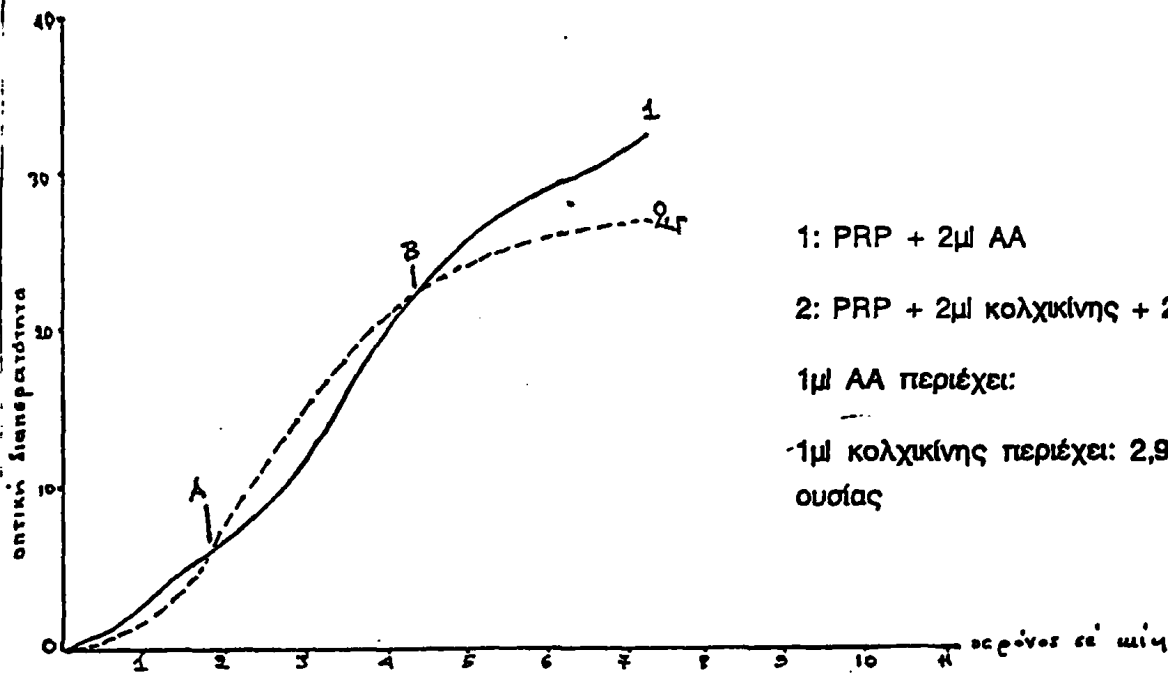
Εικόνα αρ. 3: Αποτυχία του 2-φωσφογλυκερικού οξέος να αναστείλει την αιμοπεταλιακή συσώρευση την προκαλούμενη από 50pgr P.A.F. Παρατηρείται μάλιστα ελαφρά ενίσχυση της δράσης του P.A.F.



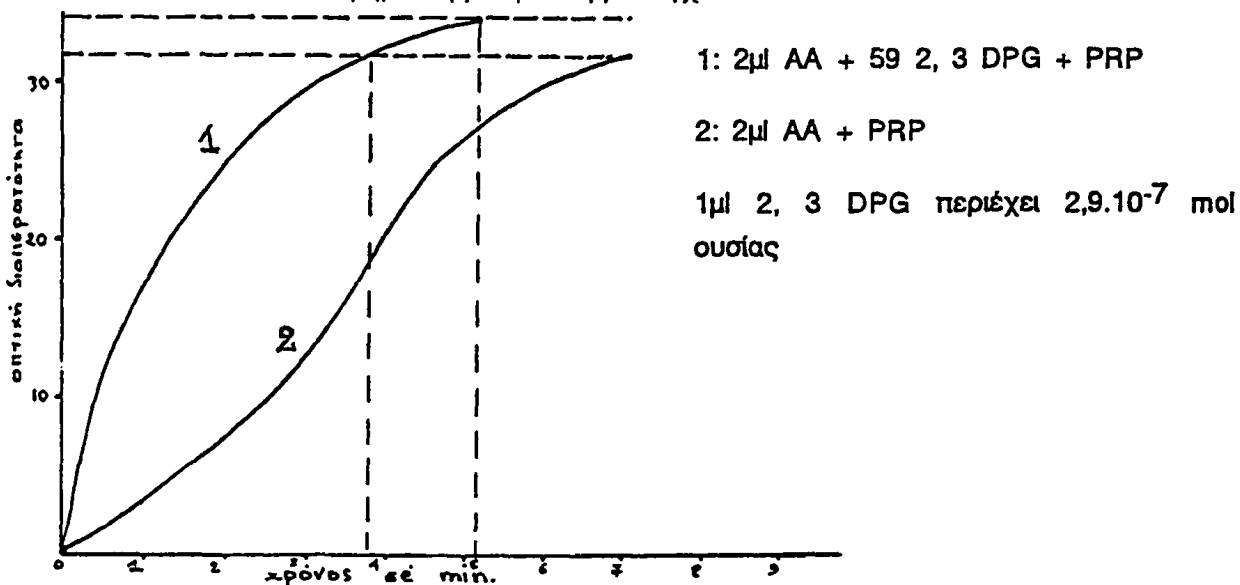
Εικόνα αρ. 4: Το 2, 3 DPG αντιστρέφει εκείνες τις συσσωρεύσεις αιμοπεταλιων διηγευμένων από μεγάλες ποσότητες P.A.F. οι οποίες είναι μη αντιστρεπτες. Το φαινόμενο αυτό εικονίζεται στο παραπάνω σχήμα το οποίο είναι μια ανιγραφή σε κλίμακα 1:1 του αντίστοιχου αγγρεγογραφήματος (καταγραφή της συσώρευσης από το καταγραφικό του συσσωρευομέτρου). Η καμπύλη 1 αντιπροσωπεύει τον έλεγχο και προκύπτει όταν στα αιμοπετάλια της κυβέττας τίθενται 100ργρ P.A.F. Η καμπύλη 2 προκύπτει όταν στα αιμοπετάλια της κυβέττας τεθούν ομοίως 100ργρ P.A.F. και αφεθούν να συσσωρευθούν μέχρι το μέγιστο δυνατό σημείο συσώρευσης. Τότε τίθεται ποσότητα 2, 3 DPG οπότε η καμπύλη αρχίζει και αποκτά καθοδική πορεία πράγμα που σημαίνει ότι τα αιμοπετάλια αποχωρίζονται μεταξύ τους και η διέλευση του φωτός γίνεται δυσχερέστερα μέσα από την κυβέττα. Η ποσότητα του χρησιμοποιούμενου 2, 3 DPG είναι ίση προς $10.3 \cdot 10^{-4} \text{m}$ και τίθεται σε κυβέττα όγκου $0,5 \text{cm}^3$.



Εικόνα αρ. 5: Φαινόμενο επαναδιέγερσης των πλυμμένων αιμοπεταλίων κουνελιού στα οποία χορηγήθηκε ταυτόχρονα P.A.F. και 2, 3 DPG. Τα αιμοπετάλια αφέθηκαν να συσσωρεύσουν και κατόπιν επαναδιεγέρθηκαν από P.A.F. και έδωσαν μια συσσωρευτική ανταπόκριση: 1: Πρώτο ερέθισμα: P.A.F. + 2, 3 DPG. 2: Δεύτερο ερέθισμα: Μόνον P.A.F. Δέον να σημειωθεί ότι σύμφωνα με την υπάρχουσα βιβλιογραφία μία πρώτη έκθεση των αιμοπεταλίων στον P.A.F. προκαλεί απευαισθητοποίησή τους σ'αυτόν πράγμα που εν προκειμένω δεν φαίνεται να ισχύει απολύτως.

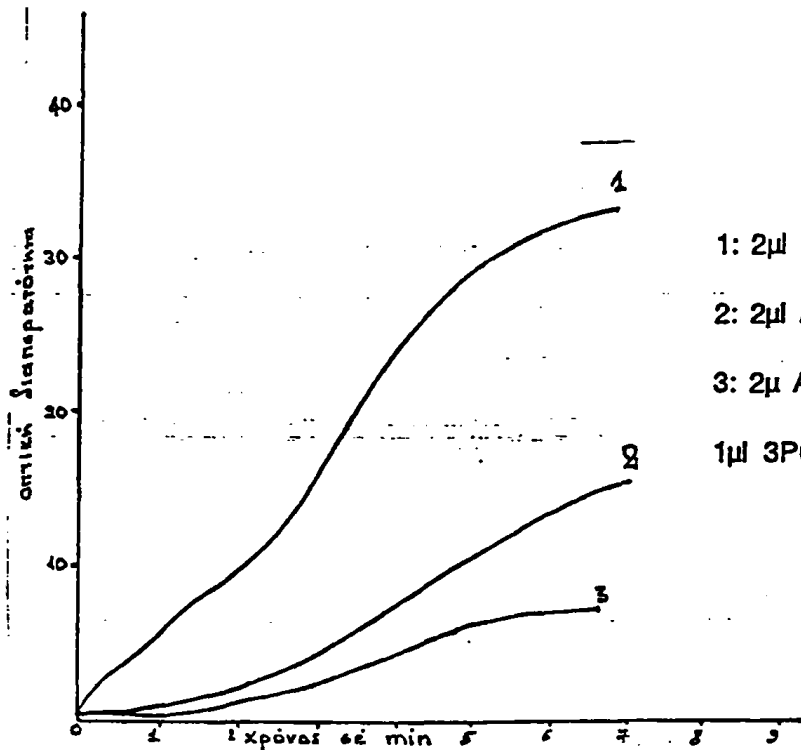


Εικόνα αρ. 6: Δράση της κολχικίνης στην αιμοπεταλιακή συσσώρευση την επαγόμενη από Αραχιδονικό οξύ: Η δράση της ουσίας είναι παράδοξη υπό την έννοια ότι μεταξύ των σημείων Α και Β της διακεκομμένης καμπύλης έχουμε αύξηση της συσσωρευτικής διαδικασίας, ενώ μεταξύ των σημείων Β και Γ η συσσώρευση προκύπτει να είναι ελαττωμένη σε σύγκριση με το αντίστοιχο τμήμα της καμπύλης ελέγχου.

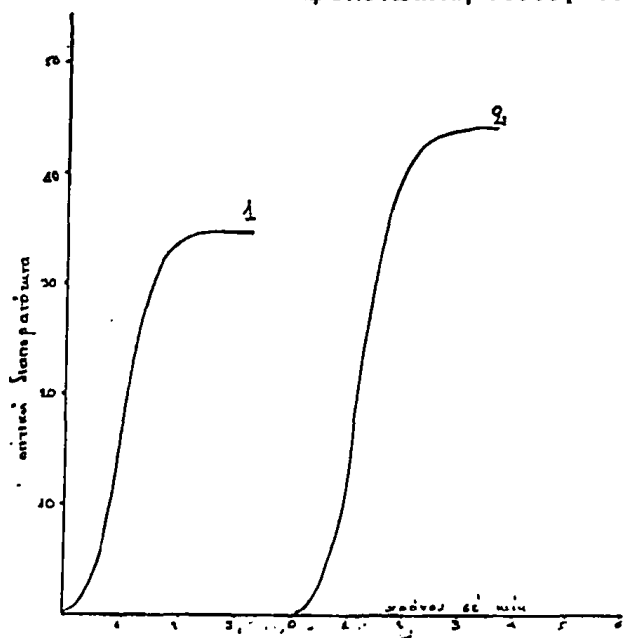


Εικόνα αρ. 7: Παράδοξη δράση του 2, 3 DPG στην αιμοπεταλιακή συσσώρευση από Αραχιδονικό οξύ: Το 2, 3 DPG ενισχύει τη δράση του AA ενώ στη βιβλιογραφία αναφέρεται ότι την αναστέλει (Συζήτηση).

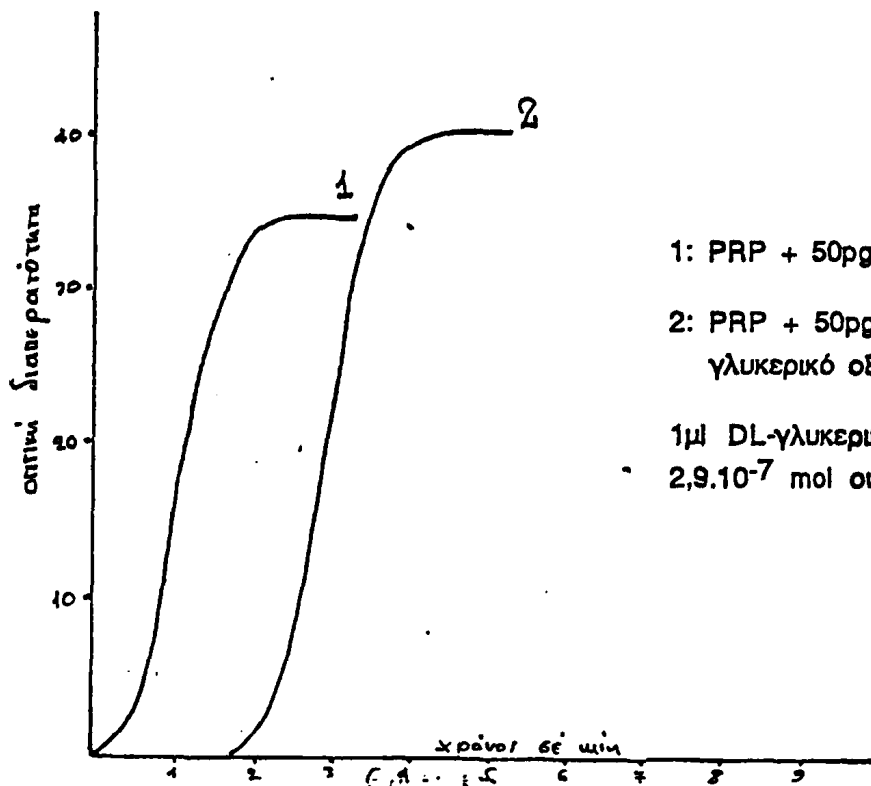




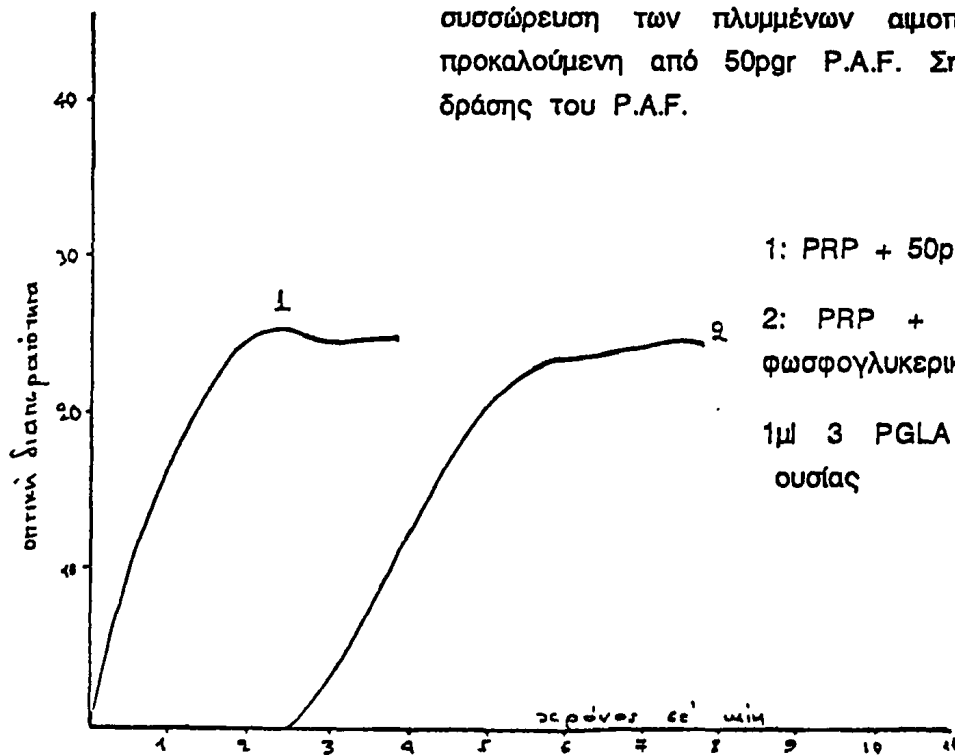
Εικόνα αρ. 8: Σαφής ανασταλτική δράση του 3-φωσφογλυκερικού οξέος στην αιμοπεταλιακή συσσώρευση την ενεργούμενη από AA.



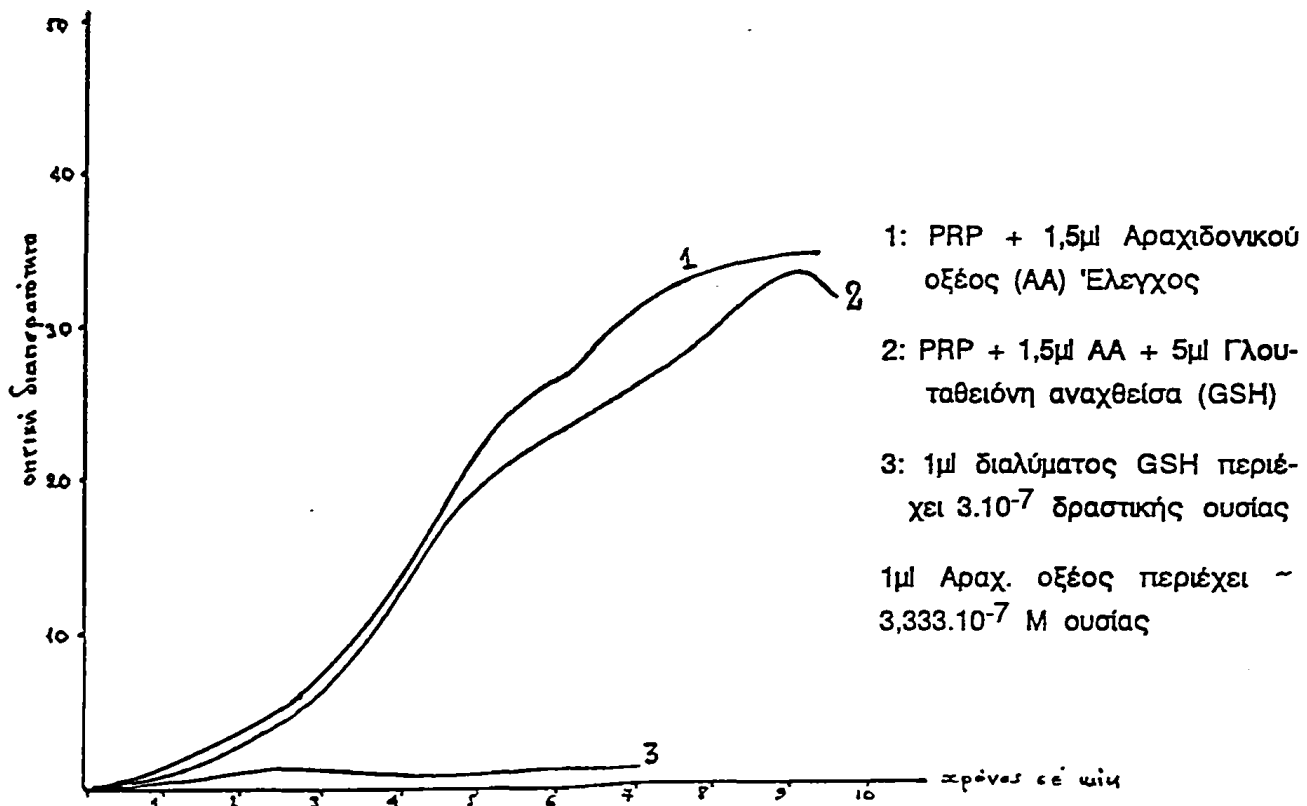
Εικόνα αρ. 9: Αποτυχία της L-a, φωσφορικής γλυκερόλης να αναστείλει τη συσσώρευση των αιμοπεταλίων κουνελιού την προκαλούμενη από 50pgr P.A.F. 1μl διαλύματος L-a, φωσφορικής γλυκερόλης περιέχει ποσότητα $2,9 \cdot 10^{-7}$ M ουσίας. Σημειώνεται ότι η L-a, GLP ενισχύει αισθητά τη δράση του P.A.F.



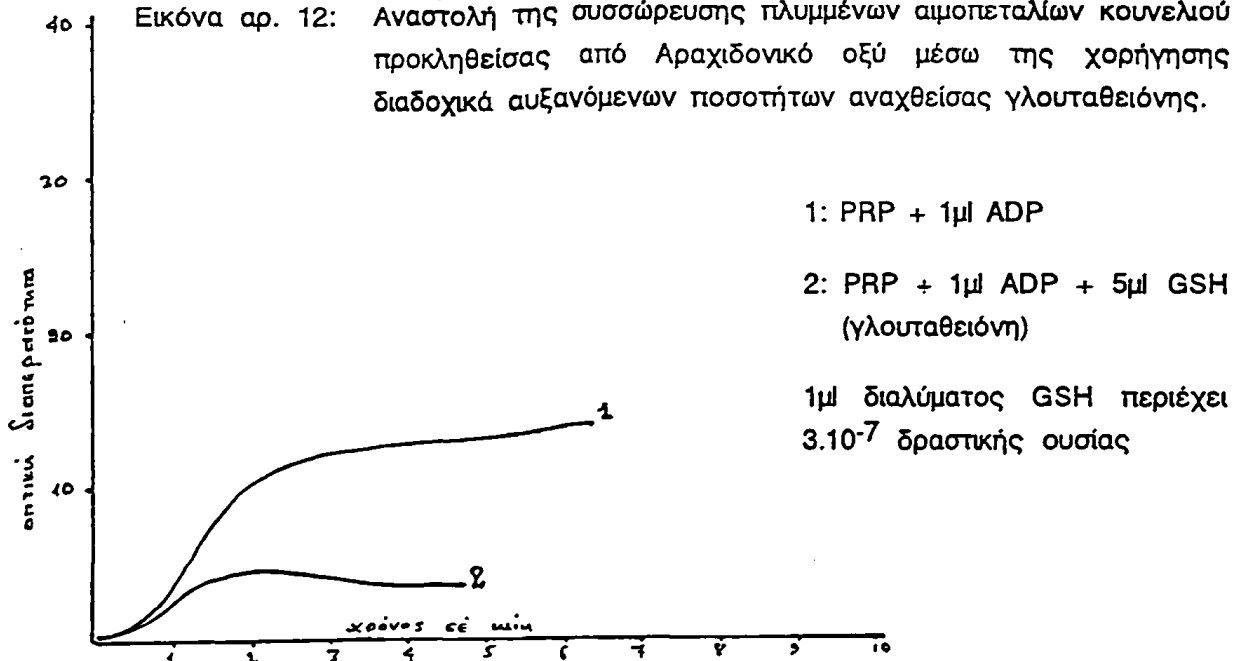
Εικόνα αρ. 10: Αποτυχία του DL-γλυκερικού οξέος να αναστείλει τη συσσώρευση των πλυμμένων αιμοπεταλίων κουνελιού την προκαλούμενη από 50pgr P.A.F. Σημειώνεται ενίσχυση της δράσης του P.A.F.



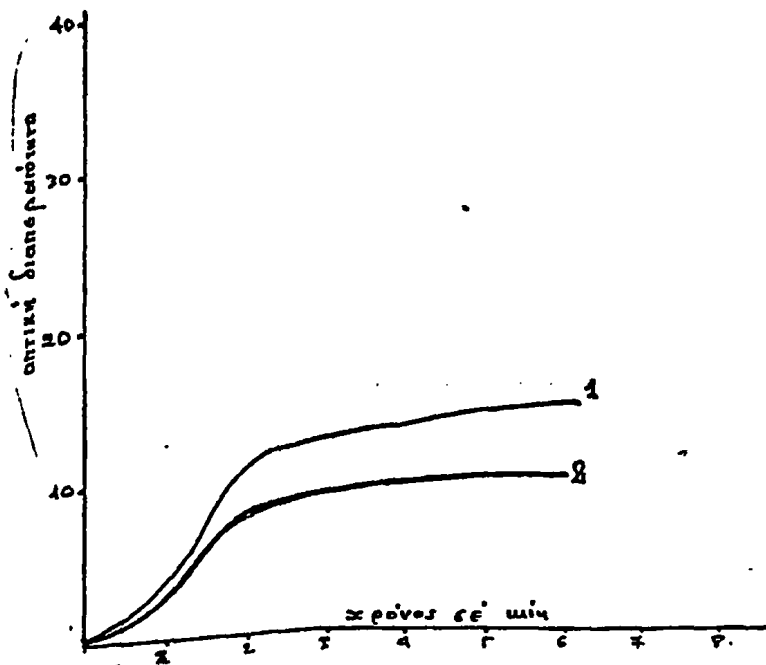
Εικόνα αρ. 11: Αποτυχία της 3-φωσφογλυκερικής αλδεϋδης να αναστείλει τη συσσώρευση των πλυμμένων αιμοπεταλίων κουνελιού διεγερμένων από 50pgr P.A.F.



Εικόνα αρ. 12: Αναστολή της συσσώρευσης πλυμένων αιμοπεταλίων κουνελιού προκληθείσας από Αραχιδονικό οξύ μέσω της χορήγησης διαδοχικά αυξανόμενων ποσοτήτων αναχθείσας γλουταθειόνης.



Εικόνα αρ. 13: Αναστολή της συσσώρευσης πλυμένων αιμοπεταλίων κουνελιού προκαλούμενης από 1μl ADP (διαλύματος 450μM ADP) μέσω χορήγησης αναχθείσας γλουταθειόνης.

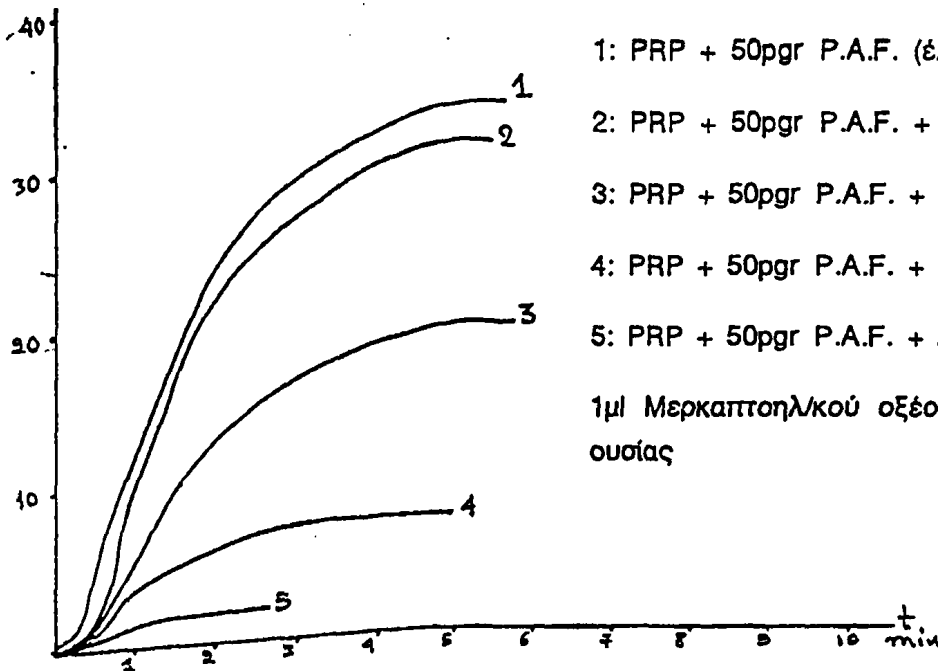


1: PRP + 1μM ADP

2: PRP + 1μM ADP + 10μM
Μεθειονίνη

1μM διαλύματος Μεθειονίνης
περιέχει $2,37 \cdot 10^{-7}$ δραστικής
ουσίας

Εικόνα αρ. 14: Αναστολή της συσσώρευσης πλυμένων αιμοπεταλίων κουνελιού προκαλούμενης από 1μM ADP (διαλύματος 450μM ADP) μέσω χορήγησης μεθειονίνης.



1: PRP + 50pg P.A.F. (έλεγχος)

2: PRP + 50pg P.A.F. + 1μM Μερκαπτικού οξέος

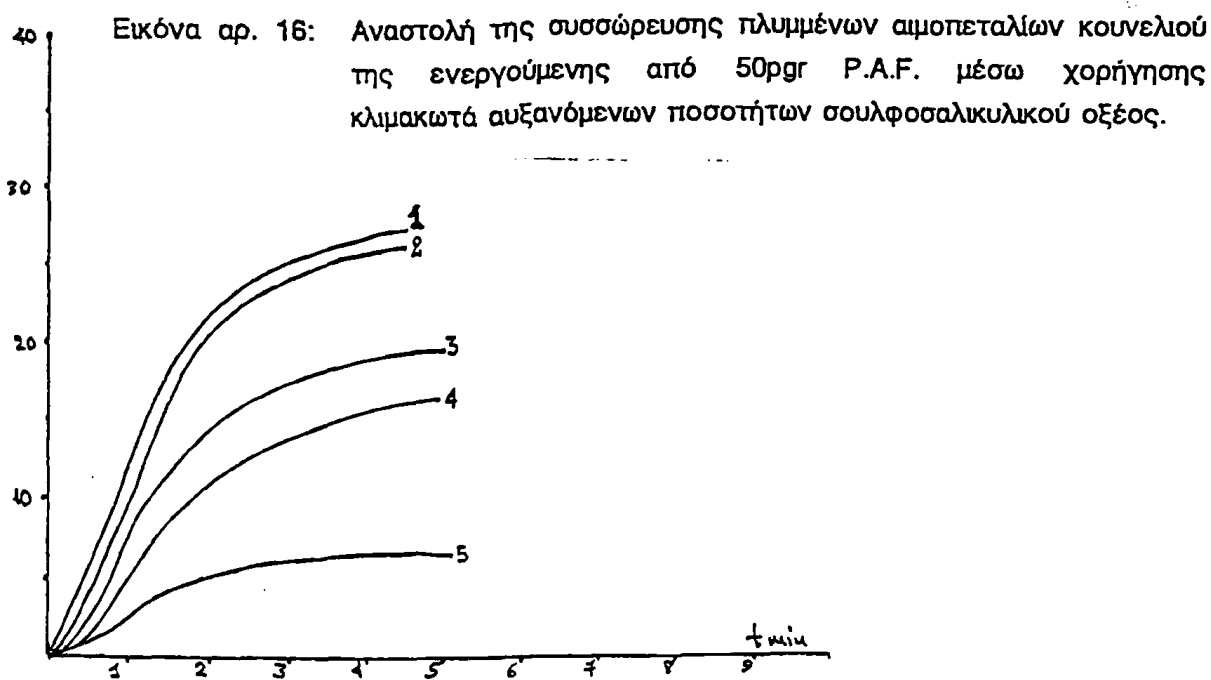
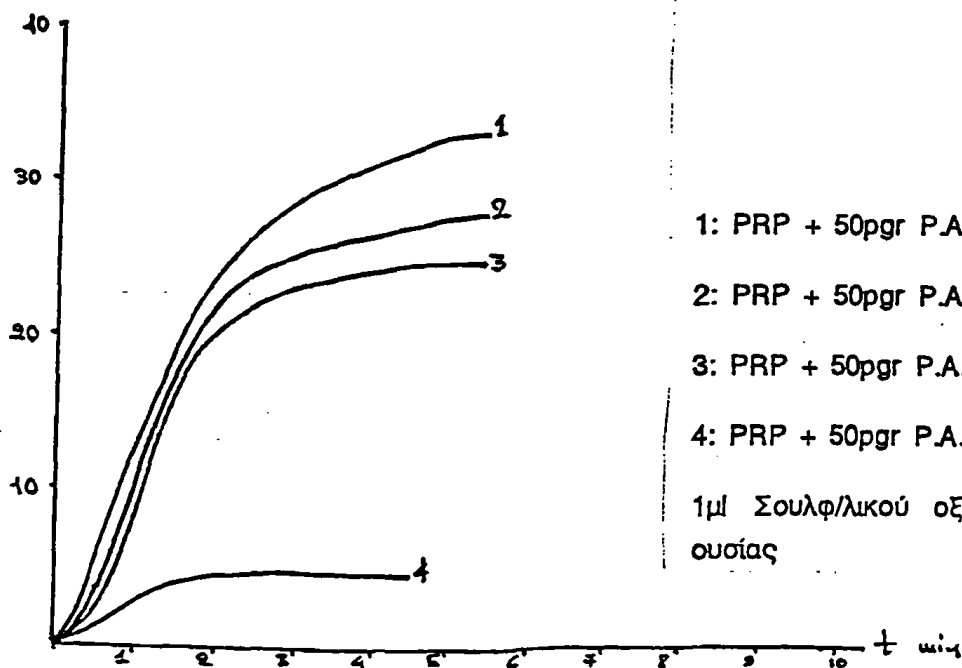
3: PRP + 50pg P.A.F. + 2μM " "

4: PRP + 50pg P.A.F. + 2,2μM " "

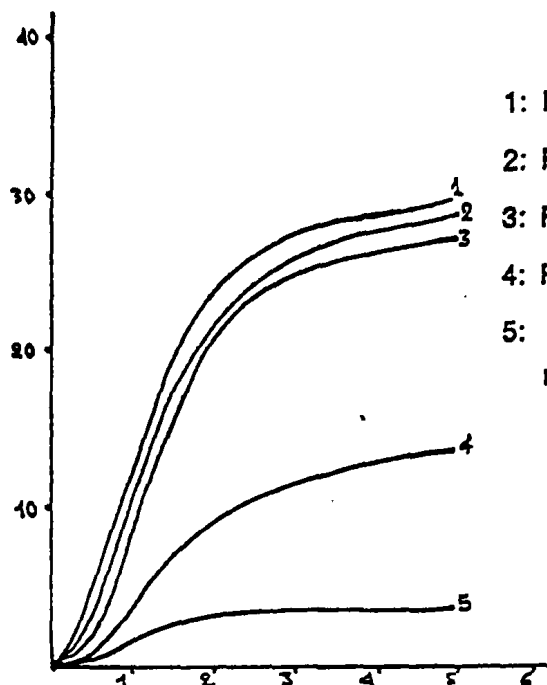
5: PRP + 50pg P.A.F. + 2,5μM " "

1μM Μερκαπτοηλεκτρικού οξέος περιέχει $2,9 \cdot 10^{-7}$ mol
ουσίας

Εικόνα αρ. 15: Αναστολή της συσσώρευσης πλυμένων αιμοπεταλίων κουνελιού της ενεργούμενης από 50pg P.A.F. μέσω χορήγησης κλιμακωτά αυξανόμενων ποσοτήτων μερκαπτοηλεκτρικού οξέος.

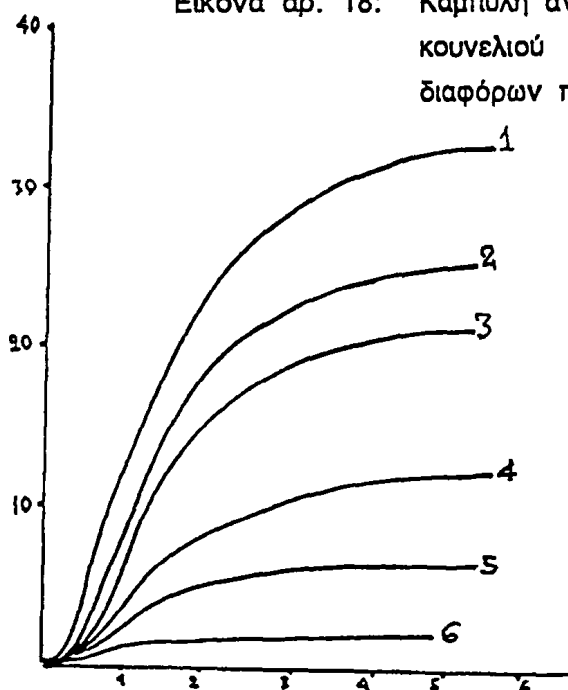


Εικόνα αρ. 17: Καμπύλη αναστολής της συσσώρευσης των πλυμένων αιμοπεταλίων κουνελιού που επάγεται από 50prg P.A.F. από τη δράση διαφόρων ποσοτήτων D-κυστεΐνης: 1: Έλεγχος = PRP + 50prg P.A.F., 2: PRP + 50prg P.A.F. + μl D-κυστεΐνης, 3: PRP + 50prg P.A.F. + 3,5μl D-κυστεΐνης, 4: PRP + 50prg P.A.F. + 3,7μl D-κυστεΐνης, 5: PRP + 50prg P.A.F. + 4μl D-κυστεΐνης. Το διάλυμα της κυστεΐνης που χρησιμοποιείται είναι $5,9 \cdot 10^{-4}$ mol L-κυστεΐνης.



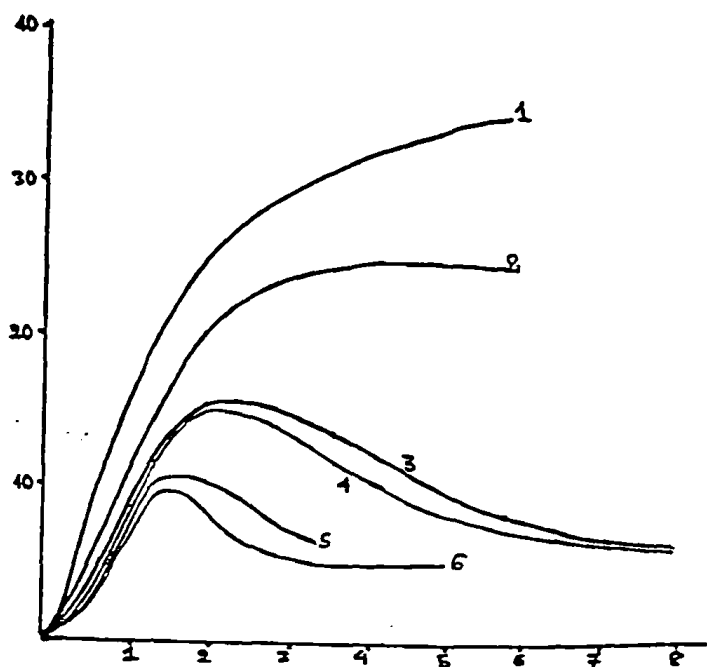
- 1: PRP + 50µgr P.A.F.
- 2: PRP + 50µgr P.A.F. + $5,9 \cdot 10^{-4}$ m Ακετύλ L-κυστεΐνης
- 3: PRP + 50µgr P.A.F. + $11,8 \cdot 10^{-4}$ m Ακετύλ-L-κυστεΐνης
- 4: PRP + 50µgr P.A.F. + $14,7 \cdot 10^{-4}$ m Ακετύλ-L-κυστεΐνης
- 5: PRP + 50µgr P.A.F. + $17,11 \cdot 10^{-4}$ m Ακετύλ-L-κυστεΐνης

Εικόνα αρ. 18: Καμπύλη αναστολής της συσσώρευσης πλυμένων αιμοπεταλίων κουνελιού που επάγεται από 50µgr P.A.F. από τη δράση διαφόρων ποσοτήτων Ακετύλ-L-κυστεΐνης.



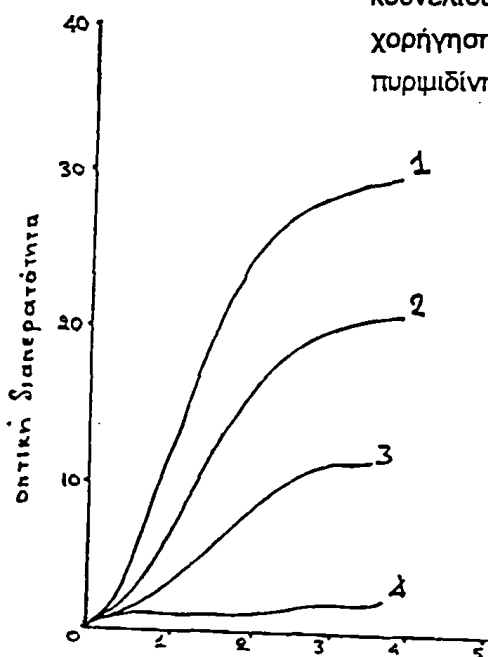
- 1: PRP + 50µgr P.A.F. (έλεγχος)
 - 2: PRP + 50µgr P.A.F.+1µl Κυστίνης
 - 3: PRP + 50µgr P.A.F. + 1,3µl Κυστίνης
 - 4: PRP + 50µgr P.A.F. + 1,5µl Κυστίνης
 - 5: PRP + 50µgr P.A.F. + 1,7µl Κυστίνης
 - 6: PRP + 50µgr P.A.F. + 2µl Κυστίνης
- Κάθε µl διαλύματος κυστίνης περιέχει

Εικόνα αρ. 19: Αναστολή της συσσώρευσης των πλυμένων αιμοπεταλίων κουνελιού της προκαλούμενης από 50µgr P.A.F. μέσω χορήγησης αυξανόμενων βαθμιαία ποσοτήτων L-κυστίνης.



- 1: PRP + 50rggr P.A.F. (έλεγχος)
 2: PRP + 50rggr P.A.F.+1μl Μερκαπτιδίνης (MPPRM)
 3: PRP + 50rggr P.A.F. + 2μl MPPRM
 4: PRP + 50rggr P.A.F. + 2,4μl MPPRM
 5: PRP + 50rggr P.A.F. + 2,8μl MPPRM
 6: PRP + 50rggr P.A.F. + 4μl MPPRM
 Κάθε μl Μερκαπτοπυριμιδίνης περιέχει $2,9 \cdot 10^{-7}$ mol της ουσίας

Εικόνα αρ. 20: Αναστολή της συσσώρευσης των πλυμένων αιμοπεταλίων κουνελιού της προκαλούμενης από 50rggr P.A.F. μέσω χορήγησης βαθμιαία αυξανόμενων ποσοτήτων Μερκαπτοπυριμιδίνης.

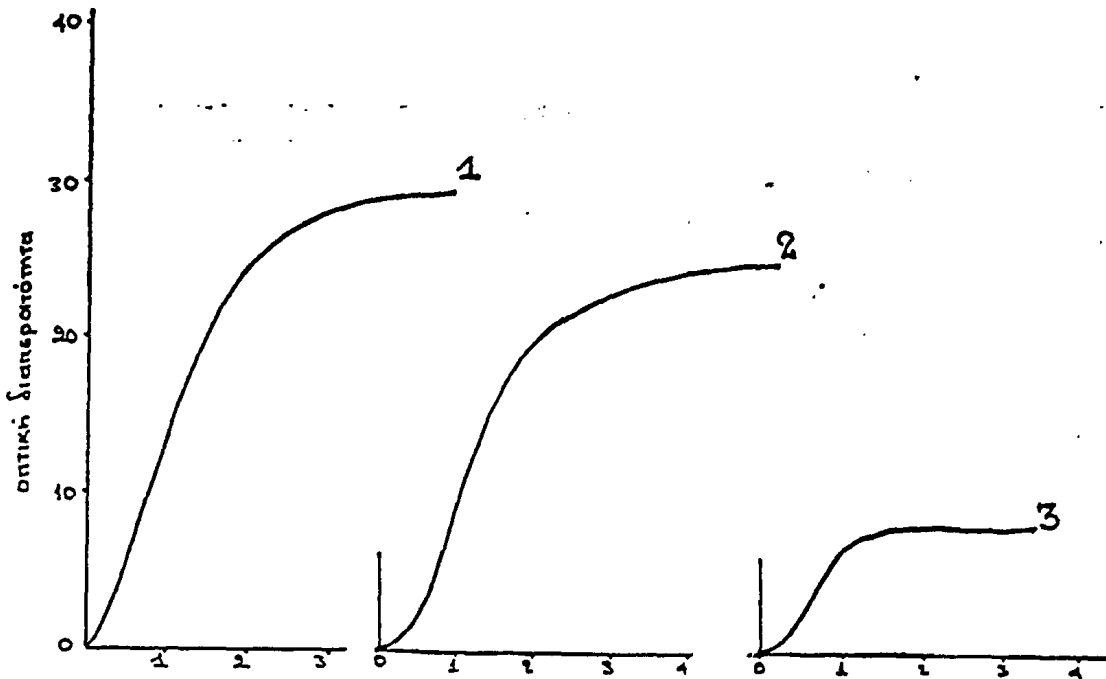


- 1: PRP + 50rggr P.A.F. (έλεγχος)
 2: PRP + 50rggr P.A.F.+2μl διαλύτος κολχικίνης
 3: PRP + 50rggr P.A.F. + 3μl " "
 4: PRP + 50rggr P.A.F. + 5μl " "
 1μl διαλύματος κολχικίνης περιέχει $2,9 \cdot 10^{-7}$ mol της ουσίας

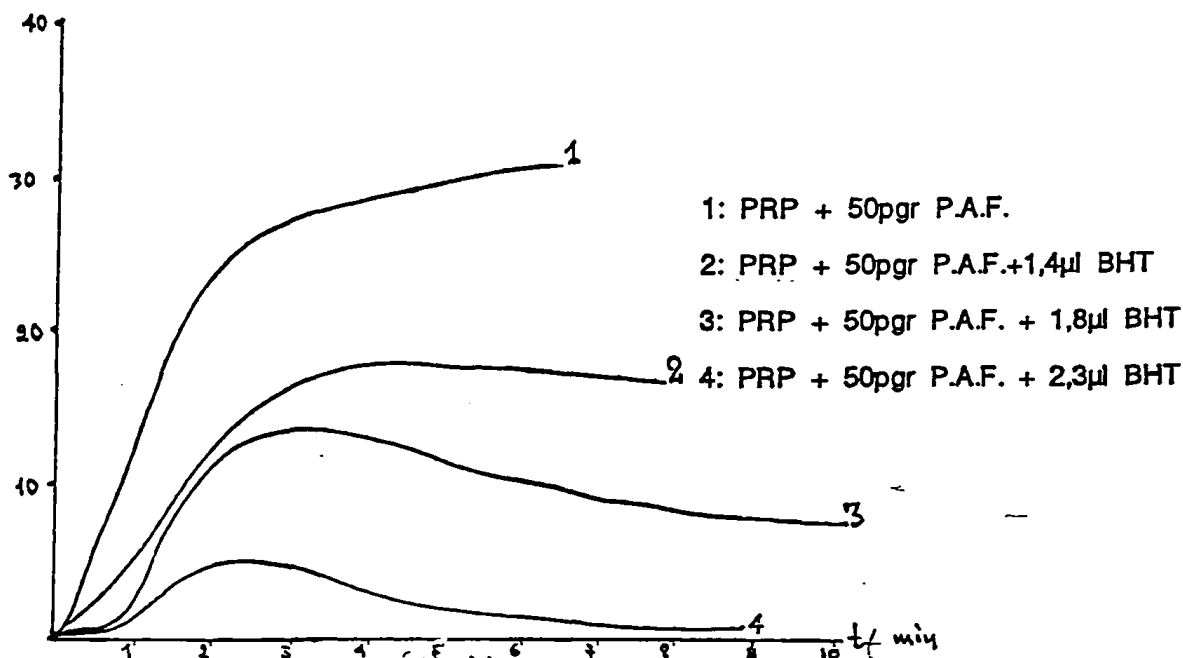
Εικόνα αρ.21: Ισχυρή αναστολή της συσσώρευσης πλυμένων αιμοπεταλίων κουνελιού ενεργοποιηθέντων από 50rggr P.A.F. μέσω χορήγησης διαδοχικά αυξανόμενων ποσοτήτων κολχικίνης. 1μl του διαλύματος αυτού περιέχει $2,9 \cdot 10^{-7}$ mol της κολχικίνης. Η κολχικίνη δρα ανταγωνιστικά προς το ATP οπότε είναι δυνατόν να μην επιτρέπει την χρησιμοποίησή του από τον κυτταροσκελετό του αιμοπεταλίου. Σ'αυτή την περίπτωση η ενέργεια του κυττάρου δεν μπορεί να διοχετευθεί στις δομές για την λειτουργία των οποίων είναι απαραίτητη.

1: PRP + 50prg P.A.F.

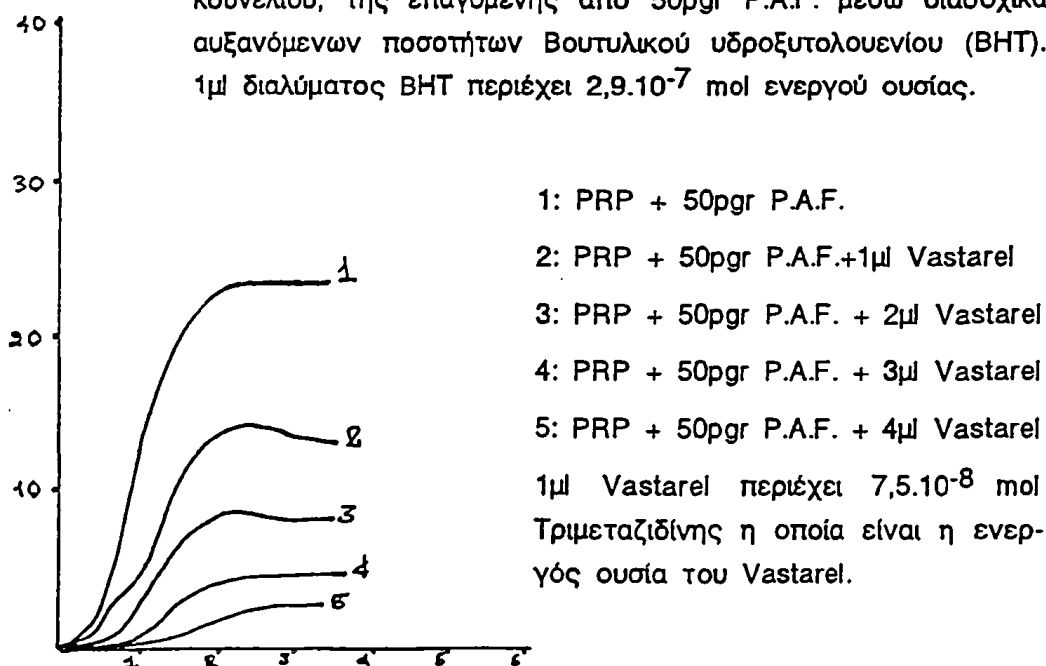
2: PRP + 50prg P.A.F., δεκάλεπτη επώαση



Εικόνα αρ.22: Σταδιακή καταστολή της λειτουργικότητας των πλυμένων αιμοπεταλίων κουνελιού επωασθέντων επί διαφορετικούς χρόνους με την ίδια ποσότητα 2, 4-Δινιτροφαινόλης. 1: PRP + 50prg P.A.F. 2: PRP (επωασθέν επί 10 λεπτά με 2, 4-Δινιτροφαινόλη) + 50prg P.A.F. 3: PRP (επωασθέν επί 45 λεπτά με 2, 4-Δινιτροφαινόλη) + 50prg P.A.F. Η 2, 4-Δινιτροφαινόλη αναστέλει την μιτοχονδριακή λειτουργία αποσυζευγύοντας την αναπνευστική αλυσίδα από την οξειδωτική φωσφορυλίωση. Κατά τον τρόπο αυτό αχρηστεύεται ο κύριος μηχανισμός παραγωγής ενέργειας του αιμοπεταλιακού κυττάρου. Τα διαγράμματα δείχνουν ότι η συσσώρευση των αιμοπεταλίων από P.A.F. είναι στενώτατα συνδεδεμένη με την δυνατότητα παραγωγής ενέργειας υπό μορφή ATP εκ μέρους των μιτοχονδρίων.



Εικόνα αρ. 23: Αναστολή της συσσώρευσης των πλυμένων αιμοπεταλίων κουνελιού, της επαγόμενης από 50pgr P.A.F. μέσω διαδοχικά αυξανόμενων ποσοτήτων Βουτυλικού υδροξυτολουενίου (BHT). 1μl διαλύματος BHT περιέχει $2,9 \cdot 10^{-7}$ mol ενεργού ουσίας.



Εικόνα αρ. 24: Αναστολή της συσσώρευσης πλυμένων αιμοπεταλίων κουνελιού, της επαγόμενης από 50pgr P.A.F. μέσω διαδοχικά αυξανόμενων ποσοτήτων του φαρμάκου Vastarel. 1μl διαλύματος Vastarel περιέχει $7,5 \cdot 10^{-8}$ mol Τριμεταζιδίνης η οποία είναι η ενεργός ουσία του ιδιοσκευάσματος. Τα έκδοχα δεν είναι ενεργά έναντι της αιμοπεταλιακής συσσώρευσης στις χρησιμοποιηθείσες συγκεντρώσεις.

Ε. ΠΕΙΡΑΜΑΤΑ ΚΑΤΑΝΑΛΩΣΗΣ ΓΛΥΚΟΖΗΣ ΑΠΟ ΔΙΗΓΕΡΜΕΝΑ ΑΙΜΟΠΕΤΑΛΙΑ ΚΟΥΝΕΛΙΟΥ ΜΕ Ρ.Α.Φ.

Στα πειράματα αυτά χρησιμοποιήθηκαν πλυμένα αιμοπετάλια κουνελιού και η εκτέλεση έγινε σύμφωνα με το πρωτόκολλο που περιγράφεται στις σελίδες 120 και 121 του κεφαλαίου των "Μεθόδων και Υλικών". Τα πειράματα έδειξαν ότι ο Ρ.Α.Φ. ενεργεί στο ΡΡΡ διακυμάνσεις μεγάλου εύρους των επιπέδων της γλυκόζης οφειλόμενες πιθανόν σε αύξηση της γλυκογονόλυσης και της κατανάλωσης της γλυκόζης οι οποίες δεν είναι κατά τα φαινόμενα ταυτόχρονες. Το 2, 3 DRG και το 3-PGA σταθεροποιεί τα επίπεδα της γλυκόζης αντιτιθέμενο στη δράση του Ρ.Α.Φ., όπως φαίνεται και από τους πίνακες που ακολουθούν.

Ε.Α. Πρώτη ομάδα πειραμάτων

Χρόνος σε λεπτά από χορήγηση ουσιών	Μόρφωση ΡΡΡ+ 100μl φυσιολ. ορού	Χρόνος σε λεπτά από χορήγηση ουσιών	ΡΡΡ+100μl Ρ.Α.Φ. (10 ⁻⁶ M) εφ'άπαξ
	mg/l γλυκόζης		mg/l γλυκόζης
1 ^ο λεπτό	187	1 ^ο	132
2 ^ο "	185	2 ^ο	179
3 ^ο "	189	3 ^ο	192
4 ^ο "	188	4 ^ο	165
5 ^ο "	188	5 ^ο	205

Πίνακας αριθμ. 1.

Πίνακας αριθμ. 2.

Χρόνος σε λεπτά από τη χορήγηση ουσιών	ΡΡΡ+200μl Ρ.Α.Φ. (10 ⁻⁶ M) εφ'άπαξ	Χρόνος σε λεπτά από τη χορήγηση ουσιών	ΡΡΡ+300μl Ρ.Α.Φ. (10 ⁻⁶ M) εφ'άπαξ
	mg/l γλυκόζης		mg/l γλυκόζης
1 ^ο	145	1 ^ο	118
2 ^ο	187	2 ^ο	192
3 ^ο	177	3 ^ο	175
4 ^ο	155	4 ^ο	142
5 ^ο	192	5 ^ο	198

Πίνακας αριθμ. 3.

Πίνακας αριθμ. 4.



Χρόνος σε πρώτα λεπτά από χορή- γηση ουσιών	* ** *** mg/l γλυκόζης	Χρόνος σε λεπτά από χορήγηση ουσιών	◊ ◊◊ ◊◊◊ mg/l γλυκόζης
1 ^ο	185	1 ^ο	188
2 ^ο	179	2 ^ο	190
3 ^ο	187	3 ^ο	184
4 ^ο	190	4 ^ο	187
5 ^ο	185	5 ^ο	189

Πίνακας αριθμ. .

Πίνακας αριθμ. .

* PRP+100μl PAF+100μl DPG

◊ PRP+200μl P.A.F.+200μl DPG

** [P.A.F.]= 10^{-6} m

◊ ◊ [P.A.F.]= 10^{-6} m

*** [DPG]= $5,9 \cdot 10^{-4}$ m

◊ ◊ ◊ [DPG]= $5,9 \cdot 10^{-4}$ m

Ε.Β. Δεύτερη ομάδα πειραμάτων

Χρόνος σε πρώτα λεπτά	Μάρτυρες PRP+	Χρόνος σε πρώτα λεπτά	Μάρτυρες DPG
	100μl φυσ. ορού mg/l γλυκόζης		PRP + 100μl DPG mg/l γλυκόζης
1 ^ο	188	1 ^ο	189
2 ^ο	187	2 ^ο	185
3 ^ο	189	3 ^ο	187
4 ^ο	182	4 ^ο	189
5 ^ο	191	5 ^ο	190



Χρόνος σε λεπτά	Μάρτυρες PAF:PRP + 200μl PAF ($10^{-6}M$) mgr γλυκόζης	Χρόνος σε λεπτά	PRP+200μl PAF+200μl DPG mgr γλυκόζης
1 ^ο	145	1 ^ο	195
2 ^ο	187	2 ^ο	189
3 ^ο	177	3 ^ο	187
4 ^ο	155	4 ^ο	192
5 ^ο	192	5 ^ο	186

Χρόνος σε λεπτά	PRP+200μl PAF+200μl DPG mgr γλυκόζης
--------------------	---

1 ^ο	192
2 ^ο	187
3 ^ο	188
4 ^ο	193
5 ^ο	185

Χρόνος σε λεπτά	Μάρτυρες PRP+2, 3 DPG (200μl) mgr γλυκόζης
--------------------	--

1 ^ο	185
2 ^ο	189
3 ^ο	192
4 ^ο	194
5 ^ο	191
6 ^ο	195
7 ^ο	189
8 ^ο	187
9 ^ο	187
10 ^ο	190



Ε.Γ. Τρίτη ομάδα πειραμάτων

Μάρτυρες		Μάρτυρες PAF ($10^{-6}M$)	
Χρόνος σε λεπτά	PRP + φυσιολ. ορός	Χρόνος σε λεπτά	PRP + 200μl PAF
	mgg γλυκόζης		mgg γλυκόζης
1 ^ο	188	1 ^ο	151
2 ^ο	185	2 ^ο	177
3 ^ο	188	3 ^ο	189
4 ^ο	184	4 ^ο	212
5 ^ο	189	5 ^ο	203
6 ^ο	186	6 ^ο	204

Πίνακας αρ. 1: Στον πίνακα αυτό φαίνεται η σταθερότητα των επιπέδων της γλυκόζης σε PRP που δεν υφίσταται τη δράση κανενός διεγέρτη των αιμοπεταλίων.

Πίνακας αρ. 2: Στον πίνακα αυτό φαίνονται οι διακυμάνσεις που επιφέρει στα επίπεδα της γλυκόζης η δράση του PAF. Αυτές οφείλονται στην αύξηση της γλυκογονόλυσης και της κατανάλωσης γλυκόζης.

Μάρτυρες DPG		Μάρτυρες PAF + DPG	
Χρόνος σε λεπτά	PRP + 200μl DPG	Χρόνος σε λεπτά	PRP+200μl PAF+ 400μl DPG
	mgg γλυκόζης		mgg γλυκόζης
1 ^ο	186	1 ^ο	222
2 ^ο	187	2 ^ο	222
3 ^ο	188	3 ^ο	227
4 ^ο	185	4 ^ο	223
5 ^ο	189	5 ^ο	225
6 ^ο	188	6 ^ο	220

Πίνακας αρ. 3: Όπως φαίνεται από τις ανωτέρω τιμές το 2, 3 DPG δεν ασκεί δράση πάνω στη γλυκογονόλυση αφού τα επίπεδα γλυκόζης του PRP παραμένουν σταθερά.

Πίνακας αρ. 4: Στον πίνακα αυτό παρατίθεται η απελευθέρωση γλυκόζης από PRP μέσω PAF και DPG. Ο PAF ανεβάζει τα επίπεδα της γλυκόζης που μένουν υψηλά λόγω της δράσης του DPG, το οποίο πιθανώς δρα αναστέλλοντας τη γλυκόλυση.



Χρόνος σε λεπτά	PRP+200μl RAF+400μl 3PG mg/g γλυκόζης
1 ^ο	201
2 ^ο	197
3 ^ο	201
4 ^ο	213
5 ^ο	221
6 ^ο	235

Πίνακας αρ. 5: Στον πίνακα αυτό παρατίθε-ται η απελευθέρωση γλυκόζης από PRP στο οποίο έχει προστεθεί 3 PGA. Ο PAF δρα και αυξάνει τα επίπεδα της γλυκόζης τα οποία όμως παραμένουν ανεβασμένα λόγω της δράσης του 3 PGA που πιθανώς αναστέλλει τη χρησιμοποίησή της.



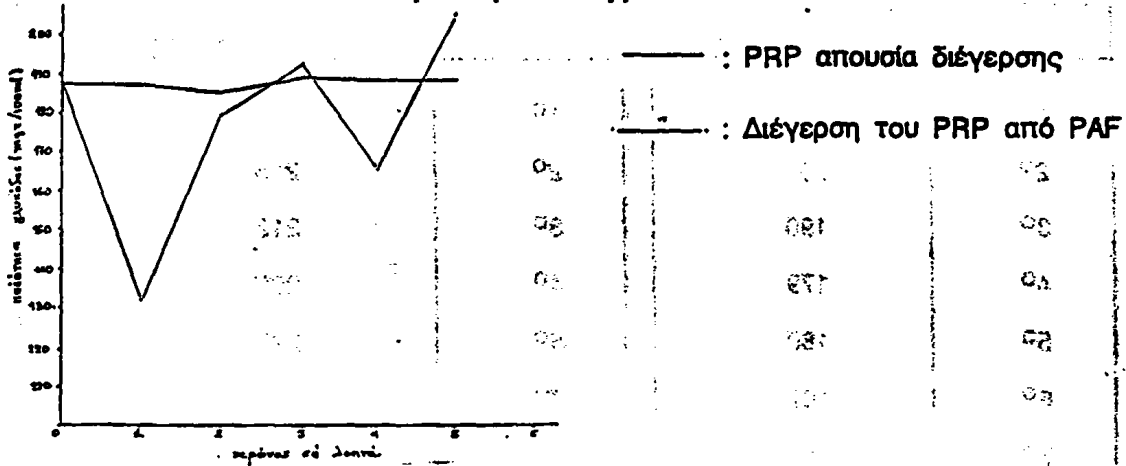
Ε.Δ. Τέταρτη ομάδα πειραμάτων

Χρόνος σε λεπτά	PRP + 400μl PAF	Χρόνος σε λεπτά	PRP+400μl PAF+600μl DPG+ 400μl PGA
	mgr γλυκόζης		mgr γλυκόζης
1 ^ο	177	1 ^ο	200
2 ^ο	201	2 ^ο	215
3 ^ο	190	3 ^ο	212
4 ^ο	179	4 ^ο	200
5 ^ο	180	5 ^ο	228
6 ^ο	197	6 ^ο	230
7 ^ο	182	7 ^ο	225
8 ^ο	250	8 ^ο	220
9 ^ο	245	9 ^ο	227
10 ^ο	237	10 ^ο	229

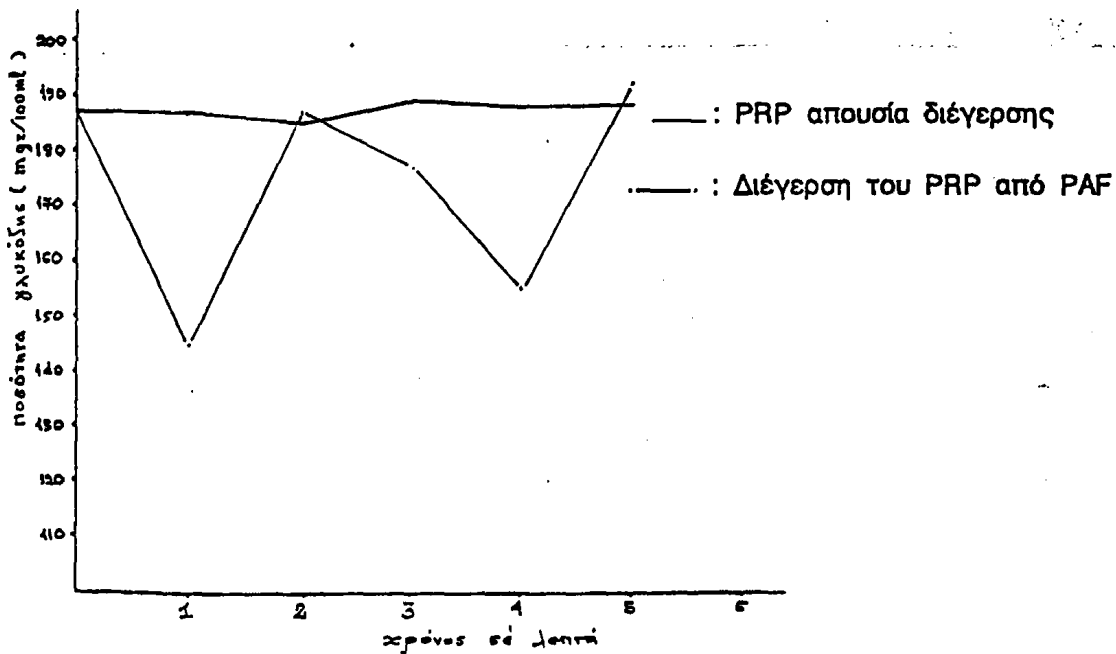


Ε.Ε. ΣΧΕΤΙΚΑ ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΑ

Πρώτη ομάδα πειραμάτων διέγερσης της γλυκόλυσης και γλυκογονόλυσης από P.A.F.

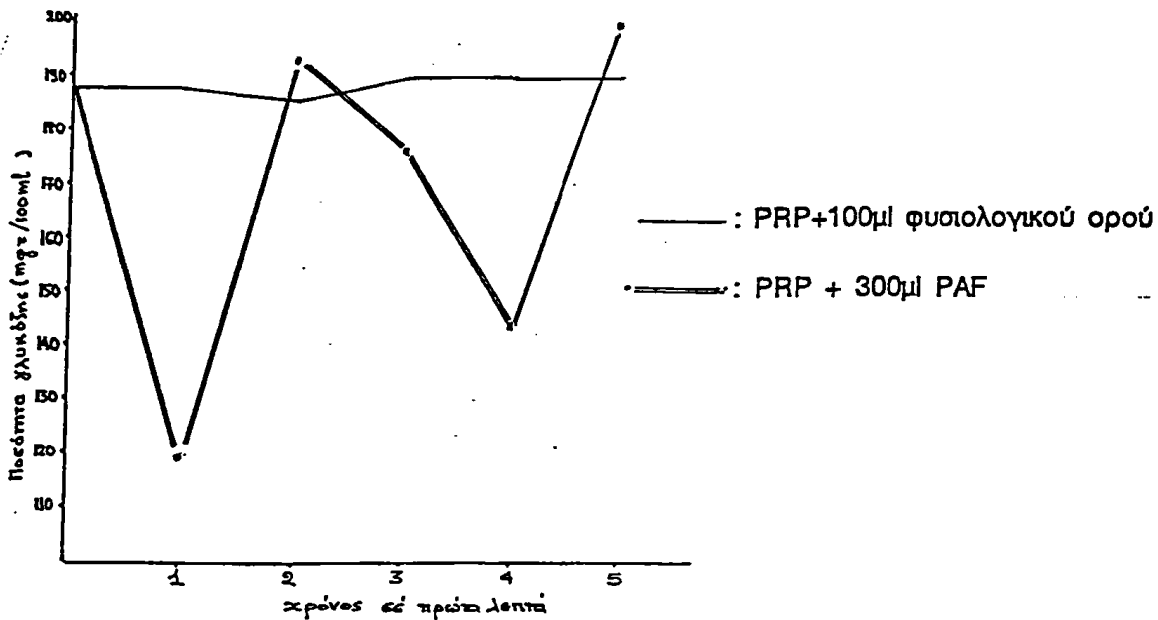


Εικόνα αρ. 1: Μεταβολές της περιεχόμενης γλυκόζης στο PRP όταν 1) τα αιμοπετάλια δεν δέχονται κανένα ερέθισμα και 2) όταν τους χορηγείται ποσότητα 100μl PAF συγκέντρωσης 10^{-6} mol.

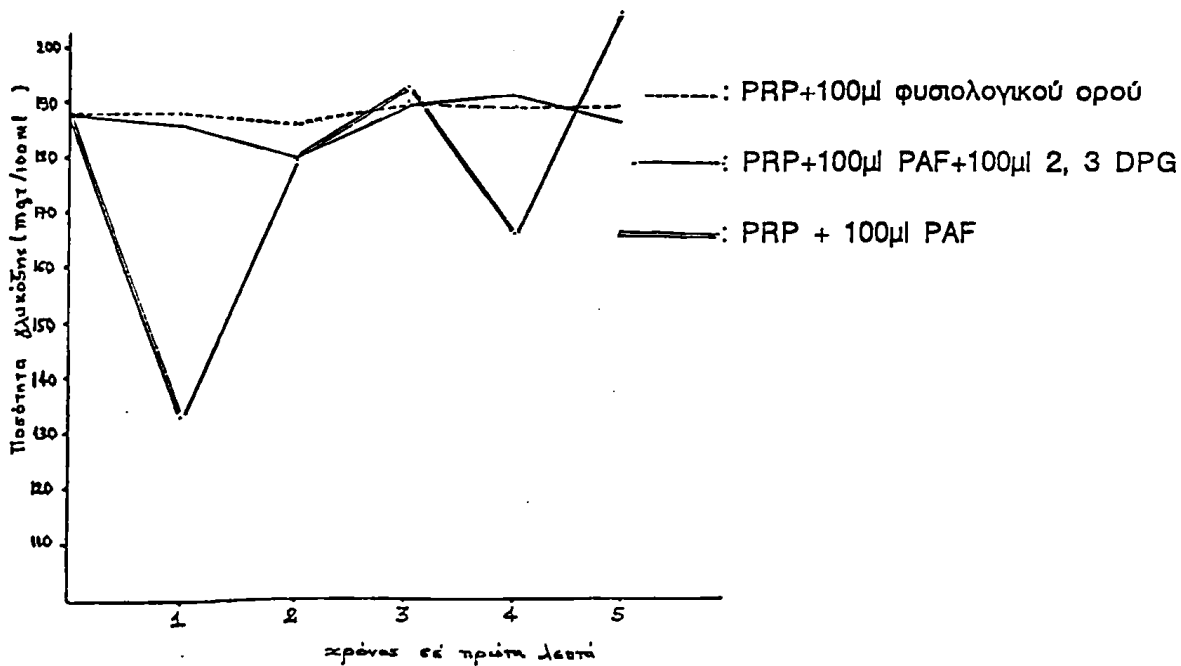


Εικόνα αρ. 2: Μεταβολές της περιεχόμενης γλυκόζης στο PRP όταν 1) τα αιμοπετάλια δεν δέχονται κανένα ερέθισμα και 2) όταν τους χορηγείται ποσότητα 200μl PAF συγκέντρωσης 10^{-6} mol.

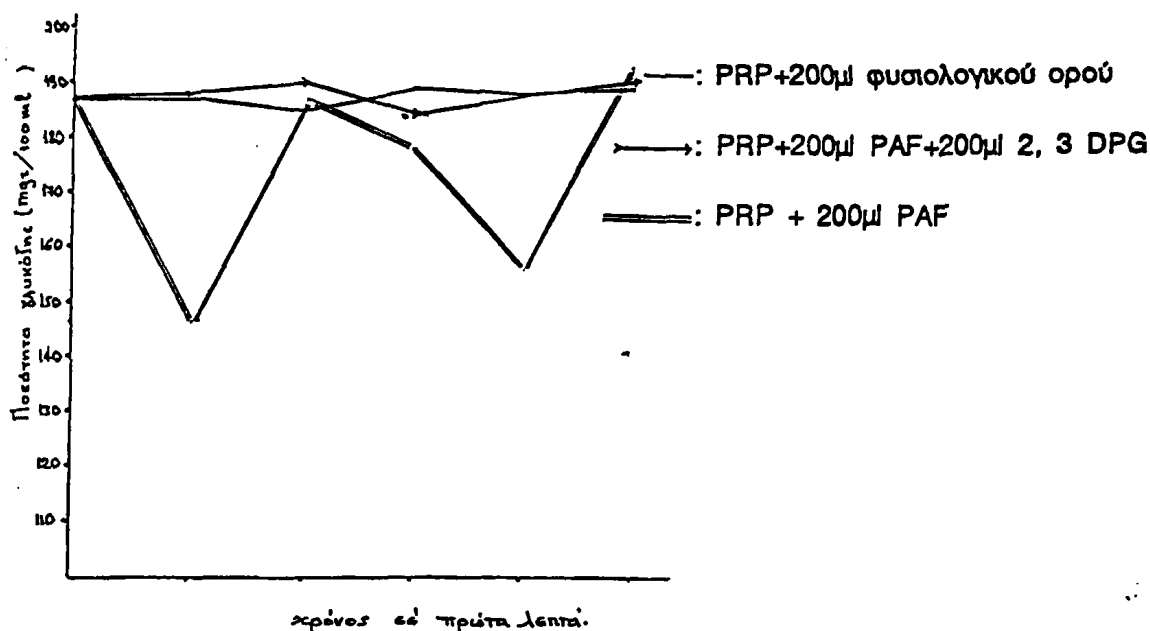




Εικόνα αρ. 3: Μεταβολές της περιεχόμενης γλυκόζης στο PRP 1) όταν αυτό δεν διεγείρεται από κανέναν αγωνιστή (χορήγηση 100µl φυσιολογικού ορού) και 2) όταν διεγείρεται από 300µl διαλύματος PAF συγκέντρωσης $10^{-6}M$.

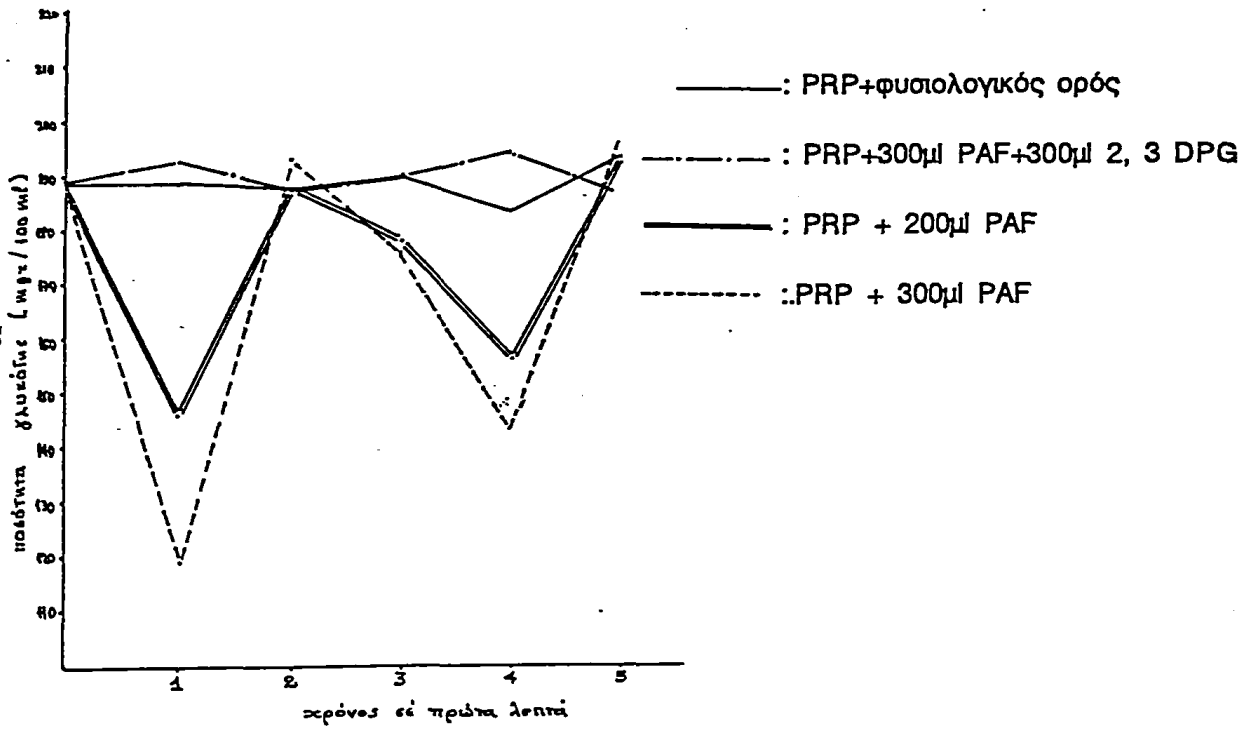


Εικόνα αρ. 4: Μεταβολές της περιεκτικότητας της ελεύθερης γλυκόζης στο PRP όταν 1) τα αιμοπετάλια δεν διεγείρονται από κανέναν αγωνιστή, 2) όταν διεγείρονται από 100µl PAF ($10^{-6}M$) και 3) όταν μαζί με τον PAF χορηγούνται και 100µl 2, 3 DPG ($5,9 \cdot 10^{-4}M$). Όπως φαίνεται το 2, 3 DPG σταθεροποιεί τα επίπεδα της γλυκόζης κοντά στα επίπεδα που το PRP εμφανίζει όταν δεν διεγείρεται από τον PAF.



Εικόνα αρ. 5: Μεταβολές των επιπέδων της ελεύθερης γλυκόζης στο PRP 1) όταν τα αιμοπετάλια δεν δέχονται καμιά διέγερση (200μl φυσιολογικού ορού), 2) όταν τα αιμοπετάλια δέχονται τη δράση 200μl PAF ($10^{-6}M$) και 3) όταν χορηγούνται στα αιμοπετάλια ταυτόχρονα 200μl PAF ($10^{-6}M$) και 200μl 2, 3 DPG ($5,9 \cdot 10^{-4}M$).

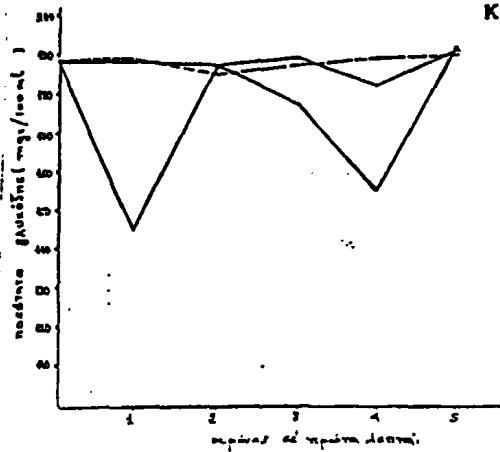
Στα διαγράμματα των εικόνων αρ. 1, 2, 3, 4, 5 φαίνεται ότι όταν το PRP διεγείρεται από διάφορες ποσότητες P.A.F., τότε τα επίπεδα της ελεύθερης γλυκόζης αρχίζουν και μεταβάλλονται συναρτήσει του χρόνου. Το φαινόμενο οφείλεται στο γεγονός ότι ο P.A.F. επιταχύνει τόσο τη γλυκογονόλυση του γλυκογόνου που περιέχεται στα αιμοπετάλια, όπως και την κατανάλωση της γλυκόζης για την παραγωγή ενέργειας υπό τη μορφή ATP. Το 2, 3 DPG όταν χορηγείται ταυτόχρονα με τον P.A.F. επιφέρει μια σταθεροποίηση των επιπέδων της γλυκόζης στο PRP πράγμα το οποίο ερμηνεύεται εξαιτίας του γεγονότος ότι το 2, 3 DPG αναστέλει την γλυκολυτική αλυσίδα. Πρέπει να σημειωθεί ότι τα αιμοπετάλια στερούνται του παρακυκλώματος Pappaport το οποίο είναι υπεύθυνο για την παραγωγή του 2, 3 DPG στα ερυθροκύτταρα του ανθρώπου και άλλων θηλαστικών. Η ανάλυση των φαινομένων αυτών γίνεται εκτενώς στη συζήτηση.



Εικόνα αρ. 6: Μεταβολές των επιπέδων της ελεύθερης γλυκόζης στο PRP όταν
 1) τα αιμοπετάλια δεν δέχονται κανένα ερέθισμα, 2) όταν τους χορηγείται
 ταυτόχρονα PAF και 2, 3 DPG και 3) όταν τους χορηγείται μόνον PAF.

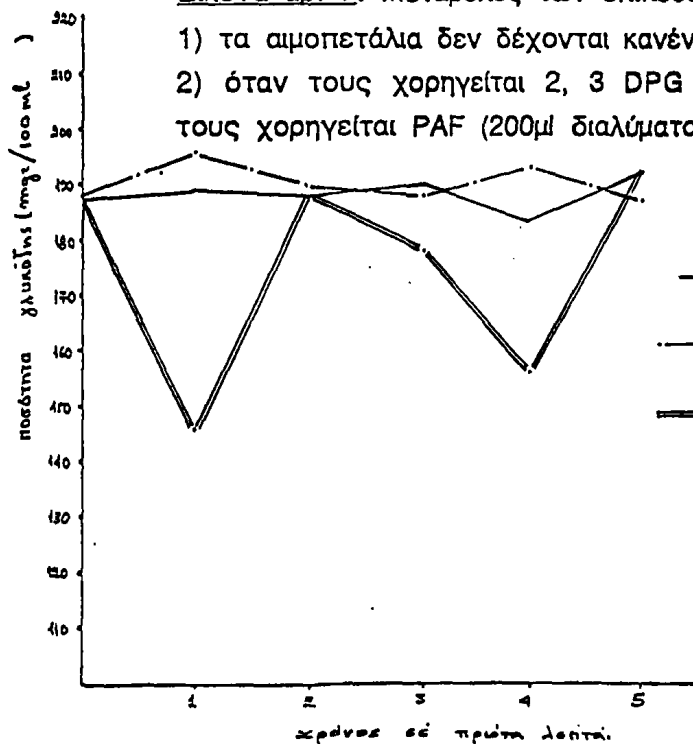
[PAF] = 10^{-6} M, [2, 3 DPG] = $5,9 \cdot 10^{-4}$ M.

Δεύτερη ομάδα πειραμάτων διέγερσης της γλυκόλυσης
και γλυκογονόλυσης από P.A.F.



— Μάρτυρες: PRP+100μl φυσιολογικού ορού
 - - - - Μάρτυρες: PRP+100μl 2, 3 DPG
 — Μάρτυρες: PRP+200μl PAF

Εικόνα αρ. 7: Μεταβολές των επιπέδων της ελεύθερης γλυκόζης στο PRP όταν
 1) τα αιμοπετάλια δεν δέχονται κανένα ερέθισμα (PRP+100μl φυσιολογικού ορού,
 2) όταν τους χορηγείται 2, 3 DPG (100μl διαλύματος $5,9 \cdot 10^{-4}M$) και 3) όταν
 τους χορηγείται PAF (200μl διαλύματος $10^{-6}M$).

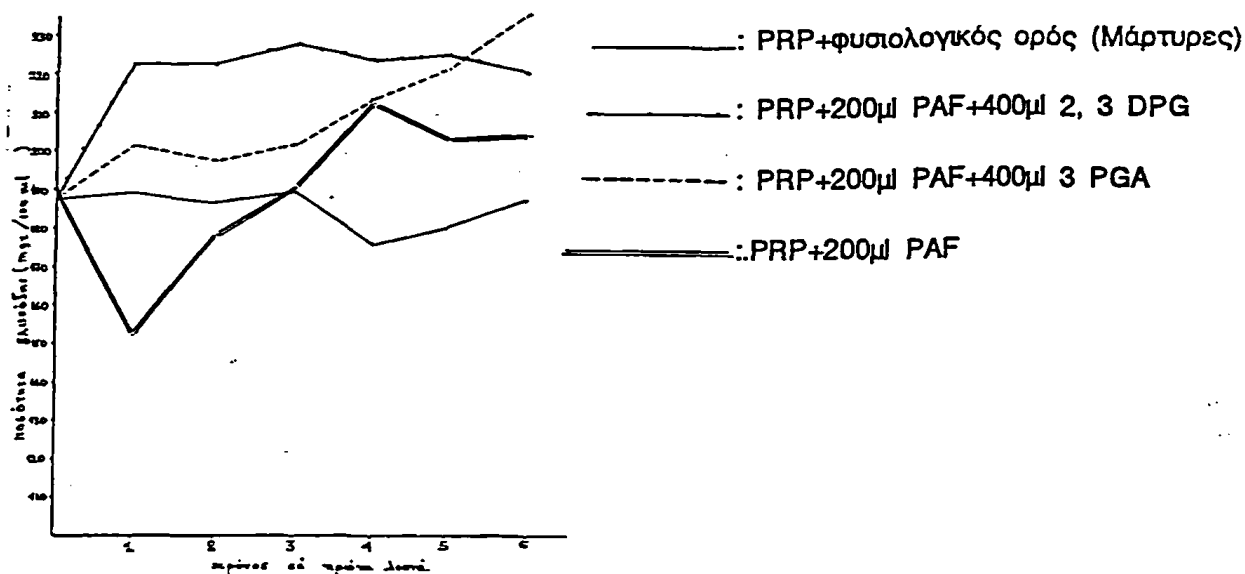


— Μάρτυρες: PRP+φυσιολογικός ορός
 - - - - : PRP+200μl PAF+200μl 2, 3 DPG
 — : PRP+200μl PAF

Εικόνα αρ. 8: Μεταβολές των επιπέδων της ελεύθερης γλυκόζης στο PRP όταν
 1) τα αιμοπετάλια δεν δέχονται κανένα ερέθισμα, 2) όταν τους χορηγούνται
 200μl PAF και 200μl 2, 3 DPG ταυτόχρονα και 3) όταν τους χορηγείται PAF
 (200μl διαλύματος $10^{-6}M$). Παρατηρείται ότι το 2, 3 DPG σταθεροποιεί τα
 επίπεδα της γλυκόζης ενώ ο PAF διεγείρει μια διαδικασία που τα μεταβάλλει
 συναρτήσει του χρόνου.

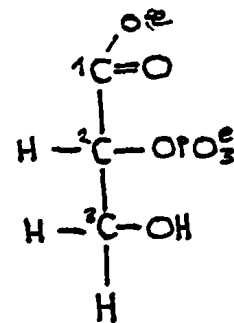
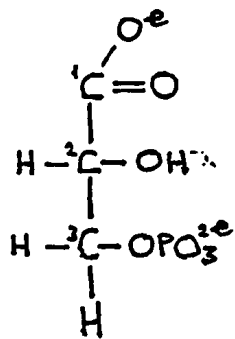
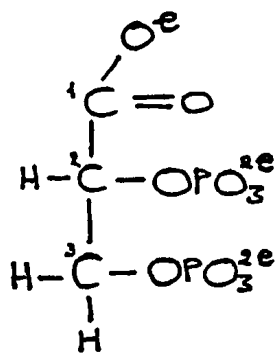


Τρίτη σειρά πειραμάτων διέγερσης της γλυκόλυσης
και γλυκογονόλυσης από P.A.F.



Εικόνα αρ. 9: Μεταβολή των επιπέδων της ελεύθερης γλυκόζης στο PRP όταν 1) τα αιμοπετάλια δεν δέχονται κανένα ερέθισμα, 2) όταν τα αιμοπετάλια δέχονται τη δράση 200μl PAF ($10^{-6}M$), 3) όταν τους χορηγείται ταυτόχρονα PAF (200μl διαλύματος $10^{-6}M$) και 2, 3 DPG (400μl διαλύματος $5,9 \cdot 10^{-4}M$) και 4) όταν τους χορηγείται ταυτόχρονα PAF (200μl διαλύματος) και 3 PGA (400μl διαλύματος $5,9 \cdot 10^{-4}M$).

Στην τρίτη σειρά πειραμάτων που εικονίζονται στο παραπάνω συλλογικό διάγραμμα παρατηρούνται τα εξής φαινόμενα: 1) ότι ο P.A.F. μεταβάλλει δραστηρικά τα επίπεδα της ελεύθερης γλυκόζης επιταχύνοντας την γλυκογονόλυση και την κατανάλωση του απελευθερούμενου ζακχάρου (όπως αναπτύσσεται και στη συζήτηση εκτενώς), 2) ότι το 2, 3 DPG και το 3 PGA επεμβαίνουν και σταθεροποιούν με μια ανοδική τάση τα επίπεδα της ελεύθερης γλυκόζης. Η ανοδική τάση των επιπέδων υποδεικνύει τα εξής: ότι οι δύο οργανοφωσφορικοί εστέρες δρουν πιθανόν διακόπτοντας τη γλυκόλυση, οπότε παρεμποδίζουν και την κατανάλωση της γλυκόζης η οποία κατ'αυτό τον τρόπο συσσωρεύεται και ότι τόσο το 2, 3 DPG, όσο και το 3 PGA δεν παρεμποδίζουν τη γλυκογονόλυση και τη διέγερσή της εκ μέρους του P.A.F. η οποία συνεχίζεται και οδηγεί στην άθροιση του μονοσακχαρίτη στο PRP.



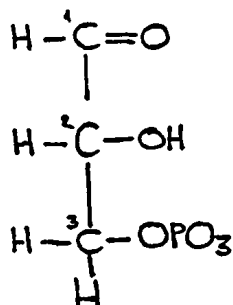
2, 3 Διφωσφογλυκερικό οξύ

3 Φωσφογλυκερικό οξύ

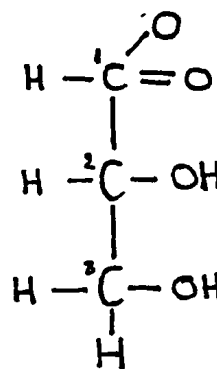
2 Φωσφογλυκερικό οξύ

(2, 3 DPG)

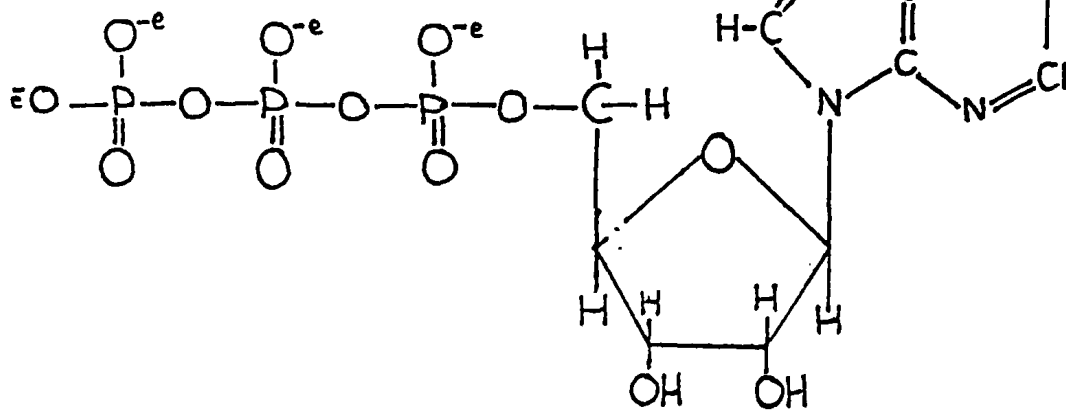
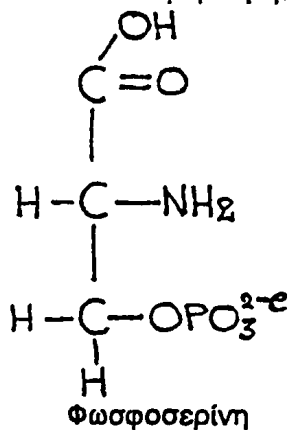
(3 PGA)



3 Φωσφορική γλυκεραλδεΐδη

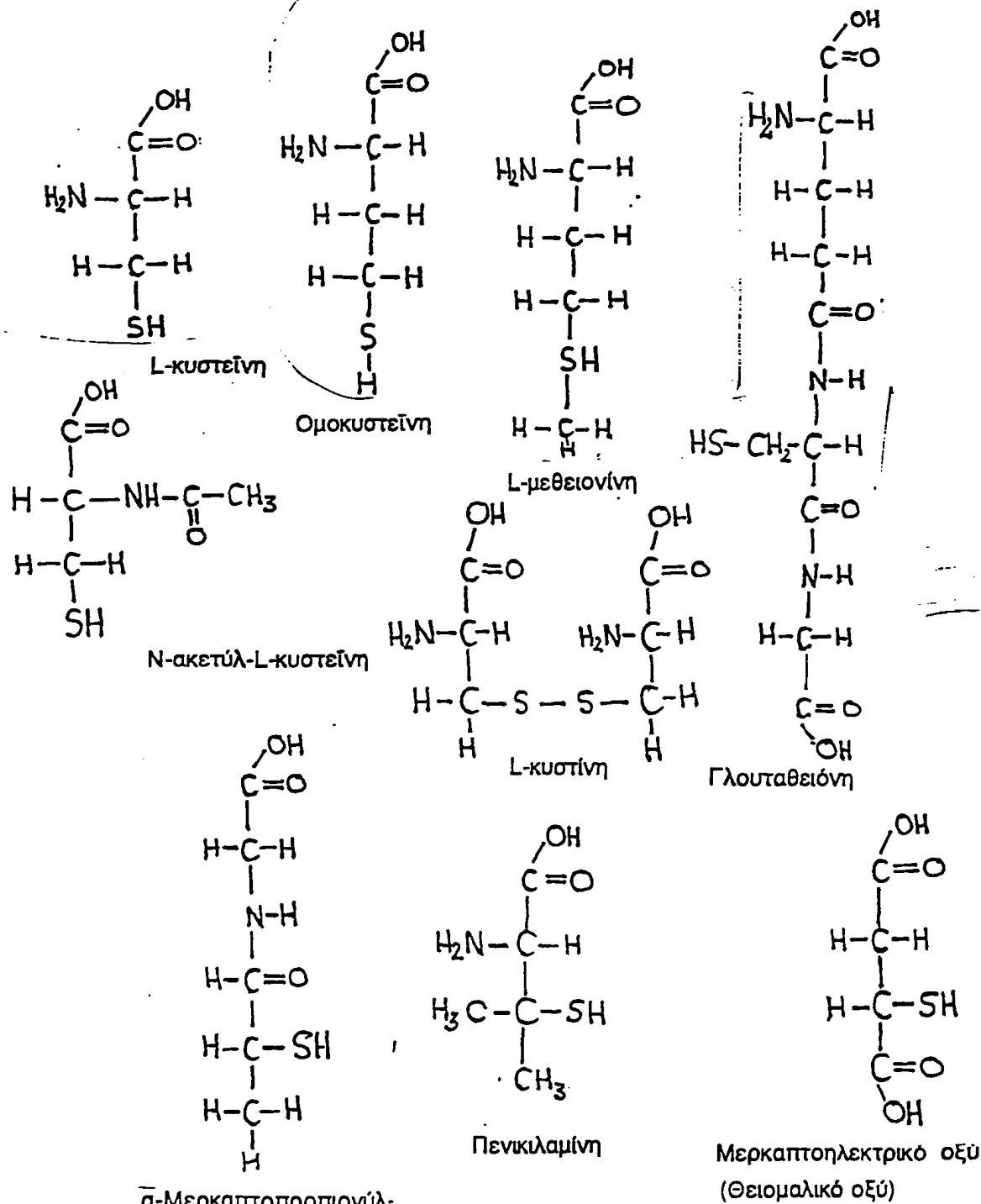


Γλυκερικό οξύ



Τριφωσφορική αδενοσίνη (ATP)

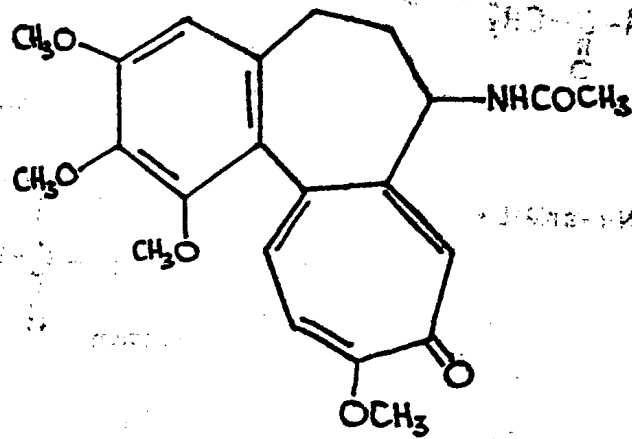
Εικόνα αρ. 10: Δομές των φωσφορικών ενώσεων που χρησιμοποιήθηκαν για την αναστολή του P.A.F. Όλες οι εικονιζόμενες ενώσεις, εκτός από το 2-Φωσφογλυκερικό οξύ, την 3-Φωσφορική αλδεΐδη και το Γλυκερικό οξύ, αναστέλουν τον P.A.F.



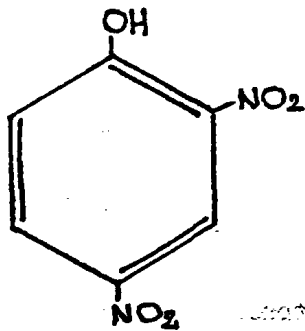
Εικόνα αρ. 11: Θειόλες που χρησιμοποιήθηκαν σαν αναστολείς της δράσης του P.A.F. Όλες οι εικονιζόμενες ουσίες, εκτός από την ομοκυστεΐνη και L-κυστεΐνη είναι ισχυροί αναστολείς της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων του κουνελιού και του ανθρώπου, όταν αυτά διαγείρονται από τον P.A.F.



Κυσταμίνη



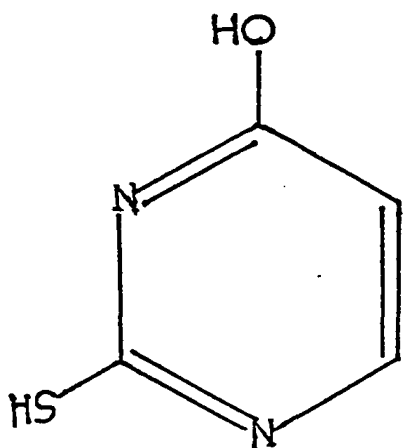
Κολχικίνη



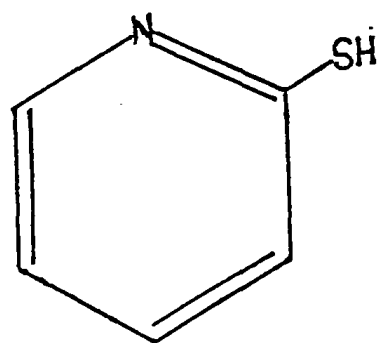
2, 4-δινιτροφαινόλη

Εικόνα αρ. 12: Τρεις ουσίες που χρησιμοποιήθηκαν για την αναστολή της δράσης του P.A.F. Η κυσταμίνη δεν έδειξε ανασταλτική δράση. Αντίθετα η δράση της κολχικίνης υπήρξε ταχεία και ισχυρή. Η 2, 4-δινιτροφαινόλη έδωσε αναστολή μόνο κατόπιν επώασης των αιμοπεταλίων μαζί της. Ο βαθμός της αναστολής υπήρξε ανάλογος του χρόνου επώασης.

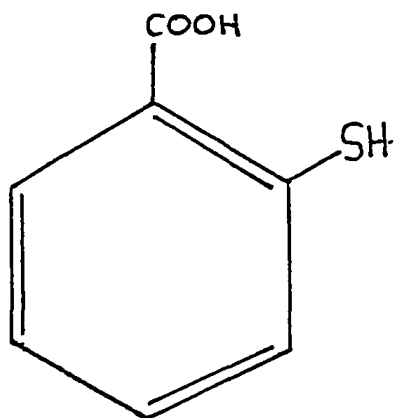




2-μερκαπτο-4-υδροξυπυριδίνη

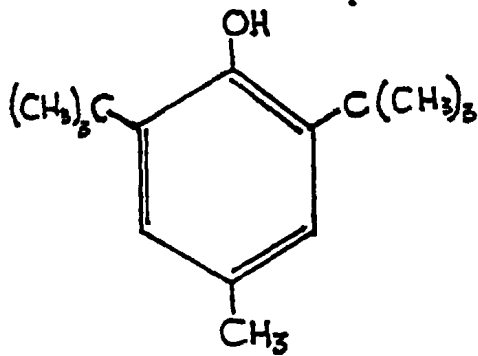


2-μερκαπτοπυριδίνη

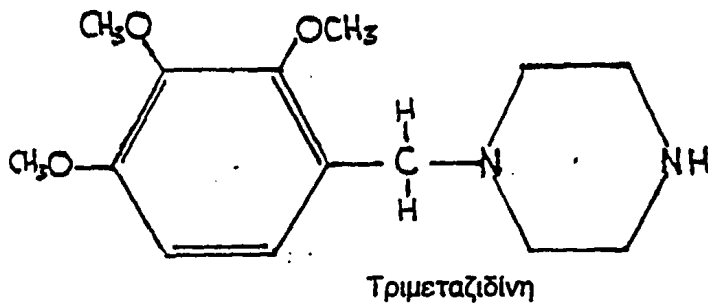


Θειοσαλικυλικό οξύ

Εικόνα αρ. 13: Και οι τρεις εικονιζόμενες ουσίες αναστέλουν ισχυρά τον P.A.F. στα πλυμένα αμποπετάλια του κουνελιού.



Βουτυλικό υδροξυταλουένιο (BHT)



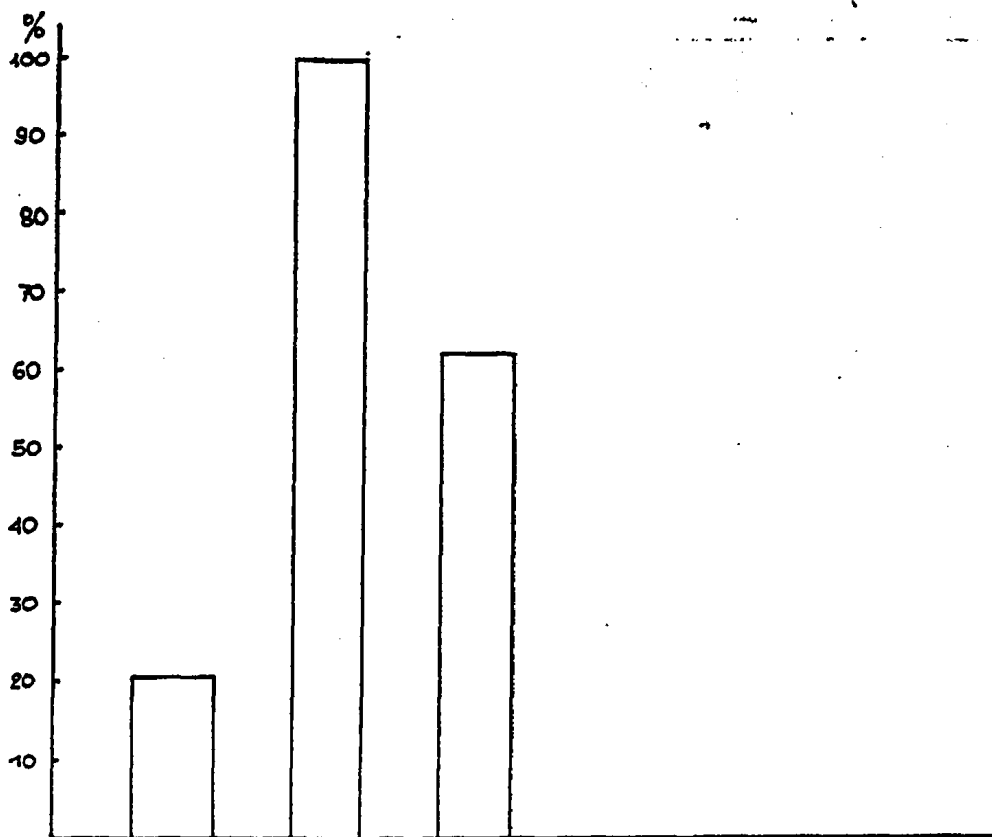
Εικόνα αρ. 14: Δύο ουσίες που χρησιμοποιήθηκαν για την αναστολή της συσσώρευσης των αμιοπεταλίων όταν αυτά διεγείρονται από τον P.A.F. Οι δύο ουσίες είναι δεσμευτές ελεύθερων ριζών. Το BHT χρησιμοποιείται σαν αντιοξειδωτικός παράγοντας, ενώ η Τριμεταζιδίνη χρησιμοποιείται ως δραστική ουσία του φαρμάκου "Vastarel" το οποίο προστατεύει τα κύτταρα από την καταστροφή που επιφέρουν οι ελεύθερες ρίζες που αναπτύσσονται κατά τη διάρκεια ισχαιμικών επεισοδίων.

Πειράματα κατανάλωσης
O₂

Έλεγχος	P.A.F.	P.A.F. + 2, 3 DPG
1,3	5	2
2,2	8	5,3
2,8	12,3	7,6
3,3	16,9	9,8
4,2	18,6	14,2
1,7	19,1	12,1
3,1	15,2	5,4
2,3	13,7	7,2
2,1	14,2	3,1
2,5	13,5	6,8

Πίνακας αρ. 1: Κατανάλωση οξυγόνου από αιμοπετάλια. Στήλη ελέγχου: Κατανάλωση από αιμοπετάλια απουσία διέγερσης και αναστολής. Στήλη P.A.F.: Κατανάλωση από αιμοπετάλια που διεγέρθησαν με P.A.F. Στήλη P.A.F. + 2, 3 DPG: Κατανάλωση από αιμοπετάλια στα οποία χορηγήθηκε ταυτόχρονα P.A.F. και 2, 3 DPG. Η μέτρηση αναφέρεται σε χρόνο διάρκειας ενός λεπτού για κάθε πείραμα.





Εικόνα αρ. 15: Εκατοστιαία ποσοστά κατανάλωσης οξυγόνου από πλυμμένα αιμοπετάλια κουνελιού.

1: Κατανάλωση οξυγόνου από PRP χωρίς την παρουσία αγωνιστών ή αναστολέων (μάρτυρες).

2: Κατανάλωση οξυγόνου από PRP με χορήγηση P.A.F.

3: Κατανάλωση οξυγόνου με ταυτόχρονη χορήγηση P.A.F. και 2, 3 DPG.

Από το ιστόγραμμα φαίνεται ότι το 2, 3 DPG μειώνει σημαντικά την κατανάλωση του οξυγόνου εκ μέρους των αιμοπεταλίων όταν αυτά διεγερθούν από τον P.A.F.

ΠΕΙΡΑΜΑΤΑ ΣΤΟ ΣΥΣΣΩΡΕΥΟΜΕΤΡΟ ΜΕ ΑΙΜΟΠΕΤΑΛΙΑ ΑΝΘΡΩΠΟΥ ΕΧ VIVO

1. ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΟΥΜΕΝΟΣ ΑΝΑΣΤΟΛΕΑΣ: 23DPG

Τα πειράματα αυτά έδειξαν ότι το 2.3 DPG είναι ισχυρός αναστολέας της συσσώρευσης των ανθρώπινων αιμοπεταλίων από τον PAF.

Πίνακας Α. Αναστολή 10μl PAF 10^{-6} Mol από 5μl 23 DPG $29 \cdot 10^{-4}$ Mol

35	38	39	36	37	33	37	35	37
38	37	40	39	38	35	37	36	37
32	36	35	35	38	38	38	39	40
39	33	37	34	39	37	35	35	39

Αναστολή σε εκατοστιαία ποσοστά της αιμοπεταλιακής συσσώρευσης της προκαλούμενης από 10μl PAF 10^{-6} μέσω 5μl 23 DPG $2,9 \cdot 10^{-4}$ M.

Πίνακας Β. Αναστολή 10μl PAF 10^{-6} από 8μl 23 DPG $2,9 \cdot 10^{-4}$ M.

78	79	74	77	80	78	77	76	80
80	77	75	78	77	81	75	78	77
75	78	78	75	77	80	74	78	74
81	75	78	79	78	78	78	77	78

Αναστολή σε εκατοστιαία ποσοστά της αιμοπεταλιακής συσσώρευσης της προκαλούμενης από 10μl PAF 10^{-6} μέσω 8μl 23 DPG $29 \cdot 10^{-4}$ M.



Πίνακας Γ. Αναστολή 10μl PAF 10⁻⁶ M από 10μl 23 DPG 29·10⁻⁴ M.

100	100	100	98	100	100	99	100
100	100	100	100	100	100	100	100
100	100	100	99	100	100	97	100
100	100	100	100	100	100	100	96

Πλήρης αναστολή της συσώρευσης αιμοπεταλίων ανθρώπου της προκαλούμενης από PAF μέσω 23 DPG.

2. ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΟΥΜΕΝΟΣ ΑΝΑΣΤΟΛΕΑΣ: GSH

Πίνακας Δ. Αναστολή 10μl PAF 10⁻⁶ από 5l GSH.

44	50	51	45	49	48	45	50
48	48	49	46	49	47	48	49
48	48	47	48	50	45	48	47
47	48	48	47	50	48	47	48

Αναστολή σε εκατοστιαία ποσοστά της αιμοπεταλιακής συσώρευσης της προκαλούμενης από 10μl PAF 10⁻⁶ μέσω 5μl GSH 2.9·10⁻⁴M.



Πίνακας Ε. Αναστολή 10μl PAF 10^{-6} M από 8λ GSH (αναχθείσα γλουταθειόνη).

90	87	89	90	87	88	87	87
91	86	90	93	87	89	87	86
88	87	87	88	87	90	84	89
88	88	89	86	87	86	88	88

Αναστολή σε εκατοστιαία ποσοστά της αιμοπεταλιακής συσσώρευσης της προκαλούμενης από 10μl PAF 10^{-6} M μέσω 8μl $2,9 \cdot 10^{-4}$ M GSH.

Πίνακας ΣΤ. Αναστολή 10μl PAF 10^{-6} M από 10μl GSH (αναχθείσα γλουταθειόνη).

100	100	100	100	100	100	100	100
100	100	100	98	100	100	100	100
100	100	100	100	100	100	97	100
100	98	100	100	100	100	100	100

Πλήρης αναστολή σε εκατοστιαία ποσοστά της αιμοπεταλιακής συσσώρευσης της προκαλούμενης από 10λ PAF 10^{-6} M μέσω 10λ GSH $2,9 \cdot 10^{-4}$ M.



ΚΕΦΑΛΑΙΟ VII

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Από τα δεδομένα της παρούσας εργασίας προέκυψε ότι υπάρχουν αρκετοί φυσιολογικοί αναστολείς της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων της ενεργούμενης από τον P.A.F. Οι αναστολείς αυτοί μπορεί αδρά να ταξινομηθούν σε δύο μεγάλες κατηγορίες όσον αφορά τα χαρακτηριστικά των μορίων τους:

1η κατηγορία:

Ουσίες που παρουσιάζουν φωσφορικές ρίζες και γλυκερινικό σκελετό. Οι ουσίες αυτές είναι το 2, 3 Διφωσφογλυκερικό οξύ, όπως επίσης και το 3-φωσφογλυκερικό οξύ (2, 3 DPG και 3-PGA αντιστοίχως).

2η κατηγορία:

Ουσίες που μπορεί να χαρακτηριστούν σαν θειόλες. Μέσα στην κατηγορία αυτή υπάγονται η αναχθείσα γλουταθειόνη (GSH), η L-κυστεΐνη, η L-κυστίνη, η L-μεθειονίνη οι οποίες απαντώνται φυσιολογικά στον οργανισμό συμμετέχοντας στις δομές και στις λειτουργίες του όπως ακριβώς και οι φωσφορυλιωμένες γλυκερινικές ενώσεις της 1ης κατηγορίας.

Συνεπώς, όλες οι εν λόγω ουσίες μπορούν να θεωρηθούν δίχως άλλο σαν ενδογενείς φυσιολογικοί αναστολείς εφόσον είναι συστατικά των κυττάρων και των υγρών του οργανισμού που προκύπτουν από την ίδια τη φύση του κι όχι από μια εξωγενή φαρμακολογική χορήγηση. Υπάρχουν επίσης και εξωγενείς, συνθετικές ουσίες όπως η D-κυστεΐνη, η μερκαπτοπροπιονυλγλυκίνη (MDG) ή θειόλα, το μερκαπτοσουκινικό ή θειομαλικό οξύ κ.ά., οι οποίες ασκούν επίσης ανασταλτική δράση σε διάφορους αγωνιστές της αιμοπεταλιακής συσσώρευσης συμπεριλαμβανομένου και του P.A.F. Οι συντακτικοί τύποι των προαναφερθεισών ενώσεων εικονίζονται στη εικόνα αρ. όπως επίσης και τα κοινά τμήματα των μορίων τους.



Όσον αφορά το 2, 3 DPG και τα ανάλογά του έχουμε να παρατηρήσουμε τα εξής: Το 2, 3 DPG όπως και το 3-PGA είναι ισχυροί αναστολείς της ενεργούμενης από τον P.A.F. αιμοπεταλιακής συσσώρευσης. Δεν υπάρχει στη διεθνή βιβλιογραφία καμιά εργασία που να αναφέρει τη δράση του DPG έναντι του συγκεκριμένου παράγοντα ενεργοποίησης της συσσωρευτικής διαδικασίας των κυττάρων αυτών. Αντίθετα υπάρχει πολύ περιορισμένος αριθμός εργασιών οι οποίες έγιναν μεταξύ του 1975 και του 1986 από δύο ομάδες ερευνητών οι οποίες δρούσαν ανεξάρτητα η μία από την άλλη και οι οποίες αναφέρουν ότι το 2, 3 DPG μπορεί να αναστείλει την αιμοπεταλιακή συσσώρευση την ενεργούμενη από το ADP, την επινεφρίνη, την νορ-επινεφρίνη, το κολλαγόνο και τη θρομβίνη (143, 142). Σε τρεις από τις εργασίες αυτές υπάρχει μια ορισμένη αντίφαση σχετικά με το ρόλο του 2, 3 DPG ο οποίος κάτω από συγκεκριμένες πειραματικές συνθήκες είναι ανεπιθύλακτα ρόλος αναστολέα της συσσώρευσης, ενώ όταν οι πειραματικές συνθήκες μεταβληθούν συγκεκριμένα, τότε είναι ρόλος διεγέρτη της αιμοπεταλιακής συσσώρευσης (143). Ωστόσο δεν αποκλείεται οι παρατηρηθείσες αντιθετικές δράσεις να οφείλονται σε καθαρά τεχνητές συνθήκες που δεν απαντώνται ουσιαστικά στον οργανισμό κατά την εκτύλιξη των διαδικασιών ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων. Επιπλέον στις εργασίες αυτές η αναστολή των προαναφερθέντων αγωνιστών από το 2, 3 DPG είναι μικρή ή ελλιπής, με την έννοια ότι εμφανίζεται σαν καθυστέρηση του 2ου κύματος συσσώρευσης και ποτέ πλήρης. Στη δική μας περίπτωση είδαμε ότι το 2, 3 DPG ασκεί πλήρη αναστολή στην ενεργούμενη από τον P.A.F. συσσώρευση ακόμη και όταν η πιθέμενη ποσότητα του P.A.F. είναι πέραν εκείνης που προκαλεί τη μέγιστη δυνατή συσσώρευση στο συγκεκριμένο πειραματικό μοντέλο, δηλαδή στα αιμοπετάλια του κουνελιού και στα αιμοπετάλια του ανθρώπου. Χρησιμοποιώντας ADP και αραχιδονικό οξύ ως αγωνιστές είδαμε επίσης ότι το 2, 3 DPG δεν αναστέλει το αραχιδονικό οξύ και δεν ασκεί δράση καθυστέρησης του 2ου κύματος συσσώρευσης, ενώ αναστέλει με σαφήνεια τη συσσώρευση από το ADP. Επιπλέον είδαμε ότι το 2, 3 Διφωσφογλυκερικό οξύ στην περίπτωση του P.A.F. δρα και ανεξάρτητα από το χρόνο έναρξης της συσσώρευσης όπως φαίνεται και από την παρατιθέμενη καταγραφή της εικόνας στη σελίδα . Η δράση αυτή δεν παρατηρείται με το ADP πράγμα το οποίο σημαίνει ότι ο εν λόγω γλυκερικός φωσφορικός εστέρας εμφανίζει κάποια εκλεκτικότητα που είναι εντονότερη για τον P.A.F. και μικρότερη για το ADP. Στις περιπτώσεις του αραχιδονικού οξέος βρήκαμε ότι το 2, 3 DPG δεν ασκεί κάποια ανασταλτική δράση τόσο σε μικρές, όσο και σε μεγάλες συγκεντρώσεις αγωνιστή και κατά συνέπεια δεν είναι αναστολέας της αιμοπεταλιακής συσσώρευσης, εν αντιθέσει με τα δεδομένα της



βιβλιογραφίας (143, 142). Θάπρεπε επιπλέον να υπογραμμισθεί ότι στα πειράματα της παρούσας εργασίας το 2, 3 DPG χρησιμοποιήθηκε σε συγκεντρώσεις που κυμαινόταν από τιμές μικρότερες των φυσιολογικά απαντώμενων στο ολικό αίμα, μέχρι τιμές που υπέρβαιναν τις φυσιολογικά απαντώμενες. Σ'όλες τις τιμές αυτές υπήρξε ανασταλτική δράση η οποία ήταν ανάλογη της χρησιμοποιούμενης συγκέντρωσης του 2, 3 DPG. Η EC_{50} του DPG κυμάνθηκε μέσα στις φυσιολογικές τιμές του 2, 3 DPG στο ολικό αίμα και βρίσκεται γύρω στα $2,4 \cdot 10^{-4} M$ (φυσιολογικές τιμές του 2, 3 DPG: $1,69-2,5 \cdot 10^{-3} M$). Όσον αφορά το 3-PGA που είναι δομικά ανάλογο του 2, 3 DPG παρατηρήθηκε ότι κι αυτό εμφανίζει εντελώς ανάλογη δράση και αναστέλει στις ίδιες περίπου συγκεντρώσεις με το 2, 3 DPG τον παράγοντα ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων. Είναι σκόπιμο να σημειωθεί ότι η ποσότητα του 2, 3 DPG στο ερυθροκύτταρο είναι κατ'αρχάς πολύ μεγαλύτερη από τις αντίστοιχες ποσότητες των υπολοίπων οργανοφωσφορικών ενώσεων συμπεριλαμβανομένου του ATP και του 3-PGA. Πιο συγκεκριμένα, η τελευταία ουσία, ανευρίσκεται σε πολύ μικρότερα ποσά εν συγκρίσει με το 2, 3 DPG αλλά σε περίπτωση αιμόλυσης το 2, 3 DPG, που μπορεί να υπάρξει ελεύθερο στο αιματικό πλάσμα επό 10λεπτο, μεταβάλεται σε 3-PGA οπότε η ανασταλτική στην αιμοπεταλιακή συσσώρευση δράση δεν χάνεται και εξακολουθεί να υπάρχει μέσω του 3-PGA, το οποίο κατόπιν μετατρέπεται σε 2-φωσφογλυκερικό οξύ που εμφανίζεται αδιάφορο απέναντι στη δράση του P.A.F. (83). Εφ'όσον, από τα προαναφερθέντα έχει δειχθεί ότι τόσο το 2, 3 DPG όσο και το 3-PGA είναι αναστολείς της αιμοπεταλιακής συσσώρευσης που εμφανίζουν κάποια εξειδίκευση έναντι του παράγοντα ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων, αναζητήθηκε η ερμηνεία της δράσης αυτής. Κατ'αρχάς προσεγγίσαμε το ζήτημα αυτό από την πλευρά της δομής του P.A.F. και των αναστολέων του. Ο P.A.F. είναι ένα γλυκεριναιθερικό λιποειδές και εμφανίζει σαν κοινό χαρακτηριστικό τόσο με το 2, 3 DPG όσο και με το 3-φωσφογλυκερικό οξύ την ύπαρξη του γλυκερινικού σκελετού. Μεταξύ τους το 2, 3 DPG και το 3-PGA έχουν σαν κοινά τα εξής χαρακτηριστικά της δομής τους: 1) Εμφανίζουν γλυκερινικό σκελετό, 2) Έχουν μία φωσφορική ρίζα στη θέση 3 του σκελετού τους και 3) Έχουν μια καρβοξυλική ομάδα στη θέση 1 του σκελετού. Συγκρίνοντας τα μόρια αυτά με άλλα μόρια ανάλογης δομής που όμως στερούνται ανασταλτικής δράσης έναντι του P.A.F. στην αιμοπεταλιακή συσσώρευση, εξάγεται το συμπέρασμα ότι τα μοριακά χαρακτηριστικά τα οποία ευθύνονται πιθανόν για την ανασταλτική δράση, είναι η ύπαρξη του γλυκερινικού σκελετού, η ύπαρξη στη θέση 3 της φωσφορικής ομάδας και στη θέση 1 της καρβοξυλικής ομάδας. Πράγματι, το 2-φωσφογλυκερικό οξύ εμφανίζει μια φωσφορική ομάδα στη θέση 2 και μια



καρβοξυλική ομάδα στη θέση 1 όπως επίσης και το γλυκερινικό σκελετό, αλλά δεν παρουσιάζει καμιά δράση αναστολής της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων της ενεργούμενης από τον P.A.F. Άρα η ύπαρξη της φωσφορικής ομάδας στη δεύτερη θέση δεν φαίνεται να είναι σημαντική για την πρόκληση της αναστολής. Ακόμη, η 3-φωσφορική γλυκερόλη που διαθέτει μόνο μια φωσφορική ρίζα στην τρίτη θέση αλλά δεν διαθέτει καρβοξυλική ομάδα, εμφανίζεται αδιάφορη έναντι της δράσης του P.A.F. Την ίδια αδράνεια παρουσιάζει και το γλυκερικό οξύ που εμφανίζει μόνο την καρβοξυλική ομάδα στη θέση 1 αλλά δεν διαθέτει καμιά φωσφορική ρίζα (εικόνα 10, σελίδα 168).

Οι δομικές λοιπόν αναλογίες μεταξύ 2, 3 DPG και 3-PGA φαίνεται πως συνηγορούν υπέρ μιας δομικής ερμηνείας της ανασταλτικής τους ικανότητας. Είναι λογικό να υποθέσει κανείς ότι οι δύο αυτές ουσίες μπορεί να καταλάβουν τους υποδοχείς του P.A.F. πάνω στην εξωτερική πλευρά της πλασματικής αιμοπεταλιακής μεμβράνης εμποδίζοντάς τον να ασκήσει την διεγερτική του δράση. Η υπόθεση αυτή είναι μεν πολύ θελκτική αλλά προσκρούει ωστόσο σε μερικά δεδομένα που δεν είναι δυνατόν να υποτιμηθούν. Τα δεδομένα αυτά είναι τα εξής:

1) Το 2, 3 DPG και το 3-PGA βάσει της υπάρχουσας βιβλιογραφίας αναστέλλουν την αιμοπεταλιακή συσσώρευση την προκαλούμενη από ADP, επινεφρίνη, νόρ-επινεφρίνη, κολλαγόνο και θρομβίνη, πράγμα που σημαίνει ότι οι αγωνιστές αυτοί θάπρεπε νάχουν κοινούς υποδοχείς τόσο μεταξύ τους όσο και με τον P.A.F. Αυτό όμως δεν είναι δυνατόν να συμβαίνει δοθέντος ότι έχει επαρκώς δειχθεί ότι οι υποδοχείς των αγωνιστών αυτών είναι διαφορετικοί (153).

2) Τα δικά μας πειράματα έδειξαν ότι το 2, 3 DPG και το 3-PGA μπορούν να αναστείλουν την αιμοπεταλιακή συσσώρευση την ενεργούμενη από P.A.F. και ανεξάρτητα από τον χρόνο "εκκίνησης" της αντίδρασης των αιμοπεταλίων. Δηλαδή, σε μια σειρά πειραμάτων ενεργοποιήσαμε τα αιμοπετάλια με P.A.F., αφήσαμε τη συσσώρευση να προχωρήσει μέχρι διάφορα σημεία και κατόπιν χορηγήσαμε το 2, 3 DPG το οποίο και πάλι λειτούργησε ανασταλτικά αποσυσσωρεύοντας μάλιστα τα αιμοπετάλια. Στα πειράματα αυτά η ποσότητα του P.A.F. ήταν, κατ'αρχάς τόση, ώστε να δίνει τη μέγιστη δυνατή αιμοπεταλιακή ανταπόκριση, και εν συνεχεία πολλαπλάσια πράγμα που σημαίνει ότι όλοι οι μεμβρανικοί υποδοχείς του P.A.F. ήταν καταλλεμένοι από τον αγωνιστή οπότε δεν υπήρχαν ελεύθερες θέσεις για να καταληφθούν από τους χορηγούμενους αναστολείς. Είναι λογικό να υποθέσει κανείς ότι όταν όλος ο αριθμός των



υποδοχέων, που είναι εξειδικευμένοι για έναν αγωνιστή, καταληφθούν από αυτόν, τότε αναγκαστικά το κύτταρο θα δώσει μια αντίδραση μεγίστη που θα έχει τον χαρακτήρα του "όλα ή τίποτα", οπότε ένα άλλο μόριο που διεκδικεί τον ίδιο ακριβώς υποδοχέα δεν είναι δυνατόν πλέον να ασκήσει τη δράση του εφόσον δεν έχει προσβάσεις στο ενεργοποιητικό σύστημα.

Άρα, στη συγκεκριμένη περίπτωση, είναι λογικό να περιμένουμε ότι τα αιμοπετάλια εφόσον διεγέρθησαν στο μέγιστο βαθμό έπρεπε να περατώσουν τη συσώρευσή τους και να παραμείνουν "αδιάφορα" στη δράση των αναστολέων. Το γεγονός ότι δεν αντέδρασαν έτσι αλλά εμφάνισαν αναστολή της συσώρευσης ακολουθούμενη από αποσυσώρευση δεν μπορεί να σημαίνει παρά δύο πράγματα:

1) Ή ο P.A.F. και τα 2, 3 DPG, 3-PGA έχουν διαφορετικούς υποδοχείς επί της αιμοπεταλιακής πλασματικής μεμβράνης ή

2) Το 2, 3 DPG και το 3-PGA ενεργούν σε κάποιο άλλο επίπεδο του κυτταρικού σώματος του αιμοπεταλίου παρακάμπτοντας μια τυπική δράση μέσω κάποιου εξειδικευμένου υποδοχέα. Η πρώτη υπόθεση δεν είναι προφανώς απορριπτή, ωστόσο θα περίμενε κανείς ότι ένας υποδοχέας εξειδικευμένος για τη δέσμευση του 2, 3 DPG και του 3-PGA θα μπορούσε να συνδέσει, έστω και με κάποια χαλαρότητα μόρια, όπως το 2-PGA, την 3-φωσφογλυκερόλη, την 3-φωσφορική δενδροξυμακετόνη ή το γλυκερικό οξύ, τα οποία έχουν διαστάσεις και στερεοδιάταξη αρκετά συγγενείς με τις αντίστοιχες των 2, 3 DPG και 3-PGA, επιτρέποντάς τους να ασκήσουν έτσι κάποια μικρή ανασταλτική δράση επί της αιμοπεταλιακής συσώρευσης. Δεδομένου ότι το φαινόμενο αυτό δεν συμβαίνει, καταλήγει κανείς στο συμπέρασμα, ότι ο υποτιθέμενος υποδοχέας των εν λόγω αναστολέων πρέπει να είναι πάρα πολύ εξειδικευμένος ώστε να εμφανίζει απόλυτη εκλεκτικότητα για τα δύο αυτά συγκεκριμένα μόρια.

Από την υπάρχουσα βιβλιογραφία γνωρίζουμε ότι το 2, 3 DPG βρίσκεται σε μεγάλες ποσότητες μέσα στα ερυθροκύτταρα και ο ρόλος του είναι η ρύθμιση της χημικής συγγένειας της αιμοσφαιρίνης με το O_2 . Το 2, 3 DPG σχηματίζει αλατικούς δεσμούς με την αιμοσφαιρίνη και μεταβάλλοντάς την τη στερεοδιάταξή της δυσχεραίνει αφ'ενός την πρόσδεση της αίμης της με το μόριο του O_2 και αφ'ετέρου διευκολύνει την απελευθέρωση του ήδη συνδεδεμένου. Συνεπώς, δεδομένου ότι ο οργανισμός χρησιμοποιεί πολύ συχνά τα ίδια μέσα για να εξυπηρετήσει διαφορετικές λειτουργίες (336) είναι λογικό να σκεφθεί κανείς ότι ο



υποτιθέμενος υποδοχέας του 2, 3 DPG στο αιμοπετάλιο θάπρεπε να είναι μια αμικρή πρωτεΐνη η οποία να εμφανίζει μεγάλες δομικές αναλογίες με την αιμοσφαιρίνη. Από την υπάρχουσα βιβλιογραφία οι πρωτεΐνες που λειτουργούν σαν υποδοχείς διαφόρων αγωνιστών στην αιμοπεταλιακή πλασματική μεμβράνη είναι ως επί το πλείστον γλυκοπρωτεΐνες, ενώ δεν αναφέρεται η ύπαρξη αιμοπρωτεϊνών με τέτοιο ρόλο (83). Από την άλλη μεριά γνωρίζουμε ότι η αιμοσφαιρίνη μπορεί να συνδεθεί αποκλειστικά με το 2, 3 DPG ενώ παραμένει αδιάφορη απέναντι στο 3-PGA. Φυσικά τα δεδομένα αυτά δεν είναι απορριπτικά για την ύπαρξη ενός κοινού υποδοχέα του 2, 3 DPG και του 3-PGA, ωστόσο όμως περιορίζουν κάπως την αληθοφάνεια της υπόθεσης αυτής.

Όσον αφορά τη δεύτερη υπόθεση, δηλαδή εκείνη που θεωρεί ότι οι δύο αυτοί αναστολείς πιθανόν να ενεργούν σε κάποιο άλλο επίπεδο του κυτταρικού σώματος του αιμοπεταλίου που βρίσκεται πέραν της μεμβράνης, δηλαδή στο εσωτερικό του, υπάρχουν κάποια δεδομένα τα οποία θα μπορούσαν να συνηγορήσουν υπέρ της εκδοχής αυτής. Τα εν λόγω δεδομένα είναι τα εξής:

1) Τα αιμοπετάλια περιλαμβάνουν ένα σύστημα καναλιών ανοιχτής επικοινωνίας με το αιματικό πλάσμα (δες στο γενικό μέρος σελ. 22) το οποίο τους επιτρέπει να προσλαμβάνουν εν δυνάμει πολλά εξωγενή μόρια και συνεπώς τόσο το 2, 3 DPG, όσο και το 3-PGA.

2) Τα αιμοπετάλια παρά το γεγονός πως διαθέτουν γλυκολυτική αλυσίδα εν τούτοις δεν είναι εφοδιασμένα με το παρακύκλωμα του Rapoport το οποίο είναι υπεύθυνο για την παραγωγή του 2, 3 DPG, όπως αντίθετα συμβαίνει στα ερυθρά αιμοσφαίρια, και συνεπώς δεν είναι ικανά να παράγουν 2, 3 DPG πράγμα που σημαίνει ότι η παρουσία του μεταβολίτη αυτού στο εσωτερικό του αιμοπεταλιακού κυττάρου δεν είναι σκόπιμη, πιθανόν για συγκεκριμένους λειτουργικούς λόγους (86, 143, 144).

3) Το 2, 3 DPG όπως επίσης και το 3-PGA δεν απαντώνται ελεύθερα στο αιματικό πλάσμα. Η φυσική τους θέση στο σώμα βρίσκεται στο εσωτερικό των ερυθροκυττάρων και έχει αποδειχθεί ότι δεν είναι δυνατόν να περάσουν μέσα από τις πλασματικές μεμβράνες των ερυθρών όταν αυτές βρίσκονται σε φυσιολογική κατάσταση και είναι αέριες. Οι δύο αυτοί οργανοφωσφορικοί εστέρες μπορούν να αποδεσμευτούν μόνον όταν τα ερυθροκύτταρα διαρραγούν πράγμα το οποίο συμβαίνει φυσιολογικά μέσα στα συραγγώδη τριχοειδή του



σπλήνα αλλά και στη μάζα των διαφόρων θρόμβων. Η διάρκεια ζωής του 2, 3 DPG στο αιματικό πλάσμα κυμαίνεται γύρω στα 10 λεπτά (143, 142).

Συνεπώς, από τα προαναφερθέντα φαίνεται ότι η φύση έχει "προνοήσει" ώστε να κρατά το 2, 3 DPG και το 3-PGA μακριά από τα αιμοπετάλια και να τα αποδεσμεύει μόνο στην περίπτωση της αιμόλυσης και της θρόμβωσης. Αν λοιπόν οι δύο αυτοί αναστολείς της αιμοπεταλιακής συσσώρευσης δρουν εισερχόμενοι στο εσωτερικό του αιμοπεταλιακού κυττάρου μέσω του ανοιχτού σωληναριακού δικτύου, τότε δεν αποκλείεται η δράση τους να διαμεσολαβείται μέσω της αναστολής ενός κρίσιμου ενζυματικού συστήματος. Σε δημοσίευση μιας ερευνητικής ομάδας (142, 143) προτείνεται η υπόθεση ότι το 2, 3 DPG ασκεί την ανασταλτική δράση του πιθανόν μέσω της αναστολής κάποιας ενδοαιμοπεταλιακής αιμοπρωτεΐνης ή μέσω της αλληλεπίδρασης με την παραγωγή προσταγλανδινών ικανών να αναστείλλουν την ανταπόκριση των αιμοπεταλίων στους διάφορους αγωνιστές. Είναι ακόμη γνωστό ότι η κυκλοξυγεννάση και η θρομβοξάνη συνθετάση που αποτελούν δύο σπουδαία ένζυμα της οδού του αραχιδονικού οξέος, απαραίτητα για τις αντιδράσεις έκλυσης και συσσώρευσης των αιμοπεταλίων είναι αιμοπρωτεΐνες (142, 143). Συνεπώς δεν θα φαινόταν καθόλου περίεργο το 2, 3 DPG να ασκούσε την παρατηρούμενη αναστολή αγωνιστών που "πυροδοτούν" την αραχιδονική οδό, αναστέλλοντας το ένα ή το άλλο ή και τα δύο αυτά ένζυμα με έναν μηχανισμό ανάλογο με τη μείωση της χημικής συγγένειας της αιμοσφαιρίνης προς το μοριακό οξυγόνο. Ωστόσο στην ερμηνεία αυτή αντίκεινται τρία πειραματικά δεδομένα που δεν μπορεί να υποτημηθούν:

1) Σε όλα τα πειράματα αναστολής της αιμοπεταλιακής συσσώρευσης της ενεργούμενης από τον P.A.F., τα χρησιμοποιηθέντα αιμοπετάλια είχαν ασπιρινιστεί οπότε η "διακλάδωση" του δρόμου του αραχιδονικού οξέος που περνά από το ένζυμο της κυκλοξυγεννάσης είχε διακοπεί εφ'όσον η ασπιρίνη προκαλεί ακετυλίωση του εν λόγω ενζύμου με αποτέλεσμα τη λειτουργική του αχρηστοποίηση (207).

2) Στην υπάρχουσα βιβλιογραφία αναφέρεται ότι το 2, 3 DPG είναι δυνατόν να προκαλέσει ενίσχυση της παραγωγής της θρομβοξάνης A_2 όταν χορηγείται σε αιμοπετάλια ανθρώπου ταυτόχρονα με πολύ μικρές ποσότητες αραχιδονικού νατρίου ανίκανες να προκαλέσουν συσσώρευση από μόνες τους (142, 143). Επιπλέον στα δικά μας πειράματα είδαμε ότι τα μη ασπιρινισμένα αιμοπετάλια που διεγείρονται μέσω χορήγησης αραχιδονικού οξέος δεν αναστέλλονται από το 2,



3 DPG και το 3-PGA. Οι αναφορές άλλων ερευνητών (142, 143) τονίζουν ότι το 2, 3 DPG ενεργεί αναστολή της δράσης αγωνιστών όπως το ADP, το κολλαγόνο, η επινεφρίνη και η νόρ-επινεφρίνη. Αν εξαιρέσουμε τις δύο κατεχολαμίνες και το ADP, το κολλαγόνο θεωρείται ότι δρα μέσω του δρόμου του αραχιδονικού οξέος πράγμα που έρχεται σε αντίθεση με τα προαναφερθέντα πειραματικά δεδομένα, εκτός κι αν ο αγωνιστής αυτός - το κολλαγόνο - μπορεί εναλλακτικά να ενεργοποιήσει και την οδό του P.A.F., η οποία κατά μερικούς ερευνητές (228) θεωρείται ότι διέρχεται μέσα από το ένζυμο λιποξυγεννάση.

3) Το 2, 3 DPG επιφέρει σαφώς αναστολή του P.A.F. και της θρομβίνης, η οποία θεωρείται ότι ασκεί τη δράση της μέσω της οδού του P.A.F., πράγμα το οποίο ενδέχεται να σημαίνει ότι ο δρόμος αυτός είναι πρωταρχικής σημασίας για την αιμοπεταλιακή συσσώρευση και ότι η ενεργοποίησή του ενδέχεται σε κάποια στάδιά της να κινητοποιεί μεταβολίτες οι οποίοι "πυροδοτούν" τόσο την αραχιδονική οδό, όσο και την οδό του ADP. Ωστόσο πρέπει να σημειωθεί ότι στα δικά μας πειράματα τόσο η κυκλοξυγεννάση, όσο και το ADP είχαν αποκλειστεί μέσω της επώασης των αιμοπεταλίων με ασπιρίνη και CP-CPK. Τα προαναφερθέντα δεδομένα, νομίζω, ότι υπογραμμίζουν με έμφαση ότι το 2, 3 DPG δεν μπορεί να δρα μέσω της αναστολής της κυκλοξυγεννάσης ή της θρομβοξάνης A₂ συνθετάσης, αλλά μέσω κάποιας άλλης δράσης έναν βασικότερο λειτουργικό μηχανισμό του αιμοπεταλιακού κυττάρου.

Η ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων από τον P.A.F. οδηγεί σε μια ταχεία αύξηση της παραγωγής ενέργειας υπό την μορφή ATP. Χωρίς την αύξηση της ενέργειας τα αιμοπετάλια δεν είναι σε θέση να πραγματοποιήσουν ούτε την αντίδραση έκλυσης, ούτε την αντίδραση συσσώρευσης (153).

Έχει δειχθεί ότι η γλυκολυτική αλυσίδα είναι ανεπαρκής για να προσδώσει στα ενεργοποιημένα αιμοπετάλια την απαραίτητη ποσότητα τριφωσφορικής αδενοσίνης (153). Η ποσότητα αυτή παρέχεται κατά κύριο λόγο από τα μιτοχόνδρια μέσω της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης (153). Η αύξηση όμως της ενεργειακής παραγωγής προϋποθέτει την ύπαρξη υποστρωμάτων ικανών να αποδώσουν ενέργεια. Τα αιμοπετάλια δεν μεταβολίζουν λιπίδια και αμινοξέα για τον προσπορισμό της ενέργειάς τους αλλά το καύσιμο υλικό τους αντιπροσωπεύεται αποκλειστικά από τα ζάκχαρα (153, 287). Πράγματι μέσα στο αιμοπεταλιακό κυτταρόπλασμα υπάρχουν άφθονα κοκκία γλυκογόνου. Αν για οποιοδήποτε λόγο το αιμοπετάλιο εμποδιστεί να χρησιμοποιήσει το γλυκογόνο του τότε δεν είναι σε θέση να παρουσιάσει πλήρη λειτουργικότητα όταν



ερεθιστεί από τους διάφορους αγωνιστές του (153). Έχοντας λοιπόν υπ'όψην τα δεδομένα αυτά υποθέσαμε ότι τόσο το 2, 3 DPG όσο και το 3-PGA θα ήταν δυνατόν να δρουν αναστέλλοντας τη διαδικασία παραγωγής ενέργειας σε κάποιο επίπεδο της διαδοχής των αντιδράσεων που την αποτελούν. Η βιβλιογραφία αναφέρει ότι η αύξηση του 2, 3 DPG στο εσωτερικό του ερυθροκυττάρου έχει ως αποτέλεσμα την αναστολή της γλυκόλυσης (83) και το αμιοπετάλιο δεν διαθέτει στη γλυκολυτική του οδό εκείνα τα ένζυμα παραγωγής και διάσπασης του 2, 3 DPG τα οποία συναποτελούν το παρακύκλωμα Rapoport. Συνεπώς αν ο P.A.F. αυξάνει τον ρυθμό της γλυκογονόλυσης αποδίδοντας γλυκόζη, ενώ το 2, 3 DPG αναστέλλει τη γλυκολυτική αλυσίδα τότε ο συνδιασμός των δύο δράσεων θάπρεπε να οδηγήσει σε κάποια αύξηση της γλυκόζης στο εσωτερικό των αιμοπεταλίων.

Η βιβλιογραφία αναφέρει (306) ότι ο P.A.F. ενεργοποιεί την γλυκογονόλυση αλλά και την κατανάλωση της γλυκόζης. Τα δύο αυτά φαινόμενα εμφανίζουν μια κάποια υστέρηση το ένα έναντι του άλλου με αποτέλεσμα να προηγείται η γλυκογονόλυση και η αύξηση της ελεύθερης γλυκόζης στο εσωτερικό του αιμοπεταλίου και εν συνεχεία να ακολουθεί η κατανάλωσή της από την γλυκολυτική αλυσίδα (306).

Χρησιμοποιώντας το πειραματικό πρωτόκολλο του Γ.Θ. Τσάγκαρη (306) είδαμε ότι πράγματι ο P.A.F. ενεργοποιεί την γλυκογονόλυση και την γλυκόλυση κατά τρόπο διαδοχικό και εναλλασσόμενο. Όταν όμως χορηγήσαμε μαζί με τον P.A.F. και την αντίστοιχη ποσότητα 2, 3 DPG παρατηρήσαμε ότι τα επίπεδα της γλυκόζης σταθεροποιήθηκαν, πράγμα που σήμαινε ότι τόσο η γλυκόλυση όσο και η γλυκογονόλυση αναστάλθηκαν σε κάποιο επίπεδο των αντιδράσεων που τις συναποτελούν. Όταν χορηγήσαμε P.A.F. και 3-PGA είδαμε μια ανοδική αύξηση των επιπέδων της γλυκόζης πράγμα που θα μπορούσε να ερμηνευτεί σαν διακοπή της γλυκολυτικής αλυσίδας αλλά συνέχιση της γλυκογονόλυσης. Η μη καταναλισκόμενη γλυκόζη συσσωρευόταν οπότε τα επίπεδά της ανέβαιναν. Τα πειράματα αυτά έδειξαν ότι το 2, 3 DPG όπως και το 3-PGA προκαλούσαν μια αναστολή στην κατανάλωση της γλυκόζης και πιθανόν και στην απελευθέρωσή της από τα κοκκία του γλυκογόνου. Είναι προφανές ότι η διακοπή της γλυκολυτικής αλυσίδας επιφέρει μια κάθετη πτώση της παραγωγής του ακετύλ-συνενζύμου A και προφανώς της συνακόλουθης τροφοδοσίας του κύκλου του Krebs με τελικό αποτέλεσμα την πτώση της παραγωγής ATP από την οξειδωτική φωσφορυλίωση στα μιτοχόνδρια των αιμοπεταλίων. Αν η υπόθεση αυτή ήταν



αληθινή τότε ένα από τα αναμενόμενα επακόλουθά της θα ήταν και η μείωση της κατανάλωσης οξυγόνου εκ μέρους των αιμοπεταλίων λόγω της δράσης του 2, 3 DPG. Η υπάρχουσα βιβλιογραφία αναφέρει ότι τα αιμοπετάλια παρουσιάζουν το φαινόμενο της "εκκρηκτικής αναπνοής" (oxygen burst) όταν διεγερθούν από θρομβίνη (259). Στην ίδια εργασία αναφέρεται ότι η χορήγηση του 2, 3 DPG προκαλεί μείωση της κατανάλωσης οξυγόνου με όσες συνέπειες προκύπτουν από το φαινόμενο αυτό. Έτσι λοιπόν μετρήσαμε με την μέθοδο του ηλεκτροδίου του Clarke την κατανάλωση οξυγόνου από τα αιμοπετάλια και βρήκαμε ότι ο P.A.F. αυξάνει την κατανάλωση του οξυγόνου, ενώ η ταυτόχρονη χορήγηση του P.A.F. και του 2, 3 DPG την μειώνει, πράγμα το οποίο συμβαδίζει με το φαινόμενο της αναστολής της γλυκολυτικής αλυσίδας που προαναφέραμε. Τα δεδομένα αυτά φαίνονται επαρκή για να στηρίξουν την υπόθεση που θεωρεί ότι το 2, 3 DPG αναστέλλει την αιμοπεταλιακή συσσώρευση την ενεργούμενη από τον P.A.F. μειώνοντας την ενεργειακή παραγωγή του αιμοπεταλιακού κυττάρου. Για να τεκμηριώσουμε ακόμη περισσότερο το ρόλο της ενεργειακής παραγωγής αλλά και της χρησιμοποίησης της ενέργειας εκ μέρους του αιμοπεταλίου για την αντίδραση έκλυσης και συσσώρευσης εκτελέσαμε ακόμη δύο πειράματα κατάλληλα σχεδιασμένα για τους σκοπούς αυτούς. Στο πρώτο πείραμα επώασαμε τα αιμοπετάλια με 2, 4-δινιτροφαινόλη η οποία αποσυζευγνύει τη διαδικασία μεταφοράς ηλεκτρονίων στην αναπνευστική αλυσίδα και την οξειδωτική φωσφορυλίωση στο εσωτερικό των μιτοχονδρίων. Η εγκατάσταση της αποσύζευξης υπήρξε σταδιακή: Έτσι, μετά από δεκαπεντάλεπτη επώαση τα αιμοπετάλια εμφάνισαν πλήρη λειτουργικότητα και συσσωρεύθηκαν μέσω της δράσης του P.A.F. Μετά από ημίωρη επώαση η λειτουργικότητα των αιμοπεταλίων κάμφθηκε με αντίστοιχη μείωση της συσσώρευσης, ενώ μετά από επώαση 45-50 λεπτών η συσσώρευση των αιμοπεταλίων καταργήθηκε απόλυτα πράγμα που αποδεικνύει τη σπουδαιότητα της ενεργειακής παραγωγής για τη συσσωρευτική δράση του P.A.F. Στο δεύτερο πείραμα προσπαθήσαμε να εμποδίσουμε τη χρησιμοποίηση της παραχθείσης τριφωσφορικής αδενοσίνης κατά τη διέγερση των αιμοπεταλίων από τον P.A.F. χορηγώντας τους κολχικίνη. Η δράση της κολχικίνης σε άλλα κυτταρικά συστήματα σχετίζεται και με την παρεμπόδιση της χρησιμοποίησης του ATP εκ μέρους των μικροσωληνίσκων του κυττάρου (149) πράγμα το οποίο μπορεί να συμβαίνει και στα αιμοπετάλια των οποίων ο συσταλτός κυτταροσκελετός συμμετέχει τόσο στην αλλαγή σχήματος όσο και στις αντιδράσεις έκλυσης και συσσώρευσης όπως και στη συστολή του θρόμβου. Πράγματι, είδαμε ότι η κολχικίνη αποτελεί έναν ισχυρό αναστολέα της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων από τον P.A.F., γεγονός το οποίο τονίζει την



ενεργειακή πλευρά του ζητήματος από τη σκοπιά της χρησιμοποίησης της παραχθείσας ενέργειας εκ μέρους του αιμοπεταλιακού κυττάρου. Το σύνολο των δεδομένων αυτών δείχνει ότι ο ενεργειακός μεταβολισμός του αιμοπεταλιακού κυττάρου είναι καίριας σημασίας για την ενεργοποίηση του από τον P.A.F. και τη θρομβίνη. Η αντίδραση έκλυσης, η αντίδραση συσσώρευσης, η αλλαγή σχήματος και η συστολή του αιμοπεταλιακού θρόμβου είναι επίσης διαδικασίες οι οποίες απαιτούν την παραγωγή ενέργειας για να επιτελεστούν (153). Συνεπώς ο P.A.F. σε κάποια από τα πρώτα στάδια της αλληλεπίδρασής του με τους μηχανισμούς του αιμοπεταλίου ενεργοποιεί μαζί με άλλες διεργασίες, σειριακές ή παράλληλες, και την αύξηση του ενεργειακού μεταβολισμού, επιταχύνοντας τη γλυκογονόλυση, τη γλυκόλυση και την αναπνοή. Το 2, 3 DPG και το 3-PGA είναι φωσφορικοί εστέρες που προέρχονται από το παρακύκλωμα Rapoport της γλυκολυτικής αλυσίδας το οποίο δεν υπάρχει στα αιμοπετάλια (86, 143, 142) αλλά είναι πολύ ενεργό στα ερυθροκύτταρα, που ως γνωστόν, εγκλωβίζονται στο δίκτυο της ινικής των αιματικών θρόμβων. Εξ'άλλου στη βιβλιογραφία (143, 142) έχει αναφερθεί ότι η αναστολή της αιμοπεταλιακής συσσώρευσης έχει επιτευχθεί όχι μόνο με τη χορήγηση του καθαρού 2, 3 DPG εν διαλύσει, αλλά και με την προσθήκη στο PRP ερυθρών αιμοσφαιρίων που προερχόταν από αναμικά άτομα και που περιείχαν υψηλά επίπεδα του εν λόγω φωσφορικού εστέρα. Πρέπει τέλος να υπογραμμισθεί ότι και άλλα φωσφορυλιωμένα μόρια όπως το ATP και η φωσφοσερίνη εμφανίζουν ισχυρή ανασταλτική δράση της αιμοπεταλιακής συσσώρευσης από P.A.F. Το δεδομένο αυτό προκύπτει με σαφήνεια από σειρά πειραμάτων που εκτελέστηκαν μέσα στα πλαίσια της παρούσας διδακτορικής διατριβής και εισάγει έναν γενικότερο προβληματισμό για το ρόλο των υψηλά φωσφορυλιωμένων μορίων στην αναστολή της αιμοπεταλιακής συσσώρευσης.



Θειόλες

Η δεύτερη κατηγορία ενώσεων που μελετήθηκαν είναι μια σειρά θειολών οι οποίες απαντούν φυσιολογικά στο σώμα των θηλαστικών συμπεριλαμβανομένου και του ανθρώπου. Έτσι μελετήσαμε τη δράση της αναχθείσας γλουταθειόνης (GSH), της L-κυστεΐνης, της L-ομοκυστεΐνης, της L-μεθειονίνης, της L-κυστίνης, στη συμπεριφορά των αιμοπεταλίων όταν αυτά διαγείρονται από τον P.A.F. Τα αποτελέσματα των πειραμάτων έδειξαν ότι η αναχθείσα γλουταθειόνη, η L-κυστεΐνη, η μεθειονίνη και η L-κυστίνη ασκούν ισχυρή αναστολή στη δράση του P.A.F. Τα διαγράμματα που περιγράφουν την αναστολή της αιμοπεταλιακής συσσώρευσης μέσω των ενώσεων αυτών έναντι συγκεκριμένων ποσοτήτων του P.A.F. είναι μεταξύ τους ανάλογα τόσο ως προς τη μορφή των καμπυλών όσο και ως προς τις δόσεις των ουσιών που αναπτύσσουν αισθητά αναστολή. Εκείνο που παρατηρήθηκε επίσης είναι ότι η ανάπτυξη της ανασταλτικής δράσης είναι σχετικά απότομη, δηλαδή λαμβάνει μια πολύ μεγάλη τιμή σε πολύ γειτονικές συγκεντρώσεις της κάθε μιας από τις χρησιμοποιηθείσες ουσίες. Ο έλεγχος της διεθνούς βιβλιογραφίας μας έδειξε ότι ο αριθμός των υπάρχουσών δημοσιεύσεων των σχετικών με τα αιμοπετάλια και τη δράση των θειολών πάνω σ'αυτά είναι εξαιρετικά μικρός (211). Εφ'όσον τα ευρήματά μας ήταν επαναλήψιμα αναζητήσαμε μια ερμηνεία της δράσης των προαναφερθεισών ενώσεων.

Κατ'αρχάς θεωρήσαμε τη δομή τους όπως επίσης και τη χημική τους κατάταξη. Κατ'αρχάς οι ουσίες αυτές είναι αμινοξέα και μικρά πεπτιδία. Η L-κυστίνη είναι ένα διμερές αποτελούμενο από δύο μόρια κυστεΐνης ενωμένα μέσω μιας δισουλφιδικής γέφυρας. Η γλουταθειόνη είναι ένα τριπεπτιδίο που αποτελείται από γλουταμικό οξύ, γλυκίνη και κυστεΐνη. Η μεθειονίνη είναι επίσης ένα θειούχο αμινοξύ στο οποίο το υδρογόνο της σουλφιδρυλικής ομάδας έχει αντικατασταθεί από ένα μεθύλιο. Όλες οι ουσίες αυτές έχουν συνεπώς σαν κοινό τους χαρακτηριστικό την ύπαρξη θείου στα μόριά τους.

Το θείο εμφανίζεται υπό τη μορφή σουλφιδρυλικής ομάδας (κυστεΐνη, γλουταθειόνη), υπό μορφή δισουλφιδικής γέφυρας (L-κυστίνη) και συνδεδεμένο με ένα μεθύλιο στην περίπτωση της μεθειονίνης. Εκτός από την ύπαρξη του θείου



οι ενώσεις αυτές έχουν αρκετές ομοιότητες στον σκελετό τους. Ωστόσο η ομοκυστεΐνη που διαφέρει από την κυστεΐνη κατά μια ομάδα $-CH_2-$ δεν αναστέλει τον P.A.F. ενώ αντίθετα η μεθειονίνη που περιέχει την ομάδα $-CH_2-$ της ομοκυστεΐνης αλλά και το μεθύλιο στη θέση του Η της ρίζας $-SH$ της ομοκυστεΐνης λειτουργεί ανασταλτικά έναντι της δράσης του P.A.F. Από τα δεδομένα αυτά δεν είναι εμφανής ο δομικός λόγος για τον οποίο τα εν λόγω μόρια παρουσιάζουν ανασταλτική δράση στη συσσώρευση των αιμοπεταλίων από τον P.A.F.

Κατά τη διάρκεια των πειραμάτων αυτών είδαμε ότι η D-μορφή της κυστεΐνης είναι πιο ισχυρή από την L-μορφή της, υποδεικνύοντας ότι η οπτική ισομέρεια παίζει κάποιο ρόλο στην ένταση της ανασταλτικής δράσης. Για να διαλευκάνουμε το αίτιο της δράσης των ουσιών που προκαλούσαν αναστολή των P.A.F. χρησιμοποιήσαμε μερικά μόρια που δεν απαντούν στους έμβιους οργανισμούς όπως τη μερκαπτοαιθανόλη, την L-ακετυλοκυστεΐνη, την κυσταμίνη, το μερκαπτοηλεκτρικό (θειομαλικό) οξύ. Οι ενώσεις αυτές εκτός, από την κυσταμίνη, περιέχουν σουλφιδρυλικές ομάδες και χρησιμοποιούνται μεταξύ των άλλων σαν αναγωγικές ουσίες σε διάφορες βιοχημικές εφαρμογές. Η κυσταμίνη είναι ένα δισουλφίδιο που προέρχεται από την οξειδωση της κυστεαμίνης η οποία χρησιμοποιείται και σαν ραδιοπροστατευτικό φάρμακο. Η κυσταμίνη δεν διαθέτει αναγωγικές ιδιότητες. Χρησιμοποιήσαμε τις ουσίες αυτές και παρατηρήσαμε ότι όλες τους, εκτός από την κυσταμίνη, ανέστειλαν τη συσσώρευση των αιμοπεταλίων από τον P.A.F. ενώ η καμπύλη αναστολής ήταν ανάλογη με εκείνη των φυσιολογικών θειολών. Η κυσταμίνη δεν έδωσε κανένα αποτέλεσμα αφήνοντας ανεπερέαστη την αιμοπεταλιακή συσσώρευση από τη δράση του P.A.F. Δεδομένου ότι οι ουσίες που πραγματοποιούσαν αναστολή θεωρούνται σαν δότες ατόμων υδρογόνου που προέρχονται από την ομάδα $-SH$, ενώ τα οξειδωμένα τους παράγωγα, όπως η κυσταμίνη, δεν είναι σε θέση να παίξουν το ρόλο αυτό υποθέσαμε ότι οι δραστικές ουσίες θα ήταν δυνατόν να ανάγουν κάποιες δισουλφιδικές γέφυρες οι οποίες υπάρχουν σε αρκετές γλυκοπρωτεΐνες της αιμοπεταλιακής πλασματικής μεμβράνης που παίζουν σημαντικό ρόλο στη λειτουργία του αιμοπεταλίου. Οι πρωτεΐνες αυτές θεωρούνται ότι αντιπροσωπεύουν τους φυσιολογικούς υποδοχείς αρκετών αγωνιστών των αιμοπεταλίων μεταξύ των οποίων και του P.A.F. Συνεπώς όλα εκείνα τα μόρια που θα μπορούσαν να διασπύσουν τις δισουλφιδικές γέφυρες θα οδηγούσαν σε μια αλλαγή της στερεοδιάταξης των πρωτεϊνών αυτών με αποτέλεσμα και τη μεταβολή της ικανότητάς τους να προσδένουν το μόριο ενός αγωνιστή κατά



αποτελεσματικό τρόπο, έχοντας σαν συνέπεια τη μείωση της λειτουργικότητας τους ως υποδοχέων του εν λόγω αγωνιστή. Προφανώς τα δισουλφίδια όπως η κυσταμίνη επειδή είναι οξειδωμένα δεν είναι σε θέση να προσδώσουν υδρογόνα και συνεπώς να διασπάσουν τις δισουλφιδικές γέφυρες των γλυκοπρωτεϊνικών υποδοχέων με αποτέλεσμα να μην μειώνουν τη λειτουργικότητά τους και να μην αναστέλουν τη δράση του αγωνιστή, εν προκειμένω του P.A.F. Για να δοκιμάσουμε την ανθεκτικότητα της υπόθεσης αυτής χρησιμοποιήσαμε δύο ουσίες οι οποίες αποδεδειγμένα παίζουν το ρόλο αναγωγής δισουλφιδικών γεφυρών και χρησιμοποιούνται εξ αιτίας της ιδιότητάς τους αυτής σε συγκεκριμένες κλινικές εφαρμογές ήδη από αρκετά χρόνια. Οι ουσίες αυτές είναι η Μερκαπτοπροπιονυλ-γλυκίνη (MPG) ή θειόλα και η D-πενικιλαμίνη. Η Μερκαπτοπροπιονυλ-γλυκίνη χρησιμοποιείται στη θεραπεία και την πρόληψη της κυστικής νεφρολιθίασης γιατί διασπώντας τις γέφυρες θείου αφ'ενός μεν διαλύει τους λίθους κυστίνης και αφ'ετέρου εμποδίζει το σχηματισμό κρυστάλων κυστίνης στους κυστινικούς (150).

Η D-πενικιλαμίνη από την άλλη μεριά, χρησιμοποιείται στη θεραπεία της ρευματοειδούς αρθρίτιδας γιατί διασπώντας τις δισουλφιδικές ομάδες που συνδέουν τα διάφορα τμήματα των ανοσοσφαιρινών αποδιοργανώνει δομικά τις ανώμαλες ανοσοσφαιρίνες κι έτσι μειώνει τις βλαπτικές τους δράσεις.

Είδαμε λοιπόν ότι χορηγώντας τόσο τη θειόλα όσο και την D-πενικιλαμίνη στο PRP, αιμοπεταλιακή συσσώρευση αναστελόταν και ο P.A.F. δεν δρούσε. Το δεδομένο αυτό ενίσχυσε τη θεωρία βάσει της οποίας οι φυσιολογικά απαντώμενες θειόλες ασκούσαν την ανασταλτική τους δράση διασπώντας τις δισουλφιδικές γέφυρες των πρωτεϊνών της μεμβράνης και αποδιοργανώνοντας έτσι δομικά τους υποδοχείς του P.A.F. Ωστόσο παρατηρήσαμε ότι μερικές από τις χρησιμοποιηθείσες ουσίες εκτός από τις δομικές τους αναλογίες εμφάνιζαν κι ένα ακόμη κοινό χαρακτηριστικό. Ήταν δηλαδή δεσμευτές ελεύθερων ριζών που για πολλούς και διάφορους λόγους είναι δυνατόν να παραχθούν μέσα σε κάθε βιολογικό σύστημα και προφανώς στο αιμοπετάλιο. Τόσο η κυκλοξυγεννάση, όσο και η λιποξυγεννάση είναι δυνατόν να οδηγήσουν στην παραγωγή ελεύθερων ριζών των οποίων δεν γνωρίζουμε την συγκεκριμένη για το αιμοπετάλιο λειτουργική σημασία στο βαθμό που φυσικά υπάρχει (85, 34).

Κατά διάφορους συγγραφείς ο P.A.F. δρα μέσω της λιποξυγεννάσης και είναι πιθανόν κάποια από τα βήματα της δράσης του να περνούν μέσα από τη δημιουργία ελεύθερων ριζών. Τόσο η αναχθείσα γλουταθειόνη, όσο και η MPG



είναι μόρια που λειτουργούν σαν scavengers ελεύθερων ριζών (34). Το ίδιο ισχύει και για την L-κυστεΐνη. Έχοντας υπόψιν τα δεδομένα αυτά χορηγήσαμε στα αιμοπετάλια μικρές ποσότητες Βουτυλικού υδροξυτολονενίου (BHT) το οποίο είναι μια κλασική αντιοξειδωτική ουσία, που χρησιμοποιείται ευρύτατα στη βιομηχανία και που ασκεί δράση scavenger και διαπιστώσαμε ότι προκαλούσε ισχυρή αναστολή στην αιμοπεταλιακή συσσώρευση την ενεργούμενη από P.A.F. Εν συνεχεία χρησιμοποιήσαμε μια φαρμακευτική ουσία, την τριμεταζιδίνη (TMZ) η οποία αποτελεί το ενεργό συστατικό ενός φαρμάκου εξειδικευμένου για τη δέσμευση ελεύθερων ριζών οξυγόνου-του Vastarel- που χρησιμοποιείται για την πρόληψη των ιστικών βλαβών οι οποίες απακολουθούν την επανααμάτωση των ισχαιμούντων ιστών και οι οποίες οφείλονται στην ανάπτυξη ελευθέρων ριζών οξυγόνου (307). Και στην περίπτωση αυτή σημειώσαμε μια ισχυρή αναστολή της αιμοπεταλιακής συσσώρευσης της ενεργούμενης από τον P.A.F. Η Τριμεταζιδίνη, το βουτυλικό υδροξυτολουένιο, η γλουταθειόνη, η θειόλα, η κυστεΐνη, η μερκαπτοαιθανόλη και γενικά όλες αυτές οι ουσίες που χρησιμοποιήθηκαν δεν έχουν πλέον δομικές αναλογίες που να υπονοούν τη δράση σ'ένα κοινό υποδοχέα αλλά το γενικό τους λειτουργικό χαρακτηριστικό είναι πως μπορούν να λειτουργήσουν σαν δεσμευτές ελεύθερων ριζών στα διάφορα βιολογικά συστήματα. Το δεδομένα αυτό εισάγει ένα νέο στοιχείο στο μηχανισμό λειτουργίας της αιμοπεταλιακής ενεργοποίησης από τον P.A.F., το οποίο πιθανόν να αναπροσανατολίσει την έρευνα τη σχετική με την εξεύρεση αναστολέων του και να δώσει τη δυνατότητα παραγωγής νέων φαρμακευτικών ουσιών που να αντιμετωπίζουν τις δράσεις του P.A.F. σε μια νέα λειτουργική βάση τόσο στο επίπεδο των αιμοπεταλίων όσο και των άλλων κυττάρων τα οποία ενεργοποιούνται από αυτόν τον ισχυρώτατο γλυκεριναιθέρα.

Στο γενικό αυτό προβληματισμό έρχονται να προστεθούν και τα ακόλουθα δεδομένα. Αναφέρεται στη διεθνή βιβλιογραφία (228) ότι ο P.A.F. δρα στα αιμοπετάλια και μέσω της αύξησης του κυκλικού GMP πράγμα το οποίο συμβάλει στην επίτευξη μη αναστρέψιμων συσσωρεύσεων. Είναι αξιόλογο να αναφερθεί ότι η αύξηση του cGMP περνά μέσα από τους μεταβολίτες του αραχιδονικού οξέος δια του ενζύμου της λιποξυγενάσης (228). Από την άλλη μεριά είναι γνωστό ότι η δράση του P.A.F. περνά και μέσα από τη μείωση του κυκλικού AMP οπότε είναι λογικό να θεωρήσει κανείς ότι το αιμοπετάλιο είναι ένα "σύστημα δύο κατευθύνσεων", σύμφωνα με την άποψη του Golberg και των συνεργατών του (104). Στα συστήματα αυτού του τύπου τα δύο κυκλικά νουκλεοτίδια ασκούν αντιτιθέμενες δράσεις οπότε, ανάλογα με τους λειτουργικούς στόχους που



τίθενται από τους ρόλους του συστήματος, όταν το ένα κυκλικό νουκλεοτίδιο αυξάνεται για να μεσολαβήσει σε μια σειρά αντιδράσεων, το άλλο νουκλεοτίδιο πρέπει ή να μειώνεται ή να παραμένει σταθερό για να μην δημιουργεί αντιστάσεις στην ανάπτυξη της δράσης του προηγούμενου. Η τρίτη περίπτωση της παράλληλης αύξησης ή ελάττωσης θα είχε αλληλοαναιρούμενα αποτελέσματα και δεν είναι πιθανή παρά μόνον όταν το σύστημα πρέπει να παραμείνει ανενεργό ακόμη κι όταν τα ερεθίσματα που ευνοούν τη διέγερσή του αυξάνουν (104).

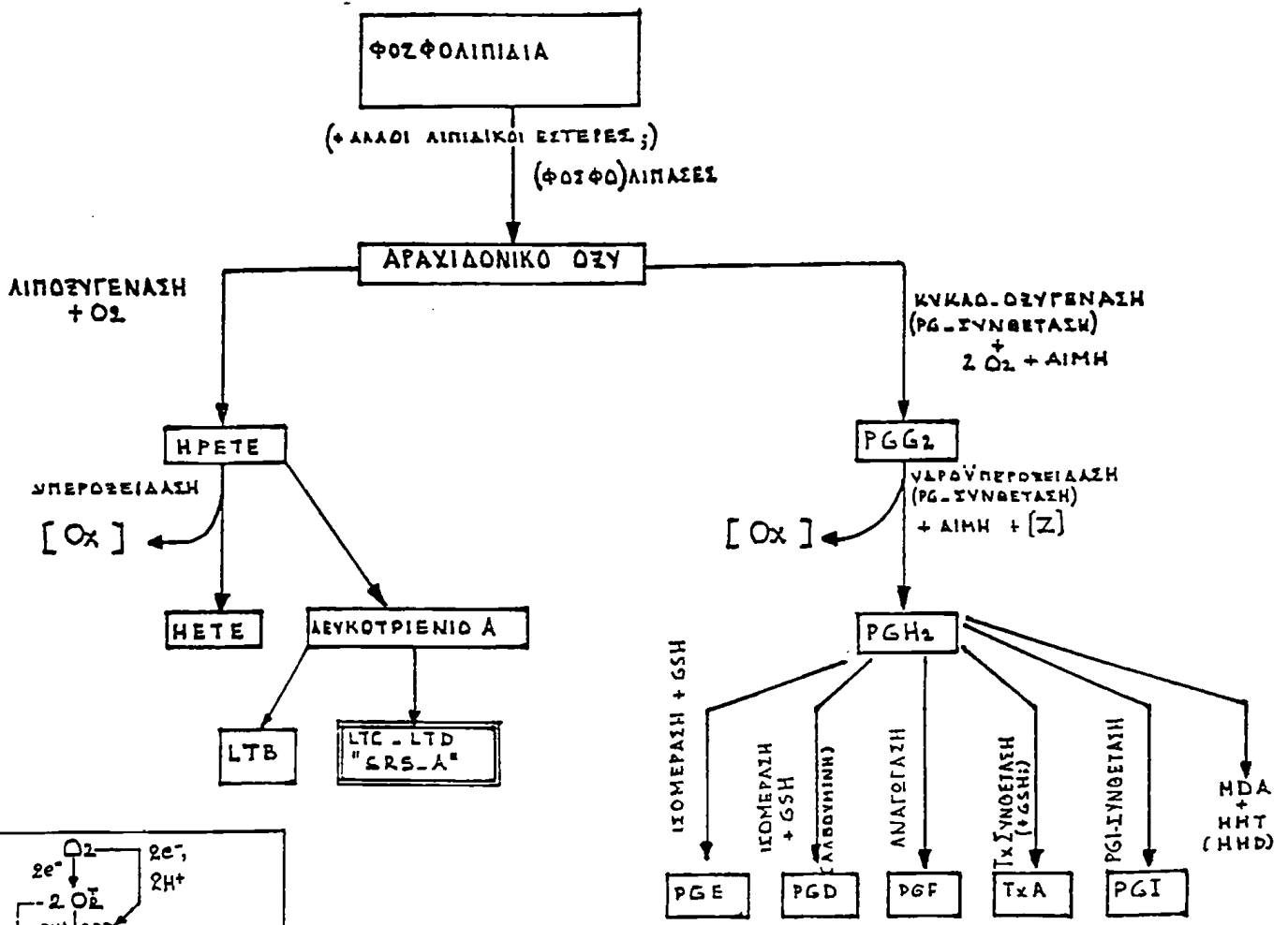
Η διεθνής βιβλιογραφία επισημαίνει ότι το ADP και το κολλαγόνο διαγείρουν στα αιμοπετάλια την παράλληλη μείωση του cAMP και την αύξηση του cGMP (44). Η αδρεναλίνη επίσης, που είναι ένας δευτερεύων ενεργοποιητής, όταν δρα στα αιμοπετάλια μέσω των άλφα υποδοχέων τους προκαλεί ταυτόχρονη μείωση του κυκλικού AMP και αύξηση του κυκλικού GMP. Από πειράματα που διενεργήσαμε μέσα στα πλαίσια της παρούσας εργασίας σε πλυμένα αιμοπετάλια κουνελιού αλλά και από την επισκόπηση της διεθνούς βιβλιογραφίας (305) επισημάναμε ότι η φαινολαμίνη, η οποία είναι ένας αναστολέας των άλφα υποδοχέων, προκαλεί αναστολή της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων όταν αυτά διεγείρονται από τον P.A.F. και μάλιστα όταν η εν λόγω ουσία χορηγηθεί, ενώ η διαδικασία της αιμοπεταλιακής συσσώρευσης έχει προχωρήσει σε σημείο, που για την ομάδα του ελέγχου είναι μη αναστρέψιμη. Τότε επιφέρει αναστροφή της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων, πράγμα που συμβαίνει επίσης και με τις θειόλες και με τους εξειδικευμένους αναστολείς ελευθέρων ριζών (τριμεταζιδίνη, BHT).

Ο άλφα αναστολέας καταλαμβάνοντας τον άλφα υποδοχέα είναι πιθανόν να εμποδίζει την ανάπτυξη της συσσώρευσης, εμποδίζοντας την αύξηση του κυκλικού GMP (44). Με την έννοια αυτή οι υποδοχείς του P.A.F. δεν αποκλείεται να έχουν κάποιο κοινό τμήμα με τους άλφα υποδοχείς ή ακόμη ο δρόμος του P.A.F. να έχει κάποια περιοχή κοινή με το δρόμο που ενεργοποιείται μέσω των άλφα αγωνιστών και οδηγεί σε αύξηση του cGMP στα αιμοπετάλια. Τα δεδομένα αναφέρουν ότι μερικές νιτροζοθειόλες ασκούν ανασταλτική δράση στη συγκόλληση των αιμοπεταλίων από ADP ή, ακόμη, ενισχύουν την αντισυσσωρευτική δράση του Ενδοθηλιακού Παράγοντα Αγγειοχάλασης (Endothelium Derived Relaxing Factor - EDRF) και των νιτροδών αυξάνοντας την δραστηριότητα της γουανυλικυκλάσης με συνέπεια την αύξηση του cGMP (208). Στην περίπτωση αυτή όμως, η χορήγηση των θειολών έπρεπε λογικά να ενισχύσει κι όχι να αναστείλει τη δράση του P.A.F., γιατί θα είχαμε επίταση του ερεθίσματος αύξησης του cGMP και συνεπώς θα προέκυπτε συνέργεια και όχι η παρατηρούμενη και μάλιστα



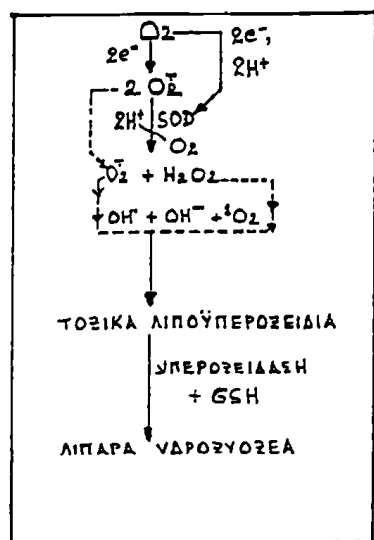
έντονη αναστολή που ασκείται στη συσσώρευση των αιμοπεταλίων από P.A.F. εκ μέρους των περισσότερων θειολών που χρησιμοποιήσαμε! Από το δεδομένο αυτό φαίνεται ότι η δράση των θειολών δεν πρέπει να σχετίζεται με την αύξηση του cGMP, αλλά με άλλο μηχανισμό ο οποίος δεν αποκλείεται να είναι η δέσμευση των ελευθέρων ριζών που παράγονται στο δρόμο του P.A.F. πιθανόν από την λιποξυγενάση (85, 228) και οι οποίες ενδέχεται να συμμετέχουν ενεργά στη διαδικασία της αιμοπεταλιακής συσσώρευσης.





ΕΙΚΟΝΑ 1Ρ . ΠΑΡΑΤΕΡΓΑ ΤΗΣ ΔΥΟ ΔΙΑΚΛΑΔΟΣΕΩΣ ΤΟΥ ΑΡΑΧΙΔΟΝΙΚΟΥ ΟΞΕΟΣ

Το διάγραμμα δεν περιέχει για λόγους απλότητας μερικά στοιχεία της αραχιδονικής οδού. Το μικρό ένδειξη στην κάτω αριστερή γωνία συνοψίζει τις αντιδράσεις που αφορούν διάφορες τοξικές ελεύθερες ρίζες του οξυγόνου οι οποίες στο κύριο διάγραμμα συμβαδίζονται με την ευτομογραφία [Ox]. Οι ρίζες αυτές μπορεί να παραχθούν από την αραχιδονική οδό ή από άλλες κυτταρικές διεργασίες, όπως επί-κειες κ από αλληλεπίδραση με άλλες ρίζες. Όπως φαίνεται από την εικόνα οι αντι-δράσεις των υπεροξειδίων και των συνθετικών τους στην διακλάδωση της λιπαυ-ξενώσεως όσο και της κυκλοοξυγενώσεως απαιτούν οξυγόνο. Η αιμή είναι απαραίτη-τη για την αντίδραση Haber-Weiss ($O_2^- + H_2O_2 \rightarrow OH^- + OH + ^1O_2$) και για την δραστηριότητα των συνθετικών. Οι ελεύθερες μορφές του ενεργοποιημένου ομ-χόνου μπορούν να ζώσουν τοξικά προϊόντα τα οποία μπορεί να αδρανοποιηθούν από scavenger's. Η GSH φαίνεται να παίζει καθοριστικό ρόλο στην διαδικασία αυτή



Συνομογραφίες: PG: Προσταγλανδίνες. [Ox]= Τοξικές μεταθεές ρίζες οξυγόνου. [Z]= αρωματικές ενώ-σεις που μπορούν να "ενεργοποιηθούν" έντονα και να προστατεύσουν από τις υπεροξειδικές ελεύθερες (π.κ τροποφάνη, κερατολίνη, επινεφρίνη, υδρακνόνες, φαινόλες, ουρικό οξύ). ΗΡΕΤΕ= υδρουπεροξειωραχιδονικό οξύ. ΗΕΤΕ= υδροαραχιδονικό οξύ. Tx= Θρομβοξάνες. GSH= γλουταθειώνη. ΗΜΔ= καλονδιολ-δεύδη. SOD= υπεροξειδίο διαμορτώση. O2- = ανιόν υπεροξειδίου. OH = ελεύθερη ρίζα υδροξυλίου. ^1O2 = οξυγόνο ΣΙΝΓΛΕΤ (ενεργοποιημένο κοράνι, χωρίς κόλυμα σπιν). LT= λευκοτριένια



ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Από την πειραματική μελέτη της παρούσας εργασίας προέκυψαν τα ακόλουθα συμπεράσματα:

1. Διαπιστώθηκε ότι το 2, 3 DPG και το 3-PGA, προϊόντα του κυκλώματος Haparrorot της γλυκαλυπτικής αλυσίδας, είναι ισχυροί αναστολείς της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων που προκαλείται από τον P.A.F. Η δράση αυτή οφείλεται πιθανώς στην αναστολή του ενεργειακού μεταβολισμού των αιμοπεταλίων από τις ουσίες αυτές. Δεδομένου ότι οι ουσίες αυτές αναστέλουν σε κάποιο βαθμό και άλλους παράγοντες συσσώρευσης (ADP, AA) η απελευθέρωσή τους στο αίμα θα ήταν δυνατόν να παίζει σημαντικό ρόλο στην πρόληψη θρομβώσεων σε διάφορες παθολογικές καταστάσεις, όπως π.χ. οι αιμολυτικές κρίσεις.
2. Διαπιστώθηκε ότι οι φυσιολογικά απαντώμενες θειόλες (γλουταθειόνη, κυστεΐνη, κυστίνη, μεθειονίνη) είναι ισχυροί αναστολείς της συγκόλλησης των αιμοπεταλίων της προκαλούμενης από τον P.A.F., πιθανώς λόγω μεταβολής της στερεοδιάταξης και της δομής των μεμβρανικών γλυκοπρωτεϊνών που θεωρούνται σαν υποδοχείς του P.A.F. και άλλων αγωνιστών της συσσώρευσης. Ακόμη προέκυψαν ενδείξεις ότι η ανασταλτική τους δράση μπορεί να οφείλεται και στην ιδιότητά τους να λειτουργούν σαν δεσμευτές (scavengers) ελεύθερων ριζών.
3. Είναι πιθανόν, η γενικευμένη δράση του P.A.F. στην αιμοπεταλιακή συσσώρευση να είναι περιορισμένη στα ανώτερα θηλαστικά, δεδομένου ότι ένας σημαντικός αριθμός φυσιολογικά απαντώμενων ουσιών - που μπορεί να απελευθερωθούν στην κυκλοφορία από διάφορες παθολογικές εξεργασίες, στις οποίες ο P.A.F. θεωρείται ότι συμμετέχει - είναι ισχυροί αναστολείς της δράσης του τουλάχιστον στα αιμοπετάλια.
4. Προέκυψαν ενδείξεις ότι στη διαδικασία συγκόλλησης αιμοπεταλίων από τον P.A.F. μπορεί να συμμετέχει και η παραγωγή ελευθέρων ριζών, δεδομένου ότι ουσίες εξειδικευμένες λειτουργικά για τη δέσμευσή τους αναστέλλουν ισχυρά τη διεγερτική του δράση για την αιμοπεταλιακή συσσώρευση.



ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ο Παράγοντας Ενεργοποίησης αιμοπεταλίων (P.A.F.) είναι ένας ισχυρός μεσολαβητής της αλλεργίας και της φλεγμονής που εκλύεται από πληθώρα κυττάρων και ιστών όταν διεγερθούν με αντιγονικά και μη ερεθίσματα και μετέχει σε ένα πλήθος φυσιολογικών διαδικασιών. Μία από τις ισχυρότερες δράσεις του P.A.F. είναι η συσσώρευση των αιμοπεταλίων "in vitro" και "in vivo". Τα τελευταία χρόνια έχουν γίνει πολλές προσπάθειες να ανευρεθούν αναστολείς του P.A.F. πλην όμως κανένας σημαντικός ενδογενής (φυσιολογικός) αναστολέας δεν έχει αναφερθεί στην διεθνή βιβλιογραφία. Στο παρόν διδακτορικό μελετήθηκαν οι δράσεις μιας σειράς ενδογενών ενώσεων που λόγω των βιοχημικών ιδιοτήτων τους θα μπορούσαν να είναι αναστολείς της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων της προκαλούμενης από τον P.A.F. Επίσης για να ελεγχθούν τα αποτελέσματα και να δοθεί ερμηνεία τους χρησιμοποιήθηκαν \dots εξωγενείς ουσίες που δεν απαντούν φυσιολογικά στον οργανισμό και που περιείχαν τις ίδιες χημικές ομάδες, ανήκαν στις ίδιες χημικές κατηγορίες ή είχαν παρόμοιες ιδιότητες. Οι χρησιμοποιηθείσες ουσίες ταξινομήθηκαν σε δύο κατηγορίες:

A. Οργανικές φωσφορικές ενώσεις με γλυκερινικό σκελετό:

1. Ενδογενείς: 2, 3 DPG, 3 PGA, 2 PGA, PGLA και PS.
2. Εξωγενείς: \emptyset

B. Σουλφυδρυλικές ενώσεις (Θειόες)

1. Ενδογενείς: Μεθειονίνη, L-κυστεΐνη, Ομοκυστεΐνη, L-κυστίνη, αναχθείσα γλουταθειονή (GSH).
2. Εξωγενείς: α-μερκαπτοπροπιονύλ-γλυκίνη, D-κυστεΐνη, D-και L-πενικυλλαμίνη, N-ακετύλ-L-κυστεΐνη, 2-Μερκαπτο-4-υδροξυ-πυριμιδίνη, Μερκαπτοπυριδίνη, Μερκαπτο-αιθανόλη, Μερκαπτοηλεκτρικό οξύ, θειοσαλικυλικό οξύ, κυσταμίνη.

Δοκιμάσθηκαν επίσης οι συνθετικές ενώσεις Τριμεταζιδίνη, βουτυλικό υδροξυτολουένιο, 2, 4-δινιτροφαινόλη και κολχικίνη.

Όλες οι εν λόγω ουσίες δοκιμάστηκαν σε πλυμμένα αιμοπετάλια κουνελιού και οι δραστικές σε αιμοπετάλια ανθρώπου, σε συσσωρευόμεντρο παρουσία 25 pg και 50 pg P.A.F., δηλαδή σε δόσεις μέγιστης συσσώρευσης.

Διαπιστώθηκε ότι: Από την πρώτη ομάδα ενώσεων το 2, 3 DPG, το 3 PGA και η PS προκαλούν δόσοεξαρτώμενη αναστολή μέχρι 100% της μέγιστης συσσώρευσης αιμοπεταλίων από P.A.F. σε συγκεντρώσεις από $5,8 \cdot 10^{-4}M$ έως $5,8 \cdot 10^{-3}M$. Η δράση αυτή αποδόθηκε εν μέρει στην αναστολή της κατανάλωσης της



γλυκόζης (πιθανόν μέσω αναστολής ενζύμων της γλυκολυτικής οδού), καθώς και στην ελάττωση από τα αιμοπετάλια της χρησιμοποίησης του O_2 , διαδικασίες τις οποίες διαγείρει ο P.A.F.

Από την δεύτερη ομάδα ενώσεων διαπιστώθηκε ότι εκτός της ομοκουστεινης και της κυσταμίνης, οι υπόλοιπες ασκούν δοσοεξαρτώμενη αναστολή μέχρι 100% της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων από P.A.F. σε συγκεντρώσεις από $5,8 \cdot 10^{-4}M$ έως $1,74 \cdot 10^{-3}M$. Δέον να σημειωθεί ότι η συγκέντρωση του 2, 3 DPG στο ολικό αίμα διακυμαίνεται φυσιολογικά μεταξύ των τιμών $1,5 \cdot 10^{-3}M$ έως $2,5 \cdot 10^{-3}M$ ενώ η συγκέντρωση της αναχθείσης γλουταθειόνης ανέρχεται περίπου $2,27 \cdot 10^{-3}M$.

Η ανασταλτική δράση των σουλφυδρυλικών ενώσεων αποδόθηκε στην ικανότητά τους να συμπεριφέρονται και σαν δεσμευτές ελευθέρων ριζών, δεδομένου ότι ουσίες με κλασσική δράση δεσμευτών (τριμεταζιδίνη, BHT) προκάλεσαν πλήρη αναστολή της δράσης του P.A.F. σε ανάλογες συγκεντρώσεις.

Από τα ευρήματα προέκυψαν ενδείξεις ότι η παραγωγή ελευθέρων ριζών συμμετέχει στην διαδικασία συσσώρευσης των αιμοπεταλίων από P.A.F. και ότι η δράση αυτή του P.A.F. περιορίζεται ή ρυθμίζεται in vivo από ενδογενώς παραγόμενες ουσίες κατά τη διάρκεια των φυσιοπαθολογικών διαδικασιών στις οποίες ενέχεται το γλυκεριναιθερικό αυτό μόριο.



ENDOGENOUS INHIBITORS OF P.A.F. - INDUCED PLATELET AGGREGATION

By Spyros Karkabounas, Biologist.

Laboratory of Experimental Physiology, Medical School, University
of Ioannina. Director: Prof. G. Kallistratos.

SUMMARY

Platelet Activating Factor (P.A.F.) is a potent mediator of allergy and inflammation, released by a variety of cells and tissues, when they are activated by immune or not stimulous and is involved to many physiopathological processes.

In the present study a variety of compounds naturally occurring in human organism (endogenous) were tested for their ability to inhibit P.A.F. induced aggregation of rabbit and human platelets. A number of exogenous compounds belonging to the same chemical groups or possessing similar biochemical properties were, also, tested, in order to elucidate the way of action, of endogenous substances tested. It was found that naturally occurring 2, 3 diphosphoglyceric acid, 3-phosphoglyceric acid and phosphoserine can inhibit up to 100% the maximun platelet aggregation induced by P.A.F. This action was attributed to their ability to inhibit intracellular glycolysis and oxygen burst, which are exaggerated by the action of P.A.F. Substances possessing sulphidrylic groups (endogenous such as glutatione, methionine etc and exogenous such as a-mercaptopropionyl glycine, D-penicillamine etc) exert, as well, a significant inhibition of P.A.F.-induced platelet aggregation, up to 100%. This inhibition is probably due to their action as free radicals scavengers, since trimetazidine and BHT, which are considered classical scavengers exert



a significant inhibition of P.A.F. action at concentrations similar to the substances tested.

Results are indicating that free radical production is a possible process participating in P.A.F.-induced platelet aggregation and platelet aggregation induced by P.A.F. in vivo, could be regulated by endogenous inhibitors released during the pathophysiological procedures, to which P.A.F. is involved.



ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗΣ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑΣ

ΑΙΜΟΠΕΤΑΛΙΑ ΚΟΥΝΕΛΙΟΥ

Πίνακας 1: Αναστολή 10μl P.A.F. (50 pg) από 0.5μl 2, 3 DPG $2.9 \cdot 10^{-4}$ M

Μεταβλητή: 0.5μl 2, 3 DPG	Πειράματα 28
Μεγίστη τιμή: 7.00	Ελάχιστη τιμή: 3.00 Εύρος: 4.00
Μέσος όρος: 5.071	Σφάλμα standard: 0.224
Μέση τετραγωνική απόκλιση: 1.184	Μεταβλητότητα: 1.402
Συντελεστής μεταβλητότητας: 23.349	

Πίνακας 2: Αναστολή 50pg P.A.F. από 1μl 2, 3 DPG $2.9 \cdot 10^{-4}$ M

Μεταβλητή: 1μl 2, 3 DPG	Πειράματα 28
Μεγίστη τιμή: 14	Ελάχιστη τιμή: 10 Εύρος: 4
Μέσος όρος: 12.679	Σφάλμα standard: 0.247
Μέση τετραγωνική απόκλιση: 1.307	Μεταβλητότητα: 1.708
Συντελεστής μεταβλητότητας: 10.307	

Πίνακας 3: Αναστολή 50pg P.A.F. από 3μl 2, 3 DPG $2.9 \cdot 10^{-4}$ M

Μεταβλητή: 3μl	Πειράματα 28
Ελάχιστη τιμή: 47	Μεγίστη τιμή: 57 Εύρος: 10
Μέσος όρος: 50.536	Σφάλμα standard: 0.419
Μέση τετραγωνική απόκλιση: 2.219	Μεταβλητότητα: 4.925
Συντελεστής μεταβλητότητας: 4.391	



Πίνακας 4: Αναστολή 50pg P.A.F. από 5μl 2, 3 DPG 2.9 . 10⁻⁴ M

Μεταβλητή: 5μl 2, 3 DPG	Πειράματα 28
Ελάχιστη τιμή: 78	Μέγιστη τιμή: 87 Εύρος: 9
Μέσος όρος: 80.929	Σφάλμα standard: 0.360
Μέση τιμή: 81	Μέση τετραγωνική απόκλιση: 1.307
Μεταβλητότητα: 1.708	Συντελεστής μεταβλητότητας: 10.307

Πίνακας 5: Αναστολή 50pg P.A.F. από 10μl 2, 3 DPG 2.9 . 10⁻⁴ M

Μεταβλητή: 10μl 2, 3 DPG	Πειράματα 28
Ελάχιστη τιμή: 98	Μέγιστη τιμή: 100 Εύρος: 2
Μέσος όρος: 99.929	Σφάλμα standard: 0.071
Μέση τιμή: 100	Μέση τετραγωνική απόκλιση: 0.378
Μεταβλητότητα: 0.143	Συντελεστής μεταβλητότητας: 10.378

Πίνακας 6: Αναστολή 25pg P.A.F. από 1μl 2, 3 DPG 2.9 . 10⁻⁴ M

Μεταβλητή: 1μl 2, 3 DPG	Πειράματα 28
Ελάχιστη τιμή: 10	Μέγιστη τιμή: 18 Εύρος: 8
Μέσος όρος: 14.4285	Σφάλμα standard: 0.327
Μέση τιμή: 14.5	Μέση τετραγωνική απόκλιση: 1.7305
Μεταβλητότητα: 2.9947	Συντελεστής μεταβλητότητας: 11.9937



Πίνακας 7: Αναστολή 25rg P.A.F. από 2μl 2, 3 DPG 2.9 . 10⁻⁴ M

Μεταβλητή: 2μl 2, 3 DPG	Πειράματα 28
Ελάχιστη τιμή: 20	Μέγιστη τιμή: 31 Εύρος: 11
Μέσος όρος: 25.5	Σφάλμα standard: 0.5875
Μέση τιμή: 25	Μέση τετραγωνική απόκλιση: 3.1091
Μεταβλητότητα: 9.6666	Συντελεστής μεταβλητότητας: 12.1926

Πίνακας 8: Αναστολή 25rg P.A.F. από 3μl 2, 3 DPG 2.9 . 10⁻⁴ M

Μεταβλητή: 3μl 2, 3 DPG	Πειράματα 28
Ελάχιστη τιμή: 50	Μέγιστη τιμή: 61 Εύρος: 11
Μέσος όρος: 53.57143	Σφάλμα standard: 0.55499
Μέση τιμή: 53	Μέση τετραγωνική απόκλιση: 2.93672
Μεταβλητότητα: 8.62434	Συντελεστής μεταβλητότητας: 5.48188

Πίνακας 9: Αναστολή 25rg P.A.F. από 4μl 2, 3 DPG 2.9 . 10⁻⁴ M

Μεταβλητή: 4μl 2, 3 DPG	Πειράματα 28
Ελάχιστη τιμή: 63	Μέγιστη τιμή: 78 Εύρος: 15
Μέσος όρος: 68.57143	Σφάλμα standard: 0.68512
Μέση τιμή: 68	Μέση τετραγωνική απόκλιση: 3.62531
Μεταβλητότητα: 13.14286	Συντελεστής μεταβλητότητας: 5.28691



Πίνακας 10: Αναστολή 25rg P.A.F. από 5μl 2, 3 DPG 2.9 . 10⁻⁴ M

Μεταβλητή: 5μl 2, 3 DPG	Παρατηρήσεις: 28
Ελάχιστη τιμή: 74	Μέγιστη τιμή: 80 Εύρος: 9
Μέσος όρος: 79.14286	Σφάλμα standard: 0.4386
Μέση τιμή: 80	Μέση τετραγωνική απόκλιση: 2.32083
Μεταβλητότητα: 5.38624	Συντελεστής μεταβλητότητας: 2.93245

Πίνακας 11: Αναστολή 25rg P.A.F. από 10μl 2, 3 DPG 2.9 . 10⁻⁴ M

Μεταβλητή: 10μl 2, 3 DPG	Πειράματα 28
Ελάχιστη τιμή: 88	Μέγιστη τιμή: 100 Εύρος: 12
Μέσος όρος: 97.85714	Σφάλμα standard: 0.69334
Μέση τιμή: 100	Μέση τετραγωνική απόκλιση: 3.66883
Μεταβλητότητα: 13.46032	Συντελεστής μεταβλητότητας: 3.74917

Πίνακας 12: Αναστολή 50rg P.A.F. από 1μl 3 PGA

Μεταβλητή: 1μl 3 PGA	Πειράματα 28
Ελάχιστη τιμή: 5	Μέγιστη τιμή: 8 Εύρος: 3
Μέσος όρος: 7.107	Σφάλμα standard: 0.208
Μέση τιμή: 7.5	Μέση τετραγωνική απόκλιση: 1.1
Μεταβλητότητα: 1.21	Συντελεστής μεταβλητότητας: 15.479



Πίνακας 13: Αναστολή 50pg P.A.F. από 2μl 3 PGA

Μεταβλητή: 2μl 3 PGA	Πειράματα 28
Ελάχιστη τιμή: 50	Μέγιστη τιμή: 58 Εύρος: 8
Μέσος όρος: 53.571	Σφάλμα standard: 0.354
Μέση τιμή: 54	Μέση τετραγωνική απόκλιση: 1.874
Μεταβλητότητα: 3.513	Συντελεστής μεταβλητότητας: 3.499

Πίνακας 14: Αναστολή 50pg P.A.F. από 3μl 3 PGA

Μεταβλητή: 3μl 3 PGA	Πειράματα 28
Ελάχιστη τιμή: 5	Μέγιστη τιμή: 8 Εύρος: 3
Μέσος όρος: 7.107	Σφάλμα standard: 0.208
Μέση τιμή: 7.5	Μέση τετραγωνική απόκλιση: 1.1
Μεταβλητότητα: 1.21	Συντελεστής μεταβλητότητας: 15.479

Πίνακας 15: Αναστολή 50pg P.A.F. από 4μl 3 PGA

Μεταβλητή: 4μl 3 PGA	Πειράματα 28
Ελάχιστη τιμή: 79	Μέγιστη τιμή: 89 Εύρος: 10
Μέσος όρος: 81.893	Σφάλμα standard: 0.535
Μέση τιμή: 81	Μέση τετραγωνική απόκλιση: 2.833
Μεταβλητότητα: 8.025	Συντελεστής μεταβλητότητας: 3.459



Πίνακας 16: Αναστολή 50pg P.A.F. από 5μl 3 PGA

Μεταβλητή: 5μl 3 PGA	Πειράματα 28
Ελάχιστη τιμή:100	Μέγιστη τιμή: 100 Εύρος: ∅
Μέσος όρος:100	Σφάλμα standard: 0.00
Μέση τιμή: 100	Μέση τετραγωνική απόκλιση: 0.00
Μεταβλητότητα: 0.000	Συντελεστής μεταβλητότητας: 0.00

Πίνακας 17: Αναστολή 50pg P.A.F. από 1μl GSH $2.9 \cdot 10^{-4}$ M

Μεταβλητή: 1μl GSH	Πειράματα 25
Ελάχιστη τιμή:28	Μέγιστη τιμή: 35 Εύρος: 7
Μέσος όρος: 31.2	Σφάλμα standard: 0.404
Μέση τιμή: 31	Μέση τετραγωνική απόκλιση: 2.021
Μεταβλητότητα: 4.083	Συντελεστής μεταβλητότητας: 6.477

Πίνακας 18: Αναστολή 50pg P.A.F. από 1.5μl GSH

Μεταβλητή: 1.5μl GSH	Πειράματα 25
Ελάχιστη τιμή:22	Μέγιστη τιμή: 52 Εύρος: 10
Μέσος όρος: 47.160	Σφάλμα standard: 0.528
Μέση τιμή: 48.00	Μέση τετραγωνική απόκλιση: 2.641
Μεταβλητότητα: 6.973	Συντελεστής μεταβλητότητας: 5.599



Πίνακας 19: Αναστολή 50pg P.A.F. από 1.8μl GSH $2.9 \cdot 10^{-4}$ M

Μεταβλητή: 1.8μl GSH	Πειράματα 25
Ελάχιστη τιμή: 68	Μέγιστη τιμή: 75 Εύρος: 7
Μέσος όρος: 71.4	Σφάλμα standard: 0.4
Μέση τιμή: 71	Μέση τετραγωνική απόκλιση: 2.00
Μεταβλητότητα: 4.00	Συντελεστής μεταβλητότητας: 2.801

Πίνακας 20: Αναστολή 50pg P.A.F. από 2μl GSH $2.9 \cdot 10^{-4}$ M

Μεταβλητή: 2μl GSH	Πειράματα 25
Ελάχιστη τιμή: 95	Μέγιστη τιμή: 100 Εύρος: 5
Μέσος όρος: 99.520	Σφάλμα standard: 0.232
Μέση τιμή: 100	Μέση τετραγωνική απόκλιση: 1.159
Μεταβλητότητα: 1.343	Συντελεστής μεταβλητότητας: 1.165



Εκατοσπιαία αναστολή της αιμοπεταλιακής συσσώρευσης που προκαλείται από 25rg P.A.F. με διάφορες ποσότητες 2, 3 DPG

2, 3 DPG ποσότητα σε μl	Αναστολή συσσώρευσης % Μέσος όρος + SD	Αριθμός πειραμάτων
1	14.4 ± 1.7	28
2	25.5 ± 3.1	28
3	53.6 ± 2.9	28
4	68.6 ± 3.6	28
5	97.8 ± 3.7	28
10	97.8 ± 3.7	28

1μl περιέχει $2.9 \cdot 10^{-7}$ moles ουσίας

Εκατοσπιαία αναστολή της αιμοπεταλιακής συσσώρευσης της προκαλούμενης από 50rg P.A.F. μέσω διαφόρων ποσοτήτων 2, 3 DPG

2, 3 DPG ποσότητα σε μl	Αναστολή συσσώρευσης % Μέσος όρος	Αριθμός πειραμάτων
0.5	5.07 ± 1.2	28
1	12.7 ± 1.3	28
3	50.5 ± 2.2	28
5	80.9 ± 1.9	28
10	99.9 ± 0.4	28

1μl περιέχει $2.9 \cdot 10^{-7}$ moles ουσίας



Εκατοσπιαία αναστολή της συσσώρευσης αιμοπεταλίων της προκαλούμενης από 50pg P.A.F. μέσω διαφόρων ποσοτήτων 3 PGA

3 PGA ποσότητα σε μl	Αναστολή συσσώρευσης % Μέσος όρος ± SD	Αριθμός πειραμάτων
1	7.1 ± 1.1	28
2	53.6 ± 1.8	28
3	77.2 ± 1.4	28
4	81.9 ± 2.8	28
5	100	28

1μl περιέχει $2.9 \cdot 10^{-7}$ moles

Εκατοσπιαία αναστολή της αιμοπεταλιακής συσσώρευσης της προκαλούμενης από 50pg P.A.F. μέσω διαφόρων ποσοτήτων GSH

GSH ποσότητα σε μl	Αναστολή συσσώρευσης % Μέσος όρος ± SD	Αριθμός πειραμάτων
1	31.2 ± 2.1	28
1.5	47.2 ± 2.6	28
1.8	771.4 ± 2	28
2	99.5 ± 1.2	28

1μl περιέχει $2.9 \cdot 10^{-7}$ moles



ΑΝΘΡΩΠΙΝΑ ΑΙΜΟΠΕΤΑΛΙΑ

Πίνακας Α: Αναστολή 10μl P.A.F. 10^{-6} M από 5μl 2, 3 DPG $2.9 \cdot 10^{-4}$ M

Μεταβλητή: 2, 3 DPG	Πειράματα 36
Ελάχιστη τιμή: 32	Μέγιστη τιμή: 40 Εύρος: 8
Μέσος όρος: 36.37	Σφάλμα standard: 0.1530
Μέση τετραγωνική απόκλιση: 5.5678	Μεταβλητότητα: 31.000^3
Συντελεστής μεταβλητότητας: 0.15308	

Πίνακας Β: Αναστολή 10μl P.A.F. 10^{-6} M από 8μl 2, 3 DPG $2.9 \cdot 10^{-4}$ M

Μεταβλητή: 2, 3 DPG	Πειράματα 36
Ελάχιστη τιμή: 74	Μέγιστη τιμή: 81 Εύρος: 7
Μέσος όρος: 77.4444	Μέση τιμή: 77.4736
Μέση τετραγωνική απόκλιση: 1.8939	Μεταβλητότητα: 3.5871
Συντελεστής μεταβλητότητας: 0.0244	

Πίνακας Γ: Αναστολή 10μl P.A.F. 10^{-6} M από 10μl 2, 3 DPG $2.9 \cdot 10^{-4}$ M

Μεταβλητή: 2, 3 DPG	Πειράματα 36
Ελάχιστη τιμή: 96	Μέγιστη τιμή: 100
Μέσος όρος: 99.6944	Εύρος: 4
Μέση τετραγωνική απόκλιση: 0.8812	Μεταβλητότητα: 0.7766
Συντελεστής μεταβλητότητας: 0.0083	



Πίνακας Δ: Αναστολή 10μl P.A.F. 10^{-6} M από 5μl GSH $2.9 \cdot 10^{-4}$ M

Μεταβλητή: GSH	Πειράματα 32	
Ελάχιστη τιμή:	Μέγιστη τιμή:	Εύρος:
Μέσος όρος: 47.8125	Μέση τιμή: 47.6111	
Μέση τετραγωνική απόκλιση: 1.5897	Μεταβλητότητα: 2.5273	
Συντελεστής μεταβλητότητας:		

ΓΛΟΥΤΑΘΕΙΟΝΗ. Πίνακας Ε: Αναστολή 10μl P.A.F. 10^{-6} M από 8μl GSH $2.9 \cdot 10^{-4}$ M

Μεταβλητή: GSH	Πειράματα 32	
Ελάχιστη τιμή:84	Μέγιστη τιμή:93	Εύρος: 9
Μέσος όρος: 87.9375	Μέση τιμή: 88.0909	
Μέση τετραγωνική απόκλιση: 1.7309	Μεταβλητότητα: 2.9961	

ΓΛΟΥΤΑΘΕΙΟΝΗ. Πίνακας ΣΤ: Αναστολή 10μl P.A.F. 10^{-6} M από 8μl GSH $2.9 \cdot 10^{-4}$ M

Μεταβλητή: GSH	Πειράματα 32	
Ελάχιστη τιμή:97	Μέγιστη τιμή:100	
Μέσος όρος: 99.7812	Εύρος: 3	
Μέση τετραγωνική απόκλιση: 0.7024	Μεταβλητότητα: 0.4933	



Εκατοσπαία αναστολή της αιμοπεταλιακής συσσώρευσης (ανθρώπινα αιμοπετάλια)
της προκαλούμενης 10μl P.A.F. 10^{-6} M από 2, 3 DPG $2.9 \cdot 10^{-4}$ M

2, 3 DPG ποσότητα σε μl	Αναστολή συσσώρευσης % Μέσος όρος	Αριθμός πειραμάτων
5	36.37 ± 5.56	36
8	77.44 ± 1.89	36
10	99.69 ± 0.88	36

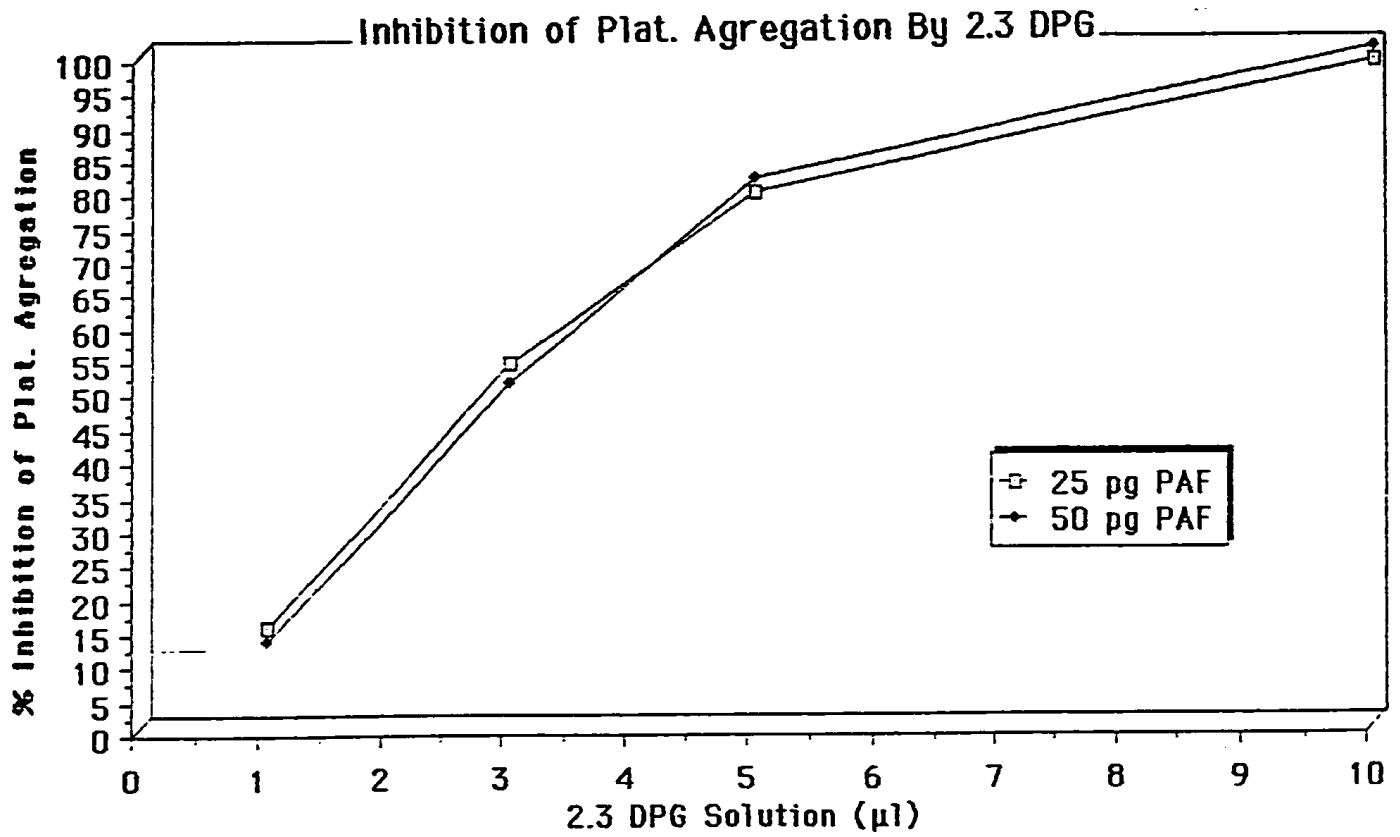
1μl διαλύματος 2, 3 DPG περιέχει ποσότητα $2.9 \cdot 10^{-7}$ moles της ουσίας

Εκατοσπαία αναστολή της αιμοπεταλιακής συσσώρευσης (ανθρώπινα αιμοπετάλια)
της προκαλούμενης από 10μl P.A.F. 10^{-6} M μέσω GSH $2.9 \cdot 10^{-4}$ M

GSH ποσότητα σε μl	Αναστολή συσσώρευσης % Μέσος όρος ± SD	Αριθμός πειραμάτων
5 μl	47.81 ± 1.58	32
8 μl	87.93 ± 1.73	32
10 μl	99.78 ± 0.7	32

1μl διαλύματος περιέχει $2.9 \cdot 10^{-7}$ moles της ουσίας

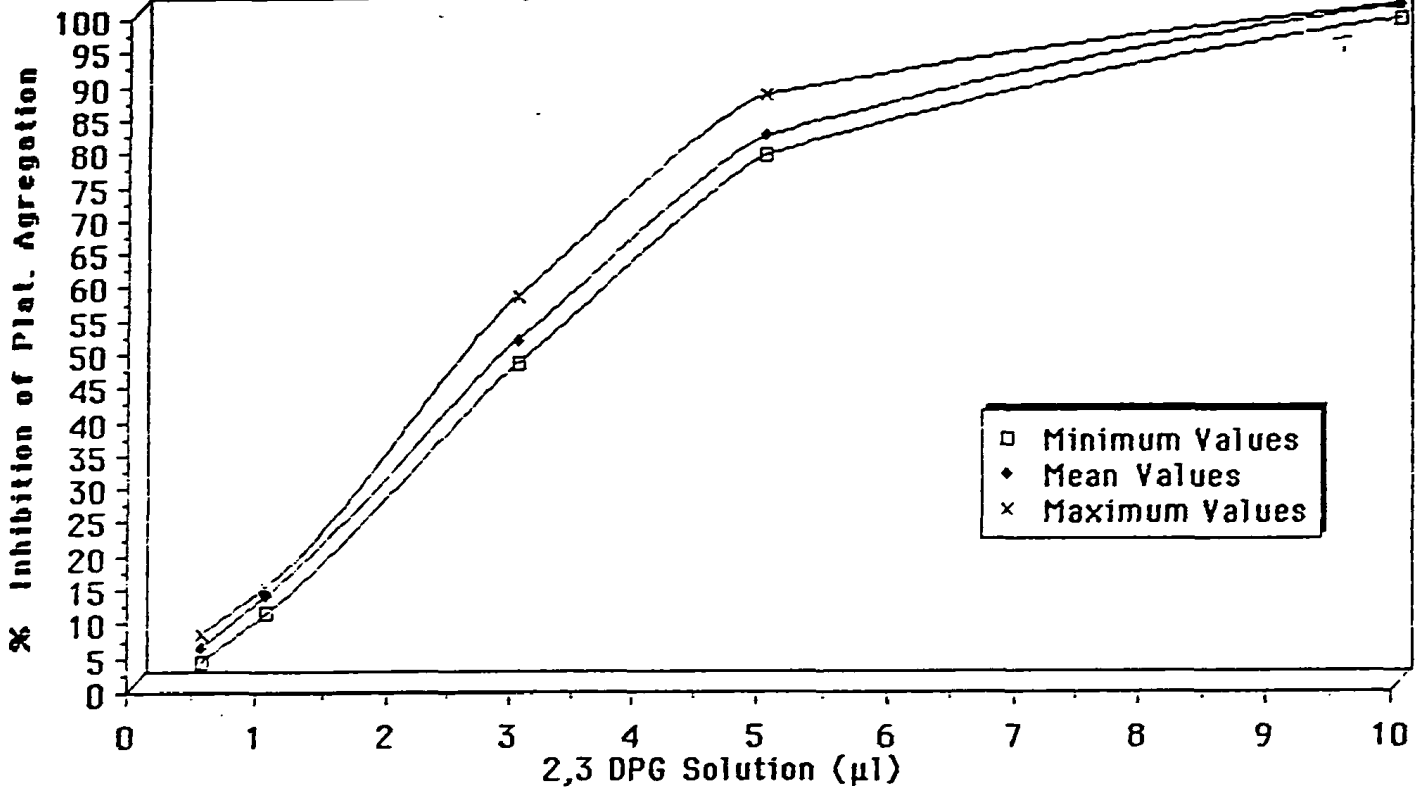


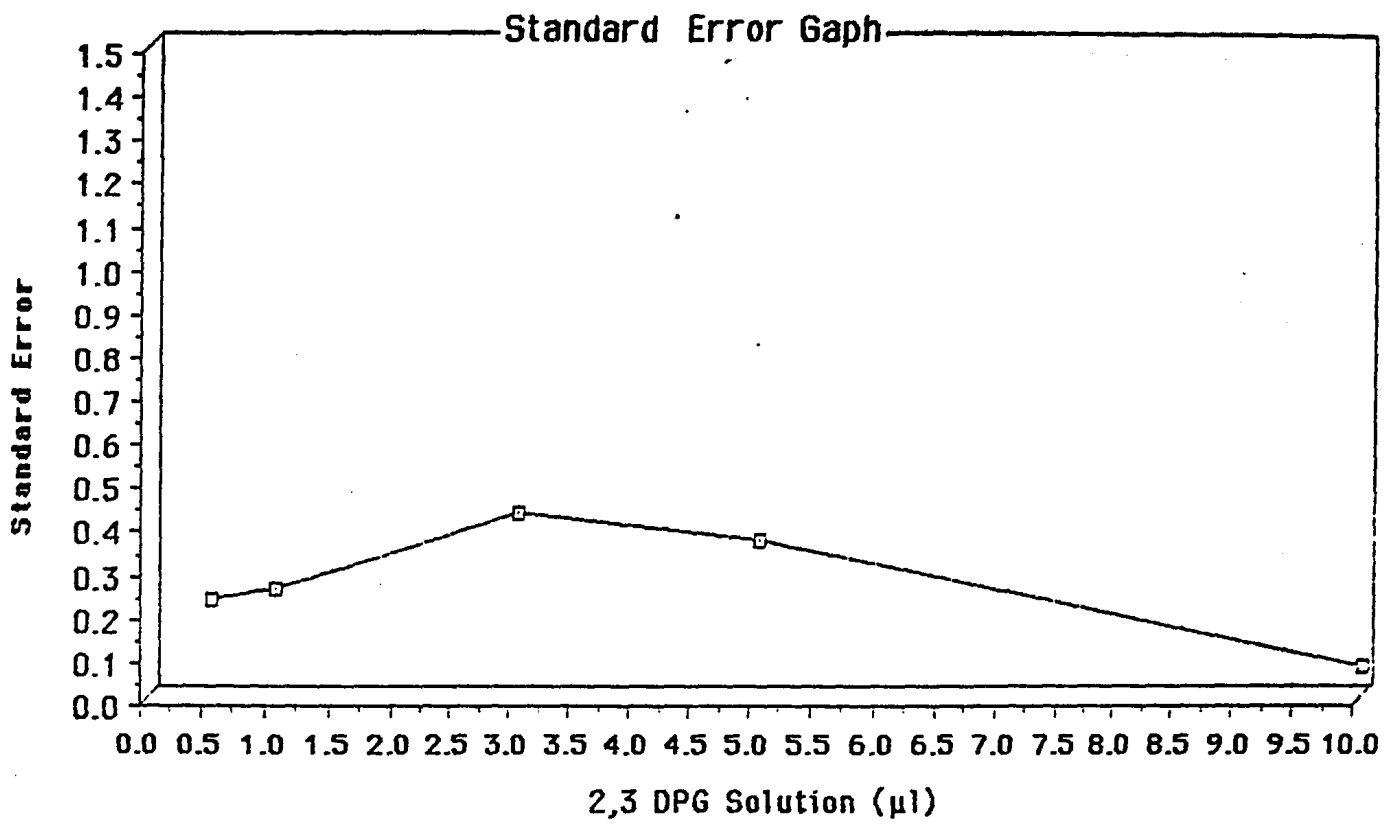


1 μl Διαλύματος = 2,3 DRG $2,9 \cdot 10^{-7}$ Moles

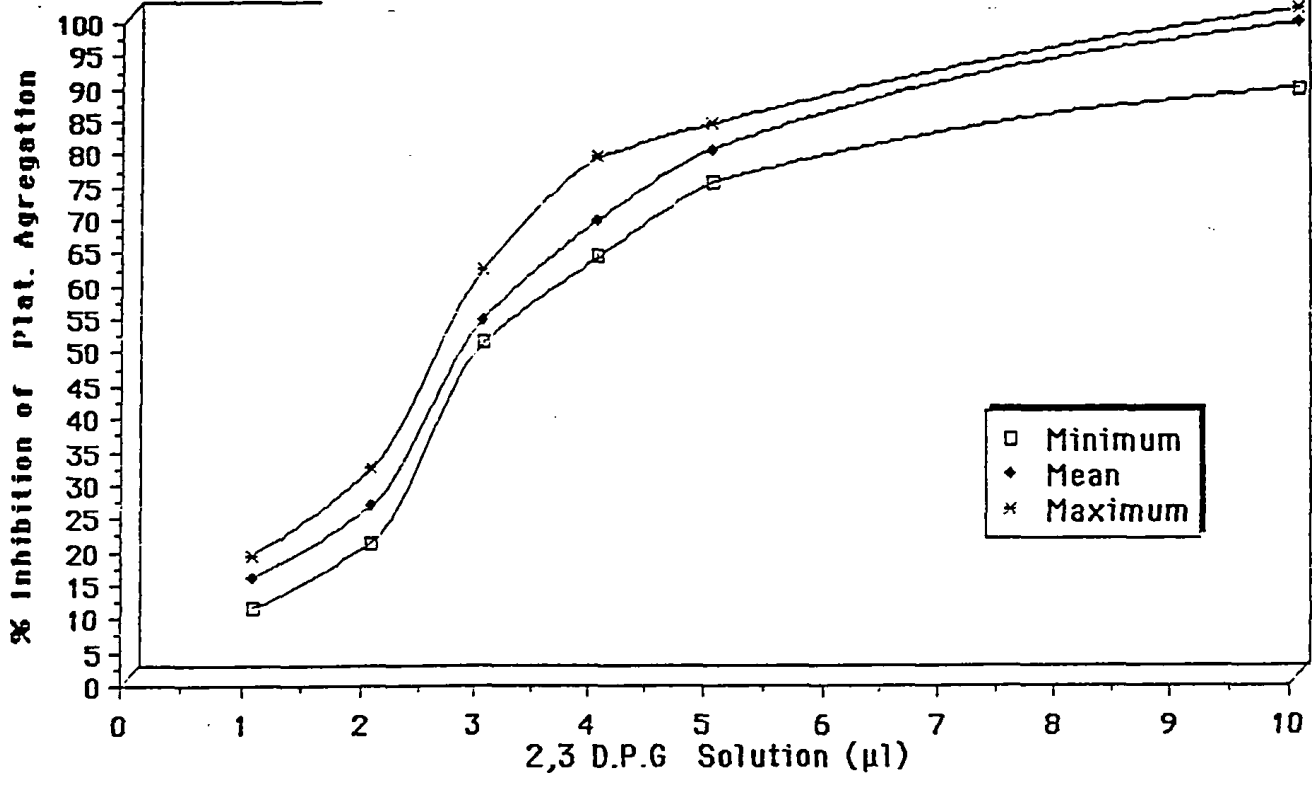


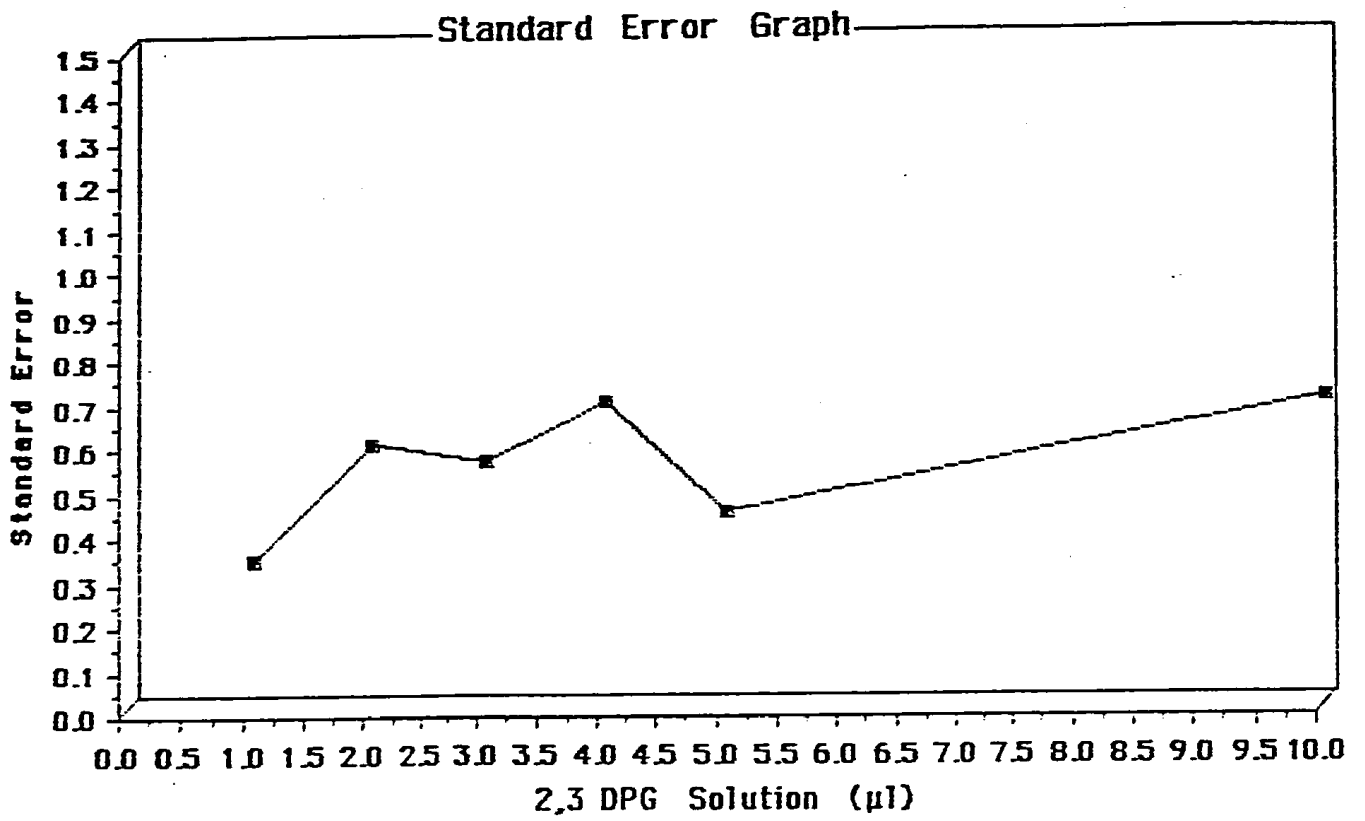
Minimum, Mean & Maximum Values Graph

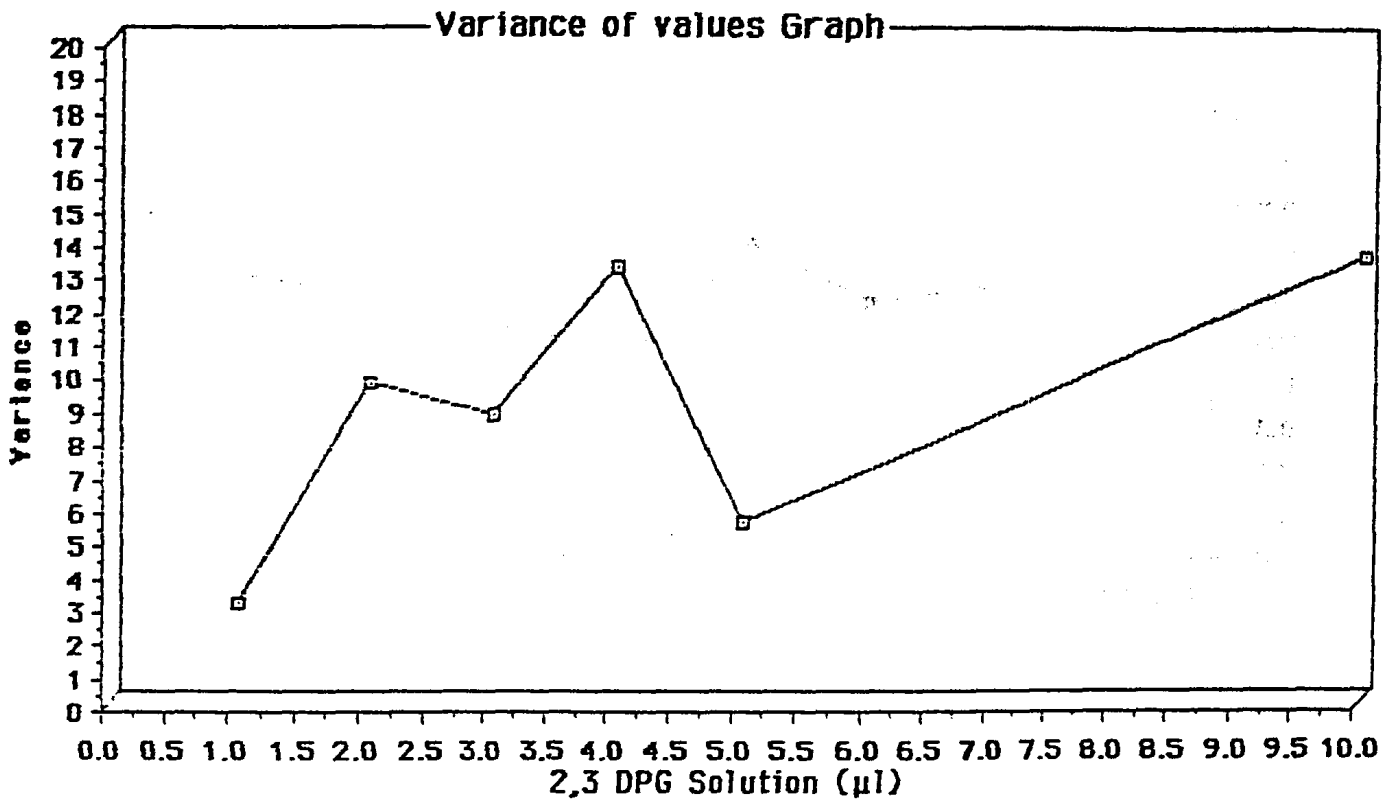


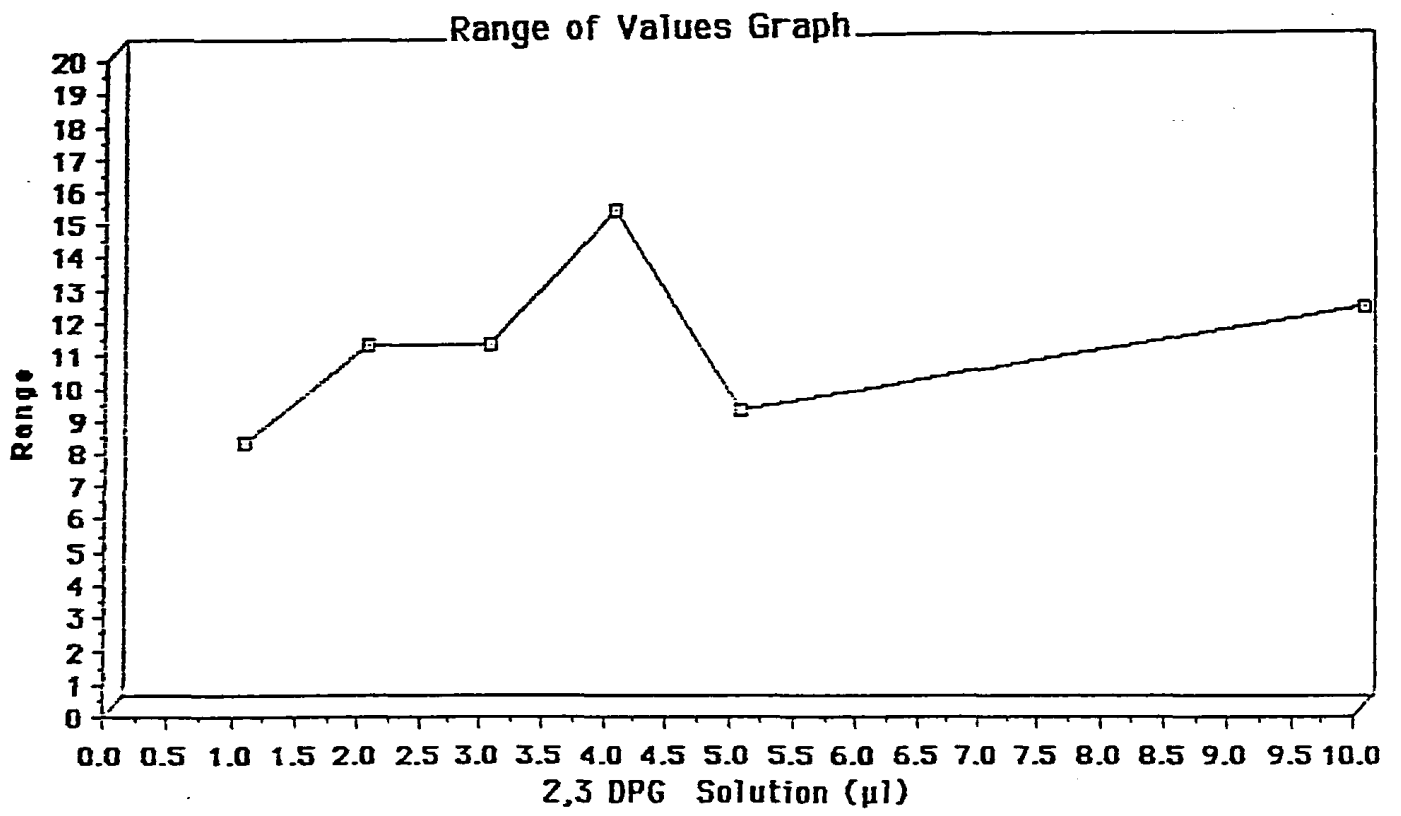


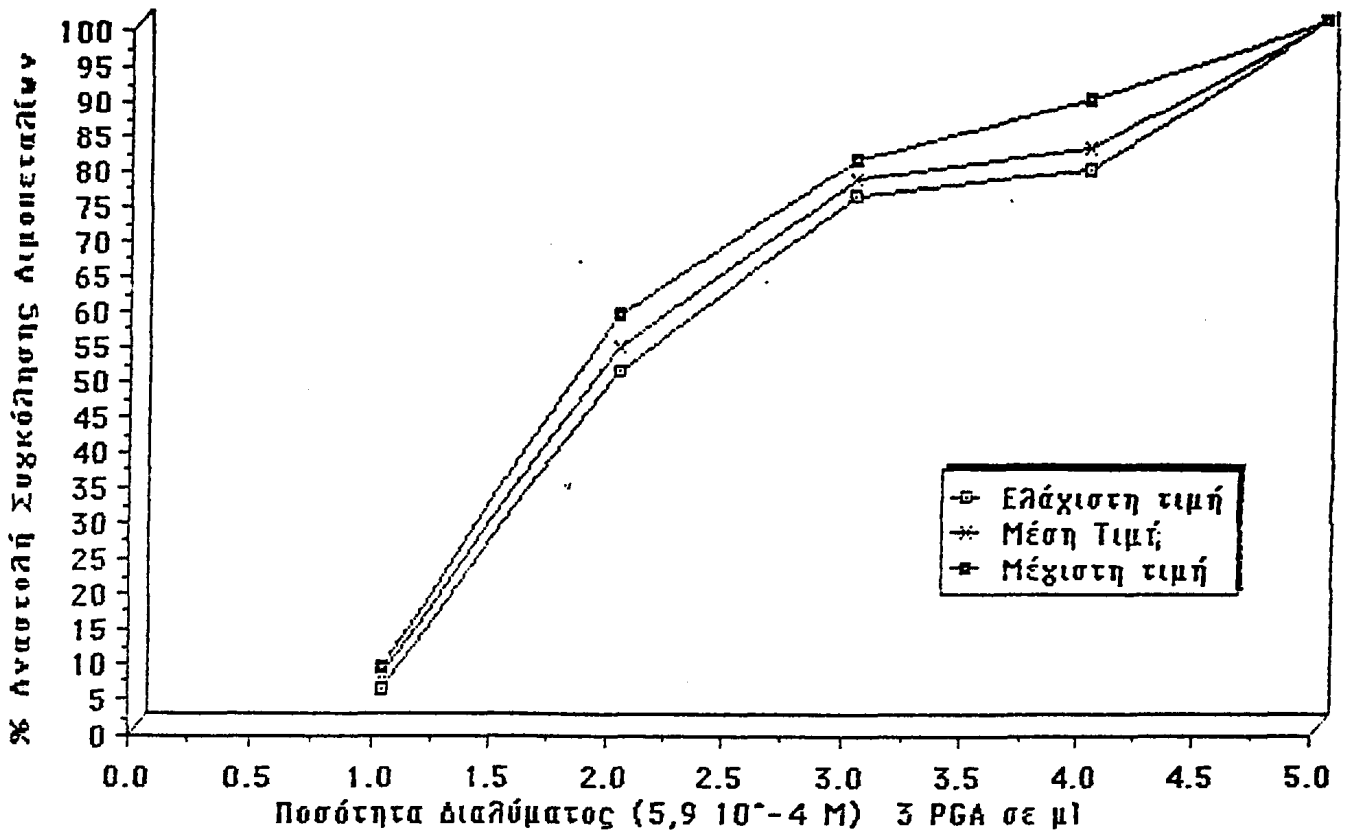
Minimum, Mean & Maximum Values Graph

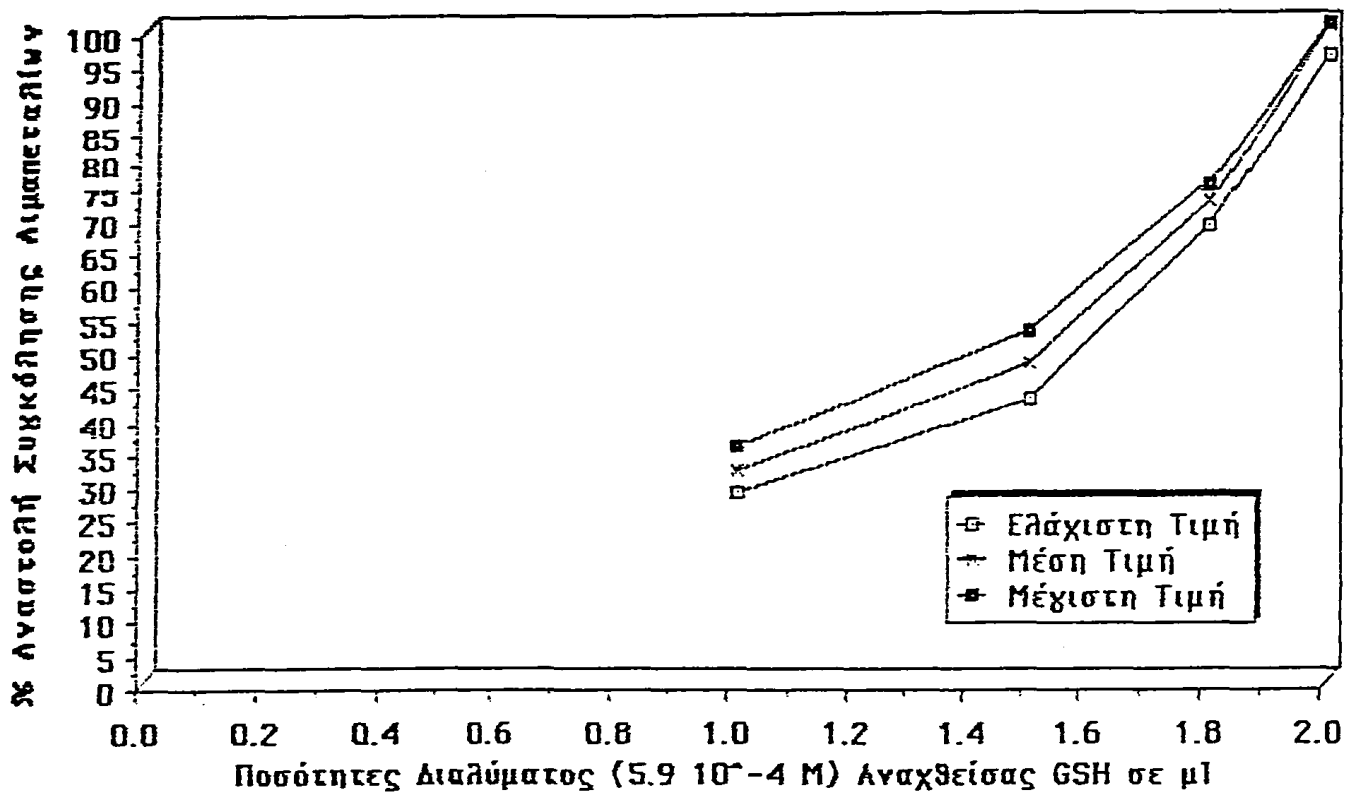












ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- 1 Alam I, Smith JB and Silner MJ: *Thromb Res* 30: 71 (1983).
- 2 Alam I, Smith JB and Silner MJ: (1983) *Lipids* 18, 534.
- 3 Alonso F, Garcia Gil M, Sanchez - Crespo M and Mato JM (1982) *J Biol Chem* 257, 3376.
- 4 Aryonx M, Vargaftig BB, Benveniste J and Le Conedic JP (1980) - *J Pharmacol* 11, 371.
- 5 Bastida E, Nakamura K, Hullin F, Admirall L, Buchanan MR (1988) - *Biochem Biophys Acta* 961 (2) 153-9.
- 6 Bartoli F (1979): In *Ophthalmology Reports on Thiola* (MPG) pg 220-225 - *Editoriale Medicamenta - Milano Italy.*
- 7 Baumgardnez HR and Born 6VR (1969) *J Physiol (London)* 201, 397.
- 8 Becker AJ, McCultogh EA and Till JE (1963) *Nature* 197-452.
- 9 Behuke o (1969) *Anat Rev* 158, 121.
- 10 Bell RL, Kennerly DA, Stanford N and Majerus PW (1979) - *Proc Natl Acad Sci USA* 76, 3238.
- 11 Bell RL and Majerus PM (1980) *J Biol Chem* 255, 1790.
- 12 Benveniste J, Henson PM and Cochrane CC (1972) *J Exp Med* 136, 1356.
- 13 Benveniste J *Nature* 279: 799 (1979).
- 14 Benveniste J *Nature (London)* 249: 581, 1974.



- 15 Benveniste J, Tencè M, Varenne P, Bidault J, Bonillet C, Polonsky J: C.R. Acad. Sx. Paris (D) 289: 1017 (1979).
- 16 Benveniste J Br J Haematol 46: 455 (1980).
- 17 Benveniste J, Chiguard M, Le Conedic JP and Vargaftig BB (1982) - Thromb Res 25, 375.
- 18 Benveniste J (1985) Thromb Res 38, 207.
- 19 Benesh R, Benesh RE (1967). Biochem Biophys Res Commun 26: 162, 1967.
- 20 Benesh R, Benesh RE, Yu CI: Proc Natl Acad Sci USA 59: 526, 1968.
- 21 Benesh R and Benesh RE: Nature 221: 618, 1969.
- 22 Benuett JS and Vilaire G (1979). J Clin Invest 64, 1393.
- 23 Bell RL, Kennerly DA, Stanford N and Majerus PW (1979). Proc Natl Acad Sci USA 76, 3238.
- 24 Bell RL and Majerus PW (1980) J Biol Chem 255, 1790.
- 25 Bills TK, Smith JB and Silver MJ (1977): J Clin Invest 60, 1.
- 26 Billah MM and Lapetina EG (1983). Proc Natl Acad Sci USA 80, 965.
- 27 Blank ML, Snyder F, Byers WL, Brooks B, Muizhead EE, Biochem Biophys Res Com 90: 1191, 1979.
- 28 Blank ML, Lee TC, Fitzzyrald V and Snyder F (1981) J Biol Chem 256, 175.
- 29 Bloom AL (1980) in Haemostasis and Thrombosis (Bloom AL and Thomas DP ed p. 321 Churchill Livingstone, Edinburg.
- 30 Berndt MC, Gregory C, Chong BH, Zola H and Castaldi PA (1983), Blood 62, 800.
- 31 Berneis KM, DaPrada M and Pletscher A, Agents and Actions 1, 35 (1969).



- 32 Betz SJ, Lotycz GZ and Henson PM (1980) J Immunol 124, 2749.
- 33 Betz SJ and Henson PM (1980) J Immunol 125, 2756.
- 34 Bintoli A, Cavallini L: I radicali Liberi - Aspetti biochimici e medici - Quaderni di Biochimica (dir. L. Boloyanni) Piccin Editore Italia 1980.
- 35 Booyse FM and Rafelson ME Jr (1969). Blood 33, 100.
- 36 Born GV and Gillson RE (1959): Physiol (London) 146, 472.
- 37 Breekman MJ, Ward JW and Marcus AJ (1980) J Clin Invest 66, 275.
- 38 Bristow JD, Metcalfe J, Krall MA, Welch EJ, Black JA and Dhinsa DS: J Appl Physiol: Respirat Environ Exercise Physiol 43 (1), 102-106, 1977.
- 39 Broquet C, Tenlade MP, Borghero C, Heymans F and Godfroid JJ (1984), Eur J Med Chem 19, 229.
- 40 Brass LF (1984) J Biol Chem 259, 12571.
- 41 Buckmaster GA (1906) Sci Progress 1, 73.
- 42 Bussolino F, Tetta C and Camussi G (1984) Agents Actions 15, 15.
- 43 Breemer J and Greenberg DM (1960). Biochim Biophys Acta 37, 173.
- 44 Campbell AK: Intracellular Calcium - its Universal Role as Regulator (1985) p. 345, by John Wiley and Sons L.T.D. New York London.
- 45 Carty DJ and Gear ARL (1985). Thromb Haemost 54, 14.
- 46 Carlsson L, Nyström LE, Lindberg U, Kannan KK, Cid-Presdnez H, Lovgren S and Jozvall H (1976) J Mol Biol 105, 353.
- 47 Cazenave J, Benveniste J and Mustard JF (1979) Lab Invest 41, 275.
- 48 Cazenave J, Guccione MA, Packham MA and Mustard JF (1973) in Proceedings of the 16th Meeting of American Society of Haematology (Chicago, Illinois 1-4 Dec. 1973) p. 163 (abstr.).
- 49 Chan LY and Tai HH (1982) Biol Biophys Acta 713, 344.



- 50 Chambers DA, Salzman EW and Neri LL (1967) Arch Biochem Biophys 119, 173.
- 51 Chambers DA, Salzman EW and Neri LL (1968) Exp Biol Med 3, 62.
- 52 Chap H, Mauco G, Simon MF, Benveniste J and Dousty-Blazy L (1981)- Nature (London) 289, 312.
- 53 Chanutin A, Curnish RR (1967): Arch Biochem Biophys 121: 96, 1967.
- 54 Chesney CM, Pifer DD and Huch KM (1983) in Platelet Activating Factor INSERM. Symposium no 23 (Benveniste J and Arnoux B eds) p. 117. Elsevier-Science Publishers, Amsterdam.
- 55 Chesney CM, Pifer DD and Huch KM (1985). Biochim Biophys Res Commun 127, 24.
- 56 Chignard M, Vargaftig BB, Benveniste J and Le Couedic JP (1980). J Pharmacol 11, 371.
- 57 Chignard M, Goëffier E and Benveniste J: in "Mechanisms of stimulus-response coupling in platelet" (eds: Westwick J, Scully MF, MacIntyre DE and Kakkar VV) Plenum Publishing Corporation (1985).
- 58 Chignard M, Tenc'e M, Le Couedic JP, Vargaftig BB, and Benveniste J (1979). Fed Proc 38: 1343 abs (1979).
- 59 Chignard M, Le Couedic JP, Tenc'e M, Vargaftig BB, and Benveniste J. Nature 279: 799 (1979).
- 60 Chignard M, Le Couedic JP, Vargaftig BB, and Benveniste J. Br J Haematol 46, 455 (1980).
- 61 Chignard M, Lalan Keraly C, Nuyez D, Goëffier E and Benveniste J (MacIntyre and Gordon eds): Platelets in biology and pathology III, 1987, Elsevier Science Publishers BV (Biomedical Division).
- 62 Clare KA and Scrutton MC (1984) Eur J Biochem 140, 129.
- 63 Clemetson KJ, McGregor JL, James E, Dechavanne M and Lüscher EF (1982) J Clin Invest 70, 304.



- 64 Clemetson KJ and McGregor JL (McIntype and Gordon eds) in "Platelets in Biology and Pathology III (1987) Elsevier Science Publishers BV (Biomedical Division).
- 65 Cockcroft S and Gomberts BD (1985) - Nature (London) 314, 534.
- 66 Coben P, Brockman MJ, Verkley A, Lisman JWW and Derksen A (1971) - J Clin Invest 50, 762.
- 67 Coëffier E, Cezzina J, Jouvin-Marche E and Benveniste J (1983) Thromb Res 31, 568.
- 68 Coëffier E, Chignard M, Le Coedic JP, Ninio E and Benveniste J (1983) Thromb Haemost 50, 163 abstract.
- 69 Connolly and Limbird LE (1983) Proc Natl Acad Sci USA 80, 5320.
- 70 Connolly and Limbird LE (1983) J Biol Chem 258, 3907.
- 71 Coller BS, Deerschke EJ, Scudder LE and Sullivan CA (1983a). Blood 61, 99.
- 72 Corn M, Jackson DP and Conley CL (1960). Bull John-Hopkins Hosp 107, 90.
- 73 Cordasco DH, Segarnick DJ and Rotrosen (1981) Life Sci 29, 2299.
- 74 Cutler L, Rodan G and Feinstein MB (1978) Biochim Biophys Acta 542, 357.
- 75 Daniel JL, Molish IR, Rigmaide M and Stewart G, (1984) J Biol Chem 259, 9826.
- 76 Daniel JL, Holmsen H and Adelstein RS (1977) Thromb Haemost 38, 284.
- 77 Daniel JL, and Adelstein RS (1976) Biochemistry 15, 2370.
- 78 Daimon T, Mizuhira V and Uchida K (1978), Histochemistry 55, 271.
- 79 Dawson RB, Ottinger WE, Chin WM, Salib AA, Fagan DS and Keath JR - Cellular and Molecular aspects of Aging: "The red cell as a model, pg 349-365 (1985). Alan Liss Inc.



- 80 De Clerck F, David JL and Janssen PA (1982b) in S-Hydroxytryptamine in Peripheral Reactions (Le Clerck F and Vayhoutte MP eds.) pg 83. Raven Press New York.
- 81 Demopoulos CA, Pinckard RN, Hanahan DJ (1979): J Biol Chem 254: 9355.
- 82 Δημόπουλος ΚΑ, Ανδρικόπουλος Ν, Καπούλας ΒΜ, Κρητικού Α, Μαύρη Μ, Μοσχίδης Μ, Σιαφάκας Ν, Τουρνής Σ, Τσελέπης Α, Τσουκάτος Δ, Hanahan DJ, Pinckard RN και McMayns, στον Τόμο: "Παράγοντας ενεργοποίησης αιμοπεταλίων" Πρακτικά 1ης Πανελλήνιας Ημερίδας 28/11/87 σελ. 1-2.
- 83 Deutiche B, Dum J and Dierkesmann: Pffügers Arch 326, 15-34 (71) by Springer-Verlag (1971).
- 84 Da Prada M, Pichard JG and Kettler R (1981) in platelets in Biology and Pathology vol 2 (Gordon JL ed) Elsevier/North Holland/Amsterdam.
- 85 Dutilh C, Haddeman E, Don JA, Tenn Hoor F. Prostaglandins Med 1981, 6: 111.
- 86 Dum J "2, 3 DPG induced displacements of the oxyhemoglobin dissociation curve in blood: Mechanisms and consequences"" Department of Physiology, Medical faculty Technical University, Aachen, Germany.
- 87 Durrell J and Garland JT (1969): Ann N.Y. Acad Sci 165, 743.
- 88 Eaton JW, Brewer GJ, Grover RF (1969). J Lab Clin Med 73, 603.
- 89 Eugel K, Duc G (1968) Nature (London) 219: 936.
- 90 Feinberg H, Belamirich F and Born GVR (1973) Fed Proc 32, 220.
- 91 Feistein MB (1978) in "Calcium in Drug Action" (Weiss GB ed) pg 197-Plenum Press, New York.
- 92 Fesus L, Csaba B and Muszbek L (1977) Clin Exp Immunol 27, 512.
- 93 Fox JEB, Goll DE, Reynolds CC and Phillips DR, J Biol Chem 260, 1060 (1985).



- 94 Fox JEB and Phillips DR (1983) *Semin Hematol* 20, 243.
- 95 Fox JEB, Boyles JK, Reynolds CC and Phillips DR (1984) *J Cell Biol* 98, 1985.
- 96 Fox JEB and Phillips DR (1982) *J Biol Chem* 257, 4120.
- 97 Fouque F and Vargaftig BB (1984) *Br J Pharmacol* 83, 625.
- 98 Gabrielian ES, Akopov SE, Badrhinian SA (1984) *Vestn Acad Med Naak SSSR* (11): 63-8.
- 99 Gartner TK, Gerrard JM, White JG and Williams DC (1981b) *Nature (London)* 289, 688.
- 100 Gardner HA, "Studies on Platelet fine structure. "Thesis for M sc Dept of Pathology, University of Toronto, Canada 1967.
- 101 Gerrard JM, Butler AM, Peterson DA and White JG (1978) *Prostaglandin Med* 1, 387.
- 102 Gerrard JM, Peterson DA and White JG (1981) in "Platelets in Biology and Pathology vol. 2 (Gordon JL ed) pg 407, Elsevier/North Holland, Amsterdam.
- 103 Ginsberg MH, Painter RG, Forsyth J, Birdwell C and Plow EF (1980). *Proc Natl Acad Sci USA* 77, 1049.
- 104 Goldberg ND, Haddox MK, Dunham E, Lopetz C and Haddox JW (1974): In the cold spring harbor symposium on the regulation of proliferation of animal cells pp 609-675. Ed Clarkson B and Basera R, Cold Spring Harbor Laboratory N.Y.
- 105 Gordon JL and Milner AJ: Gordon (ed): "Platelets in biology and pathology/Elsevier/North Holland,/Biomedical Press 1976, chap I.
- 106 Gordstein F, Carroll HJ and Duszkin E (1967) *J Lab Clin Med* 70, 938.
- 107 Greenberg J, Packham MA, Cazenave JP, Reimers HJ and Mustard JF (1975) *Lab Invest* 32, 476.
- 108 Greenwald I (1925) *J Biol Chem* 63, 339.



- 109 Gunccione MA, Packham MA, Kinlough-Rathbone RL, Perry DW and Mustard JF (1976) *Thromb Haemostas* 37, 291.
- 110 Harker LA and Finch CA (1969) *J Clin Invest* 48, 963.
- 111 Ham AW Capitolo 14: "Piastrine e Meccanismo emostatico" pg 296-305 *Istologia ed USES* 1972.
- 112 Haloyen M, Palmer JD, Lohman C, McMayus LM, Pinckard RN, (1981), *Amer Rev Resp Dis* 124: 416.
- 113 Hallam TJ, Sanchez A and Rink TJ (1984) *Biochem J* 218, 819.
- 114 Hallam TJ, Rink TJ and Sanchez A (1983) *Br J Pharmacol* 79, 351p.
- 115 Haslam RJ and Cusack NJ (1983) in *Purinergic Receptors (Receptors and Recognition)* Ser B vol 12 (Burnstock G ed) p 223-chapman and Hall-London.
- 116 Haslam RJ and Taylor A (1971) in *Platalet Ayregation* (Caen J ed) p 81-Masson, Paris.
- 117 Haslam RJ, Lynham JA and Fox JEB (1979) *Biochem J* 178, 397.
- 118 Haslam RJ and Vanderwell M (1982) *J Biol Chem* 257, 6879.
- 119 Haslam RJ and Cusack NJ (1981) in *Purinergic Receptors Receptors and Ricognition*-vol 12 (Burnstock G ed) p. 223 Chapman and Hall-London.
- 120 Hanahan DJ and Shulka SD (1982) *Biochem Biophys Res Commun* 106, 697.
- 121 Harlan JM and Harker LA: "Hemostasis, Thrombosis and Thromboembolic disorders" 1981. *The Medical Clinics of North America* vol 65 n^o 4. Symposium on Prostaglandins in Health and Disease.
- 122 Hardisty RM and Stacey RS *J Physiol (London)* 130, 711.
- 123 Hathaway DR and Adelstein RS (1979) *Proc Natl Acad Sci USA* 76, 1653.



- 124 Heinrich D, Scharf T, Santoso S, Clemetson KJ and Müller-Eckhardt C (1981) *Biochem Pharmacol* 30.
- 125 Henson PM (1970) *J Exp Med* 131, 287.
- 126 Henson PM and Giusberg MH (1981) in *Platelets in Biology and Pathology* vol 2 (Gorgon JL) p. 265 Elsevier/North Holland, Amsterdam.
- 127 Henson PM and Oades ZG (1976) *J Exp Med* 143, 953.
- 128 Henson PM and Pinckard RN (1977): *J Immunol* 119, 2179.
- 129 Henson PM (1977) *J Clin Invest* 60, 481.
- 130 Henson PM (1976) *J Exp Med* 146, 937.
- 131 Hendrikson HS and Reinertsen JL (1971) *Biochem Biophys Res Commun* 44, 1258.
- 132 Hokin LE (1969) *Ann N.Y. Acad Sci* 165, 761.
- 133 Hokin LE (1969) *Ann N.Y. Acad Sci* 165, 695.
- 134 Holmsen H, Day HJ and Storm E (1969) *Biochim Biophys Acta* 186, 254.
- 135 Holmsen H: In *Biochemistry and Pharmacology of Platelets - Ciba Fotation, Symposium 35, New Series 1975*.
- 136 Holsinger JW, Salhany JM and Eliot RS: "Evidence for a relationship between 2, 3 DPG - depleted red - blood cells, slow oxygen release and myocardium ischemia" Division of Cardiology, University of Nebraska Medical Center and Department of Biophysics, University of Chicago.
- 137 Holmsen H, Ostvold AC and Day HJ (1973) *Biochem Pharmacol* 22, 2599.
- 138 Hotchkiss A, Jordan JV, Hirata F, Shulman NR and Axelrod J (1981) *Biochem Pharmacol*
- 139 Hoving T (1974) in "Platelets: production, function, transfusion and storage" (Baldini MG and Ebbe A eds), pg 221 - Grune and Stratton. London (1974).



- 140 Hwang SB, Lee CSC, Cheah MJ and Shen TY (1983) *Biochemistry* 22, 4763.
- 141 Hynes RO, Ali IV, Destree AT, Mautner V, Perkins ME, Senger DR, Wagner DD and Smith KK (1978) *Ann N.Y. Acad Sci* 312, 317.
- 142 Iatrides SG, Iatrides PG, Markidou SG and Ragatz BH (1975), *Science* 187: 259-261.
- 143 Iatrides SG, Hadd H, Kotrotsou M and Iatrides PG (1986) *Thromb Res* 42: 177-185.
- 144 Ieyasu H, Takai Y, Kaibuchi K, Sawamura M and Nishizuka Y (1982) *Biochem Biophys Res Commun* 108, 1701.
- 145 Inarrea P, Gomez-Camponero J, Nieto M and Sanchez-Crespo M (1984) *Europ J Pharmacol* 105, 309.
- 146 Ishizaka T, Hirata F, Ishizaka K and Axelrod J (1980) *Proc Natl Acad Sci USA* 77, 190.
- 147 Kai M and Hawthorne JN (1969) *Ann N.Y. Acad Sci* 165, 761.
- 148 Kallistratos G and Fasske E: "Endogenous and Exogenous inhibitors of polycyclic Aromatic Hydrocarbons Carcinogenesis" reprint from "Folia Biochimica et Biologica Graeca" Vol XVII Fasc 1/2, 1980.
- 149 Καλλίστρατος Γεώργιος: "Χημικά Χρονικά" 29A, 87-102 (1964).
- 150 Kallistratos G (1973): *Drug Desing*, vol IV p: 238-283. Academic Press Inc, New York and London (1973).
- 151 Kasez-Glanzmann R, Jakabova M, George JN and Lüscher EF (1978) *Biochem Biophys Acta* 512, 1.
- 152 Katusic ZS and Vanhoutte PM (1989) *Am J Physiol* 257 (Heart Circ Physiol 26) 433-437.
- 153 Kinlough-Rathbone RL and Mustard JF (1987) in *platelets in biology and pathology III*, pp 239-266, Elsevier Science Publishers BV (Biomedical Division).



- 154 Kinlough-Rathbone RL, Packham MA and Mustard JF (1970) *J Lab Clin Med* 75, 780.
- 155 Kinlough-Rathbone RL, et al (1973) *Am J Physiol* 224, 941.
- 156 Kinlough-Rathbone RL, Mustard JF, Packham MA, Perry DW, Reimers HJ and Cazenave JF (1977) *Thrombo Haemostas* 37, 291.
- 157 Kirschyez M: "Il citoscheletro" στον τόμο "Βιολογία molecolare della cellula" (Bruce A, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson JD eds) Zanichelli casa edit 1981.
- 158 Klopogge E and Akkerman JWN (1984) *Biochem J* 223, 901.
- 159 Kramer RM, De Haas GH, Gorter G and Akkerman JWN (1983a) *Thromb Res* 29, 395.
- 160 Korth R, Reiss H, Brehn G and Hiller E (1981) *Thromb Res* 41, 699.
- 161 Kunichi TJ, Pidard D, Rosa JP and Nurden AT (1981) *Blood* 58, 268.
- 162 Kallistratos G
- 163 Lapetina EG and Cuatrecasas P (1979) *Bioch Biophys Acta* p73, 394.
- 164 Lapetina EG, Billah MM and Cuatrecasas P (1981) *J Biol Chem* 256, 5037.
- 165 Lapetina EG (1982) *J Biol Chem* 257, 7314.
- 166 Lapetina EG and Siegel FL (1983) *J Biol Chem* 258, 7241.
- 167 Laakso Simo (1989): in "Handbook of free Radicals and antioxidants in Biomedicine" vol III (Miquel J, Quintanicha AT and Weber eds) pg 133-139 (1989) CRC Press Inc-Florida.
- 168 Lalau Keraly C and Delantier D (1983a) in platelet Activating Factor-INSERM Symposium n^o 23 (Benveniste J and Arnoux B eds) p 145. Elsevier Science Publishers, Amsterdam.
- 169 Lalau Keraly C and Benveniste J (1982) *Br J Haematol* 51, 313.
- 170 Lassing J and Lindberg U (1985), *Nature (London)* 314, 472.



- 171 Le Breton GC, Venton DL, Enke SE and Haluska PU (1979) Proc Natl Acad Sci USA 76, 4007.
- 172 Lee TC, Malone B, Wasserman SI, Fitzgerald V and Snyder F (1982) Biochem Biophys Res Commun 105, 1303.
- 173 Lee TC, Malone B, Blank M and Snyder F (1981) Biochem Biophys Res Commun 102, 1262.
- 174 Lee TC, Malone B, Blank M and Snyder F (1983) Arch Biochem Biophys 223, 33.
- 175 Leung NL, Kinlough-Rathbone RL and Mustard JF (1977) Br J Haematol 36, 417.
- 176 Leung LLK, Harpel PC, Nachman RL and Radellino EM (1983) Blood 62, 1016.
- 177 Lenfant C, Torrance J, English E, Finch CA, Reynafarje C, Ramos J, Faura J (1968) J Clin Invest 47, 2652.
- 178 Leysen JE, Awonters F, Kennis L, Laduron PM, Vandenberg J and Janssen PAJ (1981) Life Sci 28, 1015.
- 179 Lawler JW, Slayter HS and Coligan JE (1978) J Biol Chem 253, 86009.
- 180 Lips JPM, Sivma JJ and Schiphorst ME (1980) Biochim Biophys Acta 628, 451.
- 181 Lloyd JV, Nishizawa EE, Haldar J and Mustard JF (1972) Br J Haematol 23, 571.
- 182 Lloyd JV, Nishizawa EE, Haldar J and Mustard JF (1973a) Br J Haematol 24, 589.
- 183 Lloyd JV, Nishizawa EE, Haldar J and Mustard JF (1973a) Br J Haematol 25, 77.
- 184 Lloyd JV and Mustard JF (1974) Br J Haematol 26, 243.
- 185 Lianos EA and Zanglis A (1987) J Biol Chem 262: 8990-8993.



- 186 Lotner GZ, Lynch JM, Betz SJ and Henson PM (1980) *J Immunol* 124, 676.
- 187 Lowry OH, Passonneau JV, Hasselberger FK, Schulz DW, *J Biol Chem* 239: 18, 1964.
- 188 Lüscher EF (1956) *Experientia* 12, 294.
- 189 Lynch JM, Lotner GZ, Betz SJ and Henson PM (1979) *J Immunol* 123, 1219.
- 190 Lyons RM, Stanford N and Majerus PW (1975) *J Clin Invest* 50, 924.
- 191 Lyons RM and Shaw JO (1980) *J Clin Invest* 65, 242.
- 192 Manco G, Chap H and Dousty-Blazy L (1979) *FEBS Lett.* 100, 367.
- 193 Manco G, Chap H and Dousty-Blazy L (1979) *FEBS Lett.* 153, 361.
- 194 Markwardt F (1968) *Ann Med Exp Fenn* 46, 407.
- 195 Meelmsten C, Hamberg M, Svensson J and Samuelsson B (1975) *Proc Natl Acad Sci USA* 72, 144.
- 196 Massini P (1970) *Experientia* 26, 87.
- 197 Malm B, Larsson M and Lindberg U (1983) *J Muscle Res Cell Motil* 4, 569.
- 198 Markey FT, Persson T and Lindberg U (1981).
- 199 Markov AK, Oglethorpe NC, Blace TM, Lahan PH, Hellems HK. From the University of Mississippi Medical Center, Jackson Miss. June 15, 1979 - Reprint request: Augel K. Marcou MD Dept of Medicine, University of Mississippi Medical Center 2500 N. State St Jackson Miss. 921.
- 200 Marcus AJ, Safier LB, Ullman HL, Woug KTH, Broekman MJ, Weksler BB and Kaplan KJ - *Blood* 58: 1027 (1981).
- 201 Malone B, Lee TC and Snyder F (1985) *J Biol Chem* 260, 1531.
- 202 Margueria GA and Plow FF (1983) *Ann N. Y. Acad Sci* 408, 556.



- 203 McManus LM, Hanahan DJ, Demopoulos CA, Pinckard RN: J Immunol 124: 2919, 1980.
- 204 McManus LM, Hanahan DJ, and Pinckard RN, (1981) J Clin Invest 67, 903.
- 205 McIntype DE and Shaw AM (1983) Thromb Res 31, 833.
- 206 Mehta J and Mehta P Am J Cardiol 48(2): 366-73/1983 p.3.
- 207 Metz SA (1981): The Medical clinics of North America vol 65/Number 4 pp 713-759 July 1981.
- 208 Mellion BT, Iguarro LJ, Ohlstein EH, Pontecorvo EG, Hyman AL and Kadowitz PJ Blood, vol 57, N° 5 (May 1981) p: 946-955.
- 209 Mitchell RH (1975) Biochim Biophys Acta 415, 81.
- 210 Miller OV, Ayer DE and Gorman RR (1982) Biochim Biophys Acta 770, 216.
- 211 Michell RH (1982) - Nature 296, 492.
- 212 Misselwitz F, Domogatsky SP, Repin VS, Spangenberg P, Till V (1988) - Thromb Res 50 (5) 627-36 Jun 1 1988.
- 213 Moake JL, Ahmed K, Bachus HR and Getfreund DE (1970) Biochem Biophys Acta 211, 3.
- 214 Moucada S and Vane JR (1978) Pharmacol Rev 30, 293.
- 215 Mürer EH (1969) Biochem Biophys Acta 172, 266.
- 216 Mürer EH (1969) - Science 166, 623.
- 217 Mürer EH, Hellem AJ and Resenberg MC (1967) Scand J Clin Lab Invest 19, 280.
- 218 Mustard JF and Packham MA (1968) Ser Haematol 2, 168.
- 219 Mustard JF, Perry DW, Kinlough-Rathboye RL and Packham MA (1975) Am J Physiol 228, 1757.

210



- 220 Mustard JF, Packham MA, Kinlough-Rathboye RL, Perry DW and Regoeczi E (1978) *Blood* 52, 4.
- 221 Mustard JF, Packham MA, Perry DW, Guccione MA and Kinlough-Rathboye RL (1975) in *Biochemistry and Pharmacology of platelets*, CIBA, Foundation Symposium 35 (New Series, p. 47, Elsevier/Excerpta Medica/North Holland, Amsterdam.
- 222 Mustard JF and Packham MA (1970) *Pharm Rev* 22, 97.
- 223 Mustard JF, Kinlough-Rathboye RL, Packham MA, Perry DW, Harfenist EJ and Pai KRM (1979), *Blood* 54, 987.
- 224 Mustard JF, Perry DW, Ardlie NG and Packham MA (1972) *Br J Haematol* 22, 193.
- 225 Mueller HW, Purdon AD, Smith JB and Wykle RL (1983) - *Lipids* 18, 814.
- 226 Mueller et al (1983) *J Biol Chem* 258, 6213.
- 227 Mosher DF, Vaheiri A, Choate JJ and Gahmberg CC (1979) - *Blood* 53, 437.
- 228 Μακρής ΠΕ, Παπαδόπουλος Α, Τσακίρης Δ (1987 - "ΠΑΡΑΓΟΝΤΑΣ Ενεργοποίησης αιμοπεταλίων" - Πρακτικά 1ης Πανελληνίας Ημερίδας (28/11/87 - Παν/μιο Ιωαννίνων, Τομέας Οργανικής και Βιοχημείας - οργαν. επιτροπή Τσουκάτος ΔΚ, Τσελέπης ΑΔ, Λέκκα Μ) σελ. 89.
- 229 Nachman RL and Ferris B (1972) *J Biol Chem* 247, 4468.
- 230 Nachman RL and Ferris B (1974) *J Biol Chem* 249, 704.
- 231 Nachman RL and Leung LLK (1989) *J Clin Invest* 69, 263.
- 232 Namm DH and High JA: *Thromb Res* 20: 285 (1980).
- 233 Natarajan N, Zuzarte-Augustin M, Schid HMO and Graff G (1983) - *Thromb Res* 30, 119.
- 234 Niewwenhuis HK, Akkerman JWN, Sakariassen KS, Hondijk WPM, Nieveelstein PFEM and Sixma JJ (1985) *Thromb Haemost* 54, 124.



- 235 Niewiarowski S, Budzinski AZ, Morinelli TA, Brudzinski TM and Stewart GJ (1981) J Biol Chem 256, 917.
- 236 Nishizuka Y, (1983) Trends Biochem Sci 8, 13.
- 237 Nurdin AT and Dupuis D (1981) Thromb Haemost 46, 216 (a).
- 238 Nach RL and Leung LLK (1982) J Clin Invest 62, 263.
- 239 O'Flaherty JT, Wykle RJ, McCall CE, Shewmake TB, Less CJ and Thomas M (1981) Biochem Biophys Res Commun 101, 1290.
- 240 O'Kumura T and Jamieson GA (1976) J Biol Chem 251, 5944.
- 241 O'Kumura T, Lombard C and Jamieson GA (1976) J Biol Chem 251, 5950.
- 242 Oski FA, Gottlieb AJ, Delivoria-Papadopoulos M, Miller WW: Eugl J Med 280, 1165 (1969) London.
- 243 Oueglia C, Fabris C, Marchisio U, Modica A, Rosso CM, Ricco G: "The oxygen affinity of normal human whole blood measured by double tonometer-PH depending Bohr effect and DPG" - Divisione di Medicina Generale dell'ospedale Civile di Isico, Brescia - Servizio di Fisiopatologia Neonatale della 1^a Clinica Pediatrica dell'Universit'a di Torino (1983).
- 244 Pantely GA, Oyama AA, Metcalf J, Lawson MS and Welch E: Circ. Res 49: 395-404, 1981.
- 245 Packham MA and Mustard JF (1984) in platelets in Biology and Pathology vol 2 (Gordon JL ed) p. 265, Elsevier/North Holland, Amsterdam.
- 246 Peerschke GI, Zucker MB, Grant RA, Egan JJ and Johnson MM (1980), Blood 55, 841.
- 247 Pepper DS and Jamieson GA (1969) Biochemistry 8, 3362.
- 248 Peterson DA, Rao GHR, Mills EL and White JG (1980), Advances in Prostaglandin and Thromboxane Research G: 157-161.
- 249 Pinckard RN, McMayus LM, Halonen M and Hanahan DJ (1981) Int Arch Allergy - Appl Immunol 66 (Suppl 1) 127.



- 250 Pinckard RN, Farr RS, Hanahan DJ: J Immunol 123, 1847 (1979).
- 251 Pieroni G and Hanahan DJ (1983) Arch Biochem Biophys 224, 485.
- 252 Phillips DR and Poh Agin P (1977c) Biochem Biophys Res Commun 75, 200.
- 253 Phillips DR and Poh Agin P (1977a) J Biol Chem 252, 2121.
- 254 Phillips DR and J'acabov`a M (1977) J Biol Chem 252, 5602.
- 255 Pletsher A, Da Prada M and Berneis KH (1971) in Memo irs of the Society for Eudocrinology N^o 19 pg 767 - Cambridge University Press, London.
- 256 Plow EF and Ginsberg MH (1981) J Biol Chem 256, 9477.
- 257 Polley MJ, Leung LLK, Clark FY and Nachman RL (1981) J Exp Med 154, 1058.
- 258 Pumphrey AM (1969) Biochem J 112, 61.
- 259 duPrincipe D, Menichelli A, Damiano AM, Coppela L and Bosticmo V (1976) Clin Chim Acta 75 (1977) 325-329.
- 260 Rapoport S, Guest GM: J Biol Chem 138: 269 (1941)
- 261 Rapoport S, Luebering J: J Biol Chem 189: 683 (1951).
- 262 Reimers HJ, Packham MA, Kinlough-Rathbone RL and Mustard JF (1973), Br J Haematol 25, 675.
- 263 Renooi JW and Snyder F (1981) Biochem Biophys Acta 663, 545.
- 264 Rittenhouse SE (1983) Proc Natl Acad Sci USA 80, 5417.
- 265 Rittenhouse-Simmons S (1979) J Clin Invest 63, 580.
- 266 Rittenhouse-Simmons S and Deykin D (1981): Ih Platelets in biology and Pathology vol 2 (Gordon JL ed) p. 349, Elsevier/North Holland, Amsterdam.
- 267 Sanchez A, Mallam TJ and Rink TJ (1983) FEBS Lett 164, 43.



- 268 Sasty RS and Hokin LE (1966) J Biol Chem 241, 3354.
- 269 Satouchi K, Pinckard RN, McMayus LM and Hanahan DJ (1981) J Biol Chem 256, 442.
- 270 Satouchi K, Oda M, Saito K and Hanahan DJ (1984) Arch Biochem Biophys 234, 3.
- 271 Satouchi K, Pinckard RN, Ferrigui KS, McMayus LM and Hanahan DJ (1981) J Immunol 127, 1250.
- 272 Serhan C, Anderson F, Goodman E, Dunham P and Weissman G (1981) J Biol Chem 256, 2736.
- 273 Serhan CN 1989 in "Handbook of free radical and antioxidants in biomedicine" vol III (Mique J, Quintanilha AT and Weber M eds) pg 93-100 CPC Press-Flori.
- 274 Siegel MI, McConnell RT, Abrahams SL, Porter NA and Cuatrecasas P (1979) Biochem Biophys Res Commun 89, 1273.
- 275 Schneider PR and Kirschner LB (1970) Biochem Biophys Acta 202, 283.
- 276 Show JO, Printz MP, Hirabayashi K and Henson PM (1978) J Immunol 121, 1939.
- 277 Show JO, Klusick S and Hanahan DJ (1981a) Biochem Biophys Acta 663, 222.
- 278 Show JO and Lyons RM (1982a) Biochem Biophys Acta 714, 492.
- 279 Show JO, Pinkard RN, Ferrigni KS, McMayus LM and Hanahan DJ (1981b) J Immunol 127, 1250.
- 280 Show JO and Henson PM (1980) Am J Pathol 98, 791.
- 281 Shulka SD and Hanahan DJ (1982) Biochem Biophys Res Commun 106, 697.
- 282 Smith JB, Silver MJ, Ingerman CM, Kocsis JJ (1974) Thromb Res 5, 291.



- 283 Smith JB, Ingerman CM and Silver MJ (1975) in Biochemistry and Pharmacology of Platelets, CIBA Foundation, Symposium 35 (New Series) p. 207, Elsevier/Excerpta Medica/North Holland, Amsterdam.
- 284 Skaer RJ (1975) in Biochemistry and Pharmacology of Platelets, CIBA Foundation, Symposium 35 (New Series) p. 239 Elsevier/Excerpta Medica/North Holland, Amsterdam.
- 285 Sneddon JM in Progress in Neurobiology vol 1 (Kerkut GA and Phillips JW eds) part 2 p. 151 Pergamon Press New York.
- 286 Snyder F (1985) Med Res Rev 5, 107.
- 287 Σταυρίδης Αιματολογία εκδ. ΤΥΠΟΑΡΤ
- 288 Σταυρίδης Αιματολογία - νέα έκδοση
- 289 Sungerman HJ, Pollock TW, Rosato EF, Delivori'a-Papadopoulos M, Miller LD and Oski FA (1972) Blood vol 39 n^o 4.
- 290 Snyder LM and Reddy WJ (1970) J Clin Invest 49, 1993.
- 291 Swan GW: "Optimal control problems on the circulatory system" in Applications of optimal control theory in Biomechicine - Marce Dekker INC - New York and Basel 1984.
- 292 Taffe Bonita and Kensler TW: "Role of oxidative stress in tumor promotion" - Handbook of free Radicals and antioxidants in biomedicine - vol III pg 35, 49 CRC - Press inc
- 293 Tenc`e M, Polonsky J, Le Couedic JP and Benveniste J (1980) Biochemie 62, 251.
- 294 Tenc`e M, Jouvin-Marche E, Besson G, Record M and Benveniste J (1985) - Thromb Res 38, 207.
- 295 Tenc`e M, Coëffier E, Heymans F, Polonsky J, Godfroid JJ and Benveniste J (1981) Biochemie 63, 723.
- 296 Tenc`e M, Coëffier E, Polonsky J and Benveniste J (1983) Biochem Biophys Acta 755, 526.



- 297 Teisseire BP, Soulard CD, Teisseire LJ, Herigault RA and Laurant DN (1984) *Respiration Physiology* 58, 335-344. Elsevier Science Publishers BV.
- 298 Torrance J, Jacob P, Restrepo A, Eschback J, Lenfant C, Finch CA: *N Engl J Med* 283: 165 (1970).
- 299 Tonqui L, Jacquemin C and Vargaftig BB (1983) *Biochem Biophys Res Commun* 110, 89.
- 300 Tonqui L, Hatmi M and Vargaftig BB (1983b) *Biochem J* 229, 811.
- 301 Tonqui L et al (1985a) *Biochim Biophys Acta* 833, 111.
- 302 Tonqui L, Jacquemin C and Vargaftig BB (1983) *Biochem Biophys Res Commun* 110, 890.
- 303 Tomesch JC, Lee ML and Winslow CM (1984) *Fed Proc* 43, 1505.
- 304 Τσελέπης ΑΔ, Τσουκάτος ΔΚ, Ευαγγέλου Α, Δρούδες Χ, Δημόπουλος ΚΑ, Στον τόμο: Παράγοντας Ενεργοποίησης Αιμοπεταλίων 28/11/87 σελ. 94, Παν/μιο Ιωαννίνων, Τμήμα Οργανικής Βιοχημείας.
- 305 Τσελέπης ΑΔ: Διδακτορική διατριβή.
- 306 Τσάγκαρης ΓΘ, Δημόπουλος ΚΑ, Καπούλας ΒΜ και Τσουκάτος Δ (1987) Παράγοντας Ενεργοποίησης Αιμοπεταλίων Ημερίδα 28/11/87 Πρακτικά σελ. 83, Τμήμα Οργανικής και Βιοχημείας Παν/μίου Ιωαννίνων.
- 307 Τζιμογιάννης Ευάγγελος, Τσιμογιάννης Ι. *Ιατρική* 55, 566-574
- 308 Trudgill PW: Oxygen consumption pg 329-342 in *Handbook of Methods for oxygen radical research* (Robert A Greenwald ed) CRC PRESS 1986 - Boca Raton Florida.
- 309 Tuffin DP, Wade PJ, Lunt DO and McCulloch KG (1983) *Biochim Biophys Acta* 755, 520.
- 310 Tuffin DP (1986) *Adv Exp Biol Med* (Westwich J and McIntype DE eds) p. 204 plenum Press N.Y.



- 311 Tuffin DP, Davey P, Dyer RL, Lunt DO and Wade PJ (1985) Adv Exp Biol Med (Westwick J, Scully M, MacIntyre DE and Kahhar VV eds) p. 204 Plenum - Press New York.
- 312 Tuffin DP and Wade PJ (1985) Prostaglandins 30, 702 (abstr).
- 313 Vargaftig BB, Chiguard M and Benveniste J - Commentary: Present Concepts on the mechanisms of platelet aggregation - Biochemical Pharmacology vol 30 pp 261, 271-Pergamon Press LTD 1981 G. Britain.
- 314 Vargaftig BB, Chiguard M and Benveniste J (1981) Biochem Pharmacol 30, 263.
- 315 Vargaftig BB, Chiguard M, Benveniste J, Lefort J and Wal F (1981b) Ann N.Y. Acad. Sci 370, 119.
- 316 Vargaftig BB, Joseph D, Marlas G and Chevance LG (1982a) Thromb Haemost 48, 67.
- 317 Vargaftig BB, Fouque F, Benveniste J and Odier J (1982b) Thromb Res 28, 557.
- 318 Valone FH and Johnson B (1985) J Immunol 134, 1120.
- 319 Valone FH, Coles E, Reinhold VR and Goetzl EJ (1982) J Immunol 129, 1637.
- 320 Valone FH and Goetzl EJ (1983) J Immunology 48, 141.
- 321 Valone FH (1985) Biochem Biophys Res Commun 126, 502.
- 322 Vicjers JD, Kinlough-Rathbone RL and Mustard JF (1982) Blood 60, 1247.
- 323 Vicjers JD and Mustard JF (1982) in "Platelet Function and Metabolism vol 3 (Holmsen M ed) CRC PRESS, Boca Raton Florida.
- 324 Valeri CR, Zaronis CG, Vecchione JJ, Valeri DA, Anastasi J, Pivacec LE and Emerson P (1980) Transfusion May-June 1980 vol 20 number 3.
- 325 White JG and Gerard JM: Platelet Morphology and the ultrastructure of regulatory mechanisms involved in Platelet activation In Platelets: A



multidisciplinary Approach (G de Gaetano and Garattinis eds) - Raven Press New York 1978.

- 326 White GC (1972) Am J Pathol 66, 295.
- 327 White GC (1984) Biochem Biophys Res Commun 120, 474.
- 328 Winslow RM, Swenberg ML, Berger RL, Shrager RI, Luffana M, Samaja M and Rosso-Bernardi L: J Biol Chem vol 252 n^o 7 pp 2331-2337 (1977).
- 329 Winslow RM, Morrissey JM, Berger RL, Smith DS and Gibson CC (1978) J Appl Physiol Respirat Eviron Exercise Physiol 45 (2): 289-297 (1978).
- 330 Winslow CM, Lee ML and Saunders RM (1985a) In Advances in inflammation Research (Russo Murie F, Mencia-Huerta JM and Chiguard Meds) vol 10 p. 318 Raven-Press New York.
- 331 Woodson RD, Torrance JD, Shapell SD, Lenfante (1970) J Clin Invest 49: 1349.
- 332 Wang and Richards FM (1974) J Biol Chem 249, 8005.
- 333 Zucher MB, Mosesson M, Broekman MJ and Kaplan KL (1979) Blood 54, 8.
- 334 McKean ML and Silver MJ (1986) Biochem J 225, 723.
- 335 Williams KA and Haslami RJ (1984) Biochem Biophys Acta 770, 216.

