

ΧΑΡΟΚΟΠΕΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
Τμήμα Επιστήμης Διαιτολογίας – Διατροφής

ΟΙΚΟΝΟΜΟΥ ΑΛΕΞΑΝΔΡΑ

ΒΙΟΛΟΓΟΣ

**ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΗΣ ΥΠΑΡΞΗΣ ΤΟΥ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑ
ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗΣ ΑΙΜΟΠΕΤΑΛΙΩΝ (ΡΑΦ)
Ή ΑΛΛΩΝ ΜΕΣΟΛΑΒΗΤΩΝ
ΣΕ ΚΥΑΝΟΦΥΚΗ ΣΠΗΛΑΙΩΝ**

Διδακτορική Διατριβή

ΑΘΗΝΑ 2004

Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή

Σ. ΑΝΤΩΝΟΠΟΥΛΟΥ (Επιβλέπουσα), Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Βιοχημείας, Τμήμα Επιστήμης Διαιτολογίας – Διατροφής, Χαροκόπειο Πανεπιστήμιο

Ν. ΑΝΔΡΙΚΟΠΟΥΛΟΣ, Καθηγητής Βιοχημείας-Χημείας Τροφίμων, Τμήμα Επιστήμης Διαιτολογίας – Διατροφής, Χαροκόπειο Πανεπιστήμιο

Κ.Α. ΔΗΜΟΠΟΥΛΟΣ, Καθηγητής Βιοχημείας-Χημείας Τροφίμων, Τμήμα Χημείας, ΕΚΠΑ

Επταμελής Εξεταστική Επιτροπή

Σ. ΑΝΤΩΝΟΠΟΥΛΟΥ, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Βιοχημείας, Τμήμα Επιστήμης Διαιτολογίας – Διατροφής, Χαροκόπειο Πανεπιστήμιο

Ν. ΑΝΔΡΙΚΟΠΟΥΛΟΣ, Καθηγητής Βιοχημείας-Χημείας Τροφίμων, Τμήμα Επιστήμης Διαιτολογίας – Διατροφής, Χαροκόπειο Πανεπιστήμιο

Κ.Α. ΔΗΜΟΠΟΥΛΟΣ, Καθηγητής Βιοχημείας-Χημείας Τροφίμων, Τμήμα Χημείας, ΕΚΠΑ

Α. ΕΥΑΓΓΕΛΛΟΥ, Καθηγητής Φυσιολογίας, Ιατρική Σχολή, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων

Δ. ΤΣΟΥΚΑΤΟΣ, Αναπληρωτής Καθηγητής Βιοχημείας Λιπιδίων και βιολογικών μεμβρανών, Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων

Α. ΠΑΝΤΑΖΙΔΟΥ, Λέκτορας Οικολογίας και ταξινομικής φυκών, Τμήμα Βιολογίας, ΕΚΠΑ

Α. ΚΥΡΙΑΚΟΥ, Λέκτορας Βακτηριολογίας, Τμήμα Επιστήμης Διαιτολογίας – Διατροφής, Χαροκόπειο Πανεπιστήμιο

Στους γονείς μου

Η εργασία αυτή εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Βιολογίας, Βιοχημείας και Φυσιολογίας του ανθρώπου και των μικροοργανισμών του Χαροκόπειου Πανεπιστημίου, κατά την περίοδο 1999-2004, υπό την άμεση επίβλεψη και καθοδήγηση της Αν. Καθηγήτριας κ. Σμαραγδής Αντωνοπούλου, την οποία και ευχαριστώ βαθύτατα για την αμέριστη συμπαράστασή της, το θερμό και αμείωτο ενδιαφέρον της, την υπομονή και επιμονή της, που έκαναν αυτή την προσπάθεια πραγματικότητα.

Εκφράζω επίσης τις ευχαριστίες μου στον Καθηγητή κ. Κωνσταντίνο Δημόπουλο, Διευθυντή του Εργαστηρίου Βιοχημείας του Χημικού τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Αθηνών, για τη δυνατότητα που μου παρείχε να εργαστώ στο εργαστήριο και τη συμμετοχή του στην τριμελή επιτροπή της Διδακτορικής Διατριβής, τις χρήσιμες παρατηρήσεις και διορθώσεις του.

Τον Καθηγητή κ. Νίκο Ανδρικόπουλο για τη συμμετοχή του στην τριμελή επιτροπή της Διδακτορικής Διατριβής, ευχαριστώ ιδιαίτερα για τις παρατηρήσεις και διορθώσεις του.

Τη φίλη, Λέκτορα του Βιολογικού τμήματος του Πανεπιστημίου Αθηνών κ. Ανδριανή Πανταζίδου ευχαριστώ θερμά για τη βοήθειά της στη συλλογή και ταυτοποίηση του υλικού.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες οφείλω στον φίλο Δρ. Μιχάλη Ανδριώτη για τις πολύτιμες υποδείξεις και συμβουλές του στην διεξαγωγή των πειραμάτων.

Ακόμα οφείλω ευχαριστίες στους: Τζ. Νομικό, Ελ.Φραγκοπούλου και Χ. Καραντώνη για όλη τη βοήθεια που μου προσέφεραν, σε όλο το διάστημα εκπόνησης της διατριβής.

Επίσης το συνάδελφο και φίλο Δρ. Α. Αθανασίου ευχαριστώ για τη συμβολή του στην επεξεργασία του τελικού κειμένου και των σχημάτων της διατριβής αυτής. Ευχαριστώ όλα τα μέλη του εργαστηρίου Βιολογίας, Βιοχημείας και Φυσιολογίας του ανθρώπου και των μικροοργανισμών του Χαροκόπειου Πανεπιστημίου, για τη φιλική διάθεση, το ζεστό κλίμα και την ευχάριστη ατμόσφαιρα, με τα οποία με αντιμετώπισαν.

Τέλος, ευχαριστώ θερμά τους γονείς μου, τα παιδιά μου και το σύζυγό μου, για τη συνεχή και ανεκτίμητη ηθική συμπαράστασή τους στην προσπάθειά μου αυτή.

ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ

AA	: Αραχιδονικό οξύ
ACD	: Αντιδραστήριο που περιέχει κιτρικό νάτριο, κιτρικό οξύ και δεξτρόζη
ACN	: Ακετονιτρίλιο
ADP	: Αδενοσινό-διφωσφορικό οξύ
AGEPC	: 1-Ο-αλκυλο-2-ακετυλο-γλυκερυλο-φωσφορυλοχολίνη
Aggregometer	: Συσσωρευματομέτρο (όργανο μέτρησης της συσσώρευσης των κυττάρων)
AH	: Ακετυλοϋδρολάση
AMP	: Αδενοσινό-μονο-φωσφορικό οξύ
ANSA	: Αμινοναφθολοσουλφονικό οξύ
ATP	: Αδενοσινό-τριφωσφορικό οξύ
BSA	: Αλβουμίνη βοδινού ορού
c-AMP	: Κυκλικό αδενοσινό-μονοφωσφορικό οξύ
Cer	: Κηραμίδια
Cereb	: Κερεβροζίτες
CoA	: Συνένζυμο Α
CO	: Κυκλοοξυγονάση
CP	: Φωσφοκρεατίνη
CP/CPK	: Ενζυμικό σύστημα φωσφοκρεατίνης και κινάσης της φωσφοκρεατίνης
DAG	: 9,10-διυδροξυ-οκταδεκυλο-γλυκερόλη
DG	: Διγλυκερίδια
DGDG	: Διγαλακτοζυλοδιγλυκερίδια
EC ₅₀	: Συγκέντρωση ουσίας που προκαλεί 50% συσσώρευση
EDTA	: Αιθυλενο-διαμινο-τετραοξικό οξύ

EGTA	: Αιθυλενο-γλυκολ-δισ-(β-αμινο-αιθυλο-αιθερο)-N'-τετραοξικό οξύ
FA	: Λιπαρά οξέα
FMLP	: Φορμυλο-μεθειονυλο-λευκυλο-φαινυλαλανίνη
GALCER	: Γαλακτοκερεβροζίτες
GL	Γλυκολιποειδή
HPLC	: Υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης
IC₅₀	: Συγκέντρωση ουσίας που προκαλεί 50% αναστολή της συσώρευσης
IgE	: Ανοσοσφαιρίνη E
IgG	: Ανοσοσφαιρίνη G
IgM	: Ανοσοσφαιρίνη M
IR	: Φασματοφωτομετρία υπερύθρου
ΚΝΣ	: Κεντρικό νευρικό σύστημα
LDH	: Γαλακτική αφυδρογονάση
LPC	: Λυσοφωσφατιδυλοχολίνη
M	: Μεθανόλη
MD	: Μέτωπο διαλύτη
MG	: Μονογλυκερίδια
MS	: Φασματομετρία μάζας
NL	: Ουδέτερα λιποειδή
NMR	: Φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού
OD	: Οπτική πυκνότητα
PA	: Φωσφατιδικό οξύ
PAF	: Παράγοντας ενεργοποίησης αιμοπεταλίων, 1-O-αλκυλο-2-ακετυλο-γλυκερο-3-φωσφοχολίνη
PC	: Φωσφατιδυλο-χολίνη (λεκιθίνη)
PE	: Φωσφατιδυλοαιθανολαμίνη
PF₃	: Αιμοπεταλιακός παράγοντας 3
PF₄	: Αιμοπεταλιακός παράγοντας 4
PG	: Φωσφατιδυλο-γλυκερόλη

PG D₂	: Προσταγλανδίνη D₂
PG E₁	: Προσταγλανδίνη E₁
PG E₂	: Προσταγλανδίνη E₂
PG F_{1a}	: Προσταγλανδίνη F_{1a}
PG F_{2a}	: Προσταγλανδίνη F_{2a}
PG G₂	: Προσταγλανδίνη G₂
PG H₂	: Προσταγλανδίνη H₂
PG I₂	: Προστακυκλίνη I₂
PLA₂	: Φωσφολιπάση A₂
RH	: Υδρογονάνθρακες
SM	: Σφιγγομυελίνη
SRS-A	: Ουσία της αναφυλαξίας με αργή δράση
TG	: Τριγλυκερίδια
TLC	: Χρωματογραφία λεπτής στιβάδας
UV	: Φασματοφωτομετρία υπεριώδους

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	1
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	1
1.1 Βασικά χαρακτηριστικά των φυκών	3
1.2 Καταγραφές απολιθωμένων φυκών.....	4
1.3 Προκαρυωτικά φύκη	4
1.4 Άθροισμα : CYANOPHYTA (CYANOBACTERIA).....	4
Κλάση : Cyanophyceae.....	4
1.4.1 Κύρια χαρακτηριστικά των Cyanophyceae.....	5
1.4.2 Συστηματική κατάταξη των κυανοφυκών (κυανοβακτηρίων)	6
Τάξη Chroococcales	7
Τάξη Oscillatoriales.....	7
Τάξη Nostocales	7
Τάξη Stigonematales	7
1.5 Χώροι συλλογής πειραματικού υλικού	8
1.5.1 Σπήλαιο «Κουτούκι».....	8
1.5.2 Σπήλαιο Νυμφολήπτου Βάρης Αττικής.....	8
1.5.3 Αρχαίο θέατρο Διονύσου	9
2. ΓΕΝΙΚΑ ΠΕΡΙ ΛΙΠΟΕΙΔΩΝ	10
2.1 Ταξινόμηση των λιποειδών	10
2.1.1 Ουδέτερα λιποειδή	10
Υδρογονάνθρακες.....	10
Αλκοόλες.....	11
Αλδεΐδες.....	11
Κετόνες και κινόνες	11
Λιπαρά οξέα.....	11
Κηροί.....	12

Γλυκερίδια	12
Γλυκεριναιθέρες	13
Εστέρες στερολών και βιταμινών	13
2.1.2. Πολικά λιποειδή.....	13
Φωσφολιποειδή	13
Γλυκολιποειδή	15
3. ΠΑΡΑΓΟΝΤΑΣ ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗΣ ΑΙΜΟΠΕΤΑΛΙΩΝ (PAF)	17
3.1 Γενικά.....	17
Ιδιότητες του μορίου του PAF	19
3.2 Χρωματογραφική συμπεριφορά του PAF	19
3.3 Παραγωγή του PAF από κύτταρα	21
3.4 Μηχανισμός απελευθέρωσης του PAF	22
3.5 Μεταβολισμός του PAF	23
3.5.1 Βιοσύνθεση του PAF	23
Κύκλος απακυλίωσης - επανακυλίωσης του PAF	23
Φωσφολιπάση A ₂	23
Ακετυλοτρανσφεράση	25
3.5.2 Ανενεργοποίηση του PAF.....	27
Ακετυλοϋδρολάση	27
Ακυλοτρανσφεράση	27
3.6 Δράσεις του PAF	29
Επίδραση στα αιμοπετάλια	32
3.7 PAF και αλλεργίες	35
3.7.1 Ανοσολογικό σύστημα.....	35
3.7.2 Υπερευαισθησία	36
Υπερευαισθησία τύπου I ή αναφυλαξία.....	36
Υπερευαισθησία τύπου II ή κυτταρολυτικός τύπος.	38
Υπερευαισθησία τύπου III ή αντίδραση με τη μεσολάβηση ανοσοσυμπλεγμάτων	39
Τύπος IV κυτταρικής υπερευαισθησίας ή υπερευαισθησία επιβραδυνόμενου τύπου.	39

Μικτός τύπος κυτταρικής και χημικής υπερευαισθησίας (ή τύπος απόρριψης των μοσχευμάτων), τύπος V	39
Φλεγμονή	40
Χρόνια φλεγμονή.....	40
Οξεία φλεγμονή.....	40
3.8 Παθοβιολογία του PAF	41
3.11.1 Συμμετοχή του PAF και των αιμοπεταλίων στη θρόμβωση	41
3.8.2 Συμμετοχή του PAF στην φλεγμονή	41
3.8.3 Άσθμα και συστηματική αναφυλαξία	42
3.8.4 Ανοσολογική Απόκριση	43
3.8.5 Άλλες παθοβιολογικές δράσεις του PAF	44
3.9 Αναστολείς του PAF	46
3.9.1 Μη ειδικοί αναστολείς	46
3.9.2 Ειδικοί αναστολείς	48
Δομικά Ανάλογα	48
3.10 Αναστολείς του PAF από φυσικές πηγές	54
Ginkgolide	55
α. Βενζοφουρανοειδή νεολιγνάνια.....	57
β. Υποκατεστημένα φουρανοειδή λιγνάνια.....	58
γ. Λιγνάνια που προέρχονται από τη διβενζυλοβουτυρολακτόνη	59
δ. Υποκατεστημένο φουρο(3,4-ε)φουρανοειδή λιγνάνια	60
3.11 Συνθετικοί αναστολείς του PAF	64
3.12. Ενδογενείς αναστολείς.....	74
3.13. Υποδοχείς του PAF.....	75
4. ΚΥΑΝΟΒΑΚΤΗΡΙΑ: ΛΙΠΟΕΙΔΗ ΚΑΙ PAF	78
4.1 Παρουσία του PAF στη φύση και ρόλος του	79
4.2. Κυανοβακτήρια σπηλαίων:	82
4.2.1. <i>Scytonema julianum</i>	83
4.2.2. <i>Chroococcidiopsis</i> sp.	83
ΣΚΟΠΟΣ.....	85

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	87
5. ΜΕΘΟΔΟΙ	87
5.1. Καλλιέργεια κυανοβακτηρίων in vitro	87
5.2. Εκχύλιση λιποειδών κατά Bligh-Dyer	90
5.3. Χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας (TLC) λιποειδών.....	90
5.4. Υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC) λιποειδών	91
5.5. Προσδιορισμός φωσφόρου.....	92
5.6. Προσδιορισμός σακχάρων.....	93
5.7. Προσδιορισμός εστέρων	94
5.8. Ήπια αλκαλική υδρόλυση λιποειδών	95
5.9. Ακετυλίωση λιποειδών	96
5.10. Ενζυμική υδρόλυση λιποειδών (με ακετυλοϋδρολάση ανθρώπινου ορού).....	97
5.11. Φασματοφωτομετρία υπεριώδους (UV)	97
5.12. Φασματομετρία μάζας (M.S.).....	98
5.13. Βιολογική δοκιμασία in vitro	98
5.13.1. Απομόνωση πλυμένων αιμοπεταλίων από αίμα κουνελιού...100	
5.13.2. Συσσώρευση πλυμένων αιμοπεταλίων κουνελιού.....101	
5.13.3. Πειράματα απευαισθητοποίησης σε πλυμένα αιμοπετάλια κουνελιού	102
5.13.4. Πειράματα ελέγχου του δρόμου, μέσω του οποίου προκαλείται η συσσώρευση, με χρήση ειδικών αναστολέων σε πλυμένα αιμοπετάλια κουνελιού.....	102
5.13.5. Πειράματα αναστολής της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων σε πλυμένα αιμοπετάλια κουνελιού	102
5.14. Προσδιορισμός των μικροβιακών στελεχών – Χρώση κατά Gram103	
5.15. Μέθοδος δισκίων Bauer-Kirby	104
6. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ – ΣΥΖΗΤΗΣΗ	107
6.1. <i>Scytonema julianum</i>	107
Περιγραφή και συστηματική κατάταξη.....	107
Καλλιέργεια	108

6.1.1. Διαχωρισμός σε ουδέτερα (NL) και πολικά (PL) λιποειδή – Απομάκρυνση χρωστικών ουσιών	112
6.1.2. Φωσφολιποειδή (PL).....	114
6.1.2.1. Διαχωρισμός PL με HPLC.....	114
6.1.2.2. Βιολογική δραστικότητα των κλασμάτων των πολικών λιποειδών της SCX	114
6.1.2.3. Φάσμα UV και προσδιορισμός φωσφόρου των κλασμάτων PL ₂ , PL ₃ , PL ₄ , PL ₆ , PL ₈ και PL ₁₁	117
6.1.2.4. Κατεργασία με Ακετυλοϋδρολάση	118
6.1.2.5. Φάσμα MS – Διαλεύκανση δομής.....	121
6.1.2.6. Σύνοψη των αποτελεσμάτων των φωσφολιποειδών του <i>Scytonema julianum</i>	127
6.1.3.3. Φάσμα UV και προσδιορισμός φωσφόρου και γλυκόζης των κλασμάτων G ₃ ,G ₇ ,G ₁₂ ,G ₁₄ ,G ₁₆₊₁₇	135
6.1.3.4. Κατεργασία με ακετυλοϋδρολάση	139
6.1.3.5. Ήπια αλκαλική υδρόλυση – Ακετυλίωση	139
6.1.3.6. Φάσμα MS – Διαλεύκανση δομής.....	140
6.1.3.7. Σύνοψη αποτελεσμάτων των γλυκολιποειδών του <i>Scytonema julianum</i>	152
6.1.4. Ουδέτερα λιποειδή (NL).....	154
6.1.4.1. Διαχωρισμός ουδετέρων λιποειδών με HPLC	154
6.6.2.Βιολογική δοκιμασία των ουδετέρων λιποειδών	154
6.1.4.3. Φάσμα UV των κλασμάτων NL ₉ , NL ₁₀ , NL ₂₂ , NL ₂₇ , NL ₃₂ , NL ₃₃ , NL _{38α} , NL ₄₆	159
6.1.4.4. Ήπια αλκαλική υδρόλυση–ακετυλίωση.....	164
6.2. <i>Chroococcidiopsis</i> sp.	165
6.2.1. Φωσφολιποειδή (PL).....	170
6.2.1.1. Διαχωρισμός PL με HPLC	170
6.2.1.2. Βιολογική δραστικότητα των κλασμάτων των πολικών λιποειδών της SCX	171
6.2.1.3. Ποιοτικός προσδιορισμός φωσφόρου και μονοσακχαριτών	175

6.2.1.4. Φάσμα UV και προσδιορισμός φωσφόρου των κλασμάτων PL.....	176
6.2.1.5. Σύνοψη αποτελεσμάτων των φωσφολιποειδών του <i>Chroococcidiopsis</i> sp.	178
6.2.2. Γλυκολιποειδή (GL)	179
6.2.2.1. Διαχωρισμός GL με HPLC	179
6.2.2.2. Βιολογική δοκιμασία των γλυκολιποειδών.....	179
6.2.2.3. Πειράματα με ακετυλοϋδρολάση	185
6.2.2.4. Ήπια αλκαλική υδρόλυση-Ακετυλίωση.....	185
6.2.2.5. Φάσματα MS – Διαλεύκανση δομής	185
6.2.2.6. Σύνοψη-συζήτηση αποτελεσμάτων των γλυκολιποειδών του <i>Chroococcidiopsis</i> sp.....	195
6.2.3. Ουδέτερα λιποειδή (NL)	197
6.2.3.1. Διαχωρισμός ουδετέρων λιποειδών με HPLC	197
6.2.3.2. Βιολογική δοκιμασία των ουδετέρων λιποειδών	197
6.2.3.3. Φάσματα UV των κλασμάτων.....	202
6.2.3.4. Ήπια αλκαλική υδρόλυση και ακετυλίωση των κλασμάτων NL ₂ , NL ₂₇ , και NL ₃₁	206
6.2.3.5. Πειράματα με ακετυλοϋδρολάση στα κλάσματα NL ₂ και NL ₂₇	207
6.2.3.6. Σύνοψη των αποτελεσμάτων των ουδετέρων λιποειδών του <i>Chroococcidiopsis</i> sp.....	207
6.3. Έλεγχος ευαισθησίας των καλλιιεργειών και των λιποειδών τους, των κυανοβακτηρίων <i>Scytonema julianum</i> και <i>Croococcidiopsis</i> sp.....	209
6.3.1. Έλεγχος ευαισθησίας των κυανοβακτηρίων <i>Scytonema julianum</i> και <i>Croococcidiopsis</i> sp. στα λιποειδή τους, στον PAF και το BN52021.	209
6.3.2. Έλεγχος ευαισθησίας των κυανοβακτηρίων <i>Scytonema julianum</i> και <i>Chroococcidiopsis</i> sp. σε διάφορα αντιβιοτικά.	209
6.3.3. Έλεγχος ευαισθησίας των Βακτηρίων <i>Staphylococcus aureus</i> και <i>Escherichia coli</i> , σε εναιώρημα καλλιέργειας των κυανοβακτηρίων <i>Scytonema julianum</i> και <i>Chroococcidiopsis</i> sp.	210

6.3.4. Έλεγχος ευαισθησίας των Βακτηρίων <i>Staphylococcus aureus</i> και <i>Escherichia coli</i> , στα λιποειδή των κυανοβακτηρίων <i>Scytonema julianum</i> και <i>Chroococcidiopsis</i> sp.....	211
ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	213
SUMMARY.....	215
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	217

ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Τα σπήλαια λόγω της γεωλογικής τους διαμόρφωσης και των ιδιαίτερων κλιματολογικών συνθηκών που επικρατούν σε αυτά, αποτελούν ιδιόμορφα οικοσυστήματα με ποικιλομορφία βιοτόπων, όπου αναπτύσσεται εγγενής και επιγενής μικροχλωρίδα.

Τα σπήλαια είναι κλειστά οικοσυστήματα, αφού δεν επικοινωνούν άμεσα με το εξωτερικό περιβάλλον (Cubbon, B.D. 1976), είναι σκοτεινοί χώροι και μέσα σ'αυτά δεν ζουν φυτά.

Συναντάμε όμως συχνά βλάστηση κοντά στις εισόδους των σπηλαίων αλλά και σε μεγάλη απόσταση από αυτές, όταν το σπήλαιο έχει άνοιγμα στην οροφή ή φωτίζεται τεχνητά. Παρατηρούμε τότε ότι γύρω από τα φωτιστικά σώματα αναπτύσσονται ορισμένα φυτά, που τα ευνοούν οι κλιματολογικές συνθήκες (φως, θερμοκρασία, υγρασία).

Η χημική και μηχανική αποσάθρωση των ασβεστόλιθων από το νερό οδηγεί στο σχηματισμό καρστικών σπηλαίων.

Στα σπήλαια συναντάμε σχηματισμούς, που είναι γνωστοί ως σταλακτίτες και σταλαγμίτες. Σχηματίζονται με τον εξής μηχανισμό. Το νερό της βροχής εμπλουτισμένο με διοξείδιο του άνθρακα, διαλύει το ανθρακικό ασβέστιο ενός ασβεστολιθικού στρώματος και δημιουργείται δισόξινο ανθρακικό ασβέστιο σύμφωνα με την αντίδραση:



Το εμπλουτισμένο σε δισόξινο ανθρακικό ασβέστιο νερό, περνάει μέσα από τις ρωγμές του ασβεστολιθικού πετρώματος και φτάνει στην οροφή του σπηλαίου. Εκεί εναποτίθεται εκ νέου το ανθρακικό ασβέστιο, είτε επειδή διαφεύγει το διοξείδιο του άνθρακα μέσα από το νερό (λόγω αύξησης της θερμοκρασίας ή μείωσης της πίεσης), είτε λόγω μείωσης του νερού εξαιτίας της εξάτμισης. Και οι δύο αυτές διαδικασίες, δηλαδή η διαφυγή διοξειδίου του άνθρακα και η εξάτμιση του νερού, ωθούν την παραπάνω χημική αντίδραση και προς την αντίθετη κατεύθυνση.



Έτσι σχηματίζονται οι σταλακτίτες και οι σταλαγμίτες υπό την επίδραση συγκεκριμένων βιολογικών διαδικασιών (Coute, A. 1985).

Οι σχηματισμοί του ανθρακικού ασβεστίου μπορούν να αποσαθρωθούν με επίδραση αερίων όπως το υδροθείο, το διοξείδιο του άνθρακα και η αμμωνία, αλλά και από θειικά και φωσφορικά διαλύματα. Τα παραπάνω αέρια και διαλύματα μπορεί να είναι προϊόντα του βιολογικού κύκλου. Επιπλέον καθετί που εμποδίζει τη διαφυγή του διοξειδίου του άνθρακα ή προκαλεί κορεσμό της ατμόσφαιρας του σπηλαίου σε διοξείδιο του άνθρακα, αναστέλλει την ανάπτυξη του λιθωματικού διακόσμου. Η παρουσία του διοξειδίου του άνθρακα μέσα στο σπήλαιο ρυθμίζεται κύρια από τον βιολογικό κύκλο. Έτσι λοιπόν η διατήρηση και η ανάπτυξη των σχηματισμών του ανθρακικού ασβεστίου επηρεάζεται από τον βιολογικό κύκλο των σπηλαιοβίων οργανισμών. Με την έννοια σπηλαιοχλωρίδα ή σπηλαιοβλάστηση ονομάζουμε το σύνολο των φυτών που συναντώνται στα σπήλαια.

Ξεχωριστή κατηγορία είναι η «χλωρίδα των λυχνιών», η οποία αποτελεί ιδιαίτερη μορφή βλάστησης που αναπτύχθηκε σε αξιοποιημένα τουριστικά σπήλαια, με την εγκατάσταση του τεχνητού φωτισμού. Η χλωρίδα αυτή, η οποία είναι γνωστή και ως πράσινο φύκος, περιλαμβάνει το σύνολο των αυτότροφων φυτών, που αναπτύσσονται στην περιοχή των τεχνητών πηγών φωτός, τόσο στα φυσικά όσο και στα τεχνητά σπήλαια (Αναγνωστίδης, Κ. κ.α. 1981-82).

Οι κύριες αιτίες εμφάνισης του πράσινου φύκους στα σπήλαια είναι ο φωτισμός, η αύξηση της θερμοκρασίας, η αύξηση του διοξειδίου του άνθρακα, η δημιουργία ρευμάτων αέρα από τεχνητές εισόδους, η μεταφορά μικροοργανισμών, κυρίως μυκήτων από τους επισκέπτες του σπηλαίου και η υψηλή υγρασία στην επιφάνεια του λιθωματικού διακόσμου. Οι σταλακτιτικοί και σταλαγμιτικοί σχηματισμοί, οι οποίοι ήταν λευκοί και λείοι, όταν ανακαλύφθηκε το σπήλαιο, έχουν αποκτήσει χρώμα υπότεφρο και υφή σπογγώδη. Χωρίς αμφιβολία η γενεσιουργός αιτία της ανάπτυξης των χλωροφυλλούχων οργανισμών είναι το φως, που προέρχεται από τον τεχνητό φωτισμό του σπηλαίου.

Η χλωρίδα αυτή διακρίνεται σε εγγενή και επιγενή, αποτελείται δε από φωτοαυτότροφα, φωτοσυνθέτοντα κυανοφύκη και βρυόφυτα, τα οποία οφείλουν το πράσινο χρώμα τους στις χλωροφύλλες a και b, καθώς και σε ορισμένες δευτερεύουσες χρωστικές, όπως καροτίνη και ξανθοφύλλες. Τα κυανοφύκη φέρουν επιπλέον και τη χρωμοπρωτεΐνη φυκοκυανίνη (Ηλιοπούλου-Γεωργουδάκη, Ιωάννα κ.α. 1992-93).

1.1 Βασικά χαρακτηριστικά των φυκών

Ως φύκη ορίζονται οι φυτικοί οργανισμοί που δεν έχουν ρίζες, βλαστούς και φύλλα, έχουν ως κύρια φωτοσυνθετική χρωστική χλωροφύλλη *a* και τα αναπαραγωγικά τους κύτταρα δεν περιβάλλονται από άγονα επικαλυπτικά κύτταρα.

Στα φύκη απαντώνται δύο κύριοι τύποι κυττάρων. Αφ'ενός μεν το **προκαρυωτικό** κύτταρο που χαρακτηρίζει τα Cyanophyta (κυανοφύκη) και τα Prochlorophyta (προχλωρόφυτα), αφ'ετέρου δε το **ευκαρυωτικό** κύτταρο που απαντάται σε όλα τα υπόλοιπα φύκη. Τα προκαρυωτικά κύτταρα στερούνται οργανιδίων που περιβάλλονται από μεμβράνες και κατά την αναπαραγωγή τους δεν ανταλλάσσουν γενετικό υλικό (αγενής αναπαραγωγή). Πλαστίδια, μιτοχόνδρια, ενδοπλασματικό δίκτυο, πυρήνας, συσκευή Golgi και μαστίγια απουσιάζουν. Το κυτόπλασμα περιβάλλεται από πλασματική μεμβράνη (πλασμολήμμα) και στην περιφέρειά του, βρίσκονται τα θυλακοειδή. Κύρια φωτοσυνθετική χρωστική είναι η χλωροφύλλη *a*.

Αντίθετα, το ευκαρυωτικό κύτταρο παρουσιάζει περισσότερο σύνθετη δομή, φέρει οργανίδια που περιβάλλονται από μεμβράνες και αναπαράγεται και φυλετικά. Ο πυρήνας περιέχει πυρηνίσκους και διάχυτο υλικό, την πυρηνολέμφο και περιβάλλεται από μεμβράνη, που φέρει πόρους.

Στους προκαρυωτικούς οργανισμούς (prokaryota) ανήκουν τα βακτήρια, τα κυανοφύκη, που είναι επίσης γνωστά και ως κυανοβακτήρια και τα προχλωρόφυτα. Όλοι οι άλλοι ζωντανοί οργανισμοί είναι ευκαρυωτικοί (Eukaryota).

Η σύγκριση των νουκλεοτιδίων των ριβοσωμικών RNA (rRNAs) πολλών προκαρυωτικών και ευκαρυωτικών οργανισμών, έδειξε την παρουσία τριών μεγάλων ομάδων (βασίλεια) οργανισμών.

Δύο προκαρυωτικών, τα **Archaeobacteria** και τα **Eubacteria** καθώς και ένα ευκαρυωτικών το βασίλειο των **Eukaryota**.

Οι τρεις αυτές ομάδες οργανισμών παρουσιάζουν συνοχή στο εσωτερικό τους, αλλά πολύ μακρινή σχέση μεταξύ τους.

Τα περισσότερα φύκη ζουν σε υδάτινα οικοσυστήματα (λίμνες, ποτάμια, θάλασσα κ.α.) μερικά όμως αναπτύσσονται σχεδόν αποκλειστικά, σε χερσαία περιβάλλοντα, όπου εκτός από το έδαφος και τους βράχους αναπτύσσονται ακόμη και σε αφιλόξενους βιότοπους (ψυχροί καιθερμοί, έρημοι,θερμοπηγές, αλυκές κ.α.).

Στο υδρόβιο περιβάλλον τα φύκη αναπτύσσονται ως βένθος, περίφυτο ή πλαγκτόν.

Όταν αναπτύσσονται πάνω ή μέσα σε πέτρες ή γενικά σε βραχώδη υποστρώματα χαρακτηρίζονται ως **λιθόβιοι** και διακρίνονται σε **επιλιθικούς** και **ενδολιθικούς**.

Οι **ενδολιθικοί** με κριτήριο τη θέση που έχουν μέσα στο υπόστρωμα, χωρίζονται σε **χασμοενδολιθικούς**, **κρυπτοενδολιθικούς** και **ευενδολιθικούς**.

Οι τελευταίοι χαρακτηρίζονται από ενεργητική διείδυση, με χημικές διεργασίες, σε ευδιάλυτα πετρώματα, όπου σχηματίζουν σήραγγες και κοιλότητες στο εσωτερικό τους (Δανιηλίδης, Δ. κ.α. 1998-99).

1.2 Καταγραφές απολιθωμένων φυκών

Τα κυανοφύκη είναι η αρχαιότερη ομάδα φυκών με απολιθωμένα υπολείμματα στη μορφή των στρωματολίθων.

Όταν τα κυανοφύκη εξελίχτηκαν, η ατμόσφαιρα περιείχε ελάχιστο ή καθόλου οξυγόνο και αποτελείτο κυρίως από μεθάνιο (CH_4) και αμμωνία (NH_3). Λόγω της φωτοσύνθεσης όμως, η ατμόσφαιρα εμπλουτίστηκε με οξυγόνο και έτσι τα φύκη εξελίχτηκαν σε **ευκαρυωτικά**. Από τα απολιθώματα δεν είναι γνωστός ο χρόνος εξέλιξης των φυκών. Είναι γνωστό όμως, ότι ευκαρυωτικά φύκη υπήρχαν περίπου πριν 700 ή 800 εκατομμύρια χρόνια (Δανιηλίδης, Δ. κ.α. 1998-99).

1.3 Προκαρυωτικά φύκη

Τα προκαρυωτικά φύκη περιλαμβάνουν τα κυανοφύκη και τα προχλωρόφυτα με τα εξής γενικά χαρακτηριστικά. Η πλασματική μεμβράνη (πλασμαλήμμα) περιβάλλει το πρωτόπλασμα, στο οποίο υπάρχουν τα φωτοσυνθετικά θυλακοειδή, 70S ριβοσώματα, και νήματα DNA που δεν περικλείονται από μεμβράνη. Η χλωροφύλλη *a* είναι η κύρια φωτοσυνθετική χρωστική και κατά τη φωτοσύνθεση παράγεται οξυγόνο (Δανιηλίδης, Δ. κ.α. 1998-99).

1.4 Αθροισμα : CYANOPHYTA (CYANOBACTERIA)

Κλάση : Cyanophyceae

Τα **Cyanophyta (Cyanobacteria)** είναι προκαρυωτικοί οργανισμοί, ανήκουν στο βασίλειο των **Eubacteria** και μαζί με τα **Archaeobacteria** συγκροτούν τα **Prokaryota**. Τα κύτταρα των προκαρυωτικών οργανισμών δεν έχουν πυρήνα, συσκευή Golgi, μιτοχόνδρια, ενδοπλασματικό δίκτυο και πλαστίδια. Το γενετικό υλικό (DNA) βρίσκεται ελεύθερο στην κεντρική περιοχή του κυτοπλάσματος και δεν περιβάλλεται από μεμβράνη. Στους φωτοσυνθετικούς προκαρυωτικούς οργανισμούς, όπως είναι τα κυανοφύκη, τα θυλακοειδή

βρίσκονται ελεύθερα στο κυτόπλασμα και όχι σε χλωροπλάστες. Τα κυανοφύκη έχουν μία μόνο κλάση την **Cyanophyceae**.

Τα κυανοφύκη λέγονται και **κυανοβακτήρια (Cyanobacteria)** (Δανιηλίδης, Δ. κ.α. 1998-99).

1.4.1 Κύρια χαρακτηριστικά των Cyanophyceae

Όλα σχεδόν τα κυανοφύκη είναι φωτοαυτότροφοι προκαρυωτικοί οργανισμοί με ικανότητα φωτοσύνθεσης. Χρησιμοποιούν ως πηγή ενέργειας το φως και ως πηγή άνθρακα το διοξείδιο του άνθρακα, μετατρέποντας τον ανόργανο άνθρακα σε οργανικό, ενώ ως δότη ηλεκτρονίων χρησιμοποιούν το νερό. Βασικός τρόπος θρέψης είναι η αυτοτροφία, αν και υπάρχουν περιπτώσεις φωτοετεροτροφίας σε χαμηλό φως και σπάνιες περιπτώσεις ετεροτροφίας στο σκοτάδι. Το φως λοιπόν καθορίζει την ανάπτυξή τους. Αναπτύσσονται καλύτερα σε υγρούς και θερμούς βιότοπους, αλλά έχουν ικανότητα επιβίωσης και σε ξηρές περιοχές με υψηλές θερμοκρασίες.

Τα ευρύοικα κυανοφύκη είναι ευαίσθητα στο pH. Προτιμούν το ουδέτερο ή αλκαλικό περιβάλλον τόσο σε υδρόβιους όσο και σε χερσαίους βιότοπους και δεν τους βρίσκουμε σχεδόν καθόλου σε βιότοπους με pH <4.

Είναι μονοκύτταροι, αποικιακοί ή νηματοειδής μικροοργανισμοί. Τα κύτταρά τους δεν φέρουν πλαστίδια (χλωροπλάστες), φωτοσυνθέτουν όμως μέσω χρωστικών όπως η χλωροφύλη *a*, που βρίσκεται στα θυλακοειδή (Δανιηλίδης, Δ. κ.α. 1998-99).

Μεταξύ των κυανοφυκών υπάρχουν μονοκύτταρες, αποικιακές και νηματοειδείς μορφές. Σε κανένα στάδιο του βιολογικού τους κύκλου δεν παρατηρούνται μαστιγοφόρα κύτταρα.

Το κύτταρο των κυανοφυκών είναι προκαρυωτικής δομής.

Οι φωτοσυνθετικές χρωστικές βρίσκονται στα θυλακοειδή, που είναι ελεύθερα στο κυτόπλασμα και όχι σε χλωροπλάστες.

Τα θυλακοειδή περιέχουν χλωροφύλλη *a*, ενώ δεν έχουν χλωροφύλλες *b* και *c*. Περιέχουν επίσης τα κύτταρα των κυανοφυκών τις κυανές συμπληρωματικές χρωστικές, φυκοκυανίνη, στην οποία οφείλουν το χαρακτηριστικό τους χρώμα, την αλλοφυκοκυανίνη και τη ρόδινη φυκοερυθρίνη. Η χημική σύνθεση αυτών των χρωστικών είναι παρόμοια και είναι γνωστές ως φυκοβιλιπρωτεΐνες, ενώ το τμήμα του μορίου που είναι υπεύθυνο για την εμφάνιση του χρώματος, είναι γνωστό ως φυκοβιλίνη.

Τα κύτταρα των κυανοφυκών είναι κυανοπράσινα έως ιώδη και μερικές φορές ρόδινα ή πράσινα.

Τα κύτταρα των κυανοφυκών έχουν ως αποθήκη πολυσακχαριτών το άμυλο των κυανοφυκών, που σχηματίζεται σε λεπτά κοκκία μεταξύ των θυλακοειδών.

Το δομικό υλικό του κυττάρου αποτελείται από μуреΐνη (πεπτιδογλυκάνη), εξωτερικά του οποίου υπάρχει ένα στρώμα από πολυσακχαρίτη. Τα κύτταρα συχνά περιβάλλονται από υγροσκοπική, βλεννώδη θήκη από πολυσακχαρίτη.

Τα κυανοφύκη αναπαράγονται μόνο αγενώς και αναπτύσσονται σε όλα τα περιβάλλοντα (θάλασσα, γλυκά νερά, χέρσο).

Η κλάση των κυανοφυκών περιλαμβάνει 150 περίπου γένη με 2000 είδη που βρίσκονται σε γλυκά νερά, θάλασσα, σε υγρό έδαφος, πέτρες καθώς και σε αφιλόξενα περιβάλλοντα όπως θερμοπηγές, παγετώνες, ερήμους κ.α.

Τα χερσαία κυανοφύκη ζουν σε υγρό έδαφος, υγρούς βράχους, πέτρες και κορμούς δέντρων. Ορισμένα κυανοφύκη, όπως είδη *Gloeocapsa* και *Scytonema* σχηματίζουν σε ασβεστολιθικούς βράχους μελανές κατακόρυφες ταινίες, που ακολουθούν τη ροή του νερού (Δανιηλίδης, Δ. κ.α. 1998-99).

1.4.2 Συστηματική κατάταξη των κυανοφυκών (κυανοβακτηρίων)

Το άθροισμα των κυανοφυκών έχει μόνο μία κλάση την **Cyanophyceae**.

Στο ταξινομικό σύστημα που καθιέρωσαν οι Anagnostidis και Komarek σε σειρά εργασιών, αξιολόγησαν τα διαθέσιμα γνωρίσματα και δεδομένα που υπήρχαν για τα κυανοφύκη.

Τα γνωρίσματα αυτά αφορούν στη λεπτή δομή του κυττάρου, τα διάφορα έγκλειστα, τον υβριδισμό του DNA-DNA, τα πλασμίδια, την αναλογία των φωτοσυνθετικών χρωστικών, την παρουσία δευτερογενών χημικών συστατικών, την ηλεκτροφορητική συμπεριφορά κ.α. [Anagnostidis, K. & Komarek (1985), Anagnostidis, K. & Komarek (1988), Anagnostidis, K. & Komarek (1989), Anagnostidis, K. & Komarek (1990)].

Σύμφωνα με αυτό το σύστημα η κλάση των κυανοφυκών υποδιαιρείται σε τέσσερις τάξεις.

1. Chroococcales

2. Oscillatoriales

3. Nostocales

4. Stigonematales

Τάξη Chroococcales

Η τάξη αυτή περιλαμβάνει μονοκύτταρα και αποικιακά κυανοφύκη. Σχηματίζουν αποικίες σφαιρικές, επίπεδες, κυβόμορφες ή ακανόνιστης μορφής και σπάνια ψευδοπαρέγχυμα. Στην τάξη αυτή ανήκουν και όσα κυανοφύκη σχηματίζουν ψευδονήματα. Δεν παρατηρούνται τριχώματα, ετεροκύτταρα και έμμονα κύτταρα. Αναπαράγονται με απλή κυτταρική διαίρεση και δυαδική ή πολλαπλή σχάση. Αντιπροσωπευτικά γένη είναι τα εξής: ***Cyanothece, Chroococcus, Aphanothece, Gloeocapsa, Microcystis, Pleurocarsa, Chroococcidiopsis κ.α.***

Τάξη Oscillatoriales

Η τάξη αυτή έχει χαρακτηριστικό τα κινητά ή ακίνητα τριχώματα, που προέρχονται από διαδοχικές εγκάρσιες κυτταρικές διαιρέσεις. Ορισμένα γένη φέρουν ατομικό ή κοινό κολεό. Η παρουσία ψευδών διακλαδώσεων και αεροτοπίων είναι προαιρετική. Δεν παρατηρούνται ετεροκύτταρα και έμμονα κύτταρα καθώς και γνήσια διακλάδωση. Η αναπαραγωγή γίνεται με ορμογόνια (κινητά) ή ορμοκύτταρα (ακίνητα τμήματα τριχωμάτων).

Αντιπροσωπευτικά γένη είναι: ***Oscillatoria, Lyngbya, Planktothrix, Microcoleus.***

Τάξη Nostocales

Η τάξη αυτή περιλαμβάνει αποκλειστικά νηματοιδή κυανοφύκη με ετεροκύτταρα και ψευδείς διακλαδώσεις. Τα τριχώματα είναι ομοιοπολικά ή ετεροπολικά, υποχρεωτικά μονόσειρα και τα κύτταρα διαιρούνται πάντοτε κάθετα προς τον επιμήκη άξονα του κυττάρου. Η αναπαραγωγή γίνεται με ορμογόνια, ορμοκύτταρα και έμμονα κύτταρα.

Αντιπροσωπευτικά γένη είναι: ***Nostoc, Aphanizomenon, Scytonema, Anabaena, Rivularia.***

Τάξη Stigonematales

Στη τάξη αυτή τα νήματα των κυανοφυκών είναι μονόσειρα ή πολύσειρα, έχουν γνήσια διακλάδωση και ετεροκύτταρα. Η αναπαραγωγή γίνεται με ορμογόνια, ορμοκύστες (εγκυστωμένα ορμογόνια) και έμμονα κύτταρα.

Αντιπροσωπευτικά γένη είναι: ***Stigonema, Mastigocoleus testarum*** (Δαβιηλίδης, Δ. κ.α. 1998-99).

1.5 Χώροι συλλογής πειραματικού υλικού

1.5.1 Σπήλαιο «Κουτούκι»

Ο χώρος από τον οποίο συλλέχτηκε το ένα από τα δύο κυανοβακτήρια (*Scytonema julianum*), το οποίο χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα εργασία, είναι το σπήλαιο «Κουτούκι», το οποίο βρίσκεται στις ανατολικές παρυφές του κυρίως ορεινού όγκου του Υμηττού, σε υψόμετρο 510 μέτρων και υπάγεται στο Δήμο Παιανίας.

Χαρτογραφήθηκε το 1954 από τον Γιάννη και την Άννα Πετροχείλου της Ελληνικής Σπηλαιολογικής Εταιρείας.

Το σπήλαιο εντάσσεται στο υπόγειο καρστικό σύστημα του Υμηττού. Η δημιουργία του οφείλεται στην υψηλή διαλυτότητα των ασβεστολίθων στο νερό της βροχής. Είναι σπηλαιοβάραθρο με κατακόρυφο βάθος 38,5 μέτρα και μήκος διαδρομής 350 μέτρα περίπου. Η θερμοκρασία στο εσωτερικό του είναι 17°C, το δε ποσοστό υγρασίας στο εσωτερικό του είναι πολύ υψηλό φτάνοντας τους χειμερινούς μήνες στο 99%.

Η επίσκεψη σ' αυτό γίνεται από τεχνητή είσοδο, που διανοίχτηκε στα πλαίσια της τουριστικής του αξιοποίησης (ΤΑ ΕΛΛΗΝΙΚΑ ΣΠΗΛΑΙΑ, ΑΘΗΝΑ 2000).

Το σπήλαιο «Κουτούκι» Παιανίας λειτουργεί καθόλη τη διάρκεια του έτους, ενώ ο ακατάλληλος ξεπερασμένης τεχνολογίας φωτισμός του σε συνδυασμό με τον μεγάλο αριθμό επισκεπτών δημιουργούν ευνοϊκές συνθήκες για τον ποιοτικό και ποσοτικό εμπλουτισμό της χλωρίδας. Η βλάστηση που αναπτύχθηκε κάλυψε σε μεγάλη έκταση τους σταλαγμίτες, τους σταλακτίτες, το δάπεδο και τα τοιχώματα των φωτιζόμενων περιοχών του σπηλαίου (επιλιθική χλωρίδα), σε ορισμένες δε περιπτώσεις επεκτάθηκε και στις εσωτερικές κοιλότητες του λιθωματικού διακόσμου (ενδολιθική χλωρίδα) (Οικονόμου Αλ., 2003).

Η μικροσκοπική παρατήρηση της χλωρίδας του έδειξε, ότι αυτή αποτελείται κυρίως από κυανοφύκη, λίγα χλωροφύκη, βακτήρια, μύκητες, βρυόφυτα και μερικά διάτομα. Τα είδη των κυανοφυκών που συναντώνται στα τουριστικά αξιοποιημένα σπήλαια είναι ευρύοικα ή και κοσμοπολίτικα.

1.5.2 Σπήλαιο Νυμφολήπτου Βάρης Αττικής

Ο χώρος από τον οποίο συλλέχτηκε το δεύτερο κυανοβακτήριο (*Chroococcidiopsis* sp.), το οποίο όμως δεν χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα εργασία, διότι δεν κατέσται δυνατόν να απομονωθεί πλήρως και να δώσει αξενικές καλλιέργειες, βρίσκεται στο Σπήλαιο Νυμφολήπτου Βάρης Αττικής.

Το σπήλαιο, βρίσκεται στη νότια πλευρά του Υμηττού, κοντά στο χωριό Βάρη και είναι ένα μικρό βάραθρο.

Αποτελείται από ένα θάλαμο χωρισμένο σε δύο διαμερίσματα, με τοίχο που σχηματίστηκε από κολώνες. Ο Αρχέδημος από τη Σαντορίνη, ο οποίος εγκαταστάθηκε στο σπήλαιο τον 4^ο αιώνα π.χ., λάξευσε σκαλιά στο βράχο, ενώ σκάλισε πάνω σε σταλαγμίτη θεότητα καθισμένη σε θρόνο και πλάϊ της βωμό και ράφια για αναθήματα.

Στο σπήλαιο έχει αναπτυχθεί επιλυθική και ενδολιθική χλωρίδα εξαιτίας του φυσικού φωτισμού που φθάνει σε αυτό από την είσοδο.

Σε δείγματα που συλλέχθηκαν και μεταφέρθηκαν για μελέτη στο εργαστήριο βρέθηκαν να επικρατούν κυανοβακτήρια του γένους *Chroococcidiopsis*.

1.5.3 Αρχαίο θέατρο Διονύσου

Ο βιότοπος από τον οποίο συλλέχτηκε και απομονώθηκε το κυανοφύκος *Chroococcidiopsis* sp., το οποίο χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα εργασία, βρίσκεται στο αρχαίο θέατρο του Διονύσου στη νότια πλευρά της Ακρόπολης Αθηνών. Το θέατρο χτίστηκε τον 4^ο αιώνα π.Χ. από μάρμαρο και διατηρεί μέχρι σήμερα τα κύρια χαρακτηριστικά του γνωρίσματα, δηλαδή την ορχήστρα, το κοίλον και τη σκηνή. Ανάμεσα στις μαρμάρινες πλάκες έχει αναπτυχθεί ενδολιθική χλωρίδα, δείγματα της οποίας συλλέχθηκαν και μελετήθηκαν στο εργαστήριο.



Φωτογραφική αποτύπωση σημείου δειγματοληψίας από το λιθωματικό διάκοσμο του σπηλαίου «Κουτούκι» Παιανίας, στον οποίο έχει αναπτυχθεί πράσινο φύκος.

2. ΓΕΝΙΚΑ ΠΕΡΙ ΛΙΠΟΕΙΔΩΝ

Τα λιποειδή είναι ενώσεις που βρίσκονται στη φύση, με κύριο κοινό χαρακτηριστικό τη διαλυτότητά τους σε οργανικούς διαλύτες, ενώ στην πλειοψηφία τους είναι αδιάλυτα στο νερό. Τα περισσότερα από αυτά είναι παράγωγα λιπαρών οξέων.

Τα λιποειδή και οι πρωτεΐνες αποτελούν τα δύο κύρια συστατικά των βιολογικών μεμβρανών των κυττάρων (40% περίπου λιποειδή και 60% περίπου πρωτεΐνες). Ο ρόλος των μεμβρανών στο κύτταρο είναι πολύ σημαντικός, αφού είναι εκείνες που αφ' ενός μεν ξεχωρίζουν τα κύτταρα από το περιβάλλον, ενώ συγχρόνως επιτρέπουν την επικοινωνία με αυτό, αφ' ετέρου δε οι περισσότερες διεργασίες στο κύτταρο γίνονται μέσω των μεμβρανών.

Το χαρακτηριστικό των λιποειδών που συμμετέχουν στο σχηματισμό των μεμβρανών είναι ότι είναι πολικά (αμφίφιλα) και επομένως είναι διατεταγμένα σε διπλοστοιβάδες με τις υδρόφιλες ομάδες προς τα έξω και τις υδρόφοβες ομάδες προς τα μέσα. Οι πρωτεΐνες βρίσκονται στην εξωτερική ή στην εσωτερική επιφάνεια της μεμβράνης ή διαπερνούν τη μεμβράνη. Στο μοντέλο αυτό, του "ρευστού μωσαϊκού" όπως λέγεται, οι μεμβράνες δεν αποτελούν στατικούς σχηματισμούς αλλά δυναμικούς, οι δε πρωτεΐνες και τα λιποειδή βρίσκονται σε σχετική κίνηση (Singer and Nicolson, 1972).

Ο έλεγχος διαπερατότητας των διαφόρων ουσιών δια μέσου των κυτταρικών μεμβρανών γίνεται με τη βοήθεια πειραματικών σχηματισμών, με τη βοήθεια των λιποπρωτεϊνών, ενώ τα λιποειδή συμμετέχουν στην αποθήκευση και στη μεταφορά ενέργειας των κυττάρων.

2.1 Ταξινόμηση των λιποειδών

Τα λιποειδή κατατάσσονται σε δύο κατηγορίες, τα ουδέτερα (ή απλά λιποειδή) και τα πολικά (ή σύνθετα) λιποειδή.

2.1.1 Ουδέτερα λιποειδή

Εδώ ανήκουν τα λιποειδικά μόρια με καθόλου ή ελάχιστη πολικότητα.

Αναλυτικότερα συμπεριλαμβάνονται οι παρακάτω τάξεις:

Υδρογονάνθρακες

Περιλαμβάνονται κανονικοί κεκορεσμένοι του τύπου $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_n\text{CH}_3$ ($n=6-36$), μονοδιακλαδισμένης αλυσίδας του τύπου $(\text{CH}_3)_2\text{CH}(\text{CH}_2)_n\text{CH}_3$ ($n=4-32$), πολυδιακλαδισμένης αλυσίδας, όπως τα κεκορεσμένα ισοπρενοειδή π.χ. το φυτάνιο $\text{C}_{20}\text{H}_{42}$ και το σκουαλένιο $\text{C}_{30}\text{H}_{50}$. Ακόμα περιλαμβάνονται ακόρεστοι,

όπως τα ισοπρενοειδή πολυένια π.χ. το σκουαλένιο $C_{30}H_{50}$, καροτενοειδή π.χ. το φυτάνιο $C_{40}H_{64}$, το λυκοπένιο $C_{40}H_{56}$ και τα α- β- και γ- καροτένια $C_{40}H_{56}$.

Αλκοόλες

Βρίσκονται ελεύθερες, εστεροποιημένες ή αιθεροποιημένες. Μπορεί να είναι κανονικές κεκορεσμένες του τύπου $CH_3(CH_2)_nCH_2OH$ ($n=6-30$), μονοδιακλαδισμένες του τύπου $(CH_3)_2CH(CH_2)_nCH_2OH$ ($n=4-24$) ή πολυδιακλαδισμένες του τύπου $H[CH_2(CH_3)CHCH_2CH_2]_nOH$ ($n=2,3,4$), καθώς και ακόρεστες του τύπου $CH_3(CH_2)_xCH=CH(CH_2)_yCH_2OH$, που συνήθως είναι ανάλογες των λιπαρών οξέων. Στις αλκοόλες μπορούν να περιληφθούν και οι στερόλες που διακρίνονται σε ζωοστερόλες και φυτοστερόλες, με κυριότερους αντιπρόσωπους τη χοληστερόλη $C_{27}H_{46}O$, την εργοστερόλη $C_{28}H_{44}O$, τη στιγμαστερόλη $C_{29}H_{48}O$ και την β-σιτοστερόλη $C_{29}H_{44}O$, καθώς και μερικές βιταμίνες, όπως η A_1 (ρετινόλη) $C_{20}H_{30}O$, η A_2 (δεϋδρορετινόλη) $C_{20}H_{28}O$, η D_2 (εργοκαλσιφερόλη) $C_{28}H_{44}O$, η D_3 (χοληκαλσιφερόλη) $C_{27}H_{44}O$ και οι βιταμίνες E (α-, β-, γ- και δ-τοκοφερόλες).

Αλδεΐδες

Οι αλδεΐδες βρίσκονται ελεύθερες ή προκύπτουν από τα με βινυλαιθερικά ανάλογα των λιποειδών.

Μπορεί να είναι κανονικές κεκορεσμένες $CH_3(CH_2)_nCHO$ ($n=6-20$), ακόρεστες αλδεΐδες $CH_3(CH_2)_nCH=CH(CH_2)_kCHO$, κυκλοπροπανικές καθώς και ισοπρενοειδείς, όπως η γερανιάλη $C_{10}H_{16}O$, η νεράλη $C_{10}H_{18}O$, η σιτρονελλάλη $C_{10}H_{18}O$, η φαρνεσάλη $C_{15}H_{24}O$, οι οποίες βρίσκονται στα φυτά και στις φερορμόνες των εντόμων (Kates, M. 1972a).

Κετόνες και κινόνες

Οι κετόνες είναι πολύ διαδεδομένες στην φύση, κυρίως στην ελεύθερή τους μορφή. Μπορεί να είναι μεθυλοκετόνες του τύπου $CH_3(CH_2)_nCOCH_3$ ($n=5-20$), συμμετρικές κετόνες $[CH_3(CH_2)_n]_2CO$ ($n=3-20$), ακόρεστες συμμετρικές κετόνες, που βρίσκονται στα βακτήρια, όπως η Δ^7 -παλμιτενόνη $C_{31}H_{60}O$, ακόρεστες διακλαδισμένες, όπως η 4-μεθυλοεπτανόνη-3, που είναι φερορμόνες εντόμων και κυκλικές κετόνες, μερικές από τις οποίες δρουν σαν φερορμόνες, όπως η κυβετόνη, (1-κυκλοδεκαεπτανόνη-10), και η μυσκόνη (1-μεθυλο-κυκλο-δεκαεπτανόνη-3).

Στις κινόνες με ισοπρενοειδείς πλευρικές αλυσίδες ανήκουν η βιταμίνη K_1 ή φιλοκινόνη (K), η βιταμίνη K_2 ή μενακινόνη (MK), το συνένζυμο Q ή ουβικινόνη, και η πλαστοκινόνη (PQ).

Λιπαρά οξέα

Τα λιπαρά οξέα βρίσκονται ελεύθερα αλλά και εστεροποιημένα στους κηρούς,

τα γλυκερίδια, τα φωσφατίδια κ.λ.π. Εδώ ανήκουν κανονικά κεκορεσμένα οξέα του τύπου $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_n\text{COOH}$ ($n=4-30$) όπως το μυριστικό ($n=12$), το παλμιτικό ($n=16$), το στεατικό ($n=18$) και το αραχιδονικό ($n=18$). Τα κανονικά ακόρεστα οξέα με ένα διπλό δεσμό, του τύπου $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_x\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_y\text{COOH}$ είναι πολύ διαδεδομένα στους μικροοργανισμούς, τα φυτά και τα ζώα, όπως το ελαϊκό (cis-9-δεκαοκτενοϊκό οξύ) και το παλμιτελαϊκό οξύ (cis-9-δεκαεξενοϊκό οξύ) και με περισσότερους διπλούς δεσμούς, όπως το σορβικό (2,4-εξαδιενοϊκό οξύ) το λινελαϊκό (cis-cis-9,12-δεκαοκταδιενοϊκό οξύ), το α-λινολενικό (all-cis-9,12,15-δεκαοκτατριενοϊκό οξύ), το γ-λινολενικό (all-cis-6,9,12-δεκαοκτα-τριενοϊκό οξύ) και το αραχιδονικό οξύ (all-cis-5,8,11,14-εικοσιτετραενοϊκό οξύ) (Hopkins, C.Y. et al. 1969).

Οξέα με ένα τριπλό δεσμό βρίσκονται στα φυτά, όπως το ταριρικό (6-δεκαοκτινοϊκό οξύ) το 8-δεκαοκτινοϊκό οξύ και το στεαριλικό οξύ (9-δεκαοκτινοϊκό οξύ).

Τα α-υδροξυ οξέα του τύπου $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_n\text{CH}(\text{OH})\text{COOH}$ ($n=7-21$ περιπτώσεις) βρίσκονται στους κερεβροζίτες, τα β-υδροξυ-οξέα του τύπου $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_n\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2\text{COOH}$ ($n=6-14$ άρτιος) βρίσκονται στους λιποπολυσακχαρίτες. Από τα κετο-οξέα τα πλέον συνηθισμένα είναι αυτά με 10-23 άτομα C και από τα δικαρβοξυλικά οξέα τα πιο διαδεδομένα είναι αυτά με 6-16 άτομα C.

Στα οξέα μπορούν να αναφερθούν και οι προσταγλανδίνες που περιλαμβάνουν τα ακόρεστα υδροξυ- ή κέτο-υδροξυ παράγωγα του μητρικού C_{20} -κυκλο-πεντανικού οξέος, του προστανοϊκού, όπως οι προσταγλανδίνες PGE_1 , PGF_{1a} , PGE_2 , PGE_3 κ.λ.π. (Ramwell, P.W. and Daniels, E.G. 1969).

Κηροί

Οι κηροί είναι εστέρες ανώτερων αλκοολών με ανώτερα λιπαρά οξέα, που βρίσκονται στην επιφάνεια του δέρματος των ζώων και στην επιδερμίδα των φύλλων. Χωρίζονται σε απλούς του τύπου $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_x\text{COOCH}_2(\text{CH}_2)_y\text{CH}_3$ (x και $y=8-18$) και σε σύμπλοκους, τα κηρίδια, που είναι διεστέρες των φθιοκερολών με μυκοκεροσικά οξέα, που βρέθηκαν στο βακτήριο *Mycobacterium tuberculosis* (Kates, M. 1972a).

Γλυκερίδια

Τα γλυκερίδια είναι εστέρες της γλυκερόλης (γλυκερίνης) με λιπαρά οξέα. Εδώ ανήκουν τα μονογλυκερίδια, τα διγλυκερίδια και τα τριγλυκερίδια. Τα δύο α-άτομα άνθρακα της γλυκερίνης είναι διακριτά, οπότε τα δύο υδροξύλια δεν είναι ισότιμα.

Τα φυτικής προέλευσης τριγλυκερίδια στις θέσεις 1 και 3 της γλυκερίνης περιέχουν κορεσμένα και ακόρεστα λιπαρά οξέα και στη θέση 2 κυρίως

ακόρεστα. Τα τριγλυκερίδια ζωικής προέλευσης έχουν στη θέση 1 της γλυκερίνης κορεσμένο λιπαρό οξύ, στη θέση 2 της μικρής αλυσίδας ακόρεστο λιπαρό οξύ και στη θέση 3 ανώτερο λιπαρό οξύ.

Γλυκεριναιθέρες

Οι γλυκεριναιθέρες είναι ενώσεις της γλυκερόλης, οι οποίες έχουν στο μόριό τους έναν ή περισσότερους αιθερικούς δεσμούς και διακρίνονται σε δύο ομάδες. Τους αλκυλο-αιθέρες και τους αλκυλο-1-ενυλο-αιθέρες και απαντούν είτε σαν ελεύθεροι είτε σαν εστέρες.

Εστέρες στερολών και βιταμινών

Είναι εστέρες με κεκορεσμένα και ακόρεστα λιπαρά οξέα με 12-20 άτομα C π.χ. εστέρες χοληστερόλης, στιγμαστερόλης, β-σιτοστερόλης και βιταμινών A, D, και E.

2.1.2. Πολικά λιποειδή

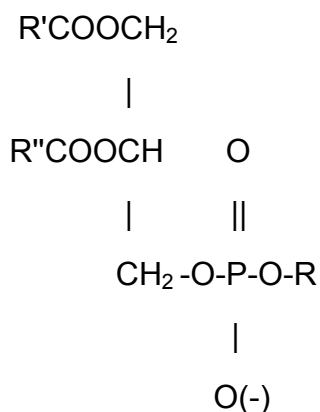
Τα πολικά λιποειδή εμφανίζουν πολικότητα και κατά συνέπεια διαλύονται σε πολικούς οργανικούς διαλύτες (π.χ. μεθανόλη).

Περιλαμβάνουν κυρίως τα φωσφολιποειδή και τα γλυκολιποειδή.

Φωσφολιποειδή

Διαιρούνται σε δύο κατηγορίες, τα γλυκερινούχα φωσφολιποειδή και τα σφιγγοσινούχα λιποειδή.

Τα γλυκερινούχα φωσφολιποειδή ανήκουν στον γενικό τύπο:



διακυλο-εστερική μορφή

Τα R' και R'' είναι κεκορεσμένες και ακόρεστες αλυσίδες.

Τα γλυκερινούχα φωσφολιποειδή εκτός από την παραπάνω γενική μορφή, τη διακυλο-εστερική, συναντώνται και με τις παρακάτω διαφορετικές μορφές:

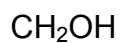


άκυλο-αλκυλο

μορφή (PE, PC)

ακυλο-αλκυλο-1-ενυλο

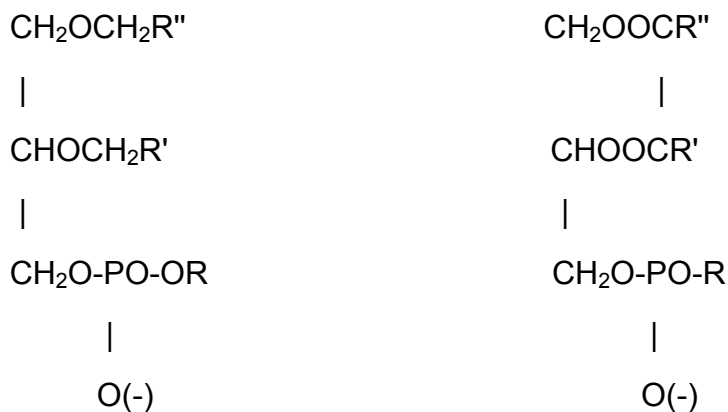
αιθερική μορφή (πλασμαλογόνα) (PS, PE, PC)



α' ισομερές

β' ισομερές

ακυλο μορφές (λυσο- μορφές) (PS, PE, PC)

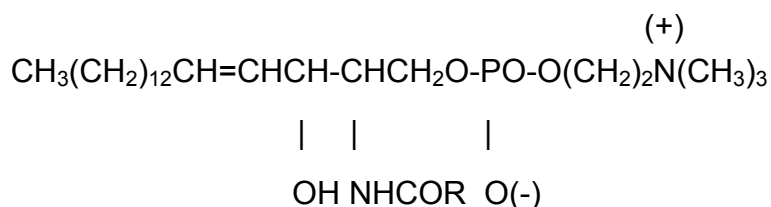


διδιθερική μορφή (PG, PGP)

φωσφόνο μορφή (PE)

Τα R' και R'' είναι κεκορεσμένες και ακόρεστες αλυσίδες και το R είναι βάσεις αζώτου ή ρίζες πολυαλκοολών.

Η δεύτερη κατηγορία, τα σφιγγοσινούχα λιποειδή θεωρούνται παράγωγα της σφιγγοσίνης. Το συνηθέστερο λιποειδές στην κατηγορία αυτή είναι η σφιγγομυελίνη, που είναι ένας φωσφο-εστέρας χολίνης μιας N-αλκυλο-σφιγγοσίνης:



(N-ακυλο-trans-4-σφιγγενινο-1-φωσφορυλο-χολίνη)

Έχουν βρεθεί και φωσφο-ανάλογα σφιγγοσυλο-φωσφολιποειδών και της σφιγγομυελίνης (Κουτσάφτης, Δ.Κ. 1981).

Γλυκολιποειδή

Στην ομάδα αυτή ανήκουν παράγωγα σακχάρων με μακρά ανθρακική αλυσίδα και χωρίζονται σε:

- γλυκοσυλο-δι-γλυκερίδια, που αποτελούνται από μονο-, δι-, και τρι-σακχαρίτες γλυκοζιτικά ενωμένους με την υδροξυλική ομάδα ενός διγλυκεριδίου

- γλυκοζίτες υδροξυ- λιπαρών οξέων
- εστέρες λιπαρών οξέων με σάκχαρα
- παράγωγα σακχάρων φωσφολιποειδών
- φυτογλυκολιποειδή, τα οποία απαντώνται στα φυτά (Kates, M. 1972b) και είναι N-ακυλο-φυτοσφιγγοσυλο-φωσφορυλο-ινοσιτόλες ενωμένες γλυκοζιτικά με ένα σύμπλεγμα ολιγοσακχαριτών
- λιποπολυσακχαρίτες, που είναι μεγαλομοριακά συμπλέγματα πολυσακχαριτών με λιπαρή βάση
- γλυκοζίτες στερολών, που βρέθηκαν στα φυτά και είναι 3-O-β-γλυκοπυρανοσιδικά παράγωγα κυρίως χοληστερόλης, σιτοστερόλης και στιγμαστερόλης
- κερεβροζίτες (εξοζίδια κεραμιδίων), που είναι γλυκοζίτες μιας N-ακυλο-βάσης μακριάς αλυσίδας όπως το N-(α-υδροξυ)-ακυλο-φυτοσφιγγοσίνη-1-O-β-γλυκοπυρανοζίδιο, που βρέθηκε στα φυτά (Kates, M. 1972b)
- γαγγλιοζίτες, που περιέχουν νευραμινικό οξύ και N-ακετυλο-εξοζαμίνη, και βρίσκονται στον εγκέφαλο, στις μεμβράνες των ερυθροκυττάρων και στο γάλα (Δημόπουλος, Κ.Α. 1973)

Τα λιποειδή που περιέχουν θείο (σουλφολιποειδή) χωρίζονται σε:

- αλκυλο-1-θειικοί εστέρες
- θειικοί εστέρες γλυκολιποειδών
- θειικοί εστέρες κερεβροζιτών (σουλφατίδια)
- σουλφο-γλυκοσυλο-δι-γλυκερίδια (SQD)

Τέλος, τα λιποειδή που περιέχουν αμινοξέα διακρίνονται σε:

- N-ακυλο-αμινοξέα και εστερικά παράγωγα
- O-ακυλο-καρνιτίνες
- λιποπεπτίδια

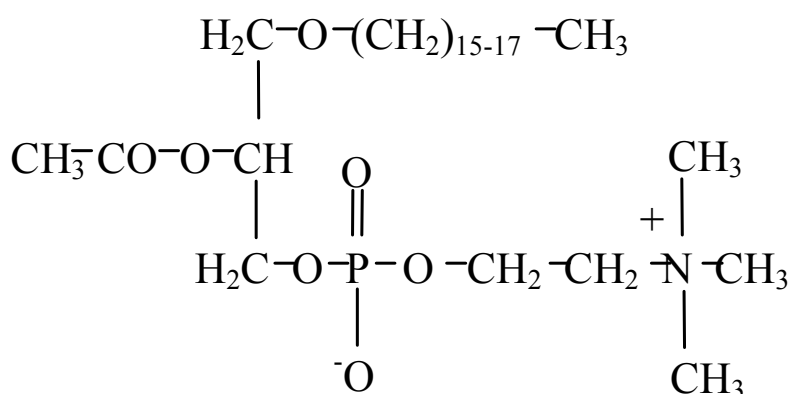
3. ΠΑΡΑΓΟΝΤΑΣ ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗΣ ΑΙΜΟΠΕΤΑΛΙΩΝ (PAF)

3.1 Γενικά

Το όνομα "Παράγοντας Ενεργοποίησης των Αιμοπεταλίων" (Platelet Activating Factor, PAF) δόθηκε από τους Benveniste, Henson και Cochrane (Benveniste, J. et al. 1972) σε μια ουσία που διαπιστώθηκε ότι ελευθερωνόταν από τα βασεόφιλα μετά από διέγερση με IgE, και η οποία προκαλούσε συσώρευση (ενεργοποιούσε) στα αιμοπετάλια. Η δομή της ουσίας αυτής παρέμεινε άγνωστη μέχρι το 1979.

Το 1979 (Demopoulos, C.A. et al. 1979) αποδείχθηκε η δομή του PAF και με ημισύνθεση παρασκευάστηκε η 1-Ο-αλκυλο-2-ακετυλο-σν-γλυκερο-3-φωσφοχολίνη (1-αλκυλο-2-ακετυλο-GPC), που είχε βιολογικές, χημικές και χρωματογραφικές ιδιότητες απόλυτα όμοιες με εκείνες του φυσικού PAF. Επίσης βρέθηκε (Benveniste, J. 1979) ότι και η 1-αλκυλο-2-ακετυλο-GPC που παρασκευάστηκε με διαφορετικό τρόπο (από το λυσο-γλυκεριναιθερικό ανάλογο της αιθανολαμίνης με μεθυλίωση της αμινομάδας και ακετυλίωση), είχε όμοιες βιολογικές ιδιότητες με του PAF που απομονώθηκε από λευκοκύτταρα χοίρου.

Ο προσδιορισμός της δομής του PAF έγινε το 1979 από τους Demopoulos, Plnckard και Hanahan (Demopoulos, C.A. et al. 1979), οι οποίοι τον συνέθεσαν και χημικά.



Σχήμα 3.1: Δομή του PAF

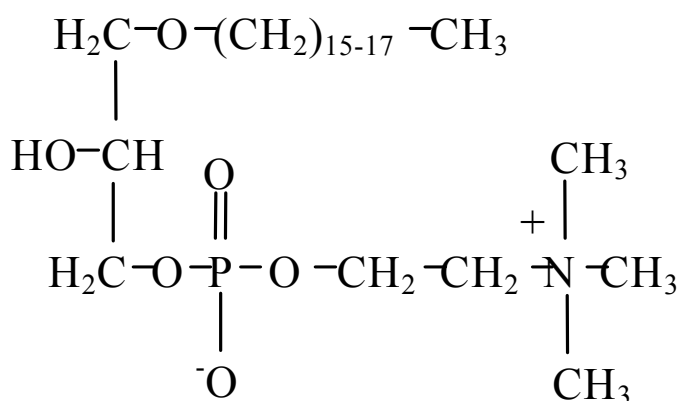
Στη συνέχεια το 1980 έγινε η ταυτοποίηση του φυσικού PAF σαν 1-αλκυλο-2-ακετυλο-GPC, αφού απομονώθηκε αρκετή ποσότητα PAF από βασεόφιλα

κουνελιού ύστερα από διέγερση με IgE, χρησιμοποιώντας αέρια χρωματογραφία (GLC) και φασματομετρία μάζας (MS).

Με τη χρήση φασματομετρίας μάζης αποδείχθηκε (Polonowsky, J. et al. 1980) ότι ο lyso-PAF που ελευθερωνόταν ταυτόχρονα με τον PAF από λευκοκύτταρα χοίρου ήταν ο 1-αλκυλο-2-λυσω-GPC, η ακετυλίωση του οποίου έδωσε προϊόν απόλυτα όμοιο με τον φυσικό PAF.

Σήμερα με τη χρήση της υγρής χρωματογραφίας με υψηλή πίεση (HPLC) γίνεται διαχωρισμός του PAF από παραπλήσιας δομής λιποειδή, αφού με τη μέθοδο αυτή μπορούν να διαχωρίζονται π.χ. τα αλκυλο- και ακυλο- ανάλογα μεταξύ τους (Tence, M. et al. 1980, Benveniste, J. et al. 1977, Blank, M.L. and Snyder, F.J.J. 1983, Chap, H. et al. 1981, Adnot, S. et al. 1986, Andrikopoulos, N.K. et al. 1986a), ή ακόμα να διαχωρίζεται ο PAF από το 1-αλκυλο-2-ακυλο-GPC (Chilton, F.H., et al. 1983a, Chilton, F.H. 1983b), που αποτελεί την πρόδρομη μορφή του PAF κατά το μεταβολισμό του.

Η ανακάλυψη της δομής του PAF έδωσε σημαντική ώθηση στην έρευνά του, με αποτέλεσμα μέχρι σήμερα να έχουν δημοσιευτεί πάνω από 9000 άρθρα, που αναφέρονται στη μελέτη του μεταβολισμού του, των μηχανισμών δράσης του και των παθοφυσιολογικών ρόλων, που αυτός παίζει στους διάφορους οργανισμούς και κυρίως στον άνθρωπο (Νομικός, Τ. κ.α. 1997).



Σχήμα 3.2: Δομή του lyso-PAF

Ο PAF αποτελεί την πρώτη ένωση που βρέθηκε σε θηλαστικά στη φύση, στην οποία παρατηρείται η ύπαρξη φωσφολιποειδών με οξικό οξύ εστεροποιημένο στη δεύτερη θέση του γλυκεριναιθερικού σκελετού. Ο παράγοντας ενεργοποίησης αιμοπεταλίων, Platelet-Activating Factor (PAF), που έχει χημικά χαρακτηριστεί σαν 1-O-αλκυλο-2-ακετυλο-sn-γλυκερο-3-φωσφοχολίνη (Demopoulos, C.A. et al. 1979) είναι ένας υψηλής

δραστικότητας βιολογικός μεσολαβητής στις φλεγμονές, αλλεργίες, ανοσοποιητικές διαταραχές (ανοσία) και ισχαιμικές ασθένειες (Koltai, M. et al. 1991). Η παρουσία του PAF έχει πιστοποιηθεί σε διάφορα πρωτόζωα, όπως η *Tetrahymena pyriformis* (Lekka, M. et al. 1986) και *Dictyostelium discoideum* (Bussolino, F. et al. 1991) στη ζύμη (Nakayama, R. et al. 1994), σε ανώτερα φυτά (Andrikopoulos, N.K. et al. 1985, Antonopoulou, S. et al. 1996b), στους γαιοσκώληκες (Sugiura, T. et al. 1995), σε κατώτερα φυτά (Turner, M.R. and Lumb, R.H. 1989) και σε θηλαστικά (Braquet, P. et al. 1987b).

Η διάδοση του PAF στην φύση και μάλιστα σε βακτήρια ενισχύει την άποψη (Henson, P.M. 1987) πως ο PAF θα μπορούσε να θεωρηθεί σαν ένας αρχέγονος μεσολαβητής.

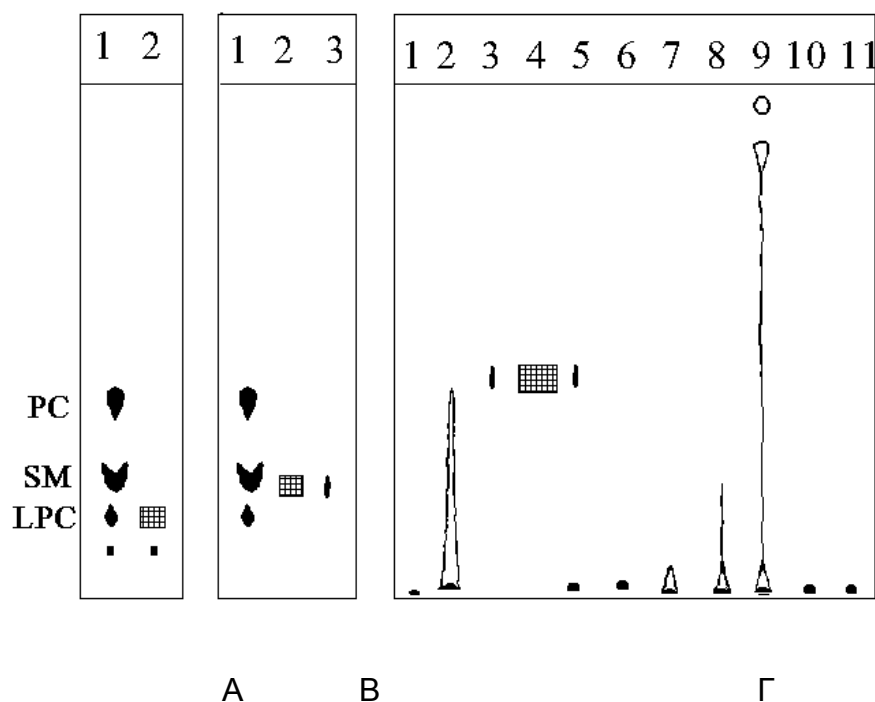
Ιδιότητες του μορίου του PAF

Ο PAF είναι διαλυτός σε μεθανόλη, αιθανόλη και σε μίγματα χλωροφορμίου: μεθανόλης, ενώ είναι αδιάλυτος σε χλωροφόρμιο, αιθέρα, βενζόλιο και ακετόνη (Pinckard, R.N. et al. 1979, McManus, L.M. et al. 1980). Στα υδατικά διαλύματα, σε χαμηλές συγκεντρώσεις, βρίσκεται υπό τη μορφή μονομερούς, αλλά σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις σχηματίζει μικκύλια. Η κρίσιμη μικκυλιακή συγκέντρωσή του έχει βρεθεί από 0,2 έως 3 μM , ανάλογα με το μοριακό είδος και την τεχνική που έχει χρησιμοποιηθεί (Asai, Y. et al. 2000, Blank, M.L. et al. 1981). Οι συγκεντρώσεις αυτές είναι πολύ χαμηλότερες από τις συνήθεις συγκεντρώσεις του PAF στα βιολογικά δείγματα ($10^{-7} \text{ M} - 10^{-11} \text{ M}$), γεγονός που δείχνει ότι ο PAF εκδηλώνει τις βιολογικές του δράσεις ως μονομερές. Η διαλυτοποίησή του σε υδατικά διαλύματα επιτυγχάνεται συνήθως με αναδιάλυσή του σε υδατικό διάλυμα βόειου αλβουμίνης ορού (BSA), με την οποία συνδέεται ισχυρά (Clay, K.L. et al. 1990).

Ο PAF είναι ιδιαίτερα σταθερός σε ουδέτερα και όξινα υδατικά διαλύματα ακόμα και σε υψηλές θερμοκρασίες. Ωστόσο, η πιο αντιπροσωπευτική χημική του ιδιότητα είναι η μεγάλη του ευαισθησία σε αλκαλικά διαλύματα, στα οποία υδρολύεται ταχύτατα η ακετυλομάδα από τη δεύτερη θέση του γλυκερινικού σκελετού (Tence, M. et al. 1980).

3.2 Χρωματογραφική συμπεριφορά του PAF

Σε χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC) ο PAF έχει τη χρωματογραφική συμπεριφορά που δίνεται στο σχήμα που ακολουθεί (Pinckard, R.N. et al. 1982).



Σχήμα 3.3: Χρωματογραφική συμπεριφορά του PAF σε TLC

Συστήματα ανάπτυξης A: CHCl_3 - CH_3OH - H_2O 65:35:4 (v/v/v)

B: CHCl_3 - CH_3OH - H_2O 65:35:6 (v/v/v)

Γ: CH_3OH - H_2O 2:1 (v/v)

A, B : 1: Πρότυπα διαλύματα λυσοφωσφατιδυλοχολίνης (LPC),
σφιγγομυελίνης (SM), φωσφατιδυλοχολίνης (PC)

2: PAF από βασεόφιλα κουνελιού

3: Συνθετικός PAF

Γ : 1: Φωσφατιδυλοχολίνη

2: Λυσοφωσφατιδυλοχολίνη

3: Συνθετικός PAF

4: PAF από βασεόφιλα κουνελιού

5: Μίγμα PAF και σφιγγομυελίνης

6: Σφιγγομυελίνη

7: Ουδέτερα λιποειδή

8: Φωσφατιδυλοαιθανολαμίνη

9: Φωσφατιδυλοϊννοσίτης

10: Φωσφατιδυλοχολίνη

11: Καρδιολιπίνη



: Περιοχή βιολογικής δραστηριότητας του PAF

Αναλυτικότερα :

- α. Με σύστημα ανάπτυξης χλωροφορμίου - μεθανόλης - νερού 65:35 : 4 v/v έχει $R_f=0,10$, ενώ η λυσοφωσφατιδυλοχολίνη (LPC) έχει $R_f=0,10$ η σφιγγομυελίνη (SM) $R_f=0,16$ και η φωσφατιδυλοχολίνη (PC) $R_f=0,30$.
- β. Με σύστημα ανάπτυξης χλωροφορμίου - μεθανόλης - νερού 65:35:6 v/v/v, έχει $R_f=0,21$, ενώ η λυσοφωσφατιδυλοχολίνη (LPC) $R_f=0,15$ η σφιγγομυελίνη (SM) $R_f=0,23$ και η φωσφατιδυλοχολίνη (PC) $R_f=0,36$.
- γ. Με σύστημα ανάπτυξης μεθανόλης - νερού 2:1 v/v έχει $R_f=0,44$, ενώ όλα τα άλλα λιποειδή παραμένουν στην αρχή σχεδόν αμετακίνητα. Η λυσοφωσφατιδυλοχολίνη (McManus, L.M. et al. 1980) εμφανίζει μια ουρά μέχρι την ίδια τιμή $R_f=0,44$, αλλά η κύρια κηλίδα παραμένει αμετακίνητη. Το σύστημα αυτό διαχωρίζει τον PAF από όλα τα άλλα λιποειδή.

Το σύστημα αυτό είναι επίσης κατάλληλο για το διαχωρισμό γλυκεριναιθερικών λιποειδών ανάλογα με το μήκος της αλυσίδας του γλυκεριναιθερικού δεσμού (Hanahan, D.J. et al. 1981) και για το διαχωρισμό φωσφο- από τα φωσφονολιποειδή (Demopoulos, C.A. et al. 1983).

Σε χρωματογραφία στήλης πυριτικού οξέος ο PAF (Pinckard, R.N. et al. 1980a) εκλύεται με το μίγμα χλωροφορμίου - μεθανόλης 1:4 v/v.

3.3 Παραγωγή του PAF από κύτταρα

Ο PAF παράγεται και εκκρίνεται από ένα πλήθος κυττάρων, τόσο σε φυσιολογικές καταστάσεις, όσο και ύστερα από ενεργοποίηση των κυττάρων με διάφορα ερεθίσματα. Η σύνθεση του PAF διαπιστώθηκε αρχικά σε κύτταρα θηλαστικών, που συμμετέχουν σε φλεγμονώδεις και αλλεργικές διεργασίες, όπως ουδετερόφιλα, βασεόφιλα, μονοκύτταρα/μακροφάγα, αιμοπετάλια, μαστοκύτταρα, ηωσινόφιλα και ενδοθηλιακά κύτταρα (Antonopoulou, S. et al. 1998, Kulikov, V.I., Muzia, G.I. 1992, Demopoulos, C.A. et al. 1994). Στην συνέχεια βρέθηκε ότι τα κύτταρα των περισσοτέρων ιστών έχουν την ικανότητα να συνθέτουν PAF σε φυσιολογικές αλλά και παθολογικές καταστάσεις μετά από διέγερση. Φυσική συνέπεια της δυνατότητας των κυττάρων να εκκρίνουν τον PAF που συνθέτουν, ήταν η ανίχνευσή του σε πολλά βιολογικά υγρά όπως στο πλάσμα (Cooney, S.J. et al. 1991), ούρα (Sobhani, I. et al. 1992), σάλιο (Billah, M.M. and Johnston,

1983) γαστρικά υγρά (Venable, M.E. et al. 1993) και αμνιακό υγρό (Prescott, S.M. et al. 1990). Τα τελευταία χρόνια η ύπαρξη του PAF έχει βρεθεί και σε φυτικά κύτταρα (Calligerou, M. et al. 1996, Antonopoulou, S. et al. 1996) σε κατώτερους ζωικούς οργανισμούς (Sugiura, T. et al. 1991, Sugiura, T. et al. 1995) και σε μονοκύτταρους ευκαρυωτικούς οργανισμούς (Nakayama, R. et al. 1994). Επίσης, έχει πιστοποιηθεί η ικανότητα πολλών προκαρυωτικών οργανισμών να συνθέτουν PAF μετά από χορήγηση της πρόδρομης ένωσης του PAF του λυσο-PAF (Denizot, Y. et al. 1989, Denizot, Y. et al. 1990, Andriotis, M. et al. 1986). Η ευρεία παρουσία του PAF σε οργανισμούς όλης της εξελικτικής βαθμίδας υποδηλώνει τον ευρύτερο ρόλο του ως αρχέγονου βιολογικού ρυθμιστή (Venable, M.E. 1993).

3.4 Μηχανισμός απελευθέρωσης του PAF

Μέχρι σήμερα δεν είναι πολλά αυτά που είναι γνωστά για τον μηχανισμό απελευθέρωσης του PAF. Μια ενδιαφέρουσα παρατήρηση για τον PAF, όταν συντίθεται στα ουδετερόφιλα του ανθρώπου, είναι ότι κατά την εξωκυτταρική απελευθέρωση είναι απαραίτητη η αλβουμίνη για τη δέσμευση του και απομάκρυνσή του από το κύτταρο για να συνεχισθεί η παραγωγή του από τα κύτταρα αυτά (Pinckard, R.N. 1983).

Επειδή ο PAF είναι ένα αδιάλυτο στο νερό λιποειδές, η εξωκυτταρική απελευθέρωση απαιτεί ένα μόριο φορέα, ρόλο που παίζει η αλβουμίνη, όπως πιστεύεται σήμερα. Για το λόγο αυτό τα ανθρώπινα ουδετερόφιλα, όταν διεγερθούν απουσία αλβουμίνης, δεν θα ελευθερώσουν PAF και η παραγωγή του PAF σταματά γρήγορα. Αλλά και η αλβουμίνη και το εξωκυτταρικό ασβέστιο δεν αποτελούν το σήμα για την παραγωγή PAF. Απουσία όμως ασβεστίου τα ουδετερόφιλα δεν μπορούν να συνθέσουν PAF.

Πολλές εργασίες δίνουν έμφαση στο γεγονός ότι το μεγαλύτερο μέρος του συντιθέμενου PAF παραμένει μέσα στο κύτταρο, γεγονός που έχει παρατηρηθεί στα ουδετερόφιλα (Ludwig, J.C. et al. 1985, Ludwig, J.C. et al. 1984, Lynch, J.M. Henson, P.M. 1985) σε μονοπύρηνα φαγοκύτταρα (Ludwig, J.C. et al. 1985, Benveniste, J. et al. 1982a), σε μαστοκύτταρα (Henson, P.M. 1987), ενδοθηλιακά κύτταρα (Prescott, S.M. et al. 1984, Lynch, J.M. Henson, P.M. 1985).

Πιστεύεται ότι αυτό συμβαίνει στους περισσότερους τύπους κυττάρων που συνθέτουν PAF. Πειράματα με εξωκυτταρικές ουσίες δέσμευσης του PAF, ενισχύουν την άποψη, ότι μόνο ένα μικρό μέρος του PAF, που συντίθεται μέσα στο κύτταρο, ελευθερώνεται στον εξωκυτταρικό χώρο (Lynch, J.M., Henson, P.M. 1985).

Στα ουδετερόφιλα το ποσοστό της εξωκυτταρικής απελευθέρωσης διαφέρει ανάλογα με τη διέγερση. Ποτέ όμως δεν είναι μεγαλύτερο από 30% του ολικού ποσού του PAF και στην περίπτωση της φαγοκυττάρωσης είναι λιγότερη από 5% (Lynch, J.M., Henson, P.M. 1985). Ακόμα χαμηλότερη (Prescott, S.M. et al. 1984) φαίνεται πως είναι η εξωκυτταρική απελευθέρωση στα ενδοθηλιακά κύτταρα. Όλα τα παραπάνω θέτουν το ερώτημα μήπως ο PAF παίζει έναν ενδοκυτταρικό ρόλο στη φυσιολογία ή παθολογία των κυττάρων που τον συνθέτουν (Henson, P.M. 1987).

3.5 Μεταβολισμός του PAF

3.5.1 Βιοσύνθεση του PAF

Κύκλος απακυλίωσης - επανακυλίωσης του PAF

Η βιοσύνθεση του PAF από αλκυλο-ακυλο-GPC γίνεται με διαδοχικές δράσεις της PLA_2 και της ακετυλο-τρανσφεράσης, που βρίσκονται στις κυτταρικές μεμβράνες. Η μεταβολική αυτή πορεία εξαρτάται από τη διέγερση του κυττάρου και για τη δράση των ενζύμων απαιτείται η παρουσία ασβεστίου.

Η ανενεργοποίηση του PAF γίνεται με μια αντίδραση απακετυλίωσης-επανακετυλίωσης, αντίδραση που καταλύεται από μια ακετυλοϋδρολάση, που βρίσκεται στο διαλυτό κυτταρόπλασμα και το πλάσμα του αίματος, και από μια ακυλοτρανσφεράση που βρίσκεται στην κυτταρική μεμβράνη. Η πορεία αυτή είναι ανεξάρτητη της διέγερσης του κυττάρου.

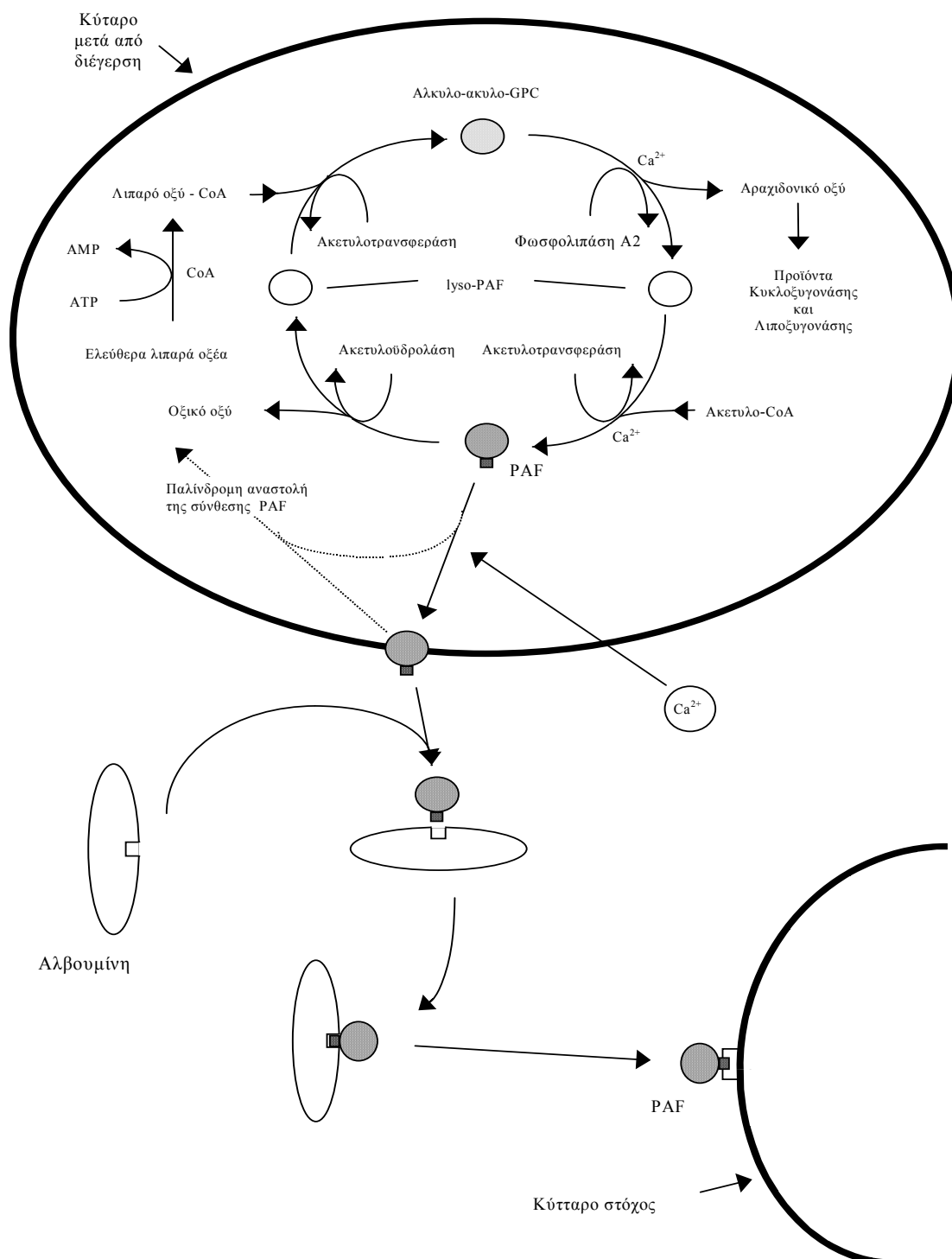
Το αραχιδονικό οξύ (AA) αποτελεί ένα από τα κυριότερα λιπαρά οξέα του μορίου της αλκυλο-ακυλο-GPC, που είναι εστεροποιημένο στη θέση 2 του γλυκεριναιθερικού σκελετού (Chilton, F.H. et al. 1983a, Chilton, F.H. et al. 1983b, Kramer, R.M. et al. 1984, Malone, B. et al. 1985, Robinson, M. et al. 1986, Robinson, M. and Snyder, F. 1985), το δε αλκυλο-ακυλο-GPC θεωρείται ότι είναι όχι μόνο η πρόδρομη μορφή του PAF, αλλά και μια σπουδαία πηγή του AA (Albert, D.H. 1984, Bachelet, M. et al. 1986, Chignard, M. et al. 1984, Chilton, F.H. et al. 1984, Swendsen, C.L., et al. 1983).

Φωσφολιπάση A_2

Η βιοσύνθεση του PAF ξεκινά, όπως αναφέρθηκε από τη δράση της PLA_2 .

Αναστολείς της PLA_2 όπως η μεπακρίνη, το βρωμοφαινακυλοβρωμίδιο (BPB), η ουσία 874CB, το EDTA (Camussi, G. et al. 1983a, Albert, D.H., Snyder, F.J. 1983, Camussi, G. et al. 1983c, Benveniste, J. et al. 1982a) και ειδικοί αναστολείς των καναλιών του ασβεστίου, όπως η νιφεδιπίνη και η

βεραπαμίλη (Mencia-Huerta, J.M. and Benveniste, J. 1979, Benveniste, J. et al. 1982a, Roubin, R. and Benveniste, J. 1985, Camussi, G. et al. 1981), αναστέλλουν την παραγωγή του PAF.



Σχήμα 3.4: Μηχανισμός βιοσύνθεσης και έκλυσης του PAF

Αλλά η ενεργοποίηση της PLA₂ οδηγεί ακόμα και στην απελευθέρωση AA από τα φωσφολιποειδή της μεμβράνης και ιδιαίτερα από τον

φωσφατιδυλοϊνοσίτη (PI) και φωσφατιδυλοχολίνη (Walsh, C.E. et al. 1983). Το AA που ελευθερώνεται, μεταβολίζεται στη συνέχεια σε λευκοτριένια (Walsh, C.E. et al. 1981, Bonser, R.W. et al. 1981), προσταγλανδίνες, θρομβοξάνη (Knapp, H.R. et al. 1977) και λιποξίνες (Λέκκα, M.E. 1987, Henson, P.M. 1987).

Ο μηχανισμός βιοσύνθεσης του PAF ενεργοποιείται με τη διέγερση του κυττάρου. Από την Αλκυλο-ακυλο-GPC με απακυλίωση ύστερα από την επίδραση της φωσφολιπάσης A₂ παράγεται ο lyso-PAF. Στη συνέχεια, μια ακετυλοτρανσφεράση μαζί με ακετυλο-CoA ακετυλιώνεται ο lyso-PAF σε PAF. Η απελευθέρωση του PAF όπως αναφέρθηκε, γίνεται μόνο παρουσία εξωκυτταρικού ασβεστίου και αλβουμίνης. Αναστολή της έκλυσης του PAF στο περιβάλλον στερεί από τα κύτταρα τη δυνατότητα να συνεχίσουν την παραγωγή PAF (Pinckard, R.N. 1983).

Ακετυλοτρανσφεράση

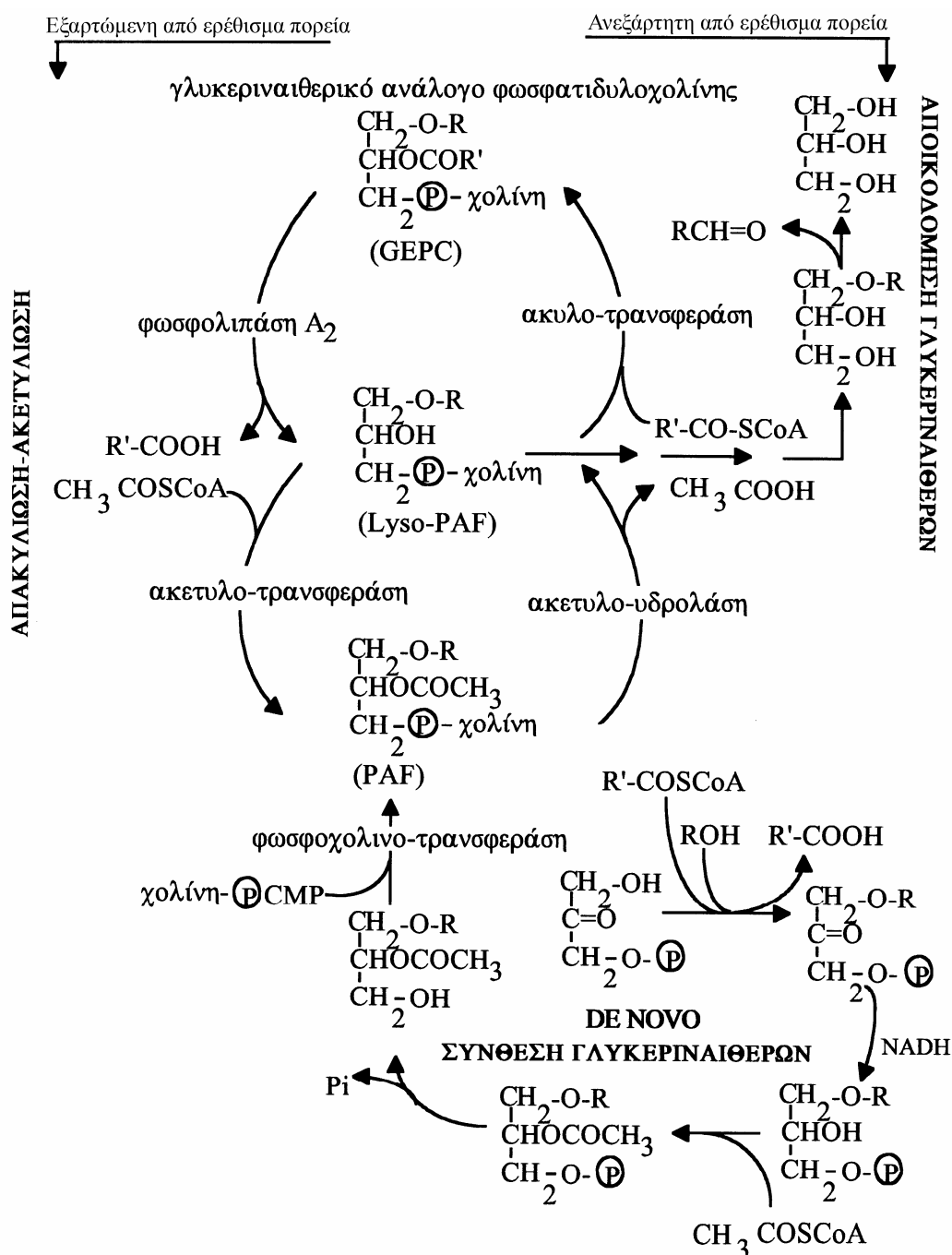
Η λυσο-αλκυλο-GPC (lyso-PAF), που παράγεται κατά την διέγερση του κυττάρου (Σχ. 3.4 και 3.5), μπορεί είτε να ακυλιωθεί με μια ακυλοτρανσφεράση προς μη δραστική βιολογικά αλκυλοακυλο GPC, είτε να ακετυλιωθεί με μια ακετυλοτρανσφεράση προς PAF (Σχ. 3.4 και 3.5) (Braquet, P. et al. 1987a). Το βρωμοφαινακυλοβρωμίδιο (BPB) και διισοπροπυλοφθοριο-φωσφορικό οξύ (DFP) αναστέλλουν και την ακετυλοτρανσφεράση και την ακυλοτρανσφεράση (Wykle, R.L. et al. 1980). Για να δράσει η ακετυλοτρανσφεράση απαιτεί την παρουσία ασβεστίου (Wykle, R.L. et al. 1980, Ninio, E. et al. 1982a) και η προσθήκη ιονοφόρου A23187, ζυμοζάνης ή θρομβίνης αυξάνει κατά πολύ τη δράση της ακετυλοτρανσφεράσης στα κύτταρα που παράγουν PAF (Ninio, E. et al. 1982b).

Η ακετυλίωση του λυσο-αλκυλο-GPC (lyso-PAF) σε διεγερμένα ανθρώπινα ουδετερόφιλα αναστέλλεται από την καλμοδουλίνη (Billah, M.M., Siegel, M.I. 1984).

Τα αιμοπετάλια παράγουν PAF και lyso-PAF σε αναλογία 1:30 μέχρι 1:100 (Benveniste, J. 1982a, Coeffier, E. et al. 1986, Touqui, L. et al. 1985b).

Αυτό συμβαίνει για πολλούς λόγους :

- Το μεγαλύτερο μέρος του lyso-PAF, που σχηματίζεται από διεγερμένα αιμοπετάλια, ελευθερώνεται πολύ γρήγορα στο εξωκυτταρικό μέσο και διαφεύγει από την ακετυλοτρανσφεράση.
- Η ακυλοτρανσφεράση περιορίζει τη διαθέσιμη ποσότητα του lyso-PAF για την ακετυλοτρανσφεράση.



Σχήμα 3.5: Μεταβολικός κύκλος του PAF στα αιμοπετάλια και το πλάσμα.

- Ο PAF, που σχηματίζεται από τα αιμοπετάλια με την δράση της ακετυλοϋδρολάσης του κυτοσολίου, μετατρέπεται γρήγορα σε Lyso-PAF.

Τέλος, η χαμηλή παραγωγή σε PAF θα μπορούσε να εξηγηθεί και με την ανεπαρκή δραστηριότητα της ακετυλοτρανσφεράσης, όπως π.χ. συμβαίνει και στα ανθρώπινα λεμφοκύτταρα (Jouvin-Marche, E. et al. 1984).

Η βιοσύνθεση του PAF μέσα από την πορεία της απακυλίωσης - επανακυλίωσης έχει μελετηθεί σε πολλά είδη κυττάρων. Μερικά από αυτά

είναι τα περιτοναϊκά ουδετερόφιλα πολυμορφοπύρρηνα κουνελιού (Wykle, R.L. 1983), κυψελιδικά μακροφάγα αρουραίου (Albert, D.H., Snyder, F.J. 1983), τα περιτοναϊκά μακροφάγα αρουραίου και ποντικού (Ninio, E. et al. 1982a, Ninio, E. et al. 1983, Mencia-Huerta, J.M. 1981), τα αιμοπετάλια κουνελιού (Chignard, M. et al. 1980, Benveniste, J. 1982a, Namm, D.H. and High, J.A. 1980) και ανθρώπου (Coeffier, E. et al. 1986), τα ανθρώπινα πολυμορφοπύρρηνα (Sanchez-Crespo, M. et al. 1983a, Alonso, F. et al. 1982) και τα ανθρώπινα ηωσινόφιλα (Lee, T.C et al. 1982, Lee, T.C. et al. 1984).

3.5.2 Ανενεργοποίηση του PAF

Ακετυλοϋδρολάση

Με το ένζυμο αυτό μετατρέπεται ο PAF σε αναναργό lyso-PAF, με υδρόλυση της ακετυλομάδας από την sn-2 θέση του γλυκεριναιθερικού σκελετού (Alam, I. et al. 1983, Blank, M.L. et al. 1981b, Farr, R.S. et al. 1983). Το ένζυμο υπάρχει και στον ενδοκυτταρικό και στον εξωκυτταρικό χώρο.

Η ενδοκυτταρική του μορφή βρίσκεται στο κλάσμα του κυτοπλάσματος των κυττάρων και των ιστών (Blank, M.L. et al. 1981a). Η εξωκυτταρική μορφή συναντάται στο πλάσμα (Farr, R.S. et al. 1983, Blank, M.L. 1983).

Η ενδοκυτταρική και εξωκυτταρική ακετυλοϋδρολάση έχουν όμοιες ιδιότητες με τη διαφορά πως η ακετυλοϋδρολάση του πλάσματος είναι ανθεκτική στη δράση των πρωτεασών (Blank, M.L. 1983) και στους αναστολείς της υδρόλωσης της σερίνης PMSF (Phenylmethyl-sulfonyl fluoride) και DFP διισοπροπυλοφθοριοφωσφορικό οξύ (Braquet, P. et al. 1987).

Σε αντίθεση με την PLA₂, η ακετυλοϋδρολάση αποσπά από την sn-2 θέση του γλυκεριναιθερικού σκελετού μόνο λιπαρά οξέα με μικρές αλυσίδες και η δράση της όχι μόνο δεν εξαρτάται από το ασβέστιο (Braquet, P. et al. 1987), αλλά η έλλειψη ασβεστίου την ενεργοποιεί κατά τι.

Ακυλοτρανσφεράση

Το ένζυμο αυτό εισάγει στην sn-2 θέση του λύσο-PAF ένα λιπαρό οξύ με μακρά αλυσίδα και ελαττώνεται η κυταροτοξικότητα (λυτικές και απορρυπαντικές ιδιότητες) (Weltzier, H.U. 1979) του lyso-PAF. Η σχηματιζόμενη αλκυλο-ακυλ-GPC είναι συστατικό της μεμβράνης (Chilton, et al. 1983a, Chilton, F.H. et al. 1983b, Albert, D.H., Snyder, F.J. 1983, Kramer, R.M. et al. 1984, Malone, B. et al. 1985, Cabot, M.C. et al. 1983, Robinson, M. et al. 1986, Robinson, M., Snyder 1985, Touqui, L. et al. 1985b, McKean, M.L. and Silver, M.J. 1985).

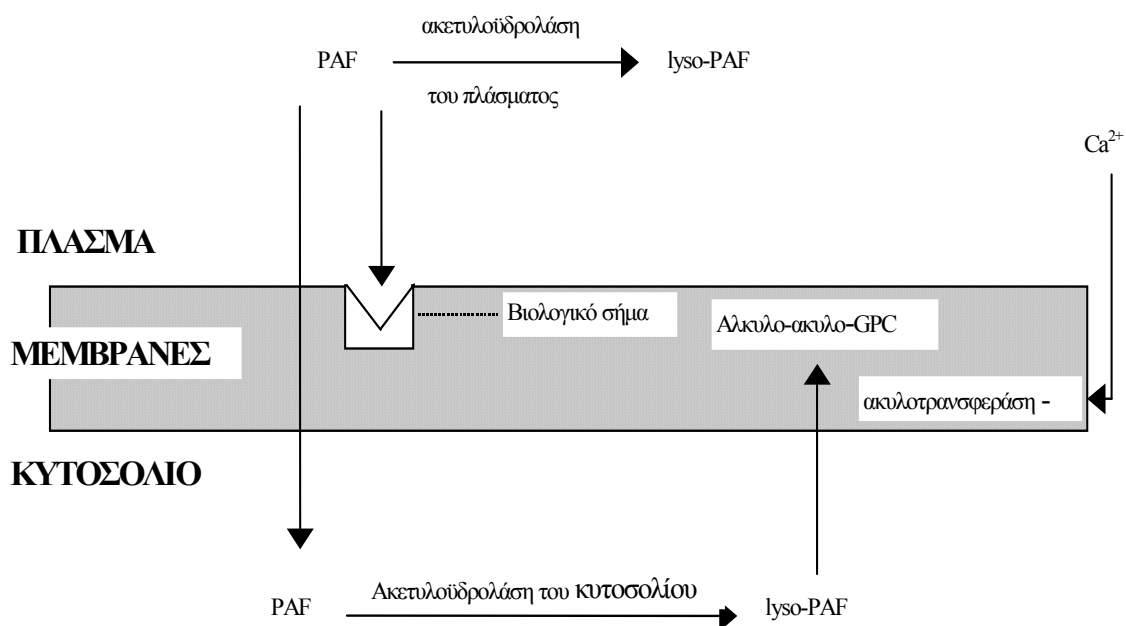
Η εξωγενής lyso-PAF κυρίως μετατρέπεται σε αλκυλο-ακυλ-GPC, ενώ μια μικρή ποσότητα της μετατρέπεται σε PAF (Σχ. 3.4 και 3.5).

Το λιπαρό οξύ που ενσωματώνεται σε μεγαλύτερο ποσοστό στον lyso-PAF είναι το αραχιδονικό οξύ (AA). Η ενσωμάτωσή του επιτυγχάνεται από μια τρανσακυλάση, που χρησιμοποιεί την PC σαν πηγή AA (Kramer, R.M. et al. 1984, Malone, B. et al. 1985, Robinson, M. et al. 1986).

Αρχικά το ελεύθερο AA ενσωματώνεται στην PC με μια ακυλοτρανσφεράση (McKean, M.L. et al. 1982) και στη συνέχεια μεταφέρεται είτε στον lyso-PAF είτε σε άλλα αιθερικά λιποειδή με μια τρανσακυλίωση ανεξάρτητη του CoA (Malone, B. et al. 1985, Colard, O. et al. 1984, Colard, O. et al. 1986, Kramer, R.M. and Deykin, D. J. 1983).

Επειδή η επανακυλίωση του lyso-PAF αναστέλλεται από το Ca^{+2} , αν κατά την ενεργοποίηση του κυττάρου αυξηθεί η εισροή Ca^{+2} , τότε αναστέλλεται η δράση της ακυλοτρανσφεράσης που μετατρέπει τον lyso-PAF σε αδρανή αλκυλο-ακυλο-GPC μέσα στην κυτταρική μεμβράνη.

Η αναστολή αυτής της ακυλοτρανσφεράσης οδηγεί σε αυξημένα επίπεδα lyso-PAF μέσα στο κυτόπλασμα με αποτέλεσμα αυξημένη σύνθεση του PAF απο lyso-PAF (Touqui, L. et al. 1987) με την βοήθεια της ακετυλοτρανσφεράσης.



Σχήμα 3.6: Η θέση των διαφόρων ενζύμων, που απενεργοποιούν τον PAF ένδο και εξωκυτταρικά. Ο PAF δεσμεύεται στον υποδοχέα του για την πρόκληση βιολογικής απόκρισης, που στην αρχή ξεκινάει με την αποικοδόμηση του φωσφατιδυλοϊνositide. Αφού ο PAF περάσει μέσα στο κύτταρο χάνει την ακετυλομάδα με την δράση της ακετυλοϋδρολάσης και ενσωματώνεται στη μεμβράνη με τη μορφή της αλκυλο-ακυλο-GPC

3.6 Δράσεις του PAF

Ο παραγόμενος από τα κύτταρα PAF μπορεί να ακολουθήσει τις παρακάτω πορείες :

Να εκκριθεί από τα κύτταρα και να δράσει, είτε αυτοκρινώς πάνω στα κύτταρα από τα οποία παράχθηκε, είτε παρακρινικά ενεργοποιώντας γειτονικά κύτταρα του ίδιου ή διαφορετικού είδους.

Να ενσωματωθεί στην πλασματική μεμβράνη του κυττάρου από το οποίο συντέθηκε και να δράσει από εκεί ως διακυτταρικός μεσολαβητής ενεργοποιώντας γειτονικά κύτταρα. Αυτός ο τρόπος δράσης του PAF είναι ιδιαίτερα σημαντικός κατά την ενεργοποίηση και προσκόλληση των ουδετερόφιλων στα ενδοθηλιακά κύτταρα σε καταστάσεις φλεγμονής.

Να παραμείνει στα κύτταρα και να δράσει ως ενδοκυτταρικός μεσολαβητής (Benveniste, J. et al. 1982, . Benveniste, J. et al. 1972).

Ο PAF ασκεί τις δράσεις του μέσω υποδοχέων, που έχουν απομονωθεί, χαρακτηριστεί και κλωνοποιηθεί. Η σύνδεση του PAF με τους υποδοχείς του ενεργοποιεί πολλές ενδοκυτταρικές πορείες μεταγωγής σήματος, που οδηγούν στην τελική απόκριση του κυττάρου. Οι δράσεις του PAF έχουν μελετηθεί, τόσο *in vitro* σε καλλιέργειες κυττάρων και απομονωμένους ιστούς (Πίνακας 1), όσο και *in vivo* μετά από χορήγηση του PAF σε πειραματόζωα αλλά και στον άνθρωπο (Πίνακας 2).

Πίνακας 1: Δράσεις του PAF σε κύτταρα και απομονωμένους ιστούς.

Είδος κυττάρου/ιστού	Δράσεις
Αιμοπετάλια	Αποκοκκίωση, αλλαγή σχήματος, συσώρευση, έκκριση εικοσανοειδών (Hanahan, D.J. 1986, Koltai, M. et al. 1991).
Ουδετερόφιλα	Αποκοκκίωση, συσώρευση, χημειοταξία, παραγωγή υπεροξειδίων, αύξηση προσκολλητικής ικανότητας, έκκριση εικοσανοειδών (Koltai, M et al. 1991, Snyder, F. 1990).
Μονοκύτταρα/Μακροφάγα	Συσώρευση, σύνθεση εικοσανοειδών, παραγωγή υπεροξειδίων, παραγωγή IL-1, έκκριση λυσοσωμιακών ενζύμων (Koltai, M. et al. 1991, Snyder, F. 1990).
Ηωσινόφιλα	Χημειοταξία, έκκριση κατιοντικών πρωτεϊνών, αύξηση κυτταροτοξικότητας, σύνθεση LTC ₄ , παραγωγή υπεροξειδίων, μετανάστευση διαμέσου των επιθηλιακών κυττάρων, σύνθεση IL-8, πολυμερισμός

Είδος κυττάρου/ιστού	Δράσεις
	ακτίνης (Koltai, M. et al. 1991, Snyder, F. 1990).
Λεμφοκύτταρα	Βλαστική τροποποίηση, καταστολή παραγωγής IL-2 (Koltai, M. et al. 1991).
Ενδοθηλιακά	Ανακατανομή κυτταροσκελετού και αλλαγή σχήματος, σύνθεση εικοσανοειδών, μετανάστευση, αύξηση της προσκολλητικής τους ικανότητας με τα ουδετερόφιλα (Prescott, S.M. et al. 1990, Bussolino, F., Camussi, G. 1995, Koltai, M. et al. 1991).
Νευρώνες	Αύξηση ενδοκυτταρικού Ca^{2+} , ενεργοποίηση του κύκλου της φωσφατιδυλοϊνοσιτόλης, ενεργοποίηση της έκφρασης των πρωτοογκογονιδίων c-fos και c-jun, έκκριση προλακτίνης (MacLennan, K.M. et al. 1996, Feuerstein, G.Z. 1996).
Σπερματοζωάρια	Αύξηση κινητικότητας, αύξηση της διεισδυτικότητάς τους στον τράχηλο της μήτρας (Frenkel, R.A. et al. 1996, Minhas, B.S. 1996).
Πρωτόζωα	Σύνθεση εικοσανοειδών, αύξηση γλυκογονόλυσης, μεταβολή στην σύσταση των λιποειδών (Tsangaris, G.T. et al. 1992, Tselepis, A.D. et al. 1986).
Φυτικά κύτταρα	Ρύθμιση δραστηριότητας H^+ ATPασών, επίδραση στο φωτοσύνστημα II των θυλακοειδών (Kulikov, V.I. et al. 1997).
Ήπαρ	Αύξηση γλυκογονόλυσης, μεταβατική αύξηση στην πίεση της πυλαίας φλέβας, αύξηση έκκρισης γαλακτικού και οξαλοξικού οξέος (Koltai, M. et al. 1991, Chao, W., Olson, M.S. 1993).
Πνεύμονας	Μείωση της επιφάνειας των τριχοειδών, σύσπαση απομονωμένου πνευμονικού ιστού και μείωση της διατασιμότητάς του, αγγειοσύσπαση, πνευμονικό οίδημα (Koltai, M. et al. 1991, Barnes, P.J. et al. 1988, Schellenberg, R.R. 1987).
Καρδιά	Μείωση της συσταλτικής ικανότητας της κοιλίας, σύσπαση των στεφανιαίων, μείωση της ροής αίματος, πρόκληση αρρυθμιών (Goldstein, R.E. et al. 1991, Montrucchio, G. et al. 2000).
Έντερο	Σύσπαση, ισχαιμική νέκρωση (Izzo, A.A. 1996).

Πίνακας 2: Δράσεις του PAF *in vivo*.

Βρογχόσπασμος (Koltai, M. et al. 1991).
Θρομβοπενία, ουδετεροπενία, βασηοφιλοπενία (Koltai, M. et al. 1991).
Σηπτικό σοκ (Koltai, M. et al. 1991, Sturk, A et al. 1989). Μεσολαβητής του σηπτικού σοκ, που επάγεται από βακτηριακές λοιμώξεις και χορήγηση ενδοτοξίνης.
Αναφυλακτικές αντιδράσεις α) Στο αναπνευστικό (Koltai, M. et al. 1991, Barnes, P.J. et al. 1988) : Μείωση αναπνευστικής συχνότητας, βρογχόσπασμο, αύξηση πνευμονικών αντιστάσεων, αύξηση της ενδοτικότητας του πνεύμονα, αύξηση της πίεσης στις πνευμονικές αρτηρίες με αποτέλεσμα πρόκληση πνευμονικού οιδήματος. Μεσολαβητής του άσθματος. β) Στο κυκλοφορικό (Koltai, M. et al. 1991, Montrucchio, G. et al. 2000) : Μείωση της συστολικής και διαστολικής πίεσης, αύξηση της κεντρικής φλεβικής πίεσης, αύξηση της πίεσης στο δεξιό κόλπο, μείωση της τελοδιαστολικής πίεσης.
Επίδραση στο καρδιαγγειακό σύστημα (Montrucchio, G. et al. 2000). Αρνητική ινότροπη δράση, μείωση της μέσης αρτηριακής πίεσης (υπόταση), μείωση του κατά λεπτό όγκου αίματος, μείωση των περιφερειακών αντιστάσεων. Καρδιακή ισχαιμία και κοιλιακές αρρυθμίες. Συμμετέχει στην παθογένεια της αρτηριοσκληρώσεως.
Επίδραση στο πεπτικό σύστημα (Koltai, M. et al. 1991, Izzo, A.A. 1996). Βλάβη γαστρικού βλεννογόνου, ισχαιμική νέκρωση εντέρου, μορφολογικές αλλοιώσεις στην άνω παγκρεατοδωδεκαδακτυλική αρτηρία. Συμμετοχή στην παθογένεια του πεπτικού έλκους και της παγκρεατίτιδας.
Επίδραση στο σύστημα αναπαραγωγής (Frenkel, R.A. et al. 1996, Minhas, B.S. 1996). Συμμετοχή στην κινητοποίηση του σπέρματος, στην ωορρηξία, στην εμφύτευση του ωαρίου στη μήτρα και στην υπέρταση της εγκυμοσύνης. Συμμετοχή στην έναρξη και διατήρηση του τοκετού.
Επίδραση στην εγκεφαλική λειτουργία (Koltai, M. et al. 1991, MacLennan, K.M. et al. 1996, Feuerstein, G.Z. 1996). Μεσολαβητής της εγκεφαλικής ισχαιμίας και του τραυματισμού των νευρώνων σε ισχαιμικές καταστάσεις. Ενεργοποίηση του άξονα υποθάλαμος-υπόφυση-επινεφρίδια και έκκριση ορμονών, ρυθμίζει τα επίπεδα των νευροπεπτιδίων. Συμμετέχει στο LTP και θεωρείται ανάδρομος (retrograde) μεσολαβητής.

Επίδραση στο ανοσολογικό (Koltai, M. et al. 1991, Feuerstein, G.Z. 1996). Συμμετέχει στην ανοσολογική κυτταρική απόκριση, είτε άμεσα ρυθμίζοντας τα επίπεδα και τον πολλαπλασιασμό των λεμφοκυττάρων και την παραγωγή κυτταροκινών από αυτά, είτε έμμεσα ενεργοποιώντας τα λευκοκύτταρα και την παραγωγή εικοσανοειδών από αυτά.
Μεσολαβητής της οξείας απόρριψης των μοσχευμάτων.

Επίδραση στα αιμοπετάλια

In vitro (Benveniste, J. et al. 1975) και in vivo (Pinckard, R.N. et al. 1977) ο PAF προκαλεί αλλαγή σχήματος των αιμοπεταλίων και αντιστρεπτή και μη αντιστρεπτή συσώρευση ανάλογα με τη συγκέντρωσή του (Korth, R. et al. 1983). Ακόμα προκαλεί έκκριση ισταμίνης, σεροτονίνης (Henson, P.M. 1970), β-θρομβοσφαιρίνης και του παράγοντα 4 των αιμοπεταλίων (PF_4) (Marcus, A.J. et al. 1981).

Η συσώρευση των αιμοπεταλίων γίνεται ως γνωστόν με τρεις δρόμους:

α) Ο πρώτος δρόμος γίνεται με την επίδραση του ADP (πρώτη συσσωρευτική οδός). Κατ' αυτόν αναστέλλεται η ATPάση Na/K (αυξάνει την εισροή Na^+) (Feinberg, H. et al. 1977) και η αδενυλοκυκλάση (μειώνει το ενδοκυττάριο c-AMP) (Haslam, R.J. and Rossan, G.M. 1975), ενώ διεγείρεται η Ca^{+2} ATPάση των αιμοπεταλίων.

β) Ο δεύτερος δρόμος γίνεται με την επίδραση θρομβοξανθής A_2 (TXA_2) (δεύτερη συσσωρευτική οδός) (Hamberg, M. et al. 1975). Οι ενδείξεις που υπάρχουν γι' αυτό το δρόμο είναι ότι οι μεταβολίτες του AA δρουν σαν ιονοφόρα του Ca^{+2} , που είναι απαραίτητο για τη συσώρευση (Moncada, S. and Vane, J.R. 1979).

γ) Τέλος ο τρίτος δρόμος γίνεται με τον PAF (τρίτη συσσωρευτική οδός), ο οποίος δρα μέσω διαμεμβρανικού υποδοχέα που ανήκει στις G πρωτεΐνες.

Η πρώτη ένδειξη για την ύπαρξη ειδικών υποδοχέων του PAF ήταν η στερεοεξειδίκευση στις δράσεις του, αφού μόνο η R μορφή προκαλούσε ενεργοποίηση αιμοπεταλίων κουνελιού και ουδετερόφιλων ανθρώπου (Wykle, R.L. et al. 1981). Στη συνέχεια μελέτες σύνδεσης με ραδιενεργό PAF έδειξαν την παρουσία δύο θέσεων σύνδεσης του PAF στα κύτταρα, μια υψηλής συγγένειας και μικρού αριθμού θέσεων και μία χαμηλής συγγένειας και απεριόριστου αριθμού θέσεων (Izumi, T. et al. 1995). Το 1991 για πρώτη φορά οι *Honda et al.* απομόνωσαν και κλωνοποίησαν το cDNA του υποδοχέα του PAF από πνεύμονα ινδικού χοιριδίου (Honda, Z. et al. 1991), ενώ μέχρι σήμερα έχει επιτευχθεί η κλωνοποίηση του cDNA από ιστούς ποντικού, επίμους και ινδικού χοιριδίου (Izumi, T. et al. 1995, Ishii, S.,

Shimizu, T. 2000), καθώς και από λευκοκύτταρα (Nakamura, M. et al. 1991), καρδιά (Sugimoto, T. et al. 1992) και τις κυτταρικές σειρές HL-60 (Ye, R.D. et al. 1991) και EoL-1 (Izumi, T. et al. 1995) ανθρώπου. Πρόσφατα, βρέθηκε ότι ο υποδοχέας του PAF εκφράζεται, όχι μόνο στην επιφάνεια, αλλά και σε ενδοσώματα ενδοθηλιακών κυττάρων (Ihida, K. et al. 1999), γεγονός που υποδηλώνει τον πιθανό ρόλο του PAF ως ενδοκυτταρικού μεσολαβητή.

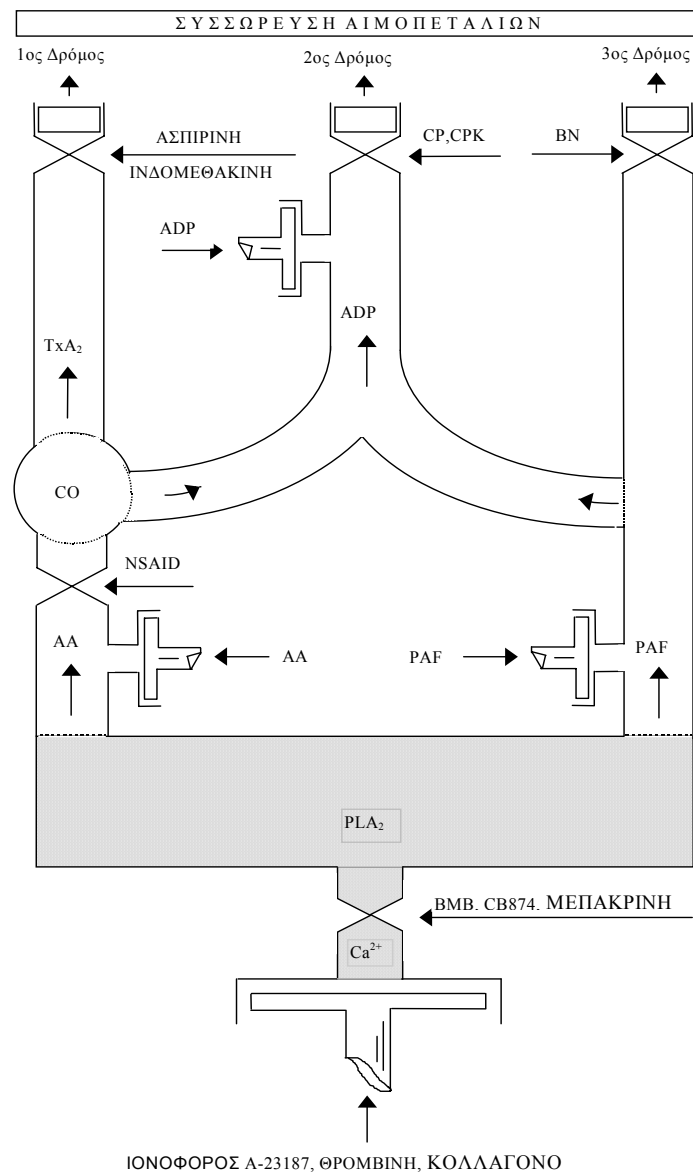
Οι πρωτεΐνες του υποδοχέα, που κωδικοποιούνται στον άνθρωπο και το ινδικό χοιρίδιο, είναι απλές πολυπεπτιδικές αλυσίδες 342 αμινοξέων και έχουν Mr 39 kDa. Ο υποδοχέας αποτελείται από 7 διαμεμβρανικές περιοχές (α-έλικες), χαρακτηριστικές της υπεροικογένειας των υποδοχέων που συνδέονται με G-πρωτεΐνες. Πολλά χαρακτηριστικά αμινοξέα αυτής της οικογένειας εμφανίζονται και στον υποδοχέα του PAF, όπως ένα μόριο ασπαραγινικού οξέος στη δεύτερη διαμεμβρανική περιοχή, δύο μόρια κυστεΐνης στη 2η και 3η εξωκυτταρική περιοχή, καθώς και τρία μόρια προλίνης στην 6η και 7η διαμεμβρανική περιοχή, που συμμετέχουν στη σύνδεση του αγωνιστή. Μία ομάδα εννέα καταλοίπων σερίνης και θρεονίνης κοντά στο καρβοξυτελικό κυτοπλασματικό άκρο είναι πιθανές περιοχές φωσφορυλίωσης από κινάσες υποδοχέων G πρωτεϊνών. Η τρισδιάστατη δομή του υποδοχέα του PAF στο χώρο μοιάζει με διπολικό κύλινδρο διαμέτρου 12-19 Å με δύο περιοχές υψηλής ηλεκτρικής τοποθετημένες αντιδιαμετρικά (Izumi, T. et al. 1995, Ishii, S., Shimizu, T. 2000).

Με τεχνικές μοριακής βιολογίας έχει μελετηθεί η κατανομή της έκφρασης του mRNA του υποδοχέα σε διάφορα πειραματόζωα και στον άνθρωπο. Το mRNA εκφράζεται στα περισσότερα κύτταρα και ιστούς, η κατανομή της έκφρασης όμως διαφέρει από οργανισμό σε οργανισμό, γεγονός που δείχνει ότι υπάρχουν ειδικοί μηχανισμοί για κάθε ιστό αλλά και για κάθε οργανισμό, που ρυθμίζουν την έκφραση του υποδοχέα του PAF (Izumi, T. et al. 1995, Ishii, S., Shimizu, T. 2000).

Η σύνδεση του PAF στον υποδοχέα του προκαλεί την ενεργοποίηση πορειών στο εσωτερικό του κυττάρου, που οδηγούν στον σχηματισμό ή στην αύξηση της συγκέντρωσης ενδοκυτταρικών μηνυματοφόρων μορίων, όπως Ca^{2+} , cAMP, 1,4,5-τριφωσφορική ινοσιτόλη (IP_3), διακυλογλυκερόλη (DAG), αραχιδονικό οξύ, τα οποία με τη σειρά τους προκαλούν την τελική απόκριση του κυττάρου. Στην ενεργοποίηση αυτών των μηχανισμών μεσολαβούν G πρωτεΐνες, οι οποίες είναι συζευγμένες με τον υποδοχέα του PAF. Το είδος του μηχανισμού μεταγωγής σήματος εξαρτάται από το είδος του κυττάρου και βρίσκεται υπό αυστηρή ρύθμιση, ενώ πολλές φορές η σύνδεση του PAF στον υποδοχέα του ενεργοποιεί παραπάνω από ένα μηχανισμούς που αλληλεπιδρούν μεταξύ τους (Koltai, M. et al. 1991, Chao, W., Olson, M.S.

1993, Izumi, T. et al. 1995, Shukla, S.D. 1991, Saunders, R.N., Handley, D.A. 1987, Ishii, S., Shimizu, T. 2000).

Η παράσταση των τριών μηχανισμών της συσσώρευσης καθώς και των αναστολέων μπορούν να δοθούν σχηματικά με το υποθετικό υδραυλικό σύστημα των Vargaftig, B.B. et al. 1981 (Σχ. 3.7).



Σχήμα 3.7. Μηχανισμοί συσσώρευσης αιμοπεταλίων κουνελιού σαν υποθετικό υδραυλικό σύστημα.

Στο σύστημα αυτό το κολλαγόνο, η θρομβίνη και το ιονοφόρο του Ca²⁺ A23187 ενεργοποιούν (σχηματικά "πιέζουν") τη φωσφολιπάση A₂ (PLA₂)

όπως η αντλία. Η "πίεση" μεταφέρεται μέσα από το υγρό μετάδοσης στο αραχιδονικό οξύ και τον PAF.

Το στάδιο της PLA_2 μπορεί να παραληφθεί, αν προσθέσουμε εξωτερικά αραχιδονικό οξύ.

Όπως φαίνεται στο σχήμα, το AA περνάει από το στάδιο της κυκλοοξυγονάσης (CO) και καταλήγει στην TXA_2 (Haslam, R.J. 1964), που αποτελεί τον δεύτερο μηχανισμό συσσώρευσης.

Το AA όμως μπορεί να προκαλεί και έμμεση συσσώρευση μέσα από την CO με τη δευτερογενή παραγωγή του ATP, που θεωρείται ως ο πρώτος μηχανισμός συσσώρευσης (Haslam, R.J. 1964).

Η ύπαρξη ενός τρίτου μηχανισμού συσσώρευσης (μέσα από τον PAF) δικαιολογείται και από τις παρακάτω παρατηρήσεις.

Τα μη στεροειδή αντιφλεγμονώδη φάρμακα NSAID (Silver, M.J. et al. 1974) αναστέλλουν τη δράση της κυκλοοξυγονάσης και συνεπώς επιδρούν στην πρώτη και δεύτερη συσσωρευτική οδό. Η ασπιρίνη και ινδομεθακίνη αναστέλλουν τη δράση της θρομβοξανθίνης A_2 (TXA_2). Η φωσφοκρεατίνη (CP) και η κινάση της φωσφοκρεατίνης (CPK) αναστέλλουν τη δράση του ATP. Τέλος παρουσία των παραπάνω αναστολέων μεγάλες ποσότητες θρομβίνης προκαλούν εντούτοις συσσώρευση.

Συνεπώς η τρίτη συσσωρευτική οδός μέσω του PAF είναι ανεξάρτητη, αν και πρέπει να αναφερθεί ότι παρουσιάζεται αλληλεπίδραση και στους τρεις δρόμους.

3.7 PAF και αλλεργίες

3.7.1 Ανοσολογικό σύστημα

Η προφύλαξη (αντίσταση) του οργανισμού στην επίδραση εξωτερικών βλαπτικών παραγόντων ονομάζεται ανοσία. Διακρίνεται στην ειδική και τη μη ειδική ανοσία (Παπαδημητρίου, Κ.Σ. 1982).

Η μη ειδική (φυσική ανοσία) δεν εξειδικεύεται εναντίον κάποιας συγκεκριμένης βλαπτικής ουσίας, αλλά συντελείται με το δέρμα, τους βλεννογόνους και με ειδικές ουσίες, που είναι προϊόντα μεταβολισμού των ιστών, όπως για παράδειγμα η ιντερφερόνη, η οποία στρέφεται (μη ειδικά) εναντίον των διαφόρων ιών. Οι παράγοντες από τους οποίους εξαρτάται είναι η φυλή, το είδος, η ηλικία, το φύλο, η κληρονομικότητα, η διατροφή και διάφορες ορμόνες (π.χ. τα κορτικοστεροειδή).

Η ειδική (επίκτητη ανοσία) αναφέρεται στην ειδική άμυνα του οργανισμού εναντίον κάποιου συγκεκριμένου βλαπτικού παράγοντα, με τον οποίο όμως ο οργανισμός έχει έρθει προηγουμένως σε επαφή.

Η ειδική αυτή ανοσία διακρίνεται σε ενεργητική (φυσική ή τεχνητή), που προκαλείται από την είσοδο ενός λοιμογόνου παράγοντα στον οργανισμό και σε παθητική (φυσική ή τεχνητή), που προκαλείται από την εισαγωγή στον οργανισμό ειδικών αντισωμάτων (Παπαπαναγιώτου, Ι.Κ. 1981).

Τα αντιγόνα είναι ουσίες, που όταν εισέλθουν στον οργανισμό μπορούν να προκαλέσουν ανοσολογική αντίδραση (Μουτσόπουλος, Χ.Μ., Εμμανουήλ, Δ.Σ. 1984).

Τα αντισώματα είναι πρωτεΐνες, που παράγονται από το αδρό ενδοπλασματικό δίκτυο ύστερα από τη είσοδο κάποιου αντιγόνου και τη διέγερση του ανοσολογικού συστήματος.

Κύτταρα του ανοσολογικού συστήματος είναι τα λεμφοκύτταρα Β, τα λεμφοκύτταρα Τ και τα μακροφάγα (Robbins, D.L. and Gershwin, M.E. 1978).

3.7.2 Υπερευαισθησία

Η υπερβολική ή παρατεταμένη ανοσολογική αντίδραση του οργανισμού, κατά την οποία προκαλούνται παθολογικές αλλοιώσεις στους ιστούς, ονομάζεται υπερευαισθησία.

Υπάρχουν δύο είδη υπερευαισθησίας: Η άμεση ή χημική υπερευαισθησία ή αλλεργία, που εκδηλώνεται με την παραγωγή και δράση αντισωμάτων και σχετίζεται κυρίως με τα Β-λεμφοκύτταρα και η επιβραδυνόμενη ή κυτταρική υπερευαισθησία, που εκδηλώνεται με την ενεργοποίηση των Τ-λεμφοκυττάρων (Παπαδημητρίου, Κ.Σ. 1982).

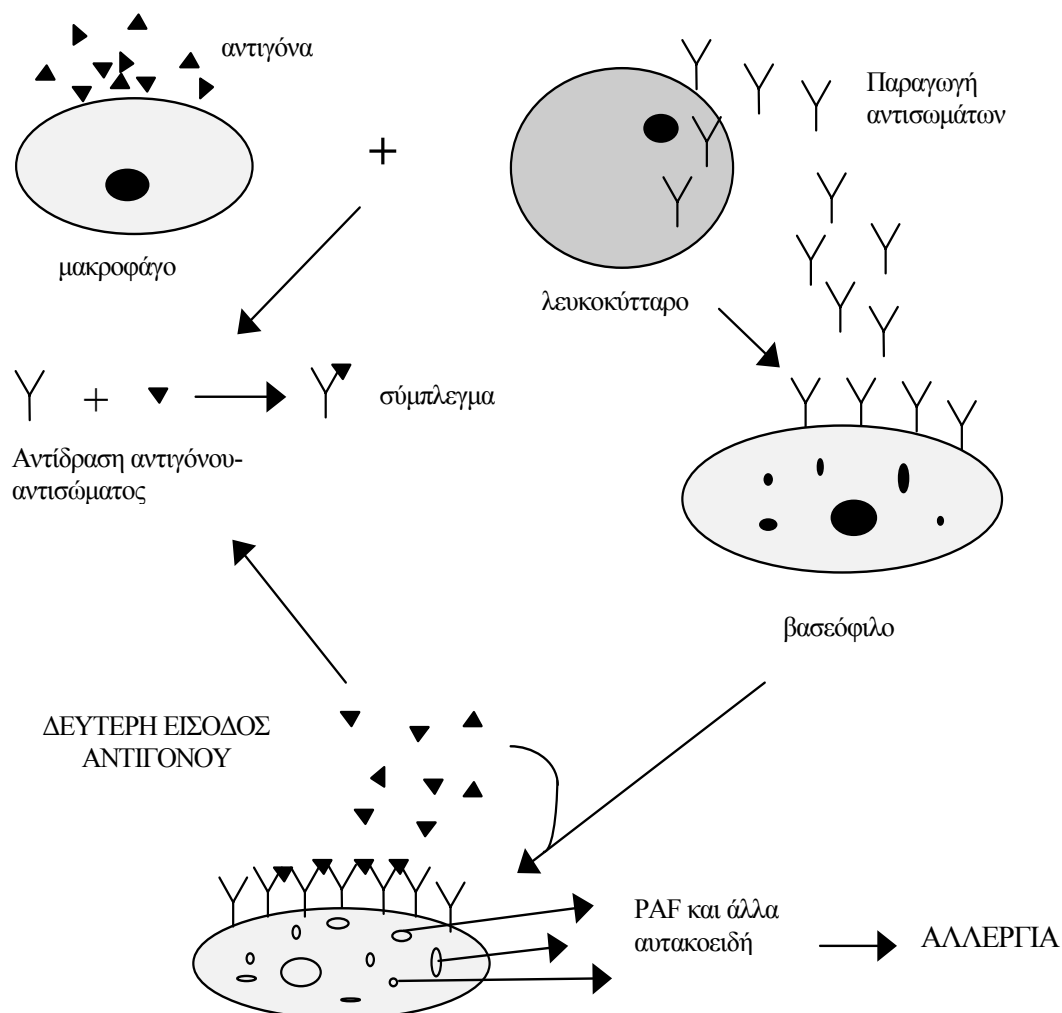
Οι ανοσολογικοί μηχανισμοί, με τους οποίους προκαλείται η ιστική βλάβη σύμφωνα με την ταξινόμηση των Goombs και Gell του 1969, κατατάσσονται σε 5 τύπους: Οι τύποι Ι, ΙΙ, ΙΙΙ (άμεση υπερευαισθησία), ο τύπος ΙV (βραδυπορούσα υπερευαισθησία) και ο τύπος V (ένανς μικτός, άμεσης και βραδυπορούσας υπερευαισθησίας).

Υπερευαισθησία τύπου Ι ή αναφυλαξία.

Ο όρος αναφυλαξία χρησιμοποιήθηκε για πρώτη φορά από τους Portier και Richet (1902) και προέρχεται από τις Ελληνικές λέξεις αν- (στερητικό) και φύλαξη (Portier, P. and Richet, 1902). Η αναφυλαξία προκαλείται από ένα μηχανισμό, όπου κύριο ρόλο παίζει η ενεργοποίηση με αντιγόνο ευαισθητοποιημένων (κυρίως με IgE αλλά και με IgG₁ ή IgG₂) μαστοκυττάρων, ουδετερόφιλων, ηωσινόφιλων, βασεόφιλων, ή αιμοπεταλίων,

που ακολουθείται από έκκριση, απ'αυτά τα κύτταρα δραστικών ουσιών (χημικοί διαβιβαστές) (Austen, K.F. 1980).

ΠΡΩΤΗ ΕΙΣΟΔΟΣ ΑΝΤΙΓΟΝΟΥ



Σχήμα 3.8 : Μηχανισμός αλλεργικής αντίδρασης (υπερευαισθησία άμεσου τύπου)

Οι χημικοί διαβιβαστές είναι :

α) ο PAF, για τον οποίο ήδη έχουν δοθεί αρκετά στοιχεία,

β) η Ισταμίνη (β - ιμιδαζολαιθανολαμίνη), που σχηματίζεται στους ιστούς με ενζυματική αποκαρβοξυλίωση της ιστιδίνης και προκαλεί πτώση της πίεσης, αύξηση της αγγειακής διαπερατότητας και σύσπαση των λείων μυών και ειδικότερα των βρόγχων δρώντας μέσα από δύο ισταμινικούς υποδοχείς, H₁ και H₂ (Black, J.W. et al. 1972).

γ) η Σεροτονίνη (5-υδροξυτρυπταμίνη) που σχηματίζεται ενζυμικά από την τρυπτοφάνη και αυξάνει την αγγειακή διαπερατότητα προκαλώντας πτώση της πίεσης και σύσπαση των λείων μυών του εντέρου και των βρόγχων (Greaves, M.W. and Shuster, S. 1967).

Τα κυριότερα είδη αναφυλακτικών αντιδράσεων που παρατηρούνται κατά την υπερευαισθησία τύπου I είναι το βρογχικό άσθμα, η αλλεργική ρινίτιδα, η κνίδωση, η δερματική αναφυλαξία, η συστηματική αναφυλαξία ή αναφυλακτικό shock, η αλλεργία από τροφές, η φαρμακευτική αλλεργία και η αλλεργία από έντομα (Παπαδημητρίου, Κ.Σ. 1982).

Πάντως πρέπει να τονιστεί ο κεντρικός ρόλος του PAF, που θεωρείται ότι είναι το "δεύτερο" βήμα για την πρόκληση της υπερευαισθησίας τύπου I. Αυτό αποδεικνύεται από το ότι όλα τα αλλεργικά συμπτώματα παρατηρούνται, όταν δοθεί μόνο ενέσιμος PAF σε μη ευαισθητοποιημένο ζώο, ενώ οι άλλοι παράγοντες προκαλούν μόνο μερικά από τα συμπτώματα.

Υπερευαισθησία τύπου II ή κυτταρολυτικός τύπος.

Τα αντισώματα, που παράγονται στον τύπο αυτό των ανοσολογικών αντιδράσεων, είναι του τύπου IgG ή IgM, και αντιδρούν είτε με αντιγόνα, που είναι συστατικά των κυττάρων (π.χ. πρωτεΐνη κυτταρικής μεμβράνης), είτε με απτίνες, που έχουν συνδεθεί με την κυτταρική μεμβράνη (π.χ. φάρμακα). Αποτέλεσμα της αντίδρασης αυτής είναι είτε η λύση του κυττάρου και η φαγοκύττωσή του, είτε η διέγερσή του και η παραγωγή αντισωμάτων, που στρέφονται όμως εναντίον των ίδιων των συστατικών του (αυτοαντισώματα).

Η υπερευαισθησία τύπου II έχει ως κλινικές εκδηλώσεις την αυτοάνοση αιμολυτική αναιμία, τη θρομβοπενική αιμορραγική πορφύρα, το σύνδρομο Goodpasture (καταστροφή της βασικής μεμβράνης των νεφρικών σπειραμάτων και των πνευμονικών κυψελίδων με αποτέλεσμα σπειραματονεφρίτιδα και αιμόπτυση), την ιδιοπαθή νόσο του Addison (ατροφία του φλοιού των επινεφριδίων) κ.λ.π.

Μια πολύ σημαντική κατηγορία αυτοαντισωμάτων είναι τα αντισώματα, που στρέφονται εναντίον των πρωτεϊνών του κυτταρικού πυρήνα. Τέτοια αντισώματα βρίσκονται στον ερυθηματώδη λύκο, όπου έχει εκτενώς μελετηθεί η συμμετοχή του PAF, καθώς και σε νόσους του κολλαγόνου (Παπαδημητρίου, Κ.Σ. 1982).

Υπερευαισθησία τύπου III ή αντίδραση με τη μεσολάβηση ανοσοσυμπλεγμάτων

Αυτό συμβαίνει, όταν υπάρχει περίσσεια αντιγόνου, οπότε τα ανοσοσυμπλέγματα που σχηματίζονται (κυρίως με το αντίσωμα IgG), εναποθέτονται στη βασική μεμβράνη του τοιχώματος των αγγείων και ενεργοποιούν το συμπλήρωμα, που με τη σειρά του προκαλεί αγγειοδιαστολή και χημειοταξία.

Κατ' αυτόν τον τρόπο συναθροίζονται φαγοκύτταρα, που φαγοκυτταρώνουν το αντιγόνο και απελευθερώνουν λυσοσωμικά ένζυμα. Τα τελευταία προκαλούν βλάβες στους παρακείμενους ιστούς (Μουτσόπουλος, Χ.Μ., Εμμανουήλ, Δ.Σ. 1984).

Η υπερευαισθησία τύπου III έχει ως κλινικές εκδηλώσεις την αντίδραση Arthus, την ορονοσία, την οζώδη περιαρτηρίτιδα και τη σπειραματονεφρίτιδα (Παπαδημητρίου, Κ.Σ. 1982).

Σήμερα έχει αποδειχθεί η συμμετοχή του PAF στις παραπάνω κλινικές εκδηλώσεις και θεωρείται πρωτεύουσα η συμμετοχή του στην ορονοσία (Camussi, G. et al. 1982).

Τύπος IV κυτταρικής υπερευαισθησίας ή υπερευαισθησία επιβραδυνόμενου τύπου.

Είναι αποτέλεσμα της σύνδεσης ευαισθητοποιημένων T-λεμφοκυττάρων με ειδικά αντιγόνα. Οι αλλοιώσεις που παρατηρούνται οφείλονται στην έκκριση λεμφοκινών από τα T_D λεμφοκύτταρα. Εκδηλώνεται 24-48 ώρες μετά την είσοδο του αντιγόνου, αλλά στην υπερευαισθησία αυτή δεν συμμετέχουν αντισώματα ή το συμπλήρωμα (Παπαδημητρίου, Κ.Σ. 1982).

Μικτός τύπος κυτταρικής και χημικής υπερευαισθησίας (ή τύπος απόρριψης των μοσχευμάτων), τύπος V

Για την πρόκληση αυτής της αντίδρασης υπεύθυνα είναι ειδικά αντιγόνα που βρίσκονται στην πλασματική μεμβράνη των κυττάρων και λέγονται αντιγόνα ιστοσυμβατότητας (ή αντιγόνα μεταμόσχευσης). Εκτός από το ρόλο που έχουν στην απόρριψη μοσχευμάτων (υπεροξεία, οξεία και χρόνια απόρριψη), συμμετέχουν στην άμυνα του οργανισμού εναντίον των λοιμώξεων από ιούς, ενεργοποιώντας τα κυτταροτοξικά λεμφοκύτταρα CTL ή T_k (Παπαδημητρίου, Κ.Σ. 1982).

Και στον τύπο αυτό έχει βρεθεί ότι ο PAF παίζει καθοριστικό ρόλο (Foegh, M.L. et al. 1987).

Φλεγμονή

Ο όρος φλεγμονή (inflammation) χρησιμοποιήθηκε για πρώτη φορά στην Ελληνική ιατρική την εποχή του Ιπποκράτη (460-380 π.Χ.), για να υποδηλώσει "το αντικείμενο που καίγεται" (the burning thing). Τον 1ο μ.Χ. αιώνα ο Ρωμαίος Κέλσος ανέφερε ότι τα κλινικά χαρακτηριστικά της φλεγμονής είναι τέσσερα, η ερυθρότητα (rubor), η εξοίδηση (tumor), ο πόνος (dolor) και η θερμότητα (calor). Σ'αυτά πρόσθεσε ο Γαληνός το 1892 και ένα πέμπτο χαρακτηριστικό, την αλλοιωμένη λειτουργία (function laesa).

Σήμερα, με τον όρο φλεγμονή, χαρακτηρίζεται η αντίδραση των αγγειακών και συνδετικών στοιχείων ενός ιστού σε ένα βλαπτικό παράγοντα και ο σχηματισμός ενός εξιδρώματος πλούσιου σε πρωτεΐνες και κύτταρα. Βλαπτικοί παράγοντες που μπορούν να προκαλέσουν μία φλεγμονή είναι τα μικρόβια, η θερμότητα, οι ακτινοβολίες, διάφορες χημικές ουσίες και τέλος διάφοροι μηχανικοί παράγοντες. Ανάλογα με τη χρονική της διάρκεια, η φλεγμονή διακρίνεται σε οξεία και χρόνια.

Χρόνια φλεγμονή

Χαρακτηρίζεται ιστολογικά από την παρουσία πολλών μονοπύρηνων κυττάρων (μονοκύτταρα, λεμφοκύτταρα, πλασματοκύτταρα και ηωσινόφιλα) και από την ανάπτυξη ινώδους συνδετικού ιστού. Συνήθως στη φλεγμονή αυτή δεν παρατηρούνται ερυθρότητα, θερμότητα και οίδημα.

Οξεία φλεγμονή

Η ανάπτυξη οξείας φλεγμονής χαρακτηρίζεται από βιοχημικές μεταβολές και ιστολογικές αλλοιώσεις (Παπαδημητρίου, Κ.Σ. 1982).

3.8 Παθοβιολογία του PAF

3.11.1 Συμμετοχή του PAF και των αιμοπεταλίων στη θρόμβωση

Η συμμετοχή του PAF και των αιμοπεταλίων στο σχηματισμό θρόμβων απεδείχθη για πρώτη φορά σε εργασίες του Chignard et al. (Chignard, M. et al. 1979, Chignard, M. et al. 1980), όπου διαπιστώθηκε πως τα αιμοπετάλια κουνελιού μετά από διέγερση με ιονοφόρο A23187, θρομβίνη ή κολλαγόνο εκκρίνουν μια ουσία, η οποία προκαλεί ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων του ανθρώπου και του κουνελιού, είναι ανεξάρτητη του ADP και AA και η οποία αργότερα βρέθηκε ότι είναι ο PAF. Επίσης ο PAF ελευθερώνεται από ανθρώπινα αιμοπετάλια μετά από διέγερση με ιονοφόρο A23187 ή θρομβίνη (Touqui, L. et al. 1985a) και μάλιστα όταν ένας αναστολέας της ακετυλοϋδρολάσης εμποδίζει την αποικοδόμησή του. Οι ανταγωνιστές του PAF (Kloprogge, E., Akkerman, J.W.N. 1986) δεν εμποδίζουν τον πρώτο και δεύτερο δρόμο συσσώρευσης των ανθρώπινων αιμοπεταλίων, πράγμα που οδηγεί στην υπόθεση ότι ο PAF είναι μεσολαβητής του τρίτου δρόμου συσσώρευσης των αιμοπεταλίων.

Επίσης ο PAF και η επινεφρίνη έχουν συνεργιστική δράση στη συσσώρευση των ανθρώπινων αιμοπεταλίων (Fouque, F. and Vargaftig, B.B. 1984, Lauri, O. et al. 1985), η οποία καταστέλλεται από τους αναστολείς του PAF.

3.8.2 Συμμετοχή του PAF στην φλεγμονή

Ο PAF ανήκει στην κατηγορία των ουσιών, που εκκρίνονται από τα κύτταρα. In vitro προκαλεί χημειοταξία και αύξηση της τάσης για προσκόλληση των PMN.

In vivo, προκαλεί σύσπαση των τριχοειδών αγγείων και αύξηση της διαπερατότητάς τους. Η δραστηριότητά του PAF στη πρόκληση αυτής της φλεγμονώδους αντίδρασης, είναι πολύ μεγαλύτερη από την αντίστοιχη της ισταμίνης και σεροτονίνης (Humphrey, D.M. et al. 1984). Επίσης προκαλεί εξίδρωση συστατικών του πλάσματος και περιφериοποίηση, προσκόλληση και μετανάστευση των λευκοκυττάρων (Humphrey, D.M. et al. 1982). Παράλληλα, ο PAF προκαλεί εξαγγείωση και συνάθροιση στους γύρω ιστούς αιμοπεταλίων και ερυθρών αιμοσφαιρίων (Morley, J. et al. 1983).

Η αγγειοσύσπαση και η αύξηση της διαπερατότητας που προκαλεί ο PAF, είναι ανεξάρτητες από την ενεργοποίηση των ουδετεροφίλων, μαστοκυττάρων και αιμοπεταλίων και δεν αναστέλλεται από τη δέσμευση των ισταμινικών υποδοχέων H_1 (Humphrey, D.M. et al. 1984). Επίσης, η δράση αυτή δεν αναστέλλεται από την ινδομεθακίνη, δηλαδή δεν εξαρτάται από τα προϊόντα της μεταβολικής πορείας της κυκλοξυγονάσης (Bjork, J. and Smedegard, G. 1983).

Οι αγωνιστές των α και β αδρενεργικών υποδοχέων (φαινυλεφρίνη και ισοπρεναλίνη) αναστέλλουν την αύξηση της διαπερατότητας των τριχοειδών και την εξίδρωση συστατικών του πλάσματος που προκαλεί ο PAF (Morley, J. et al. 1983).

Ενδοτραχειακή ενστάλλαξη PAF σε κουνέλια προκαλεί οξεία φλεγμονή στους πνεύμονες, που χαρακτηρίζεται από συνάθροιση μακροφάγων στους κυψελιδικούς χώρους, εκφυλιστικές και νεκρωτικές αλλοιώσεις στο κυψελιδικό επιθήλιο και συσώρευση PMN και αιμοπεταλίων στους αυλούς των τριχοειδών αγγείων των κυψελίδων με εκφυλιστικές αλλοιώσεις των ενδοθηλιακών κυττάρων.

Ακόμα, παρατηρείται διήθηση του κυψελιδικού διαφράγματος από φλεγμονώδη κύτταρα και αργότερα πνευμονική ίνωση. Σε αντίθεση με τον PAF, ενστάλλαξη lyso-PAF στους βρόγχους, δεν προκαλεί καμία φλεγμονώδη αντίδραση (Camussi, G. et al. 1983d).

Τέλος, ενδοδερμική ένεση 10 μ L PAF συγκέντρωσης 10^{-7} M στον άνθρωπο, προκαλεί ακαριαίο άσπρισμα του δέρματος (αγγειοσυστολή) και 30-60sec αργότερα, περιφερικό ερύθημα διαμέτρου 10-30 mm. Ακολουθεί σχηματισμός κηλιδο-βλατιδώδους εξανθήματος, που ολοκληρώνεται σε 5-10min. Σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις, 10^{-6} M, ο PAF προκαλεί καυσalgία και κνησμό, που συνήθως συνοδεύονται από ανάπτυξη κηλιδοβλατιδώδους εξανθήματος.

Από τις παραπάνω μελέτες έχει διαπιστωθεί ότι ο PAF είναι 100 φορές δραστικότερος από την ισταμίνη και η δράση του αυτή δεν επηρεάζεται από την πρεδνιζολόνη, ενώ η δέσμευση των H_1 και H_2 υποδοχέων μειώνει αλλά δεν αναστέλλει πλήρως τη δράση αυτή. Τέλος, ο lyso-PAF είναι τελείως αδρανής στο ενδοδερμικό αυτό τεστ (Pinckard, R.N. et al. 1980b).

3.8.3 Άσθμα και συστηματική αναφυλαξία

Ο PAF συμμετέχει και στο άσθμα, αφού έχει την ικανότητα, όπως αναφέρθηκε παραπάνω, να προκαλεί βροχοσπασμούς και φλεγμονή των πνευμόνων.

In vivo στο κουνέλι, ο PAF ελευθερώνεται κατά τη συστηματική αναφυλαξία, από τα αιμοπετάλια του αίματος (Halonen, M. et al. 1985), αλλά και από άλλες πηγές, όπως τα κυψελιδικά μακροφάγα (Maridonneau-Parini, I. et al. 1985).

Έτσι στο κυκλοφορικό σύστημα, 30 δευτερόλεπτα από την ένεση PAF, παρατηρούνται θρομβοκυττοπενία (που οφείλεται σε ενδοαγγειακή συσώρευση των αιμοπεταλίων και συνάθροισή τους στα πνευμονικά αγγεία), ουδετεροφιλοπενία, βασεοφιλοπενία και έκκριση TXB_2 και PF_4 (McManus, L.M. et al. 1980).

Επίσης επιδρά και στην καρδιακή λειτουργία, αφού στα πρώτα 5 λεπτά από την ένεση παρατηρείται παροδική βραδυκαρδία, αύξηση της πίεσης στην δεξιά κοιλία και μεγάλη πτώση της κεντρικής πίεσης (Halonen, M. et al. 1980).

Επίσης ο PAF που ελευθερώνεται από καρδιά, που έχει υποστεί αντιγονική πρόκληση, προκαλεί μια δυσλειτουργία που μοιάζει με εκείνη που παρατηρείται στην καρδιακή αναφυλαξία (Levi, R. et al. 1984, Levi, R. et al. 1987).

Η ελάττωση της συστολής του μυοκαρδίου και της ροής της στεφανιαίας της καρδιάς ινδοχοίρου, που προκαλείται από τον PAF αναστέλλεται από το BN-52021 και BN-52020 (Barannes, J. et al. 1986) καθώς επίσης την κατσουρενόνη, L-652731 και L-653150, υποδηλώνοντας ότι το φαινόμενο οφείλεται αποκλειστικά στον PAF.

Στα κουνέλια ο PAF προκαλεί στο αναπνευστικό τους σύστημα μείωση της αναπνευστικής συχνότητας με περιόδους άπνοιας, που οφείλεται σε καταστολή του αναπνευστικού κέντρου (Repine, J.E. and Heffner, J.E. 1983).

Επίσης προκαλεί βρογχόσπασμο, αύξηση της πίεσης στις πνευμονικές αρτηρίες και πνευμονικό οίδημα, μεταβολές που εξαρτώνται από την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων (Halonen, M. et al. 1981).

Παρόμοια δράση έχει ο PAF στο ινδικό χοιρίδιο (Demopoulos, C.A. et al. 1981) και τον κυνοπίθηκο (McManus, L.M. et al. 1981).

Στο σκύλο προκαλεί πτώση της κεντρικής πίεσης, ταχυκαρδία, ελάττωση της πίεσης στην αριστερή κοιλία, σύσπαση των στεφανιαίων αγγείων με παράλληλη μείωση της ροής του αίματος (Mardin, M. et al. 1984).

Τόσο ενδοφλέβια όσο και στην από το στόμα χορήγηση του PAF σε υπερτασικούς επίμυες, προκαλεί μεγάλη πτώση της πίεσης (Braquet, P. et al. 1986, Masugi, F. et al. 1982), που οφείλεται σε περιφερειακή αγγειοδιαστολή.

Η τοπική ή συστηματική χορήγηση του PAF καταστρέφει το κροσσωτό επιθήλιο της αναπνοής (Hahn, H.L. et al. 1986).

Η ικανότητα του PAF να ενισχύει το βρογχόσπασμο παρουσία άλλων παραγόντων σε πάσχοντες από άσθμα, ενισχύει την άποψη της σχέσης του PAF με το άσθμα (Detsouli, A. et al. 1985, Morley, J. et al. 1984).

3.8.4 Ανοσολογική Απόκριση

Πιστεύεται ότι ο PAF ρυθμίζει και τις λειτουργίες των λεμφοκυττάρων είτε έμμεσα, αφού προκαλεί το σχηματισμό λευκοτριενίων στους πνεύμονες, τα οποία με τη σειρά τους είναι σημαντικοί ρυθμιστές των λειτουργιών των λεμφοκυττάρων (Muller-Eberhard, H.J., Complement, Ann. 1975), είτε άμεσα

δρώντας επάνω στα Τ-κύτταρα και τις λειτουργίες των μακροφάγων (Braquet, P. et al. 1987a).

Τα λεμφοκύτταρα μπορούν να παράγουν είτε lyso-PAF (ύστερα από διέγερσή τους με ιονοφόρο A23187) (Jouvin-Marche, E. et al. 1984), είτε να εκκρίνουν PAF (ύστερα από διέγερση του υποδοχέα Fc) (Malavasi, F. et al. 1986). Αλλά και ανθρώπινα λευχαιμικά κύτταρα (προέλευσης Β και Τ) είναι ικανά να ελευθερώσουν μια ουσία, που μοιάζει με τον PAF, με κατάλληλη διέγερση με A23187, φυτοαιμο-συγκολλητίνη και ακετυλο-συνένζυμο Α (Bussolino, F. et al. 1984).

3.8.5 Άλλες παθοβιολογικές δράσεις του PAF

Ο PAF σήμερα έχει βρεθεί ότι εμπλέκεται σε ένα πολύ μεγάλο αριθμό ασθενειών και παθολογικών καταστάσεων.

Έχει βρεθεί ότι PAF ελευθερώνεται κατά την απόρριψη μοσχευμάτων νεφρού, ενώ η κατεργασία καρδιακών μοσχευμάτων αρουραίου με αναστολείς του PAF (Foegh, M.L. et al. 1987) καθυστερεί σημαντικά την απόρριψη μοσχεύματος. Ο PAF συμμετέχει στον ερυθρηματώδη λύκο, με εκκρινόμενη ποσότητα PAF μικρότερη στην οξεία φάση της νόσου από εκείνη της περιόδου ύφεσης.

Προκαλεί ελευθέρωση θρομβοξάνης και προσταγλανδινών σε απομονωμένους νεφρούς κουνελιών και αρουραίων, που η έκκριση αυτή αναστέλλεται με τον BN-52021 ή την κατσουρενόνη (Braquet, P. et al. 1987a). Επίσης ο PAF ελευθερώνεται από νεφρούς αρουραίου (Braquet, P. et al. 1987a) και ανθρώπου (Sanchez-Crespo, M. et al. 1983a).

Σχετίζεται ακόμα με ασθένειες του αμφιβληστροειδούς (Braquet, P. et al. 1984) προκαλώντας έντονο αιμάτωμα τόσο σ'αυτόν όσο και στον κερατοειδή. Ο αναστολέας του PAF BN-52021 ανταγωνίζεται την άνοση κερατίτιδα και ενεργοποιεί την αναγέννηση του κερατοειδή, όταν χορηγείται τοπικά (Braquet, P. et al. 1987a).

Εμπλέκεται και με την εγκυμοσύνη, αφού ο PAF εμφανίζεται στο αμνιακό υγρό (Billah, M.M. et al. 1985, Billah, M.M. and Johnston, J.M. 1983) και τη μήτρα του κουνελιού κατά την εγκυμοσύνη (Braquet, P. et al. 1984).

Και στην χημειοθεραπεία του καρκίνου φαίνεται να εμπλέκεται ο PAF, αφού φωσφολιπιδικά ανάλογα του PAF, τα ALP, είναι πιθανό να προσφέρουν μια νέα προσέγγιση στη χημειοθεραπεία του καρκίνου (Berdel, E. 1986).

Τέλος εμπλέκεται και με τη διαφοροποίηση των κυττάρων κατά την ανάπτυξη του νευρικού συστήματος (Braquet, P. et al. 1984).

Μια άλλη περιοχή δράσης του PAF σε συνδυασμό με την βακτηριακή ενδοτοξίνη είναι το έντερο, όπου έχει αποδειχθεί ότι στον αρουραίο η νέκρωση του εντέρου μπορεί να συμβεί ύστερα από συνδυασμένη χορήγηση PAF και ενδοτοξίνης (Gonzalez-Crussi, F., Hsueh, W. 1983).

Σε πειράματα με πνεύμονες ινδικού χοιριδίου (Tounay, C. et al. 1986a) κατεργασμένους ή όχι με ενδοτοξίνη αποδείχθηκε η συμμετοχή του PAF μόνο κατά την ενδοτοξαιμία.

Ο PAF προκαλεί υπεργλυκαιμία, όπως και η ενδοτοξίνη (Olson, M.S. et al. 1986), που όμως αναστέλλεται από το BN-52021 (Berdel, E. 1986). Ο PAF είναι ο πιο ισχυρός πρόξενος έλκους στον αρουραίο, που έχει μέχρι τώρα περιγραφεί (Gonzalez-Crussi, F., Hsueh, W. 1983).

Ο σχηματισμός αυτός του έλκους μοιάζει με τις γαστρεντερικές βλάβες, που παρατηρούνται μετά τη χορήγηση της ενδοτοξίνης (Rosam, A.C. et al. 1986).

Έτσι ο PAF προκαλεί αιμορραγικές βλάβες στο στομάχι και το λεπτό έντερο (Berdel, E. 1986). Σπουδαία ένδειξη για το ρόλο του PAF στη γαστρεντερική νέκρωση, που προκαλείται από ενδοτοξίνη, ήταν η παρατήρηση κατά την οποία οι αναστολείς του PAF BN-52021 (Surles, J.R. et al. 1985) και CV-3988 (Wallace, J.L. and Whittle, B.J.R. 1986) αναστέλλουν το σχηματισμό γαστρεντερικών ελκών, και μάλιστα όταν οι δόσεις των αναστολέων ήταν τέτοιες που εμποδίζουν την πρόκληση γαστρεντερικών βλαβών από τον PAF.

Μια άλλη δράση του PAF είναι η ικανότητά του να διεγείρει τη διάσπαση του γλυκογόνου προς ελεύθερες μονάδες φωσφογλυκόζης.

Το 1983 αναφέρθηκε για πρώτη φορά από την ερευνητική ομάδα του D.J. Hanahan στο San Antonio του Texas των ΗΠΑ, οι οποίοι διαπίστωσαν κατ' αρχή ότι η χορήγηση PAF σε εκπλυθέν ήπαρ επίμυος προκαλούσε μια δραματική παροδική αύξηση της γλυκόζης στα υγρά εκροής του ήπατος (Shukla, S.D. et al. 1983).

Το φαινόμενο αυτό ήταν δοσο-εξαρτώμενο σε σχέση με την τελική συγκέντρωση του PAF στο υγρό έκχυσης, αλλά σε μεγαλύτερη συγκέντρωση PAF (2×10^{-8} M) προκάλεσε ένα πιο σύνθετο φαινόμενο (Buxton, D.B. et al. 1984).

Το φαινόμενο αυτό της διέγερσης της γλυκογονόλυσης είναι χαρακτηριστικό του PAF και όχι του lyso-PAF ή του sn-1 στερεοϊσομερούς του PAF, τα οποία δεν εμφανίζουν καμιά ανάλογη δράση ακόμα και σε συγκεντρώσεις πολύ μεγαλύτερες του PAF (Fisher, R.A. et al. 1984).

Η γλυκογονόλυση εξαρτάται ακόμα από το Ca^{2+} (Buxton, D.B. et al. 1984).

3.9 Αναστολείς του PAF

Ο PAF είναι ένας ισχυρότατος μεσολαβητής με πολλές βιολογικές δράσεις τόσο *in vitro* όσο και *in vivo*. Η πληθώρα των δράσεών του έδωσε ώθηση σε μια μεγάλη ερευνητική προσπάθεια, που συνεχίζεται μέχρι σήμερα, η οποία έχει σκοπό την ανακάλυψη αναστολέων των δράσεών του.

Κατά συνέπεια, η ανακάλυψη ειδικών αναστολέων του PAF έχει μεγάλη σημασία, γιατί μπορεί να βοηθήσει αφ'ενός μεν στη διεκρίνιση του ρόλου του PAF στις φυσιοπαθολογικές καταστάσεις που εμπλέκεται και αφ'ετέρου στην εξακρίβωση της διαμόρφωσης των περιοχών σύνδεσής του καθώς και του μηχανισμού δράσης του. Τέλος, οι αναστολείς του PAF μπορεί να ενισχύσουν τη μη στεροειδή αντιφλεγμονώδη φαρμακολογία (Koltai, M. et al. 1994, Guinot, P. 1994, Summers, J.B., Albert, D.H. 1995, Fragopoulou, E. et al. 2000).

Τα κυριώτερα βιολογικά συστήματα που χρησιμοποιούνται για να ελέγξουν την ανταγωνιστική δράση διαφόρων ενώσεων έναντι του PAF είναι :

α) *in vitro*, η συσσώρευση και η έκκριση αιμοπεταλίων, η ενεργοποίηση των PMN (συσσώρευση, αποκοκκίωση, έκκριση ενζύμων, χημειοταξία και παραγωγή ελευθέρων ριζών) και η ειδική πρόσδεση σε ολικά κύτταρα (αιμοπετάλια, PMN) ή σε μεμβρανικά παρασκευάσματά τους.

Ο βιολογικός προσδιορισμός (έλεγχος συσσώρευσης αιμοπεταλίων) είναι ο πρωταρχικός και κύριος έλεγχος για τους αναστολείς του PAF, λόγω της ευκολίας μέτρησης της συσσώρευσης αιμοπεταλίων καθώς και της ανακάλυψης υποδοχέων του PAF στα αιμοπετάλια (Winslow, C.M. et al. 1985).

β) *in vivo*, τα σημαντικότερα συστήματα είναι η υποτασική δράση του PAF κυρίως στους επίμυες (Tselepis, A.D. κ.α. 1987), η αιμοσυμπύκνωση και η βρογχο-σύσπαση σε διάφορα πειραματόζωα. Τα πιο ευαίσθητα και περισσότερα συνηθισμένα πειραματόζωα είναι οι ινδόχοιροι (Handley, D.A. et al. 1986, Handley, D.A. et al. 1984) και τα κουνέλια (McManus, L.M. et al. 1981).

Οι αναστολείς του PAF διακρίνονται σε ειδικούς και μη ειδικούς αναστολείς.

3.9.1 Μη ειδικοί αναστολείς

Εδώ ανήκουν :

α) Οι ανταγωνιστές ιόντων ασβεστίου (Khan, S.N. et al. 1985), που δεσμεύουν τα κανάλια ασβεστίου, οι αναστολείς της καλμοδουλίνης καθώς και τοπικά αναισθητικά. Η βεραπαμίλη αναστέλλει τη συσσώρευση αιμοπεταλίων που προκαλείται από τον PAF στους ανθρώπους ($IC_{50}=22\mu m$) (Mac Intyre,

D.E. and Shaw, A.M. 1983) και στα κουνέλια ($IC_{50} < 10^{-4}$ M). Ακόμα προκαλεί αποφωσφορυλίωση της 40.000 Dalton πρωτεΐνης των αιμοπεταλίων. Το TMB-8 μπλοκάρει την έκκριση σεροτίνης από τον PAF και την φωσφορυλίωση των 41.000, 40.000 και 20.000 Dalton πρωτεϊνών των αιμοπεταλίων (Khan, S.N. et al. 1985).

Επίσης οι ανταγωνιστές της καλμοδουλίνης W-5, W-7 και η τριφλουοπεραζίνη εμφανίζουν ελαφρά αναστολή στη συσσώρευση των αιμοπεταλίων του ανθρώπου, του ινδόχοιρου και του κουνελιού (Levy, J.V. 1983), που προκαλείται από τον PAF. Η ένωση W-7 μειώνει την παραγωγή ελεύθερων ριζών, που προκαλεί ο PAF (Hartung, H.P. 1983).

β) Άλλες ουσίες όπως η ναλοξόνη, η τρικλοπιδίνη, η ατροπίνη, αναστολείς φωσφολιπασών, κ.λ.π. Η τρικλοπιδίνη αναστέλλει τη συσσώρευση αιμοπεταλίων που προκαλεί ο PAF στους ανθρώπους ($IC_{50} = 10$ μ M) και στα κουνέλια ($IC_{50} > 30$ μ M) (Keraly, C.L. et al. 1984). Σημαντική μείωση στην προκαλούμενη από τον PAF συσσώρευση αιμοπεταλίων παρατηρήθηκε επίσης σε ασθενείς που είχαν πάρει 250-1000mg/ημέρα τρικλοπιδίνη από το στόμα (LecRUbier, C. et al. 1983).

Ενδιαφέρον παρουσιάζει επίσης η C-αντιδρούσα πρωτεΐνη. Αυτή αναστέλλει τη συσσώρευση που προκαλείται από τον PAF αλλά και σταθεροποιεί την αιμοπεταλιακή μεμβράνη απέναντι στη λυτική δράση του Lyso-PAF (Vigo, G.J. 1985).

γ) Ουσίες όπως οι PGI_2 , PGE_1 και β_2 -ανταγωνιστές, όπως η σαλβουταμόλη για το c-AMP ή αναστολείς της φωσφοδιεστεράσης. Οι δράσεις του PAF αναστέλλονται από τις προσταγλανδίνες στα αιμοπετάλια του ανθρώπου και του κουνελιού (Miller, O.V. et al. 1982), καθώς επίσης και η προκαλούμενη από τον PAF ουδετεροπενία και θρομβοκυτοπενία στα κουνέλια (Camussi, G. et al. 1983e).

Ένα ανάλογο της PGE_1 , το OP-1206, αναστέλλει τη συσσώρευση ανθρώπινων αιμοπεταλίων και PMN που προκαλείται από τον PAF (Hecker, G. et al. 1987).

δ) Αναστολείς της κυκλοξυγονάσης και της λιποξυγονάσης, των οποίων η δράση είναι σε αρκετές περιπτώσεις αντιφατική, υπονοώντας τη συμμετοχή του θρομβοξανίου A_2 και των λευκοτριενίων σε μερικές δράσεις του PAF.

ε) Το 2,3-διφωσφογλυκερινικό οξύ (DPG), οι θειόλες καθώς και αναστολείς της παραγωγής ελεύθερων ριζών (Καρκαμπούνας, Σ. κ. α. 1990).

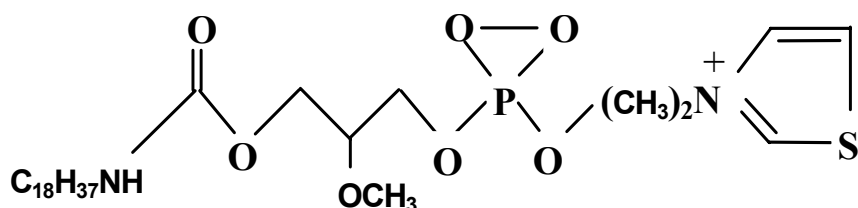
στ) Αναφέρονται επίσης στη βιβλιογραφία ανταγωνιστές του PAF από φυσικές πηγές, οι οποίοι όμως αναστέλλουν και τη συσσώρευση αιμοπεταλίων που προκαλείται και από τη θρομβίνη (Orevi, M. et al. 1995).

Οι περισσότερες από τις δομές των αναστολέων αυτών δεν έχουν ακόμα διευκρινισθεί.

3.9.2 Ειδικοί αναστολείς

Διακρίνονται σε δομικά ανάλογα του PAF, σε φυσικά προϊόντα και σε συνθετικές ουσίες.

Δομικά Ανάλογα



Σχήμα 3.9. Δομή του CV-3988

Η πρώτη προσέγγιση ήταν ότι δομικά ανάλογα του PAF, που δεν θα μπορούσαν να προκαλέσουν συσσώρευση αιμοπεταλίων, θα μπορούσαν όμως να δεσμευτούν στους υποδοχείς του PAF και να μην επιτρέψουν την πρόσδεσή του και κατά συνέπεια και τη δράση του. Το πρώτο παράγωγο ήταν το CV-3988 (Σχ. 3.9), το οποίο περιλαμβάνει μια αλυσίδα 18 ατόμων άνθρακα στην πρώτη θέση του γλυκερινικού σκελετού, μια μεθοξυ-ομάδα στη θέση 2 και τριαζολο-αιθυλο φωσφορική ομάδα στη θέση 3, όπως φαίνεται στο σχήμα.

Οι τιμές K_i του CV-3988 για την ειδική δέσμευση του [^3H]PAF στα αιμοπετάλια ανθρώπου, κουνελιού και ινδόχοιρου είναι $1,6 \times 10^{-7}$, $1,2 \times 10^{-7}$ και $1,8 \times 10^{-7}$ M, αντίστοιχα (Terashita, Z. et al. 1985a).

Σε υψηλότερες συγκεντρώσεις εμφανίζει ανασταλτική δράση *in vitro* στο αραχιδονικό οξύ, στο ADP (Nunez, D. et al. 1986) και στο κολλαγόνο (Oura, Y. et al. 1987).

Στους αρουραίους αναστέλλει δοσο-εξαρτώμενα την υποτασική δράση τόσο του PAF (Terashita, Z. et al. 1983), όσο και της ενδοτοξίνης (Terashita, Z. 1985b), ενώ σε υπερτασικούς αρουραίους αντισταθμίζει την πτώση της πίεσης του αίματος στο πρότυπο νεφρού με απόφραξη μιας αρτηρίας (Masugi, F. 1984) και εμποδίζει το θάνατο των ποντικών που προκαλείται από τον PAF (Terashita, Z. et al. 1987).

Το CV-3988 αναστέλλει την αύξηση της διαπερατότητας των αγγείων που προκαλείται στο δέρμα του αρουραίου (Hayashi, M. et al. 1987) από τον

PAF, όπως επίσης και τις αλλαγές στην έκκριση βλέννας και στο αναπνευστικό και κυκλοφορικό σύστημα στο κουνάβι (Lang, M. et al. 1987).

Η προκαλούμενη από τον PAF αιμοσυμπύκνωση στους αρουραίους (Terashita, Z. 1985b) και στους ινδόχοιρους (Handley, D.A. et al. 1986a) παρεμποδίζεται επίσης από το CV-3988. Ακόμα εμποδίζονται αρκετές δερματικές αναφυλακτικές αντιδράσεις (Issekutz, A.C. and Szpejda, M. 1986) καθώς και οι γαστροεντερικές βλάβες, που προκαλεί η ενδοτοξίνη (Wallace, J.L. and Whittle, B.J.R. 1986).

Σε εθελοντές που δόθηκε το CV-3988 εμφανίστηκε μειωμένη ευαισθησία των αιμοπεταλίων τους απέναντι στον PAF. Παρατηρήθηκε μια μικρή αλλαγή στην αιμογλοβίνη του πλάσματος και την απτογλοβίνη του ορού (Arnout, J. et al. 1987), ενώ η πίεση του αίματος, ο σφυγμός και ο ρυθμός αναπνοής έμειναν ανεπηρέαστα.

Συνεχείς αντικαταστάσεις των ομάδων στο σκελετό του CV-3988 κατέληξαν στην παρακάτω σειρά δραστηριότητας :

Για την πρώτη θέση του σκελετού :

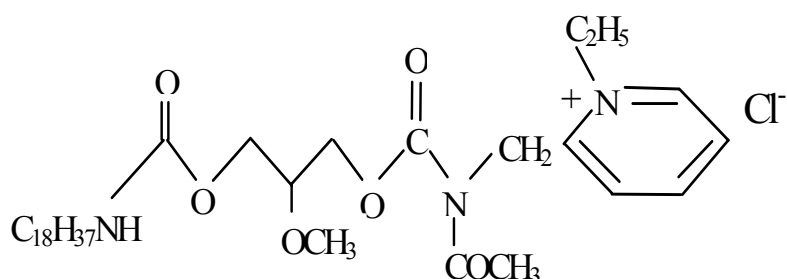
-O-CONH- > -NHCO-O- > -O-CO- > -O-

Για τη δεύτερη θέση του σκελετού :

-O-COOCH₃ > -O-CONHCH₃ > -O-COCH₃ > -OCH₃

Για την τρίτη θέση του σκελετού :

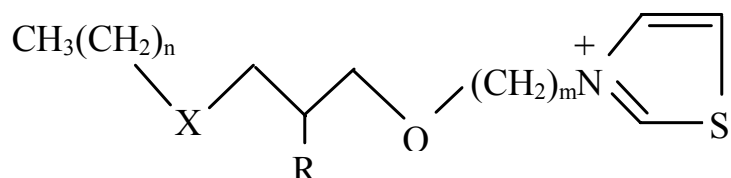
-O-CO-> -O-CO-O-> -NHCO- > -NHSO₂ > -O-PO₂ ~ -PO₂-O- > -O-PO₂-O-.



Σχήμα 3.10: Δομή του CV-6209

Το δραστικότερο συστατικό της σειράς CV είναι το CV-6209 (Σχ. 3.10) (Takatani, M. et al. 1989), το οποίο είναι 80 φορές πιο δραστικό από το CV-3988.

Το CV-6209 αναστέλλει τη συσσώρευση των αιμοπεταλίων κουνελιού και ανθρώπου που προκαλείται από τον PAF με $IC_{50}=7,5 \times 10^{-8}$ και $1,7 \times 10^{-7}$ M, αντίστοιχα, αναστέλλει ή αντιστρέφει την υποτασική δράση του PAF στους επίμυες με $ED_{50}=9$ μ g/Kg και 4,6 μ g/Kg ενδοφλέβια, αντίστοιχα και προστατεύει τα ποντίκια από την προκαλούμενη από τον PAF θνησιμότητα (Terashita, Z. 1985b).

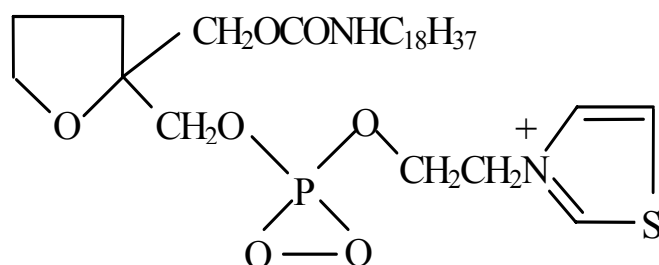


1. $n=17$, $x=NHCO_2$, $R=OCH_3$, $m=4$
2. $n=15$, $x=O$, $R=OC_2H_5$, $m=7$
3. $n=17$, $x=NHCO_2$, $R=OCO_2CH_3$, $m=4$
4. $n=17$, $x=OCON(C_3H_7)$, $R=OCONHCH_3$, $m=4$

Σχήμα 3.11: Δομή των SRI 63-119, ONO-6240, και Ro 19-3704

Αντικατάσταση της PO_3^- ομάδας στο CV-3988 με $-CH_2CH_2-$ δίνει το SRI 63-119 (Σχ. 3.11), ένα δραστικό αναστολέα της συσσώρευσης αιμοπεταλίων που προκαλείται από τον PAF στον άνθρωπο, στον ινδόχοιρο, στο κουνέλι, στο σκύλο και στον κυνοπίθηκο, με τιμές $IC_{50}=3,8$, 0,05 , 0,4 , 5,9 και 4,3 μ M αντίστοιχα (Winslow, C.M. et al. 1987).

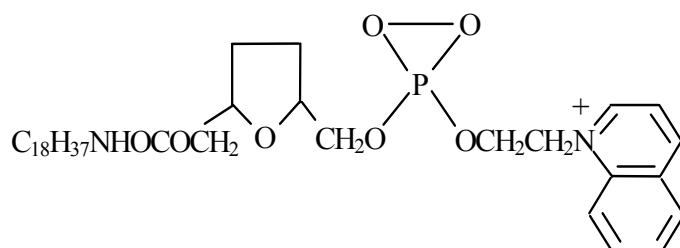
Το SRI 63-119 αναστέλλει επίσης τη βρογχοσυσπασση ($ED_{50}=0,14$ ενδοαρτηριακά (IA) και την αιμοσυμπύκνωση ($ED_{50}=0,17$ IA) (Handley, D.A. et al. 1987), που προκαλείται από τον PAF στα πρωτόγονα ανθρωποειδή (Handley, D.A. et al. 1986b).



Σχήμα 3.12: Δομή του SRI 63-072

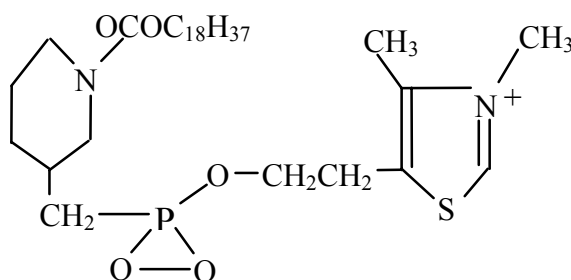
Και τα υπόλοιπα μέλη αυτής της ομάδας όπως το SRI 63-072, SRI 63-073 και το SRI 63-441 εμφανίζουν ανταγωνιστική δράση.

Αυτές οι ενώσεις (Σχήματα 3.12, 3.13 και 3.14) αναστέλλουν την υποτασική δράση του PAF, της ενδοτοξίνης και των ανοσοσυμπλεγμάτων στους επίμυες (Handley, D.A. et al. 1986d), την αιμοσυμπύκνωση και τη βρογχοσυσπωση που προκαλεί ο PAF στον ινδόχοιρο (Handley, D.A. and Saunders 1986c), καθώς επίσης την υπόταση και την αιμοσυμπύκνωση που προκαλεί ο PAF στους σκύλους (Handley, D.A. et al. 1986d).



Σχήμα 3.13: Δομή του SRI 63-073

Παρεμποδίζουν επίσης την αιμοσυμπύκνωση, που προκαλείται από τον PAF και τις αναπνευστικές αντιδράσεις στα πρωτόγονα ανθρωποειδή (Handley, D.A. et al. 1986d) και την αντίστροφη παθητική αντίδραση arthus στους ινδόχοιρους (Deacon, R.W. et al. 1986).



Σχήμα 3.14: Δομή του SRI 63-441

Τα SRI 63-072 και SRI 63-119 αναστέλλουν τα ισχαιμικά έλκη του πεπτικού συστήματος στους επίμυες (Gonzalez-Crussi, F. et al. 1986).

Το δραστικότερο συστατικό της σειράς είναι το SRI 63-441, το οποίο αναστέλλει όλες τις κύριες φυσιολογικές αντιδράσεις στους επίμυες, στον ινδόχοιρο, στους σκύλους και στα πρωτόγονα ανθρωποειδή (Handley, D.A. et al. 1986d).

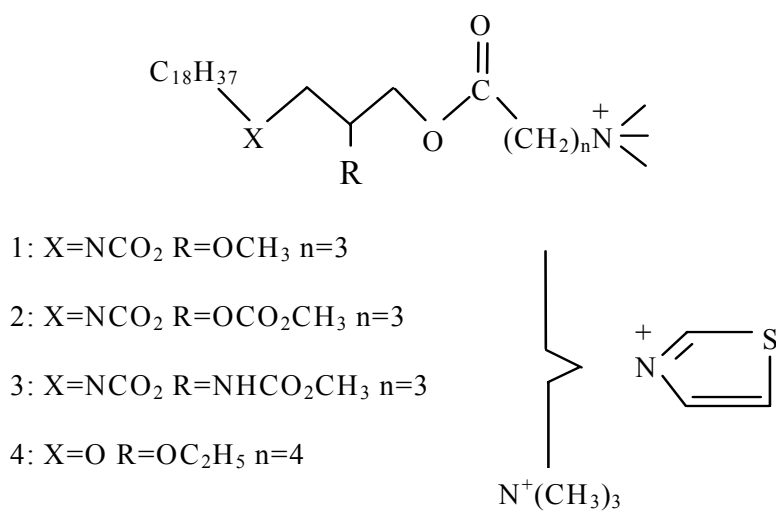
Οι εναντιομερείς μορφές του SRI 63-072 εμφανίζουν ίδια ανασταλτική ικανότητα όσον αφορά την πρόσδεση του PAF στους υποδοχείς του (Winslow, C.M. et al. 1987) και την αιμοσυμπύκνωση που προκαλεί στους ινδόχοιρους (Handley, D.A., αδημοσίευτες παρατηρήσεις), σε αντίθεση με τον PAF, ο οποίος εμφανίζει μειωμένη δραστηριότητα, όταν μετατρέπεται από R σε S (Heymans, F. et al. 1981).

Εξειδίκευση στις εναντιομερείς μορφές δεν εμφανίζει και το SRI 63-119.

Αντικατάσταση της ομάδας του φωσφόρου στο CV-3988 με επταμεθυλενοτρίαζόλιο δίνει μια άλλη ομάδα ανταγωνιστών του PAF, μέλος της οποίας είναι το ONO-6240. (Σχ. 3.13). Η ένωση αυτή αναστέλλει την συσσώρευση αιμοπεταλίων που προκαλείται από τον PAF στους ινδόχοιρους ($IC_{50}=0,2 \mu M$) και παρεμποδίζει την υποτασική δράση του PAF και τη βρογχοσυσπασση στους επίμυες και στους ινδόχοιρους (Miyamoto, T. et al. 1985).

Επίσης, το ONO-6240 παρεμποδίζει μερικώς τη μείωση στον όγκο παλμού και στη συστηματική αρτηριακή πίεση στο μοντέλο προβάτων με ενδοτοξίνη από E-coli (Toyofuku, T. et al. 1986).

Η αντικατάσταση της φωσφορικής ομάδας του CV-3988 με $-COCH_3$ και η τροποποίηση της $-OCH_2-$ ομάδας, μας δίνει μια καινούργια ομάδα ανταγωνιστών, στην οποία συμπεριλαμβάνονται τα Ro 18-7953, Ro 19-1400 και Ro 18-8736 (Σχ. 3.15).



Σχήμα 3.15. Δομή των Ro 18-7953, Ro 19400, Ro 18-87366 και RU 45703.

Αναστέλλουν την προκαλούμενη από τον PAF συσσώρευση ανθρωπίνων αιμοπεταλίων με τιμές IC_{50} : 0,50, 0,40, 0,07 μM αντίστοιχα και τη δημιουργία θρόμβων αιμοπεταλίων in vivo (Hadvary, P. and Baumgartner 1985).

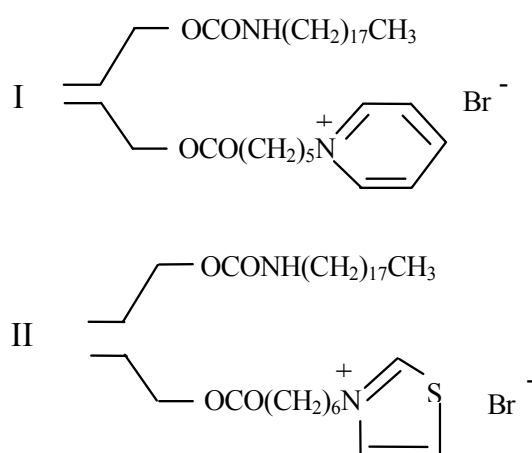
Επίσης το Ro 19-3704 αναστέλλει τη συσσώρευση αιμοπεταλίων κουνελιού. Το RU 45703 (Σχ. 3.15), είναι ισχυρός αναστολέας της συσσώρευσης PRP κουνελιού από τον PAF ($IC_{50}=8 \mu M$) και έχει προστατευτική δράση στη βρογχοσυσπασση και στην υπόταση που προκαλεί ο PAF in vivo (Wichrowski, B. et al. 1986).

Η μη στερεοειδική συμβολή της θέσης 2 του γλυκερινικού σκελετού στην ανασταλτική δράση αρκετών ανταγωνιστών του PAF οδήγησε σε σύνθεση μη χειρόμορφων δομικών αναλόγων του και αναστολέων του, όπως είναι παρακάτω τα παράγωγα των 2-μεθυλενο-προπανο-1,3-διολών (Σχ. 3.16).

Το παράγωγο II είναι ισχυρός ανταγωνιστής του PAF ($EC_{50}=0,25 \mu M$), δύο φορές πιο δραστήσιος από το παράγωγο I και 80 φορές πιο δραστήσιος από το CV-3988 (Grue-Sorensen, G. et al. 1988).

Καμία από τις δύο ενώσεις δεν αναστέλλει τη συσσώρευση που προκαλεί το κολλαγόνο ή το ADP ακόμα και σε συγκεντρώσεις $10^{-4} M$. In vivo πειράματα έδειξαν επίσης ότι η ένωση II αναστέλλει την βρογχοσυσπασση που προκαλεί ο PAF στους ινδόχοιρους ($ED_{50}=0,1 mg/kg$ IV) και είναι δυο φορές πιο δραστήσια από την I και 35 φορές πιο δραστήσια από το CV-3988 (Grue-Sorensen, G. et al. 1988).

Τέλος και τα δύο παράγωγα των 2-μεθυλενο-προπανο-1,3-διολών αναστέλλουν την υποτασική δράση του PAF στους επίμυες ($ED_{50}=0,5 mg/Kg$, IV).



Σχήμα 3.16: Δομή των παραγώγων των 2-μεθυλένο-προπανο-1,3-διολών

3.10 Αναστολείς του PAF από φυσικές πηγές

Εδώ περιλαμβάνονται φυσικές ενώσεις που έχουν απομονωθεί από παραδοσιακά αντιφλεγμονώδη, αντιυπερτασικά φυτά και από διάφορα βακτήρια.

Από το εκχύλισμα του *Ginkgo biloba* απομονώθηκαν τα γκινγκολίδια (ginkgolides), τα οποία εμφανίζουν ισχυρή ανταγωνιστική δράση απέναντι στον PAF (Braquet, P. 1985, Logani, S. et al. 2000).

Τα μόρια αυτά έχουν 20 άτομα άνθρακα, συμπεριλαμβανομένων μιας τεταρτοταγούς βουτυλομάδας και 6 πενταμελών δακτυλίων, από τους οποίους οι τρεις είναι δακτύλιοι λακτόνης, οι δύο είναι δακτύλιοι πεντανίου ενωμένοι σε ένα μόνο άνθρακα και σχηματίζουν ένα σπειροενεάνιο και ο έκτος δακτύλιος είναι τετραϋδροφουρανίου.

Πέντε από τις δομές των ginkgolides είναι όμοιες, διαφέρουν μόνο στον αριθμό και στη θέση των υδροξυλομάδων στους C_1 , C_3 ή C_7 του σκελετού τους.

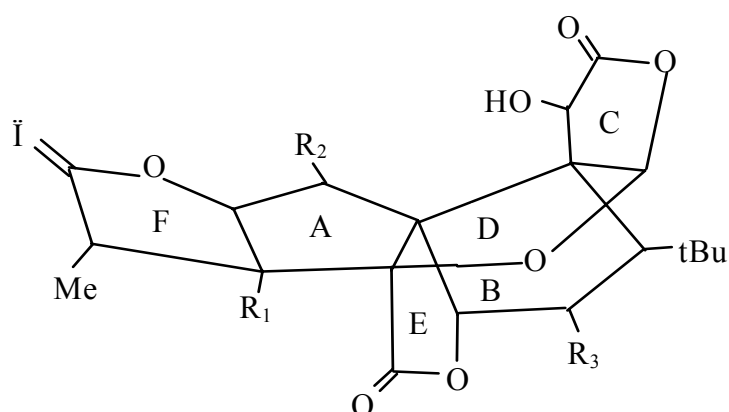
Αυτές οι ενώσεις ονομάστηκαν ginkgolides A,B,C,J και M ή BN 52020, BN52021, BN52022, BN52024 και BN52023 αντίστοιχα (Σχ. 3.17). Η προτεινόμενη δομή τους και στερεοχημεία (Maruyama, M. 1967a, Maruyama, M. 1967b) επιβεβαιώθηκε με nmR (Braquet, P. et al. 1985a) και με κρυσταλλογραφία με ακτίνες X (Dupont, L. et al. 1986a, Dupont, L. et al. 1986b).

Το πιο δραστικό είναι το BN52021, αναστέλλει τη δέσμευση του [3H] PAF στα αιμοπετάλια κουνελιού ($IC_{50}=0,51 \mu M$), ενώ οι τιμές IC_{50} για τα BN52020 και 52022 είναι 0,94 και 5,8 μM , αντίστοιχα (Braquet, P. et al. 1985b). Το BN52021 ανταγωνίζεται ($IC_{50}=10^{-9} M$) τη δέσμευση του [3H] PAF σε παρασκευάσματα ανθρώπινου πνευμονικού ιστού (Logani, S. et al, 2000).

Σε πρόσφατη κλινική μελέτη, δοκιμάστηκε η δράση του BN52021 μετά από χορήγησή του σε μικρή και μεγάλη δόση σε πνεύμονες, που επρόκειτο να μεταμοσχευτούν σε ασθενείς. Η μελέτη αυτή υπέδειξε ότι η χορήγηση υψηλής δόσης BN52021 μπορεί να βοηθήσει στη βελτίωση της πνευμονικής λειτουργίας κατά την ισχαιμική περίοδο μετά τη μεταμόσχευση (Wittwer, T. et al. 2001).

Η συσσώρευση αιμοπεταλίων ανθρώπου και κουνελιού που προκαλείται από τον PAF αναστέλλεται από το BN52021 (Logani, S. et al. 2000) ($IC_{50}=2,22 \times 10^{-6} M$, $1,88 \times 10^{-7} M$), από το BN52022 ($IC_{50}=1,83 \times 10^{-6} M$, $1,53 \times 10^{-6} M$) και από το BN52020 ($IC_{50}=6,24 \times 10^{-6} M$, $8,32 \times 10^{-7} M$) (Braquet, P. et al. 1985b).

Ginkgolide



		R₁	R₂	R₃
A	BN 52020	OH	H	H
B	BN52021	OH	OH	H
C	BN 52022	OH	OH	OH
J	BN 52024	OH	H	OH
M	BN 52023	H	OH	OH

Σχήμα 3.17: Δομή των ginkgolides

Τα ginkgolides A,B και C αναστέλλουν τη μετατροπή του [³H]PAF στο [³H]2-ακυλο ανάλογό του με την ίδια τάξη μεγέθους που αναστέλλουν και τη δέσμευση του [³H]PAF στα αιμοπετάλια, υποδηλώνοντας μια πιθανή σχέση ανάμεσα στο μεταβολισμό του PAF στα αιμοπετάλια και στη δέσμευση του στους μεμβρανικούς υποδοχείς (Lamant, V. et al. 1987).

Το BN52021 αναστέλλει :

1. Την προκαλούμενη από τον PAF συσσώρευση και αποκοκκίωση των ανθρώπινων ουδετερόφιλων (Braquet, P. et al. 1985b).
2. Την παραγωγή ελεύθερων ριζών από τα ανθρώπινα PMN (Baggiolini, M. and Dewald, B. 1986).
3. Την προκαλούμενη από τον PAF χημειοταξία, ενεργοποίηση και απελευθέρωση του LTC₄ από τα ανθρώπινα ηωσινόφιλα και τα μακροφάγα του ινδόχοιρου (Desquand, S. et al. 1986).

4. Τη δραστηριότητα καταστροφής των ανθρώπινων κερατινοκυττάρων απέναντι στο *Candida albicans* (Dobozy, A. et al. 1987) και την κυτταροτοξικότητα των φυσικών κυτταροκαταστροφικών λεμφοκυττάρων του επίμυος και του ανθρώπου απέναντι στις YAC-1 και K562 γραμμές των καρκινοκυττάρων (Mandi, Y. et al. 1987).
5. Την απελευθέρωση του ενεργοποιητή του πλασμινογόνου από τα τοιχώματα των αγγείων, που προκαλείται από τον PAF (Emeis, J.J. and Kluft., 1985).

Το BN52021 επίσης:

1. Αναστέλλει την προκαλούμενη από τον PAF (Desquand, S. et al. 1986) ή από την ανθρώπινη IgG (Weber, K.H. et al. 1987) υπόταση και αιμοσυμπύκνωση στους επίμυες.
2. Ανταγωνίζεται την εξαγγείωση που προκαλεί ο PAF στον πνεύμονα επίμυος (Barnes, P.J. et al. 1986).
3. Παρεμποδίζει την γαστροεντερική έλκωση και την ισχαιμική καταστροφή, που προκαλεί ο PAF ή η ενδοτοξίνη στους επίμυες (Droy-Lefaix, M.T. et al. 1987).
4. Μειώνει την αύξηση στην διαπερατότητα των αγγείων που προκαλείται από τις αντιδράσεις του ανοσοσυμπληρώματος στους επίμυες (Jancaq, S. 1987).
5. Αναστέλλει τις δηλητηριώδεις επιδράσεις του PAF σε απομονωμένο αμφιβληστροειδή χιτώνα από επίμυες (Doly, M. et al. 1986).

Το BN52021 έχει προστατευτικό ρόλο στις τοξικές επιδράσεις πλήθους τοξινών, βακτηρίων, δηλητηρίων και φαρμάκων (Tounay, C. et al. 1987, Logani, S. et al. 2000).

Επίσης μειώνει την καρδιακή αναφυλαξία που προκαλείται από τον PAF (Koltai, M. et al. 1986), ή από αντιγόνο (Piper, J.J. and Stewart, A.G. 1986) σε παρασκεύασμα Langendorff καρδιάς από ευαισθητοποιημένους ινδόχοιρους, μπλοκάρει τη θρόμβωση της μεσεντέριας αρτηρίας στους ινδόχοιρους από τη δράση του PAF (Bourgain, R.H. et al. 1985) και επαναφέρει στο κανονικό τις αιμοδυναμικές αλλαγές σε πειραματικό μοντέλο κίρρωσης στους επίμυες (Villamediana, L.M. et al. 1986).

Το BN52063 εμφανίζει επίσης δραστηριότητα (μίγμα των ginkgolides A,B, και C σε αναλογία 2:2:1, αντίστοιχα). Χορηγήθηκε σε υγιείς ατοπικούς

ανθρώπους 2 ώρες πριν από διαδερμική πρόκληση με PAF ή αλλεργιογόνο και βρέθηκε ότι μειώνει σημαντικά τη λεύκανση και ερυθρότητα που προκαλείται από τον PAF, αλλά στην περίπτωση του αλλεργιογόνου ελαττώνει μόνο την οξεία και επιβραδυνόμενη αντιφλεγμονώδη αντίδραση και δεν επηρεάζει την περιοχή ερυθρήματος (Guinot, P. et al. 1986, Guinot, P. et al. 1987c).

Σε ατοπικούς ασθματικούς ασθενείς παρατηρήθηκε μείωση στην αύξηση της αντίστασης στους βρόγχους, που είχε προκληθεί από εισπνοή αλλεργιογόνου μετά από χορήγηση BN52063 (Guinot, P. 1987a, Guinot, P. et al. 1987b).

Ακόμα, η αύξηση στην ουρία του πλάσματος, η πτώση στο ρυθμό της σπειραματικής διήθησης και η μείωση του βάρους του σώματος, που προκαλούνται από την κυκλοσπορίνη A σε υπερτασικούς επίμυες, επιστρέψανε στα φυσιολογικά επίπεδα, όταν δόθηκε το BN52063 (Pirotzky, E. et al. 1987).

Η σειρά BN που ήδη αναπτύχθηκε είναι η πιο καλά μελετημένη μέχρι σήμερα κατηγορία αναστολέα του PAF και έχει ήδη εγκριθεί η φαρμακευτική της χρήση.

Μια άλλη σημαντική κατηγορία αναστολέων του PAF από φυσικές πηγές είναι τα λιγνάνια (lignans), τα οποία δημιουργούνται από οξειδωτικό διμερισμό του υδροξυαλκοξυφαινυλο-προπανίου. Ο όρος λιγνάνιο χρησιμοποιείται για ενώσεις, στις οποίες οι πρόδρομες ουσίες έχουν συνδεθεί με β-άνθρακες στην κάθε πλευρική αλυσίδα, ενώ ο όρος νεολιγνάνιο αναφέρεται σε προϊόντα όπου ο διμερισμός γίνεται σε άλλους άνθρακες από του β-.

Στην οικογένεια των λιγνανίων διακρίνονται 4 βασικές υποομάδες ανάλογα με τη χημική δομή :

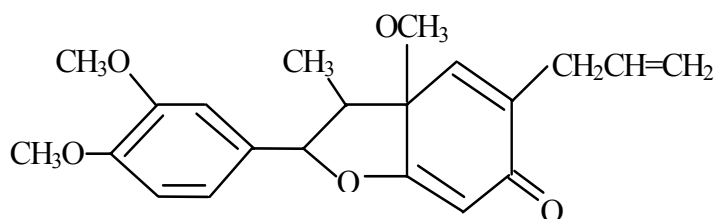
α. Βενζοφουρανοειδή νεολιγνάνια

Χαρακτηριστικός αντιπρόσωπος αυτής της υποομάδας είναι η καντσουρενόνη (Σχ.3.18), η οποία είναι δραστικό συστατικό του εκχυλίσματος του κινέζικου φαρμακευτικού φυτού *Piper futokadsurae*, που το χρησιμοποιούσαν για ανακούφιση του βρογχοάσθματος και των ρευματικών παθήσεων.

Η καντσουρενόνη είναι ισχυρός αναστολέας της δέσμευσης του [³H] PAF στις μεμβράνες αιμοπεταλίων του κουνελιού (IC₅₀=0,1 μM), όπως επίσης της συσώρευσης των αιμοπεταλίων και της αποκοκκίωσης των ουδετερόφιλων που προκαλούνται από τον PAF (Shen, T.Y. et al. 1985a).

Στους επίμυες, η καντσουρενόνη ανταγωνίζεται την υποτασική δράση του PAF και της ενδοτοξίνης (Doebber, T.W. et al. 1985), αναστέλλει τις αλλαγές στα επίπεδα του αιματοκρίτη και το τροφικό οίδημα (Hwang, S.B. et al. 1986).

Επίσης αναστέλλει τη διαπερατότητα των αγγείων που προκαλείται από τον PAF στους ενδοχίους και στους επίμυες (Shen, T.Y. et al. 1985a).



Σχήμα 3.18. Δομή της καντσουρενόνης.

Η μελέτη των υποκαταστατών και της στεreoχημείας του μορίου της οδήγησαν στα εξής συμπεράσματα: Μόνο το διυδρο-παράγωγο, η διυδροκαντσουρενόνη, η οποία προκύπτει από υδρογόνωση της αλληλοπλευρικής αλυσίδας, είναι το ίδιο δραστήριο με την καντσουρενόνη στον υποδοχέα του PAF στην αιμοπεταλιακή μεμβράνη ($IC_{50}=0,07 \mu M$) (Ponpripom, M.M. et al. 1987, Ponpripom, M.M. et al. 1986).

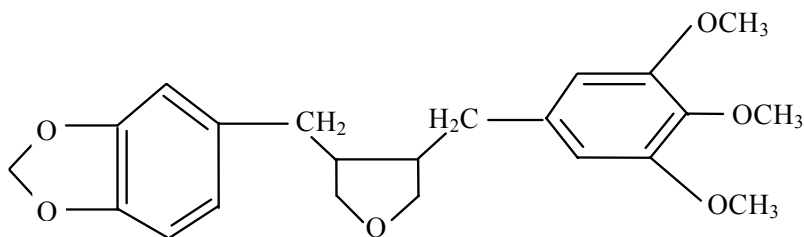
Αναστροφή της διαμόρφωσης είτε στη 2-, είτε στην 3α- θέση, οδηγεί σε μειωμένη δραστηριότητα, όπως επίσης συμβαίνει με την απουσία της λιπόφιλης αλλυλικής αλυσίδας από την 5-θέση. Σημαντικό ρόλο στη δραστηριότητα του μορίου παίζει η κετοομάδα στην θέση-6.

Η μοναδικότητα της στεreoχημείας της καντσουρενόνης φαίνεται επίσης από το γεγονός ότι τα δομικά ανάλογα πιπερενόνη και καντσουρίνη A και B, τα οποία έχουν απομονωθεί από το ίδιο φυτό Piper, εμφανίζουν πολύ μικρότερη ανταγωνιστική δράση απέναντι στον PAF (Chang, M.N. et al. 1985). Πρέπει όμως να σημειωθεί ότι η καντσουρενόνη έχει σχετικά μικρή διάρκεια δράσης ($t_{1/2}=30\text{min} - 2\text{h}$) στα ζώα.

Από μια μελέτη του μεταβολισμού που έγινε στους πιθήκους, υποστηρίχθηκε η άποψη ότι η αλκυλο-πλευρική αλυσίδα οξειδώνεται και σχηματίζονται γλυκουρονίδια.

β. Υποκατεστημένα φουρανοειδή λιγνάνια

Ένας σημαντικός αριθμός lignans που περιλαμβάνουν στο μόριο τους, δι-, τρι-, και τετρα- υποκατεστημένο τετραυδροφουράνιο και τα οποία εμφανίζουν ανταγωνιστική δράση απέναντι στον PAF, έχουν απομονωθεί από διάφορα φυτά και στη συνέχεια έχουν συντεθεί από τη Merck (Pan, J.X. et al. 1987) και το Institute Henri Beaufour (Braquet, P. et al. 1987a).

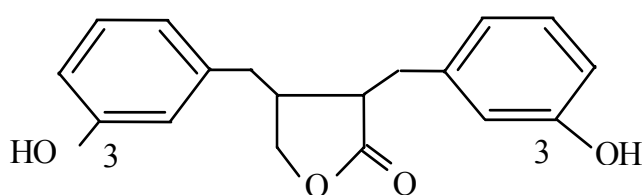


Σχήμα 3.19. Δομή της βουρσεράνης.

Η βουρσεράνη (burseran) (Σχ. 3.19), είναι ένα 3,4-διυποκατεστημένο τετραϋδροφουράνιο που απομονώθηκε από τη *Bursera miosophylla* A καθώς επίσης το 2,3,4-τριυποκατεστημένο τετραϋδροφουράνιο, η μαγνοσαλικίνη (BN 52004), που απομονώθηκε από τη *Magnolia salicifolia*, εμφανίζουν ασθενή αναστολή της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων του κουνελιού, που προκαλείται από τον PAF (Braquet, P. and Godfroid, J.J. 1987).

γ. Λιγνάνια που προέρχονται από τη διβενζυλοβουτυρολακτόνη

Λιγνάνια αυτής της σειράς ανακαλύφθηκαν στα ούρα ζώων και του ανθρώπου (Braquet, P. et al. 1985). Χαρακτηρίζονται από την παρουσία μιας υδροξυομάδας σε μετάθεση σε κάθε αρυλικό δακτύλιο. Είναι μέτριοι αναστολείς της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων του κουνελιού που προκαλείται από τον PAF ($IC_{50} = 10^{-6} - 10^{-4}$ M) (Braquet, P. et al. 1987a). Το κυριότερο λιγνάνιο αυτής της σειράς, που απομονώθηκε από τα ούρα των θηλαστικών είναι το (±)-trans-παραγώγο της εντερολακτόνης (Σχ. 3.20) (Stitch, S.R. et al. 1980).



Σχήμα 3.20. Δομή του παραγώγου της εντερολακτόνης.

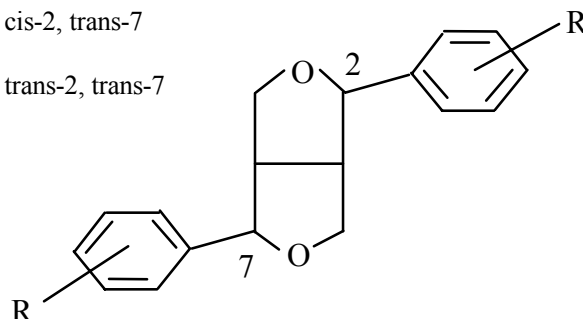
Είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι τα λιγνάνια αυτής της υποομάδας είναι και αναστολείς της αντλίας Na^+/K^+ (Braquet, P. et al. 1985) στα ανθρώπινα ερυθροκύτταρα, στην καρδιά του ανθρώπου και του ινδόχοιρου και μια και η συγκέντρωσή τους στα ούρα αυξάνεται κατά την αρχή της εγκυμοσύνης, μπορεί να σχετίζονται χημικά με ενδογενείς αναστολείς του PAF (και της αντλίας Na^+/K^+) ασκώντας παλίνδρομη ρύθμιση στον PAF και στον

ενεργοποιητή του πλασμινογόνου, που μπορεί να απελευθερωθεί σ'αυτή την περίπτωση.

1 : cis-2, cis-7

2: cis-2, trans-7

3: trans-2, trans-7



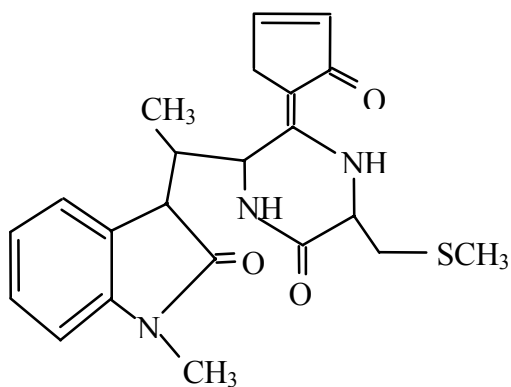
Σχήμα 3.21. Δομή της πινορεσινόλης (1), της επιπινορεσινόλης (2) και της επιγανγκαμπίνης (3).

δ. Υποκατεστημένο φουρο(3,4-c)φουρανοειδή λιγνάνια

Τα λιγνάνια της σειράς αυτής, τα οποία διαθέτουν το σκελετό της πινορεσινόλης, της επιπινορεσινόλης και της επιγανγκαμπίνης (Σχ. 3.21) εμφανίζουν ασθενή με μέτρια αναστολή της συσσώρευσης αιμοπεταλίων κουνελιού που προκαλείται από τον PAF ($IC_{50}=17-304 \mu M$) (Braquet, P. et al. 1987a).

Η σχετικά δραστική φαργκεσίνη ($IC_{50}=1,2 \mu M$) είναι ένα λιγνάνιο που απομονώθηκε από την *Magnolia fargesii* και διαθέτει σκελετό επιπινορεσινόλης (Pan, J.X. et al. 1987).

Ανταγωνιστές του PAF έχουν επίσης ανακαλυφθεί στα προϊόντα ζύμωσης μυκήτων και μικροοργανισμών.



Σχήμα 3.22: Δομή του FR-900452

Οι πιο ισχυροί ανταγωνιστές αυτής της ομάδας είναι το FR-900452 και το FR-49175, προϊόντα που προέρχονται από τη γλιτοξίνη, η οποία απομονώθηκε από μύκητα του ξύλου (Okamoto, M. et al. 1986a, Okamoto, M. et al. 1986b).

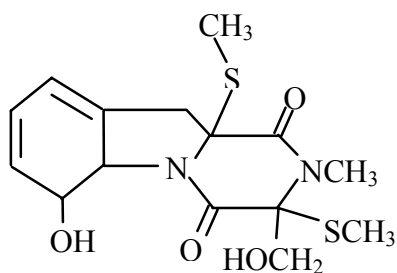
Το FR-900452 (Σχήμα 3.22) είναι παράγωγο της 2-ινδολινόνης και απομονώθηκε ως μεταβολίτης του

streptomyces phaeofaciens. Αναστέλλει τη συσσώρευση αιμοπεταλίων κουνελιού που προκαλείται από τον PAF ($IC_{50}=3,7 \times 10^{-7}$ M) και το κολλαγόνο ($IC_{50}=6,40 \times 10^{-5}$ M), αλλά δεν αναστέλλει αυτή που προκαλείται από το αραχιδονικό οξύ και το ADP (Masanori, O. et al. 1986a).

Όταν χορηγηθεί σε ποσότητα 10mg/kg IV, αναστέλλει σημαντικά την προκαλούμενη από τον PAF α)θρομβοκυτοπενία και λευκοπενία στα κουνέλια (Masanori, O. et al. 1986b) β)βρογχοσύσπαση στους ινδόχοιρους και γ) υπόταση στους επίμυες (Okamoto, M. et al. 1986b).

Το FR-900452 αναστέλλει την προκαλούμενη από την ενδοτοξίνη θρομβοκυτοπενία και λευκοπενία στα κουνέλια καθώς και την υποτασική δράση της ενδοτοξίνης στα κουνέλια (Masanori, O. et al. 1986b) και στους ευαισθητοποιημένους με μονοκλωνική IgE αρουραίους (Okamoto, M. et al. 1986b).

Η δις-διθειο-δισ (μεθυλόθειο) γλιοτοξίνη FR-49175 (Σχήμα 3.23) απομονώθηκε από το *Penicillium terlikowskii* (Okamoto, M. et al. 1986c) ή από καλλιέργειες μυκήτων του ξύλου *Gliocladium deliquescens* (Kirby, G.W. et al. 1980). Αναστέλλει την προκαλούμενη από τον PAF ($IC_{50}=8,4$ μ M) και το κολλαγόνο ($IC_{50}=8,2$ μ M), αλλά όχι από το αραχιδονικό οξύ ή το ADP συσσώρευση των αιμοπεταλίων του κουνελιού (Okamoto, M. et al. 1986c).

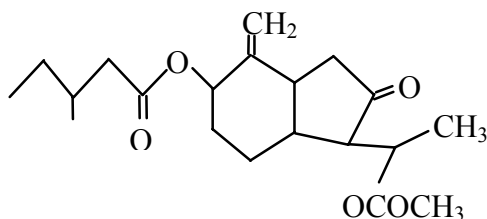


Σχήμα 3.23: Δομή του FR-49175.

Το FR-49175 αναστέλλει τη βρογχοσύσπαση που προκαλεί ο PAF ($ED_{50}=0,26$ mg/Kg IV) στους ινδόχοιρους, αλλά δεν κατάφερε να εμποδίσει την υποτασική δράση του PAF στους επίμυες καθώς επίσης τη διαπερατότητα των αγγείων στα ποντίκια. Δεν έχει επίσης καμία επίδραση στη συστηματική αναφυλαξία στους ινδόχοιρους (Okamoto, M. et al. 1986a).

Τα αποτελέσματα αυτά δεν ήταν τα αναμενόμενα για το FR-49175 σε σύγκριση με τους άλλους ανταγωνιστές των υποδοχέων του PAF και γι'αυτό απαιτούσαν παραπέρα διερεύνηση.

Οι μελέτες όσον αφορά τη σχέση δομής και δραστικότητας (με βάση την προκαλούμενη από τον PAF συσώρευση αιμοπεταλίων κουνελιού) έδειξαν ότι το βενζο-ανάλογο του είναι περίπου μισή φορά λιγότερο δραστικό ($IC_{50}=16,9 \mu M$) από το FR-49175, η δε απομάκρυνση της υδροξυμεθυλο-ομάδας οδηγεί σε σημαντική ελάττωση δραστικότητας ($IC_{50}=95,2$ και $>200 \mu M$, αντίστοιχα) (Okamoto, M. et al. 1986c).



Εκτός από τις σειρές αναστολέων που ήδη αναφέρθηκαν έχουν επίσης απομονωθεί μεμονωμένα ανταγωνιστές του PAF από διάφορες άλλες φυσικές πηγές.

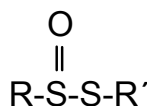
Σχήμα 3.24: Δομή του L-652,469. Το L-652,469 (Σχ. 3.24), που έχει απομονωθεί από τον κάλυκα του *Tussilago farfara* L. ανταγωνίζεται τη δέσμευση του [3H]PAF και την προκαλούμενη από τον PAF συσώρευση στα αιμοπετάλια κουνελιού ($K_i=0,56 \mu M$) (Hwang, S.B. et al. 1987).

Αναστέλλει επίσης τη διαπερατότητα των αγγείων και το τροφικό οίδημα (που προκαλείται από τον PAF) στους επίμυες.

Το L-652,469 ανήκει σε μια καινούργια τάξη ενώσεων που εμφανίζουν διπλή δράση: από τη μία πλευρά μπλοκάρουν τα κανάλια ασβεστίου και από την άλλη πλευρά ανταγωνίζονται τον PAF.

Από το κρεμμύδι απομονώθηκαν πέντε αλκ(εν)υλο-εστέρες των αλκ(εν)υλο-σουλφινοθειικών οξέων, που εμφανίζουν βιολογική δραστικότητα.

Αναστέλλουν α)τη δράση της 5-λιποξυγενάσης των λευκοκυττάρων του χοίρου β)τη βιοσύνθεση του θρομβοξανίου B_2 στα ανθρώπινα αιμοπετάλια γ)την προκαλούμενη από τον PAF απόφραξη βρόγχων στους ινδόχοιρους (ποσοστό αναστολής 41% με δόση λαμβανόμενη από το στόμα 20mg/kg) και δ)τις ασθματικές αντιδράσεις στους ινδόχοιρους, που οφείλονται σε εισπνεόμενο αλλεργιογόνο (Dorsch, W. et al. 1988).

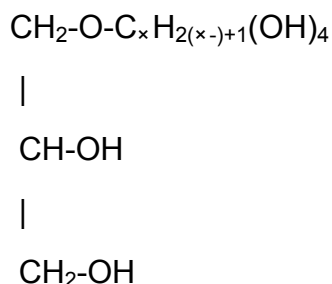


Οι δομικές μελέτες σε σχέση με τη δραστικότητα έδειξαν ότι οι αντι-ασθματικές και αντί-φλεγμονώδεις δράσεις του κρεμμυδιού εξαρτώνται εν μέρει από τη διπλανή ομάδα (Dorsch, W. et al. 1988).

Στο κρεμμύδι έχουν επίσης βρεθεί ενώσεις που αναστέλλουν τη συσώρευση των αιμοπεταλίων, πιθανώς μπλοκάροντας τη δράση της λιποξυγονάσης και της κυκλοξυγονάσης (Kawakishi and Morimitsu, 1988).

Ένας άλλος ισχυρός αναστολέας του PAF είναι η διγοξίνη, φαρμακευτικό σκεύασμα που ανήκει σε μία γενικότερη κατηγορία, τις δακτυλιτίδες, που προέρχονται από τα φύλλα και τους καρπούς διαφόρων ειδών του φυτού *Digitalis purpurea*.

Μελέτες έχουν δείξει ότι αφ' ενός μεν προκαλεί αναστολή στη συσσώρευση των αιμοπεταλίων, αφ' ετέρου αναστέλλει και τις γνωστές δράσεις του PAF στην καρδιά (Kelefiotis, D. et al. 1988).



Επίσης έχει εκχειλιστεί από τη γύρη του πεύκου *Pinus halepensis*, δραστική ένωση με γλυκεριναιθερικό σκελετό και με την παρακάτω δομή (Andrikopoulos, N. et al. 1986).

Η ένωση αυτή σε συγκέντρωση 4,5 μM αναστέλλει τη συσσώρευση αιμοπεταλίων κουνελιού, που προκαλείται από τον PAF,

ενώ σε συγκέντρωση 45 μM προκαλεί η ίδια συσσώρευση των αιμοπεταλίων του κουνελιού (Siafaka-Kapadai, A. et al. 1986).

Πρόσφατα απομονώθηκε από το Βραζιλιάνικο φυτό *Ocotea duckei* (Lauraceae) ένα συστατικό άγνωστης δομής, το yangambin, το οποίο εμφανίζει προστατευτική δράση σε αρουραίους έναντι της καρδιοαγγειακής αναφυλαξίας που προκαλεί ο PAF (Ribeiro, R. et al. 1995).

Σε in vitro μελέτη διερευνήθηκε η επίδραση του εκχυλίσματος του φυτού *Petasites hybridus* (Ze339) και του πιθανά βασικότερου δραστικού συστατικού του, της πετασίνης, στο μεταβολισμό και την ενεργοποίηση των ουδετερόφιλων, ηωσινόφιλων και μακροφάγων του ανθρώπου. Πράγματι και τα δύο αυτά επιμέρους συστατικά ανέστειλαν πλήρως την προκαλούμενη από τον PAF αύξηση των επιπέδων ασβεστίου και τη σύνθεση λευκοτριενών στα ηωσινόφιλα, ουδετερόφιλα και μακροφάγα (Thomet, O.A. et al. 2001).

Σε άλλη in vitro έρευνα μελετήθηκε η επίδραση 9 ξανθονών απομονωμένων από τα φυτά *Calophyllum inophyllum*, *Garcinia opaca*, *Garcinia bancana*, στη δράση του PAF σε αιμοπετάλια κουνελιού. Πέντε (5) από αυτές εμφάνισαν ισχυρή αναστολή του PAF με IC₅₀ από 4 μέχρι και 44 μM. Από την εξακρίβωση των χημικών τους δομών φαίνεται ότι η φαινυλική ομάδα στον C-2, η διμέθυλ-προπ-2-ενυλο ομάδα στον C-4 και η υδρόξυλο ομάδα στον C-5 δρουν θετικά στη δέσμευσή τους με τον υποδοχέα του PAF (Jantan, I. et al. 2001).

Τέλος, από το εκχύλισμα των φύλλων του φυτού *Biota orientalis*, απομονώθηκαν τρία δραστικά συστατικά. Οι ονομασίες των συστατικών

αυτών είναι οι εξής: cedrol ($IC_{50}=1,3 \times 10^{-5}$ M), pinusolid ($IC_{50}=2,5 \times 10^{-7}$ M) και pinusolidic acid ($IC_{50}=3 \times 10^{-5}$ M). Οι τιμές IC_{50} των συστατικών αυτών αναφέρονται στην ανταγωνιστική τους δράση έναντι της πρόσδεσης του PAF στα αιμοπετάλια κουνελιών. Το pinusolid αναστέλλει επίσης τη συσσώρευση αιμοπεταλίων κουνελιού που προκαλείται από τον PAF, με τιμή $IC_{50}=5 \mu M$, ενώ δεν επηρεάζει τη συσσώρευση που προκαλείται από θρομβίνη, κολλαγόνο και ADP (Yang, H.O. and Han, B.H. 1995).

Τα τελευταία χρόνια ενώσεις με σημαντική ανασταλτική δράση εναντίον του PAF έχουν βρεθεί και σε ζωικά και φυτικά τρόφιμα, όπως το ελαιόλαδο (Koussissis, S. et al. 1994, Karantonis, H.C. et al, 2002), το κόκκινο κρασί (Fragoroulou, E. et al. 2000), το μέλι και το κερί (Koussissis, S. et al. 1994), το σκουμπρί (Rementzis, J. et al. 1996) και το αγελαδινό γάλα και γιαούρτι (Antonopoulou, S. et al. 1996b).

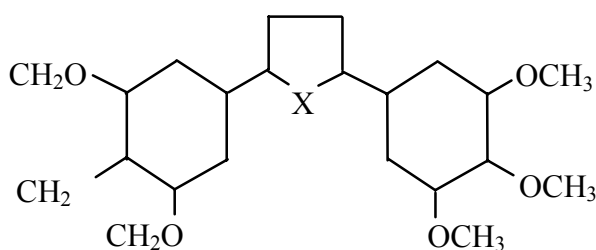
Η ύπαρξη, τέτοιων αναστολέων σε τρόφιμα της Μεσογειακής Δίαιτας εξηγεί εν μέρει την σημαντική διατροφική τους αξία όσον αφορά τη σημασία τους στην πρόληψη των καρδιοπαθειών.

3.11 Συνθετικοί αναστολείς του PAF

Πρόκειται για δομικά ή μη ανάλογα του PAF που φαίνεται ότι αναστέλλουν τη δράση του κυρίως μέσω της σύνδεσής τους με τον υποδοχέα του.

Η βιολογική δραστηριότητα των παραγώγων του τετραϋδροφουρανίου καθώς και της καντσουρενόνης οδήγησε την εταιρία Merck στη σύνθεση της σειράς L (Σχ. 3.25).

Το trans-2,5-αρυλοτετραϋδρο-φουράνιο



Σχήμα 3.25: Δομή της σειράς.

L-652,731 αναστέλλει τη συσσώρευση ανθρώπινου PRP που προκαλείται από τον PAF ($IC_{50}=6,0 \mu M$), την αποκοκκίωση των ανθρώπινων ουδετερόφιλων ($IC_{50}=3,6 \times 10^{-7}$ M) που προκαλείται από τον PAF, τη δέσμευση του [3H]PAF στα αιμοπετάλια κουνελιού

($IC_{50}=1,9 \times 10^{-8}$ M) και σε συγκέντρωση 20mg/kg (λαμβανόμενη από το στόμα) εμφανίζει 70% αναστολή της προκαλούμενης από τον PAF υπότασης, εξαγγείωσης και ουδετεροπενίας στους επίμους (Doebber, et al. 1986).

Το L-652,731 επίσης αναστέλλει στους επίμους α)την υποτασική δράση της

ενδοτοξίνης (Shen, T.Y. et al. 1987) β)τη διαπερατότητα των αγγείων που προκαλείται από τον PAF (Hwang, S.B. et al. 1985) και γ)μερικώς την πρώτη φάση (αλλά όχι τη δεύτερη) του προκαλούμενου από τον PAF οιδήματος των κάτω άκρων (Hwang, S.B. et al. 1986). Στο μοντέλο του προβάτου, το L-652,731 μπλοκάρει τις επιδράσεις του συμπληρώματος μετά από ενεργοποίηση με PAF και όχι με ζυμοζάνη (Smallbone, B.W. et al. 1987).

In vivo, οι κυριότεροι μεταβολίτες του είναι οι Ο-διμεθυλιωμένες φαινόλες, μερικές από τις οποίες εμφανίζουν μικρή δράση 5-λιποξυγενάσης σε 10 μM (Shen, T.Y. et al. 1987).

Οι μελέτες συσχέτισης της δομής με τη δραστικότητα όσον αφορά την αναστολή δέσμησης του [^3H] PAF στα αιμοπετάλια κουνελιού έδειξαν ότι το cis-ισομερές είναι 750 φορές περίπου λιγότερο δραστικό από το trans-L-652,731 (IC_{50} =15,0 έναντι 0,02 μM) και ότι οι μεθυλομάδες στους C-3 ή C-4 οδηγούν σε μειωμένη δραστικότητα (Biftu, T. et al. 1986a).

Αντικατάσταση της 3-μεθοξυ-ομάδας από διάφορες άλλες ομάδες όπως NO_2 , NHSO_2CH_3 , SCH_3 , SO_2CH_3 ή CN δίνει ενώσεις ίδιας ή μεγαλύτερης δραστικότητας από το L-652,731 (Biftu, T. et al. 1986b). Έτσι το L-662,025 και το L-659,989 αναστέλλουν την προκαλούμενη από τον PAF συσώρευση PRP με τιμές IC_{50} =5,6 και 0,8 μM αντίστοιχα.

Αντικατάσταση μιας από τις τριμεθοξυφαινυλο-ομάδες με διυποκατεστημένο φαινυλο-παράγωγο (Smallbone, B.W. et al. 1987) ή με 2-ναφθυλομάδα οδηγούν σε σημαντική απώλεια δραστικότητας.

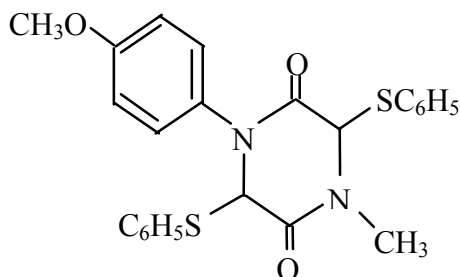
Το L-653,150, το τετραϋδροθειοφαινο-ανάλογο του L-652,731, αναστέλλει τη δέσμηση [^3H] PAF σε απομονωμένες αιμοπεταλιακές μεμβράνες κουνελιού (IC_{50} = $1,9 \times 10^{-8}$ M) και είναι πιο δραστικό στην αναστολή πολλών καταστάσεων που προκαλούνται από τον PAF in vivo και in vitro (Biftu, T. et al. 1994).

Το L-653,150 αναστέλλει επίσης τη δράση της 5-λιποξυγονάσης και τη μετατροπή του [^{14}C] αραχιδονικού οξέος σε 5-HETE (IC_{50} =2 μM) (Biftu, T. et al. 1994).

Αρκετά ανάλογα του L-653,150 έχουν εμφανίσει αναστολή στην προκαλούμενη από τον PAF συσώρευση των αιμοπεταλίων κουνελιού (Biftu, T. 1987).

Τροποποιήσεις στη δομή του FR-49175 έδωσαν μια σειρά από 3,6-δισ-RS-2,5-δικετοπιπεραζίνες, οι οποίες "μιμούνται" τον ανθρακικό δακτύλιο του FR-49175 (Norihiko, S. et al. 1987a) Το πιο δραστικό μέλος της ομάδας αυτής, είναι το cis-δισ-φαινυλοθείο παράγωγο (Σχ. 3.26) με IC_{50} =0,69 μM στην

αναστολή της προκαλούμενης από τον PAF συσσώρευσης των αιμοπεταλίων κουνελιού.



Σχήμα 3.26: Δομή του cis-δισ-φαινυλοθείο παράγωγο της δικετοπιπεραζίνης.

Το αντίστοιχο trans φαινυλοθείο παράγωγο είναι 60 φορές λιγότερο δραστικό (Norihiko, S. et al. 1987a). Το παράγωγο της 3R,6R,7R-2,5-δικετοπιπεραζίνης είναι το πιο δραστικό από μία σειρά ενώσεων, που φτιάχτηκαν με βάση τον ανταγωνιστή του PAF FR-900452 (Norihiko, S. et al. 1987b).

Αναστέλλει τη συσσώρευση των αιμοπεταλίων του κουνελιού

($IC_{50}=1,8 \times 10^{-7}$ M) που προκαλείται από τον PAF και σε δόση 10mg/kg εμφανίζει 40% αναστολή στην διαπερατότητα των αγγείων που προκαλεί ο PAF στους ινδόχοιρους (Norihiko, S. et al. 1987b).

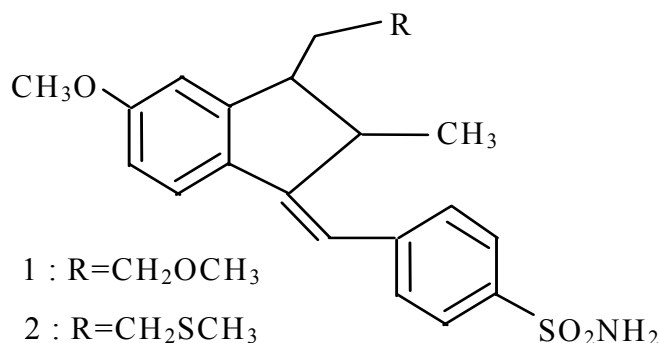
Αντικατάσταση της πολικής ομάδας της προηγούμενης σειράς των 1-ακυλο-4-[(2-μεθυλο-3-πυριδυλο) κυανομεθυλο] πιπεραζινών, με μία [2-μεθυλιμιδαζο(4,5-c)] πυριδινό ομάδα οδήγησε στην εύρεση μίας καινούργιας σειράς δραστικών ανταγωνιστών του PAF, οι οποίοι είναι δραστικοί όταν λαμβάνονται από το στόμα. Η σειρά αυτή είναι τα παράγωγα της 1-(1-ακυλο-4-πιπεριδυλο) μεθυλο-1H-2-μεθυλιμιδαζο [4,5-c] πυριδίνης και από αυτά το πιο δραστικό είναι το UR-12670, το οποίο διαθέτει μία 3,3-δифαινυλοπροπιονυλο- ομάδα σαν ακυλο-υποκαταστάτη και εμφανίζει τόσο in vitro όσο και in vivo, υψηλή ανασταλτική δράση.

Αναστέλλει in vitro τη συσσώρευση αιμοπεταλίων που προκαλείται από τον PAF με τιμή $IC_{50}=0,0076$ μ M, την προκαλούμενη in vivo από τον PAF υπόταση στους αρουραίους με τιμή $ID_{50}=0,0086$ mg/kg και $ID_{50}=0,092$ mg/kg όταν λαμβάνεται από το στόμα. Τέλος αναστέλλει τη θανατηφόρο δράση του PAF στα ποντίκια με τιμή $ID_{50}=0,0008$ mg/kg, όταν λαμβάνεται ενδοφλέβια (Carceller, E. et al. 1995)

Με βάση τη δομή του αντιφλεγμονώδους παράγοντα σουλινδάκη (sulindac) δημιουργήθηκε μια οικογένεια από 1-(4-R-φαινυλο-μεθυλενο) ινδένια, τα οποία εμφανίζουν ανταγωνιστική δράση απέναντι στον PAF (Shen, T.Y. et al. 1985b).

Τα πιο δραστικά μέλη είναι τα E-trans παράγωγα (Σχ. 3.27).

Το παράγωγο 2 αναστέλλει τη δέσμευση [^3H] PAF στις αιμοπεταλιακές μεμβράνες του κουνελιού

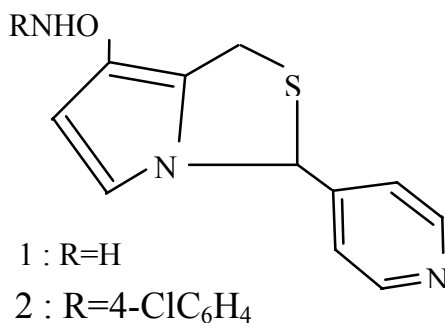


Σχήμα 3.27: Δομή των 1-(4-R-φαινυλομεθυλένο) ινδενίων.

με IC₅₀=0,1 μM και τα δύο παράγωγα σε δόσεις 20mg/kg λαμβανόμενες από το στόμα, αναστέλλουν σε ποσοστό 60 και 40% αντίστοιχα τη διαπερατότητα των αγγείων, που προκαλεί ο PAF στους ινδόχοιρους (Shen, T.Y. et al. 1985b).

Ανταγωνιστική δράση απέναντι στον PAF

βρέθηκε ότι έχουν αρκετά 3-(3-πυριδυλο)-1H,3H-πυρρολο-[1,2,-c] θειαζολο-7-καρβοξ-αμίδια (Fabre, J.L. et al. 1986).



Σχήμα 3.28: Δομή του 48740 και του RP 52770 RP.

Το πρωτότυπο της σειράς αυτής, το 48740 RP (Σχ. 3.28) αναστέλλει την προκαλούμενη από τον PAF συσώρευση αιμοπεταλίων στους ανθρώπους (IC₅₀=69 μM) και στα κουνέλια (IC₅₀=16 μM), τη δέσμευση του [^3H] PAF στα αιμοπετάλια του κουνελιού (K_i=2,3 μM) (Floch, A. et al. 1986) και την έκκριση της ελαστάσης που προκαλείται από τον PAF στα ανθρώπινα ουδετερόφιλα (Dewald, B. and Baggiolini, M. 1987).

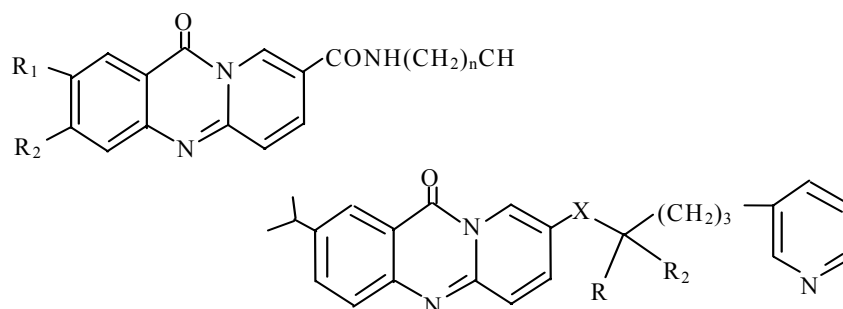
Μια εβδομάδα χορήγηση του 48740 RP σε δόση 1000mg/ημέρα σε εθελοντές οδήγησε σε 60% αναστολή της συσώρευσης των αιμοπεταλίων που προκαλείται από τον PAF και σε μία μικρή αναστολή της παραγωγής TXB₂ σε ex vivo μελέτες (Sedivy, P. et al. 1987).

Το πιο δραστικό ανάλογο είναι το 52770 RP (Σχ. 3.28) με τιμή K_i=7nm έναντι της δέσμευσης του [^3H] PAF σε παρασκευάσματα μεμβρανών από κουνέλια

(Cavero, I. et al. 1987). Το (+)-52770 RP ισομερές είναι περίπου 300 φορές πιο δραστικό από το (-) ισομερές στο να εκτοπίζει το [³H] 52770 RP από τα αιμοπετάλια του κουνελιού (Robaut, C. et al. 1987).

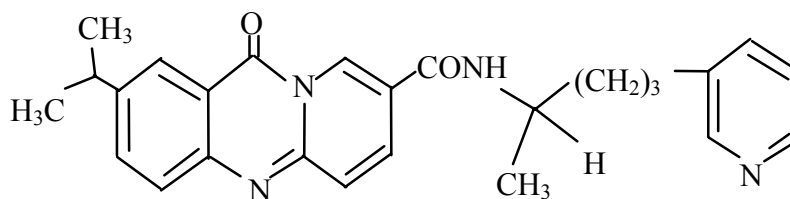
Εκτός από τους ανταγωνιστές των ιόντων Ca²⁺ που είναι μη ειδικοί αναστολείς του PAF, υπάρχουν ενώσεις που εμφανίζουν εξειδίκευση στην αναστολή του PAF, όπως η τιλτιαζέμη (diltiazem), που αναστέλλει την προκαλούμενη από τον PAF συσώρευση των αιμοπεταλίων στους ανθρώπους (IC₅₀=2,8×10⁻⁵ M) και στα κουνέλια (IC₅₀=13 μM) (Coeffinger, E. et al. 1983).

Η ουσία αυτή αναστέλλει τη δέσμευση του [³H] PAF στα ανθρώπινα αιμοπετάλια (IC₅₀=4,7×10⁻⁵ M). Το (-) ισομερές της είναι πολύ λιγότερο δραστικό (IC₅₀=98,6 μM). Τα υπάρχοντα στοιχεία για την τιλτιαζέμη και για τους άλλους ανταγωνιστές των καναλιών Ca²⁺ δηλώνουν την πιθανή ύπαρξη σχέσης μεταξύ του υποδοχέα του PAF και των καναλιών Ca²⁺ στη μεμβράνη των αιμοπεταλίων (Wade, P.J. et al. 1986).



Σχήμα 3.29: Δομή παραγώγων των κιναζολινών

Η Hoffman La Roche παρασκεύασε παράγωγα των κιναζολινών (Σχ. 3.29) ως ειδικούς αναστολείς του PAF. Ο έλεγχος της βιολογικής τους δραστηριότητας γινόταν με κριτήριο την αναστολή που προκαλούσαν στη δέσμευση [³H] PAF στον υποδοχέα του στα αιμοπετάλια σκύλου. Οι πιο δραστικές ενώσεις ήταν τα πυριδο[2,1-β] κιναζολινο-8-καρβοξαμίδια, που διέθεταν ανθρακική αλυσίδα 4- ή 6-ατόμων ανάμεσα στο άτομο του αζώτου του καρβοξαμιδίου και της πυριδίνης (Tilley, J.W. et al. 1988). Λόγω όμως της αυξημένης πιθανότητας υδρόλυσης της καρβοξαμιδομάδας in vivo, έγιναν επιπλέον δομικές δοκιμασίες.

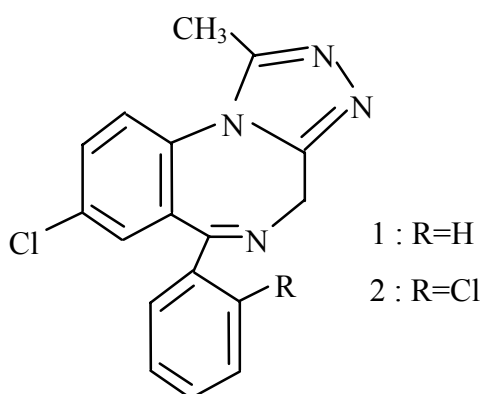


Σχήμα 3.30. Δομή του πιο δραστικού κιναζολινικού παραγώγου

Το (R)-2-(1-μεθυλοαιθυλο)-N-(1-μεθυλο-4-3-πυριδινυλο) βουτυλο-11-οξο-11H-πυριδο[2,1-β] κιναζολινο-8-καρβοξαμίδιο (Σχ. 3.30) είναι το πιο δραστικό στην αναστολή της δέσμευσης του [^3H] PAF ($\text{IC}_{50}=0,25 \mu\text{M}$) και το πιο ανθεκτικό στις αμιδάσες (Tilley, J.W. et al. 1988).

Το αντίστοιχο ρακεμικό μίγμα αναστέλλει τη θρομβοκυτοπενία και την αύξηση της πίεσης του αίματος που προκαλεί ο PAF στους ινδόχοιρους, με διάρκεια δράσης μεγαλύτερη από 5 ώρες μετά από δόση 200mg/kg, που λαμβάνεται από το στόμα (Tilley, J.W. et al. 1988).

Ενδιαφέρον παρουσιάζει η ανταγωνιστική δράση ορισμένων ενώσεων, που ανήκουν σε άλλες φαρμακολογικές τάξεις, όπως είναι οι τριαζολο-βενζοδιαζεπίνες, που είναι αναλγητικά και αγχολυτικά.



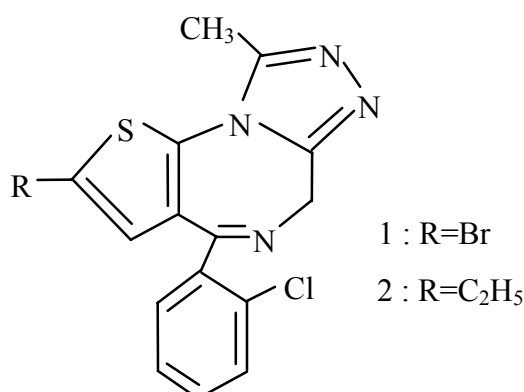
Σχήμα 3.31: Δομή αλπραζολάμης (1) και τριαζολάμης (2)

Η αλπραζολάμη και η τριαζολάμη (Σχ. 3.31) είναι ειδικοί αναστολείς της προκαλούμενης από τον PAF συσσώρευσης των αιμοπεταλίων στον άνθρωπο ($\text{IC}_{50}=5$ και $3 \mu\text{M}$, αντίστοιχα) (Kornecki, E. et al. 1984) και στο κουνέλι ($\text{IC}_{50}=2,5$ και $0,6 \mu\text{M}$, αντίστοιχα) (Cox, C.P. and Wood 1987), καθώς επίσης της δέσμευσης [^3H] PAF στα ανθρώπινα αιμοπετάλια ($\text{IC}_{50}=5$ και $1 \mu\text{M}$, αντίστοιχα) (Casals-Stenzel, J. et al. 1986).

Η ανασταλτική δράση της τριαζολάμης έναντι της συσσώρευσης αιμοπεταλίων που προκαλείται από τον PAF, δεν μπλοκάρεται από το Ro 15-1788, τον ανταγωνιστή του υποδοχέα των βενζοδιαζεπινών, υποδηλώνοντας μια διαφορετικότητα ανάμεσα στις ιδιότητες του PAF και του κεντρικού νευρικού συστήματος (ΚΝΣ) (Casals-Stenzel, J. and Weber, K.H. 1987).

Θεραπεία με τριαζολάμη (20-100mg/kg από το στόμα) αναστέλλει την

ενδοθωρακική συσσώρευση των ^{111}In -επισημασμένων αιμοπεταλίων στους ινδόχοιρους μετά από διέγερση με PAF (Casals-Stenzel, J. 1987).



Σχήμα 3.32: Δομή μπροτιζολάμης (1) και ετιζολάμης (2)

Οι μελέτες συσχέτισης δομής και δραστικότητας στο σκελετό των τριαζολο-βενζοδιαζεπινών (Chesney, C.M. et al. 1987) έδειξαν ότι η CH₃- ή η κυκλοπροπυλοομάδα στον C-1, το Cl, H, NO₂ ή η CH₃-ομάδα στον C-9 και το Cl ή το H στον C-2 οδηγεί σε μεγαλύτερη αναστολή της δέσμησης του PAF στα ανθρώπινα αιμοπετάλια.

Οι s-τριαζολο[3,4-c] θειενο[2,3-e] [1,4] διαζεπίνες (Σχ. 3.32) είναι πιο δραστικοί ανταγωνιστές του

PAF από τις τριαζολοβενζοδιαζεπίνες.

Η μπροτιζολάμη, που χρησιμοποιείται ως υπνωτικό, αναστέλλει την προκαλούμενη από τον PAF συσσώρευση των ανθρώπινων αιμοπεταλίων (IC₅₀=0,54 μM) και των ουδετερόφιλων (IC₅₀=0,21 μM) (Casals-Stenzel, J. 1987), καθώς επίσης τη δέσμηση του [^3H] PAF στον υποδοχέα του (IC₅₀=0,5 μM) (Chesney, C.M. et al. 1987).

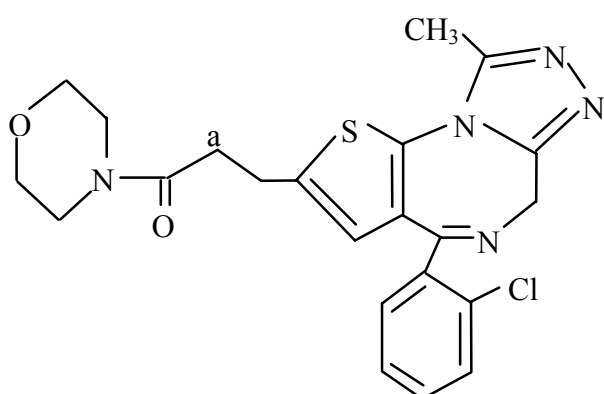
Η μπροτιζολάμη σε δόσεις από 0,05 έως 1,0mg/kg IV αναστέλλει με δόσοεξαρτωμένο τρόπο τη βρογχοσπασση που προκαλεί ο PAF στους ινδόχοιρους, την υποτασική δράση του PAF στους επίμυες και την ενδοθωρακική συσσώρευση των ^{111}In -επισημασμένων αιμοπεταλίων στους ινδόχοιρους (Casals-Stenzel, J. 1987c).

Όπως συμβαίνει με την τριαζολάμη, έτσι και η ανταγωνιστική δράση της μπροτιζολάμης δεν παρεμποδίζεται από το Ro 15-1788 (Casals-Stenzel, J. and Weber, K.H. 1987).

Η μεγαλύτερη αναστολή της δέσμησης του PAF στα ανθρώπινα αιμοπετάλια παρατηρείται, όταν μια CH₃-, Br- ή κυκλοπροπυλο-ομάδα είναι στον C-1 και ένα H ή OH στον C-4 (Chesney, C.M. et al. 1987).

Η ετιζολάμη (Σχ. 3.32), ένα αγχολυτικό φάρμακο, αναστέλλει την προκαλούμενη από τον PAF συσσώρευση των αιμοπεταλίων του κουνελιού (IC₅₀=1,3mg/ml) και σε δόσεις 0,01-1mg/kg IV αναστέλλει τη βρογχοσπασση που προκαλεί ο PAF στους ινδόχοιρους, την υποτασική δράση του στους επίμυες και το θανατικό shock στα ποντίκια (Tahara, T. et al. 1987).

Διαχωρισμός των επιδράσεων στο ΚΝΣ και των ανταγωνιστικών ιδιοτήτων έναντι του PAF στη σειρά των τριαζολοθειενοδιαζεπινών επιτεύχθηκε με τη σύνθεση του WEB 2086 (Σχήμα 3.33). Το WEB 2086 αναστέλλει εκλεκτικά



την προκαλούμενη από τον PAF συσσώρευση των ανθρώπινων αιμοπεταλίων ($IC_{50}=0,17 \mu M$) και των ουδετερόφιλων ($IC_{50}=0,36 \mu M$) και επίσης στη δέσμευση του [3H] PAF στον υποδοχέα ($K_d=1,5 \times 10^{-8} M$) (Casals-Stenzel, J. et al. 1987a).

Σχήμα 3.33 : Δομή WEB 2086

Η δέσμευση του [3H] WEB 2086 στον υποδοχέα του

PAF στα ανθρώπινα αιμοπετάλια ακολουθεί κινητική κορεσμού, ο PAF μπορεί να υποκαταστήσει το [3H] WEB 2086 και πρόσθετες μελέτες έδειξαν το WEB 2086 και ο PAF αλληλεπιδρούν σε κοινό σημείο στον υποδοχέα του PAF (Birke, F.W. and Weber, K.H. 1981).

Το WEB 2086 αναστέλλει την προκαλούμενη από τον PAF βρογχοσύσπαση ($IC_{50}=0,07 mg/kg$ από το στόμα), υπόταση ($IC_{50}=0,066 mg/kg$ από το στόμα), θρομβοκυτοπενία και ουδετεροπενία στους ινδόχοιρους (Casals-Stenzel, J. 1987a) και την υπόταση ($ED_{50}=0,052 mg/kg$ IV) στους επίμυες (Casals-Stenzel, J. et al. 1987a).

Έχει επίσης προστατευτική δράση έναντι της PAF προκαλούμενης α)θνησιμότητας στα ποντίκια (Casals-Stenzel, J. 1987a) β)ενδοθωρακικής συσσώρευσης των ^{111}In -επισημασμένων αιμοπεταλίων στους ινδόχοιρους (Casals-Stenzel, J. et al. 1987a) και γ)γαστρικής βλάβης στους επίμυες (Brambilla, A. et al. 1987).

Επίσης το WEB2086 προστατεύει τους επίμυες από την υποτασική δράση της ενδοτοξίνης (Casals-Stenzel, J. 1987b), μειώνει τη βρογχοσύσπαση και τη λευκοπενία που προκαλεί το αντιγόνο σε ευαισθητοποιημένους ινδόχοιρους (Pretolani, M. et al. 1987) και ελαττώνει τις αναφυλακτικές επιδράσεις της ωοαλβουμίνης στους ινδόχοιρους και στα ποντίκια (Casals-Stenzel, J. 1987b) (Casals-Stenzel, J. 1987a).

Το WEB 2086 εμφανίζει δοσοεξαρτώμενη αναστολή στην αύξηση που προκαλεί ο PAF στην πίεση διήθησης της πνευμονικής αρτηρίας και στην πίεση της βρογχικής εμφύσησης (Casals-Stenzel, J. 1987c).

Μελέτες συσχέτισης δομής και δραστηριότητας έδειξαν, ότι η ικανότητα δέσμευσης στον υποδοχέα των βενζοδιαζεπινών εξαρτάται από τον όγκο της καρβοξαμιδικής ομάδας και από την απόσταση που έχει η αμιδική ομάδα στον C-8 από το θειοφλινοδακτύλιο (Weber, K.H. et al. 1987). Το μήκος της αλκυλενο-αλυσίδας και η τελευταία ομάδα στον C-8 μπορεί να ποικίλλει (αμίνες, αμίδια, εστέρες, σουλφοναμίδια), ενώ διατηρείται η τιμή IC₅₀ από 0,2 έως 1,9 μM για τον υποδοχέα του PAF στα ανθρώπινα αιμοπετάλια. Οι καλύτερες ομάδες είναι για τον C-1, η CH₃ και η κυκλοπρόπυλο, για τον C-2, το Cl, F, OCH₃ ή Br.

Αντικατάσταση του τριαζολο-δακτυλίου με ιμιδαζο ή τετραζολο-δακτύλιο ή αντικατάσταση του θειενο-δακτυλίου με διαζολο- οδηγεί σε μειωμένη δραστηριότητα (Casals-Stenzel, J. et al. 1986).

Στροφή της αλκυλενο-πλευρικής, αλυσίδας του WEB 2086 και σχηματισμός δακτυλίου κυκλοπεντανίου αναμεσα στον α-C άνθρακα και στον C-7 καταλήγει στο WEB 2170 και στο CH₂ ανάλογο STY 2108. Και τα δύο αναστέλλουν τη συσσώρευση αιμοπεταλίων που προκαλεί ο PAF στους ανθρώπους (IC₅₀=0,30 και 0,04 μM, αντίστοιχα), χωρίς να παρεμποδίζουν την αντίστοιχη δράση ADP, ανδρεναλίνης, κολλαγόνου, σεροτονίνης και αραχιδονικού οξέος (Heuer, H. et al. 1987).

In vivo WEB 2170 και STY 2108 αναστέλλουν τη προκαλούμενη από τον PAF βρογχοσυσπασση (ED₅₀=0,008mg/kg IV και 0,007mg/kg αντίστοιχα) στους ινδόχοιρους και την υπόταση (ED₅₀=0,011mg/kg IV και 0,013mg/kg IV, αντίστοιχα) στους επίμυες.

Η υποτασική δράση της ενδοτοξίνης στους επίμυες παρεμποδίζεται και από τις δύο ενώσεις (Heuer, H. et al. 1987).

Το WEB 2170 μπορεί να χωρισθεί στα δύο οπτικά ισομερή του.

Το (-)- εναντιομερές του έχει καλύτερη δέσμευση (K_i=14nm) στον υποδοχέα του PAF από το (+)- ισομερές (K_i=660nm) (Heuer, H. et al. 1988).

Ένα ακόμα παράγωγο των τριαζολοθειενοδιαζεπινών, το Y-24180 αναστέλλει τη προκαλούμενη από τον PAF συσσώρευση των αιμοπεταλίων του κουνελιού και του ανθρώπου με τιμές IC₅₀ 4,1 και 0,72nm αντίστοιχα, είναι δηλαδή πολύ πιο δραστικό από το WEB 2086. Δεν εμφανίζει ανασταλτική δράση στη συσσώρευση αιμοπεταλίων που προκαλείται από το ADP και το αραχιδονικό οξύ (Terasawa, M. et al. 1989, Yamaguchi, S. et al. 2000).

Αναστέλλει τη δέσμευση [³H] PAF στα αιμοπετάλια του κουνελιού (K_i=3,5nm), όπως επίσης τη βρογχοσυσπασση που προκαλεί ο PAF στους ινδόχοιρους (0,001-0,1mg/kg IV), ενώ δεν επηρεάζει τη βρογχοσυσπασση που προκαλείται

από ισταμίνη, σεροτονίνη, αραχιδονικό οξύ, βραδυκινίνη ή από το λευκοτριένιο D₄ (Terasawa, M. et al. 1989).

Αναστέλλει εκλεκτικά την αύξηση στη διαπερατότητα των αγγείων (0,1-10mg/kg, από το στόμα) που προκαλείται από διαδερμική χορήγηση PAF στους επίμυες, καθώς επίσης τις δερματικές αντιδράσεις Arthus στους ινδόχοιρους και στα κουνέλια (Okamoto, H. et al. 1989).

Το Υ-24180 αναστέλλει δοσοεξαρτώμενα την προκαλούμενη από τον PAF α)θνησιμότητα στα ποντίκια (ED₅₀=0,017mg/kg IV) β)οίδημα ποδιού στους επίμυες (ED₅₀=0,9mg/kg από το στόμα) γ)υπόταση στους επίμυες (0,0003-0,1mg/kg IV) δ)ηωσινοφιλία στους πνεύμονες των ινδόχοιρων (0,1-1mg/kg από το στόμα) ε)αύξηση στον αιματοκρίτη (0,007mg/kg από το στόμα) και τέλος στ)σε in vitro πειράματα την παραγωγή ελευθέρων ριζών από τα κυψελιδικά μακροφάγα του ινδόχοιρου (IC₅₀=1,6×10⁻⁹ M) (Aratani, H. et al. 1989).

Ο ανταγωνιστής του PAF UK74505 είναι ένας ειδικός αναστολέας με παρατεταμένη δράση και έχει δοκιμαστεί σε μοντέλα ζώων, ενώ έχει δοκιμαστεί κλινικά για το άσθμα. Σε έρευνα που μελέτησε την επίδρασή του στις τοπικές και γενικές βλάβες που δημιουργούνται από ήπια και σοβαρή ισχαιμία στην άνω μεσεντέρια αρτηρία σε ποντικούς, φάνηκε αναστολή της τοπικής και απομακρυσμένης αύξησης της αγγειακής διαπερατότητας, της συσσώρευσης των ουδετερόφιλων και της εντερικής αιμορραγίας. Σε δόση 1mg/Kg ο αναστολέας αυτός ανέστειλε αποτελεσματικά το σχηματισμό τοπικού οιδήματος, την τοπική αύξηση της αιμοσφαιρίνης (δείκτη της αιμορραγίας των ιστών) και περιόρισε τις ιστοπαθολογικές διαφορές που παρατηρούνται στη σοβαρή ισχαιμία. Επίσης, η βλάβη των πνευμόνων αναστάλθηκε πλήρως και η πτώση της πίεσης του αίματος και η λευκοπενία περιορίστηκαν σημαντικά (Souza, D.G. et al. 2000). Τα δεδομένα αυτά ενισχύουν την υπόθεση της συμμετοχής του PAF στις ιστικές βλάβες, που προκαλούνται από τη σοβαρή και ήπια ισχαιμία κυρίως στους πνεύμονες και καθιστούν πιθανή την χρήση του συγκεκριμένου αναστολέα στην αντιμετώπιση των ποικίλων καταστάσεων ισχαιμίας.

Η λεξιπαφάντη ή αλλιώς BB-882 είναι ένας ειδικός αναστολέας του PAF, που πρόσφατα συντέθηκε με τη μορφή φαρμάκου και έχει μελετηθεί εκτενώς σε μοντέλα ζώων, ενώ έχουν γίνει και φαρμακολογικές δοκιμές ασφαλείας και είναι πλέον διαθέσιμο για κλινικές δοκιμές. Ο αναστολέας αυτός αποδείχτηκε αποτελεσματικός στην αντιμετώπιση των συμπτωμάτων της οξείας παγκρεατίτιδας (Jonson, C.D. et al. 2001, Imrie, C.W., McKay, C.J. 1999, Lane, J.S. 2001).

3.12. Ενδογενείς αναστολείς

Ενδιαφέρον παρουσιάζει η προσπάθεια ανακάλυψης ενδογενών αναστολέων του PAF θηλαστικής κυρίως προέλευσης, οι οποίοι πιθανώς να ρυθμίζουν την τοπική αυτακοειδή δράση του στα κύτταρα και στους ιστούς των θηλαστικών.

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, στα λιγνάνια που προέρχονται από τη διβενζυλοβουτυρολακτόνη, έχουν ανακαλυφθεί στα ούρα του ανθρώπου αναστολείς του PAF, η συγκέντρωση των οποίων αυξάνει στην αρχή της εγκυμοσύνης.

Οι ενώσεις αυτές αναστέλλουν τη συσσώρευση των αιμοπεταλίων κουνελιού που προκαλείται από τον PAF ($IC_{50}=2,2 \times 10^{-5}$ - $6,4 \times 10^{-6}$ M), αλλά δεν επηρεάζουν την αντίστοιχη δράση του αραχιδονικού οξέος, του ADP, του A23187 και της θρομβίνης. Επίσης, η αύξηση της έκκρισης των ενώσεων αυτών στα ούρα στην αρχή της εγκυμοσύνης συμπίπτει με την αύξηση της ιντερλευκίνης-1 στο πλάσμα.

Ενδογενείς αναστολείς του PAF βρέθηκαν στο ολικό εκχύλισμα των λιποειδών του συκωτιού του επίμου (Miwa, M. et al. 1987).

Ο χρωματογραφικός διαχωρισμός έδωσε δυο περιοχές με αναστολή. Η μια περιοχή ήταν λίγο πιο πάνω από την φωσφατιδυλοχολίνη και γι' αυτό δοκιμάστηκαν ανάλογα της φωσφατιδυλοισθινολαμίνης. Τα πιο δραστικά απ'αυτά (1×10^{-7} - 1×10^{-8} M) περιλαμβάνουν μια βινυλαιθερική ομάδα (Hanahan, D.J. et al. 1989). Τέλος, το φυσικό προϊόν ταυτοποιήθηκε ως φωσφατιδυλογλυκερόλη (Lekka, M. et al. 1993).

Η άλλη περιοχή αντιστοιχούσε στην περιοχή λιπαρών οξέων. Πράγματι, βρέθηκε ότι ο συγκεκριμένος αναστολέας είναι μίγμα λιπαρών οξέων, κυρίως ακόρεστων με μακριές αλυσίδες (Siafaka-Kapadai, A. and Hanahan, D. 1993).

Το μήκος της αλυσίδας τους ποικίλλει από 17 ως 22 άτομα άνθρακα και οι τιμές IC_{50} για την αναστολή που εμφανίζουν στην προκαλούμενη από τον PAF συσσώρευση των αιμοπεταλίων κουνελιού και στην έκκριση σεροτονίνης από αυτά είναι από 4,5 έως 140 μ M.

Έχει επίσης αναφερθεί ότι η λυσολεκθίνη, που απομονώθηκε από την μήτρα επίμου, αναστέλλει τη δράση του PAF στα αιμοπετάλια σε συγκεντρώσεις της τάξης του 10^{-5} M (Nakayama, R. et al. 1987).

Στο έκχυμα καρδιάς ινδικού χοιριδίου ανιχνεύθηκε εξειδικευμένος αναστολέας της δράσης του PAF με χρωματογραφική συμπεριφορά ανάλογη των καρδιολιπίνων και των φωσφατιδυλογλυκερολών (Τσουκάτος, Δ..Μ. 1987).

Η δομή του αναστολέα αυτού δεν έχει ακόμα διευκρινιστεί. Βρέθηκε όμως ότι η καρδιολιπίνη, που απομονώθηκε από την καρδιά βοδιού, αναστέλλει την συσσώρευση των αιμοπεταλίων κουνελιού ($IC_{50}=8,4 \times 10^{-7}$ M) (Tsoukatos, D. et al. 1993).

Καμία από τις δύο ενώσεις δεν αναστέλλει τη συσσώρευση αιμοπεταλίων που προκαλείται από το ADP ή το αραχιδονικό οξύ.

Απομονώθηκε και ταυτοποιήθηκε σε αίμα αιμοκαθαρόμενων ασθενών φωσφολιπιδείας, το οποίο εμφανίζει εξειδικευμένη ανασταλτική δράση έναντι της συσσώρευσης αιμοπεταλίων κουνελιού που προκαλείται από τον PAF καθώς και ανταγωνιστική δράση έναντι της πρόσδεσης του PAF στα αιμοπετάλια κουνελιού. Το φωσφολιπιδείας αυτό πιστοποιήθηκε και βρέθηκε ότι είναι καρδιολιπίνη (Antonopoulou, S. et al. 1996a).

Αναστολείς του PAF έχουν βρεθεί στο σάλιο, οι οποίοι αναστέλλουν τη συσσώρευση αιμοπεταλίων που προκαλείται από τον PAF, αλλά αφήνουν ανεπηρέαστη τη συσσώρευση που προκαλεί η θρομβίνη. Δεν υπάρχουν στοιχεία για τη δομή τους, παρά μόνο η χρωματογραφική τους συμπεριφορά, η οποία υποδηλώνει ότι είναι ουδέτερα λιπιδεία (Smal, M.A. and Baldo, B.A. 1989).

3.13. Υποδοχείς του PAF

Ο PAF συνδέεται σε ειδικό υποδοχέα στη μεμβράνη των κυττάρων, μέσω του οποίου ασκεί τις δράσεις του. Η ύπαρξη ειδικού υποδοχέα για τον PAF αποτέλεσε μία από τις πρώτες εκπλήξεις στην έρευνά του, αφού μέχρι τότε οι ερευνητές πίστευαν ότι θα μπορούσε να ασκεί τις δράσεις του με απλή ενσωμάτωση του στις μεμβράνες των κυττάρων, μιας και δεν είχαν βρεθεί υποδοχείς για τα φωσφολιπιδεία. Η στερεοεξειδίκευση στις δράσεις του με βάση το γεγονός ότι μόνο η R μορφή προκαλούσε ενεργοποίηση αιμοπεταλίων κουνελιού και ουδετερόφιλων ανθρώπου (Wykle R.L. et al., 1981) αποτέλεσε την πρώτη ένδειξη για την ύπαρξη ειδικών υποδοχέων του PAF. Μελέτες σύνδεσης με ραδιενεργό PAF που ακολούθησαν, έδειξαν την παρουσία δύο θέσεων σύνδεσης του PAF στα κύτταρα : α) μια υψηλής συγγένειας και μικρού αριθμού θέσεων και β) μία χαμηλής συγγένειας και απεριόριστου αριθμού θέσεων (Izumi T. et al., 1995). Παρόλα αυτά, η απομόνωση των υποδοχέων του PAF παρουσίαζε μεγάλες δυσκολίες. Αυτό γινόταν λόγω, αφενός λόγω της μη ειδικής σύνδεσης του στις μεμβράνες των κυττάρων και στα μικκύλια των απορρυπαντικών τα οποία χρησιμοποιήθηκαν

για τον σκοπό αυτό, αφετέρου εξαιτίας του μικρού αριθμού υποδοχέων στα κύτταρα. Τελικά, το 1991 για πρώτη φορά οι Honda et al απομόνωσαν και κλωνοποίησαν το cDNA του υποδοχέα του PAF από πνεύμονα ινδικού χοιριδίου (Honda Z. et al, 1991). Μέχρι σήμερα έχει επιτευχθεί η κλωνοποίηση του cDNA από ιστούς ποντικού, επίμυος και ινδικού χοιριδίου (Izumi T. et al, 1995, Ishii S. et al, 2000) καθώς και από λευκοκύτταρα (Nakamura M. et al, 1991), καρδιά (Sugimoto T. et al, 1992) και τις κυτταρικές σειρές HL-6074 και EoL-170 ανθρώπου. Πρόσφατα επίσης βρέθηκε ότι ο υποδοχέας του PAF εκφράζεται, όχι μόνο στην επιφάνεια, αλλά και σε ενδοσώματα ενδοθηλιακών κυττάρων (Ihida K. et al, 1999), γεγονός που υποδηλώνει τον πιθανό ρόλο του PAF ως ενδοκυτταρικού μεσολαβητή.

Οι πρωτεΐνες του υποδοχέα, που κωδικοποιούνται στον άνθρωπο και το ινδικό χοιρίδιο, είναι απλές πολυπεπτιδικές αλυσίδες 342 αμινοξέων και έχουν Mr 39 kDa.

Ο υποδοχέας αποτελείται από 7 διαμεμβρανικές περιοχές (α-έλικες) χαρακτηριστικές της υπεροικογένειας των υποδοχέων που συνδέονται με G-πρωτεΐνες. Μία ομάδα εννέα καταλοίπων σερίνης και θρεονίνης, κοντά στο καρβοξυτελικό κυτοπλασματικό άκρο, είναι πιθανές περιοχές φωσφορυλίωσης από κινάσες υποδοχέων G πρωτεϊνών.

Όταν συνδέεται ο PAF στον υποδοχέα του ενεργοποιούνται πορείες στο εσωτερικό του κυττάρου που οδηγούν στον σχηματισμό ή στην αύξηση της συγκέντρωσης ενδοκυτταρικών μηνυμάτων όπως Ca^{2+} , cAMP, 1,4,5-τριφωσφορική ινοσιτόλη (IP3), διακυλογλυκερόλη (DAG), αραχιδονικό οξύ, τα οποία με την σειρά τους προκαλούν την τελική απόκριση του κυττάρου. Στην ενεργοποίηση αυτών των μηχανισμών μεσολαβούν G πρωτεΐνες, οι οποίες είναι συζευγμένες με τον υποδοχέα του PAF. Το είδος του μηχανισμού μεταγωγής σήματος εξαρτάται από το είδος του κυττάρου και βρίσκεται υπό αυστηρή ρύθμιση ενώ πολλές φορές η σύνδεση του PAF στον υποδοχέα του ενεργοποιεί παραπάνω από ένα μηχανισμούς που αλληλεπιδρούν μεταξύ τους. Οι σημαντικότεροι μηχανισμοί μεταγωγής σήματος, που επάγονται από τον PAF και αναφέρονται στις ακόλουθες δημοσιεύσεις (Koltai M. et al, 1991, Chao W. et al, 1993, Izumi T. et al, 1995, Shukla SD. et al, 1991, Saunders RN. et al, 1987, Ishii S. et al, 2000) είναι:

- α) μέσω ενεργοποίησης G πρωτεϊνών
- β) μέσω αλλαγής των επιπέδων του κυκλικού AMP
- γ) μέσω αύξησης επιπέδων του ενδοκυτταρικού ασβεστίου
- δ) μέσω ενεργοποίησης της φωσφολιπάσης C (PLC) και του κύκλου της φωσφατιδυλοϊνοσιτόλης (PI)

ε) μέσω ενεργοποίησης της φωσφολιπάσης A2 (PLA2) και του σχηματισμού εικοσανοειδών

στ) μέσω ενεργοποίησης της κινάσης της φωσφατιδυλοϊνοσιτόλης (PI3K)

ζ) μέσω ενεργοποίησης της φωσφολιπάσης D (PLD)

η) μέσω ενεργοποίησης των τυροσινικών κινασών (PTK)

θ) μέσω ενεργοποίησης MAP κινασών (MAPK)

ι) μέσω ενεργοποίησης γονιδιακής έκφρασης

4. ΚΥΑΝΟΒΑΚΤΗΡΙΑ: ΛΙΠΟΕΙΔΗ ΚΑΙ ΡΑΦ

Τα κυανοβακτήρια εκπροσωπούν μια μεγάλη ομάδα μέσα στο προκαρυωτικό βασίλειο. Είναι οι παλαιότεροι οργανισμοί που ξέρουμε μέχρι σήμερα, οι οποίοι έχουν την ικανότητα οξειδωτικής φωτοσύνθεσης. Χρησιμοποιούν ως μια πλούσια πηγή νέων βιοενεργών μεταβολιτών και περιέχουν πολλές κυτοτοξικές αντιμικροβιακές και αντιβακτηριακές ενώσεις (Patterson, G.M.L. et al. 1994).

Αναλύσεις που έγιναν σε μη καθαρά κλάσματα μεμβράνης και ολόκληρων κυττάρων κυανοβακτηρίων, έχουν δείξει την παρουσία γλυκολιποειδών και φωσφολιποειδών. Σε έρευνες που έχουν γίνει στα κυανοφύκη βρέθηκε ότι η σύστασή τους σε λιποειδή και κυρίως η γλυκερολιποειδική σύσταση αυτών είναι παρόμοια με αυτή των χλωροπλαστών. Εξαίρεση αποτελεί η φωσφατιδυλοχολίνη, που ενώ συναντάται σε σημαντικά ποσά στους χλωροπλάστες, δεν υπάρχουν ενδείξεις για την παρουσία της σε κυανοβακτήρια.

Από τα φωσφολιποειδή, η φωσφατιδυλογλυκερόλη είναι το μόνο για το οποίο, υπάρχουν αναφορές για την παρουσία του στα κυανοφύκη (Golecki, J.R. and Drews, G. 1982).

Τα κυανοβακτήρια *Anacystis nidulans* και *Anaebena variabilis* έχει βρεθεί ότι διαθέτουν και γλυκολιποειδική σύσταση όμοια με αυτή των χλωροπλαστών των φύλλων. Συγκεκριμένα περιέχουν γλυκοσυλ-διακυλο-γλυκερόλη και γαλακτοζυλ-διακυλο-γλυκερόλη (Sato and Murata, 1982a).

Η σύσταση των λιπαρών οξέων των γαλακτολιποειδών και των σουλφολιποειδών του *A.nidulans* μοιάζει με αυτή ενός προκαρυωτικού οργανισμού με 16:0, 16:1, 18:0 και 18:1 ως κύρια οξέα. Παρόμοιας σύστασης λιπαρά οξέα (με την απουσία των C18 οξέων) βρέθηκαν για τα προκαρυωτικά φύκη *Prochloron* (Murata and Sato, 1983), που διαθέτουν ιδιότητες όμοιες με αυτές των χλωροπλαστών των πράσινων φυκών και ανώτερων φυτών (π.χ. παρουσία ταυτόχρονα χλωροφύλης α και β). Όμως τα λιπαρά οξέα των γλυκολιποειδών στην *A. variabilis* περιέχουν επιπλέον τα πολυακόρεστα οξέα 18:2 και 18:3, όπως συμβαίνει και στα πράσινα φύκη.

Συνοψίζοντας, τα σημαντικότερα λιποειδή των κυανοβακτηρίων είναι τα: μονογαλακτοζυλο-διγλυκερίδια, διγαλακτοζυλο-διγλυκερίδια, και τα σουλφονο-ανάλογα των μονογαλακτοζυλο-διγλυκεριδίων, ενώ σε μικρότερο βαθμό συναντάται η φωσφατιδυλογλυκερόλη (Golecki, J.R. and Drews, G. 1982).

Επιπλέον, σχετικώς πρόσφατα απομονώθηκαν και ταυτοποιήθηκαν οι λυσο-μορφές των παραπάνω λιποειδών στο κυανοβακτήριο *Synechocystis* (Kim,

Y.H. et al. 1999) καθώς και μονο- και δι- ακυλιωμένες μορφές αυτών κυρίως με παλμιτικό οξύ. Οι τελευταίες απομονώθηκαν από *Scytonema* και *Oscillatoria* (Reshef, V. et al. 1997).

4.1 Παρουσία του PAF στη φύση και ρόλος του

Το **προκαρυωτικό** βασίλειο χωρίζεται σε δύο υποβασίλεια: τα **ευβακτήρια** και τα **αρχαιοβακτήρια** (Margulis, L. 1996).

Αντίθετα από τα ευβακτήρια και τα ευκαρυωτικά κύτταρα, τα αρχαιοβακτήρια περιέχουν μοναδικά αιθερικά λιποειδή, τα οποία συναντώνται μόνο σε αυτούς τους οργανισμούς. Τα λιποειδή αυτά συνέβαλλαν στην επιβίωση των αρχαιοβακτηρίων στις ακραίες περιβαλλοντικές συνθήκες των πρώτων σταδίων της εξέλιξης, αφού είναι ανθεκτικά σε μεγάλες αυξομειώσεις αλατότητας, θερμοκρασίας, αλκαλικότητας και οξύτητας. Τα λιποειδή των μεμβρανών των ευβακτηρίων δεν περιλαμβάνουν τα αιθερικά λιποειδή, τα οποία βρίσκονται στα αρχαιοβακτήρια κι αυτό οδηγεί στο συμπέρασμα ότι το εξελικτικό μονοπάτι των αρχαιοβακτηρίων είναι μεγαλύτερο από αυτό των ευβακτηρίων. Έτσι παρόλο που τα αρχαιοβακτήρια και τα ευβακτήρια έχουν κοινούς δρόμους βιοσύνθεσης λιποειδών, το κύριο σημείο διαφοροποίησης μεταξύ τους αλλά και των αρχαιοβακτηρίων με τους υπόλοιπους οργανισμούς, είναι ότι το κύριο μονοπάτι βιοσύνθεσης για αυτά είναι η σύνθεση των ισοπρενοειδών, ενώ για τον υπόλοιπο οργανικό κόσμο τη θέση αυτή καταλαμβάνουν τα λιπαρά οξέα, οι λιπαρές αλδεΐδες και οι λιπαρές αλκοόλες (Kates, M. 1992).

Έρευνες για τον PAF σε ευβακτηριακά κύτταρα οδήγησε σε μη αναμενόμενα αποτελέσματα. Συγκεκριμένα, κύτταρα *E.Coli*, που δεν περιέχουν γλυκερινούχα φωσfolιποειδή της χολίνης, βρέθηκαν να συνθέτουν C16:O- ή C18:O- PAF μετά την προσθήκη του κατάλληλου lyso-PAF στο μέσο ανάπτυξης. Το κύριο μέρος του συντιθέμενου PAF (70%) απελευθερώνεται στον εξωκυτταρικό χώρο και περίπου το 30% παραμένει στα κύτταρα (Denizot, Y. et al. 1989, Denizot, Y. et al. 1990). Η σύνθεση του PAF στα κύτταρα της *E.Coli* θεωρείται ότι σχετίζεται με την παρουσία σε αυτά της ακετυλοτρανσφεράσης, η οποία είναι παρόμοια με την ακετυλοτρανσφεράση των ευκαρυωτικών κυττάρων και μπορεί να χρησιμοποιήσει εξωγενή lyso-PAF για την σύνθεση PAF (Denizot, Y. et al. 1989, Denizot, Y. et al. 1990).

Τα αιθερικά λιποειδή είναι ευρύτατα διαδεδομένα σε πρωτόζωα των γενών *Tetrahymena*, *Paramecium*, *Leishmania*, *Trypanosoma* και *Acanthamoeba* (Kaneshiro, E.S. 1978, Adorsaki, R.K. et al. 1996). Τα λιποειδή των πρωτόζωων των παραπάνω τάξεων βρέθηκαν να περιέχουν 1-0-αλκυλο-2-ακυλο-sn-γλυκερο-3-φωσφοχολίνη, ένωση που αποτελεί πρόδρομο για την

σύνθεση του PAF (Kaneshiro, E.S. 1978, Adorsaki, R.K. et al. 1996, Dembitsky, B.M. et al. 1989).

Η παρουσία πρόδρομων ενώσεων του PAF είναι ουσιαστική προϋπόθεση για τη σύνθεσή του στα κύτταρα. Έτσι, σύνθεση του PAF βρέθηκε ότι λαμβάνει χώρα στα κύτταρα της *Tetrahymena pyriformis* (Lekka, M. et al. 1986), καθώς και του *Dictyostelium discoideum* (Bussolino, F. et al. 1991), ενώ ο PAF που συντέθηκε με τον τρόπο αυτό παρέμεινε μέσα στα κύτταρα (Lekka, M. et al. 1986, Bussolino, F. et al. 1991). Επιπρόσθετα, κύτταρα των πρωτόζωων βρέθηκε ότι μεταβολίζουν εξωγενή PAF με παράλληλη παραγωγή λυσο-PAF και 1-0-αλκυλο-2-ακυλο-sn-γλυκερο-3-φωσφοχολίνης (Lekka, M. et al. 1990).

Φαίνεται ότι ο PAF ρυθμίζει ζωτικής σημασίας λειτουργίες για τα πρωτόζωα. Ενδεικτικά, αναφέρεται ότι ο PAF αυξάνει το ενδοκυτταρικό περιεχόμενο σε ιόντα Ca^{2+} και διεγείρει την γλυκογονόλυση στα κύτταρα της *T.pyriformis* (Tselepis, A. et al. 1986).

Τα κύτταρα της αμοιβάδας *D. discoideum* είναι γνωστό ότι σχηματίζουν έναν πολυκυτταρικό οργανισμό ως απόκριση στην έλλειψη τροφής, ενώ αυτή ακριβώς η κυτταρική συσσώρευση προκαλείται από το c-AMP (Bussolino, F. et al. 1991).

Ωστόσο, υπό την επίδραση του c-AMP η σύνθεση του PAF στα κύτταρα της *D. discoideum* αυξάνεται κατά 10 φορές μέσα σε χρονικό διάστημα που δεν ξεπερνά τα 2min, ενώ η συγκέντρωσή του ελαττώνεται κατά το τέλος της φάσης της κυτταρικής συσσώρευσης (Bussolino, F. et al. 1991). Τα στοιχεία αυτά καταδεικνύουν το γεγονός ότι στα κύτταρα της *D. discoideum* η σύνθεση του PAF σχετίζεται με τη ρυθμιστική λειτουργία του c-AMP και άρα τη λειτουργία του PAF ως κυτταρικού βιολογικού ρυθμιστή ακόμα και για τα πρωτόζωα.

Ο ρόλος του PAF ως μεσολαβητή εμφανίζεται σε πρωτόγονους οργανισμούς, όπως πρωτόζωα και διατηρείται κατά τη διάρκεια της ακολουθούμενης εξέλιξης (Kulikov, V.I. and Muzya, G.I. 1997).

Πρέπει επίσης να αναφερθεί ότι η παρουσία του PAF έχει πιστοποιηθεί στη ζύμη (Nakayama, R. et al. 1994), στους γαιοσκώληκες (Sugiura, T. et al. 1995), σε κατώτερα φυτά (Turner, M.R. and Lumb, R.H. 1989) και σε θηλαστικά (Braquet, P. et al. 1987b).

Τα ανώτερα φυτά περιέχουν τα ένζυμα τα οποία είναι απαραίτητα για τη σύνθεση των αιθερικών λιποειδών (Felde, R. et al. 1994) καθώς και για τη μετατροπή των εξωγενών αλκυλογλυκερολών σε φωσφολιποειδή με έναν απλό αιθερικό δεσμό (Weber, N. Mangold, H.K. 1985). Έτσι, κύτταρα από ραπανάκι ή σόγια βρέθηκε ότι οδηγούν σε σύνθεση 1-0-αλκυλο-2-ακυλο-sn-

γλυκερο-3-φωσφοχολίνης από 1-0- εξαδεκυλογλυκερόλες (Weber, N., Mangold, H.K. 1985). Η έρευνα για λιποειδή που παρουσιάζουν παρόμοια δράση με τον PAF (PAF-like λιποειδή) στην *Urtica dioica*, οδήγησε στην ανίχνευση PAF, ο οποίος εκτός από την πιστοποίηση με βιολογικό πείραμα, δηλαδή πρόκληση της συσώρευσης των αιμοπεταλίων και απευαισθητοποίηση αυτών στην επακόλουθη δράση PAF, πιστοποιήθηκε για πρώτη φορά σε φυτό και με άμεση χημική ανάλυση δηλαδή φάσμα EI-MS (Antonopoulou, S. et al. 1996b).

Από τα παραπάνω αλλά και το σύνολο των διαθέσιμων στοιχείων φαίνεται ότι ο PAF διαδραματίζει σημαντικό ρυθμιστικό ρόλο στα κύτταρα των ανώτερων φυτών. Έτσι, ο PAF διεγείρει την εξαρτώμενη από ATP μεταφορά H^+ σε απομονωμένα κλάσματα μεμβρανών ανώτερων φυτών (Scherer, G.F.E. 1985, Martiny-Baron, G. Scherer, G.F.E. 1989).

Παρατηρείται δε ένα μέγιστο στη μεταβολή του pH της τάξης του 50-80% της αρχικής του τιμής, όταν η συγκέντρωση σε PAF ρυθμίστηκε στα 8μM (Scherer, G.F.E. 1985), ενώ ακόμα και σε μικρότερες συγκεντρώσεις (2-4μM) ο PAF εξακολουθεί να προκαλεί μεταβολές στο pH του συστήματος. Η επίδραση αυτή του PAF στην εξαρτώμενη από ATP μεταφορά H^+ στο κύτταρο, φαίνεται ότι σχετίζεται με τη διεγερτική δράση, που ασκεί στις κυτταρικές πρωτεϊνικές κινάσες (Martiny-Baron, G., Scherer, G.F.E. 1989).

Πρέπει επίσης να παρατηρήσουμε ότι διάφορες συνθετικές αλλά και φυσικής προέλευσης ενώσεις έχουν βρεθεί να παρουσιάζουν παρόμοια με τον PAF δραστηριότητα (Demopoulos, C.A. and Antonopoulou, S. 1996, Avramopoulou, V. et al. 1997, Fragopoulou, E. et al. 2000, Zanglis, A. et al. 1996), ενισχύοντας την άποψη ότι ο PAF είναι ένα μέλος μιας μεγάλης οικογένειας που περιλαμβάνει ως μεσολαβητές λιποειδή. Συνεπώς η έρευνα πρέπει να επικεντρωθεί όχι μόνο στον PAF αλλά στην όμοια-με PAF δραστηριότητα, που προκαλείται από διάφορες ενώσεις έχοντας διαφορετικούς φυσιολογικούς ρόλους σε προκαρυωτικούς και ευκαρυωτικούς οργανισμούς.

Δεν υπάρχουν αναφορές για έρευνες ύπαρξης PAF ή αναλόγων του PAF ή ακόμα ενώσεων που εμφανίζουν παρόμοια με PAF δραστηριότητα στα κυανοβακτήρια, αν και βρίσκονται χαμηλά στο επίπεδο εξέλιξης, όπου η περιεκτικότητα σε αλκυλο-ακυλο- μορφές αιθερικών λιποειδών αναμένεται να είναι υψηλή (Kulikova, V.I. and Muzya, G.I. 1997). Επιπλέον η συσχέτιση μεταξύ αλλεργικού ερεθισμού του δέρματος και αλλεργικού άσθματος, γνωστές δράσεις του PAF (Jenks, P.J. et al. 1999, Henig, N.R. et al. 2000) με την έκθεση σε κυανοβακτήρια, έχει καταγραφεί σε αρκετές περιπτώσεις (Cohen, S.G. and Reif, O.B. 1953). Όμως αυτές οι αλλεργικές αντιδράσεις

μπορεί να μη σχετίζονται με τις τοξίνες των κυανοβακτηρίων (Falconer, I. R. 1996).

Είναι γνωστό ότι τα κυανοβακτήρια παράγουν τοξίνες, οι οποίες μπορούν να προκαλέσουν ακόμα και το θάνατο σε ζώα (Schwimmer, P.R & Schwimmer, D. 1968, Skulberg, D.M. et al. 1984, Gorham, P.R. & Carmichael, W.W. 1988). Επίσης επηρεάζουν σημαντικά την υγεία του ανθρώπου (Billings, W.H. 1981, Bourke, A.T.C. et al. 1983, Falconer, I.R. et al. 1983, Turner, P.C. et al. 1990, Hayman, J. 1992, Saadi, O.E. & Cameron, A.S. 1993).

Τα κυανοβακτήρια παράγουν τοξίνες με ηπατοτοξική, νευροτοξική και δερματολογική δράση (Falconer, I.R. 1996).

Έτσι όσον αφορά την ηπατοτοξική τους δράση προκαλούν ηπατοκυτική νέκρωση, καταστροφή στο ηπατικό ενδοθήλιο και τέλος θάνατο από υποβουλιμικό σοκ λόγω μαζικών αιμορραγιών στο ήπαρ (Tencalla, F.G. et al. 1994).

Εξίσου σημαντική είναι η δυνατότητα που έχουν να βοηθούν στην ανάπτυξη καρκινικών όγκων (Falconer, I.R. 1991, Yu, S.Z. 1994).

Η νευροτοξική δράση τους προκαλεί θάνατο λόγω αναπνευστικής παράλυσης (Carmichael, W.W. et al. 1979).

Τέλος, έχει αναλυτικά καταγραφεί η συσχέτιση μεταξύ των κυανοβακτηρίων και δερματολογικών προβλημάτων, όπως ευρύτατος ερεθισμός του δέρματος (Saadi, O.E. et al. 1995, Fujiki, H. et al. 1984).

4.2. Κυανοβακτήρια σπηλαίων:

Έχει διαπιστωθεί ότι οι είσοδοι των σπηλαίων, όπου υπάρχει φως αλλά και το εσωτερικό των τεχνητά φωτισμένων σπηλαίων, αποικίζονται από φωτοαυτότροφους οργανισμούς (κυανοβακτήρια, χλωρόφυτα, διάτομα και βρυόφυτα). Τα κυανοβακτήρια, φωτοσυνθετικοί προκαρυωτικοί οργανισμοί οι οποίοι κάνουν οξειδωτική φωτοσύνθεση, είναι η κυρίαρχη ομάδα μικροχλωρίδας στα τεχνητά φωτισμένα σπήλαια. Οι παρατηρήσεις που έγιναν και τα αποτελέσματα της μικροσκοπικής ανάλυσης φρέσκου και καλλιεργημένου υλικού αποκάλυψε ότι τουλάχιστον οκτώ είδη κυανοβακτηρίων που ανήκουν στα γένη *Aphanocapsa*, *Chroococcidiopsis*, *Leptolyngbya*, *Pseudanabaena*, *Plectonema* και *Scytonema* έχουν αποικίσει τους τοίχους των σπηλαίων που μελετήθηκαν. Βρέθηκε ότι το *Scytonema julianum* είναι ένας συνηθισμένος έποικος των αμυδρά ή έντονα φωτισμένων περιοχών των σπηλαίων (Anagnostidis, K. et al. 1982, Iliopoulou-Georgoudaki, J. et al. 1993, Pantazidou, A. 1996, 1997). Σχηματίζει γκρίζες

προς ωχρές, κυανοπράσινες αποικίες σε δεσμίδες από νήματα σχήματος μαξιλαριού (Coute, A. 1985, Coute, A. & Bury, E. 1985, Aboal, M. et al. 1994).

4.2.1. *Scytonema julianum*

Το *Scytonema* είναι ένα νηματοειδές φωτοσυνθετικό, ευρέως διαδεδομένο κυανοβακτήριο. Συναντάται πολύ συχνά σε υδάτινα οικοσυστήματα (λίμνες, ποτάμια, θάλασσα κ.ά.), αλλά και σε χερσαία περιβάλλοντα με μεγάλη υγρασία, σχηματίζοντας σε ασβεστολιθικούς βράχους, μελανές κατακόρυφες ταινίες, που ακολουθούν τη ροή του νερού.

Οι υπάρχουσες μελέτες για τη σύσταση των λιποειδών του γένους *Scytonema* δείχνουν ότι κυριαρχούν τα γλυκολιποειδή, όπως τα μονογλυκο- διγλυκερίδια, τα σουλφονο- ανάλογα αυτών, τα διγλυκο- διγλυκερίδια και μονο- και δι- ακυλιωμένα στο σάκχαρο, παράγωγά τους (Reshef, V. et al. 1997). Δεν βρέθηκαν εργασίες που να μελετούν τα φωσφολιποειδή του κυανοβακτηρίου αυτού καθώς και αναφορές για ύπαρξη PAF ή PAF αναλόγων σε αυτό.

4.2.2. *Chroococcidiopsis* sp.

Το *Chroococcidiopsis* sp. είναι ένα πρωτόγονο φωτοσυνθετικό και ευπροσάρμοστο, κοκκιώδες κυανοβακτήριο, το οποίο συναντάται σε ένα ευρύ φάσμα ακραίων, ξηρών, ζεστών ή κρύων βιοτόπων, όπως οι λιμνοθάλασσες με υψηλή περιεκτικότητα αλάτων, οι λίμνες και οι θερμές πηγές. Το *Chroococcidiopsis* sp. είναι ανθεκτικό στην ξηρασία και παραμένει ζωντανό για μεγάλο χρονικό διάστημα χωρίς τροφή.

Ο Friedman και συνεργάτες θεωρούν ότι το συγκεκριμένο κυανοβακτήριο θα μπορούσε να χαρακτηριστεί ως πρωτόγονος οργανισμός, αφού παρουσιάζει χαρακτηριστικά παρόμοια με αυτά των πρώτων μικροοργανισμών που εμφανίστηκαν στη Γη. Τέτοια χαρακτηριστικά είναι η αντοχή του σε ακραίες περιβαλλοντικές συνθήκες όπως ξηρασία, υψηλή αλατότητα και χαμηλές θερμοκρασίες. Είναι ανθεκτικό στο κρύο και μπορεί να επιβιώσει ακόμη και κατά τη διάρκεια μακροπρόθεσμου και επαναλαμβανόμενου παγετού. Είναι επίσης ανθεκτικό σε υψηλά επίπεδα ακτινοβολίας ιονισμού, πράγμα το οποίο ενισχύει την άποψη, ότι ο οργανισμός ήταν παρών στα αρχικά στάδια της φωτοσυνθετικής δραστηριότητας. Οι βιοχημικοί, δομικοί και γενετικοί μηχανισμοί του παρουσιάζουν μεγάλο ενδιαφέρον.

Αναπτύσσεται σε μέρος σκιερό και υγρό κάτω από πέτρες, σε συνθήκες όμοιες με αυτές που επικρατούν στα σπήλαια. Το ίδιο φύκος έχει εντοπισθεί και αναγνωρισθεί και σε σπήλαια, όπως αυτό του Δυρού και το σπήλαιο Νυμφολήπτου Βάρης. Το κυανοβακτήριο *Chroococcidiopsis* sp. (Geitler, 1933), καθορίζεται από κοκκιώδη, μη-πολωμένα κύτταρα, που διαιρούνται σε πολλά μικρότερα και τελικά διαμορφώνουν αποικίες. Τα κύτταρά του έχουν

διάμετρο κατά μέσον όρο 9-18μm και περιλαμβάνουν μέχρι 12 **baeocytes** διαμέτρου 2-2,5μm το καθένα.

Μελέτη για τη σύσταση των λιποειδών του κυανοβακτηρίου *Chroococcidiopsis* sp. έχει δείξει ότι στις μεμβράνες των κυττάρων κυριαρχούν τα μονογαλακτο-διγλυκερίδια (MGDG), τα διγαλακτοζυλο-διγλυκερίδια (DGDG), η φωσφατιδυλο-γλυκερόλη (PG) και τα σουλφο ανάλογα των διγλυκεριδίων (SQDG) (Murata et Nishida, 1987).

ΣΚΟΠΟΣ

Ο σκοπός της συγκεκριμένης ερευνητικής εργασίας ήταν να απομονωθούν και να διαχωριστούν τα λιποειδή από κυανοφύκη σπηλαίων, με στόχο τη μελέτη της βιολογικής τους δραστηρότητας, κυρίως ως προς την κατεύθυνση της διερεύνησης της ύπαρξης PAF ή PAF-αναλόγων ή πολικών λιποειδών, που εμφανίζουν δράση ανάλογη του PAF.

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

5. ΜΕΘΟΔΟΙ

5.1. Καλλιέργεια κυανοβακτηρίων *in vitro*

Όργανα:

Κωνικές φιάλες των 100ml.

Υδρόφοβο βαμβάκι.

Ιατρική γάζα.

Ευθύς μικροβιολογικός κρίκος.

Μεταλλική λαβίδα.

Αντιδραστήρια:

Καλλιεργητικά υλικά: BG-11 (Πίνακας 5) [Allen, M.M. and R.Y. Stanier, (1968), Rippka, R. et al. (1989)] και STAUB (1961) (Πίνακας 6) (STAUB, R. 1961).

Αρχή μεθόδου:

Η διαδικασία καλλιέργειας των κυανοβακτηρίων *in vitro* έχει σκοπό τον εμπλουτισμό του υλικού αλλά και την παραλαβή αξενικής καλλιέργειας.

Αναλυτική πορεία:

Από επιλεγμένα μέρη του βιότοπου του κυανοβακτηρίου, συλλέγεται υλικό με αποστειρωμένη λαβίδα, τοποθετείται σε αποστειρωμένο δοχείο και μεταφέρεται στο εργαστήριο.

Με αποστειρωμένη λαβίδα το υλικό τοποθετείται σε κωνικές φιάλες των 100ml, οι οποίες περιέχουν 75ml αποστειρωμένο καλλιεργητικό υλικό και είναι πωματισμένες με υδρόφοβο βαμβάκι και ιατρική γάζα.

Τοποθετούνται σε χώρο φωτιζόμενο φυσικά, χωρίς την άμεση επίδραση ηλιακού φωτός, σταθερής θερμοκρασίας 22-25°C περίπου.

Οι καλλιέργειες ανανεώνονται κάθε 30 ημέρες περίπου.

Καλλιεργητικά υλικά:**Πίνακας 3****BG-11**

Περιέχει:	g l ⁻¹	mM
NaNO ₃	1.5	17.65
K ₂ HPO ₄ ·3H ₂ O	0.04	0.18
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.075	0.30
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0.036	0.25
Κιτρικό οξύ	0.006	0.03
Ferric ammonium citrate	0.006	0.03
EDTA (disodium magnesium)	0.001	0.003
Na ₂ CO ₃	0.02	0.19
Μίγμα ιχνοστοιχείων μετάλων A5+Co	1 ml	
Απεσταγμένο νερό	1 L	

pH μετά από αποστείρωση του διαλύματος και σε θερμοκρασία δωματίου: 7.4

Μίγμα ιχνοστοιχείων μετάλων A5+Co

Περιέχει:	g l ⁻¹
H ₃ BO ₃	2.86
MnCl ₂ ·4H ₂ O	1.81
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0.222
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0.390
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.079
Co(NO ₃) ₂ ·6H ₂ O	0.049

Πίνακας 4

STAUB 1961

Περιέχει:	mg/l
NaNO ₃	467
Ca(NO ₃) ₂ ·4 H ₂ O	59
K ₂ HPO ₄	31
MgSO ₄ ·7H ₂ O	25
Fe-EDTA complex	10 ml/l
Μίγμα ιχνοστοιχείων μετάλλων	0.03 ml/l

pH : μετά από αποστείρωση του διαλύματος και σε θερμοκρασία δωματίου: 7

Μίγμα ιχνοστοιχείων μετάλλων

Περιέχει:	mg/l
H ₃ BO ₃	310
MnSO ₄ ·4H ₂ O	223
Na ₂ WO ₄ ·2H ₂ O	3,3
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ ·4H ₂ O	8,8
KBr	11,9
KJ	8,3
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	28,7
Cd(NO ₃) ₂ ·4H ₂ O	15,4
Co(NO ₃) ₂ ·6H ₂ O	14,6
CuSO ₄ ·5H ₂ O	12,5
NiSO ₄ (NH ₄) ₂ ·6H ₂ O	19,8
Cr(NO ₃) ₂ ·7H ₂ O	3,7
V ₂ O ₄ (SO ₄) ₃ ·16H ₂ O	3,5
Al ₂ (SO ₄) ₃ ·K ₂ SO ₄ ·24H ₂ O	47,4

Το διάλυμα Fe-EDTA παρασκευάζεται από: 5ml 0.1 N διαλύματος FeCl₃·6H₂O, 5ml 0.1 N Na₂-EDTA διαλυμένα σε 500ml απεσταγμένο νερό.

5.2. Εκχύλιση λιποειδών κατά Bligh-Dyer

(Bligh, E.G. et al. 1959)

Όργανα:

Περιστρεφόμενη συσκευή εξάτμισης σε ελαττωμένη πίεση (flash evaporator).

Διαχωριστικές χοάνες.

Αντιδραστήρια:

Οργανικοί διαλύτες (χλωροφόρμιο, μεθανόλη) αναλυτικής καθαρότητας.

Απεσταγμένο νερό.

Αρχή μεθόδου:

Με κατάλληλης πολικότητας μονοφασικό σύστημα διαλυτών επιτυγχάνεται η εκχύλιση όλων των λιποειδών, καθώς επίσης και εκχύλιση μικρών ποσοτήτων υδατοδιαλυτών ουσιών, όπως αλάτων, αμινοξέων, σακχάρων κ.λ.π. Με τη μετατροπή του μονοφασικού συστήματος σε διφασικό, στη μεν χλωροφορμική φάση κατανέμονται όλα τα λιποειδή, στη δε υδατική φάση κατανέμονται τα υδατοδιαλυτά συστατικά.

Αναλυτική πορεία:

Το δείγμα εκχυλίζεται με μίγμα χλωροφορμίου:μεθανόλης:νερού (1:2:0.8 v/v/v), φυγοκεντρείται, αν χρειάζεται, και στη συνέχεια προστίθενται υπολογισμένες ποσότητες χλωροφορμίου και νερού, ώστε η αναλογία να μετατραπεί σε 1:1:0,9 v/v/v. Η χλωροφορμική στοιβάδα μεταφέρεται σε σφαιρική φιάλη και ο διαλύτης απομακρύνεται με περιστρεφόμενη συσκευή εξάτμισης με ελαττωμένη πίεση και σε θερμοκρασία 30–35 °C. Τα λιποειδή μεταφέρονται με μικρή ποσότητα μίγματος χλωροφορμίου-μεθανόλης σε δοκιμαστικό σωλήνα, για περαιτέρω επεξεργασία.

5.3. Χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας (TLC) λιποειδών

Όργανα:

Σύστημα επίστρωσης πλακών TLC :Desaga.

Γυάλινες πλάκες διαστάσεων 20×20 cm, 20×10 cm.

Φυγόκεντρος: Hermle Z320.

Γυάλινοι θάλαμοι ανάπτυξης διαστάσεων 25×25×10 cm.

Αντιδραστήρια:

Οργανικοί διαλύτες (πετρελαϊκός αιθέρας, βενζόλιο, οξικό οξύ, ακετόνη, μεθανόλη, αιθέρας, χλωροφόρμιο).

Πρότυπα λιποειδή :Merck, Supelco, Sigma.

Προσροφητικό υλικό: πηκτή SiO₂ (Silica gel S 18 και Silica gel G 60).

Απεσταγμένο νερό.

Αναλυτική πορεία:

Το πυριτικό οξύ αναμιγνύεται με νερό σε αναλογία 1:3 (w/v) για silica gel S 18 και 1:2 (w/v) για silica gel G 60, αναδεύονται έντονα για 2min και επιστρώνεται στις πλάκες με διαστάσεις 20×20 cm και 20×10 cm με τη συσκευή Desaga, με πάχος επίστρωσης 0,25mm (αναλυτικές) και 0,5mm (παρασκευαστικές). Οι πλάκες παραμένουν για 24h σε θερμοκρασία δωματίου και στη συνέχεια ενεργοποιούνται σε πυριαντήριο 120 °C για 1h.

Το δείγμα ή οι πρότυπες ουσίες διαλυμένες σε μικρό όγκο κατάλληλου κάθε φορά διαλύτη, τοποθετούνται στις πλάκες (σε ύψος 2,5cm περίπου), οι οποίες έχουν χωριστεί σε παράλληλες κάθετες λωρίδες και μετά την εξάτμιση του διαλύτη αναπτύσσονται σε συγκεκριμένο ύψος 16cm σε προκεκορεσμένο θάλαμο με το κατάλληλο σύστημα ανάπτυξης. Όταν ολοκληρωθεί η ανάπτυξη, οι πλάκες αφήνονται να στεγνώσουν σε θερμοκρασία δωματίου.

Η πιστοποίηση των ουσιών στην πλάκα έγινε με τους ακόλουθους τρόπους:

Εμφάνιση των ουσιών στις πλάκες με ψεκασμό τους με διάλυμα H₂SO₄ (1:1 v/v) και τοποθέτησή τους σε πυριαντήριο 150°C για 30min, οπότε όλα τα λιποειδή εμφανίζονται ως μελανές κηλίδες.

Εμφάνιση των γλυκολιποειδών με ψεκασμό της πλάκας με αλκοολικό διάλυμα α-ναφθόλης, στη συνέχεια με ψεκασμό με H₂SO₄ και τοποθέτηση σε πυριαντήριο 120 °C, οπότε όλα τα γλυκολιποειδή εμφανίζονται ως ιώδεις κηλίδες.

Παροδική εμφάνιση όλων των λιποειδών με ψεκασμό της πλάκας με κρυστάλλους ιωδίου.

Οι κηλίδες ή οι οριζόντιες λωρίδες των διαχωρισμένων λιποειδών αποξύνονται, μεταφέρονται σε σωλήνες φυγοκέντρου και εκχυλίζονται κατά Bligh Dyer. Το πυριτικό οξύ απομακρύνεται, πριν τη μετατροπή του μονοφασικού συστήματος εκχύλισης σε διφασικό, με φυγοκέντρωση.

5.4. Υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC) λιποειδών

Όργανα:

Υγρός χρωματογράφος Hewlett-packard series 1100, με 100μl βρόγχο τοποθέτησης δείγματος.

Καταγραφέας-Ολοκληρωτής :Hewlett-packard, HP-3395.

Μικροσύριγγες ακρίβειας 250, 100 και 50μl.

Στήλη κατιοανταλλαγής: SS 10μm Partisil 25×4,6cm (i.d.) PXS 10/25 SCX, Whatman.

Στήλη ανάστροφης φάσης: Nucleosil-300, C18 7μ , 250×4mm i.d., Analysentechnik.

Στήλη κανονικής φάσης: S5 amino, 250×4,6mm i.d., Spherisorb.

Λουτρό υπερήχων.

Αντιδραστήρια:

Οργανικοί διαλύτες χρωματογραφικής καθαρότητας (ακετονιτρίλιο, μεθανόλη, τετραϋδροφουράνιο, ισοπροπανόλη, κυκλοεξάνιο, αιθανόλη) απαερωμένοι σε λουτρό υπερήχων.

Νερό χρωματογραφικής καθαρότητας.

Πρότυπα λιποειδή :Merck, Supelco, Sigma.

Αναλυτική πορεία:

Η στήλη, πριν χρησιμοποιηθεί, εκπλένεται με κατάλληλους διαλύτες ανάλογα με το υλικό πλήρωσής της, ακολουθεί η σταθεροποίησή της με τον πρώτο διαλύτη έκλουσης και στη συνέχεια η τοποθέτηση του δείγματος, το οποίο διαλύεται σε μικρό όγκο (5-100μl) του κατάλληλου διαλύτη. Η έκλουση του δείγματος γίνεται, είτε με σταθερή, είτε με μεταβαλλόμενη σύσταση διαλυτών. Η έκλουση των διαχωρισμένων ουσιών ελέγχεται με τη μεταβολή της οπτικής απορρόφησης στα 208nm ή στα 280nm και η παραλαβή τους γίνεται σε δοκιμαστικούς σωλήνες. Σε περίπτωση μη μεταβολής της οπτικής απορρόφησης, λαμβάνονται κλάσματα κατά τακτά χρονικά διαστήματα.

5.5. Προσδιορισμός φωσφόρου

(Galanos, D.S., Kapoulas, V.M. 1962, Renooij, W., Snyder, F. 1981).

Όργανα:

Αμμόλουτρο θερμοκρασίας 170-180 °C.

Φωτόμετρο Pharmacia Biotech/Novaspec II.

Αντιδραστήρια:

Υπερχλωρικό οξύ 70%.

Μολυβδαινικό αμμώνιο 0,4%: Ζυγίζονται 2,125g μολυβδαινικού αμμωνίου και διαλύονται σε απεσταγμένο νερό μέχρι τελικού όγκου 500ml.

Διάλυμα ANSA (αμινο-ναφθολο-σουλφονικού οξέος): διαλύονται 30g NaHSO₃ και 6g Na₂SO₃ σε 250ml νερό. Στο διάλυμα αυτό των θειωδών αλάτων διαλύεται 0,5g από 1,2,4 -αμινο-ναφθολο-σουλφονικό οξύ. Αν μετά

από τρεις ώρες σχηματίζεται ίζημα, διηθείται και το αντιδραστήριο φυλάσσεται σε ψύξη. Το διάλυμα θεωρείται κατάλληλο προς χρήση για ένα μήνα από την ημέρα παρασκευής του.

Αντιδραστήριο ANSA: Παρασκευάζεται πριν από την εκτέλεση του προσδιορισμού, με ανάμιξη 4ml διαλύματος ANSA και 6ml νερού.

Πρότυπο διάλυμα δισόξινου φωσφορικού καλίου συγκέντρωσης 4μg P/ml.

Αμμόλουτρο θερμοκρασίας 170–180 °C.

Φωτόμετρο Novaspec II (Pharmacia Biotech).

Αρχή μεθόδου:

Ο προσδιορισμός του φωσφόρου βασίζεται στη μετατροπή με καύση παρουσία υπερχλωρικού οξέος, του οργανικού φωσφόρου σε ανόργανα φωσφορικά άλατα. Στη συνέχεια με προσθήκη μολυβδαινικού αμμωνίου σχηματίζεται φωσφομολυβδαινικό αμμώνιο που, παρουσία του ANSA ως αναγωγικού μέσου και θέρμανση σε όξινο περιβάλλον, ανάγεται προς κυανούν του φωσφομολυβδαινίου.

Αναλυτική πορεία:

Το δείγμα που περιέχει 0,5-5μg φωσφόρου φέρεται σε ψηλό δοκιμαστικό σωλήνα rygex, εξατμίζεται ο διαλύτης, προστίθενται 0,5ml υπερχλωρικού οξέος και τοποθετείται σε αμμόλουτρο 70–180 °C για 1 ώρα. Στη συνέχεια, αφού ψυχθούν τα δείγματα, προστίθενται 1ml νερό, 3ml μολυβδαινικού αμμωνίου και τέλος 0,5ml αντιδραστηρίου ANSA. Μετά από ισχυρή ανάδευση οι σωλήνες τοποθετούνται σε υδρόλουτρο 100 °C για 10min. Αφήνονται να ψυχθούν για 20min και φωτομετρούνται στα 820nm. Παράλληλα γίνεται τυφλός προσδιορισμός και πρότυπη καμπύλη αναφοράς με διάφορες συγκεντρώσεις διαλύματος δισόξινου φωσφορικού καλίου.

5.6. Προσδιορισμός σακχάρων

(Barlett, G.R. 1959)

Όργανα:

Φωτόμετρο Pharmacia Biotech/Novaspec II.

Αντιδραστήρια:

Πυκνό θειικό οξύ.

Διάλυμα φαινόλης 5%.

Πρότυπο διάλυμα γλυκόζης.

Αρχή μεθόδου:

Οι εξόζες με την επίδραση πυκνού θειικού οξέος σχηματίζουν ω-οξυμεθυλοφουρουρόλη, που με φαινόλη δίνει έγχρωμη ένωση που απορροφά στα 490nm. Η προσθήκη του πυκνού θειικού οξέος έχει παράλληλα ως αποτέλεσμα και την υδρόλυση τυχόν παραγώγων των εξοζών.

Με τη μέθοδο αυτή προσδιορίζονται και οι πεντόζες.

Αναλυτική πορεία:

Το δείγμα, το οποίο περιέχει 20-150μg σακχάρου φέρεται σε ψηλό δοκιμαστικό σωλήνα και εξατμίζεται ο διαλύτης σε ρεύμα αζώτου. Στη συνέχεια προστίθεται 1ml νερού, 1ml διαλύματος φαινόλης και 2,5ml διαλύματος πυκνού θειικού οξέος. Ύστερα από παραμονή 15min σε θερμοκρασία δωματίου, τα δείγματα φωτομετρούνται στα 490nm. Παράλληλα γίνεται τυφλός προσδιορισμός και πρότυπη καμπύλη αναφοράς με δείγματα που περιέχουν 20-150μg γλυκόζης.

5.7. Προσδιορισμός εστέρων

(Barlett, G.R. 1959, Galanos, D.S. and Kapoulas, V.M.1965).

Όργανα:

Φωτόμετρο Pharmacia Biotech/Novaspec II.

Υδρόλουτρο.

Αντιδραστήρια:

Διάλυμα υπερχλωρικού σιδήρου: Διαλύονται 5g $\text{Fe}(\text{ClO}_4)_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ σε 10ml HClO_4 70% (v/v). Προστίθεται 10ml H_2O και γίνεται αραίωση του δείγματος στα 100ml ψυχρή απόλυτη αιθανόλη. Το διάλυμα που προκύπτει είναι σταθερό στους 4 °C για αρκετούς μήνες.

Αντιδραστήριο υπερχλωρικού σιδήρου: Αναμιγνύονται 4ml του stock διαλύματος $\text{Fe}(\text{ClO}_4)_3$ με 3ml HClO_4 70% (v/v) και το όλο αραιώνεται στα 100ml με απόλυτη αιθανόλη. Χρησιμοποιείται φρέσκο.

Αλκοολικό διάλυμα καυστικού νατρίου 8% (w/v): Διαλύονται 4g NaOH σε 5ml νερό και το διάλυμα αραιώνεται στα 50ml με απόλυτη αιθανόλη. Διατηρείται στους 4 °C.

Αλκοολικό διάλυμα υδροχλωρικής υδροξυλαμίνης 4%(w/v): Διαλύονται 2g $\text{HONH}_2 \cdot \text{HCl}$ σε 2,5ml νερό και το διάλυμα αραιώνεται στα 50ml με απόλυτη αιθανόλη. Διατηρείται στους 4 °C.

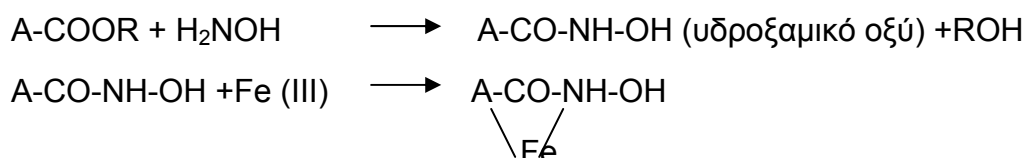
Αλκαλικό διάλυμα υδροξυλαμίνης: Ίσοι όγκοι των ανωτέρω δύο αλκοολικών διαλυμάτων (υδροχλωρικής υδροξυλαμίνης 4%(w/v) και καυστικού νατρίου 8% (w/v)) αναμιγνύονται και το στερεό που σχηματίζεται, απομακρύνεται με

φυγοκέντρωση. Παραλαμβάνεται το υπερκείμενο διάλυμα που χρησιμοποιείται αμέσως (διατηρείται για 4 ώρες).

Πρότυπο διάλυμα εστέρων 1μmol/ml: 29,8mg στεατικού μεθυλεστέρα διαλύονται μέχρις όγκου 100ml σε χλωροφόρμιο.

Αρχή μεθόδου:

Το δείγμα των λιποειδών απακυλιώνεται με αιθανολικό διάλυμα αλκαλικής υδροξυλαμίνης και το υδροξαμικό οξύ που σχηματίζεται, αντιδρά με αιθανολικό διάλυμα υπερχλωρικού σιδήρου υπερχλωρικού οξέος. Το χρώμα που προκύπτει φωτομετρείται στα 530nm. Συγχρόνως εκτελείται τυφλός προσδιορισμός καθώς και προσδιορισμός σε πρότυπα διαλύματα εστέρων.



Αναλυτική πορεία:

Το δείγμα των λιποειδών, περιεκτικότητας σε εστέρες 0,15-1μmol, φέρεται σε σωλήνα pyrex και απομακρύνεται ο διαλύτης σε ρεύμα N₂.

Στο ξηρό δείγμα προστίθεται 1ml αλκαλικού διαλύματος υδροξυλαμίνης και θερμαίνεται σε υδρόλουτρο 65 °C επί 5 λεπτά.

Αφήνεται να ψυχθεί για 5 λεπτά και προστίθεται 3ml αντιδραστηρίου υπερχλωρικού σιδήρου. Μετά την ανάμιξη αφήνεται 30 λεπτά για να αναπτυχθεί το χρώμα, το οποίο και φωτομετρείται στα 530nm.

Παράλληλα γίνεται τυφλός προσδιορισμός καθώς και προσδιορισμός σε πρότυπα διαλύματα εστέρων περιεκτικότητας 0,25, 0,50, 1,0μmol εστέρων, οπότε και κατασκευάζεται πρότυπη καμπύλη αναφοράς, ως προς την οποία συγκρίνεται το προς ανάλυση δείγμα.

5.8. Ήπια αλκαλική υδρόλυση λιποειδών

(Renkonen, O. 1961)

Όργανα:

Υδρόλουτρο 60°C.

Αντιδραστήρια:

Οργανικοί διαλύτες (χλωροφόρμιο, μεθανόλη, οξικό οξύ 1N) αναλυτικής καθαρότητας.

Μεθανολικό διάλυμα καυστικού νατρίου 1,2 N σε μεθανόλη:νερό 1:1 (v/v).

Αρχή μεθόδου:

Η μέθοδος αυτή διασπά μόνο τους εστερικούς δεσμούς των λιποειδών.

Αναλυτική πορεία:

Ποσότητα δείγματος λιποειδών που περιέχει 1-10μmol εστεροποιημένα λιπαρά οξέα φέρεται σε βιδωτό σωλήνα και εξατμίζεται ο διαλύτης σε ρεύμα αζώτου. Στη συνέχεια αναδιαλύεται σε 1ml μίγματος χλωροφορμίου:μεθανόλης 1:4 (v/v) και προστίθενται 0,1ml μεθανολικού διαλύματος καυστικού νατρίου. Το δείγμα παραμένει σε υδρόλουτρο 60 °C για περίπου 20min και μετά από ψύξη εξουδετερώνεται το μίγμα αντίδρασης με 0,2ml οξικό (Wells, M.A. et al. 1966). Στη συνέχεια προστίθενται 2ml μίγματος χλωροφορμίου:μεθανόλης 9:1 (v/v), 1ml μεθανόλης και 2ml νερού, ώστε να προκύψει το διφασικό σύστημα της εκχύλισης κατά Bligh-Dyer. Εκπλένεται η χλωροφορμική φάση δις με 0,5ml μίγματος μεθανόλης:νερού 1:2 (v/v) και τα εκπλύματα προστίθενται στην υδατική φάση.

5.9. Ακετυλίωση λιποειδών

Όργανα:

Υδρόλουτρο.

Αντίδραστήρια:

Οργανικοί διαλύτες (χλωροφόρμιο, μεθανόλη, οξικός ανυδρίτης) αναλυτικής καθαρότητας.

Αρχή μεθόδου:

Η μέθοδος αυτή ακετυλιώνει τα ελεύθερα υδροξύλια των λιποειδών με κατεργασία του δείγματος με οξικό ανυδρίτη σε άνυδρο περιβάλλον.

Αναλυτική πορεία:

Από το δείγμα εξατμίζεται ο διαλύτης σε ρεύμα αζώτου και στο βιδωτό σωλήνα όπου βρίσκεται προστίθεται 0,1ml χλωροφορμίου και 1ml οξικού ανυδρίτη. Όταν το δείγμα είναι υδατοδιαλυτό προστίθεται απευθείας ο οξικός ανυδρίτης. Μετά από παραμονή του σωλήνα σε υδρόλουτρο 60 °C για 45min, ο οξικός ανυδρίτης εξατμίζεται σε ρεύμα αζώτου και το προϊόν της αντίδρασης εκχυλίζεται κατά Bligh-Dyer. Η χλωροφορμική φάση εκπλένεται δις με 0,5ml μίγματος μεθανόλης:νερού 1:2 (v/v) και τα εκπλύματα προστίθενται στην υδατική φάση.

5.10. Ενζυμική υδρόλυση λιποειδών (με ακετυλοϋδρολάση ανθρώπινου ορού)

Όργανα:

Υδρόλουτρο.

Συσσωρευματομέτρο.

Αντιδραστήρια:

Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 0,08 M pH 7,5.

Ακετυλοϋδρολάση ανθρώπινου ορού, απομονωμένη και καθαρισμένη από την Dr. D.Stafforini (J. Biol. Chem. 262:4223, 1987). Περιληπτικά, σε πλάσμα από ανθρώπινο αίμα με αντιπηκτικό κιτρικά, γίνεται καταβύθιση των λιποπρωτεϊνών LDL και VLDL με φωσφοβολφραμικό νάτριο και $MgCl_2$. Αναδιασπείρονται οι λιποπρωτεΐνες σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών που περιέχει βουτυλοϋδροξυ-τολουόλιο και Tween 20 (διάλυμα A). Το ένζυμο καθαρίζεται περαιτέρω με δύο διαδοχικές στήλες DEAE-Sephrose CL-6B με σύστημα έκλουσης το διάλυμα A που περιέχει χλωριούχο κάλιο.

Αλβουμίνη (ορού) βοδιού (BSA) 2,5mg/ml φυσιολογικού ορού.

Αρχή της μεθόδου:

Με την ακετυλοϋδρολάση υδρολύεται κυρίως η ακετυλομάδα, αλλά και άλλα μικρού βάρους λιπαρά οξέα, από τη δεύτερη θέση του γλυκερινικού σκελετού των φωσφολιποειδών.

Αναλυτική πορεία:

Το προς εξέταση δείγμα, διαλυμένο σε BSA, φέρεται σε δοκιμαστικό σωλήνα προθερμασμένο στους 37 °C και ο οποίος έχει ρυθμιστικό διάλυμα και το ένζυμο. Μετά από επώαση για διάφορα χρονικά διαστήματα στους 34 °C, παραλαμβάνονται ίσες ποσότητες από αυτό και ελέγχεται η βιολογική του δραστηριότητα ως προς την πρόκληση συσσώρευσης πλυμένων αιμοπεταλίων κουνελιού.

5.11. Φασματοφωτομετρία υπεριώδους (UV)

Όργανα:

Φασματοφωτόμετρο υπεριώδους Unicam Helios Beta, Spectronic Unicam (Cambridge, U.K.) χρησιμοποιήθηκε για την λήψη του UV-φάσματος με κυψελίδες 1,0ml και οπτική διαδρομή 1,0cm.

Καταγραφέας Perkin - Elmer Model 550.

Αντιδραστήρια:

Οργανικοί διαλύτες χρωματογραφικής καθαρότητας.

Αναλυτική πορεία:

Πριν από τη λήψη του φάσματος της ουσίας, γίνεται η ρύθμιση του οργάνου αρχικά με κενές κυψελίδες και στη συνέχεια με τους διαλύτες που θα χρησιμοποιηθούν. Το δείγμα, αφού διαλυθεί ο διαλύτης σε ρεύμα N_2 , αναδιαλύεται στον κατάλληλο διαλύτη. Από το διάλυμα που προκύπτει περιεκτικότητας 0,01 % τοποθετείται 0,5ml στην κυψελίδα δείγματος. Επίσης τοποθετείται 0,5ml διαλύτη στην κυψελίδα αναφοράς και λαμβάνεται το φάσμα της ένωσης στον καταγραφέα με σάρωση από τα 0 - 1000nm. Οι συνθήκες είναι οι εξής: 1 AUFS (50 mV) και 2 AUFS (100 mV), ταχύτητα χαρτιού καταγραφέα 120cm/min, ταχύτητα σάρωσης 12nm/min (καταγραφή 10nm/cm).

5.12. Φασματομετρία μάζας (M.S.)**Όργανα:**

Electro-spray Mass spectrometer, API 100 Perkin Elmer SCIEX single quadrupole φασματογράφος μάζας.

Αντιδραστήρια:

Οργανικοί διαλύτες χρωματογραφικής καθαρότητας.

Ελήφθησαν θετικά και αρνητικά φάσματα των ενώσεων, καθώς και σε μερικές περιπτώσεις θραύσματα συγκεκριμένων θραυσμάτων, από κέντρο φασματομετρίας μάζας στις ΗΠΑ και του University of Leeds.

Αναλυτική πορεία:

Εξατμίζεται ο διαλύτης σε ρεύμα αζώτου και το δείγμα αναδιαλύεται σε 70μL μεθανόλης και στη συνέχεια προστίθονται 30μL υδατικού διαλύματος CH_3COONH_4 10mM. Τα δείγματα εισήχθησαν στον αναλυτή μάζας με ταχύτητα 4.0μL/λεπτό. Η συνολική τάση του ηλεκτρικού πεδίου διατηρείται στα 4000V. Τα θετικά και αρνητικά ιόντα δημιουργήθηκαν με βομβαρδισμό με αέριο αργό, ενέργειας 10 έως 50eV. Στη συνέχεια τα παραγόμενα θραύσματα ιόντων αναλύθηκαν για παραγωγή φασμάτων ms/ms από δεύτερο αναλυτή TOF (time-of-flight).

5.13. Βιολογική δοκιμασία in vitro

(Renkonen, O. 1961)

Όργανα:

Συσσωρευματομέτρο (Aggregometer) (CHRONO-LOG). (Havertown, P.A. USA model 400-VS).

pHμετρο (CHEMTRIX Type 60A).

Φωτόμετρο Pharmacia Biotech/Novaspec II.

Υδρόλουτρο 37 °C.

Φυγόκεντρος Sorval.

Αντιδραστήρια:

Διάλυμα 10×Tyrodes stock: Σε 1lt περιέχονται 80g NaCl, 1,95g KCl, 2,13g $MgCl_2 \cdot 6H_2O$, 10g γλυκόζη.

Διάλυμα 100× $CaCl_2$ stock: Ποσότητα 1,911g $CaCl_2$ σε 100ml H_2O .

Διάλυμα 0,2M EGTA stock: Ποσότητα 0,76g EGTA /10ml H_2O . Ρυθμίζεται το pH του διαλύματος στα 7,5 με 5 M NaOH.

Διάλυμα ζελατίνης 10% σε νερό.

Ρυθμιστικά διαλύματα για ρύθμιση του pHμέτρου.

Διαλύματα Tyrodes-Gelatin pH 6,5 (Tg pH 6,5), Tyrodes-Gelatin-EGTA pH 6,5 (Tg-EGTA pH 6,5): Σε 80ml νερό προστίθενται 10ml Tyrodes 10×stock. Χρησιμοποιώντας μαγνητικό αναδευτήρα κατά τη διάρκεια της προσθήκης, προστίθενται 2,5ml ζελατίνης 10% (λειτουργεί στο σημείο βρασμού). Κατόπιν προστίθενται 5ml διαλύματος $NaHCO_3$ (0,203 g $NaHCO_3$ σε 10ml H_2O) που πρέπει να χρησιμοποιείται αμέσως μετά την προσθήκη του H_2O στο $NaHCO_3$. Συμπληρώνεται ο όγκος στα 100ml με νερό και χωρίζεται σε δύο τμήματα των 50ml. Στο ένα από τα δύο προστίθενται 25μl 0.2M EGTA. Ρυθμίζεται το pH και των δύο κλασμάτων στο 6,46 με 1N HCl. Αμέσως γεμίζονται σωλήνες των 16ml μέχρι επάνω (χωρίς φυσαλίδες αέρα) και σκεπάζονται με parafilm. Φυλάσσονται σε θερμοκρασία δωματίου.

Διάλυμα Tyrodes και ασβεστίου pH 7,2 (Tg-Ca pH 7,2): Σε 5ml Tyrodes 10×stock προστίθενται 40ml νερό. Χρησιμοποιώντας μαγνητικό αναδευτήρα προστίθενται 1,25ml 10% ζελατίνη. Στη συνέχεια προστίθενται 0,5ml 100× $CaCl_2$ stock. Κατόπιν προστίθενται 2,5ml διαλύματος $NaHCO_3$ (παρασκευάζεται όπως παραπάνω). Συμπληρώνεται ο όγκος μέχρι τα 50ml με νερό και ρυθμίζεται το pH στο 7,16 με 1N HCl. Διατηρείται στους 37 °C σε ερμητικά κλειστούς σωλήνες.

Αντιδραστήριο ACD: Σε 1000ml H_2O περιέχονται 13,65g κιτρικού οξέος, 25g κιτρικού νατρίου και 20g δεξτρόζης.

Αλβουμίνη βοδινού ορού (BSA) stock: Ποσότητα 100mg BSA ελεύθερης λιπαρών οξέων (Sigma) /ml φυσιολογικού ορού. Φυλάσσεται στους 20 °C.

Διάλυμα BSA 2,5mg/ml φυσιολογικού ορού: Από 10ml φυσιολογικού ορού αφαιρούνται 250μl και προστίθενται 250μl BSA stock.

Διάλυμα θρομβίνης σε φυσιολογικό ορό .

Ficoll-Paque (Pharmacia).

Υλικό σιλικοναρίσματος (Serva).

Φωσφοκρεατίνη (Sigma) 0,7mM : Διαλυτοποιείται σε φυσιολογικό ορό.

Κινάση της φωσφοκρεατίνης (Sigma) 13 units/ml: Διαλυτοποιούνται σε φυσιολογικό ορό.

Ινδομεθακίνη (Merck) 10μM: Διαλυτοποιείται σε απόλυτη αιθανόλη και στη συνέχεια μικρή ποσότητα αυτού αραιώνεται με κατάλληλη ποσότητα νερού έτσι ώστε σε κάθε δοκιμασία να μη προστίθενται περισσότερα από 4μL αιθανόλης.

BN52021 : Διαλυτοποιείται σε 0.3 % DMSO, συγκέντρωση 0.1mM.

Αναλυτική πορεία:

5.13.1. Απομόνωση πλυμένων αιμοπεταλίων από αίμα κουνελιού

Σε πλαστικούς σωλήνες των 50ml προστίθενται 7ml ACD. Το αίμα συλλέγεται από την κεντρική αρτηρία του αυτιού του κουνελιού και ο σωλήνας γεμίζεται με αίμα μέχρι τα 50ml. Αναμιγνύεται ήπια με αναστροφή. Ακολουθεί φυγοκέντρηση για 15min στους 24 °C στα 500g (~1850rpm). Κατά τη διάρκεια της φυγοκέντρησης μεταφέρουμε 2ml Ficoll-Paque σε πλαστικούς σωλήνες των 14ml. Αναρροφώνται τα 2/3 του υπερκείμενου πλάσματος (πλάσμα πλούσιο σε αιμοπετάλια, PRP) με πλαστικό σιφώνιο των 20ml και μεταφέρονται σε άλλο πλαστικό σωλήνα των 50ml. Τοποθετείται το πλάσμα πάνω στο στρώμα του Ficoll, με μέγιστο ποσό πλάσματος τα 9ml για κάθε 2ml Ficoll, χρησιμοποιώντας πλαστικά σιφώνια και μεταφέροντας ίσους όγκους πλάσματος σε 2 ή 3 σωλήνες ανάλογα με το συνολικό όγκο του πλάσματος. Σκεπάζουμε με parafilm. Οι σωλήνες φυγοκεντρούνται για 20min στους 24 °C στα 750g (2200 rpm), οπότε τα αιμοπετάλια εμφανίζονται σαν ταινία μεταξύ της στοιβάδας του πλάσματος και του στρώματος του Ficoll. Το υπερκείμενο πλάσμα (φτωχό σε αιμοπετάλια) αναρροφάται και απορρίπτεται με πλαστική σύριγγα των 20ml. Το στρώμα των αιμοπεταλίων διαπερνάται με σιλικοναρισμένη πιπέτα Pausteur, αναρροφάτε το Ficoll και απορρίπτεται.

α) Αν υπάρχουν 2 σωλήνες :

προστίθενται 7ml (Tg EGTA pH 6.5) σε κάθε σωλήνα. Το διάλυμα αφήνεται να τρέξει ήπια στα τοιχώματα του σωλήνα και χωρίς ανάμιξη αποχύνεται το αιώρημα σε άλλο πλαστικό σωλήνα των 14ml, αφήνοντας έτσι τα ερυθρά αιμοσφαίρια στον αρχικό σωλήνα.

β) Αν υπάρχουν 3 σωλήνες :

Προστίθενται 3ml (Tg EGTA pH 6,5) σε κάθε σωλήνα. Το διάλυμα αφήνεται να τρέξει ήπια στα τοιχώματα του σωλήνα και χωρίς ανάμιξη αποχύνεται το αιώρημα σε άλλο πλαστικό σωλήνα των 14ml, του οποίου το περιεχόμενο χωρίζεται σε 2 ίσα μέρη, τα οποία μεταφέρονται σε δύο ξεχωριστούς σωλήνες και προστίθενται περίπου 3ml (Tg EGTA pH 6,5).

Το περιεχόμενο του κάθε σωλήνα μεταφέρεται σε 2ml Ficoll (8ml αιμοπεταλίων σε κάθε σωλήνα) και καλύπτεται με parafilm. Ακολουθεί φυγοκέντρηση για 15min στους 24 °C στις 2500rpm.

Το υπερκείμενο ρυθμιστικό διάλυμα απορροφάται και απορρίπτεται. Διαπερνάται το στρώμα των αιμοπεταλίων με πιπέτα pasteur, αναρροφάται το Ficoll και απορρίπτεται.

Προστίθενται ίσοι όγκοι (~8ml) Tg pH 6,5 σε κάθε σωλήνα αφήνοντας το διάλυμα να τρέξει στα τοιχώματα του σωλήνα και χωρίς ανάμιξη μεταφέρεται το αιώρημα σε καθαρό πλαστικό σωλήνα των 14ml, ενώ καλύπτεται με parafilm. Ακολουθεί φυγοκέντρηση για 15min στους 24 °C στις 2350rpm.

Το υπερκείμενο ρυθμιστικό διάλυμα απορροφάται και απορρίπτεται με πιπέτα Pasteur αφαιρώντας και την τελευταία σταγόνα από τα τοιχώματα του δοχείου.

Προστίθενται με αυτόματη πιπέτα 0,8ml Tg pH 6,5 σε κάθε συσσωμάτωμα αιμοπεταλίων αναδιασπείρωντας τα κύτταρα με προσοχή. Το περιεχόμενο των σωλήνων ενώνεται σε ένα πλαστικό σωλήνα.

Ετοιμάζεται αιώρημα αιμοπεταλίων σε Tg pH 6,5 που να περιέχει $1,25 \times 10^8$ κύτταρα/ml: Από το πυκνό διάλυμα αιμοπεταλίων παίρνω 10μL και 990 μL Tg pH 6,5 και φωτομετρώ στα 530nm. Ο αριθμός των κυττάρων στα 10λ δίνεται: αριθμός κυττάρων/10λ = $A \times 1.25 \times 10^8$ όπου A η απορρόφηση. Με βάση πρότυπη καμπύλη της οπτικής απορρόφησης συναρτήσει του αριθμού αιμοπεταλίων υπολογίζεται ο αριθμός αιμοπεταλίων και ετοιμάζεται το επιθυμητό εναιώρημα αιμοπεταλίων (Demopoulos, C.A. et al. 1979).

5.13.2. Συσσώρευση πλυμένων αιμοπεταλίων κουνελιού

Σε ειδικές πλαστικές κυψελίδες προστίθενται 100μl από το εναιώρημα αιμοπεταλίων και 400μl Tg Ca pH 7,2 καθώς και μικρός μαγνητικός αναδευτήρας. Επωάζονται για 15min σε υδρόλουτρο 37°C. Ρυθμίζεται το 100

της κλίμακας του aggregometer με Tg Ca pH 7,2 και το 0 με το εναιώρημα αιμοπεταλίων σε Tg Ca pH 7,2. Στη συνέχεια τοποθετείται η κυψελίδα με το εναιώρημα αιμοπεταλίων στην ειδική θερμοστατούμενη κυψελίδα του aggregometer, προστίθενται διάφορες συγκεντρώσεις PAF διαλυτοποιημένη σε BSA 2,5mg/ml και καταγράφεται η καμπύλη της συσσώρευσης. Ως 100% συσσώρευση ορίζεται εκείνη η συγκέντρωση PAF που προκαλεί τη μέγιστη αντιστρεπτή συσσώρευση αιμοπεταλίων, ενώ η τιμή EC₅₀ αντιστοιχεί σε εκείνη τη συγκέντρωση PAF που προκαλεί 50% συσσώρευση στα αιμοπετάλια. Η ίδια διαδικασία ακολουθείται και για τη θρομβίνη.

5.13.3. Πειράματα απευαισθητοποίησης σε πλυμένα αιμοπετάλια κουνελιού

Με κάποια συγκέντρωση PAF ή θρομβίνης προκαλείται αντιστρεπτή συσσώρευση αιμοπεταλίων και όταν τα αιμοπετάλια επανέλθουν στην αρχική τους κατάσταση προστίθεται στην κυψελίδα η ίδια συγκέντρωση PAF ή θρομβίνης αντίστοιχα. Παρατηρείται ότι η δεύτερη προσθήκη του συσσωρευτικού παράγοντα προκαλεί μικρότερη συσσώρευση από την αρχική, λόγω απευαισθητοποίησης των αιμοπεταλίων. Στα πειράματα διασταυρούμενης απευαισθητοποίησης το ίδιο πείραμα επαναλαμβάνεται με προσθήκη δύο διαφορετικών συσσωρευτικών παραγόντων.

5.13.4. Πειράματα ελέγχου του δρόμου, μέσω του οποίου προκαλείται η συσσώρευση, με χρήση ειδικών αναστολέων σε πλυμένα αιμοπετάλια κουνελιού

Στη σειρά αυτών των πειραμάτων πριν από την προσθήκη του συσσωρευτικού παράγοντα προστίθεται ξεχωριστά κάθε ένας από τους παρακάτω αναστολείς: α)Ινδομεθακίνη (10μL ινδομεθακίνης διαλυμένη σε αιθανόλη προστίθενται σε 90μL νερού), η οποία αναστέλλει τη συσσώρευση αιμοπεταλίων που προκαλείται από το δρόμο του αραχιδονικού οξέος, β)ενζυμικό σύστημα φωσφοκρεατίνης (CP) (0,795mg διαλύονται σε 100μL φυσιολογικού ορού) και κινάσης της φωσφοκρεατίνης (CPK) (2,0mg διαλύονται σε 420μL φυσιολογικού ορού), το οποίο αναστέλλει τη συσσώρευση αιμοπεταλίων που προκαλείται από το ADP και γ)BN52021, το οποίο αναστέλλει τη συσσώρευση των αιμοπεταλίων που προκαλείται από το δρόμο του PAF.

5.13.5. Πειράματα αναστολής της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων σε πλυμένα αιμοπετάλια κουνελιού

Στη σειρά αυτών των πειραμάτων πριν από την προσθήκη του συσσωρευτικού παράγοντα προστίθενται διάφορες ποσότητες του εξεταζόμενου (για αναστολή) δείγματος, ακολουθεί επώαση για 1min και στη

συνέχεια προστίθεται PAF ή θρομβίνη ή αραχιδονικό οξύ ή ADP που προκαλούν γνωστού ύψους συσώρευση αιμοπεταλίων. Υπολογίζεται το ποσοστό αναστολής στον PAF ή στη θρομβίνη για κάθε συγκέντρωση δείγματος, σχεδιάζεται η καμπύλη της επί της εκατό αναστολής, συναρτήσει της συγκέντρωσης και ως τιμή IC₅₀ ορίζεται εκείνη η συγκέντρωση του δείγματος που προκαλεί 50% αναστολή της συσώρευσης.

5.14. Προσδιορισμός των μικροβιακών στελεχών – Χρώση κατά Gram

Όργανα:

Αντικειμενοφόροι πλάκες.

Ευθύς μικροβιολογικός κρίκος.

Λυχνία Bulsen.

Αντιδραστήρια:

Οξαλικό αμμώνιο – κρυσταλλικό ιώδιο.

Διάλυμα Lugol.

Σαφρανίνη.

Αιθανόλη 95%.

Αρχή μεθόδου:

Η μέθοδος αυτή έχει σκοπό τον προσδιορισμό των μικροβιακών στελεχών και την κατάταξή τους σε Gram⁺ και Gram⁻ βακτήρια (Ανδριώτης, Μ. 1989).

Αναλυτική πορεία:

Ετοιμάζονται τα αντιδραστήρια σύμφωνα με την τροποποιημένη από τον Hucker μέθοδο (APHA 13th Edition 1971) για τη χρώση επίστρωσης από καθαρή καλλιέργεια. Ετοιμάζονται μονιμοποιημένα δείγματα βακτηρίων σε αντικειμενοφόρους, τα οποία χρωματίζονται με διάλυμα οξαλικού αμμωνίου – κρυσταλλικού ιωδίου για 1min. Πλένεται η αντικειμενοφόρος πλάκα με νερό, προστίθεται διάλυμα Lugol και αφήνεται για 1min. Πλένεται η αντικειμενοφόρος πλάκα με νερό και αποχρωματίζεται με αιθανόλη για 30sec. Μεταχρωματίζεται με διάλυμα σαφρανίνης, το οποίο αφήνεται να δράσει για 10sec, πλένεται με νερό και ξηραίνεται ανάμεσα σε φύλλα διηθητικού χαρτιού.

Τα κύτταρα που αποχρωματίζονται και δέχονται τη σαφρανίνη είναι κόκκινα και ορίζονται ως Gram αρνητικά (Gram⁻). Τα κύτταρα εκείνα που δεν αποχρωματίζονται αλλά συγκρατούν τη χρωστική του κρυσταλλικού ιωδίου, έχουν χρώμα βαθύ κυανούν και ορίζονται ως Gram θετικά (Gram⁺).

5.15. Μέθοδος δισκίων Bauer-Kirby

(Αρσένη, Α. 1967, Αρσένη, Α. 1977, Standart Methods, APHA 1995).

Όργανα:

Τρυβλία Petri.

Ευθύς μικροβιολογικός κρίκος.

Δισκία αντιβιοτικών.

Αποστειρωμένα δισκία.

Δοκιμαστικοί σωλήνες.

Αποστειρωμένη λαβίδα.

Βαμβakoφόρος στειλεός.

Επωαστικός κλίβανος.

Αντιδραστήρια:

Καλλιεργητικό υλικό.

Nutrient agar, Nutrient broth.

Καλλιέργειες κυανοβακτηρίων.

Στελέχη βακτηρίων.

Ολικά, πολικά και ουδέτερα λιποειδή κυανοβακτηρίων διαχωρισμένα με τη μέθοδο TLC.

PAF και BN 52021.

Σκοπός μεθόδου:

Η μέθοδος έχει σκοπό την διερεύνηση της ευαισθησίας των μελετουμένων κυανοβακτηρίων στα λιποειδή τους, σε σχέση με τον PAF και το BN52021, σε συνήθη αντιβιοτικά, καθώς επίσης και τον έλεγχο ευαισθησίας κοινών μεσοφύλων βακτηρίων, όπως *Staphylococcus aureus* (Gram+) και *Escherichia coli* (Gram-), σε λιποειδή των μελετουμένων κυανοβακτηρίων.

Αναλυτική πορεία:

Ετοιμάζεται καλλιεργητικό υλικό, στο οποίο γίνεται προσθήκη Nutrient agar και αποστειρώνεται. Το υλικό κατανέμεται σε τρυβλία Petri.

Τα δισκία αντιβιοτικών φυλάσσονται συσκευασμένα σε ψυγείο. Πριν τη δοκιμασία βγαίνουν από το ψυγείο και παραμένουν για 30min σε θερμοκρασία δωματίου. Παρασκευάζονται επίσης δισκία διαμέτρου 0,5cm από μεμβράνες GF/C, οι οποίες αποστειρώνονται και φυλάσσονται στο ψυγείο. Πριν τη δοκιμασία παραμένουν για 30min σε θερμοκρασία δωματίου και στη συνέχεια εμποτίζονται με καλλιέργειες κυανοβακτηρίων ή των λιποειδών τους ή PAF ή BN52021. Αφού στεγνώσουν τοποθετούνται με

αποστειρωμένη λαβίδα στην επιφάνεια του στερεού θρεπτικού υλικού, με την καλλιέργεια του μικροοργανισμού.

Σε στερεό υλικό καλλιέργειας (Nutrient agar), γίνεται εμβολιασμός των βακτηρίων *Staphylococcus aureus* και *Escherichia coli*. Επωάζονται στους 37°C για 24h. 3 έως 10 αποικίες του μικροβίου εναιωρούνται σε 4ml ζωμού (Nutrient broth) και το εναιώρημα επωάζεται για 2 έως 5 ώρες και στην συνέχεια αραιώνεται μέχρι θολερότητας παρόμοιας με πρότυπο σωληνάριο θολερότητας. Το πρότυπο σωληνάριο θολερότητας παρασκευάζεται προσθέτοντας 0,5ml διαλύματος BaCl₂ 1% σε 99,5ml διάλυμα H₂SO₄ 1% (0.36 N).

Με βαμβakoφόρο στείλεό απλώνεται το καλλιέργημα στην επιφάνεια του στερεού θρεπτικού υλικού, το οποίο έχει ήδη στεγνώσει και θερμανθεί στον κλίβανο για 20 έως 30min.

Με λαβίδα τοποθετούνται τα δισκία με τα αντιβιοτικά ή οι καλλιέργειες των κυανοβακτηρίων ή των λιποειδών τους ή PAF ή BN52021, στην επιφάνεια της στερεάς καλλιέργειας και σε απόσταση τουλάχιστον 3cm μεταξύ τους.

Στη συνέχεια το τρυβλίο τοποθετείται στον επωαστικό κλίβανο στην προγραμματισμένη θερμοκρασία.

Μετά την επώαση μετρώνται οι ζώνες αναστολής του εξεταζόμενου μικροοργανισμού γύρω από κάθε δισκίο με διαβήτη και υποδεκάμετρο σε χιλιοστά.

6. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ – ΣΥΖΗΤΗΣΗ

6.1. *Scytonema julianum*

Η συλλογή του πειραματικού υλικού έγινε από το εσωτερικό του σπηλαίου «Κουτούκι» Παιανίας κατά μήκος της τουριστικής διαδρομής. Τα στελέχη αποκολλήθηκαν από το λιθωματικό διάκοσμο του σπηλαίου, πάνω στον οποίο είχαν αναπτυχθεί, με αποστειρωμένα εργαλεία, αποκόπτοντας μικρά κομμάτια ή ξέσματα υποστρώματος, τα οποία τοποθετήθηκαν σε αποστειρωμένα φιαλίδια. Δείγματα με γαλαζοπράσινες έως ελαιοπράσινες αναπτύξεις κυανοβακτηρίων λήφθηκαν από ποικίλες, φωτισμένες με τεχνητό φωτισμό θέσεις του σπηλαίου. Έμφαση δόθηκε στα κυανοβακτήρια που αναπτύσσονταν στο σταλακτιτικό διάκοσμο, καθώς και σε ασβεστολιθικές επιφάνειες, όπου υπήρχε συγκέντρωση χρώματος. Η δειγματοληψία των κυανοβακτηρίων έγινε με αποστειρωμένα εργαλεία και με ιδιαίτερη προσοχή, ώστε να μη διαταραχθεί η επιφάνεια του σταλακτίτη. Στις περιπτώσεις όπου οι επιλιθικές κοινωνίες δεν ήταν δυνατό να αποκολληθούν εύκολα από το υπόστρωμα λήφθηκαν και δείγματα υποστρώματος. Μετά τη δειγματοληψία τα δείγματα τοποθετήθηκαν σε αποστειρωμένα φιαλίδια και μεταφέρθηκαν στο εργαστήριο για περαιτέρω επεξεργασία .

Περιγραφή και συστηματική κατάταξη

Κλάση Cyanophyceae Sachs

Τάξη Nostocales (BORZI) Geitler

Οικογένεια Scytonemataceae Kuetz

Γένος *Scytonema*

Είδος *Scytonema julianum* (Kuetz) Menegh

Ο νηματοειδής φωτοσυνθετικός μικροοργανισμός που βρέθηκε να επικρατεί σε ορισμένες θέσεις του σπηλαίου, οι οποίες ερευνήθηκαν, ανήκει στα κυανοβακτήρια, λόγω της προκαρυωτικής του δομής.

Το αερόφυτο κυανοβακτήριο που δεσμεύει το άζωτο, μελετήθηκε και αναγνωρίστηκε ως *Scytonema julianum* λόγω της μορφολογίας και οικολογίας του, σύμφωνα με το ταξινομικό σύστημα Komarek J & K Anagnostidis (1989) από τη Λέκτορα του τομέα Οικολογίας και Ταξινομικής του τμήματος Βιολογίας του Πανεπιστημίου Αθηνών κ. Α. Πανταζίδου. Ταξινομήθηκε στην τάξη των *Nostocales* λόγω των μονόσειρων ετεροκυστικών νημάτων που χαρακτηρίζονται αποκλειστικά από ψευδείς διακλαδώσεις, ως το κύριο

κριτήριο ταξινόμησης. Χαρακτηρίζεται από νήματα πλάτους 8-11μm, τριχώματα πλάτους 7-9μm, βλαστικά κύτταρα μήκους 3-5μm και ετεροκύστες με μήκος μέχρι και 14μm. Ψευδοδιακλαδώσεις αλλά και διακλαδώσεις εμφανίζονται όμοιες με τον κύριο άξονα. Κάθε τρίχωμα περιβάλλεται από άχρωμη, λεπτή, ζελατινώδη θήκη που φέρει ενασβεστώσεις.

Το *S.julianum* είναι γνωστό από έναν αριθμό σπηλαίων στην Ελλάδα και έχει μελετηθεί η μορφολογία, η ανατομία και η οικολογία του.

Καλλιέργεια

Η επιλογή του *S. julianum* για παραπέρα βιοχημική μελέτη έγινε, διότι είναι ένας συχνά απαντώμενος και σε σχετική αφθονία οργανισμός στα σπήλαια και σε παρόμοια περιβάλλοντα, χαρακτηριστικά του οποίου έχουν μελετηθεί, τόσο με φωτονικό όσο και με ηλεκτρονικό μικροσκόπιο, ενώ δεν υπάρχουν πολλές πληροφορίες για την βιοχημεία του συγκεκριμένου είδους, αλλά και του γένους γενικότερα.

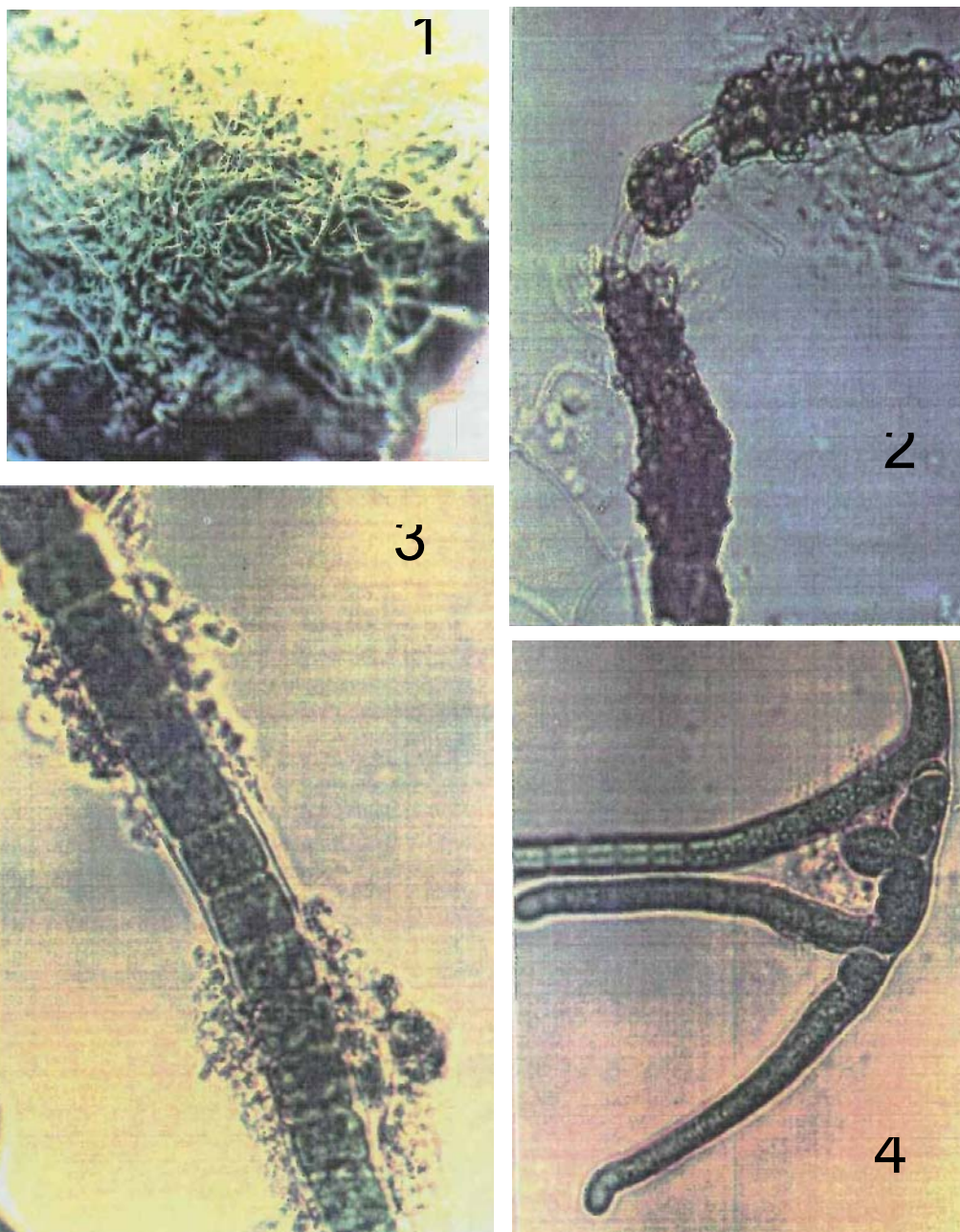
Για τη μελέτη όμως της βιοχημείας ενός μικροοργανισμού απαραίτητη είναι η ανάπτυξη σε θρεπτικό διάλυμα, ώστε να επιτευχθεί μονοκαλλιέργεια και μάλιστα αξενική, δηλαδή απαλλαγμένη από μολύνσεις (από βακτήρια, μύκητες, πρωτόζωα).

Για το σκοπό αυτό με αποστειρωμένη λαβίδα νήματα *S. julianum* τοποθετήθηκαν σε αποστειρωμένες κωνικές φιάλες των 100ml, οι οποίες περιείχαν 75ml αποστειρωμένο θρεπτικό διάλυμα και ήταν πωματισμένες με υδρόφοβο βαμβάκι και ιατρική γάζα.

Δοκιμάστηκαν δύο διαλύματα κατάλληλα για την ανάπτυξη κυανοβακτηρίων, το BG-11 (Πίνακας 3) (Allen, M.M. and R.Y. Stanier, 1968, Rippka, R. et al. 1979) και το STAUB(1961) (Πίνακας 4) (Staub, R. 1961)

Το *S. julianum* αναπτύχθηκε καλά στα επιλεγέντα ανόργανα θρεπτικά διαλύματα, δίνοντας σε σύντομο χρονικό διάστημα πλούσιες σε υλικό καλλιέργειες. Παρατηρήθηκε ότι απώλεσε τις ενασβεστώσεις από CaCO_3 γύρω από τα νήματά του, ενώ διατήρησε όλα τα άλλα χαρακτηριστικά του. Τα στελέχη που καλλιεργήθηκαν με τη συμμετοχή στο θρεπτικό διάλυμα πηγής αζώτου (μέσω BG-II) (Πίνακας 3), απώλεσαν την ετεροκυστική τους ανάπτυξη, ενώ έλλειψη της πηγής του συνδυασμένου αζώτου με BG-II, οδήγησε στο σχηματισμό ετεροκυστών.

Οι φιάλες τοποθετήθηκαν σε χώρο φωτιζόμενο φυσικά, χωρίς την άμεση επίδραση ηλιακού φωτός, σταθερής θερμοκρασίας 22-25°C περίπου, στο εργαστήριο Βιολογίας και Φυσιολογίας του ανθρώπου και των μικροοργανισμών του Χαροκόπειου Πανεπιστημίου.



Σχήμα 6.1. *Scytonema julianum* από φυσικό υλικό (εικόνες 1, 2).

Scytonema julianum με ελάχιστες ή και καθόλου ενασβεστώσεις, σε καλλιέργειες ενός και τεσσάρων μηνών αντίστοιχα (εικόνες 3, 4).



Σχήμα 6.2. Καλλιέργειες στο εργαστήριο Βιολογίας και Φυσιολογίας του ανθρώπου και των μικροοργανισμών του Χαροκόπειου Πανεπιστημίου.

Ακολούθησαν δύο ανακαλλιέργειες με σκοπό τόσο την ποσοτική αύξηση των δειγμάτων, όσο και την ποιοτική τους αναβάθμιση, αφού παράλληλα γίνονταν μικροσκοπικός έλεγχος για την διαπίστωση ύπαρξης βακτηρίων ή μολύνσεων.

Πριν από κάθε ανακαλλιέργεια γινότανε έλεγχος στο μικροσκόπιο, τόσο για να βεβαιωθεί η ανάπτυξη του φύκους, όσο και για τον έλεγχο της αξενικής καλλιέργειας.

Ο χρόνος που μεσολαβούσε ανάμεσα σε δύο καλλιέργειες ήταν περίπου σαράντα (40) ημέρες.

Οι ανακαλλιέργειες έγιναν στο εργαστήριο, κοντά σε λυχνία Bulsen με φρέσκα αποστειρωμένα καλλιεργητικά υλικά, σε αποστειρωμένες κωνικές φιάλες των 100ml, ενώ η μεταφορά του υλικού έγινε με αποστειρωμένο κρίκο. Διαπιστώθηκε μακροσκοπικά και μικροσκοπικά ότι η ανάπτυξη των στελεχών σε STAUB(1961) ήταν πολύ καλύτερη από αυτή σε BG-11, τόσο στην ποσότητα όσο και στην ποιότητα των κυττάρων του φύκους.

Μακροσκοπικά διαπιστώθηκε η μεγαλύτερη ποσοτική αύξηση του *Scytonema julianum* καθώς και η μεγάλη διαύγεια της καλλιέργειας σε STAUB(1961), σε αντίθεση με την εικόνα που παρουσίαζε το ίδιο φύκος σε BG-11, όπου η

ανάπτυξη ήταν μικρότερη, ενώ η καλλιέργεια παρουσίαζε μια σχετική θολότητα.

Σε μικροσκοπικό έλεγχο, βρέθηκε ότι υπήρχαν πολύ περισσότερα κύτταρα σε λύση του στελέχους, που αναπτύχθηκαν σε BG-11, από αυτά που αναπτύχθηκαν σε STAUB (1961).

Η αιτία της διαφορετικής συμπεριφοράς των καλλιεργητικών υλικών οφείλεται πιθανά στην παρουσία μεγαλύτερου αριθμού μετάλλων στο STAUB (1961) από ότι, στο BG-11.

Για το εμπλουτισμό του πειραματικού υλικού πραγματοποιήθηκαν άλλες δύο δειγματοληψίες σε διαφορετικά χρονικά διαστήματα και συνεχώς ανακαλλιέργειες με την προαναφερόμενη μέθοδο.

Στη συνέχεια έγινε διαχωρισμός του κυανοφύκου από το καλλιεργητικό υλικό υπό κενό με συσκευή Buhner. Ως φίλτρο χρησιμοποιήθηκε το Whatman GF/C 110cm, το οποίο τοποθετήθηκε σε πορσελάνινη χοάνη προσαρμοσμένη σε εσφυρισμένη κωνική φιάλη των 500ml. Ακολούθησε εκχύλιση των λιποειδών με τη μέθοδο Bligh-Dyer.

Συγκεκριμένα, το φίλτρο με το υλικό τοποθετήθηκε σε εσφυρισμένη κωνική φιάλη των 500ml και προστέθηκε σ' αυτό μονοφασικό διάλυμα, χλωροφορμίου – μεθανόλης – νερού, σε αναλογία 1:2:0,8. Η κωνική πωματίζεται και ακολουθεί έντονη ανάδευση για 60 περίπου λεπτά, ούτως ώστε να επιτευχθεί το σπάσιμο των κυττάρων και η απελευθέρωση των λιποειδών. Κατά διαστήματα αφαιρείται το πώμα της φιάλης, προκειμένου να διαφύγουν τα πτητικά αέρια.

Μετά την ανάδευση προσθέτονται στην κωνική οι κατάλληλες ποσότητες χλωροφορμίου και νερού, έτσι ώστε η αναλογία να γίνει 1:1:0,9. Συνεχίζεται η ανάδευση για άλλα 30 λεπτά και ακολουθεί φυγοκέντρωση.

Η φυγοκέντρωση έγινε στις 1500rpm για 10 λεπτά, σε συσκευή τύπου Hermle Z320.

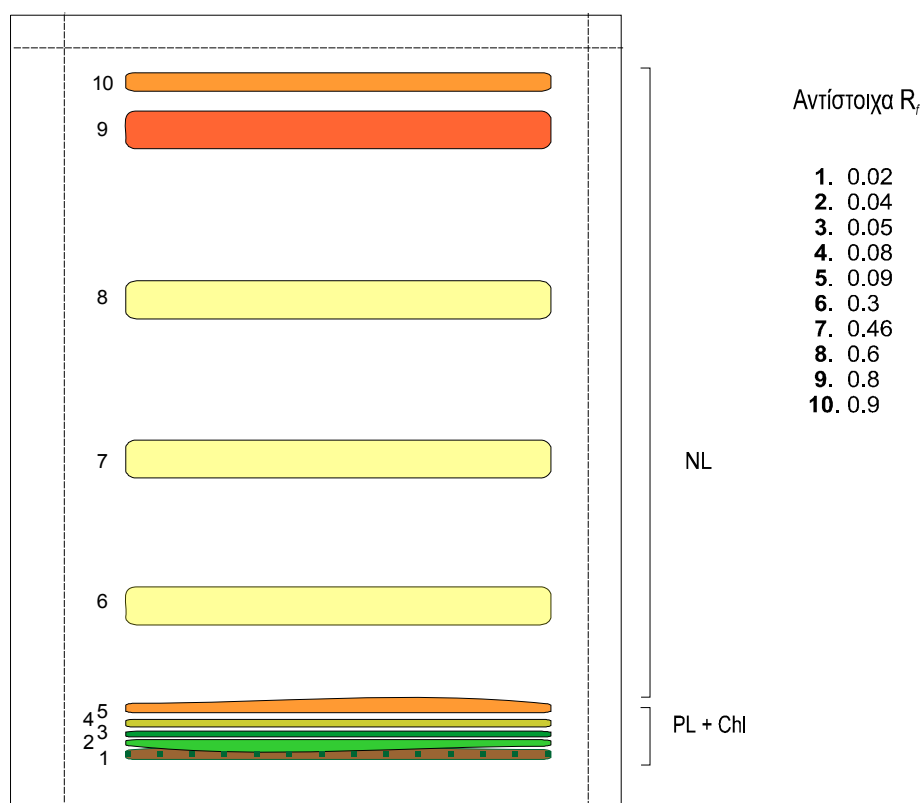
Μετά τη φυγοκέντρωση το μίγμα διαχωρίζεται σε δύο φάσεις: στην υδατοαλκοολική φάση, η οποία απορρίπτεται και τη χλωροφορμική φάση, η οποία περιέχει τα ολικά λιποειδή.

Η χλωροφορμική φάση μεταφέρεται με πιπέτα paster σε εσφυρισμένη κωνική φιάλη και εξατμίζεται μέχρι ξηρού σε περιστρεφόμενο συμπυκνωτήρα υπό ελαττωμένη πίεση. Τα ολικά λιποειδή, ποσότητας περίπου 10mg, αναδιαλύθηκαν σε συγκεκριμένο όγκο διαλύματος χλωροφορμίου – μεθανόλης 1:1 και αποθηκεύτηκαν.

6.1.1. Διαχωρισμός σε ουδέτερα (NL) και πολικά (PL) λιποειδή – Απομάκρυνση χρωστικών ουσιών

Ετοιμάστηκαν οι πλάκες TLC με τον τρόπο που περιγράφεται στο κεφάλαιο Μέθοδοι (5.3) και με δύο διαδοχικές αναπτύξεις σε κατάλληλα συστήματα, έγινε ο διαχωρισμός των ολικών λιποειδών σε ουδέτερα και πολικά καθώς και η απομάκρυνση των χρωστικών (Demopoulos, C.A. et al. 1996).

Συγκεκριμένα, η ανάπτυξη του δείγματος έγινε καταρχήν σε πετρελαϊκό αιθέρα : βενζόλιο : οξικό οξύ σε αναλογία 30 : 70 : 2 v/v/v. Στο σύστημα αυτό τα πολικά λιποειδή και οι χρωστικές παραμένουν στην αρχή, ενώ τα ουδέτερα λιποειδή κατανέμονται σε όλη την πλάκα όπως δείχνει το σχήμα (Σχήμα 6.3). Η περιοχή των ουδέτερων λιποειδών παραλαμβάνεται με απόξυση, με την βοήθεια αντικειμενοφόρου πλάκας και εκχυλίζονται με τη μέθοδο Bligh-Dyer. Τα ουδέτερα λιποειδή μετά από φυγοκέντρηση, για 10 λεπτά σε 2000rpm και αναδιάλυση σε συγκεκριμένο όγκο διαλύτη (χλωροφορμίου – μεθανόλης 1:1), φυλάχτηκαν σε ψυγείο.

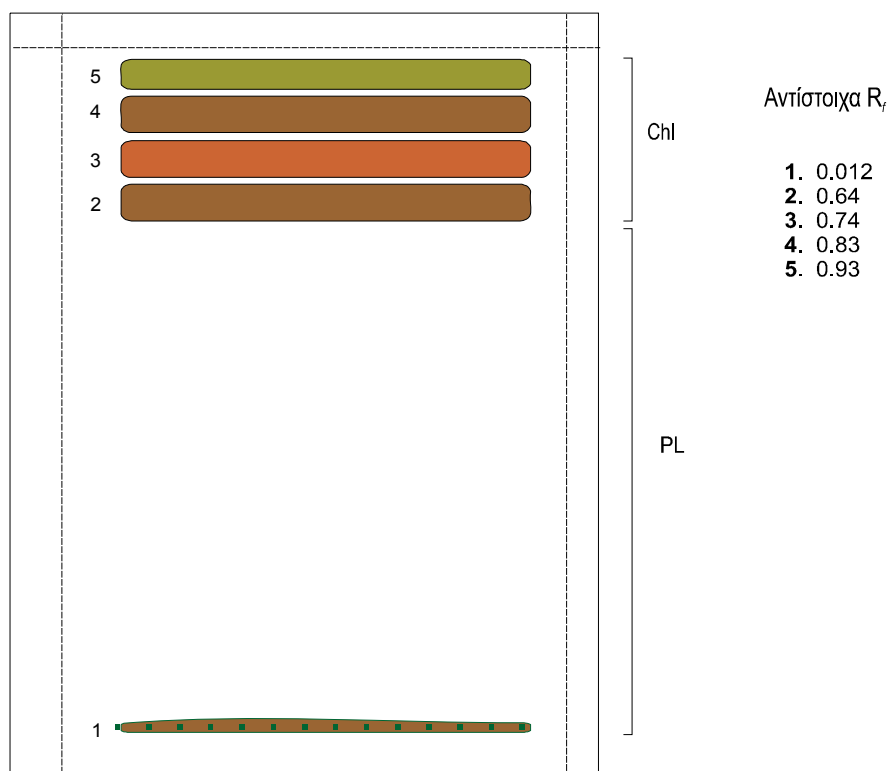


Σχήμα 6.3. Ανάπτυξη ολικών λιποειδών σε πετρελαϊκό αιθέρα:βενζόλιο:οξικό οξύ NL, ουδέτερα λιποειδή. PL, πολικά λιποειδή. Chl, χλωροφύλλες.

Η περιοχή των πολικών λιποειδών και των χρωστικών παραλαμβάνεται με απόξυση, εκχυλίζεται με τη μέθοδο Bligh-Dyer και επαναχρωματογραφείται σε TLC πυριτικού, με σύστημα ανάπτυξης ακετόνη:μεθανόλη:νερό σε αναλογία 40:20:1 v/v/v. Στο σύστημα αυτό τα πολικά λιποειδή και οι χρωστικές κατανέμονται στην πλάκα όπως δείχνει το σχήμα (Σχ. 6.4). Η περιοχή των πολικών λιποειδών παραλαμβάνεται με απόξυση, με την βοήθεια αντικειμενοφόρου πλάκας και τα λιποειδή εκχυλίζονται με τη μέθοδο Bligh-Dyer. Τα πολικά λιποειδή μετά από αναδιάλυση σε συγκεκριμένο όγκο διαλύτη (χλωροφορμίου – μεθανόλης 1:1) φυλάχτηκαν σε ψυγείο.

Η περιοχή των χρωστικών παραλαμβάνεται με απόξυση και εκχυλίζεται με τον ίδιο τρόπο.

Με αυτή την διαδικασία χωρίστηκαν τα ολικά λιποειδή (TL) από τις χρωστικές, στην πλειοψηφία τους χλωροφύλλες, οι οποίες απορρίφθηκαν, στα ουδέτερα λιποειδή (NL) που αποθηκεύτηκαν και στα πολικά λιποειδή (PL), τα οποία επίσης αποθηκεύτηκαν.



Σχήμα 6.4. Ανάπτυξη πολικών λιποειδών και χλωροφυλλών σε ακετόνη:μεθανόλη:νερό. PL, πολικά λιποειδή. Chl, χλωροφύλλες.

Θα πρέπει να επισημάνουμε ότι το κλάσμα των πολικών λιποειδών, περιέχει κυρίως φωσφολιποειδή και ότι τα γλυκολιποειδή βρίσκονται κατανεμημένα και στα δύο κλάσματα, δηλαδή στα NL και PL, ανάλογα με την πολικότητά τους.

6.1.2. Φωσφολιποειδή (PL)

6.1.2.1. Διαχωρισμός PL με HPLC

Το κλάσμα των φωσφολιποειδών μαζί με τα πολικά γλυκολιποειδή, ποσότητας περίπου 1mg, διαχωρίστηκε περαιτέρω με HPLC, (Andrikopoulos, N. et al. 1986a) με διαδοχικές ισόποσες ενέσεις. Η στήλη που χρησιμοποιήθηκε είναι στήλη κατιοανταλλαγής (SCX), ενώ το σύστημα έκλουσης είναι ισοκρατικό με αναλογία διαλυτών ακετονιτρίλιο 60% και μεθανόλη-νερό 4:1 (v/v) 40% (v/v). Η ανίχνευση των λιποειδών έγινε με ανιχνευτή UV και το χρησιμοποιούμενο μήκος κύματος ήταν 208nm. Χαρακτηριστικό χρωματογράφημα φαίνεται στο σχήμα (Σχ. 6.5).

Ένα τυπικό δείγμα του διαχωρισμού των λιποειδών αυτών με τους σχετικούς χρόνους των προτύπων φωσφολιποειδών φαίνεται στο παρακάτω σχήμα. Αυτή η μέθοδος HPLC, αν και δεν διαχωρίζει όλα τα κλάσματα των φωσφολιποειδών επαρκώς, επιλέχθηκε αφού επιτρέπει τον διαχωρισμό του PAF και των αναλόγων του PAF από τα λοιπά φωσφολιποειδή.

Τα λιποειδή που εκλούστηκαν από το σύστημα της HPLC συγκεντρώθηκαν, αντιπροσωπευόμενα από τα κλάσματα PL₁ έως PL₁₂ (Σχήμα 6.5) και καθένα από αυτά επαναχρωματογραφήθηκε στις ίδιες συνθήκες, με σκοπό τον περαιτέρω καθαρισμό του από τις γειτονικές κορυφές. Στη συνέχεια δοκιμάστηκαν για την ικανότητά τους να προκαλούν συσσώρευση πλυμένων αιμοπεταλίων κουνελιού και να αναστέλλουν την προκαλούμενη από τον PAF καθώς και το AA και το ADP συσσώρευση πλυμένων αιμοπεταλίων κουνελιού.

6.1.2.2. Βιολογική δραστικότητα των κλασμάτων των πολικών λιποειδών της SCX

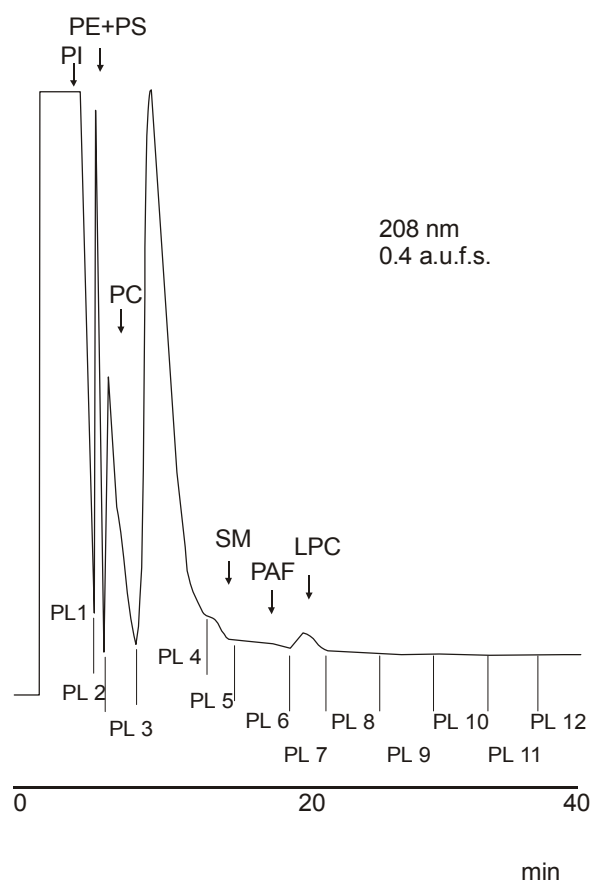
Στον πίνακα 5 συνοψίζεται η βιολογική δραστικότητα των 11 κλασμάτων της HPLC.

Το κλάσμα PL₁, που περιέχει μια ποσότητα φωσφολιποειδών μαζί με μερικά πολικά γλυκολιποειδή, φυλάχτηκε για περαιτέρω καθαρισμό σε διαφορετικές χρωματογραφικές συνθήκες.

Τα κλάσματα PL₃, PL₅, PL₇, PL₉, PL₁₀ και PL₁₂ δεν έδειξαν καμία βιολογική δραστικότητα.

Τρία κλάσματα, τα PL₂, PL₈ και PL₁₁, βρέθηκαν ότι αναστέλλουν με δόσοεξαρτώμενο τρόπο τη συσσώρευση των πλυμένων αιμοπεταλίων

κουνελιού που προκαλείται από τον PAF, καθώς και αυτήν που προκαλείται από το AA. Το κλάσμα PL₁₁ ανέστειλε ελαφρώς και την προκαλούμενη από το ADP συσώρευση (Πίνακας 5).

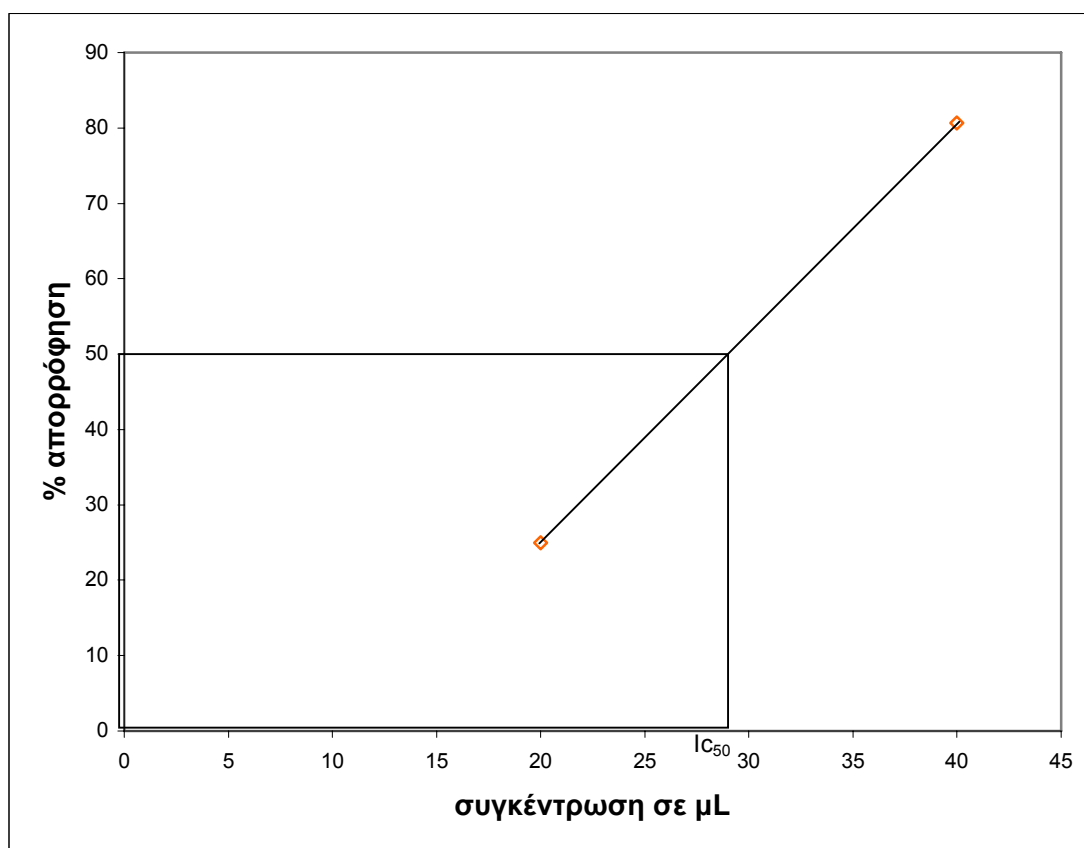


Σχήμα 6.5. Χαρακτηριστικό χρωματογράφημα διαχωρισμού των φωσφολιποειδών του *Scytonema julianum* με HPLC σε στήλη κατιοανταλλαγής, όπου φαίνονται και οι περιοχές έκλουσης των προτύπων ουσιών.

Θα πρέπει όμως να επισημανθεί ότι η αναστολή που προκάλεσαν τα παραπάνω κλάσματα δεν κρίθηκε ιδιαίτερα σημαντική, γιατί δεν ήταν ειδική ως προς τον PAF και γι' αυτό το λόγο, δεν έγιναν πειράματα που να οδηγούν στη διαλεύκανση της δομής των κλασμάτων αυτών.

Το κλάσμα PL₄, σε χαμηλές συγκεντρώσεις προκάλεσε τη συσώρευση πλυμένων αιμοπεταλίων κουνελιού με μορφή διαφορετική από εκείνη του PAF. Η συσώρευση που προκλήθηκε από το κλάσμα αυτό ήταν αργή στην αρχή και μη αντιστρεπτή σε όλες τις συγκεντρώσεις που δοκιμάστηκαν. Η μέγιστη συσώρευση παρατηρήθηκε σε τελική συγκέντρωση της τάξεως 10^{-6} M, ενώ η τιμή EC₅₀ (efficiency concentration fifty) ήταν σε τελική συγκέντρωση 0.7×10^{-6} M, βασισμένα και τα δύο στον προσδιορισμό φωσφόρου. Φαίνεται ότι αυτό το δραστικό φωσφολιποειδές δρα μέσα από το

δρόμο του PAF, αφού 1) τα αιμοπετάλια που είχαν απευαισθητοποιηθεί στον PAF δεν συσσωρεύτηκαν από το λιποειδές αυτό και 2) το BN52021, ένας ειδικός αναστολέας του PAF-υποδοχέα, παρεμπόδιζε τη συσσώρευση που προκαλείται από το λιποειδές αυτό. Το δραστικό αυτό φωσφολιποειδές, όταν δοκιμάστηκε σε υψηλότερες συγκεντρώσεις, ανέστειλε την προκαλούμενη από τον PAF συσσώρευση με δόσοεξαρτώμενο τρόπο. Συγκεκριμένα, η τιμή του IC_{50} του σε σχέση με την προκαλούμενη από τον PAF συσσώρευση ήταν σε τελική συγκέντρωση 3.2×10^{-5} M, με βάση τον προσδιορισμό του φωσφόρου.



Σχήμα 6.6. Υπολογισμός IC_{50} του φωσφολιποειδούς PL_9 του *Scytonema julianum*.

Το κλάσμα PL_6 προκάλεσε δόσο-εξαρτώμενη συσσώρευση πλυμένων αιμοπεταλίων κουνελιού με μορφή συσσώρευσης ίδια με εκείνη του PAF. Το δραστικό αυτό λιποειδές φαίνεται ότι δρα μέσα από τους υποδοχείς του PAF εφόσον 1) αιμοπετάλια που απευαισθητοποιήθηκαν από τον PAF δεν συσσωρεύτηκαν από το λιποειδές αυτό και το αντίστροφο, 2) αιμοπετάλια απευαισθητοποιημένα στο AA ή ADP, συσσωρεύτηκαν στην συνέχεια με την

προσθήκη του λιποειδούς αυτού και 3) το BN52021, ένας ειδικός αναστολέας του PAF-υποδοχέα, παρεμπόδισε πλήρως τη συσσώρευση που προκαλείται από το κλάσμα PL₆.

Πίνακας 5: Βιολογική δραστικότητα για κάθε κλάσμα φωσφολιποειδούς.

Κλάσματα	Αναστολή	Συσσώρευση
PL ₂	*	όχι
PL ₃	όχι	όχι
PL ₄	*	+
PL ₅	όχι	όχι
PL ₆	όχι	+
PL ₇	όχι	όχι
PL ₈	*	όχι
PL ₉	όχι	όχι
PL ₁₀	όχι	όχι
PL ₁₁	**	όχι
PL ₁₂	όχι	όχι

Η συσσώρευση πλυμένων αιμοπεταλίων κουνελιού προκλήθηκε από PAF 1.25×10^{-10} M τελική συγκέντρωση, από AA 0.02×10^{-5} M τελική συγκέντρωση και από ADP 0.35×10^{-5} M τελική συγκέντρωση. *: κλάσμα που αναστέλλει την προκαλούμενη από τον PAF και το AA συσσώρευση. όχι: κλάσμα χωρίς βιολογική δραστικότητα. +: κλάσμα που προκαλεί συσσώρευση πλυμένων αιμοπεταλίων κουνελιού. **: κλάσμα που αναστέλλει την από τον PAF, το AA και το ADP συσσώρευση

6.1.2.3. Φάσμα UV και προσδιορισμός φωσφόρου των κλασμάτων PL₂, PL₃, PL₄, PL₆, PL₈ και PL₁₁

Το UV φάσμα των παραπάνω τριών κλασμάτων PL₂, PL₈ και PL₁₁ έδειξε μια μέγιστη απορρόφηση στα 202nm και μια μικρή απορρόφηση στα 400nm. Τα πρότυπα δείγματα φωσφατιδυλοχολίνης, φωσφατιδυλοαιθανολαμίνης και

σφιγγομελίνης έδωσαν μια ισχυρή απορρόφηση στα 202nm, όταν εκτέθηκαν στις ίδιες συνθήκες του πειράματος. Αντιπροσωπευτικό φάσμα UV των κλασμάτων αυτών φαίνεται στο σχήμα 6.7. Δεν ανιχνεύθηκε φωσφόρος σε κανένα από τα παραπάνω αναφερόμενα κλάσματα, δείχνοντας ότι το PL₂ δεν είναι φωσφολιποειδές. Από την άλλη, επειδή τα κλάσματα PL₈ και PL₁₁ περιέχουν σίγουρα μικρή ποσότητα λιποειδών, όπως φαίνεται τόσο από τον καθαρισμό με HPLC, όσο και από το φάσμα UV, ο αρνητικός προσδιορισμός του φωσφόρου δεν μπορεί να θεωρηθεί ως ισχυρό αρνητικό στοιχείο.

Το κλάσμα PL₃ έδωσε θετικό προσδιορισμό φωσφόρου (4.3μg P, ολικό ποσό) και επίσης εμφανίζει ίδιο RF με την πρότυπη φωσφατιδυλοχολίνη σε μια πλάκα TLC, καθώς και τον ίδιο χρόνο έκλουσης στο διαχωρισμό με HPLC. Το φάσμα του UV έδωσε ισχυρή απορρόφηση στα 202nm μαζί με μια μικρότερη στα 400nm.

Παρόμοια μορφή φάσματος UV, συγκεκριμένα μέγιστη απορρόφηση στα 202nm και μία μικρή κορυφή στα 400nm, εμφάνισε και το κλάσμα PL₄.

Επιπλέον, το ίδιο κλάσμα έδωσε θετικό προσδιορισμό φωσφόρου, βάσει του οποίου εκφράστηκαν οι τιμές EC₅₀ και IC₅₀ στο βιολογικό προσδιορισμό. Το κλάσμα PL₆ έδωσε μορφή φάσματος UV παρόμοια με τα πρότυπα φωσφολιποειδή, με μέγιστη απορρόφηση στα 202nm και με μία μικρής έντασης απορρόφηση στα 400nm.

Η περιορισμένη ποσότητα του κλάσματος αυτού δεν επέτρεπε κανένα χημικό προσδιορισμό.

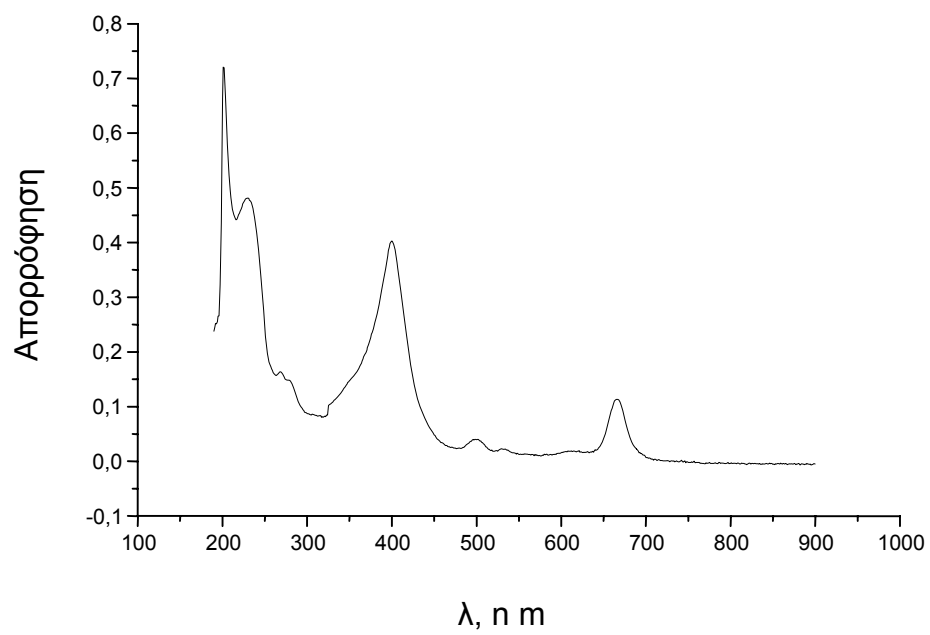
61.2.4. Κατεργασία με Ακετυλοϋδρολάση

Στα κλάσματα PL₄ και PL₆ έγινε κατεργασία με ακετυλοϋδρολάση σύμφωνα με τη μέθοδο ενζυμικής υδρόλυσης λιποειδών.

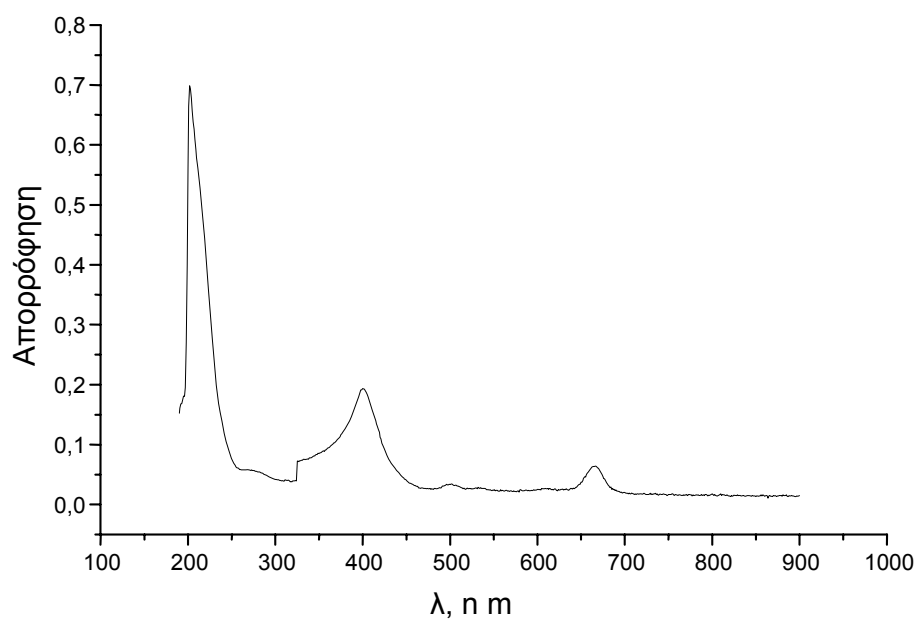
Η επώαση του φωσφολιποειδούς PL₄ με ακετυλοϋδρολάση ορού, είχε ως αποτέλεσμα την απενεργοποίησή του, αλλά ο ρυθμός υδρόλυσης που παρατηρήθηκε είναι χαμηλότερος από αυτόν του PAF, υποδηλώνοντας ότι δεν υπάρχει ακετυλομάδα στη θέση sn-2 του γλυκερινικού σκελετού.

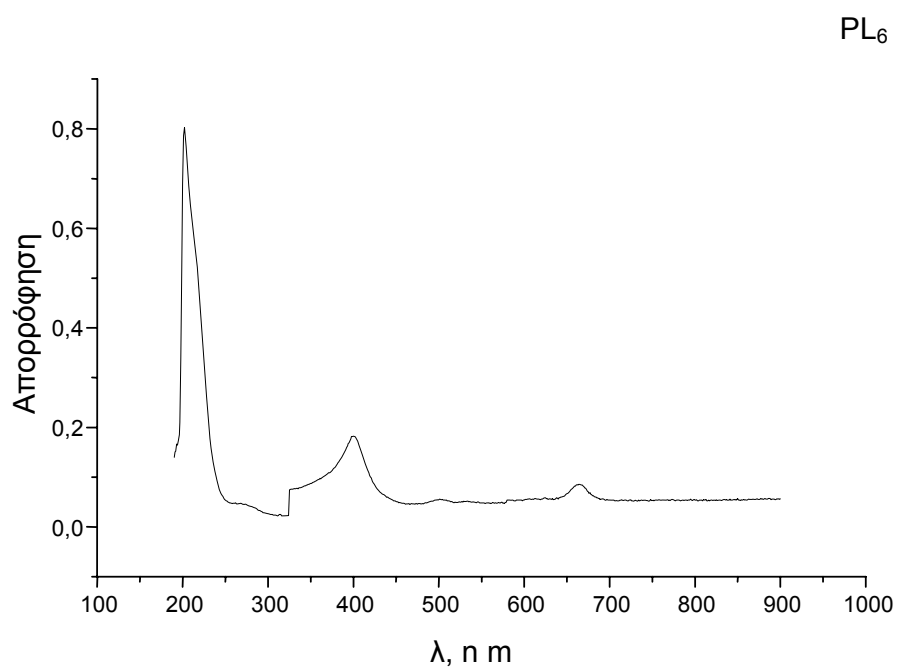
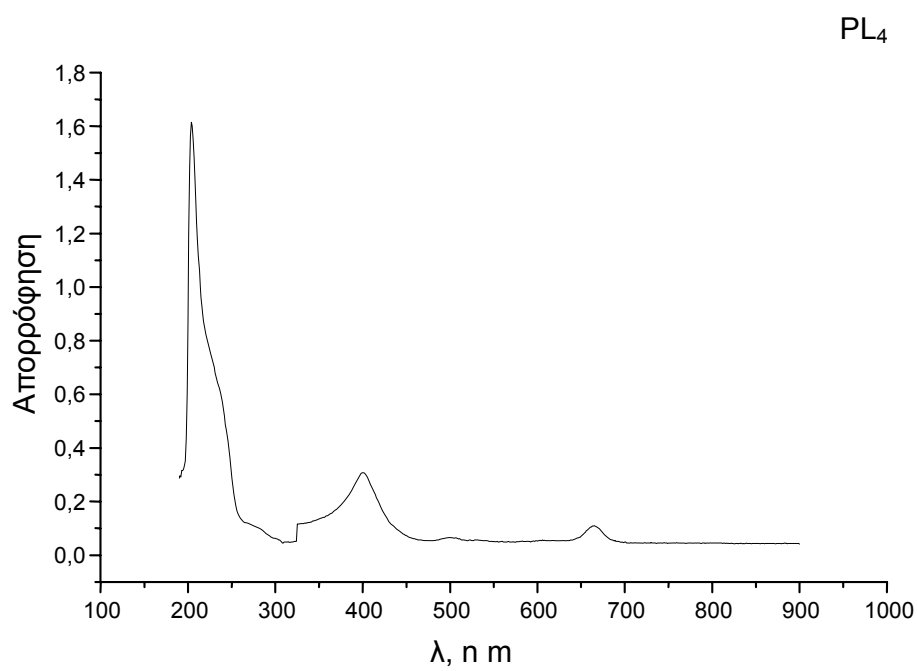
Η επώαση του φωσφολιποειδούς PL₆ με ακετυλοϋδρολάση ορού, είχε ως αποτέλεσμα τη χρονοεξαρτώμενη απενεργοποίησή του, με ρυθμό παρόμοιο με αυτό που προκαλεί ο PAF, υποδηλώνοντας την παρουσία ακετυλομάδας στη θέση sn-2 του γλυκερινικού σκελετού.

PL₂



PL₃





Σχήμα 6.7. Φάσματα UV των κλασμάτων PL₂, PL₃, PL₄ και PL₆

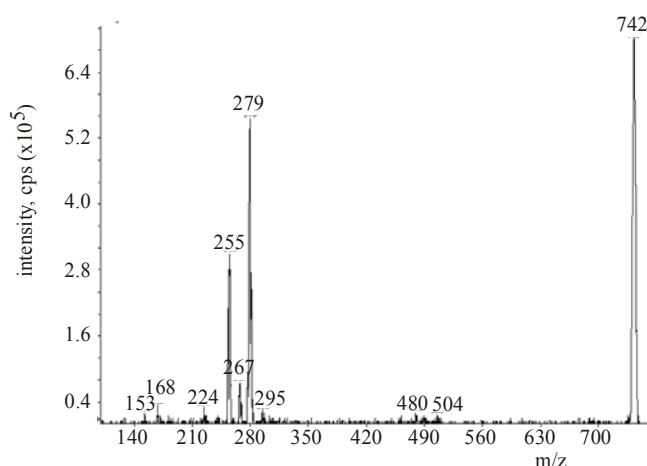
6.1.2.5. Φάσμα MS – Διαλεύκανση δομής

Στα κλάσματα PL₃, PL₄ και PL₆ ελήφθησαν φάσματα MS με σκοπό τη διαλεύκανση της δομής αυτών.

Το θετικό ESI φάσμα του PL₃ έδωσε ένα σχετικά ισχυρό [M+Na]⁺ ιόν σε m/z 780, που αντιστοιχεί σε PC (C 34:2) καθώς και το ιόν που αντιστοιχεί στη βάση της φωσφοχολίνης σε m/z 184.

Το αρνητικό electrospray φάσμα του ίδιου κλάσματος έδειξε ισχυρό [M-15]⁻ ιόν στα m/z 742, το οποίο προκύπτει από αντίδραση απομάκρυνσης μεθυλομάδας (Σχ. 6.8) (Zirrolli, J.A. et al. 1991).

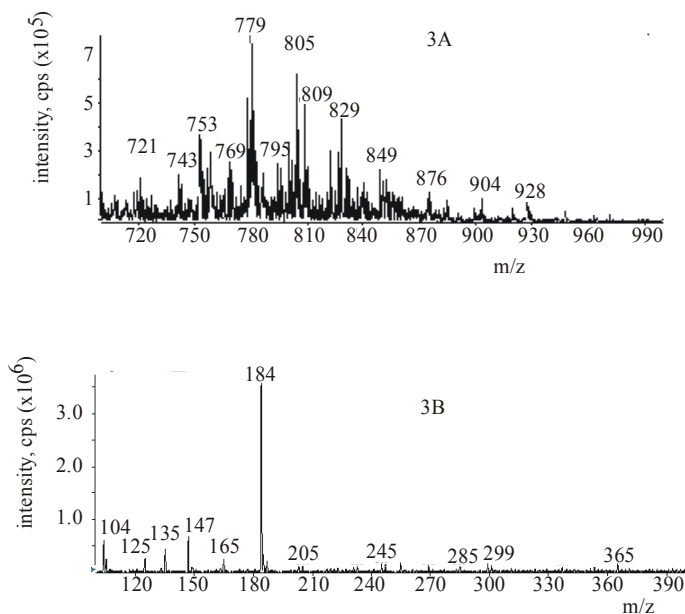
Στη συνέχεια το φάσμα MS/MS του [M-15]⁻ ιόντος (Σχ. 6.8) παράγει θραύσματα καρβοξυλικών ιόντων στα m/z 255 (C16:0) και 279 (C18:2), τα οποία αντιστοιχούν στα λιπαρά οξέα στις θέσεις sn-1 και sn-2 αντίστοιχα, αφού είναι γνωστό ότι το πιο ισχυρό καρβοξυλικό ανιόν που σχηματίζεται, αντιστοιχεί στη θέση sn-2 (Murphy, R.C. 1993a).



Σχήμα 6.8. MS/MS του κλάσματος PL₃ του αρνητικού ιόντος στα m/z 742

Επιπλέον, παρατηρήθηκαν τα παρακάτω θραύσματα: το διμεθυλαμινοφωσφορικό ανιόν σε m/z 168, το κοινό θραύσμα για όλα τα διακυλογλυκεροφωσφολιποειδή σε m/z 153 [γλυκεροφωσφορικό- H₂O]⁻ καθώς και τα ιόντα σε m/z 504 και 480, τα οποία αντιστοιχούν στην απομάκρυνση των λιπαρών οξέων (με μορφή ουδέτερων κετενο-αναλόγων) από τις θέσεις sn-1 και sn-2, αντίστοιχα.

Το θραύσμα σε m/z 224 πιθανώς αντιστοιχεί στο κομμάτι του μορίου που απομένει μετά την απομάκρυνση των λιπαρών οξέων από τις θέσεις sn-1 και sn-2



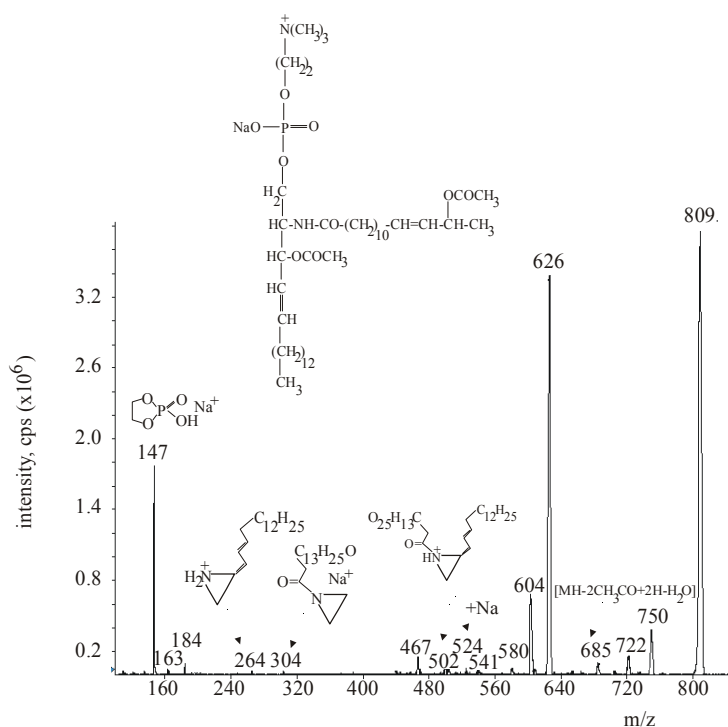
Σχήμα 6.9. Θετικά ESI-MS του κλάσματος PL₄ από τα φωσφολιποειδή του *Scytonema julianum*. (3A): m/z από 700-1000, (3B): από 100-400.

Το θετικό ESI φάσμα του κλάσματος PL₄ (Σχ. 6.9, 3A) εμφάνισε ισχυρά $[M+H]^+$ και/ή $[M+Na]^+$ ιόντα που αντιστοιχούν σε ανάλογα της SM, αφού άλλα εμφανίζονται σε μονές τιμές m/z από 721 ως 849 και επιπλέον παρατηρήθηκαν τα ιόντα σε m/z 184, 147, 125 και 104, τα οποία αντιστοιχούν σε θραύσματα χαρακτηριστικά της φωσφοχολίνης (Σχ. 6.9, 3B).

Το ESI-MS/MS φάσμα του θραύσματος στα m/z 809 φαίνεται στο σχήμα 6.10.

Το ισχυρότερο θετικό θραύσμα στα m/z 626 προκύπτει από την απομάκρυνση της πολικής φωσφοχολίνης, ως ουδέτερο κομμάτι 183 Dalton, από το μετά Na μόριο της SM, όπως έχει αναφερθεί από άλλους ερευνητές ότι συμβαίνει [Brugger, B. et al. (1997), Hsu, F.-F. and Turk, J. (2000)], ενώ το ιόν σε m/z 604 πρέπει να αντιστοιχεί στην απομάκρυνση του Na από το μόριο που εμφανίζεται σε m/z 626. Τα θραύσματα στα m/z 147 και 184 αποτελούν χαρακτηριστικά ιόντα της φωσφοχολίνης. Επιπλέον, τα παρατηρούμενα ιόντα στα m/z 750 και 722 αντιστοιχούν στην απομάκρυνση των ομάδων $[N(CH_3)_3]$ και $[(CH_2)_2N(CH_3)_3]$ από τη βάση της φωσφοχολίνης του μετά Na μορίου της SM αντίστοιχα.

Ο μηχανισμός αντίδρασης με τον οποίο προκύπτει το ιόν στο m/z 750, πρόσφατα αναφέρθηκε για τα μετά Na, Li, και K μόρια σφιγγομυελίνης (Hsu, F.F. and Turk, J. 2000).



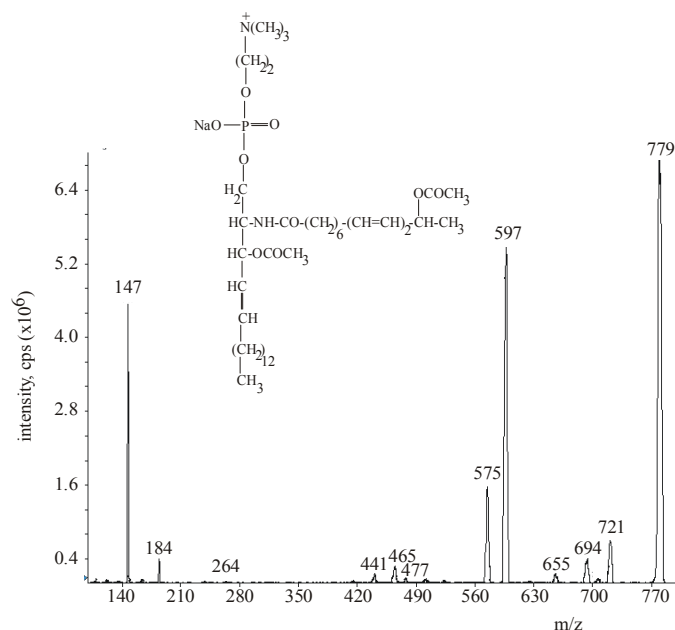
Σχήμα 6.10. MS/MS του θετικού ιόντος στα m/z 809 $[M+Na]^+$ του (3A)

Τα ιόντα στα m/z 264 και 304 αντιστοιχούν σε θετικά θραύσματα της μακριάς αλυσίδας του σκελετού της σφιγγοσίνης και του λιπαρού οξέος στο μόριο (Σχ. 6.10).

Τα θραύσματα που αντιστοιχούν σε ιόντα με m/z 502, 524 και 685 καθώς και η προτεινόμενη δομή του PL₄ φαίνονται στο σχήμα 6.10.

Φαίνεται ότι αυτό το μόριο SM έχει δύο εστεροποιημένα λιπαρά οξέα, ένα στο ελεύθερο υδροξύλιο της αλυσίδας της σφιγγοσίνης και το άλλο στο ελεύθερο υδροξύλιο της αλυσίδας του λιπαρού οξέος. Αυτά τα λιπαρά οξέα πρέπει να είναι τα οξικά, αφού παράγεται αφ'ενός το ιόν στο m/z 685 (Σχ. 6.10) και από την άλλη η χρωματογραφική συμπεριφορά μαζί με την βιολογική δραστηριότητα του λιποειδούς αυτού είναι ταυτόσημα με τα αντίστοιχα της ακετυλο-SM που έχει συντεθεί [Demopoulos, C.A. and Antonopoulou, S. (1996), Zanglis, A. et al. (1996)].

Παρόμοια θραύσματα παρατηρήθηκαν στα ESI-MS/MS φάσματα και των άλλων μορίων της σφιγγομυελίνης, που αντιστοιχούν στα ιόντα σε m/z 779, 805 και 829 (Σχ. 6.11).



Σχήμα 6.11. MS/MS του θετικού ιόντος στα m/z 779 $[M+Na]^+$ του (3B)

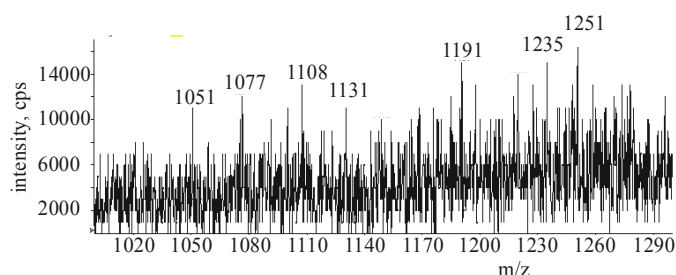
Επιπλέον, το ιόν σε m/z 721 (Σχ. 6.9, 3A) προκύπτει από την απομάκρυνση της ακετυλο-ομάδας από το κυρίαρχο σε ποσότητα μόριο της SM, που αντιστοιχεί στο m/z 779.

Το αρνητικό ESI φάσμα του κλάσματος PL_4 έδωσε ιόντα σε m/z 767 και 791, τα οποία αντιστοιχούν στο αναμενόμενο $[M-15]^-$ θραύσμα των μορίων SM με μοριακά βάρη 782 και 806, αντίστοιχα.

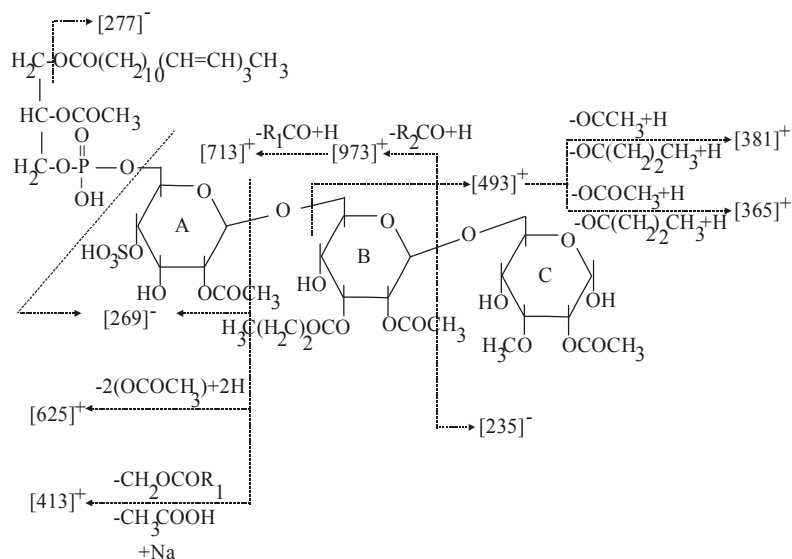
Η διαλεύκανση της δομής του κλάσματος PL_6 στηρίχθηκε κυρίως στο ESI φάσμα, καθώς όπως αναφέρθηκε η περιορισμένη ποσότητά του δεν επέτρεπε χημικούς προσδιορισμούς. Το θετικό ESI φάσμα του έδωσε θραύσματα σε m/z 1251 $[M+H]^+$, σε m/z 1191 $[M+H-AcOH]^+$, σε m/z 1131 $[M+H-2AcOH]^+$ και σε m/z 1235 $[1191-2H+2Na]^+$ (Σχ. 6.12), τα οποία υποστηρίζουν τη δομή ενός λιποειδούς με μοριακό βάρος 1250 καθώς και την παρουσία δύο τουλάχιστον ακετυλομάδων στο μόριό του. Θα πρέπει να σημειωθεί ότι η απομάκρυνση της ακετυλομάδας με τη μορφή AcOH, που αντιστοιχεί σε απώλεια 60u ή 120u (2 ακετυλομάδες) εμφανίζεται συχνά σε ακετυλιωμένα γλυκολιποειδή. Η απουσία του χαρακτηριστικού, για τη φωσφοχολίνη, θραύσματος σε m/z 184 υποδηλώνει ότι το PL_6 είναι ένα μόριο ανάλογο του PAF.

Η χρωματογραφική του συμπεριφορά, το φασματογράφημα μάζας του, εμφανίζουν πολλές ομοιότητες με αυτά που έχουν αναφερθεί για γλυκολιποειδή [Reshef, V. et al. (1997) , Kim, Y.H. et al. (1999)] ταυτόχρονα με το γεγονός ότι οι γαλακτοζυλοδιακυλο-γλυκερόλες είναι κύρια λιποειδή των μεμβρανών στα κυανοβακτήρια (Kates, M. 1990), οδηγούν στην προτεινόμενη δομή ενός ακυλο-ακετυλο-γλυκερο-φωσφογλυκολιποειδούς όπως

παρουσιάζεται στο σχήμα 6.13, μαζί με τα κλάσματα διάσπασης που πιστοποιήθηκαν. Η παρουσία της ακετυλομάδας στη θέση sn-2 του γλυκερινικού σκελετού, όπως εμφανίζεται στο σχήμα 6.13, στηρίζεται επίσης και από τα αποτελέσματα του πειράματος με την ακετυλοϋδρολάση. Επιπλέον, στη βιβλιογραφία έχει αναφερθεί ότι ακυλο-ακέτυλο-γλυκεροφωσφο ακετυλιωμένα γλυκολιποειδή προκαλούν συσσώρευση πλυμένων αιμοπεταλίων [Demopoulos, C.A. and Antonopoulou, S. (1996), Avramopoulou, V. et al. (1997)].



Σχήμα 6.12. Θετικό ESI-MS του κλάσματος PL₆ από τα φωσφολιποειδή του *Scytonema julianum*, m/z από 1000-1300.



Σχήμα 6.13. Προτεινόμενη δομή του κλάσματος PL₆ τα φωσφολιποειδή του *Scytonema julianum*. Εμφανίζονται επίσης ταυτοποιημένα θραύσματα.

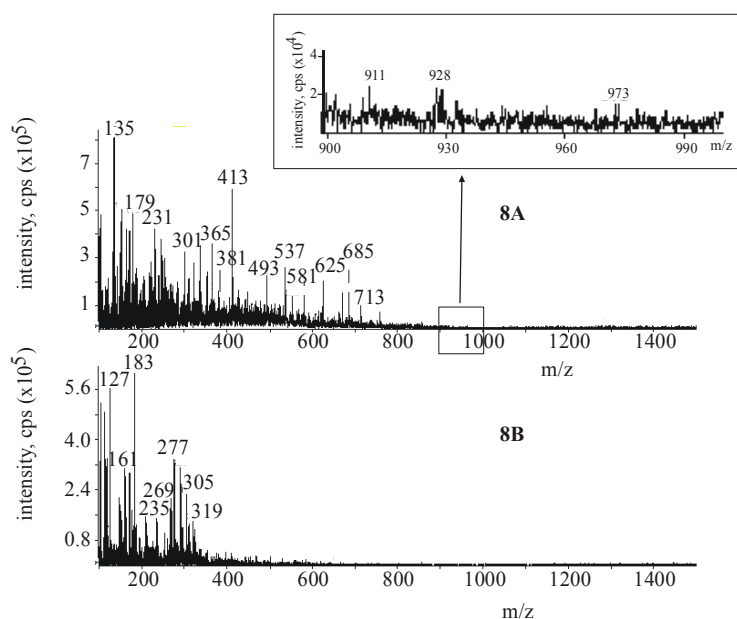
Η ύπαρξη της τελικής μονάδας σακχάρου επιβεβαιώνεται από το κυρίαρχο αρνητικό ιόν σε m/z 235 (Σχ. 6.14, 8B) και από το θετικό ιόν σε m/z 973, (Σχ.

6.14, 8A) που αντιστοιχεί στο $[M\text{-σάκχαρο } C\text{-}R_2CO]^+$. Το άλλο κυρίαρχο αρνητικό θραύσμα σε m/z 277 (Σχ. 6.14, 8B) και το θετικό ιόν σε m/z 713 (Σχ. 6.14, 8A), $[M\text{-σάκχαρο } C\text{-}R_2CO\text{-}R_1CO]^+$, σε συνδυασμό με το γεγονός ότι τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα, κυρίως το λινελαϊκό (C18:2) και το γ-λινολενικό (C18:3) εμφανίζονται κυρίως στη θέση sn-1 των διακυλογλυκερολιποειδών στα κυανοβακτήρια, παρέχουν ισχυρή ένδειξη για την ύπαρξη ενός C18:3 λιπαρού οξέος στη δομή του κλάσματος PL₆. Επιπλέον το MS/MS φάσμα του θραύσματος 713 που εμφανίζεται στο σχήμα 6.15, επιβεβαίωσε την παραπάνω αναφερόμενη δομή.

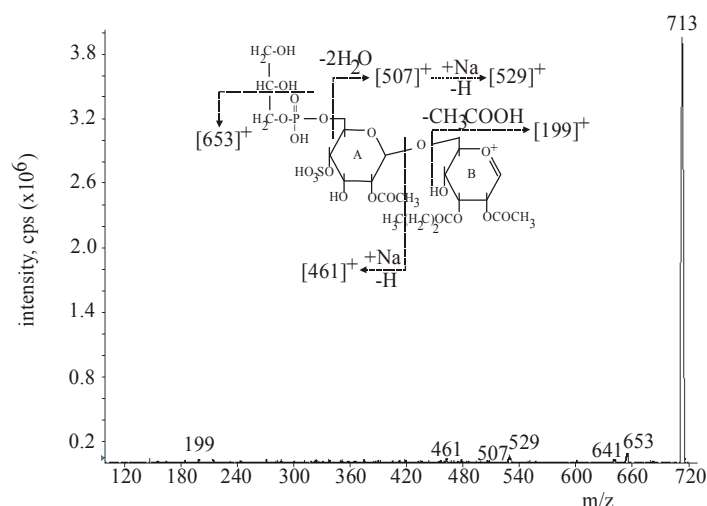
Στο ίδιο σχήμα παρουσιάζονται και οι διασπάσεις του μορίου που ταυτοποιήθηκαν.

Η παρουσία της ομάδας σακχάρου B επιβεβαιώνεται από τα θετικά θραύσματα στα m/z 493, 381 και 365 (Σχ. 6.14, 8A).

Ο τρόπος παραγωγής των θραυσμάτων αυτών παρουσιάζεται στο σχήμα 6.13. Η MS/MS ανάλυση του θραύσματος σε m/z 493 έδωσε τα ιόντα σε m/z 461 $[493\text{-CH}_3\text{OH}]^+$, σε m/z 423 $[493\text{-OC}(\text{CH}_2)_2\text{CH}_3]^+$, σε m/z 381, σε m/z 259 (μονάδα σακχάρου B), σε m/z 171 $[259\text{-HOOC}(\text{CH}_2)_2\text{CH}_3]^+$, σε m/z 241, που αντιστοιχεί στη μετά Na ομάδα σακχάρου C και σε m/z 183 $[241\text{-OCOCH}_3]^+$. Όλα τα παραπάνω θραύσματα υποστηρίζουν την προτεινόμενη δομή. Η αποχώρηση της CH₃OH συναντάται συχνά σε MS/MS φάσματα μεθόξυ-παραγώγων των σακχάρων (Murphy, R.C. 1993b).



Σχήμα 6.14. Θετικά (8A) και αρνητικά (8B) ESI-MS του κλάσματος PL₆ από τα φωσφολιποειδή του *Scytonema julianum*.



Σχήμα 6.15. MS/MS του θετικού ιόντος σε m/z 713 του σχήματος (8Α)

Τέλος, το αρνητικό ιόν σε m/z 269 και τα θετικά σε m/z 625 και 413 (Σχ. 6.14), τα οποία υποστηρίζουν την ύπαρξη της ομάδας σακχάρου Α, εμφανίζονται στο σχήμα 6.13.

Η MS/MS ανάλυση του θραύσματος 413 έδωσε κυρίαρχα θετικά ιόντα σε m/z 81, 99 και 143 που αντιστοιχούν σε $[\text{HSO}_3]^+$ (ή $[\text{H}_2\text{PO}_3]^+$), σε $[\text{H}_3\text{SO}_4]^+$ (ή $[\text{H}_3\text{PO}_4+\text{H}]^+$) και σε $[\text{HSO}_4\text{Na}_2]^+$ ή $[\text{H}_2\text{PO}_4\text{Na}_2]^+$ αντίστοιχα, καθώς και ένα άλλο ιόν σε m/z 189, που πρέπει να αντιστοιχεί στην μονάδα σακχάρου Α μετά την απώλεια της $-\text{SO}_3$ ομάδας.

6.1.2.6. Σύνοψη των αποτελεσμάτων των φωσφολιποειδών του *Scytonema julianum*.

Η χρωματογραφική συμπεριφορά τόσο σε TLC όσο και σε HPLC, το φάσμα UV, ο προσδιορισμός φωσφόρου, η βιολογική συμπεριφορά και τέλος τα φάσματα MS και MS/MS του κλάσματος PL_3 οδηγούν αναμφισβήτητα στο συμπέρασμα ότι πρόκειται για φωσφατιδυλοχολίνη, η οποία στην sn-1 θέση έχει εστεροποιημένο το λιπαρό οξύ 16:0 και στην sn-2 θέση το λιπαρό οξύ 18:2.

Θα πρέπει να επισημανθεί ότι είναι η πρώτη φορά που αποδεικνύεται η παρουσία PC στα κυανοβακτήρια. Το εύρημα αυτό είναι ιδιαίτερης σημασίας, γιατί μέχρι σήμερα πιστεύανε ότι τα βακτήρια δεν περιείχαν γλυκερινούχα φωσφολιποειδή με βάση χολίνη [Antonopoulou S. et al (2002), Nomikos T. et al (2004)].

Το κλάσμα PL_4 εμφανίζει χρωματογραφική συμπεριφορά σφιγγομυελίνης στην TLC και επιπλέον στην HPLC συνχρωματογραφείται με συνθετική ακετυλο-σφιγγομυελίνη. Το φάσμα UV του είναι παρόμοιο με εκείνο της PC

και της SM. Η βιολογική του δραστηριότητα καθώς και τα αποτελέσματα από την κατεργασία του με AH ταυτίζονται με εκείνα της συνθετικής ακετυλο- SM.

Τα φάσματα MS και MS/MS του PL₄ επιβεβαιώνουν ότι πρόκειται για ακετυλο-σφιγγομυελίνες. Η παρουσία αναλόγων της σφιγγομυελίνης ήταν αναμενόμενη, καθότι οι ενώσεις με σκελετό σφιγγοσίνης φαίνεται να είναι «πανταχού παρούσες» και ιδιαίτερα σημαντικές. Άλλωστε είναι γνωστό ότι τα κηραμίδια, οι κερεβροζίτες και τα σχετικά με αυτά λιποειδή είναι ενδοκυττάρια δεύτερα μηνύματα και εμπλέκονται σε βιολογικές διαδικασίες, όπως είναι η ανάπτυξη και ο προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος [Antonopoulou S. et al (2002), Nomikos T. et al (2004)].

Το κλάσμα PL₆ εκλύεται στον ίδιο χρόνο στην HPLC με το συνθετικό PAF. Το φάσμα του UV έχει ομοιότητες με τα φάσματα των φωσφολιποειδών (PC και SM).

Η βιολογική του συμπεριφορά και ο ρυθμός απενεργοποίησής του από την ακετυλοϋδρολάση ταυτίζονται με εκείνα του PAF. Τα δεδομένα όμως από το MS φάσμα δείχνουν ότι το κλάσμα αυτό δεν είναι ανάλογης δομής με εκείνης του PAF και κυρίως ότι δεν διαθέτει βάση φωσφοχολίνης.

Κοινό όμως χαρακτηριστικό δομής με τον PAF είναι η ύπαρξη ακετυλομάδας στην sn-2 θέση του γλυκερινικού σκελετού. Η πιστοποίηση της δομής του, ως φωσφογλυκογλυκερο-λιποειδές αποδεικνύει την ύπαρξη μίας κατηγορίας λιποειδών στα κυανοφύκη, που δεν είχε αναφερθεί έως σήμερα στην βιβλιογραφία. Επιπλέον, το γεγονός ότι αυτό το λιποειδές εμφανίζει βιολογική δραστηριότητα *in vitro* όμοια με εκείνη του PAF, οδηγεί στο συλλογισμό ότι μπορεί να εμπλέκεται στην αλλεργική δερματίτιδα και στο αλλεργικό άσθμα, που εμφανίζονται μετά από έκθεση των ατόμων σε κυανοφύκη. Έχει άλλωστε αναφερθεί ότι αυτές οι αλλεργικές αντιδράσεις που προκαλούν τα κυανοφύκη δεν πρέπει να σχετίζονται με τις τοξίνες που περιέχουν [Antonopoulou S. et al (2002), Nomikos T. et al (2004)].

6.1.3. Γλυκολιποειδή (GL)

6.1.3.1. Διαχωρισμός GL με HPLC

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, τα λιποειδή του *Scytonema julianum* έχουν διαχωρισθεί με διπλό σύστημα TLC σε 2 κλάσματα, πολικά (PL) και ουδέτερα λιποειδή (NL). Τα γλυκολιποειδή βρίσκονται κατανεμημένα και στα 2 κλάσματα, ανάλογα με την πολικότητά τους. Ένα μέρος αυτών βρίσκεται στο κλάσμα του μετώπου του διαλύτη από το διαχωρισμό των φωσφολιποειδών και πιο συγκεκριμένα στο κλάσμα PL₁, που εκλούστηκε από 0 έως τα 6min περίπου. Το κλάσμα αυτό ενώθηκε με τα NL από την TLC, εξατμίστηκε σε περιστρεφόμενο συμπυκνωτή κενού και αναδιαλύθηκε σε μικρό όγκο διαλύτη χλωροφόρμιο : μεθανόλη 1:1. Η ποσότητα που προέκυψε (περίπου 5.5mg) μ'αυτόν τον τρόπο, χρωματογραφήθηκε με πολλαπλές ενέσεις σε HPLC σε στήλη Spheredclone 5u NH₂ και με το ακόλουθο βαθμιδωτό σύστημα έκλουσης: Ακετονιτρίλιο (ACN) : μεθανόλη (M) 90:10 για τα πρώτα 7 λεπτά, μετατρέπεται σε ακετονιτρίλιο (ACN): μεθανόλη (M) 83:17 μέχρι τα 10 λεπτά, παραμένει ισοκρατικό έως τα 35 λεπτά και στη συνέχεια μετατρέπεται σε μεθανόλη (M) 100% έως τα 40 λεπτά και παραμένει μέχρι το τέλος του χρωματογραφήματος. Στο διαχωρισμό αυτό χρησιμοποιήθηκε ανιχνευτής υπεριώδους στα 208nm και ροή 1ml/min.

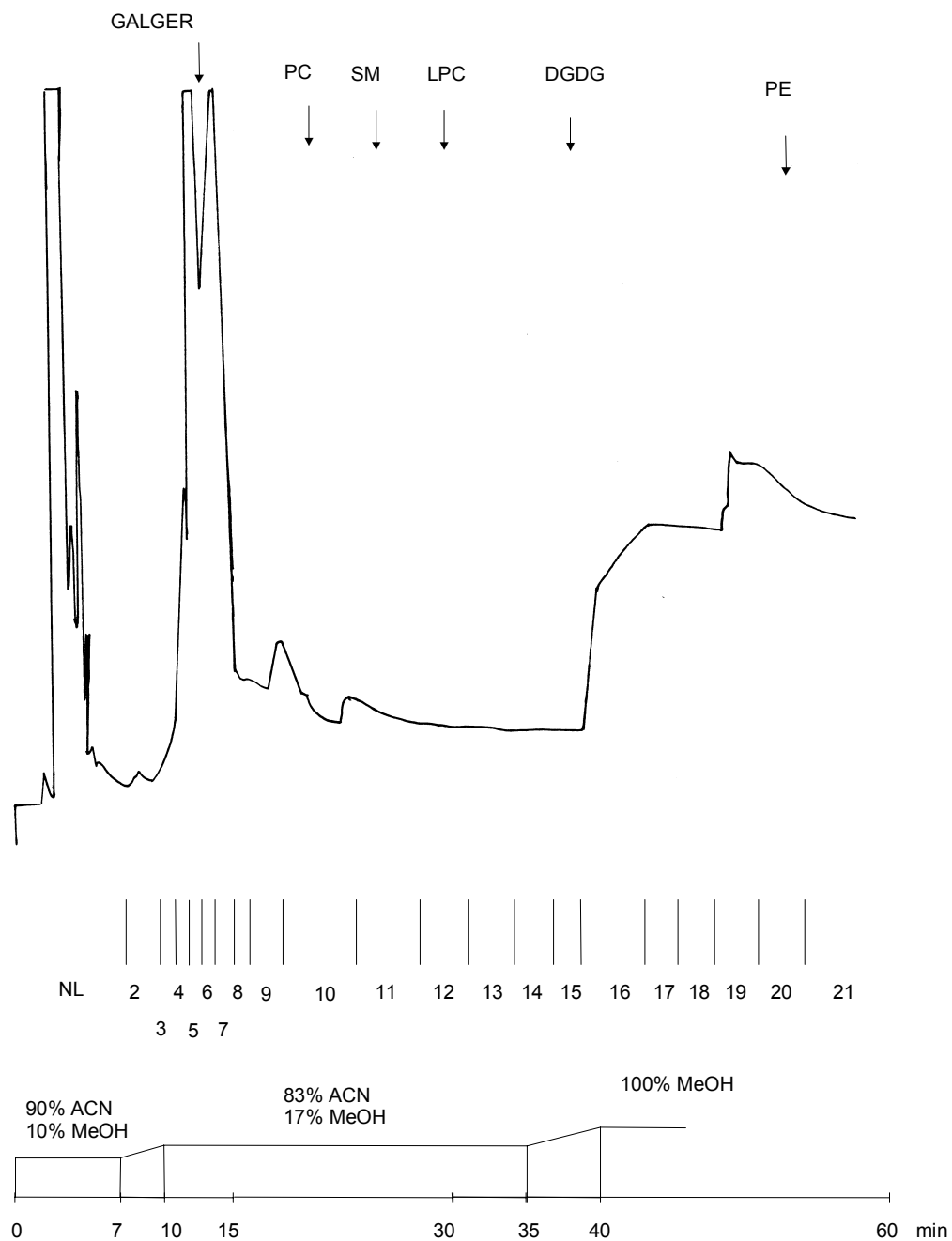
Τα γλυκολιποειδή συγκρατούνται ως ένα βαθμό από τη στήλη και εκλούνται σε διαφορετικούς χρόνους, με σειρά αυξανόμενης πολικότητας. Τα ουδέτερα λιποειδή που υπάρχουν δεν συγκρατούνται από τη στήλη, οπότε εκλούνται με το μέτωπο του διαλύτη, συλλέγονται σε κωνική φιάλη και φυλάσσονται για περαιτέρω διαχωρισμό.

Κατά το διαχωρισμό των γλυκολιποειδών ελήφθησαν 21 κλάσματα. Στη συνέχεια τα κλάσματα των ίδιων περιοχών των χρωματογραφημάτων HPLC ενώθηκαν και προέκυψαν τα δείγματα: G₁ έως G₂₁.

Κάθε ένα από τα παραπάνω κλάσματα επαναχρωματογραφήθηκε στις ίδιες συνθήκες, με σκοπό τον περαιτέρω καθαρισμό του από τις γειτονικές κορυφές.

Το κλάσμα G₁, το οποίο περιέχει τα ουδέτερα λιποειδή, φυλάσσεται για περαιτέρω διαχωρισμό.

Στο σχήμα 6.16. φαίνεται ένα χαρακτηριστικό χρωματογράφημα από το διαχωρισμό των γλυκολιποειδών.



Σχήμα 6.16. Χαρακτηριστικό χρωματογράφημα διαχωρισμού των γλυκολιποειδών του *Scytonema julianum* με HPLC σε στήλη Spherclone 5μ NH₂, όπου φαίνονται οι περιοχές έκλουσης των προτύπων ουσιών, καθώς και το αντίστοιχο βαθμιδωτό σύστημα έκλουσης.

Στον Πίνακα 6 φαίνονται οι χρόνοι έκλουσης των προτύπων ουσιών.

Πίνακας 6: Χρόνοι έκλυσης προτύπων ουσιών με τη μέθοδο διαχωρισμού των γλυκολιποειδών.

A/A	Τάξεις	Είδη	Χρόνοι έκλυσης
1	TG – MD DG–MD- MG	Τριγλυκερίδια – Μέτωπο διαλύτη Διγλυκερίδια – Μέτωπο διαλύτη Μονογλυκερίδια	4,9min
2	FA	Λιπαρά οξέα	5,5min
3	GALCER	Γαλακτοκερεβροζίτες	12–14min
4	PC	Φωσφατιδυλοχολίνη	18–20min
5	SM	Σφιγγομυελίνη	23min
6	LPC	Λυσοφωσφατιδυλοχολίνη	33min
7	DGDG	Διγαλακτοζυλοδιγλυκερίδια	40min
8	PE	Φωσφατιδυλοαιθανολαμίνη	52–54min

Στη συνέχεια τα κλάσματα G_2 έως G_{21} δοκιμάστηκαν για την ικανότητά τους να προκαλούν συσσώρευση πλυμένων αιμοπεταλίων κουνελιού ή/και να αναστέλλουν την προκαλούμενη από τον PAF και τη θρομβίνη συσσώρευση πλυμένων αιμοπεταλίων κουνελιού.

6.1.3.2. Βιολογική δραστικότητα των κλασμάτων των γλυκολιποειδών

Κατά τη διάρκεια της δοκιμασίας της ανασταλτικής ικανότητας των κλασμάτων χρησιμοποιήθηκε PAF $1,25 \times 10^{-10} M$, τελική συγκέντρωση. Όσα κλάσματα εμφάνισαν ανασταλτική ικανότητα έναντι της συσσώρευσης πλυμένων αιμοπεταλίων κουνελιού που προκαλείται από τον PAF, υπολογίστηκε το IC_{50} τους και στη συνέχεια δοκιμάστηκε στη συγκέντρωση αυτή η ικανότητά τους να αναστέλλουν και την προκαλούμενη από τη θρομβίνη συσσώρευση.

Στον Πίνακα 7 σημειώνεται η βιολογική δραστικότητα για κάθε κλάσμα γλυκολιποειδούς.

Πίνακας 7: Βιολογική δραστικότητα για κάθε κλάσμα γλυκολιποειδούς

Κλάσμα	Συσώρευση	Αναστολή	Περιοχή έκλουσης
G ₂	όχι	* *	γλυκολιποειδή
G ₃	+	όχι	γλυκολιποειδή
G ₄	όχι	όχι	γλυκολιποειδή
G ₅	όχι	όχι	γλυκολιποειδή
G ₆	όχι	όχι	GALCER
G ₇	όχι	*	GALCER
G ₈	όχι	*	Μεταξύ GALCER και PC
G ₉	όχι	*	PC
G ₁₀	όχι	* *	PC
G ₁₁	όχι	* *	SM
G ₁₂	+	όχι	Μεταξύ SM και LPC
G ₁₃	όχι	όχι	LPC
G ₁₄	+	όχι	Μεταξύ LPC και DGDG
G ₁₅	όχι	όχι	Μεταξύ LPC και DGDG
G ₁₆	+	όχι	DGDG
G ₁₇	+	όχι	DGDG
G ₁₈	όχι	όχι	Μεταξύ DGDG και PE
G ₁₉	όχι	όχι	Μεταξύ DGDG και PE
G ₂₀	όχι	όχι	Μεταξύ DGDG και PE
G ₂₁	όχι	όχι	PE

Συσώρευση πλυμένων αιμοπεταλίων κουνελιού που προκλήθηκε από PAF $1,25 \times 10^{-10}$ M τελική συγκέντρωση και με θρομβίνη 0.18 units/cuvette. *: κλάσμα που αναστέλλει την προκαλούμενη από τον PAF συσώρευση. όχι: κλάσμα χωρίς βιολογική δραστικότητα. +: κλάσμα που προκαλεί συσώρευση πλυμένων αιμοπεταλίων κουνελιού. * *: κλάσμα που αναστέλλει την από τον PAF και την θρομβίνη συσώρευση.

Από την βιολογική δοκιμασία προέκυψε ότι τα από τα 20 κλάσματα των γλυκολιποειδών που συλλέχθηκαν, τα έξη κλάσματα G_2 , G_7 , G_8 , G_9 , G_{10} , και G_{11} εμφανίζουν ανασταλτική δράση έναντι της συσσώρευσης των πλυμένων αιμοπεταλίων κουνελιού.

Αναλυτικά: Το κλάσμα G_2 εμφανίζει ανασταλτική δράση έναντι της συσσώρευσης των πλυμένων αιμοπεταλίων κουνελιού με την επίδραση PAF με $IC_{50\ PAF}=30\lambda$. Η συγκέντρωση των 30λ προκαλεί επίσης 82,5% αναστολή στην προκαλούμενη από τη θρομβίνη συσσώρευση, δηλαδή φαίνεται ότι το κλάσμα αυτό δεν είναι ειδικός αναστολέας του PAF.

Το κλάσμα G_3 προκαλεί δοσοεξαρτώμενη συσσώρευση αιμοπεταλίων με μορφή καμπύλης όμοια με εκείνη του PAF. Φαίνεται όμως ότι είναι λιγότερο δραστικό από τον PAF, αφού η τιμή EC_{50} είναι $1,65 \times 10^{-5}$ M, τελική συγκέντρωση (βασισμένη σε προσδιορισμό γλυκόζης). Το δραστικό αυτό γλυκολιποειδές δρα μέσω των υποδοχέων του PAF αφού: α) αιμοπετάλια απευαισθητοποιημένα στον PAF δεν συσσωρεύονται με την επίδραση του G_3 και αντίστροφα β) το BN52021, ένας ειδικός αναστολέας των υποδοχέων του PAF, αναστέλλει πλήρως την προκαλούμενη από το G_3 συσσώρευση.

Τα κλάσματα G_4 , G_5 , G_6 δεν παρουσιάζουν καμία βιολογική δραστικότητα.

Το κλάσμα G_7 εμφανίζει ανασταλτική δράση έναντι της συσσώρευσης των πλυμένων αιμοπεταλίων κουνελιού με την επίδραση PAF με $IC_{50\ PAF} 8,8 \times 10^{-6}$ M τελική συγκέντρωση (βασισμένη σε προσδιορισμό φωσφόρου). Η αναστολή της συσσώρευσης που προκαλεί το κλάσμα στη θρομβίνη είναι 0%, δηλαδή φαίνεται ότι είναι ειδικός αναστολέας του PAF.

Το κλάσμα G_8 εμφανίζει ανασταλτική δράση έναντι της συσσώρευσης των πλυμένων αιμοπεταλίων κουνελιού με την επίδραση PAF με $IC_{50\ PAF}=18\lambda$. Η αναστολή της συσσώρευσης που προκαλεί το κλάσμα στη θρομβίνη είναι 0%. Επειδή όμως η δραστικότητα του κλάσματος αυτού είναι αρκετά μικρότερη από εκείνη του G_7 , δεν αξιολογήθηκε για περαιτέρω διερεύνηση.

Το κλάσμα G_9 εμφανίζει ανασταλτική δράση έναντι της συσσώρευσης των πλυμένων αιμοπεταλίων κουνελιού με την επίδραση PAF με $IC_{50\ PAF}=30\lambda$. Η αναστολή της συσσώρευσης που προκαλεί το κλάσμα στη θρομβίνη είναι 0% και η δραστικότητα του κλάσματος αυτού είναι μικρότερη από εκείνη του G_7 και δεν διερευνήθηκε περαιτέρω.

Το κλάσμα G_{10} εμφανίζει ανασταλτική δράση έναντι της συσσώρευσης των πλυμένων αιμοπεταλίων κουνελιού με την επίδραση PAF με $IC_{50\ PAF}=40\lambda$. Η αναστολή της συσσώρευσης που προκαλεί το κλάσμα στη θρομβίνη είναι 100%, δηλαδή φαίνεται ότι δεν είναι ειδικός αναστολέας του PAF

Το κλάσμα G_{11} εμφανίζει ανασταλτική δράση έναντι της συσσώρευσης των πλυμένων αιμοπεταλίων κουνελιού με την επίδραση PAF με $IC_{50\ PAF}=15\lambda$. Η αναστολή της συσσώρευσης που προκαλεί το κλάσμα στη θρομβίνη είναι 100%, δηλαδή δεν είναι ειδικός αναστολέας του PAF.

Το κλάσμα G_{12} προκαλεί δόσοεξαρτώμενη συσσώρευση δια μέσου και του δρόμου του PAF διότι: α)απευαισθητοποιεί τα πλυμένα αιμοπετάλια κουνελιού ως προς την επίδραση του PAF β)απευαισθητοποιεί τα πλυμένα αιμοπετάλια κουνελιού ως προς την επίδραση της θρομβίνης και γ)η συσσώρευση που προκαλείται από το κλάσμα G_{12} αναστέλλεται πλήρως από τον ειδικό αναστολέα των υποδοχέων του PAF, το BN52021. Το EC_{50} του βασισμένο στον προσδιορισμό γλυκόζης έχει τιμή $0,91 \times 10^{-4}$ M, τελική συγκέντρωση.

Το κλάσμα G_{13} εμφανίζει ανασταλτική δράση έναντι της συσσώρευσης των πλυμένων αιμοπεταλίων κουνελιού με την επίδραση PAF με $IC_{50\ PAF}=30\lambda$.

Το κλάσμα G_{14} προκαλεί δόσοεξαρτώμενη συσσώρευση με μορφή καμπύλης όμοια με εκείνη του PAF δια μέσου του δρόμου του PAF, αφού απευαισθητοποιεί τα πλυμένα αιμοπετάλια κουνελιού ως προς την επίδραση του PAF και η συσσώρευση που προκαλείται από το κλάσμα G_{14} αναστέλλεται πλήρως από τον ειδικό αναστολέα των υποδοχέων του PAF, το BN52021.

Η τιμή EC_{50} για το κλάσμα G_{14} είναι $8,64 \times 10^{-5}$ M, τελική συγκέντρωση, βασισμένη σε προσδιορισμό γλυκόζης.

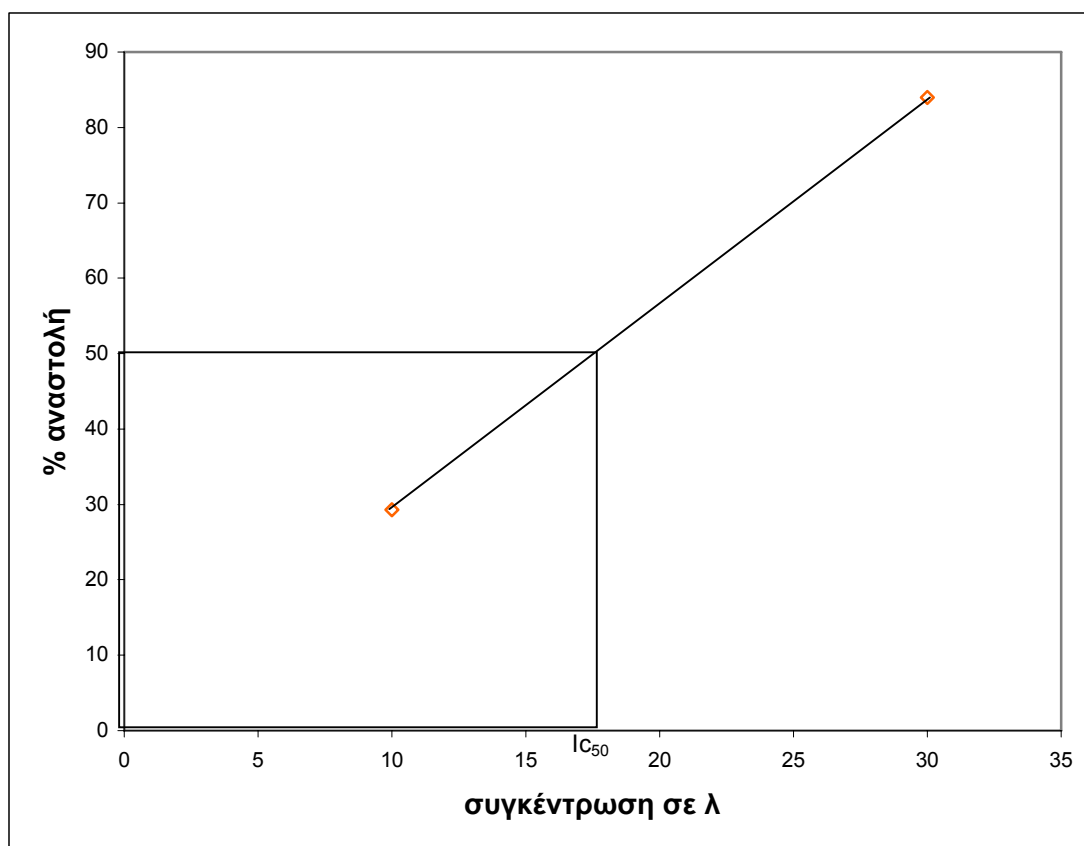
Το κλάσμα G_{15} δεν παρουσιάζει καμία βιολογική δραστικότητα.

Το κλάσμα G_{16} προκαλεί δόσοεξαρτώμενη συσσώρευση με μορφή καμπύλης όμοια με εκείνη του PAF. Η συσσώρευση που προκαλείται από το κλάσμα αυτό αναστέλλεται πλήρως από το BN52021, τον ειδικό αναστολέα των υποδοχέων του PAF, ενώ δεν επηρεάζεται καθόλου από την ινδομεθακίνη, που είναι ειδικός αναστολέας της συσσώρευσης μέσω του δρόμου του αραχιδονικού οξέος. Επιπλέον το G_{16} απευαισθητοποιεί τα αιμοπετάλια ως προς την επίδραση του PAF. Τα παραπάνω δεδομένα δείχνουν ότι το G_{16} δρα μέσω του δρόμου του PAF.

Το κλάσμα G_{17} προκαλεί και αυτό συσσώρευση αιμοπεταλίων με τα ίδια ακριβώς χαρακτηριστικά του προηγούμενου κλάσματος G_{16} . Για το λόγο αυτό, θεωρήθηκε ότι πρόκειται για το ίδιο δραστικό συστατικό και τα κλάσματα G_{16} και G_{17} ενώθηκαν σε ένα κλάσμα, G_{16+17} για περαιτέρω μελέτη.

Το κλάσμα G_{18} παρουσιάζει μία μικρή αλλαγή σχήματος που δεν αξιολογήθηκε ως σημαντική.

Τέλος, τα κλάσματα G_{19} , G_{20} , G_{21} δεν παρουσιάζουν καμία βιολογική δραστηριότητα.



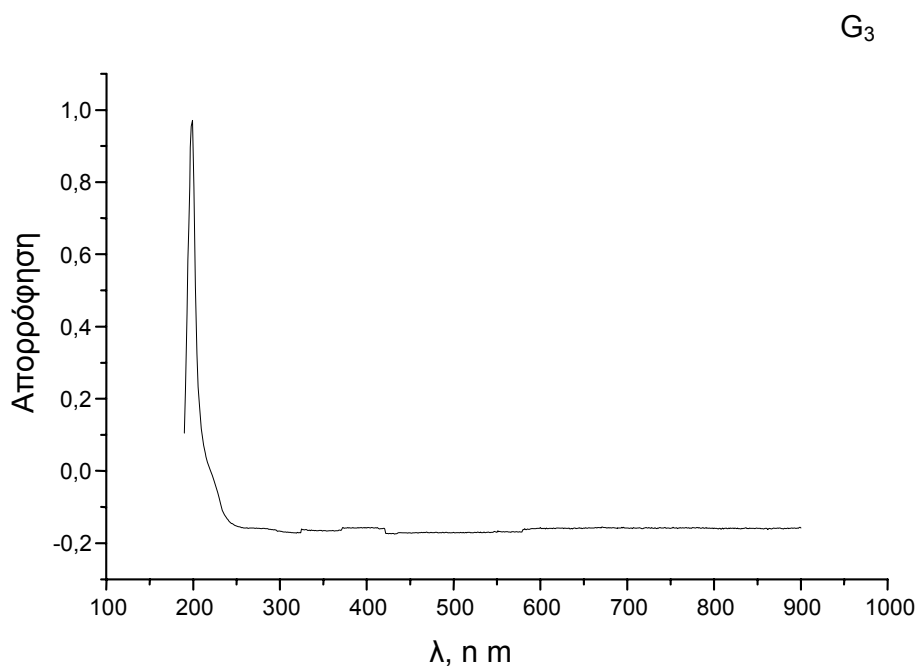
Σχήμα 6.17. Υπολογισμός IC_{50} του γλυκολιποειδούς G_8 του *Scytonema julianum*.

6.1.3.3. Φάσμα UV και προσδιορισμός φωσφόρου και γλυκόζης των κλασμάτων G_3 , G_7 , G_{12} , G_{14} , G_{16+17} .

Από τα κλάσματα των γλυκολιποειδών επιλέχτηκαν ορισμένα από τα πιο δραστηρικά και μελετήθηκαν περαιτέρω με χημικές μεθόδους, προκειμένου να διευκρινιστούν στοιχεία της δομής τους.

Στο κλάσμα G_3 έγινε προσδιορισμός γλυκόζης, ο οποίος βρέθηκε θετικός και βάσει αυτού έγινε και ο υπολογισμός της τιμής EC_{50} του κλάσματος.

Φάσμα UV του κλάσματος G_3 εμφάνισε μέγιστη απορρόφηση στα 199nm (Σχ.6.18).



Σχήμα 6.18. Φάσμα UV του κλάσματος G_3

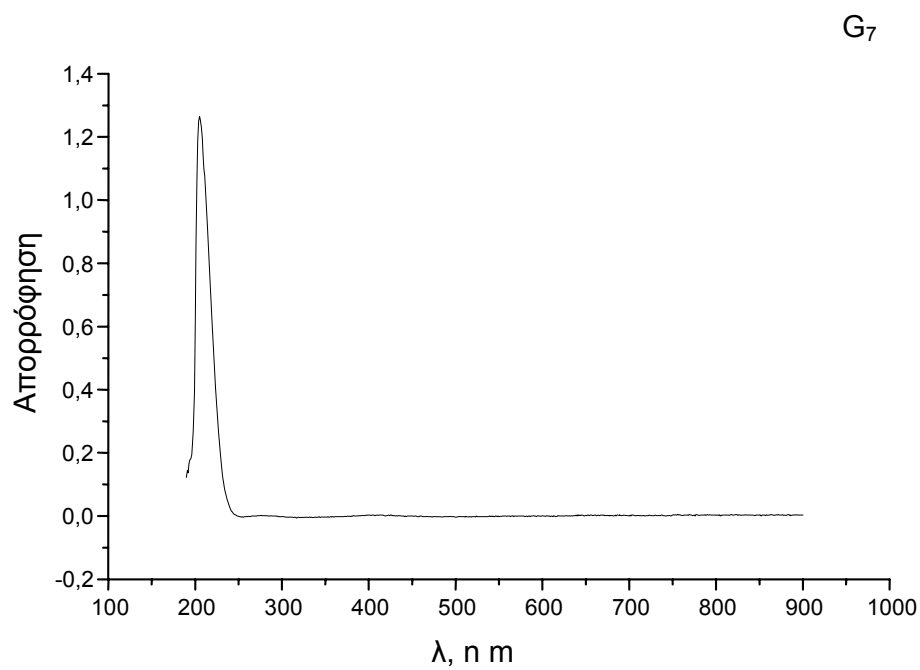
Στο κλάσμα G_7 έγιναν προσδιορισμοί γλυκόζης και φωσφόρου και βρέθηκαν θετικοί. Συγκεκριμένα, το G_7 περιέχει συνολικά 0,15μmol γλυκόζης και 0,09μmol φωσφόρου, δηλαδή πρόκειται για ένα φωσφο-γλυκο-λιποειδές, με αναλογία γλυκόζης προς φωσφόρο, 2 προς 1 περίπου.

Στον προσδιορισμό φωσφόρου βασίστηκε και ο υπολογισμός της τιμής IC_{50} του κλάσματος.

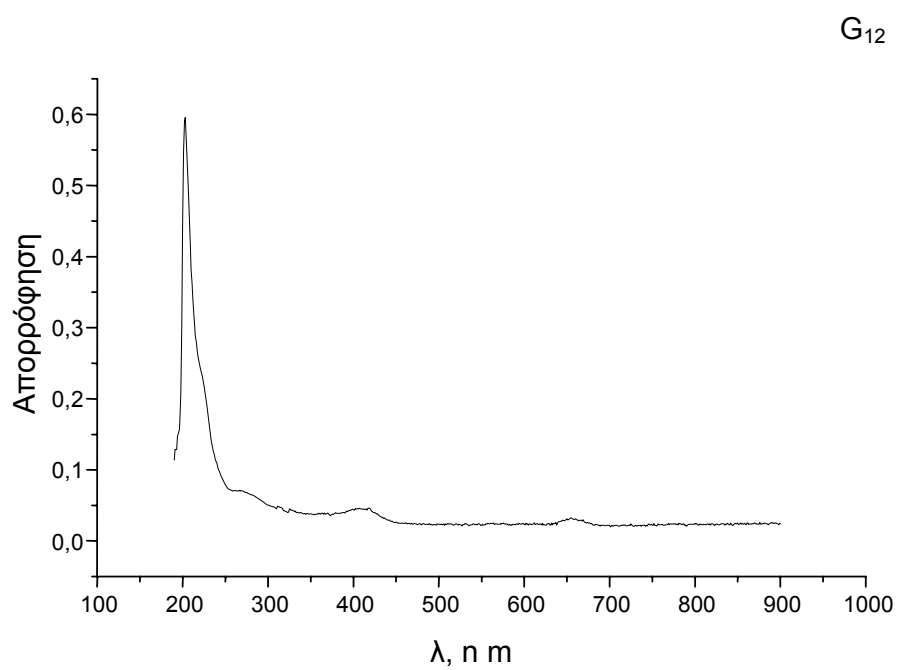
Το UV του κλάσματος G_7 έδειξε μέγιστη απορρόφηση στα 205nm και μία μικρή απορρόφηση στα 756nm (Σχ.6.19).

Στο κλάσμα G_{12} προέκυψαν επίσης θετικοί προσδιορισμοί γλυκόζης και φωσφόρου. Συνολικά περιέχει 0,196μmol γλυκόζης και 0,027μmol φωσφόρου, πρόκειται δηλαδή για ένα φωσφο-γλυκο-λιποειδές. Στον προσδιορισμό γλυκόζης βασίστηκε και ο υπολογισμός της τιμής EC_{50} του κλάσματος αυτού.

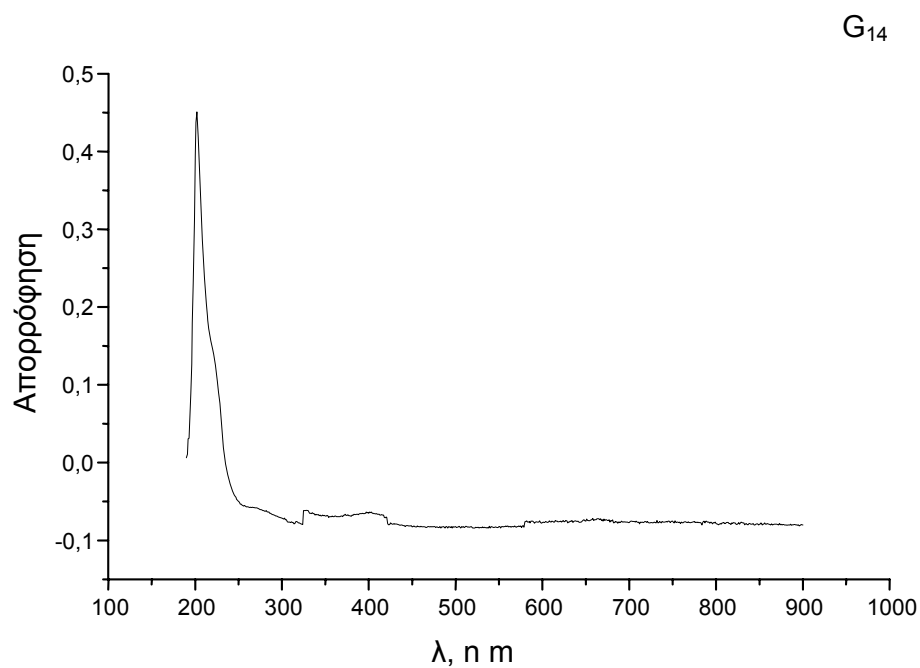
Η κύρια κορυφή απορρόφησης του φάσματος UV του G_{12} ήταν στα 203nm. Εμφανίστηκαν επίσης μικρότερης έντασης κορυφές στα 418, 655 και 800nm (Σχ.6.20).



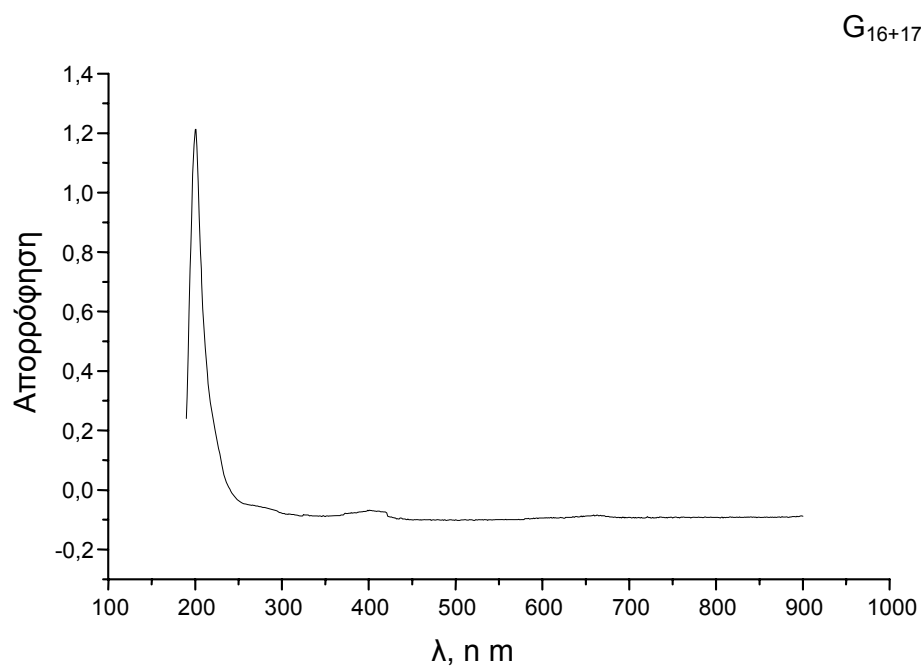
Σχήμα 6.19. Φάσμα UV του κλάσματος G_7



Σχήμα 6.20. Φάσμα UV του κλάσματος G_{12}



Σχήμα 6.21. Φάσμα UV του κλάσματος G_{14}



Σχήμα 6.22. Φάσμα UV του κλάσματος G_{16+17}

Στο κλάσμα G_{14} έγιναν προσδιορισμοί γλυκόζης και φωσφόρου και βρέθηκε ότι περιέχει συνολικά 0,288μmol γλυκόζης και 0,049μmol φωσφόρου. Από τα δεδομένα αυτά προκύπτει ότι το G_{14} είναι ένα φωσφο-γλυκο-λιποειδές. Στον προσδιορισμό γλυκόζης βασίστηκε και ο υπολογισμός της τιμής EC_{50} του κλάσματος αυτού.

Το UV φάσμα του κλάσματος G_{14} έδειξε κορυφή απορρόφησης στα 202nm (Σχ.6.21).

Τέλος, έγινε προσδιορισμός φωσφόρου στο ενωμένο κλάσμα G_{16+17} και βρέθηκε ότι περιέχει συνολικά 0,032μmol φωσφόρου.

Το UV φάσμα του κλάσματος G_{16+17} εμφάνισε απορρόφηση στα 201nm (Σχ.6.22).

6.1.3.4. Κατεργασία με ακετυλοϋδρολάση

Στα κλάσματα G_3 , G_{14} , και G_{16+17} έγινε κατεργασία με ακετυλοϋδρολάση σύμφωνα με τη μέθοδο ενζυμικής υδρόλυσης λιποειδών.

Επώαση του κλάσματος G_3 με ακετυλοϋδρολάση οδήγησε σε μερική απώλεια της δραστηρότητας του (60%) και ο παρατηρούμενος ρυθμός υδρόλυσής του είναι μικρότερος από εκείνον του PAF. Τα δεδομένα αυτά οδηγούν στο συμπέρασμα ότι υπάρχει ακετυλομάδα στο μόριό του, η οποία όμως δεν βρίσκεται σε γλυκερινικό σκελετό.

Επώαση του κλάσματος G_{14} με ακετυλοϋδρολάση οδήγησε σε σημαντικότερη μείωση της δραστηρότητάς του (80%), ο δε παρατηρούμενος ρυθμός υδρόλυσης είναι παρόμοιος με εκείνον του PAF.

Τα δεδομένα αυτά οδηγούν στο συμπέρασμα της ύπαρξης ακετυλομάδας, στο κλάσμα G_{14} , πιθανότατα σε γλυκερινικό σκελετό, η οποία παίζει καθοριστικό ρόλο στη βιολογική του δράση. Το γεγονός ότι αφ'ενός δεν χάνεται πλήρως η βιολογική δραστηρότητα του μορίου και αφ'ετέρου ότι ο ρυθμός υδρόλυσης είναι λίγο μικρότερος από εκείνον του PAF, υποδεικνύει την ύπαρξη ακετυλομάδας και σε άλλη θέση εκτός γλυκερινικού σκελετού.

Τέλος, η επώαση του κλάσματος G_{16+17} με ακετυλοϋδρολάση έδωσε ακριβώς τα ίδια αποτελέσματα με εκείνη του κλάσματος G_{14} .

6.1.3.5. Ήπια αλκαλική υδρόλυση – Ακετυλίωση

Τα πειράματα αυτά όπως περιγράφονται αναλυτικά στο κεφάλαιο των μεθόδων, έγιναν στα κλάσματα G_7 και G_{14} .

Συγκεκριμένα, ακετυλίωση του αρχικού κλάσματος G_7 , οδήγησε σε ένα μόριο με διαφορετική βιολογική δραστηρότητα. Ενώ αρχικά το G_7 προκαλούσε

αναστολή της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων, το ακετυλιωμένο ανάλογό του, προκαλεί το ίδιο συσσώρευση αιμοπεταλίων. Το στοιχείο αυτό υποδηλώνει την ύπαρξη τουλάχιστον μίας ελεύθερης υδροξυλομάδας. Αλκαλική υδρόλυση του αρχικού κλάσματος G_7 , οδήγησε σε δραματική μείωση της ανασταλτικής του ικανότητας έναντι της συσσώρευσης που προκαλείται από τον PAF.

Ακετυλίωση της χλωροφορμικής φάσης που προέκυψε από την παραπάνω υδρόλυση οδήγησε σε ένα μόριο που προκαλεί συσσώρευση, είναι όμως πολύ πιο δραστικό από το ακετυλιωμένο κλάσμα G_7 .

Τα δεδομένα αυτά υποδηλώνουν την ύπαρξη εστερικών δεσμών με λιπαρά οξέα στο κλάσμα G_7 , η αντικατάσταση δε των λιπαρών οξέων με ακετυλομάδες οδηγεί σε ένα μόριο με διαφορετική βιολογική δραστηριότητα και πιο συγκεκριμένα αυξάνει την ικανότητά του να προκαλεί συσσώρευση.

Ακετυλίωση του κλάσματος G_{14} οδήγησε σε αύξηση της δραστηριότητάς του για την πρόκληση συσσώρευσης των αιμοπεταλίων. Το αποτέλεσμα αυτό μας οδηγεί στο συμπέρασμα ότι στο μόριο G_{14} υπάρχει ελεύθερη τουλάχιστον μία υδροξυλομάδα.

Η αλκαλική υδρόλυση του G_{14} οδήγησε σε πλήρη απώλεια της δράσης του, ενώ η ακετυλίωση της χλωροφορμικής στοιβάδας από την παραπάνω υδρόλυση, έδωσε ένα μόριο, το οποίο προκαλεί μεν συσσώρευση των αιμοπεταλίων αλλά είναι λιγότερο δραστικό από το ακετυλιωμένο παράγωγο του G_{14} .

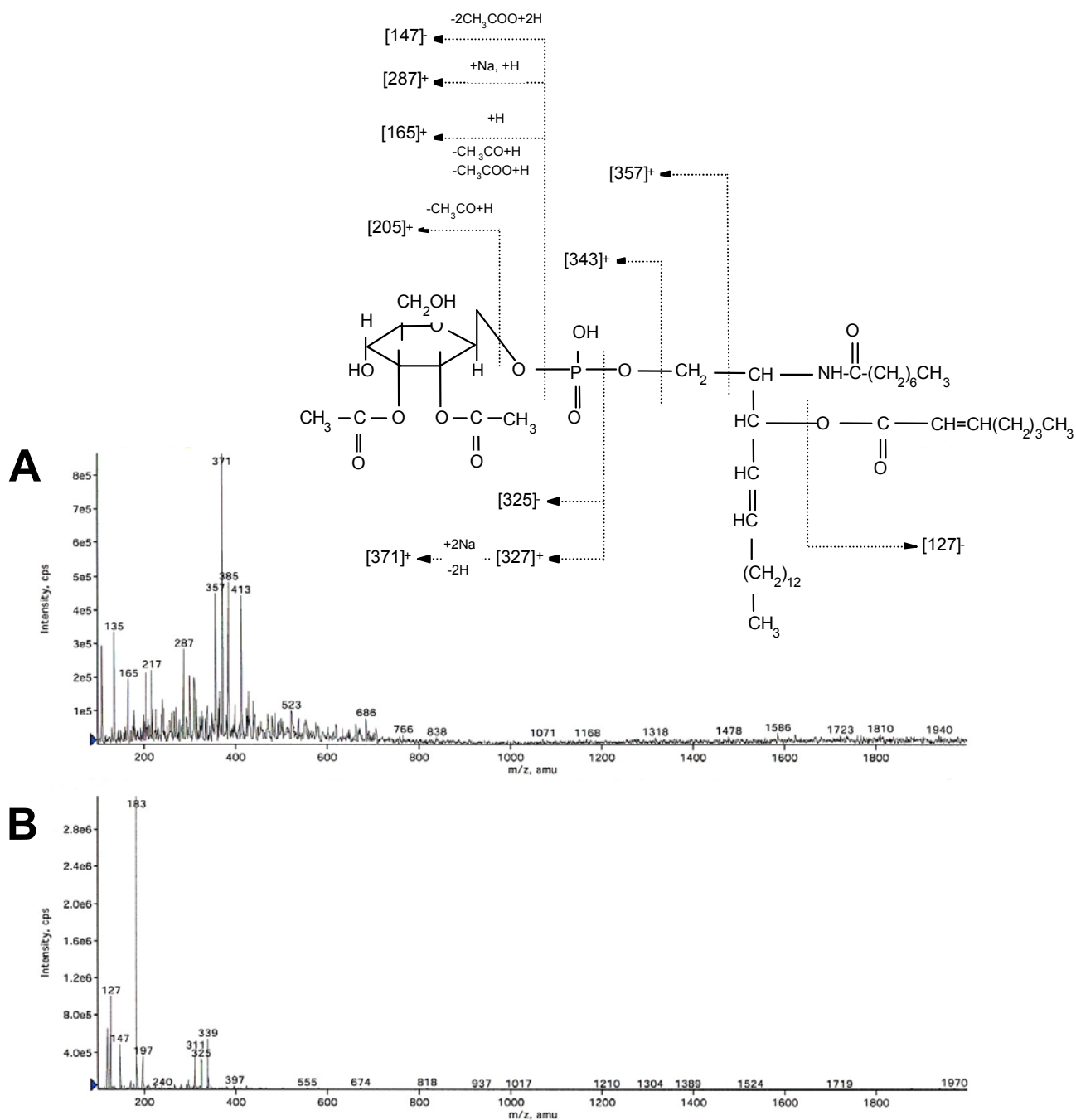
Τα αποτελέσματα αυτά οδηγούν στο συμπέρασμα ότι στο G_{14} υπάρχει τουλάχιστον ένας εστερικός δεσμός με λιπαρό οξύ, αντικατάσταση δε αυτού με ακετυλομάδα, μειώνει τη δραστηριότητα του μορίου.

6.1.3.6. Φάσμα MS – Διαλεύκανση δομής

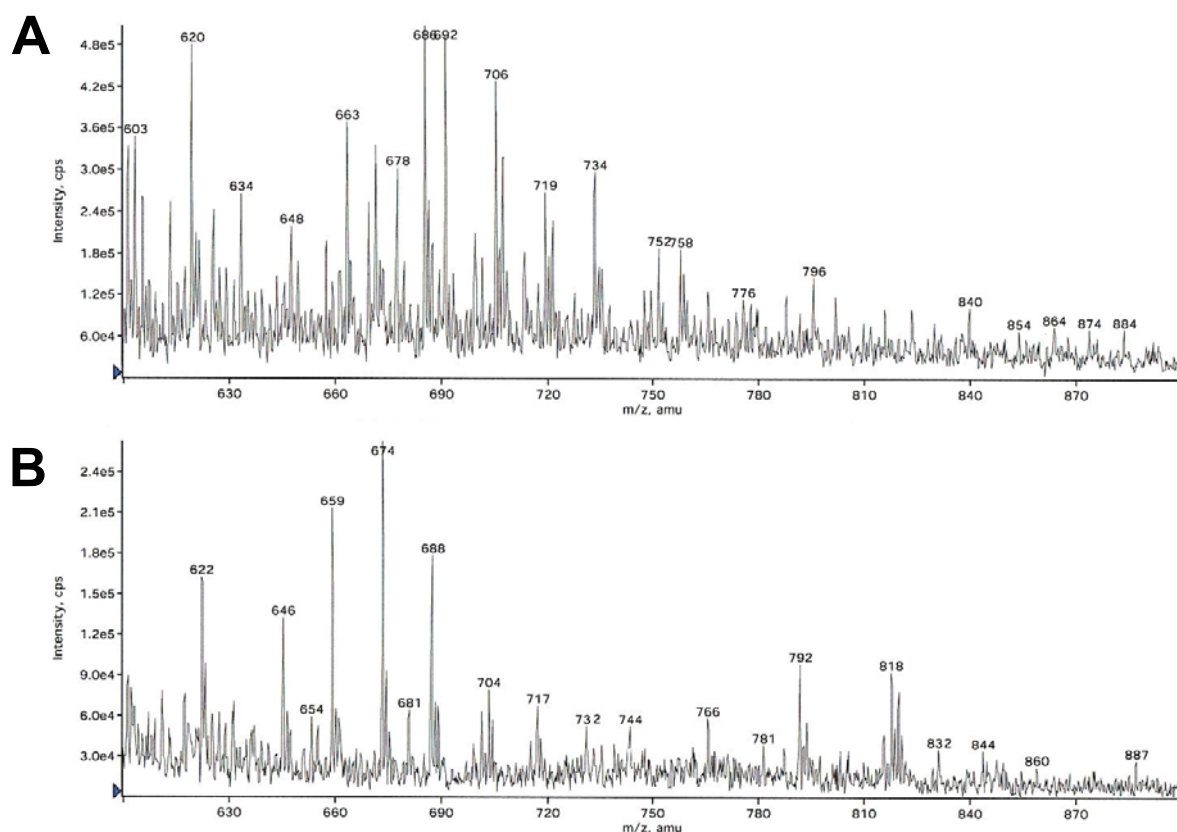
Στα κλάσματα τα οποία εμφάνισαν σημαντική βιολογική δραστηριότητα G_3 , G_7 , G_{14} και G_{16+17} ελήφθησαν φάσματα MS με σκοπό την περαιτέρω διαλεύκανση της δομής τους.

Το πρώτο κλάσμα που επιλέχθηκε είναι το G_7 , το οποίο φαίνεται να είναι ειδικός αναστολέας του PAF.

Από τα φάσματα ESI/MS παρατηρείται ότι το κυρίαρχο μοριακό είδος έχει μοριακό βάρος 861, αφού είναι παρόντα τα θετικά ιόντα $[M+Na]^+$ και $[2M+H]^+$ σε m/z 884 και 1723, αντίστοιχα καθώς επίσης και το αρνητικό ιόν σε m/z 860 (Σχ.6.23, 6.24). Το καρβοξυλικό ανιόν από την εστεροποιημένη ακυλομάδα παρατηρείται σε m/z 127, στο αρνητικό ES/MS (Σχ. 6.23).



Σχήμα. 6.23. Θετικά (A) και αρνητικά (B) ESI- MS του κλάσματος G₇ από τα γλυκολιποειδή του *Scytonema julianum*, m/z από 0-2000.



Σχήμα. 6.24. Θετικά (A) και αρνητικά (B) ESI- MS του κλάσματος G₇ από τα γλυκολιποειδή του *Scytonema julianum*, m/z από 600-900.

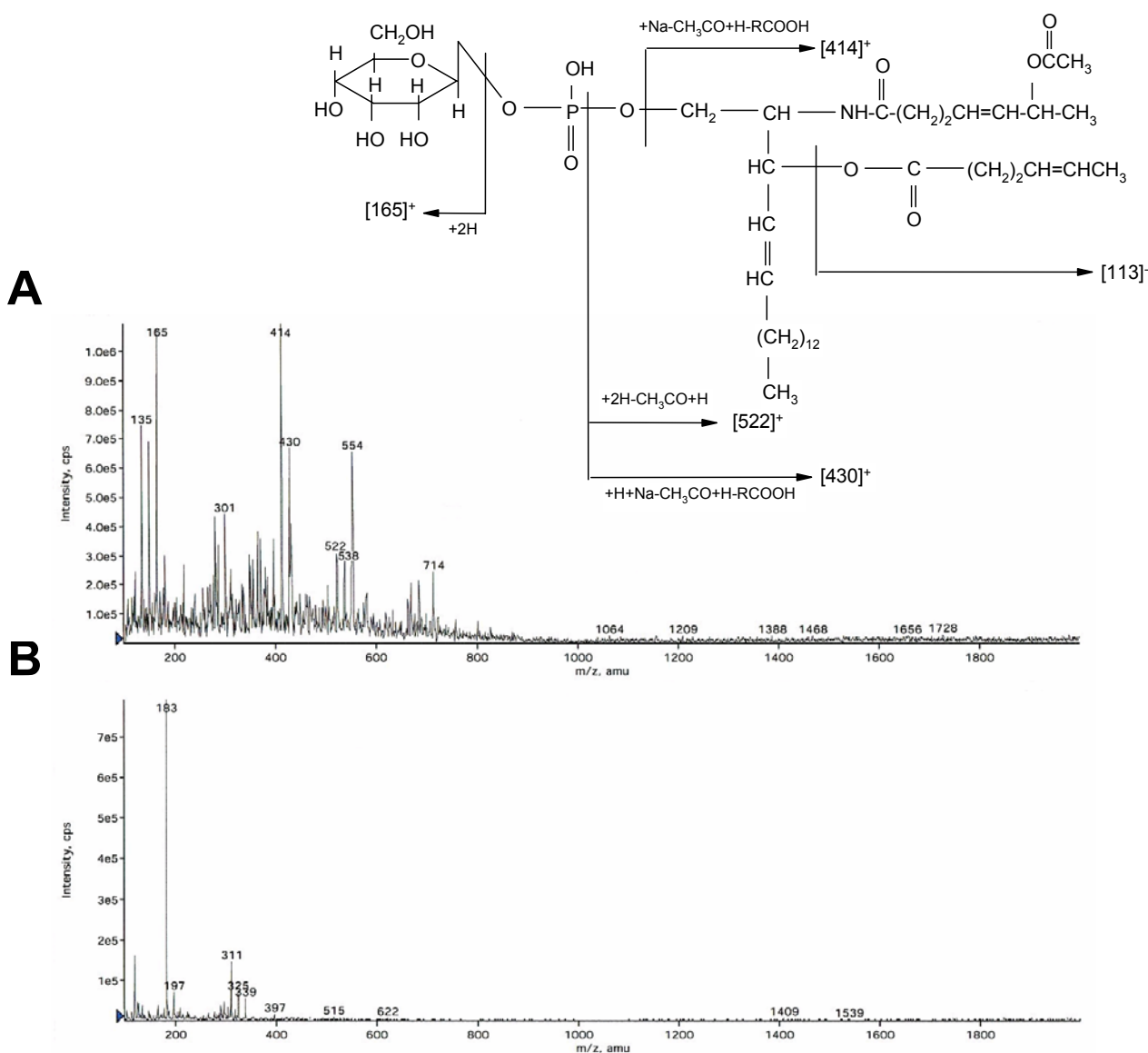
Επιπλέον, το φάσμα του δίνει τα θραύσματα σε m/z 734 $[M+4-RCOOH]^+$, σε m/z 752 $[M+H-RCO+H]^+$, σε m/z 758 $[M+Na-RCOO+H]^+$ και σε m/z 732 $[M-H-RCOOH]^-$, όπου όλα υποστηρίζουν την παρουσία του προαναφερόμενου λιπαρού οξέος (Σχ.6.23, 6.24).

Η παρουσία των δύο ακετυλομάδων στο σάκχαρο επιβεβαιώνεται από τα αρνητικά θραύσματα σε m/z 818 $[M-CH_3CO]^-$, σε m/z 744 $[M-2CH_3COO+H]^-$ και σε m/z 674 $[M-CH_3COO-RCOOH]^-$, καθώς και από τα θετικά ιόντα σε m/z 634 $[M+H-RCOOH-CH_3CO-CH_3COO+2H]^+$, σε m/z 678 $[M+H-RCOO+H-CH_3COO+H]^+$ και σε m/z 692 $[M+H-CH_3CO+H-RCOOH]^+$ (Σχ.6.24).

Η παρουσία των θετικών ιόντων στα m/z 648 $[634+14]$, 706 $[692+14]$, 840 $[M'+Na-CH_3COO+H]^+$ και 686 $[M'+Na-2CH_3CO+2H-RCOOH]^+$ καθώς και των αρνητικών ιόντων στα m/z 688 $[674+14]$, 832 $[818+14]$ και 704 $[M'-RCOOH-CH_3CO]^-$ υποδηλώνει την παρουσία και ενός άλλου μοριακού είδους, που συμβολίζεται ως M', με μοριακό βάρος 875 (Σχ. 6.24).

Η παρουσία της τελικής μονάδας του φωσφο-σακχάρου επιβεβαιώνεται από τα θετικά ιόντα στα m/z 165,205,287,327,343,357 και 371 (Σχ.6.23) και από

τα αρνητικά ιόντα στα m/z 147 και 325 (Σχ.6.23). Οι πορείες παραγωγής των παραπάνω θραυσμάτων παρουσιάζονται στο σχήμα 6.23.



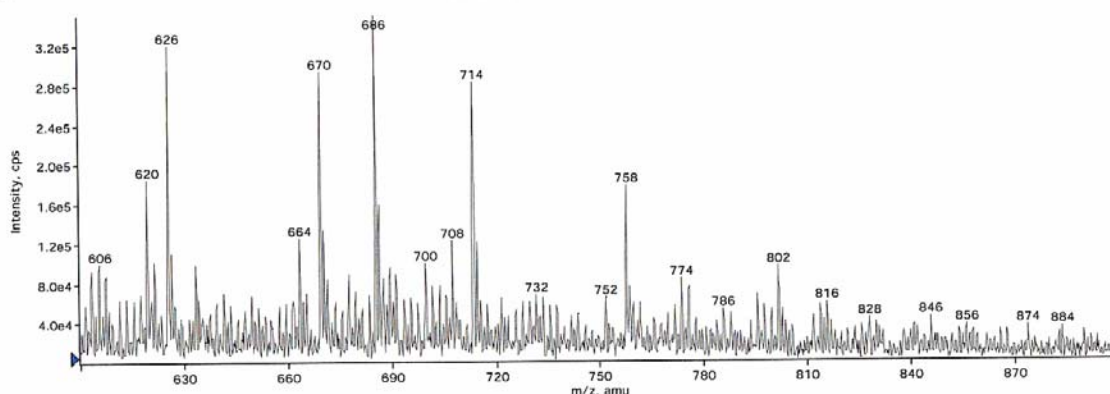
Σχήμα. 6.25. Θετικά (A) και αρνητικά (B) ESI- MS του κλάσματος G_3 από τα γλυκολιποειδή του *Scytonema julianum*, m/z από 0-2000.

Το ESI φάσμα του G_3 (Σχ.6,25.6,26) δίνει τα θετικά ιόντα σε m/z 828 $[M+Na]^+$, σε m/z 1656 $[2(M+Na)]^+$, σε m/z 786 $[M+Na-CH_3CO+H]^+$ και το αρνητικό ιόν σε m/z 804 $[M-H]^-$. Όλα τα θραύσματα αυτά υποστηρίζουν αφ'ενός τη δομή ενός λιποειδούς με μοριακό βάρος 805 και αφ'ετέρου την ύπαρξη μίας τουλάχιστον ακετυλομάδας. Θα πρέπει να τονιστεί ότι η

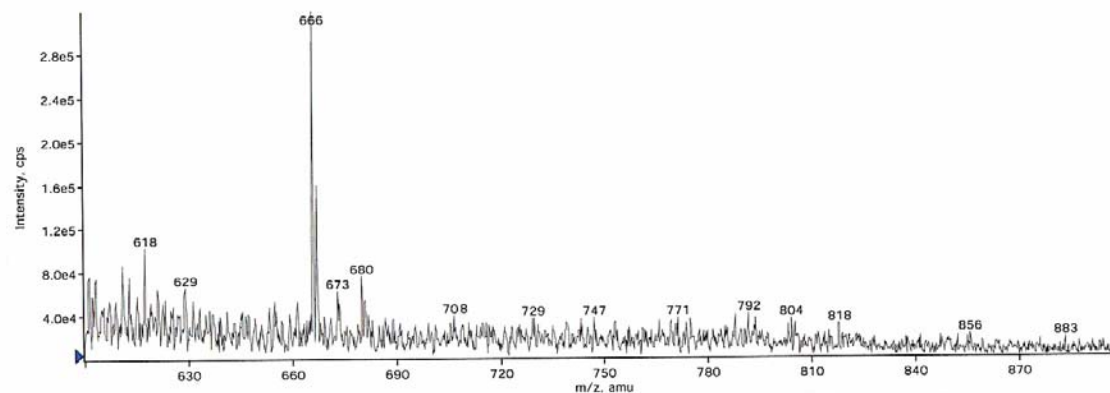
παρουσία της ακετυλομάδας υποστηρίζεται και από τα αποτελέσματα της κατεργασίας του κλάσματος με την ακετυλοϋδρολάση.

Τα αρνητικά ιόντα σε m/z 80 $[\text{HPO}_3]^-$ και σε m/z 97 $[\text{H}_2\text{PO}_4]^-$ καθώς και τα θετικά ιόντα σε m/z 81 $[\text{H}_2\text{PO}_3]^+$ και 99 $[\text{H}_3\text{PO}_4+\text{H}]^+$ (Σχ. 6.27) αποτελούν ισχυρή ένδειξη της παρουσίας της φωσφορικής ομάδας. Η μικρή ποσότητα του κλάσματος δεν επέτρεψε τη διασταύρωση των στοιχείων αυτών, με αποτελέσματα από προσδιορισμό φωσφόρου.

A



B

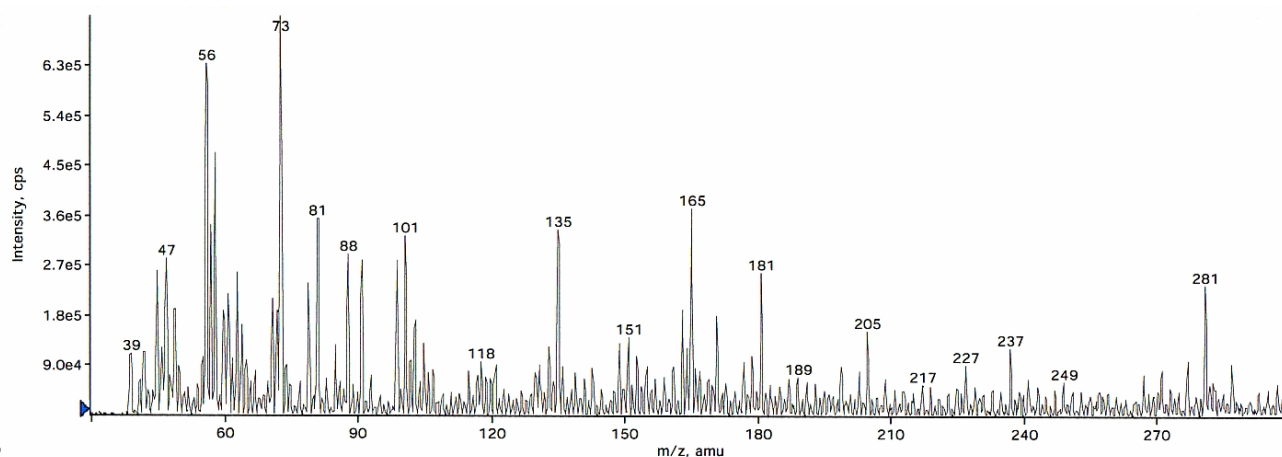


Σχήμα. 6.26. Θετικά (A) και αρνητικά (B) ESI- MS του κλάσματος G_3 από τα γλυκολιποειδή του *Scytonema julianum*, m/z από 600-900.

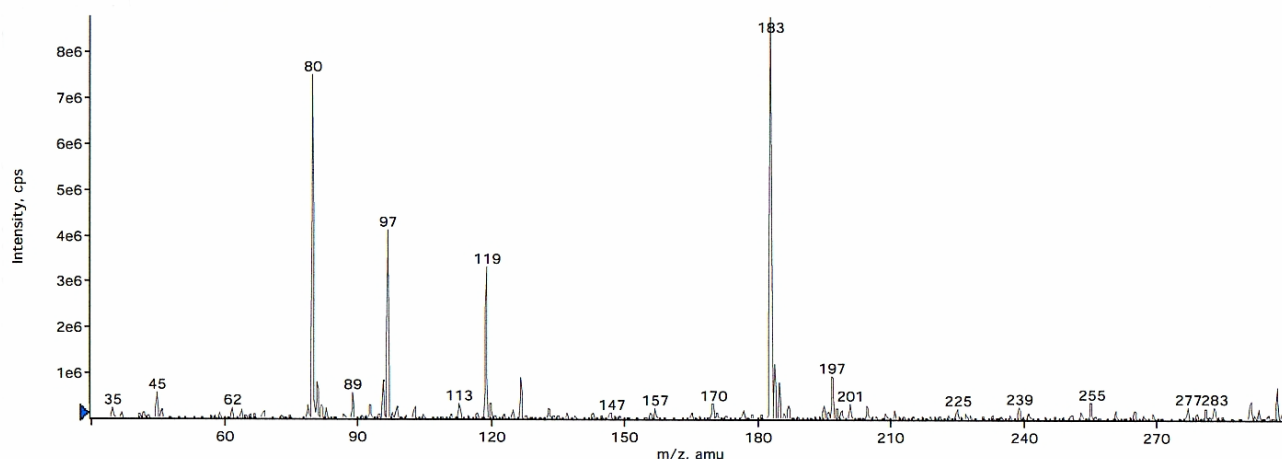
Η παρουσία των αρνητικών ιόντων σε m/z 113 $[\text{RCOO}]^-$ (Σχ. 6.26, 6.27), σε m/z 708 $[\text{M}-\text{RCO}]^-$, σε m/z 666 $[\text{M}-\text{RCO}-\text{CH}_3\text{CO}+\text{H}]^-$ και των θετικών θραυσμάτων σε m/z 732 $[\text{M}+\text{Na}-\text{RCO}+\text{H}]^+$ και σε m/z 714 $[\text{M}+\text{Na}-\text{RCOOH}]^+$ (Σχ. 6.26, 6.27), υποστηρίζει την παρουσία του λιπαρού οξέος στο λιποειδικό αυτό μόριο. Η ύπαρξη της τελικής μονάδας του σακχάρου επιβεβαιώνεται από το κυρίαρχο θετικό θραύσμα σε m/z 165. Τα άλλα κυρίαρχα θετικά ιόντα σε

m/z 554 $[M+Na-σάκχαρο+H-RCO+H]^+$ και σε m/z 538 $[M+Na-σάκχαρο+H-RCOO+H]^+$ πρέπει να προκύπτουν από τη διάσπαση της ομάδας του σακχάρου καθώς και της ακυλομάδας από το αρχικό μόριο (Σχ. 6.25). Επιπλέον, οι πορείες διάσπασης που οδηγούν στο σχηματισμό των θετικών θραυσμάτων σε m/z 522, σε m/z 429 και σε m/z 413 καθώς και η προτεινόμενη δομή του κλάσματος G_3 , εμφανίζονται στο σχήμα 6.25. Τέλος, η παρουσία των θετικών ιόντων σε m/z 816 $[M'+Na]^+$, σε m/z 774 $[M'+Na-CH_3CO+H]^+$, σε m/z 758 $[M'+Na-CH_3COO+H]^+$ και σε m/z 752 $[M'-CH_3CO+H]^+$ καθώς και των αρνητικών ιόντων σε m/z 792 $[M'-H]^-$, υποστηρίζουν την παρουσία και ενός άλλου μοριακού είδους (M') με μοριακό βάρος 793 (Σχ. 6.26).

A



B



Σχήμα. 6.27. Θετικά (A) και αρνητικά (B) ESI- MS του κλάσματος G_3 από τα γλυκολιποειδή του *Scytonema julianum*, m/Z από 0-300.

Από την ανάλυση των φασμάτων ESI των κλασμάτων G_{14} και G_{16+17} φαίνεται ότι πρόκειται για μοριακά είδη της ίδιας χημικής δομής, δηλαδή ενός φωσφο-γλυκο-λιποειδούς. Για το λόγο αυτό, η ανάλυση που ακολουθεί καθώς και η προτεινόμενη δομή, είναι κοινή για τα δύο αυτά κλάσματα. Άλλωστε πρέπει να επισημανθεί ότι τόσο οι χημικοί προσδιορισμοί, όσο και η βιολογική δραστηριότητα καθώς και τα αποτελέσματα της κατεργασίας με ακετυλοϋδρολάση, είναι ταυτόσημα και στα δύο κλάσματα.

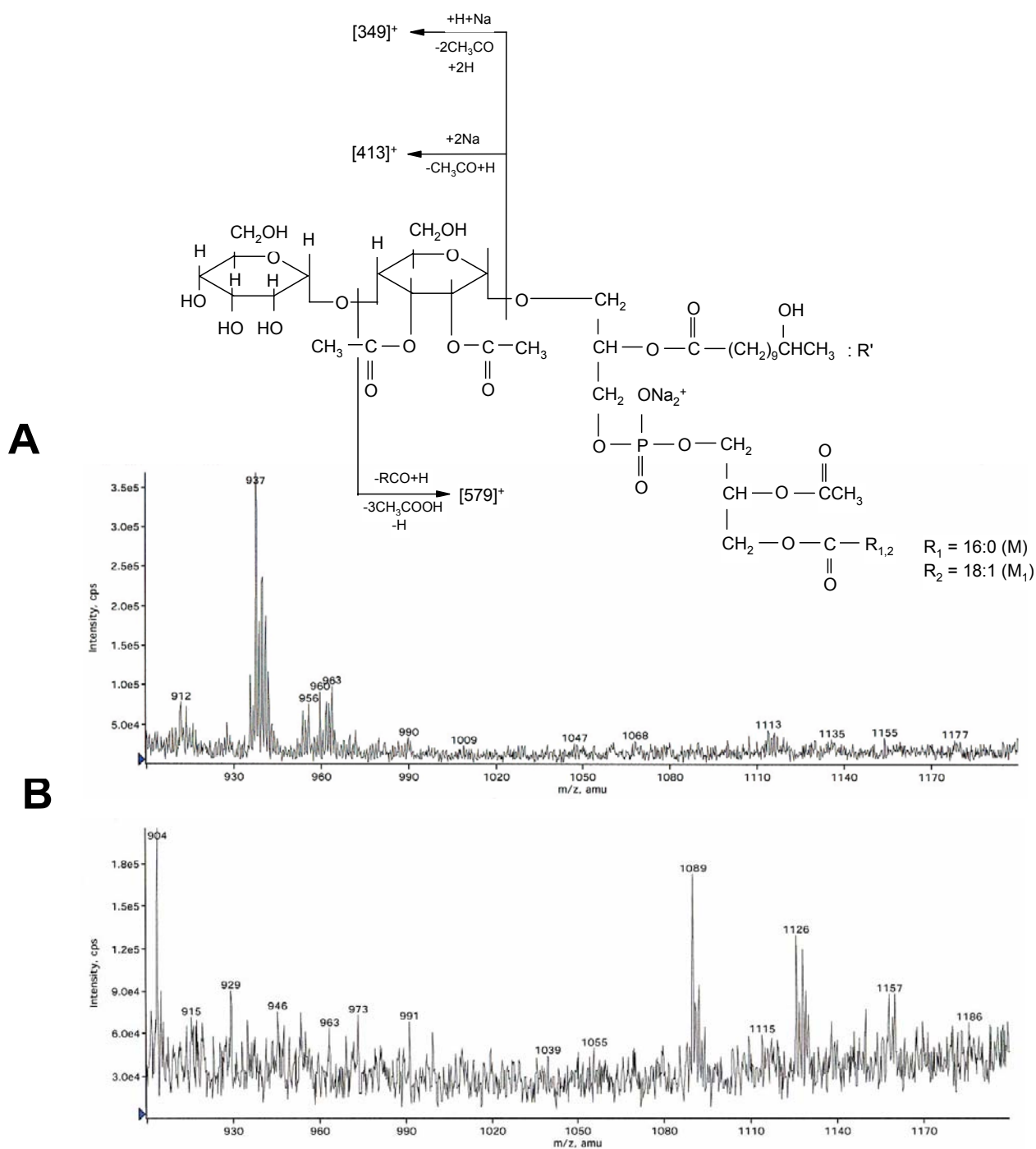
Από τα φάσματα ESI/MS παρατηρείται ότι τα κυρίαρχα μοριακά είδη M και M_1 έχουν μοριακό βάρος 1132 και 1158 αντίστοιχα. Πρόκειται κυρίως για μετά Na άλατα αυτών. Τα θετικά ιόντα που υποστηρίζουν τα δεδομένα αυτά εμφανίζονται σε m/z 1177 $[MNa_2]^+$, σε m/z 1155 $[MNa+H]^+$ και σε m/z 1181 $[M_1Na+H]^+$ (Σχ. 6.28).

Τα κλάσματα G_{14} και G_{16+17} πρέπει να είναι γλυκο-ανάλογα της φωσφατιδυλογλυκερόλης αφού εμφανίζονται τα αντίστοιχα χαρακτηριστικά θετικά ιόντα σε m/z 157 $[HOP(O)(ONa_2)OCH_3]^+$, σε m/z 213 $[CH_3OPC(O)(ONa_2)OCH=CH-CH_2OH]^+$ και σε m/z 217 $[HOP(O)(ONa_2)OCH_2CH(OH)CH_2OH]^+$. Επιπλέον, το θετικό ιόν που παρατηρείται σε m/z 199 αντιστοιχεί στο πέντε -ή έξι-υδροξυκυκλοφωσφονικό με δύο Na. Οι πορείες διάσπασης που οδηγούν στο σχηματισμό των θραυσμάτων 241, 257 και 259 απεικονίζονται στο σχήμα 6.29. Τα παραπάνω δεδομένα ενισχύονται τόσο από το γεγονός ότι η φωσφατιδυλογλυκερόλη είναι γνωστό κύριο λιποειδές στις μεμβράνες των κυανοβακτηρίων, όσο και από το ότι οι συγκεκριμένες διασπάσεις στο μόριό της έχουν ήδη αναφερθεί και από άλλους ερευνητές (Kim et al, Anal. Biochem 1999).

Επιπλέον παρατηρούνται τα θετικά θραύσματα σε m/z 1135 $[MNa_2-CH_3CO+H]^+$ και σε m/z 1113 $[MNa+H-CH_3CO+H]^+$ (Σχ. 6.28), τα οποία αφ'ενός ενισχύουν τα προτεινόμενα μοριακά βάρη, αφ'ετέρου υποδηλώνουν την παρουσία ακετυλομάδας. Σε ανάλογα συμπεράσματα οδηγούν και τα αρνητικά θραύσματα σε m/z 1157 $[M_1-H]^-$, σε m/z 1115 $[MNa_2-2H-CH_3COOH]^-$ και σε m/z 1089 $[M-CH_3CO]^-$ (Σχ. 6.28).

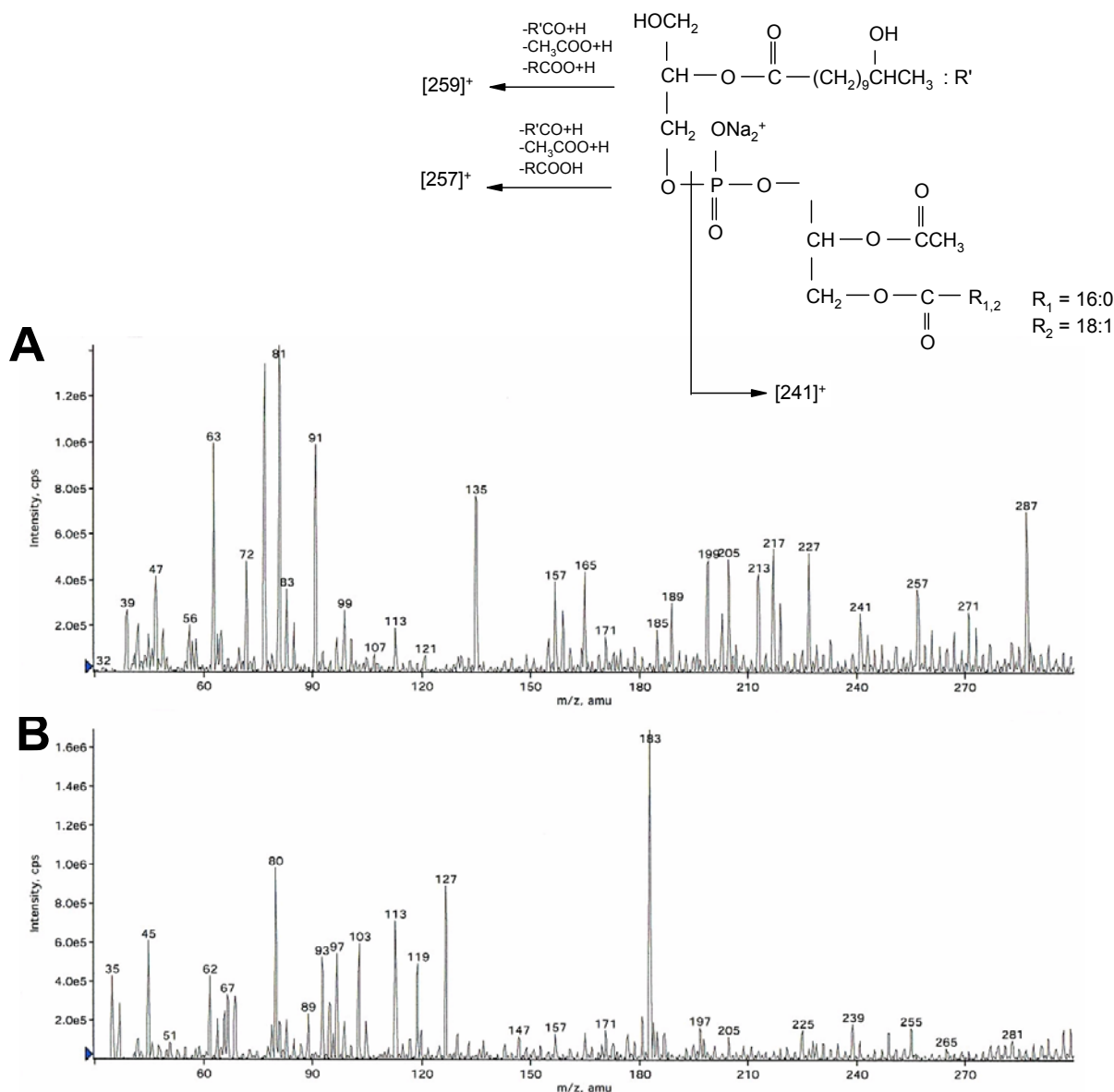
Η διαφορά ανάμεσα στο M και στο M_1 αφορά το λιπαρά οξύ που είναι εστεροποιημένο στο γλυκερινικό σκελετό. Στην περίπτωση του M πρόκειται για το 16:0 (αρνητικό θραύσμα 255), ενώ το M_1 έχει εστεροποιημένο το 18:1 (αρνητικό θραύσμα 281) (Σχ. 6.28).

Την παρουσία του $C_{16:0}$ στο μόριο του M ενισχύουν και τα θετικά θραύσματα σε m/z 939 $[MNa_2-R_1CO+H]^+$, σε m/z 855 $[MNa_2-R_1CO+H-CH_3CO+H-CH_3CO+H]^+$, σε m/z 837 $[MNa_2-R_1COOH-2CH_3CO+2H]^+$, σε m/z 813 $[MNa_2-R_1CO+H-3CH_3CO+3H]^+$, σε m/z 875 $[MNa+H-R_1CO+H-CH_3CO+H]^+$, σε m/z

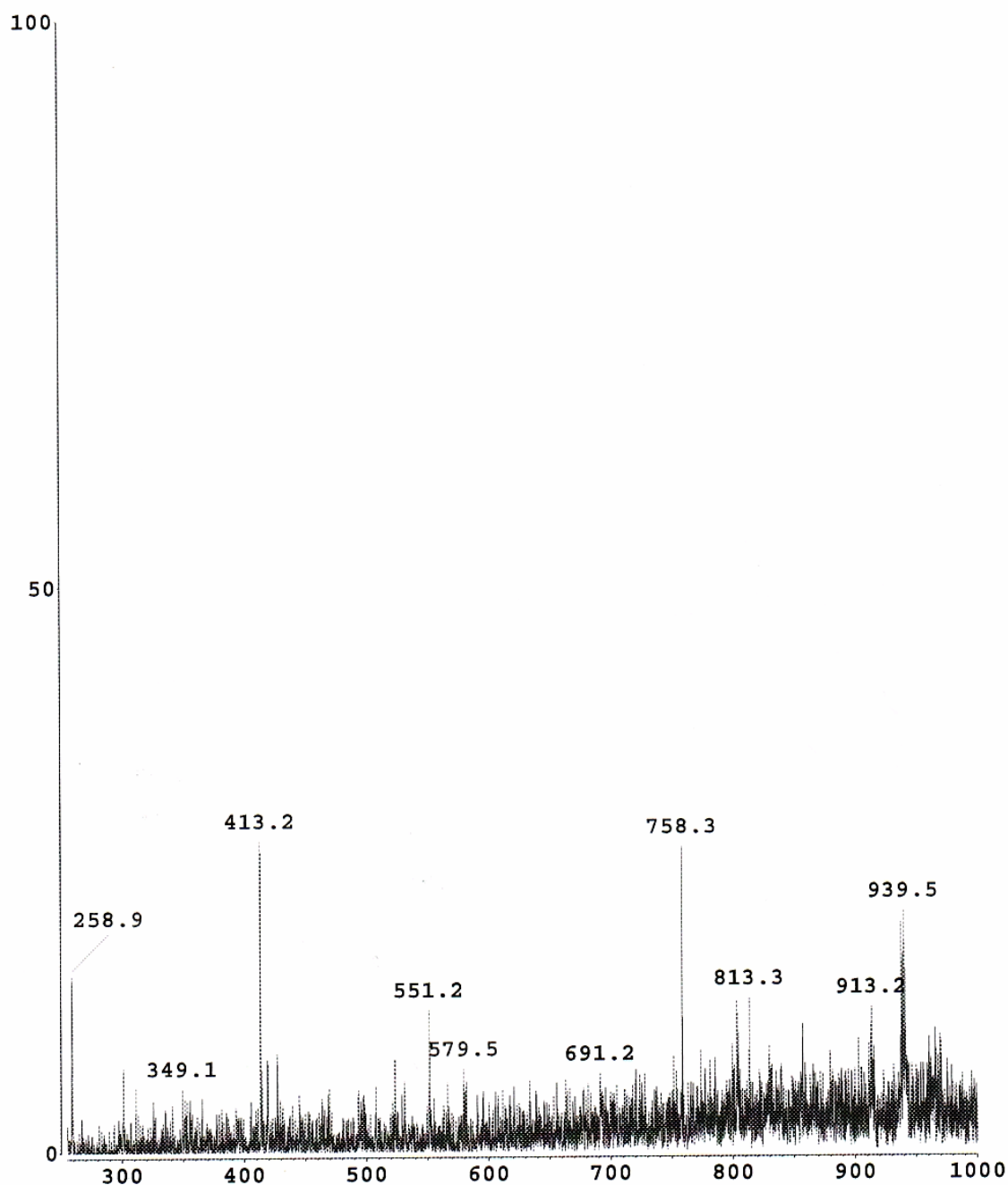


Σχήμα. 6.28. Θετικά (A) και αρνητικά (B) ESI- MS του κλάσματος G₁₄ από τα γλυκολιποειδή του *Scytonema julianum*, m/Z από 900-1200.

817 $[\text{MNa}+\text{H}-\text{R}_1\text{CO}+\text{H}-\text{CH}_3\text{CO}+\text{H}-\text{CH}_3\text{COO}+\text{H}]^+$ και σε m/z 759 $[\text{MNa}+\text{H}-\text{R}_1\text{CO}+\text{H}-\text{CH}_3\text{CO}+\text{H}-2\text{CH}_3\text{COO}+2\text{H}]^+$ (Σχ. 6.31). Τα αρνητικά ιόντα που υποστηρίζουν την παρουσία του $\text{C}_{16:0}$ φαίνονται στα m/z 875 $[\text{M}-\text{H}-\text{R}_1\text{COOH}]^-$ (Σχ. 6.31), m/z 915 (Σχ. 6.28), m/z 833 $[\text{M}-\text{H}-\text{R}_1\text{COOH}-\text{CH}_3\text{CO}+\text{H}]^-$, m/z 817 $[\text{M}-\text{H}-\text{R}_1\text{COOH}-\text{CH}_3\text{COO}+\text{H}]^-$, και στο m/z 791 $[\text{M}-\text{H}-\text{R}_1\text{COOH}-2\text{CH}_3\text{CO}+2\text{H}]^-$ (Σχ. 6.31). Τόσο τα θετικά θραύσματα σε m/z 855, 813, 875 και 817 όσο και τα αρνητικά σε m/z 833, 817 και 791 αποτελούν μία επιπλέον απόδειξη της ύπαρξης ακετυλομάδων στο M.



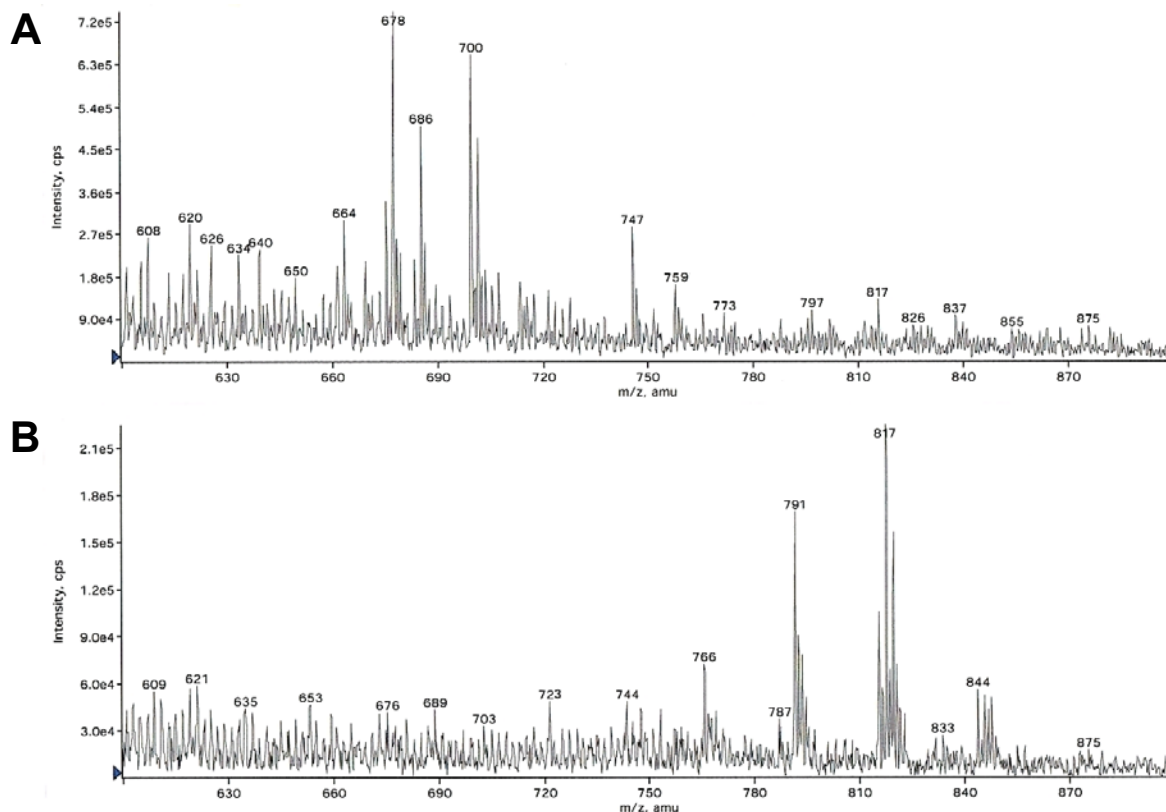
Σχήμα. 6.29. Θετικά (Α) και αρνητικά (Β) ESI- MS του κλάσματος G₁₄ από τα γλυκολιποειδή του *Scytonema julianum*, m/z από 0-300.



Σχήμα. 6.30. Θετικά ESI- MS του κλάσματος G₁₄ από τα γλυκολιποειδή του *Scytonema julianum*, m/z από 0-1000.

Η δομή του θετικού θραύσματος 939 που προτείνεται, επιβεβαιώνεται και από την MS/MS ανάλυση του ίδιου. Συγκεκριμένα, τα κυρίαρχα ιόντα σε m/z 659 και 681 αντιστοιχούν σε $[939\text{-Na+H-RCOOH-CH}_3\text{CO+H}]^+$ και σε $[939\text{-RCOOH-CH}_3\text{CO+H}]^+$. Το άλλο κυρίαρχο θραύσμα σε m/z 775 προκύπτει ως εξής $[939\text{-Na+H-2XCH}_3\text{CO+2H-CH}_3\text{CO+H}]^+$. Επιπλέον, το θραύσμα σε m/z 637 αντιστοιχεί σε $[939\text{-2Na+2H-RCOOH-CH}_3\text{CO+H}]^+$. Στο σχήμα 6.32 που

παρουσιάζεται η δομή του 939, εμφανίζονται και οι πορείες διάσπασης που οδηγούν στο σχηματισμό των θετικών ιόντων σε m/z 347, 405, 497 και 519.

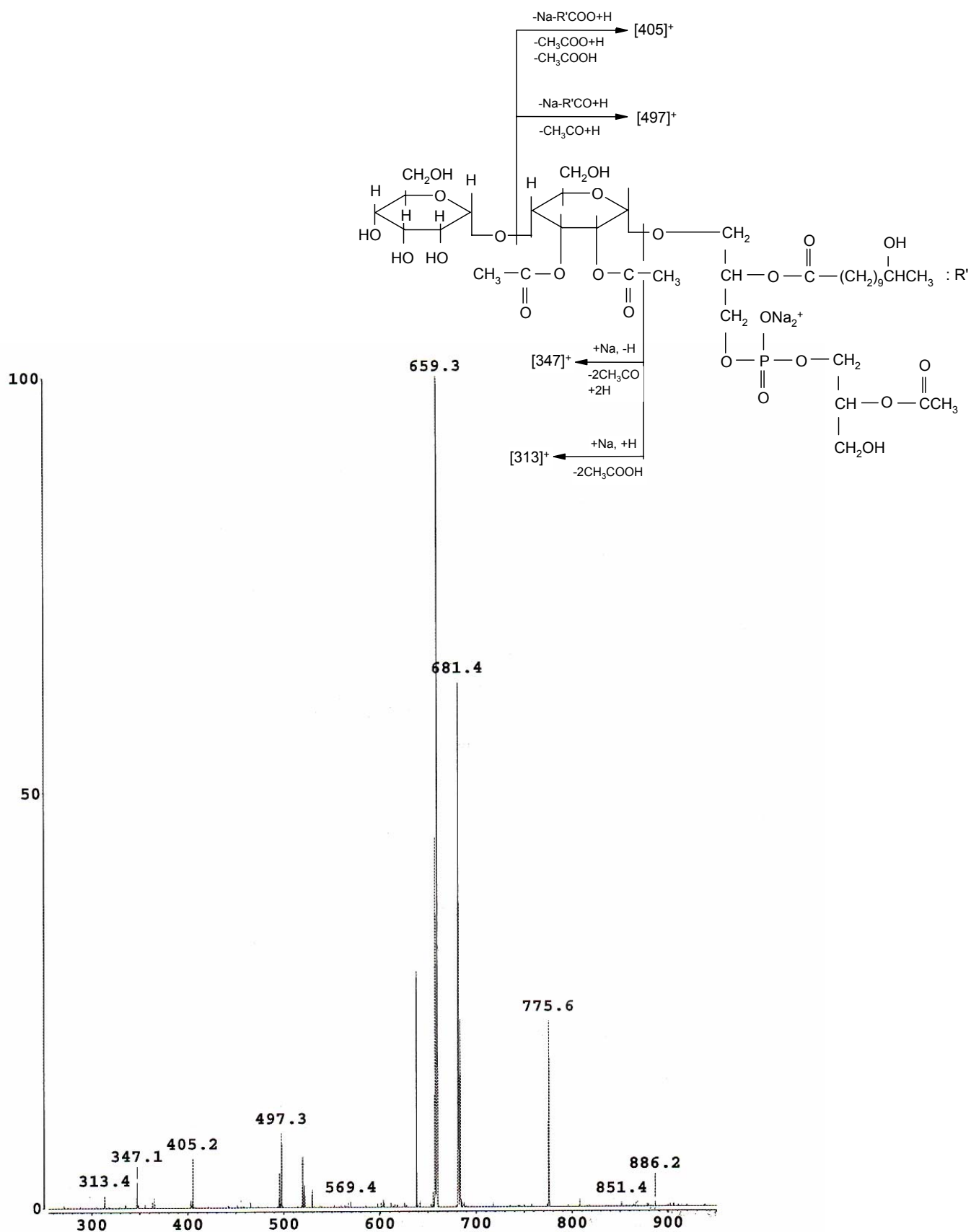


Σχήμα. 6.31. Θετικά (A) και αρνητικά (B) ESI- MS του κλάσματος G_{14} από τα γλυκολιποειδή του *Scytonema julianum*, m/z από 600-900.

Η παρουσία των μονάδων σακχάρων στο μόριο ενισχύεται από τα κάτωθι δεδομένα: Από το ESI/MS θετικό φάσμα τα ιόντα σε m/z 937 και 963, προκύπτουν από την απομάκρυνση του ακραίου μορίου σακχάρου καθώς και μίας ακετυλομάδας ως 60 unit από τα MNa_2^+ και $M_1Na_2^+$, αντίστοιχα.

Η απομάκρυνση της ακετυλομάδας ως 60unit είναι συνηθισμένη διάσπαση, όταν αυτή βρίσκεται σε μονάδα σακχάρου.

Από την απομάκρυνση από το M της ακραίας μονάδας σακχάρου καθώς και των τριών ακετυλομάδων με την μορφή $(-CH_3CO-)$ προκύπτει το αρνητικό ιόν σε m/z 843.



Σχήμα 6.32. MS /MS του θετικού ιόντος σε m/z 939 $[\text{M-N}+2\text{Na-RCO+H}]^+$

Όταν από τα αρχικά μόρια MNa^+ και M_1Na^+ απομακρύνονται και οι 2 ομάδες των σακχάρων προκύπτουν τα αντίστοιχα θετικά ιόντα σε m/z 747 και 773 καθώς και το αρνητικό ιόν σε m/z 723 [M-2σάκχαρο-].

Το θετικό ιόν σε m/z 579 αντιστοιχεί σε $[MNa\text{-ακραίο σάκχαρο-R}_1\text{CO+H-3CH}_3\text{COOH}]^+$ καθώς και σε $[M_1Na_2\text{-ακραίο σάκχαρο-R}_2\text{CO+H-3CH}_3\text{COOH}]^+$.

Επιπλέον, στο ESI/MS θετικό φάσμα, εμφανίζεται το ιόν σε m/z 165 το οποίο αντιστοιχεί στην ακραία μονάδα σακχάρου, καθώς και τα κυρίαρχα ιόντα σε m/z 413 που αντιστοιχούν στα δύο σάκχαρα με 2Na μετά την απομάκρυνση της ακετυλομάδας και σε m/z 349, που αντιστοιχεί στα δύο σάκχαρα με 1Na μετά την απομάκρυνση και των ακετυλομάδων και τέλος το ιόν σε m/z 313, το οποίο εμφανίζεται στο MS/MS του 939, που αντιστοιχεί στα δύο σάκχαρα με Na, μετά την απομάκρυνση των δύο ακετυλομάδων ως $2 \times 60\text{unit}$.

6.1.3.7. Σύνοψη αποτελεσμάτων των γλυκολιποειδών του *Scytonema julianum*

Το κλάσμα των γλυκολιποειδών του *Scytonema julianum* περιέχει σημαντικά βιολογικά δραστικά κλάσματα.

Το G_7 αξιολογήθηκε ως ο σημαντικότερος αναστολέας, αφ'ενός γιατί προκαλούσε αναστολή σε μικρή ποσότητα και αφ'ετέρου γιατί εμφάνιζε εξειδίκευση ως προς τον PAF. Η χρωματογραφική του συμπεριφορά καθώς και οι θετικοί προσδιορισμοί γλυκόζης και φωσφόρου οδηγούν στο συμπέρασμα ότι πρόκειται για ένα φωσφο-γλυκολιποειδές. Τα δε δεδομένα της ήπιας αλκαλικής υδρόλυσης και/ή ακετυλίωση δείχνουν ότι στο μόριό του έχει ελεύθερο τουλάχιστον ένα υδροξύλιο και εστεροποιημένο λιπαρό οξύ, αντικατάσταση δε αυτού με οξικό οξύ οδηγεί σε μόριο, που προκαλεί σημαντική συσσώρευση αιμοπεταλίων. Τα φάσματα MS επιβεβαίωσαν τα παραπάνω δεδομένα και έδειξαν ότι πρόκειται για ένα φωσφο-γλυκολιποειδές με σκελετό σφιγγοσίνης. Θα πρέπει να επισημανθεί ότι στη σφιγγοσίνη, η υδροξυλομάδα δεν είναι ελεύθερη αλλά εστεροποιημένη με λιπαρό οξύ (Antonopoulou S. et al, 2005).

Το G_3 προκαλούσε συσσώρευση αιμοπεταλίων μέσω του δρόμου του PAF. Η χρωματογραφική του συμπεριφορά και ο θετικός προσδιορισμός γλυκόζης οδηγεί στο συμπέρασμα ότι πρόκειται για γλυκολιποειδές, τα δε δεδομένα της επεξεργασίας του με ακετυλοϋδρολάση δείχνουν την ύπαρξη ακετυλομάδας σε διαφορετική θέση από εκείνη ενός γλυκερινικού σκελετού. Τα φάσματα MS έδειξαν ότι είναι ένα φωσφο-γλυκο-λιποειδές με σκελετό σφιγγοσίνης, η δε ακετυλομάδα βρίσκεται εστεροποιημένη στο υδροξύλιο της λιπαρής αλυσίδας

που είναι ενωμένη με αμιδικό δεσμό με το υπόλοιπο κομμάτι του μορίου (Antonopoulou S. et al, 2005).

Πρέπει να τονισθεί ότι η ύπαρξη σκελετού σφιγγοσίνης στα κλάσματα G_7 και G_3 δεν προκαλεί έκπληξη, γιατί ο σκελετός της σφιγγοσίνης είναι διαδεδομένος στη φύση και επιπλέον από την ανάλυση των φωσφολιπιδίων του *S. Julianum* βρέθηκε ακετυλο-σφυγγομυελίνη.

Τα κλάσματα G_{14} και G_{16+17} προκαλούσαν συσσώρευση μέσω του δρόμου του PAF. Η χρωματογραφική τους συμπεριφορά καθώς και οι θετικοί προσδιορισμοί γλυκόζης και φωσφόρου, αποδεικνύουν ότι πρόκειται για φωσφο-γλυκο-λιπιδιό. Τα αποτελέσματα από την επεξεργασία τους με ΑΗ υποδηλώνουν την ύπαρξη δύο διαφορετικών ακετυλομάδων, η μία σε σκελετό γλυκερίνης, η άλλη ομάδα δεν βρίσκεται σε σκελετό γλυκερίνης. Τα δεδομένα από την ήπια αλκαλική υδρόλυση και/ή ακετυλίωση δείχνουν την ύπαρξη ελεύθερου υδροξυλίου και εστεροποιημένου λιπαρού οξέος. Τα φάσματα MS έδειξαν ότι πρόκειται για γλυκο-ανάλογα της φωσφατιδυλο-γλυκερόλης. Η διαφορά τους έγκειται στο ότι το G_{14} περιέχει το λιπαρό οξύ 18:1, ενώ το G_{16+17} , το λιπαρό οξύ 16:0. Η παρουσία φωσφατιδυλογλυκερόλης ήταν αναμενόμενη, καθώς η PG είναι ένα από τα κύρια λιπιδιό της μεμβράνης των κυανοβακτηρίων (Antonopoulou S. et al, 2005).

6.1.4. Ουδέτερα λιποειδή (NL)

6.1.4.1. Διαχωρισμός ουδετέρων λιποειδών με HPLC

Προκειμένου να διαχωριστούν τα ουδέτερα λιποειδή στα συστατικά τους, το μέτωπο του διαλύτη, από το διαχωρισμό των γλυκολιποειδών με HPLC, το οποίο περιέχει όλο το κλάσμα των ουδετέρων λιποειδών, εξατμίστηκε σε περιστρεφόμενο συμπυκνωτή κενού και αναδιαλύθηκε με διαλύτη χλωροφόρμιο:μεθανόλη 1:1. Χρωματογραφήθηκε σε διαδοχικές ισόποσες ενέσεις, με HPLC σε στήλη ανάστροφης φάσης C-18 και το ακόλουθο βαθμιδωτό σύστημα έκλουσης ξεκινάει με: Μεθανόλη:νερό (M:W) 4:1, μέχρι τα 10min αλλάζει η σύσταση των διαλυτών σε ακετονιτρίλιο:μεθανόλη (ACN:M) 7:5, η οποία παραμένει ως τα 15min για να αλλάξει ως τα 25min σε ακετονιτρίλιο:τετραϋδροφουράνιο (ACN:THF) 99,5:0,5 η οποία παραμένει για 5min, για να αλλάξει ως τα 45min σε ισοπροπανόλη:ακετονιτρίλιο (IPA:ACN) 99:1 οπότε και παραμένει ως τα 65min. Χρησιμοποιήθηκε ανιχνευτής υπεριώδους στα 208nm και ροή 1ml/min. Οι χρόνοι που εκλούνται τα πρότυπα ουδετέρων λιποειδών φαίνονται στο σχήμα 6.33.

Τα ουδέτερα λιποειδή συγκρατούνται ως ένα βαθμό από τη στήλη και εκλούνται σε διαφορετικούς χρόνους, με σειρά μειούμενης πολικότητας.

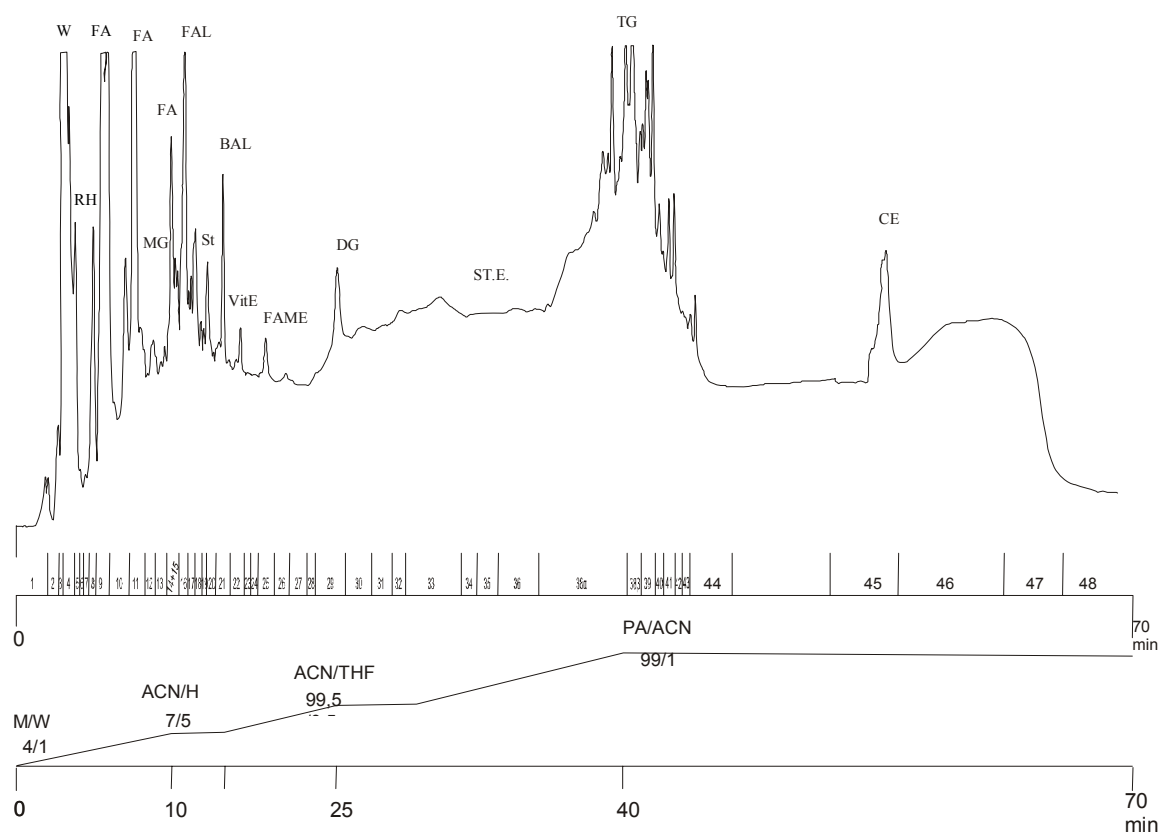
Μετά από διαδοχικές ισόποσες ενέσεις, ενώθηκαν οι ίδιες περιοχές από κάθε χρωματογράφημα και τελικά προέκυψαν 48 κλάσματα: NL₁, NL₂, NL₃, NL₄, NL₅, NL₆, NL₇, NL₈, NL₉, NL₁₀, NL₁₁, NL₁₂, NL₁₃, NL₁₄₊₁₅, NL₁₆, NL₁₇, NL₁₈, NL₁₉, NL₂₀, NL₂₁, NL₂₂, NL₂₃, NL₂₄, NL₂₅, NL₂₆, NL₂₇, NL₂₈, NL₂₉, NL₃₀, NL₃₁, NL₃₂, NL₃₃, NL₃₄, NL₃₅, NL₃₆, NL₃₇, NL_{38α}, NL_{38β}, NL₃₉, NL₄₀, NL₄₁, NL₄₂, NL₄₃, NL₄₄, NL₄₅, NL₄₆, NL₄₇, NL₄₈.

Στο σχήμα 6.33. φαίνεται ένα χαρακτηριστικό χρωματογράφημα από το διαχωρισμό των ουδετέρων λιποειδών, καθώς και η χρωματογραφική συμπεριφορά διαφόρων προτύπων ουσιών.

6.6.2.Βιολογική δοκιμασία των ουδετέρων λιποειδών

Από την βιολογική δοκιμασία προέκυψε ότι από τα 48 κλάσματα των ουδετέρων λιποειδών που συλλέχθηκαν, τα περισσότερα κλάσματα εμφανίζουν ανασταλτική δράση έναντι της συσσώρευσης των πλυμένων αιμοπεταλίων κουνελιού. Συγκεκριμένα τα κλάσματα που αναστέλλουν την συσσώρευση είναι τα εξής: NL₂, NL₇, NL₈, NL₉, NL₁₀, NL₁₁, NL₁₂, NL₁₃, NL₁₄₊₁₅, NL₁₆, NL₁₇, NL₁₈, NL₂₁, NL₂₂, NL₂₆, NL₂₇, NL₂₈, NL₂₉, NL₃₀, NL₃₁, NL₃₂, NL₃₃, NL₃₄, NL₃₅, NL₃₆, NL_{38α}, NL₃₉, NL₄₀, NL₄₅, NL₄₆, NL₄₇, NL₄₈.

Τα κλάσματα τα οποία δεν εμφανίζουν καμία βιολογική δραστηριότητα είναι τα NL₁, NL₃, NL₄, NL₅, NL₂₀, NL₂₃, NL₂₄, NL₂₅, NL_{38β}, NL₄₁, NL₄₂, NL₄₃ και NL₄₄.



Σχήμα 6.33. Χαρακτηριστικό χρωματογράφημα διαχωρισμού των ουδετέρων λιποειδών του *Scytonema julianum* με HPLC σε στήλη ανάστροφης φάσης, όπου φαίνονται και οι περιοχές έκλουσης των προτύπων ουσιών.

MG: Μονογλυκερίδια, RH: Υδρογονάνθρακες, FA: Λιπαρά οξέα, FAL: Λιπαρές αλκοόλες, VitE: Βιταμίνη E, BAL: Βουτυλική αλκοόλη, FAME: Μεθυλεστέρες λιπαρών οξέων, DG: Διγλυκερίδια, TG: Τριγλυκερίδια, CE: Εστέρες χοληστερόλης.

Τέλος, τα κλάσματα NL₆, NL₁₉, προκάλεσαν συσσώρευση των αιμοπεταλίων, η οποία όμως δεν ήταν δόσοεξαρτώμενη και επιπλέον ήταν μη αντιστρεπτή.

Πίνακας 8: Αποτελέσματα βιολογικής δοκιμασίας και χρωματογραφική συμπεριφορά των ουδετέρων λιποειδών του *Scytonema julianum*, μετά από διαχωρισμό με HPLC σε στήλη ανάστροφης φάσης C-18.

ΚΛΑΣΜΑ	ΣΥΣΣΩΡΕΥΣΗ	ΑΝΑΣΤΟΛΗ	ΠΕΡΙΟΧΗ ΕΚΛΟΥΣΗΣ
NL ₁	όχι	όχι	Στην περιοχή των W
NL ₂	όχι	*	Στην περιοχή των W
NL ₃	όχι	όχι	Στην περιοχή των W
NL ₄	όχι	όχι	Στην περιοχή των W

ΚΛΑΣΜΑ	ΣΥΣΣΩΡΕΥΣΗ	ΑΝΑΣΤΟΛΗ	ΠΕΡΙΟΧΗ ΕΚΛΟΥΣΗΣ
NL ₅	όχι	όχι	Μεταξύ W και RH
NL ₆	+	όχι	Μεταξύ W και RH
NL ₇	όχι	*	Στην περιοχή των RH
NL ₈	όχι	*	Στην περιοχή των RH
NL ₉	όχι	*	Στην περιοχή των FA
NL ₁₀	όχι	*	Στην περιοχή των FA
NL ₁₁	όχι	*	Στην περιοχή των FA
NL ₁₂	όχι	**	Στην περιοχή των mg
NL ₁₃	όχι	*	Στην περιοχή των mg
NL ₁₄₊₁₅	όχι	*	Στην περιοχή των FA
NL ₁₆	όχι	*	Στην περιοχή των FAL
NL ₁₇	όχι	*	Στην περιοχή των FAL
NL ₁₈	όχι	**	Στην περιοχή των FAL
NL ₁₉	+	όχι	Στην περιοχή των ST
NL ₂₀	όχι	όχι	Στην περιοχή των ST
NL ₂₁	όχι	*	Στην περιοχή των BAL
NL ₂₂	όχι	**	Στην περιοχή των BAL
NL ₂₃	όχι	όχι	Στην περιοχή των VitE
NL ₂₄	όχι	όχι	Στην περιοχή των FAME
NL ₂₅	όχι	όχι	Στην περιοχή των FAME
NL ₂₆	όχι	*	Στην περιοχή των FAME
NL ₂₇	όχι	*	Μεταξύ FAME και DG
NL ₂₈	όχι	**	Μεταξύ FAME και DG
NL ₂₉	όχι	*	Στην περιοχή των DG
NL ₃₀	όχι	*	Στην περιοχή των DG
NL ₃₁	όχι	*	Μεταξύ DG και ST.E
NL ₃₂	όχι	**	Μεταξύ DG και ST.E
NL ₃₃	όχι	**	Μεταξύ DG και ST.E

ΚΛΑΣΜΑ	ΣΥΣΣΩΡΕΥΣΗ	ΑΝΑΣΤΟΛΗ	ΠΕΡΙΟΧΗ ΕΚΛΟΥΣΗΣ
NL ₃₄	όχι	*	Στην περιοχή των ST.E
NL ₃₅	όχι	*	Στην περιοχή των ST.E
NL ₃₆	όχι	*	Στην περιοχή των ST.E
NL _{38α}	όχι	**	Στην περιοχή των TG
NL _{38β}	όχι	όχι	Στην περιοχή των TG
NL ₃₉	όχι	**	Στην περιοχή των TG
NL ₄₀	όχι	**	Στην περιοχή των TG
NL ₄₁	όχι	όχι	Στην περιοχή των TG
NL ₄₂	όχι	όχι	Στην περιοχή των TG
NL ₄₃	όχι	όχι	Στην περιοχή των TG
NL ₄₄	όχι	όχι	Στην περιοχή των TG
NL ₄₅	όχι	**	Στην περιοχή των CE
NL ₄₆	+	*	Στην περιοχή των CE
NL ₄₇	όχι	*	Μετά τους CE
NL ₄₈	όχι	*	Μετά τους CE

όχι: κλάσμα χωρίς βιολογική δραστικότητα *: κλάσμα που αναστέλλει την προκαλούμενη από τον PAF συσσώρευση.. +: κλάσμα που προκαλεί συσσώρευση πλυμένων αιμοπεταλίων κουνελιού. * *: κλάσμα που αναστέλλει την από τον PAF και την τη συσσώρευση.

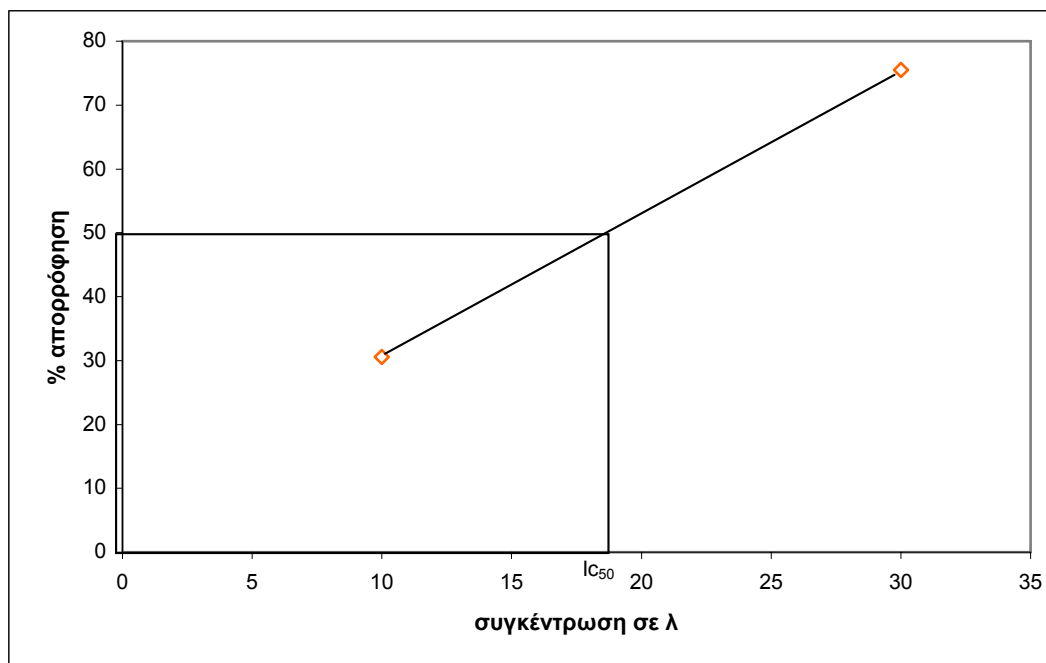
MG: Μονογλυκερίδια, RH: Υδρογονάνθρακες, FA: Λιπαρά οξέα, FAL: Λιπαρές αλκοόλες, VitE: Βιταμίνη E, BAL: Βατυλική αλκοόλη, FAME: Μεθυλεστέρες λιπαρών οξέων, DG: Διγλυκερίδια, TG: Τριγλυκερίδια, CE: Εστέρες χοληστερόλης, ST : στερόλες, ST.E : εστέρες στερολών, W : κηροί.

Στα κλάσματα που εμφάνιζαν σημαντική ανασταλτική δράση έναντι της συσσώρευσης πλυμένων αιμοπεταλίων κουνελιού με την επίδραση PAF $1,25 \times 10^{-10}$ M τελική συγκέντρωση, δοκιμάστηκαν διάφορες συγκεντρώσεις με σκοπό να υπολογισθεί η τιμή IC₅₀ για PAF. Στη συνέχεια, εκείνη η συγκέντρωση των κλασμάτων που αντιστοιχούσε στην τιμή IC₅₀, ελέγχθηκε ως προς την ικανότητά της να αναστέλλει και τη συσσώρευση που προκαλείται από τη θρομβίνη 0.18 units/cuvette.

Αναλυτικά, το κλάσμα NL₂ είχε τιμή IC_{50 (PAF)}=38λ, το NL₇ είχε τιμή IC_{50 (PAF)}=37λ, και το NL₈ είχε τιμή IC_{50 (PAF)}=37λ. Τα κλάσματα NL₉ και NL₁₀, τα οποία εκκλύονται στην περιοχή των λιπαρών οξέων είχαν τιμές IC_{50 (PAF)} 14λ και 15λ αντίστοιχα και επιπλέον δεν προκαλούσαν αναστολή στη συσσώρευση αιμοπεταλίων με την επίδραση της θρομβίνης. Τα δεδομένα αυτά συμβαδίζουν με αντίστοιχα της βιβλιογραφίας όπου αναφέρεται η ανασταλτική δράση συγκεκριμένων λιπαρών οξέων στην προκαλούμενη από τον PAF συσσώρευση των αιμοπεταλίων (Nunez, D. et al. 1990, Siafaka-Kapadai, A. et al. 1998).

Η περιοχή από το κλάσμα NL₁₁ έως το NL₁₈ εμφάνισε επίσης ανασταλτική δράση με τις εξής τιμές IC_{50 (PAF)} NL₁₁: 17λ, NL₁₂: 11λ, NL₁₃: 28λ, NL₁₄₊₁₅: 19λ, NL₁₆: 20λ, NL₁₇: 18λ και NL₁₈: 17λ. Τα πιο δραστικά κλάσματα ήταν το NL₁₂, το οποίο προκάλεσε και 30% αναστολή στην προκαλούμενη από τη θρομβίνη συσσώρευση και το NL₁₈, το οποίο ανέστειλε κατά 90% τη συσσώρευση υπό την επίδραση θρομβίνης. Καθότι, κανένα από τα δύο κλάσματα δεν είναι ειδικός αναστολέας του PAF, δεν προχώρησε η περαιτέρω διερεύνηση αυτών.

Στο σχήμα 6.34. παρουσιάζεται ένα χαρακτηριστικό παράδειγμα υπολογισμού της τιμής IC_{50 (PAF)} για το κλάσμα NL₁₆.



Σχήμα 6.34. Υπολογισμός IC₅₀ του ουδέτερου λιποειδούς NL₁₆ του *Scytonema julianum*.

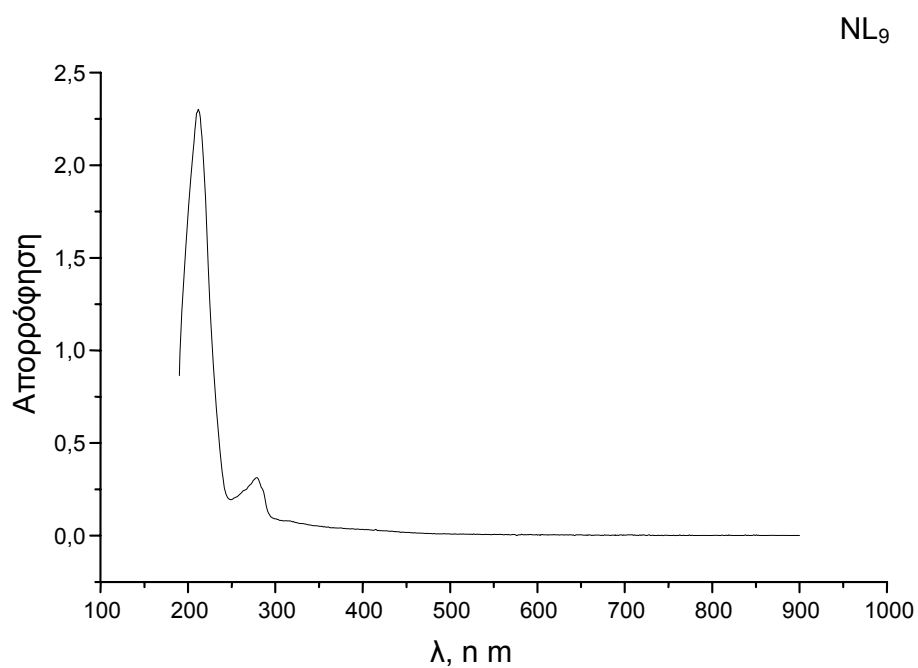
Το κλάσμα NL₂₁ είχε τιμή IC_{50 (PAF)} 30λ, ενώ το αμέσως επόμενο κλάσμα NL₂₂ ήταν πολύ πιο δραστικό με IC_{50 (PAF)}=8λ. Επιπλέον το κλάσμα NL₂₂ προκαλούσε 27% αναστολή στη θρομβίνη και άρα δεν εμφανίζει εξειδικευμένη ανασταλτική δράση έναντι του PAF.

Η περιοχή από το κλάσμα NL₂₆ έως το NL₄₀, δηλαδή η περιοχή όπου εκκλύονται διγλυκερίδια, εστέρες στερολών και τριγλυκερίδια, εμφάνισε ανασταλτική δράση με τις ακόλουθες τιμές IC_{50 (PAF)} : NL₂₆:19λ, NL₂₇:12λ, NL₂₈:14λ, NL₂₉:19λ, NL₃₀:14λ, NL₃₁:20λ, NL₃₂:8λ, NL₃₃:6λ, NL₃₄:9λ, NL₃₅:8λ, NL₃₆:8λ, NL_{38α}:5λ, NL₃₉:18λ και NL₄₀:22λ. Τα πιο δραστικά κλάσματα ήταν το NL₂₇, το οποίο δεν ανέστειλε την προκαλούμενη από τη θρομβίνη συσσώρευση αιμοπεταλίων, το NL₂₈, το οποίο προκάλεσε 30% αναστολή στη δράση της θρομβίνης και τέλος τα κλάσματα NL₃₂, NL₃₃, NL_{38α}, NL₃₉, NL₄₀, που ανέστειλαν πλήρως (100%) τη συσσώρευση υπό την επίδραση της θρομβίνης. Από τα παραπάνω αποτελέσματα φαίνεται ότι μόνο το κλάσμα NL₂₇ είναι ειδικός αναστολέας του PAF, η μικρή ποσότητα όμως αυτού δεν επέτρεψε περαιτέρω προσδιορισμούς-δοκιμασίες.

Τέλος, από την περιοχή όπου εκκλύονται οι εστέρες χοληστερόλης δηλαδή από το NL₄₅ έως το NL₄₈, οι αντίστοιχες τιμές IC_{50 (PAF)} ήταν 18λ, 17λ, 27λ και 20λ. Από τα δύο πιο δραστικά κλάσματα το NL₄₅ ανέστειλε πλήρως τη συσσώρευση που προκαλείται από τη θρομβίνη, ενώ το κλάσμα NL₄₆ δεν την επηρέασε, δηλαδή φαίνεται να εμφανίζει εξειδίκευση ως προς τον PAF. Πρέπει επίσης να αναφέρουμε ότι όταν δοκιμάστηκαν υψηλότερες συγκεντρώσεις του κλάσματος NL₄₆, φάνηκε ότι το κλάσμα αυτό προκαλούσε από μόνο του συσσώρευση αιμοπεταλίων.

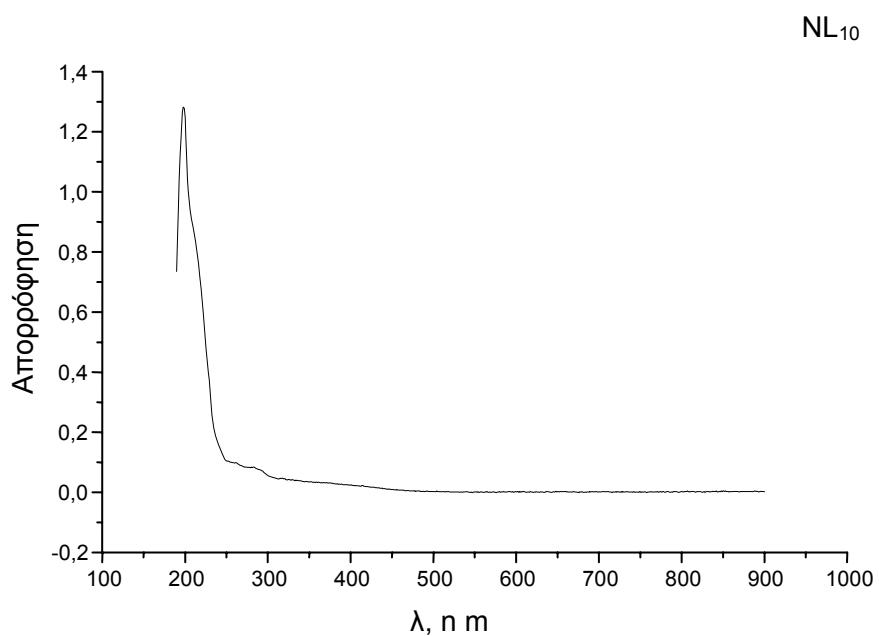
6.1.4.3. Φάσμα UV των κλασμάτων NL₉, NL₁₀, NL₂₂, NL₂₇, NL₃₂, NL₃₃, NL_{38α}, NL₄₆.

Το UV φάσμα του κλάσματος NL₉ είχε μέγιστη απορρόφηση στα 212nm, μία σημαντική κορυφή στα 279nm και μία πολύ μικρότερη στα 763nm (Σχ. 6.35) εμφανίζει ομοιότητες με το UV φάσμα της χοληστερόλης.



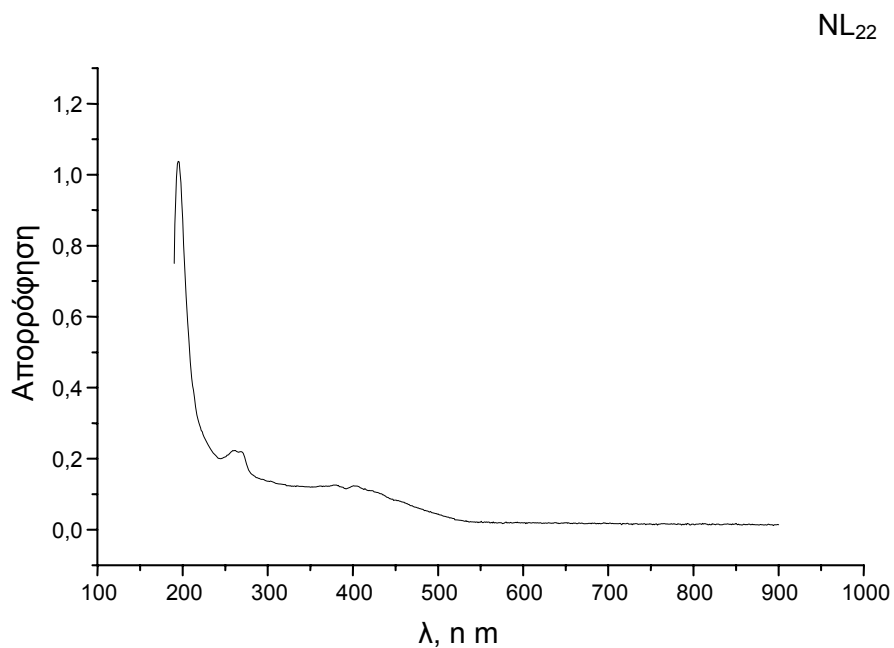
Σχήμα 6.35. Φάσμα UV του κλάσματος NL₉

Το UV φάσμα του κλάσματος NL₁₀ είχε απορρόφηση στα 198nm (Σχ. 6.36).



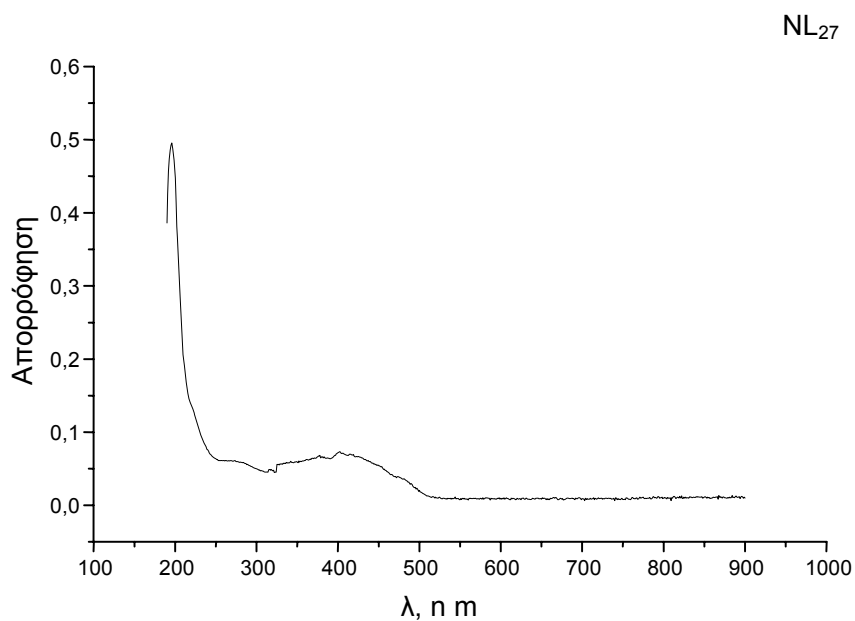
Σχήμα 6.36. Φάσμα UV του κλάσματος NL₁₀

Το κλάσμα NL₂₂ είχε κορυφή απορρόφησης στα 195nm και μία μικρότερη στα 261nm (Σχ. 6.37)



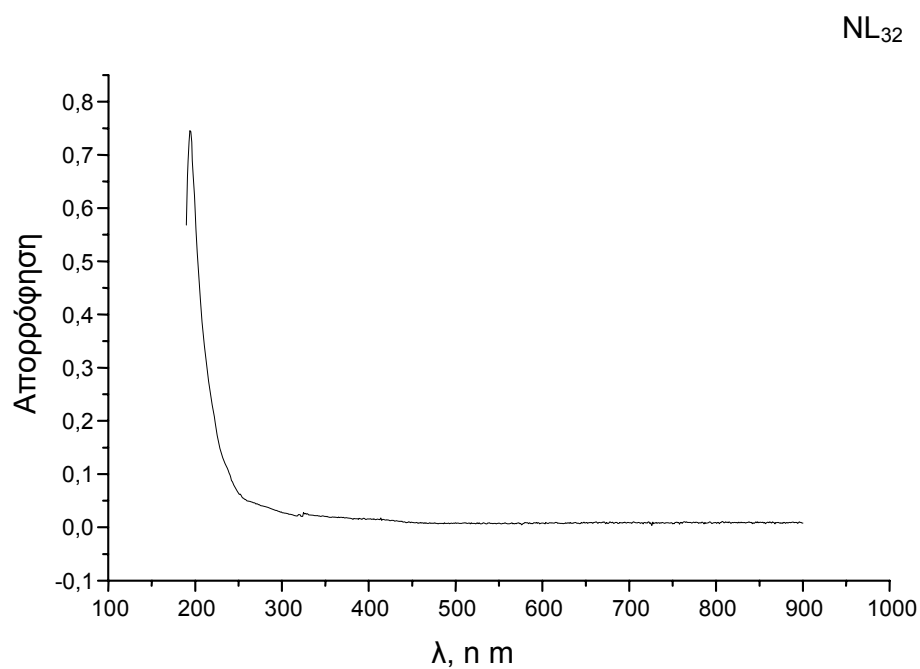
Σχήμα 6.37. Φάσμα UV του κλάσματος NL₂₂

Το UV φάσμα του κλάσματος NL₂₇ είχε δύο κορυφές απορρόφησης, η πρώτη -που ήταν και η μεγαλύτερης έντασης- εμφανίστηκε στα 196nm και η δεύτερη στα 402nm. Μία μικρή απορρόφηση υπήρξε και στα 822nm (Σχ. 6.38)



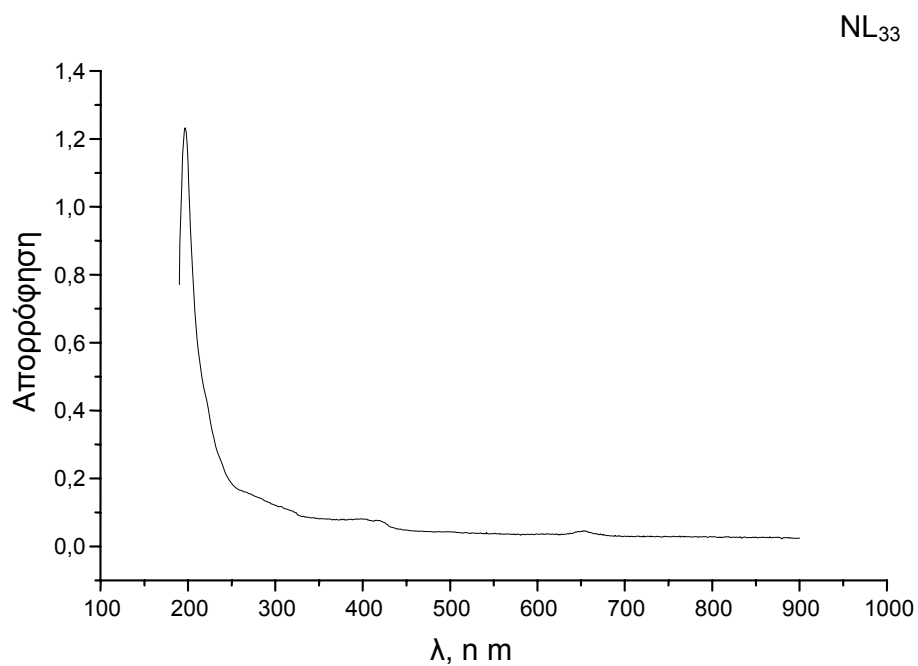
Σχήμα 6.38. Φάσμα UV του κλάσματος NL₂₇

Το κλάσμα NL₃₂ εμφάνισε απορρόφηση στα 194nm (Σχ. 6.39)



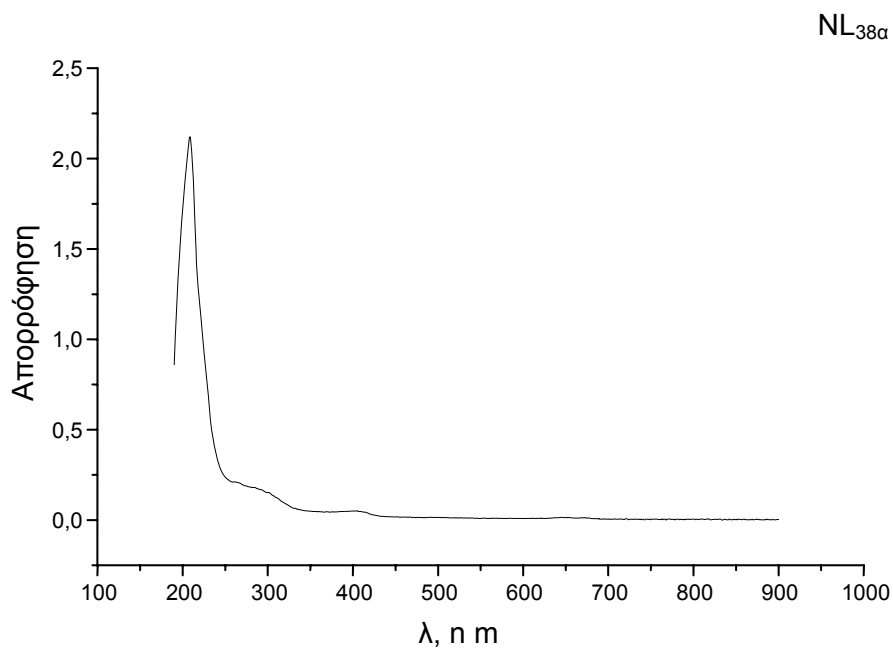
Σχήμα 6.39. Φάσμα UV του κλάσματος NL₃₂

Το φάσμα UV του κλάσματος NL₃₃, είχε μέγιστη κορυφή απορρόφησης στα 197nm και μία μικρότερης έντασης κορυφή στα 653nm (Σχ. 6.40).



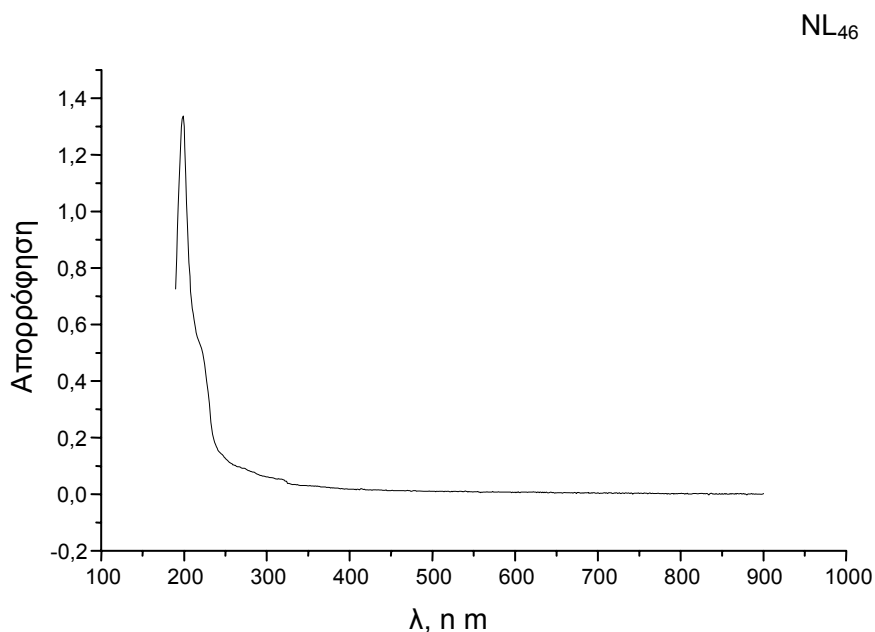
Σχήμα 6.40. Φάσμα UV του κλάσματος NL₃₃

Το φάσμα UV του κλάσματος NL_{38α} έδειξε μέγιστη απορρόφηση στα 209nm και μία μικρότερη στα 672nm (Σχ. 6.41).



Σχήμα 6.41. Φάσμα UV του κλάσματος NL_{38α}

Το φάσμα UV του κλάσματος NL₄₆ εμφάνισε μέγιστη απορρόφηση στα 199nm και δύο μικρότερες κορυφές στα 414 και 726nm (Σχ. 6.42). Το φάσμα του εμφανίζει ομοιότητες με την 1-παλμιτοϋλο,2,3-δι-ακετυλο, γλυκερόλη.



Σχήμα 6.42. Φάσμα UV του κλάσματος NL₄₆

6.1.4.4. Ήπια αλκαλική υδρόλυση–ακετυλίωση.

Τα πειράματα αυτά έγιναν στα κλάσματα NL_{38α} και NL₄₆. Οι λόγοι που οδήγησαν στην επιλογή των συγκεκριμένων ουδέτερων κλασμάτων είναι αφ'ενός μεν η σημαντική βιολογική τους δραστηριότητα και αφ'ετέρου η ύπαρξη αναγκαίας ποσότητας. Συγκεκριμένα το κλάσμα NL_{38α}, αν και δεν είναι ειδικός αναστολέας του PAF εμφανίζει τη μικρότερη τιμή IC_{50(PAF)} από όλα τα κλάσματα που απομονώθηκαν. Η ακετυλίωση του αρχικού κλάσματος οδήγησε σε ένα μόριο με διαφορετική βιολογική δράση, δηλαδή ενώ το αρχικό NL_{38α} ήταν αναστολέας, το ακετυλιωμένο παράγωγο αυτού προκαλούσε συσσώρευση αιμοπεταλίων. Το αποτέλεσμα αυτό δείχνει ότι υπάρχει τουλάχιστον ένα ελεύθερο υδροξύλιο στο μόριο του NL_{38α}.

Ήπια αλκαλική υδρόλυση του NL_{38α} δεν επηρέασε την αρχική βιολογική του δραστηριότητα, δηλαδή παρέμεινε η παρατηρούμενη ανασταλτική του ικανότητα έναντι της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων υπό την επίδραση PAF.

Ακετυλίωση της χλωροφορμικής φάσης της παραπάνω υδρόλυσης, οδήγησε όμως σε ένα μόριο που προκαλούσε συσσώρευση αιμοπεταλίων και μάλιστα η καμπύλη συσσώρευσης εμφάνιζε ίδιο ύψος με εκείνη του ακετυλιωμένου αρχικού μορίου NL_{38α}.

Τα αποτελέσματα αυτά δείχνουν ότι στο NL_{38α} δεν υπάρχει εστερικός δεσμός με λιπαρό οξύ.

Το κλάσμα NL₄₆ φαίνεται να είναι αφ'ενός ειδικός αναστολέας του PAF σε χαμηλές συγκεντρώσεις, ενώ σε υψηλότερες προκαλεί το ίδιο συσσώρευση αιμοπεταλίων.

Ακετυλίωση τέτοιας ποσότητας του αρχικού μορίου, ώστε να προκαλεί μικρή συσσώρευση αιμοπεταλίων και παράλληλα αναστολή της δράσης του PAF κατά 93%, οδήγησε αφ'ενός στη διατήρηση της ανασταλτικής δράσης αλλά αφ'ετέρου στη δραστική μείωση του ύψους της καμπύλης συσσώρευσης.

6.2. *Chroococcidiopsis* sp.

Η μονοκαλλιέργεια του κυανοβακτηρίου, που προσδιορίστηκε ως *Chroococcidiopsis* sp. και χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα εργασία για τη μελέτη των λιποειδών, απομονώθηκε από τα μάρμαρα του αρχαίου θεάτρου του Διονύσου (4^{ος} αιώνας π.Χ., νότια πλευρά των μνημείων της Ακρόπολης των Αθηνών). Σημειώνεται ότι η αρχική μονοκαλλιέργεια μας παραχωρήθηκε από την κ. Α. Πανταζίδου (Πανεπιστήμιο Αθηνών, Τμήμα Βιολογίας, τομέας Οικολογίας και Ταξινόμικης) και στη συνέχεια για τις ανάγκες της μελέτης ανακαλλιεργήθηκε στο Χαροτόπειο Πανεπιστήμιο.

Οι αναπτύξεις του κοκκοειδούς κυανοβακτηρίου *Chroococcidiopsis* sp. παρουσιάζουν ενδολιθικό και συγκεκριμένα χασμοενδολιθικό τρόπο ζωής, δεδομένου ότι συλλέχθηκαν από την κάτω επιφάνεια απολεπίσεων, παράλληλων προς την εξωτερική επιφάνεια του μαρμάρου,. Η μικροσκοπική μελέτη φυσικού υλικού από τη συγκεκριμένη θέση έδειξε ότι ο υπό μελέτη μικροοργανισμός ήταν μεταξύ εκείνων που επικρατούσαν.

Στην προσπάθειά μας να μη περιορισθούμε στη μελέτη των λιποειδών σε ένα μόνο αντιπρόσωπο από τα σπήλαια και συγκεκριμένα στο νηματοιδές κυανοβακτήριο *Scytonema julianum*, έγιναν προσπάθειες απομόνωσης και άλλων αντιπροσώπων, οι οποίοι, αν και αναπτύσσονταν σε θρεπτικό διάλυμα, δεν κατέστη δυνατόν να απομονωθούν σε μονοκαλλιέργεια. Επιδιώκοντας όμως να μελετηθούν τα λιποειδή και δεύτερου κυανοβακτηρίου, που να διαφοροποιείται στη συστηματική κατάταξη και μορφολογία από το *Scytonema julianum*, που όπως προαναφέραμε ήδη είχαμε συμπεριλάβει στη μελέτη μας, επιλέχθηκε και χρησιμοποιήθηκε η μονοκαλλιέργεια του *Chroococcidiopsis*.

Το *Chroococcidiopsis* sp. πληρούσε ορισμένα κριτήρια που είχαμε θέσει όπως:

- κυανοβακτήριο που να αναπτύσσεται στον ελλαδικό χώρο και σε συνθήκες οι οποίες θα μπορούσαν να συγκριθούν με εκείνες των σπηλαίων, τουλάχιστον ως προς ορισμένους παράγοντες (φως, υπόστρωμα),
- είδη του γένους να αναπτύσσονται σε σπήλαια,
- τα δύο κυανοβακτήρια να διαφέρουν ως προς τη μορφολογία και τη συστηματική κατάταξη.

Τις προϋποθέσεις αυτές ικανοποιούσε το *Chroococcidiopsis* και συγκεκριμένα:

- Η καλλιέργεια του *Chroococcidiopsis* sp. προέρχεται από υλικό της Ελλάδος και οι συνθήκες που χαρακτηρίζουν το βιότοπο ανάπτυξής του (μάρμαρο, ανθρακικό ασβέστιο) παρουσιάζουν ορισμένες ομοιότητες με εκείνες που επικρατούν στα σπήλαια (σταλακτίτες, ανθρακικό ασβέστιο) σε ό,τι αφορά το χαμηλό φωτισμό και τη σύσταση του υποστρώματος.
- Το *Chroococcidiopsis* sp. (τάξη Chroococcales, κοκκοειδές) διαφοροποιείται από το *Scytonema julianum* (τάξη Scytonematales, νηματοειδές) ως προς τη συστηματική κατάταξη και τη μορφολογία.
- Το γένος *Chroococcidiopsis* αναπτύσσεται σε σπήλαια, όπως το σπήλαιο του Νυμφόληπτου στην Βάρη Αττικής (Pantazidou, A. 1996), καθώς και σε σταλακτίτες σπηλαιωδών κατασκευών που σχηματίζονται στην παράκτια περιοχή των θερμοπηγών Αιδηψού (Anagnostidis and Pantazidou, 1988).

Το είδος *Chroococcidiopsis kashaii* εδραιώθηκε ως νέο είδος από υλικό προερχόμενο από σπήλαια (Friedmann 1961, 1962).

Το *Chroococcidiopsis* sp. καλλιεργήθηκε σε θρεπτικό διάλυμα BG II (Rippka et al. 1979) και απομονώθηκε σε μονοκαλλιέργεια. Η επώαση των καλλιεργειών πραγματοποιήθηκε σε ίδιες συνθήκες με εκείνες των καλλιεργειών του νηματοειδούς κυανοβακτηρίου *Scytonema julianum*.

Το υπό μελέτη κυανοβακτήριο που προσδιορίστηκε υπό το γένος *Chroococcidiopsis*, χαρακτηρίζεται από μη πολικά κύτταρα που διαιρούνται διαδοχικά σε πολλαπλά επίπεδα, με συνέπεια να προκύπτουν πολυάριθμα μη κινητά νανοκύτταρα. Στην καλλιέργεια τα βλαστικά κύτταρα είχαν διάμετρο 3-5μm, τα μητρικά κύτταρα έφθαναν σε διάμετρο έως 18μm και απελευθέρωναν σφαιρικά νανοκύτταρα διαμέτρου έως 2.5μm.

Συστηματική κατάταξη:

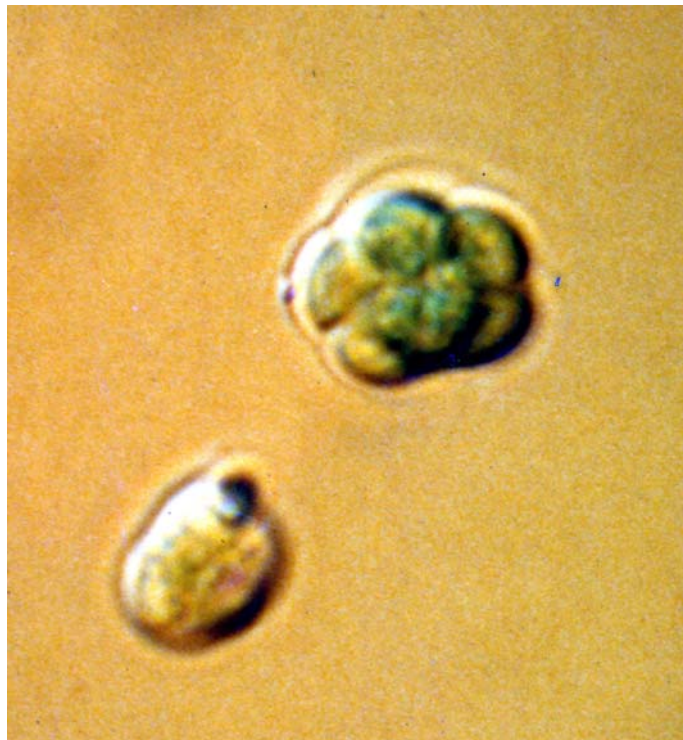
Κλάση Cyanophyceae Sachs

Τάξη: Chroococcales WETTST 1924

Οικογένεια: Xenococcaceae

Γένος: *Chroococcidiopsis* sp.

Τα στελέχη του *Chroococcidiopsis* sp. τοποθετήθηκαν σε αποστειρωμένες κωνικές φιάλες των 100ml, οι οποίες περιείχαν 75ml αποστειρωμένο καλλιεργητικό υλικό BG-11 (Πίνακας 3) (Allen, M.M. and R.Y. Stanier, 1968, Rippka, R. et al. 1979) και ήταν πωματισμένες με υδρόφοβο βαμβάκι και ιατρική γάζα (Μέθοδοι 5.1.).



Σχήμα 6.43. Κύτταρα *Chroococcidiopsis* sp. στο μικροσκόπιο. Τα κύτταρα σχηματίζουν δυάδες, τριάδες, τετράδες ή οχτάδες, ανάλογα με τη φάση της καλλιέργειας, στην οποία βρίσκονται.

Οι φιάλες μεταφέρθηκαν σε χώρο φωτιζόμενο φυσικά, χωρίς την άμεση επίδραση ηλιακού φωτός, σταθερής θερμοκρασίας 22-25°C περίπου, στο εργαστήριο Βιολογίας και Φυσιολογίας του ανθρώπου και των μικροοργανισμών του Χαροκόπειου Πανεπιστημίου.

Ακολούθησαν δύο ανακαλλιέργειες με σκοπό τόσο την ποσοτική αύξηση των δειγμάτων όσο και την ποιοτική τους αναβάθμιση, αφού παράλληλα γινόταν μικροσκοπικός έλεγχος, τόσο για τη διαπίστωση ύπαρξης βακτηρίων ή μολύνσεων, όσο και για να διαπιστωθεί η ανάπτυξη του φύκου.

Ο χρόνος που μεσολαβούσε ανάμεσα σε δύο καλλιέργειες ήταν περίπου τριάντα (30) ημέρες.

Οι ανακαλλιέργειες έγιναν στο εργαστήριο, κοντά σε λυχνία Bunsen με φρέσκα αποστειρωμένα καλλιεργητικά υλικά, σε αποστειρωμένες κωνικές φιάλες των 100ml, ενώ η μεταφορά του υλικού έγινε με αποστειρωμένο κρίκο.

Στη συνέχεια έγινε διαχωρισμός του κυανοφύκου από το καλλιεργητικό υλικό υπό κενό, με συσκευή Buhner. Ως φίλτρο χρησιμοποιήθηκε το Whatman GF/C 110cm, το οποίο τοποθετήθηκε σε πορσελάνινη χοάνη προσαρμοσμένη

σε εσφυρισμένη κωνική φιάλη των 500ml. Ακολούθησε εκχύλιση των λιποειδών με τη μέθοδο Bligh-Dyer (Μέθοδοι 5.2.).

Το φίλτρο με το υλικό, τοποθετήθηκε σε εσφυρισμένη κωνική φιάλη των 500ml στο οποίο προστέθηκε μονοφασικό διάλυμα, χλωροφορμίου – μεθανόλης – νερού, σε αναλογία 1:2:0,8. Η κωνική πωματίστηκε και ακολούθησε έντονη ανάδευση για 30 περίπου λεπτά, ούτως ώστε να επιτευχθεί το σπάσιμο των κυττάρων και η απελευθέρωση των λιποειδών. Κατά διαστήματα αφαιρείτο το πώμα της φιάλης, προκειμένου να διαφύγουν τα πτητικά αέρια.

Μετά την ανάδευση προστέθηκαν στην κωνική φιάλη οι κατάλληλες ποσότητες χλωροφορμίου και νερού, έτσι ώστε η αναλογία να γίνει 1:1:0,9. Συνεχίστηκε η ανάδευση για άλλα 30 λεπτά και στη συνέχεια έγινε φυγοκέντρηση.

Η φυγοκέντρηση έγινε στις 1500 στροφές για 10 λεπτά, σε συσκευή τύπου Hermle Z320.

Μετά την φυγοκέντρηση το μίγμα διαχωρίστηκε σε δύο φάσεις: στην υδατοαλκοολική φάση, η οποία απορρίφθηκε και την χλωροφορμική φάση, η οποία περιείχε τα ολικά λιποειδή.

Η χλωροφορμική φάση μεταφέρθηκε με πιπέτα paster σε εσφυρισμένη κωνική φιάλη και εξατμίστηκε μέχρι ξηρού σε περιστρεφόμενο συμπυκνωτήρα υπό ελαττωμένη πίεση. Τα ολικά λιποειδή, τα οποία ήταν 0.07gr, αναδιαλύθηκαν σε συγκεκριμένο όγκο διαλύματος χλωροφορμίου–μεθανόλης 1:1 και αποθηκεύτηκαν.

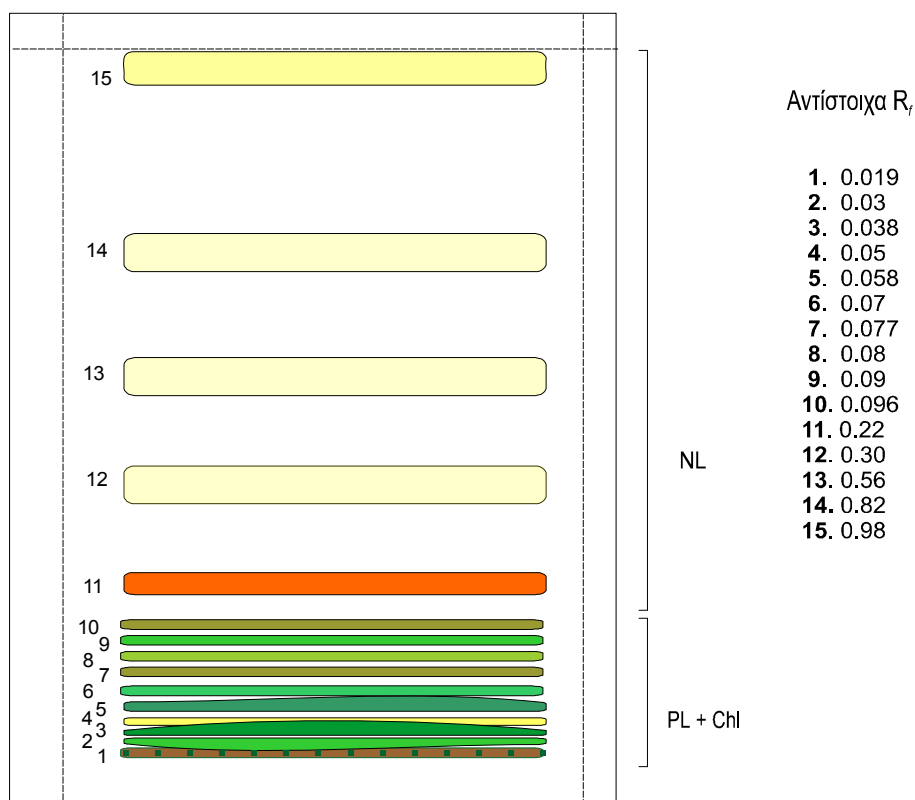
Διαχωρισμός σε ουδέτερα (NL) και πολικά (PL) λιποειδή –Απομάκρυνση χρωστικών ουσιών

Ετοιμάστηκαν οι πλάκες TLC με τον τρόπο που περιγράφεται στο κεφάλαιο Μέθοδοι (5.3.) και με δύο διαδοχικές αναπτύξεις σε κατάλληλα συστήματα έγινε ο διαχωρισμός των ολικών λιποειδών, σε ουδέτερα και πολικά καθώς και η απομάκρυνση των χρωστικών (Demopoulos, C.A. et al. 1996).

Η ανάπτυξη του δείγματος έγινε καταρχήν σε πετρελαϊκό αιθέρα :βενζόλιο :οξικό οξύ σε αναλογία 30:70:2 v/v/v. Στο σύστημα αυτό τα πολικά λιποειδή και οι χρωστικές παραμένουν στην αρχή, ενώ τα ουδέτερα λιποειδή κατανέμονται σε όλη την πλάκα, όπως δείχνει το σχήμα 6.44.

Η περιοχή των ουδέτερων λιποειδών παραλαμβάνεται με απόξυση, με την βοήθεια αντικειμενοφόρου πλάκας και εκχυλίζονται με την μέθοδο Bligh-Dyer.

Μετά από φυγοκέντρηση, για 10 λεπτά σε 2000 στροφές και αναδιάλυση σε συγκεκριμένο όγκο διαλύτη (χλωροφορμίου – μεθανόλης 1:1), τα ουδέτερα λιποειδή φυλάχτηκαν σε ψυγείο .



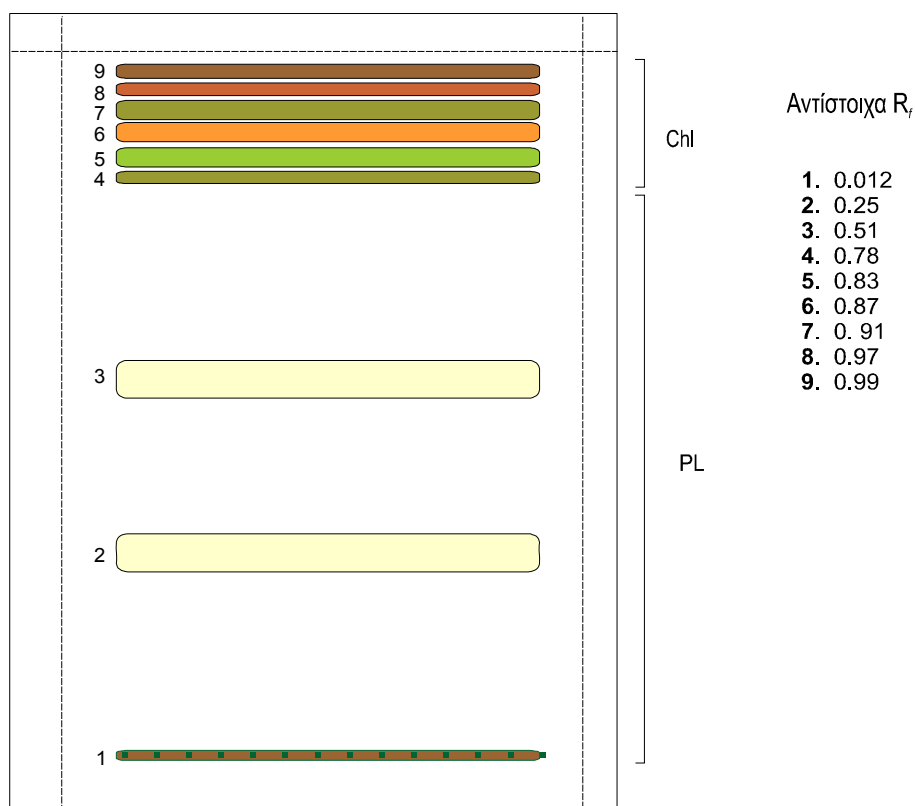
Σχήμα 6.44. Ανάπτυξη ολικών λιποειδών σε πετρελαιοϊκό αιθέρα: βενζόλιο:οξικό οξύ NL, ουδέτερα λιποειδή. PL, πολικά λιποειδή. Chl, χλωροφύλλες.

Η περιοχή των πολικών λιποειδών και των χρωστικών παραλαμβάνεται με απόξυση, εκχυλίζεται με τη μέθοδο Bligh-Dyer και επαναχρωματογραφείται σε TLC πυριτικού, με σύστημα ανάπτυξης ακετόνη : μεθανόλη : νερό σε αναλογία 40:20:1 ν/ν/ν. Στο σύστημα αυτό τα πολικά λιποειδή και οι χρωστικές κατανέμονται στην πλάκα όπως δείχνει το σχήμα 6.45. Η περιοχή των πολικών λιποειδών παραλαμβάνεται με απόξυση, με την βοήθεια αντικειμενοφόρου πλάκας και τα λιποειδή εκχυλίζονται με τη μέθοδο Bligh-Dyer. Μετά από αναδιάλυση σε συγκεκριμένο όγκο διαλύτη (χλωροφορμίου – μεθανόλης 1:1) τα πολικά λιποειδή φυλάχτηκαν σε ψυγείο .

Η περιοχή των χρωστικών παραλαμβάνεται με απόξυση και εκχυλίζεται με τον ίδιο τρόπο.

Με αυτή την διαδικασία χωρίστηκαν τα ολικά λιποειδή (TL) στις χρωστικές, στην πλειοψηφία τους χλωροφύλλες, οι οποίες απορρίφθηκαν, στα ουδέτερα λιποειδή (NL), που αποθηκεύτηκαν και στα πολικά λιποειδή (PL), τα οποία επίσης αποθηκεύτηκαν.

Θα πρέπει να επισημάνουμε ότι το κλάσμα των πολικών λιποειδών, περιέχει κυρίως φωσfolιποειδή και ότι τα γλυκολιποειδή βρίσκονται κατανεμημένα και στα δύο κλάσματα, δηλαδή στα NL και PL, ανάλογα με την πολικότητά τους.



Σχήμα 6.45. Ανάπτυξη πολικών λιποειδών και χλωροφυλλών σε ακετόνη : μεθανόλη : νερό. PL, πολικά λιποειδή. Chl, χλωροφύλλες.

6.2.1. Φωσfolιποειδή (PL)

6.2.1.1. Διαχωρισμός PL με HPLC

Το κλάσμα των φωσfolιποειδών (περίπου 4mg) μαζί με τα πολικά γλυκολιποειδή διαχωρίστηκε περαιτέρω με HPLC, (Andrikopoulos, N. et al. 1986a) με διαδοχικές ισόποσες ενέσεις. Η στήλη που χρησιμοποιήθηκε είναι στήλη κατιοανταλλαγής (SCX), ενώ το σύστημα έκλουσης είναι ισοκρατικό με αναλογία διαλυτών ακετονιτρίλιο 60% και μεθανόλη/νερό 4:1 (v/v) 40% (v/v). Η ανίχνευση των λιποειδών έγινε με ανιχνευτή UV και το χρησιμοποιούμενο μήκος κύματος ήταν 208nm. Χαρακτηριστικό χρωματογράφημα φαίνεται στο σχήμα 6.46.

Ένα τυπικό δείγμα του διαχωρισμού των λιποειδών αυτών με τους σχετικούς χρόνους των προτύπων φωσfolιποειδών φαίνεται στο παραπάνω σχήμα. Αυτή η μέθοδος HPLC, αν και δεν διαχωρίζει όλα τα κλάσματα των

φωσφολιποειδών επαρκώς, επιλέχθηκε μιας και επιτρέπει το διαχωρισμό των PAF και των αναλόγων του PAF από τα λοιπά φωσφολιποειδή.

Τα λιποειδή που εκλούστηκαν από το σύστημα της HPLC συγκεντρώθηκαν, αντιπροσωπευόμενα από τα κλάσματα PL_1 έως PL_{11} (Σχ.6.46) και καθένα από αυτά επαναχρωματογραφήθηκε στις ίδιες συνθήκες, με σκοπό τον περαιτέρω καθαρισμό τους από τις γειτονικές κορυφές. Στη συνέχεια δοκιμάστηκαν για την ικανότητά τους να προκαλούν συσσώρευση πλυμένων αιμοπεταλίων κουνελιού και να αναστέλλουν την προκαλούμενη από τον PAF καθώς και το AA και το ADP συσσώρευση πλυμένων αιμοπεταλίων κουνελιού.

6.2.1.2. Βιολογική δραστικότητα των κλασμάτων των πολικών λιποειδών της SCX

Στον πίνακα 9 συνοψίζεται η βιολογική δραστικότητα των 10 κλασμάτων της HPLC.

Το κλάσμα PL_1 , που περιέχει μια ποσότητα φωσφολιποειδών μαζί με μερικά πολικά γλυκολιποειδή, φυλάχτηκε για περαιτέρω καθαρισμό.

Τα κλάσματα, PL_2 , PL_3 , PL_4 , PL_5 , PL_6 , PL_7 , PL_8 , PL_9 , PL_{10} , και PL_{11} , βρέθηκαν ότι αναστέλλουν με δόσοεξαρτώμενο τρόπο τη συσσώρευση των πλυμένων αιμοπεταλίων κουνελιού που προκαλείται από τον PAF, καθώς και αυτήν που προκαλείται από το AA (Πίνακας 9).

Συγκεκριμένα, το κλάσμα PL_2 , προκάλεσε 100% αναστολή της συσσώρευσης που προκαλείται από τον PAF με ποσότητα 7λ, ενώ ποσότητα αυτού ίση με 1λ, δεν είχε καμία επίδραση. Το IC_{50} για PAF είναι $8,1 \times 10^{-3}M$, τελική συγκέντρωση και υπολογίσθηκε με βάση το φωσφόρο. Αντίστοιχα, ποσότητα του κλάσματος αυτού ίση με 10λ ανέστειλε κατά 50% την προκαλούμενη από το AA συσσώρευση, δηλαδή IC_{50} για AA είναι $2,7 \times 10^{-2}M$, τελική συγκέντρωση με βάση το φωσφόρο.

Το κλάσμα PL_3 εμφάνισε 100% αναστολή της προκαλούμενης από τον PAF συσσώρευσης με ποσότητα 13λ και το IC_{50} αυτού υπολογίσθηκε στα 6λ. Επιπλέον το IC_{50} του κλάσματος για το AA ήταν σε ποσότητα 7λ.

Το κλάσμα PL_4 παρουσίασε πλήρη αναστολή της συσσώρευσης που προκαλείται από τον PAF σε 40λ, με $IC_{50}=30λ$.

Αντίστοιχα, ποσότητα 10λ του PL_4 ανέστειλε πλήρως την προκαλούμενη από το AA συσσώρευση με $IC_{50}=3λ$.

Πίνακας 9: Βιολογική δραστικότητα για κάθε κλάσμα φωσφολιπιδιού.

Κλάσματα	Αναστολή	Συσσωρευση	IC ₅₀ PAF
PL ₂	*	όχι	3λ
PL ₃	*	όχι	6λ
PL ₄	*	όχι	30λ
PL ₅	*	όχι	30λ
PL ₆	*	όχι	23λ
PL ₇	*	όχι	24λ
PL ₈	*	όχι	14λ
PL ₉	*	όχι	36λ
PL ₁₀	*	όχι	28λ
PL ₁₁	*	όχι	32λ

Συσσωρευση πλυμένων αιμοπεταλίων κουνελιού που προκλήθηκε από PAF 1.25×10^{-10} M τελική συγκέντρωση, με AA 0.02×10^{-4} M τελική συγκέντρωση. *: κλάσμα που αναστέλλει την προκαλούμενη από τον PAF και το AA συσσωρευση. όχι: κλάσμα χωρίς βιολογική δραστικότητα.

Θα πρέπει επίσης να σημειώσουμε ότι ποσότητα 40λ του PL₄ προκάλεσε συσσωρευση μικρού ύψους, η οποία όμως δεν ήταν δοσοεξαρτώμενη.

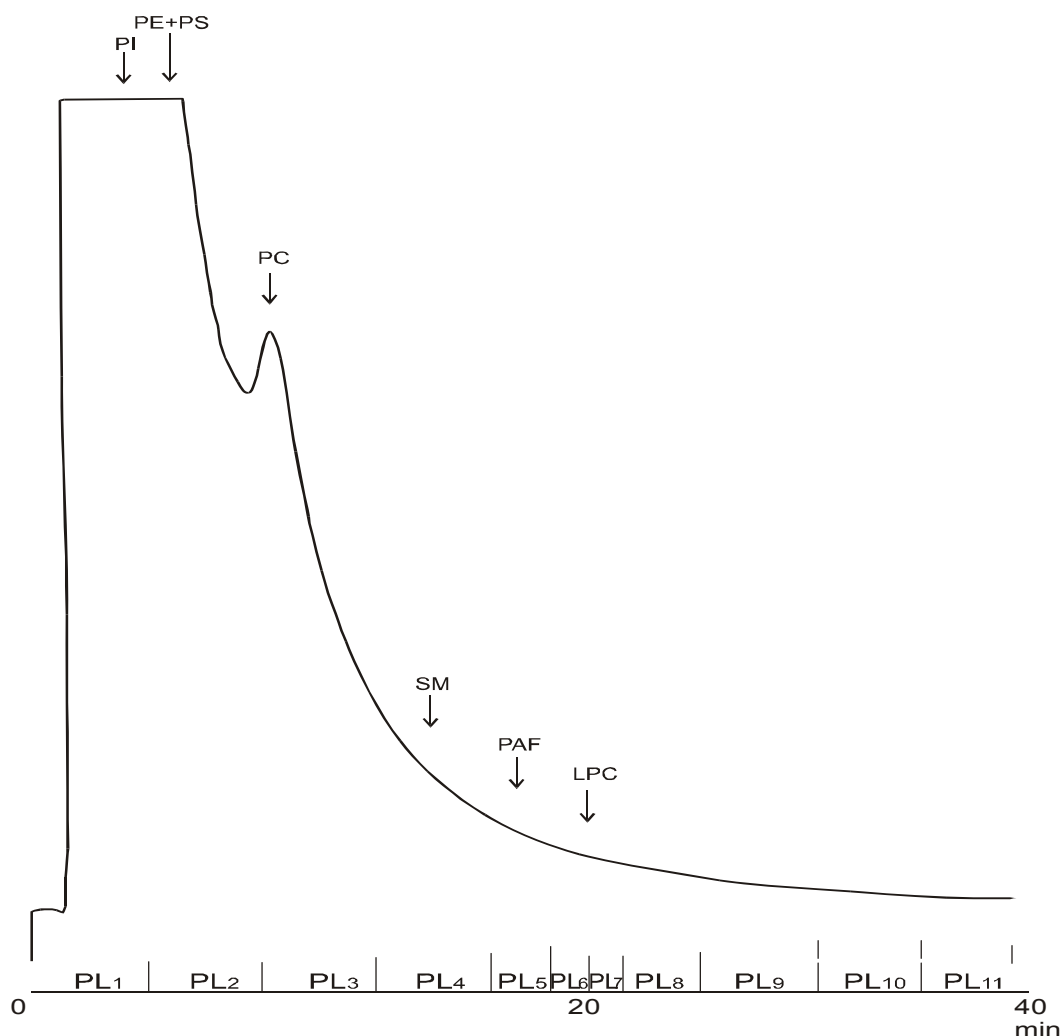
Το κλάσμα PL₅ προκάλεσε αναστολή και στη συσσωρευση που προκαλείται από τον PAF με IC₅₀=30λ και σε εκείνη που προκαλείται από το AA με IC₅₀=21λ.

Το κλάσμα PL₆, το οποίο εκλούεται στην περιοχή του PAF προκαλούσε αλλαγή σχήματος των αιμοπεταλίων, αλλά σε καμία συγκέντρωση από όσες δοκιμάστηκαν δεν προκάλεσε συσσωρευση αυτών. Αντίθετα, εμφάνισε αναστολή με IC₅₀ για PAF 23λ και IC₅₀ για AA 20λ.

Το κλάσμα PL₇ προκάλεσε αλλαγή σχήματος των αιμοπεταλίων και σε μεγάλη ποσότητα 90λ προκάλεσε συσσωρευση αυτών με μικρό ύψος καμπύλης. Το IC₅₀ του κλάσματος αυτού για PAF υπολογίσθηκε σε 24λ και το αντίστοιχο για AA στα 30λ.

Το κλάσμα PL₈ παρουσίασε αναστολή της συσσωρευσης που προκαλείται από τον PAF και το AA, με αντίστοιχα IC₅₀, 14λ και 35λ.

Το κλάσμα PL₉ προκαλούσε αλλαγή σχήματος των αιμοπεταλίων, αλλά δεν προκάλεσε συσσώρευση αιμοπεταλίων σε καμία από τις συγκεντρώσεις που δοκιμάστηκαν. Το IC₅₀ του κλάσματος για PAF ήταν σε ποσότητα 36λ και το αντίστοιχο για AA σε ποσότητα 31λ.

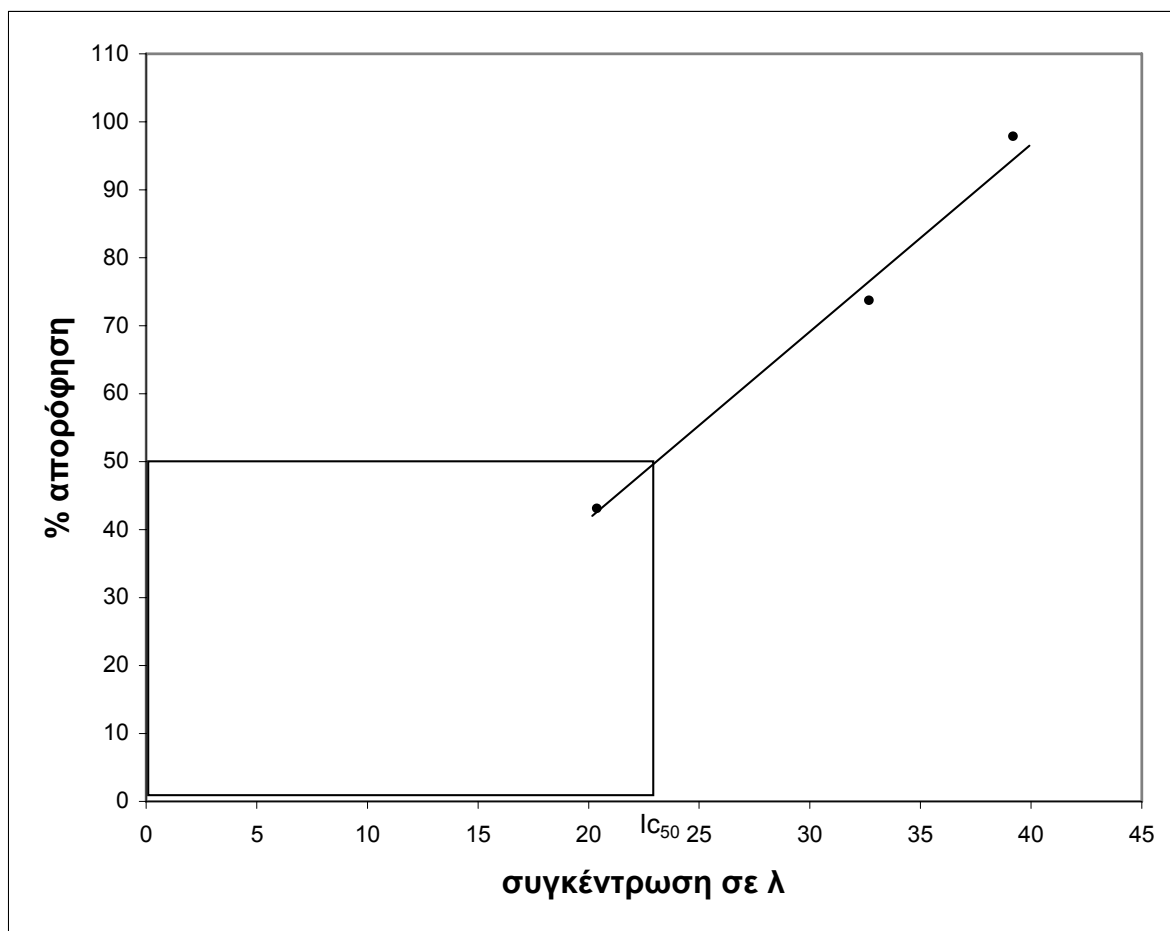


Σχήμα 6.46. Χαρακτηριστικό χρωματογράφημα διαχωρισμού των φωσφολιπιδίων του *Chroococcidiopsis* sp. με HPLC σε στήλη κατιοανταλλαγής, όπου φαίνονται και οι περιοχές έκλουσης των προτύπων ουσιών.

Το κλάσμα PL₁₀ ανέστειλε την προκαλούμενη από PAF συσσώρευση αιμοπεταλίων με IC₅₀ 28λ, ενώ το IC₅₀ για AA υπολογίσθηκε στα 11λ.

Τέλος, το κλάσμα PL₁₁ εμφάνισε παρόμοια συμπεριφορά με το PL₁₀, με IC₅₀ για PAF 32λ και IC₅₀ για AA 12λ.

Στα σχήματα 6.47 και 6.48 φαίνονται δύο αντιπροσωπευτικά παραδείγματα υπολογισμού IC₅₀, που αντιστοιχούν στα κλάσματα PL₆ και PL₉.

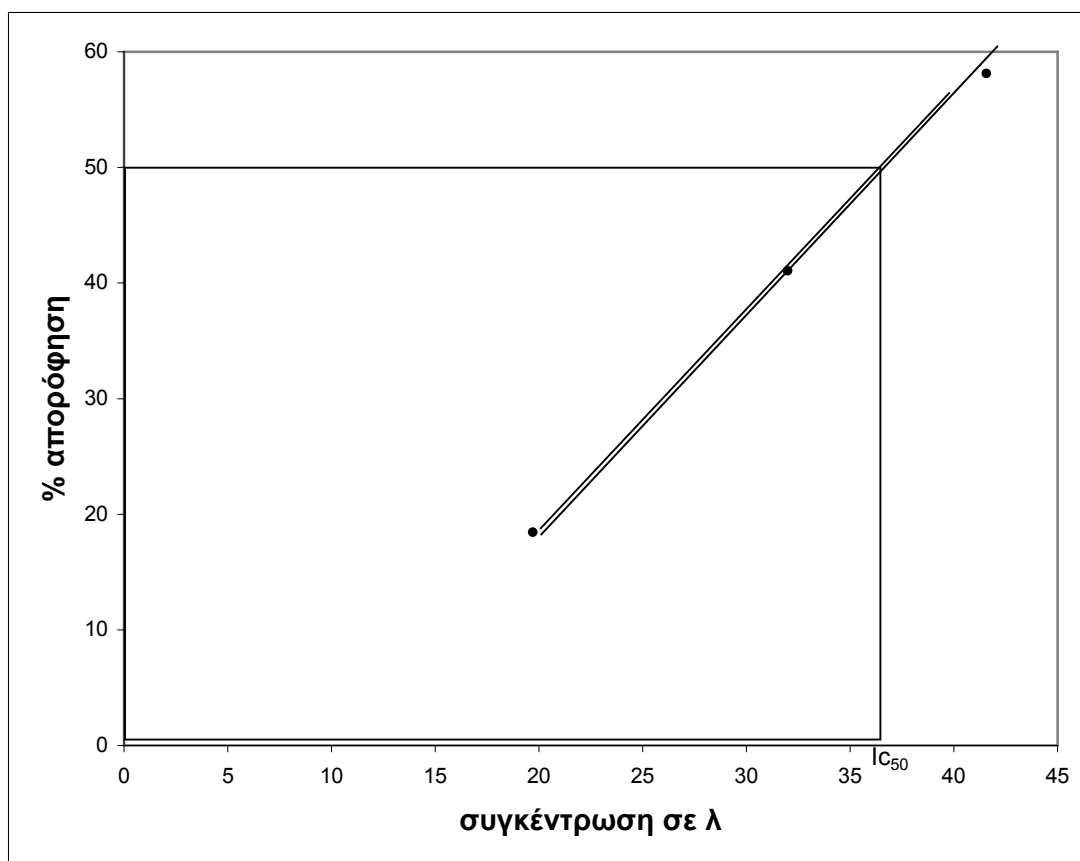


Σχήμα 6.47. Υπολογισμός IC_{50} για PAF του φωσφολιποειδούς PL_6 του *Chroococcidiopsis* sp.

Κανένα λοιπόν από τα παραπάνω κλάσματα δεν μπορεί να θεωρηθεί ειδικός αναστολέας του PAF.

Τα πιο δραστικά κλάσματα για αναστολή έναντι της συσσώρευσης του PAF είναι PL_2 , PL_3 και PL_8 . Τα κλάσματα PL_3 και PL_4 εμφανίζουν τη μεγαλύτερη ανασταλτική ικανότητα έναντι του AA.

Θα πρέπει επίσης να αναφέρουμε ότι δεν βρέθηκε κλάσμα που να προκαλεί δοσοεξαρτώμενη συσσώρευση αιμοπεταλίων. Το γεγονός αυτό δεν μπορεί να εξηγηθεί με βάση την ποσότητα των φωσφολιποειδών του *Chroococcidiopsis* sp. (4mg), σε αντιδιαστολή με εκείνη των φωσφολιποειδών του *Scytonema julianum* (1mg).



Σχήμα 6.48. Υπολογισμός IC₅₀ για PAF του φωσφολιποειδούς PL₉ του *Chroococcidiopsis* sp.

6.2.1.3. Ποιοτικός προσδιορισμός φωσφόρου και μονοσακχαριτών

Μία ποσότητα από όλα τα κλάσματα PL της HPLC (με εξαίρεση το PL₃) χρωματογραφήθηκε σε TLC με σύστημα ανάπτυξης χλωροφόρμιο:ακετόνη:μεθανόλη:νερό:οξικό οξύ (50:40:17:5:5, v/v/v/v/v). Στις ίδιες πλάκες συνχρωματογραφήθηκαν και πρότυπα διαλύματα φωσφολιποειδών και γλυκολιποειδών. Οι πλάκες εμφανίστηκαν αρχικά με ιώδιο, στη συνέχεια με διάλυμα ναφθόλης 0,5gr σε 100ml μεθανόλη:νερό (1:1 v/v) και τέλος με τοποθέτηση α) σε φούρνο 120°C για 10min και β) σε φούρνο 180°C για 20min. Η παραπάνω διαδικασία δίνει αφ' ενός μεν δεδομένα ύπαρξης συγκεκριμένων λιποειδών από τις τιμές R_f και αφ' ετέρου δε επιτρέπει τον ποιοτικό προσδιορισμό ύπαρξης φωσφόρου και μονοσακχαρίτη από την εμφάνιση συγκεκριμένης χρώσης στην πλάκα.

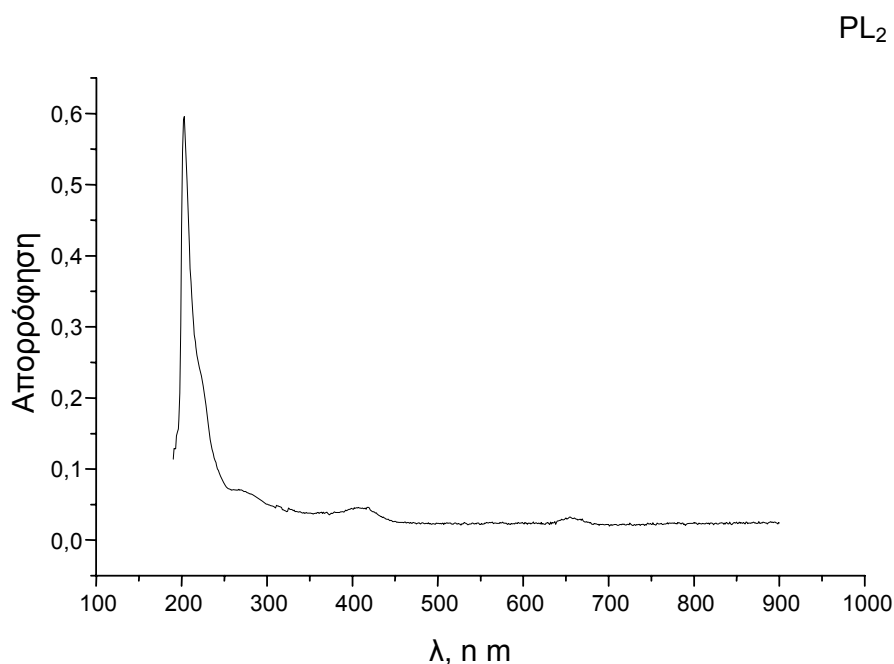
Τα αποτελέσματα του πειράματος αυτού έδειξαν ότι τα κλάσματα PL₄ έως και PL₁₁ περιέχουν μικρές ποσότητες πολικών φωσφολιποειδών, όπως σφιγγομυελίνη και λυσοφωσφατιδυλοχολίνη και δεν περιέχουν μονοσακχαρίτες.

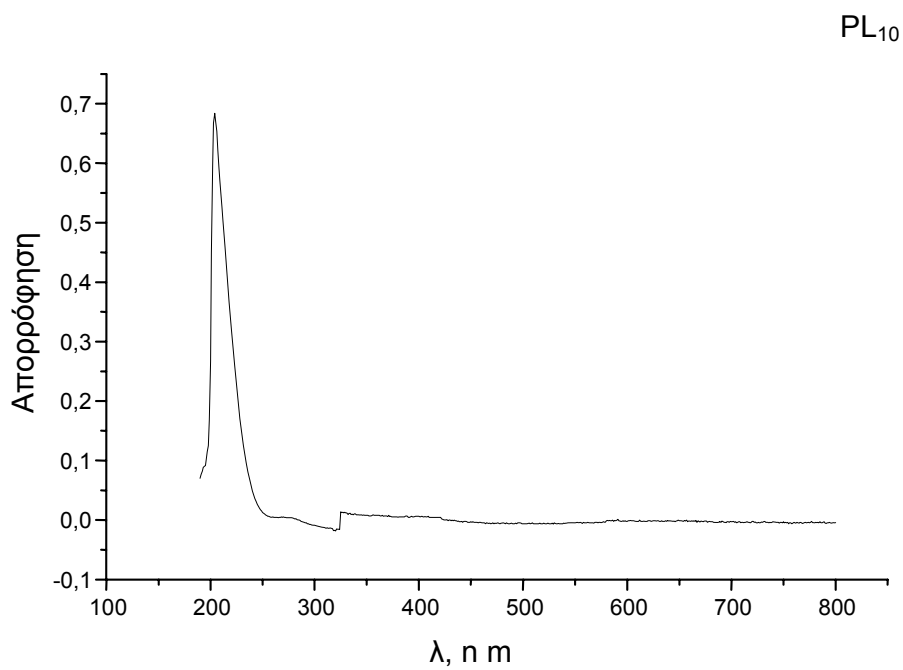
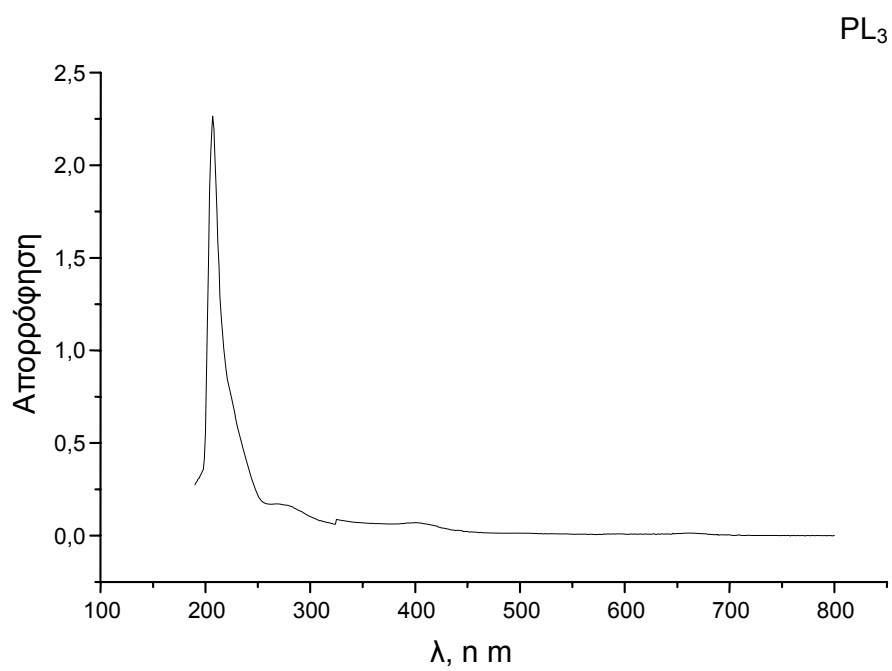
Αντίθετα το κλάσμα PL₂ έδειξε ότι περιέχει φωσφο- και γλυκο- λιποειδή, τα οποία είχαν κοινά Rf με γαλακτοκερεβροζίτες, σουλφατίδια, φωσφατιδυλοχολίνη και σφιγγομυελίνη.

6.2.1.4. Φάσμα UV και προσδιορισμός φωσφόρου των κλασμάτων PL

Ελήφθησαν UV φάσματα για τα κλάσματα PL₂ έως και PL₁₁.

Το UV φάσμα των παραπάνω κλασμάτων είχε πλήρη ταύτιση και έδειξε μια μέγιστη απορρόφηση στα 205nm με μια μικρή απορρόφηση στα 440nm. Τα πρότυπα δείγματα φωσφατιδυλοχολίνης, φωσφατιδυλοαιθανολαμίνης και σφιγγομυελίνης έδωσαν μια ισχυρή απορρόφηση στα 202nm, όταν εκτέθηκαν στις ίδιες συνθήκες του πειράματος. Αντιπροσωπευτικά φάσματα UV των κλασμάτων αυτών φαίνονται στο σχήμα 6.49. Στα κλάσματα PL₂ και PL₃ έγινε προσδιορισμός φωσφόρου και βρέθηκε ότι το κλάσμα PL₂ περιείχε 6,5μg φωσφόρου, ενώ το κλάσμα PL₃ δεν περιείχε φωσφόρο.





Σχήμα 6.49. Φάσματα UV των κλασμάτων PL₂, PL₃ και PL₁₀

6.2.1.5. Σύνοψη αποτελεσμάτων των φωσφολιποειδών του *Chroococcidiopsis* sp.

Τα δεδομένα από τα προηγούμενα πειράματα δείχνουν την ύπαρξη λιποειδικών κλασμάτων, τα οποία δρουν ανασταλτικά έναντι της συσσώρευσης αιμοπεταλίων που προκαλείται από τον PAF και το AA. Κανένα από τα κλάσματα αυτά δεν είναι ειδικός αναστολέας του PAF και γι' αυτό δεν μελετήθηκαν περαιτέρω.

Επιπλέον, δεν βρέθηκε κανένα κλάσμα που να προκαλούσε συσσώρευση αιμοπεταλίων σε αντίθεση με τα φωσφολιποειδή του *Scytonema julianum*.

Αυτό πρέπει να οφείλεται στη μη ύπαρξη φωσφο-γλυκο-λιποειδούς στα κλάσματα του *Chroococcidiopsis* sp., όπως φάνηκε από τον αρνητικό προσδιορισμό σακχάρων.

6.2.2. Γλυκολιποειδή (GL)

6.2.2.1. Διαχωρισμός GL με HPLC

Προκειμένου να διαχωριστούν τα γλυκολιποειδή στα συστατικά τους, το μέτωπο του διαλύτη από το διαχωρισμό των φωσφολιποειδών εξατμίστηκε σε περιστρεφόμενο συμπυκνωτή κενού και αναδιαλύθηκε σε μικρό όγκο διαλύτη χλωροφόρμιο:μεθανόλη 1:1. Η ποσότητα που προέκυψε μ'αυτόν τον τρόπο χρωματογραφήθηκε με πολλαπλές ενέσεις με HPLC σε στήλη silica και με το ακόλουθο βαθμιδωτό σύστημα έκλουσης: Ακετονιτρίλιο (ACN) : μεθανόλη (M) 90:10 για τα πρώτα 7 λεπτά, μετατρέπεται σε ακετονιτρίλιο (ACN): μεθανόλη (M) 83:17 μέχρι τα 10 λεπτά παραμένει ισοκρατικό έως τα 35 λεπτά και στη συνέχεια μετατρέπεται σε μεθανόλη (M) 100% μετά τα 40 λεπτά. Χρησιμοποιήθηκε ανιχνευτής υπεριώδους στα 208nm και ροή 1ml/min.

Τα γλυκολιποειδή συγκρατούνται ως ένα βαθμό από τη στήλη και εκκλούνται σε διαφορετικούς χρόνους, με σειρά αυξανόμενης πολικότητας. Τα τυχόν ουδέτερα λιποειδή που υπάρχουν δεν συγκρατούνται από τη στήλη, οπότε εκκλούνται με το μέτωπο του διαλύτη, συλλέγονται σε κωνική φιάλη και φυλάσσονται στην κατάψυξη για περαιτέρω διαχωρισμό.

Κατά το διαχωρισμό των γλυκολιποειδών ελήφθησαν 14 κλάσματα. Στη συνέχεια τα κλάσματα των ίδιων περιοχών των χρωματογραφημάτων HPLC ενώθηκαν και προέκυψαν τα δείγματα: GL₁ GL₂ GL₃ GL₄ GL₅ GL₆ GL₇ GL₈ GL₉ GL₁₀ GL₁₁ GL₁₂ GL₁₃ GL₁₄. Στο σχήμα 6.50 φαίνεται ένα χαρακτηριστικό χρωματογράφημα από το διαχωρισμό των γλυκολιποειδών .

Στον πίνακα 10 φαίνονται οι χρόνοι έκλουσης των προτύπων ουσιών.

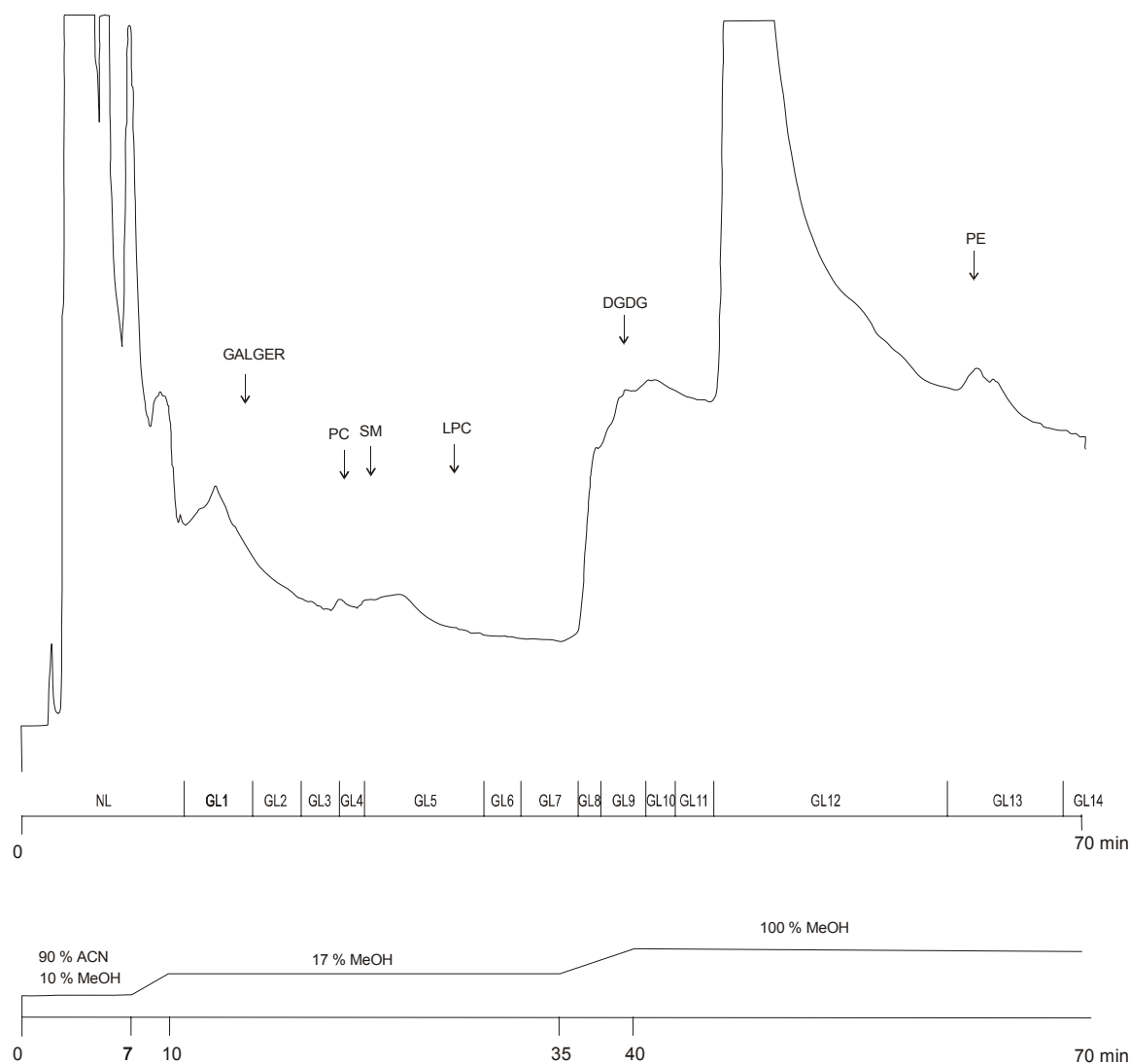
6.2.2.2. Βιολογική δοκιμασία των γλυκολιποειδών

Κατά τη διάρκεια της βιολογικής δοκιμασίας ελέγχθηκε η βιολογική δραστηριότητα των κλασμάτων με την επίδραση PAF $1,25 \times 10^{-10}$ M τελικής συγκέντρωσης. Επίσης η συγκέντρωση του κλάσματος που προκαλεί 50% αναστολή της συσσώρευσης που προκαλείται από τον PAF, εξετάστηκε εάν αναστέλλει και την προκαλούμενη από τη θρομβίνη συσσώρευση.

Από την βιολογική δοκιμασία προέκυψε ότι από τα 14 κλάσματα των γλυκολιποειδών που συλλέχθηκαν, τα κλάσματα GL₁, GL₂, GL₄, GL₅, GL₆, GL₇, GL₁₀, GL₁₁, GL₁₂, GL₁₃, GL₁₄ εμφανίζουν ανασταλτική δράση έναντι της συσσώρευσης των πλυμένων αιμοπεταλίων κουνελιού.

Πίνακας 10: Χρόνοι έκλυσης προτύπων ουσιών με τη μέθοδο διαχωρισμού των γλυκολιπιδίων.

A/A	ΤΑΞΕΙΣ	ΕΙΔΗ	ΧΡΟΝΟΙ ΕΚΛΟΥΣΗΣ
1	TG – MD DG–MD- MG	Τριγλυκερίδια Διγλυκερίδια Μονογλυκερίδια	0,5-5min
2	FA	Λιπαρά οξέα	5.5min
3	GALCER	Γαλακτοκερεβροζίτες	12 – 14min
4	PC	Φωσφατιδυλοχολίνη	18 – 20min
5	SM	Σφιγγομυελίνη	23min
6	LPC	Λυσοφωσφατιδυλοχολίνη	33min
7	DGDG	Διγαλακτοζυλοδιγλυκερίδια	40min
8	PE	Φωσφατιδυλοχολίνη	62 - 64min



Σχήμα 6.50. Χαρακτηριστικό χρωματογράφημα διαχωρισμού των γλυκολιποειδών του *Chroococcidiopsis* sp. με HPLC σε στήλη silica, όπου φαίνονται οι περιοχές έκλουσης των προτύπων ουσιών, καθώς και το αντίστοιχο βαθμιδωτό σύστημα έκλουσης.

Στον Πίνακα 11 σημειώνεται η βιολογική δραστηριότητα για κάθε κλάσμα γλυκολιποειδούς.

Πίνακας 11 : Βιολογική δραστικότητα για κάθε κλάσμα γλυκολιποειδούς.

Κλάσμα	Συσσώρευση	Αναστολή	Περιοχή έκλουσης
GL ₁	όχι	* *	GALCER
GL ₂	όχι	* *	Μεταξύ GALCER και
GL ₃	όχι	όχι	PC
GL ₄	όχι	* *	SM
GL ₅	όχι	* *	LPC
GL ₆	όχι	* *	LPC
GL ₇	όχι	* *	Μεταξύ LPC και DGDG
GL ₈	όχι	όχι	Μεταξύ LPC και DGDG
GL ₉	όχι	όχι	DGDG
GL ₁₀	όχι	*	DGDG
GL ₁₁	+	όχι	Μετά τα DGDG
GL ₁₂	όχι	*	Μεταξύ DGDG και PE
GL ₁₃	όχι	*	PE
GL ₁₄	όχι	* *	Μετά την PE

Συσσώρευση πλυμένων αιμοπεταλίων κουνελιού που προκλήθηκε είτε από PAF $1,25 \times 10^{-10}$ M τελική συγκέντρωση, είτε από θρομβίνη (0,125 units / κυψελίδα). *: κλάσμα που αναστέλλει την προκαλούμενη από τον PAF συσσώρευση. όχι: κλάσμα χωρίς βιολογική δραστικότητα. * *: κλάσμα που αναστέλλει την από τον PAF και την τηρ συσσώρευση. + κλάσμα που προκαλεί συσσώρευση πλυμένων αιμοπεταλίων κουνελιού. * *: κλάσμα που αναστέλλει την από τον PAF και την θρομβίνη συσσώρευση.

Αναλυτικά: Το κλάσμα GL₁ εμφανίζει ανασταλτική δράση έναντι της συσσώρευσης των πλυμένων αιμοπεταλίων κουνελιού, με τιμή IC₅₀ για PAF 22λ. Η αναστολή της συσσώρευσης που προκαλεί στη θρομβίνη (thr) είναι 100%. Το κλάσμα GL₂ εμφανίζει ανασταλτική δράση έναντι της συσσώρευσης των πλυμένων αιμοπεταλίων κουνελιού, με την επίδραση PAF με IC₅₀ PAF=22,5λ. Η αναστολή της συσσώρευσης που προκαλείται στη θρομβίνη (thr) είναι 100%. Στο σχήμα 6.51 φαίνεται ο τρόπος υπολογισμού της τιμής IC₅₀ του κλάσματος αυτού.

Το κλάσμα GL₃ δεν παρουσιάζει βιολογική δραστικότητα.

Το κλάσμα GL₄ εμφανίζει ανασταλτική δράση έναντι της συσσώρευσης των πλυμένων αιμοπεταλίων κουνελιού, με την επίδραση PAF με IC₅₀ PAF=21λ. Η αναστολή της συσσώρευσης που προκαλεί στην θρομβίνη (thr) είναι 60%.

Το κλάσμα GL₅ εμφανίζει ανασταλτική δράση έναντι της συσσώρευσης των πλυμένων αιμοπεταλίων κουνελιού, με την επίδραση PAF με IC₅₀ PAF=15,5λ.. Η αναστολή της συσσώρευσης που προκαλεί στη θρομβίνη (thr) είναι 100%.

Το κλάσμα GL₆ εμφανίζει ανασταλτική δράση έναντι της συσσώρευσης των πλυμένων αιμοπεταλίων κουνελιού, με την επίδραση PAF με τιμή IC₅₀ PAF=31λ. Η αναστολή της συσσώρευσης που προκαλεί στη θρομβίνη (thr) είναι 97%.

Το κλάσμα GL₇ εμφανίζει ανασταλτική δράση έναντι της συσσώρευσης των πλυμένων αιμοπεταλίων κουνελιού, με την επίδραση PAF με IC₅₀ PAF=19λ. Η αναστολή της συσσώρευσης που προκαλεί το κλάσμα στη θρομβίνη (thr) είναι 100%.

Τα κλάσματα GL₈ και GL₉ δεν παρουσιάζουν βιολογική δραστικότητα.

Το κλάσμα GL₁₀ εμφανίζει ανασταλτική δράση έναντι της συσσώρευσης των πλυμένων αιμοπεταλίων κουνελιού, με την επίδραση PAF με IC₅₀ PAF=35λ. Η συγκεκριμένη ποσότητα του κλάσματος δεν επηρεάζει τη δράση της θρομβίνης.

Το κλάσμα GL₁₁ προκαλεί συσσώρευση αιμοπεταλίων με δοσοεξαρτώμενο τρόπο. Η συσσώρευση που προκαλείται από το κλάσμα αυτό, αναστέλλεται πλήρως από τον ειδικό αναστολέα των υποδοχέων του PAF, το BN52021.

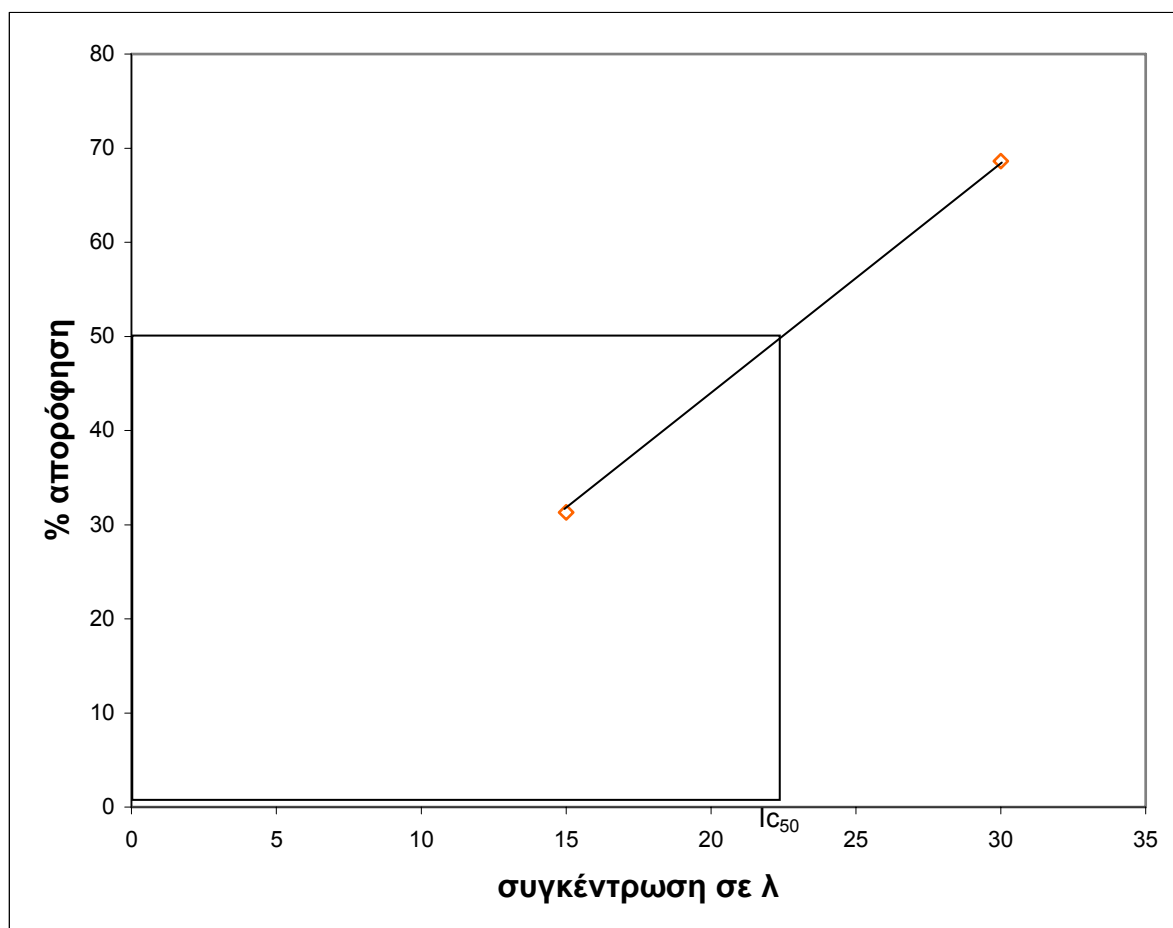
Επιπλέον, το κλάσμα αυτό απευαισθητοποιεί τα αιμοπετάλια έναντι της δράσης του PAF.

Το κλάσμα GL₁₂ εμφανίζει ανασταλτική δράση έναντι της συσσώρευσης των πλυμένων αιμοπεταλίων κουνελιού, με την επίδραση PAF με τιμή IC₅₀

$PAF=5\lambda$. Η συγκεκριμένη ποσότητα του κλάσματος δεν επηρεάζει τη συσσώρευση που προκαλείται από τη θρομβίνη (thr).

Το κλάσμα GL_{13} εμφανίζει ανασταλτική δράση έναντι της συσσώρευσης των πλυμένων αιμοπεταλίων κουνελιού, με την επίδραση PAF με τιμή $IC_{50\ PAF}=14\lambda$. Η συγκεκριμένη ποσότητα του κλάσματος δεν αναστέλλει τη δράση της θρομβίνης.

Το κλάσμα GL_{14} εμφανίζει ανασταλτική δράση έναντι της συσσώρευσης των πλυμένων αιμοπεταλίων κουνελιού, με την επίδραση PAF με τιμή $IC_{50\ PAF}=30\lambda$. Η αναστολή της συσσώρευσης που προκαλείται στη θρομβίνη (thr) είναι 98%.



Σχήμα 6.51. Υπολογισμός IC_{50} για PAF του γλυκολιποειδούς GL_2 του *Chroococcidiopsis* sp.

6.2.2.3. Πειράματα με ακετυλοϋδρολάση

Επώαση του κλάσματος GL₁₁ με ακετυλοϋδρολάση οδήγησε σταδιακά σε πλήρη απώλεια της δράσης του στα 3min.

Ποσότητα PAF που προκαλούσε το ίδιο ύψος συσώρευσης με το εξεταζόμενο κλάσμα, υδρολύθηκε από την ακετυλοϋδρολάση με τον ίδιο περίπου ρυθμό.

Τα δεδομένα αυτά υποδηλώνουν την ύπαρξη ακετυλομάδας στο κλάσμα GL₁₁ και πολύ πιθανά σε θέση γλυκερινικού σκελετού.

6.2.2.4. Ήπια αλκαλική υδρόλυση-Ακετυλίωση

Ακετυλίωση του αρχικού κλάσματος GL₁₂ οδήγησε σε αλλαγή της βιολογικής του δραστηριότητας. Συγκεκριμένα, το ακετυλιωμένο παράγωγό του προκαλεί συσώρευση αιμοπεταλίων. Η χλωροφορμική φάση που προέκυψε από την ήπια αλκαλική υδρόλυση, διατήρησε στο ακέραιο τη δραστηριότητα του κλάσματος. Επιπλέον, ακετυλίωση της παραπάνω χλωροφορμικής φάσης οδήγησε σε μόριο που εμφανίζει ποιοτικά και ποσοτικά την ίδια βιολογική δραστηριότητα με το ακετυλιωμένο παράγωγο του αρχικού κλάσματος.

Τα δεδομένα αυτά υποδηλώνουν ότι στο μόριο του GL₁₂ δεν πρέπει να υπάρχει εστερικός δεσμός, αλλά υπάρχει τουλάχιστον ένα ελεύθερο υδροξύλιο.

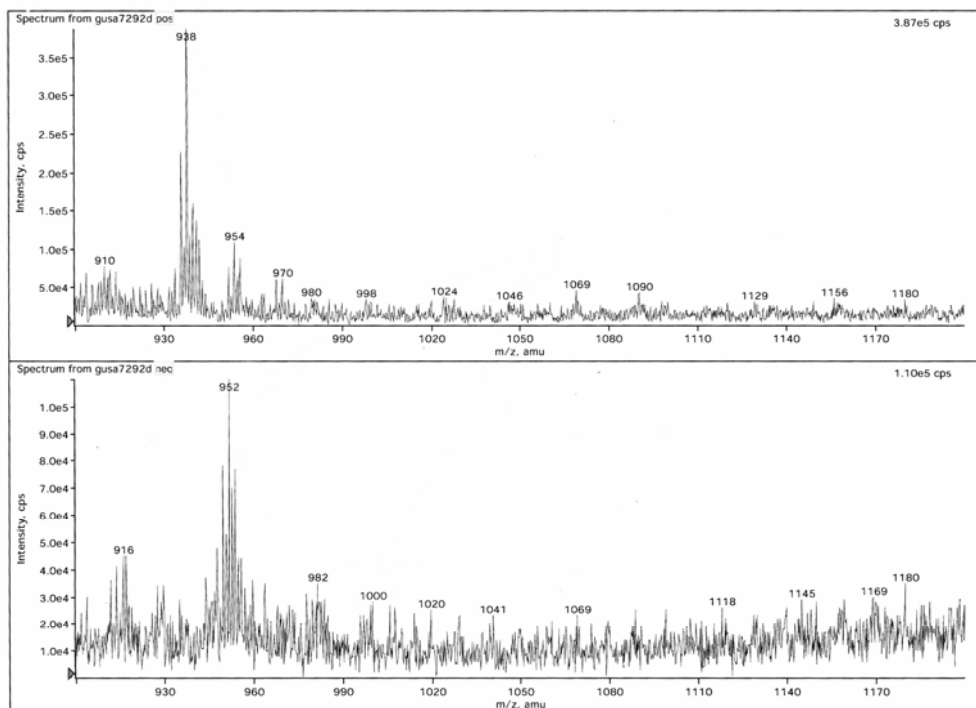
6.2.2.5. Φάσματα MS – Διαλεύκανση δομής

Από τα κλάσματα που εμφάνιζαν ανασταλτική δράση, επιλέχθηκε για διαλεύκανση δομής το GL₅ ως πιο δραστικό.

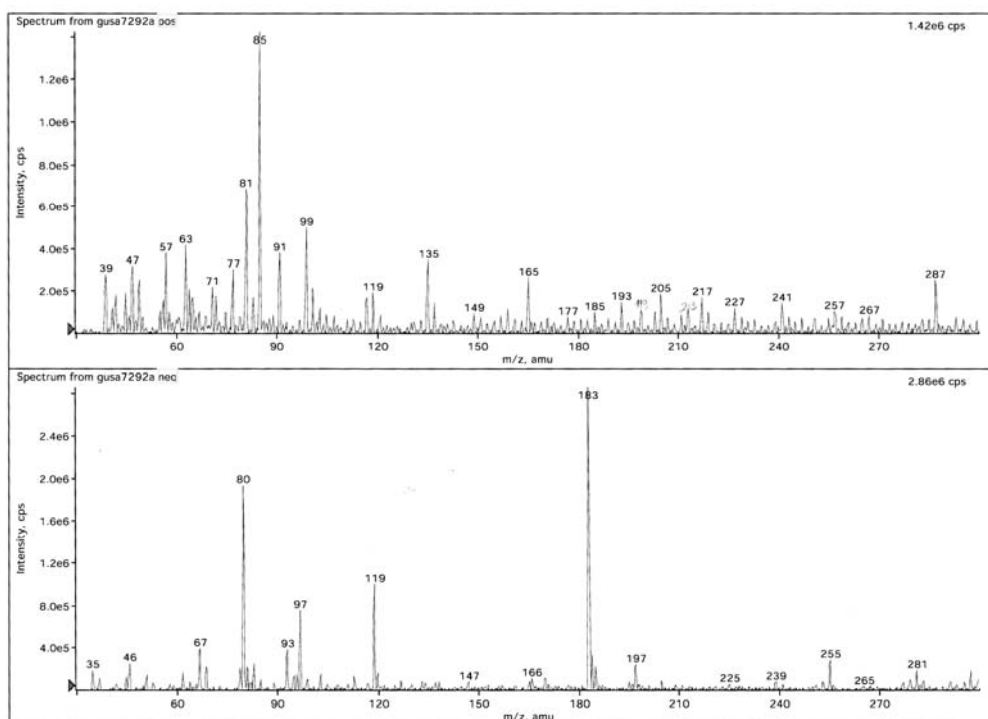
Το κλάσμα αυτό έχει μοριακό βάρος 1154, όπως φαίνεται από τα θετικά θραύσματα, σε m/z 1155 [M+H]⁺ και 1179 [M+H-CH₃CO+H+3Na-3H] (Σχ. 6.52).

Επιπλέον, η παρουσία τόσο των αρνητικών θραυσμάτων στα m/z 80 [HPO₃]⁻ και 97[H₂PO₄]⁻, όσο και των αντίστοιχων θετικών στα m/z 81 [H₃PO₄+H₃]⁺ (Σχ. 6.53), είναι μία ισχυρή απόδειξη ότι πρόκειται για φωσφολιπιδές.

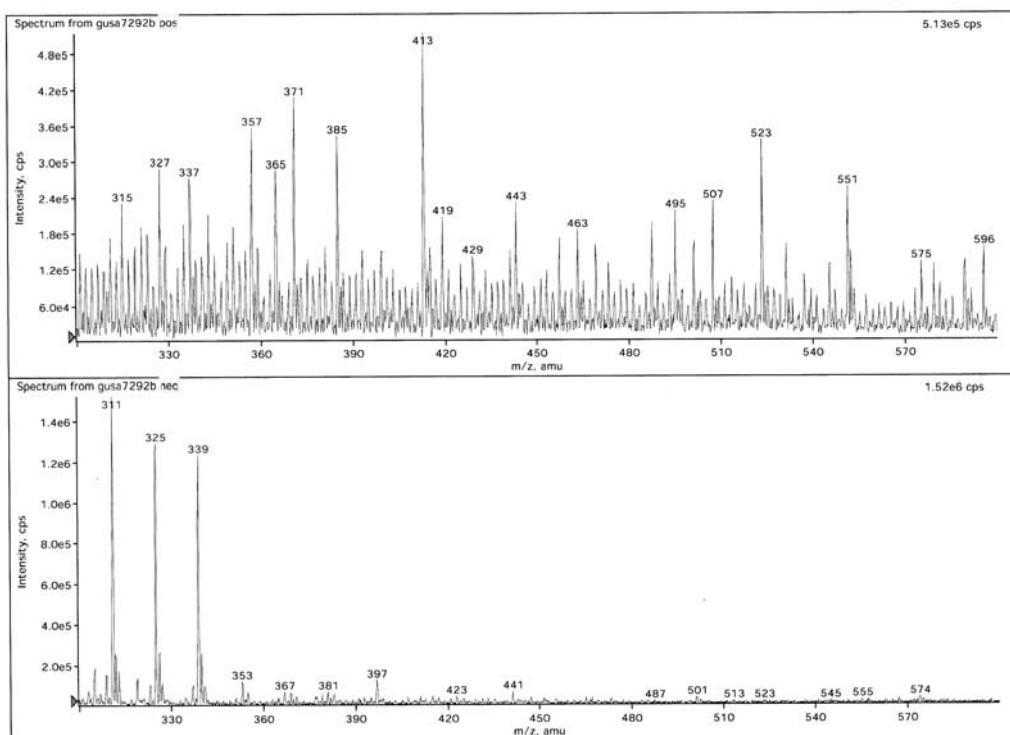
Τα αρνητικά θραύσματα στα m/z 311 και 339 (Σχ. 6.54), υποδηλώνουν την παρουσία των λιπαρών οξέων 20:0 και 22:0, στο σκελετό του GL₅. Η παρουσία της ακετυλομάδας και των παραπάνω λιπαρών οξέων αποδεικνύεται και από τα ακόλουθα θραύσματα σε m/z 883 [M+H-R₂CO+H+Na-H]⁺, σε m/z 867 [883-CH₃COOH-2H+2Na]⁺, σε m/z 817[M-R₂CO+H-CH₃CO+H]⁻, σε m/z 815[M+H-R₁COOH]⁺ σε m/z 773[815-CH₃CO+H]⁺, σε m/z 685[M-2H+Na-R₂COOH-σάκχαροA-O]⁻, σε m/z 635[M+Na-R₁CO+H-σάκχαροA-CH₃COO+H]⁺ (Σχ. 6.55), σε m/z 501[M-R₁COOH-R₂COOH-H]⁻ και τέλος σε m/z 441[501-CH₃COOH]⁻ (Σχ. 6.54).



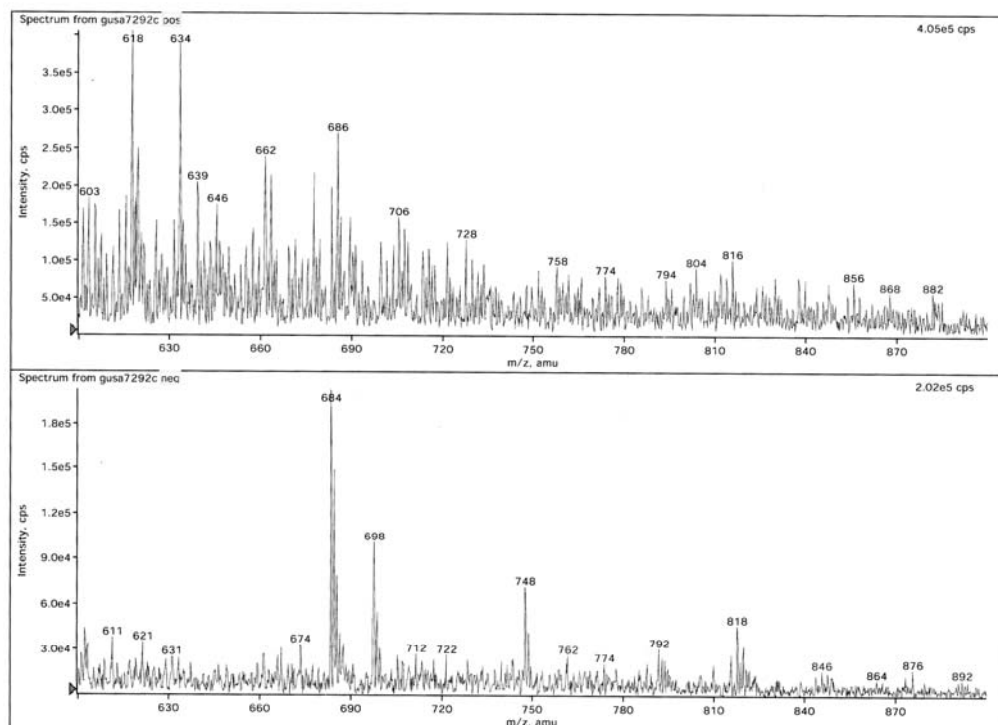
Σχήμα 6.52. Θετικό (A) και αρνητικό (B) ESI-MS του κλάσματος GL₅ από τα γλυκολιποειδή του *Chroococcidiopsis* sp. m/z από 900-1200.



Σχήμα 6.53. Θετικό (A) και αρνητικό (B) ESI-MS του κλάσματος GL₅ από τα γλυκολιποειδή του *Chroococcidiopsis* sp. m/z από 0-300.



Σχήμα 6.54. Θετικό (Α) και αρνητικό (Β) ESI-MS του κλάσματος GL₅ από τα γλυκολιποειδή του *Chroococcidiopsis* sp. m/z από 300-600.



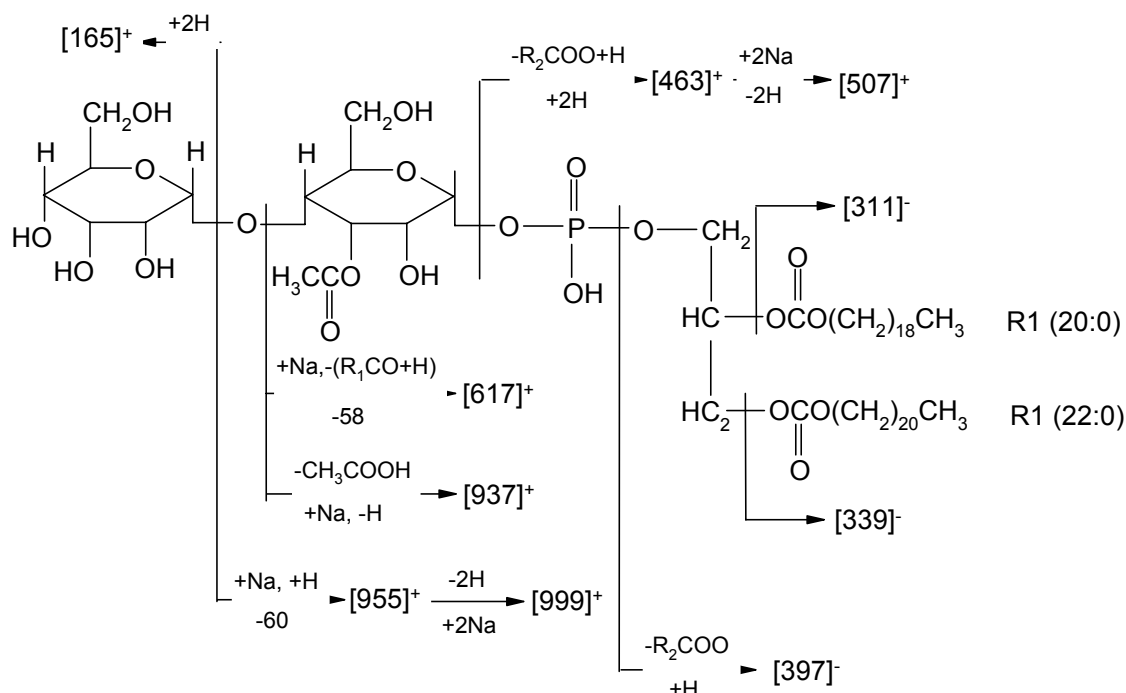
Σχήμα 6.55. Θετικό (Α) και αρνητικό (Β) ESI-MS του κλάσματος GL₅ από τα γλυκολιποειδή του *Chroococcidiopsis* sp. m/z από 600-900.

Επίσης, όπως φαίνεται από τα παραπάνω θραύσματα πρόκειται για γλυκολιποειδές, αφού άλλωστε εμφανίζεται και το θετικό θραύσμα του σακχάρου σε m/z 165.

Η παρουσία της τελικής μονάδας του σακχάρου πιστοποιείται ακόμα από τα θετικά θραύσματα σε m/z 999 $[M+3Na-H-CH_3COOH-σάκχαρο]^+$, σε m/z 955 $[M+H+Na-CH_3COOH-σάκχαρο]^+$, σε m/z 937 $[M+Na-H-CH_3COOH-σάκχαρο-O]^+$ (Σχ. 6.52) και σε m/z 617 $[M+Na-R_1CO+H-CH_3COOH+H]^+$ (Σχ. 6.55), καθώς και από το αρνητικό θραύσμα σε m/z 953 $[M+H+Na-CH_3COOH-σάκχαρο]^-$. Η παρουσία μετά Na αλάτων είναι ιδιαίτερα διαδεδομένη σε λιποειδή που απομονώνονται από φυσικές πηγές.

Η παρουσία των δύο μονάδων σακχάρων (Α και Β) επιβεβαιώνεται από το κυρίαρχο αρνητικό θραύσμα σε m/z 325 $[A+B+O-CH_3COOH+H]^-$ και το θετικό θραύσμα σε m/z 365 $[A+B+O-CH_3CO+H+H+Na]^+$ (Σχ. 6.54).

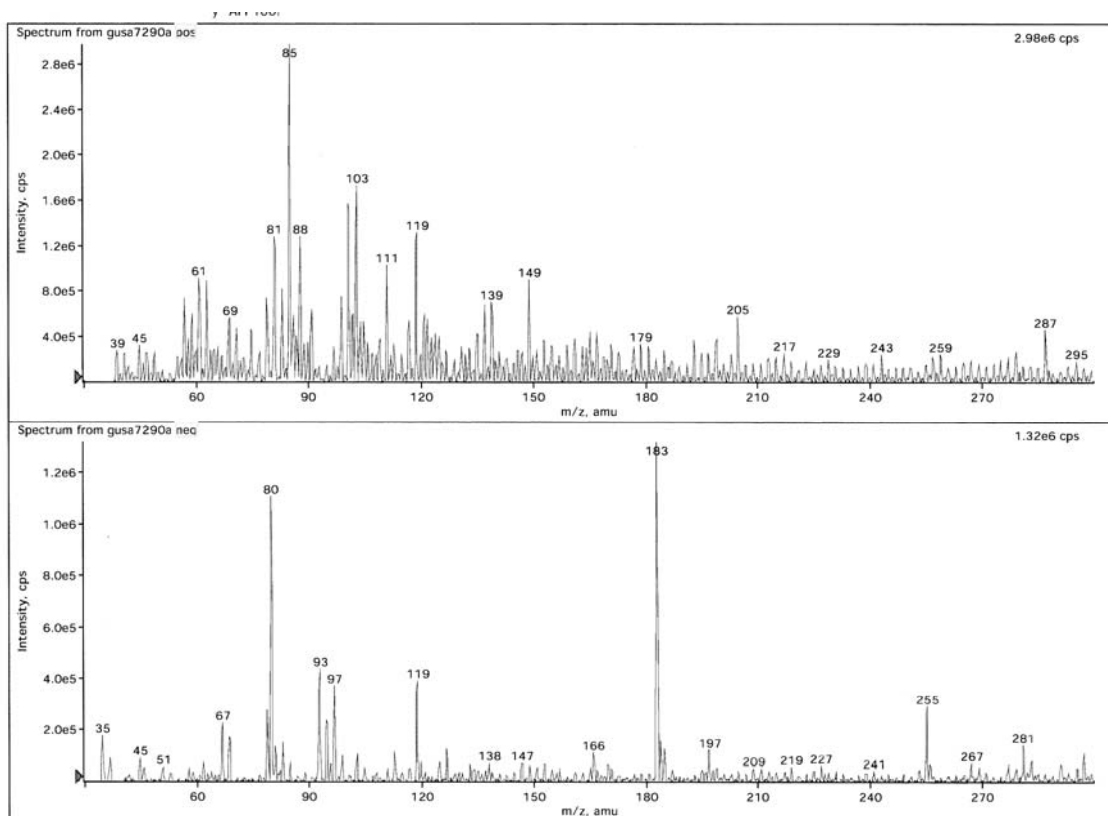
Στο σχήμα 6.56 παρουσιάζεται η προτεινόμενη δομή του κλάσματος GL₅, καθώς επίσης και τα επιπλέον θραύσματα που πιστοποιήθηκαν.



Σχήμα 6.56. Προτεινόμενη δομή μαζί με τα χαρακτηριστικότερα θραύσματα του κλάσματος GL₅ από τα γλυκολιποειδή του *Chroococcidiopsis* sp.

Η περιορισμένη ποσότητα του GL₁₁ δεν επέτρεπε κανένα χημικό προσδιορισμό και γι'αυτό το λόγο, η διαλεύκανση της δομής του στηρίχτηκε αποκλειστικά στα φάσματα EIS/MS.

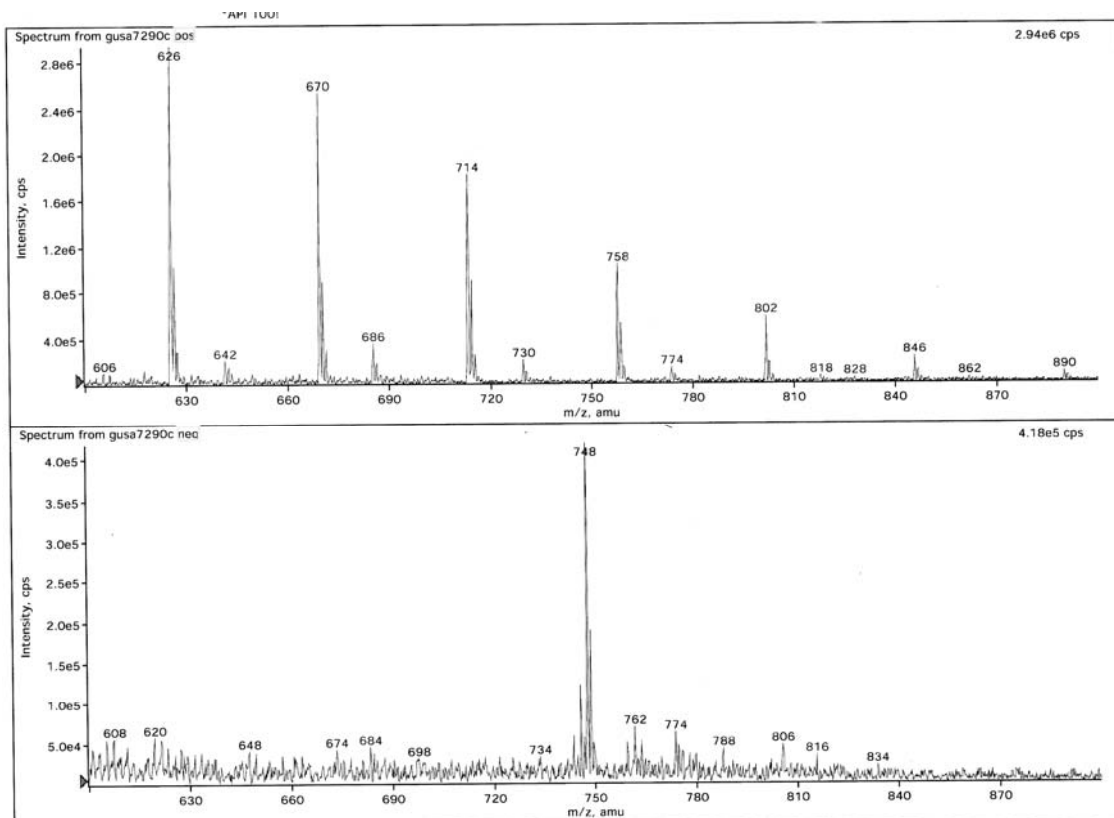
Πρόκειται για φωσφολιποειδές, αφού εμφανίζονται τα χαρακτηριστικά θραύσματα της φωσφορικής ομάδας και πιο συγκεκριμένα τα θετικά ιόντα σε m/z 81[H₂PO₃]⁺ και 99[H₃PO₄+H]⁺, καθώς και τα αρνητικά ιόντα σε m/z 80[HPO₃]⁻ και 97[H₂PO₄]⁻ (Σχ. 6.57).



Σχήμα 6.57. Θετικό (Α) και αρνητικό (Β) ESI-MS του κλάσματος GL₁₁ από τα γλυκολιποειδή του *Chroococcidiopsis* sp. m/z από 0-300.

Επιπλέον, η παρουσία των θετικών θραυσμάτων σε m/z 818[M+H]⁺ και 862[M+2Na-H]⁺, καθώς και του αρνητικού θραύσματος σε m/z 816[M-H]⁻ (Σχ. 6.58), δείχνει ότι το λιποειδές αυτό έχει μοριακό βάρος 817.

Επιπλέον, τα κυρίαρχα θετικά ιόντα σε m/z 802[862-CH₃COOH]⁺, σε m/z 758[818-CH₃COOH]⁺ καθώς και το αρνητικό ιόν σε m/z 774[816-CH₃CO+H]⁻, υποδηλώνουν την παρουσία ακετυλομάδας και μάλιστα σε μονάδα σακχάρου, αφού είναι γνωστό ότι η ακετυλομάδα αποχωρεί από σάκχαρο ως 60 unit. Η παρουσία ακετυλομάδας ήταν άλλωστε αναμενόμενη και από τα αποτελέσματα του πειράματος με την ακετυλοϋδρολάση.



Σχήμα 6.58. Θετικό (Α) και αρνητικό (Β) ESI-MS του κλάσματος GL₁₁ από τα γλυκολιποειδή του *Chroococcidiopsis* sp. m/z από 600-900.

Επιπλέον, τα θετικά θραύσματα σε m/z 686[862-62-116]⁺, σε m/z 670[862-60-114-H₂O]⁺, σε m/z 642[818-60-116]⁺ και σε m/z 626[818-60-114-H₂O]⁺, αποδεικνύουν την ύπαρξη του λιπαρού οξέος C_{6:0} στη δομή του κλάσματος GL₁₁.

Τα θετικά θραύσματα σε m/z 305, 287, 243 και 205 καθώς και τα αρνητικά σε m/z 319, 281 και 227 (Σχ. 6.57, 6.58), οφείλονται στη μονάδα του σακχάρου μετά την απομάκρυνση είτε της ακετυλομάδας ως 60 unit, είτε του λιπαρού οξέος με τη μορφή RCO⁻ ή RCOO⁻.

Τέλος, το φωσφορυλιωμένο σάκχαρο με αντίστοιχες με τις παραπάνω διασπάσεις, οδηγεί στο σχηματισμό των κυρίαρχων αρνητικών θραυσμάτων σε m/z 339 και 305 καθώς και των θετικών σε m/z 385, 315, 337, και 413.

Στο σχήμα 6.59 παρουσιάζεται η δομή του κλάσματος GL₁₁, καθώς και διασπάσεις του μορίου του, που οδηγούν σε πιστοποιημένα θραύσματα.

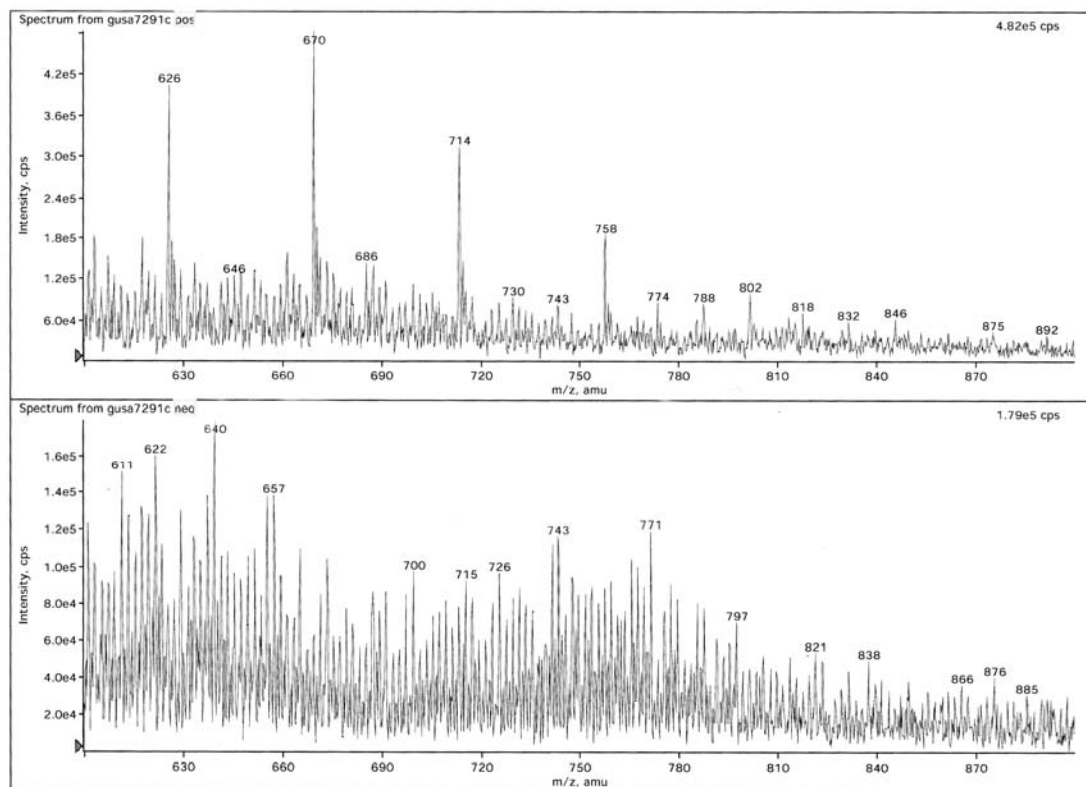
Τέλος, επιλέχθηκε για διαλεύκανση της δομής και το κλάσμα GL₁₂, διότι εμφανίζει ανασταλτική δράση μόνο έναντι της συσώρευσης αιμοπεταλίων που προκαλείται από τον PAF. Το γεγονός ότι το κλάσμα GL₁₂ χρωματογραφείται αμέσως μετά από το GL₁₁, το οποίο προκαλούσε

Η σχετικά ευρεία περιοχή έκλουσης του GL_{12} μαζί με τα φάσματα MS

Το δεύτερο μοριακό ανάλογο έχει MB₂:771 και εμφανίζεται το αρνητικό

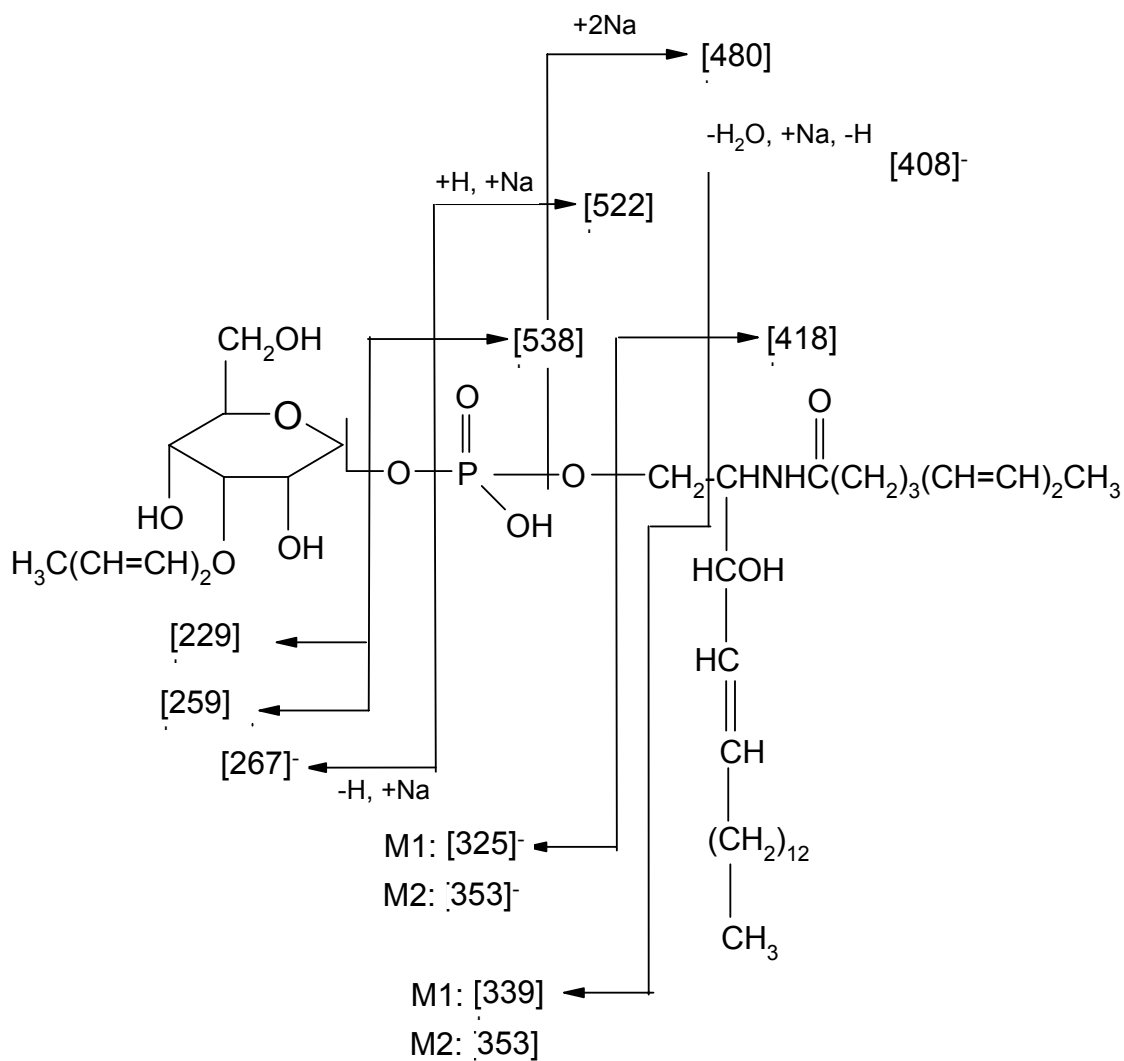
— 191 —

παρουσιάζονται τα θετικά θραύσματα σε m/z 758 $[M+H]^+$ και 802 $[M+2Na-H]^+$ (Σχ. 6.60).



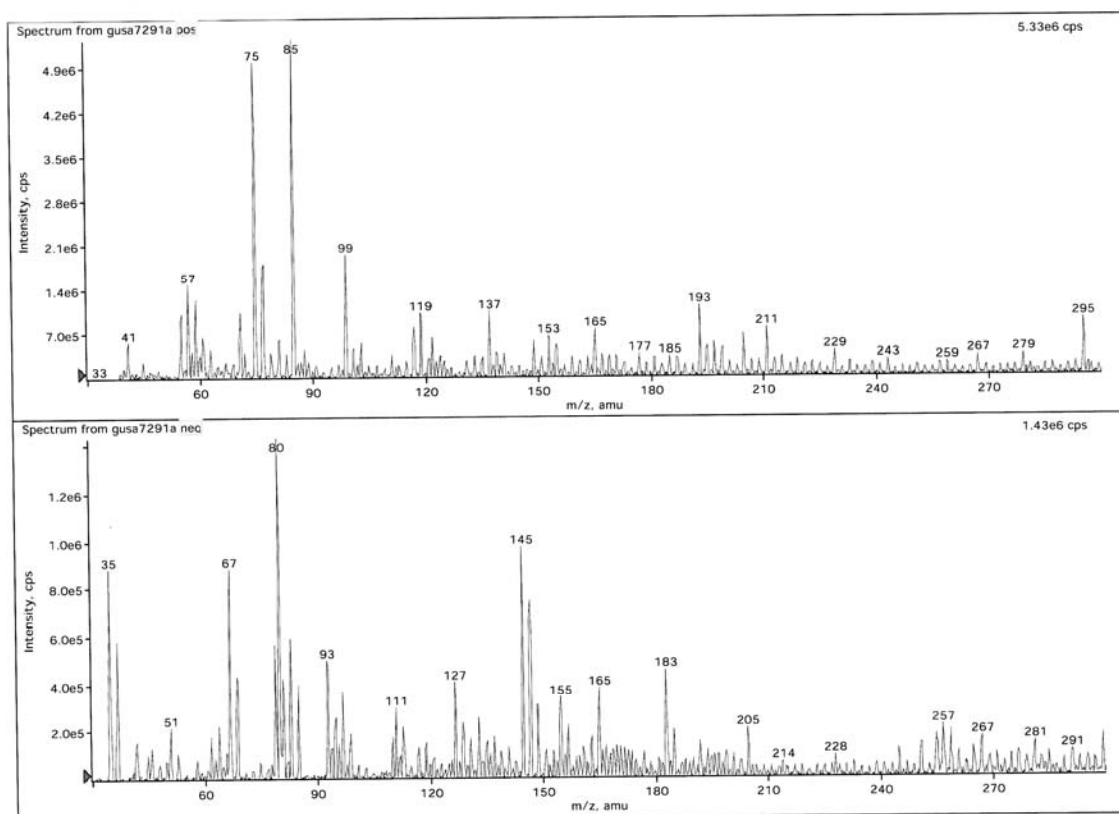
Σχήμα 6.60. Θετικό (Α) και αρνητικό (Β) ESI-MS του κλάσματος GL₁₂ από τα γλυκολιποειδή του *Chroococcidiopsis* sp. m/z από 600-900.

Τα δεδομένα από τα φάσματα του MS επιβεβαιώνουν τις προηγούμενες υποθέσεις και στηρίζουν τη δομή του κλάσματος GL₁₂ που παρουσιάζεται στο σχήμα 6.61, μαζί με πιστοποιημένα θραύσματα. Πρόκειται για φωσφο-γλυκο-παράγωγο κηραμιδίου, όπου υπάρχει αιθερικός δεσμός με μικρή λιπαρή αλυσίδα στη μονάδα του σακχάρου, τα δε μοριακά ανάλογα διαφοροποιούνται ως προς το μήκος της αλυσίδας αυτής.



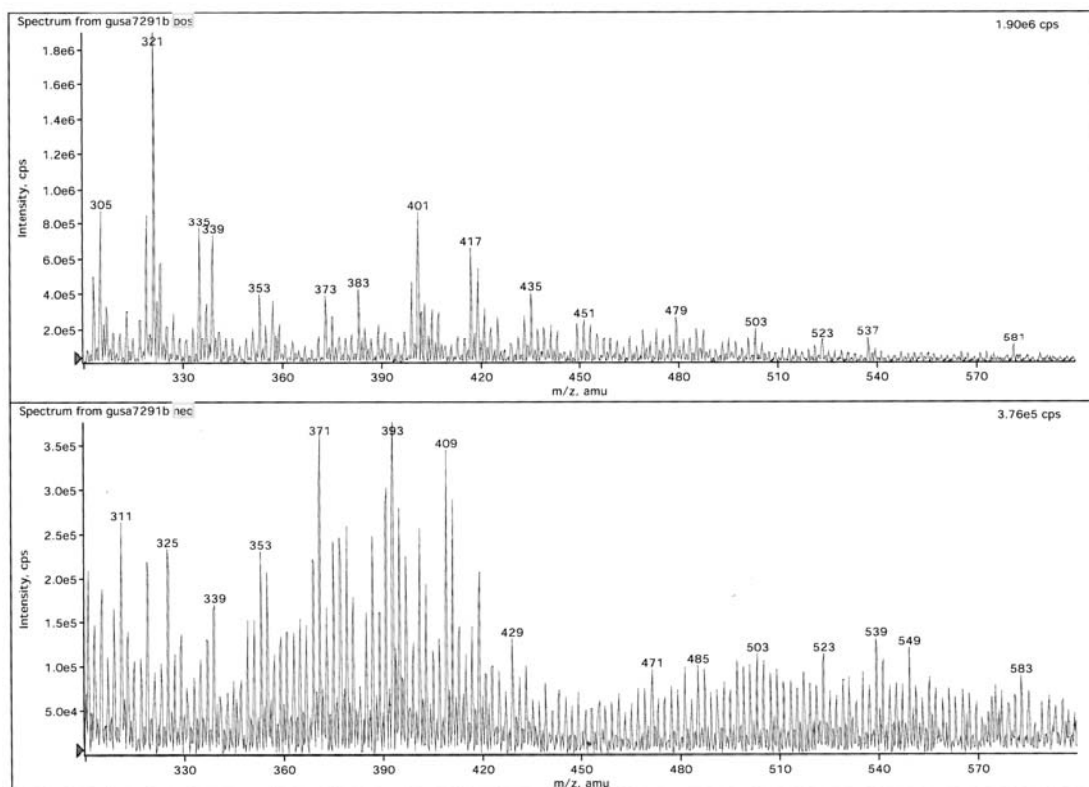
Σχήμα 6.61. Προτεινόμενη δομή μαζί με τα χαρακτηριστικότερα θραύσματα του κλάσματος GL₁₂ από τα γλυκολιποειδή του *Chroococcidiopsis* sp.

Η ύπαρξη της μονάδας του σακχάρου πιστοποιείται από τα θετικά θραύσματα σε m/z 229, σε m/z 295[229+3Na-3H]⁺, σε m/z 193[229-2H₂O]⁺ και σε m/z 145[229-CH₃(CH=CH)₂OH]⁺ για την ένωση με MB₁, σε m/z 259[257+2H]⁺, σε m/z 279[257+Na-H]⁺ για την ένωση με MB₂ και σε m/z 243 για την ένωση με MB₃ (Σχ. 6.62).



Σχήμα 6.62. Θετικό (Α) και αρνητικό (Β) ESI-MS του κλάσματος GL₁₂ από τα γλυκολιποειδή του *Chroococcidiopsis* sp. m/z από 0-300.

Επιπλέον, τα αρνητικά θραύσματα που πιστοποιούν την ύπαρξη του σακχάρου είναι για την ένωση με MB₁ σε m/z 267 (Σχ. 6.62) και σε m/z 325 (Σχ. 6.63) για την ένωση με MB₂, σε m/z 353 (Σχ. 6.63) και τέλος για εκείνη με MB₃ σε m/z 281 (Σχ. 6.62) και σε m/z 339 (Σχ. 6.63). Οι διασπάσεις που οδηγούν στα παραπάνω θραύσματα παρουσιάζονται στο σχήμα 6.61. Η παρουσία της φωσφορικής ομάδας πιστοποιείται από τα αρνητικά θραύσματα σε m/z 80[HPO₃]⁻ και 97[H₂PO₄]⁻, καθώς και από τα θετικά ανάλογά τους σε m/z 81[H₂PO₃]⁺ και 99[H₃PO₄+H]⁺ (Σχ. 6.62). Επιπλέον στο σχήμα 6.61 φαίνονται οι διασπάσεις που οδηγούν στο σχηματισμό των θετικών θραυσμάτων σε m/z 339 (MB₁) και σε m/z 353 (MB₃).



Σχήμα 6.63. Θετικό (Α) και αρνητικό (Β) ESI-MS του κλάσματος GL₁₂ από τα γλυκολιποειδή του *Chroococcidiopsis* sp. m/z από 300-600.

Η δομή του φωσφο-κηραμιδίου που προτείνεται στηρίζεται στην παρουσία των θετικών θραυσμάτων σε m/z 538[φωσφο-κηραμίδιο+H+Na]⁺, σε m/z 582[538+2Na-2H]⁺, σε m/z 522[φωσφονο-κηραμίδιο+H+Na]⁺, σε m/z 504[522-H₂O]⁺, σε m/z 480[κηραμίδιο+2Na-H]⁺ και σε m/z 502[480+Na-H]⁺ (Σχ. 6.63). Οι πορείες διάσπασης του μορίου, που οδηγούν στα παραπάνω θραύσματα φαίνονται στο σχήμα 6.61.

Το κυρίαρχο θετικό θραύσμα 320 αντιστοιχεί στο θραύσμα

$$\begin{array}{c} \text{O} \\ + \parallel \\ \text{Na}_2\text{PO}_4\text{CH}_2\text{CH}=\text{NHC}(\text{CH}_2)_3(\text{CH}=\text{CH})_2\text{CH}_3 \end{array}$$

το οποίο εμφανίζεται σε θετικά EI-MS σύμφωνα με τη βιβλιογραφία (Olsson, B-M. et al. 1999).

6.2.2.6. Σύνοψη-συζήτηση αποτελεσμάτων των γλυκολιποειδών του *Chroococcidiopsis* sp.

Τα γλυκολιποειδή του *Chroococcidiopsis* sp. εμφανίζουν κυρίως ανασταλτική δράση έναντι της συσσώρευσης αιμοπεταλίων με PAF, ADP. Τα πιο δραστικά κλάσματα ήταν το GL₅ και το GL₁₂. Η δομή του GL₅, όπως επιβεβαιώθηκε από τα φάσματα MS αντιστοιχεί σε φωσφο-ακετυλιωμένο γλυκο-ανάλογο

διγλυκεριδίου. Έχει αποδειχθεί από προηγούμενες δημοσιεύσεις (Anagnostopoulou, V. et al. 1997) ότι φωσφο-ακετυλιωμένα γλυκο-γλυκερο-λιποειδή έχουν διπλή δράση, δηλαδή εμφανίζουν σε χαμηλές συγκεντρώσεις ανασταλτική δράση και σε υψηλότερες συγκεντρώσεις, προκαλούν συσσώρευση αιμοπεταλίων. Όμως πρέπει να επισημανθεί ότι ακετυλο-ομάδα βρισκόταν και στην sn-2 θέση του γλυκερινικού σκελετού. Όπως φαίνεται από τα αποτελέσματα των γλυκολιποειδών του *Chroococcidiopsis* sp., η παρουσία ακετυλομάδας μόνο στη μονάδα του σακχάρου, οδηγεί σε μόριο που εμφανίζει ανασταλτική δράση.

Η δομή του GL₁₂, η οποία στηρίζεται τόσο στα αποτελέσματα των πειραμάτων ήπιας αλκαλικής υδρόλυσης-ακετυλίωσης, όσο και στα φάσματα MS, αντιστοιχεί σε φωσφο-γλυκο ανάλογο κηραμιδίου.

Τέλος, το κλάσμα GL₁₁ ήταν το μόνο που προκαλούσε συσσώρευση αιμοπεταλίων. Τα αποτελέσματα των πειραμάτων με AH καθώς και τα φάσματα MS επιβεβαιώνουν ότι πρόκειται για φωσφο-ακετυλιωμένο γλυκο-ανάλογο κηραμιδίου.

Θα πρέπει να τονιστεί ότι ο σκελετός του κηραμιδίου είναι, όπως φαίνεται, ιδιαίτερα διαδεδομένος στα λιποειδή των κυανοβακτηρίων και φαίνεται ότι ενώ τα ακετυλιωμένα παράγωγα φωσφο-γλυκο-κηραμιδίων καθώς και η ακετυλιωμένη σφιγγομυελίνη (Antonopoulou, S. et al. 2002) προκαλούν συσσώρευση αιμοπεταλίων, τα μη ακετυλιωμένα παράγωγα και πιο συγκεκριμένα, όπως φαίνεται από τη δομή του GL₁₂, τα αιθερικά ανάλογα φωσφο-γλυκο-κηραμιδίων είναι ειδικοί αναστολείς της δράσης του PAF.

6.2.3. Ουδέτερα λιποειδή (NL)

6.2.3.1. Διαχωρισμός ουδετέρων λιποειδών με HPLC

Προκειμένου να διαχωριστούν τα ουδέτερα λιποειδή στα συστατικά τους, το μέτωπο του διαλύτη, από το διαχωρισμό των γλυκολιποειδών με HPLC και το κλάσμα των ουδετέρων λιποειδών, όπως προέκυψε από το διαχωρισμό των ολικών λιποειδών με κατανομή κατά αντιρροή, εξατμίστηκε σε περιστρεφόμενο συμπυκνωτή κενού και αναδιαλύθηκε με διαλύτη χλωροφόρμιο:μεθανόλη 1:1. Χρωματογραφήθηκε σε διαδοχικές ισόποσες ενέσεις, με HPLC σε στήλη ανάστροφης φάσης C-18 και το ακόλουθο βαθμιδωτό σύστημα έκλουσης: μεθανόλη:νερό (M:W) 4:1, μέχρι τα 10min, οπότε η σύσταση των διαλυτών αλλάζει σε ακετονιτρίλιο:μεθανόλη (ACN:M) 7:5, η οποία παραμένει ως τα 15min για να αλλάξει στα 25min σε ακετονιτρίλιο:μεθανόλη (ACN:THF) 99,5:0,5 η οποία παραμένει για 5min, για να αλλάξει στα 45min σε ισοπροπανόλη:ακετονιτρίλιο (IPA:ACN) 99:1 οπότε και παραμένει ως τα 65min. Χρησιμοποιήθηκε ανιχνευτής υπεριώδους στα 208nm και ροή 1ml/min. Οι χρόνοι που εκλούνται τα πρότυπα ουδετέρων λιποειδών φαίνονται στο σχήμα 6.64.

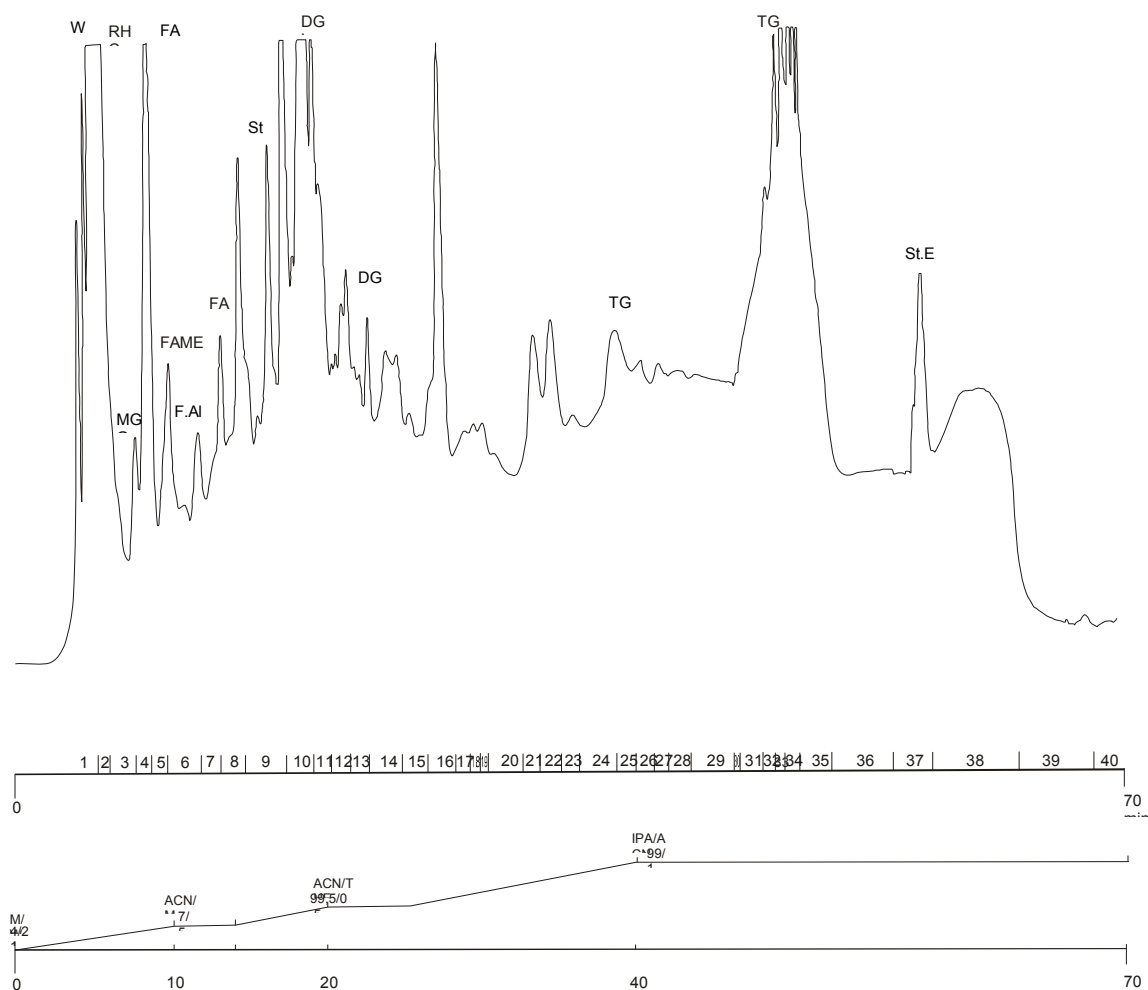
Τα ουδέτερα λιποειδή συγκρατούνται ως ένα βαθμό από τη στήλη και εκλούνται σε διαφορετικούς χρόνους, με σειρά μειούμενης πολικότητας.

Μετά από διαδοχικές ισόποσες ενέσεις, ενώθηκαν οι ίδιες περιοχές από κάθε χρωματογράφημα και τελικά προέκυψαν 40 κλάσματα: NL₁, NL₂, NL₃, NL₄, NL₅, NL₆, NL₇, NL₈, NL₉, NL₁₀, NL₁₁, NL₁₂, NL₁₃, NL₁₄₊₁₅, NL₁₆, NL₁₇, NL₁₈, NL₁₉, NL₂₀, NL₂₁, NL₂₂, NL₂₃, NL₂₄, NL₂₅, NL₂₆, NL₂₇, NL₂₈, NL₂₉, NL₃₀, NL₃₁, NL₃₂, NL₃₃, NL₃₄, NL₃₅, NL₃₆, NL₃₇, NL₃₈, NL₃₉, NL₄₀.

6.2.3.2. Βιολογική δοκιμασία των ουδετέρων λιποειδών

Από την βιολογική δοκιμασία προέκυψε ότι από τα 40 κλάσματα των ουδετέρων λιποειδών που συλλέχθηκαν, η πλειοψηφία αυτών δεν εμφανίζει βιολογική δραστηριότητα, κάποια κλάσματα δρουν ως αναστολείς, ενώ άλλα προκαλούν συσσώρευση. Συγκεκριμένα, τα κλάσματα NL₁, NL₄, NL₅, NL₁₀, NL₁₅, NL₁₆, NL₁₈, NL₁₉, NL₂₉, NL₃₀, NL₃₂, και NL₃₈, εμφανίζουν ανασταλτική δράση έναντι της συσσώρευσης των πλυμένων αιμοπεταλίων κουνελιού, που προκαλείται από τον PAF και τη θρομβίνη.

Τα κλάσματα NL₂, και NL₃₁ προκαλούσαν συσσώρευση των πλυμένων αιμοπεταλίων κουνελιού, αλλά σε διαφορετικές ποσότητες προκαλούσαν και αναστολή της δράσης του PAF και της θρομβίνης. Τέλος, το κλάσμα NL₂₇ προκαλούσε μόνο συσσώρευση των αιμοπεταλίων.



Σχήμα 6.64. Χαρακτηριστικό χρωματογράφημα διαχωρισμού των ουδετέρων λιποειδών του *Chroococcidiopsis* sp. με HPLC σε στήλη ανάστροφης φάσης, όπου φαίνονται και οι περιοχές έκλουσης των προτύπων ουσιών.

MG: Μονογλυκερίδια, RH: Υδρογονάνθρακες, FA: Λιπαρά οξέα, FAL: Λιπαρές αλκοόλες, VitE: Βιταμίνη E, BAL: Βουτυλική αλκοόλη, FAME: Μεθυλεστέρες λιπαρών οξέων, DG: Διγλυκερίδια, TG: Τριγλυκερίδια, CE: Εστέρες χοληστερόλης.

Πίνακας 12: Αποτελέσματα βιολογικής δοκιμασίας και χρωματογραφική συμπεριφορά των ουδετέρων λιποειδών του *Chroococcidiopsis* sp., μετά από διαχωρισμό με HPLC σε στήλη ανάστροφης φάσης C-18.

ΚΛΑΣΜΑ	ΣΥΣΣΩΡΕΥΣΗ	ΑΝΑΣΤΟΛΗ	ΠΕΡΙΟΧΗ ΕΚΛΟΥΣΗΣ
NL ₁	όχι	**	Στην περιοχή των W
NL ₂	+	*	Στην περιοχή των w
NL ₃	όχι	όχι	Στην περιοχή των RH και mg
NL ₄	όχι	**	Στην περιοχή των mg και FA
NL ₅	όχι	**	Στην περιοχή των FA και FAME
NL ₆	όχι	όχι	Στην περιοχή των F.AL
NL ₇	όχι	όχι	Στην περιοχή των F.AL
NL ₈	όχι	όχι	Στην περιοχή των FA
NL ₉	όχι	όχι	Στην περιοχή των St
NL ₁₀	όχι	**	Στην περιοχή των St και DG
NL ₁₁	όχι	όχι	Στην περιοχή των DG
NL ₁₂	όχι	όχι	Στην περιοχή των DG
NL ₁₃	όχι	όχι	Στην περιοχή των DG
NL ₁₄	όχι	όχι	Στην περιοχή των DG
NL ₁₅	όχι	*	Στην περιοχή των DG
NL ₁₆	όχι	*	Στην περιοχή των DG
NL ₁₇	όχι	όχι	Στην περιοχή των DG
NL ₁₈	όχι	*	Στην περιοχή των DG
NL ₁₉	όχι	*	Μεταξύ DG και TG
NL ₂₀	όχι	όχι	Μεταξύ DG και TG
NL ₂₁	όχι	όχι	Μεταξύ DG και TG
NL ₂₂	όχι	όχι	Μεταξύ DG και TG
NL ₂₃	όχι	όχι	Στην περιοχή των TG
NL ₂₄	όχι	όχι	Στην περιοχή των TG

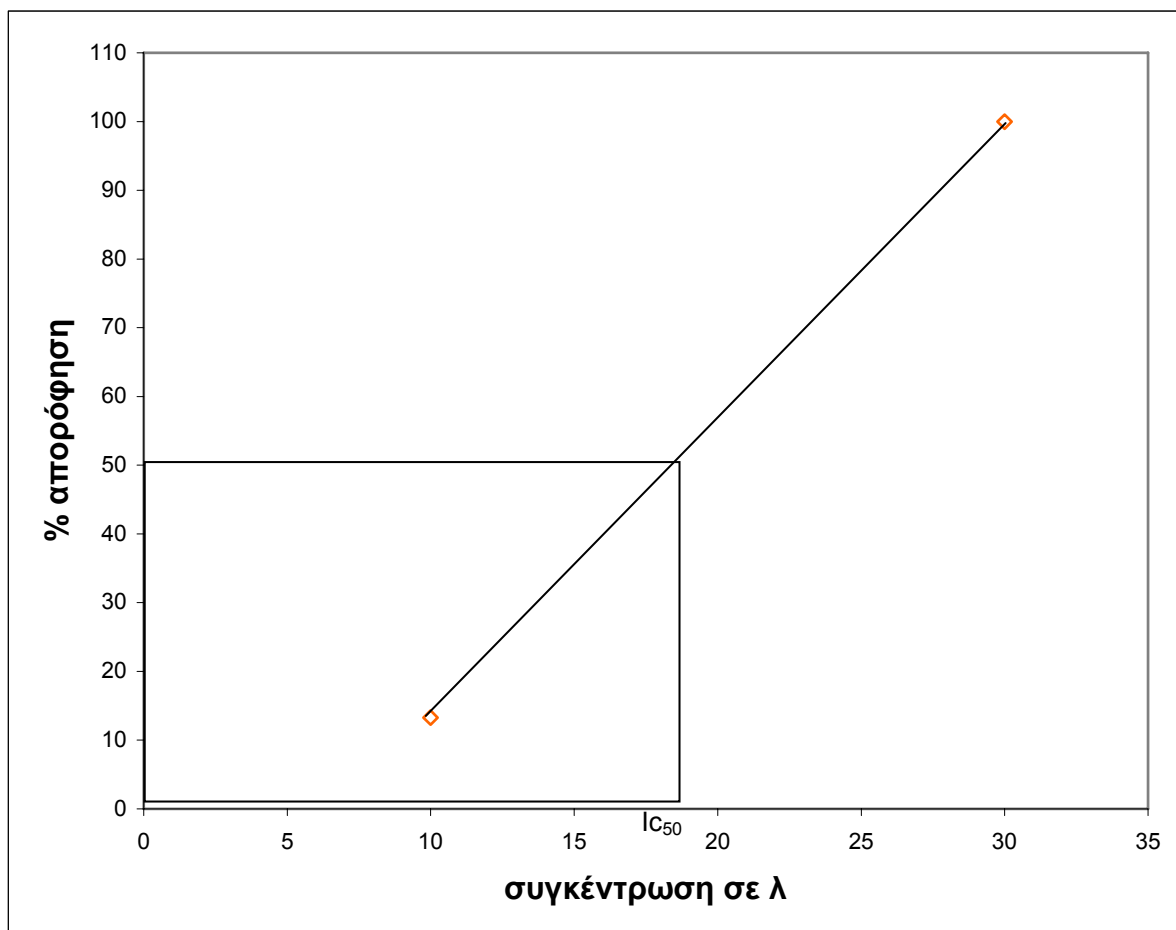
ΚΛΑΣΜΑ	ΣΥΣΣΩΡΕΥΣΗ	ΑΝΑΣΤΟΛΗ	ΠΕΡΙΟΧΗ ΕΚΛΟΥΣΗΣ
NL ₂₅	όχι	όχι	Στην περιοχή των TG
NL ₂₆	όχι	όχι	Στην περιοχή των TG
NL ₂₇	+	*	Στην περιοχή των TG
NL ₂₈	όχι	όχι	Στην περιοχή των TG
NL ₂₉	όχι	*	Στην περιοχή των TG
NL ₃₀	όχι	*	Στην περιοχή των TG
NL ₃₁	+	**	Στην περιοχή των TG
NL ₃₂	όχι	**	Στην περιοχή των TG
NL ₃₃	όχι	όχι	Στην περιοχή των TG
NL ₃₄	όχι	όχι	Στην περιοχή των TG
NL ₃₅	όχι	όχι	Στην περιοχή των TG
NL ₃₆	όχι	όχι	Μεταξύ TG και St.E
NL ₃₇	όχι	όχι	Στην περιοχή των St.E
NL ₃₈	όχι	**	Στην περιοχή των St.E
NL ₃₉	όχι	όχι	Μετά τους St.E
NL ₄₀	όχι	όχι	Μετά τους St.E

όχι: κλάσμα χωρίς βιολογική δραστηριότητα *: κλάσμα που αναστέλλει την προκαλούμενη από τον PAF (1.25×10^{-10} M, τελική συγκέντρωση) συσσώρευση. +: κλάσμα που προκαλεί συσσώρευση πλυμένων αιμοπεταλίων κουνελιού. *: κλάσμα που αναστέλλει την από τον PAF και την τη συσσώρευση.

W: κηροί,mg: Μονογλυκερίδια, RH: Υδρογονάνθρακες, FA: Λιπαρά οξέα, FAL: Λιπαρές αλκοόλες, FAME: Μεθυλεστέρες λιπαρών οξέων, DG: Διγλυκερίδια, St: στερόλες, TG: Τριγλυκερίδια, St.E: Εστέρες στερολών.

Αναλυτικά: Το κλάσμα NL₁ εμφανίζει ανασταλτική δράση έναντι της συσσώρευσης των πλυμένων αιμοπεταλίων κουνελιού με την επίδραση PAF με IC_{50(PAF)}=18λ. Η συγκεκριμένη ποσότητα προκαλεί επίσης πλήρη αναστολή στην προκαλούμενη από τη θρομβίνη συσσώρευση.

Τα κλάσματα NL₄ και NL₅ αναστέλλουν την προκαλούμενη από τον PAF συσσώρευση με τιμή IC₅₀ =10λ. Στην συγκεκριμένη ποσότητα τα δύο κλάσματα αναστέλλουν πλήρως την προκαλούμενη από τη θρομβίνη συσσώρευση.



Σχήμα 6.65. Υπολογισμός IC₅₀ για PAF του ουδετέρου λιποειδούς NL₁₀ του *Chroococcidiopsis* sp.

Το κλάσμα NL₁₀ έχει τιμή IC₅₀ για PAF 17λ. Η συγκέντρωση αυτή αναστέλλει πλήρως τη δράση της θρομβίνης στα αιμοπετάλια.

Τα κλάσματα NL₁₅ και NL₁₆ εμφάνισαν αναστολή της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων που προκαλείται από PAF. Δεν υπολογίσθηκε το IC₅₀ των κλασμάτων αυτών, γιατί η αναστολή που εμφάνιζαν δεν ήταν δόσοεξαρτώμενη και πιο συγκεκριμένα, παρατηρήθηκε αναστολή περίπου 80% σε ποσότητα 8λ και 10λ, αντίστοιχα.

Ίδια περίπτωση με την παραπάνω εμφανίστηκε και στα κλάσματα NL₁₈, NL₁₉, NL₂₉, και NL₃₀, που προκαλούσαν περίπου 70% αναστολή σε ποσότητες 9λ, 13λ, 15λ και 12λ αντίστοιχα.

Το κλάσμα NL₃₂ έχει τιμή IC₅₀ για PAF 1λ, η συγκέντρωση δε αυτή αναστέλλει πλήρως την προκαλούμενη από τη θρομβίνη συσσώρευση των αιμοπεταλίων.

Τέλος το κλάσμα NL₃₈ έχει τιμή IC₅₀ για PAF=7λ, η ποσότητα δε αυτή αναστέλλει κατά 85% την προκαλούμενη από τη θρομβίνη συσσώρευση των αιμοπεταλίων.

Το κλάσμα NL₂ εμφανίζει διπλή δραστικότητα. Συγκεκριμένα σε μικρές συγκεντρώσεις αναστέλλει τη συσσώρευση των αιμοπεταλίων που προκαλείται από τον PAF με IC₅₀=10λ, ενώ σε υψηλότερες συγκεντρώσεις προκαλεί το ίδιο συσσώρευση των αιμοπεταλίων με ύψος καμπύλης 5,2cm. Το BN52021, ειδικός αναστολέας του PAF, ανέστειλε πλήρως την προκαλούμενη από το NL₂ συσσώρευση.

Το κλάσμα NL₂₇ προκαλούσε δόσοεξαρτώμενη συσσώρευση αιμοπεταλίων με EC₅₀=25λ. Ο ειδικός αναστολέας του PAF, το BN52021 δεν κατάφερε να αναστείλει τη συσσώρευση αυτή, υποδηλώνοντας ότι το NL₂₇ προκαλεί συσσώρευση όχι μέσω του δρόμου του PAF.

Τέλος, το κλάσμα NL₃₁, σε αραιές συγκεντρώσεις αναστέλλει την προκαλούμενη από τον PAF συσσώρευση αιμοπεταλίων με IC₅₀=2λ. Η ποσότητα αυτή προκαλεί πλήρη αναστολή στη δράση της θρομβίνης στα αιμοπετάλια. Υψηλότερες συγκεντρώσεις του κλάσματος NL₃₁ προκαλούσαν αντιστρεπτή συσσώρευση αιμοπεταλίων.

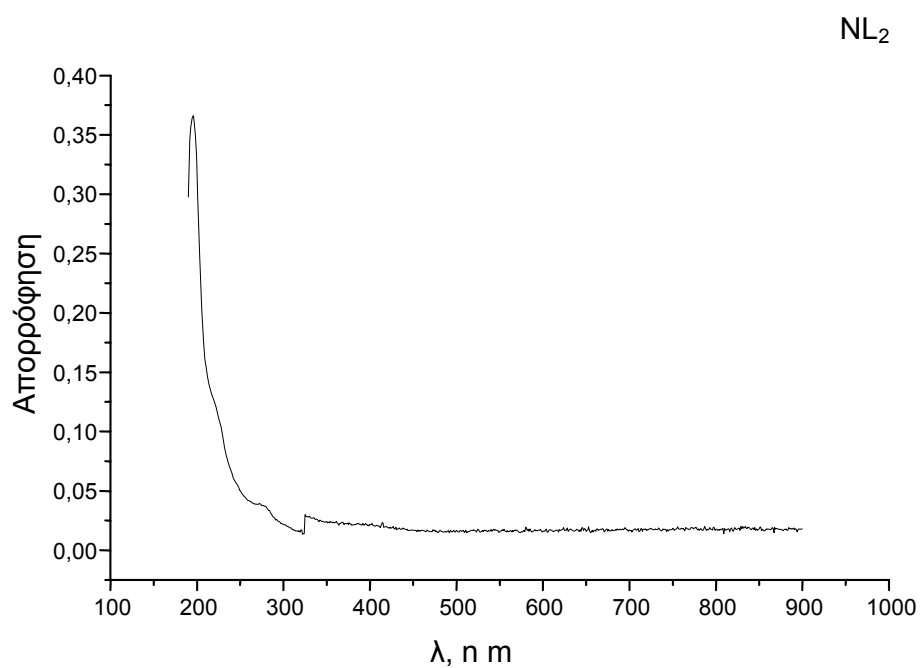
6.2.3.3. Φάσματα UV των κλασμάτων.

Το κλάσμα NL₂ εμφάνισε μέγιστη κορυφή απορρόφησης στα 196nm και δύο πολύ ασθενείς κορυφές στα 414 και 787nm (Σχ. 6.66).

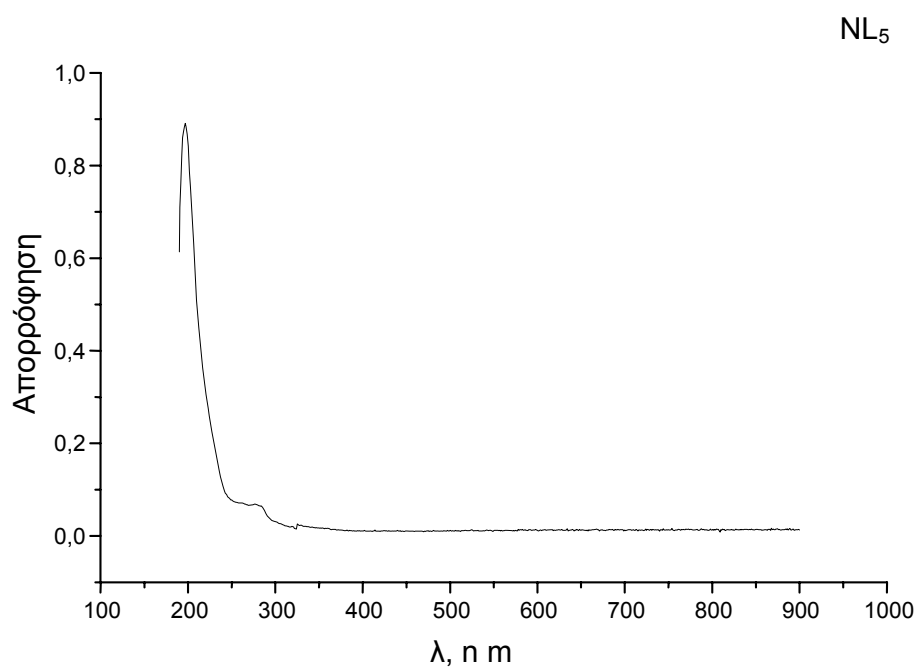
Παρόμοιας μορφής φάσματα έδωσαν δύο πρότυπα που δοκιμάστηκαν και συγκεκριμένα η δι-παλμιτοϋλο-γλυκερόλη (DG) και η 1-παλμιτοϋλο,2,3-δι-ακετυλο-γλυκερόλη. Το κλάσμα NL₅ εμφάνισε σχεδόν όμοιο φάσμα με το NL₂ με μέγιστη απορρόφηση στα 197nm και μία ασθενή κορυφή στα 754nm (Σχ. 6.67).

Το κλάσμα NL₁₄ είχε μέγιστη απορρόφηση στα 206nm και ασθενή απορρόφηση στα 340nm (Σχ. 6.68).

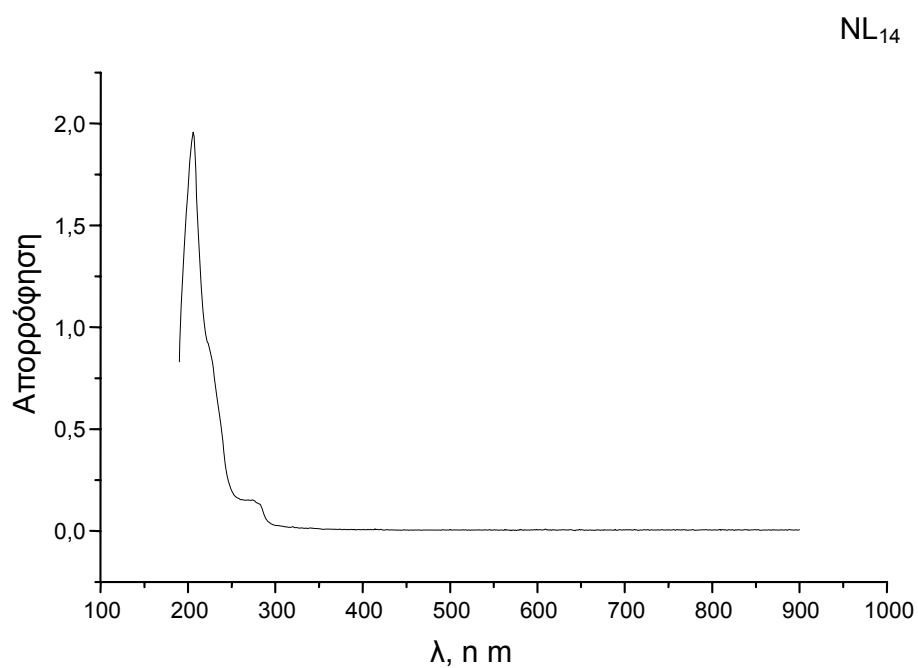
Από τα πρότυπα που δοκιμάστηκαν κανένα δεν εμφάνισε κοινό φάσμα με το κλάσμα αυτό.



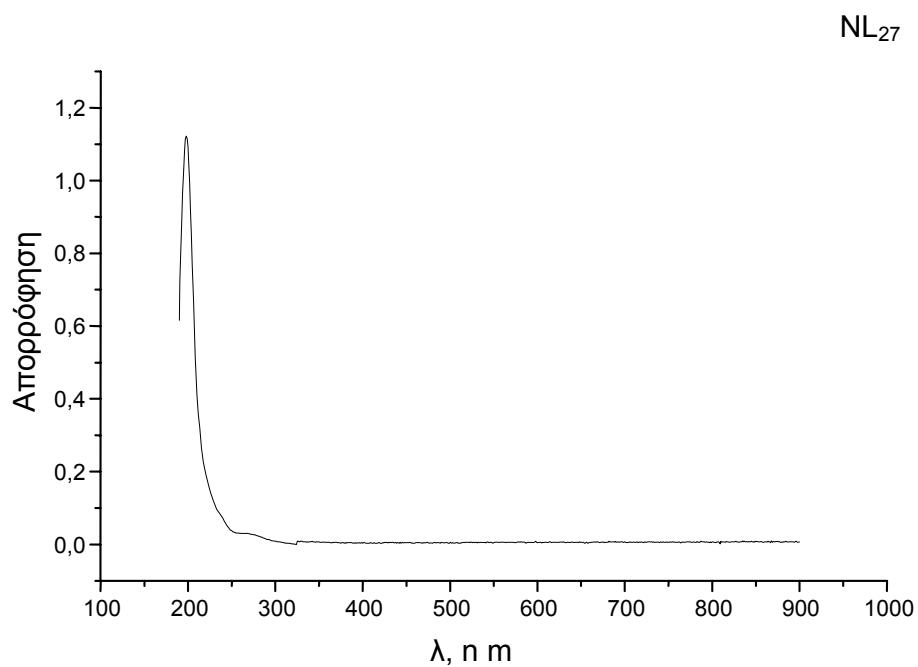
Σχήμα 6.66. Φάσμα UV του κλάσματος NL₂.



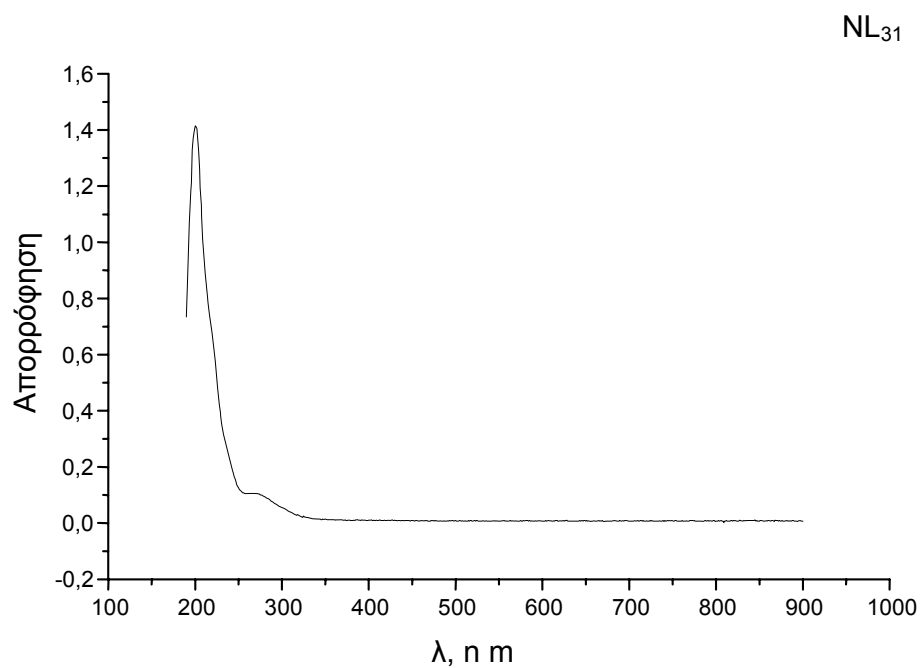
Σχήμα 6.67. Φάσμα UV του κλάσματος NL₅.



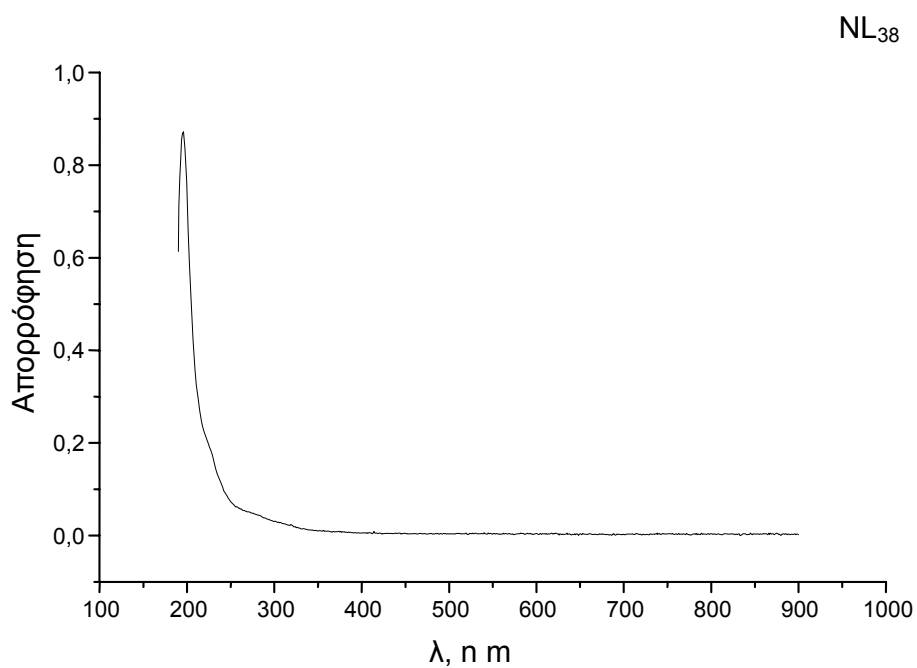
Σχήμα 6.68. Φάσμα UV του κλάσματος NL₁₄.



Σχήμα 6.69. Φάσμα UV του κλάσματος NL₂₇.



Σχήμα 6.70. Φάσμα UV του κλάσματος NL₃₁.



Σχήμα 6.71. Φάσμα UV του κλάσματος NL₃₈.

Το φάσμα του κλάσματος NL₂₇ είχε μεγάλη ομοιότητα με τα φάσματα των κλασμάτων NL₂ και NL₅, με μέγιστη απορρόφηση στα 198nm και δύο ασθενείς κορυφές στα 714 και 806nm (Σχ. 6.69).

Το κλάσμα NL₃₁ εμφανίζει μέγιστη κορυφή στα 200nm και πολύ μικρότερης έντασης κορυφή στα 845nm (Σχ. 6.70).

Πρότυπα μονογλυκεριδίου έδωσε παρόμοιο φάσμα απορρόφησης.

Τέλος, το φάσμα του κλάσματος NL₃₈ έχει μέγιστη απορρόφηση στα 196nm και δύο ασθενείς κορυφές στα 414 και 845nm (Σχ. 6.71). Το φάσμα του κλάσματος αυτού έχει ομοιότητες με το αντίστοιχο της 1-παλμιτοϋλο,2,3,-διακετυλο-γλυκερόλης.

6.2.3.4. Ήπια αλκαλική υδρόλυση και ακετυλίωση των κλασμάτων NL₂, NL₂₇, και NL₃₁

Ακετυλίωση του αρχικού κλάσματος NL₂ οδήγησε σε αυξημένου ύψους συσσώρευση των αιμοπεταλίων, υποδηλώνοντας την παρουσία ελεύθερου υδροξυλίου. Η χλωροφορμική φάση που προέκυψε από την ήπια αλκαλική υδρόλυση παρουσίασε πολύ αυξημένη συσσώρευση αιμοπεταλίων. Τέλος, ακετυλίωση της παραπάνω χλωροφορμικής φάσης οδήγησε περίπου σε ίδιου ύψους συσσώρευση με εκείνη της μη-ακατυλιωμένης χλωροφορμικής.

Τα παραπάνω δεδομένα δείχνουν ότι στο κλάσμα NL₂ υπάρχει εστεροποιημένο λιπαρό οξύ, η απομάκρυνση του οποίου αυξάνει τη βιολογική δραστηριότητα του μορίου. Αντικατάσταση αυτού του λιπαρού οξέος με οξικό οξύ και ταυτόχρονα ακετυλίωση των ελεύθερων υδροξυλίων οδηγεί σε ένα μόριο παραπλήσιας βιολογικής δραστηριότητας με το υδρολυμένο (από λιπαρά οξέα) ανάλογο του NL₂.

Ακετυλίωση του αρχικού κλάσματος NL₂₇ οδήγησε σε μικρή απώλεια της τάξης του 30% της βιολογικής του δραστηριότητας, υποδηλώνοντας την ύπαρξη ελεύθερου υδροξυλίου. Η χλωροφορμική φάση που προέκυψε από την ήπια αλκαλική υδρόλυση, δεν προκαλούσε συσσώρευση αιμοπεταλίων – όπως το αρχικό κλάσμα – αλλά αναστολή κατά 90% περίπου της συσσώρευσης που προκαλείται από τον PAF. Ακετυλίωση της παραπάνω χλωροφορμικής φάσης οδήγησε σε επανάκτηση μέρους της βιολογικής δραστηριότητας του αρχικού κλάσματος, σε ποσοστό 30%. Σύγκριση της δράσης της ακετυλιωμένης χλωροφορμικής φάσης με το ακετυλιωμένο παράγωγο του NL₂₇ δείχνει ότι για την εκδήλωση της μέγιστης δράσης του

κλάσματος αυτού είναι απαραίτητη η ύπαρξη και άλλου εστεροποιημένου λιπαρού οξέος εκτός του οξικού.

Τέλος, ακετυλίωση του κλάσματος NL₃₁ δεν επηρέασε τη βιολογική του δραστηριότητα, υποδηλώνοντας ότι στη δομή του κλάσματος αυτού δεν υπάρχουν ελεύθερα υδροξύλια.

Η χλωροφορμική φάση της ήπιας αλκαλικής υδρόλυσης οδήγησε στην πλήρη απώλεια της ικανότητας του κλάσματος να προκαλεί συσσώρευση αιμοπεταλίων, ενώ εμφάνισε 64% ανασταλτική δράση στην προκαλούμενη από τον PAF συσσώρευση.

Ακετυλίωση της παραπάνω χλωροφορμικής φάσης οδήγησε σε πλήρη ανάκτηση της δραστηριότητας του NL₃₁, το μόνο εστεροποιημένο λιπαρό οξύ, είναι το οξικό.

6.2.3.5. Πειράματα με ακετυλοϋδρολάση στα κλάσματα NL₂ και NL₂₇.

Επώαση του κλάσματος NL₂ με ακετυλοϋδρολάση οδήγησε σε 56% μείωση της δραστηριότητάς του σε 1min και σε 90% μείωση στα 5min.

Αντίστοιχα, επώαση του NL₂₇ με ακετυλοϋδρολάση οδήγησε σε 28% μείωση της δραστηριότητας σε 2min και σε 97% μείωση στα 3min.

Ποσότητα PAF που επωάστηκε με τις ίδιες συνθήκες, εμφανίζει 85% μείωση στο 1min και 100% απώλεια δραστηριότητας στα 4min.

Τα δεδομένα αυτά δείχνουν ότι στα κλάσματα που δοκιμάστηκαν δεν πρέπει να υπάρχει οξικό οξύ, αλλά κάποιο μεγαλύτερης ανθρακικής αλυσίδας, όπου η ακετυλοϋδρολάση έχει μικρότερη ικανότητα υδρόλυσης. Επίσης είναι πιθανό να υπάρχει οξικό οξύ, το οποίο όμως δεν βρίσκεται εστεροποιημένο σε γλυκερινικό σκελετό.

6.2.3.6. Σύνοψη των αποτελεσμάτων των ουδετέρων λιποειδών του *Chroococcidiopsis* sp.

Η μελέτη της βιολογικής δραστηριότητας των ουδετέρων λιποειδών του *Chroococcidiopsis* sp. έδειξε την ύπαρξη μη ειδικών αναστολέων του PAF και μάλιστα φάνηκε ότι τα κλάσματα αυτά κυρίως ανέστειλαν τη δράση της θρομβίνης. Τα πιο δραστικά κλάσματα ήταν το NL₃₂, το οποίο εκλούεται στην περιοχή των τριγλυκεριδίων και το NL₃₈, που εκλούεται στην περιοχή των εστέρων στερολών. Δεν κρίθηκε αναγκαία η περαιτέρω διερεύνηση της δομής αυτών λόγω του γεγονότος της μη ειδικής αναστολής τους έναντι της δράσης του PAF.

Στην περιοχή έκλουσης των TG εντοπίστηκαν δύο ακόμα βιοδραστικά κλάσματα, το NL₂₇, που προκαλούσε συσσώρευση αιμοπεταλίων όχι μέσω του δρόμου του PAF, αφού το BN52021 δεν ανέστειλε τη δράση του και το NL₃₁ που εμφάνισε σε χαμηλές συγκεντρώσεις ανασταλτική δράση και σε υψηλότερες συγκεντρώσεις συσσωρευτική ικανότητα.

Τέλος, στην περιοχή των κηρών εντοπίστηκε το βιοδραστικό κλάσμα NL₂ που δρούσε ως αγωνιστής του PAF.

Η χημική δομή των τελευταίων κλασμάτων δεν έχει ακόμα διαλευκανθεί.

6.3. Έλεγχος ευαισθησίας των καλλιεργειών και των λιποειδών τους, των κυανοβακτηρίων *Scytonema julianum* και *Croococcidiopsis* sp.

Στις καλλιέργειες των κυανοφυκών *Scytonema julianum* και *Croococcidiopsis* sp. καθώς και στα λιποειδή τους έγιναν έλεγχοι ευαισθησίας σε σχέση με κοινά βακτήρια, όπως *Staphylococcus aureus* και *Escherichia coli*, τον PAF και το BN52021 σε διάφορες συγκεντρώσεις, καθώς και σε σχέση με διάφορα αντιβιοτικά.

Πριν τους ελέγχους ευαισθησίας, με χρώση κατά gram, σύμφωνα με τη μέθοδο 5.14.1. που περιγράφεται στο αντίστοιχο κεφάλαιο, προσδιορίστηκε ότι και τα δύο κυανοβακτήρια είναι αρνητικά κατά gram.

6.3.1. Έλεγχος ευαισθησίας των κυανοβακτηρίων *Scytonema julianum* και *Croococcidiopsis* sp. στα λιποειδή τους, στον PAF και το BN52021.

Σε υλικό καλλιέργειας BG-11 με agar επιστρώθηκαν αξενικές καλλιέργειες των κυανοβακτηρίων *Scytonema julianum* και *Chroococcidiopsis* sp. σύμφωνα με τη μέθοδο Bauer Kirby (5.14.2).

Στην επιφάνεια των καλλιεργειών τοποθετήθηκαν δισκία διαμέτρου 0,5cm από φύλλα φίλτρων GF/C εμποτισμένα με α) PAF συγκεντρώσεων 5×10^{-5} M και 5×10^{-9} M β) BN 52021 συγκεντρώσεων 5×10^{-6} M και 5×10^{-4} M γ) ολικά, πολικά και ουδέτερα λιποειδή των δύο κυανοβακτηρίων που μελετώνται.

Για το διαχωρισμό των λιποειδών εφαρμόστηκε η μέθοδος TLC.

Δεν παρατηρήθηκε ζώνη αναστολής σε καμία περίπτωση.

6.3.2. Έλεγχος ευαισθησίας των κυανοβακτηρίων *Scytonema julianum* και *Chroococcidiopsis* sp. σε διάφορα αντιβιοτικά.

Σε στερεό υλικό καλλιέργειας BG-11 μελετήθηκαν η ευαισθησία των μελετουμένων κυανοβακτηρίων στα αντιβιοτικά Tetracycline (T), Ambiciline (A), Rifampicin (R) και Kanamycin (K).

Χρησιμοποιήθηκαν δισκία αντιβιοτικών της OXOID συσκευασμένα σε φιαλίδια.

Στους πίνακες που ακολουθούν φαίνονται τα αποτελέσματα της επίδρασης των αντιβιοτικών σε κάθε φύκος χωριστά.

Πίνακας 13: Χαρακτηρισμός ευαισθησίας του κυανοβακτηρίου *Scytonema julianum* από τη ζώνη αναστολής κατά τη μέθοδο Bauer Kirby.

Αντιβιοτικά	Χρόνος επώασης 24h Διάμετρος ζώνης αναστολής	Χρόνος επώασης 48h Διάμετρος ζώνης αναστολής
T	1cm	1,1cm
K	0,5cm	0,6cm
R	—	0,4cm
A	—	—

Από τον πίνακα προκύπτει πως το κυανοβακτήριο *Scytonema julianum* παρουσιάζει ευαισθησία σε όλα τα αντιβιοτικά που χρησιμοποιήθηκαν, εκτός της Ambiciline (A).

Η μεγαλύτερη ζώνη ευαισθησίας, εμφανίστηκε με το αντιβιοτικό Tetracycline (T), τόσο στις 24h επώαση, όσο και στις 48h.

Πίνακας 14: Χαρακτηρισμός ευαισθησίας του κυανοβακτηρίου *Chroococcidiopsis* sp. από τη ζώνη αναστολής με τη μέθοδο Bauer Kirby.

Αντιβιοτικά	Χρόνος επώασης 24h Διάμετρος ζώνης αναστολής	Χρόνος επώασης 48h Διάμετρος ζώνης αναστολής
T	—	0,9cm
K	—	0,7cm
R	—	1cm
A	—	—

Από τον πίνακα φαίνεται πως η μεγαλύτερη ζώνη ευαισθησίας στο κυανοβακτήριο *Chroococcidiopsis* sp. εμφανίστηκε γύρω από τα αντιβιοτικά Tetracycline (T) και Rifampicin (R) μετά από 48h. Το αντιβιοτικό Ambiciline (A) δεν είχε καμία επίδραση στο φύκος.

6.3.3. Έλεγχος ευαισθησίας των Βακτηρίων *Staphylococcus aureus* και *Escherichia coli*, σε εναιώρημα καλλιέργειας των κυανοβακτηρίων *Scytonema julianum* και *Chroococcidiopsis* sp.

Σε τρυβλία Petri με Nutrient agar, έγινε σπορά των Βακτηρίων *Staphylococcus aureus* και *Escherichia coli* και στη συνέχεια τοποθετήθηκαν

δισκία μεμβρανών GF/C διαμέτρου 0,5cm GF/C εμποτισμένα με μικροβιακό εναιώρημα κυανοβακτηρίων *Scytonema julianum* και *Chroococcidiopsis* sp.

Ακολούθησε επώαση των καλλιεργειών στους 37°C για 24h χωρίς να παρουσιαστεί καμία ζώνη αναστολής.

6.3.4. Έλεγχος ευαισθησίας των Βακτηρίων *Staphylococcus aureus* και *Escherichia coli*, στα λιποειδή των κυανοβακτηρίων *Scytonema julianum* και *Chroococcidiopsis* sp.

Σε τρυβλία Petri με Nutrient agar, καλλιεργήθηκαν τα βακτήρια *Staphylococcus aureus* και *Escherichia coli*.

Στη συνέχεια τοποθετήθηκαν στην καλλιέργεια δισκία μεμβρανών GF/C διαμέτρου 0,5cm, εμποτισμένα με τα ολικά, πολικά και ουδέτερα λιποειδή των κυανοβακτηρίων *Scytonema julianum* και *Chroococcidiopsis* sp.

Ακολούθησε επώαση των καλλιεργειών στους 37°C για 24h και 48h αντίστοιχα και παρατηρήθηκαν ζώνες αναστολής σε όλες τις περιπτώσεις.

Το τελευταίο αυτό σημαντικό δεδομένο χρήζει διεξοδικότερης μελέτης.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στην παρούσα ερευνητική εργασία μελετήθηκαν οι καλλιέργειες δύο κυανοφυκών που συναντώνται στα ελληνικά σπήλαια (Σπήλαιο Κουτούκι Παιανίας και Νυμφολήπτου Βάρης), αλλά και σε χώρους με παρόμοιες κλιματολογικές συνθήκες (Αρχαίο θέατρο Διονύσου), ενός νηματοειδούς κυανοβακτηρίου, του *Scytonema julianum* και ενός κοκκιώδους κυανοβακτηρίου, του *Chroococcidiopsis* sp.

Απομονώθηκαν και διαχωρίστηκαν με χρωματογραφικές τεχνικές (TLC και HPLC), τα λιποειδή τους και μελετήθηκε η βιολογική τους δραστηριότητα. Στα κλάσματα με τη σημαντικότερη βιολογική δραστηριότητα έγιναν χημικές αναλύσεις, επιπλέον βιολογικές δοκιμασίες καθώς και φασματοφωτομετρία μάζας για να πιστοποιηθεί η δομή τους.

Το *Scytonema julianum* αποδείχθηκε ότι περιέχει φωσφατιδυλοχολίνη (C_{16:0/18:2}) αν και έχει αναφερθεί ότι σπάνια τα βακτήρια περιέχουν φωσφοακυλογλυκερόλες με βάση χολίνη.

Στο κυανοβακτήριο αυτό διαπιστώθηκε η ύπαρξη τεσσάρων διαφορετικών χημικών δομών λιποειδών, τα οποία εμφανίζουν δράση ανάλογη του PAF.

Τα λιποειδή αυτά πιστοποιήθηκαν ως ακετυλοσφιγγομυελίνη, ακυλο-ακετυλογλυκερο-φωσφο-ακετυλιωμένο γλυκολιποειδές, φωσφο-γλυκο-ανάλογο της ακυλο-ακετυλο-σφιγγοσίνης και γλυκο-ανάλογο της φωσφατιδυλο-γλυκερόλης. Επιπλέον, ο πιο ισχυρός αναστολέας του PAF πιστοποιήθηκε ως φωσφο-γλυκο-ανάλογο της ακυλο-σφιγγοσίνης.

Το *Chroococcidiopsis* sp. αποδείχθηκε ότι περιέχει κυρίως λιποειδή που εμφανίζουν ανασταλτική δράση έναντι του PAF και τα οποία πιστοποιήθηκαν ως φωσφο-ακετυλιωμένο γλυκο-ανάλογο διγλυκεριδίου και φωσφο-γλυκο-ανάλογο κηραμίδιο. Βρέθηκε μόνο ένα κλάσμα που εμφάνιζε δράση ανάλογη του PAF και το οποίο πιστοποιήθηκε ως φωσφο-ακετυλιωμένο γλυκο-ανάλογο κηραμίδιο.

Η ύπαρξη των παραπάνω ενώσεων στα κυανοβακτήρια πιθανώς να αιτιολογεί τις αλλεργικές αντιδράσεις που προκαλούνται κατά την επαφή με τα βακτήρια αυτά και επιπλέον ενισχύει την άποψη ότι ο PAF είναι αρχέγονο μέλος μιας μεγάλης οικογένειας λιποειδικών μεσολαβητών, οι οποίοι έχουν διαφορετικούς φυσιολογικούς ρόλους στους προκαρυωτικούς και ευκαριωτικούς οργανισμούς.

SUMMARY

Existence of Platelet-Activating Factor (PAF) or PAF –like molecules in cyanobacteria of caves

Alexandra Oikonomou

Department of Science of Dietetics-Nutrition, Harokopio University

In the present study, two cyanobacteria namely a filamentous one *Scytonema julianum* and a coccoid one *Chroococcidiopsis* sp. were collected and cultivated. Their lipids were extracted, isolated and purified with chromatographic techniques (TLC and HPLC) and then tested for their biological activity. Lipid fractions with the most important biological activity were subjected to chemical determinations, further biological studies as well as on electro-spray mass spectrometry, in order to identify their structure.

Scytonema julianum contains a phosphatidylcholine (C_{16:0/18:2}) even though bacteria in general seldom contain choline-containing phosphoacylglycerols.

In addition, four types of polar lipids causing platelet aggregation were detected and shown to be an acetylsphingomyelin, an acylacetylglycerol phosphoacetylated glycolipid, a phospho-glyco-analog of acyl-acetylated sphingosine and a glyco-analog of phosphatidylglycerol.

One fraction was found to be a potent inhibitor of PAF- induced platelet aggregation and was identified as phosphoglyco – analog of acyl – sphingosine.

Chroococcidiopsis sp. contains mostly lipids that exerted inhibitory action against PAF and they were identified as phospho-acetylated glycoanalog of diglyceride and phospho-glycoanalog of ceramide. Only one fraction was detected that induced platelet aggregation and was identified as phospho-acetylated glyco-analog of ceramide.

The presence of the above lipids in cyanobacteria is probably related to the allergenic reactions observed with cyanobacterial exposure and reinforces the concept that PAF is a member of a large family of lipid mediators, apparently having different physiological roles in prokaryotic and eukaryotic organisms.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Aboall M., Asencio A. & Prefasi M., (1994) **Allgological Studies** 75: 31-36.
- Adnot S., Lefort J., Lagente V., Braquet P. and Vargaftig B.B., **Pharmacol. Res. Commun.** 18, 197 (1986).
- Adosraki R.K., Smith J.D., Nicolaou A., Gibbons W.A., **Biochim. Biophys. Acta** (1996), 1299, 167-174.
- Allam I., Smith J.B. and Silver M.J., **Lipids** 18, 534 (1983).
- Allbert D.H., Snyder F., **Bioch. Biophys.** 796, 92 (1984).
- Allen M.M. and R.Y. Stanier, **J. Gen. Microbiol.** 51, 203 (1968).
- Allonso F., Gil M.G., Sanchez-Crespo M. and Mato J.M., **J. Biol. Chem.** 257, 3376 (1982).
- Anagnostidis K., Economou-Amilli A. and A. Pantazidou, **Bull. Soc. Speleol. De Grèce** 18: 458-530 (1982)
- Anagnostidis K. & Komarek (1985), Modern approach to the classification of Cyanophytes. 1-Introduction, **Arch. Hydrobiol. Suppl. 71, Allgological Studies**. 38/39, p.201-302.
- Anagnostidis K. & Komarek (1988), Modern approach to the classification of Cyanophytes. 3-Oscillatoriales, **Arch. Hydrobiol., Allgological Studies** 50-53, p. 327-472.
- Anagnostidis K. & Komarek (1989), Modern approach to the classification of Cyanophytes. 4-Nostocales. **Arch. Hydrobiol., Allgological Studies** 83, 455-456.
- Anagnostidis K. & Komarek (1990), Modern approach to the classification of Cyanophytes. 5-Stigonematales, **Arch. Hydrobiol. Suppl. 86, Allgological Studies** 59, p.1-73.
- Anagnostidis K. and A. Pantazidou (1988): **Arch. Hydrobiol. / Suppl. 80, Allgological Studies** 50-53: 555-559.
- Andrikopoulos N.K., Demopoulos C.A. and Siafaka-Kapadai A., **J. Chromatogr.** 363, 412 (1986b).

- Andrikopoulos N.K., Demopoulos C.A. and Siafaka-Kapadai A. (1986a) **J. Chromatogr.** 363, 412-417.
- Andrikopoulos N.K., Siafaka-Kapadai A., Demopoulos C.A. and Kapoulas V.M., (1985) **Phytochemistry** 24, 2953-2957.
- Andrikopoulos N.K., Siafaka-Kapadai A., Yanovits-Argyriadis N. and Demopoulos C.A., **Z. Naturforsch.** 41c, 396 (1986).
- Andriotis M., Demopoulos C.A., Tournis S., Siafaka A., Mavri M., **The Second Internationall Conference**, October 26-29 (1986) **Tennessee, USA.**
- Antonopoulou S., Demopoulos C.A., **J. Agric. Food Chem.** (1996), 44, 3052.
- Antonopoulou S., Demopoulos C.A. and Andrikopoulos N.K. (1996) **J. Agric. Food Chem.** 44, 3052-3056.
- Antonopoulou S., Demopoulos C.A., Argyropoulos D., Balltas G., Kotsifaki H., Diamanti-Kipioti A., **Biochem.J.** (1998) 330 (Pt 2), 791-794.
- Antonopoulou S., Demopoulos C.A. and Iatrou C., **Int. J. Biochem. Cell Biol.** 28, 43 (1996a).
- Antonopoulou S., Oikonomou A., Karantonis H., Fragopoulou E. and A. Pantazidou, (2002) **Biochemicall Journall** vol. 367. No. 1. 287.
- Antonopoulou S., Nomikos T., Oikonomou A., Kyriacou A., Andriotis M., Fragopoulou E., Pantazidou A., **Comparative Biochemistry and Physiology**, Part B 140 (2005) 219-231.
- Antonopoulou S., Semidallas Ch., Koussissis S. and Demopoulos C.A., **J. Agric. Food Chem.** 44, 3047 (1996b).
- Aratani H., Tomumatsu N., Iwahisa Y., Terasawa M. and Setoguchi M., **Third Internationall Conference on Platelet-Activating Factor and Structurally Related Alkyl Ether Lipids**, Tokyo, Japan, abstract I 13 (1989).
- Arnout J., Van Hecken A., Delepeleire I., Miyamoto Y., Holmes I., Deschepper P. and Vermynen J., **Thromb. Haemost.** 58, 20 (1987).
- Asai Y., Nomura T., Murahashi N., Iwamoto K., **Drug.Dev.Ind.Pharm.** (2000) 26, 671-674.
- Austen KF., "Εισαγωγή στην Κλινική Ανοσολογία. Εσωτερική Παθολογία". **Harrison T.R. (Ed) Επιστημονικές Εκδόσεις Παρισιάνου Γ.Κ. Αθήνα** σελ. 457 (1980).
- Avramopoulou V., Antonopoulou S., Frousios K., Argyropoulos D. and Demopoulos C.A. (1997), **J. Biochem. Cell Biol.** 29, 767-774.

ΑΝΑΓΝΩΣΤΙΔΗΣ Κ. ΟΙΚΟΝΟΜΟΥ–ΑΙΜΙΛΗ Α. ΠΑΝΤΑΖΙΔΟΥ Α., **ΔΕΛΤΙΟ Ε.Σ.Ε.** (1981-82), τ 18.

Ανδρικόπουλος Ν., Λιποειδή της γύρης του πεύκου *Pinus hallepensis*
Διδακτορική Διατριβή, Πανεπιστήμιο Αθηνών (1983).

Ανδριώτης Μ., Βιοσύνθεση και Απομόνωση του Παράγοντα Ενεργοποίησης Αιμοπεταλίων (PAF) από Προκαρυωτικά Κύτταρα και Μελέτη της Δομής του. **Διδακτορική Διατριβή, Πανεπιστήμιο Αθηνών** (1989).

Αντωνοπούλου Σμαραγδή. Μελέτη ενώσεων με βιολογική δράση ανάλογη του PAF και αναστολέων του PAF ζωϊκής φυτικής και συνθετικής προέλευσης. **Διδακτορική διατριβή Πανεπιστήμιο Αθηνών** (1994).

Αρσένη Αντιγόνη. **Μικροβιολογία κλινική και εργαστηριακή** (1967)

Αρσένη Αντιγόνη. **Καλλιέργειες μικροβίων στη διάγνωση των λοιμώξεων** (1977).

Bachelet M., Masliah J., Vargaftig B.B., Beregiat G. and Collard O., **Biochim. Biophys. Acta** 878, 177 (1986).

Baggiolini M. and Dewalld B., **Pharmacol. Res. Commun.** 18 (Suppl.), 51 (1986).

Barnes P.J., Chung K.F., Evans T.W. and Rogers D.S.Br., **J. Pharmacol.** 89, 764 P (1986).

Barnes P.J., Chung K.F., Page C.P., **J.Allergy.Clin.Immunol.** (1988), 81, 919- 934.

Barlett G.R., **J. Biol. Chem.** (1959), 234, 466.

Benveniste J., Chignard M., Le Quedic J.P. and Vargaftig B.B., **Thromb. Res.** 25, 375 (1982a).

Benveniste J., Henson P.M. and Cochrane C.G., **J. Exp. Med.** 136, 1356 (1972).

Benveniste J., Le Couedic J.P. and Komoun P., **The Lancet** 1, 344 (1975).

Benveniste J., Le Couedic J.P., Polonowsky J. and Tence M., **Nature** 269, 170 (1977).

Benveniste J., Roubin R., Chignard M. and Jouvin-Marche E., **Agents Actions** 12, 711 (1982b).

Benveniste J., Tence M., Varenne P., Ridault J., Boullet, C. and Polonowsky J., **C.R. Hebd. Seances Acad. Sci. Ser. D. Sci. Nat.** 289, 1037 (1979).

Berdel E., **In 2nd Internationall Conference on PAF and structurally related allkyl ether lipids. Gatlimburg, TN** p52 (1986).

- Biftu T., **Eur. Pat. Appl.** 0217204 (1987).
- Biftu T., Gamble N.F., Chaballa J.C., Dallob A., Doebber T.W., Dougherty M.W., Hwang S.B. and Shen T.Y., **Adv. Prostaglandin Thromboxane Leukotriene Res.** (1994).
- Biftu T., Gamble N.F., Doebber T., Hwang S.B., Shen T.Y., Snyder J., Springer J.P. and Stevenson R., **J. Med. Chem.** 29, 1917 (1986a).
- Biftu T., Hwang S.B., Doebber T.W., Beattie T.R. and Shen T.Y., **Eur. Pat. Appl.** 0199324 (1986b).
- Billah M.M., Di Renzo G.C., Bar C., Truong C.I., Hoffman D.R., Anceschi M.M., Bleasdale J.E. and Johnston J.M., **Prostaglandins** 30, 841 (1985).
- Billah M.M. and Johnston J.M., **Biochem. Biophys. Res. Comm.** 113, 51 (1983).
- Billah M.M., Siegel M.I., **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 118, 629 (1984).
- Billings W.H., (1981) The Water Environment. Allgall Toxins and Human Helath (Ed. By W.W.Carmichael) pp 243-255 **Plenum Press New York and London**
- Birke F.W. and Weber K.H., **Recent Advances in Platelet Activating Factor, Australlia, abstract** 48 (1981).
- Bjork J. and Smedegard G., **Eur. J. Pharm.** 96, 87 (1983).
- Black J.W., Duncan W.A.M., Durant C.J., Ganellin C.R. and Parsons E.M., **Nature** 236, 385 (1972).
- Blank M.L., Cress E.A., Wittle T. and Snyder F., **Lipid Life Sci.** 29, 769 (1981a).
- Blank M.L., Hall M.N., Cress E.A. and Snyder F., **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 113, 666 (1983).
- Blank M.L., Lee T.C., Fitzgerald V. and Snyder F., **J. Biol. Chem.** 256, 175 (1981b).
- Blank M.L. and Snyder F.J., **J. Chromatogr.** 273, 415 (1983).
- Bligh E.G., Dyer W.J., **Can. J. Biochem. Physiol.** (1959), 37, 911.
- Bonser R.W., Siegel M.I., Chung M.I., McConnell R.T., Cuartasas P., **Biochemistry** 20, 5297 (1981).
- Bourgain R.H., Maes L., Braquet P., Andries R., Touqui L. and Braquet M. **Prostaglandins** 30, 185 (1985).

- Bourke A.T.C., Hawes R.B., Neilson A. and Stallman N.D. (1983) **Toxicon** 3 (Suppl) 45-48
- Brambilla A., Ghiorzi A. and Giachetti A., **Pharmacol. Res. Commun.** 19, 147 (1987).
- Braquet P., **Chem. Abstr.** 103, 189808 d (1985).
- Braquet P., Drieu K. and Etienne A., **Actual Chim. Ther.** 13, 237 (1985a).
- Braquet P., Esanu A., Etienne A., Robin J.P., Psychoyos A., Senna N. and Garay R., **New Horizons in Platelet Activating Factor Research, Hilton Head, South Carolina, USA** (1985).
- Braquet P., Etienne A., Touvay C., Bourgain R.H., Lefort J. and Vargaftig B.B. **Lancet** 1, 8444 (1986).
- Braquet P., Spinnewyn B., Braquet M., Bourgain R.H., Taylor J.E., Etienne A. and Drieu K., **Blood Vessels** 16, 559 (1985b).
- Braquet P., Touqui L., Shen T.Y. and Vargaftig B.B. (1987b). **Pharmacol. Rev.** 39, 97-145.
- Brugger B., Erben G., Sandhoff R., Wieland F.T. and Lehmann W.D. (1997), **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 94, Issue 6, 2339-2344, **Cell Biology**.
- Bussolino F., Foa R., Mallavasi F., Ferrando M.L. and Camussi G., **Exp. Haematol.** 12, 688 (1984).
- Bussolino F., Sordano C., Benfenati E. and Bozzaro S. (1991) **Eur. J. Biochem.** 196, 609-615.
- Buxton D.B., Shukla S.D., Hanahan D.J. and Olson M.S., **J. Biol. Chem.** 259, 1468 (1984).
- Cabot M.C., Blank M.L., Welsh C.J., Horan M.J., Cress E.A. and Snyder F., **Life Sci.** 31, 2891 (1983).
- Calligerou M., Siafaka-Kapadai A., Gallanopoulou D., Weintraub S.T., Mavri-Vavayanni M., **Phytochemistry** (1996), 41, 89-92.
- Camussi G., Bussolino F., Tetta C., Piacibello W. and Aglietta C., **Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.** 70, 245 (1983a).
- Camussi G., Pawloski I., Tetta C., Roffinello C., Allberton M., Brentjens J. and Andres G., **Am. J. Pathol.** 112, 78 (1983d).
- Camussi G., Tetta C. and Bussolino F., **Prostaglandins** 25, 343 (1983e).
- Camussi G., Tetta C., Segoloni G., Deregibus M.C. and Bussolino F., **Agents Actions** 11, 550 (1981).

- Cappio F., **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 83, 2443 (1986).
- Carceller E., Merlos M., Girall M., Ballsa D., Garcia-Rafanell J. and Forn J., **Fifth International Congress on Platelet-Activating Factor and Related lipid Mediators, Berlin**, September 12-16, 1995, p.149, **Germany** (1995).
- Carmichael W.W., Biggs D.F. & Peterson M.A. (1979), **Toxicon** 17: 229-236
- Casalls-Stenzel J., **Eur. J. Pharmacol.** 135, 117 (1987b).
- Casalls-Stenzel J., **Immunopharmacology** 13, 117 (1987a).
- Casalls-Stenzel J., **Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.** 335, 351 (1987c).
- Casalls-Stenzel J., Franke J., Friedrich T. and Lichey J. Br. **J. Pharmacol.** 91, 799 (1987).
- Casalls-Stenzel J., Muacevic G. and Weber K.H. **J. Pharmacol. Exp. Ther.** 241, 974 (1987a).
- Casalls-Stenzel J. and Weber K.H., **J. Pharmacol.** 90, 139 (1987).
- Casalls-Stenzel J., Weber K.H., Wallther G., Harreus A. and Muscevic G., **Eur. Pat. Appl.** 0176927 (1986).
- Cavero I., Lave D., Marquis O. and Robaut C. Br., **J. Pharmacol.** 90, 116 P (1987).
- Chang M.N., Han G., Arison B.H., Springer J.P., Hwang S.B. and Shen T.Y., **Phytochemistry** 24, 2079 (1985).
- Chao W., Olson M.S., **Biochem. J.** (1993), 292 (Pt 3), 617-629.
- Chap H., Maucog Simon M.F., Benveniste J. and Douste-Blazy L., **Nature** 289, 312 (1981).
- Chesney C.M., Pifer D.D. and Cagen L.M. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 144, 359 (1987).
- Chilton F.H., Ellis J.M., Olson S.C. and Wykle R.L., **J. Biol. Chem.** 259, 12014 (1984).
- Chilton F.H., O'Flaherty J.T., Ellis J.M., Swendsen C.L. and Wykle R.L., **J. Biol. Chem.** 258, 6357 (1983a).
- Chilton F.H., O'Flaherty J.T., Ellis J.M., Swendsen C.L. and Wykle R.L., **J. Biol. Chem.** 258, 7268 (1983b).
- Coeffier E., Ninio E., Le Quedic J.P. and Chignard M.Br., **J. Haematol.** 62, 641 (1986).

- Coeffinger E., Cerrina J., Jouvin-Marche E. and Benveniste J., **Thromb. Res.** 31, 565 (1983).
- Cohen S.G. and Reif O.B., (1953) **J. Allergy** 24, 452-457.
- Colard O., Breton M. and Bereziat G., **Biochem. J.** 222, 657 (1984).
- Colard O., Breton M. and Bereziat G., **Biochem. J.** 233, 691 (1986).
- Cooney S.J., Small M.A., Balldo B.A. **Lipids** (1991), 26, 1140-1143.
- Coute A. (1985), **Arch. Hydrobiol. Suppl.** 71, 91-98.
- Coute A., **Arch. Hydr. Supp.** 71, **Allg. Stud.** 38-39, 91-98 (1985)
- Coute A. & Bury E. (1985) **Hydrobiologia** 160: 219-240
- Cox C.P. and Wood K.L., **Thromb. Res.** 47, 249 (1987).
- Cubbon B.D. (1976), **Cave flora. The Science of Speleology** (T.D. Ford & C.H.D. cullingford, editors), pp. 423-452. **Academic press.**
- Deacon R.W., Melden M.K., Saunders R.N. and Handley D.A., **Fed. Proc.** 45, 995 (1986).
- Dembitsky B.M., Eplanova G.V., Zharikova N.I., Zharikov V.V., **Klim. Prirod. Soedin.** (1989), 2, 281-282.
- Demopoulos C.A., Andrikopoulos N.K., Antonopoulou S., **Lipids** (1994), 29, 305-309.
- Demopoulos C.A. and Antonopoulou S. (1996), **Adv.Exp. Med. Biol.** 416, 59-63.
- Demopoulos C.A., Antonopoulou S., Andrikopoulos N.K. and Kapoulas V.M. (1996), **J. Liq. Chrom. & Rel. Technol.** 19, 521-535.
- Demopoulos C.A., Kyrili M., Antonopoulou S. and Andrikopoulos N.K. (1996) **J.Liq. Chrom. & Rel. Technol.** 19, 771-781
- Demopoulos C.A., Moschidis M.C., Kritikou L.G., **J. Chromatogr.** 256, 378 (1983)
- Demopoulos C.A., Pinckard R.N. and Hanahan D.J. (1979), **J. Biol. Chem.** 254, 9355-9358.
- Demopoulos C.A., Pinckard R.N. and Hanahan D.J. (1979). **J. Biol. Chem.** 254, 9355 (1983).
- Denizot Y., Dassa E., Benveniste J. and Thomas Y. (1989). **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 161, 939-943.

- Denizot Y., Sobhani I., Rambaud J.C., Levin M., Thomas Y. and Benveniste J., (1990), **Gut**. 31, 1242-1245.
- Desquand S., Touvay C., Tandon J., Lagente V., Maridonneau-Parini I., Lefort J., Etienne A., Braquet P. and Vargaftig B.B., **Eur. J. Pharmacol.** 127, 83 (1986).
- Dewalld B. and Baggiolini M., **Biochem. Pharmacol.** 36, 2505 (1987).
- Dobozy A., Hunyadi J. and Csato M., **The Role of Platelet-Activating Factor in the Immune Response, Paris, France**, abstract p. 31 (1987).
- Doebber T.W., Wu M.S. and Biftu T., **J. Immunol.** 136, 4659 (1986).
- Doebber T.W., Wu M.S., Robbins J.C., Choy B.M., Chang M.N. and Shen T.Y., **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 127, 799 (1985).
- Doly M., Braquet P., Bonhomme B. and Meyniel G., **Pharmacol. Res. Commun.** (Suppl.) 18, 201 (1986).
- Dorsch W., Wagner H., Bayer Th., Fessler B., Hein G., Ring J., Scheftner P., Sieber W., Strasser Th. and Weib E., **Biochem. Pharmacol.** 37, 4479 (1988).
- Droy-Lefaix M.T., Braquet P. and Drouet Y., **American Gastroenterological Association Meeting** (1987).
- Dupont L., Bibeeberg O., Germain G. and Braquet P., **Acta Crystallogr. C** 42, 1759 (1986a).
- Dupont L., Germain G. and Dideberg O., **Pharmacol. Res. Commun.** 18, 25 (1986b).
- Δανιηλίδης Δ., Μοντεσάντου Β., Μπίτης Ι., Πανταζίδου Α., **ΣΗΜΕΙΩΣΕΙΣ ΦΥΚΟΛΟΓΙΑΣ Πανεπιστήμιο Αθηνών Τμήμα Βιολογίας Τομέας Οικολογίας και Ταξινομικής Αθήνα** (1998-99).
- Δημόπουλος Κ.Α., **"Γαγγλιοζίται του γάλακτος" Διδακτορική διατριβή. Αθήνα** (1973).
- Emeis J.J. and Kluft C., **Blood** 66, 86 (1985).
- Fabre J.L., Farge D., James C. and Lave D., **Eur. Pat. Appl.** 115979 (1986).
- Fallconer I.R., Beresford A.M., Runnegar M.T.C. (1983) **The Medical Journal of Australia** 1: 511-514
- Fallconer I.R. (1991), **Environmental Toxicology and Water Quality** 6: 177-184
- Fallconer I.R., **Phycologia** (1996), 35(6) 6-11

- Fallconer, I. R. (1996), **Phycologia** 35, 6-11.
- Farr R.S., Wadlow M.S., Cox C.P., Meng K.E. and Green D.L., **Fed. Proc.** 42, 3120 (1983).
- Feinberg H., Sandler N.C., Scorrer M., Le Breton B., Born G.V.R., **Biochim. Biophys. Acta** 470, 317 (1977).
- Felde R., Spiteller G., **Chem. Phys. Lipids** (1994), 71, 109-113.
- Feuerstein G.Z., **J.Lipid Mediat.Cell.Signall.** (1996), 14, 109-114.
- Fisher R.A., Shukla S.D., Debuysere M.S., Hanahan D.J. and Olson M.S., **J. Biol. Chem.** 259, 8685 (1984).
- Floch A., Sedivy P. and Caillard C.G., **J. Pharmacol.** 17, 177 (1986).
- Foegh M.L., Bijan S., Khirabadi B.S., Rowles J.R. and Ramwell P.W., **New horizons in PAF research**. Ed. by C.M. Winslow and M.L. Lee J. **Wiley (London)**. p. 343 (1987).
- Fouque F. and Vargaftig B.B., **Br. J. Pharmacol.** 83, 625 (1984).
- Fragopoulou E., Nomikos T., Antonopoulou S., Mitsopoulou C.A. and Demopoulos C.A. (2000). **J. Agric. Food Chem.** 48, 1234-1238.
- Frenkel R.A., Muguruma K., Johnston J.M., **Prog.Lipid.Res.** (1996), 35, 155-168.
- Fujiki H., Suganuma M., Hakii H., Bartolini G., Moore R.E., Takegama S. & Sugimura T. (1984), **Journall of Cancer Research and Clinical Oncology** 108: 174-176
- Gallanos D.S. and Kapoulas V.M., **Biochim. Biophys. Acta.** (1965), 98, 275.
- Gallanos D.S., Kapoulas V.M., **J. Lipid. Res.** (1962), 3, 134.
- Goldstein R.E., Feuerstein G.Z., Bradley L.M., Stambouly J.J., Laurindo F.R., Davenport N.J., **Lipids** (1991), 26, 1250-1256.
- Golecki J.R. and Drews G. (1982) pp. 125-141, **Blackwell Scientific Publications, Oxford**.
- Gonzalez-Crussi F., Hsueh W., **Am. J. Pathol.** 112, 127 (1983).
- Gonzalez-Crussi F., Hsueh W., Anderson R.C., Lee M.L. and Houlihan W., **J. Fed. Proc.** 45, 336 (1986).
- Gorham P.R. and Carmichael W.W. (1988). Hazards of freshwater blue-green algae (cyanobacteria) in: **Allgae and Human Affairs (Ed. By C.A.Lembi & J.R. Waalland)** pp 403-431 **Cambridge University Press Cambridge**.

- Greaves M.W. and Shuster S., **J. Physiol.** 193, 255 (1967).
- Grue-Sorensen G., Nielsen I.M. and Nielsen C.K., **J. Med. Chem.** 31, 1174 (1988).
- Guinot P., **Clin.Rev.Allergy** (1994), 12, 397-417.
- Guinot P., **Response, Paris France**, abstract p. 57 (1987a).
- Guinot P., Brambilla C., Duchier J., Braquet P., Bonvoisin B. and Cournot A., **Prostaglandins** 34, 723 (1987b).
- Guinot P., Braquet R., Duchier J. and Cournot A., **Prostaglandins** 32, 160 (1986).
- Guinot P., Braquet P., Duchier J. and Cournot A., **Agent Action** (Suppl.) 21, 239 (1987c).
- Hadvary P. and Baumgartner H.R., **Prostaglandins** 30, 694 (1985).
- Hahn H.L., Hartlage J. and Lang M., **Fed. Proc.** 45, 3085 (1986).
- Hallonen M., Lohman C., Dunn A.M., McManus L.M. and Pallmer J.D., **Am. Rev. Respir. Dis.** 131, 11 (1985).
- Han B.H., Yang H.O., Kang Y.H. et al, **J Med Chem** (1988), 2626-30.
- Hanahan D.J., **Am.Rev.Biochem.** (1986), 55, 483-509.
- Hanahan D.J., Mander P.G., Satouchi K., McManus L.M. and Pinckard R.N., **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 99, 103 (1981).
- Hanahan D.J., Tsuji H. and Olson M.S., **Third International Conference on Platelet-Activating Factor and Structurally Related Alkyl Ether Lipids, Japan**, abstract L 1 (1989).
- Handley D.A., Anderson R.C. and Saunders R.N., **Eur. J. Pharmacol.** 141, 409 (1987).
- Handley D.A., Farley C., Deacon R.W. and Saunders R.N., **Prostaglandins Leukotrienes Med.** 21, 269 (1986a).
- Handley D.A. and Saunders R.N., **Drug Dev. Res.** 7, 361 (1986c).
- Handley D.A., Tomesch J.D. and Saunders R.N., **Thromb. Haemost.** 56, 40 (1986d).
- Handley D.A., Van Vallen R.G., Melden M.K., Flury S., Lee M.L. and Saunders R.N., **Immunopharmacology** 12, 11 (1986).
- Handley D.A., Van Vallen, R.G. and Saunders R.N., **Immunopharmacology** 11, 175 (1986b).

- Hartung H.P., **Febs Lett.** 160, 209 (1983).
- Haslam R.J., **Nature** 202, 765 (1964)
- Haslam R.J. and Rossan G.M., **Molec. Pharm.** 11, 528 (1975).
- Hayashi M., Kimura J., Oh-Ishi S., Tsushima S. and Nomura H., **Jpn. J. Pharmacol.** 44, 127 (1987).
- Hayman J. (1992) **The Medical Journal of Australia** 157: 794-796
- Hecker G., König E., Ney P. and Schror Prog., **Clin. Biol. Res.** 242, 317 (1987).
- Heise H.A. (1949), **Journal of Allergy** 20: 383-385
- Henig N.R., Aitken M.L., Liu M.C., Yu A.S. and Henderson W.R. Jr. (2000), **J. Respir. Crit. Care Med.**, 162, 523-527.
- Henson P.M., **J. Exp. Med.** 131, 287 (1970).
- Henson P.M., **New horizons in Platelet activating factor research** Ed. by C.M. Winslow and M.L. Lee, J. Wiley London (In Proceedings of the 1st Sandoz Research Symposium) pp 1-9 (1987).
- Heuer H., Birke F. and Brandt K., **Prostaglandins** 35, 847 (1988).
- Heuer H., Casals-Stenzel J., Muacevic G., Stransky W. and Weber K.H., **Recent Advances in Platelet Activating Factor, Australia**, abstract 4 (1987).
- Heymans F., Michel E., Borrel M.C., Wichrowski B. and Godfroid J.J., **Biochim. Biophys. Acta**, 666, 230 (1981).
- Honda Z., Nakamura M., Miki I., Minami M., Watanabe T., Seyama Y., Okado H., Toh H., Ito K., Miyamoto T., **Nature** (1991), 349, 342-346.
- Hopkins C.Y., Javans A.W. and Boch R., **Can. J. Biochem.** 47, 433 (1969).
- Hsu F.-F. and Turk J. (2000), **J. Am. Soc. Mass Spectrom.** 11, 437-449.
- Humphrey D.M., Hanahan D.J. and Pinckard R.N., **Lab. Invest.** 47, 227 (1982).
- Humphrey D.M., McManus L.M., Hanahan D.J. and Pinckard R.N., **Lab. Invest.** 50, 16 (1984).
- Hwang S.B., Chang M.N., Garcia M.L., Han Q.Q., Huang L. and King V.F., **Eur. J. Pharmacol.** 141, 269 (1987).
- Hwang S.B., Lam M.H., Li C.L. and Shen T.Y., **Eur. J. Pharmacol.** 120, 33 (1986).

- Hwang S.B., Li C.H., Lam M.H. and Shen T.Y., **Lab. Invest.** 52, 617 (1985).
- Ηλιοπούλου Γεωργουδάκη Ιωάννα. Έρευνα Περιβαλλοντικών Επιπτώσεων της Τουριστικής Αξιοποίησης του Σπηλαίου Περάματος Ιωαννίνων και Προτάσεις Αποκατάστασής του. Τμήμα Βιολογίας Πανεπιστημίου Πατρών (1992-93)
- Ihida K., Predescu D., Czekay R.P., Pallade G.E., **J.Cell Sci.** (1999), 112, 285-295.
- Iliopoulou-Georgoudaki J., Pantazidou A. and P. Theoulakis (1993) **Mem. De Biospeleologie** 20: 117-120
- Imrie C.W., McKay C.J., **Baillieres Best Prat Res Clin Gastroenterol** (1999), 13:357-64
- Ishii S., Shimizu T., **Prog.Lipid.Res.** (2000), 39, 41-82.
- Issekutz A.C. and Szpejda M., **Lab. Invest.** 54, 275 (1986).
- Izumi T., Honda Z., Mutoh H., Kume K., Shimizu T., **Regulation and signall transduction of PAF receptor. Adv.Prostaglandin Thromboxane Leukot.Res.** (1995), 23, 461-466.
- Izzo A.A., **J.Pharm.Pharmacol.** (1996), 48, 1103-1111.
- Jancar S., **The Role of Platelet-Activating Factor in the Immune Response, Paris, France**, abstract p. 66 (1987).
- Jantan I., Jurivati J., Warif N.A., **J. Ethnopharmacol** (2001), 75:287-90.
- Jenks P.J., Kavanagh G.M., Brooks J., Bradfield J.W. and Archer C.B. (1999), **Clin. Exp. Dermatol.** 24, 112-117.
- Jonson C.D., Kingsnorth A.N., Imrie C.W., **Gut.** (2001), 48:62-9.
- Jouvin-Marche E., Ninio E., Beauvain G., Tence M., Niaudet P. and Benveniste J., **J. Immunol.** 133, 892 (1984).
- Kaneshiro E.S., **J. Lipid Res.** (1978), 28, 1241-1258.
- Karantonis H.C., Antonopoulou S. and Demopoulos C.A. **J. Agric. Food Chem.** 50, 1150 (2002).
- Kates M., **Biochem. Soc. Symp.** (1992), 58, 51-72.
- Kates M. (1990) **Glycolipids of higher plants, algae, yeasts and fungi. In Handbook of Lipid Research 6. Glycolipids, phosphoglycolipids and sulfoglycolipids** (Kates M., ed.), pp. 270-271, **Plenum Press, New York and London.**

- Kates M., **Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology Vol.3, part II : Technique in Lipidology. Work, T.S. and Work, E. (eds). N.Holland Publ. Co. Amsterdam. p 291-293 (1972a).**
- Kates M., **Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology Vol. 3, part II : Technique in Lipidology. Work, T.S. and Work, E. (eds). N.Holland Publ. Co. Amsterdam. p 321-325 (1972b).**
- Kawakishi and Morimitsu **Lancet** 330 (1988).
- Kerally C.L., Delautier D., Delabassee D., Chignard M. and Benveniste J., **Thromb. Res.** 34, 463 (1984).
- Khan S.N., Lane P.A. and Smith A.D., **J. Pharmacol.** 107, 189 (1985).
- Kim Y.H., Choi J.S., Yoo J.S., Park Y.M. and Kim M.S. (1999) **Anall. Biochem.** 267, 260-270.
- Kirby G.W., Robins D.J., Sefton M.A. and Tallekar R.R., **J. Chem. Soc. Perkin Trans.** 1, 119 (1980).
- Kloprogge E. and Akkerman J.W.N., **J. Biol. Chem.** 261, 11071 (1986).
- Knapp H.R., Oelz O.O., Roberts J., Sweetman B.J., Oates J.A. and Reed P.N., **Proc. Nat. Acad. Sci. USA** 74, 4251 (1977).
- Koltai M., Guinot P., Hosford D., Braquet P.G., **Adv.Pharmacol.** (1994), 28, 81-167.
- Koltai M., Hosford D., Guinot P., Esanu A. and Braquet P. (1991) **Drugs**, Part I, 9-29, Part II, 174-204.
- Koltai M., Lepran I., Szekeres L., Viossat I., Chabrier P.E. and Braquet P., **Eur. J. Pharmacol.** 130, 133 (1986).
- Komarek J. & K. Anagnostidis (1986). **Modern approach to the classification of Cyanophytes. 2-Chroococcales, Arch. Hydrobiol./Suppl. 73, Allgological Studies. 43, p. 157-226.**
- Komarek J. & K. Anagnostidis (1989). **Modern approach to the classification system of cyanophytes 4-Nostocales. Arch. Hydrobiol. Allgological Studies 56, p. 247-345.**
- Kornecki E., Ehrlich Y.H. and Lenox R.N. **Science** 226, 1454 (1984).
- Korth R., Hillmar I., Muramatsu T. and Zollner N., **Chem. Phys. Lipids** 33, 47 (1983).
- Koussissis S., Semidallas C.E., Antonopoulou S., Kapoulas V.M., Demopoulos C.A., Kallyvas V., **Revue Francaise Des Corps Gras** (1994), 9/10, 323

- Koussisis S., Semidallas C.E., Hadzistavrou E.C., Kallyvas V., Antonopoulou S., Demopoulos C.A., **Revue Francaise Des Corps Gras** (1994), 5/6, 127
- Kramer R.M. and Deykin D., **J. Biol. Chem.** 258, 13806 (1983).
- Kramer R.M., Patton G.M., Pritzker C.R. and Deukin D., **J. Biol. Chem.** 259, 13316 (1984).
- Kulikov V.I., Muzia G.I., **Biokhimiia** (1992), 57, 803-816.
- Kulikov V.I. and Muzya G. (1997), **Biochem. (Moscow)**, 62, 1103-1108.
- Καρκαμπούνας Σ., Τσουκάτος Δ., Ευαγγέλου Α. και Καλλίστρατος Γ. **Πανελλήνιο Αιματολογικό Συνέδριο, Θεσ/κη** (1990).
- Κουτσάφτης Δ.Κ., **"Απομόνωση της πρώτης φυσικής φωσφόνοσφιγγομυε-λίνης από τα κύτταρα του πρωτόζωου Tetrahymena Pyriformis"** Διδακτορική Διατριβή. Αθήνα (1981).
- Labrakis-Lazanas K., Lazanas M., Koussisis S., Tournis S. and Demopoulos, C.A., **Haematol.** 3, 379 (1988).
- Lamant V., Mauco G., Braquet P., Chap H. and Couste Blazy L., **Biochem. Pharmacol.** 36, 2749 (1987).
- Lane J.S., Todd K.E., Gloor B., **J Surg Res** (2001), 99:365-70
- Lang M., Hansen D. and Hahn H.L., **Agents Actions** (Suppl.) 21, 245 (1987).
- Lauri O., Cerletti C. and Gaetano G.J., **J. Lab. Clin. Med.** 105, 653 (1985).
- Lazanas M., Demopoulos C.A., Tournis S., Koussisis S., Labrakis-Lazanas K. and Tsarouhas X. **Arch. Dermatol. Res.** 280, 124 (1988).
- Lecrubier C., Couard J., Horellou M.H. and Samama M., **Agents Actions** 13, 77 (1983).
- Lekka M., Tokumura A., Tsuji H. and Hanahan D.J. **Arch. Biochem. Biophys.** 302, 380 (1993).
- Lekka M., Tselepis A.D. and Tsoukatos D. (1986) **FEBS Lett.** 208, 52-55.
- Lekka M.E., Tsoukatos D., Kapoulas V.M., **Biochim. Biophys. Acta.** (1990), 1042, 217-220.
- Levi R., Burke J.A. and Corey E.J., **SRS-A, leukotrienes and immediate hypersensitivity reactions of the heart. "Leukotrienes and other lipoxygenase products". Samuelson B., Paoletti R. (eds) Raven Press N.Y.** p187 (1982).

- Logani S., Chen M.C., Tran T., Lee T.C., Raffa R.B. **Life Sci** (2000), 67: 1389-96.
- Levy J.V., **Febs Lett.** 154, 262 (1983).
- Ludwig J.C., McManus L.M., Clark P.O., Hanahan D.J. and Pinckard R.N. **Arch. Biochem. Biophys.** 232, 102 (1984).
- Lynch J.M., Henson P.M., **Fed. Proc.** 44, 1272 (1985).
- Λέκκα Μ.Ε. Η *T.pyriformis* σα βιοχημικό σύστημα μελέτης των δράσεων και της παραγωγής του παράγοντα ενεργοποίησης αιμοπεταλίων. (Διδακτορική Διατριβή, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων) (1987).
- MacIntyre D.E. and Shaw A.M. **Thromb. Res.** 31, 833 (1983).
- MacLennan K.M, Smith P.F, Darlington C.L. **Prog.Neurobiol.** (1996), 50, 585-596.
- Mallavasi F., Tetta C., Funaro A., Bellone G., Ferrero E., Franzone A.C., Dellabona P., Rusci R., Matera L., Camussi G. and Calligaris-481. MacIntyre D.E. and Shaw A.M. **Thromb. Res.** 31, 833 (1983).
- Mallone B., Lee T.C and Snyder F., **J. Biol. Chem.** 260, 1531 (1985).
- Mandi Y., Farkas G., Koltai M., Braquet P. and Beladi I., **The Role of Platelet-Activating Factor in the Immune Response, Paris France**, abstract p. 27 (1987).
- Marcus A.J., Safier L.B., Ullman H.L., Wong K.T.H., Broekman J., Weksler B.B. and Kaplan K.L., **Blood** 58, 1027 (1981).
- Mardin M., Abram T.S. and Fiedel V.B., **III Int. Congr. Inflamm. Paris** (1984)
- Margulis L., **Proc. Natl. Acad. Sci.** (1996), 93, 1071-1076
- Martiny-Baron G., Scherer G.F.E., **J. Biol. Chem.** (1989), 264, 18052-18059.
- Maruyama M., Terahara A., Nakadaira Y., Woods M.C. and Nakanishi K., **Tetrahedron Lett.** 4, 309 (1967a).
- Maruyama M., Terahara A., Nakadaira Y., Woods M.C., Takagi Y. and Nakanishi K., **Tetrahedron Lett.** 4, 314 (1967b).
- Masanori O., Yoshida K., Nishikawa M., Ando T., Iwani M., Kohsaka M. and Aoki H., **J. Antibiot.** 39, 199 (1986a).
- Masanori O., Yoshida K., Nishikawa M., Masanobu K. and Hatsuo A., **Thromb. Res.** 42, 661 (1986b).
- Masugi F., Ogihara T., Otsuka A., Saeki S. and Kumahara Y. **Bioch. Biophys. Res. Commun.** 104, 280 (1982).

- Masugi F., Ogihara T., Otsuka A., Saeki S. and Kumahara Y., **Life Sci.** 34, 197 (1984).
- McKean M.L. and Silver M.J., **Biochem. J.** 225, 723 (1985).
- McKean M.L., Smith J.B. and Silver M.J., **J. Biol. Chem.** 257, 11278 (1982).
- Mencia-Huerta J.M. and Benveniste J., **Eur. J. Immunol.** 9, 409 (1979).
- Mencia-Huerta J.M., Ninio E., Roubin R. and Benveniste J., **Agents Actions**, 11, 556 (1981).
- Miller O.V., Ayer D.E. and Gorman R.R., **Biochim. Biophys. Acta** 711, 445 (1982).
- Minhas B.S., Ripps B.A., Zhu Y.P., Kim H.N., Burwinkel T.H., Gleicher N., **Am.J.Reprod.Immunol.** (1996), 35, 267-271.
- Miwa M., Hill C., Kumar R., Sugatani J., Olson M.S. and Hanahan D.J., **J. Biol. Chem** 262, 527 (1987).
- Miyamoto T., Ohno H., Yano T., Okada T., Hamanaka N. and Kawasaki A., **Adv. Prostaglandins Thromboxane Leukotrienes Res.**, 15, 719 (1985).
- Moncada S. and Vane J.R., **Pharmacol. Rev.** 30, 293 (1979).
- Montrucchio G., Alloatti G., Camussi G., **Physiol.Rev.** (2000), 80, 1669-1699.
- Morley J., Page C.P. and Paul W.Br., **J. Pharm.** 80, 503 (1983).
- Morley J., Sanjar S. and Page C.P., **Lancet** 2 1142 (1984).
- Muller-Eberhard H.J., **Complement Ann. Rev. Biochem.** 44, 697 (1975).
- Murata N. et Nishida I., (1987). Lipids of blue-green algae (cyanobacteria) in: Stumpf. P (ed.). **The biochemistry of plants, vol. 4. Lipids structure and function. Academic Press, New York, London** pp. 315-347.
- Murphy R.C. (1993a) **Glycerophospholipids. In Handbook of Lipid Research 7. Mass Spectrometry of lipids (Snyder, F., ed.), pp. 223-224, Plenum Press, New York and London.**
- Murphy R.C. (1993b) **Sphingolipids. In Handbook of Lipid Research 7. Mass Spectrometry of lipids (Snyder F., ed.), pp. 270-271, Plenum Press, New York and London.**
- Μουτσόπουλος Χ.Μ., Εμμανουήλ Δ.Σ., **Βασικές αρχές Παθοφυσιολογίας. Ιατρικές Εκδόσεις Λίτσας, Αθήνα** (1984).

- Nakamura M., Honda Z., Izumi T., Sakanaka C., Mutoh H., Minami M., Bito H., Seyama Y., Matsumoto T., Noma M., **J.Biol.Chem.** (1991), 266, 20400-20405.
- Nakayama R., Kumagai H. and Saito K. (1994), **Biochim. Biophys. Acta** 1199, 137-143.
- Nakayama R., Yasuda K. and Saito K., **J. Biol. Chem.** 262, 13174 (1987).
- Namm D.H. and High J.A., **Thromb. Res.** 20, 285 (1980).
- Ninio E., Mencia-Huerta J.M., Heymans F. and Benveniste J. **Biochim. Biophys. Acta** 710, 23, (1982a).
- Ninio E., Mencia-Huerta J.M. and Roubin R. **J. Pharmacol.** 14, 30, (1983).
- Ninio E., Roubin R., Mencia-Huerta J.M. and Benveniste J., **Fed. Proc.** 43, 731, (1982b).
- Nomikos T., Oikonomou A., Fragopoulou E., Pantazidou A. and Antonopoulou S., «Bioactive polar lipids from *Scytonema julianum*». **FEBS Special Meeting, 45th International Conference on the Bioscience of Lipids**, May 25-29, 2004, Ioannina, Greece.
- Norihiko S., Ichiro S., Keiji Yasuhisa T. and Hashimoto M., **Chem. Pharm. Bull.** 35, 3527, (1987a).
- Norihiko S., Shima I., Hemmi K. and Hashimoto M., **J. Med. Chem.** 30, 1706 (1987b).
- Nunez D., Chignard M., Korth R., Le Couedic J.P., Norel X., Spinnewyn B., Braquet P. and Benveniste J. (1986), **Eur. J. Pharmacol.** 123 :197.
- Nudez D., Randon J., Gandhi C., Siafaka-Kapadai A., Olson M.S., Hana D.J., **J. Biol. Chem.** (1990) Oct. 25, 265(30):18330-8.
- Νομικός Τ., Αντωνοπούλου Σ., Δημόπουλος Κ.Α., **Χημικά Χρονικά, Γενική Έκδοση** 59, (1997).
- Okamoto H., Iwahisa Y., Terasawa M. and Setoguchi M. **Third International Conference on Platelet-Activating Factor and Structurally Related Alkyl Ether Lipids, Japan**, abstract I 12 (1989).
- Okamoto M., Keizo Y., Uchida I., Kohsaka M. and Aoki H., **Chem. Pharm. Bull.** 34, 345 (1986a).
- Okamoto M., Yoshida K., Nishikawa H., Hayashi K.I., Uchida I., Kohsaka M. and Aoki H., **Chem. Pharm. Bull.** 34, 3005 (1986b).
- Okamoto M., Yoshida K., Uchida I., Nishikawa M., Kohsaka M. and Aoki H., **Chem. Pharm. Bull.** 34, 340 (1986c).

- Olson M.S., Buxton D.B., Fisher R.A., Lapointe D. and Hill C., **In 2nd International Conference on PAF and structurally related alkyl ether lipids, Gatlimburg, TN** p76 (1986).
- Olsson B.M., Karlsson H., Larsson T. and Lanne B. **Journall of Mass Spectrometry**: 34,942-951 (1999).
- Orevi M., Godeke M.E., Eldor A., Rigbi M., **Fifth International Congress on Platelet-Activating Factor and Related lipid Mediators, Berlin, September 12-16, 1995, p.138, Germany** (1995).
- Oura Y., Sakiyama N., Ueshima R., Higuchi M., Kakishita E. and Nagai K. **Thromb. Heamost.** 58, 185 (1987).
- Οικονόμου Αλ., (2003), **Προβλήματα μόλυνσης των τουριστικά αξιοποιημένων σπηλαίων και προτάσεις για την αντιμετώπισή τους. Περιβαλλοντικές προδιαγραφές αξιοποίησης σπηλαίων.** 1^η Πανελλήνια συνάντηση για την προστασία και ανάδειξη των σπηλαίων.
- Pan J.X., Hensens O.D., Zink D.L., Chang M.N. and Hwang S.B., **Phytochemistry** 26, 1377 (1987).
- Pantazidou A. (1996), **Allgological Studies** 83: 455-456
- Pantazidou A. (1997) **Proc. Of the Eurocare-Euromarble** 153-157
- Pantazidou A. **Archaeometry Issues in Greek Prehistory and Antiquity, Athens** (2001), pp 249-257.
- Patterson G.M.L., Larsen L.K. and Moore R.E. (1994) **J. Appl. Phycol.** 6, 151-157.
- Pinckard R.N., **Hospitall practice** p.67 (1983).
- Pinckard R.N., Kniker W.T., Lee L., Hanahan D.J. and McManus L.M., **J. Allergy Clin. Immunol.** 65, 196 (1980b).
- Pinckard R.N., McManus L.M. and Hanahan D.J., **Advances in Inflammation Research, Roven Press, N.Y.** pp 147- (1982).
- Pinckard R.N., McManus L.M., Demopoulos C.A., Hallonen M., Clark P.O., Shaw J.O., Kniker W.T. and Hanahan D.J., **J. Reticuloendothelial Soc.** 28, 95 S (1980a).
- Pinckard R.N., Farr R.S., Hanahan D.J., **J.Immunol.** (1979), 123, 1847-1857.
- Piper J.J. and Stewart A.G., **Br. J. Pharmacol.** 88, 238 P (1986).

- Pirotzky E., Colliez P., Guilnard C., Schaefferbeke J., Mencia-Huerta J.M. and Braquet P., **The Role of Platelet-Activating Factor in the Immune Response, Paris, France**, abstract p. 64 (1987).
- Polonowsky J., Tence M., Varenne P., Das B.C., Lunel J., Benveniste J., **Proc. Nat. Acad. Sci. USA** 77, 7019 (1980).
- Ponpipom M.M., Bugianesi R.L., Brooker D.R., Bao-Zhem Y., Hwang S.B. and Shen T.Y. **J. Med. Chem.** 30, 136 (1987).
- Ponpipom M.M., Yue B.Z., Bugianesi R.L., Brooker D.R., Chang M.N. and Shen T.Y., **Tetrahedron Lett.** 27, 309 (1986).
- Portier P. and Richet C., **Compt. rend. Soc. de Biol.** 54, 170 (1982).
- Prescott S.M, Zimmerman G.A, McIntyre T.M., **J.Biol.Chem.** (1990), 265, 17381-17384.
- Pretolani M., Lefort J., Mallanchiere E. and Vargaftig B.B., **Eur. J. Pharmacol.** 140, 311 (1987).
- Παπαδημητρίου Κ.Σ., **Γενική Παθολογία και Παθολογική Ανατομική. Γενική Παθολογική Ανατομική , Ιωάννινα** (1982).
- Παπαπαναγιώτου Ι.Κ., **Ιατρική Μικροβιολογία και Ανοσοβιολογία. Τόμος Α Θεσσαλονίκη** (1981).
- Ramwell P.W. and Daniels E.G., **Lipids Chr. Ann.** 2, 313 (1969).
- Rementzis J., Antonopoulou S., Argyropoulos D. and Demopoulos C.A., **Adv. Exp. Med. Biol.** 416,65 (1996).
- Renkonen O., **Biochim. Biophys. Acta** (1961),54,361.
- Renooij W., Snyder F., **Biochim.Biophys.Acta** (1981), 663, 545-556.
- Repine J.E. and Heffner J.E., **J. Pharmacol.** 14, 24 (1983).
- Reshef V., Mizrachi E., Maretzki T., Silberstein C., Loya S., Hizi A. and Carmeli S. (1997). **J. Nat. Prod.** 60, 1251-1260.
- Ribeiro R., Soares-de-Carvalho F.A.S., Barbosa-Filho J.M., Cordeiro R.S.B. and Tibirica E., **Fifth International Congress on Platelet-Activating Factor and Related lipid mediators, Berlin, September 12-16, 1995, p.139, Germany** (1995).
- Rippka R., Deruelles J., Waterbury J.B., Herdman M. and Stanier R.Y., **J. Gen. Microbiol.** 111, 1-61, (1989).
- Rippka R., Waterbury J.B. and Stanier R.Y. (1981) pp. 212-220, **Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.**

- Robaut C., Durand G., James C., Lave D., Sedivy P., Floch A., Mondot S., Pacot D., Caverio I. and LeFur G., **Biochem. Pharmacol.** 36, 3221 (1987).
- Robbins D.L. and Gershwin M.E., **Sem.Arthr. Rheum.** 7, 245 (1978).
- Robinson M., Blank M.L. and Snyder F., **J. Biol. Chem.** 260, 7889 (1986).
- Robinson M. and Snyder F., **Biochim. Biophys. Acta** 837, 52 (1985).
- Rosam A.C., Wallace J.L. and Whittle B., **J. Nature (Lond.)** 319, 54 (1986).
- Roubin R. and Benveniste J., **The Reticuloendothelial System** 8, 73 (1985).
- Saadi O.E. & Cameron A.S. (1993) **Medical Journal of Australia** 158: 792-793
- Saadi O.E., Esterman A.J., Cameron S. & Roder D. (1995), **Medical Journal of Australia** 162: 122-125.
- Summers J.B., Allbert D.H., **Adv.Pharmacol.** (1995), 32, 67-168.
- Sanchez-Crespo M., Allonso F. and Mato J.M., **J. Pharmacol.** 14, 31 (1983a).
- Sanchez-Crespo M., Inarrea P., Alvarez V., Allonso F., Edigo I. and Hernando L. Am., **J. Physiol.** 244, 706 (1983a).
- Saunders R.N., Handley D.A., **Annu.Rev.Pharmacol.Toxicol.** (1987), 27, 237-255.
- Schellenberg R.R., **Am.Rev.Respir.Dis.** (1987), 136, S28-S32.
- Scherer G.F.E., **Biochem. Biophys. Res. Commun.** (1985), 133,1160-1167.
- Schwimmer M., Schwimmer D. (1968) **Medical aspects of phycology. In : Allgae, Man and the Environment (Ed. D.J.Jackson)** pp278-358. **Syracuse University Press, Syracuse, New York.**
- Sedivy P., Weber S., Gregoire J., Gaisne F., Strauch G., De Lauture, and Floch, A. **Recent Advances in Platelet-Activating Factor, Australia** (1987).
- Shen T.Y., Hwang S.B., Chang M.N., Doebber T.W., Lam M.H., Wu M.S., Wang X., Han G.Q. and Li R.Z., **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 82, 672 (1985a).
- Shen T.Y., Hwang S.B., Doebber T.W. and Robbins J.C., **In "Platelet Activating Factor and Related Lipid Mediators" (Snyder F., Ed.) N.Y., Plenum Press, p. 153 (1987).**
- Shen T.Y., Yang S.S. and Hwang S.B., **Eur. Pat. Appl.** 142,801 (1985b).

- Shukla S.D., Buxton D.B., Olson M.S. and Hanahan D.J., **J. Biol. Chem.** 258, 10212, (1983).
- Shukla S.D., **Lipids** (1991), 26, 1028-1033.
- Siafaka-Kapadai A., Demopoulos C.A. and Andrikopoulos N.K., **Biochem. Int.** 12, 33, (1986).
- Siafaka-Kapadai A. and Hanahan D., **Biochim. Biophys. Acta** 1166, 217, (1993).
- Siafaka-Kapadai A., Svetlov S., Hanahan D.J., Javors M.A., **Life Sci.** 63(20):1769-77, (1998).
- Silver M.J., Hoch W., Kocsis J.J., Ingberman C.M. and Smith J.B., **Science** 183, 1085, (1974).
- Singer and Nicolson, **Science** 175, 720, (1972).
- Skulberg O.M., Codd G.A. and Carmichael W.W. (1984), **Toxic blue green algae blooms in Europe : a growing problem. Ambio** 13: 244-247.
- Small M.A. and Baldo B.A., **Third International Conference on Platelet Activating Factor and Structurally Related Alkyl Ether Lipids, Tokyo, Japan**, abstract I 42 (1989).
- Smallbone B.W., Taylor N.E. and McDonalld J.W., **J. Pharmacol. Exp. Ther.** 242, 1035, (1987).
- Snyder F., **Am.J.Physiol.** (1990), 259, C697-C708.
- Sobhani I., Denizot Y., Vissuzaine C., Vatie J., Benveniste J., Lewin M.J., Mignon M., **Dig.Dis.Sci.** (1992), 37, 1583-1592.
- Souza D.G., Cara D.C., Cassalli G.D., **Br J Pharmacol** (2000), 131:1800-8.
- Stafforini D.M., McIntyne T.M., Carter M.E. and Prescott S.M. (1987) **J. Biol. Chem.** 262, 4223-4230.
- Staub R. (1961): **Ernahrungs physiologische-autokologische untersuchengen an der plaktischen Blauallge Oscillatoria rubescen DC. Sciveiz Z. Hydrol.** 23, 82-199.
- Stitch S.R., Toumba J.K., Groen M.B., Funke C.W., Leemhuis J., Vink J. and Woods G.F., **Nature** 287, 738 (1980), **J.Lipid.Res.** (1991).
- Sturk A., Ten Cate J.W., Hosford D., Mencia-Huerta J.M., Braquet P., **Adv.Lipid.Res.** (1989), 23, 219-276.
- Sugimoto T., Tsuchimochi H., McGregor C.G., Mutoh H., Shimizu T., Kurachi Y., **Biochem.Biophys.Res.Comm.** (1992), 189, 617-624.

- Sugiura T., Ojima T., Fukuda T., Satouchi K., Saito K., Waku K., **J.Lipid.Res.** (1991), 32, 1795-1803.
- Sugiura T., Yamashira A., Kudo N., Fukuda T., Miyamoto T., Cheng N.N., Kishimoto S., Waku K., Tanaka T., Tsukatani H. and Tokumura A. (1995). **Biochim. Biophys. Acta** 1258, 19-26.
- Surles J.R., Wykle R.L., O' Flaerty J.T., Sallzer W.L., Thomas M.J., Snyder F. and Piantadosi C., **J. Med. Chem.** 28, 73 (1985).
- Swendsen C.L., Ellis J.M., Chilton F.H., O'Flaerty J.T. and Wykle R.L., **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 113, 72 (1983).
- Tahara T., Mikashima H., Terasawa M. and Maruyama Y., **Chem. Pharm. Bull. Jpn.** 35, 2119 (1987).
- Takatani M., Yoshioka Y., Tasaka A., Terashita Z., Imura Y., Nishikawa K. and Tsushima S., **J. Med. Chem.** 32, 56 (1989).
- Tencalla F.G., Dietrich D. & Schlatter C. (1994), **Aquatic Toxicology** 30:215-224
- Tence M., Polonowsky J., Le Couedic J.P., Benveniste J., **Biochimie** 62, 251 (1980).
- Terasawa M., Mikashima H., Takehara S., Moriwaki M., Setoguchi M. and Tahara T. **Third International Conference on Platelet-Activating Factor and Structurally Related Alkyl Ether Lipids, Japan**, abstract L 10 (1989).
- Terashita Z., Imura Y. and Nishikawa K., **Biochem. Pharmacol.** 34, 1491 (1985a).
- Terashita Z., Imura Y., Nishikawa K. and Sumida S., **Eur. J. Pharmacol.** 109, 257 (1985b).
- Terashita Z., Imura Y., Shino A. and Nishikawa K., **J. Pharmacol. Exp. Ther.** 243, 378 (1987).
- Terashita Z., Tsushima S., Yoshioka Y., Nomura H., Inada Y. and Nishikawa K. **Life Sci.** 32, 1975 (1983).
- Thomet O.A., Wiesmann U.N., Schapowall A., Bizer C., Simon H., **Biochem Pharmacol** (2001), 61:1041-7.
- Tilley J.W., Burghardt B., Burghardt C., Mowles T.F., Leinweber F-J., Klevans L., Young R., Hirkaller G., Fahrenholtz K., Zawoiski S. and Todaro L.J., **J. Med. Chem.** 31, 466 (1988).

- Touqui L., Jacquemin C., Dumarey C. and Vargaftig B.B., **Biochim. Biophys. Acta** 833, 111 (1985b).
- Touqui L., Shaw A.M., Dumarey C., Jacquemin C. and Vargaftig B.B., **Biochem. J.** 241, 555 (1987).
- Touvay C., Vilain B., Etienne A., Sirois P., Borgeat P. and Braquet P., **Immunopharmacology** 12, 97 (1986b).
- Touvay C., Vilain B., Mencia-Huerta J.M. and Braquet P., **Recent Advances in Platelet Activating Factor, Australia**, abstract 27 (1987).
- Toyofuku T., Keishi K., Kobayashi T. and Kusama S., **Prostaglandins** 31, 271 (1986).
- Tsangaris G.T., Demopoulos C.A., Tsoukatos D.C., Kapoulas V.M., **Comp. Biochem. Physiol. C.** (1992),102,495-502.
- Tselepis A., Tsoukatos D., Demopoulos C.A., Kapoulas V.M., **Biochim. Int.** (1986), 13,999-1008.
- Tsoukatos D., Demopoulos C.A., Tselepis A.D., Moschidis M.C., Donos A., Evangelou A. and Benveniste J., **Lipids** 28, 1119 (1993).
- Turner M.R. and Lumb R.H. (1989) **Biochim. Biophys. Acta** 1004, 49-52.
- Turner P.C., Gammie A.J., Hollinrake K. & Codd G.A. (1990) **British Medical Journal** 300:1440-1441
- ΤΑ ΕΛΛΗΝΙΚΑ ΣΠΗΛΛΙΑ: Παιανία, ΥΠΟΥΡΓΕΙΟ ΠΟΛΙΤΙΣΜΟΥ Εφορεία Παλαιοανθρωπολογίας – Σπηλαιολογίας ΑΘΗΝΑ (2000).
- Τσελέπης Α., **Μελέτη της επίδρασης του PAF στο κυκλοφορικό σύστημα των επίμυων και στη ρύθμιση της μεταφοράς ιόντων στο πρωτόζωο *Tetrahymena pyriformis* (Διδακτορική Διατριβή, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων)** (1985).
- Τσουκάτος Δ.Μ., **Πρώτη πανελλήνια ημερίδα για τον παράγοντα ενεργοποίησης αιμοπεταλίων, Ιωάννινα**, σελ. 133 (1987).
- Venable M.E., Zimmerman G.A., McIntyre T.M., Prescott S.M., **J.Lipid.Res.** (1993), 34, 691-702.
- Vigo G., **J. Biol. Chem.** 260, 3418 (1985).
- Villamediana L.M., Sanz E., Fernandez-Gallardo S., Caramelo C., Sanchez-Crespo M., Braquet P. and Lopez-Novoa J.M., **Life Sci.** 39, 201 (1986).
- Wade P.J., Lunt D.O., Lad N., Tuffin D.P. and McCullagh K.G., **Thromb. Res.** 41, 251 (1986).
- Wallace J.L. and Whittle B.J.R., **Eur. J. Pharmacol.** 124, 209, (1986).

- Wallsh C.E., Dechatelet L.D., Chilton F.H., Wykle R.L., Waite M., **Biochim. Biophys. Acta** 750, 32 (1983).
- Wallsh C.E., Waite M., Thomas M.J. and Dechatelet L.D., **J. Biol. Chem.** 256, 7228 (1981).
- Weber K.H., Heuer H., Birke F., Bechtel W., Harreus A., Stransky W., Wallther G. and Casalls-Stenzel J., **Recent Advances in Platelet Activating Factor, Australlia**, abstract 15 (1987).
- Weber N., Mangold H.K., **J. Lipid Res.** (1985), 26,495-500.
- Weltzier H.U., **Biochim. Biophys. Acta** 559, 259 (1979).
- Wichrowski B., Jouquey S., Heymans F., Broquet C., Godfroid J.J., Fichelle J. and Worcel M., **Sixth Internationall Conference on Prostaglandins and Related Compounds, Italy** (1986).
- Winslow C.M., Anderson R.C., D'Aries F.J., Frisch G.E., Delillo A.K., Lee M.L. and Saunders R.N., In **"New Horizons in Platelet Activating Factor Rese arch"** (Winslow C.M., and Lee M.L., Eds) New York, John Wiley and Sons, p. 153 (1987).
- Winslow C.M., Vallespir S.R., Frisch G.E., D'Aires F.J. and KowallDeLillo A., **Prostaglandins** 30, 697 (1985).
- Wittwer T., Grotte M., Oppelt P., Franke U., Schaefers H.J., Wahlers T., Heart J., **Lung Transplant** (2001), 20: 358-63
- Wykle R.L., Chilton F.H., Mueller H.W., Swendsen C.L. and O'Flaerty J.T., **J. Pharmacol.** 14, 32 (1983).
- Wykle R.L., Mallone R. and Snyder F., **J. Biol. Chem.**, 255, 10256 (1980).
- Wykle R.L., Miller C.H., Lewis J.C., Schmitt J.D., Smith J.A., Surles J.R., Piantadosi C., O'Flaherty J.T., **Biochem. Biophys. Res. Commun.** (1981), 100, 1651-1658.
- Yamaguchi S., Tomomatsu N., Komatsu H., **Inflamm Res** (2000), 49:584-90.
- Yang H.O. and Han B.H., **Fifth Internationall Congress on Platelet-Activating Factor and Related lipid mediators, Berlin, September 12-16, 1995**, p.141, **Germany** (1995).
- Ye R.D., Prossnitz E.R., Zou A.H., Cochrane C.G., **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, 1991, 180, 105-111 Yu S.Z. (1994), **Toxic cyanobacteria. Current Status of research and management. Proceedings of an internationall workshop. Adelaide Australlia**, March 22-26, Ed. By D.A. Steffensen & B.C. Nichols, pp 75-85, **Australlian Center for Water Quallity Research.**

Zanglis A., Lianos E.A. and Demopoulos C.A. (1996) **J. Biochem. Cell Biol.** 28, 63-74.

Zirrolli J.A., Clay K.L. and Murphy R.C. (1991). **Lipids** 26, 1112-1116.