







**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ  
ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ**

**ΤΟΜΕΑΣ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΟΣ - ΚΛΙΝΙΚΟΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ  
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑΣ**

**«Η δράση διαφόρων Φλαβονοειδών και άλλων  
αντιοξειδωτικών φυτικής προέλευσης στην αιμοπεταλιακή  
συσσώρευση *in vitro* & *ex vivo*»**

**ΒΑΣΙΛΕΙΟΣ Ι. ΘΕΟΧΑΡΗΣ  
ΟΡΘΟΠΑΙΔΙΚΟΣ ΧΕΙΡΟΥΡΓΟΣ**

**ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ**

**ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2011**





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



**Ημερομηνία αίτησης του κ. Θεοχάρη Βασιλείου:** 2-6-2002

**Ημερομηνία ορισμού Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής:** 484<sup>α</sup>/15-10-2002

**Μέλη Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής:**

Επιβλέπων

Χαραλαμπίδης Κωνσταντίνος Αναπληρωτής Καθηγητής Φυσιολογίας με έμφαση στην Κλινική –Λειτουργική Φυσιολογία Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Μέλη

Ευαγγέλου Άγγελος Καθηγητής Φυσιολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων  
Καρκαμπούνας Σπυρίδων Λέκτορας Φυσιολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

**Ημερομηνία ορισμού θέματος:** 18-12-2002

*«Η Δράση διάφορων φλαβονοειδών και άλλων αντιοξειδωτικών φυτικής προέλευσης στην αιμοπεταλιακή συσσώρευση in vitro και in vivo»*

**Ημερομηνία Ανασυγκρότησης Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής** 650<sup>α</sup>/16-12-2008

**Μέλη Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής:**

Επιβλέπων

Ευαγγέλου Άγγελος Καθηγητής Φυσιολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Μέλη

Χαραλαμπίδης Κωνσταντίνος Αναπληρωτής Καθηγητής Φυσιολογίας με έμφαση στην Κλινική –Λειτουργική Φυσιολογία Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων  
Καρκαμπούνα Σπυρίδων Επίκουρο Καθηγητή Φυσιολογίας με έμφαση στην Περιβαλλοντολογική Φυσιολογία

**ΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΕΠΤΑΜΕΛΟΥΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ :** 690<sup>α</sup>/30-6-2010

<b>Ανωγειανάκης Γεώργιος</b>	Καθηγητής Φυσιολογίας Ιατρικής Σχολής Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης
<b>Ευαγγέλου Άγγελος</b>	Καθηγητής Φυσιολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
<b>Χαραλαμπίδης Κωνσταντίνος</b>	Καθηγητής Φυσιολογίας Ιατρικής Σχολής Δημοκρίτειου Πανεπιστημίου Θράκης
<b>Καλφακάκου Βασιλική</b>	Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Φυσιολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
<b>Κιόρτσας Δημήτριος</b>	– Αναπληρωτής Καθηγητής Φυσιολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
<b>Νικηφόρος</b>	
<b>Καρκαμπούνας Σπυρίδων</b>	Επίκουρος Καθηγητής Φυσιολογίας με έμφαση στην



**Πέσχος Δημήτριος**

Περιβαλλοντολογική Φυσιολογία Ιατρικής Σχολής  
Πανεπιστημίου Ιωαννίνων  
Λέκτορας Φυσιολογίας, Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου  
Ιωαννίνων

Έγκριση Διδακτορικής Διατριβής με βαθμό «ΑΡΙΣΤΑ» στις 4-5-2011

**ΠΡΟΕΔΡΟΣ ΤΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΣΧΟΛΗΣ**

**Ιωάννης Γουδέβενος**

Καθηγητής Παθολογίας- Καρδιολογίας

**Η Γραμματέας της Σχολής**



**ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΣΒΕΝΤΖΟΥΡΗ -ΖΩΗ**



*Στην κόρη μου Αναστασία και τη σύζυγο μου Φοίβη.*





«Ού χρη μέχρις εσχάτης αναπνοής απογνώναι ποτέ»[άγιος Ιωάννης Σιναΐτης].

(Να μην απελπιζόμαστε μέχρι της τελευταίας μας αναπνοής)



## *Πρόλογος*

Τα τέλη του Αυγούστου και τις αρχές του Σεπτεμβρίου του 2001 παρακολουθώντας το σεμινάριο των οξειδαναγωγικών συστημάτων του οργανισμού, με διδάσκοντα τον Επίκουρο Καθηγητή κ. Καρκαμπούνα Σπύρο, τότε Λέκτορα του Εργαστηρίου Φυσιολογίας της Ιατρικής Σχολής Ιωαννίνων και προεδρεύοντα τον Καθηγητή κ. Ευαγγέλλου Άγγελο, συνειδητοποίησα ότι είχε επέλθει μία γνωσιολογική επανάσταση στον χώρο των επιστημών της Ζωής, η οποία αιτιολογούσε βαθιά τις διαδικασίες των βιολογικών βλαβών και υποδείκνυε την δυνατότητα μιας ενοποίησης της πρόληψης, της θεραπείας και της αποκατάστασης των χρόνιων παθήσεων.

Η ανάληψη της ανά χειράς διδακτορικής διατριβής αποτέλεσε για μένα μια θύρα εισόδου στην ενδοχώρα αυτής της νέας γνωσιολογικής περιοχής. Παρακολουθώντας τις διαδικασίες του Εργαστηρίου Φυσιολογίας και εμβαθύνοντας πειραματικά στο ερευνητικό μου αντικείμενο, μου δόθηκε η ευκαιρία να γνωρίσω την εκτεταμένη βιβλιογραφία, την σχετική με το οξειδωτικό stress και τον ρόλο των ελευθέρων ριζών ως λειτουργικά παραγομένων μορίων για την ανάπτυξη των αιμοπεταλιακών αντιδράσεων.

Επίσης κατανόησα ότι ήταν δυνατόν να τροποποιήσουμε την λειτουργικότητα του συνολικού συστήματος της αιμόστασης μεταβάλλοντας τις χημικές ισορροπίες μεταξύ οξειδωτικών και αναγωγικών μορίων που προσθέτουμε στα αιμοπεταλιακά παρασκευάσματα. Ως εξειδικευμένος ορθοπεδικός χειρουργός γνώριζα τον κεφαλαιώδη ρόλο της αιμόστασης για την επιτυχία της οιασδήποτε χειρουργικής επέμβασης, αλλά από την άλλη πλευρά γνώριζα τον σημαντικό ρόλο των αιμοπεταλίων και της αιμόστασης για εκφυλιστικές νόσους όπως π.χ η αρτηριοσκλήρυνση και η μετάσταση.

Οργανώνοντας τη θεραπευτική του ιατρού μου προς την κατεύθυνση αυτή, και ενσωματώνοντας φαρμακολογικά και διατροφικά πρωτόκολλα που είχαν αναπτυχθεί τόσο στο Εργαστήριο Φυσιολογίας όσο και σε άλλα Εργαστήρια της παγκοσμιοτητας πολλοί συνάνθρωποί μας με δύσκολες ασθένειες που βρισκόταν σε μια χρόνια αποτελμάτωση βρήκαν λύσεις και ανακούφιση. Εμπλουτίζοντας όλα αυτά τα χρόνια τη θεραπευτική μου στηρίζοντάς την στη βελτίωση του οξειδαναγωγικού συστήματος πλησιάσαμε και σε συνεργασία με τα μαγνητικά πεδία αυτό που λέμε ευεργεσία και παροχή βοήθειας. Πιστεύω ότι η ιατρική μου ζωή πήρε τη σωστή της διάσταση δίπλα σε αυτούς τους ανθρώπους, ευαίσθητους καθηγητές ταγμένους στην προσφορά έργου διαμέσου της έρευνάς τους για την κοινωνία των ασθενών ανθρώπων.



# Π Ε Ρ Ι Ε Χ Ο Μ Ε Ν Α

<i>Πρόλογος</i>	13
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1</b>	
<i>1.1. Αιμοπετάλια και Προέλευση αυτών</i>	19
<i>1.1.1. Μικρή Ιστορική Θεώρηση</i>	19
<i>1.1.2. Μεγακαρυοκύτταρα και ρόλος τους στην παραγωγή των αιμοπεταλίων</i>	21
<i>1.1.3. Η παραγωγή των αιμοπεταλίων</i>	23
<i>1.1.4. Περιοχές εντοπισμού των μεγακαρυοκυττάρων – πιθανά κέντρα παραγωγής αιμοπεταλίων</i>	25
<i>1.1.5. Ρύθμιση της μεγακαρυοκυτταροποίησης και της θρομβοκυτταροποίησης</i>	32
<i>1.1.6. Νευρική οδός ρύθμισης της μεγακαρυοκυτταροποίησης – θρομβοκυτταροποίησης (Markossian)</i>	39
<i>1.2. Δομές και Λειτουργίες των Αιμοπεταλίων</i>	41
<i>1.2.1. Γενικά στοιχεία της εξέλιξης της αιμοστατικής λειτουργίας</i>	41
<i>1.2.2. Η παρουσία των αιμοπεταλίων στα ζώα</i>	44
<i>1.2.3. Μορφολογία των αιμοπεταλίων</i>	46
<i>1.2.4. Φυσικές ιδιότητες των αιμοπεταλίων</i>	60
<i>1.2.5. Δομή των αιμοπεταλίων</i>	63
<i>1.2.5-α. Η μεμβράνη του αιμοπεταλιακού κυττάρου</i>	64
<i>1.2.5-β. Αιμοπεταλιακά κοκκία και πρωτεΐνες που εκκρίνονται από τα αιμοπετάλια κατά την αντίδραση έκλυσης</i>	76
<i>1.3. Δομή του Αιμοπεταλιακού Κυτταροσκελετού</i>	98
<i>1.3.1. Συσταλτές πρωτεΐνες του κυτταρικού σκελετού - Γενικά</i>	99
<i>1.3.2. Ο Ρόλος του ιονισμένου ασβεστίου ως κυρίαρχου διαβιβαστή δευτέρας τάξης (second messenger) των αιμοπεταλιακών λειτουργιών.</i>	122
<i>1.3.3. Η έννοια του δεύτερου διαβιβαστή (second messenger) και το κατιόν ασβεστίου</i>	124
<i>1.4. Ο Μεταβολισμός των αιμοπεταλίων και ο ρόλος του στις αιμοπεταλιακές αντιδράσεις</i>	132
<i>1.4.1. Γενικά</i>	132
<i>1.4.2. Ποσοτικοποίηση της ενεργειακής παραγωγής ανά οδό</i>	134

1.4.3. Ο ρόλος των κυκλικών νουκλεοτιδίων <i>c – AMP</i> και <i>c – GMP</i>	141
1.4.4. Περιγραφή της οδού μεταβολισμού του αραχιδονικού οξέος και των αιμοπεταλιακών δράσεων των προϊόντων αυτής	146

## **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2**

### **ΤΑ ΦΛΑΒΟΝΟΕΙΔΗ ΚΑΙ ΟΙ ΒΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΤΟΥΣ ΔΡΑΣΕΙΣ**

2.1. Γενικά	163
2.2. Βιοσύνθεση των φλαβονοειδών	170
2.3. Λειτουργικοί ρόλοι των φλαβονοειδών στα Φυτά	172
2.4. Δράσεις των φλαβονοειδών στα ζωικά κύτταρα και στα ενζυμικά τους συστήματα.	176
2.5. Τροποποίηση της λειτουργίας των φλεγμονωδών κυττάρων	195
2.5.1. Λεμφοκύτταρα <i>T</i>	196
2.5.2. Λεμφοκύτταρα <i>B</i>	207
2.5.3. Φυσικά Φονικά Λεμφοκύτταρα (κύτταρα <i>NK</i> )	209
2.5.4. Μαστοκύτταρα και βασεόφιλα	210

## **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3**

### **ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**

#### **ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ**

Δράσεις επιλεγμένων διατροφικών φλαβονοειδών στην συσσώρευση αιμοπεταλίων ανθρώπου <i>ex vivo</i> και πλυμένων αιμοπεταλίων κουνελιού <i>in vitro</i>	213
3.1. Προπαρασκευή διαλυμάτων για τελική χρήση στο συσσωρευόμετρο	213
3.2. Πειράματα συσσώρευσης αιμοπεταλίων ανθρώπου	214
3.2.1. Δότες και αιμοληψίες	214
3.2.2. Παρασκευή των αιμοπεταλίων [προπαρασκευή Πλούσιου σε Αιμοπετάλια Πλάσματος ( <i>PRP</i> ) και Πτωχού σε Αιμοπετάλια Πλάσματος ( <i>PPP</i> )]	214
3.2.3. Περιγραφή του συσσωρευόμετρου και της μεθόδου μελέτης των αιμοπεταλιακών αντιδράσεων <i>ex vivo</i> και <i>in vitro</i>	215
3.2.4. Τυπικά χαρακτηριστικά των φυσιολογικών συσσωρευογραφημάτων	217
3.2.5. Μεταβολές της εικόνας των συσσωρευογραφημάτων κατόπιν της χρήσης αναστολέων της αιμοπεταλιακής συσσώρευσης	220

3.2.6. Εκτέλεση των πειραμάτων αναστολής των αιμοπεταλιακών αντιδράσεων	223
3.3.1. Έλεγχος της παραγωγής θρομβοξάνης $A_2$ (TXA <sub>2</sub> ) από τα αιμοπετάλια του ανθρώπου μέσω διέγερσής τους με αγωνιστές (ADP, PAF, Αραχιδονικό οξύ και λειομυοσαρκωματικά κύτταρα επίμοος Wistar).	225
3.3.2. Εκχύλιση και προσδιορισμός της θρομβοξάνης $A_2$	227
3.4. Προσδιορισμός του αριθμού των υποδοχέων GP IIb – IIIa ανά αιμοπετάλιο μέσω της μεθόδου της κυτταρομετρίας ροής	228
3.5. Πειράματα συσσώρευσης πλυμένων αιμοπεταλίων κουνελιού στο συσσωρευόμετρο	231
3.5.1. Χρησιμοποιηθέντα πειραματόζωα – αιμοληψία	231
3.5.2. Διαλύματα έκπλυσης και συσσώρευσης αιμοπεταλίων	232
3.5.3. Έκπλυση αιμοπεταλίων, μέτρηση, σταθεροποίηση του αριθμού τους.	234
3.5.4. Η δοκιμή των αιμοπεταλιακών αντιδράσεων (αλλαγή σχήματος – αντίδραση έκπλυσης – συσσώρευση) των πλυμένων αιμοπεταλίων του κουνελιού στο συσσωρευόμετρο και η αναστολή τους	237

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

### Α Π Ο Τ Ε Λ Ε Σ Μ Α Τ Α

4.1. ΓΕΝΙΚΑ	239
I. ΑΝΑΣΤΟΛΗ ΤΗΣ ΣΥΣΣΩΡΕΥΣΗΣ ΤΩΝ ΑΙΜΟΠΕΤΑΛΙΩΝ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ ΑΠΟ ΤΑ ΦΛΑΒΟΝΟΕΙΔΗ ΚΟΥΕΡΣΕΤΙΝΗ, ΓΕΝΙΣΤΕΪΝΗ, ΑΠΙΓΕΝΙΝΗ.	240
II. ΔΡΑΣΗ ΤΩΝ ΦΛΑΒΟΝΟΕΙΔΩΝ ΚΟΥΕΡΣΕΤΙΝΗ, ΓΕΝΙΣΤΕΪΝΗ, ΑΠΙΓΕΝΙΝΗ, ΑΠΙΓΕΝΙΝΗ ΣΤΗΝ ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΘΡΟΜΒΟΞΑΝΗΣ $A_2$ ΑΠΟ ΑΙΜΟΠΕΤΑΛΙΑ ΑΝΘΡΩΠΟΥ <i>ex vivo</i> ΣΕ ΔΙΑΦΟΡΕΣ ΦΑΣΕΙΣ ΤΗΣ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑΣ ΣΥΣΣΩΡΕΥΣΗΣ	252
III. Η ΔΡΑΣΗ ΤΩΝ ΦΛΑΒΟΝΟΕΙΔΩΝ ΣΤΗΝ ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΟΥ ΥΠΟΔΟΧΕΑ GP IIb – IIIa ΕΠΙ ΤΗΣ ΕΞΩΤΕΡΙΚΗΣ ΕΠΙΦΑΝΕΙΑΣ ΤΗΣ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗΣ ΜΕΜΒΡΑΝΗΣ ΤΩΝ ΑΙΜΟΠΕΤΑΛΙΩΝ	260
IV. ΔΡΑΣΕΙΣ ΚΟΙΝΩΝ ΜΗ ΦΛΑΒΟΝΟΕΙΔΩΝ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΩΝ ΣΤΗΝ ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΟΥ ΥΠΟΔΟΧΕΑ GP IIb-IIIa	262
V. ΑΝΑΣΤΟΛΗ ΤΗΣ ΣΥΣΣΩΡΕΥΣΗΣ ΤΩΝ ΠΛΥΜΕΝΩΝ ΑΙΜΟΠΕΤΑΛΙΩΝ ΤΟΥ ΚΟΥΝΕΛΙΟΥ ΑΠΟ ΤΑ ΦΛΑΒΟΝΟΕΙΔΗ ΚΟΥΕΡΣΕΤΙΝΗ, ΓΕΝΙΣΤΕΪΝΗ, ΑΠΙΓΕΝΙΝΗ.	265

<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5</b>	
<b>ΣΥΖΗΤΗΣΗ</b>	<b>281</b>
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6</b>	
<b>ΠΕΡΙΛΗΨΗ</b>	<b>309</b>
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7</b>	
<b>ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ</b>	<b>313</b>



## ΚΕΦΑΛΑΙΟ Ι

### *1.1. Αιμοπετάλια και Προέλευση αυτών*

#### *1.1.1 Μικρή Ιστορική Θεώρηση*

Τα αιμοπετάλια, ή αλλιώς θρομβοκύτταρα, αποτελούν ένα από τα έμμορφα συστατικά του αίματος των ανωτέρων ζώων. Εξ αιτίας κυρίως του μικρού τους μεγέθους (2μm) παραβλέφτηκαν από τους πρώτους ερευνητές της οπτικής μικροσκοπίας του αίματος, το ενδιαφέρον των οποίων είχε προσελκυστεί πιο ισχυρά από τα πολύ μεγαλύτερα και πολυπληθέστερα ερυθροκύτταρα, όπως επίσης και από τα εξαιρετικά δυναμικά κύτταρα των λευκών αιμοσφαιρίων.

Έτσι οι ερευνητές εκείνης της ηρωικής εποχής της οπτικής μικροσκοπίας χρειάστηκαν περισσότερο από πενήντα χρόνια προκειμένου να καταλήξουν σε σταθερά και από κοινού παραδεκτά συμπεράσματα για την φύση των αιμοπεταλίων.

Η πρώτη βιβλιογραφική μορφολογική αναφορά περί αυτών των εξαιρετικών απύρηνων κυττάρων δίδεται από τον Donne το 1842 (1), ο οποίος τα θεώρησε ως στοιχεία της λέμφου. Λίγα χρόνια αργότερα η ύπαρξή τους επιβεβαιώθηκε από τον Zimmerman και τον Hayem (2), οι οποίοι εξέφρασαν την άποψη ότι τα αιμοπετάλια ήταν πρόδρομες μορφές των ερυθροκυττάρων. Πολύ πιο εύστοχη ήταν η παρατήρηση του Schultze(3), το 1865, ο οποίος υποστήριξε ότι τα αιμοπετάλια δεν ήταν αυτόνομα κύτταρα αλλά τμήματα των λευκοκυττάρων διαφορετικά από τα κυτταρικά ράκη. Το 1881 ο Wooldridge (4) τα εξέλαβε ως κατακρημνίσεις και συσσωρεύσεις των πρωτεϊνών του πλάσματος, ενδεχομένως εξ αιτίας των προσφύσεων της ινικής που συχνά υπάρχουν σε μικροθρόμβους. Ο Wlasson (5) υπήρξε ένας από τους πρώτους ερευνητές που τα θεώρησε ως αυτόνομη σειρά κυττάρων το 1894, ενώ με την ίδια άποψη συντασσόταν και ο Bremer (6).

Μέσα από όλη αυτή την αμφιλεγόμενη ατμόσφαιρα ξεχώρισε ο Ιταλός Bizzozero (7), ο οποίος για πρώτη φορά περιέγραψε το 1869 εκείνα τα χαρακτηριστικά κύτταρα του μυελού των οστών τα οποία κατόπιν ονομάστηκαν μεγακαρυοκύτταρα και τα οποία αποτελούν την φυσιολογική πηγή προέλευσης των αιμοπεταλίων. Το 1882 (8) ο ίδιος

μελετητής μίλησε καθαρά για αυτόνομη σειρά κυττάρων του αίματος δίνοντας ταυτόχρονα και την πρώτη περιγραφή της ιδιότητας των αιμοπεταλίων να προσκολλώνται. Μέσα στα πλαίσια των περιγραφών του ανέφερε ότι τα μικρά αυτά κύτταρα συμμετέχουν στον σχηματισμό των θρόμβων και έχουν σημαντικό ρόλο στην πήξη του αίματος.

Το 1906 ο Buckmaster(9) απέδειξε με σαφήνεια ότι τα αιμοπετάλια αντιπροσωπεύουν υπαρκτά και μόνιμα στοιχεία του αίματος των υγιών ενηλίκων ανθρώπων αλλά ήταν δύσκολο να εμφανιστούν ακέραια στα μικροσκοπικά παρασκευάσματα τα κατασκευασμένα με τις τεχνικές της τότε εποχής καθόσον ήσαν πολύ ευαίσθητα και εύκολα μετατρέπονταν σε μορφώματα που μπορούσαν να θεωρηθούν είτε κυτταρικά ράκη, είτε τεχνήματα (artifacts).

Ο Wright (10, 11, 12), την ίδια εποχή, μέσω των μελετών του πάνω στην δομή του μυελού των οστών, έδειξε ότι τα αιμοπετάλια παραγόταν από τα μεγακαρυοκύτταρα, τα οποία είχαν περιγραφεί ιστολογικά από τον Bizzozero το 1869, όπως προαναφέραμε.

Γενικά όμως στην επιστημονική ιστοριογραφία των αιμοπεταλίων υπήρξαν αρκετές παλινωδίες, όπως φερ' ειπείν το γεγονός ότι το 1925, ο Starling στο πόνημά του Textbook of Medicine, αναφέρει ότι δεν υπάρχουν, υπό φυσιολογικές συνθήκες, αιμοπετάλια στον οργανισμό (17, αναφέρεται από τον Μακρή ΠΕ, [660]).

Πολύ πιο μετά οι Vazquez και Levis (13) έδειξαν ότι τα αιμοπετάλια και τα μεγακαρυοκύτταρα ταυτίζονται ως προς την κυτταροχημική σύνθεσή τους, όπως επίσης εμφανίζουν και την ίδια αντιγονικότητα. Οι Thierry και Bessis (14) έδειξαν με το μικροσκόπιο αντιθετικής φάσης ότι τα αιμοπετάλια απελευθερώνονται από τα μεγακαρυοκύτταρα. Στο ίδιο συμπέρασμα κατέληξαν οι Kinoshita και Ohno (15), όπως επίσης και ο Yamada (16) στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο. Σύμφωνα με όλους αυτούς τους μεταγενέστερους συγγραφείς η απελευθέρωση των αιμοπεταλίων είναι ένα φαινόμενο που λαμβάνει χώρα τόσο in vivo όσο και in vitro.

Επί τη βάση όλων αυτών των πολυπληθών παρατηρήσεων και μελετών σήμερα έχει κατοχυρωθεί η αντίληψη ότι τα μεγακαρυοκύτταρα και τα αιμοπετάλια αποτελούν μια συνεχή κυτταρική σειρά, η οποία αρχίζει την πορεία της ξεκινώντας από ένα στάδιο αδιαφοροποίητων και πολυδύναμων ως προς την εξέλιξή τους κυτταρικών προγόνων, οι οποίοι κατόπιν διαφοροποιούνται προς μεγακαρυοκύτταρα που ωριμάζουν και τέλος είναι ικανά να παράγουν αιμοπετάλια. Εφ' όσον τα αιμοπετάλια απελευθερωθούν από τα

μεγακαρυοκύτταρα εισέρχονται, στην κυκλοφορία όπου, αν δεν συσσωρευτούν μέσα στο πλαίσιο την διαδικασίας δημιουργίας ενός θρόμβου, εκπίπτουν και καταστρέφονται σε σχετικά βραχέα χρονικά διαστήματα (7-11 ημέρες).

Σήμερα η σειρά μεγακαρυοκύτταρο – θρομβοκύτταρο (MK – ΘΡ) θεωρείται χωρίς αμφιβολία μια εξειδικευμένη κυτταρική σειρά που χάρη στους μορφολογικούς και λειτουργικούς της χαρακτήρες των διαφόρων στοιχείων της, διακρίνεται από όλες τις άλλες κυτταρικές του αίματος σειρές. Επίσης σήμερα έχει καταδειχθεί με σαφέστατο και λίαν πειστικό τρόπο ο πολύ μεγάλος και ιδιαίτερα κρίσιμος ρόλος των αιμοπεταλιακών κυττάρων για τις διεργασίες της αιμόστασης. Ακόμη έχει διασαφηνιστεί ο σημαντικός ρόλος τους στην ανοσολογία και ειδικότερα στην ανοσοαπάντηση, καθώς και ειδικοί μεμβρανικοί υποδοχείς για την ανοσοαντίδραση, οι οποίοι συμμετέχουν στην όλη αντιγονικότητα των αιμοπεταλιακών κυττάρων.

Στις παρακάτω σελίδες θα κάνουμε μια σύντομη περιγραφή της φυσιοπαθολογίας των αιμοπεταλίων, για τις ανάγκες της ανά χείρας διατριβής.

### ***1.1.2. Μεγακαρυοκύτταρα και ρόλος τους στην παραγωγή των αιμοπεταλίων***

Έχουν περάσει 100 και πλέον χρόνια από την πρώτη αναγνώριση των μεγακαρυοκυττάρων ως μιας αυτόνομης κυτταρικής σειράς παραγόμενης από τα πολυδύναμα αδιαφοροποίητα μητρικά κύτταρα (stem cells) του μυελού των οστών, μέσω μιας ιδιαίτερας σύνθετης διαφοροποιητικής πορείας, αρκετά στοιχεία της οποίας μας είναι σήμερα γνωστά. Παρακάμπτοντας τις λεπτομέρειες των αρχικών σταδίων της διαφοροποίησης των μεγακαρυοκυττάρων μπορούμε να πούμε ότι σήμερα διακρίνουμε τους εξής τύπους μεγακαρυοκυττάρων (17).

- ***Τύπος I ή μεγακαρυοβλάστης.***
- ***Τύπος II ή βασεόφιλο μεγακαρυοκύτταρο.***
- ***Τύπος III ή κοκκιώδες μεγακαρυοκύτταρο.***

***Τύπος I (ή μεγακαρυοβλάστης):*** Περιλαμβάνει δύο είδη συγγενικών κυττάρων, τον προμεγακαρυοβλάστη και τον μεγακαρυοβλάστη. Ο προμεγακαρυοβλάστης είναι ένα κύτταρο σχετικά μικρό, στρογγυλού σχήματος, με διάμετρο κυμαινόμενη μεταξύ 7 έως 15 μ. Δεν παρουσιάζει κατατμήσεις. Ο μεγακαρυοβλάστης είναι ομοίως ένα μικρό κύτταρο

σχήματος ελλειψοειδούς ή τραπεζοειδούς, με διάμετρο κυμαινόμενη από 20 έως 30 μ και πρωτόπλασμα βασεόφιλο, που άλλοτε περιέχει κοκκία και άλλοτε όχι. Ο πυρήνας αυτού είναι ευμεγέθης, ως επί το πλείστον απλός και σπάνια λοβωτός. Ο πυρήνας είναι πολυπλοειδής με ποσότητα περιεχόμενου DNA κυμαινόμενη από 4N έως 64N. Το όργανο του Golgi, όπως επίσης το σύστημα των μικροσωληνίσκων είναι καλώς ανεπτυγμένα, ενώ εμφανίζει και στοιχεία της διακριτής μεμβράνης. Από την όλη μορφολογικώς αναγνωρίσιμη σειρά θεωρείται ότι είναι το μόνο που συνθέτει DNA. Αποτελεί το 10,5 % του συνόλου των μορφολογικά αναγνωρίσιμων μεγακαρυοκυττάρων.

**Τύπος II ή βασεόφιλο μεγακαρυοκύτταρο:** Τα κύτταρα αυτά έχουν μεγάλες ομοιότητες με τους μεγακαρυοβλάστες. Διαφέρουν από αυτούς στο επίπεδο της πλοϊδίας το οποίο είναι ίσο ή μεγαλύτερο του 8N. Ο πυρήνας τους επίσης συχνά εμφανίζεται λοβωτός με μέτριο αριθμό αζουρόφιλων κοκκίων. Ως ποσοστό αποτελούν το 10 έως 15 % του συνολικού πληθυσμού των μεγακαρυοκυττάρων.

**Τύπος III ή κοκκιώδες μεγακαρυοκύτταρο:** Τα εν λόγω κύτταρα είναι γιγάντια με διάμετρο τουλάχιστον 100 μ ή μεγαλύτερη. Αναγνωρίζονται πολύ εύκολα από τα μορφολογικά τους χαρακτηριστικά. Το πρωτόπλασμα τους είναι οξύφιλο και άφθονο, ενώ βρίθκει αζουρόφιλων κοκκίων. Ο πυρήνας έχει υποστεί πολλές πυρηνοδιαιρέσεις και εμφανίζει πολυάριθμους λοβούς οι οποίοι διαμορφώθηκαν μετά την παύση των πυρηνοδιαιρέσεων. Εκτός από τον χαρακτηριστικό πολυλοβωτό πυρήνα, το πρωτόπλασμα του κοκκιώδους μεγακαρυοκυττάρου εμφανίζει τρεις μορφολογικά διακεκριμένες συγκεντρικές ζώνες: Μια ζώνη πέριξ του πυρήνα, η οποία είναι πλούσια σε ριβοσωμάτια. Μια ζώνη κεντρική, στην οποία εμπεριέχονται το σύστημα του Golgi, ένας πολύ μεγάλος αριθμός κοκκίων όπως το σύστημα της λεγόμενης διακριτής μεμβράνης (από το οποίο θα διαμορφωθούν οι δομές από τις οποίες κατόπιν παράγονται τα αιμοπετάλια). Τέλος διακρίνουμε μια περιφερική ζώνη η οποία περιέχει το σύστημα των μικροσωληνίσκων, αρκετά κοκκία γλυκογόνου τα οποία προφανώς αποτελούν μια αποθήκη ενέργειας για τις αιμοπεταλιακές αντιδράσεις, όπως επίσης και ινίδια. Τα μεγακαρυοκύτταρα αυτού του είδους αντιπροσωπεύουν το 60 – 70 % του συνολικού πληθυσμού των μεγακαρυοκυττάρων και το καθένα τους περιέχει μεγάλη ποσότητα πολυπλοϊδικού DNA, με βαθμούς πλοϊδίας κυμαινόμενους από 4N έως 64N.

Ο Behnke(18, 19), αρχικά όπως επίσης κατόπιν ο Behnke και Pederson (20) αναφέρουν ότι τα κοκκιώδη μεγακαρυοκύτταρα παρουσιάζουν διακριτή μεμβράνη εντοπιζόμενη, υπό την μορφή φυσαλίδων ή κενотоπιών, μόνο στην κεντρική ζώνη του πρωτοπλάσματος.

Εν συνεχεία οι εν λόγω φυσαλίδες αναπτύσσονται επεκτεινόμενες μέχρι την περιφέρεια και προοδευτικά συνενώνονται δημιουργώντας κοιλότητες που επικοινωνούν με την μεμβράνη του μεγακαρυοκυττάρου. Οι χώροι που περικλείονται στις παράγωγες αυτές κοιλότητες της διακριτής μεμβράνης, αντιστοιχούν στα κυτταρικά σώματα των υπό διαμόρφωση κατοπινών αιμοπεταλίων, ενώ τα μεμβρανικά τοιχώματα των εν λόγω κοιλότητων (που συνεχίζουν να συνενώνονται) θα αποτελέσουν την μεμβράνη των επί μέρους αιμοπεταλίων. Όταν όλα αυτά τα μορφολογικά χαρακτηριστικά εμφανιστούν στον κοκκιώδη τύπο των μεγακαρυοκυττάρων τότε το μεγακαρυοκύτταρο ονομάζεται αιμοπεταλιοπαραγωγό.

**Το αιμοπεταλιοπαραγωγό μεγακαρυοκύτταρο:** Τα αιμοπεταλιοπαραγωγά μεγακαρυοκύτταρα αποτελούν το τελικό στάδιο της εξέλιξης των μεγακαρυοκυττάρων και ανήκουν στον κοκκιώδη τύπο III. Στα κύτταρα αυτά ο ευμεγέθης πολυπλοϊδής πυρήνας περιβάλλεται από τεμάχια πρωτοπλάσματος και το χαρακτηριστικό αυτό αποτελεί ένα διαγνωστικό διαφοροποιητικό κριτήριο από τα κοκκιώδη μεγακαρυοκύτταρα τύπου III που δεν είναι ακόμη σε θέση να παράγουν αιμοπετάλια. Ωστόσο το κύριο μορφολογικό γνώρισμα των αιμοπεταλιοπαραγωγών μεγακαρυοκυττάρων είναι ότι το συνολικό τους πρωτόπλασμα έχει μετασχηματισθεί σε αιμοπεταλιακό συγκύτιο. Τα άκρα του συγκυτίου αυτού λεπταίνουν εν είδη ποδίσκων δίνοντας στο όλο μεγακαρυοκύτταρο μια όψη ομοιάζουσα με την εικόνα ενός κεφαλόποδου. Σύμφωνα με την επικρατούσα ως τώρα άποψη από τα λεπτυσμένα αυτά άκρα απελευθερώνονται τα αιμοπετάλια με έναν μηχανισμό διαπίδσης και εισέρχονται στην κυκλοφορία του αίματος.

### ***1.1.3. Η παραγωγή των αιμοπεταλίων.***

Όλα τα κύτταρα του αιμοποιητικού συστήματος διαιρούνται με διαξονική διαίρεση η οποία χαρακτηρίζεται από ταυτόχρονη διαίρεση του πυρήνα και του πρωτοπλάσματος.

Ωστόσο στα μεγακαρυοκύτταρα που παράγουν αιμοπετάλια αυτός ο κοινότατος τύπος διαίρεσης δεν λαμβάνει χώρα, αλλά εδώ συμβαίνει ένα φαινόμενο κατάτμησης του πρωτοπλάσματος (fragmentation) σε τεμάχια έκαστο των οποίων αποτελεί ένα αιμοπετάλιο. Δηλαδή στο τέλος της ωρίμανσής του κάθε κοκκιώδες αιμοπεταλιοπαραγωγό

μεγακαρυοκύτταρο διαιρεί το πρωτόπλασμα του σε μερικές χιλιάδες αιμοπετάλια ομοιόμορφων διαστάσεων και δομών.

Συνεπώς η παραγωγή των αιμοπεταλίων αντιπροσωπεύει ένα απολύτως μοναδικό φαινόμενο κυτταρικής κατάτμησης το οποίο δεν έχει προηγούμενο στην φυλογένεση των σπονδυλωτών αποτελώντας μια εξαίρεση στην κοινά αποδεκτή άποψη περί κυτταρικής διαίρεσης.

Παρά τον αξιόλογο αριθμό μελετών δεν έχει μέχρι των ημερών μας διευκρινιστεί ο ακριβής μηχανισμός αυτής της «αποσυναρμολόγησης» του πρωτοπλάσματος των μεγακαρυοκυττάρων, η οποία παράγει τα αιμοπετάλια.

Δεν γνωρίζουμε ποιοι παράγοντες ρυθμίζουν αυτό το φαινόμενο, όπως επίσης δεν γνωρίζουμε σε ποιες αιτίες οφείλεται η αύξηση ή η μείωση της αιμοπεταλιακής παραγωγής, καθώς και τα ακριβή σημεία του σώματος στα οποία παράγονται τα αιμοπετάλια.

Είναι πολύ σημαντικό να υπογραμμιστεί ότι τα ώριμα μεγακαρυοκύτταρα με άθικτο ακόμη πρωτόπλασμα, μπορούν να εισέλθουν στο εσωτερικό των κοιλιοειδών αγγείων του μυελού των οστών και να μην είναι δυνατόν να διακριθούν από νεοπαραχθέντα μεγακαρυοκύτταρα.

Με τον τρόπο αυτό τα ώριμα μεγακαρυοκύτταρα της κυκλοφορίας μπορούν να συμμετέχουν στην παραγωγή αιμοπεταλίων στο διαμέρισμα του μυελού των οστών.

Ο ρυθμός παραγωγής των αιμοπεταλίων είναι ανάλογος με το ποσό του πρωτοπλάσματος των μεγακαρυοκυττάρων (21, 22, 23, 17).

Από την άλλη πλευρά το ποσό του πρωτοπλάσματος είναι ανάλογο προς τον αριθμό των λοβών του πυρήνα τους, οπότε λαμβάνοντας υπ' όψιν ότι κάθε πυρηνικός λοβός αντιστοιχεί σε ποσότητα DNA ενός διπλοϊδούς πυρήνα (2N), φαίνεται ότι η ικανότητα παραγωγής αιμοπεταλίων εκ μέρους ενός ώριμου πολυπλοϊδούς μεγακαρυοκυττάρου εξαρτάται από τον βαθμό της πλοϊδίας του.

Το σύνολο ενός πυρηνικού λοβού (2N) με την αντίστοιχη ποσότητα πρωτοπλάσματος έχει χαρακτηριστεί από τον (21, 22, 23) ως *πυρηνική μονάδα* (nuclear unit). Σύμφωνα με τον ορισμό αυτόν ένα μεγακαρυοκύτταρο που περιέχει ποσότητα DNA ίση με αυτήν ενός πυρήνα με αριθμό πλοϊδίας 4N έχει δύο πυρηνικές μονάδες.

Ο μέσος όγκος μιας πυρηνικής μονάδας είναι ίσος προς  $1200 \mu^3$ , ενώ ο μέσος όγκος ενός αιμοπεταλίου είναι ίσος προς  $5 \mu^3$ .

Αυτό σημαίνει ότι μια πυρηνική μονάδα είναι σε θέση να παράγει 250 αιμοπετάλια κατά προσέγγιση.

Οι Harker και Finch (21) υπολόγισαν ότι κάθε πυρηνική μονάδα (NU) παράγει 50 αιμοπετάλια την ημέρα ( $50 \pm 5/NU$ ) ενώ η συνολική ημερήσια παραγωγή αιμοπεταλίων ανέρχεται στα  $35 \times 10^3 \pm 4,3$  /ml ολικού αίματος.

Σύμφωνα με τον Paulus (53, 54, 56, 57, 59, 60) η ημερήσια παραγωγή αιμοπεταλίων ανέρχεται στα  $66,2 \times 10^3$  αιμοπετάλια / ml ολικού αίματος. Οι διαφορές στους υπολογισμούς υποδεικνύουν ότι η ακρίβεια των μετρήσεων δεν είναι απόλυτη και ότι εξαρτάται από πολλούς παράγοντες οι οποίοι την μειώνουν. Δεν αποκλείεται, ωστόσο, οι διαφορές αυτές να οφείλονται σε μεθοδολογικούς λόγους, όπως επίσης και σε διαφορετικές τεχνικές σκευές (παραπομπή αρ.17: Μακρής Π, Αιμόσταση, Φυσιολογία, σελίδες 74, 75, 76, 77, [660])

#### ***1.1.4. Περιοχές εντοπισμού των μεγακαρυοκυττάρων – πιθανά κέντρα παραγωγής αιμοπεταλίων.***

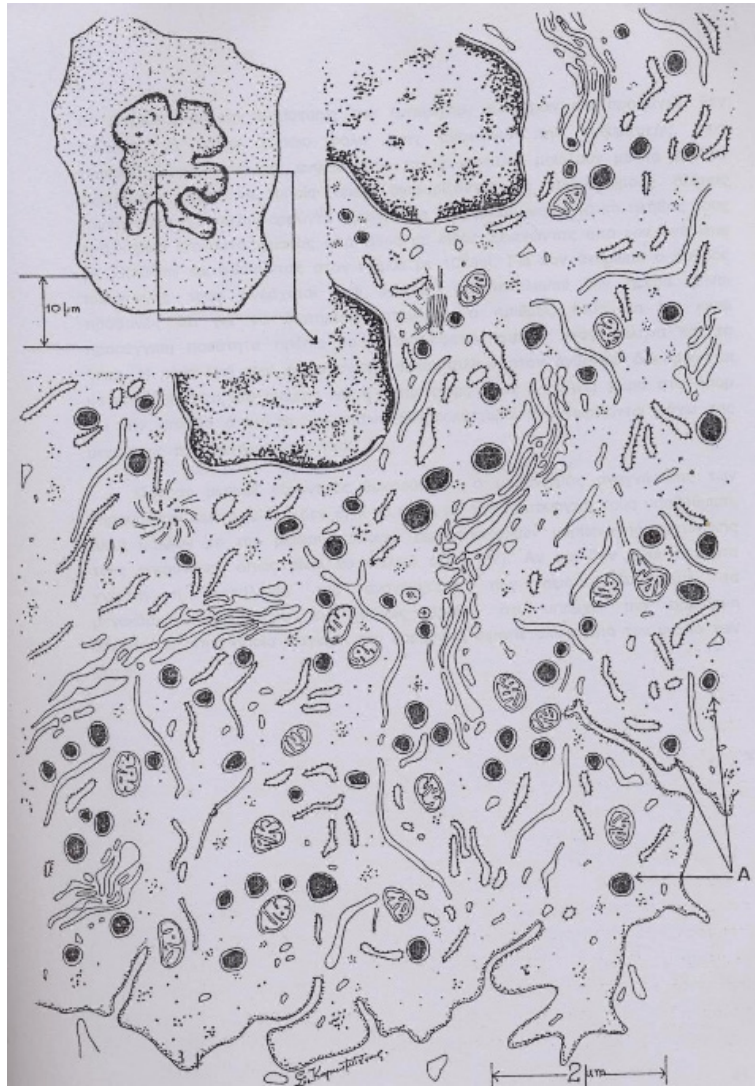
***1. Μυελός των οστών:*** Μέσω ιστολογικών μελετών εκτιμήθηκε ότι στον μυελό των οστών ευρίσκονται  $4 \times 10^7$  μεγακαρυοκύτταρα, αριθμός ο οποίος αντιστοιχεί στο 0,05% - 0,1% του συνολικού αριθμού των αιμοποιητικών κυττάρων που περιέχονται σε αυτόν (21, 54). Βάσει των εν λόγω μελετών τα μεγακαρυοκύτταρα ευρέθησαν εντοπισμένα στην εσωτερική πλευρά του τοιχώματος των κολποειδών, όπως επίσης και στην εξωτερική στοιβάδα των φλεβικών κολποειδών. Η μικροσκόπηση έδειξε ότι τα μεγακαρυοκύτταρα εμφανίζουν λεπτές προεκβολές του κυτταρικού τους σώματος (χαρακτηριστικό σχήμα που μοιάζει με χταπόδι) οι οποίες διαπερνούν το ενδοθήλιο του κολποειδούς και εισέρχονται στον αυλό του. Από τα άκρα των πρωτοπλασματικών αυτών προεκβολών φαίνεται να εξέρχονται τα αιμοπετάλια, ίσως με αποκοπή των ακροτελεύτιων τμημάτων τους, εισερχόμενα στην κυκλοφορία του αίματος. Ενδεχομένως όμως η απόσπαση των αιμοπεταλίων από τα άκρα των πρωτοπλασματικών προεκβολών να λαμβάνει χώρα και με διαπίδυση. Οποσδήποτε ο μηχανισμός της απόσπασης των αιμοπεταλίων από το σώμα του μεγακαρυοκυττάρου πρέπει να λαμβάνει χώρα κατά τρόπον τέτοιον ώστε η μεμβράνη του αιμοπεταλίου να διατηρεί την ακεραιότητα και την συνέχειά της. Αν αυτό δεν συνέβαινε

και το αιμοπετάλιο αποχωρίζονταν με τρόπο που θα προκαλούσε τραυματισμό της μεμβράνης και αποκάλυψη των ενδοαιμοπεταλιακών δομών τότε θα προέκυπτε άμεση ενεργοποίηση του αιμοπεταλίου και συνεπώς συσσώρευσή με άλλα αιμοπετάλια της περιοχής. Με την σειρά της η συσσώρευση θα προκαλούσε καταστροφή των αιμοπεταλίων οπότε η διαδικασία του αποχωρισμού τους από το σώμα του μεγακαρυοκυττάρου θα ήταν μια απρόσφορη και βλαβερή διαδικασία, γεγονός το οποίο δεν συμβαίνει στην πραγματικότητα. Λογικά φαίνεται λοιπόν ότι η μεμβράνη του αιμοπεταλίου πρέπει να διπλώνει ώστε τα ενεργά σημεία της επί των οποίων προσκολλώνται διάφορα μόρια προσκόλλησης (π.χ κολλαγόνο, ινωδογόνο, ινωεκτίνη κ.τ.λ προκειμένου το αιμοπετάλιο να συγκολληθεί κάπου), να κρύβονται και να μην είναι διαθέσιμα για την δημιουργία δεσμών. Συνεπώς κατά την απόσπαση του αιμοπεταλίου από το μεγακαρυοκύτταρο το αιμοπετάλιο πρέπει να είναι ισχυρά απενεργοποιημένο ώστε η γέννησή του να μην είναι αυτοκαταστροφική. Τα ανωτέρω δεδομένα έχουν ληφθεί από μια σειρά μελετών που χρησιμοποίησαν μερικές νέες μεθόδους, καθώς και τον συνδυασμό τους, όπως την μικροκινηματογραφία και την καλλιέργεια μικρών τομών οστών περιεχόντων ερυθρό μυελό, όπως επίσης και τις καλλιέργειες του ερυθρού μυελού των οστών (14, 15, 16, 20, 21, 22, 23, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 33, 34)

**2. Εξωμυελική εντόπιση στην περιοχή των πνευμόνων και σε άλλα όργανα:** Ήδη από το μακρινό 1894 ο Aschoff (98) είχε παρατηρήσει την παρουσία μεγακαρυοκυττάρων στους πνεύμονες του ανθρώπου. Επίσης ο Bessis (14, 42) εντόπισε μεγακαρυοκύτταρα στο ήπαρ, στον σπλήνα, στους νεφρούς αλλά και στην γενική κυκλοφορία.

Ωστόσο, πέραν των φυσιολογικών καταστάσεων, μεγακαρυοκύτταρα και μάλιστα σε αυξημένους αριθμούς παρατηρήθηκαν σε διάφορα όργανα - ειδικώς στον πνεύμονα –και σε διάφορες παθολογικές συνθήκες, όπως π.χ στην φλεγμονή, στην θρόμβωση, στον καρκίνο και την αιμορραγία (16, 25, 27, 28, 29, 31, 33, 34, 45, 46, 49 ).





**Εικόνα αρ.1.** Ωριμο αιμοπεταλιοπαραγωγό μεγακαρυοκύτταρο. Τα αιμοπετάλια δείχνονται με τα τρία βέλη που εκκινούν από το γράμμα Α.

Μια πρώτη ερμηνευτική προσέγγιση για την αυξημένη παρουσία των μεγακαρυοκυττάρων στον πνεύμονα, οδήγησε στην υπόθεση ότι αυτά παγιδεύτηκαν, τρόπον τινά, στην περιοχή των πνευμόνων κατά την διόδό τους μέσω της συστημικής κυκλοφορίας (43, 45, 46). Ωστόσο ο εντοπισμός τους εκεί δεν αποκλείεται να είναι και ζήτημα μιας μετανάστευσης για λόγους, κατ' αρχάς δυσδιάκριτους, αλλά που μπορεί να οφείλονται σε κάποιας μορφής θετικό χημειοτακτισμό, όπως επίσης σε ένα μικροπεριβάλλον ευνοϊκό που επιτρέπει στα κύτταρα αυτά να αγκυροβολήσουν στον πνευμονικό ιστό και να ενταχθούν στις δομές του

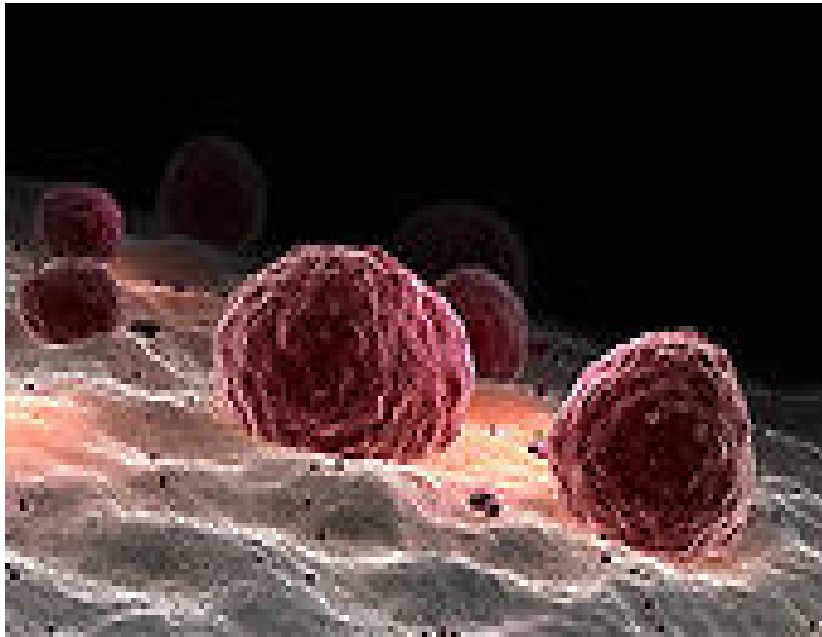
Βάσει των εν λόγω παρατηρήσεων οι Howell και Donahiou (44) διατύπωσαν την πρόταση ότι ο τόπος παραγωγής των αιμοπεταλίων είναι περισσότερο οι πνεύμονες παρά ο μυελός των οστών (17, Μακρής, σελ.71, [660]).

Σχετικά πρόσφατα ένας αριθμός μελετητών αναφέρουν την ύπαρξη αξιόλογων αριθμών μεγακαρυοκυττάρων στην άνω και κάτω κοίλη φλέβα, όπως επίσης και στην αορτή. Χρησιμοποιώντας ειδικά φίλτρα κατακράτησης των μεγακαρυοκυττάρων διαπιστώθηκε ότι η προσέλευση των μεγακαρυοκυττάρων στους πνεύμονες είναι σαφώς μεγαλύτερη από την έξοδό τους από αυτούς. Π.χ ο Kauffman (43) και οι συνεργάτες του αναφέρουν ότι βρήκαν προσεγγιστικά 24 μεγακαρυοκύτταρα /ml αίματος στην δεξιά καρδιακή κυκλοφορία σε σύγκριση με μόνον 0,3/ ml που εντόπισαν στην αριστερή καρδιακή κυκλοφορία. Επίσης ο Tinigard (45) και οι συνεργάτες του καταμέτρησαν 11,9 μεγακαρυοκύτταρα/ml αίματος να προσέρχονται και μόνον 3,9 μεγακαρυοκύτταρα / ml αίματος να φεύγουν από τους πνεύμονες προς την αορτική κυκλοφορία. Σε αυτές τις αξιόλογες παρατηρήσεις στηρίχτηκε κατά κύριο λόγο η άποψη για την πνευμονική παραγωγή των αιμοπεταλίων. Ακόμη διαπιστώθηκε, πράγμα πολύ σημαντικό, ότι τα μεγακαρυοκύτταρα της περιφερικής φλεβικής κυκλοφορίας είναι γενικά φτωχά σε κυτταρόπλασμα, πράγμα που δηλώνει ότι ήδη ο μεγαλύτερος αριθμός αιμοπεταλίων που μπορούσαν να παραχθούν από αυτά είχε ήδη αποσπαστεί από τα μεγακαρυοκύτταρα σε κάποιο άλλο ενδιαίτημα του σώματος. Αυτό οδήγησε στο συμπέρασμα ότι ο πνεύμονας έπρεπε να εμπεριέχει μόνον μεγακαρυοκύτταρα με μικρές ποσότητες κυτταροπλάσματος ως επακόλουθο της εκεί αυξημένης αιμοπεταλιακής παραγωγής. Τα δεδομένα αυτά λαμβάνουν την ορθή τους σημασία με την μελέτη του μεγακαρυοκυττάρου της συστηματικής κυκλοφορίας και των χαρακτηριστικών του, όπως θα δούμε κατωτέρω. Οι σχετικές εργασίες που δείχνουν τα εν λόγω δεδομένα είναι αρκετές και αναφέρονται στην σχετική βιβλιογραφία (56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 65, 66, 93)

**3. Το μεγακαρυοκύτταρο της συστηματικής κυκλοφορίας:** Έχοντας υπ' όψιν το δόγμα της μυελικής εντόπισης των μεγακαρυοκυττάρων υπήρξε μια έκπληξη το γεγονός ότι ένας πολύ μεγάλος αριθμός αυτών και μάλιστα πλούσιων σε κυτταρόπλασμα απαντάται στην πνευμονική αρτηρία. Από αυτά λίγα εισέρχονται άθικτα στην συστημακή κυκλοφορία ενώ όσα ανευρίσκονται στο φλεβικό δίκτυο συνήθως χάνουν τον πυρήνα τους. Το μεγαλύτερο μέρος του κυτταροπλάσματος των μεγακαρυοκυττάρων αποσπάται στην περιοχή των

πνευμόνων, οπότε φαίνεται πιθανόν ότι η πνευμονική μικροκυκλοφορία αποτελεί τόπο παραγωγής των αιμοπεταλίων.

Η απομόνωση των μεγακαρυοκυττάρων της κυκλοφορίας γίνεται με μια παραλλαγή της τεχνικής του κυτταρικού διαχωρισμού (elutriation) προσαρμοσμένη στα χαρακτηριστικά αυτού του τύπου κυττάρων. Με την τεχνική αυτή έγιναν ποσοτικοί προσδιορισμοί επίσης της ποσότητας του κυτταροπλάσματος των εν λόγω κυττάρων στον μυελό των οστών.



*Εικόνα αρ. 2.* Ωριμα μεγακαρυοκύτταρα σε καλλιέργεια.

Μέσω αυτής της προσέγγισης ευρέθη ότι τα ανέπαφα μεγακαρυοκύτταρα που κατευθύνονται στους πνεύμονες μέσω της πνευμονικής κυκλοφορίας είναι περισσότερα από αυτά που εξέρχονται από τους πνεύμονες, υποδεικνύοντας ότι ένας αριθμός των εισερχομένων κατακρατείται στους πνευμονικούς ιστούς.

Το δεδομένο αυτό προέκυψε μέσω ενός πειράματος δια του οποίου οι πειραματιστές έλαβαν, χρησιμοποιώντας έναν καθετήρα εμφυτευμένο στην πνευμονική αρτηρία, ποσότητες αίματος, όπως επίσης και ποσότητες αίματος δια καθετηριασμού της αορτής, από έναν αριθμό 20 εθελοντών. Κατόπιν στα ληφθέντα δείγματα αίματος έγινε λεπτομερής ανάλυση για τον ποσοτικό προσδιορισμό των μεγακαρυοκυττάρων που περιεχόταν σε αυτά..

Οι μετρήσεις έδειξαν ότι ο αριθμός των μεγακαρυοκυττάρων τα οποία εισερχόταν στην πνευμονική κυκλοφορία ήταν πολύ μεγαλύτερος από εκείνα που εξερχόταν. Συγκεκριμένα στην πνευμονική αρτηρία η ποσότητα των μεγακαρυοκυττάρων ήταν ίση προς 4,4 κύτταρα/ml, ενώ στην αορτή ή αντίστοιχη ποσότητα ήταν 0,4 κύτταρα/ ml αίματος. Δηλαδή 11 φορές μεγαλύτερος αριθμός μεγακαρυοκυττάρων εισερχόταν στον πνεύμονα από τον αριθμό εκείνων που τον εγκατέλειπαν. Επίσης διαπιστώθηκε ότι τα 2/3 των μεγακαρυοκυττάρων της πνευμονικής κυκλοφορίας εξερχόμενα από τον πνεύμονα είχαν χάσει το 75% του φυσιολογικού τους πρωτοπλάσματος.

Μορφολογικά τα ανέπαφα μεγακαρυοκύτταρα της πνευμονικής κυκλοφορίας ήσαν όμοια με εκείνα που ανευρίσκονται στον μυελό των οστών. Επίσης τα ¾ εξ αυτών, με βάση τα μορφολογικά χαρακτηριστικά τους ταξινομήθηκαν ως αιμοπεταλιοπαραγωγά, ενώ το εναπομένον ¼ ως μεγακαρυοκύτταρα τρίτου σταδίου.

Η μορφομετρική ανάλυση έδειξε ότι τα μεγακαρυοκύτταρα της πνευμονικής αρτηρίας ήσαν ευμεγέθη με μέση διάμετρο 38,6 μ και συνεπώς σαφώς μεγαλύτερα από τα πλέον μεγάλα του φυσιολογικού μυελού των οστών του ανθρώπου.

Επίσης η χρήση τεχνικών ανοσοϊστοχημείας (χρήση φθορίζοντων αντισωμάτων που σημαίνουν εκλεκτικά συγκεκριμένες πρωτεΐνες χαρακτηριστικές ενός ιστού) έδειξε την ύπαρξη στα εν λόγω κύτταρα του υποδοχέα ινωδογόνου GP IIb IIIa που είναι επίσης χαρακτηριστικός της μεμβράνης των αιμοπεταλίων και μάλιστα πάρα πολύ σημαντικός για την επιτέλεση της λειτουργίας τους (την συγκόλληση των αιμοπεταλίων μεταξύ τους για την δημιουργία λευκού θρόμβου).

Αναγκαστικά ο εν λόγω πρωτεϊνικός υποδοχέας υπάρχει και στα μεγακαρυοκύτταρα, διότι συντίθεται σε αυτά και παραμένει κατόπιν στις αιμοπεταλιακές μεμβράνες μετά την απόσπαση των αιμοπεταλίων.

Τα αιμοπετάλια στερούμενα πυρήνα και πρωτεϊνοσυνθετικής ικανότητας δεν είναι σε θέση να συνθέσουν de novo τον πολυπρωτεϊνικό υποδοχέα GP IIb IIIa, οπότε αναγκαστικά τον κληρονομούν, όπως και το σύνολο των δομικών τους στοιχείων, από το μητρικό μεγακαρυοκύτταρο από το οποίο γεννώνται.

Είναι σημαντικό να υπογραμμίσουμε ότι ο εν λόγω υποδοχέας είναι χαρακτηριστικός του μεγακαρυοκυττάρου και των αιμοπεταλίων, οπότε τα εναντίον του φθορίζοντα αντισώματα δεν χρωματίζουν άλλα κύτταρα του αίματος εκτός από τα προαναφερθέντα.

Στην πνευμονική αρτηρία και στην αορτή εντοπίστηκαν αρκετά μεγακαρυοκύτταρα με ελάχιστο πρωτόπλασμα και ουσιαστικά γυμνό πυρήνα. Όλοι οι εν λόγω πυρήνες ανήκουν σε ώριμα μεγακαρυοκύτταρα III και IV σταδίου, ανεξάρτητα από τον εντοπισμό τους στην αριστερή ή δεξιά κυκλοφορία. Από την άλλη πλευρά στην συστηματική κυκλοφορία έχουν εντοπιστεί κυτταρικές δομές με χαρακτηριστικά μεγακαρυοκυττάρου, αλλά αποτελούμενες εξ ολοκλήρου από πρωτόπλασμα και στερούμενες πυρήνα. Οι πρωτοπλασματικές αυτές δομές δεν είναι τυπικά κυτταρικά ράκη αλλά πολύ μεγάλα τμήματα πρωτοπλάσματος εφοδιασμένου με όμοιου τύπου κοκκίωση με εκείνη των ώριμων μεγακαρυοκυττάρων. Εμφανίζουν μεγάλη διάμετρο (21,4 μ), χρωματίζονται θετικά από αντισώματα για τον GP IIb IIIa υποδοχέα (P2/immunotek), είναι δε πολύ μεγαλύτερα από τα μακροθρομβοκύτταρα ή τα προαιμοπετάλια. Μοιάζουν πολύ με μεγακαρυοκύτταρα αλλά χωρίς πυρήνα, ενώ η μέση τους αναλογία στην πνευμονική αρτηρία είναι 6,4/ml και στην αορτή 3/ml. Πρέπει να σημειωθεί ότι μόνον λίγοι μεγακαρυοκυτταρικοί γυμνοί πυρήνες ανευρίσκονται σε δείγματα μυελού των οστών, σε ακριβείς παρατηρήσεις με ηλεκτρονικό μικροσκόπιο.

Από όλα τα προαναφερθέντα και έχοντας ως γνώμονα τον τόπο της χωριστής απομόνωσης γυμνών πυρήνων μεγακαρυοκυττάρων αλλά και πρωτοπλάσματος φαίνεται να στηρίζεται αρκετά καλά η υπόθεση ότι ο μυελός των οστών αποτελεί μια περιοχή μικρότερης σημασίας για την αιμοπεταλιογένεση σε σύγκριση με τον πνεύμονα. Βάσει αυτών των παρατηρήσεων έχει αναβαθμιστεί ο πνεύμονας ως πεδίο γένεσης των αιμοπεταλίων έναντι του μυελού των οστών στον οποίο γεννώνται και ωριμάζουν τα μεγακαρυοκύτταρα. Οι εργασίες που αναλύουν τα ανωτέρω περιγραφέντα φαινόμενα τα σχετικά με την διαφοροποίηση των μεγακαρυοκυττάρων και την γέννηση των αιμοπεταλίων είναι σχετικά αρκετές και πολύ καλά σχεδιασμένες (43, 45, 46, 47, 49, 50, 52, 53, 54, 55, 56, 58, 59, 61, 63, 65, 66, 90, 91, 92, 93)

### **1.1.5. Ρύθμιση της μεγακαρυοκυτταροποίησης και της θρομβοκυτταροποίησης**

Όπως προκύπτει από το σύνολο των μελετών η δημιουργία μεγακαρυοκυττάρων και θρομβοκυττάρων φαίνεται να ρυθμίζεται σύμφωνα με τις ανάγκες του οργανισμού σε αιμοπετάλια. Η ρύθμιση αυτή είναι σαφώς πολυεπίπεδη και εμπεριέχει μια συνιστώσα χρονικά άμεσης ή βραχυπρόθεσμης απάντησης και μια συνιστώσα μακροπρόθεσμης απάντησης.

**Βραχυπρόθεσμη (άμεση) απάντηση:** Αυτή λαμβάνει χώρα ως ανταπόκριση σε:

α) φυσιολογική έκλυση αγγειοσυσπαστικών ουσιών που πραγματοποιείται σε έκτακτες καταστάσεις ανάγκης, όπως στο οξύ stress, στην βαρεία μυική εργασία, στον τραυματισμό και την συνακόλουθη αιμορραγία.

β) στην ενεργοποίηση αντανεκλαστικών τόξων που οδηγούν στην συμπίεση των αιματοαποθηκών του σώματος.

Τα όργανα στόχοι αυτών των ισχυρών άμεσης απάντησης ερεθισμάτων είναι κατ' αρχάς ο σπλήνας και ενδεχομένως ο πνεύμονας στα οποία ευρίσκονται αποθηκευμένα αιμοπετάλια αλλά και όλα τα άλλα έμμορφα στοιχεία του αίματος. Φαίνεται όμως ότι ο ρόλος του σπλήνα κυριαρχεί.

Η απελευθέρωση αιμοπεταλίων από τον σπλήνα δεν παρατηρείται μόνον στο οξύ stress, στην βαρεία μυική εργασία και στην οξεία αιμορραγία, αλλά επίσης και στην χρόνια απώλεια αίματος. Αποδίδεται στην παρουσία κάποιου παράγοντα ο οποίος σχετίζεται με την σιδηροπενική αναιμία. Η αφαίρεση του σπλήνα οδηγεί σε θρομβοκυττάρωση καθόσον τα αιμοπετάλια μην έχοντας πλέον έναν ευμεγέθη αποθηκευτικό χώρο εναπομένουν στην αιματική κυκλοφορία (66, 67).

**Μακροπρόθεσμη (μονιμότερη) απάντηση:** Η απάντηση αυτή αντιπροσωπεύει την παραγωγή νέων αιμοπεταλίων, η οποία μπορεί να λάβει χώρα σε μια σειρά επιπέδων που περιγράφουμε κατωτέρω:

**1. Παραγωγή αιμοπεταλίων από τον σπλήνα:** Η σπληνική παραγωγή δεν είναι ιδιαίτερα αποτελεσματική πράγμα το οποίο έχει δειχθεί σε *in vivo* μελέτες που πραγματοποιήθηκαν σε πειραματόζωα. Στις μελέτες αυτές έγινε πειραματική ερήμωση του μυελού των οστών σε μύες η οποία δεν ανατάχθηκε άμεσα από αιμοπετάλια παραχθέντα στον σπλήνα αλλά οδήγησε σε πολύ μεγάλη πτώση του

αριθμού των αιμοπεταλίων διάρκειας 11 ημερών. Μετά την 11<sup>η</sup> ημέρα είχαμε σταδιακή αύξηση του αριθμού των αιμοπεταλίων η οποία αποκατάστησε τα φυσιολογικά τους επίπεδα γύρω στην 20<sup>η</sup> ημέρα από την ερήμωση του μυελού των οστών. Το επίπεδο της πλοιδίας των μεγακαρυοκυττάρων παραμένει χαμηλό και της τάξης των 2N. Επίσης ο αριθμός των διαφοροποιημένων μεγακαρυοκυττάρων παραμένει σχεδόν αμετάβλητος, ενώ ο αριθμός των κοκκιωδών καλώς διαφοροποιημένων μεγακαρυοκυττάρων αυξάνει σημαντικά από την 13<sup>η</sup> ημέρα και μετά.

**2. Παραγωγή αιμοπεταλίων από τον πνεύμονα:** Η πνευμονική εφεδρεία μεγακαρυοκυττάρων - θρομβοκυττάρων φαίνεται να είναι πιο αποτελεσματική για την παραγωγή αιμοπεταλίων σε σύγκριση με εκείνων που είναι αποθηκευμένα στον σπλήνα. Τα πνευμονικής εντόπισης μεγακαρυοκύτταρα είναι παρόμοια με εκείνα του μυελού των οστών και δεν υπάρχουν μεταξύ τους ανιχνεύσιμες διαφορές εκτός της ανατομικής τους θέσης. Εμφανίζουν ταυτόσημη βιολογική δραστηριότητα, έχουν το ίδιο επίπεδο πλοιδίας και τα βιοχημικά και ανοσολογικά τους χαρακτηριστικά είναι απολύτως όμοια. Επίσης φαίνεται ότι η πνευμονική αποθήκη και αυτή του μυελού των οστών εμφανίζουν αλληλεπιδράσεις μεταξύ τους καθώς οι ινοβλάστες των πνευμόνων στον άνθρωπο παράγουν ιντερλευκίνη 6 (IL – 6) ή κάποια ουσία όμοια με αυτήν, η οποία ασκεί διεγερτική δράση στην δραστηριότητα της παραγωγής μεγακαρυοκυττάρων από τον μυελό των οστών. Φαίνεται δηλαδή ότι τόσο ο μυελός των οστών όσο και η πνευμονική αποθήκη συμπεριφέρονται σαν ένα κοινό σύστημα όσον αφορά την παραγωγή μεγακαρυοκυττάρων, τουλάχιστον κατά το σκέλος της χυμικής τους ρύθμισης. Το δεδομένο αυτό είναι αξιόλογο και υποδεικνύει ότι η εξάπλωση της μεγακαρυοποίησης – θρομβοποίησης σε περισσότερες ανατομικές εστίες έχει έναν χαρακτήρα αναγκαιότητας για μεγέθυνση αυτής της δραστηριότητας σε περισσότερους ανατομικούς χώρους από τον αρχικό του μυελού των οστών. Ίσως το άμεσο ανιχνεύσιμο καθεστώς της υποξίας που προκύπτει από μια οξεία ή χρόνια αναιμία και οι αντίστοιχες λειτουργικές προσαρμογές της πνευμονικής λειτουργίας να αποτελούν έναν άμεσο σηματοδότη για την αναγκαιότητα μιας πολύ ισχυρής προφύλαξης του οργανισμού από την περαιτέρω απώλεια αίματος, οπότε και η κινητοποίηση των αιμοπεταλίων να αποτελεί μια άμεση απάντηση σε αυτές τις καταστάσεις.

**3. Παραγωγή αιμοπεταλίων από τον μυελό:** Η παραγωγή των αιμοπεταλίων από τον μυελό των οστών εμφανίζει μια πολύ σύνθετη εικόνα ρύθμισης, όπως θα περίμενε κανείς να συμβαίνει με μια τόσο κρίσιμης σημασίας λειτουργία που σκοπό της έχει να προφυλάξει τον οργανισμό από την απώλεια αίματος. Δεν θα επιμείνουμε εδώ στις λεπτομέρειες των παραγόντων που συμμετέχουν στην εν λόγω ρύθμιση αλλά θα αναφερθούμε επιγραμματικά σε αυτούς. Πολλά από τα δεδομένα περιγράφονται στις ερευνητικές εργασίες μιας σειράς ομάδων, όπως του Harker, των Ebbe & Stohlman του Ardaillou, του Paulus JM (20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62)

Έτσι διακρίνουμε τρεις συνιστώσες στην ρύθμιση της μεγακυτταροποίησης – θρομβοποίησης και συγκεκριμένα:

***α) την συνιστώσα των διακυτταρικών αλληλοεπιδράσεων,***

***β) την συνιστώσα του μοριακού επιπέδου που σχετίζεται με τις δράσεις στο DNA,***

***γ) την συνιστώσα χημικής ρύθμισης, η οποία περιλαμβάνει δράσεις ορμονικού χαρακτήρα.***

Τα δεδομένα υποδεικνύουν ότι οι τρεις αυτές συνιστώσες είναι αλληλοεπικαλυπτόμενες και οπωσδήποτε αλληλοεπιδρώσες, όπως πάντα συμβαίνει στα βιολογικά συστήματα και ότι ο τελικός στόχος των είναι ο αναδιπλασιασμός του DNA, όπως επίσης και των γονιδίων που κωδικοποιούν όλες τις πρωτεΐνες οι οποίες συμμετέχουν τόσο στην διαφοροποίηση των μεγακαρυοκυττάρων, στην θρομβοκυτταροποίηση αλλά και στην τελική λειτουργία των αιμοπεταλίων, δηλαδή στην δημιουργία των θρόμβων, την ρύθμιση της αιμόστασης, αλλά και της αγγειογένεσης.

Περίληπτικά, λοιπόν, έχουμε τα εξής:

***α) Συνιστώσα διακυτταρικών αλληλεπιδράσεων:*** Η συνιστώσα αυτή μελετήθηκε μέσω πειραμάτων ετεροτοπικής μεταμόσχευσης μυελού των οστών σε μύες.

Αρχικά, αμέσως μετά την ενσωμάτωση του μυελικού μοσχεύματος, παρατηρήθηκε μια αρχική αναστολή στον πολλαπλασιασμό των οστεογενών πρόδρομων κυττάρων.

Αμέσως μετά επακολούθησε μια φάση διέγερσης του πολλαπλασιασμού των μεταμοσχευθέντων έκτοπα μυελικών κυττάρων. Ειδικότερα, όταν έγινε εκλεκτική



καταστροφή των μεγακαρυοκυττάρων διαπιστώθηκε η παραγωγή ενός αυξητικού παράγοντα πρωτεϊνικής φύσης ο οποίος ονομάστηκε Thrombocyte Released Growth Factor (Αυξητικός Παράγων Αιμοπεταλιακής Προέλευσης και συντομογραφικά: TRGF).

Επίσης για να μελετηθούν οι μηχανισμοί της αιμοποίησης και της μεγακυτταροποίησης πραγματοποιήθηκαν σε πειραματόζωα σειρές πειραμάτων όπου αναλύθηκε λεπτομερειακά ο ρόλος του μικροπεριβάλλοντος στις διακυτταρικές αλληλεπιδράσεις. Μέσω της τεχνικής του κυκλικού DNA ταυτοποιήθηκε ένα νέο ιντερλευκινικό μόριο και συγκεκριμένα η ιντελευκίνη 11 (IL – 11), η οποία διεγείρει τα β – κύτταρα και σε συνέργεια με την IL – 3 οδηγεί στην ανάπτυξη του διαφοροποιημένου μεγακαρυοκυττάρου (Mk – CFU), οπότε βρέθηκε ένας σημαντικός δρόμος για την παραγωγή μεγακαρυοκυττάρων. Στα εν λόγω πειραματόζωα η IL – 11 παράγεται από τα ερημωθέντα στρωματικά κύτταρα του μυελού των οστών τους. Επίσης δείχτηκε ότι αυτόλογα ή αλλογενή περιφερικά T- λεμφοκύτταρα, παρουσία της IL – 2 ή της IL - 11, είναι σε θέση να διεγείρουν ανθρώπινα μητρικά μεγακαρυοκύτταρα (Meg – CFU) στην παραγωγή μητρικών μεγακαρυοκυττάρων με τρόπο δοσοεξαρτώμενο. Τα δεδομένα αυτά θεωρούμε ότι είναι αποφασιστικής σημασίας για την κατανόηση αλλά και τον φαρμακολογικό έλεγχο της μεγακαρυοκυτταροποίησης και κατά συνέπεια της θρομβοκυτταροποίησης.

**β) Η μοριακή ρυθμιστική συνιστώσα:** Η μοριακή συνιστώσα της ρύθμισης, δηλαδή τα γεγονότα που λαμβάνουν χώρα σε γονιδιακό επίπεδο, παρουσίασε μια καθυστέρηση ως προς την μελέτη της καθόσον έπρεπε πρώτα να δημιουργηθούν οι προϋποθέσεις της στο επίπεδο της εξωκυτταρικής και διακυτταρικής ρύθμισης, δηλαδή να βρεθούν τα ρυθμιστικά μόρια που αυτές εμπλέκουν στην όλη διαδικασία. Επίσης έπρεπε να εξελιχθούν και να εκλεπυνθούν μερικές μοριακές μικροτεχνικές, όπως η *in situ* υβριδοποίηση, η αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης του DNA, και η χρησιμοποίηση των ολιγονουκλεοτιδίων, οι οποίες μετά από κατάλληλες προσαρμογές, εφαρμόστηκαν στην μελέτη των δράσεων διαφόρων αυξητικών παραγόντων σε συνδυασμό με έναν βασικό αγωνιστή της κυτταρικής ωρίμανσης, τον οξικό εστέρα της μυριστικής φορβόλης (phorbol myristate acetate ή συντομογραφικώς PMA). Μέσα στα πλαίσια αυτών των ερευνών μελετήθηκαν οι εκφράσεις ορισμένων επιλεγμένων γονιδίων που συμμετέχουν στην ρύθμιση της αύξησης και την λειτουργία της ωρίμανσης των κυττάρων (όπως είναι το ογκογονίδιο *c-myc* και το αντίστοιχο πρωτοογκογονίδιό του). Οι πολύ σημαντικές αυτές μελέτες έδειξαν ότι οι χρησιμοποιηθέντες αυξητικοί παράγοντες έχουν

χρονοεξαρτώμενη δράση η οποία είναι ανάλογη με την συγκέντρωση των γονιδίων – στόχων.

**γ) Η χυμική ρυθμιστική συνιστώσα:** Η χυμική ρυθμιστική συνιστώσα, όπως είναι σύνηθες, εμφανίζει δύο σκέλη: το *ετεροκρινές* και το *αυτοκρινές* σκέλος εκ των οποίων το πρώτο περιλαμβάνει ορμονικές ουσίες προερχόμενες εκτός του συστήματος στόχου και το δεύτερο ορμονικές ουσίες παραγόμενες εντός του εν λόγω συστήματος. Ανάλογα με την ποιότητα της ρύθμισης οι ουσίες αυτές ασκούν θετική ρύθμιση, δηλαδή διέγερση της υποκείμενης σε έλεγχο λειτουργίας ή αρνητική ρύθμιση, δηλαδή αναστολή της λειτουργίας αυτής. Με βάση τα ανωτέρω οι ρυθμιστικές αυτές ορμονικές δράσης ουσίες συμπεριφέρονται είτε ως αγωνιστές, είτε ως αναστολείς. Οι δράσεις των τριών συνιστωσών αναλύονται σε έναν αξιόλογο αριθμό σημαντικών εργασιών διαφορετικών ομάδων, όπως των Stohlman, Kelemen, Odel – McDonald – Detwiler, De Gabriele & Pennington, Harker, Ebbe & Phalen, Siri, Hirsh & Dacie, Krisza & Csehrati (21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 48, 49, 62, 63, 64, 65, 66, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 94, 95, 96, 97, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109)

Η ετεροκρινής ρύθμιση πραγματοποιείται με σημαντικό αριθμό ορμονών και συγκεκριμένα:

- από τα οιστρογόνα
- την ινσουλίνη
- την θυροξίνη
- την αδρεναλίνη
- την πρεδνιζολόνη.

Τα οιστρογόνα ασκούν θετική ρύθμιση, δηλαδή διεγείρουν την παραγωγή της θρομβοποιητίνης και συνεπώς την μεγακαρυοκυτταροποίηση και την συνακόλουθη της θρομβοκυτταροποίηση.

Έτσι η οιστραδιόλη αυξάνει τον σχηματισμό της θρομβοποιητίνης και την ενσωμάτωση της 75 – S – μεθειονίνης στα μεγακαρυοκύτταρα ενώ η οιστριόλη αυξάνει την διαφοροποίησή τους.

Η ινσουλίνη αυξάνει τον αριθμό των μεγακαρυοκυττάρων ενώ η παγκρεατεκτομή την μειώνει κατά τρόπο σημαντικό.

Η θυροξίνη επίσης αυξάνει τον αριθμό των μεγακαρυοκυττάρων ενώ η θυρεοειδεκτομή τον ελαττώνει αξιόλογα.

Η αδρεναλίνη και η πρεδνιζολόνη αυξάνουν σημαντικά την θρομβοκυτταροποίηση ενώ η επινεφριδιοεκτομή την ελαττώνει.

Η *ετεροκρινής* χυμική ρύθμιση περιλαμβάνει ακόμη σημαντικό αριθμό παραγόντων, οι οποίοι είναι κατ' εξοχήν διεγέρτες της μεγακαρυοκυτταροποίησης.

Η *αυτοκρινής* ρύθμιση, όπως προείπαμε, περιλαμβάνει ρυθμιστικούς παράγοντες οι οποίοι προέρχονται από το ίδιο το σύστημα. Αυτοί, μέχρι στιγμής φαίνεται ότι είναι οι αρνητικοί ρυθμιστές, δηλαδή, οι κατ' εξοχήν αναστολείς της μεγακαρυοκυτταροποίησης.

### ***Θετική ρύθμιση της μεγακαρυοκυτταροποίησης και θρομβοκυτταροποίησης:***

Η ρύθμιση αυτή πραγματοποιείται από έναν αξιόλογο αριθμό ετερογενών χημικά και δομικά ουσιών, ετεροκρινούς προελεύσεως, οι οποίες διεγείρουν σημαντικά την μεγακαρυοκυτταροποίηση και την θρομβοκυτταροποίηση. Οι μελετημένοι μέχρι στιγμής διεγέρτες είναι οι εξής:

- Η θρομβοποιητίνη ή Thrombopoietic Stimulator Factor(TSF).
- Ο Παράγων Διέγερσης Σχηματισμού Αποικιών Μεγακαρυοκυττάρων( ή Meg – Colony Stimulator Factor,ή συντομογραφικά Meg-CSF)
- Η ερυθροποιητίνη (EPO)
- Ο GM – CSF
- Οι γαγγλιοσίδες CD1a CM1
- Ο οξικός εστέρας της μυριστικής φορβόλης (Phorbol Myristate Acetate ή PMA)
- Ο Ανασυνδυασμένος Ανασταλτικός Παράγων Λευχαιμίας Ζώων (Recombinant Murine Leukemia Inhibitor Factor (rLIF)
- Η Ασπιρίνη
- Η ιντελευκίνη – 3(IL – 3)
- Η ιντερλευκίνη – 6 ( IL – 6 ή η ανασυνδυασμένη ιντερλευκίνη -6, συντομογραφικά rIL – 6)
- Η IL – 1b (135, 136, 137, 138, 139, 140)

Αξίζει να σημειωθεί ότι η ασπιρίνη, παρά το γεγονός ότι είναι ένα απλό μόριο φυτικής προέλευσης που αναστέλλει την κυκλοξυγονάση - 1 των αιμοπεταλίων, όπως επίσης μειώνει την ικανότητα συσώρευσής τους δρα ως διεγέρτης της μεγακαρυοκυτταροποίησης και της θρομβοκυτταροποίησης. Επίσης ανάλογη δράση επιφέρει και το παντοθενικό οξύ. Ενδεχομένως αυτό υποδεικνύει ότι η αναστολή της αιμοπεταλιακής λειτουργικότητας εκλαμβάνεται από τον οργανισμό ως μείωση της ικανότητας πήξης του αίματος που πρέπει να διορθωθεί, οπότε ο οργανισμός απαντά με αύξηση της παραγωγής αιμοπεταλίων για να αναπληρώσει την πεσμένη λειτουργία. Φαίνεται ότι κάποιοι μεταβολίτες της αραχιδονικής οδού (αποδεδειγμένα η PGE<sub>2</sub>) λειτουργούν ως αναστολείς της μεγακαρυοκυτταροποίησης και θρομβοκυτταροποίησης. Αυτό σημαίνει ότι η χρήση μη στεροειδών αντιφλεγμονωδών φαρμάκων ή εν γένει ουσιών με αυτή την ιδιότητα, θα μπορούσαν να διεγείρουν την αιμοπεταλιακή παραγωγή.

### ***Αρνητική (αυτοκρινής) ρύθμιση (αναστολείς) της μεγακαρυοκυτταροποίησης και της θρομβοκυτταροποίησης***

Η ρύθμιση αυτή προέρχεται από παράγοντες οι οποίοι δημιουργούνται στα μεγακαρυοκύτταρα και αργά ή γρήγορα ενσωματώνονται στα αιμοπετάλια. Παράγοντες που αναστέλλουν την μεγακαρυοκυτταροποίηση και οι οποίοι δρουν είτε μόνοι τους ή συνεργικά είναι οι ακόλουθοι:

- Ο PF<sub>4</sub>
- Ο β – TG
- Το Connective Tissue Activated Peptide – III
- Ο Transforming Growth Factor – b (TGF – b)
- Οι ιντερφερόνες α και γ
- Οι υψηλές συγκεντρώσεις μονοκυττάρων
- Η προσταγλανδίνη E<sub>2</sub>(PGE<sub>2</sub>)

Ο εντοπισμός των παραγόντων που διεγείρουν ή αναστέλλουν την μεγακαρυοκυτταροποίηση και την θρομβοκυτταροποίηση, αποκάλυψε την περιπλοκότητα και συνθετότητα αυτού του φαινομένου. Στην περίπτωση αυτή παρατηρούμε ότι ο οργανισμός έχει δημιουργήσει μια μεγάλη γκάμα παραγόντων αρνητικού και θετικού

ελέγχου για να μπορέσει να περιφρουρήσει την κρίσιμη αυτή λειτουργία και να εξασφαλίσει τελικά την ορθή ρύθμιση του αριθμού και της λειτουργικότητας των αιμοπεταλίων, προκειμένου η αιμόσταση να είναι ακριβής και στην σωστή διάσταση, ανάλογα με την απειλή της αιμορραγίας και τις υπόλοιπες συνθήκες του οργανισμού (υποξία, μειωμένος σίδηρος).

Τα μεγακαρυοκύτταρα έχουν ιδιαίτερα βιολογικά χαρακτηριστικά, τα οποία τα κάνουν να διακρίνονται από άλλες φυσιολογικές κυτταρικές σειρές του οργανισμού. Μερικά από τα ξεχωριστά τους χαρακτηριστικά είναι π.χ το γεγονός ότι σταματούν να πολλαπλασιάζονται με κυτταροδιαίρεση αρκετά νωρίς και μάλιστα περίπου ταυτόχρονα με την πραγματοποίηση της διαφοροποίησής τους. Από την άλλη πλευρά εφόσον η διαφοροποίησή και ο ρόλος τους (αιμοπεταλιακή παραγωγή) τους επιβάλλουν την αναστολή των κυτταροδιαίρεσεων, αυτά ακολουθούν άλλη στρατηγική προκειμένου να αυξήσουν τον αριθμό των πυρηνικών μονάδων που περιέχουν ( 1 πυρηνική μονάδα είναι το σύνολο κυτταροπλάσματος και διπλοϊδούς DNA). Η στρατηγική αυτή έγκειται στην ταυτόχρονη αύξηση της πλοϊδίας τους (η οποία μπορεί να φτάσει και να ξεπεράσει τα 64 N) όπως επίσης και της αντίστοιχης ποσότητας του κυτταρικού πρωτοπλάσματος από το οποίο τελικά θα προέλθουν τα αιμοπετάλια. Αν τα μεγακαρυοκύτταρα ακολουθούσαν την στρατηγική των κυτταροδιαίρεσεων πιθανόν δεν θα ήταν σε θέση να συσσωρεύσουν μεγάλη ποσότητα πρωτοπλάσματος αλλά και να την διαφοροποιήσουν κατά τρόπο τέτοιο ώστε να είναι σε θέση να παράγει αιμοπετάλια σωστής δομής, μεγέθους και λειτουργικότητας.

#### ***1.1.6. Νευρική οδός ρύθμισης της μεγακαρυοκυτταροποίησης – θρομβοκυτταροποίησης (Markossian)***

Ο ρόλος ενός νευρικού ελέγχου της θρομβοκυτταροποίησης αποκαλύπτεται κατά κύριο λόγο από πειραματικά δεδομένα τα οποία τεκμηριώνουν τον ρυθμιστικό ρόλο του Κεντρικού Νευρικού Συστήματος (Κ.Ν.Σ) γενικότερα στην λειτουργία της αιμοποίησης, χωρίς να εστιάζονται ειδικά στην παραγωγή των μεγακαρυοκυττάρων και εν τέλει των αιμοπεταλίων. Κατ' αρχάς ο μυελός των οστών εμφανίζει πλούσια νεύρωση και αντιστοίχως πολύ μεγάλη ευαισθησία σε αλγογόνα ερεθίσματα, πράγμα το οποίο γίνεται έμπρακτα αντιληπτό από τον μεγάλο πόνο που συνοδεύει τις οστικές παρακεντήσεις και την αναρρόφηση μυελικού ιστού για βιοψίες και εν γένει κυτταρολογικές μελέτες. Οι τελικές απολήξεις των νεύρων έρχονται σε στενή επαφή με τις αιμοποιητικές νησίδες. Τα

δεδομένα τα οποία στηρίζουν τον άμεσο ρόλο της δράσης του Κ.Ν.Σ στην αιμοποίηση είναι επί τροχάδην τα ακόλουθα:

- Η ανατομική κατασκευή του μικροπεριβάλλοντος των μυελικών κυψελών που υποβοηθά την συμμετοχή του νευρικού ελέγχου στις διακυτταρικές αλληλεπιδράσεις.
- Η ύπαρξη νευρικών ινιδίων στο στρώμα του μυελού των οστών, τόσο στον άνθρωπο, όσο και σε άλλα ανώτερα ζώα, όπως επίσης η απελευθέρωση ακετυλχολίνης από τα εν λόγω ινίδια κατόπιν διέγερσης των φυγόκεντρων νευραξόνων που περιλαμβάνουν.
- Η επιβεβαίωση της ύπαρξης ενός χολινεργικού μηχανισμού ο οποίος ρυθμίζει την ενεργοποίηση των πολυδύναμων αδιαφοροποίητων μητρικών κυττάρων ώστε να εκκινήσουν την διαφοροποίησή τους προς ελάχιστα διαφοροποιημένα μητρικά κύτταρα.
- Η άμεση απόδειξη της αυξημένης παραγωγής όλων των κυτταρικών σειρών του αίματος κατόπιν ηλεκτρικής διέγερσης με ηλεκτρόδια εμφυτευμένα στον υποθάλαμο πειραματοζώων (113).

Στα πλαίσια των παρατηρήσεων αυτών υπάρχει μια σειρά εργασιών που επιβεβαιώνουν την άμεση δράση του Κ.Ν.Σ πάνω στην πολυσύνθετη διεργασία της αιμοποίησης. Στις εργασίες αυτές ως πειραματόζωα έχουν χρησιμοποιηθεί σκύλοι με εμφυτευμένα στον υποθάλαμό τους ηλεκτρόδια, η ενεργοποίηση των οποίων είχε ως αποτέλεσμα την διέγερση της αιμοποιητικής δραστηριότητας. Ειδικότερα για την παραγωγή αιμοπεταλίων ο Markossian και οι συνεργάτες του (110) απέδειξαν ότι η νευρική διέγερση της αιμοπεταλιακής παραγωγής λαμβάνει χώρα με αντανεκλαστικό μηχανισμό (17, Μακρής ΠΕ, Αιμόσταση, τόμος Ι, Φυσιολογία, σελ.86, [660]) Η ύπαρξη του νευρικού δρόμου ρύθμισης της μεγακαρυοκυτταροποίησης και της παραγωγής των αιμοπεταλίων δείχνει ασφαλώς ότι η περιφρούρηση της λειτουργίας των αιμοπεταλίων είναι πολύ σημαντική εξ αιτίας της κρίσιμότητάς της τελευταίας και συνεπώς δικαιολογεί ένα επιπρόσθετο επίπεδο ελέγχου τοποθετημένου ακροτελεύτια στην κορυφή της ομοιοστατικής ιεραρχίας του οργανισμού μας 110, 111, 112, 113, 114). Συνολικά το ζήτημα της παραγωγής, διαφοροποίησης, ωρίμανσης, μετανάστευσης των μεγακαρυοκυττάρων, όπως επίσης και της αντίστοιχης παραγωγής των αιμοπεταλίων περιλαμβάνει ένα μεγάλο αριθμό δημοσιεύσεων, μεταξύ των οποίων και τις αναφερόμενες ακολούθως στην παρατιθέμενη

βιβλιογραφία: 13,14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 43, 45, 46, 47, 48, 49, 52, 54, 55, 58, 59, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 68, 69, 70, 84, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 95, 96, 97, 109, 110, 122, 123, 124, 126, 127, 128, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 139, 140. Από τις εν λόγω βιβλιογραφίες συντέθηκε όλο το προηγούμενο μέρος το σχετικό με την εξέλιξη των μεγακαρυοκυττάρων, την θρομβοκυτταροποίηση και τις σχέσεις της με την συνολική κατάσταση του αίματος.

## ***1.2. Δομές και Λειτουργίες των Αιμοπεταλίων***

### ***1.2.1. Γενικά στοιχεία της εξέλιξης της αιμοστατικής λειτουργίας***

Τα αιμοπετάλια αποτελούν τα κύτταρα στα οποία έχει επιφορτιστεί ο οργανωτικός ρόλος της ιδιαίτερως περίπλοκης και άκρως σημαντικής λειτουργίας της αιμόστασης.

Η τομή των αγγείων ως επακόλουθο ενός τραυματισμού και η συνακόλουθη απώλεια αίματος αποτελεί βασική αιτία βίαιου θανάτου στην φύση, καθόσον όλα τα σαρκοφάγα ζώα εξαρτούν την επιβίωσή τους από την θανάτωση άλλων ζώων, ενώ όλα τα ζώα, συμπεριλαμβανομένων και των σαρκοφάγων μπορούν να μετατραπούν σε θηράματα ενός κυνηγού.

Τα βασικότερα όργανα επίθεσης των σαρκοφάγων είναι κατά κύριο λόγο τα δόντια, τα νύχια και τα ράμφη, ενώ σημαντικά όργανα άμυνας των θηραμάτων τους είναι τα κέρατα με τα οποία μπορούν να απωθήσουν έναν επιτιθέμενο θηρευτή.

Ο στόχος των οδόντων, των νυχιών και των ραμφών των σαρκοφάγων, όπως έχει αποκρυσταλλωθεί στις δομές και στα υλικά της κατασκευής τους, είναι ο βαθύς τραυματισμός, η τομή μεγάλων αγγείων και η απώλεια αίματος των θυμάτων τους. Αντίστοιχα τον ίδιο στόχο επιτελούν τα ισχυρά και οξύαιχμα κέρατα των φυτοφάγων ζώων. Από την άλλη πλευρά, πηγαίνοντας στην ανθρώπινη σφαίρα, διαπιστώνουμε ότι όλα τα κυνηγετικά και πολεμικά εργαλεία του ανθρώπου έχουν σαν βασικό τους σκοπό την πρόκληση μεγάλης αιμορραγίας στον αντίπαλο ή την τρώση κρίσιμων οργάνων όπως η καρδιά, το ήπαρ, οι πνεύμονες, ο εγκέφαλος κ.λ.π.

Είναι λογικό λοιπόν να θεωρήσει κανείς ότι η λειτουργία της αιμόστασης εξελίχθηκε μέσα στους γεωλογικούς αιώνες με σκοπό να διαφυλάξει τους οργανισμούς τουλάχιστον από την οξεία απώλεια μεγάλων ποσοτήτων αίματος. Φαίνεται ότι οι εξελικτικές πιέσεις που

αντιμετώπισε η αιμοστατική λειτουργία υπήρξαν πολύ μεγάλες και διαρκείς, με αποτέλεσμα να αποκτήσει την τόσο περίπλοκη και εξαιρετικά ραφιναρισμένη δομή την οποία αποκαλύπτουν οι βιολογικές επιστήμες από τις αρχές του 18<sup>ου</sup> αιώνα μέχρι σήμερα.

Η μελέτη της αιμόστασης στα ζώα παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον, καθόσον μας προμηθεύει με πληροφορίες και γνώσεις οι οποίες μπορούν κατόπιν να προσανατολίσουν, τηρουμένων των αναλογιών και την έρευνα στην αιμόσταση του ανθρώπου, όπως επίσης να βοηθήσουν στην δημιουργία θεραπευτικών σχημάτων των διαφόρων ανωμαλιών της στον άνθρωπο και κατά δεύτερο λόγο στις κτηνιατρικές εφαρμογές επί των ζώων. Ειδικά η ενασχόληση με την αιμόσταση στα ανώτερα θηλαστικά και στον άνθρωπο αποτελεί επί πολλές δεκαετίες ένα ιδιαίτερος γόνιμο πεδίο έρευνας.

Μια συνολική ματιά στην φυλογένεση της αιμόστασης, δηλαδή στο σύνολο των μελετών αυτής, που υπάρχουν για τα διάφορα είδη ζώων ανάλογα με την βαθμίδα που καταλαμβάνουν στο δένδρο της εξέλιξης, μας υποδεικνύει την εξής υπόθεση:

«Η αιμόσταση φαίνεται να αποτελεί ένα μοναδικό ενζυμικό σύστημα (και συνεπώς ένα σύστημα γονιδίων), το οποίο ανέτειλε εξελικτικά στην αρχική του μορφή με δύο θεμελιακούς παράγοντες: α) Τον «ιστικό παράγοντα» και β) το «ινωδογόνο», ενώ όλοι οι υπόλοιποι παρενεβλήθησαν, σιγά – σιγά, ανάμεσά τους κατά την διάρκεια της εξέλιξης του συστήματος των αιμοστατικών ενζύμων και αντίστοιχων γονιδίων.

Η υπόθεση αυτή φαίνεται να καθίσταται επί των ημερών μας περισσότερο σαφής και αποδεκτή καθόσον η εξέλιξη και τελικά η προέλευση των ενζύμων – παραγόντων – της πήξης μοιάζει να είναι αποτέλεσμα του «διπλασιασμού των σχετικών γονιδίων». Ο διπλασιασμός των γονιδίων είναι ένα φαινόμενο που έχει γίνει αποδεκτό ως μηχανισμός για την προέλευση των αλυσίδων μιας άλλης πολύ σημαντικής πρωτεΐνης, της αιμοσφαιρίνης, που εντάσσεται όπως και τα ένζυμα της πήξης στο ίδιο μεγάλο σύστημα του αίματος. Ο διπλασιασμός των γονιδίων που κωδικοποιούν τα αιμοστατικά ένζυμα αποτέλεσε, πιθανόν, την βάση για να δράσει πιο εκτεταμένα η φυσική επιλογή, δηλαδή σε μεγαλύτερο πληθυσμό γονιδίων κοινής προέλευσης που υφίσταντο «τυχαίες» μεταλλάξεις, και έτσι, ξεκινώντας από τα ίδια γονίδια και ένζυμα να παράγει σιγά – σιγά μια σειρά παραλλαγών τους. Από αυτές τις παραλλαγές, εκείνες οι οποίες προσέδιδαν στα ζώα που τις έφεραν μεγαλύτερες δυνατότητες επιβίωσης, κατοχυρώθηκαν εξελικτικά και διαδόθηκαν μέχρι των ημερών μας. Αυτά τα «δοκιμασμένα» από την διεργασία της φυσικής επιλογής γονίδια αποτελούν και την βάση για την λειτουργία της αιμόστασης



στον άνθρωπο και εν γένει στους σημερινούς οργανισμούς. Από την άλλη πλευρά κάθε ομάδα ζώων που απέκλινε από την εμφάνιση ενός συγκεκριμένου γονιδιακού διπλασιασμού, έχανε ταυτοχρόνως της ευκαιρία να αποκτήσει νέα γονιδιακά παράγωγα και η εξέλιξή του υστερούσε, εγκλωβίζοντάς την εν λόγω ομάδα οργανισμών σε ένα φράγμα αμετατροπίας δομών και λειτουργιών.

Η διερεύνηση των φαινομένων της αιμόστασης σε μεγάλη ζωολογική κλίμακα ειδικά τα τελευταία χρόνια, μπορεί να πραγματοποιηθεί με διάφορους τρόπους, όπως π.χ με την κλασική μελέτη της βιολογικής δραστηριότητας των διαφόρων παραγόντων της αιμόστασης σε κάθε είδος ζώου. Ο τρόπος αυτός είναι μεν αποτελεσματικός αλλά εμφανίζει προβλήματα γνωστικού χαρακτήρα για κάθε «ελλείπουσα» ενζυμική πρωτεΐνη, όπως επίσης και εκείνα που σχετίζονται με την ποιότητα των ειδο – ειδικών διαφορών. Συνεπώς είναι σημαντικό να είμαστε σε θέση να απομονώνουμε σε καθαρή μορφή όλες εκείνες τις πρωτεΐνες που θα μπορούσαν να παίξουν κάποιο ρόλο στην συνολική πήξη των κυκλοφορούντων υγρών του εκάστοτε υπό μελέτη είδους και εν συνεχεία να βλέπουμε την επί μέρους δράση της στην πηκτική διεργασία. Η προσέγγιση αυτή όμως υστερεί σε κάποια σημεία σχετιζόμενα με την μελέτη παραγόντων οι οποίοι έχουν πολύ μικρή συγκέντρωση στο πλάσμα, όπως π.χ συμβαίνει με τον παράγοντα VIII της πήξης. Η τρίτη οδός διερεύνησης τείνει να ξεπεράσει αυτές τις αδυναμίες μελετώντας ακόμη και τα ποσοτικώς πλέον ελάχιστα πρωτεϊνικά μόρια, με την χρησιμοποίηση της τεχνολογίας της κλωνοποίησης και του ανασυνδυασμένου DNA. Η εφαρμογή της πολλαπλασιαστικής αντίδρασης της πολυμεράσης του DNA πρακτικά μας επιτρέπει να δημιουργήσουμε όσες ποσότητες θέλουμε για οποιαδήποτε σπάνια και ποσοτικά ελάχιστη αλληλουχία νουκλεοτιδίων που εξειδικεύουν ελάχιστες και σπάνιες αιμοστατικές πρωτεΐνες. Η διάθεση των μεθόδων αυτών σε τυποποιημένα kit αντιδραστηρίων σίγουρα επιταχύνει την εξαγωγή συμπερασμάτων. Μια άλλη έγκυρη μέθοδος είναι η ανάλυση των αλληλουχιών με την εφαρμογή βάσεων δεδομένων σε υπολογιστές.

Βάσει των μεθοδολογικών αυτών γραμμών που προαναφέραμε η μελέτη της αιμόστασης στα είδη των διαφόρων εξελικτικών βαθμίδων του φυλογενετικού δέντρου δείχνει ότι η λειτουργία αυτή κάνει την στοιχειώδη της εμφάνιση στο Phylum των Μαλακίων (Mollusca), δηλαδή στην πρώτη μεγάλη ταξινομική ομάδα οργανισμών στην οποία εμφανίζεται για πρώτη φορά σύστημα κλειστής κυκλοφορίας των σωματικών υγρών. Στα ζώα αυτά το κυκλοφορικό σύστημα είναι στοιχειώδες και περιλαμβάνει ένα μεγάλο

κλειστό διάκενο στο οποίο διατηρούνται τα υγρά του σώματος και στο οποίο πλέον κύτταρα. Αν το σύστημα αυτό διαρραγεί τότε τα κύτταρα που περιέχει συσσωρεύονται στο σημείο της ρήξης και σχηματίζουν ένα είδος θρόμβου που εμποδίζει την απώλεια των σωματικών υγρών προς το περιβάλλον.

Η πρώτη μεγάλη ταξινομική ομάδα ζώων στην οποία, εκτός από την ύπαρξη κλειστού κυκλοφορικού συστήματος, υπάρχει ταυτοχρόνως και ένας μηχανισμός προώθησης του κυκλοφορούντος υγρού (αιμολέμφος) είναι τα βραχύποδα (Annelidae). Η κίνηση της αιμολέμφου εξασφαλίζεται μέσω παλμικής κίνησης του κεντρικού τους αγγείου, η οποία είναι διαρκής. Στα ζώα αυτά η κυκλοφορία γίνεται πιο αποτελεσματική και η αιμοστατική λειτουργία είναι επίσης πιο ακριβής και πιο εξελιγμένη. Αυτό σημαίνει ότι οι ανάγκες επιβίωσης των πολυκύτταρων οργανισμών συμβαδίζουν με τις ανάγκες καλύτερης κυκλοφορίας του εσωτερικού υγρού και ταυτοχρόνως η διαφύλαξή του από τις απώλειες (αιμόσταση) ενισχύεται και αποτελεί πλέον έναν μηχανισμό ομοιοστασίας ο οποίος εξελίσσεται όλο και περισσότερο στα μεταγενέστερα στάδια της εξέλιξης των οργανισμών για να προσεγγίσει την κορυφαία του βελτίωση στον *Homo sapiens*. Μερικές από τις ανωτέρω απόψεις περιέχονται στις ακόλουθες παραπομπές της βιβλιογραφίας 71, 72, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121.

### **1.2.2. Η παρουσία των αιμοπεταλίων στα ζώα**

Η μελέτη της καταγωγής, όπως επίσης της μορφολογίας και της λειτουργίας των κυττάρων της θρομβογένεσης (θρομβοκύτταρα) στις διάφορες βαθμίδες της Φυλογενετικής κλίμακας προσέλυσε σταθερά το ενδιαφέρον των ερευνητών. Πολύ μεγάλη έμφαση δόθηκε στην καταγωγή των αιμοπεταλίων. Πρέπει να σημειώσουμε ότι η ανακάλυψη της οντογενετικής καταγωγής των αιμοπεταλίων από τα μεγακαρυοκύτταρα εκ μέρους του Wright (10,11,12) δεν έγινε στον άνθρωπο αλλά στον μυελό των οστών της γαλής (γάτα) (Μακρής ΠΕ, Αιμόσταση, τόμος Ι, Φυσιολογία, σελ. 24, 25, [660]).

Η μελέτη των κατώτερων ζώων της μεγάλης ταξινομικής ομάδας των ασπονδύλων έδειξε ότι οι τελεστές της αιμοστατικής λειτουργίας αντιπροσωπευόταν από διάφορους τύπους κυττάρων που παρουσίαζαν συγκεκριμένες εξειδικεύσεις.

Φαίνεται λοιπόν ότι μια σειρά διαφόρων κυττάρων που συμμετέχουν στην αιμοστατική λειτουργία των ασπονδύλων, όπως τα «ατρακτοειδή κύτταρα», τα αμοιβαδοειδή κύτταρα, τα πηκτοκύτταρα (coagulocytes), τα εκρηκτικά κύτταρα (explosive cells) και τέλος τα

υαλώδη αιμοκύτταρα (yaline hemocytes) αποτελούν, για τα ασπόνδυλα ζώα, τα αντίστοιχα προς τα αιμοπετάλια κύτταρα, καθώς εκτελούν τις ίδιες προς αυτά αιμοστατικές λειτουργίες, τηρουμένων πάντοτε των αναλογιών που δίνονται από τα πλαίσια της συγκριτικής φυσιολογίας (115, 116, 117, 118, 119).

Τα χαρακτηριστικά των κυττάρων αυτών δεν είναι πλήρως μελετημένα, ώστε να είμαστε σε θέση να πραγματοποιήσουμε κάθε δυνατή σύγκριση των λειτουργιών τους με τις λειτουργίες των αιμοπεταλίων των ανωτέρων θηλαστικών. Είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι παραλλήλως προς την ύπαρξη αυτών, των ούτως ειπείν θρομβοκυττάρων, σε ορισμένα είδη μαλακίων (όπως η γνωστή *Aplysia depilans*) καταγράφηκε και η παρουσία ενός μακρομορίου το οποίο έχει κάποιον ρόλο στην επίσχεση της αιμορραγίας μαζί με τα κύτταρα που ευρίσκονται συσσωρευμένα στα χείλη του τραύματος (115, 116, 117, 118, 119, 120).

Πρέπει επίσης να υπογραμμιστεί ότι τα «πηκτοκύτταρα» ή τα υαλώδη αιμοκύτταρα εντόμων δεν διαφέρουν από τα λεγόμενα «εκρηκτικά» κύτταρα άλλων αρθροπόδων ή από τα αιμοπετάλια των θηλαστικών, όπως σημειώνει ο Gregoire (111, 112) η σε μια μελέτη που περιλαμβάνει 420 είδη εντόμων.

Περνώντας στα σπονδυλωτά η λειτουργία της αιμόστασης πραγματοποιείται με τα λιγοστά εμπύρηνα θρομβοκύτταρα τα οποία παρατηρούνται κατά κύριο λόγο στα πτηνά. Π.χ στην οικόσιτη όρνιθα (*Gallus domesticus*) συναντούμε τέτοιου είδους εμπύρηνα θρομβοκύτταρα των οποίων το μέγεθος και το σχήμα πλησιάζουν εκείνα των ερυθροκυττάρων. Η διαδικασία της αιμόστασης βελτιώνεται σημαντικά πράγμα που αντανakλά την βελτίωση της θρομβοκυτταρικής λειτουργίας. Έτσι στην όρνιθα ο χρόνος ροής του αίματος από τα τετμημένα αγγεία είναι σχετικά βραχύς (μέση τιμή 8 sec) και ανάλογος με τον φυσιολογικό αντίστοιχο χρόνο στον άνθρωπο.

Σε άλλες βαθμίδες των σπονδυλωτών (π.χ στην οικογένεια των κροκοδιλοειδών) παρατηρούμε την έλευση ποιοτικών αλλαγών οι οποίες περιλαμβάνουν ενεργό ρόλο των θρομβοκυττάρων στην συνολική διαδικασία της πήξης του αίματος. Εδώ τα θρομβοκύτταρα συμμετέχουν αποφασιστικά στους μηχανισμούς της αιμόστασης με την απελευθέρωση τεμαχίων του πρωτοπλάσματός τους, που έρχονται να συγκολληθούν πάνω στις αποκεκαλυμμένες ίνες του υπενδοθηλιακού κολλαγόνου των αγγείων στο σημείο της τομής τους, όπως και μεταξύ τους, σχηματίζοντας αιμοστατικά πύγματα. Αυτή η διαδικασία επίσης για να σταθεροποιηθεί και να ολοκληρωθεί απαιτεί την παρουσία

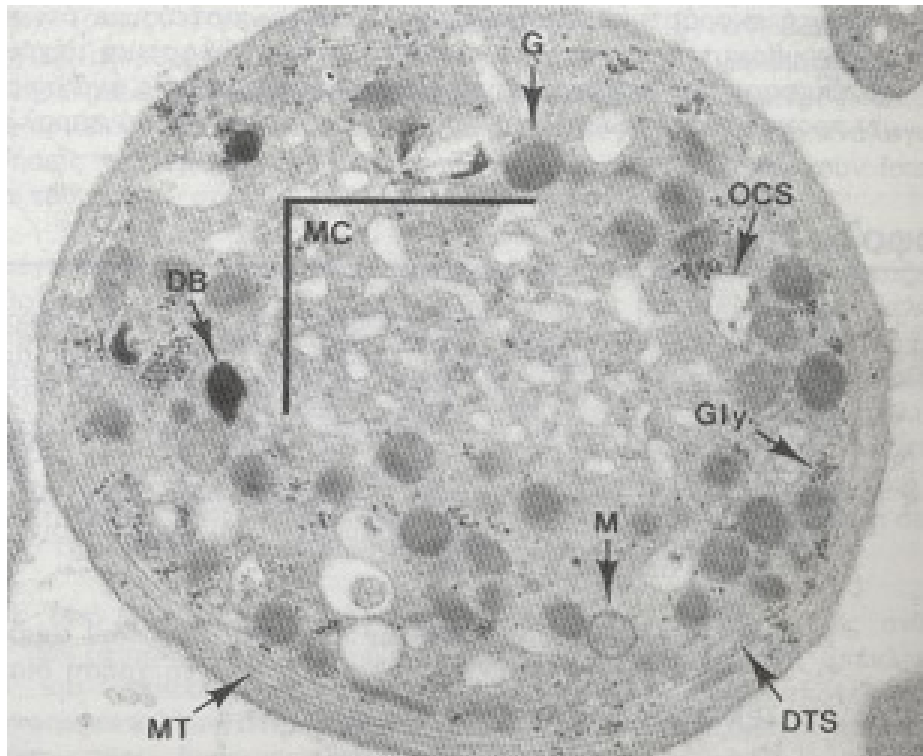
ιόντων ασβεστίου ( $\text{Ca}^{++}$ ) στο σημείο της δημιουργίας του αιμοστατικού θρόμβου, πράγμα το οποίο είναι απαραίτητο και για τα θηλαστικά.

Τέλος στα θηλαστικά και μάλιστα στα ανώτερα είδη αυτών μέχρι και τον *Homo sapiens* τα αιμοπετάλια είναι απύρρηνα, μικρά, φακοειδούς σχήματος, βραχύβια και παράγονται από τα μεγακαρυοκύτταρα στον μυελό των οστών, στους πνεύμονες και κατ' ελάχιστο, στον σπλήνα (Μακρής Π.Ε, Αιμόσταση, τόμος Ι, Φυσιολογία, [660]).

### **1.2.3. Μορφολογία των αιμοπεταλίων**

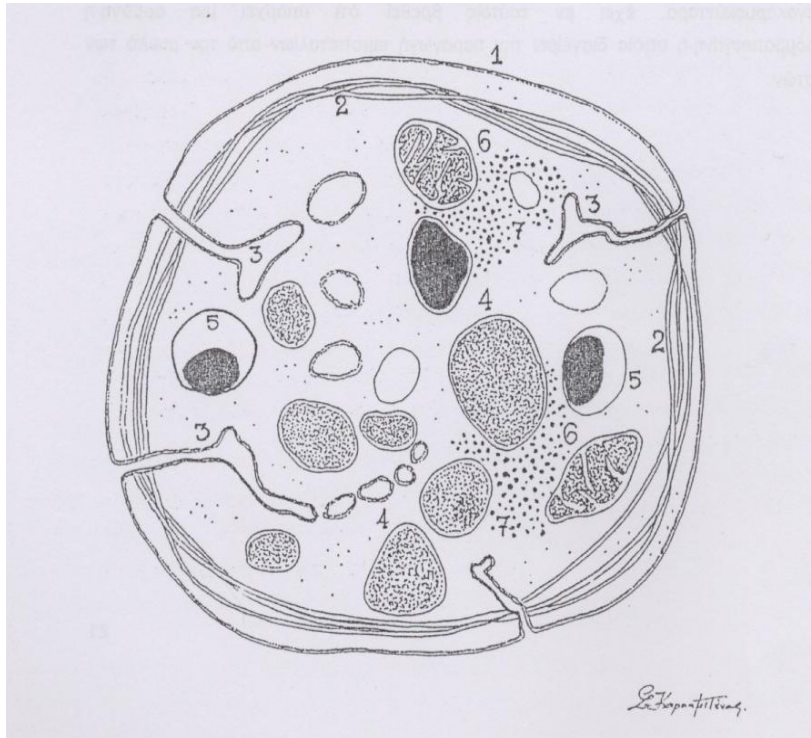
Τα αιμοπετάλια ή θρομβοκύτταρα είναι μικρά απύρρηνα κύτταρα που εμφανίζουν σε ήρεμη κατάσταση σχήμα δισκοειδούς αμφίκυρτου φακού, αρκετά συμπιεσμένου. Η διάμετρός τους (μήκος) ποικίλει μεταξύ 1 – 5 μ, ενώ το πλάτος τους κυμαίνεται μεταξύ 0,5 – 1 μ. Η πυκνότητά τους στο ολικό αίμα του φυσιολογικό άνθρωπο κυμαίνεται μεταξύ 200 - 400  $\times 10^3$ /μλ ολικού αίματος, ενώ η διάρκεια της ζωής τους είναι, σε σύγκριση με τους άλλους τύπους των κυττάρων του αίματος, αρκετά μικρή και κυμαίνεται μεταξύ 7 έως 11 ημέρες. Ο μέσος ρυθμός της ημερήσιας παραγωγής τους κυμαίνεται μεταξύ 35 – 66  $\times 10^3$  αιμοπετάλια / μλ ολικού αίματος. Αν δεν ενεργοποιηθούν κατά την διάρκεια της ζωής τους από διάφορους τραυματισμούς του ενδοθηλίου των αγγείων, τότε θα καταστραφούν στο ήπαρ ή στον σπλήνα (50, 51, 52, 53, 54).

Η παρατήρηση της επιφάνειας των αιμοπεταλίων στο οπτικό μικροσκόπιο μας επιτρέπει να διακρίνουμε σε αυτά δύο κύριες μορφολογικά περιοχές εκ των οποίων η πρώτη καλείται *υαλόμερο* (hyalomere), το οποίο εντοπίζεται κατά κύριο λόγο περιφερικά και είναι ένα στρώμα πρωτοπλάσματος που εμφανίζει στο οπτικό μικροσκόπιο όψη όμοια με το γυαλί χρώματος κυανού ή υποκύανου. Το υαλόμερο εμφανίζει την εικόνα του πρωτοπλάσματος των άλλων κυττάρων. Το *κοκκίομερο* (granulomere) το οποίο αποτελείται επίσης από πρωτόπλασμα πλούσιο σε ποικιλία ενδοκυττάρων κοκκίων και οργανιδίων. Το κοκκίομερο ευρίσκεται τοποθετημένο κεντρικότερα εν συγκρίσει με το υαλόμερο στο ήρεμο, μη ενεργοποιημένο αιμοπετάλιο. Όταν το αιμοπετάλιο ενεργοποιηθεί τότε τα κοκκία που περιλαμβάνει συγκεντρώνονται προς το κέντρο του σχηματίζοντας μια διαμόρφωση που θυμίζει τον πυρήνα των κανονικών εμπύρηνων κυττάρων.



**Εικόνα αρ. 3:** Βασικές δομές ενός αιμοπεταλίου, όπως φαίνονται μέσω παρατήρησης στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο. **G:** οργανίδιο του Golgi, **OCS:** ανοιχτό σύστημα καναλιών, **M:** μιτοχόνδριο, **Gly:** κοκκία γλυκογόνου, **MC:** μικρο – καναλίσκοι, **MT:** μικροσωληνίσκοι, **DB:** πυκνό σωματίο, **DTS:** πυκνό σύστημα σωληνίσκων.

Τα αιμοπετάλια αν και προέρχονται από την κατάτμηση του πρωτοπλάσματος των μεγακαρυοκυττάρων, όπως ήδη προείπαμε, δεν είναι κυτταρικά ράκη αλλά απύρρηνα κύτταρα ανάλογα προς τα ερυθροκύτταρα αλλά μικρότερα και με άλλη εξειδίκευση.



**Εικόνα αρ. 4:** Σχέδιο ενός αιμοπεταλίου από φωτογραφία ηλεκτρονικού μικροσκοπίου: **1.** πλασματική μεμβράνη, **2.** μικροσωληνίσκοι, **3.** τμήματα του συστήματος, **4.** κοκκία, **5.** συμπαγή σώματα, **6.** μιτοχόνδρια, **7.** κοκκία γλυκογόνου.

Παρατηρώντας τα ζωντανά αιμοπετάλια με το μικροσκόπιο αντιθετικής φάσης διαπιστώνουμε ότι αυτά διέρχονται από τρεις διαφορετικούς μορφολογικούς τύπους οι οποίοι διαδέχονται ο ένας τον άλλον καθώς προχωρούμε από την συνθήκη της ηρεμίας προς τις διαφορετικές φάσεις της ενεργοποίησης. Οι τρεις αυτοί μορφολογικοί τύποι αιμοπεταλίων είναι οι εξής:

1<sup>ov</sup>) Ο «ήρεμος» τύπος (circulating form) με τον οποίον τα μη ενεργοποιημένα αιμοπετάλια κυκλοφορούν στο αίμα.

2<sup>ov</sup>) Ο δενδριτικός τύπος (dendritic form) ο οποίος αντιστοιχεί σε αιμοπετάλια που έχουν ήδη υποστεί διέγερση.

3<sup>ov</sup>) Ο προσκολλημένος ή απλωμένος τύπος (spread form) ο οποίος αντιστοιχεί σε αιμοπετάλια στα οποία η διαδικασία της ενεργοποίησης έχει ήδη αχθεί σε πολύ προχωρημένο στάδιο, με αποτέλεσμα το αιμοπετάλιο να εκτελεί το πλήρες βιολογικό του

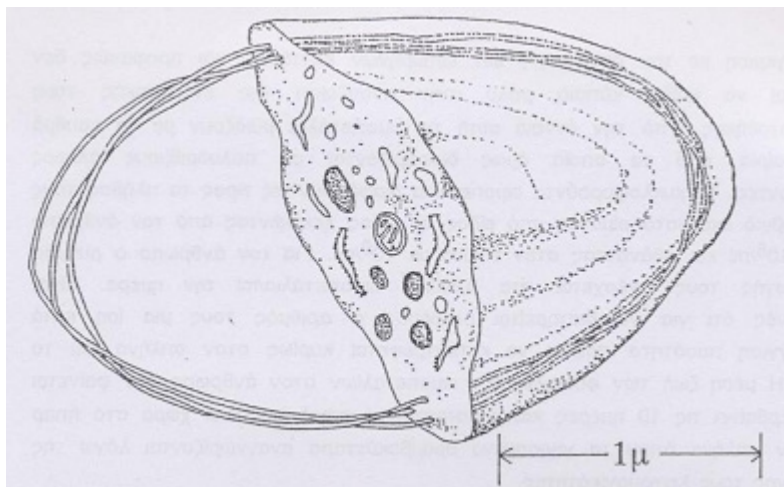
πρόγραμμα, που είναι ο σχηματισμός λευκών θρόμβων και το κλείσιμο των τομών από τις οποίες αιμορραγεί ένα αγγείο.

Οι τρεις αυτοί αιμοπεταλιακοί τύποι, συνεπώς, δεν αντιστοιχούν σε διαφορετικά είδη de novo παραγόμενων αιμοπεταλίων, αλλά απλώς σε διαφορετικά λειτουργικά τους στιγμιότυπα, τα οποία ακινητοποιήθηκαν στον ενεστώτα χρόνο, μέσω των τεχνικών μονιμοποίησης που χρησιμοποιεί η ηλεκτρονική μικροσκοπία για την προπαρασκευή των δειγμάτων της. Αυτά τα λειτουργικά στιγμιότυπα της αιμοπεταλιακής συμπεριφοράς έγινε κατορθωτό να περιγραφούν και να αποτυπωθούν φωτογραφικά με την χρήση της τεχνολογίας του ηλεκτρονικού μικροσκοπίου σάρωσης.

Κατωτέρω δίνουμε μια αναλυτικότερη εικόνα αυτών των εν λόγω αιμοπεταλιακών μορφών.

### ***1<sup>ο</sup>) Ο ήρεμος τύπος αιμοπεταλίου***

Ο ήρεμος τύπος των αιμοπεταλίων αντιστοιχεί σε εκείνα τα αιμοπετάλια τα οποία δεν έχουν ακόμη ενεργοποιηθεί από κάποιον διεγέρτη των λειτουργιών τους. Είναι ο τύπος των αιμοπεταλίων τα οποία επικρατούν στα δείγματα του αίματος που έχουν συλλεγεί μέσω ηπίων αιμοληψιών σε γυάλινους δοκιμαστικούς σωλήνες με επαρκή ποσότητα αντιπηκτικού και εσωτερική επιφάνεια επαφής με το αίμα επαλειφθείσα επιμελώς και πλήρως με ικανή ποσότητα σιλικόνης (ή σε απλούς πλαστικούς σωλήνες απουσία σιλικόνης).



***Εικόνα αρ.5:*** Κάθετη τομή αιμοπεταλίου. Διακρίνεται η περιφερική στεφάνη των μικροσωληνίσκων.

Τα αιμοπετάλια που εμπεριέχονται στα δείγματα αυτά δεν μπορούν να ενεργοποιηθούν εξ αιτίας του αντιπηκτικού που δεσμεύει με χυλικό τρόπο τα ιόντα ασβεστίου του αίματος εμποδίζοντάς τα να ενεργοποιήσουν αυθόρμητα τον καταρράκτη της πήξης. Το αντιπηκτικό συνήθως είναι ένα μετά νατρίου ή καλίου άλας του κιτρικού οξέος ή εναλλακτικά μια επαρκής ποσότητα αιθυλένιο-διάμινο τετρα- οξείκου οξέος, για την συγκράτηση των κατιόντων ασβεστίου του αίματος.

Σε αυτού του είδους τα μη ενεργοποιημένα αιμοπετάλια το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης αποκαλύπτει ότι η επιφάνειά τους είναι τρισδιάστατη και δισκοειδούς αμφίκυρτου σχήματος που ομοιάζει με το σχήμα ενός σπόρου φακής ή ενός πεπλατυσμένου συγκεντρωτικού οπτικού φακού. Η επιφάνεια αυτή είναι παρουσιάζεται διάτρητη από ένα αριθμό οπών και μικρών στομιών. Μερικές από τις εν λόγω οπές διαφαίνεται ότι είναι ανοιχτές. Οι εικόνες αυτές αποκαλύπτουν ότι τα αιμοπετάλια ομοιάζουν με τα ερυθρά αιμοσφαίρια, με την διαφορά ότι τα τελευταία εμφανίζουν αμφίκυκλο δισκοειδές σχήμα, έχουν ερυθρωπή ή κιτρινέρυθη χροιά, λόγω του χρώματος της αιμοσφαιρίνης και οι διαστάσεις τους είναι πολύ μεγαλύτερες από εκείνες των αιμοπεταλίων. Οι ανοιχτές οπές αντιστοιχούν σε πόρους του συστήματος των ανοιχτών σωληνίσκων με τους οποίους το εσωτερικό των αιμοπεταλίων επικοινωνεί με το εξωτερικό τους περιβάλλον, δηλαδή το περιβάλλον του αιματικού πλάσματος.

Σε λεπτές τομές το αιμοπετάλιο φαίνεται να είναι εφοδιασμένο με μια δέσμη μικρών σωληναρίων τα οποία διατρέχουν κυκλοτερώς την περιφέρεια του αιμοπεταλίου κάτω από την εξωτερική μεμβράνη. Το κυτταρόπλασμα του αιμοπεταλίου περιλαμβάνει μια σειρά διαφορετικών κοκκίων και σωματιδίων, όπως τα πυκνά σωματίδια, τα μιτοχόνδρια, τα α – σωματίδια κ.α, τα οποία δεν έχουν σταθερές θέσεις για όλα τα αιμοπεταλιακά κύτταρα αλλά φαίνεται να είναι ακίνητα και μάλλον τοποθετημένα με τυχαίο τρόπο στο εσωτερικό της πρωτοπλασματικής μάζας. Επίσης υπάρχουν κατανεμημένα διάσπαρτα μέσα στην κυτταρική μήτρα στοιχεία των δύο συστημάτων καναλιών, των ανοιχτών σωληνίσκων και των πυκνών σωληναρίων.

Τα κανάλια του συστήματος των ανοιχτών σωληνίσκων εκτείνονται από την μια άκρη της επιφάνειας μέχρι την άλλη δημιουργώντας επικοινωνίες του εσωτερικού με το εξωτερικό του αιμοπεταλιακού κυττάρου. Το σύστημα των πυκνών σωληναρίων βρίσκεται ακριβώς κάτω από την περιφερική ζώνη των μικροσωληναρίων και αναπτύσσει στενές σχέσεις επικοινωνίας με το κανάλι του συστήματος. Έτσι το σύστημα των ανοιχτών σωληναρίων

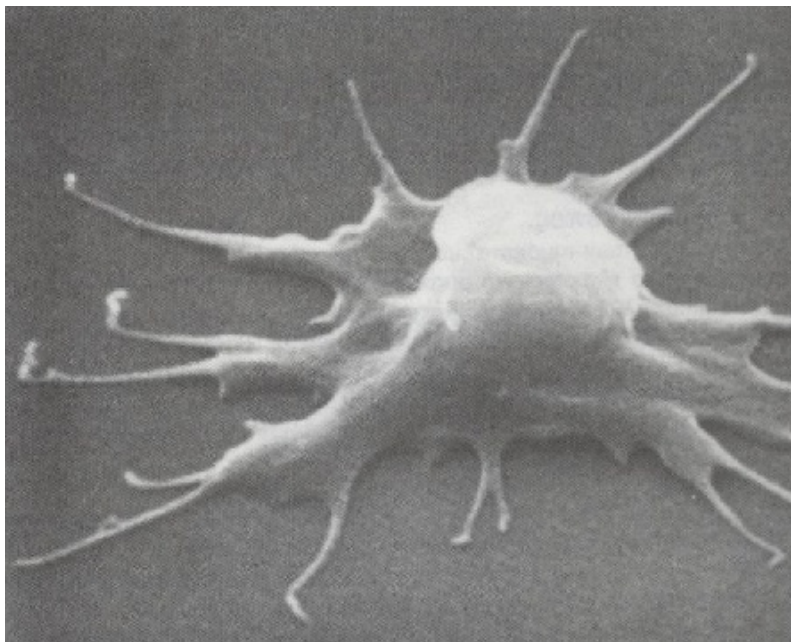


λαμβάνει την ιδιότητα ενός ευρύτερου αγωγού συστήματος στο οποίο συμμετέχουν και τα πυκνά σωληνάκια. Το σύστημα αυτό επικοινωνεί προφανώς με τον άμεσα γειτνιάζοντα προς την κυτταροπλασματική μεμβράνη εξωαιμοπεταλιακό χώρο.

Τα αιμοπετάλια του ήρεμου τύπου είναι αδρανή και δεν παρουσιάζουν άλλη συμπεριφορά.

### **2<sup>ον</sup>) Ο Δενδριτικός Τύπος των Αιμοπεταλίων(dendritic form)**

Ένα αιμοπετάλιο γίνεται δενδριτικού τύπου (ή καλύτερα λαμβάνει την δενδριτική μορφή), όταν αρχίζει να ενεργοποιείται από μια φυσική κατάσταση ή κάποιον ειδικό διεγέρτη. Για παράδειγμα τα αιμοπετάλια που εξέρχονται μαζί με το υπόλοιπο αίμα εκτός της κυκλοφορίας από την τομή ενός αγγείου λαμβάνουν σχεδόν άμεσα την δενδριτική μορφή: Αν μια ποσότητα αίματος ληφθεί μέσω μια σύριγγας και τεθεί σε έναν γυάλινο δοκιμαστικό σωλήνα μη επικαλυμμένο με σιλκόνη και χωρίς αντιπηκτικό παράγοντα, τότε όλα τα αιμοπετάλια του αίματος αυτού θα μετασχηματιστούν στον δενδριτικό τύπο διότι θα έχουν ενεργοποιηθεί, εξ αιτίας μιας πληθώρας ερεθισμάτων, μέσα σε ελάχιστα λεπτά από την αφαίμαξη.



**Εικόνα αρ. 6:** Ενεργοποιημένο αιμοπετάλιο με δενδριτική μορφή. Τα ψευδοπόδια έχουν αυξήσει την πρόσφυση επί του στερεού υποστρώματος, ενώ το κεντρικό μέρος του αιμοπεταλιακού σώματος έχει λάβει σφαιρικό σχήμα. Τα ψευδοπόδια συντήκονται αυξάνοντας την επιφάνεια πρόσφυσης.

Στην κατάσταση αυτή το αιμοπετάλιο αλλάζει, κατ' αρχάς, σχήμα και μεταπίπτει από αμφίκυρτο φακοειδές προς σφαιρικό με την ταυτόχρονη προεκβολή ψευδοποδίων.

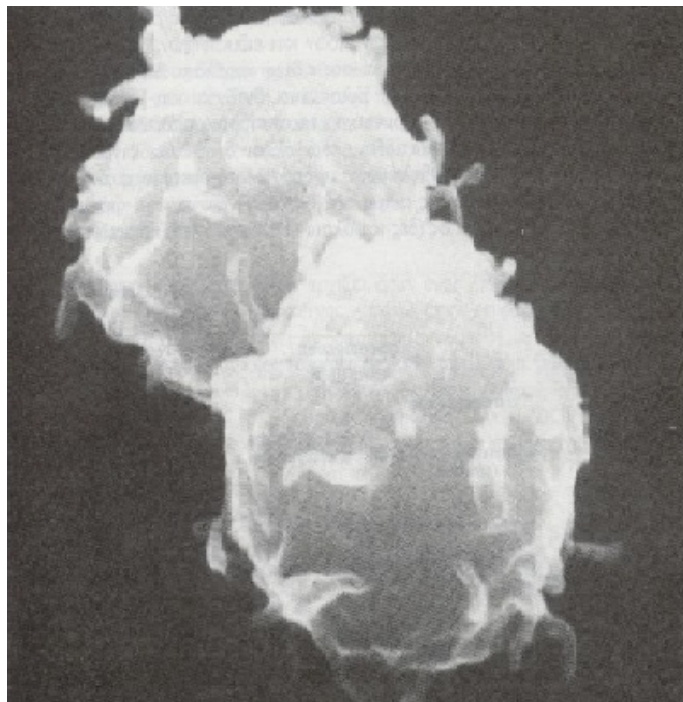
Στην αρχή της εμφάνισής τους τα ψευδοπόδια είναι μικρά, με πλατιά βάση και οξύ άκρο. Αν ο παράγων που διεγείρει το αιμοπετάλιο πάψει να δρα, στην φάση αυτή, τότε τα ψευδοπόδια αποσύρονται και το αιμοπετάλιο επιστρέφει στην ήρεμη του μορφή. Αν όμως το ερέθισμα είναι ισχυρό και επίμονο τότε ο μετασχηματισμός του αιμοπεταλίου εξελίσσεται καθώς τα ψευδοπόδια γίνονται όλο και πιο μακρύτερα υπερβαίνοντας κατά 2 ή 3 φορές την αρχική διάμετρο του εν ήρεμια αιμοπεταλίου. Ταυτοχρόνως γίνονται λεπτότερα και η κινητικότητά τους αυξάνεται.



**Εικόνα αρ. 7:** Παρασκεύασμα αίματος στο οποίο διακρίνουμε έναν αριθμό ερυθροκυττάρων, όπως επίσης και ένα ενεργοποιημένο αιμοπετάλιο σε δενδριτική μορφή. Μερικά από τα αιμοπεταλιακά ψευδοπόδια έχουν αρχίσει να προσφύονται στην εξωτερική κυτταροπλασματική μεμβράνη των ερυθροκυττάρων, προετοιμάζοντας την ενσωμάτωσή τους στην δομή ενός θρόμβου.

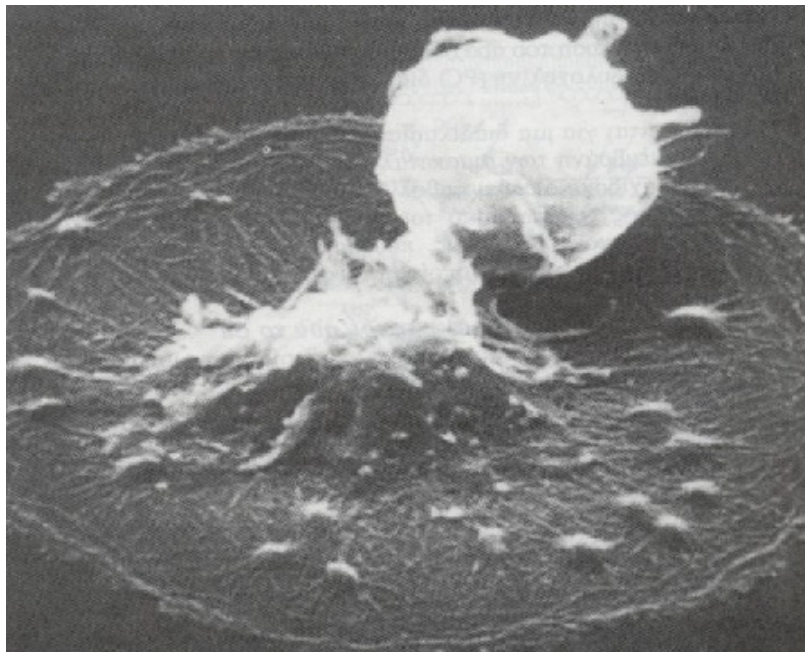
Η παρατήρηση ζωντανών αιμοπεταλίων τελούντων υπό την δράση ενός διεγέρτη αποκαλύπτει ότι η ενεργοποίησή τους είναι μια διαδικασία εξαιρετικά δυναμική, στην οποία το φαινόμενο που κυριαρχεί είναι η αλλαγή του σχήματος από δισκοειδές προς σφαιρικό, αλλά ακόμη περισσότερο η διαρκής εναλλαγή της έκτασης, της θέσης, του μεγέθους και της διεύθυνσης των ψευδοποδίων. Στην φάση αυτή λαμβάνει χώρα μια αναδιοργάνωση της λεπτής κατασκευής του εσωτερικού των αιμοπεταλίων.

Τα ποικίλα σωματίδια τα οποία στο ήρεμο αιμοπετάλιο είναι διεσπαρμένα στο κυτταρόπλασμα μαζεύονται προς το κέντρο του κυττάρου. Η περιφερική δέσμη των μικροσωληναρίων συσπάται σε λεπτούς κύκλους γύρω από τα κεντρικώς διατεταγμένα σωματίδια συνεισφέροντας σημαντικά στην αλλαγή του σχήματος από δισκοειδούς προς σφαιρικό. Επίσης μεταβολές φαίνεται να υφίστανται και τα μικροϊνίδια, οι οποίες όμως δεν είναι δυνατόν να περιγραφούν εξ αιτίας των βλαβών που προκαλούνται σε αυτά από την δράση του μονιμοποιητικού υλικού (οσμικό οξύ).



**Εικόνα αρ. 8:** Δύο ενεργοποιημένα αιμοπετάλια που έχουν ήδη λάβει σφαιρικό σχήμα και έχουν εκβάλει ψευδοπόδια. Τα δύο αιμοπετάλια αλληλεπιδρούν μεταξύ τους προσκολλώμενα το ένα επί του άλλου.

Οι λεπτές τομές αιμοπεταλίων έντονα διεγερμένων από μεγάλες συγκεντρώσεις φυσιολογικών αγωνιστών αποκαλύπτουν ακόμη πιο προχωρημένο βαθμό μεταβολών σε όλο το σύστημα των αιμοπεταλιακών δομών: Τα κανάλια του συστήματος των ανοιχτών σωληναρίων διευρύνονται και καταλαμβάνονται από ουσίες που εκκρίνονται από τα κοκκιώδη σωματίδια των αιμοπεταλίων στα οποία είχαν αποθηκευτεί κατά την φάση της ηρεμίας τους και κατά την δημιουργία τους από τα μεγακαρυοκύτταρα. Φαίνεται ότι τα ενδοκυτταροπλασματικά κοκκία των αιμοπεταλίων προσκολλώνται στα τοιχώματα του διευρυμένου ανοιχτού σωληναριακού συστήματος εκκρίνοντας στο εσωτερικό τους το περιεχόμενο των ουσιών που κατέχουν.



**Εικόνα αρ. 9:** Ενεργοποιημένο αιμοπετάλιο που έχει προσκολληθεί και απλώσει καταλαμβάνοντας όσο το μεγαλύτερη δυνατή επιφάνεια από το υπόστρωμα. Ένα δεύτερο αιμοπετάλιο τυπικά ενεργοποιημένο με σφαιρική μορφή αλληλεπιδρά και προσκολλάται στο πρώτο αιμοπετάλιο.

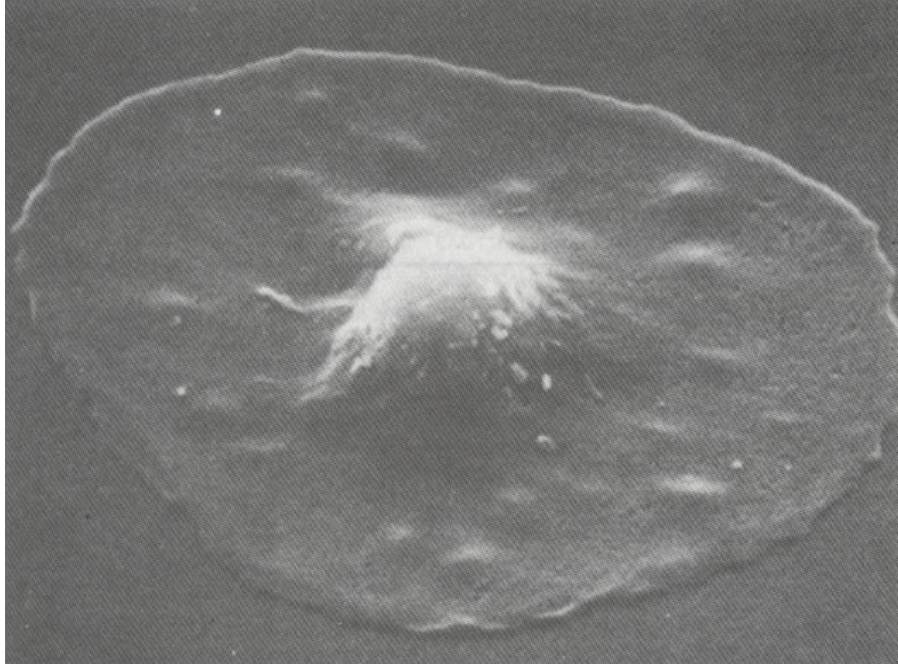
Οι δομές της ακτινομοσίνης συγκεντρώνονται στο κυτταρικό κέντρο συνενοόμενες σε μια πυκνή συστατική κηλίδα, η οποία φαίνεται να αποτελεί και το κέντρο κίνησης όλου του αιμοπεταλιακού κυτταροσκελετού. Η σύσπαση των κύκλων των μικροσωληναρίων φαίνεται λεπτότερη, εύθραυστη ή συνεσταλμένη, εν σχέσει προς τις συσπάσεις της

ακτινομυοσίνης. Φαίνεται ότι οι συνολικές συσπάσεις που προκαλούνται στο σώμα του αιμοπεταλίου αυξάνουν τις πιέσεις στο εσωτερικό του διεσταλμένου συστήματος των ανοιχτών σωληνίσκων που ήδη περιέχουν και τις ουσίες των κοκκίων, οπότε οι ουσίες αυτές οδηγούνται στο εξωτερικό του διεγερθέντος αιμοπεταλιακού κυττάρου. Η εξωκυττάρωση του περιεχομένου των αιμοπεταλιακών κοκκίων ονομάζεται «αντίδραση έκλυσης των κοκκίων» και ο ρόλος της είναι σημαντικός για την διάδοση της διέγερσης στα γειτονικά αιμοπετάλια, καθόσον τα κοκκία περιέχουν αγωνιστές της αιμοπεταλιακής αντίδρασης, όπως επινεφρίνη, 5 – υδροξυ – τρυπαμίνη, κ.α.

### **3<sup>ον</sup>) Ο Προσκολλημένος ή Απλωμένος Τύπος Αιμοπεταλίου (*spread form*)**

Αυτή η μορφή αιμοπεταλίου αποτελεί μια συνέχεια της δενδριτικής του μορφής και συνεπώς μια εξέλιξη της διέγερσής του αιμοπεταλίου. Οι προεκβολές των ψευδοποδίων οι οποίες χαρακτηρίζουν τον δενδριτικό τύπο αιμοπεταλίου είναι υπεύθυνες για την δημιουργία του προσκολλημένου τύπου. Αυτό μπορεί να δειχθεί εύκολα αν ένα από τα αιμοπεταλιακά ψευδοπόδια έλθει σε στενή επαφή με ένα στερεό υπόστρωμα όπως π.χ η αντικειμενοφόρος γυάλινη πλάκα πάνω στην οποία ευρίσκεται το υπό παρατήρηση παρασκεύασμα ζωντανών αιμοπεταλίων. Όταν το αιμοπετάλιο έλθει σε επαφή με την γυάλινη επιφάνεια τότε ενεργοποιείται ισχυρά και στην αρχή προσηλώνει μια από τις προεκβολές του πάνω σε αυτήν. Κατόπιν προσκολλάται και τελικά απλώνει την προεκβολή σε όσο το δυνατόν μεγαλύτερη επιφάνεια με αποτέλεσμα να εμφανίζει τελικά μια μορφή που θυμίζει το τηγανητό αυγό. Τα ψευδοπόδια συντήκονται μεταξύ τους και το μέτωπο της προσκόλλησης καταλαμβάνει πολύ μεγάλες διαστάσεις. Το κεντρικό τμήμα του απλωμένου και προσκολλημένου αιμοπεταλίου εμφανίζει μεγαλύτερη πυκνότητα εξ αιτίας των σωματιδίων που έχουν διαταχθεί κεντρικά. Το αιμοπετάλιο τείνει να «εναγκαλιστεί» και στην συνέχεια να φαγοκυτταρώσει όλη την ξένη επιφάνεια πράγμα που το επιτυγχάνει αν αυτή είναι μικρότερη από το ανάπτυγμα της εξωτερικής του μεμβράνης.





**Εικόνα αρ. 10:** Αιμοπετάλιο σε πλήρη πρόσφυση έχοντας την εικόνα του απλωμένου τύπου.

Όταν το αιμοπετάλιο έρχεται σε επαφή με ένα κομμένο αγγείο, τότε φαίνεται ότι η αντίδραση της ενεργοποίησης και της προσκόλλησης πυροδοτείται από τα κατεστραμμένα ενδοθηλιακά κύτταρα και τους τραυματισμένους υπενδοθηλιακούς ιστούς. Οι σπασμένες ίνες του κολλαγόνου αποτελούν διεγερτικό ερέθισμα για τα αιμοπετάλια, ενώ διάφορα μεταβολικά παράγωγα, όπως η διφωσφορική αδενοσίνη, καθώς και μεταβολίτες της οδού του αραχιδονικού οξέος αποτελούν κύριους και ισχυρούς αγωνιστές των λειτουργιών του, όπως θα δούμε παρακάτω. Γενικά τα προϊόντα κυτταρικής βλάβης και το κολλαγόνο ενεργοποιούν το αιμοπετάλιο το οποίο προσκολλάται πάνω στις παραμορφωμένες και κομμένες ίνες του κολλαγόνου. Συνεπώς μέσα σε μικρό χρονικό διάστημα τα χείλη της τομής έχουν καλυφθεί από μεγάλους αριθμούς ενεργοποιημένων και προσκολλημένων αιμοπεταλίων. Τα αιμοπετάλια συνεχίζουν την διέγερσή τους οπότε συμπαρασέρνουν σε αυτήν και άλλα αιμοπετάλια με αποτέλεσμα σε μικρό χρονικό διάστημα να σχηματίζεται ένας λευκός θρόμβος ο οποίος καλύπτει όχι μόνον τα χείλη αλλά και το διάκενο της τομής αν αυτή δεν είναι ιδιαίτερος μεγάλη. Η αντίδραση έκλυσης των κοκκίων ενισχύει ακόμη πιο πολύ την ενεργοποίηση και άλλων αιμοπεταλίων τα οποία προσεγγίζουν την πληγή καθώς μετακινούνται από το ρεύμα της κυκλοφορίας. Αυτή η διαδικασία κινείται

ταυτοχρόνως με την ενεργοποίηση των ενζύμων του καταρράκτη της αιματικής πήξης, που ισχυροποιούν την συνοχή των στοιχείων του θρόμβου σταθεροποιώντας την δομή του. Βέβαια η συνολική συνέργεια των παραγόντων της πήξης και των ενεργοποιημένων αιμοπεταλίων θα αναπτυχθεί σε άλλο κεφάλαιο.

#### ***4<sup>ον</sup>) Μεταγενέστερες παρατηρήσεις μέσω μιας βελτιωμένης προπαρασκευαστικής τεχνικής***

Η χρήση μιας τεχνικής, η οποία περιελάμβανε την επεξεργασία των αιμοπεταλίων με ένα καθαριστικό βελτίωσε πάρα πολύ την ικανότητα παρατήρησης του εσωτερικού των αιμοπεταλίων, και συνεπώς, των συμβάντων που λαμβάνουν χώρα μέσα στο πρωτόπλασμα τους, κατά την εξέλιξη των διαφόρων σταδίων της ενεργοποίησής τους.

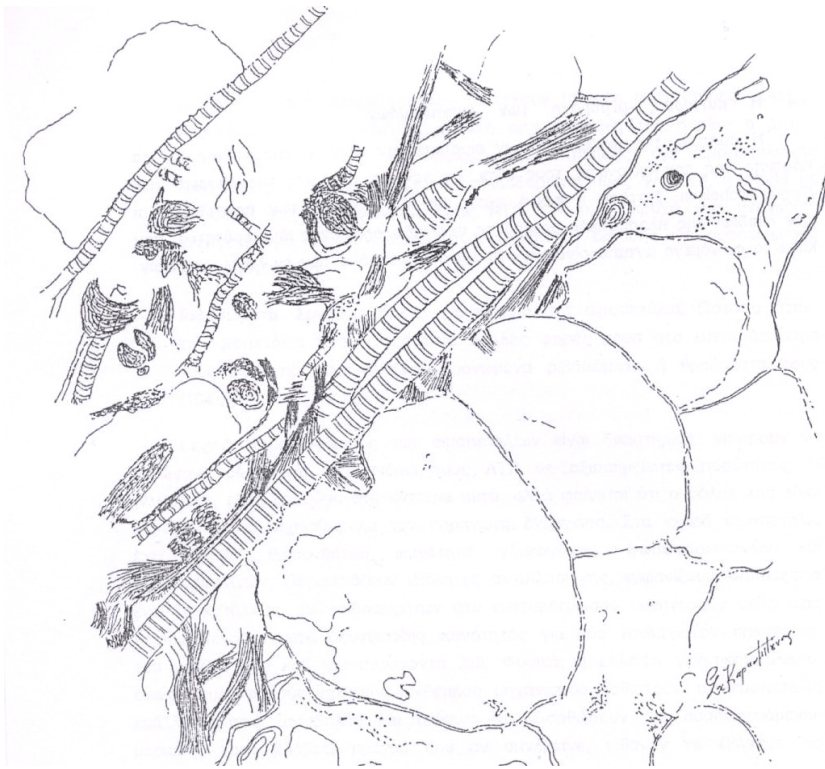
Οι μεταβολές αυτές είναι πολλές και σημαντικές, αφορούν δε τόσο το εξωτερικό όσο και το εσωτερικό των εν λόγω κυττάρων, ενώ είναι σαφές ότι αλληλοσυνδέονται μεταξύ τους. Η εξαγωγή των ψευδοποδίων, η αύξηση της κινητικότητας όλου του αιμοπεταλιακού σώματος, οι μεταβολές στην διάταξη των κοκκίων, η σύσπαση της περιφερικής στεφάνης μικροσωληναρίων, η εξωκύτωση του περιεχομένου των κοκκίων (release reaction) είναι γεγονότα τα οποία είχαν μελετηθεί με την τεχνική των λεπτών τομών στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο, η οποία, ωστόσο, δεν ξεκαθάρισε απόλυτα το τι ακριβώς συνέβαινε στην αναδιοργάνωση του εσωτερικού των αιμοπεταλίων, αφήνοντας μια σκιά σημαντικής ασάφειας.

Η επεξεργασία των αιμοπεταλίων με καθαριστικό βελτίωσε κατά πολύ την διαφανοποίηση της μεμβράνης των αιμοπεταλίων, οπότε οι δυσδιάκριτες μεταβολές του εσωτερικού τους έγιναν ορατές στην παρατήρηση. Έτσι έγινε σαφές ότι η έκθεση των αιμοπεταλίων σε διεγέρτες οδηγεί στην δημιουργία περιφερικών στοιβάδων υπομεμβρανώδους ακτίνης, οι οποίες και καθιστούν ορατό τον κυτταρικό σκελετό. Έτσι ο αιμοπεταλιακός κυτταροσκελετός περιλαμβάνει κατά κύριο λόγο ινίδια ακτίνης αλλά και άλλα πρωτεϊνικά συστατικά. Τα μόρια της ακτίνης επεκτείνονται από το κυτταρόπλασμα προς τα ψευδοπόδια και παρακολουθούν τις μεταβολές του σχήματός τους. Επίσης φάνηκε ότι η ακτίνη συσσωρεύεται μέσα σε ινίδια τα οποία αναπτύσσονται παράλληλα με το μήκος των ψευδοποδίων. Το υπόλοιπο της ακτίνης σχηματίζει μια μάζα, την συσταλή κηλίδα, η οποία συστέλλει τους κύκλους των μικροσωληναρίων, στο κέντρο του κυττάρου.

Η περιφερική ζώνη των αιμοπεταλίων παραμένει ορατή με σαφή τρόπο καθ' όλη την διάρκεια της μετάπτωσης του αιμοπεταλίου από τον δισκοειδή στον δενδριτικό τύπο και της μετατροπής των μορίων της ακτίνης σε ινίδια, ενώ στην διάρκεια των σταδίων του εσωτερικού μετασχηματισμού αυτή μπορεί να υποστεί σύσπαση με ισχυρούς κύκλους προς την κεντρική ζώνη του κυττάρου. Στα προχωρημένα στάδια της εσωτερικής σύσπασης γεννώνται δυνάμεις οι οποίες οδηγούν σε ρήξη των κύκλων και σε προώθηση και ανάπτυξη ενός απλού μικροσωληναρίου γύρω από την περιφέρεια των αιμοπεταλίων, έτσι ώστε τα συστατά υλικά να εκφεύγουν από την μάζα της συσταλτής κηλίδας. Ενδεχομένως αυτό το μικροσωληνάριο λειτουργεί ως ένας μηχανικός περιφερικός διαστολέας που έχει σκοπό να εκτείνει το αιμοπετάλιο προς όλες τις διευθύνσεις της επιφάνειας στην οποία έχει προσκολληθεί. Η αύξηση του μεγέθους του περιφερικού μικροσωληναρίου φαίνεται ότι λαμβάνει χώρα μέσω τροφοδότησης από μικροσωληνίσκους οι οποίοι προέρχονται από την πυκνή συσταλή κηλίδα. Το αιμοπετάλιο δεν κινείται κατά μια διεύθυνση γραμμική, όπως συμβαίνει με ένα φαγοκύτταρο που ερεθίζεται από μια χημειοτακτική ουσία προερχόμενη από σταθερή πηγή, αλλά η κίνησή του είναι επεκτατική, δηλαδή εξασφαλίζει την εξάπλωσή του, ώστε να καταλάβει την δυνατόν μεγαλύτερη επιφάνεια. Εντελώς ζωγραφικά θα μπορούσε κανείς να το παρομοιάσει με ένα φύλλο πίτας του απλώνεται μέσω συμπίεσης από τα πάνω και μαλακής περιφερικής ισότιμης έλξης, ώστε να μην υπάρξει παραμόρφωση κατά μια από τις άπειρες διαμέτρους του κύκλου που το περιγράφει. Φαίνεται ότι η συσταλή κεντρική κηλίδα καθλώνει τρόπον τινά το αιμοπετάλιο και τα εκτεινόμενα ψευδοπόδια το απλώνουν προς την περιφέρεια, ενώ ταυτοχρόνως τα μόρια προσκόλλησης που αναδύονται από την μεμβράνη αυτού, σταθεροποιούν την θέση του πάνω στην επιφάνεια που «κατακτήθηκε». Η διαδικασία αυτή απλώνει το αιμοπετάλιο σε μεγάλη έκταση, μεγεθύνοντας την επιφάνεια πρόσφυσης της κυτταροπλασματικής μεμβράνης στο υπόστρωμα, αλλά επίσης αυξάνει και την δύναμη της πρόσφυσης επί του υποστρώματος. Όλη αυτή η δυναμική του αναπτύγματος γίνεται μέσω της μάζας του αιμοπεταλίου, η οποία συμπιέζεται και μικραίνει κατ' ύψος, ενώ εκτείνεται κυκλοτερώς κατά πλάτος. Ο στόχος της λειτουργίας του αιμοπεταλίου είναι να καλύψει τραυματισμένες επιφάνειες, ώστε να σταματήσει η απώλεια του αίματος. Η αντίδραση έκλυσης του περιεχομένου των κοκκίων φέρνει στο άμεσο περιβάλλον του αιμοπεταλίου μεγάλες ποσότητες αγωνιστών οι οποίοι διεγείρουν τα άλλα αιμοπετάλια που βρίσκονται στο σημείο. Έτσι και αυτά αρχίζουν να εκτελούν το ίδιο πρόγραμμα αλλαγής σχήματος, εξαγωγής ψευδοποδίων,



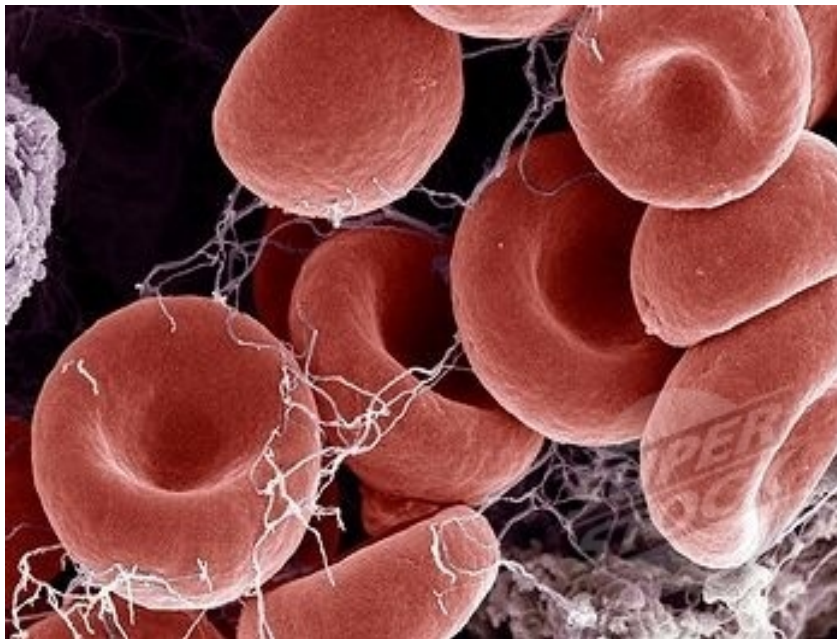
πρόσφυσης είτε στο τραυματισμένο υπόστρωμα, είτε στο αιμοπετάλιο που ήδη έχει προσκολληθεί και φυσικά απλώματος της μάζας του περιφερικά. Συνεπώς πάνω στο πρώτο στρώμα αιμοπεταλιακής κάλυψης του τραυματισμένου αγγείου, προστίθεται ένα δεύτερο, ένα τρίτο κ.ο.κ στρώμα, με αποτέλεσμα μέσα σε λίγα λεπτά της ώρας να σχηματιστεί μια δομή η οποία σφραγίζει την τομή και σταματά την αιματική απώλεια.



**Εικόνα αρ. 10:** Αιμοπετάλια συγκολλημένα σε ίνες αγγειακού κολλαγόνου (σχέδιο από φωτογραφία ηλεκτρονικού μικροσκοπίου). Μεγέθυνση 30.000 x.

Η τοπική σύσπαση του αγγείου μπορεί στο σημείο αυτό να σταματήσει, χωρίς κίνδυνο αιμορραγίας. Οι άλλοι παράγοντες πήξης ενισχύουν ακόμη πιο ισχυρά τον θρόμβο και τον σταθεροποιούν. Τέλος ο θρόμβος συσπάται, ενδεχομένως μέσω των συσταλτών μυϊκού χαρακτήρα στοιχείων των αιμοπεταλίων του και η δύναμη που αναπτύσσεται συμπλησιάζει τα χείλη της τομής οπότε η τομή κλείνει. Κατόπιν αρχίζουν οι διεργασίες της ανάπλασης των τρωθέντων τοιχωμάτων του αγγείου, καθόσον παράγοντες που εκκρίνονται από τα αιμοπετάλια συνεισφέρουν στην τοπική αγγειογένεση και στην επιδιόρθωση του αγγείου. Άλλες διεργασίες πυροδοτούνται στην περιοχή που αποτρέπουν

την περαιτέρω μεγέθυνση του θρόμβου, ώστε να μην εξαπλώνεται εις το διηλεκές και αποφράσσει και άλλα αγγεία. Εφόσον η τοιχωματική βλάβη του αγγείου αποκατασταθεί τότε ο θρόμβος αρχίζει και λύεται οπότε το αγγείο επανασηραγγούται. Όλη η διαδικασία είναι περίπλοκη, κινητοποιεί πολλά στοιχεία επί μέρους, ενεργοποιεί ταυτοχρόνως και τα λευκοκύτταρα, ώστε να αποτρέψουν την εισβολή μικροβίων και οπωσδήποτε είναι ένα εντυπωσιακό δείγμα του ακριβούς και πολύπλευρου σχεδιασμού των λειτουργιών του έμβιου συστήματος. Οι περισσότερες των πληροφοριών που αφορούν τις αιμοπεταλιακές δομές και τις λειτουργικές τους μεταβολές αναφέρονται στην ακόλουθη βιβλιογραφία 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57 58 59 60, 61, 62, 71, 72, 75, 76, 82).



**Εικόνα αρ. 11:** Κανονικός θρόμβος με δίκτυο ινικής σχηματιζόμενο στις επιφάνειες των ερυθροκυττάρων, που έχουν εγκλωβιστεί στο εσωτερικό του. Η μάζα των τετηγμένων αιμοπεταλίων φαίνεται κάτω δεξιά στο πίσω πλάνο της εικόνας.

#### **1.2.4. Φυσικές ιδιότητες των αιμοπεταλίων**

Η ανωτέρω περιγραφή των μορφολογικών μεταβολών που λαμβάνουν χώρα κατά την τέλεση των λειτουργιών των αιμοπεταλίων υπογραμμίζει ότι τα αιμοπετάλια, ως φυσικά συστήματα, είναι εντελώς ιδιαίτερα. Το συμπέρασμα αυτό είναι γενικού χαρακτήρα και ισχύει για όλα τα έμβια συστήματα. Η εντυπωσιακή δυναμική της αιμοπεταλιακής

λειτουργικότητας φαίνεται σε τελική ανάλυση να είναι το σύνθετο αποτέλεσμα των φυσικών ιδιοτήτων των κυττάρων αυτών, της βιοχημικής τους σύστασης και του μεταβολισμού τους. Πρέπει, ωστόσο, να λεχθεί ότι παρά το γεγονός, ότι σήμερα γνωρίζουμε σε βάθος τα περισσότερα στοιχεία αυτών των τριών συνιστωσών, εν τούτοις δεν είμαστε ακόμη σε θέση να δημιουργήσουμε ένα μοντέλο ικανό να ερμηνεύει όλες τις πλευρές της αιμοπεταλιακής δυναμικής. Οι φυσικές ιδιότητες των αιμοπεταλίων που εδώ παραθέτουμε *δεν αρκούν* για να ερμηνεύσουν συνολικά την δυναμική των κυττάρων αυτών, αλλά μπορεί να βοηθήσουν στην κατανόηση μερικών πλευρών της. Έτσι, επί τροχάδην, αναφέρουμε λίγες συνοπτικές πληροφορίες πάνω στις ακόλουθες φυσικές ιδιότητες: α) πυκνότητα, β) ταχύτητα καθίζησης, γ) ωσμωτική αντίσταση, δ) ρευστότητα μεμβράνης και ε) ηλεκτρικές ιδιότητες.

#### ***A. Πυκνότητα των αιμοπεταλίων***

Η πυκνότητα των αιμοπεταλίων εκφράζεται ποσοτικά ως το ειδικό τους βάρος, δηλαδή ο λόγος μεταξύ συνολικού βάρους του αιμοπεταλιακού κυττάρου προς τον όγκο που το κύτταρο αυτό καταλαμβάνει. Από τις εκτιμήσεις που υπάρχουν διαθέσιμες φαίνεται ότι υπάρχει αρκετά μεγάλη διακύμανση στις τιμές του ειδικού βάρους που δίνουν οι διάφοροι ερευνητές. Οι αρχικές αναφορές έδωσαν μια μέση τιμή ίση προς 1030, ενώ άλλοι αναφέρουν την τιμή 1053 και τέλος τιμές που κυμαίνονται μεταξύ 1062 και 1084. Δηλαδή στις διάφορες εκτιμήσεις υπάρχει ένα τόξο μεταβολής που περιλαμβάνει 54 μονάδες πυκνότητας.

#### ***B. Ταχύτητα καθίζησης των αιμοπεταλίων***

Η φυσική αυτή παράμετρος είναι συνάρτηση του ειδικού βάρους των αιμοπεταλίων, του μεγέθους τους και των πρωτεϊνών του πλάσματος. Υπολογίζεται ως δείκτης του αριθμού των αιμοπεταλίων πριν και μετά την καθίζησή τους σε ακίνητο πλάσμα. Φυσιολογικές τιμές για την ταχύτητα καθίζησής τους είναι  $0,74 \pm 0,129$ .

#### ***Γ. Ωσμωτική αντίσταση***

Η δράση υπότονων διαλυμάτων NaCl (0,3 – 0,2%) προκαλεί αξιόλογες μορφολογικές μεταβολές στα αιμοπετάλια. Έτσι τα αιμοπετάλια του ανθρώπου, αν εκτεθούν στα υπότονα διαλύματα του NaCl (0,3 – 0,2%) λαμβάνουν ένα ξιφοειδές σχήμα.

#### ***Δ. Ρευστότητα αιμοπεταλιακής μεμβράνης***

Η μεγάλη ικανότητα σχηματισμού ψευδοποδίων και αλλαγής σχήματος των αιμοπεταλίων δηλώνει ότι τα εν λόγω κύτταρα εμφανίζουν γενικά αξιόλογη μεμβρανική ρευστότητα. Γενικά η ρευστότητα της αιμοπεταλιακής μεμβράνης επηρεάζεται από μεταβολές στην σύνθεση των λιπιδικών της στοιβάδων και από την κινητικότητα των υποδοχέων. Π.χ ο μηχανισμός με τον οποίον οι λιποπρωτεΐνες επιδρούν πάνω στην ρευστότητα της μεμβράνης σχετίζεται πιθανόν με την μεταφορά χοληστερόλης στην μεμβράνη, καθόσον αιμοπετάλια πιο πλούσια σε χοληστερόλη, εμφανίζονται πιο ευαίσθητα στην διέγερση με αδρεναλίνη και ADP, ενώ παράλληλα έχουν μειωμένη ρευστότητα μεμβράνης. Από την άλλη πλευρά αιμοπετάλια φτωχά σε χοληστερόλη έχουν αυξημένη ρευστότητα μεμβράνης και ελαττωμένη ικανότητα απάντησης στην αδρεναλίνη. Άλλοι ερευνητές έδειξαν ότι οι μεταβολές στο ιξώδες της μεμβράνης επιδρούν και στον αριθμό και τον βαθμό συγγένειας των υποδοχέων της θρομβίνης (Tandom et al).

#### ***Ε. Ηλεκτρικές ιδιότητες***

Τα αιμοπεταλιακά κύτταρα έχουν αρνητικό φορτίο, το οποίο φαίνεται ότι είναι αποτέλεσμα στις μεγάλες ποσότητες σιαλικού οξέος που υπάρχουν στον γλυκοκάλυκά τους. Βάσει του φορτίου αυτού τα αιμοπετάλια παρουσιάζουν αξιόλογη ηλεκτροφορητική κινητικότητα η οποία διακυμαίνεται μεταξύ  $-0,85$  έως  $-0,04$   $\mu\text{sec/V/cm}$ . Έχοντας υπόψιν ότι η φόρτιση τόσο των κυττάρων του αγγειακού ενδοθηλίου είναι επίσης αρνητική, μπορούμε να πούμε ότι υπό συνθήκες φυσιολογικής ροής στο εσωτερικό των αγγείων οι αρνητικές φορτίσεις αιμοπεταλίων – αγγειακού ενδοθηλίου μέσω άσκησης δυνάμεων Coulomb (δηλαδή δυνάμεων ηλεκτρικού πεδίου άπωσης) δυσχεραίνει την επαφή των αιμοπεταλίων τόσο μεταξύ τους όσο και με το αγγειακό ενδοθήλιο. Επίσης έχοντας υπόψιν ότι οι μεγάλη πλειοψηφία των φυσιολογικών πρωτεϊνών είναι φορτισμένη αρνητικά, είναι φανερό ότι αυτές απωθούνται από το φράγμα αρνητικού ηλεκτρικού δυναμικού του αιμοπεταλίου. Η ισχυρή αρνητική φόρτιση των πολυφωσφορικών οργανικών μορίων (π.χ ATP, ADP, AMP, φωσφορυλιωμένα αμινοξέα, φωσφορυλιωμένες πρωτεΐνες κ.α) εμποδίζει αυτά τα μόρια να διέλθουν μέσα από το φράγμα δυναμικού λόγω της αρνητικής φόρτισης της μεμβράνης και να βγουν από το αιμοπεταλιακό κύτταρο, όπως και εν γένει από τα φυσιολογικά κύτταρα.

Είναι αξιόλογο να υπογραμμιστεί ότι μερικά μόρια, όπως π.χ ο Παράγοντας Ενεργοποίησης Αιμοπεταλίων και η θρομβίνη έχουν ηλεκτροθετική φόρτιση, οπότε

μπορούν εύκολα να ενσωματωθούν στην αιμοπεταλιακή μεμβράνη. Τα κύτταρα που έχουν υποστεί τραυματισμούς της εξωτερικής τους μεμβράνης και οι υπενδοθηλιακοί ιστοί που απελευθερώνονται από την καταστροφή του ενδοθηλίου χάνουν την αρνητική ηλεκτρική τους φόρτιση και δεν ασκούν πλέον απωστικές ηλεκτρικές δυνάμεις στα αιμοπετάλια. Κίσως το λεγόμενο φράγμα δυναμικού να μειώνεται μέσω φαινομένων τοπικής ενεργοποίησης της μεμβράνης (αντιστροφή φόρτισης), όταν αποκαλύπτεται κάποιος υποδοχέας και με τον τρόπο αυτό να διευκολύνεται η πρόσφυση ενός αιμοπεταλίου πάνω στην μεμβράνη κάποιου άλλου. Όλο το θέμα είναι εξαιρετικά ενδιαφέρον εξ αιτίας των ποικίλων του εφαρμογών στην αναχαίτιση των ανώμαλων φαινομένων ενεργοποίησης της πήξης. Οι εφαρμογές αυτές θα μπορούσαν να οδηγήσουν στην δημιουργία υλικών για την κατασκευή τεχνητών αγγείων, καθετήρων, ηθμών αιμοκάθαρσης κ.α. Πολλά από τα δεδομένα που χρησιμοποιήθηκαν για την παρουσίαση των φυσικών ιδιοτήτων των αιμοπεταλίων υπάρχουν στις βιβλιογραφικές παραπομπές 150, 156, 161, 164, 167, 168, 170, 171, 176, 178, 181, 184, 185, 186, 191, 192, 193, 195, 196, 197, 199, 202, 203, 204.

#### ***1.2.5. Δομή των αιμοπεταλίων***

Η δομή των αιμοπεταλίων είναι περίπλοκη, όπως συμβαίνει με όλα τα βιολογικά συστήματα. Μπορούμε, ωστόσο, να κάνουμε μερικές γενικεύσεις, οι οποίες μας δίνουν την δυνατότητα να ιεραρχήσουμε αδρά ποιες είναι οι κύριες δομές οι οποίες εκφράζουν την ιδιαιτερότητα των συγκεκριμένων κυττάρων.

Εδώ, ως ιδιαιτερότητα εννοούμε την λειτουργική τους εξειδίκευση, η οποία είναι, κατ' αρχάς το άμεσο κλείσιμο των αγγειακών τομών και η εμπόδιση της απώλειας αίματος.

Φαίνεται ότι το σύνολο των συστατών πρωτεϊνών, όπως επίσης και τα μόρια προσκόλλησης, που υπάρχουν στην κυτταροπλασματική μεμβράνη είναι τα προεξάρχοντα δομικά στοιχεία τα οποία κυριαρχούν στην αιμοπεταλιακή λειτουργικότητα, τουλάχιστον κατά την δική μας εκτίμηση. Τα επιχειρήματα που εδραιώνουν αυτή την άποψη είναι τα εξής:

A) Η έκκριση του περιεχομένου των ενδοκυτταροπλασματικών κοκκίων του αιμοπεταλίου περιέχουν παράγοντες πήξης και διεγέρτες της αιμοπεταλιακής λειτουργίας.

B) Δεν είναι δυνατή η δημιουργία αιμοπεταλιακού θρόμβου χωρίς την ενεργοποίηση πολλών αιμοπεταλίων.

Γ) Η ενεργοποίηση πολλών αιμοπεταλίων μπορεί να επιτελεστεί μέσω της αντίδρασης έκλυσης των κοκκίων τους.

Δ) Δεν είναι δυνατή ή έκλυση των αιμοπεταλιακών κοκκίων χωρίς την δυναμική συμμετοχή των συστατών πρωτεϊνών του κυτταροσκελετού.

Ε) Δεν είναι δυνατή η πρόσφυση των αιμοπεταλίων σε ένα υπόστρωμα χωρίς την δημιουργία ψευδοποδίων και την ενεργοποίηση της μεμβράνης τους ώστε να υπάρξει αποκάλυψη πρωτεϊνών με προσκολλητικές ιδιότητες (μόρια προσκόλλησης).

ΣΤ) Δεν είναι δυνατή η δημιουργία ψευδοποδίων, η προβολή των μορίων προσκόλλησης προς τα έξω, καθώς και το άπλωμα του αιμοπεταλίου, πάνω στο υπόστρωμα προσκόλλησης, χωρίς την ενεργοποίηση και συμμετοχή των συστατών πρωτεϊνών του κυτταροσκελετού αυτού.

Η συνολική μελέτη των αιμοπεταλιακών δομών και λειτουργιών μας υποδεικνύει ότι τα αιμοπετάλια είναι κύτταρα εκκριτικά και συστατά. Οι δύο αυτές ιδιότητες ευνοούνται από την υπερδομή των αιμοπεταλίων και την λειτουργική τους αρχιτεκτονική. Γενικά στο αιμοπετάλιο διακρίνουμε τις εξής μεγάλες δομικές συνιστώσες:

- 1) Την μεμβράνη με το εξωτερικό της επικάλυμμα που ονομάζεται «γλυκοκάλυκας».
- 2) Τον κυτταροσκελετό, με τον οποίο επιτυγχάνει την κινητική του συμπεριφορά.
- 3) Το κυτταρόπλασμα που αποτελεί το εσωτερικό του περιβάλλον.

Κατωτέρω αναλύουμε τα βασικά χαρακτηριστικά των επί μέρους αυτών δομικών συνιστωσών των αιμοπεταλίων.

#### ***1.2.5-α. Η μεμβράνη του αιμοπεταλιακού κυττάρου.***

##### ***1. Φωσφολιπιδική διπλοστοιβαδική μεμβράνη***

Η μεμβράνη των αιμοπεταλίων ακολουθεί συμβατικά το μοντέλο του ρευστού μωσαϊκού που προτάθηκε από τους Singer & Nicholson και αποτελεί δομικό χαρακτηριστικό όλων των κυτταρικών μεμβρανών των ευκαρυωτικών κυττάρων. Η μεμβράνη των αιμοπεταλίων είναι σύστασης φωσφολιπιδικής και πρωτεϊνικής και περιλαμβάνει τρία γενικά στρώματα: Εξωτερικά ένα στρώμα φωσφολιπιδίων, στο ενδιάμεσο ένα στρώμα πρωτεϊνών και εσωτερικά επίσης ένα φωσφολιπιδικό στρώμα. Οι πρωτεΐνες που παρεμβάλλονται μεταξύ των δύο φωσφολιπιδικών στοιβάδων συχνά δεν περιορίζονται μεταξύ αυτών αλλά προεξέχουν βυθιζόμενες μέσα στην μάζα της εξωτερικής ή εσωτερικής φωσφολιπιδικής

στοιβάδας, αποτελώντας ένα είδος μοριακών ικριωμάτων που γεφυρώνουν το εξωτερικό με το εσωτερικό περιβάλλον του αιμοπεταλιακού κυττάρου. Πολλές από τις μεμβρανικές πρωτεΐνες συνάπτουν σχέσεις με τον κυτταροσκελετό του αιμοπεταλίου, καθώς και με το σύστημα των ανοιχτών σωληναρίων. Γενικά η αιμοπεταλιακή μεμβράνη είναι πλούσια σε πρωτεΐνες, γλυκοπρωτεΐνες και υποδοχείς.

Το εξωτερικό στρώμα των φωσφολιπιδίων εμφανίζει, όπως προείπαμε, ιδιότητες ρευστού μωσαϊκού και επιτρέπει την σχεδόν ελεύθερη διάχυση λιπιδίων και πρωτεϊνών που έρχονται σε επαφή με αυτή. Αντίθετα δεν επιτρέπει την διάλυση και διέλευση των πολικών μορίων, τα οποία μπορούν να εισέλθουν μόνο από ειδικά διαμορφωμένες οδούς, εξειδικευμένες για την διέλευση συγκεκριμένων μορίων. Αντίστοιχη συμπεριφορά ακολουθείται και από το εσωτερικό στρώμα της φωσφολιπιδικής διπλοστοιβάδας η οποία δεν επιτρέπει την έξοδο των πολικών μορίων και με τον τρόπο αυτό συνεισφέρει στην διατήρηση της μοριακής παρακαταθήκης του αιμοπεταλιακού κυττάρου. Σημειώτεον ότι τα υψηλώς φωσφορυλιωμένα μόρια, που αποτελούν και τους μοριακούς φορείς της ενέργειας στο εσωτερικό των κυττάρων, εμφανίζουν μεγάλη πόλωση, οπότε η διέλευσή τους μέσω των φωσφολιπιδικών μεμβρανών είναι εξαιρετικά δύσκολη σε φυσιολογικές συνθήκες.

Γενικά η φωσφολιπιδική διπλοστοιβάδα αποτελεί τι βασικό ικρίωμα επάνω στο οποίο προστίθενται οι πρωτεΐνες της μεμβράνης ενώ, ταυτοχρόνως είναι η θεμελιώδης δομή που χαρακτηρίζει κάθε κύτταρο.

Η φωσφολιπιδική διπλοστοιβάδα σχηματίζεται και σταθεροποιείται αυθόρμητα μέσω την διαμοριακών αλληλοεπιδράσεων των φωσφολιπιδίων:

Οι υδρόφοβες περιοχές των φωσφολιπιδίων (οι οποίες αντιστοιχούν στις αλυσίδες των λιπαρών οξέων που έχουν εστεροποιηθεί επί του μορίου γλυκερίνης που περιέχουν) τοποθετούνται στο χώρο σε εκείνες τις θέσεις στις οποίες ασκούνται μεταξύ τους οι ισχυρότερες διαμοριακές αλληλεπιδράσεις. Δηλαδή τα λιπόφιλα τμήματα αλληλεπιδρούν μεταξύ τους καταλαμβάνοντας εκείνες τις γεωμετρικές θέσεις στις οποίες οι ελκτικές μεταξύ τους δυνάμεις μεγιστοποιούνται, ενώ οι απωστικές δυνάμεις από τα μόρια του ύδατος γίνονται ελάχιστες. Έτσι οι λιπόφιλες ουρές τοποθετούνται παράλληλα και απέναντι, σχηματίζοντας την διπλοστοιβάδα. Ταυτοχρόνως οι υδρόφιλες κεφαλές των φωσφολιπιδίων αλληλεπιδρούν με τα μόρια του νερού ώστε να προκύψει μεταξύ τους η ισχυρότερη δυνατή έλξη, με αποτέλεσμα η δομή της διπλοστοιβάδας να σταθεροποιείται

μέσα στον χώρο. Αυτό επιτυγχάνεται με την στροφή των υδρόφιλων περιοχών των φωσφολιπιδίων προς την μάζα του νερού και φαίνεται ότι η χωροταξική διευθέτηση ενός ικανού αριθμού μορίων φωσφολιπιδίων που εξυπηρετεί καλύτερα αυτή την κατάσταση είναι η διπλοστοιβάδα.

Ο σχηματισμός αυτών των δομών για να είναι, από την θερμοδυναμική πλευρά, ο πλέον σταθερός, πρέπει να χαρακτηρίζεται από την κατά το δυνατόν ελάχιστη ενέργεια. Φαίνεται ότι ο σχηματισμός των διπλοστοιβάδων εξασφαλίζει την μεγαλύτερη δυνατή ενεργειακή εκτόνωση (ή σκέδαση ενέργειας) και φυσικά, η φωσφολιπιδική διπλοστοιβάδα είναι μια τυπική σκεδαστική δομή, όσον αφορά το ενεργειακό της περιεχόμενο.

Ίσως ο καλύτερος τρόπος για να προβλέψουμε την ευστάθεια μιας δομής είναι η ικανότητα σκέδασης της ενέργειας με την οποία φορτίζεται η εν λόγω δομή: Όσο μεγαλύτερη ποσότητα ενέργειας μπορεί να σκεδαστεί στην μονάδα του χρόνου, από τα διάφορα στοιχεία της δομής, τόσο ευσταθέστερη είναι η δομή που επιτρέπει αυτή την σκέδαση. Φαίνεται ότι το ρευστό μωσαϊκό εξασφαλίζει μια υψηλή φόρτιση της μεμβράνης με κινητική ενέργεια, η οποία εκτονώνεται με την αύξηση της κίνησης των φωσφολιπιδικών μορίων μέσα στα πλαίσια της διπλοστοιβάδας. Η διπλοστοιβάδα θα σπάσει μόνον στην περίπτωση που η προστιθέμενη ενέργεια προκαλεί τόσο έντονη κίνηση των φωσφολιπιδίων ώστε οι ελκτικές δυνάμεις που τα συγκρατούν στα όρια της διπλοστοιβαδικής δομής να μην είναι πλέον σε θέση να τα κρατήσουν εκεί. Στην περίπτωση αυτή η διπλοστοιβάδα αρχίζει να θρυμματίζεται σε μικρότερα σφαιρίδια. Αυτό το παρατηρούμε έντονα όταν επεξεργαζόμαστε με υπερήχους φωσφολιπιδικές μεμβράνες, ή ζωντανά κύτταρα ή ιστούς. Αυτός ο θρυμματισμός καθίσταται πιο εύκολος αν αλλάξει η μοριακή υφή των φωσφολιπιδίων που εξασφαλίζει την διπλοστοιβαδική διευθέτηση: Αν, φερ' ειπείν, στις αλυσίδες των λιπαρών οξέων προκύψουν φαινόμενα οξειδωσης, τότε αναγκαστικά οι δυνάμεις συνοχής (δυνάμεις Van Der Waals), που αναπτύσσονται μεταξύ των λιπόφιλων αλυσίδων αδυνατίζουν, ενώ το προστιθέμενο οξυγόνο μπορεί να αλληλεπιδράσει και με πολικά μόρια. Στην περίπτωση αυτή η διπλοστοιβαδική δομή αρχίζει και καταρρέει με αποτέλεσμα την τοπική θραύση της μεμβράνης και την πυροδότηση μιας σειράς από συνοδά φαινόμενα που μειώνουν την ευταξία του συστήματος και αυξάνουν την εντροπία του. Συνεπώς η οξειδωση φαίνεται να είναι η πλέον επίφοβη αιτία αποσταθεροποίησης των φωσφολιπιδικών μεμβρανών. Άλλος ένας παράγων που απειλεί την ευστάθεια των φωσφολιπιδικών μεμβρανών είναι η υδρόλυση



των εστέρων και η αποκοπή των λιπαρών οξέων από το γλυκερινικό τμήμα του φωσφολιπιδίου. Αυτό μπορεί να συμβεί είτε αυθόρμητα είτε υπό καθεστώς κατάλυσης ενζυμικής ή μη. Τα δεδομένα αυτά θα συζητηθούν εκτενέστερα σε άλλο σημείο της ανάπτυξής μας.

Οι υδρόφιλες περιοχές του μορίου των φωσφολιπιδίων βρίσκονται τόσο στο εξωτερικό όσο και στο εσωτερικό όριο της δομής της διπλοστοιβάδας, ώστε να μπορούν να αλληλεπιδρούν ευθέως με τα μόρια του ύδατος. Οι εξωτερικές υδρόφιλες περιοχές των φωσφολιπιδίων μπορούν να συνδέσουν επάνω τους γλυκοπρωτεΐνες, πράγμα που δεν ισχύει για τις εσωτερικές υδρόφιλες περιοχές. Το φαινόμενο αυτό ιχθεί αν και δεν έχει ακόμη κατανοηθεί. Συνεπώς οι γλυκοπρωτεΐνες, εξ αιτίας αυτής της φυσικοχημείας των φωσφολιπιδίων, μπορούν να διαταχθούν μόνον εξωτερικά της διπλοστοιβαδικής μεμβράνης.

Οι μεμβράνες των αιμοπεταλίων, όπως και των υπολοίπων κυττάρων του σώματος, περιέχουν επίσης, ως δομικό τους συστατικό αξιόλογο αριθμό μορίων χοληστερόλης.

Τα μόρια της χοληστερόλης, εξ αιτίας της πολικότητάς τους φαίνεται ότι ασκούν έναν ρυθμιστικό ρόλο στην ρευστότητα των φωσφολιπιδικών μεμβρανών, εφόσον είναι σαφές ότι αυτή εξαρτάται από την λιπιδική της σύνθεση και από τον τύπο των λιπαρών οξέων που περιέχονται εστεροποιημένα στα φωσφολιπίδια.

Η χοληστερόλη έρχεται να καταλάβει θέσεις που ευρίσκονται προς το πρώτο στρώμα της διπλοστοιβάδας και κυρίως στα διάκενα που δημιουργούνται ανάμεσα σε κεκορεσμένες και ακόρεστες αλυσίδες εστεροποιημένων λιπαρών οξέων. Εφόσον η χοληστερόλη παρατίθεται μεταξύ αυτών των μορίων, έχει την ιδιότητα να τα προσδένει επάνω της και συνεπώς να μειώνει τους βαθμούς ελευθερίας της κίνησής τους μέσα στο συνολικό περιβάλλον του ρευστού μωσαϊκού. Το αποτέλεσμα αυτής της δράσης είναι ότι η κινητικότητα των φωσφολιπιδίων της μεμβράνης ελαττώνεται, οπότε η υδρόφοβη περιοχή της μεμβράνης γίνεται πιο σταθερή. Από την άλλη πλευρά αυτό μεταφράζεται σε μια αύξηση του ιξώδους της μεμβράνης, η οποία γίνεται, τρόπον τινά πιο άκαμπτη και συνεπώς παρουσιάζει μεγαλύτερη αντίσταση στην αλλαγή σχήματος. Μεμβράνες, οι οποίες έχουν μικρή συγκέντρωση χοληστερόλης και μεγάλη συγκέντρωση ακόρεστων λιπαρών οξέων, είναι περισσότερο ρευστές και ευένδοτες. Άρα, τα έμμορφα συστατικά του αίματος, με πρώτα και κύρια τα ερυθροκύτταρα, είναι πιο εύκαμπτα και μπορούν να διέλθουν πιο εύκολα μέσα από τις στενωπούς των τριχοειδών αγγείων.

Τα λιπίδια, τα οποία αποτελούν το κύριο δομικό στοιχείο της βιολογικά ενεργού μεμβράνης των αιμοπεταλίων, είναι πολυφωσφοϊνοσιτόλες, με συστατικά φωσφολιπίδιά τους την φωσφατιδυλοχολίνη, την φωσφατιδυλοσερίνη, την φωσφατιδυλοαιθανολαμίνη, οι οποίες συμμετέχουν στην δόμηση και λειτουργία των δύο στοιβάδων της. Πρέπει να υπογραμμίσουμε ότι η φωσφατιδυλοσερίνη έχει ιδιότητες διέγερσης της πήξης και υπό φυσιολογικές συνθήκες είναι τοποθετημένη στην εσωτερική πλευρά της μεμβράνης.

Η φόρτιση της μεμβράνης και από τις δύο πλευρές της με αρνητικά ηλεκτρικά φορτία είναι ο λόγος για τον οποίο τα άθικτα κύτταρα δεν επάγουν αυθόρμητα την πήξη.

Τέλος οι μεμβρανικές πρωτεΐνες είναι αποφασιστικής σημασίας για την συνολική αισθητηριακή και μεταφορική λειτουργία της μεμβράνης, όπως θα δούμε αμέσως παρακάτω.

Οι δομές που περιγράψαμε ανωτέρω ήδη δείχνουν ότι η αιμοπεταλιακή μεμβράνη είναι ένα περίπλοκο μόρφωμα με πολλαπλές ιδιότητες. Ωστόσο, όλες αυτές οι μοριακές δομές (γλυκοκάλυκας, φωσφολιπίδια, χοληστερίνη, αντιοξειδωτικά, πρωτεΐνες μεταφοράς ουσιών κ.α) είναι τακτοποιημένες σε ένα στρώμα πάχους μόλις 7 – 9 nm ( $7 - 9 \times 10^{-9}$  m). Συνεπώς για να είναι λειτουργικό όλο αυτό το συγκρότημα, αντιλαμβάνεται κανείς ότι η τοποθέτηση των επί μέρους στοιχείων του πρέπει να έχει υψηλή τάξη, ώστε να εξασφαλίζεται η σταθερή τους συνάφεια και αλληλεπίδραση που καθιστά δυνατή και την λειτουργία τους.

Στα ανώτερα ζώα, στα οποία συμπεριλαμβάνεται ο *Homo sapiens*, η μεμβράνη του κυττάρου αποτελεί κατ' αρχάς το φυσικό του όριο και ταυτοχρόνως τον φραγμό ο οποίος εμποδίζει, αφ' ενός, την έξοδο της μοριακής κυτταρικής παρακαταθήκης και αφ' ετέρου, την ανεξέλεγκτη είσοδο τοξικών ουσιών. Η μεμβράνη εκτελεί, μεταξύ των άλλων και την λειτουργία της εκλεκτικής μεταφοράς μορίων, ενώ από την άλλη πλευρά αποτελεί το γενικό αισθητήριο όργανο του κυττάρου, καθώς δέχεται στην επιφάνειά της μια πολύ μεγάλη γκάμα μορίων με σηματοδοτικό χαρακτήρα, τα οποία πληροφορούν το κύτταρο για την κατάσταση του εξωτερικού περιβάλλοντος και ταυτοχρόνως ενεργοποιούν τις αντιδράσεις του ώστε και αυτό να συντονιστεί με τις τρέχουσες ανάγκες του οργανισμού, όπως αυτές εκφράζονται σε τοπικό επίπεδο, και να συνεισφέρει στην συνολική προσπάθεια προσαρμογής και επιβίωσης του οργανισμού. Η μεμβράνη θεωρείται ότι είναι μια από τις ζωντανές δομές των κυττάρων. Οι ανωτέρω πληροφορίες υπάρχουν σε μεγάλη ανάπτυξη σε ένα πλήθος συγγραμμάτων με αντιρροσσωπικότερα την Βιοχημεία του Α.

Lehninger (εκδ. Zanichelli, 1984 [657]) και τα εγχειρίδια βιοφυσικής του Mario Ageno (εκδ. Zanichelli, 1987 [658]).

## **2. Οι πρωτεΐνες της αιμοπεταλιακής μεμβράνης**

Οι πρωτεΐνες της μεμβράνης είναι περιφερικές (peripheral) ή ολικές (integral).

Το πρώτο είδος πρωτεϊνών εντοπίζεται στο εξωτερικό ή στο εσωτερικό της μεμβρανικής επιφάνειας, ενώ το δεύτερο είδος τους διαπερνά την φωσφολιπιδική διπλοστοιβάδα με ένα τους άκρο να εξέρχεται στην έξω επιφάνειά της και το βάλλο να εισδύει στο κυτταρόπλασμα, αποτελώντας έτσι ένα είδος μοριακής γέφυρας μεταξύ εξωτερικού και εσωτερικού περιβάλλοντος.

Οι εξωτερικές πρωτεΐνες πολύ συχνά γλυκοζυλιώνονται, μετατρέπόμενες σε γλυκοπρωτεΐνες, ο ρόλος των οποίων είναι συχνά ρόλος σηματοδότη.

Οι εξωτερικές γλυκοπρωτεΐνες συνδέονται συχνά με σιαλικό οξύ, το οποίο ευθύνεται για την αρνητική τους φόρτιση, η οποία παρεμποδίζει την ένωσή τους με άλλες πρωτεΐνες ή λεκτίνες του αιματικού πλάσματος, λόγω του απωστικού φράγματος δυναμικού που δημιουργεί σε αρνητικώς φορτισμένα μακρομόρια.

Το εξωτερικό άκρο των ολικών πρωτεϊνών γλυκοζυλιώνεται, γεγονός το οποίο είναι αποφασιστικής σημασίας για την αναγνώριση των κυττάρων. Παράλληλα, το εσωτερικό (κυτταροπλασματικό) άκρο, των εν λόγω πρωτεϊνών, αλληλεπιδρά με συστατικά του κυτταροσκελετού.

Η βιολογική εξειδίκευση της μεμβράνης αποτελεί αποκλειστική ιδιότητα των πρωτεϊνών και των αλληλεπιδράσεών τους με τα λιπίδια. Οι πρωτεΐνες που διαπερνούν την φωσφολιπιδική διπλοστοιβάδα της μεμβράνης έχουν καθορισμένο προσανατολισμό και αποφασιστική συμμετοχή στην ασυμμετρία της.

## **3. Οι γλυκοπρωτεΐνες της μεμβράνης**

Οι γλυκοπρωτεΐνες της αιμοπεταλιακής μεμβράνης λειτουργούν, ως επί το πλείστον, ως υποδοχείς επί των οποίων συνδέονται καθορισμένα μόρια με σηματοδοτικό χαρακτήρα.

Η σύνδεση αυτών των ουσιών ακολουθεί την λογική ενζυμικής αντίδρασης και φτάνει μέχρι το σημείο του κορεσμού, πέραν του οποίου σταματά να λαμβάνει χώρα. Δηλαδή ένας υποδοχέας μπορεί να προσδέσει στην επιφάνειά του έναν συγκεκριμένο μέγιστο αριθμό σηματοδοτικών μορίων.

Στην κατάσταση αυτή ο υποδοχέας έχει πλήρως κορεστεί.

Η πρόσδεση των εν λόγω ουσιών λαμβάνει χώρα εξ αιτίας της υψηλής συγγένειας που διαθέτουν με την δομή του υποδοχέα και επί πλέον είναι αντιστρεπτή.

Ο νόμος της δράσης των μαζών καθορίζει και τον βαθμό πρόσδεσης μιας ουσίας, δηλαδή ο βαθμός κατάληψης του υποδοχέα εξαρτάται από την συγκέντρωσή της στο πλάσμα, μέχρι το σημείο του κορεσμού. Επίσης είναι δυνατόν ουσίες με παρόμοια δομή να ανταγωνίζονται μεταξύ τους για την κατάληψη του ενεργού κέντρου του υποδοχέα. Στην λογική αυτή βασίζονται πολλές από τις φαρμακευτικώς δρώσες ουσίες, π.χ οι αναστολείς των υποδοχέων των κατεχολαμινών, ή οι αναστολείς του ασβεστίου.

Γενικά στα αιμοπεταλιακά κύτταρα έχουν ταυτοποιηθεί περί τις πενήντα γλυκοπρωτεΐνες των οποίων οι ρόλοι δεν έχουν διευκρινιστεί, εκτός από μερικές μόνον περιπτώσεις. Έτσι από εκείνες τις γλυκοπρωτεΐνες, των οποίων ο ρόλος έχει προσδιοριστεί, οι πλέον σημαντικές αντιπροσωπεύονται από την I, την II και την III. Κάθε μια από αυτές αποτελείται από δύο πολυπεπτιδικές αλυσίδες, την αλυσίδα α και την β που έχουν τα εξής μοριακά βάρη:

- 1) Γλυκοπρωτεΐνη I: πολυπεπτιδική αλυσίδα α = 167 kDa, αλυσίδα β=143 kDa
- 2) Γλυκοπρωτεΐνη II: πολυπεπτιδική αλυσίδα α = 157 kDa, αλυσίδα β=132 kDa
- 3) Γλυκοπρωτεΐνη III: πολυπεπτιδική αλυσίδα α = 114 kDa, αλυσίδα β=97 kDa

Οι γλυκοπρωτεΐνες αυτές αντιπροσωπεύουν τους μεμβρανικούς θώκους, στους οποίους εδράζονται οι υποδοχείς πρόσδεσης με διεγέρτες ή αναστολείς της αιμοπεταλιακής λειτουργίας. Οι ρόλοι τους στην αιμοπεταλιακή λειτουργία είναι πολύ σημαντικοί, καθόσον η κληρονομική τους έλλειψη σχετίζεται με αιμορραγικά σύνδρομα. Στις σελίδες που ακολουθούν γίνεται μια βραχεία επισκόπηση της δομής και της λειτουργίας των συγκεκριμένων γλυκοπρωτεϊνών I, II και III της φυσιολογικής αιμοπεταλιακής μεμβράνης.

### ***Οι γλυκοπρωτεΐνες I, II και III. Ιδιότητες και λειτουργίες.***

Όπως προαναφέραμε ο αριθμός των ταυτοποιημένων γλυκοπρωτεϊνών της αιμοπεταλιακής μεμβράνης είναι αρκετά μεγάλος (περίπου 50), αλλά μόνον για τρεις από αυτές έχει κατανοηθεί ο λειτουργικός ρόλος στα αιμοπετάλια.

Η ονοματολογία των γλυκοπρωτεϊνών δεν έχει ακόμη συμφωνηθεί και γίνει κοινά αποδεκτή, αλλά υπάρχει μόνον μια γενική συμφωνία σε ό,τι αφορά την ονομασία

ορισμένων γλυκοπρωτεϊνών, όπως είναι οι GrIa, GrIb, GrIIa, GrIIb, GrIIIa, ενώ η ονομασία της GrIV δεν έχει γίνει κοινά αποδεκτή και έτσι χρησιμοποιείται ως εναλλακτική ονομασία η GrIIIa.

Κατόπιν λύσης των αιμοπεταλιακών κυττάρων και φυγοκέντρωσης του κυτταρολύματος με την μέθοδο της «ίσης πυκνότητας» απομονώθηκαν από την μεμβράνη γλυκοπρωτεΐνες μεγάλου μοριακού βάρους, οι οποίες κατανεμήθησαν σε τέσσερες ομάδες γλυκοπρωτεϊνών, καταταγμένες ανάλογα με το μοριακό τους βάρος. Οι τέσσερες αυτές ομάδες αντιστοιχούν στις πρωτεΐνες GrIb, GrIIb, GrIIIa και GrIV. Ακόμη σε μια από τις φάσεις του κυτταρολύματος και συγκεκριμένα στην διαλυτή φάση η οποία ακολουθεί την γλυκερόλυση, βρέθηκε μια πρωτεϊνική δομή πλούσια σε υδατάνθρακες, στην οποία δόθηκε η ονομασία γλυκοκαλυσίνη (GrIa), καθόσον προέρχεται από τον γλυκοκάλυκα της μεμβράνης. Επίσης διαπιστώθηκε ότι η GrIa (γλυκοκαλυσίνη) και η GrIb έχουν την ίδια ηλεκτροφορητική κινητικότητα σε αναγωγική gel (γέλη). Περαιτέρω μελέτες έδειξαν ότι οι πρωτεΐνες αυτές είναι ανοσολογικά ταυτόσημες και εμφανίζουν το ίδιο μακρογλυκοπεπτίδιο. Αντίστοιχες μελέτες έδειξαν ότι η γλυκοκαλυσίνη αντιπροσωπεύει το κύριο κλάσμα της  $\alpha$  – αλυσίδας της GrI και προέρχεται από την υδρόλυση της εκ μέρους μιας αιμοπεταλιακής πρωτεάσης εξαρτώμενης από το ασβέστιο, η οποία απελευθερώνεται κατά την λύση των αιμοπεταλίων. Κατωτέρω γίνεται μια περιγραφή των κυρίων χαρακτηριστικών των αιμοπεταλιακών γλυκοπρωτεϊνών.

#### ***A. Γλυκοπρωτεΐνη I***

Το μόριο της εν λόγω πρωτεΐνης περιλαμβάνει δύο πολυπεπτιδικές αλυσίδες οι οποίες συνδέονται μεταξύ τους μέσω ενός δισουλφιδικού δεσμού. Οι δύο αυτές αλυσίδες περιέχουν υδρόφοβες περιοχές οι οποίες βυθίζονται μέσα στην αιμοπεταλιακή μεμβράνη, όπου αλληλεπιδρούν με δυνάμεις Van der Waals με τα υδρόφοβα τμήματα των φωσφολιπιδίων και μέσω αυτού του μηχανισμού στερεώνονται στο εσωτερικό της, ενώ τα τελικά τους άκρα φαίνεται να εκτείνονται στο εσωτερικό του κυτταροπλάσματος. Το εν λόγω πεπτίδιο απομονώθηκε από την γλυκοκαλυσίνη και βρίσκεται στην εγγύς περιοχή της  $\alpha$  – αλυσίδας, μεταξύ της μεμβράνης και του μακρογλυκοπεπτιδίου. Το μέσο τμήμα της  $\alpha$  – αλυσίδας είναι πλούσιο σε υδατάνθρακες, βρίσκεται κάτω από την μεμβράνη στο εσωτερικό του αιμοπεταλίου και φαίνεται ότι από αυτό προέρχονται τα μακρογλυκοπεπτίδια που προκύπτουν από την πρωτεόλυση των άθικτων αιμοπεταλίων ή των απομονωμένων τους μεμβρανών. Το απομακρυσμένο της τμήμα είναι σχετικά φτωχό

σε υδατάνθρακες και περιέχει τα σημεία σύνδεσης της θρομβίνης και του παράγοντα von Willebrand. Όπως προέκυψε από μια σειρά πειραμάτων που περιλάμβαναν την σύνδεση εξειδικευμένων μονοκλωνικών αντισωμάτων αντι – GrIb (AP – 1) με τις πλευρές της GrIb της μεμβράνης των αιμοπεταλίων, φαίνεται ότι σε κάθε φυσιολογικό αιμοπετάλιο περιέχονται περίπου  $34.000 \pm 5.000$  αντίγραφα της GrIb. Τα αντίγραφα αυτά βρίσκονται ενωμένα με την γλυκοπρωτεΐνη IX και σχηματίζουν το σύμπλεγμα GrIb – IX.

Ο ρόλος της εν λόγω πρωτεΐνης κατέστη εμφανής μέσω σειράς μελετών οι οποίες αποκάλυψαν ότι σε διάφορες παθολογικές καταστάσεις η ποσότητα και η έκφραση της GrIb ελαττώνονται. Έτσι, π.χ, στο σύνδρομο Bernard – Soulier, μέσω της χρήσης του μονοκλωνικού αντισώματος AP – 1, δείχτηκε ότι η ποσότητα της πρωτεΐνης GrIb στην αιμοπεταλιακή μεμβράνη είναι σημαντικά ελαττωμένη εν σχέση προς την αντίστοιχη του φυσιολογικού αιμοπεταλίου. Στο σύνδρομο αυτό οι δεσμοί του αντισώματος με την εν λόγω πρωτεΐνη ανέρχονται μόνο στο 2% των δεσμών που προκύπτουν στο φυσιολογικό αιμοπετάλιο. Επίσης σημαντική ελάττωση της έκφρασης της GrIb έχει παρατηρηθεί όχι μόνο σε κληρονομικά νοσήματα αλλά και σε επίκτητες παθολογικές καταστάσεις, όπως σε μυελοπλασματοειδές σύνδρομο και κακοήθειες του αίματος.

Η γλυκοπρωτεΐνη GrIb εμφανίζει αξιόλογο πολυμορφισμό σε φυσιολογικά άτομα διαφορετικής εθνικότητας. Επίσης ο πολυμορφισμός της επισημάνθηκε σε ασθενείς οι οποίοι έπασχαν από τον αιμοπεταλιακό τύπο της νόσου von Willebrand και είχαν διαταραγμένη την αιμοστατική τους λειτουργία.

Η πρωτεΐνη GrIb έχει έναν επιπλέον ανοσολογικό ρόλο, ο οποίος φαίνεται να εξαρτάται από το ακροτελεύτιο σιαλικό οξύ της και σχετίζεται με το λεγόμενο «κρυφό» αντιγόνο – Tn, που ευθύνεται για την πολυσυγκόλληση των ερυθρών αιμοσφαιρίων που παρατηρείται σε ορισμένα άτομα.

Αυτό επιβεβαιώθηκε σε αιμοπετάλια ανθρώπων που δεν είχαν το αντιγόνο Tn.

Η επεξεργασία των αιμοπεταλίων αυτών με το αντιδραστήριο του Schiff (υπεριωδικά), το οποίο αποτελεί και έναν δείκτη ανίχνευσης της γλυκοπρωτεΐνης GrIb, έδειξε απουσία χρώσης στην περιοχή της γλυκοπρωτεΐνης GrIb και φυσιολογική σήμανση με σημασμένο ιώδιο ή με την τεχνική της γαλακτικής οξειδάσης.

Ειδικές μελέτες σχετικά με την σύνδεση της θρομβίνης στα αιμοπετάλια έδειξαν τα εξής:

1<sup>ov</sup>) την ύπαρξη 50 σημείων σύνδεσης πολύ μεγάλης χημικής συγγένειας μεταξύ θρομβίνης – GrIb / αιμοπετάλιο.

2<sup>ov</sup>) την ύπαρξη 1700 σημείων σύνδεσης μέσης χημικής συγγένειας μεταξύ θρομβίνης – GrIb / αιμοπετάλιο.

3<sup>ov</sup>) την ύπαρξη 600.000 σημείων σύνδεσης χαμηλής συγγένειας μεταξύ θρομβίνης – GrIb / αιμοπετάλιο.

Συνεπώς βάσει των δεδομένων αυτών προκύπτει ότι η πρωτεΐνη GrIb είναι πολύ σημαντική για την πρόσδεση της θρομβίνης πάνω στο αιμοπεταλιακό κύτταρο. Πρέπει να σημειωθεί ότι η θρομβίνη είναι ένας ισχυρός αγωνιστής της αιμοπεταλιακής συσσώρευσης και του σχηματισμού θρόμβου, όπως θα δούμε αναλυτικότερα παρακάτω.

### ***B. Το σύμπλεγμα γλυκοπρωτεΐνης GrIIb – IIIa.***

Το σύμπλεγμα αυτό σχηματίζει ένα ετεροδιμερές, το οποίο ανήκει στην οικογένεια των ιντεγκρινών και αποτελεί έναν υποδοχέα προσκόλλησης, δηλαδή ένα σημείο του αιμοπεταλιακού κυττάρου μέσω του οποίου συντελείται η λειτουργία της προσκόλλησης, όπως θα περιγράψουμε αναλυτικά παρακάτω. Το εν λόγω ετεροδιμερές εξαρτάται λειτουργικά από το ιονισμένο ασβέστιο. Το σύμπλεγμα αυτό αποτελείται από δύο υπομονάδες, την GrIIb και την GrIIIa εκάστη των οποίων παράγεται από διαφορετικό γονίδιο. Κάθε υπομονάδα του συμπλέγματος έχει μια διαμεμβρανική περιοχή, που είναι προσανατολισμένη με το αμινοτελικό της άκρο προς την εξωτερική επιφάνεια του αιμοπεταλιακού κυττάρου. Σε κάθε εν ηρεμία αιμοπετάλιο υπάρχουν τουλάχιστον 50.000 αντίγραφα του εν λόγω συμπλέγματος. Επιπλέον υπάρχουν και επιπρόσθετα συμπλέγματα τα οποία συνδέονται με το σύστημα των σωληνίσκων, δια των οποίων τα α – σωληνάρια μεταφέρονται προς την επιφάνεια των αιμοπεταλίων.

### ***Γ. Η γλυκοπρωτεΐνη GrIIb***

Η γλυκοπρωτεΐνη GrIIb έχει μοριακό βάρος 136 kDa και αποτελείται από τις υπομονάδες α και β εκ των οποίων η α είναι η βαρύτερη (125 kDa) και η β η ελαφρότερη (23 kDa). Οι δύο υπομονάδες συνδέονται μέσω δισουλφιδικών δεσμών.

Η γλυκοπρωτεΐνη GrIIb συντίθεται ως απλή πολυπεπτιδική αλυσίδα που το 15 % της μάζας της αντιπροσωπεύεται από υδατάνθρακες. Όταν εξέρχεται στην κυτταρική

επιφάνεια τότε κόβεται δια πρωτεόλυσης στην βαριά και ελαφρά αλυσίδα  $\alpha$  και  $\beta$  αντιστοίχως, οι οποίες συνδέονται πλέον μόνον με δισουλφιδικούς δεσμούς. Η ελαφρά αλυσίδα προέρχεται από το C-τελικό άκρο της αρχικής πρωτεΐνης και περιλαμβάνει μια κυτταροπλασματική περιοχή 21 αμινοξέων, όπως επίσης και μια διαμεμβρανική περιοχή η οποία δεν είναι απαραίτητη για την σύνδεση με προσκολλητικές ουσίες (μόρια προσκόλλησης). Η βαριά αλυσίδα είναι εξ ολοκλήρου εξωκυττάρια και σε αυτήν εντοπίζονται τα σημεία σύνδεσης του ασβεστίου με την καλμοντουλίνη. Η γλυκοπρωτεΐνη GrIIb ως σύνολο περιέχει μια διακυτταρική περιοχή κοντά στο καρβοξυτελικό (C-τελικό) της άκρο και επτά επαναλήψεις τεσσάρων περιοχών με ομολογίες, οι οποίες δεσμεύουν το ασβέστιο στην καλμοντουλίνη. Επίσης περιέχει 18 υπολείμματα κυστεΐνης, εκ των οποίων τα 15 στην IIb- $\alpha$  και τα 3 στην IIb- $\beta$ . Η τελευταία κυστεΐνη στην IIb- $\alpha$  και η πρώτη στην IIb- $\beta$  συνδέουν την  $\alpha$  και  $\beta$  ομάδα μεταξύ τους μέσω δισουλφιδικού δεσμού.

#### ***4. Η γλυκοπρωτεΐνη GrIIIa***

Η εν λόγω πρωτεΐνη περιλαμβάνει 762 αμινοξέα και μετά από αναγωγή το μοριακό της βάρος ανέρχεται στα 110 kDa. Η δομή της καθορίζεται από τέσσερες κύριες περιοχές και συγκεκριμένα:

- 1) μια διαμεμβρανική περιοχή με τυπικά υδρόφοβα χαρακτηριστικά, κοντά στο καρβοξυτελικό άκρο,
- 2) μια περιοχή που αποτελείται από 41 υπολείμματα αμινοξέων και φυσιολογικά ευρίσκεται στο κυτταρόπλασμα. Στο εν λόγω πολυπεπίδιο περιέχονται 6 θρεονίνες, 2 τυροσίνες και μια σερίνη. Από τα δεδομένα που έχουν εξαχθεί, φαίνεται ότι τα υπολείμματα της τυροσίνης στην γλυκοπρωτεΐνη IIIa δεν είναι φωσφορυλιωμένα, ενώ αντιθέτως έχει αποδειχθεί η φωσφορυλίωση διαφόρων υπολειμμάτων θρεονίνης. Η περιοχή αυτή φαίνεται ότι παίζει τον ρόλο μεσολαβητή για αντιδράσεις με στοιχεία του κυτταροσκελετού.
- 3) ένα πολυπεπίδιο που περιέχει μεγάλο αριθμό υπολειμμάτων κυστεΐνης. Μια περιοχή (domain) αντιστοιχούσα στο 25% του πολυπεπτιδίου αυτού είναι ανθεκτικό απέναντι στην πρωτεολυτική δράση των πρωτεασών. Η περιοχή αυτή περιλαμβάνει 56 υπολείμματα μορίων κυστεΐνης και τέσσερα επαναλαμβανόμενα τμήματα, έκαστο των οποίων περιλαμβάνει περί τα 40 ίδια αμινοξέα στην ίδια διαδοχή.



4) μια άλλη περιοχή προλίνης και λευκίνης, η οποία περιέχει 33 αμινοξέα. Η περιοχή αυτή είναι υπεύθυνη για τον ρόλο της έκφρασης των αντιγόνων των αιμοπεταλίων και για τον λόγο αυτό εμφανίζει έναν γενετικό πολυμορφισμό.

Τέλος, στο μόριο της GrIIIa υπάρχει ένα μεγάλο τμήμα το οποίο περιέχει την περιοχή των δισουλφιδικών δεσμών, οι οποίοι είναι υπεύθυνοι για την σύνδεση του αμινοτελικού της άκρου με το μέσο τμήμα αυτής (mid region).

Η GrIIIa, ή αλλιώς GrIV (ονομασία που δεν είναι ομοθύμως αποδεκτή), είναι μια γλυκοπρωτεΐνη η οποία έχει θεωρηθεί κατά καιρούς ότι παίζει διαφόρους ρόλους. Έτσι θεωρήθηκε ότι λειτουργεί ως υποδοχέας στον οποίον συνδέονται διάφοροι αγωνιστές της αιμοπεταλιακής συσσώρευσης, πράγμα το οποίο, ωστόσο, δεν επιβεβαιώθηκε με την χρησιμοποίηση ειδικών μονοκλωνικών αντισωμάτων.

Όσον αφορά τους χρωματοσωματικούς εντοπισμούς των γονιδίων της GrIIIb και της GrIIIa αυτά ευρέθησαν να ανήκουν στο χρωμόσωμα 17 του ανθρώπου και στις θέσεις Q21 προς Q22. Το γονίδιο της GrIIIb έχει μέγεθος 17,2 k-βάσεων και περιέχει 36 εξόνια, ενώ το γονίδιο της GrIIIa έχει μέγεθος 40 – 46 k-βάσεων και περιέχει 14 εξόνια. Η βιοσύνθεση της GrIIIb-IIIa περιλαμβάνει τον σχηματισμό πολυμερούς στο ενδοπλασματικό δίκτυο, ενώ ακολουθεί μια συνεχής ωρίμανση και μεταφορά του ετεροδιμερούς στο όργανο του Golgi. Η απουσία της ομάδας IIb δεν επιτρέπει στην ομάδα IIIa να συνδεθεί και να μεταφερθεί στην επιφάνεια της μεμβράνης του αιμοπεταλιακού κυττάρου.

Μια νόσος προδιαθέτουσα σε αιμορραγίες, η λεγόμενη θρομβασθένεια ή ασθένεια του Glanzmann είναι μια αυτοσωματική υπολειπόμενη νόσος η οποία προέρχεται από μια παράλληλη ελάττωση του περιεχομένου των αιμοπεταλίων σε GrIIIb-IIIa. Η γενετική βάση για την θρομβασθένεια έχει εξεταστεί μόνον σε λίγες περιπτώσεις. Σε δύο από αυτές παρατηρήθηκε μια προσθήκη DNA στο γονίδιο της IIIa ενώ σε μια άλλη περίπτωση παρατηρήθηκε έλλειψη DNA στο γονίδιο της IIb. Σε μια άλλη περίπτωση τα αιμοπετάλια να μεν είχαν φυσιολογικές ποσότητες GrIIIb-IIIa, αλλά η δυσλειτουργία του συμπλέγματος οφειλόταν σε μια σημειακή μετάλλαξη του γονιδίου της IIIa.

### ***E. Τα συμπλέγματα GrIa-IIa και GrIc-IIa***

Το σύμπλεγμα αυτό αποτελείται από δύο υπομονάδες και ανήκει λειτουργικά και δομικά στην κατηγορία των λεγόμενων ιντεγκρινών των κυτταρικών μεμβρανών και ειδικότερα στην υποομάδα β1-ιντεγκρινών.

Επίσης στο εν λόγω σύμπλεγμα ανευρίσκεται μια κοινή υπομονάδα, η οποία ανήκει στις λεγόμενες γλυκοπρωτεΐνες πολύ μικρής ενεργοποίησης (Very Low Activation or VLA).

Η υπομονάδα α2 του συμπλέγματος έχει κλωνοποιηθεί και εμφανίζει μια ομοιότητα ίση προς 18 – 25 % με τις λοιπές ιντεγκρίνες των α υπομονάδων (στις οποίες περιλαμβάνονται οι υπομονάδες α3 και α4). Η αλληλουχία αμινοξέων της α2 υπομονάδας περιλαμβάνει ένα τμήμα (domain) το οποίο αποτελείται από ένα πολυπεπίδιο 191 αμινοξέων και εμφανίζει πολλές ομοιότητες με την ιντεγκρίνη β2. Μερικές από αυτές είναι το μεγάλο ποσοστό υπολειμμάτων κυστεΐνης και άφθονα σημεία σύνδεσης με ενεργά ιόντα μετάλλων. Από την λειτουργική πλευρά στο εν λόγω σύμπλεγμα εντοπίζονται εκλεκτικά οι υποδοχείς του αιμοπεταλίου για την σύνδεση του κολλαγόνου τύπου I και τύπου III, όπως και υποδοχείς για την σύνδεση της λαμινίνης. Το σύμπλεγμα GrIc - IIa αποτελεί τον τόπο όπου εντοπίζονται οι υποδοχείς για την φιμπρονεκτίνη.

### ***1.2.5-β. Αιμοπεταλιακά κοκκία και πρωτεΐνες που εκκρίνονται από τα αιμοπετάλια κατά την αντίδραση έκλυσης***

#### ***A. Κοκκία***

Το κυτταρόπλασμα των αιμοπεταλίων, όπως ήδη προαναφέραμεν ανωτέρω περιέχει μεγάλο αριθμό σωματιδίων και κοκκιωδών σχηματισμών, τα οποία περιέχουν κυρίως εκκρινόμενες ουσίες, όπως επίσης μικροϊνίδια και μικροσωληνίσκους. Τα κυριότερα σωματίδια των αιμοπεταλίων είναι τα ακόλουθα:

#### ***1) α-σωματίδια***

Είναι σφαιρικά σωματίδια εφοδιασμένα με λιποπρωτεϊνική διπλοστοιβαδική μεμβράνη αποτελούμενη από δύο στοιβάδες φωσφολιπιδίων και μια ενδιάμεση στοιβάδα πρωτεϊνών κατά το πρότυπο των κυτταρικών μεμβρανών, όπως περιγράψαμε ανωτέρω. Ο αριθμός τους κυμαίνεται μεταξύ 20 έως 200. Φαίνεται να προέρχονται από το όργανο του Golgi ή από μιτοχόνδρια τα οποία απώλεσαν την αρχική τους δομή. Περιέχουν τον μεγαλύτερο

αριθμό αιμοπεταλιακών παραγόντων, παράγοντες πήξης, όπως επίσης και γλυκοπρωτεΐνες προσκόλλησης.

## **2) δ-σωματίδια ή πυκνά σωμάτια**

Τα εν λόγω σωμάτια περιέχουν σεροτονίνη (5-υδροξυ-τρυπταμίνη), ασβέστιο υπό την μορφή ιόντων, όπως επίσης νουκλεοτίδια (ATP, ADP). Στα πυκνά σωμάτια εντοπίζονται επίσης υπολείμματα του εργαστοπλασματικού δικτύου, υπό την μορφή ριβοσωμάτων ή RNA.

## **3) Κοκκία γλυκογόνου**

Αποτελούν την αποθήκη μια έκτακτης ποσότητας ενεργειακού υλικού και ο αριθμός τους είναι μεγάλος. Το γλυκογόνο αποτελεί ένα πρώτης τάξεως ενεργειακό υλικό το οποίο φαίνεται να χρησιμοποιείται κατά την αντίδραση έκλυσης των κοκκίων και την συσσώρευση των αιμοπεταλίων, καθώς όταν τα αιμοπετάλια ενεργοποιηθούν υδρολύεται και απελευθερώνει γλυκόζη, η οποία χρησιμοποιείται άμεσα για την παραγωγή τριφωσφορικής αδενοσίνης (ATP).

## **4) Μιτοχόνδρια**

Τα αιμοπετάλια εμπεριέχουν σημαντικό αριθμό λειτουργικών μιτοχονδρίων, τα οποία άρουν την καταγωγή τους από το κυτταρόπλασμα του μητρικού μεγακαρυοκυττάρου από το οποίο προέρχεται κάθε αιμοπετάλιο. Είναι σωματίδια μικρά, ο αριθμός των οποίων κυμαίνεται μεταξύ 10 έως 60, ανά αιμοπεταλιακό κύτταρο και αποτελούν την έδρα του αερόβιου μεταβολισμού παραγωγής ενέργειας, υπό την μορφή ATP. Η λειτουργία τους είναι η τυπική αερόβια λειτουργία των μιτοχονδρίων, δηλαδή αποτελούν την έδρα των αναπνευστικών φαινομένων του αιμοπεταλίου, της οξείδωσης των τροφικών υποστρωμάτων (β-οξείδωση και κύκλος του Krebs) καθώς και της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης προς παραγωγή ATP. Επίσης τα μιτοχόνδρια των αιμοπεταλίων αποτελούν μια σημαντική αποθήκη ιονισμένου ασβεστίου για το εν λόγω κύτταρο. Το ασβέστιο αυτό ενδεχομένως κινητοποιείται για την εκτέλεση των αιμοπεταλιακών αντιδράσεων.

## **5) Υπεροξεισώματα**

Τα υπεροξεισώματα αποτελούν την έδρα αντιδράσεων εξουδετέρωσης διάφορων μη χρήσιμων, ή επιβλαβών ουσιών, όπως π.χ των υπεροξειδίων. Η λειτουργία τους έχει σαν παράπλευρο αποτέλεσμα την δημιουργία ελευθέρων ριζών. Τα υπεροξεισώματα είναι πολύ πλούσια σε καταλάση.

## **6) Σωματία περιέχοντα λυσοένζυμα (σωμάτια λ)**

Τα σωματία αυτά αποτελούν τα αιμοπεταλιακά οργανίδια, τα αντίστοιχα προς τα λυσοσώματα των υπολοίπων κυττάρων. Περιέχουν και αυτά σαφή και πλήρως ανεπτυγμένη διπλοστοιβαδική φωσφολιπιδική μεμβράνη. Είναι πλούσια σε λυτικά ένζυμα, όπως β-γλυκουρονιδάση, β-N-ακετυλογλυκοζαμινιδάση, β-γαλατοσιδάση, π-νιτροφαινυλοφωσφατάση, όπως επίσης και άλλες όξινες υδρολάσες ή φωσφατάσες. Όλα τα λυσοσωμιακά υδρολυτικά ένζυμα που περιέχονται στα σωματία λ εκκρίνονται κατά την διάρκεια της ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων από τους ειδικούς αγωνιστές τους, κατά την λεγόμενη αντίδραση έκλυσης των αιμοπεταλιακών κοκκίων και συνεισφέρουν στον σχηματισμό του θρόμβου.

## **B. Πρωτεΐνες που εκκρίνονται μέσω της αντίδρασης έκλυσης**

Ο ρόλος των αιμοπεταλίων στην επίσχεση της αιμορραγίας είναι θεμελιώδης και πολύπλευρος, καθόσον η ενεργοποίησή τους τα αναγκάζει να συμμετάσχουν σε μεγάλο αριθμό ενδιάμεσων λειτουργικών φαινομένων (αν όχι σε όλα). Αυτά τα λειτουργικά φαινόμενα είναι:

1<sup>ov</sup>) Η δημιουργία του αιμοπεταλιακού θρόμβου (λευκός θρόμβος), μέσω της πρόσφυσης, προσκόλλησης και εν τέλει, συσσώρευσης τους στο σημείο της αγγειακής τομής.

2<sup>ov</sup>) Η διάδοση της διέγερσης σε παρακείμενα αιμοπετάλια, μέσω της απελευθέρωσης μιας σειράς ουσιών που είναι αγωνιστές της αιμοπεταλιακής συσσώρευσης και οι οποίες είτε ευρίσκονται ήδη αποθηκευμένες μέσα στα κοκκία των αιμοπεταλίων, είτε παράγονται αθρόα κατά την διεργασία της αιμοπεταλιακής ενεργοποίησης (π.χ τα ιόντα ασβεστίου, η σεροτονίνη, το ADP, ο PAF, η θρομβοξάνη A<sub>2</sub>). Η διάδοση της διέγερσης διαμεσολαβείται μέσω της αντίδρασης έκλυσης των κοκκίων και έχει σαν σκοπό την μεγιστοποίηση της αιμοπεταλιακής συσσώρευσης και της δημιουργίας θρόμβων κατάλληλου μεγέθους για την αποτελεσματική επίσχεση της αιμορραγίας.

3<sup>ov</sup>) Η διέγερση της λειτουργίας και άλλων ειδών κυττάρων, όπως των κυττάρων του αγγειακού ενδοθηλίου, των μονοπύρηνων και των μακροφάγων. Τα εν λόγω κύτταρα μπορούν να διεγερθούν σε μέγιστο βαθμό από ουσίες εκκρινόμενες από τα ενεργοποιημένα αιμοπετάλια, όπως π.χ ο Παράγοντας Ενεργοποίησης των Αιμοπεταλίων (PAF), η θρομβοξάνη A<sub>2</sub> (TxA<sub>2</sub>), ο 4<sup>os</sup> Αιμοπεταλιακός Παράγοντας (PF<sub>4</sub>), ο Αυξητικός Παράγοντας των Αιμοπεταλίων (PDGF). Τα κύτταρα – στόχοι αυτών των εκκρινόμενων από τα αιμοπετάλια ουσιών, ενεργοποιούνται στο μέγιστο και εκτελούν ενδοκυτταρικές εξαιρετικά σύνθετες λειτουργίες, όπως η ισχυρή σύσπασση των αγγείων, η φλεγμονή, η φαγοκυττάρωση και καταστροφή των εισερχομένων μικροβίων, η απορρόφηση των νεκρωμένων ιστών, η ίαση των πληγών, η νεοαγγειογένεση, η μείωση της επέκτασης του θρόμβου και επανασυράγωση του θρομβωμένου αγγειακού αυλού κ.α.

Οι ουσίες αυτές είναι από την χημική πλευρά διαφόρων τύπων, όπως: φωσφολιπίδια (PAF), λιπιδίδια (TxA<sub>2</sub>), φωσφορυλιωμένα νουκλεοτίδια (ADP), αμίνες (5-OH-τρυπταμίνη ή σεροτονίνη) και πρωτεΐνες (PF<sub>4</sub>, PDGF), μεταξύ των οποίων και ένζυμα. Παρακάτω θα κάνουμε μνεία ειδικά των ενζύμων που εκκρίνονται από τα λ – σωματίδια και των πρωτεϊνών των α – σωματίων.

### ***Πρωτεΐνες των λ - σωματίων***

Τα λ – σωματίδια είναι δομές με λυσοσωμιακό χαρακτήρα, όπως ήδη προαναφέραμε. Από τα σωματίδια αυτά εκκρίνονται κυρίως δύο σημαντικά ένζυμα: η ηπαριτινάση και η ενδογλυκοσιδάση. Η ηπαριτινάση έχει μεγάλη χημική συγγένεια με τους γλυκοζαμινογλυκουρονικούς δεσμούς και διασπά την ηπαρίνη. Η δραστηριότητα της εκφράζεται σε νανογραμμάρια και φαίνεται ότι κάθε αιμοπετάλιο περιέχει στα λ – σωματίδια αυτού μια χιλιάδα μορίων ηπαριτινάσης. Η ενδογλυκοσιδάση διασπά την θειική ηπαράνη (heparan sulfate) των ενδοθηλιακών κυττάρων, διευκολύνοντας με τον τρόπο αυτό την αγκυροβόληση των παραγόντων της πήξης στο τοίχωμα των αγγείων. Όπως ήδη έχουμε προαναφέρει, στα λ-σωματίδια των αιμοπεταλίων περιέχονται και άλλα λυτικά ένζυμα, όπως η β-γλυκουρονιδάση, η β-γαλακτοσιδάση, η καθεψίνη, η ελαστάση, η κολλαγονάση, η N-ακετυλο- γλυκοζαμινιδάση. Τα ένζυμα αυτά προσβάλλουν την θεμέλια ουσία και δημιουργούν ένα μικροπεριβάλλον καλύτερης σύνδεσης των παραγόντων της πήξης.

### ***Πρωτεΐνες των α – σωματίων***

Οι πρωτεΐνες αυτές εκκρίνονται κατά την αντίδραση έκλυσης του περιεχομένου των αιμοπεταλιακών κοκκίων, ενώ η διέγερση του αιμοπεταλίου έχει ήδη προχωρήσει ισχυρά. Μεταξύ των πρωτεϊνικών ουσιών που εκκρίνονται από τα α – σωματία (ή α– κοκκία) περιλαμβάνονται ο 4<sup>ος</sup> Αιμοπεταλιακός Παράγοντας (PF<sub>4</sub>), η β– θρομβογλοβουλίνη (β– TG), ο παράγοντας von Willebrand των αιμοπεταλίων, και ο Αυξητικός Παράγοντας των Αιμοπεταλίων (PDGF). Παρακάτω παραθέτουμε εν περιλήψει μερικά στοιχεία για τις εν λόγω πρωτεΐνες:

### ***Αιμοπεταλιακός Παράγοντας (PF<sub>4</sub>)***

Ο εν λόγω παράγοντας αποτελεί μια πρωτεΐνη μικρού μοριακού βάρους (7,8 kDa) σταθερή στην θερμότητα, η οποία εκκρίνεται από το αιμοπετάλιο ως τετραμερές σύμπλεγμα με μια πρωτεογλυκάνη μεγάλου μοριακού βάρους. Ο παράγοντας αυτός από την λειτουργική πλευρά εμφανίζει μεγάλη χημική συγγένεια με την ηπαρίνη με την οποία ενώνεται και εξουδετερώνει την αντιπηκτική της δράση. Π.χ η ποσότητα του PF<sub>4</sub> που ευρίσκεται σε ένα ml πλούσιου σε αιμοπετάλια πλάσματος (αριθμός αιμοπεταλίων ανά ml υπερδιπλάσιος κατά προσέγγιση από τον αριθμό των αιμοπεταλίων ανά ml ολικού φυσιολογικού αίματος) είναι σε θέση να εξουδετερώσει 0,5 units/ml κλασσικής ηπαρίνης. Η πολύ μεγάλη χημική συγγένεια μεταξύ ηπαρίνης και PF<sub>4</sub> φαίνεται επίσης και από την πολύ μεγάλη ποσότητα NaCl το οποίο απαιτείται για τον διαχωρισμό του από στήλη ηπαρίνης – αγαρόζης, κατά την διαδικασία καθαρισμού του μέσω χρωματογραφίας στήλης. Κατά την φάση της έκλυσης, προκειμένου να εξασθενήσουν και εν τέλει, να σπάσουν οι δεσμοί μεταξύ ηπαρίνης και PF<sub>4</sub> απαιτείται μια αυξημένη συγκέντρωση ιόντων η οποία εξασφαλίζεται από ένα πυκνό διάλυμα NaCl, μοριακότητας 1,2 M. Για τον διαχωρισμό της β – θρομβοσφαιρίνης (β–TG) απαιτείται μικρότερη συγκέντρωση NaCl (1M), προκειμένου να διαχωριστεί η ηπαρίνη από την β–TG. Η αυξημένη χημική συγγένεια του PF<sub>4</sub>, προς την ηπαρίνη, που παρατηρείται στον άνθρωπο διαπιστώνεται επίσης για τους PF<sub>4</sub> των κονίκλων, των βοειδών και των χοίρων.

Ο PF<sub>4</sub> είναι ένα σχετικά μικρό πολυπεπτίδιο, το οποίο περιλαμβάνει στην δομή του 70 υπολείμματα αμινοξέων. Κάθε μονομερές πεπτιδίο του έχει μοριακό βάρος 7,8 kDa. Η περιοχή σύνδεσης με την ηπαρίνη εντοπίζεται κοντά στο καρβοξυ–τελικό του άκρο, όπου απαντώνται δύο υπολείμματα λυσίνης (τόσο στον ανθρώπινο, όσο και στον βόειο PF<sub>4</sub>), μέσω των οποίων γίνεται η πρόσδεση της ηπαρίνης. Υπάρχει επίσης και ο PF<sub>4</sub> μικρής

χημικής συγγένειας με την ηπαρίνη (Low affinity or LAPF4), ο οποίος περιέχει 85 υπολείμματα αμινοξέων, έχει ισοηλεκτρικό σημείο στο pH 8,0 ενώ συγκρινόμενος με την  $\beta$ -TG έχει τέσσερα αμινοτελικά σημεία. Ο PF<sub>4</sub> συνδέεται επίσης και με άλλες γλυκοζαμινογλυκάνες, διαφορετικές της κλασσικής ηπαρίνης, αλλά με πολύ μικρότερη χημική συγγένεια. Επίσης ένα τετραμερές PF<sub>4</sub> συνδέεται το ίδιο καλά και με ένα μόριο των ηπαρινών μικρού μοριακού βάρους (όταν το μοριακό τους βάρος είναι μικρότερο των 10.000), ενώ με την κλασσική ηπαρίνη συνδέονται δύο ή περισσότερα τετραμερή μόρια του. Η ημιδιάρκεια ζωής του PF<sub>4</sub> παρουσιάζει μια φάση ταχείας εξαφάνισης ( $1/2\text{lifeTime} = 2,1 \text{ min}$ ), και μια φάση αργής ( $\approx 70 \text{ min}$ ). Ο PF<sub>4</sub> εναποθηκεύεται σχεδόν αποκλειστικά στο ήπαρ, ενώ ανευρίσκεται λιγότερο στα νεφρά και στην ουροδόχο κύστη. Η έγχυση ηπαρίνης αυξάνει την συγκέντρωσή του στο αιματικό πλάσμα κατά 30 φορές.

Η ηπαρίνη, κυκλοφορώντας υπό φυσιολογικές συνθήκες ασκεί προστατευτική και θεραπευτική αντιπηκτική δράση. Υπό την έννοια αυτή η δράση του PF<sub>4</sub> θα μπορούσε να φαίνεται παράδοξη. Ωστόσο η αλληλεπίδραση του PF<sub>4</sub> με τα ενδοθηλιακά κύτταρα των αγγείων εξαρτάται άμεσα από την σύνδεσή του με τις γλυκοζαμινογλυκάνες της επιφάνειας των εν λόγω κυττάρων, όπως π.χ η θεϊκή ηπαράνη των ενδοθηλιακών κυττάρων, η οποία δρα ως συμπαράγοντας της AT-III και αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό των λείων μυϊκών ινών. Συνεπώς, επί του προκειμένου, η παρέμβαση του PF<sub>4</sub>, δεσμεύοντας την θεϊκή ηπαράνη δεν της επιτρέπει να λειτουργήσει ως συμπαράγοντας της AT-III, οπότε, τοπικά, η ανασταλτική δράση των δύο τελευταίων στον πολλαπλασιασμό των λείων μυϊκών ινών χαλαρώνει και συνεπώς μπορούμε να έχουμε τον πολλαπλασιασμό τους, προκειμένου το κομμένο μυϊκό τοίχωμα του αγγείου να μπορέσει να αναπλαστεί ταχύτερα. Συνεπώς η δράση του PF<sub>4</sub> τοπικά, τροποποιεί την συμπεριφορά των λείων μυϊκών ινών, μέσα στην κατεύθυνση της επιτάχυνσης της διόρθωσης της αγγειακής βλάβης. Επιπλέον, στην μεμβράνη των αιμοπεταλίων εντοπίζονται σημεία υψηλής σύνδεσης του PF<sub>4</sub>, οπότε όταν ο παράγοντας αυτός δεσμεύεται στα εν λόγω σημεία, η ικανότητα των αιμοπεταλίων για συσσώρευση αυξάνεται καθώς μειώνεται η αντιπηκτική δράση των ηπαρινοειδών. Σημειωτέον ότι τόσο οι μικρού όσο και οι μεγάλου μοριακού βάρους ηπαρίνες καλύπτουν τους υποδοχείς του PF<sub>4</sub>, οπότε η δέσμευση του παράγοντα στα σημεία αυτά τις παρεκτοπίζει, οδηγώντας σε αύξηση της προσκολλητικότητας των σημείων αυτών και σε διέγερση της πηκτικής τάσης, πράγμα που τελικά μεταφράζεται σε αύξηση της συσσωρευτικής ικανότητας των

αιμοπεταλίων. Από τα ανωτέρω φαίνεται ότι ο 4<sup>ος</sup> Αιμοπεταλιακός Παράγοντας είναι μια ουσία η οποία εκπέμπεται από το διεγερμένο αιμοπετάλιο με σκοπό την μείωση των δράσεων των ηπαρινοειδών μορίων. Δεδομένου ότι η ενδοφλέβια χορήγηση ηπαρίνης αυξάνει τα επίπεδα του PF<sub>4</sub> ως και 30 φορές, φαίνεται ότι ο εν λόγω παράγων περιστέλλει την δράση των ηπαρινών σε συστημικό επίπεδο και όχι μόνον σε τοπικό προκειμένου να επιτευχθεί ισορροπία μεταξύ του συστήματος πήξης και αντιπήξης. Συνεπώς οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ PF<sub>4</sub> και ηπαρινοειδών μορίων φαίνεται να είναι κρίσιμης σημασίας για την τελική έκφραση των βιολογικών ιδιοτήτων αυτών.

Τέλος ο PF<sub>4</sub> λειτουργεί ως θετικός χημειοτακτικός παράγοντας προσελκύνοντας στο σημείο της βλάβης και εκεί που έχουν εγκατασταθεί διεγερμένα αιμοπετάλια τα ουδετερόφιλα, τα μονοκύτταρα και τους ινοβλάστες. Αυτή η δράση του PF<sub>4</sub> συσχετίστηκε με την ικανότητά του να λειτουργεί ως μεσολαβητής στις αντιδράσεις της φλεγμονής. Ειδικά η χημειοτακτική του δράση προς τους ινοβλάστες φαίνεται να είναι συγκρίσιμη προς εκείνη της φμπρονεκτίνης και συσχετίστηκε με τον ρόλο που ασκείται εκ μέρους του στην ίαση των τραυμάτων.

### ***β – θρομβοσφαιρίνη ή β - TG***

Η β-TG είναι επίσης μια εκκριτική πρωτεΐνη των αιμοπεταλίων που απελευθερώνεται μέσω της αντίδρασης έκλυσης των διεγερμένων αιμοπεταλίων από τα α – σωματίδια αυτών. Η πρωτεΐνη αυτή σχηματίζει τετραμερή από ισάριθμο πλήθος ταυτόσημων πολυπεπτιδίων και η συγγένειά της με την ηπαρίνη είναι μικρή. Κάθε μονομερές πεπτιδίου προέρχεται από ένα πρόδρομο μόριο του χαμηλής χημικής συγγένειας 4<sup>ου</sup> αιμοπεταλιακού παράγοντα (LAPF<sub>4</sub>) μέσω υδρόλυσης από την πλευρά του αμινοτελικού του άκρου. Αν και στο καρβοξυτελικό άκρο της β – TG έχουμε την παρουσία ενός αριθμού υπολειμμάτων λυσίνης για την σύνδεση της περιοχής αυτής προς την ηπαρίνη, ωστόσο η ικανότητα σύνδεσής του προς αυτήν είναι πολύ ελαττωμένη εν σχέσει προς εκείνη του PF<sub>4</sub>. Η συγκέντρωσή της, όπως προκύπτει από την ενσωμάτωση του εξειδικευμένου της αντισώματος, είναι 20 μg/10<sup>9</sup> αιμοπετάλια. Η συγκέντρωσή της στο αιματικό πλάσμα δεν επηρεάζεται από την έγχυση ηπαρίνης, αντίθετα με ό,τι συμβαίνει για τον PF<sub>4</sub>, ενώ η διάρκεια της ημιζωής της εμφανίζει, όπως και στην περίπτωση του PF<sub>4</sub> δύο φάσεις: μια ταχεία φάση που διαρκεί 8,4 min και μια βραδεία φάση, η οποία ανέρχεται στα 63 min.



Η β-θρομβοσφαιρίνη απεκκρίνεται από τους νεφρούς και η νεφρική ανεπάρκεια επιβραδύνει την απομάκρυνσή της από τον οργανισμό, σε αντίθεση με τον PF<sub>4</sub>.

Η αλληλουχία των υπολειμμάτων των 81 αμινοξέων της προσδιορίστηκε από τον Begg και τους συνεργάτες του, όπως επίσης το ισοηλεκτρικό της σημείο στο pH 7,0.

Η β-TG παρουσιάζει τουλάχιστον 50% κοινές ομολογίες με τον PF<sub>4</sub> και όπως και αυτός περιέχει στο καρβοξυ-τελικό της άκρο μια σειρά υπολειμμάτων λυσίνης. Η β - TG ενδέχεται να προέρχεται από τον καταβολισμό της βασικής πρωτεΐνης των αιμοπεταλίων ή ακόμη και από τον χαμηλής συγγένειας PF<sub>4</sub>. Η πρώτη λειτουργία που αναγνωρίστηκε στην β-TG είναι η αναστολή της παραγωγής προστακυκλίνης από τα ενδοθηλιακά κύτταρα, ενώ σε αντίθεση με τον PF<sub>4</sub>, αυτή δεν έχει σημεία σύνδεσης επί των αιμοπεταλίων. Είναι η πρωτεΐνη η οποία ασκεί την ισχυρότερη χημειοτακτική δράση στους ινοβλάστες και φθάνει στην μέγιστη δραστηριότητά της στην συγκέντρωση των 6 ng/ml. Για να έχουμε ένα μέτρο σύγκρισης με άλλα χημειοτακτικά ερεθίσματα έναντι των ινοβλαστών, αρκεί να αναφέρουμε ότι ο PDGF είναι 30 φορές ασθενέστερος από την β-θρομβοσφαιρίνη, ενώ ο PF<sub>4</sub> είναι 5 φορές πιο ασθενής από αυτήν.

#### ***Αυξητικός Παράγοντας των Αιμοπεταλίων (PDGF)***

Ο αυξητικός παράγοντας των αιμοπεταλίων (PDGF) είναι ένα πολυπεπτίδιο με μοριακό βάρος 30 kDa, στην μη αναγωγική μορφή του. Το ισοηλεκτρικό του σημείο ευρίσκεται μεταξύ του pH 9,5-10,4. Είναι εξαιρετικά σταθερό μόριο που αντιστέκεται στην μετουσίωση ακόμη και στην επεξεργασία του με ισχυρά διαλύματα, όπως 4M υδροχλωρικής γουανιδίνης, 6M ουρίας, 1M οξικού οξέος, 1% SDS ή 100 ° C θερμοκρασίας. Το μόριο αυτό εμφανίζει πολλά υδρόφοβα σημεία σύνδεσης, πράγμα που επιβεβαιώνεται και από την μεγάλη ικανότητα αντίστασης στην μετουσίωση. Σε κάθε αιμοπετάλιο υπολογίζεται ότι περιέχονται 1200 μόρια PDGF. Η συγκέντρωση του PDGF στα αιμοπετάλια είναι ίση προς 50 ng/10<sup>9</sup> αιμοπετάλια. Η συγκέντρωση αυτή φαίνεται ότι αρκεί για να ενεργοποιήσει τόσο τις μιτώσεις όσο και την κυτταρική ανάπτυξη σε ινοβλάστες και λείες μυϊκές ίνες υπό συνθήκες κυτταροκαλλιέργειας in vitro.

Ο PDGF απομονώθηκε σε καθαρή μορφή, από ομογενοποιημένα αιμοπετάλια, μετά από μια επίπονη διαδικασία, ξεκινώντας από την παρατήρηση ότι οι αιμοπεταλιακοί θρόμβοι διεγείρουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και την αγγειογένεση.

Ο PDGF είναι μια κατιονική πρωτεΐνη, σε αντίθεση με ό,τι συμβαίνει με την μεγάλη πλειοψηφία των πρωτεϊνών. Η μελέτη της δομής του εν λόγω μορίου και ο προσδιορισμός της αλληλουχίας των αμινοξέων αυτού, έδειξε ότι αποτελείται από δύο διαφορετικές αλυσίδες οι οποίες είναι μεταξύ τους συνδεδεμένες μέσω δισουλφιδικών γεφυρών. Η διάσπαση των δισουλφιδικών γεφυρών και η απομόνωση των δύο αλυσίδων έδειξε ότι η α-αλυσίδα έχει μοριακό βάρος 18 kDa, ενώ η β-αλυσίδα έχει μοριακό βάρος 16 kDa. Ένα σημαντικό εύρημα που έγινε κατόπιν ήταν η διαπίστωση ότι η β-αλυσίδα του PDGF εμφανίζει ένα υψηλότατο ποσοστό της τάξης του 90% ομολογιών με την πρωτεΐνη p28-ssv. Το γονίδιο που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη p28-ssv είναι ένα γονίδιο παράγωγο του ιικού ογκογονιδίου v-sis που απομονώθηκε από τον ιό του σαρκώματος του πιθήκου (simian sarcoma virus).

Το γονίδιο της πρωτεΐνης p28-ssv είναι πιθανόν να έχει ικανότητες μετασχηματισμού. Πρέπει, στο σημείο αυτό, να υπογραμμίσουμε ότι στα αιμοπετάλια εντοπίστηκαν και άλλοι παράγοντες μετασχηματισμού, όπως ο transforming growth factor ο οποίος διεγείρει τον πολλαπλασιασμό των ενδοθηλιακών κυττάρων και παίζει σημαντικό ρόλο στην αγγειογένεση. Το κυτταρικό ανάλογο c-sis έχει κλωνοποιηθεί και ταυτοποιηθεί μοριακά ως το δομικό γονίδιο για την β-αλυσίδα του PDGF, που εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 22. Τέλος, με την τεχνολογία του c-DNA, ολοκληρώθηκε η ανάλυση της α-αλυσίδας και διαπιστώθηκε ότι το γονίδιό της εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 7.

Υποδοχείς προς τους οποίους συνδέεται ο PDGF βρέθηκαν στους ινοβλάστες, στα νευρογλοιακά κύτταρα, στους κυτταροτροφοβλάστες, στον συνδετικό ιστό, στα λεία μυϊκά κύτταρα, αλλά δεν βρέθηκαν στα επιθηλιακά κύτταρα. Ουσιαστικά οι υποδοχείς αυτοί είναι οι δεσμοί σύνδεσης και μεταφοράς του ειδικού μηνύματος του PDGF. Ο υποδοχέας του για τους ινοβλάστες είναι μια διαμεμβρανική γλυκοπρωτεΐνη. Όταν ο PDGF συνδέεται στην εξωτερική περιοχή αυτής τότε ενεργοποιείται μια πρωτεϊνική κινάση της τυροσίνης στην ενδοκυττάρια πλευρά του. Η δραστηριότητα αυτής της τυροσινικής κινάσης παρατηρήθηκε αρχικά με την αυτοφωσφορυλίωση του ίδιου υποδοχέα.

Ο PDGF, προκειμένου να προκαλέσει τα κυτταρικά φαινόμενα που επάγει, πρέπει αναγκαστικά να προσδεθεί στον εξειδικευμένο προς αυτόν υποδοχέα και κατόπιν να επακολουθήσει, ως απαραίτητο πρώτο βήμα, η φωσφορυλίωση της τυροσινικής κινάσης του τελευταίου. Έχει δειχθεί ότι η φωσφορυλίωση της εν λόγω τυροσινικής κινάσης ακόμη και από μόνη της είναι ικανή να πυροδοτήσει τις διαδικασίες της κυτταρικής μίτωσης και

αύξησης. Μέσα στο πλέγμα αυτών των διαδικασιών έχει ταυτοποιηθεί μια πρωτεΐνη μοριακού βάρους 42 kDa, που φαίνεται να παίζει τον ρόλο υποστρώματος. Η πρωτεΐνη αυτή φωσφορυλιώνεται ταχύτατα ακόμη και σε κύτταρα ευρισκόμενα στην κατάσταση της ηρεμίας. Τέλος, στην πορεία μετάδοσης του σήματος στο εσωτερικό των κυττάρων φαίνεται ότι συμμετέχει μια ακόμη ομάδα μεσολαβητών, η οποία αντιπροσωπεύεται από τις λεγόμενες λιποκορτίνες, που δεσμεύουν ασβέστιο και αναστέλλουν την δραστηριότητα της φωσφολιπάσης-A<sub>2</sub>.

Η πρόσδεση του PDGF στον υποδοχέα αυτού πυροδοτεί την παραγωγή προσταγλανδινών με τον καταβολισμό των φωσφατιδυλινοσιτολών της μεμβράνης και τον σχηματισμό δύο δραστικών παραγώγων τους, της τριφωσφορικής ινοσιτόλης και της διακυλογλυκερόλης. Η φωσφολιπάση-C, που περιορίζει την ένταση αυτής της μεταβολικής δραστηριότητας, βρίσκεται υπό τον έλεγχο μιας GTP εξαρτώμενης πρωτεΐνης. Οι G-πρωτεΐνες παίζουν έναν γενικό και καθοριστικό ρόλο ως παράγοντες σύνδεσης και στα φαινόμενα που προωθούν διαδικασίες αύξησης.

Η τριφωσφορική ινοσιτόλη κινητοποιεί τα ιόντα ασβεστίου από τις ενδοκυττάρια αποθήκες τους, αυξάνοντας έτσι το ελεύθερο ιονισμένο ασβέστιο. Αυτό ακολούθως ενεργοποιεί την πρωτεϊνική κινάση C, δηλαδή τον υποδοχέα για αρκετούς παράγοντες οι οποίοι προάγουν την καρκινογένεση.

Μια άλλη αξιοσημείωτη πλευρά των δράσεων του PDGF είναι η διέγερση που ασκείται εκ μέρους του στην λειτουργία της ενδοκυττάριας αντλίας ανταλλαγής Na<sup>+</sup> / H<sup>+</sup>. Η διέγερση της εν λόγω αντλίας οδηγεί στην εξωκυττάρωση κατιόντων υδρογόνου και στην συνακόλουθη αλκαλοποίηση του εσωτερικού των κυττάρων. Οι μεταβολές αυτές του ενδοκυττάρου μέσου φαίνεται ότι είναι απαραίτητες για την μεταφορά του σήματος. Ο κύκλος των γεγονότων ολοκληρώνεται με την ενεργοποίηση της έκφρασης ειδικών γονιδίων, που είναι υπεύθυνα για την μιτογόνα απάντηση των κυττάρων. Έτσι ο PDGF ενεργοποιεί την έκφραση των γνωστών ογκογονιδίων c-fos και c-myc στους ινοβλάστες.

Ο PDGF εμφανίζει σημεία σύνδεσης με την ηπαρίνη όπως επίσης ασκεί χημειοτακτική δράση προς τους ινοβλάστες, τις λείες μυϊκές ίνες και τα μονοκύτταρα. Οι χημειοτακτικές ιδιότητες του PDGF φαίνεται να εντοπίζονται σε διαφορετικά σημεία του μορίου του. Όλα τα γεγονότα που περιγράψαμε υποδεικνύουν το συμπέρασμα ότι όταν αυτός εκκρίνεται από τα ενεργοποιημένα αιμοπετάλια πάνω στο σημείο της βλάβης του αγγειακού τοιχώματος, πυροδοτεί ταυτοχρόνως και τις διαδικασίες αποκατάστασης της βλάβης. Το

μόριο αυτό είναι πολυδύναμο και σήμερα του αναγνωρίζεται ένας κρίσιμος ρόλος όχι μόνον στην θρομβογένεση, αλλά και στην αθηρωματογένεση, καθώς δεν διεγείρει απλώς την συσσώρευση των αιμοπεταλίων, αλλά την μετανάστευση και τον πολλαπλασιασμό των λείων μυικών ινών και άλλων κυττάρων που εμπλέκονται. Αν σε αυτά προστεθεί η διεγερτική του δράση στην αύξηση των κακοήθων κυττάρων, αντιλαμβανόμαστε ότι η εμφάνιση των μηχανισμών δράσης του και η ανακάλυψη τόσο φυσιολογικών όσο και συνθετικών αναστολέων της δράσης του είναι πολύ σημαντική για τον έλεγχο τόσο της αρτηριοσκλήρυνσης όσο και του καρκίνου.

### ***Παράγοντας von Willebrand (vWF)***

Ο παράγοντας von Willebrand (vWF) είναι ένα πολύ σημαντικό μόριο προσκόλλησης το οποίο παράγεται στα ενδοθηλιακά κύτταρα των αγγείων, όπως επίσης και στα μεγακαρυοκύτταρα, από τα οποία περνά στα αιμοπετάλια. Ανευρίσκεται στην υπενδοθηλιακή στοιβάδα, στα αιμοπετάλια, όπως επίσης και στο πλάσμα. Φαίνεται ότι αποτελεί την πλέον σημαντική πρωτεΐνη προσκόλλησης και ο ρόλος του είναι καθοριστικός για την προσκόλληση των αιμοπεταλίων στο υπενδοθηλιακό στρώμα του τοιχώματος των αγγείων, τόσο κατά την διάρκεια της πρόσφυσής τους, όσο και για το άπλωμά τους πάνω στο στρώμα αυτό. Είναι μια μεγάλη προσκολλητική γλυκοπρωτεΐνη με δομή πολυμερούς.

Ο vWF των ενδοθηλιακών κυττάρων δεσμεύεται με κάποιον τρόπο στο υπενδοθηλιακό στρώμα, ώστε να είναι διαθέσιμος μόνον όταν τα ενδοθηλιακά κύτταρα αποσπαστούν από αυτό ή καταστραφούν. Αν η παρουσία του εν λόγω παράγοντα βρισκόταν στην επιφάνεια του ενδοθηλίου σε επαφή με το στρώμα του αίματος, τότε η θρόμβωση θα ήταν ένα απρόσφορο και διαρκές φαινόμενο με καταστρεπτικές επιπτώσεις για τον οργανισμό. Ο vWF των αιμοπεταλίων διευκολύνει την προσκόλλησή τους στις ίνες του κολλαγόνου των αγγείων ή του ελεύθερου κολλαγόνου, ενώ ο vWF του πλάσματος είναι απαραίτητος για την αριστοποίηση της προσκόλλησης και την δημιουργία του υποστρώματος των θρόμβων.

Το μοριακό βάρος του παράγοντα vW κυμαίνεται από 0,5 έως 1500 kDa και εμφανίζει τα χαρακτηριστικά ενός πολυμερούς με επαναλαμβανόμενες ταυτόσημες υπομονάδες των 270 kDa. Η συγκέντρωσή του στο πλάσμα είναι κατά μέσον όρο ίση προς 7 μg/ml. Η αλληλουχία των αμινοξέων στις υπομονάδες του περιλαμβάνει 2050 υπολείμματα

αμινοξέων, ενώ το 18,7% του συνολικού του μορίου αντιπροσωπεύεται από υδατάνθρακες. Ο vWF παρουσιάζει στο εξαιρετικά μεγάλο του μακρομόριο πάρα πολλά σημεία εκλεκτικής σύνδεσης ποικίλων ουσιών τόσο του πλάσματος όσο και μη περιεχόμενες σε αυτό, μέσω των οποίων προσδένεται στο κολλαγόνο, στην ηπαρίνη, και στο σύμπλεγμα GrIb-IX. Ανάλογα σημεία σύνδεσης ανευρίσκονται στο σύμπλεγμα GrIIb-IIIa καθώς επίσης και στον FVIII. Από το σύνολο των εν λόγω σημείων σύνδεσης γίνεται φανερό ότι ο παράγοντας vW συνδέεται με τα συμπλέγματα GrIb-IX και GrIIb-IIIa. Η διαφορά μεταξύ της σύνδεσης του παράγοντα vW με το πρώτο σύμπλεγμα, σε σύγκριση με το δεύτερο σύμπλεγμα έγκειται ότι στο μεν πρώτο (σύνδεση με το GrIb-IX) το απαραίτητο στοιχείο είναι το κολλαγόνο, ενώ στην σύνδεση με το GrIIb-IIIa, είναι απαραίτητη η ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων από την θρομβίνη. Η θέση των σημείων σύνδεσης του συμπλέγματος GrIb-IX βρίσκεται στο αμινοτελικό άκρο του παράγοντα vW, ενώ η θέση των σημείων σύνδεσης του συμπλέγματος GrIIb-IIIa βρίσκεται στο καρβοξυτελικό άκρο αυτού. Επίσης η σύνδεση με το κολλαγόνο γίνεται σε σημεία που ευρίσκονται στο κέντρο του μακρομορίου του παράγοντα vW. Η διαφορετική αυτή τοπογραφία των σημείων σύνδεσης ερμηνεύει και το γεγονός της σύνδεσης του παράγοντα vW με ένα ή περισσότερα αιμοπετάλια (φαινόμενο γνωστό και ως γωνιακή σύνδεση).

Ο vWF δρα λοιπόν ως μια γέφυρα προσκόλλησης ανάμεσα στα αιμοπετάλια και το τοίχωμα των αγγείων με την μεσολάβηση ειδικών υποδοχέων. Η φύση των εν λόγω υποδοχέων έχει ταυτοποιηθεί ως τριπεπτίδιο RGD ή πολυπεπτίδιο του τύπου SP, RGD, SQS. Ο παράγοντας vW συνδέεται στην υπενδοθηλιακή στοιβάδα με καθαρό κολλαγόνο τύπου III ή τύπου I, καθώς και με την μεμβράνη των αιμοπεταλίων. Στην λειτουργία αυτή μεσολαβεί η παρουσία ενός αντιβιοτικού, που ονομάζεται *ριστοσετίνη*. Παρουσία της *ριστοσετίνης* ο παράγοντας vW προσδένεται στο σύμπλεγμα GrIb-IX της αιμοπεταλιακής μεμβράνης, ενώ με την παρουσία φυσιολογικών αγωνιστών, (όπως η θρομβίνη, το ADP και το κολλαγόνο) ο vWF προσδένεται στο σύμπλεγμα GrIIb-IIIa. Στο συμπέρασμα αυτό οδήγησαν μελέτες με την χρησιμοποίηση μονοκλωνικών αντισωμάτων κατά των εν λόγω γλυκοπρωτεϊνών και αιμοπεταλίων προερχομένων από ανθρώπους με σύνδρομο Bernard-Soulier ή πάσχοντες από θρομβοασθένεια Glanzmann.

***Ο παράγοντας vW ως τελεστής της αλληλεπίδρασης αγγειακού τοιχώματος και αιμοπεταλίων. Η λειτουργική όψη της δομής αυτού***

Από την μοριακή μελέτη του παράγοντα vW προέκυψε το συμπέρασμα ότι το εν λόγω μακρομόριο εμφανίζει τόσο ευρεία γκάμα αλληλεπιδράσεων εξ αιτίας της δομικής του κατασκευής, καθόσον επάνω στα επί μέρους τμήματά του είναι ενσωματωμένες διάφορες περιοχές ικανές να αντιδράσουν με μια πληθώρα μορίων σχετιζόμενων με το συνολικό σύστημα της αιμόστασης. Τα μόρια αυτά δεν είναι μόνον στοιχεία της βασικής μεμβράνης του αγγειακού ενδοθηλίου ή του αιματικού πλάσματος, αλλά είναι ενσωματωμένα επίσης στις κυτταρικές μεμβράνες των αιμοπεταλίων. Ίσως θα έπρεπε να αντιμετωπίσουμε τον παράγοντα vW ως ένα μόριο – οργανωτή, δηλαδή ως μια κρίσιμης σημασίας πρωτεΐνη πάνω στην οποία ταυτοχρόνως θα μπορούσαν να διαδραματιστούν πολλά από τα γεγονότα τα οποία «συντονίζουν» τον «βηματισμό» των φαινομένων της πήξης. Η έννοια αυτή υποδηλώνει ότι στην εξέλιξη του μηχανισμού της αιμόστασης κάποια στιγμή επιλέχτηκε θετικά το μόριο αυτό (στην τότε μορφή του) προκειμένου να οργανώσει στον χώρο και στον χρόνο αυτά τα περίπλοκα φαινόμενα της αιμόστασης, που συναποτελούν μια υποδειγματική περίπτωση δημιουργίας τάξης. Αν τα αιμοπετάλια και τα μόρια του συστήματος πήξης δεν καθηλωθούν στην συγκεκριμένη περιοχή του αγγειακού τραύματος, τότε αναγκαστικά θα διασκορπιστούν από την κυκλοφορία και ο στόχος της λειτουργίας τους δεν θα επιτευχθεί οπότε η αιμορραγία θα συνεχίσει την καταστροφική της δράση. Φαίνεται λοιπόν ότι ο παράγοντας vW αποτέλεσε και αποτελεί έναν ισχυρό οργανωτή της διαδικασίας της πήξης εξ αιτίας της πολυδύναμης δομικής του κατασκευής. Η εντόπιση των πολλών ρόλων του εν λόγω μακρομορίου έγινε δυνατή με την χρήση πρωτεολυτικών ενζύμων τα οποία μπορούσαν να κόψουν τον παράγοντα vW σε διάφορα σημεία, οπότε μπορούσε κατόπιν να μελετηθεί η συνεισφορά του κάθε τμήματος του μακρομορίου στο σύστημα της πήξης. Κατ' αρχάς με την χρήση της πρωτεάσης Staph – V8, η οποία είναι μια πολύ εκλεκτική ενδοπεπτιδάση που υδρολύει τον πεπτιδικό δεσμό Glu(1365) – Glu(1366), έγινε μια θραύση του μορίου σε δύο άνισου μήκους τμήματα. Σημειωτέον ότι τα αμινοξέα 1365 και 1366 του εν λόγω δεσμού είναι τοποθετημένα προς το αμινοτελικό άκρο της πρωτεΐνης. Τα προκύψαντα δύο τμήματα του παράγοντα vW, δηλαδή το τμήμα III (που περιλαμβάνει το αμινοτελικό άκρο) και το τμήμα II, είναι συμπληρωματικά ως προς την λειτουργικότητά τους. Το τμήμα III έχει μοριακό βάρος 320 kDa ενώ το τμήμα II (που περιλαμβάνει το καρβοξυτελικό άκρο) έχει μοριακό βάρος 220 kDa. Μια περαιτέρω βραδεία θραύση του τμήματος III στο επίπεδο του δεσμού Glu(910)-

Gly(911) απελευθέρωσε το τμήμα I με μοριακό βάρος 44 kDa, το οποίο αποτελεί και το κεντρικό τμήμα του vWF.

Η επιστάμενη μελέτη των ιδιοτήτων των επί μέρους τμημάτων του παράγοντα vW, έδειξε ότι το τμήμα III (αμινοτελικό άκρο του vWF) προσφύεται στο σύμπλεγμα GrIb – IX και στο κολλαγόνο και λειτουργεί καταλύοντας την προσκόλληση των αιμοπεταλίων στο κολλαγόνο. Από την άλλη πλευρά το τμήμα II (καρβοξυτελικό άκρο του vWF) προσφύεται στο σύμπλεγμα GrIIb – IIIa και όχι στο κολλαγόνο ή στην GrIb, ενώ δεν υπεισέρχεται στις αντιδράσεις αιμοπεταλίων και κολλαγόνου. Ωστόσο η μεγάλη σημασία του τμήματος III έγκειται στην ανακάλυψη ότι σε αυτό περιέχεται η τριπεπτιδική ακολουθία *RGD*. Η ακολουθία αυτή απαντάται επίσης και στην περιοχή (domain) σύνδεσης του συμπλέγματος GrIIb – IIIa με την φιβρονεκτίνη και το ινωδογόνο.

Από τα ανωτέρω, όπως επίσης και από μια πληθώρα άλλων παρατηρήσεων, προκύπτουν τα εξής συμπεράσματα για τον ρόλο του παράγοντα vW στα αιμοπετάλια: 1) Κάτω από συνθήκες υψηλής διατμητικής δύναμης ο vWF συμμετέχει αποφασιστικά στην προσκόλληση των αιμοπεταλίων στην απογυμνωθείσα από ενδοθηλιακά κύτταρα υπενδοθηλιακή στοιβάδα, όπως επίσης και στο κολλαγόνο. Ακόμη συμμετέχει στην σύνδεση αιμοπεταλίων με αιμοπετάλια, φαινόμενο το οποίο είναι απολύτως αναγκαίο για τον σχηματισμό του θρόμβου.

2) Το σύμπλεγμα GrIb – IX της αιμοπεταλιακής μεμβράνης είναι απαραίτητο για την προσκόλληση των αιμοπεταλίων στους υπενδοθηλιακούς ιστούς του κομμένου αγγείου, καθόσον αποτελεί σημείο πρόσδεσης του vWF. Έτσι μελέτες στις οποίες χρησιμοποιήθηκαν αιμοπετάλια ασθενών με το σύνδρομο Bernard – Soulier, στα οποία το σύμπλεγμα GrIb – IX δεν είναι λειτουργικό, έδειξαν ότι τα αιμοπετάλια αυτά εμφανίζουν ελάχιστη προσκόλληση στον υπενδοθηλιακό ιστό, ενώ ακόμη και υπό την παρουσία της ριστοσετίνης δεν συνδέουν τον παράγοντα vW. Επίσης σε φυσιολογικά αιμοπετάλια τα οποία επώάζονται με μονοκλωνικά αντισώματα εναντίον της GrIb, αναστέλλεται η προσκόλληση των αιμοπεταλίων, όπως επίσης και η σύνδεση του vWF με το σύμπλεγμα GrIb – IX.

3) Η προσκόλληση των αιμοπεταλίων αναστέλλεται ισχυρά σε συνθήκες υψηλής διατμητικής δύναμης που αντιστοιχούν σε πολύ μεγάλη ταχύτητα αιματικής ροής (>1300 cm/sec), καθόσον σε αυτές τις περιπτώσεις ακόμη και αν αρχικά τα αιμοπετάλια προσκολληθούν, θα ξεκολλήσουν από τα χείλη της αγγειακής τομής εξ αιτίας της δύναμης με την οποία προσκρούουν επάνω τους τα ερυθρά αιμοσφαίρια. Στις αντίξοες

αυτές συνθήκες τα αιμοπετάλια μπορούν να προσκολληθούν μόνον αν οι ποσότητες του vWF είναι αρκούντως υψηλές, ενώ η παρουσία της φιβρονεκτίνης δεν είναι αποτελεσματική για την αιμοπεταλιακή προσκόλληση. Υπενθυμίζουμε ότι οι συνθήκες αυτής της πολύ ταχείας αιματικής ροής λαμβάνουν χώρα μόνο στα μικρά αγγεία, ενώ στα μεγάλα αγγεία η ταχύτητα ροής του αίματος είναι αρκετά μικρότερη.

- 4) Το σύμπλεγμα των πρωτεϊνών GrIIb – IIIa είναι πολύ σημαντικό για την προσκόλληση των αιμοπεταλίων και για την συσσώρευσή τους. Επώαση φυσιολογικών αιμοπεταλίων με μονοκλωνικά αντισώματα κατά της GrIIb – IIIa, αναστέλλουν την πρόσφυση του vWF στην GrIIb – IIIa, ελαττώνουν την προσκόλληση των αιμοπεταλίων στο κολλαγόνο και μειώνουν τις διαστάσεις των θρόμβων. Ακόμη, η επώαση των αιμοπεταλίων με συνθετικά πεπτίδια, τα οποία αντιστοιχούν στην αλληλουχία αμινοξέων της  $\gamma$  – αλυσίδας του ινωδογόνου ή περιέχουν την αλληλουχία RGD (κοινή στο ινωδογόνο, την φιβρονεκτίνη και στον vWF), αναστέλλουν την δέσμευση των τριών εν λόγω μορίων προσκόλλησης στο σύμπλεγμα GrIIb – IIIa.
- 5) Σε *in vitro* πειράματα, κατά κανόνα, δεν πραγματοποιείται η σύνδεση του vWF στο σύμπλεγμα GrIIb – IIIa χωρίς την παρουσία φυσιολογικών συγκεντρώσεων ινωδογόνου. *In vivo* η σχετική ικανότητα δέσμευσης των τριών προσκολλητικών πρωτεϊνών είναι άγνωστη. Σε *in vitro* πειράματα, ωστόσο, έχει δειχθεί ότι η προϋπάρχουσα σύνδεση του vWF στην GrIIb – IIIa μπορεί να προκαλέσει αιμοπεταλιακή συσσώρευση, ακόμη και στην περίπτωση μεγάλης έλλειψης ινωδογόνου.

Ως συμπέρασμα λοιπόν μπορεί να τεθεί ότι για την άριστη αλληλεπίδραση μεταξύ των αιμοπεταλίων, του vWF και της υπενδοθηλιακής στοιβάδας σε συνθήκες υψηλής διατμητικής δύναμης, απαιτούνται δύο υποδοχείς της μεμβράνης των αιμοπεταλίων ( η GrIb – IX και η GrIIb – IIIa), καθώς και τρεις λειτουργικές περιοχές του vWF.

### **Θρομβοσπονδίνη (Thrombospondin, ή TSP)**

Η θρομβοσπονδίνη (TSP) είναι μια ενδοαιμοπεταλιακή πρωτεΐνη η οποία εκκρίνεται από τα σωματίδια – α των αιμοπεταλίων κατά την αντίδραση έκλυσης. Είναι μια πολυλειτουργική γλυκοπρωτεΐνη η οποία ανήκει στα μόρια προσκόλλησης και έχει μοριακό βάρος 450 kDa. Η πρώτη περιγραφή της έγινε το 1971 από τον Baenziger, ως προϊόν έκκρισης αιμοπεταλίων διεγερμένων με θρομβίνη, ενώ δείχτηκε επίσης ότι εκφράζεται και στην επιφάνειά τους. Αν και η ποσότητά της στο πλάσμα του αίματος είναι



πολύ μικρή (>20 ng/ml), εν τούτοις μια σειρά από εργασίες έδειξαν ότι η διανομή τους στους ιστούς είναι αξιόλογη, αφού π.χ στα αιμοπετάλια αντιπροσωπεύει το 3% του συνόλου των πρωτεϊνών τους. Η TSP όμως συντίθεται επίσης στα ενδοθηλιακά κύτταρα, στις λείες μυικές ίνες, στους ινοβλάστες, στα κύτταρα του πνευμονικού παρεγχύματος, στα νευρογλοιακά κύτταρα, στα μονοκύτταρα φαγοκύτταρα και σε διάφορα καρκινικά κύτταρα.

Από την δομική πλευρά η εν λόγω γλυκοπρωτεΐνη αποτελείται από τρία ταυτόσημα πεπτιδία τα οποία είναι συνδεδεμένα μεταξύ τους με δισουλφιδικούς δεσμούς. Το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο έδειξε ότι η θρομβοσπονδίνη διαιρείται σε πολλές περιοχές δομικά διακριτές.

Κάθε μονομερές γλυκοπολυπεπτιδίου της TSP έχει μοριακό βάρος 150 kDa και παρουσιάζει ομοιογένειες με διάφορες πρωτεΐνες, όπως την καλμοντουλίνη, την προπερδίνη, το προκολλαγόνο, την φιβρονεκτίνη, τον παράγοντα vW και μια πρωτεΐνη του πλασμοδίου της ελονοσίας. Μέσω της τεχνικής του cDNA έγινε κατορθωτή η αποσαφήνιση της πρωτοταγούς ακολουθίας και των διακριτών περιοχών (domains) της TSP. Ξεκινώντας από το αμινοτελικό της άκρο η διαδοχή των περιοχών αυτών έχει ως εξής: πρώτη είναι η περιοχή σύνδεσης με την ηπαρίνη, κατόπιν έπεται ο δισουλφιδικός δεσμός που μεσολαβεί στην σύνδεση των τριών μονομερών του μορίου, εν συνεχεία απαντάται μια περιοχή ομόλογη του προκολλαγόνου, την οποία ακολουθούν τρεις επαναλαμβανόμενες περιοχές ομόλογες με την προπερδίνη και τρεις επίσης επαναλαμβανόμενες περιοχές EGF. Η περιοχή σύνδεσης του ιονισμένου ασβεστίου και η περιοχή σύνδεσης κυττάρων ευρίσκονται στο καρβοξυτελικό άκρο εκάστου μονομερούς της TSP.

Από την δομική πλευρά η TSP αποτελεί το μείζον συστατικό της εξωκυττάριας μήτρας και η παρουσία της έχει ανιχνευτεί στην βασική μεμβράνη του τοιχώματος των αγγείων, όπως επίσης στον συνδετικό ιστό των αδένων. Η θρομβοσπονδίνη ενσωματώνεται στην εξωκυττάρια μήτρα των ιστικών καλλιιεργειών ινοβλαστών, λείων μυικών κυττάρων και ενδοθηλιακών κυττάρων. Τα κύτταρα του μεσεγχύματος συνθέτουν μεγαλύτερες ποσότητες θρομβοσπονδίνης όταν ευρίσκονται σε φάση πολλαπλασιασμού. Τα κύτταρα των αγγείων που εμφανίζουν αρτηριοσκληρωτικές αλλοιώσεις παράγουν εμφανώς μεγαλύτερες ποσότητες από τα κύτταρα των φυσιολογικών αγγείων, φαινόμενο που υπογραμμίζει τον δυναμικό ρόλο που παίζει η πρωτεΐνη αυτή στην αντίδραση των πολλαπλασιαζόμενων κυττάρων με την εξωκυττάρια μήτρα. Ο Παράγοντας Αύξησης

Αιμοπεταλιακής Προέλευσης (PDGF) προκαλεί την σύνδεση της θρομβοσπονδίνης στα νευρογλοιακά κύτταρα και στις λείες μυικές ίνες.

Η TSP είναι μια λεκτίνη, η οποία παίζει σπουδαίο ρόλο στην διάρκεια της αιμοπεταλιακής συσσώρευσης καθώς σταθεροποιεί τους δεσμούς του ινωδογόνου προς την ενεργοποιημένη μεμβράνη των αιμοπεταλίων, μεσολαβεί στην πρόσδεση των αιμοπεταλίων στα μακροφάγα, σχηματίζοντας μια μακρομοριακή γέφυρα ανάμεσα στα ενεργοποιημένα αιμοπετάλια και στα μακροφάγα μονοκύτταρα.

Εκτός από την σύνδεσή της με τα αιμοπετάλια, η TSP σχηματίζει μακρομοριακά συμπλέγματα με το ινωδογόνο, το πλασμινογόνο, την φιβρονεκτίνη, την πλούσια σε ιστιδίνη γλυκοπρωτεΐνη, την ηπαρίνη, την θρομβίνη, το κολλαγόνο τύπου V, ενώ ενσωματώνεται στο δίκτυο της ινικής και μεταβάλλει την δομή του σχηματισμένου θρόμβου.

Η TSP ως μόριο προσκόλλησης παίζει σημαντικό ρόλο στην διαμόρφωση και τροποποίηση των διακυτταρικών σχέσεων. Η TSP ελέγχει τις αντιδράσεις κυττάρου προς κύτταρο και κυττάρου προς εξωκυττάρια μήτρα (θεμέλια ουσία), προσφέροντας ένα καθαρό δίκτυο πάνω στο οποίο υφαίνεται η κυτταρική προσκόλληση, η συσσώρευση και η μετανάστευση. Οι αντιδράσεις των γλυκοπρωτεϊνών προσκόλλησης είναι αποφασιστικές για την εξέλιξη φαινομένων όπως η φυσιολογική αιμόσταση των ενήλικων οργανισμών, όπως επίσης και για τον προσδιορισμό της μεταστατικής συμπεριφοράς πολλών καρκίνων.

Η TSP, το ινωδογόνο, ο παράγοντας vW και η φιβρονεκτίνη είναι πρωτεΐνες που απελευθερώνονται στο εξωκυττάριο περιβάλλον από την αντίδραση έκλυσης των αιμοπεταλιακών κοκκίων. Οι πρωτεΐνες αυτές συνδέονται από κοινού στην επιφάνεια της μεμβράνης των αιμοπεταλίων και συμβάλλουν στην μη αναστρέψιμη φάση της συσσώρευσης, χωρίς ακόμη να είναι απολύτως καθαρή η εικόνα του κατά πως συντελείται αυτό το φαινόμενο.

Η TSP, ο vWF και η φιβρονεκτίνη (Fn) έχουν την ιδιότητα να συνδέονται με το σύμπλεγμα της γλυκοπρωτεΐνης GrIIb-IIIa σε μια της περιοχής η οποία εμφανίζει ένα χαρακτηριστικό τετραπεπίδιο (RGDS), αποτελούμενο από αργινίνη, γλυκίνη, ασπαραγίνη και σερίνη. Το τετραπεπίδιο αυτό αποτελεί μια δομή η οποία αντιπροσωπεύει την περιοχή σύνδεσης των ανωτέρω μορίων προσκόλλησης (vWF, TSP, Fn) στα αιμοπετάλια (αλλά και σε άλλους τύπους κυττάρων), επί του γλυκοπρωτεϊνικού συμπλέγματος GrIIb-IIIa.

Πρέπει να σημειωθεί ότι το γλυκοπρωτεϊνικό σύμπλεγμα GrIIb–IIIa ευρίσκεται μεν στα αιμοπετάλια, αλλά απαντάται επίσης και σε άλλους τύπους κυττάρων, όπως στους ινοβλάστες, στα λεία μυϊκά κύτταρα καθώς και στα ενδοθηλιακά κύτταρα.

Η θρομβοσπονδίνη είναι ένα μόριο αποφασιστικής σημασίας τόσο για την έναρξη της συσσώρευσης, όσο και για την πραγματοποίηση και σταθεροποίηση της μη αναστρέψιμης συσσώρευσης. Με άλλα λόγια η παρουσία της θρομβοσπονδίνης από την μια πλευρά λειτουργεί σαν πυροδότης της συσσώρευσης και από την άλλη σαν παράγοντας που την σταθεροποιεί προς την μη αναστρεψιμότητα, πράγμα που είναι πολύ σημαντικό για την δημιουργία ενός ισχυρού αιμοστατικού θρόμβου. Συνεπώς η ισχύς της σύνδεσής της επί του αιμοπεταλίου πρέπει να είναι μεγάλη. Από τα δεδομένα των διαφόρων μελετών προκύπτουν, μεταξύ των άλλων και τα εξής:

1<sup>ov</sup>) Η θρομβοσπονδίνη δεσμεύεται, μέχρι κορεσμού, επί της μεμβράνης αιμοπεταλίων ενεργοποιημένων με θρομβίνη με μηχανισμό εξαρτώμενο από τα ιόντα του ασβεστίου.

2<sup>ov</sup>) Η ισχύς της σύνδεσης της εμφανίζει σταθερά  $K_d = 250 \text{ nM}$  και η δέσμευσή της πραγματοποιείται επί 35.000 σημείων σύνδεσης ανά αιμοπετάλιο.

3<sup>ov</sup>) Η θρομβοσπονδίνη δεσμεύεται, επιπροσθέτως, σε έναν μικρό αριθμό σημείων σύνδεσης στα *ήρεμα αιμοπετάλια*, με δεσμούς εξαιρετικά υψηλής χημικής συγγένειας και με μηχανισμό *μη εξαρτώμενο από το ιονισμένο ασβέστιο*, πράγμα το οποίο δεν λαμβάνει χώρα για την σύνδεση του ινωδογόνου και του παράγοντα vW.

4<sup>ov</sup>) Η θρομβοσπονδίνη συνδέεται ταυτοχρόνως τόσο με την GrIIb–IIIa της ενεργοποιημένης αιμοπεταλιακής μεμβράνης, όσο και με το ινωδογόνο. Αυτό σημαίνει ότι στην διαδικασία της συσσώρευσης λαμβάνει μέρος ως σύμπλεγμα μακρομορίων και όχι ως ένα ξεχωριστό μακρομόριο.

5<sup>ov</sup>) Τα σημεία σύνδεσης της θρομβοσπονδίνης και του ινωδογόνου είναι διαφορετικά από εκείνα που συνδέουν την θρομβοσπονδίνη με το γλυκοπρωτεϊνικό σύμπλεγμα GrIIb–IIIa.

Το γεγονός ότι η θρομβοσπονδίνη συνδέεται ταυτόχρονα με το ινωδογόνο και με την επιφάνεια του ενεργοποιημένου αιμοπεταλίου, σε συγκεκριμένο τμήμα της περιοχής της GrIIb–IIIa, υποδεικνύει ότι η θρομβοσπονδίνη παίζει έναν θεμελιώδη ρόλο στην όλη εξέλιξη της αιμοπεταλιακής συσσώρευσης. Όπως ήδη από πολύ καιρό γνωρίζουμε, η αιμοπεταλιακή συσσώρευση είναι ένα πολύπλοκο και πολυεπίπεδο φαινόμενο πολύ αυστηρά προγραμματισμένο και πολλαπλώς προστατευμένο από μια πλειάδα

συγκεκριμένων μορίων υψηλής εξειδίκευσης, ώστε να μην περιπίπτει σε αστοχία, δηλαδή σε αποτυχία της αιμόστασης. Η συσσώρευση των αιμοπεταλίων ξεκινά με την αποκάλυψη των υποδοχέων της γλυκοπρωτεΐνης GpIIb–IIIa και την σύνδεσή τους με το ινωδογόνο. Εν συνεχεία το σύμπλεγμα «αιμοπετάλιο (GpIIb – IIIa) – θρομβοσπονδίνη – ινωδογόνο», συμμετέχει στην πραγματοποίηση της μη – αναστρέψιμης μακροσυσσώρευσης, η οποία αποτελεί την συνέχεια και την εξέλιξη της αρχικώς αναστρέψιμης μικροσυσσώρευσης.

Η γλυκοπρωτεΐνη GpIIb–IIIa, η γλυκοπρωτεΐνη GpIV, το ινωδογόνο και η θρομβοσπονδίνη καθίστανται εμφανείς επάνω στην επιφάνεια της μεμβράνης των αιμοπεταλίων κατά την διάρκεια της ενεργοποίησής τους. Η αύξηση της κινητικότητας της μεμβράνης και του κυτταροσκελετού, που ακολουθεί την ενεργοποίηση του αιμοπεταλίου αναγκάζει τις γλυκοπρωτεΐνες, που είναι βυθισμένες μέσα στην μεμβράνη και εν μέρει, στο κυτταρόπλασμα, να αναδυθούν αποκαλύπτοντας και άλλα σημεία σύνδεσης για μόρια προσκόλλησης, τόσο του αιματικού πλάσματος, όσο των κυττάρων ή της θεμέλιας ουσίας. Καθώς η ενεργοποίηση οδηγεί στην αντίδραση έκλυσης του περιεχομένου των κοκκίων, όλο και περισσότερες πρωτεΐνες προσκόλλησης (TSP, vWF, Fn, ινωδογόνο κ.α) εξέρχονται από το αιμοπετάλιο και συνδέονται τόσο με το ίδιο αιμοπετάλιο, όσο και με άλλα προσκολλητικά μόρια του πλάσματος, των παρακειμένων αιμοπεταλίων, του υπενδοθηλίου και άλλων κυττάρων που ευρίσκονται στο μικροπεριβάλλον της αγγειακής βλάβης. Το ινωδογόνο δεσμεύεται στον υποδοχέα και με το γεγονός αυτό εισάγεται η φάση της αντιστρεπτής συσσώρευσης. Κατόπιν ακολουθεί η απελευθέρωση της θρομβοσπονδίνης που συνδέεται με την γλυκοπρωτεΐνη GpIV, η οποία, με την σειρά της, γεφυρώνεται με το ινωδογόνο, συνδεδεμένη με αυτό σε μια μοριακή του περιοχή διαφορετική από εκείνη με την οποία έχει ήδη συνενωθεί με την γλυκοπρωτεΐνη GpIIb–IIIa και που ευρίσκεται σε άλλο σημείο του μακρομορίου αυτού. Αυτό το σχήμα σύνδεσης μας ερμηνεύει με γλαφυρό τρόπο την αναγκαιότητα των εξειδικευμένων σημείων σύνδεσης για διαφορετικά μακρομόρια και τον διαφορετικό τους γεωγραφικό εντοπισμό πάνω στην πολυπεπτιδική αλυσίδα του συμπλέγματος της GpIIb–IIIa. Αυτή, όμως, η εξειδικευμένη τοπογραφική κατανομή σημείων σύνδεσης για διαφορετικά μόρια, είναι γενικεύσιμη για όλα τα μόρια προσκόλλησης, αποτελώντας τον κανόνα, η εφαρμογή του οποίου οδηγεί στην δημιουργία μακρομοριακών ικριωμάτων υψηλής τάξης. Επιστρέφοντας στην λειτουργία της θρομβοσπονδίνης, κατανοούμε ότι με την παρέμβασή της το μόριο του ινωδογόνου στερεώνεται ισχυρότερα επί της γλυκοπρωτεΐνης GpIIb–IIIa,

οπότε η θραύση των γεφυρών διαδοχικών μακρομορίων που σχηματίζονται μεταξύ δύο σημείων εξωτερικών μεμβρανών δύο αιμοπεταλίων (ή άλλων κυττάρων) γίνεται δυσχερέστερη. Έτσι λοιπόν γίνεται κατανοητό το γιατί η πρόσδεση του ινωδογόνου επί της μεμβρανικής γλυκοπρωτεΐνης GrIIb–IIIa εμφανίζει μικρότερη δύναμη συνοχής και συνεπώς τα αιμοπετάλια που έχουν συνενωθεί μεταξύ τους με τέτοιους δεσμούς μπορούν εύκολα να αποχωριστούν, δίνοντας έτσι την κλινική εικόνα της αντιστρεπτής συσσώρευσης. Αντιθέτως, η είσοδος της θρομβοσπονδίνης στην συσσωρευτική διαδικασία, ταυτοχρόνως με την κλιμάκωση της αντίδρασης έκλυσης των κοκκίων, οδηγεί, όπως περιγράψαμε, στην έτι και έτι ισχυροποίηση των μακρομοριακών γεφυρών μεταξύ των ήδη συγκολλημένων αντιστρεπτά αιμοπεταλίων. Έτσι, καθώς όλο και περισσότερα σημεία σύνδεσης μεταξύ των συγκολλημένων αιμοπεταλίων ισχυροποιούνται μέσω της παρέμβασης της θρομβοσπονδίνης, τόσο περισσότερο η αντιστρεπτή συσσώρευση ισχυροποιείται και μεταβάλλεται, εν τέλει, σε μη αντιστρεπτή. Το μοντέλο αυτό συνδέθηκε με την παρατήρηση ότι η θρομβοσπονδίνη συνδέεται με φυσιολογικό τρόπο στα θρομβασθενικά αιμοπετάλια, από τα οποία λείπει το γλυκοπρωτεϊνικό σύμπλεγμα GrIIb–IIIa, γεγονός που επιβεβαιώθηκε από την παρατήρηση ότι η θρομβοσπονδίνη δεσμεύεται σε μια περιοχή του μορίου του ινωδογόνου ανεξάρτητη από εκείνην με την οποία το ινωδογόνο δεσμεύει την GrIIb–IIIa. Το εν λόγω μοντέλο είναι, φυσικά σε θέση να συμπεριλάβει επίσης την ενσωμάτωση και άλλων μορίων προσκόλλησης που εξέρχονται με την αντίδραση έκλυσης από τα α-σωμάτια. Συνεπώς μέσω του μοντέλου αυτού μπορούμε να διερευνήσουμε τον ρόλο που παίζουν σε διαφορετικές στιγμές και υπό διαφορετικές συνθήκες η φιβρονεκτίνη (Fn), ο vWF και ο PF<sub>4</sub> .

### ***H πλούσια σε ιστιδίνη γλυκοπρωτεΐνη (Histidin rich glycoprotein, HRGP)***

Το μακρομόριο αυτό είναι μια α<sub>2</sub>-γλυκοπρωτεΐνη πλούσια σε ιστιδίνη, προλίνη και γλυκίνη, με ομόλογες ακολουθίες στην δομή της, ίδιες με τις αντίστοιχες της AT – III και του MMB κινινογόνου. Το εν λόγω γλυκοπρωτεϊνικό μακρομόριο απαντάται στα μεγακαρυοκύτταρα, στα αιμοπετάλια και στα μακροφάγα. Επίσης απαντάται στο πλάσμα του αίματος με μια μορφή μοριακού βάρους 67 kDa. . Στα α-σωμάτια (α-κοκκία) των αιμοπεταλίων αποτελεί το 0,05% των ουσιών που αυτά περιέχουν. Η Πλούσια σε Ιστιδίνη Γλυκοπρωτεΐνη των αιμοπεταλιακών α – κοκκίων έχει μοριακό βάρος 79 kDa και ο χρόνος ημιζωής της είναι προσεγγιστικά ίσος προς 3 ημέρες (2,93 ημέρες).

Η HRGP κατά την διάρκεια της αιμοπεταλιακής ενεργοποίησης συνδέεται σε ειδικά σημεία της κυτταρικής μεμβράνης, όπου και ασκεί τις ποικίλες επιδράσεις της που επιγραμματικά είναι οι εξής:

- 1<sup>ov</sup>) Ενώνεται με την ηπαρίνη της οποίας εξουδετερώνει.
- 2<sup>ov</sup>) Ενώνεται με το πλασμινογόνο, εμποδίζοντας την υδρόλυσή του προς παραγωγή πλασμίνης.
- 3<sup>ov</sup>) Ενώνεται με την θρομβοσπονδίνη με την οποία σχηματίζει διμερή.
- 4<sup>ov</sup>) Ενώνεται με την θρομβοσπονδίνη και το πλασμινογόνο σχηματίζοντας τριμερή.
- 5<sup>ov</sup>) Ενώνεται με τον συμπαράγοντα II της ηπαρίνης τον οποίον επίσης εξουδετερώνει.
- 6<sup>ov</sup>) Ενώνεται με το ινωδογόνο, όπως επίσης και με τα δισθενή ιόντα.

Από την ανωτέρω περιληπτική αναφορά των δράσεών της προκύπτει ότι η αύξηση των συγκεντρώσεων της HRGP αναστέλλει την ινωδόλυση και τους ανασταλτές της πήξης, ενώ παρεμβαίνει στις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των κυττάρων ή μεταξύ κυττάρων και βασικής τους μεμβράνης. Παρεμβαίνει ακόμη στις ανοσολογικές απαντήσεις των κυττάρων. Φαίνεται ότι τα αιμοπετάλια και τα μακροφάγα σχετίζονται με την απελευθέρωση της HRGP τοπικά στην περιοχή της μικροαγγειακής βλάβης και συνεπώς η εν λόγω πρωτεΐνη παρεμβαίνει τουλάχιστον στα πολύ αρχικά στάδια της πολυκυτταρικής φλεγμονώδους απάντησης.

Η HRGP αντιδρά με την περιοχή υψηλής χημικής συγγένειας του πλασμινογόνου συνδεόμενη σε υπολείμματα λυσίνης με συνέπεια την μείωση της συνάφειας της ινικής με το πλασμινογόνο. Συνεπώς η HRGP αντιπροσωπεύει έναν φυσιολογικό αγωνιστή της αντινωδολυτικής δράσης του ε-αμινοκαπρωϊκού οξέος. Επίσης η HRGP συνδεόμενη με την ηπαρίνη παίζει έναν ρόλο μείωσης ή, εν γένει, τροποποίησης της αντιπολλαπλασιαστικής δράσης της ηπαρίνης στα λεία μυϊκά κύτταρα των αγγείων.

Συνεπώς, η HRGP αλλοιώνοντας την αντιπολλαπλασιαστική δράση της ηπαρίνης, τροποποιεί τον πολλαπλασιασμό των λείων μυϊκών ινών των αγγείων προς την πλευρά της αύξησής του και συνεπώς, ευνοεί την αθηρογένεση, μέσω αναστολής των ηπαρινοειδών που προέρχονται από τα ενδοθηλιακά κύτταρα.

Τα επίπεδα των πρωτεϊνών που απελευθερώνονται από τα α-κοκκία (ή σωμάτια) των αιμοπεταλίων, είναι σαφώς μειωμένα στο λεγόμενο σύνδρομο των «κενών αποθηκών» ή

Gray Platelet Syndrome, φθάνοντας μόνο το 5 έως 10% του επιπέδου των πρωτεϊνών των φυσιολογικών αιμοπεταλιακών α-κοκκίων. Πρόκειται για ένα σύνδρομο στο οποίο τα αιμοπετάλια είναι μεγάλα και χαρακτηριστικώς φτωχά σε κυτταροπλασματικά κοκκία. Οι ελαττωμένες πρωτεΐνες είναι οι εξής: β-TG, PF4, PDGF, TSP, HRGP, FI, Fn, vWF, vWFag. Τα αιμοπετάλια των φορέων του Gray Platelet Syndrome παρουσιάζουν πολύ χαμηλή συσσώρευση με την θρομβίνη, την επινεφρίνη και το κολλαγόνο, ενώ από κλινική άποψη εμφανίζουν αιμορραγικές εκδηλώσεις από την στιγμή της γένεσής τους και κατόπιν.

Τα επίπεδα αυτών των πρωτεϊνών έχουν βρεθεί αυξημένα στην στεφανιαία νόσο, στο έμφραγμα, στον διαβήτη, στην αγγειοπάθεια του εγκεφάλου, στις φλεβικές θρομβώσεις, στην διάχυτη ενδαγγειακή πήξη και στον καρκίνο. Η β – είναι επίσης αυξημένη και στην χρόνια νεφρική ανεπάρκεια.

#### ***Ενδοαιμοπεταλιακές Αποθήκες Ουσιών και Διαμερισματοποίηση αυτών***

Τα αιμοπετάλια περιέχουν μια σειρά ουσιών οι οποίες χρησιμοποιούνται τόσο στην λειτουργία που επιτελούν ως κύτταρα, δηλαδή στην πήξη του αίματος, όσο και στην λειτουργία τους ως ζωντανών συστημάτων. Εκτός από τις πρωτεΐνες των κοκκίων που ήδη αναφέραμε, τα αιμοπετάλια μεταφέρουν και άλλες πρωτεΐνες, όπως το ινωδογόνο και τους παράγοντες V, VIII, XI και XII της πήξης. Επίσης μεταφέρουν βιογενείς αμίνες και συγκεκριμένα σεροτονίνη, κατεχολαμίνες και ισταμίνη σε υψηλές ποσότητες ώστε η ενδοαιμοπεταλιακή τους συγκέντρωση να υπερβαίνει τουλάχιστον κατά 125 φορές την αντίστοιχη συγκέντρωση των εν λόγω ουσιών στο αιματικό πλάσμα. Οι ουσίες αυτές προσλαμβάνονται από το πλάσμα του αίματος και μεταφέρονται στα αντίστοιχα αιμοπεταλιακά ντεπόζιτα με ενεργό μεταφορά. Τέλος τα αιμοπετάλια μεταφέρουν υδροκορτιζόνη, όπως επίσης κυανοκοβαλαμίνη (βιταμίνη B12) και ασκορβικό οξύ (βιταμίνη C).

Το σύνολο αυτών των ουσιών δεν έχει τυχαία κατανομή μέσα στο κυτταρόπλασμα αλλά φαίνεται ότι ακολουθεί μια διαμερισματοποίηση.

1<sup>ον</sup>) Έτσι στο επικάλυμμα της μεμβράνης υπάρχουν προσροφημένοι οι παράγοντες πήξης I, II, V, VII, VIII, IX, XIII, όπως επίσης και ένας ενεργοποιητής της ινωδολύσης.

2<sup>ov</sup>) Στην μεμβράνη έχει επίσης διαπιστωθεί η παρουσία μιας σειράς ουσιών, όπως μια ΑΤΡάση, ο 3<sup>os</sup> αιμοπεταλιακός παράγοντας της μεμβράνης, η ακτινομυοσίνη της μεμβράνης καθώς και τα αντιγόνα του συστήματος ΑΒΟ.

3<sup>ov</sup>) Στο αιμοπεταλιακό κοκκίομερο (σύνολο των κοκκίων) υπάρχουν οι πρωτεΐνες που αναλυτικά περιγράψαμε ανωτέρω. Τα α-κοκκία περιέχουν vWF, PF4, β – TG, TSP, FI, Fη καθώς και φωσφολιπίδια . Τα μιτοχόνδρια περιέχουν ένζυμα, όπως διαφοράσες, δισμουτάση του υπεροξειδίου του οξυγόνου (SOD), καταλάση, ηλεκτρική αφυδρογονάση, οξειδάση του κυτοχρώμου c. Στα δ-κοκκία περιέχεται σεροτονίνη, τα νουκλεοτίδια ΑΤΡ και ΑDΡ, ιονισμένο ασβέστιο, κατεχολαμίνες. Στα ριβοσώματα βρίσκουμε mRNA, όπως επίσης γλυκογόνο στα αντίστοιχα κοκκία γλυκογόνου.

4<sup>ov</sup>) Στο υαλόμερο υπάρχουν ποικίλες ουσίες, όπως ινωδογόνο, πρωτεΐνες, λιποπρωτεΐνες, ο PF4, η θρομβοσθενίνη, γλυκολυτικά ένζυμα, σεροτονίνη και ο παράγοντας XIII.

Όλες αυτές οι ουσίες εξωκυτταρώνονται με την αντίδραση έκλυσης που αποτελεί ένα τμήμα της διαδικασίας της αιμοπεταλιακής ενεργοποίησης και συσσώρευσης.

### ***1.3. Δομή του Αιμοπεταλιακού Κυτταροσκελετού***

Ο κυτταρικός σκελετός αντιπροσωπεύει το σύστημα δια του οποίου ένα κύτταρο πραγματοποιεί κινήσεις τόσο μεταφοράς του εαυτού του μέσα στον χώρο, όσο και για την μετατόπιση ορισμένων εσωτερικών του στοιχείων (π.χ χρωματοσώματα κατά την κυτταρική διαίρεση, αποβολή λυσοσωμιακών ενζύμων, εξωκυττάρωση περιεχομένου κοκκίων, κ.α). Στην περίπτωση των αιμοπεταλίων ο κυτταροσκελετός, ή σύστημα συστολής και αλλαγής σχήματος αποτελείται:

1<sup>ov</sup>) από την ινώδη συσκευή (fiber system, structural microfilaments), η οποία παρουσιάζει κεντρικότερο εντοπισμό στο αιμοπεταλιακό κύτταρο.

2<sup>ov</sup>) από την περιφερική δέσμη των μικροσωληναρίων (bundle of microtubules).

Ανωτέρω περιγράψαμε αδρά τόσο την ινώδη συσκευή όσο και την εξωτερική δέσμη των μικροσωληναρίων (ίde Β3 Μορφολογία των αιμοπεταλίων). Στις παρακάτω σελίδες θα δώσουμε μια βραχεία περιγραφή των συστατών πρωτεϊνών οι οποίες αποτελούν το δομικό υλικό των επί μέρους κινητικών συστημάτων των αιμοπεταλίων.



### ***1.3.1. Συσταλτές πρωτεΐνες του κυτταρικού σκελετού - Γενικά***

Τα αιμοπετάλια κυκλοφορούν στο αίμα, υπό συνθήκες ηρεμίας, με αμφίκυρτη δισκοειδή μορφή, την οποία τείνουν να διατηρήσουν εφόσον οι συνθήκες ροής δεν μεταβάλλονται και εφόσον δεν διαχέονται διεγέρτες της λειτουργίας τους στο εσωτερικό της αιματικής κυκλοφορίας.

Στην περίπτωση που οι συνθήκες της κυκλοφορίας διαταραχθούν επικίνδυνα, όπως συμβαίνει σε συνθήκες αιμορραγίας κατόπιν τραυματισμού που τέμνει τα αιμοφόρα αγγεία, διάφοροι φυσικοί διεγέρτες (κολλαγόνο, θρομβίνη, φωσφολιπίδια, ADP κ.α), έρχονται σε επαφή με εξειδικευμένους υποδοχείς της κυτταροπλασματικής μεμβράνης των αιμοπεταλίων, τα οποία διεγείρονται, αλλάζουν σχήμα, εκβάλλουν ψευδοπόδια, προσφύονται στα κομμένα μακρομόρια των τραυματισμένων υπενδοθηλιακών ιστών, εγκαταλείπουν την κυκλοφορία, απλώνονται πάνω στην τομή της βλάβης και αρχίζουν να συσσωρεύονται στο εν λόγω σημείο.

Όλες αυτές οι εντυπωσιακές μεταβολές λαμβάνουν χώρα εξ αιτίας των συσταλών συστημάτων των αιμοπεταλίων και κατά μια έννοια αποτελούν ένα είδος μυικών συστολών καθώς ακολουθούν σε σημαντικό βαθμό τις ίδιες με αυτές αρχές και τους ίδιους μηχανισμούς. Οι μηχανισμοί αυτοί είναι εν κατακλείδι μυικές συστολές σε κυτταρικό επίπεδο και τα θεμελιώδη συσταλτά στοιχεία τα οποία στρατολογούν στην πραγματοποίησή τους είναι τα γνωστά μόρια της ακτίνης και της μυοσίνης, όπως επίσης το οικουμενικό κατιόν του ασβεστίου.

Η ακτίνη και η μυοσίνη είναι πρωτεΐνες οι οποίες συνδυαζόμενες μεταξύ τους έχουν την δυνατότητα να αναπτύσσουν κυλιόμενους δεσμούς μεταξύ των στοιχείων της επιφανείας, έχοντας σαν στοιχείο μετάδοσης της κίνησης και μηχανικής σύζευξης το κατιόν του ασβεστίου. Κατ' αυτόν τον τρόπο η μια πρωτεΐνη μετακινείται πάνω στην άλλη καταναλίσκοντας ενέργεια η οποία προέρχεται από την τριφωσφορική αδενοσίνη (ATP). Το ATP παρέχει την ενέργειά του μέσω υδρόλυσης των δεσμών των φωσφορικών του ριζών, ενώ οι φωσφορικές ρίζες ενώνονται με υπολείμματα αμινοξέων επάνω στην πρωτεϊνική αλυσίδα ενεργοποιώντας την μετακίνηση (διολίσθηση) της μιας πρωτεΐνης απέναντι στην άλλη. Η μυοσίνη (μοριακό βάρος 500 kDa) εμπεριέχει στο μόριό της το ενεργό κέντρο που υδρολύει το ATP, ενώ η ακτίνη (μοριακό βάρος 42 kDa) δεν εμφανίζει ενζυματική δραστηριότητα. Οι δύο αυτές πρωτεΐνες είναι πολύ καλά μελετημένες ήδη από

το 1948 που προτάθηκε για πρώτη φορά από τον Huxley και τους συνεργάτες του ο μοριακός μηχανισμός της μυϊκής συστολής σε επίπεδο κυτταρικής υπερδομής.

Οι εν λόγω πρωτεΐνες είναι οργανωμένες σε ομοιόμορφες δομές που ονομάζονται ινίδια. Όταν το αιμοπετάλιο ενεργοποιηθεί τα ινίδια της ακτίνης του κυτταροπλάσματος και της τουμπουλίνης των μικροσωληναρίων αναδιατάσσονται, πράγμα το οποίο είναι εμφανές με σαφή τρόπο εφόσον κάθε ψευδοπόδιο περιέχει δίκτυο από παράλληλα μικροϊνίδια, που η εικόνα τους ομοιάζει με τους δημιουργούμενους από τα μικροσωληνάρια σχηματισμούς.

Η αιμοπεταλιακή ενεργοποίηση οδηγεί στην αναδιοργάνωση των μικροϊνιδίων της ακτίνης και της μυοσίνης (σχηματισμός ακτινομυοσίνης) καθώς και των μικροσωληναρίων της τουμπουλίνης οι οποίες πλέον ως οργανωμένο σύνολο που ταυτίζεται με τον μηχανισμό συστολής, πραγματοποιούν τα φαινόμενα κίνησης των ψευδοποδίων. Η μυϊκή συστολή των συσταλών πρωτεϊνών προτείνεται εδώ και χρόνια ως ο θεμελιώδης μηχανισμός δια του οποίου πραγματοποιούνται όλες οι λειτουργικές αντιδράσεις των αιμοπεταλίων, από την αλλαγή σχήματος, την έκλυση του περιεχομένου των κοκκίων, την συσσώρευση και την συστολή του θρόμβου, χωρίς, ωστόσο, να είναι απολύτως καθαρή η σύζευξη όλων των γνωστών δομικών και βιοχημικών δεδομένων.

Γενικά, η κυριαρχούσα άποψη για τα φαινόμενα της κυτταρικής ενεργοποίησης του αιμοπεταλίου και τον ρόλο των συστελλόμενων πρωτεϊνών παραδέχεται ότι οι εν λόγω πρωτεΐνες συμμετέχουν στα εξής φαινόμενα:

A) Στην ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων που ξεκινά από την κατάληψη των υποδοχέων εκ μέρους των αιμοπεταλιακών αγωνιστών, ενεργοποίηση του ενεργειακού μεταβολισμού για αύξηση της παραγωγής ATP, την απελευθέρωση των ιόντων του ασβεστίου από τα ενδοπλασματικά του ντεπόζιτα και την ενεργοποίηση της μυϊκού τύπου συστολής από το ασβέστιο και το ATP.

B) Στην εξωκυττάρωση του περιεχομένου των αιμοπεταλιακών κοκκίων που πραγματοποιείται μέσω της διατεταγμένης και ποσοτικής σύνδεσης των μικροϊνιδίων αφενός μεν με την επιφάνεια της μεμβράνης και αφετέρου με τις συσταλτές πρωτεΐνες των κοκκίων και των σωληναριακών συστημάτων μεταφοράς που απολήγουν σε τρήματα της μεμβράνης. Κατά τον τρόπο αυτό συγκροτούνται δομές ομοιάζουσες με τα σαρκόμερα των μυϊκών ινών, οι οποίες μέσω των κατιόντων του ασβεστίου και του ATP συστέλλονται συντονισμένα, μεταφέροντας τα κοκκία στο κέντρο του κυττάρου και συμπιέζοντάς τα

ώστε το περιεχόμενό τους να εξωθηθεί μέσω του δικτύου των σωληνίσκων στο εξωκυττάριο περιβάλλον.

Γ) Στην συστολή του θρόμβου. Μετά την περάτωση της αιμοπεταλιακής συσσώρευσης και του σχηματισμού του θρόμβου που ήδη απαγορεύει την περαιτέρω απώλεια αίματος, ο θρόμβος συστέλλεται εξ αιτίας της συστολής του συνόλου των αιμοπεταλίων έκαστο των οποίων καταλήγει σε μια τελική και παρατεταμένη συστολή. Ενδεχομένως η συστολή αυτή δεν είναι δυνατόν να σταματήσει και να αντιστραφεί εξ αιτίας της έλλειψης πλέον του ATP, που έχει εξαντληθεί χωρίς να είναι δυνατή η ανασύνθεσή του λόγω καταστροφής των δομών και λειτουργιών που το παράγουν. Η συστολή του θρόμβου λειτουργεί σαν μηχανική μέγγενη η οποία συμπλησιάζει τα χείλη της τομής φέρνοντάς τα σε επαφή μεταξύ τους. Πλέον η σύγκλιση των χειλέων της τομής εξασφαλίζει μεγαλύτερη στεγανότητα στο αγγείο ενώ η γειτνίαση διευκολύνει την ανάπτυξη των κυττάρων που είναι απαραίτητα για την τοπική επιδιόρθωση και την ανάπλαση του κομμένου αγγείου (ινοβλάστες, λείες μυικές ίνες, ενδοθηλιακά κύτταρα, διατοιχωματικά μακροφάγα).

Η ακτίνη, η μυοσίνη, η πρωτεΐνη που δεσμεύει την ακτίνη (actin binding protein or ABP), η προφιλίνη, η α-ακτινίνη και η καλμοντουλίνη αντιπροσωπεύουν μια σειρά πρωτεϊνικών μακρομορίων τα οποία ανήκουν στην ομάδα των συσταλών πρωτεϊνών, που συνδεόμενες κατάλληλα μεταξύ τους συναποτελούν το κινητικό όργανο των αιμοπεταλίων (όπως επίσης και άλλων κυττάρων). Κατωτέρω θα δούμε αναλυτικά την δομή και την λειτουργία αυτών των πρωτεϊνών, όπως επίσης θα επιχειρήσουμε και την σύνθεση των συνολικών τους αλληλεπιδράσεων στην λειτουργία του αιμοπεταλιακού οργάνου κίνησης, δηλαδή του κυτταρικού σκελετού. Σημειωτέον ότι οι πρωτεΐνες αυτές αποτελούν η κάθε μια τους ένα ποσοστό της τάξης του 2 έως 8 % των συνολικών κυτταρικών πρωτεϊνών, εκτός της ακτίνης η οποία αποτελεί από μόνη της το 20 με 30 % των πρωτεϊνών του αιμοπεταλιακού κυττάρου, υποδεικνύοντας έτσι στον κρίσιμο ρόλο της ως κύριου μορίου του ικριώματος του αιμοπεταλιακού κύτταρο.

### ***Η Ακτίνη***

Η ακτίνη είναι μια πρωτεΐνη με σφαιρικό σχήμα (μορφή G), η οποία αποτελεί την ποσοτικά κυρίαρχη πρωτεΐνη των αιμοπεταλίων. Η σφαιρική μορφή αυτής απαντάται στα ήρεμα αιμοπετάλια, τα οποία δεν έχουν ακόμη δεχθεί την δράση ενός ενεργοποιητικού ερεθίσματος. Το μοριακό βάρος της είναι 42 kDa και είναι ίσο με εκείνο της ακτίνης που

απαντάται στους γραμμωτούς μύες του σκελετού. Στους σκελετικούς μύες έχουν απομονωθεί τρεις παραλλαγές της ( $\alpha$ ,  $\beta$  και  $\gamma$ ), αλλά στα αιμοπετάλια ανιχνεύονται μόνον οι τύποι  $\beta$  και  $\gamma$ . Το κύριο διαφοροποιητικό χαρακτηριστικό του τύπου  $\beta$  είναι ότι περιέχει τρία υπολείμματα ασπαρτικού οξέος, ενώ στον τύπο  $\gamma$  απαντώνται τρία υπολείμματα γλουταμινικού οξέος. Αυτές οι διαφορές στην σύνθεση της πολυπεπτιδικής της αλυσίδας φαίνεται να μην σχετίζονται με τις διαφορές στην μορφή της οργάνωσης της ακτίνης στα διάφορα λειτουργικά ντεπόζιτα της στα αιμοπετάλια.

Η ακτίνη αντιπροσωπεύει, όπως ήδη προαναφέραμε, το 20 με 30 % των αιμοπεταλιακών πρωτεϊνών και σχετίζεται άμεσα με τα θεμελιώδη λειτουργικά φαινόμενα που χαρακτηρίζουν το αιμοπεταλιακό κύτταρο, όπως είναι η αλλαγή του σχήματος αυτού, η προεκβολή ψευδοποδίων, αντίδραση της έκλυσης του περιεχομένου των κοκκίων, η συσσώρευση και η συστολή του θρόμβου.

Όπως προείπαμε, στο ήρεμο αιμοπετάλιο ή ακτίνη είναι σφαιρική (μορφή G) και δεν παρουσιάζει πολυμερισμό, οπότε η εικόνα η οποία προκύπτει είναι η έλλειψη ινιδίων.

Η G – μορφή της ακτίνης εμφανίζει πυκνή κυτταροπλασματική διασπορά και αποτελείται από πολυπεπτιδικά μονομερή. Η έλευση ενός διεγερτικού σήματος προκαλεί έναν επιβλητικό πολυμερισμό των μονομερών της ακτίνης, ο οποίος οδηγεί στον σχηματισμό ινιδίων, όπου τα πολυμερή της ακτίνης διατάσσονται σε διπλές ή και τριπλές έλικες που συγκρατούνται μεταξύ τους σε δεσμίδα. Ο πολυμερισμός είναι ενεργό φαινόμενο και προϋποθέτει την ύπαρξη ικανών ποσοτήτων ATP στο κυτταροπλασματικό περιβάλλον. Το ATP υδρολύεται προς ADP και τα μονομερή της ακτίνης συνενώνονται μεταξύ τους σχηματίζοντας βαθμιαία τις αλυσίδες ενός ινιδίου. Η ακτίνη υπό την πολυμερισμένη αυτής νηματοειδή μορφή ονομάζεται και F – ακτίνη. Η πρώτη αυτή οργάνωση της ακτίνης αποτελεί και το εναρκτήριο βήμα της ακολουθίας των δομικών μεταβολών των αιμοπεταλίων κατά την διαδρομή των φαινομένων της ενεργοποίησής τους. Το μήκος των ινιδίων της ακτίνης είναι 1  $\mu\text{m}$  ενώ η διάμετρος της εγκάρσιας τομής τους είναι 6 – 7 nm.

Σύμφωνα με άλλες παρατηρήσεις στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο, στο κυτταρόπλασμα των ήρεμων αιμοπεταλίων η μορφή – G της ακτίνης δεν είναι απολύτως ελεύθερη αλλά ήδη αρκετά μονομερή της είναι οργανωμένα σε ένα τρισδιάστατο δίκτυο ινιδίων τα οποία συνδέονται με την Πρωτεΐνη Δέσμευσης Ακτίνης (Actin Binding Protein or ABP). Στην μεμβράνη των αιμοπεταλίων αυτών διακρίνεται η ύπαρξη ενός ικριώματος (σκελετού)

αποτελούμενου από βραχέα ινίδια ακτίνης, τα οποία είναι σταυροειδώς συνδεδεμένα μεταξύ τους δια της ABP.

Το εν λόγω ικρίωμα φαίνεται να αποτελεί ένα ελάχιστο δομικής οργάνωσης της ακτίνης που είναι απαραίτητη για την εκτέλεση μερικών βασικών λειτουργιών σχετιζομένων με την διατήρηση του σχήματος των ήρεμων αιμοπεταλίων. Έτσι το ικρίωμα αυτό στηρίζει και σταθεροποιεί την φωσφολιπιδική διπλοστοιβάδα της κυτταρικής μεμβράνης, ρυθμίζει το σχήμα της, συγκρατεί στις κατάλληλες θέσεις και προσανατολισμό τις πρωτεΐνες της μεμβράνης ώστε να μπορούν να εκτελέσουν τους ρόλους τους. Επί παραδείγματι το ικρίωμα αυτό της ακτίνης και της ABP σταθεροποιεί την θέση του πρωτεϊνικού συμπλέγματος GrIb-IX, ώστε η ανάδυσή του πάνω από την εξωτερική επιφάνεια της κυτταροπλασματικής μεμβράνης και ο προσανατολισμός του προς το περιβάλλον του αιματικού πλάσματος, να είναι επαρκείς προκειμένου να επιτρέπεται χωρίς κάλυμα η πρόσδεση του παράγοντα vW στην περίπτωση που αυτό είναι αναγκαίο. Δηλαδή το ικρίωμα της ακτίνης – ABP κρατά την GrIb σε λειτουργική ετοιμότητα, ώστε να είναι απολύτως ικανή να συνδεθεί με τον παράγοντα vW στο τραυματισμένο αγγειακό τοίχωμα. Η ίδια δομική λειτουργία του ικριώματος ισχύει για τον υποδοχέα GrIIb-IIIa και κατά τα φαινόμενα για όλους τους υποδοχείς των ποικίλων αγωνιστών και εξωτερικών μοριακών σημάτων που εκπέμπονται από τα διάφορα τοπικά ή κεντρικά συστήματα του οργανισμού, προκειμένου να πληροφορήσουν το αιμοπετάλιο για τα τοπικά ή συστηματικά συμβάντα που απαιτούν αύξηση ή μείωση της λειτουργικής ετοιμότητας των αιμοπεταλίων. Η φυσιολογία έχει διατυπώσει την έννοια του λεγόμενου «αιμοπεταλιακού τόνου» ο οποίος αντικατοπτρίζει τον βαθμό ετοιμότητας των αιμοπεταλίων για ενεργοποίηση και φαίνεται ότι ο ρόλος του ικριώματος ακτίνης – ABP είναι σημαντικός για την ρύθμιση αυτής της ετοιμότητας.

Κατά την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων ο αριθμός των ινιδίων της ακτίνης πολλαπλασιάζεται χαρακτηριστικά μέσα στα σχηματιζόμενα ψευδοπόδια, ενώ από την άλλη πλευρά στο εσωτερικό του κυτταροπλάσματος κάνει την εμφάνισή του ένα δίκτυο μικροϊνιδίων, τα οποία λειτουργούν ως βρόχος περίσφιξης των κυτταρικών κοκκίων και σωματίων, εν γένει, γύρω από το γεωμετρικό κέντρο του αιμοπεταλιακού κυττάρου. Στο επίπεδο της υπερδομής του κυτταρικού ικριώματος, δηλαδή του λεπτού δικτύου που σχηματίζεται από την ένωση της ακτίνης με την ABP, η ενεργοποίηση του αιμοπεταλίου έχει ως άμεση συνέπεια την υδρόλυση των δεσμών της ABP με την ακτίνη, μέσω της

δράσης ενεργοποιημένων πρωτεασών. Το αποτέλεσμα της υδρόλυσης αυτών των δεσμών είναι η αποσυναρμολόγηση αυτού του λεπτού δικτύου το οποίο δεν είναι πλέον ικανό να συγκρατεί την μεμβράνη υπό σχετική συμπίεση στο χαρακτηριστικό σχήμα αμφίκυρτου δίσκου. Η παύση της μηχανικής τάσης που αντιροπούσε τις δυνάμεις της επιφανειακής τάσης της μεμβράνης, απελευθερώνει αυτές τις τελευταίες και τελικά το αιμοπεταλιακό κύτταρο τείνει να λάβει σφαιρικό σχήμα, αφήνοντας να αναδυθούν από την φωσφολιπιδική διπλοστοιβάδα και να προβληθούν προς το αιματικό πλάσμα οι υποδοχείς του αιμοπεταλίου. Ωστόσο υπάρχουν και άλλες παρατηρήσεις οι οποίες υποδεικνύουν ότι η μεταβολή σχήματος δεν εξαρτάται τόσο από την διάλυση του ικριώματος της ακτίνης – ABP αλλά κυρίως από την ενεργοποίηση των μικροσωληναρίων. Κατ' αυτόν τον τρόπο οι υποδοχείς που ευρίσκονται στα μόρια των γλυκοπρωτεϊνών καθίστανται ικανοί να προσδεθούν σε μόρια προσκόλλησης και σε υποστρώματα, όπως οι κολλαγονικές ίνες των υπενδοθηλίων των κομμένων αγγείων. Ταυτοχρόνως η επιφάνεια της μεμβράνης παρουσιάζει μια μεγάλη πυκνότητα μικρών δακτυλοειδών σχηματισμών που παρουσιάζουν διαρκή κίνηση, σαν να ψαύουν τον περιβάλλοντα χώρο. Ταυτοχρόνως προς αυτά τα φαινόμενα, ξεκινά η έναρξη του πολυμερισμού των ινιδίων της ακτίνης με τον σχηματισμό πολλών μονάδων, εν είδει πυρήνων κρυστάλλωσης, οι οποίες περιέχουν, κατ' ελάχιστον, τρία μονομερή ακτίνης. Ο αρχικός σχηματισμός ενός τέτοιου πυρήνα είναι βραδύς, αλλά από την στιγμή που περατωθεί, τότε η περαιτέρω προσθήκη των μονομερών της ακτίνης επιταχύνεται σημαντικά, οπότε τα πολυμερισμένα ινίδια της ακτίνης επιμηκύνονται ταχέως. Τα μονομερή της ακτίνης είναι ασύμμετρα, και η ασυμμετρία των μονομερών της μικροϊνιδίων τα αναγκάζει να εμφανίζουν πολικότητα με αποτέλεσμα να σχηματίζουν οξύαιχμες κεφαλές με τις βαριές αλυσίδες της μυοσίνης. Οι κεφαλές αυτές είναι ορατές στα συσσωρευμένα αιμοπετάλια καθώς επίσης και σε αυτά, που εκτίθενται σε ωσμωτικό σοκ ή σε επεξεργασία με γλυκερίνη.

Η παρουσία της θρομβίνης ή η του ADP μετασχηματίζει μέσα σε χρόνο 10 sec το 25% της G – ακτίνης σε F – ακτίνη. Υπογραμμίζεται ότι ο μετασχηματισμός δεν αναστέλλεται από την παρουσία χυλικών δεσμευτών του ασβεστίου, όπως το EDTA ή ασπιρίνη και εν γένει μη στεροειδή αντιφλεγμονώδη. Συνεπώς ο σχηματισμός των ινιδίων της F – ακτίνης είναι φαινόμενο που δεν επηρεάζεται από την λειτουργία της οδού του αραχιδονικού οξέος. Επίσης ο σχηματισμός των ινιδίων της ακτίνης προηγείται από την αντίδραση έκλυσης του περιεχομένου των κοκκίων και την αντίδραση συσώρευσης. Είναι σαφές ότι προκειμένου

να κινηθούν τα ψευδοπόδια, να γίνει πρόσφυση στο υπόστρωμα και να απλωθεί το αιμοπεταλικό κύτταρο, πρέπει τα δίκτυα της F – ακτίνης να έχουν την ικανότητα της ταχείας συναρμολόγησης και αποσυναρμολόγησης. Έτσι ο πολυμερισμός και ο αποπολυμερισμός της ακτίνης σχετίζονται άμεσα με την εμφάνιση και με την εξαφάνιση των αιμοπεταλιακών ψευδοποδίων. Οι δύο μορφές της ακτίνης προσδιορίστηκαν με διάφορες μεθόδους, όπως μέσω της ηλεκτρονικής μικροσκοπίας, βιοχημικών τεχνικών – όπως η SDS ηλεκτροφόρηση – και η χρησιμοποίηση ουσιών, όπως η κυτοχαλασίνη, οι οποίες μπορούν να αναδείξουν το κατά πόσον η ακτίνη είναι σε μονομερή ή πολυμερή μορφή. Επί παραδείγματι η επεξεργασία των αιμοπεταλίων με κυτοχαλασίνη, πριν την χορήγηση σε αυτά θρομβίνης έχει σαν αποτέλεσμα την αναστολή του ταχέως πολυμερισμού της G – ακτίνης σε F – ακτίνη, όπως επίσης και την αναστολή του σχηματισμού ψευδοποδίων. Αντιθέτως, μετά την προσθήκη και δράση της θρομβίνης, η χορήγηση της κυτοχαλασίνης προκαλεί αποπολυμερισμό και διάλυση των ινιδίων της F – ακτίνης και των ψευδοποδίων. Τα ίδια αποτελέσματα λαμβάνονται μέσω της SDS - ηλεκτροφόρησης αιμοπεταλίων διεγερμένων με θρομβίνη και λυμένων με το ισχυρό απορρυπαντικό Triton – X – 100. Στον τύπο αυτό ηλεκτροφόρησης η μοναδική ζώνη της F-ακτίνης εμφανίζεται ελαττωμένη ως προς την αντίστοιχη ζώνη της F-ακτίνης των αιμοπεταλίων ελέγχου (στα οποία δεν προστίθεται κυτοχαλασίνη), ανεξάρτητα από το αν η κυτοχαλασίνη προστέθηκε πριν ή μετά την δράση της θρομβίνης. Η επεξεργασία των αιμοπεταλίων με την κυτοχαλασίνη D δεν παρεμβαίνει στην πρωτεϊνική σύνθεση των μικροσωληναρίων γεγονός που αποδεικνύει ότι το πέρασμα από την δισκοειδή στην σφαιρική μορφή δεν επηρεάζεται από την κυτοχαλασίνη και ότι η απώλεια του δισκοειδούς σχήματος είναι αποτέλεσμα των δράσεων των μικροσωληναρίων.

### ***Η μυοσίνη των αιμοπεταλίων***

Η μυοσίνη των αιμοπεταλίων αντιπροσωπεύει μόνον το 1% κατά προσέγγιση, του συνολικού ποσού των κυτταρικών πρωτεϊνών και συνεπώς η συμμετοχή της στην αιμοπεταλιακή πρωτεϊνική σύσταση είναι πολύ μικρότερη εν σχέσει προς την ακτίνη η οποία αντιπροσωπεύει το 20 – 30 % της συνολικής ποσότητας κυτταρικών πρωτεϊνών. Η μυοσίνη απαντάται στο κυτταροδιάλυμα του αιμοπεταλιακού πρωτοπλάσματος ήρεμων αιμοπεταλίων, κατόπιν ομογενοποίησης, υπό την μορφή ινιδίων, τα οποία είναι δυσδιάκριτα εν σχέσει προς τα ινίδια της ακτίνης, που φυσικά είναι πολυαριθμότερα. Ο λόγος των ινιδίων ακτίνης προς τα ινίδια της μυοσίνης προσεγγίζει το 100, ενώ η

συνένωση και ο μετέπειτα αποχωρισμός τους αποτελούν διαδοχικές φάσεις του μηχανισμού ρύθμισης των συστολικών φαινομένων των αιμοπεταλίων.

Η αιμοπεταλιακή μυοσίνη έχει μοριακό βάρος 500 kDa, αποτελούμενη από δύο βαριές αλυσίδες των 200kDa εκάστη και δύο ελαφρές με μοριακά βάρη 20 και 16 kDa αντιστοίχως. Το μόριο της αιμοπεταλιακής μυοσίνης φαίνεται να μην διαφέρει από εκείνο που απαντάται στους γραμμωτούς μύες του σκελετού.

Η σφαιρική κεφαλή της μυοσίνης εμφανίζει ενζυμικές ιδιότητες ATPάσης, ενώ το υπόλοιπο του μορίου της έχει την ιδιότητα να σχηματίζει ινίδια χωρίς, ωστόσο, να εμφανίζει την παραμικρή ενζυμική δραστηριότητα οιαδήποτε είδους.

Η υδρόλυση του ATP που επιτυγχάνεται από την μυοσίνη εξαρτάται σημαντικά από την ύπαρξη κατιόντων μαγνησίου και έχει βραδύ ρυθμό. Αντίθετα όταν η μυοσίνη είναι ενωμένη με την ακτίνη, η ταχύτητα της εξαρτώμενης από το μαγνήσιο υδρόλυσης του ATP, είναι πολύ μεγαλύτερη, πράγμα το οποίο υπογραμμίζει την σπουδαιότητα της συνένωσης των δύο αυτών συστατικών βιομορίων.

Η αιμοπεταλιακή μυοσίνη σχηματίζει ινίδια εμφανίζοντα δομική πολικότητα. Τα μόριά της ενώνονται συνολικά στο οξύαιχμο άκρο της ούτως ώστε να σχηματίζεται μια κεντρική ζώνη με σφαιρικές κεφαλές σε κάθε άκρο. Τα εν λόγω διπολικά ινίδια εμπεριέχουν 28 μόρια μυοσίνης σε ιοντική δύναμη μεταξύ του 0,05 έως 0,03 M και σε pH 7 και 8, κατά τρόπον ώστε ανάμεσά τους να παρεμβάλλεται ένα διάκενο πλάτους 14 – 15 nm, το οποίο διαχωρίζει τις σφαιρικές κεφαλές. Ένα ινίδιο του τύπου αυτού έχει μήκος 325 nm, ενώ το πάχος του στην κεντρική ζώνη ανέρχεται στα 10,7 nm.

#### ***Η ρύθμιση της αντίδρασης μεταξύ ακτίνης και μυοσίνης – ο ρόλος των φωσφορυλιώσεων των ελαφρών αλύσεων της μυοσίνης***

Στην in vivo μελέτη της αλληλεπίδρασης ακτίνης και μυοσίνης αποδείχτηκε ότι ο περιοριστικός παράγοντας της αντίδρασης αυτών των δύο πρωτεϊνών ήταν η φωσφορυλίωση των ελαφρών αλύσεων (16 και 20 kDa ) της μυοσίνης. Η φωσφορυλίωση των υποομάδων των ελαφρών αλυσίδων είναι απαραίτητη προκειμένου να εμφανιστεί η αύξηση της ATPασικής δραστηριότητας που εμφανίζεται με την συσσωμάτωση της ακτίνης στην μυοσίνη, η οποία ήδη από μόνη της κατέχει μια χαμηλή ATPασική δραστηριότητα, ενώ η ακτίνη είναι αδρανής.



Η φωσφορυλίωση των ελαφρών αλύσεων της μυοσίνης αυξάνεται σημαντικά από την παρουσία των κατιόντων ασβεστίου ( $\text{Ca}^{++}$ ). Η επίδραση του ασβεστίου αυξάνεται πολύ περισσότερο με την προσθήκη της καλμοντουλίνης, η οποία είναι μια μικρή πρωτεΐνη, με μοριακό βάρος 17 kDa που συνδέεται με το  $\text{Ca}^{++}$ . Στην κλασική μυική συστολή η τροπονίνη C έχει τον ρόλο της καλμοντουλίνης. Από τα ανωτέρω συνάγεται ότι η φωσφορυλίωση των ελαφρών αλύσεων της μυοσίνης είναι συνάρτηση του συμπλέγματος  $\text{Ca}^{++}$  - καλμοντουλίνης. Το σύμπλοκο  $\text{Ca}^{++}$  - καλμοντουλίνης ενεργοποιεί την κίνηση των ελαφρών αλυσίδων η οποία καταλύει την φωσφορυλίωση τους. Το ένζυμο αυτό απαντάται επίσης και στις λείες μυικές ίνες και πρόκειται περί μιας πρωτεΐνης μοριακού βάρους 105 kDa της οποίας η λειτουργία είναι στενά εξαρτημένη από την καλμοντουλίνη. Με τον τρόπο αυτό η ενεργοποιημένη από την καλμοντουλίνη κίνηση των ελαφρών αλυσίδων προχωρεί στην φωσφορυλίωση τους και έτσι η μυοσίνη καθίσταται ενεργός. Όπως γνωρίζουμε μόνον η φωσφορυλιωμένη ενεργός μυοσίνη είναι σε θέση να αντιδράσει με την ακτίνη ώστε να προκύψει η διολίσθηση των στοιχείων της ακτίνης επί των φωσφορυλιωμένων μυοσινών του σαρκόμερου και να αναπτυχθεί έτσι η δύναμη συστολής που θα οδηγήσει στην κεντρική διάταξη των αιμοπεταλιακών σωματιδίων και κοκκίων, στο σφαιρικό σχήμα των αιμοπεταλίων και την παράλληλη περαιτέρω φωσφορυλίωση των ελαφρών αλυσίδων η οποία με την σειρά της θα ενισχύσει την διαδικασία της συστολής, που θα εκθλίψει τα κοκκία εξαναγκάζοντάς τα να απελευθερώσουν το περιεχόμενό τους έξω από το αιμοπεταλιακό κύτταρο

Όλη αυτή η αλληλουχία αντιδράσεων παρουσιάζει μια αυστηρή τάξη και η κλιμάκωσή της γίνεται υπό την προϋπόθεση ότι τα προηγούμενα βήματα έχουν ήδη πραγματοποιηθεί. Όπως πολύ καλά μπορούμε να διαπιστώσουμε, όλα τα μακρομόρια, που είναι αναγκαία για την τέλεσή της, ήδη προϋπάρχουν στο αιμοπεταλιακό κύτταρο, που, όπως είπαμε, δεν διαθέτει πυρήνα και συνεπώς δεν δύναται να συνθέσει *de novo* πρωτεΐνες. Είναι η διαδικασία της ενεργοποίησης του αιμοπεταλίου, δηλαδή η έλευση ενός ισχυρού σήματος διέγερσης, η οποία πυροδοτεί την εμφάνιση αυτών των δομών, μέσω μιας διεργασίας αλληλοσυναρμολόγησης των επί μέρους πρωτεϊνών, που προκαλεί την τέλεση αυτής της αυστηρής αλληλουχίας αντιδράσεων. Αυτά τα φαινόμενα είναι ιδιαίτερος αξιόλογα ως μοντέλα δημιουργίας τάξης σε ένα ήδη οργανωμένο σύστημα. Όλα τα επί μέρους βήματα της διαδικασίας αυτής μπορούν να αναπαραχθούν στον δοκιμαστικό σωλήνα και οι προκύπτουσες δομές να ελεγχθούν μέσω του ηλεκτρονικού μικροσκοπίου, προκειμένου να

γίνουν κατανοητές οι μεταξύ τους αλληλεπιδράσεις, όπως επίσης και η φύση των χημικών αντιδράσεων που κυβερνούν τα εν λόγω φαινόμενα. Επειδή το όλο θέμα είναι πολύ μεγάλο και εκφεύγει από τον σκοπό και τα όρια αυτής της διατριβής, θα αναφέρουμε επί τροχάδην τα βασικά του χαρακτηριστικά:

1<sup>ov</sup>) Για την πραγματοποίηση όλης αυτής της αλληλουχίας αντιδράσεων είναι απαραίτητη η τριφωσφορική αδενοσίνη (ATP), η οποία παρέχει μια φωσφορική ρίζα και ταυτοχρόνως μετατρέπεται σε ADP (διφωσφορική αδενοσίνη).

2<sup>ov</sup>) Μελέτες σχετικές με την φωσφορυλίωση της μυοσίνης *in vivo* έδειξαν ότι το μακρομόριο αυτό ευθύνεται για την ρύθμιση της συστολής του κυτταροσκελετού κατά την διάρκεια της ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων.

3<sup>ov</sup>) Η χρησιμοποίηση αιμοπεταλίων που επώαστηκαν παρουσία ραδιενεργού φωσφόρου ( $P^{32}$ ) και κατόπιν διεγέρθηκαν με κολλαγόνο, θρομβίνη ή μια συνθετική ένωση (A123187) η οποία λειτουργεί ως ιονοφόρος του κατιόντος ασβεστίου ( $Ca^{++}$ ), έδειξαν ότι η αιμοπεταλιακή ενεργοποίηση συνοδεύεται από μια ισχυρή φωσφορυλίωση δύο πολυπεπτιδίων με μοριακά βάρη 20 και 47 kDa, αντιστοίχως (Haslam et al). Αποδείχθηκε επίσης ότι το πολυπεπτίδιο των 20 kDa αντιπροσωπεύει την ελαφρά αλυσίδα της μυοσίνης (Daniel et al.).

4<sup>ov</sup>) Το κυκλικό AMP (c-AMP) ενεργοποιεί μια πρωτεϊνική κινάση η οποία φωσφορυλιώνει την κινάση των ελαφρών αλύσεων της μυοσίνης, υποδεικνύοντας ότι ο έλεγχος της ενεργοποίησης είναι πολύ ισχυρός (ως συνέπεια των πολλών του βημάτων) και συνεπώς αναιρέσιμος σε πολλά από τα βήματά του.

5<sup>ov</sup>) Η δραστηριότητα αυτής της φωσφορυλιωμένης κινάσης ελαττωνόταν, διότι αυτή δεν μπορούσε να συνδεθεί με το σύμπλοκο καλμοντουλίνης –  $Ca^{2+}$ . Αυτό το γεγονός ερμήνευε με πειστικό τρόπο την ανικανότητα της μυοσίνης να φωσφορυλιωθεί και να αναστείλει την αντίδραση ακτίνης – μυοσίνης, δηλαδή την πρόσφυση της κεφαλής της μυοσίνης στα αντίστοιχα σημεία της ακτίνης.

Άρα στην προκειμένη περίπτωση το c – AMP φαίνεται ότι εισάγει έναν μηχανισμό ο οποίος θα μπορούσε να ανακόψει ή εν γένει να τροποποιήσει την αντίδραση της ακτίνης προς την μυοσίνη, την διολίσθηση των εν λόγω πρωτεϊνών και τελικά να αναστείλει ή να μειώσει την αντίδραση έκλυσης του περιεχομένου των αιμοπεταλιακών κοκκίων και την αλλαγή σχήματος των αιμοπεταλίων.

Παράλληλα εδείχθησαν και τα ακόλουθα:

1<sup>ο</sup>) Η ιονοφόρος A123187 του  $\text{Ca}^{2+}$  αυξάνει τα επίπεδα ελεύθερου ιονισμένου ασβεστίου στο εσωτερικό των αιμοπεταλίων και προκαλείται η αντίδραση έκλυσης του περιεχομένου των κοκκίων.

2<sup>ο</sup>) Η ιονοφόρος A123187 του  $\text{Ca}^{2+}$  αυξάνει την φωσφορυλίωση των ελαφρών αλυσίδων της μυοσίνης, ενώ οι αναστολείς ασβεστίου βεραπαμίλη και τετρακαΐνη (εικόνα τάδε) μειώνουν το ποσοστό της φωσφορυλίωσης, αναστέλλοντας την ενδοκυττάρια αύξηση του ελεύθερου κατιόντος ασβεστίου.

3<sup>ο</sup>) Η καλμοντουλίνη ασκεί δράση αποφασιστικής σημασίας στο σύστημα της φωσφορυλίωσης των ελαφρών αλύσεων της μυοσίνης και στην αντίδραση έκλυσης του περιεχομένου των αιμοπεταλιακών κοκκίων. Ο εκλεκτικός αναστολέας  $W_7$  της καλμοντουλίνης αναστέλλει την συσσωρευτική δράση της θρομβίνης αναστέλλοντας ταυτοχρόνως την φωσφορυλίωση των ελαφρών αλυσίδων της μυοσίνης και εμποδίζοντας την αντίδραση έκλυσης του περιεχομένου των αιμοπεταλιακών κοκκίων.

Από τα ανωτέρω προκύπτει το συμπέρασμα ότι η ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων είναι φαινόμενο που εξαρτάται στενά από την φωσφορυλίωση της μυοσίνης τους και την ικανότητα συστολής της ακτινομυοσίνης. Η ρύθμιση της συστολής εξαρτάται από την φωσφορυλίωση των ελαφρών της αλυσίδων. Η φωσφορυλίωση αυτή εξαρτάται από το περιεχόμενο του ελεύθερου κατιόντος ασβεστίου και την καλμοντουλίνη στο εσωτερικό των αιμοπεταλίων. Συνεπώς η διακίνηση του κατιόντος ασβεστίου και η κατάσταση της καλμοντουλίνης είναι κρίσιμοι παράγοντες για την αντίδραση αλλαγής σχήματος, αντίδραση έκλυσης των κοκκίων και τέλος της αντίδραση συσσώρευσης των αιμοπεταλιακών κυττάρων. Δεδομένου ότι οι τρεις αυτές αντιδράσεις αποτελούν και το σύνολο των λειτουργικών αιμοπεταλιακών αντιδράσεων, αντιλαμβανόμαστε ότι το ενδογενές ιονισμένο ασβέστιο και η πρόσδεσή του στην καλμοντουλίνη είναι οι *sine qua non* πυροδότες της αιμοπεταλιακής ενεργοποίησης. Σημασία για την αιμοπεταλιακή ενεργοποίηση έχουν και τα ενδογενή ντεπόζιτα ιονισμένου ασβεστίου. Αυτά αντιπροσωπεύονται από κατάλληλες διαμορφώσεις του ενδοπλασματικού δικτύου και ευρίσκονται σε συνάφεια με τις δομές συστολής του αιμοπεταλίου. Ωστόσο η απελευθέρωσή τους φαίνεται ότι είναι δυνατή μόνον από τον ισχυρό αιμοπεταλιακό διεγέρτη PAF (Platelet Activating Factor), ο οποίος αποτελεί και έναν ισχυρό οικουμενικό διαβιβαστή της φλεγμονής. Πλυμένα αιμοπετάλια κονίκλου μπορούν να συσσωρεύσουν

κατόπιν διέγερσης με PAF, ακόμη και αν στο εξωτερικό μέσον δεν παρίστανται κατιόντα ασβεστίου. Η συσσώρευση αυτού του είδους είναι επίσης ισχυρή και μη αντιστρέψιμη, υπό τον όρο ότι οι ποσότητες του PAF θα είναι επαρκείς. Η επώαση των αιμοπεταλίων με βεραπαμίλη ή εξειδικευμένους αναστολείς του ενδογενούς ασβεστίου (π.χ τριμεταζιδίνη), είναι σε θέση να αναστείλουν την ενδογενή απελευθέρωση του ιονισμένου ασβεστίου από τα ντεπόζιτα του αιμοπεταλιακού ενδοπλασματικού δικτύου και κατ' αυτόν τον τρόπο να μην επιτρέψουν στον PAF να επάγει την συσσώρευση των αιμοπεταλίων.

Πρέπει να σημειωθεί ότι οι ενδείξεις που έχουν μέχρι στιγμής συγκεντρωθεί, από διάφορες εργασίες, υποδεικνύουν ότι η μεταβολική ενέργεια για την έκλυση του περιεχομένου των αιμοπεταλιακών κοκκίων φαίνεται να προέρχεται σε σημαντικό ποσοστό από την γλυκολυτική οδό παραγωγής ATP, όπως θα δούμε αναλυτικότερα στα επόμενα κεφάλαια της ανάπτυξής μας.

### ***Η αιμοπεταλιακή τροπομυοσίνη και ο ρόλος αυτής***

Η τροπομυοσίνη αντιπροσωπεύει μια διμερή πρωτεΐνη η οποία έχει κατά κόρον μελετηθεί στον γραμμωτό σκελετικό μυ, αλλά ανευρίσκεται επίσης τόσο στα λεία μυϊκά κύτταρα, όσο και στα αιμοπετάλια, όπως επίσης και στους κυτταροσκελετούς πολλών κυττάρων. Η τροπομυοσίνη έχει σχήμα βακτηρίας, είναι άκαμπτη και συμπεριλαμβάνει δύο υπομονάδες μοριακού βάρους 33 kDa η κάθε μια τους. Έχει την ιδιότητα να συνδέεται με την F – ακτίνη εγκαθιστάμενη σε δύο αύλακες που σχηματίζονται από την σύνδεση των μονομερών κατά μήκος του πολυμερισμένου μορίου. Κατ' αυτόν τον τρόπο το πολυμερές της ακτίνης γίνεται άκαμπτο. Οι δυνάμεις με τις οποίες τα επιμήκη μόρια της τροπομυοσίνης συγκρατούνται επί των μορίων της ακτίνης είναι του τύπου Van der Waals. Στον γραμμωτό μύ η αλληλεπίδραση μεταξύ της ακτίνης και της μυοσίνης ρυθμίζεται από την τροπομυοσίνη καθώς και από την τροπονίνη, η οποία είναι ένα σύμπλεγμα τριών πολυπεπτιδίων (τροπονίνη I, τροπονίνη T και τροπονίνη C) και έχει ως εξής: Η τροπονίνη T εμφανίζει ένα σημείο σύνδεσης με την τροπομυοσίνη, το οποίο θεωρείται ότι εξασφαλίζει την σωστή θέση ενσωμάτωσης του συμπλέγματος. Όταν η τροπονίνη I προστίθεται στην τροπονίνη T και στην τροπομυοσίνη, το σύμπλεγμα αναστέλλει την αλληλεπίδραση μεταξύ ακτίνης και μυοσίνης, ακόμη και παρουσία ιόντων ασβεστίου. Η περαιτέρω προσθήκη της τροπονίνης C ολοκληρώνει την διαδικασία και η αλληλεπίδραση μεταξύ ακτίνης και μυοσίνης εξακολουθεί να αναστέλλεται απουσία των κατιόντων του ασβεστίου. Όμως η τροπονίνη C ενώνεται με τέσσερα ιόντα  $Ca^{2+}$  και με το συνδεδεμένο

ασβέστιο άρει την εν λόγω αναστολή. Η άρση της αναστολής του σχηματισμού του δεσμού μεταξύ ακτίνης και μυοσίνης, εκ μέρους των κατιόντων  $Ca^{2+}$  αντιπροσωπεύεται κατ' ουσίαν από την εξουδετέρωση των ενορχηστρωμένων δράσεων της τροπομυοσίνης που αλληλεπιδρώντας μεταξύ τους «κρύβουν» ένα σημαντικό σημείο πρόσφυσης του μορίου της μυοσίνης επί της ακτίνης. Ο μηχανισμός άρσης του εν λόγω παρεμποδισμού αλληλεπίδρασης μεταξύ ακτίνης και μυοσίνης έχει ως εξής: Κάθε επτά μονομερή ακτίνης υπάρχει ένα μόριο τροπονίνης C (η πρωτεΐνη που δεσμεύει τα κατιόντα του ασβεστίου), ενώ η αναστολή ασκείται σε όλο το μήκος του νηματίου της ακτίνης. Μελέτες που έγιναν επί της δομής αυτών των μοριακών διευθετήσεων αποκάλυψαν ότι στην κατάσταση ηρεμίας, δηλαδή όταν δεν αναπτύσσεται δύναμη συστολής, το βακτηριόμορφο σύμπλεγμα της τροπονίνης επισκιάζει την θέση στην οποία συνδέεται η κεφαλή της μυοσίνης, κατά την έναρξη της μυικής συστολής, οπότε η πρόσφυσή της επί της ακτίνης εμποδίζεται. Συνεπώς η τροπονίνη για στερεοτακτικούς λόγους εμποδίζει την αλληλεπίδραση ακτίνης και μυοσίνης. Όταν το επίπεδο των κατιόντων ασβεστίου αυξάνεται ενδοκυτταρίως (κατόπιν της διέγερσης του κυττάρου) τα μόρια της τροπομυοσίνης μετατοπίζονται ελαφρά, εξ αιτίας μιας μεταβολής της μορφής των μορίων της τροπονίνης με την οποία ευρίσκονται σε επαφή. Ενδεχομένως η κρίσιμη αυτή μεταβολή του συμπλέγματος της τροπονίνης λαμβάνει χώρα όταν τα κατιόντα ασβεστίου συνδέονται με την τροπονίνη C. Ενδεχομένως το σύμπλοκο  $Ca^{2+}$  - τροπονίνης C προκαλεί μια στερεοτακτική μεταβολή της τροπομυοσίνης μέσω της μεταφοράς και πρόσδεσης των κατιόντων του ασβεστίου στην τελευταία, η οποία ελαχιστοποιεί την ισχύ των δυνάμεων Van der Waals με την ακτίνη. Η φυσική αυτή μεταβολή ωθεί την τροπομυοσίνη να απομακρυνθεί από την αύλακα της ακτίνης, χωρίς ωστόσο να αποσπαστεί εντελώς με την ταυτόχρονη αποκάλυψη εκείνου του σημείου της ακτίνης με το οποίο μπορεί να συνδεθεί αντιστρεπτά η μυοσίνη και να διαμορφωθούν οι προϋποθέσεις της υδρόλυσης του ATP και της διολίσθησης των ινιδίων της μυοσίνης επί της ακτίνης (ή αντίστροφα, αναλόγως του σημείου επί του οποίου τίθενται οι συντεταγμένες).

Τα ανωτέρω ισχύουν για τις γραμμωτές μυικές ίνες των μυών του σκελετού, ενώ η συζήτηση είναι λίγο διαφορετική για τα λεία μυικά κύτταρα των αγγείων και των κοίλων λείων μυικών οργάνων.

Στον λείο μυικό ιστό, όπως γνωρίζουμε, τόσο η μυοσίνη, όσο και η ακτίνη είναι διαφορετικές εν σχέσει με τις αντίστοιχες πρωτεΐνες του γραμμωτού μυός. Ως προς τον

σκελετικό μυ η ακτίνη εμφανίζει μικρές διαφορές στην σύνθεση των αμινοξέων του πολυπεπτιδίου, των οποίων, ωστόσο, η λειτουργική σημασία δεν μας είναι γνωστή. Από την άλλη πλευρά η μυοσίνη των λείων μυικών ινών παρουσιάζει πολύ μεγάλες ομοιότητες με εκείνη των γραμμωτών μυικών ινών, αλλά διαφέρει λειτουργικά σε δύο σημαντικά σημεία:

1<sup>ο</sup>) Το επίπεδο της ΑΤΡασικής δραστηριότητάς της είναι 10 φορές μικρότερο από το αντίστοιχο της μυοσίνης του γραμμωτού μύος, ενώ η ρύθμισή της γίνεται άμεσα από τα κατιόντα του  $\text{Ca}^{2+}$ .

2<sup>ο</sup>) Η μυοσίνη του λείου μυικού κυττάρου, όπως και εκείνη των υπολοίπων τύπων μη μυικών κυττάρων, μπορεί να αλληλεπιδράσει με την ακτίνη και να προκαλέσει συστολή, μόνον όταν οι δύο ελαφρές της αλυσίδες φωσφορυλιώνονται. Αντιθέτως η συστολή σταματά όταν οι ελαφρές της αλυσίδες αποφωσφορυλιώνονται. Η λογική αυτή ισχύει και για το αιμοπεταλιακό κύτταρο.

Η φωσφορυλίωση και η αποφωσφορυλίωση των ελαφρών αλύσεων της μυοσίνης του λείου μυικού ιστού και των άλλων μη μυικών τύπων κυττάρων, καταλύονται από εξειδικευμένα ένζυμα. Η ΑΤΡάση της μυοσίνης του λείου μυικού κυττάρου εξαρτάται από το κατιόν του ασβεστίου, καθόσον το ένζυμο που ενεργεί την φωσφορυλίωση, η κινάση των ελαφρών αλυσίδων, ρυθμίζεται από το επίπεδο των κατιόντων του ασβεστίου. Στις λείες μυικές ίνες η δράση των ιόντων του ασβεστίου διαμεσολαβείται μέσω της καλμοντουλίνης, μιας πρωτεΐνης, που προσδένει τα ιόντα του ασβεστίου, και που ομοιάζει την τροπονίνη C, τόσο δομικά όσο και λειτουργικά. Το σύμπλοκο της καλμοντουλίνης με τα ιόντα  $\text{Ca}^{2+}$ , ενεργοποιεί την κινάση των ελαφρών αλυσίδων της μυοσίνης, η οποία διαφορετικά φωσφορυλιώνει πολύ δύσκολα την μυοσίνη. Ενώ στην γραμμωτή μυική ίνα όλη αυτή η δραστηριότητα ενεργοποιείται από την ακετυλοχολίνη και το δυναμικό δράσης, στην περίπτωση των λείων μυικών ινών και των λοιπών μη μυικών κυττάρων υπάρχουν πολυάριθμοι παράγοντες οι οποίοι ενεργοποιούν τις διαδικασίες και τελικά υπάρχει μια πληθώρα μορίων τα οποία είναι σε θέση να επηρεάσουν την φωσφορυλίωση των ελαφρών αλυσίδων της μυοσίνης: Π. χ το επίπεδο του c – AMP του λείου μυικού κυττάρου (και κάθε άλλου μη μυικού κυττάρου εκτός της γραμμωτής μυικής ίνας) επηρεάζεται από πλήθος ορμονών.

Η σύσπαση του λείου μυικού κυττάρου των αγγείων, που παρατηρείται κατά τον αγγειακό τραυματισμό πυροδοτείται κατά κύριο λόγο από το αγγειοσυσπαστικό προστανοειδές

μόριο της θρομβοξάνης  $A_2$ . Επίσης το ίδιο μόριο αποτελεί τον τελικό πυροδοτικό μεταβολίτη της αιμοπεταλιακής συσσώρευσης ανεξαρτήτως του αγωνιστή που την ξεκινά και της οδού που αυτός εκλεκτικά ενεργοποιεί. Η σύσπαση ενός αγγείου είναι μεν βραδεία σε σύγκριση με την σύσπαση ενός γραμμωτού μυός, αλλά από την άλλη πλευρά είναι μακρόχρονης διάρκειας, ώστε να επιτρέψει την δημιουργία ενός θρόμβου αιμοπεταλίων και κατόπιν ενός πλήρους θρόμβου. Επίσης είναι σημαντικό να υπογραμμιστεί ότι η σύσπαση του αιμοπεταλιακού συσταλτικού μηχανισμού τόσο για την αλλαγή σχήματος, όσο για την εξωκυττάρωση των αιμοπεταλιακών κοκκίων, όσο και για την τελική σύσπαση του σχηματισθέντος θρόμβου, φαίνεται να ομοιάζει σε πολλά σημεία με την σύσπαση του λείου μυϊκού κυττάρου. Συνεπώς πολλά στοιχεία της αιμοπεταλιακής συστολικής λειτουργίας έχουν ομοιότητας με τα αντίστοιχα στοιχεία της σύσπασης των λείων μυϊκών ινών, η δε χρονική συνάφεια των γεγονότων τους εισάγει την έννοια μιας νομοτελειακής σύγκλισης και σύζευξης, όπως επίσης εξάρτησης από τους ίδιους πυροδοτικούς και ανασταλτικούς παράγοντες.

### ***Πρωτεΐνες συνδεδεμένες με την αιμοπεταλιακή ακτίνη***

Ενώ, όπως είδαμε και προηγουμένως, υπάρχει ένας μεγάλος αριθμός πρωτεϊνών συνδεδεμένων με την ακτίνη των μυϊκών ινών, από την άλλη πλευρά στα αιμοπετάλια βρέθηκαν να συνδέονται με την ακτίνη, κυρίως τρεις πρωτεΐνες. Οι πρωτεΐνες αυτές απομονώθηκαν και ταυτοποιήθηκαν. Πρόκειται για: 1<sup>ov</sup>) την προφιλίνη, 2<sup>ov</sup>) την πρωτεΐνη που δεσμεύει την ακτίνη και 3<sup>ov</sup>) την α – ακτινίνη.

### ***1<sup>ov</sup>) Προφιλίνη***

Στο εσωτερικό των αιμοπεταλίων, εκτός από τον μηχανισμό ο οποίος πολυμερίζει την ακτίνη, υπάρχουν και μηχανισμοί οι οποίοι εμποδίζουν τον πολυμερισμό αυτής. Ένας από αυτούς τους μηχανισμούς σχετίζεται με την πρωτεΐνη προφυλακτίνη – προφιλίνη.

Η προφιλίνη έχει την ιδιότητα να σχηματίζει συμπλέγματα με τα μονομερή της ακτίνης σε λόγο 1: 1. Στα αιμοπετάλια φαίνεται ότι τα μονομερή της ακτίνης είναι εξ ολοκλήρου συνεζευγμένα με προφιλίνη, κατά την διάρκεια της ήρεμης κατάστασης. Όταν τα αιμοπετάλια ενεργοποιούνται, τα σύμπλοκα προφιλίνης – ακτίνης διαχωρίζονται, οπότε η ακτίνη αφήνεται να πολυμεριστεί. Οι διαπιστώσεις αυτές προέκυψαν από μια μακροχρόνια ερευνητική προσπάθεια διαφόρων ερευνητικών ομάδων. Το 1972 οι Probst και Luscher απομόνωσαν ένα κλάσμα αιμοπεταλιακής ακτίνης, η οποία αντιστεκόταν στον

πολυμερισμό εξ αιτίας της πρόσμιξής του με την πρωτεΐνη – συνοδό. Το 1976 ο Carlsson και οι συνεργάτες του απομόνωσαν από τον βόειο σπλήνα ένα σταθερό πρωτεϊνικό σύμπλεγμα αποτελούμενο από μονομερή ακτίνης, ένα πολυπεπτίδιο 16 kDa, την προφιλίνη και από προφιλίνη – ακτίνη. Και άλλοι ανεξάρτητα εργαζόμενοι ερευνητές απομόνωσαν την προφιλίνη των αιμοπεταλίων το 1978. Ο φυσιολογικός μεσολαβητής που πυροδοτεί τον πολυμερισμό της ακτίνης (πιθανότατα το ασβέστιο) ήταν ακόμη υπό συζήτηση. Βιοχημικές μελέτες με τέτοιους υποψήφιους μεσολαβητές δεν κατόρθωσαν να επιτύχουν τον πολυμερισμό της καθαρής προφυλακτίνης και να φθάσουν σε ακτίνη, ενώ ο Carlsson και οι συνεργάτες του το πέτυχαν χρησιμοποιώντας αυξημένες συγκεντρώσεις EDTA, πράγμα που υποδεικνύει ότι η πλήρης απαγωγή του ασβεστίου μέσω της χυλικής δέσμευσής του με το EDTA είναι αναγκαίος όρος για τον πολυμερισμό της προφυλίνης - ακτίνης (προφυλακτίνης) μέχρι την ακτίνη. Αυτά όμως τα πειράματα, αν και από την πρώτη σκοπιά, καταλήγουν σε συμπεράσματα εντελώς αντίθετα με ό,τι συμβαίνει σε φυσιολογικές συνθήκες, εν τούτοις ρίχνουν κάποιο φως στην όλη κατάσταση, καθόσον η αύξηση της συγκέντρωσης του ιονισμένου ασβεστίου είναι αυτή που αυξάνει την ενεργοποίηση σε κυτταροπλασματικό επίπεδο του πολυμερισμού της ακτίνης. Αν, συνεπώς, η χρήση των μεγάλων ποσοτήτων του EDTA είχε ως αποτέλεσμα τον πολυμερισμό των συμπλεγμάτων ακτίνης – προφιλίνης, αυτό, ενδεχομένως, αντανακλούσε ό,τι θα έπρεπε να συμβαίνει στο εν ηρεμία αιμοπεταλιακό κύτταρο. Άλλοι ερευνητές (Gonella και συνεργάτες) έδειξαν ότι ένα αιμοπεταλιακό ίζημα παρουσιάζει μια άμορφη και κοκκιώδη όψη, η οποία μετατρέπεται σε δίκτυο ινιδίων με την προσθήκη ιονοφόρου A123187, ή 50  $\mu\text{M}$   $\text{CaCl}_2$  στα αιμοπετάλια. Εξετάζοντας μέσω της ηλεκτροφόρησης τα πολυπεπτίδια που είχαν καθιζάνει από ήρεμα αιμοπετάλια εμφανίστηκε μια μπάντα 16 kDa μοριακού βάρους, αντιστοιχούσα στην προφιλίνη. Η μπάντα αυτή εξαφανιζόταν σε ίζημα από ενεργοποιημένα αιμοπετάλια. Φαίνεται ότι η προφιλίνη δεσμεύοντας έναν αριθμό μορίων ακτίνης λειτουργεί τρόπον τινά ως ένα ρυθμιστικό διάλυμα διατηρώντας πάντοτε διαθέσιμο έναν πληθυσμό μορίων ακτίνης ώστε να υπάρχει δυνατότητα διαρκούς μεταβολής του κυτταρικού σχήματος μέσω προεκβολής – απόσυρσης ψευδοποδίων. Αν όλη η ακτίνη δεσμευόταν σε σταθερές πολυμερισμένες δομές τύπου F, αναγκαστικά η πλαστικότητα της κυτταρικής μορφής και των αντίστοιχων κινήσεων θα μειωνόταν κάθετα, πράγμα το οποίο, ενδεχομένως, είναι ωφέλιμο για τα αιμοπετάλια τα οποία συνδέθηκαν και απλώθηκαν πάνω στο αγγειακό τραύμα, οπότε εδώ έχει σημασία η σταθεροποίηση, αλλά δεν είναι ωφέλιμο για τα αιμοπετάλια που ενεργοποιούνται σε



ενεστώτα χρόνο και «διερευνούν» ακόμη το που θα κάνουν πρόσφυση και το πώς πρέπει να εξαπλωθούν. Επίσης η αναγκαιότητα μιας ισορροπίας μεταξύ πολυμερισμένης ακτίνης και ελεύθερης μορφής της, συνδεδεμένης με την προφιλίνη, είναι αναπόδραστη για ένα μεταναστεύον κύτταρο, όπως π.χ ένα μακροφάγο, που κινείται κατά μήκος μιας κλίσης μορίων μέσω θετικού χημειοτροπισμού, προκειμένου να έλθει προς συνάντηση με έναν εξωγενή μικροβιακό εισβολέα για να τον εξουδετερώσει. Συνεπώς, εφόσον το καθεστώς που κυβερνά την κατάσταση της ακτίνης, δηλαδή το αν αυτή θα είναι δεσμευμένη με την προφιλίνη και αδρανής, ή αν θα πολυμερίζεται για να σχηματίζει ψευδοπόδια, υπονοεί ότι το κύτταρο πρέπει, τρόπον τινά, να είναι ικανό να διαχειρίζεται τα ενδοκυττάρια επίπεδα ιόντων ασβεστίου, ώστε πάντα να διαθέτει την ικανότητα να αποσύρει ορισμένα ψευδοπόδια και να δημιουργήσει κάποια άλλα. Αυτή η κατάσταση φαίνεται ότι θα μπορούσε να ερμηνευθεί αν υποθέταμε την ύπαρξη ενός μορίου ικανού να δεσμεύει το ιονισμένο ασβέστιο σε κάποιες κυτταρικές περιοχές, προκειμένου να προάγει τον αποπολυμερισμό της F – ακτίνης και να επανεισάγει την δημιουργία συμπλεγμάτων προφιλίνης – ακτίνης, προκειμένου να καταργήσει ένα ψευδοπόδιο και να σχηματίσει ένα ντεπόζιτο διαθέσιμης ακτίνης για τον σχηματισμό ενός άλλου ψευδοποδίου. Ενδεχομένως η ύπαρξη μιας μεγάλης διαμερισματοποίησης του κυττάρου θα μπορούσε να λύσει το πρόβλημα αυτό, θέτοντας την έννοια ότι τελικά σε κάθε κυτταρικό μικροδιαμερίσμα αντιστοιχεί η δημιουργία ενός ψευδοποδίου ή ενός μικρού αριθμού ψευδοποδίων. Υπό αυτή την έννοια το ιονισμένο ασβέστιο μπορεί να αντλείται σε αποθηκευτικές δεξαμενές μέσα στο πλαίσιο του μικροδιαμερίσματος, ή προς το εξωτερικό περιβάλλον, οπότε η πτώση των επιπέδων του εν λόγω ιόντος επιτρέπει τον αποπολυμερισμό της F – ακτίνης και την συνακόλουθη απόσυρση του ψευδοποδίου, ή των ψευδοποδίων που σχηματίζονται στην περιοχή του συγκεκριμένου μικροδιαμερίσματος. Οι υποθέσεις αυτές αποτελούν αντικείμενο έρευνας

## **2<sup>ον</sup>) Πρωτεΐνη που δεσμεύει την ακτίνη (Actin Binding Protein, ABP)**

Τρεις είναι οι κύριες πρωτεΐνες που δεσμεύουν την ακτίνη: η Actin Binding Protein (ABP), η P235 και η Vinculin (Δεσμίνη). Οι πρωτεΐνες αυτές μπορούν να απομονωθούν από αιμοπετάλια που έχουν υποστεί πλήρη κυτταρική λύση και διαχωρίζονται μέσω ηλεκτροφόρησης SDS. Μπορούν, κατόπιν να παρατηρηθούν στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο με ή χωρίς αρνητική χρώση.

Η ABP αποτελεί μια διμερή πρωτεΐνη, της οποίας κάθε μονομερής υπομονάδα έχει μοριακό βάρος 250 kDa. Από την λειτουργική άποψη, είναι σαφώς διαφορετική από την μυοσίνη και την σπεκτρίνη που επίσης συνδέονται με την ακτίνη, αλλά εμφανίζει σημαντικές ομοιότητες, τόσο ως προς την σύνθεση των αμινοξέων που την αποτελούν, όσο και προς το μοριακό βάρος, με την φιλαμίνη, η οποία απαντάται στις λείες μυϊκές ίνες.

Η ABP συνδέεται με μικρά ινίδια ακτίνης σχηματίζοντας σταυροειδείς σχηματισμούς οι οποίοι αυξάνονται ως προς τις τρεις διαστάσεις σχηματίζοντας μεγάλα δίκτυα τα οποία, όπως προείπαμε αποτελούν ένα ικρίωμα και συνεπώς ασκούν μια κυτταροσκελετική λειτουργία. Η ιδιότητα αυτή είναι αναπαραγώγιμη *in vitro*, όπου διαλύματα ακτίνης και ABP μπορούν να οργανωθούν σε δίκτυα, τα οποία μακροσκοπικά, έχουν την εικόνα γέλης, δηλαδή προσομοιώνουν την κατάσταση «gel» του κυτταροπλάσματος. Σε τέτοια διαλύματα η ABP αυξάνει εντυπωσιακά την πυκνότητα των ινιδίων καθαρής ακτίνης, δημιουργώντας μια αντίστοιχη αύξηση του ιξώδους των εν λόγω διαλυμάτων. Η οργάνωση αυτή λαμβάνει χώρα ανεξάρτητα από την παρουσία ιόντων ασβεστίου. Ακόμη αν προκαλέσουμε μια ελεγχόμενη πρωτεόλυση των δεσμών των ινιδίων της ακτίνης, η προσθήκη ABP μπορεί να προκαλέσει τον επανασχηματισμό δικτύων ακτίνης μέσω ανασύνδεσης των μορίων της τελευταίας με την ABP, απουσία ασβεστίου, χυλικών παραγόντων και συμπληρωματικών πρωτεϊνών. Ωστόσο σε συνθήκες *in vivo* η συνολική ρύθμιση της κατάστασης του κυτταροσκελετού ευρίσκεται υπό τον έλεγχο των επιπέδων του ελεύθερου ιονισμένου ασβεστίου. Αντίστοιχες ιδιότητες εμφανίζει και η φιλαμίνη των λείων μυϊκών κυττάρων, καθώς στα κύτταρα αυτά, όπως στα αιμοπετάλια και τα λευκοκύτταρα είναι πολύ σημαντικοί οι αναστρέψιμοι σχηματισμοί της κατάστασης sol – gel του κυτταροπλάσματος (μετασχηματισμοί εξαιρετικά σημαντικοί για τα κύτταρα που μεταβαίνουν από ήρεμη σε ενεργό κατάσταση και τανάπαλιν).

### 3<sup>ον</sup>) α – ακτινίνη

Η α – ακτινίνη είναι μια πρωτεΐνη αποτελούμενη από δύο υπομονάδες, κάθε μια των οποίων έχει μοριακό βάρος 100 kDa. Ο ρόλος της α–ακτινίνης φαίνεται ότι είναι η σύνδεση των ινιδίων της ακτίνης, οπότε ως προς την λειτουργία εμφανίζει κάποια αναλογία με την ABP. Η α–ακτινίνη είναι πρωτεΐνη που εμφανίζει ιδιότητες συστολής, ενώ η παρουσία της απαντάται και σε άλλους ιστούς εκτός από τα αιμοπεταλιακά κύτταρα.

Ο Schollmeyer και οι συνεργάτες του έδειξαν ότι τόσο η αιμοπεταλιακή ABP, όσο και η  $\alpha$  – ακτινίνη των γραμμωτών μυικών κυττάρων, έχουν την ιδιότητα να οργανώνουν σε παράλληλες σειρές τα ινίδια της ακτίνης, δημιουργώντας δίκτυα, τα οποία έχουν ιδιότητες κυτταροσκελετού.

Χρησιμοποιώντας αντισώματα απομονώθηκε από τα αιμοπετάλια και ταυτοποιήθηκε μια πρωτεΐνη η οποία εμφανίζει πολύ μεγάλες ομοιότητες με την  $\alpha$ –ακτινίνη των γραμμωτών μυών.

Ο Gerrard και οι συνεργάτες του απομόνωσαν το 1979 στα αιμοπετάλια μια  $\alpha$  – ακτινίνη που βρισκόταν συνδεδεμένη στην GrIIIa της μεμβράνης. Τα αιμοπετάλια τα προερχόμενα από θρομβασθενικά άτομα (θρομβασθένεια Glanzmann) φαίνεται ότι δεν μπορούν να συνδεθούν μεταξύ τους εξ αιτίας της έλλειψης του συμπλέγματος GrIIIb–IIIa και συνακόλουθα της εγγενούς αδυναμίας ενός συμπλόκου μεταξύ αυτού και της  $\alpha$  – ακτινίνης, παρά το γεγονός ότι η ενεργοποίησή τους οδηγεί στον σχηματισμό των ινιδίων της ακτίνης και την πρόσφυση σε αυτά της μυοσίνης. Τόσο η GrIIIa όσο και η  $\alpha$  – ακτινίνη είναι δύο διαφορετικές μεταξύ τους πρωτεΐνες, πράγμα το οποίο αποδεικνύεται από τα μοριακά τους βάρη (110 και 100 kDa αντιστοίχως), από την αποκλίνουσα ηλεκτροφορητική τους κινητικότητα και από τις διαφορετικές μπάντες που εμφανίζουν κατόπιν ισοεστιακής ηλεκτροφόρησης. Στα δεδομένα αυτά έρχονται να προστεθούν και άλλα στοιχεία, όπως π.χ η σύνθεση των αμινοξέων που τις αποτελούν, η διαδοχή τους κ.ο.κ. Στα ήρεμα αιμοπετάλια η GrIIIa και η  $\alpha$  – ακτινίνη είναι δύο διακρινόμενες πρωτεΐνες, ανεξάρτητες η μια από την άλλη, που μπορούν να παραληφθούν ξεχωριστά και να απομονωθούν κατόπιν λύσης των αιμοπεταλίων. Ωστόσο κατόπιν διέγερσης των αιμοπεταλίων με θρομβίνη, οι δύο πρωτεΐνες αντιδρούν και συνδέονται μεταξύ τους. Σύμφωνα με ορισμένους ερευνητές (Langer και συνεργάτες) η  $\alpha$  – ακτινίνη είναι μια πρωτεΐνη κατά κύριο λόγο της περιφερικής ζώνης και λιγότερο της μεμβράνης των αιμοπεταλίων. Αυτό συνάγεται εκ του γεγονότος ότι μπορεί να απομακρυνθεί σχετικά εύκολα με την χρήση EDTA και μάλιστα σε συγκεντρώσεις υψηλές που προσεγγίζουν την τάξη των mM.

Η  $\alpha$  – ακτινίνη είναι μια πρωτεΐνη με διακεκριμένη και σχετικά παράδοξη συμπεριφορά καθόσον είναι σε θέση να αντιδρά τόσο με τα ινίδια της κυτταροπλασματικής ακτίνης, υποδηλώνοντας ότι εμφανίζει υδρόφιλο χαρακτήρα, όσο και να καταλαμβάνει μια διαμεμβρανική θέση, εφ' όσον αντιδρά με την GrIIIa, υποδηλώνοντας χαρακτηριστικά

υδρόφοβα. Συνεπώς δεν αποκλείεται τα μόρια τα οποία χαρακτηρίζουμε ως  $\alpha$  – ακτινίνη να αποτελούν μια ολόκληρη οικογένεια μακρομορίων με κοινά αντιγονικά χαρακτηριστικά. Οποσδήποτε ο ρόλος της στην αιμοπεταλιακή συσσώρευση φαίνεται σημαντικός, τουλάχιστον για την οργάνωση της αιμοπεταλιακής ακτίνης αλλά και για την πρόσδεση των αιμοπεταλίων μεταξύ τους.

### ***Πρωτεΐνη P235.***

Η P235 είναι μια πρωτεΐνη που υπάρχει σε μορφή διμερή και εμφανίζει μοριακό βάρος ίσο με 235 kDa. Η συμμετοχή της στην συνολική πρωτεϊνική σύσταση του αιμοπεταλιακού κυττάρου είναι υψηλή καθώς αποτελεί ένα ποσοστό κυμαινόμενο μεταξύ του 3 έως 8 % των ολικών αιμοπεταλιακών πρωτεϊνών.

Συνδέεται με τα ινίδια της ακτίνης και ευνοεί τον πολυμερισμό τους. Όταν επεξεργαστούμε τα αιμοπετάλια με διαμίδιο (που αποτελεί μια ουσία η οποία μειώνει την ανηγμένη μορφή της γλουταθειόνης), τότε ενσωματώνεται στα συμπλέγματα που εμφανίζουν υψηλό μοριακό βάρος.

Ομοιάζει σημαντικά με την ταλίνη, η οποία έχει μοριακό βάρος 215 kDa και απαντάται στον λείο μυϊκό ιστό.

### ***Η πρωτεΐνη Vinculin (Δεσμίνη)***

Η πρωτεΐνη Vinculin (δεσμίνη) απαντάται στην πλασματική πλευρά της μεμβράνης και συνδέεται με τα ινίδια της ακτίνης. Έχει μοριακό βάρος 130 kDa και αποτελεί υπόστρωμα για μια πρωτεϊνική κινάση, όπως επίσης και για μια κινάση της τυροσίνης.

### ***Η πρωτεΐνη Gelsolin (γελσολίνη)***

Η γελσολίνη είναι μια πρωτεΐνη μοριακού βάρους 90 kDa, η οποία απαντάται ε πολλά είδη κυττάρων, όπως επίσης και στα αιμοπετάλια. Η γελσολίνη έχει σφαιροειδές σχήμα και η λειτουργία της εξαρτάται από την παρουσία των κατιόντων ασβεστίου  $Ca^{2+}$ . Σε συστήματα ονομαστικά, αποτελούμενα από γνωστά μόρια, χωρίς την παρουσία άλλων προσμίξεων μη ελεγμένων, η γελσολίνη φαίνεται ότι μπορεί να συνδεθεί με τα ινίδια της ακτίνης μόνο παρουσία κατιόντων ασβεστίου, ακόμη και αν αυτό ευρίσκεται σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις της τάξης των  $\mu M$ . Καθώς τα μόρια της ακτίνης παρουσιάζουν πολικότητα, η γελσολίνη εμφανίζει μια μεγαλύτερη τάση σύνδεσης με το παχύτερο τελικό άκρο των βραχέων ινιδίων της ακτίνης, το οποίο, τοιουτοτρόπως, καλύπτεται από την

συνδετική αυτή πρωτεΐνη που εμποδίζει, μέσω στερικών φαινομένων, την περαιτέρω αύξηση του ινιδίου από την πλευρά αυτού του άκρου, καθώς δεν είναι πλέον δυνατή η προσθήκη νέων μονομερών της ακτίνης. Αν και η γελσολίνη εμφανίζει μια μεγαλύτερη ευκολία πρόσδεσης στο προαναφερθέν παχύ άκρο της ακτίνης, ωστόσο, είναι δυνατή η σύνδεσή της και στα δύο άκρα του ινιδίου της ακτίνης. Αυτό που είναι αξιόλογο να αναφερθεί εδώ είναι ότι η σύνδεση της γελσολίνης, στο ένα από τα δύο άκρα της ακτίνης, εξαρτάται από το ιονισμένο ασβέστιο. Η ιδιότητα αυτή έχει σαν συνέπεια ότι η απομάκρυνση των ιόντων του ασβεστίου από τα διαλύματα των ινιδίων (ή και από το εσωτερικό του κυττάρου) έχει ως αποτέλεσμα τον αποχωρισμό της εν λόγω πρωτεΐνης εκλεκτικά από εκείνο το άκρο του ινιδίου όπου η προσθήκη της γελσολίνης καταλύεται ειδικά από το ασβέστιο. Εκ των ιδιοτήτων της η γελσολίνη αποτελεί ένα μόριο μεγάλης σημασίας τόσο για την δημιουργία όσο και για την λύση των ενδοκυττάρων gels, συνεισφέροντας έτσι στην υψηλή δυναμική του πρωτοπλάσματος των κυττάρων που μεταβαίνουν από φάσεις ηρεμίας σε φάσης ενεργοποίησης και αντιστρόφως.

### ***Η πρωτεΐνη σπεκτρίνη (Spectrin)***

Η σπεκτρίνη είναι μια πρωτεΐνη μοριακού βάρους 240 kDa αποτελούμενη από υπομονάδες και απαντώσα σε διάφορα είδη κυττάρων μεταξύ των οποίων και στα αιμοπετάλια . Εντοπίζεται στην μεμβράνη των αιμοπεταλίων και η εν γένει κατανομή της είναι περιφερική. Συνδέεται με τα ινίδια της ακτίνης.

### ***Συμπεράσματα σχετικά με τον ρόλο των συστατών πρωτεϊνών στην ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων***

Το σχήμα των αιμοπεταλίων σχετίζεται στενά με την κατάσταση ηρεμίας ή ενεργοποίησής τους. Τα φαινόμενα της αιμοπεταλιακής ενεργοποίησης επιφέρουν έντονες και δυναμικές αλλαγές στην μορφή τους. Οι αλλαγές αυτές, όπως και γενικότερα η κινητική συμπεριφορά των αιμοπεταλίων εξαρτάται από την αλληλεπίδραση μιας σειράς αιμοπεταλιακών πρωτεϊνών, οι οποίες απαντώνται στα γραμμωτά και λεία μυικά κύτταρα, όπως επίσης και στους κυτταροσκελετούς των διαφόρων κυττάρων του οργανισμού. Οι πρωτεΐνες αυτές είναι σε θέση να προκαλέσουν συστολή στο αιμοπεταλιακό κύτταρο, όπως επίσης και αλλαγή σχήματος μέσω της προεκβολής ψευδοποδίων, της προσκόλλησης, του απλώματος και της συνένωσης με άλλα αιμοπετάλια, λευκά και ερυθρά αιμοσφαίρια, υπενδοθηλιακούς ιστούς κ.α. Οι θεμελιώδεις πρωτεΐνες που

ευρίσκονται πίσω από κάθε κινητική συμπεριφορά των αιμοπεταλίων είναι η ακτίνη και η μυοσίνη. Η ακτίνη αποτελεί το κύριο συστατικό του αιμοπεταλιακού κυτταροσκελετού (ικρίωμα), ενώ όλες οι άλλες πρωτεΐνες που περιγράψαμε είτε προσφύονται πάνω στις δομές της και διολισθαίνουν επί αυτών, συμπαρασύροντας όλες τις κυτταρικές δομές, είτε αλληλεπιδρούν με αυτήν διαμορφώνοντας δομικά συμπλέγματα ικανά να μεταβάλλουν την ρευστότητα του κυτταροπλάσματος μεταξύ των καταστάσεων sol – gel με αντιστρέψιμη φορά.

Η συμπεριφορά της ακτίνης οργανώνεται σε τρία διακριτά επίπεδα:

A) Στον μετασχηματισμό των μονομερών της σε ινίδια πολυμερισμένης ακτίνης.

B) Στον μετασχηματισμό της από την κατάσταση του gel στην κατάσταση του sol, κατάσταση που της επιτρέπει να περνά από τον κυτταροσκελετικό ρόλο στον ρόλο της συστολής.

Γ) Στην αντίδρασή της με την μυοσίνη και στην συνακόλουθη ενεργό συστολή.

Κρίσιμο ρόλο για όλους αυτούς τους μετασχηματισμούς παίζουν τα κατίοντα του ενδοκυττάριου ασβεστίου και συγκεκριμένα:

- Εισάγουν τον πολυμερισμό των μονομερών της G – ακτίνης σε F – ακτίνη, που οδηγεί στον παράλληλο σχηματισμό των ψευδοποδίων.
- Επιδρώντας στην γελσολίνη (Gelsolin) διαλυματοποιεί τα gels της ακτίνης που σχηματίστηκαν με την δράση της ABP επί της ακτίνης, γεγονός που οδηγεί σε μετασχηματισμούς της μορφής.
- Ακολούθως πυροδοτεί την σύσπαση της ακτινομυοσίνης, ενεργοποιώντας την κινάση των ελαφρών αλύσεων της μυοσίνης, η οποία οδηγεί σε φωσφορυλίωση της μυοσίνης και ενεργοποιώντας την ΑΤΡασική δραστηριότητα του συμπλέγματος της ακτινομυοσίνης οδηγεί σε συστολή και έκκριση του περιεχομένου των αιμοπεταλιακών κοκκίων.

Ω αποτέλεσμα όλων αυτών των μεταβολών στην υπερδομή και τις λειτουργίες των αιμοπεταλίων μπορούμε να πούμε, εν συμπεράσματι, τα εξής:

1. Ο σχηματισμός των ψευδοποδίων τα οποία προσφύονται ισχυρά στο υπόστρωμα και η ταυτόχρονη εσωτερική συστολή των συστατών αιμοπεταλιακών στοιχείων έχουν σαν αποτέλεσμα την μείωση της αμφίπλευρης κυρτότητας των

αιμοπεταλίων και την προεκβολή μιας λοφοειδούς κεντρικής διαμόρφωσης κάτω από την οποία συγκεντρώνονται τα αιμοπεταλιακά κοκκία. Γύρω από τα κεντρικώς συσσωρευμένα κοκκία τοποθετείται ένας δακτύλιος μικροσωληνίσκων, ο οποίος στο ήρεμο αιμοπετάλιο εμφάνιζε περιφερική διάταξη.

Η ακτινική μηχανική τάση (μηχανικές δυνάμεις κατανεμημένες ακτινοειδώς) στο ισχυρά προσκολλημένο και πεπλατυσμένο αιμοπετάλιο, έχει σαν αποτέλεσμα την αποκάλυψη των τελικών άκρων των πρωτεϊνών, των οποίων οι προσκολλητικές περιοχές είναι πλέον ελεύθερες για να δεσμεύσουν άλλες πρωτεΐνες του πλάσματος, του υπενδοθηλίου και των γειτονικά προσκείμενων αιμοπεταλίων, τα οποία έχουν ήδη συνδεθεί στα υποστρώματα της περιοχής και ενεργοποιηθεί.

Στα συσσωματώματα των αιμοπεταλίων υπάρχουν οι γλυκοπρωτεΐνες GpIIb και GpIIIa, οι οποίες, ως γνωστόν, είναι συνδεδεμένες με την ακτίνη και την μυοσίνη. Έτσι λοιπόν η ακτίνη, που ήδη ευρίσκεται σε πολυμερισμένη μορφή, προσδένεται στις εν λόγω πρωτεΐνες και μετέχοντας στη διαμόρφωση ενός δικτύου ινών βοηθά στην περαιτέρω προβολή των γλυκοπρωτεϊνών, στα άκρα των οποίων αποκαλύπτονται όλο και εντονότερα οι υφιστάμενοι υποδοχείς για την σύζευξη του κυττάρου προς κύτταρο (cell to cell interaction).

2. Από τις αντίστοιχες μελέτες φαίνεται ότι όλο και περισσότεροι ερευνητές αποδέχονται την θεωρία της ύπαρξης δύο συστημάτων ισορροπίας δομικών μορίων για την ερμηνεία των αιμοπεταλιακών λειτουργιών (αντίδραση αλλαγής σχήματος, αντίδραση έκλυσης του περιεχομένου των κοκκίων, αντίδραση συσσώρευσης, όπως επίσης και συστολή του θρόμβου).

Το πρώτο σύστημα ισορροπίας αντιπροσωπεύεται από ένα ντεπόζιτο ακτίνης σε μονομερή και πολυμερή μορφή. Τα ινώδη πολυμερή της ακτίνης αντιδρούν με την μυοσίνη.

Το δεύτερο σύστημα ισορροπίας αντιπροσωπεύεται από μια μοριακή δεξαμενή η οποία περιλαμβάνει την μυοσίνη και τα πολυμερή της, τα οποία συσσωρεύονται σε πολυμερή ινίδια μυοσίνης. Όταν τα αιμοπετάλια κυκλοφορούν σε συνθήκες ηρεμίας και χαρακτηρίζονται από δισκοειδές σχήμα αμφίκυρτου φακού και οι δύο μοριακές δεξαμενές ευρίσκονται σε μια ισορροπία στρεφόμενη προς την υψηλώς ποσοτική αριθμητική κυριαρχία των ως άνω πρωτεϊνών (ακτίνη και μυοσίνη) υπό την μονομερή τους μορφή. Όταν τα αιμοπετάλια τείνουν να ενεργοποιηθούν ή ήδη ενεργοποιούνται τα δύο

μακρομόρια στα αντίστοιχα ντεπόζιτά τους τείνουν σε ισορροπίες στις οποίες το κάθε είδους μορίου (δηλαδή η ακτίνη ή η μυοσίνη) στρέφεται προς πολυμερισμένη του μορφή. Η έρευνα που αποτελεί την βάση όλων των περιγραφών του πρωτεϊνικού δομικού – λειτουργικού συγκροτήματος των αιμοπεταλίων είναι πολύ εκτεταμένη και αποτελεί ένα σύγχρονο αντικείμενο εντατικής μελέτης. Οι βασικές παραπομπές επί των οποίων στηρίζεται η περιγραφή που κάναμε στις προηγούμενες σελίδες είναι οι ακόλουθες: 16, 17, 18, 19, 20, 41, 42, 44, 52, 61, 80, 82, 83, 84, 105, 106, 107, 108, 111, 112, 117, 132, 152, 153, 154, 155, 164, 165, 170, 171, 174, 175, 179, 197, 199, 203, 206, 209, 217, 226, 228, 230.

Ο ρόλος του ιονισμένου ασβεστίου είναι κρίσιμος για την αλληλοδιαδοχή των φαινομένων αυτών. Κατωτέρω γίνεται μια, επί τροχάδην, αναφορά για την λειτουργία του ιονισμένου ασβεστίου στα αιμοπετάλια.

### ***1.3.2. Ο Ρόλος του ιονισμένου ασβεστίου ως κυρίαρχου διαβιβαστή δευτέρας τάξης (second messenger) των αιμοπεταλιακών λειτουργιών.***

#### ***Γενικά περί του κατιόντος ασβεστίου στα αιμοπετάλια***

Τα ιόντα του ασβεστίου  $Ca^{2+}$  και οι μεταβολές των επιπέδων τους στο εσωτερικό όχι μόνον των αιμοπεταλίων αλλά και όλων των μελετηθέντων ειδών ζωικών και φυτικών κυττάρων φαίνεται ότι υποδύονται σπουδαίους ρόλους για την ρύθμιση σχεδόν του συνόλου των ενδοκυττάρων φαινομένων. Ειδικά για τα αιμοπεταλιακά κύτταρα το  $Ca^{2+}$  μεσολαβεί σε πληθώρα κυτταρικών λειτουργιών, όπως είναι η διαμόρφωση του πολυμερισμού των μορίων του κυτταροσκελετού, η ανάπτυξη της κινητικότητας, η λειτουργία των συσταλών πρωτεϊνών, η ρύθμιση της λειτουργίας πολλών ενζύμων και γενικότερα του μεταβολισμού, οι διαδικασίες της εξωκυττάρωσης του περιεχομένου των μορίων (αντίδραση έκλυσης ή release reaction).

Τα ιονισμένο  $Ca^{2+}$  που απαντάται ελεύθερο στο εσωτερικό του αιμοπεταλιακού κυττάρου έχει διττή προέλευση και συγκεκριμένα προέρχεται α) από το εξωκυττάριο περιβάλλον, δηλαδή από το πλάσμα του αίματος και β) από ενδοκυττάρια ντεπόζιτα, όπως εκείνα του ενδοπλασματικού δικτύου των αιμοπεταλίων και των μιτοχονδρίων.

Το ελεύθερο ιονισμένο  $Ca^{2+}$  στο εσωτερικό των περισσότερων κυττάρων κυμαίνεται μεταξύ των συγκεντρώσεων 50 έως 300 nM, ενώ οι υπόλοιπες ποσότητές του είναι εγκλωβισμένες σε επί μέρους ενδοκυττάρια διαμερίσματα. Οι συγκεντρώσεις του



εξωκυττάριου ασβεστίου είναι πολύ υψηλότερες εν σχέσει με τις αντίστοιχες του ενδοκυττάριου αυτού κατιόντος. Η πολύ μεγάλη κλίση της συγκέντρωσης του ιονισμένου ασβεστίου εντός και εκτός της κυτταροπλασματικής μεμβράνης επιτυγχάνεται με την χρήση ενός πολύ ισχυρού μηχανισμού ελέγχου της διαμεμβρανικής διαβατότητας του  $\text{Ca}^{2+}$ , ο οποίος δεν επιτρέπει την είσοδο παρά πολύ μικρών ποσοτήτων  $\text{Ca}^{2+}$ , το οποίο επίσης, μόλις περάσει την μεμβράνη δεσμεύεται ταχύτατα σε υποκυττάρια διαμερίσματα εξειδικευμένα για την αποθήκευση του εν λόγω ιόντος. Μια μαζική, μη ελεγχόμενη είσοδος ασβεστίου θα σήμαινε την καταστροφή οιοδήποτε κυττάρου και φυσικά ο ρόλος του στην πυροδότηση του αυτόματου κυτταρικού θανάτου είναι καθοριστικός. Η διακίνηση αυτών των ελάχιστων ποσοτήτων ασβεστίου απαιτεί την προσφορά ενέργειας, δηλαδή πρόκειται περί ενός μηχανισμού ενεργού μεταφοράς.

Ο ρόλος του κατιόντος ασβεστίου στην αιμόσταση είναι γνωστός από πολλά χρόνια. Γενικά τα κατιόντα του ασβεστίου συμμετέχουν στα εξής βήματα της πορείας της αιμόστασης:

1) Στην ενεργοποίηση της αρχικής αιμόστασης και συγκεκριμένα:

α) στην σύνδεση του ινωδογόνου στους εξειδικευμένους του υποδοχείς της αιμοπεταλιακής μεμβράνης.

β) στην διαβίβαση του σήματος διέγερσης στο εσωτερικό του αιμοπεταλιακού κυττάρου μέσω του συστήματος των G – πρωτεϊνών.

γ) στην αντίδραση έκλυσης του περιεχομένου των αποθηκευμένων στα αιμοπεταλιακά κοκκία ουσιών.

2) Στην ενεργοποίηση της πήξης και συγκεκριμένα:

α) στην συμμετοχή του στην απελευθέρωση ουσιών που παίρνουν μέρος στον σχηματισμό της θρομβίνης.

β) στην συμμετοχή του στον σχηματισμό των ενζυμικών συμπλεγμάτων της πήξης, όπως των δεκασών I και II και της προθρομβινάσης.

### ***1.3.3. Η έννοια του δευτέρου διαβιβαστή (second messenger) και το κατιόν ασβεστίου***

Ο ρόλος του δευτέρου αγγελιοφόρου (second messenger) στην μεταγωγή σήματος είναι κρίσιμης σημασίας για την ενεργοποίηση των κυτταρικών δομών που ευρίσκονται στα επίπεδα οργάνωσης του κυττάρου κάτω από την κυτταροπλασματική μεμβράνη. Το κατιόν  $\text{Ca}^{2+}$  παίζει τον ρόλο δευτέρου αγγελιοφόρου για τις αιμοπεταλιακές αντιδράσεις και είναι ιδιαίτερος σημαντική η γνώση των μηχανισμών της κυτταρικής απάντησης στους οποίους εμπλέκεται, για λόγους που αφορούν τον φαρμακολογικό χειρισμό της αιμοπεταλιακής λειτουργίας στις ποικίλες θεραπευτικές παρεμβάσεις στον άνθρωπο και στο ζώο γενικότερα. Τα σηματοδοτικά μόρια πρώτης τάξεως, όπως π.χ οι ποικίλοι νευροδιαβιβαστές, οι ορμόνες, τα αυτακοειδή, οι κυτταροκίνες, τα προϊόντα του μεταβολισμού, όπως το ADP, τα ένζυμα τύπου θρομβίνης, οι διεγέρτες τύπου κολλαγόνου, τα καρκινικά κύτταρα που επίσης διεγείρουν την αιμοπεταλιακή συσσώρευση, παρά την πολύ μεγάλη ποικιλομορφία που κατέχουν ως αγγελιοφόροι διέγερσης, εν τούτοις φαίνεται να συγκλίνουν σε λίγους ενδιάμεσους μηχανισμούς για την μεταγωγή του σήματος ενεργοποίησης του κυττάρου πέραν του επιπέδου του πρώτου υποδοχέα (κυτταροπλασματική μεμβράνη) προς το εσωτερικό του αιμοπεταλιακού κυττάρου. Φαίνεται ακόμη ότι οι ενδιάμεσοι μηχανισμοί που σήμερα είναι κοινώς αποδεκτοί από την πλειοψηφία των μελετητών της αιμοπεταλιακής φυσιολογίας και οι οποίοι αντιπροσωπεύονται από την οδό του ADP, του PAF και του αραχιδονικού οξέος, καταλήγουν σε έναν τελικό δρόμο που πραγματοποιεί τις αιμοπεταλιακές αντιδράσεις. Ο κρίσιμος μεταβολίτης αυτής της τελικής οδού φαίνεται να είναι η θρομβοξάνη  $\text{A}_2$ , που, όπως θα δούμε παρακάτω, αποτελεί έναν μεταβολίτη της οδού του αραχιδονικού οξέος. Σε όλες αυτές τις ενδοκυττάρια αντιδράσεις το  $\text{Ca}^{2+}$  παίζει έναν εξέχοντα ρόλο.

Συνολικά οι αντιδράσεις στις οποίες η παρουσία του  $\text{Ca}^{2+}$  αποδεικνύεται απαραίτητη είναι οι εξής: Δράση ADP, δράση PAF, δράση Αραχιδονικού οξέος, δράση κολλαγόνου, δράση θρομβίνης, δράση επινεφρίνης, δράση ριστοσετίνης, συσσωρευτική δράση καρκινικών κυττάρων, δράση ιονοφόρου A123187.

Πολυμερισμός μορίων ακτίνης, ενσωμάτωση μυοσίνης επί των μορίων της ακτίνης, διολίσθηση ινών μυοσίνης επί των ινιδίων της ακτίνης, ενσωμάτωση επικουρικών πρωτεϊνών στα συγκροτήματα της ακτίνης και μυοσίνης, δράση καλμοντουλίνης.

Προεκβολή ψευδοποδίων, συστολή των στοιχείων του αιμοπεταλιακού κυτταροσκελετού, αντίδραση αλλαγής σχήματος, αντίδραση εξωκυττάρωσης του περιεχομένου των κοκκίων, μη αντιστρεπτή συσσώρευση των αιμοπεταλίων, συστολή του αιμοπεταλιακού θρόμβου.

Όλες αυτές οι λειτουργίες ελέγχονται τελικά από τα ιόντα  $Ca^{2+}$ , οπότε αντιλαμβάνεται κανείς την σπουδαιότητα και την κρισιμότητα του ρόλου του.

### ***Πρόελευση του $Ca^{2+}$ , ντεπόζιτα, κινητοποίηση***

Η μεγαλύτερη ποσότητα του κατιόντος ασβεστίου βρίσκεται ενσωματωμένη σε μια ποικιλία ενδοκυτταρικών διαμερισμάτων όπως είναι:

- A) Η πλασματική επιφάνεια της μεμβράνης με τα φωσφολιπίδια που την αποτελούν
- B) Οι ενδοκυττάρειες πρωτεΐνες, όπως η καλμοντουλίνη και οι ενδοκυττάρειες φωσφορικές ενώσεις οι οποίες δεσμεύουν κατιόντα ασβεστίου σε πολύ μεγάλο ποσοστό.
- Γ) Το ενδοπλασματικό δίκτυο των αιμοπεταλίων, καθώς επίσης και το δίκτυο των πυκνών σωληναρίων (τα οποία μεταφέρουν ενεργά  $Ca^{2+}$ ), αποτελώντας έτσι το σημαντικότερο ντεπόζιτο του  $Ca^{2+}$  για το αιμοπεταλιακό κύτταρο. Από την αποθήκη αυτή μπορούμε να έχουμε κινητοποίηση του κατιόντος ασβεστίου και απελευθέρωσή του στο κυτταρόπλασμα για την πραγματοποίηση των φαινομένων στα οποία η παρουσία του είναι απαραίτητη.

Δηλαδή συνοψίζοντας έχουμε δύο μεγάλα διακριτά ντεπόζιτα ασβεστίου: 1) Το ντεπόζιτο της εξωτερικής πλευράς της μεμβράνης και 2) Το ντεπόζιτο των πυκνών σωληναρίων και των πυκνών σωματίων όπου φιλοξενείται αποθηκευμένη η μεγαλύτερη ποσότητα κατιόντος ασβεστίου (που υπερβαίνει το 80% του συνολικού αιμοπεταλιακού ιονισμένου ασβεστίου).

Η συγκέντρωση του ιονισμένου ασβεστίου στα ήρεμα αιμοπετάλια κυμαίνεται μεταξύ 90 – 100 nM. Αντιθέτως η συγκέντρωση του ιονισμένου ασβεστίου στο αίμα είναι  $10^4$  φορές μεγαλύτερη. Αναγκαστικά η κλίση ενός μορίου, το οποίο στην μια πλευρά της μεμβράνης εμφανίζει συγκέντρωση 10.000 φορές μεγαλύτερη από την αντίστοιχη της άλλης μεμβρανικής πλευράς, δημιουργεί μια ισχυρότατη – σχεδόν εκρηκτική – τάση εισόδου του μορίου προς την πλευρά της χαμηλότερης συγκέντρωσης. Έτσι η διέγερση των αιμοπεταλίων με ADP, PAF, αραχιδονικό οξύ, θρομβίνη, αγγειοπιεσίνη (vasopressin), και σεροτονίνη, δημιουργεί μια αστραπιαία αύξηση της συγκέντρωσης του ελεύθερου

ιονισμένου  $\text{Ca}^{2+}$  5 έως 10 φορές πάνω από την προϋπάρχουσα εσωτερική συγκέντρωση. Το εισερχόμενο ασβέστιο είναι πλέον στην θέση να ενεργοποιήσει όλο το μενού των προγραμμάτων και των αυτοματισμών του αιμοπεταλίου.

### ***Η αποθήκευση και κινητοποίηση του ασβεστίου***

Δεν θα αναφερθούμε στην ομοιοστασία των κατιόντων του ασβεστίου, η οποία εκφεύγει από τα όρια της παρούσας διατριβής, παραπέμποντας στα σχετικά εγχειρίδια φυσιολογίας και ενδοκρινολογίας. Γενικά η καθήλωση και η αποθήκευση των κατιόντων ασβεστίου μέσα στα αιμοπεταλιακά κύτταρα (και στα κύτταρα εν γένει) ευρίσκεται κάτω από στενό ομοιοστατικό έλεγχο, ώστε τα επίπεδα του εν λόγω ιόντος να ευρίσκονται μέσα σε εκείνα τα όρια τα οποία δεν επιτρέπουν την ενεργοποίηση των κυττάρων, πάντοτε, φυσικά, υπό συνθήκες ηρεμίας. Όπως είπαμε και προηγουμένως η πλασματική πλευρά της κυτταρικής μεμβράνης, το ενδοπλασματικό δίκτυο και το σύστημα των πυκνών σωληναρίων συμμετέχουν ενεργά στην μεταφορά του ασβεστίου από το κυτταρόπλασμα προς την αποθήκη των πυκνών σωματίων. Από τα υπάρχοντα δεδομένα φαίνεται ότι η αύξηση της συγκέντρωσης του κυτταροπλασματικού  $\text{Ca}^{2+}$  ευρίσκεται υπό τον έλεγχο των εξής μηχανισμών:

1<sup>ov</sup>) Μιας ΑΤΡάσης εξαρτώμενης από το  $\text{Ca}^{2+}$  και το  $\text{Mg}^{2+}$ , η οποία είναι ενσωματωμένη στο σύστημα των πυκνών σωληναρίων και πραγματοποιεί την συσσώρευση του κατιόντος ασβεστίου στα πυκνά σωματίδια. Η συσσώρευση στα εν λόγω σωματίδια είναι μια χρονοεξαρτώμενη λειτουργία, με παροδικό χαρακτήρα, με συγκεκριμένες σταθερές κινητικής, σχετιζόμενη με τα επίπεδα των ιόντων ασβεστίου και μαγνησίου, τα οποία θέτουν σε ενεργοποίηση την ΑΤΡάση  $\text{Ca}^{2+} - \text{Mg}^{2+}$ . Η εξάρτηση της συγκεκριμένης ΑΤΡάσης από τις συγκεντρώσεις των κατιόντων ασβεστίου – μαγνησίου φαίνεται από την μείωση της δραστηριότητάς της που πραγματοποιείται με την χρήση του EDTA, το οποίο, ως γνωστόν δεσμεύει με χυλικό τρόπο τα δισθενή κατιόντα, αλλάζοντας την φυσικοχημεία τους, εφ' όσον πλέον δεν είναι σε ελεύθερη μορφή. Η αύξηση της συγκέντρωσης του EDTA στα 2 mM αναστέλλει εντελώς την ενεργοποίηση της ΑΤΡάσης, ενώ η παρουσία του μαγνησίου αυξάνει την ενσωμάτωση του ασβεστίου σε μια πρωτεΐνη του αποθηκευτικού συστήματος 2 φορές περισσότερο από την χωρίς μαγνήσιο ενσωμάτωση. Η δραστηριότητα της ΑΤΡάσης εξαρτάται επίσης από την φωσφολιπιδική σύσταση της μεμβράνης. Η φωσφατιδυλοσερίνη και η φωσφατιδυλοϊνοσιτόλη ευνοούν την λειτουργία της ΑΤΡάσης.

2<sup>ov</sup>) Η αντλία ανταλλαγής ιόντων Na<sup>+</sup> με ιόντα Ca<sup>2+</sup> φαίνεται ότι λειτουργεί ως μηχανισμός δέσμευσης των ιόντων ασβεστίου. Η αντλία αυτή ευρίσκεται στην πλασματική πλευρά της μεμβράνης και συντηρεί τα επίπεδα του ασβεστίου στα φυσιολογικά του όρια, στα πλαίσια της ομοιοστασίας του ρύθμισης. Όπως προείπαμε, τα πλαίσια αυτά είναι εκείνα τα οποία κρατούν τα αιμοπετάλια στην κατάσταση ηρεμίας τους, δηλαδή εκτός ενεργοποίησης. Η λειτουργία της αντλίας ανταλλαγής Na<sup>+</sup> - Ca<sup>2+</sup> ελέγχεται από την φωσφορυλίωση μιας πρωτεϊνικής κινάσης εξαρτημένης από το κυκλικό AMP. Η κινάση αυτή είναι μια πρωτεΐνη 23 kDa η οποία όταν φωσφορυλιωθεί διεγείρει την δέσμευση των ιόντων του Ca<sup>2+</sup> και για τον λόγο αυτό το c - AMP αυξανόμενο αναστέλλει την λειτουργικότητα των αιμοπεταλίων.

Η μελέτη των ενδοαιμοπεταλιακών επιπέδων του ελεύθερου ιονισμένου ασβεστίου έγινε δυνατή με την ανάπτυξη μιας σειράς τεχνικών οι οποίες επικεντρώνονται στην χρήση φθορίζουσών ουσιών, ικανών να δεσμεύουν το κατιόν του ασβεστίου. Π.χ οι ουσίες Quin 2, aequorin και γλωροτετρακυκλίνη, φαγοκυτταρώνονται από τα αιμοπετάλια και εισερχόμενες στο κυττόπλασμα, δεσμεύουν το ελεύθερο ενδοαιμοπεταλιακό τους ασβέστιο αποδίδοντας φθορισμό, η ένταση του οποίου μπορεί να ποσοτικοποιηθεί μέσω φθορισμομετρικών διατάξεων. Επίσης μια έμμεση δυνατότητα υπολογισμού της αύξησης του ενδοκυττάριου ελεύθερου κατιόντος ασβεστίου δίδεται από την εκμετάλλευση της αντίδρασης της λουσιφερίνης – λουσιφεράσης μέσω της μεθόδου της χημειοφωταύγειας.

Η κινητοποίηση του κατιόντος ασβεστίου Ca<sup>2+</sup> από τις ενδοκυττάριες αποθήκες του πραγματοποιείται με δύο μηχανισμούς:

1<sup>ov</sup>) Κατόπιν εξωγενούς διέγερσης και 2<sup>ov</sup>) μέσω της δράσης φυσιολογικών ενδογενών ιονοφόρων ουσιών. Αναλυτικότερα έχουμε τα εξής:

Στην κινητοποίηση μέσω της εξωγενούς διέγερσης φαίνεται ότι αμέσως μετά την πρόσδεση του διεγέρτη στους υποδοχείς του, στο επίπεδο της κυτταρικής μεμβράνης και κατόπιν, λαμβάνει χώρα απελευθέρωση ποσοτήτων Ca<sup>2+</sup>, από το ντεπόζιτο της μεμβράνης. Εδώ η απελευθέρωση του ασβεστίου είναι μάλλον εστιακή και οδηγεί σε τοπική αύξηση της συγκέντρωσής του στην αντίστοιχη υπομεμβρανική περιοχή, πάνω από την οποία ευρίσκεται η τοπογραφική θέση του υποδοχέα που κατελήφθη από τον συγκεκριμένο διεγέρτη. Φυσικά, ουδέποτε σχεδόν έχουμε την κατάληψη

μόνον ενός υποδοχέα από ένα μοναδικό μόριο – διεγέρτη, αλλά την ταυτόχρονη κατάληψη πολλών υποδοχέων, οπότε μια αξιόλογη ποσότητα ιόντων ασβεστίου αποδεσμεύεται από το ντεπόζιτο της μεμβράνης, οπότε είναι δυνατόν να ακολουθήσουν τις εξής πορείες: Ή να ενσωματωθούν σε ένα πρωτεϊνικό κλάσμα που υπάρχει στο σύστημα των πυκνών σωληναρίων (που έχει την ικανότητα να ενσωματώνει ή να απελευθερώνει ασβέστιο), ή να λάβει χώρα σημαντική αύξηση της συγκέντρωσής τους στο κυτταρόπλασμα οδηγώντας στον μαζικό σχηματισμό συμπλεγμάτων  $Ca^{2+}$  - καλμοντουλίνης. Το τελευταίο αυτό συμβάν αυτόματα καταλήγει σε πολυμερισμό της ακτίνης των αιμοπεταλίων και σε ενεργοποίηση της κίνησης των ελαφρών αλύσεων της μυοσίνης, με αποτέλεσμα την αντίδραση μυοσίνης – ακτίνης και την εισαγωγή των φαινομένων συστολής που περιγράψαμε ανωτέρω. Με τον τρόπο αυτό εισάγεται η συνολική ενεργοποίηση των φαινομένων συστολής του αιμοπεταλιακού κυτταροσκελετού και η αντίδραση έκλυσης του περιεχομένου των κοκκίων.

Στην κινητοποίηση του κατιόντος ασβεστίου μέσω ενδογενών ιονοφόρων, επίσης πραγματοποιείται απελευθέρωση ασβεστίου από το σύστημα των πυκνών σωληναρίων. Η σύνθεση των ενδογενών ιονοφόρων λαμβάνει χώρα σαν αποτέλεσμα της αντίδρασης διεγερτών – υποδοχέων, οπότε δημιουργείται μια κατάσταση σύμφωνα με την οποία μικρές ποσότητες  $Ca^{2+}$  μπορούν να συσσωρευτούν στο κυτταρόπλασμα. Αυτή η συσσώρευση των ιόντων του  $Ca^{2+}$  οδηγεί με την σειρά της στην σύνθεση των ιονοφόρων μέσα από δύο διαφορετικές μεταβολικές πορείες:

α) την οδό των ενδοϋπεροξειδίων του αραχιδονικού οξέος, που οδηγεί στον σχηματισμό της θρομβοξάνης  $A_2$

και β) την ανεξάρτητη από τα ενδοϋπεροξειδία οδό, που οδηγεί στο καταληκτικό σημείο της σύνθεσης του φωσφατιδικού οξέος. Τόσο η θρομβοξάνη  $A_2$ , όσο και το φωσφατιδικό οξύ, είναι εξαιρετικά ιονοφόρα μόρια.

Αναλυτικότερα οι δύο αυτές ανεξάρτητες οδοί έχουν ως εξής:

α) Η οδός των ενδοϋπεροξειδίων (οδός του αραχιδονικού οξέος) ξεκινά από την ενεργοποίηση της φωσφολιπάσης  $A_2$ , η οποία ως ένζυμο διεγείρεται από το ιονισμένο ασβέστιο. Η φωσφολιπάση  $A_2$  απελευθερώνει αραχιδονικό οξύ

που ευρίσκεται εστεροποιημένο στα φωσφολιπίδια της μεμβράνης και ειδικότερα από την φωσφατιδυλοχολίνη και την φωσφατιδυλοϊνοσιτόλη. Η τριφωσφορική ινοσιτόλη παίζει επίσης έναν σημαντικό ρόλο στην εν λόγω πορεία διότι λειτουργεί ως δεύτερος αγγελιοφόρος και διεγείρει φωσφορυλιώσεις πρωτεϊνών εξαρτώμενες από το  $Ca^{2+}$ . Οι πρωτεΐνες αυτές (20 και 23 kDa) είναι ανάλογες με την φωσφορυλίωση της πρωτεΐνης των 23 kDa, που εξαρτάται από το c - AMP. Η ανάλυση της αραχιδονικής οδού και της οδού των τριφωσφοϊνοσιτιδίων θα γίνει παρακάτω. Το αραχιδονικό οξύ που προέκυψε από την υδρόλυση των εστέρων του μέσω της δράσης της φωσφολιπάσης  $A_2$  στα φωσφολιπίδια της μεμβράνης υφίσταται μια σειρά μετατροπών οξειδωτικού ως επί το πλείστον χαρακτήρα καταλήγοντας σε ένα τελικό προϊόν, την θρομβοξάνη  $A_2$ , η οποία λειτουργεί ως ιονοφόρος του ασβεστίου, πυροδοτώντας όλες τις ασβεστιοεξαρτώμενες ενεργοποιήσεις του εσωτερικού των αιμοπεταλίων, που οδηγούν στην συσσώρευση αυτών.

β) Η δεύτερη οδός σχηματισμού ενδογενών ιονοφόρων του ασβεστίου είναι ανεξάρτητη από τα ενδοϋπεροξειδία του αραχιδονικού οξέος. Η αρχική υπόθεση που οδήγησε στον εντοπισμό αυτής της οδού βασίστηκε στην παρατήρηση ότι μερικοί αγωνιστές - όπως το ADP, η θρομβίνη, το κολλαγόνο - όταν χορηγηθούν σε αυξημένες συγκεντρώσεις, είναι σε θέση να προκαλέσουν μεταβολή σχήματος και έκκριση σε αιμοπετάλια επεξεργασμένα με ασπιρίνη, η οποία, ως γνωστόν, αναστέλλει την λειτουργία της οδού των ενδοϋπεροξειδίων του αραχιδονικού οξέος. Οι υψηλές συγκεντρώσεις των εν λόγω αγωνιστών στα ασπιρινισμένα αιμοπετάλια φαίνεται ότι εισάγουν την ενεργοποίησή τους μέσω άλλου μηχανισμού και η ανάλυση του φαινομένου αυτού έδειξε ότι προκύπτει η παραγωγή φωσφατιδικού και λυσοφωσφατιδικού οξέος, τα οποία δείχνουν ιδιότητες ιονοφόρων του  $Ca^{2+}$ .

Τα οργανικά αυτά οξέα προκύπτουν από μονογλυκερίδια και διγλυκερίδια, τα οποία απελευθερώνονται δια υδρολύσεως της φωσφατιδυλοϊνοσιτόλης, μέσω της παρέμβασης ενός άλλου ενζύμου, της φωσφολιπάσης C (PLC), με αποτέλεσμα την αύξηση της εισόδου του κατιόντος ασβεστίου. Στην προκειμένη περίπτωση το  $Ca^{2+}$  δρα ως δεύτερος αγγελιοφόρος και ενεργοποιεί την αποδέσμευσή του από τα ενδοαιμοπεταλιακά του

ντεπόζιτα, προκαλώντας όλα τα συνοδά φαινόμενα της αιμοπεταλιακής ενεργοποίησης. Συνεπώς στην εν λόγω περίπτωση το  $Ca^{2+}$  εισάγει αποδέσμευση  $Ca^{2+}$ .

Από τα ανωτέρω προκύπτει ότι η θρομβοξάνη, το φωσφατιδικό οξύ, το λυσοφωσφατιδικό οξύ, είναι ενδογενή ιονοφόρα μόρια, τα οποία απελευθερώνουν  $Ca^{2+}$  από ένα πρωτεϊνικό κλάσμα που ευρίσκεται στην πλασματική πλευρά της κυτταρικής μεμβράνης, όπως επίσης και στο σύστημα των πυκνών σωληναρίων. Το κλάσμα αυτό μπορεί να απομονωθεί με υπερφυγοκέντρωση στα 100.000 g αιμοπεταλίων που έχουν υποστεί λύση. Τα ιονοφόρα μόρια που προαναφέραμε αυξάνουν την συγκέντρωση του ελεύθερου ιονισμένου ασβεστίου, το οποίο με την σειρά του υπερβαίνοντας έναν φραγμό συγκέντρωσης, πυροδοτεί όλα τα ασβεστιοεξαρτώμενα φαινόμενα του πολυμερισμού της ακτίνης και της ενεργοποίησης της μυοσίνης. Δηλαδή το ιόν του ασβεστίου μιμείται από μόνο του τα αποτελέσματα της δράσης της αιμοπεταλιακής ενεργοποίησης. Είναι γνωστό ότι μια μικροένεση  $Ca^{2+}$  στο κύτταρο ενεργοποιεί αυτόματα τις λειτουργίες του κυττάρου (βιβλιογραφία).

### ***Πρωτεΐνες – φορείς του $Ca^{2+}$ - η καλμοντουλίνη***

Η καλμοντουλίνη (calmodulin) αντιπροσωπεύει μια μικρή ευδιάλυτη κυτταροπλασματική πρωτεΐνη μοριακού βάρους 16, 68 kDa, η οποία απαντάται στα αιμοπετάλια αλλά και σε όλες σχεδόν τις σειρές κυττάρων του φυσιολογικού οργανισμού, εξαιρετέων των γραμμωτών μυικών ινών, όπου εμφανίζεται υπό την εξειδικευμένη μορφή της τροπονίνης C. Η καλμοντουλίνη είναι ένας πρωτεϊνικός φορέας των ιόντων του ασβεστίου και καταλύει μια σειρά αντιδράσεων οι οποίες εξαρτώνται από αυτό και σχετίζονται με την πυροδότηση των φαινομένων της διολίσθησης των μορίων της μυοσίνης επί της ακτίνης για την πραγματοποίηση της συστολής των συσταλών δομών του αιμοπεταλιακού κυττάρου. Η καλμοντουλίνη ως πρωτεΐνη ανήκει στην οικογένεια των καλβιδινών. Αποτελείται από 148 αμινοξέα εκ των οποίων περίπου τα 50 αντιπροσωπεύονται από την γλουταμίνη και την ασπαραγίνη. Το μόριο της καλμοντουλίνης στερείται των αμινοξέων κυστεΐνης και τρυπτοφάνης. Η εν λόγω πρωτεΐνη περιλαμβάνει τέσσερες περιοχές όπου συνδέεται το κατιόν του ασβεστίου. Κάθε μια από τις περιοχές σύνδεσης αποτελείται από δύο α – έλικες μεταξύ των οποίων παρεμβάλλεται το κέντρο σύνδεσης του ασβεστίου.

Η πρόσδεση του κατιόντος ασβεστίου στην καλμοντουλίνη δεν είναι ένα απλό παθητικό γεγονός αλλά ακολουθείται από πολύ μεγάλες μεταβολές της στερεοδιάταξης της



πρωτεΐνης, όπως προβολή προς τα έξω και εμφάνιση υδρόφοβων περιοχών λόγω αύξησης των  $\alpha$  – ελίκων. Εξ αιτίας των μεταβολών αυτών η καλμοντουλίνη αναγνωρίζεται από ένζυμα, τα οποία ενεργοποιούνται από το σύμπλεγμα που συγκροτείται μεταξύ αυτής και των κατιόντων του ασβεστίου. Ένζυμα που ενεργοποιούνται από το σύμπλεγμα [ $\text{Ca}^{2+}$  - καλμοντουλίνης] είναι κάποιες κινάσες πρωτεϊνών (π.χ η κινάση των ελαφρών αλύσεων της μυοσίνης, η κινάση της φωσφορυλάσης κ.α), φωσφοδιεστεράσες (όπως του  $c$  – AMP και του  $c$  – GMP) και πρωτεάσες, όπως η καλπαΐνη, που συναντούμε στον μηχανισμό της απόπτωσης. Συνεπώς, όσον αφορά την λειτουργία των συστατών μοριακών συστημάτων των αιμοπεταλίων, η φορτισμένη με κατιόντα ασβεστίου καλμοντουλίνη ενεργοποιεί την φωσφορυλίωση των ελαφρών αλυσίδων της μυοσίνης. Την δράση αυτή αναστέλλει ο εκλεκτικός αναστολέας της καλμοντουλίνης, δηλαδή η ένωση με το κωδικό γράμμα W7. Η καλμοντουλίνη μαζί με την τροπονίνη C, καθώς και τις προλευκωματίνες (prealbumines) συναποτελούν μια ομάδα ενδοκυττάρων πρωτεϊνών μικρού μοριακού βάρους, οι οποίες δεσμεύουν εκλεκτικά τα ιόντα του  $\text{Ca}^{2+}$  και για τον λόγο αυτό ονομάζονται και ασβεστιοπρωτεΐνες (calcioproteins). Από το σύνολο αυτών των ενώσεων η καλμοντουλίνη έχει μελετηθεί περισσότερο και αναλυτικότερα εξ αιτίας του κρίσιμου ρόλου που βρέθηκε να παίζει στις ποικίλες κυτταρικές λειτουργίες, καθώς αυτή ελέγχει την δέσμευση ή απελευθέρωση των ιόντων  $\text{Ca}^{2+}$ . Η περιγραφή των αιμοπεταλιακών δομών όπως παρουσιάστηκε στις προηγούμενες σελίδες προέκυψε από την μελέτη μιας μεγάλης σειράς σχετικών άρθρων, τα οποία ανευρίσκονται στην παρατιθέμενη εκ μέρους μας βιβλιογραφία με τους σχετικούς ακόλουθους αριθμούς: 3, 5, 6, 16, 18, 19, 20, 26, 34, 35, 36, 37, 41, 42, 50, 51, 52, 58, 59, 61, 62, 71, 75, 76, 82, 154, 156, 184, 191, 193).

## ***1.4. Ο Μεταβολισμός των αιμοπεταλίων και ο ρόλος του στις αιμοπεταλιακές αντιδράσεις***

### ***1.4.1. Γενικά***

Τα αιμοπετάλια αποτελούν απύρηνα κύτταρα τα οποία, κατ' αντίθεση με ό,τι συμβαίνει στα ερυθροκύτταρα, είναι προικισμένα και με αερόβιο ενεργειακό μεταβολισμό, εδραζόμενο στα μιτοχόνδρια, τα οποία κληρονομούν από το μητρικό τους μεγακαρυοκύτταρο. Η γλυκολυτική αλυσίδα επίσης λειτουργεί στα αιμοπεταλιακά κύτταρα, αποτελώντας έναν σημαντικό μηχανισμό παραγωγής ενέργειας σε έκτακτες περιστάσεις, όπως θα δούμε παρακάτω. Επίσης στα αιμοπετάλια είναι ενεργός και ο δρόμος των φωσφορικών πεντοζών. Συνεπώς η ενέργεια των αιμοπεταλίων προσπορίζεται μέσω γλυκογονόλυσης, γλυκόλυσης, δρόμου των φωσφορικών πεντοζών, κύκλου του Krebs και οξειδωτικής φωσφορυλίωσης.

Τα αιμοπετάλια αποτελούν την έδρα υψηλής μεταβολικής δραστηριότητας, η οποία κορυφώνεται κατά την διάρκεια των φαινομένων της ενεργοποίησής τους. Ωστόσο, ακόμη και στην βασική τους ήρεμη κατάσταση, τα αιμοπετάλια είναι κύτταρα υψηλού μεταβολισμού, παρά το γεγονός ότι δεν διαθέτουν πυρήνα για να πραγματοποιούν συνθέσεις νουκλεϊνικών οξέων. Δεν είναι μεν σε θέση να συνθέσουν νουκλεοτίδια και νουκλεϊνικά οξέα αλλά συνθέτουν de novo λιπίδια, και γλυκογόνο. Τα νεαρά αιμοπετάλια διαθέτουν έναν υπολειμματικό αριθμό λειτουργικών ριβοσωμάτων. Τα νεαρά αιμοπετάλια παρουσιάζουν επίσης ιδιότητες αντιπλασμίνης, εμφανίζουν αξιόλογο αριθμό σωματίων γλυκογόνου και λιποσωμάτων, ενώ τα κατάλοιπα του ριβοσωμιακού κλάσματος στο κυτταρόπλασμά τους συνηγορούν υπέρ μιας περιορισμένης πρωτεϊνοσυνθετικής ικανότητας για δύο τουλάχιστον πρωτεΐνες: του ινωδογόνου και του παράγοντα XIII.

Όπως είναι αναμενόμενο, η έλλειψη γενετικού υλικού, όπως και εμφανούς πρωτεϊνοσυνθετικού μηχανισμού καθιστούν τα αιμοπετάλια ευάλωτα στις μεταβολές και ανάκαινα να διορθώσουν τις συσσωρευόμενες μοριακές τους βλάβες, πράγμα που αν συνέβαινε πιθανόν να καθιστούσε λιγότερο αποτελεσματικές τις κύριες λειτουργίες τους που είναι ο σχηματισμός των θρόμβων, η αποτροπή της απώλειας αίματος μέσω αιμορραγίας και η προστασία των αγγείων από τα αποτελέσματα των τραυματισμών τους. Γενικά, η έλλειψη πυρήνα και ριβοσωμιακού συστήματος, κάνει τα αιμοπετάλια, τρόπον τινά, ανάλογα των ερυθρών αιμοσφαιρίων, από τα οποία βεβαίως δίστανται εξ αιτίας της

λειτουργίας, του μεταβολισμού τους, και της προέλευσης τους, αν και ο κοινός τους πρόγονος αντιπροσωπεύεται από τα αρχέγονα μητρικά κύτταρα του μυελού των οστών.

Η ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων μέσω χορήγησης ενός αγωνιστή σε ποσότητα ικανή ώστε να προκαλέσει μέγιστη και μη αντιστρεπτή αιμοπεταλιακή συσσώρευση, συνοδεύεται από το φαινόμενο της λεγόμενης «εκρηκτικής αναπνοής» (oxygen burst), σύμφωνα με το οποίο η κατανάλωση οξυγόνου από τα ενεργοποιημένα αιμοπετάλια τουλάχιστον εικοσαπλασιάζεται. Αυτή η ισχυρότατη διέγερση της πρόσληψης οξυγόνου από το ενεργοποιημένο αιμοπετάλιο, αντικατοπτρίζει την εισαγωγή του οξειδωτικού του μεταβολισμού σε μια φάση έντονης χρησιμοποίησης του οξυγόνου για την παραγωγή ενέργειας εκ μέρους των αιμοπεταλιακών μιτοχονδρίων. Αν η οξειδωτική φωσφορυλίωση παρεμποδιστεί μέσω επώασης του αιμοπεταλιακού εναιωρήματος με το αντιβιοτικό αντιμυκίνη, τότε η συνακόλουθη μείωση της παραγωγής του ATP έχει ως αποτέλεσμα οι αιμοπεταλιακές αντιδράσεις να είναι υποτονικές ή να λείπουν εντελώς (Σ. Καρκαμπούνας, Ενδογενείς και Εξωγενείς Αναστολείς του PAF, Διδακτορική Θέση, Ιωάννινα, 1990, 657). Επίσης η επώαση του πλούσιου σε αιμοπετάλια πλάσματος (PRP) με 2,4 - δινιτροφαινόλη, η οποία αποσυζευγνύει την μεταφορά των ηλεκτρονίων κατά μήκος της αναπνευστικής αλυσίδας με την οξειδωτική φωσφορυλίωση, έχει σαν αποτέλεσμα την σταδιακή μείωση των αιμοπεταλιακών αντιδράσεων. Εδώ, αν διατηρήσουμε σταθερή την συγκέντρωση της 2,4-δινιτροφαινόλης, το φαινόμενο της μείωσης των αιμοπεταλιακών αντιδράσεων είναι καθαρά χρονοεξαρτώμενο, δηλαδή η πτώση της αιμοπεταλιακής λειτουργικότητας εξαρτάται ξεκάθαρα από τον χρόνο έκθεσης των αιμοπεταλιακών κυττάρων στον συγκεκριμένο παράγοντα (Σ. Καρκαμπούνας, Ενδογενείς και Εξωγενείς Αναστολείς του PAF, Διδακτορική Θέση, Ιωάννινα, 1990, [655]). Από την άλλη πλευρά η χορήγηση κυανιούχων στα αιμοπετάλια και η άμεση προσθήκη ενός αγωνιστή δεν καταργεί την αιμοπεταλιακή συσσώρευση (Σ. Καρκαμπούνας, Ενδογενείς και Εξωγενείς Αναστολείς του PAF, Διδακτορική Θέση, Ιωάννινα, [655] 1990). Και στην περίπτωση αυτή υπάρχει σαφής χρονοεξάρτηση της μείωσης των αιμοπεταλιακών αντιδράσεων. Η χορήγηση ενός αναστολέα της γλυκολυτικής αλυσίδας, και συγκεκριμένα του δι-ιωδιοξεικού οξέος, έχει σαν αποτέλεσμα την αναστολή της αντίδρασης έκλυσης του περιεχομένου των κοκκίων και την εισαγωγή αντιστρέψιμης συσσώρευσης, παρά την χρήση ποσοτήτων αγωνιστή ικανών να προκαλέσουν μέγιστη και μη αντιστρεπτή συσσώρευση (Σ. Καρκαμπούνας,

Ενδογενείς και Εξωγενείς Αναστολές του PAF, Διδακτορική Θέση, Ιωάννινα, 1990 [655]).

#### **1.4.2. Ποσοτικοποίηση της ενεργειακής παραγωγής ανά οδό**

Γενικά δεν υπάρχουν πολλές μελέτες σχετικές με τον ενεργειακό μεταβολισμό των αιμοπεταλίων. Από τις υπάρχουσες σχετικές μελέτες της ενεργειακής τους παραγωγής προκύπτουν τα εξής δεδομένα: α) Από την πλευρά των προσφερόμενων υποστρωμάτων και των αντιστοίχων οδών φαίνεται ότι η γλυκογονόλυση παρέχει το 57% των υδατανθράκων που καταβολίζονται από τα αιμοπετάλια προς παραγωγή ενέργειας. Το 50 – 55% της παρεχόμενης γλυκόζης εισέρχεται στην οδό των Embden – Meyerhof, δηλαδή στην γλυκολυτική αλυσίδα, και καταβολίζεται προς γαλακτικό οξύ παραγομένης μιας ποσότητας ATP, η οποία σύμφωνα με ορισμένους συγγραφείς δεν υπερβαίνει το 20% της συνολικής ποσότητας των υψηλώς φωσφορυλιωμένων ενεργειακών μορίων του αιμοπεταλίου, ενώ άλλοι συγγραφείς ανεβάζουν αυτό το ποσοστό στο 50%. Το 5 έως 20% της παρεχόμενης γλυκόζης καταβολίζεται προς H<sub>2</sub>O, CO<sub>2</sub> και ATP, μέσω του κύκλου των τρικαρβονικών οξέων (κύκλος του Krebs) και της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης στα μιτοχόνδρια. Σύμφωνα με την πρώτη ομάδα συγγραφέων το 80% της ATP προέρχεται, συνεπώς, από την μιτοχονδριακή χρησιμοποίηση της γλυκόζης, ενώ, σύμφωνα με τους υπολογισμούς της δεύτερης ομάδας συγγραφέων το ποσοστό αυτό δεν υπερβαίνει το 50%. Οι υπόλοιπες ποσότητες της προσφερόμενης γλυκόζης (κυμαινόμενες μεταξύ 25 έως 40%) χρησιμοποιούνται στο εσωτερικό του αιμοπεταλιακού κυττάρου για την βιοσύνθεση μιας σειράς ουσιών. Σημειωτέον ότι τα αιμοπετάλια μπορούν να βιοσυνθέτουν σεροτονίνη, την οποία επίσης μπορούν και να καταβολίζουν, ωστόσο οι συνθετικές τους ικανότητες φαίνεται να φθάνουν μέχρι και την σύνθεση πρωτεϊνών, όπως π.χ το ινωδογόνο και ο παράγοντας XIII της πήξης του αίματος. Οι Booyse και Rafelson απέδειξαν ότι τα αιμοπετάλια συνθέτουν θρομβοσθενίνη, η οποία κατόπιν δείχθηκε ότι ταυτίζεται με την ακτινομυοσίνη).

Δεδομένου ότι το καθεστώς της μεταβολικής δραστηριότητας των αιμοπεταλίων και ο προσπορισμός της ενέργειάς τους διαφέρει στην ήρεμη κατάσταση από την κατάσταση της ενεργοποίησής τους, είναι μεθοδολογικά σημαντικό να δούμε ξεχωριστά τον μεταβολισμό τους στην ήρεμη και στην διεγερμένη κατάστασή τους.

***Στο ήρεμο αιμοπετάλιο φαίνεται ότι ισχύουν τα ακόλουθα:***

Οι ενεργειακές ανάγκες του αιμοπεταλιακού κυττάρου στην κατάσταση της ηρεμίας φαίνεται να καλύπτονται κατά πλήρη τρόπο από τον οξειδωτικό μεταβολισμό της γλυκόζης στον κύκλο του Krebs. Όπως είναι πολύ καλά γνωστό ο αερόβιος μεταβολισμός της γλυκόζης μέσω του κύκλου αυτού έχει πάρα πολύ μεγάλη απόδοση σε σύγκριση με την αναερόβια γλυκόλυση. Έτσι, ένα γραμμομόριο γλυκόζης μεταβολιζόμενο μέσω του αερόβιου μιτοχονδριακού μηχανισμού, αποδίδει 36 γραμμομόρια ATP, ενώ η ίδια ποσότητα γλυκόζης μεταβολιζόμενη μέσω του μηχανισμού της αναερόβιας γλυκόλυσης αποδίδει καθαρό κέρδος μόνον 2 γραμμορίων ATP, ενώ ταυτοχρόνως παράγεται πυροσταφυλικό και γαλακτικό οξύ.

Για τον συγκεκριμένο αυτόν λόγο, η αναερόβια γλυκόλυση χρησιμοποιείται από τα αιμοπετάλια ως ένας εφεδρικός μηχανισμός ενεργειακής παραγωγής προκειμένου να καλύψει τις έκτακτες ανάγκες σε ATP, οι οποίες προκύπτουν στις συνθήκες της διέγερσης. Τα αιμοπετάλια δεν είναι σε θέση να οξειδώσουν αμινοξέα και κετονικά σώματα για τον σκοπό αυτής της extra ενεργειακής ανάγκης, οπότε αναγκαστικά το βάρος μετατοπίζεται προς την αναερόβια γλυκόλυση. Πρέπει, ωστόσο, να σημειωθεί ότι και κατά την διέγερση λαμβάνει χώρα, όπως θα δούμε αναλυτικότερα παρακάτω, μια επίσης επιβλητική μεγέθυνση του οξειδωτικού μεταβολισμού υπό την εικόνα της λεγόμενης «εκρηκτικής αναπνοής» που προαναφέραμε .

Στο εν ηρεμία αιμοπετάλιο δεν έχει προσδιοριστεί με ακρίβεια η αναδραστική σχέση (feed back) που υφίσταται μεταξύ μιτοχονδρίου και γλυκόλυσης, ούτε επίσης οι αντιδράσεις που προσδιορίζουν αυτή τη σχέση. Π.χ η β-οξείδωση των λιπαρών οξέων στο μιτοχονδριακό μικροδιαμέρισμα ανασχηματίζει το ακετυλο – συνένζυμο A, το οποίο κατόπιν εισέρχεται στον κύκλο του Krebs και συμμετέχει στην ροή των αντιδράσεών του και στην αναγωγή των συνενζύμων του. Η προσθήκη παλμιτικού οξέος, παρουσία γλυκόζης, σε εναιωρήματα αιμοπεταλίων που τελούν εν ηρεμία, αυξάνει την παραγωγή γαλακτικού οξέος, όπως επίσης και την πρόσληψη της γλυκόζης από τα αιμοπετάλια. Το κύριο ρυθμιστικό ένζυμο της γλυκολυτικής οδού εξακολουθεί να αντιπροσωπεύεται από την φωσφοφρουκτοκινάση, όπως εξ άλλου συμβαίνει και με πολλούς άλλους τύπους κυττάρων. Ακόμη, πρέπει να σημειωθεί, ότι τα αιμοπετάλια μειώνουν αξιόλογα τον αναπνευστικό τους ρυθμό και συνεπώς την πρόσληψη του οξυγόνου, όταν στα εναιωρήματά τους προστεθεί γλυκόζη, υποδηλώνοντας μια ευκολία στην γλυκολυτική

χρήση της γλυκόζης. Σε συνθήκες υποξικές ή και ανοξικές, τα αιμοπετάλια εντείνουν την παραγωγή γαλακτικού οξέος, πράγμα που επίσης λαμβάνει χώρα και όταν δεν είναι δυνατή η πρόσληψη του οξυγόνου.

Οι προσδιορισμοί των επιπέδων των επί μέρους ενδιάμεσων μεταβολιτών της γλυκολυτικής αλυσίδας, δείχνουν με σαφήνεια ότι ο ρυθμός της γλυκόλυσης προσδιορίζεται από την μεταφορά γλυκόζης στο κύτταρο, καθώς και μέσω της σύνθεσης της 6-φωσφορικής-γλυκόζης εκ μέρους της εξοκινάσης.

Από τα υπάρχοντα δεδομένα προκύπτει ότι η εξοκινάση αντιπροσωπεύει το ένζυμο που καθορίζει τον γλυκολυτικό ρυθμό και η λειτουργία της είναι συμβατή ακόμη και με ελάχιστα επίπεδα ενδοκυττάριου υποστρώματος καθώς η  $K_m$  για την γλυκόζη είναι για μια συγκέντρωση της τάξης των 0,06 mM. (60  $\mu$ M). Το μέγιστο κλάσμα της δραστηριότητας της εξοκινάσης ευρίσκεται στα μιτοχόνδρια.

Μέσω της χρησιμοποίησης της 2-D-δεοξυγλυκόζης (2-D-Deoxyglucose), η οποία αποτελεί έναν αντιμεταβολίτη δομικά ανάλογο της γλυκόζης, που έχει την ιδιότητα να αναστέλλει την γλυκόλυση, μπορούμε να προσδιορίσουμε τον βαθμό μεταφοράς της γλυκόζης στο εσωτερικό του κυττάρου. Χρησιμοποιώντας την προσέγγιση της μεταφοράς της δεοξυγλυκόζης στο εσωτερικό του αιμοπεταλιακού κυττάρου προέκυψε ότι υπό συνθήκες φυσιολογικών αιματικών συγκεντρώσεων γλυκόζης υπάρχει πλήρης λειτουργία των μηχανισμών μεταφοράς της γλυκόζης στο εσωτερικό του αιμοπεταλίου. Η μεταφορά της γλυκόζης στο εσωτερικό του κυττάρου αναστέλλεται από την 6-φωσφορική γλυκόζη, αλλά ο μηχανισμός της αναστολής δεν μας είναι γνωστός. Η χορήγηση ινσουλίνης έχει ως αποτέλεσμα της την αύξηση της παραγωγής γαλακτικού οξέος από την γλυκολυτική οδό. Αυτό υποδεικνύει ότι η μεταφορά της γλυκόζης ενεργοποιείται παρουσία της ορμόνης, όταν η γλυκόζη είναι παρούσα στο διάλυμα του αιμοπεταλιακού εναιωρήματος.

Στην μεμβράνη των αιμοπεταλίων ευρίσκεται παρούσα η αντλία ανταλλαγής νατρίου – καλίου, η οποία βασίζεται στην χρησιμοποίηση του ATP μέσω της σχετικής  $Na^+ - K^+$  ATPάσης. Μέσω της αντλίας  $Na^+ - K^+$  επιτυγχάνεται η είσοδος ιόντων καλίου στο εσωτερικό του κυττάρου σε επίπεδα της αυτής τάξης με τα άλλα κύτταρα του οργανισμού. Ως συνέπεια της εύρυθμης λειτουργίας της αντλίας  $Na^+ - K^+$  είναι η ανάπτυξη μιας σημαντικής διαφοράς δυναμικού στις δύο πλευρές της κυτταροπλασματικής μεμβράνης των αιμοπεταλίων. Το δυναμικό αυτό φαίνεται να αναστρέφεται όταν το αιμοπεταλιακό κύτταρο ενεργοποιείται.

### *Διεγερμένα αιμοπετάλια*

Η ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων από τους φυσιολογικούς τους διεγέρτες μεταβάλλει άρδην τα δεδομένα της παραγωγής ενέργειας που ισχύουν στα ήρεμα αιμοπετάλια. Οι μεταβολές που κυριαρχούν είναι οι εξής:

A) Η αύξηση της κατανάλωσης οξυγόνου από τα αιμοπετάλια μέσω του φαινομένου της «εκρηκτικής αναπνοής» (oxygen burst), γεγονός που παρατηρείται τόσο στα αιμοπετάλια αλλά και στα λευκοκύτταρα που υφίστανται ενεργοποίηση.

B) Η αύξηση του ρυθμού της γλυκόλυσης περισσότερο από 3 φορές εν σχέσει με το ήρεμο αιμοπετάλιο.

Γ) Η αύξηση του ρυθμού χρησιμοποίησης του ATP έτσι ώστε να είναι δυνατή η πραγματοποίηση των αλλαγών που απαιτούνται για την εκτέλεση της αιμοπεταλιακής λειτουργίας (αναδιανομή ιόντων, αλλαγή σχήματος, προεκβολή ψευδοποδίων, πρόσφυση στο υπενδοθήλιο, αντίδραση έκλυσης του περιεχομένου των κοκκίων, συσσώρευση, συστολή του θρόμβου).

Δ) Αύξηση του ρυθμού της γλυκογονόλυσης για την προσφορά γλυκόζης

Η αύξηση του ρυθμού της γλυκόλυσης εξαρτάται από δύο παράγοντες κατά την διάρκεια της διέγερσης:

1<sup>ον</sup>) Από την αύξηση του ενδοκυττάριου ελεύθερου κατιόντος ασβεστίου.

2<sup>ον</sup>) Από την ελάττωση της 6 – φωσφορικής φρουκτόζης και την αύξηση της 1,6-διφωσφορικής φρουκτόζης, ως αποτέλεσμα της ενεργοποίησης της φωσφοφρουκτοκινάσης, εξ αιτίας αύξησης των ενδοαιμοπεταλιακών συγκεντρώσεων των φωσφορικών ιόντων και των ριζών αμμωνίου. Οι παράγοντες που ευθύνονται για την δράση αυτή είναι η ελάττωση της αναστολής της γλυκολυτικής οδού λόγω πτώσης του επιπέδου του ATP, το οποίο χρησιμοποιείται για τις ενεργοβόρες ανάγκες των διεγερμένων αιμοπεταλίων.

Όλα τα φαινόμενα που συνθέτουν την διέγερση (αλλαγή σχήματος, αντίδραση έκλυσης, συσσώρευση κ.τ.λ) σχετίζονται στενά με το λεγόμενο Αδενυλικό Ενεργειακό Φορτίο (ΑΕΦ), το οποίο ορίζεται ως εξής:

$$A.E.\Phi = [ATP] + \frac{1}{2} [ADP]/[ATP] + [ADP] + AMP.$$

Η μεταβολή του σχήματος των αιμοπεταλίων που προκαλείται από το ADP ή την σεροτονίνη, συνοδεύεται από μείωση του ΑΕΦ. Αυτό δείχνει ότι λαμβάνει χώρα μια σημαντική αύξηση της κατανάλωσης του ATP, η οποία δεν μπορεί να αντισταθμιστεί από την αύξηση της σύνθεσής του.

Οι άλλες λειτουργικές αντιδράσεις των αιμοπεταλίων, όπως η έκλυση του περιεχομένου των κοκκίων και η συσώρευση, φαίνεται ότι δεν συνοδεύονται από μια ανάλογη ελάττωση του ΑΕΦ. Αυτό το δεδομένο υποδηλώνει ότι στις δύο εν λόγω αιμοπεταλιακές αντιδράσεις υπάρχει ένα καλύτερο ισοζύγιο μεταξύ της κατανάλωσης και της ανασύνθεσης του ATP. Η αναστολή της σύνθεσης του ATP, μέσω χορήγησης 2-D-δεοξυγλυκόζης και αντιμυσίνης – Α, έχει σαν αποτέλεσμα την προοδευτική αναστολή αυτών των αιμοπεταλιακών αντιδράσεων, δείχνοντας έτσι ότι τόσο η γλυκόλυση όσο και η μιτοχονδριακή σύνθεση του ATP συμμετέχουν στην ενεργειακή στήριξή τους. Η έκκριση των λυσοσωμίων αναστέλλεται με την αποκλειστική χορήγηση ενός αναστολέα της μεταφοράς των ηλεκτρονίων κατά μήκος της αναπνευστικής αλυσίδας των μιτοχονδρίων, υποδεικνύοντας ότι εξαρτάται πλήρως από το ATP που παράγεται μέσω της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης. Λιγότερο εξαρτώμενες από την μιτοχονδριακή παραγωγή ATP είναι η έκλυση του περιεχομένου των α και δ κοκκίων, ενώ κατόπιν ακολουθεί η συσώρευση και τέλος η μεταβολή του σχήματος των αιμοπεταλίων.

Είναι σημαντικό να επισημανθεί ότι η επιβίωση των αιμοπεταλίων, όπως επίσης και οι λειτουργικές τους αντιδράσεις είναι απολύτως εξαρτημένες από τις ποσότητες των νουκλεοτιδίων της αδενίνης, εφ' όσον αυτά δεν μπορούν να συντεθούν de novo από το αιμοπεταλιακό κύτταρο.

Πολλές παρατηρήσεις του αιμοπεταλιακού μεταβολισμού υποδεικνύουν ότι μέσα στο αιμοπετάλιο τα νουκλεοτίδια της αδενίνης (ATP, ADP, AMP) δεν ευρίσκονται σε ένα κοινό ενδοκυττάριο χώρο αλλά είναι συγκεντρωμένα σε δύο ξεχωριστές δεξαμενές. Το συμπέρασμα αυτό προκύπτει κατά βάση από την παρατήρηση ότι η αντίδραση έκλυσης των κοκκίων μεταφέρει εκτός του αιμοπεταλίου το 50% της ποσότητας των νουκλεοτιδίων του, χωρίς ωστόσο αυτό να μειώνει την μεταβολική δραστηριότητα του αιμοπεταλιακού κυττάρου. Η λογική απάντηση στο εν λόγω φαινόμενο είναι ότι τα νουκλεοτίδια που απελευθερώνονται με την αντίδραση έκλυσης εντάσσονται σε ένα συγκεκριμένο χώρο και δεν λαβαίνουν μέρος στην διεργασία της παραγωγής ενέργειας υπό μορφή ATP. Αυτά που χρησιμοποιούνται για την αναδημιουργία του ATP ευρίσκονται σε άλλο ενδοκυττάριο



χώρο. Ο πρώτος χώρος αποτελεί την λεγόμενη *μη μεταβολική αποθήκη (storage pool)*, η οποία περιλαμβάνει τα 2/3 της ολικής ποσότητας νουκλεοτιδίων της αδενίνης, ενώ ο δεύτερος χώρος αποτελεί την *μεταβολική αποθήκη (energy pool)* και περιέχει τα νουκλεοτίδια τα οποία χρησιμοποιούνται για την ανασύνθεση του ενεργειακού ATP. Η χρησιμοποίηση σεσημασμένου ραδιενεργού φωσφόρου ( $P^{32}$ ) έδειξε ότι δεν γίνονται ανταλλαγές μεταξύ των νουκλεοτιδίων των δύο αποθηκών. Ενδεχομένως η ενεργειακή αποθήκη νουκλεοτιδίων της αδενίνης ευρίσκεται σε στενή σχέση με τα μιτοχόνδρια των αιμοπεταλίων.

Ένα μικρό ποσοστό ATP της μεταβολικής (ενεργειακής) αποθήκης υφίσταται πλήρη καταβολισμό μέχρι του επιπέδου της υποξανθίνης στην διάρκεια της αντίδρασης έκλυσης του περιεχομένου των κοκκίων. Η ποσότητα του ATP μπορεί να χρησιμοποιηθεί σαν μέτρο της ενεργειακής δαπάνης που απαιτείται για την αντίδραση έκλυσης. Η ποσότητα αυτή χαρακτηρίζεται σαν τρίτη αποθήκη (*third pool or release energy pool*).

Πρέπει να σημειωθεί ότι η αιμοπεταλιακή λειτουργικότητα μπορεί να ελαττωθεί μέχρι του σημείου της παύσης, μέσω της προσθήκης φωσφορυλιωμένων ενδογενών μορίων, τα οποία είναι παράγωγα της γλυκολυτικής αλυσίδας. Π.χ η προσθήκη καταλλήλων ποσοτήτων 2,3 – διφωσφογλυκερικού οξέος (2,3-DPG) ή 3 – φωσφογλυκερικού οξέος (3-PGA) σε πλυμένα αιμοπετάλια κονίκλου *in vitro*, ή σε *ex vivo* αιμοπετάλια ανθρώπου αναστέλλει όλες τις αιμοπεταλιακές αντιδράσεις που εισάγει ο PAF στα προαναφερθέντα μοντέλα μελέτης της αιμοπεταλιακής λειτουργικότητας. Επίσης τα ίδια φωσφορυλιωμένα μόρια αναστέλλουν και τις αιμοπεταλιακές δράσεις άλλων αγωνιστών, όπως το ADP, το αραχιδονικό οξύ, η επινεφρίνη, η ριστοσετίνη κ.α. Ακόμη, πέραν των δύο αυτών ενδογενών φωσφορυλιωμένων μορίων που παράγονται, ως ενδιάμεσα μόρια, από την γλυκολυτική αλυσίδα και άλλα υψηλώς φωσφορυλιωμένα μόρια, όπως τα αμινοξέα φωσφοθρεονίνη και φωσφοσερίνη αναστέλλουν τις αιμοπεταλιακές αντιδράσεις στον PAF. Τέλος αυτό καθαυτό το ATP ασκεί πλήρη αναστολή στις δράσεις του PAF επί των αιμοπεταλίων. Είναι πολύ σημαντικό να σημειώσουμε ότι τα αιμοπετάλια φαίνεται να στερούνται του παρακυκλώματος Rappoport, που αποτελεί ένα κύκλωμα παράπλευρων αντιδράσεων που ξεκινά από ένα σημείο της γλυκόλυσης και καταλήγει σε ένα διαφορετικό σημείο αυτής. Το παρακύκλωμα του Rappoport είναι υπεύθυνο για την παραγωγή του 2,3 – DPG και φαίνεται ότι λείπει απολύτως στα αιμοπεταλιακά κύτταρα. Αυτή η έλλειψη ενδεχομένως να είναι σκόπιμη καθόσον η παραγωγή του 2,3 – DPG θα

μπορούσε να κρατά τα αιμοπετάλια σε μόνιμη αναστολή. Αν και τόσο το 2,3 – DPG, το 3-PGA, όσο η φωσφοσερίνη και η φωσφοθρεονίνη έχουν δομικές αναλογίες με τον PAF, οπότε θα μπορούσε κανείς να προτείνει έναν μηχανισμό αναστολής βασιζόμενο σε ανταγωνισμό για την κατάληψη των υποδοχέων του PAF, εν τούτοις διαφαίνεται ότι διαφορετικός πρέπει να είναι ο μηχανισμός δια του οποίου τα υψηλώς φωσφορυλιωμένα μόρια εισάγουν την αναστολή των αιμοπεταλιακών λειτουργικών απαντήσεων: Δεδομένου ότι και το ATP προκαλεί ομοίως πλήρη αιμοπεταλιακή αναστολή, δεν αποκλείεται η δράση των μορίων αυτών να οφείλεται σε μια καταστολή του ενεργειακού μεταβολισμού των αιμοπεταλίων ή σε μια χυλικού τύπου δέσμευση του κατιόντος ασβεστίου. Είναι γνωστό ότι το 2,3 – DPG μπορεί να αναστείλει την γλυκόλυση, αλλά αυτό δεν θα έπρεπε να ισχύει για τον μιτοχονδριακό ενεργειακό μεταβολισμό, ο οποίος, εξ άλλου, μπορεί να χρησιμοποιεί και λιπαρά οξέα, μέσω της β-οξειδωσης αυτών και του κύκλου του Krebs για την προσπόριση ενέργειας. Ιταλοί ερευνητές αναφέρουν ότι η χορήγηση 2,3 – DPG στα αιμοπετάλια μειώνει την κατανάλωση οξυγόνου εκ μέρους τους, οπότε φαίνεται ότι και το μιτοχόνδριο επηρεάζεται από αυτόν τον παράπλευρο γλυκολυτικό μεταβολίτη. Μερικές μη δημοσιευμένες δικές μας παρατηρήσεις έδειξαν ότι η χορήγηση οξέων του κύκλου του Krebs (ακονιτικό και ηλεκτρικό οξύ) σε εναιωρήματα πλυμένων αιμοπεταλίων κονίκλου, παρουσία ενός τεχνητού διαλύματος διασποράς, είναι σε θέση να προκαλέσουν μια μικρή ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων. Επειδή οι ουσίες αυτές προκαλούν σε εναιωρήματα απομονωμένων μιτοχονδρίων ενεργοποίηση της κατανάλωσης οξυγόνου, όπως επίσης και το ADP, θα μπορούσε κανείς να υποθέσει ότι η ενεργοποίηση της εκρηκτικής αναπνοής των αιμοπεταλίων και της συσσώρευσής τους είναι παράλληλες και αλληλοεξαρτώμενες διαδικασίες. Μήπως τελικά όλοι οι αιμοπεταλιακοί αγωνιστές δημιουργούν μια ανισορροπία των φωσφορυλιωμένων αδενυλικών μορίων προς την πλευρά της μείωσης του ATP και της επικράτησης των υπολοίπων λιγότερο φωσφορυλιωμένων μορφών και είναι αυτή η ανισορροπία η οποία ενεργοποιεί την εκρηκτική αναπνοή και την αύξηση του ρυθμού της γλυκόλυσης, προωθώντας έτσι προς την ολοκλήρωση όλες τις εκκινηθείσες αιμοπεταλιακές αντιδράσεις; Επίσης μήπως θα έπρεπε να προσθέσουμε στην φόρμουλα που δίνει το Αδενυλικό Ενεργειακό Φορτίο και άλλα υψηλώς φωσφορυλιωμένα μόρια τα οποία φωσφορυλιώνονται από την γλυκόλυση, ούτως ώστε να υπάρχει μια ευρύτερη θεώρηση της ενέργειας που ενσωματώνεται στους φωσφορικούς δεσμούς; Μάλλον αυτή η αναθεώρηση του Αδενυλικού Ενεργειακού Φορτίου θα μπορούσε να επεκταθεί για να περιλάβει μόρια όπως το 2,3 - DPG, το 3 - PGA, την φωσφοκρεατίνη, τα

φοσφορυλιωμένα αμινοξέα, καθώς και το GTP. Υπάρχουν δεδομένα τα οποία δείχνουν ότι το 2,3 - DPG μειώνει την παραγωγή θρομβοξάνης A<sub>2</sub>, όπως επίσης ελαττώνει την ανάδυση του συμπλέγματος GrIIb - IIIa στην μεμβράνη των αιμοπεταλίων. Επίσης ο ίδιος μεταβολίτης αναστέλλει την δράση της ριστοσετίνης υποδεικνύοντας μια ανασταλτική δράση επί του παράγοντα vW. Τα δεδομένα αυτά υποδεικνύουν ότι μερικά από τα μόρια που παράγονται από τον ενεργειακό μεταβολισμό κάθε άλλο παρά πρέπει να θεωρούνται μονοσήμαντα ως μεταφορείς ενέργειας, αλλά μάλλον και ως ρυθμιστές λεπτών και κρίσιμων διεργασιών σε πολλά επίπεδα της αλληλουχίας των μηχανισμών που ενεργοποιούνται για την τέλεση των λειτουργικών αντιδράσεων των αιμοπεταλίων. Οι εργασίες βάσει επί των οποίων στηρίχτηκαν οι ανωτέρω περιγραφές, οι σχετικές με τον αιμοπεταλιακό ενεργειακό μεταβολισμό και της σχέσης του με τις διαδικασίες των αιμοπεταλιακών αντιδράσεων αναφέρονται στο κεφάλαιο της βιβλιογραφίας με τους ακόλουθους αριθμούς παραπομπής: 159, 160, 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 169, 170, 171, 172, 173, 174, 175, 176, 177, 178, 179, 185, 186, 195, 196, 200, 201, 202, 203, 204, 205, 206, 207, 213, 214, 215, 216, 217, 218, 219, 220, 221, 222, 224, 225, 229, 230).

#### **1.4.3. Ο ρόλος των κυκλικών νουκλεοτιδίων c - AMP και c - GMP**

##### **Κυκλικό AMP (c - AMP)**

Το κυκλικό AMP (c - AMP) αποτελεί ένα μόριο που λειτουργεί ως δεύτερος αγγελιοφόρος (second messenger) για όλα τα είδη κυττάρων του φυσιολογικού οργανισμού, συμπεριλαμβανομένων και των αιμοπεταλίων. Το c - AMP παράγεται από το ένζυμο αδενυλική κυκλάση χρησιμοποιώντας ως πρώτη ύλη το ATP. Η αδενυλική κυκλάση ενεργοποιείται από μια ορμόνη, όπως π.χ η επινεφρίνη (η οποία αποτελεί τον πρώτο αγγελιοφόρο) και καταλύει την αντίδραση δημιουργίας του c - AMP από το ATP με την ταυτόχρονη απελευθέρωση πυροφωσφορικών ανιόντων. Η αντίδραση εξαρτάται από τα κατιόντα του μαγνησίου. Μόλις το c - AMP παραχθεί στο εσωτερικό των κυττάρων - στόχων, αρχίζει ταυτοχρόνως να λειτουργεί ως μεσολαβητής, μέσω της ενεργοποίησης πρωτεϊνικών κινασών, οι οποίες μέχρι εκείνη την στιγμή ήσαν ανενεργές. Σε όλες τις περιπτώσεις η ανάληψη του ρόλου ως δευτέρου αγγελιοφόρου εκ μέρους του c - AMP έχει έναν κοινό παρονομαστή, δηλαδή μια κοινή δράση, σε κάθε είδος σωματικού κυττάρου: την κινητοποίηση των εφεδρειών του, δηλαδή την ενεργοποίηση της χρησιμοποίησης του αποθηκευμένου ενεργειακού υλικού. Π.χ, όσον αφορά την

κινητοποίηση των αποθηκών του γλυκογόνου, η επινεφρίνη κινητοποιεί την αδενυλική κυκλάση και το παραγόμενο κυκλικό AMP, ως δεύτερο μήνυμα, ενεργοποιεί μια, μέχρι στιγμής, αδρανή πρωτεϊνική κινάση, η οποία, μέσω της κατανάλωσης ενός μορίου ATP, μετατρέπει την ανενεργό β – φωσφορυλάση σε ενεργό. Η ενεργοποιημένη β – φωσφορυλάση είναι πλέον μια α – φωσφορυλάση, της οποίας η δράση έγκειται στην απόσπαση από τις αλυσίδες του γλυκογόνου μορίων γλυκόζης, υπό την ενεργοποιημένη (φωσφορυλιωμένη) μορφή της 1 – φωσφορικής γλυκόζης, που εισέρχεται κατ' ευθείαν για μεταβολισμό στην γλυκολυτική αλυσίδα και οδηγεί στην παραγωγή ενέργειας υπό την μορφήν του ATP.

Το καθεστώς αυτό της ενεργοποίησης του κυττάρου, εκ μέρους του c – AMP, ισχύει για όλα τα κύτταρα, εξαιρουμένων των αιμοπεταλίων, όπου η δράση του κυκλικού AMP, ως δευτέρου αγγελιοφόρου, να μεν υφίσταται, αλλά απολύτως αντεστραμμένη:

Πράγματι στην περίπτωση των αιμοπεταλίων η αύξηση του c – AMP είναι αντιθέτου φοράς, εν σχέσει με ό,τι ισχύει για τα λοιπά σωματικά κύτταρα. Εδώ το c – AMP δεν ενεργοποιεί παρά αναστέλλει την κινητοποίηση του εφεδρικού ενεργειακού υλικού και συνεπώς αναστέλλει τις λειτουργικές αντιδράσεις των αιμοπεταλίων.

Το κυκλικό AMP κινητοποιεί στα αιμοπετάλια, τους μηχανισμούς φωσφορυλίωσης με την ενεργοποίηση της πρωτεϊνικής κινάσης A (η οποία είναι εξαρτημένη από το c – AMP). Δεν μας είναι σαφείς οι σχέσεις κινητοποιήσεων των μηχανισμών πρωτεϊνικών φωσφορυλίωσεων και της πρωτεϊνικής κινάσης A. Η φύση των στόχων για φωσφορυλίωση από την πρωτεϊνική κινάση A και των σχέσεών της με τις ανασταλτικές επιδράσεις δεν είναι σαφής και ξεκάθαρη. Ένα από τα πολυπεπίδια που φωσφορυλιώνονται είναι δεσμευμένο στην μεμβράνη και φαίνεται ότι το κυκλικό AMP ενεργοποιεί σε εκείνη την περιοχή μια  $Ca^{2+}$  -  $Mg^{2+}$  -ATPάση, που λειτουργεί ως αντλία ανταλλαγής ιόντων ασβεστίου εντοπιζόμενη στο ενδοπλασματικό δίκτυο. Η ενεργοποίηση αυτού του συστήματος επιτρέπει την αύξηση του κυκλικού AMP και εμποδίζει την αύξηση του ελεύθερου κυτταροπλασματικού ιονισμένου ασβεστίου. Αυτή η σύζευξη φαίνεται ότι λειτουργεί ως ένας αντιστροφέας καθόσον η αύξηση του c – AMP μεταφράζεται σε δραστική μείωση του ελεύθερου ιονισμένου ασβεστίου και σε κυτταρική αναστολή, ενώ η μείωση του c – AMP οδηγεί στην αύξηση του ασβεστίου και σε κυτταρική ενεργοποίηση. Είναι γνωστό ότι η ενεργοποίηση της φωσφολιπάσης – C οδηγεί σε καταβολισμό της φωσφατιδυλο – 4,5 – διφωσφορικής ινοσιτόλης με άμεση συνέπεια

την διάνοιξη των υποδοχέων για τους διαύλους των ιόντων ασβεστίου. Τα αυξημένα επίπεδα του c – AMP καταστέλλουν την δραστηριότητα της φωσφολιπάσης – C.

Η παρουσία του c – AMP στα αιμοπετάλια υπαγορεύεται ενδεχομένως από την ανάγκη της διατήρησής τους σε αναστολή ενεργοποίησης όσο αυτά ευρίσκονται υπό συνθήκες φυσιολογικής κυκλοφορίας. Η λειτουργική τους ενεργοποίηση λαμβάνει χώρα μόνον όταν η συγκέντρωση του c – AMP σε αυτά πέσει κάτω από ένα συγκεκριμένο επίπεδο. Η ταπείνωση του c – AMP κάτω από ένα οριακό επίπεδο σχετίζεται με μια αναστολή της αδενυλικής κυκλάσης, ή εναλλακτικά με διέγερση του ενζύμου φωσφοδιεστεράση, το οποίο καταλύει την αντίδραση μετατροπής του κυκλικού AMP σε απλό AMP (η αντίδραση αυτή είναι μια υδρόλυση παρουσία ιόντων Mg). Αναστολείς της αδενυλικής κυκλάσης είναι η πτώση των επιπέδων ATP, η θρομβίνη, το κολλαγόνο, η θρομβοξάνη A<sub>2</sub>, αλλά όχι το ADP, ενώ τυπικοί διεγέρτες της φωσφοδιεστεράσης είναι, π.χ, οι μεθυλοξανθίνες (καφεΐνη, θειοφιλίνη, θειοβρωμίνη κ.α). Όλοι αυτοί οι παράγοντες συνδράμουν ώστε τα επίπεδα του c – AMP να ελαττωθούν και να αρχίσει η άνοδος του ελεύθερου ιονισμένου ασβεστίου στο εσωτερικό του αιμοπεταλιακού κυτταροπλάσματος, η οποία θα καταλήξει στην κυτταρική ενεργοποίηση. Αντιθέτως, στην κατάσταση της ηρεμίας, οι διεγέρτες της αδενυλικής κυκλάσης ή οι αναστολείς της φωσφοδιεστεράσης αυξάνουν την συγκέντρωση του c – AMP, που έχει ως αποτέλεσμα την άντληση των ιόντων του ασβεστίου μέσα στις αποθήκες του ενδοπλασματικού δικτύου και την συνακόλουθη παρεμπόδιση της αιμοπεταλιακής ενεργοποίησης. Η προσταγλανδίνη E<sub>1</sub>, η προστακυκλίνη (PGI<sub>2</sub>), η αδενοσίνη κ.α είναι σημαντικοί διεγέρτες της αδενυλικής κυκλάσης, ενώ ουσίες όπως η παπαβερίνη, η διπυριδαμόλη, η τριμεταζιδίνη κ.α, είναι αναστολείς της φωσφοδιεστεράσης, με αποτέλεσμα η δράση τους να έχει ως συνέπεια την αύξηση της συγκέντρωσης του c – AMP και συνεπώς την αναστολή της απελευθέρωσης ιονισμένου ασβεστίου στο κυτταρόπλασμα, πράγμα που μεταφράζεται σε αναστολή του αιμοπεταλίου. Η προσθήκη ουσιών με ιδιότητες αναστολέα της φωσφοδιεστεράσης ή διεγέρτη της αδενυλικής κυκλάσης σε λυμένα αιμοπετάλια, έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση των συγκεντρώσεων του c – AMP στο κυτταρόλυμα. Η αναστολή της αδενυλικής κυκλάσης με ουσίες, όπως η 2,5 – δι – δεοξαδενοσίνη, έχει ως αποτέλεσμα τον εμποδισμό της αναστολής της αιμοπεταλιακής λειτουργικότητας. Ωστόσο φαίνεται ότι υπάρχουν ακόμη κάποια κενά στην κατανόηση όλων των πλευρών της δράσης του κυκλικού AMP.

### **Κοκλικό GMP (c – GMP)**

Ο ρόλος του κυκλικού GMP (c – GMP) δεν είναι ακόμη πλήρως διευκρινισμένος, παρά το γεγονός ότι η ύπαρξή του φαίνεται να σχετίζεται με την ύπαρξη ενός ρυθμιστικού μηχανισμού, όπως εκείνου του c – AMP και ενδεχομένως, κατ' αναλογία. Υπάρχουν όμως δεδομένα τα οποία διευκρινίζουν ότι τα επίπεδα του c – GMP στα αιμοπετάλια μεταβάλλονται μέσω της δράσης κάποιων χημικών παραγόντων. Π.χ το νιτροπρωσικό νάτριο (που αποτελεί το ισχυρότερο τεχνητό αγγειοδιασταλτικό μόριο), το αζίδιο του νατρίου, καθώς και το ασκορβικό οξύ προκαλούν σημαντική αύξηση στα επίπεδα του c – GMP. Το αζίδιο του νατρίου είναι ισχυρό αναγωγικό σώμα, όπως επίσης και το ασκορβικό οξύ, ενώ το νιτροπρωσικό νάτριο αποτελεί ουσία παραγωγής μονοξειδίου του αζώτου.

Είναι σημαντικό να υπογραμμιστεί ότι το ασκορβικό οξύ αποτελεί έναν ισχυρό αναστολέα της αιμοπεταλιακής λειτουργικότητας και μάλιστα όλων των γνωστών αγωνιστών, συμπεριλαμβανομένων και των πλέον ισχυρών, όπως η θρομβίνη. Οι περισσότεροι από τους παράγοντες αυτούς, όπως και το 8 – βρωμο – c – GMP (δομικό ανάλογο του c – GMP, μη μεταβολιζόμενο) οδηγούν σε αναστολή της συσσώρευσης και της έκκρισης που εισάγει η θρομβίνη. Συνεπώς το c – GMP φαίνεται ότι παίζει έναν δυναμικό ρόλο στην λειτουργία των αιμοπεταλίων, καθώςσον ενεργεί ως ανασταλτικός ενδοκυττάριος αγγελιοφόρος (second messenger).

Ο μηχανισμός με τον οποίον το c – GMP εισάγει την αναστολή της αιμοπεταλιακής λειτουργικότητας δεν είναι σαφής. Η αναστολή της αντίδρασης έκλυσης του περιεχομένου των κοκκίων, σε αιμοπετάλια που έχουν καταστεί διαπερατά κατόπιν ειδικής επεξεργασίας, προϋποθέτει υψηλές συγκεντρώσεις c – GMP. Από το γεγονός αυτό συνάγεται το συμπέρασμα ότι η αναστολή της αιμοπεταλιακής ανταπόκρισης, απαιτεί ήπιες δράσεις, όπως και στην περίπτωση του κυκλικού AMP (όπου ο κύριος μεσολαβητής είναι η πρωτεϊνική κινάση A η οποία φωσφορυλιώνει τελικώς πεπτίδια με δράση αντλίας ανταλλαγής ιόντων ασβεστίου με ιόντα μαγνησίου, οδηγώντας στην άντληση του ελεύθερου ιονισμένου ασβεστίου στο εσωτερικό του ενδοπλασματικού δικτύου). Ενδεχομένως ισχύει και εδώ ένας μηχανισμός αντίστροφης αύξησης της συγκέντρωσης του c – GMP με ταυτόχρονη πτώση αυτής του  $Ca^{2+}$ . Ωστόσο η ερμηνεία αυτή είναι εξαιρετικά υποθετική καθώςσον δεν έχει ανευρεθεί στα αιμοπετάλια ανάλογη κυτταροπλασματική κινάση – G, εξαρτημένη από το c – GMP, παρά το γεγονός ότι έχει

απομονωθεί η δραστηριότητα μιας κινάσης και μιας φωσφοδιεστεράσης εξειδικευμένων για το c – GMP.

Εν κατακλείδι, οι παράγοντες οι οποίοι μεταβιβάζουν τα μηνύματα ενεργοποίησης στο εσωτερικό των αιμοπεταλίων, δηλαδή οι δεύτεροι αγγελιοφόροι, είναι πλέον αρκετοί, όπως το κατιόν του ασβεστίου, το κυκλικό AMP, η τριφωσφορική ινοσιτόλη, η 1,2 – διακυλογλυκερόλη. Επίσης είναι πλέον εξακριβωμένος ο ρόλος των G - πρωτεϊνών στην μεταφορά του σήματος από το σύμπλεγμα υποδοχέα – διεγέρτη στο εσωτερικό του αιμοπεταλιακού κυττάρου. Δεν μας είναι ωστόσο γνωστός ο ρόλος της γουανυλικής κυκλάσης, από την οποία παράγεται το c – GMP, δηλαδή το κατά πόσον αυτή εμπλέκεται σε μηχανισμούς μετάδοσης του σήματος της μεμβράνης, όπως συμβαίνει με την φωσφολιπάση – C και την πρωτεϊνική κινάση C.

Ένα στοιχείο αντίθεσης με την διαπιστωθείσα αύξηση των επιπέδων του c – GMP από τις ουσίες που προαναφέραμε (ασκορβικό οξύ, αζίδιο του νατρίου, νιτροπρωσικό νάτριο, 8-βρωμο - c – GMP), και του εμποδισμού της δράσης της θρομβίνης, είναι η διαπίστωση ότι διεγέρτες όπως η θρομβίνη, το κολλαγόνο, το ADP, οδηγούν σε αύξηση των επιπέδων του c – GMP, ενώ παράλληλα μειώνουν το κυκλικό AMP, είτε άμεσα είτε έμμεσα μέσω θρομβοξάνης A<sub>2</sub>.

Ο Haslam και οι συνεργάτες του, από την άλλη πλευρά επιδίωξαν να ερμηνεύσουν την αναστολή που προκαλείται από την αύξηση των επιπέδων του c – GMP ύστερα από την επίδραση ενός αγωνιστή ως περιορισμό της έκτασης της απάντησης στον αγωνιστή αυτό. Ωστόσο η υπόθεση αυτή αιωρείται διότι η απάντηση των αιμοπεταλίων ποικίλλει, όντας χρονο – και δοσο - εξαρτώμενη, ανάλογα με την επίδραση των αγωνιστών στα επίπεδα του c – AMP και με την εκκριτική απάντηση, που απαιτείται από τα αιμοπετάλια στην αρχική αιμόσταση. Οι αντιφάσεις αυτές δημιουργούν μεγάλο πρόβλημα και επανατοποθετούν το ζήτημα της αναθεώρησης της μελέτης του c – GMP, σε μια ενιαία βάση με το c – AMP.

#### *1.4.4. Περιγραφή της οδού μεταβολισμού του αραχιδονικού οξέος και των αιμοπεταλιακών δράσεων των προϊόντων αυτής*

##### *Γενικά*

Τα προϊόντα του μεταβολισμού του αραχιδονικού οξέος ή εικοσανοειδή, αποτελούν μια γκάμα ενώσεων που περιέχουν στα μόριά τους, όπως και το αραχιδονικό οξύ που αποτελεί το μητρικό τους μόριο, είκοσι άτομα άνθρακος και έναν αριθμό διπλών δεσμών, δεδομένου ότι το μόριο του αραχιδονικού οξέος ήδη περιλαμβάνει τέσσερες ακόρεστους δεσμούς στον εικοσαμελή ανθρακικό σκελετό του μορίου.

Τα εικοσανοειδή παράγωγα αντιπροσωπεύουν μια σπουδαία ομάδα λιπιδικών μεσολαβητών, οι οποίοι προέρχονται από την υπεροξειδωση, κατ' αρχάς, του αραχιδονικού οξέος, αλλά και άλλων πολυακόρεστων λιπαρών οξέων.

Οι ουσίες αυτές ανέτρεψαν την εικόνα που επικρατούσε στην βιοχημεία για τον ρόλο των λιπαρών οξέων, εικόνα δομικών υλικών για την κατασκευή των φωσφολιπιδικών μεμβρανών, όπως επίσης και ενεργειακών υλικών για την αερόβια σύνθεση τριφωσφορικής αδενοσίνης, μέσω των μηχανισμών της β-οξειδωσης των λιπαρών οξέων, του κύκλου του Krebs και τέλος της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης κατά μήκος της αναπνευστικής αλυσίδας των μιτοχονδρίων. Τα εικοσανοειδή υπεροξειδωμένα παράγωγα απέδειξαν ότι τα μεταβολικά προϊόντα των ακόρεστων λιπαρών οξέων αποτελούν ισχυρούς και πολυδύναμους ρυθμιστές τόσο των κυτταρικών αντιδράσεων όσο και υψηλότερων λειτουργιών, όπως η ρύθμιση των αγγειακών ανταποκρίσεων, η πήξη του αίματος, η λειτουργία των λευκοκυττάρων, η λειτουργία του νεφρού, η σύσπαση της μήτρας κατά τον τοκετό και, σε θέση περίοπτη, όλη η διεργασία της φλεγμονής.

Στον άνθρωπο, όπως επίσης και στα πλέον μελετημένα συνήθη ανώτερα θηλαστικά, η κυριότερα πηγή όλων αυτών των πολυδυνάμων λιπιδικών ουσιών είναι το αραχιδονικό οξύ που ευρίσκεται υπό την μορφήν εστέρων στα πολυφωσφοϊνοσιτίδια των κυτταρικών μεμβρανών. Πλέον των 150 παραγώγων συντίθενται από το αραχιδονικό οξύ. Στα διαφορετικά αυτά μόρια συμπεριλαμβάνονται τα παράγωγα της οδού της κυκλοξυγονάσης (όπως οι προσταγλανδίνες, οι θρομβοξάνες και οι προστακυκλίνες), τα παράγωγα της οδού της λιποξυγονάσης (δηλαδή τα λευκοτριένια και οι λιποξίνες) και τέλος τα παράγωγα της πολύ σπουδαίας οδού του κυτοχρώμου P - 450, όπως είναι αυτά του εικοσιτριενοϊκού οξέος, τα οποία σχηματίζονται με αλληλεπιδράσεις των λιποξυγονασών, οπότε και



παράγεται ένας αριθμός από δι- και τριυδροξυλιωμένα λιπαρά οξέα, σε μεγάλο βαθμό ακόμη άγνωστα και με άγνωστες βιολογικές ιδιότητες. Είναι επίσης πολύ σημαντικό να σημειωθεί ότι το κυτόχρωμο P – 450 αποτελεί ένα εξαιρετικά ευέλικτο ενζυμικό σύστημα το οποίο μεταβολίζει έναν πολύ μεγάλο αριθμό ενδογενών και εξωγενών ουσιών, υδροξυλιώνοντας τα μόριά τους και αυξάνοντας με τον τρόπο αυτό την υδατοδιαλυτότητά τους και συνεπώς την δυνατότητα απομάκρυνσής τους από τον οργανισμό, μέσω της απεκκριτικής οδού του νεφρού. Ακόμη πρέπει να σημειωθεί ότι το σύστημα του κυτοχρώμου P-450 ενεργοποιεί πολλά γνωστά χημικά καρκινογόνα, όπως είναι οι πολυκυκλικοί αρωματικοί υδρογονάνθρακες (π.χ το 3,4 – βενζοπυρένιο, το μεθύλχολανθρένιο κ.α), οι πολυκυκλικές νιτροδοενώσεις και νιτροδοαμίνες, αλκυλιωμένους υδρογονάνθρακες, όπως ο τετραχλωράνθρακας, το χλωροφόρμιο, τα πολυχλωριωμένα διφαινύλια, φάρμακα κάθε είδους, όπως η παρακεταμόλη, η ισονιαζίδη, τα τρικυκλικά αντικαταθλιπτικά, στεροειδείς ορμόνες και στεροειδή γενικότερα κ.α, καθώς επίσης και τα περισσότερα γνωστά φυτοφάρμακα. Είναι πολύ σημαντικό να τονιστεί ότι πολλές από τις εν λόγω ουσίες, με προεξάρχοντα τα ισχυρά χημικά καρκινογόνα, όπως το βενζοπυρένιο, κατά την διάρκεια του μεταβολισμού τους από το κυτόχρωμο P-450 μετατρέπονται σε ελεύθερες ρίζες ή γενικότερα σε μόρια υψηλής ενεργότητας τα οποία μπορούν να δημιουργήσουν μεγάλες βλάβες σε όλα τα τμήματα και οργανίδια των κυττάρων, ξεκινώντας από τις μεμβράνες – που είναι οι πλέον εύθικτες και φθάνει μέχρι τα χρωματοσώματα στα οποία μπορεί να δημιουργήσει μεγάλες βλάβες, όπως π.χ οι θραύσεις και η συνακόλουθη απώλεια γενετικού υλικού με τελικό αποτέλεσμα την μη αντιστρεπτή απώλεια γενετικής πληροφορίας. Φυσικά οι γενετικές βλάβες που δεν διορθώνονται οδηγούν σε μεταλλάξεις που είτε αποσταθεροποιούν τα κύτταρα, μειώνοντας την βιωσιμότητά τους, ή και σκοτώνοντας τα άμεσα, είτε τα ωθούν προς την ανάπτυξη καρκινικών φαινοτύπων που μπορούν να οδηγήσουν τον οργανισμό στην νόσο του καρκίνου. Δεδομένου ότι σήμερα μια μεγάλη συνιστώσα του γεροντικού εκφυλισμού (η οποία βαίνει διαρκώς αυξανόμενη καθώς οι σχετικές γνώσεις μας μεγενθύνονται) προκύπτει από μεταλλάξεις, αντιλαμβάνεται κανείς ότι η μελέτη του κυτοχρώμου P-450, όπως και γενικότερα της αραχιδονικής οδού (οδός κυκλοξυγονάσης και λιποξυγονάσης) είναι πολύ σημαντική για την όλο και μεγαλύτερη ενδυνάμωση της πρόληψης και της θεραπείας πολύ βαρέων νοσημάτων, όπως η αρτηριοσκλήρυνση, τα θρομβοεμβολικά νοσήματα, οι καρκίνοι, τα ρευματοειδή νοσήματα, το γήρας καθώς και φαινόμενα οξείας τοξικότητας από διάφορα τοξικά μόρια (π.χ παρακουάτ, ή τετραχλωράνθρακας).

Όλοι αυτοί οι μεταβολισμοί έχουν ως επίκεντρό τους την αραχιδονική οδό. Στην ανάλυση την οποία κάνουμε επί του παρόντος κειμένου, επικεντρωνόμαστε κατά κύριο λόγο στον ρόλο τον οποίον κατέχει η οδός του αραχιδονικού οξέος στον αιμοπεταλιακό μεταβολισμό και την αιμοπεταλιακή λειτουργία, εν γένει. Επίσης παρουσιάζουμε μερικές όψεις της αραχιδονικής οδού σχετικές με την κινητικότητα του αγγειακού δένδρου, την αλλεργική απάντηση, όπως και την φλεγμονή. Τέλος γίνεται μια μικρή αναφορά για τον ρόλο της αραχιδονικής οδού στην χημική καρκινογένεση, όπως επίσης και στον ρόλο των αιμοπεταλίων στην μετάσταση των καρκινικών κυττάρων, διαδικασία στην οποία φαίνεται ότι οι τροποποιητές της αιμοπεταλιακής λειτουργικότητας θα μπορούσαν να παίξουν πολύ σπουδαίο ρόλο για την αντιμετώπιση αυτής της ιδιαίτερας ακανθώδους συνιστώσας της νεοπλασματικής νόσου.

### ***Βραχεία ιστορική επισκόπηση***

Η ιστορία της ανακάλυψης της οδού του αραχιδονικού οξέος και των εικοσανοειδών παραγώγων αυτής ξεκίνησε περί το 1930 από μια σειρά μελετών της τεχνητής γονιμοποίησης. Συγκεκριμένα οι von Euler US και Goldblatt MW εργαζόμενοι ανεξαρτήτως ο ένας από τον άλλο παρατήρησαν ότι τα υγρά των ανθρώπινων όρχεων ήσαν σε θέση να προκαλέσουν χάλαση ή σύσπαση της ουροδόχου κύστεως ασθενών οι οποίοι ήσαν αντιστοίχως γόνιμοι ή όχι. Η ενδιαφέρουσα αυτή παρατήρηση δεν προσέελκυσε ωστόσο το ενδιαφέρον των μελετητών και συνεπώς η έρευνα πάνω στους νέους αυτούς βιολογικούς παράγοντες καθυστέρησε αρκετά, ίσως γιατί εκείνη την εποχή η ερευνητική προσοχή των φυσιολόγων είχε κατά κύριο λόγο εστιαστεί στις δράσεις των πρόσφατα ανακαλυφθεισών βιογενών αμινών, όπως της ακετυλοχολίνης, που, όπως αποδεικνυόταν από τους πειραματισμούς ασκούσαν σύνθετες και ισχυρές δράσεις τόσο στην κυκλοφορία, όσο και στην λειτουργία πολλών οργάνων του ανθρώπου και εν γένει των ανωτέρων θηλαστικών.

Ειδικότερα, το 1934 ο Von Euler εργαζόμενος ανεξάρτητα, μελέτησε τις δράσεις επί των αγγείων του πλάσματος των όρχεων του ανθρώπου και των εκχυλισμάτων του προστατικού αδένος προβάτου, ενώ ταυτοχρόνως προχώρησε στην πρώτη προσπάθεια απομόνωσης των εν ουσιών που ήσαν υπεύθυνες για την βιολογική δραστηριότητά των εν λόγω αδενικών εκχυλισμάτων και υγρών. Ο Von Euler ανακάλυψε ότι το ενεργό συστατικό των αδενικών αυτών εκχυλισμάτων μπορούσε να εξαχθεί μέσω οξίνισης του διαλυτικού μέσου λιπιδικών διαλυμάτων και εμφάνιζε ικανότητα διάλυσης σε υδατικό

αλκαλοποιημένο διάλυμα. Το δραστικό συστατικό συμπεριφερόταν όπως τα λιπαρά οξέα, των οποίων εμφάνιζε όλες τις γνωστές ιδιότητες ενώ η συμπεριφορά του κατά την ηλεκτροφόρηση σε pH 6,5 έδειχνε μια καθαρή μετανάστευση προς το ηλεκτρόδιο της ανόδου. Ο Von Euler ελέγχοντας τα δεδομένα του συγκριτικά με τα γνωστά είδη λιπαρών οξέων κατέληξε στο συμπέρασμα ότι οι ουσίες που είχε απομονώσει αποτελούσαν μια καινοφανή κατηγορία λιπιδικών παραγώγων με ισχυρότατες βιολογικές δράσεις και τις ονόμασε προσταγλανδίνες για να υπογραμμίσει την προέλευση τους από τον προστατικό αδένα (prostate gland).

Δεκατρία χρόνια αργότερα, το 1947, ο Von Euler ξεκίνησε μια συνεργασία με τον Bergstrom πάνω στην χημεία των λιπιδίων. Ο Bergstrom ξεκίνησε προσεκτικά τον καθαρισμό και την απομόνωση των προσταγλανδινών, από συμπυκνωμένα εκχυλίσματα ωοθηκών προβάτου. Η προσπάθεια του εν λόγω ερευνητή υπήρξε μακροχρόνια καθώς συνάντησε πολλές δυσκολίες εξ αιτίας της ελάχιστης ποσότητας των δραστικών ουσιών, όπως επίσης και εξ αιτίας της ευαισθησίας τους που τις καθιστούσαν ιδιαίτερα ασταθείς, απέναντι στην οξειδωση. Μετά από πολυετείς δοκιμές εντόπισε ένα κλάσμα με υψηλή δραστηριότητα, στην περιοχή των ακόρεστων υδροξυ – λιπαρών οξέων, ωστόσο επειδή η ποσότητα της προσταγλανδίνης ήταν εξαιρετικά μικρή συνάντησε πολλές δυσκολίες προκειμένου να την απομονώσει. Το 1960 οι Sjovall και Bergstrom, κατόρθωσαν και απομόνωσαν δύο προσταγλανδίνες, την PGE<sub>1</sub> και την PGE<sub>1a</sub>. Χρησιμοποιώντας τις μεθόδους της αέριας χρωματογραφίας και της φασματοσκοπίας μάζας ο Bergstrom και οι συνεργάτες του κατόρθωσαν και περιέγραψαν τις δομές των δύο προσταγλανδινών, οι οποίες εμφάνιζαν τα χαρακτηριστικά ακόρεστων υδροξυ – καρβοξυλικών οξέων με σκελετό 20 ατόμων άνθρακα και με την προσθήκη ενός πενταμελούς ανθρακικού δακτυλίου.

Η ομάδα του Bergstrom απομόνωσε και περιέγραψε δομικά και σε άλλες προσταγλανδίνες, όπως τις E<sub>2</sub> και E<sub>3</sub> που απομόνωσε από τις ωοθήκες του προβάτου, τις F<sub>2a</sub> F<sub>3a</sub> τις οποίες απομόνωσε από τους πνεύμονες των προβάτων και των βοειδών. Οι προσταγλανδίνες αυτές εντοπίστηκαν, κατόπιν και σε άλλα όργανα και ιστούς, όπως στους νεφρούς και στην βλεννογόνο του γαστρεντερικού σωλήνα. Τα υγρά του όρχεως αποτελούν στον άνθρωπο την πλουσιότερη πηγή προσταγλανδινών. Επί των ημερών μας είναι γνωστό ότι η κυκλοξυγονάση 1 (COX<sub>1</sub>) αποτελεί ένα ένζυμο συστατικό, που εκφράζεται σταθερά και παράγει προστανοειδή σε όλους τους κυτταρικούς τύπους των

ιστών του ανθρώπινου σώματος. Επίσης έχειδειχθεί ότι σε διάφορες φλεγμονώδεις καταστάσεις εκφράζεται ένα επαγόμενο ισοένζυμο της κυκλοξυγονάσης 1, η κυκλοξυγονάση 2 (COX<sub>2</sub>), το οποίο φαίνεται ότι συνεισφέρει σε μερικές όψεις της φλεγμονώδους αντίδρασης και πρέπει να αναστέλλεται με άλλους αναστολείς διαφοροποιούμενους από εκείνους της κυκλοξυγονάσης 1. Οι εκλεκτικοί αναστολείς της κυκλοξυγονάσης 2 φαίνεται να λειτουργούν πιο εστιασμένα, εν σχέσει προς εκείνους της COX<sub>1</sub>, αποτρέποντας τις γνωστές παρενέργειες των αιμορραγιών του γαστρεντερικού σωλήνα που προκαλούνται από τους κλασσικούς αναστολείς της COX<sub>1</sub>. Ωστόσο και οι αναστολείς της COX<sub>2</sub> εμφανίζουν παρενέργειες μια των οποίων είναι και ο αιφνίδιος θάνατος από καρδιακή ανακοπή. Άλλα εικοσανοειδή παράγωγα, συμπεριλαμβανομένης της θρομβοξάνης A<sub>2</sub> και της PGI<sub>2</sub> (προστακυκλίνης) απομονώθηκαν, περιγράφηκαν δομικά και συντέθηκαν την δεκαετία του 1970. Η δράση της ασπιρίνης, ως αναστολέα της σύνθεσης των προσταγλανδινών και θρομβοξανίων εντοπίστηκε επίσης την ίδια χρονική περίοδο. Το 1979 είχαμε την ανακάλυψη των λευκοτριενίων, μιας νέας τάξης μεταβολικών παραγώγων του αραχιδονικού οξέος, τα οποία εμφανίζουν ως προεξάρχουσα δραστηριότητα την πρόκληση βρογχόσπασμου, όπως επίσης την μεσολάβηση πολλών αλλεργικών αντιδράσεων, αλλά και άλλες βιολογικές δράσεις. Η σύνθεση των λευκοτριενίων δεν επηρεαζόταν από την ασπιρίνη, καθόσον το ένζυμο που ευθύνεται για την βιοσύνθεσή τους είναι η λιποξυγονάση και όχι η κυκλοξυγονάση.

### ***Η βιοσύνθεση των προσταγλανδινών- οδός της κυκλοξυγονάσης***

Η αποσαφήνιση της βιοσύνθεσης των προσταγλανδινών άρχισε να πραγματοποιείται από τις μελέτες του Eliafsson, οι οποίες βρήκε σε ομογενοποιημένα αδένων προβάτου, κατόπιν επώασης αυξημένες ποσότητες ενεργών παραγώγων με χαρακτηριστικά προσταγλανδινών. Η ποσότητα των προστανοειδών στα ομογενοποιημένα των αδένων αυξανόταν ακόμη περισσότερο με την προσθήκη φωσφολιπάσης A<sub>2</sub> κατά την διάρκεια της επώασης. Το γεγονός ότι οι μέχρι τότε γνωστές προσταγλανδίνες εμφάνιζαν σταθερά 20 άτομα άνθρακα στο μόριό τους, όπως επίσης και καρβοξυλική ομάδα, οδήγησε τους ερευνητές να θεωρήσουν ότι όλες αυτές οι ενώσεις προήρχοντο από τον μεταβολισμό ενός πατρογονικού βιομορίου, περιέχοντος επίσης είκοσι άτομα άνθρακα και έχοντος χαρακτηριστικά ακόρεστου λιπαρού οξέος. Στα φωσφολιπίδια των κυτταρικών μεμβρανών υπάρχουν μεγάλες ποσότητες ενός πολυακόρεστου λιπαρού οξέος με αυτά τα χαρακτηριστικά. Το μόριο αυτό είναι το αραχιδονικό οξύ, το οποίο διαθέτει 20 άτομα

άνθρακα και τέσσερες διπλούς δεσμούς. Ο Van Dorp συνέθεσε αραχιδονικό οξύ που περιείχε ραδιενεργό άνθρακα και το χορήγησε στα ομογενοποιημένα των αδένων του προβάτου, οπότε διαπίστωσε ότι οι ραδιενεργοί άνθρακες εντοπιζόταν μετά τις επώσεις στην προσταγλανδίνη E<sub>2</sub>, που ήταν και το κύριο προϊόν βιοσύνθεσης από τα ενζυμικά συστήματα των ομογενοποιημένων αδενικών κυττάρων, κατοχυρώνοντας έτσι ότι η πηγή των προσταγλανδινών ήταν το αραχιδονικό οξύ. Τα δεδομένα αυτά προέκυψαν επίσης και από παράλληλες μελέτες που έλαβαν χώρα στο εργαστήριο της ομάδας του Bergstrom.

Η προσέγγιση του μηχανισμού της βιοσύνθεσης των προσταγλανδινών από τους Samuelsson και Van Dorp έλαβε υπ' όψιν της ότι στο μόριο των προσταγλανδινών εντοπιζόταν τρία μόρια οξυγόνου, τα οποία ενδεχομένως εμφυτευόταν εκεί μέσω της δράσης μιας διοξυγονάσης. Το ενδιάμεσο ενδοϋπεροξειδίο που προέκυπτε, η PGG<sub>2</sub>, απομονώθηκε από τους Samuelsson και Hamberg, οι οποίοι επίσης έκαναν την περιγραφή της δομής και των ιδιοτήτων του. Ο Samuelsson περιέγραψε επίσης την δράση του ενζύμου της κυκλοξυγονάσης, η οποία συμμετέχει στην δημιουργία της PGG<sub>2</sub>, που δεν αποτελεί ένα τελικό προϊόν, αλλά μετατρέπεται σε υδροξυ- ενδοϋπεροξειδίο (PGH<sub>2</sub>). Το παράγωγο αυτό αποτελεί κατόπιν την βάση για την σύνθεση των κλασσικών προσταγλανδινών PGE<sub>2</sub> & PGF<sub>2a</sub>.

Οι έρευνες εκείνης της εποχής έδειξαν ότι οι προσταγλανδίνες ήταν ισχυροί διαβιβαστές των φαινομένων της φλεγμονής, όπως επίσης και της αιμοπεταλιακής συσσώρευσης. Το επόμενο βήμα στην εξέλιξη της μελέτης των παραγώγων της αραχιδονικής οδού ήταν η κατανόηση των μηχανισμών λειτουργίας των ενζύμων που την αποτελούσαν και η μελέτη των ουσιών που λειτουργούσαν ως αναστολείς τους. Έτσι το ενδιαφέρον επικεντρώθηκε στην μελέτη των αναστολέων της κυκλοξυγονάσης, του σημαντικότερου ενζύμου της αραχιδονικής οδού.

Ο Vane, εργαζόμενος με πρώτη ύλη τους πνεύμονες και οι Smith και Willis χρησιμοποιώντας αιμοπετάλια προέβησαν στην ανακάλυψη ότι το ακετυλοσαλικυλικό οξύ (ασπιρίνη), όπως επίσης και άλλα μη στεροειδή αντιφλεγμονώδη φάρμακα ήταν σε θέση να αναστείλουν την κυκλοξυγονάση αυτών των ιστών. Κατόπιν ο Majerus διαπίστωσε ότι ο μηχανισμός αναστολής της κυκλοξυγονάσης από την ασπιρίνη, βασίζεται στην ακετυλίωση του αιμικού της δακτυλίου, που περιλαμβάνει στο κέντρο του ένα άτομο σιδήρου και αποτελεί το ενεργό κέντρο του ενζύμου. Ο ίδιος συγγραφέας προσδιόρισε ότι η ακετυλίωση της αίμης, που πραγματοποιείται από την ασπιρίνη είναι μη αντιστρεπτή και

συνεπώς μόνιμη, αναστέλλοντας την κυκλοξυγονάση των αιμοπεταλιακών κυττάρων, καθ' όλη την διάρκεια ζωής των συγκεκριμένων αιμοπεταλίων, ενώ άλλα μη στεροειδή αντιφλεγμονώδη ασκούν την δράση τους παροδικά, αναστέλλοντας το κρίσιμο αυτό ένζυμο με τρόπο αντιστρέψιμο, που διαρκεί ως επί το πλείστον για λίγες ώρες.

Μετά από τις διαπιστώσεις αυτές η έρευνα έδειξε ότι εκτός από το αραχιδονικό οξύ και άλλα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα, όπως το γ-λινολενικό ή το εικοσιπεντανοϊκό οξύ, είναι σε θέση να δώσουν αντίστοιχες προσταγλανδίνες και εν γένει εικοσανοειδή μόρια δια των ενζύμων της αραχιδονικής οδού. Εν γένει τα προστανοειδή αυτά παράγωγα εμφανίζουν δράσεις λιγότερο ισχυρές από τα αντίστοιχα του αραχιδονικού οξέος. Λαμβάνοντας υπ' όψιν τον αριθμό των διπλών δεσμών της πλευρικής αλυσίδας του προσταγλανδινικού μορίου, οι αντίστοιχες προσταγλανδίνες ονομάζονται PGE<sub>1</sub> (ένας διπλός δεσμός), PGE<sub>2</sub> (δύο διπλοί δεσμοί) και PGE<sub>3</sub> (τρεις διπλοί δεσμοί).

Οι προσταγλανδίνες των αιμοπεταλίων δεν εμφανίζουν ενδοκυττάρια αποθήκες, όπως συμβαίνει με άλλους αγωνιστές και οι δραστικές τους μορφές είναι μόρια ιδιαίτερας ασταθής, τα οποία μεταπίπτουν μεταβολιζόμενα ταχέως σε σταθερά παράγωγα χαρακτηριζόμενα από πολύ μικρότερη ή και μηδενική βιολογική δραστηριότητα. Η θρομβοξάνη A<sub>2</sub>, που κατά κύριο λόγο ενδιαφέρει την αιμοπεταλιακή λειτουργία, έχει ημιδιάρκεια ζωής 30 sec μετασχηματιζόμενη ταχέως σε θρομβοξάνη B<sub>2</sub>, η οποία θεωρείται βιολογικά μη δραστική. Η κύρια πηγή των προσταγλανδινών που αφορούν την συνήθη λειτουργία των κυττάρων του ανθρώπινου οργανισμού είναι το αραχιδονικό οξύ, το οποίο στα αιμοπετάλια δεν απαντάται σε ελεύθερη μορφή αλλά είναι ενσωματωμένο στα φωσφοϊνοσιτίδια των κυτταρικών μεμβρανών, από τα οποία απελευθερώνεται μέσω υδρόλυσής τους από το ένζυμο της φωσφολιπάσης A<sub>2</sub>.

Ο καταβολισμός του αραχιδονικού οξέος μέσω της συνθετάσης των προσταγλανδινών (η οποία περιέχει την κυκλοξυγονάση) στα αιμοπετάλια, οδηγεί στην παραγωγή των κυκλικών ενδοϋπεροξειδίων (PGG<sub>2</sub>, PGE<sub>2</sub>, PGD<sub>2</sub>, PGH<sub>2</sub>). Εν συνεχεία ένα επόμενο ένζυμο- η συνθετάση της θρομβοξάνης- μετατρέπει, κυρίως την PGH<sub>2</sub>, σε θρομβοξάνη A<sub>2</sub>, η οποία είναι ένα εικοσανοειδές εξαιρετικά δραστικό, αλλά και πάρα πολύ ασταθές. Η θρομβοξάνη A<sub>2</sub> συσπά την αορτή του κονίκλου, όπως επίσης και γενικότερα τα αγγεία, ενώ συσσωρεύει τα αιμοπετάλια, οδηγώντας επίσης σε σύσπαση των συσταλών τους στοιχείων, όπως ήδη αναφέραμε για την συστολή του αιμοπεταλιακού κυτταροσκελετού. Επίσης η θρομβοξάνη A<sub>2</sub> δρα στον νεφρό (στα μεσεγχεματικά κύτταρα του αγγειώδους

σπειράματος), καθώς και στο αναπνευστικό σύστημα, συσπώντας τις λείες μυϊκές ίνες των βρόγχων. Η αγγειοσυσπαστική ικανότητα της θρομβοξάνης  $A_2$  είναι πάρα πολύ ισχυρή και μπορεί να δράσει σε συστημικό επίπεδο, δημιουργώντας γενικευμένη αγγειοσυστολή, όπως επίσης και μαζική θρόμβωση. Οι επιδράσεις αυτές φαίνεται ότι επιτυγχάνονται δια της μεσολάβησης ειδικών υποδοχέων της μεμβράνης, εκ των οποίων ένας έχει κλωνοποιηθεί πρόσφατα. Η θρομβοξάνη φαίνεται ότι συμμετέχει στον μηχανισμό μεγιστοποίησης της αιμοπεταλιακής συσσώρευσης. Διεγέρτες, όπως το κολλαγόνο, η θρομβίνη, το ADP, και η επινεφρίνη, ενεργοποιούν την βιοσύνθεση της θρομβοξάνης  $A_2$ , η οποία αποτελεί τον τελικό μεσολαβητή των αιμοπεταλιακών αντιδράσεων, ενδεχομένως ως ιονοφόρος του κατιόντος ασβεστίου. Η σύνθεση και απελευθέρωση της θρομβοξάνης  $A_2$  συνεχίζει να λαμβάνει χώρα ακόμη και όταν η αιμοπεταλιακή αντίδραση έχει ολοκληρωθεί, οπότε συνδυαζόμενη με την αντίδραση έκλυσης του περιεχομένου των κοκκίων εξακολουθεί να ενεργοποιεί και τα παρακείμενα αιμοπετάλια επεκτείνοντας την συσσωρευτική διαδικασία και μεγενθύνοντας τον σχηματιζόμενο θρόμβο.

Επίσης ο καταβολισμός του αραχιδονικού οξέος στο επίπεδο των κυττάρων του αγγειακού ενδοθηλίου είναι ουσιαστικά πανομοιότυπος με εκείνο των αιμοπεταλίων, εφόσον η συνθετάση των προσταγλανδινών (ή κυκλοξυγονάση) παράγει τα ίδια, όπως ανωτέρω κυκλικά ενδοϋπεροξειδία ( $PGG_2$ ,  $PGE_2$ ,  $PGD_2$ ,  $PGH_2$ ). Ωστόσο αντί της συνθετάσης της θρομβοξάνης στα ενδοθηλιακά κύτταρα υπάρχει η συνθετάση της προστακυκλίνης ( $PGI_2$ ), η οποία συνθέτει από την  $PGH_2$  την προστακυκλίνη, η οποία έχει αντίθετες βιολογικές δράσεις από εκείνες της θρομβοξάνης  $A_2$  και ο ρόλος της είναι να προκαλεί αγγειοδιαστολή, όπως επίσης και αναστολή της αιμοπεταλιακής συσσώρευσης, υπογραμμίζοντας την ύπαρξη μιας δυναμικής ισορροπίας μεταξύ του αγγειακού ενδοθηλίου και των κυκλοφορούντων αιμοπεταλίων.

Εφ' όσον η ακεραιότητα των αγγείων παραμένει άθικτη, αυτό μεταφράζεται σε μια κατάσταση του ενδοθηλίου απόλυτα ανέπαφη, οπότε η παραγωγή της προστακυκλίνης ευρίσκεται σε ένα σταθερό επίπεδο, τέτοιο, ώστε να αποτρέπει την αυτόματη και απρόσφορη συσσώρευση των αιμοπεταλίων. Επίσης από την πλευρά των κυκλοφορούντων αιμοπεταλίων υπάρχει ένα χαμηλό επίπεδο βασικής παραγωγής θρομβοξάνης  $A_2$ , το οποίο αντιστοιχεί σε κατάσταση μη διέγερσης των αιμοπεταλίων και αντικατοπτρίζει την ετοιμότητα που αυτά παρουσιάζουν προκειμένου να αντιμετωπίσουν μια αιφνίδια αιμορραγική κατάσταση. Αυτή η ελάχιστη παραγωγή  $TXA_2$  αντιπροσωπεύει

τρόπον τινά μια μορφή «τόνου» της αιμοπεταλιακής λειτουργίας, ο οποίος μπορεί να αυξάνεται όταν το άτομο αντιμετωπίζει μεγάλες εντάσεις, π.χ στην αντίδραση της φυγής ή της μάχης, στην οποία οι κυκλοφορούσες κατεχολαμίνες διεγείρουν την αιμοπεταλιακή λειτουργία, φέρνοντάς την πιο κοντά στο σημείο στο οποίο πυροδοτούνται οι αιμοπεταλιακές αντιδράσεις της αλλαγής σχήματος, πρόσφυσης, έκλυσης των κοκκίων, συσσώρευσης κ.ο.κ. Ωστόσο και σε αυτή την περίπτωση η δυναμική ισορροπία μεταξύ προστακυκλίνης και θρομβοξάνης να μην έχει μετακινηθεί προς το σημείο της ενεργοποίησης της πήξης αλλά εξακολουθεί να είναι αρκετά μακριά από αυτό, με αποτέλεσμα η κυκλοφορία να συνεχίζεται. Η εισβολή ενός αγγειακού τραυματισμού σπάζει την ισορροπία υπέρ της επικράτησης των φαινομένων που προκαλεί η θρομβοξάνη A<sub>2</sub>, οπότε ξεκινά στο σημείο της βλάβης και η διαδικασία της δημιουργίας θρόμβου. Ενδεχομένως η θραύση της ισορροπίας οφείλεται και στην καταστροφή του ενδοθηλίου τοπικά, οπότε στο σημείο εκείνο η παραγωγή της προστακυκλίνης μειώνεται ή μηδενίζεται, ώστε να ισχύσουν τα φαινόμενα της πήξης χωρίς ιδιαίτερο κώλυμα.

Γενικά από την περιγραφή της σύνθεσης των προσταγλανδινών αξίζει να συνοψίσουμε τα εξής:

1<sup>ov</sup>) Υπάρχει ένα δυναμικό ισοζύγιο μεταξύ της παραγωγής της TXA<sub>2</sub> και της PGI<sub>2</sub>. Η σύνθεση της TXA<sub>2</sub> στα αιμοπετάλια οδηγεί στην πιο ισχυρή ενεργοποίηση της συσσώρευσής τους (και εν γένει των αντιδράσεών τους), ενώ η σύνθεση της προστακυκλίνης στα ενδοθηλιακά κύτταρα οδηγεί στην πιο ισχυρή αναστολή της. Έλλειψη της συνθετάσης της TXA<sub>2</sub>, προκαλεί μέσης βαρύτητας αιμορραγικό σύνδρομο. Διέγερση της παραγωγής της οδηγεί σε τοπική θρόμβωση.

2<sup>ov</sup>) Υπάρχει επίσης ένα δεύτερο στοιχείο δυναμικής ισορροπίας ανάμεσα στην διέγερση και την αναστολή της φωσφολιπάσης A<sub>2</sub>. Ο ρυθμιστής αυτής της δεύτερης δυναμικής ισορροπίας είναι το c – AMP. Η ελάττωση των επιπέδων αυτού διεγείρει την δραστηριότητα της φωσφολιπάσης A<sub>2</sub>, προωθώντας την παραγωγή της TXA<sub>2</sub>, ενώ αντιθέτως η αύξηση των επιπέδων του c – AMP αναστέλλει την ενεργοποίηση της φωσφολιπάσης – A<sub>2</sub> προάγοντας έτσι, στα ενδοθηλιακά κύτταρα την παραγωγή της PGI<sub>2</sub> ή της PGE<sub>2</sub>, οι οποίες με την σειρά τους διεγείρουν την αδενυλική κυκλάση και αυξάνουν έτσι τα επίπεδα του c – AMP, το οποίο αναστέλλει την λειτουργία των αιμοπεταλιακών κυττάρων.



Συνεπώς η ενδοαίμοπεταλιακή λειτουργική ισορροπία εξασφαλίζεται με μηχανισμούς ελέγχου της παραγωγής του αραχιδονικού οξέος, όπως επίσης του ρυθμού παραγωγής της TXA<sub>2</sub>, της PGE<sub>1</sub> και της PGE<sub>2</sub>, ενώ η λειτουργική ισορροπία μεταξύ ενδοθηλίου και αιμοπεταλίου εξασφαλίζεται μέσω μηχανισμών ελέγχου της παραγωγής της TXA<sub>2</sub> και της PGI<sub>2</sub>.

Τόσο η θρομβοξάνη A<sub>2</sub>, όσο και η προστακυκλίνη είναι μόρια εξαιρετικά βραχύβια, οπότε οι δράσεις τους είναι φευγαλέες και αντιστρέψιμες, στο βαθμό που το ερέθισμα το οποίο προκάλεσε την σύνθεσή τους δεν επιμένει. Η διάρκεια ημιζωής της TXA<sub>2</sub> υπολογίζεται στα 30 sec, παραγομένης της TXB<sub>2</sub>, η οποία είναι πολύ λιγότερο δραστική, αλλά με χρόνο ημιζωής που προσεγγίζει τα 5 έως 7 min.

Η TXB<sub>2</sub> καταβολίζεται περαιτέρω μέσω υδροξυλίωσής της από το κυτόχρωμο P – 450, το οποίο, όπως ήδη προαναφέραμε συμμετέχει στον μεταβολισμό των παραγώγων του αραχιδονικού οξέος, όπως και πολλών λιποειδών του οργανισμού .

Ο μείζων μεταβολίτης του πλάσματος είναι το 11-δεϋδρο- TXB<sub>2</sub> με χρόνο ημιζωής μιας ώρας, ενώ ο κύριος μεταβολίτης στα ούρα είναι το 2,3- δινορ-TXB<sub>2</sub>.

Ο ρυθμός έκκρισης της TXB<sub>2</sub> και συνεπώς της TXA<sub>2</sub>, είναι ίσος προς 0,1 ng/kg/min, ενώ ο ρυθμός έκκρισης της προστακυκλίνης είναι σχεδόν ο ίδιος, δηλαδή ίσος προς 0,08 – 0,1 ng/kg/min. Ο χρόνος ημιζωής της προστακυκλίνης είναι ίσος προς 3 min, ενώ οι συγκεντρώσεις της TXB<sub>2</sub> και της PGI<sub>2</sub> στο αιματικό πλάσμα είναι, κατά προσέγγιση, ίσος προς 2 pg/ml και 3,4 pg/ml αντίστοιχα για το πρώτο και το δεύτερο προστανοειδές. Ο μείζων μεταβολίτης της PGI<sub>2</sub> στο πλάσμα είναι η 13,14-διϋδρο-6,15-δικετο-PGF<sub>2a</sub>.

Όσον αφορά τα κύρια κυκλικά ενδοϋπεροξειδία, δηλαδή οι προσταγλανδίνες PGG<sub>2</sub> και PGH<sub>2</sub> αυτές είναι επίσης ασταθείς και στα αιμοπετάλια έχουν έναν χρόνο ημιζωής περί τα 5 min. Οι προσταγλανδίνες αυτές μετασηματίζονται μέσω της συνθετάσης της θρομβοξάνης σε TXA<sub>2</sub>, η οποία με την σειρά της ακολουθεί την μεταβολική μετατροπή που περιγράψαμε ανωτέρω. Είναι πολύ σημαντικό να αναφερθεί ότι ένα από τα τελικά παράγωγα του καταβολισμού του αραχιδονικού οξέος αντιπροσωπεύεται από την διαλδεϋδη του μηλονικού οξέος (malonic dialdehyde or MDA) και γενικότερα από τα λεγόμενα TBARS (Thiobarbituric Acid Reagent Substances), δηλαδή Ουσίες Αντιδρώσες με το Θειοβαρβιτουρικό Οξύ. Οι ουσίες αυτές έχουν χαρακτηριστικά αλδεϋδών και αποτελούν τα σταθερά τελικά προϊόντα της διαδικασίας της λιπούπεροξειδωσης. Η

λιποϋπεροξειδωση είναι μια μεταβολική διεργασία εντελώς διαφορετική από την β-οξειδωση των λιπαρών οξέων που λαμβάνει χώρα στα μιτοχόνδρια και υποδεικνύει ότι διαμεσολαβείται μέσω ενεργοποίησης του οξυγόνου με διαδικασίες δημιουργίας ελευθέρων ριζών. Μελέτες οι οποίες έγιναν κατά τις δεκαετίες του 1970 και 1980 δείχνουν ότι τόσο η κυκλοξυγονάση, όσο το κυτόχρωμο P-450 και η λιποξυγονάση λειτουργούν δημιουργώντας ελεύθερες ρίζες οξυγόνου, πράγμα το οποίο εισάγει στην μελέτη αυτών των συστημάτων την εξαιρετικά πλούσια χημεία των ελευθέρων ριζών, όπως θα δούμε παρακάτω.

### ***Η οδός της λιποξυγονάσης και η βιοσύνθεση των λευκοτριενίων***

Το αραχιδονικό οξύ που απελευθερώνεται από τα φωσφοϊνοσιτίδια μέσω της ενεργοποίησης της φωσφολιπάσης  $A_2$ , εκτός από την οδό της κυκλοξυγονάσης, μπορεί να ακολουθήσει την οδό της λιποξυγονάσης, μεταβολιζόμενο, εν τέλει σε μια κατηγορία ουσιών που ονομάζονται λευκοτριένια. Φαίνεται ότι τα δύο αυτά ένζυμα λειτουργούν εν παραλλήλω, καθόσον στο συμβάν ενός τραύματος λαμβάνουν χώρα τόσο αγγειακές αντιδράσεις όσο και αντιδράσεις κινητοποίησης του ανοσοποιητικού συστήματος. Οι τελευταίες φαίνεται να ελέγχονται μέσω της αποδέσμευσης ουσιών όπως τα λευκοτριένια.

Το ιστορικό μελέτης αυτής της οδού ξεκινά το 1967 από τους Borgeat και Samuelson οι οποίοι εκείνη την εποχή μελετούσαν τις δράσεις της λιποξυγονάσης στους φυτικούς οργανισμούς, προκειμένου να αποσαφηνίσουν τον τρόπο της ενζυμικής ενσωμάτωσης του οξυγόνου στα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα των φυτών. Οι δύο μελετητές διαπίστωσαν κατόπιν ότι τα αιμοπετάλια του ανθρώπου (όπως και άλλων ανωτέρων ζώων) είναι προικισμένα με μια δραστηριότητα 12-λιποξυγονάσης. Αυτό σημαίνει ότι τα αιμοπετάλια είναι σε θέση να μετατρέψουν το απελευθερούμενο από τις μεμβράνες τους αραχιδονικό οξύ στο παράγωγο 12-υδροϋπεροξυ-εικοσι-τετραενοϊκό οξύ, ή συντομογραφικά, 12-HPETE. Μια δραστηριότητα 5 - λιποξυγονάσης εντοπίστηκε επίσης στα πολυμορφοπύρηνα λευκοκύτταρα, τα οποία μετατρέπουν το αραχιδονικό οξύ σε 5-HPETE.

Οι Borgeat και Samuelson βρήκαν επίσης ότι το 5-HPETE μπορεί κατόπιν να μετατρέπεται σε μια σειρά συγγενών ουσιών που εκλήθησαν λευκοτριένια, καθόσον προκύπτουν από τα λευκά αιμοσφαίρια και εμφανίζουν στα μόριά τους τρεις διπλούς δεσμούς. Τα μόρια αυτά εξακολουθούν να είναι εικοσανοειδή, δηλαδή να χαρακτηρίζονται

από ανθρακικούς σκελετούς με 20 άτομα άνθρακα. Στην σύνθεση της σειράς των λευκοτριενίων C<sub>4</sub> συμμετέχει η ανηγμένη μορφή της γλουταθειόνης. Από την σειρά C<sub>4</sub> των λευκοτριενίων παράγεται η σειρά λευκοτριενίων D<sub>4</sub> και κατόπιν η σειρά των λευκοτριενίων E<sub>4</sub>. Οι σειρές C<sub>4</sub>, D<sub>4</sub> και E<sub>4</sub> των λευκοτριενίων συμμετέχουν στις λεγόμενες «βραδέως δρώσες ουσίες της αναφυλαξίας» (slow reactant substance of anaphylaxis or SRSA). Αυτές οι ουσίες, συνεπώς, είναι σε θέση να προκαλέσουν σύσπαση των λείων μυικών ινών των βρόγχων στο αναπνευστικό σύστημα κατόπιν ανοσολογικής διέγερσης, όπως συμβαίνει στον βρογχόσπασμο που απαντάται στις αλλεργικές αντιδράσεις τις σχετικές με το άσθμα. Τα λευκοτριένια γενικά, αλλά κυρίως εκείνα της σειράς B<sub>4</sub>, είναι πολύ ισχυροί χημειοτακτικοί παράγοντες για τα πολυμορφοπύρρηνα λευκοκύτταρα.

Νεότερες μελέτες έδειξαν ότι τα μεταβολικά παράγωγα της λιποξυγονάσης, όπως το 12-HPETE και το υδροξυ – αραχιδονικό οξύ (HETE) φαίνεται ότι είναι σε θέση να προκαλέσουν μη αντιστρεπτή αιμοπεταλιακή συσσώρευση, σχετιζόμενη με την μεταβολή του c-GMP, και τον δρόμο του PAF, χωρίς ωστόσο να υπάρχει πλήρης αποσαφήνιση αυτής της πορείας.

#### ***Οι μεταβολικές οδοί των πολυφωσφοϊνοσιτιδίων – φωσφοϊνοσιτιδίων***

Φυσιολογικοί διεγέρτες, όπως η θρομβίνη, το αραχιδονικό οξύ, ο PAF, το κολλαγόνο κ.α, διεγείρουν τα αιμοπετάλια συνδεδεμένοι σε ειδικούς υποδοχείς που υπάρχουν στην μεμβράνη τους. Η δράση των εν λόγω φυσιολογικών διεγερτών έχει σαν αποτέλεσμα την παραγωγή ενός μεγάλου αριθμού μεταβολών, μέσα στις οποίες συμπεριλαμβάνονται η αλλαγή του σχήματος των αιμοπεταλιακών κυττάρων από αμφίκυρτο φακοειδές σε σφαιρικό, η απελευθέρωση του περιεχομένου των δ- και α- κοκκίων και εν τέλει η συσσώρευση.

Όλες αυτές οι ιδιαίτερα εμφανείς μορφολειτουργικές μεταβολές είναι στενά συνδεδεμένες με την ενεργοποίηση μιας σειράς εξειδικευμένων ενζυμικών φωσφολιπασών οι οποίες αποσπών μέσω υδρόλυσης από τις αποθήκες των κυτταρικών μεμβρανών έναν αριθμό διαφόρων λιπιδίων τα οποία καθίστανται έτσι διαθέσιμα για την παραγωγή ενεργών λιπιδικών μεταβολιτών.

Η ενεργοποίηση λαμβάνει χώρα μέσω της μεσολάβησης μιας G – πρωτεΐνης της αιμοπεταλιακής μεμβράνης που έχει σαν στόχο της το ένζυμο φωσφοδιεστεράση της διφωσφορικής φωσφατιδυλο-ινοσιτόλης, η οποία ενεργοποιούμενη προκαλεί υδρόλυση

των πολυφωσφοϊνοσιτιδίων της κυτταρικής μεμβράνης. Με τον τρόπο αυτόν απελευθερώνονται δύο πολύ σημαντικές μεταβολικές ουσίες, οι οποίες ασκούν δράση δευτέρου αγγελιοφόρου. Οι ουσίες αυτές είναι: η 1,2-διακυλογλυκερόλης (1,2-DAG) και η 1,4,5-τριφωσφορική ινοσιτόλη (IP<sub>3</sub>). Η φωσφολιπάση C εισάγει τον καταβολισμό της 4,5-διφωσφορικής-φωσφατιδυλο-ινοσιτόλης σε 1,2-διακυλογλυκερόλη (1,2-DAG) και 1,4,5-τριφωσφορική ινοσιτόλη (IP<sub>3</sub>). Η 1,2-DAG, λειτουργώντας ως δεύτερος αγγελιοφόρος ενεργοποιεί μια πρωτεϊνική κινάση, η οποία εξαρτάται από τα φωσφολιπίδια και διεγείρεται από το Ca<sup>2+</sup>. Το εν λόγω ένζυμο ονομάζεται πρωτεϊνική κινάση C.

Η πρωτεϊνική κινάση C φωσφορυλιώνει μια πρωτεΐνη μοριακού βάρους 40 kDa, η οποία αποτελεί υπόστρωμα για την κινάση των ελαφρών αλύσεων της μυοσίνης .

Από την άλλη πλευρά η IP<sub>3</sub> αποτελεί έναν δεύτερο αγγελιοφόρο που μεσολαβεί στην κινητοποίηση των κατιόντων του Ca<sup>2+</sup> και την φωσφορυλίωση των πρωτεϊνών.

Η 1,2-DAG, στην συνέχεια είναι δυνατόν να ακολουθήσει μια από τις δύο εξής πορείες: 1<sup>ο</sup>) Είτε υφίσταται μια αποακετυλίωση μέσω της λιπάσης της 1,2-διακυλογλυκερόλης οπότε μετατρέπεται σε μονοακυλογλυκερόλη. 2<sup>ο</sup>) Είτε φωσφορυλιώνεται από την κινάση της 1,2-διακυλογλυκερόλης, μετασχηματιζόμενη σε φωσφατιδικό οξύ (PA). Η φωσφορυλίωση της μονοακυλογλυκερόλης ή η αποακετυλίωση του φωσφατιδικού οξέος με την φωσφολιπάση A<sub>2</sub> σχηματίζει λυσο-φωσφατιδικό οξύ (LPA). Τόσο το φωσφατιδικό οξύ, όσο και το λυσο-φωσφατιδικό οξύ αντιπροσωπεύουν σπουδαίους μεσολαβητές της ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων. Η φωσφολιπάση C ενεργοποιώντας τον καταβολισμό των φωσφοϊνοσιτιδίων ενεργοποιεί επίσης και την φωσφολιπάση A<sub>2</sub>, διά της δράσεως της οποίας απελευθερώνεται το αραχιδονικό οξύ από τους δεσμούς της θέσης sn-2 των διαφόρων φωσφολιπιδίων της μεμβράνης, όπως είναι η φωσφατιδυλοχολίνη, η φωσφατιδυλοαιθανολαμίνη και η φωσφατιδυλοϊνοσιτόλη.

Πρέπει να υπογραμμίσουμε ότι τόσο η διακυλογλυκερόλη όσο και το φωσφατιδικό οξύ αποτελούν τα ισχυρότερα γνωστά φυσιολογικά ιονοφόρα του Ca<sup>2+</sup> στα αιμοπεταλιακά κύτταρα των ζώων και του ανθρώπου.

Οι μεγάλες ταχύτητες με τις οποίες παράγονται η 1,2-DAG και η IP<sub>3</sub> μέσω του καταβολισμού των φωσφοϊνοσιτιδίων που ενεργοποιείται από την δράση διεγερτών όπως η θρομβίνη, συνεισφέρουν στην προώθηση της ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων και στην

επιτέλεση όλων των αιμοπεταλιακών αντιδράσεων (αλλαγή σχήματος, έκλυση του περιεχομένου των κοκκίων, συσσώρευση).

Η 1,2-DAG στα κύτταρα όλων των ιστών που έχει ανιχνευθεί φαίνεται ότι λειτουργεί με έναν στερεότυπο μηχανισμό ο οποίος συμπεριλαμβάνει πάντοτε την ενεργοποίηση της πρωτεϊνικής κινάσης C η δραστηριότητα της οποίας ενισχύεται σημαντικά από την συγκέντρωση των κατιόντων του ασβεστίου και την ύπαρξη της φωσφατιδυλοσερίνης, ως υποστρώματος. Στα αιμοπετάλια η πρωτεϊνική κινάση C φωσφορυλιώνει μια πρωτεΐνη 40 kDa . Η 1,2-DAG οδηγεί σε κινητοποίηση του ενδοαιμοπεταλιακού ιονισμένου ασβεστίου, ενεργοποιώντας με τον τρόπο αυτό όλες τις αντιδράσεις που εισάγει το κατιόν του ασβεστίου. Κατά συνέπεια η ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων από την θρομβίνη είναι αποτέλεσμα μιας διαδοχής γεγονότων, δηλαδή της σύνθεσης της 1,2-DAG και κατόπιν της κινητοποίησης των κατιόντων του  $Ca^{2+}$  . Η απελευθέρωση του  $Ca^{2+}$  μπορεί κατόπιν να δημιουργήσει έναν καταρράκτη από φαινόμενα, όπως π.χ την ενεργοποίηση της φωσφολιπάσης  $A_2$ , την απελευθέρωση αραχιδονικού οξέος, την δημιουργία  $TXA_2$ , την δράση αυτού επί των υποδοχέων του και έτσι την εγκατάσταση ενός θετικού feed – back που θα αυξήσει στο έπακρο (μέχρι εξάντλησης) την αιμοπεταλιακή απάντηση.

Είναι σημαντικό να αναφέρουμε ότι η τριφωσφορική ινοσιτόλη κινητοποιεί από την δική της πλευρά κατιόντα ασβεστίου από τα ντεπόζιτα του ενδοπλασματικού δικτύου, ενώ προκαλεί την φωσφορυλίωση των πρωτεϊνών 20 kDa και 40 kDa, οι οποίες αποτελούν υποστρώματα για την κινάση των ελαφρών αλύσεων της μυοσίνης. Επιπλέον ενεργοποιεί την πρωτεϊνική κινάση C, καθόσον τουλάχιστον η πρωτεΐνη 40 kDa αποτελεί ένα υπόστρωμά της.

Συνεπώς όλοι οι αγωνιστές που εισάγουν υδρόλυση των πολυφωσφοϊνοσιτιδίων δημιουργούν μια μεταβολική σύγκλιση των δρόμων της 1,2-DAG και της  $IP_3$ , των οποίων οι αντιδράσεις επιταχύνονται από την απελευθέρωση των κατιόντων του ασβεστίου και την ενεργοποίηση του καταβολισμού του αραχιδονικού οξέος μέσω ενεργοποίησης της φωσφολιπάσης  $A_2$ , μετατρεπόμενη έτσι σε λειτουργική σύγκλιση, δηλαδή στην ενεργοποίηση του αιμοπεταλίου και στην συνακόλουθη μεγιστοποίησή της από θετικά feed back τα οποία αλληλορυθμίζουν αυξητικά αυτές τις οδούς.

### ***Συμπεράσματα για τον αιμοπεταλιακό μεταβολισμό του αραχιδονικού οξέος***

Τα εικοσανοειδή που παράγονται από τον μεταβολισμό του αραχιδονικού αποτελούν ουσίες με μια μεγάλη γκάμα ιδιοτήτων, οι οποίες είναι πολύ σημαντικές για την ρύθμιση των κυτταρικών λειτουργιών πολλών τύπων κυττάρων, έχοντας τον χαρακτήρα τοπικής ορμόνης και λειτουργώντας ως μεσολαβητές σήματος. Η παραγωγή των εικοσανοειδών αρχίζει από την απελευθέρωση του αραχιδονικού οξέος, αλλά και άλλων πολυακόρεστων λιπαρών οξέων, από τα φωσφολιπίδια των κυτταρικών μεμβρανών μέσω της δράσης ενζύμων που ονομάζονται φωσφολιπάσες. Η φωσφολιπάση  $A_2$  φαίνεται ότι αποτελεί το κύριο υδρολυτικό ένζυμο που καθορίζει την παραγωγή του ελεύθερου αραχιδονικού οξέος από τα μεμβρανικά φωσφολιπίδια και συνεπώς την παραγωγή των διαφόρων μεταβολιτών εκ μέρους των ενζύμων της αραχιδονικής οδού. Η ενεργοποίηση της φωσφολιπάσης  $A_2$  λαμβάνει χώρα μετά την κυτταρική διέγερση, η οποία είναι αποτέλεσμα άφιξης στο αιμοπεταλιακό κύτταρο ερεθισμάτων προερχομένων:

1<sup>ov</sup>) από την βλάβη ενός αγγείου και γενικότερα ενός ιστού.

2<sup>ov</sup>) Από τα απομακρυσμένα συστήματα του οργανισμού που προσδιορίζουν την συνολική του απάντηση στο stress, όπως οι κατεχολαμίνες των οποίων η αύξηση των επιπέδων αυξάνει επίσης και την ετοιμότητα των αιμοπεταλίων προς ενεργοποίηση. 3<sup>ov</sup>) Από το ανοσοποιητικό σύστημα ως ερεθίσματα ανοσολογικής προέλευσης ή αλλεργικών απαντήσεων (π.χ PAF).

4<sup>ov</sup>) Από κυκλοφορούντα καρκινικά κύτταρα που παράγουν ενεργοποιητικές ουσίες, όπως π.χ προσταγλανδίνες.

### ***Το απελευθερούμενο αραχιδονικό οξύ στα αιμοπετάλια μετατρέπεται σε εικοσανοειδή παράγωγα από δύο ένζυμα:***

1<sup>ov</sup>) Από την κυκλοξυγονάση 1, η οποία το μετατρέπει σε  $PGG_2$  που μετασχηματίζεται σε  $PGH_2$  και τελικά από την συνθετάση της θρομβοξάνης σε  $TXA_2$ , που αποτελεί τον τελικό δραστικό μεταβολίτη της αιμοπεταλιακής συσσώρευσης.

2<sup>ov</sup>) Από την 12-λιποξυγονάση, η οποία το μετατρέπει σε 12-HPETE και 12-HETE, που εν συνεχεία μετασχηματίζονται σε λευκοτριένια (λευκοτριένια  $C_4$ ,  $D_4$ ,  $E_4$ ), τα οποία αποτελούν ισχυρούς ανοσολογικούς μεσολαβητές και ασκούν χημειοτακτική δράση. Τα λευκοτριένια επίσης ενεργοποιούν και τα αιμοπετάλια.

Το αραχιδονικό οξύ μεταβολιζόμενο από το αγγειακό ενδοθήλιο τρέπεται προς προστακυκλίνη (PGI<sub>2</sub>), η οποία έχει αντιαιμοπεταλιακές ιδιότητες και αναστέλλει την συσσώρευση των αιμοπεταλίων. Τόσο η προστακυκλίνη (PGI<sub>2</sub>) του ενδοθηλίου, όσο και η θρομβοξάνη των αιμοπεταλίων, παράγονται σε σταθερούς ρυθμούς σε μικροποσότητες από τα ενδοθήλια και τα μη ενεργοποιημένα αιμοπετάλια, ώστε τα αγγεία να παραμένουν διαπερατά και να αποτρέπεται η αυθόρμητη αιμοπεταλιακή συσσώρευση, αλλά από την άλλη πλευρά να εμποδίζονται και τα αυθόρμητα αιμορραγικά φαινόμενα.. Η εν λόγω ισορροπία ανατρέπεται όταν τοπικά το ενδοθήλιο καταστραφεί οπότε η παραγωγή της προστακυκλίνης στο σημείο εκείνο ελαττώνεται με αποτέλεσμα η απελευθέρωση των ουσιών βλάβης να ενεργοποιεί τα αιμοπετάλια και να τα θέτει σε πορεία συσσώρευσης, προκειμένου να κλείσει το τοπικό τραύμα και να εμποδιστεί η αιμορραγία. Τα λευκοτριένια και οι λοιπές προσταγλανδίνες που παράγονται από την διαδικασία της αιμοπεταλιακής ενεργοποίησης προσελκύουν με την σειρά τους τα τοπικά λευκοκύτταρα τα οποία ενεργοποιούμενα αποτρέπουν την διείσδυση μικροβίων στο εσωτερικό του οργανισμού. Συνεπώς πύξη, φλεγμονή και ανοσολογική άμυνα φαίνεται ότι ενορχηστρώνονται αρμονικά μέσω των ουσιών που παράγονται ως εικοσανοειδή παράγωγα του μεταβολισμού του αραχιδονικού οξέος. Το κεφάλαιο που συμπεριλαμβάνει την περιγραφή του ενεργειακού μεταβολισμού, των μηχανισμών μεταγωγής σήματος, μαζί με τον ρόλο του ιονισμένου ασβεστίου στην ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων και την σύζευξη σημάτων και κινητοποίησης του κυτταροσκελετού, τον μεταβολισμό του αραχιδονικού οξέος και τον ρόλο των προστανοειδών, έχει βασιστεί στις αναφορές που φέρουν τους ακόλουθους αριθμούς στην παρατιθέμενη βιβλιογραφία: 231, 232, 233, 234, 235, 236, 237, 238, 239, 240, 241, 242, 243, 244, 245, 246, 247, 248, 249, 250, 251, 252, 253, 254, 255, 256, 257, 258, 259, 260, 261, 262, 263, 264, 265, 266, 267, 268, 269, 270, 271, 272, 273, 274, 275, 276, 277, 278, 279, 280, 281, 282, 283, 284, 285, 286, 287, 288, 289, 290, 291, 292, 293, 294, 295, 296, 297, 298, 299, 300, 301.





## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

### ΤΑ ΦΛΑΒΟΝΟΕΙΔΗ ΚΑΙ ΟΙ ΒΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΤΟΥΣ ΔΡΑΣΕΙΣ

#### 2.1. Γενικά

Τα φλαβονοειδή είναι μια πολυπληθής κατηγορία χημικών ενώσεων που εμφανίζουν δομικές και λειτουργικές ομοιότητες και συντίθεται από όμοιες οδούς βιοσύνθεσης σε κάθε είδους φυτό.

Η πολύ ευρεία τους διάδοση υποδεικνύει ότι και οι βιολογικοί τους ρόλοι, τουλάχιστον στο Φυτικό Βασίλειο, είναι σημαντικοί.

Η έρευνα επί αυτών έχει ανακαλύψει περισσότερες από 4.000 ενώσεις με διαφορετικές δομές, οι οποίες, ωστόσο, εντάσσονται στο γενικό σχήμα των φλαβονοειδών μορίων [302, 303, 304, 305].

Κατ' αρχάς η έρευνα έδειξε ότι τα μόρια αυτά λειτουργούν ως χρωστικές, οι οποίες ευθύνονται για την εκρηκτική διάχυση όλων των παραλλαγών του κίτρινου χρώματος στα φύλλα και τους βλαστούς των φυλλοβόλων δένδρων κατά την είσοδο και την αρχική περίοδο του φθινοπώρου (οι μήνες του Σεπτεμβρίου και του Οκτωβρίου).

Επίσης τα φλαβονοειδή είναι υπεύθυνα για τα ερυθρά, τα κίτρινα και τα πορτοκαλί χρώματα των λουλουδιών, των καρπών, των βλαστών κάθε φυτού, όπως επίσης και κάθε είδους τροφής που παράγεται από αυτά [306, 307].

Αποτελούν εξέχοντα συστατικά των καρπών όλων των εσπεριδοειδών, (7, Kefford and Chandler, 1970 [307]) όπως και άλλων πρώτων διατροφικών υλών, όπως π.χ της σόγιας, των δημητριακών – ιδιαιτέρως του αραβόσιτου – καθώς και πολλών λαχανικών, όπως του καρότου, όλων των ειδών πιπεριάς και του σταφυλιού (Herrmann, 1976 [309])

Αξίζει να σημειώσουμε ότι όλα αυτά αποτελούν πολύ σημαντικά στοιχεία της καθημερινής διατροφής του ανθρώπου σε κλίμακα παγκόσμια, οπότε μπορεί κανείς να αντιληφθεί την συνολική σημασία τους για το ανθρώπινο είδος.

Όλα αυτά τα μικρού μοριακού βάρους χημικά παράγωγα - που προσφέρονται κατά απλόχερο τρόπο από την φύση, καθώς απαντώνται σε όλα τα αγγειόσπερμα φυτά - χαρακτηρίζονται από την χημική πλευρά ως φαινυλ-βενζοπυρόνες (φαινύλ-χρωμόνες) και

συμπεριλαμβάνουν ένα ευρύ σύνολο δομών που εμπεριέχουν ως κοινό δομικό τους στοιχείο τρεις δακτυλιοειδείς πυρήνες (εικόνα 1) .

Η ευρεία αυτή ομάδα ουσιών διαιρείται σε τρεις επί μέρους υποομάδες σύμφωνα με τους περιεχόμενους σε αυτές υποκαταστάτες και συγκεκριμένα στις εξής:

1<sup>ον</sup>) Στα Φλαβονοειδή,

2<sup>ον</sup>) Στις Ανθοκυανιδίνες (ήΑνθοκυανίδια) και

3<sup>ον</sup>) Στις Φλαβόνες, Φλαβανόνες και Χαλόνες (εικόνα 1).

Η βασική αυτή κοινή δομή περιέχει δύο τετηγμένους βενζολικούς δακτυλίους (Α και Β) οι οποίοι συνδέονται με ένα ετεροκυκλικό πυρανικό ή πυρονικό δακτύλιο (περιέχοντας έναν διπλό δεσμό, μέσω ενός απλού δεσμού άνθρακος – άνθρακος.

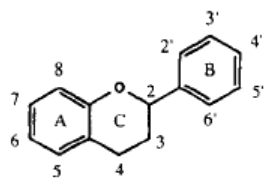
Η ως άνω διατυπωθείσα ταξινόμησή τους κατά πρώτον λόγο βασίζεται στην παρουσία ή απουσία ενός διπλού δεσμού στην θέση 4 του ανθρακικού δακτυλίου, ενός διπλού δεσμού μεταξύ των ατόμων άνθρακος 2 και 3 του ανθρακινού δακτυλίου και την παρουσία ομάδων υδροξυλίου στον δακτύλιο Β . (εικόνα 1).

Στην φλαβονοειδή δομή, μια φαινυλική ομάδα αντικαθίσταται συνήθως στην θέση 2 του πυρονικού δακτυλίου.

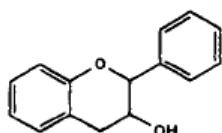
Στα ισοφλαβονοειδή η αντικατάσταση γίνεται στην θέση 3.

Τα φλαβονοειδή και οι τοκοφερόλες εμφανίζουν ένα κοινό δομικό χαρακτηριστικό, που αντιπροσωπεύεται από τον χρωμανολικό δακτύλιο. Έχουν γίνει διάφορες προσπάθειες για τον ποσοτικό προσδιορισμό των διαφορετικών φλαβονοειδών τα οποία υπάρχουν στα βρώσιμα φυτά, (Bilyk and Sapers, 1985, Hertog et al., 1992, Rice-Evans and Packer, 1998. [309, 310, 311, 312, 313, 314, 315])

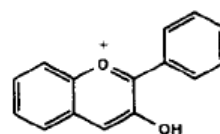
Καθιερώνοντας αυτούς τους τύπους δεδομένων οι επιστήμονες της διατροφής, θα μπορούσαν μέσω μελέτης της φαρμακοδυναμικής των φλαβονοειδών να οδηγηθούν σε μια πληρέστερη αποσαφήνιση του αν υπάρχει ένα άριστο επίπεδο κατανάλωσης για τα διατροφικά φλαβονοειδή, εν γένει (Kuhnau, 1976 [316]).



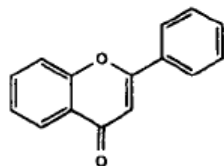
Flavonoid



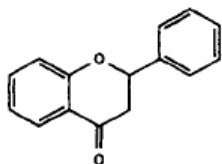
Flavan-3-ol



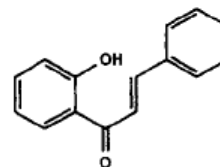
Anthocyanidin



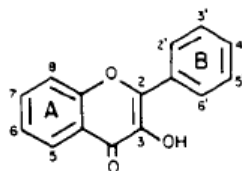
Flavone



Flavanone



Chalcone



Flavon-3-ol

	5	7	2'	3'	4'	5'
<b>Quercetin</b>	OH	OH	-	OH	OH	-
<b>Kaempferol</b>	OH	OH	-	-	OH	-
<b>Myricetin</b>	OH	OH	-	OH	OH	OH
<b>Morin</b>	OH	OH	OH	-	OH	-

Η διατροφική πρόσληψη του μίγματος των φλαβονοειδών ανέρχεται μόλις στα 23 mgr/ημέρα, όπως προκύπτει επί τη βάσει δεδομένων προερχομένων από την Deutch National Food Consumption Survey (1987 – 1988).

Το φλαβονοειδές που καταναλίσκεται περισσότερο είναι η κουερσετίνη και οι πλουσιότερες πηγές φλαβονοειδών της ανθρώπινης διατροφής αντιπροσωπεύονται από το τείον Κεϋλάνης (τσάι), που αποδίδει το 48% του συνόλου αυτών, από τα κρεμμύδια και τα μήλα (Hertog και συνεργάτες, 1993b [310, 311, 312, 313, 314]).

Η ποσότητα των 23 mgr /ημέρα ήταν κυρίως φλαβονόλες και φλαβόνες μετρούμενες ως αγλυκάνες, δηλαδή ως μόρια που δεν εμφάνιζαν σύνδεση με κάποιο σάκχαρο, (Hertog και συνεργάτες, 1993b [313, 314]).

Η αντίστοιχη ποσότητα των ημερησίως καταναλισκόμενων αγλυκανών φλαβονοειδών στις ΗΠΑ είναι 650 mgr/ημέρα, μέχρις ότου ο Kuhnu ανέβασε αυτή την ποσότητα στο 1 γραμμάριο ημερήσιας κατανάλωσης φλαβονογλυκοσιδίων [316].

Αν και υπάρχει μια σημαντική διαφορά μεταξύ των υπολογισμών του Hertog και Kuhnau, ωστόσο αυτή η διαφορά μπορεί να κατανοηθεί από το δεδομένο που προέκυψε μεταγενέστερα ότι τα γλυκοσίδια των φλαβονοειδών απορροφούνται πολύ καλύτερα από τον άνθρωπο εν συγκρίσει προς τις φλαβονοειδείς αγλυκάνες (Hollman and Katan, 1998 [317, 318, 319, 320]).

Παραταύτα τόσο η ποσότητα όσο και η πηγή μπορούν να διαφέρουν αξιοσημείωτα σε διαφορετικές χώρες. Για παράδειγμα η καταναλισκόμενη ποσότητά μπορεί να είναι αξιοσημείωτα υψηλότερη στην Μεσογειακή δίαιτα, η οποία είναι πλούσια σε έλαιόλαδο, εσπεριδοειδή και πράσινα λαχανικά.

Αυτές οι ποσότητες θα μπορούσαν να παρέχουν φαρμακολογικώς σημαντικές συγκεντρώσεις στα σωματικά υγρά και στους ιστούς. Γενικά η διαιτητική πρόσληψη των φλαβονοειδών είναι πολύ υψηλότερη από την αντίστοιχη της βιταμίνης E και του β-καροτενίου σε βάρος (Hertog et al., 1993b, [313]).

Η αύξηση του ενδιαφέροντος για την παραδοσιακή Ανατολική Ιατρική κατά τις τελευταίες δεκαετίες συνδυαζόμενη με την επέκταση της φαρμακογνωσίας αναθέρμανε το ενδιαφέρον για τα φλαβονοειδή και την ανάγκη κατανόησης των αλληλεπιδράσεών τους με τα κύτταρα και τους ιστούς του ανθρώπου.

Τα φλαβονοειδή φαίνεται ότι υπάρχουν στην φύση περισσότερο από ένα δισεκατομμύρια χρόνια (Swain, 1975 [321]) και κατ' αυτόν τον τρόπο έχουν αλληλεπιδράσει με τους εξελισσόμενους οργανισμούς κατά την διέλευση των γεωλογικών αιώνων.

Σαφώς τα φλαβονοειδή κατέχουν μερικές σπουδαίες ιδιότητες στην φύση, έχοντας επιβιώσει ως μόρια σε όλα τα αγγειόσπερμα φυτά σε όλα τα στάδια της εξέλιξης (Swain, 1975 [321]). Η ιδιαιτέρως μακρόχρονη συνύπαρξη των φυτικών φλαβονοειδών με τα ποικίλα ζωικά είδη και άλλους οργανισμούς κατά την εξέλιξη ενδεχομένως υπήρξε καθοριστική για το εξαιρετικό εύρος των βιοχημικών και φαρμακολογικών ιδιοτήτων αυτών των χημικών ουσιών στα θηλαστικά και σε άλλα βιολογικά συστήματα. Μοναδικά παραδείγματα αποτελούν η αναστολή της σύντηξης των κυτταρικών μεμβρανών των γαμετών των αχινών που προκαλεί η κουερσετίνη κατά την διάρκεια της γονιμοποίησης των ωών, (Eckberg and Perotti 1983 [322]), καθώς και η τροποποίηση της κινητικότητας του σπέρματος εκ μέρους του ιδίου χημικού παραγωγού (Nass-Arden and Breitbart, 1990, [323]).

Επίσης η προγενετική έκθεση στην γενιστεΐνη επηρεάζει την σεξουαλική διαφοροποίηση των επιμύων (Nass-Arden and Breitbart, 1990 [323]) και τοιουτοτρόπως θέτει το ερωτηματικό της πρόκλησης ανάλογων δράσεων και επί του ανθρώπινου είδους. Τα φλαβονοειδή άλλωστε ασκούν σημαντικές δράσεις στην φυσιολογία και βιοχημεία των φυτών, ενεργώντας ως αντιοξειδωτικοί παράγοντες, ως αναστολείς ενζύμων, πρόδρομοι τοξικών ουσιών, χρωστικές και φίλτρα του φωτός (Harborne et al., 1975 [302, 303, 304, 305], McClure 1986 [324, 325]). Επιπροσθέτως τα μοριακά αυτά παράγωγα υπεισέρχονται στην φωτοευασθητοποίηση, στην μεταφορά ενέργειας, στην δράση των φυτικών ορμονών και ρυθμιστών της ανάπτυξης, στον έλεγχο της αναπνοής, στην φωτοσύνθεση, στον έλεγχο της αναπνοής, στην φωτοσύνθεση, στην μορφογένεση και στον προσδιορισμό του φύλλου, όπως επίσης και στην άμυνα εναντίον των λοιμώξεων (Smith and Banks, 1986, [326]). Υπάρχουν αναφορές οι οποίες δείχνουν ότι τα φυτικά φλαβονοειδή προκαλούν την ενεργοποίηση γονιδίων βακτηρίων (*Rhizobium*), που υπεισέρχονται στον έλεγχο της καθήλωσης του αζώτου (βιολογική αζωτοδέσμευση), πράγμα που υποδεικνύει σημαντικές σχέσεις μεταξύ συγκεκριμένων φλαβονοειδών και της ενεργοποίησης και έκφρασης των γονιδίων των θηλαστικών (Firmin et al., 1986. Peters et al., 1986. Djordjevic et al., 1987. Zaat et al., 1987, [327, 328, 329, 330]).

Για τα φλαβονοειδή έχει από καιρό αναγνωριστεί ότι εμφανίζουν αντιφλεγμονώδεις, αντιοξειδωτικές, αντιαλλεργικές, ηπατοπροστατευτικές, αντιθρομβωτικές, αντιαρτηροσκληρωτικές και αντικαρκινογόνες δράσεις (Gabor, 1979, 1986, 1991. Havsteen, 1984. Cody et al., 1986. Cody et al., 1988. Farkas et al., 1986. Selway, 1986. Cody et al., 1988. Welton et al., 1988. Das, 1989. Middleton and Kandaswami, 1993. Carroll et al., 1998. Hertog and Katan, 1998 [331, 332, 333, 334, 335, 336, 337, 338, 339, 340, 341, 342, 343, 344, 345, 346, 310, 311, 312, 313]) Τα φλαβονοειδή είναι τυπικά φαινολικά παράγωγα και δρουν ως ισχυροί χυλικοί δεσμευτές μετάλλων, καθώς και ως εκκαθαριστές ελευθέρων ριζών (Hughes and Wilson, 1977. Torel et al., 1986. Clemetson, 1989. Kandaswami and Middleton, 1994, 1995, [347, 348, 349, 350, 351, 352, 353]).

Αυτά είναι πολύ ισχυροί παράγοντες που διακόπτουν τις αλυσιδωτές αντιδράσεις ελευθέρων ριζών. Τα φλαβονοειδή, συνεπώς, επιδεικνύουν ένα ευρύ τόξο βιοχημικών και φαρμακολογικών δράσεων, μερικές από τις οποίες υποδεικνύουν ότι τουλάχιστον μερικά από αυτά θα μπορούσαν να επηρεάσουν την λειτουργία διαφόρων κυτταρικών συστημάτων των θηλαστικών. Οι αντιφλεγμονώδεις δράσεις αυτών έχουν αναλυθεί επαρκώς από τον Lewis (1989, [354]) ο οποίος έδωσε μια ισχυρή έμφαση στην δυνητική

τους χρησιμοποιήση ως θεραπευτικών παραγόντων. Ήδη από τον 1955 η Ιατρική Ακαδημία της Νέας Υόρκης δημοσίευσε μια σειρά εργασιών οι οποίες ανέλυαν τις δράσεις των φλαβονοειδών επί των τριχοειδών αγγείων (Miner, 1955, [355]). Επίσης ήδη από το 1950 υπήρχαν ενδείξεις αντιαλλεργικών δράσεων, ενώ διαπιστώθηκε μια αλληλεπίδραση μεταξύ φλαβονοειδών και ασκορβικού οξέος (βιταμίνη C). Οι Schoenkerman και Justice το 1952 [356], υποδεικνύουν ότι η χορήγηση ρουτίνης και αντισταμινικών είχε ευεργετικές δράσεις σε ασθενείς πάσχοντες από αλλεργίες. Είναι ιστορικής σημασίας η παρατήρηση ότι ένα μίγμα δύο φλαβονοειδών, της κιτρίνης και της εσπεριδίνης, εμφάνιζε βιταμινική δράση (Scarborough and Bacharach, 1949. Kühnau, 1976. Hughes and Wilson, 1977, [316, 347, 357]).

Ο όρος βιταμίνη P δημιουργήθηκε<sup>7</sup> για να δείξει ότι αυτό το υλικό κατείχε την ιδιότητα της μείωσης της διαπερατότητας και ευθραυστότητας των τριχοειδών αγγείων, επιμηκύνοντας την ζωή οριακά σκορβουτικών ινδικών χοιριδίων και μειώνοντας τα σημεία της υποβιταμίνωσης C των εν λόγω πειραματοζώων. Μολονότι η ούτως ονομαζόμενη βιταμίνη P δεν εκπλήρωνε απολύτως τα χαρακτηριστικά του ορισμού της βιταμίνης, πράγμα που οδήγησε στην εγκατάλειψη του σχετικού όρου, εν τούτοις παρέμεινε η ισχυρή ένδειξη ότι τα φλαβονοειδή είναι ουσίες προικισμένες με ισχυρή αντιοξειδωτική ικανότητα, παρόμοια με εκείνη της βιταμίνης C, με την οποία δημιουργούσαν έναν πολύ ισχυρό αντιοξειδωτικό συνδυασμό (Clemetson, 1989 [349, 350, 351]), όπως θα συζητήσου με παρακάτω. Στην παρούσα κατάσταση τα φλαβονοειδή περιγράφονται ως διατροφικοί παράγοντες δευτέρου ρόλου και συνεπώς, μη απαραίτητοι για τον άνθρωπο, χωρίς κάποια αποδεδειγμένη αξία για την ανθρώπινη υγεία ή την παθολογία. Ωστόσο πλείστα όσα δεδομένα αποδεικνύουν ακριβώς το αντίθετο, υποδεικνύοντας ότι αυτή η τοποθέτηση για τα φλαβονοειδή πρέπει να αλλάξει εξ αιτίας των πλειοτροπικών και ευεργετικών για την υγεία δράσεών τους, όπως επίσης και για την ικανότητά τους να προλαμβάνουν νόσους, τουλάχιστον στα χρησιμοποιηθέντα πειραματικά μοντέλα. Μερικά φλαβονοειδή μάλιστα κατέχουν αντικαρκινογόνες ιδιότητες (Hertog et al., 1992, 1993b, 1995. [310, 311, 312, 313]) και δεν παρουσιάζουν κανένα καρκινογόνο δυναμικό στα πειραματόζωα (Aeschbacher et al., 1982. [358]). Ο αλκολισμός αποτελεί μια πολύ σημαντική και διαδεδομένη τοξικοεξάρτηση, η οποία οδηγεί στην ψυχική και σωματική κατάρρευση του εξαρτημένου ατόμου σε σχετικά μικρά χρονικά διαστήματα και ανεξαρτήτως ηλικίας, καλλιέργειας και κοινωνικής τάξης. Για τον λόγο

αυτό έχει διεξαχθεί και διεξάγεται αρκετή έρευνα προκειμένου να βρεθούν τρόποι ικανοί να βοηθήσουν στην απεξάρτηση των εξαρτημένων ατόμων από την αιθανόλη.

Για περισσότερα από 2000 χρόνια η Κινεζική Παραδοσιακή Ιατρική έχει αναγνωρίσει την αντιψωτροπική δράση του φυτού *Radix puerarie*, το οποίο οι Παραδοσιακοί γιατροί της Κίνας χρησιμοποιούν για την θεραπεία του αλκοολισμού.

Οι Keung και Vallee 1993 [359, 360]) εκμεταλεύτηκαν την τάση του χρυσού κρικετού της Συρίας να καταναλώνει αιθυλική αλκοόλη και να εξαρτάται από αυτήν, προκειμένου να μελετήσουν τις δράσεις των εκχυλισμάτων του φυτού *Radix puerarie* και δύο ισοφλαβονοειδών (της νταϊντζίνης και νταϊντζεϊνης) τα οποία απομονώθηκαν στα εν λόγω φυτικά εκχυλίσματα. Τα πειράματα των δύο αυτών ερευνητών έδειξαν ότι οι προαναφερθείσες ισοφλαβονοειδείς ουσίες ελάττωσαν την κατανάλωση της αιθανόλης από τον χρυσό Συριακό κρικετό σχεδόν κατά 50% θέτοντας έτσι τις βάσεις για την ανάπτυξη μιας νέας τάξης θεραπευτικών παραγόντων για την αντιμετώπιση του αλκοολισμού. Μια άλλη, συντόμως αναφερόμενη, παρατήρηση μεγάλης δυνητικής αξίας αντιπροσωπεύεται από τον εντοπισμό της κουερσετίνης στον αμφιβληστροειδή χιτώνα των οφθαλμών των βοειδών Pautler και συν. 1986 [361]. Η ερώτηση η οποία τίθεται είναι συνεπώς η εξής: Μπορούν τα διατροφικώς καταναλισκόμενα φλαβονοειδή να συσσωρεύονται στους διάφορους ιστούς και να τροποποιούν τις λειτουργίες αυτών; Ένα πολύ σημαντικό άρθρο ανασκόπησης για τις δράσεις των φλαβονοειδών, το οποίο διατηρεί ακόμη την αξία του, δημοσιεύτηκε από τους Rice-Evans και Packer το 1998 [315].

Ο Das και οι συνεργάτες του το 1994 [341] δημοσίευσαν μια μελέτη στην οποία πραγματοποίησαν μια λεπτομερειακή ανάλυση των σχέσεων δομής των φλαβονοειδών και καρκινογένεσης – μεταλλαξιογένεσης, όπως επίσης και των προστατευτικών ιδιοτήτων τους κατά του καρκίνου. Οι δύο ερευνητές κατέληξαν ότι, παρά την ύπαρξη μιας τρέχουσας αντιφατικότητας, «η πολύ μεγάλη πλειοψηφία των φλαβονοειδών και των ισοφλαβονοειδών αποτελούν ουσίες απολύτως αβλαβείς οι οποίες μπορούν από την άλλη πλευρά να χρησιμοποιηθούν ευεργετικά για την αντιμετώπιση ενός αριθμού διαταραχών της ανθρώπινης παθοφυσιολογίας». Τα φλαβονοειδή αποδεικνύεται ότι είναι παρόντα σε πολλά φυτικά προϊόντα που χρησιμοποιούνται θεραπευτικά. Π.χ η χημική ανάλυση των συστατικών του φαρμακευτικού φυτού *Gingo biloba* δείχνει ότι τα φλαβονοειδή αποτελούν το κυρίαρχο συστατικό αυτού, όπως αναφέρουν οι Kleinjnen and Knipschild, 1992 [362].

## 2.2. Βιοσύνθεση των φλαβονοειδών

Τα φλαβονοειδή είναι, όπως ήδη προαναφέραμε, ουσίες φαινολικού τύπου. Γενικά οι φυτικές φαινόλες είναι πολλές και συγκροτούν για μεγάλη κατηγορία ετερογενών ενώσεων. Η ετερογένεια υπάρχει τόσο σε δομικό όσο και σε μεταβολικό επίπεδο. Στην σύνθεση των φαινικών ουσιών των φυτών εμπλέκονται δύο θεμελιώδεις οδοί: 1<sup>ov</sup>) Η οδός του μηλονικού οξέος και 2<sup>ov</sup>) η διαδρομή του σικιμικού οξέος (Τσέκος, Φυσιολογία Φυτών [1]. Η οδός του μηλονικού οξέος είναι σημαντική πηγή δευτερογενών προϊόντων στους μύκητες και τα βακτήρια, αλλά έχει μικρή σημασία για τα ανώτερα φυτά. Η οδός του σικιμικού οξέος μετατρέπει υδατάνθρακες – προβαθμίδες, που προέρχονται από την γλυκόλυση και την οδό της φωσφορικής πεντόζης - σε αρωματικά αμινοξέα. Μια από τις ενδιάμεσες ενώσεις της οδού είναι και το σικιμικό οξύ, το οποίο έδωσε την ονομασία του σε όλη αυτή την ακολουθία των αντιδράσεων. Το πολύ γνωστό ζιζανιοκτόνο ευρέως φάσματος Glypho - sate (εμπορικό όνομα Roundup) θανατώνει τους φυτικούς οργανισμούς αναστέλλοντας ένα βήμα αυτής της οδού. Η οδός του σικιμικού οξέος είναι παρούσα στα φυτά, στους μύκητες και τα βακτήρια, αλλά δεν απαντάται στα ζώα. Τα ζώα δεν διαθέτουν τα κατάλληλα γονίδια και βιοχημικές οδούς για να συνθέσουν τα τρία αρωματικά αμινοξέα (φαινυλαλανίνη, τυροσίνη και θρυπτοφάνη). Για τον λόγο αυτό τα αρωματικά αμινοξέα είναι απαραίτητες θρεπτικές ουσίες της διαίτας των ζώων. Η πιο άφθονη κατηγορία φαινικών ουσιών στα φυτά προέρχεται από το αμινοξύ φαινυλαλανίνη διαμέσου της απόσπασης ενός μορίου αμμωνίας προκειμένου να σχηματισθεί το κινναμωμικό οξύ. Αυτή η αντίδραση καταλύεται από την αμμωνιακή λυάση της φαινυλαλανίνης (phenylalanine ammonia lyase, PAL), η οποία αποτελεί ένα από τα πλέον μελετημένα ένζυμα των φυτών στους δευτερογενείς μεταβολικούς τους δρόμους. Η PAL ευρίσκεται τοποθετημένη σε ένα κομβικό σημείο της αλληλουχίας των αντιδράσεων μεταξύ του πρωτογενούς και δευτερογενούς μεταβολισμού και κατ' αυτόν τον τρόπο καταλύει ένα πολύ σημαντικό βιοχημικό βήμα με ρυθμιστικό χαρακτήρα για τον σχηματισμό πολλών φαινικών ενώσεων. Έρευνες οι οποίες επιτελέστηκαν σε πολλά διαφορετικά φυτικά είδη έδειξαν ότι η δραστηριότητα της PAL αυξάνει από την δράση περιβαλλοντικών παραγόντων, όπως χαμηλά επίπεδα θρεπτικών ουσιών, την προσβολή μυκήτων και βεβαίως, το φώς (διαμέσου της δράσης του επί του φυτοχρώματος) [Hahlbrock και Scheel 1989 [363]. Το σημείο ελέγχου φαίνεται να είναι η έναρξη της μεταγραφής. Συνεπώς οι περιβαλλοντικοί στρέσορες δρουν κατά τέτοιο τρόπο ώστε να επαυξάνουν την παραγωγή mRNA για την σύνθεση της PAL, η οποία με την σειρά της



επαυξάνει την παραγωγή των φαινολών οι οποίες φαίνεται προσδίδουν ανθεκτικότητα στα φυτά έναντι του stress. Η ρύθμιση της δραστηριότητας της PAL στα φυτά καθίσταται πιο περίπλοκη καθώς αρκετά φυτικά είδη εμπεριέχουν πολλαπλά γονίδια που κωδικοποιούν την PAL, μερικά των οποίων εκφράζονται μόνον σε συγκεκριμένους ιστούς και υπό ορισμένες μόνον συνθήκες (Logemann et al, 1995 [364]).

Το προϊόν της PAL, δηλαδή το *trans*-κινναμωμικό οξύ (*cinnamic acid*), μετατρέπεται σε *para*-κουμαρικό οξύ με την προσθήκη μιας ρίζας υδροξυλίου, επάνω στον αρωματικό δακτύλιο σε θέση *para* - .

Οι επακολουθούσες αντιδράσεις οδηγούν στην προσθήκη περισσότερων ομάδων υδροξυλίου και άλλων υποκαταστατών. Το *trans* - κινναμωμικό οξύ (*cinnamic acid*), το *para* – κουμαρινικό οξύ και τα παράγωγά τους είναι απλές φαινολικές ουσίες οι οποίες καλούνται **φαινυλοπροπανοειδή**, γιατί περιέχουν έναν δακτύλιο του βενζενίου και μια πλευρική αλυσίδα με τρία άτομα άνθρακα. Τα φαινυλοπροπανοειδή είναι σημαντικοί οικοδομικοί λίθοι των πιο συμπλόκων φαινικών ενώσεων, όπως τα φλαβονοειδή.

Ο βασικός ανθρακικός σκελετός ενός φλαβονοειδούς περιέχει 15 άτομα άνθρακα σε μια διάταξη δύο αρωματικών δακτυλίων που συνδέονται από μια γέφυρα με τρία άτομα άνθρακα. Η γέφυρα και ο ένας αρωματικός δακτύλιος (δακτύλιος Β) συνιστά μια φαινυλοπροπανοειδή μονάδα που βιοσυντίθεται από την φαινυλαλανίνη – η οποία επίσης είναι προϊόν της οδού του σικιμικού οξέος. Τα έξι άτομα άνθρακα του άλλου αρωματικού δακτυλίου (δακτύλιος Α) προέρχονται από την συμπύκνωση των τριών μονάδων του οξικού οξέος διαμέσου της διαδρομής του μηλονικού οξέος. Η σύντηξη αυτών των δύο μερών εμπλέκει την βαθμιαία συμπύκνωση ενός φαινυλοπροπανοειδούς, του *para* – κουμαρόυλο – συνένζυμο Α, με τρία υπολειμματικά μόρια του μηλότυλο-συνενζύμου Α (κάθε ένα από τα οποία δίνει δύο άτομα άνθρακα) σε μια αντίδραση που καταλύεται από την **συνθάση της χαλκόνης**.

Αυτή η σειρά των συμπυκνώσεων είναι ανάλογη προς τον κύκλο της προσθήκης δύο ατόμων άνθρακα κατά την διάρκεια της βιοσύνθεσης των λιπαρών οξέων, εξαιρουμένου του ότι η σύνθεση των φλαβονοειδών ξεκινά με το *para*-κουμαρόυλο-συνένζυμο Α και όχι με το ακέτυλο-συνένζυμο και η αυξανόμενη ακυλική αλυσίδα δεν ανάγεται ή αφυδατώνεται. Οι χαλκόνες που σχηματίζονται σε αυτή την διεργασία δημιουργούν όλους τους άλλους τύπους των φλαβονοειδών. Η συνθάση της χαλκόνης, όπως η PAL, είναι ένα σημαντικό ρυθμιστικό ένζυμο στον δευτερογενή φυτικό μεταβολισμό. Η δραστηριότητά της τροποποιείται από διάφορες περιβαλλοντικές συνθήκες και ο έλεγχος

πραγματοποιείται στο επίπεδο της γονιδιακής μεταγραφής (Hahlbrock και Scheel 1989 [363]).

Τα φλαβονοειδή ταξινομούνται σε διάφορες ομάδες, βάσει κυρίως του βαθμού οξειδώσεως της γέφυρας με τα τρία άτομα άνθρακα. Οι σημαντικότερες από τις ομάδες αυτές, όπως ήδη προαναφέραμε, είναι οι ανθοκυανίνες, οι φλαβόνες, οι φλαβονόλες και οι ισοφλαβόνες. Ο βασικός ανθρακικός σκελετός των φλαβονοειδών έχει πολυάριθμους υποκαταστάτες. Οι υδροξυλικές ομάδες κυρίως παρουσιάζονται στις θέσεις 4,5 και 7 αλλά απαντώνται επίσης και σε άλλες θέσεις. Τα σάκχαρα επίσης είναι ένας πολύ συνηθής υποκαταστάτης και στην πραγματικότητα οι πλειοψηφία των φλαβονοειδών υπάρχει στην φύση με την μορφή των γλυκοζιτών. Ενώ αμφότερες οι υδροξυλικές ομάδες και τα σάκχαρα αυξάνουν την υδατοδιαλυτότητα των φλαβονοειδών, άλλοι υποκαταστάτες, όπως μεθυλικοί αιθέρες ή τροποποιημένες ομάδες ισοπεντυλίου καθιστούν τα φλαβονοειδή λιπόφιλα (υδροφοβικά). Διάφοροι τύποι φλαβονοειδών πραγματοποιούν πολύ διαφορετικές λειτουργίες στο φυτό, συμπεριλαμβανομένων της εμφάνισης χρωστικών και άμυνας.

### ***2.3. Λειτουργικοί ρόλοι των φλαβονοειδών στα Φυτά***

Φαίνεται ότι οι γενικοί ρόλοι των φλαβονοειδών στα φυτά είναι τέσσερις:

1<sup>ov</sup>) Προστασία των φυτών από την δράση του υπεριώδους φωτός.

2<sup>ov</sup>) Προστασία από μύκητες και βακτήρια.

3<sup>ov</sup>) Λειτουργία ως φερομονών για την προσέλκυση ζώων που ευοδώνουν την επικονίαση και την διασπορά των σπερμάτων. 4<sup>ov</sup>) Σύνθεση ουσιών (ταννίνες) που αποκρούουν την βόσκηση. Αναλυτικά οι ρόλοι αυτοί έχουν ως εξής:

#### ***1. Προστασία των φυτών από την υπεριώδη ακτινοβολία και φερομονικός ρόλος***

Οι κύριες ομάδες των φλαβονοειδών που απαντώνται στα άνθη είναι οι **φλαβόνες** και οι **φλαβονόλες**. Αυτά τα φλαβονοειδή απορροφούν γενικά το φώς σε βραχεία μήκη κύματος (σε σύγκριση με τις ανθοκυανίνες) και έτσι δεν είναι ορατά στον ανθρώπινο οφθαλμό. Ωστόσο διάφορα έντομα, όπως οι μέλισσες, οι οποίες έχουν αίσθηση φωτός στην παραπέρα περιοχή του υπεριώδους φάσματος από ό,τι ο άνθρωπος, φαίνεται ότι ανταποκρίνονται στις χροιές των φλαβονών και των φλαβονολών, τις οποίες εκλαμβάνουν ως προσελκυστικά ερεθίσματα. Ο Levy και οι συνεργάτες του στο Πανεπιστήμιο του Purdue, χρησιμοποιώντας υπεριώδη φωτογράφιση, έδειξαν ότι η κατανομή των φλαβονών

σε ένα άνθος συχνά σχηματίζει συμμετρικά πρότυπα κηλίδων, ραβδώσεων ή συγκεντρικών κύκλων που ονομάζονται οδηγοί του νέκταρος (McCrea και Levy, 1983 [365] Τσέκος). Αυτά τα χρωματικά πρότυπα είναι εμφανή στα έντομα και επιβοηθούν την εκτέλεση της διατροφικής τους συμπεριφοράς υποδεικνύοντας την θέση των γυρεοκόκκων και του νέκταρος. Οι φλαβόνες και οι φλαβονόλες, ωστόσο δεν περιορίζονται μόνο στα άνθη αλλά απαντώνται και στα φύλλα όλων των πράσινων φυτών. Ειδικότερα τις συναντούμε στην δομή των θυλακοειδών των χλωροπλαστών. Η συσσώρευση των μορίων αυτών στα επιδερμικά στρώματα των φύλλων και των βλαστών, όπου απορροφούν ισχυρά την ακτινοβολία στην περιοχή του UV-B, ενώ από την άλλη πλευρά επιτρέπουν την διέλευση φωτοσυνθετικώς ενεργών μηκών κύματος (ορατό φως), υποδεικνύει ότι οι εν λόγω ουσίες προστατεύουν τις φωτοσυνθετικές δομές των φυτών και εν γένει τα εκτεθειμένα στην ηλιακή ακτινοβολία μέρη τους, από την αποσταθεροποιητική δράση της υπεριώδους ακτινοβολίας. Επιπροσθέτως η έκθεση των φυτών σε αυξημένες ποσότητες B-υπεριώδους ακτινοβολίας έχει σαν αποτέλεσμα την αύξηση της βιοσύνθεσης των φλαβονών και των φλαβονολών. Πρόσφατα αποδείχτηκε η σημαντικότητα των φλαβονοειδών ως προστατευτικών ουσιών απέναντι στο UV. Ο Last και οι συνεργάτες του, μελετώντας μεταλλάγματα του φυτού *Arabidopsis thaliana*, τα οποία στερούνται της δραστηριότητας της συνθάσης της χαλκόνης, διαπίστωσαν ότι τα μεταλλαγμένα αυτά φυτά δεν παράγουν φλαβονοειδή. Το κύριο χαρακτηριστικό των εν λόγω μεταλλαγμένων φυτών είναι η πολύ μικρή ανθεκτικότητά τους στην υπεριώδη – B ακτινοβολία, σε σύγκριση με αντίστοιχα φυτά αγρίου τύπου, πράγμα το οποίο αντικατοπτρίζεται στην πολύ μικρή τους ανάπτυξη υπό κανονικές συνθήκες φωτισμού, δηλαδή στις συνθήκες όπου η κύρια πηγή φωτός αντιπροσωπεύεται από τον ήλιο. Δηλαδή τα φλαβονοειδή που παράγονται φυσιολογικά στα αγρίου τύπου φυτά, εξασφαλίζουν την ανάπτυξή τους, πράγμα που δεν είναι εφικτό για τα μεταλλαγμένα φυτά του *Arabidopsis thaliana*, τα οποία στερούνται φλαβονοειδών. Ωστόσο όταν τα τελευταία αυτά γενετικώς μειονεκτούντα φυτά τίθενται υπό τεχνητές συνθήκες φωτισμού, στα οποία η υπεριώδης – B ακτινοβολία δεν είναι παρούσα, τότε η αύξησή τους φυσιολογικοποιείται (Li και συν. 1993 [366]). Ωστόσο στο φυτό *Arabidopsis* εκτός από τα φλαβονοειδή φαίνεται ότι προστατευτικό ρόλο απέναντι στην ακτινοβολία UV-B παίζουν και ωρισμένοι φαινυλοπροπανοειδείς εστέρες, χωρίς αυτό να μειώνει ουδόλως την κρίσιμη σημασία των φλαβονοειδών παραγώγων. Πρόσφατα ανακαλύφθηκαν και άλλες δράσεις των φλαβονών και φλαβονολών σχετιζόμενες με την μεσολάβησή τους στις συμβιωτικές σχέσεις μεταξύ χεδρωπών φυτών και

αζωτοδεσμευτικών βακτηριδίων. Επίσης είναι από πολλά χρόνια γνωστή η προσελκυστική δράση των φλαβονοειδών που απορροφούν στο υπέρυθρο για έντομα, όπως οι μέλισσες, τα οποία λειτουργούν ως επικονιαστές. Φυσικά το χρώμα είναι μόνον ένας τύπος σήματος που χρησιμοποιείται από τα άνθη για την προσέλκυση των επικονιαστών εντόμων. Άλλοι τύποι σήματος σχετίζονται με πτητικές ουσίες, όπως τα μονοτερπένια, τα οποία προσελκύουν τα επικονιαστικά έντομα.

## ***II. Αμυντικός ρόλος των ισοφλαβονοειδών που συντίθενται αμέσως μετά την μόλυνση από βακτήρια και μύκητες.***

Τα ισοφλαβονοειδή (ισοφλαβόνες) είναι μια ομάδα φλαβονοειδών στην οποία η θέση του ενός αρωματικού δακτυλίου μετατοπίζεται. Τα ισοφλαβονοειδή απαντώνται κατά κύριο λόγο στα χεδρωπά φυτά και εμφανίζουν αρκετές βιολογικές δράσεις. Μερικά ισοφλαβονοειδή, όπως τα ροτενοειδή, έχουν ισχυρές εντομοκτόνες ιδιότητες, ενώ άλλα έχουν αντιοιστρογόνο δράση και είναι σε θέση να προκαλέσουν στειρότητα στα θηλαστικά. Αυτά τα μόρια παρουσιάζουν εξαιρετικό ενδιαφέρον από την άποψη των ιατρικών τους εφαρμογών και μελετώνται εντατικά τα τελευταία χρόνια. Επίσης προσφάτως έγινε γνωστό ότι πολλά ισοφλαβονοειδή εμφανίζουν αντιμικροβιακές ιδιότητες και συντίθενται σε υψηλά ποσοστά από τα φυτά αμέσως μετά μια προσβολή αυτών από βακτήρια ή μύκητες. Η αύξηση της παραγωγής των εν λόγω μορίων, τα οποία εκλήθησαν και **φυτοαλεξίνες**, έχει την σκοπιμότητα του περιορισμού της εξάπλωσης των παθογόνων μικροοργανισμών που έχουν εισβάλλει στο σώμα του φυτού. Και αυτά τα μόρια εμφανίζουν εξαιρετικό ενδιαφέρον για τις βιολογικές εφαρμογές τους στην αντιμετώπιση των λοιμωδών νόσων του ανθρώπου και των ζώων.

## ***III. Οι ταννίνες ως προϊόντα πολυμερισμού φλαβονοειδών με τοξικές ιδιότητες***

Οι συμπυκνούμενες ταννίνες είναι μόρια που σχηματίζονται από τον πολυμερισμό των μονάδων των φλαβονοειδών και συχνά είναι συστατικά των ξυλωδών φυτών. Επειδή οι συμπυκνούμενες ταννίνες μπορούν συχνά να υποστούν υδρόλυση προς ανθοκυανίδες κατόπιν επεξεργασίας με ισχυρά οξέα, για αυτό μερικές φορές καλούνται προανθοκυανίδες. Οι υδρολυόμενες είναι ετερογενή πολυμερή που περιέχουν φαινολικά οξέα, όπως το γαλλικό οξύ και απλά σάκχαρα. Αυτές είναι μικρότερα μόρια εν συγκρίσει με εκείνα των συμπυκνούμενων ταννινών και υδρολύονται πιο εύκολα. Οι πιο πολλές ταννίνες έχουν μοριακά βάρη μεταξύ 600 και 3000 Da.

Οι ταννίνες είναι τοξίνες γενικού χαρακτήρα που δρουν ως δηλητήρια και χρησιμοποιούνται στην δέψη των ακατέργαστων ζωικών δερμάτων προκειμένου να τα καταστήσουν ανθεκτικά στην διαδικασία της σήψης, αυξάνοντας την αντοχή τους στο νερό, την θερμότητα και τις μικροβιακές προσβολές. Οι ταννίνες (δεψικές ύλες) συνδέονται με τις ίνες του κολλαγόνου των δερμάτων προσδίδοντάς του την ανθεκτικότητα που προαναφέραμε. Οι ταννίνες συμπεριφέρονται γενικά ως τοξίνες που ελαττώνουν σημαντικά την αύξηση και την διάρκεια επιβίωσης πολλών φυτοφάγων ζώων, όταν προστίθενται στην διαίτά τους. Στην φύση οι ταννίνες δρουν ως ουσίες που αποτρέπουν τα φυτοφάγα ζώα να βοσκήσουν τα φυτά που τις περιέχουν σε μεγάλα ποσοστά, ενδεχομένως εξ αιτίας της κακής τους γεύσης. Στον άνθρωπο οι ταννίνες προκαλούν μια έντονη αίσθηση στύψης στο στόμα, εξ αιτίας της πρόσδεσής τους στις σιελοπρωτεΐνες. Τα θηλαστικά, όπως ελάφια, βοειδή και πρωτεύοντα (πίθηκοι) αποφεύγουν κατά τρόπο χαρακτηριστικό εκείνα τα φυτά ή τα τμήματά τους τα οποία περιέχουν υψηλά ποσοστά ταννινών. Τα άγουρα φρούτα, έχουν συχνά πολύ υψηλά επίπεδα ταννινών στα εξωτερικά κυτταρικά τους στρώματα. Ωστόσο είναι πολύ ενδιαφέρον το γεγονός ότι αρκετοί άνθρωποι επιλέγουν αυτόματα την κατανάλωση τροφίμων που περιέχουν κάποιο επίπεδο στυπτικότητας, όπως μήλων, τσαγιού, κόκκινου κρασιού και βατόμουρων. Τα τρόφιμα αυτά εμπεριέχουν βεβαίως και αρκετές φλαβονοειδείς ουσίες. Οι στυπτικές ιδιότητες των ταννινών επεκτείνονται σε ολο το πεπτικό σύστημα προκαλώντας συχνά δυσκοιλιότητα. Γενικά οι βιολογικές δράσεις των ταννινών οφείλονται στην ικανότητά τους να συνδέονται με τις πρωτεΐνες. Ήδη από αρκετά χρόνια θεωρείται ότι οι φυτικές ταννίνες σχηματίζουν σύμπλοκα με τις πρωτεΐνες στο έντερο των φυτοφάγων ζώων δημιουργώντας δεσμούς υδρογόνου μεταξύ των υδροξυλικών τους ομάδων και ηλεκτραρνητικών θέσεων επί των μακρομορίων των πρωτεϊνών. Νεώτερα δεδομένα υποδεικνύουν τον σχηματισμό ομοιοπολικών δεσμών μεταξύ των διαιτητικών πρωτεϊνών και των ταννινών. Το φύλλωμα πολλών φυτών περιέχει ένζυμα τα οποία οξειδώνουν τις ταννίνες προς τις αντίστοιχες κινόνες στο εσωτερικό του εντέρου των φυτοφάγων ζώων. Αυτές οι αντιδράσεις ενδεχομένως να εμποδίζουν την αύξηση των μικροβιακών χλωρίδων. Οι κινόνες είναι υψηλώς δραστικά ηλεκτρόφιλα μόρια, τα οποία αντιδρούν εύκολα με πυρηνόφιλες ομάδες  $-SH$  και  $NH_2$  των πρωτεϊνών. Αυτή η διαδικασία έχει αρνητικές συνέπειες στην χρησιμοποίηση των πρωτεϊνών από το πεπτικό σύστημα του ζώου, με αποτέλεσμα την πλημμυγή του θρέψης. Οι ταννίνες επίσης μπορούν να αδρανοποιήσουν τα πεπτικά ένζυμα των ζώων οπότε

παρεμποδίζουν την διαδικασία της πρωτεόλυσης και της συνακόλουθης λήψης αμινοξέων από την εντερική βλεννογόνο του ζώου. Νεώτερα δεδομένα υποδεικνύουν ότι οι ταννίνες μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως φάρμακα αντιελμινθικά και γενικώς κατά των εντερικών παρασιτώσεων. Και στο επίπεδο αυτό η έρευνα είναι αξιόλογη για τις κτηνιατρικές και ιατρικές της εφαρμογές .

#### **2.4. Δράσεις των φλαβονοειδών στα ζωικά κύτταρα και στα ενζυμικά τους συστήματα.**

Οι δράσεις των φλαβονοειδών στα ζωικά κύτταρα είναι πολλές και ποικιλόμορφες ώστε να μην αμφιβάλλει κανείς για την δυνατότητα χρησιμοποίησης των ουσιών αυτών ως φαρμάκων ή συμπληρωμάτων σε μια ευρύτατη γκάμα παθοφυσιολογικών διαταραχών. Η πραγματικά τεράστια γκάμα δράσεων δεν μας επιτρέπει μια αναλυτική παρουσίαση όλης της σχετικής βιβλιογραφίας, οπότε αναγκαστικά θα προβούμε σε μια περιεκτική της σύνοψη χωρίς μεγάλη ανάλυση, παρά μόνο στα σημεία τα οποία εμπίπτουν στο ερευνητικό στόχο της παρούσας διατριβής, δηλαδή στις δράσεις των φλαβονοειδών πάνω στην συσσώρευση των αιμοπεταλίων, καθώς και των εμπλεκόμενων ενζυμικών συστημάτων.

##### **A. Δράσεις επί των ενζυμικών συστημάτων των ζωικών κυττάρων**

Έχει αποδειχθεί ότι τα φλαβονοειδή μεταβάλουν την δραστηριότητα πάρα πολλών ενζυμικών συστημάτων των κυττάρων των θηλαστικών *in vitro*. Υπάρχουν επίσης σαφείς ενδείξεις ότι οι τροποποιητικές ή ανασταλτικές αυτές δράσεις επί των συγκεκριμένων ενζυμικών συστημάτων λαμβάνουν χώρα και σε *in vivo* μοντέλα πειραματισμού, όπως θα δούμε αναλυτικότερα κατωτέρω. Πέραν από τα δεδομένα αυτά το κυρίαρχο ερώτημα από την φαρμακολογική πλευρά είναι το ποια από τα φλαβονοειδή μπορούν να εισέλθουν στο εσωτερικό των κυττάρων και αν μπορούν να συσσωρευτούν σε στα κύτταρα συγκεκριμένων οργάνων. Προς την κατεύθυνση αυτή η έρευνα έχει εντοπίσει ότι υπάρχουν αξιοσημείωτες αλληλοσυσχετίσεις μεταξύ δομών και δράσεων, οι οποίες μνημονεύονται στις σελίδες που ακολουθούν. Το σύνολο των αναφορών τις οποίες παρουσιάζουμε εδώ δεν εξαντλεί την πολύ μεγάλη έκταση του θέματος, αλλά βοηθά στην δημιουργία μια εξοικείωσης με την έκταση των τροποποιητικών δράσεων επί των λειτουργιών των ενζυμικών συστημάτων, που έχουν μέχρι στιγμής καταγραφεί.

## 1. Κινάσες

Η πρωτεϊνική κινάση C (PKC), αποτελεί ένα οικουμενικής διάδοσης ένζυμο, με πολυλειτουργικές δράσεις, εξαρτώμενο από το ιονισμένο ασβέστιο  $Ca^{2+}$  και τα φωσφολιπίδια, το οποίο φωσφορυλιώνει εκλεκτικά τα αμινοξέα θρεονίνη και σερίνη (όπως επίσης τα υπολείμματα αυτών επί μιας πρωτεϊνικής αλύσου). Το εν λόγω πολυλειτουργικό ένζυμο εμπλέκεται σε μια ευρεία γκάμα κυτταρικών δραστηριοτήτων, στις οποίες συμπεριλαμβάνονται η προαγωγή στην καρκινογένεση, η μιτογένεση, οι εκκριτικές διεργασίες, η λειτουργία των κυττάρων της φλεγμονής και η λειτουργία των λεμφοκυττάρων T, για να δώσουμε μια ιδέα της έκτασης των λειτουργιών στις οποίες η εν λόγω φωσφορική κινάση C παίζει έναν ρόλο (Nishizuka, 1986, 1988, 1995, [367, 368, 369]).

Η φωσφορική κινάση C (PKC) φαίνεται ότι αναστέλλεται *in vitro* από ορισμένα φλαβονοειδή (Graziani και συν, 1981. Gschwendt και συν.1983. End και συν.,1987. Hagiwara και συν. 1988. Ferriola και συν. 1989. Picq και συν., 1989, [370, 371, 372, 373, 374, 375, 376, 377, 378])

Ειδικότερα ο Graziani και οι συνεργάτες του (1983 [372]) απέδειξαν ότι η κουερσετίνη αναστέλλει την φωσφορυλιωτική δραστηριότητα της πρωτεΐνης που παράγεται από το γονίδιο το ευθυνόμενο για την καρκινική εξαλλαγή του ιού του σαρκώματος του Rous, τόσο *in vitro* και *in vivo*. Επιπροσθέτως η κουερσετίνη λειτουργεί ανταγωνιστικά για τα νουκλεοτιδικά υποστρώματα του ATP και GTP. Η πρωτεϊνική κινάση που ενεργοποιείται από τα μιτογόνα (Mitogen Activated Protein Kinase, or MAP) στα κύτταρα του επιδερμιοειδούς καρκινώματος αναστέλλεται ισχυρά από την κουερσετίνη στην συγκέντρωση των 30 mM.

Ο Ferriola και οι συνεργάτες του, το 1989 [377], χρησιμοποιώντας ένα μερικώς κεκαθαρισμένο παρασκεύασμα PKC από τον εγκέφαλο αρουραίου, διαπίστωσαν ότι η φισετίνη, η κουερσετίνη και η λουτεολίνη αποτελούν τους πλέον δραστικούς φλαβονοειδείς αναστολείς αυτού του ενζύμου.

Σε πειράματα στα οποία χρησιμοποιήθηκαν διαφορετικά πρωτεϊνικά υποστρώματα (ιστόνες και πρωταμίνη), όπως επίσης και διαφορετικοί ενεργοποιητές [διακυλγλυκερόλη (DAG) και οξεική τετραδεκανούλ – φορβόλη (TPA)], αποδείχτηκε ότι η φισετίνη και η λουτεολίνη ασκούν ανταγωνιστική παρεμπόδιση στο σημείο πρόσδεσης του ATP στο καταλυτικό κέντρο της PKC. Επίσης διάφορα άλλα φλαβονοειδή αναστέλλουν την

λειτουργία ενζύμων που χρησιμοποιούν ATP μέσω ανταγωνιστικής κατάληψης εκ μέρους του φλαβονοειδούς του ενεργού κέντρου στο οποίο προσδένεται το ATP. Μελέτες σχετικές με τα δομικά χαρακτηριστικά των φλαβονοειδών υποδεικνύουν ότι η προσθήκη μιας ομάδας υδροξυλίου στην θέση 3 καταργεί την ανασταλτική δραστηριότητα του φλαβονοειδούς (Alexandrakis και συν, 1999, [379]).

Η κινάση των ελαφρών αλυσίδων της μυοσίνης (MLCK) καταλύει την φωσφορυλίωση των ελαφρών αλύσεων της μυοσίνης, σε πολλούς τύπους κυττάρων. Το βήμα αυτό, όπως είδαμε και στο σχετικό κεφάλαιο το αναφερόμενο στην αιμοπεταλιακή ενεργοποίηση, είναι απαραίτητο για την ανάπτυξη μηχανικής τάσης στις λείες μυικές ίνες, όπως επίσης και για την κίνηση ή την μετανάστευση άλλων τύπων κυττάρων (π.χ λευκοκύτταρα). Είναι σημαντικό να υπογραμμιστεί ότι η καμφερόλη αποτελεί έναν δραστικό και σχετικά εξειδικευμένο αναστολέα ( $IC_{50}$  0,45 mM) για την κινάση των ελαφρών αλύσεων της μυοσίνης (Rogers and Williams, 1989, [380]).

Η καμφερόλη είναι ειδική για την MLCK κατά έναν παράγοντα 30 ή μεγαλύτερο, όταν συγκρίνεται με διαφορετικές άλλες κινάσες. Όπως και σε άλλα συστήματα με διαφορετικά φλαβονοειδή, η καμφερόλη δρά ανταγωνιστικά ως προς το ATP. Η MLCK των πτηνών επίσης αναστέλλεται από διαφορετικά φλαβονοειδή, εκ των οποίων εκείνα που ασκούν μέγιστη δράση φέρουν διπλό δεσμό μεταξύ των ανθράκων  $C_2-C_3$  καθώς και μεγάλο αριθμό ομάδων υδροξυλίου σε δύο από τους τρεις δακτυλίους τους (Jinsart et al., 1991, [381, 382]). Η μεθοξυλίωση ή γλυκοζυλίωση μειώνει ισχυρά ή καταργεί την δραστηριότητα των φλαβονοειδών ως αναστολέων της MLCK. Ένας μεγάλος αριθμός πρωτεϊνικών κινασών της τυροσίνης (PTK) έχει ήδη περιγραφεί. Οι πρωτεϊνικές αυτές κινάσες της τυροσίνης έχουν βρεθεί σε πολλούς και διαφορετικούς τύπους κυττάρων και εμπλέκονται λειτουργικά στην ρύθμιση της κυτταρικής εξαλλαγής και του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, στην έκφραση των γονιδίων, στην πρόσδεση κυττάρου προς κύτταρο, στην κυτταρική κινητικότητα και στην αλλαγή του σχήματος των κυττάρων (Huang, 1989. Taniguchi και συν., 1995. Qian και Weiss, 1997. [383, 384, 385, 386]). Η PTK αναστέλλεται από την γενιστεΐνη, όπως αναφέρουν ο Akiyama και οι συνεργάτες του 1987 [387]. Η κουερσετίνη επιπροσθέτως προς την αναστολή της δραστηριότητας της PTK και της PKC, είναι επίσης σε θέση να αναστείλλει την δραστηριότητα της πυρηνικής κινάσης – II, η οποία καταλύει την φωσφορυλίωση απομονωθέντων πυρηνικών πρωτεϊνών σε καρκινικά κύτταρα He La, χρησιμοποιώντας το GTP ως δωρητή φωσφορικών ριζών (Friedman και



συν., 1985 (388)]. Το αποτέλεσμα αυτό είναι ενδιαφέρον διότι μας δείχνει ότι η κουερσετίνη (και άλλα φλαβονοειδή) θα μπορούσε να αναστείλλει μια αντίδραση φωσφορυλίωσης εξαρτώμενη από το GTP και θέτει το ερώτημα του κατά πόσον τα φλαβονοειδή αυτά θα μπορούσαν να αναστείλλουν την φωσφορυλίωση των πυρηνικών πρωτεϊνών σε ανέπαφα κύτταρα επιδρώντας έτσι στην ρύθμιση πολλών πλευρών της κυτταρικής λειτουργίας μη εξαρτώμενων από το ATP. Μια άλλη μορφή ευαίσθητης στα φλαβονοειδή κινάσης αντιπροσωπεύεται από την φωσφορυλάση κινάση του μυός του κονίκλου. Ο Κυριακίδης και οι συνεργάτες του το 1986 [389] βρήκαν ότι η κουερσετίνη και η φισετίνη είναι αποτελεσματικοί αναστολείς της μη ενεργοποιημένης φωσφορυλάσης κινάσης, ενώ η φλαβανόνη εσπερετίνη διεγείρει το εν λόγω ένζυμο. Η κουερσετίνη δρά ως ένας ανταγωνιστικός αναστολέας του ATP για την κατάληψη του ενεργού κέντρου αυτού ενζύμου – στόχων και γίνεται ακόμη πιο αποτελεσματική ως αναστολέας του εν λόγω ενζύμου όταν διεγείρεται από αιθανόλη ή αλκαλικό pH. Ο Cochet και οι συνεργάτες του το 1982 [390] μελέτησαν την δράση της κουερσετίνης, όπως και διαφόρων άλλων φλαβονοειδών στην αναστολή της ανεξάρτητης από τα κυκλικά νουκλεοτίδια πρωτεϊνικής κινάσης (G τύπου καζεϊνικής κινάσης), όπως επίσης και άλλων δύο κινασών. Η τύπου G κινάση, η οποία χρησιμοποιεί GTP, όπως επίσης και ATP, αναστέλλεται εκλεκτικά από διάφορα φλαβονοειδή. Η μελέτη της κινητικής του ενζύμου έδειξε ότι η κουερσετίνη συμπεριφέρεται ως ένας ανταγωνιστικός αναστολέας ως προς το υπόστρωμα αυτού. Η φισετίνη, η χρυσίνη και η καμφερόλη είναι επίσης ενεργές και παρουσιάζουν ανασταλτική δράση. Η σημαντικότητα του προτύπου υδροξυλίωσης των δακτυλίων A και B, ο ακόρεστος δεσμός μεταξύ των ανθράκων C<sub>2</sub> – C<sub>3</sub>, η κετοομάδα στην θέση C<sub>4</sub>, αποδείχτηκε ξανά ότι επηρεάζουν την δραστηριότητα της αναστολής. Ο Srivastava το 1985 [391] έδειξε ότι η κουερσετίνη είναι ένας αποτελεσματικός αναστολέας της φωσφορυλάσης κινάσης, όπως επίσης και της πρωτεϊνικής τυροσινικής κινάσης. Το ATP παρεμποδίζει απολύτως την ανασταλτική δράση της κουερσετίνης επί της πρωτεϊνικής κινάσης της τυροσίνης, αλλά όχι και την ανασταλτική δράση αυτής επί της φωσφορυλάσης κινάσης. Τα δεδομένα υποδεικνύουν ότι η δράση της κουερσετίνης δεν περιορίζεται μόνο στον ανταγωνισμό για το κέντρο πρόσδεσης του ATP, στην πρωτεϊνική κινάση της τυροσίνης. Είναι προς το παρόν άγνωστη η οδός εισόδου των φλαβονοειδών στα κύτταρα, όπως επίσης και ο τρόπος με τον οποίο αντιδρούν στο εσωτερικό του μικροδιαμερίσματος στο οποίο εντοπίζονται οι κινάσες. Μια πιθανότητα είναι ότι τα φλαβονοειδή δεν έχουν δράση σε κινάσες κυττάρων ευρισκομένων εν ηρεμία αλλά δρουν

επάνω στο κέντρο πρόσδεσης του ATP μόνον όταν το ένζυμο-στόχος ενεργοποιείται και μετακινείται στο εσωτερικό του κυττάρου. Ο Kakeya και οι συνεργάτες του το 1993 [392] απομόνωσαν έναν μοναδικό αναστολέα της κινάσης της τυροσίνης, ανταγωνιστικό προς το υπόστρωμα, από το φυτό *Desmos chinensis*. Αυτοί ονόμασαν το εν λόγω παράγωγο «Desmal»(δεσμάλη) και προσδιόρισαν ότι η δομή του είναι 8-φορμύλ-29,5,7-τριυδροξυ-6-μεθύλφλαβανόνη. Η δεσμάλη έδειξε ανταγωνιστική αναστολή της φωσφορυλίωσης σε αναφορά προς τις ιστόνες και μη ανταγωνιστική αναστολή σε αναφορά ως προς το ATP, εν αντιθέσει με ό,τι συμβαίνει με διάφορους άλλους φλαβονοειδείς αναστολείς που προαναφέραμε. Η δεσμάλη επίσης αναστέλλει τον σχηματισμό φωσφορικής ινοσιτόλης τον επαγόμενο από τον EGF (Epidermal Growth Factor). Επιπλέον η δεσμάλη αναστέλλει την ενδοκυττάρια φωσφορυλίωση της τυροσίνης στον υποδοχέα του EGF, που υπερεκφράζεται σε κύτταρα της σειράς NIH 3T3 (ER12). Ο ανθρώπινος DNA -κυτταρομεγαλοϊός μπορεί να επάγει μια πρωτεϊνική κινάση της σερίνης και θρεονίνης με μοριακή μάζα 68 kDa σε ανθρώπινους διπλοειδείς ινοβλάστες των πνευμόνων. Η καταλυτική δραστηριότητα αυτής της p68-κινάσης μπορεί να ανασταλλεί από την κουερσετίνη, η οποία δρα ανταγωνιστικά αναφορικά ως προς το νουκλεοτιδικό υπόστρωμα (Michelson και συν, το 1985 [393]. Σε μελέτες της κυτταροτοξικότητας που προκαλούν τα φυσικά φονικά λεμφοκύτταρα (NK), ο Nishio και οι συνεργάτες του το 1994 [394]) βρήκαν ότι η γενιστεΐνη μειώνει την χημική συγγένεια της τυροσινικής κινάσης p56<sup>lck</sup> προς την β-αλυσίδα του υποδοχέα της ιντελευκίνης IL-2, που αποτελεί ένα κρίσιμης σημασίας στιγμιότυπο στα διεγερόμενα από την IL-2 γεγονότα μεταγωγής σήματος. Επιπροσθέτως η γενιστεΐνη ελαττώνει το ταχύ ρεύμα ιόντων Na<sup>+</sup> κατά τρόπο δοσοεξαρτώμενο, παρουσιάζοντας μια IC<sub>50</sub> των 9 mM σε λειομυοσαρκωματικά κύτταρα της ανθρώπινης μήτρας (Kusaka and Sperelakis 1996 [395]). Οι εν λόγω ερευνητές μελέτησαν επίσης την δράση της γενιστεΐνης και της νταϊντζεΐνης στην ρύμιση των τύπου-L διαύλων Ca<sup>2+</sup> επί λείων μυικών κυττάρων της μήτρας πρόσφατης απομόνωσης. Η γενιστεΐνη μειώνει το ρεύμα ιόντων Ca<sup>2+</sup> δια των διαύλων τύπου-L, που προκαλείται λόγω διαφοράς συγκέντρωσης, ενώ η νταϊντζεΐνη δεν έχει δράση (Kusaka and Sperelakis 1995, [396]). Η καταλυτική υπομονάδα της εξαρτώμενης από το κυκλικό AMP πρωτεϊνικής κινάσης του ήπατος αρουραίου αναστέλλεται από μια ποικιλία φλαβονοειδών (Jinsart και συν 1992, [382]). Ξανά και στην περίπτωση αυτή επανεμφανίζεται το ίδιο σύνολο αποτελεσματικών δομικών χαρακτηριστικών, ήτοι: ο διπλός δεσμός στους

άνθρακες C<sub>2</sub> – C<sub>3</sub>, και η πολυυδροξυλίωση δυο ή περισσότερων δακτυλίων του φλαβονοειδούς. Τα δομικά αυτά χαρακτηριστικά ευνοούν την ανάπτυξη ανασταλτικής δραστηριότητας, ενώ οι μεθοξυλιωμένες ή/και γλυκοξυλιωμένες φλαβονοειδείς ενώσεις είναι πολύ λιγότερο δραστικές.

Διάφορα φλαβονοειδή που είναι αδρανή απέναντι στην MLCK είναι από την άλλη πλευρά καλοί αναστολείς της καταλυτικής υπομονάδας της εξαρτώμενης από το κυκλικό AMP πρωτεϊνικής κινάσης. Πρόσφατα δεδομένα δείχνουν ότι τα φλαβονοειδή μπορούν να επάγουν την φωσφορυλίωση μιας πρωτεΐνης 78 kDa, η οποία έχειδειχθεί ότι είναι ομόλογη της μοεσίνης (Theoharides και συν 2000, [397]). Περαιτέρω ανάλυση έδειξε ότι αυτή η φωσφορυλίωση προκαλείται από ένα ισοένζυμο της PKC, το λεγόμενο ισοένζυμο «ζ», το οποίο είναι ανεξάρτητο από το Ca<sup>2+</sup> και τους εστέρες της φορβόλης (Wang και συν., 1999 [398]). Το ενδεχόμενο του να οφείλεται η αύξηση της ενσωμάτωσης των φωσφορικών ριζών σε αναστολή μιας φωσφατάσης δεν φαίνεται πιθανό, καθόσον δεν έχει προκύψει καμιά τέτοια ένδειξη. Προκαταρκτικά δεδομένα προερχόμενα από μελέτες του Θεοχαρίδη και των συνεργατών του υποδεικνύουν ότι τα φλαβονοειδή μειώνουν τα επίπεδα των ενδοκυττάρων ιόντων ασβεστίου, μειώνοντας έτσι την έκκριση και ενεργοποιώντας ένα ισοένζυμο της PKC ανεξάρτητο από το Ca<sup>2+</sup>. Ο συνδυασμός των εν λόγω δράσεων είναι ρυθμιστικός για την έκκριση.

## **2. Φωσφολιπάση A<sub>2</sub> και Φωσφολιπάση C**

Η Φωσφολιπάση A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) είναι ένα στρατηγικής σημασίας ένζυμο το οποίο υπεισέρχεται στις διαδικασίες ενεργοποίησης πάρα πολλών τύπων κυττάρων (αν όχι όλων) καταλύοντας την υδρόλυση των φωσφολιπιδίων τα οποία έχουν εστεροποιηθεί στον δεύτερο άνθρακα ενός μορίου γλυκερίνης. Ως γνωστόν, ο γλυκερινικός σκελετός είναι ο βασικός σκελετός των φωσφολιπιδίων. Συνήθως στον δεύτερο άνθρακα του γλυκερινικού σκελετού των φωσφολιπιδίων ευρίσκεται εστεροποιημένο το αραχιδονικό οξύ (εικοσιτετραενοϊκό οξύ), του οποίου ο μεταβολισμός έχει ένα τεράστιο ενδιαφέρον για την ενεργοποίηση όλων των ειδών κυττάρων, όπως επίσης και για την ρύθμιση όλων σχεδόν των λειτουργιών των οργάνων, αλλά και των συστημάτων. Η υδρολυτική δράση της φωσφολιπάσης A<sub>2</sub> στον αραχιδονικό εστέρα του δεύτερου άνθρακα της γλυκερίνης, απελευθερώνει μέσα στο κύτταρο αραχιδονικό οξύ, το οποίο, κατόπιν μεταβολίζεται στις οδούς της κυκλοξυγονάσης και λιποξυγονάσης, για τις οποίες μιλήσαμε εκτενώς στο κεφάλαιο το σχετικό με τα αιμοπετάλια. Συνεπώς η φωσφολιπάση A<sub>2</sub> καταλύει ένα πολύ

σημαντικό βήμα για την εξέλιξη τόσο των ενδοκυττάρων, όσο και των εξωκυττάρων φαινομένων της φλεγμονής (Pruzanski and Vadas, 1991, [399]). Έχει διαπιστωθεί ότι η κουερσετίνη αποτελεί έναν αποτελεσματικό αναστολέα της PLA<sub>2</sub> στα λευκοκύτταρα του ανθρώπου (Lee et al., 1982, [400]) και του κονίκλου (Lanni and Becker, 1985, [401]). Η κουερσεταζετίνη, το γαλακτοσίδιο της καμφερόλης (καμφερόλ-3-Ο-γαλακτοσίδιο) και η σκουτελαρεΐνη αναστέλλει την ανθρώπινη ανασυνδυασμένη PLA<sub>2</sub> με τιμές IC<sub>50</sub> κυμαινόμενες από 12,2 έως 17,6 mM (Gil et al., 1994, [402]). Τα δεδομένα αυτά υποδεικνύουν ότι τα φλαβονοειδή είναι σε θέση να ασκήσουν μια σημαντική δράση τροχοπέδης στον αραχιδονικό μεταβολισμό, αναστέλλοντας το ένζυμο που εξασφαλίζει την πρώτη του ύλη, δηλαδή το αραχιδονικό οξύ. Συνεπώς θα αναμέναμε ότι οι ουσίες αυτές είναι σε θέση να ασκήσουν αντιφλεγμονώδη δράση.

Η συλλογιστική αυτή θεωρητικά θα μπορούσε να ισχύσει επίσης για την πολύ σημαντική φωσφολιπάση C (PLC), η οποία αποτελεί το κύριο τροφοδοτικό ένζυμο του μεταβολισμού των φωσφοϊνοσιτιδίων, ο οποίος έχει μια σημαντική θέση στους μηχανισμούς ενεργοποίησης των κυττάρων, τουλάχιστον του ανοσοποιητικού συστήματος με ιδιαίτερη έμφαση την ενεργοποίηση των μαστοκυττάρων. Δυστυχώς δεν υπάρχουν άμεσες μετρήσεις σχετικές με την δράση των φλαβονοειδών επί της PLC. Ωστόσο, όπως θα δούμε αναλυτικότερα κατωτέρω, υπάρχει μια ένδειξη η οποία ενισχύει ισχυρά την υπόθεση ότι τα φλαβονοειδή θα μπορούσαν να επηρεάσουν την εν λόγω μεταβολική οδό. Η ένδειξη αυτή συνίσταται στο γεγονός ότι η ενεργοποίηση της PLC-g απαιτεί την φωσφορυλίωση του συγκεκριμένου ενζύμου μέσω της πρωτεϊνικής τυροσινικής κινάσης (PTK). Συνεπώς η αναστολή της PTK από φλαβονοειδείς ενώσεις, όπως η γενιστεΐνη, θα μπορούσε να εμποδίσει την ενεργοποίηση της PLC και να αναστείλλει τον σχηματισμό της τριφωσφορικής ινοσιτόλης (IP<sub>3</sub>) και της διακύλ-γλυκερόλης (DAG). Μια προκαταρκτική εργασία του Cockcroft το 1982 [403], δείχνει ότι η κουερσετίνη εμμέσως αναστέλλει την δραστηριότητα της PLC σε ενεργοποιημένα μαστοκύτταρα επίμυος, αλλά ο μηχανισμός, δια του οποίου, δρα δεν είναι εξακριβωμένος.

### **3. Λιποξυγονάσεις και Κυκλοξυγονάσεις**

Στα λεία μυϊκά κύτταρα το αραχιδονικό οξύ το οποίο απελευθερώνεται από τις φωσφολιπιδικές μεμβράνες αυτών (ή από άλλες πηγές) μεταβολίζεται μέσω της οδού της λιποξυγονάσης προς μια σειρά προϊόντων που προκαλούν συστολή των λείων μυϊκών ινών. Αν οι λείες μυϊκές ίνες ανήκουν στα αγγεία το φαινόμενο αυτό θα οδηγήσει σε

αγγειοσύσπαση, ενώ αν ανήκουν στους βρόγχους θα οδηγήσει σε βρογχόσπασμο. Τα ίδια ισχύουν για τις λείες μυκές ίνες του στομάχου, του εντέρου, της χοληδόχου κύστης, των χοληφόρων πόρων, της μήτρας και γενικότερα όλων των κοίλων οργάνων στα οποία ο λείος μυικός ιστός συμμετέχει καθοριστικά στην δόμηση του τοιχώματός τους. Ωστόσο τα φαινόμενα αυτά ισχύουν επίσης για τα λευκοκύτταρα, καθώς και για τα αιμοπετάλια, στα οποία η ενεργοποίηση της LOX προκαλεί μεταβολή του σχήματος, αντίδραση έκλυσης του περιεχομένου των κοκκίων, συστολή, εξαγωγή ψευδοποδίων και στοχοκινούμενη κίνηση (τακτισμός). Στα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος και στα αιμοπετάλια οι αντιδράσεις αυτές φαίνεται να διαμεσολαβούνται μέσω μεταβολών του κυτταροσκελετού τους, όπως ήδη έχουμε δει για την περίπτωση των αιμοπεταλίων. Μερικοί από τους μεταβολίτες της οδού της λιποξυγονάσης είναι τα λευκοτριένια, από τα οποία σημειώνουμε το  $LTB_4$  που παρουσιάζει ισχυρές χημειοτακτικές ιδιότητες (Lewis and Austen, 1984, [404]), καθώς και τα  $LTC_4$ ,  $LTD_4$ ,  $LTE_4$ , τα οποία εισάγουν συστολή των λείων μυικών ινών, αγγειοσύσπαση και βρογχόσπασμο. Τα μόρια αυτά εμπλέκονται στενά στην φλεγμονή, στο άσθμα, στην αλλεργία, καθώς και σε ένα μεγάλο τόξο φυσιολογικών και παθολογικών διαδικασιών. Ο Yamamoto και οι συνεργάτες του (1984, [405]) μελέτησαν την δράση διαφόρων βενζοκινονών και φλαβονοειδών ουσιών σε διάφορα ένζυμα της βιοσυνθετικής οδού των λευκοτριενίων. Π.χ η κισιλιόλη (39,49,5-τριϋδροξυ-6,7-διμεθοξυφλαβόνη) αποδείχτηκε ότι είναι ένας ισχυρός αναστολέας της 5-λιποξυγονάσης ( $IC_{50}$  0,1 mM) της προερχόμενης από βασεόφιλα λευχαιμικά κύτταρα επίμυος καθώς και από πολυμορφοπύρηνα περιτοναϊκά λευκοκύτταρα ινδικού χοιριδίου. Η μερικώς κεκαθαυμένη 5-λιποξυγονάση των βασεόφιλων λευχαιμικών κυττάρων του επίμυος αναστέλλονται ισχυρά από την κισιλιόλη (Furukawa et al., 1984, [406]). Ο Hoult και οι συνεργάτες του το 1984 [407] μελέτησαν την δράση των φλαβονοειδών επί της 5-λιποξυγονάσης και κυκλοξυγονάσης σε περιτοναϊκά λευκοκύτταρα επίμυος καθώς και σε ανθρώπινα πολυμορφοπύρηνα λευκοκύτταρα τα οποία διεγείροντο από την μη φυσιολογικώς απαντώσα ιονοφόρο του ασβεστίου A23187. Η 5-λιποξυγονάση παρουσίαζε μια καλύτερη αναστολή από τις ενώσεις τις φέρουσες πολλά υδροξύλια. Οι συγγραφείς θεωρούν ότι η αναστολή της 5-LOX αλλά όχι της COX οφειλόταν σε έναν συνδυασμό των αναγωγικών και χυλικών ιδιοτήτων των ιόντων του σιδήρου και δεν εξαρτώταν από την εκκαθάριση των υπεροξυλικών λιπιδικών ελευθέρων ριζών. Ο Laughton και οι συνεργάτες του το 1991 [408] έδειξαν επίσης ότι απαιτείται ένας συνδυασμός χυλικών ιδιοτήτων του σιδήρου και αναγωγικών ιδιοτήτων των ιόντων αυτού

για να προκύψει μια επιλεκτική αναστολή της 5-LOX των περιτοναϊκών λευκοκυττάρων από φαινολικά παράγωγα. Συνεπώς, σύμφωνα με τους ερευνητές που συνέγραψαν τα εν λόγω άρθρα, οι παράγοντες οι οποίοι καθορίζουν από την πλευρά του ενζύμου 5-λιποξυγονάση την δυνατότητα αναστολής της λειτουργίας του σχετίζονται με δύο διαφορετικές κατηγορίες χαρακτηριστικών του σιδήρου που συμμετέχει στο ενεργό κέντρο του ενζύμου:

1<sup>ov</sup>) Με τα δομικά χαρακτηριστικά του συμπλόκου στο οποίο εντάσσεται ο σίδηρος στο ενεργό κέντρο του ενζύμου.

2<sup>ov</sup>) Με την δυνατότητα αναγωγής του εν λόγω σιδήρου.

Μεταπηδώντας από την 5-λιποξυγονάση των λευκοκυττάρων στην 12-λιποξυγονάση, η οποία αποτελεί ένα δεύτερο ισοένζυμο της λιποξυγονάσης, έγινε η διαπίστωση ότι η κισιλιόλη παρουσιάζει δέκα φορές μικρότερη ανασταλτική δράση για το εν λόγω ισοένζυμο, εν συγκρίσει με την ανασταλτική δράση που εμφανίζει για την 5-λιποξυγονάση. Επίσης η κισιλιόλη εμφανίζει αμελητέα ανασταλτική δράση στην δραστηριότητα της κυκλοξυγονάσης του προστατικού αδένου του βοδιού. Η μερικώς κεκαθαυμένη λιποξυγονάση επιδερμικών κυττάρων ποντικού αναστέλλεται ισχυρά από φλαβονοειδή παράγωγα τα οποία είναι φορείς καταλλήλων σχημάτων υδροξυλίωσης, ενώ η φλαβόνη αυτή καθαυτή δεν έχει δράση (Wheeler and Berry, 1986 [409]). Αναφέρεται ότι η μπαϊκαλεΐνη αναστέλλει εκλεκτικά την αιμοπεταλιακή 5-λιποξυγονάση (Sekiya and Okuda, 1982, [410]). Η Αρτονίνη Ε (59-υδροξυμορουσίνη) αποτελεί έναν ισχυρό και εντελώς εκλεκτικό αναστολέα της λευκοκυτταρικής 5-λιποξυγονάσης του χοίρου (Reddy et al., 1991, [411]). Η υπολαετίνη (hypolaetin), η οποία αποτελεί ένα κατεχολικό φλαβονοειδές, είναι ένας καλός αναστολέας της 5-λιποξυγονάσης διεγερμένων περιτοναϊκών λευκοκυττάρων του επίμου, μονονότι είναι αδρανής ως αναστολέας της κυκλοξυγονάσης, ενώ το γλυκοσίδιο της είναι αδρανές και για την λιποξυγονάση (Moroney et al., 1988, [412]).

Είναι πολύ ενδιαφέρον το γεγονός ότι οι εν λόγω ερευνητές (Moroney et al., 1988, [412]), διαπίστωσαν ότι τα φλαβονοειδή τα οποία φέρουν λίγα υδροξύλια ασκούν ισχυρότερη αναστολή στην κυκλοξυγονάση και μικρότερη στην λιποξυγονάση. Σημείωσαν μάλιστα την έλλειψη του σχήματος υδροξυλίωσης 39,49-διυδροξυ- στον δακτύλιο Β.

Αντιθέτως ο Kalkbrenner και οι συνεργάτες του (1992, [413]) ανακάλυψαν ότι τα φλαβάνια με μη επίπεδα μόρια ήταν πολύ ισχυρότεροι αναστολείς για την λιποξυγονάση των σπερματοδόχων κύστεων του επίμου, σε σύγκριση με τις επίπεδες φλαβόνες και

φλαβονόλες. Οι φλαβονόλες δεν προκαλούσαν αναστολή εκτός από την σιλιβινίνη, μια φλαβανο-3-όλη. Η κινητική της αναστολής μεταβάλλεται με την ταξινόμηση του φλαβονοειδούς. Από την άλλη πλευρά, ο Swies και οι συνεργάτες του (1984, [414]) βρήκαν ότι η κυκλοξυγονάση των σπερματοδόχων κύστεων του προβάτου διεγείροταν τόσο από την κουερσετίνη όσο και από άλλα φλαβονοειδή σε υψηλές συγκεντρώσεις αραχιδονικού οξέος ως υποστρώματος, ενώ σε χαμηλές συγκεντρώσεις υποστρώματος η δράση της κουερσετίνης ήταν ανασταλτική. Δηλαδή η δράση της κουερσετίνης ήταν παράδοξη σε συσχέτιση πάντοτε με την συγκέντρωση του υποστρώματος. Ο Baumann και οι συνεργάτες του (1980a, [415]) μελέτησαν επίσης την δράση διαφόρων φλαβονοειδών επί της υπεροξειδωσής του αραχιδονικού οξέος. Η λουτεολίνη (39,49-διυδροξυφλαβόνη), η μορίνη, η γαλανγίνη και η (1)-κατεχίνη λειτουργούν ως μετρίως δραστηριοί αναστολείς της κυκλοξυγονάσης του μυελού των νεφρών. Ο Landolfi και οι συνεργάτες του (1984, [416]) βρήκαν ότι η φλαβόνη, η χρυσίνη, η απιγενίνη και η φλορετίνη καταστέλλουν την δραστηριότητα της κυκλοξυγονάσης και αναστέλλουν την αιμοπεταλιακή συσσώρευση. Σε προκαταρκτικά πειράματα οι Fiebrich και Koch (1979, [417]) βρήκαν ότι τρεις φαρμακολογικώς δραστηριότητες της σιλυμαρίνης και συγκεκριμένα η σιλυβίνη, η σιλυδιανίνη και η σιλυκριστίνη, αναστέλλουν την κυκλοξυγονάση. Ο Ferrandiz και οι συνεργάτες του (1990, [418]) μελέτησαν μερικά ασυνήθη φλαβονοειδή για τις δράσεις τους επί του μεταβολισμού του αραχιδονικού οξέος μέσω της οδού της λιποξυγονάσης (5-HEETE και LTB<sub>4</sub>) και της οδού της κυκλοξυγονάσης (TXB<sub>2</sub>, PGE<sub>2</sub>, 6-keto-PGF<sub>1a</sub>) σε περιτοναϊκά μακροφάγα λευκοκύτταρα του επίμυος. Οι μελετητές αυτοί διαπίστωσαν ότι τα εν λόγω φλαβονοειδή ανέστειλαν και τις δύο ενζυμικές οδούς επιδεικνύοντας μια IC<sub>50</sub> μικρότερη των 10 mM για την σιδηρητοφλαβόνη, την οροξινιδίνη, την 7-γλυκοσιδιοκουερσεταζετίνη, και την ταμπουλερίνη. Επίσης οχτώ φυσικώς απαντώσες ισοπρενυλικές φλαβόνες μελετήθηκαν ως προς τις δράσεις τους επί κεκαθαρισμένων παρασκευασμάτων 5-λιποξυγονάσης προερχομένων από λευκοκύτταρα χοίρου. Η Αρτονίνη E (59-υδροξυμορουσίνη) υπήρξε ο ισχυρότερος αναστολέας με IC<sub>50</sub> ίση προς 0,36 mM. Ο Butenko και οι συνεργάτες του (1993, [419]) απέδειξαν ότι η μπαϊκαλεΐνη αποτελεί έναν αναστολέα της παραγωγής LTC<sub>4</sub> μέσω της αναστολής της οδού της λιποξυγονάσης. Η προκύπτουσα αντιφλεγμονώδης δράση είναι μεγαλύτερη όταν εφαρμόζεται στο μοντέλο πειραματικής επιβοηθούμενης αρθρίτιδος του επίμυος, παρά στο μοντέλο φλεγμονής με οίδημα της ουράς του επίμυος μέσω εφαρμογής καραγενάνης. Ο Rao και οι συνεργάτες του (1985, [420]) βρήκαν διαφορετικές δράσεις των αναστολέων επί λιποξυγονασών με

διαφορετικό ενδοκυττάριο εντοπισμό (δηλαδή μεμβρανική λιποξυγονάση και λιποξυγονάση του κυτταροπλάσματος). Η κουερσετίνη αποτελεί έναν δραστικό αναστολέα της 12-λιποξυγονάσης στα ανθρώπινα αιμοποετάλια. Η ανασταλτική δραστηριότητα μερικών παραγώγων της χαλκόνης στην 12-λιποξυγονάση και κυκλοξυγονάση της επιδερμίδος του ποντικού μελετήθηκε ειδικά από τον Nakadate και τους συνεργάτες του (1985b, [421]). Οι δράσεις των παραγώγων της χαλκόνης επί της 12-λιποξυγονάσης είναι πολύ μεγαλύτερη από τις αντίστοιχες δράσεις αυτών επί της κυκλοξυγονάσης. Η ανασταλτική δραστηριότητα σχετίζεται με το αν η χαλκόνη διαθέτει στο μόριό της ένα κινναμοϋλικό ή 4-υδροξυκινναμοϋλικό υπόλειμμα. Η δημιουργία κακοήθους όγκου και η επαγωγή της αποκαρβοξυλάσης της ορνιθίνης μέσω TPA (12-τετραδεκαονυλικής-13-οξεικής φορβόλης) αναστέλλεται επίσης ισχυρά από μερικούς αναστολείς της λιποξυγονάσης (Aizu και συν. 1986, [422]).

#### **4. Γλουταθειόνη S-Τρανσφεράση**

Τα ισένζυμα της S-τρανσφεράσης της γλουταθειόνης (S-μεταφοράσης της γλουταθειόνης) ή συντομογραφικά GST, είναι σημαντικά ένζυμα τα οποία συμμετέχουν σε διαδικασίες αποτοξίνωσης μέσω της κατάλυσης του σχηματισμού συμπλεγμάτων αποτελούμενων από ξενοβιοτικές ουσίες και γλουταθειόνη (GSH). Τα ανιονικά και ιονικά ισένζυμα της GST αναστέλλονται διαφορετικά σε ποικίλους βαθμούς από την κουερσετίνη *in vitro* (Das and Ratty, 1986, [423]). Ωστόσο η *in vivo* χορήγηση, επάγει αυτή την δραστηριότητα (Trela and Carlson, 1987). Η GST του ήπατος του επίμυος αναστέλλεται αποτελεσματικά *in vitro* από διαφορετικά άλλα φλαβονοειδή. Η εν λόγω δραστηριότητα μπορεί ξανά να σχετίζεται στενά με το σχήμα της υδροξυλίωσης και την παρουσία ενός διπλού δεσμού στους άνθρακες C<sub>2</sub> – C<sub>3</sub> (Merlos και συν., 1991, [424]).

#### **5. Υδρολάση Εποξειδίων**

Η υδρολάση των εποξειδίων καταλύει την προσθήκη ατόμων υδρογόνου σε οξειδία του αρενίου (τα οποία δημιουργούνται από τα ένζυμα του κυτόχρωμου P-450) για να δώσει διυδροδιόλες, οι οποίες με την σειρά τους μπορούν να μετατραπούν σε διολ-εποξειδία μέσω των πολυλειτουργικών οξειδασών (MFOs) των εξαρτωμένων από το κυτόχρωμο P-450. Τα διόλ-εποξειδία που δημιουργούνται από πολυκυκλικούς αρωματικούς υδρογονάνθρακες (PAHs), όπως π.χ το βενζο[α]πυρένιο, μπορεί να λειτουργήσουν ως τελικά καρκινογόνα (Dipple και συν., 1984,[425]). Η φλαβόνη και η 7,8-βενζοφλαβόνη



διεγείρουν αμφοτέρως την δραστηριότητα της υδράσης των εποξειδίων και η φλαβονή χορηγούμενη ως τροφή σε επίμυες αυξάνει την δραστηριότητα του ενζύμου αυτού στα ηπατικά μικροσώματα (Alworth και συν., 1980, [426]).

#### **6. Συστήματα κυτοχρώμου P450.**

Οι μελέτες πάνω στην δράση των φλαβονοειδών στα ένζυμα του κυτοχρώμου P-450 αναλύονται και σε άλλα σημεία του κειμένου. Μια πρόσφατη μελέτη επικεντρώθηκε στις σχέσεις που υφίστανται μεταξύ των ηλεκτροχημικών ιδιοτήτων των φλαβονοειδών και στην επίδρασή τους επί της υδροξυλάσης των φαινολών στα ηπατικά μικροσώματα του αρουραίου. Η δράση των φλαβονοειδών επί της P450 εξαρτώμενης δραστηριότητας της υδροξυλάσης των φαινολών, διαπιστώθηκε ότι συσχετίζεται καλά με το οξειδωτικό δυναμικό για τα αγλυκονικά φλαβονοειδή (Hendrickson et al., 1994, [427]). Τα ευκόλως οξειδούμενα φλαβονοειδή αναστέλλουν την μικροσωματική υδροξυλάση των φαινολών με δόσοεξαρτώμενο τρόπο, ενώ ο βαθμός της αναστολής συσχετίζεται καλά με την ευκολία της οξείδωσης. Αντιθέτως, τα φλαβονοειδή που παρουσιάζουν υψηλά οξειδωτικά δυναμικά, διεγείρουν την υδροξυλασική δραστηριότητα κατά ένα τρόπο ανεξάρτητο από την δόσολογία. Δεν διαπιστώθηκε συσχέτιση μεταξύ ηλεκτροχημικών ιδιοτήτων και δράσεων επί της δραστηριότητας της μικροσωματικής υδροξυλάσης.

#### **7. Συνθετάση του Νιτροξειδίου**

Το μονοξείδιο του αζώτου (NO<sup>•</sup>) έχει αναγνωριστεί ως ένας ιδιαίτερος διεισδυτικός χημικός μεσολαβητής ο οποίος υπεισέρχεται σε μια μεγάλη γκάμα λειτουργικών διεργασιών και φυσιολογικών δραστηριοτήτων, όπως π.χ. η χαλάρωση των λείων μυϊκών ινών και εν γένει των λείων μυών, η λύση των νεοπλασματικών κυττάρων, η καταστροφή των μικροοργανισμών, για να αναφέρουμε λίγες από αυτές (Lowenstein and Snyder 1992 [428], Nathan 1992 [429], Moncada and Higgs 1993, [430]). Η σύνθεσή του από την αργινίνη καταλύεται από ένα επαγόμενο ένζυμο, την συνθετάση του οξειδίου του αζώτου ή νιτροξείδιο συνθετάση. Σημειωτέον ότι το μονοξείδιο του αζώτου είναι μια ελεύθερη ρίζα και συνεπώς ένα μόριο εξαιρετικά ενεργό από την καθαρώς χημική πλευρά. Έχει πολύ μεγάλο ενδιαφέρον η παρατήρηση ότι η γενιστεΐνη, όπως επίσης η ερμιπιμυκίνη και η τυρφοστίνη, που είναι, όπως και αυτή φλαβονοειδείς αναστολείς της PTK, αναστέλλουν την παραγωγή του NO<sup>•</sup> καθώς και την επαγωγή της συνθετάσης του μονοξειδίου του αζώτου σε μακροφάγα ζώων, όπως αναφέρει ο Dong και οι συνεργάτες του το 1993, [431].

Η επαγωγή των συνθετασών του μονοξειδίου του αζώτου, που εξαρτάται 1<sup>ov</sup>) από την LPS, και 2<sup>ov</sup>) από τις κυτταροκίνες, παρεμποδίζεται από την γενιστεΐνη σε γλοιωματικά κύτταρα C<sub>6</sub> [Feinstein και συν. 1994, 432]. Διαφορετικές πολυφαινόλες διατροφικής προέλευσης δείχνουν ότι μειώνουν την παραγωγή του NO<sup>o</sup> σε καλλιέργειες αστροκυττάρων. Τα ενεργά φλαβονοειδή στην περίπτωση αυτή συμπεριλαμβάνουν την κουερσετίνη, την γαλλική επιγαλλοκατεχίνη, την μορίνη, την απιγενίνη, την ταξιφολίνη, την φισετίνη και την κατεχίνη [Soliman and Mazzio 1998 [433]. Οι Chiesi και Schwaller το 1995, [434]) βρήκαν ότι η ταννίνη και η κουερσετίνη αναστέλλουν την δραστηριότητα της συνετάσης του νιτροξειδίου σε τρεις ισοενζυμικές μορφές του εν λόγω ενζύμου.

Είναι σκληρό να θεωρητικοποιεί κανείς πάνω στην ευρεία ικανότητα των φλαβονοειδών να αναστέλλουν την δραστηριότητα τόσων πολλών διαφορετικών τύπων ενζύμων. Ωστόσο, στις περιπτώσεις αυτές απαιτείται η ύπαρξη διπλού δεσμού στους άνθρακες C<sub>2</sub>-C<sub>3</sub>, όπως επίσης και η υδροξυλίωση του δακτυλίου B προς την κατεύθυνση κάποιας στερεοειδικής αλληλεπίδρασης, ειδικά σε ό,τι αφορά τις ανταγωνιστικές αλληλεπιδράσεις με το σημείο πρόσδεσης του ATP στις κινάσες. Όμως δεν είναι πιθανό ότι ο ίδιος τρισδιάστατος προσανατολισμός θα μπορούσε να απαιτείται για ένζυμα τα οποία παρουσιάζουν τόσο ευρείες διαφορές. Μια εναλλακτική δυνατότητα αντιπροσωπεύεται από το ότι τα φλαβονοειδή ενσωματώνονται στις ενζυμικές πρωτεΐνες καθιστώντας απροσπέλαστο το ενεργό τους κέντρο. Για παράδειγμα περίπου το 98% της κουερσετίνης στο ανθρώπινο πλάσμα ευρίσκεται ενσωματωμένο σε πρωτεΐνες (Gugler και συν. 1975 [435]). Σε μια εργασία του 1998 ο Manach [436] και οι συνεργάτες του αναφέρουν την ύπαρξη ενός σταθερού συμπλόκου φλαβονοειδών – πρωτεΐνης. Το δεδομένο αυτό είναι πολύ σημαντικό διότι θα μπορούσε να υπονοεί ότι τα φλαβονοειδή, εφ' όσον σχηματίζουν σταθερά σύμπλοκα με τις πρωτεΐνες, θα μπορούσαν να έχουν έναν πολύ σημαντικό ρυθμιστικό ρόλο για την λειτουργία των εν λόγω μακρομορίων. Πρέπει οπωσδήποτε να υπογραμμισθεί ότι τόσο τα φυτοφάγα όσο και τα παμφάγα ζώα εισάγουν, με την διατροφή τους στο σώμα τους, πολύ μεγάλες ποσότητες φλαβονοειδών, τα οποία είναι συνεπώς πάντοτε παρόντα στις πρωτεΐνες του αιματικού πλάσματος αλλά και των ιστών του σώματος. Η διαρκής αυτή παρουσία είναι αδύνατον να μην λειτουργεί τροποποιητικά για πολλές σωματικές λειτουργίες, όπως θα δούμε και παρακάτω, κατά την περαιτέρω ανάπτυξη της ανάλυσής μας. Αν θεωρήσει κανείς ότι τόσο η αραχιδονική οδός, όσο και η νιτροξείδιο συνθετάση, κατ'ουσίαν παράγουν μοριακούς διαβιβαστές, δηλαδή μνηματοδοτικά μόρια, για την ρύθμιση κρίσιμων λειτουργιών, αντιλαμβάνεται κανείς το

πόσο ισχυρή είναι η παρέμβαση των φλαβονοειδών μορίων στην λεπτή ρύθμιση ιδιαίτερος κρίσιμων λειτουργικών οδών για την ζωή. Επίσης αν κανείς θεωρήσει την δράση των φλαβονοειδών στις πολλές και ποικίλες κινάσες, οι οποίες επίσης ενεργοποιούν σχεδόν την ολότητα των κυτταρικών ρυθμίσεων, αντιλαμβάνεται το πόσο ο ρόλος των φλαβονοειδών αναβαθμίζεται και εντάσσεται πλέον στην ρύθμιση πολύ σημαντικών ομοιοστατικών αναδραστικών κυκλωμάτων εξαιρετικής σημασίας για την ζωή των οργανισμών και τις ανταποκρίσεις τους. Στα ζητήματα αυτά όμως θα επανέλθουμε λίγο παρακάτω, με περισσότερα πειραματικά δεδομένα.

#### **8. Μονοάμινο-Οξειδάση (περιέχουσα FAD)**

Οι φλαβόνες, οι κουμαρίνες (νεοφλαβονοειδή) καθώς και άλλες φυσικές ουσίες περιέχουσες οξυγόνο, διαπιστώθηκε ότι αναστέλλουν τις Μονοάμινο-οξειδάσες Α και Β, οι οποίες αποτελούν το κατ' εξοχήν καταβολικό ένζυμο για τις βιογενείς αμίνες. Η αναστολή την οποία προκαλούν τα φλαβονοειδή είναι αντιστρέψιμη και ανεξάρτητη από τον χρόνο (Thull and Testa, 1994, [437]). Οι τελευταίες αυτές αποτελούν πολύ σημαντικούς νευροδιαβιβαστές για όλη την συμπεριφορά των σχέσεων στον άνθρωπο και στο ζώο. Πρέπει να υπογραμμιστεί ότι η φαρμακολογική προσέγγιση της κατάθλιψης αλλά και της σχιζοφρένειας σχετίζεται με την παρεμπόδιση της επαναπρόσληψης της σεροτονίνης (reuptake) στην πρώτη και με διαταραχές της διάθεσης της ντοπαμίνης στην δεύτερη. Τα πρώτα σημαντικά αντικαταθλιπτικά φάρμακα ήσαν αναστολείς της μονοαμινοοξειδάσης. Συνεπώς τα φλαβονοειδή είναι σε θέση να επηρεάσουν σημαντικά την συμπεριφορά των ανωτέρων ζώων και του ανθρώπου, στο βαθμό που είναι σε θέση να λειτουργήσουν ως αναστολείς της MAO. Ίσως η ευφορητική δράση του κρασιού να μην σχετίζεται μόνον με την καταστολή που παράγει η αιθυλική αλκοόλη, αλλά και η αναστολή που επιφέρουν στην MAO τα φλαβονοειδή που εμπεριέχονται στα σταφύλια. Είναι πολύ σημαντικό να υπογραμμιστεί ότι η ικανότητα μερικών αντιοξειδωτικών, όπως το ασκορβικό οξύ (το οποίο δεν είναι φλαβονοειδές), χορηγούμενα σε μεγάλες ημερήσιες δόσεις, είναι σε θέση να αναστείλλουν το στερητικό σύνδρομο σε εξαρτημένα από την ηρωΐνη άτομα. Ενδεχομένως κάποια φλαβονοειδή να έχουν μια σημαντική θέση στην αντιμετώπιση αυτού του μεγάλου προβλήματος.

### **9. Κατεχολ-Ο-μεθύλ-τρανσφεράση**

Προκαταρκτικές μελέτες έδειξαν ότι μερικά φλαβονοειδή έχουν μια δράση αναπληρωματική της επινεφρίνης (Clark and Geissman, 1949, [438]), φαινόμενο το οποίο θα μπορούσε να αποδοθεί σε αναστολή του βασικού καταβολικού ενζύμου των κατεχολαμινών, το οποίο είναι η κατεχολ-Ο-μεθύλ-τρανσφεράση (COMT) (Gugler and Dengler, 1973, [439], Borchardt and Hubert, 1975, [440]). Τρεις ισοφλαβονοειδείς αναστολείς της COMT απομονώθηκαν από το διήθημα μιας καλλιέργειας (Chimura και συν. 1975, [441]).

### **10. Οξειδάση της Ξανθίνης**

Η οξειδάση της ξανθίνης καταλύει την δημιουργία ουρικού οξέος και ανιόντος υπεροξειδίου του οξυγόνου από την ξανθίνη. Ο Bindoli και οι συνεργάτες του το 1985, [442] σε προκαταρκτικά πειράματα απέδειξαν την ανασταλτική δράση της κουερσετίνης τόσο επί της οξειδάσης της ξανθίνης, όσο και επί της αφυδρογονάσης της ξανθίνης. Ο Hayashi και οι συνεργάτες του το 1988 [443] έδειξαν επίσης ότι και άλλα φλαβονοειδή είναι αποτελεσματικοί αναστολείς της οξειδάσης της ξανθίνης του αγελαδινού γάλακτος. Η κουερσετίνη και διαφορετικά άλλα φλαβονοειδή είναι μη ισχυροί αναστολείς (100 mM) του ενζύμου. Η ανασταλτική δραστηριότητα τους δεν συσχετίζεται σημαντικά με την επαγόμενη από το φλαβονοειδές αναγωγή του κυτοχρώμου c (Iio et al 1986, [444]). Ο Chang και οι συνεργάτες του (1993 [445]) βρήκαν επίσης ότι η μπαϊκαλείνη και η κουερσετίνη είναι ισχυροί αναστολείς της οξειδάσης της ξανθίνης. Αυτοί οι συγγραφείς επίσης σημειώνουν ότι τα επίπεδα της οξειδάσης της ξανθίνης στον ορό του αίματος αυξάνονται σε ασθενείς με ηπατίτιδα και όγκους του εγκεφάλου. Οι εν λόγω συγγραφείς υποδεικνύουν ότι επιλεγμένα φλαβονοειδή θα μπορούσαν να είναι χρήσιμα στην θεραπευτική των συγκεκριμένων αυτών παθολογιών. Είναι επίσης πολύ σημαντικό να αναφερθεί ότι, σύμφωνα με τον Haliwell και άλλους [446, 447, 448], η οξειδάση της ξανθίνης συμμετέχει στο οξειδωτικό stress που προκύπτει από το σύνδρομο ισχαιμίας – επαναιμάτωσης και το οποίο είναι συχνά πολύ επικίνδυνο για την ακεραιότητα του πληγόμενου ιστού. Καθώς η ισχαιμία προκαλεί, μέσω της έλλειψης του οξυγόνου, την αναστολή της φωσφορυλλίωσης του ADP και του AMP στα μιτοχόνδρια, ταχέως τα νουκλεοτίδια αυτά διασπώνται προς αδενοσίνη η οποία κατόπιν μετατρέπεται σε ξανθίνη και υποξανθίνη. Στο σημείο αυτό επεμβαίνει η οξειδάση της ξανθίνης η οποία μετατρέπει την υποξανθίνη και την ξανθίνη σε ουρικό οξύ, παράγοντας ως παράπλευρα προϊόντα

αυτής της μετατροπής, ελεύθερες ρίζες ανιόντος υπεροξειδίου του οξυγόνου. Η διαδικασία αυτή ισχυροποιείται πολύ περισσότερο όχι κατά την διάρκεια της ισχαιμίας, όπου το ένα από τα υποστρώματα της αντίδρασης, δηλαδή το  $O_2$ , ευρίσκεται σε πολύ μικρή συγκέντρωση, αλλά κατά την διάρκεια της επανοξυγόνωσης του ισχαιμούντος ιστού, όπου η συγκέντρωση του οξυγόνου μεγιστοποιείται. Αυτό έχει ως συνέπεια και την συνακόλουθη αύξηση της παραγωγής ελευθέρων ριζών ανιόντος οξυγόνου κατά την μετατροπή της ξανθίνης και υποξανθίνης σε ουρικό οξύ, μέχρις ότου εξαντληθούν τα συσσωρευμένα υποστρώματα των δύο αυτών ουσιών που προέκυψαν από τον καταβολισμό των νουκλεοτιδίων της αδενίνης. Οι ελεύθερες ρίζες που παράγονται είναι σε θέση να προκαλέσουν σωρεία βλαβών, κάθε είδους και σε όλα τα κυτταρικά μικροδιαμερίσματα και οργανίδια, με πρώτο και κύριο τις μεμβράνες του κυττάρου. Τα μεμβρανικά φωσφολιπίδια είναι το πλέον ευάλλωτο υλικό για την διαδικασία της υπεροξειδωσίας, οπότε οι μεμβράνες είναι η ευπαθέστερη κυτταρική δομή, η οποία πλήγεται πρώτη από τις ελεύθερες ρίζες και καταστρέφεται πρώτη. Αν η υπεροξειδωτική φθορά της εξωτερικής μεμβράνης υπερβεί μια ορισμένη τιμή, τότε η φωσφολιπιδική διπλοστοιβάδα σχίζεται και η μεμβράνη διαρρηγνύεται σε πολλά σημεία, οπότε ο θάνατος του κυττάρου επέρχεται με μεγάλη ταχύτητα. Αν οι μοριακές βλάβες είναι μικρότερου μεγέθους τότε η μεμβράνη δυσλειτουργεί ως προς την μεταφορά ιόντων, την κατακράτηση υλικών, την ανώμαλη είσοδο μεταβολιτών και βεβαίως την δημιουργία ενός σταθερού και ισχυρού διαμεμβρανικού δυναμικού. Ειδικά στο μυοκάρδιο, η κατάσταση αυτή ισοδυναμεί με ηλεκτρική αστάθεια, οπότε η φάση της επαναιμάτωσης ενός ισχαιμικού μυοκαρδίου μπορεί να το καταστήσει ευάλλωτο σε πολλά αρρυθμολογικά φαινόμενα, ή και σε ανακοπή. Στο μυοκάρδιο επίσης, η αδυναμία των μεμβρανών να λειτουργήσουν καλά, να σχηματίσουν υψηλά δυναμικά, να ιονοφορήσουν το ασβέστιο, να σχηματίσουν στα μιτοχόνδρια υψηλή κλίση ιόντων υδρογόνου, έχει ως αποτέλεσμα η συστολή των μυικών του ινών να είναι υποτονική και εν γένει ασθενής, επί ένα σημαντικό χρονικό διάστημα μετά την ισχαιμική προσβολή και την επαναιμάτωση. Αν ο οργανισμός διαθέτει μια υψηλή ποσότητα εκκαθαριστών ελευθέρων ριζών για να αντιμετωπίσει το οξειδωτικό stress της επαναιμάτωσης, τότε όλα αυτά τα φαινόμενα μπορούν να αποφευχθούν. Το ίδιο ισχύει και με την αναστολή της οξειδάσης της ξανθίνης που αποτελεί έναν από τους βασικότερους μηχανισμούς παραγωγής ελευθέρων ριζών κατά την φάση της επαναιμάτωσης μετά από ισχαιμία. Συνεπώς τα φλαβονοειδή που είναι ικανά να αναστείλλουν την λειτουργία του ενζύμου αυτού αλλά, ως αντιοξειδωτικά, είναι και από μόνα τους εκκαθαριστές ελευθέρων

ρίζων, θα μπορούσαν να αποτελέσουν ιδανικούς φαρμακολογικούς παράγοντες για την πρόληψη του οξειδωτικού stress στην ισχαιμία και την επαναιμάτωση.

### **11. Υαλουρονιδάση**

Οι υαλουρονιδάσες αποπολυμερίζουν το υαλουρονικό οξύ προς ολιγοσακχαρίτες μέσω θραύσης των γλυκοζαμινικών δεσμών και εξ αιτίας της δράσης τους αυτής φαίνεται ότι παίζουν κάποιο ρόλο στην δημιουργία βλαβών στους χόνδρους των αρθρώσεων και συνεπώς στην εξέλιξη της οστεοαρθρίτιδας. Επίσης τα ίδια ένζυμα φαίνεται ότι συμμετέχουν στην διηθητική διαδικασία των καρκινικών κυττάρων, όπως φαίνεται και από την υιοθέτηση του όρου «παράγοντες εξάπλωσης» (spreading factor) για την απόδοση αυτού του σημαντικού παθοφυσιολογικού ρόλου. Ο Rodney και οι συνεργάτες του, το 1950 [449] περιέγραψαν μια ανασταλτική δράση επί των υαλουρονιδασών, η οποία προερχόταν από μια σειρά φλαβονοειδών μορίων. Αν και η μελέτη αυτή είναι πολύ παρωχημένη, εν τούτοις σαράντα χρόνια μετά ο Kurppusamy και οι συνεργάτες αυτού το 1990 [450] επανεξέτασαν τις δράσεις 31 φλαβονοειδών, που αντιπροσώπευαν διαφορετικές χημικές κατηγορίες αυτών, πάνω στην δραστηριότητα υαλουρονουδασών του βοείου όρχεως. Η μελέτη αυτή έδειξε ότι η καμφερόλη και η σιλβίνη είναι οι πλέον ισχυρές. Η κινητική ανάλυση των αντιδράσεων αναστολής έδειξε ότι οι ουσίες αυτές δρουν ανταγωνιστικά ως προς το υπόστρωμα.

### **12. Ελαστάση**

Ένα μοναδικό φλαβονοειδές, η 39-υδροξυφαρρερόλη (6,8 – διμεθυλ- 5,7,39,49-τετραϋδροξυφλαβόνη), γνωστή επίσης και ως IdB1031, αναστέλλει την ελαστάση των ανθρώπινων ουδετεροφίλων, αλλά μόνον αδύναμα ( $IC_{50}$  κατά προσέγγιση ίση με 200 mM), λειτουργώντας κατά αντιστρέψιμο, μη ανταγωνιστικό τρόπο αναστολής (Meloni και συν. 1995 [451]). Ωστόσο, αυτή η ένωση μειώνει σημαντικά την παραγωγή του Παράγοντα Νέκρωσης Όγκων (TNF- $\alpha$ ) και της IL-8, εκ μέρους διεγερθέντων με LPS περιφερικών μονοπύρηνων λευκοκυττάρων (στην συγκέντρωση των 10 mM), όπως αναφέρει ο Meloni και οι συνεργάτες του το 1995 [451]. Οι ιδιότητες αυτές, μαζί με την ικανότητα του εν λόγω μορίου να αναστέλλει την ελαστάση των ανθρώπινων ουδετεροφίλων, το καθιστούν υποψήφιο για την φαρμακοθεραπεία των χρόνιων νόσων του πνεύμονα των χαρακτηριζόμενων από λευκοκυτταρική διήθηση.

### **13. RNA και DNA πολυμεράσες**

Τα πειράματα του Nose το 1984 [452] έδειξαν ότι η κουερσετίνη, η καμφερόλη και η φισετίνη αναστέλλουν την μεταγραφή με την RNA πολυμεράση II σε φυσιολογικούς ινοβλάστες του ανθρώπου που κατέστησαν μεμβρανικώς διαπερατοί. Η φλαβόνη και η χρυσίνη δείχνουν μικρή δραστηριότητα. Χορήγηση κουερσετίνης σε μια αντίδραση μεταγραφής εν εξελίξει σταματά άμεσα την αντίδραση, υποδεικνύοντας ότι η κουερσετίνη αναστέλλει το βήμα της επιμήκυνσης. Οι δράσεις διαφόρων φλαβονοειδών (κουερσετίνη, κουερσεταγετίνη, μυρισετίνη και μπαϊκαλεΐνη) δείχνουν περίπλοκες αλληλεπιδράσεις με τις DNA και τις RNA πολυμεράσες, εξαρτώμενες από το συγκεκριμένο φλαβονοειδές και το είδος του ενζύμου (Ono and Nakane 1990, [453, 454] ).

### **14. Αλδεΰδη και Αλκοόλ αφυδρογονάσεις**

Ένα εκχύλισμα του φυτού *R. Puerarie*, που χρησιμοποιείται από αρχαιότατους χρόνους στην παραδοσιακή κινεζική ιατρική για την αντιμετώπιση της εξάρτησης από το αλκοόλ και την σχετική τοξίκωση, καταστέλλει την αυθόρμητη τάση της πρόσληψης αιθανόλης από τούς επιρρεπείς προς την κατανάλωση αιθανολικών παρασκευασμάτων χρυσούς κρικετούς της Συρίας (Syrian golden hamsters), όπως αναφέρουν οι Keung and Vallee το 1994 ([457]. Τα ισοφλαβονοειδή νταϊντζεΐνη (49,7-διυδροξυϊσοφλαβόνη) και νταϊντζΐνη (7-γλυκοσίδιο της νταϊντζεΐνης) που έχουν απομονωθεί από το φυτικό εκχύλισμα (Keung, 1993 [456, 455] ) έχει δειχθεί ότι προκαλούν αυτή την δράση αναστέλλοντας την αλκοόλ-αφυδρογονάση του ανθρώπου. Η νταϊντζΐνη και νταϊντζεΐνη, σε δόσεις οι οποίες καταστέλλουν την πρόσληψη αιθανόλης δεν δείχνουν δράση στον συνολικό μεταβολισμό της ακεταλδεΰδης και της αιθανόλης στους κρικετούς, καίτοι αυτές αναστέλλουν την ανθρώπινη μιτοχονδριακή αφυδρογονάση της αλδεΰδης και την γ-γ-αφυδρογονάση της αλκοόλης, *in vitro*. Αυτές οι παρατηρήσεις καθαρά διαχωρίζουν τις δράσεις αυτών των ισοφλαβονοειδών από τις αντίστοιχες εκείνων των κλασικών ευρέως δρώντων αναστολέων της αλδεΰδικης αφυδρογονάσης και της κατηγορίας 1 των αφυδρογονασών της αλκοόλης. Συνεπώς η νταϊντζΐνη και η νταϊντζεΐνη αντιπροσωπεύουν μια νέα τάξη ουσιών οι οποίες προσφέρονται ως ασφαλή και αποτελεσματικά θεραπευτικά μέσα για την εξάρτηση από την αιθυλική αλκοόλη.

### **15. Αμυλάση**

Η έκκριση της αμυλάσης από τα εξειδικευμένα κύτταρα της εξωκρινούς μοίρας του παγκρέατος, που διεγείρεται από την χολεκυστοκινίνη (οκταπεπτιδική ορμόνη), από την καρβαχόλη ή το TPA, αναστέλλεται από την κουερσετίνη. Από την άλλη πλευρά η δράση του VIP (Vasoactive Intestinal Peptide), το οποίο επάγει γενική έκκριση στις βλενογόνους του πεπτικού δεν επηρεάζεται (Lee και συν. 1988 [458]).

### **16. Αποκαρβοξυλάση της ιστιδίνης και αποκαρβοξυλάση της DOPA.**

Σε προκαταρκτικά πειράματα ο Martin και οι συνεργάτες του το 1949 [459] υπέδειξαν ότι η αποκαρβοξυλάση της ιστιδίνης αναστελλόταν από επίλεκτα φλαβονοειδή, όπως είναι η κουερσετίνη και η (1)-κατεχίνη, ενώ τα αντίστοιχα γλυκοσίδια των φλαβονοειδών είναι αδρανή. Η ισταμίνη διεγείρει την έκκριση του γαστρικού οξέος και οι εκλεκτικοί αναστολείς των υποδοχέων ισταμίνης της γαστρικής βλενογόνου, αποτελούν μια σημαντική φαρμακολογική προσέγγιση για την ρύθμιση των καταστάσεων της υπερχλωριδρίας που εμφανίζονται σε πολλές διαταραχές της λειτουργίας του στομάχου. Το συνθετικό φλαβονοειδές παράγωγο φλαβόνη – 6 - καρβοξυλικό οξύ αναστέλλει αξιοσημείωτα την επαγόμενη από την ισταμίνη έκκριση υδροχλωρικού οξέος προσελκύοντας το ενδιαφέρον για την φαρμακολογική του χρήση (Pfister και συν. 1980, [460]). Ο Parmar και οι συνεργάτες του περιέγραψαν την γαστρική αντεκκριτική δραστηριότητα του φλαβονοειδούς παραγώγου 3-μεθοξυ-5,7,39,49-τετραϋδροξυ-φλαβάνης, μιας ουσίας η οποία φαίνεται να είναι ένας ειδικός αναστολέας της αποκαρβοξυλάσης της ιστιδίνης στους επίμυες και ταυτοχρόνως να είναι τόσο αποτελεσματική όσο και η σιμετιδίνη στην μείωση της έκκρισης γαστρικού οξέος από την βλενογόνο του στομάχου. Η φλαβάνη αυτή επόισης μεώνει και το περιεχόμενο της ισταμίνης στον γαστρικό ιστό των επιμύων (Parman and Hennings 1984., Parman et al 1984 [461, 462]). Η ναρινγενίνη, το αγλυκονικό μόριο της ναρινγίνης, είναι ένας ήπιος αναστολέας της αποκαρβοξυλάσης της ιστιδίνης, και επίσης δείχνει μια αντίστοιχη αντιελκωτική δραστηριότητα (Parmar 1983, [463]). Επίσης, ο Umezawa και οι συνεργάτες του το 1975, [464] αναφέρουν ότι η οροβόλη και η 39,49,5,7-τετραϋδροξυ-8-μεθοξυ-ισοφλαβόνη, που απομονώθηκαν από διηθήματα εκχυλισμάτων καλλιέργειών μανιταριών και στρεπτομυκήτων είναι αποτελεσματικοί αναστολείς της αποκαρβοξυλάσης της ντοπαμίνης ασκώντας μια σημαντική υποτασική δράση σε υπερτασικούς επίμυες.



## **2.5. Τροποποίηση της λειτουργίας των φλεγμονωδών κυττάρων**

Το ανοσοποιητικό σύστημα είναι ένα εξαιρετικά περίπλοκο και εσωτερικά ρυθμιζόμενο σύνολο κυττάρων των οποίων οι ολοκληρωμένες λειτουργίες είναι θεμελιώδεις για την υγεία και την διατήρηση της δομικής και λειτουργικής σταθερότητας του οργανισμού. Τα είδη και οι υποπληθυσμοί των κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος είναι σε θέση να αλληλεπιδρούν κύτταρο προς κύτταρο και κατά τον τρόπο αυτόν να ανταποκρίνονται σε διακυτταρικά μηνύματα στα οποία συμπεριλαμβάνονται ορμόνες, κυτταροκίνες και αυτακοειδή που προέρχονται από διάφορες κυτταρικές ομάδες. Τα αυτακοειδή συνήθως συμπεριλαμβάνουν την ισταμίνη, τις διάφορες κινίνες, τα λευκοτριένια, τις προσταγλανδίνες και την σεροτονίνη. Η συμπεριφορά του ανοσοποιητικού συστήματος μπορεί να μεταβληθεί από την διαίτα, τις φαρμακευτικές ουσίες, τους περιβαλλοντικούς ρύπους, όπως επίσης και από φυσικώς απαντώσες διατροφικές ουσίες, όπως οι βιταμίνες και τα φλαβονοειδή.

Στις σελίδες που ακολουθούν περιλαμβάνονται μερικά συλλεκτικά δεδομένα που αναφέρονται στις δράσεις των φλαβονοειδών επί της λειτουργίας των κυττάρων T και B, των μακροφάγων, των Φυσικών Φονικών Κυττάρων, των βασεοφίλων, των μαστοκυττάρων, των ουδετεροφίλων και ηωσινοφίλων. Είναι σαφές ότι τα φλαβονοειδή επιδεικνύουν ένα ευρύ τόξο βιοχημικών και φαρμακολογικών δράσεων, οι οποίες υποδεικνύουν ότι ορισμένα εξ αυτών είναι σε θέση να επηρεάσουν βαθειά την λειτουργία των φλεγμονωδών κυττάρων και του ανοσοποιητικού συστήματος (Middleton and Kandaswami, 1992, [344, 345]). Διάφορα φλαβονοειδή επηρεάζουν κατά ειδικό τρόπο την λειτουργία των ενζυμικών συστημάτων τα οποία παρουσιάζουν ένα κρίσιμο ρόλο στην δημιουργία των διαφόρων φλεγμονωδών διεργασιών, όπως π.χ το ενζυμικό σύστημα των κινασών της τυροσίνης και της σερίνης-θρεονίνης (Nishizuka, 1988, [367, 368, 369]), Hunter, 1995, [465]), όπως αναδείξαμε προηγουμένως. Προσφάτως, έγινε σαφές ότι τα ένζυμα αυτά παίζουν σπουδαίο ρόλο στην μεταγωγή σήματος και στην ενεργοποίηση κυτταρικών διεργασιών, οι οποίες εμπλέκουν τόσο τα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος, όσο και άλλα κύτταρα ενεργοποιούμενα από ορμόνες, αυτακοειδή, νευροδιαβιβαστές και αυξητικούς παράγοντες. Ο Weber και οι συνεργάτες του το 1997 [466] επισκόπησαν το ευρύ αντικείμενο της ρύθμισης της μεταγωγής σήματος από φάρμακα. Η περιπλοκότητα της διαδικασίας της μεταγωγής σήματος δείχτηκε πρόσφατα από τον Gomez και τους συνεργάτες του το 1998 [467] σε ένα σχετικό άρθρο επισκόπησης επί των επαγόμενων κυτταρικών ανταποκρίσεων από την IL-2.

Οι πιθανές δράσεις των φλαβονοειδών στις διάφορες συνιστώσες της οδού της μεταγωγής σήματος επισκοπήθηκαν πρόσφατα και παρουσιάστηκαν με τρόπο ανάγλυφο και σαφή σε έναν κομψό πίνακα από τον Packer και τους συνεργάτες του το 1998 [468].

Η δυναμική σημασία αυτών των δράσεων επί του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και της καρκινικής αύξησης συζητώνται σε περαιτέρω παραγράφους του κειμένου μας.

### **2.5.1. Λεμφοκύτταρα T**

Πρόσφατες εργασίες επί της φύσης της αναγνώρισης αντιγόνου από τα λεμφοκύτταρα T καθώς και μελέτες επί της μεταγωγής σήματος στα T και B λεμφοκύτταρα οδήγησαν σε νέες βασικές έννοιες σύμφωνα με τις οποίες ο πολλαπλασιασμός των λεμφοκυττάρων T ακολουθεί την συνεργητική αλληλεπίδραση μεταξύ του καθοριστικού συμπλέγματος 4 (CD4), CD8 και του συμπλέγματος CD3 που είναι ο υποδοχέας του κυττάρου T (TCR), κατόπιν έκθεσης σε ένα εξωγενές αντιγόνο και σε συνδυασμό με τα κατάλληλα μόρια του μέγιστου συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας. Σήμερα έχει γίνει κατανοητό ότι το μήνυμα για κυτταρικό πολλαπλασιασμό δημιουργείται από τα μέλη μιας οικογένειας Πρωτεϊνικών Κινασών της Τυροσίνης (PTKs) οι οποίες καταλύουν την φωσφορυλίωση κυτταρικών υποστρωμάτων, που με την σειρά της οδηγεί τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό (Rudd 1990 [469]). Οι φωσφατάσες της τυροσίνης αποφωσφορυλιώνουν τις φωσφοπρωτεΐνες, απαναφέροντας το κύτταρο προς την βασική του κατάσταση (Fisher και συν. 1991, [470], Hunter, 1995 [465]).

Μερικά φλαβονοειδή επηρεάζουν την δραστηριότητα των PTKs αλλά οι PTKs διαφορετικών κυττάρων δεν επηρεάζονται κατά ομοιόμορφο τρόπο από τα διάφορα φλαβονοειδή (Geahlen και συν., 1989, [471]). Οι γνώσεις μας πάνω στις πιθανές δράσεις τους επί των φωσφατασών της τυροσίνης είναι λιγοστές (Van Wart-Hood και συν., 1989, [472]). Η διέγερση των Λεμφοκυττάρων T μέσω του υποδοχέα αντιγόνων προκαλεί πρόωμη ενεργοποίηση μιας κινάσης της τυροσίνης (Samelson και συν. 1986, [473]), Patel και συν. 1987 [474], Trevillyan και συν. 1990, [475]) και την παραγωγή δευτέρων αγγελιοφόρων, της IP3 και της DAG, από την φωσφατιδυλινοσιτόλη (PI) και την διφωσφορική φωσφατιδυλινοσιτόλη, μέσω της ενεργοποίησης της φωσφολιπάσης C (Koretzky και συν. 1990, [476], Ledbetter και συν. 1991, [477]). Διάφορα κυτταρικά υποστρώματα φωσφορυλιώνονται, συμπεριλαμβανομένου και του TCR- $\alpha$  υποδοχέα μέσω της ενεργοποίησης της PTK p56<sup>lck</sup>. Ο Trevillyan και οι συνεργάτες του το 1990 [475] έδειξαν ότι η ισοφλαβόνη γενιστεΐνη, που είναι ειδικός αναστολέας της PTK (Akiyama και

συν. 1987, [478]) μπλοκάρει την δραστηριότητα της p56<sup>lck</sup> κατά τρόπο δοσοεξαρτώμενο (IC50, 40 mM). Η αναστολή της δραστηριότητας του ενζύμου συσχετίζεται με την μειωμένη έκκριση IL-2 και μειωμένη έκφραση του IL-2R (υποδοχέα της εν λόγω ιντερλευκίνης), αλλά όχι με την υδρόλυση της PI της επαγόμενης από τον TCR. Μελέτες με αναστολείς της PTK, όπως οι τυρφοστίνες ενισχύουν την υπόθεση ότι η φωσφορυλίωση της τυροσίνης είναι ένα υποχρεωτικό βήμα για την έκκριση της IL-2 (Stanley και συν. 1990 [479]).

Ο Rao και οι συνεργάτες του το 1995, [480] βρήκαν ότι η ταχεία επαγωγή της υδρόλυσης της φωσφατιδυλοχολίνης σε επιμολυσμένα κύτταρα NIH 3T3, διεγερμένα από την IL-3, αναστέλλεται από την γενιστεΐνη αλλά όχι από αναστολείς της PKC.

Οι Atluru και Atluru το 1991, [481, 482] σύγκριναν τις ανοσοκατασταλτικές δράσεις που προκαλεί η γενιστεΐνη με εκείνες της κυκλοσπορίνης A επί της διέγερσης του πολλαπλασιασμού των κυττάρων T, της σύνθεσης IL-2 και της έκφρασης των υποδοχέων της IL-2 (χρησιμοποιώντας ως διεγέρτη το μονοκλωνικό αντίσωμα CD 28). Η γενιστεΐνη ανέστειλε τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων Tα, την σύνθεση της IL-2 καθώς και την έκφραση του υποδοχέα της IL-2, χωρίς τοξικές δράσεις επί των εν λόγω κυττάρων στις μελετηθείσες συγκεντρώσεις (μεταξύ του 1 και των 100 mM). Η δυνητική χρήση της γενιστεΐνης ως ενός ανοσοκατασταλτικού παράγοντα μαζί με την κυκλοσπορίνη υποδεικνύεται μέσω της εν λόγω μελέτης, για την παρεμπόδιση της απόρριψης αλλομοσχευμάτων .

Ο Namgoong και οι συνεργάτες του το 1993 [483] βρήκε γενικά όμοια αποτελέσματα σε μελέτες στις οποίες χρησιμοποιήθηκε η κονκαναβαλίνη A και ο λιποπολυσακχαρίτης ως επαγωγείς του πολλαπλασιασμού των λεμφοκυττάρων ζώων σε μικτές κυτταροκαλλιέργειες λεμφοκυττάρων, παρά το γεγονός ότι η ευαισθησία των φλαβονοειδών στα μιτογόνα αυτά ερεθίσματα μεταβάλεται αξιόλογα. Το τελευταίο αυτό σημείο υποδεικνύει μετά παρησίας ότι η ευαισθησία των φλαβονοειδών αντανάκλα την χρησιμοποίηση διαφορετικών οδών κυτταρικής ενεργοποίησης. Όπως περιγράφεται από τον Dibirdik και τους συνεργάτες του το 1991, [484], η δέσμευση του υποδοχέα της IL-7 από ανασυνδυασμένη ανθρώπινη IL-7 οδηγεί σε εντόνως αυξημένη φωσφορυλίωση των τυροσινών συνδεόμενη από μια ταχεία αύξηση της παραγωγής τριφωσφορικής ινοσιτόλης σε βλάστες οξείας λεμφοβλαστικής λευχαιμίας. Οι μεταβολές αυτές παρεμποδίζονται από την γενιστεΐνη, αλλά όχι από τον H-7, έναν αναστολέα της PKC.

Η IL-7 ενδεχομένως παίζει έναν σημαντικό ρόλο στην ρύθμιση της οξείας λεμφοβλαστικής λευχαιμίας και η δράση της γενιστεΐνης φαίνεται να δεικνύει δυνητικές θεραπευτικές εφαρμογές.

Το 1990 αποδείχθηκε ότι η CD45 τυροσίνη φωσφατάση είναι απαραίτητη για την σύζευξη του υποδοχέα αντιγόνου προς την οδό της PI (Koretzky και συν. 1990, [485]). Πειράματα του Ledbetter και των συνεργατών του (1991, [486]), όπως επίσης και άλλων ερευνητών έδειξαν ότι η CD45 τυροσίνη φωσφατάση μπορεί να χρησιμεύσει ως ένας ρυθμιστής της ενεργοποίησης ανθρώπινων λεμφοκυττάρων του περιφερικού αίματος, της εξαρτώμενης από το σύμπλεγμα TCR. Το CD45 αναστέλλει την αύξηση της συγκέντρωσης του κυτταροπλασματικού  $Ca^{2+}$ , υποδεικνύοντας ότι η υδρόλυση της φωσφατιδυλινοσιτόλης (PI) ρυθμίζεται από το CD45. Επίσης η δέσμευση του CD45 αναστέλλει την φωσφορυλίωση της τυροσίνης σε ειδικά υποστρώματα κατά την διάρκεια της ενεργοποίησης των κυττάρων T. Θα ήταν πολύ σημαντικό να προσδιοριστούν οι δράσεις των φλαβονοειδών επί της τυροσίνης φωσφατάσης του CD45. Η φωσφορυλίωση των πρωτεϊνικών τυροσινών και η κινητοποίηση του ασβεστίου αυξάνονται ισχυρά μέσω διασταυρούμενης σύνδεσης του CD4 ή του CD8 με το CD3. Αυτή η ανακάλυψη έχει συνέπειες για την θετική και αρνητική επιλογή που πραγματοποιείται στο εσωτερικό του θύμου αδένου (Turka et al, 1991, [487]). Η τυροσινική κινάση pp60<sup>src</sup> του σαρκώματος του Rous που αναστέλλεται από την γενιστεΐνη έχει επίσης βρεθεί και στο ανθρώπινο πλάσμα (Hass et al, 1986, [488]). Εφ' όσον η φωσφορυλίωση των πρωτεϊνικών τυροσινών είναι γνωστό ότι επηρεάζεται από τουλάχιστον δύο φλαβονοειδή και συγκεκριμένα από την γενιστεΐνη και την κουερσετίνη (Akiyama et al, 1987, [387], Glossmann et al, 1981, [489], Levy et al, 1984, [490]) φαίνεται ότι αυτή η θεμελιώδης διαδικασία που προκαλεί την θυμική επιλογή είναι ένας μηχανισμός ευαίσθητος στην δράση των φλαβονοειδών.

Η αναστροφή του ισοζυγίου της φωσφατιδυλινοσιτόλης προς την πλευρά της υδρόλυσης της είναι ένα κεντρικό μέγεθος για την ενδοκυττάρια μεταγωγή σήματος, λαμβάνοντας χώρα ως απάντηση στην δράση νευροδιαβιβαστών, αυξητικών παραγόντων και ορμονών (Berridge and Irvine, 1984, 1989 [491, 492], Bradford, 1998, [493]). Η επαγόμενη από τα ογκογονίδια *ras*, *src*, *erb*, *fms* και *fes* επίσης αυξάνει την κινητικότητα του μεταβολισμού των φωσφοϊνοσιτιδίων προς την πλευρά της υδρόλυσής τους (Nishioka et al 1989, [494]). Ένα σημαντικό ένζυμο για την κινητοποίηση των φωσφοϊνοσιτιδίων είναι η φωσφατιδυλινοσιτόλη κινάση (ή PI κινάση), η οποία φωσφορυλιώνει το μοριακό τμήμα της ινοσιτόλης της PI στην θέση 4 και για αυτό αναφέρεται και ως

φωσφατιδυλοϊνοσιτόλη-4-κινάση. Είναι ενδιαφέρον το γεγονός ότι ο Nishioka και οι συνεργάτες του βρήκαν το 1989 [494], ότι η ισοφλαβόνη οροβόλη αποτελούσε έναν ισχυρό αναστολέα της PI-κινάσης με IC50 ίσο προς 0,25 mg/ml. Η κουερσετίνη έχει μια τιμή IC50 ίση προς 1,8 και η φισετίνη 2 mg/ml. Η κινητική ανάλυση αποκάλυψε ότι η οροβόλη είναι ανταγωνιστική ως προς το ATP και μη ανταγωνιστική ως προς την PI. Ένα άλλο ισοφλαβονοειδές, ανάλογο με την γενιστεΐνη, η c-τεκτοριγενίνη, όπως και η οροβόλη, έδειξε ότι είναι ένας ισχυρός αναστολέας της κινητοποίησης της PI, της επαγόμενης από τον Παράγοντα Αύξησης Δέρματος (EGF) στην κυτταρική σειρά A431 με μια IC50 ίση προς 1 mg/ml (Imoto et al, 1988, [495]). Αυτή η ουσία αναστέλλει την κινητοποίηση της PI χωρίς να προσβάλλει την δραστηριότητα τυροσίνης κινάσης του υποδοχέα του EGF. Τα φλαβονοειδή με αυτές τις βιοχημικές ιδιότητες φαίνεται να αποτελούν χρήσιμους ιχνηλάτες της λειτουργικής ανάλυσης της κινητοποίησης του καταβολισμού των φωσφοϊνοσιτιδίων (PI turnover) και της σχέσης τους με την λειτουργία των ανοσοκυττάρων. Μια μελέτη στην οποία σχετίζονται η δομή και η ανασταλτική δραστηριότητα των φλαβονοειδών επί της φωσφατιδυλινοσιτόλ-3-κινάσης πραγματοποιήθηκε από τον Agullo και τους συνεργάτες του το 1997, και περιλαμβάνει συγκρίσεις, επίσης, μεταξύ της αναστολής της PKT και της PKC. Η μυρισετίνη, η λουτεολίνη, η απιγενίνη, η κουερσετίνη και η φισετίνη είναι δραστικές ουσίες. Το πρότυπο υδροξυλίωσης του δακτυλίου B και η κατάσταση του κορεσμού των δεσμών μεταξύ των ανθράκων C2-C3 φαίνεται να αποτελούν σημαντικές παραμέτρους, καθοριστικές για την αναστολή και άλλων κυτταρικών διεργασιών. Επιπροσθέτως προς την PTK, το οικουμενικό φωσφορυλιωτικό ένζυμο PKC της σερίνης και της θρεονίνης, το εξαρτώμενο από το Ca<sup>2+</sup> και τα φωσφολιπίδια και το εμπλεκόμενο σε ένα ευρύ τόξο κυτταρικών αντιδράσεων, στις οποίες συμπεριλαμβάνεται η προαγωγή των όγκων και η κινητοποίηση των T λεμφοκυττάρων, αναστέλλεται από ορισμένα φλαβονοειδή in vitro (Nishizuka, 1986, 1995, [367, 368, 369], Patel και συν., 1987 [496], Graziani και συν., 1981 [371] ; Gschwendt και συν., 1983 [374], Ferriola και συν., 1989 [377]).

Η φισετίνη, η κουερσετίνη και η λουτεολίνη είναι οι πλέον ισχυρές ουσίες στην μελέτη του Ferriola και των συνεργατών του το 1989 [377], ενώ μια ισοφλαβόνη, η φορμονονετίνη, η οποία έχει δομική συγγένεια με την γενιστεΐνη δεν εμφανίζει δράση. Έχει δειχθεί ότι η φισετίνη ασκεί ανταγωνιστική δράση απέναντι στην ATP, ως προς το σημείο πρόσδεσής της στην καταλυτική μονάδα του ενεργού κέντρου της PCK (Ferriola και συν., 1989, [377]).

Ο Huang και οι συνεργάτες του το 1996, [383] απέδειξαν ότι η απιγενίνη καταστέλλει την προαγωγική δράση του TPA στην καρκινογένεση της επιδερμίδος του ποντικού, ανταγωνιζόμενη το ATP, παρέχοντας έτσι ένα άλλο παράδειγμα αναστολής ενός συστήματος εξαρτώμενου από το ATP, μέσω επιλεγμένων φλαβονοειδών, εξειδικευμένης δομής (Ferriola και συν. 1989 [377]). Η διαφοροποίηση των δράσεων και οι σχέσεις μεταξύ δομής και δραστηριότητας των φλαβονοειδών ως αναστολέων της κινάσης της τυροσίνης αναλύθηκαν από τον Hagiwara και τους συνεργάτες του το 1988 [376]. Ο Bagmasco και οι συνεργάτες του το 1989 [497] μελέτησαν την διαμεμβρανική μεταγωγή σήματος μέσω των μοριακών συμπλόκων CD2 και CD3 στις εξωκυττάριας μεμβράνες των λεμφοκυττάρων T, όπως επίσης και τον ρόλο που ενέχει στην εν λόγω διαδικασία η μετατόπιση της PCK. Η ενεργοποίηση των λεμφοκυττάρων T από μονοκλωνικά αντισώματα (mAbs), τα οποία στοχεύουν το πρωτεϊνικό σύμπλεγμα CD3/TRC και το μακρομόριο CD2, καταλήγει σε μια ταχεία αύξηση του ελεύθερου ιονισμένου ενδοκυττάρου  $Ca^{2+}$ . Παραταύτα, έχει αποδειχθεί ότι στην ανθρώπινη κυτταρική γραμμή λευχαιμικών T κυττάρων Jurkat η πυροδότηση τους μέσω κατάλληλων μονοκλωνικών αντισωμάτων αντι-CD2 επάγει την δημιουργία IP3 και DAG, προερχομένων από την αποδόμηση της PIP<sub>2</sub>. Η εμφάνιση αυτών των αγγελιοφόρων δευτέρας τάξεως υποδεικνύει ότι το μακρομόριο CD2, όπως επίσης και το σύμπλεγμα CD3/TCR συνοδεύεται επίσης από μια μετατόπιση της δραστηριότητας της PCK προς την κυτταρική μεμβράνη σε συνδυασμό με την αύξηση του ενδοκυττάρου  $Ca^{2+}$ . Κατ' αναλογία με τις δράσεις των φλαβονοειδών επί της PTK, κάθε ένα από τα βήματα που ελέγχονται στα εν λόγω πειράματα είναι εν δυνάμει ευαίσθητο στα φλαβονοειδή. Ένα σημαντικό ερώτημα είναι το αν η ενεργοποίηση της PTK αποτελεί ένα προαπαιτούμενο για την ενεργοποίηση της PLC ή αν οι δύο αυτές πορτείες της μεταγωγής σήματος ρυθμίζονται ανεξαρτήτως. Από πειράματα τα οποία πραγματοποιήθηκαν εκ μέρους του June και των συνεργατών του (1990<sup>α</sup> και 1990<sup>β</sup> [498, 499]) εδείχθει ότι μια ταχεία αύξηση της δραστηριότητας της PTK λαμβάνει ήδη χώρα πριν την ενεργοποίηση της PLC (όπως προσδιορίζεται από την εμφάνιση της IP3) και μετά την πρόσδεση του αντισώματος αντι-CD3mAb στο σύμπλεγμα του υποδοχέα του κυττάρου T. Όλη αυτή η δραστηριότητα μοιάζει με τα λαμβάνοντα χώρα στα αιμοπετάλια μέσω διέγερσης δια του PAF, υποδεικνύοντας την ύπαρξη του κοινού χαρακτήρα διαφόρων διαδικασιών που παρεμποδίζονται από τα αντιοξειδωτικά (όπως π.χ η καρκινική εξαλλαγή και η αιμοπεταλιακή συσσώρευση). Αυτή η δραστηριότητα της PTK είναι ευαίσθητη στις δράσεις της ερμπιμυκίνης, ενός αντιβιοτικού

τύπου βενζοκινονοειδούς ανασταμνικής, το οποίο σταματά την κακοήθη εξαλλαγή μέσω της pp60<sup>v-src</sup>. Ο Mustelin και οι συνεργάτες του το 1990, [500] επέτυχαν παρόμοια αποτελέσματα, χρησιμοποιώντας όμως την ισοφλαβόνη γενιστεΐνη στην θέση της ερμπιμυκίνης, ως αναστολέα της PTK. Σε συγκεντρώσεις οι οποίες αναστέλλουν την φωσφορυλίωση της τυροσίνης στην υπομονάδα TCR- $\alpha$  του σχετικού υποδοχέα, αλλά μη αναστέλλουσες την δραστηριότητα της PLC (αύξηση της IP<sub>3</sub>), η γενιστεΐνη παρεμποδίζει την πυροδοτούμενη από το σύμπλεγμα TCR-CD3 ενεργοποίηση της PLC, του πολλαπλασιασμού των κυττάρων T και την έκφραση των υποδοχέων της ιντερλευκίνης-2. Οι δράσεις αυτές δεν συσχετίζονται με την τοξικότητα της γενιστεΐνης.

Ο Nishibe και οι συνεργάτες του το 1990 [501] απέδειξαν ότι η PLC-g1, ένα ισοένζυμο της οικογένειας PLC της εξειδικευμένης προς τα φωσφοϊνοσιτίδια, αντιπροσωπεύει ένα εξαιρετικό υπόστρωμα για την κινάση της τυροσίνης του υποδοχέα του EGF και ότι η επαγόμενη από τον EGF φωσφορυλίωση της τυροσίνης της PLC-g1 συνοδεύεται από υδρόλυση της PIP<sub>2</sub> σε διάφορες κυτταρικές σειρές. Δεδομένα ενισχυτικά της άποψης αυτής εδόθησαν από τον Uckun και τους συνεργάτες του (1991 β, [502]), που παρατήρησαν κατάργηση της δραστηριότητας της PTK και διέγερση της PLC, σε ανθρώπινα λεμφοκύτταρα B που εξετέθησαν σε ένα αντίσωμα εναντίον του ran-υποδοχέα των B κυττάρων CD<sub>40</sub>/Bp50. Η PLC-g1 εντοπίστηκε επίσης στην ανθρώπινη σειρά T λευχαιμικών κυττάρων Jurkat ως μια φωσφοπρωτεΐνη (Cranja και συν. 1991, [503]). Η ενεργοποίηση των T κυττάρων μέσω του CD<sub>3</sub> προκαλεί φωσφορυλίωση της PLC-g1, συνδεόμενη με μια έντονη αύξηση της δραστηριότητας της PLC.

Η γενιστεΐνη αναστέλει τόσο την φωσφορυλίωση της τυροσίνης όσο και την αύξηση της δραστηριότητας της PTK. Όλες αυτές οι παρατηρήσεις ενισχύουν την επισήμανση ότι η ενεργοποίηση της PLC είναι μια διαδικασία ευαίσθητη στην γενιστεΐνη και εξαρτώμενη από την PTK. Ο Traganos και οι συνεργάτες του (1992, [504]) μελέτησαν τις δράσεις της γενιστεΐνης πάνω στον πολλαπλασιασμό και την πορεία του κυτταρικού κύκλου σε φυσιολογικά ανθρώπινα λεμφοκύτταρα, σε ανθρώπινα λευχαιμικά κύτταρα της σειράς MOLT-4, όπως επίσης και στα πολύ γνωστά ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα του τραχήλου της μήτρας της σειράς HL-60. Η βραχείας χρονικής διάρκειας έκθεση των λευχαιμικών κυττάρων στην γενιστεΐνη (5 – 20 mg/ml) καταστέλλει την διέλευση των εν λόγω κυττάρων από την φάση S ή από τις φάσεις S και G<sub>2</sub>, ενώ η ίδια ακριβώς έκθεση, ως προς τον χρόνο και τις συγκεντρώσεις της γενιστεΐνης, δεν έχει κανένα αποτέλεσμα σε φυσιολογικά πολλαπλασιαζόμενα λεμφοκύτταρα. Η προκαλούμενη από μιτογόνους

παράγοντες μετατόπιση των λεμφοκυττάρων από το σημείο ισορροπίας  $G_0$  προς την ολοκλήρωση της φάσης  $G_1$  είναι πάρα πολύ ευαίσθητη στην γενιστεΐνη ( $IC_{50}$ , 1,6 mg/ml). Luton και οι συνεργάτες του (1994, [505]) απέδειξαν την ύπαρξη μιας ευαίσθητης στην γενιστεΐνη PTK, η οποία φαίνεται να ελέγχει την επαγόμενη από τον προσδέτη ανακατανομή και εσωτερίκευση του συμπλόκου TCR/CD3, στον κυτταρικό κλώνο CD8 χλωριούχου 5-κυανο-2,3-διτοϋλτετραζόλιου, γεγονός που αποτελεί μια επιπρόσθετη ένδειξη ότι η λευκοκυτταρική λειτουργία μπορεί να επηρεάζεται από την συγκεκριμένη ισοφλαβόνη. Η ανάπτυξη ενός ανοσολογικού «ρεπερτορίου» εξαρτάται από την ιακνότητα επιλεκτικής κυτταρικής θανάτωσης και την εξόντωση των κυττάρων τα οποία εκφράζουν ξένα αντιγόνα. Η πρόσδεση του αντιγόνου Fas επάγει μια ταχεία (1 min) φωσφορυλίωση πολλών κυτταρικών πρωτεϊνών σε λευχαιμικά T κύτταρα Jurkat, σε κύτταρα ανθρώπινου ιστιοκυτταρικού λεμφώματος της σειράς U937 και σε κύτταρα ανθρώπινης μυελογενούς λευχαιμίας της σειράς K562, με μια αποκλιμάκωση της εν λόγω δραστηριότητας και επαναφοράς της προς την βασική γραμμή εντός 30 min, λόγω τυροσινικής φωσφατασικής δραστηριότητας. Η χορήγηση της γενιστεΐνης εμποδίζει τον επαγόμενο από το Fas κατακερματισμό του DNA και προεκτείνει την κυτταρική επιβίωση. Τα αποτελέσματα υποστηρίζουν την ύπαρξη μιας συγκράτησης της ενεργοποίησης της PTK σε ένα πρώιμο αναγκαστικό στιγμότυπο της επαγόμενης από το Fas απόπτωσης (Eischen και συν., 1994, [506]). Η ανάπτυξη των T-λεμφοειδών λευχαιμικών κυττάρων αναστέλλεται από την μπαϊκαλεΐνη, όπως επίσης και από την δραστηριότητα της PTK. Η δραστηριότητα της PKC, διεγερμένη από τον PMA, επίσης μειώνεται μέσω αυτού του συγκεκριμένου φλαβονοειδούς (Huang et al, 1994a [507]) Η αναστολή των PTKs από την γενιστεΐνη μπορεί να μην είναι, μολαταύατα, οικουμενική, καθόσον η κεκαθαρμένη PTK των θυμοκυττάρων του βοδιού (καλούμενη επίσης p40) παραμένει απρόσβλητη (Geahlen και συν. 1989 [508]). Συνθετικά ανάλογα φλαβονοειδών, δραστικά απέναντι της PTK έχουν παρασκευασθεί (Ogawara και συν., 1989 [509]. Cushman et al, 1991, [510]) και μπορεί να συμπεριφέρονται, όπως και η γενιστεΐνη, ως ισχυροί ανασοκατασταλτικοί παράγοντες, ειδικά απέναντι σε λευκοκύτταρα, τα οποία ευρίσκονται υπό καθεστώς εντατικής κυτταροδιαίρεσης. Ενώ τα δεδομένα αυτά αποδεικνύουν καθαρά ότι τόσο η PTK και η PKC, όσο και η κινάση της PI μπορούν να ανασταλλούν *in vitro* από μερικά φλαβονοειδή, εν τούτοις απαιτούνται πολύ περισσότερα *in vivo* πειράματα προκειμένου να ξεκαθαριστεί αν οι ουσίες αυτές έχουν κάποιες δράσεις στις διάφορες όψεις της ανοσοποιητικής λειτουργίας. Η εκτελεστική λειτουργία των κυτταροτοξικών λεμφοκυττάρων T, είναι,



τουλάχιστον εν μέρει, εξαρτημένη από την δραστηριότητα της Ρ-γλυκοπρωτεΐνης (Pgp), που αποτελεί το προϊόν του γονιδίου 1 της πολυφαρμακευτικής αντίστασης. Η Pgp έχει τον ρόλο μιας αντλίας εκκροής, η οποία είναι λειτουργικά ενεργός σε καρκινικές κυτταρικές σειρές που παρουσιάζουν ανθεκτικότητα σε πολλούς ταυτοχρόνως κυτταροτοξικούς φαρμακευτικούς παράγοντες. Η δράση της εν λόγω αντλίας μπορεί να παρακαμφθεί σε διάφορες πολυανθεκτικές καρκινικές σειρές ευρισκόμενες υπό καθεστώς κυτταροκαλιέργειας, χρησιμοποιώντας το φλαβονοειδές λουτεολίνη, με αποτέλεσμα την αναστολή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού (Gupta και συν. 1992, [511]). Ο Mookerjee και οι συνεργάτες του (1986, [512]) απέδειξαν ότι η κουερσετίνη και η τανγκερετίνη, η οποία είναι ένα πολυμεθοξυλιωμένο φλαβονοειδές, μπορεί να καταστείλει την έκφραση των αντιγόνων ιστοσυμβατότητας δευτέρας τάξεως (DR) σε μονοκύτταρα του περιφερικού αίματος του ανθρώπου, μέσω επεξεργασίας της στρεπτολυσίνης Ο ως αντιγόνου. Η έκφραση του αντιγόνου δευτέρας τάξεως υπολογίζεται μέσω προσδιορισμού της ενσωμάτωσης του αντισώματος OK-1a-1 μέσω ραδιοανοσοδοκιμής στερεάς φάσεως. Η δράση του φλαβονοειδούς είναι αντιστρέψιμη. Οι μελετητές αυτοί παρατήρησαν επιπροσθέτως ότι ορισμένα φλαβονοειδή αναστέλλουν αντιστρεπτά τις πολλαπλασιαστικές ανταποκρίσεις των λεμφοκυττάρων σε φυτομιτογόνους διεγέρτες, διαλυτά αντιγόνα και φορβολικούς εστέρες μέσω παρεμπόδισης ενός ή περισσότερων βημάτων, που ακολουθούν την χορήγηση του ερεθίσματος. Μολαταύτα, η κουερσετίνη και η τανγκερετίνη βρέθηκε ότι αναστέλλουν την μεταφορά της θυμιδίνης σε διεγερμένα λεμφοκύτταρα. Οι εν λόγω ανακαλύψεις ευρίσκονται σε συμφωνία με τα δεδομένα πρώιμων μελετών (Hume και συν., 1979, [513]) τα οποία αποδεικνύουν την ανασταλτική δράση της κουερσετίνης επί της πρόληψης γλυκόζης σε λεμφοκύτταρα διεγερθέντα από μιτογόνα ερεθίσματα. Η κουερσετίνη αναστέλλει επίσης την πρόσληψη της 2-δεοξυγλυκόζης και της 3-μεθυλ-γλυκόζης σε ένα παρασκεύασμα ανθρώπινων διπλοειδών ινοβλαστών (Salter και άλλοι 1978, [514]). Αναφέρεται επίσης ότι η κουερσετίνη αναστέλλει την ενσωμάτωση της ραδιενεργού [<sup>3</sup>H]θυμιδίνης στο DNA καλλιεργούμενων λεμφοκυττάρων προερχομένων από ποντικούς τύπου C3H/HCJ και στις ανθρώπινες λεμφοειδείς σειρές Daudi και Bristol-8 (Jung et al, 1983, [515]). Η παρατηρούμενη αναστολή φαίνεται να αντιστρέφεται εν μέρει μέσω της προσθήκης δισθενών κατιόντων. Η ανακάλυψη ότι ένα φλαβονοειδές, όπως η κουερσετίνη, αναστέλλει την πρόσληψη θυμιδίνης εκ μέρους των λεμφοκυττάρων, επιβεβαιώνει τις πρώιμες αναφορές των Graziani και Chayoth (1979, [370]). Ο Okada και οι συνεργάτες του (1990, [516])

μελέτησαν την δυνατότητα εισαγωγής της κουερσετίνης στην ανοσία απέναντι των καρκινικών κυττάρων. Μετά από έκθεση στην κουερσετίνη μεταστατικών κυττάρων της σειράς BMT-11I (ένας κλώνος της σειράς BMT-11 που είναι ένα μεταμοσχευόμενο ινοσάρκωμα ποντικού), οι κλώνοι οι οποίοι προέκυψαν, στους φυσιολογικούς συγγενείς ξενιστές, υποχώρησαν αυθόρμητα. Οι πιθανοί μηχανισμοί της συρρίκνωσης αυτών των κλώνων μελετήθηκαν μέσω προσδιορισμού της κυτταροτοξικής δραστηριότητας των λεμφοκυττάρων T, που δημιουργήθηκαν κατά την διάρκεια μιας μικτής καλλιέργειας λεμφοκυττάρων του σπληνός με καρκινικά κύτταρα τα οποία ελήφθησαν από καρκινοπαθείς ποντικούς. Οι μελέτες αυτές δείχνουν την δυνητική ικανότητα των φλαβονοειδών να προκαλούν ενζυμικές αλλοιώσεις, οι οποίες μπορούν να καταλήξουν στην παραγωγή ποικιλιών καρκινικών κυττάρων ικανών να παρουσιάζουν τροποποιημένες ανοσολογικές απαντήσεις. Από την επιστημολογική σκοπιά της βιολογίας οι μελέτες αυτές υποδεικνύουν ότι το ακολουθούμενο πειραματικό μοντέλο λειτουργεί με μια Λαμαρκιανή λογική, επιτρέποντας την κληρονόμηση επίκτητων χαρακτηριστικών, εξαρτώμενων από τις τροποποιημένες, μέσω των φλαβονοειδών, ενζυμικές λειτουργίες. Η δράση επί των ενζύμων – δηλαδή επί του φαινοτύπου – και όχι επί των γονιδίων (γονότυπος) καταλήγει στην εμπέδωση νέων γενετικών χαρακτηριστικών (ανοσοποίηση).

Η λευκωματίνη ενός βόειου ορού, που προκύπτει από επεξεργασία με ρουτίνη, διεγείρει μια απάντηση μέσω ανοσοσφαιρινών IgE στην χορήγηση της λευκωματίνης του βόειου ορού, αλλά όμως χωρίς την ύπαρξη αντισωμάτων με αιμογλουτινικά χαρακτηριστικά. Τα δεδομένα υποδεικνύουν ότι η ρουτίνη ασκεί μια ρυθμιστική δράση στην έκφραση των ισοτύπων. Ακολούθως δείχτηκε ότι μια γλυκοπρωτεΐνη του φυτού *Tabacus nicotinius*, περιέχουσα πολυφαινόλες, διεγείρει την παραγωγή IL-4 από κύτταρα Th2 ζώων, γεγονός που ευρίσκεται σε συμφωνία με την αυξημένη δημιουργία IgE (Baum και συν. 1990, [517]). Στον ποντικό, η διαδερμική χορήγηση τρανσγλουταμινάσης του προστάτη, διεγείρει μια παρατεινόμενη απάντηση με ανοσοσφαιρίνες IgE (Francus και συν. 1983, [518]). Ο Schwartz και οι συνεργάτες του το 1982, [519] και κατόπιν οι Schwartz και Middleton το 1984 [520]) περιέγραψαν την δράση της κουερσετίνης και διαφόρων άλλων φλαβονοειδών τόσο επί της δημιουργίας κυτταροτοξικών λεμφοκυττάρων όσο και επί της εκτελεστικής ικανότητας ναυτών. Μερικά φλαβονοειδή αναστέλλουν κατά τρόπο δόσοεξαρτώμενο την δημιουργία κυτταροτοξικών λεμφοκυττάρων, σε μικτές καλλιέργειες σπληνικών κυττάρων και καταστέλλουν την κυτταροτοξική τους δραστηριότητα εναντίον

κυττάρων P815 μαστοκυττώματος ζώου, ως στόχων. Η προσθήκη ιόντων  $\text{Cu}^{2+}$  παρεμποδίζει την αναστολή που παρατηρείται από την προσθήκη μόνον ορισμένων φλαβονοειδών, αποδεικνύοντας ότι η χυλική δέσμευση κάποιων δισθενών ιόντων, όπως των ιόντων χαλκού, δεν ερμηνεύει την δράση όλων των φλαβονοειδών στα εν λόγω συστήματα. Ο Yamada και οι συνεργάτες του το 1989 [521] βρήκαν ότι το γλυκοζυλιωμένο φλαβονοειδές πλανταγοσίδιο (plantagoside) αναστέλλει *in vitro* την ανοσολογική ανταπόκριση των σπληνικών κυττάρων του ποντικού εναντίον ερυθροκυττάρων προβάτου κατά δόσοεξαρτώμενο τρόπο. Το πλανταγοσίδιο επίσης αναστέλλει την πολλαπλασιαστική απάντηση σπληνικών κυττάρων BALB/c την οποία προκαλεί η κονκαναβαλίνη A, αλλά δεν έχει δράση στην μιτογόνο δραστηριότητα του λιποπολυσακαχαρίτη (LPS) ή την αντίστοιχη της φυτοαιμαγλουτινίνης, δείχνοντας ότι τα δύο αυτά μιτογόνα χρησιμοποιούν μάλλον οδούς διέγερσης οι οποίες δεν είναι ευαίσθητες απέναντι στο συγκεκριμένο εξειδικευμένο φλαβονοειδές. Το πλανταγοσίδιο είναι ένας αναστολέας της α-μανοσιδάσης και είναι άξιο λόγου ότι ένας άλλος αναστολέας της μανοσιδάσης, γνωστός ως σβαϊνσονίνη, φαίνεται ότι αποκαθιστά την ανοσοποιητική λειτουργία σε ανοσοκατασταλμένους ποντικούς (Hino et al, 1985, [522], Kino et al, 1985, [523]). Το ανοσοφαρμακολογικό προφίλ ενός ξεχωριστού φλαβονοειδούς περιγράφηκε από τον Li και τους συνεργάτες του (1991, [524]). Η πολύπλοκη σχετικά φλαβονοειδής ένωση μπαοχουοσίδιο-1 (3,5,7-τριϋδροξυ-49-μεθοξυ-8-πρενυλφλαβόνη-3-O-α-L-ραμνοπυρανοσίδιο) καταστέλλει σημαντικά την χημειοταξία των ουδετερόφιλων λευκοκυττάρων του ανθρώπου, την λεμφοκυτταρική μεταμόρφωση μέσω μιτογόνων σε μικτές καλλιέργειες λεμφοκυττάρων, την κυτταροτοξική δραστηριότητα των φυσικών φονικών λεμφοκυττάρων (NK λεμφοκύτταρα), καθώς και την σύνθεση της ιντερλευκίνης-2 (Gibbon leukemic MLA-144 cell line). Η δράσεις αυτές είναι δόσοεξαρτώμενες και δεν έχουν σχέση με την άμεση κυτταροτοξικότητα της εν λόγω ουσίας. Μια άλλη μελέτη των βιολογικών ιδιοτήτων του εν λόγω φλαβονοειδούς, από τον Li και τους συνεργάτες του (1990, [525]) έδειξε ότι το μπαοχουοσίδιο έχει επίσης κυτταροτοξική και κυτταροστατική δράση σε έξι σειρές καρκινικών κυττάρων. Η κυτταροτοξική και κυτταροστατική δράση που παρατηρήθηκε στις έξι αυτές καρκινικές σειρές έδειξε αναστολή της σύνθεσης του DNA και του RNA, αλλά όχι αναστολή της πρωτεϊνικής σύνθεσης. Σε ποντικούς στους οποίους χορηγήθηκε μαυριτιανίνη και μυρικιτρίνη και οι οποίοι είχαν υποστεί καρκινογένεση δύο βημάτων (έναρξη με 7,12-διμεθυλ-βεζανθρακένιο και προαγωγή με TPA) οι βραδείς αντιδράσεις υπερευαίσθησίας στο δινιτροφθοριοβενζένιο, ήσαν

μειωμένες αλλά εκείνες στα ερυθροκύτταρα του προβάτου ήσαν φυσιολογικές (Takeuchi et al, 1986, [526], Yasukawa et al, 1990, [527]). Είναι πολύ ενδιαφέρον ότι οι δράσεις των φλαβονοειδών παραγώγων επί της επαγόμενης από το TPA φλεγμονής υπήρξαν έντονα παράλληλες προς τις ανασταλτικές δράσεις επί της προαγωγής του όγκου στους ποντικούς (Yasukawa et al, 1990, [527]). Ο Gerritsen και οι συνεργάτες του (1995, [528]) περιέγραψαν τις ανασταλτικές δράσεις της απιγενίνης στην βραδέως τύπου υπερευαισθησία στον ποντικό, όπως επίσης και στην ανάπτυξη οιδήματος της ουράς του επίμυος μέσω καρραγενάνης. Η σιλυμαρίνη αυξάνει σημαντικά την απάντηση των περιφερικών λεμφοκυττάρων του αίματος στην διέγερσή τους με κονκαναβαλίνη Α και φυτοαιμαγλουτινίνη Α, σε ασθενείς με αλκοολική κίρρωση του ήπατος. Η σιλυμαρίνη, από την άλλη πλευρά, μειώνει την εξαρτώμενη από αντισώματα κυτταρική κυταροτοξικότητα, μειώνει την δραστηριότητα των φυσικών φονικών λεμφοκυττάρων, ενώ μειώνει τα ποσοστά των κυττάρων T81 στο περιφερικό αίμα (Lang et al, 1988, [529]). Η εν λόγω ερευνητική ομάδα μελέτησε επίσης την δράση της σιλυμαρίνης στην δραστηριότητα της δισμουτάσης του υπεροξειδίου (SOD) στα ερυθροκύτταρα και στα λεμφοκύτταρα των ασθενών με ηπατική κίρρωση (Feher et al, 1986, [530]). Η δραστηριότητα της SOD αυξάνεται σημαντικά τόσο στα ερυθροκύτταρα, όσο και στα λεμφοκύτταρα των ασθενών κατόπιν *in vitro* έκθεσής τους στην σιλυμαρίνη, όπως επίσης και κατόπιν *per os* χορήγησης δόσης 210 mg ημερησίως της ουσίας αυτής. Οι McCabe και Orrenius (1993, [531]) αναφέρουν ότι η γενιστεΐνη προκαλεί απόπτωση σε έναν υποπληθυσμό ανθρώπινων θυμοκυττάρων (CD3<sub>2</sub>, CD4<sub>1</sub>, CD8<sub>1</sub>) ευαίσθητων στην επαγόμενη από γλυκοκορτικοειδή απόπτωση. Η ερμπιμυκίνη (herbimycin), ένας αναστολέας της PTK, ανάλογος με την γενιστεΐνη, αποτυγχάνει να επάγει απόπτωση στα εν λόγω κύτταρα, οδηγώντας τους μελετητές να συμπεράνουν ότι η ανασταλτική δράση της γενιστεΐνης επί της PTK δεν ευθύνεται για την αποπτωτική της δραστηριότητα. Μάλλον η δραστηριότητα της γενιστεΐνης ως ενός αναστολέα της τοποϊσομεράσης II, μπορεί να συνδέεται με την εκ μέρους της επαγωγή της απόπτωσης. Συνοψίζοντας όλα τα ανωτέρω εκτεθέντα δεδομένα καθίσταται φανερό ότι τα φλαβονοειδή μπορεί κατ' αρχάς να έχουν μια ανασταλτική δράση, όπως επίσης και σποραδικές διεγερτικές δράσεις επί των λειτουργιών των λεμφοκυττάρων T. Οι ανακαλύψεις αυτές απαιτούν περαιτέρω αποσαφηνίσεις, οι οποίες μπορούν να προκύψουν από τον εντοπισμό των διαφορετικών μηχανισμών δράσης, όπως π.χ από την ενσωμάτωση σε πρωτεΐνες, από την

αλληλεπίδραση με ενεργά κέντρα ή, τέλος, από τις αντιοξειδωτικές δράσεις των επιμέρους φλαβονοειδών μορίων.

### **2.5.2. Λεμφοκύτταρα B**

Η ενεργοποίηση των B λεμφοκυττάρων ξεκινά από την πρόσδεση ενός αντιγόνου στην μεμβρανική ανοσοσφαιρίνη J, η οποία αποτελεί και τον υποδοχέα των αντιγόνων για το λεμφοκύταρο B. Η πρόσδεση αποτελεί το σήμα για την ενεργοποίηση και ωρίμανση του λεμφοκυττάρου B, και ομοίως προς την ενεργοποίηση των λεμφοκυττάρων T, περιλαμβάνει την φωσφορυλίωση των υπολλειμμάτων του αμινοξέος τυροσίνης επί ειδικών πρωτεϊνών των εν λόγω λεμφοκυττάρων (Campbell and Sefton, 1990, [532], Gold et al, 1990, [533], Lane et al, 1991, [534], Yamanashi et al, 1991, [535]). Η συσσώρευση των B λεμφοκυττάρων που προκαλείται από προσδέτες II τάξεως του Μέγιστου Σύμπλοκου Ιστοσυμβατότητας (MHC) συνοδεύεται από φωσφορυλίωση των υπολλειμμάτων τυροσίνης (Fuleihan et al, 1992, [536]). Για την εξακρίβωση του ενδεχόμενου της σύζευξης της πρόσδεσης του αντιγόνου με την ενεργοποίηση της φωσφολιπάσης C και της κινητοποίησης των ιόντων  $Ca^{2+}$ , κατόπιν ενεργοποίησης της PTK, ο Cambier και οι συνεργάτες του (1991, [537]) εξέτασαν την ικανότητα των αναστολέων της PTK, γενιστεΐνης και ερμπιμυκίνης να αναστέλλουν την ενεργοποίηση των εν λόγω ανταποκρίσεων. Και οι δυο αυτοί αναστολείς περιόρισαν την I-εξαρτώμενη κινητοποίηση του  $Ca^{2+}$ , αλλά η χρησιμοποιηθείσα συγκέντρωση της γενιστεΐνης ήταν υψηλή (60 mg/ml). Ο Carter και οι συνεργάτες του (1991 β, [538]) έδειξαν επίσης ότι η γειστεΐνη αναστέλλει την αύξηση των επιπέδων του ελεύθερου ενδοκυττάρου ιονισμένου  $Ca^{2+}$ , και την δημιουργία τριφωσφορικής ινοσιτόλης μέσω της ενεργοποιημένης PLC σε κύτταρα που έχουν υποστεί ενεργοποίηση δια του συμπλέγματος CD19/CR2. Ο Cumella και οι συνεργάτες του (1987, [539]) βρήκαν ότι η κουερσετίνη, αλλά όχι η ταξιφολίνη (διϋδροκουερσετίνη), αναστέλλει την έκκριση ανοσοσφαιρινών των ισοτύπων IgG, IgM και IgA in vitro, με μια  $IC_{50}$  30 mM για κάθε ισότυπο. Σε μελέτες των προδρόμων των B λεμφοκυττάρων του ανθρώπου, ο Uckun και οι συνεργάτες του (1991<sup>a</sup>, [540]) βρήκαν ότι η κατάληψη του υποδοχέα της IL-7 με μια ανασυνδυασμένη ανθρώπινη IL-7 προκάλεσε φωσφορυλίωση της τυροσίνης σε ποικιλία από υποστρωματικές πρωτεΐνες, διέγερση του μεταβολισμού των φωσφατιδυλοϊνοσιτιδίων με αύξηση της σύνθεσης  $IP_3$  (ενεργοποίηση της PLC), όπως επίσης και σύνθεση του DNA. Η γενιστεΐνη μειώνει την δραστηριότητα της τυροσινικής κινάσης και την επακόλουθη αύξηση της παραγωγής  $IP_3$ . Αξιοσημείωτη

είναι η παρατήρηση ότι το ορθοβαναδικό νάτριο, που είναι αναστολέας της πρωτεϊνικής τυροσινικής φωσφατάσης, επιτρέπει την εξακολούθηση της φωσφορυλίωσης των πρωτεϊνικών τυροσινών κατόπιν έκθεσης των κυττάρων στην ιντερλευκίνη 7. Επίσης είναι αξιοσημείωτη η διαπίστωση ότι η κουερσετίνη δρά συνεργικά με το ορθοβαναδικό άλας ώστε να αυξήσει έντονα την έκταση της τυροσινικής φωσφορυλίωσης σε φυσιολογικούς ινοβλάστες εμβρύου όρνιθας, όπως επίσης και σε ινοβλάστες έμβρυων όρνιθας που υπέστησαν καρκινική εξαλλαγή μέσω του ιού του σαρκώματος του Rous (Van Wart – Hood et al, 1989, [372]).

Ένα παράδειγμα μιας φωσφορυλίωσης συντρέχουσας ταυτοχρόνως με μια αποφωσφορυλίωση καταδείχτηκε σε πειράματα που πραγματοποιήθηκαν από τον Carter και τους συνεργάτες του (1991<sup>a</sup>, [541]), οι οποίοι μελέτησαν την φωσφορυλίωση της τυροσίνης στην PLC-g σε λεμφοβλαστοειδή κύτταρα της σειράς L4B. Από τον χρόνο 0 έως το 30<sup>ο</sup> λεπτό υπήρξε μια σαφέστατη απόδειξη φωσφορυλίωσης την οποία ακολουθούσε αποφωσφορυλίωση διαφόρων κυτταρικών πρωτεϊνών. Οι ίδιοι ερευνητές μελέτησαν επίσης τους ανασταλείς της PTK γενιστεΐνη, τυρφοστίνη και ερμπιμυκίνη και διαπίστωσαν ότι η γενιστεΐνη αναστέλλει την αύξηση του κυτταροπλασματικού ελεύθερου ιονισμένου ασβεστίου στα B λεμφοκύτταρα, κατόπιν πρόσδεσης ανοσοσφαιρίνης IgM στην κυτταρική μεμβράνη, όπως επίσης παρατήρησαν και ενεργοποίηση της PLC, εξαρτώμενη από την PTK. Η ενεργοποίηση της οδού της PI αυξάνει την συγκέντρωση του ελεύθερου ιονισμένου ασβεστίου και συνακόλουθα τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, όπως παρατηρήθηκε από τον Lane και τους συνεργάτες του (1990, [542]). Σε μη κυτταροτοξικές συγκεντρώσεις η γενιστεΐνη αναστέλλει την ενεργοποίηση του ιού Epstein – Barr (EBV), όπως προσδιορίστηκε μέσω επαγωγής του EBV, δια του πρώιμου αντιγόνου (EA) αυτού και του πρώιμου BZF1 mRNA, καθώς και του πρωτεϊνικού προϊόντος αυτού ZEBRA στην κυτταρική σειρά Akata του λεμφώματος Burkitt, κατόπιν διέγερσης με το αντι- IgG (DAibata et al, 1990, [543]). Ο Okamoto και οι συνεργάτες του (1983, [544]) μελέτησαν την έκφραση του πρώιμου αντιγόνου του EBV σε μια σειρά λεμφοβλαστοειδών κυττάρων (κύτταρα Raji) τα οποία ήσαν φορείς του γονιδιώματος του ιού Epstein – Barr, καθώς επίσης και τις δράσεις μιας σειράς φλαβονοειδών ουσιών επί αυτών. Η κουερσετίνη και η ρετινόλη αναστέλλουν αποτελεσματικά την έκφραση του πρώιμου αντιγόνου του εν λόγω ιού, ενώ ένα συνθετικό φλαβονοειδές παράγωγο, η α-ναφθοφλαβόνη, εμφανίζει μια ασθενέστερη δράση. Διάφορα άλλα φυσικώς απαντώμενα φλαβονοειδή υπήρξαν μη δραστικά. Όπως περιγράφεται από τον Polke και τους συνεργάτες του (1986, [545]) και

λαμβάνοντας υπόψιν τις παρατηρήσεις του Trevillyan και των συνεργατών του (1990, [546]) επί λεμφοκυττάρων T, μερικά φλαβονοειδή αναστέλλουν την αυξημένη έκφραση των υποδοχέων της IL-2 και την έκκριση ανοσοσφαιρινών, που διεγείρονται από TPA σε ένα σύνολο υποσειρών αθανατοποιημένων, μέσω EBV, λεμφοκυττάρων B του ανθρώπου. Σε μελέτες της ενεργοποίησης, μέσω PAF, μιας σειράς ανθρώπινων λεμφοβλαστοειδών κυττάρων B, θετικών ως προς τον EBV, ο Kuruvilla και οι συνεργάτες του (1993, [547]) παρατήρησαν ότι η η γενιστεΐνη αναστέλλει την ενσωμάτωση ραδιενεργού φωσφόρου  $^{32}\text{P}$  στα φωσφορίνοσιτίδια και μειώνει την δημιουργία φωσφορικής ινοσιτόλης όπως επίσης και το ελεύθερο ιονισμένο ενδοκυττάριο ασβέστιο. Επιπροσθέτως η επαγωγή της έκφρασης του πρωτοογκογονιδίου c-Fos ελαττώνεται ουσιαστικά.

### **2.5.3. Φυσικά Φονικά Λεμφοκύτταρα (κύτταρα NK)**

Το φλαβονοξεικό οξύ (flavone acetic acid), ένα συνθετικό φλαβονοειδές, εκδηλώνει μια δόσοεξαρτώμενη *in vivo* αντικαρκινική δράση σε μερικά είδη συμπαγών όγκων του ποντικού. Το εν λόγω φλαβονοπαράγωγο αυξάνει την δραστηριότητα των NK λεμφοκυττάρων των πειραματοζώων κατά την διάρκεια της επαγωγής ιντερφερόνης (για μια σύνθεση των εν λόγω εργασιών: Hornung και συν., 1988<sup>a,b</sup>, [548, 549]). Σπληνικά κύτταρα προερχόμενα από ποντικούς στους, οποίους χορηγήθηκε φλαβονοξεικό οξύ εμφάνισαν ταχεία έκφραση του m-RNA της ιντερφερόνης-α (Hornung et al., 1988b, [549]). Ακόμη το φλαβονοξεικό οξύ εμφάνισε εκλεκτική δράση εφ' όσον δεν προκάλεσε αυξορύθμιση του σπληνικού mRNA για την ιντερλευκίνη-1 ή την ιντερλευκίνη-2, όπως επίσης και για την ιντερφερόνη-β, μετά την χορήγησή του (Mace 1990, [550]). Το φλαβονοξεικό οξύ επίσης επέδειξε αντικαρκινική δράση μέσω της ικανότητάς του να προκαλεί αποκλεισμό των αγγείων του όγκου. Η δράση του αυτή αποδόθηκε στην ταχεία επαγωγή TNF που προκλήθηκε από αυτό (Mahadevan et al., 1990, [551], Pratesi et al., 1990, [552]). Η προεπεξεργασία με αντισώματα αντι-TNF ελλάτωσε την συγκεκριμένη δράση του φλαβονοξεικού οξέος πάνω στην έκφραση του TNF. Σε μια βραχεία έκθεση ο Wleklík και οι συνεργάτες του [553] υπέδειξε ότι ποντικοί που λάμβαναν αμεντοφλαβόνη ή κουερσετίνη ανέπτυξαν μετρήσιμα επίπεδα ιντερφερόνης στον αιματικό ορό. Η αντικαρκινική (Verma et al, 1986, [554]) και αντική δράση (Selway, 1986, [555]) φυσικώς απαντώντων φλαβονοειδών μπορεί να αποδοθεί στην ανοσοτροποποιητική δράση των επαγόμενων ιντερφερονών μέσω της συνοδού αύξησης της λειτουργικότητας των NK λεμφοκυττάρων. Η κυτταροκτόνος ικανότητα των λεμφοκυττάρων NK εναντίον των ευαίσθητων στα NK

σειρών καρκινικών κυττάρων K562 και U937 συνοδεύεται από πρόωμη ενσωμάτωση ραδιενεργού φωσφόρου  $^{32}\text{P}$  στα φωσφωινιοσιτίδια (PI), υποδεικνύοντας ενεργοποίηση της φωσφολιπάσης C (Steele and Brahmi, 1988, [556]). Η κουερσετίνη (100 mM) αναστέλλει έντονα τον αυξημένο μεταβολισμό των PI όπως επίσης την ικανότητα θανάτωσης. Ο Ng και οι συνεργάτες του (1987, [557]) μελέτησαν την εξαρτώμενη από το ιονισμένο ασβέστιο κυτταροτοξική δραστηριότητα των λεμφοκυττάρων T και των λεμφοκυττάρων NK, χρησιμοποιώντας κουερσετίνη και ανταγωνιστές διαύλων ασβεστίου. Η κυτταρόλυση στα εν λόγω πειράματα ενεργοποιείται μέσω ταυτόχρονης διέγερσης με TPA και ιονοφόρο A23187, υποδεικνύοντας ότι στην όλη διαδικασία υπεισερχόταν η ενεργοποίηση της PKC. Η κουερσετίνη ανέστειλε την εξαρτώμενη από τα ιόντα ασβεστίου θανάτωση πιθανόν λόγω της ανασταλτικής δράσης της επί της PKC (Graziani et al, 1981, [371], Gschwendt et al, 1983, [374], Ferriola et al, 1989, [377]).

Εδώ ξανά τα φλαβονοειδή φαίνεται να εμφανίζουν αντιθετικές δράσεις. Ωστόσο, μια έμμεση διεγερτική δράση διαμεσολαβούμενη μέσω της σύνθεσης ιντερφερόνης πρέπει να διακρίνεται από μια δράση ανασταλτική επί της κυτταροτοξικής ικανότητας των λεμφοκυττάρων NK. Διαφορετικές συγκεντρώσεις φλαβονοειδών όπως επίσης και διαφορετικές συνθήκες μπορούν να εξηγήσουν τα φαινομενικώς αντίθετα αποτελέσματα. Γενικά πρέπει να σημειωθεί ότι ανάλογα φαινόμενα «παράδοξης δράσης» έχουν αναφερθεί για αντιοξειδωτικές ουσίες που χρησιμοποιήθηκαν ως αναστολείς της χημικής καρκινογένεσης σε μοντέλα καρκινογένεσης *in vivo* με την χρήση 3,4-βενζοπυρενίου, ως καρκινογόνου και ασκορβικού οξέος ως αντιοξειδωτικού (Καλλίστρατος και συνεργάτες 1984, [558]).

#### **2.5.4. Μαστοκύτταρα και βασεόφιλα**

Τα μαστοκύτταρα, ως γνωστόν, παίζουν έναν σπουδαίο ρόλο στην παθογένεση νόσων όπως το αλλεργικό άσθμα, η αλλεργική επιπεφυκίτιδα και ρινίτιδα, η ουρτικάρια, η αναφυλαξία και η συστηματική μαστοκυττάρωση. Επίσης τα μαστοκύτταρα παίζουν σημαντικό ρόλο και σε άλλες χρόνιες φλεγμονώδεις παθήσεις, όπως οι φλεγμονώδεις νόσοι του εντέρου και η ρευματοειδής αρθρίτιδα (Galli, 1993, [559], Theoharides, 1996, [560]). Τα μαστοκύτταρα μπορούν επίσης να συμμετάσχουν και σε άσηπτες φλεγμονώδεις καταστάσεις οι οποίες εκτραχύνονται από το stress, όπως είναι η ατοπική δερματίτιδα, η διάμεση κυστίτιδα, οι ημικρανίες,, το σύνδρομο του ευερέθιστου εντέρου, και τέλος η σκλήρυνση κατά πλάκας (Theoharides, 1996, [560]). Τα βασεόφιλα, τα οποία αποτελούν



το εν κυκλοφορία «ισοδύναμο» των ιστικών μαστοκυττάρων, θεωρούνται σήμερα ως σημαντικά κύτταρα στην παθογένεση αλλεργικών αντιδράσεων βραδείας φάσης (Lemanske and Kaliner, 1988, [561], Grand and Li, 1998, [562]). Ο πολλαπλασιασμός των μαστικών κυττάρων ρυθμίζεται σημαντικά από έναν παράγοντα βλαστικών κυττάρων, έναν προσδέτη για τον υποδοχέα του c-kit (Galli 1993, [563]). Προκαταρκτικές μελέτες που πραγματοποιήθηκαν εκ μέρους του Nagai και των συνεργατών του (1975, [564]) έδειξαν ότι η μπαϊκαλεΐνη και μερικά από τα παράγωγά της μπορεί να εμποδίσει τον πολλαπλασιασμό των μαστοκυττάρων. Ο Nagai και οι συνεργάτες του λίγο μετά (1995, [565]) έδειξαν ότι η γενιστεΐνη αναστέλλει την απελευθέρωση ισταμίνης από τα μαστικά κύτταρα περιτοναίου αρουραίου την προκαλούμενη από τον παράγοντα των βλαστικών κυττάρων. Σε προκαταρκτικά πειράματα ο Moss και οι συνεργάτες του (1950, [566]) περιέγραψαν αναστολή της αναφυλαξίας σε ινδικά χοιρίδια με την χορήγηση κατεχίνης. Η κουερσετίνη (μέσω διά στόματος χορήγησης) μπορεί ουσιαστικά να αναστείλει την ανάπτυξη βρογχόσπασμου σε ευαισθητοποιημένα ινδικά χοιρίδια τα οποία διεγείρονται μέσω αντιγόνου υπό την μορφή αεροζόλ (Dorsch et al, 1995, [567]). Επίσης διαπιστώθηκε ότι η σιβυλίνη μπορεί να αναστείλει την αναφυλακτική καταπληξία σε επίμυες ευαισθητοποιημένους με λευκωματίνη (Lecomte, 1992, [568]). Αμφότερα τα μαστοκύτταρα και τα βασεόφιλα κατέχουν υποδοχείς υψηλής συγγένειας για τις IgE ανοσοσφαιρίνες (FcεRI) στις εξωκυττάριας μεμβράνες τους. Η διασταυρωμένη δέσμευση αυτών των υποδοχέων είναι απαραίτητη για την πυροδότηση της έκκρισης της ισταμίνης και άλλων προσχηματισμένων διαβιβαστικών ουσιών οι οποίες ευρίσκονται έγκλειστες στα κοκκία των κυττάρων περί των οποίων μιλούμε, όπως επίσης και για τον de novo σχηματισμό διαβιβαστών φωσφολιπιδικής προελεύσεως (Galli, 1993, [569]). Έχει δειχθεί σε διάφορα κυτταρικά είδη ότι ποικίλα φλαβονοειδή είναι σε θέση να αναστείλουν αυτή την εκκριτική διεργασία (Middleton, 1986, [570]). Οι πρώτες καθοριστικές ενδείξεις της ασκούμενης από τα φλαβονοειδή ρύθμισης της έκκρισης καταγράφηκαν από τους Fewtrell και Gompers (1977<sup>a-b</sup> [571, 572]) σε μελέτες της έκκρισης ισταμίνης από μαστικά κύτταρα αρουραίων κατόπιν διέγερσης με αντιγόνα, μιτογόνα, ή με την ιονοφόρο δισθενών κατιόντων A23187. Ανάλογα αποτελέσματα επιτεύχθηκαν επί της απελευθέρωσης β-γλυκουρονιδάσης από διεγερμένα λευκοκύτταρα κονίκλου (Bennett et al, 1981, [573]). Η κουερσετίνη, η καμφερόλη και η μυρισετίνη βρέθηκε ότι αναστέλλουν την απελευθέρωση ισταμίνης από τα μαστικά κύτταρα των αρουραίων. Η φλορετίνη επίσης δείχτηκε ότι αποτελεί έναν αποτελεσματικό αναστολέα της απελευθέρωσης ισταμίνης (Grossman,

1988, [574]). Ο Middleton και οι συνεργάτες του (1981, 1982, [575, 576]) ανέλαβαν την εξέταση των δράσεων διαφόρων φυσικών απαντώντων φλαβονοειδών επί της έκκρισης ισταμίνης από βασεόφιλα λευκοκύτταρα του ανθρώπου. Η κουερσετίνη αναστέλλει την απελευθέρωση της ισταμίνης από βασεόφιλα λευκοκύτταρα ενεργοποιηθέντα από αντιγόνα (Middleton et al., 1981, [577]) με δόσοεξαρτώμενο αποτέλεσμα, ενώ η δράση της είναι ακαριαία. Η δράση αυτή δεν επηρεάζεται ιδιαίτερα από την εξωκυττάρια συγκέντρωση ιόντων ασβεστίου, ή από την χορήγηση θεοφυλίνης, υποδεικνύοντας ότι η εν λόγω αναστολή δεν αποτελεί μια διαδικασία εξαρτώμενη από το κυκλικό AMP. Μεταγενέστερα πειράματα αποκάλυψαν ότι η δράση του φλαβονοειδούς στην διαδικασία απελευθέρωσης ισταμίνης μέσω αντιγονικής διέγερσης σχετιζόταν κατά τρόπο κρίσιμο με την μοριακή δομή της συγκεκριμένης ουσίας (Middleton and Drzewiecki, 1982, [577]). Η ανασταλτική δραστηριότητα ήταν συνδεδεμένη με τα ακόλουθα δομικά χαρακτηριστικά: μια κετοομάδα στον άνθρακα 4, ένας ακόρεστος διπλός δεσμός στην θέση C2-C3, ένας γ-πυρονικός δακτύλιος, όπως επίσης και ένα κατάλληλο πρότυπο υδροξυλίωσης του δακτυλίου B. Τα χαρακτηριστικά αυτά είναι παρόμοια με εκείνα που αντιστοιχούν σε άλλες ανασταλτικές ιδιότητες. Τα γλυκοζυλιωμένα φλαβονοειδή ρουτίνη και ναρινγενίνη είναι αδρανή, όπως επίσης και οι φγλαβανόνες ταξιφολίνη και εσπερετίνη, που έχουν αναγμένο τον διπλό δεσμό στην θέση C2-C3. Η μορίνη, η κατεχίνη και η κυανιδίνη είναι και αυτές αδρανείς. Επίσης τα πολυμεθοξυλιωμένα παράγωγα όπως η νομπιλετίνη και η τανγκερίνη εμφανίζουν σαφώς χαμηλότερη ή μηδενική ανασταλτική δράση, στην απελευθέρωση ισταμίνης από τα βασεόφιλα τα διαγειρόμενα με κατάλληλα αντιγόνα, συγκρινόμενα με την ανασταλτική δραστηριότητά τους ως αναστολέων της ενεργοποίησης λεμφοκυττάρων εν γένει (Mookerjee et al, 1986, [578])

## ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

### ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

#### ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

*Δράσεις επιλεγμένων διατροφικών флаβονοειδών στην συσσώρευση αιμοπεταλίων ανθρώπου ex vivo και πλυμένων αιμοπεταλίων κουνελιού in vitro*

##### *3.1. Προπαρασκευή διαλυμάτων για τελική χρήση στο συσσωρευόμετρο*

Για την μελέτη των δράσεων των επιλεγμένων διατροφικών флаβονοειδών έγινε η ακόλουθη προπαρασκευή των διαλυμάτων αυτών:

Από κάθε флаβονοειδές (αναλυτικής καθαρότητας) γινόταν ζύγιση σε αναλυτικό ζυγό μιας ποσότητας αντιστοιχούσας στην συγκέντρωση των  $10^{-1}$  M, προσαρμοζόμενης σε όγκο διαλύτη 1 ml (δηλαδή η ποσότητα που θα περιεχόταν σε 1 ml διαλύματος της εκάστοτε ουσίας). Παρασκευάστηκαν και χρησιμοποιήθηκαν μια σειρά διαλυμάτων των флаβονοειδών με διαλύτες ελαφρώς αλκαλοποιημένο δισαπεσταγμένο ύδωρ, διμεθυλοσουλφοξείδιο (DMSO) και διαλύματα DMSO – ύδατος [(1:1, 1:2, θερμοκρασίας 37 – 45°C, ή θερμοκρασίας δωματίου (20 - 25°C)]. Τα διαλύματα αυτά ήταν συνήθως γραμμομοριακότητας  $10^{-1}$  –  $10^{-2}$  M. Από τα διαλύματα αυτά μικρές ποσότητες (λίγων μl) διαλύονταν σε τελικό όγκο 0,5 ml (PRP, στην κυψελίδα του συσσωρευομέτρου) και δοκιμαζόταν η δράση τους στα αιμοπετάλια. Οι ουσίες που δοκιμάστηκαν ήσαν η απιγενίνη, κουερσετίνη και γενιστεΐνη). Επίσης δοκιμάστηκαν η ναρινγενίνη και ναρινγίνη, καθώς και μερικά συμπυκνώματα ερυθρών οίνων της περιοχής μας με υψηλό περιεχόμενο σε флаβονοειδή.

### **3.2. Πειράματα συσσώρευσης αιμοπεταλίων ανθρώπου**

#### **3.2.1. Δότες και αιμοληψίες**

Για τα εν λόγω πειράματα χρησιμοποιήθηκαν 12 υγιείς εθελοντές (5 θήλεις και 7 άρρενες), ηλικίας 24 έως 48 ετών, μη καθ' ἑξίν καπνιστές, οι οποίοι απείχαν από την κατανάλωση οιοπνευματωδών ποτών τουλάχιστον επτά ημέρες προ εκάστης αιμοληψίας.

Επίσης οι εθελοντές απείχαν από την σταθερή ή περιστασιακή χρήση συμπληρωμάτων διατροφής ή φαρμάκων τουλάχιστον δύο εβδομάδες προ της αιμοληψίας.

Η αιμοληψία γινόταν από την μεσοβασιλική φλέβα του αντιβραχίου, ή από τις επιπολής φλέβες της ραχιαίας επιφάνειας της άκρας χειρός, με την χρήση πλαστικοποιημένου φλεβοκαθετήρα ή πεταλούδας, με ελεύθερα ροή και όχι διά αναρροφήσεως, ώστε τα αιμοπετάλια να μην υφίστανται stress ροής (shear stress) και ενεργοποιούνται.

Το αίμα συλλεγόταν σε δοκιμαστικούς σωλήνες νοσοκομειακής χρήσης, τυποποιημένους για την συλλογή αίματος προοριζόμενου για αιματολογικό έλεγχο και χωρητικότητας 5 κ.ε με την αντίστοιχη ποσότητα κιτρικών ως αντιπηκτικού (1 κ.ε διαλύματος κιτρικών 0,2 % ανά 9 κ.ε αίματος).

Σε αρχικά πειράματα χρησιμοποιήθηκαν επίσης δοκιμαστικοί σωλήνες από νεοπρένιο των 10 κ.ε με την αντίστοιχη ποσότητα του ίδιου αντιπηκτικού διαλύματος.

#### **3.2.2. Παρασκευή των αιμοπεταλίων [προπαρασκευή Πλούσιου σε Αιμοπετάλια Πλάσματος (PRP) και Πτωχού σε Αιμοπετάλια Πλάσματος (PPP)]**

Αμέσως μετά την αιμοληψία το αίμα αναδευόταν ήπια, ώστε να γίνει πλήρης ανάμιξή του με το αντιπηκτικό και αφού αφηνόταν πέντε έως 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου, ετίθετο κατόπιν σε φυγοκέντρηση στις 1000 στροφές ανά λεπτό, πάντα με την ίδια φυγόκεντρο, επί 10 min.

Μερικές φορές γινόταν συνέχιση της φυγοκέντρησης ώστε να υπάρξει πλήρης διαχωρισμός του πλούσιου σε αιμοπετάλια πλάσματος (PRP) από την στοιβάδα των ερυθροκυττάρων και την λεπτή στοιβάδα των λευκοκυττάρων (Buffy coat).

Κατόπιν γινόταν επιμελής αναρρόφηση του Πλούσιου σε Αιμοπετάλια Πλάσματος (PRP) μέχρι 2 – 4 mm πάνω από την γραμμή διαχωρισμού των ερυθροκυττάρων, ώστε να μην αναρροφηθούν και λευκοκύτταρα, των οποίων η παρουσία, ως γνωστόν, παραλλάσσει την αιμοπεταλιακή λειτουργικότητα.

Το λαμβανόμενο PRP ετίθετο σε πλαστικό αποστειρωμένο σωλήνα, ο οποίος πωματιζόταν και τοποθετούταν κάθετος σε στατώ εντός υδατόλουτρου θερμοκρασίας 37° C, μέχρι την δοκιμασία των αιμοπεταλίων, η οποία άρχιζε όχι αργότερα από 20 έως 30 min μετά την λήψη του αίματος.

Συνήθως δεν γινόταν αιμοληψίες μεγαλύτερες των 15 – 20 κ.ε ώστε η παραμονή των αιμοπεταλίων εκτός σώματος να μην υπερβεί τις 2 έως 3 ώρες και υποστούν αλλοιώσεις οι λειτουργικές τους αντιδράσεις.

Μετά την παραλαβή του PRP, το εναπομείναν δείγμα αίματος, ετέθη εκ νέου σε φυγοκέντρηση στις 3100 στροφές ανά λεπτό επί 20 min, ώστε να γίνει ολοκληρωτική κατακρήμνιση και των υπολοίπων εν αιωρήσει αιμοπεταλίων, και να προκύψει το Πτωχό σε Αιμοπετάλια Πλάσμα (PPP), το οποίο είναι απαραίτητο για την ρύθμιση του σημείου του άνω άκρου του διαγράμματος συσσώρευσης, στο συσσωρευόμετρο.

### ***3.2.3. Περιγραφή του συσσωρευόμετρου και της μεθόδου μελέτης των αιμοπεταλιακών αντιδράσεων ex vivo και in vitro***

Η συσσωρευομετρία αποτελεί μια ενόργανη (instrumental) μέθοδο για την ακριβή ποσοτική και ποιοτική μελέτη των τριών κυρίων αιμοπεταλιακών αντιδράσεων. Η μέθοδος αυτή επινοήθηκε στις αρχές της δεκαετίας του 1960 από (Lynch's: Medical Laboratory Technology. Italian Ed. Stanley S. Raphael.: “Tecniche di Laboratorio di Lynch”, trad. e pres. Prof. Angelo Burlina. Cap.42, Alterazioni dell' Emostasi. Cap.43, Metodiche per l' esame dei difetti dell' Emostasi, pp 1198 – 1267, Piccin editore Padova, 1983, Italia.) και έκτοτε χρησιμοποιείται ευρύτατα για τον έλεγχο ρουτίνας των αιμοπεταλιακών αντιδράσεων, όπως επίσης και για ερευνητικές εφαρμογές αφορούσες την τροποποίηση της αιμοπεταλιακής λειτουργίας σε διάφορες κλινικές καταστάσεις (π.χ θρομβασθένειες ή θρομβοφιλίες) ή για την δοκιμή της δράσης παραγόντων με τροποποιητικές ιδιότητες επί των αιμοπεταλιακών λειτουργιών (αναστολείς ενζύμων, ουσίες με ανασταλτικές ή διεγερτικές ιδιότητες, αναστολείς υποδοχέων κ.α).

Το συσσωρευόμετρο (aggregometer) περιλαμβάνει το κύριο όργανο το οποίο περιέχει μια ενσωματωμένη λυχνία λευκού φωτός σταθερής έντασης και δέσμης παράλληλης. Είναι φανερό ότι, με τις κατάλληλες τροποποιήσεις, δηλαδή με την χρήση μονοχρωμάτορα, είναι δυνατόν να επιλέξει κανείς οποιοδήποτε μήκος κύματος του ορατού φωτός ή της ακτινοβολίας UV, στο βαθμό που υπάρχει μια αντίστοιχη μελετητική αναγκαιότητα. Η λευκή λυχνία εκπέμπει μέσω μιας κυκλικής θυρίδας διαμέτρου 1 cm στο εσωτερικό ενός

κυλινδρικού φρεατίου, το οποίο αποτελεί και την σχισμή του οργάνου. Η απόσταση από την έξοδο του φωτός μέχρι το απέναντι σημείο του φρεατίου είναι 0,5 cm. Στην απέναντι της φωτεινής εξόδου της λυχνίας πλευρά του φρεατίου είναι εγκατεστημένο ένα φωτοκύτταρο το οποίο είναι κατάλληλα διαμορφωμένο ώστε να διακρίνει αναλογικά όλες τις διαβαθμίσεις της έντασης του φωτός και να τις μετατρέπει σε ηλεκτρικό σήμα.

Τα ούτω διαμορφούμενα ηλεκτρικά σήματα ενεργοποιούν έναν πλωτήρα ο οποίος καταγράφει τις φωτεινές διακυμάνσεις που λαμβάνουν χώρα στο εσωτερικό της κυψελίδας της περιέχουσας τα αιμοπετάλια και προφανώς καταγράφει τον βαθμό διαφάνειας (θολερότητα) του αιμοπεταλιακού εναιωρήματος.

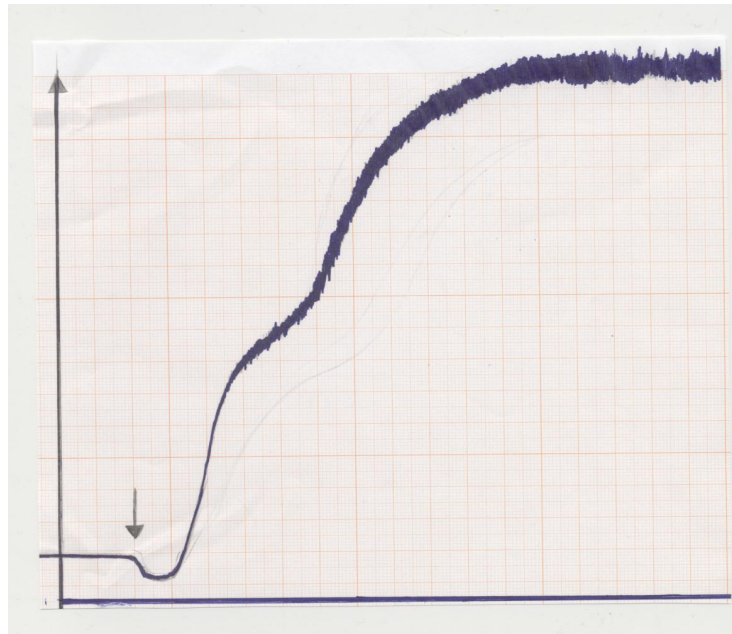
Ακριβώς κάτω από το δάπεδο του πυθμένα του φρεατίου, που αντιπροσωπεύει την σχισμή της συσκευής, είναι τοποθετημένος ένας ηλεκτρικός τροχίσκος, ο οποίος περιέχει πυκνές ακτίνες από σιδηρομαγνητικό υλικό. Η ταχύτητα περιστροφής του τροχίσκου ρυθμίζεται εξωτερικά από κατάλληλο κοχλία, τοποθετημένου στον πίνακα ελέγχου της συσκευής, σε ένα εύρος στροφών από 0 έως 3000 rpm [rpm = rotations per minutes, στροφές ανά λεπτό (0, 50, 100, 500, 1000, 1500, 2000, 2500, 3000 rpm)].

Στην σχισμή του οργάνου τοποθετούμε την κυψελίδα με 450 μl αιμοπεταλιακού εναιωρήματος και θέτουμε εντός της κυψελίδας μικρό πλαστικοποιημένο μαγνήτη, ικανό να περιστρέφεται ακωλύτως στο εσωτερικό της, και ρυθμίζουμε την ταχύτητα περιστροφής του μαγνήτη - και συνεπώς του PRP- στις 1500 rpm, ανάβοντας ταυτόχρονα την λυχνία της συσκευής. Επειδή τα εν αιωρήσει αιμοπετάλια σκεδάζουν το φως, δημιουργείται το λεγόμενο φαινόμενο Tyndal, οπότε το σύνολο του PRP εμφανίζει μια χαρακτηριστική λευκωπή θολερότητα. Το αισθητήριο φωτοκύτταρο καταγράφει την οπτική διαπερατότητα του διαλύματος, δίνοντας ταυτόχρονα και το χαμηλότερο σημείο της καταγραφής, δηλαδή το σημείο με την ένδειξη 0 στον βαθμονομημένο καταγραφικό χάρτη. Κατόπιν εξάγουμε από την σχισμή της συσκευής την κυψελίδα με το PRP και θέτουμε εντός της σχισμής μια νέα κυψελίδα η οποία περιέχει το Πτωχό σε Αιμοπετάλια Πλάσμα (PPP), το οποίο, επειδή ακριβώς δεν περιέχει καθόλου αιμοπετάλια, αφήνει το λευκό φως να διέλθει ακωλύτως δια της μάζας του πλάσματος και να καταγραφεί από τον αισθητήρα. Σε αυτή την περίπτωση η γραφίδα του καταγραφέα ανέρχεται στην ένδειξη 100 του βαθμονομημένου χάρτη. Το σημείο μηδέν αντιστοιχεί λοιπόν σε αιμοπετάλια τα οποία είναι απολύτως διαχωρισμένα (δηλαδή έχουν 0% συσσώρευση), ενώ το σημείο 100 αντιστοιχεί σε αιμοπετάλια τα οποία έχουν εξ ολοκλήρου συσσωρευτεί μεταξύ τους,

σχηματίζοντας μικρότερους ή μεγαλύτερους λευκούς θρόμβους (δηλαδή συσώρευση 100% του συνόλου των αιμοπεταλίων).

#### **3.2.4. Τυπικά χαρακτηριστικά των φυσιολογικών συσσωρευογραφήματων**

Από την στιγμή που θα χορηγηθεί ένας τυπικός αγωνιστής στα περιδινούμενα αιμοπετάλια του PRP αυτά αρχίζουν να δίνουν τις χαρακτηριστικές αντιδράσεις που αντιπροσωπεύουν τα διαδοχικά στάδια της ενεργοποίησής τους, όπως φαίνεται στην εικόνα που ακολουθεί:

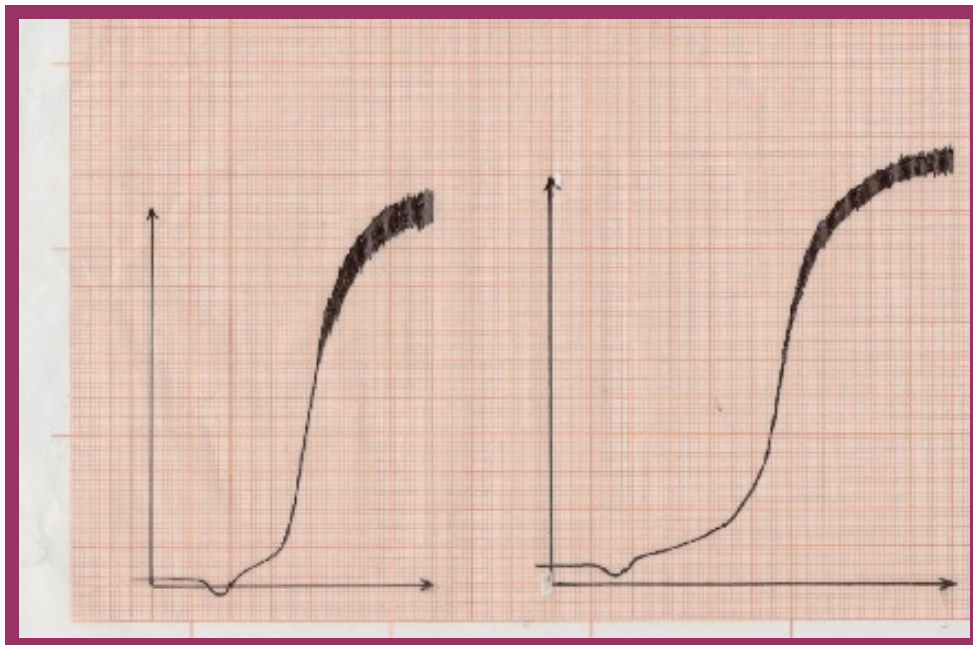


**Εικόνα 1. Συσσωρευογράφημα 1**

1<sup>ο</sup>) Η πρώτη λειτουργική αντίδραση – η αλλαγή σχήματος – φαίνεται στην περιοχή Α του ανωτέρω συσσωρευογραφήματος, με την χαρακτηριστική εικόνα μιας μικρής ημικυκλικής ταπείνωσης του γραφήματος. Η μικρή αυτή ταπείνωση αντιστοιχεί στην αύξηση της οπτικής απορρόφησης του κυτταρικού εναιωρήματος, καθώς τα διογκούμενα αιμοπετάλια προβάλλουν μεγαλύτερη δυσχέρεια στην διέλευση του φωτός, καταλαμβάνοντας περισσότερο χώρο και μειώνοντας τις κενές μεταξύ των αιμοπεταλίων αποστάσεις. Αν το ερέθισμα που χορηγήθηκε είναι πολύ μικρό (υποκατώφλιο), η αλλαγή σχήματος παρέρχεται και η γραμμή που αντιστοιχεί στην θολερότητα του εναιωρήματος επιστρέφει από την αρνητική της τιμή στην τιμή 0.

2<sup>ον</sup>) Αν το ερέθισμα (ποσότητα αγωνιστή) υπερβαίνει την οδό διέγερσης των αιμοπεταλίων αλλά είναι ακόμη μικρό, τότε σε μικρή απόσταση από την αλλαγή σχήματος, η γραμμή αποτύπωσης της θολερότητας αρχίζει να λαμβάνει ανοδική κατεύθυνση και ανέρχεται μέχρι ενός σημείου, μετά από το οποίο κάμπτεται και επιστρέφει σε ένα σημείο περιεχόμενο μεταξύ του μηδενός και του 5 έως 20%. Η περιοχή της ανοδικής καμπύλης αποτελεί το λεγόμενο κύμα α της αιμοπεταλιακής συσσώρευσης. Στην περίπτωση αυτή έχουμε το φαινόμενο της αντιστρεπτής αιμοπεταλιακής συσσώρευσης. Αν λάβουμε το PRP και το ελέγξουμε στο μικροσκόπιο θα παρατηρήσουμε ότι η πλειονότητα των αιμοπεταλίων παραμένει διαχωρισμένη, ενώ ένας αριθμός τους έχει συγκροτήσει συσσωματώματα αποτελούμενα από μικρούς αριθμούς συγκολλημένων αιμοπεταλιακών κυττάρων.

3<sup>ον</sup>) Αν η ποσότητα του χρησιμοποιούμενου διεγέρτη είναι επαρκής ώστε να καταλάβει όλους τους εξειδικευμένους της υποδοχείς τότε η αιμοπεταλιακή διέγερση γίνεται μέγιστη και περνά από όλα τα διαδοχικά στάδια αυτής: αλλαγή σχήματος, α κύμα συσσώρευσης, αντίδραση έκλυσης του περιεχομένου των κοκκίων και β κύμα συσσώρευσης (συσσωρευογράφημα αρ. 3, εικόνα τάδε).



**Εικόνα αρ. 2. Συσσωρευογραφήματα με PAF και ADP**



Στην περίπτωση που εικονίζεται στην καταγραφή 3, διακρίνουμε την ύπαρξη των δύο κυμάτων συσσώρευσης, όπως σε άλλες περιπτώσεις, όπου τα φαινόμενα έχουν μεγάλη ταχύτητα τα δύο κύματα συντήκονται και σχηματίζουν μια ενιαία σιγμοειδή γραμμή.

Τα αιμοπετάλια στην τελευταία αυτή περίπτωση είναι όλα συνδεδεμένα μεταξύ τους και η συσσώρευσή τους δεν είναι πλέον αντιστρέψιμη, πράγμα το οποίο καταδεικνύεται από την σταθερότητα της γραμμής συσσώρευσης που αντιστοιχεί στην πολύ μικρή θολερότητα του Πτωχού σε Αιμοπετάλια Πλάσματος (PPP, plasma poor platelets). Δεν έχει νόημα να χορηγούμε στα αιμοπεταλιακά εναιωρήματα μεγαλύτερες ποσότητες ενός αγωνιστή από την συγκεκριμένη ποσότητα του που προκαλεί την μέγιστη αιμοπεταλιακή συσσώρευση, καθόσον η προσθήκη μεγαλύτερων ποσοτήτων δεν μεταφράζεται σε αύξηση του ύψους της συσσώρευσης. Στην εν λόγω περίπτωση όλοι οι υποδοχείς του εν λόγω αγωνιστή έχουν καταληφθεί και η προσθήκη άλλων ποσοτήτων εξ αυτού δεν μεταβάλλει το καθεστώς της κατάληψης των υποδοχέων ανοδικά.

4<sup>ov</sup>) Πέραν των ανωτέρω αναφερθέντων, πολύ μεγάλο ρόλο παίζουν και οι ταχύτητες με τις οποίες σχηματίζονται οι αιμοπεταλιακοί θρόμβοι. Στην περίπτωση που η ταχύτητα δημιουργίας των συσσωματωμάτων είναι υψηλή, τότε η κλίση της γραμμής συσσώρευσης (γωνία που προκύπτει από τον άξονα του χρόνου και της εφαιπτόμενης προς την γραμμή συσσώρευσης στην αρχή αυτής) είναι μεγάλη. Οι εν λόγω συσσωρεύσεις είναι απότομες και ανέρχονται στην περιοχή του οροπεδίου (plateau) μέσα σε μικρό χρόνο από την στιγμή τη χορήγησης του αγωνιστή. Στην περίπτωση αυτή ο αγωνιστής είναι ισχυρός (ή εναλλακτικά η ποσότητά του είναι μεγάλη). Αν, αντιθέτως τα αιμοπετάλια αργούν να συσσωρευτούν τότε η γραμμή της συσσώρευσης καθυστερεί αρκετά στο να φθάσει στην περιοχή της μέγιστης συσσώρευσης (περιοχή οροπεδίου).

5<sup>ov</sup>) Το μέγεθος των θρόμβων είναι χρήσιμο στοιχείο για την εκτίμηση της αιμοπεταλιακής συσσώρευσης.

Το μέγεθος των θρόμβων μπορεί να εκτιμηθεί από τις διαστάσεις της ταλάντωσης του γραφήματος γύρω από την λεγόμενη μέση γραμμή συσσώρευσης.

Η μελέτη των συσσωρευογραφήματων δείχνει ότι αυτά αποτελούνται από μια γραμμή η οποία μπορεί να είναι συνεχής και χωρίς μικρές ταλαντώσεις, αλλά μπορεί να παρουσιάζει και ταλαντώσεις αξιόλογου εύρους, οι οποίες δίνουν στην γραμμή του συσσωρευογραφήματος μια πριονωτή εικόνα.

Όσο μεγαλύτεροι είναι οι λευκοί αιμοπεταλιακοί θρόμβοι τόσο μεγαλύτερο είναι το εύρος της πριονωτής γραμμής.

Για παράδειγμα, οι λευκοί θρόμβοι που σχηματίζονται εκ μέρους της ριστοσετίνης είναι ευμεγέθεις, πράγμα το οποίο αντικατοπτρίζεται στο πολύ μεγάλο εύρος της πριονωτής γραμμής του συσσωρευογραφήματος.

Επίσης οι ευμεγέθεις θρόμβοι της προκαλούμενης από την ριστοσετίνη συσσώρευσης είναι και πολυπληθείς οπότε οι διαδοχικές οδοντώσεις του συσσωρευογραφήματος είναι ιδιαιτέρως πυκνές.

Αντίθετα στην συσσώρευση που εισάγεται από το ADP ή το αραχιδονικό οξύ η οδόντωση του γραφήματος είναι πολύ μικρή ή λείπει εντελώς.

Πέραν της πυκνότητας και του ύψους της οδόντωσης της γραμμής του συσσωρευογραφήματος, ο πειραματιστής μπορεί να έχει μια άμεση εικόνα του μεγέθους των θρόμβων μέσω ενός παραθύρου που είναι ενσωματωμένο στην σχισμή του οργάνου και βλέπει ακριβώς στο εσωτερικό της κυψελίδας.

Οι μεγαλύτεροι λευκοί θρόμβοι είναι ορατοί δια γυμνού οφθαλμού ενώ οι μικρότεροι χρειάζονται την χρήση του στερεοσκοπίου ή του μικροσκοπίου για να υπολογιστεί η μέση τους διάμετρος και οι αριθμοί των αιμοπεταλίων που περιέχουν, υπό τον όρο ότι δεν έχει ακόμη συμβεί η τήξη των μεμβρανών τους.

Οι λευκοί θρόμβοι του συσσωρευομέτρου μπορούν να μονιμοποιηθούν σε φορμαλδεΰδη ή γλουταραλδεΰδη ώστε να μελετηθούν στις βαθύτερες λεπτομέρειές τους στο οπτικό ή στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο αντιστοίχως.

### ***3.2.5. Μεταβολές της εικόνας των συσσωρευογραφήματων κατόπιν της χρήσης αναστολέων της αιμοπεταλιακής συσσώρευσης***

Όταν χορηγούμε μια ουσία η οποία έχει ιδιότητες αναστολέα της αιμοπεταλιακής συσσώρευσης, η δράση της αντικατοπτρίζεται άμεσα στα χαρακτηριστικά του συσσωρευογραφήματος των αιμοπεταλίων.

Οι μεταβολές των χαρακτηριστικών αυτών είναι, επί τροχάδην, οι ακόλουθες:

1<sup>ov</sup>) Αν η ουσία τεθεί σε μικρές ποσότητες που δεν επαρκούν να επιφέρουν πλήρη αναστολή των αιμοπεταλίων τότε το κύμα της συσσώρευσης είναι πιο χαμηλό από το κύμα συσσώρευσης ελέγχου (εικόνα αρ.4, καμπύλη 2, σελ.272). Η προσθήκη ακόμη μεγαλύτερης ποσότητας αναστολέα επιφέρει ακόμη μεγαλύτερη πτώση του ύψους του

συσσώρευογραφήματος (εικόνα αρ.4, καμπύλη 3, σελ.272). Τέλος αν αυξήσουμε την προσθήκη της ουσίας πέραν ενός ορίου, κάποια στιγμή η χορήγηση του αγωνιστή δεν θα προκαλεί καθόλου συσσώρευση (εικόνα αρ.4, καμπύλη 4, σελ. 272). Η συγκέντρωση αναστολέα η οποία προκαλεί μείωση του ύψους της συσσώρευσης κατά 50 % ονομάζεται «συγκέντρωση ημιαναστολής» ( Inhibiting Concentration 50% ή συντομογραφικά IC<sub>50</sub> ). Η ελάχιστη δόση που προκαλεί πλήρη αναστολή (αναστολή100%) της αιμοπεταλιακής συσσώρευσης ονομάζεται Ελάχιστη Συγκέντρωση Πλήρους Αναστολής (minimal inhibiting concentration 100% ή συντομογραφικά MIC<sub>100%</sub>). Η αύξηση της συγκέντρωσης ενός αιμοπεταλιακού αναστολέα πέραν της ελάχιστης συγκέντρωσης αυτού που προκαλεί 100% αναστολή δεν έχει έννοια να προστίθεται, εκτός αν η κατανάλωσή της στο διάλυμα επαναφέρει την αιμοπεταλιακή λειτουργικότητα.

Στον εν λόγω τύπο δοκιμής ο προς μελέτη αναστολέας χορηγείται στο PRP ένα μικρό χρονικό διάστημα πριν την χορήγηση του αγωνιστή. Φυσικά υπάρχουν ποικίλες παραλλαγές της χορήγησης του αναστολέα. Π. χ μπορεί να χορηγηθεί σε μεγαλύτερη χρονική απόσταση από την στιγμή χορήγησης του αγωνιστή ή τα αιμοπετάλια να επωαστούν επί μακρόν με διάφορες συγκεντρώσεις αυτού. Επίσης ο αναστολέας μπορεί να χορηγηθεί και ως εξής:

A) Ταυτοχρόνως με τον αγωνιστή.

B) Αμέσως μετά τον αγωνιστή.

Γ) Στο μέσον του 1<sup>ου</sup> κύματος συσσώρευσης.

Δ) Στο σημείο μεταξύ 1<sup>ου</sup> και 2<sup>ου</sup> κύματος συσσώρευσης.

E) Την στιγμή που το κύμα ανέρχεται στο υψηλότερο σημείο συσσώρευσης πριν την έναρξη του οροπεδίου.

ΣΤ) Μετά την επίτευξη του οροπεδίου (σε διαφορετικούς χρόνους από 1 έως 30 min), για την περίπτωση ελέγχου της ενδεχόμενης θρομβολυτικής ικανότητας μιας ουσίας.

2<sup>ον</sup>) Άλλου τύπου μεταβολές με χαρακτήρα αναστολής είναι οι εξής:

α) Υπάρχουν συσσωρευογραφήματα ενός χαρακτηριστικού τύπου στα οποία η συσσώρευση καθυστερεί μεν αλλά τελικά επιτυγχάνεται. Συνεπώς εδώ ο χρόνος μέσα στον οποίο επιτελείται επιμηκύνεται πάρα πολύ. Η μείωση της γωνίας που σχηματίζεται μεταξύ της εφαπτομένης και της γραμμής συσσώρευσης στην εκθετική φάση αυτής, αποτελεί ένα ποσοτικό στοιχείο αναστολής πολύ σημαντικό, το οποίο μπορεί να συνδυαστεί με την διάρκεια του χρόνου συσσώρευσης, παράμετροι που χρησιμοποιείται για την εκτίμηση της δράσης ορισμένων ανασταλτικών παραγόντων. Ο εν λόγω τύπος συσσώρευσης λαμβάνει χώρα υπό την σταθερή μερική καταστολή ή επιβράδυνση της λειτουργίας ενός ενζύμου. Η αύξηση της δόσης του αναστολέα επιτυγχάνει τελικά πλήρη αναστολή της αιμοπεταλιακής συσσώρευσης.

β) Επίσης υπάρχουν συσσωρευογραφήματα στα οποία χορηγείται ένας αναστολέας που αναστέλλει μόνον ένα ενδιάμεσο βήμα της συνολικής πορείας συσσώρευσης. Συνεπώς η πορεία της συσσώρευσης θα προχωρήσει μέχρι εκείνου του σημείου στο οποίο ευρίσκεται το αποκλεισμένο βήμα και κατόπιν θα σταματήσει. Αυτή είναι η περίπτωση όλων των λεγομένων αντιστρέψιμων συσσωρεύσεων λόγω αναστολής της αντίδρασης έκλυσης του περιεχομένου των αιμοπεταλιακών κοκκίων. Επί παραδείγματι, η χορήγηση δι-ιωδιοξεικού οξέος σε πλυμένα αιμοπετάλια κονίκλου *in vitro* ή αιμοπετάλια ανθρώπου *ex vivo* και εν συνεχεία η ενεργοποίησή τους μέσω ενός τυπικού αγωνιστή έχει σαν αποτέλεσμα την αντιστρεπτή συσσώρευση των αιμοπεταλίων εξ αιτίας του εμποδισμού της αντίδρασης έκλυσης του περιεχομένου των κοκκίων, που μεγιστοποιεί την συσσώρευση και την καθιστά μη αντιστρεπτή.

γ) Η χορήγηση ενός αναστολέα μετά την επίτευξη μέγιστης συσσώρευσης (φάση του οροπεδίου) και η επίτευξη αποσυσσώρευσης των αιμοπεταλίων δηλώνει την εισαγωγή μιας θρομβολυτικής διεργασίας.

Τα ανωτέρω δεδομένα χρησιμοποιούνται για την μελέτη των συσσωρευογραφημάτων και για την εκτίμηση του επιπέδου αναστολής, του αιμοπεταλιακού υποσυστήματος που θίγεται από αυτήν, όπως επίσης και της ισχύος ενός υπό μελέτη αναστολέα των αιμοπεταλιακών αντιδράσεων.

### **3.2.6. Εκτέλεση των πειραμάτων αναστολής των αιμοπεταλιακών αντιδράσεων**

Μετά την προπαρασκευή των PRP και PPP, καθώς και την ρύθμιση των σημείων μηδενικής συσσώρευσης και μέγιστης συσσώρευσης χρησιμοποιούσαμε 450 μl PRP τα οποία θέταμε εντός κυψελίδας χωρητικότητας 500 μl, στο εσωτερικό της οποίας είχε προστεθεί μικρός πλαστικοποιημένος μαγνήτης για την ανάδευση των αιμοπεταλίων στις 1500 rpm.

Κατόπιν η κυψελίδα ετίθετο στην σχισμή του οργάνου, γινόταν προσθήκη του αγωνιστή και ακολουθούσε η συσσώρευση, η διάρκεια παρακολούθησης της οποίας ήταν 15 λεπτά. Με τον τρόπο αυτό ελεγχόταν η δράση των τριών αντιπροσωπευτικών αγωνιστών (ADP, PAF, Αραχιδονικό Οξύ) των τριών ομωνύμων οδών της αιμοπεταλιακής συσσώρευσης.

Τα προκύπτοντα συσσωρευογράφημα αποτελούσαν και τους ελέγχους των μετέπειτα δοκιμών. Κατόπιν παρασκευαζόταν 6 κυψελίδες με 450 μl PRP εκάστη, των οποίων τα στόμια καλυπτόταν με ένα στρώμα μεμβράνης πλαστικοποιημένης κυτταρίνης (parafilm), ώστε να μην εισέρχονται εις το εσωτερικό τους αιωρούμενα σωματίδια ή μικροοργανισμοί, και οι έξι αυτές κυψελίδες ετίθεντο σε ισάριθμα μεταλλικά φρεάτια σταθερής θερμοκρασίας 37 ° C.

Κάθε μία από τις παρασκευασθείσες κυψελίδες ετίθετο στην σχισμή του συσσωρευομέτρου, προστίθετο ο μαγνήτης, καθώς και μια δεδομένη ποσότητα ουσίας υπό δοκιμήν, παρασκευασμένη σύμφωνα με όσα αναφέραμε ανωτέρω. Μετά από ολιγόλεπτη επώαση χορηγείτο ο επιλεγείς αγωνιστής και λαμβανόταν το συσσωρευογράφημα επί 15 λεπτά.

Εν συνεχεία προχωρούσαμε στην 2<sup>η</sup> κυψελίδα ακολουθώντας την ίδια διαδικασία αλλά χορηγώντας διπλάσια ποσότητα εκχυλίσματος των φυτών.

Η ίδια διαδικασία επαναλαμβανόταν μέχρι του προσδιορισμού της ποσότητας εκχυλίσματος που έδινε 50% αναστολής της συσσώρευσης, όπως επίσης και του προσδιορισμού της ελάχιστης ποσότητας εκχυλίσματος που προκαλούσε 100% αναστολή.

Γινόταν επανέλεγχος της αιμοπεταλιακής λειτουργικότητας με τρεις εκ νέου ελέγχους της συσσωρευτικής ικανότητας των αιμοπεταλίων (με την προσθήκη των ιδίων βασικών αγωνιστών ADP, PAF, Αραχιδονικό Οξύ) και εφ' όσον τα αιμοπετάλια ήσαν πλήρως λειτουργικά, προχωρούσαμε σε νέα εξάδα δοκιμών όπου χρησιμοποιούσαμε τον δεύτερο αγωνιστή και τις ίδιες δόσεις εκχυλίσματος προκειμένου να δούμε αν υπήρχε ή όχι ισότιμη αναστολή εν συγκρίσει προς τον πρώτο αγωνιστή.

Οι δοκιμές συνεχιζόταν έως ότου προσδιοριστούν η IC<sub>50</sub> και η ελάχιστη συγκέντρωση του εκχυλίσματος, που εισήγαγε πλήρη αναστολή (100%).

Μετά γινόταν επίσης επανέλεγχος της αιμοπεταλιακής λειτουργικότητας κατά τα γνωστά προαναφερθέντα και αν τα αιμοπετάλια ήσαν ξανά λειτουργικά, συνεχίσαμε την μελέτη της δράσης του εκχυλίσματος στην αιμοπεταλιακή συσσώρευση που εισήγαγε ο τρίτος αγωνιστής.

Τα πειράματα αυτά επαναλαμβανόταν σε ικανό αριθμό επαναλήψεων με τα PRP εκάστου δότη (ενός κάθε φορά) ώστε να πληρώνονται οι προϋποθέσεις της στατιστικής σημαντικότητας.

Μετά την ολοκλήρωση του κύκλου των πειραμάτων που αφορούσαν τους τρεις κυρίους αιμοπεταλιακούς αγωνιστές που προαναφέραμε, προχωρήσαμε σε έναν νέο κύκλο πειραμάτων στον οποίο ως διεγέρτης της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων χρησιμοποιήθηκαν μεγάλοι αριθμοί κυττάρων λειομυοσαρκώματος επίμυος Wistar. Εφ όσον οι συσσωρεύσεις των αιμοπεταλίων με τα λειομυοσαρκωματικά κύτταρα τυποποιήθηκαν, δοκιμάστηκε κατά πόσον το εκχύλισμα είναι σε θέση να αναστείλει την συσσώρευση που εισάγουν στα αιμοπετάλια τα λειομυοσαρκωματικά κύτταρα. Το μοντέλο αυτό αποτέλεσε ένα μοντέλο μελέτης της αναστολής της μεταστατικής διασποράς σε εκείνη την συνιστώσα της που εξαρτάται από την αλληλεπίδραση καρκινικών κυττάρων και αιμοπεταλίων.

### ***Χρησιμοποιηθείσες συσκευές***

Για την μελέτη των αιμοπεταλιακών αντιδράσεων και των επί αυτών δράσεων του ανασυσταθέντος δι' ύδατος αποξηραμένου αιθανολικού εκχυλίσματος, χρησιμοποιήθηκε τεχνολογία της εταιρίας Cronolog και συγκεκριμένα το σύστημα ηλεκτρονικής συσσωρευογραφίας Ca – 500. Το σύστημα αυτό περιλαμβάνει τρία στοιχεία:

1<sup>ο</sup>) Το κυρίως συσσωρευόμετρο που περιέχει το σύστημα λυχνίας λευκού φωτός – κυψελίδας – φωτοηλεκτρικού κυττάρου – εξόδου προς τον υπολογιστή και την οθόνη όπου προβάλλεται το συσσωρευογράφημα, εφ όσον οι μεταβολές της οπτικής διαπερατότητας έχουν μετατραπεί σε ψηφιακό σήμα, ικανό να διαβαστεί από το πρόγραμμα. Αν το υπολογιστικό σύστημα αποσυνδεθεί από το βασικό συσσωρευόμετρο, μπορούμε στην έξοδό του να συνδέσουμε απλό καταγραφικό βαθμονομημένου χάρτου

και να καταγράψουμε με αυτόν τον τρόπο τις αιμοπεταλιακές αντιδράσεις (παλιά προσέγγιση πριν την είσοδο του υπολογιστή στην τεχνολογία καταγραφής).

2<sup>ov</sup>) Η μονάδα μνήμης και επεξεργασίας του ψηφιακού σήματος, η οποία έχει προγραμματιστεί να λειτουργεί σε περιβάλλον Windows 1995. Η μονάδα αποθηκεύει τα συσσωρευογραφήματα, τα οποία είναι ανακτήσιμα με διάφορους τρόπους πρόσβασης στην μνήμη (π.χ μέσω ID, ονοματεπωνύμου καθώς και ημερολογιακά). Τα δεδομένα μπορούν να αριθμοποιηθούν και να μεταφερθούν στο Excell για στατιστική και άλλη επεξεργασία.

3<sup>ov</sup>) Ο ηλεκτρονικός υπολογιστής (πλήρης), ο οποίος περιλαμβάνει την δική του μονάδα επεξεργασίας, η οποία αναλαμβάνει τον έλεγχο της μονάδας επεξεργασίας και μνήμης του συσσωρευομέτρου, και την χειρίζεται με το πρόγραμμά του, που είναι συμβατό με το πρόγραμμα της συσκευής της Cronolog. Ο υπολογιστής περιλαμβάνει οθόνη και πληκτρολόγιο. Ο χρησιμοποιούμενος υπολογιστής είναι ένα μοντέλο της Hewlett – Packard 2000, τύπου Pentium III.

### ***3.3.1. Έλεγχος της παραγωγής θρομβοξάνης $A_2$ ( $TXA_2$ ) από τα αιμοπετάλια του ανθρώπου μέσω διέγερσής τους με αγωνιστές (ADP, PAF, Αραχιδονικό οξύ και λειομυοσαρκωματικά κύτταρα επίμνος Wistar).***

Στα πειράματα αυτά χρησιμοποιήσαμε επίσης την μεθοδολογία της συσσωρευογραφίας των αιμοπεταλιακών αντιδράσεων, αλλά όχι προς την κατεύθυνση της εύρεσης των δόσεων των εκχυλίσματος που επιφέρουν 50% και 100% αναστολή της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων, αλλά προς την κατεύθυνση της μελέτης της αναστολής της παραγωγής  $TXA_2$  εκ μέρους εκείνης της ποσότητας εκχυλίσματος η οποία προκαλεί πλήρη (100%) αναστολή της αιμοπεταλιακής συσσώρευσης που εισάγουν οι αγωνιστές ADP, PAF, Αραχιδονικό Οξύ και λειομυοσαρκωματικά κύτταρα.

Προς τούτο επαναλαμβάνουμε την διαδικασία ελέγχου της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων ενός δότη, μέσω διέγερσής τους από έναν συγκεκριμένο αγωνιστή κάθε φορά, σύμφωνα με την ως άνω περιγραφείσα τεχνική.

Εν συνεχεία θέταμε στις κυψελίδες τις περιέχουσες το PRP του δότη αυτού εκείνη την ποσότητα εκχυλίσματος που επέφερε αναστολή επιπέδου 100% στην συσσώρευση των αιμοπεταλίων όταν ως διεγέρτης αυτή χρησιμοποιείτο ο εν λόγω αγωνιστής, τον οποίον και χορηγούσαμε στα αιμοπετάλια.

Σε όλες τις περιπτώσεις μετά την παρέλευση 5 ή 10 min από την λήξη της συσσώρευσης παραλαμβάναμε το PRP και το τοποθετούσαμε σε ξεχωριστά συλλεκτικά κρυσταλλικά φιαλίδια στα οποία είχαμε προηγουμένως προσθέσει 50 μl διαλύματος περιέχοντος 5 mgf ινδομεθακίνης, ώστε να αναστέλλονται οριστικά τα ένζυμα που συμμετέχουν στην παραγωγή της θρομβοξάνης (δηλαδή η αιμοπεταλιακή κυκλοξυγονάση1). Έτσι προέκυψαν οι εξής ομάδες φιαλιδίων PRP:

1<sup>ov</sup>) Η ομάς I, η οποία περιείχε φιαλίδια με PRP που δεν υπέστη συσσώρευση.

2<sup>ov</sup>) Η ομάς II, η οποία περιείχε φιαλίδια με PRP που συσσωρεύτηκε με ADP.

3<sup>ov</sup>) Η ομάς III, η οποία περιείχε φιαλίδια με PRP που συσσωρεύτηκε με PAF.

4<sup>ov</sup>) Η ομάς IV, η οποία περιείχε φιαλίδια με PRP που συσσωρεύτηκε με Αραχιδονικό Οξύ.

5<sup>ov</sup>) Η ομάς V, η οποία περιείχε φιαλίδια με PRP που συσσωρεύτηκε με λειομυοσαρκωματικά κύτταρα (στα τελευταία αυτά φιαλίδια, εκτός από την ως άνω αναφερθείσα ποσότητα ινδομεθακίνης, προσθέσαμε και μια ποσότητα 5 mgf ναμπουμετόνης, για την αναστολή του ενζύμου κυκλοξυγονάση 2, που ενδεχομένως περιείχετο στα λειομυοσαρκωματικά κύτταρα.

Η συλλογή του PRP στα φιαλίδια γινόταν αμέσως την παρέλευση 5 ή 10 min από την περάτωση της συσσώρευσης και έκαστο φιαλίδιο παρέμεινε βυθισμένο εντός θρυμματισμένου πάγου μέχρι την λήξη του πειράματος, δηλαδή έως ότου πληρωθεί από όλο το PRP των αντίστοιχων δοκιμών.

Κατόπιν ετίθετο σε καταψύκτη – 80 ° C και φυλασσόταν εκεί μέχρι την ημέρα της μετρήσεως της θρομβοξάνης.

Πρίν την τοποθέτηση στην βαθεία ψύξη στον αεροθάλαμο του φιαλιδίου γινόταν εμφύσηση του ευγενούς αερίου αργού και κατόπιν επιμελής αεροστεγής σφράγιση, ώστε να μην εκφύγει το αδρανές αέριο.

Τα ούτω παρασκευασθέντα δείγματα παρέμειναν στην βαθεία ψύξη επί το μέγιστον 30 ημέρες και ύστερα χρησιμοποιήθηκαν για τους προσδιορισμούς της θρομβοξάνης A<sub>2</sub> .



### **3.3.2. Εκχύλιση και προσδιορισμός της θρομβοξάνης A<sub>2</sub>**

Η εκχύλιση και ο προσδιορισμός των ολικών θρομβοξανίων (και όχι μόνον της θρομβοξάνης A<sub>2</sub>) έγινε με την ακόλουθη μεθοδολογία:

Τα φιαλίδια που περιείχαν το PRP που συνελέγη, όπως περιγράψαμε, εξήχθησαν από την βαθεία ψύξη και παρέμειναν σε θερμοκρασία δωματίου για αποψυχθούν και να ισορροπήσουν θερμικά επί ένα ημίωρο. Κατόπιν το περιεχόμενο εκάστου φιαλιδίου αναμίχθηκε επιμελώς με αναδευτήρα δόνησης (vortex) ώστε να ομογενοποιηθεί το δυνατόν περισσότερο και να διασπαστούν οι θρόμβοι. Εν συνεχεία όλα τα φιαλίδια ετέθησαν σε θερμοστατούμενη φυγόκεντρο και φυγοκεντρήθηκαν επί 5 min στις 3000 rpm και σε θερμοκρασία 0° C.

Για την εκχύλιση των αιμοπεταλιακών λιποειδών χρησιμοποιήθηκαν κατάλληλες στήλες (Amprap ethyl C2 microcolumns), οι οποίες αφού τοποθετήθηκαν σε κατάλληλη διάταξη επιτρέπουν την διέλευση υγρών κατά μήκος τους και με την δύναμη της βαρύτητας, ενεργοποιήθηκαν μέσω έκπλυσής τους με μεθανόλη και εν συνεχεία δισαπεσταγμένο ύδωρ.

Η διαδικασία η οποία ακολουθήθηκε για την εκχύλιση των λιποειδών έχει αναλυτικώς ως ακολούθως:

1. Έκπλυση κάθε στήλης με 2 κ.ε μεθανόλης και κατόπιν με 4 κ.ε δισαπεσταγμένου ύδατος.
2. Φυγοκέντρωση των δειγμάτων στις 3000 rpm για 5 min σε ψυκτική – θερμοστατούμενη φυγόκεντρο στους 0° C.
3. Λήψη μιας ποσότητας 400 μl από το υπερκείμενο του φυγοκεντρηθέντος δείγματος και οξίνισή του με 25 μl αραιού υδροχλωρικού οξέος.
4. Αραίωση του οξινισμένου δείγματος με 4 όγκους δισαπεσταγμένου ύδατος.
5. Τοποθέτηση του τελικού αυτού αραιωμένου δείγματος στην στήλη, ασκώντας μια ελαφρά πίεση ώστε να υπάρχει μια ροή περίπου 0,5 κ.ε / min.
6. Έκπλυση της στήλης με 3 κ.ε δισαπεσταγμένο ύδωρ και απόρριψη του εκπλύματος.
7. Έκπλυση της στήλης με 3 κ.ε αιθανόλης 10% και απόρριψη του εκπλύματος.
8. Έκπλυση της στήλης με 3 κ.ε δισαπεσταγμένο ύδωρ και απόρριψη του εκπλύματος.
9. Έκπλυση της στήλης με 3 κ.ε κανονικού εξανίου και απόρριψη του εκπλύματος.
10. Εφαρμογή 5 κ.ε οξεικού αιθυλίου (ethyl acetate) στην στήλη και παραλαβή του εκπλύματος σε μεγάλο γυάλινο δοκιμαστικό σωλήνα.

11. Ξήρανση του εκχυλίσματος με ρεύμα αζώτου σε θερμοκρασία δωματίου και φύλαξη των στεγνωμένων σωληναρίων στον καταψύκτη (-20° C).

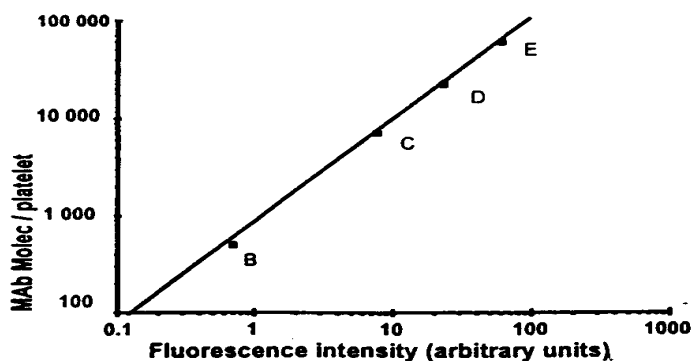
Μετά την ανασύσταση και την επεξεργασία με τα εξειδικευμένα αντισώματα του kit μετρήθηκε η ραδιενέργεια σε γ – κάμερα και το αποτέλεσμα εξήχθη σε pgf TXB<sub>2</sub> /ml της οποίας το ποσό αντιπροσωπεύει και την TXA<sub>2</sub>.

#### ***3.4. Προσδιορισμός του αριθμού των υποδοχέων GP IIb – IIIa ανά αιμοπετάλιο μέσω της μεθόδου της κυτταρομετρίας ροής.***

Οι αιμοπεταλιακοί υποδοχείς του τύπου GP IIb – IIIa είναι απαραίτητοι για την προσκόλληση των μορίων ινωδογόνου που ευρίσκονται στο αιματικό πλάσμα και ευθύνονται για τον σχηματισμό του δικτύου της ινικής. Η ανάδυση των εν λόγω υποδοχέων στην έξω επιφάνεια της κυτταρικής μεμβράνης του αιμοπεταλίου φαίνεται να είναι συνάρτηση της λειτουργικής τους κατάστασης και ενδεχομένως του λεγόμενου «αιμοπεταλιακού τόνου», δηλαδή του βαθμού ετοιμότητας των αιμοπεταλίων να ενεργοποιηθούν προς δημιουργία θρόμβων. Ο αριθμός των υποδοχέων αυτών αυξομειώνεται ανάλογα προς το αν καταλαμβάνονται από κάποιο σχετικό μόριο. Είναι ενδεχόμενο επίσης ο αριθμός τους να αυξομειώνεται όταν οι υποδοχείς αποκαλύπτονται προς τα έξω ή κρύβονται προς τα μέσα στην κυτταρική μεμβράνη. Η κίνηση αυτή μπορεί να είναι αναδυτική – καταδυτική ως προς την έξω επιφάνεια της μεμβράνης ή να σχετίζεται με το ξεδίπλωμα ή την πτύχωσή της. Ο προσδιορισμός των υποδοχέων GP IIb – IIIa έγινε μέσω της μεθόδου της κυτταρομετρίας ροής. Πρόκειται για μια υψηλής ακρίβειας αυτοματοποιημένη μέθοδο μέτρησης κυττάρων με βάση συγκεκριμένα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά τους που προσδιορίζονται άμεσα και ξεχωριστά πάνω σε καθένα από τα κύτταρα του υπό εξέταση δείγματος. Αυτό επιτυγχάνεται με την υδροδυναμική διάταξη του κυτταρικού εναιωρήματος σε ρεύμα μονήρων κυττάρων, που διασταυρώνεται κάθετα με μια δέσμη LASER. Οι φυσικοχημικοί χαρακτήρες των κυττάρων ανιχνεύονται είτε ως το μέτρο της άμεσης αλληλεπίδρασης της φωτεινής δέσμης με αυτά (σκέδαση του φωτός), είτε ως αποτέλεσμα της επίδρασης του φωτός επί φθορίζουσών ουσιών, με τις οποίες έχουν σημειωθεί ειδικά συγκεκριμένα ενδοκυτταρικά ή εξωκυτταρικά μόρια (συνδεδεμένα με το κύτταρο). Η δυνατότητα ταυτόχρονου προσδιορισμού πολλαπλών παραμέτρων (πρόσθιος και πλάγιος σκεδασμός και χρήση τουλάχιστον δύο φθοριοχρωμάτων) κατά την απλή διέλευση του κάθε κυττάρου μπροστά

από την φωτεινή δέσμη, αυξάνει θεαματικά την αναλυτική ικανότητα και την αξιοπιστία της κυτταρομετρίας ροής σε σύγκριση με τις συμβατικές τεχνικές (μικροσκοπία). Η πολύ υψηλή ταχύτητα με την οποία επιτυγχάνονται οι προσδιορισμοί επιτρέπει τον έλεγχο τεράστιου αριθμού κυττάρων και την μελέτη πολύ μικρών κυτταρικών πληθυσμών με ιδιαίτερα κυτταρικά χαρακτηριστικά που εμπεριέχονται σε κάποιο κυτταρικό εναιώρημα (ένα κύτταρο σε ένα εναιώρημα  $10^5$  κυττάρων). Για τον λόγο αυτό η κυτταρομετρία ροής μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον εντοπισμό π.χ μεμονωμένων κυκλοφορούντων καρκινικών κυττάρων, για τον διαχωρισμό λευχαιμικών κυττάρων από φυσιολογικά κύτταρα, ή για τον εντοπισμό κυττάρων που έχουν μολυνθεί από κάποιον ιό κ.α.

Στην παρούσα εργασία για τον προσδιορισμό του αριθμού των υποδοχέων GP IIb – IIIa χρησιμοποιήθηκε το KIT ADIAflo Platelet Occurance, το οποίο είναι εξειδικευμένο για τον ποσοτικό προσδιορισμό του αιμοπεταλιακού υποδοχέα GP IIb – IIIa μέσω κυτταρομετρίας ροής. Ο συνολικός αριθμός των αιμοπεταλιακών υποδοχέων GP IIb – IIIa προσδιορίζονται με την χρησιμοποίηση μονοκλωνικών αντισωμάτων (Mabs – Monoclonic Antibodies) έναντι του υποδοχέα GP IIb – IIIa, ανάλογα με την ένταση του φθορισμού που μετράται σε κυτταρομετρητή ροής και βάσει μιας συγκεκριμένης καμπύλης (παρατιθέμενο σχήμα στο τέλος της σχετικής ανάλυσης)



Το **KIT** περιλαμβάνει τα ακόλουθα αντιδραστήρια:

1) Ένα συμπυκνωμένο ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (buffer) (αντιδραστήριο 1), το οποίο χρησιμοποιείται ως αραιωτικό μέσο για τα διαλύματα της δοκιμής και αραιώνεται 1:10 με δισαπεσταγμένο ύδωρ προ της χρήσης του,

- 2) Ένα αντιδραστήριο αποτελούμενο από μονοκλωνικά αντισώματα μυός, αποκλειστικώς τύπου IgG, το οποίο χρησιμοποιείται ως αρνητικός ισοτυπικός έλεγχος (αντιδραστήριο 2α),
- 3) Ένα αντιδραστήριο αποτελούμενο από μονοκλωνικά αντισώματα μυός εξειδικευμένα για την πρωτεΐνη GrIIIa Mab1 (CD 61) (αντιδραστήριο 2β),
- 4) Ένα αντιδραστήριο αποτελούμενο από μονοκλωνικά αντισώματα μυός εξειδικευμένα για την πρωτεΐνη GrIIIa Mab2 (CD 61) (αντιδραστήριο 2γ).
- 5) Ένα αντιδραστήριο που περιέχει σφαιρίδια καλυμμένα με γνωστές ποσότητες ανοσοσφαιρινών IgG μυός (αντιδραστήριο 3).
- 6) Ένα αντιδραστήριο χρώσης που περιέχει πολυκλωνικά αντισώματα anti-mouse IgG-FITC (αντιδραστήριο 4).

Συνολικά η διαδικασία της επεξεργασίας έχει ως εξής: Γίνεται απομόνωση του PRP κατά τα ως άνω γνωστά. Το απομονωθέν PRP φυλάσσεται, όχι περισσότερο από μία ώρα, σε υδατόλουτρο στους 37°C και προφυλαγμένο από δονήσεις ώστε να μην ενεργοποιηθούν τα αιμοπετάλια μέχρι την στιγμή της χρήσης τους. Πριν από την χρήση και αμέσως μετά, μία μικρή ποσότητα αιμοπεταλίων ενεργοποιείται στο συσσωρευόμετρο για να διαπιστωθεί η φυσιολογική τους λειτουργικότητα. Εφ' όσον τα αιμοπετάλια είναι λειτουργικά προχωρούμε στα επόμενα βήματα: Χρησιμοποιούμε για έκαστο δείγμα 5 πλαστικούς δοκιμαστικούς σωλήνες (ή γυάλινους επιχρισμένους εσωτερικά με σιλκόνη) οι οποίοι χαρακτηρίζονται ως T1, T2, T3, T4, T5. Σε έκαστο των δοκιμαστικών σωλήνων τοποθετούμε τα προαναφερθέντα αντιδραστήρια ως ακολούθως:

- 1) T1: Θέτουμε 25μl PRP και 25μl αραιωμένου αντιδραστηρίου 1, ώστε να προκύψει PRP αραιωμένο 1:2. Προσθέτουμε ακόμη 150μl αραιωμένου αντιδραστηρίου 1. (Στην παρούσα ερευνητική εργασία, για την εκτίμηση των δράσεων των υπό μελέτη ουσιών, προστέθηκαν και 5μl της κάθε ουσίας, με συγκέντρωση  $3 \times 10^{-3} \text{M}$ ). Αναδεύουμε στον αναδευτήρα.
- 2) T2: Θέτουμε 20μl αντιδραστηρίου 2α.
- 3) T3: Θέτουμε 20μl αντιδραστηρίου 2β (Mab 1).
- 4) T4: Θέτουμε 20μl αντιδραστηρίου 2γ (Mab 2).
- 5) T5: Θέτουμε 20μl αντιδραστηρίου 3. (Καλή ανάδευση πριν την αναρρόφηση του δείγματος και την ανάλυσή του στον κυτταρομετρητή ροής).

Η ανοσοσήμανση των δειγμάτων και του μάρτυρα γίνεται ως εξής:

Σε έναστο των δοκιμαστικών σωλήνων T2, T3 και T4 προσθέτουμε 20μl από το περιεχόμενο του σωλήνα T1 και ομογενοποιούμε με την χρήση ενός αναδευτήρα. Μετά την ανάδευση επωάζουμε επί 20 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.

Η φθορίζουσα χρώση πραγματοποιείται ως ακολούθως: Σε έναστο των δοκιμαστικών σωλήνων από T2 έως και T5 προσθέτουμε: 20μl από το αντιδραστήριο 4 και ομογενοποιούμε με έναν αναδευτήρα. Εν συνεχεία επωάζουμε για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και κατόπιν προσθέτουμε σε όλους τους δοκιμαστικούς σωλήνες 2ml αραιωθέντος αντιδραστηρίου 1. Τα παρασκευασθέντα δείγματα τοποθετούνται για δύο ώρες σε θερμοκρασία 2-8°C (συντήρηση ψυγείου) πριν από την ανάλυση στον κυτταρομετρητή ροής.

Για την κυτταρομετρία ροής χρησιμοποιήθηκε το σύστημα EpicS XL-MCL της εταιρείας Beckman-Coulter. Αρχικά, με την χρήση του αντιδραστηρίου 3, που αποτελείται από σφαιρίδια καλυμμένα με 4 γνωστές συγκεντρώσεις IgG μύος, σε συνάρτηση με τις αντίστοιχες τιμές MnIx (ένταση φθορισμού που καταγράφεται από τον κυτταρομετρητή ροής), δημιουργούμε την πρότυπη γραμμική καμπύλη αναφοράς, στην οποία στον άξονα x αναγράφονται οι τιμές της έντασης φθορισμού και στον άξονα ψ οι τιμές του αριθμού των υποδοχέων GrIIb/IIIa ανά αιμοπετάλιο. Στην συνέχεια, με την ανάλυση των δειγμάτων στον κυτταρομετρητή ροής λαμβάνουμε την τιμή της έντασης φθορισμού του κάθε δείγματος και βάσει της πρότυπης γραμμικής καμπύλης υπολογίζουμε τον αριθμό των υποδοχέων GrIIb/IIIa ανά αιμοπετάλιο<sup>428,429</sup>.

Οι τιμές εκφράστηκαν ως μέσες τιμές ± σταθερή απόκλιση.

Η στατιστική ανάλυση έγινε με το t-test.

### ***3.5. Πειράματα συσσώρευσης πλυμένων αιμοπεταλίων κουνελιού στο συσσωρευόμετρο***

#### ***3.5.1. Χρησιμοποιηθέντα πειραματόζωα – αιμοληψία***

Για τα εν λόγω πειράματα χρησιμοποιήθηκαν 15 αλφικά κουνέλια τύπου New Zealand, ηλικίας 6 – 12 μηνών και βάρους 2,5 – 5 kgf. Σε πειραματόζωο γινόταν δύο αιμοληψίες ανά δεκαπενθήμερο. Η αιμοληψία γινόταν από τις φλέβες των αυτιών του κουνελιού με την χρήση φλεβοκαθετήρα ή πεταλούδας και το αίμα συλλεγόταν με ελεύθερη ροή σε πλαστικό δοκιμαστικό σωληνάριο χωρητικότητας 50 ml. Το συνολικό αίμα κάθε δείγματος ήταν 40 ml και το χρησιμοποιούμενο αντιπηκτικό ήταν διάλυμα 0,2 % άλατος EDTA μετά καλίου. Η αναλογία του αντιπηκτικού ήταν 1 ml ανά 10 ml συλλεγομένου

αίματος. Η ανάμιξη του αίματος με το αντιπηκτικό γινόταν ταυτόχρονα με την αιμοληψία για την αποφυγή δημιουργίας θρόμβων καθώς η διάρκεια της αιμοληψίας ήταν συχνά παρατεταμένη. Η ανάμιξη γινόταν με ήπιες κυκλικές κινήσεις του δοκιμαστικού σωλήνα. Μετά το πέρας της αιμοληψίας γινόταν πλήρης ανάμιξη του αίματος και του αντιπηκτικού με δύο ήπιες ανατροπές του σωλήνα. Ο δοκιμαστικός σωλήνας με το αίμα έμπαινε κατόπιν στην φυγόκεντρο για τον άμεσο διαχωρισμό του αίματος σε Πλάσμα Πλούσιο σε Αιμοπετάλια (PRP) και ερυθροκύτταρα-λευκοκύτταρα.

### **3.5.2. Διαλύματα έκπλυσης και συσσώρευσης αιμοπεταλίων**

Για τα *in vitro* πειράματα στα οποία είχαμε ως μοντέλο συσσώρευσης τα πλυμένα αιμοπετάλια του κουνελιού, χρησιμοποιήσαμε δύο διαφορετικά ρυθμιστικά διαλύματα. Ένα ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης (TG – EGTA) και ένα ρυθμιστικό διάλυμα συσσώρευσης (TG –  $\text{Ca}^{2+}$ ). Η λογική της έκπλυσης 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. Π.χ ένας αγωνιστής μπορεί να προσροφηθεί στις λευκοματίνες του πλάσματος και έτσι η ειδική συγκέντρωσή του στην υδατική φάση να μειωθεί. Οι υπάρχοντες διεγέρτες στο φυσιολογικό πλάσμα απομακρύνονται και έτσι ορίζονται κατά απόλυτο τρόπο από τον πειραματιστή οι συγκεντρώσεις που θα χρησιμοποιηθούν για την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων. Όλα τα τεχνήματα που οφείλονται στο περιεχόμενο του φυσιολογικού πλάσματος σε δραστικές ουσίες αποφεύγονται όταν τα αιμοπετάλια έχουν εκπλυθεί και το πλάσμα έχει απομακρυνθεί και αντικατασταθεί από ένα άλλο διάλυμα, το οποίο επιτρέπει την επιβίωση των αιμοπεταλίων σε καλή λειτουργική κατάσταση κατά την διάρκεια του πειράματος.

Το πρώτο διάλυμα ή διάλυμα έκπλυσης (TG – EGTA buffer) που χρησιμοποιήσαμε είχε σαν σκοπό την απομάκρυνση όλων των στοιχείων του πλάσματος και την διατήρηση των αιμοπεταλίων στην ζωή και σε υψηλή λειτουργικότητα παρεμποδίζοντας ταυτόχρονα την αυτόματη ενεργοποίησή τους κατά την διάρκεια των χειρισμών έκπλυσης και αναδιασποράς. Για την εξασφάλιση αυτής της συνθήκης το διάλυμα TG – EGTA δεν περιέχει στην σύνθεσή του ιόντα ασβεστίου, τα οποία παίζουν κεφαλαιώδη ρόλο στην αιμοπεταλιακή συσσώρευση, ενώ περιέχει EGTA που δεσμεύει τα τυχόν υπάρχοντα  $\text{Ca}^{2+}$

σχηματίζοντας μαζί τους χυλικές ενώσεις. Ακόμη το pH του διαλύματος TG – EGTA ρυθμίζεται στο 6,5, τιμή στην οποία η αντιδραστικότητα των αιμοπεταλίων είναι χαμηλή, επειδή πολλά ένζυμά τους είναι ανεσταλμένα. Η αναστολή αυτή λόγω χαμηλού pH είναι αντιστρέψιμη και τα αιμοπετάλια γίνονται εκ νέου πλήρως λειτουργικά όταν το διάλυμα στο οποίο ευρίσκονται αποκτήσει την φυσιολογική τιμή του 7,4.

Η ρύθμιση του pH γίνεται με την χρήση διαλυμάτων HCl και NaOH. Η σύνθεση του ρυθμιστικού διαλύματος έκπλυσης είναι η εξής: KCl: 195 mgr, MgCl<sub>2</sub> x 6H<sub>2</sub>O: 212,5 mgr, NaCl: 8 gr, NaHCO<sub>3</sub>: 1,015 gr, Tris: 0, CaCl<sub>2</sub> x 2H<sub>2</sub>O: 0, EGTA: 1 ml διαλύματος 0,2 M (76,2 gr/l), άνυδρη γλυκόζη: 1 gr, ζελατίνη 10% (25 ml), νερό δισαπεσταγμένο 1000 ml, 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 ρυθμιστικό διάλυμα, υπό σταθερή ανάδευση. Το τελικό pH του διαλύματος TG – EGTA ρυθμίζεται την στιγμή της χρησιμοποίησής του.

Το δεύτερο χρησιμοποιούμενο διάλυμα ονομάζεται διάλυμα συσσώρευσης και συμβολίζεται με την συντομογραφία TG – Ca<sup>2+</sup>. Το διάλυμα TG – Ca<sup>2+</sup> έχει την ίδια ωσμωτικότητα με το προηγούμενο διάλυμα αλλά διαφέρει από αυτό στα εξής σημεία: 1) περιέχει ιόντα ασβεστίου, 2) δεν περιέχει NaHCO<sub>3</sub>, 3) δεν περιέχει EGTA, 4) περιέχει Tris και 5) το pH του ρυθμίζεται στο 7,4 δηλαδή σε μια τιμή όπου η αιμοπεταλιακή λειτουργία μπορεί να είναι άριστη. Η σύνθεση του διαλύματος αυτού έχει ως εξής: KCl: 195 mgr, MgCl<sub>2</sub> x 6H<sub>2</sub>O: 212,5 mgr, NaCl: 8 gr, NaHCO<sub>3</sub>: 0 gr, Tris: 1,21 gr, CaCl<sub>2</sub> x 2H<sub>2</sub>O: 191 mgr, EGTA: 0 ml, άνυδρη γλυκόζη: 1 gr, ζελατίνη 10% (25 ml), νερό δισαπεσταγμένο 1000 ml, pH: 7,4. Η ρύθμιση του pH γίνεται με μικρές ποσότητες HCl και NaOH.

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 150 ml (TG - EGTA) και 50 ml (TG – Ca<sup>2+</sup>) και αποθηκεύονται στον καταψύκτη σε – 20 °C, όπου παραμένουν σταθερά για χρονικά διαστήματα μεγαλύτερα 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 αλλοίωση στα συστατικά τους. Παρασκευάζονται σε μεγάλες ποσότητες και αποθηκεύονται ώστε να μπορούν να χρησιμοποιηθούν ανάλογα με τις περιστάσεις.

### ***3.5.3. Έκπλυση αιμοπεταλίων, μέτρηση, σταθεροποίηση του αριθμού τους.***

Τα αιμοπετάλια του κουνελιού (που παρουσιάζουν ιδιαίτερα μεγάλη ευαισθησία έναντι του PAF και συνεπώς αποτελούν ένα αξιόπιστο μοντέλο για την μελέτη των δράσεών του), παρασκευάζονται ως ακολούθως: Μετά την 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 1500 στροφές επί 20 λεπτά. Μετά την φυγοκέντρηση λαμβάνεται προσεκτικά με αυτόματη πιπέτα το υπερκείμενο πλάσμα κατά τρόπο ώστε να μην αναρροφώνται τα ερυθρά αιμοσφαίρια. Το πλάσμα αυτό έχει μεγάλη περιεκτικότητα σε αιμοπετάλια (PRP, plasma rich platelets), όπως και στην περίπτωση του ανθρώπινου αίματος. Το PRP τίθεται σε φυγοκέντρηση στις 3100 στροφές επί δεκαπεντάλεπτο, οπότε το μεγαλύτερο ποσοστό των αιμοπεταλίων κατακρημνίζεται στον πυθμένα, σχηματίζοντας ένα λευκωπό στρώμα, ενώ το υπερκείμενο γίνεται διαυγές (στερούμενο των αιμοπεταλίων) και χρησιμοποιείται ως Πλάσμα Πτωχό σε Αιμοπετάλια (PPP, plasma poor platelets) για την ρύθμιση του συσσωρευομέτρου. Η κλίμακα βαθμονομείται σε εκατοστά και το 100 % αντιστοιχεί στην ακώλυτη διέλευση του φωτός, όπως θα συνέβαινε αν όλα τα αιμοπετάλια είχαν απομακρυνθεί από το εναιώρημα (μέσω συσσώρευσης), ενώ το 0% στην διέλευση του φωτός, παρουσία όλου του αριθμού των αιμοπεταλίων που εμπεριέχονται εν ηρεμία στο PRP. Το PPP αφαιρείται με πολύ προσοχή από τον σωλήνα ώστε να μην αποσπώνται τεμάχια από το λεπτό στρώμα των κατακρημνισθέντων αιμοπεταλίων. Μετά την απομάκρυνση του PPP, τίθεται στον δοκιμαστικό σωλήνα μια ποσότητα 8 - 10 ml από το διάλυμα έκπλυσης (TG – EGTA), το pH του οποίου έχει ρυθμιστεί στο 6,5 ώστε να μην ενεργοποιούνται τα θρομβοκύτταρα από τις τυχούσες μηχανικές διαταραχές τις οποίες υφίστανται. Χρησιμοποιώντας την αυτόματη πιπέτα κάνουμε μια σειρά διαδοχικών ήπιων αναρροφήσεων και εκτινάξεων του διαλύματος αυτού, ώστε τα κατακρημνισθέντα αιμοπετάλια να αποκολληθούν από τον πυθμένα του σωλήνα και να αναδιασπαρθούν στο διάλυμα έκπλυσης που αντικαθιστά τώρα το πλάσμα. Μόλις διαπιστωθεί ότι όλα τα συσσωματώματα έχουν διαλυθεί και οφθαλμοφανώς τα αιμοπετάλια ευρίσκονται εν αιωρήσει, τότε ο σωλήνας συμπληρώνεται μέχρι του ορίου των 40 ml από διάλυμα έκπλυσης και γίνονται διαδοχικές ανατροπές ώστε ακόμη και τα μη ορατά αιμοπεταλιακά συσσωματώματα να αποκοκκιωθούν και να αποδώσουν τα αιμοπετάλια στο εναιώρημα. Ακολουθεί ολιγόλεπτη επώαση και κατόπιν ανάδευση με ήπιες ανατροπές όπως και προηγουμένως. Στην συνέχεια ο δοκιμαστικός σωλήνας τίθεται ξανά σε φυγοκέντρηση



στις 3100 στροφές επί δεκαπεντάλεπτο, οπότε και πάλι τα αιμοπετάλια κατακρημνίζονται σχηματίζοντας το γνωστό λευκωπό στρώμα στον πυθμένα του δοκιμαστικού σωλήνα. Κατά την φυγοκέντρωση, ενώ τα αιμοπετάλια κινούνται προς τον πυθμένα τα διαλυτά μόρια του φυσιολογικού, που είναι προσροφημένα στην επιφάνειά τους, αποχωρίζονται και εισέρχονται στο διάλυμα. Κατόπιν το υπερκείμενο αφαιρείται προσεκτικά και η διαδικασία της αναδιασποράς των θρομβοκυττάρων επαναλαμβάνεται όπως προηγουμένως, χρησιμοποιώντας το διάλυμα έκπλυσης. Μετά την αναδιασπορά ο σωλήνας με το περιεχόμενό του ξαναφυγοκεντρείται στις 3100 στροφές, πάλι επί δεκαπεντάλεπτο, το υπερκείμενο αφαιρείται, προστίθεται ποσότητα διαλύματος έκπλυσης, ακολουθεί νέα αναδιασπορά και επαναπλήρωση του σωλήνα στα 40 ml. Όταν τα αιμοπετάλια αποχωριστούν και βρεθούν σε πλήρη εναιώρηση (πράγμα το οποίο ελέγχεται με το μάτι τοποθετώντας τον σωλήνα ενάντια στο φώς και ανακινώντας τον ελαφρά, οπότε τα κύτταρα φαντάζουν σαν «νέφη σκόνης»), τότε λαμβάνονται 20 ml του εναιωρήματος τα οποία τίθενται σε 380 ml 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 επωαστεί επί λίγα λεπτά μια μικρή ποσότητά του (10 ml) χρησιμοποιείται για την επίστρωση μιας πλάκας Newbauer (αιμοκυττόμετρο), πάνω στην οποία έχει τοποθετηθεί καλυπτρίδα. Το αιμοκυττόμετρο μετά την επίστρωση μεταφέρεται σε τρυβλίο Pietri, στο οποίο υπάρχει ένα βοτύλιο βρεγμένου βαμβακιού για να διατηρείται υγρή η ατμόσφαιρα. Το τρυβλίο σκεπάζεται με το κάλυμμά του, ώστε να είναι το δυνατότερο στεγανό και τίθεται σε χώρο σταθερής θερμοκρασίας, μακριά από μηχανικές δονήσεις και ρεύματα αέρα, ώστε τα αιμοπετάλια να αφεθούν να καθιζάνουν και να σταθεροποιηθούν πάνω στον σταυρό της πλάκας σε διάστημα μισής ώρας κατά τρόπο που η μετέπειτα αρίθμησή τους να αποδίδει τον πραγματικό τους αριθμό με την μέγιστη δυνατή προσέγγιση. Μετά την σταθεροποίηση η καταμέτρηση των αιμοπεταλίων γίνεται με το κοινό μικροσκόπιο του οποίου το σύστημα Abbe' βρίσκεται στην κατώτερη θέση χρησιμοποιώντας φακό μεγέθυνσης 40x. Μετρώνται τα αιμοπετάλια 5 μετρίου μεγέθους τετραγώνων (80 μικρά) του κεντρικού μεγάλου τετραγώνου του αιμοκυττομέτρου. Το συνολικό άθροισμα πολλαπλασιάζεται επί 1000 και δίνει τον αριθμό των αιμοπεταλίων ανά ml αίματος. Το σφάλμα της μεθόδου είναι 11 – 15 % (μέθοδος Brecher – Cronkite). Τα αιμοπετάλια διακρίνονται καθαρά από τα λευκοκύτταρα εξ αιτίας του μικρού τους μεγέθους και της διαθλαστικότητάς τους και δεν συγχέονται .

### **Ασπιρινισμός**

Παράλληλα με την διαδικασία αρίθμησης γίνεται και η ασπιρίνηση των αιμοπεταλίων, προκειμένου να αποκλειστεί η οδός του αραχιδονικού οξέος (όταν μελετάμε το ενδεχόμενο της ύπαρξης ενός ειδικού αναστολέα των αιμοπεταλίων), ως εξής: Ζυγίζονται 16,2 mgf ασπιρίνης και διαλύονται σε 500 ml φυσιολογικού ορού. Εν συνεχεία λαμβάνονται τόσα ml διαλύματος ασπιρίνης όσα ml είναι ο όγκος του αιμοπεταλιακού εναιωρήματος και εγχέονται στο δοκιμαστικό σωλήνα που εμπεριέχει το εναιώρημα των θρομβοκυττάρων. Το περιεχόμενο του σωλήνα αναδεύεται με ήπιες ανατροπές και τα αιμοπετάλια αφήνονται να επωαστούν επί ένα τουλάχιστον ημίωρο, ώστε να ακετυλιωθούν επαρκώς τα ένζυμα της κυκλοξυγονάσης που περιέχουν εκ μέρους του ακετυλοσαλικυλικού οξέος, οδηγώντας στην αδρανοποίηση (ή αποκλεισμό) της βιοχημικής οδού του αραχιδονικού οξέος των θρομβοκυττάρων. Μετά την παρασκευή του διαλύματος ασπιρίνης – φυσιολογικού ορού φροντίζουμε να γίνει ταχέως η ασπιρίνηση των αιμοπεταλίων, καθόσον το ακετυλοσαλικυλικό οξύ υδρολύεται εντός μικρού χρονικού διαστήματος (λίγο περισσότερο από 5 λεπτά) από την διάλυσή του στο νερό. Μετά την επώασή τους με ασπιρίνη και την αρίθμηση, τα αιμοπετάλια υποβάλλονται εκ νέου σε φυγοκέντρηση στις 3100 στροφές για να καθιζήσουν στον πυθμένα του δοκιμαστικού σωλήνα και να αναδιασπαρθούν σε μια κατάλληλη ποσότητα έκπλυτικού διαλύματος, ώστε η πυκνότητά τους να αποκτήσει μια προκαθορισμένη τιμή η οποία αποτελεί και το standard αριθμό τους για τις ακόλουθες λειτουργικές δοκιμές στο συσσωρευόμετρο. Η ποσότητα διαλύματος έκπλυσης στην οποία αναδιασπείρονται τα αιμοπετάλια μετά την τελική τους 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 για τα πειράματα συσσώρευσης στο συσσωρευόμετρο που αφορούν τα αιμοπετάλια του κουνελιού.

#### **3.5.4. Η δοκιμή των αιμοπεταλιακών αντιδράσεων (αλλαγή σχήματος – αντίδραση έκλυσης – συσσώρευση) των πλυμένων αιμοπεταλίων του κουνελιού στο συσσωρευόμετρο και η αναστολή τους.**

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. Αν πρόκειται να εργαστούμε με ανοιχτές όλες τις οδούς συσσώρευσης χρησιμοποιούμε αιμοπετάλια που δεν υπέστησαν ασπιρινισμό, ούτε αναστολή των άλλων δύο οδών (του PAF και του ADP). Για να αποκλείσουμε την οδό του ADP εκλεκτικά σε ποσότητα 50 ml εκπλυμένου αιμοπεταλιακού εναιωρήματος προσθέτουμε 1 ml του διαλύματος CP – CPK (του οποίου την παρασκευή περιγράψαμε ανωτέρω). Για να αποκλείσουμε την οδό του PAF χρησιμοποιούμε δύο ειδικούς αναστολείς αυτού, τα γιγκολίδια BN-1 και BN-2.

Η συσκευή του συσσωρευομέτρου που περιγράψαμε ανωτέρω ρυθμίζεται κατά τα γνωστά στις σταθερές συνθήκες λειτουργίας της, ως εξής: Εφ' όσον η θερμοκρασία της συσκευής έχει σταθεροποιηθεί στους 37°C τίθεται σε μια γυάλινη διαφανή κυλινδρική κυψελίδα κατάλληλη ως προς το μέγεθος για την σχισμή του οργάνου, 1<sup>ov</sup>) ένας μικρός πλαστικοποιημένος μαγνήτης, ή ένας ισομεγέθης μαγνήτης καλυμμένος επιμελώς με σιλικόνη, 2<sup>ov</sup>) 400 ml ρυθμιστικού διαλύματος συσσώρευσης (TG – Ca<sup>2+</sup>). Κατόπιν η κυψελίδα τοποθετείται στην σχισμή υποδοχής της στην συσκευή. Μετά την τοποθέτηση της κυψελίδας η γραφίδα του οργάνου ρυθμίζεται μέσω του κουμπιού που φέρει την συντομογραφία PRP στο σημείο 10 του καταγραφικού χάρτη (ή αντιστρόφως ανάλογα με το σύστημα αναφοράς). Κατόπιν η κυψελίδα αφαιρείται και παρασκευάζεται μια δεύτερη κυψελίδα, όπως προηγουμένως αλλά με την διαφορά ότι προσθέτουμε επίσης μια ποσότητα 100 ml PRP, οπότε η γραφίδα του καταγραφέα τοποθετείται μέσω του κουμπιού με την συντομογραφία PRP στο σημείο 100 του καταγραφικού χάρτη. Αφού διαπιστώνεται ότι η ανάδευση του περιεχομένου της κυψελίδας τελείται ακωλύτως, αφαιρείται η κυψελίδα και προχωρούμε στην διαδικασία των δοκιμών συσσώρευσης, κρατώντας τις δύο κυψελίδες ως standards ρύθμισης, αν χρειαστεί να βαθμονομήσουμε εκ νέου την συσκευή κατά την εξέλιξη του πειραματισμού. Κάθε κυψελίδα παρασκευάζεται με 400 ml διαλύματος συσσώρευσης, μια συγκεκριμένη ποσότητα ενός αγωνιστή (συνήθως αυτή που προκαλεί μη αντιστρεπτή και εκείνη που προκαλεί αντιστρεπτή συσσώρευση) και εν συνεχεία τοποθετείται στην σχισμή του συσσωρευομέτρου, οπότε η γραφίδα επιστρέφει στο σημείο 10 του καταγραφικού χάρτη, που αντιστοιχεί στην ακώλυτη

διέλευση του φωτός μέσω του PPP. Εφ' όσον η ανάδευση γίνεται χωρίς πρόβλημα και δεν υπάρχουν φυσαλίδες, αιωρούμενα στερεά ή άλλες πηγές θορύβου, τότε προστίθεται στο εσωτερικό της κυψελίδας 100 μl του PRP μέσω αυτόματης πιπέτας και με ήπια κένωση. Αν τα αιμοπετάλια είναι φυσιολογικά τότε αρχίζει άμεσα η συσσώρευσή τους που ελέγχεται με γυμνό οφθαλμό από το παράθυρο της σχισμής και καταγράφεται από το καταγραφικό με την μορφή μιας σιγμοειδούς καμπύλης. Επαναλαμβάνοντας τις δοκιμές με διαδοχικά αυξανόμενες ποσότητες αγωνιστή εξακριβώνεται η ελάχιστη ποσότητα του τελευταίου που προκαλεί μέγιστη μη αντιστρεπτή αιμοπεταλιακή συσσώρευση (ουδός μέγιστης μη αντιστρεπτής συσσώρευσης) στις συνθήκες του συσσωρευομέτρου. Εφ' όσον 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 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 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 αντιστοίχου μάρτυρα. Λεπτομέρειες για την ερμηνεία των χαρακτηριστικών των κυμάτων συσσώρευσης δίνονται στα Υλικά και Μέθοδοι, στο σημείο όπου περιγράφονται οι αντιδράσεις των ανθρώπινων αιμοπεταλίων.

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

### ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

#### 4.1. ΓΕΝΙΚΑ

1. Τα δεδομένα τα οποία προέκυψαν από όλες τις πειραματικές δράσεις της ανά χείρας διατριβής είναι αξιόλογα και αποδεικνύουν ότι τα χρησιμοποιηθέντα φλαβονοειδή (κουερσετίνη, γενιστεΐνη και απιγενίνη) αποτελούν αξιόλογους αναστολείς της αιμοπεταλιακής συσσώρευσης και για τις τρεις οδούς συσσώρευσης, αν και με διαφορετικά επίπεδα ευαισθησίας απέναντι σε κάθε μια από αυτές. Συνεπώς μπορούμε να πούμε ότι οι εν λόγω ουσίες είναι σαφώς μη εκλεκτικοί αναστολείς της αιμοπεταλιακής συσσώρευσης.
2. Επίσης κατέστη σαφές ότι τα εν λόγω φλαβονοειδή αναστέλλουν ισχυρά και δόσοεξαρτώμενα την παραγωγή της θρομβοξάνης  $A_2$ , όπως αυτή μετρήθηκε μέσω της εξαιρετικά ευαίσθητης ραδιοανοσοϊσοτοπικής μεθόδου που χρησιμοποιήσαμε. Συνεπώς μπορούμε να πούμε ότι η εν λόγω μείωση της θρομβοξάνης  $A_2$  προκύπτει από αναστολή της λειτουργίας της αιμοπεταλιακής κυκλοξυγονάσης. Δεν έγινε προσδιορισμός του τύπου αναστολής της κυκλοξυγονάσης, καθόσον το ερώτημα αυτό δεν περιεχόταν στους στόχους της διατριβής. Η αναστολή της παραγωγής της θρομβοξάνης  $A_2$  μελετήθηκε στα αιμοπετάλια του ανθρώπου και όχι του κουνελιού. Επίσης μελετήθηκε και υπό διέγερση των αιμοπεταλίων από τους τρεις κυρίους αγωνιστές ξεχωριστά, σε αιμοπετάλια τα οποία είχαν ανοιχτούς ταυτοχρόνως και τους τρεις δρόμους συσσώρευσης, όπως συμβαίνει στις φυσιολογικές καταστάσεις.
3. Το τρίτο στοιχείο που προέκυψε από τα αποτελέσματα των πειραμάτων δείχνει σαφώς ότι η παρουσία του υποδοχέα ινωδογόνου GP IIb – IIIa μειώνεται σε πολύ μικρά ποσοστά όταν τα αιμοπετάλια του ανθρώπου επωαστούν σε συγκεντρώσεις εκάστου των μελετηθέντων φλαβονοειδών, οι οποίες προκαλούν πλήρη αναστολή στην συσσώρευσή τους. Παράπλευρα πειράματα έδειξαν επίσης ότι η παρουσία του εν λόγω υποδοχέα ινωδογόνου φαίνεται να μειώνεται δόσοεξαρτώμενα επωάζοντας τα

αιμοπετάλια σε συγκεντρώσεις φλαβονοειδών μικρότερες από την ελάχιστη πλήρως αναστέλλουσα την αιμοπεταλιακή συσσώρευση συγκέντρωση.

4. Οι συσσωρεύσεις των αιμοπεταλίων φαίνεται να αντιστρέφονται σε μεγάλο βαθμό όταν τα φλαβονοειδή προστίθενται σε μεγάλες συγκεντρώσεις μετά το πέρας της αιμοπεταλιακής συσσώρευσης.

Αναλυτικά τα δεδομένα έχουν, σημείο προς σημείο, ως εξής:

## **I. ΑΝΑΣΤΟΛΗ ΤΗΣ ΣΥΣΣΩΡΕΥΣΗΣ ΤΩΝ ΑΙΜΟΠΕΤΑΛΙΩΝ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ ΑΠΟ ΤΑ ΦΛΑΒΟΝΟΕΙΔΗ ΚΟΥΕΡΣΕΤΙΝΗ, ΓΕΝΙΣΤΕΪΝΗ, ΑΠΙΓΕΝΙΝΗ.**

### **I(1). Ανασταλτικές δράσεις της κουερσετίνης σε αιμοπετάλια του ανθρώπου *ex vivo*.**

Η κουερσετίνη αναστέλλει την συσσώρευση των αιμοπεταλίων που προκαλούν ξεχωριστά οι αντιπροσωπευτικοί αγωνιστές των τριών δόμων συσσώρευσης, δηλαδή της οδού του ADP, της οδού του PAF και της οδού του αραχιδονικού οξέος. Αναλυτικά η κουερσετίνη αναστέλλει τον PAF σε αιμοπετάλια στα οποία έχουν αποκλειστεί οι οδοί του αραχιδονικού οξέος με ασπιρίνη και του ADP με CP – CPK. Συγκεκριμένα έχουμε τα εξής:

**IC<sub>50</sub> κουερσετίνης έναντι του PAF = 1,0 – 1, 52 mM.**

Ομοίως η κουερσετίνη αναστέλλει το ADP, σε αιμοπετάλια στα οποία έχουν αποκλειστεί οι οδοί του PAF και του αραχιδονικού οξέος με γιγκολίδια A&B, όπως και με ασπιρίνη, αντιστοίχως. Συγκεκριμένα έχουμε τα εξής:

**IC<sub>50</sub> κουερσετίνης έναντι του ADP = 2,0 – 3,0 mM. IC<sub>50</sub> κουερσετίνης έναντι του αραχιδονικού οξέος = 1,5 – 2,0.**

Οι ελάχιστες συγκεντρώσεις κουερσετίνης που προκαλούν πλήρη αιμοπεταλιακή αναστολή (100%) είναι οι ακόλουθες:

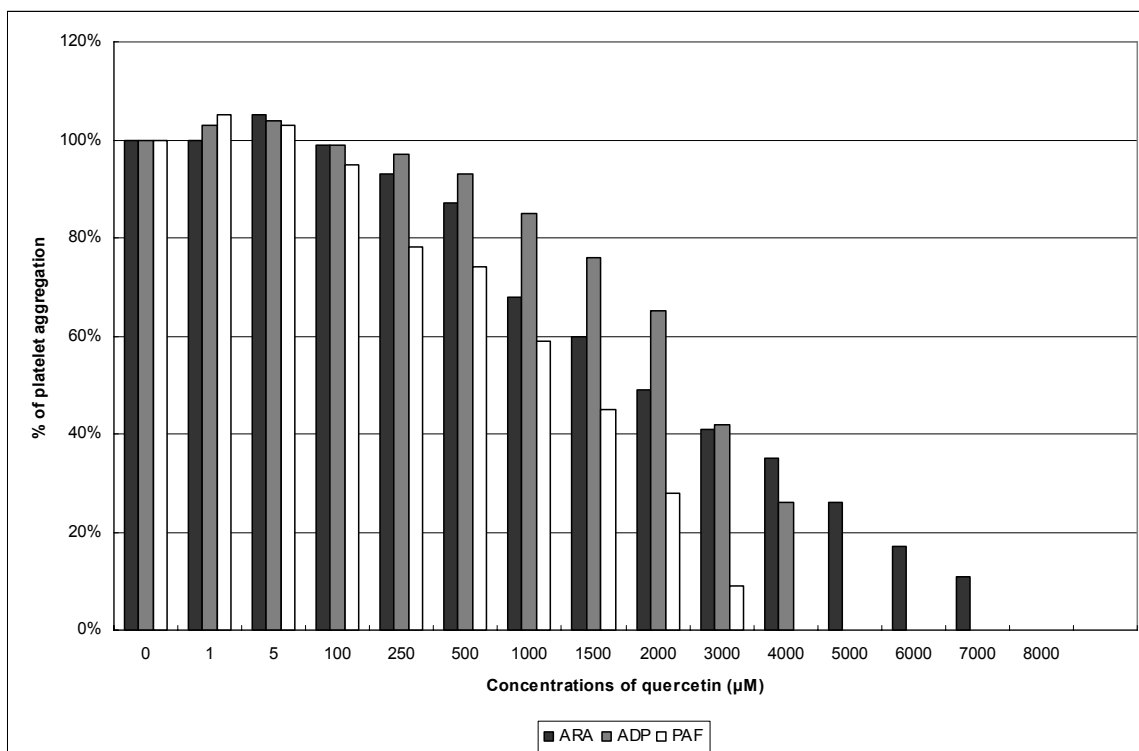
**MIC – κουερσετίνης για τον PAF = 4 mM. MIC- κουερσετίνης για το ADP = 6 mM.**

**MIC – κουερσετίνης για το Αραχιδονικό Οξύ = 7, 5 mM.**

Συνοψίζοντας η ανασταλτική δράση της κουερσετίνης στις συσσωρευτικές δράσεις του PAF, του ADP και του αραχιδονικού οξέος εμφανίζεται στον πίνακα 1.

Επίσης η ανασταλτική δράση της ουσίας αυτής στους ίδιους αιμοπεταλιακούς αγωνιστές φαίνεται στο διάγραμμα αρ.1. Μέσα στο διάγραμμα φαίνεται συγκριτικά η δράση της κουερσετίνης σε κάθε έναν από τους τρεις κύριους αιμοπεταλιακούς αγωνιστές. Μερικά

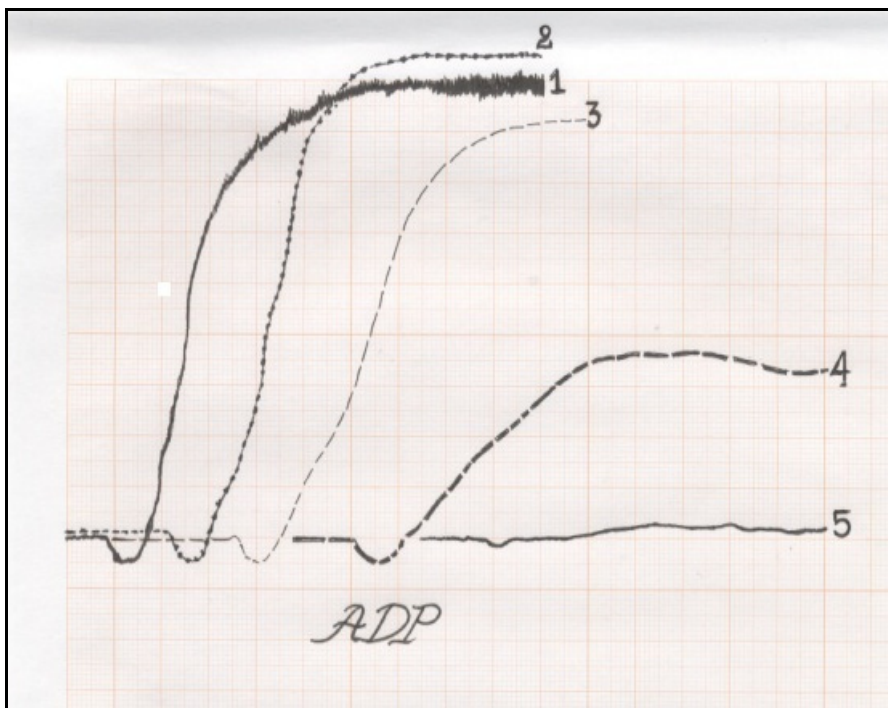
συσσωρευογραφήματα που συνοψίζουν τις σημαντικότερες καμπύλες συσσώρευσης και αναστολής φαίνονται στην εικόνα αρ. 1



**Διάγραμμα αρ.1:** Ανασταλτικές δράσεις κουερσετίνης στην συσσώρευση των αιμοπεταλίων.

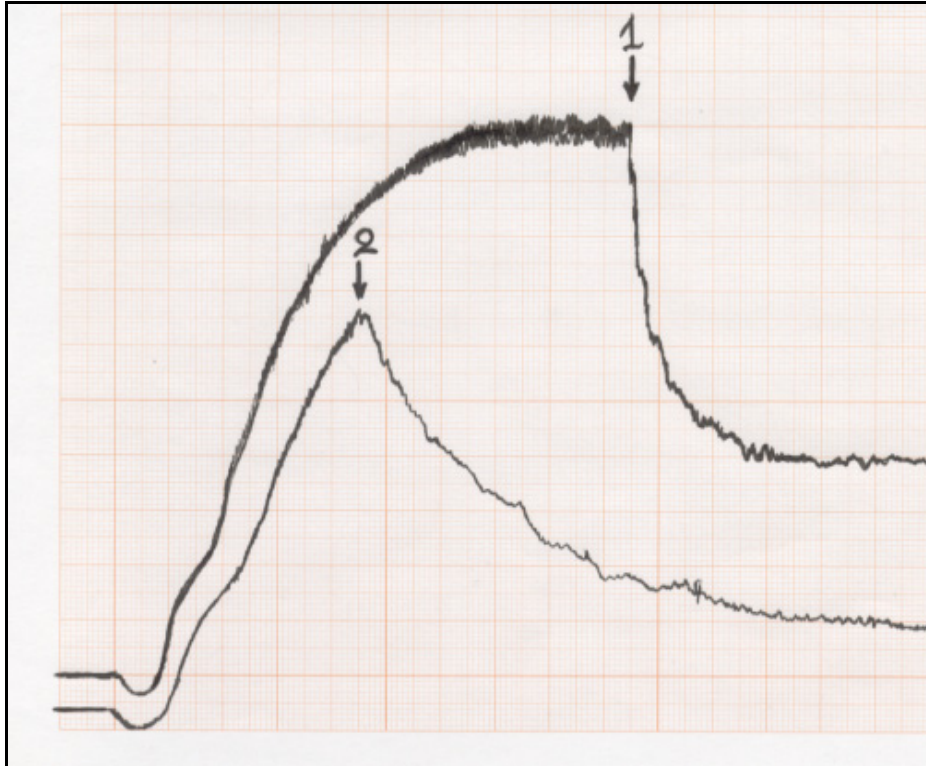
Συγκέντρωση κουερσετίνης	Αγωνιστής ADP	Αγωνιστής PAF	Αγωνιστής Αραχ. Οξύ	Συγκέντρωση Κουερσετίνης	Αγωνιστής ADP	Αγωνιστής PAF	Αγωνιστής Αραχ. Οξύ
	% συσσώρευσης	% συσσώρευσης	% συσσώρευσης	% Συσσώρευσης	% συσσώρ.	% συσσώρ.	% συσσώρ.
0μM	0%	0%	0%	3000μM	43%	8,5%	42%
1μM	104%	109%	0%	4000μM	26%	0%	36%
5μM	109%	106%	109%	5000μM	0%	0%	26%
100μM	98%	96%	98%	6000μM	0%	0%	17%
250μM	96%	78%	92%	7000μM	0%	0%	10%
500μM	93%	75%	87%	8000μM	0%	0%	0%
1000μM	85%	59%	68%				
1500μM	77%	45%	60%				
2000μM	66%	29%	49%				

**Πίνακας 1.** Δοσοεξαρτώμενη αναστολή της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων του ανθρώπου μέσω χορήγησης κουερσετίνης. Η σειρά ισχύος της κουερσετίνης για τους τρεις αγωνιστές είναι PAF>ADP>ARA.



**Εικόνα 1.** Δοσοεξαρτώμενη ανασταλτική δράση της κουερσετίνης στην συσσώρευση αιμοπεταλίων που προκαλείται από ADP. Οι άλλες δύο οδοί συσσώρευσης έχουν αποκλειστεί με ασπιρίνη (οδός του αραχιδονικού οξέος) και γιγκολίδια της *Ginkgo biloba* (οδός του PAF). 1: έλεγχος με μια ποσότητα ADP δύο φορές μεγαλύτερη από εκείνη που προκαλεί πλήρη και μη αναστρέψιμη συσσώρευση, 2: 5  $\mu\text{M}$  κουερσετίνης (παρατηρούμε ότι οι πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις κουερσετίνης προκαλούν μια ελαφρά επίταση της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων, στο 109% της τιμής του ελέγχου), 3: 1000 $\mu\text{M}$  (1 mM) κουερσετίνης και μείωση της συσσώρευσης στο 83% της τιμής του ελέγχου, 4: 4000  $\mu\text{M}$  (4 mM) – μείωση συσσώρευσης στο 26% του ελέγχου. 5: 5000  $\mu\text{M}$  (5 mM) – 100% αναστολή της συσσώρευσης.





**Εικόνα 2.** Αναστροφή της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων σε διαφορετικούς χρόνους από την έναρξή της μέσω μεγάλων συγκεντρώσεων κουερσετίνης (>10 mM).

Το ποσοστό της αποσυσσώρευσης φαίνεται να είναι συνάρτηση του χρόνου που μεσολαβεί από την στιγμή της έναρξης της αιμοπεταλιακής ενεργοποίησης και της χορήγησης της κουερσετίνης. Μετά από την παρέλευση χρόνων μεγαλύτερων των 8 – 10 λεπτών, η συσσώρευση γίνεται ανθεκτική στα αντιοξειδωτικά και δεν αντιστρέφεται παρά υπό την χορήγηση πολύ μεγάλων συγκεντρώσεων αυτών (>30 mM). Το ίδιο φαινόμενο παρατηρείται με την χορήγηση επίσης μεγάλων δόσεων ασκορβικού οξέος. Φαίνεται ότι η αιμοπεταλιακή συσσώρευση παρουσιάζει υψηλή αναστρεψιμότητα μέχρι και το 8<sup>ο</sup> έως 10<sup>ο</sup> λεπτό από την έναρξή της.

### **I(2). Ανασταλτικές δράσεις της γενιστεΐνης στην συσσώρευση των αιμοπεταλίων του ανθρώπου *ex vivo*.**

Η γενιστεΐνη αναστέλλει την συσσώρευση των αιμοπεταλίων που προκαλούν ξεχωριστά οι αντιπροσωπευτικοί αγωνιστές των τριών δόμων συσσώρευσης, δηλαδή της οδού του ADP, της οδού του PAF και της οδού του αραχιδονικού οξέος. Αναλυτικότερα έχουμε τα εξής:  
1<sup>ο</sup>) Η γενιστεΐνη αναστέλλει τον PAF σε αιμοπετάλια στα οποία έχουν αποκλειστεί οι οδοί του αραχιδονικού οξέος με ασπιρίνη και του ADP με CP – CPK. Συγκεκριμένα έχουμε τα εξής:

**IC50 γενιστεΐνης έναντι του PAF = 4,0 – 5,0 mM.**

2<sup>ov</sup>) Ομοίως η γενιστεΐνη αναστέλλει το ADP, σε αιμοπετάλια στα οποία έχουν αποκλειστεί οι οδοί του PAF και του αραχιδονικού οξέος με γιγκολίδια A&B, όπως και με ασπιρίνη, αντιστοίχως. Συγκεκριμένα έχουμε τα εξής:

**IC50 γενιστεΐνης έναντι του ADP = 8,0 – 9,0 mM.**

3<sup>ov</sup>) Επίσης η γενιστεΐνη αναστέλλει την δράση του αραχιδονικού οξέος σε αιμοπετάλια ανθρώπου *ex vivo* στα οποία οι οδοί του PAF και του ADP έχουν αποκλειστεί αντιστοίχως μέσω των γιγκολιδίων A&B και της χορήγησης CP – CPK.

**H IC50 γενιστεΐνης έναντι του αραχιδονικού οξέος = 5 – 7mM.**

Οι ελάχιστες συγκεντρώσεις γενιστεΐνης που προκαλούν πλήρη αιμοπεταλιακή αναστολή (100%) είναι οι ακόλουθες:

MIC – γενιστεΐνης για τον PAF = 11 mM. MIC- γενιστεΐνης για το ADP = 12 mM.

MIC – γενιστεΐνης για το Αραχιδονικό Οξύ = 15 mM.

Στον Πίνακα αρ.2 φαίνεται αναλυτικά η ανασταλτική δράση της γενιστεΐνης απέναντι στην αιμοπεταλιακή συσσώρευση που προκαλείται από τους τρεις κύριους αγωνιστές των λειτουργικών αντιδράσεων των αιμοπεταλίων του ανθρώπου *ex vivo*.

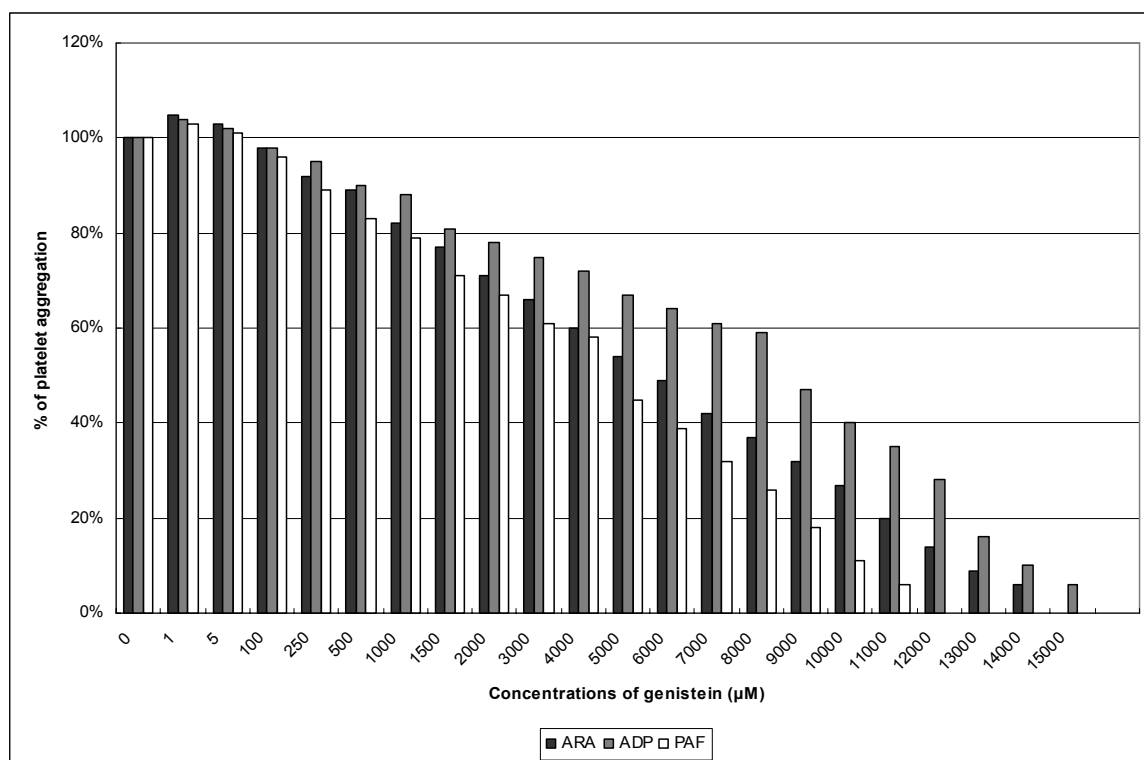
Στο Διάγραμμα αρ.2 φαίνεται η αναλυτική δράση της γενιστεΐνης απέναντι στην αιμοπεταλιακή συσσώρευση σύμφωνα με το σύνολο των καμπυλών συσσώρευσης των αιμοπεταλίων στο συσσωρευόμετρο.

Στην Εικόνα αρ. 3 φαίνονται οι δοσοεξαρτώμενες δράσεις της γενιστεΐνης επί της διαδικασίας συσσώρευσης των αιμοπεταλίων όταν αυτά διεγείρονται από ένα από τα κυρία οδών συσσώρευσης.

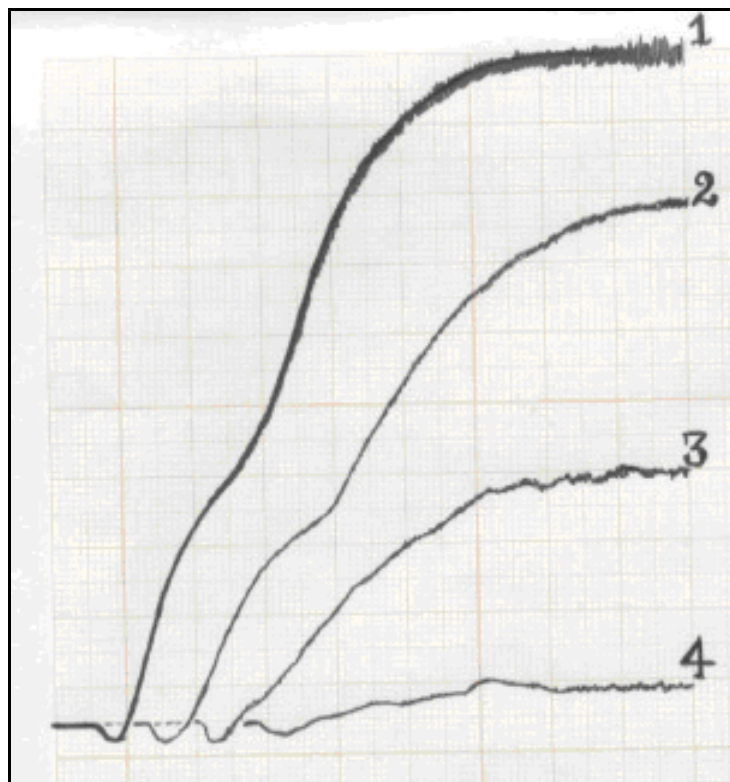
Στην εικόνα αρ. 4 φαίνεται η δράση της γενιστεΐνης όταν αυτή χορηγείται σε διαφορετικές χρονικές στιγμές της αιμοπεταλιακής συσσώρευσης. Η γενιστεΐνη έχει την ιδιότητα να σταματά την αιμοπεταλιακή συσσώρευση σε όλα τα χρονικά στιγμιότυπα αυτής. Όταν η συσσώρευση ολοκληρωθεί, η γενιστεΐνη μπορεί να προκαλέσει αποσυσσώρευση των αιμοπεταλίων και αποικοδόμηση των λευκών θρόμβων μέχρι χρονικού διαστήματος έως και 10 λεπτών από την ενεργοποίηση των θρομβοκυττάρων.

Συγκέντρωση γενιστεΐνης	Αγωνιστής ADP	Αγωνιστής PAF	Αγωνιστής Αραχ. Οξύ	Συγκέντρωση γενιστεΐνης	Αγωνιστής ADP	Αγωνιστής PAF	Αγωνιστής Αραχ. Οξύ
	% συσσώρευσης	% συσσώρευσης	% συσσώρευσης	% Συσσώρευσης	% συσσώρ.	% συσσώρ.	% συσσώρ.
0μM	0%	0%	0%	5000μM	67%	44%	53%
1μM	104%	103%	106%	6000μM	64%	39%	48%
5μM	102%	100,5%	102,5%	7000μM	61%	32%	42%
100μM	97%	97,5%	96%	8000μM	59%	26%	37%
250μM	94%	88%	92%	9000μM	47%	18%	31%
500μM	91%	83%	89%	10 000μM	40%	12%	26%
1000μM	82%	78%	79%	11000μM	36%	6%	20%
1500μM	81%	71%	77%	12 000μM	28%	0%	14%
2000μM	78%	69%	72%	13 000μM	17%	0%	9%
3000μM	75%	61%	65%	14 000μM	10%	0%	6%
4000μM	72%	58%	60%	15 000μM	5%	0%	0%

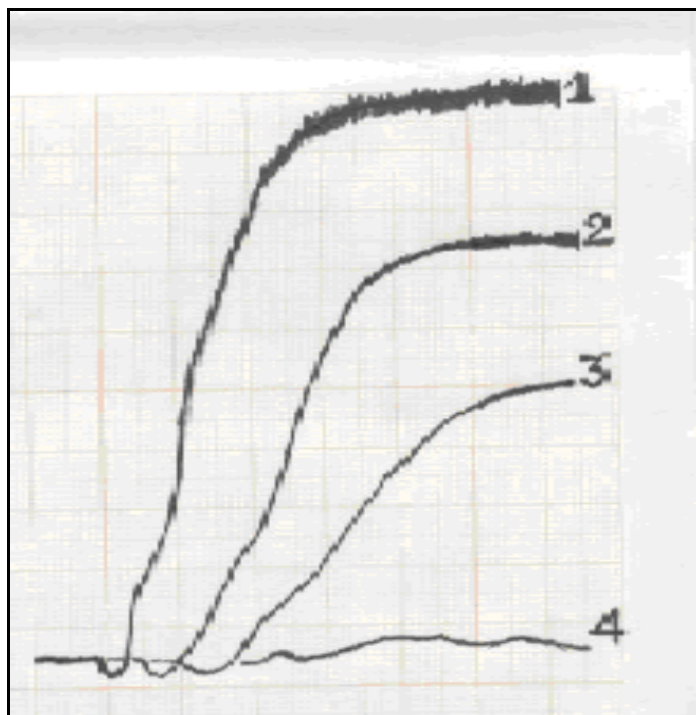
**Πίνακας 2:** Ανασταλτική δράση της γενιστεΐνης στην αιμοπεταλιακή συσσώρευση που προκαλείται από έκαστο των κύριων αγωνιστών των τριών οδών ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων. Ανθρώπινα αιμοπετάλια *ex vivo*.



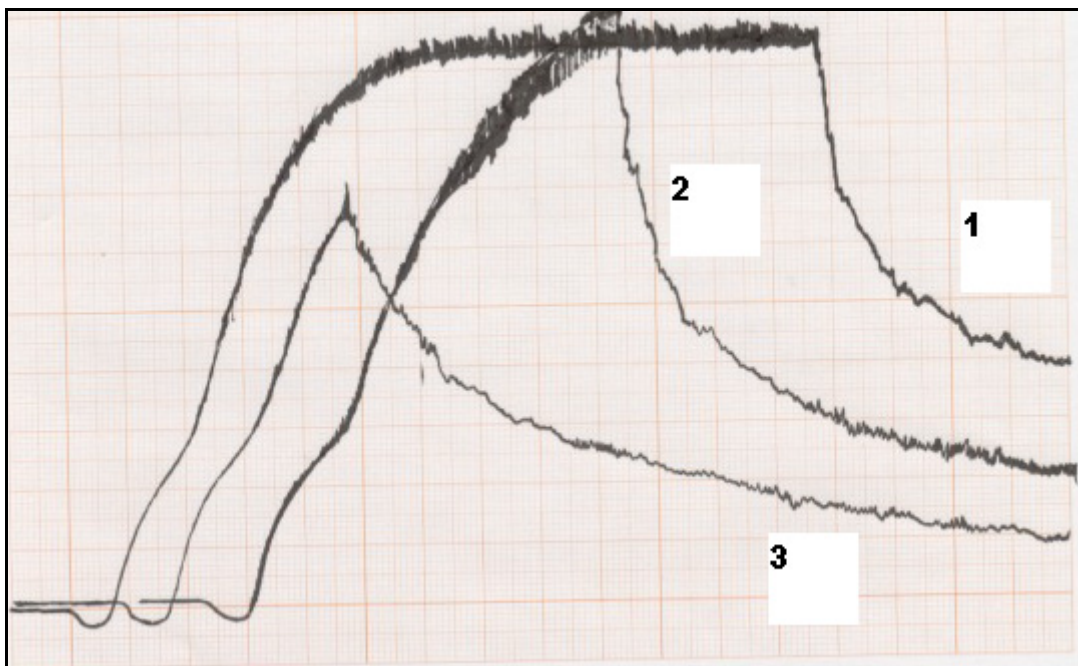
**Διάγραμμα αρ.2:** Δοσοεξαρτώμενη ανασταλτική δράση της γενιστεΐνης στην αιμοπεταλιακή συσσώρευση την προκαλούμενη από έκαστο των τριών κυρίων αγωνιστών της αιμοπεταλιακής λειτουργίας (ADP, PAF, ARA). Συγκριτικά η κλίμακα ενεργότητας της γενιστεΐνης έχει την ακόλουθη διαβάθμιση PAF>ARA>ADP.



**Εικόνα αρ. 3.** Δοσοεξαρτώμενη αναστολή της συσσωρευτικής δράσης του ADP επί των αιμοπεταλίων του ανθρώπου *ex vivo* μέσω της χορήγησης γενιστεΐνης. Οι οδοί συσσώρευσης του PAF και του αραχιδονικού οξέος έχουν αποκλειστεί εκλεκτικά με γιγκολίδια του φυτού *Gingko biloba* και ασπιρίνη αντιστοίχως (ίδη «Υλικά και Μέθοδοι»). 1: Συσσώρευση ελέγχου με ADP τιθέμενο σε δόση που προκαλεί μέγιστη και μη αντιστρεπτή αιμοπεταλιακή συσσώρευση (συγκέντρωση γενιστεΐνης 0 M). 2: Αναστολή της αιμοπεταλιακής συσσώρευσης στο 78 % της συσσώρευσης ελέγχου – συγκέντρωση γενιστεΐνης 1000  $\mu\text{M}$  (1 mM). 3: Αναστολή της αιμοπεταλιακής συσσώρευσης στο 40% της συσσώρευσης ελέγχου – συγκέντρωση γενιστεΐνης 10000 (10 mM). 4: Πλήρης (100%) αναστολή της αιμοπεταλιακής συσσώρευσης – συγκέντρωση γενιστεΐνης 15.000  $\mu\text{M}$  (15 mM). Η γενιστεΐνη προκύπτει ασθενέστερη της κουερσεΐνης στην ικανότητα αναστολής της συσσωρευτικής δράσης του ADP



**Εικόνα αρ. 4.** Δοσοεξαρτώμενη ανασταλτική δράση της γενιστεΐνης επί της ισχυρής συσσωρευτικής δράσης του PAF σε αιμοπετάλια ανθρώπου ex vivo, στα οποία οι άλλες δύο οδοί, δηλαδή του αραχιδονικού οξέος και του ADP είχαν παραμείνει ανοιχτές επωάζοντας το PRP με τις κατάλληλες ποσότητες ασπιρίνης και διαλύματος CP – CPK. 1: Συσσώρευση ελέγχου με χορήγηση ποσότητας PAF που προκαλεί μέγιστη (100%) και μη αντιστρέψιμη αιμοπεταλιακή συσσώρευση. 2: αναστολή της αιμοπεταλιακής συσσώρευσης σε ποσοστό 73 % της συσσώρευσης ελέγχου – συγκέντρωση γενιστεΐνης στο PRP ίση με 1500  $\mu\text{M}$  (mM). 3: αναστολή της αιμοπεταλιακής στο 44% αυτής του ελέγχου – συγκέντρωση γενιστεΐνης 5000  $\mu\text{M}$  (mM). 4: 100% αναστολή της συσσωρευτικής δράσης του PAF – συγκέντρωση γενιστεΐνης 12.000  $\mu\text{M}$  (12 mM).



**Εικόνα αρ. 5.** Αντιστροφή της αιμοπεταλιακής συσσώρευσης με την χορήγηση γενιστεΐνης σε υψηλές δόσεις (> 15 mM). 1: 8 min από την έναρξη της συσσώρευσης. 2: 4,5 min από την έναρξη της συσσώρευσης. 3: 2 min από την έναρξη της συσσώρευσης.

### **I(2). Ανασταλτικές δράσεις της απιγενίνης στην συσσώρευση των αιμοπεταλίων του ανθρώπου *ex vivo*.**

Η απιγενίνη αναστέλλει την συσσώρευση των αιμοπεταλίων που προκαλούν ξεχωριστά οι αντιπροσωπευτικοί αγωνιστές των τριών δόμων συσσώρευσης, δηλαδή της οδού του ADP, της οδού του PAF και της οδού του αραχιδονικού οξέος. Αναλυτικά η απιγενίνη αναστέλλει τον PAF σε αιμοπετάλια στα οποία έχουν αποκλειστεί οι οδοί του αραχιδονικού οξέος με ασπιρίνη και του ADP με CP – CPK. Συγκεκριμένα έχουμε τα εξής:

**IC<sub>50</sub> απιγενίνης έναντι του PAF = 4,0 – 5,0 mM.**

Ομοίως η απιγενίνη αναστέλλει το ADP, σε αιμοπετάλια στα οποία έχουν αποκλειστεί οι οδοί του PAF και του αραχιδονικού οξέος με γιγκολίδια A&B, όπως και με ασπιρίνη, αντιστοίχως. Συγκεκριμένα έχουμε τα εξής:

**IC<sub>50</sub> απιγενίνης έναντι του ADP = 8,0 – 9,0 mM. IC<sub>50</sub> απιγενίνης έναντι του αραχιδονικού οξέος = 5 – 7mM.**

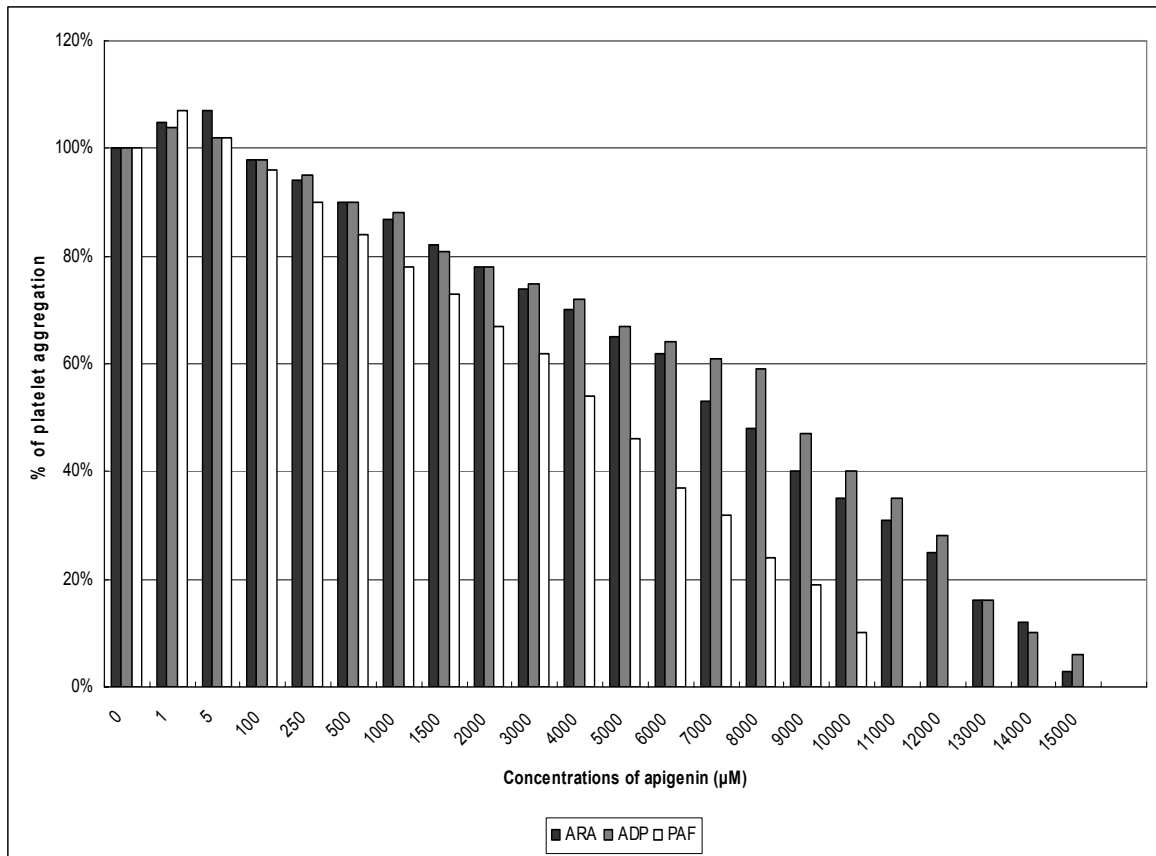
Οι ελάχιστες συγκεντρώσεις απιγενίνης που προκαλούν πλήρη αιμοπεταλιακή αναστολή (100%) είναι οι ακόλουθες:

MIC – απιγενίνης για τον PAF = 12 mM. MIC- απιγενίνης για το ADP = 15 mM.

MIC – απιγενίνης για το Αραχιδονικό Οξύ = 15 mM.

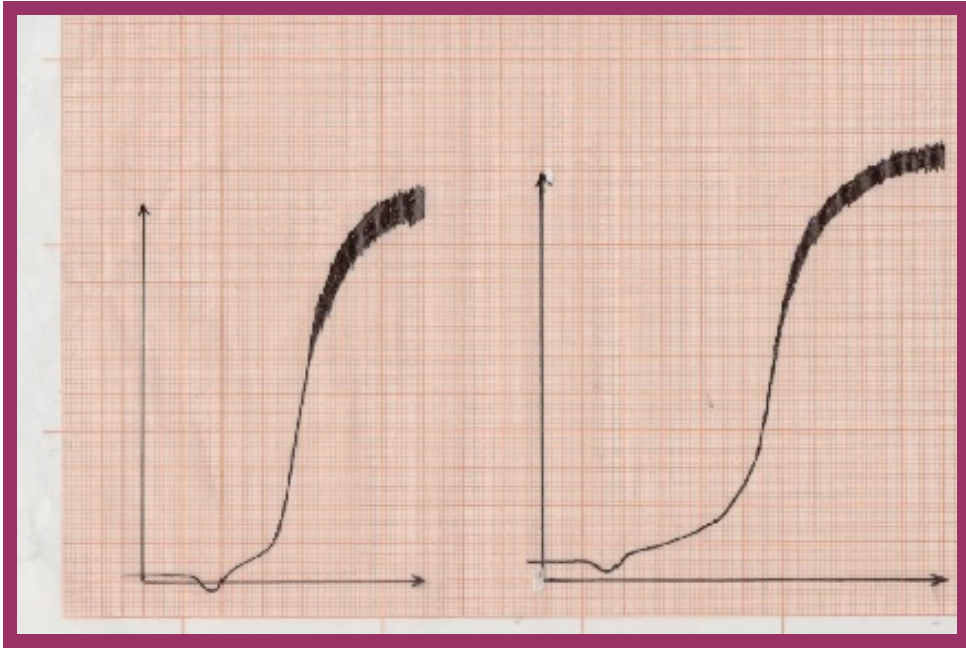
Συγκέντρωση απιγενίνης	Αγωνιστής ADP	Αγωνιστής PAF	Αγωνιστής Αραχ. Οξύ	Συγκέντρωση απιγενίνης	Αγωνιστής ADP	Αγωνιστής PAF	Αγωνιστής Αραχ. Οξύ
	% συσσώρευσης	% συσσώρευσης	% συσσώρευσης	% Συσσώρευσης	% συσσώρ.	% συσσώρ.	% συσσώρ.
0μM	0%	0%	0%	5000μM	67%	47%	65%
1μM	109%	103%	103%	6000μM	64%	37%	62%
5μM	102%	102%	109%	7000μM	61%	32%	56%
100μM	98%	95%	97%	8000μM	59%	24%	49%
250μM	94%	90%	93%	9000μM	48%	19%	40%
500μM	91%	90,5%	84%	10 000μM	40%	10%	36%
1000μM	88%	78%	87%	11000 μM	36%	0%	32%
1500μM	80,5%	72%	82%	12 000μM	28%	0%	25%
2000μM	78%	67%	77%	13 000μM	17%	0%	16%
3000μM	75%	62%	76%	14 000μM	15%	0%	11%
4000μM	74%	56%	72 %	15 000μM	5%	0%	3%

**Πίνακας αρ.3:** Ανασταλτική δράση της απιγενίνης στην αιμοπεταλιακή συσσώρευση που προκαλούν οι τρεις κύριοι αγωνιστές των αντίστοιχων οδών της αιμοπεταλιακής λειτουργίας. Η ισχύς της απιγενίνης ακολουθεί την ίδια τάξη που έχουμε δει επίσης για την δράση της γενιστεΐνης: PAF>ARA>ADP, ενώ η κουερσετίνη ακολουθεί άλλο προφίλ (PAF>ADP>ARA). Η διαφορά αυτή οφείλεται ενδεχομένως στο γεγονός ότι οι γενιστεΐνη και η απιγενίνη είναι ουσίες ισομερείς και συνεπώς είναι ενδεχόμενο να καταλαμβάνουν τους ίδιους υποδοχείς ή τα ενεργά κέντρα ενζύμων όπως η COX1 ή η LOX με την ισότιμη δύναμη, ενώ η κουερσετίνη διαφέροντας δομικά επιδεικνύει και διαφορετική λειτουργική διαβάθμιση.

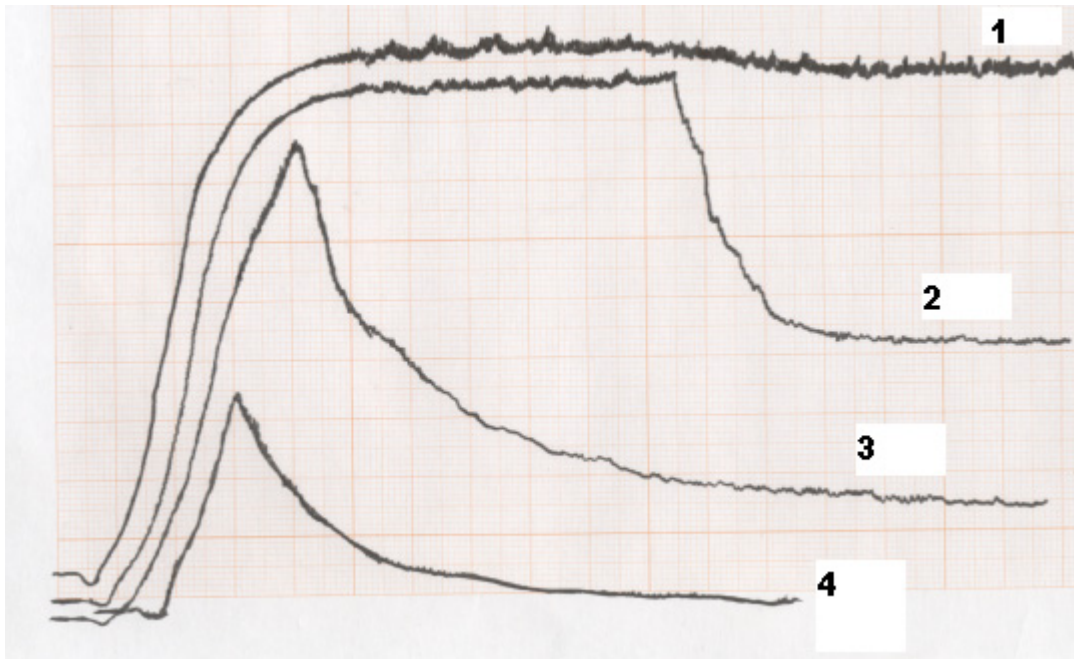


**Διάγραμμα αρ. 3:** Αναστολή της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων μέσω της χορήγησης απιγενίνης. Το εν λόγω φλαβονοειδές αναστέλλει και τις τρεις οδούς της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων του ανθρώπου. Η οδός του PAF εμφανίζει μεγαλύτερη ευαισθησία απέναντι στην δράση της απιγενίνης. Η σειρά δραστηριότητας είναι η εξής: PAF>ARA>ADP. Η δράση της απιγενίνης μοιάζει αρκετά με εκείνη της γενιστεΐνης τόσο στον τρόπο όσο και στην δοσολογία.





*Εικόνα αρ. 5:*



*Εικόνα αρ.6*

## II. ΔΡΑΣΗ ΤΩΝ ΦΛΑΒΟΝΟΕΙΔΩΝ ΚΟΥΡΣΕΤΙΝΗ, ΓΕΝΙΣΤΕΪΝΗ, ΑΠΙΓΕΝΙΝΗ, ΑΠΙΓΕΝΙΝΗ ΣΤΗΝ ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΘΡΟΜΒΟΞΑΝΗΣ A<sub>2</sub> ΑΠΟ ΑΙΜΟΠΕΤΑΛΙΑ ΑΝΘΡΩΠΟΥ *ex vivo* ΣΕ ΔΙΑΦΟΡΕΣ ΦΑΣΕΙΣ ΤΗΣ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑΣ ΣΥΣΣΩΡΕΥΣΗΣ

### Γενικά

Η χορήγηση ξεχωριστά εκάστου από τα μελετηθέντα φλαβονοειδή (κουρσετίνης, γενιστεΐνης και απιγενίνης) εκτός από την αναστολή ή τροποποίηση της αιμοπεταλιακής συσσώρευσης μέσω των τριών οδών λειτουργικής ενεργοποίησης της λειτουργικής αντίδρασης των αιμοπεταλίων του ανθρώπου, έχει την ιδιότητα να μειώνει την παραγωγή της θρομβοξάνης A<sub>2</sub> σε επίπεδα σχετιζόμενα με τις αντίστοιχες λειτουργικές μεταβολές. Η εν λόγω δράση των συγκεκριμένων φλαβονοειδών φαίνεται να συσχετίζεται με την αναστολή της κυκλοξυγονάσης 1, η οποία αποτελεί το κύριο ένζυμο της βιοσύνθεσης των προστανοειδών μεταβολιτών στα αιμοπετάλια του ανθρώπου.

Τα τρία χρησιμοποιηθέντα φλαβονοειδή έχουν ανάλογες μοριακές δομές οπότε μπορεί να θεωρηθεί ότι είναι σε θέση να αλληλεπιδράσουν με το ενεργό κέντρο του συγκεκριμένου ενζύμου.

Το δεδομένο αυτό ενισχύεται από την παρατήρηση ότι οι δύο ισομερείς φλαβονοειδείς ουσίες γενιστεΐνη και απιγενίνη αναστέλλουν την παραγωγή της θρομβοξάνης A<sub>2</sub> κατά τρόπο σχεδόν πανομοιότυπο όσον αφορά το επίπεδο της αναστολής ανά χρησιμοποιηθείσα συγκέντρωση.

Προκειμένου να εκτιμηθεί η αντιστοιχία μεταξύ παρατηρούμενης αναστολής και δόσης, χρησιμοποιήσαμε τρία διαφορετικά σημεία μέτρησης, αντιστοιχούντα σε διαφορετικές συγκεντρώσεις ανασταλτικής ουσίας:

1<sup>ov</sup>) Το σημείο A που αντιστοιχούσε σε μηδενική συγκέντρωση θρομβοξάνης A<sub>2</sub>, δηλαδή στα αιμοπετάλια ελέγχου (πλήρης συσσώρευση με έκαστο των κυρίων αγωνιστών).

2<sup>ov</sup>) Το σημείο B που αντιστοιχούσε στην IC<sub>50</sub> κάθε ουσίας.

3<sup>ov</sup>) Το σημείο Γ που αντιστοιχούσε στην Ελάχιστη Συγκέντρωση Πλήρους Αναστολής.

Τα δεδομένα αυτά επιδεικνύονται αναλυτικά κατωτέρω.

### Π(α). Επίπεδα παραγωγής θρομβοξάνης A<sub>2</sub> μέσω της δράσης των κυρίων και δευτερευόντων αγωνιστών της αιμοπεταλιακής συσσώρευσης

Ο αναλυτικός προσδιορισμός της παραγωγής θρομβοξάνης A<sub>2</sub> (μετρούμενη ως θρομβοξάνη B<sub>2</sub>) μετά από παρέλευση οχτώ λεπτών από την έναρξη της αιμοπεταλιακής συσσώρευσης φαίνεται στον πίνακα αρ.4.

Οι αγωνιστές της αιμοπεταλιακής συσσώρευσης που χρησιμοποιήθηκαν ήσαν οι ακόλουθοι: ADP, PAF, Αραχιδονικό Οξύ, επινεφρίνη, θρομβίνη, ριστοσετίνη, κολλαγόνο.

	<b>ADP</b>	<b>PAF</b>	<b>ARA</b>	<b>ADRE.</b>	<b>THR.</b>	<b>COL.</b>	<b>RISTO.</b>
Πριν (PRP σε ηρεμία )	137±9 pg/ml	137± 9 pg/ml	137± 9 pg/ml	137± 9 pg/ml	137± 9 pg/ml	137± 9 pg/ml	137± 9 pg/ml
Μετά (PRP 8 min μετά διέγερσης)	1087±22 pg/ml	1783±26 pg/ml	1375±18 pg/ml	1237±31 pg/ml	2375±34 pg/m	1241±14 pg/ml	1398±42 pg/ml

**Πίνακας αρ.5:** Παραγωγή θρομβοξάνης A<sub>2</sub> από τα αιμοπετάλια του ανθρώπου στο φυσιολογικό τους πλάσμα (PRP ex vivo) απουσία διέγερσης και μετά την παρέλευση 8 λεπτών από την έναρξη της συσσώρευσής τους, εκ μέρους διαφόρων αγωνιστών. Οι αγωνιστές που χρησιμοποιήθηκαν είναι οι αντιπροσωπευτικοί των τριών οδών λειτουργίας (οδοί των ADP, PAF και Αραχιδονικό Οξύ [ARA]) όπως επίσης η επινεφρίνη, η θρομβίνη, το κολλαγόνο και η ριστοσετίνη. Αναλυτικά: B.L (base lane) = συγκέντρωση TXA<sub>2</sub> σε αιμοπετάλια εν ηρεμία, παρουσία αντιπηκτικού (κιτρικό τρινάτριο 0,2%). ADP: [TXA<sub>2</sub>] με αγωνιστή το ADP. PAF: [TXA<sub>2</sub>] με αγωνιστή τον PAF, ARA: [TXA<sub>2</sub>] με αγωνιστή το αραχιδονικό οξύ. ADRE: [TXA<sub>2</sub>] με αγωνιστή την επινεφρίνη. THR: [TXA<sub>2</sub>] με αγωνιστή την θρομβίνη. COL: [TXA<sub>2</sub>] με αγωνιστή το κολλαγόνο. RISTO1: [TXA<sub>2</sub>] με αγωνιστή το αντιβιοτικό ριστοσετίνη.

**Π(β). Επίπεδα παραγωγής θρομβοξάνης A<sub>2</sub> από αιμοπετάλια ανθρώπου *ex vivo* πριν και μετά την χορήγηση κουερσετίνης στο PRP σε συγκεντρώσεις ίσες με την IC<sub>50</sub> και την MIC**

Στον πίνακα αρ.6 φαίνονται οι μεταβολές της παραγωγής θρομβοξάνης A<sub>2</sub> από τα ανθρώπινα αιμοπετάλια *ex vivo* όταν αυτά ενεργοποιούνται μέσω των κυρίων αγωνιστών τους, αλλά και άλλων αγωνιστών που δρουν δια των τριών οδών.

Εν προκειμένω οι αγωνιστές που χρησιμοποιήθηκαν ήσαν οι εξής: Διφωσφορική αδενοσίνη (ADP), Παράγων Ενεργοποίησης Αιμοπεταλίων (PAF), αραχιδονικό οξύ (ARA), επινεφρίνη (ADRE), θρομβίνη (THR), κολλαγόνο (COL), ριστοσετίνη (RISTO). Η βασική γραμμή της TXA<sub>2</sub> είναι αρκετά χαμηλή με μέσο όρο τα 137±9 pg/ml PRP.

Η χορήγηση της κουερσετίνης στα αιμοπετάλια και η επώασή τους επί λίγα λεπτά (5 έως 10) έχει ως αποτέλεσμα όχι μόνον την δοσοεξαρτώμενη αναστολή της συσσώρευσης αλλά και την αντίστοιχου επιπέδου αναστολή της παραγωγής TXA<sub>2</sub>.

Ο ασθενέστερος αγωνιστής που επάγει την μικρότερη παραγωγή θρομβοξάνης από τα αιμοπετάλια, εν σχέσει προς τους υπολοίπους, είναι το ADP (1087 pg/ml PRP), ενώ η θρομβίνη αποτελεί τον ισχυρότερο αγωνιστή επάγοντας την υψηλότερη παραγωγή θρομβοξάνης από τα ανθρώπινα αιμοπετάλια (2375 pg/ml PRP).

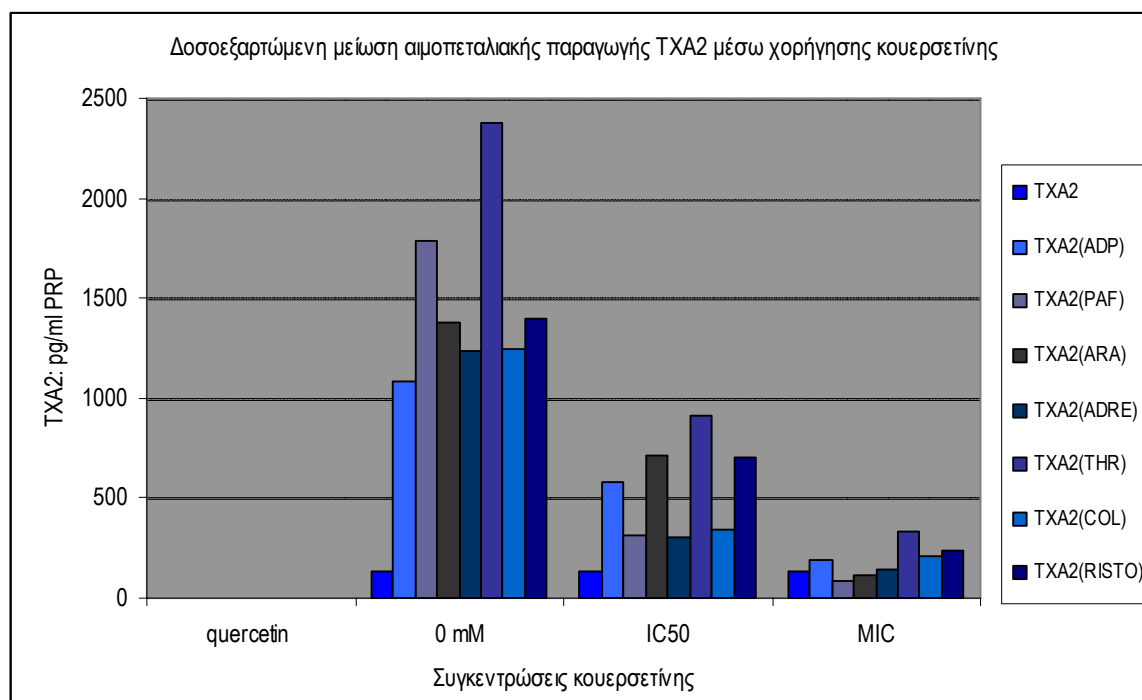
Η σειρά δραστηριότητας των αγωνιστών ως προς την παραγωγή θρομβοξάνης από τα αιμοπετάλια είναι η εξής: Θρομβίνη>PAF>RISTO>ARA>COL>ADRE>ADP.

Είναι σημαντικό να σημειώσουμε ότι η χορήγηση μιας δόσης κουερσετίνης ίση με την συγκεκριμένη IC<sub>50</sub> που αναστέλλει κατά 50% την συσσωρευτική δράση του αντίστοιχου αγωνιστή, επιφέρει μια αναστολή της παραγωγής TXA<sub>2</sub> που είναι σαφώς υψηλότερη του 50% της αντίστοιχης μέγιστης παραγωγής θρομβοξάνης για αγωνιστές όπως ο PAF, η επινεφρίνη, η θρομβίνη και το κολλαγόνο, ενώ για το ADP, το αραχιδονικό οξύ και την ριστοσετίνη κυμαίνεται γύρω από το 50%. Συνεπώς μπορούμε να θεωρήσουμε ότι η δράση της κουερσετίνης πλήττει περισσότερο την παραγωγή TXA<sub>2</sub> για τον PAF, την επινεφρίνη, την θρομβίνη και το κολλαγόνο και λιγότερο την αντίστοιχη που προκαλούν το ADP, η ριστοσετίνη και το αραχιδονικό οξύ. Αυτό δηλώνει ενδεχομένως ότι η δράση της κουερσετίνης για τους τέσσερες πρώτους αγωνιστές φαίνεται να αναστέλλει όχι μόνον την COX1, αλλά και κάποιον άλλο μηχανισμό, ο οποίος μάλλον ευρίσκεται πριν την κυκλοξυγονάση. Δεδομένου ότι τόσο η θρομβίνη όσο και ο PAF επάγουν τις υψηλότερες παραγωγές TXA<sub>2</sub> είναι πιθανόν η δράση της κουερσετίνης να λαμβάνει χώρα και στο επίπεδο των φωσφολιπασών: όσο λιγότερο αραχιδονικό οξύ απελευθερώνεται από τις

φωσφολιπάσες της μεμβράνης λόγω αναστολής τους, τόσο λιγότερη TXA2 παράγεται τελικά από την αραχιδονική οδό. Αν όμως η αναστολή ίσχυε και για ένα ένζυμο τοποθετημένο μετά την COX1, π.χ την συνθετάση της TXA2, ομοίως θα υπήρχε μια μεγάλη μείωση της TXA2. Μόνον ο προσδιορισμός των ενδιάμεσων μεταβολιτών μπορεί να ξεκαθαρίσει το εν λόγω ζήτημα. Στον πίνακα αρ.6 που ακολουθεί φαίνονται οι μεταβολές της παραγωγής TXA2 από αιμοπετάλια στα οποία έχουμε χορηγήσει τόσο την IC50 όσο και MIC της κουερσετίνης για κάθε έναν αγωνιστή.

ΑΓΩΝΙΣΤΗΣ	ADP	PAF	ARA	ADRE.	THR.	COL.	RISTO.
Κατάσταση αιμοπεταλίων							
Πριν (PRP σε ηρεμία )	TXA2: 137±9 pg/ml	TXA2 137± 9 pg/ml	TXA2 137± 9 pg/ml	TXA2 137± 9 pg/ml	TXA2 137± 9 pg/ml	TXA2 137± 9 pg/ml	TXA2 137± 9 pg/ml
Οχτώ min κατόπιν διέγερσης	TXA2 1087±22 pg/ml	TXA2 1783±26 pg/ml	TXA2 1375±18 pg/ml	TXA2 1237±31 pg/ml	TXA2 2375±34 pg/m	TXA2 1241±14 pg/ml	TXA2 1398±42 pg/ml
[κουερσετίνης] = IC50 ανά αγωνιστή	3 mM	1,5 mM	2 mM	3 mM	5 mM	3 mM	6 mM
[κουερσετίνης] = IC50 Οχτώ min κατόπιν διέγερσης	TXA2 578±36 pg/ml	TXA2 310±29 pg/ml	TXA2 712±41 pg/ml	TXA2 306±17 pg/ml	TXA2 912±25 pg/ml	TXA2 345±17 pg/ml	TXA2 702±38 pg/ml
[κουερσετίνης] = MIC ανά αγωνιστή	6 mM	4 mM	7,5 mM	5 mM	7,5 mM	5,8 mM	8,5 mM
[κουερσετίνης] = MIC Οχτώ min κατόπιν διέγερσης	TXA2 192±12 pg/ml	TXA2 90±5 pg/ml	TXA2 117±8 pg/ml	TXA2 144±11 pg/ml	TXA2 329±16 pg/ml	TXA2 206±12 pg/ml	TXA2 237±18 pg/ml

**Πίνακας αρ.6:** Δράσεις της κουερσετίνης επί της αιμοπεταλιακής παραγωγής TXA2 η οποία επάγεται από βασικούς αγωνιστές της αιμοπεταλιακής λειτουργίας. Σειρά δραστηριότητας κουερσετίνης μεταξύ των τριών κυρίων αγωνιστών: PAF>ADP>ARA. Η IC50 των διαφόρων αγωνιστών. MIC – κουερσετίνης για τον PAF = 4 mM. MIC-κουερσετίνης για το ADP = 6 mM. MIC – κουερσετίνης για το Αραχιδονικό Οξύ = 7, 5 mM.



**Διάγραμμα αρ.4** Μείωση της παραγωγής θρομβοξάνης από τα αιμοπετάλια του ανθρώπου *ex vivo* κατόπιν επώασής τους με κατάλληλες συγκεντρώσεις κουερσετίνης ικανές να επιφέρουν αναστολή κατά 50 % και 100% της αιμοπεταλιακής συσσώρευσης (IC50 και MIC αντιστοίχως).

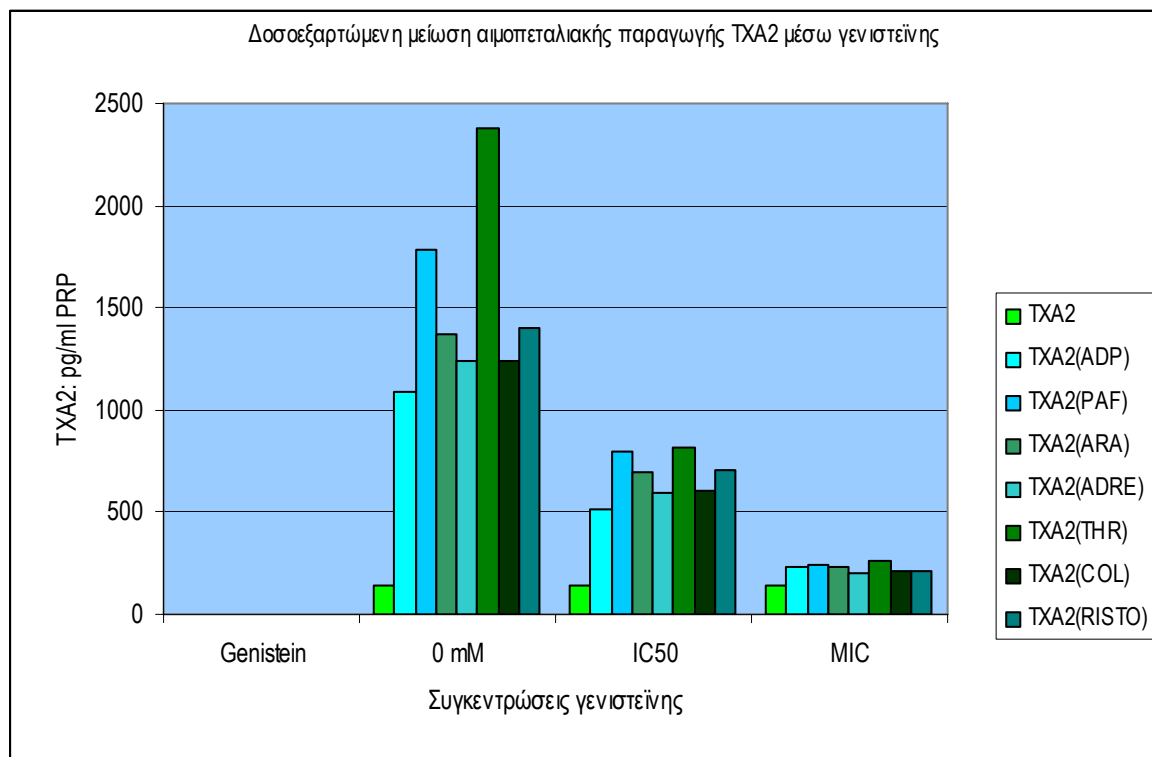
**II(β). Επίπεδα παραγωγής θρομβοξάνης A<sub>2</sub> από αιμοπετάλια ανθρώπου *ex vivo* πριν και μετά την χορήγηση γενιστεΐνης στο PRP σε συγκεντρώσεις ίσες με την IC<sub>50</sub> και την MIC**

Τα επίπεδα της TXA2 μειώνονται σημαντικά όταν χορηγούμε στα αιμοπετάλια του ανθρώπου συγκεκριμένες ποσότητες γενιστεΐνης και κατόπιν πραγματοποιούμε επώαση 5 – 10 λεπτών πριν την ενεργοποίησή τους με έναν αγωνιστή αυτών.

Εν προκειμένου χρησιμοποιήσαμε τις συγκεντρώσεις της γενιστεΐνης που προκαλούν 50 % και 100 % αναστολή της αιμοπεταλιακής συσσώρευσης, δηλαδή τις IC50 και τις MIC που αντιστοιχούν σε κάθε έναν από τους ακόλουθους αγωνιστές: διφωσφορική αδενοσίνη (ADP), παράγοντα ενεργοποίησης αιμοπεταλίων (PAF), αραχιδονικό οξύ (ARA), επινεφρίνη ADRE), θρομβίνη (THR), κολλαγόνο (COL) και ριστοσετίνη (RISTO). Τα δεδομένα αυτά παρουσιάζονται στον πίνακα αρ. 7 και στο αντίστοιχο διάγραμμα αρ. 5.

ΑΓΩΝΙΣΤΗΣ	ADP	PAF	ARA	ADRE.	THR.	COL.	RISTO.
Κατάσταση αιμοπεταλίων							
Πριν (PRP σε ηρεμία )	TXA2: 137±9 pg/ml	TXA2 137± 9 pg/ml	TXA2 137± 9 pg/ml	TXA2 137± 9 pg/ml	TXA2 137± 9 pg/ml	TXA2 137± 9 pg/ml	TXA2 137± 9 pg/ml
Οχτώ min κατόπιν διέγερσης	TXA2 1087±22 pg/ml	TXA2 1783±26 pg/ml	TXA2 1375±18 pg/ml	TXA2 1237±31 pg/ml	TXA2 2375±34 pg/m	TXA2 1241±14 pg/ml	TXA2 1398±42 pg/ml
[γενιστεΐνης]= IC50 ανά αγωνιστή	8,5 mM	4,5 mM	6 mM	5 mM	9 mM	5 mM	7 mM
[γενιστεΐνης]= IC50 Οχτώ min κατόπιν διέγερσης	TXA2 512±21 pg/ml	TXA2 796±39 pg/ml	TXA2 695±48 pg/ml	TXA2 597±13 pg/ml	TXA2 812±71 pg/ml	TXA2 609±32 pg/ml	TXA2 708±52 pg/ml
[γενιστεΐνης]= MIC ανά αγωνιστή	12 mM	11 mM	15 mM	10 mM	15 mM	12 mM	10 mM
[γενιστεΐνης]= MIC Οχτώ min κατόπιν διέγερσης	TXA2 230±57 pg/ml	TXA2 245±35pg /ml	TXA2 233±42 pg /ml	TXA2 199±29 pg/ml	TXA2 267±74 pg/ml	TXA2 210±37 pg/ml	TXA2 216±61 pg/ml

**Πίνακας αρ.7:** Δράσεις της γενιστεΐνης επί της παραγωγής TXA<sub>2</sub> η οποία επάγεται από την ενεργοποίηση των αιμοπεταλιακών λειτουργιών μέσω της προσθήκης των βασικών αγωνιστών των αιμοπεταλίων. Οι αντίστοιχες IC<sub>50</sub> της γενιστεΐνης απέναντι στους τρεις κύριους αγωνιστές είναι: 4 – 5mM PAF, 5 – 7mM ARA, 8 – 9mM ADP. Η σειρά δραστηριότητας της γενιστεΐνης απέναντι στους τρεις κύριους αγωνιστές των αιμοπεταλίων είναι η εξής: PAF>ARA>ADP μέχρι το επίπεδο της IC<sub>50</sub>. Κατόπιν το ADP παίρνει την δεύτερη θέση και η αναστολή του αραχιδονικού οξέος γίνεται πιο δυσχερής. Οι αντίστοιχες MIC – γενιστεΐνης είναι οι εξής: για τον PAF = 11 mM, για το ADP = 12 mM, για το Αραχιδονικό Οξύ = 15 mM .



**Διάγραμμα αρ.5** Μείωση της παραγωγής θρομβοξάνης από τα αιμοπετάλια του ανθρώπου *ex vivo* κατόπιν επώασής τους με κατάλληλες συγκεντρώσεις γενιστεΐνης ικανές να επιφέρουν αναστολή κατά 50 % και 100% της αιμοπεταλιακής συσσώρευσης (IC<sub>50</sub> και MIC αντιστοίχως).

**II(β). Επίπεδα παραγωγής θρομβοξάνης A<sub>2</sub> από αιμοπετάλια ανθρώπου *ex vivo* πριν και μετά την χορήγηση απιγενίνης στο PRP σε συγκεντρώσεις ίσες με την IC<sub>50</sub> και την MIC**

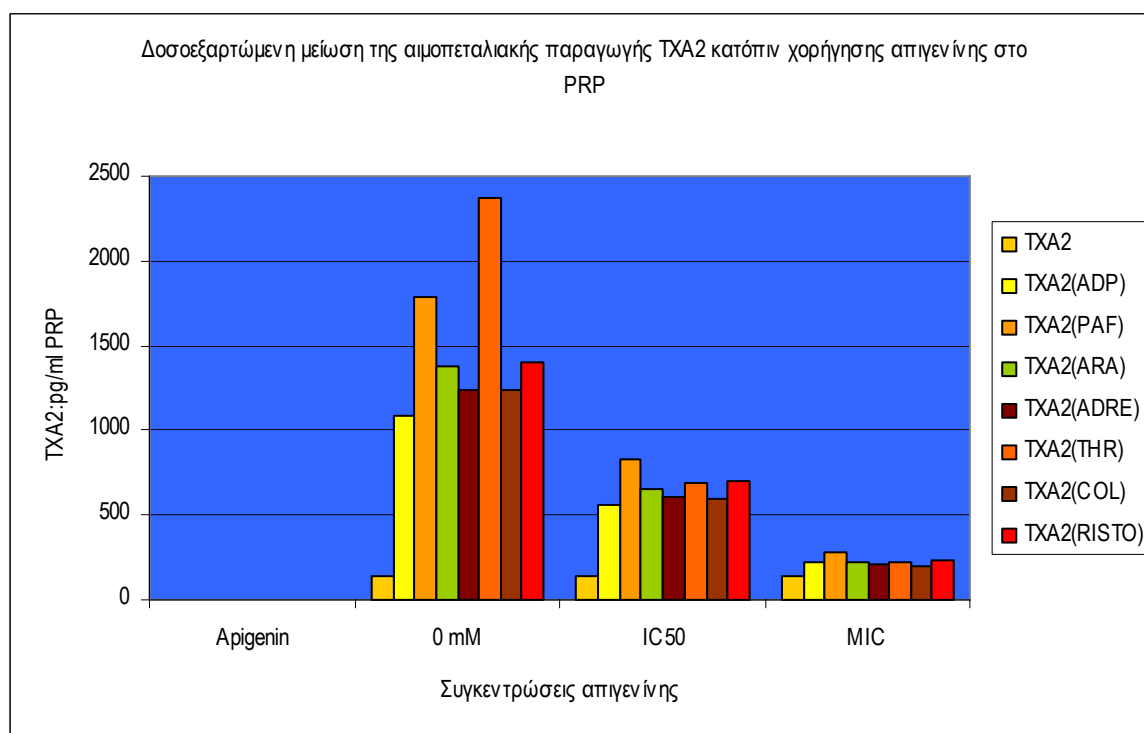
Όπως η κουερσετίνη και η γενιστεΐνη έτσι και η απιγενίνη προκαλεί δοσοεξαρτώμενα την μείωση της παραγωγής TXA<sub>2</sub> όταν χορηγείται στα αιμοπετάλια του ανθρώπου και λαμβάνει χώρα επώαση διάρκειας 5 έως 10 min. Μετά την επώαση η ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων με έκαστο των ήδη προαναφερθέντων αγωνιστών επιφέρει μειωμένη συσσώρευση και ταυτόχρονη ελάττωση των επιπέδων της TXA<sub>2</sub> στο PRP, μετά την παρέλευση 8 λεπτών από την έναρξη της συσσώρευσης (προσθήκη του αντίστοιχου αγωνιστή). Οι ποσότητες απιγενίνης που χρησιμοποιήθηκαν ήσαν εκείνες της IC<sub>50</sub> και της MIC για έκαστο των χρησιμοποιηθέντων αγωνιστών. Τα δεδομένα αυτά δεικνύονται στον πίνακα αρ.8 και στο διάγραμμα αρ. 6.



ΑΓΩΝΙΣΤΗΣ	ADP	PAF	ARA	ADRE.	THR.	COL.	RISTO.
Κατάσταση αιμοπεταλίων							
Πριν (PRP σε ηρεμία )	TXA2: 137±9 pg/ml	TXA2 137± 9 pg/ml	TXA2 137± 9 pg/ml	TXA2 137± 9 pg/ml	TXA2 137± 9 pg/ml	TXA2 137± 9 pg/ml	TXA2 137± 9 pg/ml
Οχτώ min κατόπιν διέγερσης	TXA2 1087±22 pg/ml	TXA2 1783±26 pg/ml	TXA2 1375±18 pg/ml	TXA2 1237±31 pg/ml	TXA2 2375±34 pg/m	TXA2 1241±14 pg/ml	TXA2 1398±42 pg/ml
[απιγενίνης]= IC50 ανά αγωνιστή	8,5 mM	4,5 mM	6 mM	5 mM	9 mM	5 mM	7 mM
[απιγενίνης]= IC50 Οχτώ min κατόπιν διέγερσης	TXA2 564±41 pg/ml	TXA2 835±27 pg/ml	TXA2 655±14 pg/ml	TXA2 612±26 pg/ml	TXA2 687±51 pg/ml	TXA2 598±12 pg/ml	TXA2 698±46 pg/ml
[απιγενίνης]= MIC ανά αγωνιστή	15 mM	12 mM	15 mM	10 mM	15 mM	12 mM	10 mM
[απιγενίνης]= MIC Οχτώ min κατόπιν διέγερσης	TXA2 224±12 pg/ml	TXA2 278±17pg /ml	TXA2 221±15 pg /ml	TXA2 208±19 pg/ml	TXA2 219±8 pg/ml	TXA2 195±11 pg/ml	TXA2 237±25 pg/ml

**Πίνακας αρ. 8:** Δοσοεξαρτώμενη ανασταλτική δράση της απιγενίνης επί της αιμοπεταλιακής παραγωγής TXA2. Η απιγενίνη προστέθηκε στο PRP στις συγκεντρώσεις που προκαλεί 50% και 100% αναστολή της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων, δηλαδή στις IC50 και MIC αντιστοίχως, οι οποίες είναι χαρακτηριστικές για τους διαφορετικούς αντιπροσωπευτικούς (ADP, PAF, ARA) και δευτερεύοντες αγωνιστές (ADRE, THR, COL, RISTO). Για τις IC50 η σειρά δραστηριότητας της απιγενίνης απέναντι στους αγωνιστές είναι η εξής: PAF>ARA>(ADRE = COL)>RISTO>THR. Για τις MIC η σειρά δραστηριότητας είναι: (ADRE=RISTO)>(PAF=COL)>(ADP=ARA=THR).

Η διαγραμματική παρουσίαση των εν λόγω στοιχείων δίνει την ακόλουθη εικόνα:



**Διάγραμμα αρ.6** Μείωση της παραγωγής θρομβοξανής από τα αιμοπετάλια του ανθρώπου *ex vivo* κατόπιν επώασής τους με κατάλληλες συγκεντρώσεις απιγενίνης, ικανές να επιφέρουν αναστολή κατά 50 % και 100% της αιμοπεταλιακής συσσώρευσης (IC50 και MIC αντιστοίχως για τους συγκεκριμένους βασικούς και δευτερεύοντες αγωνιστές).

### III. Η ΔΡΑΣΗ ΤΩΝ ΦΛΑΒΟΝΟΕΙΔΩΝ ΣΤΗΝ ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΟΥ ΥΠΟΔΟΧΕΑ GP IIb – IIIa ΕΠΙ ΤΗΣ ΕΞΩΤΕΡΙΚΗΣ ΕΠΙΦΑΝΕΙΑΣ ΤΗΣ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗΣ ΜΕΜΒΡΑΝΗΣ ΤΩΝ ΑΙΜΟΠΕΤΑΛΙΩΝ

Τα εν λόγω δεδομένα προέρχονται από την κυτταρομετρία ροής που χρησιμοποιήσαμε για την μελέτη της παρουσίας του υποδοχέα ινωδογόνου στην εξωτερική (κυτταροπλασματική) μεμβράνη των αιμοπεταλίων του ανθρώπου *ex vivo*.

Σύμφωνα με τα δεδομένα αυτά η επώαση των ανθρώπινων αιμοπεταλίων (ως PRP) με συγκεκριμένες συγκεντρώσεις κουερσετίνης, γενιστεΐνης και απιγενίνης, όταν εκάστη εξ αυτών τίθεται ξεχωριστά στα αιμοπεταλιακά εναιωρήματα, έχει ως αποτέλεσμα την μείωση του αριθμού των υποδοχέων GP IIb–IIIa στην εξωτερική επιφάνεια των κυτταροπλασματικών μεμβρανών των αιμοπεταλίων.

Με βάση τα δεδομένα της κυτταρομετρίας ροής με την χρήση του ΚΙΤ της εταιρείας American Diagnostics κάθε εν ημερία αιμοπετάλιο από τα χρησιμοποιηθέντα παρουσιάζει έναν αριθμό ίσο προς 77.688 υποδοχείς GPIIb-IIIa.

Υπό τις ίδιες συνθήκες (τοποθέτηση σε υδατόλουτρο θερμοκρασίας 37°C, δοκιμαστικός σωλήνας με ανενεργό πλαστικό, ατμόσφαιρα φυσιολογική κεκορεσμένη με υδρατμούς, συνθήκες άσηπτες, παρουσία κιτρικού τρινατρίου ως αντιπηκτικού, απουσία κραδασμών και άλλων μηχανικών διαταραχών ή ανάδευσης) η επώαση των αιμοπεταλίων με ποσότητες από υπό μελέτη φλαβονοειδή, ικανές να προκαλέσουν πλήρη αναστολή της συσσώρευσης έδωσαν τα εξής αποτελέσματα ως προς τους αριθμούς των υποδοχέων GPIIb-IIIa ανά αιμοπετάλιο:

A) Για την κουερσετίνη ο αριθμός των υποδοχέων μειώθηκε από τους 77.688 στους 4163 (5,36%, μείωση 94,64%).

B) Για την γενιστεΐνη ο αριθμός των υποδοχέων μειώθηκε από τους 77.688 στους 7996 (10,3% του αριθμού υποδοχέων χωρίς ουσία, μείωση 89,7%).

Γ) Για την απιγενίνη ο αριθμός των υποδοχέων μειώθηκε από τους 77.688 στους 7923 (10,1% του αριθμού των υποδοχέων χωρίς ουσία, ήτοι μείωση κατά 89,8%).

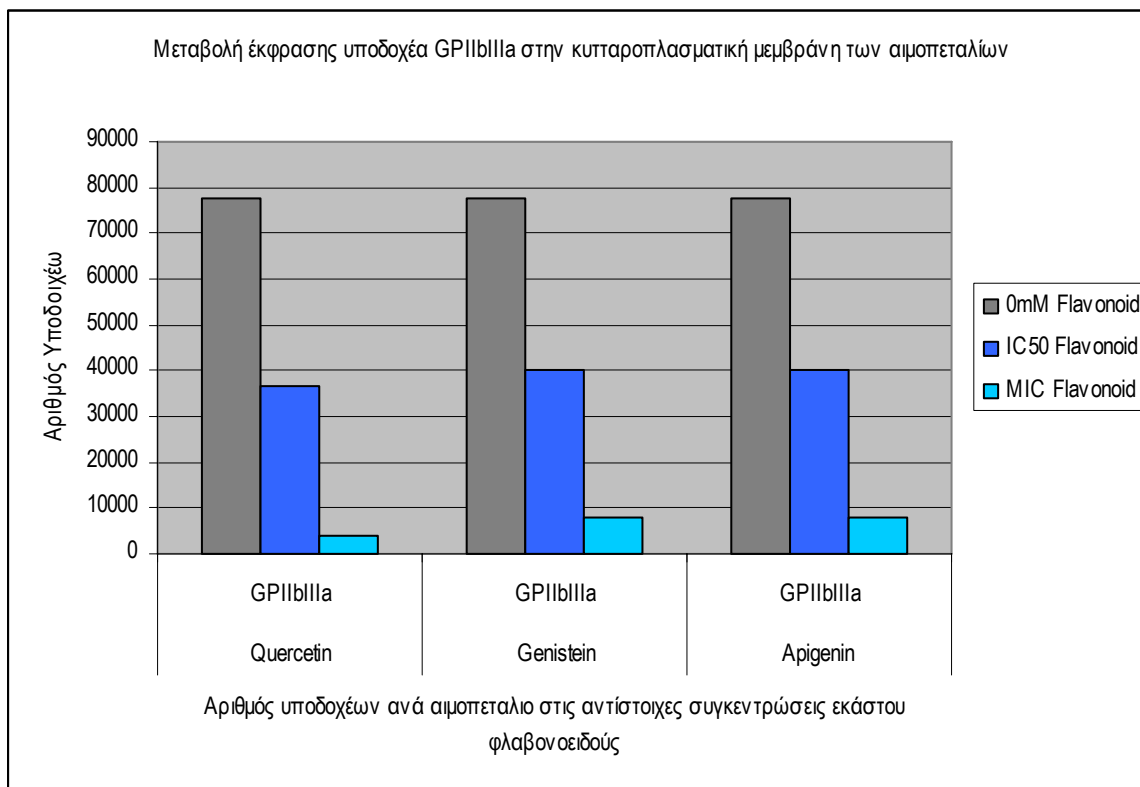
Επαναλαμβάνοντας το πείραμα με τα ίδια αιμοπετάλια, αλλά χρησιμοποιώντας ποσότητες από τα υπό μελέτη φλαβονοειδή ίσες προς τις IC<sub>50</sub> αυτών, είχαμε τα εξής αποτελέσματα, ως προς τους αριθμούς των υποδοχέων GPIIb-IIIa ανά αιμοπετάλιο:

A) Για την κουερσετίνη ο αριθμός των υποδοχέων μειώθηκε από τους 77.688 στους 36.452 (46,9%, μείωση ίση προς 53,1%).

B) Για την γενιστεΐνη ο αριθμός των υποδοχέων μειώθηκε από τους 77.688 στους 39.981 (51,45%, μείωση ίση προς 48,5%).

Γ) Για την απιγενίνη ο αριθμός των υποδοχέων μειώθηκε από τους 77.688 στους 40.284 (51,85%, μείωση ίση προς 48,14%).

Τα δεδομένα αυτά ενσωματώνονται στον πίνακα αρ. 9 και στο διάγραμμα αρ. 7.



*Διάγραμμα αρ.7*

#### IV. ΔΡΑΣΕΙΣ ΚΟΙΝΩΝ ΜΗ ΦΛΑΒΟΝΟΕΙΔΩΝ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΩΝ ΣΤΗΝ ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΟΥ ΥΠΟΔΟΧΕΑ GPIIb-IIIa

Τα πειράματα αυτά έλαβαν χώρα για την πραγματοποίηση ενός διασταυρούμενου ελέγχου των δράσεων μεταξύ αντιοξειδωτικών διαφορετικών μοριακών δομών οι οποίες διαφέρουν επίσης από εκείνες των φλαβονοειδών παραγόντων που μελετήσαμε. Τα αντιοξειδωτικά αυτά ήσαν οι ενδογενούς προέλευσης ουσίες ασκορβικό οξύ και αναχθείσα γλουταθειόνη, οι φυτικής προέλευσης ουσίες θυμόλη, καρβακρόλη και αζουλένιο, εκ των οποίων οι δύο πρώτες ανευρίσκονται στο φυτό ρίγανη (*Origanum vulgare*) και η δεύτερη στο χαμομήλι [*Matricaria (Chamomilla) recutita*], αντιστοίχως. Επίσης χρησιμοποιήθηκαν οι εξωγενείς ουσίες τριμεταζιδίνη (ουσία χρησιμοποιούμενη στην θεραπεία της ισχαιμίας) και η βισμούθειόλη (ουσία με αντικαρκινογόνες ιδιότητες) που έχουν προκύψει εκ συνθέσεως. Τέλος χρησιμοποιήσαμε δύο εξωγενείς ουσίες, το τρι-φαινυλο νιτρώδες-βουτύλιο (PBN), και το 2-μεθυλο-2-νιτρώδες-προπάνιο (2-MNP). Οι δύο αυτές ουσίες χρησιμοποιούνται ως παγιδευτές ελευθέρων ριζών (παγιδευτές ηλεκτρονικής ιδιοστροφορμής ή spin traps) στην

φασματοσκοπία συντονισμού του spin, καθόσον έχουν την ιδιότητα να διατηρούν επί μακρόν το ασύζευκτο ηλεκτρόνιο της ρίζας που συλλαμβάνουν, ώστε αυτό να προλάβει να αλληλεπιδράσει με το μαγνητικό πεδίο της συσκευής για να γίνει η ταυτοποίηση της δομής της ελεύθερης ρίζας.

Τα κοινά χαρακτηριστικά όλων των ανωτέρω ουσιών – ενδογενών και εξωγενών – είναι ότι 1<sup>ov</sup>) αποτελούν αναστολείς της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων και 2<sup>ov</sup>) δεσμεύουν ελεύθερες ρίζες εξ αιτίας των αντιοξειδωτικών τους ιδιοτήτων. Οι δύο αυτές ιδιότητες είναι επίσης κοινές με τα υπό μελέτη φλαβονοειδή.

Οι επώσεις των εν λόγω ουσιών σε συγκεντρώσεις που αναστέλλουν πλήρως την *ex vivo* αιμοπεταλιακή συσσώρευση με PRP, προερχόμενα από τους ίδιους δότες, έδειξαν ότι όλες οι συγκεκριμένες ουσίες προκαλούν μια κατακόρυφη πτώση του αριθμού των υποδοχέων GPIIb-IIIa στην έξω επιφάνεια των κυτταροπλασματικών μεμβρανών των αιμοπεταλίων. Η μείωση αυτή είναι ανάλογη με εκείνη που παρατηρήθηκε μέσω της επώασης των αιμοπεταλίων με την κουερσετίνη, γενιστεΐνη και απιγενίνη, μπορεί δε να αποδοθεί στον ίδιο μηχανισμό δράσης, ο οποίος, κατά τα φαινόμενα, σχετίζεται με τον αντιοξειδωτικό χαρακτήρα των μορίων αυτών και την ικανότητά τους να δεσμεύουν ελεύθερες ρίζες. Αναλυτικά τα δεδομένα αυτά έχουν ως εξής:

1<sup>ov</sup>) Ασκορβικό οξύ: Η επώαση των αιμοπεταλίων με ασκορβικό οξύ μείωσε τον αριθμό των υποδοχέων από 77.688 στους 579 (0,745%, μείωση 99,255%).

2<sup>ov</sup>) Ανηγγμένη γλουταθειόνη: Η επώαση των αιμοπεταλίων με ανηγγμένη γλουταθειόνη μείωσε τον αριθμό των υποδοχέων GPIIbIIIa από 77.688 στους 6339 (8,16%, μείωση 91,84%).

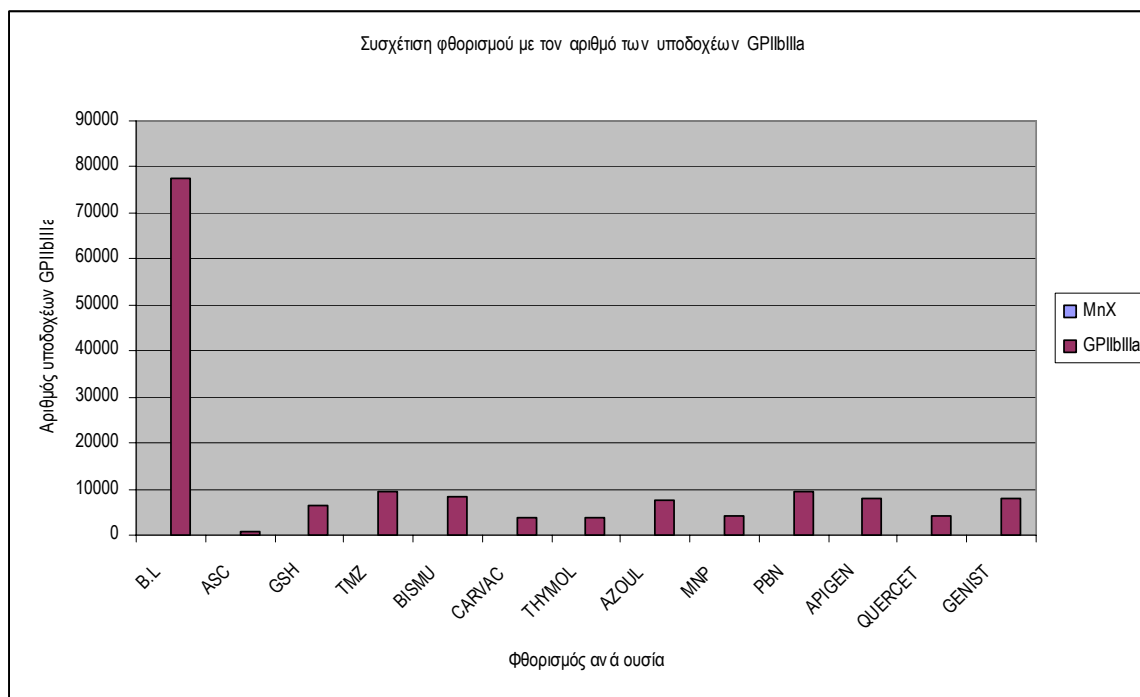
3<sup>ov</sup>) Τριμεταζιδίνη: Η επώαση των αιμοπεταλίων με τριμεταζιδίνη μείωσε τον αριθμό των υποδοχέων GPIIbIIIa από τις 77.688 ανά αιμοπετάλιο στους 9580 (12,3%, μείωση 87,7%).

4<sup>ov</sup>) Βισμουθειόλη: Η επώαση των αιμοπεταλίων με την εξωγενή ουσία βισμουθειόλη μείωσε τον αριθμό των υποδοχέων GPIIbIIIa από τους 77.688 ανά αιμοπετάλιο στους 8284 (10,66%, μείωση 89,33%).

5<sup>ov</sup>) Καρβακρόλη: Η επώαση των αιμοπεταλίων με την ουσία καρβακρόλη (συστατικό της ρίγανης) μείωσε τον αριθμό των αιμοπεταλιακών υποδοχέων GPIIb/IIIa από τους 77688 στους 3601 ανά αιμοπετάλιο (4,63%, μείωση 95,36%).

6<sup>ov</sup>) Θυμόλη: Η επώαση των αιμοπεταλίων με την ουσία θυμόλη (επίσης συστατικό της ρίγανης) μείωσε τον αριθμό των αιμοπεταλιακών υποδοχέων GPIIb/IIIa, από τους 77688 στους 3644 ανά αιμοπετάλιο (4,7%, μείωση 95,3%).

7<sup>ov</sup>) Αζουλένιο: Η φυτικής προέλευσης ουσία αζουλένιο (συστατικό της *Matricaria recutita* – χαμομήλι), χρησιμοποιούμενη για την επώαση των αιμοπεταλίων μείωσε τον αριθμό των υποδοχέων GPIIb/IIIa, από τους 77688 στους 7420 ανά αιμοπετάλιο (9,55%, ήτοι μείωση κατά 90,44%).



**Διάγραμμα αρ. 8**

8<sup>ov</sup>) Η συνθετική ουσία 2-μεθυλ-2-νιτρώδες προπάνιο (2MNP) κατόπιν επώασης με τα αιμοπετάλια του ανθρώπου *ex vivo*, μείωσε τον αριθμό των ελεύθερων υποδοχέων GPIIb/IIIa από τους 77.688 στους 4308. Το υπολειμματικό ποσοστό υποδοχέων βρέθηκε ίσο προς 5,54%, ενώ το ποσοστό της μείωσής τους ήταν ίσο προς 94,45%.

9<sup>ον</sup>) Η συνθετική ουσία τρι-φαινυλο νιτρώδες-βουτύλιο (PBN), κατόπιν επώασης με τα αιμοπετάλια του ανθρώπου *ex vivo*, μείωσε τον αριθμό των ελεύθερων υποδοχέων GPIIb/IIIa από τους 77.688 στους 9364. Το υπολειμματικό ποσοστό ελεύθερων υποδοχέων κατήλθε συνεπώς στο 12,05%, ενώ το ποσοστό της μείωσής τους ήταν 87,94%.

Συνεπώς όλες οι εν λόγω ουσίες αν και δομικά πολύ διαφορετικές μεταξύ τους, εμφάνισαν ωστόσο μια ποσοτικά συγκλίνουσα δράση τιθέμενες σε ποσότητες που προκαλούσαν πλήρη αιμοπεταλιακή αναστολή. Γραμμομοριακά οι ποσότητες αυτές είναι διαφορετικές μεταξύ τους αλλά εμπεριέχονται όλες στην τάξη των mM. Το κοινό χαρακτηριστικό που τις συνδέει στο επίπεδο των χημικών τους ιδιοτήτων είναι ότι όλες μαζί αποτελούν εκκαθαριστές ελευθέρων ριζών.

#### **V. ΑΝΑΣΤΟΛΗ ΤΗΣ ΣΥΣΣΩΡΕΥΣΗΣ ΤΩΝ ΠΛΥΜΕΝΩΝ ΑΙΜΟΠΕΤΑΛΙΩΝ ΤΟΥ ΚΟΥΝΕΛΙΟΥ ΑΠΟ ΤΑ ΦΛΑΒΟΝΟΕΙΔΗ ΚΟΥΕΡΣΕΤΙΝΗ, ΓΕΝΙΣΤΕΪΝΗ, ΑΠΙΓΕΝΙΝΗ.**

Τα χρησιμοποιηθέντα φλαβονοειδή αναστέλλουν δοσοεξαρτώμενα τα πλυμένα αιμοπετάλια του κουνελιού, όταν προστίθενται στο PRP (με επώαση ή χωρίς αυτήν). Οι ανασταλτικές δράσεις αφορούν και τις τρεις κύριες οδούς συσσώρευσης, είτε όταν στα αιμοπετάλια έχουν αποκλειστεί οι δύο εξ αυτών με τους αντίστοιχους εκλεκτικούς αναστολείς και η μια παραμένει ενεργός, είτε όταν και οι τρεις οδοί είναι ανοιχτές.

Επίσης η συσσώρευση των πλυμένων αιμοπεταλίων του κουνελιού αποδεικνύεται ότι είναι σε θέση να αντιστραφεί, εφ' όσον έχει ολοκληρωθεί αν χορηγήσουμε στο PRP κατάλληλες ποσότητες καθενός από τα υπό μελέτη φλαβονοειδή μόρια. Γενικότερα η παρατηρούμενη αποσυσσώρευση των αιμοπεταλίων του κουνελιού είναι δυνατόν να λάβει χώρα σε όλες τις φάσεις της αιμοπεταλιακής συσσώρευσης, είτε αυτή ευρίσκεται ακόμη υπό εξέλιξη, είτε έχει φτάσει στο επίπεδο του σχετικού πλατώ. Είναι σημαντικό να υπογραμμιστεί ότι τα αιμοπετάλια μπορούν να αποσυσσωρευθούν όταν ο χρόνος που μεσολαβεί από την έναρξη της συσσώρευσης και την προσθήκη της ουσίας δεν υπερβαίνει τα 8 έως 10 min. Μετά την παρέλευση των 10 min φαίνεται ότι η αποσυσσώρευση είναι δύσκολο να πραγματοποιηθεί ακόμη και με την χορήγηση μεγάλων δόσεων των φλαβονοειδών (>15 – 20 mM).

Τα δεδομένα αυτά επιδεικνύονται αναλυτικότερα στις σελίδες που ακολουθούν:

## **Π(1). Ανασταλτικές δράσεις της κουερσετίνης σε πλυμένα αιμοπετάλια κουνελιού *in vitro*.**

Η κουερσετίνη αναστέλλει την συσσώρευση των πλυμένων αιμοπεταλίων του κουνελιού που προκαλούν ξεχωριστά οι αντιπροσωπευτικοί αγωνιστές των τριών δόμων συσσώρευσης, δηλαδή της οδού του ADP, της οδού του PAF και της οδού του αραχιδονικού οξέος.

Αναλυτικά η κουερσετίνη αναστέλλει τον PAF σε αιμοπετάλια κουνελιού στα οποία έχουν αποκλειστεί οι οδοί του αραχιδονικού οξέος με ασπιρίνη και του ADP με CP – CPK.

Συγκεκριμένα έχουμε τα εξής:

1) IC50 κουερσετίνης έναντι του PAF = 1,5 – 1,8 mM.

2) Ομοίως η κουερσετίνη αναστέλλει το ADP, σε αιμοπετάλια στα οποία έχουν αποκλειστεί οι οδοί του PAF και του αραχιδονικού οξέος με γιγκολίδια A&B, όπως και με ασπιρίνη, αντιστοίχως.

Συγκεκριμένα έχουμε τα εξής: IC50 κουερσετίνης έναντι του ADP = 2,5 – 3,0 mM. IC50 κουερσετίνης έναντι του αραχιδονικού οξέος = 1,4 – 1,9.

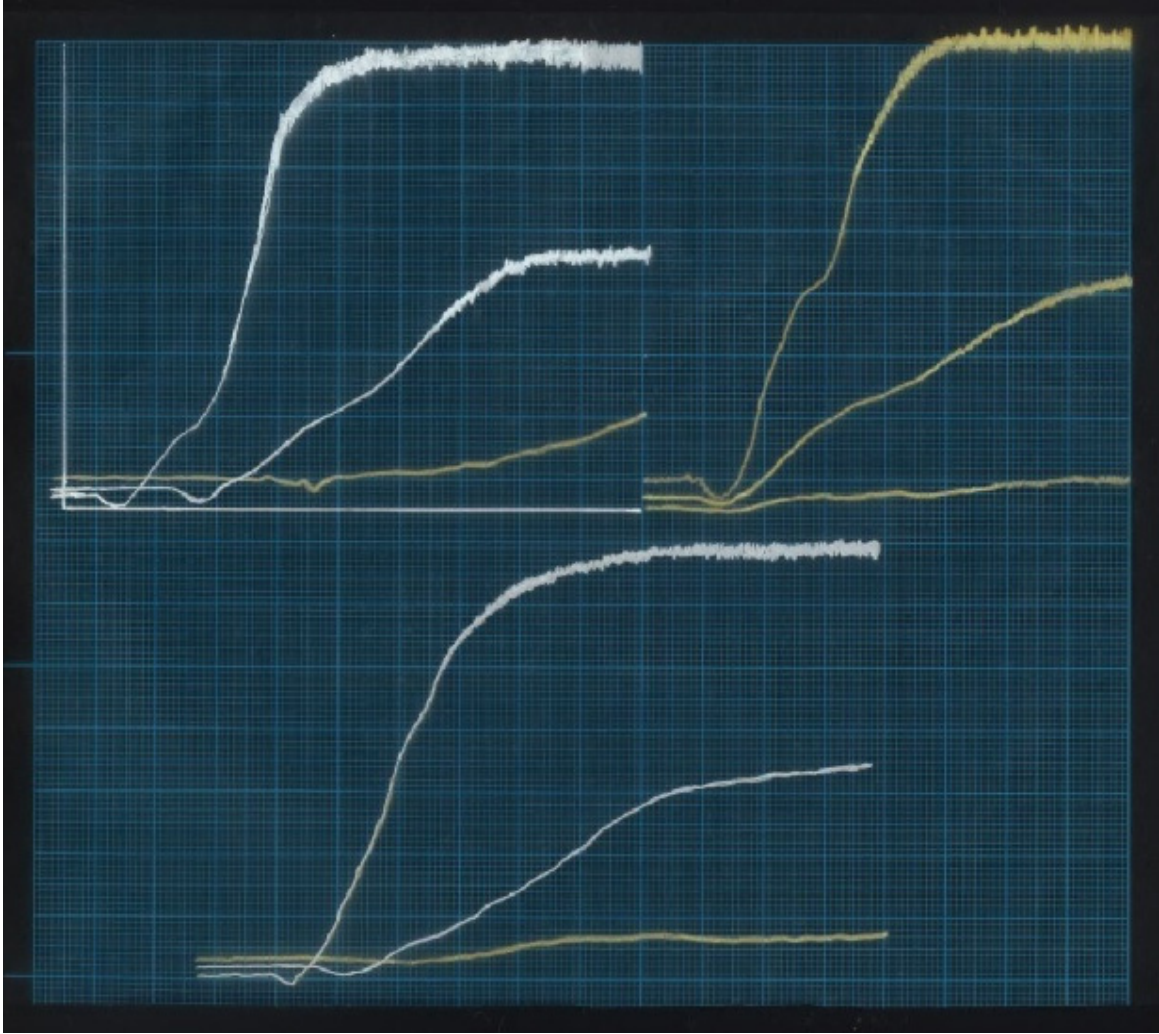
3) Οι ελάχιστες συγκεντρώσεις κουερσετίνης που προκαλούν πλήρη αιμοπεταλιακή αναστολή (100%) είναι οι ακόλουθες: MIC – κουερσετίνης για τον PAF = 2,9 mM. MIC-κουερσετίνης για το ADP = 3,9 – 4,8 mM. Η MIC – κουερσετίνης για το Αραχιδονικό Οξύ = 7,5 mM. Τα δεδομένα αυτά φαίνονται στον πίνακα αρ. 10, όπως επίσης στα συσσωρευογραφήματα που παρατίθενται στην εικόνα αρ. 7 και στα διαγράμματα αρ.9, αρ.10 και αρ.11. Τα δεδομένα που αναγράφονται στον πίνακα δεν αναφέρονται απολύτως στις ίδιες συγκεντρώσεις κουερσετίνης ανά οδό αιμοπεταλιακής συσσώρευσης, αλλά γενικότερα στα σημεία όπου αυτές συμπίπτουν, όπως επίσης και εκεί όπου διαφέρουν, ενώ η αιμοπεταλιακή τους δράση είναι σαφώς διακριτή.

Επίσης εμπεριέχονται οι συγκεντρώσεις των IC50 και των MIC της κουερσετίνης για έκαστο των τριών οδών συσσώρευσης.

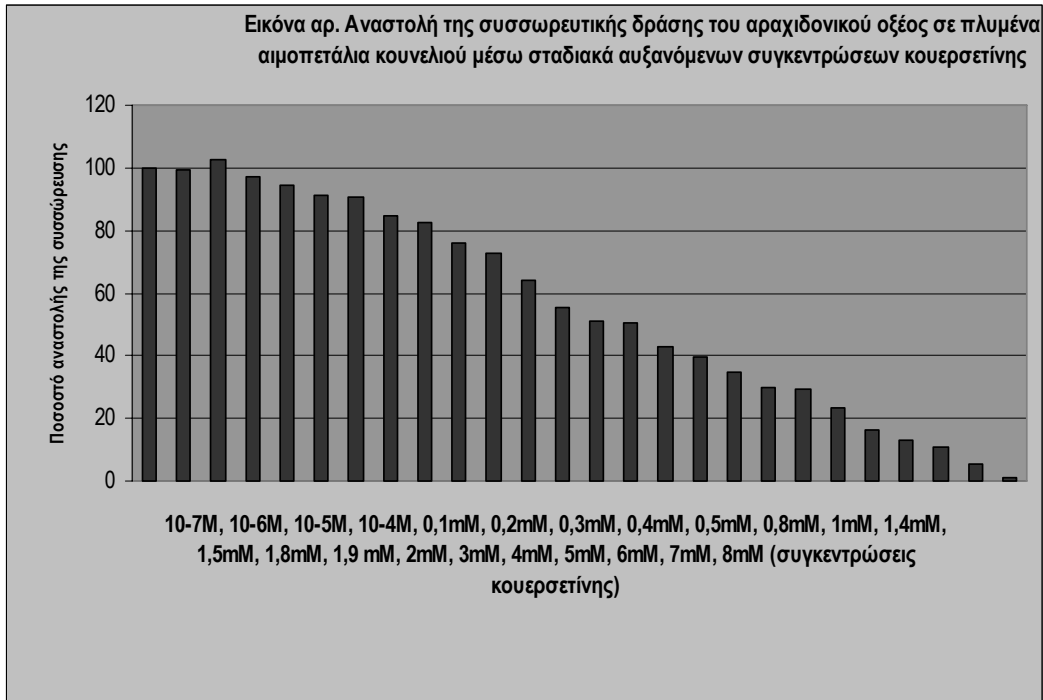


Συγκέντρωση κουερσετίνης	Αγωνιστής Αραχ. Οξύ	Αγωνιστής PAF	Αγωνιστής ADP	Συγκέντρωση Κουερσετίνης	Αγωνιστής Αραχ. Οξύ	Αγωνιστής PAF	Αγωνιστής ADP
	% συσσώρευσης	% συσσώρευσης	% συσσώρευσης	% Συσσώρευσης	% συσσώρ.	% συσσώρ.	% συσσώρ.
0 M	100%	100 %	100 %	1000 μM	63,9 %	62 %	70 %
10 <sup>-7</sup> M	99,3 %	0 %	105 %	1,4 mM	55,3 %	-	-
1 μM	107 %	103 %	106 %	1,5 mM	51,3 %	58 %	68 %
10 μM	97,2 %	97 %	100 %	1,8 mM	50,3 %	48 %	-
100 μM	94,3 %	96 %	97 %	1,9 mM	42,9 %	40 %	-
150 μM	91 %	92 %	94 %	2 mM	39,54 %	32 %	61 %
200 μM	90,9 %	-	-	2,5 mM	34,59 %	14 %	57 %
-	-	-	-	2,6 mM	28 %	8 %	-
-	-	-	-	2,7 mM	-	4 %	-
-	-	-	-	2,9 mM	-	0 %	51 %
300 μM	84,9 %	-	-	3 mM	23,27 %	0 %	49 %
				3,2 mM			36 %
				3,4 mM			28%
400 μM	82,4 %	-	-	3,9 mM	-	0 %	12 %
				4 mM			8 %
				5 mM			1 %
500 μM	76,1 %	87 %	81 %	6 mM	10,9 %	0 %	0 %
800 μM	73,7 %	72 %	75 %	7 mM	5,36 %	0 %	0 %
900 μM	-	-	-	8 mM	1,18 %	0 %	0 %

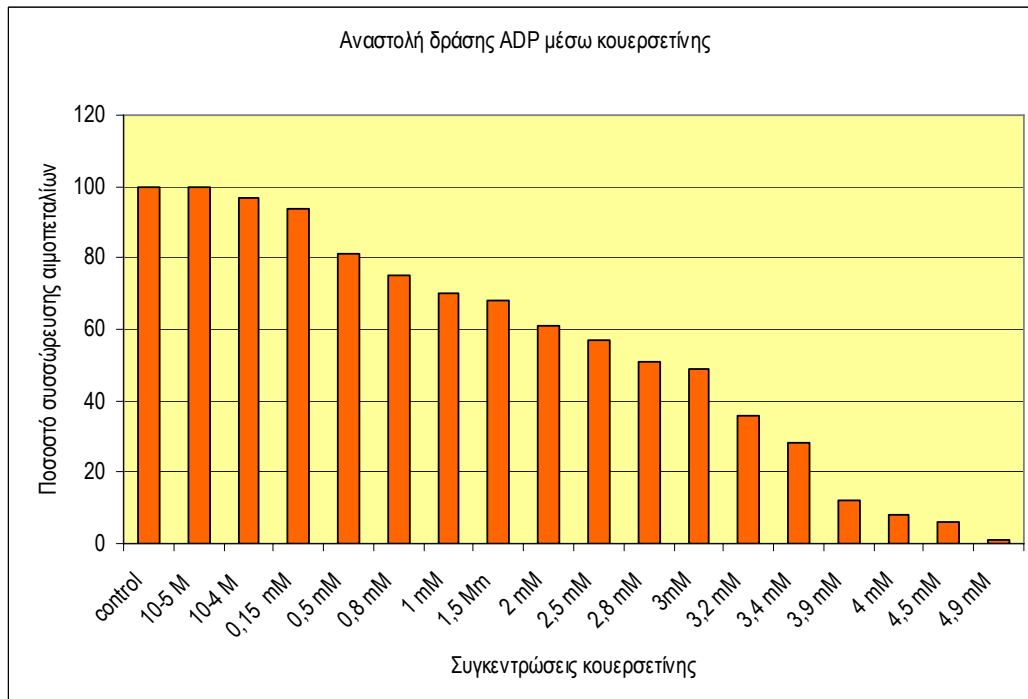
**Πίνακας αρ. 10:** Αναστολή της συσσώρευσης των πλυμένων αιμοπεταλίων του κουνελιού από την κουερσετίνη. IC50 κουερσετίνης έναντι του PAF = 1,5 – 1,8 mM. IC50 κουερσετίνης έναντι του ADP = 2,5 – 3,0 mM. IC50 κουερσετίνης έναντι του αραχιδονικού οξέος = 1,4 – 1,9 mM. 4) MIC – κουερσετίνης για τον PAF = 2,9 mM. MIC-κουερσετίνης για το ADP = 3,9 – 4,8 mM. Η MIC – κουερσετίνης για το Αραχιδονικό Οξύ = 7,5 mM.



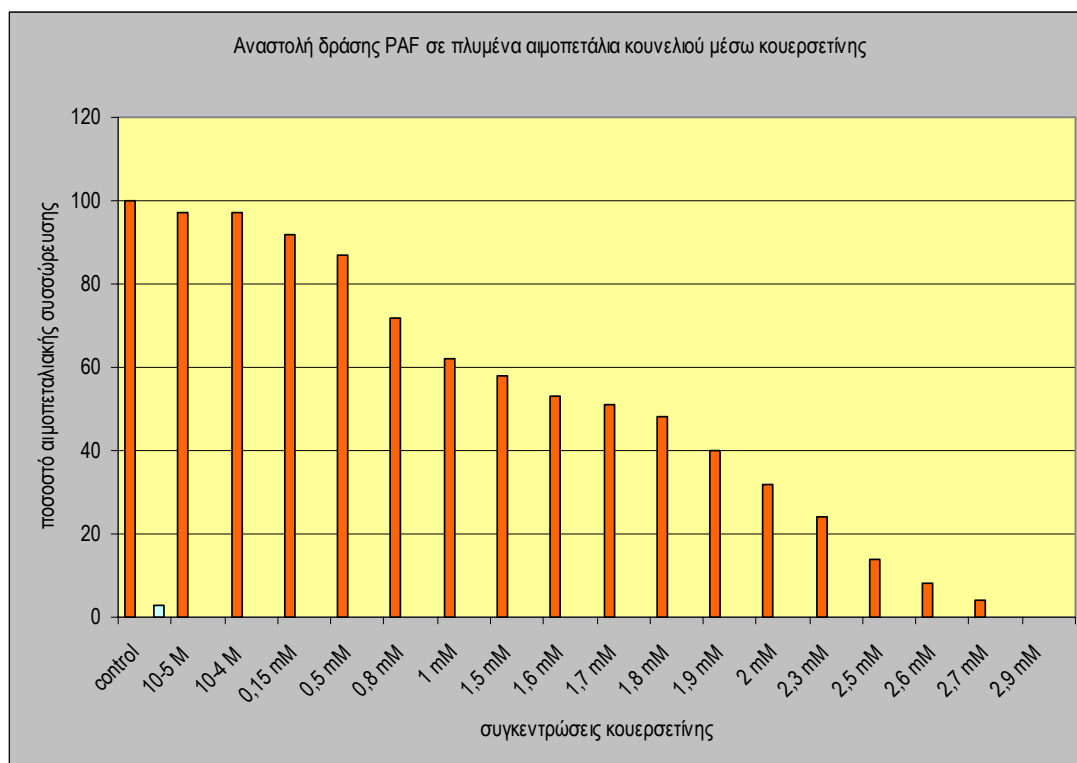
**Εικόνα αρ. 7.** Συσσωρευογραφήματα που δείχνουν την δοσοεξαρτώμενη αναστολή της συσώρευσης των πλυμένων αιμοπεταλίων του κουνελιού από την κουερσετίνη: Άνω αριστερό μέρος της εικόνας: Αναστολή της δράσης του PAF (επάνω καμπύλη = έλεγχος – 50 pg PAF, μεσαία καμπύλη: [κουερσετίνη] = 1,7 mM. Κάτω καμπύλη: [κουερσετίνη] = 2,9 mM). Άνω δεξιό μέρος της εικόνας: Αναστολή της δράσης του ADP (επάνω καμπύλη: έλεγχος με ADP. Ενδιάμεση καμπύλη: [κουερσετίνη] = 2,7 mM. Κάτω καμπύλη: [κουερσετίνη] = 4,2 mM). Κάτω τμήμα της εικόνας: Αναστολή της δράσης του αραχιδονικού οξέος (επάνω καμπύλη: έλεγχος – αραχιδονικό οξύ. Ενδιάμεση καμπύλη: [κουερσετίνη] = 1,8 mM. Κάτω καμπύλη: [κουερσετίνη] = 6,9 mM).



**Διάγραμμα αρ.9.** Αναστολή της συσσωρευτικής δράσης του αραχιδονικού οξέος επί των πλυμένων αιμοπεταλίων του κουνελιού, μέσω της χορήγησης διαδοχικώς αυξανόμενων συγκεντρώσεων κουερσετίνης. Οι οδοί του PAF και του ADP έχουν αποκλειστεί μέσω χορήγησης γιγκολιδίων (Α και Β), καθώς και CP – CPK.



**Διάγραμμα αρ. 10.** Ανασταλτική δράση της κουερσετίνης στην συσσωρευτική δράση του ADP. Οι οδοί του PAF και του αραχιδονικού οξέος έχουν αποκλειστεί καταλλήλως μέσω γιγκολιδίων και ασπιρίνης αντιστοίχως.



**Διάγραμμα αρ. 11.** Ανασταλτική δράση της κουερσετίνης στην συσσωρευτική δράση του PAF επί πλυμένων αιμοπεταλίων κουνελιού. Οι οδοί του αραχιδονικού οξέος και του ADP έχουν αποκλειστεί αντιστοίχως μέσω ασπιρίνης και CP- CPK.

## Π(2)Ανασταλτικές δράσεις της γενιστεΐνης σε πλυμένα αιμοπετάλια κουνελιού *in vitro*

Η γενιστεΐνη αναστέλλει την συσσωρευση των πλυμένων αιμοπεταλίων του κουνελιού που προκαλούν ξεχωριστά οι αντιπροσωπευτικοί αγωνιστές των τριών δόμων συσσωρεύσεως, δηλαδή της οδού του ADP, της οδού του PAF και της οδού του αραχιδονικού οξέος. Αναλυτικά η γενιστεΐνη αναστέλλει τον PAF σε αιμοπετάλια κουνελιού στα οποία έχουν αποκλειστεί οι οδοί του αραχιδονικού οξέος με ασπιρίνη και του ADP με CP – CPK. Η ανασταλτική δράση της γενιστεΐνης είναι σαφώς δοσοεξαρτώμενη.

Η συγκέντρωση της γενιστεΐνης που προκαλεί 50% αναστολή της συσσωρευτικής δράσης του PAF, δηλαδή η IC<sub>50</sub> της γενιστεΐνης έναντι του PAF είναι ίση προς 0,8 – 1,2 mM.

Ομοίως η γενιστεΐνη αναστέλλει το ADP, σε αιμοπετάλια στα οποία έχουν αποκλειστεί οι οδοί του PAF και του αραχιδονικού οξέος με γιγκολίδια A&B, όπως και με ασπιρίνη, αντιστοίχως. Και εδώ η δράση της γενιστεΐνης είναι δοσοεξαρτώμενη.

Ειδικότερα η συγκέντρωση της γενιστεΐνης που επιφέρει 50 % αναστολή της συσσωρευτικής δράσης του ADP, ήτοι η IC50 γενιστεΐνης έναντι του ADP, κυμαίνεται μεταξύ 1,2 – 1,9 mM.

Αντιστοίχως η γενιστεΐνη ασκεί δοσοεξαρτώμενη ανασταλτική δράση στην συσσωρευτική ικανότητα του αραχιδονικού οξέος απέναντι στα πλυμένα αιμοπετάλια του κουνελιού. Η συγκέντρωση της γενιστεΐνης η οποία προκαλεί μια αναστολή ύψους 50 % στην αιμοπεταλιακή συσσώρευση, δηλαδή η IC50 της γενιστεΐνης έναντι του αραχιδονικού οξέος, κυμαίνεται από 1,8 – 2,3 mM.

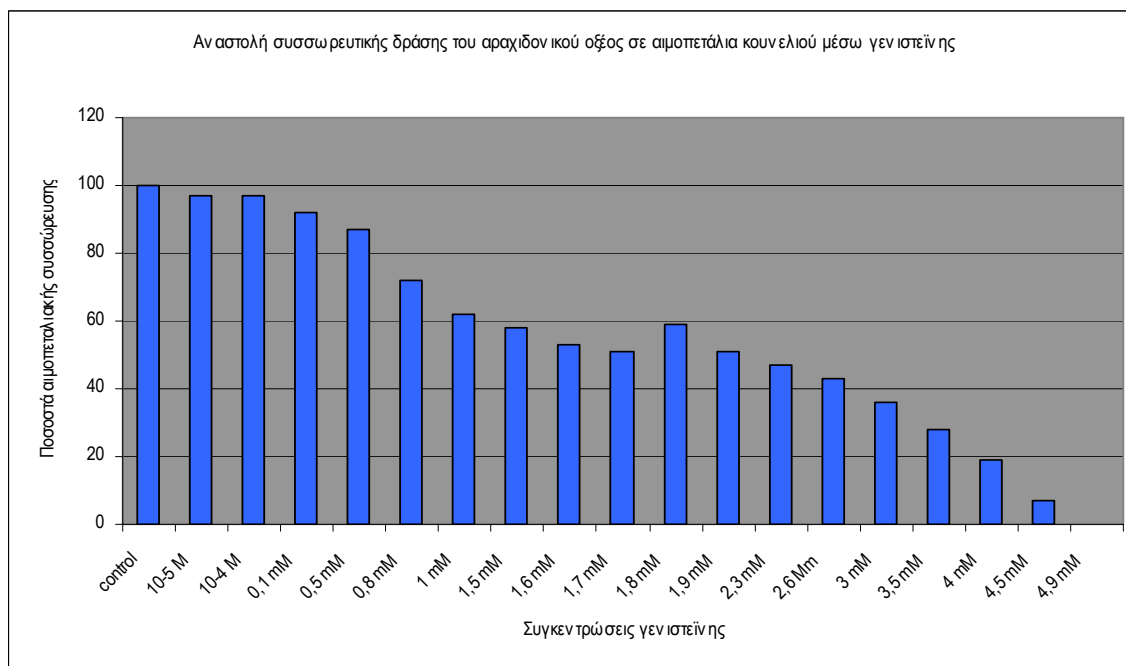
Οι ελάχιστες συγκεντρώσεις γενιστεΐνης που προκαλούν πλήρη αιμοπεταλιακή αναστολή (100%) είναι οι ακόλουθες:

- 1) MIC – γενιστεΐνης για τον PAF = 2,9 mM.
- 2) MIC- γενιστεΐνης για το ADP = [3,5 – 4,2M].
- 3) MIC – γενιστεΐνης για το Αραχιδονικό Οξύ = 4,9 mM.

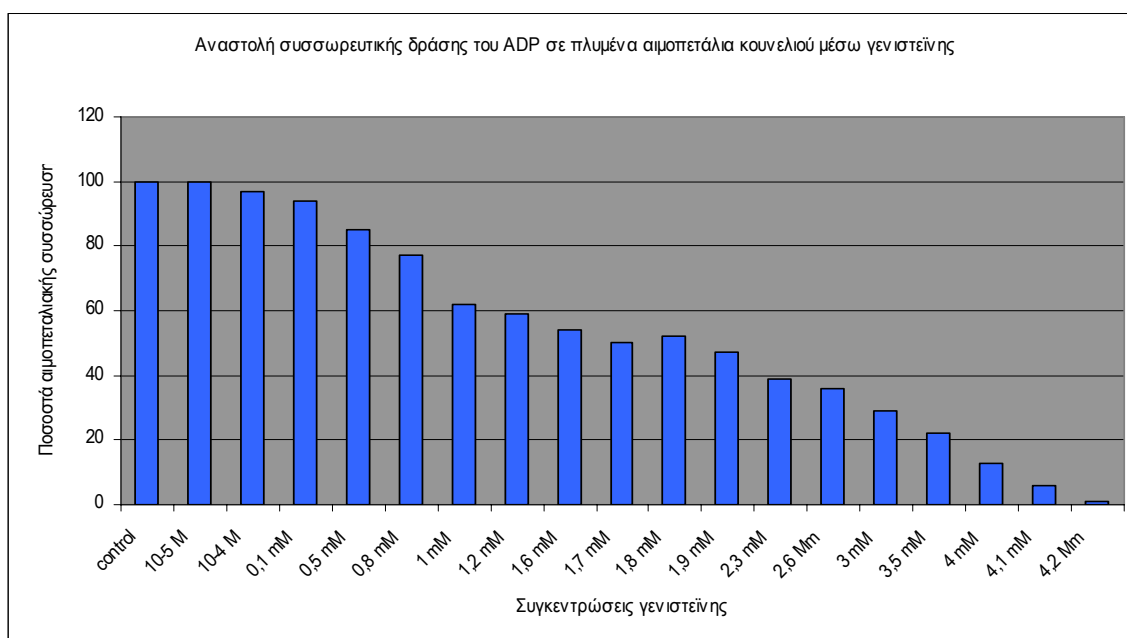
Τα δεδομένα αυτά περιγράφονται στον πίνακα αρ. 11, στο διάγραμμα αρ. 12, αρ.13, αρ. 14, όπως επίσης και στη εικόνα αρ. 8, στην οποία φαίνονται σειρές συσσωρευογραφημάτων πλυμένων αιμοπεταλίων κουνελιού, με αγωνιστές το αραχιδονικό οξύ, το ADP και τον PAF στα οποία επιδεικνύονται τυπικές αιμοπεταλιακές συσσωρεύσεις των ελέγχων, καθώς και αντιπροσωπευτικές αιμοπεταλιακές συσσωρεύσεις που αντιστοιχούν στις συγκεντρώσεις IC50 της γενιστεΐνης ανά κύριο αγωνιστή και αντίστοιχη οδό συσσώρευσης (ADP, PAF, Αραχιδονικό οξύ), όπως επίσης και αντιπροσωπευτικές συσσωρεύσεις που αντιστοιχούν στις σχετικές MIC των τριών διαφορετικών αγωνιστών.

Συγκέντρωση γενιστεΐνης	Αγωνιστής Αραχ. Οξύ	Αγωνιστής PAF	Αγωνιστής ADP	Συγκέντρωση Γενιστεΐνης	Αγωνιστής Αραχ. Οξύ	Αγωνιστής PAF	Αγωνιστής ADP
	% συσσώρευσης	% συσσώρευσης	% συσσώρευσης	% συσσώρευσης	% συσσώρ.	% συσσώρ.	% συσσώρ.
0 M	100 %	100 %	100 %	1,9 mM	-	%	47 %
10 <sup>-7</sup> M	100 %	100 %	100 %	2 mM	-	36 %	-
1 μM	105 %	100 %	106 %	2,2 mM	-	25 %	-
10 μM	97 %	97 %	100 %	2,3 mM	-	-	39 %
100 μM	97 %	91 %	97 %	2,4 mM	-	17 %	-
150 μM	92 %	88 %	94 %	2,6 mM	-	10 %	36 %
500 μM	87 %	67 %	85 %	2,7 mM	-	6 %	-
800 μM	72	54 %	77 %	2,9 mM	-	0 %	-
1000 μM	62 %	50 %	62 %	3 mM	37 %	%	-
1,2 mM	-	47 %	59 %	3,5 mM	30 %	%	22 %
1,5 mM	58 %	41 %	-	4 mM	19 %		13 %
1,6 mM	53 %	51 %	54 %	4,1 mM	-	%	6 %
1,7 mM	55 %	-	50 %	4,2 mM	-	%	1 %
1,8 mM	58 %	-	52 %	4,5 mM	7 %	%	0 %
	-			4,9 mM	0 %		

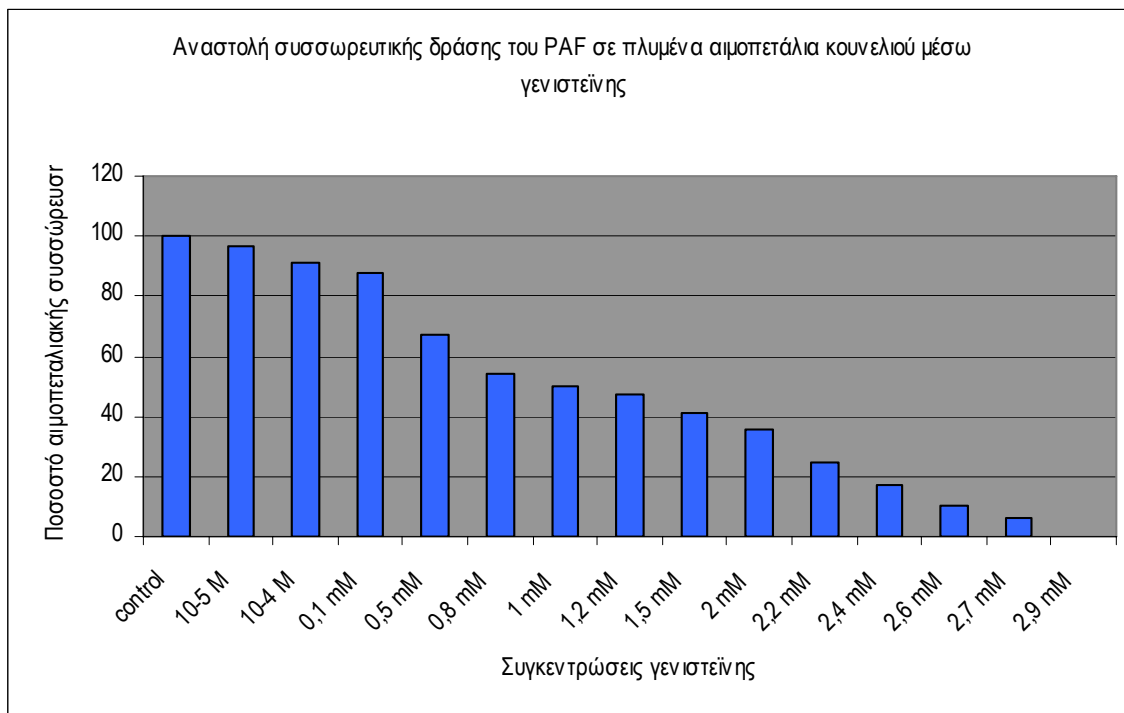
**Πίνακας αρ. 11:** Ποσοστά αναστολής της συσσώρευσης των πλυμένων αιμοπεταλίων κουνελιού τα οποία επιτυγχάνονται μέσω χορήγησης κατάλληλων ποσοτήτων γενιστεΐνης σε PRP στο οποίο οι δύο οδοί της αιμοπεταλιακής συσσώρευσης ήταν αποκλεισμένες με εξειδικευμένους προς αυτές αναστολείς, ενώ η τρίτη οδός παρέμεινε ενεργός. Σημειώνεται ότι η γενιστεΐνη αναστέλλει και τις τρεις οδούς με διαφορετική ευαισθησία.



**Διάγραμμα αρ. 12:** Αναστολή της συσσωρευτικής δράσης του αραχιδονικού οξέος σε πλυμένα αιμοπετάλια κουνελίου στα οποία οι οδοί του PAF και του ADP είχαν αποκλειστεί με κατάλληλους αναστολείς. Η δράση της γενιστεΐνης είναι δοσοεξαρτώμενη και φτάνει μέχρι το επίπεδο της πλήρους αναστολής.

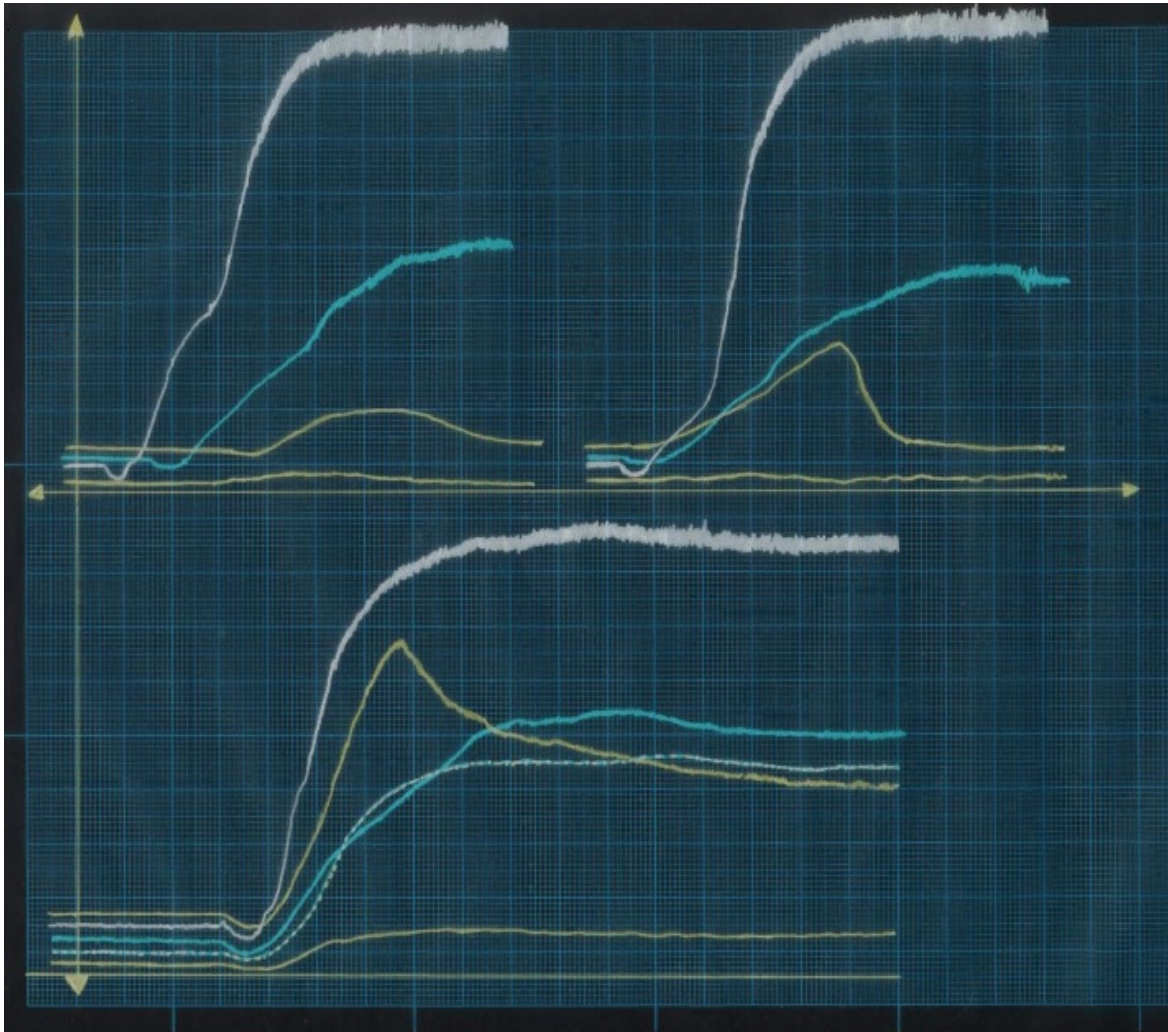


**Διάγραμμα αρ.13:** Αναστολή της συσσωρευτικής δράσης του ADP από την γενιστεΐνη σε πλυμένα αιμοπετάλια κουνελίου στα οποία οι οδοί του αραχιδονικού οξέος και του PAF είχαν αποκλειστεί μέσω εξειδικευμένων αναστολέων τους.



**Διάγραμμα αρ.14:** Ανασταλτική δράση της γενιστεΐνης στην συσσωρευτική δράση του PAF σε πλυμένα αιμοπετάλια κουνελιού στα οποία οι οδοί του αραχιδονικού οξέος και του ADP είχαν αποκλειστεί μέσω κατάλληλων εκλεκτικών αναστολέων. Η αναστολή είναι δοσοεξαρτώμενη και φτάνει μέχρι το επίπεδο της πλήρους κατάργησης της αιμοπεταλιακής συσσώρευσης.





**Εικόνα αρ.8:** Συσσωρευογραφήματα που δείχνουν την δοσοεξαρτώμενη αναστολή της συσσώρευσης των πλυμένων αιμοπεταλίων του κουνελιού από την γενιστεΐνη: Άνω αριστερό μέρος της εικόνας: Αναστολή της δράσης του ADP (πρώτη άνω καμπύλη: έλεγχος με ADP. Δεύτερη καμπύλη: [γενιστεΐνη] = 1,2 mM. Ενδιάμεση καμπύλη: [γενιστεΐνη] = 3,5 mM). Κάτω τελευταία καμπύλη: [γενιστεΐνη] = 4,2 mM (πλήρης αναστολή). Άνω δεξιό μέρος της εικόνας: Αναστολή της δράσης του PAF (επάνω καμπύλη = έλεγχος – 50 pg PAF. Δεύτερη καμπύλη: [γενιστεΐνη] = 0,9 mM. Ενδιάμεση καμπύλη: [γενιστεΐνη] = 1,2 mM. Κάτω καμπύλη: [γενιστεΐνη] = 2,9 mM). Κάτω τμήμα της εικόνας: Αναστολή της δράσης του αραχιδονικού οξέος (επάνω καμπύλη: έλεγχος – αραχιδονικό οξύ. Δεύτερη καμπύλη: [γενιστεΐνη] = 1,8 mM. Ενδιάμεση καμπύλη: [γενιστεΐνη] = 2,8 mM. Κάτω καμπύλη: [γενιστεΐνη] = 4,9 mM).

**Π(3): Ανασταλτικές δράσεις της απιγενίνης σε πλυμένα αιμοπετάλια κουνελιού *in vitro*.**

Η απιγενίνη αναστέλλει την συσσώρευση των πλυμένων αιμοπεταλίων του κουνελιού που προκαλούν ξεχωριστά οι αντιπροσωπευτικοί αγωνιστές των τριών δόμων συσσώρευσης, δηλαδή της οδού του ADP, της οδού του PAF και της οδού του αραχιδονικού οξέος.

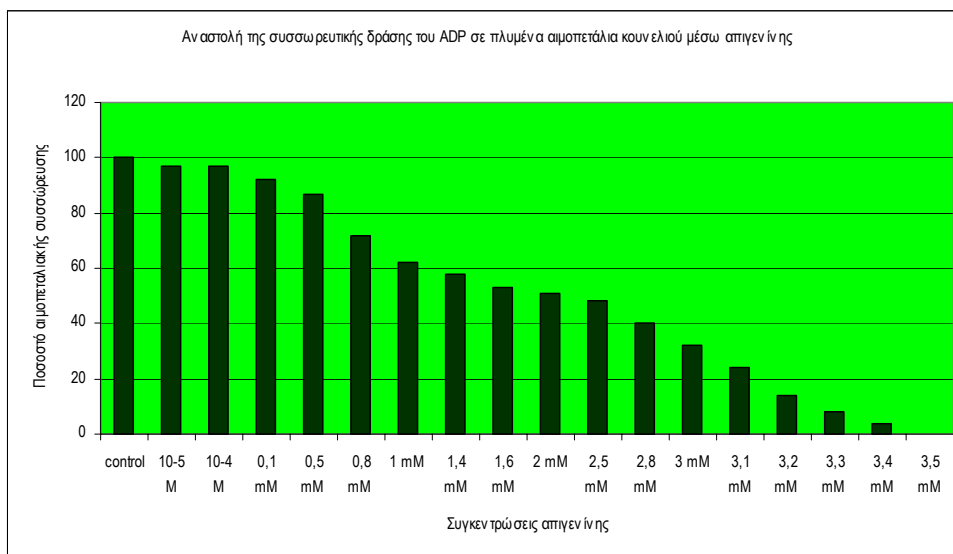
Αναλυτικά η απιγενίνη αναστέλλει τον PAF σε αιμοπετάλια κουνελιού στα οποία έχουν αποκλειστεί οι οδοί του αραχιδονικού οξέος με ασπιρίνη και του ADP με CP – CPK. Συγκεκριμένα έχουμε τα εξής: IC50 απιγενίνης έναντι του PAF = [0,8 – 1,7 mM]. Ομοίως η απιγενίνη αναστέλλει το ADP, σε αιμοπετάλια στα οποία έχουν αποκλειστεί οι οδοί του PAF και του αραχιδονικού οξέος με γιγκολίδια A&B, όπως και με ασπιρίνη, αντιστοίχως.

Συγκεκριμένα έχουμε τα εξής: IC50 απιγενίνης έναντι του ADP = [1,4 – 2,8] mM. IC50 απιγενίνης έναντι του αραχιδονικού οξέος = [2,2 – 2,9].

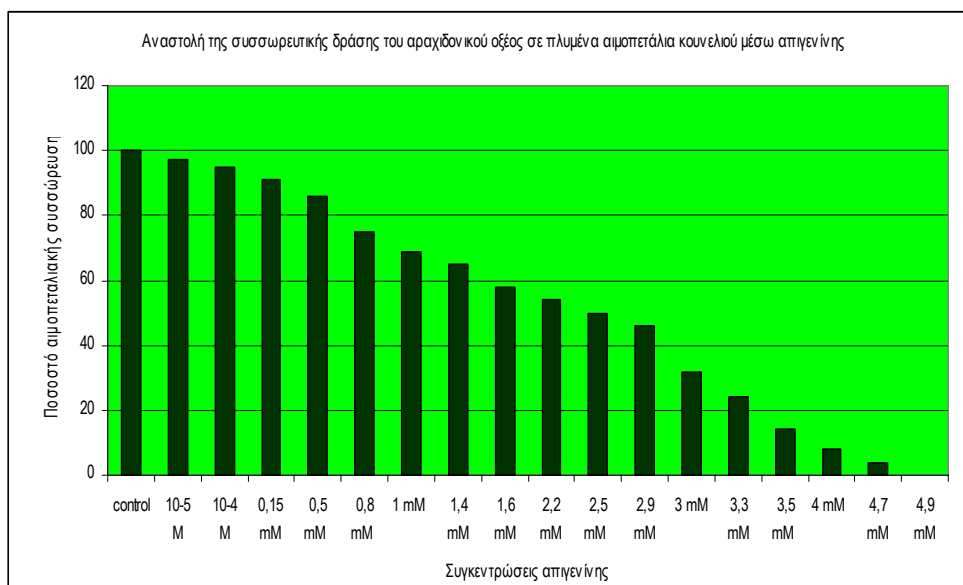
Οι ελάχιστες συγκεντρώσεις απιγενίνης που προκαλούν πλήρη αιμοπεταλιακή αναστολή (100%) είναι οι ακόλουθες: MIC – απιγενίνης για τον PAF = 2,9 mM. MIC- απιγενίνης για το ADP = 3,5 M. MIC – απιγενίνης για το Αραχιδονικό Οξύ = 4,9 mM.

Συγκέντρωση Απιγενίνης	Αγωνιστής Αραχ. Οξύ	Αγωνιστής PAF	Αγωνιστής ADP	Συγκέντρωση Απιγενίνης	Αγωνιστής Αραχ. Οξύ	Αγωνιστής PAF	Αγωνιστής ADP
	% συσσώρευσης	% συσσώρευσης	% συσσώρευσης	% συσσώρευσης	% συσσώρ.	% συσσώρ.	% συσσώρ.
0 M	100 %	100 %	100 %	1,9 mM	-	%	%
10 <sup>-7</sup> M	100 %	100 %	100 %	2 mM	-	36 %	51 %
1 μM	105 %	107 %	106 %	2,2 mM	54 %	24 %	-
10 μM	97 %	98 %	97 %	2,3 mM	-	-	%
100 μM	95 %	150 %	97 %	2,4 mM	-	%	48 %
150 μM	91 %	89 %	92 %	2,6 mM	50 %	15 %	%
500 μM	86 %	69 %	87 %	2,7 mM	-	3 %	40 %
800 μM	75 %	58 %	72 %	2,9 mM	46 %	0 %	-
1000 μM	69 %	53 %	62 %	3 mM	32 %	0 %	32 %
1,2 mM	-	49 %	-	3,5 mM	14 %	0 %	0 %
1,5 mM	65 %	-	57 %	4 mM	8 %	0 %	0 %
1,6 mM	58 %	-	53 %	4,1 mM	-	0 %	0 %
1,7 mM	-	44 %	-	4,2 mM	-	0 %	0 %
1,8 mM	-	-	-	4,7 mM	4 %	0 %	0 %
-	-	-	-	4,9 mM	0 %	0 %	0 %

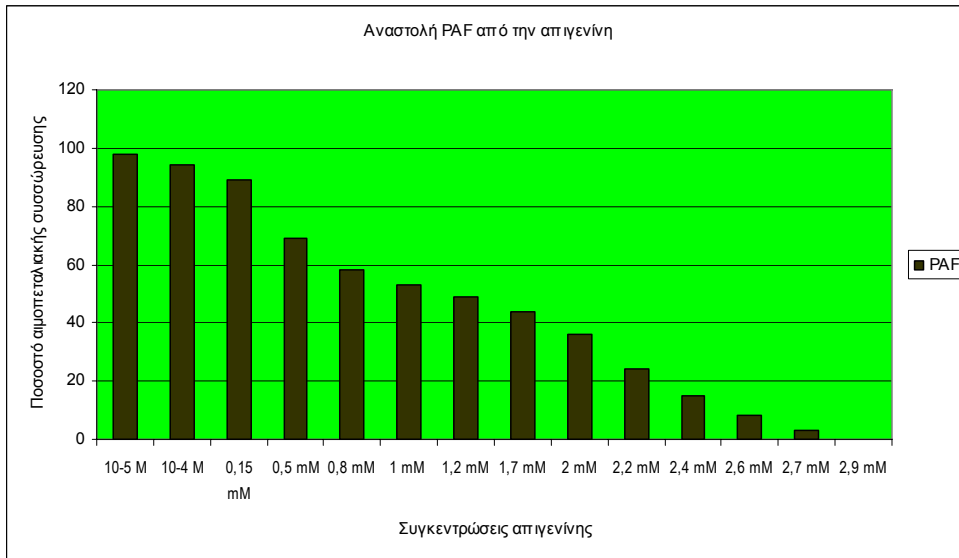
**Πίνακας αρ. 11:** Ποσοστά αναστολής της συσσώρευσης των πλυμένων αιμοπεταλίων κουνελιού τα οποία επιτυγχάνονται μέσω χορήγησης κατάλληλων ποσοτήτων γενιστεΐνης σε PRP στο οποίο οι δύο οδοί της αιμοπεταλιακής συσσώρευσης ήταν αποκλεισμένες με εξειδικευμένους προς αυτές αναστολείς, ενώ η τρίτη οδός παρέμεινε ενεργός. Σημειώνεται ότι η γενιστεΐνη αναστέλλει και τις τρεις οδούς με διαφορετική ευαισθησία.



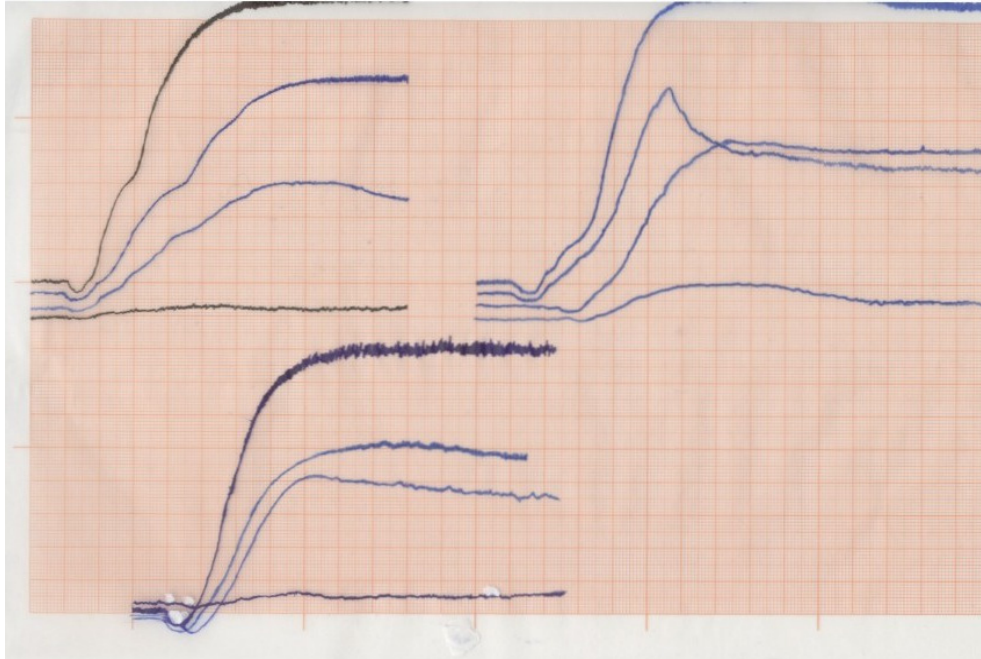
**Διάγραμμα αρ. 15.** Ανασταλτική δράση της απιγενίνης στην συσσώρευση πλυμένων αιμοπεταλίων κουνελιού που ενεργοποιούνται από ADP, το οποίο χορηγείται στο PRP σε συγκέντρωση που προκαλεί μέγιστη μη αντιστρεπτή συσσώρευση. Οι οδοί του PAF και του αραχιδονικού οξέος έχουν αποκλειστεί μη αντιστρεπτά μέσω χορήγησης κατάλληλων εξειδικευμένων αναστολέων για κάθε μια από τις δύο εν λόγω οδούς συσσώρευσης. Η αναστολή εκ μέρους της απιγενίνης είναι δοσοεξαρτώμενη και καταλήγει σε πλήρη μη αναστρέψιμη αναστολή στα 3,5 mM απιγενίνης.



**Διάγραμμα αρ. 16:** Αναστολή της συσσωρευτικής δράσης του αραχιδονικού οξέος σε πλυμένα αιμοπετάλια κουνελιού μέσω χορήγησης απιγενίνης. Οι οδοί του PAF και του ADP είναι αποκλεισμένες με εξειδικευμένους αναστολείς. Η ανασταλτική δράση της απιγενίνης είναι δοσοεξαρτώμενη και φτάνει μέχρι πλήρους κατάργησης της συσσώρευσης.



**Διάγραμμα αρ.17:** Αναστολή της συσσωρευτικής δράσης του PAF σε πλυμένα αιμοπετάλια κουνελιού μέσω χορήγησης απιγενίνης. Οι οδοί του αραχιδονικού οξέος και του ADP έχουν αποκλειστεί με ειδικούς αναστολείς. Η ανασταλτική δράση της απιγενίνης είναι δοσοεξαρτώμενη και φθάνει μέχρι την πλήρη κατάργηση της συσσωρεύσεως.



**Εικόνα αρ.9:** Συσσωρευογραφήματα που δείχνουν την δοσοεξαρτώμενη αναστολή της συσσώρευσης των πλυμένων αιμοπεταλίων του κουνελιού από την απιγενίνη: Άνω αριστερό μέρος της εικόνας: Αναστολή της δράσης του ADP (πρώτη άνω καμπύλη: έλεγχος με ADP. Δεύτερη καμπύλη: [απιγενίνη] = 0,8 mM. Ενδιάμεση καμπύλη: [απιγενίνη] = 2,9 mM). Κάτω τελευταία καμπύλη: [απιγενίνη] = 3,5 mM (πλήρης αναστολή). Άνω δεξιό μέρος της εικόνας: Αναστολή της δράσης του PAF (επάνω καμπύλη = έλεγχος – 50 pg PAF. Δεύτερη καμπύλη: [απιγενίνη] = 2,2 mM. Ενδιάμεση καμπύλη: [απιγενίνη] = 1,7 mM. Κάτω καμπύλη: [απιγενίνη] = 2,9 mM). Κάτω τμήμα της εικόνας: Αναστολή της δράσης του αραχιδονικού οξέος (επάνω καμπύλη: έλεγχος – αραχιδονικό οξύ. Δεύτερη καμπύλη: [απιγενίνη] = 1,8 mM. Ενδιάμεση καμπύλη: [απιγενίνη] = 2,9 mM. Κάτω καμπύλη: [απιγενίνη] = 4,9 mM).

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5

### ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Τα δεδομένα που προέκυψαν από την ανά χείρας διδακτορική διατριβή κατανέμονται σε τέσσερα διαφορετικά επίπεδα μελέτης, τα οποία πραγματοποιήθηκαν σε πλήρως λειτουργικά αιμοπεταλιακά παρασκευάσματα τόσο του ανθρώπου *ex vivo*, όσο και του κουνελιού *in vitro*. Τα εν λόγω επίπεδα μελέτης αφορούσαν:

1<sup>ον</sup>) Τις μορφολειτουργικές μεταβολές των αιμοπεταλίων που λαμβάνουν χώρα από την κατάσταση της ηρεμίας και μετά την διέγερσή τους διατρέχουν όλα τα στάδια των χαρακτηριστικών τους λειτουργικών αντιδράσεων (αλλαγή σχήματος, αντίδραση έκλυσης του περιεχομένου των κοκκίων, συσσώρευση) μέχρι τον σχηματισμό σταθερών λευκών θρόμβων.

2<sup>ον</sup>) Την αναστολή ή την τροποποίηση των λειτουργικών μεταβολών των αιμοπεταλίων μέσω της χορήγησης μιας σειράς ουσιών που ανήκουν στην χημική κατηγορία των φλαβονοειδών μορίων. Τα μόρια που μελετήθηκαν ήσαν η κουερσετίνη, η γενιστεΐνη και η απιγενίνη, που απαντούν σε μεγάλο αριθμό φυτών πολλά εκ των οποίων χρησιμοποιούνται στην καθημερινή διατροφή του ανθρώπου (ποικιλία φρούτων, λαχανικών, δημητριακών, ψυχανθών, ελαίων). Παράλληλα με τις δράσεις των εν λόγω φλαβονοειδών μελετήθηκαν και οι δράσεις μιας σειράς ουσιών τόσο φυσικής (ενδογενούς) όσο και τεχνητής (εξωγενούς) προέλευσης. Οι ουσίες αυτές ήσαν δομικά ετερογενείς και το κύριο κοινό τους χαρακτηριστικό ήταν η ύπαρξη αντιοξειδωτικών ιδιοτήτων και η ικανότητα να αντιδρούν με ελεύθερες ρίζες.

3<sup>ον</sup>) Το τρίτο επίπεδο της μελέτης μας αφορούσε την ποσοτικοποίηση της παραγωγής της θρομβοξάνης A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>) από τα αιμοπετάλια τόσο του ανθρώπου *ex vivo*, όσο και τα πλυμένα αιμοπετάλια του κουνελιού, όταν αυτά ενεργοποιούταν είτε απουσία των φλαβονοειδών ως αναστολέων, είτε παρουσία αυτών σε διακεκριμένες ποσότητες, οι οποίες προκαλούσαν με δοσοσεξαρτώμενο τρόπο αναστολή της αιμοπεταλιακής συσσώρευσης διαφορετικών ποσοστών. Μέσω αυτού του επιπέδου πειραμάτων θέλαμε να συσχετίσουμε το κατά πόσον τα υπό μελέτη φλαβονοειδή ανέστειλαν τα αιμοπετάλια

αναστέλλοντας την παραγωγή TXA<sub>2</sub> από την αιμοπεταλιακή κυκλοξυγονάση. Επίσης στο ερευνητικό αυτό επίπεδο – που ήταν και το βαθύτερο καθόσον έμπαινε στην κρίσιμη ενδοχώρα των μηχανισμών της αιμοπεταλιακής λειτουργίας – μελετήθηκε και η ικανότητα μερικών αντιοξειδωτικών παραγόντων να προκαλούν αναστολή της παραγωγής TXA<sub>2</sub>.

4<sup>ov</sup>) Το τέταρτο επίπεδο μελέτης αφορούσε το κατά πόσον οι χρησιμοποιηθείσες φλαβονοειδείς ουσίες ήσαν ικανές στο να μειώσουν την εμφάνιση του υποδοχέα ινωδογόνου GPIIb/IIIa στην εξωτερική επιφάνεια της αιμοπεταλιακής κυτταροπλασματικής μεμβράνης. Ο εν λόγω υποδοχέας είναι κρίσιμης σημασίας γιατί επί αυτού προσδέεται το ινωδογόνο προκειμένου να σχηματιστεί το δίκτυο της ινικής, η οποία αποτελεί το βασικό συνδετικό στοιχείο των αιμοπεταλιακών θρόμβων που συγκολλά τα επί μέρους ενεργοποιημένα αιμοπετάλια με τα μοριακά στοιχεία των τραυματισμένων υπενδοθηλιακών ιστών. Τα πειράματα αυτού του τέταρτου επιπέδου πραγματοποιήθηκαν προκειμένου να δειχθεί αν τα υπό μελέτη φλαβονοειδή λειτουργούσαν είτε ως δομικοί ανταγωνιστές του υποστρώματος των υποδοχέων – δηλαδή ως ανταγωνιστές του ινωδογόνου – καταλαμβάνοντας εν μέρει ή εν όλω τον χώρο του υποδοχέα και αποκλείοντας την πρόσδεση του ινωδογόνου. Εναλλακτικά οι φλαβονοειδείς αυτές ουσίες θα μπορούσαν να οδηγήσουν σε μια «καταβύθιση» του υποδοχέα GPIIb/IIIa μέσα στην κυτταροπλασματική μεμβράνη, έτσι ώστε να μην είναι σε θέση να ενσωματώσει το ινωδογόνο και να σχηματίσει τον θρόμβο. Στην πρώτη περίπτωση η δράση θα ήταν άμεση και θα ακολουθούσε μια κινητική κορεσμού των υποδοχέων γραμμική, ενώ στην δεύτερη περίπτωση η κινητική θα είχε τον χαρακτήρα μιας εξίσωσης κατά Michaelis – Menden διαφορετικής μορφής.

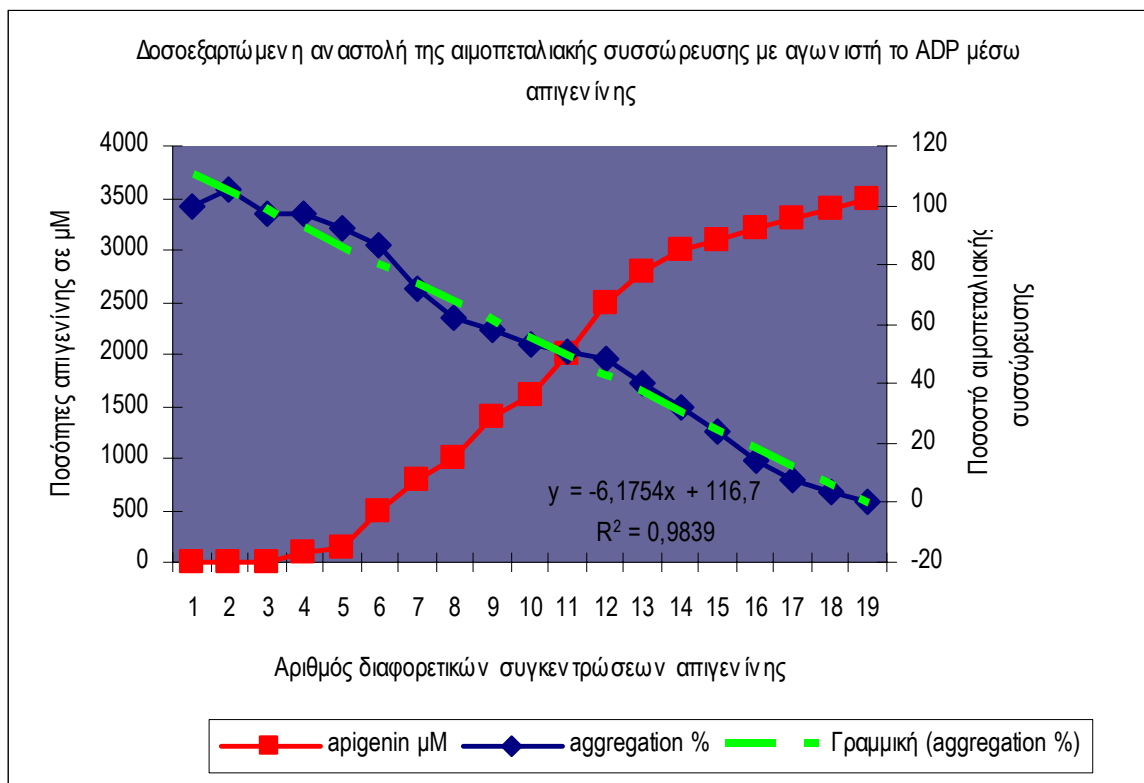
Η συνολική θεώρηση όλων των δεδομένων υποδεικνύει τα εξής:

1<sup>ov</sup>) Η συσχέτιση της δράσης των επιμέρους δόσεων της απιγενίνης με τα αντίστοιχα ποσοστά της αιμοπεταλιακής συσσώρευσης όταν ο αγωνιστής είναι το αραχιδονικό οξύ φαίνεται στην εικόνα αριθμός 10(α, β, γ). Εδώ η συσχέτιση δόσης – αναστολής φαίνεται να είναι γραμμικά αντίστροφη. Υπό αυτή την έννοια η εξίσωση που περιγράφει κατά καλύτερο τρόπο την αλληλεξάρτηση δόσης – αποτελέσματος είναι μια αντίθετου πρόσημου εξίσωση 1<sup>ov</sup> βαθμού τύπου  $y = -ax + c$ . Το ίδιο συμπέρασμα βγαίνει και όταν θεωρούμε την δράση της απιγενίνης στην αιμοπεταλιακή συσσώρευση που προκύπτει με αγωνιστή το ADP. Επίσης και η συσχέτιση μεταξύ της αναστολής της συσσωρευτικής

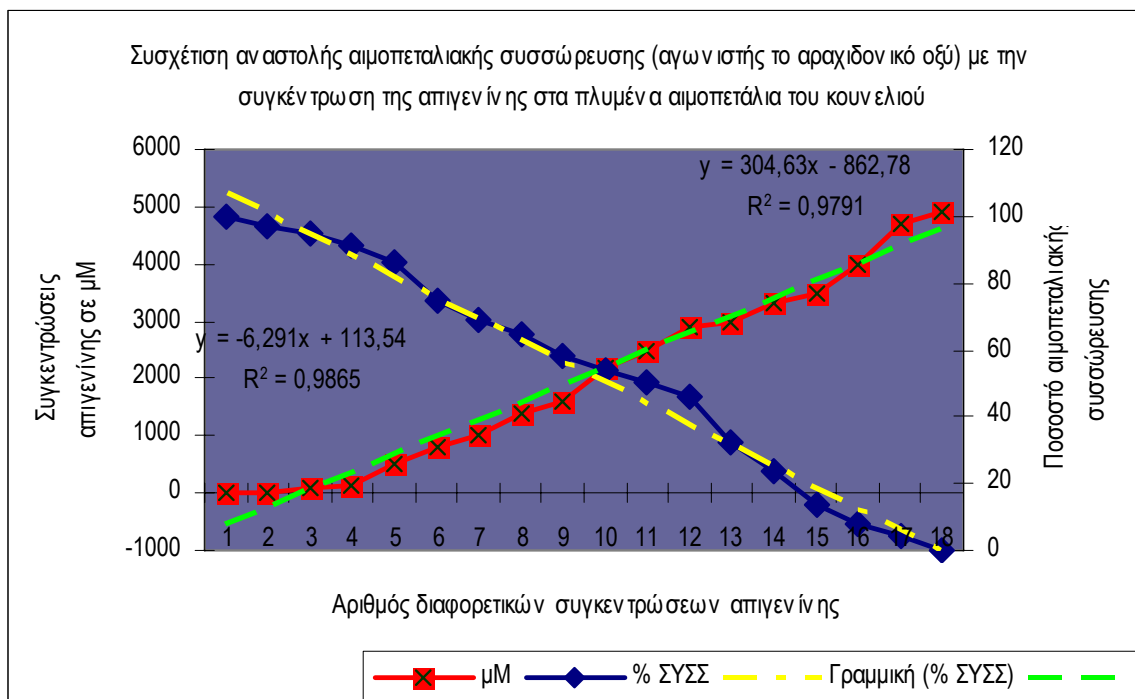


δράσης του PAF από την απιγενίνη εμφανίζει τον ίδιο τύπο αντίθετης γραμμικής εξάρτησης

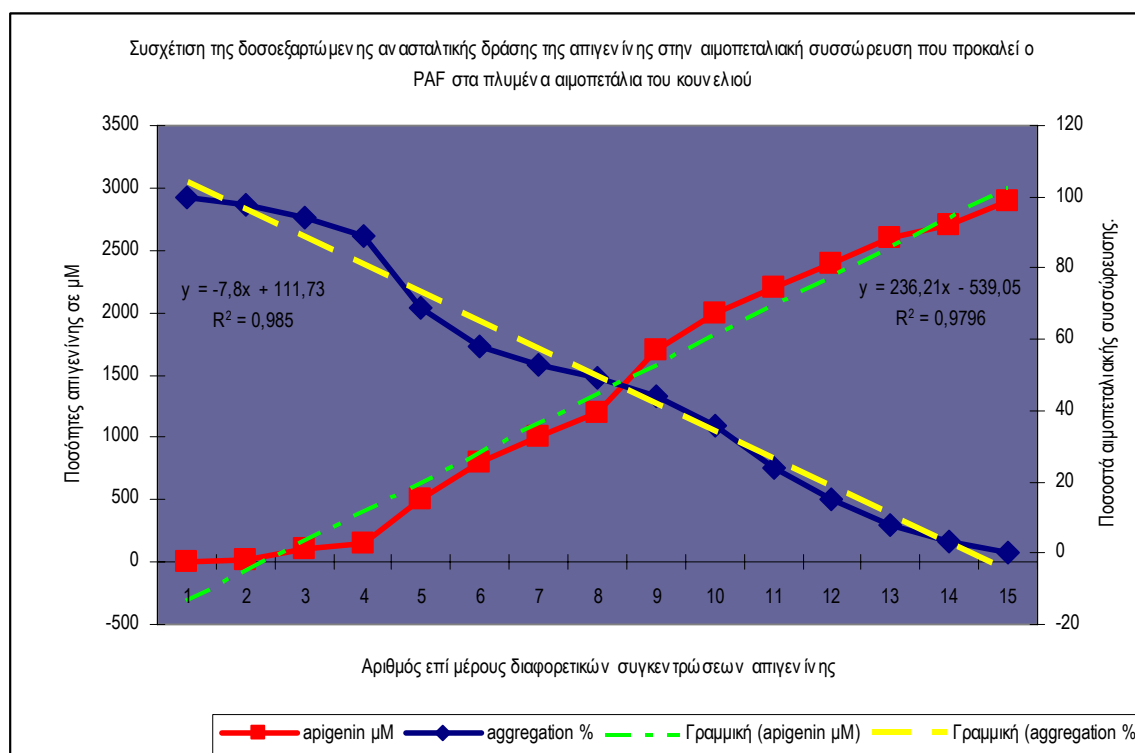
**Εικόνα αρ.10 (α, β, γ):** Γραφική συσχέτιση της δοσοεξαρτώμενης ανασταλτικής δράσης της απιγενίνης στις αιμοπεταλιακές συσσωρεύσεις που προκαλούνται από τους κύριους αγωνιστές μεμονωμένα, δηλαδή το ADP, το αραχιδονικό οξύ και ο PAF. Η συσχέτιση αυτή υποδεικνύει την ύπαρξη ενός κοινού τελικού μηχανισμού στην ενεργοποίηση της αιμοπεταλιακής συσώρευσης.



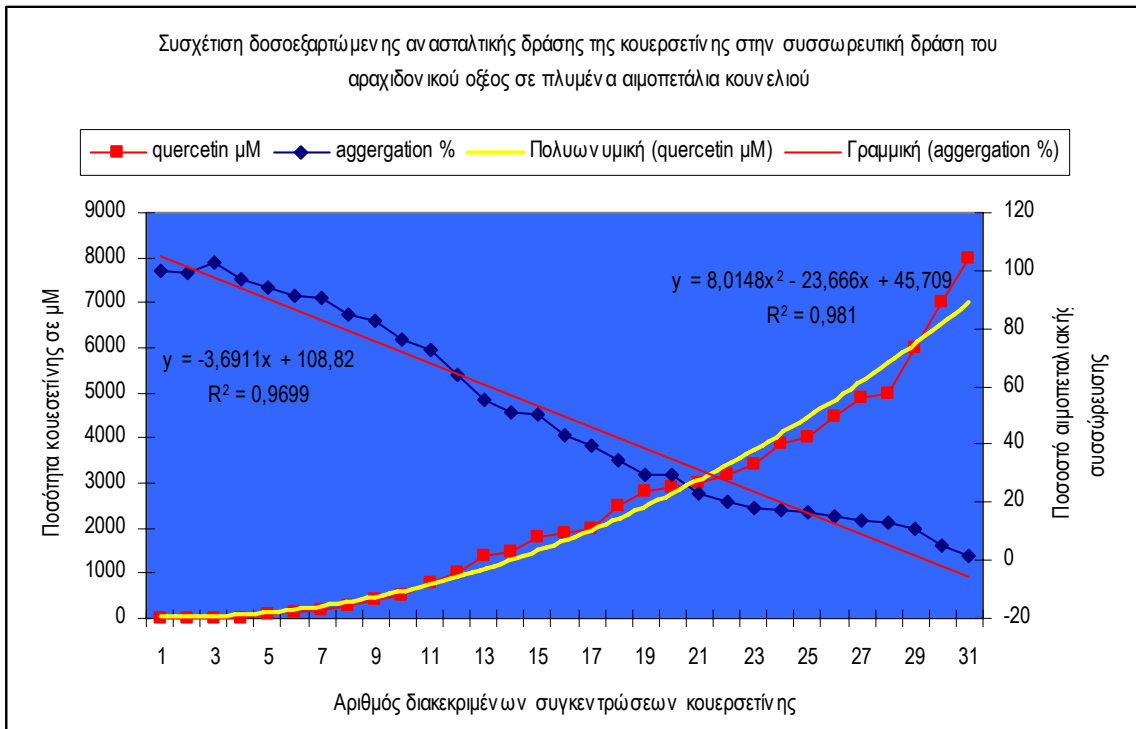
**Εικόνα αρ. 10(α):** Συσχέτιση δράσης απιγενίνης και συσσωρευτικής δράσης ADP.



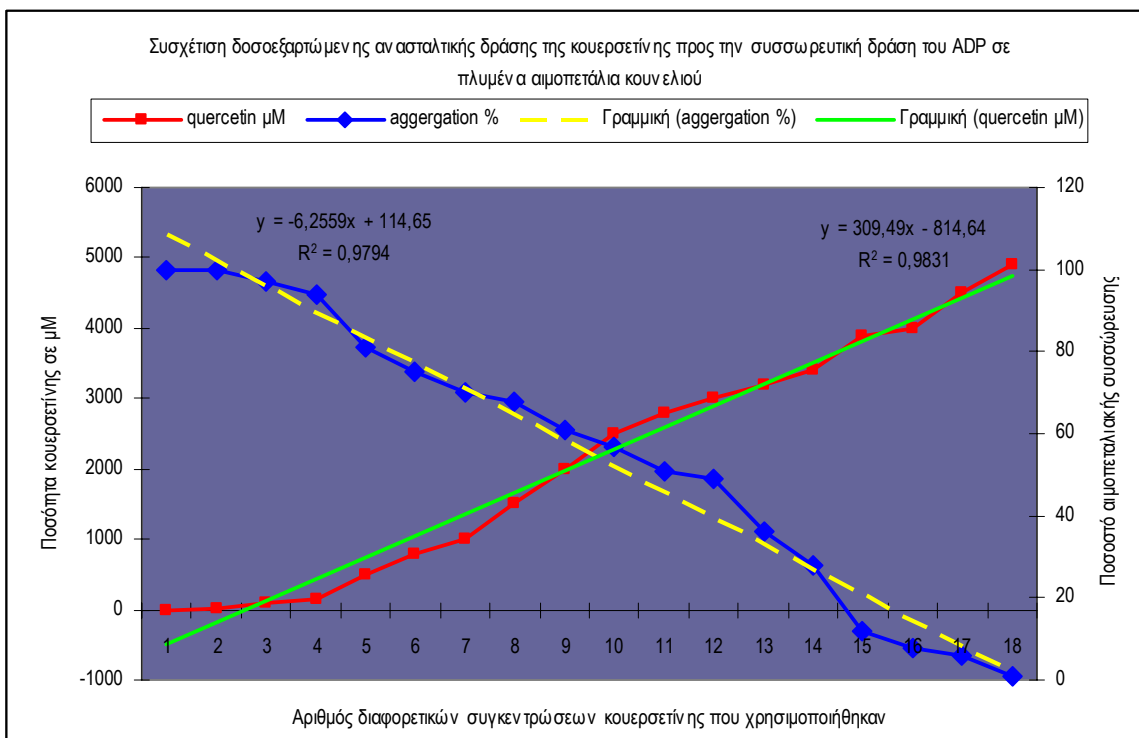
**Εικόνα αρ.10(β):** Συσχέτιση δράσης απιγενίνης με την συσσωρευτική δράση του αραχιδονικού οξέος.



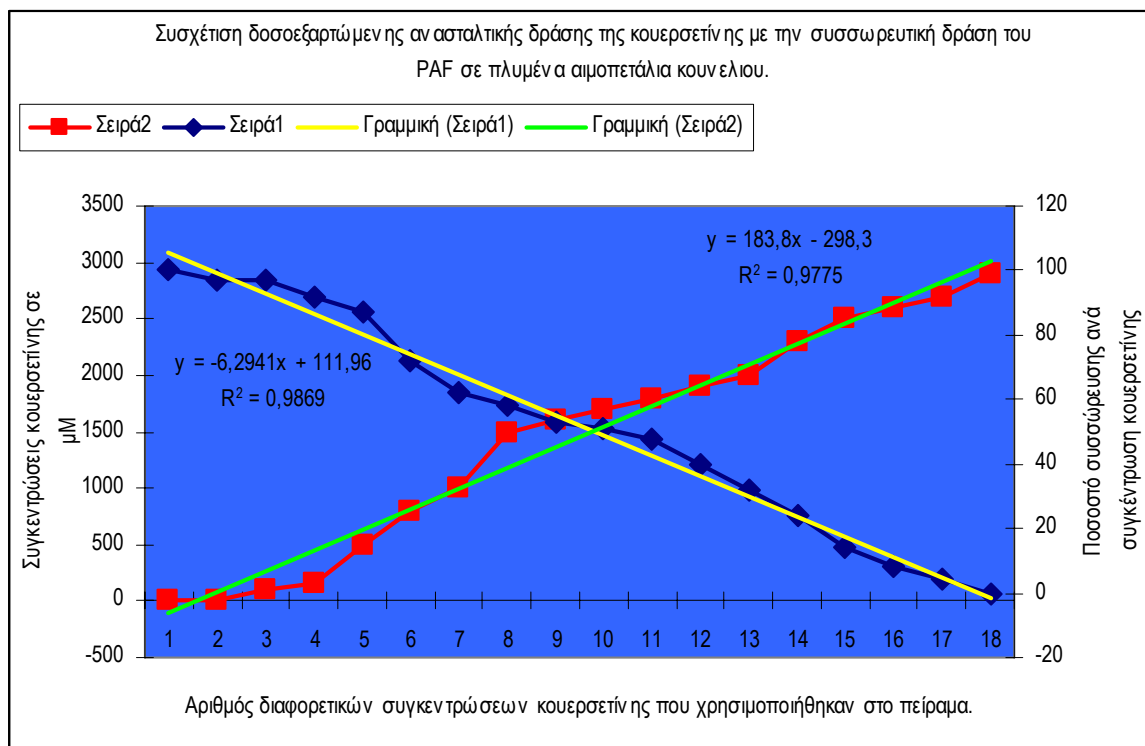
**Εικόνα αρ. 10(γ):** Συσχέτιση δράσης απιγενίνης στην συσσωρευτική δράση του PAF.



**Εικόνα 11(α):** Συσχέτιση δόσεων κουερσετίνης με αντίστοιχα επίπεδα αναστολής αιμοπεταλιακής συσσώρευσης σε πλυμένα αιμοπετάλια κουνελιού. Αγωνιστής το αραχιδονικό οξύ.



**Εικόνα 11(β):** Συσχέτιση δοσολογίας κουερσετίνης με την αναστολή της αιμοπεταλιακής συσσώρευσης σε πλυμένα αιμοπετάλια κουνελιού. Αγωνιστής το ADP.



**Εικόνα αρ. 11(γ):** Συσχέτιση δοσολογίας κουερσετίνης με την αντίστοιχη αναστολή σε πλυμένα αιμοπετάλια κουνελιού. Αγωνιστής ο PAF.

2<sup>ov</sup>) Η συσχέτιση της δράσης των επιμέρους δόσεων της κουερσετίνης με τα αντίστοιχα ποσοστά της αιμοπεταλιακής συσσώρευσης όταν ο αγωνιστής είναι το αραχιδονικό οξύ φαίνεται στην εικόνα αριθμός 10(α, β, γ). Εδώ η συσχέτιση δόσης – αναστολής φαίνεται να είναι γραμμικά αντίστροφη. Υπό αυτή την έννοια η εξίσωση που περιγράφει κατά καλύτερο τρόπο την αλληλεξάρτηση δόσης – αποτελέσματος είναι μια αντίθετου πρόσημου εξίσωση 1<sup>ov</sup> βαθμού τύπου  $y = -ax + c$ . Το ίδιο συμπέρασμα βγαίνει και όταν θεωρούμε την δράση της κουερσετίνης στην αιμοπεταλιακή συσσώρευση που προκύπτει με αγωνιστή το ADP. Επίσης και η συσχέτιση μεταξύ της αναστολής της συσσωρευτικής δράσης του PAF από την κουερσετίνη εμφανίζει τον ίδιο τύπο αντίθετης γραμμικής εξάρτησης.

3<sup>ov</sup>) Ο ίδιος τύπος αντιθετικής γραμμικής εξάρτησης μεταξύ χρησιμοποιούμενων συγκεντρώσεων κουερσετίνης και αντίστοιχης αναστολής της αιμοπεταλιακής συσσώρευσης εμφανίζεται όταν χρησιμοποιούμε την γενιστεΐνη ως αναστολέα των αιμοπεταλιακών αντιδράσεων συσσώρευσης στα πλυμένα αιμοπετάλια του κουνελιού, τόσο όσο χρησιμοποιείται ως αγωνιστής ο PAF, το ADP ή το αραχιδονικό οξύ.

4<sup>ov</sup>) Μια όμοιου τύπου συσχέτιση αρνητικής γραμμικής εξάρτησης μεταξύ των συγκεντρώσεων των χρησιμοποιούμενων φλαβονοειδών (κουερσετίνη, γενιστεΐνη και απιγενίνη) και αντίστοιχων επιπέδων αναστολής της αιμοπεταλιακής συσσώρευσης, παρατηρείται επίσης και στα πειράματα που έλαβαν χώρα με αιμοπετάλια ανθρώπου *ex vivo*.

Τα δεδομένα αυτά υποδεικνύουν ότι η δράση των φλαβονοειδών ασκείται επί του αυτού μηχανισμού ο οποίος πραγματοποιεί την συσσώρευση των αιμοπεταλίων τόσο στο μοντέλο των πλυμένων αιμοπεταλίων του κουνελιού (*in vitro*), όσο και στο μοντέλο των αιμοπεταλίων του ανθρώπου (*ex vivo*).

Τα δεδομένα της αιμοπεταλιακής συσσώρευσης προέκυψαν από δύο τύπους πειραμάτων: 1<sup>ov</sup>) Από αιμοπετάλια στα οποία οι τρεις οδοί συσσώρευσης ήσαν ταυτοχρόνως ανοιχτοί και 2<sup>ov</sup>) από αιμοπετάλια στα οποία οι δύο οδοί συσσώρευσης είχαν αποκλειστεί με ειδικούς αναστολείς και παρέμεινε ανοιχτή μόνον μια οδός.

Παρά το γεγονός της εκλεκτικής αναστολής των δύο οδών, εν τούτοις σε όλες τις περιπτώσεις ο αγωνιστής που ενεργοποιούσε τα αιμοπετάλια μέσω της ελεύθερης απομένουσας οδού, προκαλούσε μέγιστη, μη αντιστρεπτή συσσώρευση, το ύψος της οποίας ήταν σε όλες τις συσσωρεύσεις ενός συγκεκριμένου δείγματος αίματος περίπου το ίδιο, υπό τον όρο ότι ο αγωνιστής έπρεπε να χορηγείται σε ποσότητες ικανές να προκαλέσουν μέγιστη μη αντιστρεπτή συσσώρευση. Ακόμη, το σχήμα των καμπυλών συσσώρευσης έδειξε μια αξιόλογη μορφολογική σύγκλιση, ακόμη και όταν οι συσσωρεύσεις πραγματοποιούνταν μέσω ενεργοποίησης από διαφορετικούς αγωνιστές. Αυτό είναι αναμενόμενο όταν οι συσσωρεύσεις γίνονται με ποσότητες αγωνιστών οι οποίες είναι μεγάλες ώστε να προκαλέσουν ισχυρή αιμοπεταλιακή ενεργοποίηση, που αναγκάζει κάθε λειτουργική φάση της να λαμβάνει την μέγιστη τιμή της.

Το όλο ζήτημα της ποσοτικοποίησης της μέγιστης αιμοπεταλιακής αντίδρασης ανά χρησιμοποιούμενο αγωνιστή είναι αρκετά δύσκολο και για να προσδιοριστεί απαιτούνται αρκετές δοκιμές ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων ενός συγκεκριμένου δότη. Γενικά ένας συγκεκριμένος δότης ο οποίος ευρίσκεται σε σταθερή κατάσταση, ακολουθεί ένα δεδομένο διατροφικό πρότυπο, δεν υφίσταται την δράση διαφορετικών stress και δεν λαμβάνει φαρμακευτικές ουσίες ή συμπληρώματα, εμφανίζει κατά κανόνα μια σταθερότητα στην λειτουργική συμπεριφορά των αιμοπεταλίων του, οπότε μπορούμε να προσδιορίσουμε τις αιμοπεταλιακές του αντιδράσεις. Στην περίπτωση των πειραμάτων μας

οι άνθρωποι που χρησιμοποιήθηκαν ως αιμοδότες είχαν μια επαρκή τυποποίηση ώστε οι αντιδράσεις των αιμοπεταλίων τους να μην εμφανίζουν διακυμάνσεις.

Πολύ μεγαλύτερη τυποποίηση είχαν τα κουνέλια που χρησιμοποιήσαμε ως πειραματόζωα για την λήψη αίματος, την απομόνωση, την έκπλυση των αιμοπεταλίων και τέλος την λειτουργική τους δοκιμή.

Συνεπώς μπορούμε να πούμε ότι οι συγκλίσεις που παρατηρήθηκαν στα μεγέθη των αιμοπεταλιακών συσσωρεύσεων με την χρήση ίσων ποσοτήτων ενός συγκεκριμένου αγωνιστή, αλλά και με την χρήση διαφορετικών αγωνιστών μεταξύ τους (υπό τον όρο ότι αυτές ήσαν σε θέση να εισάγουν μέγιστη, μη αντιστρεπτή συσσώρευση), ήσαν συγκλίσεις αντικειμενικές – τόσο για τα αιμοπετάλια των ανθρώπων *ex vivo*, όσο και για εκείνα των κουνελιών *in vitro*.

Εφ' όσον προσδιορίστηκαν τα συγκεκριμένα επίπεδα των συγκεντρώσεων των τριών φλαβονοειδών που έδιναν αντίστοιχα ποσοστά αναστολής της συσσώρευσης, μελετήθηκε το κατά πόσον οι διάφοροι τύποι αγωνιστών ενεργοποιούν την παραγωγή θρομβοξάνης A<sub>2</sub>, εκ μέρους του συστήματος των ενζύμων της αιμοπεταλιακής αραχιδονικής οδού.

Χρησιμοποιώντας τυποποιημένα αντιδραστήρια της εταιρείας Cronolog ως πρότυπα παρασκευάσαμε μια σειρά των κύριων αιμοπεταλιακών αγωνιστών και μελετήσαμε την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων του ανθρώπου και την ταυτόχρονη παραγωγή θρομβοξάνης A<sub>2</sub>, εκ μέρους τους.

Οι αγωνιστές που μελετήθηκαν ήταν το ADP, το αραχιδονικό οξύ, ο PAF, η επινεφρίνη, η θρομβίνη, το κολλαγόνο και η ριστοσετίνη.

Τα δεδομένα αυτά δείχνουν ότι στην κατάσταση της ηρεμίας τα αιμοπετάλια παράγουν μικρή ποσότητα TXA<sub>2</sub> η οποία ανέρχεται στα 137±9 pg/ml PRP.

Από την άλλη πλευρά η παραγωγή της TXA<sub>2</sub> (η οποία μετρήθηκε ως ο σταθερός μεταβολίτης αυτής TXB<sub>2</sub>) αυξάνεται ισχυρά μετά την διέγερση των αιμοπεταλιακών κυττάρων σε ποσοστά κυμαινόμενα μεταξύ του 793% (για το ADP, που είναι ο ασθενέστερος αγωνιστής) και του 1733% για την θρομβίνη που αποτελεί και τον ισχυρότερο αγωνιστή.

Η σειρά δραστηριότητας των διαφόρων αγωνιστών όταν αυτοί χορηγούνται σε δόσεις που επάγουν μέγιστη μη αντιστρεπτή συσσώρευση είναι η εξής: RISTO<PAF<THR  
Διφωσφορική αδενοσίνη (1087±22pg/ml )<αδρεναλίνη (1237±31pg/ml)<Κολλαγόνο

(1241±14 pg/ml)<Αραχιδονικό οξύ (1375±18 pg/ml)<Ριστοσετίνη (1398±42 pg/ml)< PAF (1783±26 pg/ml )<Θρομβίνη (2375±34 pg/m).

Σε όλες αυτές τις περιπτώσεις παρατηρούμε ότι οι μέγιστες μη αντιστρεπτές συσσωρεύσεις των αιμοπεταλίων του ανθρώπου *ex vivo* σχετίζονται (ή προϋποθέτουν) την παραγωγή μιας ποσότητας θρομβοξάνης η οποία στο 8<sup>ο</sup> λεπτό της συσσώρευσης (δηλαδή όταν αυτή έχει ολοκληρωθεί) φτάνει στο επίπεδο τουλάχιστον των 1100 pg/ml PRP (που αντιστοιχεί στην παραγωγή TXB2 με διεγέρτη το ADP).

	<b>ADP</b>	<b>PAF</b>	<b>ARA</b>	<b>ADRE.</b>	<b>THR.</b>	<b>COL.</b>	<b>RISTO.</b>
Πριν (PRP σε ηρεμία )	137±9 pg/ml	137± 9 pg/ml	137± 9 pg/ml	137± 9 pg/ml	137± 9 pg/ml	137± 9 pg/ml	137± 9 pg/ml
Μετά (PRP 8 min μετά διέγερσης)	1087±22 pg/ml	1783±26 pg/ml	1375±18 pg/ml	1237±31 pg/ml	2375±34 pg/m	1241±14 pg/ml	1398±42 pg/ml

Αυτό το άλμα παραγωγής από τα 137 pg στα 1080 pg, για το ADP (ή ακόμη περισσότερο στα 1783 pg και στα 2375 pg, όπως συμβαίνει αντιστοίχως για τον PAF και την θρομβίνη), δηλώνει ότι η ροή των μεταβολιτών μέσω της αραχιδονικής οδού τουλάχιστον οχταπλασιάζεται (ADP) και κατά μέγιστο δεκαοχταπλασιάζεται (θρομβίνη) για να επιτελέσει την αιμοπεταλιακή συσσώρευση. Ταυτόχρονα και ο ρυθμός χρησιμοποίησης του οξυγόνου ανέρχεται σε υψηλό επίπεδο, δίνοντας το λεγόμενο φαινόμενο της οξειδωτικής έκρηξης (oxygen burst), το οποίο συνήθως αποδίδεται σε αύξηση της αναπνευστικής διαδικασίας για την παραγωγή έκτακτης ποσότητας ATP, που χρησιμοποιείται για την όλη αιμοπεταλιακή ενεργοποίηση. Πρέπει να σημειωθεί ότι η αιμοπεταλιακή ενεργοποίηση περιλαμβάνει πολύ υψηλή αύξηση της κινητικότητας των αιμοπεταλίων (αλλαγή σχήματος, εξαγωγή ψευδοποδίων, πρόσφυση και άπλωμα, αντίδραση εκκένωσης του περιεχομένου των κοκκίων άλφα και δέλτα,

Η οξειδωτική έκρηξη είναι ένα φαινόμενο που συνοδεύει τόσο την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων όσο και την ενεργοποίηση των περισσότερων τύπων λευκοκυττάρων.

Αν και έχει θεωρηθεί ότι το μέγα μέρος αυτής της μεγάλης ποσότητας οξυγόνου που καταναλίσκεται από το ενεργοποιημένο αιμοπετάλιο χρησιμοποιείται για την μιτοχονδριακή αναπνοή, προκειμένου να έχουμε υψηλή παραγωγή ATP, εν τούτοις είναι πιθανόν ένα μέρος του επί πλέον καταναλισκόμενου οξυγόνου ενεργοποιείται υπό την

μορφή υπεροξειδίου του οξυγόνου ( $O_2^{\cdot-}$ , ή άλλη μορφή ενεργοποιημένου οξυγόνου) το οποίο εντάσσεται στους διπλούς δεσμούς των μορίων του αραχιδονικού οξέος για την σύνθεση των προστανοειδών. Προφανώς η αύξηση της παραγωγής  $TXA_2$  κατά πολύ μεγάλα ποσοστά είναι φυσικό να απαιτεί αντίστοιχη αύξηση των ποσοστών του οξυγόνου στην αντίδραση. Είναι πολύ σημαντικό να υπογραμμιστεί εδώ ότι η ένταξη του οξυγόνου στους διπλούς δεσμούς του αραχιδονικού οξέος προϋποθέτει την ενεργοποίησή του, δηλαδή την αναγκαστική του μερική αναγωγή και συνεπώς την μετατροπή του σε ελεύθερη ρίζα. Ανάλογα με το μέγεθος της συγκέντρωσης αναγωγικών σωμάτων, όπως π.χ το  $NADH$ , ή το  $FADH$ , στο ενδοκυττάριο περιβάλλον του αιμοπεταλίου, η αναγωγή μπορεί να γίνει ευκολότερα ή δυσκολότερα. Η χημεία του τετραπυρρολικού σιδήρου της αίμης της κυκλοξυγονάσης μπορεί να δώσει αντιδράσεις τύπου Fenton για την παραγωγή ελευθέρων ριζών. Η ισχυρή κατάλυση που πραγματοποιείται εξασφαλίζεται από το πρωτεϊνικό τμήμα της κυκλοξυγονάσης. Αυτό φαίνεται να καταδεικνύεται από το γεγονός ότι η παρουσία υπεροξειδίων διεγείρει την δραστηριότητα της κυκλοξυγονάσης. Από την άλλη πλευρά η παρουσία κάποιων αναγωγικών φαινολικών ενώσεων επίσης διεγείρει την δραστηριότητα του εν λόγω ενζύμου. Γνωρίζουμε ότι οι αντιδράσεις τύπου Fenton μπορεί να υπάρξουν τόσο παρουσία μικρών συγκεντρώσεων οξειδωτικών σωμάτων (όπως το  $H_2O_2$ ), όπως επίσης και παρουσία αναγωγικών χημικών ουσιών (όπως π.χ το ασκορβικό οξύ, η αδρεναλίνη, κ.α). Η ενεργοποίηση της παραγωγής των βιοδραστικών λιποειδών της οδού του αραχιδονικού οξέος θεωρείται ότι είναι πάντοτε απαραίτητη για την πραγματοποίηση των αιμοπεταλιακών αντιδράσεων.

ΑΓΩΝΙΣΤΗΣ	ADP	PAF	ARA	ADRE.	THR.	COL.	RISTO.
Κατάσταση αιμοπεταλίων							
Πριν (PRP σε ηρεμία )	TXA2: 137±9 pg/ml	TXA2 137± 9 pg/ml	TXA2 137± 9 pg/ml	TXA2 137± 9 pg/ml	TXA2 137± 9 pg/ml	TXA2 137± 9 pg/ml	TXA2 137± 9 pg/ml
Οχτώ min κατόπιν διέγερσης	TXA2 1087±22 pg/ml	TXA2 1783±26 pg/ml	TXA2 1375±18 pg/ml	TXA2 1237±31 pg/ml	TXA2 2375±34 pg/m	TXA2 1241±14 pg/ml	TXA2 1398±42 pg/ml



[κουερσετίνη] = IC50 ανά αγωνιστή	3 mM	1,5 mM	2 mM	3 mM	5 mM	3 mM	6 mM
[κουερσετίνη] = IC50 Οχτώ min κατόπιν διέγερσης	TXA2 578±36 pg/ml	TXA2 310±29 pg/ml	TXA2 712±41 pg/ml	TXA2 306±17 pg/ml	TXA2 912±25 pg/ml	TXA2 345±17 pg/ml	TXA2 702±38 pg/ml
[κουερσετίνη] = MIC ανά αγωνιστή	6 mM	4 mM	7,5 mM	5 mM	7,5 mM	5,8 mM	8,5 mM
[κουερσετίνη] = MIC Οχτώ min κατόπιν διέγερσης	TXA2 192±12 pg/ml	TXA2 90±5 pg/ml	TXA2 117±8 pg/ml	TXA2 144±11 pg/ml	TXA2 329±16 pg/ml	TXA2 206±12 pg/ml	TXA2 237±18 pg/ml

Η ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων συνοδεύεται επίσης με μια ισχυρή ενεργοποίηση της γλυκογονόλυσης, όπως επίσης και της γλυκόλυσης. Επίσης φαίνεται ότι ενεργοποιείται εκ παραλλήλου και η οδός των φωσφορικών πεντοζών.

Γενικά το αναγωγικό δυναμικό του κυττάρου είναι σημαντικό για την πραγματοποίηση της ενεργοποίησης του μοριακού οξυγόνου, αλλά μια υπερβολικά μεγάλη ποσότητα αναγωγικού δυναμικού είναι σε θέση να απενεργοποιήσει την παραγωγή ελευθέρων ριζών και να εκτρέψει την αιμοπεταλιακή λειτουργία προς μια κατάσταση αδράνειας.

Ο αιμοπεταλιακός μεταβολισμός είναι γενικώς πολύ μελετημένος με αποτέλεσμα σήμερα να είμαστε σε θέση να γνωρίζουμε την σύνδεση των διαφόρων «ανεξάρτητων» οδών ενεργοποίησης, κατά τρόπον ώστε η παλαιότερη άποψη του Chignard M, Vargaftig B και συνεργατών (56, 57, 58, 59, 60, 61) να φαίνεται επιβεβαιωμένη.

Η διέγερση των αιμοπεταλίων από την παρουσία φυσιολογικών διεγερτών, (όπως είναι το κολλαγόνο, η θρομβίνη, το αραχιδονικό οξύ, ο PAF κ.α ) λαμβάνει χώρα με την σύνδεση αυτών στους εξειδικευμένους αντίστοιχους υποδοχείς της αιμοπεταλιακής μεμβράνης, η οποία οδηγεί ταχέως σε έναν μεγάλο αριθμό μεταβολών (αλλαγή σχήματος των αιμοπεταλίων, ενεργοποίηση της αντίδρασης έκλυσης του περιεχομένου των άλφα και δέλτα κοκκίων και τέλος αιμοπεταλιακή συσσώρευση). Όλες αυτές οι αιμοπεταλιακές αποκρίσεις σχετίζονται με την ενεργοποίηση ειδικών φωσφολιπασών και την μεσολάβηση ειδικών ενεργών λιπιδικών παραγώγων. Η ενεργοποίηση γίνεται με την μεσολάβηση μιας G – πρωτεΐνης της μεμβράνης των αιμοπεταλίων με κύριο αποδέκτη της το ένζυμο

φωσφοδιεστεράση της διφωσφορικής φωσφατιδυλο- ινοσιτόλης, η οποία προκαλεί διάσπαση των πολυφωσφοϊνοσιτιδίων της μεμβράνης. Έτσι απελευθερώνονται δύο ουσίες, η 1,2 – διάκυλο-γλυκερόλη (DAG) και η 1,4,5 – τριφωσφορική ινοσιτόλη (IP3). Οι ουσίες αυτές έχουν και οι δύο τον ρόλο δεύτερου αγγελιοφόρου. Η φωσφολιπάση – C αρχικά ενεργοποιεί τον καταβολισμό της 4,5 – διφωσφορικής φωσφατιδυλο – ινοσιτόλης σε DAG και σε IP3, ενώ η διάκυλο – γλυκερόλη, ως δεύτερος αγγελιοφόρος διεγείρει μια πρωτεϊνική κινάση, η οποία ενεργοποιείται από το ιονισμένο ασβέστιο και εξαρτάται από τα φωσφολιπίδια. Η εν λόγω κινάση είναι η γνωστή πρωτεϊνική κινάση C.

Ακολούθως η IP3 μεσολαβεί στην κινητοποίηση των ιόντων ασβεστίου και την φωσφορυλίωση των πρωτεϊνών. Εν συνεχεία η DAG είτε αποακετυλιώνεται με την λιπάση της 1,2 – διάκυλο – γλυκερόλης (δηλαδή την εξειδικευμένη λιπάση που έχει αυτήν ως υπόστρωμα) σε μονοακυλογλυκερόλη, είτε φωσφορυλιώνεται με την κινάση της 1,2 – διάκυλο – γλυκερόλης, σχηματίζοντας έτσι φωσφατιδικό οξύ (PA).

Επιπροσθέτως η φωσφορυλίωση της μονοακυλογλυκερόλης ή αποακετυλίωση με την φωσφολιπάση – A2 του φωσφατιδικού οξέος, παράγει λυσοφωσφατιδικό οξύ (LPA). Τόσο το λυσοφωσφατιδικό όσο και το φωσφατιδικό οξύ (LPA, PA) αποτελούν σημαντικούς μεσολαβητές της ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων. Η φωσφολιπάση – C εισάγοντας τον καταβολισμό των φωσφοϊνοσιτιδίων ενεργοποιεί και την φωσφολιπάση – A2, με την οποία απελευθερώνεται το αραχιδονικό οξύ από τους δεσμούς της θέσης sn – 2 των διαφόρων φωσφολιπιδίων της μεμβράνης (μεταξύ των οποίων εμπεριέχονται η φωσφατιδυλοχολίνη, η φωσφατιδυλοαιθανολαμίνη, η φωσφατιδυλοϊνοσιτόλη και το PA).

Το απελευθερούμενο αραχιδονικό οξύ εξ αιτίας της λιπιδικής φύσης και των τεσσάρων διπλών δεσμών που διαθέτει είναι εξαιρετικά ευαίσθητο στην οξειδωση – σε ελεύθερη ατμόσφαιρα είναι δυνατόν να αυτοαναφλεγεί – με αποτέλεσμα να υπεροξειδώνεται ταχέως και συνεπώς να λειτουργεί ως θετικός διεγέρτης της αντίδρασης της κυκλοξυγονάσης. Τα δύο εκ των τριών ενζυμικών βημάτων που είναι απαραίτητα στην δημιουργία των προσταγλανδινών εκ μέρους του αραχιδονικού οξέος (20:4, ω6) ή άλλων πολυακόρεστων λιπαρών οξέων, πραγματοποιούνται από το ενζυμικό σύστημα της συνθετάσης των προσταγλανδινών (συντομογραφικά PHS). Το εν λόγω ενζυμικό σύστημα καταλύει την αρχική αντίδραση της κυκλοξυγονάσης για τον σχηματισμό της PGG<sub>2</sub>, όπως επίσης και την αμέσως επόμενη αντίδραση της υδροϋπεροξειδάσης για την παραγωγή της PGH<sub>2</sub>. Η ενζυμική δραστηριότητα της συνθετάσης των προσταγλανδινών εξαρτάται από την παρουσία της αίμης, πράγμα που αποδεικνύεται άμεσα αν η αίμη καταστραφεί ή αφαιρεθεί

από το ένζυμο. Η συνθετάση των προσταγλανδινών εκτός από το περιεχόμενό της σε αίμη (ως πρωτοπορφυρίνης IX), περιέχει επίσης μη αιμικό σίδηρο, η ποσότητα του οποίου κυμαίνεται από 0,2 έως 1,6 γραμμοάτομα ανά γραμμομόριο ενζυμικού συμπλόκου. Υπάρχει σαφής διαφορά μεταξύ των λειτουργιών της αιμικής ομάδας στο σύμπλεγμα της συνθετάσης των προσταγλανδινών και των λειτουργιών της αιμικής ομάδας του κυτοχρώμου P-450. Κατ' αντίθεση με το κυτόχρωμο P-450 η συνθετάση των προσταγλανδινών δεν αναστέλλεται από το μονοξειδίο του άνθρακα (CO). Η αντίδραση της κυκλοξυγονάσης είναι μια μορφή αντίδρασης διοξυγόνωσης και συγκεκριμένα διπλής διοξυγόνωσης των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων ως υποστρωμάτων. Το αραχιδονικό οξύ είναι το προτιμώμενο υπόστρωμα. Χαρακτηριστικές ιδιότητες του εν λόγω ενζύμου είναι: 1<sup>ov</sup>) η αυτοενεργοποίηση από υδροϋπεροξειδία, 2<sup>ov</sup>) η διέγερση από φαινόλες (εκκαθάριση καταστρεπτικών ελευθέρων ριζών) και 3<sup>ov</sup>) η αυτοαποενεργοποίηση μέσω οξειδωτικών ισοδυνάμων. Τα οξειδωτικά αυτά ισοδύναμα σχηματίζονται κατά την αναγωγή της PGG<sub>2</sub> στο επίπεδο του άνθρακα C-15. Τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα υπεροξειδώνονται μέσω πρόσληψης οξυγόνου και κυκλοποίησης. Πρίν την ενσωμάτωση του οξυγόνου είναι αναγκαία μια ειδική αντίδραση του χρησιμοποιούμενου ακόρεστου λιπαρού οξέος. Η εν λόγω ενεργοποίηση του ακόρεστου λιπαρού οξέος φαίνεται σημαντικότερη από την αντίστοιχη ενεργοποίηση του οξυγόνου, όπως υποστηρίζουν κατόπιν σχετικών πειραμάτων οι Hemler και Lands. Αυτό σημαίνει ότι η ενεργοποίηση της κυκλοξυγονάσης και η αντίδραση υπεροξειδωσης εξαρτώνται από τον σίδηρο της αίμης και όχι από το σύμπλοκο που αυτός σχηματίζει με το οξυγόνο [581, 582]. Ωστόσο οι Kulmacz και Lands, χρησιμοποιώντας συνθετάση προσταγλανδινών προερχόμενη από σπερματοδόχους κύστεις έδειξαν ότι στην αντίδραση εμπλέκονται και μη ειδικές αντιδράσεις, όπως είναι οι σχετιζόμενες με ελεύθερες ρίζες [582].

Κατά την διάρκεια της σύνθεσης των ενδοϋπεροξειδίων από αραχιδονικό οξύ, ενσωματώνονται σε αυτό δύο μόρια οξυγόνου [579, 580]. Από τα τέσσερα άτομα οξυγόνου τα τρία παραμένουν στο εσωτερικό του ενδοϋπεροξειδίου PGH<sub>2</sub> ενώ το τέταρτο άτομο εξακολουθεί να είναι διαθέσιμο για περαιτέρω αντιδράσεις. Το πρώτο μόριο οξυγόνου ενσωματώνεται κατόπιν σχηματισμού μιας ενδοϋπεροξειδικής γέφυρας μεταξύ των ανθράκων C-9 και C-11, η οποία αναδιατάσσεται μέσω στερεοειδικού ανασυνδυασμού σε μια δικυκλική μορφή με μια γέφυρα μεταξύ των C-8 και C-12. Μετά αυτή την δομική διευθέτηση το δεύτερο μόριο του οξυγόνου προστίθεται στο άτομο του άνθρακα C-15. Ο μηχανισμός της προσθήκης του οξυγόνου είναι ταυτόσημος τόσο για την

συνθετάση των προσταγλανδινών όσο και για τις λιποξυγονάσεις [583, 584]. Η προσθήκη του οξυγόνου έπεται μετά από την απόσπαση ενός ατόμου υδρογόνου [585]. Η απόσπαση του υδρογόνου ξεκινά από τους διαλλυλικούς άνθρακες του μορίου του αραχιδονικού οξέος που ευρίσκονται στις θέσεις 7, 10 και 13. Σύμφωνα με την αλλαγή του γειτονικού διπλού δεσμού στο σύστημα συνεζευγμένων διπλών δεσμών και την ανακατανομή των ηλεκτρονίων μεταξύ δύο ανθράκων, προκύπτουν έξι διαφορετικές πιθανότητες προσθήκης του οξυγόνου και συνεπώς του σχηματισμού έξι διαφορετικών ισομερών. Η δημιουργία των ισομερών θέσης καθορίζεται από την φύση του ενζύμου που εμπλέκεται.

Η συμμετοχή ενεργών μορφών οξυγόνου στην διαδικασία της προσθήκης οξυγόνου μελετήθηκε από μια σειρά ερευνητών. Οι Hamberg and Samuelsson συγκρίνοντας τις αντιδράσεις τύπου λιποξυγονάσης με μια αντίδραση κυκλικής προσθήκης υποθέτουν ότι αυτές είναι εφικτό να προκύψουν μέσω ατόμων οξυγόνου που ευρίσκονται στην μονήρη κατάσταση [585]. Οι Rahimtula και O'Brian [586] επίσης πρότειναν την συμμετοχή ενεργών μορφών οξυγόνου στην μονήρη κατάσταση ( $^1\text{O}_2$ ). Μονήρες οξυγόνο σχηματίζεται κατά την διάρκεια της αντίδρασης υπεροξειδάσης της συνθετάσης των προσταγλανδινών τουλάχιστον σε πολύ μικρές ποσότητες ( $10^{-10}$  M) [587, 588]. Οι Rahimtula και O'Brian υποδεικνύουν ότι το μονήρες οξυγόνο αποτελεί τον αρχικό πυροδότη των αντιδράσεων σχηματισμού υπεροξειδίων, καθόσον οι εκκαθαριστές ελευθέρων ριζών που είναι εξειδικευμένοι για την εκκαθάριση μονήρους οξυγόνου, όπως η 2,7-διόλη του ναφθαλενίου ή η χολερυθρίνη, αναστέλλουν ισχυρά την δραστηριότητα της συνθετάσης των προσταγλανδινών των σπερματοφόρων κύστεων του προβάτου, ενώ η δισμουτάση του υπεροξειδίου του οξυγόνου (SOD) και η μανιτόλη, που εξουδετερώνουν την ρίζα του ανιόντος υπεροξειδίου, είναι πολύ αδύναμοι αναστολείς. Ο Marnett και οι συνεργάτες του, όπως επίσης οι Rahimtula και O'Brian σημειώνουν μια μικρή ανασταλτική δράση του 1,3-διφαινυλο-ισοβενζοφουρανίου, που αποτελεί έναν τυπικό εκκαθαριστή του μονήρους οξυγόνου, στην αντίδραση της κυκλοξυγονάσης [589, 590]. Ωστόσο δεν έχουμε τον σχηματισμό του 5 α- υδροϋπεροξειδίου της χοληστερίνης, που αποτελεί έναν αξιόλογο δείκτη παρουσίας μονήρους οξυγόνου [589, 590].

Οι Baumann και Wurm χρησιμοποιώντας χημικές μεθόδους δεν διαπιστώνουν την ύπαρξη μονήρους οξυγόνου σε παρασκευάσματα βόειων σπερματοδόχων κύστεων [591]. Από την άλλη πλευρά ο Cadenas και οι συνεργάτες του χρησιμοποιώντας μια ευαίσθητη μέθοδο χημειοφωταύγειας χαμηλού επιπέδου και φασμάτων απορρόφησης δείχνουν ότι κατά την φάση της αντίδρασης της υδροϋπεροξειδάσης σχηματίζεται μονήρες οξυγόνο

[587]. Γενικότερα όμως οι ποσότητες μονήρους οξυγόνου που καταγράφονται είναι πολύ μικρές ως προς τις ποσότητες των υπεροξειδίων που ενεργοποιούν την κυκλοξυγονάση, με αποτέλεσμα η τελική εκτίμηση που γίνεται να μην θεωρεί τον ρόλο αυτού ουσιαστικό για την αντίδραση της κυκλοξυγονάσης [592, 593, 594, 595]. Οι μελέτες που χρησιμοποιούν την προσθήκη SOD δείχνουν επίσης ότι ούτε το ανιόν του υπεροξειδίου του οξυγόνου είναι απαραίτητο για την αντίδραση της κυκλοξυγονάσης [589, 595]. Μελέτες οι οποίες έγιναν με την χρήση λουμινόλης κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι μόνον οι ελεύθερες ρίζες υδροξυλίου υπεισέρχονται στην αντίδραση της κυκλοξυγονάσης [589]. Το δεδομένο αυτό φαίνεται να έρχεται σε συμφωνία με τα αποτελέσματα παλαιότερων μελετών του Εργαστηρίου μας, όπου οι εκκαθαριστές ελευθέρων ριζών που χρησιμοποιήσαμε είναι εκκαθαριστές οξειδωτικών ριζών υδροξυλίου (Σπυρίδων Χ. Καρκαμπούνας, διδακτορική διατριβή, 1990., Γεώργιος Σόφης, διδακτορική διατριβή, 1992, [655, 656]).

Τέλος οι συγκρίσεις των φασμάτων συντονισμού της ηλεκτρονικής ιδιοστροφορμής (ESR) μεταξύ ενζύμου συνθετάσης των προσταγλανδινών, μεθαιμοσφαιρίνης, και μεθμυοσφαιρίνης αποδεικνύουν ότι οι διεργασίες που εμπλέκουν ελεύθερες ρίζες μπορούν να ερμηνευτούν μόνο στην βάση του αιμικού σιδήρου που αποτελεί το ενεργό ενζυμικό κέντρο [596, 597]. Οι οργανικές ελεύθερες ρίζες υποτίθεται ότι ευρίσκονται πλησίον του αιμικού δακτυλίου, οπότε τα σήματα συντονισμού της ηλεκτρονικής ιδιοστροφορμής που καταγράφηκαν αρχικά από τον Egan και τους συνεργάτες του [580] πρέπει να οφείλονται σε οργανικές ελεύθερες ρίζες εν διαλύσει, πράγμα που πρέπει να προσδιοριστεί με πολύ μεγαλύτερη ακρίβεια και αναλυτική αυστηρότητα. Οι ελεύθερες ρίζες πενταϋδρονών του σαλικυλικού οξέος αυξάνουν την δραστηριότητα της κυκλοξυγονάσης [598, 599].

Για την ενεργοποίηση της συνθετάσης των προσταγλανδινών απαιτούνται πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις υπεροξειδίων ( $10^{-8}$  M) [600, 601]. Η περιοχή δράσης υποτίθεται ότι ταυτίζεται με το κυκλοξυγονασικό μέρος της συνθετάσης των προσταγλανδινών [602]. Η ενεργοποίηση της κυκλοξυγονάσης μέσω υπεροξειδίων είναι εφικτή, παρά το γεγονός της ύπαρξης ενός υπεροξειδασικού μέρους στο ίδιο συνολικό ενζυμικό σύστημα [582], διότι οι δραστικές συγκεντρώσεις των υπεροξειδίων για έκαστο των διαφορετικών ενζυμικών τμημάτων (κυκλοξυγονασικό και υπεροξειδασικό) είναι σαφώς διαφορετικές. Δηλαδή η  $K_p$  της κυκλοξυγονάσης είναι 21 nM, ενώ η  $K_m$  της υπεροξειδάσης είναι 2,5  $\mu$ M. Συνεπώς οι ελάχιστες συγκεντρώσεις ενεργοποίησης του ενός και του άλλου ενζυμικού τμήματος διαφέρουν τουλάχιστον κατά μια τάξη μεγέθους, ενώ η κυκλοξυγονάση είναι εκείνο το τμήμα της συνθετάσης των προσταγλανδινών που ενεργοποιείται πρώτο εξ αιτίας της πολύ

μικρότερης συγκέντρωσης υπεροξειδίων που απαιτεί. Επί αυτής της βάσης είναι εφικτή η συνολική αύξηση της διαδικασίας μέσω της ύπαρξης ενός μηχανισμού θετικού feedback [603, 604, 605]. Επίσης τα υπεροξειδία άλλης προέλευσης, (όπως αυτά που προκύπτουν από λιπιδική υπεροξειδωση, από λιποξυγόνωση κ.τ.λ) ανταγωνίζονται μεταξύ τους κατά την διεξαγωγή της ολικής αντίδρασης της συνθετάσης των προσταγλανδινών. Ωστόσο αυτή η κατάσταση τροποποιεί κατά πολύ το μέγεθος της αναστολής που προκαλούν ποικίλοι αναστολείς της κυκλοξυγονάσης [606]. Η ιδιαίτερος εύκολη ενεργοποίηση της κυκλοξυγονάσης – με μια μεγιστοποιητική διαδικασία διάρκειας λίγων δευτερολέπτων – καθιστά το εν λόγω ένζυμο να ανταποκρίνεται ταχύτατα και πολύ εκτεταμένα σε λεπτοφυή σήματα, όπως επίσης να τροποποιεί την ενεργοποίηση άλλων αντιδράσεων που απαιτούν υπεροξειδία [582]. Βλέπουμε δηλαδή ότι η κυκλοξυγονάση αποτελεί ένα πυροδοτικό ένζυμο που κινητοποιεί ταχέως μεγάλες κυτταρικές ανταποκρίσεις, ευρισκόμενο στην κορυφή ενός μεγάλου καταρράκτη αντιδράσεων. Η αιμοπεταλιακή ενεργοποίηση αποτελεί ένα πολύ ισχυρό παράδειγμα αυτού του ρόλου της κυκλοξυγονάσης.

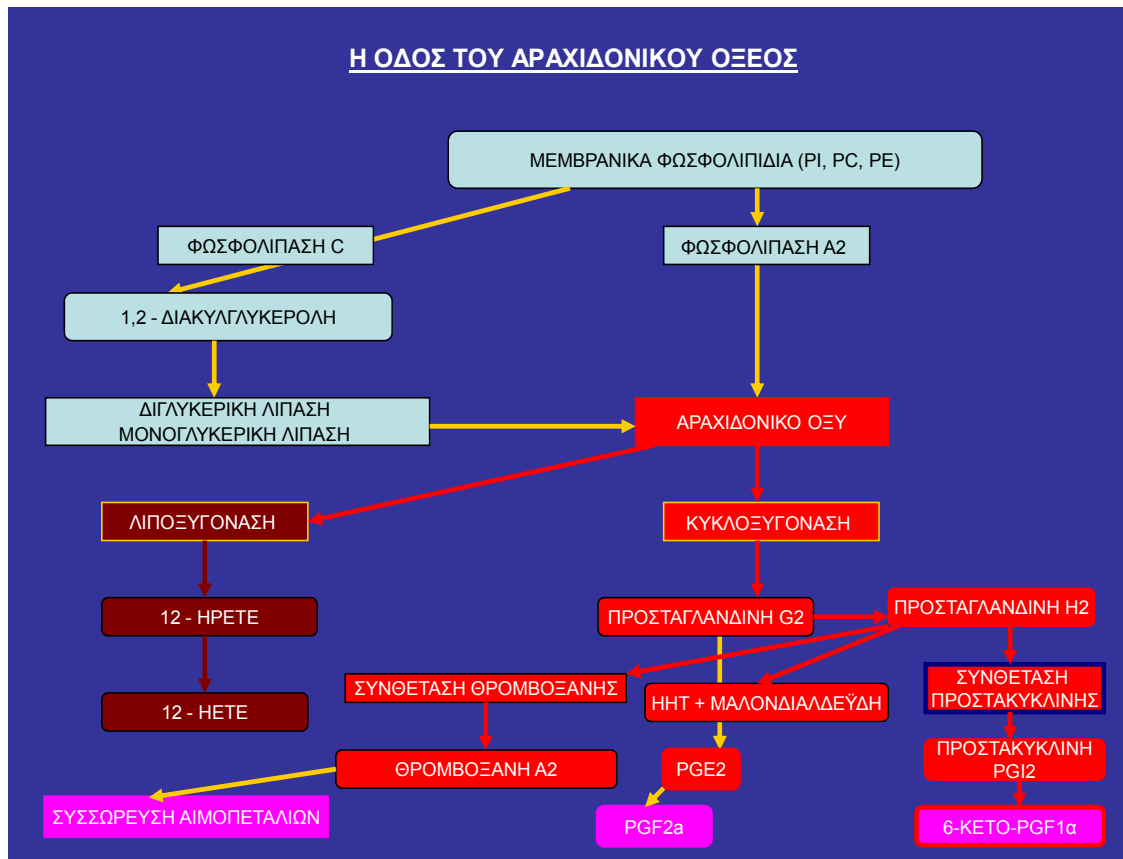
Η προσθήκη υπεροξειδίων (π.χ PGG<sub>2</sub>) αυξάνει τον αρχικό ρυθμό της κυκλοξυγόνωσης [602, 606, 607], ενώ αν δεν υπάρξει προσθήκη υπεροξειδίων η ενζυμική αντίδραση εκκινεί με χρονική υστέρηση. Η υστέρηση αυτή αυξάνεται παρουσία ιόντων κυανίου και φαινολών [582, 603]. Η δράση υστέρησης στην ενζυμική ενεργοποίηση που προκαλεί το κυάνιο, ερμηνεύεται μέσω του ανταγωνισμού που προκύπτει μεταξύ αυτού και του υδροϋπεροξειδίου για την αντίδρασή τους με το άτομο σιδήρου της αιμικής ομάδας, πράγμα το οποίο έχει ως συνέπεια τον περιορισμό της σύνδεσης του υδροϋπεροξειδίου με τον αιμικό σίδηρο και συνεπώς την καθυστέρηση της πυροδότησης της συνολικής κυκλοξυγονασικής αντίδρασης [608, 609]. Οι Kulmacz και Lands [582], εργαζόμενοι με καθαρή συνθετάση των προσταγλανδινών, που απομόνωσαν από παρασκευάσματα σπερματικών κύστεων προβάτου έδειξαν ότι η προσθήκη κυανίου, δίνει στην ενεργοποίηση του υπεροξειδίου τον χαρακτήρα εκείνου του βήματος που καθορίζει τον ρυθμό της αντίδρασης. Εκτός αυτού, η προσθήκη του κυανίου επηρεάζει το κυκλοξυγονασικό τμήμα της συνθετάσης των προσταγλανδινών, μέσω υπεροξειδασικού τμήματος αυτής (ίδε κατωτέρω) [582].

Στο σημείο αυτό είναι σημαντικό να αναφέρουμε ότι μια υστέρηση της αντίδρασης λαμβάνει χώρα όταν χορηγούμε υπεροξειδάση της γλουταθειόνης στο παρασκεύασμα των σπερματικών κύστεων του προβάτου [579, 604, 610]. Η δράση της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης εξακολουθεί να είναι ισχυρή ακόμη και όταν χορηγούμε το ένζυμο μετά

την έναρξη της αντίδρασης [611], καθόσον το υπεροξειδίο απαιτείται σταθερά κατά την διάρκεια της κατάλυσης. Από την άλλη πλευρά η αυτοαδρανοποίηση που προκύπτει από τα υπεροξείδια δεν μπορεί να προληφθεί μέσω της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης [600]. Σημειωτέον ότι η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης χρησιμοποιώντας ως αναγωγικό υπόστρωμα την ανηγμένη γλουταθειόνη προκαλεί αναγωγή των υδροϋπεροξειδίων προς αλκοόλες και συνεπώς αδρανοποιεί τα υδροϋπεροξείδια μειώνοντας την ενεργοποιητική τους δράση επί του κυκλοξυγονασικού τμήματος της συνθετάσης της προσταγλανδίνης. Αν το ένζυμο έχει ήδη υποστεί φθορά από την υψηλή συγκέντρωση υδροϋπεροξειδίων, δεν είναι δυνατόν να έχουμε αποκατάστασή του μέσω προσθήκης υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης. Η καταλάση σε μεγάλες ποσότητες μπορεί επίσης να μειώσει τον ρυθμό χρησιμοποίησης του αραχιδονικού οξέος στα παρασκευάσματα των σπερματικών κύστεων του προβάτου [586, 612].

Η αναγκαία ενεργοποίηση για όλες τις οξυγονάσεις των λιπαρών οξέων (συνθετάση των προσταγλανδινών, λιποξυγονάσεις), απαιτεί μολαταύτα έναν μηχανισμό έναρξης, δηλαδή τον ενζυμικό ή μη ενζυμικό (μέσω προσβολής από ελεύθερες ρίζες) σχηματισμό των υπεροξειδίων [613, 614, 615]. Υπεροξείδια μπορούν να σχηματιστούν παντού, από πολλές οδούς αντιδράσεων.

Η διαδικασία των αντιδράσεων σύνθεσης των προσταγλανδινών φαίνεται σχηματικά στην εικόνα 12.



**Εικόνα αρ. 12:** Σχηματική παράσταση που δείχνει το διάγραμμα ροής των μεταβολιτών του αραχιδονικού οξέος γενικά. Ο κλάδος του αραχιδονικού μεταβολισμού που αντιστοιχεί στην αιμοπεταλιακή λειτουργία περνά από την φωσφολιπάση A2, στην απελευθέρωση του αραχιδονικού οξέος, στην κυκλοξυγονάση, στην συνθετάση της θρομβοξάνης A2 και τέλος στην απελευθέρωση της θρομβοξάνης, η οποία ενεργοποιεί όλη την υπόλοιπη αιμοπεταλιακή αντίδραση.

Η προσβολή των ελευθέρων ριζών στα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα αποτελεί ένα περιοριστικό βήμα και ξεκινά με την απόσπαση ενός αλλυλικού υδρογόνου από τον άνθρακα C13 [587, 616]. Το υδρογόνο αυτό κατέχει μια ενέργεια δεσμού λίγο μικρότερη (86 kcal) από την ενέργεια δεσμού ενός μεθυλενικού υδρογόνου (96 kcal). Η προκύπτουσα ελεύθερη ρίζα του λιπαρού οξέος είναι επικεντρωμένη στο αντίστοιχο άτομο άνθρακα και μπορεί να ανιχνευθεί με ESR [616, 617]. Επίσης μπορεί να παραχθεί με αναερόβια διαδικασία. Όμως υπό αερόβιες συνθήκες, ο σχηματισμός της συνοδεύεται από πρόσληψη οξυγόνου [617]. Υπάρχει μια δομική σχέση αντιστοιχίας μεταξύ απόσπασης υδρογόνου και προσθήκης οξυγόνου [618], η οποία μοιάζει με εκείνη που παρατηρείται στην αντίδραση της λιποξυγονάσης [619]. Περαιτέρω ενδείξεις για την συμμετοχή μιας



ελεύθερης ρίζας εντοπιζόμενης σε άτομο άνθρακα, στην εν λόγω αντίδραση μας παρέχονται μέσω της αναστολής της συνθετάσης της PGH<sub>2</sub> δια του παγιδευτή ηλεκτρονικής ιδιοστροφορμής 2-μεθυλο-2-νιτρώδες προπανίου [617]. Η ελεύθερη ρίζα του λιπαρού οξέος μετατρέπεται σε *cis*, *trans*-διένιο, μέσω ενδιάμεσου σχηματισμού μιας ρίζας με κέντρο τον C11, η οποία με την προσθήκη οξυγόνου μετασχηματίζεται σε μια 11-υπεροξυ-ρίζα [617, 620]. Προφανώς δεν παράγεται 11-HPETE, διότι το υπεροξειδίο αυτό δεν μπορεί να μετατραπεί σε προσταγλανδίνες [621]. Η σχηματιζόμενη υπεροξυ – ρίζα είναι ικανή να πυροδοτήσει περαιτέρω απόσπαση ατόμων H, δίνοντας έναρξη σε μια αλυσιδωτή αντίδραση ελευθέρων ριζών. Συμφώνως με τον Mason [622], η αλυσιδωτή αντίδραση μπορεί να τερματιστεί μετά από 8 έως 14 βήματα αντιδράσεων ή κατόπιν προσθήκης ελευθέρων ριζών [613]. Η αντίδραση της κυκλοξυγονάσης έχει συνεπώς, τυπικές ιδιότητες αντίδρασης ελευθέρων ριζών [603, 623, 624, 625].

Η συνθετάση των προσταγλανδινών, όπως ήδη είπαμε συμπεριλαμβάνει τόσο την κυκλοξυγονάση, όσο και την υπεροξειδάση. Η αντίδραση της κυκλοξυγονάσης παράγει το κυκλικό ενδοϋπεροξειδίο PGG<sub>2</sub>, ενώ αυτή της υπεροξειδάσης ανάγει το εν λόγω προϊόν σε PGH<sub>2</sub>. Γενικότερα κατά την αντίδραση της υδροϋπεροξειδάσης (μέσω της υδροϋπεροξειδάσης της συνθετάσης των προσταγλανδινών), διάφορα υδροϋπεροξειδία, όπως η PGG<sub>2</sub>, το 15-υδροϋπεροξειδίο E<sub>1</sub>, το 15-υδροϋπεροξειδίο E<sub>2</sub>, ή τα HPETEs, υφίστανται αναγωγή. Η παρουσία φαινολικών μορίων ή άλλων ουσιών ικανών να υποστούν οξειδωση (δηλαδή αναγωγικών ουσιών) αυξάνει τον ρυθμό της αντίδρασης της υπεροξειδάσης ενώ τα σήματα ESR παρουσιάζουν ταυτοχρόνως μείωση, υποδεικνύοντας την εκκαθάριση ελευθέρων ριζών, χωρίς ωστόσο οι εν λόγω χημικές διεργασίες να προκαλούν απενεργοποίηση του ενζύμου [626]. Το ουρικό οξύ [627] και η γλουταθειόνη [628], θεωρούνται ότι παίζουν τον ρόλο φυσιολογικών αποδεκτών. Η αφαίρεση οξυγόνου από τα υπεροξειδία, όπως είναι το PGG<sub>2</sub>, οδηγεί στην παραγωγή μορφών οξυγόνου οι οποίες θεωρούνται ότι είναι ελεύθερες ρίζες οξυγόνου (65) ή μονήρες οξυγόνο [586, 587, 629, 630]. Οι εν λόγω ενεργοποιημένες μορφές οξυγόνου φαίνεται ότι λειτουργούν ως συνοξειδωτές διαφόρων υποστρωμάτων, που ευρίσκονται παρόντα στον ενζυμικό χώρο και έχουν τον χαρακτήρα συν-δωρητών αναγωγικών ισοδυνάμων, ενώ αποτελούν ταυτοχρόνως μια πηγή χημειοφωταύγειας [587]. Η αντίδραση συνολικά μπορεί να εξηγηθεί επίσης από την παρουσία αίμης (ή άλλων προφυρινών) με το άτομο του σιδήρου στον υψηλότερο αριθμό οξειδωσης [593, 593, 631]. Η αίμη παίζει έναν αναπόδραστο ρόλο

στην αντίδραση της υπεροξειδάσης [632], όπως συμβαίνει και με άλλες αιμικές υπεροξειδάσες και αναστέλλεται από το κυάνιο [583]. Έχει αποδειχθεί ότι το σύνολο αίμης – σιδήρου στην υπεροξειδάση της συνθετάσης των προσταγλανδινών, δεν μπορεί να αντικατασταθεί από πρωτοπορφυρίνες με μαγγάνιο [634, 602].

Ο Nastainczyk και οι συνεργάτες του [593], έδειξαν μέσω φασματικών διαφορών ότι το ιωδοβενζένιο, που αποτελεί έναν δωρητή οξενίου (oxene), ασκεί την ίδια δράση με το PGG<sub>2</sub>. Οι εν λόγω συγγραφείς προτείνουν ένα κύκλο redox ως εξής: κατά την αναγωγή ενός πρώτου υπεροξειδίου, σχηματίζεται ένα τρισθενές θετικά φορτισμένο σύμπλοκο οξυγόνου - σιδήρου (FeO)<sup>+3</sup>. Το σύμπλοκο αυτό ιόν ονομάζεται σύμπλοκο I και μετατρέπεται σε Fe<sup>III</sup> κατά την δεύτερη αναγωγή ενός δευτέρου μορίου υπεροξειδίου καταλήγοντας στον σχηματισμό μιας αλκοόλης και ενός μονήρους οξυγόνου <sup>1</sup>O<sub>2</sub>, χωρίς την αναγκαιότητα αναγωγικών ισοδυνάμων. Το σύμπλοκο (FeO)<sup>+3</sup> ως ενδιάμεσο βήμα μοιάζει συνεπώς με το σύμπλοκο ενεργού οξυγόνου και κυτοχρώμου P-450 [587, 633], όπως επίσης και το σύμπλεγμα I της υπεροξειδάσης horseradish [634]. Όμως αμφότερες οι υπεροξειδάσες αυτές παρουσιάζουν μια μεταφορά ριζών ενεργού οξυγόνου σαφώς ασθενέστερη από την αντίστοιχη του κυτοχρώμου P-450, πράγμα που οφείλεται προφανώς στα διαφορετικά αμινοξέα που λειτουργούν ως προσδέτες του σιδήρου (ιστιδίνη για την horseradish υπεροξειδάση και κυστεΐνη για το κυτόχρωμο P-450 [641]. Το σύμπλοκο ιόν (FeO)<sup>+3</sup> αντιστοιχεί στο σύμπλοκο I της horseradish υπεροξειδάσης [634], και φαίνεται ότι υπάρχει τόσο στην γαλακτοϋπεροξειδάση όσο και στην οξειδάση του κυτοχρώμου c. Τα υδροϋπεροξειδία κατ' αρχάς οξειδώνουν το σύμπλοκο σιδήρου των πρωτοπορφυρινών σε μια πεντασθενή μορφή (σύμπλοκο I) και εν συνεχεία σχηματίζουν αλκοόλες. Σύμφωνα με την έννοια αυτή οι ουσίες που παρέχουν ηλεκτρόνια (συμπεριλαμβανομένων και των φαινόλων) είναι σε θέση να διεγείρουν την υδροϋπεροξειδάση της συνθετάσης των προσταγλανδινών [635, 636, 637, 638]. Οι ουσίες αυτές λειτουργούν ως συν-υποστρώματα για την αναγωγή της μη παραγωγικής οξειδωμένη μορφής (σύμπλεγμα I) προς μια εκ νέου ενεργό μορφή. Εφ' όσον η σταθερά υποδιπλασιασμού παραμένει αμετάβλητη από την παρουσία της φαινόλης [603], μια αύξηση της καταλυτικής δραστηριότητας είναι περισσότερο αναμενόμενη, παρά μια προστασία από την αυτό-απενεργοποίηση (16). Τα εν λόγω υποστρώματα μπορούν να ασκήσουν δράσεις και επί της κυκλοξυγονάσης [639, 640, 616]. Για διάφορους λόγους η συνύπαρξη των δύο ενζύμων οδηγεί σε μεγιστοποίηση των χημικών τους αποτελεσμάτων μέσω ενός θετικού feedback. Ωστόσο μια τέτοια εκδοχή φαίνεται να λειτουργεί όταν

τηρούνται επακριβώς οι στοιχειομετρίες των αντιδράσεων, ενώ αν τα αναγωγικά σώματα ευρίσκονται σε περίσσεια και η συγκέντρωση του οξυγόνου είναι χαμηλή η ενεργοποίηση, αλλά και η συνέχιση της αντίδρασης θα δυσκολευτεί αρκετά. Οποσδήποτε η κυκλοξυγονοασική αντίδραση έχει τα χαρακτηριστικά μιας τυπικής αντίδρασης ελευθέρων ριζών [624, 642, 643]

Από το σύνολο των βιβλιογραφικών προσεγγίσεων που πραγματοποιήσαμε μέσα στο πλαίσιο της διατριβής μας, αυτό που σταθερά επιβεβαιώνεται είναι ότι το κέντρο βάρους των αιμοπεταλιακών λειτουργιών σχετίζεται σταθερά με την οδό του αραχιδονικού οξέος και ειδικότερα με τα ένζυμα της κυκλοξυγονάσης και συνθετάσης της θρομβοξάνης  $A_2$ . Ένας επιπλέον ρόλος αποδίδεται επίσης και στη λιποξυγονάση. Δεδομένου ότι όλες οι φλαβονοειδείς ενώσεις είναι αντιοξειδωτικοί παράγοντες και δεδομένου ότι οι στερεοδομές τους έχουν μεγάλη ομοιότητα αναγκαστικά τίθεται η υπόθεση ότι οι εν λόγω ουσίες πρέπει να λειτουργούν όχι όπως η ασπιρίνη, αλλά ως ανταγωνιστές των προϊόντων της δράσης αυτών των ενζύμων, δηλαδή των ελευθέρων ριζών που παράγουν προκειμένου να ενεργοποιήσουν τόσο το αραχιδονικό οξύ, όσο και τα παράγωγα αυτού, όπως επίσης και άλλα ακόρεστα οξέα σαν το λινολεϊκό, λινολενικό, εικοσιπενταενοϊκό. Αν δηλαδή οι τρεις μελετηθείσες φλαβονοειδείς ουσίες αναστέλλουν την παραγωγή θρομβοξάνης  $A_2$  αυτό συμβαίνει διότι εκκαθαρίζουν τις ελεύθερες ρίζες που παράγονται για λειτουργικούς λόγους στο ενεργό κέντρο της κυκλοξυγονάσης ή της συνθετάσης της  $TXA_2$ . Επίσης το ίδιο θα μπορούσε να συμβεί με την φωσφολιπάση  $A_2$ , η οποία φαίνεται να λειτουργεί με παραγωγή ελευθέρων ριζών. Νομίζουμε ότι το πρόβλημα αυτό πρέπει να λυθεί οποσδήποτε μέσω μιας συνέχισης της έρευνάς μας σε μεταδιδακτορικό επίπεδο με την χρήση της μεθόδου του συντονισμού της ιδιοστροφορμής των ηλεκτρονίων (Electron Spin Resonance or ESR). Γενικά θεωρούμε ότι το επίπεδο της μελέτης πρέπει να μεταφερθεί σε μοντέλα του ενζύμου της κυκλοξυγονάσης, της λιποξυγονάσης, αλλά και άλλων ενζύμων που λειτουργούν στον μηχανισμό της μεταγωγής σήματος από τους κυτταροπλασματικούς υποδοχείς των ποικίλων αγωνιστών των αιμοπεταλίων μέχρι τον μηχανισμό συστολής του αιμοπεταλιακού κυτταροσκελετού.

Εμείς μέσα στο πλαίσιο της διερεύνησης που πραγματοποιήσαμε καλύψαμε τις σχέσεις που υπάρχουν μεταξύ δράσης των συγκεκριμένων φλαβονοειδών στις αιμοπεταλιακές αντιδράσεις αλλαγής σχήματος, έκλυσης, συσσώρευσης, στην παραγωγή θρομβοξάνης  $A_2$  και στην παρουσία του υποδοχέα ινωδογόνου GPIIb/IIIa στην αιμοπεταλιακή μεμβράνη.

Δεν μπορούμε να αποσαφηνίσουμε με την εν λόγω προσέγγιση αν οι εν λόγω δράσεις είναι δομικού χαρακτήρα του τύπου υποδοχέα – αντιστοιχούσας ουσίας ή του τύπου ενζύμου – υποστρώματος.

Δεδομένου ότι και άλλες δοκιμασθείσες ουσίες δομικά διαφορετικές αλλά αντιοξειδωτικών ιδιοτήτων ασκούν τις ίδιες δράσεις, φαίνεται ότι η αντιοξειδωτική ικανότητα ενός μορίου έχει μεγάλη σημασία για την αναστολή του άξονα: υποδοχέας – αραχιδονικός μεταβολισμός με επίκεντρο την κυκλοξυγονάση και την λιποξυγονάση – ποσοστό εμφάνισης του υποδοχέα ινωδογόνου GPIIbIIIa.

Η κινητική αλληλεπίδρασης μεταξύ της αναστολής της αιμοπεταλιακής συσσώρευσης – παραγωγής θρομβοξάνης A<sub>2</sub> και εμφάνισης του υποδοχέα GPIIbIIIa φαίνεται ότι έχει χαρακτήρα γραμμικό, πράγμα που υποδηλώνει μια αναστολή χωρίς ανταγωνισμό ως προς το υπόστρωμα, δηλαδή ενώ το αραχιδονικό οξύ προσεγγίζει και τοποθετείται ομαλά στο ενεργό κέντρο, εν τούτοις δεν οξειδώνεται φυσιολογικά καθόσον τα οξειδωτικά ισοδύναμα καταναλίσκονται από τον αντιοξειδωτικό παράγοντα που χρησιμοποιείται ως αναστολέας. Είναι πιθανόν το αντιοξειδωτικό φλαβονοειδές να καταλαμβάνει κάποιο γειτονικό σημείο προς το ενεργό κέντρο ώστε η αντίδρασή του με τα ενεργοποιημένα μόρια του οξυγόνου να είναι άμεση ώστε να μην έχουν τον χρόνο να προσεγγίσουν το αραχιδονικό οξύ. Βεβαίως η ταχύτητα αντίδρασης των εν λόγω ενεργοποιημένων μορίων οξυγόνου μπορεί να είναι ο καθοριστικός παράγοντας για τον οποίο τα φλαβονοειδή αντιδρούν με τις ελεύθερες ρίζες. Η ταχύτητα αυτή πρέπει να είναι μεγαλύτερη από την ταχύτητα αντίδρασης του αραχιδονικού οξέος με τις ελεύθερες ρίζες του ενεργοποιημένου οξυγόνου. Συνεπώς το αραχιδονικό οξύ μπορεί να οξειδωθεί μόνον στο μέτρο στο οποίο τα μόρια του φλαβονοειδούς επιτρέπουν σε κάποιες ελεύθερες ρίζες να διέλθουν, είτε κατά τρόπο τυχαίο, είτε λόγω κορεσμού των φλαβονοειδών από την εκκαθάριση ελευθέρων ριζών. Αυτό φαίνεται από το γεγονός ότι σε ορισμένα πειράματα η χορήγηση μιας ποσότητας φλαβονοειδούς δεν αναστέλλει απόλυτα τα αιμοπετάλια αλλά επιβραδύνει πάρα πολύ την συσσώρευσή τους, η οποία για να περατωθεί χρειάζεται χρόνο μεγαλύτερο της μιας ώρας.

Ειδικότερα φαίνεται ότι τα συγκεκριμένα φλαβονοειδή αναστέλλουν ισχυρά την λειτουργία τόσο της κυκλοξυγονάσης όσο και της υπεροξειδάσης που εμπεριέχονται στο σύμπλοκο της συνθετάσης των προσταγλανδινών. Η παρουσία αναγωγικού δυναμικού φαινολικού χαρακτήρα επιταχύνει την αντίδραση της υπεροξειδάσης, αλλά είναι σε θέση να

αναστείλει την αντίδραση της κυκλοξυγονάσης. Συνεπώς θέτοντας μικρές συγκεντρώσεις φλαβονοειδών στα αιμοπετάλια είναι δυνατόν να παρατηρήσουμε μια επίταση της δράσης των αγωνιστών που εκφράζεται ως επίταση της συσσώρευσης. Το φαινόμενο αυτό έχει παρατηρηθεί σε πολλά από τα πειράματά μας, όταν οι συγκεντρώσεις των φλαβονοειδών δεν υπερβαίνουν τα λίγα  $\mu\text{M}$ . Δηλαδή σε συγκεντρώσεις περικλειόμενες μεταξύ  $10^{-8}$  έως  $10^{-6}$   $\mu\text{M}$ . Σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις όμως η κυκλοξυγονάση αρχίζει να επιβραδύνεται όλο και περισσότερο οπότε οι ποσότητες  $\text{PGG}_2$  που παράγονται βαίνουν συνεχώς μειούμενες, όπως μειούμενες βαίνουν οι ποσότητες της αντίστοιχης  $\text{PGH}_2$  και συνεπώς της  $\text{TXA}_2$ . Ακόμη είναι λογικό να θεωρήσουμε ότι όλοι οι χρησιμοποιούμενοι αγωνιστές εισάγουν το ισχυρό φαινόμενο της οξειδωτικής έκρηξης ή εκρηκτικής αναπνοής (oxygen burst) αναγκαστικά και για την παραγωγή υπεροξειδίων τα οποία θα ενεργοποιήσουν κατόπιν την κυκλοξυγονάση και συνεπώς όλο τον καταρράκτη των αντιδράσεων. Αν τα φλαβονοειδή αντιοξειδωτικά θεωρούνται ως ουσίες οι οποίες μπορούν να καταστείλουν την παραγωγή ελευθέρων ριζών λειτουργικού χαρακτήρα στην συνθετάση της προσταγλανδίνης, εμποδίζοντας έτσι την παραγωγή της  $\text{TXA}_2$ , τίθεται το ερώτημα του πως οι εν λόγω ουσίες προκαλούν την μείωση της παρουσίας του υποδοχέα  $\text{GPIIbIIIa}$  στην εξωτερική επιφάνεια της κυτταροπλασματικής μεμβράνης των αιμοπεταλίων.

Είναι πιθανόν ότι η αύξηση της παρουσίας της  $\text{GPIIbIIIa}$  στην εξωτερική κυτταρική μεμβράνη επιτείνεται κατά την αιμοπεταλιακή διέγερση από την στιγμή που το αιμοπετάλιο ενεργοποιηθεί και περάσει από την φακοειδή στην σφαιρική μορφή: Αν θεωρήσουμε ότι η φακοειδής μορφή εμπεριέχει μια σειρά πτυχώσεων, η σφαιρική μορφή προκύπτει από το ξεδίπλωμα κάθε πτυχωμένου σημείου, οπότε περισσότεροι υποδοχείς γίνονται ορατοί. Βέβαια η μέτρηση που πραγματοποιήσαμε στο κυτταρόμετρο ροής έγινε επί αιμοπεταλίων τα οποία δεν ήσαν ενεργοποιημένα και συνεπώς οι όποιες μειώσεις του αριθμού των υποδοχέων  $\text{GPIIbIIIa}$  τους δεν είναι δυνατόν να οφείλονται σε αλλαγή του αιμοπεταλιακού σχήματος. Συνεπώς πρέπει να καταλήξουμε στο συμπέρασμα ότι η χορήγηση των εν λόγω φλαβονοειδών μορίων πρέπει να προκαλεί:

1<sup>ov</sup>) είτε κατάληψη του υποδοχέα και εμποδισμό της πρόσφυσης των φθοριζόντων αντισωμάτων, πράγμα που μεταφράζεται σε φαινομενική μείωση του αριθμού των υποδοχέων,

2<sup>ov</sup>) είτε μετακίνηση του υποδοχέα προς το εσωτερικό του αιμοπεταλιακού κυττάρου και συνακόλουθη καταβύθισή του μέσα στην κυτταροπλασματική μεμβράνη, οπότε τα

φθορίζοντα αντισώματα δεν είναι πλέον σε θέση να προσδεθούν επί των πρωτεϊνικών τμημάτων αυτού και να σηματοδοτήσουν την ύπαρξή του.

Δεδομένου ότι εκτός από τις μελετηθείσες φλαβονοειδείς ουσίες και άλλα αντιοξειδωτικά, spin traps, εκκαθαριστές ελευθέρων ριζών ενδογενείς και εξωγενείς, προκαλούν το φαινόμενο της μείωσης της παρουσίας των υποδοχέων στην εξωτερική επιφάνεια της κυτταροπλασματικής μεμβράνης των αιμοπεταλίων, φαίνεται ότι δεν έχουμε να κάνουμε με ένα φαινόμενο κατάληψης του υποδοχέα, αλλά μάλλον με ένα φαινόμενο μετακίνησής του προς τα ενδότερα του κυττάρου. Η άποψη αυτή χρήζει περαιτέρω έρευνας για να επιβεβαιωθεί με τρόπο αναντίρρητο. Συγκεκριμένα πρέπει οι υποδοχείς GPIIbIIIa να απομονωθούν και κατόπιν να επωαστούν με ραδιοσημανθέντα αντίγραφα των υπό μελέτη φλαβονοειδών και μετά την πραγματοποίηση ανοσοαποτυπώματος κατά Western να ελεγχθεί αν οι εν λόγω ουσίες ενσωματώνονται επί των διαφόρων σημείων της πρωτεϊνικής αλληλουχίας που αποτελεί τον υποδοχέα. Αν ενσωματώνονται τότε έχουμε να κάνουμε με τυπικούς προσδέτες στον υποδοχέα, αλλά αν όχι, τότε αναγκαστικά η δράση των ουσιών αυτών λαμβάνει χώρα σε άλλο επίπεδο του αιμοπεταλίου. Φυσικά η ίδια προσέγγιση μπορεί να εφαρμοστεί για όλα τα χρησιμοποιηθέντα μη φλαβονοειδή μόρια, που προκαλούν την φαινόμενη αυτή μείωση του αριθμού των συγκεκριμένων υποδοχέων ινωδογόνου.

Η υπόθεση που εμείς υιοθετούμε ως πιο πιθανή είναι ότι τα εν λόγω φλαβονοειδή δρούν κατ' αρχάς στο επίπεδο των ενζύμων της συνθετάσης των προσταγλανδινών, δηλαδή στην κυκλοξυγονάση ή στην υπεροξειδάση. Φαίνεται ότι υπάρχει κάποιος μηχανισμός ο οποίος «μεταφράζει» την μείωση της παραγωγής προσταγλανδινών σε μείωση της κινητικότητας του κυτταροσκελετού, που καταλήγει σε απόσυρση των υποδοχέων GPIIbIIIa προς το εσωτερικό του αιμοπεταλίου. Όταν το αιμοπετάλιο είναι ήρεμο, δεν παύει να παρουσιάζει έναν βασικό «τόνο» ο οποίος οδηγεί στην προβολή ενός ποσοστού υποδοχέων στην κυτταροπλασματική επιφάνεια. Συνεπώς έχουμε στο σημείο αυτό την καλή ένδειξη ότι τα φλαβονοειδή δρούν παραλλάσσοντας και την μεταγωγή ενεργοποιητικού σήματος που καταλήγει στην μετακίνηση προς τα έξω του υποδοχέα GPIIbIIIa. Τα τελευταία χρόνια υπάρχουν δημοσιεύσεις που αποδεικνύουν ότι τα φλαβονοειδή λειτουργούν σαφώς και προς αυτή την κατεύθυνση. Μια από τις σχετικές ερευνητικές προσεγγίσεις μελετά την μεταγωγή σήματος που ενεργοποιείται από την θρομβίνη προκειμένου να εισαχθεί η ισχυρή αιμοπεταλιακή συσώρευση η οποία προκαλείται από τον συγκεκριμένο

αιμοπεταλιακό αγωνιστή που θεωρείται ως ο ισχυρότερος εξ όλων. Η θρομβίνη είναι το σπουδαιότερο γνωστό πρωτεολυτικό ένζυμο στον καταρράκτη της πήξης και η μεταγωγή σήματος που πυροδοτεί λαμβάνει χώρα μέσω των «Ενεργοποιούμενων Από Πρωτεάσες Υποδοχέων» (PARs = protease-activated receptors) δια πρωτεολυτικού σχηματισμού ενός προσδέτη. Τα ανθρώπινα αιμοπετάλια εκφράζουν δύο λειτουργικούς υποδοχείς της θρομβίνης, τον PAR<sub>1</sub> και τον PAR<sub>4</sub> [642,643] σύμφωνα με την ονοματολογία του Alexander [644]. Οι οδοί μεταγωγής σήματος των δύο αυτών υποδοχέων δεν είναι σαφείς. Έχει δειχθεί ότι η ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων με θρομβίνη οδηγεί 1<sup>ov</sup>) σε ενεργοποίηση της φωσφολιπάσης C<sub>b</sub> (PLC<sub>b</sub>) με συνακόλουθη κινητοποίηση ασβεστίου και 2<sup>ov</sup>) σε ενεργοποίηση της πρωτεϊνικής κινάσης C (PKC) η οποία με την σειρά της πραγματοποιεί την αντίδραση έκλυσης των αιμοπεταλιακών κοκκίων. Πρόσφατες μελέτες απέδωσαν στην παραγωγή της TXA<sub>2</sub> και στην απελευθέρωση του ADP έναν ρόλο-κλειδί, για την επίτευξη σαφώς σταθερής-μη αντιστρεπτής συσσώρευσης, εισαγόμενης κατόπιν δράσης χαμηλών ή μετρίων συγκεντρώσεων θρομβίνης, μέσω ενός μηχανισμού ενίσχυσης σήματος που συμπεριλαμβάνει κινάσες του ογκογονιδίου *Src* και της ενεργοποιούμενης από μιτογόνους παράγοντες κινάσης ERK1/2, όπως επίσης και άλλων μορίων [645, 646]. Οι σηματοδοτικές δράσεις που ενεργοποιούνται από αυτούς τους μεσολαβητές δεύτερης τάξης, συνεργούν με τις εξαρτώμενες από το ασβέστιο και την PKC πρωτογενείς οδούς προκειμένου να επάγουν την ενεργοποίηση του Rap1b και των ιντεγκρινών α και β [647, 648, 649]. Εκτός όμως από τους υποδοχείς PAR<sub>1</sub> και PAR<sub>4</sub>, στους οποίους θεωρείται ότι η θρομβίνη συνδέεται με μέτρια ή μικρή συνάφεια αντιστοίχως (2), έχει δειχθεί ότι υπάρχει και ο υποδοχέας υψηλής χημικής συγγένειας GPIIb/IX/V με τον οποίο η θρομβίνη συνδέεται εκλεκτικά ισχυρά. Ο υποδοχέας αυτός, όπως είπαμε ανωτέρω, είναι υψηλής συγγένειας για την πρωτεάση, και παρά το γεγονός ότι ο ρόλος του αποτελεί ένα πεδίο διαμάχης [650, 651], υπάρχει ένα διαρκώς αυξανόμενο σύνολο ενδείξεων που υποδεικνύει ότι ενδεχομένως συνεισφέρει στην ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων [650, 651]. Οι L Navarro-Núñez, και συνεργάτες σε ένα πρόσφατο άρθρο τους [652] υποδεικνύουν ότι τα φλαβονοειδή γενιστεΐνη, απιγενίνη και κουερσετίνη είναι σε θέση να καταστείλουν την δράση της θρομβίνης μέσω μεταβολής της μεταγωγής σήματος που σχετίζεται με τους υποδοχείς PAR<sub>1</sub> και PAR<sub>4</sub> στα αιμοπετάλια. Οι εν λόγω υποδοχείς όπως είπαμε ανωτέρω θεωρούνται μέσης και μικρής χημικής συγγένειας αντιστοίχως ως προς την θρομβίνη, η οποία αποτελεί μάλλον τον ισχυρότερο γνωστό αγωνιστή των αιμοπεταλίων. Οι εν λόγω συγγραφείς μέσω των ευρημάτων τους υποστηρίζουν ότι η κουερσετίνη, η απιγενίνη και η

γενιστεΐνη δεν αναστέλλουν τις αιμοπεταλιακές αντιδράσεις μέσω του υποδοχέα της θρομβίνης, αλλά παρεμβαίνουν στην ενδοκυττάρια μεταγωγή σήματος. Τα δεδομένα αυτών των συγγραφέων δείχνουν ότι τα τρία φλαβονοειδή αναστέλλουν την αιμοπεταλιακή συσσώρευση, την απελευθέρωση σεροτονίνης (5-υδροξυτρυπταμίνη) και την κινητοποίηση του ιονισμένου ασβεστίου που προκαλεί η θρομβίνη. Η κουερσετίνη και η απιγενίνη είναι αναστολείς πρωτεϊνικών κινασών, ενώ η γενιστεΐνη εμφανίζει μια ελάχιστη ικανότητα να καταστέλλει την αιμοπεταλιακή φωσφορυλίωση. Επίσης οι συγγραφείς αυτοί διαπιστώνουν ότι τα συγκεκριμένα φλαβονοειδή δεν αλληλεπιδρούν με τους υποδοχείς της θρομβίνης. Τα δεδομένα αυτά υποδεικνύουν μια δράση επί της ενδοκυττάριας μεταγωγής σήματος, τουλάχιστον για την απιγενίνη και την κουερσετίνη. Για την γενιστεΐνη είναι πιθανή η δράση επί της κινητοποίησης του ασβεστίου, ως δεύτερου αγγελιοφόρου με συνέπεια την αναστολή της αντίδρασης έκλυσης των κοκκίων και της συσσώρευσης. Η αναστολή της αιμοπεταλιακής συσσώρευσης εκ μέρους της απιγενίνης και της κουερσετίνης σχετίζεται, κατά τους συγγραφείς, με αναστολή των πρωτεϊνικών κινασών και εξ αυτής των υπολοίπων αντιδράσεων των αιμοπεταλίων, τουλάχιστον σε ό,τι αφορά την αιμοπεταλιακή ενεργοποίηση μέσω θρομβίνης.

Το ποσοστό αυτό στο ήρεμο αιμοπετάλιο αντικατοπτρίζει ένα είδος ελάχιστης λειτουργικής ετοιμότητας, ώστε αν υπάρξει κάποιο αιφνίδιο αιμορραγικό συμβάν, δηλαδή ένας αιφνίδιος τραυματισμός, να είναι τα αιμοπετάλια σε θέση να αντιδράσουν άμεσα και να ξεκινήσουν τις αντιδράσεις συγκόλλησης για να σχηματίσουν τον αιμοστατικό θρόμβο ταχέως και εύκολα, ώστε να μην υπάρξει απώλεια αίματος. Αυτό φαίνεται πρακτικά να ισχύει, διότι έχουμε καταγράψει εξαιρετικά βραδείες, αλλά σταθερά επισυμβαίνουσες συσσωρεύσεις, όταν στο PRP υπάρχουν υψηλές συγκεντρώσεις αντιοξειδωτικών, συμπεριλαμβανομένων των φλαβονοειδών που μελετήσαμε. Τα αντιοξειδωτικά φλαβονοειδή (αλλά και άλλα αντιοξειδωτικά μη φλαβονοειδή) ρυθμίζουν τον αιμοπεταλιακό τόνο ανάλογα με την συγκέντρωσή τους, αλλά δεν τον καταργούν. Συνεπώς είναι πιθανόν οι ποσότητες των αντιοξειδωτικών μορίων που υπάρχουν στο αίμα να λειτουργούν ως φυσιολογικοί ρυθμιστές του αιμοπεταλιακού τόνου δρώντας κατά κύριο λόγο επάνω στον μεταβολικό ρυθμό της οδού του αραχιδονικού οξέος. Είναι σημαντικό να σημειώσουμε ότι χρησιμοποιώντας συγκεντρώσεις ίσες προς την IC<sub>50</sub> των υπό μελέτη φλαβονοειδών, οι συγκεντρώσεις της TXA<sub>2</sub> μειωνόταν προσεγγιστικά στο ήμισυ των συγκεντρώσεων της TXA<sub>2</sub> που προέκυπταν χωρίς την παρουσία των εν λόγω



φλαβονοειδών μορίων, δηλαδή στα δείγματα μάρτυρες. Η προσθήκη της ελάχιστης ποσότητας φλαβονοειδούς που προκαλούσε πλήρη αιμοπεταλιακή αναστολή μείωνε την παραγωγή θρομβοξάνης σε επίπεδα γειτονικά ή ταυτόσημα προς αυτά που παρουσίαζε το ήρεμο μη ενεργοποιημένο PRP. Είναι επίσης σημαντικό να υπογραμμίσουμε ότι το ποσοστό παρουσίας του υποδοχέα GPIIb/IIIa σε αιμοπετάλια επωαζόμενα με την IC<sub>50</sub> των υπό μελέτη φλαβονοειδών (αλλά και με τις IC<sub>50</sub> και άλλων αντιοξειδωτικών) εμφάνιζαν σχεδόν το 50% του αριθμού των υποδοχέων που εμφανίζουν τα αιμοπετάλια στην ήρεμη κατάσταση. Η επώαση των ήρεμων αιμοπεταλίων με τις ελάχιστες συγκεντρώσεις φλαβονοειδών που προκαλούν πλήρη αναστολή της συσσώρευσης έχει ως αποτέλεσμα την μείωση του αριθμού των υποδοχέων σε ένα ποσοστό αναλογούν στο 10% των μαρτύρων χωρίς αντιοξειδωτικό. Συνεπώς υπάρχει μια σαφής ευθυγράμμιση μεταξύ συγκεντρώσεων TXA<sub>2</sub> και αριθμών GPIIb/IIIa, που φαίνεται να στηρίζει την θεωρία μας. Προφανώς μια αναλυτικά ποσοτικοποιημένη μελέτη των αντιστοιχιών μεταξύ συγκεντρώσεων φλαβονοειδών, συγκεντρώσεων TXA<sub>2</sub> και αριθμού υποδοχέων GPIIb/IIIa θα στηρίζει πολύ καλύτερα αυτή την άποψη που προτείνουμε. Τα αντικείμενα αυτά θα ήταν ευχής έργο να αναλυθούν στο επίπεδο μιας μεταδιδακτορικής έρευνας του Εργαστηρίου Φυσιολογίας.



## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6

### ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στην παρούσα διδακτορική διατριβή μελετήθηκαν σε βάθος ένα σύνολο δράσεων μερικών φλαβονοειδών της διατροφής επί των λειτουργικών αντιδράσεων των αιμοπεταλίων όταν αυτά ενεργοποιούνται από τους αντιπροσωπευτικούς αγωνιστές των διακριτών οδών συσσώρευσης, δηλαδή της διφωσφορικής αδενοσίνης (ADP), του αραχιδονικού οξέος και του παράγοντα ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων (PAF).

Οι λειτουργικές αιμοπεταλιακές αντιδράσεις μελετήθηκαν σε δύο μοντέλα μελέτης αιμοπεταλίων: α) Σε αιμοπετάλια ανθρώπου *ex vivo*, δηλαδή στο φυσιολογικό τους αιματικό πλάσμα (Πλάσμα Πλούσιο σε Αιμοπετάλια ή PRP) και β) σε πλυμένα αιμοπετάλια κουνελιού (rl-PRP). Ταυτοχρόνως και σε διαφορετικές στιγμές της αιμοπεταλιακής συσσώρευσης μελετήθηκε επίσης η παραγωγή θρομβοξάνης A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>), υπό την μορφή του σταθερού της αποκλειστικού παραγώγου της θρομβοξάνης B<sub>2</sub> (TXB<sub>2</sub>). Ο προσδιορισμός της TXB<sub>2</sub> και σχετικών παραγώγων, έγινε ποσοτικά με την χρήση γ-κάμερας και ραδιοσημανσθέντων αντισωμάτων της θρομβοξάνης ειδικών για όλα τα παράγωγα αυτής, συμπεριλαμβανομένων της TXB<sub>2</sub> και συνεπώς ικανών να καταγράψουν όλη την παραγωγή TXA<sub>2</sub>, από τα διεγερθέντα αιμοπετάλια. Οι δράσεις των φλαβονοειδών που χρησιμοποιήθηκαν αντιπροσωπευτικά επί της αιμοπεταλιακής συσσώρευσης έγινε τόσο επί αιμοπεταλίων με ανοιχτές τις τρεις οδούς συσσώρευσης, όσο και επί αιμοπεταλίων με αποκλεισμένες τις οδούς συσσώρευσης ανά δύο και με την τρίτη ανοιχτή (ADP-PAF αποκλεισμένες και αραχιδονική οδό ανοιχτή, ADP-αραχιδονική αποκλεισμένες και οδός PAF ανοιχτή και αραχιδονικό οδός-PAF αποκλεισμένες και οδός ADP ανοιχτή). Τα φλαβονοειδή των οποίων οι δράσεις μελετήθηκαν ήσαν η κουερσετίνη, η γενιστεΐνη και η απιγενίνη. Μελετήθηκαν επίσης οι δράσεις της ναριγκίνης και ναριγκενίνης, όπως επίσης και οι δράσεις συμπτκνωμένων διαλυμάτων ερυθρού και λευκού οίνου, κατόπιν εκδίωξης της αιθανόλης διά ζέσεως, των οποίων τα αποτελέσματα δεν αναφέρουμε στο κείμενο καθόσον δεν υπήρξαν σταθερά ως προς τις τιμές αναστολής ή έδωσαν πολύ μικρή αναστολή στην αιμοπεταλιακή συσσώρευση. Η δράση των τριών φλαβονοειδών που προαναφέραμε (κουερσετίνη, απιγενίνη, γενιστεΐνη) επί της παραγωγής

θρομβοξάνης B2 και λοιπών παραγώγων της TXA<sub>2</sub>, έλαβε χώρα επί αιμοπεταλίων ανθρώπου και κουνελιού με ανοιχτές και τις τρεις οδούςβ συσσώρευσης. Τέλος μελετήσαμε το κατά πόσον οι τρεις ως άνω φλαβονοειδείς ενώσεις ήσαν σε θέση να μεταβάλλουν την παρουσία του υποδοχέα ινωδογόνου GP-IIb-IIIa επί της εξωτερικής μεμβράνης των αιμοπεταλίων του ανθρώπου. Η έκφραση του εν λόγω υποδοχέα περιορίστηκε στα ανθρώπινα αιμοπετάλια λόγω της πλήρους συμβατότητας των αντισωμάτων κατά του συγκεκριμένου υποδοχέα. Για την μελέτη της αιμοπεταλιακής συσσώρευσης και της αναστολής – τροποποίησης από τα εν λόγω φλαβονοειδή, χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της συσσωρευομετρίας και το συσσωρευόμετρο Ca-500 της εταιρείας Cronolog. Για την μελέτη της παραγωγής θρομβοξάνης χρησιμοποιήθηκε το kit της εταιρείας IZOTOP και η γ-κάμερα της Nucleus. Για τον προσδιορισμό της κατάληψης των υποδοχέων Gr-IIb-IIIa χρησιμοποιήθηκε το kit ADIAflo Platelet Occupancy της εταιρείας American Diagnostics, καθώς και το σύστημα κυτταρομετρίας ροής Epics XL-MCL της εταιρείας Beckman-Coulter. Από την συνολική μελέτη που πραγματοποιήθηκε επί των συγκεκριμένων ουσιών εξήχθησαν τα ακόλουθα δεδομένα: 1<sup>ov</sup>) Και τα τρία μελετηθέντα φλαβονοειδή αναστέλλουν την αιμοπεταλιακή συσσώρευση και από τις τρεις οδούς συσσώρευσης παρουσιάζοντας ωστόσο μια μικρή διαφορά ως προς την ευαισθησία αναστολής της κάθε οδού ξεχωριστά. Για την γενιστεΐνη έχουμε τα εξής:

1) MIC – γενιστεΐνης για τον PAF = 2,9 mM. 2)MIC- γενιστεΐνης για το ADP = [3,5 – 4,2M]. 3) MIC – γενιστεΐνης για το Αραχιδονικό Οξύ = 4,9 mM, και συνεπώς: PAF<ADP<αραχιδονικό οξύ. Για την απιγενίνη η σειρά αναστολής ως προς του αγωνιστές είναι: 1)MIC – απιγενίνης για τον PAF = 12 mM. 2)MIC- απιγενίνης για το ADP = 15 mM. 3)Οι MIC – απιγενίνης για το Αραχιδονικό Οξύ = 1 MIC – κουερσετίνης για τον PAF = 4 mM. MIC- κουερσετίνης για το ADP = 6 mM. MIC – κουερσετίνης ενώ για το Αραχιδονικό Οξύ = 7,5 mM-5 mM. και συνεπώς: PAF<ADP=Αραχιδονικό οξύ . Για την κουερσετίνη έχουμε: 1)MIC – κουερσετίνης για τον PAF = 4 mM. 2)MIC- κουερσετίνης για το ADP = 6 mM. 3)MIC – κουερσετίνης για το Αραχιδονικό Οξύ = 7, 5 mM και συνεπώς η σειρά δραστηκότητας είναι: PAF<ADP<αραχιδονικό οξύ.

Όσον αφορά την δραστηκότητα επί της παραγωγής της θρομβοξάνης A<sub>2</sub> τα δεδομένα δείχνουν ότι και τα τρία χρησιμοποιηθέντα φλαβονοειδή επιφέρουν δοσοεξαρτώμενη αναστολή της παραγωγής της θρομβοξάνης A<sub>2</sub>, από τα διεγερθέντα με τον εκάστοτε αγωνιστή, αιμοπετάλια του ανθρώπου, η οποία σχετίζεται καλά τόσο στις σχετικές IC<sub>50</sub>

των εν λόγω ουσιών, όπως επίσης και στις ευρεθείσες MIC για την αντίστοιχου μεγέθους (50% και 100%) αναστολή της αιμοπεταλιακής συσσώρευσης.

Έτσι για τους διεγέρτες ADP, PAF, ARA, ADRE, THR, COL, RISTO, οι δράσεις της κουερσετίνης έδωσαν τις εξής συγκεντρώσεις TXB<sub>2</sub> για τις αντίστοιχες IC<sub>50</sub> αυτού του φλαβονοειδούς: συγκέντρωση ηρεμίας TXB<sub>2</sub>: 137±9 pg/ml, συγκέντρωση TXB<sub>2</sub> κατόπιν χορήγησης ADP: 1087±22 pg/ml (control ADP), συγκέντρωση TXB<sub>2</sub> κατόπιν χορήγησης PAF: 1783±26 pg/ml (control PAF), συγκέντρωση TXB<sub>2</sub> κατόπιν χορήγησης ARA: 1375±18 pg/ml (control ARA), συγκέντρωση TXB<sub>2</sub> κατόπιν χορήγησης ADRE: 1237±31 pg/ml (control ADRE), συγκέντρωση TXB<sub>2</sub> κατόπιν χορήγησης THR: 2375±34 pg/ml (control THR), συγκέντρωση TXB<sub>2</sub> κατόπιν χορήγησης COL: 1241±14 pg/ml (control COL), συγκέντρωση TXB<sub>2</sub> κατόπιν χορήγησης RISTO: 1398±42 pg/ml (control RISTO). Οι αντίστοιχες μειώσεις της TXB<sub>2</sub>, όταν για κάθε αγωνιστή χορηγούταν η αντίστοιχη συγκέντρωση κουερσετίνης που προκαλεί κατά 50% μείωση της αιμοπεταλιακής συσσώρευσης είναι: TXB<sub>2</sub>: 192±12 pg/ml (ADP), 90±5 pg/ml (PAF), 117±8 pg/ml (ARA), 144±11 pg/ml (ADRE), 329±16 pg/ml (THR), 206±12 pg/ml (COL), 237±18 pg/ml (RISTO).

Αντίστοιχες μειώσεις της παραγωγής TXB<sub>2</sub> έχουμε τόσο για τις IC<sub>50</sub> και τις MIC της γενιστεΐνης και της απιγενίνης, οι οποίες αντιστοιχούν επίσης καλά με το ποσοστό αναστολής της αιμοπεταλιακής συσσώρευσης κατά 50% και 100%.

Ο τρίτος άξονας της μελέτης μας έδειξε ότι η χορήγηση των εν λόγω φλαβονοειδών σε συγκεντρώσεις που προκαλούν αντιστοίχως 50% και 100% αναστολή της αιμοπεταλιακής συσσώρευσης, προκαλούν επίσης απόσυρση ή κάλυψη των υποδοχέων ινωδογόνου GPIIb-IIIa, που τείνει προς το 50% και το 100% του αριθμού τους ανά αιμοπεταλιακό κύτταρο.

Από την συσχέτιση των τριών φαινομένων, δηλαδή της δόσοεξαρτώμενης αναστολής της αιμοπεταλιακής συσσώρευσης, της ομοίως δόσοεξαρτώμενης αναστολής της παραγωγής TXB<sub>2</sub> και της επίσης δόσοεξαρτώμενης μείωσης του αριθμού των υποδοχέων GP IIb-IIIa, φαίνεται μια σαφής σύνδεση μεταξύ των τριών εν λόγω φαινομένων, η οποία φαίνεται να έχει αιτιακό έναυσμα. Δεδομένου ότι τα ίδια φαινόμενα παρατηρούνται και με την χρήση άλλων ουσιών απολύτως διαφορετικής χημικής δομής, αλλά που έχουν ως κοινό τους χαρακτηριστικό την ιδιότητα του ότι είναι αντιοξειδωτικές και εκκαθαριστές ελευθέρων ριζών ή παγιδευτές της ηλεκτρονικής ιδιοστροφορμής (spin traps) συγκροτείται η άποψη ότι όλες οι εν λόγω μεταβολές προκύπτουν λόγω των αντιοξειδωτικών ιδιοτήτων των μορίων που μελετήθηκαν. Φαίνεται δε ότι ο κύριος στόχος και η πηγή όλων των

παρατηρηθεισών μεταβολών είναι η αναστολή της αιμοπεταλιακής συνθετάσης των προσταγλανδινών, μέσω των αντιοξειδωτικών δράσεων επί του μορίου της κυκλοξυγονάσης και ενδεχομένως της υπεροξειδάσης του απαρτίζουν την συνθετάση των προσταγλανδινών. Η παραγωγή της TXA<sub>2</sub> φαίνεται να αποτελεί τον κύριο τελικό διαβιβαστή, ο οποίος μεσολαβεί στην έναρξη της ενεργοποίησης του ενεργειακού μεταβολισμού των αιμοπεταλίων, στην αλλαγή σχήματος, στην αντίδραση έκλυσης του περιεχομένου των κοκκίων, στην εξαγωγή των ψευδοποδίων, την πρόσφυση στο υπόστρωμα και τελικά στην όλη κινητοποίηση του κυτταροσκελετού. Είναι πολύ πιθανόν οι υποδοχείς GPIIb-IIIa ως πρωτεϊνικά μόρια να υφίστανται μια μετακίνηση κατά το πάχος της μεμβράνης ώστε να υπάρχει μεταβολή της εμφάνισης των σημείων πρόσδεσης του ινωδογόνου. Στην περίπτωση όπου υφίσταται η δράση των φλαβονοειδών και των άλλων μελετηθέντων αντιοξειδωτικών η μείωση της παραγωγής της TXA<sub>2</sub> λειτουργεί ως επιβραδυντής (ή και πλήρης αναστολέας) της ροής των αντιδράσεων και της συναφούς κινητοποίησης του αιμοπεταλιακού κυτταροσκελετού, έτσι ώστε το σύμπλεγμα GP IIb-IIIa (και ενδεχομένως και άλλες πρωτεΐνες πρόσδεσης με παράγοντες πήξης ή προσκολλητικά μόρια) να καταβυθίζονται στο εσωτερικό της αιμοπεταλιακής μεμβράνης και με τον τρόπο αυτό να μην επιτρέπουν στην συγκόλληση των αιμοπεταλίων με τα μόρια του ινωδογόνου, και τελικά μεταξύ τους, οπότε έχουμε την αποφυγή της συσσώρευσης και του σχηματισμού θρόμβου. Αν ο μηχανισμός αυτός είναι γενικεύσιμος τότε ο ρόλος των φλαβονοειδών και άλλων μορίων με αντιοξειδωτικές ιδιότητες θα μπορούσε να αναβαθμιστεί προς την πλευρά της φαρμακευτικής τους χρήσης ως αντ αιμοπεταλιακών παραγόντων.

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7

### ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Donne A. De l'origine des globules du sang de leur mode de formation de leur fin. CR Acad. Sc. Paris 14, 366, 1842.
2. Hayem G. Recherches sur l'évolution des hématies dans le sang de l'homme et les vertèbres. Arch. Physl. Norm. et Path.5, 692, 1878. (Heilmeyer L., Bagemann H.). Blut und blutkrankheiten. In Handbuch der inneren Medizin Vol II, Berlin, Springer, 1951.
3. Schultze M. Ein heizbarer Objecttisch. Arch fur mikrosk Anatomie 1, 36, 1865 (ed. Tokantins, 1948).
4. Woldridge L. Die Gerinnung des Blutes. Leipzig 1891.
5. Wlassow K. Untersuchungen uber die histologischen vorgange bei der gerinnung und thrombose mit besonderer berucksichtigung der entstehung der blutplattchen. Ziegler's Beitrage 15, 543, 1894.
6. Bremer L. Ueber die Herkunft und Bedeutung der Blutplattchen. Centralblatt fur die mediz, Wissenschaften 32, 338, 1894.
7. Bizzozero G (1882) D'un nouvel élément morphologique du sang et de son importance dans la coagulation et la thrombose. Virchow's Archiv 90, 261.
8. Bizzozero G (1886). Sul midollo delle ossa. Tocantis L.M. ed. Historical notes on blood platelets. Blood 3, 1073, 1948.
9. Buckmaster GA (1906) Sci. Progress 1, 73.
10. Wright, JH. Minot L (1916). In "Blood Platelets", Maupin B, ed., 1969.
11. Wright, JH. The origin and nature of the blood-plates. Boston Med Surgical J, 154, 643, 1906.
12. Wright, JH. The histogenesis of the blood platelets. J Morphol 21, 263, 1910.
13. Vazquez JJ, Lewis JH. The demonstration of a common antigen in human platelets and megakaryocytes. Blood 16, 968, 1960.
14. Thiery JP, Bessis M. Mécanisme de la plaquettogenese. Etud in vitro par la microcinématographie. Rev. Hemat 11, 162, 1956.
15. Kinoshita R., Ohno S. Biodynamics of thrombopoiesis. (Maupin 1969), 1961.

16. Yamada E. The fine structure of the megakaryocyte in the mouse spleen. *Acta Anat (Basel)* 29, 267, 1957.
17. Μακρής Π. Η Αιμόσταση. Τόμος Ι, Φυσιολογία. Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης, ISBN 960-220-637-3).
18. Behnke O. Electron microscopical observation on the surface coating of human platelets. *J. Ultrastr. Res.* 24, 51-69, 1968.
19. Behnke O. Microtubules in disk-shaped blood cells. *Int. Rev. Exp. Pathol.* 9, 1, 1970.
20. Behnke O., Pedersen NT. Ultrastructural aspects of megakaryocytes maturation and platelet release. *Platelets Production, Function, Transfusion and Storage.* MG. Baldini, S. Ebbe (eds), New York, Grune and Stratton ed. P.21, 1974.
21. Harker LA, Finch CA. Thrombokinetis in man. *J. Clin. Invest.* 48, 963, 1969.
22. Harker LA. Measurement of total megakaryocyte mass. In *Platelet Kinetics* JM Paulus (ed.), North Holland Publ Co. Amsterdam, p. 172, 1971.
23. Harker LA. Platelet production and its regulation. In *Platelet Kinetics* JM Paulus (ed.), North Holland Publ Co. Amsterdam,, p.202, 1971a.
24. Harker LA. Specificity of the thrombin-induced release of tissue plasminogen activator from cultured human endothelial cells. *Thromb. Haemostasis*, 56, 115-119, 1986.
25. Ebbe S. Megakaryocytopoiesis and platelet turnover. *Sem Hematol.*1, 65, 1968.
26. Ebbe S. Thrombopoietin. *Blood* 44, 605, 1974.
27. Ebbe S., Phalen E. Effects of hereditary defects of hematopoietic micro-environment on Megakaryocytopoiesis in SL/SLd and W/WV mice. In *Platelets, production, function transfusion and storage*, ME Baldini & S Ebbe NY Grune, 1974.
28. Ebbe S., Stohlman F. Jr. Megakaryocytopoiesis in the rat. *Blood* 26, 20, 1965.
29. Ebbe S., Stohlman F. Jr., Overcash J. Megakaryocyte maturation rate in thrombocytopenic rats. *Blood* 32, 787, 1968b.
30. Ardaillou N, Najean Y, Eberlin A. Platelet kinetics study using <sup>75</sup>Selenomethionine, *Platelet Kinetics, Radioisotopic, cytological, mathematical and clinical aspects.* JM Paulus, Amsterdam, North Holland Publication ed, p.131, 1971.
31. Ardaillou N. Megakaryocytopoiesis et thrombopoiesis. *Aspects dynamiques et regulation.* Hématologie, Bernard, p 1528, 1976.
32. Nageli (1931). Αναφέρεται από τον Maupin B. στο δίτομο έργο του: Maupin B. *Blood Platelets in Man and Animals.* Oxford Pergamon Press, (2 vol), 1969 (σελίδα 6).



33. Cronkite EP, Bond VP, Fliender TM, Paglia DA, Adamik ER. Studies on the origin, production and destruction of platelets. In Johnson SA, Monto RW, Rebeck JW and Horn RC (eds), *Blood Platelets*. Boston. Little, Brown and Company, p.595, 1961.
34. Hiraki K, Ofuji T. Microcinematographic observations on the blood cells and their clinical applications particularly by means of bone marrow culture. *Acta Haem Japonica* 19, 406, 1955.
35. Maupin B. *Blood Platelets in Man and Animals*. Oxford Pergamon Press, 2 vol. 1969.
36. Maupin B. La composition chimique des plaquettes. Actes 3em Sym Baldacci Formentor 1960, 1 vol Omnia Med Pise, 1962.
37. Maupin B. La plaquette est-elle une cellule vivante? *Transfusion Sanguine et Actualités Hématologiques* 1vol, Masson, Paris, p 628, 1953c.
38. Maupin B. *Les plaquettes sanguines de l'homme*. 1 vol, Masson and Cil, Paris, 1954a.
39. Maupin B. Recherches sur la biochimie et la physiologie des plaquettes sanguines de l'homme. Note 4<sup>e</sup> Congr Soc Europ Hemat. Amsterdam, 1953d.
40. Maupin B. Saint-Blanchard J, Storck J. Soufre taurine, protéines et ATP plaquettaires, *Rev Franc Etud Clin Biol* 7, 169, 1962.
41. Maupin-Szamier P and Pollard TD. Actin filament destruction by osmium tetroxide. *J Cell Biol* 77, 837-852, 1978.
42. Bessis M. *Living blood cells and their ultrastructure*. Weed IR (eds) Springer, Verlag, Berlin, Heidelberg, NY, 1973.
43. Kaufmann RM, Airo R, Pollack S, Crosby WH, Doberneck R. Origin of pulmonary megakaryocytes. *Blood* 25, 767-774, 1965.
44. Howell WH, Holt E. The new factors in blood coagulation – heparin and pro-antithrombin. *Amer J Physiol* 47, 328-241, 1918.
45. Tingaard-Pederson N. Occurrence of megakaryocytes in various vessels and their retention in the pulmonary capillaries in man. *Scand J Haem* 21, 369-375, 1978.
46. Trowbridge EA. Pulmonary platelet production: A physical analogue of mitosis. *Blood Cells* 13, 451-459, 1988.
47. Tavasoli M, Aoki M. Localisation of megakaryocytes in the bone marrow. *Blood Cells* 15, 3-14, 1989.
48. Stohlman F.Jr., Ebbe S, Morse B., Howard D., Donovan J. Regulation of erythropoiesis, XX kinetics of red cell production. *Ann NY Acad Sci* 149, 156, 1968.

49. Stohlman F.Jr. Stem cell regulation. In "Platelets production, function, transfusion and storage". M. Baldini and S. Ebbe, (eds) Grune and Stratton, NY, 1974.
50. Breton-Gorius J. Morphologie de la ligne megakaryocytaire et plaquettaire. Bernard J., Lévy JP., Varet B. Hématologie, Paris, Flammarion p.1511, 1976.
51. Paulus J.M. Platelet size in man. Blood 46, 321, 1975.
52. Paulus J.M., Breton-Gorius J., Kinet-Denoel C., Boniver J., Megakaryocyte ultrastructure and ploidy in human macrothrombocytosis. In Platelets Production, Function, Transfusion and Storage, (eds) MG Baldini, S. Ebbe, Grune and Stratton NY, p.131, 1974.
53. Paulus J.M, Fillet G., Thomson RH., Willelms J. Etude mathématique de la durée de vie des plaquettes marquées au chrome radioactive. NRF d'Hemat 9, 886, 1969.
54. Paulus J.M., Mel H.C. Viability studies on megakaryocytes in mechanically and enzymatically suspended bone marrow. Exp. Cell Res. 28, 47, 1967.
55. Paulus J.M., Pennington D.G., Kinet-Denoel C., Jackson C.W., Odell T.T. Jr. Determination of megakaryocyte ploidy in human diseases. In Platelet Kinetics, (ed) JM Paulus North Holland Publ. Co, Amsterdam p.330, 1971.
56. Paulus J.M. Production et destruction des plaquettes sanguines, Paris, Masson (ed), 1974.
57. Paulus J.M. Computer analysis of platelet size distribution curves. Proc. 14<sup>th</sup> Cong. Amer. Soc. Haematol., San Francisco 339, 1971 c.
58. Paulus J.M. DNA metabolism and development of organelles in guinea-pig megakaryocytes. A combined ultrastructural auto radiographic and cytophoto-metric study. Blood 35, 298, 1970.
59. Paulus J.M. Multiple differentiation in megakaryocytes and platelets. Blood, 29, 407, 1967.
60. Paulus JM. Measuring mean life-span mean age and variance of longevity in platelets. In Platelet Kinetics, (ed) JM Paulus, North Holland Publ. Co. Amsterdam, p 80, 1971b.
61. Paulus JM. Ultrastructural aspects of megakaryocyte kinetics. In Platelet Kinetics, (ed) JM Paulus, North Holland Publ.Co., Amsterdam, p. 193, 1971a.

62. Odell T.T., Jackson C.W. Relationships between DNA replication and morphology, length of maturation time, distribution of ploidy values within immature and mature populations. In "Platelet Kinetics"(ed), JM. Paulus, North Holland Publ Co., Amsterdam, p.183, 1971.
63. Odell T.T.Jr, Jackson C.W., Friday T.J., Charsha D.E. Effect of thrombocytopenia on Megakaryocytopoiesis. Br. J. Haem. 17, 91, 1969.
64. Odell T.T.JR, McDonald T.P., Detwiler T.C. Stimulation of platelet production by serum of platelet-depleted rats. Proc. Soc. Exp. Biol. Mes. 108, 428, 1961.
65. Odell T.T. Megakaryocytopoiesis and its response to stimulation and suppression. Platelets production function transfusion and storage. M. Baldini, S. Ebbe (eds), Grune Stratton NY, p.11, 1974.
66. Odell T.T. Regulation of the megakaryocyte-platelet system. Regulation of organ and tissue growth. NY Acad. Press, p.187, 1972.
67. Aster R.H. Pooling of platelets in the spleen: role in the pathogenesis of "hypersplenic" thrombocytopenia. J. Clin. Invest. 45, 645, 1966.
68. Aster R.H. Platelet antigen system. Research monographs in Immunology, vol.5, Immunohematology, Elsevier Science Publ. p.23-67, 1984.
69. Von Behrens W.E. Mediterranean macrothrombocytopenia. Blood 46, 199-204, 1975.
70. Von Behrens W.E., Arweling R.K., Lander H. Macrothrombocytes and thrombocytopenia-A variant in healthy Greek and Italian subjects. Pathology 3, 78, (abstract), 1971.
71. Von Behrens W.E., Inana I., Harker L.A. Platelet diameter Evaluation. 5th Intern. Congr. Thromb. Haemost. Held., Paris, France, July, 1975.
72. Von Behrens W.E. Evidence of phylogenetic canalisation of the circulating platelet mass in man. Thromb. Diath. Haemor. 27, 159, 1972.
73. Von Behrens W.E. Platelet Size. Thesis submitted for the degree of Doctor of Medicine University of Adelaide, South Australia, 1972.
74. Von Behrens W.E. Splenomegaly, macrothrombocytopenia and stomatocytosis in healthy Mediterranean subjects. Scand. J. Haem., 14, 258-267, 1975a.
75. Μακρής ΠΕ. Ο όγκος των αιμοπεταλίων του ανθρώπου. Διδακτορική Διατριβή, Θεσσαλονίκη 1978.

76. Makris P.E., Zurukzoglu W., Ballas A., Sklavunu-Zurukzoglu S. Le volume plaquettaire: Etud comparative de deux populations d'origine grecque et française. *Nouv. Rev. Fran. d' Hemat.* 24, 302-306, 1982.
77. Desforges J.F., Bigelow F.S., Chalmers T.C. The effect of massive gastrointestinal haemorrhage on haemostasis I. The blood platelets. *J. Lab. Clin. Med.* 43, 501, 1954.
78. Krevans J.R., Jackson D.P. Hemorrhagic disorder following massive blood transfusion. *J. Amer. Med. Ass.* 159, 171, 1955.
79. Zucher M.B., Ley A.B., Mayer K. Studies on platelet life-span and platelet depots by use of DF32. *J. Lab. Clin. Med.* 58, 405, 1961.
80. Zucher M.B., Borelli J. Platelet clumping produced by connective tissue suspensions and by collagen. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 109, 779, 1962.
81. Zucher M.B. Platelet agglutination and vasoconstriction as factors in spontaneous hemostasis in normal thrombocytopenic heparinised and hypo-thrombinemic rats. *Amer. J. Phys.* 148, 275, 1947.
82. Zucher-Franklin D and Bloomberg N. Microfibrils of blood platelets: their relationships to microtubules and the contractile protein. *J. Clin. Invest.* 48, 165-175, 1969.
83. Zucher-Franklin D. The sub membranous fibrils of human blood platelets. *J. Cell Biol.* 47, 293-299, 1970.
84. Kelemen E., Cserhati I., Tanos B. Demonstration and some properties of human Thrombopoietin in thrombocythaemic sera. *Acta Haematol.* 20, 350, 1958.
85. Kelemen E., Lehoczky D., Perkedy J., Cserhati I., Rak K. Serum thrombo-cytopoietic purpura. *Lancet I*, p.1134, 1960.
86. Kelemen E., Lehoczky D., Cserhati I., Krizsa F., Rak K. Demonstrability of a serum factor inducing thrombocytosis prior to acute rises of platelets in mice and men. *Act. Haematol.* 29, 16, 1963.
87. Kelemen E., Rak K., Cserhati I., Lehoczky D. Thrombocytosis enhancing activity of serum from a patient with pathological thrombocytopoiesis. *Acta Med. Acad. Sci. Hung.* 17, 293, 1961.
88. Cserhati I., Kelemen E. Acute prolonged thrombocytosis in mice induced by thrombocythaemic sera: a possible human Thrombopoietin. A preliminary communication. *Acta Med. Acad. Sci. Hung.* 11, 473, 1958.

89. Cserhati I., Krizsa F., Rak K. Uber die mit Ultraviolette-Behandlung Hrvogerufene thrombozytose des maus. Proc. VIIIth. Congr. Europ. Soc. Hemat. Vienna 2, 3776, 1961.
90. Pennington D.G., Olsen T.E. Megakaryocytes in states of altered platelet production: cell numbers, size, and DNA content. Br. J. Haem. 18, 447, 1970.
91. Pennington D.G., Steatfield K., Roxburg A.E. Megakaryocytes and the heterogeneity of circulating platelets. Br. J. Haem. 34, 639, 1976.
92. Pennington D.G., Steatfield K., Weste S. Megakaryocyte ploidy and ultrastructure in stimulated thrombopoiesis. Platelets: Production, Function, Transfusion and Storage, M. Baldini and S. Ebbe, eds, Grune and Stratton NY., p.115, 1974.
93. Pennington D.G., Steatfield K. Heterogeneity of megakaryocytes and platelets. Series Haem. 8, 22, 1975.
94. Krizsa F. Erythropoietin level and thrombopoiesis in mice. Acta Haem. 56, 221, 1971a.
95. Krizsa F., Cserhati I., Rak K. Uber die thrombozytopoetische Aktivitat des serus beiden experimentellen Thrombozytose. Maus Med. Exp.7, 32, 1962.
96. Krizsa F. Absence of the thrombopoietic response provoked by haemorrhage in nephrectomized rats. Proc. 13<sup>th</sup> Congr. Int. Soc. Haematol., Munich., p.114, 1970.
97. Krizsa F. Study on the development of posthaemorrhagic thrombocytosis in rats. Acta Haem. (Basel), 56, 461, 1971.
98. Wang-Iverson P. Binding of lipoprotein lipase to cultured endothelial cells. In Biology of Endothelial Cells, Jaffe E.A.(ed), Boston, The Hague, Dordrecht, Lancaster, Martinus Nijhoff Publishers, p.350-355, 1984.
99. Aschoff 1894, Αναφέρεται από τον Bessis, 1973.
100. Donaldson V.H. Blood coagulation and related plasma enzymes in inflammation. Sem. Haem. 3, 1, 40-95, 1970.
101. De Gabriele G., Pennington D.G. Physiology of the regulation of platelet production. Br. J. Haemat. 13, 202, 1967a, 13, 210, 1967b, 13, 384, 1967 c.
102. Siri W.E., van Dyke D.C., Winchell H.S., Pollycove M., Parker H.C., Cleveland A.S. Early erythropoietin, blood and physiological response to severe hypoxia in man. J Appl. Physiol. 21, 73, 1966.

103. Hirsh J., and Dacie J.V. Persistent post splenectomy, thrombocytosis and thromboembolism: a consequence of continuing anaemia. *Br. J. Haem.* 12, 44-53, 1966.
104. Hirsh J., and Gallus A.S. Heparin. In "Recent Advances in Haematology", ed. by Hoffbrand A.V., Brain M.C., and Hirsh J. Churchill Living, p. 453-466, 1977.
105. Hirsh J., Clynn M.F., Mustard J.F. The effect of platelet age on platelet adherence to collagen. *J. Clin. Invest.* 47, 466, 1968.
106. Hirsh J. Heparin induced bleeding. *NRF d' Hem.* 26, 261-266, 1984.
107. Hirsh J. Heparin. *NEJ Med.* 324, 1565-1574, 1991.
108. Hirsh J. Low molecular weight heparin. *Thromb. Haemost.* 70 (I), 204-207, 1993.
109. Evatt B., Spivak J.L., Levin J. Relationships between thrombopoiesis and erythropoiesis: with studies of the effects of preparations of thrombopoietin and erythropoietin. *Blood* 48, 547, 1976.
110. Markossian A.A. Die physiologische Bedeutung der Thrombocyten. *Folia Haem.* (L.pz) 79, 1, 1962.
111. Gregoire C., Tagnon H.J. Blood coagulation. In Florkin M., Masson Hs (eds), *Comparative Biochemistry*. Academic Press, NY p.435-482, 1962.
112. Gregoire C. Haemolymph coagulation in arthropods. *Symp. Zool. Soc. London*, No 27, 45-74, 1970.
113. Medado P., Izak G., Feldman S. The effect of electrical stimulation of the central nervous system on erythropoiesis in the rat. II. Localisation of a specific brain structure capable of enhancing red cell production. *J. Lab. Clin. Med.* 69, 776, 1967.
114. Calvo W. The innervation of the bone marrow in laboratory animals. *Am. J. Anat.* 123, 315, 1984.
115. Dodds W.J. First international registry of animal models of thrombosis and haemorrhagic diseases. *Ins. of Lab. Anim. Resources News* 21, A1-A23, 1977.
116. Dodds W.J. Canine von Willebrand's disease. *J. Lab. Clin. Med.* 76, 713-721, 1970.
117. Doolittle R.F., Riley M. The amino terminal sequence of lobster fibrinogens reveals common ancestry with vitellogenins. *Biochim. Biophys. Res. Com.* 167, 16-19, 1990.
118. Doolittle R.F., Surgenor D.M. Blood coagulation in fish. *Am. J. Phys.* 203, 964-970, 1962.

119. Doolittle R.F. The evolution of vertebrate blood coagulation: a case of yin and yang. *Thromb. Haemostas.* 70, (1), 24-28, 1993.
120. Davis M.L., Upton A.C., Cosgrove G. E., Satterfield L.C. Effect of age of recipient mice on growth and differentiation of transplanted bone marrow cells. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 128, 1149, 1968.
121. Rencricca N., Rizzoli V., Howard D., Duffy P., Stohlman F Jr. Stem cell migration and proliferation during severe anaemia. *Blood* 36, 764, 1970.
122. Jacob H.S., McDonald R.A., and Jandl J.H. Regulation of spleen growth and sequestering function. *J. Clin. Invest.* 42, 1476, 1963.
123. Banu N., Fawcett J., Williams N., Di Giorgio, Withy R. Tissue source of megakaryocyte potentiator: biochemical and immunological studies. *Br. J. Haemat.* 75(3), 313-318, 1990.
124. Yamamoto R., Lin L.S., Lowe R., Warren M.K., White T.J. The human lung fibroblast cell line, MRC-5, produces multiple factors involved with Megakaryocytopoiesis. *J. Immunol.* 144, (5), 1808-1816, 1990.
125. Ivasenko I.V., Klestova O.V., Arkadieva G.E., Almazov V.A. Role of stromal micro environment in the regulation of bone marrow haemopoiesis after currently administration. *Biull. Eksp. Biol. Med.* 110, (7), 98-100, 1990.
126. Williams N. Megakaryocyte growth factors. *Immun. Ser.* 215-229. 1990.
127. Williams N. Stimulators of megakaryocyte development and platelet production. *Prog. Growth Factor Res.* 2, (2), 81-95, 1990.
128. Bellucci S., Ham Z.C and Caen J.P. Studies of in vitro Megakaryocytopoiesis in adults immune thrombocytopenic purpura. *Eur. J. Haem.* 47, 86-90, 1991.
129. Paul S.R., Bennett F., Calvetti J.A., et al. Molecular cloning of a cDNA encoding interleukin 11, a stromal derived lymphopoietic and hematopoietic cytokine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, (19), 7512-7516, 1990.
130. Hill R.J., Warren M.K., Stenberg P., et al. Stimulation of Megakaryocytopoiesis in mice in human recombinant interleucin-6. *Blood* 77, 42-48, 1991.
131. Hamamughih H., Takano N., Saito K., Enokihara H., Shishido H. Interaction of monocytes and T cells in the regulation of normal human megakaryocytopoiesis in vitro: role of IL-1, and IL-2. *Br. J. Haem.* 76, (1), 12-20, 1990.

132. Gewirtz A.M., Shen Y.M. Effect of phorbol Myristate acetate on c-myc, beta-actin, and FV gene expression in morphologically recognisable human megakaryocytes: a kinetic analysis employing in situ hybridisation. *Exp. Haematol.* 18(8), 945-952, 1990.
133. Gewirtz A.M. In vitro regulation of human megakaryocyte maturation. *Prog. Clin. Biol. Res.* 352, 123-132, 1990.
134. Gewirtz A.M. Human megakaryocytopoiesis. *Sem. Hematol.*, 23, 27-42, 1986.
135. Abesadze A.I., Mosidze M.A., Kvernadze M.G., Soseliia T.S., Mdivnishvili M.G. Hormonal mechanisms of the regulation of thrombocytopoiesis. *Vestn. Acad. Med. Nauk. SSSR*, 9, 47-52, 1990.
136. Levin J. Is interleukin-3 a physiologic regulator of megakaryocytopoiesis, in vivo? *Blood Cells* 15, 134-139, 1989.
137. De Alarcon Jr. Megakaryocyte colony-stimulator factor (Mk-CSF): Its significance in human disease: *Blood Cells* 15, 189-191, 1989.
138. Mazur M. Megakaryocytopoietic regulation: the forest and the trees. *Blood Cells* 15, 167-171, 1989.
- Aster 66, (op cit 67)
  - Aster 84, (op cit 68)
139. Solberg L.A. Stimulators and inhibitors of megakaryocytopoiesis in human plasma. *Blood Cells*, 15, 189-191., 1989.
140. Byron J.W. Cholinergic mechanisms and the hemopoietic stem cell Erythropoiesis. *Proc. IVth. Int. Conf. on Erythropoiesis*,(ed) Nakao K., Fisher J.W., Taraku F., Univ. Park. Press, p.141, 1974.
141. McCuskey R. S., Meineke H. A., Kaplan S. M. Studies on the hemopoietic microenvironment. II. Effect of erythropoietin on the splenic microvasculature of polycythemic CF1 mice. *Blood* 39, 809, 1972.
142. Halvorsen S. Effects of ACTH on erythropoiesis in the rabbit. *Acta Phys. Scan.* 58, 30, 1963.
143. Halvorsen S. The central nervous system in regulation of erythropoiesis. *Acta Haem.* 35, 65, 1966.
144. Halvorsen S. Plasma erythropoietin levels following hypothalamic stimulation in the rabbit. *Scan J. Clin. And Lab. Invest.* 13, 564, 1961.



145. Ham Z.C., Bellucci S., and J.P. Caen. Regulation of human megakaryocytopoiesis. *NRF d' Hemat.* 32, 395-396, 1990.
146. Ham Z.C., Bellucci Z.C., Waltz A., Baggiolini M., Caen J.P. Negative regulation of human megakaryocytopoiesis by human platelet factor 4(PF4) and connective tissue-activating peptide (CTAP-III). *Int. J. Cell Cloning* 8, (4), 253-259, 1990b.
147. Piliero J. S., Medici P. T., Orr A. Influence of hypoxic stimuli upon erythropoiesis in hypothalamic lessened animals. *Acta Haem.* 28, 101, 1962.
148. Rak K., Krizsa F., Varga L., Cserhati I. Humoral aspects of thrombocytopoiesis in pernicious anaemia. Xth Congr. ISH, Stockholm (abstract), p.41, 1964.
149. Feldman S., Rachmilewitz E.A., Izak G. The effect of central nervous system stimulation of erythropoiesis in rats with chronically implanted electrodes. *J. Lab. Clin. Med.* 67, 713, 1966.
150. Bull B.S., Zucher M.B. Changes in platelet volume produced by temperature, metabolic inhibitors and aggregating agents. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 120, 296, 1965.
151. Zucher M. B., Ley A. B., Mayer K. Studies on platelet life-span and platelet depots by use of DF3. *J. Lab. Clin. Med.* 58, 405, 1961.
152. Zucher M. B., Borelli J. Platelet clumping produced by connective tissue suspensions and by collagen. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 109, 779, 1962.
153. Zucher M. B. Platelet agglutination and vasoconstriction as factors in spontaneous hemostasis in normal thrombocytopenic heparinised and hypo-thrombinemic rats. *Amer. J. Phys.* 148, 275, 1947.
154. Zucher-Franklin D. The sub membranous fibrils of human blood platelets. *J. Cell Biol.* 47, 293-299, 1970.
155. Zucher-Franklin D., and Bloomberg N. Microfibrils of blood platelets: their relationship to microtubules and the contractile protein. *J. Clin. Invest.* 48, 165-175, 1969.
156. Garg S. K., Amorosi E. L., Karpatkin S. The large platelet on peripheral smear as an index of thrombopoiesis. *J. Clin. Invest.* 48, 10073, (abstract) *Blood* 34, 851, 1969.
157. Garg S. K., Amorosi E. L., Karpatkin S. Use of megathrombocyte as an index of platelet production. In *Platelet kinetics*, ed J.M. Paulus, North Holland Publ. Co Amsterdam, p. 228, 1971a.

158. Garg S. K., Amorosi E. L., Karpatkin S. Use of megathrombocyte as an index of megakaryocyte number. *NEJ Med.* 284, 11-17, 1971.
159. Karpatkin S. Studies on human platelet glycolysis. Effect of glucose, cyanide, insulin, citrate and agglutination and contraction on platelet glycolysis. *J. Clin. Invest.* 46, 409, 1967.
160. Karpatkin S., Langer R. M. Biochemical energetics of stimulated platelet plug formation. Effect of thrombin, ADP and epinephrine on intra- and extracellular adenine nucleotide kinetics. *J. Clin. Invest.* 47, 2158, 1968.
161. Karpatkin S. Heterogeneity of human platelets. I. Metabolic and kinetic evidence suggestive of young and old platelets. *J. Clin. Invest.* 48, 1073, 1969a.
162. Karpatkin S. Heterogeneity of human platelets. II. Functional evidence suggestive of young and old platelets. *J. Clin. Invest.* 48, 1083, 1969b.
163. Karpatkin S. Charmatz A., Langer R. M. Glycogenesis and gluconeogenesis in human platelets: incorporation of glucose pyruvate and citrate into platelet glycogen: glycogen synthetase and fructose 1,6-diphosphatase activity. *J. Clin. Invest.* 49, 140, 1970.
164. Karpatkin S., Garg S. K., Siskind G. W. Autoimmune thrombocytopenic purpura and the compensated thrombolytic state. *Am. J. Med.* 51, 1, 1971.
165. Karpatkin S., Strick N., Karpatkin M.B., Siskind G. Cumulative experience in the detection of antiplatelet antibody in 234 patients with ITP, systemic lupus erythematosus and other clinical disorders. *Amer. J. Med.* 52, 776, 1972.
166. Karpatkin S., Garg S. K. The megathrombocyte as an index of platelet production (annotation). *Br. J. Haem.* 26, 307, 1974.
167. Karpatkin S. Human platelet senescence. *Ann. Rev. Med.* 23, 101, 1972.
168. Karpatkin S. Heterogeneity of rabbit platelets. Effect of chronic blood loss on glycolytic and related enzyme activity. *Arch. Bioch. Bioph.* 164, 752, 1974.
169. Karpatkin S., Garg S., Freedman M. L. Role of iron as a regulator of thrombopoiesis. *Am. J. Med.* 57, 521, 1974.
170. Karpatkin S. Ferziger R., and Dorfman D. Crossed immunoelectrophoresis of human platelet membranes. Effect of charge on association and dissociation of the glycoprotein GPIIb-IIIa membrane complex. *J. Biol. Chem.* 261, 14266-14272, 1986.

171. Niewiarowski S. Platelet membrane components and receptors. In "Trends in Haematology", Part I, Plenary and education lectures at the 8<sup>th</sup> Meet ISH, Warsaw-Poland, (ed) J. Koscielak, W. WJedrzejczak, B. Kotelba-Witkowska and Traczyk, 46-55, 1985.
172. Detwiler T.C., Charo I. F., Feinan R. D. Evidence that calcium regulate platelet function. *Thr. Haem.* 40, 207-211, 1978.
173. Detwiler T.C., Odell T.T., Mcdonald T.P. Platelet size ATP content and clot retraction in relation to platelet age. *Amer. J. Physiol.* 203, 107, 1974.
174. Nurden A. T., Dirty D., Kieffer N., and McEver R. P. Residual amounts of glycoproteins IIb and IIIa may be present in the platelets of most patients with Glanzmann's thrombasthenia. *Blood* 65, 1021-1024. 1985.
- a. Hirsh J., Clynn MF et al. (*op. cit* 105).
  - b. Karpatkin S., Langer R.M (*op. cit* 160)
175. Parise L. V., and Phillips DR. Fibronectin – binding properties of the purified platelet glycoprotein IIb-IIIa complex. *J. Biol. Chem.* 261, 14011-1420, 1986.
- Karpatkin S., Langer R. M (*op cit* 160).
176. Minter F.M., Ingram M. Platelet volume density relationships in normal and acutely bled dogs. *Br. J. Haem.* 20, 55, 1971.
177. Amorosi E. L., Garg S. K., Karpatkin S. Heterogeneity of human platelets IV. Identification of a young platelet population with <sup>75</sup>Se-selenomethionine. *Brit. J. Haematol.* 21, 227, 2971.
178. Ginsburg A. D., Aster R. H. Changes associated with platelet aging. *Thromb. Diath. Haemor.* 27, 407, 1972.
179. George J., Nurden A., Philip D. Molecular defects in interactions of platelets with vessel wall. *NEJ Med.* 311, 084-1098, 1984.
180. George J., Nurden A., Philip D. Platelet membrane glycoproteins. NY-London. Plenum Press, 1985.
181. Kraytman M. Platelet size in thrombocytopenias and thrombocytosis of various origine. *Blood* 41, 587, 1973.
182. Freedman M. L., Karpatkin S. Heterogeneity of rabbit platelets. Preferential splenic sequestration of megathrombocytes. *Br. J. Haem.* 31, 255, 1975.
- a. Karpatkin S. 1969a (*op cit.* 161).
  - b. Karpatkin S. 1969b (*op cit.* 162).

183. Weiner M. and Karpatkin S. Use of megathrombocyte to demonstrate thrombopoietin. Th. Diath. Haem. 28, 24, 1972.
184. Goguel A., Houbouyan L. Determination du volume plaquettaire moyen de la repartition des volumes plaquettaires: correlations cliniques, biologiques, isotopiques. Act. Hemat. 8eme ser, p.244, 1974.
185. Baldini M. G. Increased platelet destruction. Platelet Kinetics. Ed by J.M. Paulus, North-Holland comp. Amsterdam, p. 287, 1971.
186. Murphy S., and Gardner F. H. Platelet preservation: effect of storage temperature on maintenance of platelet viability-deleterious effect of refrigerated storage. NEJ Med. 280, 1094-1098, 1969.
187. Murphy S., Oski F. A., Naiman J. L., Lusch C. L., Gordberg S., Gardner F. H. Platelet size and kinetics in hereditary and acquired thrombocytopenia. NEJ Med. 286, 499, 1972.
188. Godwin H. A., Ginsburg A. D. May-Hegglin anomaly: defect in megakaryocyte fragmentation. Proc. 14<sup>th</sup> Cong. Amer. Soc. Haematol., San Francisco 279, 1972.
189. Aitchison J., Brown J. A. C. The Lognormal Distribution with Special Reference to its Use in Economics, Cambridge University Press, 1975.
190. Epstein B. The mathematical description of certain breakage mechanisms leading to the logarithmic normal distribution. J. Franklin Institute 244, 471, 1947.
- a. Pennington DG et al (op cit 91)
  - b. Pennington DG et al (op cit 93)
191. Annoni G. Il diametro delle piastrine in condizioni normali e patologiche. Hematologica 18, 465, 1937.
192. O'Brien J. R., Jamieson S. A relationship between platelet volume and platelet number. Thromb. Diath. Haemor. 31, 363-365, 1974.
193. Μακρής ΠΕ. Ο όγκος των αιμοπεταλίων του ανθρώπου. Διδακτορική Διατριβή, Θεσσαλονίκη 1978.
194. Makris P. E., Louizou, C., Mandalaki T. Course Marathonienne: Influence sur le volume plaquettaire. V. Int. Cong. On Thromboembolism. Abs. book p.208, 1978.
195. Makris P. E., Pithara E., Iliadis I., Anastasopoulos A., Tsakiris D. A., Triandaphyllou A. Effects of noise pollution on haemostasis. XIIth Int. Cong. of ISTH, Tokyo, 19-25/08/1989.

196. Makris P. E., Louizou C., Kapoulas S., et al. Effects of prolonged sitting on the mechanism of haemostasis . The changes of VII: C and the cold activated FVII: C. *Throm. Haemost.* 53, 440-441, 1985.
197. White J. G. Platelet ultrastructure. In *Haemostasis and Thrombosis*, of Bloom A. L., and Thomas D. P., Churchill Livingstone, 2<sup>nd</sup> ed. p. 20-46, 1987.
- a. Bessis M (1973) op. cit.42.
198. Tullis J. L. Separation and purification of leukocytes and platelets. *Blood* 7, 891, 1952.
- a. Maupin B (1953c) op. cit 37.
- b. Maupin B. (1953d), op. cit 39.
199. Corash L., Tan H., Gralnick H. Heterogeneity of human whole blood platelet sub populations. I-Relationship between buoyant, density, cell volume, and ultrastructure. *Blood* 49, 71, 1977.
200. Mocchi N. Velocita di sedimentazione delle piastrine e suoi rapporti con le proteine plasmatiche. *Haematologica* 44, 229, 1959.
201. Mocchi N., Cascone A. Relazione tra velocita di trombocito-sedimentazione e velocita di eritrocito-sedimentazione. *Policlinico Sez Prat* 65, 298, 1958<sup>a</sup>.
202. Mocchi N., Cascone A. Comportamento della velocita di trombocito-sedimentazione nelle trombosi vasali. *Policlinico Sez Prat* 65, 80, 1958<sup>b</sup>.
203. Seaman C. V. F., Vassar R. S. Changes in the electrokinetic properties of platelets during their aggregation. *Arch. Biochim. Biophys.* 10, 117, 1966.
204. Ulutin O. N., Riddle J. M., Rebeck J.W. Platelet osmotic resistance test using the electron microscope. *New Istanbul Contr. Clin. Sci.* 6, 142, 1963.
205. Shattil S. J., and Cooper S. A. *Biochemistry* 15, 4832-4837, 1976.
206. Shattil S. J., Hoxie J. A., Cunningham M., and Brass L. F. Changes in the platelet membrane glycoprotein IIb-IIIa complex during platelet activation. *J. Biol. Chem.* 260, 11107-11114, 1985.
207. Shattil S. J. and Brass L. F. Induction of the fibrinogen receptor on human platelets by intracellular mediators. *J. Biol. Chem.* 262, 992-1000, 1987.
208. Jaffe E. A., Hoyer L. W., and Nachman R. L. Synthesis of antihemophilic factor antigen by cultured human endothelial cells. *J. Clin. Inv.* 52, 2757-2764, 1973.
209. Jaffe E. A., Hoyer L. W., and Nachman R. L. Synthesis of von Willebrand factor by cultured human endothelial cells. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 71, 1906-1909, 1974.

210. Jaffe E. A., Leung L. L. K., Nachman R. L., Levin R., and Mosher D. F. Thrombospondin is the endogenous lectin of human platelets. *Nature* 295, 246-248, 1982.
211. Jaffe E. A., Ruggeri J. M., Falcone D. J. Monocytes and macrophages synthesise and secrete Thrombospondin. *Blood* 65, 79-84, 1985.
212. Tandon N. N., Harmon J. T., Rodhard D., and Jamieson G. A. *J. Biol. Chem.* 258, 11840-11846, 1982.
213. Tandon N. N., Hoeg J. M., Jamieson G. A. Perfusion studies on the formation of mural thrombi with cholesterol-modified and hypercholesterolemic platelets. *J. Lab. Clin. Med.* 105, 157-163, 1985.
214. Brass L. F., and Joseph S. K. A role of inositol triphosphate in intra-cellular  $Ca^{2+}$  mobilisation and granule secretion in platelets. *J. Biol. Chem.* 260, 15172-15179, 1985.
215. Brass L. F., and Shattil S. J. Identification and function of the high affinity binding sites for  $Ca^{2+}$  on the surface of platelets. *J. Clin. Inv.* 73, 626-632, 1984.
216. Brass L. F., Laposata M., Banga H. S., and Rittenhouse S. E. Regulation of the phosphoinositide hydrolysis pathway in thrombin-stimulated platelets by a pertussis toxin-sensitive guanine nucleotide-binding protein. *J. Biol. Chem.* 261, 16838-16847, 1986.
217. Brass L. F., Shattil S. J., Kunicki T. J., and Bennett J. S. Effect of calcium on the stability of the platelet membrane glycoprotein IIb-IIIa complex. *J. Biol. Chem.* 260, 7875-7881, 1985.
218. Brass L. F.  $Ca^{++}$  transport across the platelet plasma membrane. A role for membrane glycoproteins IIb and IIIa. *J. Biol. Chem.* 260, 2231-2236, 1985.
- a. Behnke O., Pedersen N. T (1974), op. cit 18
219. Weiss H. J. Platelet mechanisms. In "Platelets pathophysiology and antiplatelet drug therapy", A. Liss, 2<sup>nd</sup> edit, p.4-6, 1983.
220. Weiss H. J. Platelet mechanisms. In "Platelets pathophysiology and antiplatelet drug therapy", A. Liss, 2<sup>nd</sup> edit, p.3-4, 1983.
221. Weiss H. J., Turitto V. T., and Baumgartner H. R. Role of shear rate and patients in promoting fibrin formation on rabbit sub endothelium. Studies utilising patients with quantitative and qualitative platelet defects. *J. Clin. Invest.* 78, 1072-1082, 1987.
222. Caen J. P. Aggregation (ed), Masson, Paris, 1971.

223. Caen J. P., Larrieu M. J., Samama M. L' hemostase. 2eme ed Paris, Expansion Scientifique Française, 1975.
224. Caen J. P. Physiology of platelet function. In main lectures book of ISH, 7<sup>th</sup> Meeting of Eur & Africa Div. Barcelona 4-9/09/1983, p. 29-41, 1983.
225. Caen J. P. Heparine. 1914-1984, 70 ans de mauvances. NRF d' Hem 26, 209-210, 1984.
226. Pepper D. S., and Jamieson G. A. Studies on glycoproteins. III. Isolation of sialylglycopeptides from human platelets membranes. *Biochemistry* 9, 3706-3713, 1970.
227. Bloom A. L., and Thomas D. P. Hemostasis and Thrombosis. Edinburgh, Churchill Livingstone, 1981, 1987.
228. Bloom A. L. Advances in inherited disorders of coagulation factor VIII. In main lectures book of ISH, 7<sup>th</sup> Meeting of Eur & Afric. Div. Barcelona 4-9/09/1983, p. 42-60, 1983.
229. Bloom J. W., and Mann K. G. Metal ion induced conformational transitions of prothrombin and prothrombin fragment 1. *Biochemistry* 17, 4430-4438, 1978.
230. Bloom J. W., Nesheim M. E., and Mann K. G. Phospholipid binding properties of bovine factor V and factor Va. *Biochemistry* 18, 4419, 1979.
231. Houslay M. D., Bojanic D., Gawler D., O' Hagan S., and Wilson A. Thrombin, unlike vasopressin, appears to stimulate two distinct guanine nucleotide regulatory proteins in human platelets. *Biochem J.*, 38, 109-113, 1986.
232. Miyamoto T., Ogino, N., Yamamoto, S., and Hayaishi, O. Purification of prostaglandine endoperoxide synthase from vesicular gland microsomes. *J. Biol. Chem.* 251, 2629, 1976.
233. van der Ouderaa, F. J., Buytenhek, M., Nugteren, D. M, and van Dorp., D. A. Purification and characterisation of prostaglandine endoperoxide synthetase from sheep vesicular glands. *Biochim. Biophys. Acta.* 487, 315, 1977.
234. Ogino, N., Ohki, S., Yamamoto, S., and Hayaishi, O., Prostaglandine endoperoxide synthetase from bovine vesicular gland microsomes. Inactivation and activation by heme and other metalloporphyrins, *J. Biol. Chem.* 253, 5061, 1978.
235. Ohki, S., Ogino, N., Yamamoto, S., and Hayaishi, O., Prostaglandine hydroperoxidase, an integral part of prostaglandin endoperoxide synthetase from vesicular gland microsomes. *J. Biol. Chem.*, 254, 829, 1979.

236. Ho, P. R. K., Towner, R. D. T., and Esterman, M. A., Purification and characterization of fatty acid cyclooxygenase from human platelets, *Prep. Biochem*, 10, 597, 1980.
237. Ueno, R., Shimizu, T., Kondo, K., and Hayaishi, O. Activation of prostaglandin endoperoxide synthetase by hemoproteins. *J. Biol. Chem.* 257, 5584, 1982.
238. Roth, G. J., Madruga, E. T., and Strittmatter, P., The heme-binding properties of prostaglandine synthetase from sheep vesicular gland. *J. Biol. Chem.* 256, 10018, 1981.
239. Kulmacz, R. J., and Lands, W. E. M., Prostaglandin H synthase. Stoichiometry of heme co-factor. *J. Biol. Chem.*, 259, 6358, 1984.
240. Nastainczyk, W., Schuhn, D., and Ullrich, V., Spectral intermediates of prostaglandine hydroperoxidase, *Eur. J. Biochem.*, 144, 381, 1984.
241. van der Ouderaa, F. J., Buytenhek, M., Slikkerveer, F. J., and van Drop, D. A. On the haemoprotein character of prostaglandin endoperoxide synthetase. *Biochim. Biophys. Acta*, 572, 29, 1979.
242. Egan, R. W., Gale, P. H., Baptista, E. M., Kennicott, K. L., Vandenheuvel, W. J. A., Walker, R. W., Fagerness, P. E., and Kuehl, F. A., Oxidation reactions by prostaglandin cyclooxygenase-hydroperoxidase, *J. Biol. Chem.*, 256, 7352, 1981.
243. Hemler, M E., and Lands, W. E. M., Evidence for a peroxide-initiated free radical mechanism for prostaglandin biosynthesis, *J. Biol. Chem.* 256, 7352, 1981.
244. Hemler, M. E., and Lands, W. E. M., Evidence for a peroxide-initiated free radical mechanism for prostaglandin biosynthesis, *J. Biol. Chem.*, 255, 6253, 1980.
245. Kulmacz, R. J., Miller, J. F., and Lands, W. E. M., PGH-synthase: a case of enzymic symbiosis, *Biochemistry*, 24, 3381, 1985.
246. Smith, W. L., and Lands, W. E. M. Oxygenation of polyunsaturated fatty acids during prostaglandin biosynthesis by sheep vesicular gland, *Biochemistry*, 11, 3276, 1972.
247. Egan, R. W., Paxton, J., and Kuehl, F. Mechanism for irreversible self-deactivation of prostaglandine synthase, *J. Biol. Chem.*, 521, 7329, 1976.
248. Hemler, M. E., and Lands, W. E. M., Evidence for a peroxide-initiated free radical mechanism of prostaglandine biosynthesis, *J. Biol. Chem.*, 255, 6253, 1980.
249. Kulmacz, R. J., and Lands, W. E. M., Quantitative similarities in the several actions of cyanide on prostaglandine H-synthase, *Prostaglandins*, 29, 175, 1985.
250. Tappel, A. L., Boyer, P. D., and Lundberg, W. O., The reaction mechanism of soy bean lipoxidase, *J. Biol. Chem.* 199, 267, 1952.



251. Samuelsson, B., Granström, E., Green, K., Hamberg, M., and Hammarström, S., Prostaglandins, *Ann. Rev. Biochem.*, 44, 669, 1975.
252. Hamberg, M., and Samuelsson, B., On the specificity of the oxygenation of unsaturated fatty acids catalysed by soybean lipoxidase, *J. Biol. Chem.*, 242, 5329, 1967.
253. Rahimtula, A., and O'Brien, P. J., The possible involvement of singlet oxygen in prostaglandine biosynthesis, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 70, 893, 1976.
254. Cadenas, E., Sies, H., Nastainczyk, W., and Ullrich, V., Singlet oxygen formation detected by low level chemiluminescence during enzymatic reduction of prostaglandin G<sub>2</sub> to H<sub>2</sub>. *Hoppe Seylers Z. Physiol. Chem.* 364, 519, 1983.
255. Cadenas, E., Brigelius, R., Akerblom, T., and Sies, H., Oxygen radicals and hydroperoxides in mammalian organs: aspects of redox cycling and hydrogen peroxide metabolism, in *Biological Oxidations*, Sund, H and Ullrich, V., eds., Springer-Verlag, Berlin, 1983, 288.
256. Marnett, L. J., Wlodawer, P., and Samuelsson, B., Co-oxygenation of organic substrates by the prostaglandine synthase of sheep vesicular gland, *J. Biol. Chem.*, 250, 8510, 1975.
257. Yoshimoto, T., Yamamoto, Sugioka, K., Nakano, M., Takyu, C., Yanigishi, A., and Inaba, H., Studies on the tryptophan-dependent light emission by prostaglandin hydroperoxide reaction, *J. Biol. Chem.* 255, 10199, 1980.
258. Baumann, J., and Wurm, G., Studies on the possible involvement of singlet oxygen and superoxide anion radicals in the cyclo-oxygenase reaction. *Prostagl. Leukotr. Med.*, 14, 139, 1984.
259. Griffiths, J., Chu, K. Y., and Hawkins, C., Photosensitised oxidation of 1-naphthols, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, 1976, 676, 1976.
260. Nastainczyk, W., Ullrich, V., Cadenas, E., and Sies, H., Mechanism of arachidonic acid-stimulated singlet oxygen formation by prostaglandin-endoperoxide synthase, in *Oxygen Radicals in Chemistry and Biology*, Bors, W., Saran, M., and Tait, D., eds. Walter de Gruyter, Berlin, 1984, 441.
261. Lands, W. E. M., Biological consequences of fatty acid oxygenase reaction mechanisms, *Prostagl. Leukotr. Med.*, 12, 35, 1984.

262. Panganamala, R. V., Brownlee, N. R., Sprecher, H., and Cornwell, D. G., Evaluation of superoxide anion and singlet oxygen in the biosynthesis of prostaglandins from eicosa-8, 11, 14-trienoic acid. *Prostaglandins*, 7, 21, 1974.
263. O'Brien, P. J., and Hulett, A. L., Hydroxyl radical involvement in the luminol chemiluminescence from the reaction of arachidonic acid with sheep vesicular gland microsomes. *Prostaglandins*, 19, 683, 1980.
264. Shiga, T., and Imaizumi, K., Electron spin resonance study on peroxidase- and oxidase-reactions of horseradish peroxidase and methemoglobin, *Arch. Biochem. Biophys.*, 167, 469, 1975.
265. Holmes, T. J., John, V., Vennerstrom, J., Kulmacz, R. J., and Lands, W. E. M., Stimulation of cyclooxygenase activity of prostaglandine-H-synthesis by salicylate-derived quinhydrone, *Prostaglandins*, 28, 711, 1984.
266. Kalyanaraman, B., Mason, R. P., Tainer, B., and Eling, T. E., The free radical formed during the hydroperoxide-mediated deactivation of ram seminal vesicles is hemoproteins-derived. *J. Biol. Chem.* 257, 4764, 1982.
267. Lands, W. E. M., Kulmacz, R. J., and Marshall, P. J., Lipid peroxide actions in the regulation of prostaglandin biosynthesis, in *Free Radicals in Biology*, Vol. 6, Pryor, W. A., Ed. Academic Press, New York, 1984, 39.
268. Kulmacz, R. J., and Lands, W. E. M., Requirements for hydroperoxides by the cyclooxygenase or peroxidase activities of prostaglandine H synthase, *Prostaglandins*, 25, 531, 1983.
269. Hemler, M. E., Graff, G., and Lands, W. E. M., Accelerative autoactivation of prostaglandine biosynthesis by PGG<sub>2</sub>, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 85, 1325, 1978.
270. Lands, W. E. M., Lee, R., and Smith, W., Factors regulating the biosynthesis of various prostaglandins, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 180, 107, 1971.
271. Kulmacz et al, op. cit. 14.
272. Hanel, A. M., and Lands, W. E. M., Modification of anti-inflammatory drug effectiveness by ambient lipid peroxides. *Biochem. Pharmacol.*, 31, 3307, 1982.
273. Marnett, L. J., Weller, P., Markly, C., and Alward, A., Peroxide synthesis and metabolism by prostaglandine H synthase, *Biochemistry*, 24, 3372, 1985.
274. Hemler, M. E., Cook, H. W., and Lands, W. E. M., Prostaglandin biosynthesis can be triggered by lipid peroxides, *Arch. Biochem. Biophys.*, 193, 340, 1979.

275. Saunders, B. C., Holmes, A. G., Siedke, A., and Stark, B. P., Peroxidases, Butterworths, Reading, Mass., 1964, 1.
276. Saunders, B. C., Peroxidases and catalases, in *Inorganic Biochemistry*, Eichorn, G. L., ed. vol. 2, Elsevier, New York, 1973, 988.
277. Cook, H. W., and Lands, W. E. M., Mechanism of suppression of cellular biosynthesis of prostaglandins, *Nature (London)*, 260, 630, 1976.
278. Lands, W. E. M., Cook, H. W., and Rome, L. H., Prostaglandins biosynthesis: consequences of oxygenase mechanism upon in vitro assays of drug effectiveness, in *Advances of Prostaglandin and Thromboxane Research*, Vol. 1, Samuelsson, B., and Paoletti, R., eds., Raven Press, New York, 1976, 07.
279. Panganamala, R. V., Sharma, H. M., Sprecher, H., Geer, J. C., and Cornwell, D. G., A suggested role of hydrogen peroxide in the biosynthesis of prostaglandins, *Prostaglandins*, 8, 3, 1974.
280. Mead, J.F., Free radical mechanisms in lipid peroxidation and prostaglandins., in *Free Radicals in Molecular Biology, Aging and Disease*, vol 27, Armstrong, D., Sohal, R. S., Cutler, R. G., and Slater, T. F., eds, Raven Press, New York, 1984, 53.
281. Marshall, P. J., Role of active oxygen in the formation of lipid peroxides, in *Prostaglandins, Leukotrienes, and cancer*, vol. 1, Lands, W. E. M., ed., Martinus Nijhoff, Boston, 1985, 95.
282. Frankel, E. N., Chemistry of free radical and singlet oxidation of lipids., *Prog. Lipid. Res.*, 23, 197, 1985.
283. Nugteren, D. H., Kalyanaraman, B., Tainer, B. E., and Eling, T. E., The enzymic conversion of all cis-8,11,14,-eicisatrienoic acid into prostaglandin E., *Recl. Trav. Chim. Pays Bas Belg.* 85, 405, 1966.
284. Mason, R. P., Kalyanaraman, B., Tainer, B. E., and Eling, T. E., A carbon-centered free radical intermediated in the prostaglandin synthase oxidation of arachidonic acid. Spin trapping and oxygen uptake studies. *J. Biol. Chem.*, 255, 5019, 1980.
285. Hamberg, M., and Samuelsson, B., Stereochemistry in the formation of 9-hydroxy-10, 12-octadecadienoic acid and 13-hydroxy, 9, 11-octadecadienoic acid from linoleic acid by fatty acid cyclooxygenase., *Biochim. Biophys. Acta.*, 617, 545, 1980.
286. Hamberg, M , and Hamberg, G., On the mechanism of oxygenation of arachidonic acid by human platelet lipoyxygenase., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 95, 1090, 1980.

287. Aust, S. D., and Svingen, B.A., The role of iron in enzymatic lipid peroxidation, in *Free Radicals in Biology*, Pryor, W. A., ed., vol. 5, Academic Press, New York, 1982, 1.
288. Porter, N. A., Wolf, R. A., Pagels, W. R., and Marnett, L. J., A test for the intermediacy of 11-hydroperoxyeicosa-5,8,12,14-tetraenoic acid (11-HPETE), in prostaglandin biosynthesis, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 92, 349, 1980.
289. Mason, R., P. Free-radical intermediates in the metabolism of toxic chemicals, in *Free Radicals in Biology*, vol.5, Pryor, W. A., ed. Academic Press, New York, 1982,161.
290. O'Brien, P J., and Rahimtula, A. D., The possible involvement of a peroxidase in prostaglandin biosynthesis., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 70, 832, 1976.
291. Panganamala, R. V., Sharma, H. M., Heikkila, R. E., Geer, R. E., and Cornwell, D. G., Role of hydroxyl radicals scavengers dimethyl sulfoxide, alcohols and methional in the inhibition of prostaglandin biosynthesis., *Prostaglandins*, 11, 599, 11976.
292. O'Brien, P. J and Rahimtula, A. D., Mechanisms of oxygen activation involved in the prostaglandin synthetase mechanism, *Adv. Prostagl. Thrombox. Res.* 6, 145, 1980.
293. Egan, R. W., Gale, P. H., and Kuehl, F. A., Reduction of hydroperoxides in the prostaglandin biosynthetic pathway by a microsomal peroxidase., *J. Biol. Chem.*, 254, 3295, 1979.
294. Ogino., N., Yamamoto, S., Hayaishi, O., and Tokuayama, T., Isolation of an activator for prostaglandin hydroperoxidase from bovine vesicular gland cytosol and its identification as uric acid. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 87, 184, 1979.
295. Eling, T., Curtis, J. F., Harman, L. S., and Mason, R. P., Oxidation of glutathione to its thiyl free radical metabolite by prostaglandin synthase. A potential endogenous substrate for the hydroperoxidase., *J. Biol. Chem.*, 261, 5023, 1986.
296. Marnett, L. J., Bienkowski, M. J., Leithauser, M., Pagels, W. R., Panthananickel, A., and Reed, G. A., Prostaglandin synthetase-dependent cooxygenations., in *Prostaglandins and Cancer*, vol.2., Proc. 1<sup>st</sup> Int. Conf. of Prostaglandins and Cancer., Powles, T. J., Bockman, R. S., Honn, K. V., and Ramwell, P. Eds. Alan R. Liss, New York, 1982, 97.
297. Marnett, L. J., Wlodawer, P., and Samuelsson, B., Light emission during the action of prostaglandin synthetase., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 60, 1286, 1974.
298. Dietz., R., Schuhn, D., and Nastainczyk, E., Formation of singlet oxygen by prostaglandin synthetase., *Hoppe Seylers Z. Physiol. Chem.*, 365, 978, 1984.

299. Kuehl, F. A., Humes, J. L., Ham, E. A., Egan, R. W., and Dougherty, H. W., Inflammation: The role of peroxidase-derived products., *Adv. Prostagl. Thrombox. Res.*, 6, 77, 1980.
300. Yamazaki, I., Peroxidase, in *Molecular Mechanisms of Oxygen Activation*, Hayaishi, O., ed., Academic Press, New York, 1974, 535.
301. Cadenas, E., Sies, H., Graf, H., and Ullrich, V., Oxene donors yield low-level chemiluminescence with microsomes and isolated P-450, *Eur. J. Biochem.* 130, 117, 1983.
302. Harborne JB (1986) Nature, distribution, and function of plant flavonoids, in *Plant Flavonoids in Biology and Medicine: Biochemical, Pharmacological, and Structure-Activity Relationships* (Cody V, Middleton E Jr and Harborne JB eds) pp.15–24, Alan R. Liss, Inc., New York.
303. Harborne JB (1988a) *The Flavonoids: Advances in Research Since 1986*. Chapman & Hall, New York.
304. Harborne JB (1988b) Flavonoids in the environment: Structure-activity relationships, in *Plant Flavonoids in Biology and Medicine II: Biochemical, Cellular and Medicinal Properties* (Cody V, Middleton E, Harborne JB and Beretz A eds) pp17–28, Alan R. Liss, Inc: New York.
305. Harborne JB, Mabry TJ and Mabry H (1975) *The Flavonoids*. Academic Press, New York.
306. Brouillard R and Cheminant A (1988) Flavonoids and plant color, in *Plant Flavonoids in Biology and Medicine: Biochemical, Cellular and Medicinal Properties* (Cody V, Middleton E and Harborne JB eds) pp 93–106, Alan R. Liss, Inc., New York.
307. Timberlake CF and Henry BS (1986) Plant pigments as natural food colours. *Endeavour* **10**:31–36.
308. Kefford JF and Chandler BV, eds (1970) *The Chemical Constituents of Citrus Fruits*. Academic Press, New York.
309. Herrmann K (1976) Flavonols and flavones in food plants: A review. *J Food Technol* **11**:433–448.
310. Bilyk A and Sapers GM (1985) Distribution of quercetin and kaempferol in lettuce, kale, chive, garlic chive, leek, horseradish, red radish, and red cabbage tissues. *J Agric Food Chem* **33**:226–228.

311. Hertog MGL, Feskens EJM, Hollman PCH, Katan MB and Kromhout D (1993a) Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: The Zutphen elderly study. *Lancet* **342**:1007–1011.
312. Hertog MGL, Hollman PCH and Katan MB (1992) Content of potentially anticarcinogenic flavonoids of 28 vegetables and 9 fruits commonly consumed in the Netherlands. *J Agric Food Chem* **40**:2379–2383
313. Hertog MGL, Hollman PCH, Katan MB and Kromhout D (1993b) Intake of potentially anticarcinogenic flavonoids and their determinants in adults in the Netherlands. *Nutr Cancer* **20**:21–29.
314. Hertog MGL, Kromhout D, Aravanis C, Blackburn H, Buzina R, Fidanza F, Giampaoli S, Jansen A, Menotti A, Nedeljkovic S, Pekkarinen M, Simic BS, Toshima H, Feskens E, Hollman PCH and Katan MB (1995) Flavonoid intake and long-term risk of coronary heart disease and cancer in the seven countries study. *Arch Intern Med* **155**:381–386.
315. (α) Rice-Evans CA and Miller NJ (1998) Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and isoflavonoids, in *Flavonoids in Health and Disease* (Rice-Evans CA and Packer L eds) pp 199–238, Marcell Dekker, Inc., New York.
316. (β) Rice-Evans CA and Packer L, eds (1998) *Flavonoids in Health and Disease*. Marcel Dekker, Inc., New York.
317. Kušhnau J (1976) The flavonoids: A class of semi-essential food components: Their role in human nutrition. *World Rev Nutr Diet* **24**:117–191.
318. Hollman PC and Katan MB (1998a) Bioavailability and health effects of dietary flavonols in man. *Arch Toxicol Suppl* **20**:237–248.
319. Hollman PC, van der Gaag M, Mengelers MJ, van Trup JM, de Vries JH and Katan MB (1996) Absorption and disposition kinetics of the dietary antioxidant quercetin in man. *Free Radical Biol Med* **21**:703–707.
320. Hollman PC, van Tripp J, Buysman MN, van der Gaag MS, Mengelers MJ, de Vries JH and Katan MB (1995) Relative bioavailability of the antioxidant flavonoids quercetin from various foods in man. *FEBS Lett* **418**:152–156.
321. Hollman PCH and Katan MB (1998b) Absorption, metabolism, and bioavailability of flavonoids, in *Flavonoids in Health and Disease* (Rice-Evans CA and Paker L eds) pp 483–522, Marcel Dekker, Inc., New York.

322. Swain T (1975) Evolution of flavonoid compounds, in *The Flavonoids* (Harborne JB, Mabry TJ and Mabry H eds) pp 109–1129, Chapman and Hall, Ltd., London.
323. Eckberg WR and Perotti ME (1983) Inhibition of gamete membrane fusion in the sea urchin by quercetin. *Biol Bull* **164**:62–70.
324. Nass-Arden L and Breitbart H (1990) Modulation of mammalian sperm motility by quercetin. *Mol Reprod Dev* **25**:369–373.
325. McClure JW (1975) Physiology and functions of flavonoids, in *The Flavonoids* (Harborne JB, Mabry TJ and Mabry H eds) pp 970–1055, Academic Press, New York.
326. McClure JW (1986) Physiology of flavonoids in plants, in *Plant Flavonoids in Biology and Medicine: Biochemical, Pharmacological, and Structure-Activity Relationships* (Cody V, Middleton E and Harborne JB eds) pp 77–85, Alan R. Liss, Inc., New York.
327. Smith DA and Banks SW (1986) Formation and biological properties of isoflavonoid phytoalexins, in *Plant Flavonoids in Biology and Medicine: Biochemical, Pharmacological, and Structure-Activity Relationships* (Cody V, Middleton E and Harborne JB eds) pp 113–124, Alan R. Liss, Inc., New York.
328. Firmin JL, Wilson KE, Rossen L and Johnston AWB (1986) Flavonoid activation of nodulation genes in *Rhizobium* reversed by other compounds present in plants. *Nature (London)* **324**:90–92.
329. Peters NK, Frost JW and Long SR (1986) A plant flavone, luteolin, induces expression of *Rhizobium meliloti* nodulation genes. *Science (Wash DC)* **233**:978–980.
330. Djordjevic MA, Redmond JW, Batley M and Rolfe BG (1987) Clovers secrete specific phenolic compounds which either stimulate or repress nod gene expression in *Rhizobium trifolii*. *EMBO J* **6**:1173–1179.
331. Zaat SAJ, Wijffelman CA, Spaink HP, VanBrussel AAM, Okker RJH and Lugtenberg BJJ (1987) Induction of the nodA promoter of *Rhizobium leguminosarum* symbiosome pRLJI by plant flavanones and flavones. *J Bacteriol* **169**:198–204.
332. Gabor M (1979) Anti-inflammatory substances of plant origin, in *Handbook of Experimental Pharmacology: Anti-Inflammatory Drugs* (Vane JR and Ferreira SH eds) pp 698–739, Springer-Verlag, New York.
333. Gabor M (1986) *The Pharmacology of Benzopyrone Derivatives and Related Compounds*, Akademiai Kiad, Budapest.

334. Gabor M and Razga Z (1991) Effect of benzopyrone derivatives on simultaneously induced croton oil ear edema and carrageenan paw edema in rats. *Acta Physiol Hung* **77**:197–207.
335. Havsteen B (1984) Flavonoids: A class of natural products of high pharmacological potency. *Biochem Pharmacol* **32**:1141–1148.
336. Cody V, Middleton E and Harborne JB, eds (1986) *Plant Flavonoids in Biology and Medicine: Biochemical, Pharmacological, and Structure-Activity Relationships*. Alan R. Liss, Inc., New York.
337. Cody V, Middleton E, Harborne JB and Beretz A, eds (1988) *Plant Flavonoids in Biology and Medicine II: Biochemical, Cellular and Medicinal Properties*. Alan R. Liss, Inc., New York.
338. Farkas L, Gabor M and Kallay F (1986) in *Flavonoids and Bioflavonoids*, Akademiai Kiado, Budapest.
339. Selway JWT (1986) Antiviral activity of flavones and flavans, in *Plant Flavonoids in Biology and Medicine: Biochemical, Pharmacological, and Structure-Activity Relationships* (Cody V, Middleton E and Harborne JB eds) pp 521–536, Alan R. Liss, Inc., New York.
340. Cody V, Middleton E, Harborne JB and Beretz A, eds (1988) *Plant Flavonoids in Biology and Medicine II: Biochemical, Cellular and Medicinal Properties*. Alan R. Liss, Inc., New York.
341. Welton AR, Hurley I and Will P (1988) Flavonoids and arachidonic acid metabolism, in *Plant Flavonoids in Biology and Medicine II: Biochemical, Cellular and Medicinal Properties* (Cody V, Middleton E, Harborne JB and Beretz A eds) pp 301–312, Alan R. Liss, Inc., New York.
342. Das A, Wang JH and Lien EJ (1994) Carcinogenicity, mutagenicity and cancer preventing activities of flavonoids: A structure-system-activity relationship (SSAR) analysis. *Prog Drug Res* **42**:133–166.
343. Das M, Khan WA, Asokan P, Bickers DR and Mukhtar H (1987a) Inhibition of polycyclic aromatic hydrocarbon-DNA adduct formation in epidermis and lung of SENCAR mice by naturally occurring plant phenols. *Cancer Res* **47**:767–773.
344. Das M, Mukhtar H, Bik DP and Bickers DR (1987b) Inhibition of epidermal xenobiotic metabolism in SENCAR mice by naturally occurring plant phenols. *Cancer Res* **47**:760–766.



345. Middleton E and Kandaswami C (1992) Effects of flavonoids on immune and inflammatory cell function. *Biochem Pharmacol* **43**:1167–1179.
346. Middleton E and Kandaswami C (1993) The impact of plant flavonoids on mammalian biology: Implications for immunity, inflammation and cancer, in *The Flavonoids: Advances in Research Since 1986* (Harborne IR ed) pp 619–645, Chapman and Hall, London.
347. Carroll KK, Guthrie N, So FV and Chambers AF (1998) Anticancer properties of flavonoids, with emphasis on citrus flavonoids, in *Flavonoids in Health and Disease* (Rice-Evans CA and Packer L eds) pp 437–446, Marcel Dekker Inc., New York.
- (10). Hertog MGL, Feskens EJM, Hollman PCH, Katan MB and Kromhout D (1993a) Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: The Zutphen elderly study. *Lancet* **342**:1007–1011.
  - (11). Hertog MGL, Hollman PCH and Katan MB (1992) Content of potentially anticarcinogenic flavonoids of 28 vegetables and 9 fruits commonly consumed in the Netherlands. *J Agric Food Chem* **40**:2379–2383.
  - (12). Hertog MGL, Hollman PCH, Katan MB and Kromhout D (1993b) Intake of potentially anticarcinogenic flavonoids and their determinants in adults in the Netherlands. *Nutr Cancer* **20**:21–29.
  - (13). Hertog MGL, Kromhout D, Aravanis C, Blackburn H, Buzina R, Fidanza F, Giampaoli S, Jansen A, Menotti A, Nedeljkovic S, Pekkarinen M, Simic BS, Toshima H, Feskens E, Hollman PCH and Katan MB (1995) Flavonoid intake and long-term risk of coronary heart disease and cancer in the seven countries study. *Arch Intern Med* **155**:381–386.
348. Hughes RE and Wilson HK (1977) Flavonoids: Some physiological and nutritional consideration. *Prog Med Chem* **14**:285–301.
349. Torel J, Cillard J and Cillard P (1986) Antioxidant activity of flavonoids and reactivity with peroxy radical. *Phytochemistry* **25**:383–385.
350. Clemetson CAB (1980) Histamine and ascorbic acid in human blood. *J Nutr* **110**:662–668.
351. Clemetson CAB (1989) Bioflavonoids, in *Vitamin C* (Clemetson CAB ed) pp 101–128, CRC Press, Inc., Boca Raton, FL.

352. Clemetson CAB and Anderson L (1966) Plant polyphenols as antioxidants for ascorbic acid. *Ann NY Acad Sci* **136**:341–376.
353. Kandaswami C and Middleton E (1994) Free radical scavenging and antioxidant activity of plant flavonoids, in *Free Radicals in Diagnostic Medicine* (Armstrong D ed) pp 351–376, Plenum Press, New York.
354. Kandaswami C and Middleton E (1995) Flavonoids as antioxidants, in *Natural Antioxidants: Chemistry, Health Effects and Applications* (Shahidi F ed) pp 174–203, AOCS Press, Champaign, IL.
355. Lewis DA (1989) *Anti-Inflammatory Drugs from Plant and Marine Sources*. Birkhauser Verlag, Basel, Switzerland.
356. Miner RW (1955) Bioflavonoids and the capillary. *Ann NY Acad Sci* **61**:637–736.
- Miniscalco A, Lundahl J, Regardh CG, Edgar B and Eriksson UG (1992) Inhibition of dihydropyridine metabolism in rat and human liver microsomes by flavonoids found in grapefruit juice. *J Pharmacol Exp Ther* **261**:1195–1199.
357. Schoenkerman BB and Justice RS (1952) Treatment of allergic disease with a combination of antihistamine and flavonoid. *Ann Allergy* **10**:138–141.
358. Scarborough H and Bacharach AL (1949) Vitamin P, in *Vitamins and Hormones: Advances in Research and Applications* (Harris RS and Thimann KV eds) pp 1–55, Academic Press, New York.
- Kühnau J (1976) The flavonoids: A class of semi-essential food components: Their role in human nutrition. *World Rev Nutr Diet* **24**:117–191.
359. Aeschbacher H-U, Meier H and Ruch E (1982) Nonmutagenicity *in vivo* of the food flavonol quercetin. *Nutr Cancer* **4**:90–98.
360. Keung WM and Vallee BL (1993) Daidzin and daidzein suppress free-choice ethanol intake by Syrian golden hamsters. *Proc Natl Acad Sci USA* **90**:10008–10012.
361. Keung WM and Vallee BL (1994) Therapeutic lessons from traditional Oriental medicine to contemporary Occidental pharmacology, in *Toward a Molecular Basis of Alcohol Use and Abuse* (Jansson B, Jdrnvall H, Rydberg U, Terenius L and Vallee BL eds) pp 371–381, Birkhauser Verlag, Basel, Switzerland.
362. Pautler EL, Maga JA and Tengerdy C (1986) A pharmacologically potent natural product in the bovine retina. *Exp Eye Res* **42**:285–288.
363. Kleinjnen J and Knipschild P (1992) *Ginkgo biloba*. *Lancet* **340**:1136–1139.
364. Hahlbrock και Scheel 1989 (63).

365. (Logemann et al, 1995 (64)).
366. McCrea και Levy, 1983 (65) Τσάκος.
367. Li και συν. 1993 (66)
368. Nishizuka Y (1986) Studies and perspective of protein kinase C. *Science (Wash DC)* **233**:305–312.
369. Nishizuka Y (1988) The molecular heterogeneity of protein kinase C and its implications for cellular regulation. *Nature (London)* **334**:661–665.
370. Nishizuka Y (1995) Protein kinase and lipid signaling for sustained cellular responses. *FASEB J* **9**:484–496.
371. Graziani Y and Chayoth R (1979) Regulation of cyclic AMP level and synthesis of DNA, RNA and protein by quercetin in Ehrlich Ascites tumor cells. *Biochem Pharmacol* **28**:397–403.
372. Graziani Y, Chayoth R, Karny N, Feldman B and Levy J (1981) Regulation of protein kinase activity by quercetin in Ehrlich Ascites tumor cells. *Biochim Biophys Acta* **714**:415–421.
373. Graziani Y, Erikson E and Erikson RL (1983) The effect of quercetin on the phosphorylation activity of the Rous sarcoma virus transforming gene product *in vitro* and *in vivo*. *Eur J Biochem* **135**:583–589.
374. Graziani Y, Winikoff J and Chayoth R (1977) Regulation of cyclic AMP level and lactic acid production in Ehrlich ascites tumor cells. *Biochim Biophys Acta* **497**: 499–506.
375. Gschwendt M, Horn F, Kittstein W and Marks F (1983) Inhibition of the calcium and phospholipid-dependent protein kinase activity from mouse brain cytosol by quercetin. *Biochem Biophys Res Commun* **117**:444–447.
376. End DW, Look RA, Shaffer NL, Balles EA and Persico FJ (1987) Non-selective inhibition of mammalian protein kinases by flavonoids *in vitro*. *Res Commun Chem Pathol Pharm* **56**:75–86.
377. Hagiwara M, Inoue S, Tanaka T, Nunoki K, Ito M and Hidaka H (1988) Differential effects of flavonoids as inhibitors of tyrosine protein kinases and serine/threonine protein kinases. *Biochem Pharmacol* **37**:2987–299.
378. Ferriola PC, Cody V and Middleton E (1989) Protein kinase C inhibition by plant flavonoids, kinetic mechanism and structure-activity relationships. *Biochem Pharmacol* **38**:1617–1624.

379. Picq M, Dubois M, Munari-Silem Y, Prigent A-F and Pacheco H (1989) Flavonoid modulation of protein kinase C activation. *Life Sci* **44**:1563–1571.
380. Alexandrakis M, Singh L, Boucher W, Letourneau R, Theoflopoulos P and Theoharides TC (1999) Differential effects of flavonoids on inhibition of secretion and on accumulation of secretory granules in rat basophilic leukemia cells. *Int J Immunopharmacol* **21**:379–390.
381. Rogers JC and Williams DL (1989) Kaempferol inhibits myosin light chain kinase. *Biochem Biophys Res Commun* **164**:419–425.
382. Jinsart W, Ternal B and Polya GM (1991) Inhibition of wheat embryo calciumdependentprotein kinase and avian myosin light chain kinase by flavonoids and related compounds. *Biol Chem Hoppe-Seyler* **372**:819–827.
383. Jinsart W, Ternai B and Polya GM (1992) Inhibition of rat liver cyclic AMPdependent protein kinase by flavonoids. *Biol Chem Hoppe-Seyler* **373**:205–211.
384. Huang C-K (1989) Protein kinases in neutrophils: A review. *Membr Biochem* **8**:61–79.
385. Taniguchi S, Fujiki H, Kobayashi H, Go H, Miyado K, Sadano H and Shimokawa R (1992) Effect of (2)-epigallocatechin gallate, the main constituent of green tea, on lung metastasis with mouse B16 melanoma cell lines. *Cancer Lett* **65**:51–54.
386. Taniguchi T, Miyazaki T, Minami Y, Kawahara A, Fujii H, Nakagawa Y, Hatakeyama M and Liu ZJ (1995) IL-2 signaling involves recruitment and activation of multiple protein tyrosine kinases by the IL-2 receptor. *Ann NY Acad Sci* **766**:235–244.
387. Qian D and Weiss A (1997) T cell antigen receptor signal transduction. *Curr Opin Cell Biol* **9**:205–212.
388. Akiyama T, Ishida J, Nakagawa S, Ogawara H, Watanabe S, Itch N, Shibuya M and Fukami Y (1987) Genistein, a specific inhibitor of tyrosine-specific protein kinases. *J Biol Chem* **262**:5592–5595.
389. Friedman DL, Kleiman NJ and Campbell FE (1985) Nuclear protein phosphorylation in isolated nuclei from HeLa cells. Evidence that <sup>32</sup>P incorporation from [<sup>32</sup>P] GTP is catalyzed by nuclear kinase II. *Biochim Biophys Acta* **847**:165–176.
390. Kyriakidis SN, Sotiroudis TG and Evangelopoulos AE (1986) Interaction of flavonoids with rabbit muscle phosphorylase kinase. *Biochim Biophys Acta* **871**:121–129.

391. Cochet C, Feige JJ, Porollet F, Kerimidias M and Chambaz EM (1982) Selective inhibition of a cyclic nucleotide independent protein kinase (G type casein kinase) by quercetin and related polyphenols. *Biochem Pharmacol* **31**:1357–1361.
392. Srivastava AK (1985) Inhibition of phosphorylase kinase, and tyrosine protein kinase activities by quercetin. *Biochem Biophys Res Commun* **131**:1–5.
393. Kakeya H, Imoto M, Tabata Y, Iwami J, Matsumoto H, Nakamura K, Koyano T, Tadano K and Umezawa K (1993) Isolation of a novel substrate-competitive tyrosine kinase inhibitor, desmal, from the plant *Desmos chinensis*. *FEBS Lett* **320**:169–172.
394. Michelson S, Tardy-Panit M and Banu O (1985) Catalytic properties of a human cytomegalovirus-induced protein kinase. *Eur J Biochem* **149**:393–399.
395. Nishio K, Miura K, Ohira T, Heike Y and Saijo N (1994) Genistein, a tyrosine kinase inhibitor, decreased the affinity of p56lck to b-chain of interleukin-2 receptor in human natural killer (NK)-rich cells and decreased NK-mediated cytotoxicity. *Proc Soc Exp Biol Med* **207**:227–233.
396. Kusaka M and Sperelakis N (1995) Inhibition of L-type calcium current by genistein. A tyrosine kinase inhibitor, in pregnant rat myometrial cells. *Biochim Biophys Acta* **1240**:196–200.
397. Kusaka M and Sperelakis N (1996) Genistein inhibition of fast Na<sup>+</sup> current in uterine leiomyosarcoma cells is independent of tyrosine kinase inhibition. *Biochim Biophys Acta* **1278**:1–4.
398. Theoharides TC, Patra P, Boucher W, Letourneau R, Kempuraj D, Chiang G, Jeudy S, Hesse L and Athanasiou A (2000) Chondroitin sulfate inhibits connective tissue mast cells. *Br J Pharmacol*, in press.
399. Wang L, Correia I, Basu S and Theoharides TC (1999) Calcium and phorbol ester effect on the mast cell phosphoprotein induced by cromolyn. *Eur J Pharmacol* **371**:241–249.
400. Pruzanski W and Vadas P (1991) Phospholipase A<sub>2</sub>—A mediator between proximal and distal effectors of inflammation. *Immunol Today* **12**:143–144.
401. Lee T-P, Matteliano ML and Middleton E (1982) Effect of quercetin on human polymorphonuclear leukocyte lysosomal enzyme release and phospholipid metabolism. *Life Sci* **31**:2765–2774.

402. Lanni C and Becker EL (1985) Inhibition of neutrophil phospholipase A2 by p-bromophenylacetyl bromide, nordihydroguaiaretic acid, 5,8,11,14-eicosatetraenoic acid and quercetin. *Int Arch Allergy Appl Immunol* **76**:214–217.
403. Gil B, Sanz MJ, Terencio M, Ferrandiz ML, Bustos G, Paya M, Gunasegaran R and Alcaraz MJ (1994) Effects of flavonoids on *Naja naja* and human recombinant synovial phospholipase A2 and inflammatory responses in mice. *Life Sci* **54**: PL333–PL338.
404. Cockcroft S (1982) Phosphatidylinositol metabolism in mast cells and neutrophils. *Cell Calcium* **3**:337–349.
405. Lewis RA and Austen KF (1984) The biologically active leukotrienes: Biosynthesis, metabolism, receptors, functions and pharmacology. *J Clin Invest* **73**:889–897.
406. Yamamoto S, Yoshimoto T, Furukawa M, Horie T and Watanabe-Kohno S (1984) Arachidonate S-lipoxygenase and its new inhibitors. *J Allergy Clin Immunol* **74**:349–352.
407. Furukawa M, Yoshimoto T, Ochi K and Yamamoto S (1984) Studies on arachidonate 5-lipoxygenase of rat basophilic leukemia cells. *Biochim Biophys Acta* **795**:458–465.
408. Hoult JRS, Moroney MA and Paya M (1994) Actions of flavonoids and coumarins on lipoxygenase and cyclooxygenase. *Methods Enzymol* **234**:443–454.
409. Loughton MJ, Evans PJ, Moroney MA, Hoult JR and Halliwell B (1991) Inhibition of mammalian 5-lipoxygenase and cyclo-oxygenase by flavonoids and phenolic dietary additives. Relationship to antioxidant activity and to iron ion-reducing ability. *Biochem Pharmacol* **42**:1673–1681.
410. Wheeler EL and Berry DL (1986) *In vitro* inhibition of mouse epidermal cell lipoxygenase by flavonoids: Structure-activity relationships. *Carcinogenesis* **7**:33–36.
411. Sekiya K and Okuda H (1982) Selective inhibition of platelet lipoxygenase by baicalein. *Biochem Biophys Res Commun* **105**:1090–1095.
412. Reddy GR, Ueda N, Hada T, Sackeyflo AC, Yamamoto S, Hano Y, Aida M and Nlomura T (1991) A prenylflavone, artonin E, as arachidonate 5-lipoxygenase inhibitor. *Biochem Pharmacol* **41**:115–118.
413. Moroney M-A, Alcaraz MJ, Forder RA, Carey F and Hoult JRS (1988) 1. Selectivity of neutrophil 5-lipoxygenase and cyclo-oxygenase inhibition by an anti-inflammatory flavonoid glycoside and related aglycone flavonoids. *Pharm Pharmacol* **40**:787–792.

414. Kalkbrenner F, Wurm G and von Bruchhausen F (1992) *In vitro* inhibition and stimulation of purified prostaglandin endoperoxide synthase by flavonoids: Structure-activity relationship. *Pharmacology* **44**:1–12.
415. Swies J, Robak J, Dabrowski L, Duniec Z, Michalska Z and Gryglewski RJ (1984) Antiaggregatory effects of flavonoids *in vivo* and their influence on lipoxygenase and cyclooxygenase *in vitro*. *Pol J Pharmacol Pharm* **36**:455–463.
416. Baumann J, von Bruchhausen VF and Wurm G (1980a) Flavonoids and related compounds as inhibitors of arachidonic acid peroxidation. *Prostaglandins* **20**:627–639.
417. Landolfi R, Nower RL and Steiner M (1984) Modification of platelet function and arachidonic acid metabolism by bioflavonoids. Structure-activity relationships. *Biochem Pharmacol* **33**:1525–1530.
418. Fiebrich F and Koch H (1979) Silymarin, an inhibitor of prostaglandin synthetase. *Experientia* **35**:1550–1552.
419. Ferrandiz ML, Ramachandran Nair AG and Alcaraz MJ (1990) Effect of flavonoids from Spanish and Indian medicinal herbs on arachidonate metabolism in rat peritoneal leukocytes. *Pharmazie* **45**:444–445.
420. Butenko IG, Gladchenko SV and Galushko SV (1993) Anti-inflammatory properties and inhibition of leukotriene C<sub>4</sub> biosynthesis *in vitro* by flavonoid baicalein from *Scutellaria baicalensis* Georgy roots. *Agents Actions* **39**:C49–51.
421. Rao GH, Radha E and White JG (1985) Irreversible platelet aggregation does not depend on lipoxygenase metabolites. *Biochem Biophys Res Commun* **131**:50–57.
422. Nakadate T, Aizu E, Yamamoto S, Fujiki H, Sugimura T and Kato R (1985b) Inhibition of teleocidin-caused epidermal ornithine decarboxylase induction by phospholipase A<sub>2</sub>-, cyclooxygenase- and lipoxygenase-inhibitors. *Japan J Pharmacol* **37**:253–258.
423. Aizu E, Nakadate T, Yamamoto S and Kato R (1986) Inhibition of 11-Otetradecanoylphorbol-13-acetate-mediated epidermal ornithine decarboxylase induction and skin tumor promotion by new lipoxygenase inhibitors lacking protein kinase C inhibitory effects. *Carcinogenesis* **7**:1809–1812.

424. Das NP and Ratty AK (1986) Effects of flavonoids on induced non-enzymic lipid peroxidation, in *Plant Flavonoids in Biology and Medicine: Biochemical, Pharmacological, and Structure-Activity Relationships* (Cody V, Middleton E and Harborne JB eds) pp 243–248. Alan R. Liss, Inc., New York.
425. Merlos M, Sanchez RM, Camarasa I and Adzet T (1991) Flavonoids as inhibitors of rat liver cytosolic glutathione S-transferase. *Experientia* **47**:616–619.
426. Dipple A, Michejda CJ and Weisburger EK (1985) Metabolism of chemical carcinogens. *Pharmacol Ther* **27**:265–296.
427. Alworth WL, Dang CC, Ching LM and Viswanathan T (1980) Stimulation of mammalian epoxide hydrase activity by flavones. *Xenobiotica* **10**:395–400.
428. Hendrickson HP, Sahafayen M, Bell MA, Kaufman AD, Hadwiger ME and Lunte CE (1994) Relationship of flavonoid oxidation potential and effect on rat hepatic microsomal metabolism of benzene and phenol. *J Pharm Biomed Anal*
429. Lowenstein CJ and Snyder SH (1992) Nitric oxide, a novel biologic messenger. *Cell* **70**:705–707
430. Nathan C (1992) Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *FASEB J* **6**:3051–3064.
431. Moncada S and Higgs A (1993) The L-arginine-nitric oxide pathway. *N Engl J Med* **329**:2002–2012.
432. Dong Z, Qi X, Xie K and Fidler IJ (1993) Protein tyrosine kinase inhibitors decrease induction of Nitric oxide synthase activity in lipopolysaccharide-responsive and lipopolysaccharide non responsive murine macrophages. *J Immunol* **151**:2717–2724.
433. Feinstein DL, Galea E and Reis DJ (1994) Suppression of glial iNOS expression by tyrosine kinase inhibitors. *Ann NY Acad Sci* **738**:325–328.
434. Soliman KF and Mazzio EA (1998) *In vitro* attenuation of nitric oxide production in C6 astrocyte cell culture by various dietary compounds. *Proc Exp Biol Med* **218**:390–397.
435. Chiesi M and Schwaller R (1995) Inhibition of constitutive endothelial NO-synthase activity by tannin and quercetin. *Biochem Pharmacol* **14**:495–501.
436. Gugler R, Leschik M and Dengler HJ (1975) Disposition of quercetin after single oral and intravenous doses. *Eur J Clin Pharmacol* **9**:229–234.



437. Manach C, Morand C, Crespy V, Demigne C, Texier O, Regeat F and Remesy C (1998) Quercetin is recovered in human plasma as conjugated derivatives which retain antioxidant properties. *FEBS Lett* **24**:331–336.
438. Thull U and Testa B (1994) Screening of unsubstituted cyclic compounds as inhibitors of monoamine oxidase. *Biochem Pharmacol* **47**:2307–2310.
439. Clark WG and Geissman TA (1949) Potentiation of epinephrine effects by flavonoid compounds. *Nature (London)* **163**:36–37.
440. Gugler R and Dengler HJ (1973) Inhibition of human liver catechol-O-methyltransferase by flavonoids. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* **276**:223–233.
441. Borchardt TT and Huber JA (1975) Catechol-O-methyltransferase. 5. Structure activity relationships for inhibition by flavonoids. *J Med Chem* **18**:120–122.
442. Chimura H, Sawa T, Kumada Y, Naganawa H, Natsuzaki M, Takita T, Hamada M, Takeuchi T and Umezawa H (1975) New isoflavones, inhibiting catechol-O-methyltransferase, produced by streptomyces. *J Antibiot* **28**:619–626.
443. Bindoli A, Cavallini L and Siliprandi N (1977) Inhibitory action of silymarin on lipid peroxide formation in rat liver mitochondria and microsomes. *Biochem Pharmacol* **26**:2405–2409.
444. Hayashi T, Sawa K, Kawasaki M, Arisawa M, Shlmizu M and Morita N (1988) Inhibition of cow's milk xanthine oxidase by flavonoids. *J Nat Prod* **51**:345–348.
445. Iio M, Ono Y, Kai S and Fukumoto M (1986) Effects of flavonoids on xanthine oxidation as well as on cytochrome C reduction by milk xanthine oxidase. *J Nutr Sci Vitaminol* **32**:635–642.
446. Chang WS, Lee YJ, Lu FJ and Chiang HC (1993) Inhibitory effects of flavonoids on xanthine oxidase. *Anticancer Res* **13**:2165–2170
447. Halliwell B and Gutteridge JM (1990) Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: An overview. *Methods Enzymol* **186**:1–85.
448. Halliwell B and Gutteridge JMC (1985) *Free Radicals in Biology and Medicine*, Oxford, New York.
449. Halliwell B, Gutteridge JMC and Cross CE (1992) Free radicals, antioxidants, and human disease: Where are we now? *J Lab Clin Med* **119**:598–620.

450. Rodney G, Swanson AL, Wheeler LM, Smith GN and Worrel CS (1950) The effect of a series of flavonoids on hyaluronidase and some other related enzymes. *J Biol Chem* **183**:739–747
451. Kuppusamy UR, Khoo HE and Das NP (1990) Structure-activity studies of flavonoids as inhibitors of hyaluronidase. *Biochem Pharmacol* **40**:397–401.
452. Meloni F, Ballabio P, Gorrini M, De Amici M, Marena C, Malandrino S and Luisetti M (1995) Effects of 39-hydroxyfarrerol (1dB 1031), a novel flavonoid agent, on phagocyte products. *Inflammation* **19**:689–699.
453. Nose K (1984) Inhibition by flavonoids of RNA synthesis in permeable WI-38 cells and of transcription by RNA polymerase II. *Biochem Pharmacol* **33**:3823–3827.
454. Ono K and Nakane H (1990) Mechanisms of inhibition of various cellular DNA and RNA polymerases by several flavonoids. *J Biochem* **108**:609–613.
455. Ono K, Nakane H, Fukushima M, Chermann J-C and Barre-Sinoussi F (1990) Differential inhibitory effects of various flavonoids on the activities of reverse transcriptase and cellular DNA and RNA polymerases. *Eur J Biochem* **190**:469–476
456. Keung WM (1993) Biochemical studies of a new class of alcohol dehydrogenase inhibitors from *Radix puerariae*. *Alcohol Clin Exp Res* **17**:1254–1260
457. Keung WM and Vallee BL (1993) Daidzin and daidzein suppress free-choice ethanol intake by Syrian golden hamsters. *Proc Natl Acad Sci USA* **90**:10008–10012.
458. Keung WM and Vallee BL (1994) Therapeutic lessons from traditional Oriental medicine to contemporary Occidental pharmacology, in *Toward a Molecular Basis of Alcohol Use and Abuse* (Jansson B, Jdrnvall H, Rydberg U, Terenius L and Vallee BL eds) pp 371–381, Birkhauser Verlag, Basel, Switzerland.
459. Lee PS, Shimizu K, Rossi TM and Cumella JC (1988) Selectivity of quercetin inhibition on stimulated amylase release in rat pancreatic acini. *Pancreas* **3**:17–23.
460. Martin GJ, Graff M, Brendel R and Beiler JM (1949) *Arch Biochem* **21**:177.
461. Pfister JR, Wymann WE, Schuler ME and Roszkowski AP (1980) Inhibition of histamine-induced gastric secretion by flavone-6-carboxylic acid. *J Med Chem* **23**:335–338.
462. Parmar NS and Hennings G (1984) The gastric antisecretory activity of 3-methoxy-5,7,3949-tetrahydroxyflavan (ME)—A specific histidine decarboxylase inhibitor in rats. *Agents Actions* **15**:143–145.

463. Parmar NS, Hennings G and Gulati OP (1984) Histidine decarboxylase inhibition: A novel approach towards the development of an effective and safe gastric anti-ulcer drug. *Agents Actions* **15**:494–499.
464. Parmar NS (1983) The gastric anti-ulcer activity of naringenin, a specific histidine decarboxylase inhibitor. *Int J Tissue React* **4**:415–420
465. Umezawa H, Tobe H, Shibamoto N, Nakamura F, Nakamura K, Matsuzaki M and Takeuchi T (1975). Isolation of isoflavones inhibiting DOPA decarboxylase from fungi and streptomyces. *J Antibiot (Tokyo)* **28**:947–952.
466. Hunter T (1995) Protein kinases and phosphatases: The yin and yang of protein phosphorylation and signaling. *Cell* **80**:225–236.
467. Weber G, Shen F, Prajda N, Yang H, Li W, Yeh A, Csokay B, Olah E and Look KY (1997), Regulation of the signal transduction program by drugs. *Adv Enzyme Regul* **37**:35–55.
468. Gomez J, Gonzalez A, Martinez AC and Rebello A (1998) IL-2-induced cellular events. *Crit Rev Immunol* **18**:185–220.
469. Packer L, Saliou C, Droy-Lejaix MT and Christen Y (1998) *Ginkgo biloba* extract EGb761: Biological actions, antioxidant activity, and regulation of nitric oxide synthase, in *Flavonoids in Health and Disease* (Rice-Evans CA and Packer L eds) pp 303–341, Marcel Dekker, Inc., New York.
470. Rudd CE (1990) CD4, CD8 and the TCR-CD3 complex: A novel class of proteintyrosine kinase receptor. *Immunol Today* **11**:400–406.
471. Fisher EH, Charbonneau H and Tonks NK (1991) Protein tyrosine phosphatases: A diverse family of intracellular and transmembrane enzymes. *Science (Wash DC)* **253**:401–406.
472. Geahlen RL, Koonchanok NM and McLaughlin JL (1989) Inhibition of proteintyrosine kinase activity by flavonoids and related compounds. *J Nat Prod* **52**:982 – 986.
473. Van Wart-Hood JE, Linder ME and Burr JG (1989) TPCK and quercetin act synergistically with vanadate to increase protein-tyrosine phosphorylation in avian cells. *Oncogene* **4**:1267–1271.
474. Samelson LE, Patel MD, Weissman AM, Harford JB and Klausner RD (1986) Antigen activation of murine T cells Induces tyrosine phosphorylation of a polypeptide associated with the T cell antigen receptor. *Cell* **46**:1083–1090.

475. Patel MD, Samelson LE and Klausner RD (1987) Multiple kinases and signaltransduction: Phosphorylation of the T cell antigen receptor complex. *J Biol Chem.* **262**:5831–5838.
476. Trevillyan JM, Lu Y, Atluru D, Phillips CA and Bjorndahl JM (1990) Differential inhibition of T cell receptor signal transduction and early activation events by a selective inhibitor of protein-tyrosine kinase. *J Immunol* **145**:3223–3230.
477. Koretzky GA, Picus I, Thomas ML and Weiss A (1990) Tyrosine phosphatase CD45 is essential for coupling T-cell antigen receptor to the phosphatidyl inositol pathway. *Nature (London)* **346**:66–63.
478. Ledbetter JA, Schieven GL, Uckun GM and Imboden JB (1991) CD45 cross-linking regulates phospholipase C activation and tyrosine phosphorylation of specific substrates in CD3/Ti stimulated T cells. *J Immunol* **146**:1577–1583.
479. Akiyama T, Ishida J, Nakagawa S, Ogawara H, Watanabe S, Itch N, Shibuya M and Fukami Y (1987) Genistein, a specific inhibitor of tyrosine-specific protein kinases. *J Biol Chem* **262**:5592–5595.
480. Stanley JB, Gorczynski R, Huang C-K, Love J and Mills GB (1990) Tyrosine phosphorylation is an obligatory event in IL-2 secretion. *J Immunol* **145**:2189–2198.
481. Rao P, Kitamura T, Miyajima A and Mufson RA (1995) Human IL-3 receptorsignaling: Rapid induction of phosphatidylcholine hydrolysis is independent of protein kinase C but dependent on tyrosine phosphorylation in transfected NIH 3T3 cells. *J Immunol* **154**:1664–1674.
482. Atluru D, Jackson TM and Atluru S (1991) Genistein, a selective protein tyrosine kinase inhibitor, inhibits interleukin-2 and leukotriene B4 production from human mononuclear cells. *Clin Immunol Immunopathol* **59**:379–387.
483. Atluru S and Atluru D (1991) Evidence that genistein, a protein-tyrosine kinase inhibitor, inhibits CD 28 monoclonal-antibody-stimulated human T cell proliferation. *Transplantation* **51**:448–450.
484. Namgoong SY, Son KH, Chang HW, Kang SS and Kim HP (1993) Effects of naturally occurring flavonoids on mitogen-induced lymphocyte proliferation and mixed lymphocyte culture. *Life Sci* **54**:313–320.

485. Dibirdik I, Langlie M-C, Ledbetter JA, Tuel-Ahlgren L, Obuz V, Waddick KG, Gaji-Peczaiska K and Schieven GL and Uckun FM (1991) Engagement of interleukin-7 receptor stimulates tyrosine phosphorylation, phosphoinositide turnover, and clonal proliferation of human T-lineage acute lymphoblastic leukemia cells. *Blood* **78**:564–570.
486. Koretzky GA, Picus I, Thomas ML and Weiss A (1990) Tyrosine phosphatase CD45 is essential for coupling T-cell antigen receptor to the phosphatidyl inositol pathway. *Nature (London)* **346**:66–63.
487. Ledbetter JA, Schieven GL, Uckun GM and Imboden JB (1991) CD45 cross-linking regulates phospholipase C activation and tyrosine phosphorylation of specific substrates in CD3/Ti stimulated T cells. *J Immunol* **146**:1577–1583.
488. Turka LA, Linsley PS, Paine R, Schieven GL, Thompson CB and Ledbetter JA (1991). Signal transduction via CD4, CD8 and CD28 in mature and immature thymocytes. Implications for thymic selection. *J Immunol* **146**:1428–1436.
489. Haas A, Heller I and Presek P (1986) Detection of a tyrosine kinase in human sera and blood cells by pp60src antiserum. *Biochem Biophys Res Commun* **135**:426–434.
490. Glossmann H, Presek P and Eigenbrodt E (1981) Quercetin inhibits tyrosine phosphorylation by the cyclic nucleotide-independent, transforming protein kinase, pp60src. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* **217**:100–102.
491. Levy J, Teuerstein I, Marbach M, Radian S and Sharon Y (1984) Tyrosine protein kinase activity in the DMBA-induced rat mammary tumor: Inhibition by quercetin. *Biochem Biophys Res Commun* **123**:1227–1233.
492. Berridge MJ and Irvine RF (1984) Inositol trisphosphate, a novel second messenger in cellular signal transduction. *Nature (London)* **312**:315–321.
493. Berridge MJ and Irvine RF (1989) Inositol phosphates and cell signaling. *Nature (London)* **341**:197–205.
494. Bradford P (1998) Receptor structures and signal transduction, in *Allergy: Principles and Practice* (Middleton E, Reed CE, Ellis EF, Adkinson NF, Yunginger JW and Busse WW eds) Mosby, St. Louis.
495. Nishioka H, Imoto M, Sawa T, Hamada M, Naganawa H, Takeuchi T and Umezawa K (1989) Screening of phosphatidylinositol kinase inhibitors from streptomyces. *J Antibiot (Tokyo)* **42**:823–825.

496. Imoto M, Yamashita Y, Sawa T, Kurasawa S, Naganawa H, Takeuchi T, Bao-quan Z and Umezawa K (1988) Inhibition of cellular phosphatidylinositol turnover by c-tectorigenin. *FEBS Lett* **230**:43–46.
497. Patel MD, Samelson LE and Klausner RD (1987) Multiple kinases and signaltransduction: Phosphorylation of the T cell antigen receptor complex. *J Biol Chem* **262**:5831–5838
498. Bagmasco M, Nunes J, Lopez M, Lipcey C, Mawas C and Olive D (1989) Transmembrane signaling via both CD3 and CD2 human T cell surface molecules involves protein kinase C translocation. *Res Clin Lab* **19**:221–229.
499. June CH, Fletcher MC, Ledbetter JA and Samelson LE (1990a) Increases in tyrosine phosphorylation are detectable before phospholipase C activation after T cell receptor stimulation. *J Immunol* **144**:1591–1599.
500. June CH, Fletcher MC, Ledbetter JA, Schieven GL, Siegel JN, Phillips AF and Samelson LE (1990b) Inhibition of tyrosine phosphorylation prevents T-cell receptor-mediated signal transduction. *Proc Natl Acad Sci USA* **87**:7722–7726
501. Mustelin T, Coggeshall KM, Isakow N and Altman A (1990) T cell antigen receptor mediated activation of phospholipase C requires tyrosine phosphorylation. *Science (Wash DC)* **247**:1584–1587.
502. Nishibe S, Wahl MI, Hernandez-Sotomayor SMT, Tonks NK, Rhee SG and Carpenter G (1990) Increase of the catalytic activity of phospholipase C-g1 by tyrosine phosphorylation. *Science (Wash DC)* **250**:1253–1256.
503. Uckun FM, Schieven GL, Dibirdik I, Chandan-Langlie M, Tuel-Ahigren L and Ledbetter JA (1991b) Stimulation of protein tyrosine phosphorylation, phosphoinositide turnover, and multiple previously unidentified serine/threonine-specific protein kinases by the pan-B-cell receptor CD40/Bp50 at discrete developmental stages of human B-cell ontogeny. *J Biol Chem* **266**:17478–17485.
504. Granja C, Lin L-L, Yunis EJ, Relias V and Dasgupta JD (1991) PLC-g 1, a possible mediator of T cell receptor function. *J Biol Chem* **266**:16277–16280.
504. Traganos F, Ardelt B, Halko M, Bruno S and Darzynkiewicz Z (1992) Effects of genistein on the growth and cell cycle progression of normal human lymphocytes and human leukemic MOLT-4 and HL-60 cells. *Cancer Res* **52**:6200–6208.

505. Luton F, Buferne M, Davoust J, Scmitt-Verhulst A-M and Boyer C (1994) Evidence for protein tyrosine kinase involvement in ligand-induced TCR/CD3 internalization and surface redistribution. *J Immunol* **153**:63–72.
506. Eischen CM, Dick CJ and Leibson PJ (1994) Tyrosine kinase activation provides an early and requisite signal for Fas-induced apoptosis. *J Immunol* **153**:1947–1954.
507. Huang HC, Hsieh LM, Chen HW, Lin YS and Chen JS (1994a) Effects of baicalein and esculetin on transduction signals and growth factors expression in T-lymphoid leukemia cells. *Eur J Pharmacol* **268**:73–78.
508. Geahlen RL, Koonchanok NM and McLaughlin JL (1989) Inhibition of proteintyrosine kinase activity by flavonoids and related compounds. *J Nat Prod* **52**:982–986.
509. Ogawara H, Akiyama T, Watanabe S-I, Ito N, Kobori M and Seoda Y (1989) Inhibition of tyrosine protein kinase activity by synthetic isoflavones and flavones. *J. Antibiot (Tokyo)* **42**:340–343.
510. Cushman M, Nagarathnam D, Burg DL and Geahlen RL (1991) Synthesis and protein-tyrosine kinase inhibitory activities of flavonoid analogues. *J Med Chem.* **34**:798–806.
511. Gupta S, Kim CH, Tsuruo T and Gollapudi S (1992) Preferential expression and activity of multidrug resistance gene 1 product (P-glycoprotein), a functionally active efflux pump, in human CD81 T cells: A role in cytotoxic effector function. *J Clin Immunol* **12**:451–458.
512. Mookerjee BK, Lee T-P, Lippes HA and Middleton E (1986) Some effects of flavonoids on lymphocyte proliferative responses. *J Immunopharmacol* **8**:371–392.
513. Hume DA, Weldemann MJ and Ferber E (1979) Preferential inhibition by quercetin of mitogen-stimulated thymocyte glucose transport. *J Natl Cancer Inst* **62**:1243–1246.
514. Salter DW, Custead-Jones S and Cook JS (1978) Quercetin inhibits hexose transport in a human diploid fibroblast. *J Membr Biol* **40**:67–76.
515. Jung G, Hennings G, Pfeifer M and Bessler WG (1983) Interaction of metal complexing compounds with lymphocytes and lymphoid cell lines. *Mol Pharmacol.* **23**:698–702.

516. Okada F, Hosokawa M, Hasegawa J, Ishikawa M, Chiba I, Nakamura Y and Kobayashi H (1990) Regression mechanisms of mouse fibrosarcoma cells after *in vitro* exposure to quercetin: Diminution of tumorigenicity with a corresponding decrease in the production of prostaglandin E2. *Cancer Immunol Immunother.* **31**:358–364.
517. Baum CG, Szabo P, Siskind GW, Becker CG, Firpo A, Clarick CJ and Francus T (1990) Cellular control of IgE induction by a polyphenol-rich compound, preferential activation of Th2 cells. *J Immunol* **145**:779–784.
518. Francus T, Siskind GW and Becker CG (1983) Role of antigen structure in the regulation of IgE isotype expression. *Proc Natl Acad Sci USA* **80**:3430–3434
519. Schwartz A and Middleton E (1984) Comparison of the effects of quercetin with those of other flavonoids on the generation and effector function of cytotoxic T lymphocytes. *Immunopharmacology* **7**:115–126.
520. Schwartz A, Sutton SL and Middleton E (1982) Quercetin inhibition of the induction and function of cytotoxic T lymphocytes. *Immunopharmacology* **4**:125–138.
521. Yamada H, Nagai T, Takemoto N, Endoh H, Kiyohara H, Kawamura H and Otsuka Y (1989) Plantagoside, a novel  $\alpha$ -mannosidase inhibitor isolated from the seeds of *Plantago asiatica*, suppresses immune response. *Biochem Biophys Res Commun* **165**:1292–1298.
522. Hino M, Nakayama O, Tsurimi Y, Adachi K, Shibata T, Terano H, Kohsaka M, Aoki H and Imanaka H (1985) Studies of an immunomodulator, swainsonine. 1. Enhancement of immune response by swainsonine *in vitro*. *J Antibiot (Tokyo)* **7**:926–933.
523. Kino T, Inamura N, Nakahara K, Kiyoto S, Goto T, Terano H, Kohsaka M, Aoki H and Imanaka H (1985) Studies of an immunomodulator, swainsonine. II. Effect of swainsonine on mouse immunodeficient system and experimental murine tumor. *J Antibiot (Tokyo)* **7**:936–940.
524. Li SY, Teh BS, Seow WK, Li F and Thong YH (1990) Effects of the plant flavonoid baohuosid-1 on cancer cells *in vitro*. *Cancer Lett* **53**:175–181.
525. Li SY, Teh BS, Seow WK, Liu YL and Thong YH (1991) *In vitro* immunopharmacological profile of the plant flavonoid baohuoside-1. *Int J Immunopharmacol* **13**:129–134.



526. Takeuchi M, Fujiki H and Nitta K (1986) Cell-mediated immune response in mice during the two-step carcinogenesis experiment by 7,12 dimethylbenz[a]anthracene and 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate. *Jpn J Exp Med* **56**:131–134.
527. Yasukawa K, Takido M, Takeuchi M, Sato Y, Nitta K and Nakagawa S (1990) Inhibitory effects of flavonol glycosides on 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate-induced tumor promotion. *Chem Pharm Bull* **38**:774–776.
528. Gerritsen ME, Carley WW, Ranges GE, Shen C-P, Phan SA, Ligon GF and Perry CA (1995) Flavonoids inhibit cytokine-induced endothelial cell adhesion protein gene expression. *Am J Pathol* **147**:278–292.
529. Lang I, Deak GY, Nekam K, Muzes GY, Gonzalez-Cabello R, Gergely P and Feher J (1988) Hepatoprotective and immunomodulatory effects of antioxidant therapy. *Acta Med Hung* **45**:287–295.
530. Feher J, Lang I, Deak G, Cornides A, Nekam K and Gergely P (1986) Free radicals in tissue damage in liver diseases and therapeutic approach. *Tokai J Exp Clin Med* **11**:121–134.
531. McCabe MJ and Orrenius S (1993) Genistein induces apoptosis in immature human thymocytes by inhibiting topoisomerase-II. *Biochem Biophys Res Commun* **194**: 944–950.
532. Campbell M-A and Sefton CM (1990) Protein tyrosine phosphorylation is induced in murine B lymphocytes in response to stimulation with anti-immunoglobulin. *EMBO J* **9**:2125–2131.
533. Gold MR, Law DA and DeFranco AL (1990) Stimulation of protein tyrosine phosphorylation by the B-lymphocyte antigen receptor. *Nature (London)* **345**:810–813.
534. Lane PJJ, Ledbetter JA, McConnell FN, Draves K, Deans J, Schieven GL and Clark EA (1991) The role of tyrosine phosphorylation in signal transduction through surface Ig in human B cells: Inhibition of tyrosine phosphorylation prevents intracellular calcium release. *J Immunol* **146**:715–722.
535. Yamanashi Y, Kakiuchi T, Milizuguchi J, Yamamoto T and Toyoshima K (1991). Association of B cell antigen receptor with protein tyrosine kinase Lyn. *Science (Wash DC)* **251**:192–194.

536. Fuleihan R, Spertini R, Geha RS and Chatila T (1992) Role of protein kinase activation in the induction of B cell adhesion by MHC class II ligands. *J Immunol* **149**:1853–1858.
537. Cambier JC, Morrison DC, Chien MM and Lehmann KR (1991) Modeling of T cell contact-dependent B cell activation. IL-4 and antigen receptor ligation primes quiescent B cells to mobilize calcium in response to Ia cross-linking. *J Immunol* **146**:2075–2082.
538. Carter RH, Park DJ, Rhee SG and Fearon DT (1991a) Tyrosine phosphorylation of phospholipase C induced by membrane immunoglobulin in B lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* **88**:2745–2749.
539. Cumella JC, Faden H and Middleton E (1987) Selective activity of plant flavonoids on neutrophil chemiluminescence (CL). *J Allergy Clin Immunol* **77**:131.
540. Uckun FM, Dibirdik I, Smith R, Tuel-Ahigren L, Chandan-Langlie M, Schieven GL, Waddick KG, Hanson M and Ledbetter JA (1991a) Interleukin 7 receptor ligation stimulates tyrosine phosphorylation, inositol phospholipid turnover, and clonal proliferation of human B-cell precursors. *Proc Natl Acad Sci USA* **88**:6323–6327.
541. Carter RH, Park DJ, Rhee SG and Fearon DT (1991a) Tyrosine phosphorylation of phospholipase C induced by membrane immunoglobulin in B lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* **88**:2745–2749.
542. Lane PJ, McConnell FM, Schieven GL, Clark EA and Ledbetter JA (1990) The role of class II molecules in human B cell activation. Association with phosphatidyl inositol turnover, protein tyrosine phosphorylation, and proliferation. *J Immunol* **144**:3684–3692.
543. Daibata M, Mellinghoff I, Takagi S, Humphreys RE and Sairenji T (1991) Effect of genistein, a tyrosine kinase inhibitor, on latent EBV activation induced by crosslinkage of membrane IgG in Akata B cells. *J Immunol* **147**:292–297.
544. Okamoto H, Yoshida D and Mizusaki S (1983) Inhibition of 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate-induced induction in Epstein-Barr virus early antigen in Raji cells. *Cancer Lett* **19**:47–53.
545. Polke CR, Lowenthal JW, Roth SA, Rohwer P, MacDonald HR and Kalden JR (1986) Phorbol ester enhances both interleukin 2 receptor expression and immunoglobulin secretion in human Epstein-Barr virus-immortalized B cells. *Eur J Immunol* **16**:146–150.

546. Trevillyan JM, Lu Y, Atluru D, Phillips CA and Bjorndahl JM (1990) Differential inhibition of T cell receptor signal transduction and early activation events by a selective inhibitor of protein-tyrosine kinase. *J Immunol* **145**:3223–3230.
547. Kuruvilla A, Putcha G, Poulos E and Shearer WT (1993) Tyrosine phosphorylation of phospholipase C concomitant with its activation by platelet-activating factor in a human B cell line. *J Immunol* **151**:637–648.
548. Hornung RL, Back TC, Zaharko DS, Urba WJ, Longo DL and Wiltrott RH (1988a) Augmentation of natural killer activity, induction of IFN and development of tumor immunity during the successful treatment of established murine renal cancer using flavone acetic acid and JL-2. *J Immunol* **141**:3671–3679.
549. Hornung RL, Young HA, Urba WJ and Wiltrott RH (1988b) Immunomodulation of natural killer cell activity by flavone acetic acid: Occurrence via induction of interferon alpha/beta. *J Natl Cancer Inst* **80**:1226–1231.
550. Mace KF, Hornung RL, Wiltrott RH and Young HA (1990) Correlation between *in vivo* induction of cytokine gene expression by flavone acetic acid and strict dosedependency and therapeutic efficacy against murine renal cancer. *Cancer Res* **50**:1742–1747.
551. Mahadevan V, Malik STA, Meager A, Fiers W, Lewis GP and Hart IR (1990) Role of tumor necrosis factor in flavone acetic acid-induced tumor vasculature shutdown. *Cancer Res* **50**:5537–5542.
552. Pratesi G, Rodolfo M, Rovetta G and Parmiani G (1990) Role of T cells and tumour necrosis factor in antitumour activity and toxicity of flavone acetic acid. *Eur J Cancer* **26**:1079–1083.
553. Wleklík M, Zahorska R and Luczak M (1987) Interferon-inducing activity of flavonoids. *Acta Microbiol Pol* **36**:151–154.
554. Verma AK, Johnson JA, Gould MN and Tanner MA (1988) Inhibition of 7,12-dimethylbenz[a]anthracene and N-nitrosomethylurea-induced rat mammary cancer by dietary flavonol quercetin. *Cancer Res* **48**:5754–5758.
555. Selway JWT (1986) Antiviral activity of flavones and flavans, in *Plant Flavonoids in Biology and Medicine: Biochemical, Pharmacological, and Structure-Activity Relationships* (Cody V, Middleton E and Harborne JB eds) pp 521–536, Alan R. Liss, Inc., New York.

556. Steele TA and Brahmī Z (1988) Phosphatidylinositol metabolism accompanies early activation events in tumor target cell-stimulated human natural killer cells. *Cell Immunol* **112**:402–413.
557. Ng J, Fredholm BB and Jondal M (1987) Studies on the calcium dependence of human cell killing. *Biochem Pharmacol* **36**:3943–3949.
558. Kallistratos et al, 1984.
559. Gali SJ (1993) New concepts about the mast cell. *N Engl J Med* **328**:257–265.
560. Theoharides TC (1996) Mast cell: A neuroimmunoendocrine master player. *Int J Tissue React* **18**:1–21.
561. Lemanske RF and Kaliner M (1988) Late-phase IgE-mediated reactions. *J Clin Immunol* **8**:1–13.
562. Grant JA and Li H (1998) Biology of Basophils, in *Allergy: Principles and Practice* (Middleton E, Reed CE, Ellis EF, Adkinson NF, Yunginger JW and Busse WW eds) pp 65–79, Mosby, St. Louis.
563. Gali SJ (1993) New concepts about the mast cell. *N Engl J Med* **328**:257–265.
564. Nagai H, Osuga K and Koda A (1975) Inhibition of hypersensitivity reactions by soluble derivatives of baicalein. *Jpn J Pharmacol* **25**:763–772
565. Nagai S, Kitani S, Hirai K, Takaishi T, Nakajima K, Kihara H, Nonomura Y, Ito K and Morita Y (1995) Pharmacological study of stem-cell-factor-induced mast cell histamine release with kinase inhibitors. *Biochem Biophys Res Commun* **208**:576–581.
566. Moss JN, Beiler JM and Martin GJ (1950) Inhibition of anaphylaxis in guinea pigs by D-catechin. *Science (Wash DC)* **112**:16.
567. Dorsch W, Bittinger M, Keas A, Muller A, Kreher B and Wagner H (1992) Antiasthmatic effects of *Galphimia glauca*, gallic acid, and related compounds prevent allergen and platelet-activating factor-induced bronchial obstruction as well as bronchial hyperreactivity in guinea pigs. *Int Arch Allergy Immunol* **97**:1–7.
568. Lecomte J (1975) Propriétés pharmacologiques générales de la silybine et de la silymarine chez le rat. *Arch Int Pharmacodyn* **214**:165–176.
569. Gali SJ (1993) New concepts about the mast cell. *N Engl J Med* **328**:257–265.
570. Middleton E (1986) The role of hydrogen peroxide in basophil histamine release and the effect of selected flavonoids. *Allergy Clin Immunol* **78**:321–328.
571. Fewtrell CMS and Gomperts BD (1977b) Quercetin: A novel inhibitor of Ca<sup>2+</sup> influx and exocytosis in rat peritoneal mast cells. *Biochim Biophys Acta* **469**:52–60.

572. Fewtrell CMS and Gomperts BD (1977a) Effect of flavone inhibitors of transport ATPases on histamine secretion from rat mast cells. *Nature (London)* **265**:635–636.
573. Bennett JP, Gomperts BD and Wollenweber E (1981) Inhibitory effects of natural flavonoids on secretion from mast cells and neutrophils. *Arzneim-Forsch Drug Res* **31**:433–437.
574. Grossman N (1988) Inhibitory effects of phloretin on histamine release from isolated rat mast cells. *Agents Actions* **25**:284–290.
575. Middleton E, Drzewiecki G and Krishnarao D (1981) Quercetin: An inhibitor of antigen-induced human basophil histamine release. *J Immunol* **127**:546–550.
576. Middleton E and Drzewiecki G (1982) Effect of flavonoids and transitional metal cations on antigen-induced histamine release from human basophils. *Biochem Pharmacol* **31**:1449–1453.
577. Middleton E and Drzewiecki G (1984) Flavonoid inhibition of human basophil histamine release stimulated by various agents. *Biochem Pharmacol* **33**:3333–3338.
578. Mookerjee BK, Lee T-P, Lippes HA and Middleton E (1986) Some effects of flavonoids on lymphocyte proliferative responses. *J Immunopharmacol* **8**:371–392.
579. Smith, W. L., and Lands, W. E. M., Oxygenation of polyunsaturated fatty acids during prostaglandin biosynthesis by sheep vesicular gland., *Biochemistry*, 11, 3276, 1972.
580. Egan, R. W., Paxton, J., and Kuehl, F. A., Mechanism for irreversible self – deactivation of prostaglandin synthetase, *J. Biol. Chem.*, 251, 7329, 1985.
581. Hemler, M. E., and Lands, W. E. M., Evidence for a peroxide – initiated free radical mechanism of prostaglandin biosynthesis., *J. Biol. Chem.* 255, 6253, 1980.
582. Kulmacz, R. J. and Lands, W. E. M., Quantitative similarities in the several actions of cyanide on prostaglandin H – synthase., *Prostaglandins*, 29, 175, 1985.
583. Tappel, A. L., Boyer, P. D., and Lundberg, W. O., The reaction mechanism of soy bean lipoxidase, *J. Biol. Chem.*, 199, 267, 1952.
584. Samuelsson, B., Granström, E., Green, K., Hamberg, M., and Hammarström, S., Prostaglandins, *Ann. Rev. Biochem.* 44, 669, 1975.
585. Hamberg, M., and Samuelsson, B., On the specificity of the oxygenation of unsaturated fatty acid catalyzed by soybean lipoxidase, *J. Biol. Chem.*, 242, 5329, 1967.
586. Rahimtula, A., and O'Brien, P. J., The possible involvement of singlet oxygen in prostaglandin biosynthesis, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 70, 893, 1976.

587. Cadenas, E., Sies, H., Nastainczyk, W., and Ullrich, V., Singlet oxygen formation detected by low – level chemiluminescence during enzymatic reduction of prostaglandin G<sub>2</sub> to H<sub>2</sub>, *Hoppe Seylers Z. Physiol. Chem.* 364, 519, 1983.
588. Cadenas, E., Brigelius, R., Akerblom, T., and Sies, H., Oxygen radicals and hydroperoxides in mammalian organs: aspects of redox cycling and hydrogen peroxide metabolism, in *Biological Oxidations*, Sund, H., and Ullrich, V., Eds., Springer – Verlag, Berlin, 1983, 288.
589. Marnett, L. J., Wlodawer, P., and Samuelsson, B., Co – oxidation of organic substrates by the prostaglandin synthetase of sheep vesicular gland, *J. Biol. Chem.*, 250, 8510, 1975.
590. Yoshimoto, T., Yamamoto, S., Sugioka, K., Nakano, M., Takyu, C., Yanigishi, A., and Inaba, H., Studies on the tryptophan – dependent light emission by prostaglandin hydroperoxide reaction, *J. Biol. Chem.*, 255, 10199, 1980.
591. Baumann, J., and Wurm, G., Studies on the possible involvement of singlet oxygen and superoxide anion radicals in the cyclo-oxygenase reaction. *Prostagl. Leukotr. Med.*, 14, 139, 1984.
592. Griffiths, J., Chu, K. Y., and Hawkins, C., Photosensitised oxidation of 1-naphthols, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, 1976, 676, 1976.
593. Nastainczyk, W., Ullrich, V., Cadenas, E., and Sies, H., Mechanism of arachidonic acid-stimulated singlet oxygen formation by prostaglandin-endoperoxide synthase, in *Oxygen Radicals in Chemistry and Biology*, Bors, W., Saran, M., and Tait, D., Eds., Walter de Gruyter, Berlin, 1984, 441.
594. Lands, W. E. M., Biological consequences of fatty acid oxygenase reaction mechanisms, *Prostagl. Leukotr. Med.*, 13, 35, 1984.
595. Panganamala, R. V., Brownlee, N. R., Sprecher, H., and Cornwell, D. G., Evaluation of superoxide anion and singlet oxygen in the biosynthesis of prostaglandins from eicosa-8,11,14-trienoic acid, *Prostaglandins*, 7, 21, 1974.
596. O'Brien, P. J., and Hulett, A. L., Hydroxyl radical involvement in the luminol chemiluminescence from the reaction of arachidonic acid with sheep vesicular gland microsomes, *Prostaglandins*, 16, 683, 1980.
597. Kalyanaraman, B., Masson, R. P., Tainer, B., and Eling, T. E., The free radical formed during the hydroperoxide – mediated deactivation of ram vesicles is hemoprotein-derived. *J. Biol. Chem.*, 257, 4764, 1982.

598. Shiga, T., and Imaizumi, K., Electron spin resonance study on peroxidase- and oxidase- reaction in horse radish peroxidase and methemoglobin, *Arch. Biochem. Biophys.*, 167, 469, 1975.
599. Holmes, T. J., John, V., Vennerstrom, J., Kulmacz, R.J., and Lands, W. E. M., Stimulation of the cyclooxygenase activity of prostaglandin-H-synthesis by salicylate – derived quinhydrone., *Prostaglandins*, 28, 711, 1984.
600. Lands, W. E. M., Kulmacz, R. J., and Marshall, P. J., Lipid peroxide actions in the regulation of prostaglandin biosynthesis, in *Free Radicals in Biology*, Vol.6, Pryor, W. E., Ed., Academic Press, New York, 1984, 39.
601. Kulmacz, R. J., and Lands, W. E. M., Requirement for hydroperoxides by the cyclooxygenase on peroxidase activities of prostaglandin H synthase, *Prostaglandins*, 25, 531, 1983.
602. Helmer, M. E., Graff, G., and Lands, W. E. M., Accelerative autoactivation of prostaglandin biosynthesis by PGG<sub>2</sub>., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 85, 1325, 1978.
603. Lands, W. E. M., Lee, R., and Smith, W., Factors regulating the biosynthesis of various prostaglandins, *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 180, 107, 1971.
604. Kulmacz, R. J., Miller, J. F., and Lands, W. E. M., Prostaglandin H synthase: an example of enzyme symbiosis, *Biochim. Biophys. Res. Commun.*, 130, 918, 1985.
605. Hanel, A. M., and Lands, W. E. M., Modification of antiinflammatory drug effectiveness by ambient lipid peroxides, *Biochem. Pharmacol.*, 31, 3307, 1982.
606. Hemler, M. E., Weller, P., Markly, C., and Alward, A., Peroxide synthesis and metabolism by prostaglandin H synthase, *Biochemistry*, 24, 3372, 1985.
607. Saunders, B. C., Holmes, A. G., Siedke, A., and Stark, B. P., *Peroxidases*, Butterworths, Mass., 1964. 1.
608. Saunders, B. C., *Peroxidases and catalases*, in *Inorganic Biochemistry*, Eihorn, G. L., Ed. Vol.2 Elsevier, New York, 1973, 988.
609. Cook, H. W., and Lands, W. E. M., Mechanism of suppression of cellular biosynthesis of prostaglandins, *Nature (London)*, 260, 630, 1976.
610. Lands, W. E. M., Cook, H. W., and Rome, L. H., Prostaglandin biosynthesis: consequences of oxygenase mechanism upon in vitro assays of drug effectiveness, in *Advances in Prostaglandin and Thromboxane Research*, Vol. 1, Samuelsson, B., and Paoletti, R., eds., Raven Press, New York, 1976, 7.

611. Panganamala, R. V., Sharma, H. M., Sprecher, H., Geer, J. C., and Cornwell, D. G., A suggested role for hydrogen peroxide in the biosynthesis of prostaglandins, *Prostaglandins*, 8, 3, 1974.
612. Mead, J. E., Free radical mechanism in lipid peroxidation and prostaglandins, in *Free Radicals in Molecular Biology, Aging and Disease*, vol. 27, Armstrong, D., Sohal, R. S., Cutler, R. G., and Slater, T. F., Eds. Raven Press, New York, 1984, 53.
613. Marshall, P. J., Role of active oxygen in the formation of lipid peroxides, in *Prostaglandins, Leucotrienes and Cancer*, vol. 1, Lands, W. E. M., ed. Martinus, Nijhoff, Boston, 1985, 95.
614. Frankel, E. N., Chemistry of free radical and singlet oxygen of lipids, *Prog. Lipid. Res.*, 23, 197, 1985.
615. Nugteren, D. H., Berthuis, R. K., and van Dorp, D. A. The enzymic conversion of all – cis 8, 11, 14 – eicosaenoic acid into prostaglandin E, *Recl. Trav. Chim. Pays Bas. Belg.*, 85, 405, 1966.
616. Masson, R. P., Kalyanaraman, B., Tainer, B. E., and Eling, T. E., A carbon – centered free radical intermediate in the prostaglandin synthetase oxidation of arachidonic acid. Spin trapping and oxygen uptake studies. *J. Biol. Chem.* 255, 5019, 1980.
617. Hamberg, M., and Samuelsson, B. Stereochemistry in the formation of 9-hydroxy-10, 12-octadecadienoic acid and 13-hydroxy-9,11-octadecadienoic acid from linoleic acid by fatty acid cyclooxygenase, *Biochim, Biophys. Acta*, 617, 545, 1980.
618. Hamberg, M., and Hamberg, G., On the mechanism of oxygenation of arachidonic acid by human platelet lipoxygenase, *Biochim. Biophys. Res. Commun.*, 95, 1090, 1980.
619. Aust, S. D., Wolf, R. A., Pagels, W. R., and Marnett, L. J., The role of iron in enzymatic lipid peroxidation, in *Free Radicals in Biology*, Pryor, W. A., eds., vol.5., Academic Press, New York, 1982,1.
620. Porter, N. A., Wolf, R. A., Pagels, W. R., and Marnett, L. J., A test for the intermediacy of 11-hydroperoxyeicosa-5,8,12,14-tetraenoic acid (11-HPETE) in prostaglandin biosynthesis, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 92, 349, 1980.
621. Mason, R. P., Free radical intermediates in the metabolism of toxic chemicals, in *Free Radicals in Biology*, vol.5, Pryor, W.A., ed., Academic Press, New York, 1982, 161.
622. O'Brien, P. J., and Rahimtula, A., The possible involvement of a peroxidase in prostaglandin biosynthesis, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 70, 832, 1976.y



623. Panganamala, R. V., Sharma, H. M., Heikkila, R. E., Geer, R. E., and Cornwell, D.C., Role of hydroxyl radical scavengers dimethyl sulphoxide, alcohols and methional in the inhibition of prostaglandin biosynthesis, *Prostaglandins*, 11, 599, 1976.
624. O'Brien, P.J., and Rahimtula, A. D., Mechanism of oxygen activation involved in the prostaglandin synthetase mechanism, *Adv. Prostagl. Thrombox. Res.*, 6, 145, 1980.
625. Egan, R. W., Gale, P. H., and Kuehl, F. A., Reduction of hydroperoxides in the prostaglandin biosynthetic pathway by a microsomal peroxidase, *J. Biol. Chem.*, 254, 3295, 1979.
626. Ogino, N., Yamamoto, S., Hayaishi, O., and Tokuyama, T. Isolation of an activator for prostaglandin hydroperoxidase from bovine vesicular gland cytosol and its identification as uric acid, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 87, 184, 1979.
627. Eling, T., Curtis, J. F., Harman, L. S., and Mason, R. P., Oxidation of glutathione to its thiyl free radical metabolite by prostaglandin synthase. A potential endogenous substrate for the hydroperoxidase. *J. Biol. Chem.*, 261, 5023, 1986.
628. Marnett, L.J., Wlodawer, P., and Samuelsson, B. Light emission during the action of prostaglandin synthase, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 60, 1286, 1974.
629. Dietz, R., Schuhn, D., and Nastainczyk, W. Formation of singlet oxygen by prostaglandin H (PGH) synthase, *Hoppe Seylers Z. Physiol. Chem.* 365, 978, 1984.
630. Kuehl, F. A., Humes, J. L., Ham, E. A., Egan, R. W., and Daugherty, H. W., Inflammation: the role of peroxidase – derived products, *Adv. Prostagl. Thrombox. Res.*, 6, 77, 1980.
631. Yamazaki, I., Peroxidase, in *Molecular Mechanism of Oxygen Activation*, Hayaishi, O., Ed., Academic Press, New York, 1974, 535.
632. Cadenas, E, Sies, H., Graf, H., and Ullrich, V. Oxene donors yield low-level chemiluminescence with microsomes and isolated P-450, *Eur. J. Biochem.*, 130, 117, 1983.
633. Dunford, H. B., Araiso, T., Job, D., Ricard, J., Rutter, R., Hager, L. P., Wever, R., Kast, W. M., Boelens, R., Elkfolk, N., and Ronnberg, M., in *Biological Chemistry of Iron*, Dunford, H. B., Dolphin, D., Raymond, K. N., and Sieker, L., Eds., Reidel, Dordrecht, Netherlands, 1982, 337.
634. Marnett, L.J., Hydroperoxide dependent oxidations during prostaglandin synthesis, in *Free Radicals in Biology*, vol.6, Pryor, W. A., Ed., Academic Press, New York, 1984, 413.

635. Ohki, S., Ogino, N., Yamamoto, S., and Hayaishi, O., Prostaglandin hydroperoxidase, An integral part of prostaglandin endoperoxidase synthetase from bovine vesicular gland microsomes, *J. Biol. Chem.* 254, 829, 1979.
636. Gale, P. H., and Egan, R. W., Prostaglandin endoperoxide synthase-catalised oxidation reactions, in *Free Radicals in Biology*, vol.6, Pryor, W. A., Ed., Academic Press, New York, 1984,1.
637. van der Ouderaa, F.J., Buytenhek, M., Nugteren, D. M., and van Dorp, D.A., Purification and characterization of prostaglandin synthetase from sheep vesicular
638. Ogino, N., Ohki, S., Yamamoto, S., and Hayaishi, O., Prostaglandin endoperoxide synthetase from bovine vesicular gland microsomes. Inactivation and activation by heme and other metalloporphyrins, *J. Biol. Chem.*, 253, 5061, 1978.
639. Nastainczyk, W., Schuhn, D., and Ullrich, V. Spectral intermediates of prostaglandin endoperoxidase, *Eur. J. Biochem.* 144, 381, 1984.
640. Ho, P. R. K., Towner, R. D. T., and Esterman, M. A., Purification and characterization of fatty acid cyclooxygenase from human platelets. *Prep. Biochem.* 10, 597, 1980.
641. Ueno, R., Shimizu, T., Kondo, K., and Hyaishi, O., Activation mechanism of prostaglandin endoperoxide synthetase by hemoproteins, *J. Biol. Chem.*, 257, 5584, 1982
642. Kahn ML, Zheng YW, Huang W, Bigornia V, Zeng D, Moff S *et al.*(1998). A dual thrombin receptor system for platelet activation. *Nature* **394**: 690–694.
643. Kahn ML, Nakanishi-Matsui M, Shapiro MJ, Ishihara H, Coughlin SR (1999). Protease-activated receptors 1 and 4 mediate activation of human platelets by thrombin. *J Clin Invest* **103**: 879–887.
644. Alexander SPH, Mathie A, Peters JA (2008). *Guide to Receptors and Channels (GRAC)*, 3rd edn. *Br J Pharmacol* **153** (Suppl. 2): S1–S209.
645. Falker K, Lange D, Presek P (2004). ADP secretion and subsequent P2Y12 receptor signalling play a crucial role in thrombin-induced ERK2 activation in human platelets. *Thromb Haemost* **92**: 114–123.
646. Shankar H, Garcia A, Prabhakar J, Kim S, Kunapuli SP (2006). P2Y12 receptor-mediated potentiation of thrombin-induced Thromboxane A2 generation in platelets occurs through regulation of ERK1/2 activation. *J Thromb Haemost* **4**: 638–647.

647. Cho MJ, Pestina TI, Steward SA, Lowell CA, Jackson CW, Gartner TK. (2002). Role of the Src family kinase Lyn in TxA2 production, adenosine diphosphate secretion, Akt phosphorylation, and irreversible aggregation in platelets stimulated with gamma-thrombin. *Blood* **99**: 2442–2447.
648. Quinton TM, Kim S, Dangelmaier C, Dorsam RT, Jin J, Daniel JL *et al.* (2002). Protein kinase C- and calcium-regulated pathways independently synergize with Gi pathways in agonist-induced fibrinogen receptor activation. *Biochem J* **368**: 535–543.
649. Kamae T, Shiraga M, Kashiwagi H, Kato H, Tadokoro S, Kurata Y *et al.* (2006). Critical role of ADP interaction with P2Y12 receptor in the maintenance of alpha(IIb)beta3 activation: association with Rap1B activation. *J Thromb Haemost* **4**: 1379–1387.
650. Brass LF (2003). Thrombin and platelet activation. *Chest* **124**: 18S–25S.
651. Coughlin SR (2005). Protease-activated receptors in hemostasis, thrombosis and vascular biology. *J Thromb Haemost* **3**: 1800–1814.
652. De Marco L, Mazzucato M, Masotti A, Fenton JW, Ruggeri ZM (1991). Function of glycoprotein Ib alpha in platelet activation induced by alpha-thrombin. *J Biol Chem* **266**: 23776–23783.
653. Lova P, Campus F, Lombardi R, Cattaneo M, Sinigaglia F, Balduini C *et al.* (2004). Contribution of protease-activated receptors 1 and 4 and glycoprotein Ib-IX-V in the Gi-independent activation of platelet Rap1B by thrombin. *J Biol Chem* **279**: 25299–25306.

### ***BIBΛΙΑ – ΔΙΑΤΡΙΒΕΣ***

654. Lynch's: Medical Laboratory Technology. Italian Ed. Stanley S. Raphael.: “Tecniche di Laboratorio di Lynch”, trad. e pres. Prof. Angelo Burlina. Cap.42, Alterazioni dell' Emostasi. Cap.43, Metodiche per l' esame dei difetti dell' Emostasi, pp 1198 – 1267, Piccin editore Padova, 1983, Italia.
655. Ενδογενείς και εξωγενείς αναστολές του Παράγοντα Ενεργοποίησης Αιμοπεταλίων. Σπύρου Καρκαμπούνα, Διδακτορική Διατριβή, Εργαστήριο Φυσιολογίας, Ιατρική Σχολή, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων, Οκτώβριος 1990.
656. Η αναστολή των αιμοπεταλίων από εκκαθαριστές ελευθέρων ριζών. Γεώργιος Σόφης. Διδακτορική Διατριβή. Εργαστήριο Φυσιολογίας, Ιατρική Σχολή, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων. 1992.

657. Biochimica, A. Lehninger, ed. Zanichelli, 1984.
658. Introduzione alla Biofisica, M. Ageno, ed. Zanichelli, 1987.
659. Φυσιολογία Φυτών, Ιωάννης Τσέκος, καθηγητής Φυσιολογίας φυτών, Αος τόμος, σελ.965-975, 2003, εκδοτικός οίκος αδελφών Κυριακίδη, Α.Ε., Θεσσαλονίκη.
660. Η Αιμόσταση, τόμος Ι, Φυσιολογία. Τόμος ΙΙ, Παθολογία. Παντελής Ε. Μακρής, παθολόγος-αιματολόγος, καθηγητής παθολογίας, Ιατρικής Σχολής Αριστοτέλειου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης. Επιστημονικές Εκδόσεις Ζανβές, Θεσσαλονίκη 2000.



