

Δε. οισι... 624... 5



A

218

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ
ΚΛΙΝΙΚΟΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ ΤΟΜΕΑΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗΣ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑΣ
ΔΙΕΥΘΥΝΤΗΣ: ΑΓΓΕΛΟΣ ΕΥΑΓΓΕΛΟΥ, ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ

**Μελέτη των επιδράσεων μεταβολικών προϊόντων των κατεχολαμινών
στην ενεργοποίηση και συσσώρευση των αιμοπεταλίων**

Τηλέμαχος Α. Δασκάλου

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2004



ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ



026000200198



«Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από την Ιατρική Σχολή του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων δεν υποδηλώνει αποδοχή των γνωμών του συγγραφέα. Ν. 5343/32, άρθρο 202, παράγραφος 2»



Πρόεδρος Ιατρικής Σχολής: Ε. Τσιάνος, Καθηγητής Παθολογίας

Ημερομηνία αίτησης: 5-1-97

Ημερομηνία ορισμού Τριμελούς Επιτροπής: Γ.Σ. 317^α/25-2-97

Μέλη Τριμελούς Επιτροπής:

1. Ευαγγέλου Άγγελος, Επίκουρος Καθηγητής Φυσιολογίας, Επιβλέπων
2. Καλφακάκου Βασιλική, Επίκουρος Καθηγήτρια Φυσιολογίας, Μέλος
3. Βεζυράκη Πατρώνα, Λέκτορας Φυσιολογίας, Μέλος

Ημερομηνία ορισμού θέματος: 10-4-97

Ημερομηνία κατάθεσης Διατριβής: 29-4-2004

Βαθμὸς Διδακτορικής Διατριβής: «Άριστα»

Μέλη Επταμελούς Εξεταστικής Επιτροπής:

1. Ευαγγέλου Άγγελος, Καθηγητής Φυσιολογίας, Επιβλέπων
2. Μπουραντάς Κωνσταντίνος, Καθηγητής Παθολογίας-Αιματολογίας, Μέλος
3. Μαλάμου-Μήτση Βασιλική, Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομίας, Μέλος
4. Καλφακάκου Βασιλική, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Φυσιολογίας, Μέλος
5. Βεζυράκη Πατρώνα, Επίκουρος Καθηγήτρια Φυσιολογίας, Μέλος
6. Λεβειδιώτου Σταματίνα, Επίκουρος Καθηγήτρια Μικροβιολογίας
7. Καρκαμπούνας Σπυρίδων, Λέκτορας Φυσιολογίας, Μέλος

Η Γραμματέας της Σχολής

Ε. Τσαγγαλά



Αφιερωμένο στη μνήμη
της αγαπημένης μου θείας Ρούλας



Αφιερωμένο στους γονείς μου,
στη γυναίκα μου και στα παιδιά μας



Εισαγωγή	1
1. Ορισμοί	2
2. Η σημασία της έρευνας	3
3. Η μεθοδολογία της έρευνας	4
4. Η επικοινωνία στην έρευνα	5
5. Η ηθική στην έρευνα	6
6. Η αξιολόγηση της έρευνας	7
7. Η δημοσίευση της έρευνας	8
8. Η χρηματοδότηση της έρευνας	9
9. Η συνεργασία στην έρευνα	10
10. Η κοινωνική ευθύνη της έρευνας	11
11. Η ανάπτυξη της έρευνας	12
12. Η μελλοντική έρευνα	13
13. Η σημασία της έρευνας για την κοινωνία	14
14. Η σημασία της έρευνας για την οικονομία	15
15. Η σημασία της έρευνας για την υγεία	16
16. Η σημασία της έρευνας για την παιδεία	17
17. Η σημασία της έρευνας για την πολιτική	18
18. Η σημασία της έρευνας για την κουλτούρα	19
19. Η σημασία της έρευνας για την αειμωσία	20
20. Η σημασία της έρευνας για την ανθρωπότητα	21

Αφιερωμένο στους φίλους μου



ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

Συντομογραφίες	7
ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	9
Αιμοπετάλια-Ιστορική αναδρομή, Προέλευση, Παραγωγή	9
Μορφολογία-Δομή αιμοπεταλίων	11
Λειτουργίες-Αντιδράσεις αιμοπεταλίων	24
Ελεύθερες ρίζες-Γενικά χαρακτηριστικά	47
Ελεύθερες ρίζες οξυγόνου και αιμοπετάλια	73
Κατεχολαμίνες	82
Κατεχολαμίνες και αιμοπετάλια	98
Σκοπός	105
ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	107
Υλικό και μέθοδοι-Στατιστικά δείγματα	107
Λειτουργικές δοκιμασίες συσσώρευσης αιμοπεταλίων στο συσσωρευμόμετρο	110
Μέτρηση ελευθέρων ριζών οξυγόνου με την μέθοδο d-Roms test	113
Προσδιορισμός της αντιοξειδωτικής ικανότητας των υπό μελέτη ουσιών με την μέθοδο TAS	114
Εκτίμηση της παραγωγής ΤΧΑ ₂ από αιμοπετάλια ανθρώπου ex vivo με μέθοδο RIA	115
Προσδιορισμός των υποδοχέων GrPb-IIIa ανά αιμοπετάλιο μέσω κυτταρομετρίας ροής	116
Αποτελέσματα	119
Συζήτηση	171
Συμπεράσματα	183
Περίληψη	185
Summary	189
Βιβλιογραφία	195
Παράρτημα (Πίνακες αποτελεσμάτων)	219



ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η συσσώρευση των αιμοπεταλίων αποτελεί μία από τις σημαντικότερες συνιστώσες της διαδικασίας της αιμόστασης, αλλά και βασική παράμετρο πολλών παθολογικών καταστάσεων, όταν δεν διενεργείται φυσιολογικά. Τα τελευταία χρόνια πολλοί ερευνητές έχουν προσπαθήσει να διευκρινίσουν τους λεπτούς μηχανισμούς και τις μεταξύ αυτών σχέσεις, που συμβάλλουν στην συσσώρευση των αιμοπεταλίων.

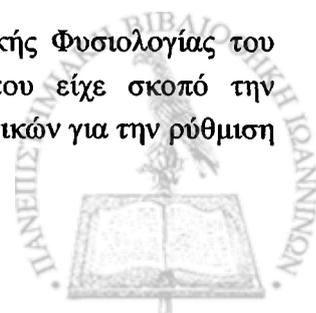
Στα πλαίσια της έρευνας για την μελέτη των μηχανισμών αυτών χρησιμοποιήθηκαν αιμοπεταλιακοί διεγέρτες, μεταξύ των οποίων ήταν οι κατεχολαμίνες, το ADP, το αραχιδονικό οξύ, ο PAF και η θρομβίνη. Έγινε έτσι γνωστό ότι οι κατεχολαμίνες παίζουν σημαντικό ρόλο στην αιμοπεταλιακή ενεργοποίηση και συσσώρευση. Η επινεφρίνη δε, αποδείχθηκε ισχυρότερος αιμοπεταλιακός διεγέρτης από την νορεπινεφρίνη.

Στην πορεία της έρευνας σχετικά με τις κατεχολαμίνες και τα αιμοπετάλια αποδείχθηκε ότι τα επίπεδα των κατεχολαμινών αυξάνονται στο αίμα κατά την διάρκεια stress, σωματικής άσκησης ή καπνίσματος, με αποτέλεσμα να αυξάνεται παράλληλα και η συγκολλητικότητα των αιμοπεταλίων, λόγω της δράσης των κατεχολαμινών σε αυτά. Εάν η δράση αυτή των κατεχολαμινών δεν ρυθμιστεί έγκαιρα, είναι πιθανό να παρατηρηθούν φαινόμενα αυθόρμητης αιμοπεταλιακής συσσώρευσης στο εσωτερικό των αγγείων κατά την διάρκεια της κατεχολαμινικής διέγερσης.

Περί τα μέσα της δεκαετίας του 1990, στο Εργαστήριο της Πειραματικής Φυσιολογίας του Ιατρικού Τμήματος του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, άρχισε μία μελέτη που στόχευε στην εξακρίβωση των πιθανών μηχανισμών που εμπλέκονται στην ρύθμιση της αιμοπεταλιακής συσσώρευσης που προκαλείται από διάφορους διεγέρτες των αιμοπεταλίων. Δεδομένου ότι η αιμοπεταλιακή διέγερση από φυσιολογικούς διεγέρτες παίζει σημαντικό ρόλο στην διαδικασία της δημιουργίας των θρόμβων, διατυπώθηκε η άποψη ότι είναι πιθανόν η σταδιακή απευαισθητοποίηση των αιμοπεταλίων στην δράση των διεγερτών αυτών να μην είναι ο μοναδικός ρυθμιστικός μηχανισμός της αιμοπεταλιακής συσσώρευσης. Για την ερμηνεία του φαινομένου της άμεσης ρύθμισης του βαθμού της αιμοπεταλιακής διέγερσης έγινε η υπόθεση ότι η συσσώρευση που προκαλείται από την επινεφρίνη και άλλους διεγέρτες των αιμοπεταλίων, πιθανόν να αυτορυθμίζεται άμεσα από προϊόντα μεταβολισμού των κατεχολαμινών στον ανθρώπινο οργανισμό, με έναν μηχανισμό αρνητικής παλίνδρομης ρύθμισης (negative feed-back mechanism).

Είναι επίσης γνωστό ότι ο καταβολισμός των κατεχολαμινών μέσω κυρίως της μονοαμινοξειδάσης (ΜΑΟ), οδηγεί στην παραγωγή δραστικών μορφών οξυγόνου (Ελευθέρων Ριζών Οξυγόνου), που συμβάλλουν στο οξειδωτικό stress. Περί τα τέλη της δεκαετίας του 1970 έγινε γνωστό από Γερμανούς ερευνητές ότι τα αιμοπετάλια είναι δυνατόν να ενεργοποιηθούν μέσω παραγωγής ελευθέρων ριζών οξυγόνου από εξωγενώς χορηγούμενα οξειδωτικά μέσα και σχεδόν ταυτόχρονα βρέθηκε ότι τα αιμοπετάλια παράγουν ελεύθερες ρίζες οξυγόνου. Αργότερα αποδείχθηκε ότι οι ελεύθερες ρίζες οξυγόνου στα αιμοπετάλια παράγονται κυρίως κατά τον μεταβολισμό του αραχιδονικού οξέος μέσω της λιποξυγονάσης και της κυκλοξυγονάσης. Κατά συνέπεια, η διαδικασία σύνθεσης των θρομβοξανίων στα αιμοπετάλια συσχετίζεται με την παραγωγή ελευθέρων ριζών οξυγόνου από τα συγκεκριμένα ενζυμικά συστήματα των εν λόγω κυττάρων.

Περί τα μέσα της δεκαετίας του 1980, στο Εργαστήριο της Πειραματικής Φυσιολογίας του Ιατρικού Τμήματος του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, άρχισε μία μελέτη που είχε σκοπό την εξακρίβωση των πιθανών μηχανισμών που διαθέτουν οι οργανισμοί των θηλαστικών για την ρύθμιση



των δράσεων του PAF στο επίπεδο του αίματος, των αγγείων και της καρδιάς. Οι έρευνες αυτές κατέδειξαν ότι υπάρχουν ποικίλοι παράγοντες που μπορούν να αναστείλουν την συσσωρευτική δράση του PAF στα αιμοπετάλια και ότι οι περισσότεροι ήταν μόρια με κλασσικές αντιοξειδωτικές ιδιότητες που μπορούσαν να λειτουργήσουν και ως εκκαθαριστές ελευθέρων ριζών οξυγόνου.

Οι μελέτες αυτές επεκτάθηκαν και στους τρεις δρόμους της αιμοπεταλιακής συσσώρευσης και τα αποτελέσματά τους έδειξαν ότι: α) Ουσίες που λειτουργούν ως εκκαθαριστές ελευθέρων ριζών (scavengers) μπορούσαν να αναστείλουν, *in vitro*, την συσσώρευση των αιμοπεταλίων την προκαλούμενη από αγωνιστές που ενεργοποιούν ξεχωριστά τους τρεις γνωστούς δρόμους συγκόλλησής τους, β) Ουσίες με ιδιότητες εκκαθαριστή ελευθέρων ριζών, εκτός από την αναστολή της συσσώρευσης, λειτουργούν και αποσυσσωρευτικά στα αιμοπετάλια, ακόμη και όταν η συσσώρευση έχει εισέλθει στη μη αναστρέψιμη φάση της, γ) Ορισμένες από τις ουσίες αυτές, που χρησιμοποιούνται και στην κλινική πράξη, όπως η βιταμίνη C και η τριμεταζιδίνη, λόγω της αποσυσσωρευτικής τους δράσης θα μπορούσαν να δοκιμαστούν ως πιθανά θρομβολυτικά και δ) Στους μηχανισμούς της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων οι ελεύθερες ρίζες παίζουν σημαντικό ρόλο τόσο για την πυροδότηση, όσο και τον έλεγχο των βιοχημικών αντιδράσεων, αποτελώντας πιθανώς τον κοινό μεσολαβητή των διαφορετικών οδών συσσώρευσης.

Με βάση τα παραπάνω, στην παρούσα μελέτη διερευνήθηκε ο πιθανός έλεγχος της δράσης της επινεφρίνης και άλλων αιμοπεταλιακών διεγερτών από μεταβολικά προϊόντα των κατεχολαμινών κατά την διαδικασία της αιμοπεταλιακής συσσώρευσης καθώς και ο ρόλος των ελευθέρων ριζών οξυγόνου στην εξέλιξη των ανωτέρω φαινομένων.

Η παρούσα μελέτη ξεκίνησε το 1999 και ολοκληρώθηκε το 2003 στο Εργαστήριο της Πειραματικής Φυσιολογίας του Ιατρικού Τμήματος του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων. Μερικά σημαντικά τμήματά της έγιναν στο Εργαστήριο Βιολογικής Χημείας του Ιατρικού Τμήματος του Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης, όπως επίσης και στο Ιατρείο Αιμόστασης & Θρόμβωσης της Α΄ Παθολογικής Προπαιδευτικής Κλινικής Α.Π.Θ. του Π.Γ.Ν. ΑΧΕΠΑ Θεσσαλονίκης.

Καταθέτοντας την μελέτη αυτή, επιθυμώ να εκφράσω τις θερμότερες μου ευχαριστίες προς τον Καθηγητή Φυσιολογίας και Διευθυντή του Εργαστηρίου Πειραματικής Φυσιολογίας του Ιατρικού Τμήματος του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, Δρ. Άγγελο Ευαγγέλου, ο οποίος μου έδωσε την δυνατότητα της συνολικής εκπόνησης της διδακτορικής μου διατριβής και συγχρόνως το ερέθισμα για γνωστική εμβάθυνση σε εξαιρετικά ενδιαφέροντες τομείς της ιατροβιολογικής έρευνας. Τον ευχαριστώ επίσης θερμά για την υποστήριξη που μου προσέφερε με ιδέες, γνώσεις και κριτικές παρατηρήσεις όπως και για την πολύτιμη καθοδήγηση που μου παρείχε κατά την διάρκεια όλων των σταδίων της παρούσας μελέτης.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες οφείλω στον συνεργάτη και φίλο Δρ. Σπύρο Καρκαμπούνα, Λέκτορα του Εργαστηρίου Φυσιολογίας, για την βοήθεια που μου προσέφερε τόσο στην απόκτηση της απαραίτητης τεχνικής κατάρτισης όσο και στην εκτέλεση πολλών σημαντικών και ποικίλων πειραμάτων και την υποστήριξή του σε όλα τα στάδια της εκπόνησης της μελέτης, τόσο σε πρακτικό όσο και σε θεωρητικό επίπεδο. Η προσπάθεια που κατέβαλε μαζί μου, η ενθάρρυνση και η στήριξη που μου παρείχε κατά τις δύσκολες φάσεις της εργασίας μου, συνέβαλαν ουσιαστικά στην ολοκλήρωσή της. Τον Δρ. Καρκαμπούνα ευχαριστώ επίσης για την πολύτιμη προσφορά ιδεών και συζητήσεων καθ' όλη την διάρκεια της εκπόνησης της παρούσης διατριβής, τόσο στα Ιωάννινα όσο και στην Θεσσαλονίκη.

Ευχαριστώ επίσης θερμά τον Αναπληρωτή Καθηγητή Αιματολογίας του Ιατρικού Τμήματος του Α.Π.Θ. και υπεύθυνο του Ιατρείου Αιμόστασης & Θρόμβωσης της Α΄ Παθολογικής Προπαιδευτικής



Κλινικής Α.Π.Θ. του Π.Γ.Ν. ΑΧΕΠΑ Θεσσαλονίκης, Δρ. Παντελή Μακρή, για την καθοδήγηση που μου παρείχε στα πρώτα στάδια της εκπόνησης της παρούσας μελέτης τόσο σε θεωρητικό όσο και σε πειραματικό επίπεδο, για την παραχώρηση της υλικοτεχνικής υποδομής του Ιατρείου Αιμόστασης & Θρόμβωσης ώστε να ολοκληρωθεί σ' αυτό μέρος των πειραμάτων καθώς και για τις παρεμβάσεις και τις υποδείξεις του οι οποίες συνέβαλαν καθοριστικά στην επιστημονικά ορθή σχεδίαση και εκτέλεση των πειραμάτων αυτών. Τις θερμές μου ευχαριστίες θέλω να εκφράσω επίσης στην συνεργάτιδα του Δρ. Μακρή, Παρασκευάστρια στο Ιατρείο Αιμόστασης & Θρόμβωσης, κα. Ελευθερία Πυθαρά για την βοήθεια που μου προσέφερε στην απόκτηση της απαραίτητης τεχνικής κατάρτισης για την ορθή εκτέλεση των σχετικών με την αιμοπεταλιακή συσσώρευση πειραμάτων.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες οφείλω επίσης στον Αναπληρωτή Καθηγητή Βιοχημείας του Ιατρικού Τμήματος του Α.Π.Θ., Δρ. Μιχάλη Καραμούζη, για την παραχώρηση της υλικοτεχνικής υποδομής του Εργαστηρίου Βιολογικής Χημείας του Ιατρικού Τμήματος του Α.Π.Θ., όπου και ολοκληρώθηκε τμήμα των πειραμάτων της παρούσας μελέτης, την φιλοξενία – με την πραγματική έννοια του όρου – που μου παρείχε στο εργαστήριό του, όπως και για την αμέριστη βοήθειά του κατά την εκτέλεση των πειραμάτων και την στενή του υποστήριξη καθ' όλη την διάρκεια της εκπόνησης της παρούσας διδακτορικής διατριβής.

Ευχαριστώ ακόμη θερμά την Διευθύντρια του Ανοσολογικού Εργαστηρίου του Π.Γ.Ν. ΑΧΕΠΑ, Δρ. Χριστίνα Αγγουριδάκη για την παραχώρηση του εξοπλισμού του εργαστηρίου, ώστε να εκτελεστεί σ' αυτό μέρος των πειραμάτων, όπως και την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Μικροβιολογίας της Ιατρικής Σχολής του Α.Π.Θ. και Διευθύντρια του Μικροβιολογικού Εργαστηρίου του Π.Γ.Ν. ΑΧΕΠΑ, Δρ. Στέλλα Αλεξίου-Δανιήλ για την υποστήριξη που μου παρείχε κατά την διάρκεια της εκπόνησης της παρούσας μελέτης.

Ακόμη ευχαριστώ θερμά το επιστημονικό προσωπικό του Εργαστηρίου Φυσιολογίας για την βοήθεια που μου προσέφερε κατά την εκτέλεση πολλών και ποικίλων πειραμάτων της παρούσας μελέτης όπως επίσης και για την υπομονή και την προθυμία του, έτσι ώστε να υπερνικηθεί κάθε δυσκολία κατά την εκπόνηση της διδακτορικής μου διατριβής.



ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

- AA = Αραχιδονικό οξύ
 ABP = Πρωτεΐνη συνδέουσα την ακτίνη
 ADP = Διφωσφορική αδενοσίνη
 ADR = Αδρεναλίνη
 AMT = Μονοφωσφορική αδενοσίνη
 ANΣ = Αυτόνομο νευρικό σύστημα
 ASC = Ασκορβικό οξύ
 ATP = Τριφωσφορική αδενοσίνη
 A₂₃₁₈₇ = Ιονοφόρος του ασβεστίου
 BHA = Βουτυλική υδροξυανισόλη
 BHT = Βουτυλικό υδροξυτολουένιο
 c-AMP = Κυκλικό AMP
 COMT = Κατεχολ-Ο-μεθυλ-τρανσφεράση
 CP-CPK = Διάλυμα φωσφορικής κρεατίνης και κινάσης της φωσφορικής κρεατίνης
 Ca²⁺ = Ιονισμένο ασβέστιο
 c-GMP = Κυκλικό GMP
 DAG = Διακυλγλυκερόλη
 DHPG = 3, 4-διυδροξυ-φαινυλγλυκόλη
 DOMA = 3, 4-διυδροξυ-μανδελικό οξύ
 DPPD = N-N-διφαινυλ-P-φαινυλενο-διαμίνη
 DPPH = Διφαινυλ-πικρυλ-υδραζίνη
 EDTA = Αιθυλεν-διαμινο-τετραοξειδικό δινάτριο
 EGTA = Αιθυλεν-γλυκολ-δισ [-2-αμινοαιθυλαιθήρ] N,N-τετραοξειδικό οξύ
 EP = Ερυθροποιητίνη
 EPO = Ελεύθερες ρίζες οξυγόνου
 ESR = Παραμαγνητικός ηλεκτρονικός συντονισμός
 ΦΝΣ = Φυτικό νευρικό σύστημα
 GDP = Διφωσφορική γουανοσίνη
 GMP = Μονοφωσφορική γουανοσίνη
 GnRH = Εκκριτική ορμόνη των γοναδοτροπινών
 GP (I, II, III, V) = Γλυκοπρωτεΐνη (I, II, III, V) αντιστοίχως
 GSH = Αναχθείσα γλουταθειόνη
 GS-SG = Οξειδωθείσα γλουταθειόνη
 GTP = Τριφωσφορική γουανοσίνη
 5-HT = 5-υδροξυτρυπταμίνη (σεροτονίνη)
 12-HPETE = 12, 1-υδροϋπεροξυ-5, 8, 10, 14-εικοσιτετραενοϊκό οξύ
 12-HETE = 12, 1-υδροξυ-5, 8, 10, 14-εικοσιτετραενοϊκό οξύ
 HHT = 12, 1-υδροξυ-5, 8, 10-δεκαεπτατριενοϊκό οξύ
 IL-3 = Ιντερλευκίνη-3
 IL-6 = Ιντερλευκίνη-6
 INS = Ινσοιτόλη
 IP₃ = Τριφωσφορική ινσοιτόλη



IRP = Πρωτεΐνη πλούσια σε ιστιδίνη
 KD = Χιλιοδάλτον
 ΚΝΣ = Κεντρικό νευρικό σύστημα
 MAO = Μονοαμινοξειδάση
 MDA = Μαλονική δεαλδεύδη
 Meg-CSF = Παράγοντας διέγερσης αποικιών μεγακαρυοκυττάρων
 Μκ = Μεγακαρυοκύτταρο
 NDGA = Νορ-διωδρο-γουαιτερικό οξύ
 NOR = Νορεπινεφρίνη
 PA = Φωσφατιδικό οξύ
 PAF = Παράγοντας ενεργοποίησης αιμοπεταλίων
 PF-4 = Αιμοπεταλιακός παράγοντας 4
 PGD₂ = Προσταγλανδίνη D₂
 PGE₂ = Προσταγλανδίνη E₂
 PGF₂ = Προσταγλανδίνη F₂
 PGG₂ = Προσταγλανδίνη G₂
 PGH₂ = Προσταγλανδίνη H₂
 PGI₂ = Προσταγλανδίνη I₂ ή Προστακυκλίνη
 PI = Φωσφατιδυλινοσιτόλη
 PIP = 4-φωσφορική φωσφατιδυλινοσιτόλη
 PIP₂ = 4, 5-διφωσφορική φωσφατιδυλινοσιτόλη
 PKA = Πρωτεϊνική κινάση A
 PLA₂ = Φωσφολιπάση A₂
 PLC = Φωσφολιπάση C
 PNMT = Φαινυλαιθανολαμινο-N-μεθυλ-Ο-τρανσφεράση
 PPP = Πλάσμα φτωχό σε αιμοπετάλια
 PRP = Πλάσμα πλούσιο σε αιμοπετάλια
 PTH = Παραθορμόνη
 PTK = Πρωτεϊνική κινάση τυροσίνης
 SOD = Υπεροξειδιοδισμουτάση
 ΣΝΣ = Συμπαθητικό νευρικό σύστημα
 TG-EGTA = Διάλυμα έκπλυσης αιμοπεταλίων κουνελιού
 TG-Ca²⁺ = Διάλυμα συσώρευσης αιμοπεταλίων κουνελιού
 THR = Θρομβίνη
 TMZ = Τριμεταζιδίνη
 Tris = Τρις-υδροξυ-μεθυλ-αμινοαιθάνιο
 TSH = Θυρεοειδοτρόπος ορμόνη
 TSF = Παράγοντας διέγερσης θρομβοποίησης
 TXA₂ = Θρομβοξάνη A₂
 TXB₂ = Θρομβοξάνη B₂
 VIP = Αγγειοδραστικό εντερικό πεπτίδιο
 VMA = 3-μεθοξυ-4-υδροξυ-μανδελικό οξύ
 XOD = Ξανθίνη οξειδάση



ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

A. ΑΙΜΟΠΕΤΑΛΙΑ

1. Ιστορική αναδρομή

Περισσότερο από μισό αιώνα χρειάστηκαν οι ερευνητές για να καταλήξουν σχετικά με τη φύση των αιμοπεταλίων. Πρώτος ο Donne το 1842 αναφέρθηκε στα αιμοπετάλια και τα θεώρησε προϊόντα της λέμφου. Αργότερα άλλοι, όπως ο Zimmerman και ο Hayem, νόμισαν ότι τα αιμοπετάλια ήταν πρόδρομοι των ερυθρών αιμοσφαιρίων. Το 1865 ο Schultze πίστεψε πως τα σωματίδια που οι άλλοι περιέγραφαν, δεν ήταν παρά τμήματα των λευκοκυττάρων, ενώ ο Wooldridge το 1891 υποστήριξε ότι είναι κατακρημνίσεις των πρωτεϊνών του πλάσματος. Μόνο το 1894 ο Wlasson τα θεώρησε ότι είναι ξεχωριστή σειρά κυττάρων¹.

Το γεγονός ότι τα αιμοπετάλια αντιπροσωπεύουν υπαρκτά και μόνιμα στοιχεία του αίματος των υγιών ενηλίκων καταδείχτηκε πρώτη φορά το 1906 από τον Buekmaster, που συμπέρανε ότι είναι δύσκολο να εμφανιστούν στα μικροσκοπικά παρασκευάσματα σαν αυτοτελείς κυτταρικές οντότητες εξ αιτίας της μεγάλης ευαισθησίας τους στις κλασσικές μεθόδους παρασκευής που τα μετέτρεπαν σε μορφώματα ομοιάζοντα με τεχνήματα ή κυτταρικά ράκη^{2, 3}. Την ίδια χρονική περίοδο αποδείχθηκε από τον Wright, χάρη στις μελέτες του σχετικά με τα κύτταρα του μυελού των οστών, ότι τα αιμοπετάλια κατάγονται από τα μεγακαρυοκύτταρα, τα οποία για πρώτη φορά είχαν περιγραφεί το 1869 από τον Bizzozero. Παρ' όλα αυτά, το 1925 στο Textbook of Medicine του Starling αναφέρεται η άποψη ότι σε φυσιολογικές συνθήκες δεν υπάρχουν αιμοπετάλια στον ανθρώπινο οργανισμό!¹.

Από τις πρώτες σοβαρές έρευνες σχετικά με τα αιμοπετάλια προέκυψε ότι τα στοιχεία αυτά σχετίζονται με την διαδικασία της πήξης του αίματος⁴. Με την πάροδο των χρόνων έγινε σταδιακά σαφές ότι τα κύτταρα αυτά του αίματος συμμετείχαν όχι μόνο στην πήξη και την θρομβογένεση αλλά και σε άλλες φυσιολογικές και παθολογικές διεργασίες που λαμβάνουν χώρα στους οργανισμούς των θηλαστικών, συμπεριλαμβανομένου και του ανθρώπου. Έτσι σήμερα θεωρείται με βεβαιότητα ότι τα αιμοπετάλια λαμβάνουν μέρος στην διαδικασία της θρομβογένεσης, της αρτηριοσκλήρυνσης και της μετάστασης των καρκινικών κυττάρων, ενώ υπάρχουν σοβαρές ενδείξεις ότι είναι σε θέση να δώσουν αντιδράσεις που σχετίζονται με τα φαινόμενα της αγγειοσύσπασης και της σύσπασης των διακλαδώσεων του βρογχικού δέντρου. Με αυτά τα δεδομένα γίνεται φανερό ότι η έρευνα για την κατανόηση του συνόλου των λειτουργιών των αιμοπεταλίων με στόχο τον φαρμακολογικό χειρισμό τους αποτελεί έρευνα αιχμής για τις ιατρικές επιστήμες⁵.

2. Προέλευση - Παραγωγή των αιμοπεταλίων

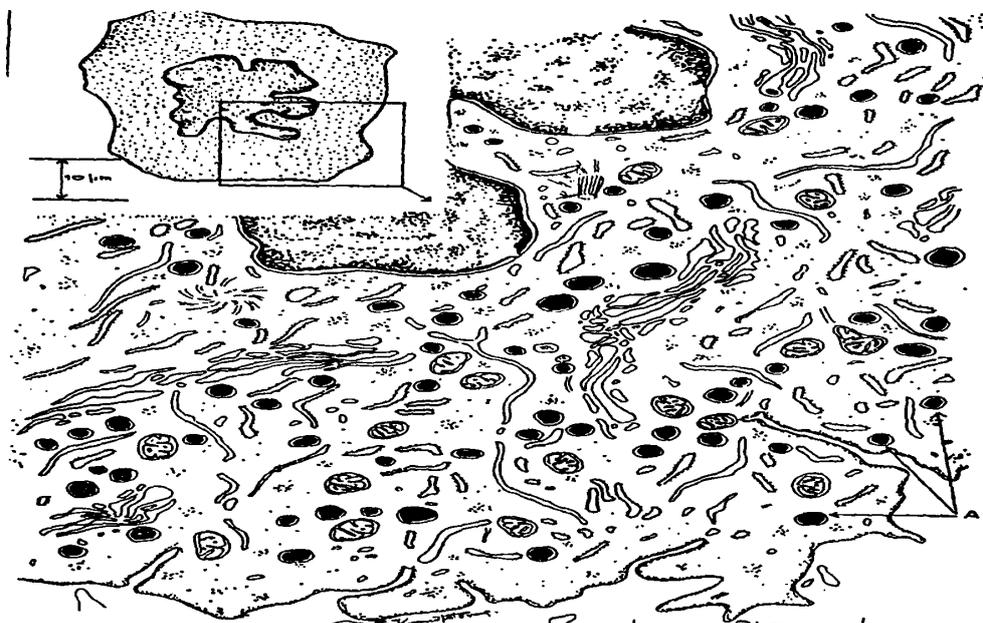
Τα αιμοπετάλια είναι κυτταρικά τμήματα που στερούνται πυρήνα και προέρχονται από το πρωτόπλασμα των μεγακαρυοκυττάρων, τα οποία φαίνεται ότι έχουν κοινό πρόδρομο με τα κύτταρα της λευκής και ερυθράς σειράς^{6-8, 2}. Από την στιγμή που το πολυδύναμο προδρομικό κύτταρο (stem cell) αρχίσει να διαφοροποιείται προς μεγακαρυοκύτταρο, μέχρι την ωρίμανσή του, παρεμβάλλεται



ένα χρονικό διάστημα 70 περίπου ωρών, κατά την διάρκεια του οποίου η μάζα του κυττάρου αυξάνει σημαντικά, ώστε να μπορεί να παράγει αρκετές εκατοντάδες αιμοπεταλίων⁵ (Εικόνα 1).

Η παραγωγή των αιμοπεταλίων από το μεγακαρυοκύτταρο (Μκ), γίνεται με τεμαχισμό (fragmentation) του κυτταροπλάσμάτος του, σε αντίθεση με την παραγωγή όλων των άλλων κυττάρων του αίματος, που παράγονται με "διαξονική" διαίρεση, δηλαδή ταυτόχρονη διαίρεση του πυρήνα και του πρωτοπλάσματος. Επικρατέστερη θεωρία για την παραγωγή των αιμοπεταλίων είναι ότι παράγονται στο μυελό των οστών. Είναι γεγονός όμως ότι η θεωρία αυτή δεν έχει επιβεβαιωθεί ακόμη, γι' αυτό και από πολλούς αμφισβητείται.

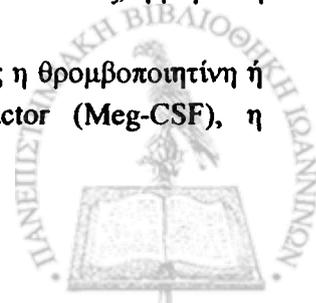
Ανεξάρτητα από τον τόπο παραγωγής των αιμοπεταλίων, είναι σίγουρο ότι τα Μκ κάποια στιγμή προετοιμάζονται για την παραγωγή των κυττάρων αυτών. Αυτή η προετοιμασία σημαίνει πριν απ' όλα σύνθεση αλλά και παραγωγή όλων εκείνων των πρωτεϊνών που βρίσκονται μέσα στα αιμοπετάλια είτε ως υλικό, το οποίο απελευθερώνεται στη φάση της ενεργοποίησής τους, είτε ως δομικό υλικό των ενδοαιμοπεταλιακών οργανυλίων στο σύνολό τους¹. Στο τέλος της περιόδου της ωρίμανσης, κάθε ώριμο Μκ εμφανίζει ανώμαλη μορφή, σε αντίθεση με τους ανώριμους προδρόμους του οι οποίοι έχουν σφαιρικό σχήμα, ενώ το κυτταρόπλάσμα του εμφανίζεται περιφερικά διαχωρισμένο σε σχηματισμούς, οι οποίοι θα δώσουν τα αιμοπετάλια.



Εικόνα 1 Σχέδιο ώριμου μεγακαρυοκυττάρου από φωτογραφία παρασκευασμάτων στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο. Αιμοπετάλια. ("R V Cratic: Ultrastructure of the mammalian cell: BERLIN SPRINGER 1979)

Όσον αφορά την φυσιολογία του σχηματισμού των αιμοπεταλίων από τα Μκ, αυτή δεν έχει απόλυτα διευκρινιστεί. Κατά τον Harker, ο κύριος ρυθμιστής της είναι το επίπεδο του αριθμού των αιμοπεταλίων. Η ελάττωσή του διεγείρει την παραγωγή νεαρών αιμοπεταλίων, που εκδηλώνεται μετά 4-5 ημέρες, ενώ η αύξησή του αναστέλλει την παραγωγή και οδηγεί σε παροδική θρομβοκυτταροπενία. Όλες αυτές οι παρατηρήσεις συνηγορούν στο ότι υπάρχει σχέση αρνητικής εξάρτησης του ρυθμού παραγωγής από το επίπεδο των αιμοπεταλίων που κυκλοφορούν, δηλαδή στην ύπαρξη ενός μηχανισμού αναστροφής ρύθμισης "feedback mechanism", στον οποίο εμπλέκονται επιμέρους ρυθμίσεις όπως η διακυτταρική-στρωματική ρύθμιση του μικροπεριβάλλοντος, η μοριακή και η χυμική (ορμονική "ετεροκρινής" και "αυτοκρινής").

Στους διεγέρτες της θρομβοκυτταροποίησης συγκαταλέγονται ουσίες όπως η θρομβοποιητίνη ή "Thrombopoietic Stimulator Factor (TSF), ο Meg-Colony Stimulator Factor (Meg-CSF), η



Ιντερλευκίνη 3(IL-3), η Ερυθροποιητίνη (EP), οι γαγγλιοσίδες GD1a και GM1 και η Ιντερλευκίνη 6 (IL-6).

Στους "αυτοκρινείς" ανασταλτές της θρομβοκυτταροποίησης συγκαταλλέγονται παράγοντες οι οποίοι δημιουργούνται στα Μκ και αργά ή γρήγορα ενσωματώνονται σχεδόν αποκλειστικά στα αιμοπετάλια. Τέτοιοι παράγοντες, οι οποίοι δρουν μόνοι ή συνεργικά είναι: ο PF₄, 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 και η PGE.

Όπως υπολογίστηκε από τους Harker και Finch, το 1/3 των παραγόμενων αιμοπεταλίων παγιδεύεται στον σπλήνα (σπληνική αποθήκη), ενώ τα 2/3 κυκλοφορούν στο αίμα. Από τους ίδιους υπολογίστηκε επίσης ότι τα 2/3 των αιμοπεταλίων καταστρέφονται στον σπλήνα και το 1/3 στο ήπαρ.

Τα κυκλοφορούντα αιμοπετάλια διαφέρουν ως προς το πλήθος τους ανά κυβικό εκατοστό αίματος από είδος σε είδος, ξεκινώντας από τον άνθρωπο με 2×10^8 /ml και φθάνοντας στον επίμυ τα 10^9 /ml. Για τον άνθρωπο ο ρυθμός παραγωγής τους ανέρχεται στα $3,5 \times 10^7$ /ml την ημέρα. Είναι προφανές ότι για να διατηρείται σταθερός ο αριθμός τους, μια ίση κατά προσέγγιση ποσότητα πρέπει να καταστρέφεται κυρίως στον σπλήνα και το ήπαρ. Η μέση ζωή των φυσιολογικών αιμοπεταλίων στον άνθρωπο δεν υπερβαίνει τις 10 ημέρες. Μερικοί ερευνητές θεωρούν ότι ο μηχανισμός αναγνώρισης των γηρασμένων αιμοπεταλίων δεν έχει να κάνει με την λειτουργική τους υποβάθμιση, αλλά μάλλον με την μείωση κάποιων χαρακτηριστικών μορίων της κυτταρικής τους επιφάνειας, όπως είναι το σιαλικό οξύ⁹.

3. Μορφολογία - Δομή

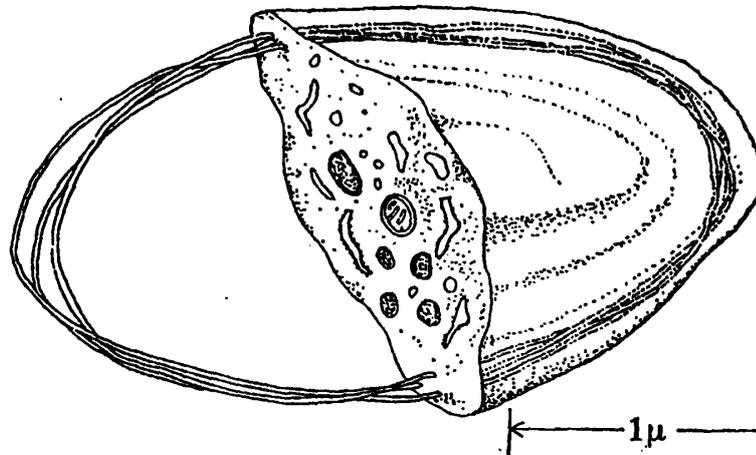
Η περιγραφή των μορφολογικών γνωρισμάτων των αιμοπεταλίων σχετίζεται με τις πληροφορίες, οι οποίες προκύπτουν από την χρήση διαφόρων τεχνικών μέσων, που χρησιμοποιήθηκαν για την μελέτη τους.

Τα ξηρά και χρωματισμένα επιχρίσματα του περιφερικού αίματος παρέχουν πληροφορίες σχετικές με την στατική πλευρά της μορφολογίας των αιμοπεταλίων, ενώ αντίθετα τα νωπά παρασκευάσματα προσφέρουν δυνατότητες για μία δυναμική μελέτη των ζωντανών αιμοπεταλίων.

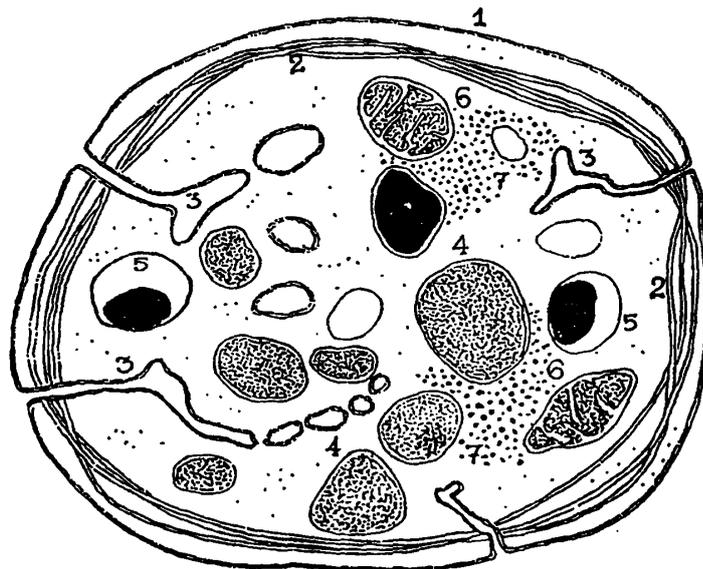
♦ **Μορφολογικά γνωρίσματα με το απλό μικροσκόπιο:** Στα ξηρά παρασκευάσματα τα αιμοπετάλια εμφανίζουν σχήμα αμφίκυρτο δισκοειδές (σχήμα κοκκίου φακής) ή ελλειπτικό^{3,1} (Εικόνα 2α, 2β), έχουν δε διάμετρο 1-5μ και πλάτος γύρω στο 1μ. Ο όγκος τους είναι 5-7μ³.

Στην επιφάνειά τους διακρίνονται δύο μέρη^{3,10}. Το υαλόμερο, που καταλαμβάνει τον μεγαλύτερο όγκο και κείται στο εξωτερικό μέρος του αιμοπεταλίου και το κοκκιόμερο που βρίσκεται συνήθως προς το κέντρο του. Το υαλόμερο είναι διαυγές και αποτελείται από μια βασική ουσία η οποία χρωματίζεται με τις συνήθεις χρωστικές του αίματος με αχνή κυανή χροιά, ενώ το κοκκιόμερο αποτελείται από σαφώς έγχρωμο υλικό (μπλε ή πορφυρό), το οποίο εμφανίζει κοκκιώδη υφή, αποτελείται δε από κοκκία και σωματίδια. Όταν τα αιμοπετάλια ενεργοποιηθούν, τα κοκκία μαζεύονται προς το κέντρο και μοιάζουν με τον πυρήνα των άλλων κυττάρων.

Επίσης, κάτω από ανώμαλες συνθήκες λήψης και παρασκευής (δονήσεις, μη τήρηση των χρόνων, ακατάλληλα υλικά, κακή χρήση φυγοκέντρου κ.λ.π.), τα αιμοπετάλια μπορούν να παρουσιάσουν διαφορετικές όψεις. Ακόμη είναι δυνατόν τα νεώτερα αιμοπετάλια να εμφανίζουν στο οπτικό μικροσκόπιο όψεις που απέχουν πολύ από εκείνες που επιδεικνύονται από τα γηραιότερα¹⁰.



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



Ε. Καραφίλης

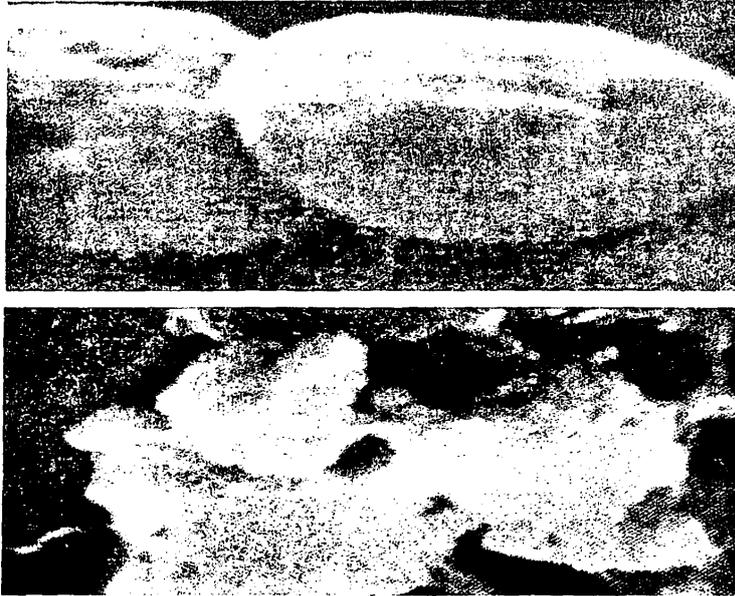
Εικόνα 2β Σχηματική παράσταση εγκάρσιας τομής αιμοπεταλίου. 1.πλασματική μεμβράνη. 2.Μικροσωληνίσκοι. 3.Τμήματα του συστήματος σύνδεσης με την επιφάνεια. 4. κοκκία. 5. Συμπαγή σωμάτια. 6. Μιτοχονδρία. 7. Γλυκογόνο.



♦ **Μορφολογικά γνωρίσματα με το μικροσκόπιο αντιθετικής φάσης:** Παρατηρώντας τα αιμοπετάλια σε νεπά παρασκευάσματα, δηλαδή σε ζωντανή κατάσταση, με το μικροσκόπιο αυτό διαπιστώνεται ότι αυτά παίρνουν τρεις διαφορετικούς μορφολογικά τύπους, που χρονικά διαδέχεται ο ένας τον άλλον στην πορεία της ενεργοποίησής τους. Οι τύποι αυτοί είναι: α) ο ήρεμος τύπος, με τον οποίο κυκλοφορούν (circulating form), β) ο δενδριτικός τύπος (dendritic form) και γ) ο προσκολλημένος ή απλωμένος τύπος (spread form). Αυτοί έγινε δυνατό να περιγραφούν λεπτομερώς με τη χρήση του ηλεκτρονικού μικροσκοπίου σάρωσης.

α) ο ήρεμος τύπος

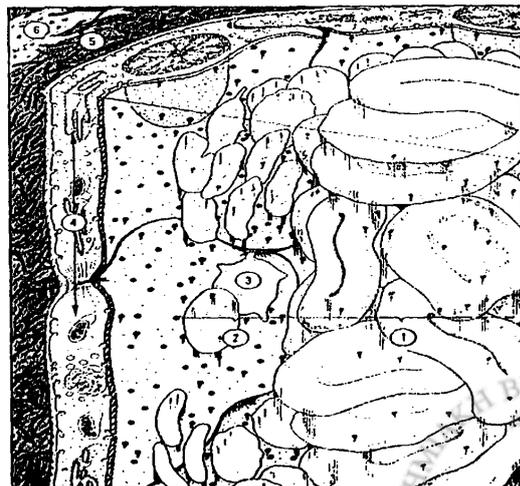
Είναι ο τύπος των αιμοπεταλίων που παρατηρείται με τη συλλογή του αίματος (Εικόνες 3α, 3β).



Εικόνες 3α, 3β.

Σε εικόνες με το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης διαπιστώνεται ότι η επιφάνεια των αιμοπεταλίων έχει τρισδιάστατη και δισκοειδή όψη, διάτρητη από οπές (λίγες από αυτές είναι ανοικτές) και μικρά στόματα. Έτσι, τα αιμοπετάλια μοιάζουν με τα ερυθρά αιμοσφαίρια, με τη διαφορά ότι αυτά είναι πολύ μεγαλύτερα και έχουν αμφίκυκλο δισκοειδές σχήμα (Εικόνα 4). Οι ανοικτές οπές παριστούν πόρους του συστήματος των ανοικτών σωληνίσκων, με τους οποίους το εσωτερικό των αιμοπεταλίων επικοινωνεί με το εξωτερικό.

1. Έρυθροκύτταρα
2. Αίμοπετάλια
3. Μεμονωμένα αίμοπετάλια με παραλλαγή σχήματος
4. Αγγειακό ένδοθηλιο
5. Ελαστικές και συνδετικές ίνες (έσω ελαστική στιβάδα)
6. Ίνοκύτταρο



Εικόνα 4



Σε λεπτές τομές το αιμοπετάλιο μοιάζει να διαπερνάται από μια δέσμη με μικρά σωληνάκια, τα οποία σχηματίζουν την περιφερική δέσμη ακριβώς κάτω από την επιφάνεια (από τη μεμβράνη). Τα διάφορα αιμοπεταλιακά σωματίδια (όπως τα μιτοχόνδρια, τα πυκνά σωματίδια αλλά και τα ασωματίδια) είναι ακίνητα, διασπαρμένα στην τύχη μέσα στο κυτταρόπλασμα. Υπάρχουν ακόμη στοιχεία από τα δύο συστήματα καναλιών, των ανοικτών σωληνίσκων και των πυκνών σωληναρίων.

Τα κανάλια του συστήματος των ανοικτών σωληνίσκων εκτείνονται από τη μία άκρη της επιφάνειας μέχρι την άλλη και δημιουργούν ανοικτές επικοινωνίες του εσωτερικού με το εξωτερικό του κυττάρου. Το σύστημα των πυκνών σωληναρίων βρίσκεται ακριβώς κάτω από την περιφερική ζώνη των μικροσωληναρίων και αναπτύσσει κλειστές σχέσεις επικοινωνίας με το κανάλι του συστήματος των ανοικτών σωληνίσκων. Έτσι αυτά παραμένουν συνδεδεμένα και σχηματίζουν συμπλέγματα με την μεμβράνη¹.

β) ο δενδριτικός τύπος

Ο τύπος αυτός παρατηρείται στην αρχική φάση της ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων (όπως π.χ. αν παραμείνουν εκτός κυκλοφορίας έστω για λίγα λεπτά) και σχετίζεται με την εμφάνιση προσεκβολών ή ψευδοποδίων στην επιφάνειά τους. Τα ψευδοπόδια στην αρχή είναι βραχέα, με πλατιά βάση και οξύ άκρο, ακολούθως γίνονται μακρύτερα (2 ή 3 φορές μεγαλύτερα από το συνολικό μέγεθος του αιμοπεταλίου) και λεπτότερα. Έτσι, τα αιμοπετάλια χάνουν το δισκοειδές σχήμα τους και γίνονται σχεδόν σφαιρικά. Η παρατήρηση ζωντανών αιμοπεταλίων αποκαλύπτει μία δυναμική διαδικασία, στην οποία ενυπάρχει η διαρκής εναλλαγή θέσης, έκτασης ή μεγέθους, συστολής και διεύθυνσης των ψευδοποδίων.

Ο δενδριτικός τύπος παρατηρείται επίσης στη φάση της διέγερσης των αιμοπεταλίων με ισχυρούς διεγέρτες, που οδηγούν στη μη αναστρέψιμη συσώρευση. Στη φάση αυτή επισυμβαίνει αναδιοργάνωση της λεπτής κατασκευής του εσωτερικού των αιμοπεταλίων (Εικόνα 5).

1. Ψευδοπόδια
2. Μικροσωληνάκια
3. Δομικά Ινίδια
4. Σωμάτια του Golgi
5. Κοκκία γλυκογόνου
6. Μιτοχόνδρια
7. Κοκκία
8. Κενοτόπια
9. Ένδοπλασματικό δίκτυο
10. Άργυρόφυλα κοκκία



Εικόνα 5

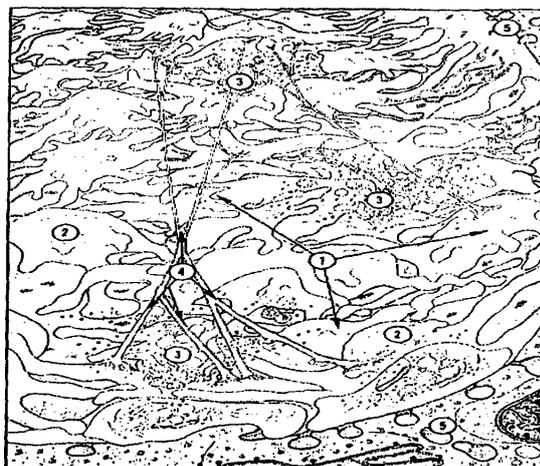
1. Ένδοθηλιακά κύτταρα
2. Ένδοθηλιακή βλάβη
3. Αιμοπετάλια σε σχήμα αντίδρασης που προσφύονται στις συνδετικές ίνες του ένδοθηλιου.
4. Έντονη εξοίδηση αιμοπεταλίου
5. Λευκό αιμοσφαίριο που εγκατέλειψε τό αγγείο.
6. Ίνοκύτταρο



Εικόνα 6

Έτσι, τα τυχαία διεσπαρμένα σωματίδια στο κυτταρόπλασμα των ήρεμων αιμοπεταλίων μαζεύονται στο κέντρο του κυττάρου (Εικόνες 6, 7). Η περιφερική δέσμη των μικροσωληναρίων συνεισφέρει στη μεταβολή του δισκοειδούς σχήματος και συσπάται σε λεπτούς κύκλους γύρω από τα κεντρικά διατεταγμένα σωματίδια, ενώ τα μικροϊνίδια μολονότι υπάρχουν, είναι δύσκολο να διακριθούν, επειδή έχουν υποστεί βλάβη από το οσμικό οξύ¹.

1. Συγκεντρώσεις αιμοπεταλίων στο ένδοθηλιο
2. Έξοιδηση των αιμοπεταλίων
3. Αποκοκκίωση με απελευθέρωση του θρομβοκυτταρικού περιεχομένου
4. Δημιουργία ινώδους δικτύου
5. Ένδοθηλιο



Εικόνα 7

γ) ο προσκολλημένος ή απλωμένος τύπος

Ο απλωμένος τύπος μορφοποιείται τη στιγμή που μία από τις προσεκβολές του δενδριτικού τύπου θα έλθει σε επαφή με την γυάλινη επιφάνεια της αντικειμενοφόρου πλάκας, στην οποία παρατηρούμε το παρασκεύασμα. Τότε το αιμοπετάλιο ενεργοποιείται έκδηλα και στην αρχή προσηλώνει, στη συνέχεια προσκολλά και τελικά απλώνει την προσεκβολή πάνω στην γυάλινη επιφάνεια (που είναι ξένη επιφάνεια) με τρόπο σα να ήταν ένα λεπτό, “αραχνοϋφαντο”, απλωμένο φύλλο πίτας. Τα τμήματα ανάμεσα στα ψευδοπόδια γεμίζουν και παίρνουν μορφή που θυμίζει τα τηγανισμένα αυγά. Η κεντρική αύξηση της πυκνότητας στα απλωμένα αιμοπετάλια φαίνεται να οφείλεται στα κεντρικά διατεταγμένα σωματίδια μεταξύ των κέντρων των κυττάρων. Το ίδιο γίνεται με όλες τις προσεκβολές. Το αιμοπετάλιο τείνει να “αγκαλιάσει” και στη συνέχεια να “φαγοκυτταρώσει” την ερεθιστική γι' αυτό επιφάνεια, μιμούμενο το αρχέγονο αντανακλαστικό της

σύλληψης, πράγμα που επιτυγχάνει αν η ερεθιστική επιφάνεια είναι μικρότερή του. Αν όμως, όπως συνήθως συμβαίνει, η επιφάνεια είναι “τεράστια”, τότε - προσπαθώντας να την αγκαλιάσει -, απλώνεται, τελικά κολλά πάνω της και αυτοκαταστρέφεται¹ (Εικόνα 8).

♦ **Μορφολογικά γνωρίσματα με το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο:** Οι πληροφορίες από την μελέτη της μορφολογίας των αιμοπεταλίων με το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο αντιστοιχούν στον τύπο του αιμοπεταλίου που κυκλοφορεί χωρίς να ενεργοποιηθεί από κανένα ιστικό ή βιοχημικό μέσο. Έτσι τα αιμοπετάλια δέχονται την επίδραση μόνο των μονιμοποιητικών μέσων, που χρησιμοποιούνται για την προετοιμασία των παρασκευασμάτων του ηλεκτρονικού μικροσκοπίου. Φυσικά, η παρατήρηση με το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο παρέχει πολύ περισσότερες πληροφορίες από την παρατήρηση με το κλασικό οπτικό μικροσκόπιο.

Με την ηλεκτρονική μικροσκόπηση διακρίνονται στα αιμοπετάλια τρεις βασικές ζώνες: η περιφερική ζώνη, η ζώνη Sol-Gel (ζώνη λεπτόρευστου-πυκνόμεστου κυτταροπλάσματος) και η ζώνη των οργανυλίων (Εικόνα 2α, 2β).

A) Περιφερική ζώνη

Η περιφερική ζώνη αποτελείται από τρεις στοιβάδες: α) Το εξωτερικό επικάλυμμα (ή γλυκοκάλυκα), β) Την μεμβρανική μονάδα και γ) Την υπομεμβρανική περιοχή^{10,2}.

Το εξωτερικό επικάλυμμα έχει πάχος 10-50nm, επαλείφει την κυτταρική μεμβράνη και αποτελείται από βλενοπολυσακχαρίτες, γλυκοπρωτεΐνες, ΑΤΡάσες, μεγάλη ποσότητα σιαλικού οξέος και προσροφηθείσες πρωτεΐνες. Στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο εμφανίζει χαμηλή ηλεκτρονική πυκνότητα. Η στοιβάδα αυτή, η οποία απαντάται και σε άλλα κύτταρα του σώματος και είναι αρνητικά φορτισμένη στο φυσιολογικό πλασματικό περιβάλλον του αίματος, παρουσιάζει αντιγονικούς προσδιοριστές και φέρει υποδοχείς διαφόρων ερεθισμάτων. Το περιφερικό σωληναριακό σύστημα διαπερνά την στιβάδα αυτή και εκβάλλει προς τα έξω. Το επικάλυμμα τέλος συμμετέχει τόσο στην πρόσφυση όσο και στην συσσώρευση των αιμοπεταλίων. Τέλος, το σιαλικό οξύ μαζί με τις γλυκοπρωτεΐνες, προσδίδουν ηλεκτραρνητικό φορτίο στην μεμβράνη.

Η μεμβρανική μονάδα (πλασματική μεμβράνη) βρίσκεται ακριβώς κάτω από το εξωτερικό επικάλυμμα και αποτελείται από τρία στρώματα: δύο πρωτεϊνικά και ένα λιπιδικής φύσης που παρεμβάλλεται μεταξύ τους. Η δομή της μεμβράνης ακολουθεί το κλασικό υπόδειγμα των Singer και Nicolson^{10,2}.

Η υπομεμβρανική περιοχή χαρακτηρίζεται από την παρουσία μιας στεφανιαίας δέσμης περιφερικών μικροσωληνίσκων που προσδίδουν στα εν ηρεμία αιμοπετάλια το φακοειδές-δισκοειδές σχήμα τους^{10,11,2}. Η στεφάνη αυτή των μικροσωληνίσκων, διαπερνά τις δύο προαναφερθείσες στιβάδες και συνδέει το εξωτερικό της μεμβράνης με τα αιμοπεταλιακά κοκκία, αποτελώντας ένα αγωγό σύστημα που θέτει σε αμοιβαία επικοινωνία το αιματικό πλάσμα με το εσωτερικό του αιμοπεταλίου. Η δομή αυτή των μικροσωληνίσκων επιτρέπει σε ουσίες του πλάσματος να περνούν στο εσωτερικό των αιμοπεταλίων όπως επίσης και στα συστατικά των κοκκίων να εξέρχονται στο αιματικό περιβάλλον, για να επάγουν την ενεργοποίηση και άλλων αιμοπεταλίων.

B) Ζώνη Sol - Gel (ζώνη λεπτόρευστου-πυκνόμεστου κυτταροπλάσματος)

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



α) Σ' αυτά που παίζουν το ρόλο κυτταροσκελετού και είναι υπεύθυνα για την διατήρηση του σχήματος των αιμοπεταλίων και την διατήρηση της θέσης των διαφόρων οργανυλίων όταν το κύτταρο βρίσκεται σε "ηρεμία" και

β) σε εκείνα που ευθύνονται για τις δυναμικές μεταβολές του αιμοπεταλίου και προκαλούν τα κύματα συστολής που προωθούν το περιεχόμενο των αιμοπεταλιακών κοκκίων στο αιματικό περιβάλλον (αντίδραση έκλυσης), εκπληρώνοντας έτσι ένα σημαντικό βήμα της λειτουργίας των θρομβοκυττάρων κατά την ενεργοποίησή τους.

Τά μικροϊνίδια του δικτύου αυτού θεωρούνται ότι είναι ανατομικά συνδεδεμένα με τους μικροσωληνίσκους. Το όλο σύμπλεγμα, σύμφωνα με την ερμηνεία που δίνουν αρκετοί σύγχρονοι κυτταρολόγοι, φαίνεται να παρουσιάζει μία δομή ανάλογη προς εκείνη του σαρκοπλάσματος των λείων μυϊκών κυττάρων, παρά το γεγονός πως η ομοιότητα δεν είναι εύκολο να καταστεί προφανής.

Ωστόσο οι αναλογίες με το λείο μυϊκό κύτταρο αναδύονται κατά την μελέτη της λειτουργίας του αιμοπεταλίου, όπως επίσης και από την βιοχημική ανάλυση των συστατικών που απαρτίζουν το κρύωμα. Πράγματι στις προαναφερθείσες δομές συμμετέχουν πρωτεΐνες όπως η ακτίνη και η μυοσίνη, οι οποίες είναι όμοιες με εκείνες του λείου μυός, ενώ η ενεργοποίησή τους φαίνεται να ρυθμίζεται από ένα σύμπλεγμα τύπου τροπονίνης-τροπομυοσίνης¹².

Γ) Ζώνη οργανυλίων

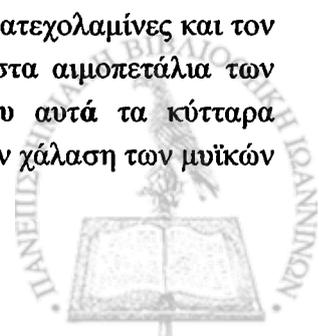
Στο βαθύτερο μέρος των αιμοπεταλίων απαντώνται τα διάφορα συστατικά του κοκκιομερούς της κλασσικής οπτικής μικροσκοπίας. Η ηλεκτρονική μικροσκοπία αποκάλυψε στην περιοχή αυτή μία ποικιλία δομών που περιγράφεται κατωτέρω. Οι δομές αυτές αποτελούν τα οργανίδια του αιμοπεταλίου τα οποία είναι: α) κοκκία,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

Τα άλφα κοκκία αποτελούνται από τρίστοιβη μεμβράνη. Έχουν ωοειδές σχήμα, διάμετρο μεταξύ 0,2 και 0,3μ. Περιέχουν μικροσωληνίσκους, φωσφολιπίδια, θειούχους βλενοπολυσακχαρίτες, κατιονικές πρωτεΐνες, υδρολυτικά ένζυμα, όξινη φωσφατάση, θρομβοσθενίνη, ινωδογόνο, 5-υδροξυτρυπταμίνη (5-HT), τριφωσφορική αδενοσίνη (ATP), διφωσφορική αδενοσίνη (ADP), και ΑΤΡάση. Κάθε αιμοπετάλιο περιέχει 20 με 200 άλφα κοκκία.



Εικόνα 8. Απεικόνιση ενεργοποιημένου αιμοπεταλίου-απλωμένος τύπος.

Τα πυκνωτικά σωμάτια αποταμιεύουν σεροτονίνη, Ca^{++} , ADP, ATP, κατεχολαμίνες και τον αιμοπεταλιακό παράγοντα 4 (PF-4). Ο αριθμός των πυκνωτικών σωμάτων στα αιμοπετάλια των διαφόρων ειδών μεταβάλλεται ανάλογα με την ποσότητα σεροτονίνης που αυτά τα κύτταρα περιέχουν. (Η σεροτονίνη μπορεί ως γνωστόν, να προκαλέσει την σύσπαση ή την χάλαση των μυϊκών



ινών των αρτηριολίων και των αρτηριών). Τα αιμοπετάλια του ανθρώπινου είδους δεν περιέχουν μεγάλες ποσότητες σεροτονίνης και συνεπώς τα πυκνωτικά τους σωμάτια δεν είναι πολυάριθμα, όπως αντίθετα συμβαίνει στα αιμοπετάλια των κουνελιών. Στον άνθρωπο τα πυκνωτικά σωμάτια φαίνεται ότι μεταπίπτουν σε κοκκία άλφα αφού προηγουμένως προσλάβουν σεροτονίνη από το πλασματικό τους περιβάλλον μέσω του σωληναριακού συστήματος που συνδέει την επιφάνεια της εξωτερικής μεμβράνης με τον εσωτερικό χώρο του αιμοπεταλίου².

Τα **μιτοχόνδρια** (βήτα κοκκία κατά την ταξινόμηση του Schulz) παρατηρούνται στις λεπτές τομές των αιμοπεταλίων στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο. Αποτελούν - όπως και σε όλα τα κύτταρα γενικά - το κύριο μέρος του μηχανισμού ενέργειας υπο την μορφή της ATP. Είναι η δεξαμενή του μεταβολισμού των νουκλεοτιδίων και της αδενίνης και οπωσδήποτε η έδρα των φαινομένων της κυτταρικής αναπνοής. Χρησιμεύουν και ως αποθήκες Ca^{++} . Στις περισσότερες λεπτές τομές των αιμοπεταλίων αντιστοιχούν 2 έως 3 μικρού μεγέθους μιτοχόνδρια τα οποία εμφανίζουν 2 ως 3 εσωτερικές πτυχές - συνολικά 10-60 μιτοχόνδρια ανά αιμοπετάλιο - και συνεπώς σχετικά μικρή ποσότητα αναπνευστικών αλυσίδων, άρα όχι αυξημένη μεταβολική ένταση.

Το **σύστημα σωλήνων και φυσαλίδων** περιγράφεται συνήθως ως αποτελούμενο από κενοτόπια συνδεόμενα μεταξύ τους. Το σύστημα αυτό διαιρείται σε δύο κύρια μέρη: Το πρώτο μέρος συνδέεται καθώς φαίνεται με την επιφάνεια της πλασματικής μεμβράνης και γι' αυτό ονομάστηκε **σύστημα σύνδεσης με την επιφάνεια**. Η εσωτερική επιφάνεια των μεμβρανών των κενοτοπίων του εν λόγω συστήματος παρουσιάζει τον ίδιο τύπο επιφανειακού επικαλύματος με εκείνον που απαντάται στην πλασματική μεμβράνη των αιμοπεταλίων. Δεδομένου ότι τα αιμοπετάλια παρουσιάζουν φαγοκυτταρική δραστηριότητα¹²⁻¹⁵ φαίνεται λογικό ότι το σύστημα αυτό συσχετίζεται με την λειτουργία μεταφοράς ουσιών στο εσωτερικό του κυττάρου. Το δεύτερο μέρος ονομάζεται **πυκνό σωληναριακό δίκτυο**, γιατί οι μεμβρανώδεις μικροσωληνίσκοι του αποτελούνται από ένα υλικό μέτριας ηλεκτρονικής πυκνότητας¹⁰. Τα μέρη του συστήματος αυτού προέρχονται πιθανόν από τις συσκευές Golgi του μεγακαρυοκυττάρου από το οποίο παρήχθη το αιμοπετάλιο.

Σιδηροσώματα. Πρόκειται για σφαιροειδείς, φυσαλιδωτούς σχηματισμούς, με διαυγές περιεχόμενο, εκτός της εσωτερικής επιφάνειας της μεμβράνης τους η οποία φαίνεται επενδυμένη με μικρά κοκκία διαμέτρου 55 Å. Δεδομένου ότι τα σωματίδια της φερριτίνης (που περιέχουν σίδηρο) έχουν αυτές τις διαστάσεις, οι φυσαλίδες που παρουσιάζουν τα πυκνά αυτά κοκκία ονομάστηκαν σιδηροσώματα. Γενικά είναι δομές που σπανίζουν μέσα στα αιμοπετάλια και η λειτουργική τους σημασία δεν είναι σαφής.

Κοκκία γλυκογόνου. Είναι μικρά κοκκία που απαντώνται στο κυτταρόπλασμα του αιμοπεταλίου σε μικρές ομάδες ή σπανιότερα σε μεγαλύτερα συσσωματώματα που περιέχουν μερικές εκατοντάδες κοκκίων. Αποτελούν μία σημαντική ενεργειακή παρακαταθήκη της οποίας ο ρόλος γίνεται κρίσιμος κατά τη διάρκεια της αιμοπεταλιακής λειτουργίας, όταν το γλυκογόνο αποικοδομείται προς γλυκόζη, η οποία με τη σειρά της μεταβολίζεται προς ATP για την παροχή της αναγκαίας ενέργειας για τις αντιδράσεις ενεργοποίησης, έκλυσης και συσσώρευσης των αιμοπεταλίων.

ΡΙβΟΣΩΜΑΤΑ. Συνήθως δεν ανευρίσκονται στα αιμοπετάλια. Ωστόσο όταν τα αιμοπετάλια είναι νεαρά τότε πολλές φορές μέσα στο κυτταρόπλασμά τους παρατηρούνται κυρίως μεμονωμένα ριβοσώματα ή θραύσματά τους¹⁶.

Η δομή αυτή των αιμοπεταλίων επιτρέπει την σύσπαση των συσταλών πρωτεϊνών με την οποία επιτυγχάνεται η έκκριση των ενδογενών τους ουσιών στη διάρκεια της ενεργοποίησής τους. Συνεπώς τα αιμοπετάλια είναι συσταλά και εκκριτικά κύτταρα.



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

Η κυτταρική μεμβράνη των αιμοπεταλίων

Η μεμβράνη με πάχος 7-9 ημ, είναι διάτρητη από ένα σύστημα μικροσωληναρίων, τα οποία διαπερνούν όλο το αιμοπετάλιο, αυξάνοντας έτσι εκπληκτικά την έκταση και την λειτουργικότητά της. Η διάτρητη αυτή όψη αποδίδει την πραγματικότητα, αφού σε πάρα πολλές θέσεις η μεμβράνη, αλλά και ολόκληρο το αιμοπετάλιο, διασχίζεται και από το σύστημα των ανοικτών σωληνίσκων, από τους οποίους άλλοι έρχονται σε επαφή με τα αιμοπεταλιακά σωματίδια και άλλοι με την ακτομυοσίνη. Η καταγωγή της μεμβράνης ανάγεται στο ενδοπλασματικό δίκτυο των μεγακαρυοκυττάρων ή στο σύστημα της διακριτής μεμβράνης τους.

Στα θηλαστικά η μεμβράνη των αιμοπεταλίων αποτελεί το φυσικό και χημικό φραγμό που χωρίζει το εσωτερικό του κυττάρου από τις διάφορες τοξικές επιδράσεις, και εκτός από τις λειτουργίες ανταλλαγής ουσιών επιτελεί επιπλέον μία ακόμη ουσιαστική λειτουργία, μεταδίδει δηλαδή μηνύματα και επιδράσεις από το εξωκυττάριο περιβάλλον στο εσωτερικό του κυττάρου. Εξάλλου μηχανισμοί ελέγχου της λειτουργίας της κυτταρικής μεμβράνης καθορίζουν τον τρόπο, το χρόνο και το είδος των ενδοκυττάρων παραγώγων, τα οποία προβάλλουν στην εξωτερική πλευρά της μεμβράνης των αιμοπεταλίων.

Η μεμβράνη των αιμοπεταλίων έχει ασύμμετρη όψη και δομή, αποτελείται από τρεις στιβάδες (τρίστιβη), δύο φωσφολιπιδικές και ανάμεσά τους μια πρωτεϊνική, και είναι πλούσια σε πρωτεΐνες, γλυκοπρωτεΐνες και διάφορους υποδοχείς. Η δομή της μεμβράνης των αιμοπεταλίων εκφράζεται με τον καλύτερο τρόπο στο κλασικό μοντέλο του ρευστού μωσαϊκού της δίστιβης μεμβράνης των Singer και Nicholson. Αυτό επιτρέπει την ελεύθερη διάχυση λιπιδίων και πρωτεϊνών μεταξύ των δύο λιπιδικών στίχων και αποτρέπει τη ροή πολικών μορίων, υποδηλώνοντας έτσι τον αμφίτροπο χαρακτήρα των φωσφολιπιδίων, που οδήγησε στον αυθόρμητο σχηματισμό της "διπλής στιβάδας" τους. Η "στιβάδα" αυτή σταθεροποιείται με ηλεκτροστατικές δυνάμεις-έλξεις που ασκούνται μεταξύ των πολικών κεφαλών των λιπιδίων και των μορίων του νερού, καθώς επίσης και με δυνάμεις van der Waals, οι οποίες αναπτύσσονται στην υδρόφοβο περιοχή της "στιβάδας" των λιπιδίων. Οι

ομοιοπολικές ομάδες των μορίων τους βρίσκονται στην εξωτερική και εσωτερική επιφάνεια της μεμβράνης, όμως μόνον οι ομάδες της εξωτερικής επιφάνειας συνδέονται με γλυκοπρωτεΐνες. Στα φωσφολιπίδια της μεμβράνης βρίσκονται μόρια χοληστερόλης, που με την πολικότητά τους φαίνεται ότι παίζουν σημαντικό ρόλο στη ρευστότητά της, αφού αυτή εξαρτάται από τη λιπιδική σύνθεση και συγκέντρωση των συστατικών της λιπαρών οξέων των φωσφολιπιδίων.

Η χοληστερόλη τοποθετείται προς την εξωτερική πλευρά της μεμβράνης σε περιοχές όπου το σχετικά υδρόφοβο μόριό της ταιριάζει με το κενό που υπάρχει ανάμεσα σε κορεσμένες και ακόρεστες αλυσίδες υδρογονανθράκων. Με τον τρόπο αυτό η χοληστερόλη σταθεροποιεί την υδρόφοβη περιοχή της μεμβράνης, που βρίσκεται προς την εξωτερική επιφάνεια. Σε φυσιολογικές συνθήκες αύξηση του λόγου χοληστερόλης/φωσφολιπιδίων οδηγεί σε αύξηση και της γλοιότητας της μεμβράνης. Όσο περισσότερη χοληστερόλη υπάρχει τόσο μεγαλύτερη είναι η γλοιότητα της μεμβράνης και όσο μεγαλύτερη είναι η συγκέντρωση λιπαρών οξέων τόσο μεγαλύτερη και η σταθερότητά της. Μεμβράνες, οι οποίες έχουν μικρή συγκέντρωση χοληστερόλης και υψηλή συγκέντρωση ακόρεστων λιπαρών οξέων, είναι περισσότερο ρευστές.

Το μωσαϊκό μοντέλο της μεμβράνης είναι πιθανό να διατηρείται με 3 περιορισμούς:

1. Οι εξωτερικές γλυκοπρωτεΐνες συνδέονται με σιαλικό οξύ, το οποίο εμποδίζει άλλες γλυκοπρωτεΐνες και λεκτίνες να ασκούν επίδραση στις πρωτεΐνες του πλάσματος.
2. Οι πρωτεΐνες της μεμβράνης, προτιμώντας το υδρόφοβο περιβάλλον των λιπιδίων, συνδέονται με τα υδρόφοβα συστατικά των γλυκοπρωτεϊνών της επιφάνειας και σχηματίζουν συνάθροιση ενός μωσαϊκού λιπιδίων εδάφους και
3. Η επίδραση του κυτταροπλασματικού δεσμού ασκείται με τις συσταλτές πρωτεΐνες σε πρωτεϊνικά μόρια, που διαπερνούν το λιπιδικό δίστιβο στρώμα, έτσι ώστε να διασφαλίζονται οι αιχμηρές πρωτεΐνες της μεμβράνης.

Ορισμένες γλυκοπρωτεΐνες της επιφάνειας επίσης συνδέονται ισοσθενικά με κυτταροπλασματικές πρωτεΐνες και ένζυμα, όπως π.χ. η αδενυλική κυκλάση. Έτσι επηρεάζουν τη σύνθεση της μεμβράνης μεταβολικά γεγονότα του κυτταροπλάσματος των κυττάρων. Μεταβολές δηλαδή στα λιπίδια της μεμβράνης αλλάζουν τη ρευστότητά της, ενώ μεταβολές στα συστατικά των συσταλών πρωτεϊνών αλλάζουν την έκφραση επάνω στην επιφάνεια των συνδεδεμένων ή ασύνδετων γλυκοπρωτεϊνών. Παρόμοιες μεταβολές επιδρούν στην εξωτερική σύνθεση των λιπιδίων του πλάσματος. Συνεπώς, ο κυτταροπλασματικός μεταβολισμός ή και εξωτερικές δυνάμεις τροποποιούν τη ρευστότητα και ίσως και τη σταθερότητα της μεμβράνης. Τέτοιες μεταβολές μπορεί να είναι σημαντικές για την ανθρώπινη παθολογία.

Τα κύρια συστατικά της μεμβράνης είναι λιπίδια και γλυκοπρωτεΐνες.

α) **Λιπίδια:** Είναι το κύριο δομικό υλικό της βιολογικά ενεργής μεμβράνης των αιμοπεταλίων. Τα μόρια αυτά αποτελούνται από μία υδρόφιλη κεφαλή και δύο υδρόφοβες ουρές. Η κεφαλή μπορεί να έχει θετικό ή αρνητικό φορτίο. Οι υδρόφοβες ουρές αποφεύγουν την επαφή με το υγρό διάλυμα που τις περιβάλλει και στρέφονται από κοινού προς το εσωτερικό της μεμβράνης, ενώ οι υδρόφιλες κεφαλές στρέφονται προς το εξωτερικό της. Η εξωτερική πλευρά της μεμβράνης συνδέεται και μεταφέρει σταθερά κάθε τι που έχει αρνητικό φορτίο, ενώ σχεδόν αποκλειστικά αρνητικά φορτισμένες κεφαλές βρίσκονται και στο εσωτερικό του ακέραιου και μη ενεργοποιημένου κυττάρου. Αυτή η διπλή θωράκιση της μεμβράνης και από τις δύο πλευρές της με αρνητικό φορτίο είναι ο λόγος που τα άθικτα κύτταρα δεν είναι προπηκτικά. Ένα ποσοστό των αιμοπεταλιακών λιπιδίων είναι φωσφολιπίδια, ενώ το υπόλοιπο αποτελείται από ουδέτερα λίπη, ιδιαίτερα από ελεύθερη χοληστερόλη και κατά δεύτερο λόγο από γλυκολιπίδια. Το φωσφολιπιδικό δυναμικό της αιμοπεταλιακής μεμβράνης



αντιπροσωπεύεται από πέντε βασικά είδη φωσφολιπιδίων: την φωσφατιδυλχολίνη (37%), την φωσφατιδυλαιθανολαμίνη (27%), την σφιγγομυελίνη (17%), την φωσφατιδυλσερίνη (10%) και την φωσφατιδυλνισιτόλη (5%). Τα δύο φωσφολιπίδια της χολίνης, η φωσφατιδυλχολίνη και η σφιγγομυελίνη, απαντώνται κυρίως στο εξωτερικό φύλλο της μεμβρανικής διπλοστιβάδας, ενώ η φωσφατιδυλσερίνη -με προπηκτικές κυρίως ιδιότητες- και η φωσφατιδυλαιθανολαμίνη είναι πιο συχνές στο εσωτερικό φύλλο της διπλοστιβάδας, σε στενή επαφή με το κυτταρόπλασμα. Η ασύμμετρη αυτή διάταξη των φωσφολιπιδίων εκφράζει έναν συγκεκριμένο λειτουργικό ρόλο που συσχετίζεται με τις γενικότερες λειτουργίες των αιμοπεταλίων και είναι σαφώς διαφορετική από την διάταξη που παρουσιάζει η μεμβράνη των ερυθροκυττάρων. Είναι γνωστό ότι μία μικρού βαθμού υδρόλυση των φωσφολιπιδίων της χολίνης στην επιφάνεια των αιμοπεταλίων από την φωσφολιπάση A_2 , είναι αρκετή για να πυροδοτηθεί η αντίδραση έκλυσης^{17,18}.

Ακόμη, ορισμένα γλυκολιπίδια φαίνεται να χρησιμεύουν σαν υποδοχείς για την πυροδότηση της αιμοστατικής λειτουργίας των αιμοπεταλίων, ενώ τα φωσφοϊνσιτίδια συμμετέχουν αποφασιστικά στη μεταβολή του σχήματος όπως επίσης και στη λειτουργία της συσσώρευσης των κυττάρων αυτών¹⁸.

β) Γλυκοπρωτεΐνες: Τα αιμοπετάλια - όπως και άλλα κύτταρα των θηλαστικών - παρουσιάζουν στην πλασματική τους μεμβράνη μία ποικιλία γλυκοπρωτεϊνών, οι οποίες ευθύνονται για πολλές από τις αλληλεπιδράσεις των κυττάρων αυτών με το εξωτερικό τους περιβάλλον. Η πλασματική μεμβράνη λειτουργεί σαν διαχωριστική γραμμή, ενώ οι μεμβρανικές γλυκοπρωτεΐνες ρυθμίζουν την ενεργό μεταφορά ιόντων και άλλων ουσιών. Ακόμη οι γλυκοπρωτεΐνες αυτές φαίνονται απαραίτητες για τη δημιουργία δεσμών μεταξύ των στοιχείων του κυτταροσκελετού και των διαφόρων ξένων επιφανειών (συμπεριλαμβανομένων και των άλλων αιμοπεταλίων) στις οποίες μπορεί να προσκολληθεί το αιμοπεταλιακό κύτταρο. Ένα χαρακτηριστικό των αιμοπεταλίων που αναδύεται από την διέγερσή τους μέσω ενός ευρέος φάσματος φυσιολογικών και μη ερεθισμάτων, είναι η προεκβολή ψευδοποδίων που είναι ταυτόχρονη με την αλλαγή του σχήματός τους από δισκοειδές σε σφαιρικό και η παράλληλη πυροδότηση της αντίδρασης έκλυσης. Όταν τα αιμοπετάλια συσσωρευθούν, τα ψευδοποδία επανέλκονται προς τα πίσω οπότε το συσσωμάτωμα των κυττάρων αυτών μειώνεται και σε όγκο, πράγμα που συμβαίνει στη συστολή των θρόμβων. Τά τελευταία χρόνια έχει αυξηθεί το ποσό των παρατηρήσεων που αποδεικνύουν ότι οι μεμβρανικές γλυκοπρωτεΐνες έχουν και ρόλους υποδοχέων για τους αγωνιστές που ενεργοποιούν τις αιμοπεταλιακές λειτουργίες¹⁷. Αρχικά περιγράφησαν τρεις βασικές γλυκοπρωτεΐνες ύστερα από διάλυση των αιμοπεταλιακών μεμβρανών με SDS και ηλεκτροφόρηση του υλικού σε πηκτή SDS-πολυακρυλαμίδιου. Τά ληφθέντα από την ηλεκτροφόρηση φάσματα χαρακτηρίστηκαν σαν κλάσμα I, κλάσμα II, κλάσμα III¹⁹⁻²².

Η γλυκοπρωτεΐνη I (GPI) διαθέτει το μικρότερο μοριακό βάρος (90.000 daltons), ενώ οι γλυκοπρωτεΐνες II (GPII) και III (GPIII) διαθέτουν μεγαλύτερα μοριακά βάρη (μέχρι 150.000 daltons). Με την χρησιμοποίηση τροποποιημένων ηλεκτροφορητικών τεχνικών, με μικρότερες ποσότητες πολυακρυλαμίδιου, διαπιστώθηκε ότι τα κλάσματα I, II, III είναι ανομοιογενή και ότι το καθένα τους διαχωρίζεται σε δύο επιμέρους κλάσματα Ia, Ib, IIa, IIb, και IIIa, IIIb, ενώ εντοπίστηκε και η γλυκοπρωτεΐνη V (GPV). Η γλυκοπρωτεΐνη Ia (GPIa) αποτελεί ένα μακρομόριο που βρίσκεται σε σχετικά μικρές ποσότητες στην πλασματική μεμβράνη του αιμοπεταλίου, παρουσιάζει μοριακή μάζα 153 KD και ισοηλεκτρικό σημείο (PI) μεταξύ 4,5 και 5,5. Περιέχει μία σειρά δισουλφιδικών γεφυρών και πιθανόν έχει τον ρόλο του υποδοχέα για το κολλαγόνο δοθέντος ότι έχουν περιγραφεί ασθενείς οι οποίοι παρουσιάζουν αιμοπετάλια με ελαττωματική ανταπόκριση στο κολλαγόνο και ταυτοχρόνως ένα ποσοστό GPIa ελαττωμένο στα 15-20% των φυσιολογικών επιπέδων της¹⁷. Τά

αιμοπετάλια των ασθενών αυτών εμφανίζουν επίσης αδράνεια στη διέγερση αγλουτίνης από σπόρους σιταριού, πράγμα το οποίο αποτελεί ένδειξη ότι η GPIa λειτουργεί και σαν υποδοχέας της εν λόγω αυτής λεκτίνης²³. Υπάρχουν αρκετές ενδείξεις οι οποίες υποδεικνύουν ότι η γλυκοπρωτεΐνη GPIa μαζί με την GPIb συνδέονται στον κυτταροσκελετό του αιμοπεταλίου μέσω μίας ειδικής πρωτεΐνης (actin binding protein)²⁴. Αυτά φανερώνουν ότι πιθανώς υπάρχει μία σχέση μεταξύ του σημείου πρόσδεσης του παράγοντα Vw και του θεωρούμενου ως υποδοχέα του κολλαγόνου στην αιμοπεταλιακή πλασματική μεμβράνη και γενικά υποδεικνύουν το μέγεθος της σημασίας της γλυκοπρωτεΐνης Ia για την πρόσδεση του αιμοπεταλίου στους υπενδοθηλιακούς ιστούς.

Η γλυκοπρωτεΐνη GPIb αποτελεί την μεγαλύτερη σιαλοπρωτεΐνη της πλασματικής μεμβράνης των αιμοπεταλίων και είναι γενικά παραδεκτό ότι αντιπροσωπεύει τον υποδοχέα του παράγοντα vW, ο οποίος υπεισέρχεται στη διαδικασία προσκόλλησης των αιμοπεταλίων, στον υπενδοθηλιακό ιστό των τραυματισμένων αγγείων. Οι αρχικές ενδείξεις για την κατανόηση του ρόλου της GPIb προήλθαν από την μελέτη των αιμοπεταλίων ασθενών πασχόντων από το σύνδρομο Bernard-Soulier, στο οποίο συνυπάρχει ελάττωση της ικανότητας προσκόλλησης των αιμοπεταλίων και έλλειψη των γλυκοπρωτεϊνών GPIb, GPV και 22KDa²⁵⁻²⁸.

Οι πρωτεάσες που απομακρύνουν το εξωτερικό τμήμα της GPIb οδηγούν σε μία σχετική μείωση της συσσωρευτικής ικανότητας των αιμοπεταλίων που ενεργείται από τον παράγοντα vW, ενώ τα μονοκλωνικά και πολυκλωνικά αντισώματα κατά της GPIb προκαλούν αναστολή της δράσης του vW στα αιμοπετάλια που έχουν υποστεί την επεξεργασία αυτή. Τα δεδομένα αυτά δείχνουν ότι η GPIb είναι ο υποδοχέας του παράγοντα vW. Η GPIb περιέχει επιπλέον ένα σημείο πρόσδεσης για την θρομβίνη, αλλά από διάφορες μελέτες φαίνεται ότι το σημείο αυτό δεν παίζει σημαντικό ρόλο για την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων από την θρομβίνη^{29,30}. Όπως η GPIa έτσι και η GPIb φαίνεται πως διαθέτει αρκετές ενδομοριακές δισουλφιδικές γέφυρες²². Η GPIb συνδέεται με τον κυτταροσκελετό του αιμοπεταλίου και συγκεκριμένα με την εξειδικευμένη πρωτεΐνη πρόσδεσης της ακτίνης (actin binding protein), αλλά δεν είναι σαφές το κατά πόσον η σύνδεση αυτή γίνεται κατ' ευθείαν ή μέσω της παρεμβολής ενός άλλου παράγοντα. Κατά την διάρκεια της αιμοπεταλιακής ενεργοποίησης, το απελευθερούμενο ιονισμένο ασβέστιο ενεργοποιεί κάποιες πρωτεάσες που υδρολύουν σε ένα βαθμό την πρωτεΐνη πρόσδεσης της ακτίνης, δίνοντας έτσι στην GPIb την δυνατότητα να κινείται πολύ πιο ελεύθερα στην αιμοπεταλιακή επιφάνεια και να έρχεται πιο εύκολα σε επαφή με τον παράγοντα vW, πράγμα που διευκολύνει τη συσσωρευτική ανταπόκριση των αιμοπεταλίων στον παράγοντα αυτό. Είναι ενδεχόμενο, οι στερεοτατικές αλλαγές του μορίου της GPIb που προκαλούνται από την διάσπαση των γεφυρών θείου να επιφέρουν και μεταβολές στη λειτουργία της εν λόγω πρωτεΐνης. Η γλυκοπρωτεΐνη GPIIa έχει μοριακή μάζα 150KDa και PI 4,1-4,8. Περιέχει κι αυτή δισουλφιδικές ομάδες, ενώ η λειτουργία της δεν έχει εξιχνιαστεί. Η GPIIa εκτός από τα αιμοπετάλια ανευρίσκεται και στο ενδοθήλιο των αγγείων. Έχει αναφερθεί ότι συμμετέχει στους υποδοχείς των IgG αντισωμάτων της αιμοπεταλιακής επιφάνειας.

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

Η γλυκοπρωτεΐνη V έχει μοριακή μάζα 82KDa και ισοηλεκτρικό σημείο μεταξύ 6,5 και 7,5. Θεωρείται ότι αποτελεί τον κύριο υποδοχέα της θρομβίνης στην αιμοπεταλιακή εξωτερική μεμβράνη, χωρίς ωστόσο η υπόθεση αυτή να είναι αναμφισβήτητα τεκμηριωμένη^{25,17}.



Τέλος, στην πλασματική μεμβράνη των αιμοπεταλίων υπάρχουν και άλλες γλυκοπρωτεΐνες σε μικρές ποσότητες των οποίων η λειτουργία δεν είναι προς το παρόν γνωστή. Ως τώρα έχουν ταυτοποιηθεί περίπου 50 τέτοιες πρωτεΐνες στην μεμβράνη των αιμοπεταλίων. Είναι ωστόσο σαφές, ότι οι υποδοχείς για τους περισσότερους παράγοντες της ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων (μεταξύ των οποίων το ADP, η σεροτονίνη και η αδρεναλίνη) παραμένουν ακόμη άγνωστοι, οπότε είναι πιθανόν οι γλυκοπρωτεΐνες αυτές να παίζουν τον ρόλο των υποδοχέων τους. Υπάρχει ακόμη η πιθανότητα οι εν λόγω γλυκοπρωτεΐνες να ασκούν τις ίδιες λειτουργίες και σε άλλους τύπους κυττάρων εκτός από τα αιμοπετάλια αλλά προς το παρόν η ύπαρξη διαφόρων τεχνικών προβλημάτων επιβραδύνει την ανάπτυξη της έρευνας στο χώρο αυτό. Η χρήση μονοκλωνικών αντισωμάτων και της μοριακής γενετικής υπόσχονται μια ταχεία εξέλιξη στην ανάπτυξη της έρευνας για την κατανόηση της λειτουργικής ταυτότητας των εν λόγω πρωτεϊνών^{25,17}.

4. Φυσικές ιδιότητες

Οι φυσικές ιδιότητες των αιμοπεταλίων, οι οποίες έχουν ήδη μελετηθεί, είναι: α) η πυκνότητα, β) η ταχύτητα καθίζησης, γ) οι ηλεκτρικές ιδιότητες, δ) η ωσμωτική τους αντίσταση και ε) η ρευστότητα της μεμβράνης.

α) **Πυκνότητα:** Αυτή ποσοτικά εκφράζεται ως το ειδικό βάρος τους. Υπάρχει μεγάλη διακύμανση στις τιμές του ειδικού βάρους, που δίνονται από διάφορους ερευνητές. Οι πρώτες αναφορές έδωσαν μέση τιμή 1030, κατ' άλλους 1053 ή ακόμη και τιμές που κυμαίνονται από 1062 μέχρι 1084.

β) **Ταχύτητα καθίζησης:** Η φυσική αυτή παράμετρος τους εξαρτάται από το ειδικό βάρος, το μέγεθος καθώς επίσης και από τις πρωτεΐνες του πλάσματος. Υπολογίζεται ως δείκτης του αριθμού των αιμοπεταλίων πριν και μετά την καθίζησή τους. Φυσιολογικές τιμές για την ταχύτητα καθίζησης είναι $0,74 \pm 0,129$.

γ) **Ηλεκτρικές ιδιότητες:** Τα αιμοπετάλια έχουν αρνητικό φορτίο, το οποίο αποδίδεται στην μεγάλη αναλογία σιαλικού οξέος στον γλυκοκάλυκά τους. Χάρη σ' αυτό το φορτίο μπορεί να υπολογιστεί η ηλεκτροφορητική κινητικότητά τους. Έτσι σε φυσιολογικές συνθήκες (pH 7,4 και ισότονο διάλυμα φυσιολογικού ορού), η ηλεκτροφορητική κινητικότητα ανέρχεται σε $-0,85$ έως $-0,04 \mu/\text{sec}/\text{V}/\text{cm}$.

δ) **Ωσμωτική αντίσταση:** Τα αιμοπετάλια μεταβάλλονται μορφολογικά με την επίδραση υπότονου διαλύματος. Έτσι τα ανθρώπινα αιμοπετάλια μέσα σε υπότονο διάλυμα (0,30-0,20% NaCl) παίρνουν σχήμα ξιφοειδές.

ε) **Ρευστότητα μεμβράνης:** Αυτή επηρεάζεται από μεταβολές στη σύνθεση των λιπιδικών στιβάδων της μεμβράνης και από την κινητικότητα των υποδοχέων. Αυτές οι επιδράσεις φανερώνουν ότι η λειτουργία των αιμοπεταλίων δεν είναι μία απλή συνιστώσα. Ο μηχανισμός, με τον οποίο οι λιποπρωτεΐνες επιδρούν σ' αυτή, φαίνεται πιθανό να σχετίζεται με τη μεταφορά χοληστερόλης στη μεμβράνη τους, αφού τα εμπλουτισμένα με χοληστερόλη αιμοπετάλια είναι πιο ευαίσθητα από τα φυσιολογικά σε διέγερση με αδρεναλίνη και ADP, ενώ παράλληλα έχουν μειωμένη ρευστότητα στη μεμβράνη τους. Αντίθετα, αιμοπετάλια φτωχά σε χοληστερόλη έχουν αυξημένη ρευστότητα στη μεμβράνη τους και ελαττωμένη ικανότητα απάντησης σε αδρεναλίνη. Οι Tandom et al έδειξαν επίσης ότι μεταβολές στη γλοιότητα της μεμβράνης των αιμοπεταλίων, επιδρούν στον αριθμό και το επίπεδο συγγένειας των υποδοχέων της θρομβίνης (υψηλής και χαμηλής συγγένειας), ενώ μεταβολές στη

ρευστότητα της μεμβράνης δεν επιδρούν στην αποκάλυψη των υποδοχέων του ινωδογόνου πάνω στην επιφάνεια των αιμοπεταλίων¹.

5. Λειτουργίες και αντιδράσεις των αιμοπεταλίων

♦ Γενικά

Τα αιμοπετάλια παίζουν σημαντικότερο ρόλο στην αιμόσταση (πήξη και θρομβογένεση). Για τον λόγο αυτό η κατανόηση των λειτουργιών τους μπορεί να συμβάλλει σημαντικά στην πρόληψη των νόσων οι οποίες σχετίζονται με την αρτηριοσκλήρυνση και την συνακόλουθη μερική ή ολική απόφραξη των αγγείων. Γενικότερα η πήξη του αίματος είναι μία ιδιαίτερα περίπλοκη διαδικασία, της οποίας η κατανόηση και ο έλεγχος εκ μέρους του κλινικού γιατρού είναι κρίσιμης σημασίας για τον έλεγχο για ένα μεγάλο φάσμα παθήσεων (καρδιαγγειακές παθήσεις), γύρω από τις οποίες συγκεντρώνεται ο μεγαλύτερος αριθμός θανάτων στην καθημερινή κλινική πράξη. Εκτός, π.χ., από το έμφραγμα του μυοκαρδίου και τα εμφράγματα που αφορούν άλλα όργανα, η λειτουργία της πήξης του αίματος φαίνεται να παίζει έναν σημαντικό ρόλο και στη διαδικασία της μετάστασης των καρκινικών κυττάρων από την έδρα του πρωτοπαθούς όγκου προς άλλες κατευθύνσεις μέσα στο σώμα³¹. Γίνεται λοιπόν φανερό ότι η εμπάθυνση στην γνώση των λειτουργιών τους, αποτελεί έναν πολύ σημαντικό παράγοντα για την βελτίωση των παλιών και την ανάπτυξη νέων θεραπευτικών σχημάτων που αφορούν τα προαναφερθέντα πεδία της παθολογίας. Αν και υπάρχουν αρκετά κενά στις γνώσεις μας τις σχετικές με το κυτταρικό σύστημα που είναι το αιμοπετάλιο, ωστόσο κατά την τελευταία δεκαετία ο ρυθμός εξαγωγής πληροφοριών από την μελέτη του συστήματος αυτού είναι εντυπωσιακός και προφανώς οδηγεί σε μια όλο και ουσιαστικότερη διαλεύκανση των λειτουργικών του ρόλων στο φυσιολογικό και παθολογικό πεδίο.

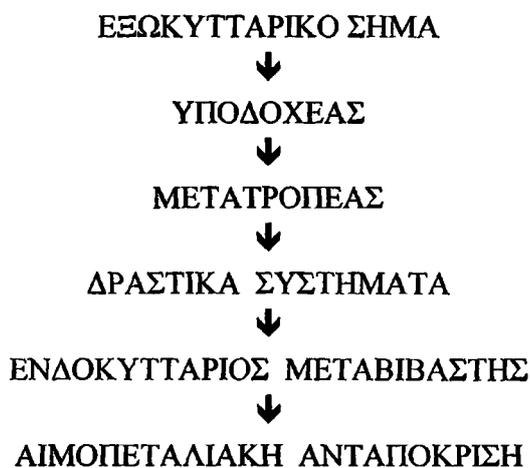
5.1 Ο ρόλος των αιμοπεταλίων στην αιμόσταση

Οι αιμοστατικές αντιδράσεις που συντελούνται για την προστασία του οργανισμού από την απώλεια αίματος, μπορεί σχηματικά να ταξινομηθούν σε πέντε διαφορετικά αλλά επικαλυπτόμενα φαινόμενα: α) την τοπική αγγειοσύσπαση, β) την αιμοπεταλιακή πρόσφυση, γ) τον αιμοπεταλιακό θρόμβο, δ) την ενίσχυση του αιμοπεταλιακού θρόμβου με ινική και ε) την απομάκρυνση των εναποτεθέντων υλικών μέσω ινωδολυτικών και άλλων μηχανισμών. Κάθε ένα από τα φαινόμενα αυτά εμπεριέχει μία πολύπλοκη σειρά αλληλεπιδράσεων, μεταξύ του αίματος και των αγγειακών τοιχωμάτων, στην οποία τα αιμοπετάλια παίζουν πρωτεύοντα ρόλο³². Τα αιμοπετάλια εμφανίζουν *in vivo* τις εξής διαδικασίες με τις οποίες μετέχουν στην αιμόσταση: Πρόσφυση, μεταβολές σχήματος, συσσώρευση και έκλυση. Αν και τα ερεθίσματα και η ανταπόκριση των αιμοπεταλίων είναι ποικίλα, εν τούτοις η ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων ρυθμίζεται από ένα ορισμένο αριθμό μηχανισμών. Κοινή διαδικασία όλων των φυσιολογικών ερεθισμάτων των αιμοπεταλίων είναι η πρόσδεσή τους σε ειδικούς υποδοχείς της επιφάνειας της μεμβράνης. Το σήμα το οποίο "εκπέμπεται" από τους



ενεργοποιημένους υποδοχείς μεταβιβάζεται μετά στην πλασματική μεμβράνη μέσω ειδικών πρωτεϊνών, που δεσμεύουν το GTP. Αυτοί οι διαβιβαστικοί και μετατρεπτικοί μηχανισμοί διεγείρουν και ρυθμίζουν ειδικά δραστικά συστήματα, όπως η φωσφολιπάση C, η οποία υδρολύει τα φωσφολιποειδή και τα κανάλια Ca^{++} . Τα δραστικά αυτά συστήματα τροποποιούν τα επίπεδα ειδικών ενδοκυττάρων μεσολαβητών, όπως η τριφωσφορική 1,4,5-ινοσιτόλη, το Ca^{++} και η διακυγλυκερόλη, οι οποίοι στη συνέχεια πυροδοτούν τη φυσιολογική ανταπόκριση του κυττάρου με μεταβολές της φωσφορυλίωσης, μεταβολές της δραστηριότητας των κυτταρικών ενζύμων και των δομικών ιδιοτήτων των πρωτεϊνών. Είναι προφανές ότι τα μοριακά αυτά φαινόμενα που πυροδοτούνται από την ενεργοποίηση των υποδοχέων, πραγματώνονται με υψηλές ταχύτητες και εμφανίζουν πολλαπλές αλληλεπιδράσεις. Ενίσχυση π.χ. ή αναστολή του σήματος που εκπέμπεται από την ενεργοποίηση του υποδοχέα μπορεί να συμβεί σε κάθε φάση της διαδικασίας αυτής. Επιπλέον το αιμοπετάλιο διαθέτει δύο μεγάλα αναδραστικά κυκλώματα (παλίνδρομης ρύθμισης): το σχηματισμό ενδοϋπεροξειδίων, θρομβοξάνης A_2 και την έκλυση ADP. Οι ουσίες αυτές απελευθερούμενες από τα αιμοπετάλια δρουν σαν τοπικές ορμόνες, καθώς προσδένονται στους ειδικούς μεμβρανικούς υποδοχείς και πυροδοτούν μία παρόμοια αλυσίδα μοριακών φαινομένων, όπως και οι υπόλοιποι φυσιολογικοί διεγέρτες (αγωνιστές).

Σχηματικά η μετατροπή εξωκυττάρων “σημάτων” σε κυτταρική ανταπόκριση (ενεργοποίηση) μπορεί να δοθεί όπως παρακάτω:



α) Τοπική αγγειοσύσπαση

Η αρχική σύσπαση των αγγείων σε περίπτωση τοπικής βλάβης οφείλεται στη διέγερση των νευρικών απολήξεων του συμπαθητικού των λείων μυϊκών ινών των αγγείων με αντανακλαστικό μηχανισμό. Η αγγειοσύσπαση επιτείνεται με την επακολουθούσα ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων και την έκλυση από αυτά σεροτονίνης, αλλά και θρομβοξάνης A_2 , που είναι και ισχυρή αγγειοσυσπαστική ουσία. Το αγγειακό ενδοθήλιο μπορεί να μεταβολίσει τα παραγόμενα από την ενεργοποίηση των

αιμοπεταλίων κυκλικά ενδοϋπεροξειδία σε προστακυκλίνη (προσταγλανδίνη I_2 -PG₂). Η προστακυκλίνη είναι ισχυρός αναστολέας της αιμοπεταλιακής συσσώρευσης, αλλά και ισχυρή αγγειοδιασταλτική ουσία. Έτσι στην αντίδραση μεταξύ αίματος-αγγείων στην αιμοστατική διαδικασία εμπλέκονται νευρικοί και χημικοί μηχανισμοί που καθορίζουν τη συμπεριφορά του αγγείου^{33,34}.

β) Αιμοπεταλιακή πρόσφυση

Η αιμοπεταλιακή πρόσφυση είναι το πρώτο βήμα του σχηματισμού του αιμοπεταλιακού θρόμβου. Για να γίνει πρόσφυση των αιμοπεταλίων, απαιτείται αποκάλυψη των υπενδοθηλιακών στοιβάδων των αγγείων, που συμβαίνει λόγω τραυματισμού ή αγγειακής βλάβης. Στους υπενδοθηλιακούς αυτούς σχηματισμούς γίνεται η πρόσφυση των αιμοπεταλίων με τη βοήθεια άλλων παραγόντων, όπως ο παράγοντας Von Willebrand (VWf), ο οποίος, εκτός από το πλάσμα, απαντάται τόσο στα αιμοπετάλια, όσο και στα ενδοθηλιακά κύτταρα. Εκτός από τον VWf, ένα άλλο σημαντικό στοιχείο της αιμοπεταλιακής πρόσφυσης είναι τα ερυθρά αιμοσφαίρια. Πιστεύεται ότι τα ερυθρά αιμοσφαίρια συμβάλλουν στην αιμοπεταλιακή πρόσφυση με δύο τρόπους: Ο ένας είναι μηχανικός και οφείλεται στην άπωση των αιμοπεταλίων από τα βαρύτερα κύτταρα στην περιφέρεια των αγγείων κατά τη ροή του αίματος και την πίεσή τους πάνω στα αγγειακά τοιχώματα³²⁻³⁶.

Ο δεύτερος αφορά την έκλυση ADP από τα καταστρεφόμενα ερυθρά στην περιοχή της αγγειακής βλάβης, το οποίο διεγείρει την αιμοπεταλιακή πρόσφυση³⁷. Και στο φαινόμενο της αιμοπεταλιακής πρόσφυσης οι αλληλεπιδράσεις αγγειακών τοιχωμάτων και στοιχείων του αίματος είναι βασικής σημασίας.

γ) Σχηματισμός αιμοπεταλιακού θρόμβου

Όταν τα αιμοπετάλια προσφύονται στα αγγειακά τοιχώματα ή ενεργοποιούνται από συσσωρευτικούς παράγοντες, πολύ γρήγορα μεταβάλλουν το δισκοειδές (φακοειδές) σχήμα τους και διασπείρονται στην αγγειακή επιφάνεια. Σε πολύ σύντομο χρονικό διάστημα νέα αιμοπετάλια προσκολλώνται στα άλλα αιμοπετάλια που έχουν προσκολληθεί στο αγγειακό τοίχωμα και σχηματίζεται ο αιμοπεταλιακός θρόμβος³⁸.

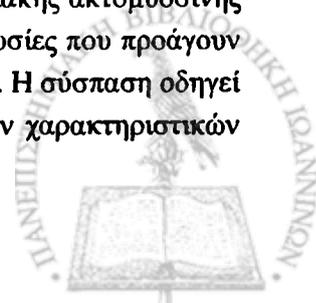
Η διαδικασία της διασποράς των αιμοπεταλίων και ο σχηματισμός επιμήκων ψευδοποδίων αποδίδεται στην ενεργοποίηση μίας συσταλτικής διαδικασίας. Η διαδικασία της προσκόλλησης κυκλοφορούντων αιμοπεταλίων σ' αυτά που έχουν ήδη προσφύθει στο αγγειακό τοίχωμα αποδίδεται σε ουσίες "διαβιβαστές", όπως η θρομβοξάνη A₂ και το ADP, που περιέχονται στα κοκκία των αιμοπεταλίων^{38,39}.

Τρία είναι τα βασικά φαινόμενα της φάσης σχηματισμού του αιμοπεταλιακού θρόμβου:

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

1. Αιμοπεταλιακή Σύσπαση και Χάλαση

Οι περισσότεροι φυσιολογικά απαντώμενοι αγωνιστές της αιμοπεταλιακής συσσώρευσης, όπως το κολλαγόνο, η θρομβίνη, το ADP κ.α., προκαλούν μία αντίδραση συστολής των αιμοπεταλίων. Αυτή αποδίδεται στην απελευθέρωση ιόντων Ca²⁺ από τις αποθηκευτικές δεξαμενές του αιμοπεταλίου και στην ενεργοποίηση του Ca²⁺, της Ca²⁺ εξαρτώμενης ΑΤΡάσης της αιμοπεταλιακής ακτομυοσίνης και θρομβοσθενίνης. Παρόμοιο αποτέλεσμα μπορεί να προκαλέσουν και άλλες ουσίες που προάγουν την είσοδο εξωκυττάριου ασβεστίου στο αιμοπετάλιο, όπως π.χ. τα ιονοφόρα Ca²⁺. Η σύσπαση οδηγεί στη μεταβολή του σχήματος της μεμβράνης και την αλλαγή των φυσικοχημικών χαρακτηριστικών



της. Αποτέλεσμα αυτής της μεταβολής είναι η “κολλώδης” σύσταση της μεμβράνης, που ευνοεί τη συγκόλληση και η αποκάλυψη των μεμβρανικών υποδοχέων για άλλους φυσιολογικά απαντώμενους διεγέρτες της αιμοπεταλιακής συσώρευσης, που εδράζονται στις μεμβρανικές γλυκοπρωτεΐνες, όπως του vWf, του κολλαγόνου, της θρομβίνης, του ADP, του ινωδογόνου κ.ά.^{32,38}.

Η μεταβολή της μεμβράνης των ενεργοποιημένων αιμοπεταλίων οδηγεί στην εμφάνιση ιδιοτήτων που προάγουν την πήξη και αναφέρονται σαν αιμοπεταλιακός παράγοντας-3 (PF₃). Ο PF₃ αντιστοιχεί στις μεμβρανικές μεταβολές που προάγουν την προσρόφηση από το αιμοπετάλιο παραγόντων πήξης και ευνοούν τις αλληλεπιδράσεις τους, κυρίως του παράγοντα X_a, V και της προθρομβίνης. Με τη δράση του PF₃ εκτίθενται στη μεμβρανική επιφάνεια νέα φωσφολιπίδια, τα οποία μέχρι τότε παρέμεναν “κρυμμένα”. Τη δράση αυτή μπορεί να την εμφανίσει και η θρομβίνη³². Εκτός από την συστολή τα αιμοπετάλια μπορούν επίσης να χαλώνται. Η χάλαση αποδίδεται στην επαναποθήκευση του ενδοκυττάριου Ca²⁺. Η επαναποθήκευση αποδίδεται στην φωσφορυλίωση μέσω της c-AMP εξαρτώμενης φωσφορικής κινάσης, μίας φωσφοπρωτεΐνης³³, η οποία δεσμεύει το Ca²⁺. Για το λόγο αυτό η αύξηση του κυκλικού-AMP στο κύτταρο ενισχύει τη φωσφορυλίωση της πρωτεΐνης αυτής και οδηγεί μέσω της δέσμευσης του κυτταροπλασματικού Ca²⁺ στην αιμοπεταλιακή χάλαση και αποσυσώρευση. Στην ενεργοποίηση της αδενυλ-κυκλάσης και την ενδοαιμοπεταλιακή αύξηση του c-AMP αποδίδεται κατά μεγάλο μέρος η αντισυσσωρευτική δράση της προστακυκλίνης (PGI₂) στα αιμοπετάλια⁴⁰. Όπως προαναφέρθηκε, τα υγιά αγγειακά ενδοθήλια μετατρέπουν τα κυκλικά ενδοϋπεροξειδία που παράγονται από τα ενεργοποιημένα αιμοπετάλια σε PGI₂ και έτσι ελέγχεται κατά σημαντικό μέρος η έκταση του αιμοπεταλιακού θρόμβου^{32,40}.

2. Σύνθεση της θρομβοξάνης-A₂ (TXA₂)

Η σύνθεση της θρομβοξάνης A₂ είναι μία σύνθετη βιοχημική διαδικασία, που επιτελείται στα αιμοπετάλια, συντελείται μέσω του αραχιδονικού οξέος και θα αναπτυχθεί στους μηχανισμούς συσώρευσης των αιμοπεταλίων. Η TXA₂ είναι ένας ισχυρός συσσωρευτικός παράγοντας των αιμοπεταλίων, ο οποίος πιθανότατα ασκεί την δράση του προάγοντας την έκλυση του περιεχομένου των αίμοπεταλιακών κοκκίων⁴¹.

3. Έκλυση του Περιεχομένου των Αιμοπεταλιακών Κοκκίων

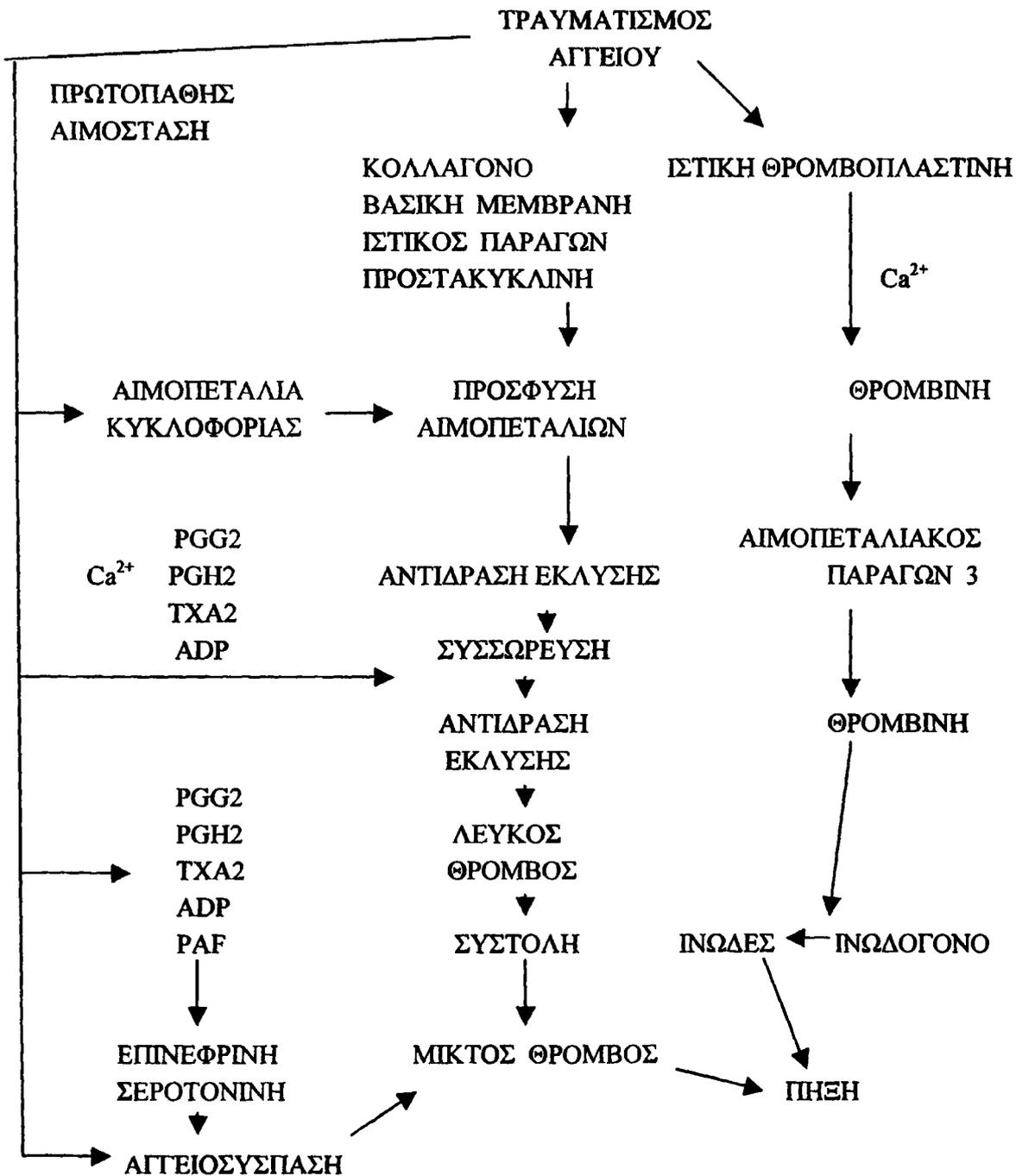
Η έκλυση του περιεχομένου των αιμοπεταλιακών κοκκίων μπορεί να προκληθεί τόσο μέσω της δράσης της TXA₂, όσο και ανεξάρτητα, όπως έχει αποδειχθεί ότι συμβαίνει με την δράση της θρομβίνης σε ασπιρινισμένα αιμοπετάλια. Τα αιμοπεταλιακά κοκκία με τη σειρά τους απελευθερώνουν παράγοντες, οι οποίοι προκαλούν ή ενισχύουν τη συσώρευση, μεταξύ των οποίων, όπως προαναφέρθηκε, οι σημαντικότεροι είναι: Η ADP, η σεροτονίνη, ο αιμοπεταλιακός παράγοντας 4 (PF₄), η β-θρομβοσφαιρίνη, ο μιτογόνος παράγων και λυσοσωματικά ένζυμα³⁹. Με την αντίδραση έκλυσης ολοκληρώνεται η ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων με την απελευθέρωση των παραπάνω ουσιών στον περιαιμοπεταλιακό χώρο και την πραγματοποίηση των παρακάτω παράλληλων φαινομένων:

- ♦ Κεντρική διάταξη σωματιδίων με αναδιάταξη του κυτταρικού σκελετού.
- ♦ Πολυμερισμός της ακτίνης σε ακτίνη F και σχηματισμός περιφερικών μικροϊνιδίων.
- ♦ Πολυμερισμός της μυοσίνης και σύνδεσή της με τα ινίδια της ακτίνης, που σχηματίζουν κύκλο γύρω από τα σωματίδια.



- Σύνδεση της ΑΒΡ με πολυμερισμένα μυοϊνίδια ακτίνης και με ακτίνη Α της μεμβράνης, η οποία είναι ήδη συνδεδεμένη με το σύμπλεγμα γλυκοπρωτεϊνών της μεμβράνης (GIIb-GIIIa), όπου εδράζονται και οι περισσότεροι υποδοχείς αγωνιστών (διεγερτών) της συσώρευσης.
- Συστολή ακτίνης-μυοσίνης.
- Έκκριση των ενδοαιμοπεταλιακών ουσιών^{42,32}.

Με την έκλυση, εκτός από τη μεγιστοποίηση της συσώρευσης, ολοκληρώνεται η αιμοστατική διαδικασία με το σχηματισμό της θρομβίνης (PF₃, FV, FVIII, FI) η οποία θα υδρολύσει το ινωδογόνο και θα σχηματισθεί ο θρόμβος (Σχήμα 1).



Σχήμα 1: Σχηματική παράσταση του ρόλου των αιμοπεταλίων στην αιμόσταση.



5.2 Συσσώρευση των αιμοπεταλίων

Η συσσώρευση των αιμοπεταλίων *in vitro* θεωρείται ότι επιτυγχάνεται με την ενεργοποίηση τριών διαφορετικών ανεξάρτητων μεταβολικών οδών, που μέσω της καθεμιάς μπορεί να συσσωρευθούν τα αιμοπετάλια, ακόμη και αν με διάφορες ουσίες αποκλείσουμε την ενεργοποίηση των δύο άλλων οδών. Όταν η διαδικασία συσσώρευσης συντελείται *in vivo* χωρίς τη συμμετοχή εξωγενών αναστολέων, τότε στην αιμοπεταλιακή συσσώρευση εμπλέκονται και συμμετέχουν διαδοχικά ή ταυτόχρονα και οι τρεις αυτές μεταβολικές διαδικασίες. Οι “οδοί” αυτοί ή “δρόμοι” ονομάζονται συνήθως δρόμος του ADP, του αραχιδονικού (ή κυκλοξυγονάσης) και του PAF (ή λιποξυγονάσης), γιατί κλασικά ενεργοποιούνται από αυτούς τους τρεις παράγοντες (αγωνιστές)⁴³⁻⁴⁶.

Τόσο *in vitro* όσο και *in vivo* η ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων με οποιονδήποτε αγωνιστή οδηγεί σε μια αρχική περιορισμένη απάντηση, που ονομάζεται αναστρέψιμη συσσώρευση, ενώ η μέγιστη απάντηση οδηγεί στη μη αναστρέψιμη συσσώρευση. Στη μη αναστρέψιμη συσσώρευση συμμετέχει και η αντίδραση έκλυσης, κατά την οποία η απελευθέρωση των ενδοαιμοπεταλιακών παραγόντων ολοκληρώνει την συσσώρευση και επεκτείνει την ενεργοποίηση *in vivo* σε νέα αιμοπετάλια, που προσέρχονται στο σημείο της βλάβης με την κυκλοφορία⁴³.

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

- ♦ Με την απελευθέρωση ενδοαιμοπεταλιακού ADP
- ♦ Με την παραγωγή θρομβοξάνης A₂ και
- ♦ Με την απελευθέρωση ενδοαιμοπεταλιακού PAF⁴⁷⁻⁴⁹

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

- Ο δρόμος του ADP με επώαση των αιμοπεταλίων με CP/CPK, που υδρολύει την φωσφορική αδενosίνη⁴⁴
- Ο δρόμος του Αραχιδονικού οξέος με ασπιρίνη, που αναστέλλει, δεσμεύοντας μη αντιστρεπτά την κυκλοξυγονάση^{50,47} και
- Ο δρόμος του PAF με αναστολείς των υποδοχέων του ή με αναστολείς της λιποξυγονάσης (BW755C)⁵¹

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



Ο ρόλος του Ca^{2+} στη συσσώρευση των αιμοπεταλίων

Η συσσώρευση των αιμοπεταλίων από όλες τις γνωστές οδούς προϋποθέτει την ενδοκυττάρια αύξηση των ιόντων Ca^{2+} . Για τον λόγο αυτό περιγράφεται περιληπτικά ο ρόλος του Ca^{2+} στη διαδικασία συσσώρευσης.

- Το Ca^{2+} διεγείρει την ΑΤΡάση Ca^{2+} - Mg^{2+} στο σύστημα πυκνών σωληναρίων του αιμοπεταλίου αυξάνοντας την κινητοποίηση-απελευθέρωση των ενδοαιμοπεταλιακών ιόντων Ca^{2+} .
- Ενεργοποιεί την φωσφολιπάση- A_2 .
- Ενεργοποιεί την πρωτεϊνική κινάση C, που φωσφορυλιώνει περισσότερα μόρια της πρωτεΐνης P40 KDalton, η οποία αποτελεί το κύριο βήμα της λύσης των μεμβρανών των αιμοπεταλιακών κοκκίων.
- Ενεργοποιεί μαζί με την καλμοδουλίνη την κινάση των ελαφρών αλύσεων της μυοσίνης, που είναι το κύριο βήμα για τη συστολή της ακτινομυοσίνης.
- Συνδέει την γλυκοπρωτεΐνη II_β (GPIIb) με την γλυκοπρωτεΐνη III_α (GPIIIa) σχηματίζοντας το σύμπλεγμα GPIIb-III_α των μεμβρανικών γλυκοπρωτεϊνών, πάνω στις οποίες εδράζεται το μεγαλύτερο μέρος των υποδοχέων των αγωνιστών συσσώρευσης^{48,52}.

Ο δρόμος του ADP

Το ADP προκαλεί συσσώρευση αιμοπεταλίων με μηχανισμούς, οι οποίοι δεν είναι πλήρως διευκρινισμένοι. Σε μικρές δόσεις η συσσώρευση είναι αντιστρεπτή, ενώ σε μεγαλύτερες είναι διφασική, λόγω της συμμετοχής και της αντίδρασης έκλυσης⁴⁴.

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

Όταν το ADP χορηγείται εξωγενώς, θεωρείται πιθανόν ότι το παραπάνω φαινόμενο γίνεται μέσω ενός άλλου ενζύμου της κυτταρικής επιφάνειας, της νουκλεοσιδιοδιφωσφορικής κινάσης, το οποίο φωσφορυλιώνοντας το ADP σε ATP προκαλεί πιθανώς μείωση του c-AMP, το οποίο αυξάνει την ενδοαιμοπεταλιακή απελευθέρωση Ca^{2+} και μέσω αυτού αποσυζεύγνυται η προαναφερθείσα συστατική πρωτεΐνη. Αν και η υπόθεση αυτή έχει αμφισβητηθεί, δεν μπορεί εν τούτοις να αποκλεισθεί^{52-54,45}.

Έχει προταθεί ακόμα ότι η αντίδραση αυτή επηρεάζει την ανταλλαγή των φωσφορικών ομάδων της φωσφατιδυλινωσιτόλης και μεταβάλλει τη μεταφορά ιόντων Ca^{2+} διά μέσω των μεμβρανών των αιμοπεταλίων. Η διαδικασία αυτή φαίνεται ότι γίνεται μέσω της ενεργοποίησης της φωσφολιπάσης C και πιθανόν μέσω αναστολής της σύνθεσης της 4,5-διφωσφορικής ινοσιτόλης⁵⁵⁻⁵⁸ και χωρίς την ενεργοποίηση της οδού του αραχιδονικού και την αντίδραση έκλυσης.



Τέλος έχει προταθεί ότι το ADP “εκτρέπει” το ATP από διάφορα σημεία της κυτταρικής μεμβράνης εκεί όπου αυτό χρησιμοποιείται για τη διατήρηση της συσταλτής πρωτεΐνης σε κατάσταση μη συστολής και οδηγεί έτσι στη συσσώρευση^{59,60}.

Όταν οι δόσεις ή η έκλυση ADP είναι υψηλές, τότε το φαινόμενο συμπληρώνεται με το δεύτερο κύμα, που οφείλεται στην αντίδραση έκλυσης των αιμοπεταλίων και οδηγεί στη μη αντιστρεπτή συσσώρευση⁶⁰⁻⁶³ (Σχήμα 2).

Ο δρόμος του αραχιδονικού οξέος

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

Το αραχιδονικό οξύ, εφ' όσον δεν προστίθεται εξωγενώς για πειραματικούς λόγους αυξάνεται στα αιμοπετάλια με την ενεργοποίηση μιας ομάδας μεμβρανικών φωσφολιπασών, από τις οποίες οι πιο σημαντικές είναι κυρίως η φωσφολιπάση A₂ (PLA₂) και η φωσφολιπάση C (PLC). Αυτό γίνεται με την ενεργοποίηση του συμπλέγματος διεγέρτη (αγωνιστή)-υποδοχέα στην κυτταρική μεμβράνη. Οι φωσφολιπάσες αυτές καταβολίζουν τα μεμβρανικά φωσφολιπίδια οδηγώντας στην απελευθέρωση αραχιδονικού οξέος. Το αραχιδονικό οξύ στη συνέχεια μεταβολίζεται με τη δράση δύο ενζύμων, της κυκλοξυγονάσης και της λιποξυγονάσης. Με την κυκλοξυγονάση η μεταβολική οδός οδηγείται στη βιοσύνθεση προσταγλανδινών και θρομβοξάνης A₂, ενώ με την λιποξυγονάση σε HPETE, HETE και Λευκοτρίενια⁶⁴⁻⁶⁶ (Σχήμα 3).

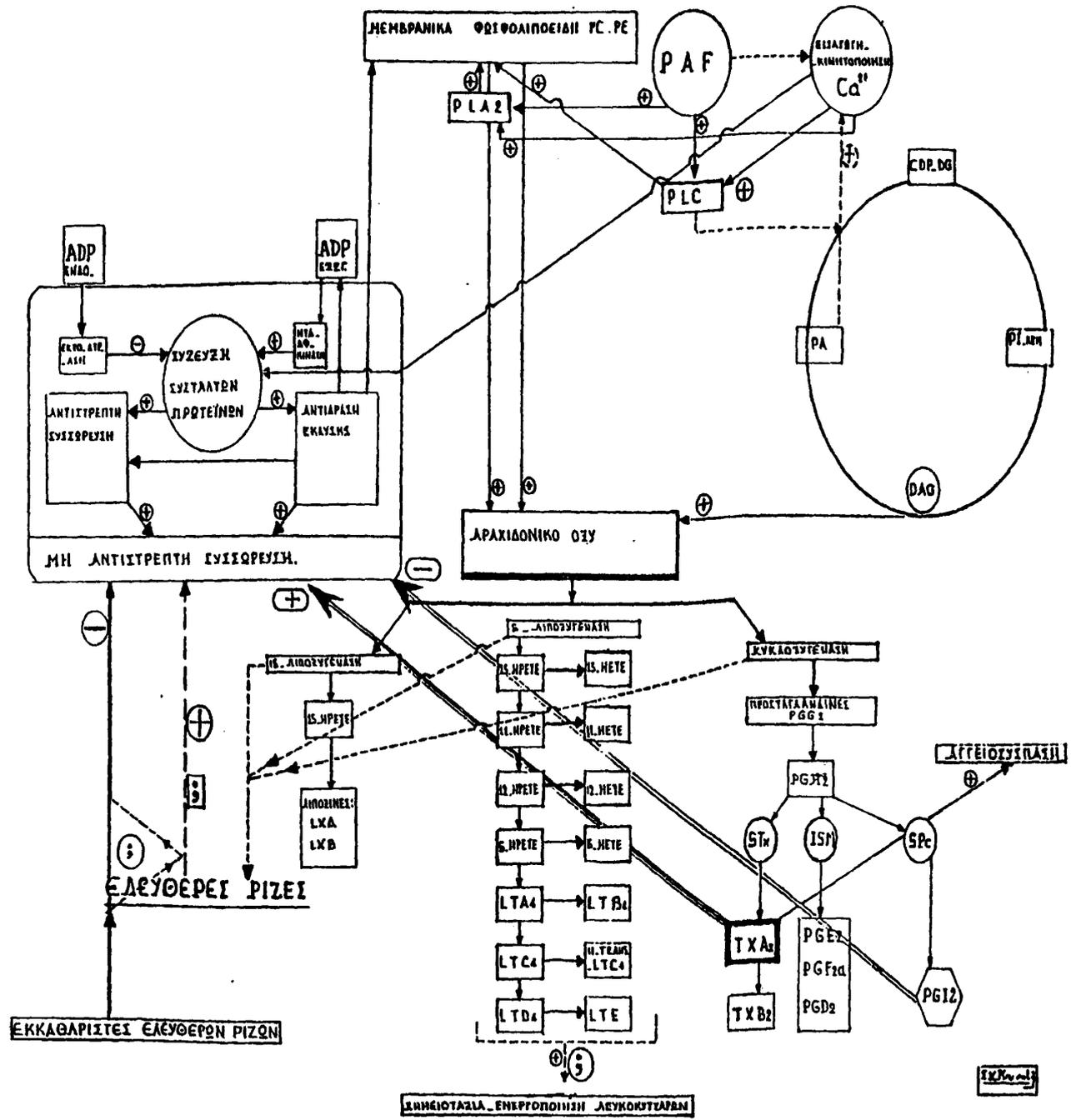
Αναλυτικότερα η διαδικασία βιοσύνθεσης των προσταγλανδινών έχει ως ακολούθως:

Από το αραχιδονικό οξύ με τη δράση του ενζύμου κυκλοξυγονάση των λιπαρών οξέων σχηματίζεται προσταγλανδίνη G₂ (PGG₂) με ενδοϋπεροξειδική δομή (κυκλικό ενδοϋπεροξείδιο). Από εκεί με τη δράση της υπεροξειδάσης σχηματίζεται η προσταγλανδίνη H₂ (PGH₂) και με τη δράση ενδοϋπεροξειδικών ισομερασών, η 15-υδροξυπεροξυ-προσταγλανδίνη E₂. Και τα δύο ένζυμα, ενδοϋπεροξειδική ισομεράση και υπεροξειδάση, φαίνεται ότι διεγείρονται από την αναχθείσα γλουταθειόνη και η υπεροξειδάση θεωρείται ταυτόσημη με την υπεροξειδάση της γλουταθειόνης. Με τη βοήθεια των δύο ενζύμων, τα οποία καταλύουν τώρα αντίστροφα τα προϊόντα της PGG₂, και τα δύο προϊόντα μπορεί να μετατραπούν σε προσταγλανδίνη E₂ (PGE₂)^{61,66,67} (Σχήμα 4).

Το αραχιδονικό οξύ, όταν επωάζεται με αιμοπετάλια, μετατρέπεται σχεδόν αποκλειστικά σε προϊόντα διαφορετικά από τις κλασικές προσταγλανδίνες (Σχήμα 5).

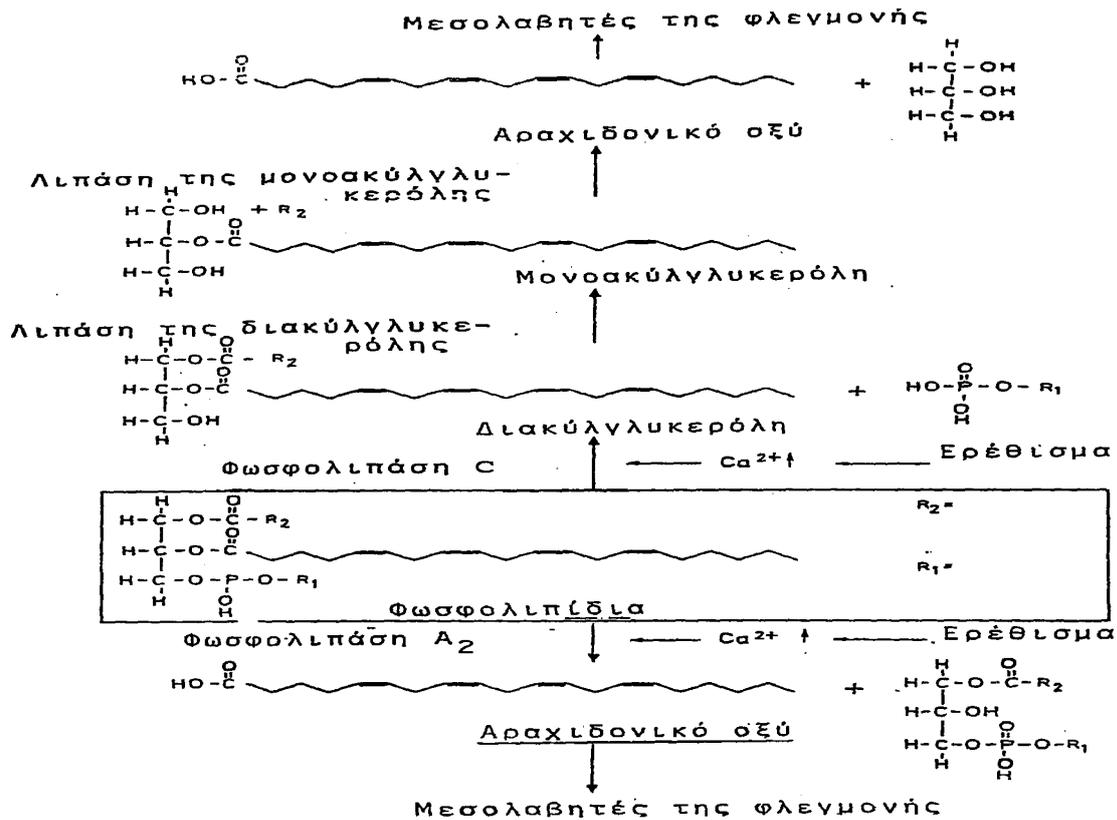
Η σημαντική διαφορά από την κλασική οδό βιοσύνθεσης προσταγλανδινών είναι ότι στα αιμοπετάλια τα κυκλικά ενδοϋπεροξείδια PGG₂ και PGH₂ μετατρέπονται σχεδόν πλήρως σε μη προστανοϊκές ενώσεις. Με την κυκλοξυγονάση σχηματίζονται τα ενδοϋπεροξείδια PGG₂, PGH₂ και με την αφαίρεση της μαλονδιαλδεύδης (MDA), τα ενδοϋπεροξείδια μετατρέπονται σε θρομβοξάνη A₂ (TXA₂), πού αρχικά είχε ονομασθεί ΗΗΤ. Η θρομβοξάνη A₂ είναι ένα πολύ ασταθές μεταβολικό προϊόν με βιολογικό χρόνο ημιζωής 32 δευτερόλεπτα, το οποίο στη συνέχεια μετατρέπεται σε 8-(1-υδροξυ-3-οξυπροπυλ)-9,12L-διυδροξυ-5,10-επταδεκαδιενοϊκό οξύ, που ονομάζεται θρομβοξάνη B₂. Με την λιποξυγονάση το αραχιδονικό οξύ οδηγείται, όπως προαναφέρθηκε στο υδροξυεικοσιτετραενοϊκό οξύ (HETE) και στη σύνθεση Λευκοτριενίων^{45,61,66,68} (Σχήμα 6).





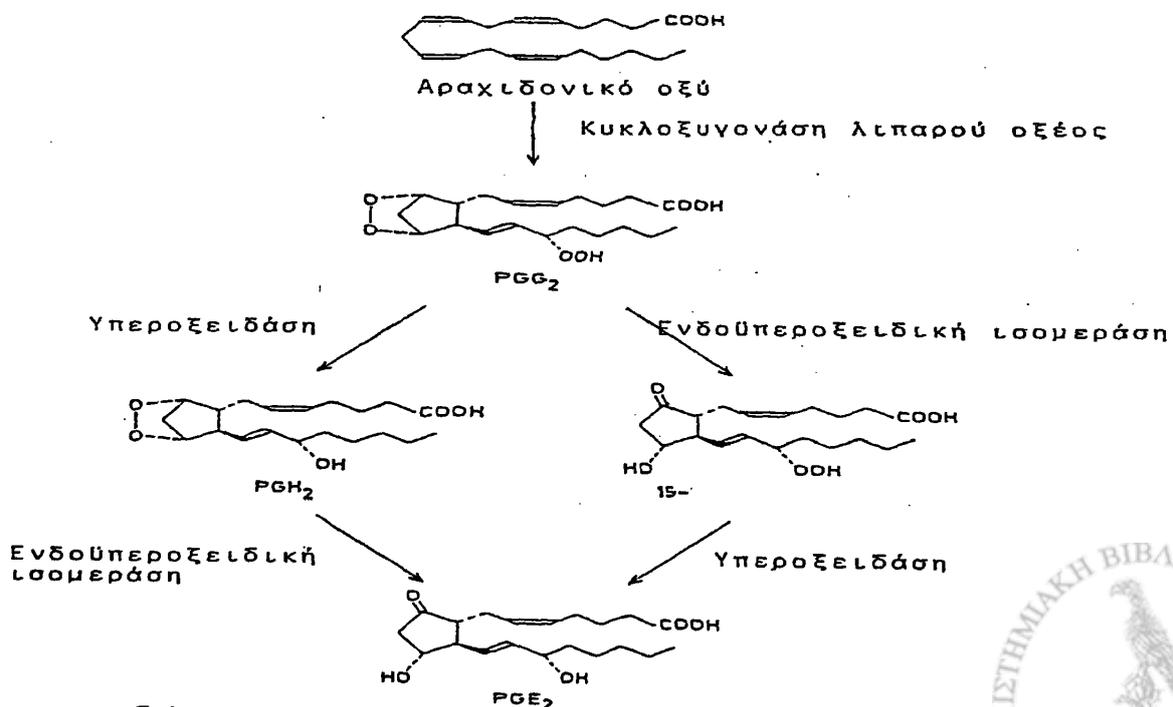
Σχήμα 2 Σχηματική παρουσίαση της ενεργοποίησης αιμοπεταλίων από τον PAF, το ADP και το Αραχιδονικό





Σχήμα 3

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



Σχήμα 4

Οδός βιοσύνθεσης της προσταγλανδίνης E₂ από το αραχιδονικό οξύ.



Ο δρόμος του PAF

Η ικανότητα του PAF να προκαλεί συσσώρευση ήταν γνωστή πριν αποκαλυφθεί η χημική δομή του. Σε μικρές συγκεντρώσεις 10^{-9} έως 10^{-8} M, ο PAF, σε ανθρώπινο PRP, προκαλεί αντιστρεπτή συσσώρευση, ενώ σε μεγαλύτερες (10^{-8} - 10^{-7} M) μη αντιστρεπτή. Τα αιμοπετάλια του κουνελιού είναι πιο ευαίσθητα από του ανθρώπου και είναι δυνατό να συσσωρευτούν και *in vivo* μετά από ενδοφλέβια χορήγηση PAF^{69,70}.

Ο PAF εκτός από τη συσσώρευση προκαλεί μεταβολή του σχήματος των αιμοπεταλίων και έκκριση β-θρομβοσφαιρίνης, σεροτονίνης και PF₄, που οφείλονται στην έκλυση των πυκνών σωματιδίων των αιμοπεταλίων. Η δράση του PAF στα αιμοπετάλια απαιτεί την εξωκυττάρια ή την ενδοκυττάρια κινητοποίηση του Ca²⁺. Το σύμπλεγμα PAF-υποδοχέα ενεργοποιεί την φωσφολιπάση C της αιμοπεταλιακής μεμβράνης, με αποτέλεσμα τη διάσπαση των φωσφατιδιλινοσιτολών της μεμβράνης και το σχηματισμό διακυλγλυκερόλης και φωσφατιδικού οξέος (Σχήμα 2).

Τα δύο αυτά προϊόντα αυξάνουν το ελεύθερο ενδοαιμοπεταλιακό Ca²⁺, είτε εισάγοντάς το (δράση ιονοφόρου) είτε απελευθερώνοντάς το από τις ενδοκυττάρια αποθήκες. Στην αύξηση αυτή του Ca²⁺ δρουν ενισχυτικά η αναστολή της αδενυλκυκλάσης και η διέγερση της φωσφοδιεστεράσης που προκαλεί ο PAF, με αποτέλεσμα τη μείωση του 3,5-κυκλικού AMP, το οποίο προκαλεί δέσμευση του ενδοκυττάριου Ca²⁺. Η ενδοαιμοπεταλιακή αύξηση του Ca²⁺ προκαλεί αυξημένη φωσφορυλίωση με διέγερση των φωσφορυλασών, της καλμοδουλίνης, μίας πρωτεΐνης της ελαφράς αλύσου της μυοσίνης 20KD και μιας πρωτεΐνης 40KD, η οποία ενέχεται στην αντίδραση έκλυσης. Ταυτόχρονα ενεργοποιείται η φωσφολιπάση A₂, με αποτέλεσμα την αύξηση του αιμοπεταλιακού αραχιδονικού οξέος, το οποίο στη συνέχεια μέσω κυκλο- και λιποξυγονάσης ακολουθεί τις πορείες που περιγράφηκαν⁷¹⁻⁷³ (Σχήμα 5, 6).

Έχει διαπιστωθεί ότι τόσο τα κυκλικά ενδοϋπεροξειδία (PGG₂, PGH₂), όσο και η TXA₂ είναι ισχυροί αγωνιστές της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων. Με τη χρήση αναστολέων της κυκλοξυγονάσης (ασπιρίνη, ινδομεθακίνη) έχει διαπιστωθεί ότι ο PAF δεν αναστέλλει τη συσσωρευτική δράση στα αιμοπετάλια, αν και αναστέλλεται η παραγωγή προσταγλανδινών και θρομβοξανίων. Έτσι σήμερα είναι παραδεκτό ότι ο PAF εισάγει τη συσσώρευση των αιμοπεταλίων και μέσω της λιποξυγονάσης (τρίτος δρόμος) και την παραγωγή αυξημένων ποσοτήτων HETE, όταν η κυκλοξυγονάση είναι ανεσταλμένη. Η αύξηση ιδίως των 12-HETE έχει διαπιστωθεί ότι αυξάνει την ενδοαιμοπεταλιακή συγκέντρωση του c-GMP, το οποίο θεωρείται υπεύθυνο για τη μη αντιστρεπτή συσσώρευση που προκαλείται από τον PAF. Είναι επίσης γνωστό ότι η αύξηση του c-GMP οδηγεί σε αύξηση του GTP, το οποίο αυξάνει την είσοδο Ca²⁺ στα αιμοπετάλια και αποτελεί το υπόστρωμα μίας πρωτεΐνης που συνδέεται με τη φωσφολιπάση C^{49,73-78}.

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

- Διέγερση της φωσφολιπάσης C και σχηματισμός διακυλγλυκερόλης και φωσφατιδικού οξέος, τα οποία αυξάνουν το ελεύθερο αιμοπεταλιακό Ca²⁺, είτε εισάγοντάς το είτε προκαλώντας απελευθέρωσή του από τις ενδοαιμοπεταλιακές αποθήκες.
- Διέγερση, στη συνέχεια, της φωσφολιπάσης-A₂ και ενεργοποίηση του μεταβολισμού του αραχιδονικού οξέος προς παραγωγή θρομβοξανίων και HETE.
- Ενεργοποίηση αναστρέψιμης και μη συσσώρευσης, ακόμη και όταν έχει αποκλεισθεί η μεταβολική οδός της κυκλοξυγονάσης στα αιμοπετάλια (τρίτος δρόμος).



5.3 Μεταβολισμός και αντιδράσεις των αιμοπεταλίων

α. Μεταβολική ενέργεια

Τα αιμοπετάλια εκτός από την ενέργεια πού απαιτούν για τη διατήρησή τους στη ζωή, έχουν ανάγκη και ενός έκτακτου ενεργειακού ποσού υπό μορφή ATP για την πρόσληψη και αποδέσμευση σεροτονίνης, την ενεργό μεταφορά καλίου, την εξαγωγή ψευδοποδίων και την μεταβολή του σχήματός τους, την αντίδραση έκλυσης του περιεχομένου των κοκκίων τους, την συσσώρευση και τέλος την συστολή τους, που οδηγεί στην συστολή του αιμοπεταλιακού θρόμβου^{12,13,18,79-83}. Τα αιμοπετάλια εξάγουν την απαιτούμενη για τις λειτουργίες τους ενέργεια από το γλυκογόνο και την γλυκόζη, μέσω της γλυκολυτικής αλυσίδας και της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης.

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

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

Το πρώτο διαμέρισμα θεωρείται αδρανές για την παραγωγή του ATP, ενώ το δεύτερο διαμέρισμα είναι εκείνο το οποίο συμμετέχει άμεσα στην παραγωγή του. Έχει δειχθεί ότι μεταξύ των δύο αυτών διαμερισμάτων υπάρχει μία βραδεία ανταλλαγή αδενικών νουκλεοτιδίων^{84,85}. Όταν τα αιμοπετάλια διεγερθούν τότε το περιεχόμενό τους σε ATP μειώνεται σημαντικά, μέσα κιόλας στα πρώτα δευτερόλεπτα από τη στιγμή της ενεργοποίησής τους.

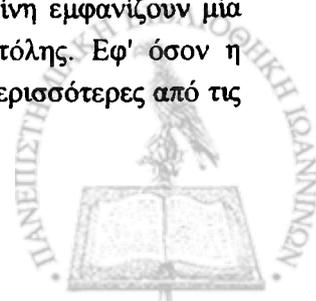
Ταυτόχρονα παρατηρείται μία μείωση του περιεχομένου τους σε γλυκογόνο, το οποίο, όπως έχουμε ήδη προαναφέρει, βρίσκεται αποθηκευμένο στα αντίστοιχα κοκκία. Αν τα αιμοπετάλια στερηθούν τη γλυκόζη, τότε έχει αποδειχθεί ότι είναι ανίκανα να αντιδράσουν στην θρομβίνη^{18,86,87}.

Κατά την ενεργοποίησή τους τα αιμοπετάλια παρουσιάζουν το φαινόμενο της εκρηκτικής αναπνοής, πράγμα που δηλώνει ότι η κατανάλωση οξυγόνου εκ μέρους τους αυξάνεται^{87,88}. Αν η οξειδωτική φωσφορυλίωση παρεμποδιστεί μέσω του αντιβιοτικού αντιμυκίνη πού χορηγείται στο αιμοπεταλιακό εναιώρημα πριν από την προσθήκη της γλυκόζης, τότε η αντίδραση των αιμοπεταλίων είναι υποτονική ή λείπει εντελώς^{18,87,88}. Η γλυκολυτική αλυσίδα φαίνεται ότι από μόνη της δεν μπορεί να παράγει την ποσότητα ενέργειας που απαιτείται για την αντίδραση έκλυσης και συσσώρευσης των αιμοπεταλίων.

Πράγματι, τα αιμοπετάλια στα οποία έχει ανασταλεί η οξειδωτική φωσφορυλίωση ενώ η γλυκόλυση είναι ανέπαφη, δεν είναι ικανά να αντιδράσουν φυσιολογικά στις δράσεις των διαφόρων αγωνιστών. Συνεπώς η ενεργειακή συνιστώσα της αιμοπεταλιακής λειτουργίας βασίζεται κατά τα φαινόμενα κυρίως στα μιτοχόνδρια και το γεγονός αυτό είναι ικανή και αναγκαία συνθήκη για την εκτύλιξη των φαινομένων, που απαρτίζουν την αντίδραση των κυττάρων αυτών στους διάφορους διεγέρτες τους. Προφανώς το ATP, είναι απαραίτητο και για το σχηματισμό των διαφόρων ενδογενών μεσολαβητών της αιμοπεταλιακής αντίδρασης¹⁸.

β. Μεταβολισμός των φωσφοϊνοσιτιδίων και η φωσφορυλίωση πρωτεϊνών

Ήδη από το 1953 είχε παρατηρηθεί ότι ο μεταβολισμός των φωσφολιπιδίων υπεισέρχεται στις αντιδράσεις των κυττάρων από την δράση διαφόρων ερεθισμάτων⁸⁹. Είχε για παράδειγμα δειχθεί, ότι διάφοροι εκκριτικοί ιστοί, όπως το πάγκρεας, όταν διεγείρονται από ακετυλχολίνη εμφανίζουν μία ταχεία αποικοδόμηση ακολουθούμενη από ανασύνθεση της φωσφατιδυλινοσιτόλης. Εφ' όσον η φωσφατιδυλινοσιτόλη αποτελούσε το πλέον ανιχνεύσιμο φωσφοϊνοσιτίδιο, οι περισσότερες από τις



έρευνες αυτές στράφηκαν αρχικά προς τη μελέτη των μεταβολών του εν λόγω φωσφολιπιδίου. Μια σειρά άλλων ερευνών έδειξε ότι η επώαση ιστών ή κυττάρων με ραδιενεργό φωσφόρο ^{32}P , οδηγεί σε μία ταχεία εμφάνιση της ραδιενέργειας στο φωσφατιδικό οξύ (PA), στη φωσφατιδυλινοσιτόλη (PI), στην 4-φωσφορική φωσφατιδυλινοσιτόλη (PIP) και στην 4,5 διφωσφορική φωσφατιδυλινοσιτόλη (PIP_2). Το φαινόμενο αποδόθηκε στην ταχεία ανταλλαγή των φωσφορικών τμημάτων των φωσφολιπιδίων αυτών⁹⁰⁻⁹⁴. Δοθέντος ότι η αύξηση της ραδιενέργειας που περνά στο PA από την PI συμβαίνει όταν τα κύτταρα διεγείρονται, είναι λογικό να θεωρηθεί ότι οι αλλαγές του μεταβολισμού των φωσφολιπιδίων μπορεί να αντιπροσωπεύουν σημαντικά βήματα ενός αριθμού φυσιολογικών διεργασιών, όπως τα φαινόμενα έκκρισης, η αποπόλωση των νευρικών κυττάρων, η φαγοκυττάρωση εκ μέρους των λευκών αιμοσφαιρίων και η αντίδραση συσώρευσης και έκλυσης των αιμοπεταλίων^{92,93, 95-97}. Οι μεταβολές των πολυφωσφοϊνοσιτιδίων που συνυπάρχουν στις ποικίλες αυτές αντιδράσεις θεωρείται ότι συζευγνύονται με αλλαγές της μεμβρανικής διαπερατότητας στο νάτριο και το κάλιο, όπως επίσης και στην απόδοση του ασβεστίου^{94,98-100} (Σχήμα 7,8).

Όσον αφορά τα αιμοπετάλια έχει δειχθεί ότι, όταν αυτά συσσωρεύονται με ADP σε ένα μέσον που περιέχει ασβέστιο, χωρίς την αντίδραση έκλυσης, τότε η PIP_2 εμφανίζει ελάττωση μέσα στο αιμοπεταλιακό κύτταρο^{101,102}. Όμως όταν τα αιμοπετάλια συσσωρεύονται από ADP δεν εμφανίζουν αντίδραση έκλυσης (ή την εμφανίζουν πολύ περιορισμένη) και δεδομένου ότι η αποικοδόμηση της PIP_2 από την φωσφολιπάση C με συνακόλουθο σχηματισμό IP_3 και 1,2-διακυγλυκερόλης συνδέεται με την αντίδραση έκλυσης, είναι λογικό να υποθέσει κανείς ότι η μείωση της PIP_2 οφείλεται στη δράση μιας φωσφομονοεστεράσης και μιας PIP κινάσης, οι οποίες ρυθμίζουν την ανταλλαγή μεταξύ των PIP και PIP_3 ¹⁰². Η αποικοδόμηση της PIP_2 από την φωσφολιπάση C συνοδεύεται από σχηματισμό IP_3 , η οποία προκαλεί αύξηση του ελεύθερου ιονισμένου ασβεστίου μέσα στο κύτταρο και κατά συνέπεια διάφορες ενδοκυτταρικές αντιδράσεις όπως π.χ. την ενεργοποίηση του συστατού συστήματος του κυτταροσκελετού¹⁰³. Όταν τα αιμοπετάλια διεγείρονται κατά τρόπον ώστε να παρουσιάσουν την αντίδραση έκλυσης (όπως π.χ. με την χορήγηση ADP σε PRP χωρίς ασβέστιο ή μέσω χορήγησης θρομβίνης), τότε ενεργοποιείται η φωσφολιπάση C και διασπά τα πολυφωσφοϊνοσιτιδία σε 1,2-διακυγλυκερόλη και φωσφορικές ινοσιτόλες οι οποίες φαίνεται πως σχετίζονται με την φωσφορυλίωση των πρωτεϊνών 20 και 47Kda. Οι υποδοχείς της αιμοπεταλιακής μεμβράνης συνδέονται λειτουργικά με τη φωσφολιπάση C μέσω μίας πρωτεΐνης που χρησιμοποιεί σαν υπόστρωμά της το GTP¹⁰⁴. Η σύνδεση ενός αγωνιστή με τον υποδοχέα του φαίνεται πως ενεργοποιεί την πρωτεΐνη αυτή η οποία δρα πάνω στην φωσφολιπάση C και την θέτει σε λειτουργία χωρίς να απαιτεί αύξηση του ενδοκυττάρου ελεύθερου ασβεστίου. Η ενεργοποιημένη φωσφολιπάση C με την σειρά της διασπά την PIP_2 (ή άλλα φωσφολιπίδια της ινοσιτόλης) και παράγει 1,2-διακυγλυκερόλη και IP_3 . Η 1,2-διακυγλυκερόλη που σχηματίζεται, ενεργοποιεί την πρωτεϊνική κινάση C, η οποία οδηγεί στην φωσφορυλίωση και στην αντίδραση έκλυσης. Παράλληλα, η IP_3 απελευθερώνει Ca^{2+} το οποίο επιτρέπει στη φωσφολιπάση C να διασπάσει την PI και PIP σε 1,2-διακυγλυκερόλη και τα αντίστοιχα ινοσιτιδία IP και IP_2 . Η 1,2-διακυγλυκερόλη μπορεί να διασπαστεί περαιτέρω από μια διγλυκερική λιπάση και μία μονογλυκερική λιπάση, αποδεσμεύοντας αραχιδονικό οξύ. Επίσης η φωσφολιπάση A_2 μπορεί να ενεργοποιηθεί από την αύξηση του ελεύθερου Ca^{2+} και να εξάγει αραχιδονικό οξύ από την PI ή άλλα φωσφολιπίδια, όπως την φωσφατιδυλγολίνη και φωσφατιδυλαιθανολαμίνη. Όλες αυτές οι αντιδράσεις φαίνονται υπό την μορφή ενός διαγράμματος ροής στο Σχήμα 7. Οι αλληλοσχέσεις του μεταβολισμού των πολυφωσφοϊνοσιτιδίων συμπυκνώνονται στο Σχήμα 8.

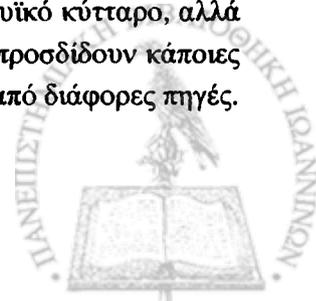


Όσον αφορά τις πρωτεΐνες 20 και 47KDa συνοπτικά αναφέρουμε τα εξής: Το 1977 δείχθηκε ότι η ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων από θρομβίνη, με συνακόλουθη συσσώρευση και έκλυση των κοκκίων τους, συνδέεται με φωσφορυλίωση δύο πρωτεϊνών, μίας που εμφανίζει μοριακό βάρος 40-47KDa και μίας δεύτερης, που μοιάζει με την μυοσίνη και έχει βάρος 20KDa. Όταν τα αιμοπετάλια ενεργοποιούνται από το ADP απουσία της αντίδρασης έκλυσης, οι δύο αυτές πρωτεΐνες φαινόταν να μην φωσφορυλιώνονται, με αποτέλεσμα την εξαγωγή του συμπεράσματος ότι η αντίδραση έκλυσης προϋποθέτει ή συνοδεύεται από την φωσφορυλίωση των εν λόγω πρωτεϊνών. Πολύ πρόσφατα δείχθηκε ότι το ADP προκαλεί κι αυτό φωσφορυλίωση των δύο πρωτεϊνών απουσία της αντίδρασης έκλυσης, μόνο που η φωσφορυλίωση είναι αντιστρεπτή και εξαιρετικά φευγαλέα¹⁰⁵. Δείχθηκε επίσης ότι η φωσφορυλίωση της πρωτεΐνης των 20KDa έχει ως μεσολαβητές της το Ca^{2+} και μία πρωτεϊνική κινάση εξαρτώμενη από την καλμοδουλίνη¹⁰⁶.

γ. Ασβέστιο-Νάτριο-Ενδοκυττάριο pH

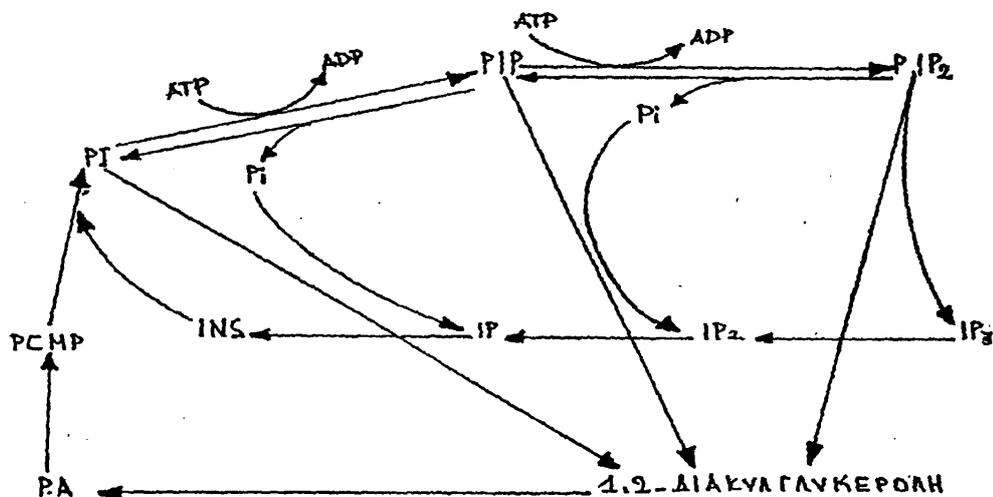
Το ασβέστιο παίζει πρωτεύοντα ρόλο σε πάρα πολλές κυτταρικές λειτουργίες όλων των τύπων των κυττάρων των διαφόρων οργανισμών, τόσο στο ζωικό όσο και στο φυτικό βασίλειο. Όσον αφορά τα αιμοπετάλια έχειδειχθεί ότι, όταν τα μέσα που χρησιμοποιούνται για τη διασπορά τους έχουν χαμηλότερες του φυσιολογικού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

Κατ' αρχάς, στο επίπεδο της αιμοπεταλιακής μεμβράνης (πλασματικής), το Ca^{2+} συμμετέχει στην διατήρηση της δομής του γλυκοπρωτεϊνικού συμπλέγματος IIb/IIIa, το οποίο είναι απαραίτητο για την αλληλεπίδραση με το ινωδογόνο αλλά επίσης και στην ενσωμάτωση του ινωδογόνου στο "ενεργοποιημένο" γλυκοπρωτεϊνικό σύμπλεγμα IIb/IIIa, ώστε τα γειτονικά αιμοπετάλια να συγκρατούνται μεταξύ τους κατά τη συσσώρευση (Σχήμα 9). Επιπλέον το ασβέστιο συνεισφέρει στη σταθεροποίηση του αιμοπεταλιακού συσσωματώματος, γιατί επιβοηθεί κάποιες εκκρινόμενες πρωτεΐνες, όπως η θρομβοσπονδίνη, να προσδένουν μεταξύ τους τα αιμοπετάλια μετά την αντίδραση έκλυσης. Εν συνεχεία, στο εσωτερικό των αιμοπεταλίων το ασβέστιο παίζει διάφορους ρόλους συμμετέχοντας σε ποικίλες βιοχημικές αντιδράσεις που ενισχύουν τα διάφορα φαινόμενα τα οποία σχετίζονται τόσο με τη συσσώρευση και την αντίδραση έκλυσης, όσο και με τη συστολή του λευκού θρόμβου και πλήρους αιματικού θρόμβου, π.χ. το Ca^{2+} είναι απαραίτητος παράγοντας για την ενεργοποίηση της φωσφολιπάσης A_2 και της φωσφολιπάσης C. Η φωσφολιπάση A_2 , εξάγει αραχιδονικό οξύ από την φωσφατιδυλχολίνη και την φωσφατιδυλαιθανολαμίνη, ενώ η φωσφολιπάση C, μπορεί μεν να ενεργοποιηθεί από την γουνοσυν-νουκλεϊτιδική πρωτεΐνη της μεμβράνης, αλλά η δραστηριότητά της μεγεθύνεται από την παρουσία του Ca^{2+} , οδηγώντας σε παραγωγή 1,2-διακυλγλυκερόλης και IP_3 . Η σύσπαση των συσταλών πρωτεϊνών του αιμοπεταλιακού κυτταροσκελετού φαίνεται πως για την πραγματοποίησή της απαιτεί ασβέστιο, όπως συμβαίνει και για κάθε συστολή μυϊκού χαρακτήρα. Το αιμοπετάλιο, ναί μεν δεν είναι αμιγές μυϊκό κύτταρο, αλλά εν τούτοις κατέχει μερικά λειτουργικά και δομικά χαρακτηριστικά τα οποία του προσδίδουν κάποιες αναλογίες με τα λεία μυϊκά κύτταρα¹⁶. Το Ca^{2+} μέσα στα αιμοπετάλια προέρχεται από διάφορες πηγές.



Σε πολλά είδη φαίνεται να βρίσκεται μαζί με τα αδενικά νουκλεοτίδια, τη σεροτονίνη και τα πυροφωσφορικά, στα πυκνωτικά αιμοπεταλιακά κοκκία¹⁶. Φαίνεται ότι το 60% του συνολικού αιμοπεταλιακού ασβεστίου βρίσκεται συγκεντρωμένο στα κοκκία αυτά, από τα οποία κινητοποιείται ευθύς μόλις το αιμοπεταλιακό κύτταρο διεγερθεί από αγωνιστές όπως η θρομβίνη^{107,80}. Ωστόσο σε μερικά είδη όπως τα κουνέλια, τους ινδόχοιρους, τους χοίρους, τις γάτες και μερικές φορές τους αρουραίους, είναι πιθανό ότι το κύριο δυσθενές μεταλλοϊόν δεν αντιπροσωπεύεται από το Ca^{2+} αλλά από το μαγνήσιο^{31,108-111}.

Σχήμα 8 Δρόμοι του μεταβολισμού των πολυφωσφοϊνοσιπιδίων PI: Φωσφατιδυλινοσιτόλη, PIP: 4-Φωσφορική φωσφατιδυλινοσιτόλη, PIP₂: 4, 5-Διφωσφορική φωσφατιδυλινοσιτόλη, PA: Φωσφατιδικό οξύ, PCMP: Μονοφωσφορική φωσφατιδυλ-κυπιδίνη, INS: ινοσιτόλη, IP: 1-Μονοφωσφορική ινοσιτόλη, IP₂: 1, 4-Διφωσφορική ινοσιτόλη, IP₃: 1, 4, 5 Τριφωσφορική ινοσιτόλη

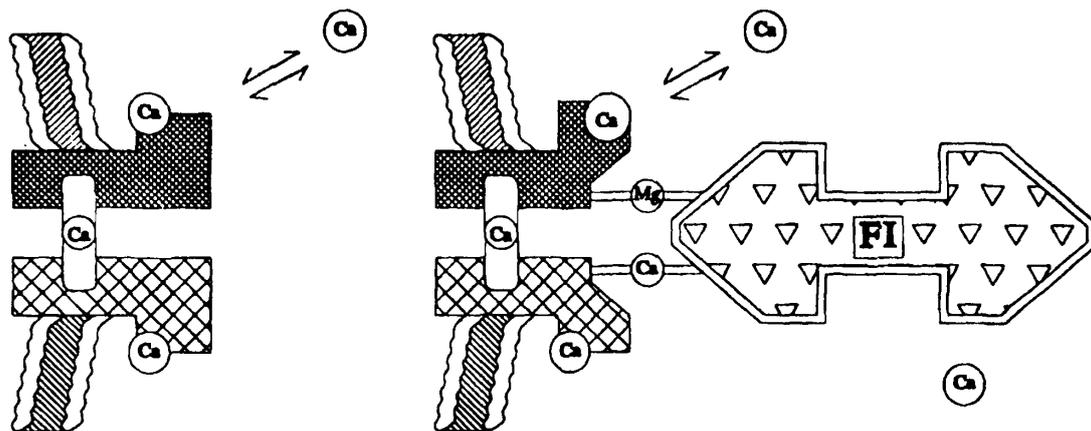


Μία άλλη πηγή εσωτερικού ασβεστίου βρίσκεται στο πυκνό σωληναριακό δίκτυο. Έχει προταθεί ότι κατά την ενεργοποίηση του αιμοπεταλίου, το ασβέστιο απελευθερώνεται από διάφορα σημεία στα οποία βρίσκεται συγκεντρωμένο και διοχετεύεται στο εσωτερικό του εν λόγω δικτύου, κατά τρόπο όμοιο με τον παρατητούμενο στο σαρκοπλασματικό δίκτυο των μυϊκών ινών^{112,113}.

Ο Gergard και οι συνεργάτες του¹¹² υπογραμμίζουν ορισμένα σημεία τα οποία οδηγούν στο συμπέρασμα αυτό:

1) Το πυκνό σωληναριακό δίκτυο είναι το διαμέρισμα του αιμοπεταλιακού κυττάρου στο οποίο εντοπίζεται κατ' εξοχήν η ΑΤΡάση του ασβεστίου και του μαγνησίου, που θεωρείται υπεύθυνη για την μετακίνηση του Ca^{2+} .





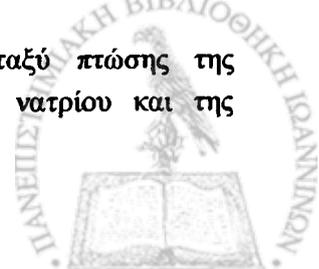
Σχήμα 9 *Ενεργοποίηση του συμπλέγματος GrIIb-IIIa και σύνδεσή του με τη βοήθεια ιόντων Ca^{++} με το ινωδογόνο (FI).*

2) Οι μεμβράνες του πυκνού σωληναριακού δικτύου περιέχουν τμήματα εξαιρετικά πλούσια σε προσταγλανδίνη συνθετάση όπως και άλλα ένζυμα, τα οποία ανευρίσκονται άφθονα στο ενδοπλασματικό δίκτυο. Τα μεμβρανικά αυτά τμήματα έχουν την ικανότητα να αποδεσμεύουν πολύ περισσότερα ιόντα ασβεστίου σε σύγκριση με τα κλάσματα που είναι εμπλουτισμένα με ένζυμα απαντώμενα στις πλασματικές μεμβράνες και τα οποία παρουσιάζουν μία πολύ χαμηλή ικανότητα αποδέσμευσης Ca^{2+} ¹¹⁴.

3) Η μεταβολή του σχήματος των αιμοπεταλίων θεωρείται ότι είναι αποτέλεσμα της ανακατανομής μέσα στο κύτταρο των ιόντων του ασβεστίου. Η μεταβολή αυτή μπορεί να συμβεί ακόμη κι όταν τα πυκνωτικά κοκκία είναι άδεια από Ca^{2+} , τα μιτοχόνδρια είναι μη λειτουργικά, όπως επίσης όταν παροχή Ca^{2+} από το περιβάλλον είναι ελαχιστότατη (χρησιμοποίηση μέσω διασποράς χωρίς Ca^{2+}). Η μεταβολή του σχήματος επίσης, συμβαίνει κι όταν τα αιμοπετάλια έχουν αποκοκκιωθεί μέσω χορήγησης κατάλληλων ποσοτήτων θρομβίνης. Το συμπέρασμα απ' όλα αυτά είναι ότι πρέπει να υπάρχει κάποια εναλλακτική πηγή Ca^{2+} , εφ' όσον η ύπαρξή του είναι απαραίτητη για την αλλαγή σχήματος και η πιθανότερη υποψήφια πηγή είναι ακριβώς το πυκνό σωληναριακό δίκτυο.

Στην αλλαγή του σχήματος των αιμοπεταλίων παίζουν ρόλο και οι μεταβολές του ενδοκυττάριου νατρίου, όπως και του pH. Όταν ένα ερέθισμα δρα επάνω στην αιμοπεταλιακή μεμβράνη, τότε επισυμβαίνει μία άμεση αλλαγή του διαμεμβρανικού δυναμικού, η οποία συνοδεύεται από αλλοιώσεις του ενδοκυττάριου pH και της κατανομής των ιόντων νατρίου και ασβεστίου μέσα στο κύτταρο. Τα αιμοπετάλια έχουν την δυνατότητα να διατηρούν κλίσεις συγκέντρωσης για το νάτριο και το κάλιο μέσω της πλασματικής τους μεμβράνης, κατά τρόπο ώστε το νάτριο να είναι υψηλότερο από εκείνο του αιματικού πλάσματος. Αυτές οι κλίσεις συγκέντρωσης διατηρούνται λόγω της συνεχούς δράσης μίας εξαρτώμενης από το μαγνήσιο ΑΤΡάσης, που λειτουργεί σαν αντλία νατρίου-καλίου και είναι ευαίσθητη στην ουαμπαΐνη ¹⁰⁷. Όταν τα αιμοπετάλια διεγείρονται απουσία ιόντων νατρίου, τότε παρουσιάζουν μία μειωμένης έντασης και έκτασης συσσώρευση, όπως επίσης και μία έντονα μειωμένη απελευθέρωση σεροτονίνης, στο μέσο διασποράς. Η ελάττωση της έκτασης και έντασης της συσσώρευσης παρατηρείται στη διέγερση από επινεφρίνη, ADP και χαμηλής συγκέντρωσης θρομβίνη ¹¹⁵.

Οι Connolly και Limbird, εξετάζοντας την υφιστάμενη σχέση μεταξύ πτώσης της αιμοπεταλιακής ανταπόκρισης λόγω της απομάκρυνσης του εξωκυτταρικού νατρίου και της



αντίστοιχης που παρατηρείται όταν επεξεργαστούμε τα αιμοπετάλια με ινδομεθακίνη, βρήκαν ότι υπάρχει ένας ισχυρός δεσμός μεταξύ της παρουσίας του εξωκυττάριου νατρίου και των διαφόρων λειτουργιών, των εν λόγω κυττάρων, που διαμεσολαβούνται από την οδό του αραχιδονικού οξέος. Οι ίδιοι ερευνητές βρήκαν ότι η απομάκρυνση του εξωκυττάριου νατρίου μειώνει την εκοκκίωση των αιμοπεταλίων την επαγόμενη από επινεφρίνη, υποδεικνύοντας ότι η ενδοαιμοπεταλιακή μείωση των επιπέδων του κυκλικού AMP, είναι μία διαδικασία μάλλον ανεξάρτητη από την ελάττωση του εξωκυτταρικού νατρίου¹¹⁶.

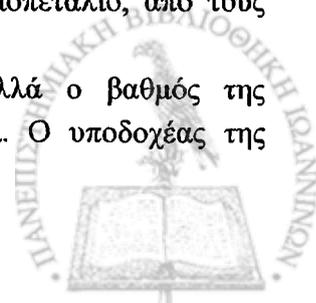
Η θρομβίνη αυξάνει κατά τρεις φορές την περιεκτικότητα σε νάτριο των αιμοπεταλίων όπως επίσης και το ADP, πράγμα που φαίνεται από την αύξηση του φθορισμού της 3,3-διπροπυλθειοκαρβοκυανίνης και δείχνει ότι η πλασματική μεμβράνη έχει εκπολωθεί. Μέσα στα πλαίσια των μεταβολών του δυναμικού της πλασματικής μεμβράνης βρέθηκε ότι και το pH του αιμοπεταλίου υφίσταται αλλαγές. Το ενδοκυττάριο pH αυξάνεται περισσότερο από 0,3 μονάδες. Όταν το ενδοκυτταρικό νάτριο αυξάνει, π.χ. λόγω αδρανοποίησης της αντλίας $\text{Na}^+\text{-K}^+$ με ουαμπαΐνη, τα αιμοπετάλια γίνονται υπερευαίσθητα στο ADP. Έχει ακόμηδειχθεί ότι η αύξηση των ιόντων Na^+ στο εσωτερικό του αιμοπεταλίου δεν συνοδεύεται από αύξηση των ιόντων του Cl^- κατά τη διάρκεια της συσσώρευσης με ADP, υποδεικνύοντας έτσι την ύπαρξη ενός εκλεκτικού μηχανισμού μεταφοράς του Na^+ και όχι του NaCl , πράγμα που πιθανότατα αποκλείει την μεταφορά μέσω μίας απλής ωσμωτικής προσρόφησης οφειλόμενης σε μια κλίση συγκέντρωσης. Γενικά φαίνεται ότι υπάρχει κάποια σχέση μεταξύ των κλίσεων συγκέντρωσης του νατρίου στην πλασματική αιμοπεταλιακή μεμβράνη και της ομοιοστασίας του ασβεστίου στο αιμοπετάλιο¹¹⁷.

Όταν η κλίση συγκέντρωσης του νατρίου αλλοιώνεται μέσω της ουαμπαΐνης ή μέσω απομάκρυνσής του από το εξωκυττάριο μέσον, τότε παρατηρείται μία αύξηση του ανταλλάξιμου ασβεστίου του κυτταροπλάσματος, μία αύξηση του ανταλλάξιμου ασβεστίου που απάγεται από το πυκνό σωληναριακό δίκτυο και μία αύξηση της ροής των ιόντων ασβεστίου μέσω της πλασματικής μεμβράνης. Ωστόσο δεν υπάρχει αλλαγή στη συνολική ποσότητα του αιμοπεταλιακού ασβεστίου. Οι παρατηρήσεις αυτές μπορεί να δείχνουν ότι η κλίση συγκέντρωσης νατρίου της πλασματικής μεμβράνης επηρεάζει έντονα την ομοιοστασία του Ca^{2+} , αλλά η ανταλλαγή $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ δεν είναι η μόνη αναγκαία συνθήκη της εκροής Ca^{2+} από το αιμοπετάλιο¹¹⁷.

δ. Σεροτονίνη

Η σεροτονίνη ανευρίσκεται στα αιμοπετάλια σε σχετικά υψηλές ποσότητες. Η ουσία αυτή συγκεντρώνεται μέσα στα αιμοπεταλιακά κοκκία (κατά πρώτο λόγο στα πυκνωτικά και εν συνεχεία στα άλφα κοκκία), όπου σχηματίζει σύμπλοκα με νουκλεοτίδια της αδενίνης όπως επίσης με ιόντα, σαν το ασβέστιο. Η σεροτονίνη συσσωρεύεται στα αιμοπετάλια - ενάντια σε κλίση συγκέντρωσης - με ενεργό μεταφορά, η οποία είναι συζευγμένη με τη διακίνηση του νατρίου και προφανώς καταναλώνει ενέργεια υπό μορφή $\text{ATP}^{118-120}$. Η σεροτονίνη μπορεί και διαχέεται από τα αιμοπετάλια προς το μέσο στο οποίο βρίσκονται εμβαπτισμένα, όπως επίσης ανταλλάσσεται ελεύθερα με την σεροτονίνη του μέσου αυτού¹²¹⁻¹²³. Όταν τα αιμοπετάλια ενεργοποιηθούν, τότε οι περιεχόμενες στα κοκκία αμίνες όπως επίσης και η σεροτονίνη, αποδεσμεύονται στο αιματικό περιβάλλον και μεγεθύνουν τη διέγερση. Τα αιμοπετάλια ανταποκρίνονται στη σεροτονίνη κατά διάφορους τρόπους:

- 1) Ένα τμήμα της σεροτονίνης που αποδεσμεύεται επιστρέφει πίσω στο αιμοπετάλιο, από τους υποδοχείς που ενεργούν την πρόσληψή της.
- 2) Τα αιμοπετάλια μπορούν να συσσωρευθούν από την σεροτονίνη, αλλά ο βαθμός της συσσώρευσης εξαρτάται από το ζωικό είδος απ' το οποίο προέρχονται. Ο υποδοχέας της



αιμοπεταλιακής μεμβράνης που υπαισέρχεται στην ενεργοποίηση από σεροτονίνη, είναι του τύπου 5HT₂ και διαφέρει από εκείνον ο οποίος ευθύνεται για την πρόσληψη της ουσίας αυτής¹²⁴.

- 3) Η σεροτονίνη πιθανόν παίζει κι έναν ρόλο μεγέθυνσης της αιμοπεταλιακής ανταπόκρισης στο κολλαγόνο, την επινεφρίνη, το ADP και την νορεπινεφρίνη, αλλά αυτό εξαρτάται από την συγκέντρωση των αγωνιστών και το χρονικό διάστημα μεταξύ των διαδοχικών διεγέρσεων.
- 4) Συμβαίνει, στα αιμοπετάλια ορισμένων ειδών να μην παρατηρείται συσσώρευση ακόμη κι όταν η ουσία αυτή προστίθεται μαζί με άλλους αγωνιστές, όπως η επινεφρίνη, τότε επέρχεται έντονη συσσώρευση, πράγμα που δηλώνει ότι η συνέργεια των δύο αυτών ουσιών είναι απαραίτητη για την πραγματοποίηση διαφόρων αντιδράσεων των αιμοπεταλιακών κυττάρων¹²⁵.
- 5) Η φαρμακευτική ουσία κετανσερίνη που αποτελεί έναν εκλεκτικό ανταγωνιστή της 5-HT στον εγκεφαλικό ιστό, αναστέλλει τη μεγεθυντική δράση της σεροτονίνης πάνω στην αιμοπεταλιακή αντίδραση που προκαλείται από κολλαγόνο, ADP ή επινεφρίνη και επιφέρει πλήρη αναστολή της αιμοπεταλιακής συσσώρευσης, όταν αυτή πραγματοποιείται μόνο μέσω της σεροτονίνης. Η συνέργεια μεταξύ σεροτονίνης κι άλλων αγωνιστών είναι περίπλοκη. Τά αιμοπετάλια που έχουν κορεστεί με 5-HT, δεν ενεργοποιούνται από επινεφρίνη. Επιπλέον τα αιμοπετάλια που έχουν επωαστεί επί μακρόν με σεροτονίνη, παρουσιάζουν πτώση της ικανότητάς τους να ανταποκρίνονται σε άλλους αγωνιστές όπως τα προσταγλανδινικά ενδοϋπεροξειδία, το κολλαγόνο, το ADP, η θρομβίνη και η αντιδιουρητική ορμόνη¹⁸.

ε. Δομικές και συσταλτές πρωτεΐνες

1. Ακτίνη

Η ακτίνη ανευρίσκεται στα κύτταρα σε δύο μορφές: στη σφαιρική μορφή (G-ακτίνη)- η οποία είναι συνήθως συνδεδεμένη με την προφιλίνη- και τη νηματοειδή μορφή (F-ακτίνη). Τα αιμοπετάλια περιέχουν μεγάλη ποσότητα ακτίνης που ανέρχεται στο 15-20% των συνολικών τους πρωτεϊνών. Κατά τη διάρκεια της ενεργοποίησής τους το μεγαλύτερο ποσοστό της ακτίνης (70-80% ίσως και περισσότερο), λαμβάνει την νηματοειδή μορφή F. Τα ινίδια της νηματοειδούς μορφής φαίνονται να είναι συνδεδεμένα με μυοσίνη και ταυτόχρονα με μία ειδικευμένη πρωτεΐνη γνωστή με τον όρο "πρωτεΐνη συνδεόμενη με την ακτίνη". Όσο τα αιμοπετάλια βρίσκονται εν ηρεμία, το μέγιστο μέρος της ακτίνης τους αποπολυμερίζεται και φαίνεται ότι υπάρχουν συγκεκριμένοι μηχανισμοί οι οποίοι εμποδίζουν τον αποπολυμερισμό της πρωτεΐνης αυτής κατά την διάρκεια της ήρεμης κατάστασης των αιμοπεταλιακών κυττάρων. Υπό την έννοια αυτή, η προφιλίνη λειτουργεί συνδεόμενη με τα ακτινικά μονομερή ώστε να αποτρέπει την συνένωσή τους και τον σχηματισμό νηματοειδών πολυμερών.^{126,127}

Εκτός από την προφιλίνη, πρέπει να υπάρχουν κι άλλες πρωτεΐνες πού καταλαμβάνουν τα άκρα κάθε σωματιδίου σφαιρικής ακτίνης, εμποδίζοντας τον πολυμερισμό^{127, 128}.

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

Η πρωτεΐνη σύνδεσης με την ακτίνη λειτουργεί σαν πυρήνας ή σαν στήριγμα πάνω στο οποίο προσκολλώνται τα μονομερή της ακτίνης, όταν ενεργοποιούνται τα αιμοπετάλια. Η πρωτεΐνη αυτή θα μπορούσε να παίζει το ρόλο της τροπομυοσίνης που συγκρατεί τα μονομερή της ακτίνης στις μυϊκές ίνες. Η πρόσδεση αυτή οδηγεί σε πολυμερισμό της σφαιρικής μορφής.

Ο πολυμερισμός προάγεται ακόμη περισσότερο, μέσω απόρριψης των πρωτεϊνών που καλύπτουν τα άκρα ήδη υπαρχόντων νηματοειδών ακτίνης. Οι πρωτεΐνες αυτές, όπως αναφέρθηκε, εμποδίζουν την σύνδεση των μονομερών κατά την φάση ηρεμίας του αιμοπεταλίου και απορρίπτονται όταν το αιμοπετάλιο διεγείρεται.

Τα υπάρχοντα νημάτια ακτίνης αναδιοργανώνονται δομικά όταν τα αιμοπετάλια διεγείρονται και συνδέονται μεταξύ τους¹²⁸.



Οι μεταβολές αυτές και κυριώτερα η επαγωγή του πολυμερισμού της ακτίνης, φαίνεται ότι συνδέεται με τον μεταβολισμό των πολυφωσφοϊνοσιτιδίων. Οι μελέτες που οδήγησαν στο συμπέρασμα αυτό ξεκίνησαν από την παρατήρηση πως ο πολυμερισμός της ακτίνης φαίνεται να λαμβάνει χώρα πάνω στην πλασματική μεμβράνη του αιμοπεταλίου και η πρόδρομη μορφή της ακτίνης βρίσκεται κοντά και πιθανόν αλληλεπιδρά με την λιπιδική διπλοστιβάδα. Η προφυλίνη και η προφυλακτίνη, συμπεριφέρονται σαν πρωτεΐνες μεμβράνης, οπότε μπορεί να θεωρήσει κανείς ότι αλληλεπιδρούν άμεσα με τα φωσφολιπίδια^{129,130}. Σχετικά πρόσφατα έχει δειχθεί ότι, τα φωσφολιπίδια της ινοσιτόλης και κυριώτερα η PIP₂, μπορούν να αποσυνθέσουν το σύμπλεγμα της προφυλακτίνης (προφυλίνη+ακτίνη), επειδή σχηματίζουν δεσμούς με την προφυλίνη. Οι ισχυρότεροι δεσμοί σχηματίζονται μεταξύ προφυλίνης και PIP₂, ενώ η PIP και η PI σχηματίζουν ασθενέστερους δεσμούς. Η σειρά δύναμης των δεσμών είναι: PIP₂>PIP>PI. Πιθανόν τα φωσφοϊνοσιτιδία να ανταγωνίζονται ένα σημείο πρόσδεσης πάνω στην προφυλίνη με την ακτίνη. Το απελευθερούμενο μονομερές της ακτίνης δεν φαίνεται να αλληλεπιδρά με τα φωσφολιπίδια. Έτσι η ακτίνη μπορεί πλέον να αντιδράσει και ν' αρχίσει τη διαδικασία του πολυμερισμού της. Η δράση της PIP₂ (ή της PIP) πάνω στο πρόδρομο των μικροϊνιδίων, δηλαδή στο σύμπλεγμα της προφυλακτίνης και συνεπώς η έναρξη της αύξησης της κυτταρικής κινητικότητας, μπορεί να ρυθμίζεται μέσω της αύξησης της ανταλλαγής του κύκλου των φωσφολιπιδίων της ινοσιτόλης¹⁸. Δεδομένου ότι η αύξηση της ανταλλαγής των φωσφολιπιδίων της ινοσιτόλης συμβαίνει όταν τα αιμοπετάλια ενεργοποιούνται από αγωνιστές όπως η θρομβίνη ή το ATP, είναι λογικό να δεχθεί κανείς ότι η αύξηση του πολυμερισμού της ακτίνης είναι ένα από τα πολλαπλά παρεπόμενα της δραστηριοποίησης του μεταβολισμού των φωσφοϊνοσιτιδίων, που επισυμβαίνει από τη δράση των διαφόρων αγωνιστών και κατέχει έναν σπουδαίο ρόλο στην πυροδότηση πολλών ενζυμικών διαδικασιών καίριας σημασίας για τις αιμοπεταλιακές λειτουργίες.

2. Μυοσίνη

Όταν τα αιμοπετάλια βρίσκονται εν ηρεμία τότε η μυοσίνη τους είναι διαχωρισμένη από την ακτίνη. Ευθύς μόλις τα αιμοπετάλια ενεργοποιηθούν, οι ελαφρές αλυσίδες των 20KDa της μυοσίνης φωσφορυλιώνονται ταχύτατα και κατόπιν αρχίζουν να αποφωσφορυλιώνονται¹³¹⁻¹³³. Η φωσφορυλίωσή τους καταλύεται από μία κινάση των ελαφρών αλυσίδων της μυοσίνης που εξαρτάται από το ασβέστιο και περιέχει καλμοδουλίνη^{134,135}. Στα εν ηρεμία αιμοπετάλια είναι φωσφορυλιωμένο μόνο το 10% των ελαφρών αλυσίδων των 20KDa, αλλά μετά από διέγερσή τους φωσφορυλιώνεται σχεδόν το 100%. Διάφορες μελέτες έδειξαν ότι ο χρόνος που απαιτείται για την φωσφορυλίωση των ελαφρών αλυσίδων της μυοσίνης, σε απάντηση σε ποικίλα και διαφορετικής φύσης συσσωρευτικά ερεθίσματα, είναι ίσος με αυτόν που απαιτείται για τη σύνδεση των νηματιδίων ακτίνης με τη μυοσίνη κι ότι η έκταση της φωσφορυλίωσης συσχετίζεται με το ποσοστό συνδεδεμένων νηματιδίων ακτίνης με τα σωματίδια μυοσίνης. Τα ευρήματα αυτά οδηγούν στο συμπέρασμα ότι η σύνδεση ακτίνης και μυοσίνης ρυθμίζεται από τον βαθμό φωσφορυλίωσης των ελαφρών αλυσίδων της μυοσίνης¹³⁶.

Οί Fox και Phillips¹³⁶ έδειξαν ότι όταν τα αιμοπετάλια διεγείρονται με ADP υπό συνθήκες κατά τις οποίες δεν έχουμε αντίδραση έκλυσης, τότε η ακτίνη και η μυοσίνη τους δεν συζευγνύονται, παρά το γεγονός της εμφάνισης τόσο μεταβολής του αιμοπεταλιακού σχήματος, όσο και συσσώρευσης των αιμοπεταλίων.

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

Η "πρωτεΐνη σύνδεσης με την ακτίνη" βρίσκεται κατανεμημένη γενικά μέσα στα αιμοπετάλια, αλλά η συγκέντρωσή της είναι πολύ μεγάλη στα ψευδοπόδια μέσα στα οποία συνδέεται με την ακτίνη



όταν τα αιμοπετάλια διεγερθούν. Διάφορες *in vitro* μελέτες έδειξαν ότι η οργάνωση των ινιδίων της ακτίνης επηρεάζεται σημαντικά από την σύνδεσή τους με την πρωτεΐνη αυτή οδηγώντας τα σε μία κατάσταση πηκτής¹²⁷.

Το 1977 περιγράφηκε μία πρωτεάση εξαρτώμενη από το ασβέστιο, η οποία είχε σαν υποστρώματα την εν λόγω πρωτεΐνη και μία άλλη πρωτεΐνη, την P235¹³⁷. Και οι δύο αυτές πρωτεΐνες δρουν πάνω στον πολυμερισμό και την οργάνωση των ινιδίων της ακτίνης, έχει δε αποδειχθεί σε *in vitro* πειράματα, ότι συνδέονται στον αιμοπεταλιακό κυτταροσκελετό, όταν τα αιμοπετάλια ενεργοποιούνται. Τα αποτελέσματα των πειραμάτων αυτών (που περιέλαβαν και τη δράση διαφόρων αναστολέων όπως το EGTA ή την N-αιθυλμαλεμίδη, την λεπεπτίνη ή τη μερσαρίλη που αναστέλουν τη δράση της εν λόγω πρωτεάσης), οδήγησαν στα εξής συμπεράσματα:

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

Έχοντας υπ' όψη τις δύο αυτές παρατηρήσεις έγινε η υπόθεση ότι η αύξηση του κυτταροπλασματικού ελεύθερου ασβεστίου, που συμβαίνει όταν τα αιμοπετάλια ενεργοποιούνται, προκαλεί μεταξύ των άλλων και την ενεργοποίηση της Ca^{2+} εξαρτώμενης πρωτεάσης, η οποία υδρολύει την πρωτεΐνη που συνδέεται με την ακτίνη, με αποτέλεσμα την αποσυναρμολόγηση του νηματοειδούς δικτύου της ακτίνης. Όμως τώρα άλλες πρωτεΐνες είναι σε θέση να ενσωματωθούν στα ινίδια και να αναδιοργανώσουν τη δομή τους¹²⁷.

στ) Πρωτεΐνες που αποδεσμεύονται από τα αιμοπετάλια στην αντίδραση έκλυσης

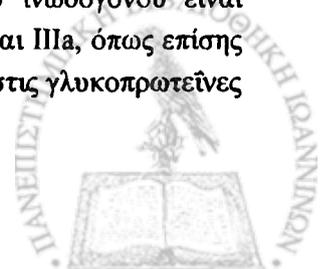
Γενικά

Όταν τα αιμοπετάλια ενεργοποιηθούν και υποστούν την αντίδραση έκλυσης τότε εξωκυτταρώνουν το περιεχόμενο των κοκκίων τους που περιλαμβάνει ADP, σεροτονίνη και μία ποικιλία αμινών, οι οποίες διαφέρουν από είδος σε είδος, λ.χ. ισταμίνη και επινεφρίνη. Απελευθερώνεται το περιεχόμενο των α-κοκκίων, όπως επίσης και αυτό των λυσοσωμάτων. Μέσα στις ουσίες που αποδεσμεύονται από τα α-κοκκία συμπεριλαμβάνονται η θρομβοσπονδίνη, η φμπρονεκτίνη, το ινωδογόνο και μία γλυκοπρωτεΐνη πλούσια σε ιστιδίνη. Υπάρχουν όλο και περισσότερες ενδείξεις ότι κάθε μία από τις πρωτεΐνες αυτές συνεισφέρει στον σχηματισμό και τη σταθεροποίηση των αιμοπεταλιακών συσσωρευμάτων¹⁸.

1. Ινωδογόνο

Το ινωδογόνο ενισχύει τη συσσώρευση των αιμοπεταλίων που προκαλείται από ADP και άλλους αγωνιστές¹³⁸. Η πρωτεΐνη αυτή ενσωματώνεται στα αιμοπετάλια κατά τη διάρκεια της αλλαγής του σχήματός τους και αποχωρίζεται απ' αυτά όταν έχουμε την αποσυσσώρευσή τους¹³⁹.

Διάφορες μελέτες έδειξαν ότι το ADP προκαλεί μία αποκάλυψη των σημείων πρόσδεσης του ινωδογόνου στην εξωτερική επιφάνεια των αιμοπεταλίων, καθιστώντας έτσι δυνατή την ενσωμάτωση του ινωδογόνου στους εξειδικευμένους του υποδοχείς. Το ADP ως γνωστόν, προστίθεται είτε εξωγενώς είτε απελευθερώνεται από τα ίδια τα αιμοπετάλια μεγεθύνοντας τις αντιδράσεις τους και διαδίδοντάς τες σε μεγαλύτερο αιμοπεταλιακό πληθυσμό. Ο υποδοχέας του ινωδογόνου είναι περίπλοκος και περιλαμβάνει στη δομή του το γλυκοπρωτεϊνικό σύμπλεγμα IIb και IIIa, όπως επίσης και ασβέστιο¹⁸. Τα θρομβοσθενικά αιμοπετάλια τα οποία εμφανίζουν ανωμαλίες στις γλυκοπρωτεΐνες



Πb και IIIa, δεν ενσωματώνουν ινωδογόνο και δεν συσσωρεύονται από το ADP, παρά το γεγονός του ότι αλλάζουν μορφή¹⁸. Άτομα τα οποία παρουσιάζουν συγγενή έλλειψη ινωδογόνου, εμφανίζουν μείωση ή ακόμη και απουσία της αιμοπεταλιακής συσσώρευσης της επαγόμενης από το ADP και αυτή η λειτουργική ανεπάρκειά τους είναι δυνατόν να διορθωθεί μέσω της προσθήκης φυσιολογικού ινωδογόνου στο αιματικό τους πλάσμα^{18,140}. Επίσης, όταν πλυμμένα αιμοπετάλια διασπείρονται σε ένα μέσο απουσία ινωδογόνου, τότε η αντίδρασή τους στο ADP είναι ασθενής¹⁴⁰. Οι παρατηρήσεις αυτές δείχνουν ότι το ινωδογόνο φαίνεται απαραίτητο, τουλάχιστον σε εκείνες τις περιπτώσεις κατά τις οποίες η αιμοπεταλιακή συσσώρευση λαμβάνει χώρα χωρίς την ταυτόχρονη ή πρότερη εμφάνιση και της αντίδρασης έκλυσης, κατά την οποία το ινωδογόνο προσφέρεται από τα ίδια τα αιμοπετάλια. Στα αιμοπετάλια του κουνελιού έχουμε την απελευθέρωση ινωδογόνου από τα α-κοκκία τους και την άμεση χρησιμοποίησή του για την σταθεροποίηση του αιμοπεταλιακού θρόμβου, ενώ στον άνθρωπο η ποσότητα ινωδογόνου που εκλύεται από τα αιμοπετάλια φαίνεται να είναι μικρότερη¹⁴⁰.

2. Θρομβοσπονδίνη

Η θρομβοσπονδίνη είναι μία γλυκοπρωτεΐνη μοριακού βάρους 420.000Dalton, αποτελούμενη από τρεις πολυπεπτιδικές αλυσίδες συνδεόμενες μεταξύ τους μέσω δισουλφιδικών γεφυρών^{18,141}. Η θρομβοσπονδίνη, που καλείται επίσης και γλυκοπρωτεΐνη G και πρωτεΐνη “ευαίσθητη στην θρομβίνη”, αποτελεί το σημείο ενδογενούς λεκτινικής δραστηριότητας στην εξωτερική επιφάνεια των αιμοπεταλίων και είναι ικανή να ενσωματώνει ινωδογόνο και φιβρονεκτίνη (ινονεκτίνη). Διάφοροι ερευνητές θεωρούν ότι η θρομβοσπονδίνη ενισχύει την σταθερότητα των αιμοπεταλιακών συσσωματωμάτων¹⁴².

Έχει δειχθεί ότι τα αντισώματα ενάντια στην θρομβοσπονδίνη δεν επηρεάζουν την πρωτογενή συσσώρευση από ADP, αλλά προκαλούν ταχεία αποσυσσώρευση και καταργούν τη δεύτερη φάση συσσώρευσης από ADP. Τα δεδομένα αυτά συμβαδίζουν με την παρατήρηση των Gardner και συν.^{142,143} σύμφωνα με την οποία τα αντισώματα ενάντια στο τμήμα (υπομονάδα) 23KDa της θρομβοσπονδίνης, που ενσωματώνει και την ηπαρίνη, αναστέλλουν την αιμοπεταλιακή συσσώρευση την επαγόμενη από κολλαγόνο, θρομβίνη και ADP (υπό συνθήκες στις οποίες το ADP προκαλεί αντίδραση έκλυσης). Επιπλέον, ο Leung έδειξε ότι τα αντιθρομβοσπονδινικά αντισώματα, ελαττώνουν την ικανότητα ενσωμάτωσης του ινωδογόνου στην εξωτερική επιφάνεια των ενεργοποιημένων αιμοπεταλίων. Ακόμη, δοθέντος ότι, όταν επεξεργασθούν τα αιμοπετάλια με αντιθρομβοσπονδινικό ορό συμβαίνει εκτόπιση του σεσημασμένου ινωδογόνου από ινωδογόνο μη σεσημασμένο, ο Leung κατέληξε ότι η θρομβοσπονδίνη σταθεροποιεί την πρόσδεση του ινωδογόνου σε σημεία διαφορετικά του γλυκοπρωτεϊνικού IIa-IIIb υποδοχέα του και ενισχύει τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των αιμοπεταλίων, οδηγώντας στο σχηματισμό συσσωματωμάτων πιο σταθερών^{142,18}.

3. Ινονεκτίνη (Φιβρονεκτίνη)

Η ινονεκτίνη είναι παρούσα στα α-κοκκία, ενώ δεν απαντάται στη μεμβρανική εξωτερική επιφάνεια των εν ηρεμία αιμοπεταλίων¹⁴⁴. Όταν τα αιμοπετάλια ενεργοποιηθούν, τότε η ινονεκτίνη απελευθερώνεται μαζί με άλλες πρωτεΐνες μέσω της αντίδρασης έκλυσης στο αιματικό πλάσμα και ταυτόχρονα εμφανίζεται στην επιφάνεια της πλασματικής μεμβράνης των αιμοπεταλίων¹⁸. Η ινονεκτίνη δεν είναι απαραίτητη για τη συσσώρευση των αιμοπεταλίων την επαγόμενη από ADP και δεν ενσωματώνεται σ' αυτά, όταν ενεργοποιούνται και συσσωρεύονται από απουσία της αντίδρασης έκλυσης¹⁹. Ωστόσο, όταν τα αιμοπετάλια διαγείρονται από άλλους αγωνιστές όπως η θρομβίνη, τότε η ινονεκτίνη συνδέεται με την εξωτερική τους επιφάνεια. Αυτό δείχνει ότι υπάρχει κάποια σχέση

μεταξύ ενσωμάτωσης της ινονεκτίνης και των απελευθερούμενων πρωτεϊνών από τα α-κοκκία, δηλαδή της θρομβοσπονδίνης, του ινωδογόνου, του παράγοντα von Willebrand και της "πλούσιας σε ιστιδίνη πρωτεΐνης". Μολαταύτα οι πρωτεΐνες αυτές, δεν φαίνεται να αλληλεπιδρούν με ένα κοινό σημείο ενσωμάτωσης, αλλά ενσωματώνονται σε διάφορα σημεία και η μεταξύ τους αλληλεπίδραση φαίνεται πως συνεισφέρει στη σταθεροποίηση των αιμοπεταλιακών συσσωματωμάτων¹⁴⁵.

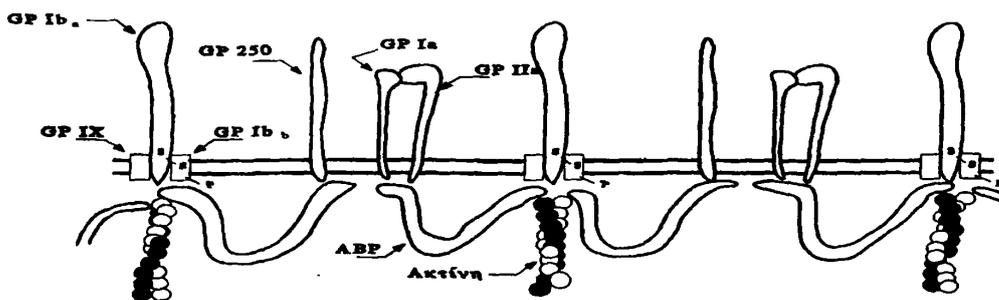
4. Ο παράγοντας von Willebrand

Είναι μία μεγάλη μοριακού βάρους πρωτεΐνη που εναποθηκεύεται στα α-κοκκία και εκλύεται όταν τα αιμοπετάλια διεγείρονται από αγωνιστές όπως η θρομβίνη. Ο παράγοντας von Willebrand (vWf) δεν παίζει σημαντικό ρόλο στην αιμοπεταλιακή συσσώρευση, εφ' όσον ενσωματώνεται στα αιμοπετάλια και απουσία του ινωδογόνου. Ο κύριος ρόλος του σαν ενδογενούς μεσολαβητή της αιμοπεταλιακής ενεργοποίησης πιθανόν σχετίζεται με την ικανότητά του να προωθεί την αιμοπεταλιακή σύνδεση με τους υπενδοθηλιακούς ιστούς¹.

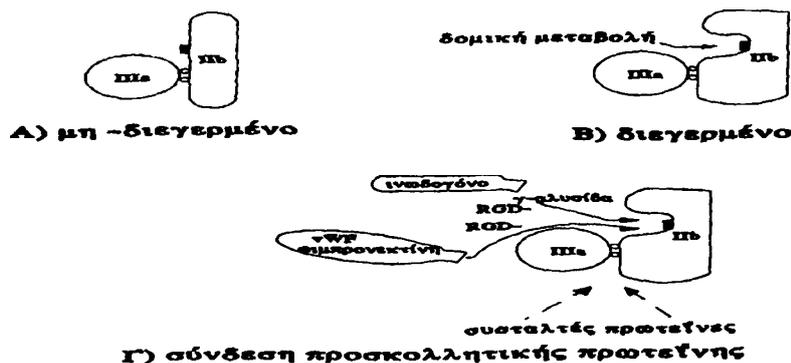
5. Η "πρωτεΐνη πλούσια σε ιστιδίνη" (I.R.P. protein)

Η πρωτεΐνη αυτή είναι μία γλυκοπρωτεΐνη που εκκρίνεται από τα αιμοπετάλια κατά την αντίδραση έκλυσης και ο λειτουργικός της ρόλος είναι απροσδιόριστος. Δεδομένου ότι αλληλεπιδρά με το πλασμινόγόνο και ενσωματώνει ηπαρίνη, πιθανόν να συνεισφέρει στη σταθεροποίηση των αιμοπεταλιακών θρόμβων, ρυθμίζοντας την ινωδόλυση και την τοπική δράση της ηπαρίνης¹⁸.

Το γλυκοπρωτεϊνικό σύμπλεγμα IIb/IIIa φαίνεται να είναι η σημαντικότερη μεμβρανική γλυκοπρωτεΐνη για την αντίδραση της συσσώρευσης, ενώ η γλυκοπρωτεΐνη Ib είναι μία σημαντική πρωτεΐνη για την πρόσδεση των αιμοπεταλίων στις επιφάνειες και την εξάπλωσή τους πάνω σ' αυτές (Σχήματα 10, 11).



Σχήμα 10 Σχηματική αναπαράσταση του σκελετού της μεμβράνης των αιμοπεταλίων και κυρίως των συμπλεγμάτων $GPIIb-IX$ και $GPIb-IIIa$.



Σχήμα 11 Σχηματική παράσταση της δομικής μεταβολής του συμπλέγματος $GPIIb-IIIa$ (κοιν και μετά τη διέγερση) καθώς και της θέσης σύνδεσης των προσκολλητικών ουσιών.



B. ΕΛΕΥΘΕΡΕΣ ΡΙΖΕΣ

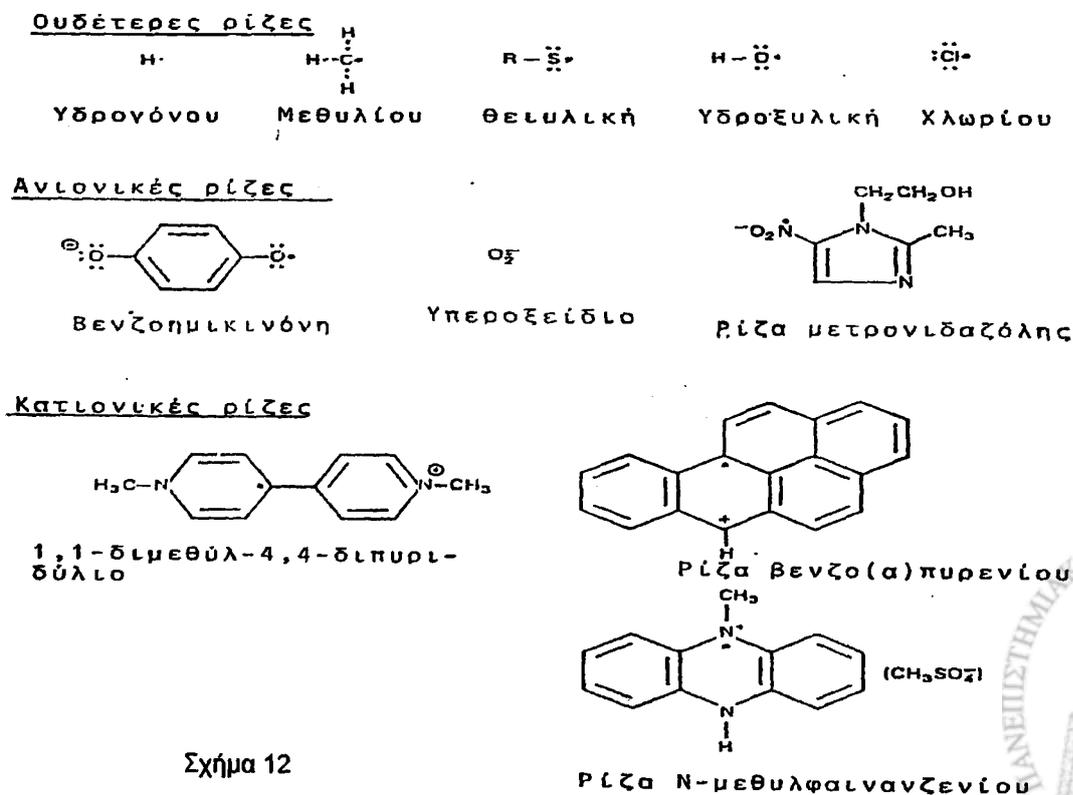
1. Γενικά χαρακτηριστικά των ελευθέρων ριζών

Οι πρώτοι οργανικοί χημικοί ονόμασαν "ρίζα" το τμήμα διαφόρων οργανικών ενώσεων που προκύπτει από την αφαίρεση κάποιου στοιχείου από το μόριο ενός υδρογονάνθρακα. Για παράδειγμα, στα παράγωγα του μεθανίου CH_3Cl , CH_3J , CH_3F , το τμήμα του μορίου CH_3 ονομάστηκε "ρίζα μεθυλίου" ή "ομάδα μεθυλίου" με τη σύγχρονη ονοματολογία. Ορίστηκαν δηλαδή ως ρίζες οργανικές ενώσεις που περιέχουν ένα σθένος ελεύθερο στο μόριό τους.

Έρευνες κατά το πρώτο τέταρτο του 20ου αιώνα επιβεβαίωσαν την ύπαρξη ελευθέρων ριζών, αλλά το ενδιαφέρον εξέλιπε μέχρι το τέλος της δεκαετίας του 1950. Την εποχή εκείνη η κατάκτηση του διαστήματος ενεργοποίησε έρευνες για ισχυρά προωθητικά πυραύλων. Παράλληλα η ανάπτυξη των πλαστικών υλικών που συντίθενται με ριζικές αλυσιδωτές αντιδράσεις αναζωπύρωσε το ενδιαφέρον για έρευνες στις ελεύθερες ρίζες. Το 1960 μερικοί βιοχημικοί και ιδιαίτερα ο αμερικανός Irvine Fridovich άρχισαν να διερωτώνται μήπως οι ριζικές διεργασίες παρεμβαίνουν στις αντιδράσεις της ζώσας ύλης με το οξυγόνο¹⁴⁶.

Σήμερα ως ελεύθερες ρίζες θεωρούνται εξ' ορισμού άτομα ή μόρια που περιέχουν μονό αριθμό ηλεκτρονίων. Έχουν δηλαδή στην εξωτερική τους στιβάδα ένα ασύζευκτο ηλεκτρόνιο. Επειδή η μαγνητική ροπή αυτού του ηλεκτρονίου δεν αντισταθμίζεται από αντίθετη ροπή άλλου ηλεκτρονίου, οι ελεύθερες ρίζες αποκτούν παραμαγνητικές ιδιότητες και είναι παραμαγνητικά υλικά. Συμβολίζονται με τον χημικό τους τύπο, που ακολουθείται από μια τελεία (\cdot). Η τελεία αυτή δείχνει συμπεριφορά-ύπαρξη ελεύθερης ρίζας¹⁴⁷⁻¹⁴⁹. Το φορτίο τους είναι θετικό ή αρνητικό ή μπορεί να είναι ηλεκτρικά ουδέτερες.

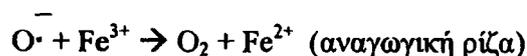
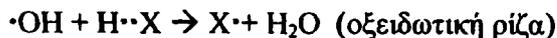
Παραδείγματα ελευθέρων ριζών δίνονται στο παρακάτω σχήμα (Σχήμα 12):



Σχήμα 12



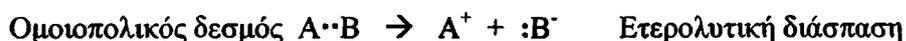
Από την χημική σκοπιά οι ρίζες είναι σχηματισμοί εξαιρετικά δραστικοί εφ' όσον τείνουν να συζευχθούν το ασύζευκτο ηλεκτρόνιό τους μ' ένα άλλο αντιθέτου spin, ευρισκομένου σε μια δεύτερη ρίζα ($R\cdot + R\cdot \rightarrow R\cdot R$). Πέρα όμως απ' αυτό μπορούν να προκαλέσουν αντιδράσεις μεταφοράς ηλεκτρονίων οπότε μπορούν να συμπεριφερθούν σαν δέκτες ηλεκτρονίων (οξειδωτικά) ή σαν δότες ηλεκτρονίων (αναγωγικά):



Στην πρώτη αντίδραση παρατηρείται πως η οξειδωτική ρίζα μπορεί να αποσπά ένα άτομο υδρογόνου από το υπόστρωμα HX, που έτσι οξειδώνεται. Αντίθετα, στην δεύτερη αντίδραση η ρίζα του ανιόντος υπεροξειδίου δρα σαν αναγωγικό μέσο παραχωρώντας ένα ηλεκτρόνιο στο τρισθενές ιόν του σιδήρου που μεταβάλλεται έτσι σε δισθενές (Fe^{2+}).

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

Ο σχηματισμός των ελευθέρων ριζών μπορεί να προκληθεί μέσω της ομοιοπολικής διάσπασης του ομοιοπολικού δεσμού. Όπως είναι γνωστό, ο ομοιοπολικός δεσμός δημιουργείται από αμοιβαία συνεισφορά δύο αντίθετου spin ηλεκτρονίων, των ατόμων που συνδέονται^{148,149}. Η διάσπαση του δεσμού μπορεί να γίνει κατά δύο τρόπους: α) Ετερολυτική διάσπαση: τα ηλεκτρόνια του δεσμού μένουν στο ένα άτομο, οπότε σχηματίζονται δύο ιόντα αντίθετου φορτίου και β) Ομολυτική διάσπαση: ο δεσμός θραύεται κατά τέτοιον τρόπο ώστε το ένα ηλεκτρόνιο του δεσμού μένει στο πρώτο άτομο και το άλλο στο δεύτερο. Έτσι σχηματίζονται δύο ελεύθερες ρίζες.



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



Εκτός από την θερμική και την φωτοχημική διάσπαση υπάρχει και μία τρίτη δυνατότητα δημιουργίας ελευθέρων ριζών, εξαρτώμενη από οξειδοαναγωγικές διαδικασίες. Στις αντιδράσεις αυτές οι ελεύθερες ρίζες προκύπτουν από την αλληλεπίδραση ενός υποστρώματος μ' ένα μεταλλικό ιόν που υφίσταται μία οξειδοαναγωγική αντίδραση στην οποία εμπλέκεται μόνον ένα ηλεκτρόνιο. Το πιο γνωστό παράδειγμα αποτελείται από το "αντιδραστήριο του Fenton" που προκύπτει από ένα διάλυμα H_2O_2 και ιόντων υποσιδήρου:





Το ιόν του υποσιδήρου περνά στην κατάσταση του σιδήρου με την ταυτόχρονη απελευθέρωση μίας ρίζας υδροξυλίου που αποτελεί τον ουσιαστικό οξειδωτικό παράγοντα του συστήματος.

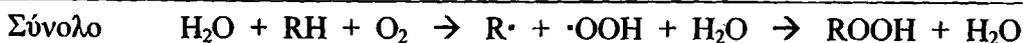
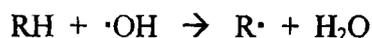
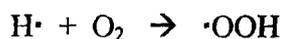
Στη ζώσα ύλη η δημιουργία ελευθέρων ριζών γίνεται κατά κανόνα με σύλληψη ατόμων υδρογόνου (ηλεκτρόνιο και πρωτόνιο) σε βάρος γειτονικών μορίων. Έχουμε έτσι ρήξη ενός ομοιοπολικού δεσμού μεταξύ ενός ατόμου άνθρακα και ενός ατόμου υδρογόνου, που παρουσιάζει τη μεγαλύτερη ευκολία στη διάσπασή του. Προκαλούνται λοιπόν αφυδρογονώσεις που δημιουργούν νέες ρίζες, που δεσμεύουν με τη σειρά τους άλλα ηλεκτρόνια. Η αλυσίδα αυτή διακόπτεται αρκετά γρήγορα με τον συνδυασμό δύο ελεύθερων ριζών, που συνεισφέρουν από κοινού τα μη συζευγμένα ηλεκτρόνια τους, σχηματίζοντας έναν ομοιοπολικό δεσμό¹⁵⁰.

2. Μορφές αντιδράσεων ελευθέρων ριζών (Αλυσιδωτές Ριζικές Αντιδράσεις)

Οι ελεύθερες ρίζες είναι γενικά πολύ δραστικές, ικανές να προκαλέσουν "Αλυσιδωτές Αντιδράσεις". Οι αντιδράσεις αυτές είναι μια σειρά καταστάσεων σε καθεμιά από τις οποίες δημιουργείται μια ελεύθερη ρίζα, που ενεργοποιεί την επόμενη κατάσταση. Έτσι έχουμε τρεις φάσεις: *Αρχή, Διάδοση, Τερματισμός*¹⁴⁹.

Στην πρώτη φάση, στην *Αρχή*, απορροφάται ενέργεια από το μόριο και μέσω της ομολυτικής διάσπασής σχηματίζεται το δραστικό σωματίδιο, δηλαδή η ελεύθερη ρίζα. Στη δεύτερη φάση, στη *Διάδοση*, έχουμε αντιδράσεις στις οποίες καταναλίσκεται μία ελεύθερη ρίζα και σχηματίζεται μία άλλη, χωρίς καθαρή κατανάλωση ριζών. Τέλος, στη φάση του *Τερματισμού* της "αλυσιδωτής αντίδρασης" καταναλώνονται οι ελεύθερες ρίζες χωρίς να δημιουργούνται άλλες, γιατί στην φάση αυτή οι ρίζες συνδέονται μεταξύ τους^{147,148}.

Όπως μπορεί να παρατηρήσει κανείς, οι αλυσιδωτές αντιδράσεις είναι διαδικασίες οι οποίες αυτοδιατηρούνται μέσω της γένεσης νέων ριζών στο στάδιο της διάδοσης της αλυσίδας και για το λόγο αυτό μια πρωταρχική ρίζα σχηματισμένη στο αρχικό στάδιο μπορεί να προξενήσει την δημιουργία χιλιάδων μορίων προϊόντος:



Αλυσιδωτή Ριζική Αντίδραση



2.1 Αντίδραση Fenton

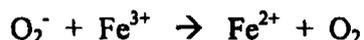
Ο Fenton το 1894 διαπίστωσε ότι ένα μίγμα υπεροξειδίου του υδρογόνου και αλάτων Fe (II) μπορεί να αντιδράσει με πολλά οργανικά μόρια, μέσω της παραγωγής κυρίως ρίζας υδροξυλίου^{151,152,147,148}:



Τίχνη Fe^{3+} μπορεί στη συνέχεια να αντιδράσουν με H_2O_2 :



Επιπλέον μπορούν να συμβούν οι παρακάτω αντιδράσεις:



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



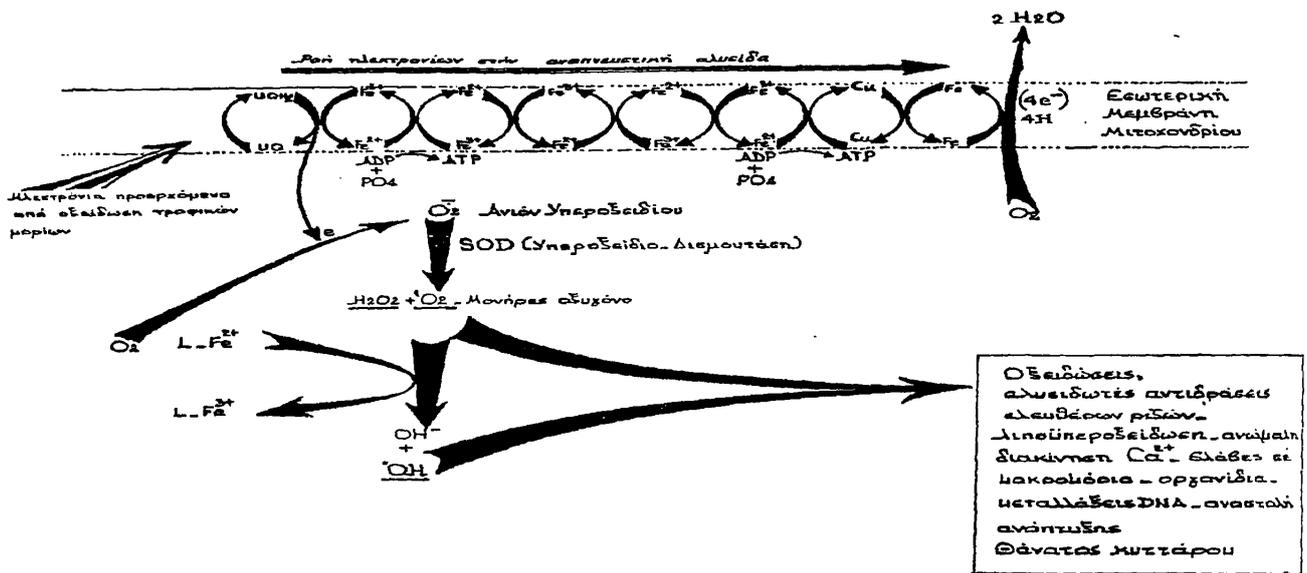
Άλλα στοιχεία, όπως ο χαλκός Cu (I), εάν είναι παρόντα, μπορεί να αντιδράσουν με ποικίλες ρίζες και να μεταβάλουν το μηχανισμό της αντίδρασης:



3. Δράση των ελευθέρων ριζών στα βιολογικά συστήματα

Κατά τα στάδια εξέλιξης πολλών βιολογικών αντιδράσεων σχηματίζονται ελεύθερες ρίζες διαφόρων τύπων. Ο σχηματισμός και η εξουδετέρωση των ριζών αυτών ακολουθεί την φυσιολογική διαδικασία εξέλιξης των αντιδράσεων οι οποίες συμβαίνουν στο εσωτερικό ενός μικροδιαμερίσματος, στο οποίο είναι παρών και ο φυσιολογικός τους αποδέκτης. Έτσι, ελέγχεται η παραγωγή ελευθέρων ριζών, άρα και η τοξικότητά τους. Παραδείγματα του τύπου αυτού είναι οι μεταφορικές αλυσίδες ηλεκτρονίων των μιτοχονδρίων, των μικροσωμάτων και των χλωροπλαστών. (Σχήμα 13).





Σχήμα 13

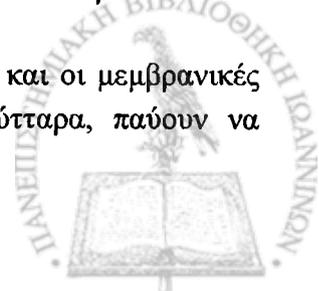
Σχηματική Παρουσίαση της μεταφοράς ηλεκτρονίων στην αναπνευστική αλυσίδα των μιτοχονδρίων.

Αντίθετα, οι ελεύθερες ρίζες εξωγενούς, μη φυσιολογικής προέλευσης (από χημικές ουσίες, φάρμακα, δραστικές συνιστώσες της αιθολομίχλης, καρκινογόνα κ.λ.π.) ή ρίζες που σχηματίζονται λόγω αλλοιώσεων, παρεκκλίσεων ή απορρυθμίσεων του φυσιολογικού μεταβολισμού, δρουν αδιάκριτα με τα βιολογικά μόρια και μετατρέπονται σε παράγοντες επικίνδυνους για την ακεραιότητα του κυττάρου^{146,147}.

Ένα σημαντικό παράδειγμα της δράσης των ελευθέρων ριζών στα βιολογικά συστήματα είναι η καταστροφή των κυτταρικών μεμβρανών από παράγωγα οξυγόνου¹⁵⁰.

Όταν τά κύτταρα στερηθούν οξυγόνο για ένα μεγάλο χρονικό διάστημα και στην συνέχεια επανοξυγονώνονται, έχουμε το φαινόμενο της ανοξοεπανοξυγόνωσης. Κατά την διάρκεια έλλειψης οξυγόνου διακόπτεται ο μηχανισμός μεταφοράς ηλεκτρονίων διά μέσου της μιτοχονδριακής αναπνευστικής αλυσίδας. Τα μιτοχόνδρια ως γνωστό, είναι οι μονάδες παραγωγής ενέργειας του κυττάρου. Στις μεμβράνες τους υπάρχουν πρωτεΐνες (κυττοχρώματα) που είναι μεταφορείς ηλεκτρονίων. Κατά την αναπνοή οι πρωτεΐνες αυτές μεταφέρουν ηλεκτρόνια, μέχρις ότου ανάγουν σε νερό ένα μόριο οξυγόνου, που είναι ο τελικός αποδέκτης ηλεκτρονίων της αναπνοής. Η μεταφορά αυτή των ηλεκτρονίων και η αναγωγή του οξυγόνου επιτρέπει το σχηματισμό μορίων τριφωσφορικής αδενοσίνης (ATP) με αποτέλεσμα την δέσμευση και αποθήκευση ενέργειας στο κύτταρο. Αν διακοπεί η παροχή οξυγόνου, διακόπτεται και η μεταφορά ηλεκτρονίων. Κατά την επανοξυγόνωση το σύστημα των κυττοχρωμάτων δεν τίθεται αυτομάτως σε λειτουργία και το οξυγόνο δεν ανάγεται σε νερό, αλλά σε ανιόν υπεροξειδίου $O_2^{\cdot -}$. Στην συνέχεια παράγονται υπεροξειδίου του υδρογόνου H_2O_2 και υδροξυλική ρίζα OH^{\cdot} . Οι ισχυροί αυτοί οξειδωτικοί παράγοντες (ελεύθερες ρίζες) που δημιουργούνται στο εσωτερικό του κυττάρου προσβάλλουν τις πρωτεΐνες, το DNA και τα λιπίδια της μεμβράνης. Οι βλάβες αυτές που αρχίζουν στα μιτοχόνδρια, επεκτείνονται στο σύνολο του κυττάρου μέσω της NADPH - οξειδάσης, της οποίας η δράση διεγείρεται έμμεσα από την είσοδο ασβεστίου στο κύτταρο^{147,148}.

Με την διακοπή της αναπνευστικής αλυσίδας σταματά η παραγωγή ATP και οι μεμβρανικές αντλίες, που συντηρούν μία χαμηλή συγκέντρωση ασβεστίου μέσα στα κύτταρα, παύουν να



λειτουργούν, με αποτέλεσμα μία ανεξέλεγκτη αύξηση του ενδοκυτταρικού ασβεστίου, που ενεργοποιεί την ξανθίνη-οξειδάση. Η ενεργοποίηση αυτή έχει σαν αποτέλεσμα την παραγωγή ανιόντος υπεροξειδίου O_2 και τον σχηματισμό ελευθέρων ριζών ($RO\cdot$, $ROO\cdot$, $OH\cdot$), που προκαλούν λιποϋπεροξειδωση στα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα της κυτταρικής μεμβράνης. Η λιποϋπεροξειδωση προκαλεί την καταστροφή των μεμβρανών και τελικά τον θάνατο του κυττάρου.

Εκτός από τις βλάβες των μεμβρανών, η λιποϋπεροξειδωση ελευθερώνει στο κύτταρο ρίζες που μπορούν να προσβάλλουν και άλλες μοριακές δομές, ιδίως νουκλεϊκά οξέα. Έτσι, προκαλούν μεταλλάξεις. Με τον τρόπο αυτό, σύμφωνα με τον Maneghini και συν. 1988, οι ελεύθερες ρίζες συμμετέχουν στην καρκινογένεση^{146,153-155}.

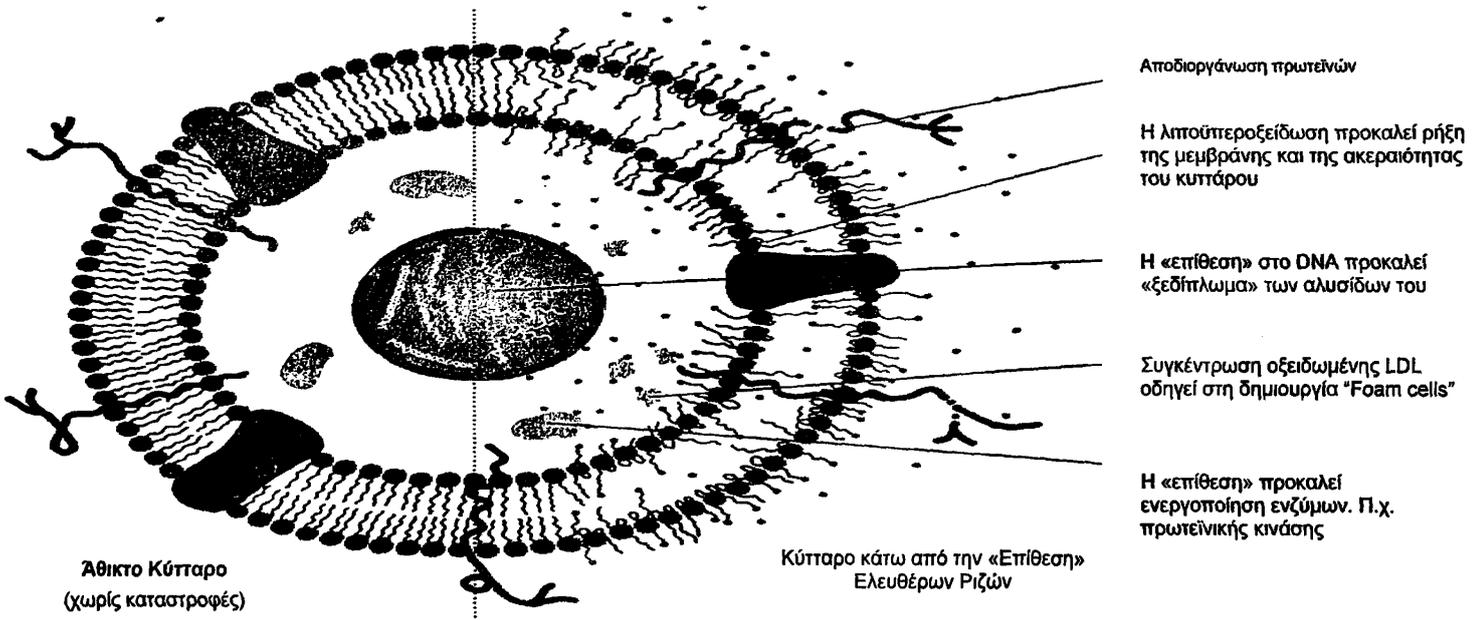
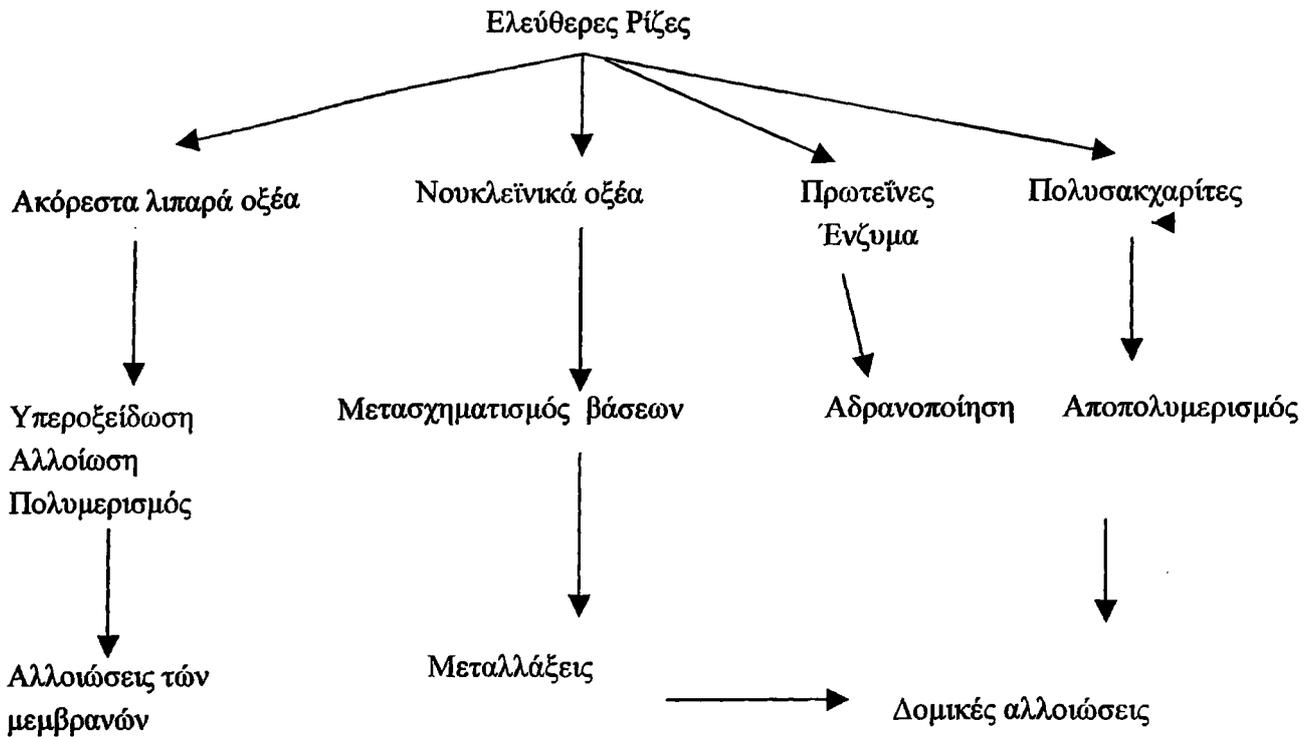
Οι ελεύθερες ρίζες παίρνουν μέρος και σε πολλές άλλες βιολογικές αντιδράσεις όπως: α) στην ανοξία-επανοξυγόνωση στο σύνδρομο ισχαιμίας-επαναιμάτωσης προκαλώντας λιποϋπεροξειδώσεις, αλλοιώσεις κυττάρων και νέκρωση της ισχαιμικής περιοχής¹⁵⁶⁻¹⁵⁹, β) στη διαδικασία της γήρανσης των κυττάρων. Ο D. Harman θεωρεί ότι η γήρανση είναι προοδευτική συσσώρευση βιοχημικών αλλαγών στον οργανισμό. Η συσσώρευση αυτή οφείλεται σε ριζικές αντιδράσεις. Ο R.G. Cytler θεωρεί ότι ο κυτταρικός εκφυλισμός είναι συνέπεια μίας προοδευτικής αλλοίωσης των γονιδίων, σε εξαιρετικά διαφοροποιημένα κύτταρα, που επιτελούν πολύ εξειδικευμένες και αναντικατάστατες λειτουργίες¹⁴⁶. Η προοδευτική αλλοίωση οφείλεται στη συμμετοχή ελευθέρων ριζών¹⁶⁰⁻¹⁶³.

Ο οργανισμός όμως είναι σε θέση να απενεργοποιήσει τις ελεύθερες ρίζες πριν αυτές κατορθώσουν να αναπτύξουν τη βλαπτική τους δράση. Όλες οι φυσικές ή συνθετικές ουσίες που δρουν κατά των ελευθέρων ριζών ονομάζονται με τον γενικό αγγλικό όρο "scavengers" ή "εκκαθαριστές" σε ελληνική απόδοση.

Ορισμένες φορές όμως, στους διάφορους οργανισμούς κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες, οι ενδογενείς "εκκαθαριστές" ελαττώνονται, με αποτέλεσμα να είναι ανεπαρκείς για να εξουδετερώσουν την κανονική παραγωγή των ελευθέρων ριζών.

Στις περιπτώσεις αυτές, οι ελεύθερες ρίζες αντιδρούν με τα διάφορα τμήματα του κυττάρου προξενώντας σοβαρές αλλοιώσεις σε μοριακό επίπεδο, όπως φαίνεται στο παρακάτω σχήμα:





Εικόνα 9

4. Προϊόντα αναγωγής του Οξυγόνου
Υπεροξειδίο, Οξυγονούχο ύδωρ, Ρίζα υδροξύλιο, Οξυγόνο Singlet



4.1 Τοξική δράση του οξυγόνου στους ζωντανούς οργανισμούς

Το οξυγόνο είναι αναγκαίο για τη ζωή των αερόβιων οργανισμών, είναι όμως και τοξικό όταν η συγκέντρωσή του υπερβαίνει ακόμη και ελάχιστα τη συγκέντρωση του οξυγόνου της ατμόσφαιρας (21%). Οργανισμοί που βρίσκονται σε ατμόσφαιρα που περιέχει μεγαλύτερη συγκέντρωση οξυγόνου από την ατμοσφαιρική παθαίνουν βλάβες στον αμφιβληστροειδή και στους πνεύμονες. Το οξυγόνο (μοριακό) είναι δυνητικά τοξικό αλλά η τοξικότητά του αυξάνεται κατακόρυφα στις ενδιάμεσες μοριακές μορφές που προκύπτουν από την αναγωγή του. Οι αναχθείσες αυτές μορφές είναι πολύ πιο δραστικές από την κλασική μοριακή μορφή του. Η τοξικότητα του οξυγόνου εκδηλώνεται όχι μόνον στο επίπεδο των οργανισμών θεωρούμενων ως σύνολα κυττάρων αλλά και σε κυτταρικές καλλιέργειες και σε ελαιωρήματα υποκυτταρικών οργανιδίων όπως τα μιτοχόνδρια και οι χλωροπλάστες.

Οι αναερόβιοι οργανισμοί που δεν διαθέτουν κανένα μηχανισμό άμυνας έναντι του οξυγόνου, φονεύονται από αυτό ταχύτατα ακόμη κι όταν οι συγκεντρώσεις του είναι χαμηλότερες. Οι αερόβιοι οργανισμοί έχουν αναπτύξει ένα περίπλοκο αμυντικό σύστημα ενάντια στον κίνδυνο που το αέριο αυτό αντιπροσωπεύει. Αν η συγκέντρωση του οξυγόνου ξεπεράσει τις κανονικές τιμές της, οι άμυνες αυτές καθίστανται ανεπαρκείς, οπότε αρχίζουν να εκδηλώνονται τοξικά φαινόμενα που οφείλονται στην υπεροξία^{148,160-162,164-166}.

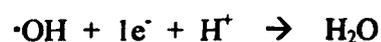
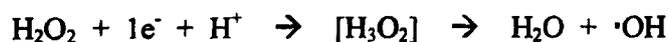
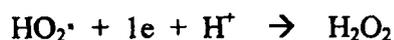
4.2 Χημικές ιδιότητες του μορίου του Οξυγόνου

Στην θεμελιώδη κατάσταση το οξυγόνο έχει δύο ασύζευκτα ηλεκτρόνια τοποθετημένα σε διαφορετικά τροχιακά. Η κατάσταση αυτή του οξυγόνου λέγεται triplet και συμβολίζεται $^3\text{O}_2$. Στην μορφή αυτή τα ηλεκτρόνια ισοκατανέμονται μεταξύ των δύο ατόμων του μορίου. Η ενεργειακή τακτοποίηση των ηλεκτρονίων στο μόριο του οξυγόνου είναι αυτή της ελάχιστης ενέργειας και δίνει στο μόριο την μεγαλύτερη δυνατή σταθερότητα.

Η πλήρης αναγωγή του οξυγόνου σε νερό απαιτεί 4 ηλεκτρόνια:



Η ίδια διαδικασία μπορεί να γίνει μέσω τεσσάρων σταδίων:



Όπως φαίνεται από τις αντιδράσεις δημιουργούνται 3 ενδιάμεσα μόρια:

1. Η ρίζα ανιόντος υπεροξειδίου O_2^\cdot



2. Το οξυγονούχο ύδωρ H_2O_2
3. Η ρίζα υδροξυλίου $\cdot OH$

Από τα προϊόντα αυτά το οξυγονούχο ύδωρ είναι σταθερό.

4.3 Η ρίζα ανιόν υπεροξειδίου $O_2\cdot$

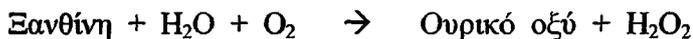
Το οξυγόνο που ανάγεται μονοσθενώς είναι μία ελεύθερη ρίζα, που ονομάζεται ανιόν υπεροξειδίου στην ιονισμένη μορφή $O_2\cdot$ και υδροϋπεροξειδίου στην πρωτονιωμένη μορφή $HO_2\cdot$. Το υδροϋπεροξειδίου είναι ένα ασθενές οξύ, του οποίου η pK αντιστοιχεί στο 4.88: $HO_2\cdot \rightarrow H^+ + O_2\cdot$

4.3.1. Βιολογικές πηγές της ρίζας Υπεροξειδίου O_2

Στο κανονικό κύτταρο ένα μικρό σταθερό ποσοστό του ολικά καταναλισκόμενου οξυγόνου χρησιμοποιείται για την δημιουργία ρίζας υπεροξειδίου. Το ποσοστό αυτό είναι δυνατόν να αυξηθεί σε ειδικές παθολογικές συνθήκες ή από την παρουσία ξένων ενώσεων¹⁶².

Η ρίζα του υπεροξειδίου μπορεί να παραχθεί από αυτοοξειδωση αναχθισών φλαβινών, υδροκινονών, αναχθισής γλουταθειόνης, κατεχολαμινών, τετραϋδροπτερίνης, ρουμπρεδοξίνης και αναχθισών αιμοπρωτεϊνών¹⁴⁸.

Οξειδωτικά ένζυμα όπως η διυδροοροτική αφυδρογονάση, η αλδεϋδη οξειδάση και η ξανθίνη-οξειδάση παράγουν ρίζες υπεροξειδίου. Η ξανθίνη-οξειδάση (XOD) είναι ένα ένζυμο που περιέχει μολυβδένιο, σίδηρο όχι σε μορφή αίμης, και FAD σαν προσθετικές ομάδες. Μετατρέπει την υποξανθίνη σε ξανθίνη και την ξανθίνη σε ουρικό οξύ. Η ξανθίνη προκαλεί δισθενή και μονοσθενή αναγωγή του οξυγόνου παράγοντας αντίστοιχα οξυγονούχο ύδωρ και υπεροξειδίου¹⁴⁷:



Στην δημιουργία υπεροξειδίου από φλαβοπρωτεΐνες σημαντική θέση έχουν τά μέταλλα που υπάρχουν στο ενεργό κέντρο των ενζύμων.

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

4.3.2 Ο κίνδυνος από το υπεροξειδίου

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

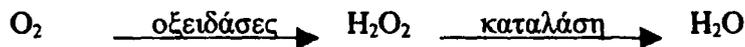
4.4 Οξυγονούχο ύδωρ H_2O_2

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





Το οξυγονούχο ύδωρ παράγεται στα κύτταρα σαν πρωτογενές προϊόν της αναγωγής του οξυγόνου από πολυάριθμες οξειδάσες, οι οποίες υπάρχουν στα υπεροξεισώματα. Ακολούθως το H_2O_2 ανάγεται σε νερό από την καταλάση.



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

Το οξυγονούχο ύδωρ προκαλεί την οξείδωση πολυάριθμων ουσιών, μεταξύ των οποίων οι σουλφυδρικές ομάδες και τα μεθειονυλικά υπολείμματα των πρωτεϊνών. Οι οξειδώσεις αυτές συμβαίνουν σε συγκεντρώσεις μεγαλύτερες από αυτές που υπάρχουν *in vivo*. Θεωρείται επομένως ότι το H_2O_2 είναι τοξικό όχι εξαιτίας μίας κατευθείαν αντίδρασης με διάφορα τμήματα του κυττάρου, αλλά γιατί μπορεί να δημιουργήσει την ελεύθερη ρίζα υδροξύλιο, μέσω αντίδρασης με το υπεροξειδίο ή με δισθενή ιόντα σιδήρου (αντιδραστήριο Fenton)¹⁵¹.

4.5 Ρίζα υδροξύλιου

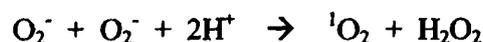
Στις αντιδράσεις τύπου Fenton σχηματίζεται η ρίζα υδροξύλιο $\text{OH}\cdot$ που είναι άκρως οξειδωτική και αντιδρά με πολλές οργανικές ουσίες με πολύ υψηλές ταχύτητες^{147,148,150}.

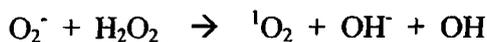
Όταν τα βιολογικά συστήματα παράγουν ρίζα υπεροξειδίου και οξυγονούχο ύδωρ πάνω από μία ορισμένη συγκέντρωση, τότε αλληλεπιδρούν η ρίζα υπεροξειδίου και το οξυγονούχο ύδωρ και παράγουν ρίζα υδροξύλιου $\cdot\text{OH}$. Τα ένζυμα υπεροξειδίου-δισμουτάση, που εξουδετερώνει τη ρίζα υπεροξειδίου και η καταλάση με τις υπεροξειδάσες, που διασπούν το οξυγονούχο ύδωρ, διατηρούν χαμηλές τις συγκεντρώσεις O_2 και H_2O_2 με αποτέλεσμα η παραγωγή ρίζας υδροξύλιου $\cdot\text{OH}$ να είναι αμελητέα¹⁶⁷.

4.6 Οξυγόνο Singlet (Μονήρες Οξυγόνο)

Το μόριο του οξυγόνου εκτός από την θεμελιώδη κατάσταση μπορεί να έχει δύο ακόμη ενεργειακές διεγερμένες καταστάσεις. Η θεμελιώδης κατάσταση λέγεται κατάσταση triplet, και ενεργειακά συμβολίζεται με $^3\Sigma_g$. Οι διεγερμένες καταστάσεις λέγονται καταστάσεις Singlet και συμβολίζονται με $^1\text{O}_2$ ή O_2^* .

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





Οξυγόνο Singlet παράγεται και κατά τη διάρκεια της υπεροξειδωσής των λιπιδίων όταν υπάρχουν δύο ενδιάμεσες υπεροξυλικές ρίζες ROO. Οι υπεροξυλικές ρίζες αντιδρούν μεταξύ τους και σχηματίζουν ένα τεταρτοξειδίο που αποσυντίθεται και παράγει οξυγόνο Singlet.

4.6.1. Αντιδράσεις του οξυγόνου Singlet

Το οξυγόνο singlet αντιδρά με αρκετές κατηγορίες ενώσεων που έχουν βιολογικό ενδιαφέρον^{147,148}. Τέτοιες κατηγορίες είναι:

1. **Ολεφίνες:** Οι ολεφίνες αντιδρούν με το οξυγόνο Singlet και σχηματίζουν υδροϋπεροξειδία. Τέτοια αντίδραση είναι ο σχηματισμός υδροϋπεροξειδίων από τα ακόρεστα λιπαρά οξέα και τη χοληστερίνη.
2. **Φαινόλες:** Η BHT (2,6-δι-τερβουτυλ-4-μεθυλφαινόλη) οξειδώνεται από το οξυγόνο singlet.
3. **Αμινοξέα:** Το οξυγόνο singlet αντιδρά με πολυάριθμα αμινοξέα όπως: μεθειονίνη, ιστιδίνη, τρυπτοφάνη, τυροσίνη, κυστεΐνη. Για παράδειγμα η αντίδραση μεθειονίνης με οξυγόνο singlet οδηγεί στην παραγωγή σουλφοξειδίου της μεθειονίνης. Στην ιστιδίνη το οξυγόνο singlet προκαλεί θραύση του ιμιδαζολικού δακτυλίου. Η τυροσίνη αντιδρά με το οξυγόνο singlet κατά τρόπο ανάλογο με τις φαινόλες. Η κυστεΐνη μετατρέπεται βραδέως σε κυστεϊνικό οξύ.
4. **Νουκλεϊκά Οξέα:** Οι πουρινικές και πυριμιδινικές βάσεις των νουκλεϊκών οξέων οξειδώνονται από το οξυγόνο singlet με αποτέλεσμα το άνοιγμα του δακτυλίου.

5. Βιολογικές άμυνες στις Ελεύθερες Ρίζες και τα παράγωγά τους

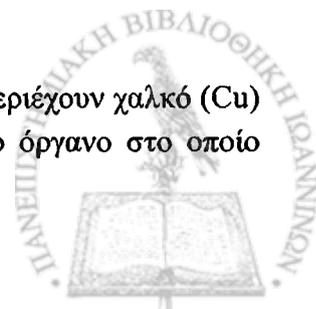
Η επικινδυνότητα του οξυγόνου εξαρτάται από τα μερικώς αναχθέντα προϊόντα του (O_2 , H_2O_2 , $\cdot\text{OH}$), από την ενεργοποιημένη μορφή του ${}^1\text{O}_2$, από τα υδροϋπεροξειδία (ROOH), τις υπεροξυλικές ρίζες ($\text{ROO}\cdot$), όπως επίσης και από τις αλκοξυλικές ρίζες ($\text{RO}\cdot$) που παράγονται γενικά στις αντιδράσεις ριζών παρουσία του οξυγόνου.

Η χρησιμοποίηση του οξυγόνου βεβαίως εκ μέρους των αερόβιων οργανισμών προϋποθέτει την ενεργοποίησή του και συνεπώς τον ενδεχόμενο κίνδυνο της δημιουργίας ενδιάμεσων μορφών του περισσότερο ή λιγότερο τοξικών. Για τον λόγο αυτόν ένα σύνολο ενζύμων και άλλων παραγόντων αντιτίθενται στην βλαπτική δράση αυτών των χημικών μορφών, εξουδετερώνοντάς τις σιγά-σιγά καθώς παράγονται ή δυναμικά επιδιορθώνοντας τις βλάβες που προκλήθηκαν από την διαφυγή των εν λόγω ριζών.

Στην πρώτη γραμμή άμυνας βρίσκεται το ένζυμο υπεροξειδιο-δισμουτάση (SOD), η οποία εξουδετερώνει τη ρίζα υπεροξειδίου και το ένζυμο καταλάση που αποτοξινώνει, σε συνεργασία με τις υπεροξειδάσες, τα κύτταρα από το οξυγονούχο ύδωρ (H_2O_2). Η δεύτερη γραμμή άμυνας αντιπροσωπεύεται από τα διάφορα αντιοξειδωτικά που καταστέλλουν τις αλυσίδες αντιδράσεων των ριζών επιβραδύνοντας και σταματώντας αυτές τις διαδικασίες.

5.1 Υπεροξειδίο Δισμουτάση (SOD)

Το 1969 ο Fridovich και άλλοι ερευνητές ανακάλυψαν ότι πρωτεΐνες που περιέχουν χαλκό (Cu) και είχαν ονομαστεί ηπατοκουπρεΐνη, εγκεφαλοκουπρεΐνη κλπ, ανάλογα με το όργανο στο οποίο



απομονώθηκαν, έχουν την κοινή ιδιότητα να μετασχηματίζουν το ανιόν υπεροξειδίου σε οξυγονούχο ύδωρ. Οι πρωτεΐνες αυτές καταχωρήθηκαν σε μια ομάδα με τον κοινό τίτλο Υπεροξειδίου Δισμουτάση (SOD)^{168,169,170}.

Επειδή η SOD υπάρχει στα κύτταρα σε συγκεντρώσεις πολύ μεγαλύτερες από τις φυσιολογικές συγκεντρώσεις του ανιόντος υπεροξειδίου O_2^- , η πιθανότητα αντίδρασης μεταξύ δύο ανιόντων υπεροξειδίων είναι πολύ μικρότερη από την πιθανότητα αντίδρασης ανιόντος υπεροξειδίου και SOD. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα την παραγωγή μη τοξικού οξυγόνου triplet¹⁷¹.

Η SOD βρίσκεται σε όλους τους αερόβιους οργανισμούς, φυτικούς και ζωικούς. Στα ζωικά κύτταρα εντοπίζεται στο κυτταρόπλασμα και στα μιτοχόνδρια, δεν βρίσκεται όμως στα υπεροξεισώματα^{147,148}.

Το ιόν του χαλκού που βρίσκεται στο ενεργό κέντρο της SOD ($E-Cu^{2+}$) ανάγεται και οξειδώνεται κατά τις αλληλεπιδράσεις με το ανιόν υπεροξειδίου, σε δύο διαδοχικές αντιδράσεις. Η πρώτη αντίδραση οδηγεί στην οξείδωση του ανιόντος υπεροξειδίου σε οξυγόνο. Η δεύτερη το ανάγει σε οξυγονούχο ύδωρ.

5.2 Καταλάση – Υπεροξειδάσες

Η καταλάση και η υπεροξειδάση είναι ένζυμα που δεσμεύουν το οξυγονούχο ύδωρ. Η καταλάση είναι μία πρωτεΐνη με μοριακό βάρος 250.000 και περιέχει 4 ομάδες αίμης με το σίδηρο στην τρισθενή του μορφή Fe^{3+} . Η δράση της είναι εμφανής σ' όλα τα ζωικά κύτταρα, σ' όλα τα φυτά και τους μικροοργανισμούς με εξαίρεση τους αναγκαστικά αναερόβιους.

Η καταλάση έχει μια ταχύτητα ανταλλαγής υψηλότερη (44.000 moles H_2O_2 ανά δευτερόλεπτο ανά mole ενζύμου) και προλαμβάνει συνεπώς την κυτταρική συσσώρευση του οξυγονούχου ύδατος.

Οι υπεροξειδάσες εκτελούν τον ίδιο αποτοξινωτικό ρόλο, αλλά είναι λιγότερο διαδεδομένες από την καταλάση στους ζωικούς ιστούς. Ονομάζονται σύμφωνα με το όνομα του αναγωγικού υποστρώματος που χρησιμοποιούν.

Μεταξύ των υπεροξειδασών σημαντικό ρόλο παίζει η γλουταθειόνη-υπεροξειδάση η οποία είναι σε θέση να αδρανοποιεί τόσο το H_2O_2 όσο και τα ποικίλα υδροϋπεροξειδία χρησιμοποιώντας σαν υπόστρωμα την αναχθείσα γλουταθειόνη (GSH):



* ROOH = ter-butyl-υδροϋπεροξειδίου, υδροϋπεροξειδίου του κομενίου, υδροϋπεροξειδίου του λινελαϊκού οξέος, υδροϋπεροξειδίου της προγεστερόνης κ.ά.

Η οξειδωθείσα γλουταθειόνη GS - SG επαναμετατρέπεται εν συνεχεία σε αναχθείσα γλουταθειόνη GSH εκ μέρους ενός άλλου ενζύμου, της αναγωγάσης της γλουταθειόνης της εξαρτώμενης από το NADPH:



Το NADPH προέρχεται από την οξείδωση της 6-P-γλυκόζης εκ μέρους της γλυκόζης-6P-αφυδρογονάσης.



Η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης είναι ευρύτατα κατανεμημένη στα κύτταρα των θηλαστικών και είναι πιο ευέλικτο αποτοξινωτικό από την καταλάση. Αυτό αποδεικνύεται από το γεγονός πως άτομα που στερούνται γενετικά την καταλάση (ακαταλασαιμικοί) μπορούν να ζήσουν φυσιολογικά χάρη στην παρουσία της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης στα ερυθροκύτταρά τους. Η συγγενής έλλειψη της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης στα ερυθροκύτταρα προδιαθέτει αντιθέτως στην αιμολυτική αναιμία, ενώ η απουσία του ενζύμου αυτού στα αιμοπετάλια προξενεί την θρομβοκυττοπενία του Glanzmann^{148,172}.

Η γλουταθειόνη υπεροξειδάση έχει μοριακό βάρος 84.000 D., αποτελείται από τέσσερις όμοιες υπομονάδες, κάθε μία από τις οποίες περιέχει ένα άτομο σεληνίου συνδεδεμένο ομοιοπολικά με το αποένζυμο ως σελήνιο-κυστεΐνη. Το σελήνιο είναι απαραίτητο για την δραστηριότητα του ενζύμου^{172,173}.

5.3 Αμυντικοί παράγοντες ενάντια στο μονήρες οξυγόνο (Οξυγόνο Singlet)

Στην περίπτωση του μονήρους οξυγόνου η άμυνα είναι δύο κατηγοριών. Υπάρχουν κατά πρώτο λόγο συστήματα που εμποδίζουν την δημιουργία του και κατά δεύτερο λόγο συστήματα που εξουδετερώνουν την ενεργοποιημένη αυτή μορφή του.

Οι χρωστικές της επιδερμίδας, των λεπιών και των φτερών λειτουργούν σαν προστατευτικές ασπίδες απέναντι στο φως.

Τα καρτενοειδή που βρίσκονται στα φυτά αλληλεπιδρούν αποτελεσματικά με το μονήρες οξυγόνο. Η β-καροτίνη μπορεί να απενεργοποιήσει το οξυγόνο Singlet με εξαιρετικά μεγάλη ταχύτητα. Η διαδικασία περιορίζεται ουσιαστικά μόνο από την διάχυση¹⁴⁸.

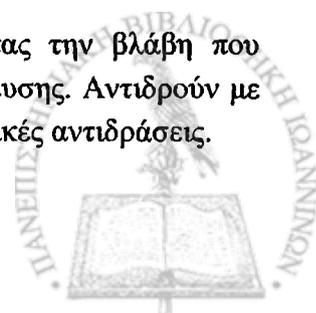
Η α-τοκοφερόλη (βιταμίνη E) καθώς και οι άλλες τοκοφερόλες έχουν αποτοξινωτική δράση έναντι του οξυγόνου Singlet. Αποτελούν δε, τα κύρια φυσικά αντιοξειδωτικά, ευρισκόμενες κυρίως στις κυτταρικές μεμβράνες.

Σε αντιδράσεις με ελεύθερες ρίζες οι τοκοφερόλες είναι δότες ηλεκτρονίων. Για παράδειγμα η οξειδωση με την ελεύθερη ρίζα διφαινυλ-πικρυλ-υδραζίνη (DPPH) καθαρών ή διαλυμένων τοκοφερολών, δίνουν χαρακτηριστικά σήματα καταγράψιμα με φασματοσκοπία ESR. Τα σήματα αυτά προκύπτουν από τις τοκοφερολικές ρίζες που δημιουργούνται από την απομάκρυνση ενός υδρογόνου από το υδροξύλιο της 6^{ης} θέσης, και έχουν χρόνο ζωής σε θερμοκρασία δωματίου περίπου 10 min^{147,148}.

5.4 Φυσικά και συνθετικά αντιοξειδωτικά

Η υπεροξειδίο-δισμουτάση, η καταλάση και οι υπεροξειδάσες, διατηρούν χαμηλά την συγκέντρωση της ρίζας υπεροξειδίου και του οξυγονούχου ύδατος. Για τον λόγο αυτό, τα εν λόγω ένζυμα αποτελούν την πρώτη γραμμή της άμυνας του οργανισμού.

Τα αντιοξειδωτικά λειτουργούν σαν δεύτερη γραμμή άμυνας μειώνοντας την βλάβη που προκαλείται από υδροξυλικές και άλλες ρίζες ενδογενούς και εξωγενούς προέλευσης. Αντιδρούν με τις ελεύθερες ρίζες και σχηματίζουν προϊόντα που διακόπτουν τις αλυσιδωτές ριζικές αντιδράσεις.



Οι τοκοφερόλες - με πιο διαδεδομένη την α-τοκοφερόλη -, βρίσκονται κυρίως στις κυτταρικές μεμβράνες και αποτελούν τα κύρια φυσικά αντιοξειδωτικά^{174,175}.

Τα συνθετικά αντιοξειδωτικά είναι συνθετικές ουσίες με αντιοξειδωτική δράση. Χρησιμοποιούνται συνήθως ως συντηρητικά για διατήρηση λιπών, ελαίων, κονσερβών, φαρμάκων, προστασία βιταμίνης C, E και άλλων ουσιών που οξειδώνονται εύκολα. Μερικές από τις συνήθειες αντιοξειδωτικές ουσίες είναι: Βουτυλικό υδροξυτολουένιο (BHT), Βουτυλική υδροξυανισόλη (BHA), Νορ-διυδρο-γουαιαρετικό οξύ (NDGA), Γαλλικό προπύλιο, N-N-διφαινυλ-P-φαινυλενο-διαμίνη (DPPD), 6-διυδροξυ, 1-4-διμεθυλκαρβαζόλη.

5.4 Υπεροξείδωση ακόρεστων λιπιδίων και αλλοιώσεις βιολογικών μεμβρανών

Το μοριακό οξυγόνο χρησιμοποιείται στις μεταβολικές αντιδράσεις κατά διάφορους τρόπους¹⁷⁶:

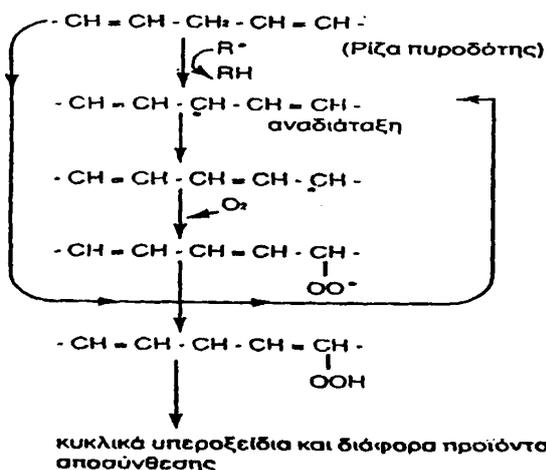
α) Στην οξείδωση των υδατανθράκων, λιπιδίων και μερικών αμινοξέων το μοριακό οξυγόνο δρα σαν τελικός αποδέκτης ηλεκτρονίων, αλληλεπιδρώντας με την κυττόχρωμο οξειδάση της μιτοχονδριακής αναπνευστικής αλυσίδας. Στην αντίδραση αυτή το οξυγόνο δημιουργεί νερό και δεν ενσωματώνεται στους ενδιάμεσους μεταβολίτες.

β) Το μοριακό οξυγόνο επεμβαίνει σε άλλες μεταβολικές αντιδράσεις αλληλεπιδρώντας απευθείας με μεταβολίτες, φάρμακα ή ξένες ουσίες. Αυτές οι αντιδράσεις καταλύονται από τις διοξυγενάσες που ενσωματώνουν δύο άτομα οξυγόνου και από τις μονοοξυγενάσες που ενσωματώνουν στα υποστρώματά τους ένα μόνο άτομο οξυγόνου.

γ) Το μοριακό οξυγόνο στα βιολογικά συστήματα, μπορεί ακόμη να αλληλεπιδράσει με ουσίες που οξειδώνονται εύκολα, όπως τα ακόρεστα ακυκλικά υπολείμματα των φωσφολιπιδίων.

Ο τύπος αυτός οξείδωσης των λιπιδίων πυροδοτείται από ελεύθερες ρίζες που μπορεί να παραχθούν από ορισμένες μεταβολικές αντιδράσεις, από εξωγενείς ουσίες και από ιονίζουσες ακτινοβολίες.

Υπάρχουν τέσσερις οικογένειες ακόρεστων λιπαρών οξέων, των οποίων οι τυπικοί αντιπρόσωποι είναι αντίστοιχα το παλμιτολεϊκό, το ολεϊκό, το λινολεϊκό και το λινολενικό οξύ. Τα δύο τελευταία δεν μπορούν να συντεθούν από τον οργανισμό μας και πρέπει συνεπώς να εισαχθούν με την διατροφή. Όλα τα άλλα μονο- και πολυακόρεστα αλειφατικά οξέα σχηματίζονται με βάση αυτά τα τέσσερα, με επιμήκυνση της αλυσίδας και δημιουργίας διπλών δεσμών (απαλειφατοποίηση ή ακορεστοποίηση). Στο παρακάτω σχήμα φαίνεται ο γενικός μηχανισμός της λιπούπεροξείδωσης (Σχήμα 14).



Πολυακόρεστο λιπαρό οξύ
Απόσπαση ενός ατόμου υδρογόνου

Ελεύθερη ρίζα του πολυακόρεστου
λιπαρού οξέος

Συνεζευγμένο διένιο

Υπεροξυλική ρίζα

υδρούπεροξειδίο

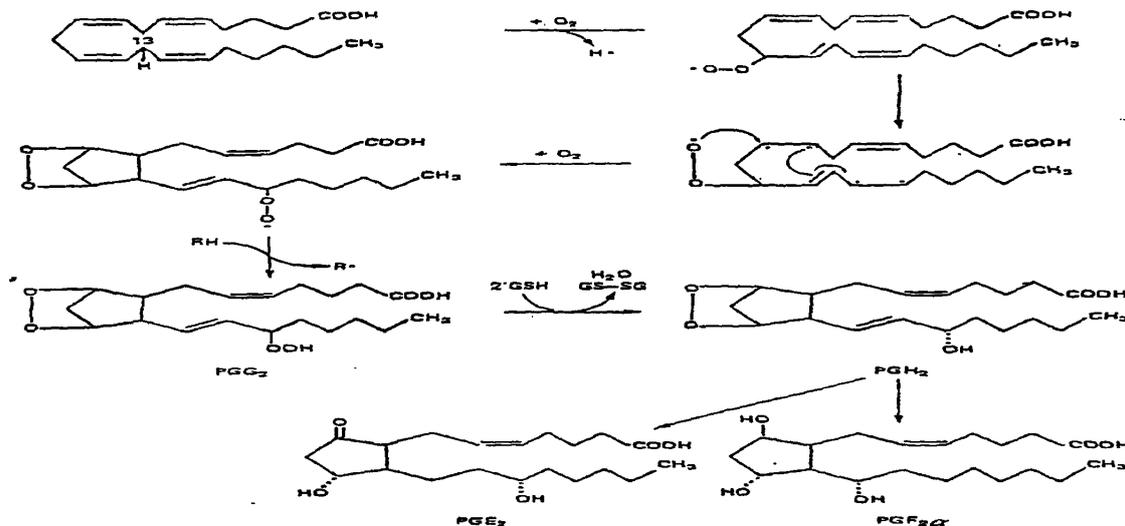
Σχήμα 14 Αλυσίδα αντιδράσεων ριζών στην λιπιδική υπεροξείδωση



5.5 Ενζυματική Λιποϋπεροξειδωση (Σχηματισμός Προσταγλανδινών)

Μια κατηγορία ενώσεων που προκύπτουν από λιποϋπεροξειδωση ακόρεστων λιπαρών οξέων είναι οι προσταγλανδίνες. Το εικοσιτριενικό οξύ είναι ο πρόδρομος των προσταγλανδινών PGE₁ και PGF_{1α}. Το αραχιδονικό οξύ (AA) είναι ο πρόδρομος των PGE₂ και PGF_{2α} και το εικοσιπεντενοϊκό οξύ των PGE₃ και PGF_{3α}. Η σύνθεση των προσταγλανδινών καταλύεται από ένα σύμπλεγμα ενζύμων που βρίσκεται στις μεμβράνες των μικροσωμάτων και ονομάζεται Συνθετάση Προσταγλανδινών¹⁷⁷⁻¹⁷⁹.

Η αντίδραση ξεκινά με την απόσπαση ενός ατόμου υδρογόνου από τη θέση 13 της αλυσίδας του αραχιδονικού οξέος. Η ελεύθερη ρίζα που σχηματίζεται αντιδρά με μοριακό οξυγόνο και σχηματίζεται μια υπεροξυλική ρίζα. Η ρίζα αυτή κυκλοποιείται και σχηματίζεται ένα ενδοϋπεροξειδίο, που ονομάζεται PGG₂. Το ένζυμο του συμπλέγματος προσταγλανδίνη-συνθετάση, που καταλύει την αντίδραση μέχρι τον σχηματισμό του ενδοϋπεροξειδίου PGG₂, λέγεται κυκλοξυγονάση. Το ενδοϋπεροξειδίο PGG₂, παρουσία γλουταθειώνης (GSH) μετατρέπεται σε PGH₂ με τελικά προϊόντα τις προσταγλανδίνες PGE₂ και PGF_{2α}¹⁸⁰. Η αντίδραση φαίνεται στο Σχήμα 15.



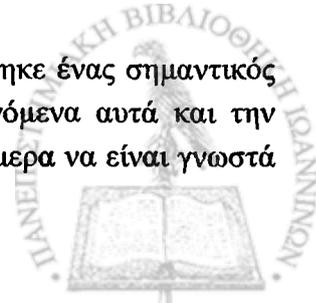
Σχήμα 15

Μηχανισμός βιοσύνθεσης προσταγλανδινών

1. Οι Ελεύθερες Ρίζες Οξυγόνου στην ανθρώπινη φυσιολογία

Το ανθρώπινο είδος κατά την διάρκεια των ιστορικών χρόνων ήλθε κατά τρόπο έμμεσο σε επαφή με την χημεία των ελευθέρων ριζών του οξυγόνου. Ένα χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η βαλσάμωση που είχε αναπτυχθεί στην αρχαία Αίγυπτο. Οι ομάδες των αιγυπτιακών ιερατείων είχαν ανακαλύψει διάφορες μεθόδους διατήρησης των νεκρών σωμάτων, μέσα στις συνταγές των οποίων περιέχονταν διάφορα έλαια και άλλα φυτικά εκχυλίσματα τα οποία λειτουργούσαν ως αντιοξειδωτικά. Τις τελευταίες δεκαετίες τα φαινόμενα της οξειδωσης τα σχετιζόμενα με τις διάφορες ενεργοποιημένες μορφές του οξυγόνου, έχειδειχθεί πως όχι απλώς συμμετέχουν, αλλά συχνά αποτελούν ένα από τα απαραίτητα κρίσιμα στάδια των διαδικασιών που οδηγούν στην δημιουργία ενός ευρύτερου φάσματος παθολογιών.

Λόγω της σπουδαιότητας αυτών των οξειδωτικών φαινομένων, αναπτύχθηκε ένας σημαντικός κλάδος της βιοχημείας και της παθοφυσιολογίας που ασχολείται με τα φαινόμενα αυτά και την επίδρασή τους στην γένεση και την εξέλιξη των ασθενειών, με αποτέλεσμα σήμερα να είναι γνωστά



πολλά στοιχεία σχετικά με τις φυσικοχημικές ιδιότητες των ελευθέρων ριζών οξυγόνου. Έχει επίσης αναπτυχθεί ένας σημαντικός αριθμός τεχνικών, που επιτρέπουν τον ποιοτικό και ποσοτικό προσδιορισμό αυτών των εξαιρετικά δραστήριων και πολύ συχνά εξαιρετικά φευγαλέων χημικών οντοτήτων, τόσο *in vitro* όσο και *in vivo*^{181,182}.

1.1 Παραγωγή ελευθέρων ριζών στον ανθρώπινο οργανισμό

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

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

- Ενδογενείς πηγές:
- ♦ Αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων στα μιτοχόνδρια
 - ♦ Αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων στα μικροσωμάτια
 - ♦ Αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων στους χλωροπλάστες
 - ♦ Οξειδωτικά ένζυμα: Οξειδάση της ξανθίνης
 Διοξυγονάση της τρυπτοφάνης
 Κυκλοξυγονάση
 Λιποξυγονάση
 Μονοαμινοξειδάσες
 - ♦ Κύτταρα που φαγοκυττώνουν: Ουδετερόφιλα
 Μονοκύτταρα και μακροφάγα
 Ενδοθηλιακά κύτταρα
 - ♦ Αυτοξειδωτικές αντιδράσεις (π.χ. Fe^{2+} , επινεφρίνη)

- Εξωγενείς παράγοντες:
- ♦ Ουσίες ανακύκλωσης του Redox (π.χ. Paraquat, Diquat, αλλοξάνη, δοξορουμπίνη)
 - ♦ Οξειδώσεις φαρμάκων (π.χ. παρακεταμόλη)
 - ♦ Κάπνισμα
 - ♦ Ιονίζουσα ακτινοβολία
 - ♦ Ηλιακή ακτινοβολία
 - ♦ Θερμικό shock
 - ♦ Ουσίες που οξειδώνουν την γλουταθειόνη



6.2 Κλινικές καταστάσεις στις οποίες εμπλέκονται ελεύθερες ρίζες οξυγόνου

Δράση σε πολλά όργανα

Φλεγμονή – ανοσολογική βλάβη
 Σπειραματονεφρίτιδα
 Αγγειίτιδα
 Καταστάσεις ισχαιμίας-επαναιμάτωσης
 Αντιδράσεις από φάρμακα και τοξίνες
 Υπερβολική πρόσληψη σιδήρου
 Ιδιοπαθής αιμοχρωμάτωση
 Διαιτητική υπερπρόσληψη σιδήρου
 Θαλασσαιμία και άλλες χρόνιες αναιμίες
Πρωτοπαθής δράση σε ξεχωριστά όργανα

Διατροφικά ελλείμματα
 Ένδεια βιταμίνης E
 Αλκοολισμός
 Βλάβες από ακτινοβολία
 Γήρας
 Διαταραχές από “πρώιμο γήρας”
 Ανοσολογική ανεπάρκεια των γερόντων
 Καρκίνος
 Αμυλοειδείς νόσοι (Alzheimer)

Ερυθροκύτταρα

Τοξίκωση από φαινυλδραζίνη
 Τοξίκωση από πριμακίνη
 Δηλητηρίαση από μόλυβδο
 Πρωτοπορφυρινική φωτο-οξειδωση
 Ελονοσία
 Δρεπανοκυτταρική αναιμία
 Κυάμωση (Φαβισμός)
 Αναιμία Fanconi

Πνεύμονας

Δράσεις του εισπνεόμενου καπνού
 Εμφύσημα
 Υπεροξία
 Βρογχοπνευμονική δυσπλασία
 Οξειδωτικοί ρύποι
 Σύνδρομο οξείας αναπνευστικής δυσχέρειας
 Πνευμονοκονίαση των μεταλλωρύχων
 Τοξικότητα από παρακουάτ

Καρδιά και αγγειακό σύστημα

Αλκοολική μυοκαρδιοπάθεια
 Νόσος Keshay (ελλιπής πρόσληψη σεληνίου)
 Αρτηριοσκλήρυνση
 Τοξικότητα από δοξορουβισίνη

Νεφροί

Νεφροτοξικότητα από αμινογλυκοσίδες
 Νεφροτοξικότητα από βαρέα μέταλλα
 Απόρριψη νεφρικού μωσχεύματος

Γαστρεντερικό σύστημα

Ηπατική βλάβη από ενδοτοξίνη
 Ηπατική βλάβη από τετραχλωράνθρακα
 Διαβητογόνος δράση της αλλοζάνης

Αρθροπάθειες

Ρευματοειδής αρθρίτιδα

Παγκρεατίτιδα από ελεύθερα λιπαρά οξέα

Βλάβες από δράση μη στεροειδών
 αντιφλεγμονωδών φαρμάκων

Κεντρικό νευρικό σύστημα

Χορήγηση υπερβαρικού οξυγόνου
 Νευροτοξίνες
 Γεροντική άνοια
 Νόσος του Πάρκινσον
 Εγκεφαλικές βλάβες της υπέρτασης,
 εγκεφαλικό τραύμα
 Κηροειδής λιποφουσκίνωση των νευρώνων
 Αλλεργική εγκεφαλομυελίτις και άλλες
 απομυελινωτικές νόσοι

Οφθαλμοί

Καταρρακτογένεση

Ενδοφθάλμιες αιμορραγίες
 Αμφιβληστροειδοπάθεια των πρόωρων νεογνών
 Ακτινική αμφιβληστροειδοπάθεια



6.3 Ενδοκυτταρικές και εξωκυτταρικές αντιοξειδωτικές άμυνες του ανθρώπινου οργανισμού

Στο εσωτερικό των κυττάρων οι αντιοξειδωτικές άμυνες αντιπροσωπεύονται ευρέως από εξειδικευμένες ενζυμικές πρωτεΐνες όπως είναι η υπεροξειδιοδισμουτάση (SOD) και η γλουταθειόνη-υπεροξειδάση. Ωστόσο στο πλάσμα όπως επίσης και στο αρθρικό υγρό η συγκέντρωση της υπεροξειδιοδισμουτάσης είναι πάρα πολύ μικρή ενώ η καταλάση και η γλουταθειόνη-υπεροξειδάση είναι ουσιαστικά ανύπαρκτες. Στα εν λόγω εξωκυττάρια υγρά λειτουργούν άλλα μόρια ως αντιοξειδωτικοί παράγοντες. Τα μόρια αυτά φαίνονται αναλυτικά στον παρακάτω πίνακα^{183,184}:

- ♦ Τρανσφερρίνη - Λακτοφερίνη:

Ενσωματώνουν τον σίδηρο και σταματούν ή επιβραδύνουν την καταλυτική του συμμετοχή σε αντιδράσεις Haber-Weiss που οδηγούν σε λιπούπεροξείδωση και φαύλους οξειδωτικούς κύκλους.

- ♦ Σερουλοπλασμίνη:

Οξειδώνει τον δυσθενή σίδηρο προς τρισθενή χωρίς να απελευθερώνει στο αιματικό πλάσμα ελεύθερες ρίζες οξυγόνου. Αναστέλλει την λιπούπεροξειδωτική δράση του σιδήρου και του χαλκού. Αντιδρά επίσης στοιχειομετρικά με το ανιόν υπεροξειδίου, χωρίς ωστόσο η δράση της αυτή να θεωρείται ιδιαίτερα σημαντική. Ένα μεγάλο μέρος της αντιοξειδωτικής δράσης του ανθρώπινου αιματικού πλάσματος οφείλεται στην σερουλοπλασμίνη.

- ♦ Λευκωματίνη:

Ενσωματώνει τον χαλκό ισχυρά και τον σίδηρο με ασθενή τρόπο. Η συγκέντρωση στο πλάσμα είναι υψηλή (50-60 mg/ml). Ο χαλκός που ενσωματώνεται στην λευκωματίνη μπορεί να συμμετάσχει σε αντιδράσεις Fenton, αλλά οι σχηματιζόμενες οξειδωτικές ρίζες υδροξυλίου εξουδετερώνονται από την ίδια την λευκωματίνη και έτσι δεν διαφεύγουν στο περιβάλλον μέσο. Η δράση αυτή αντιπροσωπεύει μία βιολογικώς μη σημαντική εξειδικευμένη αντίδραση. Η λευκωματίνη θεωρείται ως “αυτοθυσιαζόμενος” αντιοξειδωτικός παράγοντας.

- ♦ Απτοσφαιρίνη:

Ενσωματώνει την ελεύθερη αιμοσφαιρίνη και την αίμη.

- ♦ Αιμοσφαιρίνη και Μεθαιμοσφαιρίνη:

Είναι ισχυρότατες υπεροξειδάσες και μπορούν να επιταχύνουν την λιπούπεροξείδωση. Η ενσωμάτωση μπορεί να παρεμποδίσει την υπεροξειδωτική τους δράση. Η απτοσφαιρίνη μπορεί να εμποδίσει την οξείδωση του διμεθυλσουλφοξειδίου εκ μέρους της αιμοσφαιρίνης.

- ♦ Ουρικό οξύ:

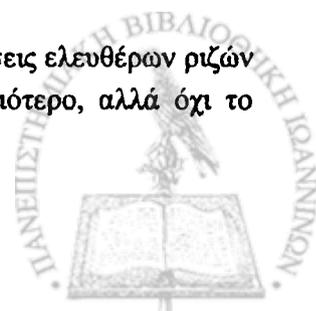
Αναστέλλει την λιπούπεροξείδωση και εξουδετερώνει τις ελεύθερες ρίζες. Η ικανότητά του να δεσμεύει ισχυρά τον σίδηρο και τον χαλκό αντιπροσωπεύουν ένα σημαντικό τμήμα του αντιοξειδωτικού του ρόλου.

- ♦ Γλυκόζη:

Εξουδετερώνει τις ελεύθερες ρίζες. Συμπεριφέρεται χημικά, ως προς την εκκαθαριστική της ιδιότητα, κατά ανάλογο τρόπο με την μαννιτόλη. Η φυσιολογική της αιματική συγκέντρωση είναι ίση περίπου προς 4,5 mmol αμέσως μετά από ένα γεύμα πλούσιο σε υδατάνθρακες.

- ♦ Βιταμίνη E:

Λειτουργεί ως ισχυρό αντιοξειδωτικό διακόπτοντας τις αλυσιδωτές αντιδράσεις ελευθέρων ριζών παγιδεύοντας τις υπερόξυ- και άλλες ρίζες. Η βιταμίνη E είναι το σπουδαιότερο, αλλά όχι το



μοναδικό, μέσο του ανθρώπινου αιματικού πλάσματος. Τα υπόλοιπα αντιοξειδωτικά που προαναφέρθηκαν λειτουργούν στην υδατική φάση.

♦ Ασκορβικό οξύ (βιταμίνη C)

Η ενζυμική εξουδετέρωση του ανιόντος υπεροξειδίου του οξυγόνου όπως επίσης και του υπεροξειδίου του υδρογόνου στο εσωτερικό των κυττάρων είναι σημαντική, αν λάβουμε υπ' όψιν μας ότι ο ελεύθερος σίδηρος που βρίσκεται εκεί αποτελεί μία διαρκή πηγή ενεργοποιημένων μορφών οξυγόνου. Πάντως, στα εξωκυττάρια υγρά η μεγαλύτερη γραμμή άμυνας εναντίον των οξειδωτικών παραγόντων αντιπροσωπεύεται από μόρια που εμποδίζουν τον σίδηρο να ελευθερωθεί και να συμπεριφερθεί σαν εκλυτικός παράγοντας ελευθέρων ριζών, ερμηνεύοντας έτσι και την λειτουργία της περίσσειας της τρανσφερρίνης στο αίμα.

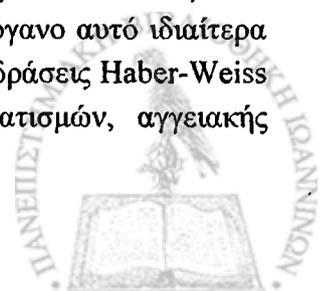
Έτσι, το ουρικό οξύ, η λευκοματίνη, η απτογλοβίνη και η αιμοπυξίνη εμφανίζουν αντιοξειδωτική συμπεριφορά η οποία οφείλεται πιθανώς στην ιδιότητά τους να δεσμεύουν διάφορα μέταλλα ικανά να καταλύσουν αντιδράσεις ελευθέρων ριζών στο αιματικό περιβάλλον^{184,185}.

Η σερουλοπλασμίνη, ένας σημαντικός εξωκυττάριος αντιοξειδωτικός παράγοντας, έχει την ιδιότητα να οξειδώνει τον δισθενή σίδηρο προς τρισθενή ο οποίος μπορεί υπό την μορφή αυτή να ενσωματωθεί στην τρανσφερίνη, όπως επίσης και κάθε άτομο σιδήρου που κινητοποιείται από την πλασματική φερριτίνη¹⁸⁶.

Εδώ όμως δημιουργείται το ερώτημα: Για ποιους λόγους τα εξωκυττάρια υγρά διαθέτουν αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς διαφορετικούς από εκείνους που υπάρχουν στο εσωτερικό των κυττάρων; Αυτή η διαφορά φαίνεται να βασίζεται στον λειτουργικό ρόλο που παίζουν το ανιόν υπεροξειδίου όπως επίσης και το υπεροξείδιο του υδρογόνου στο εξωκυττάριο περιβάλλον. Όταν τα διάφορα φαγοκύτταρα ενεργοποιούνται, εμφανίζουν το φαινόμενο της εκρηκτικής αναπνοής με αποτέλεσμα να απελευθερώνουν στο άμεσο περιβάλλον τους μικρές ποσότητες ανιόντος υπεροξειδίου και υπεροξειδίου του υδρογόνου τα οποία φαίνεται να παίζουν τον ρόλο χρήσιμων μηνυμάτων που ανταλλάσσουν μεταξύ τους τα κύτταρα που συμμετέχουν στις φλεγμονώδεις διαδικασίες. Για παράδειγμα το ανιόν υπεροξειδίου συμμετέχει στην χημειοταξία που επάγεται από το λευκοτριένιο B4 στα πολυμορφοπύρηνα λευκά, ενώ το υπεροξείδιο του υδρογόνου φαίνεται να παίζει ένα σημαντικό ρόλο στην αιμοπεταλιακή ενεργοποίηση όπως επίσης και άλλες ελεύθερες ρίζες^{187,188}. Συνεπώς ο οργανισμός πρέπει, από την μια πλευρά, να επιτρέψει την εκπομπή σε μικρές ποσότητες των χρήσιμων μορφών ενεργοποιημένου οξυγόνου, αλλά πρέπει ταυτοχρόνως να εξασφαλίσει την μη παραγωγή καταστροφικών οξειδωτικών ριζών υδροξυλίου και για τον λόγο αυτό επιλέγει την στρατηγική αποκλεισμού του σιδήρου και άλλων βαρέων μετάλλων ικανών να καταλύσουν την αντίδραση Haber-Weiss η οποία παράγει $\text{OH}\cdot$ από O_2^- και H_2O_2 .

Ωστόσο υπάρχουν μερικά εξωκυττάρια υγρά τα οποία είναι φτωχά σε μεταλλοδεσμευτικά αντιοξειδωτικά. Το εγκεφαλονωτιαίο υγρό, για παράδειγμα, έχει ελάχιστη ή και μηδενική σιδηροδεσμευτική ικανότητα, ενώ ο εγκέφαλος είναι πλούσιος σε σίδηρο.

Όταν ο εγκεφαλικός ιστός θραύεται, υφίσταται μια ταχεία λιπούπεροξείδωση, ίσως επειδή τα μέταλλα που απελευθερώνονται από τα κύτταρα δεν απομακρύνονται με ασφαλή τρόπο^{184,186,189}. Ο σίδηρος είναι στενά συνδεδεμένος με διάφορες νευρολογικές λειτουργίες χωρίς ωστόσο να έχουμε μια ακριβή γνώση των διαφόρων αλληλεπιδράσεων που προκαλεί στο εσωτερικό των νευρικών κυττάρων¹⁸⁹. Η υψηλή περιεκτικότητα του εγκεφάλου σε λιπίδια καθιστά το όργανο αυτό ιδιαίτερα τρωτό στις δράσεις των ελευθέρων ριζών που δύνανται να παραχθούν από αντιδράσεις Haber-Weiss που λαμβάνουν χώρα όταν έχουμε απελευθέρωση σιδήρου λόγω τραυματισμών, αγγειακής καταστροφής ή ισχαιμικών φαινομένων¹⁸⁹.



6.4 Το φάσμα των παθολογικών καταστάσεων

Κατά την διάρκεια της τελευταίας εικοσιπενταετίας η έρευνα επί θεμάτων ιστικής καταστροφής αποκάλυψε έναν μεγάλο αριθμό ενδείξεων ότι η ενεργοποίηση του οξυγόνου και η γένεση ελευθέρων ριζών αποτελούν φαινόμενα συσχετιζόμενα στενά με την εξέλιξη πολλών παθολογιών^{181,183,190-195}.

6.4.1 Φλεγμονώδεις παθήσεις

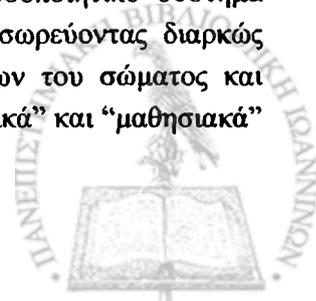
Ο ερεθισμός των πολυμορφοπύρηνων λευκοκυττάρων εκ μέρους πολλών ενεργοποιητικών ουσιών παράγει συν τοις άλλοις και ενεργοποιημένες μορφές οξυγόνου όπως το υπεροξειδίο του οξυγόνου και το ανιόν του υπεροξειδίου (O_2^-). Σήμερα θεωρείται ότι οι οξειδωτικές διαδικασίες που σχετίζονται με την ενεργοποίηση των πολυμορφοπύρηνων λευκοκυττάρων και την εντατικοποίηση της λειτουργίας των διαφόρων κλάδων της αραχιδονικής οδού στο εσωτερικό τους, είναι υπεύθυνες για την πλειοψηφία των βλαβερών φαινομένων που συνοδεύουν την εξέλιξη της φλεγμονής και οδηγούν σε καταστροφή των ιστών του σώματος, στους οποίους συναθροίζονται μεγάλοι αριθμοί ενεργοποιημένων πολυμορφοπύρηνων και άλλων “επαγγελματικών” φαγοκυττάρων. Αυτές οι οξειδωτικές διαδικασίες βλάπτουν σημαντικά τα ενδοθήλια των τριχοειδών αγγείων και γενικότερα της μικροκυκλοφορίας (αρτηριόλια και φλεβίδια) όλων των οργάνων που εμφανίζουν φλεγμονή, οδηγώντας στις διάφορες εικόνες της ανθρώπινης φλεγμονώδους-ανοσολογικής παθολογίας και στις συνθήκες που παράγονται στα πειραματικά μοντέλα της φλεγμονής^{191,196,197}.

Η μελέτη της φλεγμονής των αρθρώσεων στα διάφορα είδη αρθρίτιδας έχει φωτίσει μέχρι σήμερα αρκετά σημεία της αλληλεπίδρασης μεταξύ των φαινομένων φλεγμονώδους παραγωγής ενεργοποιημένων μορφών οξυγόνου και ιστικής βλάβης^{184,198,199}.

Η φλεγμονή των αρθρώσεων είτε αυτή προκαλείται από ανοσοσυμπλέγματα, είτε από βακτηριακά προϊόντα είτε από κρυστάλλους, ξεκινά από την τοπική ενεργοποίηση των πολυμορφοπύρηνων λευκοκυττάρων από τους προαναφερθέντες παράγοντες, με άμεση συνέπεια την παραγωγή ελευθέρων ριζών. Το υαλουρονικό οξύ καταστρέφεται βραδέως από τις ελεύθερες ρίζες, όπως συμβαίνει και με διάφορα πρωτεογλυκάνια, ίνες κολλαγόνου και ελαστίνης¹⁸³. Χαρακτηριστικό είναι το γεγονός ότι οι διάφορες περιπτώσεις χρόνιων φλεγμονών και καταστροφής του DNA που συνοδεύουν τις αυτοάνοσες παθήσεις αλλά και η πρωταρχική ενεργοποίηση των λεμφοκυττάρων T που οδηγεί τους υποπληθυσμούς τους να πολλαπλασιάζονται για να αντιμετωπίσουν τον συγκεκριμένο εισερχόμενο κίνδυνο, σχετίζονται στενά με την διατήρηση των συγκεντρώσεων των ελευθέρων ριζών σε ψηλά επίπεδα^{191,200,201}. Δεν υπάρχουν διαθέσιμες αποδείξεις που να δείχνουν ότι αντιοξειδωτικά συμπληρώματα διατροφής μπορούν να “ανακουφίσουν” τον πάσχοντα από αρθρίτιδα. Παρ' όλα αυτά, σε μελέτη των επιπέδων της βιταμίνης E στο υγρό του αρθρικού υμένα ασθενών με ρευματοειδή αρθρίτιδα, βρέθηκε ότι αυτά είναι σημαντικά ελαττωμένα σε σχέση με εκείνα υγιών ατόμων²⁰². Σε μία άλλη μελέτη βρέθηκε ότι χαμηλά επίπεδα βιταμίνης E, β-καροτένιου και σεληνίου σχετίζονται με αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης ρευματοειδούς αρθρίτιδας²⁰³. Ακόμη βρέθηκε ότι τα επίπεδα της γλουταθειόνη-υπεροξειδάσης και του σεληνίου είναι ελαττωμένα στο αίμα ασθενών με ρευματοειδή αρθρίτιδα²⁰⁴.

6.4.2 Αυτοάνοσα νοσήματα

Τα αυτοάνοσα νοσήματα αποτελούν μία μεγάλη κατηγορία νοσημάτων τα οποία φαίνεται να έχουν κάποιες κοινές βάσεις και κατά τις οποίες εκδηλώνεται μία σοβαρή διαταραχή στις λειτουργίες του ανοσοποιητικού συστήματος, χαρακτηριζόμενη ως αυτοανοσία. Το ανοσοποιητικό σύστημα αναπτύσσεται σταδιακά μέσα στα πρώτα χρόνια της παιδικής ηλικίας συσσωρεύοντας διαρκώς πληροφορίες σχετικές με την φύση της ταυτότητας των διαφόρων τμημάτων του σώματος και συνεπώς είναι ένα σύστημα που η διάρθρωση και η λειτουργία του έχει “γνωστικά” και “μαθησιακά”



χαρακτηριστικά, χωρίς ωστόσο η “μάθηση” εν προκειμένω να έχει τους χαρακτήρες της νευρολογικής μαθήσεως που βασίζεται σε συναπτικά φαινόμενα και σε αλληλεπιδράσεις νευρωνικών κυκλωμάτων με σταθερές ανατομικές θέσεις. Αν και δεν γνωρίζουμε ακριβώς με ποιόν τρόπο το ανοσοποιητικό σύστημα “μαθαίνει” τα χαρακτηριστικά του σώματος φαίνεται ωστόσο ότι τα χαρακτηριστικά αυτά δηλώνονται από κάθε κύτταρο μέσω ειδικών πρωτεϊνικών σημάτων τα οποία λειτουργούν ως διακριτικά που δηλώνουν ότι ένα κύτταρο ανήκει στον εν λόγω οργανισμό. Τα διακριτικά αυτά φαίνεται να συσχετίζονται με το λεγόμενο “Μέγιστο Σύμπλοκο Ιστοσυμβατότητας”. Συνεπώς οποιοσδήποτε οργανισμός εξωγενούς προέλευσης βρεθεί στην ακτίνα εποπτείας των ανοσολογικών κυττάρων χωρίς να διαθέτει τα διακριτικά του οργανισμού θα καταστραφεί ταχέως από τα λευκοκύτταρα και τα στοιχεία που τον συναποτελούν θα αρχειοθετηθούν στις μνημονικές αποθήκες του ανοσοποιητικού συστήματος που είναι τα T λεμφοκύτταρα.

Συμβαίνει όμως τα κύτταρα αυτού καθ' αυτού του οργανισμού για λόγους τόσο ενδογενείς όσο και εξωγενείς να υφίστανται ποικίλες μεταλλάξεις με αποτέλεσμα κάποια στιγμή να κωδικοποιούν πρωτεΐνες οι οποίες διαφέρουν από τις πρωτεΐνες αναγνώρισης του σώματος. Επειδή τα μεταλλαγμένα κύτταρα συχνά εκτρέπονται από την φυσιολογική τους λειτουργία και παρασιτούν εις βάρος του οργανισμού, το ανοσοποιητικό σύστημα τα αναγνωρίζει και τα καταστρέφει. Η μεγαλύτερη και πλέον επικίνδυνη εκτροπή είναι η καρκινική εξαλλαγή. Ένα ανοσοποιητικό που λειτουργεί κανονικά διακρίνει τα καρκινικά κύτταρα και τα φαγοκυτταρώνει μη επιτρέποντάς τα να δώσουν γένεση σε όγκο και σε μεταστατική διασπορά.

Η εφαρμογή των αντιοξειδωτικών είναι ικανή να επιφέρει, σε θεωρητικό πλαίσιο, μια ύφεση της φλεγμονώδους διαδικασίας μόνον όταν τα αντιοξειδωτικά μπορούν να χορηγούνται επί μακρό χρονικό διάστημα και σε υψηλές δόσεις. Σε μικρές δόσεις τα αντιοξειδωτικά τελικού σταδίου, δηλαδή οι εκκαθαριστές ελευθέρων ριζών, είναι πιθανώς επιβλαβή, διότι μπορούν να μετατραπούν σε υποστρώματα για την αντίδραση Haber-Weiss εφ' όσον ανάγουν τον σίδηρο και του δίνουν έτσι την δυνατότητα να παράγει καταλυτικά ελεύθερες ρίζες. Η εφαρμογή των αντιοξειδωτικών τελικού σταδίου θα μπορούσε να λειτουργήσει ικανοποιητικά με την παράλληλη χορήγηση χυλικών δεσμευτών των μετάλλων μεταπτώσεως, οι οποίοι δεσμεύοντας τον σίδηρο θα ήταν σε θέση να αποκλείσουν εντελώς αντιδράσεις παραγωγής ελευθέρων ριζών του τύπου Haber-Weiss. Η εφαρμογή μιας αντιφλεγμονώδους αγωγής βασιζόμενης σε αναστολείς της κυκλοξυγονάσης καθώς και η προσθήκη στην διατροφή λιπαρών οξέων προερχομένων από ιχθυέλαια, θα μείωνε περαιτέρω την αντιδραστικότητα της αραχιδονικής οδού και την ένταση των βλαβών.

6.4.3 Γεροντική ανοσολογική ανεπάρκεια

Με την αύξηση της ηλικίας αυξάνονται και οι αντιδράσεις των ελευθέρων ριζών ενώ μειώνονται οι αντιοξειδωτικές άμυνες²⁰⁵. Έχει δείχθει ότι η προσθήκη μερικών αντιοξειδωτικών όπως το ασκορβικό οξύ, η α-τοκοφερόλη, το ιχνοστοιχείο σελήνιο, ο ψευδάργυρος και ο χαλκός ενισχύουν την αντιοξειδωτική άμυνα των ανοσοκυττάρων ενδυναμώνοντας τις ανοσολογικές τους αντιδράσεις.

Ακόμη, μετρήσεις των επιπέδων των ενδογενών αντιοξειδωτικών, όπως η γλουταθειόνη-υπεροξειδάση, δείχνουν μείωσή τους με την αύξηση της ηλικίας, γεγονός που συνηγορεί υπέρ της εμπλοκής αυτής της μείωσης σε παθολογικές καταστάσεις που σχετίζονται με το γήρας²⁰⁶.

6.4.4 Ισχαιμία - Επαναιμάτωση

Οι παθολογικές καταστάσεις που προκαλούνται από ισχαιμία, από ανεπαρκή δηλαδή αιμάτωση και συνακολούθως οξυγόνοση των ιστών αντιπροσωπεύουν το μεγαλύτερο αίτιο θανάτου στον βιομηχανοποιημένο κόσμο με υψηλό επίπεδο ζωής.



Η μεθοδική ανάλυση αυτής της αντιστοιχίας έδειξε ότι η πειραματική ισχαιμία αυτή καθαυτή πολλές φορές είναι δυνατόν να διαρκέσει επί αρκετό χρόνο χωρίς το όργανο να υποστεί μη αντιστρέψιμες βλάβες των δομών και των λειτουργιών του. Τα μεγάλα προβλήματα προκύπτουν αμέσως μόλις αποκατασταθεί η επανατροφοδοσία του οργάνου είτε από την κανονική του οδό είτε από την παράπλευρη κυκλοφορία του. Ενώ δηλαδή οι πειραματιστές περίμεναν την πλήρη ανάνηψη του οργάνου μετά την αποκατάσταση της κυκλοφορίας του, παρατηρήθηκε ότι πολλές βλάβες εγκαθίσταντο ακριβώς την στιγμή της επαναϊμάτωσης και συνεπώς της επανοξυγόνωσης. Για τον λόγο αυτό χρησιμοποίησαν τον όρο “βλάβη από επανακυκλοφορία” ή “παράδοξο του οξυγόνου”^{207,208}. Για να μπορέσουν να ερμηνεύσουν την βλάβη από την επανακυκλοφορία χρησιμοποίησαν την υπόθεση της δημιουργίας ελευθέρων ριζών οξυγόνου και πράγματι οι ισχαιμικές συνθήκες μπορούν να λειτουργήσουν ως συνθήκες ικανές να ευνοήσουν την εκρηκτική παραγωγή ενεργοποιημένων μορφών οξυγόνου, όταν το οξυγόνο επαναχορηγηθεί στο ισχαιμούν σύστημα.

Η θεωρία ότι οι ελεύθερες ρίζες οξυγόνου ευθύνονται για την παρατηρούμενη βλάβη δοκιμάστηκε σε μία σειρά επιτυχών πειραμάτων τα οποία έδωσαν σημαντικά αποτελέσματα²⁰⁹. Σε μελέτες πειραματικής ισχαιμίας που αφορούσε το έντερο γάτας βρέθηκε ότι η ενδοφλέβια χορήγηση του ενζύμου υπεροξειδίου δισμουτάσης (SOD) προστάτευε τους θιγόμενους ιστούς σε υψηλό βαθμό έναντι της αυξήσεως της διαβατότητας των ενδοθηλιακών μεμβρανών των τριχοειδών αγγείων, η οποία παρατηρείτο στους μάρτυρες των πειραμάτων ισχαιμίας-επαναιμάτωσης²⁰⁹.

Ήδη από τα πρώτα πειράματα και γενικά από διάφορες αναφορές είχε δειχθεί ότι η αλλοπουρινόλη παρείχε προστασία έναντι της ισχαιμικής βλάβης ή του αιμορραγικού shock^{210,211}. Δοθείσης της παρατηρήσεως αυτής έγινε η υπόθεση ότι η οξειδάση της ξανθίνης (XOD) έπρεπε να ενεπλέκετο κατά έναν τρόπο στις βλάβες τις προερχόμενες από την επανοξυγόνωση των ισχαιμούντων ιστών. Η οξειδάση της ξανθίνης αποτελεί την πρώτη αναφερθείσα βιολογική πηγή ρίζας ανιόντος υπεροξειδίου (O_2^*) και ως ένζυμο είναι ευρέως κατανεμημένο και υψηλώς συγκεντρωμένο στους ιστούς του ήπατος και του πεπτικού²¹². Ωστόσο το ένζυμο αυτό, ευθύς μόλις παραχθεί από τα ριβοσώματα, και πριν υποστεί άλλες μεταβολές, λειτουργεί ως αφυδρογονάση και όχι σαν οξειδάση του αντίστοιχου υποστρώματος. Η αφυδρογονασική παραλλαγή του, δηλαδή η ξανθίνη-αφυδρογονάση, αναφέρεται και ως μορφή D, η δε λειτουργία της συνίσταται στο να μεταφέρει ηλεκτρόνια στην ισοκιτρική αφυδρογονάση και όχι στο μοριακό οξυγόνο. Έτσι, η ξανθίνη αφυδρογονάση δεν είναι σε θέση να παράγει ελεύθερες ρίζες ανιόντος υπεροξειδίου²¹³. Στους υγιείς ιστούς το 90% της δραστηριότητας αυτού του ενζύμου αντιπροσωπεύεται από την μορφή D. Αν όμως η εν λόγω ενζυμική μορφή υποστεί 1) την δράση κάποιων ήπιων οξειδωτικών με αποτέλεσμα την οξείδωση των σουλφυδρυλικών ομάδων της ή 2) μία περιορισμένη πρωτεόλυση, τότε μετατρέπεται από αφυδρογονάση σε οξειδάση της ξανθίνης, λαμβάνοντας την λεγόμενη μορφή O (από το oxidase).

Μία πειραματική επιβεβαίωση του θεωρητικού αυτού σχήματος δόθηκε κατ' αρχάς από πειράματα που αφορούσαν ισχαιμία και επαναιμάτωση του εντέρου γάτας. Σε ένα μοντέλο συνιστώμενο σε μερική απόφραξη των μεσεντέριων αρτηριών για 30 λεπτά, η ενδοφλέβια χορήγηση διαλυμάτων υπεροξειδίου δισμουτάσης μείωσε κατά πολύ τις ενδοθηλιακές αλλοιώσεις των τριχοειδών αγγείων που εμφανιζόταν στους μάρτυρες μετά την επαναιμάτωση, όπως έχει ήδη αναφερθεί²¹⁶. Σε μια παραλλαγή του ίδιου μοντέλου, στην οποία η χρονική διάρκεια της ισχαιμίας ήταν τρεις ώρες (παρατεινόμενη ισχαιμία) η υπεροξειδίου δισμουτάση προσέφερε εξαιρετική υψηλή προστασία σε σχέση με τους μάρτυρες²¹⁴⁻²¹⁷.

Η χορήγηση στα πειραματόζωα αλλοπουρινόλης - η οποία είναι αναστολέας της οξειδάσης της ξανθίνης - παρείχε επίσης προστασία από τις βλάβες της επανοξυγόνωσης. Η μετατροπή της



αφυδρογονάσης της ξανθίνης σε οξειδάση λόγω ισχαιμίας αποδείχθηκε ότι λαμβάνει χώρα τόσο στο έντερο όσο και σε άλλα όργανα των επιμύων²¹⁸. Σε παρασκεύασμα απομονωμένης καρδιάς επίμυος *in vitro* δείχθηκε ότι η κυτταροπλασματική αύξηση του ασβεστίου είναι ικανή να πυροδοτήσει την μετατροπή της ξανθίνης αφυδρογονάσης προς οξειδάση σε καταστάσεις ενεργειακής εκπτώσεως ή υποξίας, όπως ακριβώς προβλέπεται από την θεωρητική προσέγγιση. Τα γενικά σημεία της όλης θεωρίας, έχουν επαληθευθεί σε διάφορα μοντέλα πολλών οργάνων προερχομένων από μία ποικιλία ειδών. Μέσα σ' αυτά περιλαμβάνονται το ήπαρ και το δέρμα του επίμυος, η καρδιά, ο σκελετικός μυς και το πάγκρεας των σκυλιών²¹⁹⁻²²³.

Στην απομονωθείσα *in vitro* καρδιά του επίμυος πραγματοποιήθηκε μία ισχυρότατη επαλήθευση της υπόθεσης της ξανθίνης οξειδάσης²²⁴. Στα πειράματα αυτά οι απομονωθείσες καρδιές, μετά την ανάρτησή τους, αφέθηκαν να πάλλουν ελευθέρως διαβρεχόμενες από ένα οξυγονωμένο ρυθμιστικό διάλυμα που περιείχε γλυκόζη, επί μία εξισορροπιστική περίοδο διάρκειας 15 λεπτών.

Κατόπιν οι καρδιές διαβράχισαν επί 40 λεπτά από ένα ανοξικό ρυθμιστικό διάλυμα γλυκόζης, για να επιτευχθεί η κατάσταση της πλήρους ισχαιμίας και της ενεργειακής έκπτωσης. Αμέσως μετά την πάροδο της σαραντάλεπτης ισχαιμίας οι καρδιές επανατροφοδοτούντο με το αρχικό οξυγονωμένο διάλυμα και μετά πάροδο ενός λεπτού γινόταν διαδοχικοί προσδιορισμοί της κρεατινίνης - φωσφοκινάσης στο υγρό που είχε διέλθει από το μυοκάρδιο. Η συγκέντρωση της φωσφοκινάσης ανέρχεται σε μία μέγιστη τιμή μετά την πάροδο δύο περίπου λεπτών από την επανοξυγόνωση και ελαττωνόταν βραδέως επί δέκα συνολικά λεπτά από την έναρξή της. Η προσθήκη στο διάλυμα υπεροξειδίου δισμουτάσης, καταλάσης ή αναστολέων της οξειδάσης της ξανθίνης (αλλοπουρινόλη ή περιναλδεϋδη), μείωνε σε υψηλότατο ποσοστό την απελευθέρωση της κρεατινίνης - φωσφοκινάσης παρέχοντας προστασία της τάξεως του 87% στο σύνολο των πειραμάτων²²⁵.

Ο υψηλός βαθμός προστασίας που επιτυγχάνεται από τους ενζυμικούς εκκαθαριστές του ανιόντος υπεροξειδίου και του υπεροξειδίου του υδρογόνου μας υπογραμμίζει τον βασικό ρόλο που παίζουν για την πραγματοποίηση της βλάβης οι δύο αυτές μορφές ενεργοποιημένου οξυγόνου. Η προστασία που παρέχει η SOD φθάνει ένα μέγιστο του 77%, ενώ η προσθήκη της καταλάσης βελτιώνει λίγο περισσότερο την κατάσταση. Ίσως η συνολική βλάβη να οφείλεται σε ένα μεγάλο ποσοστό στο H_2O_2 και σε ένα τρίτο ποσοστό στην ανάπτυξη ριζών $OH\cdot$, οι οποίες για να παραχθούν απαιτούν την ταυτόχρονη παρουσία $O_2\cdot$ και H_2O_2 όπως επίσης και σιδήρου²²⁶. Η προστασία του μυοκαρδίου από την αλλοπουρινόλη δεικνύει ότι η οξειδάση της ξανθίνης υπεισέρχεται κατά καθοριστικό τρόπο στην παραγωγή των ζημιογόνων ελευθέρων ριζών του οξυγόνου.

6.4.5 Αρτηριοσκλήρωση - Καρδιοαγγειακές παθήσεις

Οι αρτηριοσκληρυντικές βλάβες τείνουν να σχηματισθούν σε εκείνες τις περιοχές του αγγειακού συστήματος οι οποίες υπόκεινται σε διάφορους τραυματισμούς, συχνά μηχανικής αιτιολογίας. Οι βλάβες αυτές ωστόσο, μπορούν να ξεκινήσουν και να επαυξηθούν από ουσίες οι οποίες προκαλούν ερεθισμό στο αρτηριακό τοίχωμα. Μία σταθερή πηγή παραγωγής ερεθιστικών ουσιών αντιπροσωπεύεται από τις αντιδράσεις του μοριακού οξυγόνου, ή των ενεργοποιημένων μορφών του, με τα πολυακόρεστα λιπίδια που κυκλοφορούν στο πλάσμα ή που βρίσκονται στα κύτταρα του αγγειακού τοιχώματος. Τα προϊόντα της οξειδωσης συμπεριλαμβάνουν μεταξύ των άλλων υπεροξειδία, όπως επίσης και βαρύτερα μόρια προκύπτοντα από τις αντιδράσεις οξειδωτικού πολυμερισμού ριζών λιπιδίων, πρωτεϊνών και άλλων οργανικών ουσιών. Τα προϊόντα αυτά παράγονονται σε αξιοσημείωτες ποσότητες ώστε να συνεισφέρουν σημαντικά στην διαδικασία δημιουργίας της αρτηριοσκλήρωσης. Επιπλέον ελεύθερες ρίζες οξυγόνου μπορούν να παραχθούν από

την ενεργοποίηση των πολυμορφοπύρηνων και των αιμοπεταλίων συμμετέχοντας έτσι στον ερεθισμό του αγγειακού τοιχώματος. Έχει ακόμη δειχθεί ότι οι λιποπρωτείνες χαμηλού μοριακού βάρους (LDL) οι οποίες ενοχοποιούνται για την εναπόθεση της χοληστερίνης στους ιστούς πρέπει να υποστούν οξείδωση από διάφορα κύτταρα του αίματος (μακροφάγα) προκειμένου να προσληφθούν από τους υποδοχείς των κυττάρων του αγγειακού τοιχώματος^{227,469}. Είναι αξιοσημείωτο ακόμη το γεγονός ότι η οξειδωμένη χοληστερίνη φαίνεται να εναποτίθεται στα αγγεία σε πολύ μεγαλύτερα ποσοστά από την μη οξειδωμένη και η παραγωγή $O_2^{\cdot-}$ να είναι αυξημένη στα αιμοπετάλια υπερχοληστερολαιμικών ασθενών⁴⁶⁵. Η αυξημένη αρτηριοσκλήρωση των νεφροπαθών που υποβάλλονται χρονίως σε αιμοδιάλυση μπορεί να οφείλεται σε ενδοθηλιακές βλάβες οφειλόμενες σε ελεύθερες ρίζες. Κατά την διάρκεια της αιμοδιάλυσης συχνά λαμβάνει χώρα ενεργοποίηση του συμπληρώματος και το σύμπλοκο C_{5A} προκαλεί συσσώρευση των πολυμορφοπύρηνων λευκών με την ταυτόχρονη απελευθέρωση H_2O_2 και $O_2^{\cdot-}$. Επιπλέον πρέπει να σημειωθεί ότι οι αντιδράσεις ελευθέρων ριζών που λαμβάνουν χώρα από τις ιονίζουσες ακτινοβολίες μπορεί να οδηγήσουν σε αρτηριοσκλήρωση. Ακόμη φαίνεται ότι οι εκτεταμένες αρτηριοσκληρωτικές βλάβες που απαντώνται στα αγγεία των πασχόντων από ομοκυστινουρία είναι πιθανόν να σχετίζονται με τον σχηματισμό ανιόντος υπεροξειδίου κατά την μετατροπή της ομοκυστεΐνης σε ομοκυστίνη από την δράση του μοριακού οξυγόνου^{228,229}.

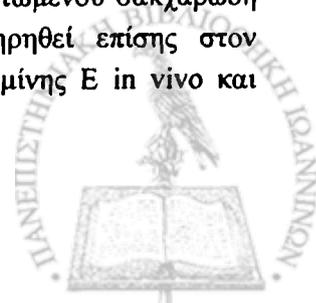
Παράλληλα με τις διαπιστώσεις αυτές έχει δειχθεί πειραματικά ότι τα πλυμμένα αιμοπετάλια του κουνελιού όπως και τά *ex vivo* αιμοπετάλια του ανθρώπου αφ' ενός μπορούν να ενεργοποιηθούν από χημικά συστήματα που παράγουν ελεύθερες ρίζες οξυγόνου, αφ' ετέρου η συσσώρευσή τους όταν προκαλείται από τους φυσιολογικούς τους διεγέρτες (ADP, PAF, επινεφρίνη) μπορεί να ανασταλλεί αλλά και να αντιστραφεί (αποσυσσώρευση) μέσω χορήγησης αναστολέων ελευθέρων ριζών, υπογραμμίζοντας έτσι την συμμετοχή των ελευθέρων ριζών στην αιμοπεταλιακή ενεργοποίηση. Επομένως, χαμηλά επίπεδα ενδογενών αντιοξειδωτικών (Total antioxidant status: TAS), προκαλούν αυξημένη ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων με αποτέλεσμα την αύξηση του κινδύνου αρτηριοσκλήρωσης και καρδιοαγγειακών παθήσεων. Πράγματι, χαμηλά επίπεδα TAS έχουν παρατηρηθεί σε ασθενείς μετά από έμφραγμα του μυοκαρδίου και στηθάγχη²³⁰. Ειδικότερα, χαμηλά επίπεδα υπεροξειδίου δισμουτάσης έχουν παρατηρηθεί σε ασθενείς μετά από έμφραγμα του μυοκαρδίου και στηθάγχη^{231,232}. Όπως και χαμηλά επίπεδα σεληνίου και γλουταθειόνη-υπεροξειδάσης θεωρείται ότι αυξάνουν την πιθανότητα εμφάνισης καρδιοαγγειακής νόσου, όπως η νόσος Keshan και η αρτηριοσκλήρυνση²³³.

Επίσης, χαμηλή αντιοξειδωτική ικανότητα στο πρώτο τρίμηνο της κύησης έχει περιγραφεί ως θετικός παράγοντας κινδύνου για την εμφάνιση προεκλαμψίας²³⁴.

6.4.6 Σακχαρώδης διαβήτης

Ο σακχαρώδης διαβήτης είναι μία συνήθης πάθηση, που συναντάται σε πολλά άτομα όπου η υπεργλυκαιμία συμβαίνει σαν αποτέλεσμα ελλειπτούς έκκρισης ή δραστηριότητας της ινσουλίνης. Ο σακχαρώδης διαβήτης σχετίζεται με τον αυξημένο κίνδυνο επιπλοκών όπως αμφιβληστροειδοπάθεια, νεφρική ανεπάρκεια, νευρική καταστροφή, κυκλοφοριακά προβλήματα και καρδιοπάθειες, γεγονότα που αποδίδονται στην υπερλειτουργικότητα των αιμοπεταλίων των διαβητικών ασθενών⁴⁴⁵.

Μελέτες σε ζώα έχουν δείξει ότι ελεύθερες ρίζες οξυγόνου συμβάλλουν στην καταστροφή των κυττάρων των παγκρετικών νησιδίων κατά την παθογένεση του ινσουλινοεξαρτώμενου σακχαρώδη διαβήτη. Ελαττωμένος μεταβολισμός του ασκορβικού οξέος έχει παρατηρηθεί επίσης στον σακχαρώδη διαβήτη. Το ασκορβικό χρειάζεται για την ανασύσταση της βιταμίνης E *in vivo* και



μπορεί να οξειδώνεται σε δεϋδροασκορβικό οξύ, το οποίο μπορεί να διασπάσει τις κυτταρικές δομές και να δράσει σαν νευροτοξίνη. Σε υγιείς ιστούς το δεϋδροασκορβικό οξύ γενικά ανακυκλώνεται προς ασκορβικό οξύ. Αυξημένη έκθεση σε ψηλά επίπεδα δεϋδροασκορβικού οξέος και χαμηλά επίπεδα ασκορβικού οξέος καταλήγει σε αυξημένη ευαισθησία των κυττάρων στην οξείδωση²³⁵.

Η συμπληρωματική χορήγηση βιταμίνης C έχει δείχθει ότι βελτιώνει τον έλεγχο της γλυκόζης και ελαττώνει τις τιμές του σακχάρου, των τριγλυκεριδίων και της χοληστερίνης στο αίμα ασθενών με μη ινσουλινοεξαρτώμενο διαβήτη²³⁶.

Σε άλλες μελέτες έχει δείχθει ότι το ασκορβικό οξύ είναι ελαττωμένο σε διαβητικούς ασθενείς σε σχέση με τους υγιείς²³⁷. Ακόμη, έχει δείχθει ότι τά επίπεδα της γλουταθειόνη-υπεροξειδάσης είναι αυξημένα σε διαβητικούς ασθενείς σε σύγκριση με υγιείς²³⁸, γεγονός που είναι ένδειξη ότι υπάρχει αυξημένη οξείδωση σε διαβητικούς ασθενείς. Πρόσφατες μελέτες έχουν αποδείξει επίσης ότι η ινσουλίνη προάγει την αιμοπεταλιακή συσσώρευση που προκαλείται από ADP⁴³³. Τέλος, τα επίπεδα της αλβουμίνης είναι ελαττωμένα σε διαβητικούς ασθενείς συγκρινόμενα με εκείνα υγιών ατόμων²³⁹.

6.4.7 Ανδρική στειρότητα

Η ανδική στειρότητα γενικά προκαλείται από ελλιπή λειτουργικότητα του σπέρματος, σε ένα ποσοστό που αντιστοιχεί στο 24% των ζευγαριών που επισκέπτονται κλινικές στειρότητας. Μία ποικιλία δυσλειτουργιών του σπέρματος έχει περιγραφεί, όπως ανώμαλη κινητικότητα των σπερματοζωαρίων, αδυναμία αναγνώρισης του ωαρίου και αναστολή της εισόδου στο ωάριο. Πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει επίσης ότι στείροι άνδρες έχουν χαμηλότερα επίπεδα αντιοξειδωτικών απ' ότι γόνιμοι άνδρες, ειδικά αυτοί με μειωμένη κινητικότητα των σπερματοζωαρίων τους²⁴⁰. Παράλληλα, θεραπεία με γλουταθειόνη φαίνεται να αυξάνει την κινητικότητα παθολογικών σπερματοζωαρίων στείρων ανδρών, βελτιώνοντας τις μεταβολικές παραμέτρους²⁴¹.

6.4.8 Νεφρικές παθήσεις

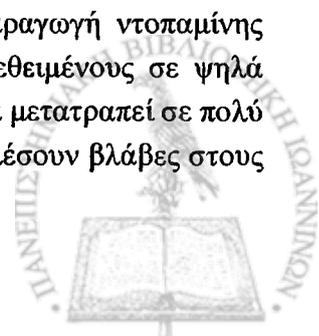
Πολλές παθολογικές καταστάσεις έχουν σχετιστεί με την χρόνια νεφρική ανεπάρκεια, συμπεριλαμβανομένων της αθηροσκλήρωσης, του καταρράκτη, της δυσλειτουργίας των αιμοπεταλίων και του γήρατος.

Ασθενείς που υπόκεινται σε αιμοδιάλυση, είναι γνωστό ότι χάνουν αντιοξειδωτικά χαμηλού μοριακού βάρους. Αυτό προκαλεί μία ανισορροπία στην αντιοξειδωτική άμυνα και φυσικά μία ελάττωση των επιπέδων των αντιοξειδωτικών²⁴². Τα επίπεδα της γλουταθειόνη-υπεροξειδάσης στους ασθενείς αυτούς είναι χαμηλότερα απ' ότι σε φυσιολογικούς ανθρώπους, και επειδή παίζει σημαντικό ρόλο στην προστασία από την λιπούπεροξειδωση, φαίνεται ότι η ελάττωσή της ενέχεται στην παθογένεση πολλών νεφρικών παθήσεων²⁴².

6.4.9 Νευρολογικές παθήσεις

Οξειδωτικό *stress* στον εγκέφαλο είναι πιθανόν να συμβεί, αφού ο εγκέφαλος χρησιμοποιεί το 20% του εισπνεόμενου οξυγόνου ενώ ζυγίζει μόνο το 2% του συνολικού σωματικού βάρους. Ο εγκέφαλος επίσης φιλοξενεί ψηλές συγκεντρώσεις πολυακόρεστων λιπαρών οξέων, τα οποία μπορούν να υποστούν λιπούπεροξειδωση σε ένα περιβάλλον τόσο πλούσιο σε οξυγόνο.

Ο μεταβολισμός της ντοπαμίνης παράγει ελεύθερες ρίζες. Αυξημένη παραγωγή ντοπαμίνης υπάρχει σε ασθενείς με νόσο του Πάρκινσον, γεγονός που τους καθιστά εκτεθειμένους σε ψηλά επίπεδα υπεροξειδίου του υδρογόνου²⁴³. Το υπεροξειδίο του υδρογόνου μπορεί να μετατραπεί σε πολύ δραστικές ρίζες υδροξυλίου, οι οποίες είναι πολύ τοξικές και μπορούν να προκαλέσουν βλάβες στους ντοπαμινεργικούς νευρώνες.



Πολλές χαρακτηριστικές νευροπαθολογίες σχετίζονται με απώλεια νευρώνων και ινώδεις εκφυλίσεις, μεταξύ άλλων. Στον εγκέφαλο νευρολογικών ασθενών βρέθηκε επίσης αυξημένο οξειδωτικό *stress* και ελαττωμένα επίπεδα βιταμινών C και E στο πλάσμα²⁴⁴.

6.4.10 Πνευμονικές παθήσεις

Ένας μεγάλος αριθμός πνευμονικών παθήσεων σχετίζεται με το οξειδωτικό *stress*, όπως καρκίνος, εμφύσημα, κυστική ίνωση κ.ά. Οι πνεύμονες είναι επιρρεπείς στην οξείδωση, καθώς είναι εκτεθειμένοι σ' ένα περιβάλλον πλούσιο σε οξυγόνο όπως επίσης και σε μεγάλο αριθμό τοξινών του περιβάλλοντος.

Παρατεταμένη έκθεση στο οξυγόνο και στις τοξίνες του περιβάλλοντος διεγείρει τα φαγοκύτταρα στον πνεύμονα, τα οποία παράγουν ελεύθερες ρίζες που προκαλούν λιπούπεροξείδωση. Μερικές παθολογικές καταστάσεις, π.χ. η κυστική ίνωση, οδηγούν σε αυξημένα επίπεδα ελεύθερου σιδήρου, ελαττωμένα επίπεδα γλουταθειόνης και σεληνίου και αυξημένες οξειδωτικές βλάβες στο DNA²⁴⁵.

6.4.11 Οξειδωτικές βλάβες του DNA, καρκίνος και γήρας

Έχειδειχθεί ότι ο συσσωρευτικός κίνδυνος εκδήλωσης νεοπλασματικής νόσου αυξάνει προσηγιστικά με την τέταρτη δύναμη της ηλικίας, τόσο στα βραχύβια ζωικά είδη όσο και στα μακρόβια. Έτσι, είδη όπως οι μύες και οι επίμυες, περί τα τέλη της ζωής τους, που διαρκεί 2 έως 3 χρόνια, πάσχουν σε ποσοστό 30% του συνολικού έσχατου γεροντικού τους πληθυσμού από καρκίνο, ενώ τα μακρόβια είδη όπως του ανθρώπου, παρουσιάζουν το ποσοστό αυτό καρκίνου περί τα τέλη της ζωής τους, που για τον άνθρωπο είναι περίπου τα 85 έτη²⁴⁶⁻²⁵⁰.

Ένας σημαντικός παράγοντας για την μακροζωία φαίνεται να είναι ο ρυθμός του μεταβολισμού, ο οποίος είναι πολύ χαμηλότερος στους ανθρώπους σε σύγκριση με τους επίμυες και φαίνεται να επηρεάζει έντονα το επίπεδο των ενδογενών μεταλλαξιογόνων που παράγονται υπερβολικά. Η οξειδωτική φθορά του DNA φαίνεται να αποτελεί τον βασικότερο παράγοντα που συνεισφέρει στην καρκινογένεση και στην γήρανση την συσχετιζόμενη με τον μεταβολικό ρυθμό^{251,252}.

Οι ελεύθερες ρίζες μπορούν να προκύψουν από πολλές και διάφορες πηγές στο εσωτερικό των ζωντανών οργανισμών. Οι μορφές του ενεργοποιημένου οξυγόνου, δηλαδή το υπεροξειδίο του υδρογόνου, το ανιόν υπεροξειδίου, η ρίζα OH[•] δημιουργούνται *in vivo* σε διάφορα σημεία του φυσιολογικού μεταβολισμού όπως η αναπνευστική αλυσίδα των μιτοχονδρίων και στην μικροσωματική αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων⁴⁶⁷, ενώ οι ιονίζουσες ακτινοβολίες κατέχουν κι αυτές έναν σημαντικό ρόλο στην γένεση ελευθέρων ριζών οι οποίες βλάπτουν κατ' ευθείαν το DNA των κυττάρων²⁵³⁻²⁵⁵.

Η δράση αυτών των ριζών σε διάφορα κυτταρικά συστατικά συνεισφέρει στην πρόκληση τόσο των φαινομένων γήρανσης του οργανισμού, όσο και στην εμφάνιση των νόσων που σχετίζονται με την διαδικασία του γήρατος^{253,256,255}. Οι ελεύθερες ρίζες υδροξυλίου, έχειδειχθεί ότι προκαλούν καταστροφές τόσο στις βάσεις του DNA, όσο και θραύσεις στα μόριά του. Γενικά οι οξειδωτικοί παράγοντες παρουσία μεταλλικών ιόντων προκαλούν έναρξη λιπούπεροξείδωτικών διαδικασιών μέσω των οποίων παράγονται ποικίλα μεταλλαξιγόνα, καρκινογόνα και προωθητικά της καρκινογένεσης μόρια^{256,257,258,259,260,262,263,265,265} όπως τα υδροϋπεροξειδία, το υδροϋπεροξειδίο της χοληστερίνης, τα ποικίλα ενδοϋπεροξειδία, τα εποξειδία της χοληστερίνης και των λιπαρών οξέων, διάφορες κυτταροτοξικές αλδεϋδες, αλκοξυ- και υπεροξυ- ρίζες, καθώς και οι ελεύθερες ρίζες οξυγόνου.

Ο πεπτικός σωλήνας εκτίθεται κατά τρόπο έντονο σε αρκετά από τα λιποειδικής προελεύσεως καρκινογόνα. Το έκκριμα του ανθρώπινου μαζικού αδένου μπορεί να περιέχει υψηλά επίπεδα (υψηλότερα από 780 μg) εποξειδίου της χοληστερίνης το οποίο αποτελεί ένα μεταλλαξιγόνο και



καρκινογόνο προϊόν οξειδωσης της χοληστερίνης^{259,266}, που φαίνεται να προέρχεται τόσο από την βρώση οξειδωμένων λιπών (οξειδωση λόγω παρασκευής της αντίστοιχης τροφής π.χ. τηγάνισμα ή ψήσιμο σε πυρακτωμένο μέταλλο ή κάρβουνο), όσο και από διάφορες οξειδωτικές διαδικασίες που λαμβάνουν χώρα στο εσωτερικό του σώματος και αφορούν το σωματικό λίπος.

Τα υπεροξυσώματα οξειδώνουν σημαντικές ποσότητες λιπιδίων διαιτητικής προέλευσης μέσω μίας διαδικασίας απόσπασης ενός ζεύγους γειτονικών ανθράκων από την αλυσίδα του οξειδούμενου λιπιδίου (β-οξειδωση) παράγοντας για κάθε ζεύγος ανθράκων ένα μόριο υπεροξειδίου του υδρογόνου το οποίο είναι από μόνο του μεταλλαξιογόνος, καρκινογόνος και προωθητικός παράγοντας της καρκινογένεσης²⁶⁷⁻²⁷³.

Πολύ σοβαρές ενδείξεις για την ενοχοποίηση των ελευθέρων ριζών στην παθολογία των μεταλλάξεων και του καρκίνου παρέχουν τα αποτελέσματα μελετών που έχουν γίνει στα παραπάνω πεδία.

Η Κίνα έχει μία από τις μεγαλύτερες συχνότητες εμφάνισης καρκίνου του οισοφάγου παγκοσμίως. Μια πενταετής μελέτη έδειξε ότι η χορήγηση αντιοξειδωτικών σε συγκεκριμένη ομάδα πληθυσμού ελάττωσε την θνησιμότητα από τον εν λόγω καρκίνο κατά 13% στο τέλος της πενταετίας, όπως επίσης και την τοξικότητα των χρησιμοποιούμενων φαρμάκων^{274,275}.

Χαμηλά επίπεδα ενδογενών αντιοξειδωτικών έχουν βρεθεί σε ασθενείς με καρκίνο²⁷⁶. Αυτό βέβαια δεν είναι ακόμη γνωστό αν αποτελεί αίτιο ή αποτέλεσμα. Ίσως ένας συνδυασμός και των δύο να δίνει την απάντηση στην αιτιοπαθογένεια του καρκίνου. Πάντως τα επίπεδα των ενδογενών αντιοξειδωτικών μπορούν να αποτελέσουν ένα δείκτη επικινδυνότητας για την εμφάνιση καρκίνου.

Μετρήσεις σε ζώα έχουν δείξει ότι το σελήνιο είναι προστατευτικό έναντι του καρκίνου^{277,278}, γεγονός που μπορεί να αντανάκλα την αντιστοιχία που υπάρχει με ανθρώπους που είχαν αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου και στους οποίους βρέθηκαν χαμηλά επίπεδα σεληνίου στον ορό.

Όσον αφορά το γήρας, πιστεύεται ότι προκαλείται από αντιδράσεις ελευθέρων ριζών που συμβαίνουν κυρίως στα μιτοχόνδρια και έχουν συσσωρευτικό χαρακτήρα με την πάροδο του χρόνου. Οι ελεύθερες ρίζες προκαλούν την σταδιακή οξειδωση των πρωτεϊνών και των λιπιδίων των κυτταρικών μεμβρανών ενώ συγχρόνως ενεργοποιούν φωσφολιπάσες, πρωτεάσες και ενδονουκλεάσες. Αυξημένη λιπούπεροξειδωση έχει ενοχοποιηθεί για την διαδικασία του γήρατος. Κατά συνέπεια, σ' έναν οργανισμό με την πάροδο των ετών, πραγματοποιείται μία συσσώρευση ελαττωματικών μορίων, χρωμοσωμιακών βλαβών και κυτταρικών υπολειμμάτων. Όλες αυτές οι θεωρήσεις καταλήγουν στην υπόθεση πως οι ελεύθερες μπορεί να αποτελούν μία καθοριστική αιτία για την διαδικασία του γήρατος.

7. Ελεύθερες ρίζες οξυγόνου και αιμοπετάλια

Ελεύθερες ρίζες οξυγόνου και αιμοπεταλιακές λειτουργίες

Οι ελεύθερες ρίζες οξυγόνου (EPO), οι οποίες περιλαμβάνουν το ανιόν υπεροξειδίου ($O_2^{\cdot-}$), την ρίζα υδροξυλίου (HO^{\cdot}) και άλλες μορφές ριζών όπως το οξυγονούχο ύδωρ (H_2O_2) και το οξυγόνο singlet (μονήρες οξυγόνο) (1O_2), είναι πολύ δραστικές ενώσεις οι οποίες αντιδρούν με λιπίδια, πρωτεΐνες και DNA προκαλώντας μη αντιστρεπτές αλλαγές στην μοριακή τους δομή. Υπάρχει μέχρι σήμερα ένας μεγάλος όγκος πειραματικών αποδείξεων σχετικά με τον ρόλο των EPO στην ρύθμιση των κυτταρικών λειτουργιών. Οι EPO είναι ενδιάμεσοι μεταβολίτες σε πολλές ενζυμικές αντιδράσεις,

παίζουν δε σημαντικό ρόλο στην μεταφορά ενδοκυτταρικών σημάτων. Πολλά κύτταρα, όπως τα λευκοκύτταρα, τα μονοκύτταρα και τα κύτταρα του ενδοθηλίου των αγγείων είναι ικανά να ελευθερώσουν EPO μετά από κατάλληλη διέγερση. Μέχρι πριν λίγα χρόνια δεν ήταν ακόμη γνωστό αν και τα αιμοπετάλια είναι ικανά να παράγουν EPO. Την τελευταία δεκαετία αρκετές μελέτες έχουν διερευνήσει τον ρόλο των EPO στις αιμοπεταλιακές λειτουργίες. Ιδιαίτερα στον τομέα των καρδιαγγειακών νόσων υπάρχουν πλέον αποδείξεις σχετικά με τον ρόλο EPO και αιμοπεταλίων στην αιτιοπαθογένεια και την εξέλιξη των συγκεκριμένων παθήσεων.

7.1 Παραγωγή ελευθέρων ριζών οξυγόνου από τα αιμοπετάλια

Σήμερα θεωρείται βέβαιο ότι τα αιμοπετάλια εκτός από τον μηχανισμό της πήξης συμμετέχουν και σε φλεγμονώδεις αντιδράσεις. Η συμμετοχή τους στην διαδικασία της φλεγμονής γίνεται μέσω της έκκρισης δραστικών ουσιών οι οποίες εκλύονται κατά την διέγερση των αιμοπεταλίων. Τέτοιες ουσίες όπως η σεροτονίνη, η θρομβοξάνη A_2 (TXA_2), ο αιμοπεταλιακός παράγοντας 4 (PF-4), ο παράγοντας ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων (PAF) και άλλα εικοσανοειδή επηρεάζουν τις λειτουργίες και πολλών άλλων κυττάρων (ουδετεροφίλων, λεμφοκυττάρων, μακροφάγων κ.α.) προκαλώντας την έκλυση μεσολαβητών-διαβιβαστών²⁷⁹⁻²⁸¹ και μεταβάλλουν την συσταλτικότητα και την διαβατότητα των τριχοειδών²⁸². Ακόμη, τα αιμοπετάλια διαθέτουν φαγοκυτταρικές ιδιότητες²⁸³. Μπορούν να φαγοκυτταρώνουν διάφορα σωματίδια όπως το latex, η φερριτίνη, η σιλικόνη και το thogiotrast. Αυτή η διαδικασία συνοδεύεται από αλλαγές του μεταβολισμού των αιμοπεταλίων, αν και δεν είναι πλήρως διευκρινισμένο σε ποιο ποσοστό οι μεταβολές αυτές οφείλονται στην φαγοκύτωση και στην επακολουθούσα αιμοπεταλιακή συσσώρευση²⁸⁴. Τέλος, τα αιμοπετάλια κάτω από ορισμένες συνθήκες όπως π.χ. σε ασθενείς με άσθμα που εκλύεται από την ασπρίνη, μπορεί να εμφανίζουν in vivo κυτταροτοξική δράση²⁸⁵.

Πολλές από αυτές τις δράσεις των αιμοπεταλίων προϋποθέτουν την ικανότητα παραγωγής EPO εκ μέρους των κυττάρων αυτών. Ήδη από το 1976 έχει δειχθεί ότι τα αιμοπετάλια παράγουν υψηλής δραστηριότητας ελεύθερες ρίζες $O_2^{\cdot-}$ και HO^{\cdot} , ανιχνευόμενες στο υπερκείμενο των ελαιωρημάτων τους²⁸⁴. Οι Marcus και συν. χρησιμοποιώντας τις δοκιμασίες του ferricytochrome C και του nitrobluetetrazolium, συμπέραναν ότι η παραγωγή των ελευθέρων ριζών $O_2^{\cdot-}$ είναι ένα συνεχές φαινόμενο, ανεξάρτητο από την διέγερσή τους, και δεν αυξάνεται ποσοτικά με την επίδραση αγωνιστών της αιμοπεταλιακής συσσώρευσης όπως π.χ. θρομβίνη και κολλαγόνο. Ακόμη διαπιστώθηκε ότι η παραγωγή τους είναι ανεξάρτητη από την δράση της ασπρίνης, ενδεικτικό του ότι αυτή σχετίζεται με ένα μεμβρανικό σύστημα και δεν οφείλεται στην διέγερση του δρόμου του αραχιδονικού μέσω κυκλοξυγονάσης. Ακόμη μετρήθηκαν τα επίπεδα των παραγόμενων υπεροξειδίων σε αιμοπετάλια σε ηρεμία αλλά αυτά δεν άλλαξαν μετά την πάροδο της αιμοπεταλιακής ενεργοποίησης και συσσώρευσης²⁸⁶. Εν τούτοις, in vitro μελέτες από τον Mills και συν. έδειξαν ότι κατά την αντίδραση της αιμοπεταλιακής κυκλοξυγονάσης με λινελαϊκό οξύ μπορεί να παραχθούν ελεύθερες ρίζες ικανές να προκαλέσουν χημειοφωταύγεια²⁸⁷. Μεταγενέστερα δεδομένα παρέχουν ενδείξεις ότι τα διαγειρόμενα αιμοπετάλια παράγουν ελεύθερες ρίζες ανιόντος υπεροξειδίου ($O_2^{\cdot-}$) και υδροξυλίου (HO^{\cdot}) που ανιχνεύονται με παραμαγνητικό ηλεκτρονικό συντονισμό (ESR) και μερικές φορές με την αναγωγή του κυττοχρώματος C^{288-293,462}.

Άλλες μελέτες έδειξαν ότι κατά την διάρκεια της αιμοπεταλιακής συσσώρευσης απελευθερώνονται από τα αιμοπετάλια και άλλα είδη ενεργών μορφών οξυγόνου, όπως π.χ. το H_2O_2 ^{290,293,294}. Έχει επίσης αποδειχθεί ότι ένα μέρος του H_2O_2 που παράγεται από τα αιμοπετάλια μετατρέπεται στην πολύ δραστική μορφή της ρίζας υδροξυλίου (HO^{\cdot}) - με έναν τρόπο παρόμοιο της



αντίδρασης Fenton - εφ' όσον εκκαθαριστές του HO[•] αναστέλλουν την αιμοπεταλιακή συσσώρευση που προκαλείται από ADP, κολλαγόνο, αραχιδονικό οξύ και PAF²⁹⁵⁻²⁹⁷. Νεότερα δεδομένα δείχνουν ότι η αιμοπεταλιακή συσσώρευση που προκαλείται από κολλαγόνο σχετίζεται με την παραγωγή ριζών O₂^{-•} και HO[•], η οποία εξαρτάται από την ποσότητα του αραχιδονικού οξέος που απελευθερώνεται²⁹⁸. Οι Krinsky και συν. διαπίστωσαν την παραγωγή H₂O₂ κατά την φαγοκύτωση σωματιδίων latex από αιμοπετάλια. Την απέδωσαν όμως στην "μόλυνση" των παρασκευασμάτων τους από μικρό αριθμό λευκοκυττάρων²⁸⁴.

Νεότερες μελέτες έχουν δείξει ότι λιποπολυσακχαρίτες της μεμβράνης στελεχών του Gram(-) μικροβίου *Proteus mirabilis* προκαλούν συσσώρευση των αιμοπεταλίων, αύξηση της παραγωγής ριζών υπεροξειδίου από αυτά καθώς και αύξηση της απεικρινόμενης μαλονικής διαλδεύδης, πράγμα που δεικνύει την αύξηση του ρυθμού του μεταβολισμού του αραχιδονικού οξέος και της σύνθεσης θρομβοξάνης A₂²⁹⁹.

7.2 Μηχανισμοί απελευθέρωσης EPO από τα αιμοπετάλια

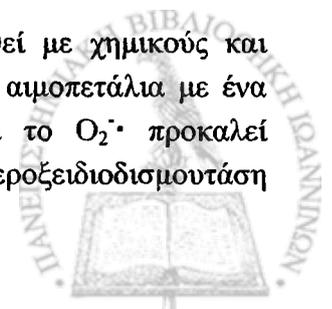
Σύμφωνα με νεότερες απόψεις, η παραγωγή ελευθέρων ριζών ανιόντος υπεροξειδίου και υδροξυλίου από τα αιμοπετάλια απαιτεί την παρουσία ελευθέρου αραχιδονικού οξέος και ακολουθεί διαφορετική διαδικασία από αυτήν της παραγωγής τους στα πολυμορφοπύρηνα. Οι ελεύθερες ρίζες στα αιμοπετάλια παράγονται κατά τον μεταβολισμό των εικοσανοειδών κυρίως μέσω του ενζύμου λιποξυγονάσης - την δραστηριότητα της οποίας διεγείρει ο PAF⁴⁷⁸ - δεδομένου ότι η ποσότητά τους δεν μειώνεται σημαντικά με αναστολείς της κυκλοξυγονάσης όπως η ασπιρίνη και η ινδομεθακίνη³⁰⁰. Όμως, υπάρχουν νεότερα δεδομένα που δεικνύουν ότι ένα μικρό ποσοστό, περίπου 10-20% των ριζών O₂^{-•} και HO[•] μπορεί να παραχθεί μέσω του ενζύμου κυκλοξυγονάση²⁸⁸.

Η παραγωγή EPO από τα αιμοπετάλια εμπλέκεται και σε άλλους μεταβολικούς δρόμους, όπως της μεμβρανικής οξειδάσης και της συνθάσης του NO. Οι Finazzi, Agró et al. απέδειξαν την ύπαρξη μιας οξειδάσης της αιμοπεταλιακής μεμβράνης η οποία παράγει υπεροξείδιο του υδρογόνου παρουσία NADH και ενεργοποιείται από παράγοντες οι οποίοι διαταράσσουν την ισορροπία της αιμοπεταλιακής μεμβράνης²⁹². Μια πρόσθετη ισχυρή πηγή O₂^{-•} και H₂O₂ θα μπορούσε να είναι η συνθάση του NO. Έχει δειχθεί ότι ο συνδυασμός της έλλειψης της L-αργινίνης και της επάρκειας NADPH προκαλεί την ενεργοποίηση της συνθάσης του NO και την παραγωγή από αυτήν O₂^{-•} και H₂O₂^{301,463}.

Πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι EPO σχηματίζονται και κατά την διάρκεια του μεταβολισμού των εικοσανοειδών στο επίπεδο της συνθάσης της PGH. Η συνθάση της PGH εμφανίζει δράσεις παρόμοιες μ' αυτές της κυκλοξυγονάσης και της υδροξυπεροξειδάσης. Με την δράση κυκλοξυγονάσης καταλύει τον σχηματισμό PGG₂ και με την δράση υπεροξειδάσης ελαττώνει την 15-υδροξυπεροξυ-ομάδα από την PGG₂ προς την PGH₂, χρησιμοποιώντας μια σειρά από δότες ηλεκτρονίων. Αυτά τα ελαττούμενα υποστρώματα οξειδώνονται κατά την διάρκεια της αντίδρασης της υπεροξειδάσης με σχηματισμό ενδιάμεσων ριζών και οδηγούν σε πιθανή έναρξη αλυσιδωτών αντιδράσεων που οφείλονται στην "έξοδο" των ριζών στο ελεύθερο διάλυμα³⁰²⁻³⁰⁵.

7.2 Ο ρόλος των EPO στις λειτουργίες των αιμοπεταλίων

Η δράση των EPO στις λειτουργίες των αιμοπεταλίων έχει διερευνηθεί με χημικούς και κυτταρικούς τρόπους παραγωγής ελευθέρων ριζών. Ο Handin et al. επώασαν αιμοπετάλια με ένα σύστημα παραγωγής O₂^{-•} (Ξανθίνη-Ξανθίνη Οξειδάση) και απέδειξαν ότι το O₂^{-•} προκαλεί αιμοπεταλιακή συσσώρευση και αύξηση της έκκρισης σεροτονίνης. Η υπεροξειδιοδισμουντάση



(SOD) ελάττωνε την αιμοπεταλιακή συσσώρευση που προκαλούσε το $O_2^{\cdot -}$ ενώ η καταλάση και η μαννιτόλη δεν την ελάττωναν, γεγονός που δείχνει ότι τουλάχιστον σ' αυτό το σύστημα, το $O_2^{\cdot -}$ ήταν το μόριο που εμπλεκόταν στην διαδικασία της αιμοπεταλιακής συσσώρευσης³⁰⁶. Αιμοπεταλιακή συσσώρευση μπορούν να προκαλέσουν επίσης και ρίζες HO^{\cdot} , 1O_2 και H_2O_2 οι οποίες παράγονται από τετραϋπεροξυχρωμικό κάλιο. Πιθανότατα η εξωγενής χορήγηση υψηλών συγκεντρώσεων EPO σε πλυμένα αιμοπετάλια να προκαλεί συσσώρευση των αιμοπεταλίων μέσω ενός μηχανισμού ενεργοποίησης της μεμβρανικής φωσφολιπάσης A_2 και καταβολισμού των φωσφολιποειδών προς αραχιδονικό οξύ και άλλα προϊόντα (φωσφατιδυλινοσιτόλη, φωσφατιδικό οξύ) που ενέχονται στους μηχανισμούς συσσώρευσης των αιμοπεταλίων³⁰⁷. Μελέτες που επικεντρώθηκαν στην διερεύνηση του ρόλου του H_2O_2 στις αιμοπεταλιακές λειτουργίες έδωσαν αντιφατικά αποτελέσματα. Συγκεκριμένα αποδείχθηκε ότι το H_2O_2 αναστέλλει αλλά και διεγείρει την αιμοπεταλιακή συσσώρευση^{16, 308-311}. Αυτό το παράδοξο μπορεί να ερμηνευθεί από το γεγονός ότι η αναστολή της συσσώρευσης συνέβαινε μόνο όταν χρησιμοποιούνταν ψηλές συγκεντρώσεις H_2O_2 . Ο Ohyashiki et al. αναφέρουν αναστολή της αιμοπεταλιακής συσσώρευσης από ADP με 2-10 mM H_2O_2 , μία συγκέντρωση που είναι κατά πολύ υψηλότερη από τις συγκεντρώσεις του H_2O_2 σε φυσιολογικές συνθήκες³¹¹. Για παράδειγμα, η απελευθέρωση από ενεργοποιημένα λευκοκύτταρα μπορεί να φτάσει τοπικά σε συγκεντρώσεις 10-12 μM . Κάτι ανάλογο συμβαίνει και με την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων μέσω του οξυγόνου singlet που παράγουν τα πολυμορφοπύρρηνα λευκοκύτταρα, τα οποία μέσω αυτού δημιουργούν μια "αντιπηκτική" ζώνη στην περιφέρεια του κυτταροπλάσματός τους. Φαίνεται λοιπόν ότι το οξυγόνο singlet σε φυσιολογικές συγκεντρώσεις αποτελεί έναν αντιπηκτικό παράγοντα³¹². Πρόσφατα έχει αποδειχθεί ότι η ενεργοποίηση αιμοπεταλίων που εκτίθενται σε H_2O_2 , τροποποιείται από ρίζες υδροξυλίου (HO^{\cdot}) οι οποίες σχηματίζονται σε μία εξωκυτταρική αντίδραση παρόμοια με την αντίδραση Fenton και μετριοούνται με ESR²⁹⁶. Αυτός ο ρόλος των ριζών HO^{\cdot} επιβεβαιώθηκε και με άλλα πειράματα και προτάθηκε ότι οι EPO δρουν ως "δευτερεύοντες διαβιβαστές" κατά την διάρκεια της αιμοπεταλιακής ενεργοποίησης. Η βιολογική σημασία αυτών των μελετών επιβεβαιώθηκε με πειράματα όπου μελετήθηκε η σχέση μεταξύ ερυθροκυττάρων και αιμοπεταλιακών λειτουργιών. Έτσι, αποδείχθηκε ότι νανομοριακά επίπεδα αιμοσφαιρίνης που ελευθερώθηκε από κατεστραμένα ερυθρά αιμοσφαίρια, μπορούν να προκαλέσουν αιμοπεταλιακή ενεργοποίηση με έναν μοριακό μηχανισμό - άγνωστο ακόμη - στον οποίον εμπλέκονται EPO που προέρχονται από την αιμοσφαιρίνη³¹³. Πιθανόν, στον μηχανισμό της αιμοπεταλιακής ενεργοποίησης με EPO να εμπλέκεται η φωσφολιπάση A_2 (PLA_2), αφού αναστολείς της PLA_2 αναστέλλουν την αιμοπεταλιακή συσσώρευση από EPO^{296,314}. Σχετική μ' αυτήν την πρόταση είναι και η ευαισθησία της PLA_2 σε λιπούπεροξειδία που σχηματίστηκαν στην μεμβράνη από Fe^{++} /τετραβουτυλυδροϋπεροξειδίο³¹⁵ ή κατά την διάρκεια της LDL οξείδωσης³¹⁸.

Ο σίδηρος (Fe^{++}) μπορεί να αντιδράσει άμεσα με τα αιμοπετάλια. Η δράση του αυτή ελέγχεται από την παραγωγή HO^{\cdot} και εμπεριέχει την δραστηριοποίηση της πρωτεϊνικής κινάσης (PTK)³¹⁷. Ενδείξεις υπάρχουν ακόμη ότι παραγωγή ελευθέρων ριζών $O_2^{\cdot -}$ μπορεί να σχετίζεται με τον ενδοκυττάριο κύκλο της γλουταθειόνης^{318,319}.

Σοβαρές ενδείξεις υπάρχουν ακόμη ότι η εξωγενής χορήγηση ουσιών στα εναιωρήματα αιμοπεταλίων όπως η ξανθίνη-ξανθινοξειδάση που προκαλεί την παραγωγή ελευθέρων ριζών $O_2^{\cdot -}$ και το τετραϋπεροξυχρωμικό κάλιο που παράγει ρίζες υδροξυλίου (HO^{\cdot}), οξυγόνου singlet και υπεροξειδίου του υδρογόνου (H_2O_2), μπορεί να προκαλέσουν in vitro συσσώρευση των αιμοπεταλίων. Πιθανότατα η εξωγενής χορήγηση υψηλών συγκεντρώσεων ελευθέρων ριζών οξυγόνου σε πλυμένα



αιμοπετάλια να προκαλεί συσσώρευση των αιμοπεταλίων μέσω ενός μηχανισμού ενεργοποίησης της μεμβρανικής φωσφολιπάσης- A_2 και καταβολισμού των φωσφολιποειδών προς αραχιδονικό οξύ αλλά και άλλα προϊόντα (φωσφατιδυλινοσιτόλη – φωσφατιδικό οξύ), που ενέχονται στους μηχανισμούς συσσώρευσης των αιμοπεταλίων³²⁰.

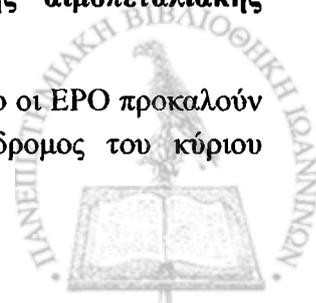
Ακόμη, το H_2O_2 σε ελάχιστες συγκεντρώσεις ενισχύει την συσσώρευση των αιμοπεταλίων που προκαλείται από άλλους αγωνιστές, ενώ τέτοιου είδους συσσώρευση αναστέλλεται από την προσθήκη καταλάσης και ενισχύεται από την αμινοτετραζόλη, έναν αναστολέα της ενδοκυττάριας καταλάσης, ευρήματα ενδεικτικά της ενδοκυττάριας παραγωγής H_2O_2 κατά την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων³²¹. Ενίσχυση της πρόσφυσης και συσσώρευσης των αιμοπεταλίων προκαλείται *in vitro* με την προσθήκη πυρογαλόλης που προκαλεί την παραγωγή ριζών $O_2^{\cdot-}$, ενώ οι ίδιες ρίζες μειώνουν τα ελάχιστα επίπεδα πρόκλησης συσσώρευσης από την θρομβίνη^{290,322}. Νεότερες μελέτες έδειξαν ότι αιμοπετάλια που είχαν υποστεί ανοξία και στη συνέχεια οξυγονώθηκαν, παρήγαγαν ρίζες $O_2^{\cdot-}$ και HO^{\cdot} οι οποίες ενεργοποίησαν τον μεταβολισμό του αραχιδονικού οξέος μέσω της φωσφολιπάσης A_2 και C ³²³.

Συμπερασματικά, μπορούμε να πούμε ότι τα αιμοπετάλια διαθέτουν μηχανισμούς παραγωγής ελευθέρων ριζών $O_2^{\cdot-}$, H_2O_2 και OH^{\cdot} τουλάχιστον, μέσω κυρίως του μεταβολισμού του αραχιδονικού από την λιποξυγονάση και την κυκλοξυγονάση. Οι ρίζες αυτές φαίνεται ότι χρησιμεύουν για την βακτηριοκτόνο και παρασιτοκτόνο δράση των αιμοπεταλίων ενώ συμμετέχουν και στους μηχανισμούς συσσώρευσης των κυττάρων όπως φαίνεται από την αναστολή της με αντιοξειδωτικά ή εκκαθαριστές ελευθέρων ριζών. Ακόμη, οι ελεύθερες ρίζες μπορεί δρώντας εξωγενώς να προκαλέσουν ή να ενισχύσουν την συσσώρευση των αιμοπεταλίων που προκαλείται από διάφορους αγωνιστές³²⁴.

Τά ανωτέρω δεδομένα δείχνουν ότι τα αιμοπετάλια ενεργοποιούνται κατά την έκθεσή τους σε συστήματα που παράγουν EPO, συμπεριλαμβανομένων των πολυμορφοπύρηνων λευκοκυττάρων και των ερυθρών αιμοσφαιρίων⁴⁵⁴. Στα βιολογικά συστήματα τα αιμοπετάλια βρίσκονται σε στενή σχέση με τα λευκοκύτταρα και τα ερυθροκύτταρα και μάλιστα σε παθολογικές καταστάσεις που συνδέονται με αγγειακές βλάβες όπως το έμφραγμα του μυοκαρδίου και η ασταθής στηθάγχη³²⁵. Ένα ακόμη σημαντικό στοιχείο είναι ότι σε καταστάσεις καρδιακής ισχαιμίας έχει βρεθεί να συνυπάρχει αυξημένη δραστηριότητα της αιμοπεταλιακής ξανθίνης οξειδάσης και αύξηση των επιπέδων της μαλονικής δεαλδεύδης (MDA) με ελάττωση της δράσης ενζύμων “εκκαθαριστών” ελευθέρων ριζών (υπεροξειδιοδισμουτάση, καταλάση, γλουταθειώνη υπεροξειδάση, γλουταθειώνη ρεντουκτάση)³²⁶. Εκτός όμως από τις παθήσεις του κυκλοφορικού συστήματος, η αυξημένη συγκολλητικότητα των αιμοπεταλίων φαίνεται να συνδέεται και με τον σακχαρώδη διαβήτη. Εκεί έχει αποδειχθεί ότι η υπεργλυκαιμία προκαλεί αύξηση της παραγωγής υπεροξειδίου από τα μιτοχόνδρια των αιμοπεταλίων που οδηγεί σε αυξημένη αιμοπεταλιακή δραστηριότητα *in vitro*. Στο γεγονός αυτό ίσως οφείλονται και οι μικρο- και μακροαγγειοπάθειες που συναντώνται σε διαβητικούς ασθενείς³²⁷. Επίσης, έχει αποδειχθεί ότι τα αιμοπετάλια ασθενών με σακχαρώδη διαβήτη παρουσιάζουν αυξημένη διεγερσιμότητα στην δράση του PAF, με αποτέλεσμα την δημιουργία μικροθρόμβων³²⁸. Η παρουσία EPO στο περιβάλλον μέσο αποτελεί επομένως έναν σημαντικό διεγέρτη για την αιμοπεταλιακή συσσώρευση και μπορεί να συμβάλει στην θρομβογένεση.

7.3 Αλληλεπιδράσεις μεταξύ EPO και δρόμων σηματοδότησης της αιμοπεταλιακής ενεργοποίησης

Αρκετοί δρόμοι μπορούν να συμπεριληφθούν στον μηχανισμό με τον οποίο οι EPO προκαλούν αιμοπεταλιακή ενεργοποίηση. Το ελεύθερο αραχιδονικό οξύ είναι ο πρόδρομος του κύριου



αιμοπεταλιακού ενεργοποιητή, της θρομβοξάνης A_2 . Η διαθεσιμότητα του αραχιδονικού οξέος ρυθμίζεται από δύο μηχανισμούς: i) Την απελευθέρωσή του από φωσφολιπίδια, μέσω δράσης φωσφολιπασών και ii) Τον επανασχηματισμό φωσφολιπιδίων από το ένζυμο αραχιδονυλ-CoA συνθετάση. Ο Hornberger et al. αναφέρουν ότι η δράση του ενζύμου αυτού αναστέλλεται από H_2O_2 με συνεπακόλουθη αύξηση του ελεύθερου αραχιδονικού το οποίο μετατρέπεται σε θρομβοξάνη A_2 ³²⁹. Επίσης, πολλοί ακόμη ερευνητές αναφέρουν ότι οι EPO ενεργοποιούν την φωσφολιπάση A_2 με διέγερση αρκετών δρόμων "σηματοδότησης"^{296,314,315,325}. Η φωσφολιπάση A_2 ενεργοποιείται επίσης από την κινητοποίηση του Ca^{++} αλλά μέχρι τώρα δεν υπάρχει σαφής απόδειξη ότι οι EPO διεγείρουν την είσοδο του Ca^{++} . Ο Mirabelli et al. έδειξαν μια αύξηση της συγκέντρωσης του κυτταροπλασματικού Ca^{++} μετά από έκθεση των αιμοπεταλίων σε οξειδωτικό στρές³³⁰ ενώ άλλοι ερευνητές δεν παρατήρησαν ανάλογα αποτελέσματα²⁹⁶.

Η διέγερση της φωσφολιπάσης A_2 μπορεί επίσης να συμβεί έμμεσα, μέσω της ενεργοποίησης με EPO του συστήματος της πρωτεϊνικής τυροσίνη-κινάσης (PTK). Η φωσφορυλίωση της PTK φαίνεται να παίζει σημαντικό ρόλο στην επαγωγή των κυτταρικών λειτουργιών από εξωκυττάρια διέγερση σε πολλούς τύπους κυττάρων³³¹. Στα αιμοπετάλια, PTK αναστολείς, όπως οι τυρφοστίνες, η γενιστεΐνη και η ερμπαστατίνη έχει βρεθεί ότι αναστέλλουν πολλές αιμοπεταλιακές λειτουργίες συμπεριλαμβανομένου και της ενεργοποίησης του υποδοχέα IIb/IIIa και της αιμοπεταλιακής συσσώρευσης³³². Αρκετές πρόσφατες μελέτες δηλώνουν τον ρόλο των EPO στην ρύθμιση της δραστηριότητας της PTK. Έχει αποδειχθεί ότι το H_2O_2 αναστέλλει τις φωσφατάσες της τυροσίνης οδηγώντας σε ενεργοποίηση της PTK³³³.

Η ακτινοβολία UVB παράγει ελεύθερες ρίζες και αυξάνει την βιοσύνθεση των προσταγλανδινών μέσω ενός δρόμου που οδηγεί σε ενεργοποίηση της φωσφολιπάσης A_2 ^{325,334}. Η φωσφολιπάση A_2 φαίνεται ότι αυξάνει την δραστηριότητά της μετά από φωσφορυλίωση που προκαλείται από την ενεργοποιημένη μιτοχονδριακή πρωτεϊνική κινάση (MAP)^{335,336}. Η MAP φωσφορυλιώνεται και ενεργοποιείται από έναν PTK-εξαρτώμενο δρόμο³³⁷. Περιληπτικά μπορούμε να πούμε ότι το οξειδωτικό στρες ενεργοποιεί τις PTK που σχετίζονται με την κυτταρική μεμβράνη. Αυτό προκαλεί φωσφορυλίωση της τυροσίνης η οποία στην συνέχεια φωσφορυλιώνει την MAP κινάση. Η κινάση αυτή στην συνέχεια φωσφορυλιώνει και ενεργοποιεί την κυτταροπλασματική PLA_2 η οποία παράγει υπόστρωμα (αραχιδονικό οξύ) για το ένζυμο ενδοπεροξυ-συνθάση των προσταγλανδινών. Ο Chao et al έδειξαν ότι η φωσφορυλίωση της PTK μπορεί να ρυθμιστεί και από μια NADPH-εξαρτώμενη διαδικασία, όπως η παραγωγή EPO³³⁸. Στην πραγματικότητα η φωσφορυλίωση της PTK είναι ευαίσθητη σε εξωγενείς αλλά και σε ενδογενείς οξειδωτικούς παράγοντες και αντιοξειδωτικά³³⁹. Πρόσφατα ερευνητικά δεδομένα δεικνύουν ότι και η πρωτεϊνική κινάση D (PKD, παρόμοια της PKC) ενεργοποιείται στα αιμοπετάλια από την PTK⁴⁷⁷.

Οι EPO επάγουν επίσης τον μεταβολισμό του αραχιδονικού οξέος δράοντας σε διάφορα επίπεδα, όπως π.χ. αυξάνοντας την δραστηριότητα του ενζύμου κυκλοξυγονάση. Έχει δειχθεί ότι το H_2O_2 και άλλα υδροϋπεροξειδία διεγείρουν το ένζυμο αυτό και έτσι προκαλούν αύξηση της παραγωγής θρομβοξάνης A_2 ³⁴⁰. Η ασπιρίνη αναστέλλει την συσσώρευση αιμοπεταλίων τα οποία διεγέρθηκαν με H_2O_2 ³⁴¹. Αλλά οι EPO μπορούν να ενεργοποιήσουν τα αιμοπετάλια και σε ένα επίπεδο ανεξάρτητο από τον δρόμο των εικοσανοειδών, όπως έχει αποδειχθεί σε πειράματα όπου αντιοξειδωτικά ανέστειλαν την αιμοπεταλιακή συσσώρευση που εξαρτιόταν από την κυκλοξυγονάση. Έτσι, η βιταμίνη E και το σαλικυλικό, που είναι εκκαθαριστές $HO\cdot$ και η διτυριδαμόλη, η οποία είναι εκκαθαριστής $O_2\cdot^-$ και $HO\cdot$ ³⁴¹⁻³⁴⁴, μείωσαν την συσσώρευση ασπινισμένων αιμοπεταλίων τα οποία διεγέρθηκαν με μεγάλες συγκεντρώσεις αγωνιστών³⁴⁵⁻³⁴⁷. Οι EPO ίσως επηρεάζουν τις



λειτουργίες των αιμοπεταλίων αντιδρώντας με NO^\bullet , μία αγγειοδιασταλτική ουσία που ελευθερώνεται από το ενδοθήλιο των αγγείων ως αντίδραση στην διέγερση από διάφορους ενδογενείς παράγοντες^{435,436,438-440,443,444,450,452,453,459,468,470-472,474}. Το NO^\bullet παράγεται επίσης από αιμοπετάλια στα οποία αναστέλλει την συσσώρευση αυξάνοντας το c-GMP ^{348-351,448,458,460}. Η βιολογική δραστηριότητα του NO^\bullet ελαττώνεται παρουσία $\text{O}_2^{\bullet-}$, το οποίο αντιδρά με το NO^\bullet σε υδατικό διάλυμα ($k=3,7 \times 10^7 \text{M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$) για να σχηματίσει το ανιόν περοξονιτρίτη (OONO^\bullet), το οποίο μετατρέπεται σε HO^\bullet σε ουδέτερο pH ^{352,353}. Το NO^\bullet πιθανόν να είναι ένας ισχυρός αναστολέας της λιποξυγονάσης και της κυκλοξυγονάσης στα αιμοπετάλια. Το H_2O_2 φαίνεται να παίζει τον ρόλο ενός σημαντικού ρυθμιστή της δράσης του NO^\bullet ³⁵⁴. Η α -τοκοφερόλη διεγείρει την παραγωγή του NO^\bullet *in vitro* και *in vivo* πιθανώς μέσω αντιοξειδωτικών μηχανισμών στους οποίους φαίνεται να εμπλέκεται η πρωτεΐνη κινάση C^{355} .

Τα δεδομένα αυτά δεικνύουν ότι οι EPO συμπεριφέρονται ως διεγέρτες της αιμοπεταλιακής συσσώρευσης, δρώντας σε διαφορετικά επίπεδα “σηματοδότησης” όπως αναστέλλοντας το NO^\bullet , διεγείροντας την οδό του μεταβολισμού του αραχιδονικού οξέος, προκαλώντας την είσοδο Ca^{++} και δραστηριοποιώντας την PTK.

7.4 Αιμοπεταλιακές λειτουργίες και αντιοξειδωτικά

Ο ρόλος των EPO στους μηχανισμούς της αιμοπεταλιακής ενεργοποίησης έχει μελετηθεί έμμεσα, χρησιμοποιώντας αντιοξειδωτικά και εξετάζοντας τον ρόλο τους στην ρύθμιση των αιμοπεταλιακών λειτουργιών. Πειράματα σε ζώα έχουν δείξει ότι η έλλειψη βιταμίνης E σχετίζεται με την αύξηση της αιμοπεταλιακής συσσώρευσης και αύξηση της σύνθεσης μεταβολιτών του αραχιδονικού οξέος (θρομβοξάνης και 12-υδροξυεικοσιτετρανοϊκού οξέος)³⁵⁶⁻³⁵⁸. Ακόμη, σε πειράματα με ποντίκια η τροφή των οποίων δεν περιείχε βιταμίνη E, φάνηκε αυξημένη δραστηριότητα της φωσφολιπάσης A_2 ³⁵⁹. Έχει επίσης αποδειχθεί ότι η βιταμίνη E προκαλεί αξιοσημείωτη ελάττωση της αιμοπεταλιακής συσσώρευσης^{345,449}. Ακόμη έχει αναφερθεί αναστολή της αιμοπεταλιακής συσσώρευσης από ασκορβικό οξύ³⁶⁰ και από συνθετικά αντιοξειδωτικά όπως η βουτυλική υδροξυανισόλη³⁶¹ και το βουτυλικό υδροξυτολουένιο³⁶². Η βιταμίνη C όταν χορηγείται από το στόμα σε ποσότητα 2 gr, ελαττώνει τον βαθμό σκλήρυνσης των αγγείων σε υγιείς εθελοντές. Παράλληλα αναστέλλει *in vitro* την αιμοπεταλιακή συσσώρευση που προκαλείται από ADP⁴³⁴. Αν τα αποτελέσματα αυτά επιβεβαιωθούν και σε ασθενείς με αθηροσκλήρωση, τότε ίσως η βιταμίνη C αποδειχθεί ένα καλό φάρμακο για τις αγγειακές παθήσεις³⁶³. Η βιταμίνη C σε μεγάλες συγκεντρώσεις (3mM) βρέθηκε να έχει προστατευτικό ρόλο εναντίον του οξειδωτικού stress που προκλήθηκε σε αιμοπετάλια από σισπλαστίνη (συγκέντρωση: 20 μM). Ελάττωσε την λιπούπεροξειδωση και την παραγωγή ελευθέρων ριζών οξυγόνου⁴⁶¹, που προκλήθηκαν από την σισπλαστίνη³⁶⁴. Ακόμη, η βιταμίνη C βρέθηκε να αναστέλλει την αιμοπεταλιακή συσσώρευση που προκαλείται από επινεφρίνη³⁶⁵.

Τα τελευταία χρόνια δοκιμάζεται η δράση ενός πλήθους ουσιών με ιδιότητες “εκκαθαριστών” ελευθέρων ριζών πάνω στην αιμοπεταλιακή δραστηριότητα. Η ρεσβερατρόλη, η γενιστεΐνη και άλλες πολυφαινόλες, φλαβονοειδή και ξανθόνες⁴⁷³, ουσίες που βρίσκονται σε πολλά φυτά, έχουν εμφανίσει προστατευτικές ιδιότητες στην στεφανιαία νόσο, όπως επίσης και αντιφλεγμονώδεις και αντικαρκινικές δράσεις^{366,437,441,447}. Όσον αφορά την δράση τους στα αιμοπετάλια, αναστέλλουν την συσσώρευσή τους από επινεφρίνη⁴⁶⁴ και θρομβίνη, δρώντας ως “εκκαθαριστές” ριζών $\text{O}_2^{\bullet-}$, H_2O_2 και οξυγόνου *singlet*^{366,437,441,451,461}. Δύο άλλες ουσίες, η νικαραβένη και η κινετίνη, με ιδιότητες “εκκαθαριστών” ελευθέρων ριζών HO^\bullet , αναστέλλουν την αιμοπεταλιακή συσσώρευση που προκλήθηκε από ADP και κολλαγόνο σε υγιείς εθελοντές και ασθενείς με εγκεφαλική θρόμβωση (η

νικαραβένη)^{367,442}. Η αμιφοστίνη, ένας άλλος “εκκαθαριστής” ελευθέρων ριζών οξυγόνου με ραδιο- και χημειοπροστατευτικές ιδιότητες, αναστέλλει την αιμοπεταλιακή συσσώρευση που προκαλείται από ADP, κολλαγόνο και PAF³⁶⁸. Το εκχύλισμα από το φυτό Gingo Biloba (GBLE), παρουσιάζει επίσης αντιοξειδωτικές ιδιότητες ως “εκκαθαριστής” ελευθέρων ριζών οξυγόνου. Παράλληλα, προκαλεί αναστολή των δράσεων του PAF (Platelet Activating Factor) και βελτίωση της μικροκυκλοφορίας με σύγχρονη ελάττωση των προϊόντων της λιπούπεροξειδωσις³⁶⁹. Η καρνιτίνη επίσης βρέθηκε ότι αναστέλλει την αιμοπεταλιακή συσσώρευση που προκλήθηκε από κολλαγόνο, όπως και την παραγωγή ριζών O_2^- ⁴⁵⁵. Συστατικά του φυστικιού agesa έχει δείχθει ότι εμφανίζουν αντιαιμοπεταλιακές δράσεις⁴⁶⁶.

Θέματα υπό διερεύνηση αποτελούν ακόμη οι μηχανισμοί με τους οποίους τα αντιοξειδωτικά επηρεάζουν τις αιμοπεταλιακές λειτουργίες καθώς και οι συγκεντρώσεις στο πλάσμα των ουσιών αυτών, οι οποίες είναι απαραίτητες για να εμφανιστεί η δράση τους στα αιμοπετάλια. Είναι επίσης ενδιαφέρον να σημειωθεί εδώ ότι το γνωστό φάρμακο διπυριδαμόλη, το οποίο χρησιμοποιείται στην στεφανιαία νόσο για τις αντιαιμοπεταλιακές και αγγειοδιασταλτικές του ιδιότητες, βρέθηκε να έχει αντιοξειδωτικές ιδιότητες και συγκεκριμένα ιδιότητες “εκκαθαριστή” ριζών O_2^- και $HO\cdot$ ^{342-344,446}. Φαίνεται λοιπόν ότι η διπυριδαμόλη ασκεί την αντιαιμοπεταλιακή της δράση κυρίως μέσω ενός αντιοξειδωτικού μηχανισμού, δεδομένου ότι οι EPO διεγείρουν την αιμοπεταλιακή δραστηριότητα.

Σκευάσματα που αποτελούνται από συνδυασμό ασπιρίνης-διπυριδαμόλης, εμφανίζουν επίσης σημαντικές αντιαιμοπεταλιακές δράσεις⁴⁷⁶.

Ένα άλλο φάρμακο, η τριμεταζιδίνη (ομάδα πιπεραζίνης) χρησιμοποιείται ως αντιστηθαγικό στην αντιμετώπιση της ισχαιμίας του μυοκαρδίου³⁷⁰. Η ουσία αυτή σε πειράματα *in vitro* αναστέλλει δοσοεξαρτώμενα την αιμοπεταλιακή συσσώρευση που προκαλείται από θρομβίνη, κολλαγόνο, ADP, αραχιδονικό οξύ, A_{23187} και U_{46619} ³⁷¹. Παράλληλα βρέθηκε ότι ελαττώνει την είσοδο Ca^{++} στα αιμοπετάλια, σε βαθμό ανάλογο του βαθμού της αναστολής της αιμοπεταλιακής συσσώρευσης³⁷². Ο Kiyosue et al. επίσης πρότειναν ότι η τριμεταζιδίνη δρά ως ένας μη ειδικός αναστολέας Ca^{++} . Αυτός όμως δεν είναι ο μόνος τρόπος δράσης της, δεδομένου ότι αναστέλλει την αιμοπεταλιακή συσσώρευση που προκαλείται από ADP, χωρίς να επηρεάζει τα αιμοπεταλιακά επίπεδα του Ca^{++} . Ακόμη, η τριμεταζιδίνη αυξάνει το pH του αιμοπεταλιακού πρωτοπλάσματος και “προστατεύει” την κυτταρική ομοιοσταση από την έκθεση σε EPO δρώντας ως “εκκαθαριστής”. Έτσι εξασφαλίζει την ακεραιότητα της λειτουργίας των αντλιών ιόντων και την διαμεμβρανική ροή νατρίου-καλίου και αποτρέπει την κατακόρυφη πτώση των ενδοκυτταρικών συγκεντρώσεων του ATP. Έχει αποδειχθεί επίσης η δυνατότητα της TMZ να εκκαθαρίζει και ελεύθερες ρίζες $HO\cdot$ καθώς και αλκυλοπεροξυλικές ρίζες³⁷³. Στις μελέτες αυτές έχει προταθεί σαν πιθανός μηχανισμός εκκαθάρισης των ριζών O_2^- η αντίδρασή τους με μερικές λειτουργικές ομάδες του μορίου της TMZ και κυρίως με τις μεθοξυλικές ομάδες του αζώτου του μορίου της, με αποτέλεσμα τον σχηματισμό σταθερών ριζών ή άλλων προϊόντων. Για τις ρίζες $HO\cdot$ φαίνεται ότι παρόμοιες αντιδράσεις λαμβάνουν χώρα στην βενζυλική ομάδα του μορίου της TMZ με αποτέλεσμα τον σχηματισμό υδροξυλικών προϊόντων. Η εκκαθαριστική δράση της τριμεταζιδίνης στις EPO φαίνεται ότι ασκείται σε συγκεντρώσεις της τάξης των $10^{-4}M$ ως $10^{-3}M$ ³⁷⁴.

Τα ανωτέρω δεδομένα αποδεικνύουν ότι οι EPO παίζουν ένα σημαντικό ρόλο στην αιμοπεταλιακή συσσώρευση *in vitro* και *in vivo* και μάλιστα αποτελούν ισχυρούς διεγέρτες της. Η χορήγηση αντιοξειδωτικών ουσιών, οι οποίες δρουν ως “εκκαθαριστές” των EPO αναστέλλει την αιμοπεταλιακή συσσώρευση. Επομένως, τέτοιες ουσίες θα μπορούσαν να χορηγηθούν θεραπευτικά



και προληπτικά σε θρομβοαγγειακές παθήσεις, αντιπροσωπεύοντας μία νέα και μάλιστα αποτελεσματική προσέγγιση στις νόσους του καρδιαγγειακού συστήματος.

Η σχέση ανάμεσα στις EPO και τις αιμοπεταλιακές λειτουργίες όπως επίσης και η δυνατότητα της ρύθμισής της από αντιοξειδωτικές ουσίες, θα πρέπει να ληφθεί υπ' όψιν ως ένα σημαντικό υπόβαθρο για την περαιτέρω διερεύνηση του ρόλου των EPO σε κλινικές οντότητες στην εξέλιξη των οποίων η αιμοπεταλιακή υπερδιέγερση παίζει σημαντικό ρόλο. Ειδικότερα, η μελέτη της αλληλεπίδρασης μεταξύ EPO και αιμοπεταλίων αποδεικνύεται πολύ χρήσιμη στην κατανόηση της αθηροσκληρωτικής αιτιοπαθογένειας, όπου υπάρχει μια ανισορροπία ανάμεσα στις οξειδωτικές αντιδράσεις και στις αντιοξειδωτικές άμυνες, με αποτέλεσμα την επίταση της οξειδωτικής διαδικασίας. Ακόμη, υπάρχουν αποδείξεις πως η χρήση αντιοξειδωτικών ουσιών επιβραδύνει την πορεία της αθηροσκλήρωσης και βελτιώνει την λειτουργικότητα του αγγειακού ενδοθηλίου. Περαιτέρω έρευνα είναι απαραίτητη για να διερευνηθεί αν οι αντιοξειδωτικές αυτές ουσίες δρουν απευθείας στο αγγειακό ενδοθήλιο ή αν στην όλη διαδικασία εμπλέκονται - και μάλιστα με ποιόν τρόπο - λειτουργικές αλλαγές των αιμοπεταλίων και των άλλων κυττάρων του αίματος, έτσι ώστε να καταστεί πληρέστερη και αποτελεσματικότερη η θεραπευτική προσέγγιση των παθήσεων του κυκλοφορικού συστήματος.



Γ. ΚΑΤΕΧΟΛΑΜΙΝΕΣ

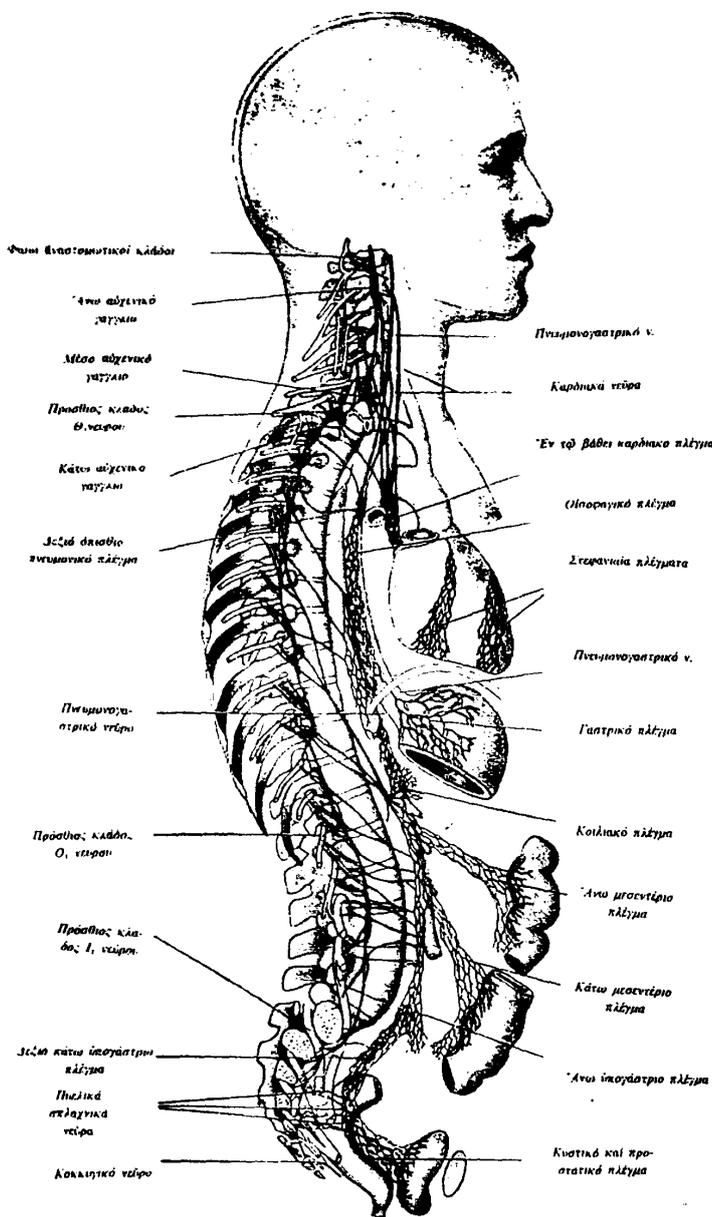
1. Κατεχολαμίνες και Αυτόνομο Νευρικό Σύστημα

1.1 Το Αυτόνομο Νευρικό Σύστημα

Το τμήμα του νευρικού συστήματος το οποίο ρυθμίζει τις σπλαχνικές λειτουργίες του σώματος ονομάζεται Αυτόνομο Νευρικό Σύστημα (ΑΝΣ), ή διαφορετικά Φυτικό Νευρικό Σύστημα (Εικόνα 10). Το ΑΝΣ ενεργοποιείται κυρίως από κέντρα που εντοπίζονται στο νωτιαίο μυελό, το εγκεφαλικό στέλεχος και τον υποθάλαμο. Επίσης, τμήματα του εγκεφαλικού φλοιού και ιδιαίτερα του μεταιχμιακού φλοιού, είναι δυνατόν να μεταδίδουν νευρικές ώσεις προς τα κατώτερα κέντρα και με αυτόν τον τρόπο να επηρεάζουν τον έλεγχο που ασκείται από το ΑΝΣ. Συχνά επίσης το ΑΝΣ λειτουργεί και με τα σπλαχνικά αντανακλαστικά.

Τα φυγόκεντρα νευρικά σήματα από το αυτόνομο νευρικό σύστημα μεταδίδονται προς το σώμα με δύο μείζονες κλάδους του, που ονομάζονται αντίστοιχα συμπαθητικό και παρασυμπαθητικό νευρικό σύστημα (Σχήματα 16,17).

Τα συμπαθητικά και τα παρασυμπαθητικά νεύρα διαφέρουν από τα κινητικά νεύρα των σκελετικών μυών στο γεγονός ότι κάθε συμπαθητική ή παρασυμπαθητική νευρική οδός, από τον νωτιαίο μυελό προς τον νευρούμενο ιστό, αποτελείται από μία προγαγγλιακή και μία μεταγαγγλιακή νευράδα, ενώ η κινητική νευρική οδός για τους σκελετικούς μύες αποτελείται από μια μόνο νευράδα. Ωστόσο, μεταξύ των συμπαθητικών και



Εικόνα 10. Το φυτικό νευρικό σύστημα

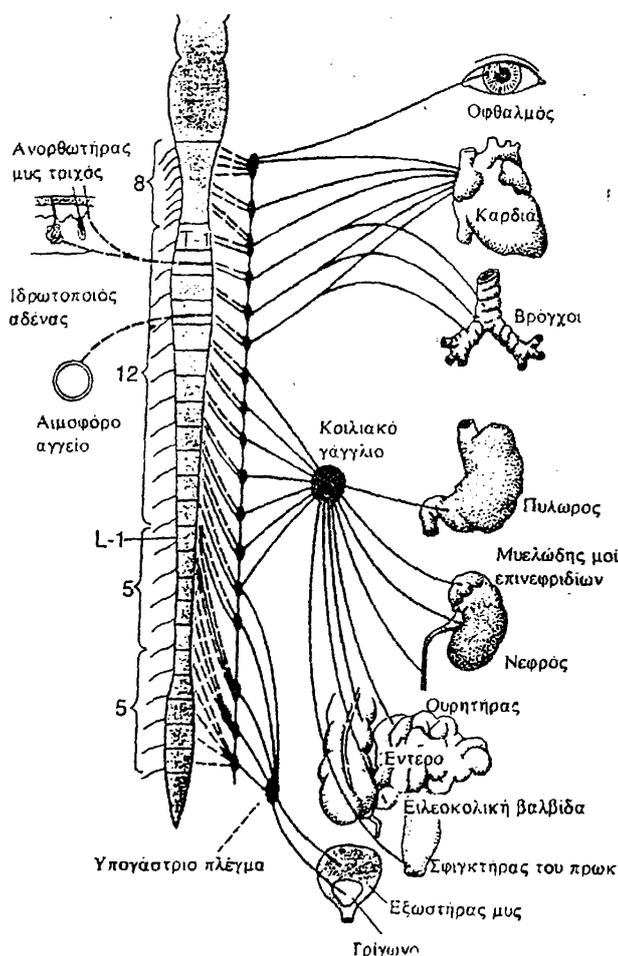
των παρασυμπαθητικών νεύρων υπάρχουν κάποιες χαρακτηριστικές ανατομικές διαφορές, ως προς το μήκος των προγαγγλιακών και των μεταγαγγλιακών τους νευρώνων. Στο συμπαθητικό σύστημα οι προγαγγλιακές ίνες εισέρχονται στα αντίστοιχα συμπαθητικά γάγγλια τα οποία βρίσκονται δεξιά και αριστερά κατά μήκος της σπονδυλικής στήλης και από αυτά ξεκινούν οι μεταγαγγλιακές



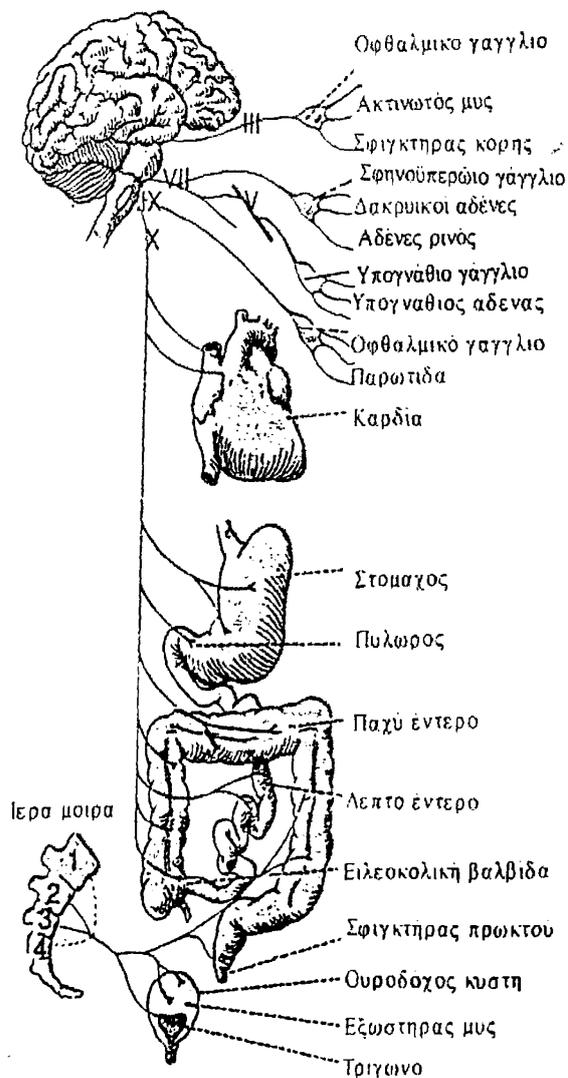
συμπαθητικές ίνες, που κατευθύνονται προς το νευρούμενο όργανο. Στο παρασυμπαθητικό σύστημα οι προγαγγλιακές ίνες φέρονται χωρίς διακοπή προς το νευρούμενο όργανο και στη συνέχεια, μέσα στο τοίχωμά του βρίσκουν τα παρασυμπαθητικά γάγγλια απ' όπου εκφύονται βραχείες μεταγαγγλιακές ίνες μήκους ενός ή και λίγων εκατοστών οι οποίες κατανέμονται στο νευρούμενο όργανο.

Όλες οι συμπαθητικές και οι παρασυμπαθητικές νευρικές ίνες εκκρίνουν μία από τις δύο νευροδιαβιβαστικές ουσίες, την ακετυλοχολίνη είτε την νοραδρεναλίνη. Αυτές που εκκρίνουν ακετυλοχολίνη χαρακτηρίζονται ως χολινεργικές, ενώ εκείνες που εκκρίνουν νοραδρεναλίνη ονομάζονται αδρενεργικές.

Όλες οι προγαγγλιακές νευράδες, τόσο του συμπαθητικού όσο και του παρασυμπαθητικού νευρικού συστήματος είναι χολινεργικές. Γι' αυτό τον λόγο, η ακετυλοχολίνη, είτε ουσίες που μοιάζουν με την ακετυλοχολίνη, όταν επιδρούν πάνω στα γάγγλια, προκαλούν διέγερση τόσο των συμπαθητικών όσο και των παρασυμπαθητικών μεταγαγγλιακών νευράδων.



Σχήμα 16. Το συμπαθητικό νευρικό σύστημα. Με τις διακεκομμένες γραμμές παριστάνονται οι μεταγαγγλιακές ίνες μέσα στους φαιούς αναστοματικούς κλάδους, που φέρονται προς τα νωτιαία νεύρα για κατανομή στα αιμοφόρα αγγεία τους



Σχήμα 17. Το παρασυμπαθητικό νευρικό σύστημα



Οι μεταγαγγλιακές νευράδες του παρασυμπαθητικού νευρικού συστήματος είναι επίσης χολινεργικές. Εξ' άλλου, οι περισσότερες από τις μεταγαγγλιακές νευράδες του συμπαθητικού είναι αδρενεργικές, άλλες όμως μεταγαγγλιακές συμπαθητικές ίνες, όπως αυτές που νευρώνουν τους ιδρωτοποιούς αδένες, τους ανορθωτήρες μύες των τριχών, καθώς και λίγα αιμοφόρα αγγεία, είναι χολινεργικές. Κάθε προγαγγλιακός νευρώνας συνδέεται κατά μέσο όρο με 8 ή 9 μεταγαγγλιακούς νευρώνες με αποτέλεσμα την διάχυση του νευρικού ερεθίσματος.

Έτσι, όλες οι τελικές νευρικές απολήξεις του παρασυμπαθητικού νευρικού συστήματος εκκρίνουν ακετυλοχολίνη και οι περισσότερες από τις συμπαθητικές νευρικές απολήξεις εκκρίνουν νορεπινεφρίνη (νοραδρεναλίνη), ενώ υπάρχουν και άλλες ουσίες όπως η ντοπαμίνη, το αγγειοδραστικό εντερικό πεπτίδιο (vasoactive intestinal peptide, VIP), η τριφωσφορική αδενοσίνη (ATP), η εκκριτική ορμόνη των γοναδοτροπινών (GnRH) και το νευροπεπτίδιο Υ οι οποίες εκκρίνονται σε πολύ μικρότερα ποσά. Οι ορμόνες αυτές με τη σειρά τους επιδρούν πάνω στα διάφορα όργανα για να εξασκήσουν τις αντίστοιχες επιδράσεις του παρασυμπαθητικού και του συμπαθητικού νευρικού συστήματος. Γι' αυτό το λόγο συχνά οι ουσίες αυτές αποκαλούνται αντίστοιχα νευρδιαβιβαστικές ουσίες του παρασυμπαθητικού και του συμπαθητικού.

Ειδικά για τα επινεφρίδια, υπάρχει μία ειδική φύση των συμπαθητικών νευρικών απολήξεων στη μυελώδη μοίρα τους. Οι προγαγγλιακές συμπαθητικές νευρικές ίνες φέρονται, χωρίς να πραγματοποιούν συνάψεις, από την μεσοκυττάρια ζώνη της φαιάς ουσίας του νωτιαίου μυελού, μέσα από το συμπαθητικό στέλεχος, και στην συνέχεια, με τα σπλαχνικά νεύρα, προς την μυελώδη μοίρα των επινεφριδίων. Εκεί μέσα, απολήγουν κατ' ευθείαν πάνω σε τροποποιημένα νευρικά κύτταρα, από τα οποία εκκρίνονται επινεφρίνη (αδρεναλίνη) και νορεπινεφρίνη (νοραδρεναλίνη) που αποδίδονται προς το αίμα. Τα εκκριτικά αυτά κύτταρα προέρχονται από εμβρυολογική άποψη, από νευρικό ιστό, και είναι ανάλογα προς τις μεταγαγγλιακές νευράδες. Πράγματι, διατηρούν ακόμη και υποτυπώδεις νευρικές ίνες, από τις οποίες εκκρίνονται και οι ορμόνες που αναφέρονται παραπάνω. Δηλαδή, ουσιαστικά, ο μυελός των επινεφριδίων αν και αποτελεί τμήμα ενός ενδοκρινούς οργάνου, στην πραγματικότητα είναι ένα συμπαθητικό γάγγλιο, δηλαδή ένα παράγωγο του συμπαθητικού τμήματος του ANΣ, που δεν διαθέτει μεταγαγγλιακές ίνες και εκκρίνει κυρίως αδρεναλίνη αλλά και νοραδρεναλίνη και ντοπαμίνη απευθείας στην κυκλοφορία και όχι στην συναπτική σχισμή. Αποτελεί δε την μόνη πηγή παραγωγής αδρεναλίνης, καθώς διαθέτει το απαραίτητο ένζυμο φαινυλαιθανολαμινο-N-μεθυλ-O-τρανσφεράση (PNMT) που λείπει από τα συμπαθητικά νεύρα. Παρ' όλο ότι επιτελεί ποικίλες φυσιολογικές λειτουργίες δεν είναι απαραίτητος για την ζωή, εφ' όσον το ANΣ παραμένει ανατομικά ακέραιο και λειτουργικό³⁷⁵.

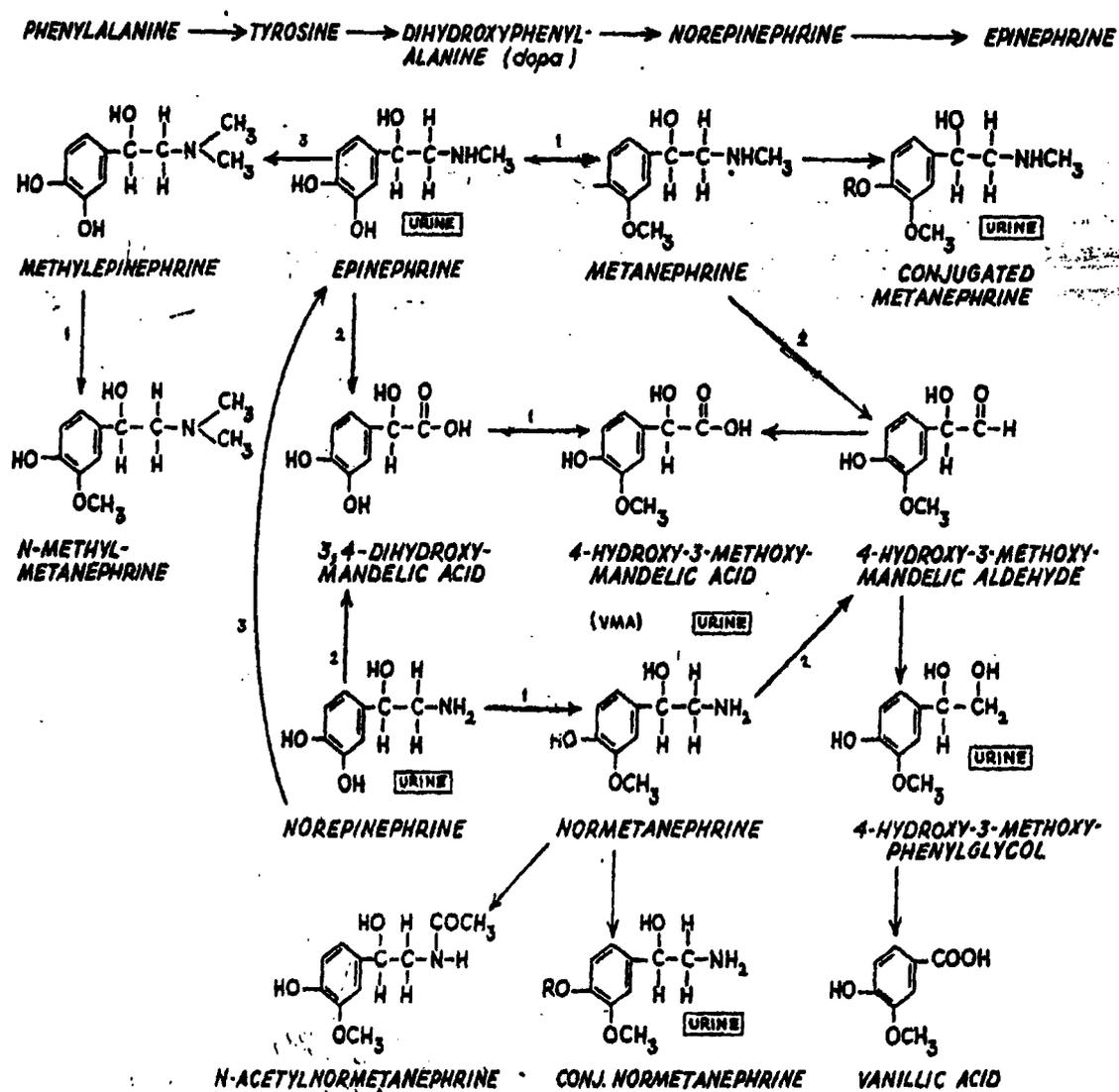
Χημεία

Οι ορμόνες του μυελού των επινεφριδίων σχετίζονται δομικά με μία ομάδα οργανικών συμπλόκων που ορίζονται ως κατεχόλες. Το όνομα της ομάδας αυτής είναι μια συντόμηση του αρχικού όρου που ήταν πυροκατεχόλες. Το οργανικό σύμπλοκο που τώρα ονομάζεται κατεχόλη παρασκευάστηκε για πρώτη φορά το 1839 με απόσταξη κατεχίνης, ενός χυμού που προέρχεται από το ασιατικό φυτό που λέγεται *Mimosa catechu*. Αν και οι ορμόνες του μυελού των επινεφριδίων συνήθως καλούνται "κατεχολαμίνες", αυτός ο όρος δεν είναι αυστηρά ακριβής, όπως μπορούμε να παρατηρήσουμε από τις δομικές φόρμες που φαίνονται στο παρακάτω σχήμα. (Σχήμα 18). Ο αρωματικός πυρήνας αυτών των ορμονών είναι όντως πυρήνας κατεχόλης, αλλά η αμινοομάδα είναι συνδεδεμένη με πλευρά αλειφατικής αλυσίδας και όχι κατευθείαν με αρωματικό δακτύλιο όπως εννοείται με τον όρο κατεχολαμίνη.



Παρ' όλα αυτά, η κλινική βιβλιογραφία σήμερα έχει επιλέξει να κατηγοριοποιεί τις διάφορες διυδροξυφαινυλακυλαμίνες κάτω από τον γενικό όρο κατεχολαμίνη, και αυτή θα είναι και η ορολογία που χρησιμοποιείται και σ' αυτό το κείμενο.

Το 80% της δραστηριότητας των κατεχολαμινών στο μυελό των επινεφριδίων αποδίδεται στην επινεφρίνη που υπάρχει μέσα στον αδένα σε συγκέντρωση 1-3 mg/g ιστού. Η χημική δομή της επινεφρίνης φαίνεται στο παρακάτω σχήμα (Σχήμα 18). Η επινεφρίνη που προκύπτει "φυσικά" είναι το L-ισομερές. Η μη φυσική D-μορφή είναι δραστική μόνο κατά το 1/15. Παρ' όλα αυτά, η L-επινεφρίνη που παράγεται συνθετικά είναι παρόμοια σε δραστικότητα με το φυσικό προϊόν. Η νορεπινεφρίνη βρίσκεται αρχικά στα συμπαθητικά νεύρα, όπου δρα σαν νευροδιαβιβαστής. Η περιοχή αυτή είναι αποτέλεσμα αφ' ενός μεν της σύνθεσής της στο νευρικό ιστό και αφετέρου δε της λήψης της από τον ιστό μέσω της κυκλοφορίας. Όπως φαίνεται στο παραπάνω σχήμα, η επινεφρίνη διαφέρει από την νορεπινεφρίνη μόνο στο ότι η πρώτη μεθυλιώνεται στην αρχική αμινομάδα της πλευράς της αλειφατικής αλυσίδας.



Σχήμα 18.



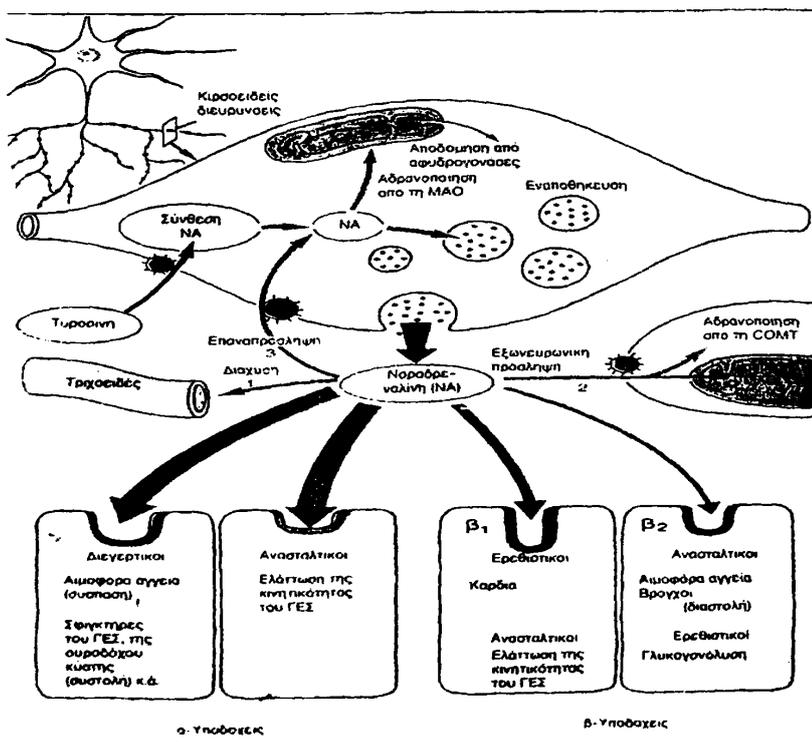
Οι κατεχολαμίνες, νοραδρεναλίνη, αδρεναλίνη και η ντοπαμίνη, αποτελούν τους κύριους νευροδιαβιβαστές του Συμπαθητικού Νευρικού Συστήματος (ΣΝΣ). Η ντοπαμίνη, πρόδρομη ουσία της νοραδρεναλίνης, είναι ο κύριος νευροδιαβιβαστής στο Κεντρικό Νευρικό Σύστημα (ΚΝΣ). Η αδρεναλίνη δρα κυρίως ως ορμόνη στην περιφέρεια αφού απελευθερωθεί από τον μυελό των επινεφριδίων στο περιφερικό αίμα. Τέλος, η νοραδρεναλίνη αποτελεί τον κύριο μεταβιβαστή του ΣΝΣ, ενώ πολύ μικρό ποσοστό της κυκλοφορούσης νοραδρεναλίνης προέρχεται από τον μυελό των επινεφριδίων.

Η σύνθεση της νορεπινεφρίνης (νοραδρεναλίνης) αρχίζει μέσα στο αξονόπλασμα της τελικής νευρικής απόληξης της αδρενεργικής νευρικής ίνας, αλλά συμπληρώνεται μέσα στα εκκριτικά κυστίδια (Εικόνα 11). Οι βασικές βαθμίδες αυτής της σύνθεσης είναι οι ακόλουθες:

- Υδροξυλίωση
1. Τυροσίνη → DOPA
- Αποκαρβοξυλίωση
2. DOPA → Ντοπαμίνη
1. Μεταφορά της ντοπαμίνης μέσα στα εκκριτικά κυστίδια
- Υδροξυλίωση
4. Ντοπαμίνη → Νορεπινεφρίνη

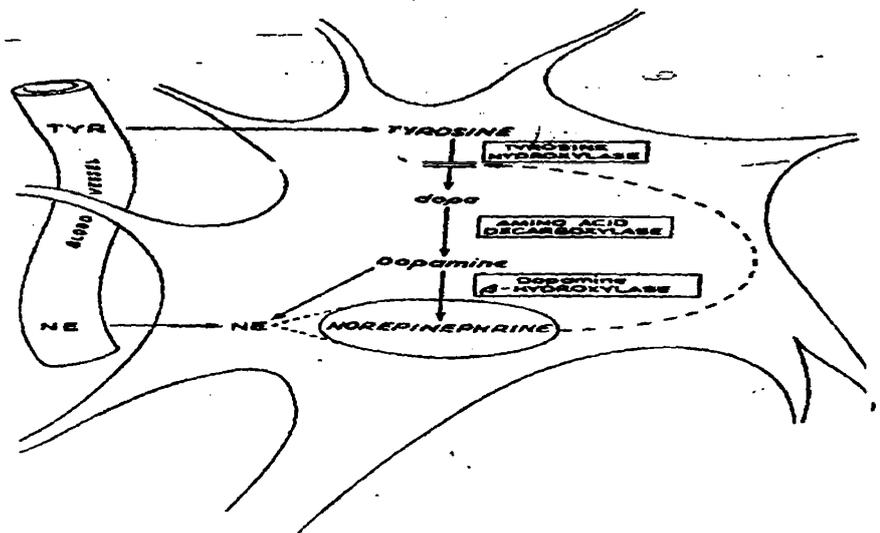
Μέσα στην μυελώδη μοίρα των επινεφριδίων αυτή η αντίδραση προχωρεί ακόμη μία βαθμίδα παρακάτω, για την μετατροπή του 80% περίπου της νορεπινεφρίνης σε επινεφρίνη:

- Μεθυλίωση
5. Νορεπινεφρίνη → Επινεφρίνη



Εικόνα 11. Αδρενεργική νευροδιαβίβαση





Σχήμα 19:
Βιοσύνθεση
κατεχολαμινών

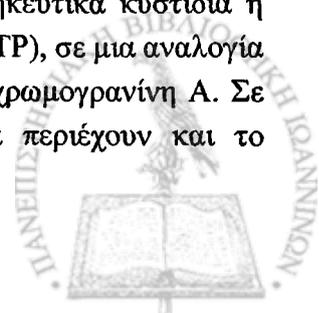
Αναλυτικότερα, η διαδικασία έχει ως εξής: Το αμινοξύ τυροσίνη είτε προσλαμβάνεται με την τροφή είτε παράγεται στο ήπαρ από την φαινυλαλανίνη με την δράση της υδροξυλάσης της φαινυλαλανίνης. Με ενεργό μεταφορά εισέρχεται στους μεταγαγγλιακούς νευρώνες ή στα χρωμαφινικά κύτταρα του μυελού των επινεφριδίων, όπου με τη δράση του ενζύμου υδροξυλάση της τυροσίνης μετατρέπεται σε DOPA και ακολούθως με την δράση της αποκαρβοξυλάσης της DOPA σε ντοπαμίνη. Η αποκαρβοξυλάση της DOPA είναι μη ειδικό ένζυμο και δρα και σε άλλα αμινοξέα, γι' αυτό και λέγεται αποκαρβοξυλάση των αρωματικών L-αμινοξέων και είναι παρόμοια αλλά όχι ίδια με την αποκαρβοξυλάση της 5-υδροξυτρυπτοφάνης. Η μετατροπή της τυροσίνης σε DOPA φαίνεται ότι αποτελεί τον κύριο ρυθμιστικό μηχανισμό σύνθεσης των κατεχολαμινών. Το ένζυμο υδροξυλάση της τυροσίνης που καταλύει αυτό το στάδιο υφίσταται αρνητική παλίνδρομη ρύθμιση από την ντοπαμίνη και την νοραδρεναλίνη.

Η ντοπαμίνη με την δράση της β-υδροξυλάσης της ντοπαμίνης μετατρέπεται σε νοραδρεναλίνη στα αποθηκευτικά κυστίδια που ευρίσκονται στις τελικές μεταγαγγλιακές απολήξεις, όπου και παραμένει μέχρι να απελευθερωθεί (Σχήμα 19).

Στα κύτταρα του μυελού των επινεφριδίων καθώς και σε ορισμένους νευρώνες η νοραδρεναλίνη εξέρχεται από τα κυστίδια στο κυτταρόπλασμα και με την δράση του ενζύμου φαινυλαιθανολαμινο-N-μεθυλοτρανσφεράση (PNMT) μετατρέπεται σε αδρεναλίνη η οποία με την σειρά της αποθηκεύεται σε άλλη ομάδα κυστιδίων όπου και παραμένει μέχρι την έκλυσή της. Η δραστηριότητα του ενζύμου επάγεται από την επίδραση της κορτιζόλης η οποία ευρίσκεται σε μεγάλες πυκνότητες στο αίμα το οποίο από τον φλοιό των επινεφριδίων φτάνει στον μυελό. Σε περιπτώσεις υποφουσιεκτομής η ελάττωση των επιπέδων της κορτιζόλης στο αίμα που φθάνει στον μυελό των επινεφριδίων ακολουθείται από ελάττωση της σύνθεσης αδρεναλίνης.

Οι κατεχολαμίνες δεν διαπερνούν τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό. Έτσι η νορεπινεφρίνη του εγκεφάλου πρέπει να συντεθεί μέσα στον ιστό. Η L-dopa, ο πρόδρομος των κατεχολαμινών διαπερνά τον φραγμό, γι' αυτό τον λόγο χρησιμοποιείται για να αυξήσει την σύνθεση των κατεχολαμινών στην νόσο του Parkinson.

Η αδρεναλίνη στα κύτταρα του μυελού των επινεφριδίων αποτελεί το 80%, ενώ η νοραδρεναλίνη το 20% του συνολικού ποσού των κατεχολαμινών. Στα αποθηκευτικά κυστίδια η αδρεναλίνη και η νοραδρεναλίνη συνδέονται με την τριφωσφορική αδενοσίνη (ATP), σε μια αναλογία περίπου 4 moles ορμόνης προς 1 mole ATP, καθώς και με μια πρωτεΐνη, την χρωμογρανίνη Α. Σε ορισμένους αλλά όχι σε όλους τους αδρενεργικούς νευρώνες τα κυστίδια περιέχουν και το



νευροπεπτίδιο Υ. Οι κατεχολαμίνες διατηρούνται μέσα στα αποθηκευτικά κυστίδια με ενεργό σύστημα μεταφοράς του οποίου η δράση αναστέλλεται από την ρεσερπίνη.

Η απελευθέρωση των κατεχολαμινών ακολουθεί την εκπόλωση ενός νευρικού μεταγαγγλιακού νευρώνα. Η εκπόλωση αυτή ακολουθείται από είσοδο ιόντων ασβεστίου, σε ίδια αναλογία με αυτήν που αποθηκεύονται, με αποτέλεσμα μετακίνηση των κυστιδίων προς την κυτταρική μεμβράνη, συνένωση των μεμβρανών και απελευθέρωση του περιεχομένου των κυστιδίων στην συναπτική σχισμή. Μαζί με την νοραδρεναλίνη εκκρίνονται και ATP, χρωμογρανίνη Α και το ένζυμο β-υδροξυλάση τη ντοπαμίνης που βρίσκονται επίσης μέσα στα αποθηκευτικά κυστίδια³⁷⁶.

Στο πλάσμα το 95% της ντοπαμίνης και περίπου το 70% της νοραδρεναλίνης και αδρεναλίνης κυκλοφορούν συζευγμένες με θεικές ρίζες. Στην μορφή αυτή οι κατεχολαμίνες είναι ανενεργές και η σημασία τους άγνωστη. Σε ύπτια θέση τα επίπεδα της νοραδρεναλίνης είναι περίπου 3000pg/ml, ενώ στην όρθια θέση αυξάνονται κατά 50 έως 100%. Μετά από επινεφριδεκτομή τα επίπεδα της νοραδρεναλίνης παραμένουν αμετάβλητα, ενώ της αδρεναλίνης, που φυσιολογικά κυμαίνονται περί τα 30pg/ml, πέφτουν πρακτικά στο μηδέν. Η αδρεναλίνη υπό φυσιολογικές συνθήκες βρίσκεται σε όργανα πλην του μυελού των επινεφριδίων και του εγκεφάλου, προέρχεται από την αδρεναλίνη του αίματος³⁷⁷. Μετά από επινεφριδεκτομή χαμηλά επίπεδα αδρεναλίνης επανεμφανίζονται στο αίμα χωρίς η προέλευσή τους να είναι γνωστή. Συνθετικά ένζυμα της οδού των κατεχολαμινών έχουν βρεθεί στα καρδιακά γάγγλια³⁷⁸. Η ντοπαμίνη στο πλάσμα κυμαίνεται σε επίπεδα περίπου 35pg/ml. Ο χρόνος ημιζωής των κατεχολαμινών στην κυκλοφορία είναι περίπου 2 min.

Η νοραδρεναλίνη που απελευθερώνεται στη συναπτική σχισμή δρά στους προσυναπτικούς β₂ υποδοχείς. Η διέγερση των β₂ υποδοχέων ακολουθείται από αύξηση της παραγωγικής κυκλικής μονοφωσφορικής αδενοσίνης (c-AMP) από την τριφωσφορική αδενοσίνη (ATP), είναι δε η c-AMP απαραίτητη για την περαιτέρω εξωκύτωση και αύξηση της απελευθέρωσης της νοραδρεναλίνης. Ένα μέρος της νοραδρεναλίνης διαφεύγει από την συναπτική σχισμή στην συστηματική κυκλοφορία και η νοραδρεναλίνη που ανιχνεύεται στο πλάσμα αποτελεί έμμεση εκτίμηση της συνολικής διέγερσης του ΣΝΣ, καθώς αντιπροσωπεύει ποσοστό λιγότερο από 10% της νοραδρεναλίνης που απελευθερώνεται στη συναπτική σχισμή. Στη συνέχεια μεταβολίζεται στο ήπαρ ή απεκκρίνεται από τους νεφρούς.

Μετά την έκκριση της νοραδρεναλίνης από τις τελικές νευρικές απολήξεις, η απομάκρυνσή της από τον τόπο της έκκρισης γίνεται με τρεις διαφορετικούς τρόπους: (1) Επαναπόσληψη με ενεργητική διεργασία μεταφοράς, μέσα στις ίδιες τις αδρενεργικές νευρικές απολήξεις και μάλιστα κυρίως από τον προσυναπτικό νευρώνα και αποθήκευση μέσα στα προσυναπτικά κυστίδια. Με τον τρόπο αυτό απομακρύνονται τα 50 ως 80% από την εκκρινόμενη νοραδρεναλίνη και εξοικονομούνται κατεχολαμίνες για επόμενη απελευθέρωση. Η επαναπόσληψη αυτή μέσα στον νευρώνα μετατρέπει τις κατεχολαμίνες σε αδρανείς μορφές αποθήκευσης και αποτελεί έναν σημαντικό μηχανισμό γρήγορης λήξης της ορμονικής και νευροδιαβιβαστικής δραστηριότητας. Η αναστολή της επαναπόσληψης προκαλεί σημαντική επίταση της δράσης των κατεχολαμινών. Η υπερευαισθησία των οργάνων στόχων μετά από συμπαθητική απονεύρωση οφείλεται στην μη επαναπόσληψη των κατεχολαμινών που προέρχονται από άλλες πηγές και έρχονται σε παρατεταμένη επαφή με τους μεταγαγγλιακούς αδρενεργικούς υποδοχείς. Ένα μικρό ποσοστό κατεχολαμινών προσλαμβάνεται και μεταβολίζεται από τον μετασυναπτικό νευρώνα. (2) Διάχυση από τις νευρικές απολήξεις προς το γύρω υγρό των ιστών και από εκεί προς το αίμα – με τον τρόπο αυτό απομακρύνεται το μεγαλύτερο ποσό από την υπολειπόμενη νοραδρεναλίνη, και (3) Καταστροφή από ένζυμα, όπως η μονοαμινοξειδάση (ΜΑΟ), που προκαλεί οξειδωση, και η κατεχολ-Ο-μεθυλτρανσφεράση (COMT) που προκαλεί αδρανοποίηση των κατεχολαμινών με μεθυλίωση της υδροξυ-1 ομάδας σε τρεις θέσεις.



Η ΜΑΟ, η οποία στην πραγματικότητα αποτελείται από μία σειρά ισοενζύμων, βρίσκεται κυρίως στις νευρικές απολήξεις από όπου απελευθερώνονται οι κατεχολαμίνες, στην έξω επιφάνεια των μιτοχονδρίων. Είναι ένζυμο με μεγάλη ειδικότητα, ικανό να καταλύει την οξειδωση των παράπλευρων αλυσίδων σε μια μεγάλη ποικιλία κατεχολαμινών. Η COMT δεν βρίσκεται στις νευρικές απολήξεις αλλά απαντάται στο ήπαρ, στους νεφρούς και στις λείες μυϊκές ίνες. Το Mg^{++} εξαρτώμενο αυτό ένζυμο βρίσκεται στο κυτταρόπλασμα και είναι ικανό να μεθυλιώνει μία ποικιλία κατεχολαμινικών παραγώγων, χρησιμοποιώντας την S-αδενοσυλμεθειονίνη σαν πηγή των μεθυλομάδων. Αν και τα δύο ένζυμα, ΜΑΟ και COMT, απαντώνται στους περισσότερους ιστούς, η δραστηριότητά τους είναι ιδιαίτερα υψηλή στο ήπαρ, όπου συμβαίνει και το μεγαλύτερο μέρος του καταβολισμού των κυκλοφορούντων κατεχολαμινών.

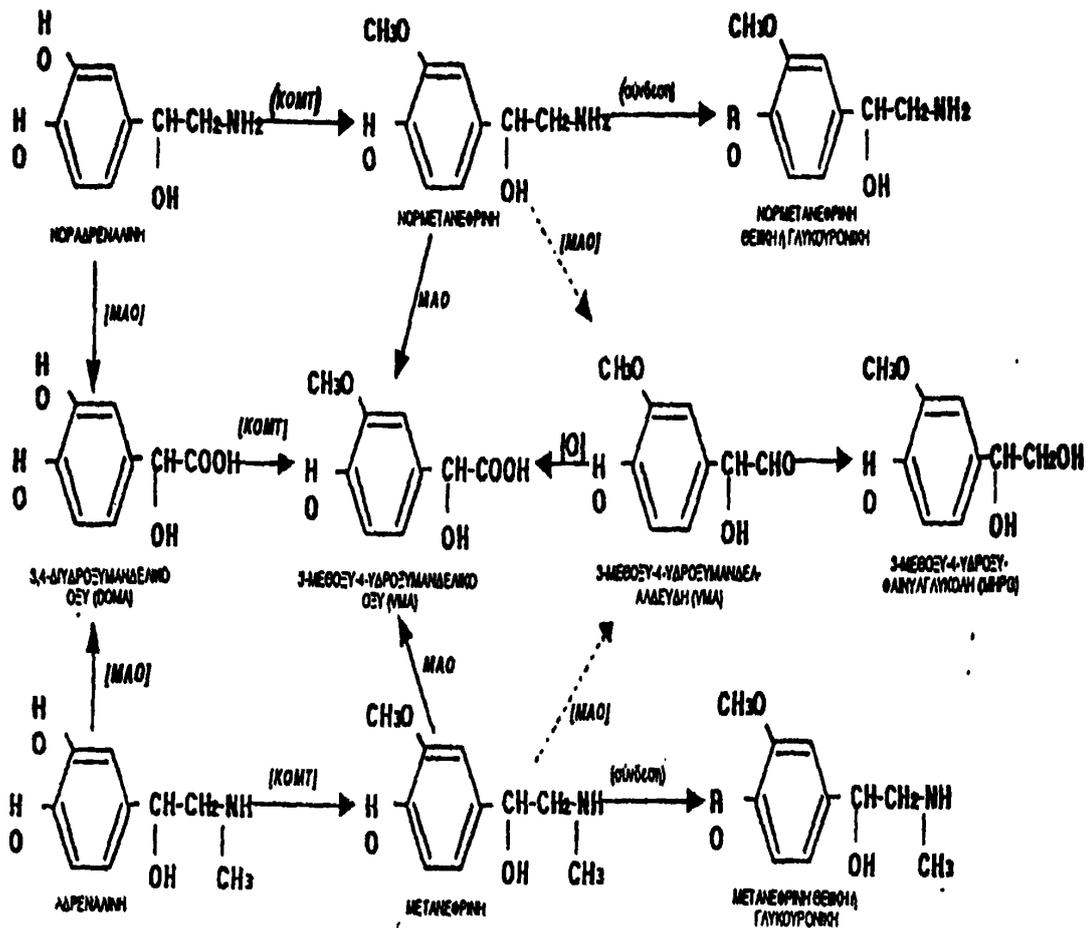
Το πρώτο βήμα στον μεταβολισμό των κατεχολαμινών μπορεί να είναι είτε η μεθυλίωση είτε η οξειδωση της πλευρικής αλυσίδας, γεγονός που δεν έχει ακόμη πλήρως διευκρινιστεί. Το σύμπλεγμα της νορεπινεφρίνης που είναι ισχυρά συνδεδεμένο στον ιστό αρχικά μεταβολίζεται από την μιτοχονδριακή μονοαμινοοξειδάση, ενώ το λιγότερο ισχυρά συνδεδεμένο σύμπλεγμα αρχικά μεθυλιώνεται από την κατεχολ-Ο-μεθυλτρανσφεράση. Στους νευρώνες, ενοείται ο μεταβολισμός της νορεπινεφρίνης από την μονοαμινοοξειδάση, εφ' όσον τα επίπεδα της κατεχολ-Ο-μεθυλτρανσφεράσης είναι χαμηλά σ' αυτόν τον ιστό. Εφ' όσον και τα δύο ένζυμα αντιδρούν με τα μεταβολικά προϊόντα στο ήπαρ, οι τελικοί μεταβολίτες που εμφανίζονται στα ούρα δεν μπορούν να δώσουν απάντηση σχετικά με το ποια αντίδραση συνέβη πρώτη.

Συνήθως, η νοραδρεναλίνη που εκκρίνεται κατ' ευθείαν μέσα σε έναν ιστό, παραμένει σε δραστική κατάσταση για λίγα μόνο δευτερόλεπτα, γεγονός που αποδεικνύει ότι η επαναπρόσληψη και η διάχυσή της γίνονται με αρκετά μεγάλη ταχύτητα. Εν τούτοις, η νοραδρεναλίνη και η αδρεναλίνη που εκκρίνονται προς το αίμα από την μυελώδη μοίρα των επινεφριδίων, παραμένουν σε δραστική κατάσταση μέχρι τη διάχυσή τους σε κάποιον ιστό, όπου καταστρέφονται από την κατεχολ-Ο-μεθυλοτρανσφεράση. Αυτό συμβαίνει κατά κύριο λόγο μέσα στο ήπαρ. Για τον λόγο αυτό, η νοραδρεναλίνη και η αδρεναλίνη, όταν εκκρίνονται προς το αίμα, παραμένουν σε εξαιρετικά δραστική μορφή για 10 ως 30 δευτερόλεπτα, ακολουθεί δε μια χρονική περίοδος από 1 ως μερικά λεπτά, κατά την οποία η δραστηριότητά τους εμφανίζει προοδευτική ελάττωση.

Στην κυκλοφορία η αδρεναλίνη και η νοραδρεναλίνη έχουν ως επί το πλείστον υποστεί μεθυλίωση και αποβάλλονται από τα ούρα σαν Ο-μεθυλιωμένα παράγωγα μετανεφρίνη και νορμετανεφρίνη. Τα Ο-μεθυλιωμένα παράγωγα που δεν αποβάλλονται υφίστανται οξειδωση και το 3-μεθοξυ-4-υδροξυμανδελικό οξύ (VMA) είναι ο κυριότερος μεταβολίτης των κατεχολαμινών στα ούρα.

Στις απολήξεις των αδρενεργικών νεύρων η νοραδρεναλίνη μετατρέπεται από την ΜΑΟ σε ανενεργά παράγωγα, 3,4-διυδροξυμανδελικό οξύ (DOMA) και στην αντίστοιχη γλυκόλη, 3,4-διυδροξυφαινυλγλυκόλη (DHPG), τα οποία στη συνέχεια μετατρέπονται στα Ο-μεθυλιωμένα παράγωγα, όπως το 3-μεθοξυ-4-υδροξυμανδελικό οξύ (VMA) και η 3-μεθοξυ-4-υδροξυφαινυλγλυκόλη (MHPG). Συνολικά, περίπου το 50% των εκκρινόμενων κατεχολαμινών είναι υπό την μορφή ελεύθερης ή συζευγμένης μετανεφρίνης ή νορμετανεφρίνης και το 40% σαν VMA. Επίσης μπορεί να βρεθούν και μικρές ποσότητες από ακετυλιωμένα παράγωγα. Μόνο μικρές ποσότητες ελεύθερης νοραδρεναλίνης και αδρεναλίνης εκκρίνονται στα ούρα (Σχήμα 20).





Σχήμα 20. Μεταβολική οδός της νοραδρεναλίνης και της αδρεναλίνης COMT, κατεχολ-Ο-μεθυλτρανσφεράση MAO, μονοαμινο-οξειδάση

Μία τυπική αναλογία των μεταβολιτών των κατεχολαμινών στα ούρα που ανευρίσκονται μετά από ένεση ραδιοσημασμένης επινεφρίνης, είναι η εξής:

Αμετάβλητη επινεφρίνη	6%
Μετανεφρίνη	40%
Βανυλμανδελικό οξύ	41%
4-υδροξυ-3-μεθοξυ-φαινυλγλυκόλη	7%
3,4-διυδροξυμανδελικό οξύ	2%
Διάφορα	4%



Τα μεταβολικά προϊόντα των κατεχολαμινών στον άνθρωπο, που απεκκρίνονται στα ούρα, απαντώνται με την μορφή θεικών αλάτων.

Ρύθμιση

Η ποσότητα των ενεργών κατεχολαμινών ελέγχεται στα επίπεδα της σύνθεσης, της έκκρισης, της επαναπρόσληψης και του καταβολισμού. Οι κατεχολαμίνες είναι αλλοστερικοί ανασταλτές της σύνθεσής τους, στο επίπεδο της υδροξυλάσης της τυροσίνης. Έτσι, όταν οι ορμόνες κινητοποιούνται γρήγορα, η σύνθεση αντίστοιχα μειώνεται. Κατά την διάρκεια παρατεταμένου stress, β-αδρενεργικής διέγερσης, υπερδραστηριότητας της υπόφυσης και έκκρισης ACTH και κορτικοστεροειδών, όλα τα ένζυμα σταδιακά αυξάνονται. Γλυκοκορτικοειδή από τον γειτονικό φλοιό των επινεφριδίων, ειδικά διεγείρουν την φαινυλαιθανολαμινο-N-μεθυλτρανσφεράση, το τελικό ένζυμο που είναι απαραίτητο για την σύνθεση της επινεφρίνης. Η έκκριση είναι επίσης ευαίσθητη σε χολινεργικό έλεγχο και η ακετυλοχολίνη είναι ένας ισχυρός θετικός διεγέρτης της. Αυτή η χολινεργική διέγερση φαίνεται να ρυθμίζεται απ'ευθείας από ένα σήμα του υποθαλάμου, το οποίο σχετίζεται άμεσα με το stress.

Η δυσουλφιράμη αναστέλλει την β-υδροξυλάση της ντοπαμίνης, μειώνοντας την σύνθεση των κατεχολαμινών. Επομένως είναι ένας χρήσιμος παράγοντας για την ρύθμιση της υπέρτασης. Η ρεσερπίνη και η γουανεθιδίνη είναι αντιυπερτασικοί και ηρεμιστικοί παράγοντες, οι οποίοι μειώνουν τις κατεχολαμίνες αυξάνοντας την καταστροφή τους. Η κοκαΐνη και οι αντικαταθλιπτικές αμφεταμίνες εμποδίζουν τη σταθεροποίηση και επαναπρόσληψη των κατεχολαμινών στους ιστούς, με αποτέλεσμα την αυξημένη βιολογική τους διαθεσιμότητα. Παρ' όλα αυτά, πιθανώς αυτή να μην είναι η κυριότερη δράση αυτών των ουσιών.

Πολλές ουσίες μορφολογικά όμοιες με την επινεφρίνη και την νορεπινεφρίνη, αν και με μικρότερη βιολογική δράση μπορούν να αποθηκευτούν στους ιστούς σε θέσεις φυσιολογικά "κρατημένες" για τις ενεργείς ορμόνες. Οι παράγοντες αυτοί, γνωστοί ως "ψευδείς νευροδιαβιβαστές", εμποδίζουν είτε την σύνθεση είτε την αποθήκευση των ορμονών και εκλύονται κατά την φυσιολογική συμπαθητική διέγερση στη θέση τους. Έτσι, αυτοί οι παράγοντες ή οι πρόδρομοί τους μπορούν να χρησιμοποιηθούν κλινικά για να ελαττώσουν την έκκριση των ενεργών ορμονών και έτσι να λειτουργήσουν ως αντιυπερτασικοί παράγοντες. "Ψευδείς νευροδιαβιβαστές", όπως η β-υδροξυτρυπταμίνη, η α-μεθυλνορεπινεφρίνη και η μεταραμινόλη παράγονται με επεξεργασία τυραμίνης, μεθυλντόπα, α-μεθυλτυροσίνης ή και μεταραμινόλης. Αρχικά, αυτοί οι παράγοντες οδηγούν σε αυξημένα επίπεδα κυκλοφορούντων ορμονών, αποκλείοντας την σύνδεσή τους στους ιστούς.

Η αντίδραση "συναγερμού" του συμπαθητικού νευρικού συστήματος

Όταν μεγάλα τμήματα του συμπαθητικού νευρικού συστήματος εκφορτίζονται συγχρόνως - δηλαδή σε περιπτώσεις μαζικής εκφόρτισης - παρατηρείται αύξηση, με πολλούς τρόπους, της ικανότητας



του σώματος να επιδίδεται σε έντονη μυϊκή δραστηριότητα, δηλαδή συμβαίνουν τα ακόλουθα:

- 1) Αύξηση της αρτηριακής πίεσης.
- 2) Αύξηση της αιμάτωσης των λειτουργούντων μυών, με συνακόλουθη ελάττωση της αιμάτωσης οργάνων, όπως είναι ο γαστρεντερικός σωλήνας και οι νεφροί, η λειτουργία των οποίων δεν απαιτείται για ταχεία κινητική δραστηριότητα.
- 3) Αύξηση του μεταβολισμού των κυττάρων σε ολόκληρο το σώμα.
- 4) Αύξηση της συγκέντρωσης της γλυκόζης στο αίμα.
- 5) Αύξηση της γλυκογονόλυσης στο ήπαρ και στους μύες.
- 6) Αύξηση της δύναμης συστολής των μυών.
- 7) Αύξηση της διανοητικής δραστηριότητας.
- 8) Αύξηση της πηκτικότητας του αίματος.

Με το σύνολο αυτών των επιδράσεων επιτρέπεται στο άτομο να επιδίδεται σε πολύ εντονότερη φυσική δραστηριότητα από την συνήθη. Επειδή η πνευματική είτε η σωματική ένταση είναι εκείνη που συνήθως αποτελεί το αίτιο της διέγερσης του συμπαθητικού συστήματος, συχνά λέγεται ότι η αποστολή του συμπαθητικού νευρικού συστήματος συνίσταται στην παροχή επιπρόσθετης δραστηριοποίησης του σώματος σε καταστάσεις έντασης (stress). Γι' αυτό και η μαζική κινητοποίηση του συμπαθητικού συστήματος συχνά χαρακτηρίζεται ως συμπαθητική αντίδραση προς το stress.

Το συμπαθητικό σύστημα διεγείρεται ιδιαίτερα έντονα σε πολλές συναισθηματικές καταστάσεις. Για παράδειγμα, στην κατάσταση της οργής (μανίας), η οποία προκαλείται κυρίως με τον ερεθισμό του υποθαλάμου, νευρικά σήματα μεταδίδονται προς τα κάτω, μέσα από τον δικτυωτό σχηματισμό και τον νωτιαίο μυελό, για να προκαλέσουν τη μαζική εκφόρτιση του συμπαθητικού, οπότε αμέσως εκδηλώνονται όλες οι αντιδράσεις που αναγράφονται παραπάνω. Η κατάσταση αυτή ονομάζεται συμπαθητική αντίδραση συναγερμού. Συχνά επίσης αποκαλείται και αντίδραση πάλης ή φυγής, γιατί το ζώο που βρίσκεται σ' αυτήν την κατάσταση αποφασίζει σχεδόν αμέσως αν θα σταθεί να πολεμήσει ή αν "θα το βάλει στα πόδια". Και στις δύο περιπτώσεις, η συμπαθητική αντίδραση συναγερμού καθιστά τις επόμενες δραστηριότητες του ζώου εξαιρετικά έντονες.

Αδρενεργικοί υποδοχείς

Οι δράσεις των κατεχολαμινών ασκούνται μέσω των αδρενεργικών υποδοχέων. Πριν η νορεπινεφρίνη είτε η επινεφρίνη, που εκκρίνονται από τις νευρικές απολήξεις του αυτόνομου νευρικού συστήματος μπορέσουν να διεγείρουν το εκτελεστικό όργανο, πρέπει να συνδέονται με εξαιρετικά εξειδικευμένους υποδοχείς, που βρίσκονται στα εκτελεστικά όργανα. Ο υποδοχέας συνήθως βρίσκεται στην εξωτερική επιφάνεια της κυτταρικής μεμβράνης, συνδεδεμένος ως προσθετική ομάδα με μόριο πρωτεΐνης, που διαπερνά ολόκληρο το πάχος της κυτταρικής μεμβράνης. Όταν η νευροδιαβιβαστική ουσία συνδέεται με τον υποδοχέα, προκαλείται μία μορφολογική αλλοίωση στη δομή του μορίου της πρωτεΐνης. Με τη σειρά του, το μεταβληθέν μόριο της πρωτεΐνης προκαλεί τη διέγερση είτε την αναστολή του κυττάρου, συνήθως (1) με την πρόκληση μεταβολής της διαπερατότητας της κυτταρικής μεμβράνης προς ένα ή περισσότερα ιόντα, είτε (2) με την ενεργοποίηση είτε την απενεργοποίηση, ενός ενζύμου που βρίσκεται συνδεδεμένο με το άλλο άκρο της δεκτικής πρωτεΐνης, κατά το σημείο που προέχει προς το εσωτερικό του κυττάρου.

Από πειραματικές έρευνες που έχουν γίνει με διάφορα φάρμακα τα οποία μιμούνται την επίδραση της νορεπινεφρίνης (συμπαθητικομιμητικά φάρμακα) σε εκτελεστικά όργανα που νευρώνονται από το συμπαθητικό, αποκαλύπτεται ότι υπάρχουν δύο μείζονες τύποι αδρενεργικών υποδοχέων, οι άλφα υποδοχείς και οι βήτα υποδοχείς. Με τη σειρά τους, οι α υποδιαίρονται σε α₁



(α_{1A} , α_{1B} , α_{1C}) και α_2 , οι οποίοι επίσης υποδιαιρούνται σε κατηγορίες, χωρίς να είναι πλήρως ταξινομημένοι (α_{2A} , α_{2B} , α_{2C}). Τέλος, οι τύπου β υποδιαιρούνται σε β_1 , β_2 και β_3 .

Οι αδρενεργικοί υποδοχείς είναι γλυκοπρωτεΐνες που διασχίζουν την κυτταρική μεμβράνη επτά φορές, με εξωκυττάριο αμινοτελικό τμήμα και ενδοκυττάριο καρβοξυτελικό τμήμα. Συνδέονται με τις G πρωτεΐνες με αμινοξέα της τρίτης ενδοκυττάριας έλικας που ευρίσκεται πλησιέστερα προς το καρβοξυτελικό τμήμα. Το σύστημα των G πρωτεϊνών χρησιμοποιείται από πολλές ουσίες, όπως νευροδιαβιβαστές, ορμόνες, ταχυκινίνες, για την ενδοκυττάρια μετάδοση των ερεθισμάτων. Τέτοιες ουσίες είναι: αδρεναλίνη, νοραδρεναλίνη, ντοπαμίνη, σεροτονίνη, ισταμίνη, ακετυλχολίνη, αδενοσίνη, νευροκινίνη Α, νευροπεπτίδιο Υ, αγγειοτενσίνη ΙΙ, αργινίνη-βασοπρεσίνη, αγγειοδραστικό εντερικό πεπτίδιο (VIP), θυρεοειδοτρόπος ορμόνη (TRH), παραθορμόνη (PTH), θρομβοξάνη A_2 , ενδοθηλίνες, ενεργοποιητικός παράγοντας των αιμοπεταλίων (PAF), ιντερλευκίνη-8 κ.ά. Η σύνδεση με τις κατεχολαμίνες γίνεται μέσω αμινοξέων των υδρόφοβων τμημάτων που διασχίζουν την κυτταρική μεμβράνη.

Οι G πρωτεΐνες αποτελούν ένα σύστημα ενδοκυττάριας μεταβίβασης σημάτων και ονομάζονται έτσι επειδή πρόκειται για πρωτεΐνες που συνδέονται με την τριφωσφορική γουανοσίνη (GTP), το γουανοσινικό ανάλογο της τριφωσφορικής αδενοσίνης (ATP). Πρόκειται για 22 διαφορετικές ετεροτριμερείς πρωτεΐνες που αποτελούνται από τρεις υπομονάδες που αποκαλούνται α , β και γ . Μέχρι στιγμής έχουν απομονωθεί πολλές ισομορφές των τριών αυτών υπομονάδων και συγκεκριμένα 16 της α , 5 της β και 12 της γ υπομονάδας. Η α υπομονάδα είναι συνδεδεμένη με διφωσφορική γουανοσίνη (GDP) στην φάση ηρεμίας. Όταν ένας διεγέρτης συνδέεται με τον υποδοχέα, το GDP ανταλλάσσεται με GTP και η α υπομονάδα αποσυνδέεται από το σύμπλεγμα $\alpha\beta\gamma$. Συνήθως η υπομονάδα α είναι η υπεύθυνη για τις δράσεις του υποδοχέα. Στην συνέχεια η υπομονάδα α με την ενδογενή δράση της σαν υδροξυλάση μετατρέπει το GTP σε GDP με αποτέλεσμα επανασύνδεση των υπομονάδων α και $\beta\gamma$ και παύση της δράσης του υποδοχέα⁴⁸¹.

Η ενεργοποίηση του συμπλέγματος υποδοχέα της κυτταρικής μεμβράνης και της G πρωτεΐνης ακολουθείται από τη μεσολάβηση ενός δεύτερου μεταβιβαστού που πρόκειται είτε για το σύστημα τριφωσφορικής ινοσιτόλης (IP_3)-διακυλγλυκερόλης (DAG) είτε του c-AMP (Σχήμα 21).

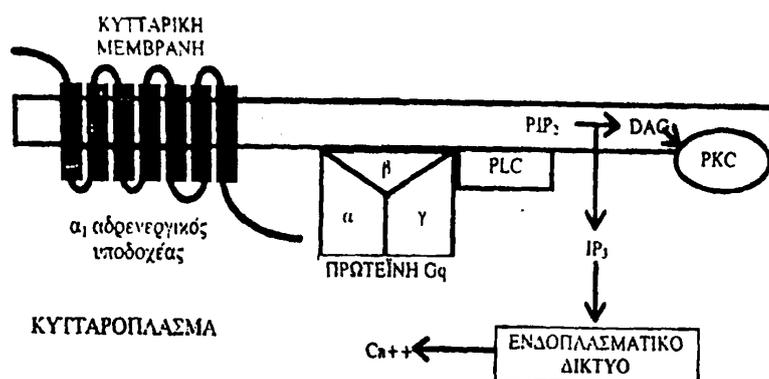
Όσον αφορά το σύστημα της τριφωσφορικής ινοσιτόλης (IP_3)-διακυλγλυκερόλης (DAG), η ενεργοποίηση της πρωτεΐνης G_q ακολουθείται από ενεργοποίηση μίας φωσφολιπάσης C στο εσωτερικό της κυτταρικής μεμβράνης. Συνολικά οκτώ ισομορφές της φωσφολιπάσης C (PLC) έχουν αναγνωρισθεί μέχρι τώρα και οι $PLC\beta_1$ και $PLC\beta_2$ ενεργοποιούνται από G πρωτεΐνες. Καταλύουν την υδρόλυση της 4,5-διφωσφορικής φωσφοτυδυλινοσιτόλης (PIP_2) σε IP_3 και διακυλγλυκερόλη. Η IP_3 δρα στο ενδοπλασματικό δίκτυο και προκαλεί την απελευθέρωση ιόντων ασβεστίου στο κυτταρόπλασμα. Η διακυλγλυκερόλη ασκεί τη δράση της στην κυτταρική μεμβράνη όπου ενεργοποιεί μια πρωτεϊνική κινάση C που φωσφορυλιώνει κυτταρικές πρωτεΐνες. Το σύστημα αυτό χρησιμοποιείται από τους α_1 -αδρενεργικούς υποδοχείς.

Το δεύτερο σύστημα της κυκλικής 3,5-μονοφωσφορικής αδενοσίνης (c-AMP) προέρχεται από την υδρόλυση της τριφωσφορικής αδενοσίνης (ATP) με την δράση της αδενυλικής κυκλάσης. Το σύστημα αυτό χρησιμοποιείται από τους α_2 και όλους τους β αδρενεργικούς υποδοχείς.

Το c-AMP ενεργοποιεί μία πρωτεϊνική κινάση A που όπως η πρωτεϊνική κινάση C προκαλεί φωσφορυλίωση πρωτεϊνών. Στη συνέχεια το c-AMP μεταβολίζεται με την δράση της φωσφοδιεστεράσης στο ανενεργό 5-AMP. Η αδενυλική κυκλάση είναι πρωτεΐνη η οποία διαπερνά την κυτταρική μεμβράνη δώδεκα φορές και υπάρχει σε οχτώ ισομορφές.



Η σύνδεση ενός αγωνιστή με έναν διεγερτικό υποδοχέα ακολουθείται από την δράση μιας πρωτεΐνης Gs (s=stimulatory, διεγερτική) που αυξάνει την παραγωγή του c-AMP.



Σχήμα 21. Το σύστημα τριφωσφορικής ινοσιτόλης (IP_3)-διακυλγλυκερόλης (DAG). Η σύνδεση ενός αγωνιστή με την πρωτεΐνη G_q ενεργοποιεί τη φωσφολιπάση C (PLC). Η υδρόλυση της διφωσφορικής φωσφατιδυλινοσιτόλης (PIP_2) παράγει IP_3 η οποία απελευθερώνει Ca^{++} το ενδοπλασματικό δίκτυο και DAG η οποία ενεργοποιεί την πρωτεϊνική κινάση C (PKC). Από Review of Medical Physiology, WF Ganong, 1997.

Αντιθέτως, η σύνδεση ενός αγωνιστή με έναν ανασταλτικό υποδοχέα ακολουθείται από την δράση μιας πρωτεΐνης G_i (i=inhibitory, ανασταλτική), που ελαττώνει την παραγωγή c-AMP. Στη συνέχεια η αύξηση του c-AMP ενεργοποιεί μία πρωτεϊνική κινάση A (PKA), η οποία με την σειρά της φωσφορυλιώνει τους τύπου L διαύλους ασβεστίου με αποτέλεσμα μεγαλύτερη είσοδο ιόντων ασβεστίου ενδοκυτταρίως κατά την ενεργοποίησή τους από το δυναμικό ενεργείας.

Συμπερασματικά, όσον αφορά τους αδρενεργικούς υποδοχείς, αυτοί συνδέονται: οι μεν τύπου β με G_s , αυξάνοντας την παραγωγή c-AMP, οι τύπου α_2 με G_i , ελαττώνοντας την παραγωγή c-AMP και οι α_1 με G_q , που ακολουθείται από ενεργοποίηση της φωσφολιπάσης C.

Κατανομή των υποδοχέων – Δράσεις των κατεχολαμινών

Η νοραδρεναλίνη και η αδρεναλίνη, που εκκρίνονται από την μυελώδη μοίρα των επινεφριδίων, εμφανίζουν κάποιες διαφορές όσον αφορά την επίδρασή τους στους άλφα και στους βήτα υποδοχείς. Η νοραδρεναλίνη διεγείρει, κατά κύριο λόγο, τους άλφα υποδοχείς, αλλά διεγείρει και ως ένα μικρό βαθμό και τους βήτα υποδοχείς. Εξάλλου, η αδρεναλίνη διεγείρει και τους δύο αυτούς τύπους των υποδοχέων στον ίδιο περίπου βαθμό. Γι' αυτό το λόγο, η σχετική επίδραση της νοραδρεναλίνης και της αδρεναλίνης σε διάφορα εκτελεστικά όργανα καθορίζεται από τον τύπο των υποδοχέων που υπάρχουν σ' αυτά τα όργανα. Είναι προφανές ότι εάν όλοι οι υποδοχείς είναι βήτα υποδοχείς, η αδρεναλίνη θα είναι η περισσότερο αποτελεσματική διεγερτική ουσία.

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, η γενικευμένη εκφόρτιση του ΣΝΣ συμβαίνει συνήθως σε επείγουσες καταστάσεις και τα αποτελέσματά της είναι σημαντικά για την αντιμετώπισή τους. Έτσι, παρατηρείται χάλαση της προσαρμογής και μυδρίαση (επιτρέπει την είσοδο περισσότερου φωτός στον οφθαλμό), ταχυκαρδία και άνοδος της αρτηριακής πίεσης (καλύτερη αιμάτωση των μυών και των ζωτικών οργάνων), αγγειοσύσπαση των αγγείων του δέρματος (ελάττωση της αιμορραγίας και απώλειας θερμότητας), αύξηση της γλυκόζης και των λιπαρών οξέων (προσφορά ενέργειας). Εκτός αυτών οι αδρενεργικές ίνες επιτελούν και άλλες εξ' ίσου σημαντικές λειτουργίες. Χαρακτηριστικότερο παράδειγμα οι σταθερές και μικρού βαθμού εκφορτίσεις αδρενεργικών ινών προς τα αρτηριόλια, που συμβάλλουν στη διατήρηση σταθερής αρτηριακής πίεσης, ενώ με μεταβολές

αυτών των εκφορτίσεων επηρεάζεται με αρνητικό παλίνδρομο μηχανισμό μέσω των τασεοϋποδοχέων η ρύθμιση της αρτηριακής πίεσης σε διάφορες καταστάσεις.

Η νοραδρεναλίνη (NOR) και η αδρεναλίνη (ADR) αυξάνουν την συχνότητα και την ένταση της καρδιακής συστολής (β_1) υποδοχείς. Επίσης αυξάνουν την διεγερσιμότητα, προκαλούν έκτακτες συστολές και σε ορισμένες περιπτώσεις σοβαρές καρδιακές αρρυθμίες.

Η NOR προκαλεί αγγειοσύσπαση πρακτικά σε όλα τα όργανα (α_1 υποδοχείς) ενώ η ADR προκαλεί αγγειοδιαστολή στα αγγεία των μυών και στο ήπαρ (β_2 υποδοχείς), με αποτέλεσμα ελάττωση των ολικών περιφερικών αντιστάσεων. Μάλιστα νεώτερα πειραματικά δεδομένα αποδεικνύουν ότι η αγγειοδιασταλτική αυτή δράση των β_2 υποδοχέων εξαρτάται από την παραγωγή μονοξειδίου του αζώτου (NO) από το ενδοθήλιο³⁷⁹ ενώ παλαιότερα δεδομένα δείχνουν ελαττωμένη αγγειοδιαστολή της βραχιόνιας κυκλοφορίας στην έγχυση ισοπροτερενόλης³⁸⁰.

Η βραχεία έγχυση NOR ακολουθείται από αύξηση τόσο της συστολικής όσο και της διαστολικής αρτηριακής πίεσης. Αυτή η αύξηση της πίεσης διεγείρει τους καρωτιδικούς και αορτικούς τασεοϋποδοχείς με αποτέλεσμα αντανακλαστική βραδυκαρδία παρά την άμεση ταχυκαρδιακή δράση της NOR στην καρδιά. Έτσι η καρδιακή παροχή ελαττώνεται.

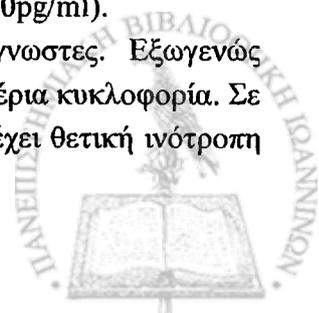
Η ADR προκαλεί διεύρυνση του εύρους παλμού, καθώς δε η διέγερση των τασεοϋποδοχέων είναι ανεπαρκής για να υπερνικήσει την άμεση δράση της στο μυοκάρδιο, προκαλείται ταχυκαρδία και αύξηση της καρδιακής παροχής.

Οι κατεχολαμίνες αυξάνουν την εγρήγορση, είναι δε ADR και NOR εξ' ίσου αποτελεσματικές. Στους ανθρώπους φαίνεται ότι η ADR επιτείνει άγχος και φόβο.

Οι δράσεις των κατεχολαμινών στα επίπεδα του σακχάρου στο αίμα είναι πολλαπλές. Κατ' αρχήν προκαλούν γλυκογονόλυση μέσω πολλαπλών μηχανισμών, όπως με τους β υποδοχείς και αύξηση του c-AMP, ενεργοποίηση της φωσφορυλάσης και τέλος μέσω των α υποδοχέων και αύξηση του ενδοκυττάριου ασβεστίου. Επιπλέον οι β υποδοχείς αυξάνουν και οι α υποδοχείς ελαττώνουν την έκκριση ινσουλίνης και γλουκαγόνου. Οι κατεχολαμίνες αυξάνουν τον μεταβολικό ρυθμό άμεσα και ανεξάρτητα από την ηπατική λειτουργία καθώς και καθυστερημένα σε σχέση με το ήπαρ και την αύξηση του γαλακτικού στο αίμα. Η αρχική αύξηση στηρίζεται στην άθικτη λειτουργία του θυρεοειδούς και του φλοιού των επινεφριδίων. Η αύξηση των κατεχολαμινών ακολουθείται από αρχική αύξηση του καλίου στο πλάσμα λόγω απελευθέρωσης από το ήπαρ και ακολουθείται από παρατεταμένη πτώση που οφείλεται σε είσοδό του στους γραμματούς μύες μέσω των β_2 υποδοχέων.

Η αύξηση της NOR και ADR στο πλάσμα που είναι απαραίτητη για να προκαλέσει τα ανωτέρω αποτελέσματα έχει προσδιοριστεί με την έγχυσή τους σε φυσιολογικά άτομα. Έτσι διαπιστώθηκε ότι απαιτείται αύξηση της NOR σε επίπεδα περίπου 5 φορές πάνω από τα φυσιολογικά, που σπάνια απαντούνται στις καθημερινές δραστηριότητες του ανθρώπου. Φαίνεται δε ότι η NOR ασκεί τις διάφορες δράσεις της κυρίως με την απελευθέρωση στην συναπτική σχισμή. Αντίθετα οι δράσεις της ADR είναι εμφανείς σε επίπεδα που συχνά επιτυγχάνονται στην καθημερινή πράξη. Η πρόκληση ταχυκαρδίας (50pg/ml), η αύξηση της συστολικής αρτηριακής πίεσης και η λιπόλυση (75pg/ml) επιτυγχάνεται με επίπεδα ADR 2-3 φορές υψηλότερα από τα φυσιολογικά. Η πρόκληση υπογλυκαιμίας, η αύξηση του γαλακτικού στο πλάσμα και η ελάττωση της διαστολικής αρτηριακής πίεσης παρατηρούνται με επίπεδα 5 φορές υψηλότερα από τα φυσιολογικά (150pg/ml). Η ελάττωση της έκκρισης ινσουλίνης με επίπεδα 10 φορές υψηλότερα από τα φυσιολογικά (400pg/ml).

Οι φυσιολογικές δράσεις της ντοπαμίνης στην κυκλοφορία είναι άγνωστες. Εξωγενώς χορηγούμενη ντοπαμίνη προκαλεί αγγειοδιαστολή στην νεφρική και στην μεσεντέρια κυκλοφορία. Σε άλλα αγγεία προκαλεί αγγειοσύσπαση πιθανόν λόγω απελευθέρωσης NOR και έχει θετική ινότροπη



δράση στην καρδιά μέσω των β₁ υποδοχέων. Συνολικά η ντοπαμίνη προκαλεί αύξηση της συστολικής αρτηριακής πίεσης χωρίς μεταβολή της διαστολικής με διατήρηση της νεφρικής αιμάτωσης και έτσι είναι παράγων χρήσιμος στη θεραπεία της καρδιογενούς και τραυματικής καταπληξίας.

Απευαισθητοποίηση των αδρενεργικών υποδοχέων (downregulation)

Απευαισθητοποίηση είναι η σταδιακή ελάττωση της λειτουργίας των υποδοχέων παρά την ύπαρξη ενός ερεθίσματος σε σταθερή ένταση.

Πολλοί παράγοντες ρυθμίζουν την έκφραση των αδρενεργικών υποδοχέων. Κατ' αρχήν διάφορες ορμόνες, όπως τα γλυκοκορτικοειδή και η θυροξίνη αυξάνουν την έκφραση των αδρενεργικών υποδοχέων.

Κλινικά σημαντικότερη είναι η ρύθμιση των υποδοχέων υπό την επίδραση αγωνιστών και ανταγωνιστών ουσιών των υποδοχέων. Παραδείγματα είναι η απευαισθητοποίηση των β-υποδοχέων στο βρογχικό άσθμα μετά την δράση αγωνιστών, η ταχυφυλαξία μετά α-αγωνιστές ως ρινικά αποσυμφορητικά και το σύνδρομο απόσυρσης μετά από απότομη διακοπή β-αποκλειστών.

Η απευαισθητοποίηση των αδρενεργικών υποδοχέων μετά τη δράση αγωνιστών περιλαμβάνει πολλά στάδια. Η σύνδεση ενός διεγέρτη με τον υποδοχέα προκαλεί μέσω αυξημένης φωσφορυλίωσης αύξηση στην μεταγραφή του mRNA του υποδοχέα με αποτέλεσμα αύξηση του αριθμού των υποδοχέων. Παρ' όλα αυτά ακολουθεί απευαισθητοποίηση των υποδοχέων καθώς ο αυξημένος αυτός αριθμός των αδρενεργικών υποδοχέων συγκεντρώνεται στο εσωτερικό του κυττάρου χωρίς να έρχεται σε άμεση επαφή με το εξωτερικό του κυττάρου.

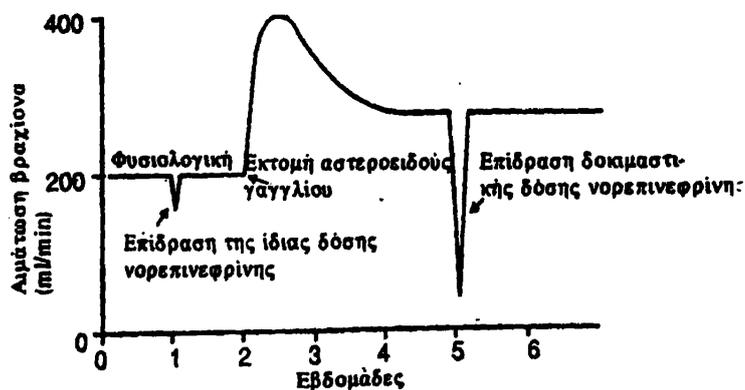
Η απευαισθητοποίηση των υποδοχέων επέρχεται ταχύτατα. Η πρώτη διαταραχή που ακολουθεί την παρατεταμένη σύνδεση αδρενεργικών αγωνιστών με τους υποδοχείς αφορά την παραγωγή του δεύτερου μεταβιβαστού. Η φωσφορυλίωση των β-υποδοχέων με την δράση δύο διαφορετικών κινασών, της PKA και της κινάσης των β υποδοχέων (β-ARK) ελαττώνει την ικανότητα των υποδοχέων να ενεργοποιούν την πρωτεΐνη Gs. Μάλιστα στο μυοκάρδιο ασθενών με καρδιακή ανεπάρκεια και διατασική μυοκαρδιοπάθεια, καταστάσεις που χαρακτηρίζονται από μεγάλη απευαισθητοποίηση των β-υποδοχέων, έχει βρεθεί αυξημένη ποσότητα β-ARK³⁸¹. Από τους δύο αυτούς μηχανισμούς η ύπαρξη υψηλών συγκεντρώσεων κατεχολαμινών προκαλεί ενεργοποίηση και των δύο κινασών (PKA και β-ARK), ενώ όταν η συγκέντρωση των κατεχολαμινών είναι χαμηλή, τον κυρίαρχο ρόλο παίζει η PKA. Επίσης μετά παρατεταμένη διέγερση των β υποδοχέων η αύξηση του c-AMP αυξάνει την παραγωγή της πρωτεΐνης Gi ενώ η πρωτεΐνη Gs παραμένει σταθερή. Τελικά ακολουθεί ελάττωση του αριθμού των υποδοχέων, γεγονός που απαιτεί μεγαλύτερη χρονική διάρκεια. Όταν η αυξημένη διέγερση παραταθεί, το mRNA του υποδοχέα ελαττώνεται, πιθανόν λόγω βράχυνσης της διάρκειας ημίσειας ζωής, με αποτέλεσμα την ελάττωση του αριθμού των β-υποδοχέων μετά παρατεταμένη διέγερσή τους. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η συμφορητική καρδιακή ανεπάρκεια, κατάσταση στην οποία παρατηρείται μακροχρόνια διέγερση του ΣΝΣ και αύξηση των κατεχολαμινών στο πλάσμα. Στο μυοκάρδιο των ασθενών παρατηρείται ελάττωση του αριθμού των β-υποδοχέων, κυρίως των β₁, ελάττωση της διέγερσης της αδενυλικής κυκλάσης από την ισοπροτερενόλη και ελαττωμένη συσταλτική απάντηση στις εξωγενείς κατεχολαμίνες³⁸². Η πυκνότητα των α υποδοχέων παραμένει αμετάβλητη ή αυξάνει.

Η υπερευαισθητοποίηση των οργάνων που νευρώνονται από το συμπαθητικό και το παρασυμπαθητικό μετά από απονεύρωσή τους (Υπερευαισθησία από απονεύρωση)

Σε αντίθεση με την απευαισθητοποίηση των αδρενεργικών υποδοχέων έρχεται το φαινόμενο της υπερευαισθησίας από απονεύρωση, όπου μετά την καταστροφή ενός συμπαθητικού είτε



παρασυμπαθητικού νεύρου, το νευρούμενο όργανο καθίσταται ολοένα και περισσότερο ευαίσθητο προς ενιέμενη επινεφρίνη είτε ακετυλχολίνη αντίστοιχα. Αυτό το φαινόμενο παριστάνεται στο παρακάτω σχήμα (Σχήμα 22) όπου φαίνεται η αιμάτωση του αντιβραχίου, πριν από την διακοπή της συμπαθητικής του νεύρωσης να είναι περίπου 200ml/min. Με μια δοκιμαστική δόση επινεφρίνης, ελάχιστη μόνο καταστολή αυτής της αιμάτωσης παρατηρείται. Στη συνέχεια, αφαιρείται το αστεροειδές γάγγλιο, με αποτέλεσμα την απώλεια του τόνου του συμπαθητικού. Στην αρχή, η αιμάτωση αυξάνεται σε σημαντικό βαθμό εξαιτίας της απώλειας του αγγειακού τόνου, αλλά μέσα σε χρονικό διάστημα ημερών ως εβδομάδων, η αιμάτωση αποκαθίσταται σχεδόν στο φυσιολογικό της επίπεδο, εξαιτίας της προοδευτικής αύξησης του ενδογενούς τόνου των ίδιων των λείων μυϊκών ινών του αγγειακού τοιχώματος, η οποία με αυτόν τον τρόπο αντισταθμίζει την απώλεια του τόνου του συμπαθητικού. Σ' αυτό το σημείο ενίεται και πάλι μια άλλη δοκιμαστική δόση νορεπινεφρίνης. Σ' αυτή την περίπτωση, η αιμάτωση ελαττώνεται πολύ περισσότερο σε σύγκριση με την προηγούμενη δόση, γεγονός που αποτελεί ένδειξη ότι τα αιμοφόρα αγγεία αποκρίνονται προς την νορεπινεφρίνη δύο ως τέσσερις φορές περισσότερο σε σύγκριση με την προηγούμενή τους κατάσταση. Αυτό το φαινόμενο ονομάζεται *υπερευαισθησία από απονεύρωση*. Αυτό το φαινόμενο παρατηρείται τόσο στα όργανα που νευρώνονται από το συμπαθητικό, όσο και σε εκείνα που νευρώνονται από το παρασυμπαθητικό και σε πολύ μεγαλύτερο βαθμό σε ορισμένα όργανα σε σύγκριση με άλλα. Συχνά η απάντηση προς τη χημική νευροδιαβιβαστική ουσία αυξάνεται μέχρι και στο δεκαπλάσιο περίπου. Το αίτιο της υπερευαισθησίας από απονεύρωση δεν είναι επακριβώς γνωστό. Κατά ένα μέρος, αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι ο αριθμός των υποδοχέων που βρίσκονται στην μετασυναπτική μεμβράνη των εκτελεστικών κυττάρων αυξάνεται - πολλές φορές στο πολλαπλάσιο - όταν η νορεπινεφρίνη είτε η ακετυλοχολίνη δεν απελευθερώνεται πια στις συνάψεις, διεργασία που χαρακτηρίζεται ως *υπερρύθμιση των υποδοχέων*. Γι' αυτό το λόγο, όταν αυτές οι ορμόνες ενίονται πρόσκαιρα προς το κυκλοφορούμενο αίμα, η απάντηση του εκτελεστικού οργάνου εμφανίζεται πολλαπλά ενισχυμένη³⁸³.

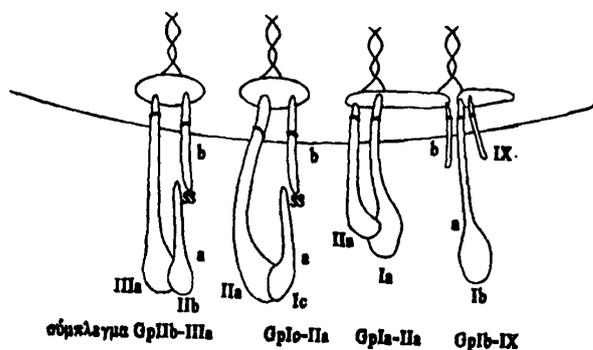


Σχήμα 22. Η επίδραση της συμπαθηκτομής στην αιμάτωση του βραχίονα, και η επίδραση μιας δοκιμαστικής δόσης νορεπινεφρίνης πριν και μετά τη συμπαθηκτομή. Φαίνεται η ευαισθητοποίηση των αγγείων προς τη νορεπινεφρίνη.



2. Κατεχολαμίνες και αιμοπετάλια

Οι δράσεις των αγωνιστών που αυξάνουν την συγκολλητικότητα των αιμοπεταλίων, όπως η αδρεναλίνη (επινεφρίνη), ADP, PAF, θρομβίνη, TXA_2 , κολλαγόνο, ασκούνται μέσω υποδοχέων στην κυτταρική μεμβράνη (Σχήμα 23).



Σχήμα 23. Σχηματική απεικόνιση των γλυκοπρωτεϊνικών συμπλεγμάτων της μεμβράνης των αιμοπεταλίων

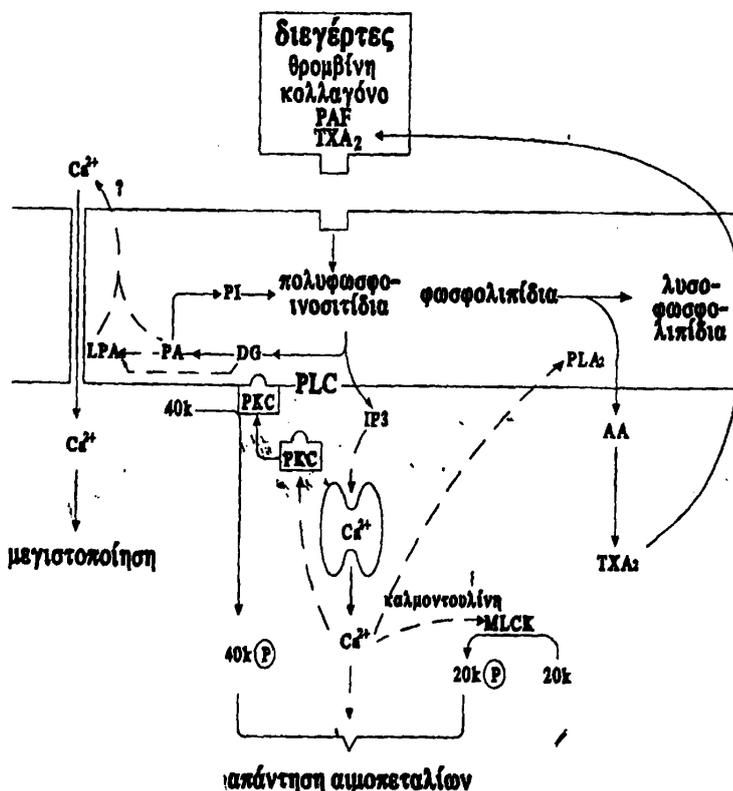
Οι κατεχολαμίνες μέσω των α_2 υποδοχέων αναστέλλουν την αδενυλική κυκλάση και προκαλούν ελάττωση του c-AMP. (Ελαττωμένα επίπεδα c-AMP εμφανίζονται και σε ασθενείς με σύνδρομο πανικού⁴⁷⁵). Οι υποδοχείς συνδέονται με G πρωτεΐνες που ενεργοποιούν την φωσφολιπάση C, με αποτέλεσμα την παραγωγή IP_3 και διακυλγλυκερόλης και τελικά αύξηση του ενδοκυττάρου ασβεστίου. Τελικό αποτέλεσμα είναι η έκφραση του υποδοχέα GPIIb-IIIa ⁴³², έκκριση του περιεχομένου των κοκκίων των αιμοπεταλίων και ενεργοποίηση της φωσφολιπάσης A_2 , με αποτέλεσμα την παραγωγή TXA_2 . Η άποψη περί δράσης των κατεχολαμινών στα αιμοπετάλια μέσω α_2 υποδοχέων ενισχύεται από πειραματικά δεδομένα που δείχνουν ότι ένας άλφα αδρενεργικός ανταγωνιστής, η φεντολαμίνη, αναστέλλει την αύξηση του ενδοκυττάρου Ca^{++} , η οποία προκαλείται από την αδρεναλίνη, ενώ ένας βήτα αδρενεργικός ανταγωνιστής, η προπρανολόλη, δεν έχει επίδραση στην ενδοαιμοπεταλιακή συγκέντρωση του Ca^{++} , που προκαλείται από την αδρεναλίνη³⁸⁴. Ανάλογα πειράματα έχουν γίνει και με έναν άλλον α_2 -αδρενεργικό ανταγωνιστή, την ιοχιμβίνη, η οποία ανέστειλε την αιμοπεταλιακή συσσώρευση που προκλήθηκε από την επινεφρίνη, ενώ η πρασοζίνη (α_1 -ανταγωνιστής) και η προπρανολόλη (β -ανταγωνιστής) δεν ανέστειλαν την αιμοπεταλιακή συσσώρευση από επινεφρίνη³⁸⁵. Ένας άλλος α_2 -ανταγωνιστής, η ατιπαμεζόλη, ανέστειλε επίσης την αιμοπεταλιακή συσσώρευση από επινεφρίνη, όντας μάλιστα και πιο ισχυρός από την ιοχιμβίνη³⁸⁶.

Οι ανταγωνιστές, η προστακυκλίνη και το NO, αναστέλλουν την συγκολλητικότητα των αιμοπεταλίων. Συγκεκριμένα η προστακυκλίνη αυξάνει την δραστηριότητα της γουανυλικής κυκλάσης και προκαλεί αύξηση του c-GMP ενώ το NO αυξάνει την δραστηριότητα της αδενυλικής κυκλάσης με αποτέλεσμα την αύξηση της παραγωγής c-AMP. Σχετικά με το NO και την δραστηριότητα των β_2 -αδρενεργικών υποδοχέων, οι Queen, Xu και συνεργάτες υποστηρίζουν ότι οι β_2 -αδρενεργικοί αγωνιστές, ενεργοποιούν την NO συνθάση, αυξάνοντας το c-AMP με ενεργοποίηση η οποία εξαρτάται από το Ca^{++} . Το γεγονός αυτό επηρεάζει την δραστηριότητα των αιμοπεταλίων ως

προς την προσκόλληση στο ενδοθήλιο των αγγείων, αλλά όχι ως προς την συσσώρευση³⁸⁷. Ακόμη, έχει αποδειχθεί ότι το ATP σε πειράματα *in vitro* προάγει την συσσώρευση που προκαλείται από επινεφρίνη και νορεπινεφρίνη αλλά όχι από σεροτονίνη⁴³⁰.

Οι αγωνιστές χρησιμοποιούν διπλή οδό ενεργοποίησης. Η πρώτη διαμέσου της οδού του αραχιδονικού οξέος και της θρομβοξάνης A_2 και η δεύτερη με άμεση δράση στον υποδοχέα. (Σχήμα 24). Έτσι η ασπιρίνη που αναστέλλει μόνο την οδό της θρομβοξάνης A_2 , δεν μπορεί να αναστείλει την δεύτερη οδό. Το αποτέλεσμα της δράσεως των ανωτέρω παραγόντων είναι η ελάττωση της παραγωγής του c-AMP και αύξηση της παραγωγής θρομβοξάνης A_2 . Η TXA_2 επιτείνει την αύξηση του ασβεστίου και την υδρόλυση της φωσφοτιδυλινোসιτόλης. Ανάλογη είναι και η δράση της θρομβίνης. Οι παράγοντες αυτοί επιταχύνουν την συγκόλληση και άλλων αιμοπεταλίων, ενώ συμβάλλουν στην παραγωγή θρομβίνης με τελικό αποτέλεσμα την παραγωγή του οριστικού θρόμβου ινικής. Η TXA_2 προκαλεί εκτός της ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων και αγγειοσύσπαση με τελικό αποτέλεσμα επίταση της στένωσης και της θρόμβωσης.

Η θρομβοξάνη A_2 μετά την απελευθέρωσή της δρα στους υποδοχείς της στην κυτταρική μεμβράνη των αιμοπεταλίων και προκαλεί την αντίδραση έκλυσης των αιμοπεταλίων με αποτέλεσμα επίταση της συγκόλλησης. Η έκκριση του περιεχομένου των α κοκκίων απαιτεί τη δράση χαμηλότερων πυκνοτήτων των αγωνιστών από ότι η έκκριση των πυκνών κοκκίων. Η έκκριση οφείλεται στην σύσπαση της περιφερικής ζώνης των μικροσωληναρίων. Επίσης η P-σελεκτίνη από τα κοκκία μεταφέρεται στην επιφάνεια των αιμοπεταλίων και διαδραματίζει ρόλο στην συγκόλλησή τους. Η θρομβίνη και το κολλαγόνο μπορεί να προκαλέσουν την αντίδραση έκλυσης χωρίς την συμμετοχή της TXA_2 . Με την παραγωγή θρομβίνης και τους ανωτέρω παράγοντες, η συνάθροιση των αιμοπεταλίων μετατρέπεται πλέον σε μια αυτοτροφοδοτούμενη αλυσίδα.



Σχήμα 24. Αντιδράσεις που εμπλέκονται στη λειτουργική απάντηση των αιμοπεταλίων. Ειδικοί αγωνιστές (όπως η θρομβίνη, το κολλαγόνο, ο PAF και η TXA_2) αντιδρούν με ειδικούς υποδοχείς τη μεμβράνης και οδηγούν στον καταβολισμό των πολυφωσφοϊνοσιτιδίων.



Εκτός των τοπικών παραγόντων που ευθύνονται για την πρόκληση θρόμβωσης, υπάρχουν πλέον αποδείξεις ότι πολλές καταστάσεις χαρακτηρίζονται από την ύπαρξη συστηματικής υπερπηκτικότητας ή θρομβογόνου διάθεσης. Ενδεικτικά αναφέρονται οι κατεχολαμίνες που προκαλούν διέγερση των αιμοπεταλίων και παραγωγή θρομβίνης. Πιθανόν δε η αυξημένη συχνότητα των ισχαιμικών επεισοδίων μετά από καταστάσεις stress ή ο κirkάρδιος ρυθμός εμφάνισής τους (αύξηση κατά τις πρωινές ώρες) να συνδέεται με την αύξηση των κατεχολαμινών που παρατηρείται στις καταστάσεις stress και κατά τις πρωινές ώρες³⁸⁸.

Η αυξημένη συγκολλητικότητα των αιμοπεταλίων - λόγω αλλαγής του σχήματος των υποδοχέων τους - που παρατηρείται στους καπνιστές μπορεί να ευθύνεται για την αυξημένη συχνότητα των ισχαιμικών επεισοδίων^{389,431}. Υπάρχει δε η πιθανότητα να σχετίζεται τόσο με την αύξηση των κατεχολαμινών στους καπνιστές³⁹⁰, όσο και με ελαττωμένη παραγωγή NO από τα αιμοπετάλια των καπνιστών³⁹¹.

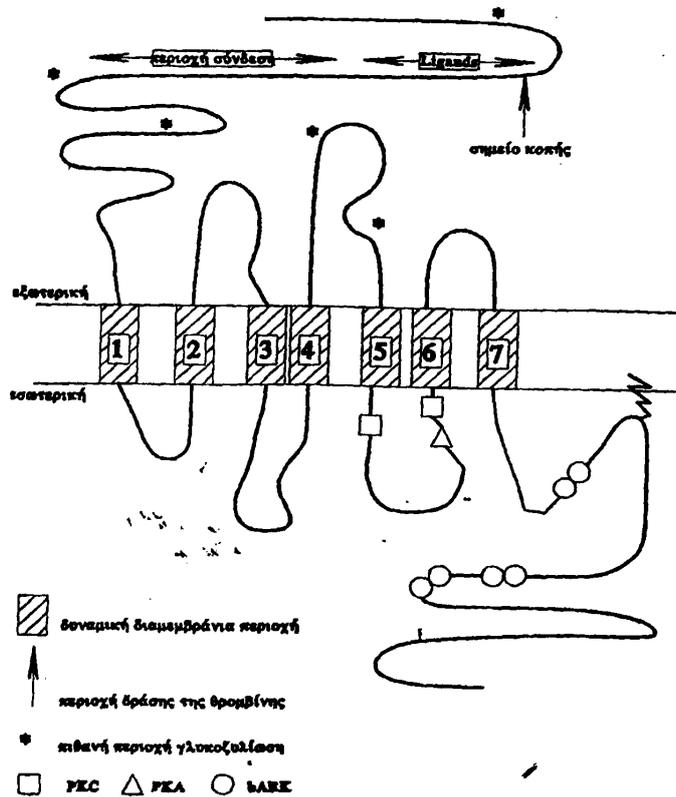
Ανάλογες μελέτες με αιμοπετάλια καπνιστών έχουν δείξει ότι η αυξημένη συγκολλητικότητά τους οφείλεται πιθανώς σε αυξημένη ευαισθησία των εν λόγω κυττάρων στην αδρεναλίνη³⁹², αλλά και σε ελαττωμένη ευαισθησία στο NO⁴⁵⁶.

Η αδρεναλίνη και η σεροτονίνη αποτελούν συγκριτικά ασθενέστερους αγωνιστές της συγκόλλησης των αιμοπεταλίων, παρουσία όμως και άλλων αγωνιστών ή ουσιών, όπως το λυσοφωσφατιδικό οξύ⁴⁷⁹, προκαλούν περαιτέρω επίταση της συγκόλλησης των αιμοπεταλίων, ενώ ουσίες όπως τα αντιδιουρητικά που αναστέλλουν την καρβονική ανυδράση ελαττώνουν τις δράσεις των κατεχολαμινών στα αιμοπετάλια⁴⁸⁰. Φαίνεται ότι το κολλαγόνο και η θρομβίνη (THR) αποτελούν τους κυριότερους και ισχυρότερους ενεργοποιητές της αιμοπεταλιακής συγκόλλησης. Πειραματικά δεδομένα δείχνουν ότι η αδρεναλίνη μέσω των α_2 αδρενεργικών υποδοχέων αυξάνει την συγκολλητικότητα των αιμοπεταλίων υπό συνθήκες υψηλής διατμητικής τάσης³⁹³. Το εύρημα πιθανόν να έχει κλινική σημασία για την δημιουργία θρόμβων σε στενωμένα στεφανιαία αγγεία, όπου παρατηρείται υψηλή διατμητική τάση, υπό συνθήκες διέγερσης του Σ.Ν.Σ.

Η αδρεναλίνη (ADR) δρα μέσω των α_2 υποδοχέων χωρίς ο τρόπος δράσης της να έχει διευκρινιστεί πλήρως. Είναι γνωστό όμως ότι εισάγει υδρόλυση των φωσφοϊνοσιτιδίων με έναν μηχανισμό ευαίσθητο στην ασπιρίνη, εξαρτημένο από την παραγωγή TXA₂. Οι υποδοχείς αυτοί δρουν ως μέλη ενός τριαδικού συστήματος μεταφοράς του μηνύματος στο εσωτερικό του αιμοπεταλίου. Το σύστημα αποτελείται από τον υποδοχέα, την G-πρωτεΐνη και το ένζυμο αποδέκτη. Αυτοί οι υποδοχείς έχουν χαρακτηριστική δομή στην οποία περιλαμβάνεται μια απλή πολυπεπτιδική αλυσίδα, η οποία με επτά περιοχές της διαπερνά την πλασματική μεμβράνη επτά φορές. Παράλληλα, υπάρχουν σειρές αμινοξέων που συνδέουν αυτές τις περιοχές προς την κυτταροπλασματική πλευρά (όπου βρίσκεται το C-τελικό άκρο της πεπτιδικής αλυσίδας), ή προς την εξωτερική πλευρά (όπου βρίσκεται το N-τελικό άκρο της αλυσίδας). Στους υποδοχείς αυτούς περιλαμβάνονται οι υποδοχείς της TXA₂, του PAF και της ADR. (Σχήμα 25). Η ADR προκαλεί αναστολή της αδενυλικής κυκλάσης και ελάττωση του c-AMP όπως επίσης και ενεργοποίηση υποδοχέων του ινωδογόνου, με αποκάλυψη των πλευρών σύνδεσης του ινωδογόνου με τους υποδοχείς του στην μεμβράνη των αιμοπεταλίων, με αποτέλεσμα να αυξάνει την λεγόμενη δευτεροπαθή συγκόλληση που εξαρτάται από την παραγωγή TXA₂ και αναστέλλεται από την ασπιρίνη. Άλλες ουσίες όμως που αναστέλλουν την αδενυλική κυκλάση δεν έχει βρεθεί να προκαλούν συγκόλληση των αιμοπεταλίων. Η ADR και η THR αναστέλλουν την σύνθεση του c-AMP και ενεργοποιούν την φωσφολιπάση-A₂, αλλά μόνο η θρομβίνη ενεργοποιεί άμεσα και την φωσφολιπάση-C ενεργοποιώντας τους υποδοχείς της θρομβοξάνης.



Φαίνεται ότι η διέγερση των α_2 -αδρενεργικών υποδοχέων στα αιμοπετάλια δεν επιδρά στην ενεργοποίηση της φωσφολιπάσης C, αλλά προκαλεί αύξηση του ενδοκυττάριου ασβεστίου³⁹⁴. Άλλοι πιθανοί μηχανισμοί είναι η αύξηση του ενδοκυττάριου ασβεστίου ή η ενεργοποίηση του αντιμεταφορέα Na^+-H^+ ³⁹⁵. Πειράματα με χλωροκίνη σε σχέση με διεγερμένα με αδρεναλίνη αιμοπετάλια, έδειξαν ότι η αιμοπεταλιακή συσσώρευση που προκλήθηκε από αδρεναλίνη αναστάληκε από την χλωροκίνη, η οποία ανέστειλε: 1) την είσοδο Ca^{++} στα αιμοπετάλια και 2) την ενεργοποίηση της φωσφολιπάσης A_2 ³⁹⁶. Πειραματικά δεδομένα δείχνουν ότι η αντίδραση απελευθέρωσης των αιμοπεταλίων με ήπιους διεγέρτες - όπως το ADP και η ADR - σε συνθήκες έλλειψης ιόντων Ca^{++} , παρουσιάζει παροδική αναστολή, ύστερα από την εμφάνιση του πρώτου κύματος της συσσώρευσης, όπως συμβαίνει και στην πλήρη δέσμευσή τους από τα κιτρικούχα αντιπηκτικά άλατα. Αντίθετα, σε φυσιολογική παρουσία Ca^{++} , η αναστολή απουσιάζει, οπότε πραγματοποιείται το δεύτερο κύμα της συσσώρευσης και η αντίδραση απελευθέρωσης με δοσοεξαρτώμενο τρόπο. Επίσης, έχει δείξει ότι οι ανασταλτές των ιόντων Ca^{++} (Nifedipine, Verapamil), αναστέλλουν πλήρως την συσσώρευση με PAF ή PAF και ADR. Φαίνεται ότι ο συνδυασμός PAF και ADR έχει μία συνεργική δράση που μεγιστοποιεί την αρχική απάντηση στον PAF, με δύο δρόμους: α) εξαρτημένο από την κυκλοξυγονάση και β) ανεξάρτητο από την κυκλοξυγονάση. Η ομάδα de Gaetano, με την χρησιμοποίηση ειδικών ανασταλτών της λιποξυγονάσης (BW755c) ταύτισε τον ανεξάρτητο από την κυκλοξυγονάση δρόμο, με αυτόν της λιποξυγενάσης, αφού ο συνδυασμός δεν υπερπηδούσε την αναστολή της BW755c. Επίσης, ο Μακρής και οι συνεργάτες του, προσδιορίζοντας προϊόντα μεταβολισμού του αραχιδονικού οξέος (AA) διά του δρόμου της λιποξυγονάσης, επιβεβαίωσαν τα ευρήματα της ομάδας του de Gaetano. Σύμφωνα μάλιστα με την άποψη των Dutilh et al, τα παράγωγα του AA με την λιποξυγονάση (12-HETE), αυξάνουν την συγκέντρωση του c-GMP, το οποίο και θεωρούν υπεύθυνο για την μη αναστρέψιμη συσσώρευση των αιμοπεταλίων. Επίσης, ο Fox (1987) έκανε γνωστό ότι η αυξημένη δίοδος Ca^{++} στα αιμοπετάλια διευκολύνεται από το GTP.



Σχήμα 25. Στο σχήμα αυτό παρουσιάζεται με σαφή τρόπο α) η σύνθεση του μορίου των G-πρωτεϊνών, με τις 7 περιοχές που διαπερνούν τη μεμβράνη των αιμοπεταλίων, και β) το σημείο όπου η θρομβίνη «κόβει» το N-τελικό άκρο της G-πρωτεΐνης και αποκαλύπτει τους υποδοχείς της.

Ο υποδοχέας GPIIb/IIIa λόγω της κεντρικής του θέσης στη συγκόλληση των αιμοπεταλίων απετέλεσε στόχο για την ανάπτυξη επιτυχούς και ισχυρής αντιαιμοπεταλιακής θεραπείας. Η αντιαιμοπεταλιακή δράση της τικλοπιδίνης στηρίζεται στην αναστολή της σύνδεσης του ινωδογόνου με τον υποδοχέα GPIIb/IIIa και αναστέλλει την συγκόλληση που προκαλείται από ADP^{397,398}.

Το 1987 αναπτύχθηκαν ειδικά μονοκλωνικά αντισώματα έναντι του υποδοχέα GPIIb/IIIa³⁹⁹ και στην συνέχεια μελετήθηκαν στην κλινική πράξη σε ασθενείς με οξεία στεφανιαία σύνδρομα^{400,485-490} καθώς και σε ασθενείς μετά από αγγειοπλαστική^{401,402}.

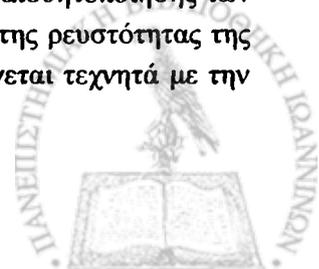
Μελετήθηκαν ακόμη πεπτιδικές ουσίες που συνδέονται άμεσα με τον υποδοχέα και προκαλούν αναστολή της συγκόλλησης των αιμοπεταλίων, όπως το Eptifibatide⁴⁰³ αλλά και μη πεπτιδικές ουσίες, όπως το Lamifiban⁴⁰⁴, το Tirofiban^{405,406,457}, το Roxifiban⁴⁸², το Abciximab⁴⁸⁴ και σε πειραματικό επίπεδο το SR121566A⁴⁸³. Πρόσφατα έχουν παρασκευαστεί ανάλογες ουσίες αποτελεσματικές μετά χορήγηση και από το στόμα⁴⁰⁷. Η χρήση τους στα οξεία ισχαιμικά επεισόδια συνοδεύεται από ενθαρρυντικά αποτελέσματα^{408,409}.

Απευαισθητοποίηση υποδοχέων

Τα αιμοπετάλια, όπως και άλλα κύτταρα “απευαισθητοποιούνται”, χάνουν δηλαδή την ικανότητα να απαντούν στους διεγέρτες ή ανασταλτές τους, και γίνονται λιγότερο “ευαίσθητα” στην επίδρασή τους. Αυτό διαπιστώνεται με προηγούμενη έκθεσή τους σε λιγότερο χρόνο και σε μικρότερη δόση στον συγκεκριμένο διεγέρτη ή ανασταλτή του κυττάρου. Πρόκειται για την τυπικά ομόλογη απευαισθητοποίηση, η οποία επηρεάζει μόνο την υπεύθυνη απάντηση προς τον συγκεκριμένο παράγοντα και εξαρτάται από την συνεχή ή μη κατάληψη του ειδικού επιφανειακού υποδοχέα της μεμβράνης από τον αγωνιστή του. Οι απαντήσεις σε άλλους αγωνιστές ή δεν επηρεάζονται ή δεν αυξάνονται. Εξαιρούνται οι περιπτώσεις που απευαισθητοποίηση εισάγεται από την σεροτονίνη, η οποία σε παρατεταμένη έκθεση γενικά ελαττώνει την απάντηση σε όλους τους άλλους διεγέρτες εκτός από την αδρεναλίνη. Η βάση για αυτό το τελευταίο αποτέλεσμα, ενώ δεν είναι ακόμη κατανοητή, είναι ανεξάρτητη από την συνεχιζόμενη κατάληψη των υποδοχέων της σεροτονίνης ή από την πρόσληψη αυτών των αμινών από τα αιμοπετάλια.

Για λίγους αγωνιστές, όπως η αδρεναλίνη και το ADP, η απευαισθητοποίηση φαίνεται να προέρχεται από εκλεκτική ελάττωση της πυκνότητας των υποδοχέων της μεμβράνης. Σε τέτοιες περιπτώσεις η απευαισθητοποίηση εξελίσσεται αργά, διαρκεί πολλές ώρες, ενώ η απομάκρυνση του αγωνιστή οδηγεί επίσης σε αργή απελευθέρωση ανάλογη με την απαντητικότητα και την πυκνότητα του υποδοχέα της μεμβράνης. Σύμφωνα με την άποψη αυτή, επειδή η ικανότητα των αιμοπεταλίων για de novo σύνθεση πρωτεΐνης είναι πολύ περιορισμένη, οι μεταβολές στην πυκνότητα των υποδοχέων της μεμβράνης είναι μονιμότερες. Εντούτοις, ο μηχανισμός με τον οποίο ένας αγωνιστής εισάγει κατάληψη των υποδοχέων, δεν είναι ακόμη σαφής.

Οι περισσότεροι διεγέρτες με την ταχεία απευαισθητοποίηση χάνουν την ικανότητα χαρακτηριστικών απαντήσεων. Αυτό εξηγείται από την αποδέσμευση των υποδοχέων από τους μηχανισμούς μεταφοράς του σήματος. Δεν είναι σαφές προς το παρόν αν η απευαισθητοποίηση παίζει κάποιο μείζονα ρόλο στην τροποποίηση της απαντητικότητας των αιμοπεταλίων *in vivo*. Εν τούτοις το φαινόμενο προσμετράται στην μεταφορά ελαττωμένων απαντήσεων, οι οποίες παρατηρούνται συχνά, όταν τα αιμοπετάλια απομονώνονται από το πλάσμα και ειδικά, όταν δεν παίρνονται προφυλάξεις, που να αποκλείουν τη λειτουργία έκκρισης. Οι ιδιότητες της απευαισθητοποίησης των αιμοπεταλίων θεωρούνται ειδικές σε άλλη σύνθεση της μεμβράνης. Ελάττωση της ρευστότητας της μεμβράνης των αιμοπεταλίων και της ικανότητας για απευαισθητοποίηση εισάγεται τεχνητά με την



επώασή της με χοληστερόλη, η οποία εισάγει επίσης και μία μη ειδική αύξηση της απαντητικότητας των αιμοπεταλίων¹.



ΣΚΟΠΟΣ

Δεδομένου ότι η συσσώρευση των αιμοπεταλίων αποτελεί μία από τις σημαντικότερες συνιστώσες της διαδικασίας της αιμόστασης, αλλά και βασική παράμετρο πολλών παθολογικών καταστάσεων, όταν δεν διενεργείται φυσιολογικά, πολλοί ερευνητές έχουν προσπαθήσει να διευκρινίσουν τους λεπτούς μηχανισμούς και τις μεταξύ αυτών σχέσεις, που συμβάλλουν στην συσσώρευση των αιμοπεταλίων.

Στα πλαίσια της έρευνας για την μελέτη των μηχανισμών αυτών έγινε έτσι γνωστό ότι οι κατεχολαμίνες παίζουν σημαντικό ρόλο στην αιμοπεταλιακή ενεργοποίηση και συσσώρευση.

Στην πορεία της έρευνας σχετικά με τις κατεχολαμίνες και τα αιμοπετάλια αποδείχθηκε ότι τα επίπεδα των κατεχολαμινών αυξάνονται στο αίμα κατά την διάρκεια stress, σωματικής άσκησης ή καπνίσματος, με αποτέλεσμα να αυξάνεται παράλληλα και η συγκολλητικότητα των αιμοπεταλίων, λόγω της δράσης των κατεχολαμινών σε αυτά. Εάν η δράση αυτή των κατεχολαμινών δεν ρυθμιστεί έγκαιρα, είναι πιθανό να παρατηρηθούν φαινόμενα αυθόρμητης αιμοπεταλιακής συσσώρευσης στο εσωτερικό των αγγείων κατά την διάρκεια της κατεχολαμινικής διέγερσης.

Περί τα μέσα της δεκαετίας του 1990, στο Εργαστήριο της Πειραματικής Φυσιολογίας του Ιατρικού Τμήματος του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, άρχισε μία μελέτη που στόχευε στην εξακρίβωση των πιθανών μηχανισμών που εμπλέκονται στην ρύθμιση της αιμοπεταλιακής συσσώρευσης που προκαλείται από διάφορους διεγέρτες των αιμοπεταλίων. Δεδομένου ότι η αιμοπεταλιακή διέγερση από φυσιολογικούς διεγέρτες παίζει σημαντικό ρόλο στην διαδικασία της δημιουργίας των θρόμβων, διατυπώθηκε η άποψη ότι είναι πιθανόν η σταδιακή απευαισθητοποίηση των αιμοπεταλίων στην δράση των διεγερτών αυτών να μην είναι ο μοναδικός ρυθμιστικός μηχανισμός της αιμοπεταλιακής συσσώρευσης. Για την ερμηνεία του φαινομένου της άμεσης ρύθμισης του βαθμού της αιμοπεταλιακής διέγερσης έγινε η υπόθεση ότι η συσσώρευση που προκαλείται από την επινεφρίνη και άλλους διεγέρτες των αιμοπεταλίων, πιθανόν να αυτορυθμίζεται άμεσα από προϊόντα μεταβολισμού των κατεχολαμινών στον ανθρώπινο οργανισμό, με έναν μηχανισμό αρνητικής παλίνδρομης ρύθμισης (negative feed-back mechanism).

Είναι επίσης γνωστό ότι ο καταβολισμός των κατεχολαμινών μέσω κυρίως της μονοαμινοξειδάσης (ΜΑΟ), οδηγεί στην παραγωγή δραστικών μορφών οξυγόνου (Ελευθέρων Ριζών Οξυγόνου), που συμβάλλουν στο οξειδωτικό stress. Περί τα τέλη της δεκαετίας του 1970 έγινε γνωστό από Γερμανούς ερευνητές ότι τα αιμοπετάλια είναι δυνατόν να ενεργοποιηθούν μέσω παραγωγής ελευθέρων ριζών οξυγόνου από εξωγενώς χορηγούμενα οξειδωτικά μέσα και σχεδόν ταυτόχρονα βρέθηκε ότι τα αιμοπετάλια παράγουν ελεύθερες ρίζες οξυγόνου. Αργότερα αποδείχθηκε ότι οι ελεύθερες ρίζες οξυγόνου στα αιμοπετάλια παράγονται κυρίως κατά τον μεταβολισμό του αραχιδονικού οξέος μέσω της λιποξυγονάσης και της κυκλοξυγονάσης. Κατά συνέπεια, η διαδικασία σύνθεσης των θρομβοξανίων στα αιμοπετάλια συσχετίζεται με την παραγωγή ελευθέρων ριζών οξυγόνου από τα συγκεκριμένα ενζυμικά συστήματα των εν λόγω κυττάρων.

Περί τα μέσα της δεκαετίας του 1980, στο Εργαστήριο της Πειραματικής Φυσιολογίας του Ιατρικού Τμήματος του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, άρχισε μία μελέτη που είχε σκοπό την εξακρίβωση των πιθανών μηχανισμών που διαθέτουν οι οργανισμοί των θηλαστικών για την ρύθμιση των δράσεων του PAF στο επίπεδο του αίματος, των αγγείων και της καρδιάς. Οι έρευνες αυτές κατέδειξαν ότι υπάρχουν ποικίλοι παράγοντες που μπορούν να αναστείλουν την συσσωρευτική δράση



του PAF στα αιμοπετάλια και ότι οι περισσότεροι ήσαν μόρια με κλασικές αντιοξειδωτικές ιδιότητες που μπορούσαν να λειτουργήσουν και ως εκκαθαριστές ελευθέρων ριζών οξυγόνου.

Οι μελέτες αυτές επεκτάθηκαν και στους τρεις δρόμους της αιμοπεταλιακής συσσώρευσης και τα αποτελέσματά τους έδειξαν ότι: α) Ουσίες που λειτουργούν ως εκκαθαριστές ελευθέρων ριζών (scavengers) μπορούσαν να αναστείλουν, *in vitro*, την συσσώρευση των αιμοπεταλίων την προκαλούμενη από αγωνιστές που ενεργοποιούν ξεχωριστά τους τρεις γνωστούς δρόμους συγκόλλησής τους, β) Ουσίες με ιδιότητες εκκαθαριστή ελευθέρων ριζών, εκτός από την αναστολή της συσσώρευσης, λειτουργούν και αποσυσσωρευτικά στα αιμοπετάλια, ακόμη και όταν η συσσώρευση έχει εισέλθει στη μη αναστρέψιμη φάση της, γ) Ορισμένες από τις ουσίες αυτές, που χρησιμοποιούνται και στην κλινική πράξη, όπως η βιταμίνη C και η τριμεταζιδίνη, λόγω της αποσυσσωρευτικής τους δράσης θα μπορούσαν να δοκιμαστούν ως πιθανά θρομβολυτικά και δ) Στους μηχανισμούς της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων οι ελεύθερες ρίζες παίζουν σημαντικό ρόλο τόσο για την πυροδότηση, όσο και τον έλεγχο των βιοχημικών αντιδράσεων, αποτελώντας πιθανώς τον κοινό μεσολαβητή των διαφορετικών οδών συσσώρευσης.

Με βάση τα παραπάνω, στην παρούσα μελέτη διερευνήθηκε ο πιθανός έλεγχος της δράσης της επινεφρίνης και άλλων αιμοπεταλιακών διεγερτών από μεταβολικά προϊόντα των κατεχολαμινών κατά την διαδικασία της αιμοπεταλιακής συσσώρευσης καθώς και ο ρόλος των ελευθέρων ριζών οξυγόνου στην εξέλιξη των ανωτέρω φαινομένων.

Παράλληλα μελετήθηκαν οι δράσεις του ασκορβικού οξέος και της τριμεταζιδίνης – γνωστών εκκαθαριστών ελευθέρων ριζών οξυγόνου – στην ρύθμιση της λειτουργικότητας των αιμοπεταλίων κατά την διάρκεια της αιμοπεταλιακής διέγερσης και συσσώρευσης.



ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**ΥΛΙΚΟ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ****1.1 Στατιστικά δείγματα**

α) Άνθρωποι: Για τα πειράματα αυτά ελήφθη αίμα από 28 υγιείς εθελοντές (18 άνδρες και 10 γυναίκες) ηλικίας μεταξύ 22 και 46 ετών. Η συμμετοχή τους στην όλη μελέτη υπήρξε αυθόρμητη και όχι αμειβόμενη, σύμφωνα με τις διατάξεις της συνδιάσκεψης του Ελσίνκι περί ανθρωπίνων δικαιωμάτων (1979). Οι εθελοντές ήταν μη καπνιστές, ελεύθεροι από ιστορικό βαρείας νόσου και δεν έκαναν χρήση φαρμακευτικών ουσιών για διάστημα 15 ημερών πριν από κάθε αιμοληψία.

Κατά την διάρκεια της συμμετοχής τους στην μελέτη υποβάλλοντο σε πλήρεις εργαστηριακούς ελέγχους αίματος και ούρων, καθώς και σε πλήρη κλινική εξέταση. Οι αντιδράσεις των αιμοπεταλίων τους δεν παρουσίασαν κάποια χαρακτηριστική ανωμαλία και υπήρξαν φυσιολογικές και σταθερές καθ' όλη την διάρκεια της μελέτης.

β) Πειραματόζωα: Για την εκτέλεση της ανά χείρας εργασίας χρησιμοποιήθηκαν 30 κουνέλια (15 άρρενα και 15 θήλεα) πολυφυλετικής προελεύσεως. Τα πειραματόζωα είχαν γεννηθεί σε κονικλοτροφείο και κατά την ένταξή τους στο εκτροφείο των πειραματόζωων του εργαστηρίου Φυσιολογίας είχαν υποβληθεί σε δύο πλήρεις κτηνιατρικούς ελέγχους και σε μηνιαία απομόνωση στους χώρους του εργαστηρίου.

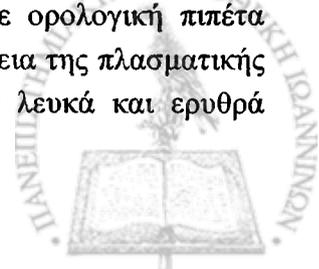
Κατά την διάρκεια της απομόνωσης υποβλήθησαν σε πλήρεις μικροβιολογικούς, αιματολογικούς και βιοχημικούς ελέγχους, οι οποίοι συνεχίστηκαν καθ' όλη την διάρκεια της μελέτης, ενώ μία εβδομάδα προ της λήξης της απομόνωσης υπεβλήθησαν σε προληπτικούς εμβολιασμούς. Οι αιμοληψίες από τα πειραματόζωα έγιναν μετά την ενηλικίωσή τους, όταν το σωματικό τους βάρος κυμαινόταν μεταξύ 3,5 και 5 χιλιογράμμων.

Κατά την διάρκεια της μελέτης τα ζώα δεν εμφάνισαν νόσους και οι αιμοπεταλιακές τους αντιδράσεις παρέμειναν σταθερές.

1.2 Αιμοληψίες – Απομόνωση αιμοπεταλίων

α) Άνθρωποι: Οι αιμοληψίες έγιναν από την μεσοβασιλική φλέβα, με χρήση κατάλληλης βελόνας (19G) και με ελεύθερη ροή από το στόμιο της βελόνας. Σε κάθε αιμοληψία λαμβάνονταν 40 ml αίματος σε δοκιμαστικό σωλήνα αποτελούμενο από αδρανή πλαστική ύλη, ώστε να μην διεγείρονται τα αιμοπετάλια και τα λευκά αιμοσφαίρια. Το χρησιμοποιούμενο αντιπηκτικό ήταν το κιτρικό τρινάτριο (διάλυμα 3% κ.β.) και σε αναλογία 1 ml διαλύματος αντιπηκτικού προς 9 ml αίματος (1:10). Ήπιες κυκλικές κινήσεις των σωλήνων γίνονταν, έτσι ώστε να αναμιχθεί καλά το αίμα με το αντιπηκτικό.

Στην συνέχεια, οι δοκιμαστικοί σωλήνες ετίθεντο σε υδατόλουτρο σταθερής θερμοκρασίας 37° C για 5 λεπτά και κατόπιν φυγοκεντρούντο στις 1.000 στροφές ανά λεπτό επί δέκα λεπτά, ώστε να καταπέσουν τα ερυθρά και τα λευκά αιμοσφαίρια και να διαχωριστεί το πλούσιο σε αιμοπετάλια πλάσμα (PRP). Εν συνεχεία το PRP αφαιρείτο προσεκτικά κατά τα 2/3 με ορολογική πιπέτα πλαστικού ρύγχους μέχρις ύψους λίγων χιλιοστών από την διαχωριστική επιφάνεια της πλασματικής και της ερυθράς στιβάδας κατά τρόπο τέτοιον ώστε να μην αναρροφηθούν λευκά και ερυθρά



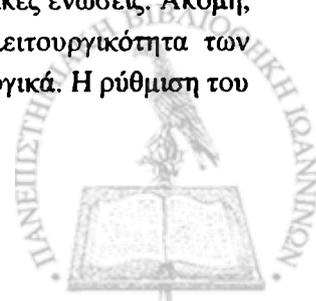
αιμοσφαίρια, τα οποία μπορούν να αλλοιώσουν σημαντικά την αντίδραση των αιμοπεταλίων, τόσο προς την πλευρά της διέγερσης όσο και προς την πλευρά της αναστολής τους.

Μετά τον διαχωρισμό, το πλούσιο σε αιμοπετάλια πλάσμα (σε πλαστικό δοκιμαστικό σωλήνα) τοποθετείτο σε υδατόλουτρο, ενώ το υπόλοιπο αίμα φυγοκεντρείτο εκ νέου στις 3.000 στροφές ανά λεπτό, επί δεκάλεπτο ώστε να καταπέσουν πλήρως τα λευκά αιμοσφαίρια και τα ερυθρά και να προκύψει το πτωχό σε αιμοπετάλια πλάσμα (PPP). Το PPP ελαμβάνετο προσεκτικά από τον σωλήνα ώστε να μην υπάρξει αναρρόφηση ερυθρών και λευκών αιμοσφαιρίων και φυλαγόταν επίσης εντός του υδατόλουτρου μέχρι την στιγμή της χρησιμοποίησής του.

β) Πειραματόζωα: Το αίμα των πειραματοζώων λαμβανόταν από τις ωτιαίες φλέβες - με κατάλληλη βελόνα - με ελεύθερη ροή και συλλεγόταν σε δοκιμαστικό σωλήνα από αδρανές πλαστικό υλικό. Για να διασταλούν οι φλέβες των πτερυγών των αυτιών χρησιμοποιείτο ξυλόλη και θέρμανση με αερόθερμο. Τα αυτιά των κουνελιών καθαριζόταν και απολυμνιόταν (αντιμικροβιακή αλοιφή Citatrex στην έσω και στην έξω επιφάνειά τους) πριν από την αιμοληψία ώστε να μην έχουμε τυχαίους ενοφθαλμισμού μικροβίων στο χρησιμοποιούμενο αίμα, διότι η μόλυνση με μικροβιακούς παράγοντες απευαισθητοποιεί τα αιμοπετάλια. Τα ζώα ακινητοποιούνταν σε κατάλληλη παγίδα και όλοι οι χειρισμοί της αιμοληψίας γίνονταν υπό άσηπτες συνθήκες. Κατά την λήψη του αίματος λαμβάνονταν δείγματά του για βιοχημικούς και αιματολογικούς ελέγχους. Σε κάθε πειραματόζωο γινόταν μία αιμοληψία το μήνα.

Η συνολική ποσότητα αίματος που λαμβανόταν σε κάθε αιμοληψία ήταν 40 ml. Το χρησιμοποιούμενο αντιπηκτικό ήταν ένα διάλυμα άλατος EDTA με Κάλιο ή Νάτριο (0,2%) σε αναλογία 1 ml αντιπηκτικού ανά 10 ml αίματος. Κατά την λήψη το αίμα αναδεύονταν με ήπιες κυκλικές κινήσεις του σωλήνα ενώ μετά το πέρας της αιμοληψίας ο σωλήνας τοποθετείτο σε υδατόλουτρο με σταθερή θερμοκρασία 37° C. Το αίμα παρέμενε στο υδατόλουτρο για 5 λεπτά και κατόπιν έμπαινε στην φυγόκεντρο για τον διαχωρισμό του πλούσιου σε αιμοπετάλια πλάσματος (PRP).

β1) Έκπλυση αιμοπεταλίων κουνελιού, μέτρηση, σταθεροποίηση του αριθμού τους: Για τα in vitro πειράματα στα οποία είχαμε ως μοντέλο συσσώρευσης τα πλυμένα αιμοπετάλια των κουνελιών, χρησιμοποιήσαμε δύο ρυθμιστικά διαλύματα. Ένα διάλυμα έκπλυσης (TG-EGTA) και ένα διάλυμα συσσώρευσης (TG-Ca). Η λογική της έκπλυσης των αιμοπεταλίων βασίζεται στο γεγονός πως με τον τρόπο αυτό απομακρύνονται όλες οι διαλυτές ουσίες του αιματικού πλάσματος, οι οποίες θα μπορούσαν να αλληλεπιδράσουν με τους δοκιμαζόμενους αγωνιστές και τους υπό δοκιμήν αναστολείς τους, έτσι ώστε να προκύψουν επικαλυπτόμενα φαινόμενα που θα μπορούσαν να οδηγήσουν σε εσφαλμένα συμπεράσματα και παρερμηνείες. Απομακρύνοντας όλους τους φυσιολογικούς διεγέρτες των αιμοπεταλίων και δίνοντας σ' αυτά ένα μέσο που εξασφαλίζει επί τινά χρόνο την επιβίωση και την καλή τους λειτουργικότητα μπορεί κανείς να ελέγξει την δράση μιας συγκεκριμένης ποσότητας ενός συγκεκριμένου παράγοντα ή ενός μίγματος παραγόντων των οποίων ζητείται η αλληλεπίδραση. Το πρώτο διάλυμα ή διάλυμα έκπλυσης (TG-EGTA buffer) που χρησιμοποιήσαμε είχε σαν σκοπό να απομακρύνει τα στοιχεία του αιματικού πλάσματος και να διατηρήσει ζωντανά και λειτουργικά τα αιμοπετάλια παρεμποδίζοντας την αυτόματη ενεργοποίησή τους κατά την διάρκεια των χειρισμών έκπλυσης και αναδιασποράς. Για την εξασφάλιση της συνθήκης αυτής το διάλυμα TG-EGTA δεν περιέχει ιόντα ασβεστίου, τα οποία παίζουν κεφαλαιώδη ρόλο στην συσσώρευση, ενώ περιέχει EGTA, ουσία που δεσμεύει το ιονισμένο ασβέστιο, σχηματίζοντας μαζί του χηλικές ενώσεις. Ακόμη, το pH του διαλύματος TG-EGTA ρυθμίζεται στο 6,5, τιμή στην οποία η λειτουργικότητα των αιμοπεταλίων είναι ιδιαίτερα χαμηλή, επειδή πολλά ένζυμά τους είναι υπολειπόμενα. Η ρύθμιση του



pH γίνεται με διαλύματα HCl και NaOH. Η σύνθεση του ρυθμιστικού διαλύματος έκπλυσης είναι η εξής: KCl 195 mg, MgCl₂·6H₂O 212,5 mg, NaCl 8 gr, NaHCO₃ 1,015 gr, Tris 0 gr, CaCl₂·2H₂O 0 gr, EGTA 1 ml διαλύματος 0,2 M (76,02 gr/L H₂O), Άνυδρη γλυκόζη 1 gr, Ζελατίνη 10% (25 ml), Νερό απεσταγμένο 800 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 buffer, υπό σταθερή ανάδευση. Το τελικό pH του TG-EGTA ρυθμίζεται την στιγμή της χρησιμοποίησής του.

Το δεύτερο χρησιμοποιούμενο διάλυμα ονομάζεται διάλυμα συσσώρευσης διότι αποτελεί το μέσον στο οποίο αναδιασπείρονται τα αιμοπετάλια προκειμένου να ενεργοποιηθούν στο συσσωρευμόμετρο και συμβολίζεται με την συντομογραφία TG-Ca. Το TG-Calcium έχει την ίδια οσμωτικότητα με το προηγούμενο διάλυμα, αλλά διαφέρει απ' αυτό στα εξής σημεία: 1) Περιέχει ιόντα ασβεστίου, 2) Δεν περιέχει NaHCO₃, 3) Δεν περιέχει EGTA, 4) Περιέχει Tris και 5) Το pH του ρυθμίζεται στο 7,4 δηλαδή σε μία τιμή όπου η αιμοπεταλιακή λειτουργία μπορεί να είναι άριστη. Η σύνθεση του διαλύματος αυτού είναι η εξής: KCl 195 mg, MgCl₂·6H₂O 212,5 mg, NaCl 8 gr, NaHCO₃ 0 gr, Tris 1,21 gr, CaCl₂·2H₂O 191 mg, EGTA 0 gr, Άνυδρη γλυκόζη 1 gr, Ζελατίνη 10% (25 ml), Νερό απεσταγμένο 800 ml, pH 7,4. Η ρύθμιση του pH γίνεται με μικρές ποσότητες HCl και NaOH. Τα δύο αυτά διαλύματα παρασκευάζονται με άσηπτο τρόπο διότι τα μικρόβια καταστρέφουν τα υποστρώματα που περιέχουν αλλά επίσης προξενούν και απευαισθητοποίηση των αιμοπεταλίων. Τα διαλύματα χωρίζονται σε ποσότητες 200 ml και αποθηκεύονται στον καταψύκτη στους -20 °C, όπου παραμένουν σταθερά για χρονικό διάστημα μεγαλύτερο του ενός έτους. Όταν πρόκειται να χρησιμοποιηθούν, θερμαίνονται σε υδατόλουτρο θερμοκρασίας 37 °C και ποτέ σε θερμοκρασίες μεγαλύτερες των 40 °C, οι οποίες μπορεί να επιφέρουν μεταβολές στα συστατικά τους. Παρασκευάζονται σε μεγάλες ποσότητες και αποθηκεύονται ώστε να μπορούν να χρησιμοποιηθούν ανάλογα με τις περιστάσεις.

Τα αιμοπετάλια του κουνελιού διαχωριζόμενα από το πλάσμα και εκπλυνόμενα, παρουσιάζουν μεγάλη ευαισθησία έναντι των διαφόρων αγωνιστών της αιμοπεταλιακής συσσώρευσης, αποτελώντας έτσι ένα αξιόπιστο και ακριβές υπόδειγμα για την έρευνα των διαδικασιών της θρόμβωσης. Τα πλυμένα αιμοπετάλια κουνελιού παρασκευάζονται ως ακολούθως: Μετά την λήψη του αίματος – που έγινε όπως περιγράφηκε προηγουμένως – ο δοκιμαστικός σωλήνας αφού εξέλθει από το υδατόλουτρο ανατρέπεται ήπια μερικές φορές ώστε να έχουμε μία καλή ανάμιξη του περιεχομένου του και τίθεται σε φυγοκέντρηση στις 1500 στροφές για 20 λεπτά. Μετά την φυγοκέντρηση λαμβάνεται με αυτόματη πιπέτα πλαστικού στομίου το υπερκείμενο πλάσμα κατά τρόπον ώστε να μην αναρροφώνται ερυθρά αιμοσφαίρια. Το πλάσμα αυτό έχει μεγάλη περιεκτικότητα σε αιμοπετάλια και λέγεται PRP (Platelet Rich Plasma), όπως και στην περίπτωση του ανθρώπινου αίματος. Το PRP τίθεται σε φυγοκέντρηση στις 3000 στροφές για 15 λεπτά, οπότε το μεγαλύτερο ποσοστό των αιμοπεταλίων κατακρημνίζεται στον πυθμένα του σωληναρίου σχηματίζοντας ένα λευκωπό στρώμα, ενώ το υπερκείμενο γίνεται αρκετά διαυγές και χρησιμοποιείται κατόπιν για την ρύθμιση του συσσωρευμόμετρον. Το πλάσμα αυτό έχει πολύ μικρή περιεκτικότητα σε αιμοπετάλια – λέγεται PPP (Platelet Poor Plasma) – μεταγγίζεται με πολλή προσοχή από τον σωλήνα ώστε να μην αποσπώνται τεμαχίδια από το λεπτό στρώμα των κατακρημνισθέντων αιμοπεταλίων. Μετά την απομάκρυνση του PPP τοποθετείται στον δοκιμαστικό σωλήνα 40ml από το διάλυμα έκπλυσης (TG-EGTA) του οποίου το pH έχει ρυθμιστεί στα 6,5 ώστε να μην ενεργοποιούνται τα αιμοπετάλια από τις τυχούσες μηχανικές και χημικές διαταραχές τις οποίες υφίστανται. Χρησιμοποιώντας την αυτόματη πιπέτα γίνεται μία σειρά διαδοχικών ήπιων αναρροφήσεων και εξωθήσεων του διαλύματος αυτού ώστε τα κατακρημνισθέντα αιμοπετάλια να αποκολληθούν από τον πυθμένα του σωλήνα και να

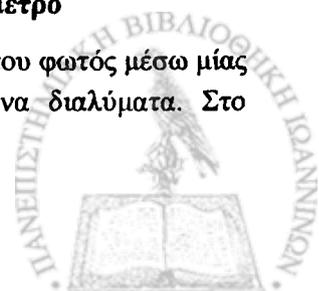
αναδιασπαρούν στο διάλυμα έκπλυσης που αντικαθιστά τώρα το πλάσμα. Μόλις διαπιστωθεί ότι όλα τα συσσωματώματα έχουν διαλυθεί και τα αιμοπετάλια βρίσκονται εν αιωρήσει, τότε συμπληρώνουμε με TG-EGTA μέχρι του ορίου των 40ml και γίνονται διαδοχικές ήπιες ανατροπές ώστε ακόμη και τα μη ορατά αιμοπεταλιακά συσσωματώματα να αποκολληθούν και να αποδώσουν τα αιμοπετάλια στο ελαιώρημα. Ακολουθεί ολιγόλεπτη επώαση και κατόπιν ανάδευση με ήπιες ανατροπές όπως και προηγουμένως. Στην συνέχεια ο δοκιμαστικός σωλήνας τίθεται ξανά σε φυγοκέντρηση στις 3000 στροφές για 15 λεπτά, οπότε και πάλι τα αιμοπετάλια κατακρημνίζονται σχηματίζοντας το γνωστό λευκωπό στρώμα στον πυθμένα του δοκιμαστικού σωλήνα. Το υπερκείμενο αφαιρείται προσεκτικά και η διαδικασία αναδιασποράς των θρομβοκυττάρων επαναλαμβάνεται όπως προηγουμένως χρησιμοποιώντας το διάλυμα έκπλυσης. Μετά την αναδιασπορά ο σωλήνας ξαναφυγοκεντρείται στις 3000 στροφές για 15 λεπτά, το υπερκείμενο αφαιρείται, προστίθεται ποσότητα διαλύματος έκπλυσης, ακολουθεί νέα αναδιασπορά και επαναπλήρωση του σωλήνα στα 40ml με TG-EGTA. Όταν τα αιμοπετάλια αποχωριστούν και βρεθούν σε πλήρη ελαιώρηση, πράγμα το οποίο ελέγχεται με το μάτι – τοποθετώντας τον σωλήνα ενάντια στο φως και ανακινώντας τον ελαφρά οπότε τα κύτταρα φαίνονται σαν “νέφη σκόνης” – τότε λαμβάνονται 20ml του ελαιωρήματος τα οποία τίθενται σε 380ml οξαλικού αμμωνίου 1% το οποίο έχει την ιδιότητα να καθιστά διπλοθλαστικά τα αιμοπετάλια ώστε να φαίνονται σαν “πέρλες” στο οπτικό πεδίο του μικροσκοπίου. Αφού το νέο αυτό ελαιώρημα ανακινηθεί καλώς με ήπιες κινήσεις και επωασθεί επί λίγα λεπτά, μία μικρή ποσότητά του χρησιμοποιείται για την επίστρωση μιας πλάκας Newbauer (αιμοκυτόμετρο) πάνω στην οποία έχει τοποθετηθεί καλυπτρίδα. Το αιμοκυτόμετρο με την επίστρωση μεταφέρεται σε τριβλίο, σκεπάζεται ώστε να είναι όσο το δυνατόν στεγανό και τίθεται σε χώρο σταθερής θερμοκρασίας, μακριά από δονήσεις και ρεύματα αέρα, ώστε τα αιμοπετάλια να αφεθούν να καθιζάνουν και να σταθεροποιηθούν πάνω στον σταυρό της πλάκας σε διάστημα μισής έως μίας 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 Abbé βρίσκεται στην κατώτερη θέση, χρησιμοποιώντας φακό μεγέθυνσης 40X. Μετριοούνται τα αιμοπετάλια πέντε μεσαίου μεγέθους τετραγώνων (80 μικρά τετράγωνα) του κεντρικού μεγάλου τετραγώνου του σταυρού του αιμοκυτομέτρου. 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 τυχόντα λευκοκύτταρα τόσο εξαιτίας του μεγέθους και του σχήματός τους, όσο και εκ της διπλοδιαθλαστικότητάς τους και δεν συγχέονται.

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

Η σταθεροποίηση του αριθμού των αιμοπεταλίων στο ελαιώρημα που θα χρησιμοποιηθεί για τις δοκιμασίες στο συσσωρευμόμετρο γίνεται ως εξής: Μετά την τελική φυγοκέντρηση στην διαδικασία της έκπλυσης τα αιμοπετάλια αναδιασπείρονται ξανά σε τόση ποσότητα διαλύματος έκπλυσης, ώστε να έχουμε συγκεκριμένο αριθμό αιμοπεταλίων ανά ml ελαιωρήματος. Η ποσότητα αυτή δίνεται από τον μαθηματικό τύπο: $X = 212.000 \times 4/N$, όπου N είναι ο αριθμός αιμοπεταλίων ανά ml αίματος και X είναι τα ζητούμενα ml του διαλύματος έκπλυσης. Το τελικό αυτό ελαιώρημα είναι το standard PRP που χρησιμοποιείται για τα πειράματα συσώρευσης στο συσσωρευμόμετρο.

1.3 Λειτουργικές δοκιμασίες συσώρευσης αιμοπεταλίων στο συσσωρευμόμετρο

Το συσσωρευμόμετρο είναι ένα φωτόμετρο που καταγράφει την διέλευση του φωτός μέσω μίας κυψελίδας στην οποία τοποθετούνται τα αιμοπετάλια μέσα σε συγκεκριμένα διαλύματα. Στο

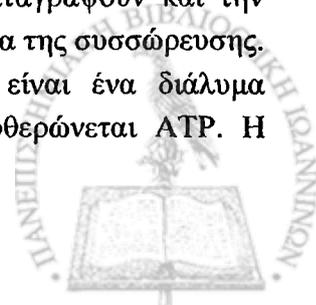


εσωτερικό της κυψελίδας τοποθετείται μικρός μαγνήτης με πλαστικό κάλυμα ή κάλυμα σιλίκονης. Αυτό συμβαίνει διότι ο σίδηρος, από τον οποίον είναι κατασκευασμένος ο μαγνήτης, είναι δυνατόν να προκαλέσει αλλοιώσεις στην συμπεριφορά των αιμοπεταλίων, όπως π.χ. την αυθόρμητη ενεργοποίησή τους απουσία αγωνιστών. Το κάτω μέρος της θέσης στην οποία τοποθετείται η κυψελίδα περιλαμβάνει μία ηλεκτρονικά θερμοστατούμενη αντίσταση η οποία λειτουργεί ως θερμαντικό σώμα και μας επιτρέπει να ρυθμίζουμε την θερμοκρασία στο εσωτερικό της κυψελίδας μεταξύ 36 και 40 βαθμών Κελσίου, ανάλογα με τις συνθήκες εκτέλεσης του πειράματος. Κατά κανόνα, η ελάττωση της θερμοκρασίας κάτω των 37°C μειώνει την αιμοπεταλιακή αντιδραστικότητα, ενώ η επαύξησή της μεταξύ 37 και 40°C την αυξάνει. Το κάτω μέρος της θέσης της κυψελίδας περιλαμβάνει εκτός του θερμαντικού σώματος και έναν αναδευτήρα, ο οποίος περιστρέφει τον μαγνήτη εντός της κυψελίδας με τέτοια συχνότητα ώστε επιβληθεί την αιμοπεταλιακή συσσώρευση, διότι απουσία ταχείας περιστροφικής κίνησης, τα αιμοπετάλια δεν μπορούν να σχηματίσουν ικανούς σε μέγεθος και ποσότητα λευκούς θρόμβους. Όταν τα αιμοπετάλια που έχουν τοποθετηθεί στο εσωτερικό της κυψελίδας δεν συσσωρεύονται, τότε η διέλευση του φωτός καταγράφεται στην οθόνη του υπολογιστή που είναι συνδεδεμένος με το συσσωρευμόμετρο ως ευθεία γραμμή. Αντιστοίχως, όταν τα αιμοπετάλια, λόγω συσσωρευτικού ερεθίσματος μεταβάλλουν σχήμα προσεκβάλλοντας ψευδοπόδια, τότε η οπτική πυκνότητα του μέσου μειώνεται με αποτέλεσμα στην οθόνη του υπολογιστή να καταγράφεται ένα μικρό κύμα που ονομάζεται κύμα μεταβολής σχήματος.

Αν το ερέθισμα υπερβαίνει το κατώφλι ενεργοποίησης, τότε τα αιμοπετάλια περιδινούμενα, αρχίζουν να συσσωρεύονται σχηματίζοντας μικρούς ορατούς θρόμβους. Το γεγονός αυτό καταγράφεται στην οθόνη ως κύμα συσσώρευσης α . Μέχρι του σταδίου αυτού η αιμοπεταλιακή συσσώρευση μπορεί να είναι και αντιστρεπτή. Αν όμως η ένταση του ερεθίσματος είναι αρκετά ισχυρή, τότε το κύμα α ακολουθείται από το κύμα β και τα αιμοπετάλια σχηματίζουν πλέον ευκρινέστερους και οργανωμένους λευκούς θρόμβους οι οποίοι περιδινούνται και γίνονται ορατοί μέσα στην κυψελίδα ως "νιφάδες χιονιού". Στο στάδιο αυτό η αιμοπεταλιακή συσσώρευση λαμβάνει μία μέγιστη τιμή η οποία δεικνύεται στην οθόνη από την διακοπή της ανόδου της γραμμής συσσώρευσης, η οποία έχει την εικόνα μιας πυκνά τεθλασμένης ευθείας γραμμής. Οι διακυμάνσεις της γραμμής είναι ενδεικτικές του μεγέθους των αιμοπεταλιακών θρόμβων.

Η ταχύτητα με την οποία συσσωρεύονται τα αιμοπετάλια, το τελικό ύψος της συσσώρευσης, οι διακυμάνσεις της τελικής γραμμής συσσώρευσης, η αναστροφή της γραμμής και η επάνοδος της σε χαμηλά επίπεδα ή ακόμη και στο επίπεδο έναρξης της ανόδου αποτελούν χρήσιμους διαγνωστικούς δείκτες της λειτουργικής κατάστασης των αιμοπεταλίων του εξεταζόμενου ατόμου και μας βοηθούν να εξατομικεύσουμε και να ρυθμίσουμε την ένταση με την οποία ασκούμε μία θεραπευτική αγωγή που επηρεάζει την αιμοπεταλιακή λειτουργικότητα ενός συγκεκριμένου ασθενούς. Οι λειτουργικές δοκιμασίες των αιμοπεταλίων απουσία του αιματικού πλάσματος ή παρουσία αυτού μπορούν να μας προσφέρουν χρήσιμες πληροφορίες για διαταραχές της πήξης και της θρομβόλυσης οφειλόμενες αντιστοίχως σε παράγοντες ενδογενείς του αιμοπεταλιακού κυττάρου ή σε παράγοντες αφορώντες το αιματικό περιβάλλον του.

Τα συσσωρευμόμετρα που χρησιμοποιήθηκαν για την μελέτη των αιμοπεταλιακών λειτουργιών στην ανα χείρας εργασία, ήταν τα μοντέλα: 1) PICA και 2) CA-500 της CHRONOLOG τα οποία εκτός από την συσσώρευση των αιμοπεταλίων έχουν την δυνατότητα να καταγράφουν και την ποσότητα του ATP που απελευθερώνεται από τα αιμοπετάλια κατά την διαδικασία της συσσώρευσης. Αυτό επιτυγχάνεται με την προσθήκη ειδικού αντιδραστήριου, το οποίο είναι ένα διάλυμα λουσιφερίνης-λουσιφεράσης, που φθορίζει όταν από τα αιμοπετάλια απελευθερώνεται ATP. Η



καταγραφή της απελευθέρωσης του ATP γίνεται μέσω ενός ειδικού καναλιού του συσσωρευμόμετρου, όπου με ειδικούς ενισχυτές σήματος η ένταση του φθορισμού πολλαπλασιάζεται και μετατρέπεται τελικά σε ηλεκτρικό σήμα που καταγράφεται στην οθόνη του υπολογιστή - ο οποίος είναι συνδεδεμένος με το συσσωρευμόμετρο με μία ηλεκτρονική διάταξη (Aggro/Link Interface) - ως μία καμπύλη γραμμή, ανάλογη των καμπυλών που καταγράφουν την συσσώρευση, αλλά με διαφορετικό χρώμα. Επίσης, στα εν λόγω συσσωρευμόμετρα υπάρχει η δυνατότητα καταγραφής της παρουσίας υπεροξειδίων. Οι συγκεντρώσεις στις οποίες οι αιμοπεταλιακοί αγωνιστές ευρέθησαν να επιτυγχάνουν μη αναστρέψιμη συσσώρευση ήταν για την επινεφρίνη $5 \pm 0,7 \mu\text{M}$, για το ADP $12 \pm 2 \mu\text{M}$, για το αραχιδονικό οξύ $0,7 \pm 0,2 \text{ mM}$, για τον PAF $40 \pm 5 \mu\text{g/ml}$ και για την θρομβίνη $1 \pm 0,2 \text{ units/ml}$. Η ποσότητα των διαλυμάτων των αγωνιστών και των ανταγωνιστών που προστιθόταν για κάθε μέτρηση στην κυβέττα του συσσωρευμόμετρου δεν ήταν μεγαλύτερη των 5μl. Η αναστολή της συσσώρευσης υπολογίστηκε ως ποσοστό % της μέγιστης μη αναστρέψιμης συσσώρευσης που προκαλούσαν οι αιμοπεταλιακοί διεγέρτες.

α) Μέθοδος πειραματισμού με πλυμένα αιμοπετάλια κουνελιού.

Οι λειτουργικές δοκιμασίες συσσώρευσης πλυμένων αιμοπεταλίων κουνελιού 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 θέλουμε να ελέγξουμε την συνολική αιμοπεταλιακή λειτουργικότητα τότε χρησιμοποιούμε αιμοπετάλια στα οποία δεν έχουμε προσθέσει κανέναν ειδικό ή γενικό αναστολέα ουδεμίας των τριών γνωστών δρόμων συσσώρευσης (ADP, PAF, Αραχιδονικού Οξέος). Αν οι στόχοι του πειράματος απαιτούν τον αποκλεισμό της οδού του ADP, τότε μέσα σε ποσότητα 50 περίπου ml διαλύματος συσσώρευσης θέτουμε 1ml διαλύματος Κρεατίνης-Φωσφοκινάσης της Κρεατίνης (CP/CPK). Αν θέλουμε να διακόψουμε την οδό του αραχιδονικού οξέος έχουμε ήδη μεριμνήσει κατά την έκπλυση των αιμοπεταλίων να ασπρινίσουμε το εναιώρημά τους, όπως ήδη έχει περιγραφεί ανωτέρω (έκπλυση αιμοπεταλίων κουνελιού, μέτρηση, σταθεροποίηση του αριθμού τους). Αν τέλος είναι αναγκαία η διακοπή της οδού του PAF, προσθέτουμε στην κυβέττα στην οποία έχουμε τοποθετήσει τα αιμοπετάλια, μία ποσότητα τιτλοποιημένου εκχυλίσματος του φυτού Gingo Biloba ώστε τα θρομβοκύτταρα να μην διεγείρονται καθόλου, ακόμη και από δόσεις PAF ίσες ή μεγαλύτερες από εκείνες που προκαλούν μέγιστη συσσώρευση ($>50\text{pg PAF}$). Το εκχύλισμα της Gingo Biloba περιέχει τους εκλεκτικούς αναστολείς του PAF BN-5021 και BN-5020 που αντιστοιχούν σε δύο τερπενοειδή σώματα. Η πρώτη ύλη του εκχυλίσματος χρησιμοποιείται για την παρασκευή του ενδοφλέβιου παρασκευάσματος Tebonin το οποίο χρησιμοποιείται ως φάρμακο βελτίωσης της μικροκυκλοφορίας.

Το συσσωρευμόμετρο ρυθμίζεται στις σταθερές συνθήκες λειτουργίας ως εξής: Εφ' όσον η θερμοκρασία της συσκευής φθάσει και σταθεροποιηθεί στους 37°C , τίθεται στην κυψελίδα 1) Ένας μικρός μαγνήτης επενδεδυμένος με πλαστικό ή εμβαπτισμένος σε σιλικόνη, 2) 400μl ρυθμιστικού διαλύματος συσσώρευσης και η κυψελίδα τοποθετείται στην ειδική για την ρύθμιση του συσσωρευμόμετρου θέση υποδοχής. Μετά την τοποθέτηση της κυψελίδας πατούμε το κουμπί του συσσωρευμόμετρου με την ένδειξη "base line", έτσι ώστε η θολερότητα του διαλύματος να αντιστοιχεί στο σημείο 0 της οθόνης του υπολογιστή. Με τον τρόπο αυτό καθορίζεται το σημείο από το οποίο θα αρχίσει η καμπύλη της συσσώρευσης στην οθόνη του υπολογιστή.

Αφού διαπιστώνεται ότι η ανάδευση του περιεχομένου της κυψελίδας γίνεται ομαλά, προχωρούμε στις δοκιμασίες της συσσώρευσης. Κάθε κυψελίδα παρασκευάζεται με 400μl διαλύματος



συσσώρευσης, μία συγκεκριμένη ποσότητα αγωνιστή και τοποθετείται στην σχισμή της συσκευής, οπότε ελέγχεται η καταγραφή στην οθόνη του υπολογιστή, όπου θα πρέπει η καμπύλη καταγραφής της συσσωρεύσης να ξεκινάει από το σημείο 0. Εφ' όσον η ανάδευση γίνεται χωρίς πρόβλημα και δεν υπάρχουν φυσαλίδες ή αιωρούμενα στερεά, τότε προστίθενται στο εσωτερικό της κυψελίδας 100μl του PRP μέσω αυτόματης πιπέτας και με ήπια εκκένωση. Αν τα αιμοπετάλια είναι λειτουργικά, τότε φυσιολογικά αρχίζει η συσσωρεύσή τους η οποία καταγράφεται στην οθόνη του υπολογιστή με την μορφή μίας σιγμοειδούς καμπύλης. Επαναλαμβάνοντας τις δοκιμές με διαδοχικά αυξανόμενες ποσότητες αγωνιστή, εξακριβώνεται η ποσότητα του τελευταίου η οποία επιφέρει την μέγιστη αιμοπεταλιακή συσσωρεύση στις συνθήκες του συσσωρευομέτρου.

Εφ' όσον διαπιστούται η επαναληψιμότητα των δοκιμών – η οποία κατά τακτά χρονικά διαστήματα επανελέγχεται με μετρήσεις ρύθμισης, διότι η λειτουργική κατάσταση των αιμοπεταλίων εκπίπτει συναρτήσει του χρόνου – τοποθετούνται στην κυψελίδα 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 συσσωρεύσης είναι όμοιες με εκείνες των αντίστοιχων μαρτύρων. Αντίθετα, αν η ουσία προκαλεί αναστολή της δράσης του αγωνιστή, τότε οι καμπύλες συσσωρεύσης είναι χαμηλότερες ή διαφορετικής μορφής ή λείπουν εντελώς. Αν τέλος η υπό εξέταση ουσία προκαλεί επίταση της δράσης του αγωνιστή, τότε το κύμα συσσωρεύσης γίνεται πιο υψηλό ή πιο απότομο από εκείνο του αντίστοιχου μάρτυρα.

β) Μέθοδοι πειραματισμού με αιμοπετάλια ανθρώπου *ex vivo*.

Στα *ex vivo* αιμοπετάλια ανθρώπου το πείραμα είναι απλούστερο διότι δεν χρησιμοποιούνται ρυθμιστικά διαλύματα παρά μόνο το αιμοπεταλιακό ελαιώρημα του αιματικού πλάσματος που απομονώθηκε όπως έχει ήδη περιγραφεί. Στα πειράματα που περιγράφονται χρησιμοποιήσαμε αγωνιστές τόσο τυποποιημένους όσο και παρασκευασμένους στο εργαστήριο της Πειραματικής και Κλινικής Φυσιολογίας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων. Για την εκτέλεση της κάθε δοκιμής θέτουμε στην κυψελίδα του συσσωρευομέτρου 450μl PPP και το ρυθμίζουμε πατώντας το κουμπί με την ένδειξη “base line”. Εφ' όσον το όργανο ρυθμιστεί και σταθεροποιηθεί, θέτουμε σε άλλη κυψελίδα 450μl PRP και συγκεκριμένη ποσότητα αγωνιστή και καταγράφουμε τις αιμοπεταλιακές αντιδράσεις του δείγματος ελέγχου. Κατόπιν επαναλαμβάνουμε τους ίδιους χειρισμούς και με την προσθήκη των υπό εξέταση ουσιών και προχωρούμε όπως και για τα πλυμένα αιμοπετάλια κουνελιού.

1.4 Μέτρηση Ελευθέρων Ριζών Οξυγόνου με την μέθοδο D-Roms test

Η μέθοδος D-Roms test (Determine Reactive Oxygen Metabolites)⁴¹⁰ βασίζεται στην ικανότητα μετάλλων που μεταβάλλουν το σθένος τους να καταλύουν παρουσία υπεροξειδίων τον σχηματισμό ελευθέρων ριζών (Αντίδραση Fenton), οι οποίες στην συνέχεια παγιδεύονται από μία αμίνη (N,N-diethyl-para-phenylendiamine)⁴¹¹. Η εν λόγω αμίνη έχει χαρακτηριστικά παγιδευτή ηλεκτρονικής ιδιοστροφορμής (spin trap) και όταν λαμβάνει ελεύθερες ρίζες ενώ γίνεται παραμαγνητικό μόριο, άρα ανιχνεύσιμο από το ESR (Φασματοσκοπία Συντονισμού Ηλεκτρονικής Ιδιοστροφορμής), ταυτοχρόνως αυξάνει και την οπτική της απορρόφηση στα 505 nm παράγοντας μία χρωμογόνο ρίζα η οποία ανιχνεύεται φωτομετρικά στα 505 nm μέσω μίας κινητικής αντίδρασης η οποία είναι γραμμική μέχρι τις 500 Units Carratelli (U-Carrs). 1 U-Carr αντιστοιχεί σε συγκέντρωση H₂O₂ 0,08 mg%⁴¹². Πρέπει να σημειωθεί ότι η ένταση του ESR σήματος και η μεταβολή του χρώματος έχουν πλήρη

αναλογία, οπότε η εν λόγω μέθοδος μεταφέρει σε μία δοκιμή προσπελάσιμη χρωματομετρικώς αυτό που συμβαίνει στην βαριά αναλυτική συσκευή του ESR με μεγάλη ακρίβεια. Η ίδια χρωμογόνος αντίδραση της αμίνης λαμβάνει χώρα όταν ένα μικρό ποσό μίγματος PRP-όξινου διαλύματος προστεθούν σε διάλυμα αμίνης. Η ένταση του χρώματος αντιστοιχεί στο ποσό ελευθέρων ριζών οξυγόνου που παράγονται στο προς εξέταση δείγμα. Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιούνται είναι το χρωμογόνο R1 (N,N-diethyl-para-phelylendiamine) και το R2 (ρυθμιστικό διάλυμα με pH 4,8).

Κατά την διάρκεια των πειραμάτων, 10μl PRP προστίθονταν σε 1ml R2 και το μίγμα αμέσως προστιθόταν σε 10 μl R1. Το δείγμα αναδεύονταν ήπια και επωαζόταν για 1 πρώτο λεπτό στους 37°C. Αμέσως μετά γινόταν φωτομέτρηση του δείγματος στα 505 nm με το ειδικό σπεκτροφωτόμετρο PHARMALAB d-Roms της εταιρείας Callegari, που δίνει το αποτέλεσμα σε U-Carrs. Η αρχή της φωτομέτρησης είναι η εξής: Γίνεται αρχικά μία μέτρηση και μετά από 1 πρώτο λεπτό γίνεται και δεύτερη φωτομέτρηση του δείγματος. Η διαφορά των δύο τιμών των φωτομετρήσεων (ΔA) υπολογίζεται και πολλαπλασιάζεται με μία σταθερά K (9000). Έτσι, το τελικό αποτέλεσμα προκύπτει από την εξίσωση: $\Delta A \times K = U-Carr$.

1.5 Προσδιορισμός της αντιοξειδωτικής ικανότητας των υπό μελέτη ουσιών με την μέθοδο TAS (Total Antioxidant Status)

Η μέθοδος Total Antioxidant Status σχεδιάστηκε για την εκτίμηση της συνολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας ενός διαλύματος που περιέχει έναν ή περισσότερους αντιοξειδωτικούς παράγοντες. Η μέθοδος, βιβλιογραφικά, δεν φαίνεται να έχει μία εκλεκτικότητα εφαρμογής σε λιποδιαλυτά ή υδατοδιαλυτά αντιοξειδωτικά και τα τεχνικά της φύλλα δείχνουν ότι μπορεί κάλλιστα να εφαρμοστεί σε όλα εκείνα τα διαλύματα στα οποία ένας αντιοξειδωτικός παράγοντας μπορεί να ευρίσκεται υπό μορφήν ομογενούς διαλύματος. Δεν είναι γνωστό αν η μέθοδος έχει ισχύ σε γαλακτώματα αλλά μπορούμε να υποθέσουμε ότι τα πολύ λεπτά κολλοειδή διαλύματα απαντούν καλά στην μέθοδο αυτή.

Η βασική αρχή της μεθόδου είναι η ακόλουθη: Το ABTS (2,2'-Azino-di-[3-ethylbenzthiazoline sulphonate]) είναι μία ουσία η οποία μπορεί να προσδώσει ηλεκτρόνια στον αμικό σίδηρο μίας μεταλλοπρωτεΐνης, της μεταμυοσφαιρίνης, και έτσι να προκαλέσει την αναγωγή της. Ταυτοχρόνως και το ABTS μετατρέπεται σε κατιονική ελεύθερη ρίζα η οποία είναι οπτικώς ενεργή και παρουσιάζει απορρόφηση στα 600 nm. Η ανάπτυξη του χρώματος του καρβοκατιόντος είναι ταχύτερη όταν οι αντιδράσεις της εκπομπής ηλεκτρονίων λαμβάνουν χώρα σε διαλύματα χωρίς αντιοξειδωτικά και χαρακτηρίζεται από μία συγκεκριμένη ταχύτητα εμφάνισης. Όταν όμως οι αντιδράσεις αυτές λαμβάνουν χώρα παρουσία ενός ή περισσότερων αντιοξειδωτικών παραγόντων, τότε η ανάπτυξη του χρώματος καθυστερεί τόσο περισσότερο χρόνο όσο μεγαλύτερη είναι η συγκέντρωση των αντιοξειδωτικών (διότι πρέπει πρώτα να οξειδωθούν τα αντιοξειδωτικά). Για να μπορέσει να εκκινήσει η αντίδραση απαιτείται προηγουμένως η επεξεργασία της μεταμυοσφαιρίνης με υπεροξείδιο του υδρογόνου, οπότε έχουμε οξείδωση του σιδήρου από τον αριθμό οξειδώσεως III στον αριθμό οξειδώσεως IV (Μεταμυοσφαιρίνη → Σιδηρυλμυοσφαιρίνη). Συνεπώς η μεταμυοσφαιρίνη λειτουργεί εδώ ως υπεροξειδάση⁴¹³⁻⁴¹⁵.

Στα πειράματα της παρούσης διατριβής χρησιμοποιήσαμε ως αντιοξειδωτικά διαλύματα τα διαλύματα της μετανεφρίνης, του βανυλ-αμυγδαλικού οξέος, της τριμεταζιδίνης, του ασκορβικού οξέος και της επινεφρίνης. Ως αντιοξειδωτικό διάλυμα αναφοράς για την αξιολόγηση της αντιοξειδωτικής ισχύος ενός προς μέτρηση διαλύματος χρησιμοποιείται το διάλυμα 6-υδροξυ-2,5,7,8-τετραμεθυλ-χρωμαν-2-καρβοξυλικό οξύ (TROLOX) το οποίο είναι μία τροποποιημένη μορφή τοκοφερόλης ώστε να είναι υδατοδιαλυτή.



1.6 Εκτίμηση της παραγωγής TXA_2 από αιμοπετάλια ανθρώπου *ex vivo* με μέθοδο RIA (Radio Immuno Assay)

Η θρομβοξάνη A_2 (TXA_2) αποτελεί έναν πολύ σημαντικό τελικό μεταβολίτη της αραχιδονικής οδού μέσω της δράσης του ενζύμου κυκλοξυγονάση⁴¹⁶, ο οποίος είναι υπεύθυνος για την πραγματοποίηση της αιμοπεταλιακής συσσώρευσης όπως επίσης και της αγγειοσύσπασης κατά την διάρκεια ενός αγγειακού τραυματισμού⁴¹⁷⁻⁴²¹. Δεδομένου ότι η TXA_2 καταβολίζεται ταχύτατα προς θρομβοξάνη B_2 (TXB_2), η οποία αποτελεί και ένα μόριο σταθερότερης δομής αλλά μηδενικής συσσωρευτικής και αγγειοσυσπαστικής ικανότητας^{423,424}, μετρήσαμε τα επίπεδα του μεταβολίτη TXB_2 της TXA_2 χρησιμοποιώντας ραδιοανοσολογική μέθοδο (RIA) - που βασίζεται στην αντίδραση αντιγόνου-αντισώματος - και η οποία έχει τυποποιηθεί σε αντίστοιχο ΚΙΤ: $\text{TXB}_2/2,3\text{-DINOR-TXB}_2[^{125}\text{I}]$ RIA ΚΙΤ, με κωδικό RK-17M της εταιρείας IZOTOP, INSTITUTE OF ISOTOPE Co. Ltd. Πρόκειται για ραδιοανοσολογική μέθοδο ανταγωνιστικού τύπου όπου η προς μέτρηση TXB_2 , η οποία παράγεται από τα αιμοπετάλια στο PRP, ανταγωνίζεται συγκεκριμένη ποσότητα ραδιοσημασμένης με ^{125}I TXB_2 για την κατάληψη ορισμένου αριθμού περιοχών σύνδεσης ειδικού αντισώματος έναντι της TXB_2 . Μετά από έκπλυση του συμπλέγματος αντιγόνου-αντισώματος, στον δοκιμαστικό σωλήνα παραμένει ποσότητα ραδιοσημασμένης TXB_2 που αντιστοιχεί στην ποσότητα της παραγόμενης από τα αιμοπετάλια TXB_2 , η οποία εκτόπισε την ραδιοσημασμένη TXB_2 από τις θέσεις σύνδεσης του ειδικού αντισώματος έναντι της TXB_2 .

Ο μεταβολίτης αυτός της TXA_2 μετρήθηκε στο PRP πριν την συσσώρευση και μετά από αυτήν παρουσία και απουσία του αντίστοιχου υπό μελέτη αιμοπεταλιακού αναστολέα. Σε κάθε δείγμα 450 μl PRP αμέσως μετά την παρέλευση 5 πρώτων λεπτών από την έναρξη της συσσώρευσης χορηγήσαμε 50 μl διαλύματος ινδομεθακίνης και BN 52021 – BN 52020 για την διακοπή της λειτουργίας των ενζύμων της αραχιδονικής οδού και της οδού του PAF. Τα δείγματα αναμίχθησαν με ισχυρή ανάδευση στο Vortex και κατόπιν φυγοκεντρήθηκαν στις 10000 στροφές/λεπτό επί 5 πρώτα λεπτά. Συλλέξαμε το υπερκείμενο και επεξεργαστήκαμε με εκχύλιση⁴²⁵ 400 μl από κάθε δείγμα μέσω διέλευσης της εν λόγω ποσότητας εκάστου δείγματος από στήλες κατάλληλες για την συγκράτηση λιποειδών θρομβοξανικού τύπου (Amprep ethyl C2 microcolumns). Τα λιποειδή παρελήφθησαν με έκπλυση από τις στήλες σε 5 ml Ethyl acetate το οποίο ξηράνθηκε σε ρεύμα αζώτου. Αναλυτικότερα, η διαδικασία της προετοιμασίας των δειγμάτων έχει ως εξής:

1. Έκπλυση κάθε στήλης με 2ml μεθανόλη και κατόπιν με 4ml απεσταγμένο νερό.
2. Φυγοκέντρωση δειγμάτων στις 3000 στροφές για 5 λεπτά (σε κρυοφυγόκεντρο στους 0°C).
3. Λήψη μίας ποσότητας από το υπερκείμενο του φυγοκεντρημένου δείγματος και οξίνισή του με 25μl αραιού HCl οξέος.
4. Αραιώση του οξινισμένου δείγματος με 4 όγκους νερού απεσταγμένου.
5. Τοποθέτηση του τελικού αυτού αραιωμένου δείγματος στην στήλη, ασκώντας μία ελαφρά πίεση ώστε να υπάρχει μία ροή περίπου 0,5 ml/min.
6. Έκπλυση της στήλης με 3ml νερό απεσταγμένο και απόρριψη του εκπλύματος.
7. Έκπλυση της στήλης με 3ml αιθανόλης 10% και απόρριψη του εκπλύματος.
8. Έκπλυση της στήλης με 3ml νερό απεσταγμένο και απόρριψη του εκπλύματος.
9. Έκπλυση της στήλης με 3ml εξανίου και απόρριψη του εκπλύματος.
10. Εφαρμογή 5ml ethyl-acetate στην στήλη και συγκεντρωση 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 ειδικά αντιδραστήρια του kit μετρήθηκε η ραδιενέργεια σε γ -camera και το αποτέλεσμα εξήχθη σε $\text{pg TXB}_2/\text{ml}$, της οποίας το ποσό αντιπροσωπεύει και την TXA_2 .

Τα ειδικά χαρακτηριστικά της μεθόδου ήταν:

α) Ειδικότητα

Thromboxane B_2 : 100 %

11-dehydrothromboxane: 3,4 %

Prostaglandin D_2 : 2,5 %

Prostaglandin E_2 : 0,3%

Prostaglandin F_{2a} : 0,4 %

Prostaglandin B_2 : 0,002 %

Prostaglandin A_2 : 0,01 %

11-epi-prostaglandin F_{2a} : 0,02 %

Prostaglandin E_1 : 0,1 %

Prostaglandin F_{1a} : 0,1 %

15-keto-prostaglandin E_2 : <0,01 %

13, 14-dihydro-15-keto-prostaglandin A_2 : <0,01 %

13, 14-dihydro-15-keto-prostaglandin D_2 : <0,01 %

13, 14-dihydro-15-keto-prostaglandin E_2 : <0,01 %

13, 14-dihydro-15-keto-prostaglandin F_{2a} : <0,01 %

β) Ευαισθησία

Η ευαισθησία της μεθόδου θεωρήθηκε αποδεκτή και ήταν περίπου 7,5 pg/ml .

γ) Ακρίβεια

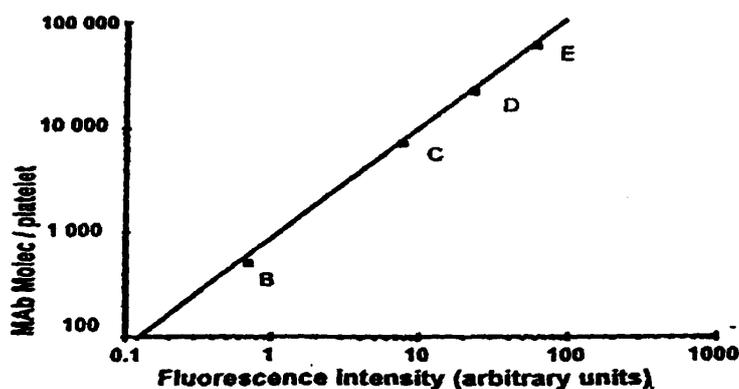
Οι συντελεστές μεταβλητότητας της μεθόδου - intra και inter coefficients of variation (CV) - ήταν αντίστοιχα 4,7 και 9,0 %.

1.7 Προσδιορισμός του αριθμού των υποδοχέων GP IIb-IIIa ανά αιμοπετάλιο μέσω κυτταρομετρίας ροής

Οι αιμοπεταλιακοί υποδοχείς προσδιορίστηκαν μέσω ανάλυσης διά κυτταρομετρίας ροής. Πρόκειται για αυτοματοποιημένη μέθοδο μέτρησης κυττάρων (ή γενικότερα σωματιδίων) 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 δέσμη LASER. Οι φυσικοχημικοί χαρακτήρες των κυττάρων ανιχνεύονται είτε ως το μέτρο της άμεσης αλληλεπίδρασης της φωτεινής δέσμης με αυτά (σκεδασμός) είτε ως αποτέλεσμα της επίδρασης του φωτός επί φθορίζουσών ουσιών, με τις οποίες έχουν σημειωθεί, ειδικά, συγκεκριμένα ενδοκυτταρικά ή εξωκυτταρικά μόρια. Η δυνατότητα ταυτόχρονου προσδιορισμού πολλαπλών παραμέτρων (πρόσθιος και πλάγιος σκεδασμός και δύο τουλάχιστον φθοριοχρώματα), κατά την απλή διέλευση 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 ταχύτητα δε, με την οποία επιτυγχάνονται οι προσδιορισμοί, επιτρέπει τον έλεγχο τεράστιου αριθμού κυττάρων και την ανίχνευση πολύ μικρών κυτταρικών πληθυσμών που ενδεχομένως εμπεριέχονται σε κάποιο εναιώρημα (ένα κύτταρο σε εναιώρημα 10^5 κυττάρων). Στην παρούσα εργασία, για τον προσδιορισμό του αριθμού των υποδοχέων GpIIb/IIIa, χρησιμοποιήθηκε το KIT ADIAflo Platelet Occurance, το οποίο είναι εξειδικευμένο για τον ποσοτικό προσδιορισμό GpIIb/IIIa του αιμοπεταλιακού υποδοχέα GpIIb/IIIa μέσω κυτταρομετρίας ροής⁴²⁶⁻⁴²⁸. Ο συνολικός αριθμός των αιμοπεταλιακών υποδοχέων GpIIb/IIIa προσδιορίζονται με την χρησιμοποίηση μονοκλωνικών αντισωμάτων (Mabs) έναντι του υποδοχέα GpIIb/IIIa, ανάλογα με την ένταση του φθορισμού που μετράται σε κυτταρομετρητή ροής και βάσει συγκεκριμένης καμπύλης (Σχήμα 28).

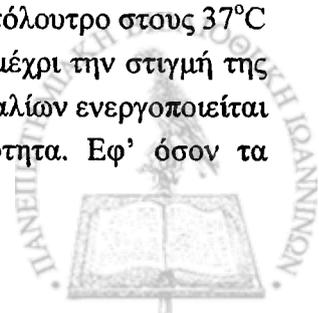


Σχήμα 28.

Το KIT περιλαμβάνει τα ακόλουθα αντιδραστήρια:

- Ένα συμπυκνωμένο ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (buffer) (αντιδραστήριο 1), το οποίο χρησιμοποιείται ως αραιωτικό μέσο για τα διαλύματα της δοκιμής και αραιώνεται 1:10 με διασπασταμένο ύδωρ πρό της χρήσης του,
- Ένα αντιδραστήριο αποτελούμενο από μονοκλωνικά αντισώματα μύδς, αποκλειστικώς τύπου IgG, το οποίο χρησιμοποιείται ως αρνητικός ισοτυπικός έλεγχος (αντιδραστήριο 2α),
- Ένα αντιδραστήριο αποτελούμενο από μονοκλωνικά αντισώματα μύδς εξειδικευμένα για την πρωτεΐνη GpIIIa Mab1 (CD 61) (αντιδραστήριο 2β),
- Ένα αντιδραστήριο αποτελούμενο από μονοκλωνικά αντισώματα μύδς εξειδικευμένα για την πρωτεΐνη GpIIIa Mab2 (CD 61) (αντιδραστήριο 2γ).
- Ένα αντιδραστήριο που περιέχει σφαιρίδια καλυμμένα με γνωστές ποσότητες ανοσοσφαιρινών IgG μύδς (αντιδραστήριο 3).
- 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. Πρίν από την χρήση και αμέσως μετά, μία μικρή ποσότητα αιμοπεταλίων ενεργοποιείται στο συσσωρευμόμετρο 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 ανοσοσήμευση των δειγμάτων και του μάρτυρα γίνεται ως εξής:

Σε έκαστο 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 έκαστο 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 καλυμένα με 4 γνωστές συγκεντώσεις IgG μύος, σε συνάρτηση με τις αντίστοιχες τιμές Mplx (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^{428,429}.

Οι τιμές εκφράστηκαν ως μέσες τιμές ± σταθερή απόκλιση.

Η στατιστική ανάλυση έγινε με το t-test.



ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

1) Αποτελέσματα πειραμάτων αιμοπεταλιακής συσσώρευσης

□ Στους πίνακες 1 έως 20 φαίνονται τα αποτελέσματα της εκατοστιαίας αναστολής της μέγιστης συσσώρευσης των αιμοπεταλίων του ανθρώπου, με διεγέρτες συσσώρευσης την επινεφρίνη (EPN), τον PAF, το ADP, το αραχιδονικό οξύ (ARA) και την θρομβίνη (THR), παρουσία διαφόρων συγκεντρώσεων μετανεφρίνης (MET), βανυλμανδελικού οξέος (VMA), ασκορβικού οξέος (ASC) και τριμεταζιδίνης (TMZ). Οι τιμές είναι οι μέσες τιμές συν-πλην (\pm) η σταθερή απόκλιση από 28 μετρήσεις για κάθε συγκέντρωση.

Τα αποτελέσματα εμφανίζονται επίσης παραστατικά στα αντίστοιχα διαγράμματα 1 έως 20 υπό τον τύπο ιστογράμματος.

□ Στα συσσωρευμογραφήματα 1 έως 5 φαίνεται η αναστολή που προκαλείται στην συσσώρευση των αιμοπεταλίων του ανθρώπου (με διεγέρτες συσσώρευσης την ADR, το ADP, τον PAF, το ARA και την THR) από τις ουσίες MET, VMA, ASC και TMZ σε συγκέντρωση 3×10^{-3} M.

□ Στους πίνακες 21 και 22 φαίνεται η επί τοις % συσσώρευση των αιμοπεταλίων του ανθρώπου (με διεγέρτες συσσώρευσης την ADR, το ADP, τον PAF, το ARA και την THR), καθώς επίσης και η επί τοις % συσσώρευση μετά από χορήγηση των ουσιών MET, VMA, ASC και TMZ σε συγκέντρωση 3×10^{-3} M για κάθε ουσία. Οι τιμές είναι οι μέσες τιμές συν-πλην (\pm) η σταθερή απόκλιση από 28 μετρήσεις για κάθε συγκέντρωση.

Τα αποτελέσματα εμφανίζονται επίσης παραστατικά στα αντίστοιχα διαγράμματα 21 και 22 υπό τον τύπο ιστογράμματος.

□ Στον πίνακα 22* φαίνονται οι συγκεντρώσεις των ουσιών MET, VMA, ASC και TMZ που προκαλούν 50% αναστολή της μέγιστης συσσώρευσης (IC 50) που προκαλείται από τους αιμοπεταλιακούς διεγέρτες EPN, ADP, THR, ARA και PAF.

Τα αποτελέσματα εμφανίζονται επίσης παραστατικά στο διάγραμμα 22* υπό τον τύπο ιστογράμματος.

□ Στα διαγράμματα 22α, 22β, 22γ και 22δ φαίνεται η αναστολή της συσσώρευσης (%) πλυμένων αιμοπεταλίων κουνελιού (wRP) διεγερόμενων από ADR και αναστειλόμενων από διαδοχικά αυξανόμενες συγκεντρώσεις MET, VMA, ASC και TMZ.

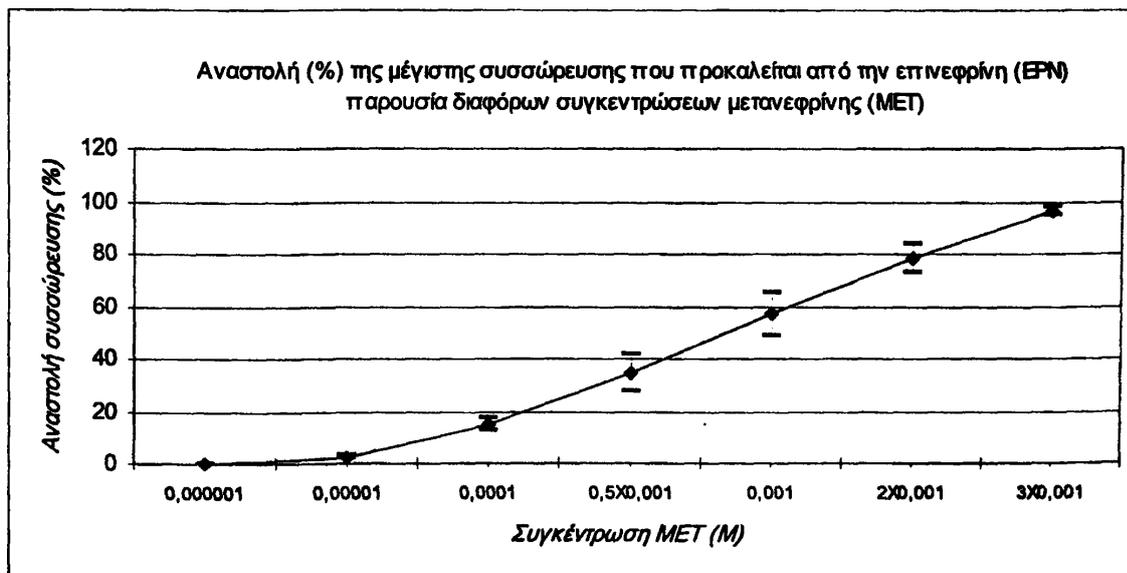


Πίνακας 1

Αναστολή (%) της μέγιστης συσσώρευσης που προκαλείται από την επινεφρίνη (EPN) παρουσία διαφόρων συγκεντρώσεων μετανεφρίνης (MET)
(ΜΤ±ΣΑ από 28 μετρήσεις για κάθε συγκέντρωση)

Συγκέντρωση	Αναστολή συσσώρευσης (%)
0,000001	0
0,00001	2±1
0,0001	15±3
0,5Χ0,001	35±7
0,001	57±8
2Χ0,001	78±6
3Χ0,001	96±2 (p<0,001)

Διάγραμμα 1

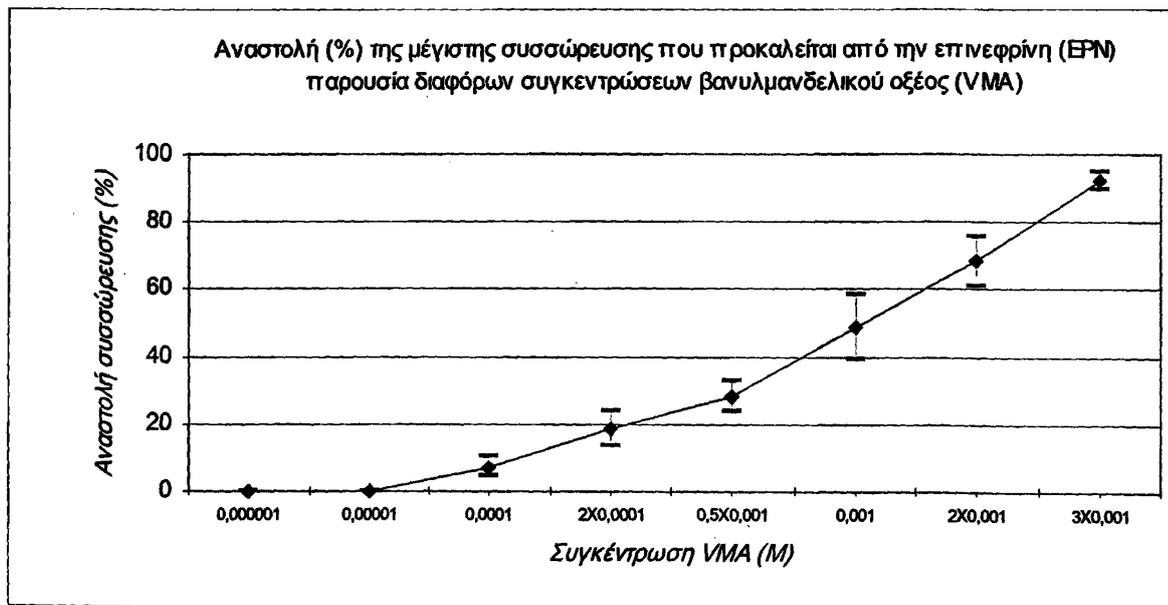


Πίνακας 2

Αναστολή (%) της μέγιστης συσσώρευσης που προκαλείται από την επινεφρίνη (EPN) παρουσία διαφόρων συγκεντρώσεων βανυλ-μανδελικού οξέος (VMA)
(ΜΤ±ΣΑ από 28 μετρήσεις για κάθε συγκέντρωση)

Συγκέντρωση VMA (M)	Αναστολή συσσώρευσης (%)
0,000001	0
0,00001	0
0,0001	7±3
2Χ0,0001	19±5
0,5Χ0,001	28±5
0,001	48±9
2Χ0,001	68±7
3Χ0,001	92±3 (p<0,001)

Διάγραμμα 2

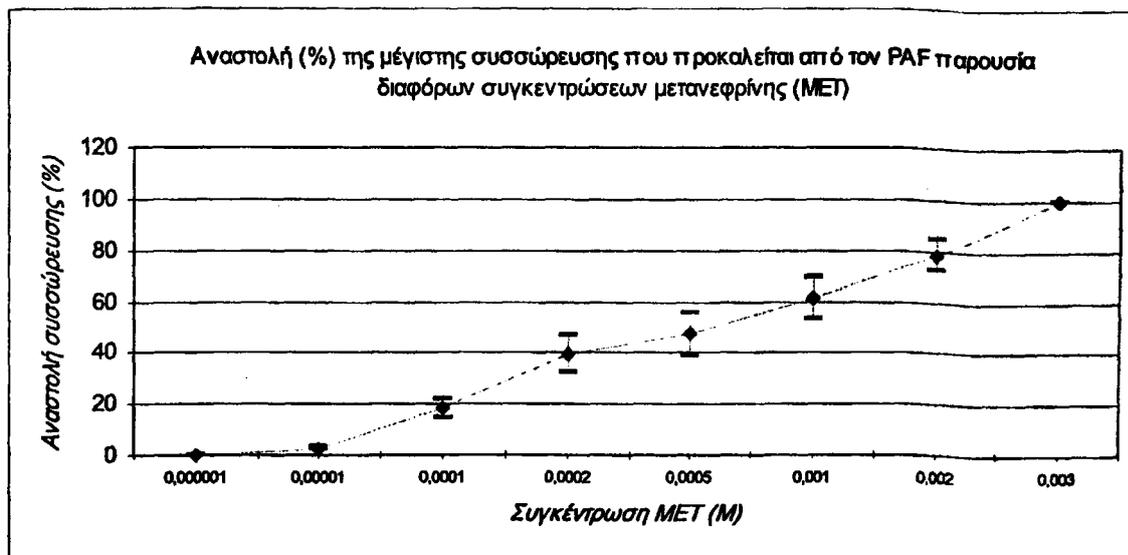


Πίνακας 3

Αναστολή (%) της μέγιστης συσσώρευσης που προκαλείται από τον PAF παρουσία διαφόρων συγκεντρώσεων μετανεφρίνης (MET)
(ΜΤ±ΣΑ από 28 μετρήσεις για κάθε συγκέντρωση)

Συγκέντρωση MET (M)	Αναστολή συσσώρευσης (%)
0,000001	0
0,00001	2±1
0,0001	18±4
2Χ0,0001	40±7
0,5Χ0,001	47±9
0,001	61±8
2Χ0,001	79±6
3Χ0,001	100 (p<0,001)

Διάγραμμα 3

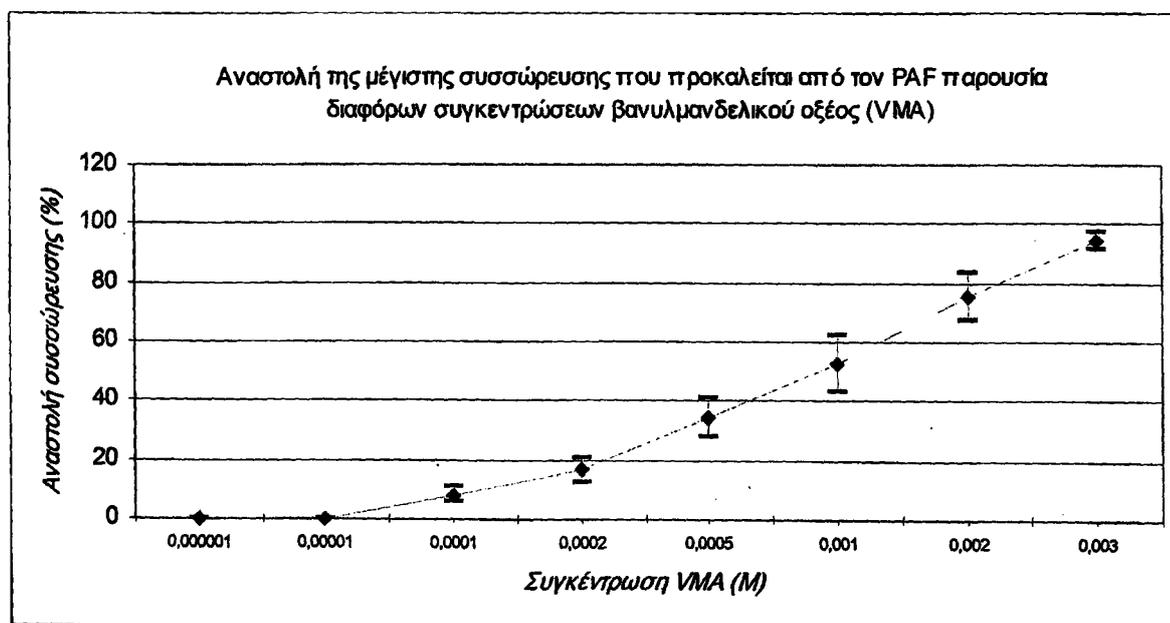


Πίνακας 4

Αναστολή (%) της μέγιστης συσσώρευσης που προκαλείται από τον PAF παρουσία διαφόρων συγκεντρώσεων βανυλ-μανδελικού οξέος (VMA)
(ΜΤ±ΣΑ από 28 μετρήσεις για κάθε συγκέντρωση)

Συγκέντρωση VMA (M)	Αναστολή συσσώρευσης (%)
0,000001	0
0,00001	0
0,0001	9±2
2Χ0,0001	17±4
0,5Χ0,001	34±7
0,001	53±9
2Χ0,001	76±8
3Χ0,001	95±3 (p<0,001)

Διάγραμμα 4

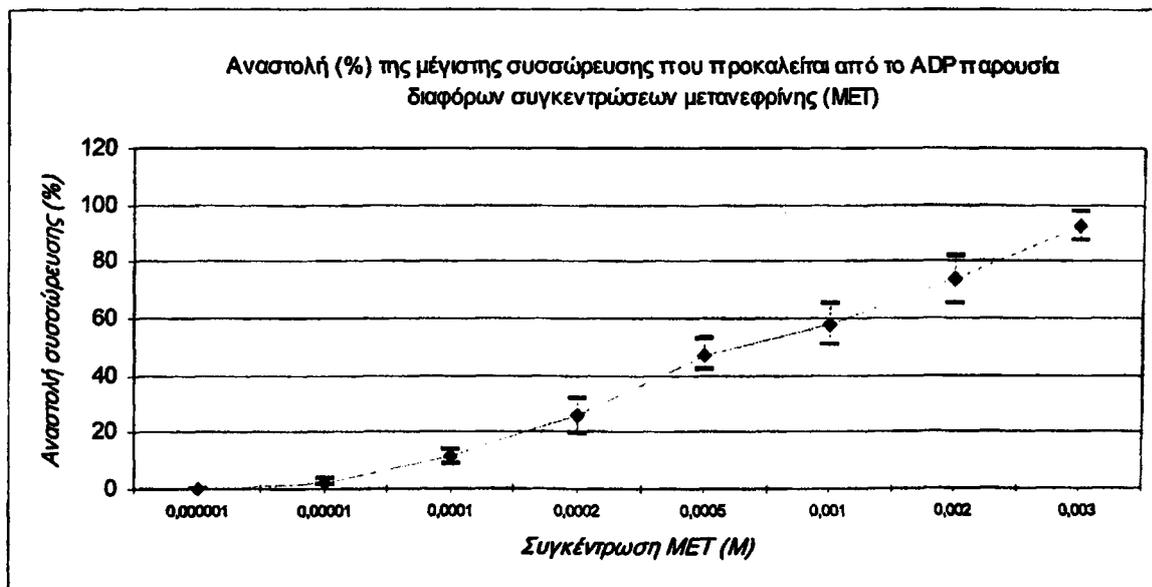


Πίνακας 5

*Αναστολή (%) της μέγιστης συσσώρευσης που προκαλείται από το ADP παρουσία διαφόρων συγκεντρώσεων μετανεφρίνης (MET)
(ΜΤ±ΣΑ από 28 μετρήσεις για κάθε συγκέντρωση)*

Συγκέντρωση MET (M)	Αναστολή συσσώρευσης (%)
0,000001	0
0,00001	2±1
0,0001	11±3
2X0,0001	26±6
0,5X0,001	47±6
0,001	58±7
2X0,001	74±8
3X0,001	92±5 (p<0,001)

Διάγραμμα 5

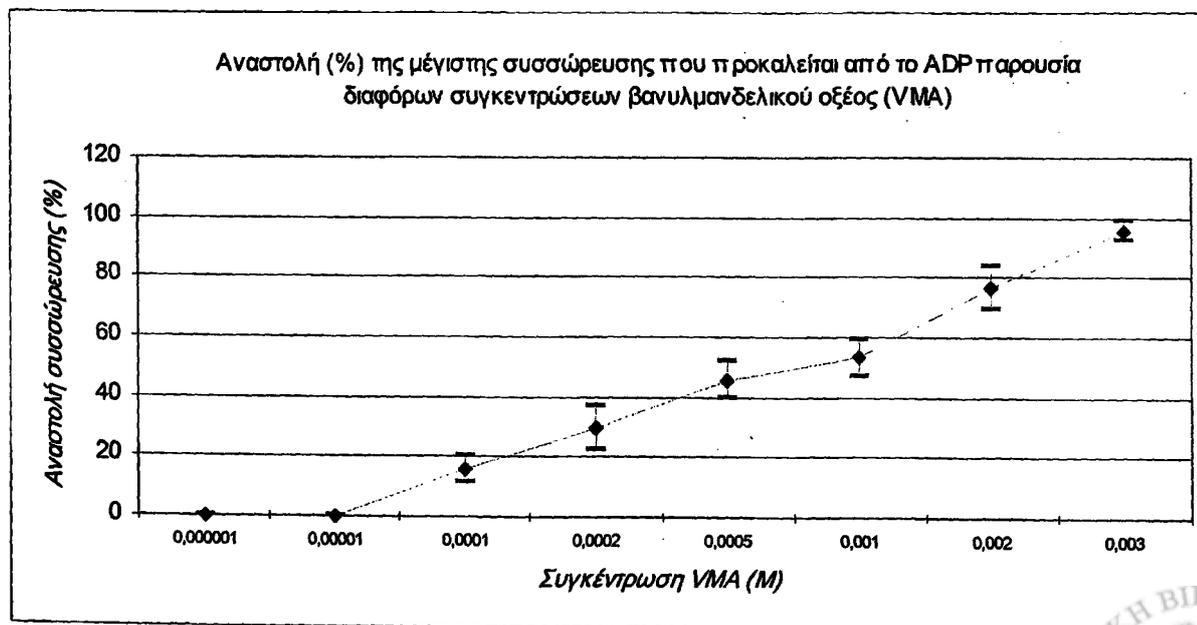


Πίνακας 6

Αναστολή (%) της μέγιστης συσσώρευσης που προκαλείται από το ADP παρουσία διαφόρων συγκεντρώσεων βανυλ-μανδελικού οξέος (VMA)
(ΜΤ±ΣΑ από 28 μετρήσεις για κάθε συγκέντρωση)

Συγκέντρωση VMA (M)	Αναστολή συσσώρευσης (%)
0,000001	0
0,00001	0
0,0001	16±4
2Χ0,0001	30±7
0,5Χ0,001	46±6
0,001	53±6
2Χ0,001	77±7
3Χ0,001	96±3 (p<0,001)

Διάγραμμα 6

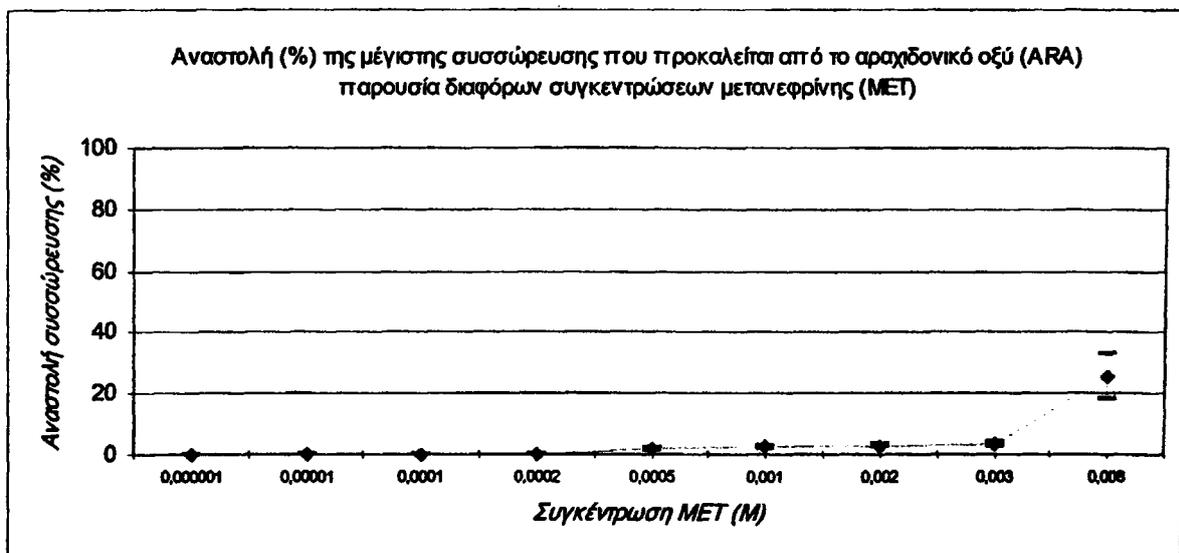


Πίνακας 7

Αναστολή (%) της μέγιστης συσσώρευσης που προκαλείται από το Αραχιδονικό Οξύ (AA)
 παρουσία διαφόρων συγκεντρώσεων μετανεφρίνης (MET)
 (MT±ΣΑ από 28 μετρήσεις για κάθε συγκέντρωση)

Συγκέντρωση MET (M)	Αναστολή συσσώρευσης (%)
0,000001	0
0,00001	0
0,0001	0
2Χ0,0001	0
0,5Χ0,001	2±1
0,001	3±1
2Χ0,001	3±1
3Χ0,001	4±1
8Χ0,001	26±7

Διάγραμμα 7

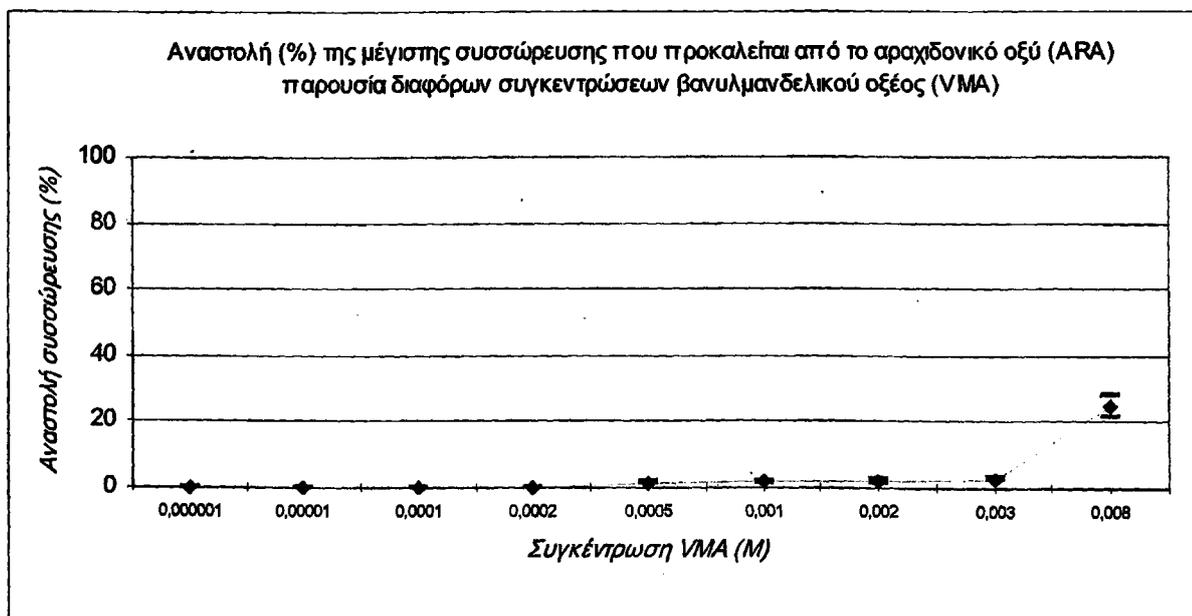


Πίνακας 8

Αναστολή (%) της μέγιστης συσσώρευσης που προκαλείται από το Αραχιδονικό Οξύ (AA)
παρουσία διαφόρων συγκεντρώσεων βανυλ-μανδελικού οξέος (VMA)
(ΜΤ±ΣΑ από 28 μετρήσεις για κάθε συγκέντρωση)

Συγκέντρωση VMA (M)	Αναστολή συσσώρευσης (%)
0,000001	0
0,00001	0
0,0001	0
2Χ0,0001	0
0,5Χ0,001	2±1
0,001	2±1
2Χ0,001	2±1
3Χ0,001	3±1
8Χ0,001	25±4

Διάγραμμα 8

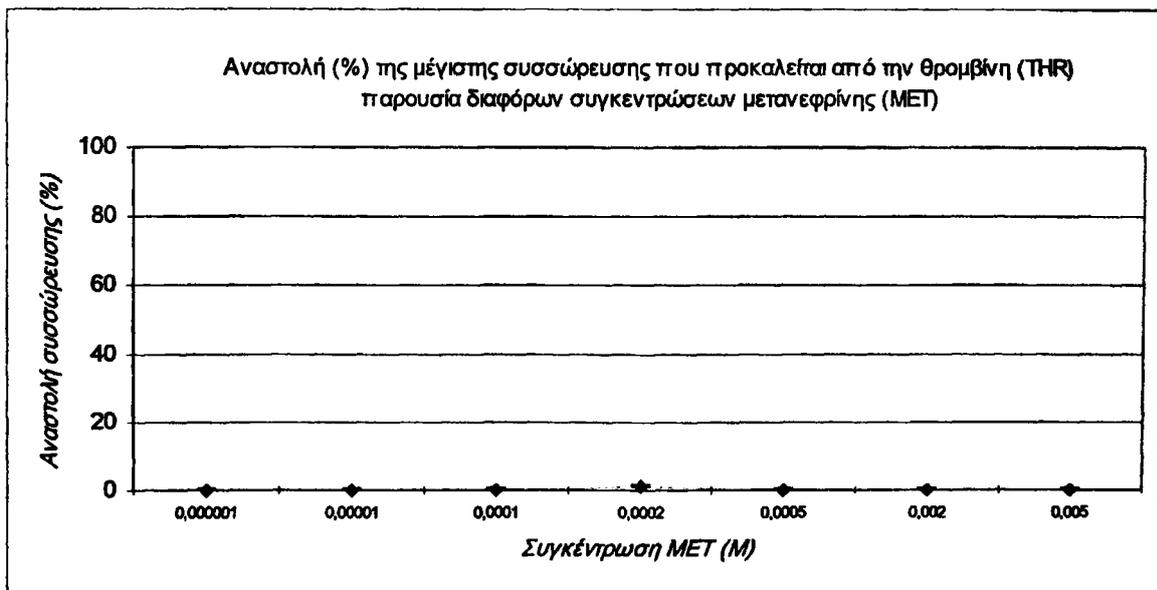


Πίνακας 9

Αναστολή (%) της μέγιστης συσσώρευσης που προκαλείται από την θρομβίνη (THR)
παρουσία διαφόρων συγκεντρώσεων μετανεφρίνης (MET)
(ΜΤ±ΣΑ από 28 μετρήσεις για κάθε συγκέντρωση)

Συγκέντρωση MET (M)	Αναστολή συσσώρευσης (%)
0,000001	0±
0,00001	0±
0,0001	0±
2X0,0001	1±
0,5X0,001	0±
2X0,001	0±
5X0,001	0±

Διάγραμμα 9

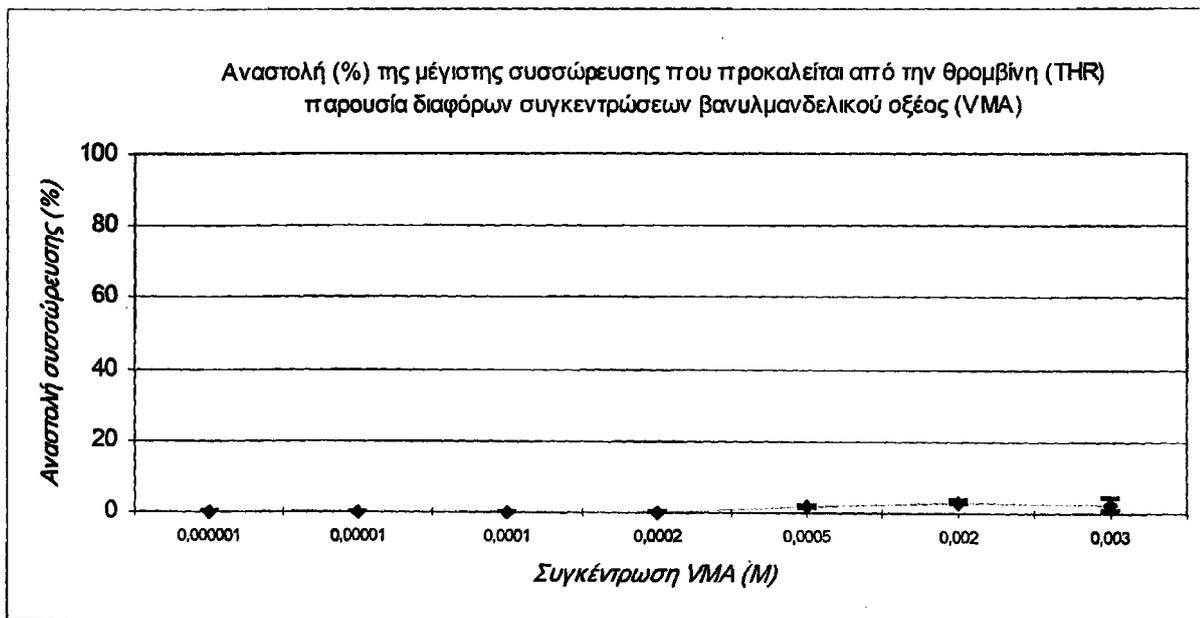


Πίνακας 10

Αναστολή (%) της μέγιστης συσσώρευσης που προκαλείται από την θρομβίνη (THR)
παρουσία διαφόρων συγκεντρώσεων βανυλ-μανδελικού οξέος (VMA)
(MT±ΣΑ από 28 μετρήσεις για κάθε συγκέντρωση)

Συγκέντρωση VMA (M)	Αναστολή συσσώρευσης (%)
0,000001	0±
0,00001	0±
0,0001	0±
2X0,0001	0±
0,5X0,001	1±1
2X0,001	3±1
3X0,001	2±2

Διάγραμμα 10

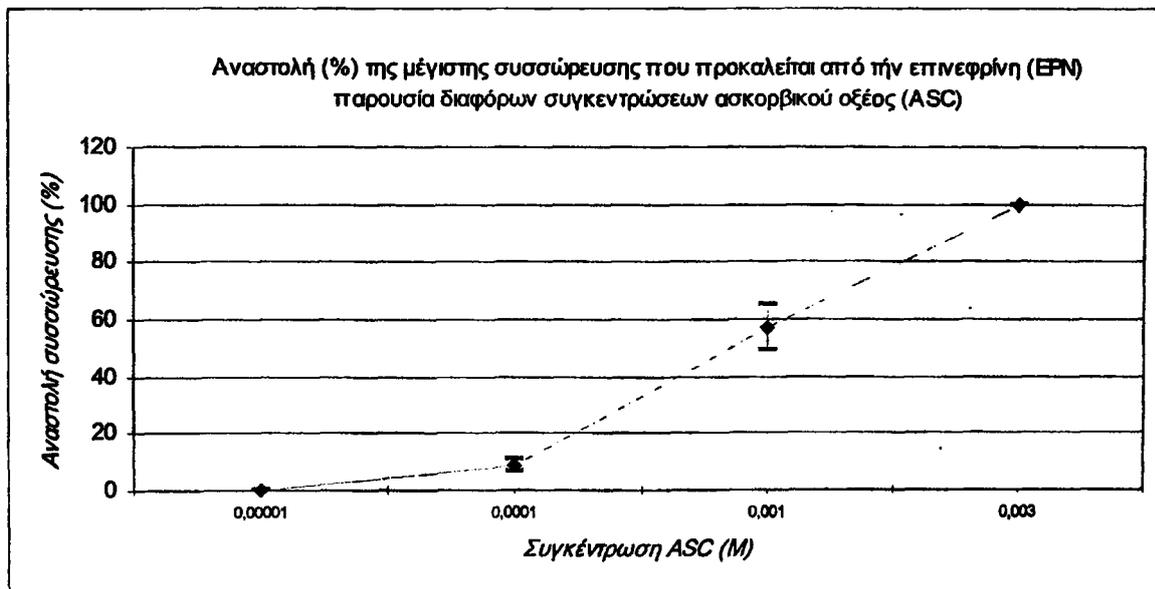


Πίνακας 11

**Αναστολή (%) της μέγιστης συσσώρευσης που προκαλείται από την επινεφρίνη (EPN) παρουσία διαφόρων συγκεντρώσεων ασκορβικού οξέος (ASC)
(ΜΤ±ΣΑ από 28 μετρήσεις για κάθε συγκέντρωση)**

Συγκέντρωση ASC (M)	Αναστολή συσσώρευσης (%)
0,00001	0
0,0001	9±2
0,001	57±8
3X0,001	100 (p<0,001)

Διάγραμμα 11

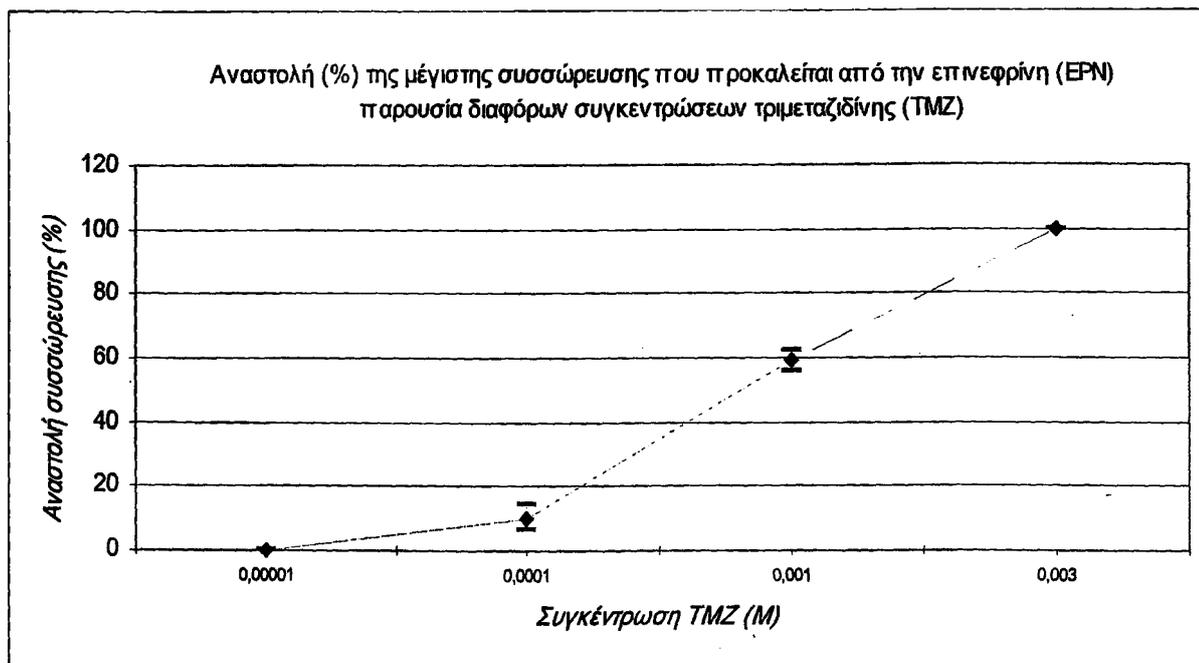


Πίνακας 12

Αναστολή (%) της μέγιστης συσσώρευσης που προκαλείται από την επινεφρίνη (EPN) παρουσία διαφόρων συγκεντρώσεων τριμεταζιδίνης (TMZ)
(ΜΤ±ΣΑ από 28 μετρήσεις για κάθε συγκέντρωση)

Συγκέντρωση TMZ (M)	Αναστολή συσσώρευσης (%)
0,00001	0
0,0001	10±4
0,001	59±3
3X0,001	100 (p<0,001)

Διάγραμμα 12

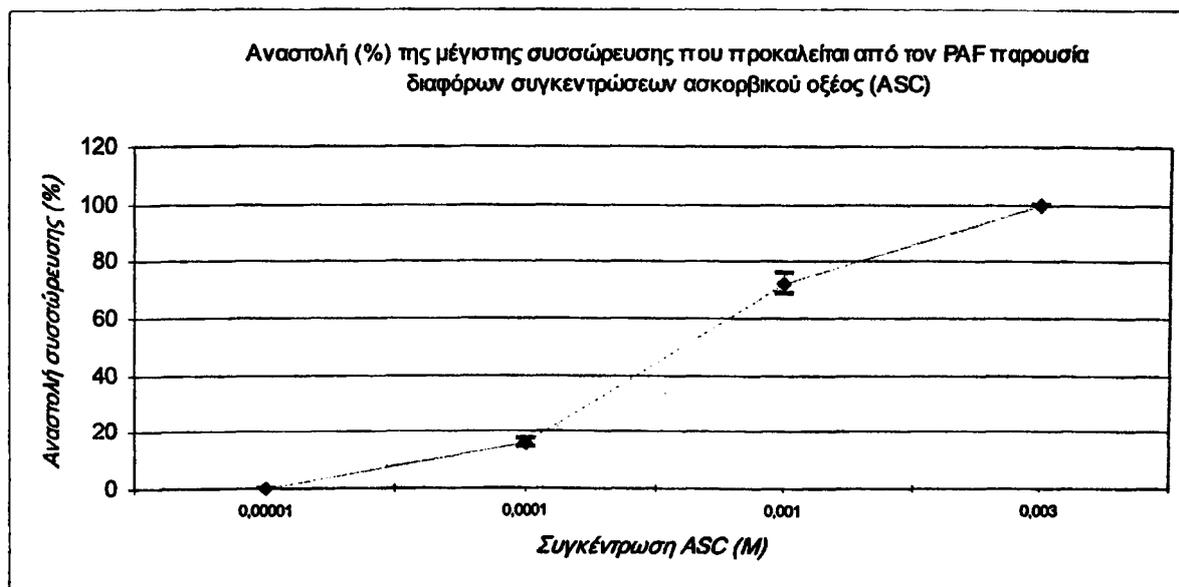


Πίνακας 13

Αναστολή (%) της μέγιστης συσσώρευσης που προκαλείται από τον PAF παρουσία διαφόρων συγκεντρώσεων ασκορβικού οξέος (ASC)
(ΜΤ±ΣΑ από 28 μετρήσεις για κάθε συγκέντρωση)

Συγκέντρωση ASC (M)	Αναστολή συσσώρευσης (%)
0,00001	0
0,0001	15±2
0,001	73±3
3Χ0,001	100 (p<0,001)

Διάγραμμα 13

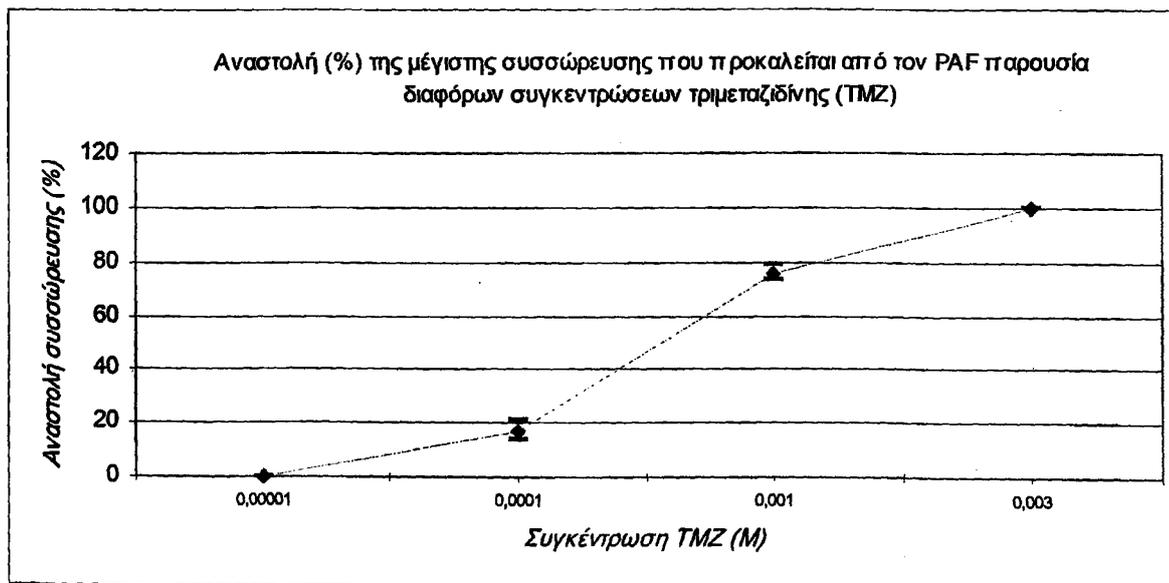


Πίνακας 14

Αναστολή (%) της μέγιστης συσσώρευσης που προκαλείται από τον PAF
 παρουσία διαφόρων συγκεντρώσεων τριμεταζιδίνης (TMZ)
 (ΜΤ±ΣΑ από 28 μετρήσεις για κάθε συγκέντρωση)

Συγκέντρωση TMZ (M)	Αναστολή συσσώρευσης (%)
0,00001	0
0,0001	17±4
0,001	76±3
3Χ0,001	100 (p<0,001)

Διάγραμμα 14

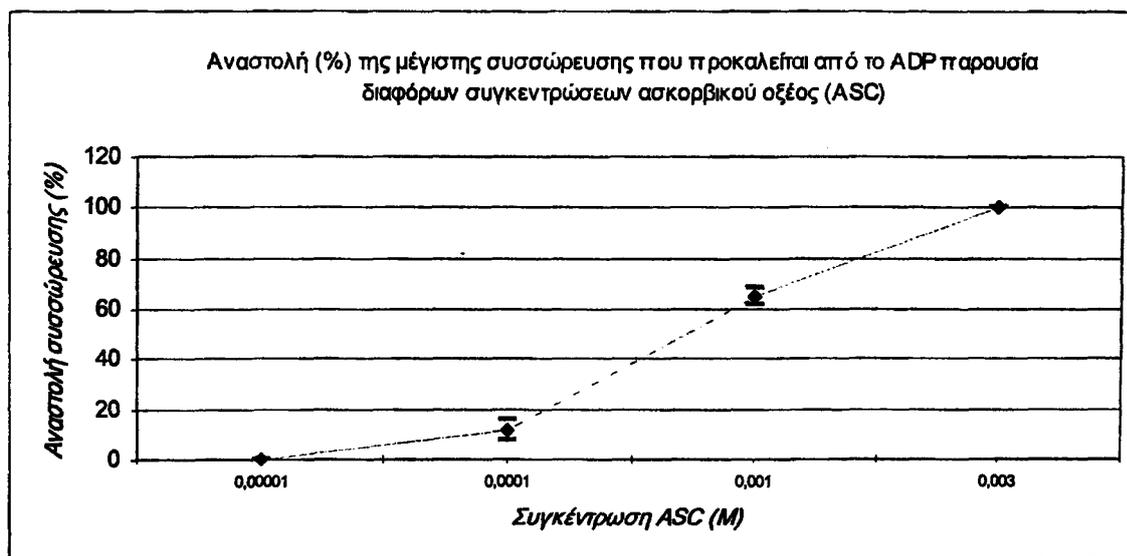


Πίνακας 15

Αναστολή (%) της μέγιστης συσσώρευσης που προκαλείται από το ADP παρουσία διαφόρων συγκεντρώσεων ασκορβικού οξέος (ASC)
(ΜΤ±ΣΑ από 28 μετρήσεις για κάθε συγκέντρωση)

Συγκέντρωση ASC (M)	Αναστολή συσσώρευσης (%)
0,00001	0
0,0001	12±4
0,001	65±3
3Χ0,001	100 (p<0,001)

Διάγραμμα 15

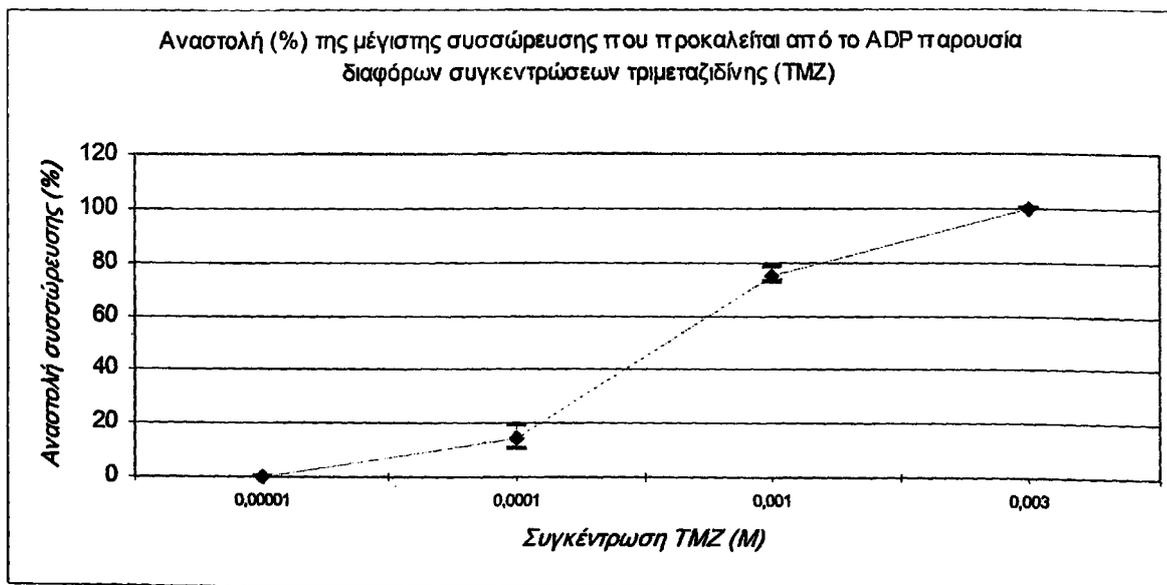


Πίνακας 16

Αναστολή (%) της μέγιστης συσσώρευσης που προκαλείται από το ADP παρουσία διαφόρων συγκεντρώσεων τριμεταζιδίνης (TMZ)
(ΜΤ±ΣΑ από 28 μετρήσεις για κάθε συγκέντρωση)

Συγκέντρωση TMZ (M)	Αναστολή συσσώρευσης (%)
0,00001	0
0,0001	15±2
0,001	75±6
3X0,001	100 (p<0,001)

Διάγραμμα 16

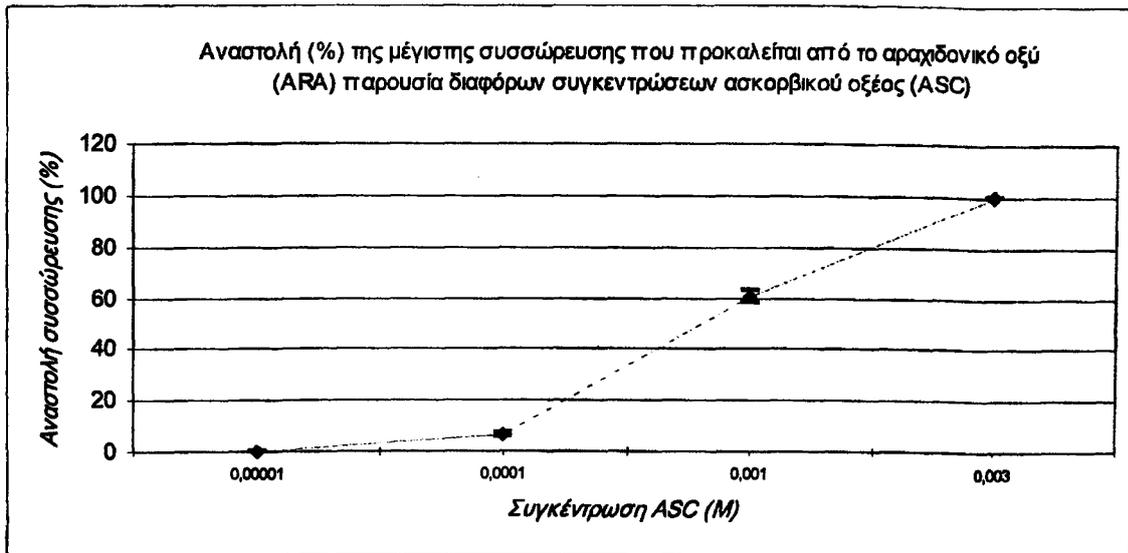


Πίνακας 17

**Αναστολή (%) της μέγιστης συσσώρευσης που προκαλείται από το Αραχιδονικό Οξύ (AA)
παρουσία διαφόρων συγκεντρώσεων ασκορβικού οξέος (ASC)
(ΜΤ±ΣΑ από 28 μετρήσεις για κάθε συγκέντρωση)**

Συγκέντρωση ASC (M)	Αναστολή συσσώρευσης (%)
0,00001	0
0,0001	6±1
0,001	60±3
3X0,001	100 (p<0,001)

Διάγραμμα 17

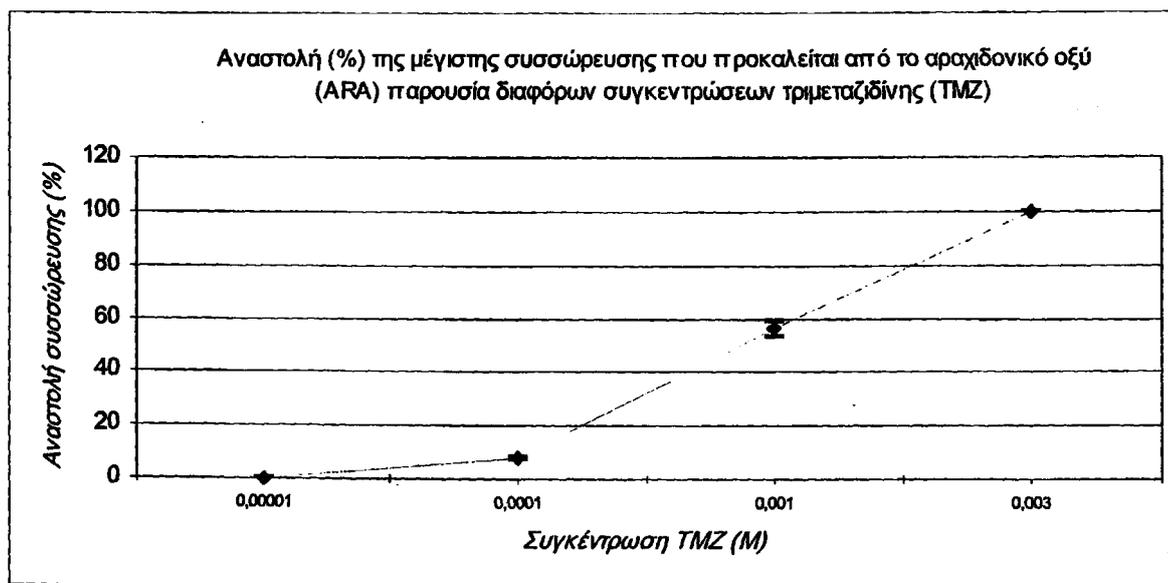


Πίνακας 18

Αναστολή (%) της μέγιστης συσσώρευσης που προκαλείται από το Αραχιδονικό Οξύ (AA)
παρουσία διαφόρων συγκεντρώσεων τριμεταζιδίνης (TMZ)
(ΜΤ±ΣΑ από 28 μετρήσεις για κάθε συγκέντρωση)

Συγκέντρωση TMZ (M)	Αναστολή συσσώρευσης (%)
0,00001	0
0,0001	8±1
0,001	56±3
3Χ0,001	100 (ρ<0,001)

Διάγραμμα 18

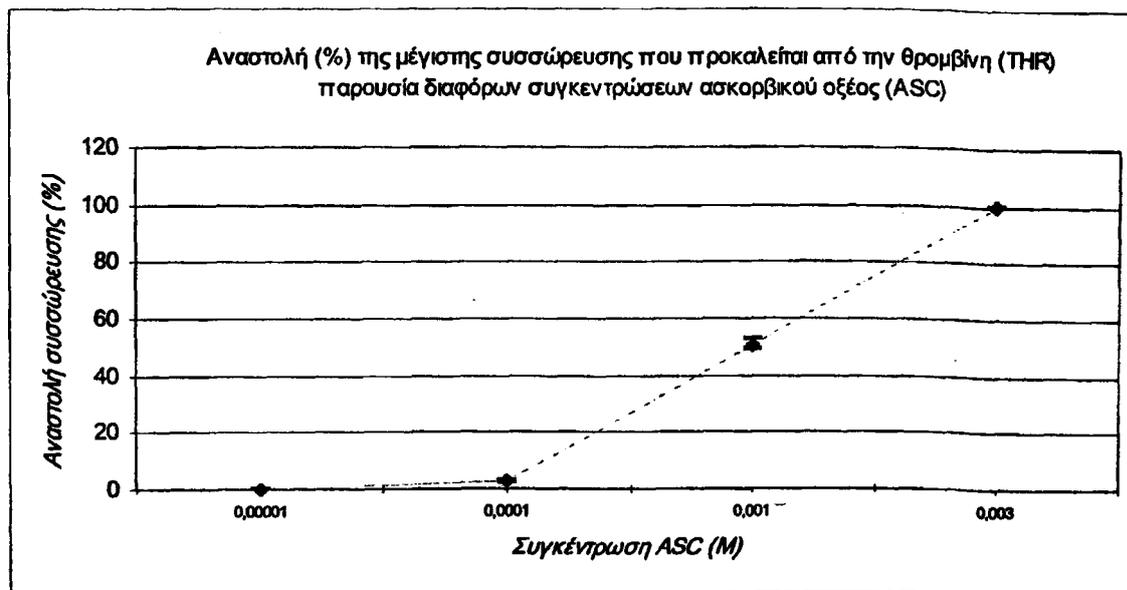


Πίνακας 19

Αναστολή (%) της μέγιστης συσσώρευσης που προκαλείται από την θρομβίνη (THR)
παρουσία διαφόρων συγκεντρώσεων ασκορβικού οξέος (ASC)
(ΜΤ±ΣΑ από 28 μετρήσεις για κάθε συγκέντρωση)

Συγκέντρωση ASC (M)	Αναστολή συσσώρευσης (%)
0,00001	0
0,0001	3±1
0,001	50±2
3Χ0,001	100 (p<0,001)

Διάγραμμα 19

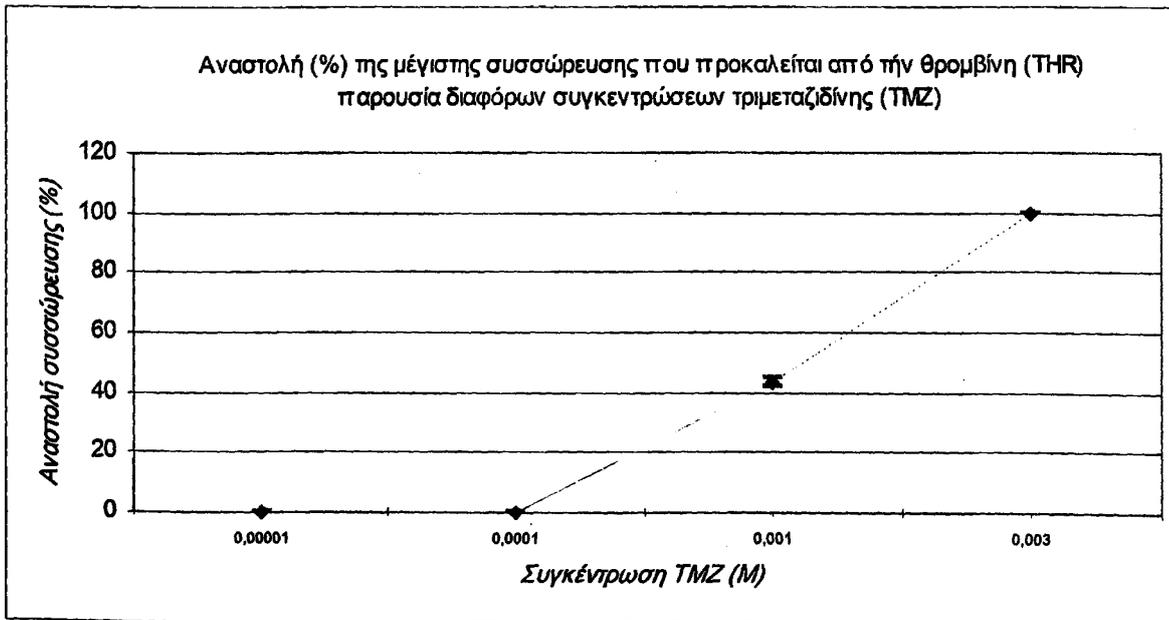


Πίνακας 20

Αναστολή (%) της μέγιστης συσσώρευσης που προκαλείται από την θρομβίνη (THR)
παρουσία διαφόρων συγκεντρώσεων τριμεταζιδίνης (TMZ)
(MT±ΣΑ από 28 μετρήσεις για κάθε συγκέντρωση)

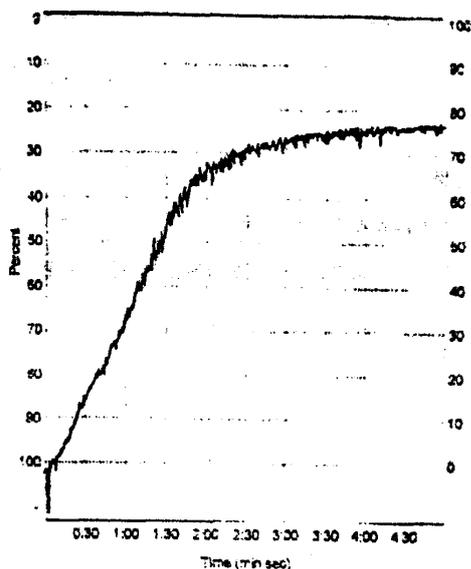
Συγκέντρωση TMZ (M)	Αναστολή συσσώρευσης (%)
0,00001	0
0,0001	0
0,001	44±1
3Χ0,001	100 (p<0,001)

Διάγραμμα 20

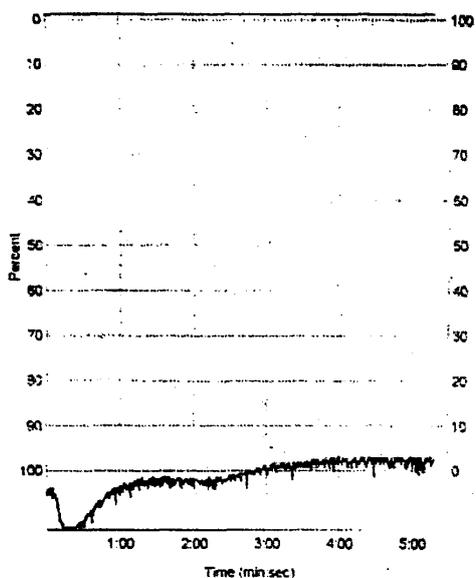


Συσσωρευμογραφήματα 1

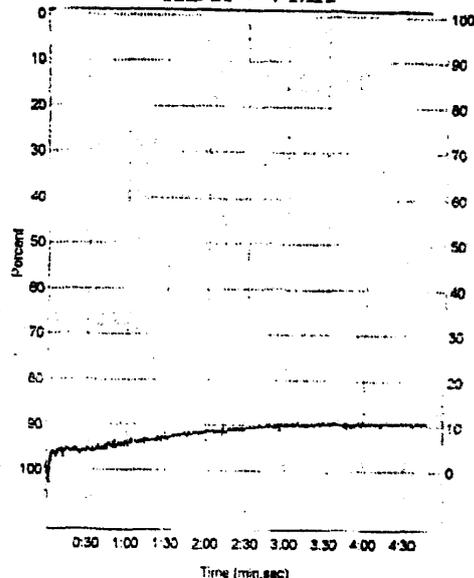
Διεγέρτης: ADR



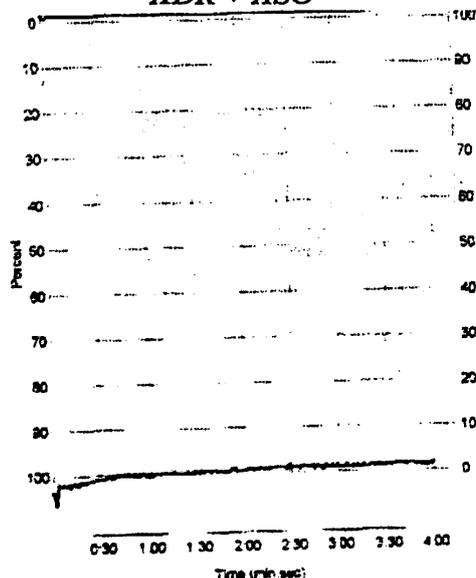
ADR + MET



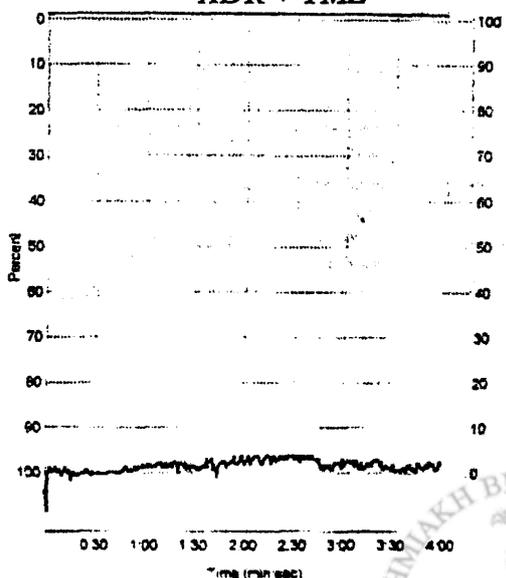
ADR + VMA



ADR + ASC

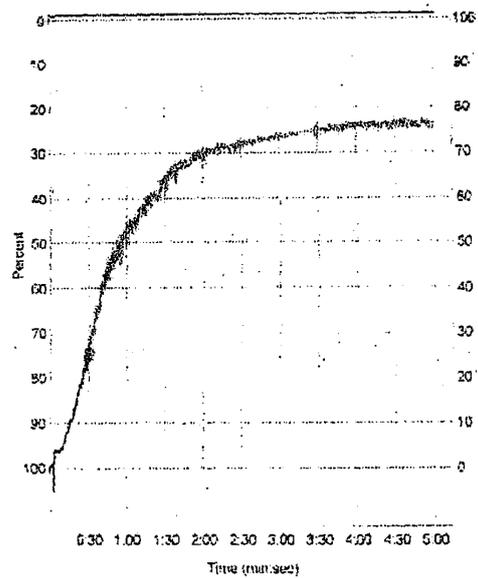


ADR + TMZ

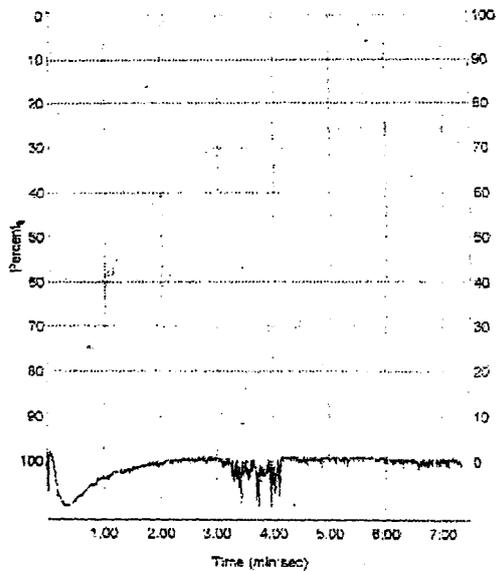


Συσσωρευμογραφήματα 2

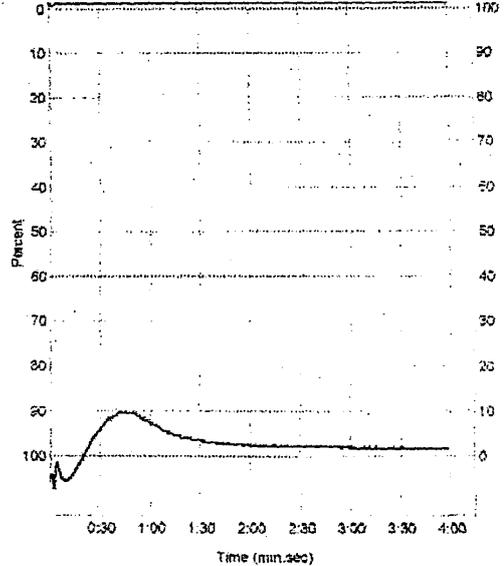
Διεγέρτης: ADP



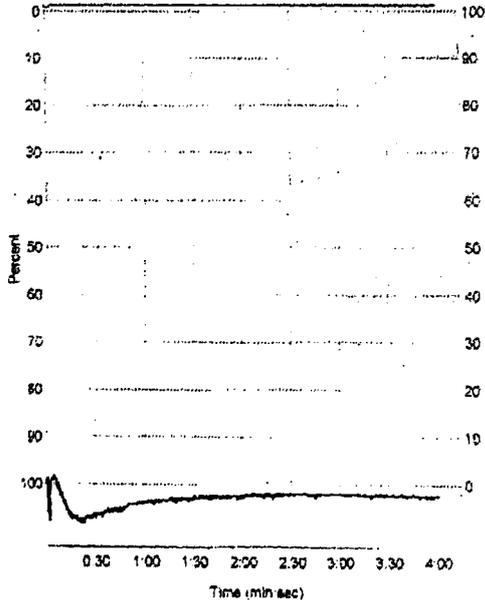
ADP + MET



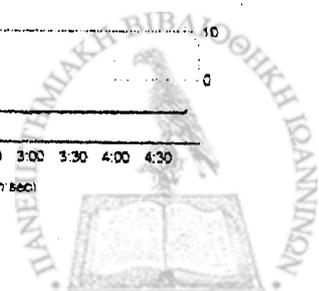
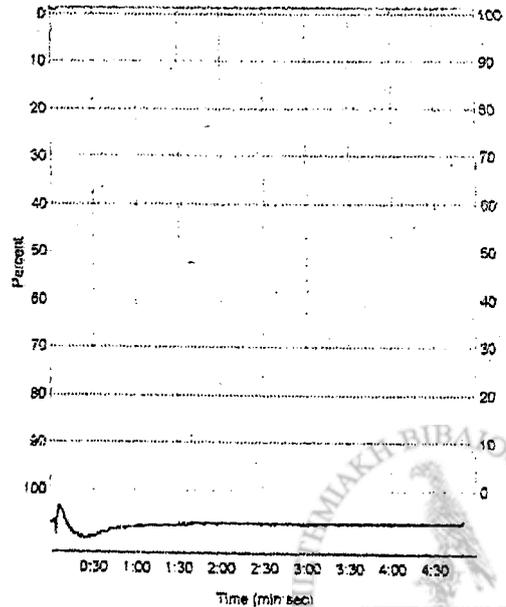
ADP + VMA



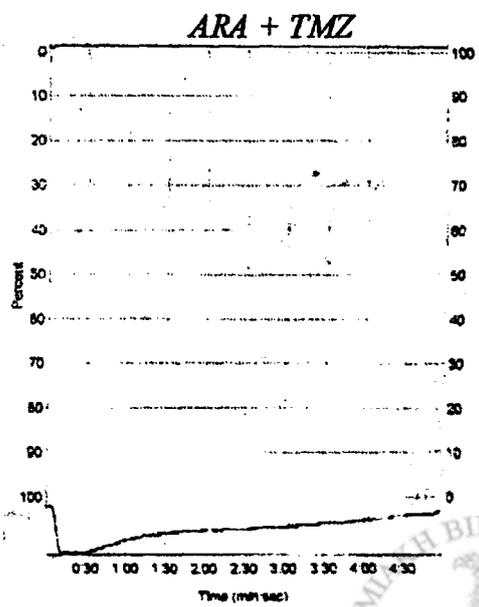
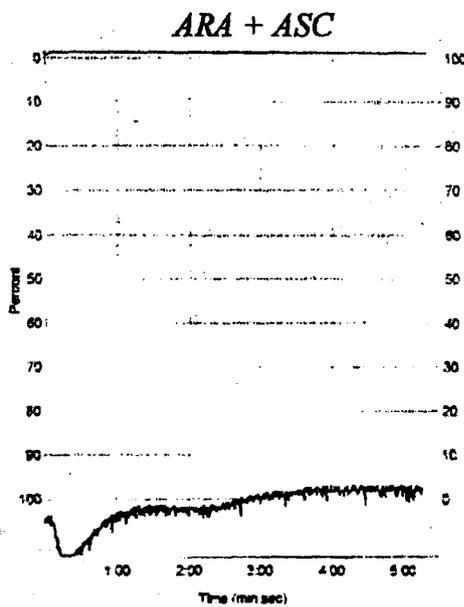
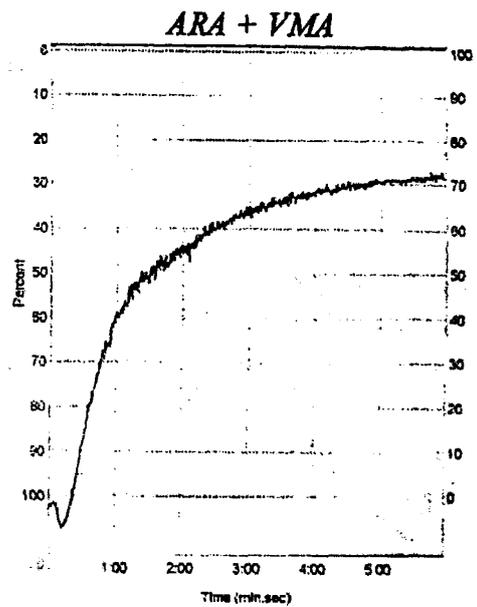
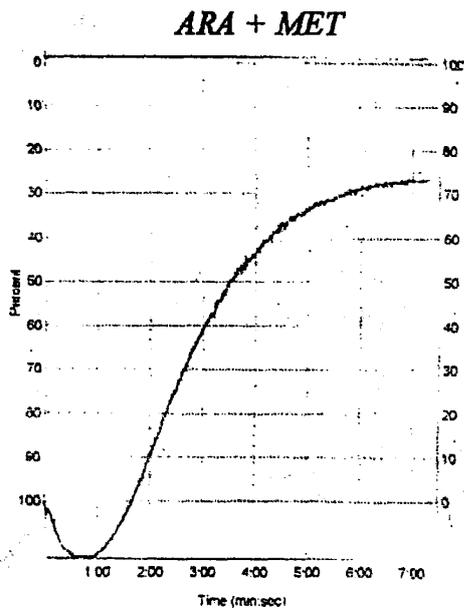
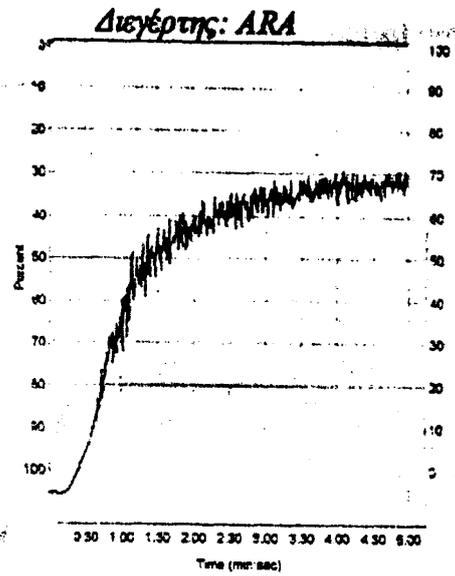
ADP + ASC



ADP + TMZ

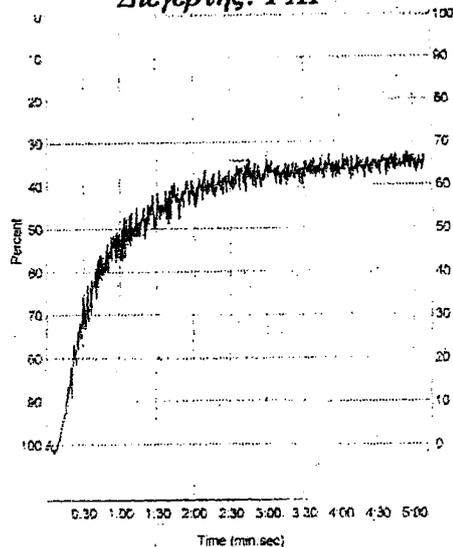


Συσσωρευμογραφήματα 3

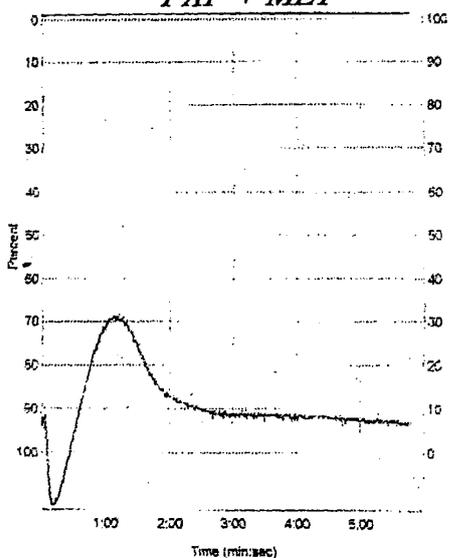


Συσσωρευμογραφήματα 4

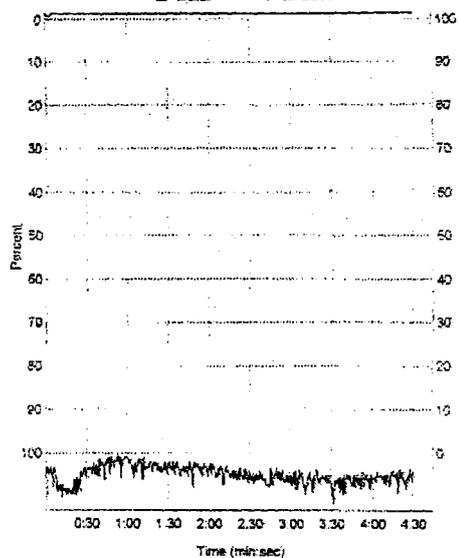
Διεγέρτης: PAF



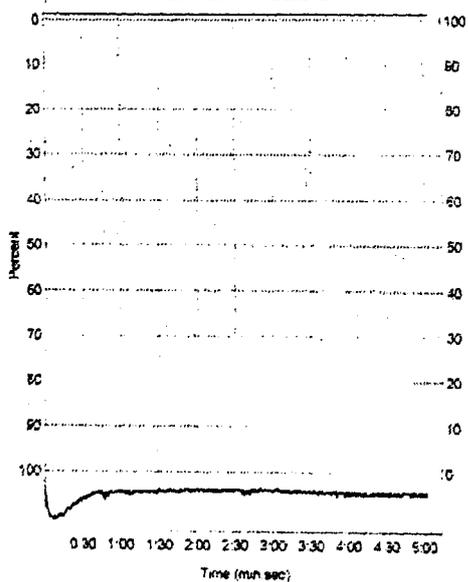
PAF + MET



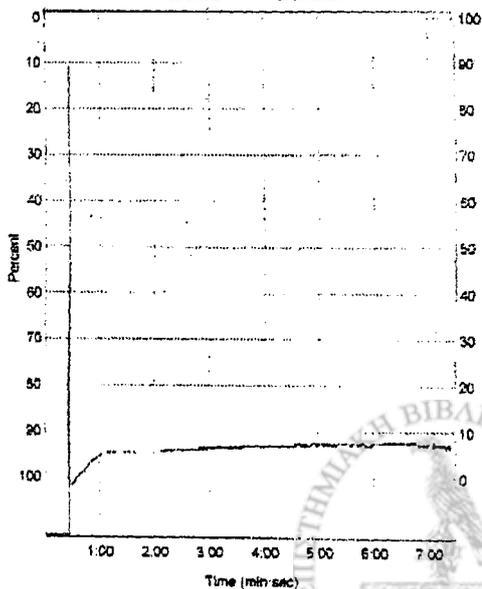
PAF + VMA



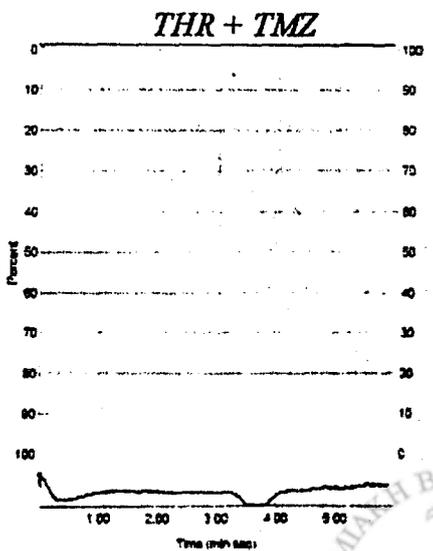
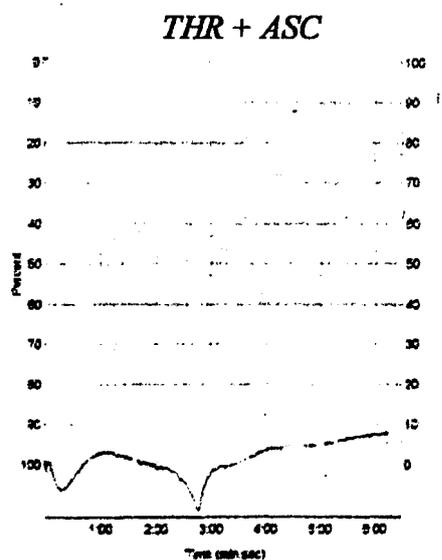
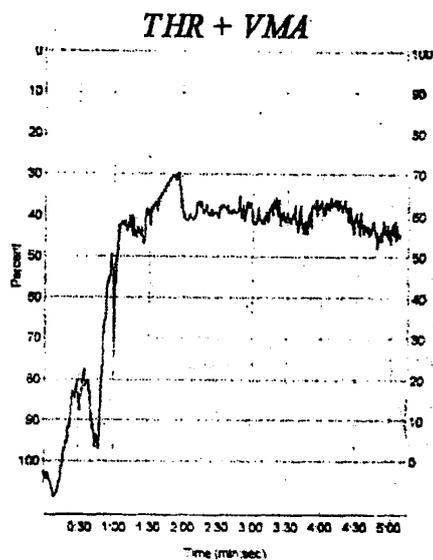
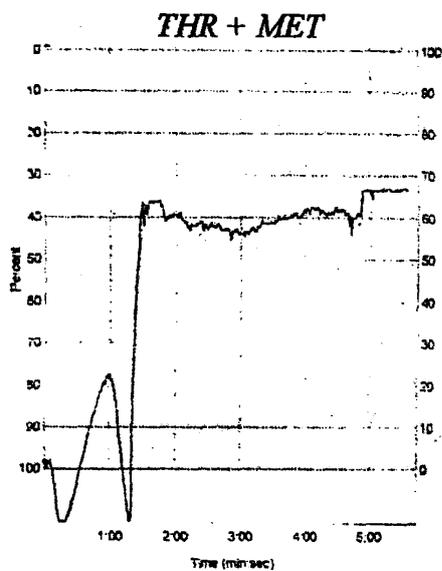
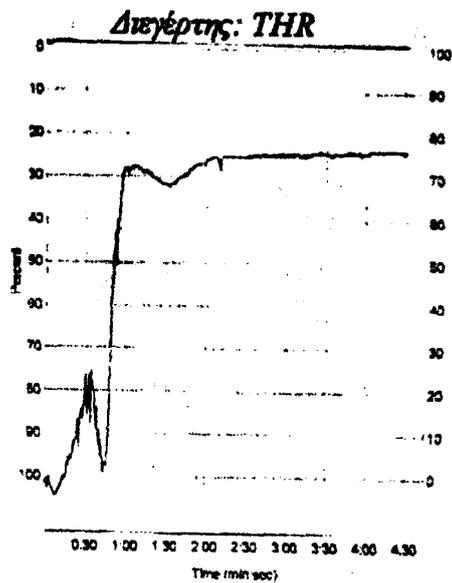
PAF + ASC



PAF + TMZ



Συσσωρευμογραφήματα 5

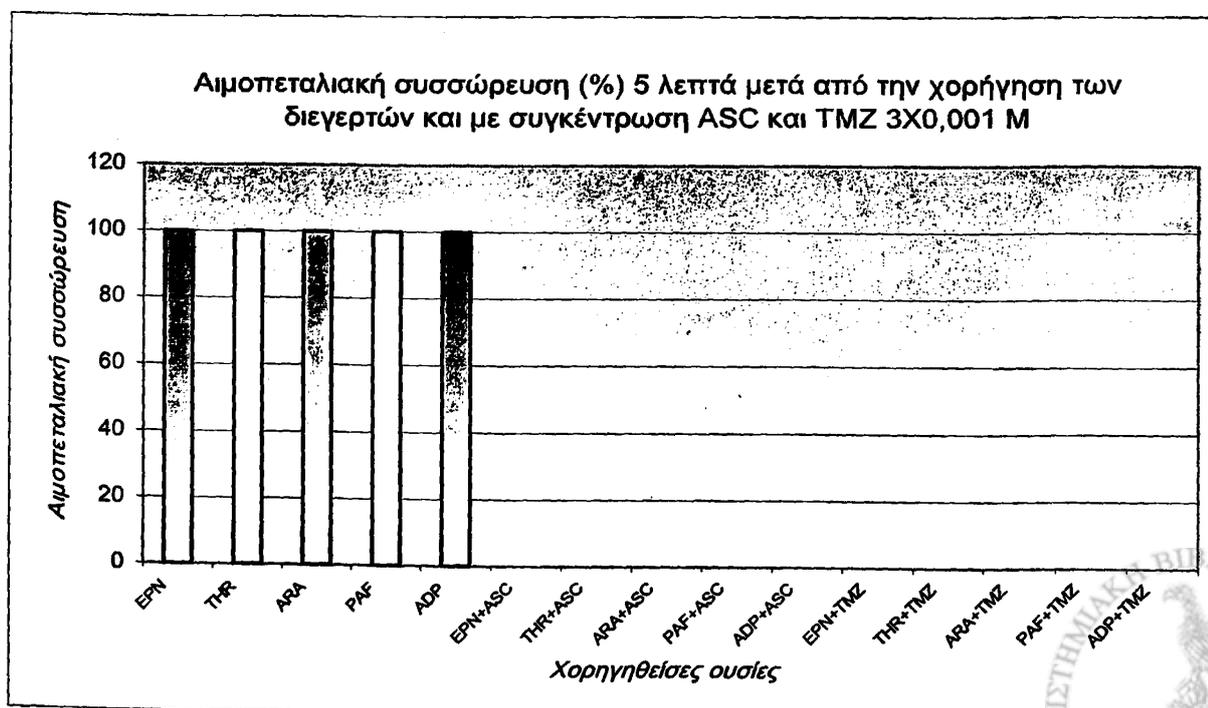


Πίνακας 21

Αιμοπεταλιακή συσσώρευση (%) 5 λεπτά μετά την χορήγηση των διεγερτών
και με συγκέντρωση ASC και TMZ 3X0,001 M
(ΜΤ από 28 μετρήσεις για κάθε χορηγηθείσα ουσία)

Χορηγηθείσες ουσίες	Αιμοπεταλιακή συσσώρευση (%)
EPN	100
THR	100
ARA	100
PAF	100
ADP	100
EPN+ASC	0±
THR+ASC	0±
ARA+ASC	0±
PAF+ASC	0±
ADP+ASC	0±
EPN+TMZ	0±
THR+TMZ	0±
ARA+TMZ	0±
PAF+TMZ	0±
ADP+TMZ	0±

Διάγραμμα 21

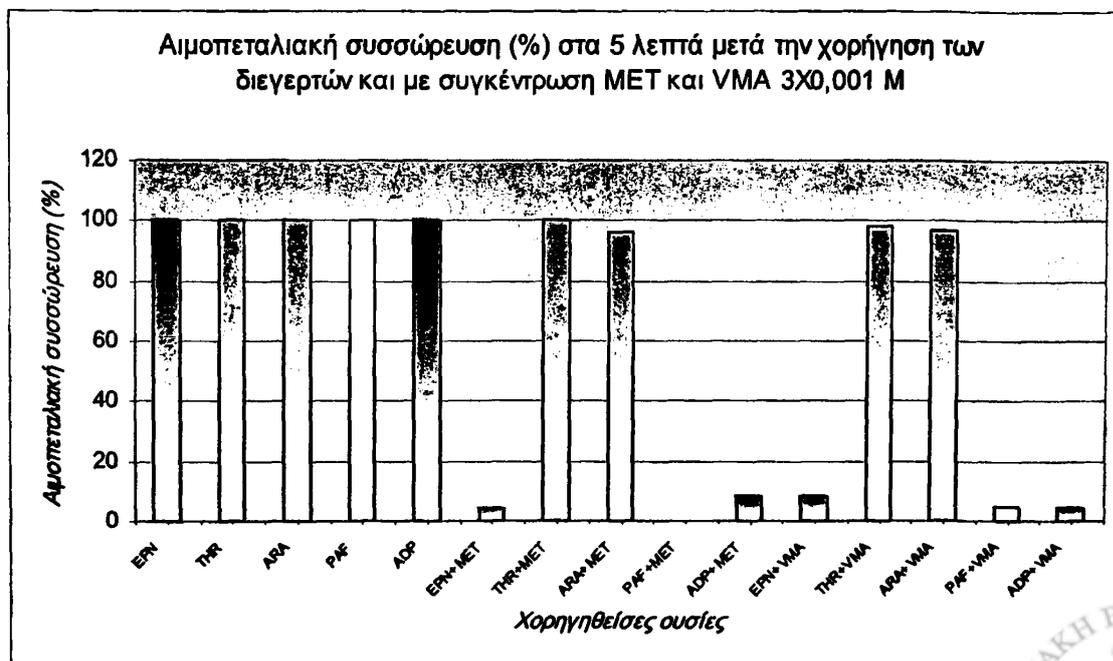


Πίνακας 22

Αιμοπεταλιακή συσσώρευση (%) 5 λεπτά μετά την χορήγηση των διεγερτών
και με συγκέντρωση MET και VMA 3X0,001 M
(ΜΤ±ΣΑ από 28 μετρήσεις για κάθε χορηγηθείσα ουσία)

Χορηγηθείσες ουσίες	Αιμοπεταλιακή συσσώρευση
EPN	100
THR	100
ARA	100
PAF	100
ADP	100
EPN+MET	4±2
THR+MET	100
ARA+MET	96±1
PAF+MET	0
ADP+MET	8±5
EPN+VMA	8±3
THR+VMA	98±2
ARA+VMA	97±1
PAF+VMA	5±3
ADP+VMA	4±3

Διάγραμμα 22

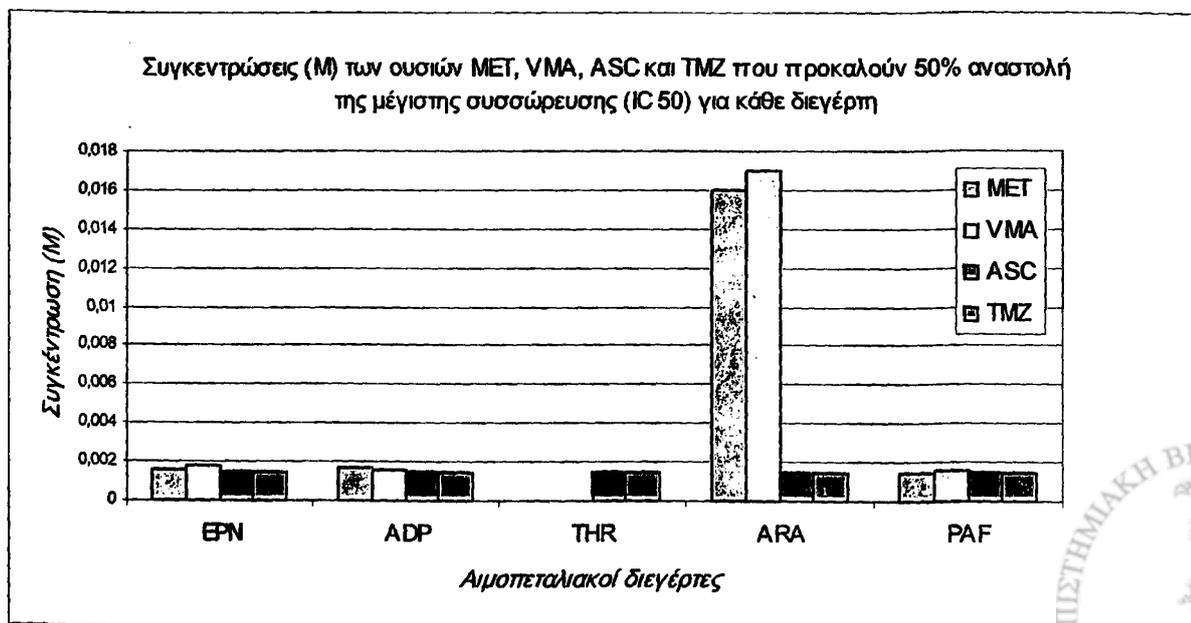


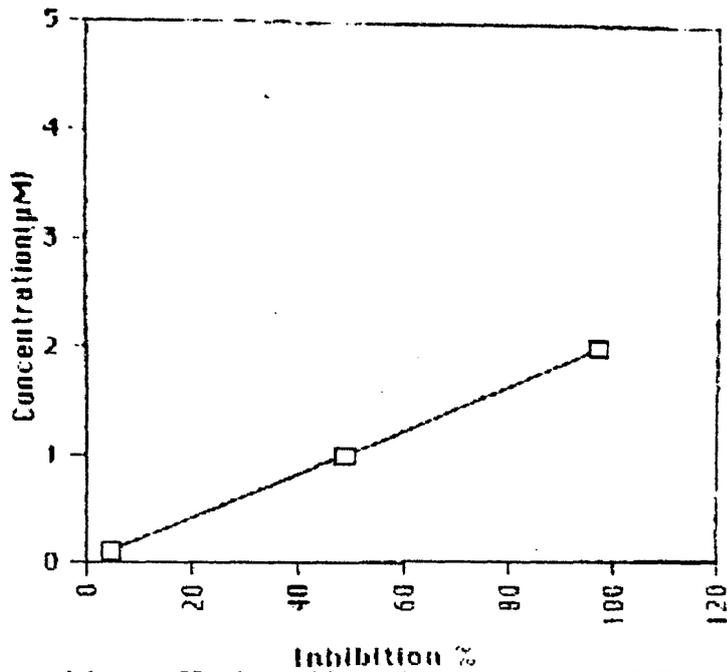
Πίνακας 22*

Συγκεντρώσεις (M) των ουσιών MET, VMA, ASC και TMZ που προκαλούν 50% αναστολή της μέγιστης συσσώρευσης (IC 50) για κάθε αιμοπεταλιακό διεγέρτη (EPN, ADP, THR, ARA, PAF)

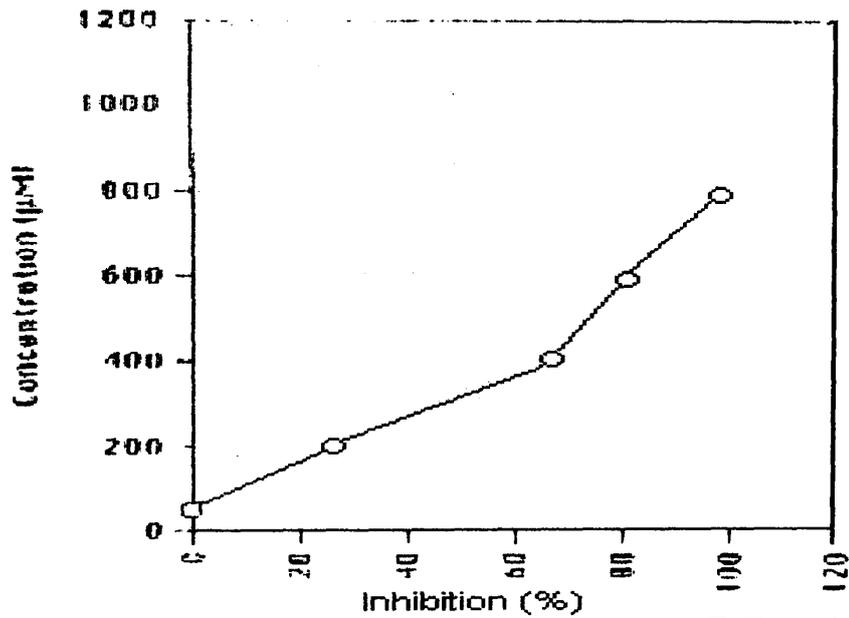
IC 50 (M)				
Διεγέρτες	MET	VMA	ASC	TMZ
EPN	$1,6 \times 10^{-3}$	$1,8 \times 10^{-3}$	$1,5 \times 10^{-3}$	$1,5 \times 10^{-3}$
ADP	$1,7 \times 10^{-3}$	$1,6 \times 10^{-3}$	$1,5 \times 10^{-3}$	$1,5 \times 10^{-3}$
THR			$1,5 \times 10^{-3}$	$1,5 \times 10^{-3}$
ARA	$1,6 \times 10^{-2}$	$1,7 \times 10^{-2}$	$1,5 \times 10^{-3}$	$1,5 \times 10^{-3}$
PAF	$1,5 \times 10^{-3}$	$1,6 \times 10^{-3}$	$1,5 \times 10^{-3}$	$1,5 \times 10^{-3}$

Διάγραμμα 22*



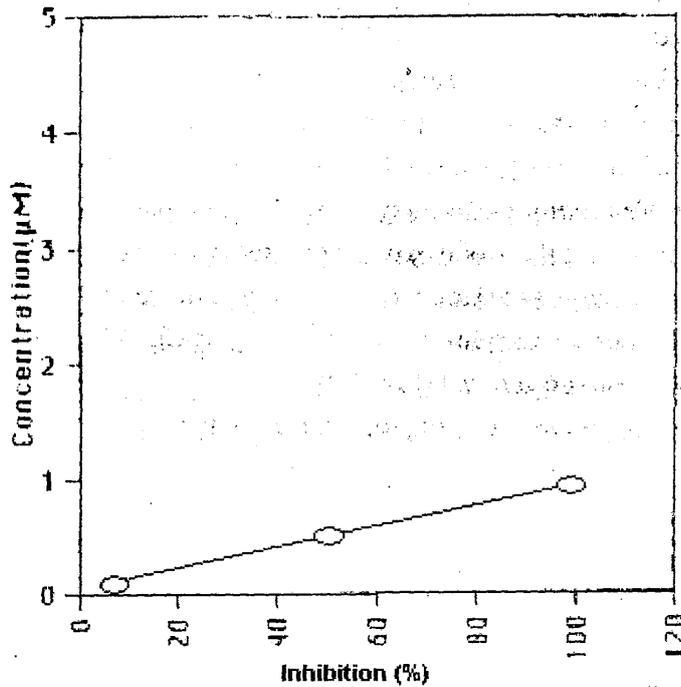


Διάγραμμα 22α: Αναστολή συσσώρευσης wRP από την MET

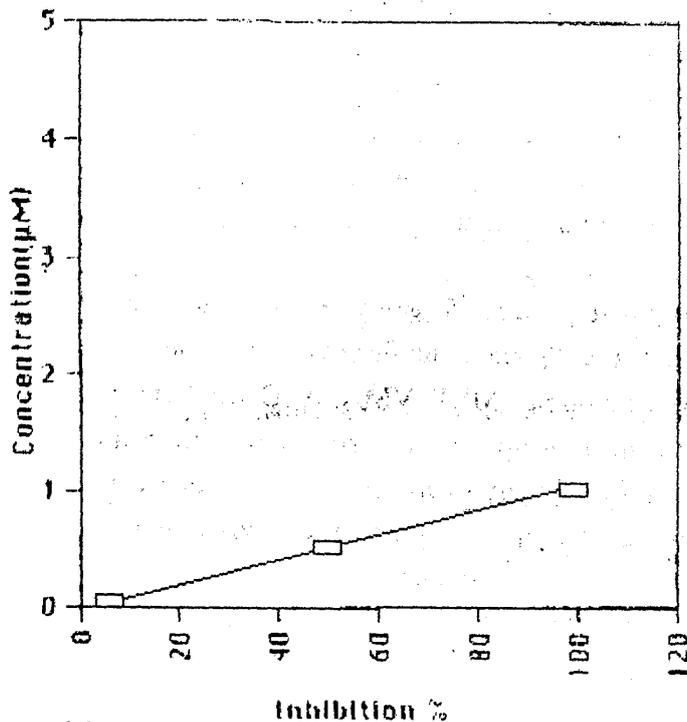


Διάγραμμα 22β: Αναστολή συσσώρευσης w R P από το VMA





Διάγραμμα 22γ: Αναστολή συσσώρευσης wRP από το ASC



Διάγραμμα 22 δ: Αναστολή συσσώρευσης wRP από την TMZ



Από τα αποτελέσματα των πειραμάτων της αιμοπεταλιακής συσσώρευσης προέκυψε ότι τα μεταβολικά προϊόντα των κατεχολαμινών, μετανεφρίνη και βανυλμανδελικό οξύ (VMA), ανέστειλαν σε σημαντικό βαθμό την αιμοπεταλιακή συσσώρευση που προκλήθηκε από την επινεφρίνη (Πίνακας 1 και Διάγραμμα 1, Πίνακας 2 και Διάγραμμα 2), τον PAF (Πίνακας 3 και Διάγραμμα 3, Πίνακας 4 και Διάγραμμα 4) και το ADP (Πίνακας 5 και Διάγραμμα 5, Πίνακας 6 και Διάγραμμα 6), ενώ δεν είχαν σχεδόν καμία επίδραση στην αιμοπεταλιακή συσσώρευση που προκλήθηκε από το αραχιδονικό οξύ (Πίνακας 7 και Διάγραμμα 7, Πίνακας 8 και Διάγραμμα 8) και την θρομβίνη (Πίνακας 9 και Διάγραμμα 9, Πίνακας 10 και Διάγραμμα 10), μέχρι την συγκέντρωση 3×10^{-3} M, στην οποία χρησιμοποιήθηκαν. Αντίθετα, το ασκορβικό οξύ και η τριμεταζιδίνη (σε συγκέντρωση 3×10^{-3} M) ανέστειλαν σε ποσοστό 100% την αιμοπεταλιακή συσσώρευση που προκλήθηκε από όλους τους αιμοπεταλιακούς διεγέρτες που χρησιμοποιήθηκαν (αδρεναλίνη, PAF, ADP, αραχιδονικό οξύ και θρομβίνη) (Πίνακες 11 έως 20 και Διαγράμματα 11 έως 20).

Όσον αφορά το ποσοστό της αναστολής της αιμοπεταλιακής συσσώρευσης, αυτό φαίνεται να εξαρτάται από την συγκέντρωση στην οποία χορηγήθηκαν οι αιμοπεταλιακοί αναστολείς (μετανεφρίνη, VMA, ασκορβικό και τριμεταζιδίνη). Έτσι, όπως προέκυψε από τα αποτελέσματα των πειραμάτων αυτών, το ποσοστό της αναστολής της αιμοπεταλιακής συσσώρευσης αυξάνεται όσο αυξάνονται και οι συγκεντρώσεις στις οποίες χορηγούνται οι αναστολείς, με μέγιστη αναστολή (ποσοστό 100%) να επιτυγχάνεται στην συγκέντρωση 3×10^{-3} M για κάθε αιμοπεταλιακό αναστολέα. Φαίνεται έτσι, ότι η αναστολή της αιμοπεταλιακής συσσώρευσης είναι δοσοεξαρτώμενη, εξαρτάται δηλαδή από την συγκέντρωση του χορηγούμενου αναστολέα. Αυτό βέβαια ισχύει, όσον αφορά την μετανεφρίνη και το VMA, για την αιμοπεταλιακή συσσώρευση που προκλήθηκε από την επινεφρίνη, τον PAF και το ADP (Πίνακες 1 έως 6 και Διαγράμματα 1 έως 6), αφού, όπως προαναφέρθηκε, οι εν λόγω κατεχολαμινικοί μεταβολίτες δεν προκάλεσαν καμία αναστολή στην συσσώρευση που προκλήθηκε από το αραχιδονικό οξύ και την θρομβίνη, μέχρι την συγκέντρωση των 3×10^{-3} M, στην οποία χρησιμοποιήθηκαν (Πίνακες 7 έως 10 και Διαγράμματα 7 έως 10). Όσον αφορά το ασκορβικό οξύ και την τριμεταζιδίνη, οδηγούν σε δοσοεξαρτώμενη αναστολή της αιμοπεταλιακής συσσώρευσης η οποία προκαλείται από όλους τους αιμοπεταλιακούς διεγέρτες που χρησιμοποιήθηκαν (αδρεναλίνη, PAF, ADP, αραχιδονικό οξύ και θρομβίνη). Η αναστολή αυτή φτάνει στο μέγιστο ποσοστό (100%), όταν το ασκορβικό και η τριμεταζιδίνη χορηγηθούν στην συγκέντρωση 3×10^{-3} M, και αφορά την αιμοπεταλιακή συσσώρευση που προκαλείται από όλους τους αιμοπεταλιακούς διεγέρτες που χρησιμοποιήθηκαν.

Στα Συσσωρευμογραφήματα 1 έως 5 φαίνεται η αναστολή που προκαλείται στην συσσώρευση των αιμοπεταλίων του ανθρώπου (με διεγέρτες συσσώρευσης την ADR, το ADP, τον PAF, το ARA και την THR) από τις ουσίες MET, VMA, ASC και TMZ σε συγκέντρωση 3×10^{-3} M. Αναλυτικότερα, στα Συσσωρευμογραφήματα 1, φαίνονται οι καμπύλες καταγραφής στο συσσωρευμόμετρο της αιμοπεταλιακής συσσώρευσης που προκαλείται από την αδρεναλίνη (Διεγέρτης: ADR), όπως επίσης και η αναστολή της προκαλούμενης από την αδρεναλίνη συσσώρευσης, όταν στο αιμοπεταλιακό εναιώρημα χορηγούνται παράλληλα με την αδρεναλίνη και μετανεφρίνη (ADR + MET), VMA (ADR + VMA), ασκορβικό οξύ (ADR + ASC) και τριμεταζιδίνη (ADR + TMZ). Φαίνεται δηλαδή, ότι όταν χορηγείται στο αιμοπεταλιακό εναιώρημα μόνο αδρεναλίνη, το συσσωρευμόμετρο καταγράφει ως καμπύλη την αιμοπεταλιακή συσσώρευση η οποία είναι η μέγιστη δυνατή και μάλιστα μη αναστρέψιμη. Όταν όμως χορηγηθούν παράλληλα οι αναφερθέντες αιμοπεταλιακοί αναστολείς, η αιμοπεταλική συσσώρευση αναστέλλεται, γεγονός που καταγράφεται στο συσσωρευμόμετρο ως μία πυκνά τεθλασμένη γραμμή που παραμένει "παράλληλη"



με τον άξονα των χ , ξεκινώντας από την τιμή 0 (μηδενική συσσώρευση) και καταλήγοντας μετά την πάροδο 5 λεπτών πάλι στην τιμή 0, γεγονός που δεικνύει την πλήρη αναστολή της αιμοπεταλιακής συσσώρευσης.

Αντίστοιχα, στα Συσσωρευμογραφήματα 2, φαίνονται οι καμπύλες καταγραφής στο συσσωρευμόμετρο της αιμοπεταλιακής συσσώρευσης που προκαλείται από το ADP (Διεγέρτης: ADP), καθώς και η αναστολή της προκαλούμενης από το ADP συσσώρευσης, όταν στο αιμοπεταλιακό εναιώρημα χορηγούνται παράλληλα με ADP και μετανεφρίνη (ADP + MET), VMA (ADP + VMA), ασκορβικό οξύ (ADP + ASC) και τριμεταζιδίνη (ADP + TMZ). Φαίνεται και εδώ ότι οι εν λόγω αιμοπεταλιακοί αναστολείς προκαλούν πλήρη αναστολή της αιμοπεταλιακής συσσώρευσης που προκαλείται το ADP, όταν χορηγηθούν στην συγκέντρωση $3 \leq 10^{-3}$ M. Αντίστοιχα, στα Συσσωρευμογραφήματα 4, φαίνεται η καταγραφόμενη από το συσσωρευμόμετρο πλήρης αναστολή της προκαλούμενης από τον PAF αιμοπεταλιακής συσσώρευσης, όταν χορηγούνται παράλληλα μετανεφρίνη, VMA, ασκορβικό οξύ και θρομβίνη σε συγκέντρωση $3 \leq 10^{-3}$ M για κάθε ουσία.

Στα Συσσωρευμογραφήματα 3 φαίνεται η αιμοπεταλιακή συσσώρευση που προκαλείται από το αραχιδονικό οξύ και καταγράφεται ως μία καμπύλη στο συσσωρευμόμετρο (Διεγέρτης: ARA), όπως επίσης και οι καμπύλες συσσώρευσης όταν παράλληλα με το αραχιδονικό οξύ χορηγείται στο αιμοπεταλιακό εναιώρημα μετανεφρίνη (ARA + MET) και VMA (ARA + VMA). Στις καμπύλες αυτές φαίνεται ότι η παράλληλη χορήγηση μετανεφρίνης ή βανυλμανδελικού οξέος δεν επηρεάζει την συσσώρευση, η οποία καταλήγει και πάλι μέγιστη και μη αναστρέψιμη. Αντίθετα, η παράλληλη χορήγηση-ασκορβικού (ARA + ASC) και τριμεταζιδίνης (ARA + TMZ) προκαλεί πλήρη αναστολή της συσσώρευσης, όπως φαίνεται και από την πορεία της καμπύλης που καταγράφεται από το συσσωρευμόμετρο. Οι συγκεντρώσεις των ουσιών μετανεφρίνης, βανυλμανδελικού οξέος, ασκορβικού οξέος και τριμεταζιδίνης ήταν και εδώ $3 \leq 10^{-3}$ M.

Στα Συσσωρευμογραφήματα 5 φαίνεται αντίστοιχα η αιμοπεταλιακή συσσώρευση που προκαλείται από την θρομβίνη και καταγράφεται ως καμπύλη στο συσσωρευμόμετρο (Διεγέρτης: THR), όπως επίσης και καμπύλες συσσώρευσης όταν παράλληλα με την θρομβίνη χορηγείται στο αιμοπεταλιακό εναιώρημα μετανεφρίνη (THR + MET) και VMA (THR + VMA). Στις καμπύλες αυτές φαίνεται ότι η παράλληλη χορήγηση μετανεφρίνης ή βανυλμανδελικού οξέος δεν επηρεάζει την συσσώρευση, ενώ αντίθετα η παράλληλη χορήγηση ασκορβικού (THR + ASC) ή τριμεταζιδίνης (THR + TMZ) προκαλεί πλήρη αναστολή της αιμοπεταλιακής συσσώρευσης. Οι συγκεντρώσεις των ουσιών μετανεφρίνης, βανυλμανδελικού οξέος, ασκορβικού οξέος και τριμεταζιδίνης είναι επίσης $3 \leq 10^{-3}$ M.

Τα ανωτέρω αποτελέσματα εμφανίζονται συγκεντρωτικά στους Πίνακες 21 και 22, καθώς και στα Διαγράμματα 21 και 22.

Όπως προέκυψε από τα αποτελέσματα των πειραμάτων της αιμοπεταλιακής συσσώρευσης, οι συγκεντρώσεις (M) των ουσιών MET, VMA, ASC και TMZ που προκαλούν 50% αναστολή της μέγιστης αιμοπεταλιακής συσσώρευσης (IC 50) για κάθε αιμοπεταλιακό διεγέρτη, είναι ανάλογες για όλες τις ανωτέρω ουσίες όταν διεγέρτες είναι η επινεφρίνη, το ADP και ο PAF, ενώ όταν διεγέρτης είναι το αραχιδονικό, για την μετανεφρίνη και το VMA είναι $1,6 \times 10^{-2}$ M και $1,7 \times 10^{-2}$ M αντίστοιχα, ενώ για το ασκορβικό και την τριμεταζιδίνη είναι $1,5 \times 10^{-3}$ M (Πίνακας 22* και Διάγραμμα 22*).



2) Αποτελέσματα πειραμάτων μέτρησης ελευθέρων ριζών οξυγόνου

□ Στον πίνακα 23 φαίνονται οι u-Carbs κατά την εξέλιξη της αιμοπεταλιακής συσσώρευσης (5 και 10 λεπτά μετά την έναρξή της), μετά από χορήγηση των διεγερτών ADR, ADP, PAF, ARA και THR. Οι τιμές είναι οι μέσες τιμές συν-πλην (\pm) η σταθερή απόκλιση από 28 μετρήσεις για κάθε συγκέντρωση.

Τα αποτελέσματα εμφανίζονται επίσης παραστατικά στο αντίστοιχο διάγραμμα 23 υπό τον τύπο ιστογράμματος.

□ Στον πίνακα 24 φαίνονται οι u-Carbs 10 λεπτά μετά την έναρξη της αιμοπεταλιακής συσσώρευσης (με διεγέρτες συσσώρευσης την ADR, το ADP, τον PAF, το ARA και την THR) και με την χορήγηση ASC και TMZ σε συγκέντρωση 3×10^{-3} M για κάθε ουσία. Οι τιμές είναι οι μέσες τιμές συν-πλην (\pm) η σταθερή απόκλιση από 28 μετρήσεις για κάθε ουσία.

Τα αποτελέσματα εμφανίζονται επίσης παραστατικά στο αντίστοιχο διάγραμμα 24 υπό τον τύπο ιστογράμματος.

□ Στον πίνακα 25 φαίνονται οι u-Carbs 10 λεπτά μετά την έναρξη της αιμοπεταλιακής συσσώρευσης (με διεγέρτες συσσώρευσης την ADR, το ADP, τον PAF, το ARA και την THR) και με την χορήγηση MET και VMA σε συγκέντρωση 3×10^{-3} M για κάθε ουσία. Οι τιμές είναι οι μέσες τιμές συν-πλην (\pm) η σταθερή απόκλιση από 28 μετρήσεις για κάθε ουσία.

Τα αποτελέσματα εμφανίζονται επίσης παραστατικά στο αντίστοιχο διάγραμμα 25 υπό τον τύπο ιστογράμματος.

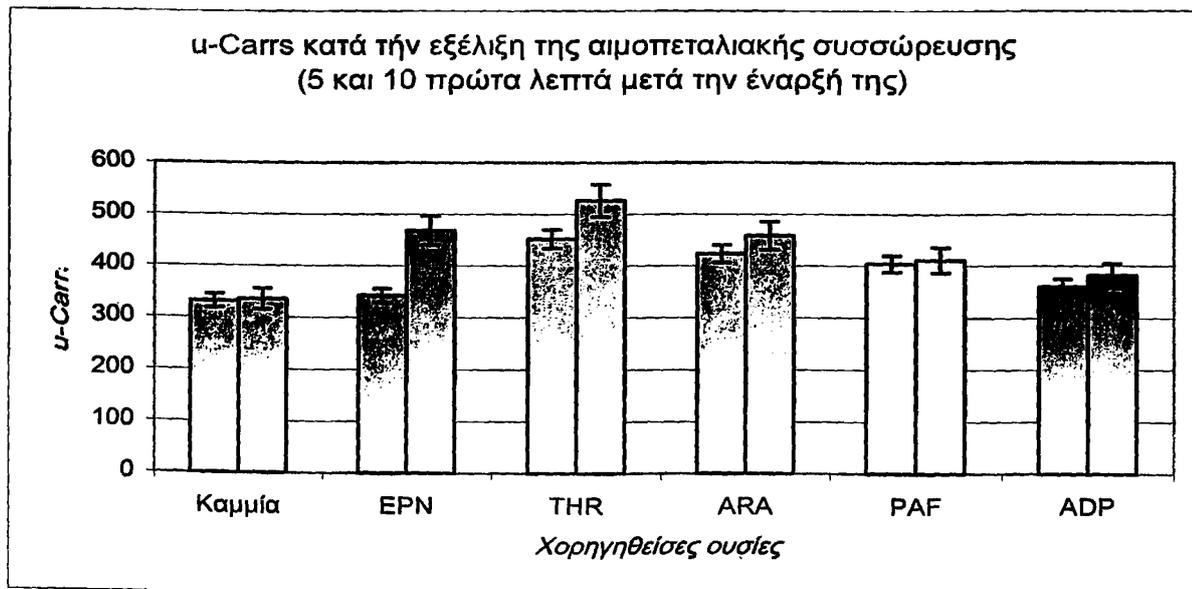


Πίνακας 23

*u-Carrs κατά την εξέλιξη της αιμοπεταλιακής συσσώρευσης (5 και 10 λεπτά μετά την έναρξή της), μετά από χορήγηση των διεγερτών EPN, THR, ARA, PAF και ADP
(ΜΤ±ΣΑ από 28 μετρήσεις για κάθε διεγέρτη)*

Χορηγηθείσες ουσίες	FR (u-Carrs) 5min	FR (u-Carrs) 10min
Καμμία	331±10	335±8
EPN	342±8	468±33
THR	452±24	526±38
ARA	423±19	458±30
PAF	404±20	411±32
ADP	360±16	382±28

Διάγραμμα 23

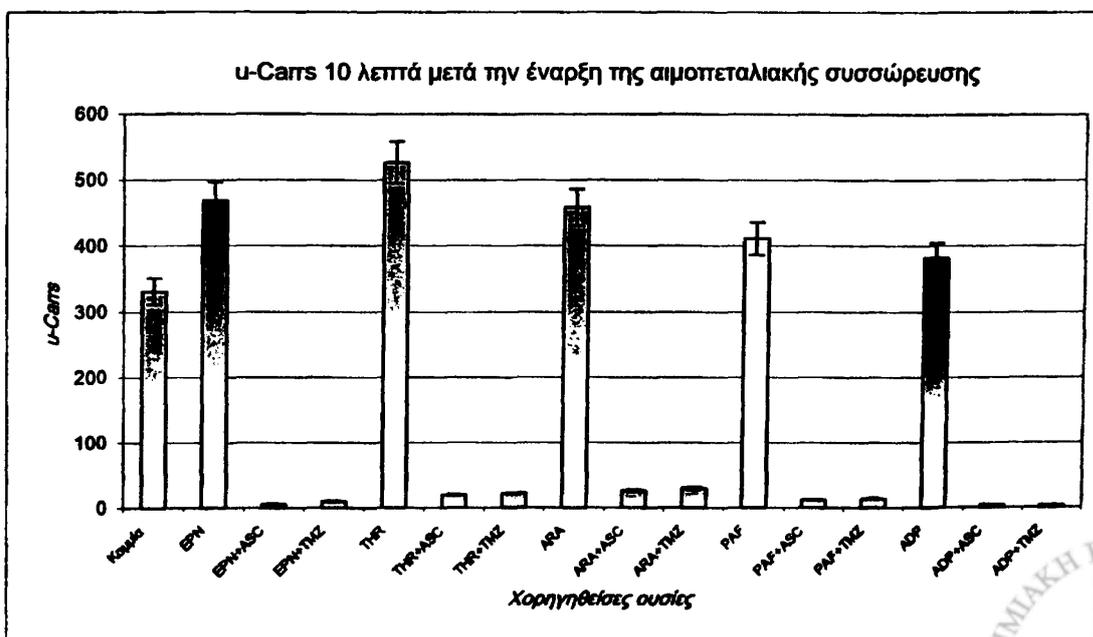


Πίνακας 24

*u-Carrs 10 λεπτά μετά την έναρξη της αιμοπεταλιακής συσσώρευσης
με ASC και TMZ σε συγκέντρωση 3Χ0,001 Μ
(ΜΤ±ΣΑ από 28 μετρήσεις για κάθε ουσία)*

Χορηγηθείσες ουσίες	FR (u-Carrs) 10min
Καμία	335±8
EPN	468±33
EPN+ASC	6±3 (p<0,001)
EPN+TMZ	10±4 (p<0,001)
THR	526±38
THR+ASC	20±8 (p<0,001)
THR+TMZ	22±6 (p<0,001)
ARA	458±30
ARA+ASC	26±5 (p<0,001)
ARA+TMZ	30±4 (p<0,001)
PAF	411±32
PAF+ASC	12±3 (p<0,001)
PAF+TMZ	14±2 (p<0,001)
ADP	382±28
ADP+ASC	4±1 (p<0,001)
ADP+TMZ	3±1 (p<0,001)

Διάγραμμα 24

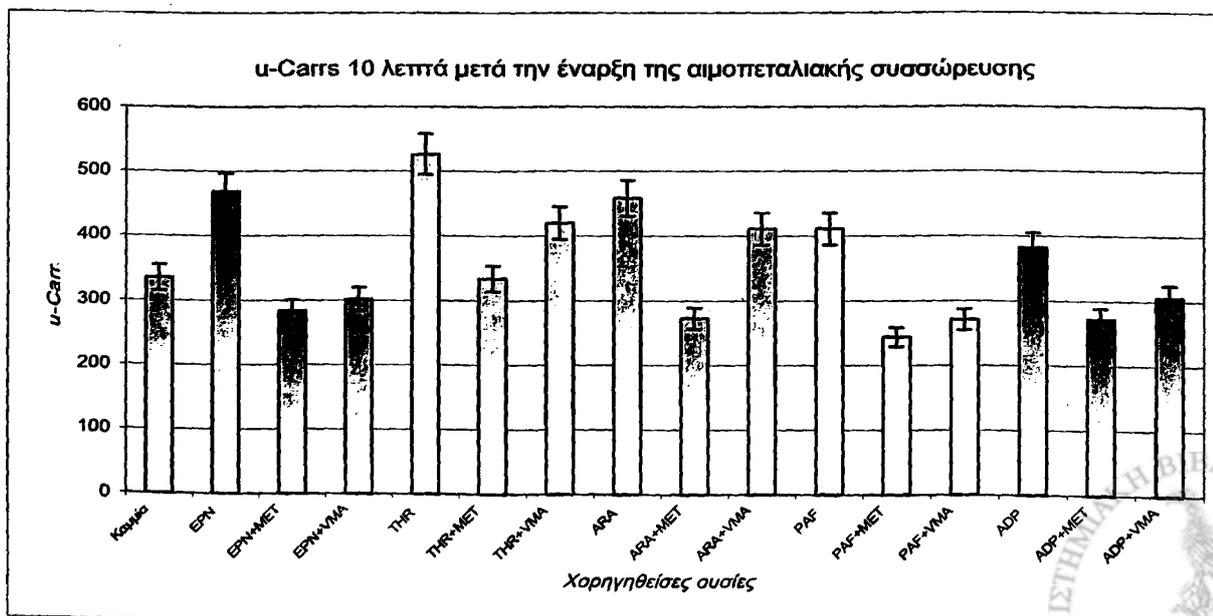


Πίνακας 25

*u-Carrs 10 λεπτά μετά την έναρξη της αιμοπεταλιακής συσσώρευσης
με MET και VMA σε συγκέντρωση 3Χ0,001 Μ
(ΜΤ±ΣΑ από 28 μετρήσεις για κάθε ουσία)*

Χορηγηθείσες ουσίες	FR (u-Carrs) 10min
Καμία	335±8
EPN	468±33
EPN+MET	284±18 (p<0,01)
EPN+VMA	302±19 (p<0,01)
THR	526±38
THR+MET	334±23 (p<0,01)
THR+VMA	420±26 (p<0,02)
ARA	458±30
ARA+MET	273±16 (p<0,01)
ARA+VMA	411±27 (p<0,05)
PAF	411±32
PAF+MET	244±14 (p<0,01)
PAF+VMA	271±15 (p<0,02)
ADP	382±28
ADP+MET	272±12 (p<0,03)
ADP+VMA	306±20 (p<0,04)

Διάγραμμα 25



Από τα δεδομένα των πειραμάτων μέτρησης των παραγομένων από τα αιμοπετάλια ελευθέρων ριζών οξυγόνου κατά το φαινόμενο της αιμοπεταλιακής συσσώρευσης, προκύπτει ότι κατά την αιμοπεταλιακή διέγερση και συσσώρευση παράγονται από τα αιμοπετάλια ελεύθερες ρίζες οξυγόνου, το ποσό των οποίων αυξάνεται κατά την εξέλιξη της συσσώρευσης. Ειδικότερα, το ποσό των ριζών H_2O_2 αυξάνεται κατά πολύ περισσότερο όταν διεγέρτες είναι η θρομβίνη, το αραχιδονικό και η αδρεναλίνη σε σχέση με αυτό που παράγεται όταν διεγέρτες είναι το ADP και ο PAF (Πίνακας 23 και Διάγραμμα 23).

Όσον αφορά την επίδραση της μετανεφρίνης και του VMA στην διαδικασία του σχηματισμού ελευθέρων ριζών οξυγόνου από τα αιμοπετάλια, (συγκεκριμένα ριζών H_2O_2), από τα πειραματικά δεδομένα προκύπτει ότι όταν χορηγούνται μετανεφρίνη και VMA στο PRP παράλληλα με τους αιμοπεταλιακούς διεγέρτες (αδρεναλίνη, ADP, PAF, αραχιδονικό οξύ και θρομβίνη), υπάρχει σημαντική μείωση του ποσού των ριζών H_2O_2 που παράγονται από τα αιμοπετάλια και οι οποίες ανιχνεύονται στο υπερκείμενο. Φαίνεται δηλαδή ότι η μετανεφρίνη και το VMA πιθανώς να δρουν ως "εκκαθαριστές" ελευθέρων ριζών οξυγόνου, όπως φαίνεται και από τα αποτελέσματα των πειραμάτων της εκτίμησης της αντιοξειδωτικής τους ικανότητας (Πίνακας 25 και Διάγραμμα 25).

Αντίστοιχα, η επίδραση του ασκορβικού οξέος και της τριμεταζιδίνης στην παραγωγή ριζών H_2O_2 από τα αιμοπετάλια είναι σημαντικότερη. Όταν χορηγούνται στο PRP ασκορβικό και τριμεταζιδίνη (σε συγκέντρωση 3×10^{-3} M για κάθε ουσία) παράλληλα με τους διεγέρτες (αδρεναλίνη, ADP, PAF, αραχιδονικό οξύ και θρομβίνη), το ποσό των ριζών H_2O_2 σχεδόν μηδενίζεται. Η αναστολή δηλαδή της αιμοπεταλιακής συσσώρευσης συμβαδίζει απόλυτα με την αναστολή της παραγωγής ριζών H_2O_2 από τα αιμοπετάλια. Σε σχέση δε με την δράση της μετανεφρίνης και του VMA στο φαινόμενο της παραγωγής ελευθέρων ριζών οξυγόνου από τα αιμοπετάλια, φαίνεται ότι το ασκορβικό και η τριμεταζιδίνη αποτελούν ισχυρότερους "εκκαθαριστές" ελευθέρων ριζών οξυγόνου, δεδομένου ότι η ελάττωση που προκαλούν στο ποσό των παραγομένων από τα αιμοπετάλια ριζών H_2O_2 είναι μεγαλύτερη από την προκαλούμενη από τη μετανεφρίνη και το VMA (Πίνακας 24 και Διάγραμμα 24).

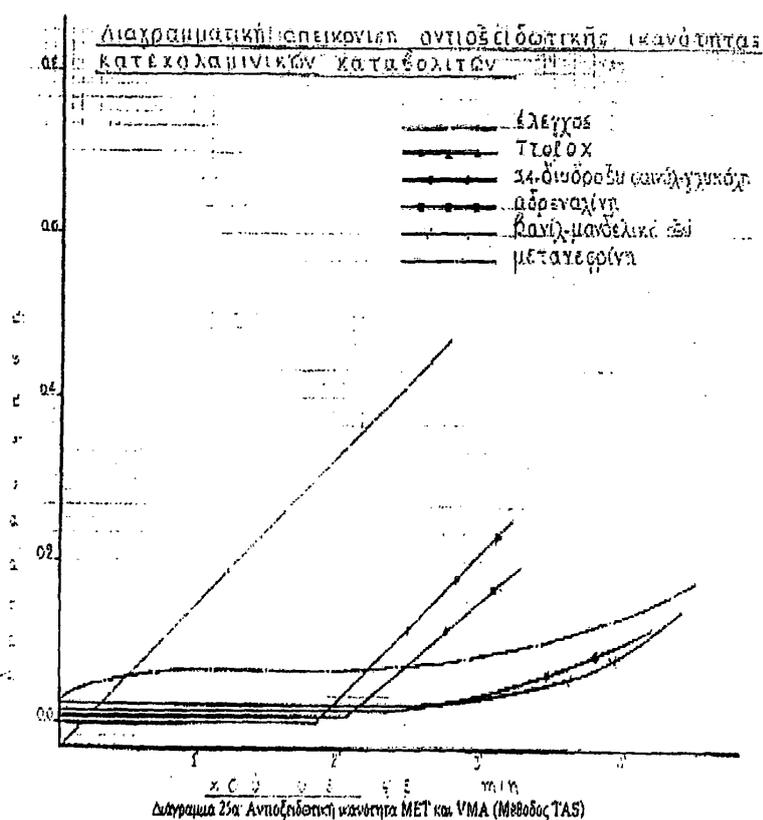


3) Αποτελέσματα πειραμάτων μέτρησης ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας

□ Στον πίνακα 25α και στο διάγραμμα 25α φαίνεται υπό τον τύπο ιστογράμματος η αντιοξειδωτική ικανότητα των κατεχολαμινικών μεταβολιτών MET και VMA, η οποία προσδιορίστηκε με την μέθοδο TAS (Total Antioxidant Status) της εταιρείας RANDOX.

Πίνακας 25α.

Ουσίες	T.A.S.	Λανθάνουσα περίοδος (sec)
Επινεφρίνη	2,10	140
VMA	2,30	150
Μετανεφρίνη	2,40	165



Από τα αποτελέσματα των πειραμάτων εκτίμησης της αντιοξειδωτικής ικανότητας των υπό μελέτη ουσιών (MET και VMA) με την μέθοδο TAS προέκυψε ότι υπήρξε καθυστέρηση στην εμφάνιση του χρώματος του καρβοκατιόντος (όπως περιγράφεται στο Κεφάλαιο “Υλικό και Μέθοδοι”), μετά την προσθήκη στο διάλυμα μετανεφρίνης, όπως και μετά την προσθήκη βανυλμανδελικού οξέος. Η καθυστέρηση της εμφάνισης του χρώματος υποδεικνύει ότι οι εν λόγω ουσίες εμφανίζουν αντιοξειδωτικές ιδιότητες. Για την μετανεφρίνη η καθυστέρηση (λανθάνουσα περίοδος) ήταν 165 sec, ενώ για το VMA ήταν 150 sec. Η αξιολόγηση της αντιοξειδωτικής ισχύος των εν λόγω ουσιών έγινε με το διάλυμα αναφοράς TROLOX, το οποίο είναι μία τροποποιημένη μορφή τοκοφερόλης ώστε να είναι υδατοδιαλυτή, και βρέθηκε για την μετανεφρίνη 2,4 mM/L Trolox και για το VMA 2,3 mM/L Trolox (Πίνακας 25α και Διάγραμμα 25α).

4) Αποτελέσματα πειραμάτων μέτρησης TXB₂

□ Στον πίνακα 26 φαίνονται οι ποσότητες της TXB₂ (pg/ml) 5 λεπτά μετά την έναρξη της αιμοπεταλιακής συσσώρευσης (με διεγέρτες συσσώρευσης την ADR, το ADP, τον PAF, το ARA και την THR). Οι τιμές είναι οι μέσες τιμές συν-πλην (\pm) η σταθερή απόκλιση από 28 μετρήσεις για κάθε ουσία.

Τα αποτελέσματα εμφανίζονται επίσης παραστατικά στο αντίστοιχο διάγραμμα 26 υπό τον τύπο ιστογράμματος.

□ Στον πίνακα 27 φαίνονται οι ποσότητες της TXB₂ (pg/ml) 5 λεπτά μετά την έναρξη της αιμοπεταλιακής συσσώρευσης (με διεγέρτες συσσώρευσης την ADR, το ADP, τον PAF, το ARA και την THR) και με χορήγηση ASC και TMZ σε συγκέντρωση 3×10^{-3} M για κάθε ουσία. Οι τιμές είναι οι μέσες τιμές συν-πλην (\pm) η σταθερή απόκλιση από 28 μετρήσεις για κάθε ουσία.

Τα αποτελέσματα εμφανίζονται επίσης παραστατικά στο αντίστοιχο διάγραμμα 27 υπό τον τύπο ιστογράμματος.

□ Στον πίνακα 28 φαίνονται οι ποσότητες της TXB₂ (pg/ml) 5 λεπτά μετά την έναρξη της αιμοπεταλιακής συσσώρευσης (με διεγέρτες συσσώρευσης την ADR, το ADP, τον PAF, το ARA και την THR) και με χορήγηση MET και VMA σε συγκέντρωση 3×10^{-3} M για κάθε ουσία. Οι τιμές είναι οι μέσες τιμές συν-πλην (\pm) η σταθερή απόκλιση από 28 μετρήσεις για κάθε ουσία.

Τα αποτελέσματα εμφανίζονται επίσης παραστατικά στο αντίστοιχο διάγραμμα 28 υπό τον τύπο ιστογράμματος.

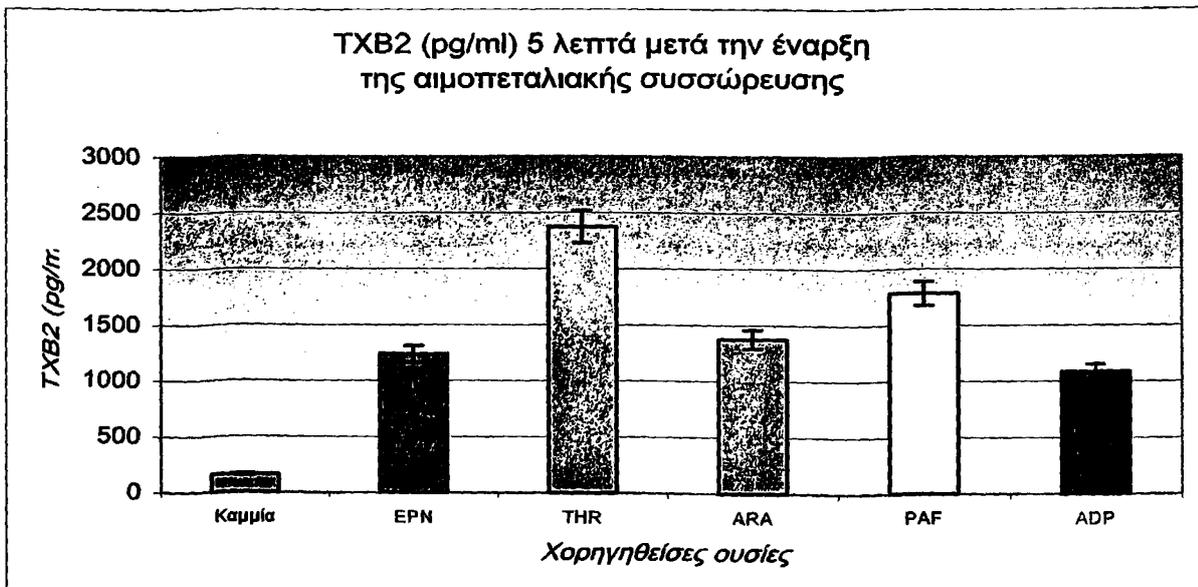


Πίνακας 26

*TXB₂ (pg/ml) 5 λεπτά μετά την έναρξη της αιμοπεταλιακής συσσώρευσης
(ΜΤ±ΣΑ από 28 μετρήσεις για κάθε ουσία)*

Χορηγηθείσες ουσίες	TXB ₂ (pg/ml)
Καμία	160±17
EPN	1237±127
THR	2375±152
ARA	1375±45
PAF	1783±357
ADP	1087±48

Διάγραμμα 26

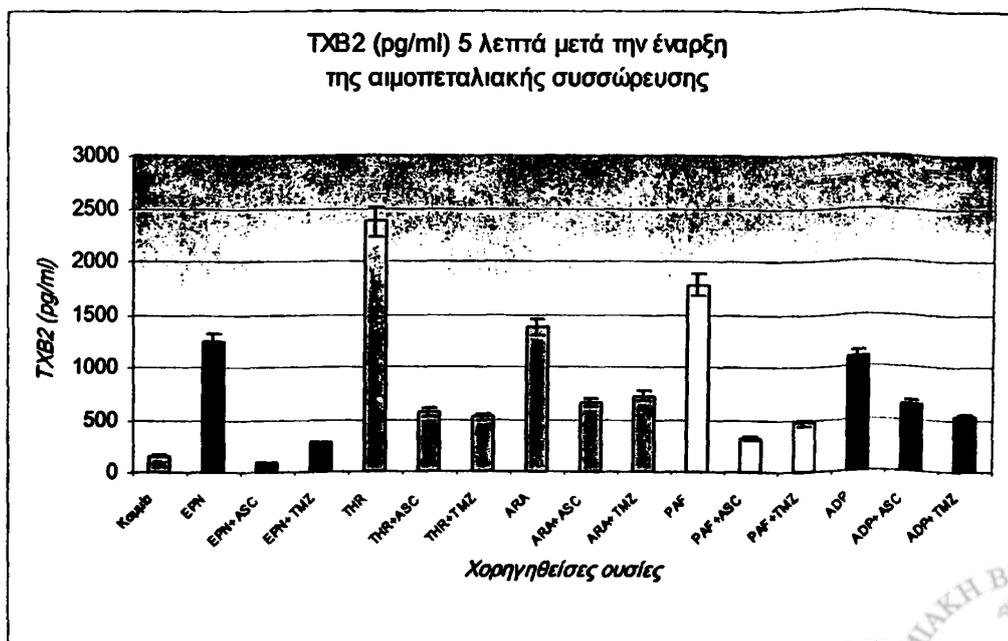


Πίνακας 27

*TXB₂ (pg/ml) 5 λεπτά μετά την έναρξη της αιμοπεταλιακής συσσώρευσης
και με συγκέντρωση ASC και TMZ 3Χ0,001 Μ
(ΜΤ±ΣΑ από 28 μετρήσεις για κάθε ουσία)*

Χορηγηθείσες ουσίες	TXB ₂ (pg/ml)
Καμία	160±17
EPN	1237±127
EPN+ASC	90±12 (p<0,001)
EPN+TMZ	275±17 (p<0,002)
THR	2375±152
THR+ASC	562±36 (p<0,001)
THR+TMZ	525±32 (p<0,001)
ARA	1375±45
ARA+ASC	655±41 (p<0,005)
ARA+TMZ	723±32 (p<0,005)
PAF	1783±357
PAF+ASC	325±35 (p<0,001)
PAF+TMZ	466±50 (p<0,002)
ADP	1087±48
ADP+ASC	637±68 (p<0,005)
ADP+TMZ	525±56 (p<0,004)

Διάγραμμα 27

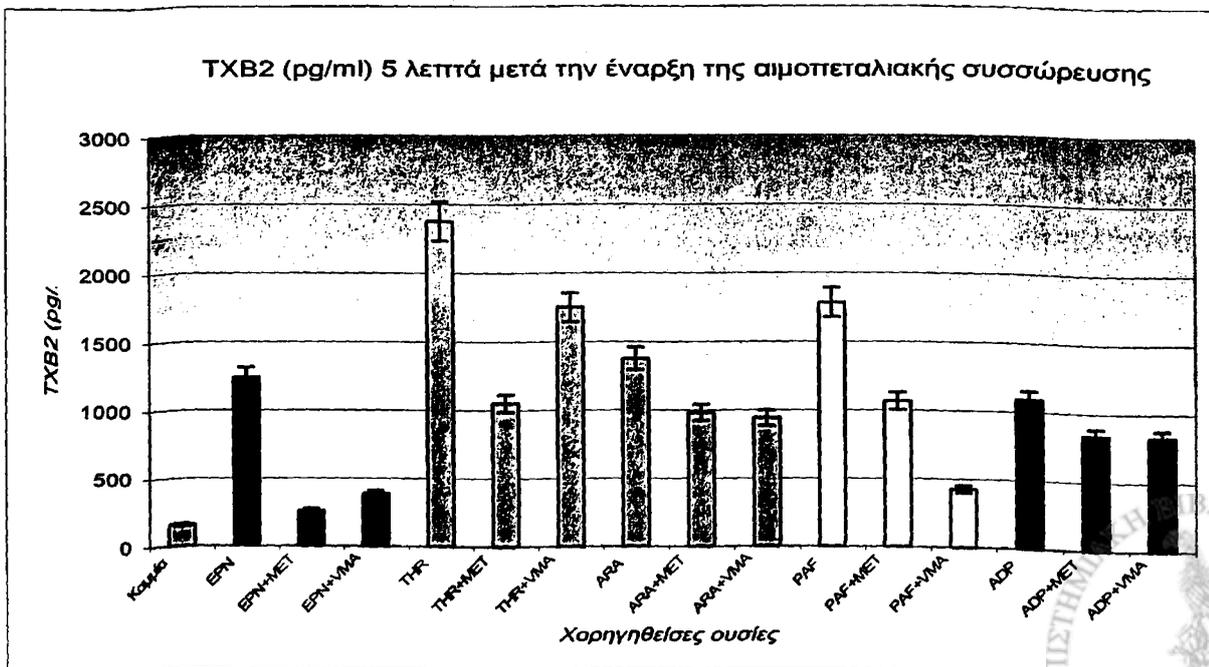


Πίνακας 28

*TXB₂ (pg/ml) 5 λεπτά μετά την έναρξη της αιμοπεταλιακής συσσώρευσης
και με συγκέντρωση MET και VMA 3Χ0,001 Μ
(ΜΤ±ΣΑ από 28 μετρήσεις για κάθε ουσία)*

Χορηγηθείσες ουσίες	TXB ₂ (pg/ml)
Καμία	160±17
EPN	1237±127
EPN+MET	262±18 (p<0,001)
EPN+VMA	387±35 (p<0,002)
THR	2375±152
THR+MET	1050±138 (p<0,005)
THR+VMA	1750±153 (p<0,01)
ARA	1375±45
ARA+MET	980±87 (p<0,01)
ARA+VMA	940±113 (p<0,01)
PAF	1783±357
PAF+MET	1066±123 (p<0,005)
PAF+VMA	425±25 (p<0,004)
ADP	1087±48
ADP+MET	837±39 (p<0,03)
ADP+VMA	825±52 (p<0,03)

Διάγραμμα 28



Από τα αποτελέσματα των πειραμάτων εκτίμησης της παραγωγής TXB_2 από τα αιμοπετάλια προκύπτει ότι το ποσό της αυξάνεται κατά πολύ όταν τα αιμοπετάλια διεγείρονται και μάλιστα είναι μεγαλύτερο όταν αιμοπεταλιακοί διεγέρτες είναι η θρομβίνη, το αραχιδονικό οξύ και PAF από αυτό που παράγεται όταν διεγέρτες είναι η επινεφρίνη και το ADP (Πίνακας 26 και Διάγραμμα 26).

Όταν παράλληλα με τους διεγέρτες (αδρεναλίνη, ADP, PAF, αραχιδονικό οξύ και θρομβίνη), χορηγούνται στο PRP μετανεφρίνη και VMA, υπάρχει μία σημαντική μείωση του ποσού της παραγόμενης από τα αιμοπετάλια TXB_2 (Πίνακας 28 και Διάγραμμα 28). Ακόμη μεγαλύτερη είναι η μείωση της παραγωγής TXB_2 , όταν παράλληλα με τους διεγέρτες χορηγούνται στο PRP ασκορβικό οξύ ή τριμεταζιδίνη (Πίνακας 27 και Διάγραμμα 27).

Η αύξηση του ποσού της παραγόμενης από τα διεγειρόμενα αιμοπετάλια TXB_2 συμβαδίζει με την εξέλιξη της αιμοπεταλιακής συσσώρευσης όπως και με την αύξηση των παραγομένων από τα αιμοπετάλια ριζών H_2O_2 , γεγονός που δεικνύει ότι στο όλο φαινόμενο της αιμοπεταλιακής συσσώρευσης εμπλέκονται μηχανισμοί παραγωγής ελευθέρων ριζών οξυγόνου, οι οποίοι σχετίζονται άμεσα με την παραγωγή της TXB_2 . Ως γνωστόν, η TXB_2 αποτελεί σταθερό μεταβολίτη της σχετικά ασταθούς TXA_2 , η οποία παράγεται με την δράση του ενζύμου κυκλοξυγονάση.

5) Αποτελέσματα πειραμάτων κυτταρομετρίας ροής

□ Στον πίνακα 29 φαίνεται η έκφραση του υποδοχέα Gr IIb-IIIa των αιμοπεταλίων ανθρώπου (υποδοχείς ανά αιμοπετάλιο) μετά από χορήγηση MET, VMA, ASC και TMZ (σε συγκέντρωση $3 \leq 10^{-3}$ M για κάθε ουσία). Οι τιμές είναι οι μέσες τιμές συν-πλην (\pm) η σταθερή απόκλιση από 28 μετρήσεις για κάθε ουσία.

Τα αποτελέσματα εμφανίζονται επίσης παραστατικά στο αντίστοιχο διάγραμμα 29 υπό τον τύπο ιστογράμματος.

□ Στον πίνακα 30 φαίνεται η αναστολή έκφρασης (%) του αιμοπεταλιακού υποδοχέα Gr IIb-IIIa μετά από χορήγηση MET, VMA, ASC και TMZ (σε συγκέντρωση $3 \leq 10^{-3}$ M για κάθε ουσία). Οι τιμές είναι οι μέσες τιμές συν-πλην (\pm) η σταθερή απόκλιση από 28 μετρήσεις για κάθε ουσία.

Τα αποτελέσματα εμφανίζονται επίσης παραστατικά στο αντίστοιχο διάγραμμα 30 υπό τον τύπο ιστογράμματος.

□ Στα διαγράμματα 31 έως 35 φαίνεται η έκφραση του υποδοχέα Gr IIb-IIIa των αιμοπεταλίων ανθρώπου (υποδοχείς ανά αιμοπετάλιο) μετά από χορήγηση MET, VMA, ASC και TMZ (σε συγκέντρωση $3 \leq 10^{-3}$ M για κάθε ουσία), όπως επίσης και οι υποδοχείς ανά αιμοπετάλιο ανθρώπου, χωρίς να χορηγηθεί καμία από τις προαναφερθείσες ουσίες.

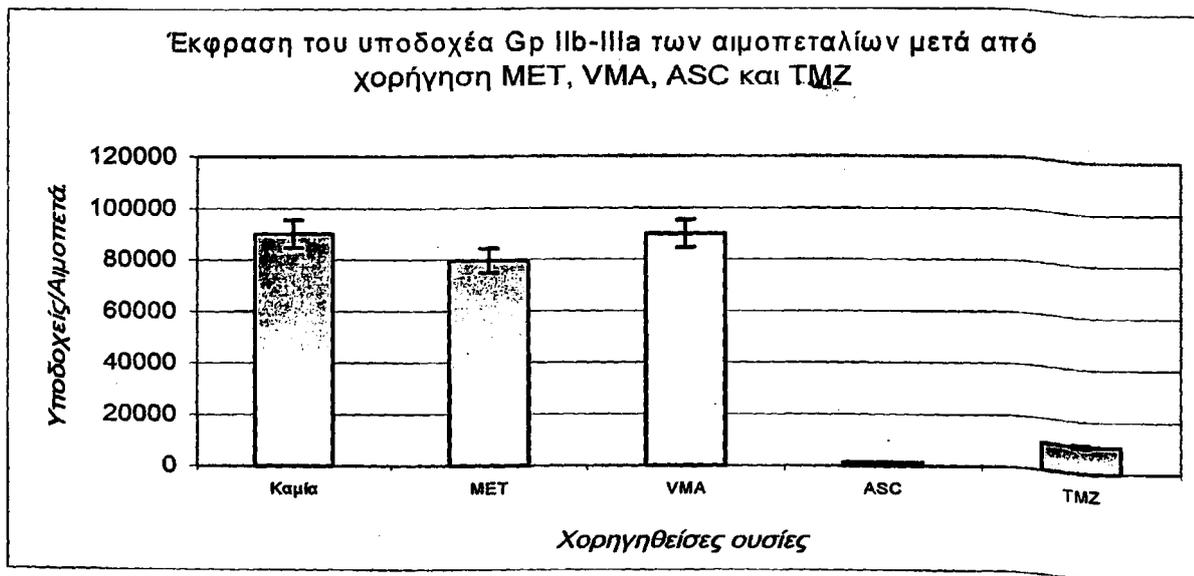


Πίνακας 29

Έκφραση του υποδοχέα Gr IIb-IIIa των αιμοπεταλίων μετά από χορήγηση
 MET, VMA, ASC και TMZ (σε συγκέντρωση 3Χ0,001 Μ)
 (ΜΤ±ΣΑ από 28 μετρήσεις για κάθε ουσία)

Χορηγηθείσες ουσίες	Υποδοχείς/Αιμοπετάλιο
Καμία	90138±4562
MET	79591±3874
VMA	88484±3425
ASC	1408±112 (p<0,001)
TMZ	10339±618 (p<0,001)

Διάγραμμα 29

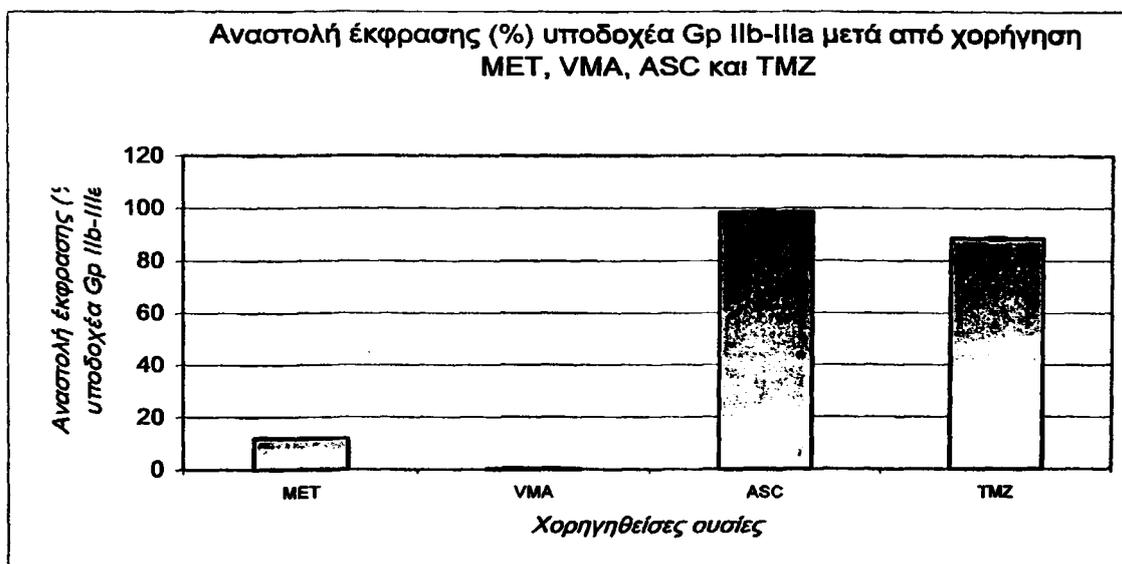


Πίνακας 30

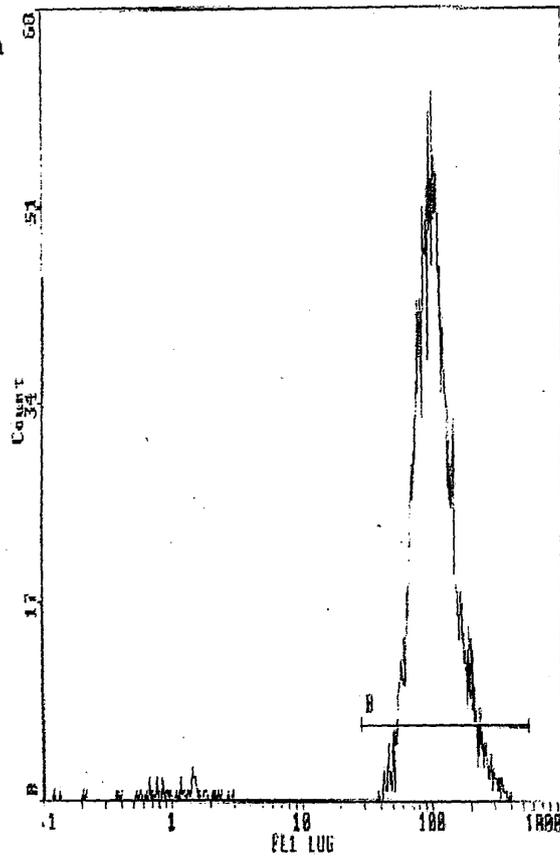
Αναστολή έκφρασης (%) του αιμοπεταλιακού υποδοχέα Gr IIb-IIIa μετά από χορήγηση MET, VMA, ASC και TMZ (σε συγκέντρωση 3Χ0,001 Μ)

Χορηγηθείσες ουσίες	Αναστολή έκφρασης (%) υποδοχέα Gr IIb-IIIa
MET	11,7±0,7
VMA	0,2±0,1
ASC	98,5±0,4
TMZ	88,5±1,2

Διάγραμμα 30



Διάγραμμα 31: Έκφραση του υποδοχέα GrIIb-IIIa των αιμοπεταλίων ανθρώπου (υποδοχείς ανά αιμοπεταλίο)

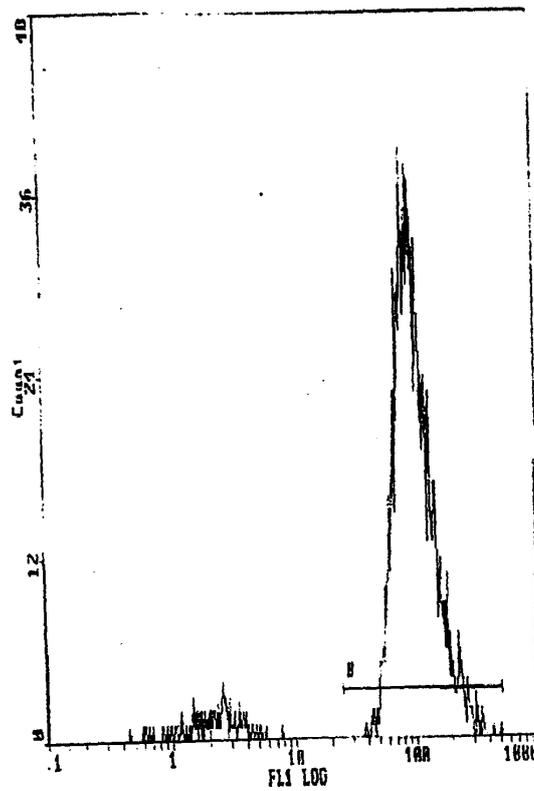


Stats Not Normalized. Listgating: Disabled

Hist	Region ID	%	Count	Mn X	Md X	PkPosX	PkCm	HPCV	Min	Max
3	B B	94.1	4729	109.8	106.0	113.0	66	14.60	29.6	565.0



Διάγραμμα 32: Έκφραση του υποδοχέα GrPb-IIIa των αιμοπεταλίων ανθρώπου (υποδοχείς ανά αιμοπεταλίο), μετά από χορήγηση MET σε συγκέντρωση 3 X 0,001 M

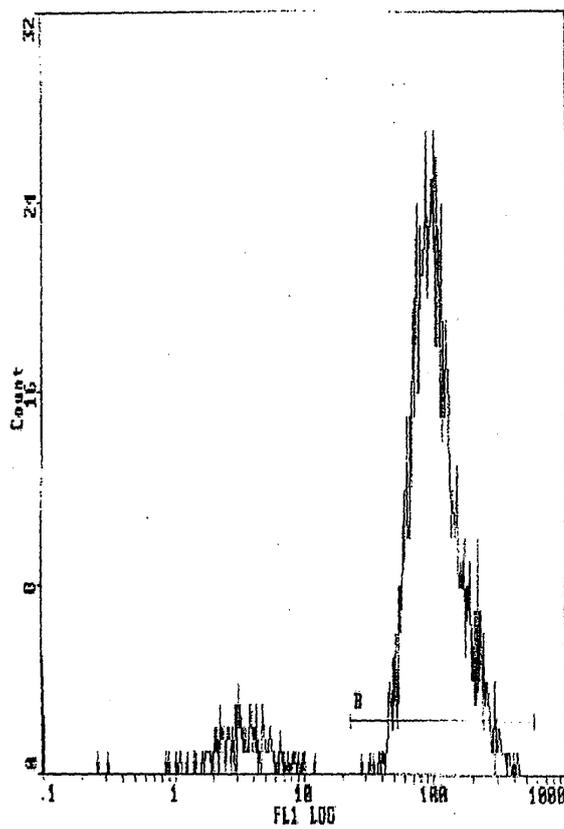


Stats: Not Normalized. Listgating: Disabled

Hist	Region ID	%	Count	Mn X	Md X	Pk-PosX	Pk-Clst	HPLV	Min	Max
3	B B	90.3	3129	105.3	100.3	85.5	45	13.78	25.2	226.3



Διάγραμμα 33: Έκφραση του υποδοχέα
Grp94 των αιμοπεταλίων
ανθρώπου (υποδοχείς αντί
αιμοπετάλιο), μετά από
χρήση VMA
σε συγκέντρωση $3 \times 10^{-6} \text{ M}$



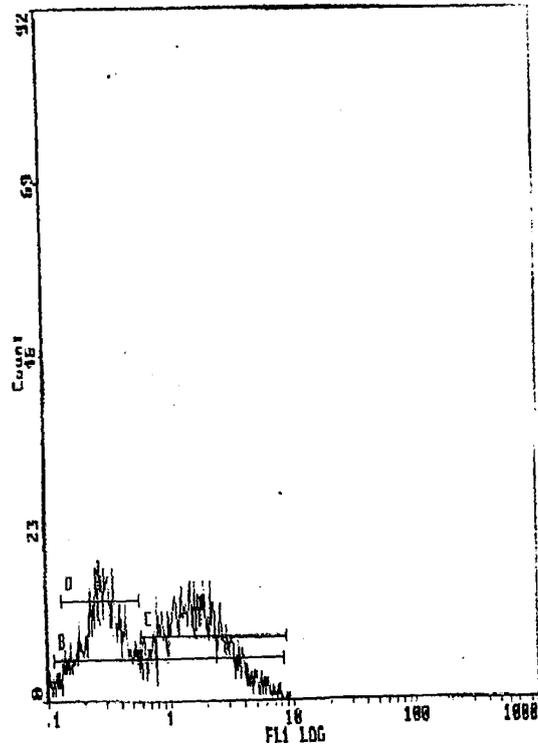
Stats: Not Normalized.

Listgating: Disabled

Hist	Region ID	%	Count	Mn X	Std X	PkPosX	PkCnt	HPCV	Min	Max
3	B B	88.2	2537	107.2	102.6	104.3	30	15.95	23.4	366.3



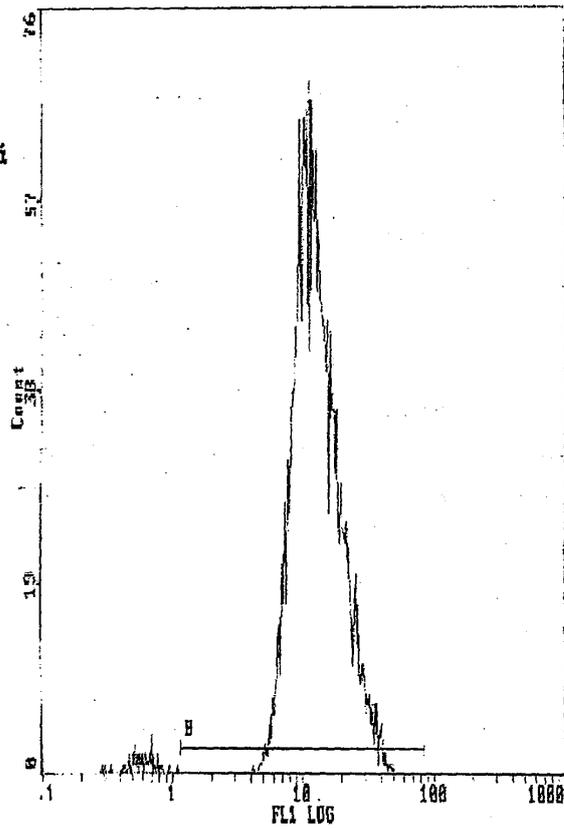
Διάγραμμα 34: Έκφραση του υποδοχέα
Gp11b-IIIa των αιμοπεταλίων
ανθρώπου (υποδοχείς ανέ
αιμοπετάλιο), μετά από
χρήση ASC
σε συγκέντρωση 3 X 0,001 M



Stat: Not Normalized. Largaing: Disabled

Hist	Region ID	%	Count	Md X	Md X	PkPosX	PkCnt	HPCV	Min	Max
3	B B	94.5	3895	0.804	0.860	0.259	25	1.60	0.116	2.61
	C C	54.7	2255	1.71	1.65	1.39	21	1.27	0.597	9.03
	D D	38.4	1584	0.292	0.294	0.259	25	1.60	0.137	0.586

Διάγραμμα 35: Έκφραση του υποδοχέα
GPIIb-IIIa
των αιμοπεταλίων
ανθρώπου (υποδοχείς ανά
αιμοπετάλιο), μετά από
χρήρηση TMZ
σε συγκέντρωση
3 X 0,001M



Stats: Not Normalized, Listgating: Disabled

Plot	Region ID	%	Count	Min X	Mid X	PltPosX	PltCat	HPCV	Min	Max
3	B R	97.8	6323	13.3	12.7	11.6	74	23.22	1.18	87.9



Από τα αποτελέσματα των πειραμάτων για την εκτίμηση του βαθμού έκφρασης του αιμοπεταλιακού υποδοχέα GrIIb-IIIa προκύπτει ότι το ασκορβικό οξύ προκαλεί αναστολή της έκφρασης του σε ποσοστό 98,5% και η τριμεταζιδίνη σε ποσοστό 88,5% (Πίνακας 30 και Διάγραμμα 30). Αναλυτικότερα, όπως περιγράφεται στο Κεφάλαιο "Υλικό και Μέθοδοι" παρ. 1.7, και φαίνεται ενδεικτικά από το Διάγραμμα 31 του κυτταρομετρητή ροής, ένταση του φθορισμού $MnX=109,8$ αντιστοιχεί σε 90138 υποδοχείς Gr IIb/IIIa ανά αιμοπετάλιο ανθρώπου, όταν αυτό δεν είναι διεγερμένο (Πίνακας 29 και Διάγραμμα 29). Όταν χορηγηθεί στο αιμοπεταλιακό εναιώρημα ασκορβικό οξύ, η ένταση του φθορισμού, όπως καταγράφεται από τον κυτταρομετρητή ροής είναι $MnX=0,804$ και αντιστοιχεί σε 1408 υποδοχείς Gr IIb/IIIa ανά αιμοπετάλιο (Πίνακας 29 και Διάγραμμα 29). Παράλληλα, το ασκορβικό οξύ φαίνεται να προκαλεί και μία μεταβολή στην στερεοχημική διάταξη του μορίου του εν λόγω υποδοχέα, όπως προκύπτει από τα γραφήματα του κυτταρομετρητή ροής (Διάγραμμα 34).

Αντίστοιχα, η τριμεταζιδίνη προκαλεί σημαντικότερη ελάττωση της έκφρασης του εν λόγω υποδοχέα όταν χορηγείται στο αιμοπεταλιακό εναιώρημα (Ένταση φθορισμού $MnX=13,3$ που αντιστοιχεί σε 10339 υποδοχείς Gr IIb/IIIa ανά αιμοπετάλιο), όπως φαίνεται στο Διάγραμμα 35 του κυτταρομετρητή ροής και στους Πίνακες 29 και 30, όπως επίσης και στα Διαγράμματα 29 και 30.

Το γεγονός ότι μετά την χορήγηση ασκορβικού ή τριμεταζιδίνης αναστέλλεται η έκφραση του αιμοπεταλιακού υποδοχέα GrIIb-IIIa κατά 98,5% και 88,5% αντίστοιχα, δεικνύει ότι οι δύο ουσίες πιθανόν να δρουν και σε επίπεδο μεμβρανικών υποδοχέων αναστέλλοντας την έκφρασή τους και κατά συνέπεια την δημιουργία του αιμοπεταλιακού θρόμβου.

Αντίθετα, τα κατεχολαμινικά μεταβολικά προϊόντα μετανεφρίνη και VMA δεν φαίνεται να έχουν επίδραση στην έκφραση του εν λόγω υποδοχέα, γεγονός που δεικνύει ότι η αντιαιμοπεταλιακή τους δράση τους δεν ασκείται μέσω του συγκεκριμένου υποδοχέα (Πίνακες 29 και 30, Διαγράμματα 29 και 30). Αναλυτικότερα, όταν χορηγείται μετανεφρίνη στο αιμοπεταλιακό εναιώρημα, η ένταση του φθορισμού γίνεται $MnX=105,3$ (φαίνεται ενδεικτικά στο Διάγραμμα 32) και αντιστοιχεί σε 79591 υποδοχείς Gr IIb/IIIa ανά αιμοπετάλιο (Πίνακας 29 και Διάγραμμα 29), ενώ όταν χορηγείται VMA στο αιμοπεταλιακό εναιώρημα, η ένταση του φθορισμού γίνεται $MnX=107,2$ (φαίνεται ενδεικτικά στο Διάγραμμα 33) και αντιστοιχεί σε 88484 υποδοχείς Gr IIb/IIIa ανά αιμοπετάλιο (Πίνακας 29 και Διάγραμμα 29).



ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Από τα αποτελέσματα των πειραμάτων της αιμοπεταλιακής συσσώρευσης φάνηκε ότι τα μεταβολικά προϊόντα των κατεχολαμινών, μετανεφρίνη και βανυλμανδελικό οξύ (VMA), ανέστειλαν σε σημαντικό βαθμό την αιμοπεταλιακή συσσώρευση που προκλήθηκε από την αδρεναλίνη, το ADP και τον PAF, ενώ δεν είχαν σχεδόν καμία επίδραση στην αιμοπεταλιακή συσσώρευση που προκλήθηκε από την θρομβίνη και το αραχιδονικό οξύ (μέχρι την συγκέντρωση 3×10^{-3} M, στην οποία χρησιμοποιήθηκαν). Αντίθετα, το ασκορβικό οξύ και η τριμεταζιδίνη (σε συγκέντρωση 3×10^{-3} M) ανέστειλαν σε ποσοστό 100% την αιμοπεταλιακή συσσώρευση που προκλήθηκε από όλους τους αιμοπεταλιακούς διεγέρτες που χρησιμοποιήθηκαν (αδρεναλίνη, ADP, PAF, αραχιδονικό οξύ και θρομβίνη).

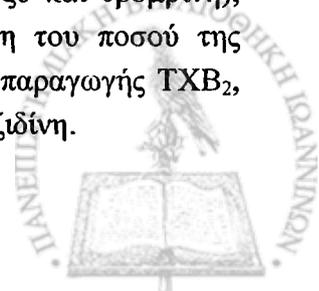
Από τα δεδομένα των πειραμάτων μέτρησης των παραγομένων από τα αιμοπετάλια ελευθέρων ριζών οξυγόνου κατά το φαινόμενο της αιμοπεταλιακής συσσώρευσης, προκύπτει ότι κατά την αιμοπεταλιακή διέγερση και συσσώρευση παράγονται από τα αιμοπετάλια ελεύθερες ρίζες οξυγόνου, το ποσό των οποίων αυξάνεται κατά την εξέλιξη της συσσώρευσης. Ειδικότερα, το ποσό των ριζών H_2O_2 αυξάνεται κατά πολύ περισσότερο όταν διεγέρτες είναι η θρομβίνη, το αραχιδονικό και η αδρεναλίνη σε σχέση με αυτό που παράγεται όταν διεγέρτες είναι το ADP και ο PAF.

Όσον αφορά την επίδραση της μετανεφρίνης και του VMA στην διαδικασία του σχηματισμού ελευθέρων ριζών οξυγόνου από τα αιμοπετάλια, (συγκεκριμένα ριζών H_2O_2), από τα πειραματικά δεδομένα προκύπτει ότι όταν χορηγούνται μετανεφρίνη και VMA στο PRP παράλληλα με τους αιμοπεταλιακούς διεγέρτες (αδρεναλίνη, ADP, PAF, αραχιδονικό οξύ και θρομβίνη), υπάρχει σημαντική μείωση του ποσού των ριζών H_2O_2 που παράγονται από τα αιμοπετάλια και οι οποίες ανιχνεύονται στο υπερκείμενο. Φαίνεται δηλαδή ότι η μετανεφρίνη και το VMA πιθανώς να δρουν ως "εκκαθαριστές" ελευθέρων ριζών οξυγόνου, όπως φαίνεται και από τα αποτελέσματα των πειραμάτων της εκτίμησης της αντιοξειδωτικής τους ικανότητας.

Αντίστοιχα, η επίδραση του ασκορβικού οξέος και της τριμεταζιδίνης στην παραγωγή ριζών H_2O_2 από τα αιμοπετάλια είναι σημαντικότερη. Όταν χορηγούνται στο PRP ασκορβικό και τριμεταζιδίνη (σε συγκέντρωση 3×10^{-3} M για κάθε ουσία) παράλληλα με τους διεγέρτες (αδρεναλίνη, ADP, PAF, αραχιδονικό οξύ και θρομβίνη), το ποσό των ριζών H_2O_2 σχεδόν μηδενίζεται. Η αναστολή δηλαδή της αιμοπεταλιακής συσσώρευσης συμβαδίζει απόλυτα με την αναστολή της παραγωγής ριζών H_2O_2 από τα αιμοπετάλια. Σε σχέση δε με την δράση της μετανεφρίνης και του VMA στο φαινόμενο της παραγωγής ελευθέρων ριζών οξυγόνου από τα αιμοπετάλια, φαίνεται ότι το ασκορβικό και η τριμεταζιδίνη αποτελούν ισχυρότερους "εκκαθαριστές" ελευθέρων ριζών οξυγόνου, δεδομένου ότι η ελάττωση που προκαλούν στο ποσό των παραγομένων από τα αιμοπετάλια ριζών H_2O_2 είναι μεγαλύτερη από την προκαλούμενη από τη μετανεφρίνη και το VMA.

Από τα αποτελέσματα των πειραμάτων εκτίμησης της παραγωγής TXB_2 από τα αιμοπετάλια προκύπτει ότι το ποσό της αυξάνεται κατά πολύ όταν τα αιμοπετάλια διεγείρονται και μάλιστα είναι μεγαλύτερο όταν αιμοπεταλιακοί διεγέρτες είναι η θρομβίνη, το αραχιδονικό οξύ και PAF από αυτό που παράγεται όταν διεγέρτες είναι η επινεφρίνη και το ADP.

Όταν παράλληλα με τους διεγέρτες (αδρεναλίνη, ADP, PAF, αραχιδονικό οξύ και θρομβίνη), χορηγούνται στο PRP μετανεφρίνη και VMA, υπάρχει μία σημαντική μείωση του ποσού της παραγόμενης από τα αιμοπετάλια TXB_2 . Ακόμη μεγαλύτερη είναι η μείωση της παραγωγής TXB_2 , όταν παράλληλα με τους διεγέρτες χορηγούνται στο PRP ασκορβικό οξύ ή τριμεταζιδίνη.



Η αύξηση του ποσού της παραγόμενης από τα διεγερόμενα αιμοπετάλια TXB_2 συμβαδίζει με την εξέλιξη της αιμοπεταλιακής συσσώρευσης όπως και με την αύξηση των παραγομένων από τα αιμοπετάλια ριζών H_2O_2 , γεγονός που δεικνύει ότι στο όλο φαινόμενο της αιμοπεταλιακής συσσώρευσης εμπλέκονται μηχανισμοί παραγωγής ελευθέρων ριζών οξυγόνου, οι οποίοι σχετίζονται άμεσα με την παραγωγή της TXB_2 . Ως γνωστόν, η TXB_2 αποτελεί σταθερό μεταβολίτη της σχετικά ασταθούς TXA_2 , η οποία παράγεται με την δράση του ενζύμου κυκλοξυγονάση.

Τέλος, από τα αποτελέσματα των πειραμάτων για την εκτίμηση του βαθμού έκφρασης του αιμοπεταλιακού υποδοχέα $GrIIb-IIIa$ προκύπτει ότι το ασκορβικό οξύ προκαλεί αναστολή της έκφρασής του σε ποσοστό 98,5% και η τριμεταζιδίνη σε ποσοστό 88,5%. Παράλληλα, το ασκορβικό οξύ φαίνεται να προκαλεί και μία μεταβολή στην στερεοχημική διάταξη του μορίου του εν λόγω υποδοχέα, όπως προκύπτει από τα γραφήματα του κυτταρομετρητή ροής. Αντίθετα, τα κατεχολαμινικά μεταβολικά προϊόντα μετανεφρίνη και VMA δεν φαίνεται να έχουν καμία επίδραση στην έκφραση του εν λόγω υποδοχέα, γεγονός που δεικνύει ότι η αντιαιμοπεταλιακή τους δράση τους δεν ασκείται μέσω του συγκεκριμένου υποδοχέα.

Όπως έχει ήδη αναφερθεί στο ανά χείρας κείμενο, περί τα μέσα της δεκαετίας του 1990, στο Εργαστήριο της Πειραματικής Φυσιολογίας του Ιατρικού Τμήματος του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, άρχισε μία μελέτη που στόχευε στην εξακρίβωση των πιθανών μηχανισμών που εμπλέκονται στην ρύθμιση της αιμοπεταλιακής συσσώρευσης που προκαλείται από διάφορους διεγέρτες των αιμοπεταλίων. Στα πλαίσια αυτής της μελέτης διατυπώθηκε η άποψη ότι είναι πιθανόν η σταδιακή απευαισθητοποίηση των αιμοπεταλίων στην δράση διεγερτών τους να μην είναι ο μοναδικός ρυθμιστικός μηχανισμός της αιμοπεταλιακής συσσώρευσης. Για την ερμηνεία του φαινομένου της άμεσης ρύθμισης του βαθμού της αιμοπεταλιακής διέγερσης έγινε η υπόθεση ότι η συσσώρευση που προκαλείται από την αδρεναλίνη και άλλους διεγέρτες των αιμοπεταλίων, πιθανόν να αυτορυθμίζεται άμεσα από προϊόντα μεταβολισμού των κατεχολαμινών στον ανθρώπινο οργανισμό, με έναν μηχανισμό αρνητικής παλίνδρομης ρύθμισης (negative feed-back mechanism). Επίσης είναι γνωστό ότι ο καταβολισμός των κατεχολαμινών μέσω κυρίως της μονοαμινοξειδάσης (MAO), οδηγεί στην παραγωγή δραστικών μορφών οξυγόνου (Ελευθέρων Ριζών Οξυγόνου), που συμβάλλουν στο οξειδωτικό stress⁴⁹¹⁻⁴⁹³.

Σήμερα είναι πλέον γνωστό ότι τα αιμοπετάλια συμμετέχουν εκτός από τον πηκτικό μηχανισμό και σε φλεγμονώδεις αντιδράσεις μέσω της έκκρισης δραστικών ουσιών οι οποίες εκλύονται κατά την διέγερση των εν λόγω κυττάρων. Τέτοιες ουσίες όπως η σεροτονίνη, η θρομβοξάνη A_2 (TXA_2), ο αιμοπεταλιακός παράγοντας 4 (PF-4), ο παράγοντας ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων (PAF) και άλλα εικοσανοειδή επηρεάζουν τις λειτουργίες και πολλών άλλων κυττάρων (ουδετεροφίλων, λεμφοκυττάρων, μακροφάγων κ.α.) προκαλώντας την έκλυση μεσολαβητών-διαβιβαστών²⁷⁹⁻²⁸¹ και μεταβάλλουν την συσταλτικότητα και την διαβατότητα των τριχοειδών²⁸². Ακόμη, τα αιμοπετάλια διαθέτουν φαγοκυτταρικές ιδιότητες²⁸³ και κάτω από ορισμένες συνθήκες όπως π.χ. σε ασθενείς με άσθμα που εκλύεται από την ασπιρίνη, μπορεί να εμφανίζουν in vivo κυτταροτοξική δράση²⁸⁵.

Πολλές από αυτές τις δράσεις των αιμοπεταλίων προϋποθέτουν την ικανότητα παραγωγής EPO εκ μέρους των κυττάρων αυτών. Ήδη από το 1976 έχει δειχθεί από τον Marcus και συν. ότι τα αιμοπετάλια παράγουν υψηλής δραστηριότητας ελεύθερες ρίζες O_2^{\cdot} και HO^{\cdot} , ανιχνευόμενες στο υπερκείμενο των εναιωρημάτων τους²⁸⁴. Παράλληλα, in vitro μελέτες από τον Mills και συν. έδειξαν ότι κατά την αντίδραση της αιμοπεταλιακής κυκλοξυγονάσης με λινελαϊκό οξύ μπορεί να παραχθούν ελεύθερες ρίζες ικανές να προκαλέσουν χημειοφωταύγεια²⁸⁷. Μεταγενέστερα δεδομένα παρέχουν ενδείξεις ότι τα διεγερόμενα αιμοπετάλια παράγουν ελεύθερες ρίζες ανιόντος υπεροξειδίου ($O_2^{\cdot-}$) και



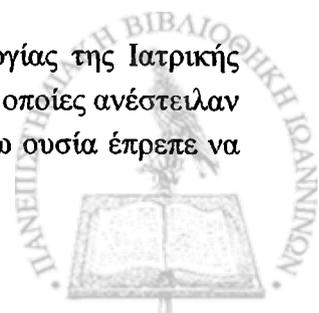
υδροξυλίου ($\text{HO}\cdot$) που ανιχνεύονται με παραμαγνητικό ηλεκτρονικό συντονισμό (ESR) και μερικές φορές με την αναγωγή του κυττοχρώματος $\text{C}^{288-293,462}$.

Άλλες μελέτες έδειξαν ότι κατά την διάρκεια της αιμοπεταλιακής συσσώρευσης απελευθερώνονται από τα αιμοπετάλια και άλλα είδη ενεργών μορφών οξυγόνου, όπως π.χ. το H_2O_2 ^{290,293,294}. Έχει επίσης αποδειχθεί ότι ένα μέρος του H_2O_2 που παράγεται από τα αιμοπετάλια μετατρέπεται στην πολύ δραστική μορφή της ρίζας υδροξυλίου ($\text{HO}\cdot$) - με έναν τρόπο παρόμοιο της αντίδρασης Fenton - εφ' όσον εκκαθαριστές του $\text{HO}\cdot$ αναστέλλουν την αιμοπεταλιακή συσσώρευση που προκαλείται από ADP, κολλαγόνο, αραχιδονικό οξύ και PAF²⁹⁵⁻²⁹⁷. Νεότερα δεδομένα δείχνουν ότι η αιμοπεταλιακή συσσώρευση που προκαλείται από κολλαγόνο σχετίζεται με την παραγωγή ριζών $\text{O}_2\cdot^-$ και $\text{HO}\cdot$, η οποία εξαρτάται από την ποσότητα του αραχιδονικού οξέος που απελευθερώνεται²⁹⁸. Οι Krinsky και συν. διαπίστωσαν επίσης την παραγωγή H_2O_2 κατά την φαγοκύτωση σωματιδίων latex από αιμοπετάλια²⁸⁴.

Περί τα τέλη της δεκαετίας του 1970 έγινε γνωστό από Γερμανούς ερευνητές ότι τα αιμοπετάλια είναι δυνατόν να ενεργοποιηθούν μέσω παραγωγής ελευθέρων ριζών οξυγόνου από εξωγενώς χορηγούμενα οξειδωτικά μέσα. Έτσι, οι Peter Wurner, Heinrich Patscheke και Walf Paschen έδειξαν ότι αιμοπεταλιακή συσσώρευση μπορούν να προκαλέσουν ρίζες $\text{HO}\cdot$, $^1\text{O}_2$ και H_2O_2 οι οποίες παράγονται από τετραϋπεροξυχρωμικό κάλιο³⁰⁶. Οι συγγραφείς καταλήγουν επίσης στο συμπέρασμα ότι το υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2) λειτουργεί ως παράγοντας μεταβολής του σχήματος και ως συσσωρευτής των αιμοπεταλίων, ενώ το μονήρες οξυγόνο ($^1\text{O}_2$) και η ενεργότατη οξειδωτική ρίζα του υδροξυλίου ($\text{HO}\cdot$) λειτουργούν ως πυροδότες των αντιδράσεων έκλυσης των αιμοπεταλιακών κοκκίων. Στην ίδια δημοσίευση αναφέρεται ακόμη ότι το H_2O_2 φαίνεται να διαβιβάζει τις δράσεις του μέσω της οδού βιοσύνθεσης των προσταγλανδινών, δοθέντος ότι η προσθήκη στα αιμοπετάλια ινδομεθακίνης ή ακετυλοσαλικυλικού οξέος αναστέλλουν τα αποτελέσματα της δράσης του, ενώ το $\text{HO}\cdot$ και το μονήρες οξυγόνο ενδέχεται να λειτουργούν μέσω μίας οδού η οποία πιθανόν να μην είναι ενζυματική και που οπωσδήποτε δεν σχετίζεται με την οδό βιοσύνθεσης των προσταγλανδινών. Το πείραμα με το τετραϋπεροξυχρωμικό κάλιο έδειξε ότι οι ελεύθερες ρίζες οξυγόνου φαινόταν να εμπλέκονται στην διαδικασία της αιμοπεταλιακής συσσώρευσης ως εξωγενές λειτουργικό αίτιο. Δεδομένου ότι σε όλα τα βήματα της αιμοπεταλιακής ενεργοποίησης φαίνεται να υπεισέρχεται η οδός του αραχιδονικού οξέος και δεδομένου ότι τα προϊόντα της διάσπασης του τετραϋπεροξυχρωμικού καλίου ήταν σε θέση να προκαλέσουν τόσο την αλλαγή σχήματος, την αντίδραση έκλυσης και την συσσώρευση, είναι λογικό να αναρωτηθούμε μήπως κάποια από τα ένζυμα που ρυθμίζουν τις επί μέρους αντιδράσεις της αραχιδονικής οδού λειτουργούν παράγοντας ελεύθερες ρίζες, οι οποίες με την σειρά τους συμμετέχουν στον σχηματισμό των μεταβολιτών που καθορίζουν την κλιμάκωση των αιμοπεταλιακών ανταποκρίσεων.

Την ίδια χρονική περίοδο που η μελέτη για την πιθανή συμμετοχή ελευθέρων ριζών στην λειτουργία των ενζύμων της αραχιδονικής οδού βρισκόταν σε εξέλιξη, άλλοι ερευνητές έδειχναν ότι πιθανότατα η εξωγενής χορήγηση υψηλών συγκεντρώσεων EPO σε πλυμμένα αιμοπετάλια να προκαλεί την συσσώρευσή τους μέσω ενός μηχανισμού ενεργοποίησης της μεμβρανικής φωσφολιπάσης A_2 και καταβολισμού των φωσφολιποειδών προς αραχιδονικό οξύ και άλλα προϊόντα (φωσφατιδυλινοσιτόλη, φωσφατιδικό οξύ) που ενέχονται στους μηχανισμούς συσσώρευσης των αιμοπεταλίων³⁰⁷.

Το 1989 οι ερευνητές της ομάδας του Εργαστηρίου Πειραματικής Φυσιολογίας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων μελετώντας μία σειρά ενδογενών ουσιών οι οποίες ανέστειλαν τον Παράγοντα Ενεργοποίησης των Αιμοπεταλίων (PAF), υπέθεσαν ότι η εν λόγω ουσία έπρεπε να



ασκεί την δράση της μέσω του ενζύμου λιποξυγονάσης. Στην βιβλιογραφία υπήρχαν ενδείξεις ότι η λιποξυγονάση λειτουργούσε μέσω ενός μηχανισμού ο οποίος περιελάμβανε την δημιουργία ελευθέρων ριζών. Διάφορες ουσίες όπως η αναχθείσα γλουταθειόνη, η μερκαπτοπροπιονυλ-γλυκίνη, το ασκορβικό οξύ κ.ά. ανέστειλαν τόσο την δράση του PAF στα αιμοπετάλια, όσο και την λιποξυγονάση σε *in vitro* πειράματα. Δοθέντος ότι οι εν λόγω ουσίες ήταν τυπικοί εκκαθαριστές ελευθέρων ριζών, ενισχύθηκαν οι ενδείξεις οι οποίες υποδήλωναν την συμμετοχή των τελευταίων στην αιμοπεταλιακή συσσώρευση την πραγματοποιούμενη διά του PAF^{4,5,494}. Ωστόσο, ουσίες που δεν διέρχονται την μεμβράνη των αιμοπεταλίων, όπως η SOD, δεν ανέστειλαν την αιμοπεταλιακή συσσώρευση που προκλήθηκε από διάφορους διεγέρτες των αιμοπεταλίων^{4,5}.

Η συνέχιση της έρευνας στο ίδιο αντικείμενο από την ομάδα αυτή έδειξε ότι η αιμοπεταλιακή συσσώρευση που ο PAF προκαλούσε ήταν δυνατόν να περιοριστεί, να σταματήσει αλλά και να αντιστραφεί χρησιμοποιώντας μία σειρά ουσιών, τους λεγόμενους "παγιδευτές της ιδιοστροφορμής του ηλεκτρονίου" που περιέχουν όλοι στα μόριά τους την ομάδα νιτροξειδίου (-NO). Δεδομένου ότι οι παγιδευτές του spin είναι μόρια τα οποία αντιδρούν εκλεκτικά με ορισμένες φευγαλέες ελεύθερες ρίζες όπως π.χ. τη ρίζα υδροξυλίου με αποτέλεσμα να μετατρέπονται και αυτά σε ελεύθερες ρίζες μεγάλης όμως διάρκειας ζωής, η υπόθεση εργασίας της ομάδας ενισχύθηκε ακόμη περισσότερο. Από τα πειράματα δηλαδή γινόταν ολοένα και πιο φανερό ότι το σύνολο των αντιδράσεων που οδηγούσαν στην συσσώρευση των αιμοπεταλίων περιείχε ένα ή περισσότερα κομβικά σημεία τα οποία λειτουργούσαν μέσω σχηματισμού ελευθέρων ριζών.

Αργότερα αποδείχθηκε ότι οι ελεύθερες ρίζες οξυγόνου στα αιμοπετάλια παράγονται κυρίως κατά τον μεταβολισμό του αραχιδονικού οξέος μέσω της λιποξυγονάσης και της κυκλοξυγονάσης. Βρέθηκε δηλαδή ότι οι ελεύθερες ρίζες στα αιμοπετάλια παράγονται κατά τον μεταβολισμό των εικοσανοειδών κυρίως μέσω του ενζύμου λιποξυγονάσης - την δραστηριότητα της οποίας διεγείρει ο PAF⁴⁷⁸ - δεδομένου ότι η ποσότητά τους δεν μειώνεται σημαντικά με αναστολείς της κυκλοξυγονάσης όπως η ασπιρίνη και η ινδομεθακίνη³⁰⁰. Όμως, υπάρχουν νεώτερα δεδομένα που δεικνύουν ότι ένα μικρό ποσοστό, περίπου 10-20% των ριζών $O_2^{\cdot-}$ και HO^{\cdot} μπορεί να παραχθεί μέσω του ενζύμου κυκλοξυγονάση^{287,288,290}. Υποστηρίζεται ότι για την δραστηριοποίηση του ενζύμου αυτού απαιτείται μία ελάχιστη ποσότητα ενδοϋπεροξειδίου PGG_2 ώστε να αντιδράσει με τον Fe^{3+} της κυκλοξυγονάσης ώστε να σχηματιστεί μία υπερόξυ-ρίζα, που αν και δεν ανήκει στο ίδιο είδος έχει αρκετές ιδιότητες που μοιάζουν με αυτές της υδροξυλικής. Η ρίζα αυτή αφαιρεί από το υπόστρωμα (αραχιδονικό οξύ) ένα άτομο υδρογόνου και εκκινεί η αντίδραση. Κατά την διάρκεια της αντίδρασης με την βοήθεια μίας υπεροξειδάσης, η PGG_2 μετατρέπεται σε PGH_2 με ταυτόχρονη παραγωγή οξυγόνου singlet. Επιπλέον, υδροϋπεροξειδία λειτουργώντας ως υποστρώματα της υδροϋπεροξειδάσης των προσταγλανδινών μπορεί να προκαλέσουν την παραγωγή ελευθέρων ριζών οξυγόνου (HO^{\cdot} και $O_2^{\cdot-}$)³⁰⁰⁻³⁰⁵.

Κατά συνέπεια, η διαδικασία σύνθεσης των θρομβοξανίων στα αιμοπετάλια φαίνεται να σχετίζεται με την παραγωγή ελευθέρων ριζών οξυγόνου από τα συγκεκριμένα ενζυμικά συστήματα των εν λόγω κυττάρων.

Στην ανά χείρας εργασία μελετήθηκαν οι επιδράσεις τεσσάρων ουσιών (μετανεφρίνη, βανυλμανδελικό οξύ, τριμεταζιδίνη και ασκορβικό οξύ) στην διαδικασία της αιμοπεταλιακής συσσώρευσης - η οποία προκλήθηκε από αδρεναλίνη, ADP, PAF, αραχιδονικό οξύ και θρομβίνη -, της παραγωγής ελευθέρων ριζών οξυγόνου από τα αιμοπετάλια κατά την διάρκεια της αιμοπεταλιακής διέγερσης και συσσώρευσης, της παραγωγής TXA_2 από τα αιμοπετάλια, όπως επίσης και στην



έκφραση του υποδοχέα GrIIb-IIIa της αιμοπεταλιακής μεμβράνης. Παράλληλα μελετήθηκαν και οι πιθανές αντιοξειδωτικές ικανότητες των τεσσάρων αυτών ουσιών.

Όσον αφορά την τριμεταζιδίνη, στα πειράματα με πλυμένα αιμοπετάλια κουνελιού τα οποία διεγέρθηκαν με αδρεναλίνη, η δράση της προκάλεσε δοσοεξαρτώμενη αναστολή της συσσώρευσης. Συγκεκριμένα, προκαλούσε πλήρη αναστολή της συσσώρευσης σε συγκέντρωση 1μM.

Στα πειράματα συσσώρευσης ανθρώπινων αιμοπεταλίων *ex vivo*, με διεγέρτες την αδρεναλίνη, το ADP, το αραχιδονικό οξύ, την θρομβίνη και τον PAF, η τριμεταζιδίνη προκάλεσε επίσης δοσοεξαρτώμενη αναστολή της συσσώρευσης. Συγκεκριμένα, η IC 50 της τριμεταζιδίνης (δηλαδή η συγκέντρωσή της που προκαλούσε 50% αναστολή της μέγιστης συσσώρευσης) για όλους τους διεγέρτες βρέθηκε να είναι της τάξης των $1,5 \times 10^{-3}$ M.

Στα πειράματα μέτρησης των ριζών H_2O_2 , στο υπερκείμενο των αιμοπεταλίων μετά την διέγερσή τους από τους παραπάνω διεγέρτες, η τριμεταζιδίνη χορηγούμενη σε συγκέντρωση 3×10^{-3} M, βρέθηκε να προκαλεί σημαντικότερη ελάττωση του ποσού των εν λόγω ριζών. Η ελάττωση δε αυτή συμβάδιζε με την αναστολή της συσσώρευσης.

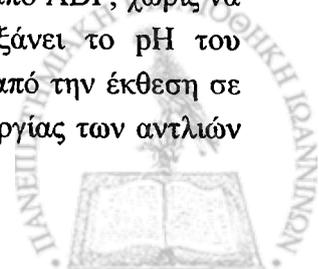
Στα πειράματα μέτρησης της παραγόμενης από τα αιμοπετάλια TXA_2 , η χορήγηση τριμεταζιδίνης σε συγκέντρωση 3×10^{-3} M, προκάλεσε σημαντική ελάττωση της παραγωγής TXA_2 , η οποία ήταν παράλληλη με την αναστολή της συσσώρευσης και την αναστολή παραγωγής ριζών H_2O_2 από τα αιμοπετάλια.

Στα πειράματα προσδιορισμού του αριθμού των υποδοχέων IIb-IIIa ανά αιμοπετάλιο, βρέθηκε ότι η χορήγηση τριμεταζιδίνης σε συγκέντρωση 3×10^{-3} M, προκαλεί αναστολή της έκφρασης του συγκεκριμένου υποδοχέα σε ένα ποσοστό της τάξης του 88%, γεγονός που συμβαίνει παράλληλα με την αναστολή της συσσώρευσης και της παραγωγής ριζών H_2O_2 και TXA_2 από τα αιμοπετάλια.

Όσον αφορά την δράση της μοριακής δομής της τριμεταζιδίνης, προσδιορίστηκαν τα εξής: Ως γνωστόν, η τριμεταζιδίνη αντιπροσωπεύεται από ένα μόριο το οποίο περιέχει έναν τριμεθοξυφαινολικό δακτύλιο και έναν δακτύλιο πιπεραζίνης, συνεπώς οι όποιες δράσεις της ουσίας αυτής - συμπεριλαμβανομένων και των φαρμακολογικών - έπρεπε να είναι συναρτήσεις της συνολικής αυτής δομής.

Οι πρώτες μελέτες που απέδειξαν την δράση της τριμεταζιδίνης ως εκκαθαριστή ελευθέρων ριζών δημοσιεύθηκαν από τους Maridonneau και Harpey το 1985³⁷⁰. Οι μελέτες τους στα ερυθρά αιμοσφαίρια του ανθρώπου έδειξαν ότι η τριμεταζιδίνη προφυλάσσει τα κύτταρα από την δράση του υπεροξειδίου του υδρογόνου (H_2O_2) και του ανιόντος υπεροξειδίου ($O_2^{\cdot-}$), που παράγονται με την επώαση των ερυθρών αιμοσφαιρίων με μεθειονινοθειϊκή φαιναζίνη. Ως δείκτες της προστατευτικής δράσης της TMZ στα ερυθρά χρησιμοποιήθηκαν τα επίπεδα των μεμβρανικών υπεροξειδωμένων λιπιδίων και ο βαθμός της απώλειας ενδοκυτταρίου K^+ , που είναι αποτέλεσμα της δράσης των ελευθέρων ριζών στο ερυθρό αιμοσφαίριο.

Η ουσία αυτή σε πειράματα *in vitro* βρέθηκε να αναστέλλει δοσοεξαρτώμενα την αιμοπεταλιακή συσσώρευση που προκαλείται από θρομβίνη, κολλαγόνο, ADP, αραχιδονικό οξύ, A_{23187} και U_{46619} ³⁷¹. Παράλληλα βρέθηκε ότι ελαττώνει την είσοδο Ca^{++} στα αιμοπετάλια, σε βαθμό ανάλογο του βαθμού της αναστολής της αιμοπεταλιακής συσσώρευσης³⁷². Ο Kiyosue et al. επίσης πρότειναν ότι η τριμεταζιδίνη δρά ως ένας μη ειδικός αναστολέας Ca^{++} . Αυτός όμως δεν είναι ο μόνος τρόπος δράσης της, δεδομένου ότι αναστέλλει την αιμοπεταλιακή συσσώρευση που προκαλείται από ADP, χωρίς να επηρεάζει τα αιμοπεταλιακά επίπεδα του Ca^{++} . Ακόμη, η τριμεταζιδίνη αυξάνει το pH του αιμοπεταλιακού πρωτοπλάσματος και "προστατεύει" την κυτταρική ομοιόσταση από την έκθεση σε EPO δρώντας ως "εκκαθαριστής". Έτσι εξασφαλίζει την ακεραιότητα της λειτουργίας των αντλιών



ιόντων και την διαμεμβρανική ροή νατρίου-καλίου και αποτρέπει την κατακόρυφη πτώση των ενδοκυτταρικών συγκεντρώσεων του ATP. Έχει αποδειχθεί επίσης η δυνατότητα της TMZ να εκκαθαρίζει και ελεύθερες ρίζες HO[•] καθώς και αλκυλοϋπεροξυλικές ρίζες³⁷³. Στις μελέτες αυτές έχει προταθεί σαν πιθανός μηχανισμός εκκαθάρισης των ριζών O₂^{•-} η αντίδρασή τους με μερικές λειτουργικές ομάδες του μορίου της TMZ και κυρίως με τις μεθοξυλικές ομάδες του αζώτου του μορίου της, με αποτέλεσμα τον σχηματισμό σταθερών ριζών ή άλλων προϊόντων. Για τις ρίζες HO[•] φαίνεται ότι παρόμοιες αντιδράσεις λαμβάνουν χώρα στην βενζυλική ομάδα του μορίου της TMZ με αποτέλεσμα τον σχηματισμό υδροξυλικών προϊόντων. Η εκκαθαριστική δράση της τριμεταζιδίνης στις EPO φαίνεται ότι ασκείται σε συγκεντρώσεις της τάξης των 10⁻⁴M ως 10⁻³M³⁷⁴.

Σε μελέτες που έχουν γίνει την δεκαετία του 1990 στο Εργαστήριο Πειραματικής Φυσιολογίας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων σχετικά με την δράση της τριμεταζιδίνης στην αιμοπεταλιακή συσσώρευση, για να διαπιστωθεί η πιθανή συμμετοχή των δύο δακτυλίων του μορίου της (τριμεθοξυφαινολικού και πιπεραζινικού) στην αναστολή της αιμοπεταλιακής συσσώρευσης, δοκιμάστηκε η δράση μερικών σχετικά απλών μορίων - τα οποία περιείχαν τον τριμεθοξυφαινολικό δακτύλιο - επί των αιμοπεταλίων. Παρατηρήθηκε ότι το 1,2,3-τριμεθοξυφαινολικό οξύ, το 2,3,5-τριμεθοξυφαινολικό οξύ, η 1,2,3-τριμεθοξυφαινολική αλδεϋδη, η τριμεθοπρίμη και η κολχικίνη ασκούσαν αναστολή στην αιμοπεταλιακή συσσώρευση την προκαλούμενη από PAF, ενώ οι δράσεις τους επί του αραχιδονικού οξέος και επί του ADP ήταν ασθενέστερες. Επίσης οι δράσεις τους υπήρξαν ιδιαίτερα εμφανείς επί της συσσώρευσης διά επινεφρίνης και λιγότερο διά κολλαγόνου. Αντίθετα, η δράση της πιπεραζίνης δεν υπήρξε ανασταλτική στην αιμοπεταλιακή συσσώρευση την προκαλούμενη από οποιονδήποτε αιμοπεταλιακό διεγέρτη⁴⁹⁵. Δεδομένου ότι οι ανασταλτικές δράσεις όλων των χρησιμοποιηθέντων τριμεθοξυφαινολικών μορίων υπήρξαν ασθενέστερες της TMZ, αυτό σημαίνει ότι στην εν λόγω ουσία ο τριμεθοξυφαινολικός δακτύλιος φαίνεται να "δυναμοποιείται" από την αλληλεπίδρασή του με την πιπεραζινική ομάδα. Πρέπει ακόμη να σημειωθεί ότι όχι μόνον ο τριμεθοξυφαινολικός δακτύλιος, αλλά και οι δακτύλιοι με δύο ή και μία μεθοξυλική ρίζα είναι σε θέση να αναστείλουν την αιμοπεταλιακή διέγερση. Στην υπάρχουσα βιβλιογραφία αναφέρεται ότι ένα τριμεθοξυφαινολικό μόριο και συγκεκριμένα το 3,4,5-τριμεθοξυφαινολικό-8-(N,N-διαιθυλαμινο)-οκτύλιο (TMB-8) δρα ως αναστολέας της κινητοποίησης του ενδοκυτταρίου ασβεστίου που είναι αποθηκευμένο στο πυκνό σωληναριακό σύστημα των αιμοπεταλίων⁴⁹⁶. Το εν λόγω μόριο (TMB-8) φαίνεται να ακινητοποιεί το ασβέστιο μέσα στις φυσικές του ενδοαιμοπεταλιακές αποθήκες και να εμποδίζει την διαρροή του προς εκείνα τα σημεία των ενδοπλασματικών μεμβρανών στα οποία βρίσκεται τοποθετημένη η φωσφολιπάση A₂. Η απουσία ροής ασβεστίου εμποδίζει την ενεργοποίηση της φωσφολιπάσης A₂ και συνεπώς την απελευθέρωση αραχιδονικού οξέος από τις μεμβράνες, με αποτέλεσμα την αναστολή της αιμοπεταλιακής συσσώρευσης λόγω μη ενεργοποίησης της αραχιδονικής οδού.

Δεδομένου ότι η τριμεταζιδίνη, όπως και οι άλλες συγγενείς μοριακά ως προς αυτήν χημικές ενώσεις που αναστέλλουν την αιμοπεταλιακή συσσώρευση, έχουν ως κοινό τους σημείο τον τριμεθοξυφαινολικό δακτύλιο, είναι λογικό να υποθέσουμε ότι όλες οι ενώσεις αυτές πιθανόν να λειτουργούν και ως αναστολείς της φωσφολιπάσης A₂. Συνεπώς, η κινητοποίηση του ενδοκυτταρίου ασβεστίου, οι διαδικασίες παραγωγής ελευθέρων ριζών από κάποιο συγκεκριμένο χημικό σύστημα των αιμοπεταλίων, η ενεργοποίηση της φωσφολιπάσης A₂ και η ενεργοποίηση της αραχιδονικής οδού είναι πιθανόν να συνδέονται με λειτουργικούς ή και δομικούς δεσμούς και να αποτελούν ένα ολοκληρωμένο σύστημα ρύθμιση της αιμοπεταλιακής συσσώρευσης.



Στην βιβλιογραφία αναφέρεται μία στενή συσχέτιση μεταξύ της ενεργοποίησης διαφόρων τοξικών μορίων⁴⁹⁵, της αραχιδονικής οδού και μίας σχεδόν ταυτόχρονης διαταραχής της ομοιοστασίας του ενδοκυττάρου ασβεστίου⁴⁹⁷⁻⁵⁰⁰. Στο σύνολο των φαινομένων αυτών, ο σχηματισμός ελευθέρων ριζών φαίνεται να παίζει πρωταρχικό ρόλο^{283,287,291,294,297}. Οι ελεύθερες ρίζες δημιουργούνται από την ενεργοποίηση του τοξικού μορίου – π.χ. τετραχλωράνθρακα – μέσω ενός ενζυμικού συστήματος γνωστού ως κυττόχρωμα P-450 (όπου P: pigment-χρωστική και 450 το μήκος κύματος σε νανόμετρα στο οποίο απορροφά η χρωστική). Η λειτουργία του κυττοχρώματος P-450, η φωσφολιπάση A₂ και η αραχιδονική οδός σχετίζονται στενά με την οδό των φωσφορικών πεντοζών, την μιτοχονδριακή λειτουργία και το αναγωγικό σύστημα του μιτοχονδρίου, του οποίου η περιγραφή δεν είναι ακόμη σαφής, υπό την έννοια ότι δεν γνωρίζουμε κατά πλήρη τρόπο τις δομές και τις λειτουργίες του.

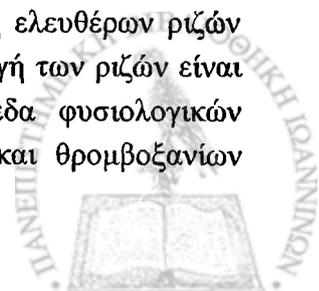
Μερικοί συγγραφείς έχουν δείξει ότι οι συνθετάσες των προσταγλανδινών και των θρομβοξανίων στα αιμοπετάλια μοιάζουν φασματοφωτομετρικά με το κυττόχρωμα P-450, ώστε να θεωρούνται παραλλαγές του αυτού ενζυμικού συστήματος⁴⁹⁵.

Τόσο στην λειτουργία των μικροσωμάτων, που επικεντρώνεται γύρω από το κυττόχρωμα P-450, όσο στην λειτουργία των αιμοπεταλίων που επικεντρώνεται γύρω από το σύστημα της συνθετάσης των προσταγλανδινών και των θρομβοξανίων, όσο και στο σύστημα της λιποξυγονάσης, φαίνεται ότι η διακίνηση ιόντων του ενδοκυττάρου ασβεστίου παίζει έναν κεφαλαιώδη ρόλο, διότι συμμετέχει πιθανόν σε έναν μηχανισμό θετικής αναδράσεως, η οποία μεγεθύνει τις κυτταρικές ενεργοποιήσεις.

Αν η απελευθέρωση του ασβεστίου λάβει χώρα κατά τρόπο ανώμαλο, μη ελεγχόμενο και υπερβολικό, τότε θα έχουμε μία μέγιστη και καταστροφική ενεργοποίηση του κυττάρου, που θα οδηγήσει το πιθανότερο σε κυτταρικό θάνατο και το φαινόμενο αυτό ακολουθεί σταθερά εκείνες τις καταστάσεις κατά τις οποίες έχουμε εκτεταμένη και ανεξέλεγκτη παραγωγή ελευθέρων ριζών, η οποία δύναται να συμβεί κατά τον μεταβολισμό διαφόρων τοξικών μορίων.

Κυτταρική καταστροφή λαμβάνει χώρα επίσης μετά την διαδικασία της μη αντιστρεπτής αιμοπεταλιακής συσσώρευσης, όπου τα θρομβοκύτταρα συντήκονται με τον σχηματισμό του θρόμβου και χάνουν την κυτταρική τους φυσιολογία. Των μη αντιστρεπτών αυτών μεταβολών προηγείται μία πολύ μεγάλη και συνεπώς καταστροφική απελευθέρωση ασβεστίου, η οποία σχετίζεται με την παραγωγή προσταγλανδινών και θρομβοξανίων εκ μέρους των αντίστοιχων ενζύμων της αραχιδονικής οδού. Τα δεδομένα πειραμάτων σχετικών με την δράση της τριμεταζιδίνης στην ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων, που έγιναν στο Εργαστήριο της Πειραματικής Φυσιολογίας του Ιατρικού Τμήματος του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων κατά την δεκαετία του 1990, δείχνουν ότι η συνολική παραγωγή των ως άνω αναφερθέντων δραστικών μεταβολιτών της αραχιδονικής οδού πρέπει να συνοδεύεται ή και να προκαλείται από διεργασίες ελευθέρων ριζών, οι οποίες λαμβάνουν χώρα στα ενεργά κέντρα των ενζύμων της προσταγλανδίνης-συνθετάσης και της λιποξυγονάσης⁴⁹⁵. Νεότερα πειραματικά δεδομένα επιβεβαιώνουν αυτά τα ευρήματα^{298,316,322,325}.

Σύμφωνα με υπόθεση που διατυπώθηκε από ερευνητές του Εργαστηρίου Πειραματικής Φυσιολογίας του Ιατρικού Τμήματος του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, οι δραστικοί μεταβολίτες της αραχιδονικής οδού πιθανόν να λειτουργούν όχι μόνον ως ιονοφόρα, αλλά και να αποδιοργανώνουν κάποιες συγκεκριμένες μεμβρανικές περιοχές που λειτουργούν ως θυρίδες των διαύλων του ασβεστίου. Η αποδιοργάνωση αυτή πρέπει να είναι αντιστρεπτή όταν τα επίπεδα των δραστικών αραχιδονικών μεταβολιτών είναι χαμηλά και συνεπώς η προηγηθείσα παραγωγή ελευθέρων ριζών είναι ελεγχόμενη, ενώ είναι μη αντιστρεπτή και πολύ εκτεταμένη όταν η παραγωγή των ριζών είναι υψηλή και ανεξέλεγκτη, συνοδευόμενη αναγκαστικά και από υψηλά επίπεδα φυσιολογικών αραχιδονικών μεταβολιτών. Δεδομένου ότι οι συνθετάσες προσταγλανδινών και θρομβοξανίων

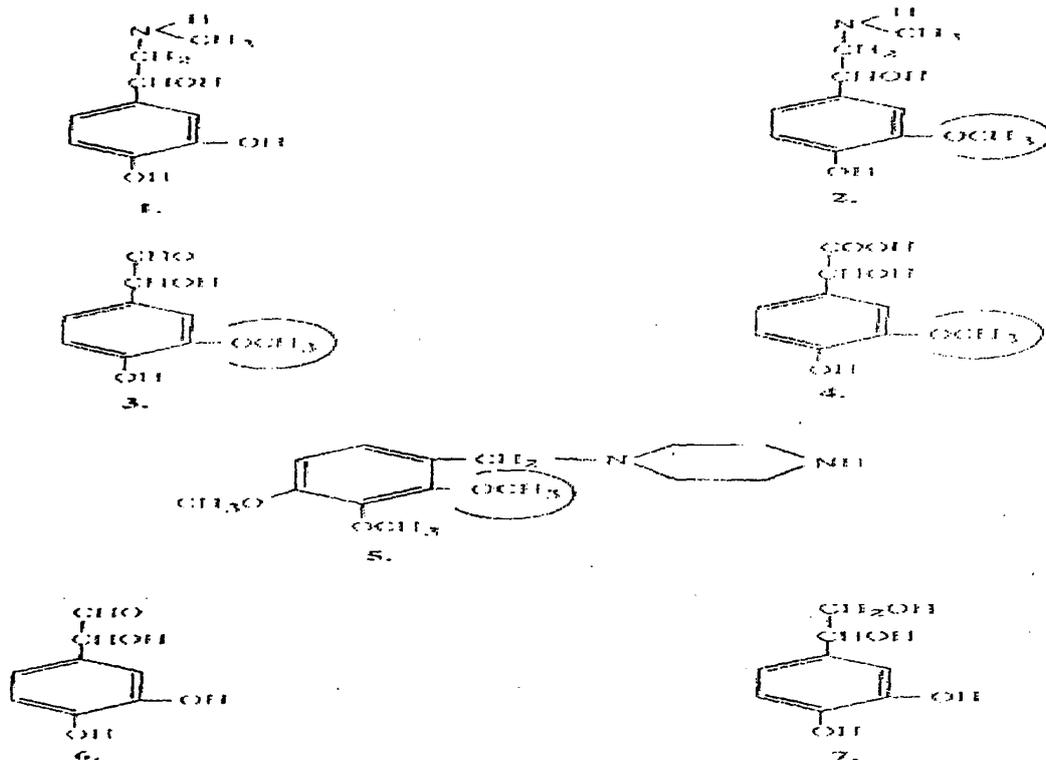


θεωρούνται ως κυττοχρώματα P-450 και μας είναι γνωστό ότι η λειτουργία τους σχετίζεται με την παραγωγή μίας ελεύθερης ρίζας υπεροξυλικού τύπου εντοπιζόμενης σε ένα άτομο άνθρακα¹⁹¹, είναι πολύ πιθανόν η παραγωγή των προσταγλανδινών και θρομβοξανίων να είναι αποτέλεσμα αυτής της ρίζας η οποία θα μπορούσε συν τοις άλλοις να προκαλέσει και την παραγωγή μίας πληθώρας άλλων ριζών μη εξειδικευμένων, που με την σειρά τους θα μπορούσαν να σπάσουν τα κωλύματα των διαύλων ασβεστίου ή ακόμη και τις μεμβράνες των αποθηκών του ιόντος αυτού, απελευθερώνοντάς το εκρηκτικά και προκαλώντας τις γνωστές μέγιστες κυτταρικές ενεργοποιήσεις, οι οποίες οδηγούν αναπόφευκτα στην καταστροφή του θρομβοκυττάρου που βεβαίως έχει χαρακτήρα λειτουργικό και και είναι τμήμα της διαδικασίας σχηματισμού του θρόμβου.

Οι εκκαθαριστές των ελευθέρων ριζών, όπως η τριμεταζιδίνη, αναστέλλουν την διαδικασία της συσσώρευσης πιθανώς εκκαθαρίζοντας την υπεροξυλική ρίζα του ενεργού κέντρου της συνθετάσης, όπως επίσης και τις λοιπές ελεύθερες ρίζες οι οποίες δημιουργούνται δευτερογενώς και εξαπλώνουν τις ριζοπαραγωγικές αντιδράσεις σε ευρύτερες κυτταρικές περιοχές. Η δέσμευση των ριζών αυτών, που φαίνεται να συντελείται από την τριμεταζιδίνη λόγω της ύπαρξης του τριμεθυλοφαινολικού δακτυλίου (ο οποίος δυναμοποιείται λόγω της ύπαρξης και πεπεραζινικού δακτυλίου) στο μόριο της εν λόγω ουσίας, οδηγεί σε σημαντικότερη μείωση της παραγωγής θρομβοξανίων μέσω της αραχιδονικής οδού των αιμοπεταλίων, όπως έδειξαν τα πειράματα της παρούσης μελέτης. Η μείωση αυτή της παραγωγής TXA_2 προκάλεσε την αναστολή της αιμοπεταλιακής συσσώρευσης, δεδομένου ότι η TXA_2 αποτελεί έναν από τους ισχυρότερους διεγέρτες των αιμοπεταλίων. Παράλληλα, η μείωση της παραγωγής της από τα αιμοπετάλια ανέστειλε την αντίδραση έκλυσης των αιμοπεταλίων, με αποτέλεσμα να μην είναι δυνατή η διέγερση των εν λόγω κυττάρων από προϊόντα που αποθηκεύονται στα κοκκία του κυτταροπλάσματός τους. Η όλη διαδικασία της αναστολής της παραγωγής TXA_2 , όπως έδειξαν τα πειράματα μέτρησης των παραγόμενων από τα αιμοπετάλια ελευθέρων ριζών οξυγόνου, συνοδευόταν από σημαντικότερη ελάττωση των εν λόγω ριζών, γεγονός που ενισχύει την υπόθεση ότι η εκκαθάριση ελευθέρων ριζών οξυγόνου από την τριμεταζιδίνη οδηγεί σε αναστολή της δραστηριότητας της προσταγλανδίνη-συνθετάσης. Η αναστολή αυτή προκαλεί σημαντικότερη μείωση της παραγωγής TXA_2 από τα αιμοπετάλια, τα οποία παρά την χορήγηση διεγερτών στα εναωρήματά τους παραμένουν μη διεγερμένα και μη συσσωρευμένα.

Όπως έχει ήδη αναφερθεί στο ανά χείρας κείμενο, περί τα μέσα της δεκαετίας του 1990, στο Εργαστήριο της Πειραματικής Φυσιολογίας του Ιατρικού Τμήματος του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, στα πλαίσια μελετών για την εξακρίβωση των πιθανών μηχανισμών που εμπλέκονται στην ρύθμιση της αιμοπεταλιακής συσσώρευσης που προκαλείται από διάφορους διεγέρτες των αιμοπεταλίων, διατυπώθηκε η άποψη ότι η συσσώρευση που προκαλείται από την αδρεναλίνη και άλλους διεγέρτες των αιμοπεταλίων, είναι πιθανόν να αυτορυθμίζεται άμεσα από προϊόντα μεταβολισμού των κατεχολαμινών στον ανθρώπινο οργανισμό, με έναν μηχανισμό αρνητικής παλίνδρομης ρύθμισης (negative feed-back mechanism). Στην διάρκεια της εν λόγω μελέτης, διαπιστώθηκε ότι τα μόρια ορισμένων μεταβολικών προϊόντων των κατεχολαμινών παρουσιάζουν δομικές ομοιότητες με το μόριο της τριμεταζιδίνης. Συγκεκριμένα, η μετανεφρίνη και το βανυλ-μανδελικό οξύ (VMA) περιέχουν στο μόριό τους από μία μεθοξυ- ($-OCH_3$) ομάδα, η οποία βρίσκεται συνδεδεμένη στην θέση 3 του φαινολικού τους δακτυλίου. Αντίστοιχα, η τριμεταζιδίνη (ομάδα πεπεραζίνης) περιέχει στο μόριό της τρεις μεθοξυ- ($-OCH_3$) ομάδες, οι οποίες είναι συνδεδεμένες επίσης στον φαινολικό δακτύλιο του μορίου της. Αντίθετα, τα κατεχολαμινικά μεταβολικά προϊόντα 3, 4-διυδροξυ-φαινυλ-γλυκολ-αλδεϋδη (DHPGA) και 3, 4-διυδροξυ-φαινυλ-γλυκόλη (DHPG) δεν περιέχουν στα μόριά τους μεθοξυ- ($-OCH_3$) ομάδες συδεδεμένες με τον φαινολικό δακτύλιο του μορίου τους. (Σχήμα 29).





Σχήμα 29. Μοριακή δομή επινεφρίνης, μεταβολικών της προϊόντων και τριμεταζιδίνης.

- [1. Επινεφρίνη, 2. Μετανεφρίνη, 3. 3-μεθοξυ-4-υδροξυ-φαινυλ-γλυκολ-αλδεύδη, 4. 3-μεθοξυ-4-υδροξυ-μανδελικό οξύ (VMA), 5. Τριμεθοξυ-φαινυλ-μεθυλ-πιπεραζίνη (TMZ), 6. 3,4-διυδροξυ-φαινυλ-γλυκολ-αλδεύδη (DHPGA), 7. 3,4-διυδροξυ-φαινυλ-γλυκόλη (DHPG)].

Στα πλαίσια των πειραμάτων της εκτίμησης του βαθμού αναστολής της αιμοπεταλιακής συσσώρευσης προκαλούμενης από επινεφρίνη, όταν χορηγούνταν στο εναιώρημα των αιμοπεταλίων κατεχολαμινικά μεταβολικά προϊόντα, διαπιστώθηκε ότι ιδιότητες αναστολέων της αιμοπεταλιακής συσσώρευσης είχαν μόνο τα μεταβολικά προϊόντα που είχαν μεθοξυ- ($-\text{OCH}_3$) ομάδα συνδεδεμένη στον φαινολικό δακτύλιο του μορίου τους. Αντίθετα, κατεχολαμινικά μεταβολικά προϊόντα χωρίς την μεθυξυ- ($-\text{OCH}_3$) ομάδα στον φαινολικό δακτύλιο του μορίου τους, δεν εμφάνισαν καμία ανασταλτική δράση επί της αιμοπεταλιακής συσσώρευσης που προκαλούσε η επινεφρίνη και το ADP^{501} . Εδώ πρέπει επίσης να αναφερθεί ότι το μόριο της επινεφρίνης, στην οποία οφειλόταν η αιμοπεταλιακή συσσώρευση, δεν περιέχει μεθοξυ- ($-\text{OCH}_3$) ομάδα στον φαινολικό δακτύλιο του μορίου της, παρά μόνο υδροξυ- ομάδες (Σχήμα 29). Φαίνεται λοιπόν ότι η μεθοξυ- ομάδα του φαινολικού δακτυλίου, είναι πιθανόν να προσδίδει συγκεκριμένα χαρακτηριστικά στα κατεχολαμινικά μεταβολικά προϊόντα που την εμπεριέχουν και συγκεκριμένα να τους δίνει ιδιότητες αναστολέων της αιμοπεταλιακής συσσώρευσης, η οποία προκαλείται από επινεφρίνη και ADP^{501} .

Έχει διατυπωθεί η άποψη από άλλους ερευνητές, ότι η αιμοπεταλιακή συσσώρευση που προκαλείται από την επινεφρίνη και το ADP ρυθμίζεται μέσω μηχανισμών στους οποίους υπεισέρχεται η ενεργοποίηση α_2 -αδρενεργικών υποδοχέων⁷⁸. Από τα αποτελέσματα όμως της εν λόγω μελέτης, δεν φάνηκε η αντιαιμοπεταλιακή δράση της μετανεφρίνης και του VMA να ασκείται μέσω δράσης στον υποδοχέα, είτε με απενεργοποίηση του υποδοχέα, είτε με ανταγωνιστική δράση ως προς την επινεφρίνη για τον ίδιο υποδοχέα. Το συμπέρασμα αυτό εξάγεται από το γεγονός ότι ενώ όλα τα

κατεχολαμινικά μεταβολικά προϊόντα παρουσιάζουν δομικές ομοιότητες μεταξύ τους όπως και με την επινεφρίνη, μόνο αυτά που περιέχουν μεθοξυ- ($-OCH_3$) ομάδα στον φαινολικό δακτύλιο του μορίου τους, αναστέλλουν την αιμοπεταλιακή συσσώρευση που προκλήθηκε από επινεφρίνη και ADP. Η άποψη αυτή ενισχύεται από το γεγονός ότι η αντιαιμοπεταλιακή δράση των εν λόγω μεταβολιτών εκδηλώθηκε και σε πειράματα όπου πρώτα χορηγήθηκε στο εναιώρημα των αιμοπεταλίων η επινεφρίνη (ή το ADP) και κατά την διάρκεια της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων χορηγήθηκαν οι μεθυξυ- μεταβολίτες. Φαίνεται δηλαδή πως η δράση των μεθοξυ- μεταβολιτών δεν ασκείται στα αιμοπετάλια μέσω δράσης σε κάποιο υποδοχέα. Όσον αφορά τα κατεχολαμινικά μεταβολικά προϊόντα DHPGA και DHPG, τα μόρια των οποίων παρουσιάζουν μεγαλύτερες ομοιότητες με το μόριο της επινεφρίνης απ' ότι τα μεθυξυ- μεταβολικά προϊόντα, δεν αναστέλλουν την αιμοπεταλιακή συσσώρευση.

Στην ίδια μελέτη διερευνήθηκε και ο ρόλος των μεθοξυ- μεταβολιτών και της τριμεταζιδίνης στην αντίδραση οξειδωσης του λινελαϊκού οξέος μέσω της λιποξυγενάσης *in vitro*. Η αντίδραση λινελαϊκού-λιποξυγονάσης χρησιμοποιείται πειραματικά *in vitro* αντί της αντίδρασης αραχιδονικού-λιποξυγονάσης, που λαμβάνει χώρα *in vivo* στα αιμοπετάλια κατά την ενεργοποίησή τους. Κατά την αντίδραση αυτή, η λιποξυγονάση καταλύει την αντίδραση μεταξύ του οξέος και του οξυγόνου και παράγει σαν προϊόν το 13-HPOD-13-(5)-υπεροξυ-9(Z), 11-(E)-οκταδεκανοϊκό οξύ. Τα δεδομένα που προέκυψαν έδειξαν ότι η τριμεταζιδίνη και τα μεθοξυ- κατεχολαμινικά μεταβολικά προϊόντα ανέστειλαν την αντίδραση σε συγκεντρώσεις μεγαλύτερες των $0,3\mu M^{501}$.

Στα πειράματα της αιμοπεταλιακής συσσώρευσης της παρούσης διατριβής, όπως έχει ήδη αναφερθεί, η μετανεφρίνη και το VMA ανέστειλαν σε πολύ σημαντικό βαθμό την αιμοπεταλιακή συσσώρευση που προκλήθηκε από την επινεφρίνη, το ADP και τον PAF, ενώ δεν είχαν σχεδόν καμία επίδραση στην αιμοπεταλιακή συσσώρευση που προκλήθηκε από την θρομβίνη και το αραχιδονικό οξύ (μέχρι την συγκέντρωση $3 \times 10^{-3} M$, στην οποία χρησιμοποιήθηκαν). Συγκεκριμένα, όταν χορηγήθηκαν στο PRP σε συγκέντρωση $3 \times 10^{-3} M$, ανέστειλαν σε ποσοστό 95-100% την αιμοπεταλιακή συσσώρευση που προκλήθηκε από την αδρεναλίνη, το ADP και τον PAF, ενώ δεν επηρέασαν την αιμοπεταλιακή συσσώρευση που προκλήθηκε από την θρομβίνη και το αραχιδονικό οξύ. Παράλληλα, στα πειράματα της μέτρησης των παραγομένων από τα αιμοπετάλια ελευθέρων ριζών οξυγόνου κατά την διάρκεια του φαινομένου της αιμοπεταλιακής συσσώρευσης, παρατηρείται ελάττωση των ριζών οξυγόνου όταν χορηγούνται η μετανεφρίνη και το VMA στο εναιώρημα των αιμοπεταλίων (με διεγέρτες την αδρεναλίνη, το ADP, τον PAF, την θρομβίνη και το αραχιδονικό οξύ), οποία είναι στατιστικώς σημαντική. Επίσης, η αναστολή παραγωγής TXA_2 από τα αιμοπετάλια, όταν στο εναιώρημά τους χορηγείται μετανεφρίνη ή VMA είναι στατιστικώς σημαντική και ακολουθεί την αναστολή της παραγωγής ελευθέρων ριζών οξυγόνου από τα αιμοπετάλια. Το γεγονός ότι η αναστολή της παραγωγής TXA_2 και ελευθέρων ριζών οξυγόνου δεν συμβαδίζει με την αναστολή της αιμοπεταλιακής συσσώρευσης (όταν διεγέρτες είναι το αραχιδονικό οξύ και η θρομβίνη), μπορεί να εξηγηθεί για το μεν αραχιδονικό με την υπόθεση ότι εφ' όσον η αιμοπεταλιακή συσσώρευση σχετίζεται με την παραγωγή ριζών O_2^{\cdot} και HO^{\cdot} , η οποία εξαρτάται από την ποσότητα του αραχιδονικού οξέος που απελευθερώνεται²⁹⁸, όταν ως αιμοπεταλιακός διεγέρτης χορηγείται το αραχιδονικό οξύ, υπάρχει μεγάλη ποσότητα υποστρώματος για την κυκλοξυγονάση, με αποτέλεσμα να προάγεται η συσσώρευση παρ' όλη την ανασταλτική δράση της μετανεφρίνης και του VMA. Άλλωστε, στα πειράματα της αιμοπεταλιακής συσσώρευσης της παρούσης διατριβής, όταν η μετανεφρίνη και το VMA χρησιμοποιήθηκαν σε συγκέντρωση $8 \times 10^{-3} M$ (με διεγέρτη το αραχιδονικό), προκλήθηκε αναστολή της αιμοπεταλιακής συσσώρευσης της τάξης του 25%, ενώ σε συγκέντρωση



$3 \times 10^{-3} \text{M}$ δεν προκλήθηκε αναστολή, γεγονός που ενισχύει την ανωτέρω υπόθεση. Όταν χορηγήθηκε στα διεγερμένα με αραχιδονικό αιμοπετάλια τριμεταζιδίνη σε συγκέντρωση 3×10^{-3} παρατηρήθηκε αναστολή της συσσώρευσης σε ποσοστό 100%, δηλαδή πλήρης αναστολή της. Αν λάβουμε υπ' όψιν τις χημικές δομές των μορίων της τριμεταζιδίνης, της μετανεφρίνης και του VMA, όπως επίσης και τις ιδιότητές τους ως εκκαθαριστές ελευθέρων ριζών οξυγόνου – όπως προέκυψε από τα πειράματα προσδιορισμού της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας -, μπορούμε να διατυπώσουμε την άποψη ότι εφ' όσον η τριμεταζιδίνη διαθέτει στο μόριό της τρεις μεθοξυ- ($-\text{OCH}_3$) ομάδες, ενώ η μετανεφρίνη και το VMA από μία, το μόριο της τριμεταζιδίνης εμφανίζει ισχυρότερη εκκαθαριστική δράση για τις ελεύθερες ρίζες οξυγόνου που παράγονται από αιμοπεταλιακούς ενζυμικούς μηχανισμούς, με αποτέλεσμα την μεγαλύτερη αναστολή της συσσώρευσης. Όπως υπολογίστηκε δε από τα αποτελέσματα των πειραμάτων της αιμοπεταλιακής συσσώρευσης, η IC 50 της τριμεταζιδίνης για το αραχιδονικό είναι $1,5 \times 10^{-3}$, ενώ για την μετανεφρίνη και το VMA είναι $1,6 \times 10^{-2}$ και $1,7 \times 10^{-2}$ αντίστοιχα. Το γεγονός αυτό δεικνύει ότι η αναστολή που προκαλείται από τις ανωτέρω ουσίες είναι δόσοεξαρτώμενη και μάλιστα φαίνεται να εξαρτάται από τον αριθμό των μεθοξυ- ($-\text{OCH}_3$) ομάδων που χορηγούνται συνολικά – μέσω των μορίων στα οποία περιέχονται – στο αιμοπεταλιακό εναιώρημα.

Όσον αφορά την δράση της μετανεφρίνης και του VMA στα αιμοπετάλια που διεγέρθηκαν με θρομβίνη, από τα αποτελέσματα των πειραμάτων της αιμοπεταλιακής συσσώρευσης, προκύπτει ότι ακόμη και σε συγκέντρωση $5 \times 10^{-3} \text{M}$, η μετανεφρίνη και το VMA δεν ανέστειλαν την αιμοπεταλιακή συσσώρευση. Ανέστειλαν όμως την παραγωγή ελευθέρων ριζών οξυγόνου όπως και την παραγωγή TXA_2 σε στατιστικώς σημαντικό βαθμό. Το γεγονός αυτό μπορεί να ερμηνευθεί με την παραδοχή ότι εφ' όσον η θρομβίνη δύναται να προκαλεί αιμοπεταλιακή συσσώρευση χωρίς την συμμετοχή της αντίδρασης έκλυσης των αιμοπεταλίων¹, η αναστολή της παραγωγής θρομβοξάνης, η οποία συνοδεύεται από την αναστολή παραγωγής ελευθέρων ριζών οξυγόνου, δεν παρεμποδίζει την συσσωρευτική δράση της θρομβίνης, η οποία ασκείται στα αιμοπετάλια ανεξάρτητα από την αντίδραση έκλυσης. Έτσι, παρ' όλη την σημαντική ελάττωση του ποσού της παραγόμενης θρομβοξάνης, η συσσωρευτική διαδικασία εξελίσσεται χωρίς αναστολή. Όσον αφορά την δράση της τριμεταζιδίνης στα διεγερμένα από θρομβίνη αιμοπετάλια, προκύπτει ότι η αναστολή της συσσώρευσης συμβαδίζει με την αναστολή της παραγωγής θρομβοξάνης και ελευθέρων ριζών οξυγόνου από τα αιμοπετάλια. Όπως και στην περίπτωση του αραχιδονικού οξέος, έτσι και στην περίπτωση της θρομβίνης, φαίνεται ότι η τριμεταζιδίνη είναι ισχυρότερος αντιαιμοπεταλιακός παράγοντας απ' ό,τι η μετανεφρίνη και το VMA, λόγω της δομής του μορίου της, το οποίο περιέχει τρεις μεθοξυ- ($-\text{OCH}_3$) ομάδες σε σχέση με αυτά της μετανεφρίνης και του VMA, που περιέχουν από μία.

Όσον αφορά την δράση του ασκορβικού οξέος στα διεγερμένα αιμοπετάλια, φαίνεται να είναι ανάλογη με αυτή της τριμεταζιδίνης στα πειράματα της αιμοπεταλιακής συσσώρευσης όπως και στα πειράματα υπολογισμού των παραγομένων από τα αιμοπετάλια ελευθέρων ριζών οξυγόνου και της παραγόμενης από τα αιμοπετάλια θρομβοξάνης. Η αναστολή της αιμοπεταλιακής συσσώρευσης, της παραγωγής ελευθέρων ριζών οξυγόνου και θρομβοξάνης φαίνεται να είναι αποτέλεσμα της ικανότητας του ασκορβικού οξέος να εκκαθαρίζει ελεύθερες ρίζες οξυγόνου^{363-365,434,461}, οι οποίες όπως είδαμε και στα πειράματα της παρούσης διατριβής εμπλέκονται στην διαδικασία της αιμοπεταλιακής συσσώρευσης, παραγόμενες κυρίως από την κυκλοοξυγονάση και την λιποξυγονάση των αιμοπεταλίων^{288,290,293,294}. Το ασκορβικό οξύ, όπως και οι περισσότεροι εκκαθαριστές ελευθέρων ριζών οξυγόνου φαίνεται πως αναστέλλει την διαδικασία της συσσώρευσης πιθανώς εκκαθαρίζοντας

την υπεροξυλική ρίζα του ενεργού κέντρου της συνθετάσης, όπως επίσης και τις λοιπές ελεύθερες ρίζες οι οποίες δημιουργούνται δευτερογενώς και εξαπλώνουν τις ριζοπαραγωγικές αντιδράσεις σε ευρύτερες κυτταρικές περιοχές. Η δέσμευση των ριζών αυτών οδηγεί σε σημαντικότερη μείωση της παραγωγής θρομβοξανίων μέσω της αραχιδονικής οδού των αιμοπεταλίων. Η μείωση αυτή της παραγωγής TXA_2 προκάλεσε την αναστολή της αιμοπεταλιακής συσσώρευσης, όπως επίσης και την αναστολή της αντίδρασης έκλυσης των αιμοπεταλίων, με αποτέλεσμα να μην είναι δυνατή η διέγερση των εν λόγω κυττάρων από προϊόντα που αποθηκεύονται στα κοκκία του κυτταροπλάσματός τους. Η όλη διαδικασία της αναστολής της παραγωγής TXA_2 , όπως προέκυψε από αποτελέσματα των πειραμάτων μέτρησης των παραγόμενων από τα αιμοπετάλια ελευθέρων ριζών οξυγόνου, συνοδευόταν από σημαντικότερη ελάττωση των εν λόγω ριζών, γεγονός που ενισχύει την υπόθεση ότι η εκκαθάριση ελευθέρων ριζών οξυγόνου από το ασκορβικό οδηγεί σε αναστολή της δραστηριότητας της προσταγλανδίνη-συνθετάσης. Η αναστολή αυτή προκαλεί σημαντικότερη μείωση της παραγωγής TXA_2 από τα αιμοπετάλια, τα οποία παρά την χορήγηση διεγερτών στα ελαιωρήματά τους παραμένουν μη διεγερμένα και δεν συσσωρεύονται.

Σχετικά με την δράση των ουσιών που μελετήθηκαν στην παρούσα διατριβή (μετανεφρίνη, VMA, τριμεταζιδίνη και ασκορβικό οξύ) στην έκφραση του μεμβρανικού υποδοχέα $Gr_{IIb-IIIa}$ των αιμοπεταλίων, προέκυψε ότι η μετανεφρίνη και το VMA δεν είχαν σχεδόν καμία επίδραση στην έκφρασή του. Φαίνεται λοιπόν, ότι η μετανεφρίνη και το VMA δεν δρουν απευθείας στον συγκεκριμένο υποδοχέα, ούτε αναστέλλουν την έκφρασή του, γεγονός που ενισχύει την άποψη ότι η ανασταλτική τους δράση στην αιμοπεταλιακή συσσώρευση συνδέεται με τις αντιοξειδωτικές τους ιδιότητες οι οποίες φαίνεται να οφείλονται στη μεθοξυ- ($-OCH_3$) του φαινολικού δακτυλίου του μορίου τους. Σχετικά με την δράση των παραπάνω ουσιών στον εν λόγω υποδοχέα δεν υπάρχουν προς το παρόν βιβλιογραφικά δεδομένα, γεγονός που υποδεικνύει την ανάγκη για περαιτέρω διερεύνηση της επίδρασης των ουσιών αυτών στον συγκεκριμένο υποδοχέα και γενικότερα στους αιμοπεταλιακούς μεμβρανικούς υποδοχείς.

Αντίθετα με την μετανεφρίνη και το VMA, η τριμεταζιδίνη και το ασκορβικό οξύ προκάλεσαν αναστολή της έκφρασης του εν λόγω υποδοχέα σε ποσοστά 88,5 και 98,5% αντίστοιχα. Το γεγονός αυτό δεικνύει ότι οι δύο ουσίες πιθανόν να δρουν και σε επίπεδο μεμβρανικών υποδοχέων αναστέλλοντας την έκφρασή τους και κατά συνέπεια την δημιουργία του αιμοπεταλιακού θρόμβου. Είναι ακόμη πιθανόν, οι εν λόγω ουσίες να μεταβάλλουν συνολικώς την διάταξη του συστήματος των μεμβρανικών G πρωτεϊνών – τμήματα των οποίων είναι οι μεμβρανικοί υποδοχείς – με τελικό αποτέλεσμα την αναστολή της έκφρασής τους. Το ασκορβικό οξύ μάλιστα, όπως προκύπτει από τα αποτελέσματα των πειραμάτων, φαίνεται να μεταβάλλει την διάταξη του υποδοχέα $Gr_{IIb-IIIa}$, με αποτέλεσμα να καθιστά αδύνατη την προσκόλληση του ινωδογόνου σ' αυτόν, και κατά συνέπεια να εμποδίζεται ο σχηματισμός του δικτύου ινικής με το οποίο συνδέονται τα αιμοπετάλια κατά την εξέλιξη της διαδικασίας της αιμόστασης. Μέχρι στιγμής δεν υπάρχουν βιβλιογραφικά δεδομένα σχετικά με την δράση του ασκορβικού οξέος στον υποδοχέα $Gr_{IIb-IIIa}$ των αιμοπεταλίων, γεγονός που σημαίνει ότι ο τρόπος δράσης της εν λόγω ουσίας στον συγκεκριμένο υποδοχέα χρήζει περαιτέρω διερεύνησης.



ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Από την παρούσα εργασία προέκυψαν τα παρακάτω:

- 1) Τα μεταβολικά προϊόντα των κατεχολαμινών, μετανεφρίνη και βανυλμανδελικό οξύ (VMA), τα οποία περιέχουν στο μόριό τους μία μεθοξυ- (-OCH₃) ομάδα, συνδεδεμένη στην θέση 3 του φαινολικού τους δακτυλίου, ανέστειλαν σε σημαντικό βαθμό την αιμοπεταλιακή συσσώρευση που προκλήθηκε από την αδρεναλίνη, το ADP και τον PAF, ενώ δεν είχαν σχεδόν καμία επίδραση στην αιμοπεταλιακή συσσώρευση που προκλήθηκε από την θρομβίνη και το αραχιδονικό οξύ (μέχρι την συγκέντρωση 3×10^{-3} M, στην οποία χρησιμοποιήθηκαν). Η αναστολή της αιμοπεταλιακής συσσώρευσης προκλήθηκε τόσο σε κατάσταση έκπλυσης όσο και στο φυσικό περιβάλλον των αιμοπεταλίων (στο πλάσμα-ex vivo).
- 2) Αντίστοιχα, η τριμεταζιδίνη (ομάδα πιπεραζίνης) η οποία περιέχει στο μόριό της τρεις μεθοξυ- (-OCH₃) ομάδες, συνδεδεμένες επίσης στον φαινολικό δακτύλιο του μορίου της, ανέστειλε σε ποσοστό 100% την αιμοπεταλιακή συσσώρευση που προκλήθηκε από όλους τους αιμοπεταλιακούς διεγέρτες που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία (αδρεναλίνη, ADP, PAF, αραχιδονικό οξύ και θρομβίνη), όταν χορηγήθηκε σε συγκέντρωση 3×10^{-3} M.
- 3) Το ασκορβικό οξύ (σε συγκέντρωση 3×10^{-3} M) ανέστειλε σε ποσοστό 100% την αιμοπεταλιακή συσσώρευση που προκλήθηκε από όλους τους αιμοπεταλιακούς διεγέρτες που χρησιμοποιήθηκαν (αδρεναλίνη, ADP, PAF, αραχιδονικό οξύ και θρομβίνη).
- 4) Το γεγονός ότι η τριμεταζιδίνη αποτελεί ισχυρότερο αναστολέα της αιμοπεταλιακής συσσώρευσης από την μετανεφρίνη και το VMA, φαίνεται να συνδέεται με το ότι περιέχει τρεις μεθοξυ- (-OCH₃) ομάδες συνδεδεμένες στον φαινολικό δακτύλιο του μορίου της, σε σχέση με τις ανωτέρω αναφερθείσες ουσίες, οι οποίες περιέχουν αντίστοιχα από μία μεθοξυ- (-OCH₃) ομάδα συνδεδεμένη με τον φαινολικό δακτύλιο του μορίου τους. Το γεγονός αυτό (σε συνδυασμό με τα υπόλοιπα αποτελέσματα των πειραμάτων της αιμοπεταλιακής συσσώρευσης της παρούσης εργασίας) δεικνύει ότι η αναστολή της αιμοπεταλιακής συσσώρευσης είναι δοσοεξαρτώμενη, εξαρτάται δηλαδή από την συγκέντρωση του χορηγούμενου αναστολέα και πιο συγκεκριμένα από τον αριθμό των μεθοξυ- (-OCH₃) ομάδων που χορηγούνται στο αιμοπεταλιακό εναιώρημα.
- 5) Τα κατεχολαμινικά προϊόντα (μετανεφρίνη και VMA) έχουν αντιοξειδωτικές ιδιότητες, έχουν δηλαδή ιδιότητες "εκκαθαριστών" ελευθέρων ριζών οξυγόνου, γεγονός στο οποίο φαίνεται να οφείλεται κυρίως η αντιαιμοπεταλιακή τους δράση.
- 6) Η τριμεταζιδίνη και το ασκορβικό οξύ αντίστοιχα, είναι γνωστοί "εκκαθαριστές" ελευθέρων ριζών οξυγόνου, γεγονός στο οποίο φαίνεται να οφείλουν επίσης την δράση τους στα αιμοπετάλια.
- 7) Από την έρευνα προέκυψαν ισχυρές ενδείξεις ότι οι ελεύθερες ρίζες αποτελούν κοινό βήμα των διαφόρων βιοχημικών οδών της αιμοπεταλιακής ενεργοποίησης που οδηγεί στην συσσώρευση των αιμοπεταλίων.
- 8) Η παραγωγή ελευθέρων ριζών οξυγόνου από τα αιμοπετάλια αυξάνει κατά την φάση της διέγερσης και συσσώρευσής τους και ελαττώνεται μετά την χορήγηση των κατεχολαμινικών μεταβολιτών μετανεφρίνης και VMA, συνοδευόμενη από αναστολή της αιμοπεταλιακής συσσώρευσης (όταν διεγέρτες είναι η επινεφρίνη, ο PAF και το ADP). Αντίστοιχα, όταν ως αναστολείς της αιμοπεταλιακής συσσώρευσης χρησιμοποιούνται η τριμεταζιδίνη και το ασκορβικό οξύ, η ελάττωση της παραγωγής ελευθέρων ριζών οξυγόνου από τα αιμοπετάλια συνοδεύεται από αναστολή της



αιμοπεταλιακής συσσώρευσης όταν διεγέρτες είναι η επινεφρίνη, ο PAF, το ADP, η θρομβίνη και το αραχιδονικό οξύ.

8) Οι κατεχολαμινικοί μεταβολίτες μετανεφρίνη και VMA ελαττώνουν σημαντικά την παραγωγή TXA_2 από τα αιμοπετάλια, ουσία που αποτελεί έναν ισχυρότατο αιμοπεταλιακό διεγέρτη (προϊόν της κυκλοξυγονάσης των αιμοπεταλίων).

9) Η τριμεταζιδίνη και το ασκορβικό οξύ ελαττώνουν επίσης σημαντικά την παραγωγή TXA_2 από τα αιμοπετάλια. Η δράση όλων των ανωτέρω ουσιών φαίνεται να οφείλεται στην ικανότητά τους να "εκκαθαρίζουν" ελεύθερες ρίζες οξυγόνου. Πιθανώς η δράση τους να ασκείται εκκαθαρίζοντας την υπεροξυλική ρίζα του ενεργού κέντρου της συνθετάσης των προσταγλανδινών, όπως επίσης και τις λοιπές ελεύθερες ρίζες οι οποίες δημιουργούνται δευτερογενώς και εξαπλώνουν τις ριζοπαραγωγικές αντιδράσεις σε ευρύτερες κυτταρικές περιοχές.

10) Η αναστολή της παραγωγής TXA_2 από τα αιμοπετάλια, μετά την χορήγηση των προς μελέτη ουσιών (μετανεφρίνη, VMA, τριμεταζιδίνη και ασκορβικό οξύ), συνοδεύεται από αναστολή παραγωγής ελευθέρων ριζών οξυγόνου από τα αιμοπετάλια, γεγονός που παρέχει ισχυρές ενδείξεις ότι οι ελεύθερες ρίζες οξυγόνου ρυθμίζουν την λειτουργικότητα του ενζυμικού συστήματος της κυκλοξυγονάσης-συνθετάσης των προσταγλανδινών και κατ' επέκταση την αιμοπεταλιακή ενεργοποίηση, η οποία οδηγεί στην συσσώρευση.

11) Τα κατεχολαμινικά μεταβολικά προϊόντα μετανεφρίνη και VMA δεν φαίνεται να δρουν σε επίπεδο αιμοπεταλιακού μεμβρανικού υποδοχέα $GpIIb-IIIa$.

12) Η τριμεταζιδίνη και το ασκορβικό οξύ αναστέλλουν την έκφραση του αιμοπεταλιακού μεμβρανικού υποδοχέα $GpIIb-IIIa$ σε ποσοστά 88,5 και 98,5% αντίστοιχα, γεγονός που δεικνύει ότι είναι πιθανόν οι εν λόγω ουσίες να ασκούν την δράση τους και μέσω του συγκεκριμένου υποδοχέα είτε με άμεση δράση σ' αυτόν είτε με δράσεις στην αιμοπεταλιακή μεμβράνη, επηρεάζοντας έτσι και την έκφραση του υποδοχέα $GpIIb-IIIa$.

13) Με βάση τα ανωτέρω, μπορούμε να συμπεράνουμε πως η άμεση ρύθμιση του βαθμού της αιμοπεταλιακής διέγερσης που προκαλείται από την αδρεναλίνη και άλλους διεγέρτες των αιμοπεταλίων, πιθανόν να αυτορυθμίζεται άμεσα από προϊόντα μεταβολισμού των κατεχολαμινών στον ανθρώπινο οργανισμό, με έναν μηχανισμό αρνητικής παλίνδρομης ρύθμισης (negative feed-back mechanism), με αποτέλεσμα την αποφυγή ανεξέλεγκτης αιμοπεταλιακής συσσώρευσης στο εσωτερικό των αγγείων. Στον μηχανισμό αυτό φαίνεται να εμπλέκονται ελεύθερες ρίζες οξυγόνου, οι οποίες αποτελούν και ρυθμιστές της λειτουργικότητας του ενζυμικού συστήματος της κυκλοξυγονάσης-συνθετάσης των προσταγλανδινών των αιμοπεταλίων.

14) Η τριμεταζιδίνη και το ασκορβικό οξύ, βάσει των αποτελεσμάτων της παρούσης εργασίας, θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν ως αντιαιμοπεταλιακοί παράγοντες, είτε μόνοι είτε συμπληρωματικά, με στόχο την πρόληψη και πιθανώς την θεραπεία των θρομβοεμβολικών νόσων.



ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκαν οι δράσεις των κατεχολαμινικών προϊόντων μετανεφρίνης και VMA (βανυλμανδελικό οξύ) όπως επίσης και της τριμεταζιδίνης και του ασκορβικού οξέος στην αιμοπεταλιακή συσσώρευση, με σκοπό την διευκρίνιση της εμπλοκής των ελευθέρων ριζών οξυγόνου στην συσσώρευση των αιμοπεταλίων.

Για την μελέτη χρησιμοποιήθηκαν οι ενώσεις Μετανεφρίνη (MET), Βανυλμανδελικό οξύ (VMA), Τριμεταζιδίνη (TMZ) και Ασκορβικό οξύ (ASC).

Ως αιμοπεταλιακοί διεγέρτες χρησιμοποιήθηκαν οι ενώσεις Αδρεναλίνη (ADR), Διφωσφορική αδενοσίνη (ADP), Platelet Activating Factor (PAF), Αραχιδονικό οξύ (AA) και Θρομβίνη (THR).

Η μελέτη διεξήχθη σε πλυμένα αιμοπετάλια κουνελιού και σε πλούσιο σε αιμοπετάλια πλάσμα ανθρώπου, που παρασκευάστηκαν με τον τρόπο που περιγράφεται στην εργασία.

Η συσσώρευση των αιμοπεταλίων ελέγχθηκε με την χρήση φωτοσυσσωρευμόμετρου κάτω από διαρκή ανάδευση υπό 1200 rpm σε θερμοκρασία 37° C.

Στην συσσώρευση πλυμένων αιμοπεταλίων κουνελιού χρησιμοποιήθηκε ως αγωνιστής η αδρεναλίνη, ενώ στην συσσώρευση με πλούσιο σε αιμοπετάλια πλάσμα ανθρώπου χρησιμοποιήθηκαν αδρεναλίνη, ADP, PAF, αραχιδονικό οξύ και θρομβίνη. Όλοι οι αγωνιστές χρησιμοποιήθηκαν σε συγκεντρώσεις που προκαλούν την μέγιστη συσσώρευση (100%). Οι συγκεντρώσεις στις οποίες οι αιμοπεταλιακοί διεγέρτες ευρέθησαν να επιτυγχάνουν μη αναστρέψιμη συσσώρευση ήταν για την αδρεναλίνη $5 \pm 0,7 \mu\text{M}$, για το ADP $12 \pm 2 \mu\text{M}$, για το αραχιδονικό οξύ $0,7 \pm 0,2 \text{ mM}$, για τον PAF $40 \pm 5 \mu\text{g/ml}$ και για την θρομβίνη $1 \pm 0,2 \text{ units/ml}$. Η ποσότητα των διαλυμάτων των αγωνιστών και των ανταγωνιστών που προστιθόταν για κάθε μέτρηση στην κυβέττα του συσσωρευμόμετρου δεν ήταν μεγαλύτερη των 5μl. Η αναστολή της συσσώρευσης υπολογίστηκε ως ποσοστό % της μέγιστης μη αναστρέψιμης συσσώρευσης που προκαλούσαν οι αιμοπεταλιακοί διεγέρτες.

Όλα τα προς μελέτη μόρια (μετανεφρίνη, VMA, τριμεταζιδίνη και ασκορβικό οξύ), που ελέγχθηκαν για την αναστολή της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων, η οποία προκλήθηκε από τους ανωτέρω αναφερθέντες αιμοπεταλιακούς διεγέρτες, χρησιμοποιήθηκαν σε συγκεντρώσεις από 10^{-6} M μέχρι 3×10^{-3} M. Ειδικά για τα πειράματα συσσώρευσης με διεγέρτη το αραχιδονικό οξύ, τα κατεχολαμινικά μεταβολικά προϊόντα μετανεφρίνη και VMA χρησιμοποιήθηκαν μέχρι την συγκέντρωση 8×10^{-3} M.

Έγινε ακόμη εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας των προς μελέτη μορίων με την μέθοδο TAS της εταιρείας Randox, όπως επίσης και μέτρηση των παραγόμενων από τα αιμοπετάλια ελευθέρων ριζών οξυγόνου κατά την διάρκεια της διέγερσής τους με τους ανωτέρω αναφερθέντες διεγέρτες, με και χωρίς την παρουσία των προς μελέτη ουσιών, οι οποίες στα πειράματα αυτά χορηγήθηκαν σε συγκέντρωση 3×10^{-3} M σε πλούσιο σε αιμοπετάλια πλάσμα ανθρώπου. Η μέτρηση των ελευθέρων ριζών οξυγόνου έγινε με την μέθοδο d-Rom test της εταιρείας Callegari.

Έγινε ακόμη εκτίμηση της παραγωγής Θρομβοξάνης- A_2 (TXA₂) από τα αιμοπετάλια κατά την διάρκεια της διέγερσής τους από τους αναφερθέντες αιμοπεταλιακούς διεγέρτες, με και χωρίς την παρουσία των προς μελέτη ουσιών, οι οποίες χορηγήθηκαν επίσης σε συγκέντρωση 3×10^{-3} M σε πλούσιο σε αιμοπετάλια πλάσμα ανθρώπου. Η εκτίμηση της παραγωγής Θρομβοξάνης- A_2 από τα αιμοπετάλια έγινε με την μέτρηση του ποσού της Θρομβοξάνης- B_2 (TXB₂), σταθερού μεταβολικού προϊόντος της Θρομβοξάνης- A_2 , με ραδιοανοσολογική μέθοδο (RIA).



Ακόμη έγινε εκτίμηση της δράσης των προς μελέτη ουσιών στον αιμοπεταλιακό μεμβρανικό υποδοχέα GpIIb-IIIa, που αποτελεί την θέση σύνδεσης του ινωδογόνου στα αιμοπετάλια. Στα πειράματα αυτά οι προς μελέτη ουσίες χορηγήθηκαν σε συγκέντρωση 3×10^{-3} M σε πλούσιο σε αιμοπετάλια πλάσμα ανθρώπου, χρησιμοποιήθηκε δε το kit ADIAflo Platelet Occurance της εταιρείας American Diagnostica, το οποίο είναι εξειδικευμένο για τον ποσοτικό προσδιορισμό του αιμοπεταλιακού υποδοχέα GpIIb-IIIa μέσω κυτταρομετρίας ροής και ο κυτταρομετρητής Erics XL-MCL της εταιρείας Beckman-Coulter.

Από τα αποτελέσματα των πειραμάτων της αιμοπεταλιακής συσσώρευσης προέκυψε ότι τα μεταβολικά προϊόντα των κατεχολαμινών, μετανεφρίνη και βανυλμανδελικό οξύ (VMA), ανέστειλαν σε σημαντικό βαθμό την αιμοπεταλιακή συσσώρευση που προκλήθηκε από την αδρεναλίνη, το ADP και τον PAF, ενώ δεν είχαν σχεδόν καμία επίδραση στην αιμοπεταλιακή συσσώρευση που προκλήθηκε από την θρομβίνη και το αραχιδονικό οξύ (μέχρι την συγκέντρωση 3×10^{-3} M, στην οποία χρησιμοποιήθηκαν). Αντίθετα, το ασκορβικό οξύ και η τριμεταζιδίνη (σε συγκέντρωση 3×10^{-3} M) ανέστειλαν σε ποσοστό 100% την αιμοπεταλιακή συσσώρευση που προκλήθηκε από όλους τους αιμοπεταλιακούς διεγέρτες που χρησιμοποιήθηκαν (αδρεναλίνη, ADP, PAF, αραχιδονικό οξύ και θρομβίνη).

Από τα δεδομένα των πειραμάτων μέτρησης των παραγομένων από τα αιμοπετάλια ελευθέρων ριζών οξυγόνου κατά το φαινόμενο της αιμοπεταλιακής συσσώρευσης, προκύπτει ότι κατά την αιμοπεταλιακή διέγερση και συσσώρευση παράγονται από τα αιμοπετάλια ελεύθερες ρίζες οξυγόνου, το ποσό των οποίων αυξάνεται κατά την εξέλιξη της συσσώρευσης. Ειδικότερα, το ποσό των ριζών H_2O_2 αυξάνεται κατά πολύ περισσότερο όταν διεγέρτες είναι η θρομβίνη, το αραχιδονικό και η αδρεναλίνη σε σχέση με αυτό που παράγεται όταν διεγέρτες είναι το ADP και ο PAF.

Όσον αφορά την επίδραση της μετανεφρίνης και του VMA στην διαδικασία του σχηματισμού ελευθέρων ριζών οξυγόνου από τα αιμοπετάλια, (συγκεκριμένα ριζών H_2O_2), από τα πειραματικά δεδομένα προκύπτει ότι όταν χορηγούνται μετανεφρίνη και VMA στο PRP παράλληλα με τους αιμοπεταλιακούς διεγέρτες (αδρεναλίνη, ADP, PAF, αραχιδονικό οξύ και θρομβίνη), υπάρχει σημαντική μείωση του ποσού των ριζών H_2O_2 που παράγονται από τα αιμοπετάλια και οι οποίες ανιχνεύονται στο υπερκείμενο του εναιωρήματός τους. Φαίνεται δηλαδή ότι η μετανεφρίνη και το VMA πιθανώς να δρουν ως "εκκαθαριστές" ελευθέρων ριζών οξυγόνου, όπως φαίνεται και από τα αποτελέσματα των πειραμάτων της εκτίμησης της αντιοξειδωτικής τους ικανότητας.

Αντίστοιχα, η επίδραση του ασκορβικού οξέος και της τριμεταζιδίνης στην παραγωγή ριζών H_2O_2 από τα αιμοπετάλια είναι σημαντικότερη. Όταν χορηγούνται στο PRP ασκορβικό και τριμεταζιδίνη (σε συγκέντρωση 3×10^{-3} M για κάθε ουσία) παράλληλα με τους διεγέρτες (αδρεναλίνη, ADP, PAF, αραχιδονικό οξύ και θρομβίνη), το ποσό των ριζών H_2O_2 σχεδόν μηδενίζεται. Η αναστολή δηλαδή της αιμοπεταλιακής συσσώρευσης συμβαδίζει απόλυτα με την αναστολή της παραγωγής ριζών H_2O_2 από τα αιμοπετάλια. Σε σχέση δε με την δράση της μετανεφρίνης και του VMA στο φαινόμενο της παραγωγής ελευθέρων ριζών οξυγόνου από τα αιμοπετάλια, φαίνεται ότι το ασκορβικό και η τριμεταζιδίνη αποτελούν ισχυρότερους "εκκαθαριστές" ελευθέρων ριζών οξυγόνου, δεδομένου ότι η ελάττωση που προκαλούν στο ποσό των παραγομένων από τα αιμοπετάλια ριζών H_2O_2 είναι μεγαλύτερη από την προκαλούμενη από τη μετανεφρίνη και το VMA.

Από τα αποτελέσματα των πειραμάτων εκτίμησης της παραγωγής TXA_2 από τα αιμοπετάλια προκύπτει ότι το ποσό της αυξάνεται κατά πολύ όταν τα αιμοπετάλια διεγείρονται και μάλιστα είναι μεγαλύτερο όταν αιμοπεταλιακοί διεγέρτες είναι η θρομβίνη, το αραχιδονικό οξύ και PAF από αυτό που παράγεται όταν διεγέρτες είναι η επινεφρίνη και το ADP.



Όταν παράλληλα με τους διεγέρτες (αδρεναλίνη, ADP, PAF, αραχιδονικό οξύ και θρομβίνη), χορηγούνται στο PRP μετανεφρίνη και VMA, υπάρχει μία σημαντική μείωση του ποσού της παραγόμενης από τα αιμοπετάλια TXA_2 . Ακόμη μεγαλύτερη είναι η μείωση της παραγωγής TXA_2 , όταν παράλληλα με τους διεγέρτες χορηγούνται στο PRP ασκορβικό οξύ ή τριμεταζιδίνη.

Η αύξηση του ποσού της παραγόμενης από τα διεγειρόμενα αιμοπετάλια TXA_2 συμβαδίζει με την εξέλιξη της αιμοπεταλιακής συσσώρευσης, όπως και με την αύξηση των παραγομένων από τα αιμοπετάλια ριζών H_2O_2 , γεγονός που δεικνύει ότι στο όλο φαινόμενο της αιμοπεταλιακής συσσώρευσης εμπλέκονται μηχανισμοί παραγωγής ελευθέρων ριζών οξυγόνου, οι οποίοι σχετίζονται άμεσα με την παραγωγή της TXA_2 , η οποία παράγεται με την δράση του ενζύμου κυκλοοξυγονάση.

Τέλος, από τα αποτελέσματα των πειραμάτων για την εκτίμηση του βαθμού έκφρασης του αιμοπεταλιακού υποδοχέα $GpIIb-IIIa$ προκύπτει ότι το ασκορβικό οξύ προκαλεί αναστολή της έκφρασης του σε ποσοστό 98,5% και η τριμεταζιδίνη σε ποσοστό 88,5%. Παράλληλα, το ασκορβικό οξύ φαίνεται να προκαλεί και μία μεταβολή στην στερεοχημική διάταξη του μορίου του εν λόγω υποδοχέα, όπως προκύπτει από τα γραφήματα του κυτταρομετρητή ροής.

Από την παρούσα εργασία προέκυψαν ισχυρές ενδείξεις ότι οι ελεύθερες ρίζες αποτελούν κοινό βήμα των διαφόρων βιοχημικών οδών της αιμοπεταλιακής ενεργοποίησης που οδηγεί στην συσσώρευση των αιμοπεταλίων.

Τα μεταβολικά προϊόντα των κατεχολαμινών, μετανεφρίνη και βανυλμανδελικό οξύ (VMA), τα οποία περιέχουν στο μόριό τους μία μεθοξυ- ($-OCH_3$) ομάδα, συνδεδεμένη στην θέση 3 του φαινολικού τους δακτυλίου, αποτελούν αναστολείς της αιμοπεταλιακής συσσώρευσης δράοντας πιθανώς ως "εκκαθαριστές" ελευθέρων ριζών οξυγόνου (όπως προέκυψε και από τα πειράματα της εκτίμησης της αντιοξειδωτικής τους ικανότητας), ενδεχομένως εκκαθαρίζοντας την υπεροξυλική ρίζα του ενεργού κέντρου της συνθετάσης των προσταγλανδινών, όπως επίσης και τις λοιπές ελεύθερες ρίζες οι οποίες δημιουργούνται δευτερογενώς και εξαπλώνουν τις ριζοπαραγωγικές αντιδράσεις σε ευρύτερες κυτταρικές περιοχές.

Αντίστοιχα, η τριμεταζιδίνη, η οποία περιέχει στο μόριό της τρεις μεθοξυ- ($-OCH_3$) ομάδες, συνδεδεμένες επίσης στον φαινολικό δακτύλιο του μορίου της, φαίνεται να αποτελεί ισχυρότερο αιμοπεταλιακό αναστολέα, δράοντας επίσης ως "εκκαθαριστής" ελευθέρων ριζών οξυγόνου, ιδιότητα που εμφανίζει λόγω της ύπαρξης των τριών μεθοξυ- ($-OCH_3$) ομάδων στο μόριό της.

Το ασκορβικό οξύ οξυγόνου φαίνεται πως ασκεί την αντιαιμοπεταλιακή του δράση λόγω της ιδιότητάς του ως "εκκαθαριστή" ελευθέρων ριζών.

Οι κατεχολαμινικοί μεταβολίτες μετανεφρίνη και VMA ελαττώνουν σημαντικά την παραγωγή TXA_2 από τα αιμοπετάλια.

Η τριμεταζιδίνη και το ασκορβικό οξύ ελαττώνουν επίσης σημαντικά την παραγωγή TXA_2 από τα αιμοπετάλια. Η δράση όλων των ανωτέρω ουσιών φαίνεται να οφείλεται στην ικανότητά τους να "εκκαθαρίζουν" ελεύθερες ρίζες οξυγόνου. Η αναστολή της παραγωγής TXA_2 από τα αιμοπετάλια, μετά την χορήγηση των προς μελέτη ουσιών (μετανεφρίνη, VMA, τριμεταζιδίνη και ασκορβικό οξύ), συνοδεύεται από αναστολή παραγωγής ελευθέρων ριζών οξυγόνου από τα αιμοπετάλια, γεγονός που παρέχει ισχυρές ενδείξεις ότι οι ελεύθερες ρίζες οξυγόνου ρυθμίζουν την λειτουργικότητα του ενζυμικού συστήματος της κυκλοοξυγονάσης-συνθετάσης των προσταγλανδινών και κατ' επέκταση την αιμοπεταλιακή ενεργοποίηση, η οποία οδηγεί στην συσσώρευση.

Τα κατεχολαμινικά μεταβολικά προϊόντα μετανεφρίνη και VMA δεν φαίνεται να δρουν σε επίπεδο αιμοπεταλιακού μεμβρανικού υποδοχέα $GpIIb-IIIa$.



Η τριμεταζιδίνη και το ασκορβικό οξύ φαίνεται να ασκούν την αντιαμοπεταλιακή τους δράση και μέσω του αιμοπεταλιακού μεμβρανικού υποδοχέα GrIIb-IIIa, είτε με άμεση δράση σ' αυτόν είτε με δράσεις στην αιμοπεταλιακή μεμβράνη, επηρεάζοντας έτσι και την έκφραση του υποδοχέα GrIIb-IIIa.

Με βάση τα ανωτέρω, μπορούμε να συμπεράνουμε πως η άμεση ρύθμιση του βαθμού της αιμοπεταλιακής διέγερσης που προκαλείται από την αδρεναλίνη και άλλους διεγέρτες των αιμοπεταλίων, πιθανόν να αυτορυθμίζεται άμεσα από προϊόντα μεταβολισμού των κατεχολαμινών στον ανθρώπινο οργανισμό, με έναν μηχανισμό αρνητικής παλίνδρομης ρύθμισης (negative feed-back mechanism), με αποτέλεσμα την αποφυγή ανεξέλεγκτης αιμοπεταλιακής συσσώρευσης στο εσωτερικό των αγγείων. Η δράση τους αυτή φαίνεται να οφείλεται στην μοριακή δομή των ανωτέρω μεταβολικών προϊόντων. Συγκεκριμένα, η μετανεφρίνη και το βανυλ-μανδελικό οξύ (VMA) περιέχουν στο μόριό τους από μία μεθοξυ- ($-OCH_3$) ομάδα, η οποία βρίσκεται συνδεδεμένη στην θέση 3 του φαινολικού τους δακτυλίου. Αντίστοιχα, η τριμεταζιδίνη (ομάδα πιπεραζίνης) περιέχει στο μόριό της τρεις μεθοξυ- ($-OCH_3$) ομάδες, οι οποίες είναι συνδεδεμένες επίσης στον φαινολικό δακτύλιο του μορίου της. Αντίθετα, τα κατεχολαμινικά μεταβολικά προϊόντα 3, 4-διυδροξυ-φαινυλ-γλυκολ-αλδεΐδη (DHPGA) και 3, 4-διυδροξυ-φαινυλ-γλυκόλη (DHPG) δεν περιέχουν στα μόριά τους μεθοξυ- ($-OCH_3$) ομάδες συδεδεμένες με τον φαινολικό δακτύλιο του μορίου τους και δεν παρουσιάζουν αντιαμοπεταλιακές δράσεις.

Στον μηχανισμό της αρνητικής παλίνδρομης ρύθμισης που αναφέρθηκε παραπάνω, φαίνεται να εμπλέκονται ελεύθερες ρίζες οξυγόνου, οι οποίες αποτελούν και ρυθμιστές της λειτουργικότητας του ενζυμικού συστήματος της κυκλοξυγονάσης-συνθετάσης των προσταγλανδινών των αιμοπεταλίων.

Όσον αφορά την τριμεταζιδίνη και το ασκορβικό οξύ, βάσει των αποτελεσμάτων της παρούσης εργασίας, αποτελούν ισχυρούς ανταγωνιστές της αιμοπεταλιακής ενεργοποίησης και συσσώρευσης αναστέλοντας την παραγωγή θρομβοξάνης A_2 , δρώντας τόσο στο επίπεδο του ενζυμικού συστήματος της κυκλοξυγονάσης των αιμοπεταλίων, όσο και στο επίπεδο του αιμοπεταλιακού μεμβρανικού υποδοχέα GrIIb-IIIa. Ως εκ τούτου θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν ως αντιαμοπεταλιακοί παράγοντες, είτε μόνοι είτε συμπληρωματικά, με στόχο την πρόληψη και πιθανώς την θεραπεία των θρομβοεμβολικών νόσων.



SUMMARY**Studies on catecholamines degradation products influence on platelet activation and aggregation**

Telemachos A. Daskalou

*Laboratory of Experimental Physiology, Faculty of Medicine, University of Ioannina,
451 10 IOA, Greece*

Introduction

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

Catecholamines' levels in plasma increase during the catecholaminic stress. As catecholamines are platelets' stimulators, there is a major risk of thrombosis during this stress.

However, since the role of free radicals produced by platelets in relation to their physiology and pathophysiology is speculated as a very important one, the present study is encountered with the involvement of free radicals into platelet aggregation and the influence of catecholamines degradation products on platelet activation and aggregation.

Materials and Methods

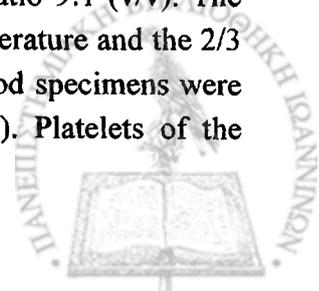
Female and male New Zealand white rabbits and healthy female and male human volunteers aged 22-46 years old were used as platelet sources.

Substances tested: Metanephrine (MET), Vanylmandelic acid (VMA), Trimetazidine (TMZ), Ascorbic acid (ASC) (Sigma).

Platelets stimulators: Adrenaline (ADR), Adenosine diphosphate (ADP), Platelet activating factor (PAF), Arachidonic acid (AA), Thrombin (THR) (Chronolog).

Buffers and reagents: i) Tyrode's-gelatin-EGTA buffer solution (TG-EGTA): KCl 2,6 mM, MgCl₂ 1,0 mM, NaCl 137 mM, NaHCO₃ 12 mM, Glucose 1 g/L, EGTA 0,2 mM and Gelatin (Merck) 0,25% (by volume), ii) ACD solution (Merck): (Citric acid, Trisodium citrate and Glucose 0,1 M each one), iii) EDTA (Merck).

Preparation of human Platelet Rich Plasma (hPRP): Peripheral blood samples were collected from an antecubical vein into plastic tubes and mixed with ACD solution at a ratio 9:1 (v/v). The anticoagulated specimen was centrifuged at 1000 rpm for 10 minutes at room temperature and the 2/3 of the upper phase platelet rich plasma (hPRP) was separated. The remaining blood specimens were centrifuged at 3000 rpm for 10 minutes to prepare poor platelet plasma (PPP). Platelets of the



specimens were counted by a Coulter counter. The platelet count of PRP was then adjusted to $2,5 \times 10^9$ cells/ml with homologous PPP.

Preparation of washed Rabbit Platelets (wRP): Blood from rabbits' ear vessels was collected into polyethylene tubes and mixed with EDTA solution at a ratio 9:1 (v/v). The anticoagulated specimen was centrifuged at 1000 rpm for 10 minutes at room temperature and the 2/3 of the upper phase platelet rich plasma (PRP) was separated. Then, PRP was centrifuged at 1500 rpm for 10 minutes at room temperature for Platelet Poor Plasma (PPP) preparation. The remaining is restored to 40 ml volume with TG-EGTA buffer solution and by successive centrifugations and dilutions, according to the method of Ardlie et al., modified by Benveniste et al., washed rabbit platelets were obtained. Platelet counts were determined in a Coulter Counter (Coulter Electronics, Ltd) and the washed platelets were suspended in the appropriate volume of TG-EGTA to yield a concentration of $2,9 \times 10^9$ cells/ml.

Platelet aggregometry: Platelet aggregation was monitored by two Chronolog Aggregometers (Models PICA and CA-500), under constant stirring of 1200 rpm, at 37 °C. For hPRP, aliquots of 0,5 ml were used.

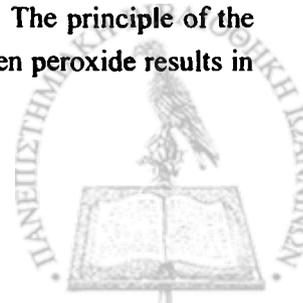
For wRP, aggregometry was monitored as follows: 100µl of platelet suspension was transferred into the cuvette of the aggregometer in which 400µl of the TG-Ca buffer was added. Measurements were as well performed under constant stirring at 1200 rpm at 37 °C.

Aggregation was studied by adding the agonist into the cuvettes of the aggregometer at increasing concentrations until irreversible aggregation of human and rabbit platelets was succeeded. The concentrations that succeeded irreversible aggregation were: for epinephrine $5 \pm 0,7$ Mm, for ADP 12 ± 2 µM, for arachidonic acid $0,7 \pm 0,2$ mM, for PAF 40 ± 5 µg/ml and for thrombine $1 \pm 0,2$ units/ml. For studies concerning the inhibition of the above agonists-induced platelet aggregation, the antagonists were transferred into the cuvettes of the aggregometer within one minute prior to the addition of the agonists. The volumes of the agonists and the antagonists solutions added into the cuvettes did not exceed 5 µl.

Inhibition of aggregation was calculated as the percentage (%) of the agonists-induced irreversible platelet aggregation curve, which was expressed as the percentage of light transmission calibrated for each specimen. Concentrations of the antagonists resulting in 50% inhibition (IC_{50}) of the irreversible platelet aggregation induced by the above mentioned agonists were also calculated. All results were expressed as means \pm SD.

Determination of Free Radicals (D-Roms test): For the determination of Free Radicals (FRs), a portable system (D-Roms test, Diacron) was used. This test is based on the ability of transition metals to catalyse in the presence of peroxides with formation of FRs which are trapped by an alchilamine. The alchilamine reacts forming a coloured radical detectable at 505 nm. FRs were determined in the upper platelet suspensions before, during and after the completion of aggregation progress, with and without the antagonists addition.

Estimation of the tested substances antioxidant ability: For the estimation of the tested substances antioxidant ability the Total Antioxidant Status method (Randox Co) was used. The principle of the method is: Incubation of ABTS[®] with a peroxidase (metmyoglobin) and hydrogen peroxide results in



the production of the radical cation $ABTS^{+\cdot}$. This species is blue-green in colour and can be detected at 600 nm. Antioxidants present in the sample inhibit the reaction and development of the blue-green colour. The degree of inhibition is proportional to the concentration of antioxidants in the sample.

Estimation of TXA_2 production by the platelets: For the estimation of TXA_2 production by the platelets, a Radio Immunoassay (RIA) method was used ($TXB_2/2,3$ -Dinor- TXB_2 [^{125}I]RIA Kit, IZOTOP, Institute of Isotopes Co, Ltd). The measurement of the amount of the TXA_2 produced by the platelets took place before, during and after the completion of the aggregation process, with and without the antagonists addition.

Estimation of GpIIb-IIIa expression on the human platelets membrane: For the estimation of GpIIb-IIIa expression on human platelets membrane, the under study substances were supplied at the concentration of 3×10^{-3} M to the human PRP and the kit ADIAflo Platelet Occupancy, American Diagnostica was used. This kit is specific for the quantitative determination of the platelet membranous glycoprotein receptor GpIIb-IIIa through flow cytometry. The cytometric machine Epics XL-MCL, Beckman-Coulter was also used.

Results

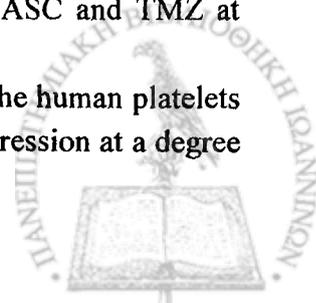
The catecholamines biological degradation products MET and VMA remarkably inhibited platelet aggregation (in both PRP and wRP) which was induced by ADR, ADP and PAF. Inhibition was dose dependent and reached its maximum (almost 100%) at concentrations of 3×10^{-3} M for each substance. MET and VMA at concentrations from 10^{-6} to 3×10^{-3} M didn't have any influence on the aggregation which was induced by AA and THR. On the contrary, ASC and TMZ at concentrations of 3×10^{-3} M for each substance, caused 100% inhibition of the aggregation which was induced by ADR, ADP, PAF, AA and THR.

From the experiments for the determination of free radicals production by the platelets appeared that during platelet stimulation and aggregation, platelets produce oxygen free radicals. The total amount of these free radicals seems to increase during aggregation and it's much higher when THR and AA are used as platelet stimulators. When MET and VMA, at concentrations of 3×10^{-3} M for each substance are added to PRP, the amount of the oxygen free radicals is decreased. The same result occurs when ASC and TMZ, at concentrations of 3×10^{-3} M for each substance are added to PRP.

From the experiments for the estimation of the tested substances antioxidant ability appeared that the catecholamines biological degradation products MET and VMA have a remarkable antioxidant ability. According to ASC and TMZ antioxidant ability, it's well known that these substances are free radical scavengers.

The data from the experiments for the estimation of TXA_2 production by the platelets showed that the amount of the TXA_2 produced by the platelets during their stimulation and aggregation is higher when THR and AA were used as platelet stimulators. When MET and VMA at concentrations of 3×10^{-3} M for each substance are added to PRP, there is a significant decrease of the TXA_2 produced by the platelets. The decrease of the TXA_2 is more significant when ASC and TMZ at concentrations of 3×10^{-3} M for each substance are added to PRP.

Finally, from the experiments for the estimation of GpIIb-IIIa expression on the human platelets membrane appeared that ASC and TMZ inhibited platelet GpIIb-IIIa receptor's expression at a degree



of 98,5 and 88,5% respectively. In contrast, MET and VMA didn't cause any inhibition of the platelet GpIIb-IIIa receptor expression.

Discussion

According to our results, platelet aggregation induced by ADR, ADP and PAF is significantly and dose-dependent inhibited *in vitro* and *ex vivo* by MET and VMA, which are substances generated through catecholamines biological metabolic degradation. These substances (MET and VMA) possess one methoxy- (-OCH₃) group at position 3 of the phenolic ring of their molecule. Thus, the methoxy-group at position 3 of the phenolic ring, may provide certain characteristics to phenolic degradation products of catecholamines.

The above is supported by evidence that TMZ, the synthetic methoxyphenolic substance which was also tested in our experiments, possessing three methoxy- groups in its molecule, exerted inhibiting effects on platelet aggregation induced by ADR, ADP, PAF, AA and THR. TMZ is also a known free radical scavenger. Therefore, it is possible for MET and VMA to exert free radical scavenging abilities, which are the result of the presence of the methoxy- group at position 3 of their phenolic ring.

According to bibliographic data and our results, there are strong indications of participation of free radicals in platelets stimulation and aggregation. Oxygen free radicals as OH· play a very important role in platelets enzymic systems function. The methoxy- group in position 3 of the phenolic ring in the molecules of MET and VMA may provide antioxidant characteristics to these substances by scavenging the OH· radical from the active center of cyclooxygenase's enzymic system. As a result of this scavenging, a significant decrease of TXA₂ production by the platelets during their stimulation by various stimulators occurs. As it is known, TXA₂ plays a very important role in platelet aggregation, because it is a very strong platelet stimulator, which is secreted by the platelets during their stimulation. The inhibition of TXA₂ production, after the addition of MET, VMA or TMZ leads to a significant inhibition of the platelet aggregation.

As it is well known, ASC is a free radical scavenger. Therefore it is possible to exhibit inhibitory effects on platelet aggregation because of its free radical scavenging abilities. In addition, ASC and TMZ seem to act also at the level of the platelet GpIIb-IIIa receptor by significantly inhibiting its expression. It is possible for these two substances to act in positions of the platelet membrane and change the stereochemic arrangement of the platelet membrane receptors. In contrast, MET and VMA didn't show any influence on the platelet GpIIb-IIIa receptor's expression. This fact support the hypothesis that these substances' inhibitory effects occur because of their antioxidant properties. These properties seem to protect the organism from thrombosis during catecholaminic stress. Our results indicate that platelet aggregation may also be autoregulated *in vivo* by catecholamines metabolic products. Such a downregulation may play a role in a rapid acting network which supports mechanisms such as the desensitization or the number reduction of α₂-adrenergic receptors, which takes time to evolve and finally regulate platelet activation and aggregation.

Our results also indicate that the final products of metabolism may play functional roles in the human body and we should focus our investigation on such an alternative.

In addition, ASC and TMZ could be used alone or together with other substances in order to protect from thrombotic incidents.



Conclusions

Our investigation indicates that:

- Π Platelet aggregation induced by ADR, ADP and PAF is significantly and dose-dependent inhibited *in vitro* and *ex vivo* by MET and VMA at the concentration of 3×10^{-3} M for each substance, which are substances generated through catecholamines biological metabolic degradation and possess one methoxy- ($-\text{OCH}_3$) group at position 3 of the phenolic ring of their molecule.
- Π Platelet aggregation induced by ADR, ADP, PAF, AA and THR is significantly and dose-dependent inhibited *in vitro* and *ex vivo* by TMZ at the concentration of 3×10^{-3} M, a synthetic methoxyphenolic substance possessing three methoxy- groups in its molecule.
- Π Platelet aggregation induced by ADR, ADP, PAF, AA and THR is significantly and dose-dependent inhibited *in vitro* and *ex vivo* by ASC at the concentration of 3×10^{-3} M.
- Π TMZ and ASC are stronger platelet aggregation inhibitors than MET and VMA at the concentration of 3×10^{-3} M.
- Π MET and VMA show antioxidant properties.
- Π Platelets produce oxygen free radicals during their activation and aggregation.
- Π The addition of MET and VMA in the PRP at the concentration of 3×10^{-3} M for each substance, causes significant inhibition of the production of oxygen free radicals by the platelets.
- Π The addition of ASC and TMZ in the PRP at the concentration of 3×10^{-3} M for each substance, causes significant inhibition of the production of oxygen free radicals by the platelets.
- Π The addition of MET and VMA in the PRP at the concentration of 3×10^{-3} M for each substance, causes significant inhibition of the production of TXA_2 by the platelets.
- Π The addition of ASC and TMZ in the PRP at the concentration of 3×10^{-3} M for each substance, causes significant inhibition of the production of TXA_2 by the platelets.
- Π ASC and TMZ seem to act also at the level of the platelet GpIIb-IIIa receptor by significantly inhibiting its expression.
- Π MET and VMA have no influence on the platelet GpIIb-IIIa receptor's expression.
platelet aggregation may also be autoregulated *in vivo* by catecholamines metabolic products. Such a downregulation may play a role in a rapid acting network which supports mechanisms such as the desensitization or the number reduction of α_2 -adrenergic receptors, which takes time to evolve and finally regulate platelet activation and aggregation.
- Π ASC and TMZ could be used alone or together with other substances in order to protect from thrombotic incidents.

Key words

Platelet Aggregation, Metanephrine, Vanylmandelic Acid, Adrenaline, ADP, Arachidonic Acid, PAF, Thrombin, Ascorbic Acid, Trimetazidine, Oxygen Free Radicals, Free Radicals Scavengers, Thromboxane A_2 , Platelet Glycoprotein Receptors.



BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Μακρής Ε Παντελής: Αιμόσταση, 1994
2. Σταυρίδης Ι: Αιματολογία, Εκδ. Τυπο Αρτ, 1980, Θεσσαλονίκη
3. Buckmaster GA: Progress 1906, 1:73
4. Σόφης Δ Γεώργιος: Η Διερεύνηση του ρόλου των ελεύθερων ριζών στη συσσώρευση των αιμοπεταλίων, Διδακτορική Διατριβή, 1992, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων
5. Καρκαμπούνας Χ Σπύρος: Ενδογενείς αναστολείς της αιμοπεταλιακής συσσώρευσης από PAF, Διδακτορική Διατριβή, 1990, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων
6. Clemeston KJ and Mc Gregor JL, in: Platelets I Biology and Pathology III, Mc Intyze and Gregor eds. Elsevier Science Publ, NY 1987, pp:272
7. Brecher G and Cronkite EP: J Appl Physiology 1950, 3:365
8. Mustard JF, Perry BW Kinglough Rathbone RL and Packhman MA: Am J Physiology 1975, 228:1757
9. Greenberg J, Packham MA, Cazenave JP, Reimers HJ and Mustard JF: Lab Invest 1975, 32, 476
10. Ham AW Capitolo, 14: Piastrine e Meccanismo emostatico, pg 296-305
11. White JG and Gerard JM: Platelet Morphology and the ultrastructure of regulatory mechanisms involved in Platelet activation in Platelets: A multidisciplinary Approach (G de Gaetano and Garattinis eds) – Raven Press New York 1978
12. Gordon JL and Milner AJ, Gordon (ed): Platelets in biology and pathology/Elsevier/North Holland/Biomedical Press 1976, chap I
13. Mustard JF and Packham MA: Ser Haematol 1968, 2, 168
14. Behuke O: Anat Rev 1969, 158, 121
15. Hoving T, in: Platelets: production, function, transfusion and storage (Baldini MG and Ebbe A eds), 1974, pg 221 – Grune and Stratton, London
16. Goldberg ND, Haddox MK, Dunham E, Lopetz C and Haddox JW, in: The cold spring harbor symposium on the regulation of proliferation of animal cells pp 609-675. Ed Clarkson B and Baserja Cold Spring Harbor Laboratory NY 1974
17. Clemeston KJ and McGregor JL, (McIntype and Gordon eds) in: Platelets in Biology and Pathology III, 1987, Elsevier Science Publishers (BV Biomedical Division)
18. Kinlough-Rathbone RL and Mustard JF: Platelets in biology and pathology III, 1987, pp 239-266, Elsevier Science Publishers (BV Biomedical Division)
19. McKean ML and Silver MJ: Biochem J 1986, 225, 723
20. Pepper DS and Jamieson GA: Biochemistry 1969, 8, 3362
21. Nachmann RL and Ferris B: J Biol Chem 1972, 247, 4468
22. Phillips DR and Poh Agin P: J Biol Chem 1977a, 252, 2121
23. Niewwenhuis HK, Akkerman JWN, Sakariassen KS, Hondijk WPM, Nievelstein Pfem and Sixma JJ: Thromb Haemost 1985, 54, 124
24. Fox JB, Goll DE, Reynolds CC and Phillips DR: J Biol Chem 1985, 260, 1060
25. Clemeston KJ, McGregor JL, James E, Dechavanne M and Luscher EF: J Clin Invest 1982, 70, 304
26. Berndt MC, Gregory C, Chong BH, Zola H and Castaldi P: Blood 1983, 62, 800



27. Collier BS, Deerschke EJ, Scudder LE and Sullivan CA: *Blood* 1983a, 61, 99
28. Nurdin AT and Dupuis D: *Thromb Haemost* 1981, 46, 216 (a)
29. Okumura T and Jamieson GA: *J Biol Chem* 1976, 251, 5944
30. Okumura T, Lombard C and Jamieson GA: *J Biol Chem* 1976, 251, 5950
31. Berneis KM, DaPrada M and Pletscher A, *Agents and Actions* 1969, 1, 35
32. Vermynen J: *Physiology of Hemostasis*, in: *Platelets: A Multidisciplinary Approach* Ed. by G. Gaetano and S. Garantinni. Raven Press, New York 1978, pp 3-15
33. Zahavi J, Jones NAG, Leyton J, Dubiel M and Kakkar W: Enhanced in vivo platelet "release reaction" in old healthy individuals. *Thrombosis Res* 1980, 17:329-336
34. Gaarder A, Jonsen J, Laland, Hellen AJ, Owren PA: Adenosine diphosphate in red cells as a factor in the adhesiveness of human blood platelets. *Nature* 1961, 192:531-532
35. Joseph R, Nelch KAM, Andrea GD, Riddle JN: Platelet activating factor and red blood cells. *Tromb Res* 1989, 53:629-633
36. Born GVR, Berguist Dand, Azfors KE: Evidence for inhibition of platelet activation in blood by a drug effect on erythrocyte. *Nature* 1976, 259:233-235
37. Born GVR, Gross MJ: Effects of adenosine diphosphate on the concentration of platelets in circulating blood. *Nature* 1963, 19:974-976
38. Honor AJ, Mitchell JRA: Platelet clumping in vivo. *Nature* 1967, 197:1019-1020
39. Kaplan KL and Owen J: Plasma levels of a β -thromboglobulin and platelet factor 4 as indices of platelet activation in vivo. *Blood* 1981, 199-202
40. Blair R, Barrow SE, Waddell K. Alewis PJ and Dollerty CT: Prostacyclin is not a circulating hormone in man. *Prostaglandins* 1982, 23:579-589
41. Siegel MI, McConnel RT, Abrahams SL, Porter NA and Quatrecassas P: Regulation of Arachidonate Metabolism via lipoxygenase and cyclooxygenase by 12-HPETE, the product of human platelet lipoxygenase. *Bioch and Biophys Res Commun* 1979, 89:1273-1280
42. Fox JB: The platelet cytoskeleton, in: *Thrombosis and Haemostasis*, ed. by Vestraete M, Vermynen J, Lijjen R, Arnout J, Leuven Univ Press 1987, pp 175-275
43. Vaargaftic BB, Chignard M, Benveniste J: Present concepts on the mechanism for platelet aggregation. *Bioch Pharmacology* 1981, 30:263-371
44. Mustard JF, Perry BW, Kinglough Rathbone RL and Packman MA: Factors responsible for ADP induced and release reaction of human platelets. *Am J Physiol* 1975, 228:1757-1763
45. Halsam RJ and Rosson GM: Effect of ADP on levels of C-AMP in human blood platelets in relation to adenosine incorporation and platelet aggregation. *Molec Pharm* 1975, 11:528-533
46. Vermynen J: *Physiology of haemostasis in: Platelets. A Multidisciplinary Approach*. Ed by de Gaetano G and Garattini S, Raven Press, New York 1977, pp 3-16
47. Garevane JP, Benveniste J, Mustard JF: Aggregation of rabbit platelets by PAF is independent of the release reaction and the arachidonate pathway and inhibited by membraneactive drugs. *J Lab Invest* 1979, 41:275-285
48. Μακρής ΠΕ: "PAF" Τρίτος δρόμος ενεργοποίησης των Αιμοπεταλίων: Σχέσεις με το Δρόμο της Λιποξυγονάσης. 1^η Πανελλήνια Ημερίδα για τον PAF 28/11/87, Ιωάννινα 1987, Πρακτικά σελ.72-81
49. Τσελέπης ΑΔ: Μελέτη της επίδρασης του PAF στο κυκλοφορικό σύστημα των επίμυων και στη ρύθμιση της μεταφοράς ιόντων στο πρωτόζωο *Tetrahymena Pyriformis*, Διδακτορική Διατριβή, 1985, Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων



50. Lauri D, Cerletti C, De Gaetano G: Amplification of primary response of human platelet to paf. Aspirin sensitive and aspirin insensitive pathways. *J Lab Clin Med* 1986, 105:653-658,
51. Chignard M, Goeffier E and Benveniste J: Role of Paf-acether and related Ether. *Lipid Metabolism in Platelets*. In: *Mechanisms of stimulus Response Coupling in Platelets*. Ed by Westwick J, Scully MF, MacIntyre DE and Kakkar W, 1985, Plenum Publishing Co, pp 309-323
52. Benveniste J and Pertolani M: Paf-acether (platelet – Activating Factor). Its Role in Inflammation. In: *Advances in Inflammation Research*. Ed by Russo Mane et al. Raven Press, New York 1985, Vol 10, pp 7-19
53. Haslam RJ and Cusack NJ, in: *Purinergic Receptors (Receptors and Recognition) Ser. B Vol 12* Burnstock G (ed) 1983, p 223, Chapman and Hall London
54. Cooper DMF and Rodbell M: ADP is a potent inhibitor of human platelet plasma membrane adenylyl-cyclase. *Nature* 1979, 282:517-521
55. Haslam RJ and Taylor A, in: *Platelet Aggregation* Caen J (ed) p 81, Masson, 1971, Paris
56. Chan LY and Tai H: *Biol Biochem Acta* 1982, 713:344
57. Manco G, Chap H and Dousty-Blazy L: Characterizations and properties of A phosphatidyl inositol phosphodiesterase (phospholipase C) from platelet cytosol. *FEBS Lett* 1979, 100:367
58. Manco G, Chap H and Dousty-Blazy L: Platelet activating factor (PAF-acether) promotes an early degradation of phosphatidyl inositol-4, 5-biphosphate in rabbit platelets. *FEBS Lett* 1979, 153:361
59. Peerschke GL, Zucker MB, Grant RA, Egan JJ and Johnson MM: *Blood* 1980, 55:841
60. Born GVR: Aggregation of blood platelets by ADP and its reversal. *Nature* 1962, 194:27-31
61. Nachman RL and Ferris B: Binding of ADP by isolated membranes from human platelets. *J Biol Chem* 1974, 249:704-708
62. Holmsen H, Day HJ and Storm E: Adenine nucleotide metabolism of blood platelets via Subcellular localization of nucleotide pools with different functions in the platelet release reaction. *Bioch Bioph Acta* 1969, 186:254-259
63. Holmsen H: Secretory storage pools in platelets. *Ann Rev Med* 1979, 30:119-134
64. Granstrom E: Biosynthesis of prostaglandins. In: "Prostaglandins and Thromboxanes". Ed by Beri F, Samuelson B, Velo GP, Plenum Press, New York, 1977, pp 65-74
65. Serham CN, Hamberg M and Samuelson B: Novel mechanisms in the arachidonic acid cascade, relating to inflammation III. *Int Congr Inflam*, Paris 1984
66. Reilly IAG and FitzGerald GA: Eicosenoid Biosynthesis and Platelet Functions with Advancing Age. *Thromb Res* 1986, 41:545-554
67. Hamberg M, Severson J, Wakabayashi Tand, Samuelson B: Isolation and structure of two prostaglandin peroxides that cause platelet aggregation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1974, 71:345-349
68. Siegel MI, McConnell I, Abrahams SL, Porter NA and Quatrecasas: Regulation of Arachidonate Metabolism via lipoxygenase and cyclo-oxygenase by 12-HPETE, the product of human platelet lipoxygenase. *Bioch Bioph Res Commun* 89:1273-1280
69. Marcus AJ, Safier LB, Ullman HC, Wong KTH, Broekman MJ, Weiksier BB and Kaplan KL: Effects of acetyl glyceryl ether phosphocholine on human platelet function in vitro. *Blood* 1981, 58:1027-1029



70. Cargill DI, Cohen Ds, Van Allen RG, Klimec JJ and Levin RP: Aggregation, release and desensitisation induced in platelets from five species, by platelet activating factor *PAF). *Thromb Haemost* 1983, 49:204-210
71. Shaw JD, Prinz MP, Hirabaysji K and Henson PM: Role of prostaglandin synthesis in rabbit platelet activation induced by basophil-derived platelet activating factor. *J Immunol* 1978, 121:1939-1942
72. Shaw JD, Klusick SJ and Hanahan DJ: Activating of rabbit platelet phospholipase and thromboxane synthesis by Platelet Activating Factor. *Bioch Bioph Acta* 1981, 51:313-317
73. Chignard M, Le Conedic JP, Tence M, Vargafting BB, Benveniste G: The role of platelet activating factor in platelet aggregation. *Nature (Lond)* 1979, 179:799-800
74. Klopogge E, DeHall GH, Gorter C, Akkerman JNN: Stimulus loading in human platelets. Evidence against a role of paf-acether in the "third pathway". *Thromb Res* 1983, 30:107-112
75. Sturk A, Schaap MCL, Ten Gate JW, Heymans HAS, Schutgens RBH, Borst B: Platelet activating factor: Mediator of the third pathway of platelet aggregation. *J Clin Inv* 1987, 79:344-350
76. Makris PE, Papadopoulos A, Tsakiris DA: Lipoxygenase products changes "in vitro" and "in vivo" aspirinated platelets under the influence of paf and epinephrine. *Thromb Haemost* 1987, 58 (1), 548
77. Snyder F: Chemical aspects and Biochemical Aspects of Platelet Activating Factor: A novel Claos of Acetylated Ether-Longed Choline Phospolipids. *Medical Research Reviews* 1985, vol 5(1) pp 107-140
78. Siess W: Molecular Mechanisms of platelet Activation. *Physiological Reviews* 1989, 69:58-178
79. Luscher EF: *Experientia* 1956, 12, 294
80. Murer EH: *Science* 1969, 166, 623
81. Murer EH, Hellem AJ and Resenberg MC: *Scand J Clin Lab Invest* 1967, 19, 280
82. Markwardt F: *Ann Med Exp Fenn* 1968, 46, 407
83. Corn M, Jackson DP and Conley CL: *Bull John-Hopkins Hosp* 1960, 107, 90
84. Holmsen H, Day HJ and Storm E: *Biochim Biophys Acta* 1969, 186, 254
85. Holmsen H In: *Biochemistry and Pharmacology of Platelets - Ciba Fotation, Symposium 35, New Series* 1975
86. Bussolino F, Tetta C and Camussi G: *Agents Actions* 1984, 15, 15
87. Kinlough-Rathbone RL, Packman MA and Mustard JF: *J Lab Clin Med* 1970, 75, 780
88. Breemer J and Greenberg DM: *Biochim Biophys Acta* 1960, 37, 173
89. Hokin LE: *Ann N.Y. Acad Sci* 1969, 165, 761
90. Schneider PR and Kirschner LB: *Biochem Biophys Acta* 1970, 202, 283
91. Leung NL, Kinlough-Rathbone RL and Mustard JF: *Br J Haematol* 1977, 36, 417
92. Hokin LE: *Ann N.Y. Acad Sci* 1969, 165, 695
93. Coben P, Brockman MJ, Verkley A, Lisman JWW and Derksen A: *J Clin Invest* 1971, 50, 762
94. Kai M and Hawthorye JN: *Ann N.Y. Acad Sci* 1969, 165, 761
95. Lloyd JV, Nishizawa EE, Haldar J and Mustard JF: *Br J Haematol* 1972, 23, 571
96. Lloyd JV, Nishizawa EE, Haldar J and Mustard JF: *Br J Haematol*, 1973a 24, 589
97. Lloyd JV, Nishizawa EE, Haldar J and Mustard JF: *Br J Haematol* 1973a, 25, 77
98. Durrell J and Garland JT: *Ann N.Y. Acad Sci* 1969, 165, 743



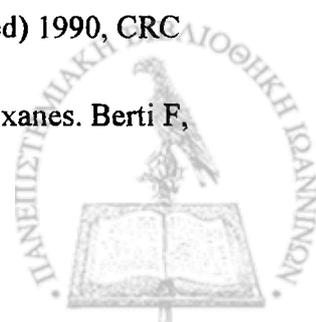
99. Hendrikson HS and Reinertsen JL: *Biochem Biophys Res Commun* 1971,44, 1258
100. Mellion BT, Iguarro LJ, Ohlstein EH, Pontecorvo EG, Hyman AL and Kadowitz PJ *Blood* May 1981, vol 57, No 5, pp 946-955
101. Leunk LK, Harpel PC, Nachman RL and Radellino EM: *Blood* 1983, 62, 1016
102. Vicjers JD and Mustard JF, in: *Platelet Function and Metabolism 1982*, vol 3 (Holmsen M ed) CRC PRESS, Boca Raton Florida
103. Valeri CR, Zaronlis CG, Vecchione JJ, Valeri Da, Anastasi J, Pivacec Le and Emerson P: *Transudion* May-June 1980, vol 20, number 3
104. Cockcroft S and Gomberts BD: *Nature (London)* 1985, 314, 534
105. Carty DJ and Gaer ARL: *Thromb Haemost* 1985, 54, 14
106. Daniel JL, Molish IR, Rigmaide M and Stewart G: *J Biol Chem* 1984, 259, 9826
107. Moake JL, Ahmed K, Bachus HR and Getfreund DE: *Biochem Biophys Acta* 1970, 211, 3
108. Kinlough-Rathbone RL et al: *Am J Physiol* 1973, 224, 941
109. Da Prada M, Pipchard JG and Kettler R, in: *Platelets in Biology and Pathology 1981*, vol 2 (Gordon JL ed) Elsevier/North Holland/Amsterdam
110. Pletscher A, Da Prada M and Berneis KH, in: *Memo IRS of the Society for Endocrinology* 1971, No 19 pp 767 – Cambridge University Press, London
111. Reimers HJ, Packham MA, Kinlough-Rathbone RL and Mustard JF: *Br J Haematol* 1973, 25, 675
112. Gerrard JM, Peterson DA and White JG, in: *Platelets in Biology and Pathology 1981*, vol 2 (Gordon JL ed) pg 407, Elsevier / North Holland Amsterdam
113. Ginsberg MH, Painter RG, Forsyth J, Birdwell C and Plow EF: *Proc Nati Acad Sci USA* 1980, 77, 1049
114. Καλλίστρατος Γεώργιος: *Χημικά Χρονικά* 1964, 29^A, 87-102
115. Connoly and Limbird LE: *Proc Nati Acad Sci USA* 1983, 80, 5320
116. Connoly and Limbird LE: *J Biol Chem* 1983, 258, 3907
117. Brass LF: *J Biol Chem* 1984, 259, 12571
118. Booyse FM and Rafelson ME Jr: *Blood* 1969, 33, 100
119. Hardisty RM and Stacey RS: *J Physiol (London)* 130, 711
120. Sneddon JM, in: *Progress in Neurobiology* vol 1 (Kerkut GA and Phillips JW eds) part 2 p.151 Pergamon Press New York
121. Bintoli A, Cavallini L: *I radicali liberi – Aspetti biochimici e medici – Quaderni di Biochimica* (dir. L. Boloyani) Piccin Editore 1980, Italia
122. Holmsen H, Ostvold AC and Day HJ, *Biochem Pharmacol* 1973, 22, 2599
123. Massini P: *Experientia* 1970, 26, 87
124. De Clerck F, David JL and Janssen PA, in: *S-Hydroxytryptamine in Peripheral Reactions* (Le Clerck F and Vayhoutte MP eds) 1982b, pg 83, Raven Press New York
125. Baumgardnez HR and Born VR: *J Physiol (London)* 1969, 201, 397
126. Carlsson L, Nystrom LE, Lindberg U, Kannan KK, Cid-Presdnez H, Lovgren S and Jozvall H: *J Mol Biol* 1976, 105, 353
127. Fox JB and Phillips DR: *Semin Hematol* 1983, 20, 243
128. Fox JB, Boyles JK, Reynolds CC and Phillips DR: *J Cell Biol* 1984, 98, 1985
129. Lassing J and Lindberg U: *Nature (London)* 1985, 314, 472
130. Malm B, Larsson M and Lindberg U: *J Muscle Res Cell Motil* 1983, 4, 569



131. Daniel JL, Holmsen H and Adelstein RS: *Thromb Haemost* 1977, 38, 284
132. Haslam RJ, Lynham JA and Fox JEB: *Biochem* 1979, J 178, 397
133. Lyons RM, Standford N and Majerus PW: *J Clin Invest* 1975, 50, 924
134. Daniel JL, and Adelstein RS: *Biochemistry* 1976, 15, 2370
135. Hathaway DR and Adelstein RS: *Proc Nati Acad Sci USA* 1979, 76, 1653
136. Fox JB and Phillips DR: *J Biol Chem* 1982, 257, 4120
137. Phillips DR and Jacobova M: *J Biol Chem* 1977, 252, 5602
138. Mustard JF and Packham MA: *Pharm Rev* 1970, 22, 97
139. Mustard JF, Packham Ma, Kinlough-Rathbone RL, Perry DW and Regoeczi E: *Blood* 1978, 52, 4
140. Mustard JF, Perry DW, Ardlie NG and Packham MA: *Br J Haematol* 1972, 22, 193
141. Lawler JW, Slayter HS and Coligan JE: *J Biol Chem* 1978, 253, 86009
142. Gardner TK, Gerrard JM, White JG and Williams DC: *Nature (London)* 1981b, 289, 688
143. Gardner H: *Studies on Platelet fine structure* 1967, Thesis for Msc Dept of Pathology, University of Toronto, Canada
144. Gerrard JM, Butler AM, Peterson DA and White JG: *Prostaglandin Med* 1978, 1, 387
145. Plow EF and Ginsberg MH: *J Biol chem* 1981, 256, 9477
146. Deby C: *Βιοχημεία του Οξυγόνου. Περισκόπιο της Επιστήμης* 1991, 138:49-57
147. Halliwell B and Gutteridge JMC: *Free radicals in Biology and Medicine*. Clarendon Press 1985, Oxford
148. Bindoli A and Cavallini L: *I Padicalli Liberi. Aspetti Biochemici e Medici* Piccin Editore 1980, Padova
149. Morrison and Boyd: *Οργανική Χημεία (Μετάφραση Σακαρέλλος Κ, Πηλίδης Γ, Γεροθανάσης Ι)* Εκδοση Γραφείο Εκτυπώσεων Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, 1991, σελ. 50.
150. Vigo – Pelfrey C: *Membrane Lipid Oxidation* 1990, Vol I. CRC Press Florida
151. Cohen G: *The Fenton Reaction*, In: *CRC Handbook of Methods for Oxygen Radical Research*. Ed by Greevald RA, CRC Press, Florida 1985, pp 55-64
152. Walling C: *Fenton's reagent revisited*. *ACC Chem Res* 1975, 8:125-131
153. Borek C: *In vitro cells cultures as tools in the study of free radicals and free radicals modifiers in carcinogenesis*, in: *Methods in Enzymology, Volume on Oxygen Radicals in Biological Systems*. Colowick CP et al (eds) 1984, p 465, Academic Press, New York
154. Borek C and Troll W: *Modifiers of free radicals inhibit in vitro, the oncogenic actions of x-rays, bloomycin, and the tumor promotor, 12-o-tetradecanoyl horbol 13-acetate*. *Proc Nati Sci USA*, 80-5749
155. Oberly L: *Free Radical Biology: A Paradox in cancer research*. *Journal of the NCI* 1990, vol. 82, No 11, June 6
156. Hess ML, Manson NH, Okabe E: *Involvement of free radicals in the pathophysiology of scientific heart disease*. *Can J Physiol Pharmacol* 1982, 60:1382-1389
157. Parks D, Bulkley G, Granger D, Hamilton S, MacCord J: *Ischemic injury in the cat small intestine: Role of superoxide radicals*. *Gastroenterology* 1982, 82:9-15
158. Parks D, Granger D, Townsley M, Taylor A: *The role of oxygen derived free radicals in ischemia-induced increases in canine skeletal muscle vascular permeability*. *Circ Res* 1985, 57:599-609



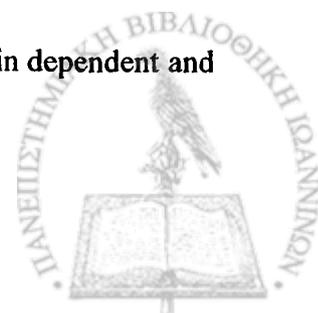
159. Nauta R, Tsimoyiannis E, Uribe M, Walsh D, Miller D, Butterfield A: Role of the oxygen – derived free radicals in hepatitis ischemia / reperfusion injury in the rat. *Surg Gynecol Obster* 1990, 171:120-125
160. Del Maestro R: An approach to free radicals in medicine and biology. *Acta Physiol Scand* 1980, 492 (supp):153-168
161. Bulklely GB: The role of oxygen free radicals in human disease processes. *Surgery* 1983, 94:407-411
162. Slater TF: Free radicals mechanisms in tissue injury. *Biochem J* 1984, 222:1-15
163. Τσιμογιάννης Ε, Τσιμογιάννης Ι: Η παθογένεια της ισχαιμίας των ιστών. *Ιατρική* 1989, 55566-574
164. Fracica JP, Piantadosi AC, Crapo DJ: Oxygen Toxicity, in: *The Lung*. Crystal GR, West BJ (eds) 1991, vol II, p. 2155-2161, Raven Press
165. Fisher BA: Pulmonary Oxygen Toxicity, in: *Pulmonary Disease and Disorders*, Fishman PA (ed) 1988, vol III, pp 2331-2338, McGraw Hill
166. Slater TF, Riley PH: Free radical damage in retrolental fibroplasia. *Lancet* 1970, 2:467
167. Cederbaum AL and Cohen G: Microsomal Oxidation of Hydroxyl Radicals Scavenging Agents. In: "CRC Handbook of Methods for Oxygen Radical Research". Ed by Greenwald RA. CRC Press 1985, Florida pp 81-87
168. McCord JM and Fridovich I: Superoxide dismutase. An enzyme function for erythrocuprein (hemocuprein). *J Biol Chem* 1969, 244:6049-6055
169. Cohen G: Defense of Haber-Weiss, in: *Superoxide and Superoxide Dismutases*. Michaelson MA, McCord JM and Fridovich I (eds) 1977, Academic Press, New York, pp 317-321
170. Crapo JD and Tierny DF: Superoxide dismutase and pulmonary oxygen toxicity. *Am J Physiol* 1974, 226:1401-1402
171. Corey EJ, Mehrotra MM and Khan AV: Water induced dismutation of superoxide anion generates singlet molecular oxygen. *Biochem Biophys Res* 1987, 145:842-846
172. Lynch RE and Fridovich I: Effects of superoxide on the erythrocyte membrane. *J Biol Chem* 1978, 253:1838-1845
173. Goldberg B and Stern A: Superoxide anion as a mediator of drug induced oxidative hemolysis. *J Biol Chem* 1976, 251:6468-6478
174. Makoto Mino: Analysis of Tocopherol in Blood and Liver, in: *Handbook of Free Radicals and Antioxidants in Biomedicine*, Vol III. Miquel J, Quintanilha AI, Weber H (eds) 1989, CRC Press, Florida pp 239-245
175. Desai ID: Methods of analysis of Vitamine E in animals tissues, in: *Handbook of Free Radicals and Antioxidants in Biomedicine*, Vol III. Miquel J, Quintanilha AI, Weber H (eds) 1989, CRC Press, Florida pp 247-252
176. Porter NA: Autoxidation of polyunsaturated fatty acids: Initiation, propagation, and product distribution (basic chemistry), in: *Membrane Lipid Oxidation*, Vol I. Vigo-Pelfrey C (ed) 1990, CRC Press, Florida pp 33-62
177. Martin RA, Richard C and Rousseau-Richard C: Oxidation of linoleic acid and related or similar compounds, in: *Membrane Lipid Oxidation*, Vol I. Vigo-Pelfrey C (ed) 1990, CRC Press, Florida pp 63-69
178. Granstrom E: Metabolism of Prostaglandin, in: *Prostaglandins and Thromboxanes*. Berti F, Samuelsson B and Velo GP (eds), 1977, Plenum Press, New York pp 75-83



179. Frankel EM: Lipid Oxidation. *Prog Lipid Res* 1980, 19:1-22
180. Granstrom E: Chemistry of Prostaglandins and Thromboxanes, in: Prostaglandins and Thromboxanes. Berti F, Samuelsson B and Velo GP (eds) 1977, Plenum Press, New York, pp 1-8
181. Halliwell B, Grootveld M: *FEBS Lett* 1987, 213:9
182. Frankel EN: *Prog. Lipid Res* 1985, 23:197
183. Halliwell B, Gutteridge JMC: *Mol Aspects Med* 1985, 8:89
184. Halliwell B, Gutteridge JMC: *Arch Biochem Biophys* 1986, 246:501
185. Davies KJA, Sevanian A, Muakkassah – Kelly SF, Hochstein P: *Biochem J* 1986, 235:747
186. Stocks J, Gutteridge JMC, Sharp RJ, Dormandy TI: *Clin Mol Med* 1974, 47:223.
187. Martin W, Loschen G, Cunzler WA, Flone L: *Agents Actions* 1985, 16:48
188. Del Principe D, Menichelli A, De Matteis W, Di Corpo MI, Di Giulio Finazziaro A: *FEBS Lett* 1985, 185:142
189. Halliwell B, Gutteridge JMC: *Trends Neurosci* 1985, 8:22
190. Bors W, Saran M: Oxygen Radicals, in: *Chemistry and Biology*. ed. Walter de Gruyter, 1984, Berlin, pp:1029
191. Halliwell B, Gutteridge JMC: *Free Radicals in Biology and Medicine*, Clarendon, Oxford 1985, pp:34
192. Johnson Jr JE, Walford R, Jarman D, Miguel J: *Free Radicals, Aging and Degenerative Diseases*. Alan R, Liss, New York, 1986, pp:600
193. Rice-Evans C: *Free Radicals, Cell Damage and Disease*. Richelien Press, London, 1989, pp:312
194. Sies H: *Oxidative Stress*, Academic Press, London, 1985, pp:707
195. Taylor AE, Matalon S: *Physiology of Oxygen Radical*, Wardped, American Physiological Society, 1986, pp:311
196. Fantone JC, Ward PA: *Am J Pathol* 1982, 107:397
197. Ward PA: *J. Allergy Clin Immunol* 1986, 78:373
198. Halliwell B, Gutteridge JMC, Blake D: *Philos Transp Royal Lond* 1985, 311:659
199. Greenwald RA: *J. Free Rad Biol Med* 1985, 1:173
200. Emerit I, in: *Free radicals, Aging and Degenerative Diseases*. (Johnson JE Jr, Walford R, Harmon D, Miguel J, Eds) Alan R. Liss New York 1986, Inc. pp:307
201. Chaudhri C, Clarck IA, Hund Nh, Cowden WB, Ceredig R: *J Immunol* 1986, 137:2646
202. Fairburn K et al: α -Tocopherol, lipids and lipoproteins in the knee joint synovial fluid and serum from patients with inflammatory joint disease. *Clin Sci* 1992, 83, 657-664
203. Heliouvarra M et al: Serum antioxidants and risk of rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 1994, 53, 51-53
204. Masumoto H and Seis H: The reaction of ebselen with peroxynitrite *Chem Res Toxicol* 1996, 9, 262-267
205. Harman D: Free radical theory of ageing: role of free radicals in the origination and evolution of life ageing and disease processes, in *Free Radicals, Ageing and Degenerative Disease processes*. Eds Johnson, JE, New York, 1996, Alan R. Liss, p3-49
206. Rodriguez ML et al: Total Antioxidation Status (TAS) and Glutathione Reductase (GR) in geriatric patients. VIII Biennial meeting for the International Society for Free Radical Research, 1996, Spain



207. Hearse DJ, Hymphrey SM, Chain EB: *J. Mol Cell Cardiol* 1973, 5:395
208. Hearse DJ, Hymphrey SM, Bullock GR: *J. Mol Cell Cardiol* 1978, 10:641
209. Guarnieri C, Flamigni F, Caldarera CM: *J. Mol Cell Cardiol* 1980, 12:797
210. De Wall RA, Vasko KA, Stanley EL, Kezdi P: *Amer Heart J* 1971, 82:362
211. Crowell J.M., Jones CE, Smite EE: *Emr J Physiol* 1969, 216:744-8
212. McCord JM, Fridovich I: *J Biol Chem* 1968, 243:5753
213. Battelli MG, Corte ED, Stripe F: *Biochem J* 1972, 126:747-9
214. McCord JM: *N Engl J Med* 1985, 312:159
215. Granger Dn, Hollwarth ME, Parks DA: *Acta Physiol Scand* 1986, [Supp] 548:47
216. Granger DN, Rutili G, McCORD JM: *Gastroenterology* 1981, 81:22
217. Parks DA, Bulkley GB, Granger DN, Hamilton SR, McCord JM: *Gastroenterology* 1982, 82:9
218. McCord JM: *N Engl J Med* 1985, 312:159
219. Adkison D, Hallwarth ME, Benoit JN, Parks McCord JM, Granger BN: *Acta Phusiol Scand* 1986, [Supp] 548:101
220. Im MJ, Manson PN, Bulkey GB, Hoopes JE: *Ann Surg* 1985, 201:357
221. Champers RJ, Parks DA, Patterson G: *J Mol Cell Cardiol* 1985, 17:145
222. Korthuis RJ, Granger DN, Townsley MJ, Taylor AE: *Circ. Res.* 1985, 57:599
223. Comporti M: *Lab Invest* 1985, 53:599
224. Grisman MB, Russell WZ, Roy RS, McCord JM: *Superoxide and Superoxide Dismutase in Chemistry, Biology and Medicine*, Rotilio G ed. Elsevier Science. Amsterdam 1986, pp.571
225. Granger DN, McCord, Parks DA, Hollwarth ME: *Gastrenterology* 1986, 90:80
226. McCord JM, Day ED Jr: *FEBS Lett* 1987, 86:139
227. Heinecken JW, Baker H, Rosen H, Chait A: *J Clin Invest* 1986, 77:757
228. Harman D: *Free Radicals, Ageing and Degenerative Diseases*. Johnson JE Jr, Harman D, Miguel J. ed. Alan R. Liss, N.Y. 1986, pp:3
229. Harman D: *Age* 1984, 7:111
230. Mitrvski A et al: *Total Antioxidant Status and Superoxide Dismutase after cerebrovascular accident*. XVI International Congress of Clinical Chemistry, London, 1996, Poster A106
231. Sushil K et al: *Relationship between elevated lipid peroxides vitamin E deficiency and hypertension in pre-eclampsia*. *Mol And Cel Biochem* 1995, 151, 33-38
232. Vukelic N et al: *Monitoring of total antioxidant status and activity of superoxide dismutase in patients with ischaemic heart disease*. Abstracts from MEDLAB, 1997, 12th IFCC European Congress of Clinical Chemistry
233. Baines M and Shenkin A: *Total antioxidant status of patients receiving total parenteral nutrition (TPN)*. Proceedings of the Nutritional Society 1997, Poster 242A
234. Miller NJ et al: *Serum total antioxidant activity after myocardial infarction*. *Ann Clin Biochem* 1997, 34, 85-90
235. Young et al: *The effects of desferrioxamine and ascorbate on oxidative stress in the streptozotocin diabetic rat*. *Free Radical Biol Med* 1995, 18(5), 833-840
236. Eriksson J et al: *Mg and ascorbic acid supplementation in diabetes melitus*. *Ann Nutr Metab* 1995, 39 (4) 217-223
237. Maxwell SRK et al: *Antioxidant status in patients with uncomplicated insulin dependent and non-insulin diabetes mellitus*. *Eur J Clin Invest* 1997, 26, 484-490



238. Leonard SF et al: Cigarette smoking and free radical activity in young adults with insulin dependent diabetes. *Diabet Med* 1996, 12, 46-50
239. O'Brien S.F. et al: Lipids, lipoproteins and glomerular and tubular dysfunction in Type I diabetes. *Diabetes Res and Clin Practice* 1996, 32, 81-90
240. Gavella M et al: Superoxide scavenging capacity of human seminal plasma. *Int J of Andrology* 1996, 19, 82-90
241. Sharma RK and Agarwal A: Role of ROS in male infertility. *Urology* 1996, 48(6), 835-850
242. Racek J et al: Clinical significance of extra- and intracellular markers of antioxidant defence. Abstracts from MEDLAB, 12th IFCC European Congress of Clinical Chemistry, Balse 1997, Poster A29
243. EBADI, M et al: Oxidative stress and antioxidant therapy in Parkinson's disease. *Progress in Neurobiology* 1996, 48, 1-19
244. Zaman Z et al: Plasma concentrations of vitamins A and E and carotenoids in Alzheimers disease. *Age Ageing* 1992, 21, 91-94
245. Portal BC et al: Altered antioxidant status and increase lipid peroxidation in children with Cystic Fibrosis. *Am J Clin Nutr* 1995, 61, 843-847
246. Ross MH, Lustbader Ed, Bras G: *Nutr Cancer* 1982, 3:150
247. Preston SH, Keyfitz N, Schoen R: New York 1972, Seminar Press pp98
248. Ames Bn, Saul RJ, Schwiers E, Adelman R, Cathcart R, in: *Molecular biology of ageing. Gene stability and Gene expression.* Sohal RS, Birnbaum LS, Culter RG, Eds. Raven Press, New York, 1985, pp137
249. Dix D, Cohen P, Flannery J: *JTheorBiol* 1980, 83:163
250. Peto R: *Proc Royal Soc Lond (Biol)* 1979, 205:111
251. Cutler RG, in: *Free Radicals in Biology.* Pryor WA ed. Vol 6. Academic Press, New York 1984, Chapt. 6:371
252. Tolmasoff JM, Ono T, Cuttler RG: *Proc Natl Acad Sci USA* 1980, 72:2777
253. Ames BN: *Science* 1983, 221:1256
254. Pryor WA, Tamura M, Church DF: *J Am Chem Soc* 1984, 106:5073
255. Nygaard OF, Simic MG: *Radioprotectors and Anticarcinogens.* Academic Press NY 1983, pp:184
256. Pryor WA: In *Free Radicals in Biology.* Academic Press NY 1984, vol 6, pp:1976
257. Bischoff F: *Advances in Lipid Reseach.* Paroletti R, Dritchvsky D, eds Academic Press NY 1969, pp:164
258. Imai H, Werthessen NT, Subramanyam V, Lequesne PW, Soloway AH, Kanisawa M: *Science* 1980, 207:651
259. Petrakis NI, Gruenke L, Graig J: *Cancer Res* 1981, 41:2563
260. Bird RP, Draper HH, Basrur PK: *Mutat Res* 1982, 101:237
261. Ferrali M, Fulceri R, Benedetti A, Comporti M: *Res Commun Chem Pathol Pharmacol* 1980, 30:99
262. Levin DE, Hollstein M, Christman MF, Schwiers E, Ames BN: *Proc Natl Acad Sci USA* 1982, 79:7445
263. Demopoulos HB, Pietronigro DD, Flamm ES, Seligman ML, in: *Cancer and the Environment.* Mehlman MA, Demopoulos HB eds. Park Forest. Illinois 1980, pp:273



264. Shorland FB, Igene JG, Pearson AN, Thomas JW, McGuggey PK, Aldridge AE: *J. Agric Food Chem* 1981, 29:863
265. Simic MG, Karel M, eds. : New York: 1980, Plenum Press
266. Sevanian A, Peterson AR: *Proc Natl Acad Sci USA* 1984, 81:4198
267. Hirota N, Yokoyama T: *Gann* 1981, 72:811
268. Ito A, Naito M, Naito Y, Watanabe H: *Gann* 1982, 73:315
269. Paline HL: *Genetics* 1955, 40:268
270. Reddy JK, Lalwani ND: *CRC Crit Rev Toxicol* 1983, 12:1
271. Reddy JK, Warren JR, Redde MK, Lalwani ND: *Ann NY Acad Sci* 1982, 386:81
272. Speit G, Vogel W, Wolf M: *Environ Mutagen* 1982, 4:135
273. Tsuda H: *Jpn J Genet* 1981, 56:1
274. Blot et al: Nutrition intervention trials in Linxian, China: Supplementation with specific vitamin and mineral combinations, cancer incidence and disease specific mortality in the general population. *Natl Cancer Instit* 1993, 85, 1483-92
275. Burr ML et al: Antioxidation and cancer. *J of Human Nutr And Diatetics* 1994, 7, 409-416
276. Salgo MD, et al: Plasma TAS in various diseases. Abstracts from MEDLAB; 12th IFCC European Congress of Clinical Chemistry, Balse 1997, Poster A11
277. Sahin YN et al: Superoxide Dismutase, Catalase and glutathione Peroxidase activities in human colorectal carcinoma tissue. Abstracts from MEDLAB; 12th IFCC European Congress of Clinical Chemistry, Balse 1997, Poster A29
278. Salonen, JT et al: Risk of cancer in relation to serum concentrations of selenium and vitamins A and E. Matched case control analysis of prospective data. *Brit Med J* 1995, 290, 417-420.
279. Dewel TF, Senior K.M, Chang D, Griffin QL, Heinrickson RL, Keiser ET: Platelet factor 4 is chemotactic for neutrophils and monocytes. *Proc Natl Acad Sci, USA* 1974, 71:1227-1230
280. Ross R, Glomset JA, Kaya B, Harpor L: A platelet depended serum factor that stimulates the life pro-ration of arterial smooth muscle cells in vitro. *Proc Natl Acad Sci, USA* 1974, 71:1207-1210
281. Benveniste J, Chignard M: A role of paf-acether in platelet depended vascular disease. *Circulation* 1985, 72:713-717
282. Mustard JF, Packham MA: Platelet phagocytosis. *Ser Haematol* 1968,1:168-171
283. Krinsky NI, Scoon KL, Hardin JC and Levine PH: Source of Hydrogen peroxide and chemiluminescence observed in Activated Human Platelets. *Blood* 1977,50(4):597-602
284. Ameisen JC, Capron A, Joseph M, Mclouf J, Vorgn H: Aspirin-sensitive asthma: Abnormal platelet response to drugs inducing asthma attacks. *Int Allergy Appl Immunol* 1985, 78:438-448
285. Mills EL, Gerrard JM, Millipovich D, White JD, Quie PG: The chemiluminescence response of human platelets. *J Clin Invest* 1978, 61:807-814
286. Marcus JA, Silk ST, Safier LB and Ullman HL: Superoxide production and Reducing Activity in Human platelets. *J Clin Invest* 1977, 59:149-158
287. Singh D, Greenwald JE, Bianchine J, Metz EN, Sagone AL: Evidence for the generation of hydroxyl radical dyring arachidonic acid metabolism by hyman platelets. *Am J Haematol* 1981, 11(3):2303-2340



288. Cesbron JY, Capron A, Vargaftig BB, Lagarde M, Pincemail J, Braquet P, Toelman H, Joseph M: Platelets mediate the action of diethylcarbamazine on microfilariae. *Nature* 1987, 325:533-536
289. Iuliano L, Pratico D, Ghiselli A, Bonavita MS, Violi F: Superoxide dismutase triggers activation of "primed" platelets. *Arch Biochem Biophys* 1991, 289:180-183
290. Leoncini G, Maresca M, Colao C: Oxidative metabolism of human platelets. *Biochem Int* 1991, 25:647-655
291. Finazzi-Argo A, Menichelli A, Persiani M, Biancini G, Del Principe D: Hydrogen peroxide release from human blood platelets. *Biochim Biophys Acta* 1982, 718:21-25
292. Salvemini D, De Nucci G, Sneddon JM, Vane JR: Superoxide anion enhance platelet adhesion and aggregation. *B J Pharmacol* 1989, 97:1145-1150
293. Del Principe D, Menichelli A, De Matteis W, Di Corpo ML, Di Giulio S, Finazzi-Argo A: Hydrogen peroxide has a role in the aggregation of human platelets. *FEBS Lett* 1985, 185:142-146
294. Violi F, Ghiselli A, Iuliano L, Alessandri C, Cordova C, Balsano F: Influence of hydroxyl radical scavengers on platelet function. *Haemostasis* 1988, 18:91-98
295. Iuliano L, Pedersen JZ, Pratico D, Rotilio G, Violi F: Role of hydroxyl radicals in the activation of human platelets. *Eur J Biochem* 1994, 221:695-704
296. Leo R, Ghiselli A, Iuliano L, Violi F: Detection of hydroxyl radicals by the salicylate bis-hydroxylation during arachidonic acid-dependent platelet activation. *Thromb Haemost* 1995, 73:A347
297. Caccese D, Pratico D, Ghiselli A, Natoli S, Pignatelli P, Sanguini V, Iuliano L, Violi F: Superoxide anion and hydroxyl radical release by collagen-I induced platelet aggregation: role of arachidonic acid metabolism. *Thromb Haemost* 2000, 83(3):485-490
298. Saluk-Juszczak J, Wachowicz B, Kaca W: Endotoxins stimulate generation of superoxide radicals and lipid peroxidation in blood platelets. *Microbios* 2000, 103(404):17-25
299. Chamulitrat W, Mason RP: Lipid peroxy radicals intermediates in the peroxidation of polyunsaturated fatty acids by lipoxygenase. *J Biol Chem* 1989, 264:20968-20973
300. Pou S, Pou WS, Bredt DS, Snyder SH, Rosen GM: Generation of superoxide by purified brain nitric oxide synthase. *J Biol Chem* 1992, 267:24173-24176
301. Marnett LJ, Bienkowski MJ, Pagels WR: Oxygen 18 investigation of the prostaglandin synthetase-dependent co-oxidation of diphenylisobenzofuran. *J Biol Chem* 1979, 254:5077-5082
302. Egan RW, Gale PH, Baptista EM, Kennicott KL, Vanden Henvel WS, Waletz RW, Fagerness PE, Kuebl FA Jr: Oxidation reactions by prostaglandin cyclooxygenase hydroperoxidase. *J Biol Chem* 1981, 256:61-72
303. Kontos HA, Wei EP, Ellis EF, Jenkins LW, Rowe GT, Hess ML: Appearance of superoxide anion radical in cerebral extracellular space during increased prostaglandin synthesis in cats. *Circ Res* 1985, 57:142-151
304. Kulmacz RJ, Tsai AL, Palmer G: Heme spin states and peroxide induced radical species in prostaglandin H synthase. *J Biol Chem* 1987, 262:10531-10542
305. Handin RI, Karabin R, Boxer GJ: Enhancement of platelet function by superoxide anion. *J Clin Invest* 1977, 59:959-965



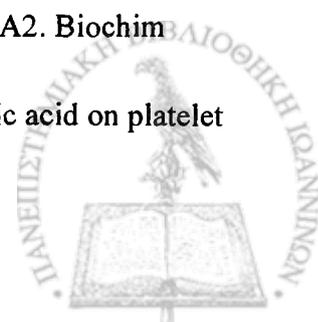
306. Wurner P, Patscheke H, Paschen W: Response of platelets to potassium tetraperochromate, an extracellular source of singlet oxygen, hydroxyl radicals, superoxide anions and hydrogen peroxide. *Hoppe Seyler's Z Physiol Chem* 1979, 360:559-570
307. Canoso RT, Rodvien R, Scoon K, Levine PH: Hydrogen peroxide and platelet function. *Blood* 1974, 43:645-655
308. Levine PH, Weinger RS, Simon J, Scoon KL, Krinsky NI: Release of hydrogen peroxide by granulocytes as a modulator of platelet reactions. *J Clin Invest* 1976, 57:955-962
309. Clark RA, Seymour J, Klebanoff J: Neutrophil platelet interaction mediated by myeloperoxidase and hydrogen peroxide. *J Immunol* 1980, 124:399-403
310. Ohyashiki T, Kobayashi M, Matsui K: Oxygen-radical-mediated lipid peroxidation and inhibition of ADP-induced platelet aggregation. *Arch Biochem Biophys* 1991, 288:282-286
311. Stief TW, Kurz J, Doss MO, Farreed J: Singlet oxygen inactivates fibrinogen, factor V, factor VIII, factor X, and platelet aggregation of human blood. *Thromb Res* 2000, 97(6):473-80
312. Iuliano L, Violi F, Pedersen JZ, Pratico D, Rotilio G, Balsano F: Free radical-mediated platelet activation by hemoglobin released from red blood cells. *Arch Biochem Biophys* 1992, 299:220-224
313. Iuliano L, Pratico D, Bonavita MS, Violi F: Involvement of Phospholipase A2 in H2O2-dependent platelet aggregation. *Platelets* 1992, 2:87-90
314. Hashizume T, Yamaguchi H, Kawamoto A, Tamura A, Sato T, Fujii T: Lipid peroxide makes rabbit platelet hyperaggregable to agonists through phospholipase A2 activation. *Arch Biochem Biophys* 1991, 289:47-52
315. Weidtmann A, Scheithe R, Hrbotichy N, Pietsch A, Lorenz R, Seiss W: Mildly oxidized LDL induces platelet aggregation through activation of phospholipase A2. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1995, 15:1131-1138
316. Pratico D, Pasin M, Barry OP, Chiselli A, Sabatino G, Iuliano L, Fitzgerald GA, Violi F: Iron-dependent human platelet activation and hydroxyl radical formation: involvement of protein kinase C. *Circulation* 1999, 99(24):3118-24
317. Patscheke H, Wurner P: Sequential effects of the thiol-oxidizing agent, diamide, on human platelets. *Thromb Res.* 12(4):609-618, 1978
318. Chang WC, Nakao J, Orimo H, Murotas I: Effects of reduced glutathione on the 12-lipoxygenase pathways in rat platelets. *Biochem J* 1982, 202(3):771-776
319. Wurner P, Patscheke H, Paschen W: Response of platelets exposed to potassium tetraperochromate, an extracellular source of singlet oxygen, hydroxyl radicals, superoxide anions and hydrogen-peroxide. *Hoppe Seylers Z Physiol Chem* 1979, 360(4):559-70
320. Clark RA, Klebanoff SJ: Neutrophil-platelet interaction mediated by myeloperoxidase and hydrogen peroxide. *J Immunol* 1980, 124(1):399-405
321. Radomski MV, Palmer RMJ, Moncada S: Comparative pharmacology of endothelium-derived relaxing factor, nitric oxide and prostacyclin in platelets. *Br J Pharmacol* 1987, 92(1):181-7
322. Leo R, Pratico D, Iuliano L, Pulcinelli FM, Ghiselli A, Pignatelli P, Colavita AR, Fitzgerald GA, Violi F: Platelet activation by superoxide anion and hydroxyl radicals intrinsically generated by platelets that had undergone anoxia and then reoxygenated. *Circulation* 1997, 95(4):885-91
323. Del Principe D, Menichelli A, De Matteis ML, Di Corpo ML, Di Ginlo S, Finanzi A: Production of oxygen free radicals by platelets. *A FEBS* 1988, 18:142-147



324. Miller CC, Hale P, Pentland AP: Ultraviolet B injury increase prostaglandin synthesis through a tyrosine kinase-depended pathway. *J Biol Chem* 1994, 269: 3523-3529
325. Pandey NR, Kaur G, Chandra M, Sanwal GG, Misra MK: Enzymatic oxidant and antioxidants of human blood platelets in unstable angina and myocardial infarction. *Int J Cardiol* 2000, 76(1):33-8
326. Yamagishi SI, Edelstein D, Du XL, Brownlee M: Hyperglycemia potentiates collagen-induced platelet activation through mitochondrial superoxide overproduction. *Diabetes* 2001, 50(6):1491-4
327. Tiano L, Kantar A, Falcioni G, Littarru GP, Cherubini V, Fiorini R: Oxidative response and membrane modification of diabetic platelets challenged with PAF. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 2000, 62(4):351-366
328. Hornberger W, Patscheke H: Primary stimuli of eicosanoid release inhibit arachidonyl-CoA synthetase and lysophospholipid acyl transferase. *Eur J Biochem* 1990, 187:175-181
329. Mirabelli F, Salis A, Vairetti M, Bellomo G, Thor H, Orenius S: Cytoskeletal alterations in human platelets exposed to oxidative stress are mediated by oxidative and CA2-depended mechanism. *Arch Biochem Biophys* 1989, 270:478-488
330. Clark E, Brugge JS: Tyrosine phosphorylation in platelets. Potential role in intracellular signal transduction. *Trends Cardiovasc Med* 1993, 3:218-227
331. Gold A, Brugge JS, Shattil S: Role of platelet membrane glycoprotein Iib/IIIa in agonist-induced tyrosine phosphorylation of platelet protein. *J Cell Biol* 1990, 111:3117-3127
332. Hecht D, Zick Y: Selective inhibition of protein tyrosine phosphatase activities by H₂O₂ and vanadate in vitro. *Biochem Biophys Res Comm* 1992, 188:773-779
333. Bednarska K, Wachowicz B, Buczynski A: UV-B-induced generation of free radicals in blood platelets. *J Photochem Photobiol B* 2000, 55(2-3):109-12
334. Clark S, Dunlop M: Modulation of phospholipase A2 activity by epidermal growth factor (EGF) in CHO cells transfected with human EGF receptor. *Biochem J* 1991, 274:715-721
335. Lin LL, Lin AY, Knopf JL: Cytosolic phospholipase A2 is coupled to hormonally regulated release of arachidonic acid. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992, 89:6147-6151
336. Lin LL, Wartman M, Lin AY, Knopf JL, Seth A, Davis RJ: cPLA2 is phosphorylated and activated by MAP kinase. *Cell* 1993, 72:269-278
337. Chao TS, Byron KL, Lee KM, Villereal M, Rosner MR: Activation of MAP kinases by calcium depended and calcium independed pathways. Stimulation by thapsigranin and epidermal growth factor. *J Biol Chem* 1992, 267:19876-19883
338. Fialkow L, Chan CK, Grinstein S, Downey GP: Regulation of tyrosine phosphorylation in neutrophils by the NADPH-oxidase. Role of reactive oxygen intermediates. *J Biol Chem* 1993, 268:17131-17137
339. Taylor L, Menconi MJ, Polgar P: The participation of hydroperoxides and oxygen radicals in the control of prostaglandin synthesis. *J Biol Chem* 1983, 258:6855-6857.
340. Pratico D, Iuliano L, Ghiselli A, Alessandri C, Violi F: Hydrogen peroxide as trigger of platelet aggregation. *Haemostasis* 1991, 21:169-174
341. Halliwell B, Grootveld M, Gutteridge JM: Methods for the measurement of hydroxyl radicals in biochemical systems: Deoxyribose degradation and aromatic hydroxylation. *Methods Biochem Anal* 1988, 33:59-90



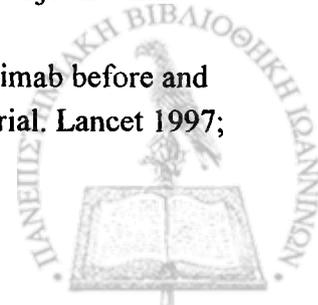
342. Iuliano L, Violi F, Ghiselli A, Alessandri C, Balsano F: Dipyridamole inhibits lipid peroxidation and scavenges oxygen free radicals. *Lipids* 1989, 24:430-433.
343. Iuliano L, Pratico D, Ghiselli A, Bonavita MS, Violi F: Reaction of dipyridamole with the hydroxyl radical. *Lipids* 1992, 27:349-353
344. Iuliano L, Pedersen JZ, Rotilio G, Ferro D, Violi F: A potent chain breaking antioxidant activity of the cardiovascular drug dipyridamole. *Free Rad Biol Med* 1995, 18:239-247
345. Violi F, Pratico D, Ghiselli A, Alessandri C, Iuliano L, Cordova C, Balsano F: Inhibition of cyclooxygenase-independent platelet aggregation by low vitamin E concentration. *Atherosclerosis* 1990, 82:247-252
346. Violi F, Alessandri C, Pratico D, Guzzo A, Ghiselli A, Balsano F: Inhibition of cyclooxygenase-independent platelet aggregation by sodium-salicylate. *Thromb Res* 1989, 54:583-593
347. Violi F, Pratico D, Iuliano L, Balsano F: Dipyridamole potentiates the inhibition of platelet aggregation by aspirin (in human platelet rich plasma and whole blood). *J Lipid Mediators* 1991, 4:61-68
348. Stamler JS, Singel DJ, Loscalzo J: Biochemistry of nitric oxide and its redox-active forms. *Science* 1992, 258:1898-1902
349. Muruganandam A, Mutus B: Isolation of nitric oxide synthase from human platelets. *Biochim Biophys Acta* 1994, 1200:1-6
350. Moncada S, Palmer RMJ, Higgs EA: Nitric oxide: Physiology, pathophysiology and pharmacology. *Pharmacol Rev* 1991, 43:109-142
351. Ribeiro JMC, Hazzard JMH, Nussenzweig RH, Champagne DE, Walker FA: Reversible binding of nitric oxide by a salivary heme protein from a blood sucking insect. *Science* 1993, 260:539-541
352. Blough NV, Zafiriou OC: Reaction of superoxide with nitric oxide to form peroxynitrite in alkaline aqueous solution. *Inorg Chem* 1985, 24:3502-3505
353. Beckman JS, Beckman TW, Chen J, Marshall PA, Freeman BA: Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: Implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990, 87:1620-1624
354. Fugimoto Y, Tagano S, Ogawa K, Sakuma S, Fugita T. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 1998, 59(2):95-100
355. Freedman JE, Li L, Santer R, Keaney JF JR: alpha-Tocopherol and protein kinase C inhibition enhance platelet-derived nitric oxide release. *FASEB J* 2000, 14(15):2377-9
356. Karpen CW, Merola AJ, Trewyn RW, Cornwell DG, Panganamala RV: Modulation of platelet thromboxane A2 and arterial prostacyclin by dietary vitamin E. *Prostaglandins* 1981, 22:651-661
357. Hamelin S StJ, Chan AC: Modulation of platelet thromboxane and malonaldehyde by dietary vitamin E and linoleate. *Lipids* 1983, 18:267-269
358. Pritchard KA, Greco NJ, Panganamala RV: Effect of dietary vitamin E on the production of platelet 12-hydroxyeicosatetraenoic acid (12-HETE). *Thromb Haemost* 1986, 55:6-7
359. Douglas CE, Chan AC, Choy PC: Vitamin E inhibits platelet phospholipase A2. *Biochim Biophys Acta* 1986, 876:639-645
360. Cordova C, Musca A, Violi F, Perrone A, Alessandri C: Influence of ascorbic acid on platelet aggregation in vitro and in vivo. *Atherosclerosis* 1982, 41:15-19



361. Agradi E, Petroni A, Socini A, Galli C: In vitro effects of antioxidants and vitamin E on arachidonic acid metabolism and thromboxane formation in human platelet aggregation. *Prostaglandins* 1981, 22:255-266
362. Alexandre A, Doni M, Padoin E, Deana R: Inhibition by antioxidants of agonist evoked cytosolic Ca⁺⁺ increase, ATP secretion and aggregation of aspirinated human platelets. *Biochem Biophys Res Comm* 1986, 139:509-514
363. Wilkinson IB, Megson IL, MacCallum H, Sogo H, Cockcroft JR, Webb DJ: Oral vitamin C reduces arterial stiffness and platelet aggregation in humans. *J Cardiovasc Pharmacol* 1999, 34(5):690-3
364. Olas B, Waschowicz B, Krajewski T, Buczy'nski A: Vitamin C suppresses the cisplatin toxicity on blood platelets. *Anticancer Drugs* 2000, 11(6):487-493
365. S. Karkabounas, T. Daskalou, A. Avdikos, M. Chatzidimitriou, S. Tsabalas, P. Veltsistas, J. Binolis, N. Xiropotamos, R. Liasko, A. Evangelou and P. Makris: Strong indications of participation of free radicals in the aggregation of platelets through thrombine and epinephrine. The meeting of the Society for Free Radical Research Europe, 22-24 June 2001, Roma, Italy
366. Olas B, Zbikowska HM, Wachowicz B, Krajewski T, Buczy'nski A, Magnuszewska A: Inhibitory effect of resveratrol on free radical generation in blood platelets. *Acta Biochim Pol* 1999, 46(4):961-966
367. Komiya T, Higurashi K, Iizuka K, Mizuno Y: A novel free radical scavenger, nicaraven, inhibits human platelet aggregation in vitro. *Clin Neuropharmacol* 1999, 22(1):11-4
368. Porta C, Maiolo A, Tua A, Grignani G: Amifostine, a reactive oxygen species scavenger with radiation- and chemo-protective properties, inhibits in vitro platelet activation induced by ADP, collagen or PAF. *Haematologica* 2000, 85(8):820-5
369. Yoshikawa T, Naito Y, Kondo M: Ginkgo biloba leaf extract: review of biological actions and clinical applications. *Antioxid Redox Signal* 1999 Winter, 1(4):469-80
370. Harpey C, Clauser P, Labrid C, Freyra JL, Poirier JP: Trimetazidine, a cellular anti-ischemic agent. *Cardiovasc Drug Rev* 1989, 6:292-312
371. Shirahase H, Suzuki Y, Osumi Y, Kakeya N, Kurahashi K: Inhibitory effects of trimetazidine dihydrochloride on aggregation, serotonin release and malondialdehyde production in rabbit platelets. *Jpn J Pharmacol* 1988, 47:2934
372. Siess W: Molecular mechanism of platelet activation. *Physiol Rev* 1989, 69:58-141
373. Astarie-Dequeker C, Joulin Y, Devynck MA: Inhibitory effect of trimetazidine on thrombin-induced aggregation and calcium entry into human platelets. *J Cardiovasc Pharmacol* 1994, 23:401-407
374. Astarie-Dequeker C, Joulin Y, Devynck MA: Inhibitory effect of trimetazidine on thrombin-induced aggregation and calcium entry into human platelets. *J Cardiovasc Pharmacol* 1994, 23:401-407
375. *Ιατρική φυσιολογία* Guyton, 1992
376. Harper's review of physiological chemistry, 15th edition
377. Ganong WF: The adrenal medulla & adrenal cortex, in: Ganong WF, ed. *Review of Medical Physiology*. Stamford: Appleton and Lange, 1997: 334-358



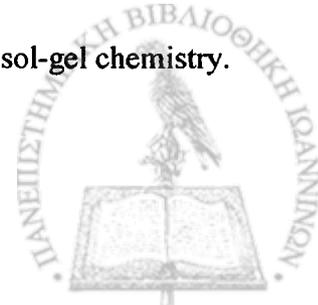
378. Singh S, Johnson PI, Javed A et al: Monoamine – and histamine – synthesizing enzymes and neurotransmitters within neurons of adult human cardiac ganglia. *Circulation* 1999; 99:411-419
379. Dawes M, Chowieńczyk PJ, Ritter JM: Effects of inhibition of the Larginine/ nitric oxide pathway on vasodilation caused by β -adrenergic agonists in human forearm. *Circulation* 1997; 95:2293-2297
380. Chowieńczyk PJ, Watts GF, Cockcroft JR et al: Impaired endothelium-dependent vasodilation of forearm resistance vessels in hypercholes-terolemia. *Lancet* 1992; 340: 1430-1432
381. Ungerer M, Bohm M, Elce JS et al: Altered expression of betaadrenergic receptor kinase and beta-adrenergic receptors in the failing human heart. *Circulation* 1993; 87: 454-463
382. Bristow MR, Ginsburg R, Minobe W: Decreased catecholamine sensitivity and beta-adrenergic-receptor density in failing human hearts. *N Engl J Med* 1982; 307: 206-211
383. Φυσιολογία Guyton, 1997
384. Kimura Y, Okuda H: *Biochem Biophys Res Commun*, 202(2):1069-75 1994 Jul 29
385. Yun-Choi HS, Park KM, Pyo MK: *Thromb Res* 2000 Dec 15; 100(6):511-518
386. Mustonen P, Savola J, Lassila R: *Thromb Res* 2000 Aug 1; 99(3): 231-237
387. Queen LR, Xu B, Horinouchi K, Fisher I, Ferro A: *Circ Res* 2000 Jul 7; 87(1):39-44
388. Tofler GH, Brezinski DA, Schafer AI et al: Concurrent morning increase in platelet aggregability and the risk of myocardial infarction and sudden death. *N. Engl Med* 1987; 316: 1514-1518
389. Meade TW, Mellows S, Brozovic M et al: Haemostatic function and inschemic heart disease: principal results of the Northwick Park Heart Study. *Lancet* 1986; 2: 533-537
390. Hung J, Lam JYT, Lacoste L et al : Cigarette smoking acutely increases platelet thrombus formation in patients with coronary artery disease taking aspirin. *Circulation*, 1995; 92: 2432-2436
391. Ichiki K, Ikeda H, Haramaki N et al: Long-term smoking impairs platelet-derived nitric oxide release. *Circulation* 1996; 94:3109-3114
392. Fusegawa Y, Handa S: *Thromb Res*, 97(5): 287-95 2000 Mar 1
393. Goto S, Ikeda Y, Murata M et al: Epinephrine augments von Willbrand factor – dependent shcar – induced platelet aggregation. *Circulation* 1992; 86: 1859-1863
394. Keularts IM, Van Gorp RM, Ferjge MA, Vuist WM, Heemskerk JW: *J Biol Chem* 2000 Jan 21;275(3):1763-72
395. Kjeldsen SE, Weder AB, Egan B et al: Effect of circulating epinephrine on platelet function and hematocrit. *Hypertension*. 1995; 25: 1096-1105
396. Nosal' R, Jancinova V, Danihelona E: *Thromb Res* 2000 Jun 1;98(5):411-421
397. Editorial, Ticlopidine; *Lancet* 1991; 337:459
398. Cattanco M, Akkawat B, Leechi A et al: Ticlopidine selectively inhibits human platelet responses to adenosine diphosphate. *Thromb Hacmost* 1991; 66:694
399. Coller BS, Scudder LE, Berger HJ et al: Inhibition of human platelet function in vivo with a monoclonal antibody. With observation on the newly dead as experimental subjects. *Ann Intern Med* 1988; 109:635
400. The CAPTURE Investigators. Randomized placebo-controlled trial of abciximab before and during coronary intervention in refractory unstable angina: the CAPTURE trial. *Lancet* 1997; 349: 1429-1435



401. The EPIC Investigators. Use of a monoclonal antibody directed against the platelet glycoprotein IIb/IIIa receptor in high-risk coronary angioplasty. *N. Engl J Med* 1994; 330:956-961
402. The EPILOG Investigators. Platelet glycoprotein IIb/IIIa receptor blockade and low-dose heparin during percutaneous coronary revascularization. *N. Engl J Med* 1997; 336: 1689-1696
403. The PURSUIT investigators. Inhibition of platelet glycoprotein IIb/IIIa with eptifibatid in patients with acute coronary syndromes. *N. Engl J Med* 1998; 339:436-443
404. Theroux P, Fuster V: Acute coronary syndromes: unstable angina and nonQ-wave myocardial infarction. *Circulation* 1998; 97:1195-1206
405. The platelet receptor inhibition in ischemic syndrome management (PRISM) study investigators. A comparison of aspirin plus tirofiban with aspirin plus heparin for unstable angina. *N Engl J Med* 1998; 338:1498-1505
406. The platelet receptor inhibition in ischemic syndromes management in patients limited by unstable signs and symptoms (PRISM-PLUS) study investigators. Inhibition of the platelet glycoprotein IIb/IIIa receptor with tirofiban in unstable angina and non-Q-wave myocardial infarction. *N Engl J Med* 1998; 338:1488-1497
407. Frederick LG, Suleymanov OD, Szalony JA et al: Protective effect of oral xemilofiban in arterial thrombosis in dogs: increased activity in combination with aspirin. *Circulation*, 1998; 98:813-820
408. Cannon RO: Does coronary endothelial dysfunction cause myocardial ischemia in the absence of obstructive coronary artery disease? *Circulation* 1997; 96: 3251-3254
409. Keriakes DJ, Kleiman NS, Ferguson JJ et al: for the Oral Glycoprotein IIb/IIIas Receptor Blockade to Inhibit Thrombosis (ORBIT) Trial Investigators. *Circulation* 1998; 98:1268-1278
410. Aberti A, Bolognini L, Carratelli M, Della Bona MA, Macciantelli D: Assessing oxidative stress with the D-Roms test. Some mechanistic consideration. *SFRR Summer meeting 1997*: 82-3
411. M.R Cesarone et al: A simple test to monitor oxidative stress. *International Angiology*, Vol. 18, No 2, June 1999
412. Belcaro G, Carratelli M, Cesarone MR, Cornelli U, Incandela L, Nicolaides A: Oxygen free radicals: a method, a product, an application. *SFRR Summer Meeting 1997*: 183-4
413. Jacob RA: The integrated antioxidant system *Nutr Res* 1995; 15:755-766
414. Gavella M, Lipovac V, Vucic M & Rocic B: Superoxide anion scavenging capacity of human seminal plasma. *International Journal of Andrology*, 1996; 19: 82-90
415. Reiter RJ: Oxidative processes and antioxidative defense mechanisms in the ageing brain. *FASEB J*, 1995; 9:526-533
416. Patrono C, Clabelloni G, Pugliese, et al: *Adv. Prosia Thromb Res*, 6:187-191
417. Bergstrom S, Danielsson H, Samuelsson B: *Biochit Biophys Acte*, 1964 90:207-210
418. Bergstrom S, Danielsson H, Klenberg D, Samuelsson B: *J Biol Chem*, 1984, 239: 4006-4008
419. Hamberg M, Svensson J, Samuelsson B: *Froc Natl Acad Sci USA*, 1975, 72:2994-2998
420. Bunting S, Gryglewski R, Moncada S et al: *Prostaglandins* 1976, 12: 897-913
421. Moncada S, Gryglewski R, Bunting S et al: *Nature*, 1976, 263:663-665



422. Benedestic C, McDonald-Gibson RC, Nigam S, Staler TF: Prostaglandins and Pelatal Substances. A Practical Approach, Oxford: IRL Press Ltd, 1987
423. Palrono C, Peskar BA: Radioimmuroassay in Basic and Clinical Pharmacology. Handbook of Experimental Pharmacology, Vol.82 Berlin: Springer Verlag, 1987
424. Powell WS et al: Rapid extraction of oxygenated metabolites of arachidonic acid from biological samples using octadecylsilyl silica, Prostaglandins, 1980 Nov;20(5):947-957
425. Lefkovits J et al: Platelet glycoprotein Iib/IIIa receptors in cardiovascular medicine. New Engl J Med 1995, 332:1553-1559
426. Hezard N et al: Free and total platelet glycoprotein Iib/IIIa measurement in whole blood by quantitative flow cytometry during and after infusion of c7E3 Fab in patients undergoing PTCA. Thromb Haemost 1999, 81:869-873
427. Quinn M et al: Quantifying GpIIb/IIIa receptor binding using 2 monoclonal antibodies. Circulation 1999, 99:2231-2238
428. Hezard N et al: Use of the PFA-100 apparatus to asses platelet function in patients undergoing PTCA during and after infusion of c7E3 Fab in the presence of other antiplatelet agents. Thromb Haemost 2000, 83:540-544
429. Nguyen P et al: Unexpected flow cytometric results with two small GpIIb/IIIa blockers: Eptifibatide and Tirofiban. Thromb Haemost 2001, 85:561-562
430. Birk AV, Leno E, Robertson HD, Bolotina VM, Szeto HH: Interaction between ATP and catecholamines in stimulation of platelet aggregation. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2003 Feb;284(2):H619-25. Epub 2002 Oct 10
431. Nair S, Kulkarni S, Camoens HM, GhoshK, Mohanty D: Changes in platelet glycoprotein receptors after smoking--a flow cytometric study. Platelets. 2001 Feb;12(1):20-6
432. Lam NY, Rainer TH, Ng MH, Leung Y, Cocks RA: Effect of stress hormones on the expression of fibrinogen-binding receptors in platelets. Resuscitation. 2002 Dec;55(3):277-83
433. Yngen M, Li N, Hjemdahl P, Wallen NH: Insulin enhances platelet activation in vitro. Thromb Res. 2001 Oct 15;104(2):85-91
434. Raghavan SA, Sharma P, Dikshit M: Role of ascorbic acid in the modulation of inhibition of platelet aggregation by polymorphonuclear leukocytes. Thromb Res. 2003 May 1;110(2-3):117-26
435. Komori K: Mechanisms and prevention of intimal thickening of the autogenous vein grafts—possible involvement of nitric oxide--Nagoya J Med Sci. 2003 May;66(1-2):9-19
436. Klinge JM, Topf HG, Trusen B, Rauh M, Rascher W, Dotsch J: Endothelial cells play an important role in the antiaggregatory effect of nitric oxide. Crit Care Med. 2003 Jul;31(7):2010-4
437. Olas B, Wachowicz B, Stochmal A, Oleszek W: Inhibition of oxidative stress in blood platelets by different phenolics from Yucca schidigera Roezl. bark. Nutrition. 2003 Jul-Aug;19(7-8):633-40
438. Gries A, Herr A, Kirsch S, Gunther C, Weber S, Szabo G, Holzmann A, Bottiger BW, Martin E: Inhaled nitric oxide inhibits platelet-leukocyte interactions in patients with acute respiratory distress syndrome. Crit Care Med. 2003 Jun;31(6):1697-704
439. Robbins ME, Schoenfisch MH: Surface-localized release of nitric oxide via sol-gel chemistry. J Am Chem Soc. 2003 May 21;125(20):6068-9



440. Beghetti M, Sparling C, Cox PN, Stephens D, Adatia I: Inhaled NO inhibits platelet aggregation and elevates plasma but not intraplatelet cGMP in healthy human volunteers. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2003 Aug;285(2):H637-42. Epub 2003 May 15
441. Gottstein N, Ewins BA, Eccleston C, Hubbard GP, Kavanagh IC, Minihane AM, Weinberg PD, Rimbach G: Effect of genistein and daidzein on platelet aggregation and monocyte and endothelial function. *Br J Nutr*. 2003 May;89(5):607-16
442. Hsiao G, Shen MY, Lin KH, Chou CY, Tzu NH, Lin CH, Chou DS, Chen TF, Sheu JR: Inhibitory activity of kinetin on free radical formation of activated platelets in vitro and on thrombus formation in vivo. *Eur J Pharmacol*. 2003 Apr 4;465(3):281-7
443. Anderson TJ: Nitric oxide, atherosclerosis and the clinical relevance of endothelial dysfunction. *Heart Fail Rev*. 2003 Jan;8(1):71-86
444. Alonso D, Radomski MW: Nitric oxide, platelet function, myocardial infarction and reperfusion therapies. *Heart Fail Rev*. 2003 Jan;8(1):47-54
445. Trovati M, Anfossi G: Mechanisms involved in platelet hyperactivation and platelet-endothelium interrelationships in diabetes mellitus. *Curr Diab Rep*. 2002 Aug;2(4):316-22
446. Aktas B, Utz A, Hoenig-Liedl P, Walter U, Geiger J: Dipyridamole enhances NO/cGMP-mediated vasodilator-stimulated phosphoprotein phosphorylation and signaling in human platelets: in vitro and in vivo/ex vivo studies. *Stroke*. 2003 Mar;34(3):764-9. Epub 2003 Jan 30
447. Martin S, Andriantsitohaina R: Cellular mechanism of vasculo-protection induced by polyphenols on the endothelium. *Ann Cardiol Angeiol (Paris)*. 2002 Dec;51(6):304-15
448. Mullershausen F, Friebe A, Feil R, Thompson WJ, Hofmann F, Koesling D: Direct activation of PDE5 by cGMP: long-term effects within NO/cGMP signaling. *J Cell Biol*. 2003 Mar 3;160(5):719-27. Epub 2003 Feb 25
449. Liu M, Wallmon A, Olsson-Mortlock C, Wallin R, Saldeen T: Mixed tocopherols inhibit platelet aggregation in humans: potential mechanisms. *Am J Clin Nutr*. 2003 Mar;77(3):700-6
450. Cominacini L, Fratta Pasini A, Garbin U, Pastorino A, Rigoni A, Nava C, Davoli A, Lo Cascio V, Sawamura T: The platelet-endothelium interaction mediated by lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1 reduces the intracellular concentration of nitric oxide in endothelial cells. *J Am Coll Cardiol*. 2003 Feb 5;41(3):499-507
451. Suttar J, Masova L, Scheiner T, Sorelova V, Dyr JE: Role of free radicals in blood platelet activation. *Cas Lek Cesk*. 2002 Sep 22;141 Suppl:47-9
452. Borgdorff P, Fekkes D, Tangelder GJ: Hypotension caused by extracorporeal circulation: serotonin from pump-activated platelets triggers nitric oxide release. *Circulation*. 2002 Nov 12;106(20):2588-93
453. Aslan M, Freeman BA: Oxidases and oxygenases in regulation of vascular nitric oxide signaling and inflammatory responses. *Immunol Res*. 2002;26(1-3):107-18
454. Cerwinka WH, Cooper D, Krieglstein CF, Ross CR, McCord JM, Granger DN: Superoxide mediates endotoxin-induced platelet-endothelial cell adhesion in intestinal venules. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2003 Feb;284(2):H535-41. Epub 2002 Oct 10
455. Pignatelli P, Lenti L, Sanguigni V, Frati G, Simeoni I, Gazzaniga PP, Pulcinelli FM, Violi F: Carnitine inhibits arachidonic acid turnover, platelet function, and oxidative stress. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2003 Jan;284(1):H41-8. Epub 2002 Sep 05



456. Sawada M, Kishi Y, Numano F, Isobe M: Smokers lack morning increase in platelet sensitivity to nitric oxide. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2002 Oct;40(4):571-6
457. Seligmann C, Simsek Y, Schimmer M, Leitsch T, Bock A, Schultheiss HP: Human thrombocytes are able to induce a myocardial dysfunction in the ischemic and reperfused guinea pig heart mediated by free radicals-role of the GPIIb/IIIa-blocker tirofiban. *Life Sci.* 2002 Sep 27;71(19):2319-29
458. De La Cruz JP, Moreno A, Guerrero A, Ortega G, Gonzalez-Correa JA, Sanchez de la Cuesta F: Nitric oxide-cGMP and prostacyclin-cAMP pathways in patients with type II diabetes and different types of retinopathy. *Pathophysiol Haemost Thromb.* 2002 Jan- Feb;32(1):25-32
459. Koga T, Az-ma T, Yuge O: Prostaglandin E1 at clinically relevant concentrations inhibits aggregation of platelets under synergic interaction with endothelial cells. *Acta Anaesthesiol Scand.* 2002 Sep;46(8):987-93
460. Pistono M, Bergerone S, Carrieri L, Paglia I, Stefano D, Capizzi A, Ferri M, Pescarmona G, Bosia A, Trevi G: Platelet cyclic GMP levels in unstable angina and myocardial infarction. *Platelets.* 2002 Aug-Sep;13(5-6):307-1
461. Olas B, Wachowicz B: Resveratrol and vitamin C as antioxidants in blood platelets. *Thromb Res.* 2002 Apr 15;106(2):143-8
462. Wachowicz B, Olas B, Zbikowska HM, Buczynski A: Generation of reactive oxygen species in blood platelets. *Platelets.* 2002 May;13(3):175-82
463. Krotz F, Sohn HY, Gloe T, Zahler S, Riexinger T, Schiele TM, Becker BF, Theisen K, Klaus V, Pohl U: NAD(P)H oxidase-dependent platelet superoxide anion release increases platelet recruitment. *Blood.* 2002 Aug 1;100(3):917-24
464. Folts JD: Potential health benefits from the flavonoids in grape products on vascular disease. *Adv Exp Med Biol.* 2002;505:95-111
465. Sanguigni V, Pignatelli P, Caccese D, Pulcinelli FM, Lenti L, Magnaterra R, Martini F, Lauro R, Violi F: Increased superoxide anion production by platelets in hypercholesterolemic patients. *Thromb Haemost.* 2002 May;87(5):796-801
466. Jeng JH, Chen SY, Liao CH, Tung YY, Lin BR, Hahn LJ, Chang MC: Modulation of platelet aggregation by areca nut and betel leaf ingredients: roles of reactive oxygen species and cyclooxygenase. *Free Radic Biol Med.* 2002 May 1;32(9):860-71
467. Lenaz G, Bovina C, D'Aurelio M, Fato R, Formiggini G, Genova ML, Giuliano G, Pich MM, Paolucci U, Castelli GP, Ventura B: Role of mitochondria in oxidative stress and aging. *Ann N Y Acad Sci.* 2002 Apr;959:199-213
468. Anfossi G, Russo I, Massucco P, Mattiello L, Trovati M: Catecholamines, via beta adrenoceptors, increase intracellular concentrations of 3',5'-cyclic guanosine monophosphate (cGMP) through nitric oxide in human platelets. *Thromb Haemost.* 2002 Mar;87(3):539-40
469. Fujita T: Formation and removal of reactive oxygen species, lipid peroxides and free radicals, and their biological effects. *Yakugaku Zasshi.* 2002 Mar;122(3):203-18
470. Zabel U, Kleinschnitz C, Oh P, Nedvetsky P, Smolenski A, Muller H, Kronich P, Kugler P, Walter U, Schnitzer JE, Schmidt HH: Calcium-dependent membrane sensitizes soluble guanylyl cyclase to nitric oxide. *Nat Cell Biol.* 2002 Apr;4(4):307-11
471. Kasuya N, Kishi Y, Sakita SY, Numano F, Isobe M: Acute vigorous exercise primes enhanced NO release in human platelets. *Atherosclerosis.* 2002 Mar;161(1):225-32



472. Anfossi G, Russo I, Massucco P, Mattiello L, Cavalot F, Balbo A, Trovati M: Adenosine increases human platelet levels of cGMP through nitric oxide: possible role in its antiaggregating effect. *Thromb Res.* 2002 Jan 1;105(1):71-8
473. Chung MI, Weng JR, Wang JP, Teng CM, Lin CN: Antiplatelet and anti-inflammatory constituents and new oxygenated xanthenes from *Hypericum geminiflorum*. *Planta Med.* 2002 Jan;68(1):25-9
474. Li J, Zhang Y, Yao X, Zhang B, Du J, Tang C: Effect of homocysteine on the L-arginine/nitric oxide synthase/nitric oxide pathway in human platelets. *Heart Vessels.* 2002 Jan;16(2):46-50
475. Marcourakis T, Gorenstein C, Brandao de Almeida Prado E, Ramos RT, Glezer I, Bernardes CS, Kawamoto EM, Scavone C: Panic disorder patients have reduced cyclic AMP in platelets. *J Psychiatr Res.* 2002 Mar-Apr;36(2):105-10
476. Serebruany VL, Malinin AI, Sane DC: Rapid platelet inhibition after a single capsule of Aggrenox: challenging a conventional full-dose aspirin antiplatelet advantage? *Am J Hematol.* 2003 Apr;72(4):280-1
477. Stafford MJ, Watson SP, Pears CJ: PKD: a new protein kinase C-dependent pathway in platelets. *Blood.* 2003 Feb 15;101(4):1392-9. Epub 2002 Oct 10
478. Michibayashi T: Platelet aggregating response to platelet activating factor participates in activation of the 12-lipoxygenase pathway in platelets from rabbits. *Int Angiol.* 2002 Sep;21(3):260-7
479. Nilsson UK, Svensson SP, Grenegard M: Synergistic activation of human platelets by lysophosphatidic acid and adrenaline. *Haematologica.* 2002 Jul;87(7):730-9; discussion 739
480. Vaitkevicius H, Turner I, Spalding A, Lockette W: Chloride increases adrenergic receptor-mediated platelet and vascular responses. *Am J Hypertens.* 2002 Jun;15(6):492-8
481. Lova P, Paganini S, Sinigaglia F, Balduini C, Torti M: A Gi-dependent pathway is required for activation of the small GTPase Rap1B in human platelets. *J Biol Chem.* 2002 Apr 5;277(14):12009-15. Epub 2002 Jan 28
482. Serebruany VL, Malinin AI, O'connor CM, Gurbel PA: Effects of roxifiban on platelet aggregation and major receptor expression in patients with coronary artery disease for the Roxifiban Oral Compound Kinetics Evaluation Trial-I (ROCKET-I Platelet Substudy). *Am Heart J.* 2003 Jul;146(1):91-8
483. Ching S, Thoma A, Monkman S, Kelton JG: Inhibition of microsurgical thrombosis by the platelet glycoprotein IIb/IIIa antagonist SR121566A. *Plast Reconstr Surg.* 2003 Jul;112(1):177-85
484. Bright JM, Dowers K, Powers BE: Effects of the glycoprotein IIb/IIIa antagonist abciximab on thrombus formation and platelet function in cats with arterial injury. *Vet Ther.* 2003 Spring;4(1):35-46
485. Naimushin YA, Mazurov AV: Role of glycoprotein IIb-IIIa (alpha IIb beta 3-integrin) in stimulation of secretion from platelet granules. *Biochemistry (Mosc).* 2003 Feb;68(2):209-16
486. Goldschmidt-Clermont PJ, Kandzari DE, Sketch MH Jr, Phillips HR: Inflammation, platelets and glycoprotein IIb/IIIa inhibitors. *J Invasive Cardiol.* 2002 Dec;14 Suppl E:18E-25E; quiz 26E
487. Nannizzi-Alaimo L, Alves VL, Phillips DR: Inhibitory effects of glycoprotein IIb/IIIa antagonists and aspirin on the release of soluble CD40 ligand during platelet stimulation. *Circulation.* 2003 Mar 4;107(8):1123-8



488. Furman MI, Kereiakes DJ, Krueger LA, Mueller MN, Broderick TM, Schneider JF, Howard WL, Fox ML, Barnard MR, Frelinger AL 3rd, Michelson AD: Quantification of abciximab-induced platelet inhibition is assay dependent: a comparative study in patients undergoing percutaneous coronary intervention. *Am Heart J.* 2003 Feb;145(2):e6
489. Gum PA, Lincoff AM: Abciximab and atherosclerotic heart disease: use in percutaneous coronary intervention, acute coronary syndromes and acute myocardial infarction. *Int J Clin Pract.* 2003 Jan-Feb;57(1):43-8
490. Leclerc JR: Platelet glycoprotein IIb/IIIa antagonists: lessons learned from clinical trials and future directions. *Crit Care Med.* 2002 May;30(5 Suppl):S332-40
491. Kruk I: Oxidation of catecholamines by enzymatically generated free radicals. *Z. Phys. Chemie Leipzig* 269 (1988) 1- S. 161-168
492. Bounias M, Kol Adny J, Kruk I, Michalska T: Hydroxyl radical generation during oxidation of catecholamines and dopa. *Toxicological and Environmental Chemistry*, Vol. 60, pp. 163-169, 1997
493. Bindoli A, Rigobello MP, Deeble DJ: Biochemical and toxicological properties of the oxidation products of catecholamines. *Free Radical Biology & Medicine.* Vol. 13, pp. 391-405, 1992
494. Ευαγγέλου Α, Καρκαμπούνας Σ, Σόφης Γ, Χαραλαμπίδης Κ, Στεφάνου Π, Λιβέρης Κ: Ελληνική Ιατρική. 15: 392, 1992
495. Κώτσης Ν: Η μελέτη της αναστολής της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων μέσω τριμεταζιδίνης και άλλων μεθοξυφαινολικών παραγώγων, ως ένδειξη συμμετοχής ελευθέρων ριζών στην αιμοπεταλιακή συσσώρευση. Διδακτορική διατριβή, Ιωάννινα 1996
496. Rittenhouse-Simmons S, Deykin D: Platelets in biology and pathology, vol 2 (Gordon JL ed), p. 349, Elsevier/North Holland, Amsterdam, 1981
497. Astarie-Dequeker C, Iouzalet L, David-Duflho M, Devynck MA: In vitro inhibition by endothelins of thrombin induced aggregation and Ca^{2+} mobilization in human platelets. *Br J Pharmacol* 1992;106:966-71
498. Astarie C, Levenson J, Simon A, Meyer P, Devynck MA: Platelet cytosolic proton and free calcium concentration in essential hypertension. *J Hypertens* 1989;7:485-91
499. Rink TJ, Smith SW, Tsien RY: Cytoplasmic free Ca^{2+} in human platelets: Ca^{2+} threshold and Ca-independent activation for shape-change and secretion. *FEBS Lett* 1982;148:21-6
500. Fisher GJ, Bakshian S, Baldassare JJ: Activation of human platelets by ADP causes a rapid rise in cytosolic free calcium without hydrolysis of phosphatidylinositol-4,5- biphosphate. *Biochem Biophys Res Commun* 1985;129:958-64
501. Evangelou A, Malamas M, Vezyraki P, Karkabounas S: Is epinephrine-induced platelet aggregation autoregulated by its metabolic degradation products *in vivo*? *In vivo* 1998;12(3):321-5



ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

Πίνακες αποτελεσμάτων



Συγκέντρωση (M) →							
α/α ↓	10^{-6}	10^{-5}	10^{-4}	$0,5 \times 10^{-3}$	10^{-3}	2×10^{-3}	3×10^{-3}
1	0	2	15	38	57	72	96
2		3	13	29	61	80	95
3		1	14	33	63	83	95
4		3	16	42	49	78	96
5		2	14	39	51	82	97
6		1	17	42	63	73	94
7		3	15	41	54	76	96
8		1	16	40	65	84	95
9		3	14	32	56	79	98
10		1	16	28	53	76	96
11		1	16	40	65	83	97
12		2	17	37	60	73	98
13		3	15	28	51	77	97
14		2	14	34	58	74	96
15		3	13	41	65	72	94
16		1	14	35	52	83	98
17		2	16	30	57	75	95
18		1	15	35	56	81	97
19		3	14	29	64	79	96
20		2	16	31	51	84	97
21		1	14	42	58	75	98
22		1	14	28	63	78	95
23		3	16	30	50	80	96
24		1	14	35	49	72	94
25		3	15	37	49	77	95
26		3	12	35	50	84	94
27		2	18	36	62	81	97
28		2	17	33	64	73	96

Πίνακας 1: Αναστολή % της αιμοπεταλιακής συσσώρευσης με διαδοχικά αυξανόμενες συγκεντρώσεις μετανεφρίνης επί 28 μετρήσεων για κάθε συγκέντρωση και με αιμοπεταλιακό διεγέρτη την επινεφρίνη.



Συγκέντρωση (M) →								
α/α ↓	10^{-6}	10^{-5}	10^{-4}	2×10^{-4}	$0,5 \times 10^{-3}$	10^{-3}	2×10^{-3}	3×10^{-3}
1			6	23	28	40	68	95
2			10	14	25	56	75	94
3			5	24	31	56	66	89
4			5	19	28	43	63	95
5			8	15	26	57	68	90
6			7	19	24	46	62	93
7			9	22	33	57	75	93
8			7	15	33	40	66	95
9			10	19	28	30	61	90
10			5	17	30	44	62	94
11			7	20	23	48	68	92
12			6	19	29	45	75	94
13			10	23	33	40	71	89
14			8	15	28	47	62	91
15	0	0	4	18	24	57	68	89
16			7	24	32	48	75	92
17			9	19	26	51	74	89
18			9	23	25	52	61	94
19			4	16	28	39	68	95
20			9	19	27	56	74	91
21			7	21	23	50	70	90
22			5	15	31	49	68	92
23			6	19	28	40	61	90
24			7	23	30	48	73	95
25			8	20	32	53	65	91
26			4	18	28	56	61	93
27			5	19	23	48	74	92
28			9	14	28	39	70	89

Πίνακας 2: Αναστολή % της αιμοπεταλιακής συσσώρευσης με διαδοχικά αυξανόμενες συγκεντρώσεις VMA επί 28 μετρήσεων για κάθε συγκέντρωση και με αιμοπεταλιακό διεγέρτη την επινεφρίνη.



Συγκέντρωση (M) →				
α/α ↓	10^{-5}	10^{-4}	10^{-3}	3×10^{-3}
1		11	65	
2		8	57	
3		8	52	
4		9	59	
5		11	54	
6		8	53	
7		7	49	
8		9	64	
9		10	57	
10		10	55	
11		7	60	
12		9	51	
13		8	57	
14	0	11	65	100
15		9	53	
16		10	57	
17		7	59	
18		11	61	
19		8	54	
20		10	63	
21		9	57	
22		7	61	
23		11	50	
24		8	55	
25		10	62	
26		10	60	
27		9	46	
28		7	57	

Πίνακας 3: Αναστολή % της αιμοπεταλιακής συσσώρευσης με διαδοχικά αυξανόμενες συγκεντρώσεις ASC επί 28 μετρήσεων για κάθε συγκέντρωση και με αιμοπεταλιακό διεγέρτη την επινεφρίνη.



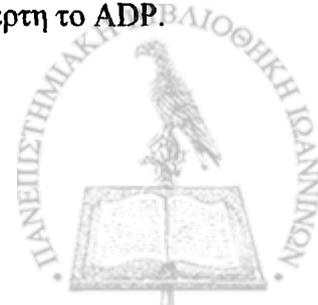
Συγκέντρωση (M) →	10 ⁻⁵	10 ⁻⁴	10 ⁻³	3X10 ⁻³
α/α ↓				
1	0	10	62	100
2		13	58	
3		6	60	
4		9	58	
5		12	61	
6		14	58	
7		10	60	
8		13	57	
9		7	61	
10		11	59	
11		8	57	
12		10	62	
13		6	61	
14		12	57	
15		10	57	
16		7	59	
17		11	56	
18		9	62	
19		14	61	
20		8	59	
21		14	56	
22		12	60	
23		10	57	
24		7	59	
25		13	61	
26		8	58	
27		6	60	
28		10	56	

Πίνακας 4: Αναστολή αιμοπεταλιακής συσσώρευσης (%) με διαδοχικά αυξανόμενες συγκεντρώσεις TMZ επί 28 μετρήσεων για κάθε συγκέντρωση και με αιμοπεταλιακό διεγέρτη την επινεφρίνη.



Συγκέντρωση (M) →		10^{-6}	10^{-5}	10^{-4}	2×10^{-4}	$0,5 \times 10^{-3}$	10^{-3}	2×10^{-3}	3×10^{-3}
α/α ↓									
1			1	14	32	53	61	68	97
2			2	10	26	42	58	79	88
3			3	11	21	52	55	72	96
4			2	8	28	51	63	66	88
5			1	13	22	44	54	80	92
6			3	10	24	43	60	80	95
7			1	8	30	46	56	82	89
8			2	11	26	53	65	76	96
9			1	10	23	47	58	71	94
10			3	13	25	43	56	77	88
11			2	11	22	52	62	68	94
12			1	9	20	44	58	74	90
13			1	14	26	46	52	67	96
14			1	9	32	46	64	73	92
15	0		2	11	31	47	58	66	89
16			3	14	22	47	56	81	97
17			1	12	26	50	53	75	87
18			3	13	20	42	61	67	90
19			2	11	32	48	52	72	88
20			3	9	30	41	60	68	96
21			3	8	26	51	58	74	92
22			2	14	29	48	64	82	94
23			2	12	24	42	55	76	90
24			3	13	30	47	51	70	88
25			3	11	27	52	54	69	95
26			2	9	28	48	60	80	96
27			1	12	26	50	62	78	92
28			2	8	20	41	58	81	87

Πίνακας 5: Αναστολή αιμοπεταλιακής συσώρευσης (%) με διαδοχικά αυξανόμενες συγκεντρώσεις μετανεφρίνης επί 28 μετρήσεων για κάθε συγκέντρωση και με αιμοπεταλιακό διεγέρτη το ADP.



Συγκέντρωση (M) →	10 ⁻⁶	10 ⁻⁵	10 ⁻⁴	2X10 ⁻⁴	0,5X10 ⁻³	10 ⁻³	2X10 ⁻³	3X10 ⁻³
a/a ↓								
1	0	0	19	37	52	53	75	94
2			12	25	46	59	72	99
3			16	36	42	48	70	95
4			20	30	49	59	81	96
5			13	27	43	57	84	98
6			17	36	40	58	82	94
7			14	33	41	50	71	99
8			18	23	44	47	74	95
9			16	23	46	57	79	99
10			20	32	46	59	81	96
11			17	30	41	53	73	93
12			19	37	49	56	76	98
13			15	28	52	52	73	94
14			16	29	46	49	77	97
15			13	30	48	47	83	93
16			16	30	52	56	73	93
17			12	31	43	48	70	98
18			14	24	46	53	81	94
19			15	28	40	58	73	97
20			18	30	51	49	78	99
21			12	33	49	47	82	96
22			16	37	44	54	79	93
23			19	32	48	59	75	95
24			20	24	51	57	81	97
25			17	27	43	53	72	99
26			16	30	46	49	80	93
27			15	35	50	50	77	96
28			13	23	40	47	84	98

Πίνακας 6: Αναστολή αιμοπεταλιακής συσσώρευσης (%) με διαδοχικά αυξανόμενες συγκεντρώσεις VMA επί 28 μετρήσεων για κάθε συγκέντρωση και με αιμοπεταλιακό διεγέρτη το ADP.



Συγκέντρωση (M) →				
α/α ↓	10^{-5}	10^{-4}	10^{-3}	3×10^{-3}
1		16	67	
2		9	62	
3		14	65	
4		15	63	
5		11	66	
6		16	62	
7		8	66	
8		12	64	
9		9	65	
10		12	64	
11		10	68	
12		8	67	
13		16	65	
14	0	12	64	100
15		8	66	
16		16	63	
17		12	65	
18		14	62	
19		12	64	
20		15	66	
21		8	68	
22		16	65	
23		9	66	
24		13	64	
25		15	67	
26		10	68	
27		8	63	
28		12	65	

Πίνακας 7: Αναστολή αιμοπεταλιακής συσσώρευσης (%) με διαδοχικά αυξανόμενες συγκεντρώσεις ASC επί 28 μετρήσεων για κάθε συγκέντρωση και με αιμοπεταλιακό διεγέρτη το ADP.



Συγκέντρωση (M) →	10^{-5}	10^{-4}	10^{-3}	3×10^{-3}
α/α ↓				
1	0	15	80	100
2		13	70	
3		16	81	
4		14	73	
5		15	80	
6		17	75	
7		13	70	
8		16	77	
9		13	76	
10		15	71	
11		17	70	
12		13	81	
13		16	78	
14		15	72	
15		17	69	
16		17	75	
17		13	75	
18		14	70	
19		17	80	
20		14	79	
21		15	74	
22		13	73	
23		17	80	
24		15	70	
25		13	77	
26		16	69	
27		14	80	
28		17	75	

Πίνακας 8: Αναστολή αιμοπεταλιακής συσσώρευσης (%) με διαδοχικά αυξανόμενες συγκεντρώσεις TMZ επί 28 μετρήσεων για κάθε συγκέντρωση και με αιμοπεταλιακό διεγέρτη το ADP.



Συγκέντρωση (M) →	10^{-6}	10^{-5}	10^{-4}	2×10^{-4}	$0,5 \times 10^{-3}$	10^{-3}	2×10^{-3}	3×10^{-3}	8×10^{-3}
α/α ↓									
1					1	4	3	3	33
2					2	3	2	4	22
3					3	2	4	3	25
4					1	3	3	5	22
5					2	3	2	4	26
6					1	4	2	4	33
7					3	4	3	3	30
8					1	3	2	5	27
9					2	3	4	3	20
10					3	2	2	4	24
11					2	4	4	5	21
12					1	3	2	3	30
13					2	4	3	3	19
14	0	0	0	0	1	2	4	3	33
15					2	4	3	5	21
16					3	3	4	4	26
17					3	2	2	5	31
18					2	4	3	3	28
19					2	2	3	4	32
20					3	4	4	4	25
21					3	2	4	5	22
22					2	3	3	5	19
23					3	2	3	4	26
24					1	2	2	5	31
25					3	3	4	5	27
26					2	4	3	4	30
27					1	2	4	3	19
28					1	3	2	4	26

Πίνακας 9: Αναστολή αιμοπεταλιακής συσσώρευσης (%) με διαδοχικά αυξανόμενες συγκεντρώσεις μετανεφρίνης επί 28 μετρήσεων για κάθε συγκέντρωση και με αιμοπεταλιακό διεγέρτη το αραχιδονικό οξύ.



Συγκέντρωση (M) →	10^{-6}	10^{-5}	10^{-4}	2×10^{-4}	$0,5 \times 10^{-3}$	10^{-3}	2×10^{-3}	3×10^{-3}	8×10^{-3}
a/a ↓									
1					1	2	2	3	21
2					1	1	1	2	23
3					2	2	2	4	29
4					3	3	3	3	26
5					3	1	3	2	29
6					3	2	1	2	22
7					2	3	2	3	25
8					1	2	3	2	25
9					2	1	2	4	28
10					3	3	1	2	23
11					2	3	2	4	27
12					1	1	1	2	22
13					2	3	3	3	29
14	0	0	0	0	1	2	1	4	25
15					2	1	2	2	21
16					3	2	3	4	28
17					1	1	3	3	22
18					3	2	1	4	29
19					3	3	3	2	25
20					1	2	2	3	21
21					2	1	1	3	28
22					3	2	3	4	23
23					2	3	2	4	27
24					1	3	2	3	22
25					3	3	1	3	28
26					2	2	3	2	21
27					1	1	2	4	24
28					2	1	1	3	27

Πίνακας 10: Αναστολή αιμοπεταλιακής συσσώρευσης (%) με διαδοχικά αυξανόμενες συγκεντρώσεις VMA επί 28 μετρήσεων για κάθε συγκέντρωση και με αιμοπεταλιακό διεγέρτη το αραχιδονικό οξύ.



Συγκέντρωση (M) →				
α/α ↓	10^{-5}	10^{-4}	10^{-3}	3×10^{-3}
1		6	63	
2		5	58	
3		7	58	
4		6	62	
5		5	59	
6		5	61	
7		7	62	
8		6	59	
9		5	60	
10		7	62	
11		6	61	
12		7	60	
13		6	58	
14		6	63	
15	0	7	57	100
16		5	59	
17		6	60	
18		5	61	
19		6	60	
20		5	62	
21		7	58	
22		5	59	
23		7	61	
24		7	60	
25		7	58	
26		6	62	
27		5	57	
28		6	60	

Πίνακας 11: Αναστολή αιμοπεταλιακής συσσώρευσης (%) με διαδοχικά αυξανόμενες συγκεντρώσεις ASC επί 28 μετρήσεων για κάθε συγκέντρωση και με αιμοπεταλιακό διεγέρτη το αραχιδονικό οξύ.



Συγκέντρωση (M) →				
α/α ↓	10^{-5}	10^{-4}	10^{-3}	3×10^{-3}
1		7	59	
2		8	54	
3		7	56	
4		9	53	
5		8	54	
6		9	55	
7		9	53	
8		8	58	
9		7	55	
10		9	59	
11		7	56	
12		8	53	
13		7	58	
14		8	54	
15	0	9	53	100
16		9	57	
17		8	59	
18		8	56	
19		7	57	
20		7	59	
21		9	55	
22		8	57	
23		9	54	
24		8	58	
25		7	53	
26		8	59	
27		9	56	
28		7	58	

Πίνακας 12: Αναστολή αιμοπεταλιακής συσσώρευσης (%) με διαδοχικά αυξανόμενες συγκεντρώσεις TMZ επί 28 μετρήσεων για κάθε συγκέντρωση και με αιμοπεταλιακό διεγέρτη το αραχιδονικό οξύ.



Συγκέντρωση (M) →		10^{-6}	10^{-5}	10^{-4}	2×10^{-4}	$0,5 \times 10^{-3}$	10^{-3}	2×10^{-3}	3×10^{-3}
α/α ↓									
1			2	14	43	44	64	80	
2			1	20	40	56	68	79	
3			2	18	33	43	64	82	
4			3	22	37	50	56	73	
5			3	15	41	51	57	81	
6			2	17	40	54	54	75	
7			2	18	35	38	65	79	
8			3	16	42	48	64	81	
9			3	17	47	41	56	79	
10			2	15	40	56	58	78	
11			3	18	37	47	61	77	
12			1	21	41	54	66	79	
13			3	16	33	44	62	83	
14			2	19	39	47	64	77	
15		0	1	22	40	43	65	76	
16			1	17	47	40	61	79	
17			1	14	45	46	68	80	
18			2	19	39	55	58	78	
19			3	18	40	39	57	85	
20			1	20	43	47	65	80	
21			2	16	38	51	60	73	
22			1	21	46	46	61	78	
23			3	19	33	48	58	84	
24			1	18	40	40	66	79	
25			2	20	39	47	69	85	
26			3	14	41	50	57	78	
27			2	22	34	53	53	80	
28			1	18	47	38	61	74	
									100

Πίνακας 13: Αναστολή αιμοπεταλιακής συσσώρευσης (%) με διαδοχικά αυξανόμενες συγκεντρώσεις μετανεφρίνης επί 28 μετρήσεων για κάθε συγκέντρωση και με αιμοπεταλιακό διεγέρτη τον PAF



Συγκέντρωση (M) →								
α/α ↓	10^{-6}	10^{-5}	10^{-4}	2×10^{-4}	$0,5 \times 10^{-3}$	10^{-3}	2×10^{-3}	3×10^{-3}
1			9	17	34	46	74	95
2			11	16	39	58	83	98
3			8	19	32	45	76	97
4			10	17	35	45	75	95
5			9	21	34	61	71	95
6			10	16	39	59	76	94
7			8	15	27	53	80	96
8			9	17	28	62	68	93
9			8	14	34	48	78	95
10			7	19	41	60	83	97
11			9	17	33	49	76	97
12			10	20	29	60	81	93
13			8	18	27	53	69	94
14			7	15	35	47	75	93
15	0	0	11	13	40	53	77	92
16			9	19	34	48	81	97
17			10	18	29	61	69	96
18			7	17	36	53	70	95
19			8	20	38	58	80	92
20			9	13	40	60	76	98
21			7	16	27	50	84	97
22			11	14	34	44	68	93
23			9	15	30	53	84	96
24			9	20	41	56	71	98
25			7	14	28	53	72	93
26			11	17	33	46	77	95
27			11	21	41	46	72	94
28			10	18	34	57	82	92

Πίνακας 14: Αναστολή αιμοπεταλιακής συσσώρευσης (%) με διαδοχικά αυξανόμενες συγκεντρώσεις VMA επί 28 μετρήσεων για κάθε συγκέντρωση και με αιμοπεταλιακό διεγέρτη τον PAF.



Συγκέντρωση (M) →				
α/α ↓	10^{-5}	10^{-4}	10^{-3}	3×10^{-3}
1	0	17	76	100
2		14	73	
3		16	71	
4		13	76	
5		15	74	
6		17	71	
7		13	73	
8		15	75	
9		14	72	
10		17	74	
11		14	70	
12		13	70	
13		17	76	
14		17	75	
15		15	73	
16		16	71	
17		13	76	
18		17	70	
19		15	76	
20		13	72	
21		16	74	
22		13	71	
23		17	75	
24		15	72	
25		14	70	
26		16	73	
27		13	75	
28		13	70	

Πίνακας 15: Αναστολή αιμοπεταλιακής συσσώρευσης (%) με διαδοχικά αυξανόμενες συγκεντρώσεις ASC επί 28 μετρήσεων για κάθε συγκέντρωση και με αιμοπεταλιακό διεγέρτη τον PAF.



Συγκέντρωση (M) →				
α/α ↓	10^{-5}	10^{-4}	10^{-3}	3×10^{-3}
1		17	79	
2		21	77	
3		16	76	
4		14	73	
5		19	79	
6		13	77	
7		20	74	
8		17	79	
9		19	75	
10		14	73	
11		16	75	
12		18	76	
13		17	77	
14	0	21	78	100
15		17	74	
16		13	79	
17		16	76	
18		18	77	
19		15	76	
20		17	73	
21		14	78	
22		20	75	
23		21	73	
24		15	76	
25		20	79	
26		17	75	
27		18	73	
28		13	76	

Πίνακας 16: Αναστολή αιμοπεταλιακής συσσώρευσης (%) με διαδοχικά αυξανόμενες συγκεντρώσεις TMZ επί 28 μετρήσεων για κάθε συγκέντρωση και με αιμοπεταλιακό διεγέρτη τον PAF.



Συγκέντρωση (M) →	10^{-6}	10^{-5}	10^{-4}	2×10^{-4}	$0,5 \times 10^{-3}$	2×10^{-3}	5×10^{-3}
α/α ↓							
1							
2							
3							
4							
5							
6							
7							
8							
9							
10							
11							
12							
13							
14	0	0	0	$1 \pm$	0	0	0
15							
16							
17							
18							
19							
20							
21							
22							
23							
24							
25							
26							
27							
28							

Πίνακας 17: Αναστολή αιμοπεταλιακής συσσώρευσης (%) με διαδοχικά αυξανόμενες συγκεντρώσεις μετανεφρίνης επί 28 μετρήσεων για κάθε συγκέντρωση και με αιμοπεταλιακό διεγέρτη την θρομβίνη.



Συγκέντρωση (M) →	10^{-6}	10^{-3}	10^{-4}	2×10^{-4}	$0,5 \times 10^{-3}$	2×10^{-3}	3×10^{-3}
a/a ↓							
1					0	3	4
2					2	4	1
3					1	2	0
4					2	3	2
5					0	3	4
6					1	4	4
7					2	3	1
8					0	4	2
9					2	2	0
10					1	4	3
11					2	3	3
12					0	2	2
13					1	4	4
14	0	0	0	0	1	4	3
15					2	3	0
16					0	3	2
17					1	2	1
18					0	4	1
19					1	2	2
20					2	4	4
21					1	2	0
22					1	3	3
23					0	4	0
24					1	2	4
25					2	3	3
26					2	2	2
27					0	2	0
28					0	3	2

Πίνακας 18: Αναστολή αιμοπεταλιακής συσσώρευσης (%) με διαδοχικά αυξανόμενες συγκεντρώσεις VMA επί 28 μετρήσεων για κάθε συγκέντρωση και με αιμοπεταλιακό διεγέρτη την θρομβίνη.



Συγκέντρωση (M) →				
α/α ↓	10^{-5}	10^{-4}	10^{-3}	3×10^{-3}
1		4	52	
2		2	49	
3		3	51	
4		4	52	
5		3	48	
6		3	52	
7		3	52	
8		2	48	
9		4	50	
10		3	49	
4911		2	51	
12		3	50	
13		3	49	
14		2	48	
15	0	4	50	100
16		4	51	
17		3	49	
18		2	50	
19		4	50	
20		3	52	
21		3	48	
22		2	51	
23		4	49	
24		3	50	
25		3	48	
26		2	52	
27		4	51	
28		3	48	

Πίνακας 19: Αναστολή αιμοπεταλιακής συσσώρευσης (%) με διαδοχικά αυξανόμενες συγκεντρώσεις ASC επί 28 μετρήσεων για κάθε συγκέντρωση και με αιμοπεταλιακό διεγέρτη την θρομβίνη.



Συγκέντρωση (M) →	10^{-3}	10^{-4}	10^{-3}	3×10^{-3}
a/a ↓				
1			44	
2			45	
3			45	
4			44	
5			43	
6			44	
7			43	
8			45	
9			44	
10			45	
11			43	
12			44	
13			43	
14			45	
15	0	0	43	100
16			44	
17			45	
18			44	
19			43	
20			44	
21			45	
22			45	
23			44	
24			43	
25			45	
26			44	
27			43	
28			43	

Πίνακας 20: Αναστολή αιμοπεταλιακής συσσώρευσης (%) με διαδοχικά αυξανόμενες συγκεντρώσεις TMZ επί 28 μετρήσεων για κάθε συγκέντρωση και με αιμοπεταλιακό διεγέρτη την θρομβίνη.



Χορηγηθείσες ουσίες →	Καμία	EPN	THR	ARA	PAF	ADP
α/α ↓						
1	338	341	467	442	424	376
2	323	337	438	423	397	361
3	329	349	469	431	385	352
4	335	336	476	418	390	373
5	332	348	430	436	421	350
6	330	343	429	407	404	355
7	326	350	460	417	401	365
8	331	345	456	441	417	374
9	337	334	448	405	403	366
10	341	340	474	412	395	353
11	352	349	431	409	413	354
12	341	341	452	420	405	369
13	323	335	470	440	391	346
14	331	350	435	426	407	351
15	327	344	473	434	412	345
16	336	338	468	406	387	362
17	322	348	458	437	418	348
18	334	342	454	429	400	360
19	339	339	436	408	404	367
20	328	347	475	439	396	370
21	333	335	466	410	408	347
22	321	339	437	428	423	368
23	324	343	452	419	411	359
24	339	345	444	423	398	349
25	330	336	434	427	384	371
26	332	346	450	438	410	344
27	321	334	446	415	420	360
28	340	342	428	404	388	358

Πίνακας 21: u-Carrs 5 λεπτά μετά την έναρξη της αιμοπεταλιακής συσσώρευσης, μετά από χορήγηση των διεγερτών EPN, THR, ARA, PAF και ADP επί 28 μετρήσεων για κάθε διεγέρτη.



Χορηγηθείσες ουσίες →	Καμία	EPN	THR	ARA	PAF	ADP
α/α ↓						
1	332	470	491	446	400	394
2	330	497	523	435	385	358
3	341	435	504	428	410	383
4	333	449	528	455	394	374
5	337	495	556	459	441	397
6	330	480	488	481	417	364
7	333	498	545	465	379	398
8	328	467	562	486	418	387
9	327	436	501	461	423	369
10	339	458	553	470	433	357
11	337	463	555	445	390	406
12	332	437	519	457	440	354
13	328	455	503	476	435	365
14	342	494	499	485	404	390
15	341	442	549	469	399	381
16	333	481	533	429	428	402
17	340	473	564	443	382	370
18	337	478	500	430	412	388
19	343	469	490	472	387	400
20	333	456	552	440	405	376
21	329	441	524	473	381	367
22	337	487	507	488	437	407
23	342	501	529	471	443	410
24	338	499	497	487	439	366
25	329	439	548	451	422	399
26	331	466	561	444	389	362
27	340	500	496	447	432	395
28	338	438	551	431	383	377

Πίνακας 22: u-Carrs 10 λεπτά μετά την έναρξη της αιμοπεταλιακής συσσώρευσης, μετά από χορήγηση των διεγερτών EPN, THR, ARA, PAF και ADP επί 28 μετρήσεων για κάθε διεγέρτη.



Χορηγηθείσες ουσίες → α/α ↓	EPN	EPN+MET	EPN+VMA	EPN+ASC	EPN+TMZ
1	494	268	293	9	12
2	435	302	304	4	11
3	497	273	283	7	14
4	464	289	314	7	9
5	492	298	307	3	6
6	466	271	291	4	8
7	500	287	285	8	9
8	467	290	308	8	6
9	443	267	317	3	12
10	482	277	321	5	9
11	496	291	294	6	14
12	480	283	286	7	13
13	493	297	310	9	11
14	458	277	305	8	10
15	436	286	284	7	9
16	454	299	296	5	14
17	436	291	320	9	11
18	444	278	318	4	6
19	472	285	313	5	7
20	501	270	287	7	11
21	440	269	290	3	12
22	469	295	321	6	7
23	478	282	300	9	8
24	456	301	299	5	13
25	442	266	311	8	6
26	500	279	283	5	10
27	439	300	297	4	8
28	470	281	319	3	14

Πίνακας 23: u-Carrs 10 λεπτά από την έναρξη της αιμοπεταλιακής συσσώρευσης μετά από χορήγηση EPN, EPN+MET, EPN+VMA, EPN+ASC και EPN+TMZ επί 28 μετρήσεων για κάθε χορηγηθείσα ουσία ή συνδυασμό ουσιών (Συγκέντρωση MET, VMA, ASC και TMZ: 3×10^{-3} M για κάθε ουσία).



Χορηγηθείσες ουσίες →	THR	THR+MET	THR+VMA	THR+ASC	THR+TMZ
α/α ↓					
1	491	339	419	18	21
2	523	342	441	15	27
3	504	330	394	12	20
4	528	327	411	25	18
5	556	353	401	22	21
6	488	328	442	19	16
7	545	318	439	13	24
8	562	332	423	15	26
9	501	311	404	12	17
10	553	349	427	21	22
11	555	317	400	14	20
12	519	333	445	19	23
13	503	319	413	28	16
14	499	336	407	26	21
15	549	340	395	27	18
16	533	349	432	13	24
17	564	351	440	15	27
18	500	335	446	12	28
19	490	315	395	25	17
20	552	326	408	19	23
21	524	357	433	21	17
22	507	338	417	28	20
23	529	356	399	25	26
24	497	319	429	22	28
25	548	312	436	27	23
26	561	341	445	21	27
27	496	350	421	18	22
28	551	329	398	28	24

Πίνακας 24: u-Carrs 10 λεπτά από την έναρξη της αιμοπεταλιακής συσσώρευσης μετά από χορήγηση THR, THR+MET, THR+VMA, THR+ASC και THR+TMZ επί 28 μετρήσεων για κάθε χορηγηθείσα ουσία ή συνδυασμό ουσιών (Συγκέντρωση MET, VMA, ASC και TMZ: 3×10^{-3} M για κάθε ουσία).



Χορηγηθείσες ουσίες →	ARA	ARA+MET	ARA+VMA	ARA+ASC	ARA+TMZ
α/α ↓					
1	446	285	434	22	28
2	435	259	401	29	31
3	428	289	412	31	33
4	455	282	395	27	29
5	459	271	437	22	30
6	481	276	385	25	32
7	465	266	426	30	26
8	486	288	434	21	33
9	461	262	386	23	34
10	470	265	416	25	28
11	445	270	422	27	30
12	457	284	402	31	27
13	476	264	403	23	33
14	485	284	417	21	26
15	469	268	420	25	32
16	429	275	388	30	30
17	443	282	410	27	29
18	430	257	437	21	34
19	472	264	406	29	31
20	440	281	385	30	32
21	473	277	410	27	27
22	488	287	427	31	34
23	471	262	421	26	28
24	487	280	388	22	30
25	451	258	400	31	29
26	444	261	396	26	27
27	447	278	436	25	31
28	431	269	412	21	26

Πίνακας 25: u-Carrs 10 λεπτά από την έναρξη της αιμοπεταλιακής συσσώρευσης μετά από χορήγηση ARA, ARA+MET, ARA+VMA, ARA+ASC και ARA+TMZ επί 28 μετρήσεων για κάθε χορηγηθείσα ουσία ή συνδυασμό ουσιών (Συγκέντρωση MET, VMA, ASC και TMZ: 3×10^{-3} M για κάθε ουσία).



Χορηγηθείσες ουσίες →	PAF	PAF+MET	PAF+VMA	PAF+ASC	PAF+TMZ
α/α ↓					
1	442	234	281	13	13
2	420	243	268	12	14
3	426	223	260	10	12
4	412	249	272	12	15
5	394	236	284	9	16
6	381	244	258	15	16
7	383	240	283	11	15
8	434	238	263	15	14
9	422	241	259	10	12
10	408	257	261	13	14
11	423	242	282	9	16
12	414	232	270	14	13
13	440	258	283	15	12
14	419	239	285	12	15
15	403	265	259	11	13
16	382	231	272	10	14
17	408	254	257	9	12
18	399	248	284	14	16
19	414	250	270	13	13
20	400	245	281	14	14
21	388	255	279	10	12
22	439	244	282	15	15
23	441	230	260	11	16
24	428	246	274	12	12
25	410	252	258	8	13
26	396	256	283	14	15
27	402	233	259	13	14
28	380	247	261	11	16

Πίνακας 26: u-Carrs 10 λεπτά από την έναρξη της αιμοπεταλιακής συσσώρευσης μετά από χορήγηση PAF, PAF+MET, PAF+VMA, PAF+ASC και PAF+TMZ επί 28 μετρήσεων για κάθε χορηγηθείσα ουσία ή συνδυασμό ουσιών (Συγκέντρωση MET, VMA, ASC και TMZ: 3×10^{-3} M για κάθε ουσία).



Χορηγηθείσες ουσίες →	ADP	ADP+MET	ADP+VMA	ADP+ASC	ADP+TMZ
α/α ↓					
1	361	275	303	3	4
2	395	280	292	4	2
3	377	273	322	5	2
4	406	266	325	3	4
5	393	276	312	5	2
6	368	281	314	3	4
7	408	260	323	4	3
8	386	264	307	5	2
9	354	261	291	3	4
10	379	262	287	5	3
11	356	274	324	3	2
12	380	269	304	3	4
13	405	283	316	3	2
14	357	264	296	5	4
15	385	280	288	5	2
16	408	284	305	4	3
17	384	261	317	5	4
18	378	283	295	5	2
19	396	270	300	3	4
20	371	264	320	3	3
21	359	268	289	4	2
22	407	275	309	5	4
23	358	282	325	5	3
24	410	271	287	3	3
25	369	280	308	4	2
26	403	269	290	4	4
27	387	263	321	3	4
28	356	278	298	5	3

Πίνακας 27: u-Carrs 10 λεπτά από την έναρξη της αιμοπεταλιακής συσσώρευσης μετά από χορήγηση ADP, ADP+MET, ADP+VMA, ADP+ASC και ADP+TMZ επί 28 μετρήσεων για κάθε χορηγηθείσα ουσία ή συνδυασμό ουσιών (Συγκέντρωση MET, VMA, ASC και TMZ: 3×10^{-3} M για κάθε ουσία).



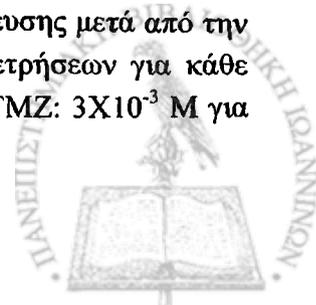
Χορηγηθείσες ουσίες →	Καμία	EPN	THR	ARA	PAF	ADP
α/α ↓						
1	176	1205	2451	1379	1770	1040
2	169	1187	2394	1340	1850	1118
3	162	1113	2242	1376	2115	1052
4	157	1275	2223	1420	1736	1135
5	143	1165	2381	1391	2137	1070
6	165	1345	2462	1362	2034	1133
7	162	1210	2346	1409	1782	1102
8	151	1129	2249	1352	2140	1045
9	146	1146	2376	1409	1477	1086
10	150	1226	2478	1337	1597	1065
11	164	1364	2274	1378	1787	1109
12	175	1323	2523	1404	1984	1055
13	156	1148	2469	1343	1446	1110
14	177	1264	2268	1331	1662	1105
15	163	1326	2272	1372	1779	1127
16	157	1328	2452	1419	1904	1119
17	172	1199	2527	1341	1784	1047
18	148	1287	2476	1330	1969	1064
19	170	1309	2288	1374	1830	1039
20	163	1151	2501	1407	1426	1129
21	144	1274	2356	1341	2120	1104
22	158	1269	2434	1413	1716	1056
23	155	1345	2299	1388	1582	1072
24	169	1361	2227	1371	1429	1134
25	158	1110	2508	1410	1796	1069
26	145	1248	2374	1398	2089	1122
27	174	1127	2281	1346	1532	1088
28	151	1202	2369	1359	1451	1041

Πίνακας 28: TXB₂ (pg/ml) 5 λεπτά από την έναρξη της αιμοπεταλιακής συσσώρευσης μετά από την χορήγηση EPN, THR, ARA, PAF και ADP επί 28 μετρήσεων για κάθε χορηγηθείσα ουσία.



Χορηγηθείσες ουσίες →	EPN	EPN+MET	EPN+VMA	EPN+ASC	EPN+TMZ
α/α ↓					
1	1166	269	411	81	269
2	1363	246	385	97	287
3	1216	266	352	101	292
4	1189	272	380	90	279
5	1274	244	400	88	274
6	1285	265	391	93	286
7	1347	270	353	89	278
8	1149	257	413	95	290
9	1325	275	399	82	284
10	1168	263	360	78	270
11	1306	275	412	83	285
12	1331	245	386	96	258
13	1233	273	420	100	283
14	1110	254	363	79	264
15	1348	249	354	79	281
16	1126	258	422	87	266
17	1241	264	369	80	291
18	1321	280	375	98	260
19	1127	267	388	91	265
20	1258	259	361	82	271
21	1182	250	394	102	263
22	1143	261	421	84	280
23	1292	252	374	90	276
24	1153	279	389	92	277
25	1112	255	362	101	259
26	1363	251	414	99	272
27	1306	274	383	85	273
28	1202	260	405	98	267

Πίνακας 29: TXB₂ (pg/ml) 5 λεπτά από την έναρξη της αιμοπεταλιακής συσσώρευσης μετά από την χορήγηση EPN, EPN+MET, EPN+VMA, EPN+ASC και EPN+TMZ επί 28 μετρήσεων για κάθε χορηγηθείσα ουσία ή συνδυασμό ουσιών (Συγκέντρωση MET, VMA, ASC και TMZ: 3×10^{-3} M για κάθε ουσία).



Χορηγούμενες ουσίες →	THR	THR+MET	THR+VMA	THR+ASC	THR+TMZ
α/α ↓					
1	2482	1101	1720	587	513
2	2249	1175	1745	535	540
3	2434	912	1603	561	554
4	2527	1073	1899	583	512
5	2223	1039	1731	534	494
6	2299	915	1598	597	528
7	2272	923	1902	532	550
8	2508	1051	1876	564	519
9	2242	999	1749	588	551
10	2316	1187	1602	569	526
11	2274	1031	1597	526	552
12	2381	1055	1850	559	537
13	2501	1049	1780	563	495
14	2523	924	1901	541	493
15	2478	1061	1787	565	522
16	2374	1027	1751	527	507
17	2268	1188	1622	590	539
18	2462	1036	1649	578	556
19	2288	1177	1756	536	499
20	2451	1102	1898	594	531
21	2356	912	1903	556	524
22	2394	1185	1612	559	509
23	2469	1069	1902	589	558
24	2476	1003	1889	537	498
25	2227	919	1768	592	543
26	2281	1064	1601	530	504
27	2376	1178	1713	598	499
28	2369	1045	1599	546	497

Πίνακας 30: TXB₂ (pg/ml) 5 λεπτά από την έναρξη της αιμοπεταλιακής συσσώρευσης μετά από την χορήγηση THR, THR+MET, THR+VMA, THR+ASC και THR+TMZ επί 28 μετρήσεων για κάθε χορηγούμενη ουσία ή συνδυασμό ουσιών (Συγκέντρωση MET, VMA, ASC και TMZ: 3X10⁻³ M για κάθε ουσία).



Χορηγηθείσες ουσίες →	ARA	ARA+MET	ARA+VMA	ARA+ASC	ARA+TMZ
α/α ↓					
1	1409	990	830	663	712
2	1330	1059	851	682	725
3	1341	981	998	616	731
4	1398	999	881	664	699
5	1362	972	827	614	695
6	1376	1066	1050	647	694
7	1410	1057	834	661	701
8	1352	893	1002	637	705
9	1341	901	939	690	696
10	1379	898	977	663	730
11	1359	985	881	621	728
12	1407	992	950	633	755
13	1340	979	1053	626	717
14	1346	1047	891	696	725
15	1372	970	1035	665	747
16	1404	894	959	632	741
17	1420	988	1049	641	691
18	1388	1067	911	689	733
19	1371	910	893	619	727
20	1331	968	930	684	752
21	1343	913	903	677	745
22	1409	1060	1052	694	718
23	1391	901	845	678	750
24	1419	1061	1029	628	704
25	1378	975	987	651	751
26	1314	961	1046	624	732
27	1413	1050	696	686	711
28	1337	903	828	659	728

Πίνακας 31: TXB₂ (pg/ml) 5 λεπτά από την έναρξη της αιμοπεταλιακής συσσώρευσης μετά από την χορήγηση ARA, ARA+MET, ARA+VMA, ARA+ASC και ARA+TMZ επί 28 μετρήσεων για κάθε χορηγηθείσα ουσία ή συνδυασμό ουσιών (Συγκέντρωση MET, VMA, ASC και TMZ: 3×10^{-3} M για κάθε ουσία).



Χορηγηθείσες ουσίες →	PAF	PAF+MET	PAF+VMA	PAF+ASC	PAF+TMZ
α/α ↓					
1	1716	1044	445	355	420
2	1597	1182	430	326	514
3	2140	1043	409	351	461
4	1451	943	447	290	432
5	1429	952	402	323	416
6	1446	1188	446	300	469
7	2137	1032	420	359	515
8	1779	950	439	308	418
9	1770	1007	418	340	470
10	1782	949	426	312	499
11	1984	1067	415	291	467
12	1830	998	428	352	422
13	1904	1087	401	317	505
14	2120	964	410	330	417
15	1532	1089	432	296	433
16	1477	1065	450	334	462
17	1787	1183	429	323	516
18	1582	1102	405	360	463
19	1426	1053	411	298	427
20	1784	1189	440	342	502
21	1850	1054	424	310	470
22	2034	1087	441	299	465
23	1796	1168	403	254	510
24	1662	944	449	295	425
25	2089	1133	421	338	471
26	2115	1180	422	320	512
27	1969	1079	402	327	460
28	1736	1046	435	350	507

Πίνακας 32: TXB₂ (pg/ml) 5 λεπτά από την έναρξη της αιμοπεταλιακής συσσώρευσης μετά από την χορήγηση PAF, PAF+MET, PAF+VMA, PAF+ASC και PAF+TMZ επί 28 μετρήσεων για κάθε χορηγηθείσα ουσία ή συνδυασμό ουσιών (Συγκέντρωση MET, VMA, ASC και TMZ: 3X10⁻³ M για κάθε ουσία).



Χορηγηθείσες ουσίες →	ADP	ADP+MET	ADP+VMA	ADP+ASC	ADP+TMZ
α/α ↓					
1	1127	834	830	650	531
2	1102	875	781	581	565
3	1039	869	875	569	524
4	1104	841	819	657	476
5	1088	798	773	695	509
6	1056	804	851	591	481
7	1135	838	787	701	469
8	1040	860	876	637	575
9	1086	833	820	580	474
10	1072	847	799	624	519
11	1133	799	780	703	470
12	1052	840	869	568	535
13	1110	872	774	699	526
14	1065	801	873	635	580
15	1041	835	826	648	511
16	1134	814	870	705	479
17	1047	868	822	574	541
18	1109	870	775	702	520
19	1045	827	809	685	569
20	1069	803	877	573	581
21	1129	876	824	636	475
22	1122	818	860	579	530
23	1064	802	841	617	574
24	1119	805	831	704	539
25	1105	856	776	683	571
26	1055	874	791	575	515
27	1070	806	828	626	576
28	1118	871	863	639	485

Πίνακας 33: TXB₂ (pg/ml) 5 λεπτά από την έναρξη της αιμοπεταλιακής συσσώρευσης μετά από την χορήγηση ADP, ADP+MET, ADP+VMA, ADP+ASC και ADP+TMZ επί 28 μετρήσεων για κάθε χορηγηθείσα ουσία ή συνδυασμό ουσιών (Συγκέντρωση MET, VMA, ASC και TMZ: 3X10⁻³ Μ για κάθε ουσία).



Χορηγηθείσες ουσίες →	Καμία	MET	VMA	ASC	TMZ
α/α ↓					
1	88134	83446	86498	1308	10136
2	93545	81923	91156	1361	9775
3	86015	75913	87076	1502	10128
4	87372	78391	90488	1358	10827
5	94702	77587	91909	1296	9721
6	91935	78771	85959	1463	10795
7	88152	79438	88346	1339	10898
8	94668	83465	88553	1443	9718
9	88620	77792	85823	1414	9889
10	85617	76238	91694	1449	10797
11	92304	81845	85083	1296	10672
12	87668	77136	88144	1455	10903
13	92142	83269	89892	1331	10542
14	94261	79743	91009	1325	9782
15	85608	81595	88234	1391	10004
16	91796	80412	85059	1519	10963
17	88339	77259	91145	1314	10786
18	92608	82944	86481	1521	10551
19	85576	80791	87783	1424	9881
20	92124	75717	88415	1402	10944
21	86924	77791	88824	1458	9883
22	89969	82045	88622	1491	10957
23	94659	75736	85274	1508	9726
24	91656	81577	89184	1373	10952
25	93352	77337	90471	1477	9851
26	90307	81392	85811	1353	10783
27	88482	77605	88734	1367	9895
28	86729	81390	91885	1485	9734

Πίνακας 34: Αιμοπεταλιακοί υποδοχείς GrIIb-IIIa ανά αιμοπετάλιο ανθρώπου μετά από την χορήγηση MET, VMA, ASC και TMZ επί 28 μετρήσεων για κάθε χορηγηθείσα ουσία. (Συγκέντρωση MET, VMA, ASC και TMZ: 3×10^{-3} M για κάθε ουσία).

