

ΜΕΛΕΤΗ ΦΥΤΙΚΩΝ ΣΤΕΡΟΕΙΔΩΝ ΠΟΥ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΟΥΝ
ΜΕ ΤΗΝ ΠΡΩΤΕΪΝΗ ΧΑΡΥΒΔΙΝΗ ΤΟΥ ΟΡΓΑΝΙΣΜΟΥ
Charybdis maritima agg.

ΑΛΕΞΑΝΔΡΙΔΗΣ ΝΙΚΟΛΑΟΣ

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ: Δ. ΓΑΝΩΤΑΚΗΣ

ΔΙΑΤΡΙΒΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

ΤΟΥ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟΥ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑΤΟΣ Ε.Π.Ε.Α.Ε.Κ.

ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΚΑΙ ΣΥΝΘΕΣΗ ΦΥΣΙΚΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ ΜΕ ΒΙΟΛΟΓΙΚΗ
ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑ

ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ – ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ

ΗΡΑΚΛΕΙΟ 2008

Study of the interaction of plant steroids
with the protein charybdin, which is
isolated from *Charybdis maritima* agg.

ALEXANDRIDES NICKOLAOS

SUPERVISOR: D. GHANOTAKIS

DEPARTMENT OF CHEMISTRY

UNIVERSITY OF CRETE

HERAKLION 2008

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ο οργανισμός *Charybdis maritima* (κν. σκυλοκρεμμύδα), που φύεται κυρίως στις παράκτιες περιοχές της λεκάνης της Μεσογείου, είναι γνωστός από την αρχαιότητα για τις ποικίλες φαρμακευτικές του δράσεις. Πρόσφατα, διαπιστώθηκε ότι η σκυλοκρεμμύδα περιέχει σε μεγάλες ποσότητες μία πρωτεΐνη, τη χαρυβδίνη, που ανήκει στην κατηγορία των *πρωτεϊνών αποικοδομητών των ριβοσωμάτων* (RIPs).

Στην παρούσα εργασία επιχειρήσαμε να εντοπίσουμε, να απομονώσουμε και να χαρακτηρίσουμε τις ουσίες που προσαρτώνται στη χαρυβδίνη, κατά τη διαδικασία της απομόνωσής της και πιθανά λειτουργούν σαν συμπαραγόντες, που επηρεάζουν τη βιολογική δράση της πρωτεΐνης. Με μία σειρά χρωματογραφικών τεχνικών (TLC, LC, HPLC) και με συνδυαστική φασματοσκοπία μάζας (ESI-MS), διαπιστώθηκε ότι οι ουσίες που συνδέονται με τη χαρυβδίνη είναι κυρίως γλυκοζίτες της χημικής ομάδας των βουφαδιενολιδών. Οι βουφαδιενολίδες είναι φυτικά στεροειδή με καρδιοτονωτική, αντιμικροβιακή και αντικαρκινική δράση. Επιβεβαιώθηκε η παρουσία 6 συνολικά βουφαδιενολιδών με κοινά δομικά χαρακτηριστικά που μας επιτρέπει να υποθέσουμε πως η σύνδεσή τους με το μόριο της χαρυβδίνης είναι ειδική.

Παράλληλα, ελέγχθηκε η κυτταροτοξικότητα του μεθανολικού εκχυλίσματος της χαρυβδίνης και διαπιστώθηκε ότι το μίγμα των βουφαδιενολιδών εμφανίζει υψηλή αντικαρκινική δράση.

Λέξεις-κλειδιά: Σκυλοκρεμμύδα, *Charybdis maritima*, χαρυβδίνη, πρωτεΐνες RIP, βουφαδιενολίδες, φυτικά στεροειδή, φασματοσκοπία μάζας

ABSTRACT

The plant *Charybdis maritima* (squill), which is popular in all areas around the Mediterranean basin, is well known for its pharmaceutical use. Recently, a new RIP protein, named charybdin, was reported to be contained in significantly large amounts in the bulbs of the white squill.

In this thesis we tried to locate, isolate and characterize the substances which are connected with charybdin, during its isolation procedure. A variety of chromatographic techniques (TLC, LC, HPLC) and tandem mass spectrometry was used to determine that charybdin is connected mainly with glucosides of a category of plant steroids called bufadienolides. We ascertained the presence of at least 6 bufadienolides with common structural features, a fact that allows us to suggest that their connection with the molecule of charybdin is achieved in a specific manner.

Additionally, we checked the cytotoxicity of charybdin's methanolic extract and we determined that the isolated mixture of bufadienolides displays a significant anti-cancer activity.

Keywords: White squill, *Charybdis maritima*, charybdin, RIP proteins, bufadienolides, plant steroids, mass specrometry

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ	σελ.
ΕΙΣΑΓΩΓΗ	3
1.Α. ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΟΥ ΟΡΓΑΝΙΣΜΟΥ <i>Charybdis maritima</i>	3
1.Β. ΟΝΟΜΑΤΟΛΟΓΙΑ	5
1.Γ. ΙΣΤΟΡΙΑ	7
1.Δ. ΒΙΟΤΟΠΟΣ	9
1.Ε. ΚΥΡΙΟΤΕΡΑ ΣΥΣΤΑΤΙΚΑ ΤΟΥ ΦΥΤΟΥ <i>Charybdis maritima</i>	9
1.ΣΤ. ΙΑΤΡΙΚΕΣ ΧΡΗΣΕΙΣ ΚΑΙ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ	12
2.Α. ΠΡΩΤΕΪΝΕΣ ΑΠΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΤΕΣ ΤΩΝ ΡΙΒΟΣΣΩΜΑΤΩΝ (ΠΡΩΤΕΪΝΕΣ RIP)	13
2.Β. ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ ΔΡΑΣΗΣ ΤΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ RIP	15
2.Γ. ΔΟΜΗ ΤΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ RIP	17
2.Δ. ΛΟΙΠΕΣ ΒΙΟΛΟΓΚΕΣ ΔΡΑΣΕΙΣ	19
2.Ε. Ο ΡΟΛΟΣ ΤΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ RIP	19
2.ΣΤ. ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΤΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ RIP ΣΤΗΝ ΙΑΤΡΙΚΗ	20
3. ΧΑΡΥΒΔΙΝΗ: ΜΙΑ ΝΕΑ ΠΡΩΤΕΪΝΗ RIP ΑΠΟ ΤΟ ΒΟΛΒΟ ΤΟΥ ΟΡΓΑΝΙΣΜΟΥ <i>Charybdis maritima</i>	21
4. ΦΥΤΙΚΑ ΣΤΕΡΟΕΙΔΗ – ΒΟΥΦΑΔΙΕΝΟΛΙΔΕΣ (BUFADIENOLIDES)	23
ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	31
1. ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΑΠΟΜΟΝΩΣΗΣ ΤΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ ΧΑΡΥΒΔΙΝΗΣ	31
2. ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑ ΥΠΕΡΙΩΔΟΥΣ – ΟΡΑΤΟΥ (UV – VIS)	32
3. ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑ ΥΠΕΡΥΘΡΟΥ (IR)	32
4. ΕΚΧΥΛΙΣΗ ΟΥΣΙΩΝ ΠΟΥ ΠΡΟΣΑΡΤΩΝΤΑΙ ΣΤΗ ΧΑΡΥΒΔΙΝΗ	33
5. ΧΡΩΜΑΤΙΚΟΙ ΕΛΕΓΧΟΙ ΓΙΑ ΤΗ ΧΗΜΙΚΗ ΣΥΣΤΑΣΗ ΤΟΥ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΟΣ	33
6. ΥΓΡΗ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΣΤΗΛΗΣ (LC)	34
7. ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΛΕΠΤΗΣ ΣΤΙΒΑΔΑΣ (TLC)	35
8. ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑ ΜΑΖΑΣ (ESI – MS)	36

9. ΥΓΡΗ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΥΨΗΛΗΣ ΑΠΟΔΟΣΗΣ (HPLC)	36
10. ΣΥΝΔΥΑΣΤΙΚΗ ΥΓΡΗ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΥΨΗΛΗΣ ΑΠΟΔΟΣΗΣ ΜΕ ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑ ΜΑΖΑΣ (TANDEM HPLC – MS)	37
11. ΕΛΕΓΧΟΣ ΚΥΤΤΑΡΟΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑΣ ΤΟΥ ΜΕΘΑΝΟΛΙΚΟΥ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΟΣ ΤΗΣ ΧΑΡΥΒΔΙΝΗΣ	37
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ – ΣΥΖΗΤΗΣΗ	40
1. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑΣ ΥΠΕΡΙΩΔΟΥΣ (UV)	40
2. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΥΓΡΗΣ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΣΤΗΛΗΣ (LC)	41
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑΣ ΥΠΕΡΥΘΡΟΥ (IR)	42
4. ΜΕΛΕΤΗ ΚΛΑΣΜΑΤΩΝ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑΣ ΜΕΣΩ ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑΣ ΜΑΖΑΣ (LC – MS)	43
5. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑΣ ΛΕΠΤΗΣ ΣΤΙΒΑΔΑΣ (TLC)	47
6. ΜΕΛΕΤΗ ΚΛΑΣΜΑΤΩΝ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑΣ ΛΕΠΤΗΣ ΣΤΙΒΑΔΑΣ ΜΕΣΩ ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑΣ ΜΑΖΑΣ (TLC – MS)	49
7. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΥΓΡΗΣ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑΣ ΥΨΗΛΗΣ ΑΠΟΔΟΣΗΣ (HPLC)	61
8. ΣΥΝΔΥΑΣΤΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΚΛΑΣΜΑΤΩΝ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑΣ HPLC ΜΕΣΩ ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑΣ ΜΑΖΑΣ (TANDEM HPLC – MS)	63
9. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΕΛΕΓΧΟΥ ΤΗΣ ΚΥΤΤΑΡΟΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑΣ ΤΟΥ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΟΣ ΤΗΣ ΧΑΡΥΒΔΙΝΗΣ	70
10. ΣΧΟΛΙΑΣΜΟΣ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ	72
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ – ΠΡΟΟΠΤΙΚΕΣ	76
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	78

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1. Α. ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΟΥ ΟΡΓΑΝΙΣΜΟΥ *Charybdis maritima*

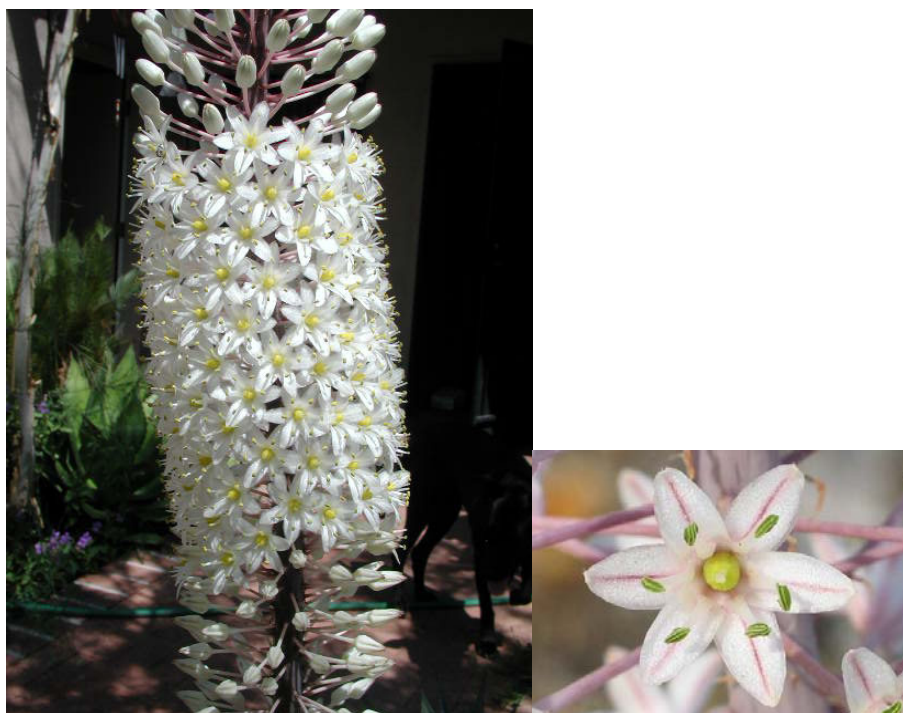
Ο οργανισμός *Charybdis maritima* ή αλλιώς σκυλοκρεμμύδα, ανήκει στην οικογένεια των Λειριωδών, είναι πολυετές φυτό, ψηλό, με πολύ μεγάλο βολβό και φύεται σε ξερότοπους και φρύγανα (εικόνα 1). Έχει έναν απιοειδές βολβό, με διάμετρο από 7,5 έως 15,24 εκ., και αποτελείται από ομόκεντρες κλίμακες, όπου οι εξωτερικές από αυτές είναι λεπτές και μεμβρανώδεις, ενώ οι εσωτερικές είναι υπόλευκες, παχιές, σαρκώδεις, γεμάτες από χυμό και ζυγίζουν από μισό έως 2 Kg, παρόλο που έχουν βρεθεί σκυλοκρεμμύδες έως και 5 Kg. Ο βολβός καταλήγει σε δυνατές και ινώδεις ρίζες.



Εικόνα 1. Ο οργανισμός *Charybdis maritima* (Koehler, 1887).

Η σκυλοκρεμμύδα παρουσιάζει μακρύ στέλεχος, με γκριζωπό ιώδες χρώμα, ύψους 80 με 90 cm., και τελειώνει με μια πυκνή, μακριά και ωσειδής ταξιανθία. Τα άνθη της είναι μικρά και λευκά στο χρώμα (εικόνα 2). Η πρόοδος της άνθησης των μπουμπουκιών είναι βαθμιαία από κάτω προς τα πάνω. Όταν το λουλούδι κλείνει, τα πέταλα δεν πέφτουν αλλά κλείνουν πάλι και επαναλαμβάνουν μια κυλινδρική δομή λίγο πολύ παρόμοια με τα μπουμπουκία, πράγμα που καθιστά την άνθηση της

ταξιανθίας αξιοσημείωτη. Τα κλειστά πέταλα προστατεύουν την αναπτυσσόμενη ωοθήκη που σχηματίζεται μέσα σε καψοειδείς σχηματισμούς. Οι σχηματισμοί αυτοί μετατρέπονται σε μια επιμήκη κάψα με μία διαμήκη διόγκωση. Όταν ωριμάσουν διασπώνται σε 3 μέρη ώστε να απελευθερωθούν οι μαύροι φτερωτοί σπόροι του. Υπάρχουν περίπου 25 σπόροι ανά κάψα με μήκος 5mm ο καθένας, τους οποίους μπορεί ο αέρας να μεταφέρει σε μεγάλη απόσταση, λόγω της ελαφριάς δομής τους.



Εικόνα 2. Η μακριά, ωοειδής ταξιανθία και το άνθος της σκυλοκρεμμύδας (www.maltawildplants.com).

Τα φύλλα της σκυλοκρεμμύδας είναι πολύ μεγάλα, φθάνουν σε μήκος 30-60 cm και πλάτος 3-6 cm, επιπλέον είναι λεία και λαμπερά και έχουν ένα βαθύ πράσινο χρώμα. Αυξάνονται σε συστάδες άμεσα από τον καφεκόκκινο βολβό που προεξέχει ελαφρώς επάνω από το έδαφος (εικόνα 3). Αυτά βγαίνουν αφού εμφανιστούν τα άνθη, στο τέλος του καλοκαιριού με αρχές του φθινοπώρου.

Διάφοροι βοτανολόγοι έχουν περιγράψει μέχρι στιγμής περίπου είκοσι πέντε ποικιλίες σκυλοκρεμμύδας που διαφέρουν στο μέγεθος και το χρώμα του βολβού, των φύλλων και των ανθέων. Οι πιο διαδεδομένες είναι η λευκή και η κόκκινη. Στην λευκή ποικιλία οι κάλυκες των βολβών είναι υπόλευκοι ή κιτρινωποί στο χρώμα. Στην κόκκινη ποικιλία οι εξωτερικοί κάλυκες είναι καφέ-κόκκινοι και οι

εσωτερικοί κάλυκες άσπρο-κιτρινωποί, ενώ μια ροζ επιδερμίδα εμφανίζεται στις ενδιάμεσες μορφές. Τα δύο αυτά είδη έχουν αφθονία πικρού πυκνού χυμού. Σύμφωνα με τον καθηγητή Schroff περιέχουν οξαλικό ασβέστιο, δεξτρόζη, άμυλο, πτητικά έλαια και ορυκτά άλατα (Bentley and Trimen, 1880).



Εικόνα 3. Συστάδες φύλλων της σκυλοκρεμμύδας.

Η σκυλοκρεμμύδα έχει έναν παράξενο κύκλο ζωής επειδή το φυτικό και αναπαραγωγικό της μέρος αναπτύσσεται σε διαφορετικές περιόδους του έτους. Ούσα προσαρμοσμένη στο μεσογειακό κλίμα, με τις εναλλαγές της υγρής (Οκτώβριος - Μάιος) και άνυδρης (Ιούνιος - Σεπτέμβριος) περιόδου, διαθέτει φύλλα που φυτρώνουν απευθείας από το έδαφος μόλις έρθουν τα πρωτοβρόχια. Αυτά είναι μεγάλα, φαρδιά και φωτοσυνθέτουν έντονα όλη την υγρή περίοδο, στέλνοντας υλικά στον βολβό που συνεχώς διογκώνεται. Μόλις φτάσει το τέλος της άνοιξης τα φύλλα αρχίζουν να ξεραίνονται. Όμως, λίγο πριν πέσουν μεταφέρουν μεγάλο μέρος του υλικού που περιείχαν στον βολβό, που θα το έχει ιδιαίτερη ανάγκη όσο το μακρύ και θερμό καλοκαίρι πλησιάζει. Ιδιαίτερα αυξημένη ανάγκη υλικών υπάρχει προς το τέλος Αυγούστου όπου το φυτό ανθίζει, μια και σχηματίζεται μεγάλος, συχνά πάνω από ένα μέτρο, ανθικός άξονας, στην κορυφή του οποίου υπάρχουν τα λουλούδια. Μάλιστα αυτός ο ψηλός ανθικός άξονας ευθύνεται για την έξοδο των λουλουδιών πάνω από τους τριγύρω θάμνους, γεγονός που διευκολύνει και τα έντομα που γονιμοποιούν τα λουλούδια να τα «εντοπίζουν» πιο εύκολα. Ίσως να φαίνεται περίεργο το πώς οι σκυλοκρεμμύδες, μακριά η μία

από την άλλη, ανθίζουν συγχρόνως. Ιδιαίτερα γιατί την περίοδο αυτή δεν έχουν υπέργεια μέρη - φύλλα τα οποία θα μπορούσαν να «πληροφορηθούν» την εποχή από το μήκος της ημέρας. Φαίνεται ότι η «εντολή» για άνθιση στο τέλος Αυγούστου δίνεται από τα φύλλα προς τον βολβό τον Μάρτιο μ' έναν άγνωστο μηχανισμό. Η άνθιση της σκυλοκρεμμύδας αυτή την εποχή, όταν ελάχιστα άλλα φυτά είναι ανθισμένα, είναι σημαντική κυρίως για την επιβίωση των εντόμων που τη γονιμοποιούν, παίρνοντας σαν ανταμοιβή το νέκταρ. Αν δηλαδή, λείψουν οι σκυλοκρεμμύδες που συντηρούν αυτά τα έντομα, για μια περίοδο τουλάχιστον δύο εβδομάδων, θα υπάρξουν προβλήματα και στα φυτά τα οποία πρόκειται να ανθίσουν στη συνέχεια, γιατί πολύ απλά θα έχουν εκλείψει τα έντομα εκείνα που τα γονιμοποιούν.

1. Β. Ονοματολογία

Η σκυλοκρεμμύδα ανήκει στην οικογένεια των *Hyacinthaceae*. Στον παρακάτω πίνακα (πίνακας 1) διακρίνεται η ταξινόμηση της σκυλοκρεμμύδας σύμφωνα με το μοντέρνο σύστημα ταξινόμησης Dahlgren.

Πίνακας 1

Βασίλειο	<i>Plantae</i>
Υποβασίλειο	<i>Cormobionta</i>
Υπερφύλο	<i>Embryophyta</i>
Φύλο	<i>Tracheophyta</i>
Υποφύλο	<i>Spermatophyta</i>
Υπερκλάση	<i>Angiospermatae</i>
Κλάση	<i>Magnoliopsida</i>
Υποκλάση	<i>Magnoliidae</i>
Υπερτάξη	<i>Lilianae</i>
Τάξη	<i>Asparagales</i>
Οικογένεια	<i>Hyacinthaceae</i>

Υποοικογένεια	<i>Urgineoideae</i>
Γένος	<i>Charybdis</i>
Είδος	<i>Charybdis maritima</i>

Το *Scilla maritima* ήταν το πρώτο επιστημονικό όνομα που δόθηκε από τον Linnaeus το 1753, αλλά αυτό άλλαξε σε *Urginea maritima*, όταν ο Steinheil το 1834 αφού εξέτασε αυτό το φυτό, το αφαίρεσε από το γένος *Scilla*. Η κύρια διαφορά μεταξύ των γενεών είναι ότι το γένος *Urginea* έχει επίπεδους δισκοειδείς σπόρους, ενώ το γένος *Scilla* είναι με τρεις οξείες γωνίες. Αργότερα ο Baker το 1873 το ονόμασε *Urginea maritima* διατηρώντας το *Scilla* ως τυπικό όνομα. Στη συνέχεια ο Stearn το 1978, το ονόμασε *Drimia maritima*, και τελικά ο Speta το 1998 άλλαξε την επιστημονική ονομασία του φυτού σε *Charybdis maritima* με βάση τις πλαστιδιακές ακολουθίες DNA της οικογένειας των *Hyacinthaceae* (Pfosser and Speta, 2004).

Άλλα συνώνυμα που χρησιμοποιούνται είναι: *Urginea indica*, *White Squill*, *Red Squill*, *Urginea scilla*, *Urginea pancratium*, *Sea Squill*, *Sea Onion*. Τα ελληνικά δημώδη ονόματα που συναντιούνται για την *Charybdis maritima* είναι: σκυλοκρεμμύδα, αθανατοκρεμμύδα, αγριοκρεμμύδα, κρεμμυδόσκυλα, κουτσούπα, ασκέλλα και αρκόσκυλα.

1. Γ. Ιστορία

Κατά την αρχαιότητα η σκυλοκρεμμύδα χρησίμευε αρχικά σαν φυλαχτό και για αυτό ακριβώς τον λόγο την κρεμούσαν πάνω από τις πόρτες των σπιτιών. Οι πρώτες μαρτυρίες εμφανίζονται τον 6ο αιώνα π.Χ. Ακόμα και ο γνωστός φιλόσοφος Πυθαγόρας πίστευε ότι η σκυλοκρεμμύδα προφύλασσε τον κάτοχο της από πιθανούς κινδύνους και ότι συμβόλιζε τη δύναμη που ήθελαν οι άνθρωποι να διοχετεύσουν στα κτήματα και στα σπίτια τους. Την χρησιμότητα της σκυλοκρεμμύδας ως μέσο μαντικής ή ως ευοίωνου αντικειμένου για την ευδαιμονία της χρονιάς την συναντάμε και σε νεότερες εποχές. Πιο συγκεκριμένα παρατηρείται η ανθοφορία της, και όταν αυτή κρίνεται ικανοποιητική τότε θεωρείται οιωνός μιας

καλής χρονιάς! Αν όμως τα άνθη της διαπιστωθούν ότι είναι λειψιά, τότε θεωρείται ότι η χρονιά δεν θα έχει καθόλου καλή έκβαση. Επειδή ακριβώς ακόμα και σήμερα σε ορισμένες περιοχές της Ελλάδος λαμβάνεται ως γούρι που φέρνει καλή τύχη, γι' αυτό και κάθε Πρωτοχρονιά χρησιμοποιείται ευρύτατα στις πόρτες των σπιτιών.

Μια ιδιότητα που είχε ήδη παρατηρηθεί από την αρχαιότητα, είναι ότι ο χυμός της σκυλοκρεμμύδας όταν έρθει σε επαφή με το δέρμα, προκαλεί φαγούρα και φουσκάλες. Εξαιτίας αυτής της ιδιότητας η χρήση της ήταν ευρέως διαδεδομένη για να απομακρύνονται τα ανεπιθύμητα ζώα. Πιο συγκεκριμένα, έκοβαν τον βολβό της, τον ανακάτευαν με αλεύρι ή πίτουρο και τον τοποθετούσαν κάτω από τις ρίζες της ροδιάς και της αμυγδαλιάς σαν ένα είδος ποντικοφάρμακου. Οι ποντικοί που έτρωγαν αυτό το μείγμα πέθαιναν.

Άλλο ένα χαρακτηριστικό της σκυλοκρεμμύδας, που είχε διαπιστωθεί από τους αρχαίους χρόνους, είναι ότι διέθετε πολλές φαρμακευτικές και ιατρικές ιδιότητες. Χαρακτηριστικά αναφέρεται ότι το φάρμακο *Oxymel squill*, που χρησιμοποιείται για τον βήχα εφευρέθηκε από τον φιλόσοφο Πυθαγόρα τον έκτο αιώνα προ Χριστού. Επιπλέον αναφέρεται και από τον Θεόφραστο, φιλόσοφο και συνεργάτη του Αριστοτέλη, τον τρίτο αιώνα προ Χριστού. Επίσης και ο Επιμενίδης έχει αναφέρει ότι χρησιμοποιούσε συχνά την σκυλοκρεμμύδα για ιατρικούς λόγους. (Grieve, 1984). Όπως λοιπόν προκύπτει από τις μαρτυρίες της εποχής ήταν ιδιαίτερα γνωστή σε όλους τους αρχαίους Έλληνες παθολόγους (Theophrastus, *Historia Plantarum*). Για τους Ιπποκράτειους μάλιστα, ήταν ένα από τα πιο αρχαία φαρμακευτικά φυτά (*Corpus Hippocraticum*). Κατόπιν, κατά τον 1^ο αιώνα μ.Χ ο Διοσκορίδης, γιατρός από την Κιλικία και φημισμένος φαρμακολόγος, συνοψίζοντας αναφέρει ότι όχι μόνο κρεμούσαν την σκυλοκρεμμύδα πάνω από την πόρτα ως φυλαχτό, αλλά και ότι την θεωρούσαν «πανάκεια» δηλαδή φάρμακο που θεραπεύει κάθε αρρώστια. Αλλά και κατά τον Μεσαίωνα η σκυλοκρεμμύδα φαίνεται ότι ήταν γνωστή εξαιτίας της διουρητικής της δράσης και της ευεργετικής της επίδρασης στα νεφρά. Με την πάροδο του χρόνου, όλο και περισσότερο χρησιμοποιούνταν ως τονωτικό για την ενδυνάμωση του αναπνευστικού και ουροποιητικού συστήματος. Η δράση λοιπόν του οργανισμού *Charybdis maritima*

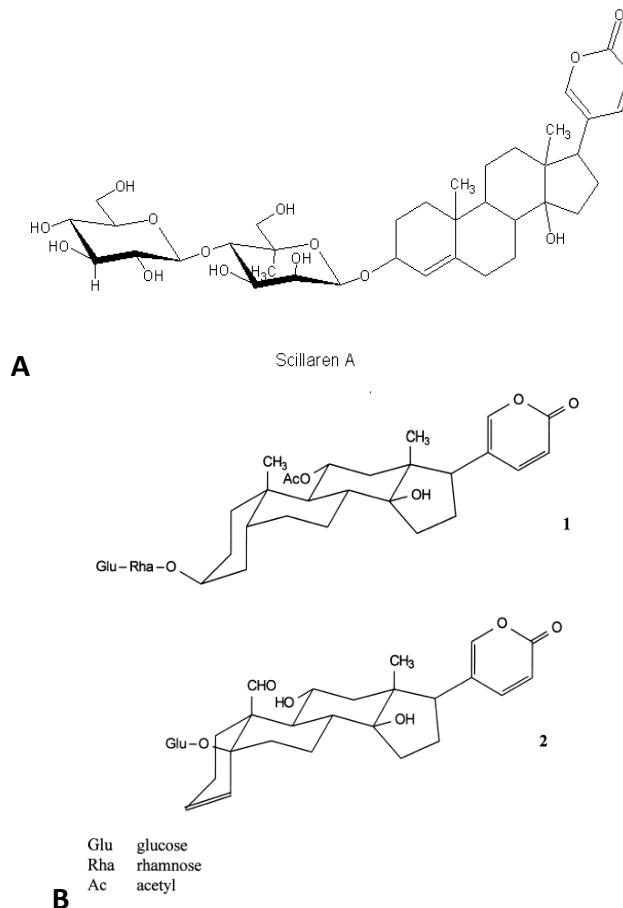
αλλά και η χρησιμότητά του ως φαρμακευτικό σκεύασμα ξεκινάει από τα αρχαία χρόνια και φτάνει ως την εποχή μας.

1. Δ. Βιότοπος

Ένα από τα χαρακτηριστικά της σκυλοκρεμμύδας είναι ότι προσαρμόζεται πολύ καλά στον τύπο κλίματος. Συναντιέται όχι μόνο σε ανομοιομορφα, σκληρά και εξαντλημένα από την υπερβόσκηση εδάφη, αλλά και σε άγρια δάση και στις ξηρές, αμμώδεις και παράκτιες μεσογειακές περιοχές ειδικότερα δε στα μικρά νησιά. Παρουσιάζεται σε αφθονία στη νότια Ισπανία, στην Πορτογαλία, το Μαρόκο, την Αλγερία, την Κορσική, τη νότια Γαλλία, την Ιταλία, τη Μάλτα, τη Δαλματία, την Ελλάδα, τη Συρία και τη Μικρά Ασία (Quezel and Santa, 1963). Επίσης βρίσκεται στις Κανάριες Νήσους και στο Ακρωτήριο της Καλής Ελπίδας.

1. E. Κυριότερα συστατικά του φυτού *Charybdis maritima*

Η χημική σύσταση της *Charybdis maritima* δεν είναι πλήρως ξεκάθαρη. Το 1879 ο Merck προσδιόρισε σε αυτή 3 γλυκοζίτες, τους scillitoxin, scillipicrin και scillin. Οι δύο πρώτοι έχουν καρδιοτονωτική δράση, με τον δεύτερο γλυκοζίτη (scillipicrin) να είναι πιο ενεργός. Ο τρίτος γλυκοζίτης, scillin, προκαλεί μούδιασμα και εμετό. Το scilliroside, υψηλής τοξικότητας γλυκοζίτης, είναι το κύριο ενεργό συστατικό (Verbiscar *et al.*, 1986), (Iizuka *et al.*, 2001). Υπάρχουν επίσης και άλλοι γλυκοζίτες και αγλυκόνες που έχουν απομονωθεί από το βολβό (Kopp *et al.*, 1996). Τα κυριότερα χημικά συστατικά της *Charybdis maritima* είναι οι καρδιακοί γλυκοζίτες τύπου βουφαδιενολίδες (0,15 - 2,4%), όπως: το scillaren A που αποτελεί το 10 με 20% της συνολικής περιεκτικότητας σε γλυκοζίτες (εικόνα 4A), το proscillaridin A, το scilliroside, το 11 α -acetylgamabufotalin 3-O-(4-O- β -D-glucosyl)- α -L-rhamnoside και το 11 α -hydroxyscilliglaucoside (εικόνα 4B).



Εικόνα 4. Α) Το Scillaren A. Β) Οι ενώσεις **(1)** 11α-acetylgamabufotalin 3-O-(4-O-β-D-glucosyl)-α-L-rhamnoside και **(2)** 11α-hydroxyscilliglaucoside.

Το πικρό συστατικό scillain, απομονώθηκε το 1879 από τον Jarmerstedt και αργότερα από τον Kurtz το 1894. Είναι ένας γλυκοζίτης, που παράγεται από υδρόλυση δεξτρόζης, βουτυρικού οξέος και ισοπροπυλικής αλκοόλης. Επίσης, υπάρχει σε μεγάλη ποσότητα, ένας κολλώδης υδατάνθρακας (C₆H₁₀O₅) που μοιάζει με τη δεξτρίνη ο οποίος ονομάστηκε sinistrin από τον Schmiedeberg το 1879 και έπειτα *scillin* από τους Riche και Rimont το 1880 (Moerk, 1894). Περιέχει επίσης χρωστικές ανθοκυανίνες, φλαβονοειδή, πολυσακχαρίτες αλλά και λιπαρά οξέα (Vega *et al.*, 1972) (Praznik and Spies, 1993). Επίσης, βρίσκονται μεγάλες ποσότητες οξαλικού ασβεστίου υπό μορφή δεσμίδων μακρών βελονοειδών κρυστάλλων, που εύκολα διαπερνούν το δέρμα και προκαλούν ερεθισμό και εξανθήματα (European Agency for the Evaluation of Medicinal Products, 1999). Μεγάλος αριθμός γλυκοζιτών έχει απομονωθεί από την σκυλοκρεμμύδα αλλά σε άμορφη κατάσταση χωρίς ακριβή χημική ταυτότητα. Ο ακόλουθος πίνακας (πίνακας 2) αναφέρει τα συστατικά του βολβού της σκυλοκρεμμύδας.

chelidonic-acid	kaempferol-7-glucoside-3-rhamnoglucoside	Scillicoeloside
cyanidin-3-caffeoyl-glucoside	kaempferol-7-glucoside-3-triglucoside	scillicyanoside
cyanidin-3-glucoside	leucocyanidin	scilliglaucoside
dihydroquercetin	p-coumaric-acid	scillikryptoside
dihydroquercetin-4'-monoglucoside	pelargonidin-monoglucoside	scillin
gallic-acid	phytosterols	scilliphaeoside
glucoscillaren-a	proscillaridin-a	scillipicrin
glucoscilliphaeoside	quercetin	scilliroside
glucosinistrin	quercetin-3-monoglucoside	scillirosidine
9-hydroxyscilliphaeoside	Quercitrin	scillirubroside
isorhamnetin	scillaren-a	scillirubrosidine
kaempferol-3-O-glucoside	scillarenin-a	scillitoxin
kaempferol-3-triglucoside	scillarenin-beta-d-glucoside	sinistrin
kaempferol-7-glucoside	scillaridin-a	taxifolin
kaempferol-7-glucoside-3-diglucoside	scillazuroside	

Πίνακας 2. Κυριότερα συστατικά που έχουν αναφερθεί για το βολβό της σκυλοκρεμμύδας (<http://www.maltawildplants.com>).

1. ΣΤ. ΙΑΤΡΙΚΕΣ ΧΡΗΣΕΙΣ ΚΑΙ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ

Η χημεία της σκυλοκρεμμύδας είναι περίπλοκη αλλά αρκετά μελετημένη. Οι βολβοί περιέχουν βουφαδιενολίδες (μυοκτόνα) και καρδιακούς γλυκοζίτες (καρδιοτονωτικά). Το Scilliroside είναι μια αρκετά τοξική βουφαδιενολίδα και υπεύθυνη για τη δράση της σκυλοκρεμμύδας ως μυοκτόνο, ωστόσο η *Charybdis maritima* περιέχει ακόμα ένα αρκετά μεγάλο αριθμό γλυκοζιτών. Η τοξικότητα της διαφέρει λόγω της γενετικής ετερογένειας αλλά και των περιβαλλοντολογικών παραγόντων (περίοδος θέρους, συνθήκες αποθήκευσης, μέθοδος απομόνωσης).

Η σκυλοκρεμμύδα χρησιμοποιείται ως εμετικό, σε περιπτώσεις κοκίτη αλλά και λαρυγγίτιδας, πάντα όμως σε περιορισμένες ποσότητες. Λήψη μεγάλων ποσοτήτων της σκυλοκρεμμύδας επιφέρει το θάνατο μέσα σε διάστημα δέκα έως εικοσιτεσσάρων ωρών από γαστρεντερίτιδα, νεφρίτιδα ή ανακοπή της καρδιάς.

Σε μικρές δόσεις προκαλεί ναυτία και την μείωση του σφυγμού. Υποκινεί μάλιστα και όλα τα εκκριτικά όργανα. Μικρές δόσεις ανακουφίζουν την ενόχληση των βλεννωδών επιφανειών ελέγχοντας την υπερβολική έκκριση (Usher, 1974) (Mills, 1985) (Polunin and Huxley, 1987) (Bown, 1995).

Ο βολβός χρησιμοποιείται ευρέως στην ομοιοπαθητική, κυρίως για τις αποχρεμπτικές, τις διουρητικές ιδιότητες και την επίδρασή του στην καρδιά (Grieve, 1984) (Chevallier, 1996). Χρησιμοποιείται εσωτερικά για την θεραπεία της βρογχίτιδας, του βρογχικού άσθματος και του δυνατού βήχα. Εξωτερικά, ο βολβός έχει χρησιμοποιηθεί ενάντια στην πιτυρίαση και την σμηγματόρροια. Οι χημικές ουσίες μπορούν να διαφέρουν, ανάλογα με το χρώμα των εξωτερικών στρωμάτων του βολβού. Οι βολβοί των δύο κύριων ποικιλιών του φυτού περιέχουν μία σειρά φαρμακευτικών ουσιών, ειδικότερα όμως η κόκκινη ποικιλία περιέχει σε μεγαλύτερο ποσοστό την δηλητηριώδη ουσία scilliroside. Επομένως, μόνο η άσπρη σκυλοκρεμμύδα χρησιμοποιείται συνήθως ως ιατρική πηγή. Ο κόκκινος βολβός χρησιμοποιείται ως δηλητήριο αρουραίων ενώ ο άσπρος βολβός χρησιμοποιείται ως καρδιοτονωτικό, έχει όμως μελετηθεί και η εντομοκτόνος δράση του (Pascual-Villalobos and Fernandez, 1999).

2. Α. ΠΡΩΤΕΪΝΕΣ ΑΠΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΤΕΣ ΤΩΝ ΡΙΒΟΣΩΜΑΤΩΝ (ΠΡΩΤΕΪΝΕΣ RIP)

Οι πρωτεΐνες RIP (Ribosome-inactivating proteins), είναι μια ομάδα από πρωτεΐνες κυρίως φυτικής προελεύσεως, που έχουν την ιδιότητα να αναστέλλουν μη αντιστρεπτά τη δράση των ριβοσωμάτων. Αυτό συμβαίνει διότι καταλύουν την υδρόλυση του N - γλυκοζιτικού δεσμού ενός συγκεκριμένου κατάλοιπου αδενοσίνης στο rRNA, με μερικές RIP να αποκόπτουν παραπάνω από ένα κατάλοιπο. Το θέμα έχει εξεταστεί σε διάφορες μελέτες (Nielsen and Boston, 2001) (Peumans *et al.*, 2001) (Van Damme *et al.*, 2001). Δύο ισχυρές τοξίνες, ρισίνη και αβρίνη, από τους σπόρους των φυτών *Ricinus communis* και *Abrus precatorius* αντίστοιχα, ήταν γνωστές περισσότερο από έναν από αιώνα, αλλά η ονομασία RIP εισήχθη πολύ αργότερα, αφότου ανακαλύφτηκε ότι απενεργοποιούν τα ριβοσώματα (Stirpe, 1982). Στη συνέχεια, διαπιστώθηκε ότι άλλες παρόμοιες τοξίνες και άλλες πολύ λιγότερο τοξικές πρωτεΐνες αδρανοποιούν τα ριβοσώματα, όλες όμως με παρόμοιο μηχανισμό (Stirpe, 2004).

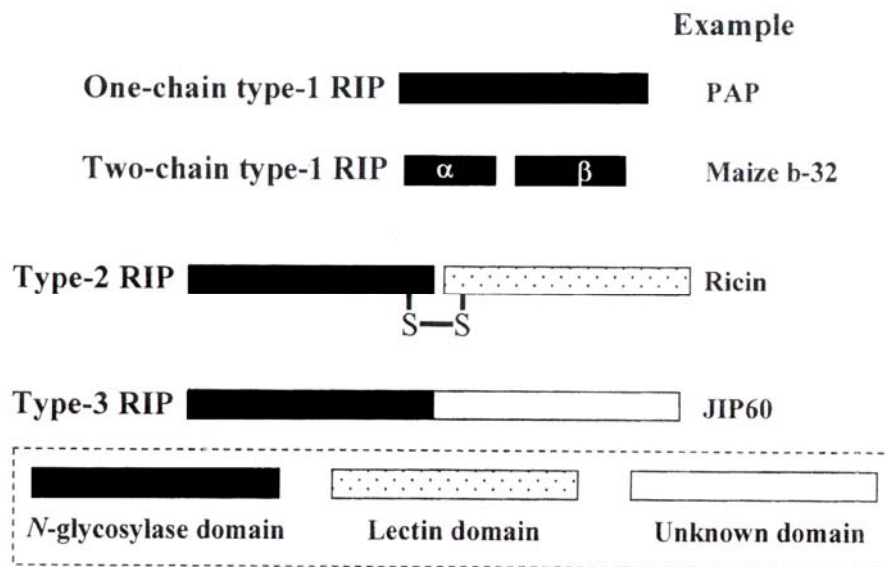
Οι πρωτεΐνες RIP (EC 3.2.2.22, rRNA N-glycosylase) έχουν θεωρηθεί σαν μια πολύ συγκεκριμένη κατηγορία ενζύμων και βρίσκονται ενδεχομένως σε όλα τα φυτά και σε ορισμένα βακτήρια (*Shigella* και *Escherichia coli*). Υδρολύουν τον N-γλυκοζιτικό δεσμό στην αδενίνη στο σημείο A-4324 στο 28S rRNA ριβόσωμα αρουραίου (Endo and Tsurugi, 1988)(Barbieri *et al.*, 1993). Έρευνες έδειξαν ότι απελευθερώνουν κατάλοιπα αδενίνης όχι μόνο από την θέση A-4324 του 28S rRNA αλλά και από την θέση A-2660 του rRNA από το *Escherichia coli*, (Endo and Tsurugi, 1988) (Stirpe *et al.*, 1988). Επίσης, μερικές πρωτεΐνες RIP, εκτός από το rRNA, δρουν σε RNA και σε DNA (Barbieri *et al.*, 1994, 2000). Οι πρωτεΐνες RIP πιστεύεται ότι μπορεί να υπάρχουν και σε ζωικούς ιστούς (Barbieri *et al.*, 2001).

Οι πρωτεΐνες RIP διαιρούνται σε τρεις ευρείες ομάδες (Girbes *et al.*, 2004):

- Τις RIP τύπου 1, όπου αποτελούνται από μια ενιαία πεπτιδική αλυσίδα που περιλαμβάνει την ριβοσωμική ανασταλτική δράση και έχει μοριακό βάρος περίπου 30kDa. Υπάρχουν παραδείγματα πρωτεϊνών RIP τύπου 1 που αποτελούνται από 2 μικρές πολυπεπτιδικές αλυσίδες οι οποίες συνδέονται μεταξύ τους με μη-ομοιοπολικούς δεσμούς (Walsh *et al.*, 1991).

- Τις RIP τύπου 2, που αποτελούνται από μια ενζυμικά ενεργή αλυσίδα A παρόμοια με αυτή των RIP τύπου 1, η οποία ενώνεται με δισουλφιδικό δεσμό με μία λίγο μεγαλύτερη (35kDa) την αλυσίδα B, η οποία έχει ιδιότητες λεκτίνης με υψηλή συγγένεια στη γαλακτόζη και σε παράγωγα αυτής σάκχαρα (Lord *et al.*, 1994). Οι περισσότερες RIP τύπου 2 είναι είτε μονομερείς είτε διμερείς πρωτεΐνες.
- Τις RIP τύπου 3, που αποτελούνται από μια μονή αλυσίδα η οποία περιέχει μια εκτεταμένη περιοχή στο C-τερματικό με άγνωστη λειτουργία (Dueneva and Gorschen, 1999).

Μια σχηματική αναπαράσταση της δομής των διαφόρων τύπων RIP παρουσιάζεται στην εικόνα 5 (Hartley *et al.*, 1996).



Εικόνα 5. Σχηματική αναπαράσταση της μοριακής δομής των διαφόρων τύπων RIP (van Damme *et al.*, 2001).

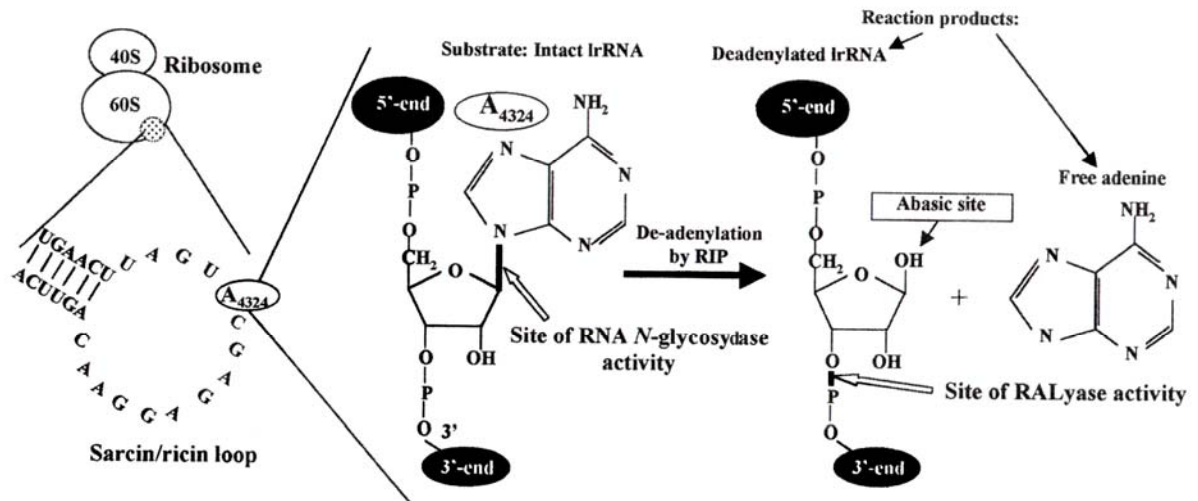
Η υψηλή τοξικότητα των πρωτεϊνών RIP τύπου 2 οφείλεται στη σύνδεση της αλυσίδας B στην επιφάνεια των κυττάρων. Αυτό πραγματοποιείται με τη σύνδεση της λεκτίνης στα γαλακτόσιλο-κατάλοιπα που βρίσκονται στην επιφάνεια των περισσότερων κυττάρων. Για παράδειγμα, η ρισίνη εισάγεται στα μακροφάγα και στα ημιτονοειδή κύτταρα του συκωτιού μέσω των υποδοχών μαννόζης των κυττάρων, που δεσμεύουν τα κατάλοιπα μαννόζης, παρόντα στο μόριο της ρισίνης (Simmons *et al.*, 1986) (Magnusson *et al.*, 1991). Η συνδεδεμένη στα κύτταρα, αλυσίδα B επιτρέπει και διευκολύνει την είσοδο των τοξινών στα κύτταρα, όπου η

αλυσίδα A μπορεί να ασκήσει την ενζυμική της δράση, καταστρέφοντας τα ριβοσώματα και ενδεχομένως άλλες δομές, με φυσικό επακόλουθο τη ζημιά του κυττάρου και το θάνατο. Αν και οι τύποι 1 και 2 είναι εξίσου αποτελεσματικοί αναστολείς της πρωτεϊνικής σύνθεσης σε εκχυλίσματα κυττάρων, η απουσία της B αλυσίδας στο τύπο 1 δεν επιτρέπει στην πρωτεΐνη την σύνδεση και την εισαγωγή της στο κύτταρο (Barbieri *et al.*, 1993). Οι πρωτεΐνες RIP τύπου 1 μπορούν να γίνουν ιδιαίτερα τοξικές εάν συνδεθούν με έναν κατάλληλο μεταφορέα ικανό να συνδέεται και να εισάγεται στα κύτταρα (Stirpe *et al.*, 1980).

2. B. ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ ΔΡΑΣΗΣ ΤΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ RIP

Διάφορες μελέτες έδειξαν ότι η ρισίνη εμποδίζει την πρωτεϊνική σύνθεση σε κυτταρικά και σε μη-κυτταρικά συστήματα (Lin *et al.*, 1971)(Olsnes and Pihl, 1972). Μερικές πρωτεΐνες RIP απαιτούν διάφορους συμπαραγόντες για να αποκτήσουν τη μέγιστη ανασταλτική δραστηριότητα τους, όπως στην περίπτωση της γελονίνης (gelonin) που απαιτείται ένα συγκεκριμένο tRNA (Carnicelli *et al.*, 1992) (Brigotti *et al.*, 1995).

Ο μηχανισμός της ριβοσωμικής αναστολής ανακαλύφθηκε από τον Endo (1987), ο οποίος διαπίστωσε ότι η ρισίνη διασπούσε το γλυκοσιδικό δεσμό μιας συγκεκριμένης αδενίνης (A4324 του rRNA στο συκώτι αρουραίων) (εικόνα 6). Η αδενίνη αυτή βρίσκεται στην περιοχή διάσπασης από την α -sarcin, δίπλα σε ένα τετρανουκλεοτίδιο GA4324GA σε έναν ιδιαίτερα συντηρημένο βρόχο (loop) στην κορυφή ενός μίσχου και για αυτό αποκαλείται βρόχος α -sarcin/ρισίνης (εικόνα 7). Αυτή η παρατήρηση επεκτάθηκε και σε άλλες RIP οι οποίες ταξινομήθηκαν επίσημα ως rRNA N-γλυκοσιδάσες (Stirpe *et al.*, 1988).



Εικόνα 6. Σχηματική αναπαράσταση της RNA N-γλυκοσιδικής δράσης των πρωτεϊνών RIP στα ριβοσώματα αρουραίου. Το νουκλεοτίδιο στόχος (A₄₃₂₄) βρίσκεται στο βρόχο α-sarcin/ρισίνης του μεγάλου ριβοσωμικού RNA (IrRNA) (van Damme *et al.*, 2001).

Οι πρωτεΐνες RIP αφαιρούν τις πουρίνες και των μη θηλαστικών ριβοσωμάτων, όπως των εντόμων (Zhou *et al.*, 2000), των φυτών (Iglesias *et al.*, 1993), των ζυμών (Roberts and Selitrennikoff, 1986) και των βακτηρίων (Girbes *et al.*, 1993a). Στη συνέχεια, διαπιστώθηκε ότι μερικές RIP αφαιρούν περισσότερα από ένα κατάλοιπα αδενίνης ανά ριβόσωμα (Barbieri *et al.*, 1994) και ότι αφαιρούν επίσης κατάλοιπα αδενίνης από το DNA και από άλλα (Nicolas *et al.*, 1998, 2000).

Παρατηρήθηκε ότι η ρισίνη και άλλες RIP αφαιρούν τις αδενίνες από την πολυ (A) ουρά της poly(ADP-ribosyl) poly(ADP-ribose) (Barbieri *et al.*, 2003).



Εικόνα 7. Το ριβόσωμα όπου πραγματοποιείται η πρωτεϊνική σύνθεση (<http://www.ebc.ee/molbio/>). Διακρίνεται η περιοχή όπου βρίσκεται η αδενίνη A4324 η οποία είναι στόχος των πρωτεϊνών RIP.

2. Γ. ΔΟΜΗ ΤΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ RIP

Πρωτοταγής δομή

Σήμερα είναι διαθέσιμες οι αλληλουχίες για πάνω από 20 πρωτεΐνες RIP τύπου 1, για περισσότερες από 30 πρωτεΐνες τύπου 2 και μια τύπου 3. Μια συγκριτική ανάλυση αυτών των αλληλουχιών δείχνει μια μεγάλη ομοιότητα μεταξύ των τύπου 1 και την περιοχή με N-γλυκοσιδική δράση των πρωτεϊνών τύπου 2 και 3. Μια σύγκριση των αλληλουχιών δείχνει επίσης ότι οι αλυσίδες B όλων των πρωτεϊνών τύπου 2 εμφανίζουν πολύ μεγάλη ομοιότητα.

Τρισδιάστατη δομή

Η πρώτη ανάλυση τρισδιάστατης δομής πρωτεΐνης RIP ήταν της ρισίνης από τον Montfort το 1987 (εικόνα 8). Έκτοτε έχουν αναφερθεί πολλά κρυσταλλογραφικά δεδομένα για τις πρωτεΐνες RIP. Υπάρχουν τουλάχιστον τριών πρωτεϊνών τύπου 2 και επτά πρωτεϊνών τύπου 1 (Van Damme, 2001). Η γνώση μας πάνω στη δομή και στην ενεργότητα των πρωτεϊνών RIP βασίζεται σε μεγάλο βαθμό στην ανάλυση της

ρισίνης, των υπομονάδων της ρισίνης, μεταλλαγμένης ρισίνης και συμπλόκων ρισίνης με υπόστρωμα. Τα αποτελέσματα αυτών των δομικών αναλύσεων χρησιμοποιήθηκαν για την αναγνώριση των αμινοξέων που σχηματίζουν το ενεργό κέντρο – σημείο δέσμευσης της αδερίνης στην Α έλικα της ρισίνης και την διευκρίνιση του μηχανισμού της Ν-γλυκοσιδική δράσης. Τα αμινοξέα Tyr80, Tyr123, Glu177, Arg180 και Trp211 σχηματίζουν το σημείο δέσμευσης της αδερίνης. Τα αμινοξέα αυτά είναι συντηρημένα και στις πρωτεΐνες τύπου 1. Έξι ακόμη αμινοξέα, τα οποία βρίσκονται σε κοντινή απόσταση, Asn78, Arg134, Gln173, Ala178, Glu208 και Asn209, είναι σημαντικά για τον σχηματισμό του ενεργού κέντρου.



Εικόνα 8. Η τρισδιάστατη δομή της πρωτεΐνης ρισίνη από το οργανισμό *Ricinus communis* (Montfort *et al.*, 1987)

2. Δ. ΛΟΙΠΕΣ ΒΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΔΡΑΣΕΙΣ

Οι πρωτεΐνες RIP παρουσιάζουν αντί-ικκή, αντιμυκητιακή και εντομοκτόνο δράση. Οι αντί-ικκές ιδιότητες εκχυλίσματος φύλλων *Phytolacca americana* οδήγησε στον καθαρισμό της πρωτεΐνης PAP, η οποία εμποδίζει την πρωτεϊνική σύνθεση με τον ίδιο μηχανισμό όπως τον μηχανισμό της αλυσίδας A της ρισίνης (Irvin, 1983). Η πρωτεΐνη PAP ήταν η πρώτη γνωστή προσδιορισμένη RIP τύπου 1. Η πρωτεΐνη PAP όπως και άλλες πρωτεΐνες RIP αναπτύσσει αντί-ικκή δράση ενάντια σε ιούς φυτών και ζώων (Aron and Irvin, 1980) (Lodge *et al.*, 1993), έχει επίσης αντι-μυκητιακή και εντομοκτόνο δράση (Zhou *et al.*, 2000).

2. Ε. Ο ΡΟΛΟΣ ΤΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ RIP ΣΤΗ ΦΥΣΗ

Διάφορες υποθέσεις έχουν προταθεί για τις πρωτεΐνες RIP όσο αφορά το ρόλο τους στη φύση. Το ίδιο το γεγονός ότι είναι πολλές δείχνει ότι καμία από τις υποθέσεις αυτές δεν είναι πλήρως πειστική. Προτάθηκε ένας αμυντικός ρόλος ενάντια στα παθογόνα για την αντί-ικκή και αντιμυκητιακή τους δράση όπως επίσης και για την τοξικότητά τους ενάντια στα αρπακτικά ζώα. Υποστηρίχτηκε ακόμα ότι θα μπορούσαν να παίζουν ρόλο στην παθογένεση της απόπτωσης λόγω της υψηλής έκφρασής τους στους γερασμένους, πληγωμένους ή στρεσαρισμένους ιστούς. Επίσης θα μπορούσαν να θεωρηθούν αποθηκευτικές πρωτεΐνες λόγω της αφθονίας τους στους σπόρους σε κάποια είδη φυτών (π.χ. σαπορίνη 268-414mg ανά 100g σπόρων, γελονίνη 250-300mg ανά 100g σπόρων (Stirpe *et al.*, 1980), (Liu *et al.*, 2002). Όλες αυτές οι ερμηνείες περιέχουν κάποια αλήθεια, δεδομένου ότι μερικοί από αυτούς τους ρόλους είναι πραγματικοί, όμως δεν ισχύουν όλοι για όλες τις πρωτεΐνες RIP ή για όλους τους οργανισμούς που τις παράγουν. Πάντως, η ευρεία κατανομή τους υποδηλώνει ότι μπορούν να έχουν έναν σημαντικό ρόλο, που προσφέρει ένα εξελικτικό πλεονέκτημα το οποίο δικαιολογεί τη συντήρησή τους. Είναι δυνατό να επεμβαίνουν σε κάποια μεταβολική πορεία, κοινή τουλάχιστον για

όλους τους οργανισμούς που τις παράγουν. Η άμυνα και οι άλλες τυχόν ιδιότητες μπορούν να είναι απλά χρήσιμες συμπτώσεις.

2. ΣΤ. ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΤΩΝ RIP ΣΤΗΝ ΙΑΤΡΙΚΗ

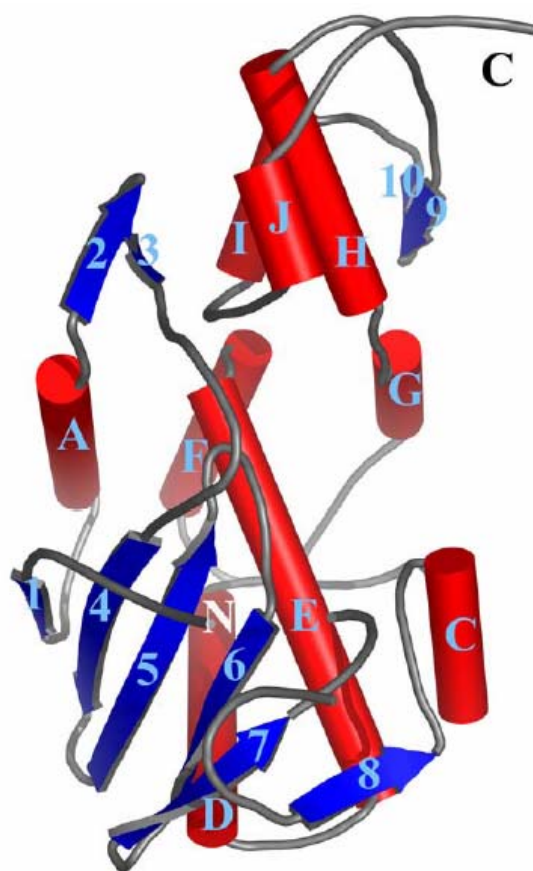
Οι πρωτεΐνες RIP λόγω των ιδιοτήτων τους μπορούν να έχουν εφαρμογές στον τομέα της ιατρικής και της γεωργίας. Στην ιατρική, έχουν μελετηθεί ως ανοσοτοξίνες ή ως αντί-ιικοί παράγοντες, κυρίως ενάντια στον ιό HIV. Μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την θεραπεία όγκων, παραδείγματος χάριν του καρκίνου της ουροδόχου κύστης, όπως προτείνονται από τις *in vitro* μελέτες και τις αρχικές κλινικές δοκιμές (Thiesen *et al.*, 1987) (Battelli *et al.*, 1996) (Yu *et al.*, 1998) (Zang *et al.*, 2000).

Πιο συγκεκριμένα, οι πρωτεΐνες RIP έχουν χρησιμοποιηθεί για την παρασκευή ανοσοτοξινών συζευγμένων με μονοκλωνικά αντισώματα ή με άλλους κατάλληλους μεταφορείς, π.χ. ορμόνες ή νευροπεπτίδια. Ανοσοτοξίνες έχουν παρασκευαστεί με πρωτεΐνες RIP τύπου 1, ειδικά με τις PAP, σαπορίνη και γελονίνη. Οι περισσότερες ανοσοτοξίνες έχουν παρασκευαστεί για την πειραματική θεραπεία της κακοηθείας (καρκίνου), για την καταστολή του ανοσοποιητικού συστήματος και επίσης για τη θεραπεία ασθενειών που προέρχονται από ιούς. Για τον σκοπό αυτό, οι πρωτεΐνες RIP έχουν συνδεθεί με αντισώματα ενάντια σε αντιγόνα που εκφράζονται περισσότερο σε καρκινικά κύτταρα, σε κύτταρα με ανοσολογική ανεπάρκεια ή σε κύτταρα μολυσμένα από ιούς, ειδικά από τον HIV (Pincus and Tolstikov, 1995), (Knechtle, 2001). Χαρακτηριστικό κάποιων πρωτεϊνών RIP είναι η ανθεκτικότητα τους απέναντι σε πρωτεάσες γεγονός που ενθαρρύνει περισσότερο την εφαρμογή τους σε ανοσοτοξίνες (Santanche *et al.*, 1997).

Επιπρόσθετα, στη γεωργία, οι πρωτεΐνες RIP εξετάζονται σαν αντί-ιικοί, σαν αντιμυκητιακοί και σαν εντομοκτόνοι παράγοντες (Lodge *et al.*, 1993).

3. ΧΑΡΥΒΔΙΝΗ: ΜΙΑ ΝΕΑ ΠΡΩΤΕΪΝΗ RIP ΑΠΟ ΤΟ ΒΟΛΒΟ ΤΟΥ ΟΡΓΑΝΙΣΜΟΥ *Charibdis maritima*

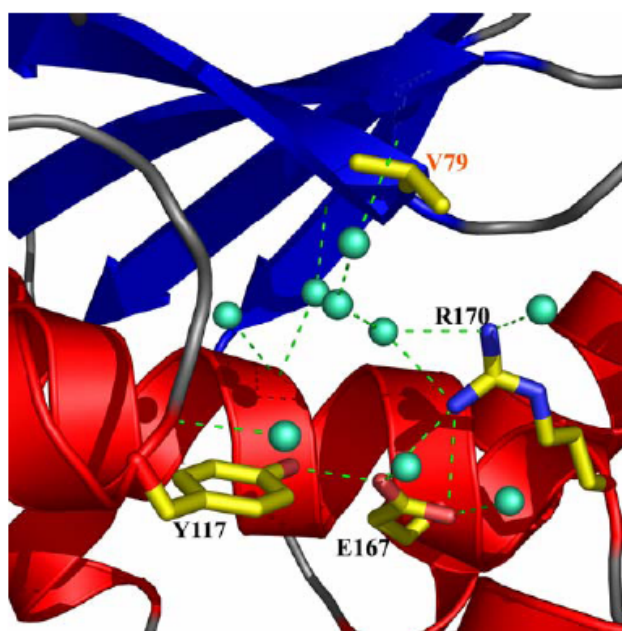
Το 2006 μελετήθηκε από τον Toulouarakis *et al.*, η απομόνωση, ο χαρακτηρισμός και ο προσδιορισμός της αλληλουχίας και της δομής της **χαρυβδίνης**, μιας νέας πρωτεΐνης μεγέθους 29kDa, από τους βολβούς του φυτού *Charybdis maritima*.



Εικόνα 9. Γενική δομή της χαρυβδίνης. Οι β-κλώνοι φαίνονται με μπλε και οι α-έλικες με κόκκινο. Τα δομικά στοιχεία διακρίνονται ως εξής: β-κλώνοι 1-10 και α-έλικες A-J. Το N- και το C-τερματικό της πρωτεΐνης διακρίνονται με N και C αντίστοιχα (Toulouarakis *et al.*, 2006).

Η νέα αυτή πρωτεΐνη (χαρυβδίνη) απομονώθηκε σε καθαρή μορφή, σε μεγάλη ποσότητα, από τους βολβούς του φυτού, ενώ παράλληλα προσδιορίστηκε η ακολουθία DNA και η επαγόμενη ακολουθία των αμινοξέων, η οποία αποκάλυψε την ύπαρξη μιας σημαντικής ομολογίας με τις **πρωτεΐνες RIP**.

Όπως αναφέρθηκε προηγουμένα (βλ. παράγραφο 2.Γ.), το ενεργό κέντρο των πρωτεϊνών RIP απαρτίζεται από τέσσερα βασικά κατάλοιπα αμινοξέων, τα οποία είναι πολύ συντηρημένα. Αν και τρία από τα τέσσερα βασικά κατάλοιπα είναι παρόντα στο ενεργό κέντρο της χαρυβδίνης, το τέταρτο κατάλοιπο, το οποίο είναι μια τυροσίνη, παρούσα σε περισσότερες από 360 διαφορετικές πρωτεΐνες RIP, έχει αντικατασταθεί από μια βαλίνη.



Εικόνα 10. Η περιοχή του ενεργού κέντρου της χαρυβδίνης. Φαίνονται τα τέσσερα σημαντικά αμινοξέα, τα μόρια νερού που καταλαμβάνουν την κοιλότητα παρουσιάζονται ως σφαίρες. Οι διακεκομμένες γραμμές δείχνουν τους δεσμούς υδρογόνου στα άτομα των κύριων ή πλευρικών αλυσίδων (Τουλουράκης *et al.*, 2006).

Το τεστ ενεργότητας (*in vitro* πρωτεϊνοσύνθεση) έδειξε ότι η χαρυβδίνη παρουσιάζει IC_{50} ίσο με 24,8 nM γεγονός που υποδηλώνει ότι δεν είναι ένας τόσο ισχυρός ανασταλτικός παράγοντας της πρωτεϊνικής σύνθεσης, όπως οι άλλες πρωτεΐνες RIP.

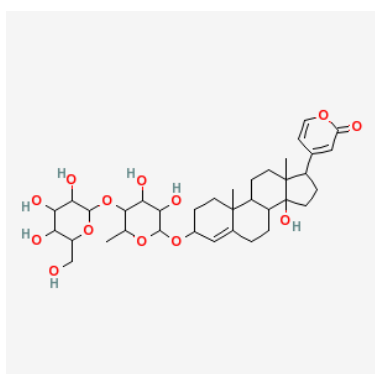
Η αντικατάσταση της τυροσίνης από μία βαλίνη στη θέση 79 του ενεργού κέντρου της χαρυβδίνης αποτελεί ένα μοναδικό δομικό γνώρισμα της πρωτεΐνης, που εξηγεί ενδεχομένως τη χαμηλή ανασταλτική της δράση σε σχέση με άλλες πρωτεΐνες RIP.

Σημαντικό χαρακτηριστικό της χαρυβδίνης είναι η μεγάλη ανθεκτικότητά στις πρωτεάσες. Το χαρακτηριστικό αυτό σε συνδυασμό με την μελέτη της ανασταλτικής δράσης της χαρυβδίνης σε ολόκληρα ευκαρυωτικά κύτταρα, θα θέσει τις βάσεις για την χρησιμοποίησή της σε ανοσοτοξίνες.

Δεδομένου ότι η χαρυβδίνη είναι το κύριο πρωτεϊνικό συστατικό του βολβού, είναι πιθανόν ότι η παρεμπόδιση της σύνθεσης των πρωτεϊνών δεν είναι η σημαντικότερη ή η μοναδική λειτουργία της. Η χαρυβδίνη ενδέχεται να λειτουργεί και ως πρωτεΐνη αποθήκευσης π.χ. όπως η πρωτεΐνη Cinnamomin.

4. ΦΥΤΙΚΑ ΣΤΕΡΟΕΙΔΗ – ΒΟΥΦΑΔΙΕΝΟΛΙΔΕΣ (BUFADIENOLIDES)

Οι βουφαδιενολίδες είναι καρδιοτονωτικές, στεροειδείς ουσίες που ο βασικός



σκελετός τους αποτελείται από 24 άτομα άνθρακα. Η φαρμακευτική δράση αυτών των ουσιών ήταν ήδη γνωστή από την εποχή των αρχαίων Αιγυπτίων, οι οποίοι χρησιμοποιούσαν την σκυλοκρεμμύδα, φυτό που περιέχει μεγάλα ποσά βουφαδιενολιδών, στην **καταπολέμηση καρδιακών παθήσεων. Η ουσία**

Εικόνα 12 *Scillaren A* Scillaren A, ένας από τους κύριους γλυκοζίτες που περιέχεται στη σκυλοκρεμμύδα, υπήρξε η πρώτη βουφαδιενολίδη που αποσαφηνίστηκε η δομή της το 1933.

Μετάπειτα, αποκαλύφθηκε η δομή σε πολλές από αυτές τις στεροειδείς ουσίες, οι οποίες προέρχονταν είτε από φυτικούς είτε από ζωικούς οργανισμούς.

Η καρδιοτονωτική τους δράση οφείλεται στην ικανότητά τους να αναστέλλουν τη λειτουργία της Na^+/K^+ -ΑΤΡάσης που υπάρχει στο μυοκάρδιο, προκαλώντας ενίσχυση της έντασης της μυϊκής συστολής και, κατ' επέκταση, της καρδιακής σύσπασης (Akizawa *et al.*, 1994). Για το λόγο αυτό, πολλές ουσίες αυτής της

κατηγορίας, όπως για παράδειγμα η Helleborin, που απομονώνεται από είδη του γένους *Helleborus*, έχουν χρησιμοποιηθεί στο παρελθόν για την καταπολέμηση καρδιακών αρρυθμιών (Muhr *et al.*, 1995). Τελευταία έχει δειχθεί ότι στα ανώτερα θηλαστικά παράγονται ενδογενώς αντίστοιχες καρδιοτονωτικές στεροειδείς ουσίες, από τον φλοιό των επινεφριδίων, συνθέτοντας έτσι μία νέα ομάδα στεροειδών ορμονών που εμπλέκονται στη ρύθμιση της υπέρτασης (Schoner *et al.*, 2000).

Εκτός από την καρδιοτονωτική τους δράση, ορισμένες βουφαδιενολίδες αναστέλλουν τη δημιουργία και την ανάπτυξη καρκινικών όγκων (Yamagishi *et al.*, 1989), ενώ είναι τοξικές για τα περισσότερα ζώα (McKenzie *et al.*, 1989). Επιπλέον, οι περισσότερες βουφαδιενολίδες διαθέτουν εντομοκτόνο (Supratman *et al.*, 2000) και αντιμικροβιακή δράση (Taniguchi *et al.* 1993).

Η παρουσία των βουφαδιενολιδών, τόσο στο ζωικό όσο και στο φυτικό βασίλειο δεν είναι καθολική. Τέτοιες ουσίες έχουν βρεθεί σε λίγες μόνο οικογένειες φυτών και ζώων. Στο ζωικό βασίλειο, οι βουφαδιενολίδες είναι διαδεδομένες κυρίως στην οικογένεια των αμφιβίων Bufonidae, από όπου πήραν και το όνομά τους. Συγκεκριμένα, η ανακάλυψη των πρώτων βουφαδιενολιδών έγινε στο δηλητήριο ειδών βατράχου του γένους *Bufo*. Παράλληλα, στα παραδοσιακά ασιατικά φάρμακα Ch'an Su και Senso, που παρασκευάζονται από δηλητήριο βατράχων, απομονώθηκε και χαρακτηρίστηκε μεγάλος αριθμός βουφαδιενολιδών. Στα ερπετά βουφαδιενολίδες βρέθηκαν σε ένα μόνο αντιπρόσωπο της οικογένειας Colubridae, ενώ στα αρθρόποδα απομονώθηκαν βουφαδιενολίδες από τρία είδη του γένους *Photinus* (οικ. Lampyridae)

Στο φυτικό βασίλειο η παρουσία των βουφαδιενολιδών φαίνεται να περιορίζεται στα αγγειόσπερμα και συγκεκριμένα σε έξι οικογένειες: Crassulaceae, Hyacinthaceae, Iridaceae, Meliantaceae, Ranunculaceae και Santalaceae. Μάλιστα, ο μεγαλύτερος αριθμός και ποικιλία βουφαδιενολιδών έχει απομονωθεί από τα γένη *Drimia* και *Urginea* της οικογένειας Hyacinthaceae. Συνολικά, περισσότερες από 100 διαφορετικές ουσίες – γενίνες (genins) και οι γλυκοζίτες τους – έχουν απομονωθεί από διάφορα φυτικά είδη.

Συγκεκριμένα, στον φυτικό οργανισμό *Charybdis maritima*, το μεγαλύτερο ποσοστό των βουφαδιενολιδών που έχουν ανιχνευτεί είναι γλυκοζίτες και προέρχονται από τη βιοχημική μετατροπή των παρακάτω ουσιών: *scillarenin*, *proscillaridin A*, *scillaren A*, *scillicyanoside*, *scilliglaucogenin*, *scilliglaucoside*, *scilliglaucosidin*, *scilliphaeosidin*, *scilliphaeoside*, *scillirosidin*, *scilliroside*, *scillirubrosidin* and *scillirubroside* (Steyn and van Heerden, 1998).

Στον πίνακα που ακολουθεί αναγράφεται το σύνολο των βουφαδιενολιδών που έχουν ανιχνευτεί και χαρακτηριστεί από διάφορες ποικιλίες του οργανισμού *Charybdis maritima*:

1. 16 α -Acetoxycamabufotalin 3-O- α -L-rhamnoside	2. 16 α -Hydroxyscillarenin 3-O- α -D-glucoside	3. 5 α -4,5-Dihydro-16 α -acetoxyscillirosidin 3-O-[α -D-glucosyl-(1)4]- α -L-thevetoside]	4. Scillarenin
5. 16 α -Acetoxylglucosyllaren A	6. 11 α -Hydroxyscilliglauco side	7. 5 α -4,5-Dihydroglucosyllaren A	8. Scillarenin 3-O- α -D-glucoside
9. 16 α -Acetoxyposcillaridin A	10. 12 α -Hydroxyscilliglauco sidin 3-O- α -D-glucoside	11. 5 α -4,5-Dihydro-12 α -hydroxyscillirosidin	12. Scillarenin 3-O-[α -D-glucosyl-(1)4]- α -L-2,3-di-O-acetylramnoside]
13. 16 α -Acetoxyscillarenin 3-O- α -D-glucoside	14. 11 α -Hydroxyscilliglauco sidin 3-O- α -L-rhamnoside	15. 5 α -4,5-Dihydro-12 α -hydroxyscillirosidin 3-O-[α -D-glucosyl-(1)4]- α -L-thevetoside]	16. Scillarenin 3-O-[α -D-glucosyl-(1)4]- α -D-glucoside]
17. 16 α -Acetoxyscillarenin 3-O-[α -D-glucosyl-(1)4]- α -D-glucoside	18. 9-Hydroxyscilliphaeoside	19. 5 α -4,5-Dihydro-12 α -hydroxyscillirosidin 3-O- α -L-thevetoside	20. Scillarenin 3-O-[α -D-glucosyl-(1)3]- α -D-glucosyl-(1)4]- α -L-2,3-di-O-acetylramnoside
21. 16 α -Acetoxyscillarenin 3-O-[α -D-glucosyl-(1)4]- α -D-glucosyl-(1)4]- α -L-glucosylmethoside	22. 12 α -Hydroxyscilliroside	23. 5 α -4,5-Dihydro-16 α -hydroxyscillirosidin 3-O- α -L-thevetoside	24. Scillarenin 3-O-[α -D-glucosyl-(1)4]- α -D-glucosyl-(1)4]- α -L-2,3-di-O-acetylramnoside

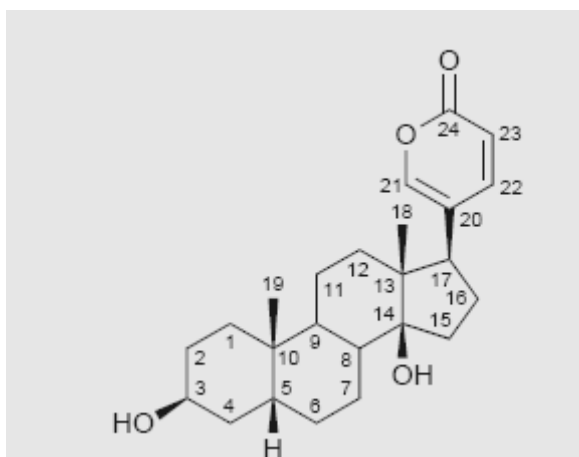
25. 16 α -Acetoxyscillirubroside	26. 12 α -Hydroxyscillirosidin	27. 5 α -4,5-Dihydroproscillaridin A	28. Scillarenin 3- <i>O</i> -[α -D-glucosyl-(1)3]- α -D-glucosyl-(1)4]- α -L-rhamnoside
29. 11- <i>O</i> -Acetylgamabufotalin 3- <i>O</i> -[α -D-glucosyl-(1)4]- α -L-rhamnoside	30. 12 α -Hydroxyscillirosidin-3-one	31. 5 α -4,5-Dihydroscillaren A	32. Scillicyanoside
33. Anhydroscilliphaeosidin	34. 12 α -Hydroxyscillirubrosidin 3- <i>O</i> - α -L-rhamnoside	35. 5 α -4,5-Dihydroscillirosidin 3- <i>O</i> - α -L-glucomethyloside	36. Scilliglaucogenin
37. Arenobufagin 3- <i>O</i> -[α -D-glucosyl-(1)4]- α -L-rhamnoside]	38. 12 α -Hydroxyscillirubrosidin-3-one	39. 5 α -4,5-Dihydroscillirosidin 3- <i>O</i> - α -D-glucoside	40. Scilliglaucoside (scillaren F)
41. Arenobufagin 3- <i>O</i> - α -L-rhamnoside	42. Physodine A	43. 5 α -4,5-Dihydroscillirosidin 3- <i>O</i> -[α -D-glucosyl-(1)4]- α -L-glucomethyloside	44. Scilliglaucosidin
45. 10-Carboxy-5 α ,14 α -dihydroxybufa-3,20,22-trienolide 5- <i>O</i> - α -D-glucoside	46. Physodine B	47. 5 α -4,5-Dihydroscillirosidin 3- <i>O</i> -[α -D-glucosyl-(1)4]- α -D-glucosyl-(1)4]- α -L-glucomethyloside	48. Scilliglaucosidin-3-one
49. 6-Desacetoxyscillirosidin	50. Physodine C	51. 5 α -4,5-Dihydroscillirosidin 3- <i>O</i> -[α -D-glucosyl-(1)4]- α -D-glucosyl-(1)4]- α -L-rhamnoside]32	52. Scilliglaucosidin 3- <i>O</i> - α -D-glucoside54 (Altoside)
53. 6-Desacetyl-12 α -hydroxyscilliroside	54. Physodine D	55. 5 α -4,5-Dihydroscillirosidin 3- <i>O</i> -[α -D-glucosyl-(1)4]- α -D-glucosyl-(1)4]- α -L-thevetoside]30	56. Scilliglaucosidin 3- <i>O</i> - α -L-rhamnoside
57. 6-Desacetyl-12 α -hydroxyscillirosidin	58. Proscillaridin A50	59. 5 α -4,5-Dihydroscillirosidin 3- <i>O</i> -[α -D-glucosyl-(1)4]- α -L-rhamnoside	60. Scilliphaeoside
	61. Rubellin	62. 5 α -4,5-Dihydroscillirosidin 3- <i>O</i> -[α -D-glucosyl-(1)4]- α -L-thevetoside	63. Scilliphaeosidin
64. 6-Desacetylscllirosidin	65. Scillaren A	66. 5 α -4,5-Dihydroscillirosidin 3- <i>O</i> - α -L-thevetoside	67. Scilliphaeosidin 3- <i>O</i> - α -D-glucoside

68. Hellebrigenin 3- <i>O</i> - α -D-glucoside	69. 12 α -Hydroxyscilliglaucosidin 3- <i>O</i> - α -D-glucoside	70. 12-Epiglucoscilliphaeoside	71. Scilliphaeosidin 3- <i>O</i> -[α -D-glucosyl-(1)3]- α -D-glucosyl-(1)4)- α -L-rhamnoside
72. 16 α -Hydroxyglucoscillaren A	73. 11 α -Hydroxyscilliglaucosidin 3- <i>O</i> - α -L-rhamnoside	74. 12-Episcilliphaeoside	75. Scilliphaeosidin 3- <i>O</i> -[α -D-glucosyl-(1)4]- α -D-glucosyl-(1)4)- α -L-rhamnoside
76. 16 α -Hydroxyproscillaridin A	77. 9-Hydroxyscilliphaeoside	78. 12-Episcilliphaeosidin 3- <i>O</i> - α -D-glucoside	79. Scilliroside
80. Scillarenin 3- <i>O</i> -[α -D-glucosyl-(1)4]- α -D-glucosyl-(1)4)- α -L-2,3-di- <i>O</i> -acetylramnoside	81. 12 α -Hydroxyscilliroside	82. 12-Episcilliphaeosidin 3- <i>O</i> -[α -L-rhamnosyl-(1)4]- α -L-rhamnoside	83. Scillirosidin
84. 5 α -4,5-Dihydro-16 α -acetoxyscillirosidin 3- <i>O</i> -[α -D-glucosyl-(1)4]- α -L-thevetoside	85. Scillarenin	86. Gamabufotalin 3- <i>O</i> -[α -D-glucosyl-(1)4]- α -L-rhamnoside	87. Scillirubroside
88. 5 α -4,5-Dihydroglucoscillaren A	89. Scillarenin 3- <i>O</i> - α -D-glucoside	90. Gamabufotalin 3- <i>O</i> - α -L-rhamnoside	91. Scillirubrosidin
92. 5 α -4,5-Dihydro-12 α -hydroxyscillirosidin	93. Scillarenin 3- <i>O</i> -[α -D-glucosyl-(1)4]- α -L-2,3-di- <i>O</i> -acetylramnoside	94. Glucoscillaren A	95. Scillirubrosidin 3- <i>O</i> -[α -D-glucosyl-(1)4]- α -D-glucoside
96. 5 α -4,5-Dihydro-12 α -hydroxyscillirosidin 3- <i>O</i> -[α -D-glucosyl-(1)4]- α -L-thevetoside	97. Scillarenin 3- <i>O</i> -[α -D-glucosyl-(1)4]- α -D-glucoside	98. Glucoscilliphaeoside	99. Scillirubrosidin 3- <i>O</i> -[α -D-glucosyl-(1)4]- α -D-glucosyl- α -L-rhamnoside
100. 5 α -4,5-Dihydro-16 α -hydroxyscillirosidin 3- <i>O</i> - α -L-thevetoside	101. Scillarenin 3- <i>O</i> -[α -D-glucosyl-(1)4]- α -D-glucosyl-(1)4)- α -L-2,3-di- <i>O</i> -acetylramnoside	102. Hellebrigenin	103. 11 α -Hydroxyscilliglaucoside
104. 5 α -4,5-Dihydroproscillaridin A	105. Scillarenin 3- <i>O</i> -[α -D-glucosyl-(1)3]- α -D-glucosyl-(1)4)- α -L-rhamnoside	106. 5 α -4,5-Dihydroscillirosidin 3- <i>O</i> - α -D-glucoside	107. Scilliglaucoside (scillaren F)
108. 5 α -4,5-Dihydroscillaren A	109. Scillicyanoside	110. 5 α -4,5-Dihydroscillirosidin 3- <i>O</i> -[α -D-glucosyl-(1)4]- α -L-glucomethylsode	111. Scilliglaucosidin

112. 5 α -4,5-Dihydroscillirosidin 3- <i>O</i> - α -L-glucomethyloside	113. Scilliglaucogenin	114. 5 α -4,5-Dihydroscillirosidin 3- <i>O</i> -[α -D-glucosyl-(1)4]- α -D-glucosyl-(1)4]- α -L-glucomethyloside	115. Scilliglaucosidin -3-one
	116. Scillarenin 3- <i>O</i> -[α -D-glucosyl-(1)4]- α -L-2,3-di- <i>O</i> -acetylramnoside	117. 5 α -4,5-Dihydroscillirosidin 3- <i>O</i> -[α -D-glucosyl-(1)4]- α -D-glucosyl-(1)4]- α -L-rhamnoside	118. Scilliglaucosidin 3- <i>O</i> - α -D-glucoside (Altoside)
119. 5 α -4,5-Dihydro-12 α -hydroxyscillirosidin 3- <i>O</i> -[α -D-glucosyl-(1)4]- α -L-thevetoside	120. Scillarenin 3- <i>O</i> -[α -D-glucosyl-(1)4]- α -D-glucoside	121. 5 α -4,5-Dihydroscillirosidin 3- <i>O</i> -[α -D-glucosyl-(1)4]- α -D-glucosyl-(1)4]- α -L-thevetoside	122. Scilliglaucosidin 3- <i>O</i> - α -L-rhamnoside
123. 5 α -4,5-Dihydro-12 α -hydroxyscillirosidin 3- <i>O</i> - α -L-thevetoside	124. Scillarenin 3- <i>O</i> -[α -D-glucosyl-(1)3]- α -D-glucosyl-(1)4]- α -L-2,3-di- <i>O</i> -acetylramnoside	125. 5 α -4,5-Dihydroscillirosidin 3- <i>O</i> -[α -D-glucosyl-(1)4]- α -L-rhamnoside	126. Scilliphaeoside
127. 5 α -4,5-Dihydro-16 α -hydroxyscillirosidin 3- <i>O</i> - α -L-thevetoside	128. Scillarenin 3- <i>O</i> -[α -D-glucosyl-(1)4]- α -D-glucosyl-(1)4]- α -L-2,3-di- <i>O</i> -acetylramnoside	129. 5 α -4,5-Dihydroscillirosidin 3- <i>O</i> -[α -D-glucosyl-(1)4]- α -L-thevetoside	130. Scilliphaeosidin
131. 5 α -4,5-Dihydroscillirosidin 3- <i>O</i> - α -D-glucoside	132. Scilliglaucoside (scillaren F)	133. Hellebrigenin 3- <i>O</i> - α -D-glucoside	134. 12 α -Hydroxyscilliglaucosidin 3- <i>O</i> - α -D-glucoside
135. 5 α -4,5-Dihydroscillirosidin 3- <i>O</i> -[α -D-glucosyl-(1)4]- α -L-glucomethyloside	136. Scilliglaucosidin	137. 16 α -Hydroxyglucoscillaren A	138. 11 α -Hydroxyscilliglaucosidin 3- <i>O</i> - α -L-rhamnoside
139. 5 α -4,5-Dihydroscillirosidin 3- <i>O</i> -[α -D-glucosyl-(1)4]- α -D-glucosyl-(1)4]- α -L-glucomethyloside	140. Scilliglaucosidin-3-one	141. 16 α -Hydroxyproscillaridin A	142. 9-Hydroxyscilliphaeoside
143. 5 α -4,5-Dihydroscillirosidin 3- <i>O</i> - α -L-thevetoside	144. Scilliphaeosidin 3- <i>O</i> - α -D-glucoside	145. 5 α -4,5-Dihydroproscillaridin A	146. 12 α -Hydroxyscilliroside
147. 5 α -4,5-Dihydro-12 α -hydroxyscillirosidin	148. Scillarenin 3- <i>O</i> -[α -D-glucosyl-(1)4]- α -L-2,3-di- <i>O</i> -acetylramnoside	149. 5 α -4,5-Dihydro-16 α -acetoxyscillirosidin 3- <i>O</i> -[α -D-glucosyl-(1)4]- α -L-thevetoside	150. Scillarenin50
151. 5 α -4,5-Dihydro-12 α -hydroxyscillirosidin 3- <i>O</i> -[α -D-glucosyl-(1)4]- α -L-thevetoside	152. Scillarenin 3- <i>O</i> -[α -D-glucosyl-(1)4]- α -D-glucoside	153. 5 α -4,5-Dihydroglucoscillaren A	154. Scillarenin 3- <i>O</i> - α -D-glucoside

155. 5 α -4,5-Dihydro-12 α -hydroxyscillirosidin 3- <i>O</i> - α -L-thevetoside	156. Scillarenin 3- <i>O</i> -[α -D-glucosyl-(1)3]- α -D-glucosyl-(1)4]- α -L-2,3-di- <i>O</i> -acetylramnoside	157. 5 α -4,5-Dihydro-16 α -hydroxyscillirosidin 3- <i>O</i> - α -L-thevetoside	
158. 5 α -4,5-Dihydro-12 α -hydroxyscillirosidin 3- <i>O</i> - α -L-thevetoside	159. Scillarenin 3- <i>O</i> -[α -D-glucosyl-(1)3]- α -D-glucosyl-(1)4]- α -L-2,3-di- <i>O</i> -acetylramnoside	160. Glucoscilliroside	161. 16 α -Hydroxyscillarenin 3- <i>O</i> - α -D-glucoside

Το ιδιαίτερο δομικό χαρακτηριστικό στο στεροειδή σκελετό των βουφαδιενολιδών είναι ένας διπλά ακόρεστος εξαμελής δακτύλιος λακτόνης (α -πυρόνη) στη θέση 17β.



Εικόνα 13. Δομή και αρίθμηση του άγλυκου τμήματος (γενίνη) των βουφαδιενολιδών.

Επιπρόσθετα, οι ουσίες αυτές χαρακτηρίζονται από μία *trans*-σύζευξη των δακτυλίων Β και Γ του στεροειδούς σκελετού και συνήθως από μία *cis*-σύζευξη των δακτυλίων Γ και Δ.

Η ουσίες Physodine C και D από το φυτό *Urginea physodes* είναι οι πρώτες φυσικές βουφαδιενολίδες που ανακαλύφθηκαν με *trans* – σύζευξη μεταξύ των δακτυλίων Γ και Δ. Εκτός από τους διπλούς δεσμούς στον δακτύλιο της λακτόνης, οι βουφαδιενολίδες δύνανται να διαθέτουν διπλούς δεσμούς στη θέση 4 και σπανιότερα στις θέσεις 3 και 6 του στεροειδούς σκελετού. Οι μόνες γνωστές έως

σήμερα βουφατετραενολίνες είναι η helleborogenone, προερχόμενη από διάφορα είδη του γένους *Helleborus* και η scillaridine, που απομονώνεται από είδη του γένους *Urginea*.

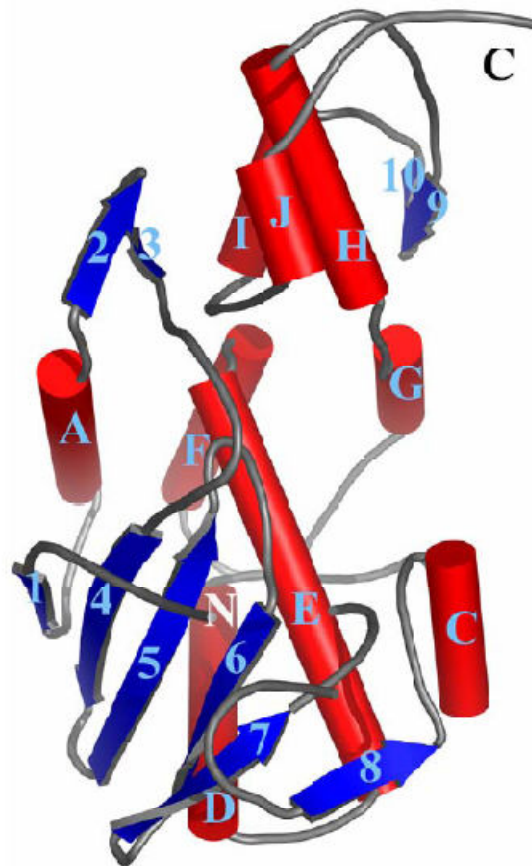
Η μεγάλη ποικιλία των μέχρι σήμερα γνωστών βουφαδιενολιδών οφείλεται κυρίως στον αριθμό και τη θέση των διαφόρων υποκαταστατών. Έτσι, υπάρχουν βουφαδιενολίδες που διαθέτουν στο μόριό τους υδρόξυ-, επόξυ-, ακετόξυ- και όξο-χημικές ομάδες, ενώ σπανιότερα απαντώνται βουφαδιενολίδες που διαθέτουν μεθόξυ- και φορμυλόξυ- ομάδες. Οι περισσότερα συχνά εμφανιζόμενες υποκαταστάσεις είναι η πρόσδεση ομάδων υδροξυλίου στο στεροειδή σκελετό και συγκεκριμένα στις θέσεις 3β, 5β, 6β, 8β, 11α, 11β, 12α, 12β, 14β, 16β και 19, η πρόσδεση ακετόξυ- ομάδων στις θέσεις 3β, 5β, 6β και 16β και η πρόσδεση όξο-ομάδων στις θέσεις 3, 11, 12 και 19.

Οι βουφαδιενολίδες που προέρχονται από φυτικούς οργανισμούς συνήθως απαντώνται με τη μορφή γλυκοζιτών με ένα έως τρία μόρια σακχάρων σε σειρά, προσδεμένα στην 3-υδρόξυ ομάδα του στεροειδούς σκελετού. Οι πρώτοι γλυκοζίτες βουφαδιενολιδών με διακλαδώσεις σακχάρων στο μόριό τους απομονώθηκαν από το φυτό *Urginea epigea*. Στις ενώσεις που η στη θέση 3 υπάρχει διπλός δεσμός Δ^{3,4}, τα μόρια των σακχάρων προσδέονται στο υδροξύλιο της θέσης 5β. Σε γενικές γραμμές οι μονοσακχαρίτες στο μόριο των βουφαδιενολιδών ενώνονται μεταξύ τους με 1→4 γλυκοζιτικό δεσμό. Σε αντίθεση με την άλλη μεγάλη κατηγορία των φυτικών καρδιοτονωτικών στεροειδών, τις καρδιενολίνες (cardienolides) οι γλυκοζίτες των βουφαδιενολιδών εμφανίζουν μικρότερη ποικιλομορφία στο είδος των μονοσακχαριτών που προσδέονται στο μόριό τους. Έτσι, οι ομάδες των σακχάρων απαρτίζονται κυρίως από μόρια γλυκόζης και ραμνόζης

Η παρουσία του εξαμελούς δακτυλίου της λακτόνης, που αποτελεί ένα χρωμοφόρο μόριο, στο σκελετό των βουφαδιενολιδών, προσδίδει στις ουσίες αυτές μία χαρακτηριστική απορρόφηση στο φάσμα της υπεριώδους ακτινοβολίας. Έτσι, στο φάσμα απορρόφησης των βουφαδιενολιδών εμφανίζονται δύο χαρακτηριστικές κορυφές [λ_{\max} στα 296-299nm και συντελεστή απορρόφησης $\epsilon=5000 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (σε διάλυμα μεθανόλης) και μία δευτερεύουσα στα 200-220nm].

1. ΧΑΡΥΒΔΙΝΗ: ΜΙΑ ΝΕΑ ΠΡΩΤΕΪΝΗ RIP ΑΠΟ ΤΟ ΒΟΛΒΟ ΤΟΥ ΟΡΓΑΝΙΣΜΟΥ *Charibdis maritima*

Το 2006 μελετήθηκε από τον Τουλουράκης και τους συνεργάτες του (Τουλουράκης *et al.*, 2006), η απομόνωση, ο χαρακτηρισμός και ο προσδιορισμός της αλληλουχίας και της δομής της **χαρυβδίνης**, μιας νέας πρωτεΐνης μεγέθους 29kDa, από τους βολβούς του φυτού *Charibdis maritima*.

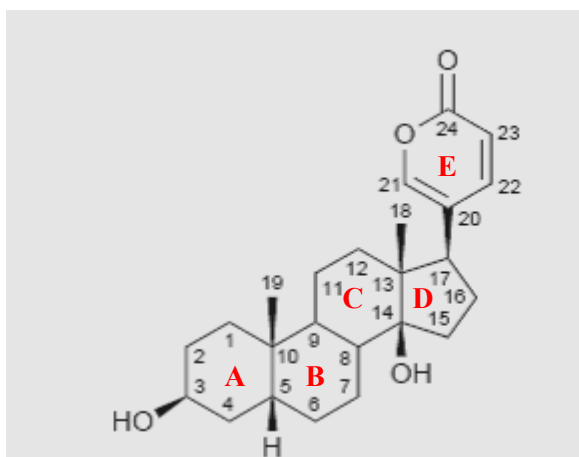


Εικόνα 9. Γενική δομή της χαρυβδίνης. Οι β-κλώνοι φαίνονται με μπλε και οι α-έλικες με κόκκινο. Τα δομικά στοιχεία διακρίνονται ως εξής: β-κλώνοι 1-10 και α-έλικες A-J. Το N- και το C-τερματικό της πρωτεΐνης διακρίνονται με N και C αντίστοιχα (Τουλουράκης *et al.*, 2006).

Η νέα αυτή πρωτεΐνη (χαρυβδίνη) απομονώθηκε σε καθαρή μορφή, σε μεγάλη ποσότητα, από τους βολβούς του φυτού, ενώ παράλληλα προσδιορίστηκε η ακολουθία DNA και η επαγόμενη ακολουθία των αμινοξέων, η οποία αποκάλυψε την ύπαρξη μιας σημαντικής ομολογίας με τις **πρωτεΐνες RIP**.

155. 5 α -4,5-Dihydro-12 α -hydroxyscillirosidin 3- <i>O</i> - α -L-thevetoside	156. Scillarenin 3- <i>O</i> -[α -D-glucosyl-(1)3]- α -D-glucosyl-(1)4]- α -L-2,3-di- <i>O</i> -acetylramnoside	157. 5 α -4,5-Dihydro-16 α -hydroxyscillirosidin 3- <i>O</i> - α -L-thevetoside	
158. 5 α -4,5-Dihydro-12 α -hydroxyscillirosidin 3- <i>O</i> - α -L-thevetoside	159. Scillarenin 3- <i>O</i> -[α -D-glucosyl-(1)3]- α -D-glucosyl-(1)4]- α -L-2,3-di- <i>O</i> -acetylramnoside	160. Glucoscilliroside	161. 16 α -Hydroxyscillarenin 3- <i>O</i> - α -D-glucoside

Το ιδιαίτερο δομικό χαρακτηριστικό στο στεροειδή σκελετό των βουφαδιενολιδών είναι ένας διπλά ακόρεστος εξαμελής δακτύλιος λακτόνης (α -πυρόνη) στη θέση 17β.



Εικόνα 13. Δομή και αρίθμηση του άγλυκου τμήματος (γενίνη) των βουφαδιενολιδών.

Επιπρόσθετα, οι ουσίες αυτές χαρακτηρίζονται από μία *trans*-σύζευξη των δακτυλίων Β και Γ του στεροειδούς σκελετού και συνήθως από μία *cis*-σύζευξη των δακτυλίων Γ και Δ.

Η ουσίες Physodine C και D από το φυτό *Urginea physodes* είναι οι πρώτες φυσικές βουφαδιενολίδες που ανακαλύφθηκαν με *trans* – σύζευξη μεταξύ των δακτυλίων Γ και Δ. Εκτός από τους διπλούς δεσμούς στον δακτύλιο της λακτόνης, οι βουφαδιενολίδες δύνανται να διαθέτουν διπλούς δεσμούς στις θέσεις 4-5 και σπανιότερα στις θέσεις 3-4 και 6-7 του στεροειδούς σκελετού. Οι μόνες γνωστές

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΑΠΟΜΟΝΩΣΗΣ ΤΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ ΧΑΡΥΒΔΙΝΗΣ

Επιλέγουμε βολβούς από φρεσκοκομμένες κρεμμύδες. Καθαρίζουμε προσεκτικά τα εξωτερικά μέρη και τεμαχίζουμε το εσωτερικό του βολβού σε μικρά κομμάτια. Περίπου 500g βολβού λευκής *Charybdis maritima*, ομογενοποιήθηκαν με 1.5L διαλύματος αλέσεως το οποίο περιείχε 60mM φωσφορικό νάτριο pH=7,2, 100mM χλωριούχο νάτριο, 5mM EDTA, 5mM DTT, 1mM PMSF και 1,5%w/v PVP. Το εκχύλισμα φιλτραρίστηκε περνώντας από τετραπλό φύλλο γάζας έτσι ώστε να απομακρυνθούν τα άσπαστα κύτταρα και τμήματα του φυτού. Έπειτα το φιλτραρισμένο εκχύλισμα φυγοκεντρήθηκε στα 20000g για 30 λεπτά.

Το υπερκείμενο διάλυμα υποβλήθηκε σε διαδοχικές φυγοκεντρήσεις στα 34000g για 30 λεπτά, στους 4°C, έως ότου λάβουμε διαυγές υπερκείμενο διάλυμα.

Το υπερκείμενο της φυγοκέντρωσης, μετά από διήθηση σε απλό χάρτινο ηθμό, υποβλήθηκε σε διαδικασία πρωτεϊνικής καταβύθισης με την βοήθεια θειικού αμμωνίου. Συγκεκριμένα, στο διαυγές διάλυμα που λήφθηκε από τη διαδικασία των διαδοχικών φυγοκεντρήσεων προστίθεται σταδιακά στερεό θειικό αμμώνιο, ενώ το διάλυμα βρίσκεται υπό συνεχή ανάδευση σε μηχανικό αναδευτήρα. Η τελική συγκέντρωση του θειικού αμμωνίου στο διάλυμα είναι 60% κ.β. Το διάλυμα αφήνεται υπό ανάδευση στους 4 °C για 24 ώρες. Έπειτα, υποβάλλεται σε νέα φυγοκέντρωση, στα 20000g, ώστε να συλλεχθεί στα τοιχώματα των σωλήνων φυγοκέντρωσης η καταβυθισμένη πρωτεΐνη. Η άμορφη πρωτεϊνική μάζα που λαμβάνεται ξεπλένεται προσεκτικά με ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικού νατρίου συγκέντρωσης 60mM και pH=7,2, ώστε να απομακρυνθούν υπολείμματα θειικού αμμωνίου και τυχούσες ανεπιθύμητες προσμίξεις.

Η άμορφη πρωτεϊνική μάζα εμβαπτίζεται σε μία σειρά υδατικών διαλυμάτων, γνωστών οργανικών διαλυτών και αφήνεται υπό ανάδευση για 24 ώρες, με στόχο την εκχύλιση των ουσιών που δεσμεύονται με την πρωτεΐνη κατά τη διαδικασία απομόνωσής της.

Δοκιμάστηκε εκχύλιση σε :

- Αιθανόλη (80% κ.ο. και καθαρή)
- Μεθανόλη « «
- Ακετόνη « «
- Χλωροφόρμιο

2. ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑ ΥΠΕΡΙΩΔΟΥΣ-ΟΡΑΤΟΥ (UV-Vis)

Το εκχύλισμα του εκάστοτε διαλύτη διηθείται με τη βοήθεια χάρτινου ηθμού και λαμβάνεται το UV-Vis φάσμα απορρόφησης του στη φασματική περιοχή 200-500 nm. Παρατηρούμε σημαντική απορρόφηση τόσο στο αιθανολικό όσο και στο μεθανολικό διάλυμα στην φασματική περιοχή 296-300 nm. Γνωρίζοντας ότι στην περιοχή αυτή απορροφούν τα φυτικά στεροειδή **βουφαδιενολίδες (bufadienolides)** και με δεδομένη την ποσοτική παρουσία τους στον οργανισμό *Charybdis maritima* έχουμε μία πρώτη ένδειξη για τη φύση και τη χημική κατηγορία των ουσιών που δεσμεύονται κατά τη διαδικασία της απομόνωσης της πρωτεΐνης χαρυβδίνη (Toulourakis et al.).

Όλες οι μετρήσεις φασματοσκοπίας UV-Vis έγιναν σε φασματοφωτόμετρο ορατού-υπεριώδους SIM-AMINCO DW-2000.

3. ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑ ΥΠΕΡΥΘΡΟΥ (IR)

Το μεθανολικό και το αιθανολικό εκχύλισμα της χαρυβδίνης συμπυκνώθηκαν μέχρι ξηρού και χρησιμοποιώντας την τεχνική των δίσκων KBr, πραγματοποιήθηκε φασματοσκοπία IR στο στερεό υπόλειμμα των εκχυλισμάτων. Για τη λήψη των φασμάτων IR χρησιμοποιήθηκε φασματοφωτόμετρο Perkin Elmer 1760X.

4. ΕΚΧΥΛΙΣΗ ΟΥΣΙΩΝ ΠΟΥ ΠΡΟΣΑΡΤΩΝΤΑΙ ΣΤΗ ΧΑΡΥΒΔΙΝΗ

Επιλέγουμε το μεθανολικό εκχύλισμα των ουσιών για περαιτέρω εξέταση, αφού η μεθανόλη είναι ο κύριος διαλύτης εκχύλισης των βουφαδιενολιδών.

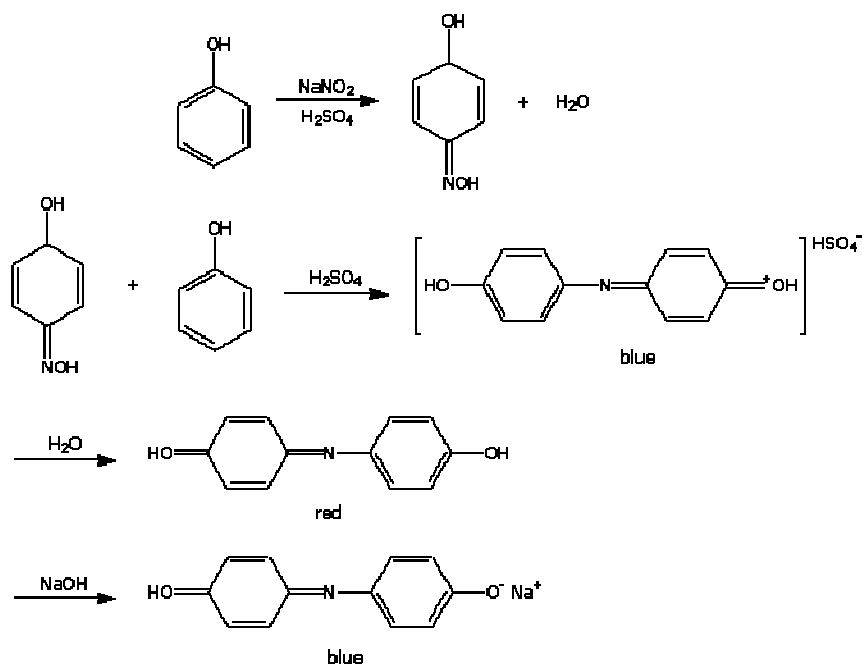
Επαναλαμβάνουμε τη διαδικασία απομόνωσης της χαρυβδίνης και αφού συλλέξουμε την καταβυθισμένη πρωτεΐνη την εμβαπτίζουμε σε υδατικό διάλυμα μεθανόλης και την υποβάλλουμε σε εκχύλιση reflux στους 40 °C για 24 ώρες. Έπειτα το μεθανολικό διάλυμα της πρωτεΐνης φυγοκεντρείται στα 20000g για 15 λεπτά και το υπερκείμενο διάλυμα διηθείται με τη βοήθεια χάρτινου ηθμού. Το μεθανολικό διάλυμα που συλλέγεται, απαλλαγμένο πλέον από την πρωτεΐνη, περιέχει της προς εξέταση ουσίες.

5. ΧΡΩΜΑΤΙΚΟΙ ΕΛΕΓΧΟΙ ΓΙΑ ΤΗ ΧΗΜΙΚΗ ΣΥΣΤΑΣΗ ΤΟΥ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΟΣ

Λαμβάνουμε δείγμα από το μεθανολικό διάλυμα και πραγματοποιούμε **Molisch's test** για τον έλεγχο παρουσίας σακχάρων στο διάλυμα. Ο έλεγχος αυτός πραγματοποιείται παρουσία H_2SO_4 και αιθανολικού διαλύματος ναφθόλης. Το θειικό οξύ αφυδατώνει την πεντόζη σε φουρφουράλη και την εξόζη σε υδρόξυμέθυλ-φουρφουράλη, αλδεϋδικές ενώσεις, που όταν ενωθούν με τα μόρια της ναφθόλης, δίνουν ένα έγχρωμο, ιώδες προϊόν.

Πράγματι το τεστ δίνει θετικό αποτέλεσμα γεγονός που μαρτυρά την παρουσία γλυκοζιτών ή ελεύθερων σακχάρων στο μεθανολικό διάλυμα.

Παράλληλα, υποβάλλουμε το δείγμα από το μεθανολικό διάλυμα στο **test Liebermann's Nitroso**. Με τον έλεγχο αυτό ανιχνεύεται η παρουσία φαινολικών ενώσεων σε ένα άγνωστο μίγμα ουσιών. Ωστόσο, θετικό αποτέλεσμα στο test δίνει και ο α-πυρονικός δακτύλιος των βουφαδιενολιδών. Η αντίδραση Liebermann's Nitroso παρουσιάζεται διαγραμματικά στο παρακάτω σχήμα:



Αντίδραση Liebermann's Nitroso

Η δημιουργία στιβάδας κυανού χρώματος είναι δηλωτική της παρουσίας φαινολών–βουφαδιενολιδών στο υπό εξέταση δείγμα.

Πράγματι, το δείγμα από το μεθανολικό μίγμα των ουσιών έδωσε θετικό αποτέλεσμα στον παραπάνω έλεγχο, γεγονός που αποτελεί άλλη μία ισχυρή ένδειξη της παρουσίας βουφαδιενολιδών στο άγνωστο μεθανολικό διάλυμα.

6. ΥΓΡΗ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΣΤΗΛΗΣ (LC)

Στη συνέχεια, το μεθανολικό μίγμα των γλυκοζιτών συμπυκνώνεται και υποβάλλεται σε υγρή χρωματογραφία στήλης. Το υλικό πλήρωσης της στήλης είναι Si-gel 60 Merck και ως διαλύτης έκλουσης χρησιμοποιείται μίγμα διαλυτών CHCl_3 – MeOH – H_2O αυξανόμενης πολικότητας (από **90:3,5:0,2** έως **80:10:1**). Συλλέχθηκαν συνολικά 58 κλάσματα (30 ml το καθένα). Επιπλέον, κάθε κλάσμα συμπυκνώθηκε μέχρι ξήρασης και το στερεό υπόλειμμα κάθε κλάσματος αναδιαλύθηκε σε μεθανόλη. Λαμβάνουμε το φάσμα απορρόφησης κάθε κλάσματος στη φασματική περιοχή 200-400 nm.

7. ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΛΕΠΤΗΣ ΣΤΙΒΑΔΑΣ (TLC)

Στο κάθε κλάσμα από την υγρή χρωματογραφία στήλης πραγματοποιείται χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC) σε πλακίδια αλουμινίου επιστρωμένα με silica gel 60 F₂₅₄ (Merck 5554). Ως διαλύτες έκλουσης χρησιμοποιήθηκαν τρία συστήματα διαλυτών:

1. **EtOAc – MeOH – H₂O** (81:11:8) (Wagner *et al.*,1984)
2. **CHCl₃ – MeOH – H₂O** (70:22:3,5) (Kopp *et al.*,1996)
3. **MeCOEt – toluene- H₂O – MeOH – HOAc** (40:5:3:2,5:1)

(Görlisch, 1965)

Παράλληλα χρησιμοποιήθηκαν τρία μέσα εμφάνισης:

1. **Διάλυμα χλωριούχου αντιμονίου.**
2. **Αιθανολικό διάλυμα H₂SO₄ 50% κ.ο.**
3. **Διάλυμα ανισαλδεΐδης – H₂SO₄.**

Οι πλάκες του TLC θερμαίνονται μετά την εφαρμογή του μέσου εμφάνισης για 5 min στους 100 °C (ή με τη βοήθεια στεγνωτήρα) και η παρατήρηση των αποτελεσμάτων της χρωματογραφίας (spots) πραγματοποιείται στο ορατό και σε λάμπα UV 365 nm.

Παράλληλα, σε χρωματογραφία λεπτής στιβάδας υποβάλλεται και δείγμα (≈50μL) από το συνολικό μεθανολικό εκχύλισμα της χαρυβδίνης.

Για την απομόνωση των κλασμάτων που διαχωρίζονται με αυτόν τον τρόπο από το μεθανολικό μίγμα των ουσιών, πραγματοποιούμε *παρασκευαστική χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (PTLC)* σε γυάλινες πλάκες επιστρωμένες με silica gel 60 F₂₅₄, πάχους 2mm (Merck 5717). Τα κλάσματα που εμφανίζουν ενδιαφέρον απορρίπτονται με απόξεση της silica από το γυάλινο πλακίδιο και τα θρύμματα της silica, αφού κονιορτοποιηθούν, εμβαπτίζονται σε ένα μικρό όγκο μεθανόλης (1ml για κάθε κλάσμα) και αφήνονται υπό ανάδευση για 12h. Με αυτόν τον τρόπο επιτυγχάνεται η πλήρης εκχύλιση των ουσιών κάθε κλάσματος που είναι δεσμευμένες στη silica.

8. ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑ ΜΑΖΑΣ (ESI-MS)

Με βάση τα αποτελέσματα της φασματοσκοπίας UV, επιλέγουμε τα κλάσματα της υγρής χρωματογραφίας στήλης που εμφανίζουν ενδιαφέρον και πραγματοποιούμε φασματοσκοπία μάζας.

Παράλληλα, σε φασματοσκοπία μάζας υποβάλλουμε και το μεθανολικό εκχύλισμα των κλασμάτων που απομονώσαμε από την παρασκευαστική χρωματογραφία λεπτής στιβάδας.

Ο φασματογράφος μάζας που χρησιμοποιήθηκε ήταν ο *ThermoFinnigan LCQ Advantage* και ο ιονισμός των μορίων που εξετάστηκαν επετεύχθη μέσω της τεχνικής του ψεκασμού ηλεκτρονίων *ESI (Electron Spray Ionization)*.

9. ΥΓΡΗ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΥΨΗΛΗΣ ΑΠΟΔΟΣΗΣ (HPLC)

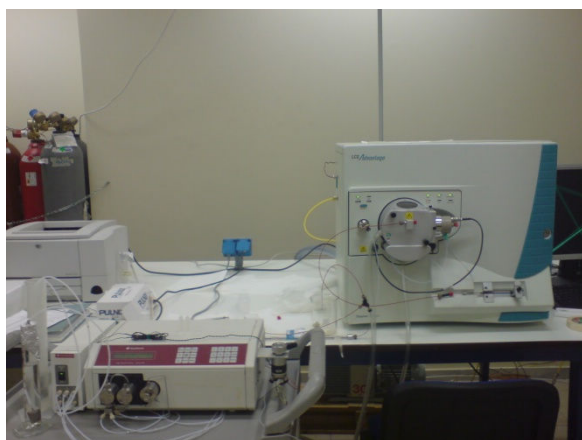
Η πιο αποδοτική μέθοδος για τον βέλτιστο διαχωρισμό των βουφαδιενολιδών μέσω χρωματογραφίας HPLC είναι η **υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης αντίθετης φάσης** (RP-HPLC). Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιείται, ως στήλη διαχωρισμού, μια Kromasil C₁₈ στήλη, διαστάσεων 250x4,0mm, και διάμετρο πόρων 5μm. Η στήλη συνδέεται με μία τετρακάναλη αντλία υψηλής ακρίβειας Gynkotek 480 και με ένα ανιχνευτή UV, Linear UVIS 200, που είναι ρυθμισμένος σε μήκος κύματος 299nm.

Η κινητή φάση της χρωματογραφίας αποτελείται από ακετονιτρίλιο (MeCN) και νερό που περιέχει 0,3% κ.ο. οξικό οξύ. Δοκιμάστηκαν τα εξής συστήματα έκλουσης:

1. **Ισοκρατική έκλουση** συστήματος **MeCN – H₂O (25:75 έως 40:60)** (Kopp *et al*).
2. **Έκλουση γραμμικής διαβάθμισης** (linear gradient) ακετονιτριλίου από **28%** έως **54%** για τα πρώτα 15 λεπτά και ισοκρατική έκλουση με σύστημα ακετονιτριλίου **54% για τα** επόμενα 15 λεπτά (Ye *et al*).

Ο ρυθμός ροής του εκάστοτε συστήματος έκλουσης ρυθμίστηκε στα 800μL/min.

10. ΣΥΝΔΥΑΣΤΙΚΗ ΥΓΡΗ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΥΨΗΛΗΣ ΑΠΟΔΟΣΗΣ ΜΕ ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑ ΜΑΖΑΣ (tandem HPLC-MS)



Εικόνα 14 Πειραματική διάταξη HPLC-MS

Η περαιτέρω ανάλυση και ταυτοποίηση των κλασμάτων που διαχωρίζονται μέσω της χρωματογραφίας HPLC, μπορεί να επιτευχθεί με τη σύνδεση της εξόδου της C₁₈ στήλης διαχωρισμού με την είσοδο του φασματογράφου μάζας.

Ως κινητή φάση της χρωματογραφίας επιλέγεται το ισοκρατικό σύστημα έκλουσης MeCN – H₂O (25:75). Ο ρυθμός ροής (flow rate) του συστήματος έκλουσης της RP-HPLC επιλέγεται στα 800μL/min, ενώ ο ρυθμός εισόδου των διαχωρισμένων ουσιών στο φασματογράφο μάζας καθορίζεται στα 200μL/min. Αυτό επιτυγχάνεται με ένα σύστημα διαχωρισμού της ροής (splitting) κατά την έξοδο του συστήματος έκλουσης από τη στήλη διαχωρισμού.

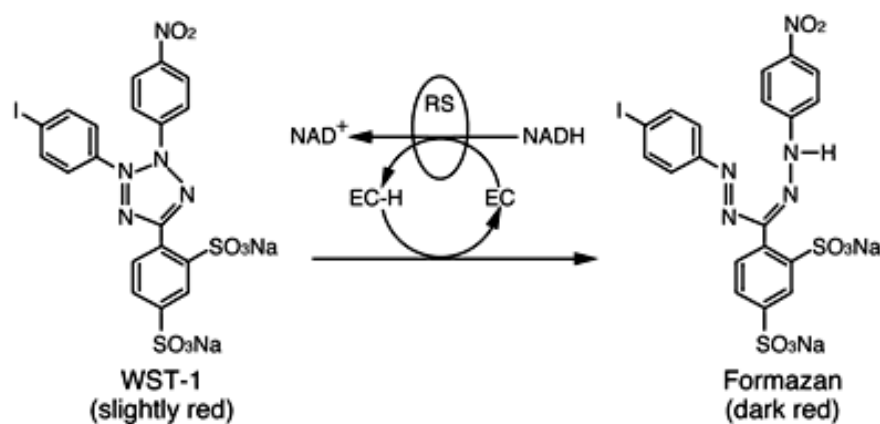
11. ΕΛΕΓΧΟΣ ΚΥΤΤΑΡΟΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑΣ ΤΟΥ ΜΕΘΑΝΟΛΙΚΟΥ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΟΣ ΤΗΣ ΧΑΡΥΒΔΙΝΗΣ

Η κυτταροτοξική δράση των βουφαδιενολιδών είναι ευρέως γνωστή (Kamano *et al*). Στόχος μας είναι να ελέγξουμε την κυτταροτοξική και κατ' επέκταση αντικαρκινική δράση του μεθανολικού μίγματος των βουφαδιενολιδών, που απομονώνεται από την πρωτεΐνη χαρυβδίνη. Για το σκοπό αυτό εφαρμόζουμε διάφορες συγκεντρώσεις από το μεθανολικό εκχύλισμα σε καλλιέργεια καρκινικών κυτταρικών σειρών *HeLa*. Ο υπολογισμός της συγκέντρωσης των βουφαδιενολιδών στο μεθανολικό εκχύλισμα γίνεται με τη βοήθεια της απορρόφησης του μίγματος

στα 299nm και του συντελεστή απορρόφησης ($\epsilon=5000 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) των βουφαδιενολιδών, εφαρμόζοντας τον τύπο $C=A/(\epsilon*d)$.

Τα καρκινικά κύτταρα τοποθετούνται σε ένα 24χωρο πιάτο καλλιέργειας κυττάρων (**24-well microtiter plate**) και αφήνονται να αναπτυχθούν για 24 ώρες, μέχρι να δημιουργηθεί ένας ευκρινώς σχηματισμένος κυτταρικός τάπητας σε κάθε «πηγαδάκι» του πιάτου καλλιέργειας. Στο κάθε «πηγαδάκι» έχουν τοποθετηθεί περίπου $2,5*10^4$ καρκινικά επιθηλιακά κύτταρα HeLa. Η επώαση γίνεται σε ειδικό θάλαμο κυτταρικών καλλιέργειών, ελεγχόμενης ροής αερίων (incubator), στους 37°C και 5% CO₂.

Στη συνέχεια, εφαρμόζουμε σε κάθε «πηγαδάκι» διαφορετικές συγκεντρώσεις βουφαδιενολιδών (3 «πηγαδάκια» για κάθε συγκέντρωση), από το μεθανολικό εκχύλισμα και αφήνουμε τα κύτταρα για επώαση για 72 ώρες στις ίδιες συνθήκες με προηγούμενα. Ο ρυθμός επιβίωσης των κυττάρων υπολογίζεται με τη χρωματομετρική **μέθοδο MTT**. Η μέθοδος MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] βασίζεται στη ενζυμική διάσπαση του κίτρινου άλατος του τετραζολίου και στον επαγόμενο σχηματισμό αδιάλυτων στο νερό κυανών κρυτάλλων φορμαζανίου.

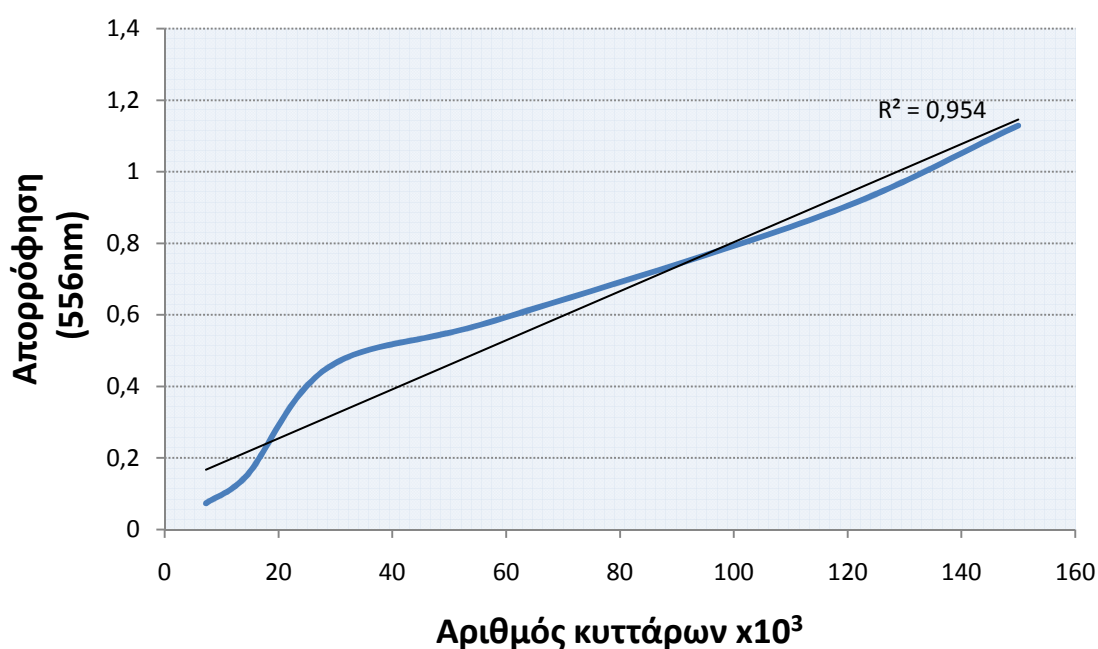


Εικόνα 15

ενζυμική διάσπαση του MTT

(EC = electron coupling reagent, RS = mitochondrial succinate-tetrazolium-reductase system)

Αυτή η διάσπαση λαμβάνει χώρα μόνο σε ζωντανά κύτταρα, καθώς υποκινείται από το μιτοχονδριακό ένζυμο **αφυδρογονάση του σουκινικού οξέος** (Mosmann, 1983). Οι υδατικά αδιάλυτοι κρύσταλλοι του φορμαζανίου διαλυτοποιούνται σε κατάλληλο οργανικό διαλύτη (DMSO) και οι τιμές της οπτικής απορρόφησης (σε μήκος κύματος 556nm) των διαλυμένων κρυστάλλων, μπορούν άμεσα να συσχετιστούν με τον αριθμό των μεταβολικά ενεργών κυττάρων (ζωντανών) της καλλιέργειας. Έτσι, κατασκευάζουμε μία πρότυπη καμπύλη, με τη βοήθεια της οποίας θα υπολογίσουμε τον αριθμό των κυττάρων που επιζούν μετά την εφαρμογή, στις καλλιέργειες των καρκινικών κυττάρων, των ουσιών του εκχυλίσματος. Η πρότυπη αυτή καμπύλη απεικονίζεται παρακάτω:

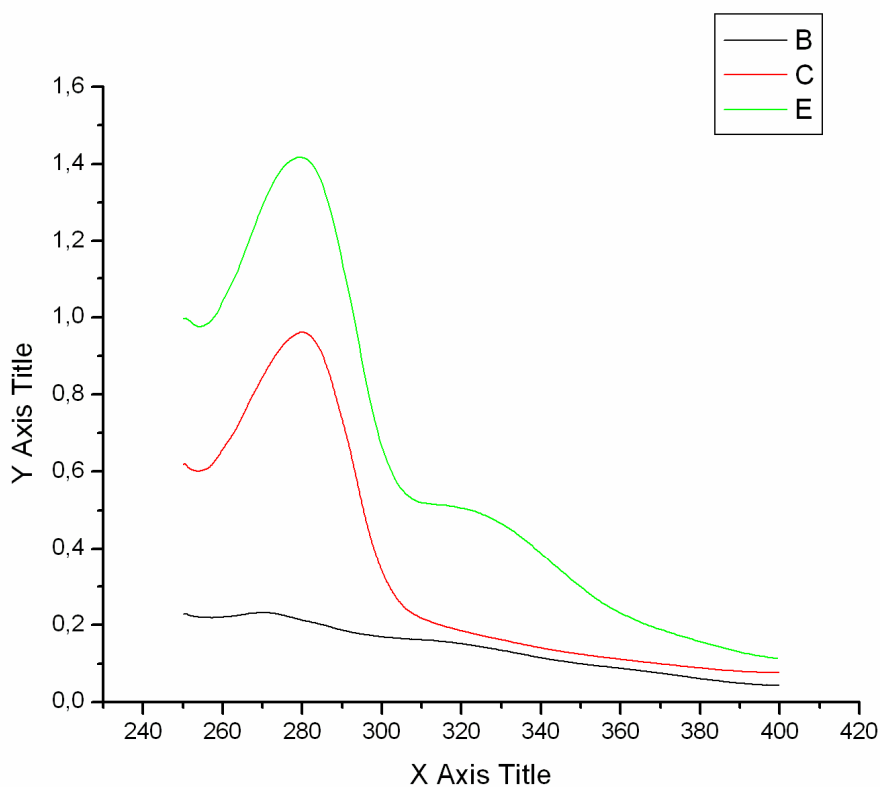


Η κυτταροτοξικότητα του μίγματος των βουφαδιενολιδών εκφράζεται με το συντελεστή **IC₅₀**, που αντιστοιχεί στη συγκέντρωση εκείνη των βουφαδιενολιδών του μίγματος που προκαλεί 50% μείωση του αριθμού των καρκινικών κυττάρων.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ

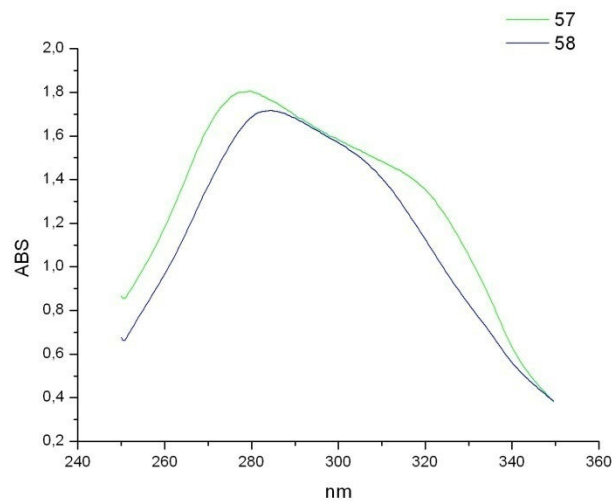
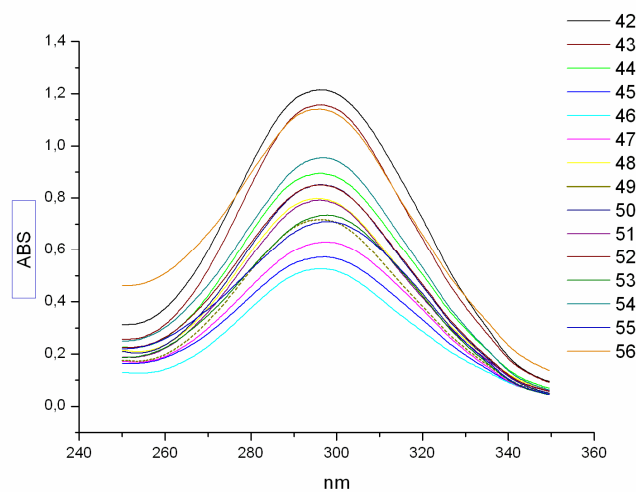
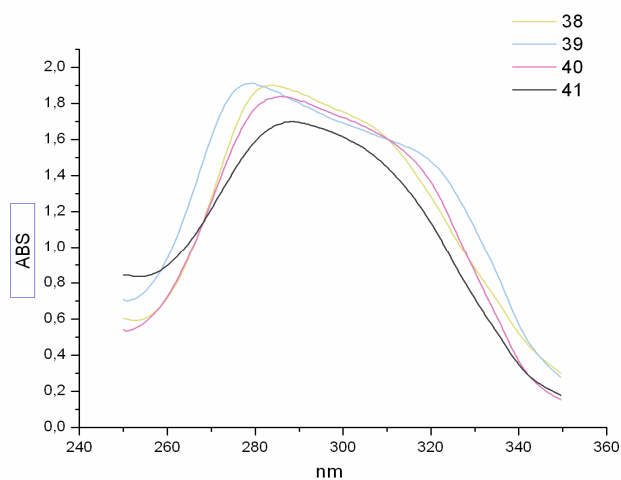
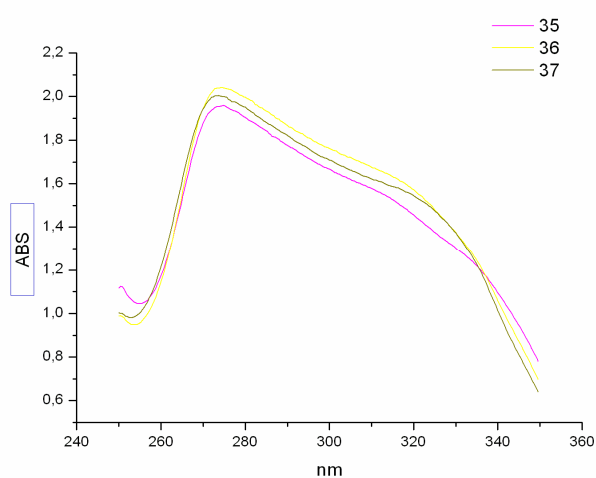
1. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑΣ ΥΠΕΡΙΩΔΟΥΣ (UV)

Στο παρακάτω διάγραμμα απεικονίζεται το φάσμα απορρόφησης (E) της πρωτεΐνης χαρυβδίνη όπως αυτή απομονώνεται από το φυτό *Charybdis maritima* με τη μέθοδο που περιγράφηκε. Παρατηρούμε ότι εκτός από τη χαρακτηριστική κορυφή των πρωτεϊνών στην περιοχή των 280nm, εμφανίζεται και μία επιπλέον κορυφή στη φασματική περιοχή των 300-320 nm, που αποδίδεται στην απορρόφηση των ουσιών που συναπομονώνονται με την πρωτεΐνη. Επίσης, στο ίδιο διάγραμμα δεικνύεται το φάσμα απορρόφησης της πρωτεΐνης (C) μετά την υποβολή της στη διαδικασία της μοριακής διαπίδωσης, χρησιμοποιώντας ως διαλύτη διάλυμα μεθανόλης 80%(B).



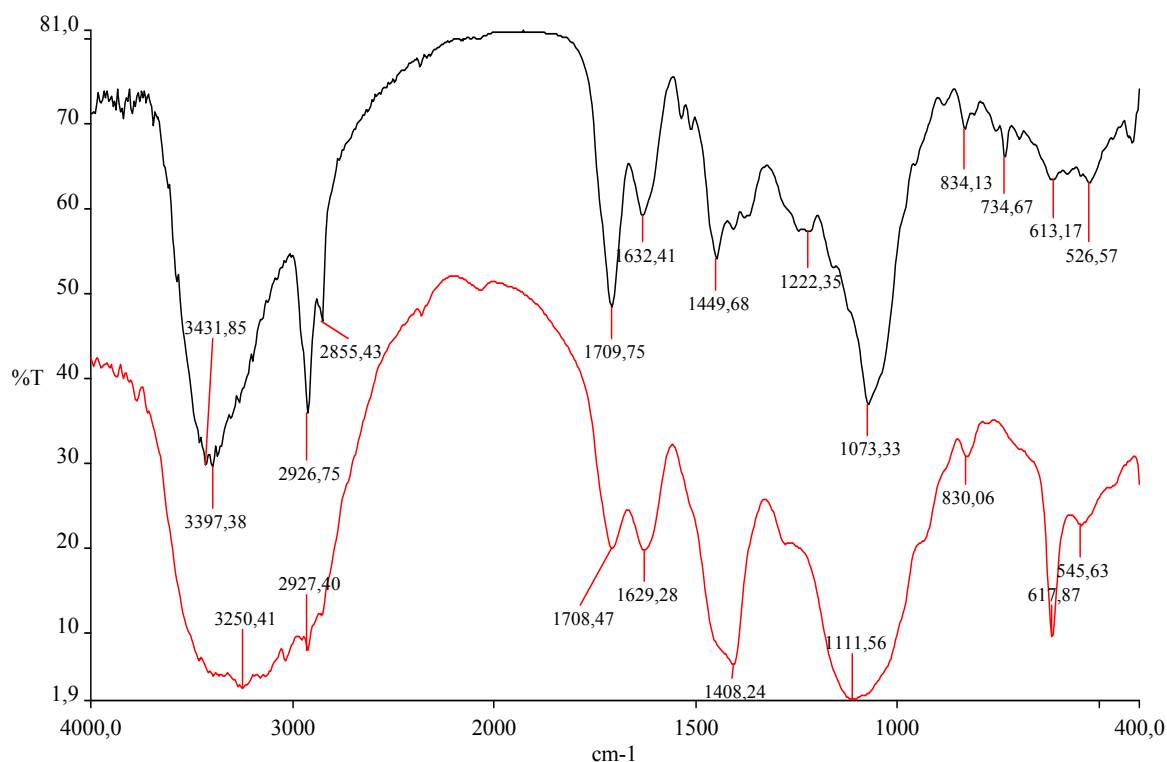
2. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΥΓΡΗΣ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑΣ ΣΤΗΛΗΣ (LC)

Από την υγρή χρωματογραφία των ουσιών που απομονώθηκαν από την πρωτεΐνη συλλέχθηκαν συνολικά 56 κλάσματα. Τα κλάσματα αυτά συμπυκνώθηκαν μέχρι ξηρού και το περιεχόμενό τους αναδιαλύθηκε σε μεθανόλη. Παρακάτω παρατίθενται τα φάσματα απορρόφησης των κλασμάτων εκείνων που εμφανίζουν απορρόφηση στη φασματική περιοχή των 300nm (κλάσματα 30-56) ταξινομημένα σε 4 ομάδες σύμφωνα με την ομοιότητα που παρουσιάζουν στη μορφή τους.



3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑΣ ΥΠΕΡΎΘΡΟΥ (IR)

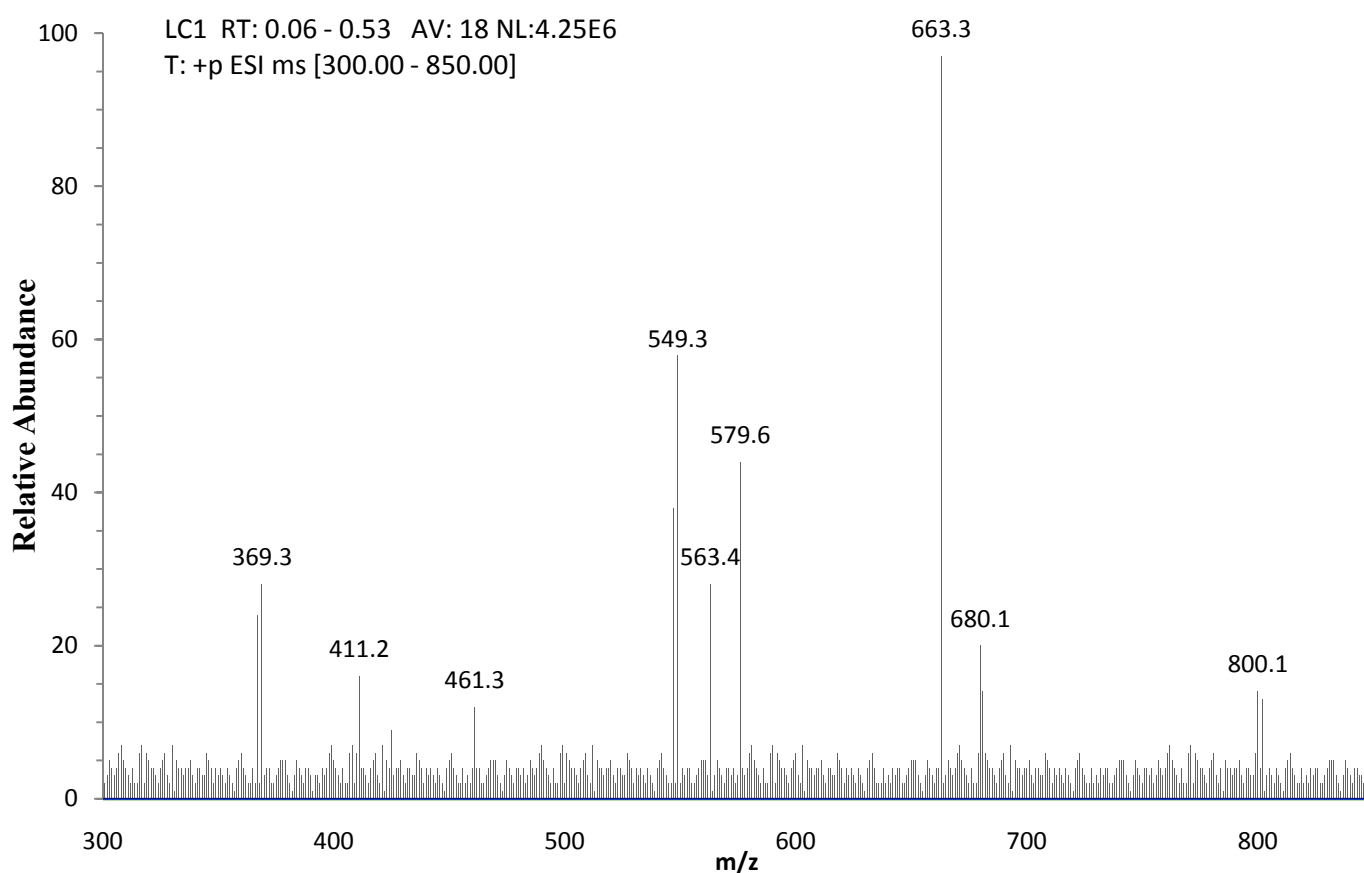
Το στερεό υπόλειμμα που προκύπτει από την ξήρανση του μεθανολικού (μαύρη γραμμή) και του αιθανολικού (κόκκινη γραμμή) εκχυλίσματος της πρωτεΐνης χαρυβδίνης εμφανίζει το παρακάτω φάσμα, όταν αυτό υποβάλλεται σε φασματοσκοπία IR:



Το φάσμα του στερεού υπολείμματος του μεθανολικού εκχυλίσματος εμφανίζει περισσότερο οξείες και ευκρινείς κορυφές, από το αντίστοιχο του αιθανολικού, με σημαντικότερες εκείνες στα **3431cm⁻¹** (έκταση δεσμού O-H υδροξυλομάδων που συμμετέχουν σε δεσμό υδρογόνου), στα **2926** και **2855cm⁻¹** (εκτάσεις δεσμών C-H αρωματικών και αλειφατικών ομάδων). **1708cm⁻¹** (έκταση δεσμού C=O), **1449** και **1247cm⁻¹** (κάμψη CH₂ και CH₃) και **1073cm⁻¹** (έκταση δεσμού C-O). Οι παραπάνω κορυφές βρίσκονται σε συμφωνία με της πρότυπο του φάσματος IR των περισσότερων βουφαδιενολιδών που έχουν μελετηθεί (Pohl *et al.*, 2001).

4. ΜΕΛΕΤΗ ΚΛΑΣΜΑΤΩΝ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑΣ ΜΕΣΩ ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑΣ ΜΑΖΑΣ (LC-MS)

Τα αποτελέσματα της φασματοσκοπίας μάζας για το «κλάσμα 36» που ανήκει στην πρώτη ομάδα φασμάτων (κλάσματα 35-37) παρουσιάζεται στο παραπάνω διάγραμμα:

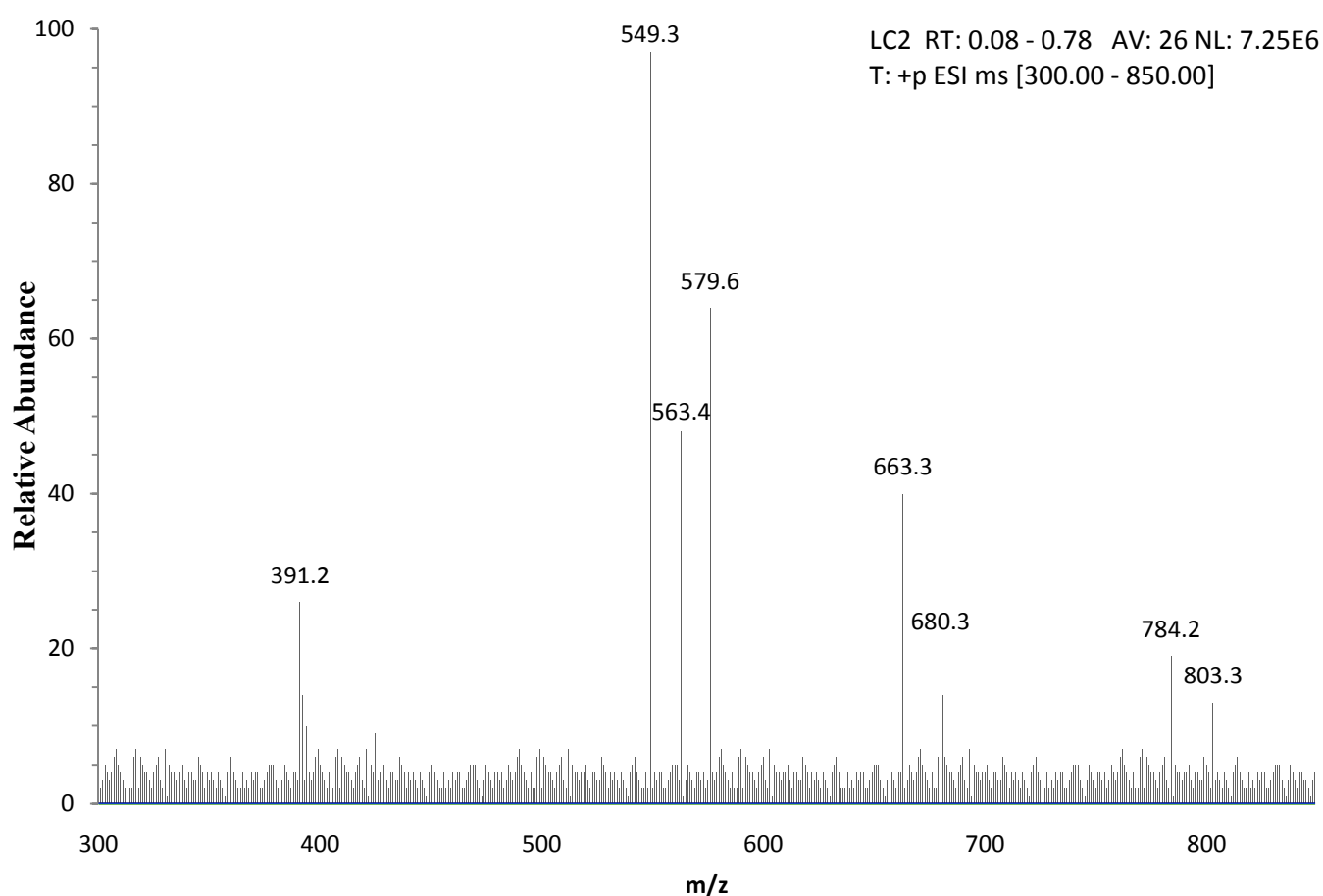


Τα ιόντα με μάζες **549**, **563** και **579** είναι αυτά με τη μεγαλύτερη σχετική αφθονία στο δείγμα. Το ιόν με μάζα **663**, αν και είναι το κυρίαρχο στο συγκεκριμένο κλάσμα, δεν εμφανίζει ταξινομικό ενδιαφέρον καθώς η παρουσία του, όπως θα δειχθεί και παρακάτω, είναι γενικευμένη σε όλα τα κλάσματα που εξετάστηκαν. Αποτελεί προϊόν επιμόλυνσης των δειγμάτων από τους διαλύτες που χρησιμοποιήθηκαν ή

από κάποια πρόσμιξη της silica κατά την περάτωση της υγρής χρωματογραφίας του μεθανολικού μίγματος των ουσιών.

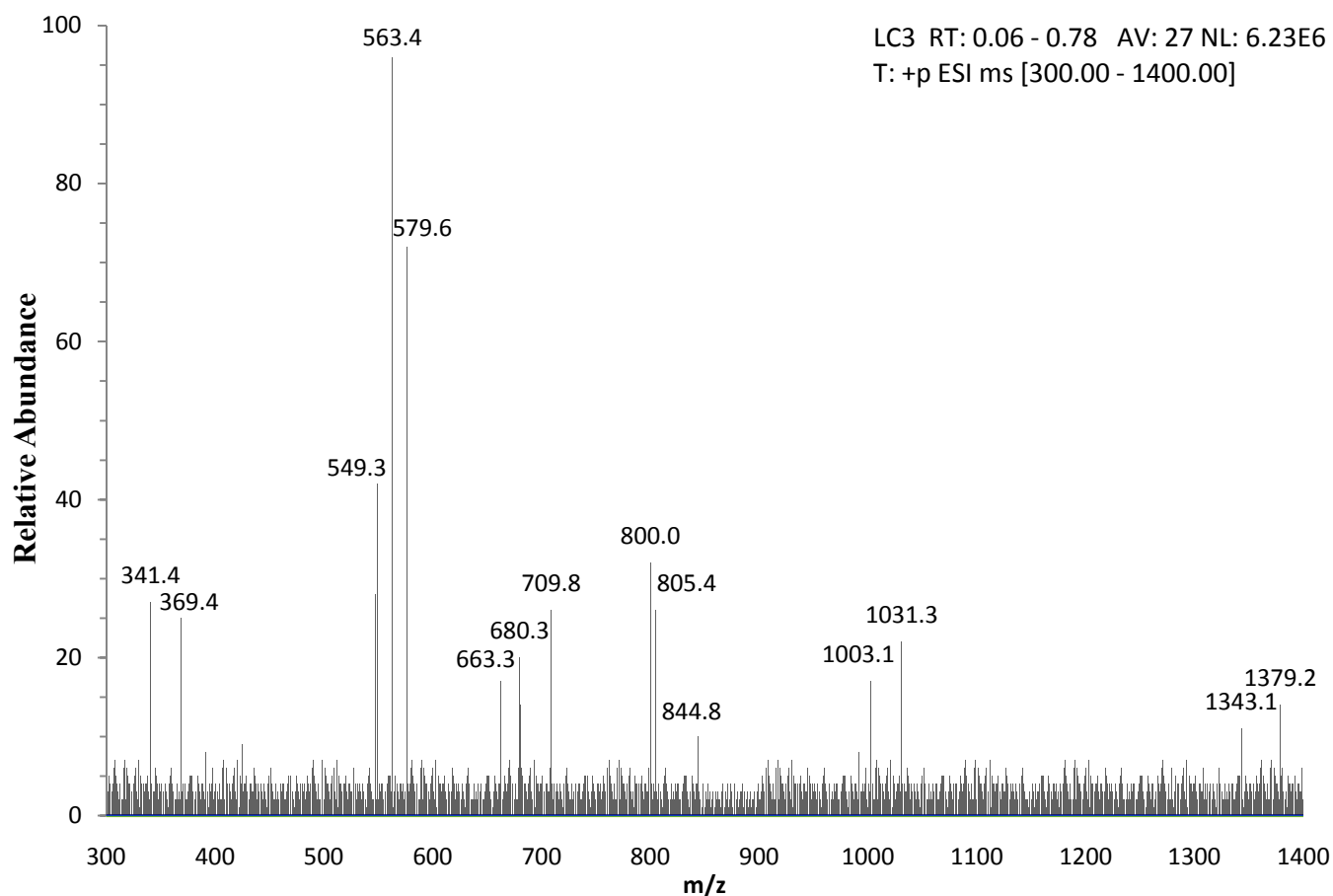
Οι ουσίες αυτές συνεπώς είναι οι κύριες υπεύθυνες για το φάσμα απορρόφησης της πρώτης ομάδας κλασμάτων.

Το «φάσμα μάζας» του «κλάσματος 40», που είναι αντιπροσωπευτικό της δεύτερης ομάδας φασμάτων απορρόφησης, παρουσιάζεται παρακάτω:



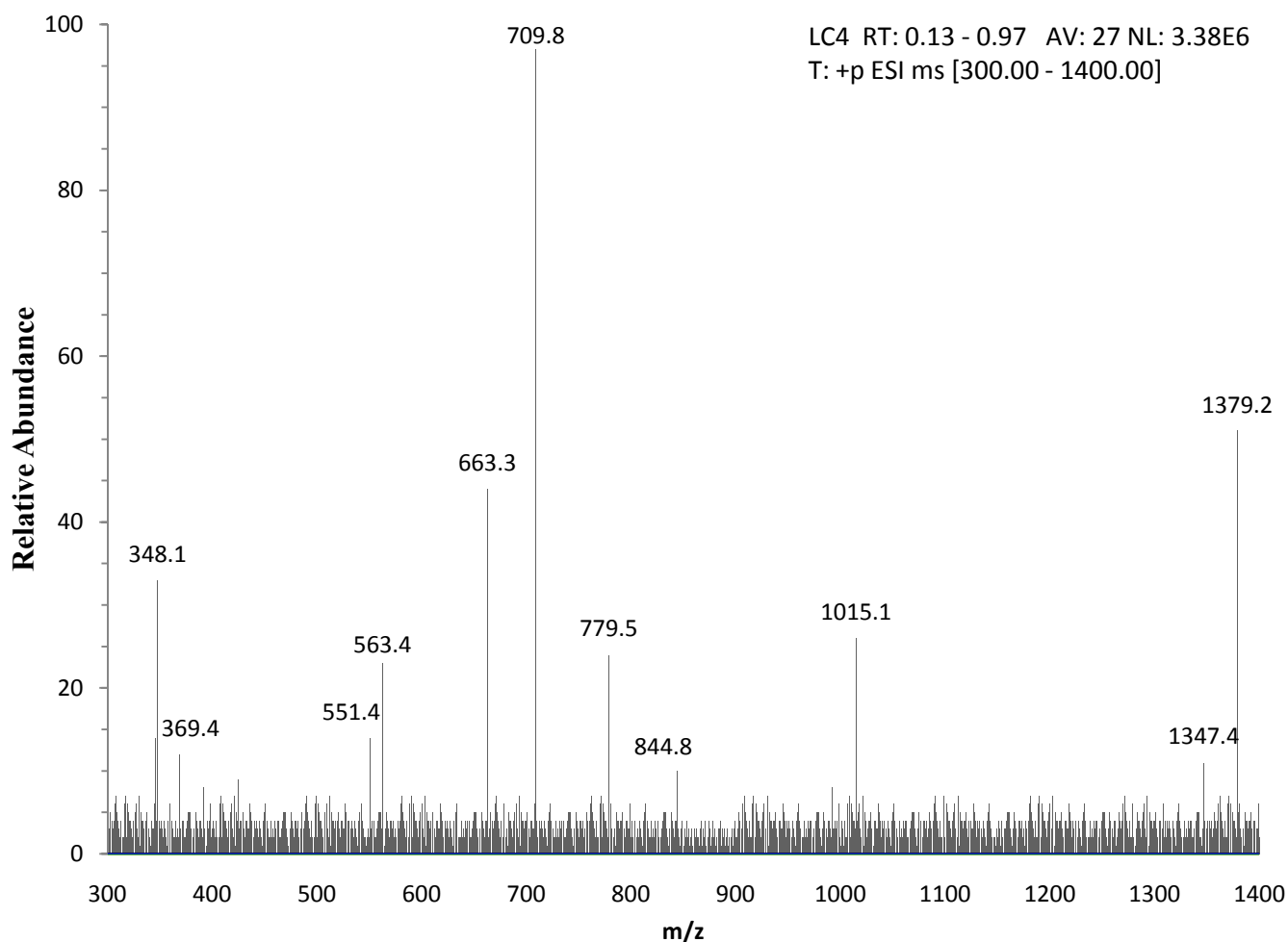
Η σχετική αφθονία των ιόντων με μάζες **549**, **563**, **579** είναι αισθητά αυξημένη, με το ιόν με μάζα 549 να είναι πλέον το επικρατές στο συγκεκριμένο κλάσμα. Η αύξηση στην αφθονία των παρακάτω ιόντων έχει σαν αποτέλεσμα και την αλλαγή στη μορφή του φάσματος απορρόφησης, με την ευρεία κορυφή στη φασματική περιοχή των 280 – 320 nm να τείνει να κανονικοποιηθεί σε μία διακριτή και οξύτερη κορυφή με μικρότερο φασματικό εύρος.

Στη συνέχεια, ακολουθεί το «φάσμα μάζας» του «κλάσματος 42» που ανήκει στην τρίτη κατηγορία φασμάτων απορρόφησης:



Τα ιόντα με μάζες **549**, **563**, **579** είναι και πάλι τα επικρατή ιόντα στο δείγμα, με το ιόν με μάζα **563** να είναι πλέον το κυρίαρχο. Παρατηρούμε πως μοριακά ιόντα με μεγαλύτερα μοριακά βάρη (850-14000) αρχίζουν και κάνουν την εμφάνισή τους, με χαρακτηριστικότερα τα ιόντα με μάζες **709** και **1379**. Το φάσμα απορρόφησης της τρίτης ομάδας κλασμάτων, που είναι και η πιο πολυπληθής εμφανίζει τη χαρακτηριστική μορφή του φάσματος απορρόφησης των βουφαδιενολιδών με μία οξεία κορυφή και μέγιστο απορρόφησης τα 299nm.

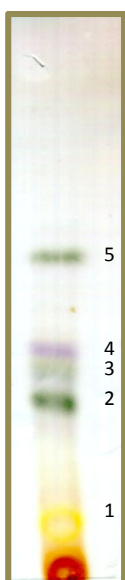
Στην τέταρτη ομάδα φασμάτων απορρόφησης ανήκει το «κλάσμα 58», το οποίο είναι και το τελευταίο κλάσμα που συλλέχθηκε από την υγρή χρωματογραφία στήλης. Το «φάσμα μάζας» του συγκεκριμένου κλάσματος παρατίθεται παρακάτω:



Το μοριακό ιόν με μάζα **709** είναι στο συγκεκριμένο κλάσμα το ιόν με τη μεγαλύτερη σχετική αφθονία, ενώ αυξημένη είναι και η σχετική αφθονία του ιόντος με μάζα **1379**. Η σχετική αφθονία του ιόντος με μάζα **563** έχει ελαττωθεί αισθητά, ενώ τα μοριακά ιόντα με μάζες **549** και **579**, που υπήρχαν σε όλα τα προηγούμενα εξεταζόμενα κλάσματα, πλέον δεν ανιχνεύονται.

5. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑΣ ΛΕΠΤΗΣ ΣΤΙΒΑΔΑΣ (TLC)

Ο καλύτερος διαχωρισμός των υπό εξέταση ουσιών του μεθανολικού εκχυλίσματος, που απομονώθηκε από τη χαρυβδίνη, κατά την χρωματογραφία λεπτής στιβάδας, πραγματοποιήθηκε με το σύστημα έκλουσης **EtOAc – MeOH – H₂O** σε αναλογία **81:11:8**. Μετά την εφαρμογή του μέσου εμφάνισης (διάλυμα ανισαλδεΰδης), που παρουσιάζει υψηλή σχετικά εκλεκτικότητα στη χρωματική εμφάνιση των βουφαδιενολιδών, αποκαλύφθηκαν ορισμένα σημεία, τόσο στην ορατή, όσο και στην υπεριώδη ακτινοβολία (365nm).



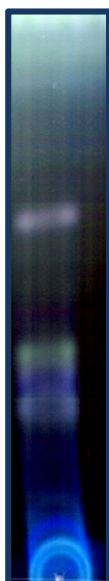
Εικόνα 16

Στην **εικόνα 16** παρουσιάζεται ένα χρωματογράφημα λεπτής στιβάδας του μίγματος των προς εξέταση ουσιών, μετά την εφαρμογή διαλύματος ανισαλδεΰδης, ως μέσο εμφάνισης. Στην **εικόνα 17** δεικνύεται το ίδιο χρωματογράφημα, όπως αυτό εμφανίζεται κάτω από λάμπα εκπομπής υπεριώδους ακτινοβολίας.

Επίσης παρουσιάζονται τα χρωματογραφήματα του συνόλου των βουφαδιενολιδών που απομονώνονται από τον οργανισμό *Charybdis maritima*, τόσο σε μεθανολικό (εικόνες 18 & 19), όσο και σε χλωροφορμικό (εικόνες 20 & 21)

εκχύλισμα, όπως αυτά εμφανίζονται υπό την εφαρμογή ορατής και υπεριώδους ακτινοβολίας.

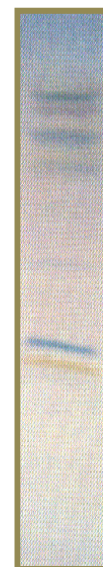
Από τη σύγκριση των χρωματογραφημάτων, είναι φανερή η ποιοτική διαφοροποίηση στη σύσταση του μεθανολικού εκχυλίσματος της χαρυβδίνης, σε σχέση με το ολικό εκχύλισμα της σκυλοκρεμμύδας. Τα πολυάριθμα σημεία (spots) στο χρωματογράφημα του ολικού εκχυλίσματος, που αντιστοιχούν σε διαφορετικά είδη βουφαδιενολιδών, έχουν περιοριστεί σε 4-5 διακριτά σημεία στο TLC του εκχυλίσματος της



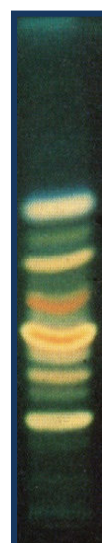
Εικόνα 17



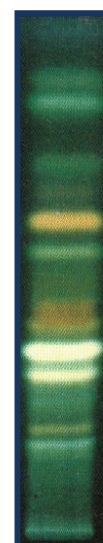
Εικόνα 18



Εικόνα 20



Εικόνα 19



Εικόνα 21

χαρυβδίνης. Υπολογίζοντας το hR_f για τα σημεία αυτά και συγκρίνοντάς τα με τα βιβλιογραφικά δεδομένα έχουμε μία σημαντική ένδειξη για το είδος των βουφαδιενολιδών που περιέχονται στο μεθανολικό εκχύλισμα της χαρυβδίνης.

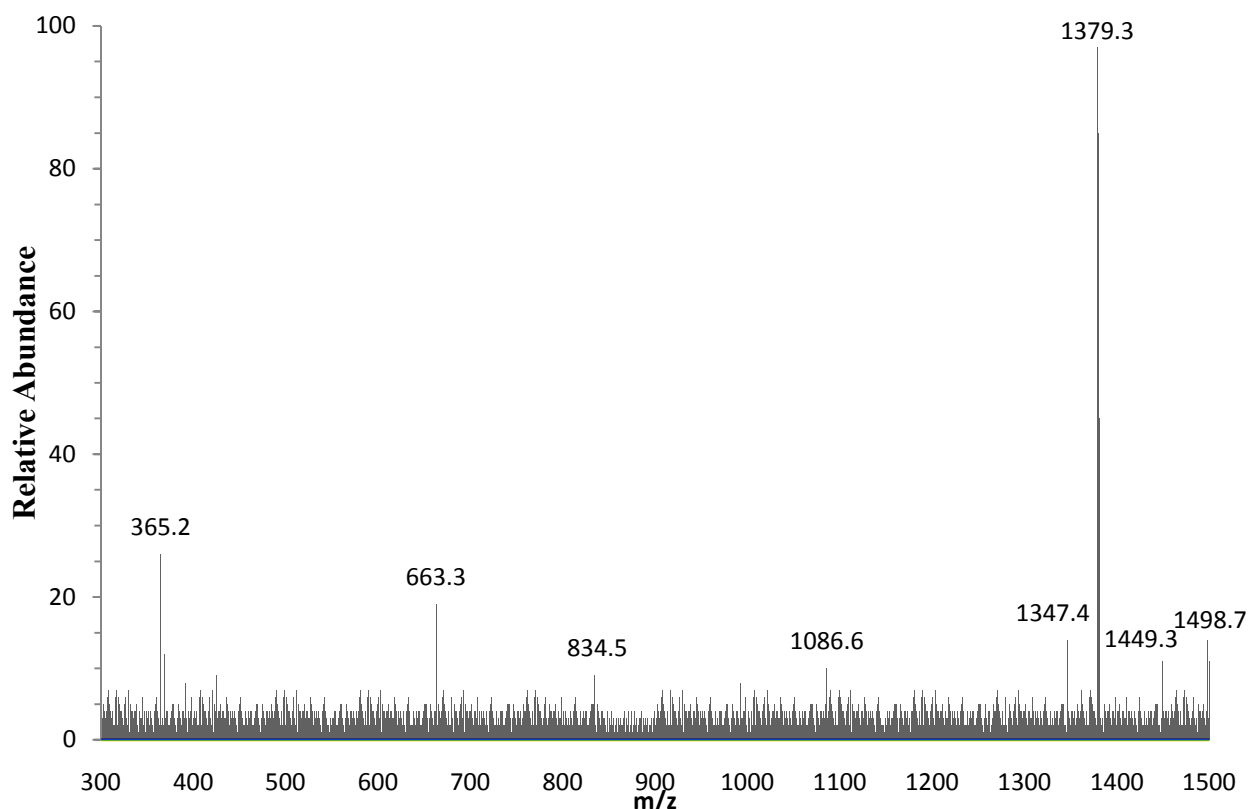
Έτσι λοιπόν, για τα πέντε σημεία που εντοπίζονται στο χρωματογράφημα οι τιμές των αντίστοιχων hR_f αναγράφονται στον ακόλουθο πίνακα:

Σημείο (spot)	hR_f
1	12
2	24
3	34
4	36
5	51

Για την περαιτέρω ανάλυση των συγκεκριμένων σημείων πραγματοποιούμε **παρασκευαστική χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (PTLC)**, με τις ίδιες παραμέτρους όπως προηγουμένως, χωρίς όμως να εφαρμόσουμε στο χρωματογράφημα κάποιο μέσο εμφάνισης. Απομονώνουμε τα 5 κλάσματα της χρωματογραφίας (spots) ξύνοντας τη silica και επανεκχυλίζουμε τις ουσίες, που είναι δεσμευμένες στα σημεία αυτά, χρησιμοποιώντας ως διαλύτη μεθανόλη. Ακολούθως, σε καθένα από τα 5 κλάσματα που απομονώσαμε πραγματοποιούμε φασματοσκοπία μάζας.

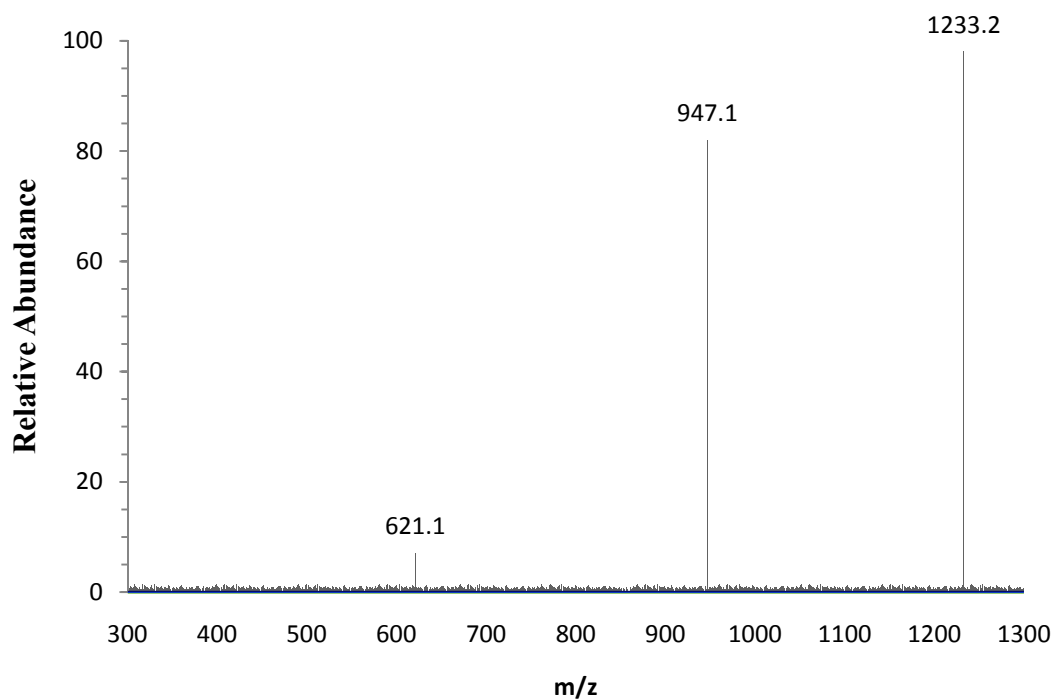
6. ΜΕΛΕΤΗ ΚΛΑΣΜΑΤΩΝ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑΣ ΛΕΠΤΗΣ ΣΤΙΒΑΔΑΣ ΜΕΣΩ ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑΣ ΜΑΖΑΣ (TLC-MS)

Παρακάτω παρατίθεται το «φάσμα μάζας» του πρώτου σημείου της χρωματογραφίας ($hR_f=12$):

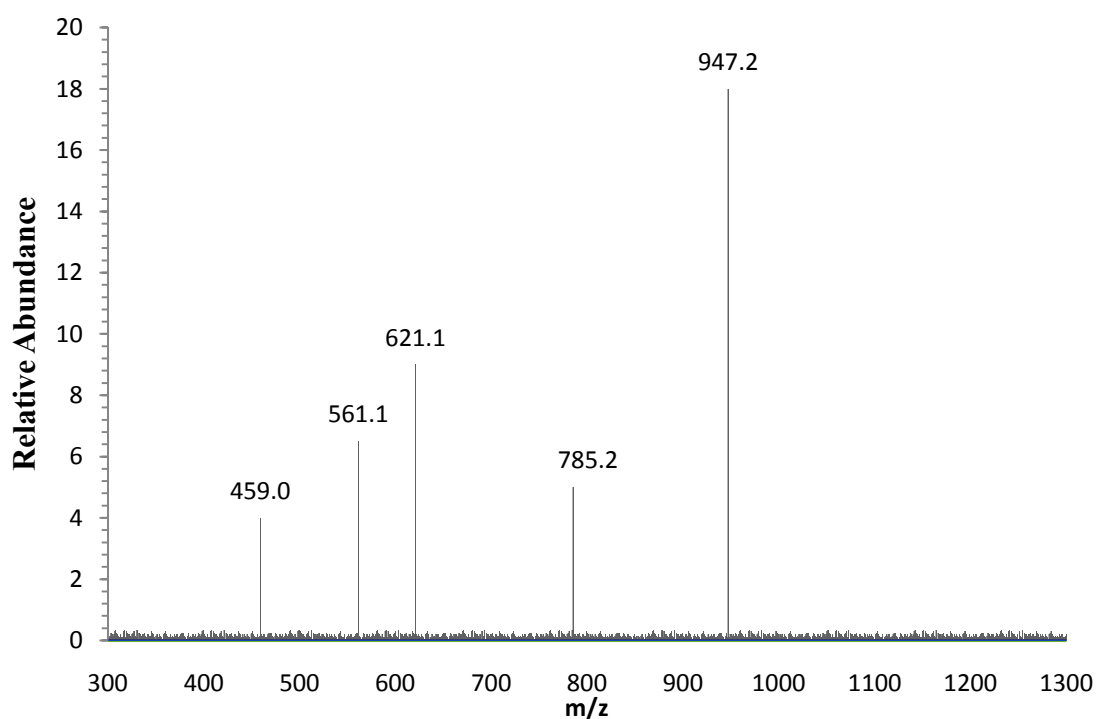


Το μοριακό ιόν $[MH]^+$ με την υψηλότερη σχετική αφθονία είναι το ιόν με μάζα **1379.3**. Το μοριακό βάρος των βουφαδιενολιδών που έχουν απομονωθεί από τον οργανισμό *Charybdis maritima* κυμαίνεται μεταξύ 380 – 900. Συνεπώς, ένα ιόν με μοριακό βάρος 1379 πιθανά να αντιστοιχεί σε κάποιο «συμπλοκοποιημένο» μόριο βουφαδιενολίδης. Για να διαπιστώσουμε τη φύση του μοριακού ιόντος με μάζα 1379 προβαίνουμε στην επιλεκτική θραυσματοποίηση του (MS^2). Από τη μάζα των θραυσμάτων που προκύπτουν μπορούμε να αντλήσουμε πληροφορίες για τη δομή και το είδος των χημικών ομάδων που απαρτίζουν το αρχικό μοριακό ιόν (parent ion).

Έτσι, το φάσμα μάζας των θραυσμάτων του ιόντος με μάζα 1379 παρατίθεται παρακάτω:



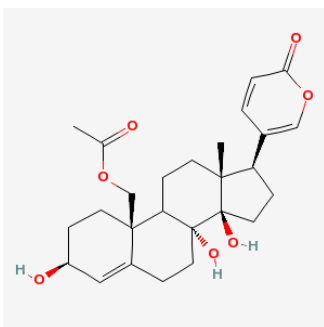
Τα προκύπτοντα θραύσματα με τη μεγαλύτερη σχετική αφθονία είναι τα ιόντα με μάζες **1233** $[MH-146]^+$ και **947** $[MH-432]^+$. Η επιμέρους θραυσματοποίηση (MS^3) του ιόντος με μάζα 947 δίνει το παρακάτω «φάσμα μάζας»:



Τα θραύσματα που προκύπτουν από το μοριακό ιόν $[MH]^+$ με μάζα 947 είναι τα ιόντα με μάζες 785 $[MH-162]^+$, , 621 $[MH-162-162]^+$, 561 $[MH-162-162-60]^+$, 459 $[MH-162-162-162]^+$.

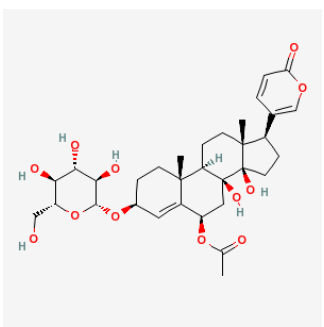
Το πρότυπο θραυσματοποίησης $[MH]^+-162$ δηλώνει την παρουσία στο άκρο του αρχικού ιόντος μίας εξόξης (στις βουφαδιενολίδες συνήθως γλυκόζη), ενώ η απώλεια **146** μονάδων από το $[MH]^+$ είναι χαρακτηριστική σε γλυκοζυλιωμένες ενώσεις που διαθέτουν στο άκρο τους μια δεοξυεξόζη (η ραμνόζη απαντάται στις βουφαδιενολίδες). Επίσης, η απώλεια **60** μονάδων μάζας είναι ένα σύνηθες πρότυπο θραυσματοποίησης για ουσίες που διαθέτουν στο μόριό τους μια ακετόξυ ομάδα ($-C(=O)O^-$).

Με βάση τα παραπάνω δεδομένα, μπορούμε να συμπεράνουμε ότι το μοριακό ιόν



Εικόνα 22 Scillirosidin (M.B. 458)

$[MH]^+$ με μοριακό βάρος 947 αντιστοιχεί στην τρις-γλυκοζυλιωμένη μορφή της βουφαδιενολίδης (γενίνη) **Scillirosidin**. Η ουσία αυτή, όπως και τα γλυκοζυλιωμένα παράγωγα της (π.χ. Scilliroside), έχουν απομονωθεί από διάφορες ποικιλίες του οργανισμού *Charybdis maritima*, γεγονός που καθιστά πιθανή την παρουσία τους στο μεθανολικό εκχύλισμα της χαρυβδίνης.



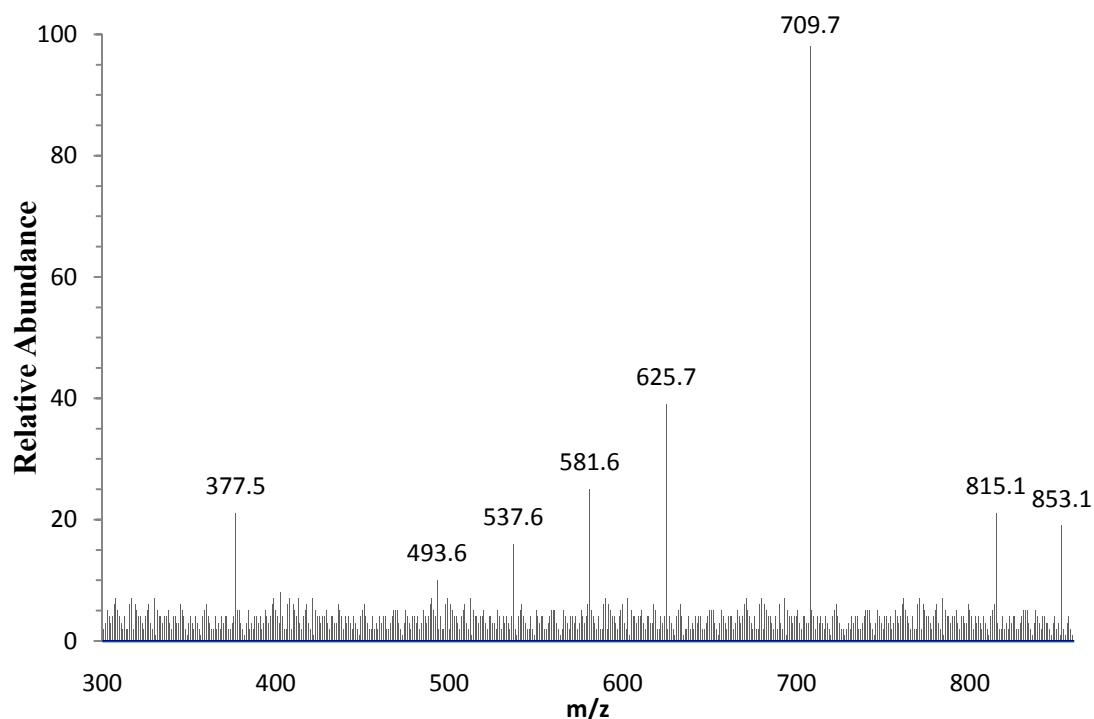
Εικόνα 23 Scilliroside (M.B. 620)

Το θραύσμα του αρχικού μοριακού ιόντος $[MH]^+$ (1379), με μάζα 1233, προκύπτει με την απόσπαση ενός μορίου ραμνόζης, ενώ το θραύσμα με μάζα 947 πιθανά να προέρχεται από την απομάκρυνση μίας ακόμα γενίνης με **M.B. 432 (126-OH-deacetylscillirosidin)**. Είναι πιθανό το

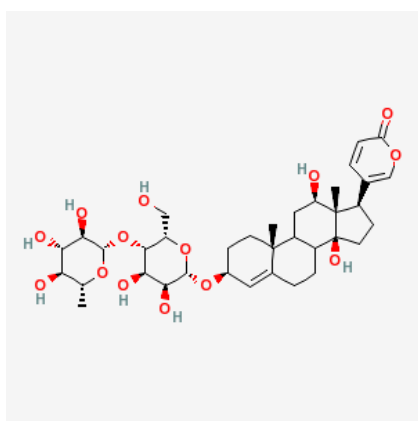
πυκνό μίγμα των γλυκοζιτών που βρίσκεται στην μεθανόλη να υφίσταται, στο διάστημα που φυλάσσεται, μία μορφή αποδόμησης ή χημικής αναδιαμόρφωσης των μορίων με προσδέσεις ή απώλειες σακχάρων από τα αρχικά μόρια. Έτσι, κάποια μόρια βουφαδιενολιδών δύνανται να δημιουργήσουν ασθενή σύμπλοκα με ελεύθερα σάκχαρα ή και με άλλες γενίνες. Τα σύμπλοκα αυτά παρουσιάζουν μικρή

κινητικότητα κατά την χρωματογραφία λεπτής στιβάδας. Μία τέτοια περίπτωση φαίνεται να είναι και το πρώτο σημείο της χρωματογραφίας ($hR_f=12$).

Το επόμενο κλάσμα της παρασκευαστικής χρωματογραφίας που απομονώσαμε, με $hR_f=24$, εμφανίζει το ακόλουθο «φάσμα μάζας»:



Όπως γίνεται αντιληπτό, στο συγκεκριμένο κλάσμα το επικρατές μοριακό ιόν $[MH]^+$ είναι το ιόν με μάζα **709**.

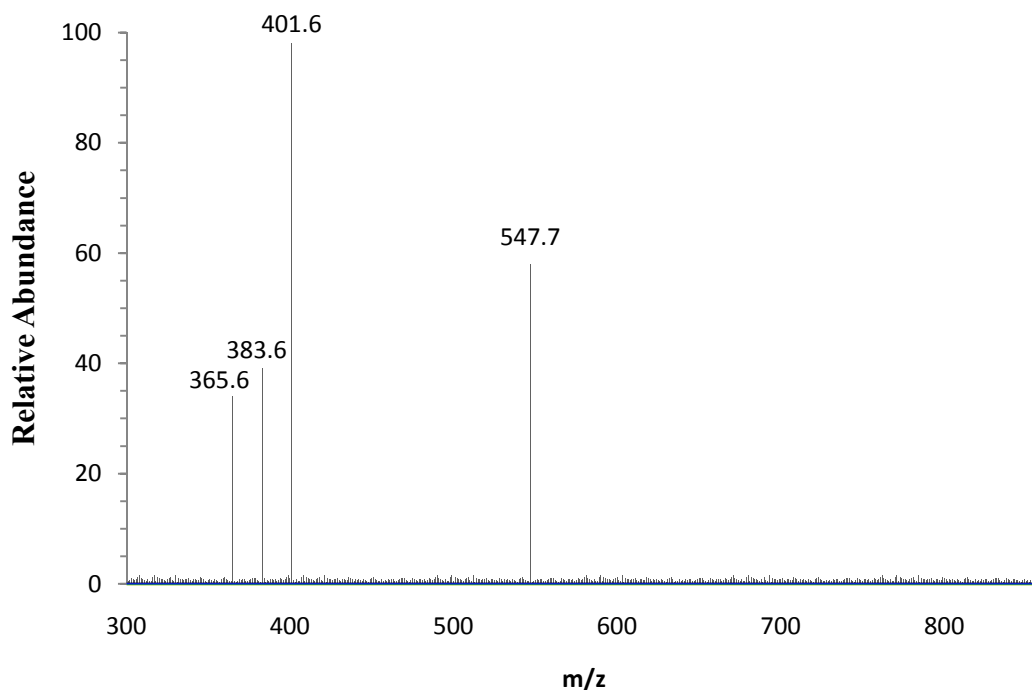


Εικόνα 24 *Glucoscillipheoside* (M.B.708)

Η βουφαδιενολίδη που αντιστοιχεί στο συγκεκριμένο μοριακό βάρος (708,79) και εμφανίζει παρόμοια κινητικότητα ($hR_f=24$), σε χρωματογραφία λεπτής στιβάδας με το ίδιο σύστημα έκλουσης, είναι ο διγλυκοζίτης ***Glucoscillipheoside***. Το άγλυκο τμήμα του μορίου περιλαμβάνει μία δις-υδροξυλιωμένη γενίνη η οποία συνδέεται στη θέση 3 με δύο μόρια

σακχάρων, μία ραμνόζη και μία γλυκόζη.

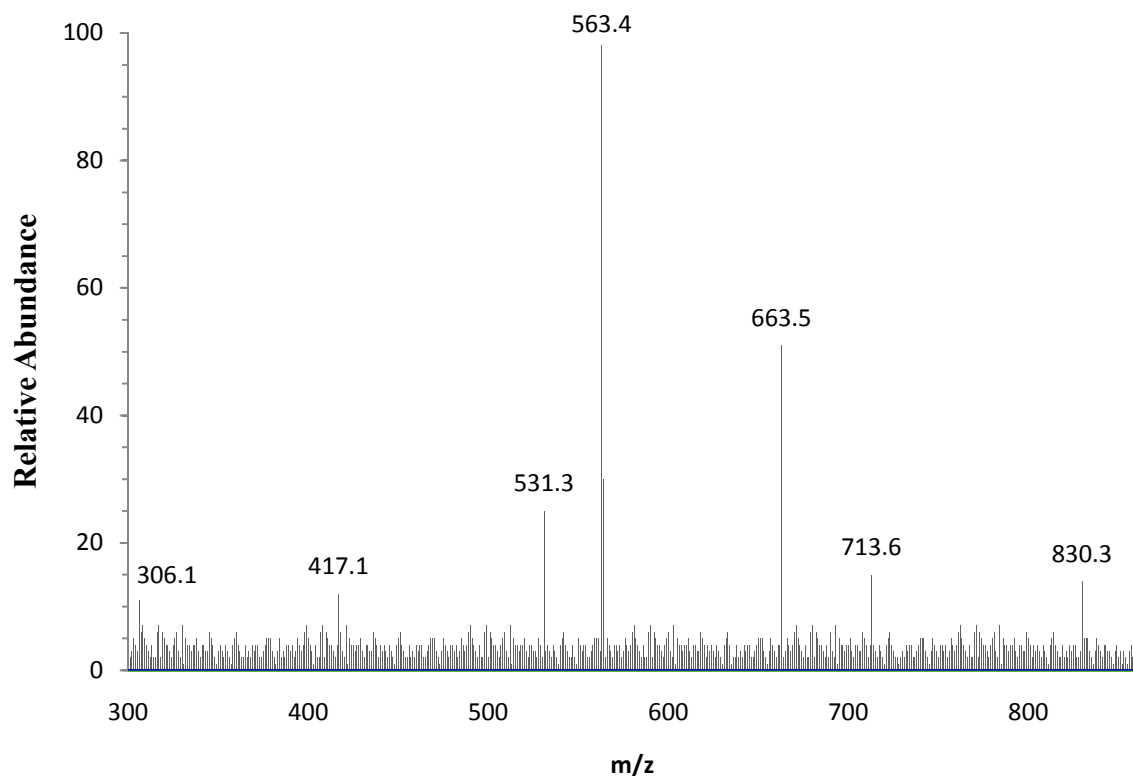
Για να μπορέσουμε να διαπιστώσουμε αν το ιόν με μάζα 709, που απομονώσαμε από την PTLC, διαθέτει τις δομικές ιδιαιτερότητες της *Glucoscillipheoside*, προβαίνουμε στην επιλεκτική θραυσματοποίηση του (MS^2). Το φάσμα μάζας των θραυσμάτων του ιόντος με μάζα 709 παρατίθεται παρακάτω:



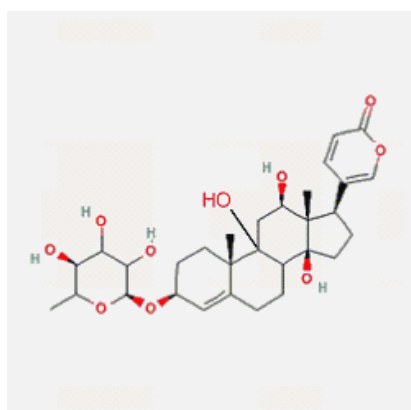
Τα θραύσματα που προκύπτουν είναι τα μοριακά ιόντα με μάζες **547** $[MH-162]^+$, **401** $[MH-162-146]^+$, **383** $[MH-162-146-18]^+$ και **365** $[MH-162-146-18-18]^+$. Από το πρότυπο θραυσματοποίησης συμπεραίνουμε πως το ιόν με μάζα 709 αντιστοιχεί σε ένωση που διαθέτει δύο μόρια σακχάρων και συγκεκριμένα ένα ακραίο μόριο γλυκόζης και ένα μόριο ραμνόζης, ενώ παράλληλα η ένωση διαθέτει δύο υδροξυλομάδες (-OH) στον κεντρικό σκελετό της.

Συνεπώς, από το φάσμα MS^2 του μοριακού ιόντος με την μεγαλύτερη σχετική αφθονία ($[MH]^+=709$), στο δεύτερο κλάσμα του PTLC, διαπιστώνονται όλα τα δομικά χαρακτηριστικά της βουφαδιενολίδης *Glucoscillipheoside*, επιβεβαιώνοντας έτσι την παρουσία της στο μεθανολικό εκχύλισμα της πρωτεΐνης χαρυβδίνης.

Στη συνέχεια παρατίθεται το «φάσμα μάζας» του τρίτου κατά σειρά σημείου ($hR_f \approx 34$) που απομονώθηκε από την παρασκευαστική χρωματογραφία λεπτής στιβάδας:



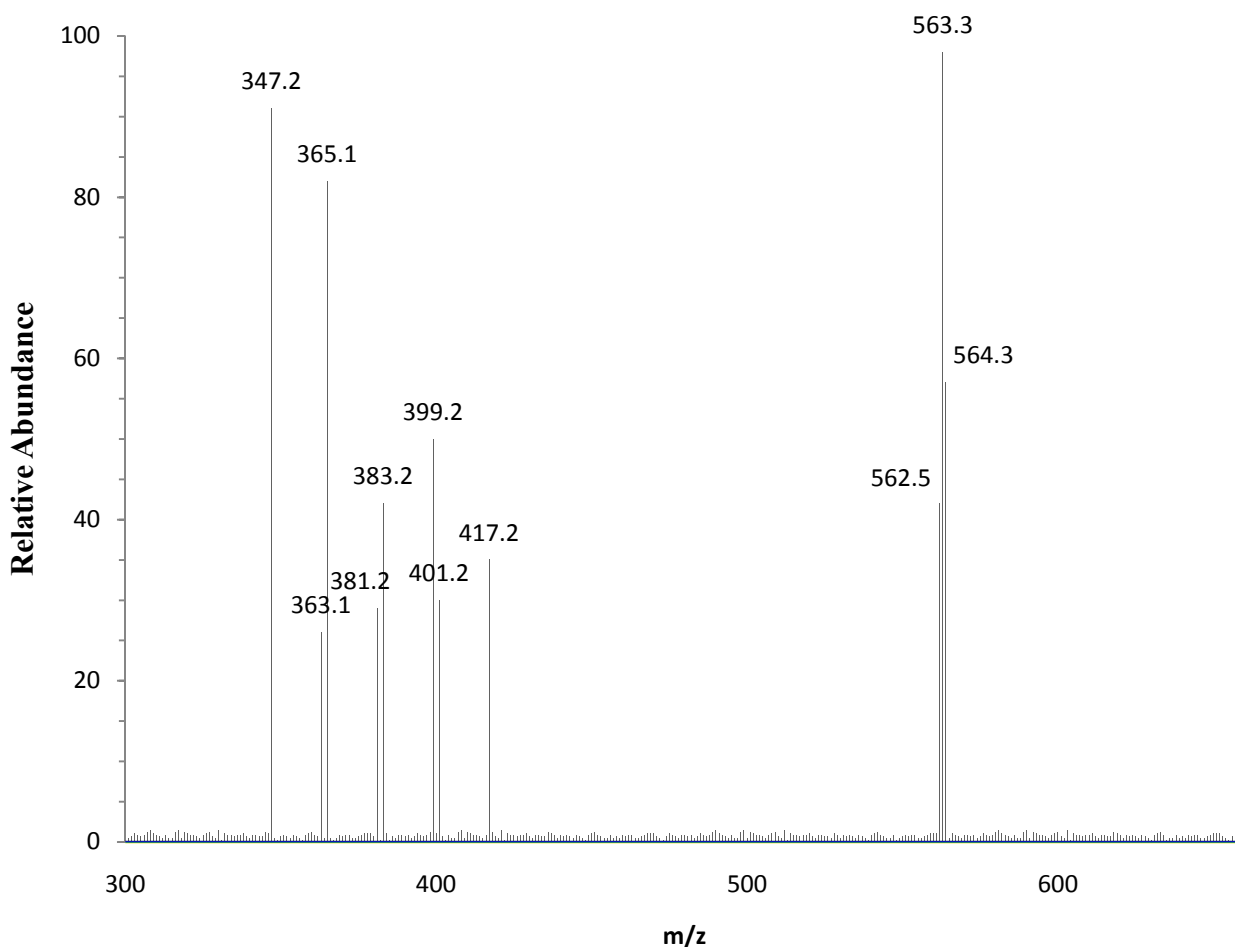
Τη μεγαλύτερη σχετική αφθονία στο απομονωθέν κλάσμα την παρουσιάζει το μοριακό ιόν ($[MH]^+$) με μάζα **563**. Μεταξύ των βουφαδιενολιδών που έχουν απομονωθεί από τον οργανισμό *Charybdis maritima*, υπάρχει μία ουσία που αντιστοιχεί σε αυτό το μοριακό βάρος (562) και έχει παρόμοια πολικότητα ($hR_f=33$) σε σύστημα TLC με τις πειραματικές παραμέτρους (μέσο προσρόφησης, σύστημα έκλυσης, μέσο εμφάνισης) που προαναφέρθηκαν.



Εικόνα 25 9-OH-Scillipheoside(M.B. 562)

Πρόκειται για τον μονοσακχαρίτη **9-Hydroxy-scillipheoside**. Το άγλυκο τμήμα της βουφαδιενολίδης αυτής περιλαμβάνει τρεις ομάδες υδροξυλίου, ενώ στη θέση 3 ενώνεται με ένα μόριο ραμνόζης. Το πρότυπο

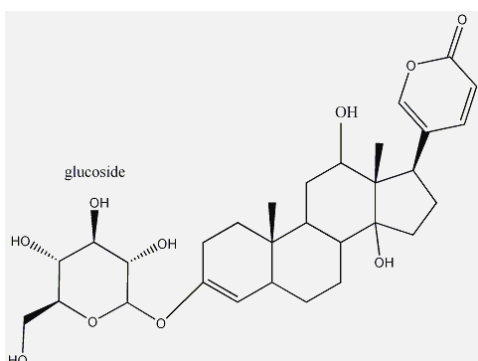
θραυσματοποίησης που αναμένουμε από ένα φάσμα MS² της συγκεκριμένης ένωσης περιλαμβάνει τα ιόντα [MH-146]⁺, [MH-146-18]⁺, [MH-146-18-18]⁺ και [MH-146-18-18-18]⁺. Πραγματοποιούμε, λοιπόν επιλεκτική θραυσματοποίηση (MS²) του ιόντος με μάζα 563 για να διαπιστώσουμε αν το «φάσμα μάζας» των θραυσμάτων επιβεβαιώνει την παρουσία, στο συγκεκριμένο κλάσμα, της βουφαδιενολίδης 9-Hydroxy-scillipheoside. Τα αποτελέσματα της θραυσματοποίησης παρουσιάζονται στο ακόλουθο «φάσμα μάζας»:



Όπως διαπιστώνεται, η θραυσματοποίηση του ιόντος με μάζα 563 οδηγεί στα αναμενόμενα θραύσματα με μάζες **417** [MH-146]⁺, **399** [MH-146-18]⁺, **381** [MH-146-18-18]⁺ και **363** [MH-146-18-18-18]⁺, που ακολουθούν το πρότυπο θραυσματοποίησης της 9-Hydroxy-scillipheoside, επιβεβαιώνοντας έτσι την παρουσία της στο συγκεκριμένο κλάσμα της χρωματογραφίας. Ωστόσο, το φάσμα

μάζας των θραυσμάτων του «ιόντος 563» μαρτυρά την παρουσία και κάποιας άλλης ουσίας, που εμφανίζει διαφορετικό πρότυπο θραυσματοποίησης από τη βουφαδιενολίδη 9-Hydroxy-scillipheoside.

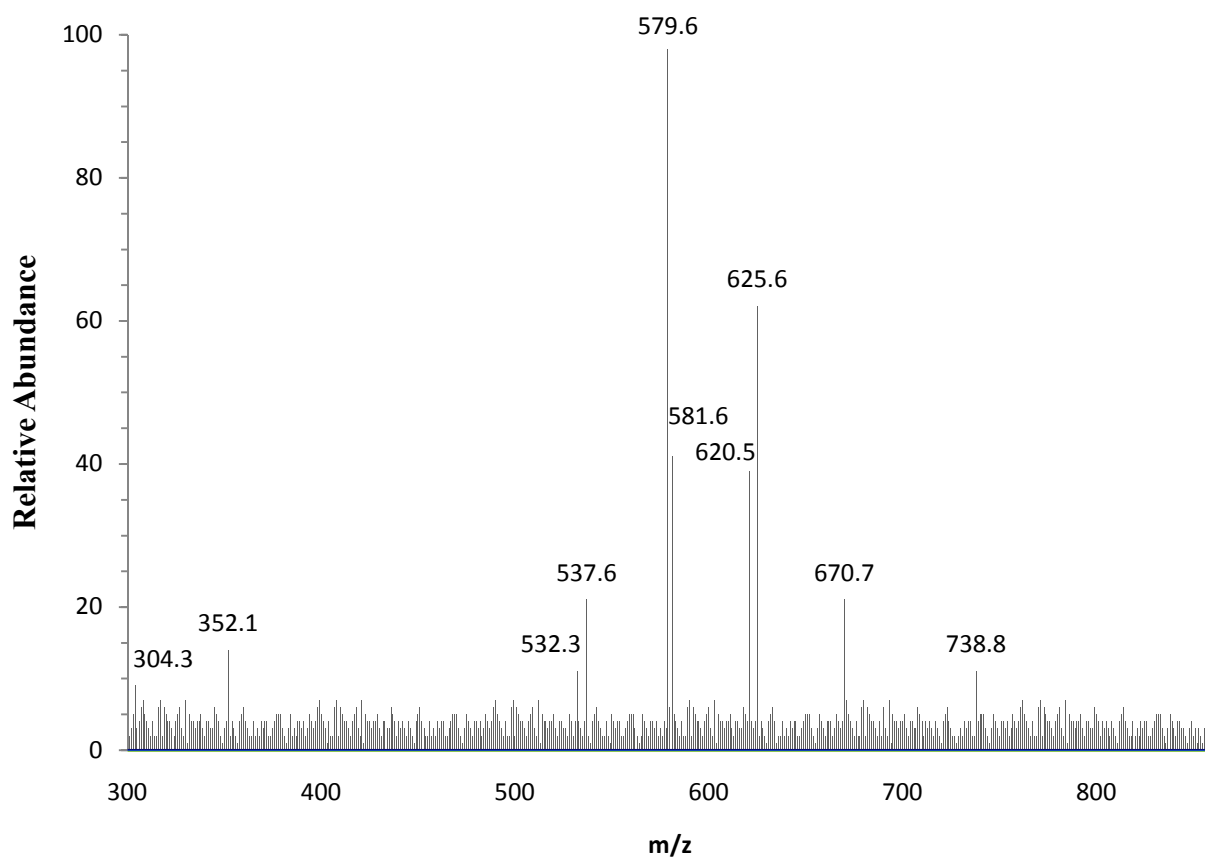
Έτσι τα ιοντικά θραύσματα με μάζες **401** [MH-162]⁺, **383** [MH-162-18]⁺, **365** [MH-162-18-18]⁺ και **347** [MH-162-18-18-18]⁺ υποδηλώνουν την παρουσία στο κλάσμα μιας ακόμα υδροξυλιωμένης βουφαδιενολίδης με μάζα 562, που το άγλυκο τμήμα της (γενίνη) είναι συνδεδεμένο με ένα μόριο γλυκόζης. Η ουσία που διαθέτει τα



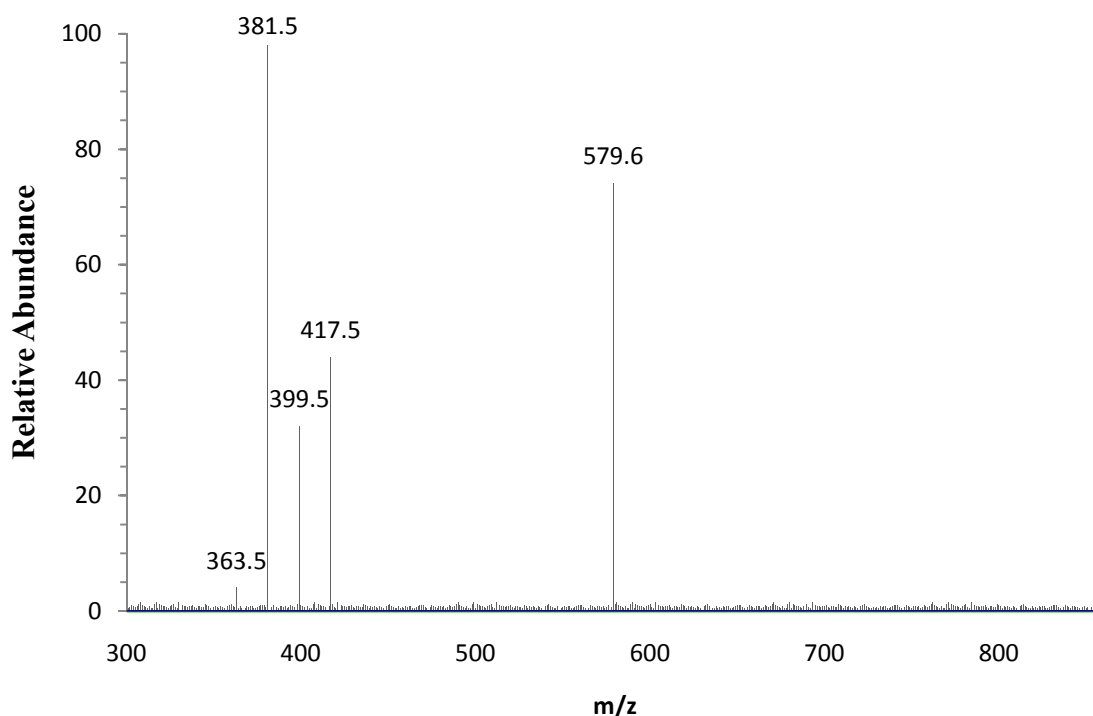
Εικόνα 26 *Scillipheosidin-3-O-β-D-glucoside*.

παραπάνω δομικά χαρακτηριστικά και παράλληλα έχει παραπλήσιο R_f (≈ 34) σε χρωματογραφία λεπτής στιβάδας, είναι η βουφαδιενολίδη ***Scillipheosidin-3-O-β-D-glucoside***. Η ουσία αυτή μοιάζει δομικά με την ***9-Hydroxy-scillipheoside*** με τη διαφορά ότι η γενίνη συνδέεται με ένα μόριο γλυκόζης στη θέση 3, ενώ διαθέτει ένα υδροξύλιο λιγότερο, αφού απουσιάζει η υδροξυλομάδα στη θέση 9. Συνεπώς, το πρότυπο θραυσματοποίησης αυτής της ένωσης ταιριάζει απόλυτα με τα επιπλέον ιοντικά θραύσματα, που λαμβάνουμε από το MS² του μοριακού ιόντος με μάζα 563. Γίνεται, λοιπόν, αντιληπτό πως το τρίτο κλάσμα ουσιών που απομονώθηκε από την PTLC περιλαμβάνει δύο μόρια βουφαδιενολιδών, που τυχαίνει να έχουν το ίδιο μοριακό βάρος και παρόμοια πολικότητα. Κάτι τέτοιο είναι φυσιολογικό, αφού οι δύο ουσίες έχουν σαν βασικό δομικό σκελετό την ίδια γενίνη (***scillipheoside***) και ο πιο πολικός χαρακτήρας της γλυκόζης, που διαθέτει η ***Scillipheosidin-3-O-β-D-glucoside***, έναντι της ραμνόζης, εξισορροπείται από την επιπλέον υδροξυλομάδα που διαθέτει η ***9-Hydroxy-scillipheoside***.

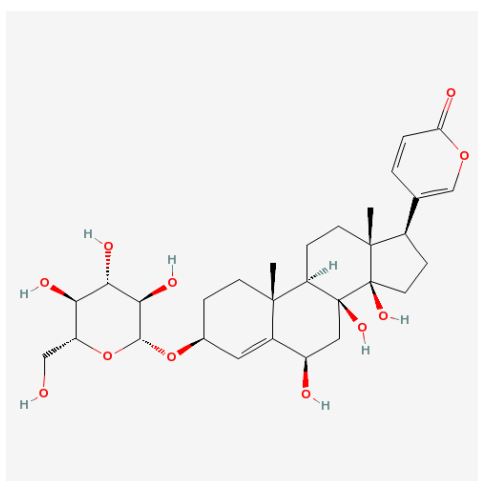
Ακολουθεί το «φάσμα μάζας» του τέταρτου κλάσματος που απομονώνεται από την παρασκευαστική χρωματογραφία λεπτής στιβάδας:



Διαπιστώνουμε, ότι το μοριακό ιόν με μάζα **579** είναι το επικρατές ιόν στο κλάσμα, αφού παρουσιάζει την υψηλότερη σχετική αφθονία. Ανατρέχοντας στις βιβλιογραφικές αναφορές, για το σύνολο των ουσιών που έχουν απομονωθεί από όλα τα υποείδη και τις ποικιλίες του οργανισμού *Charybdis maritima*, διαπιστώνουμε πως η βουφαδιενολίδα **Deacetylscilliroside**, με μοριακό βάρος **579** και $R_f \approx 36$, είναι πιθανά η ουσία που απομονώθηκε από το μεθανολικό εκχύλισμα της χαρυβδίνης. Για να επιβεβαιώσουμε την παρουσία της Deacetylscilliroside στο κλάσμα της PTLC, πραγματοποιούμε την επιλεκτική θραυσματοποίηση του μοριακού ιόντος με μάζα 579 και τα αποτελέσματα της φασματοσκοπίας μάζας (MS^2) παραθέτονται παρακάτω:



Τα ιοντικά θραύσματα του μοριακού ιόντος $[MH]^+$ με μάζα 579 είναι τα ιόντα με



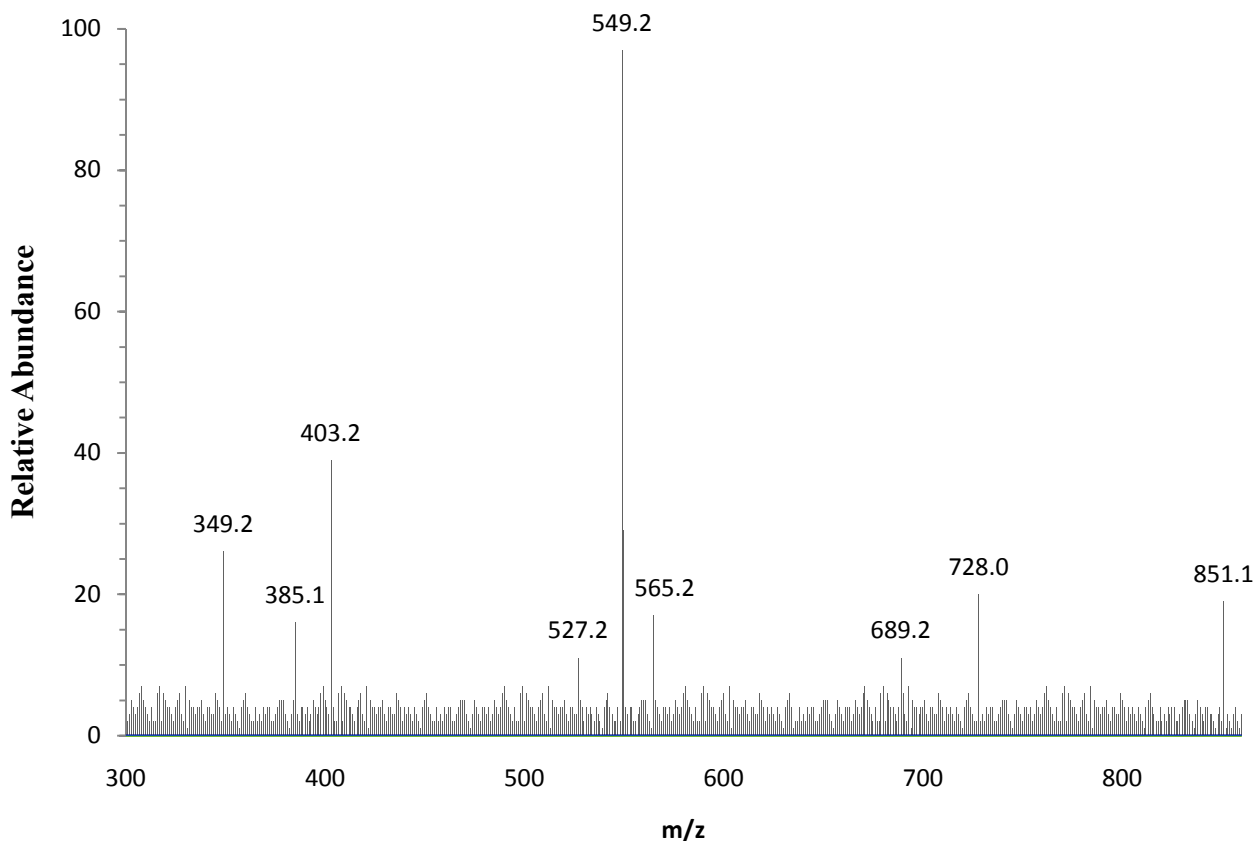
Εικόνα 27 *Deacetylscilliroside* (M.B. 578,65)

μάζες **417** $[MH-162]^+$, **399** $[MH-162-18]^+$, **381** $[MH-162-18-18]^+$ και **363** $[MH-162-18-18-18]^+$.

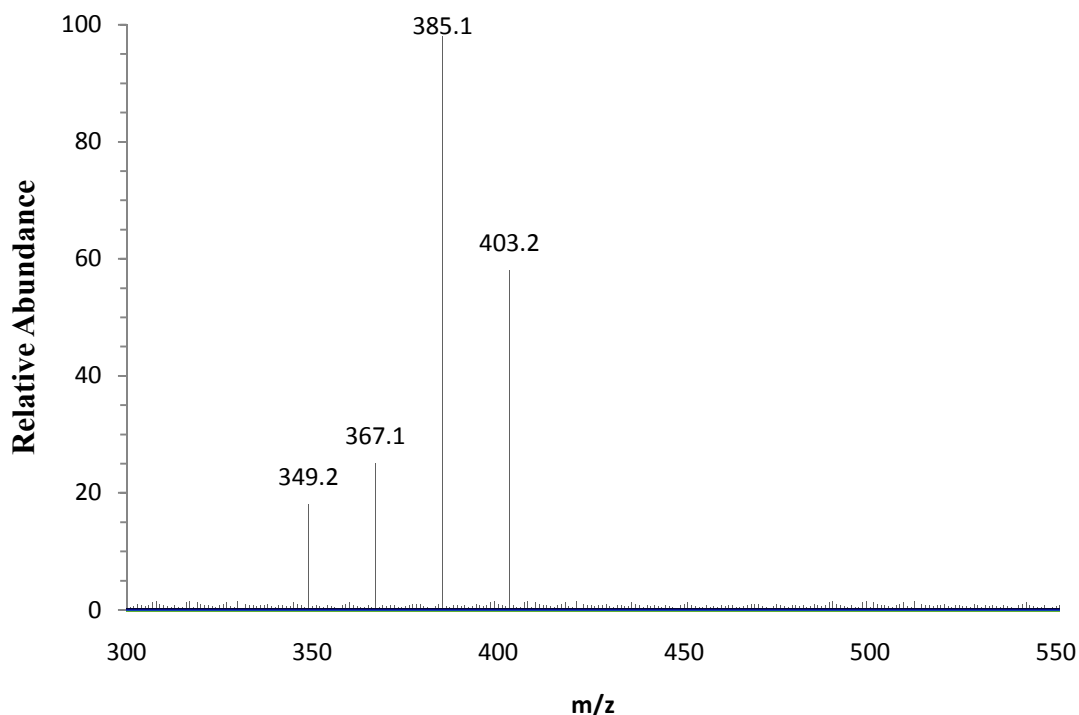
Το πρότυπο αυτό θραυσματοποίησης υποδηλώνει την παρουσία μίας γενίνης, που είναι γλυκοζυλιωμένη με ένα μόριο γλυκόζης, ενώ ο κεντρικός σκελετός του μορίου της διαθέτει τρεις ομάδες υδροξυλίου. Οι πληροφορίες που απορρέουν από τα παραπάνω ιοντικά θραύσματα έρχονται σε συμφωνία με τα δομικά χαρακτηριστικά της

βουφαδιενολίδης *Deacetylscilliroside* γεγονός που πιστοποιεί την παρουσία της στο τέταρτο κατά σειρά κλάσμα που απομονώθηκε από την PTLC.

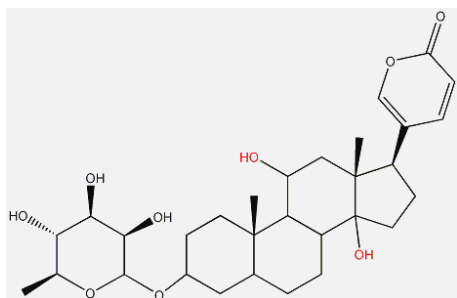
Το τελευταίο κλάσμα που απομονώθηκε από την PTLC εμφανίζει το λιγότερο πολικό χαρακτήρα ($hR_f=51$) και το φάσμα μάζας του είναι το εξής:



Το ιόν με τη μεγαλύτερη σχετική αφθονία έχει μάζα **549**. Όπως και προηγουμένως, προβαίνουμε στην επιλεκτική θραυσματοποίηση του παραπάνω ιόντος και από το πρότυπο των θραυσμάτων (fragmentation pattern) που προκύπτει, αντλούμε πληροφορίες για τα δομικά χαρακτηριστικά του μορίου. Από το αποτέλεσμα του MS^2 , συνυπολογίζοντας τη μάζα του μοριακού ιόντος και την κινητικότητα που εμφανίζει στο συγκεκριμένο σύστημα της χρωματογραφίας TLC (hR_f), ταυτοποιούμε την εξεταζόμενη ένωση. Το «φάσμα μάζας» των θραυσμάτων (MS^2) του ιόντος με μάζα 549 είναι το ακόλουθο:



Τα προκύπτοντα ιοντικά θραύσματα με μάζες **403** [MH-146]⁺, **385** [MH-146-18]⁺, **367** [MH-146-18-18]⁺ και **349** [MH-146-18-18-18]⁺ υποδηλώνουν την παρουσία του μονογλυκοζίτη μιας υδοξυλιωμένης γενίνης, που είναι ενωμένη με ένα μόριο ραμνόζης. Ανάμεσα στις ουσίες που έχουν απομονωθεί από τον οργανισμό *Charybdis maritima* υπάρχει μόνο μία βουφαδιενολίδα με μοριακό βάρος 548, που



Εικόνα 28 *Gamabufotalin-3-O-α-L-rhamnoside* (M.B. 548,7)

εμφανίζει όμοια κινητικότητα ($R_f=51$) στο αντίστοιχο σύστημα TLC και παρουσιάζει τα προαναφερθέντα δομικά χαρακτηριστικά.

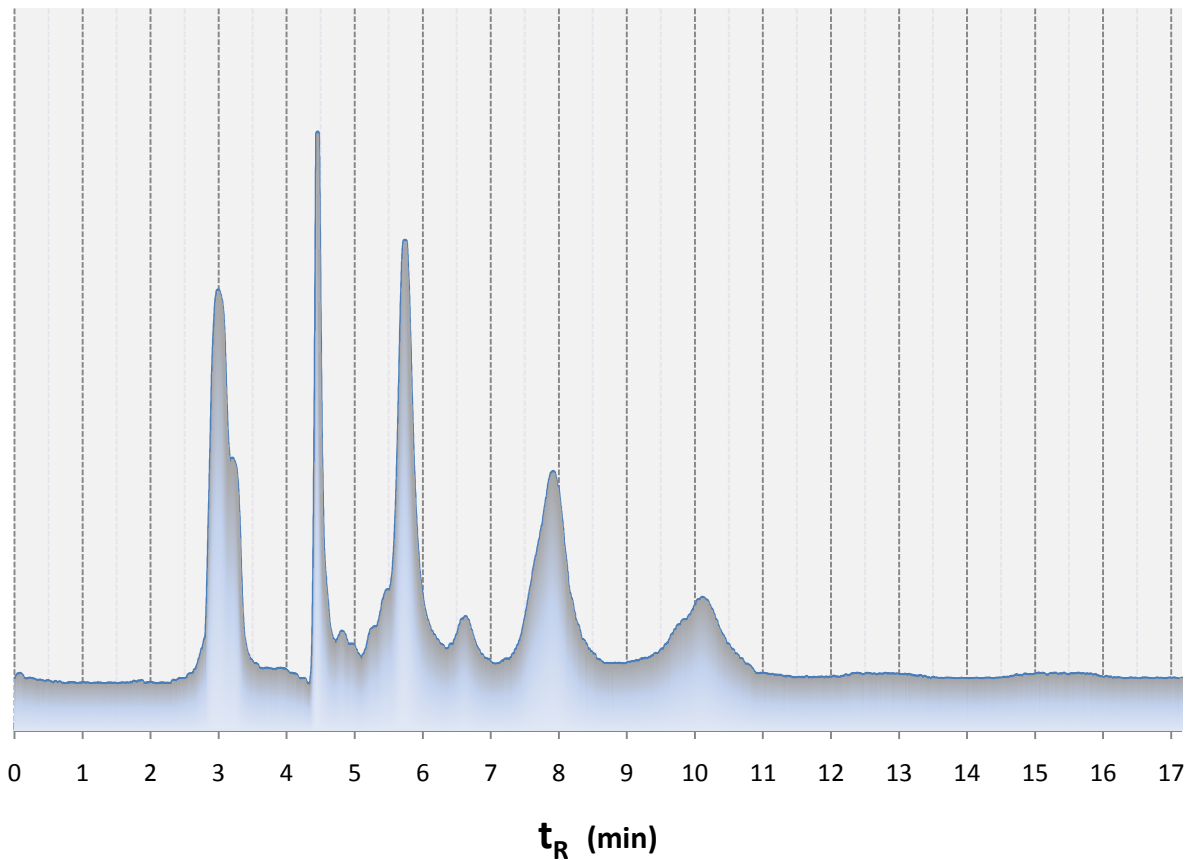
Πρόκειται για την βουφαδιενολίδα ***Gamabufotalin-3-O-α-L-rhamnoside***. Η ένωση αυτή διαθέτει δύο ομάδες υδροξυλίου, στις

θέσεις 11 και 17, ενώ στη θέση 3 βρίσκεται συνδεδεμένο ένα μόριο ραμνόζης.

7. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΥΓΡΗΣ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑΣ ΥΨΗΛΗΣ ΑΠΟΔΟΣΗΣ (HPLC)

Για την περαιτέρω ανάλυση του μεθανολικού εκχυλίσματος της πρωτεΐνης χαρυβδίνη, πραγματοποιούμε, σε αραιωμένο δείγμα, υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης αντίστροφης φάσης (**RP-HPLC**). Για το σκοπό αυτό, επιλέγουμε μία RP-C₁₈ στήλη διαχωρισμού που επιτρέπει τον βέλτιστο διαχωρισμό των βουφαδιενολιδών, που απομονώνονται από φυτικούς οργανισμούς (Tittel & Wagner, 1980). Ως σύστημα έκλουσης, επιλέχτηκε ένα ισοκρατικό σύστημα διαλύματος ακετονιτρίλιο σε νερό 25% κ.ο. Ο ρυθμός ροής των διαλυτών ρυθμίστηκε στα 800μL/min.

Τα αποτελέσματα της χρωματογραφίας παρουσιάζονται στο παρακάτω διάγραμμα:



Όπως είναι εύληπτο, η RP-HPLC του μίγματος των βουφαδιενολιδών διαρκεί συνολικά 11 λεπτά, καθώς μετά το πέρας αυτού του χρονικού διαστήματος δεν παρατηρούμε περαιτέρω διαχωρισμό του δείγματος. Συνολικά, εμφανίζονται 6 διακριτές κορυφές με τους εξής χρόνους έκλουσης (t_R):

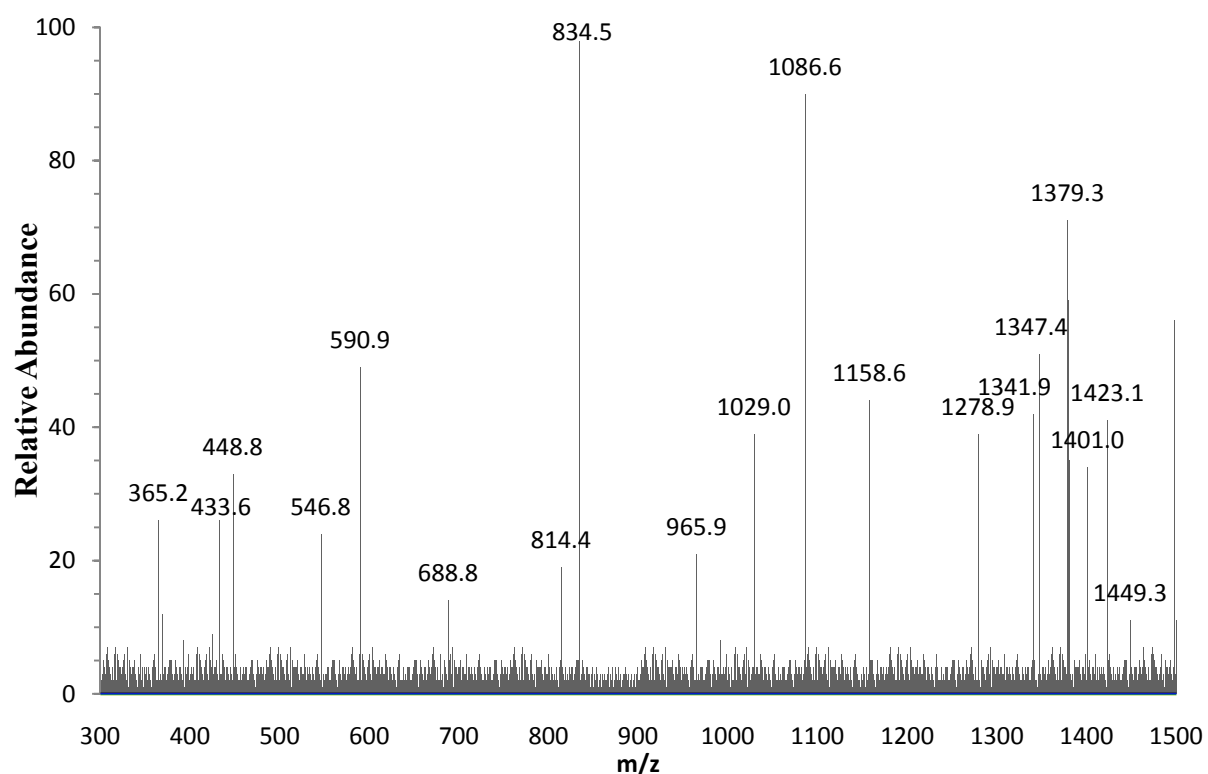
Κορυφή HPLC	t_R (min)
1 ^η	3,01
2 ^η	4,49
3 ^η	5,72
4 ^η	6,62
5 ^η	7,98
6 ^η	10,18

Παρατηρούμε πως υπάρχει μια σαφής αντιστοιχία στον αριθμό των ουσιών (6), που απομονώθηκαν από τη χρωματογραφία PTLC, με τον αριθμό των κορυφών που προκύπτουν από το διαχωρισμό του δείγματος μέσω της χρωματογραφίας HPLC.

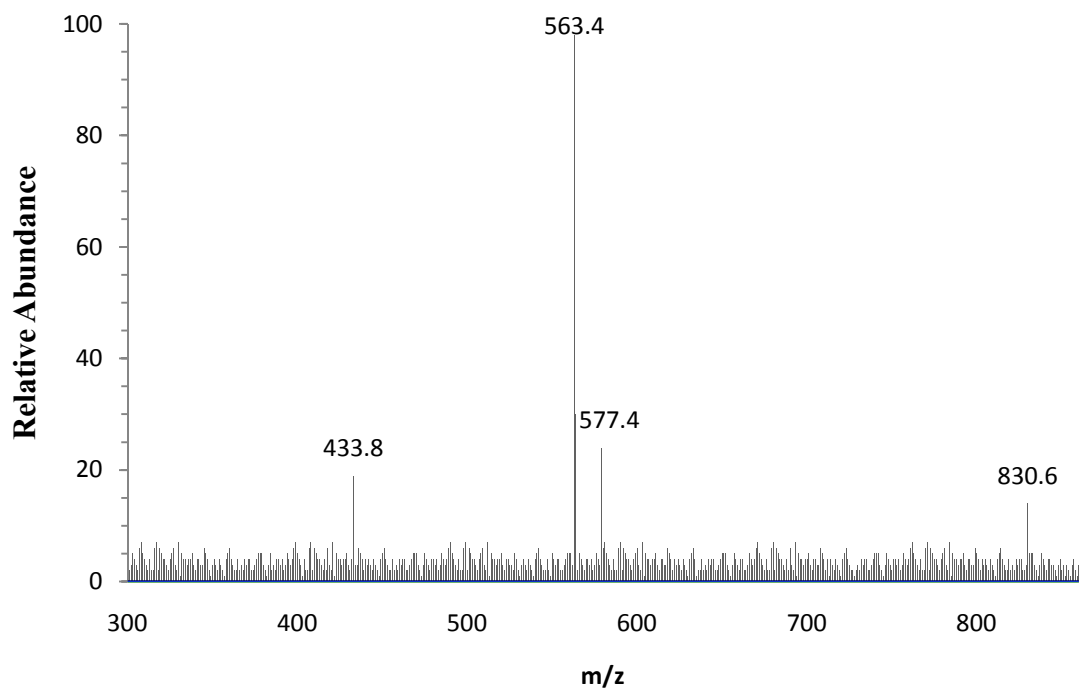
8. ΣΥΝΔΥΑΣΤΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΚΛΑΣΜΑΤΩΝ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑΣ HPLC ΜΕΣΩ ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑΣ ΜΑΖΑΣ (tandem HPLC-MS)

Για να μπορέσουμε να ταυτοποιήσουμε την κάθε κορυφή της χρωματογραφίας HPLC πραγματοποιούμε μία συνδυαστική φασματοσκοπία HPLC-MS, όπου κάθε κλάσμα ουσιών, μετά το διαχωρισμό του από την στήλη HPLC, εισέρχεται σε ένα φασματογράφο μάζας και έτσι μπορούμε να λάβουμε το «φάσμα μάζας» για κάθε κορυφή της χρωματογραφίας HPLC.

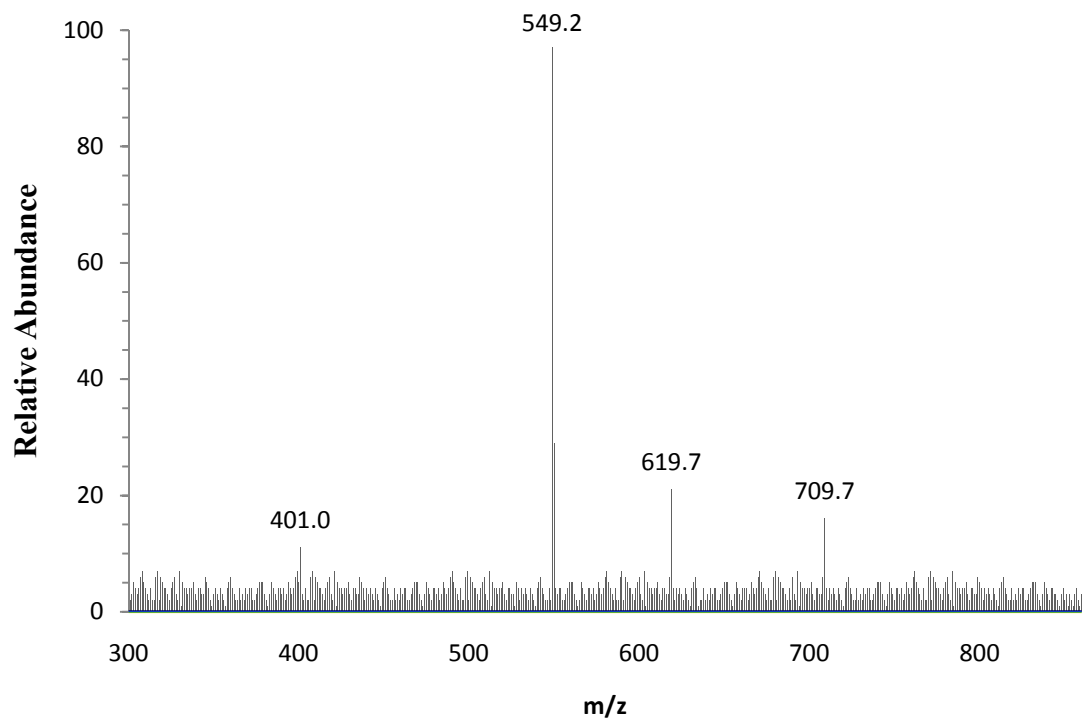
Τα «φάσματα μάζας» των έξι κορυφών της χρωματογραφίας HPLC φαίνονται παρακάτω. Πιο συγκεκριμένα, για την πρώτη κορυφή λαμβάνουμε το εξής φάσμα:



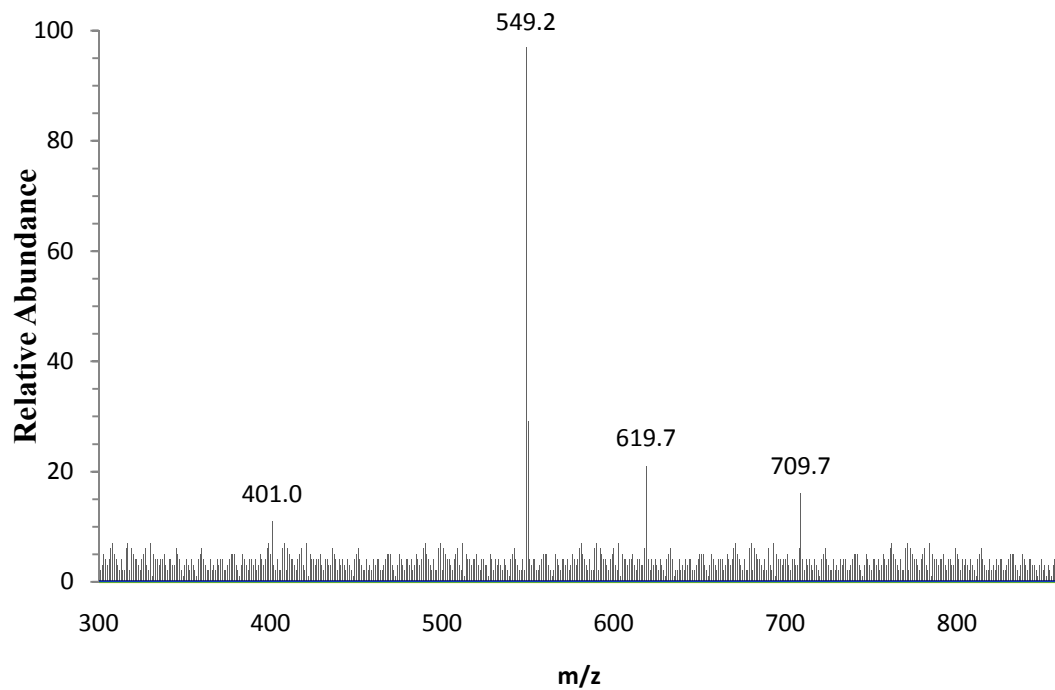
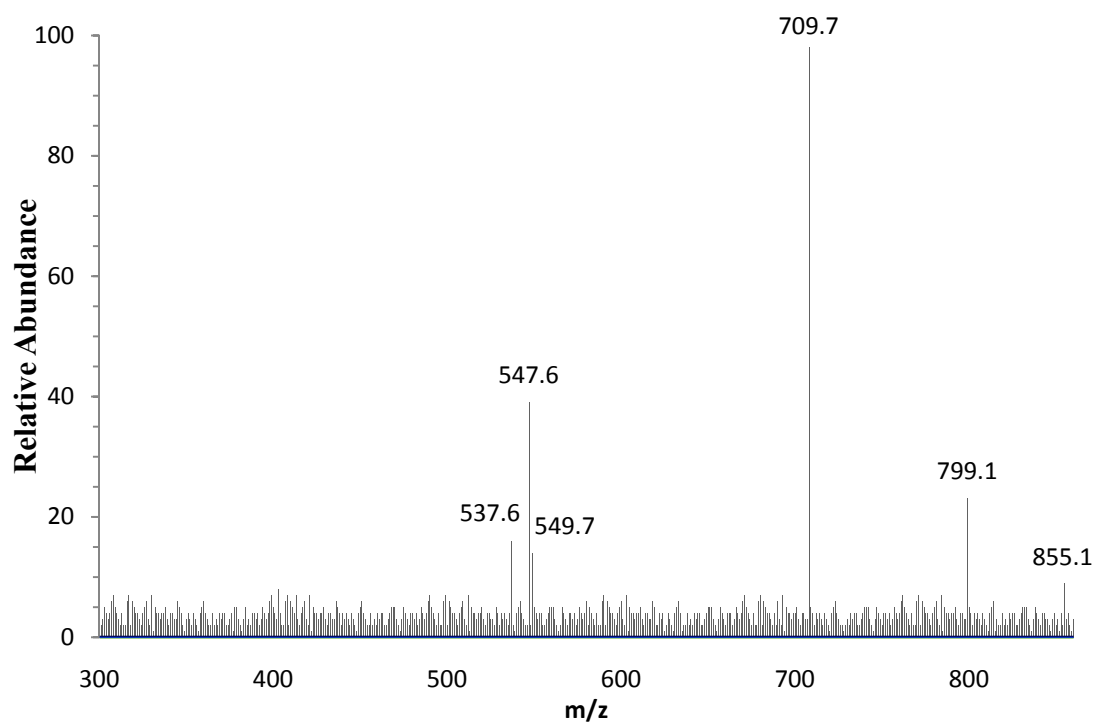
Για τη δεύτερη κορυφή λαμβάνουμε:

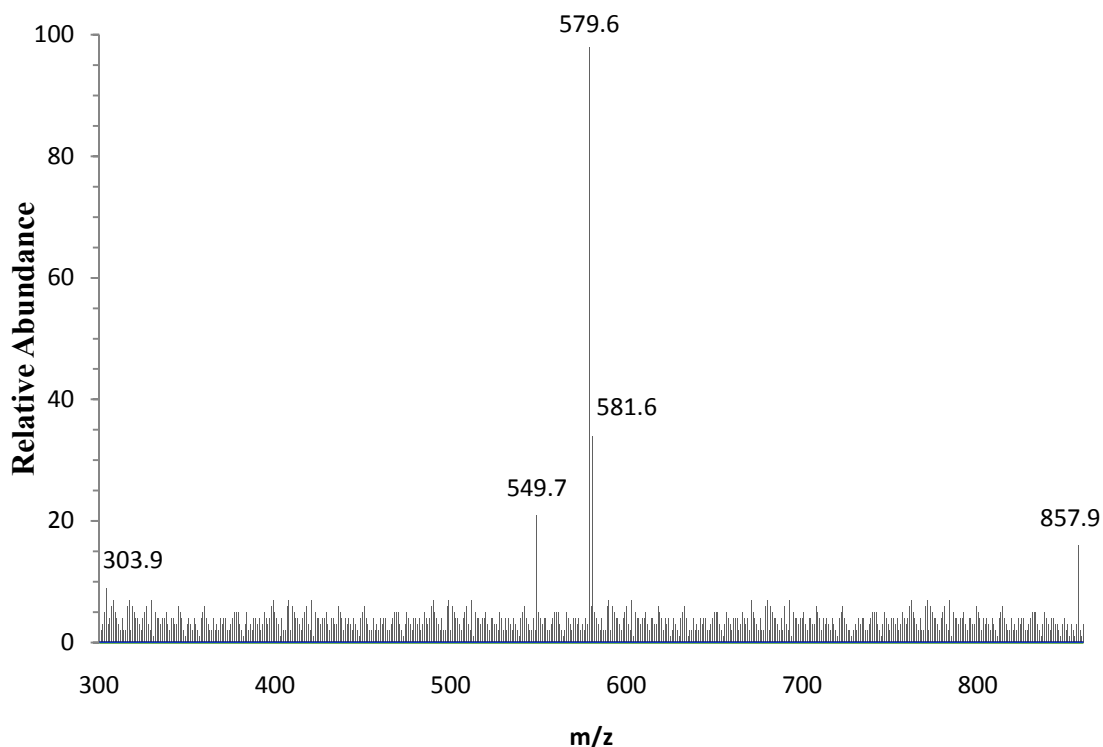


Για την τρίτη κορυφή λαμβάνουμε το παρακάτω «φάσμα μάζα»:



Για την τέταρτη, πέμπτη και έκτη κορυφή της χρωματογραφίας HPLC παίρνουμε αντίστοιχα, τα παρακάτω «φάσματα μάζας»:





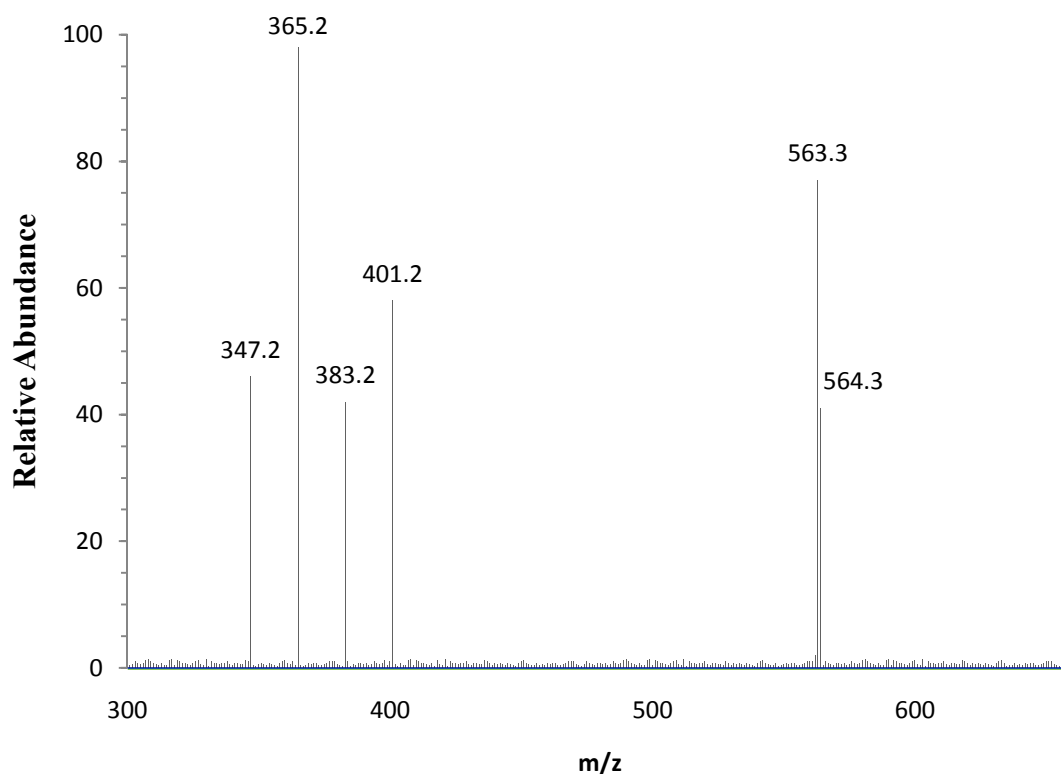
Εξετάζοντας τα παραπάνω «φάσματα μάζας», διαπιστώνουμε πως η πρώτη κορυφή περιλαμβάνει ένα σύνολο πολικών ουσιών που «ξεπλένονται» ταχύτατα από τη στήλη διαχωρισμού. Είναι ουσίες που η ταυτοποίησή τους παρουσιάζει δυσκολία, καθώς είναι πιθανό να πρόκειται για προϊόντα αποδόμησης ή συμπλοκοποίησης. Υπάρχουν μοριακά ιόντα με μεγάλο μοριακό βάρος (<900), χαρακτηριστικό που δεν είναι σύνηθες για τους πιο κοινούς γλυκοζίτες των βουφαδιενολιδών, που έχουν απομονωθεί από τον οργανισμό *Charybdis maritima*. Το γεγονός αυτό μας επιτρέπει να υποθέσουμε ότι ελεύθερα σάκχαρα ή ολιγοσακχαρίτες, που βρίσκονται στο μεθανολικό εκχύλισμα, είτε ως αποτέλεσμα αποδόμησης άλλων γλυκοζιτών, είτε ως προϊόντα απομόνωσης από τη χαρυβδίνη, προσαρτώνται σε βουφαδιενολίδες του μίγματος, με αποτέλεσμα να αυξάνουν το μοριακό βάρος και την πολικότητά τους.

Ανάμεσα σε αυτές τις «προκύπτουσες» ενώσεις, περιλαμβάνεται, χωρίς ωστόσο να είναι το επικρατές, το μοριακό ιόν με μάζα **1379**, που απομονώθηκε από το πρώτο κλάσμα της χρωματογραφίας TLC και όπως δείχθηκε προηγουμένως, μέσω MS², πρόκειται για ένα σύμπλοκο βουφαδιενολίδης (scilliroside), γενίνης (9-OH-Deacetylscillirosidin) και εξοζών.

Η δεύτερη και τρίτη κορυφή της χρωματογραφίας HPLC οφείλονται σε δύο μοριακά ιόντα με την ίδια μάζα (**563**). Ωστόσο, ο διαχωρισμός τους στο συγκεκριμένο σύστημα διαχωρισμού της χρωματογραφίας HPLC ($t_{R2}=4,49min$ & $t_{R3}=5,72min$) υποδηλώνει την παρουσία δύο διακριτών βουφαδιενολιδών με διαφορετικά δομικά χαρακτηριστικά και ως εκ τούτου με διαφορετικές χημικές ιδιότητες.

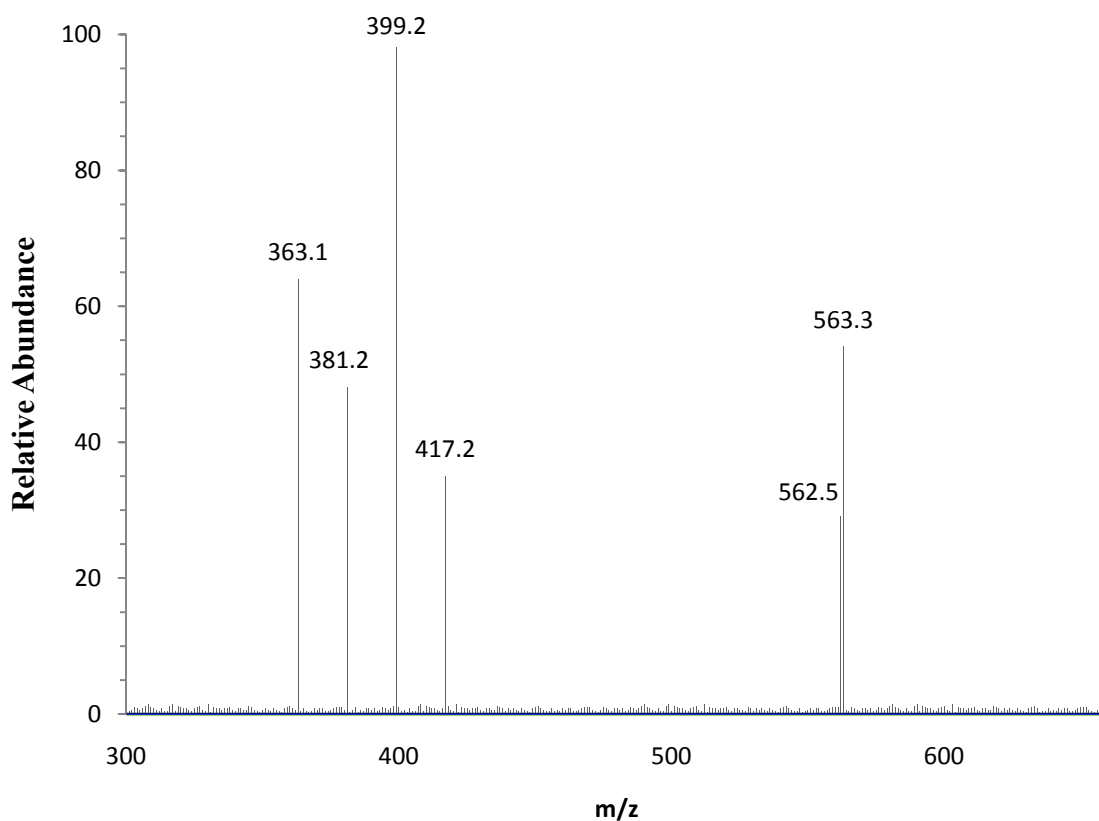
Ακολούθως, προβαίνουμε στην επιλεκτική θραυσματοποίηση (MS²) των παραπάνω μοριακών ιόντων με μάζα **569**.

Έτσι, για το ιόν της δεύτερης κορυφής της HPLC, το φάσμα μάζας των ιοντικών θραυσμάτων του δίνεται παρακάτω:



Το πρότυπο θραυσματοποίησης (fragmentation pattern) του παραπάνω φάσματος περιλαμβάνει τα ιόντα με μάζες **401** [MH-162]⁺, **383** [MH-162-18]⁺, **365** [MH-162-18-18]⁺ και **347** [MH-162-18-18-18]⁺ και αντιστοιχεί στο πρότυπο θραυσματοποίησης της βουφαδιενολίδης **Scillipheosidin-3-O-β-D-glucoside**.

Το αντίστοιχο «φάσμα μάζας» των θραυσμάτων (MS²) του ιόντος με μάζα 563, της τρίτης κορυφής της χρωματογραφίας HPLC, είναι το ακόλουθο:



Παρατηρούμε πως τα ιοντικά θραύσματα του «ιόντος 563» της τρίτης κορυφής, περιλαμβάνουν τα ιόντα με μάζες **417** [MH-146]⁺, **399** [MH-146-18]⁺, **381** [MH-146-18-18]⁺ και **363** [MH-146-18-18-18]⁺. Ακολουθείται συνεπώς το πρότυπο θραυσματοποίησης της βουφαδιενολίδης **9-Hydroxy-scillipheoside**.

Συνεπώς, με τη βοήθεια της χρωματογραφίας RP-HPLC έγινε εφικτός ο διαχωρισμός των βουφαδιενολιδών **9-Hydroxy-scillipheoside & scillipheosidin-3-O-β-D-glucoside**, ουσίες, που όπως είδαμε προηγουμένως, απομονώθηκαν από το ίδιο κλάσμα και παρουσιάζουν παρόμοια κινητικότητα στο σύστημα της παρασκευαστικής χρωματογραφίας TLC.

Στο «φάσμα μάζας» της τέταρτης κορυφής της χρωματογραφίας HPLC, το μοριακό ιόν με τη μεγαλύτερη σχετική αφθονία είναι το ιόν με μάζα 709, που αντιστοιχεί στο μοριακό βάρος του πρωτονιομένου ιόντος $[MH]^+$ της βουφαδιενολίδης **Glucoscillipheoside** και πρόκειται για την ουσία που απομονώθηκε από το δεύτερο κλάσμα της παρασκευαστικής TLC.

Το επικρατές μοριακό ιόν στο «φάσμα μάζας» της πέμπτης κορυφής της HPLC είναι το ιόν με μάζα 549 και μαρτυρά την παρουσία της βουφαδιενολίδης **Gamabufotalin-3-O-α-L-rhamnoside**, γεγονός που έρχεται σε συμφωνία με τα αποτελέσματα της φασματοσκοπίας μάζας του πέμπτου κλάσματος που απομονώθηκε από την PTLC.

Το «φάσμα μάζας» της έκτης και τελευταίας κορυφής της HPLC εμφανίζει ως επικρατές το μοριακό ιόν με μάζα 549. Η βουφαδιενολίδα που αντιστοιχεί σε αυτό το μοριακό βάρος είναι ο γλυκοζίτης **Deacetylscilliroside** που απομονώθηκε από το τέταρτο κατά σειρά κλάσμα της παρασκευαστικής χρωματογραφίας TLC.

Συγκεντρώνοντας τις παραπάνω πληροφορίες που μας δίνει η συνδυαστική φασματοσκοπία μάζας HPLC-MS, μπορούμε να προβούμε στην ταυτοποίηση των ουσιών που διαχωρίζονται μέσω της RP-HPLC και έχουν σαν αποτέλεσμα την εμφάνιση των έξι κορυφών στο χρωματογράφημα. Έτσι, μπορούμε να συγκεντρώσουμε τα αποτελέσματα στον πίνακα που ακολουθεί:

Κορυφή HPLC	Βουφαδιενολίδη	t _R (min)
1 ⁿ	Ασαφές μίγμα συμπλόκων	3,01
2 ⁿ	<i>Scillipheosidin-3-O-β-D-glucoside</i>	4,49
3 ⁿ	<i>9-Hydroxy-scillipheoside</i>	5,72
4 ⁿ	<i>Glucoscillipheoside</i>	6,62
5 ⁿ	<i>Gamabufotalin-3-O-α-L-rhamnoside</i>	7,98
6 ⁿ	<i>Deacetylscilliroside</i>	10,18

9. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΕΛΕΓΧΟΥ ΤΗΣ ΚΥΤΤΑΡΟΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑΣ ΤΟΥ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΟΣ ΤΗΣ ΧΑΡΥΒΔΙΝΗΣ

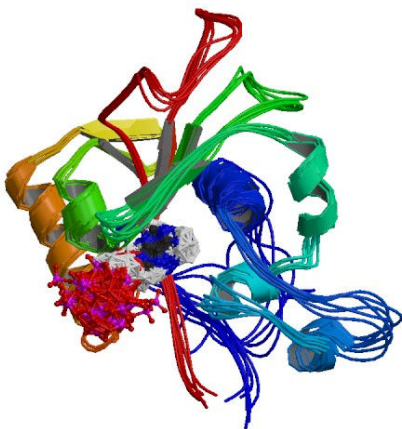
Ο έλεγχος της κυτταροτοξικότητας του μεθανολικού εκχυλίσματος της χαρυβδίνης αποκάλυψε πως το μίγμα των γλυκοζιτών που απομονώθηκε από την πρωτεΐνη είναι ιδιαίτερα δραστικό, όσον αφορά τις αντικαρκινικές του ιδιότητες. Συγκεκριμένα, διαδοχικές συγκεντρώσεις του εκχυλίσματος εφαρμόστηκαν σε καλλιέργεια καρκινικών επιθηλιακών κυττάρων HeLa και υπολογίστηκε ότι το μίγμα των βουφαδιενολιδών έχει συντελεστή αναστολής κυτταρικής ανάπτυξης $IC_{50} = 3,9 \cdot 10^{-1} \mu\text{mol/L}$. Ο υπολογισμός αυτός έγινε με βάση τη πρότυπη καμπύλη της μεθόδου MTT (βλ. Πειραματικό Μέρος). Η τιμή αυτή είναι ιδιαίτερα υψηλή αν κανείς λάβει υπ' όψιν του το γεγονός ότι ο αντίστοιχος συντελεστής IC_{50} για την ευρέως διαδεδομένη αντικαρκινική ουσία ταξόλη (taxol) έχει τιμή $1,5 \cdot 10^{-2} \mu\text{mol/L}$,

ενώ ο IC_{50} της ουσίας resibufogenin, μίας από τις ισχυρότερες αντικαρκινικές βουφαδιενολίδες, έχει τιμή $1 \cdot 10^{-2}$ $\mu\text{mol/L}$ (Ye *et al.*, 2005, 2006). Ωστόσο, πρέπει να αναφέρουμε ότι ο υπολογισμός της συγκέντρωσης των δραστικών ουσιών του μίγματος έγινε με βάση την τιμή της οπτικής του απορρόφησης στα 299nm και με την παραδοχή ότι η αντικαρκινική δράση του μίγματος οφείλεται μόνο στις βουφαδιενολίδες που περιέχονται σε αυτό. Όμως, το μεθανολικό εκχύλισμα της χαρυβδίνης είναι πολύ πιθανό να περιέχει και άλλες δραστικές ουσίες, που απομονώνονται μαζί με τα φυτικά στεροειδή, όπως φαινολικές ενώσεις, φλαβονοειδή και ένα σύνολο συμπλοκοποιημένων μορίων και τροποποιημένων καταλοίπων, τα οποίων η συνεπικουρική ή ανασταλτική αντικαρκινική δράση αγνοείται. Έτσι, η τιμή του συντελεστή IC_{50} που υπολογίσαμε μπορεί να ληφθεί υπ' όψιν μόνο ως ένδειξη για την δυνητική αντικαρκινική δράση του μεθανολικού εκχυλίσματος. Η πλήρης απομόνωση και ο καθαρισμός των βουφαδιενολιδών που περιέχονται σε αυτό είναι αναγκαίος για την τεκμηρίωση των παραπάνω αποτελεσμάτων.

10. ΣΧΟΛΙΑΣΜΟΣ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Όπως διαπιστώθηκε από τα παραπάνω αποτελέσματα, το μεθανολικό εκχύλισμα της πρωτεΐνης χαρυβδίνης περιλαμβάνει τις βουφαδιενολίδες *Deacetylscilliroside*, *Gamabufotalin-3-O- α -L-rhamnoside*, *Glucoscillipheoside*, *9-Hydroxy-scillipheoside*, *Scillipheosidin-3-O- β -D-glucoside* καθώς και τροποποιημένα κατάλοιπα του γλυκοζίτη *Scilliroside*.

Ιδιαίτερη εντύπωση προκαλεί το γεγονός, πως στο μίγμα των γλυκοζιτών της χαρυβδίνης δεν περιλαμβάνονται οι βουφαδιενολίδες **Scillaren A** και **Proscillaridin A**, οι πιο διαδεδομένοι γλυκοζίτες του οργανισμού *Charybdis maritima*, με την περιεκτικότητά τους να υπερβαίνει το 25% του συνόλου των γλυκοζιτών, που έχουν απομονωθεί από το βολβό της σκυλοκρεμμύδας (Kopp *et al.*, 1996). Το γεγονός αυτό, αποτελεί μία ένδειξη, πως η σύνδεση των συγκεκριμένων βουφαδιενολιδών με την πρωτεΐνη χαρυβδίνη αποτελεί μία ειδική σύνδεση, που διευκολύνεται από τις δομικές και ηλεκτροχημικές ιδιαιτερότητες των απομονωμένων γλυκοζιτών.



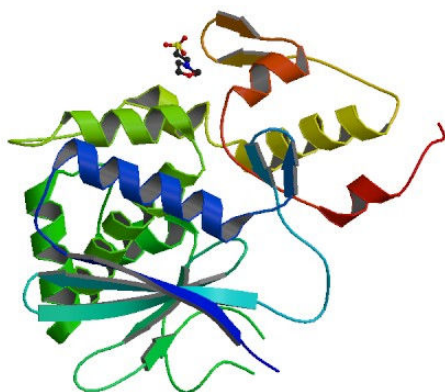
Εικόνα 29 Τρισδιάστατη δομή Na^+/K^+ -ΑΤΡάσης

Η σύνδεση των φυτικών στεροειδών, όπως είναι οι βουφαδιενολίδες, με πρωτεϊνικά μόρια, δεν είναι ένα πρωτόγνωρο γεγονός, καθώς η καρδιοτονωτική δράση των ουσιών αυτών οφείλεται στη σύνδεσή τους με την πρωτεΐνη **Na^+/K^+ -ΑΤΡάση** του μυοκαρδίου. Η πρωτεΐνη αυτή ανήκει ταξινομικά στην ευρύτερη κατηγορία των υδρολασών, αφού υδρολύει τον φωσφοδιεστερικό δεσμό μεταξύ μίας φωσφορικής ομάδας και του

ADP. Η σύνδεση των βουφαδιενολιδών με την Na^+/K^+ -ΑΤΡάση έχει μελετηθεί ευρύτατα και έχει διαπιστωθεί πως οι παράμετροι που συμμετέχουν σε αυτήν είναι οι «στερικές» αλληλεπιδράσεις, οι ηλεκροστατικές δυνάμεις, οι υδρόφοβοι δεσμοί και οι δεσμοί υδρογόνου με ποσοστό συνεισφοράς της κάθε παραμέτρου 12, 20, 16 και 52% αντίστοιχα (S. Paula *et al.*, 2005).

Γίνεται, λοιπόν, αντιληπτό πως οι δεσμοί υδρογόνου που αναπτύσσονται μεταξύ των βουφαδιενολιδών και των αμινοξέων της πρωτεΐνης είναι ο σημαντικότερος παράγοντας που ευνοεί τη συγκεκριμένη σύνδεση.

Η χαρυβδίνη ανήκει και αυτή στην κατηγορία των υδρολασών, ενώ παράλληλα εμφανίζει και ορισμένες δομικές ομοιότητες με την Na^+/K^+ -ΑΤΡάση



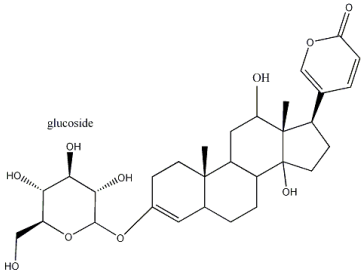
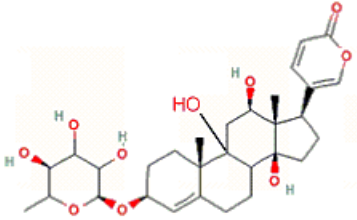
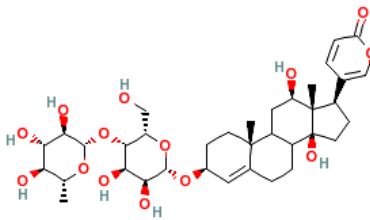
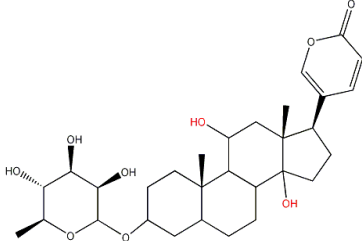
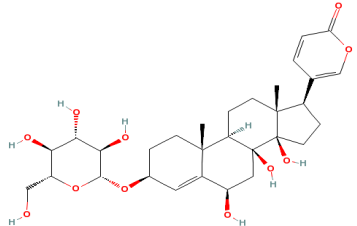
Εικόνα 30

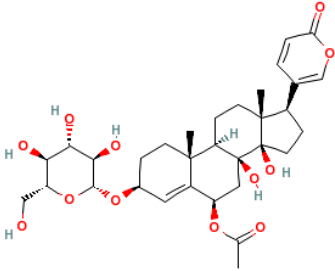
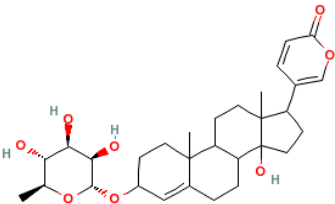
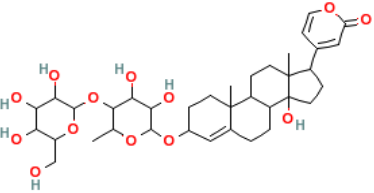
Τρισδιάστατη δομή χαρυβδίνης

(παρόμοια ποσοστά συμμετοχής στη τριτοταγή δομή α -ελικών και β -πτυχωτών επιφανειών), γεγονός που μας επιτρέπει να υποθέσουμε πως οι προαναφερθείσες παράμετροι, που καθορίζουν τη σύνδεση βουφαδιενολιδών - Na^+/K^+ -ΑΤΡάσης, ενδεχομένως να διαδραματίζουν κυρίαρχο ρόλο και στην σύνδεση **βουφαδιενολιδών - χαρυβδίνης**.

Έτσι, η δυνατότητα των βουφαδιενολιδών, να σχηματίζουν δεσμούς υδρογόνου με τα αντίστοιχα αμινοξέα της χαρυβδίνης πιθανά να είναι η κυρίαρχη δύναμη που οδηγεί στη μεταξύ τους σύνδεση. Μάλιστα, οι δεσμοί υδρογόνου που σχηματίζονται μεταξύ του *κεντρικού στεροειδούς σκελετού* και των αμινοξέων της χαρυβδίνης, όπως και στην περίπτωση της σύνδεσης βουφαδιενολιδών - Na^+/K^+ -ΑΤΡάσης (S. Paula *et al.*, 2005), πιθανά να είναι αυτοί που καθορίζουν την ισχύ της σύνδεσης βουφαδιενολιδών - χαρυβδίνης, με τους δεσμούς, που σχηματίζονται μεταξύ των εξοζών και των αμινοξέων της πρωτεΐνης, να λειτουργούν μάλλον συνεπικουρικά.

Με βάση την παραπάνω υπόθεση κατασκευάζουμε έναν πίνακα που δεικνύει τη δυνατότητα των απομονωμένων βουφαδιενολιδών να σχηματίζουν δεσμούς υδρογόνου, σύμφωνα με τον αριθμό των ατόμων-δοτών (H-bond donor) και των ατόμων-δεκτών (H-bond acceptor) δεσμών υδρογόνου, που υπάρχουν στο μόριό τους:

Βουφαδιενολίδη	Δομή	Δότες δ-H	Δέκτες δ-H
Scillipheosidin-3-O-β-D-glucoside		6	10
9-Hydroxy-scillipheoside		6	10
Glucoscillipheoside		8	14
Gamabufotalin-3-O-α-L-rhamnoside		5	9
Deacetylscilliroside		7	11

<p>Scilliroside</p>		<p>6</p>	<p>12</p>
<p>Proscillaridin A</p>		<p>4</p>	<p>8</p>
<p>Scillaren A</p>		<p>7</p>	<p>13</p>

Όπως διαπιστώνουμε, τα φυτικά στεροειδή που απομονώθηκαν από το εκχύλισμα της χαρυβδίνης, είναι ουσίες πλούσιες σε άτομα δότες (H) και δέκτες (O) δεσμών υδρογόνου με αποτέλεσμα να διευκολύνεται η σύνδεση τους με τα αντίστοιχα αμινοξέα της περιοχής ή των περιοχών σύνδεσης της χαρυβδίνης. Πρόκειται για μόνο- ή δις-γλυκοζυλιωμένες ενώσεις που ο στεροειδής τους σκελετός είναι δις ή τρις-υποκατεστημένος με ομάδες υδροξυλίου (ή ακετόξυ ομάδα στην περίπτωση της *Scilliroside*). Αντίθετα, οι μόνο-υδροξυλιωμένοι στεροειδείς σκελετοί των βουφαδιενολιδών *Scillaren A* και *Proscillaridin A*, που δεν απαντώνται στο εκχύλισμα της πρωτεΐνης, είναι σχετικά φτωχοί σε θέσεις σχηματισμού δεσμών υδρογόνου (κυρίως στο κεντρικό σκελετό της γενίνης), γεγονός που πιθανά να κάνει απαγορευτική τη σύνδεσή τους με το μόριο της χαρυβδίνης.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ – ΠΡΟΟΠΤΙΚΕΣ

- Το μεθανολικό εκχύλισμα της πρωτεΐνης χαρυβδίνης, που απομονώνεται από τον οργανισμό *Charybdis maritima* περιέχει ένα μίγμα γλυκοζιτών και ελεύθερων σακχάρων, μεταξύ των οποίων κυρίαρχη θέση καταλαμβάνουν τα φυτικά στεροειδή **βουφαδιενολίδες** (Bufadienolides).
- Με τη βοήθεια χρωματογραφικών τεχνικών (υγρή χρωματογραφία στήλης, χρωματογραφία λεπτής στιβάδας, υγρή χρωματογραφία λεπτής απόδοσης) επιτεύχθηκε ο διαχωρισμός και η μερική απομόνωση των ποσοτικά επικρατέστερων βουφαδιενολιδών του εκχυλίσματος της χαρυβδίνης.
- Με τη βοήθεια της φασματοσκοπίας μάζας (MS) και με συνδυαστικές τεχνικές χρωματογραφίας-φασματοσκοπίας μάζας πραγματοποιήθηκε ο χαρακτηρισμός των βουφαδιενολιδών που διαχωρίστηκαν από το μεθανολικό εκχύλισμα. Οι ουσίες αυτές είναι οι γλυκοζίτες: *Deacetylscilliroside*, *Gamabufotalin-3-O-α-L-rhamnoside*, *Glucoscillipheoside*, *9-Hydroxy-scillipheoside*, *Scillipheosidin-3-O-β-D-glucoside*, καθώς και τροποποιημένα κατάλοιπα του γλυκοζίτη *Scilliroside*. Είναι πιθανό, το μεθανολικό μίγμα των ουσιών να περιέχει και άλλες βουφαδιενολίδες, που όμως η χαμηλή τους συγκέντρωση στο μίγμα να έκανε δυσχερή τον διαχωρισμό τους ή ικανότητά τους να ιονίζονται να είναι αισθητά χαμηλότερη από τα κυρίαρχα ιόντα που παράγονται κατά τη τεχνική της ESI-MS που χρησιμοποιήθηκε, με αποτέλεσμα οι κορυφές των παραγόμενων ιόντων να εμφανίζουν σχετική αφθονία τέτοια, που κάνει απαγορευτικό τον εντοπισμό τους στα δείγματα που εξετάστηκαν.
- Η παρουσία των συγκεκριμένων 6 μόνο γλυκοζιτών, από ένα σύνολο περισσότερων από 160 βουφαδιενολιδών, που έχει καταγραφεί η παρουσία τους στις διάφορες ποικιλίες του φυτού *Charybdis maritima*, αποτελεί μία ένδειξη κάποιας επιλεκτικής σύνδεσης των ουσιών αυτών με το μόριο της χαρυβδίνης. Η απουσία, μάλιστα, των βουφαδιενολιδών εκείνων με την υψηλότερη συγκέντρωση στο συνολικό εκχύλισμα του οργανισμού (π.χ

Scillaren A) ενισχύει την υπόθεση της **εκλεκτικής δέσμησης** βουφαδιενολιδών – χαρυβδίνης.

- Η εκλεκτική αυτή δέσμηση φαίνεται να καθορίζεται, σε μεγάλο βαθμό, από τον αριθμό και τη θέση των ομάδων υδροξυλίου (-OH), που βρίσκονται ως υποκαταστάτες στον κεντρικό, στεροειδή σκελετό των μορίων και δύνανται να σχηματίσουν δεσμούς υδρογόνου με τα αμινοξέα της χαρυβδίνης, που βρίσκονται σε θέση τέτοια που ευνοεί τη μεταξύ τους σύνδεση.
- Το μίγμα των γλυκοζιτών δείχτηκε ότι εμφανίζει σημαντική κυτταροτοξική – αντικαρκινική δράση με δείκτη αναστολής της κυτταρικής ανάπτυξης IC₅₀ αντίστοιχο με εκείνο των πιο κυτταροτοξικών βουφαδιενολιδών. Η δράση αυτή των προσαρτημένων στη χαρυβδίνη βουφαδιενολιδών, πιθανά να αναπληρώνει τη μειωμένη κυτταροτοξικότητα, που εμφανίζει η συγκεκριμένη *RIP-πρωτεΐνη*, λόγω της περιορισμένης της βιολογικής ενεργότητας, σε σχέση με άλλες πρωτεΐνες της ίδιας κατηγορίας (π.χ. ρισίνη). Έτσι, ενισχύεται ο αμυντικός μηχανισμός του οργανισμού *Charybdis maritima*, που πιθανά να αποτελεί τη φυσιολογική ερμηνεία της παρουσίας του συμπλέγματος χαρυβδίνη-βουφαδιενολίδες.
- Ο περαιτέρω καθαρισμός, η πλήρης απομόνωση των συστατικών του μίγματος των βουφαδιενολιδών και ο χαρακτηρισμός τους με τεχνικές πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR) είναι οι μελλοντικοί στόχοι του ερευνητικού εγχειρήματος. Παράλληλα, η διαλεύκανση του μηχανισμού σύνδεσης και των «κινητήριων δυνάμεων» που οδηγούν στην αλληλεπίδραση των συγκεκριμένων φυτικών στεροειδών με τη χαρυβδίνη, αποτελεί μία ερευνητική πρόκληση. Τέλος η παρασκευή σκευασμάτων με βάση το μίγμα των γλυκοζιτών που απομονώνεται από το εκχύλισμα της χαρυβδίνης, καθώς και εκδόχων που θα περιέχουν το σύμπλεγμα χαρυβδίνης-βουφαδιενολιδών, αποτελεί μία ερευνητική προοπτική με στόχο το σχεδιασμό και τη σύνθεση νέων αντικαρκινικών φαρμάκων.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Aron GM and Irvin JD (1980). Inhibition of herpes simplex virus multiplication by the pokeweed antiviral protein. *Antimicrob Agents Chemother*, 17, 1032-1033.
- Barbieri L, Valbonesi P, Govoni M, Pession A, Stirpe F (2000). Polynucleotide : adenosine glycosidase activity of saporin-L1: effect on various forms of mammalian DNA. *Biochim Biophys Acta*, 1480, 258-266.
- Barbieri L, Battelli MG, Stirpe F (1993). Ribosome-inactivating proteins from plants. *Biochim Biophys Acta*, 1154, 237-282.
- Barbieri L, Brigotti M, Perocco P, Carnicelli D, Ciani M, Mercatali L, Stirpe F (2003). Ribosome-inactivating proteins depurinate poly(ADP-ribosyl)ated poly(ADP-ribose) polymerase and have transforming activity for 3T3 fibroblasts. *FEBS Lett*, 538, 178-182.
- Barbieri L, Gorini P, Valbonesi P, Castiglioni P, Stirpe F (1994). Unexpected activity of saporins. *Nature*, 372, 624.
- Barbieri L, Valbonesi P, Bondioli M, Alvarez ML, Dal Monte P, Landini MP, Stirpe F (2001). Adenine glycosylase activity in mammalian tissues: an equivalent of ribosome-inactivating proteins. *FEBS Lett*, 505, 196-197.
- Battelli MG, Polito L, Bolognesi A, Lafleur L, Fradet Y, Stirpe F (1996). Toxicity of ribosome-inactivating proteins containing immunotoxins to a human bladder carcinoma cell line. *Int J Cancer*, 65, 485-490.
- Bentley R and Trimen H (1880). *Med Plants*, 281
- Bown D (1995). *Encyclopaedia of Herbs and their Uses*. Dorling Kindersley, London.
- Brigotti M, Carnicelli D, Alvergnà P, Pallanca A, Lorenzetti R, Denaro M, Sperti S, Montanaro L (1995). 30-Immature tRNATrp is required for ribosome inactivation by gelonin, a plant RNA N-glycosidase. *Biochem J*, 310, 249-253.
- Brown P, Kamano Y, Petit GR (1972). High Resolution Mass Spectrometry. Bufadienolides I. *Org. Mass Specrom.*, 6, 47-74.
- Carnicelli D, Brigotti M, Montanaro L, Sperti S (1992). Differential requirement of ATP and extra-ribosomal proteins for ribosome inactivation by eight RNA N-glycosidases. *Biochem Biophys Res Commun*, 182, 579-582.
- Chevallier A (1996). *The Encyclopedia of Medicinal Plants* Dorling Kindersley. London.
- Crouch N.R, Bangani V, Mulholland DA (1999). Homoisoflavanones from three South African Scilla species. *Phytochemistry* 51, 943-946.

- Dias C, Graca B, Goncalves L (2000). *Scilla maderensis*, TLC screening and positive inotropic effect of bulb extracts. *J. Ethnopharmacol.* 71, 487-492.
- Dinan L, Harmatha J, Lafont R (2001). Chromatographic procedures for the isolation of plant steroids. *J. Chromatogr. A* 935, 105-123.
- Dueneva M and Gorschen E (1999). RIP-JIP60 alters conformation of ribosomes in vivo. *Biochem Biophys Res Commun*, 258, 572-573.
- Endo Y and Tsurugi K (1988). The RNA N-glycosidase activity of ricin A-chain. The characteristics of the enzymatic activity of ricin A-chain with ribosomes and with rRNA. *J Biol Chem*, 263, 8735-8739.
- Endo Y, Mitsui K, Motizuki K, Tsurugi K (1987). The mechanism of action of ricin and related toxic lectins on eukaryotic ribosomes. The site and characteristics of the modification in 28 S ribosomal RNA caused by the toxins. *J Biol Chem*, 262, 5908-5912.
- Girbes T, Citores L, Ferreras JM, Rojo MA, Iglesias R, Munoz R, Arias F J, Calonge M, Garcia JR, Mrndez E (1993). Isolation and partial characterization of nigrin b, a non-toxic novel type 2 ribosome-inactivating protein from the bark of *Sambucus nigra L.* *Plant Mol Biol*, 22, 1181-1186.
- Girbes T, de Torre C, Iglesias R, Ferreras JM, Mendez E (1996). RIP for viruses. *Nature*, 379, 777-778.
- Görlisch B (1965). Chemische Wertbestimmung der Glukoside eines pflanzlichen Herz and Kreislaufmittels. *Arzneimittel Forschung* 15, 493-503.
- Grieve (1984). A Modern Herbal. Penguin.
- Hartley MR, Chaddock JA, Bonness MS (1996). The structure and function of ribosome-inactivating proteins. *Trends Plant Sci*, 1, 254-260.
- Iglesias R, Arias FJ, Rojo MA, Escarmis C, Ferreras JM, Girbe's T (1993). Molecular action of the type 1 ribosomeinactivating protein saporin 5 on *Vicia sativa* ribosomes. *FEBS Lett.* 325, 291-294.
- Iizuka M, Warashina T, Noro T (2001). Bufadienolides and a New Lignan from the Bulbs of *Urginea maritima*. *Chem Pharm Bull*, 49, (3), 282-286.
- Kamano Y, Kotake A, Hashima H, Inoue M, Morita H, Takeya K, Itokawa H, Nandachi N, Segawa T, Yukita A, Saitou K, Katsuyama M, Pettit GR (1998). Structure-Cytotoxic Activity Relationship for the Toad Poison Bufadienolides. *Bioorg. Med. Chem.* 6, 1103-1115.
- Knechtle SJ (2001). Treatment with immunotoxin. *Philos Trans R Soc Lond*, 356, 681-689.

- Kopp B, Krenn L, Draxler M, Hoyer A, Terkola R, Vallaster P, Robien W (1996). Bufadienolides from *Urginea maritima* from Egypt. *Phytochemistry*, 42, 513-522.
- Kopp B, Krenn L, Jurenitsh J (1990). Bufadienolide in Meerzwiebeln. *Deutsche Apotheker Zeitung* 130, 2175-2180.
- Krebs KG, Heusser D, Winner H (1969). Spray reagents. In: Stahl, E. (Ed.), Thin-Layer Chromatography, 2nd edn. Springer, Berlin, 857-900.
- Krenn L and Kopp B (1998). Bufadienolides from animal and plant sources. *Phytochemistry*, 48 (1), 1-29.
- Krenn L, Ferth R, Robien W, Kopp B (1991). Bufadienolides from *Urginea maritima sensu strictu*. *Planta Med.* 57, 560-565.
- Krenn L, Jelovina M, Kopp B (2000). New Bufadienolides from *Urginea maritima sensu strictu*. *Fitoterapia* 71, 126-129.
- Krenn L, Kopp B (1996). 9-Hydroxyscilliphaeoside, a new Bufadienolide from *Urginea maritima*. *J. Nat. Prod.*, 59, 612-613.
- Lin JY, Liu K, Chen CC, Tung TC (1971). Effect of crystalline ricin on the biosynthesis of protein, RNA, and DNA in experimental tumor cells. *Cancer Res*, 31, 921-924.
- Liu RS, Wei GG, Yang Q, He WJ, Liu WY (2002). Cinnamomin, a type II ribosome-inactivating protein, is a storage protein in the seed of the camphor tree (*Cinnamomum camphora*). *Biochem. J.* 362, 659-663.
- Lodge JK, Kaniewski WK, Tumer NE (1993). Broad-spectrum virus resistance in transgenic plants expressing pokeweed antiviral protein. *PNAS*, 90, 7089-7093.
- Lord JM, Roberts LM, Robertus JD (1994). Ricin: structure, mode of action, and some current applications. *FASEB J*, 8, 201-208.
- Magnusson S, Berg T, Turpin E, Frenoy J-P (1991). Interactions of ricin with sinusoidal endothelial rat liver cells. Different involvement of two distinct carbohydrate-specific mechanisms in surface binding and internalization. *Biochem J*, 277, 855-861.
- Mills SY (1985). The Dictionary of Modern Herbalism Wellingborough: Thorsons.
- Moerk FX (1894). *Amer J Pharm*, 245-250.
- Montfort W, Villafranca JE, Monzingo AF, Ernst SR, Katzin B, Rutenber E, Xuong NH, Hamlin R, Robertus JD (1987). *J Biol Chem*, 262 (11), 5398-5403.
- Mosmann T (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods*, 65, 55-61.

- Nicolas E, Beggs JM, Haltiwanger BM, Taraschi TF (1998). A new class of DNA glycosylase/apurinic/aprimidinic lyases that act on specific adenines in single-stranded DNA. *J Biol Chem*, 273, 17216-17220.
- Nicolas E, Beggs JM, Taraschi TF (2000). Gelonin is an unusual DNA glycosylase that removes adenine from single-stranded DNA, normal base pairs and mismatches. *J Biol Chem*, 275, 31399-31406.
- Nielsen K and Boston RS (2001). Ribosome-inactivating proteins: a plant perspective. *Annu Rev Physiol Plant Mol Biol*, 52, 785-816.
- Olsnes S and Pihl A (1972). Ricin a potent inhibitor of protein synthesis. *FEBS Lett*, 20, 327-329.
- Pascual-Villalobos MJ and Fernandez M (1999). Insecticidal activity of ethanolic extracts of *Urginea maritima* (L.) Baker bulbs. *Industrial Crops and Products*, 10, 115-120.
- Paula S, Tabet MR, Ball WJ (2005). Interactions between Cardiac Glycosides and Sodium/Potassium-ATPase: Three-Dimensional Structure-Activity Relationship Models for Ligand Binding to the E2-Pi Form of the Enzyme versus Activity Inhibition. *Biochemistry* 44, 498-510.
- Peumans WJ, Hao Q, Van Damme EJM (2001). Ribosome inactivating proteins from plants: more than RNA N-glycosidases? *FASEB J*, 15, 1493-1506.
- Pfoster MF and Speta F (2004). From Scilla to Charybdis – is our voyage safer now? *Plant Syst Evol*, 246, 245-263.
- Pincus SH and Tolstikov VV (1995). Anti-human immunodeficiency virus immunoconjugates. *Adv Pharmacol*, 32, 205-247.
- Pohl T, Koorbanally C, Crouch NR, Mulholland DR (2001). Bufadienolides from *Drimys robusta* and *Urginea altissima* (Hyacinthaceae). *Phytochemistry* 58, 557–561.
- Polunin O and Huxley A (1987). *Flowers of the Mediterranean*, Hogarth Press.
- Praznik W and Spies T (1993). Fructo-oligosaccharides from *Urginea maritima*. *Carbohydr Res*, 243, 91-97.
- Quezel P and Santa S (1963). *New flora of Algeria and of southernmost desert areas*. ED. CNRS.
- Roberts WK and Selitrennikoff CP (1986). Isolation and partial characterization of two antifungal proteins from barley. *Biochim Biophys Acta*, 880, 161-170.
- Santanche S, Bellelli A, Brunori M (1997). The unusual stability of Saporin, a candidate for the synthesis of immunotoxins. *Biochem Biophys Res Commun*, 234, 129-132.
- Simmons BM, Stahl PD, Russell JH (1986). Mannose receptor mediated uptake of ricin toxin and ricin A chain by macrophages. Multiple intracellular pathways for A chain translocation. *J Biol Chem*, 261, 7912-7920.

- Steyn PS, van Heerden FR (1998). Bufadienolides of plant and animal origin. *Nat. Prod. Reports* 15, 397-413.
- Stirpe F (1982). On the action of ribosome-inactivating proteins: are plant ribosomes species-specific? *Biochem J*, 202, 279-280.
- Stirpe F (2004). Ribosome-inactivating proteins. *Toxicon*, 44, 371-383.
- Stirpe F, Bailey S, Miller SP, Bodley JW (1988). Modification of ribosomal RNA by ribosome-inactivating proteins from plants. *Nucleic Acids Res*, 16, 1349-1357.
- Stirpe F, Olsnes S, Pihl A (1980). Gelonin, a new inhibitor of protein synthesis, nontoxic to intact cells. Isolation, characterization, and preparation of cytotoxic complexes with concanavalin A. *J Biol Chem*, 255, 6947-6955.
- The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products, Veterinary Medicines Evaluation Unit, *Urginea maritima* Summary Report, EMEA/MRL/603/99-FINAL.
- Thiesen HJ, Juhl H, Arndt R (1987). Selective killing of human bladder cancer cells by combined treatment with A and B chain ricin antibody conjugates. *Cancer Res*, 47, 419-423.
- Touloupakis E, Gessmann R, Kavelaki K, Christofakis E, Petratos K, Ghanotakis DF (2006). Isolation, characterization, sequencing and crystal structure of charybodin, a type 1 ribosome-inactivating protein from *Charybdis maritima* agg. *FEBS Journal*, 273, 2684-2692.
- Usher G (1974). A Dictionary of Plants Used by Man, Constable.
- Van Damme EJM, Hao Q, Barre A, Vandenbussche F, Desmyter S, Rouge P, Peumans WJ (2001). Ribosome inactivating proteins: a family of plant proteins that do more than inactivate ribosomes. *Crit Rev Plant Sci*, 20, 395-465.
- Vega FA, Garcia-Jalon I, Fernandez M, Renedo J (1972). Anthocyanins of red squill, *Urginea maritima*. *Phytochemistry*, 11, 2896.
- Verbiscar AJ, Patel J, Banigan TF, Schatz RA (1986). Scilliroside and other scilla compounds in Red Squill. *J Agric Food Chem*, 34, 973-979.
- Verbiscar AJ, Patel J, Banigan TF, Schatz RA (1986). Scilliroside and Other Scilla Compounds in Red Squill. *J Agric. Food Chem.* 34, 973-979.
- Wagner H, Blatt S (1984). Plant Drug Analysis. A Thin Layer Chromatography Atlas. Springer, New York.
- Walsh TA, Morgan AE, Hey TD (1991). Characterization and molecular cloning of a proenzyme form of a ribosome-inactivating protein from maize. Novel mechanism of proenzyme activation by proteolytic removal of a 2.8-kilodalton internal peptide segment. *J Biol Chem*, 266, 23422-23427.
- Ye M and Guo DA (2005). Analysis of bufadienolides in the Chinese drug ChanSu by high-performance liquid chromatography with atmospheric pressure chemical ionization tandem mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 19, 1881-1892.

- Ye M, Guo H, Han J, Guo D (2006). Simultaneous determination of cytotoxic bufadienolides in the Chinese medicine ChanSu by high-performance liquid chromatography coupled with photodiode array and mass spectrometry detections. *J. Chromatogr. B* 838, 86–95.
- Yu L, Gu F, Zhang C, Xie S, Guo Y (1998). Targeted diagnosis and treatment of superficial bladder cancer with monoclonal antibody BDI-1. *Chin Med J*, 111, 404-407.
- Zang Z, Xu H, Yu L, Yang D, Xie S, Shi Y, Li Z, Li J, Wang J, Li M, Guo Y, Gu F (2000). Intravesical immunotoxin as adjuvant therapy to prevent the recurrence of bladder cancer. *Chin Med J*, 113, 1002-1006.
- Zhou X, Li XD, Yuan JZ, Tang ZH, Liu WY (2000). Toxicity of cinnamomin-a new type II ribosome-inactivating protein to bollworm and mosquito. *Insect Biochem Mol Biol*, 30, 259-264.

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

ATP: αδενόσινο-5-τριφωσφορικός εστέρας

DNA: δεοξυριβονουκλεϊκό οξύ

DTT: διθειοθρεϊτόλη

EDTA: αιθυλενο-διαμινο-τετραοξικό οξύ

ESI: Electron Spray Ionization/Τεχνική ιονισμού μορίων με ψεκασμό ηλεκτρονίων

HeLa: κύτταρα από καρκίνωμα του τραχήλου της μήτρας

HIV: Human immunodeficiency virus

HPLC: Υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης

IR: Infra Red/υπέρυθρη ακτινοβολία

kDa: kilodalton

LC: Υγρή χρωματογραφία στήλης

MS: Mass Spectrometry/ φασματοσκοπία μάζας

MW: μοριακό βάρος

PAP: Pokeweed antiviral protein

PMSF: φαινυλο-μεθυλ-σουλφονυλο-φθορίδιο

R_f: συντελεστής επιβράδυνσης

RIP: Ribosome inactivating protein

rRNA: ριβοσωμικό ριβονουκλεϊκό οξύ

RSD: σχετική τυπική απόκλιση

TLC: Χρωματογραφία λεπτής στιβάδας

tRNA: μεταφορικό ριβονουκλεϊκό οξύ

UV: Ultra violet/υπεριώδης ακτινοβολία