

ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗΣ
ΤΟΜΕΑΣ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΟΛΕΥΡΩΠΑΙΝΗΣ ΣΤΗΝ ΧΡΟΝΙΑ ΚΑΡΔΙΑΚΗ
ΑΝΕΠΑΡΚΕΙΑ ΠΟΥ ΠΡΟΚΑΛΕΙ Η ΧΟΡΗΓΗΣΗ ΤΗΣ ΑΔΡΙΑΜΥΚΙΝΗΣ.
ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΥ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΥ ΔΡΑΣΗΣ.

ΚΩΝ/ΝΟΣ Ε. ΙΩΑΝΝΙΔΗΣ
ΦΑΡΜΑΚΟΠΟΙΟΣ

ΑΘΗΝΑ 2012

ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗΣ
ΤΟΜΕΑΣ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΟΛΕΥΡΩΠΑΙΝΗΣ ΣΤΗΝ ΧΡΟΝΙΑ ΚΑΡΔΙΑΚΗ
ΑΝΕΠΑΡΚΕΙΑ ΠΟΥ ΠΡΟΚΑΛΕΙ Η ΧΟΡΗΓΗΣΗ ΤΗΣ ΑΔΡΙΑΜΥΚΙΝΗΣ.
ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΥ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΥ ΔΡΑΣΗΣ.

ΚΩΝ/ΝΟΣ Ε. ΙΩΑΝΝΙΔΗΣ
ΦΑΡΜΑΚΟΠΟΙΟΣ

ΑΘΗΝΑ 2012

ΕΠΤΑΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

- Μικρός Εμμανουήλ, Καθηγητής (Επιβλέπων Καθηγητής)
- Ανδρεάδου Ιωάννα, Επίκουρη Καθηγήτρια
- Σιγάλα Φραγκίσκα, Επίκουρη Καθηγήτρια
- Ηλιοδρομίτης Ευστάθιος, Καθηγητής
- Σκαλτσούνης Αλέξιος-Λέανδρος, Καθηγητής
- Παπαπετρόπουλος Ανδρέας, Καθηγητής
- Τσαντίλη-Κακουλίδου Άννα, Καθηγήτρια

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η εργασία αυτή πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Φαρμακευτικής Ανάλυσης του Τομέα Φαρμακευτικής Χημείας του Τμήματος Φαρμακευτικής του Πανεπιστημίου Αθηνών. Η ολοκλήρωση αυτής της εργασίας δεν θα ήταν δυνατή χωρίς τη συμμετοχή, την υποστήριξη και το ενδιαφέρον ορισμένων ανθρώπων τους οποίους και θα ήθελα να ευχαριστήσω.

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον επιβλέποντα Καθηγητή κ. Εμμανουήλ Μικρό, που είχε την ευθύνη για την ανάθεση του συγκεκριμένου θέματος. Τον ευχαριστώ για την επιστημονική καθοδήγηση και τις συμβουλές που μου παρείχε, για την εποικοδομητική συνεργασία και την υπομονή που επέδειξε καθ'όλη τη διάρκεια της εκπόνησης της παρούσας διδακτορικής διατριβής.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ στην Επικ. Καθηγήτρια κ. Ιωάννα Ανδρεάδου για τον σχεδιασμό και την ανάπτυξη του θέματος, για την καθοδήγηση και ουσιαστική υποστήριξη της, ώστε να πραγματοποιηθεί η παρούσα εργασία. Επίσης, θα ήθελα να την ευχαριστήσω για τη συμπαράσταση και τη φιλία της που μου έχει προσφέρει στα έξι χρόνια που βρίσκομαι στην ερευνητική της ομάδα.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω την Επικ. Καθηγήτρια κ. Φραγκίσκα Σιγάλα για την πραγματοποίηση του πειραματικού τμήματος της μελέτης και την καθοδήγηση της σε όλα τα στάδια της προσπάθειας αυτής.

Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω τα υπόλοιπα μέλη της Επταμελούς Εξεταστικής Επιτροπής, τον Καθηγητή κ. Ευστάθιο Ηλιοδρομίτη, τον Καθηγητή κ. Λεάνδρο Σκαλτούνη, τον Καθηγητή κ. Ανδρέα Παπαπετρόπουλο και την Καθηγήτρια κ. Άννα Τσαντίλη-Κακουλίδου για την καθοδήγηση και τις επισημάνσεις τους κατά τη διάρκεια της συγγραφής.

Ευχαριστώ την Επικ. Καθηγήτρια κ. Αικατερίνη Νάκα για την πολύτιμη βοήθειά της στην πραγματοποίηση και επεξεργασία της υπερηχοκαρδιογραφικής ανάλυσης, τον Επικ. Καθηγητή κ. Αλιγιάννη Νεκτάριο για την προμήθεια της αδριαμυκίνης και της ολευρωπαΐνης και τον Δρ. Σαράντο Κωστίδη για την εκμάθηση του φασματόμετρου NMR και του στατιστικού προγράμματος SIMCA.

Τέλος, θέλω να ευχαριστήσω όλους τους Καθηγητές και όλους τους συμφοιτητές που συνεργάστηκα αυτά τα τέσσερα χρόνια της διδακτορικής διατριβής μου για την πολύτιμη βοήθεια και υποστήριξή τους.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

A. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	8
ΚΑΡΔΙΑΚΗ ΑΝΕΠΑΡΚΕΙΑ.....	9
1. ΓΕΝΙΚΑ.....	9
1.1 Ορισμός.....	9
1.2 Επιδημιολογία.....	9
1.3 Αιτιολογία.....	10
1.4 Πρόγνωση.....	11
2. ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ.....	12
3. ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΗ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ.....	15
3.1 Γενικά.....	15
3.2 Περιφερικοί αντιρροπιστικοί μηχανισμοί.....	15
3.3 Υπερτροφική αναδιαμόρφωση.....	17
3.4 Κυτταρική παθοφυσιολογία.....	18
4. ΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΗ ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗ.....	22
4.1 Φαρμακευτική θεραπεία.....	22
5. ΚΑΡΔΙΑΚΗ ΑΝΕΠΑΡΚΕΙΑ ΚΑΙ ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟ ΣΤΡΕΣ.....	24
5.1 Γενικά.....	24
5.2 Πηγές ενεργών ενδιαμέσων οξυγόνου.....	28
5.3 Πιθανά ερεθίσματα αυξημένης παραγωγής ενεργών ενδιαμέσων οξυγόνου στην ΚΑ.....	30
5.4 Επιδράσεις ενεργών ενδιαμέσων οξυγόνου στην ΚΑ.....	31
5.5 Ποσοτικοποίηση του οξειδωτικού στρες.....	32
5.5.1 Μηλονική διαλδεϋδη.....	32
5.5.2 Πρωτεϊνικά καρβονύλια.....	32
5.5.3 Νιτροτυροσίνη.....	33
6. ΔΕΙΚΤΕΣ ΦΛΕΓΜΟΝΗΣ ΚΑΙ ΑΠΟΠΤΩΣΗΣ.....	34
7. ΑΔΡΙΑΜΥΚΙΝΗ.....	37
7.1 Γενικά.....	37
7.2 Οξεία καρδιοτοξικότητα.....	38
7.3 Χρόνια καρδιοτοξικότητα – Καρδιακή ανεπάρκεια.....	38
7.4 Παθοφυσιολογικοί μηχανισμοί.....	39

7.4.1 Σχηματισμός ελεύθερων ριζών οξυγόνου	39
7.4.2 Εξασθένιση των αντί-αποπτωτικών μηχανισμών.....	42
7.4.3 Ενεργοποίηση της iNOS και διαταραχή της ομοιόστασης του NO.....	48
7.4.4 Απορρύθμιση της ομοιόστασης σιδήρου	50
7.4.5 Απορρυθμίση της ομοιόστασης του Ca^{2+}	54
7.4.6 Πρόκληση βλαβών στο DNA μέσω της οδού του κεραμιδίου.....	56
7.4.7 Μεταβολές στον ενεργειακό μεταβολισμό.....	57
7.4.8 Αμεσές επιδράσεις στο μυοκάρδιο.....	66
7.5 Φαρμακολογική αντιμετώπιση καρδιοτοξικότητας ανθρακυκλινών.....	67
8. ΟΛΕΥΡΩΠΑΙΝΗ.....	68
9. ΜΕΤΑΒΟΝΟΜΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ.....	72
9.1 Εισαγωγή στην μεταβονομική.....	72
9.2 Εφαρμογές της μεταβονομικής στον ιστό μυοκαρδίου.....	73
B. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	77
1. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ.....	78
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	79
2.1 Πρωτόκολλο μελέτης	79
2.2 Εργαστηριακές Αναλύσεις.....	80
2.2.1 Ηχοκαρδιογραφική εξέταση	80
2.2.2 Ιστολογική αξιολόγηση	81
2.2.3 Ομογενοποίηση καρδιακών ιστών	81
2.2.4 Μέτρηση μηλονικής διαλδεϋδης.....	82
2.2.5 Μέτρηση πρωτεϊνικών καρβονυλίων	84
2.2.6 Μέτρηση νιτροτυροσίνης	86
2.2.7 Μέτρηση ιντερλευκίνης-6.....	88
2.2.8 Μέτρηση Big ενδοθηλίνης-1.....	90
2.2.9 Προσδιορισμός πρωτεΐνης.....	92
2.2.10 Western Blot	93
2.2.11 Ανοσοϊστοχημική ανάλυση.....	99
2.2.12 Στατιστική ανάλυση αποτελεσμάτων.....	104
2.2.13 Μεταβονομική.....	104
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	112
4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΜΕΤΑΒΟΝΟΜΙΚΗΣ.....	125
5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	170

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

6.ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑ.....	183
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	184
ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	200
ABSTRACT.....	203

A. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΚΑΡΔΙΑΚΗ ΑΝΕΠΑΡΚΕΙΑ

1. Γενικά

1.1 Ορισμός

Καρδιακή ανεπάρκεια (ΚΑ) ορίζεται η κατάσταση κατά την οποία η καρδιά δεν μπορεί να αντλήσει επαρκή όγκο αίματος για τις ανάγκες του ιστικού μεταβολισμού ή μπορεί να το επιτύχει αυτό μόνο με παθολογικά αυξημένη πίεση πλήρωσης ¹. Κατά τον Milton Packer η ΚΑ ορίζεται ως ένα σύνθετο κλινικό σύνδρομο, το οποίο χαρακτηρίζεται από διαταραχές της λειτουργικότητας της αριστερής κοιλίας και της νευροορμονικής διέγερσης, συνοδευόμενο από κακή ανοχή στην κόπωση, κατακράτηση υγρών και μειωμένη επιβίωση ².

1.2 Επιδημιολογία

Η καρδιακή ανεπάρκεια είναι ένα συχνό σύνδρομο με αυξανόμενη συχνότητα και επιπολασμό. Περίπου 5 εκατομμύρια ασθενείς στις ΗΠΑ πάσχουν από ΚΑ, και κάθε χρόνο διαγιγνώσκονται 500,000 νέες περιπτώσεις ³. Είναι κυρίως πάθηση που σχετίζεται με την ηλικία, με μεγαλύτερο από το 75% των ασθενών που πάσχουν από ΚΑ να έχουν ηλικία μεγαλύτερη των 65 ετών. Ο επιπολασμός της ΚΑ αυξάνει από 1% σε ηλικίες μικρότερες των 60 ετών σε 10% σε ηλικίες που ξεπερνούν τα 80 χρόνια ³. Η συχνότητα εμφάνισης της ΚΑ είναι μεγαλύτερη σε άνδρες από ότι σε γυναίκες σε όλες τις ομάδες ηλικίας κάτω των 65 ετών ⁴. Αυτό εξηγείται πιθανώς από τη μεγαλύτερη συχνότητα εμφάνισης στεφανιαίας νόσου στους άνδρες. Ωστόσο, μετά την ηλικία των 75 ετών, περισσότερες γυναίκες παρά άνδρες εμφανίζουν ΚΑ. Ο αιφνίδιος θάνατος που εμφανίζεται σε ασθενείς με ΚΑ οφείλεται κυρίως σε αρρυθμίες, πνευμονική εμβολή ή οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου, και συμβαίνει σε ποσοστό 40% ⁵. Το υπόλοιπο 60% των ασθενών καταλήγουν λόγω της προοδευτικής εξέλιξης της νόσου ⁵.

1.3 Αιτιολογία

Η ΚΑ είναι ένα παθοφυσιολογικό σύμπλεγμα που αφορά τη δυσλειτουργία της καρδιάς και αποτελεί την κατάληξη πολλών νοσημάτων του καρδιαγγειακού συστήματος. Στις αναπτυγμένες χώρες, το σύνδρομο της ΚΑ είναι αποτέλεσμα κυρίως εμφράγματος του μυοκαρδίου που έχει σαν τελικό επακόλουθο τη μείωση της καρδιακής λειτουργίας (ισχαιμική μυοκαρδιοπάθεια) ⁶. Η αρτηριακή υπέρταση παραμένει μια σημαντική αιτία ανάπτυξης ΚΑ, και σε πολύ μεγαλύτερο ποσοστό σε ασθενείς που συνυπάρχει στεφανιαία νόσος ⁶. Άλλες αιτίες ανάπτυξης ΚΑ είναι η διαστολική ή συμφορητική μυοκαρδιοπάθεια, (η οποία οδηγεί σε διαστολή της αριστερής ή και της δεξιάς κοιλίας προκαλώντας συστολική δυσλειτουργία), η αλκοολική καρδιομυοπάθεια, η ιογενής μυοκαρδίτιδα (συμπεριλαμβανομένης και της μόλυνσης από τον ιό HIV), καθώς και μυοκαρδιοπάθειες άγνωστης αιτιολογίας (ιδιοπαθής καρδιομυοπάθεια) ⁷. Σπάνιες αιτίες αποτελούν η αιμοχρωμάτωση, η αμυλοείδωση, η σαρκοείδωση, μεταβολικές διαταραχές και η καρδιοτοξικότητα διαφόρων φαρμάκων ⁷. Στους Πίνακες 1 και 2 περιλαμβάνονται τα κυριότερα αίτια της δεξιάς και αριστερής ΚΑ αντίστοιχα ⁸.

Πίνακας 1. Αιτίες δεξιάς καρδιακής ανεπάρκειας.

Προτριχοειδική απόφραξη:

1. Συγγενής (αρτηριοφλεβώδης επικοινωνία).
2. Ιδιοπαθής πνευμονική υπέρταση.

Πρωτοπαθής δεξιά καρδιακή ανεπάρκεια:

1. Έμφραγμα δεξιάς κοιλίας.

Πνευμονική καρδιά:

1. Αγγειοσύσπαση λόγω υποξίας.
2. Πνευμονική εμβολή.
3. Χρόνια αποφρακτική νόσος των πνευμόνων.

Πίνακας 2. Αιτίες αριστερής καρδιακής ανεπάρκειας.

Υπερφόρτωση όγκου:

1. Ανεπάρκεια βαλβίδων (μιτροειδούς ή αορτικής).
2. Υπερδυναμική κυκλοφορία (αναιμία, υπερθυρεοειδισμός).

Υπερφόρτωση πίεσης:

1. Αρτηριακή υπέρταση.
2. Απόφραξη εκροής (στένωση αορτικής βαλβίδας).

Απώλεια μυϊκής μάζας:

1. Έμφραγμα του μυοκαρδίου.
2. Νοσήματα του συνδετικού ιστού (συστηματικός ερυθηματώδης λύκος).

Μείωση της συσταλτικότητας:

1. Τοξικές ουσίες (οινόπνευμα, δοξορουβικίνη).
2. Λοιμώξεις (ιογενείς, βακτηριακές).

Μείωση της καρδιακής πλήρωσης:

1. Στένωση μιτροειδούς.
2. Νοσήματα περικαρδίου (συμπιεστική περικαρδίτιδα και καρδιακός επιπωματισμός).
3. Διηθητικά νοσήματα (αμυλοείδωση).

1.4 Πρόγνωση

Το σύνδρομο της ΚΑ έχει κακή πρόγνωση. Το ποσοστό 5 ετούς επιβίωσης είναι μικρότερο από 50% σε όλες τις ομάδες ηλικίας³. Το ποσοστό θνητότητας ποικίλει από 5% τον χρόνο για τους ασθενείς που παρουσιάζουν λίγα ή καθόλου συμπτώματα και είναι μέχρι 30% για τους ασθενείς με πολλαπλά συμπτώματα³. Γενικά, οι άνδρες έχουν φτωχότερη πρόγνωση σε σύγκριση με τις γυναίκες γιατί εμφανίζουν σε μεγαλύτερο ποσοστό στεφανιαία νόσο, η οποία σχετίζεται με μεγαλύτερα ποσοστά θνητότητας σε αντίθεση με τη διαστολική ΚΑ η οποία παρουσιάζει μικρότερη θνητότητα³. Τα παραπάνω στοιχεία δείχνουν την αναγκαιότητα της πρώιμης διάγνωσης της ΚΑ και της θεραπευτικής παρέμβασης. Τις τελευταίες δύο δεκαετίες η πρόγνωση της ΚΑ έχει βελτιωθεί σημαντικά, πιθανότατα λόγω της χρήσης των αναστολέων του μετατρεπτικού ενζύμου της αγγειοτασίνης (α-MEA) και των αναστολέων των β-αδρενεργικών υποδοχέων (β-αποκλειστών), οι οποίοι έχουν βελτιώσει εντυπωσιακά την επιβίωση.

2. Ταξινόμηση

- **Αριστερή, δεξιά και ολική ΚΑ** ανάλογα με την κοιλία που πάσχει. Στην αριστερή ΚΑ αυξάνεται η διαστολική πίεση της αριστερής κοιλίας, η πίεση του αριστερού κόλπου, των πνευμονικών τριχοειδών και της πνευμονικής αρτηρίας με αποτέλεσμα να επικρατούν συμπτώματα από τους πνεύμονες. Στην περίπτωση της δεξιάς ΚΑ έχουμε κάμψη της δεξιά κοιλίας κυρίως λόγω χρόνιων παθήσεων των πνευμόνων και ανεπάρκειας της τριγλώχινης βαλβίδας που οδηγούν σε συμπτώματα από το φλεβικό σύστημα. Η ολική ΚΑ είναι αποτέλεσμα της συνύπαρξης δεξιάς και αριστερής ΚΑ ⁹.
- **Οξεία και χρόνια ΚΑ** ¹⁰. Οξεία ΚΑ μπορεί να προκύψει έπειτα από οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου ή από έκθεση σε τοξικά επίπεδα φαρμάκων. Χρόνια ΚΑ αναπτύσσεται όταν η καρδιά υφίσταται βλάβες από καταστάσεις όπως πρωτοπαθής υπέρταση ή ισχαιμία και έμφραγμα. Στη χρόνια ΚΑ οι ασθενείς εμφανίζουν περιόδους ύφεσης και έξαρσης, με τις τελευταίες να χρειάζονται συνήθως νοσηλεία.
- **Συστολική και διαστολική ΚΑ** ¹¹. Σε περιπτώσεις διαστολικής δυσλειτουργίας, το τοίχωμα της κοιλίας έχει μειωμένη ενδοτικότητα, δηλαδή είναι παθολογικά άκαμπτο και, κατά συνέπεια, δεν είναι εφικτή η ικανοποιητική πλήρωση της κοιλίας παρά τις φυσιολογικές διαστολικές πιέσεις πλήρωσης. Το αποτέλεσμα είναι η μείωση του τελοδιαστολικού όγκου και, συνεπώς, η μείωση του όγκου παλμού, σύμφωνα με το νόμο των Frank-Starling. Αντίθετα με τη διαστολική δυσλειτουργία, η συστολική δυσλειτουργία οφείλεται σε βλάβη του μυοκαρδίου, όπως συμβαίνει για παράδειγμα στο έμφραγμα του μυοκαρδίου και χαρακτηρίζεται από μια μείωση της καρδιακής συσταλτικότητας (χαμηλότερος όγκος παλμού για ένα δεδομένο τελοδιαστολικό όγκο). Η συστολική δυσλειτουργία εκδηλώνεται με μείωση του κλάσματος εξώθησης ενώ η επηρεασμένη κοιλία δεν παρουσιάζει υπερτροφία.
- **Αντιρροπούμενη και μη ΚΑ**. Ο όρος αντιρρόπηση στην ΚΑ, αναφέρεται στα πρώτα στάδια του συνδρόμου, στα οποία δεν υπάρχουν σαφείς κλινικές εκδηλώσεις, λόγω της ικανότητας των αντιρροπιστικών μηχανισμών να ελέγχουν τη μειωμένη καρδιακή παροχή. Στην εξέλιξη της νόσου οι

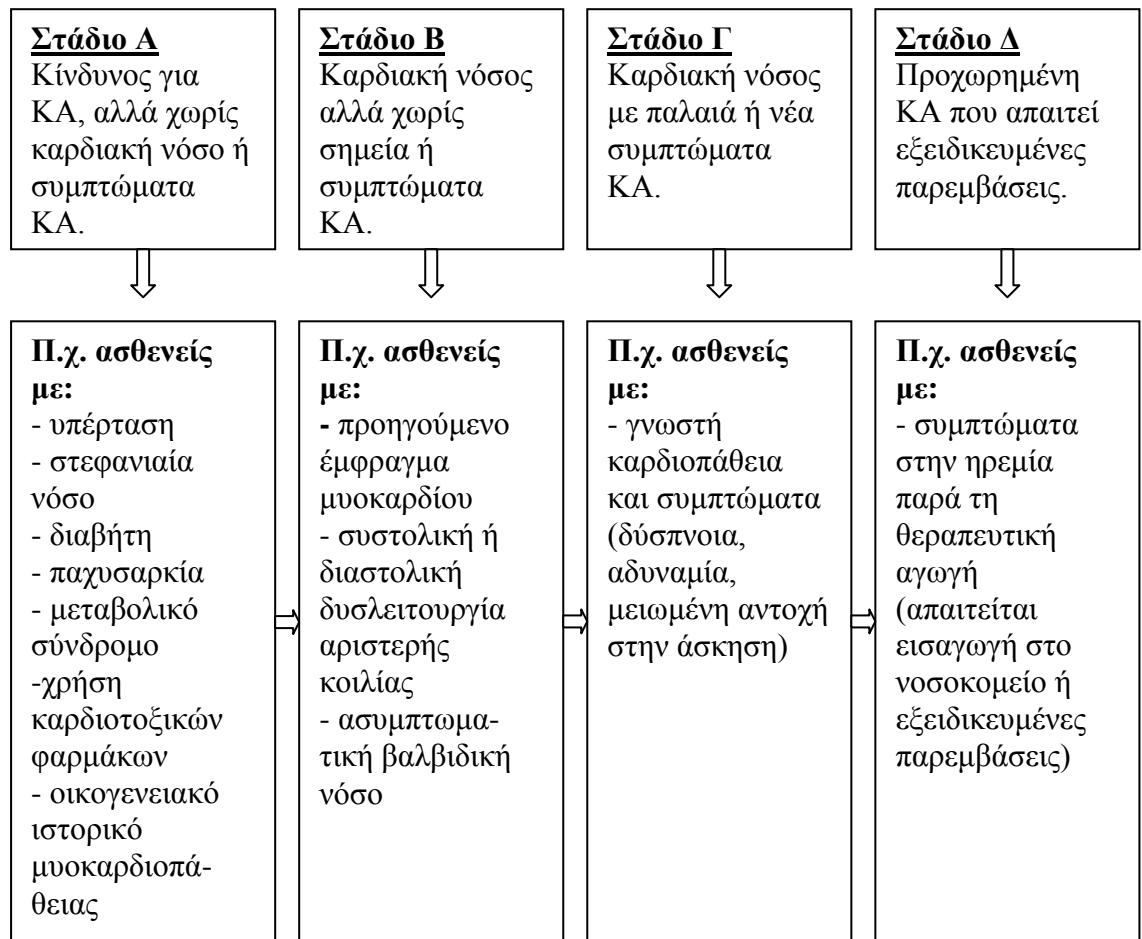
αντιρροπιστικοί μηχανισμοί δεν επαρκούν, με αποτέλεσμα την προοδευτική μεγαλοκαρδία και την εμφάνιση συμπτωμάτων.

- Η **Καρδιολογική Εταιρεία της Νέας Υόρκης** (New York Heart Association – NYHA), για την καλύτερη μελέτη της ΚΑ, έχει προτείνει το διαχωρισμό της σε τέσσερα στάδια – κλάσεις (βαθμοί σοβαρότητας), ανάλογα με τα συμπτώματα και τον περιορισμό της φυσικής δραστηριότητας των ασθενών (Πίνακας 3) ¹².

**Πίνακας 3. Λειτουργική ταξινόμηση της ΚΑ σύμφωνα με την
Καρδιολογική Εταιρεία της Νέας Υόρκης (NYHA).**

- **Στάδιο I :** Ασθενείς με καρδιοπάθεια, αλλά χωρίς περιορισμό της σωματικής δραστηριότητάς τους. Η συνήθης σωματική δραστηριότητα δεν προκαλεί αίσθημα κοπώσεως, παλμών, δύσπνοιας ή στήθαγχικό πόνο στον ασθενή.
- **Στάδιο II :** Ασθενείς με καρδιοπάθεια που προκαλεί σχετικό περιορισμό της σωματικής δραστηριότητάς τους. Αισθάνονται άνετα στην ηρεμία. Η συνήθης όμως σωματική δραστηριότητα τους προκαλεί αίσθημα κοπώσεως, παλμών, δύσπνοιας ή στήθαγχικό πόνο.
- **Στάδιο III :** Ασθενείς με καρδιοπάθεια που προκαλεί σοβαρό περιορισμό της σωματικής δραστηριότητάς τους. Αισθάνονται άνετα σε ηρεμία. Όμως, σε σωματική δραστηριότητα μικρότερη από τη συνηθισμένη, προκαλείτε αίσθημα κοπώσεως, παλμών, δύσπνοιας ή στήθαγχικό πόνο.
- **Στάδιο IV :** Ασθενείς με καρδιοπάθεια που προκαλεί αδυναμία επιτέλεσεως οποιασδήποτε σωματικής δραστηριότητας χωρίς ενόχληση. Συμπτώματα ΚΑ ή στήθαγχικού πόνου μπορεί να εκδηλώνονται ακόμη και στην ηρεμία. Με κάθε σωματική δραστηριότητα τα ενοχλήματα επιτείνονται.

- Το 2001 το **Αμερικανικό Κολλέγιο Καρδιολογίας** και η **Αμερικανική Ένωση Καρδιολογίας** διαμόρφωσαν, χωρίς να καταργούν αυτής της ΝΥΗΑ, μια νέα προσέγγιση στην ταξινόμηση της ΚΑ, με βάση την εξελικτική πορεία της νόσου και δίνοντας ιδιαίτερη έμφαση στην πρόληψη και στην έγκαιρη διάγνωση (Σχήμα 1) ¹³.



Σχήμα 1. Ταξινόμηση της ΚΑ από το Αμερικανικό Κολλέγιο Καρδιολογίας και την Αμερικανική Ένωση Καρδιολογίας (2001).

3. Παθολογική φυσιολογία

3.1 Γενικά

Η κυριότερη λειτουργία του κυκλοφορικού συστήματος είναι η μεταφορά οξυγονωμένου αίματος στα περιφερικά όργανα. Η κυκλοφορική ομοιοστασία απαιτεί την καλή καρδιακή απόδοση και την φυσιολογική μέση αρτηριακή πίεση (Mean Arterial Pressure – MAP) ¹⁴. Η σπουδαιότητα της μέσης αρτηριακής πίεσης οφείλεται στο γεγονός ότι η συστηματική κυκλοφορία περιλαμβάνει έναν μεγάλο αριθμό κυττάρων τα οποία ανθίστανται στη ροή του αίματος. Αυτή η αντίσταση στην ροή του αίματος μπορεί να μεταβάλλει (είτε αυξάνοντας, είτε μειώνοντας) τη μεταφορά οξυγόνου στους ιστούς. Το αποτέλεσμα είναι η μεταβολή σε νέο επίπεδο ρύθμισης της καρδιακής παροχής, μέσω της αριστερής κοιλίας, έτσι ώστε να αποκατασταθεί η αιμάτωση των περιφερικών ιστών ¹⁴.

Ενώ η τοπική αυτορύθμιση καθορίζει την περιφερική διανομή της καρδιακής παροχής κάτω από φυσιολογικές συνθήκες, το κυκλοφορικό σύστημα πρέπει επίσης να έχει τη δυνατότητα να μεταβάλλει την τοπική αυτορύθμιση όταν η απαίτηση των ιστών για οξυγόνο υπερβαίνει τη δυνατότητα της καρδιακής απόδοσης ¹⁴.

3.2 Περιφερικοί αντιρροπιστικοί μηχανισμοί

- Η **διέγερση του συμπαθητικού συστήματος**, προκαλεί αύξηση της καρδιακής συχνότητας και της συσταλτικότητας του μυοκαρδίου, ώστε να βελτιωθεί η καρδιακή παροχή. Όμως, η συνεχής επίδραση του συμπαθητικού στην καρδιά, προκαλεί αύξηση της ζήτησης οξυγόνου από τα μυοκαρδιακά κύτταρα, μείωση της διαστολικής περιόδου και αύξηση της συχνότητας των αρρυθμιών που έχουν σαν αποτέλεσμα την αύξηση της νοσηρότητας και της θνητότητας (Σχήμα 2).



Σχήμα 2. Διέγερση του συμπαθητικού συστήματος και του συστήματος ρενίνης-αγγειοτενσίνης-αλδοστερόνης στην ΚΑ.

- Η **διέγερση του συστήματος ρενίνης – αγγειοτενσίνης**, λόγω μειωμένης αιμάτωσης των νεφρών, οδηγεί σε αύξηση της καρδιακής απόδοσης και της μέσης αρτηριακής πίεσης¹⁴. Η μειωμένη αιματική ροή στους νεφρούς έχει σαν αποτέλεσμα την αυξημένη νεφρική έκκριση της ρενίνης, ενός ενζύμου που μετατρέπει το εκκρινόμενο από το ήπαρ αγγειοτανοσινογόνο σε αγγειοτενσίνη I η οποία με τη σειρά της μετατρέπεται στην ισχυρή αγγειοσυσπαστική αγγειοτενσίνη II μέσω του μετατροπτικού ενζύμου της αγγειοτενσίνης¹⁴. Η αγγειοτενσίνη II, μέσω της αγγειοσυσπαστικής της δράσης, αυξάνει τον αγγειακό τόνο που έχει σαν αποτέλεσμα τη διατήρηση της αιμάτωσης των ζωτικών οργάνων (εγκέφαλος, καρδιά), εις βάρος άλλων μικρότερης σπουδαιότητας (δέρμα, μύες). Επιπλέον, η παρατεταμένη αγγειοσυσπαστική της δράση αυξάνει το μεταφορτίο και την κατανάλωση ενέργειας (οξυγόνου) από το μυοκάρδιο, γεγονός που επιδεινώνει την ΚΑ.
- Η **αυξημένη έκκριση αλδοστερόνης (μέσω του συστήματος ρενίνης-αγγειοτενσίνης-αλδοστερόνης)** οδηγεί σε κατακράτηση ύδατος και νατρίου,

με αποτέλεσμα την αύξηση του προφορτίου και σύμφωνα με το νόμο του Starling, την αύξηση της καρδιακής συσταλτικότητας (όγκος παλμού) ¹¹. Όμως, ο μηχανισμός αυτός δεν δίνει στην καρδιά τη δυνατότητα να αυξάνει απεριόριστα τη δύναμη συστολής της για κάθε μονάδα αύξησης του προφορτίου. Μετά από ένα κριτικό μήκος σαρκομεριδίου, ο όγκος παλμού δεν βελτιώνεται, για να μειωθεί στη συνέχεια, καθώς ο τελοδιαστολικός όγκος συνεχίζει να αυξάνεται.

- **Η αυξημένη έκκριση του κολπικού νατριουρητικού παράγοντα (ANF).** Ο ANF συντίθεται και εκκρίνεται από τα κύτταρα των καρδιακών κόλπων μετά από αυξημένη διάταση των κόλπων της καρδιάς ¹¹. Ο ANF δρα στα σωληνάρια και αναστέλλει την επαναρρόφηση του νατρίου. Επιπλέον, αυξάνει το ρυθμό σπειραματικής διήθησης, ο οποίος με τη σειρά του συμβάλλει στην αύξηση της απέκκρισης του νατρίου ¹¹. Όμως η ευαισθησία του νεφρού στο πεπτιδίο αυτό μειώνεται καθώς η ΚΑ εξελίσσεται.

3.3 Υπερτροφική αναδιαμόρφωση

Είναι γνωστό ότι η καρδιά του ενήλικα δεν μπορεί να αντιδράσει στο αιμοδυναμικό stress (αυξημένη έκκριση νορεπινεφρίνης και αγγειοτασίνης II, μετά από βλάβη του μυοκαρδίου) μόνο με την υπερπλασία. Ο οργανισμός για να αντιμετωπίσει το αιμοδυναμικό stress ενεργοποιεί τη σύνθεση και την οργάνωση νέων συσταλτικών πρωτεϊνών των μυοκαρδιακών κυττάρων, μια διαδικασία γνωστή ως υπερτροφική αναδιαμόρφωση ¹⁵.

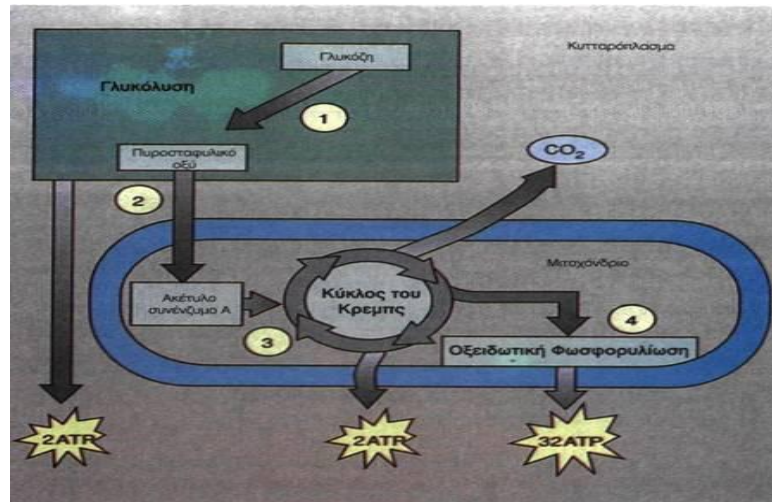
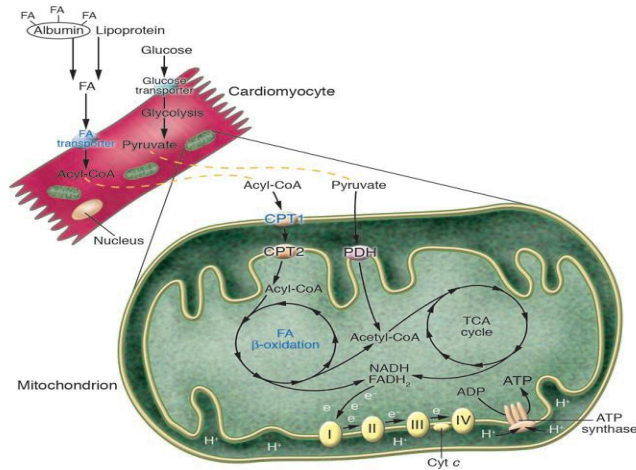
Οι νέες συσταλτικές πρωτεΐνες των μυοκαρδιακών κυττάρων, οδηγούν σε αύξηση του τοιχωματικού πάχους και σε μείωση της θαλαμικής ακτίνας των κοιλιών, με αποτέλεσμα τη μείωση της συστολικής τοιχωματικής πίεσης ¹⁵. Η μείωση της συστολικής τοιχωματικής πίεσης αρχικά έχει αντισταθμιστική δράση επειδή το κλάσμα εξώθησης της αριστερής κοιλίας είναι αντιστρόφος ανάλογο με τη συστολική τοιχωματική πίεση, με αποτέλεσμα την προσωρινή διατήρηση του φυσιολογικού όγκου παλμού της αριστερής κοιλίας ¹⁶. Το μειονέκτημα της υπερτροφικής αναδιαμόρφωσης οφείλεται στο γεγονός ότι μειώνεται η κοιλιακή ενδοτικότητα (λόγω της ίνωσης του μυοκαρδίου) με συνέπεια τη μείωση της συστολικής κοιλιακής πίεσης και της εμφάνισης των συμπτωμάτων της ΚΑ ¹⁶.

3.4 Κυτταρική παθοφυσιολογία

Η έλλειψη της απαραίτητης ενέργειας για την μυοκαρδιακή συστολή είναι το προεξέχον χαρακτηριστικό της ΚΑ. Η καρδιά έχει υψηλές ενεργειακές απαιτήσεις και ως εκ τούτου χρειάζεται να παράγει συνεχώς ATP (το κύριο ενεργειακό μόριο), με στόχο τη διατήρηση της συσταλτικής ικανότητάς της, των διαφόρων μεταβολικών πορειών, της μετακίνησης μορίων και του ομοιοστατικού ελέγχου των ιόντων (συμπεριλαμβανομένου του καθοριστικού Ca^{2+})¹⁷⁻¹⁹. Η καρδιά έχει χαμηλή “χωρητικότητα” για υποστρώματα που αποδίδουν μόρια ATP και ως εκ τούτου τα μονοπάτια παραγωγής του θα πρέπει να ανταποκρίνονται άμεσα στις εκάστοτε συνθήκες και τη διαθεσιμότητα αυτών¹⁸. Επιπρόσθετα, επειδή η ποσότητα του ATP στην καρδιά είναι πολύ μικρότερη (10mM) σε σχέση με τις πραγματικές απαιτήσεις της (10000 φορές μεγαλύτερες), το μυοκαρδιακό κύτταρο πρέπει συνεχώς να ενεργοποιεί τα μονοπάτια σύνθεσής του¹⁹. Σε μια φυσιολογική ενήλικη καρδιά, σχεδόν ολόκληρη ($\approx 95\%$) η παραγωγή ATP προέρχεται από την μιτοχονδριακή οξειδωτική φωσφορυλίωση, ενώ το υπόλοιπο ποσοστό προέρχεται από την οξείδωση των λιπαρών οξέων, τη γλυκόλυση και τον κύκλο του Krebs (TCA cycle, citric acid cycle). Προκειμένου η καρδιά να διατηρήσει αποτελεσματικά τα επίπεδα παραγωγής του ATP, χρησιμοποιεί πληθώρα υποστρωμάτων ως ενεργειακές πηγές. Σε καρδιά ενήλικου, το 50-70% της παραγωγής ATP προέρχεται από την οξείδωση των λιπαρών οξέων¹⁷⁻²⁰. Τα λιπαρά οξέα, τόσο τα ελεύθερα μη εστεροποιημένα όσο και τα προερχόμενα από τα κυκλοφορούντα τριγλυκερίδια, υφίστανται β-οξείδωση (FAs β-oxidation, FAO) παράγοντας ακέτυλο-CoA. Το ίδιο συμβαίνει και με το πυροσταφυλικό οξύ, τελικό προϊόν γλυκόλυσης, που οξειδώνεται από την PDH (αφυδρογονάση του πυροσταφυλικού οξέος), στην εσωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη, προς ακέτυλο-CoA. Τα μόρια ακέτυλο-CoA από τις παραπάνω μεταβολικές πορείες, εισέρχονται στον κύκλο TCA.

Το NADH (Nicotinamide adenine dinucleotide) και το FADH₂ (hydroquinone form) σχηματίζονται κατά την εισροή υποστρωμάτων στη γλυκόλυση, την οξείδωση των λιπαρών οξέων και τον κύκλο του κιτρικού οξέος. Είναι μόρια πλούσια σε ενέργεια, διότι το κάθε ένα περιέχει ένα ζεύγος ηλεκτρονίων με υψηλό δυναμικό μεταφοράς. Όταν αυτά τα ηλεκτρόνια ενώνονται με O₂,

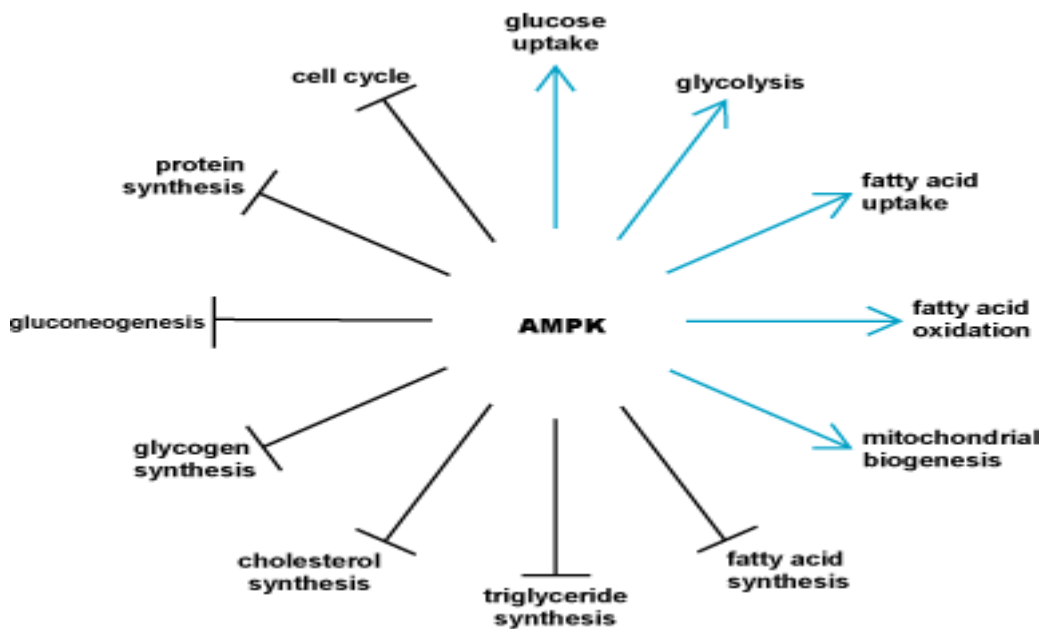
απελευθερώνεται μεγάλη ποσότητα ελεύθερης ενέργειας η οποία μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την παραγωγή του ATP. Η οξειδωτική φωσφορυλίωση, που λαμβάνει χώρα στα μιτοχόνδρια, είναι η διεργασία στην οποία παράγεται ATP κατά τη μεταφορά ηλεκτρονίων από το NADH ή το FADH₂ προς το O₂ δια μέσου μιας σειράς φορέων e⁻. Αυτή η διεργασία είναι συζευγμένη με τη σύνθεση ATP, μέσω μιας βαθμίδωσης συγκέντρωσης H⁺ ¹⁸.



Σχήμα 3. Μονοπάτια καρδιακού ενεργειακού μεταβολισμού ¹⁸.

Πολύ σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση του ενεργειακού μεταβολισμού παίζει ο παράγοντας PGC-1 (PPARγ coactivator-1). Οι Janice M. Huss et al ¹⁸ απέδειξαν ότι στα καρδιομυοκύτταρα ο PGC-1 α) αυξάνει τον αριθμό των μιτοχονδρίων (κυρίως στη νεογνική και όχι τόσο στην ενήλικη καρδιά), β) διεγείρει την έκφραση των μιτοχονδριακών ενζύμων και γ) αυξάνει το ποσοστό της οξείδωσης

των λιπαρών οξέων και της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης^{19,20}. Ένας ακόμη καθοριστικός μηχανισμός ελέγχου του καρδιακού ενεργειακού μεταβολισμού είναι η AMPK (AMP-activated protein kinase), η οποία ενεργοποιείται από την μείωση του [ATP], της [PCr] ή/και την αύξηση της [AMP] και του [ADP]. Ως αποτέλεσμα της ενεργοποίησης αυτής, διεγείρεται α) ο παράγοντας PGC-1 και οι οδοί παραγωγής ATP, β) ταυτοχρόνως μειώνονται οι οδοί κατανάλωσής μέσω αναστολής πορειών που καταναλώνουν ATP και δεν είναι άμεσα απαραίτητες για την επιβίωση του κυττάρου (σύνθεση λιπιδίων, υδατανθράκων και πρωτεϊνών)^{19,21}.

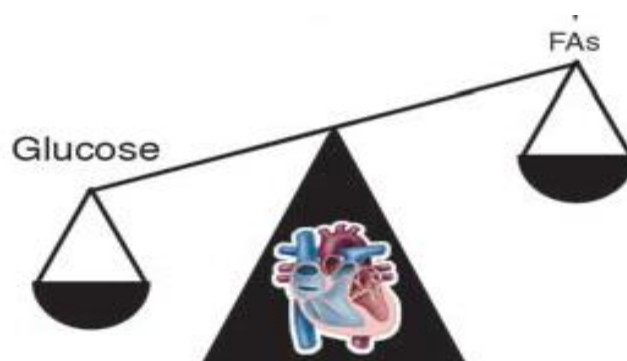


Σχήμα 4. Δράσεις της ενεργοποιημένης AMPK.

Στο μυοκάρδιο ανεπάρκουσας καρδιάς, παρατηρείται [ATP] περίπου 30% χαμηλότερη σε σχέση με μιας υγιούς καρδιάς. Η μείωση αυτή λαμβάνει χώρα τόσο στην δεξιά όσο και στην αριστερή κοιλία και είναι αργή, σταδιακή και προοδευτική οδηγώντας σε αυξημένη θνητότητα όταν το [ATP] μειώνεται δραματικά^{19,22}. Οι Ingwall et al¹⁹ έδειξαν ότι η ολική [Cr] και ως εκ τούτου και η [PCr], επίσης μειώνονται σε ΚΑ και μάλιστα πιο άμεσα και σε μεγαλύτερο

ποσοστό από το [ATP] (πτώση ίση με το 30% της πτώσης της [Cr] και [PCr]). Έχειδειχθεί από πολλούς ερευνητές ότι τόσο η έκφραση των γονιδίων που είναι υπεύθυνα για την β-οξείδωση των λιπαρών οξέων, όσο και η ενζυματική δραστηριότητά τους, μειώνονται σε ασθενείς με ΚΑ. Στην ΚΑ το κύριο μυοκαρδιακό υπόστρωμα παραγωγής ATP είναι η γλυκόζη και όχι τα λιπαρά οξέα, γεγονός εκ διαμέτρου αντίθετο με ό,τι συμβαίνει υπό φυσιολογικές συνθήκες^{18,20}.

Σημαντική πρόοδος έχει επιτευχθεί στην σκιαγράφιση των γεγονότων που λαμβάνουν χώρα στην μειωμένη χρησιμοποίηση των λιπαρών οξέων στην ανεπάρκουςα καρδιά. Έρευνες σε ποντίκια έδειξαν μειωμένη έκφραση του Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1 (PGC-1), σημαντικού ρυθμιστή της οξείδωσης των λιπαρών οξέων¹⁸. Αυτή η αλλαγή της προτίμησης υποστρωμάτων σε ανεπάρκουςα καρδιά, γίνεται άμεσα και οδηγεί σε αυξημένη αποδοτικότητα, υπό την προϋπόθεση ότι η γλυκόζη μπορεί να οξειδωθεί. Στη συνέχεια, όσο η ΚΑ εξελίσσεται, επέρχεται μείωση του ποσοστού της γλυκόλυσης και αυξημένη παραγωγή γαλακτικού οξέος. Οι μεταφορείς γλυκόζης GLUT-1 και GLUT-4, καθώς και η έκφραση της συνθετάσης του γλυκογόνου (GSK), υφίστανται αρνητική ρύθμιση. Αντιθέτως, υπάρχει υπερέκφραση του MCT1 μεταφορέα γαλακτικού. Η ΚΑ, στα αρχικά στάδιά της, δεν χαρακτηρίζεται από αύξηση στα γλυκολυτικά μονοπάτια και στα τελικά στάδια παρατηρείται μείωση στα γλυκολυτικά ένζυμα²⁰.



Σχήμα 5. Χρησιμοποίηση της γλυκόζης έναντι των λιπαρών οξέων σε ΚΑ¹⁸.

Η ΚΑ προκαλεί επίσης μία γενικευμένη αλλαγή στο σύστημα της κρεατινικής κινάσης (CK). Η CK καταλύει την αντιστρεπτή μεταφορά φωσφορικών ομάδων

από το ATP στην Cr, αποθηκεύοντας με αυτόν τον τρόπο την ελεύθερη ενέργεια από το ATP υπό την μορφή PCr. Σε περίπτωση ανάγκης (αυξημένη δραστηριότητα μυοκαρδίου), η PCr χρησιμοποιείται για να συμπληρώσει την ενέργεια από ATP, μέσω παραγωγής ATP από ADP. Υπάρχουν διάφορες ισομορφές CK, με πιο σημαντικές την mi-CK (στα μιτοχόνδρια), που αντιπροσωπεύει το 20-40% της ολικής δραστηριότητας των CK στα καρδιακά κύτταρα, και την MCK (muscle CK). Η mi-CK βρίσκεται στην εξωτερική πλευρά της εσωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης, στην γειτονική περιοχή των ANT (ATP-ADP translocator).

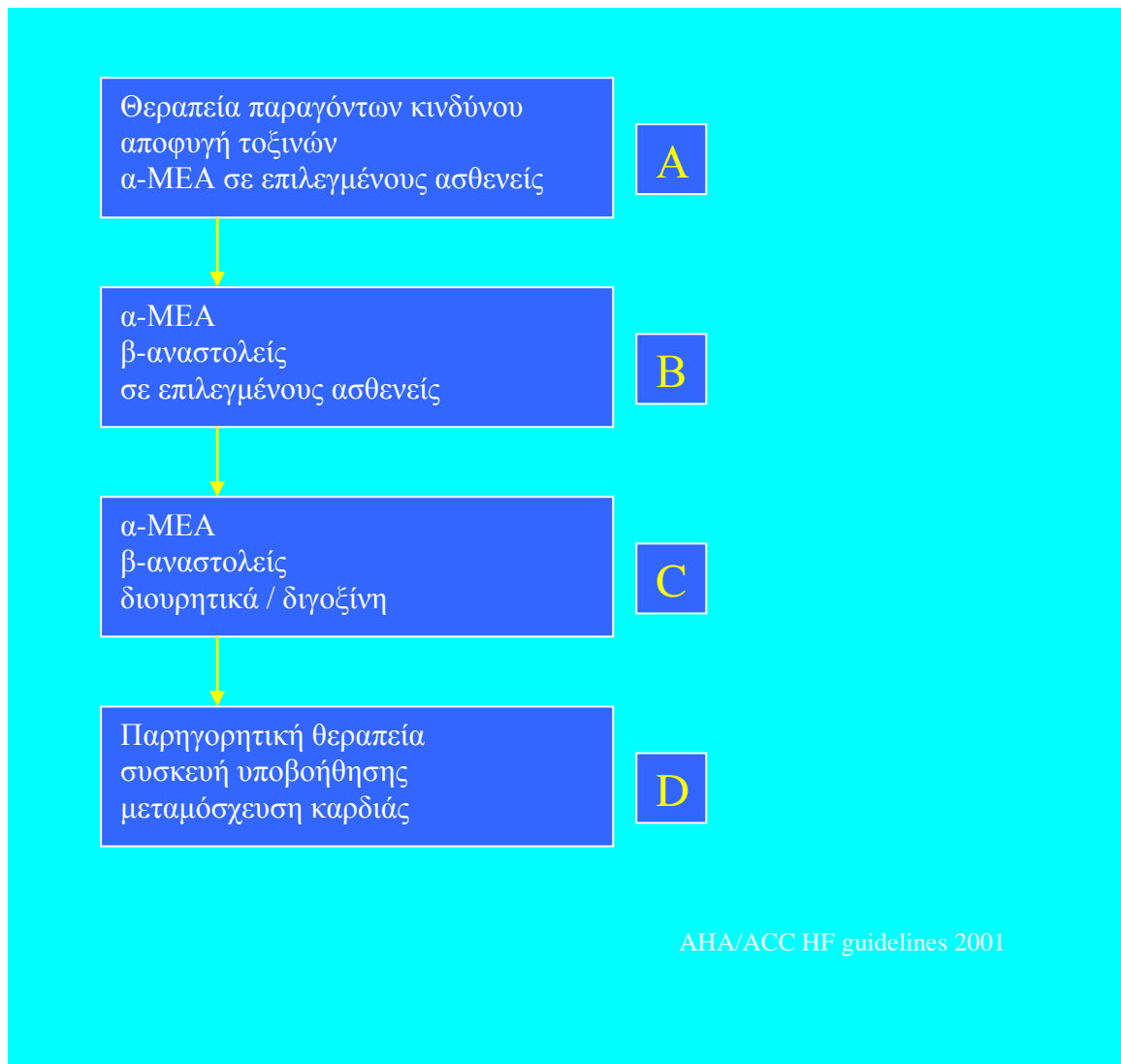
Το σχηματιζόμενο ATP στα μιτοχόνδρια, εξέρχεται μέσω των ANT. Εκεί, η mi-CK προκαλεί την μετατροπή του ATP σε ADP και ταυτόχρονα τον σχηματισμό PCr (phosphocreatine). Έτσι το ADP είναι άμεσα διαθέσιμο για την οξειδωτική φωσφορυλίωση και με αυτόν τον τρόπο διεγείρεται περαιτέρω η κυτταρική αερόβια αναπνοή. Όσον αφορά την ισομορφή MCK, μέσω των διμερών MMCK που σχηματίζει, παίζει σημαντικό ρόλο στην παροχή ενέργειας που είναι απαραίτητη για την μυική συστολή, μιας και είναι συζευγμένη με την ATPάση της μυοσίνης. Ακόμα, η MMCK είναι συνδεδεμένη με την Ca^{2+} -ATPάση του σαρκοπλασματικού δικτύου, παίζοντας πρωτεύοντα ρόλο στην παροχή επαρκούς ενέργειας για την πρόσληψη ασβεστίου και την εναλλαγή συστολής και διαστολής. Η μειωμένη ενζυμική δραστηριότητα, η δραματική μείωση σε κάποιες ισομορφές της CK (MCK, mi-CK) καθώς και η προβληματική εισροή CK, αποτελούν χαρακτηριστικά γνωρίσματα της ΚΑ και της προβληματικής μεταφοράς και χρησιμοποίησης της ενέργειας^{19,20}.

4. Θεραπευτική αντιμετώπιση²³

4.1 Φαρμακευτική θεραπεία

Η φαρμακευτική θεραπεία στοχεύει στην ανακούφιση των συμπτωμάτων, την αύξηση της αντοχής στην άσκηση, τη βελτίωση της ποιότητας ζωής του ασθενούς και την αύξηση του προσδόκιμου επιβίωσης.

Γενικά, όσον αφορά στη φαρμακευτική θεραπεία της ΚΑ χορηγείται κυρίως ο συνδυασμός τεσσάρων κατηγοριών φαρμάκων ανάλογα με το στάδιο αυτής (Σχήμα 6): α) διουρητικά, β) αναστολείς του μετατρεπτικού ενζύμου της αγγειοτασίνης (α-MEA), γ) ανταγωνιστές των υποδοχέων της αγγειοτασίνης και δ) β-αναστολείς.



Σχήμα 6. Θεραπευτική αγωγή στη καρδιακή ανεπάρκεια σύμφωνα με τη σταδιοποίηση κατά AHA/ACC.

5. Καρδιακή ανεπάρκεια και οξειδωτικό στρες

5.1 Γενικά

Ο όρος οξειδωτικό στρες αναφέρεται στη διαταραχή της οξειδωτικής – αντιοξειδωτικής ισορροπίας προς όφελος της πρώτης λόγω της μεγαλύτερης παραγωγής ενεργών ενδιάμεσων οξυγόνου (Reactive Oxygen Species – ROS) και ενεργών ενδιάμεσων αζώτου (Reactive Nitrogen Species – RNS) σε σχέση με τη δυνατότητα εξουδετέρωσης τους από τους ενδογενείς μηχανισμούς του οργανισμού ²⁴.

Κάθε χημική μορφή που διαθέτει ένα ή περισσότερα ασύζευκτα ηλεκτρόνια και έχει τη δυνατότητα αυτόνομης ύπαρξης καλείται ελεύθερη ρίζα. Οι ελεύθερες ρίζες προέρχονται κυρίως από το οξυγόνο και το άζωτο και σε λιγότερο βαθμό από τον άνθρακα και το θείο. Τα ROS μπορεί να είναι ρίζες οξυγόνου, αλλά και παράγωγα οξυγόνου που δεν αποτελούν ρίζες. Τα ROS μπορούν να συμμετέχουν σε αντιδράσεις οι οποίες οδηγούν στο σχηματισμό ελεύθερων ριζών ή στην καταστροφή οργανικών υποστρωμάτων. Στα ROS περιλαμβάνονται π.χ. το υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2) και το υπεροξυνιτρώδες ανιόν ($ONOO^-$). Τα RNS είναι μόρια τα οποία μπορούν να διευκολύνουν αντιδράσεις νιτροζυλίωσης. Τα RNS περιλαμβάνουν π.χ. το μονοξείδιο του αζώτου (NO), το υπεροξυνιτρώδες ανιόν ($ONOO^-$), το κατιόν του μονοξειδίου του αζώτου (NO^+) και το ανιόν του μονοξειδίου του αζώτου (NO^-).

Το οξειδωτικό στρες μπορεί να έχει ως αποτέλεσμα ²⁴:

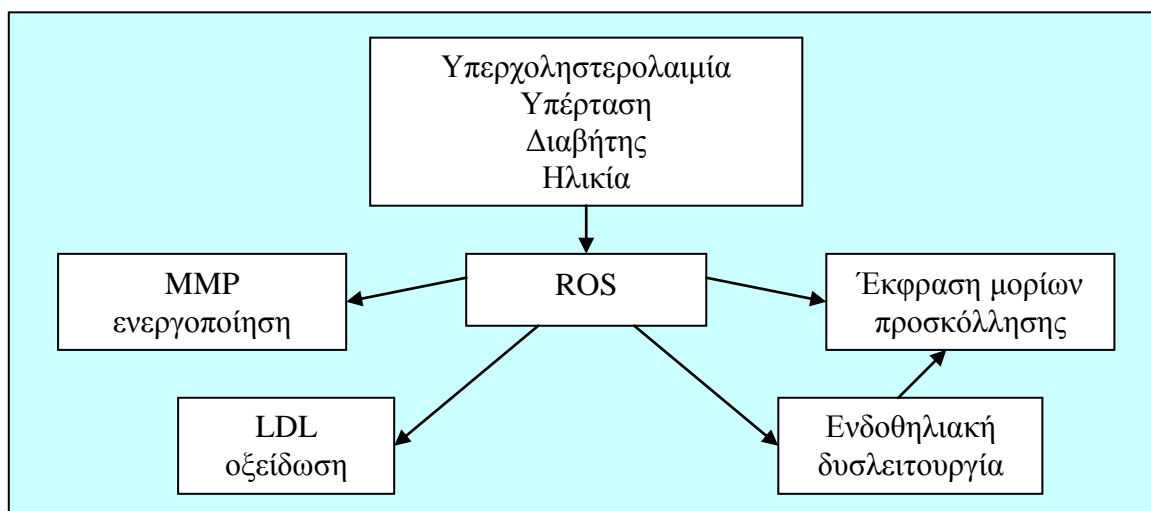
1. Προσαρμογή των αμυντικών μηχανισμών σε ανώτερο επίπεδο ρύθμισης.
2. Βλάβη των ιστών, η οποία μπορεί να προκληθεί σε όλους τους μοριακούς στόχους όπως DNA, πρωτεΐνες, υδατάνθρακες και λιπίδια.
3. Κυτταρικό θάνατο. Ο κυτταρικός θάνατος μπορεί να συμβεί με δύο μηχανισμούς, τη νέκρωση και την απόπτωση.
4. Αντιδράσεις νιτροζυλίωσης, οι οποίες μπορούν να αλλάξουν την πρωτεϊνική δομή ώστε να εμποδίσουν τη φυσιολογική λειτουργία.

Διάφορες παθοφυσιολογικές καταστάσεις που σχετίζονται με την καρδιαγγειακή νόσο, όπως η υπερχοληστερολαιμία, η υπέρταση, ο σακχαρώδης διαβήτης, το

κάπνισμα, η παχυσαρκία και η ηλικία έχουν σαν αποτέλεσμα την παραγωγή ROS και ελεύθερων ριζών²⁴⁻²⁸. Τα ROS με τη σειρά τους ευθύνονται για μια σειρά από παθολογικές διεργασίες από τις οποίες οι σπουδαιότερες είναι (Σχήμα 7) :

1. Ενεργοποίηση των μεταλλοπρωτεϊνών (MMPs). Οι μεταλλοπρωτεϊνάσες είναι ένζυμα τα οποία ανήκουν στην οικογένεια των ζελατινασών και καταλύουν πρωτεΐνες της εξωκυττάρου δομικού πλέγματος (π.χ. κολλαγόνο) οι οποίες περιβάλλουν το κύτταρο και δημιουργούν το συνδετικό ιστό της. Η ενεργοποίηση τους στην καρδιαγγειακή νόσο έχει άμεση συσχέτιση με τη ρήξη της πλάκας²⁹.
2. Οξείδωση της χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνης (LDL). Η οξειδωτική τροποποίηση της LDL γίνεται κυρίως στο αρτηριακό τοίχωμα και προκαλεί μεταβολές τόσο στο πρωτεϊνικό όσο και στο λιπιδικό περιεχόμενο της οδηγώντας στο σχηματισμό ενός λιποπρωτεϊνικού σωματιδίου πλούσιου σε προφλεγμονώδη και κυτταροτοξικά μόρια με άμεση επίπτωση τον σχηματισμό αφρωδών κυττάρων και το σχηματισμό της LOX-1 (ενδοθηλιακός υποδοχέας για οξείδωση της LDL)^{30,31}. Η οξείδωση της LDL διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην αθηρογένεση, αφού ενεργοποιεί τα κύτταρα του αρτηριακού τοιχώματος και επηρεάζει τις πολύπλοκες αλληλεπιδράσεις μεταξύ τους οι οποίες οδηγούν στο σχηματισμό της αθηρωματικής πλάκας.
3. Ενδοθηλιακή δυσλειτουργία με άμεσο αποτέλεσμα τη μειωμένη διαθεσιμότητα του ενδοθηλιακού μονοξειδίου του αζώτου (NO). Η δυσλειτουργία του ενδοθηλίου ορίζει το στάδιο της αθηροσκλήρυνσης. Κάτω από φυσιολογικές συνθήκες το αγγειακό ενδοθήλιο απελευθερώνει συνεχώς στην κυκλοφορία αγγειοχαλαρωτικούς παράγοντες ως απάντηση, είτε σε νευροορμονικά ερεθίσματα, όπως η ακετυλοχολίνη ή η βραδυκινίνη είτε σε φυσικά ερεθίσματα όπως η αύξηση της καρδιακής παροχής. Ο πιο σημαντικός παράγοντας με αγγειοδιασταλτικές ιδιότητες είναι το NO που επηρεάζει τη συσταλτικότητα των αγγειακών λείων μυϊκών κυττάρων εξουδετερώνοντας τη αγγειοσυσπαστική δράση παραγόντων, όπως η νορεπινεφρίνη, η ενδοθηλίνη-1 και η αγγειοτανσίνη II. Η ανεπαρκής έκκριση NO από το ενδοθήλιο έχει σαν αποτέλεσμα την ενδοθηλιακή δυσλειτουργία με αποτέλεσμα την αγγειακή αναδιαμόρφωση (remodeling)³².

4. Έκφραση των μορίων προσκολλησεως στο ενδοθήλιο όπως ICAM-1 και VCAM-1 ^{33,34}. Κατά τα αρχικά στάδια της αθηροσκλήρυνσης, στην παρατηρημένη μεταβολή της φυσιολογικής λειτουργίας του ενδοθηλίου παρατηρείται αυξημένη παραγωγή προσκολλητικών μορίων στο ενδοθήλιο. Τα μόρια αυτά αποτελούν προγνωστικούς παράγοντες για την εμφάνιση της στεφανιαίας νόσου ³⁴.



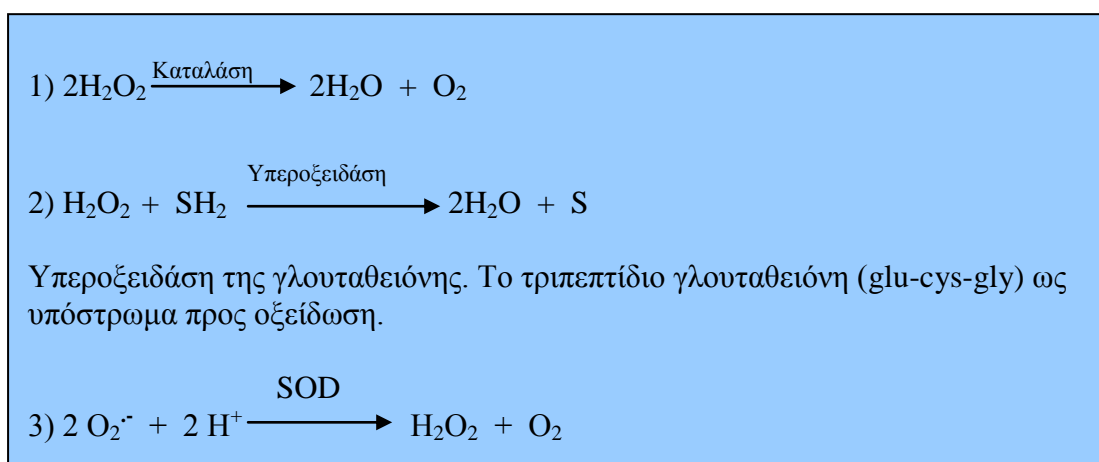
Σχήμα 7. Ρόλος των ενεργών ενδιάμεσων οξυγόνου (ROS) στα αγγεία.

Υπό φυσιολογικές συνθήκες όμως, επικρατεί οξειδωτική-αντιοξειδωτική ισορροπία καθώς το Αντιοξειδωτικό Αμυντικό Σύστημα (Antioxidant Defense System – ADS), ρυθμίζει τις οξειδωτικές αντιδράσεις. Ως αντιοξειδωτικό ορίζεται κάθε «σώμα» το οποίο όταν βρίσκεται σε χαμηλές συγκεντρώσεις σε σύγκριση με το προς οξείδωση υπόστρωμα καθυστερεί σημαντικά ή προλαμβάνει την οξείδωση του υποστρώματος ³⁵. Ανάλογα με τον μηχανισμό με τον οποίο παρέχουν προστασία, τα αντιοξειδωτικά χωρίζονται σε τρεις κατηγορίες ³⁶:

- 1) Αντιοξειδωτικά τα οποία ελαττώνουν την παραγωγή ριζών και ενεργών μορφών οξυγόνου. Αυτό πραγματοποιείται είτε με εξάλειψη και μετατροπή ενεργών μορφών οξυγόνου, είτε με δέσμευση ιόντων μετάλλων.
- 2) Σαρωτές ριζών οι οποίοι εμποδίζουν την έναρξη και τη διάδοση αλυσιδωτών αντιδράσεων με παγίδευση των ριζών πριν φτάσουν στα μόρια στόχους.
- 3) Μόρια ή ένζυμα τα οποία εμπλέκονται στην αποκατάσταση και αναγέννηση των βιολογικών μορίων που έχουν υποστεί βλάβες μετά από προσβολή ελεύθερων ριζών.

Πιο συγκεκριμένα οι σαρωτές ριζών, που απομακρύνουν τα ROS, περιλαμβάνουν τις παρακάτω κατηγορίες:

- Μικρομοριακά αντιοξειδωτικά τα οποία περιλαμβάνουν υδατοδιαλυτές ενώσεις, όπως η βιταμίνη C και η γλουταθειόνη, καθώς και λιποδιαλυτά αντιοξειδωτικά τα οποία περιλαμβάνουν ενώσεις όπως η βιταμίνη E, τα καροτένια, το συνένζυμο Q10 και το λιπιδικό οξύ³⁷.
- Μεγαλομοριακά αντιοξειδωτικά ένζυμα στα οποία ανήκουν η υπεροξειδική δισμουτάση (SOD) η οποία προσφέρει ενζυμική προστασία κατά της ρίζας ανιόντος υπεροξειδίου, η καταλάση η οποία αντιμετωπίζει το υπεροξείδιο του υδρογόνου και η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GPx) η οποία προσφέρει ενζυμική προστασία κατά των κυτταρικών υπεροξειδίων (Σχήμα 8). Αυτά τα ένζυμα συντίθεται από τα κύτταρα και υπόκεινται σε γενετικούς ή μακρομοριακούς ρυθμιστικούς μηχανισμούς.



Σχήμα 8. 1), 2) Ενζυμική προστασία κατά του H_2O_2 προσφέρεται από την καταλάση και την ομάδα των υπεροξειδασών. 3) Υπεροξειδική δισμουτάση. Τρεις κατηγορίες SOD ανάλογα με τα μέταλλα τα οποία περιέχουν, ονομάζονται CuZnSOD, FeSOD, MnSOD.

5.2 Πηγές ενεργών ενδιαμέσων οξυγόνου

Η αναγωγή του οξυγόνου από τα ενζυμικά συστήματα της οξειδάσης της ξανθίνης (XO), της οξειδάσης της NADPH, της συνθετάσης του NO (ασύζευκτη) και των μιτοχονδριακών ενζύμων, έχει σαν αποτέλεσμα την μετατροπή του σε ρίζα ανιόντος υπεροξειδίου ($O_2^{\cdot-}$), η οποία στη συνέχεια ανάγεται και μετατρέπεται σε H_2O_2 .

Μιτοχονδριακά ένζυμα: Τα μιτοχόνδρια αποτελούν σημαντική πηγή παραγωγής $O_2^{\cdot-}$ in vivo. Σε φυσιολογικές συνθήκες η πλειοψηφία των e που εισέρχονται στη μιτοχονδριακή αλυσίδα e ανάγουν το μοριακό O_2 σε H_2O ³⁸. Παρόλα αυτά, σε φυσιολογικά ακόμη επίπεδα O_2 το 1-3% αυτού ανάγεται ατελώς στα μιτοχόνδρια σε $O_2^{\cdot-}$. Το ποσοστό αυτό στα μυοκαρδιακά κύτταρα είναι μεγαλύτερο λόγω της αυξημένης πυκνότητας των μιτοχονδρίων και του αυξημένου ρυθμού οξειδωτικής φωσφορυλίωσης στα κύτταρα αυτά ³⁸. Υπό φυσιολογικές συνθήκες τα ενδογενή αντιοξειδωτικά συστήματα των μιτοχονδρίων μεταβολίζουν τα ROS. Όμως σε διάφορες παθολογικές καταστάσεις, όπως στη ΚΑ, η λειτουργία των συστημάτων αυτών διαταράσσεται με αποτέλεσμα τη βλάβη των μιτοχονδρίων ³⁹. Μάλιστα, έχει αποδειχθεί ότι η προκαλούμενη από τη $O_2^{\cdot-}$ βλάβη στα μιτοχόνδρια ευνοεί την περαιτέρω παραγωγή $O_2^{\cdot-}$. Επιπλέον, οι παράγοντες που διεγείρουν την αναδιαμόρφωση (remodeling) της καρδιάς στην ΚΑ ελέγχουν το μιτοχονδριακό σύστημα μεταφοράς ηλεκτρονίων (e) και αυξάνουν την παραγωγή ROS στα μυοκαρδιακά κύτταρα μεταβάλλοντας έτσι το μυοκαρδιακό οξειδωτικό στρες ³⁸.

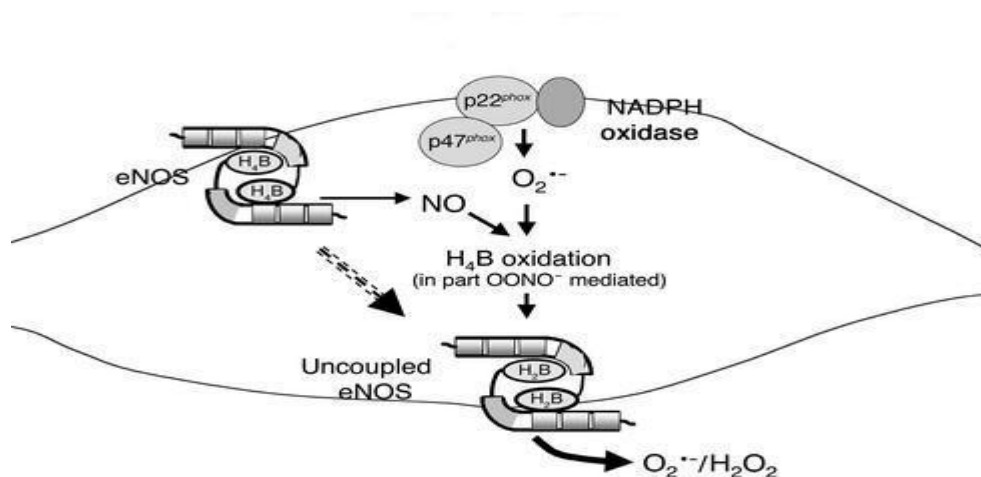
Σύστημα οξειδάσης της ξανθίνης (XO): Υπό φυσιολογικές συνθήκες το ένζυμο XO αποτελεί κλειδί στο μεταβολικό μονοπάτι της πουρίνης παράγοντας το τελικό προϊόν, δηλαδή το ουρικό οξύ και το υποπροϊόν $O_2^{\cdot-}$. Ωστόσο το μεγαλύτερο ποσοστό οξείδωσης των υποστρωμάτων ξανθίνης και υποξανθίνης πραγματοποιείται από το ένζυμο δεϋδρογενάση της ξανθίνης το οποίο μεταφέρει e απο τα υποστρώματα πάνω στο NAD^+ παρά στο O_2 . Έτσι ο μεταβολισμός της ξανθίνης και υποξανθίνης μέσω της δεϋδρογενάσης της ξανθίνης δεν οδηγεί στην παραγωγή $O_2^{\cdot-}$ in vivo σε αντίθεση με το ένζυμο XO ⁴⁰. Κατά τη διάρκεια όμως ιστικής βλάβης μέρος του ενζύμου δεϋδρογενάσης της ξανθίνης μετατρέπεται σε XO μέσω οξείδωσης των -SH ομάδων του ή μέσω επίδρασης σε αυτό πρωτεολυτικών ενζύμων (Ca^{+2} - διεγερτικές πρωτεάσες) με αποτέλεσμα την αυξημένη παραγωγή $O_2^{\cdot-}$. Επίσης, τα ουδετερόφιλα, τα οποία έχουν την τάση να συσσωρεύονται στο ενδοθήλιο του ισχαιμικού ιστού, μετά από την ενεργοποίηση του συμπληρώματος, ενεργοποιούν και αυτά με τη σειρά

τους το ένζυμο XO προς σχηματισμό ουρικού οξέος και $O_2^{\cdot-}$. Οι $O_2^{\cdot-}$ έχουν την τάση να διεισδύουν στα μυοκύτταρα και να συμμετέχουν σε μια σειρά από αντιδράσεις από τις οποίες η κυριότερη είναι η αντίδραση Haber-Weiss με αποτέλεσμα το σχηματισμό της πολύ δραστικής και τοξικής οξειδωτικής ρίζας OH^{\cdot} ^{41,42}. Επιπλέον σε ασθενείς με χρόνια ΚΑ έχει παρατηρηθεί αυξημένη έκφραση και δραστηριότητα του ενζύμου XO που δικαιολογεί και τα υψηλά επίπεδα του ουρικού οξέος που παρατηρούνται στον ορό των ασθενών αυτών. Ωστόσο, τα κλινικά στοιχεία που δείχνουν ότι η αναστολή της XO μπορεί να είναι ωφέλιμη στην ΚΑ είναι ανεπαρκή ⁴³.

NADPH οξειδάση: Η οικογένεια ενζύμων της NADPH οξειδάσης αποτελεί κύρια πηγή ROS στο καρδιαγγειακό σύστημα. Πρόκειται για τη μοναδική κατηγορία μέχρι τώρα της οποίας ο πρωταρχικός ρόλος είναι η παραγωγή ROS. Το ενζυμικό αυτό σύστημα εκφράζεται στα ενδοθηλιακά κύτταρα και ενεργοποιείται από την αγγειοτασίνη II και από φλεγμονώδεις κυτταροκίνες όπως η ιντερλευκίνη-6 και ο παράγοντας νέκρωσης των όγκων TNF-a ^{44,45}. Κάθε ένζυμο αυτής της οικογένειας περιέχει μια καταλυτική μονάδα, τη Nox η οποία σχηματίζει ένα ετεροδιμερές το οποίο καλείται $p22^{phox}$. Αυτό το ετεροδιμερές κυτόχρωμα είναι η θέση μεταφοράς e από το NADPH στο μοριακό O_2 και οδηγεί στο σχηματισμό $O_2^{\cdot-}$. Μέχρι τώρα έχουν αναγνωριστεί πέντε ισομορφές Nox (Nox1-5) με την πιο διαδεδομένη ισομορφή την Nox4 καθώς ανιχνεύεται στα ενδοθηλιακά κύτταρα, στα κύτταρα του μυοκαρδίου και τους ινοβλάστες. Μελέτες έχουν δείξει ότι τα ROS τα οποία παράγονται από τη NADPH οξειδάση μπορούν να ενισχύσουν την περαιτέρω παραγωγή ROS μέσω της αποσύζευξης της ενδοθηλιακής συνθετάσης του NO ⁴⁶. Επιπλέον, η έκφραση και η δραστηριότητα των υπομονάδων της NADPH οξειδάσης φαίνεται να είναι αυξημένη στο μυοκάρδιο ασθενών με ΚΑ τελικού σταδίου.

Συνθετάσες μονοξειδίου του αζώτου (NO) ^{47,48}: Το NO συντίθεται από τους οργανισμούς από τη δράση μιας ομάδας ενζύμων που ονομάζονται συνθετάσες του μονοξειδίου του αζώτου (NOSs). Οι NOSs μετατρέπουν το αμινοξύ L-αργινίνη σε NO (ενδοθηλιακός παράγοντας χάλασης) και στο αμινοξύ L-κιτρουλίνη. Για την παραπάνω μετατροπή απαιτείται O_2 και τα συνένζυμα FAD, FMN, NADPH και η τετραϋδροβιοπτερίνη (BH_4). Έχουν αναγνωριστεί 3 ισοένζυμα: η νευρωνική NOS (nNOS) το οποίο ανιχνεύεται στα κύτταρα του νευρικού συστήματος, η ενδοθηλιακή NOS (eNOS) το οποίο εκφράζεται κυρίως στα ενδοθηλιακά κύτταρα και είναι υπεύθυνο για την ρύθμιση της αρτηριακής πίεσης και η επαγωγήμη NOS (iNOS) η οποία παρατηρείται σε χρόνιες φλεγμονώδεις παθήσεις. Και τα τρία ισοένζυμα για να

είναι δραστικά απαιτούν Ca^{+2} και πρέπει να συνδεθούν με την πρωτεΐνη καλμοδουλίνη. Σε αποσύζευξη του ενζύμου λόγω ανεπάρκειας του συνενζύμου BH_4 ή έλλειψης του υποστρώματος L-αργινίνη αυξάνεται η παραγωγή $\text{O}_2^{\cdot-}$ από το ένζυμο (Σχήμα 9). Μάλιστα η NADPH οξειδάση διεγείρει την παραγωγή $\text{O}_2^{\cdot-}$ με αποτέλεσμα την οξείδωση της BH_4 ⁴⁶.



Σχήμα 9. Αποσύζευξη της ενδοθηλιακής NO συνθετάσης.

5.3 Πιθανά ερεθίσματα αυξημένης παραγωγής ενεργών ενδιάμεσων οξυγόνου στην ΚΑ

Όπως έχει προαναφερθεί, στην ΚΑ παρατηρείται υπέρμετρη ενεργοποίηση του συμπαθητικού συστήματος και του συστήματος ρενίνη-αγγειοτανσίνη. Επιπλέον στους ασθενείς με ΚΑ ανιχνεύονται αυξημένα επίπεδα προφλεγμονωδών κυτοκινών. Όλα τα παραπάνω φαίνεται να ευνοούν την υπέρμετρη έκφραση και δραστηριότητα της NADPH οξειδάσης που είναι η κυριότερη οδός παραγωγής ROS⁴⁹.

5.4 Επιδράσεις ενεργών ενδιαμέσων οξυγόνου στην ΚΑ

Η επίδραση των ROS σε διαύλους ιόντων και στο ρεύμα Ca^{+2} : Τα ROS ασκούν αρνητική ινότροπο δράση στο μυοκάρδιο εμποδίζοντας την είσοδο Ca^{+2} στα μυοκαρδιακά κύτταρα και μειώνοντας τη δραστηριότητα της $Ca^{+2} - ATP$ ασης του σαρκοπλασματικού δικτύου των μυοκυττάρων, τα οποία έχουν σημαντικό ρόλο στη συσταλτικότητα του μυοκαρδίου ^{37,50}. Επιπλέον, τα ROS μέσω της λιπιδικής υπεροξειδωσης προκαλούν μεμβρανική καταστροφή που έχει σαν συνέπεια τη μείωση του αριθμού των λειτουργικών μυοκυττάρων και επιδείνωση της ΚΑ.

Καρδιακή υπερτροφία: Πολλοί εξωκυττάριοι παράγοντες επάγουν την υπερτροφία του μυοκαρδίου και πολλά μονοπάτια τα οποία μεσολαβούν στην ανταπόκριση σε αυτούς τους παράγοντες ενεργοποιούνται άμεσα ή έμμεσα από τα ROS. Επίσης τα ROS επάγουν την καρδιακή υπερτροφία μεταβάλλοντας τη γονιδιακή έκφραση ³⁷.

Απόπτωση: Τα ROS διεγείρουν τον προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο μέσω πολλαπλών οδών, οι οποίες περιλαμβάνουν και την άμεση γονιδιακή τοξικότητα ⁵¹. Τα επίπεδα των ROS είναι αυτά που καθορίζουν την επαγωγή της απόπτωσης των μυοκαρδιακών κυττάρων από το οξειδωτικό στρες. Επίσης, η απόπτωση που επάγεται από τους β-αδρενεργικούς υποδοχείς, φαίνεται να μεσολαβείται από την ενεργοποίηση των ROS ³⁷.

Ενεργοποίηση των μεταλλοπρωτεϊνών (MMPs) – αναδιαμόρφωση: Η υπέρμετρη ενεργοποίηση των MMPs μέσω της αυξημένης παραγωγής ROS οδηγεί σε καταστροφή της μηχανικής υποστήριξης της καρδιάς, δηλαδή του κολλαγόνου. Η απώλεια του κολλαγόνου έχει σαν αποτέλεσμα την διαφυγή μυοκυττάρων, την κοιλιακή διάταση (αναδιαμόρφωση) και την προοδευτική συστολική δυσλειτουργία επιδεινώνοντας έτσι την ΚΑ ⁵².

Στεφανιαία αγγεία και ενδοθήλιο: Η χρόνια ΚΑ χαρακτηρίζεται από ενδοθηλιακή δυσλειτουργία, στην παθογένεση της οποίας εμπλέκεται το αυξημένο οξειδωτικό στρες ⁵². Το οξειδωτικό στρες μειώνει τη βιοδιαθεσιμότητα του NO στο καρδιαγγειακό σύστημα προκαλώντας αγγειοσύσπαση και αύξηση του καρδιακού μεταφορτίου. Επιπλέον, το οξειδωτικό στρες μειώνει τις συγκετρώσεις των απαραίτητων για τη δράση της eNOS συνθετάσης συνενζύμων όπως της τετραϋδροβιοπτερίνη (BH_4) μέσω οξείδωσης της προς την μη λειτουργική διϋδροβιοπτερίνη. Σε έλλειψη της BH_4 παρατηρείται αποσύζευξη της eNOS με συνέπεια την παραγωγή O_2^- παρά NO το οποίο επιδεινώνει το οξειδωτικό στρες ⁵³.

5.5 Ποσοτικοποίηση του οξειδωτικού στρες

Τα ROS και τα RNS είναι πολύ ασταθή σωματίδια και η απευθείας in vivo μέτρηση τους είναι δύσκολη. Η μοναδική τεχνική που έχει χρησιμοποιηθεί για την απευθείας μέτρηση των ελεύθερων ριζών είναι ο Ηλεκτρικός Παραμαγνητικός Συντονισμός (Electron Paramagnetic Resonance – EPR) ο οποίος όμως μειονεκτεί στο γεγονός ότι δεν μπορεί να ανιχνεύσει άμεσα ρίζες όπως η $O_2^{\cdot -}$ και η OH^{\cdot} . Για τον λόγο αυτόν η ποσοτικοποίηση του οξειδωτικού στρες γίνεται:

- είτε με την τεχνική «παγίδευσης» (**trapping**), στην οποία η ελεύθερη ρίζα που θέλουμε να μετρήσουμε αντιδρά με ένα μόριο «παγίδα» σχηματίζοντας ένα σταθερό μετρήσιμο προϊόν,
- είτε με την τεχνική «αποτυπώματος» (**fingerprinting**), στην οποία μετράμε το προϊόν της βλάβης που προκαλείται από τα ROS ή τα RNS.

5.5.1 Μηλονική διαλδεΰδη

Η υπεροξείδωση των λιπιδίων της κυτταρικής μεμβράνης είναι ένας μηχανισμός της τοξικότητας των ελεύθερων ριζών. Η διαδικασία οξειδωτικής διάσπασης των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων των κυτταρικών μεμβρανών ονομάζεται λιπιδική υπεροξείδωση και οδηγεί στην αυξημένη διαπερατότητα της κυτταρικής μεμβράνης με αποτέλεσμα τον θάνατο του κυττάρου ⁵⁴. Η μηλονική διαλδεΰδη (malondialdehyde-MDA) αποτελεί το τελικό προϊόν της λιπιδικής υπεροξείδωσης και μπορεί να μετρηθεί εύκολα με φασματοσκοπικές τεχνικές. Έχει βρεθεί ότι τα επίπεδα της MDA διαφέρουν σημαντικά μεταξύ υγιών ατόμων και ασθενών με ΚΑ, ενώ επιπλέον συσχετίζονται με την ταξινόμηση κατά NYHA ^{55,56}.

5.5.2 Πρωτεϊνικά καρβονύλια

Οι πρωτεΐνες αποτελούν κυτταρικούς στόχους των ελεύθερων ριζών με αποτέλεσμα να παρουσιάζονται τροποποιήσεις στην πρωτοταγή, δευτεροταγή και τριτοταγή τους διαμόρφωση ⁵⁷. Η οξειδωτική καταστροφή των πρωτεϊνών είναι επιβλαβής και έχει σημαντικό ρόλο στην παθογένεση αρκετών παθήσεων.

Η αντίδραση των ελευθέρων ριζών του οξυγόνου με τις πρωτεΐνες οδηγούν στο σχηματισμό καρβονυλικών ενώσεων (αλδεΰδες ή κετόνες) οι οποίες παράγονται στις πολυπεπτιδικές αλυσίδες ιδιαίτερα της προλίνης, της αργινίνης, της λυσίνης και της

θρεονίνης. Τα πρωτεϊνικά καρβονύλια (protein carbonyl – PCs) που σχηματίζονται είναι χημικά σταθερά μόρια τα οποία μπορούν να προσδιοριστούν εύκολα με φασματοσκοπικές τεχνικές και τα επίπεδα τους μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως μέτρο οξειδωτικής καταστροφής.

5.5.3 Νιτροτυροσίνη

Η αντίδραση ανάμεσα στο NO και στη ρίζα $O_2^{\cdot -}$ οδηγεί στο σχηματισμό του υπεροξυνιτρώδους ανιόντος ($ONOO^-$). Αυτό αντιδρά με το φαινολικό δακτύλιο της τυροσίνης και προκύπτει ένα σταθερό προϊόν, η νιτροτυροσίνη (nitrotyrosine – NT) (Σχήμα 10). Ο σχηματισμός της νιτροτυροσίνης σχετίζεται με την παθολογία της χρόνιας μυοκαρδιακής δυσλειτουργίας και αποτελεί δείκτη οξειδωτικής καταστροφής από τα RNS.



Σχήμα 10. Αντιδράσεις σχηματισμού της νιτροτυροσίνης.

6. Δείκτες φλεγμονής και απόπτωσης

Τα τελευταία χρόνια, ιδίως κατά την τελευταία δεκαετία, έχει διατυπωθεί η απόψη ότι σημαντικό ρόλο στην παθοφυσιολογία του συνδρόμου της καρδιακής ανεπάρκειας διαδραματίζουν τόσο η ενδοθηλίνη 1 (ET-1) όσο και οι φλεγμονώδεις κυτταροκίνες ⁵⁸.

Η ενεργοποίηση του συστήματος της ενδοθηλίνης θεωρείται τμήμα της απάντησης του νευροενδοκρινικού συστήματος στην καρδιακή ανεπάρκεια. Η ενδοθηλίνη παράγεται από τα ενδοθηλιακά κύτταρα των αγγείων και έχει αγγειοσυσπαστικές ιδιότητες. Τα αυξημένα επίπεδα ενδοθηλίνης σχετίζονται με την αναδιαμόρφωση του μυοκαρδίου, την τοξική δράση επί του μυοκαρδίου, την ελάττωση της αιμάτωσης των στεφανιαίων αγγείων και την επιδείνωση της καρδιακής ανεπάρκειας ⁵⁹.

Σε πρόσφατες μελέτες έχει αποδειχθεί ότι σε ασθενείς με καρδιακή ανεπάρκεια τα επίπεδα στο πλάσμα της ενδοθηλίνης-1 καθώς και των υποδοχέων της, ET-A και ET-B, είναι σημαντικά αυξημένα ⁵⁹. Επίσης, η ενδοθηλίνη-1 φαίνεται να επάγει την παραγωγή των φλεγμονωδών κυτταροκινών μέσω των μακροφάγων ⁶⁰.

Οι κυτταροκίνες είναι πεπτίδια που παράγονται από πολλά είδη τόσο αιμοποιητικών όσο και μη αιμοποιητικών κυττάρων. Έχουν ως αποστολή την ανάπτυξη, εξέλιξη και ενεργοποίηση του ανοσοποιητικού συστήματος, ενώ επίσης θεωρούνται ουσίες – διαμεσολαβητές της φλεγμονώδους αντίδρασης. Οι κύριες φλεγμονώδεις κυτταροκίνες είναι ο παράγοντας νέκρωσης όγκου-α (TNF-α) και η ιντερλευκίνη 6 (IL-6).

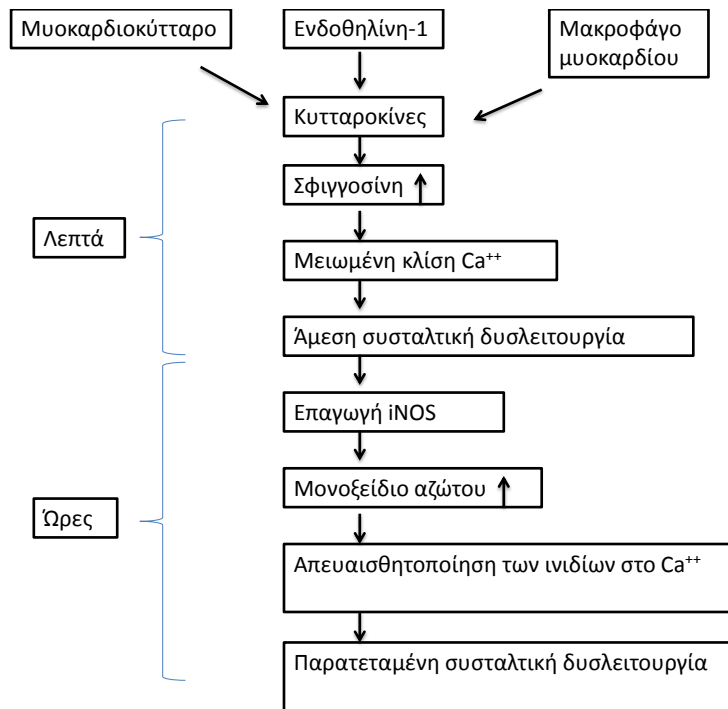
Ο TNF-α είναι ένα ενδογενές πυρετογόνο, συμμετέχει και ρυθμίζει τη φλεγμονώδη αντίδραση ασκώντας παρακρινική και αυτοκρινική δράση στα λευκοκύτταρα, διεγείρει τα μακροφάγα για την παραγωγή άλλων φλεγμονωδών κυτταροκινών, αλλά και του ίδιου, ενώ σε υψηλές συγκεντρώσεις στην κυκλοφορία ($>10^{-8}$ mol/L) ασκεί ενδοκρινική δράση προκαλώντας υπόταση, σηπτική καταπληξία και υποξία των ιστών ⁶¹. Με βάση τις μέχρι στιγμής μελέτες, είναι πλέον αποδεδειγμένο ότι ο TNF-α είναι αυξημένος στον ορό ασθενών με σοβαρή καρδιακή ανεπάρκεια ⁶².

Η IL-6 αποτελεί ρυθμιστή της ανοσιακής απάντησης και της φλεγμονής ⁶¹. Παράγεται κυρίως από τα μακροφάγα, αλλά και από τα T-λεμφοκύτταρα, το αγγειακό ενδοθήλιο και τους ινοβλάστες. Οι περισσότερες μελέτες δείχνουν ότι η IL-6 είναι αυξημένη στον ορό ασθενών με καρδιακή ανεπάρκεια, ⁶³⁻⁶⁵ ενώ παράλληλα,

σύμφωνα με αρκετές από αυτές, η συγκέντρωσή της αυξάνεται όσο πιο σοβαρή είναι η νόσος ^{65,66}. Σύμφωνα με πρόσφατες μελέτες, η IL-6 μπορεί να θεωρηθεί ως αξιόπιστος και ανεξάρτητος προγνωστικός παράγοντας καρδιακής ανεπάρκειας, ^{65,66} ενώ η αύξηση της IL-6 στην καρδιακή ανεπάρκεια δεν εξαρτάται από την αιτιολογία της νόσου ⁶⁷.

Πιστεύεται ότι οι κυτταροκίνες ασκούν αρνητική ινότροπο δράση με τρεις μηχανισμούς (Σχήμα 11):

- Ο πρώτος μηχανισμός συνίσταται σε ελάττωση του μέγιστου ενδοκυττάρου Ca^{++} των καρδιακών μυοκυττάρων κατά τη συστολή ⁶⁸. Η ελάττωση της συσταλτικότητας του μυοκαρδίου παρατηρείται άμεσα, με μικρές έως μέτριες συγκεντρώσεις κυτταροκινών. Η δράση αυτή των κυτταροκινών είναι μη εξαρτώμενη από το NO ⁶³ και ασκείται μέσω της σφιγγοσίνης ⁶⁹.
- Ο δεύτερος μηχανισμός συνίσταται σε ενεργοποίηση της συνθετάσης του NO των καρδιακών μυοκυττάρων, που ονομάζεται eNOS ή NOS3. Το παραγόμενο NO θεωρείται ότι μειώνει την ευαισθησία των ινιδίων του καρδιακού μυός στο Ca^{++} ⁷⁰.
- Ο τρίτος και σπουδαιότερος ίσως μηχανισμός συνίσταται σε ενεργοποίηση από τον TNF-a, αλλά και από την IL-6, μιας άλλης συνθετάσης του NO, της επαγόμενης iNOS ⁷¹. Η δράση αυτή παρατηρείται μετά από έκθεση αρκετών ωρών του μυοκαρδίου στις κυτταροκίνες ⁷¹. Η επαγόμενη iNOS παράγεται στα καρδιακά μυοκύτταρα, αλλά και στο μικροαγγειακό και ενδοκαρδιακό ενδοθήλιο ⁷¹. Πιστεύεται ότι το παραγόμενο NO, μετά την επαγωγή της iNOS από τις κυτταροκίνες, ελατώνει τόσο τη βασική όσο και την ενεργοποιημένη από τους β-αγωνιστές ινότροπη ανταπόκριση του μυοκαρδίου ⁷², μειώνοντας την ευαισθησία των ινιδίων του καρδιακού μυός στο Ca^{++} ⁷¹.



Σχήμα 11. Κυτταροκίνες και αρνητική ενότροπη δράση στο μυοκάρδιο.

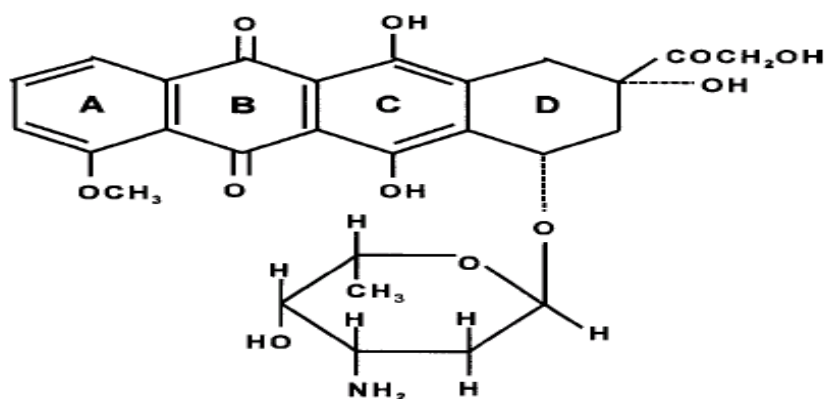
Έχει βρεθεί ότι οι κυτταροκίνες προάγουν την απόπτωση στα μυοκαρδιακά κύτταρα μέσω ενός μηχανισμού που εξαρτάται από τη σφίγγοσίνη⁷³. Πιθανόν παίζει ρόλο και η αυξημένη παραγωγή NO μέσω επαγωγής από τις κυτταροκίνες του ενζύμου iNOS⁷⁴. Επιπλέον οι κυτταροκίνες φαίνεται να συμμετέχουν στις διαταραχές του ενδοθηλίου, που παρατηρούνται στην καρδιακή ανεπάρκεια, προκαλώντας μείωση των επιπέδων του ενζύμου eNOS, που ευθύνεται για την παραγωγή NO στο ενδοθήλιο⁷⁵, και αφετέρου εμποδίζει τη σύνθεση και αυξάνει τον καταβολισμό των πρωτεϊνών στους σκελετικούς μυς⁷⁶.

7. Αδριαμυκίνη

7.1 Γενικά

Το αντιβιοτικό αδριαμυκίνη (δοξορουβικίνη – DXR) ανακαλύφθηκε στις αρχές του 1960 και θεωρείται ακόμη και σήμερα ένα από τα πιο αποτελεσματικά αντινεοπλασματικά φάρμακα εναντίον πολλών μορφών καρκίνου όπως λευχαιμία, σάρκωμα, όγκος του μαστού, των πνευμόνων και των ωοθηκών⁷⁷.

Η αδριαμυκίνη ανήκει στην τάξη των ανθρακυκλινών. Οι ανθρακυκλίνες είναι μια τάξη αντινεοπλασματικών φαρμάκων. Η πρώτη ανθρακυκλίνη που απομονώθηκε ήταν η νταουνομυκίνη από καλλιέργειες των *streptomyces peucetius*. Η αδριαμυκίνη παράγεται από μικροβιακή βιοσύνθεση, αλλά είναι πλέον εφικτή και η χημική της σύνθεση από την νταουνομυκίνη. Το μόριο της ανδριαμυκίνης (Σχήμα 12) αποτελείται από ένα αμινοσάκχαρο, το οποίο συνδέεται με έναν τετρακυκλικό πυρήνα μέσω ενός γλυκοζιτικού δεσμού.



Σχήμα 12. Χημική δομή της Αδριαμυκίνης.

Η θεραπεία με την αδριαμυκίνη καθίσταται περίπλοκη λόγω των παρενεργειών της όπως η μυελοτοξικότητα, η ναυτία, ο εμετός, η διάρροια, η αλωπεκία και η καρδιοτοξικότητα η οποία αποτελεί και την πιο σημαντική ανεπιθύμητη ενέργεια της και με βάση τον χρόνο εμφανισής της ταξινομείται σε οξεία και χρόνια⁷⁷.

7.2 Οξεία καρδιοτοξικότητα

Η οξεία καρδιοτοξικότητα της αδριαμυκίνης μπορεί να εμφανιστεί από την στιγμή της έναρξης της θεραπείας μέχρι και δύο εβδομάδες μετά το τέλος της. Χαρακτηρίζεται από ηλεκτροκαρδιογραφικές ανωμαλίες όπως υπερκοιλιακές και κοιλιακές ταχυκαρδίες, από αυξημένα επίπεδα β-νατριοδιουρητικού πεπτιδίου, το οποίο αποτελεί δείκτη αυξημένης πλήρωσης της αριστερής κοιλίας, μέχρι και εμφάνιση περικαρδίτιδας ή μυοκαρδίτιδας ⁷⁸.

Σε μελέτη που πραγματοποιήθηκε στην Γερμανία 1697 ασθενείς έλαβαν αδριαμυκίνη για θεραπεία λεμφώματος. Μόλις 55 (3,2%) από αυτούς εμφάνισαν οξεία καρδιοτοξικότητα που περιελάμβανε κολπική μαρμαρυγή (n=12), οξεία καρδιακή ανεπάρκεια (n=5), μυοκαρδίτιδα (n=2), και οξύ έμφραγμα μυοκαρδίου (n=1) ⁷⁹. Αντιθέτως, 2 μελέτες που περιελάμβαναν ηλικιωμένους ασθενείς που έλαβαν το χημειοθεραπευτικό σχήμα CHOP (κυκλοφωσφαμίδιο, αδριαμυκίνη, βινκριστίνη, πρενιζολόνη), για την θεραπεία λεμφώματος, παρουσίασαν υψηλά ποσοστά (11% και 21%) στην εμφάνιση οξείας καρδιοτοξικότητας ⁸⁰.

Κάποιοι ερευνητές συσχετίζουν την οξεία καρδιοτοξικότητα της αδριαμυκίνης ως προδιαθεσικό παράγοντα για την εμφάνιση καρδιακής ανεπάρκειας στο μέλλον ⁸¹.

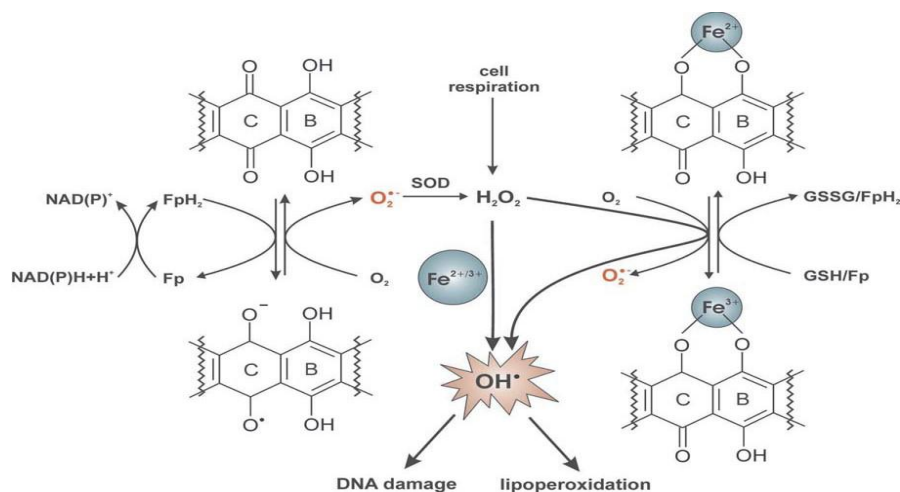
7.3 Χρόνια καρδιοτοξικότητα – Καρδιακή ανεπάρκεια

Η χρόνια καρδιοτοξικότητα της αδριαμυκίνης τυπικά μπορεί να εμφανιστεί ακόμη και μέσα σε ένα χρόνο από τον τελευταίο κύκλο χημειοθεραπείας και η θνητότητα μπορεί να φτάσει ακόμη και το 50%. Φαίνεται μάλιστα να σχετίζεται ισχυρά με συνολική αθροιστική δόση μεγαλύτερη από 550 mg/m² ⁸². Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί μελέτη που περιελάμβανε 3941 ασθενείς που έλαβαν αδριαμυκίνη όπου 88 από αυτούς εμφάνισαν καρδιακή ανεπάρκεια. Το 0,14% από τους ασθενείς αυτούς είχαν λάβει συνολική δόση αδριαμυκίνης κάτω από 400 mg/m², 7% 550 mg/m² και 18% περισσότερο από 700 mg/m² ⁸³.

7.4 Παθοφυσιολογικοί μηχανισμοί

Αν και οι ανθρακυκλίνες αποτελούν αποτελεσματική αντιμετώπιση του καρκίνου, σοβαρή καρδιοτοξικότητα εκδηλώνεται σε >20% των ασθενών που λαμβάνουν τέτοια θεραπεία. Η ισορροπία ανάμεσα στο προσδοκώμενο όφελος και στην αναμενόμενη τοξικότητα είναι ένας καθημερινός προβληματισμός για τους ογκολογικούς ασθενείς, καθότι φάρμακο ή θεραπευτική πρακτική χωρίς τοξικότητα δεν υφίσταται παρά μόνο στα πλαίσια του ιδεατού. Η κατανόηση, όμως, των μηχανισμών- μονοπατιών πρόκλησης καρδιοτοξικότητας από DXR, είναι πρωταρχικής σημασίας για την ανάπτυξη αποτελεσματικών στρατηγικών, με στόχο την, όσο το δυνατόν, ασφαλή χορήγησή της. Ο κυτταρικός θάνατος λόγω απόπτωσης αποτελεί χαρακτηριστικό γνώρισμα της DXR-επαγόμενης καρδιοτοξικότητας, αν και οι ακριβείς εμπλεκόμενοι μηχανισμοί δεν έχουν διασαφηνισθεί πλήρως και οι καταλληλότερες προσεγγίσεις για καρδιοπροστασία παραμένουν ασαφείς ⁸⁴.

7.4.1 Σχηματισμός ελεύθερων ριζών οξυγόνου (ROS, reactive oxygen species)



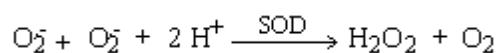
Σχήμα 13. Προτεινόμενοι μηχανισμοί παραγωγής ROS από DXR ⁸⁵.

Αν και ο ακριβής μηχανισμός της επαγόμενης καρδιοτοξικότητας παραμένει ασαφής, υπάρχουν ενδείξεις που εμπλέκουν την δημιουργία ελεύθερων ριζών οξυγόνου. Το επακόλουθο οξειδωτικό stress οδηγεί σε κυτταρική βλάβη. Η ικανότητα των ανθρακυκλινών και πιο συγκεκριμένα της DXR, να προκαλούν την δημιουργία ROS φαίνεται ξεκάθαρα από την δομή τους που περιλαμβάνει ένα κινονικό σύστημα ⁸⁶. Αυξημένο οξειδωτικό stress μπορεί να οδηγήσει σε πληθώρα υποκυτταρικών

αλλαγών στο μυοκάρδιο, συμπεριλαμβανομένης της σταδιακής, αργής απώλειας μυϊκών ινών και του σχηματισμού κενотоπίων, αλλαγές τυπικές της DXR-επαγόμενης μυοκαρδιοπάθειας, όπως έχει περιγραφεί τα τελευταία 30 χρόνια. Επιπρόσθετα, η χορήγηση DXR σχετίζεται και με μείωση των ενδογενών αντιοξειδωτικών μηχανισμών^{84,87}.

Η δημιουργία δραστικών ελευθέρων ριζών γίνεται με δύο διαφορετικούς μηχανισμούς: ο πρώτος περιλαμβάνει την εμπλοκή οξειδοαναγωγικών ενζύμων ενώ ο δεύτερος εξαρτάται άμεσα από τα ιόντα Fe και τη δημιουργία συμπλόκων DXR-Fe δίχως εμπλοκή των παραπάνω ενζύμων^{86,88}.

Όσον αφορά τον πρώτο μηχανισμό, αναγωγή του δακτυλίου C της DXR οδηγεί στην δημιουργία της αντίστοιχης ημικινόνης. Η αναγωγή αυτή καταλύεται από ειδικές φλαβοπρωτεΐνες που δέχονται το ηλεκτρόνιο από το NADH ή το NADPH και το δίνουν στην DXR. Κάτω από φυσιολογικές συνθήκες, η ρίζα της ημικινόνης είναι ασταθής και δίνει το μονήρες ηλεκτρόνιο στο μοριακό οξυγόνο (O₂) το οποίο ανάγεται προς ρίζα ανιόντος υπεροξειδίου (O₂⁻) που ακολουθείται από ενζυμική μετατροπή, μέσω της υπεροξειδικής δισμουτάσης (SOD), σε υπεροξείδιο του υδρογόνου (H₂O₂). Το ένζυμο SOD είναι απαραίτητο για την σάρωση των ριζών ανιόντος υπεροξειδίου. Οι ιστοί με αυξημένη δραστηριότητα SOD ή υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης (GSH) είναι προστατευμένοι. Όταν τα κυτταρικά αποθέματα της γλουταθειόνης μειωθούν στο 20-30% των φυσιολογικών, οι μηχανισμοί προστασίας του κυττάρου από τη δράση τοξικών ουσιών διαταράσσονται με πιθανό αποτέλεσμα τον κυτταρικό θάνατο^{85,89,90,91}.



Το H₂O₂ είναι γενικά ένα σταθερό και χαμηλής τοξικότητας μόριο και το κύτταρο διαθέτει μηχανισμούς προστασίας από αυτό (καταλάση, υπεροξειδάση της γλουταθειόνης) [19, 14]. Τα ένζυμα αυτά είναι απαραίτητα για την εξουδετέρωση του H₂O₂ που σχηματίζεται από την παραπάνω αντίδραση και περιέχει το τοξικό ανιόν του υπεροξειδίου (O₂²⁻)⁸⁵.



Ο σίδηρος αποτελεί ένα στοιχείο πολύ σημαντικό για την επιβίωση του κυττάρου. Όμως, παίζει και πολύ σημαντικό ρόλο στη δημιουργία των ROS μέσω δύο μηχανισμών. Ο πρώτος αφορά τις αντιδράσεις Fenton και Haber-Weiss και ο δεύτερος τη δημιουργία συμπλόκων του με την DXR. Το H₂O₂ και η ρίζα ανιόντος υπεροξειδίου, που σχηματίστηκαν προηγουμένως, μπορούν μέσω της αντίδρασης Fenton και Haber-Weiss να μετατραπούν σε ρίζα υδροξυλίου. Η αντίδραση αυτή είναι πολύ αργή, εκτός και αν καταλύεται από μέταλλα, όπως ο Fe^{85,91}.

Fenton chemistry



Haber-Weiss reaction



LDL peroxidation



Η ρίζα υδροξυλίου που σχηματίζεται, έχει πολύ βραχεία διάρκεια ζωής και εξαιρετικά μεγάλη τοξικότητα. Το χαρακτηριστικό της είναι ότι, σε αντίθεση με το H₂O₂ και της O₂^{·-}, δεν υπάρχει κανένα ενζυμικό σύστημα που να μπορέσει να την εξουδετερώσει. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα, να αντιδρά με οποιοδήποτε μόριο μπορεί να οξειδωθεί, χωρίς να έχει κανένα “εμπόδιο”, προκαλώντας βλάβες σε διάφορα μόρια, όπως λιπίδια, νουκλεϊνικά οξέα και πρωτεΐνες^{85,92}.

Η DXR μπορεί να συνδεθεί με ιόντα σιδήρου, όπως προαναφέρθηκε, σχηματίζοντας σύμπλοκα. Το σύμπλοκο DXR-Fe³⁺ μπορεί να αναχθεί στο σύμπλοκο DXR-Fe²⁺ παρουσία αναγωγικών ουσιών. Στη συνέχεια η επανοξείδωση του συμπλόκου, παρουσία O₂ οδηγεί στην δημιουργία ρίζας ανιόντος υπεροξειδίου, H₂O₂ και ρίζας υδροξυλίου, με τον τρόπο που προαναφέρθηκε. Θα πρέπει επίσης να σημειωθεί η εναλλακτική οδός άμεσης αντίδρασης του συμπλόκου DXR-Fe²⁺ με το H₂O₂ σχηματίζοντας άμεσα την εξαιρετικά τοξική ρίζα υδροξυλίου (Σχήμα 13)⁸⁵.

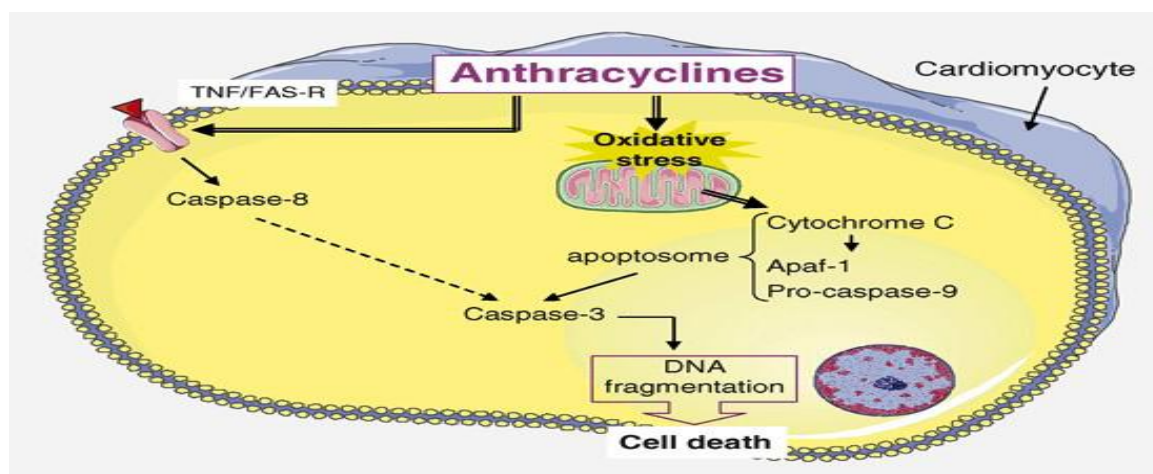
Όλη η παραπάνω διαδικασία λαμβάνει χώρα στο κυτταρόπλασμα, στα μιτοχόνδρια και στο σαρκοπλασματικό δίκτυο και οι ROS που δημιουργούνται έχουν

κυτταροτοξική δράση και επιδρούν επί ενδοκυττάρων μορίων (πρωτεΐνες, DNA, λιπίδια). Η λιπιδική υπεροξειδωση, που μπορεί να επηρεάσει μεγάλο ποσοστό των λιπιδίων με αρνητικές επιπτώσεις στη μεμβρανική διαπερατότητα, πιθανώς εξηγεί σε μεγάλο βαθμό την καρδιοτοξικότητα της DXR^{88,90,91}.

Η μηλονική διαλδεύδη (MDA) είναι δείκτης οξειδωτικού stress ενδοκυτταρικά⁸⁵. Τα ROS αντιδρούν με πολυακόρεστα λιπίδια και σχηματίζουν MDA, που είναι δραστική αλδεύδη και βρίσκεται κυρίως υπό την ενολική της μορφή. Αντιδρά με την δεοξυαδενοσίνη και δεοξυγουανοσίνη του DNA, παράγοντας M1dG που έχει μεταλλαξιογόνο δράση⁹⁰.

7.4.2 Εξασθένιση των αντί-αποπτωτικών μηχανισμών του μυοκαρδιακού κυττάρου

Δύο είναι τα κύρια μονοπάτια που οδηγούν στην απόπτωση και έχουν μελετηθεί εκτενώς (Σχήμα 14). Το “εξωτερικό” μονοπάτι που ρυθμίζεται από τον υποδοχέα Fas/FasL και περιλαμβάνει την ενεργοποίηση της κασπάσης-8 και το “εσωτερικό” μονοπάτι που αποτελείται από την μιτοχondριακή δυσλειτουργία, την απελευθέρωση του κυτοχρώματος C και την ενεργοποίηση της κασπάσης-9. Ποικιλία πρωτεϊνών, όπως η Bcl-2 και η FLIP, γνωστών για την καταστολή του εξωτερικού και εσωτερικού μονοπατιού απόπτωσης έχουν ανιχνευθεί ότι συμμετέχουν.



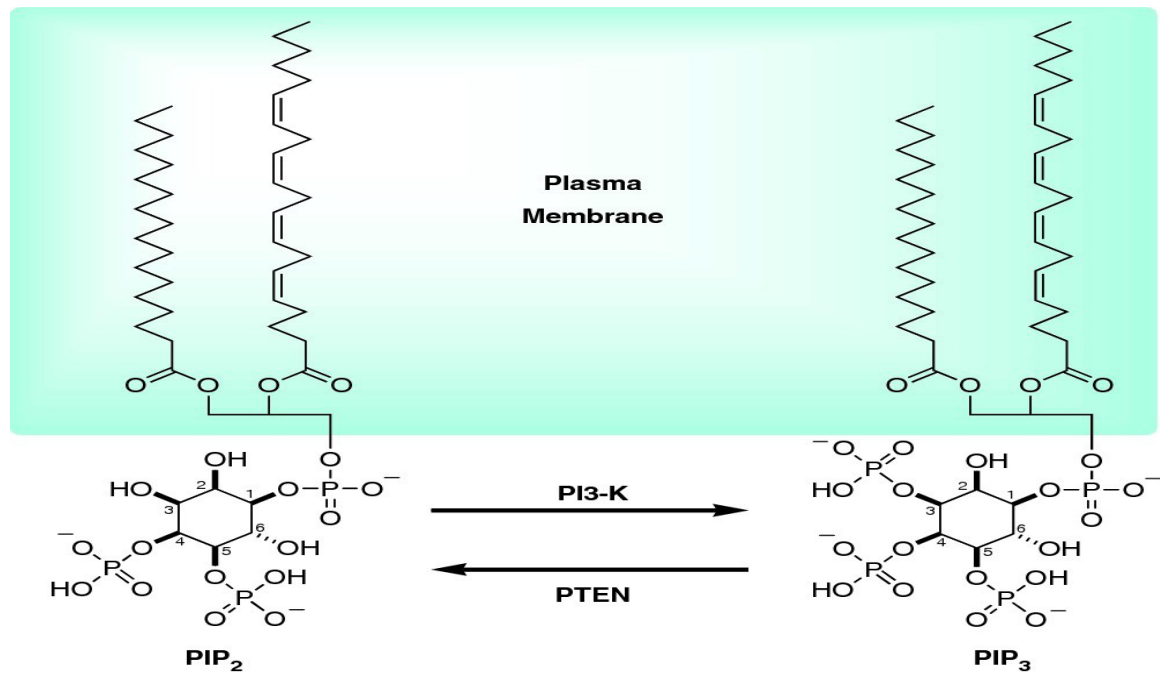
Σχήμα 14. Οδοί πρόκλησης απόπτωσης στα μυοκαρδιακά κύτταρα από την DXR.

Το FasL (Fas ligand) είναι κυτοκίνη που επάγει την απόπτωση μόλις συνδεθεί με τον υποδοχέα Fas. Η DXR προκαλεί ευαισθητοποίηση των μυοκαρδιακών κυττάρων σε αυτό το μονοπάτι. Οι Joji Nitobe et al ⁹³ απέδειξαν ότι ο μηχανισμός “ευαισθητοποίησης” περιλαμβάνει μείωση της ποσότητας της πρωτεΐνης FLIP μέσω των παραγόμενων ROS. Πιο συγκεκριμένα το H₂O₂ φαίνεται να ευθύνεται σε μεγάλο βαθμό ⁹³.

Εκτός από τη δημιουργία των παραπάνω ριζών που είναι εξαιρετικά τοξικές για το κύτταρο η ημικινονική μορφή της DXR μπορεί επίσης να μετατραπεί στο αντίστοιχο άγλυκο τμήμα υπό τη μορφή ρίζας. Η ρίζα αυτή είναι πιθανός αλκυλιωτικός παράγοντας προκαλώντας βλάβη στο DNA οδηγώντας έτσι στην απόπτωση.

Όλα αυτά έχουν ακόμα μεγαλύτερη αρνητική επίδραση στην καρδιά και στα μυοκαρδιακά κύτταρα, τα οποία χαρακτηρίζονται από χαμηλή δραστηριότητα αντιοξειδωτικών μηχανισμών. α) Η καρδιά (και οι όγκοι) έχουν γενικά χαμηλή περιεκτικότητα σε SOD. β) Ο καρδιακός ιστός στερείται SOD και έτσι δεν μπορεί να απαλλαγεί από το H₂O₂

Στην φυσιολογική κατάσταση, οι προ-αποπτωτικοί μηχανισμοί βρίσκονται υπό πλήρη έλεγχο των αντι-αποπτωτικών παραγόντων, όπως Bcl-2 και Bcl-xL. Οι Venkatesan et al. ερεύνησαν την επίδραση της DXR επί αυτών των παραγόντων. Φυσιολογικά, στα μυοκαρδιακά κύτταρα υπάρχει σχετικά υψηλή ποσότητα πρωτεϊνών Bcl-2. Όμως, μετά από θεραπεία με DXR, παρατηρήθηκε αξιοσημείωτη μείωση της έκφρασής τους. Το ίδιο συνέβη και με την αντιαποπτωτική πρωτεΐνη Bcl-xL. Αντιθέτως, η DXR διέγειρε την πρωτεΐνη Bcl-xS η οποία έχει προαποπτωτικές ιδιότητες. Πεδίο πρόσφορο σε έρευνα και περαιτέρω μελέτη αποτελεί η αντιαποπτωτική κινάση Akt/PKB και η επίδραση που έχει η DXR σε αυτήν. Οι Venkatesan et al. έδειξαν ότι η DXR περιόρισε τα επίπεδα ενεργοποίησής της (αναστολή της φωσφορυλίωσης στη Thr³⁰⁸) χωρίς να επηρεάζεται η έκφρασή της ^{94,95}. Μια έρευνα ⁹⁶ βρήκε ότι το σηματοδοτικό μονοπάτι της Akt περιορίστηκε από την DXR in vitro και μία άλλη το 2002 ⁹⁷ μελέτησε την επίδραση που έχει η αυξημένη δραστηριότητα της κινάσης αυτής στο μυοκάρδιο επί DXR-επαγόμενης ΚΑ με ενθαρρυντικά αποτελέσματα.



Σχήμα 15. Δράση της PI3 κινάσης.

Η Akt (PKB) ανήκει στην οικογένεια των σερίνης/θρεονίνης κινασών. Υπάρχουν τρεις διαφορετικές ισομορφές η Akt1, η Akt2 και η Akt3. Η Akt διεγείρεται από υποδοχείς κινάσης της τυροσίνης και υποδοχείς συζευγμένων με G πρωτεΐνες, μέσω της δράσης της PI3K (phosphatidylinositol 3- kinase). Πιο συγκεκριμένα, η PI3K καταλύει την δημιουργία 3-φωσφολιπιδίων που ενεργοποιούν απευθείας την Akt^{98,99}. Σύμφωνα με έρευνα που διεξήχθη το 2006⁹⁸, διαπιστώθηκε η έντονη σημασία της ενεργοποιημένης Akt στην φυσιολογική υπερτροφία (αύξηση του μεγέθους της καρδιάς)^{95,98} που παρατηρείται τόσο σε καρδιακούς ιστούς νεογνών όσο και σε εκείνους αθλητών. Η φωσφορυλιωμένη Akt, ρυθμίζει το μέγεθος των μυοκαρδιακών κυττάρων μέσω ενεργοποίησης του mTOR-εξαρτώμενου μονοπατιού ανάπτυξης, αναστολής της GSK-3β και του FOXO- εξαρτώμενου μονοπατιού ατροφίας^{98,100,101}. Πέρα όμως από τις ρυθμιστικές δράσεις της Akt στην ανάπτυξη, είναι πλέον αποδεκτός ο ρόλος της που αφορά την κυτταροπροστασία στο μυοκάρδιο τόσο σε οξείες όσο και σε χρόνιες περιπτώσεις καρδιακής βλάβης^{95,98,100}. Αναλυτικότερα οι δράσεις της Akt περιλαμβάνουν:

1) αναστολή προαποπτωτικών μορίων και επαγωγή μιτοχονδριακής προστασίας από την απόπτωση (όπως Bad, procaspase-9, PRAS40). Η επαγόμενη από DXR απόπτωση μυοκαρδιακών κυττάρων μπορεί να προληφθεί από πληθώρα διασωστικών

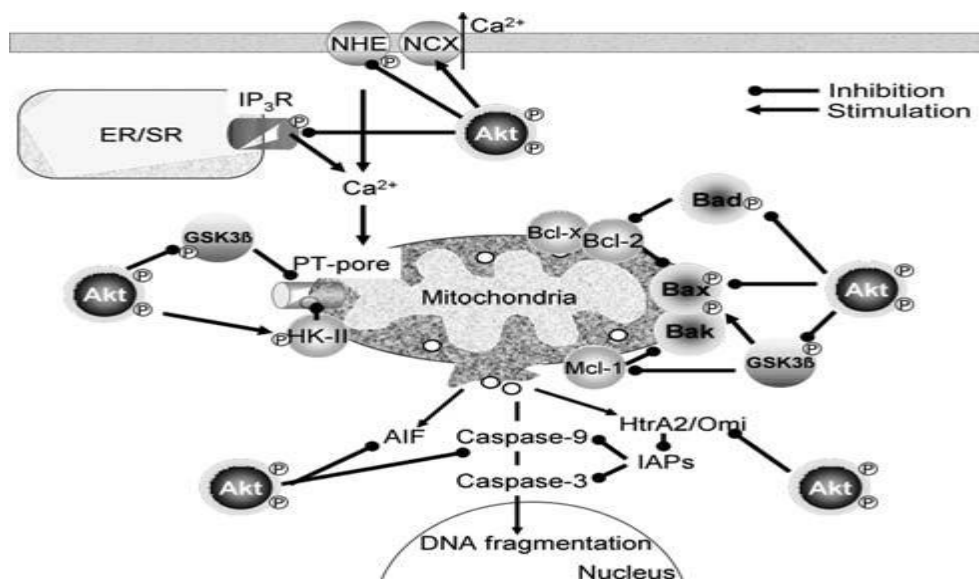
μονοπατιών σηματοδοτούμενων από την Akt ⁹⁰. Η Bad, μία BH3 προαποπτωτική πρωτεΐνη, ήταν το πρώτο μέλος της πρωτεϊνικής οικογένειας Bcl-2 που βρέθηκε ότι αποτελεί στόχο της Akt ^{95,97,99}. Η Akt φωσφορυλιώνει την Bad στη Ser¹³⁶ οδηγώντας έτσι στην αποσύνδεση του Bad από την προστατευτική Bcl-2 πρωτεΐνη Bcl-XL με συνέπεια την παρεμπόδιση της ρυθμιζόμενης από Bax/Bak διάνοιξη των μιτοχονδριακών πόρων διαπερατότητας (mPTP) ^{96,99}. Επιπρόσθετα, η Akt φωσφορυλιώνει και αναστέλλει την Bax. Εκτός από την απευθείας ρύθμιση, μέσω φωσφορυλίωσης της οικογένειας των Bcl-2 πρωτεϊνών, η Akt ρυθμίζει και τα επίπεδα έκφρασής τους ⁹⁹.

Πρόσφατη μελέτη έδειξε την πιθανή ανασταλτική δράση της ενεργοποιημένης Akt στην μετακίνηση του παράγοντα που επάγει την απόπτωση (apoptosis inducing factor-AIF) στα μιτοχόνδρια, ως απάντηση στο προ-αποπτωτικό κεραμίδιο. Ο παράγοντας αυτός απελευθερώνεται από τα μιτοχόνδρια, μεταφέρεται στον πυρήνα και είναι υπεύθυνος για την καταστροφή του DNA. Αυτό λαμβάνει χώρα στα κύτταρα της αριστερής κοιλίας της καρδιάς ως απάντηση στο οξειδωτικό stress. Επιπρόσθετα, η ενεργοποιημένη Akt έχει καταγραφεί ότι φωσφορυλιώνει και αναστέλλει την δραστηριότητα της HtrA2/Omi. Η HtrA2/Omi είναι μία σερίνη πρωτεάση που απελευθερώνεται στο κυττόςόλιο, ως απάντηση στο οξειδωτικό stress, προσδένεται και αναστέλλει την δράση των αναστολέων των αποπτωτικών πρωτεϊνών (inhibitor of apoptotic proteins-IAPs). Οι IAPs είναι υπεύθυνες για την αναστολή της δράσης των κασπασών ⁹⁹. Με την απελευθέρωση του κυτοχρώματος C από τα μιτοχόνδρια, σχηματίζεται ένα σύμπλοκο που αποτελείται από Araf-1, dATP και προκασπάση-9, που ονομάζεται αποπτώσωμα. Μετά τον σχηματισμό του, η προκασπάση-9 διαχωρίζεται και ενεργοποιείται προς κασπάση-9, προκαλώντας έτσι την ενεργοποίηση της downstream κασπάσης. Η ανθρώπινη κασπάση-9 έχει αποδειχθεί ότι φωσφορυλιώνεται από την Akt οδηγώντας στην απενεργοποίησή της ^{96,99,102,103}. Πολλές διαφορετικές οδοί σηματοδότησης μπορούν να επιφέρουν την απόπτωση, αλλά, σε όλες τις περιπτώσεις, η τελική οδός που προκαλεί τον κυτταρικό θάνατο, είναι η ενεργοποίηση μιας οικογένειας πρωτεασών (κασπάσες), οι οποίες απενεργοποιούν διάφορες ενδοκυτταρικές πρωτεΐνες.

Σε έρευνα που πραγματοποιήθηκε ⁹⁹, διαπιστώθηκε ότι σε μυοκαρδιακά κύτταρα κοιλίων ποντικών η μιτοχονδριακή HK-II κατέχει κεντρικό ρόλο στην Akt-επαγόμενη καρδιοπροστασία. Η ενεργοποίηση της Akt οδηγεί σε συσσώρευσή της στα μιτοχόνδρια αυξάνοντας έτσι την επαγόμενη φωσφορυλίωση της HK-II. Αυτό είναι

πολύ σημαντικό μιας και υπάρχουν ενδείξεις ότι οι HK-I και HK-II ασκούν καρδιοπροστατευτική δράση μέσω παρεμπόδισης της εκπόλωσης της μιτοχονδριακής μεμβράνης από το H₂O₂ στο κοιλιακό μυοκάρδιο. Επίσης, η HK αλληλεπιδρά με αποπτωτικές πρωτεΐνες της Bcl-2 οικογένειας, όπως Bax και Bid. Πιο συγκεκριμένα, η HK-II φαίνεται να επεμβαίνει στην ικανότητα της Bax να προσδένεται στα μιτοχόνδρια και να συντελεί στην απελευθέρωση του κυτοχρώματος C. Αύξηση της μιτοχονδριακής HK-II σχετίζεται και με απώλεια της t-Bid-επαγόμενης BAX και BAK ενεργοποίησης στα μιτοχόνδρια. Οι δράσεις αυτές στην Bcl-2 οικογένεια δεν έχουν ακόμα επιβεβαιωθεί ότι λαμβάνουν χώρα και στην καρδιά, αλλά φαίνεται ότι το μονοπάτι Akt/HK-II μπορεί να έχει ευεργετικές επιδράσεις στα μιτοχόνδρια ⁹⁹.

2) ρύθμιση κυκλοφορίας του Ca²⁺ στα μυοκαρδιακά κύτταρα ^{99,100}. Η Akt φαίνεται ότι ρυθμίζει τη συσταλτικότητα της καρδιάς μέσω L-τύπου διαύλων Ca²⁺ και του SERCA υποδοχέα ¹⁰⁰. Επίσης, η Akt επάγει τη φωσφορυλίωση του IP₃ υποδοχέα (IP₃R), με αποτέλεσμα την απενεργοποίησή του και την μερική προστασία του κυττάρου από την Ca²⁺ επαγόμενη απόπτωση ⁹⁹.



Σχήμα 16. Αναστολή της μιτοχονδριακής οδού απόπτωσης από την Akt ⁹⁹.

3) ενεργοποίηση (φωσφορυλίωση) αντιαποπτωτικών μορίων όπως FLIP και IKKα ¹⁰⁰

4) προαγωγή της πρόσληψης και χρησιμοποίησης γλυκόζης

α) αύξηση της έκφρασης του GLUT1 και GLUT3 και της μετατόπισης ⁹⁷ του GLUT4

100

β) προωθεί την γλυκογονογένεση μέσω απενεργοποίησης (φωσφορυλίωσης) της GSK-3 (glycogen synthase kinase-3) ^{97,99,100}. Η GSK-3 είναι μία σερίνη θρεονίνη κινάση που ανιχνεύθηκε αρχικά ως ένα μόριο-κλειδί στην ρύθμιση της γλυκογονογένεσης. Η φωσφορυλίωσή της οδηγεί στην απενεργοποίησή της. Έτσι, λοιπόν, με την απενεργοποίηση της GSK-3, δεν επέρχεται φωσφορυλίωση-απενεργοποίηση της συνθέτασης του γλυκογόνου. Επακολούθως, αποδείχθηκε ότι έχει επίσης την ικανότητα ρύθμισης διαφόρων κυτταρικών λειτουργιών, συμπεριλαμβανομένου του κυτταρικού θανάτου. Υπάρχουν δύο ισομορφές GSK-3α και -3β και η Akt φωσφορυλιώνει την GSK-3α και -β στη Ser²¹ και Ser⁹, αντίστοιχα προκαλώντας έτσι την αναστολή της λειτουργίας τους. Ο ρόλος της GSK-3β στην καρδιά έχει μελετηθεί εκτενώς και έχει διαπιστωθεί η καρδιοπροστατευτική της δράση. Φαίνεται ότι η αναστολή της GSK-3β μπορεί να ασκεί προστατευτική δράση μέσω αναστολής της διάνοιξης των mPTP στο μυοκάρδιο της αριστερής κοιλίας. Τα δεδομένα αυτά καταδεικνύουν ότι η φωσφορυλίωση της GSK-3β από την Akt στη Ser⁹ είναι καθοριστικής σημασίας μηχανισμός για την Akt-επαγόμενη καρδιοπροστασία ⁹⁹.

γ) διέγερση της γλυκόλυσης μέσω ενεργοποίησης-φωσφορυλίωσης της PFK-2

5) επιπρόσθετα η GSK-3 παίζει σημαντικό ρόλο στην αρνητική ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου μέσω απενεργοποίησης της cyclinD. Όμως, με τη δράση της ενεργοποιημένης Akt αναστέλλεται η GSK-3 και ρυθμίζεται θετικά ο κύκλος. φωσφορυλίωση της p21 και p27, ρυθμίζοντας έτσι “θετικά” τον κυτταρικό κύκλο. Οι παραπάνω πρωτεΐνες ανήκουν στην οικογένεια CIP (CDK inhibitory proteins, ανασταλτικές πρωτεΐνες των CDK) και είναι αρνητικοί ρυθμιστές του κυτταρικού κύκλου.

6) ενεργοποίηση-φωσφορυλίωση της eNOS, υποδηλώνοντας έναν σημαντικό ρόλο της Akt στη ρύθμιση της αγγειογένεσης, της διατήρησης του αγγειακού τόνου και της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων ¹⁰². Είναι ήδη αποδεδειγμένο ότι η ενεργοποιημένη Akt επάγει την ενεργοποίηση της eNOS στη Ser¹¹⁷⁷ μέσω απευθείας φωσφορυλίωσης. Συνοψίζοντας, τα υποστρώματα της Akt επηρεάζουν σχεδόν κάθε πλευρά κυτταρικής λειτουργίας συμπεριλαμβανομένης της ανάπτυξης, της επιβίωσης, αλλά και του μεταβολισμού, της πρόσληψης γλυκόζης, της έκφρασης γονιδίων και της κυτταρικής επικοινωνίας ⁹⁹.

7.4.3 Ενεργοποίηση της iNOS και διαταραχή της ομοιόστασης του NO

Τα ένζυμα των συνθετασών του NO (NOS) κατέχουν κεντρική θέση στον έλεγχο της βιοσύνθεσης του NO. Υπάρχουν 3 γνωστές ισομορφές των NOS. Και οι τρεις ισομορφές είναι διμερή, είναι λειτουργικά πολύπλοκες, με αρκετές ομοιότητες προς τα ένζυμα του κυτοχρώματος P450:

α) iNOS (NOS-2, επαγωγίμη μορφή), β) eNOS (NOS-3, συστατική μορφή που είναι παρούσα υπό φυσιολογικές συνθήκες στο ενδοθήλιο, μυοκαρδιοκύτταρα κ.α.), γ) nNOS (NOS-1, μορφή που είναι παρούσα υπό φυσιολογικές συνθήκες στους νευρώνες).

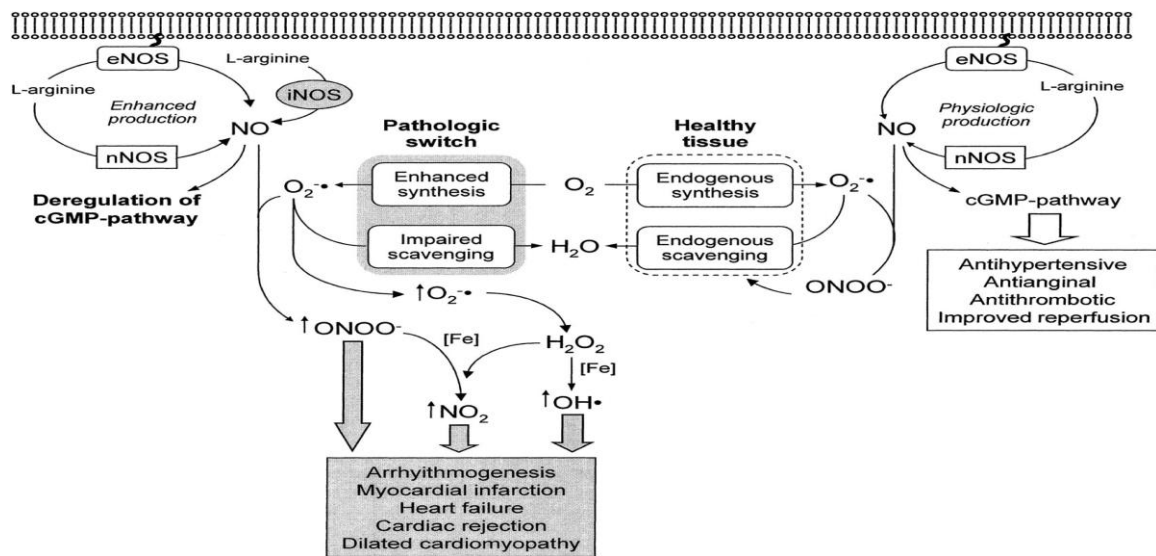
Το άτομο του αζώτου στο NO προέρχεται από το γουανιδινικό άκρο της L-αργινίνης. Η L-αργινίνη ανευρίσκεται συνήθως σε περίσσεια στο κυτταρόπλασμα των ενδοθηλιακών κυττάρων, οπότε και ο βαθμός παραγωγής του NO καθορίζεται, κατά κύριο λόγο, από τη δραστηριότητα του ενζύμου παρά από τη βιοδιαθεσιμότητα του υποστρώματος.

Και οι τρεις ισομορφές eNOS, iNOS και nNOS εκφράζονται στο μυοκάρδιο. Η nNOS εκφράζεται στις νευρικές απολήξεις, και οι iNOS και eNOS στα ενδοθηλιακά και μυοκαρδιακά κύτταρα. Η ολοκληρωτική παρουσία των συνθετασών του NO στο μυοκάρδιο και η πολύ σημαντική δράση του, το καθιστούν ένα καθοριστικό μόριο στην λειτουργία της καρδιάς που εξαρτάται από την συγκέντρωσή του και από την δραστηριότητα των επιμέρους ισομορφών¹⁰⁴.

Η eNOS ισομορφή παίζει πολύ σημαντικό ρόλο στην ρύθμιση της καρδιαγγειακής λειτουργίας. Το, προερχόμενο από την eNOS, NO αναστέλλει την λειτουργία των L-τύπου διαύλων Ca^{2+} (VDCC) οδηγώντας έτσι σε μειωμένη συστολή του μυοκαρδίου, ενέργεια αντίθετη από το NO που παράγεται από την nNOS. Ποντίκια με κατεσταλμένο το γονίδιο που κωδικοποιεί την eNOS, εμφάνισαν υπερτροφία της αριστερής κοιλίας, γεγονός που σχετίζεται με την εκδήλωση ΚΑ¹⁰⁵. Πέρα από την δημιουργία ROS, δραστικές ρίζες αζώτου (RNS) ενοχοποιούνται εξίσου για την επαγόμενη από τις ανθρακυκλίνες καρδιοτοξικότητα. Αυτό αποκαλύπτει σύνδεση μεταξύ των ανθρακυκλινών και της παραγωγής NO. Αυξημένη παραγωγή του NO μέσω της iNOS σχετίζεται άμεσα με βλάβες στο DNA, μυοκαρδιοπάθεια και ΚΑ. Έχει δειχθεί ότι τόσο στα επίπεδα του mRNA, όσο και στα επίπεδα της πρωτεΐνης, χορήγηση DXR οδηγεί σε αυξημένη παραγωγή NO εξαιτίας αύξησης της έκφρασης της μυοκαρδιακής iNOS⁹². Αυξημένη έκφραση της ισομορφής αυτής έχει

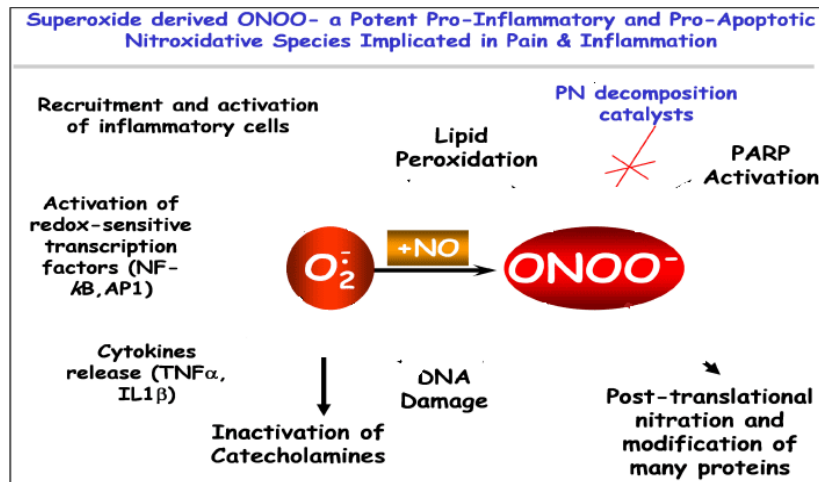
παρατηρηθεί σε διάφορες καρδιακές νόσους, συμπεριλαμβανομένης της ΚΑ και της μυοκαρδιοπάθειας^{104,106}. Αντίθετα, κάτι ανάλογο δεν συνέβη με τις άλλες ισομορφές του ενζύμου eNOS και nNOS σε περιπτώσεις οξείας καρδιοτοξικότητας από DXR¹⁰⁶.

Το NO, το προϊόν της καταλυτικής αντίδρασης της iNOS, συμμετέχει στις αντιδράσεις οξειδωτικού μεταβολισμού, στην απαμίνωση των βάσεων πουρίνης και πυριμιδίνης (με αποτέλεσμα τη ρήξη των αλυσίδων του DNA) και στην οξειδωτική απενεργοποίηση διαφόρων ενζύμων¹⁰⁷. Επίσης, μαζί με τις RNS ενεργοποιεί την μιτοχονδριακή οδό απόπτωσης⁸⁷.



Σχήμα 17. Αποτέλεσμα της διαταραχής της ομοιόστασης του NO¹⁰⁶.

Το υπεροξυνιτρώδες ανιόν (NO³⁻) είναι αδιαμφισβήτητα ένας από τους πιο δραστικούς οξειδωτικούς παράγοντες. Είναι το αποτέλεσμα της αντίδρασης του NO και της ρίζας του υπεροξειδίου⁸⁵.



Σχήμα 18. Αντίδραση παραγωγής υπεροξυνιτρώδους ανιόντος.

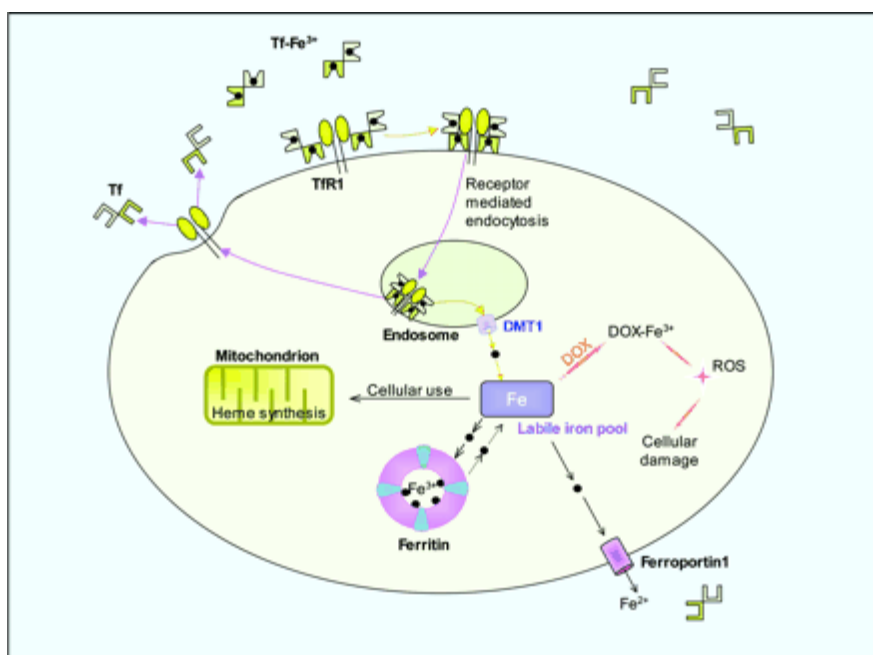
Το παραγόμενο ανιόν, στο εσωτερικό του μιτοχονδρίου, φαίνεται πως είναι υπεύθυνο για την αντίδραση και απενεργοποίηση της Mn-SOD [36]. Οι μεταλλοπρωτεϊνάσες (MMPs) και οι υποδοχείς PARP είναι μονοπάτια σηματοδότησης που διαμεσολαβούνται από την NO^3^-/ROS -επαγόμενη μυοκαρδιακή βλάβη. Έχει βρεθεί ότι η DXR αύξησε τα επίπεδα mRNA της μυοκαρδιακής MMP-2 και MMP-9 και την PARP-δραστηριότητα εξαρτώμενου κυτταρικού θανάτου 2-3 φορές περισσότερο από το φυσιολογικό ⁸⁷. Η υπερενεργοποίηση του PARP οδηγεί σε ταχεία εξάντληση των ενδοκυτταρικών αποθεμάτων NAD και ATP, μειώνοντας τα επίπεδα γλυκόλυσης και οξειδωτικής φωσφορύλιωσης και σε έκφραση γονιδίων που εμπλέκονται στην φλεγμονή. Όταν υπάρχει αυξημένη MMP δραστηριότητα επέρχεται προοδευτική διάσπαση του δικτύου κολλαγόνου, διεύρυνση και ανακατασκευή της αριστερής κοιλίας της καρδιάς ¹⁰⁸.

7.4.4 Απορρύθμιση της ομοιόστασης σιδήρου

Ο Fe βρίσκεται στο πλάσμα του αίματος συνδεδεμένος (Fe^{3+}) με μια πρωτεΐνη-φορέα που ονομάζεται τρανσφερρίνη (Tf). Το μεγαλύτερο ποσοστό του χρησιμοποιείται για ερυθροποίηση και μικρή ποσότητα προσλαμβάνεται από άλλους ιστούς. Για αυτό τον λόγο τα κύτταρα διαθέτουν μεμβρανικούς υποδοχείς που επιτρέπουν την είσοδο του συνδεδεμένου με την Tf σχηματίζοντας το ενδόσωμα. Ο Fe αποχωρίζεται από την Tf, ανάγεται προς Fe^{2+} και μετά διαπερνά την μεμβράνη του ενδοσώματος. Μετά ο Fe ¹⁰⁹: α) προορίζεται για άμεση κυτταρική χρήση ή β) συνδέεται με την φερριτίνη (Fer),

το μόριο αποθήκευσης του στο εσωτερικό των κυττάρων, γ)απομακρύνεται από το κύτταρο μέσω της φερροπορτίνης 1 ή δ)συνδέεται με την DXR σχηματίζοντας σύμπλοκο.

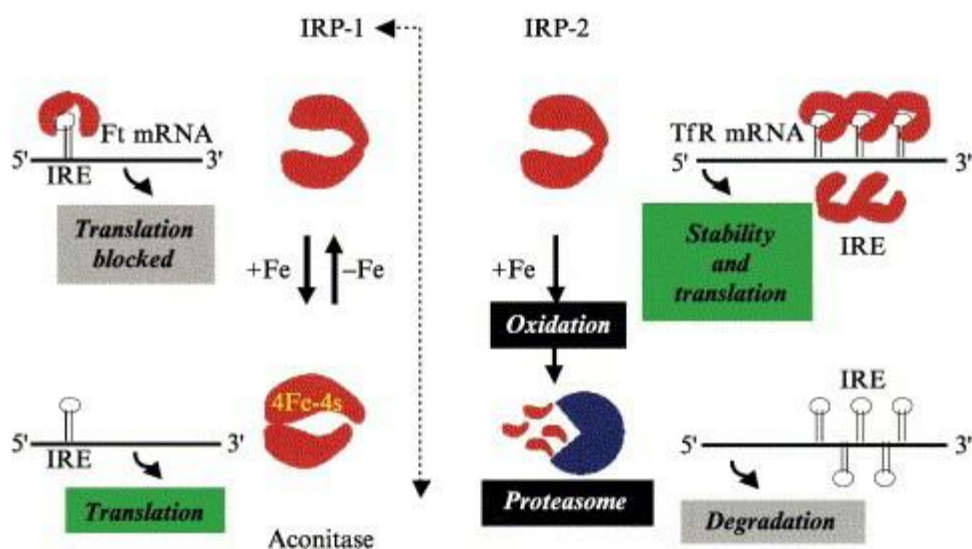
Η ρύθμιση της ομοιόστασης Fe γίνεται σε πολλά επίπεδα. Ένα από αυτά είναι οι πρωτεΐνες IRP1 και IRP2 (Iron-Regulatory Proteins). Πρόκειται για μόρια που συνδέονται με το mRNA της Fer και του υποδοχέα της Tf αντίστοιχα, ρυθμίζοντας έτσι την έκφραση των αντίστοιχων γονιδίων σε επίπεδο της μετάφρασης^{90,109,110}.



Σχήμα 19. Μεταβολισμός του Fe στο κύτταρο Tf=transferrin, TfR1=transferrin receptor¹⁰⁹.

Η IRP1 αναγνωρίζει στο Fer mRNA κάποιες ειδικές περιοχές που ονομάζονται IRE (Iron-Responsive Elements). Όταν υπάρχουν αυξημένα επίπεδα Fe στο κύτταρο, παρεμποδίζεται η σύνδεση IRP1- IRE, με αποτέλεσμα να μεταφράζεται κανονικά το Fer mRNA. Έτσι το κύτταρο, αναγνωρίζοντας τα υψηλά επίπεδα Fe, αυξάνει την έκφραση της Fer που είναι το μόριο αποθήκευσής του. Το αντίστροφο συμβαίνει όταν τα επίπεδα του ενδοκυτταρικού Fe είναι χαμηλά. Η IRP2 αναγνωρίζει στο Tfr mRNA ειδικές περιοχές (IRE). Η ρύθμιση της μετάφρασης του Tfr mRNA πραγματοποιείται μέσω αποικοδόμησής του από το πρωτεόσωμα. Όταν υπάρχουν αυξημένα ποσά ενδοκυτταρικού Fe, πραγματοποιείται αποικοδόμηση. Όταν υπάρχει έλλειψη Fe, η IRP2 συνδέεται με το Tfr mRNA και γίνεται κανονικά η μετάφραση, προστατεύοντας

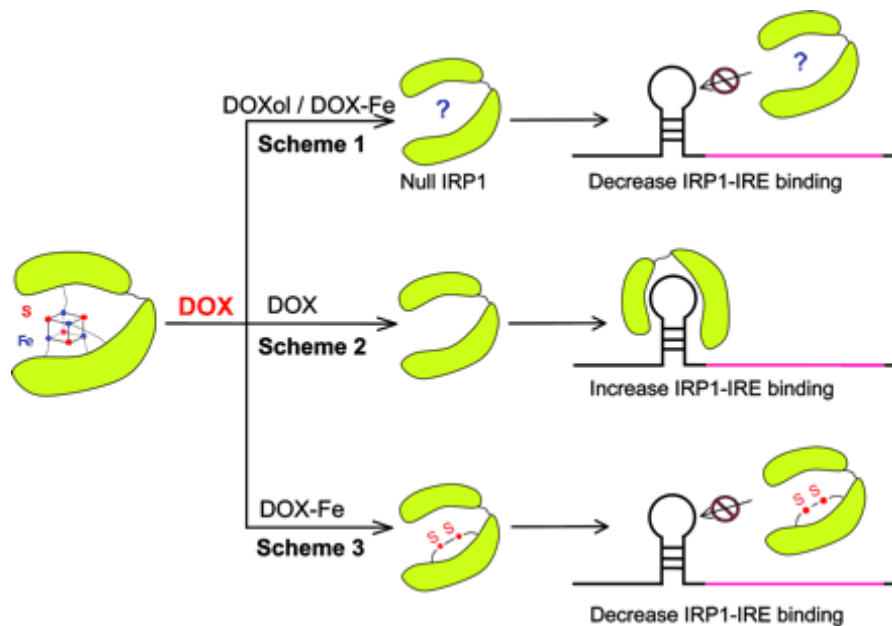
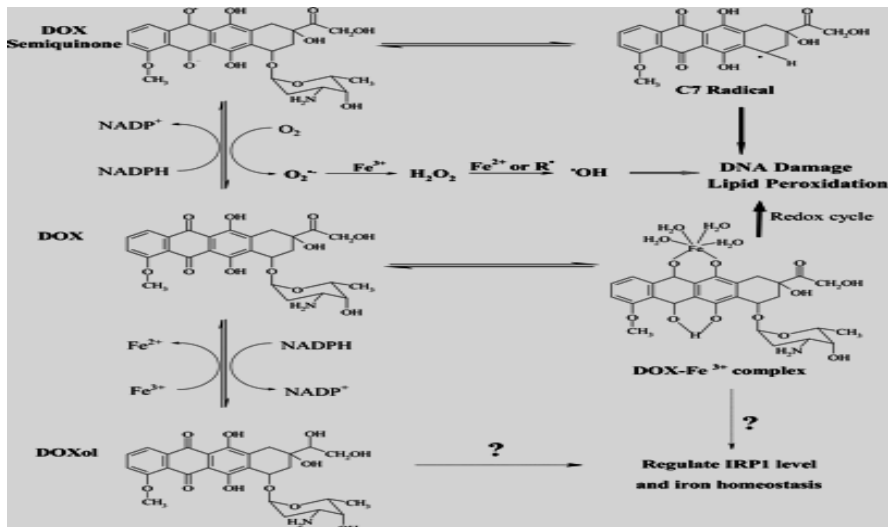
το mRNA από την αποικοδόμηση από το πρωτεόσωμα, αυξάνοντας την έκφραση των μεμβρανικών υποδοχέων Tf πρόσληψης Fe^{90,109,110}. Η επίδραση της DXR στην ομοιόσταση του Fe περιλαμβάνει τα εξής^{90,109}:



Σχήμα 20. Σχηματική απεικόνιση επίδρασης Fe στην έκφραση της τρανσφερρίνης και φερριτίνης.

α) Η δοξορουβικινόλη μειώνει την σύνδεση IRP1-mRNA μέσω μηχανισμού που δεν έχει διευκρινισθεί πλήρως, β) Η DXR αυξάνει την σύνδεση IRP1-mRNA μέσω απομάκρυνσης του πυρήνα [4Fe-4S] της IRP1, γ) Το σύμπλοκο DXR-Fe μειώνει την σύνδεση IRP1-mRNA μέσω κατάλυσης δημιουργίας δισουλφιδικής γέφυρας σε πολύ σημαντικές για την σύνδεση αυτή θειολομάδες.

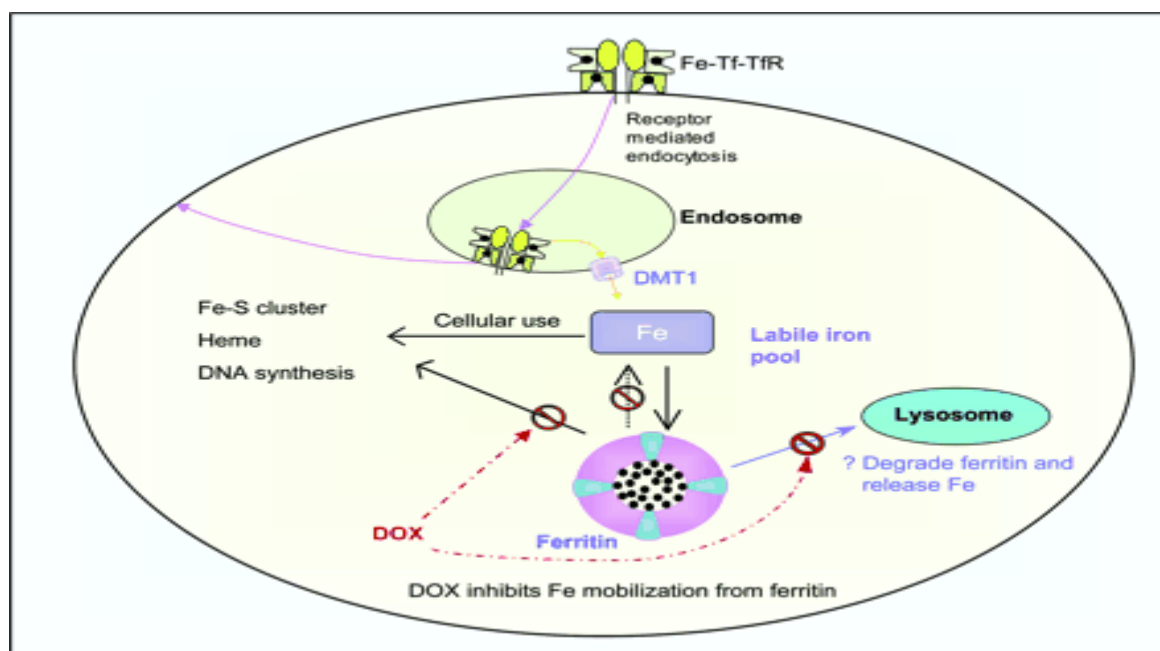
Οι συνέπειες είναι καρδιοτοξικές, διότι το μυοκαρδιακό κύτταρο αδυνατεί να αντληφθεί τα επίπεδα Fe και να “συγχρονίσει” την έκφραση του υποδοχέα της Tf και της Fer. Επίσης, οι διάλυτοι Ca²⁺ διαθέτουν παρόμοιους μηχανισμούς απενεργοποίησης από τον Fe²⁺.



Σχήμα 21. Προτεινόμενοι μηχανισμοί της επίδρασης της DXR στην δραστηριότητα της IRP-1¹⁰⁹.

δ) Η DXR προκαλεί έμμεσα την συσσώρευση Fe στην Fer. Η ποσότητα του συνολικού ενδοκυτταρικού Fe δεν επηρεάζεται, παρά μόνο η κατανομή του στο εσωτερικό του κυττάρου. Η δράση αυτή της DXR είναι αποτέλεσμα παρεμπόδισης της “κινητικότητας” του Fe από την Fer και όχι άμεσα αύξησης της αποθήκευσής του. Ο μηχανισμός δεν έχει αποσαφηνιστεί πλήρως αλλά πιστεύεται ότι περιλαμβάνει δυσλειτουργία των λυσοσωμάτων (ή/και του πρωτεοσώματος), οργανιδίων πολύ σημαντικών για την αποικοδόμηση της Fer και την απελευθέρωση του δεσμευμένου Fe. Επίσης, οι Thomas and Aust απέδειξαν ότι οι ανθρακυκλίνες μπορούν να

αυξήσουν την συγκέντρωση του ελεύθερου Fe στο εσωτερικό του κυττάρου μέσω παραγωγής O^{2-} , το οποίο προκαλεί την αργή απελευθέρωση του από την Fer¹¹¹. Η ελλιπής δυνατότητα της Fer να αποδεσμεύσει τον Fe στο κυτταρόπλασμα, επιφέρει κυτταροτοξικά αποτελέσματα λόγω του καθοριστικού ρόλου του σε διάφορες μεταβολικές διεργασίες του κυττάρου.



Σχήμα 22. Απεικόνιση των δράσεων της DXR στον ενδοκυτταρικό μεταβολισμό σιδήρου¹⁰⁹.

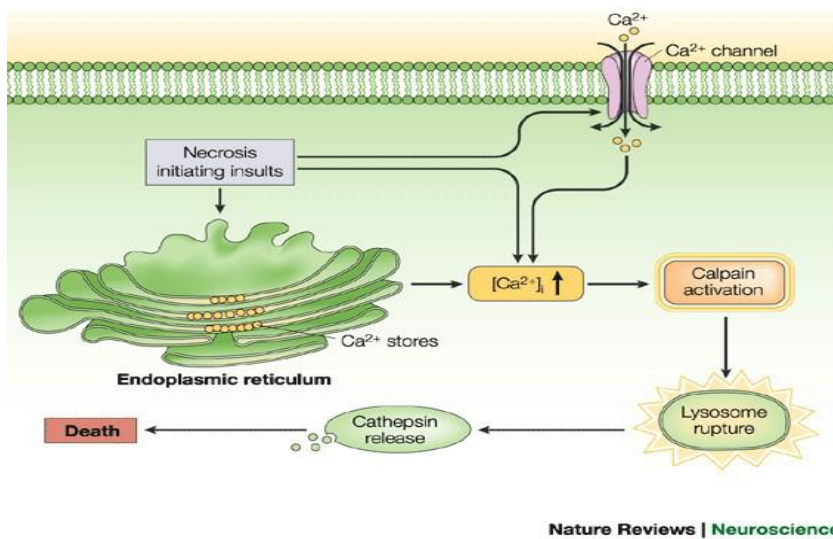
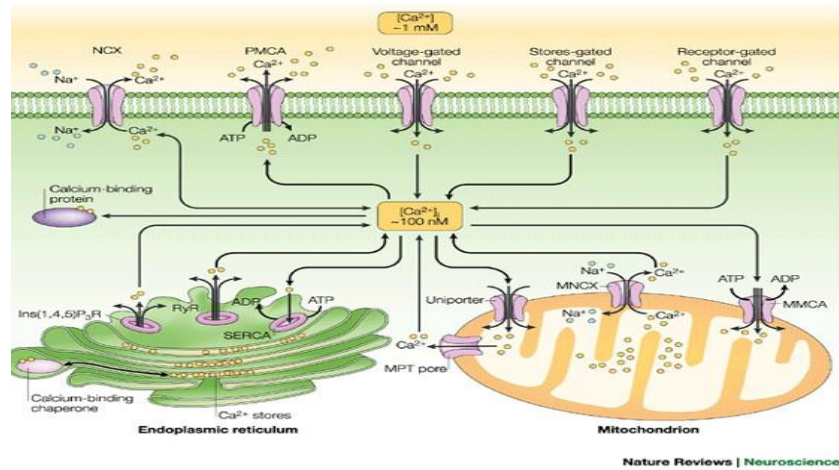
7.4.5 Απορρυθμίση της ομοιόστασης του Ca^{2+}

Η ομοιόσταση του ενδοκυττάρου Ca^{2+} είναι ζωτικής σημασίας για τη συστατικότητα του μυοκαρδίου. Φαίνεται ότι η παραγωγή ελευθέρων ριζών κοντά στο σαρκοπλασματικό δίκτυο προκαλεί αλλαγές στο οξειδωτικό περιβάλλον, με αποτέλεσμα την α) υπερενεργοποίηση των L- τύπου διαύλων Ca^{2+} της κυτταροπλασματικής μεμβράνης. Αυτό πιθανώς συμβαίνει είτε μέσω οξείδωσης των σουλφυδρυλικών ομάδων των διαύλων Ca^{2+} , είτε απλά μέσω ενεργοποίησης “υπερευαίσθητων” διαύλων Ca^{2+} , λόγω αλλαγής στο οξειδωτικό περιβάλλον, χωρίς όμως άμεση επίδραση στους διαύλους. β) Υπερενεργοποίηση του υποδοχέα RYR2 (cardiac type ryanodine receptor 2) του σαρκοπλασματικού δικτύου, γ) αυξημένη ευαισθησία του υποδοχέα RYR2 στη ρυανοδίνη και δ) απενεργοποίηση και μειωμένη

έκφραση της Ca^{2+} -ATPase (SERCA) του σαρκοπλασματικού δικτύου. Αυτό οδηγεί σε αύξηση της ενδοκυττάριας συγκέντρωσης λόγω απελευθέρωσης των αποθεμάτων Ca^{2+} του ενδοπλασματικού δικτύου. Από την άλλη μεριά, ο βασικός μεταβολίτης της DXR, η δοξορουβικινόλη, πιστεύεται ότι μειώνει την έκφραση του γονιδίου του RYR2 προκαλώντας έτσι αντίθετα αποτελέσματα από το “προ μεταβολισμού” μόριο. Αυτό εξηγεί την απορύθμιση των μηχανισμών ομοιόστασης Ca^{2+} στο μυοκαρδιακό κύτταρο. Η δοξορουβικινόλη επίσης αναστέλλει την αντλία SERCA με αποτέλεσμα την προβληματική αποθήκευση του κυτταροπλασματικού Ca^{2+} στο ενδοπλασματικό δίκτυο. Όλα αυτά δείχνουν την DXR-προκαλούμενη προβληματική ομοιόσταση Ca^{2+} στο μυοκάρδιο και την επακόλουθη αυξημένη ενδοκυττάρια συγκέντρωση Ca^{2+} ^{109,112}. Οι calpains, που ενεργοποιούνται από αυξημένη συγκέντρωση Ca^{2+} , προκαλούν βλάβες στην μεμβράνη των λυσοσωμάτων με επακόλουθη απελευθέρωση >80 διαφορετικών υδρολυτικών ενζύμων, περιλαμβανομένου και των καθεψινών. Αυτές, αφού ενεργοποιηθούν από το κεραμίδιο, επιφέρουν τον κυτταρικό θάνατο μέσω της μιτοχονδριακής οδού απόπτωσης ^{109,113}.

Θα πρέπει ακόμα να υπογραμμιστεί και η συνεισφορά της οδού του κεραμιδίου στην προβληματική ομοιόσταση Ca^{2+} . Το κεραμίδιο ενεργοποιεί τους B-τύπου διαύλους Ca^{2+} , συνεισφέροντας στην προβληματική μυοκαρδιακή λειτουργία των ασθενών υπό DXR θεραπεία.

Έρευνες δείχνουν ότι η DXR μπορεί να αυξήσει ή να μειώσει την συσταλτικότητα της καρδιάς. Η ασυμφωνία των αποτελεσμάτων μπορεί να οφείλεται σε διαφορετικά μοντέλα πειραματόζωων, τύπο κυττάρων, δόση DXR, διάρκεια θεραπείας και κυρίως στάδιο εξέλιξης της νόσου. Στα αρχικά στάδια, η DXR τείνει να προκαλεί απελευθέρωση του Ca^{2+} από το σαρκοπλασματικό δίκτυο, οδηγώντας σε αυξημένη συσταλτικότητα. Στο τελευταίο στάδιο της νόσου, η DXR αναστέλλει τις Ca^{2+} ρυθμιστικές πρωτεΐνες, οδηγώντας σε μειωμένη συσταλτικότητα ¹¹².



Σχήμα 23. 1) Ρύθμιση ομοιόστασης $[Ca^{2+}]_i$, 2) Απόπτωση ρυθμιζόμενη από αυξημένη $[Ca^{2+}]_i$.¹¹³

7.4.6 Πρόκληση βλαβών στο DNA μέσω της οδού του κεραμιδίου

Οι ανθρακυκλίνες προκαλούν μυοκαρδιακή βλάβη και μέσω ενεργοποίησης του μηχανισμού της απόπτωσης, λόγω καταστροφής του DNA του κυττάρου. Οι ελεύθερες ρίζες οξυγόνου και υδροξυλίου καθώς και η C7 ρίζα της DXR, όταν φθάνουν στον πυρήνα, επιδρούν άμεσα και βλαπτικά στο DNA. Επιπρόσθετα, η προκαλούμενη από τις ανθρακυκλίνες, αναστολή της τοποϊσομεράσης II, οδηγεί σε αδυναμία του κυττάρου να διορθώσει αυτές τις βλάβες και έτσι το κύτταρο οδηγείται σε απόπτωση. Οι παραπάνω ενέργειες ανήκουν στις φαρμακευτικές δράσεις αυτών των μορίων και δεν είναι εκλεκτικές για το μυοκάρδιο. Φαίνεται όμως, ότι οι

ανθρακυκλίνες ενεργοποιούν το μηχανισμό της απόπτωσης ειδικά στα μυοκαρδιακά κύτταρα και με την ενεργοποίηση της οδού του κεραμιδίου καθώς και με την αύξηση της de novo σύνθεσης του ¹¹⁷.

Η οδός της σφιγγομυελίνης είναι ένα από τα διαμεμβρανικά συστήματα μετάδοσης αποπτωτικού σήματος. Η σφιγγομυελίνη αποτελεί βασικό στοιχείο της εξωτερικής επιφάνειας των κυτταρικών μεμβρανών. Υδρολύεται μέσω σφιγγομυελινάσων σε φωσφοχολίνη και κεραμίδιο, το οποίο διαχέεται από τις μεμβράνες και δρα ως ενδοκυττάριος αγγελιοφόρος που προκαλεί απόπτωση. Η ενεργοποίηση του κύκλου της σφιγγομυελίνης και η επακόλουθη αύξηση των ενδοκυττάριων επιπέδων του κεραμιδίου ή/και η de novo σύνθεση κεραμιδίου από σερίνη και παλμιτοϋλ-CoA, ακολουθείται από: α) μείωση της μιτωτικής δραστηριότητας, β) επαγωγή της κυτταρικής διαφοροποίησης, γ) ενεργοποίηση της καθεψίνης D δ) έναρξη του αποπτωτικού προγράμματος (αποφωσφορυλίωση των αντι-αποπτωτικών πρωτεϊνών Bcl-2, απελευθέρωση AIF και cyt C και αναστολή της Akt/PKB αντιαποπτωτικού μονοπατιού), ε) ενεργοποίηση των Β-τύπου διαύλων Ca²⁺ της κυτταροπλασματικής μεμβράνης. Οι Delpy et al έδειξαν ότι τα μυοκαρδιακά κύτταρα εκφράζουν το συγκεκριμένο υποδοχέα και η χορήγηση DXR σχετίζεται με 1) ενεργοποίησή του, 2) de novo βιοσύνθεση του κεραμιδίου μέσω ενεργοποίησης της συνθάσης του κεραμιδίου, 3) ενεργοποίηση της σφιγγομυελινάσης και 4) συσσώρευσή του στην αριστερή κοιλία ¹¹⁸.

7.4.7 Μεταβολές στον ενεργειακό μεταβολισμό

Η καρδιά απαιτεί υψηλά ποσά ενέργειας προκειμένου να διατηρήσει την συσταλτική της ικανότητα. Το ATP (5mmol/kg heart wet weight) αποτελεί την πρωταρχική πηγή ενέργειας. Όμως, οι ενδοκυτταρικές αποθήκες του είναι περιορισμένες. Επομένως, σε περιπτώσεις αυξημένων αναγκών, το ATP μπορεί να συμπληρωθεί και από την φωσφοκρεατίνη (PCr) (10mmol/kg heart wet weight). Η DXR έχει αποδειχθεί ότι μειώνει τα επίπεδα του ATP, της PCr καθώς και τις αναλογίες PCr/ATP, PCr/Cr και ATP/ADP. Υπάρχουν διάφοροι μηχανισμοί ρύθμισης της παραγωγής και χρησιμοποίησης της ενέργειας στο εσωτερικό των κυττάρων. Το σημαντικότερο ποσοστό της ρύθμισης πραγματοποιείται με την συνδυαστική δράση της CK και της AMPK ¹¹⁶. Η DXR:

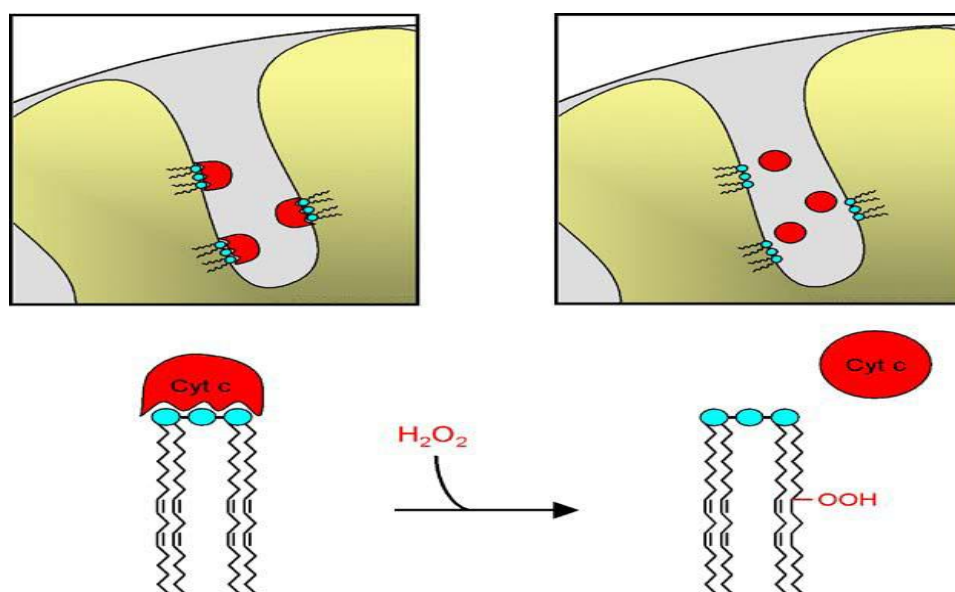
α) απενεργοποιεί σχεδόν όλες τις ισομορφές CK. Η απενεργοποίηση οφείλεται στην οξείδωση των σουλφυδρυλικών ομάδων (-SH) των CK από τον Β υδροκινονικό δακτύλιο της DXR και τα παραγόμενα ROS και RNS και επιταχύνεται από τον σχηματισμό συμπλόκων DXR-Fe¹¹⁶.

β) αποσταθεροποιεί τα οκταμερή που σχηματίζει η sMtCK, ισομορφή που βρίσκεται κυρίως στην καρδιά. Η αποσταθεροποίηση οδηγεί στη δημιουργία διμερών sMtCK και οφείλεται στην οξείδωση που προκαλείται από την DXR (κυρίως από την ρίζα ανιόντος υπεροξειδίου) σε ομάδες κυστεΐνης του ενεργού κέντρου. Ειδικά η sMtCK είναι πιο εκτεθειμένη από τις άλλες ισομορφές CK, γιατί βρίσκεται στο περιβάλλον συσσώρευσης της DXR και των ROS που αυτή παράγει¹¹⁶.

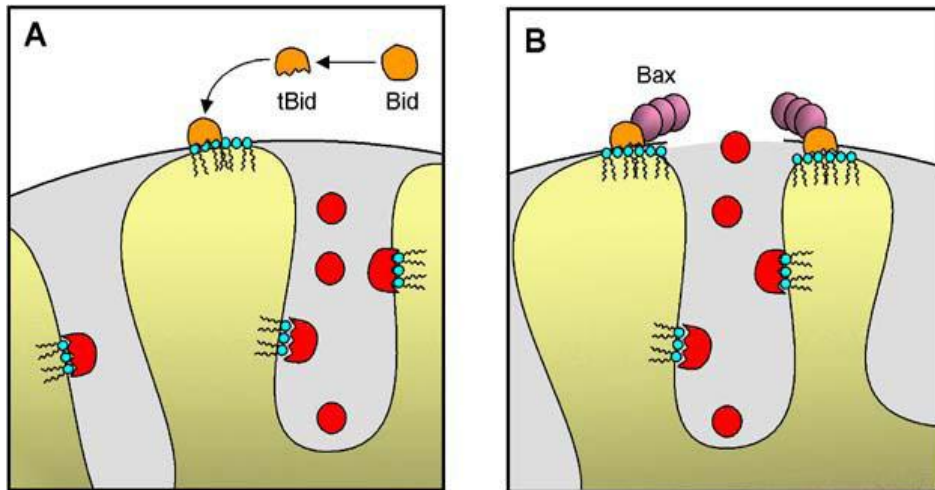
γ) παρεμποδίζει τη σύνδεση του κυτοχρώματος C (cyt C) με την καρδιολιπίνη (CL). Οι ανθρακυκλίνες ενώνονται στην εσωτερική μεμβράνη των μιτοχονδρίων με τα μόρια της καρδιολιπίνης. Η καρδιολιπίνη αποτελεί πρωταρχικό στόχο για τις ROS, αφενός γιατί βρίσκεται στην περιοχή παραγωγής τους και αφετέρου λόγω των ακόρεστων αλυσίδων της. Η καρδιολιπίνη είναι φωσφολιπίδιο που βρίσκεται στην εσωτερική μεμβράνη του μιτοχονδρίου αλλά και στην εξωτερική, στα σημεία επαφής τους¹¹⁷. Αυτή η σύνδεση αποσταθεροποιεί την μιτοχονδριακή μεμβράνη (μέσω οξείδωσης λιπιδίων) και εμποδίζει συναγωνιστικά την αλληλεπίδραση της καρδιολιπίνης με το cyt C. Η σύνδεση της DXR με την καρδιολιπίνη εξηγεί σε κάποιο βαθμό την τοξικότητα που εμφανίζεται κυρίως στα μιτοχόνδρια. Η καρδιολιπίνη με την ιδιότητά της να αλληλεπιδρά με διάφορες πρωτεΐνες, είναι πολύ σημαντική για τη μιτοχονδριακή δομή και λειτουργία, τον καρδιακό ενεργειακό μεταβολισμό και την επιβίωση του κυττάρου. Η σύνδεση της DXR με την καρδιολιπίνη προκαλεί μεταβολές στο φωσφολιπιδικό περιβάλλον και στην λειτουργία σημαντικών μιτοχονδριακών πρωτεϊνών-ενζύμων που συμμετέχουν στην αναπνευστική αλυσίδα¹¹³. Η σύνδεση αυτή έχει ως αποτέλεσμα την παρεμβολή των ανθρακυκλινών (του κινονικού δακτυλίου) στην αναπνευστική αλυσίδα και έτσι τα e- από το NADPH και NADH μεταφέρονται απευθείας σε O₂, με συνέπεια την παραγωγή ROS¹¹⁶.

Κατά τη διάρκεια ανάπτυξης ενός οργανισμού ή σε περιπτώσεις σημαντικής κυτταρικής βλάβης σε επιμέρους κύτταρα παρατηρείται προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος ή απόπτωση. Τα μιτοχόνδρια δρουν ως κέντρα ελέγχου που ρυθμίζουν τη διεργασία αυτή. Ένας από τους πιο δυνατούς ενεργοποιητές είναι το cyt C. Το cyt C υπό φυσιολογικές συνθήκες απαντάται μεταξύ της εξωτερικής και

εσωτερικής μεμβράνης των μιτοχονδρίων, όπου και συμμετέχει στις αντιδράσεις οξειδωτικής φωσφορυλίωσης και την παραγωγή ATP. Η καρδιολιπίνη είναι υπεύθυνη για την σύνδεση και δέσμευση του cyt C. Η υπεροξείδωση της καρδιολιπίνης οδηγεί στην απελευθέρωση του cyt C στον χώρο ανάμεσα στην εσωτερική και εξωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη, μέσω ενός μηχανισμού που δεν έχει διερευνηθεί πλήρως. Πιθανότατα το ίδιο το σύμπλοκο CL-cyt C καταλύει την εξαρτώμενη από H_2O_2 υπεροξείδωση της καρδιολιπίνης ^{116,118}.



Σχήμα 24. Το cyt C συνδέεται με την καρδιολιπίνη στην εξωτερική επιφάνεια της εσωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης και έτσι δεν μπορεί να εξέλθει. Η αποσύνδεσή του είναι απαραίτητη για την διαπέραση της εξωτερικής μεμβράνης και προκαλείται από την υπεροξείδωση της καρδιολιπίνης ¹¹⁶.

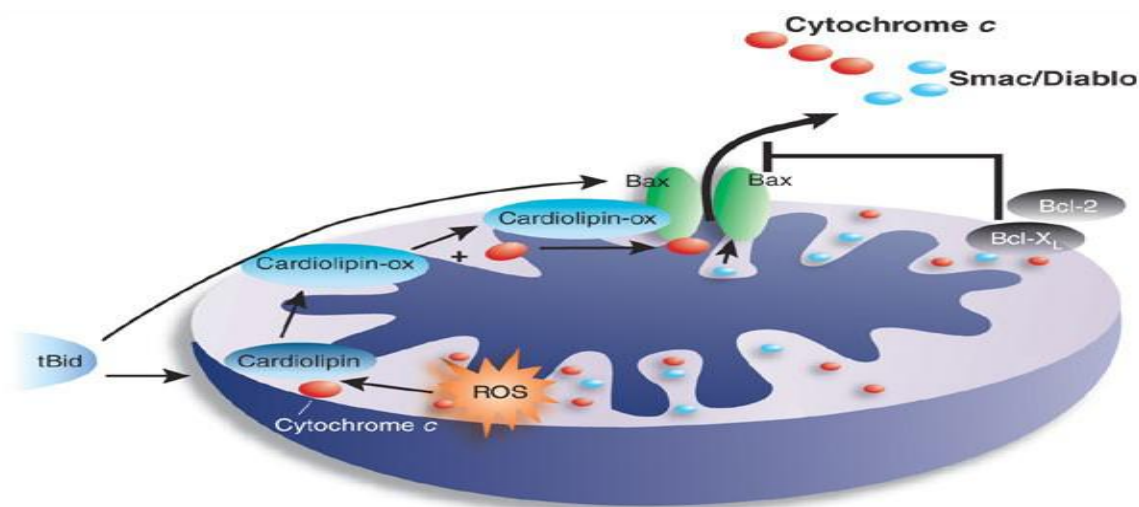


Σχήμα 25. (A) Η καρδιολιπίνη λειτουργεί σαν “πλατφόρμα σύνδεσης” για τα προ-αποπτωτικά μόρια Bcl-2 πρωτεΐνη tBid, ειδικά στα σημεία επαφής της εσωτερικής με την εξωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη. (B) Η καρδιολιπίνη υποβοηθά την διάτρηση της εξωτερικής μεμβράνης από tBid και Bax¹¹⁷.

Μετά την έκθεση των κυττάρων σε αποπτωτικά ερεθίσματα, απελευθερώνεται το cyt C από τα μιτοχόνδρια στο κυττόςολιο, όπου συνδέεται με τον παράγοντα APAF-1 (Apoptotic Protease Activating Factor-1). Το σχηματιζόμενο σύμπλοκο, που ονομάζεται αποπτωσώμιο, προσελκύει και συνδέεται με την προκασπάση-9. Η ώριμη μορφή της κασπάσης-9 απελευθερώνεται από το σύμπλοκο και ενεργοποιεί τις κασπάσες «τελεστές» όπως την κασπάση-3^{99,103}.

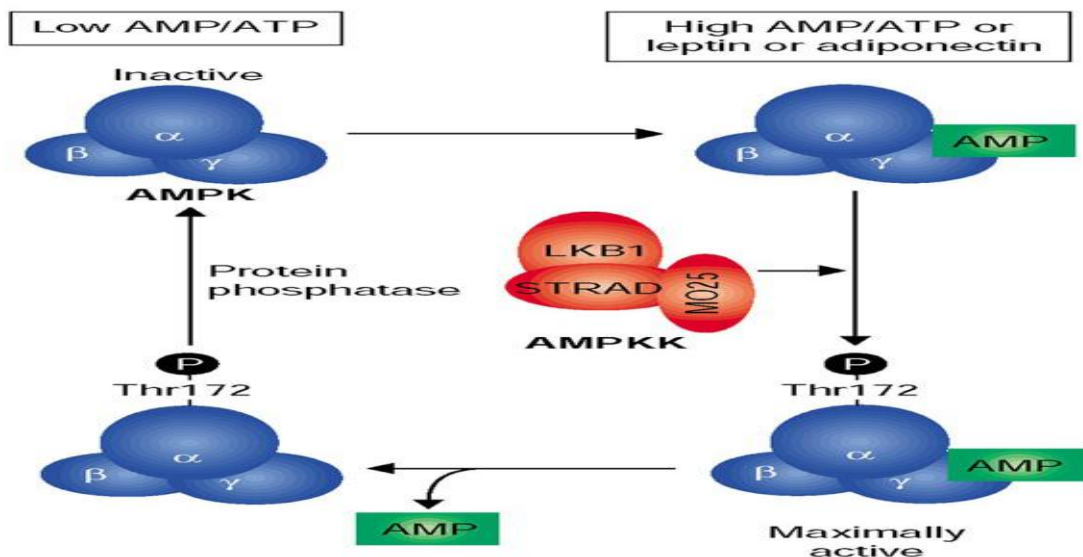
Η απελευθέρωση του cyt C γίνεται με διάφορους προτεινόμενους μηχανισμούς. Ο κυριότερος είναι μέσω μη ειδικών διαύλων στην εξωτερική μεμβράνη των μιτοχονδρίων, δημιουργουμένων από τα αποπτωτικά μέλη της οικογένειας του Bcl-2, όπως το Bax. Η DXR, μέσω των ROS που παράγει, οξειδώνει την καρδιολιπίνη που εν συνεχεία διανοίγει τους πόρους mtPTP για την απελευθέρωση του cyt C στο κυτταρόπλασμα. Οι mtPTP αυξάνουν τη διαπερατότητα της μιτοχονδριακής μεμβράνης, με πολλαπλές συνέπειες για το μιτοχόνδριο και το κύτταρο. Η “κινητήριος δύναμη” για τη σύνθεση του ATP είναι η βαθμίδωση συγκέντρωσης H⁺ μεταξύ των δύο πλευρών της εσωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης. Μέσω των πόρων H⁺ εξέρχονται του μιτοχονδρίου με αποτέλεσμα την μειωμένη σύνθεση ATP γεγονός που παίζει σημαντικό ρόλο στην επιβίωση του κυττάρου (ειδικά για το

μυοκάρδιο) και τη διατήρηση της λειτουργίας μεμβρανικών αντλιών. Μέσω των mPTP γίνεται και η απελευθέρωση Ca^{2+} από το μιτοχόνδριο στο κυτταρόπλασμα ¹¹⁶.



Σχήμα 26. Απεικόνιση της συμμετοχής της καρδιολιπίνης στη μιτοχονδριακή οδό θανάτου.

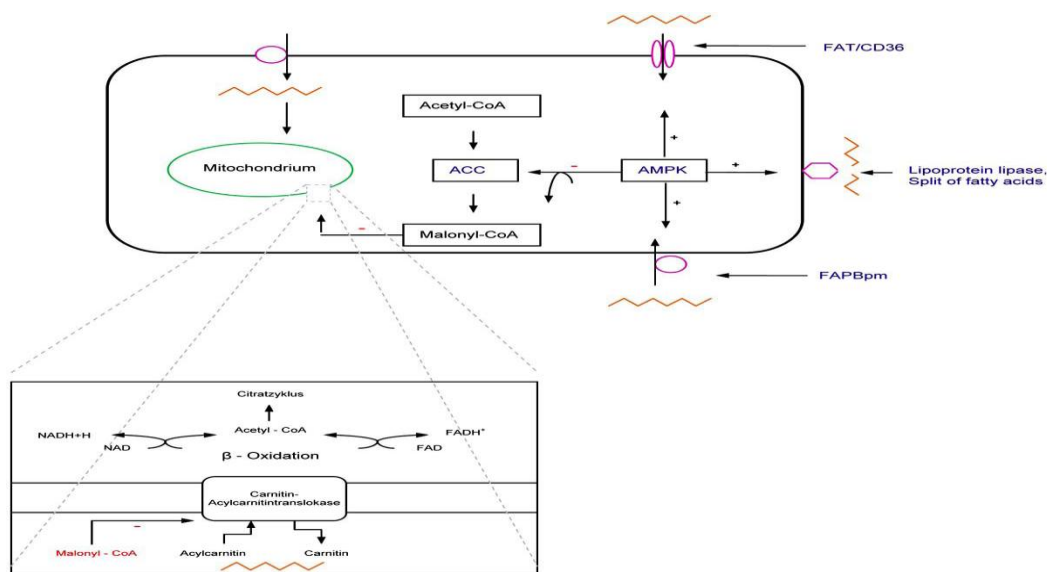
δ) παρεμβάλλεται στο μονοπάτι σηματοδότησης της AMPK παρεμποδίζοντας την ενεργοποίησή της ^{95,116,119} καθώς και τα συνολικά ποσά της ¹¹⁶. Η AMPK είναι ένας πολύ σημαντικός ρυθμιστικός μηχανισμός της καρδιάς. Είναι μία σερίνη-θρεονίνη κινάση που ρυθμίζει την κυτταρική λειτουργία και τον μεταβολισμό. Αποτελείται από τρεις υπομονάδες (α, β, γ). Στην α-υπομονάδα υπάρχει ο σημαντικός ρυθμιστής Thr¹⁷² που φωσφορυλιώνεται από upstream κινάσες. Η AMPK είναι ένας εξαιρετικά ευαίσθητος στόχος της DXR. Η AMPK ενεργοποιείται μέσω δύο μηχανισμών. Ο πρώτος είναι ATP-εξαρτώμενος. Περιλαμβάνει τη σύνδεση του AMP με τη γ-υπομονάδα της AMPK που οδηγεί στην αλλοστερική ενεργοποίησή της. Ο δεύτερος δεν εξαρτάται από ATP και αφορά ενεργοποίηση-φωσφορυλίωση της Thr¹⁷² ^{120,121}.



Σχήμα 27. Απεικόνιση της ενεργοποίησης της AMPK.

Κύριος στόχος της ενεργοποιημένης AMPK είναι η προώθηση της παραγωγής ATP έναντι της χρησιμοποίησής του ^{121,122}. Πιο συγκεκριμένα:

1) Προωθεί την οξείδωση των λιπαρών οξέων (εμποδίζει τη σύνθεση λιπαρών οξέων, χοληστερόλης μέσω αναστολής της HMG-CoA αναγωγής και τριγλυκεριδίων μέσω φωσφορυλίωσης της ακυλοτρανσφεράσης της 3-φωσφορικής γλυκερόλης), φωσφορυλιώνοντας-απενεργοποιώντας (Ser⁷⁹, Ser¹²⁰⁰ και Ser¹²¹⁵) τις δύο ισομορφές του ενζύμου ACC (ακετυλο-CoA καρβοξυλάση) και ενεργοποιώντας το MCD (αποκαρβοξυλάση του μαλονικού-CoA) ^{101,122-124}. Ακόμα, διεγείρει την ενδοκυττάρια πρόσληψη λιπαρών οξέων μέσω αύξησης έκφρασης του υποδοχέα FAT/CD36 (μεταφορέα των λιπαρών οξέων) και της μεμβρανικής πρωτεΐνης που προσδέεται με λιπαρά οξέα (FAPBpm) ¹²².



Σχήμα 28. Απεικόνιση της επίδρασης της AMPK στον μεταβολισμό λιπαρών οξέων¹²⁵.

2) Προωθεί την γλυκολυτική πορεία, αφενός διεγείροντας την πρόσληψη γλυκόζης μέσω των υποδοχέων GLUT1 και GLUT4 (μετακίνηση προς την μεμβράνη από ενδοκυττάριας θέσεις) και αφετέρου ενεργοποιώντας το ένζυμο PFK2 και αυτό στη συνέχεια το PFK1 που αποτελεί ένα πολύ σημαντικό ρυθμιστικό στάδιο της γλυκόλυσης^{101,120,124}. 3) Αναστέλλει την πρωτεϊνοσύνθεση μέσω ενεργοποίησης του eEF2K (eucaryotic elongation factor-2 kinase). Είναι πρωτεϊνική κινάση που συμμετέχει ενεργά στην ρύθμιση της πρωτεϊνικής σύνθεσης μέσω φωσφορυλίωσης-αναστολής της λειτουργίας του eEF2¹²⁰. Επιπρόσθετα, η AMPK, αναστέλλοντας το μονοπάτι σηματοδότησης του mTOR, προκαλεί μείωση της φωσφορυλίωσης στη Thr³⁸⁹ της p70RSK (p70 ribosomal protein S6 kinase), σημαντικής κινάσης που συμμετέχει στην πρωτεϊνοσύνθεση¹²³.

4) Φωσφορυλιώνει-ενεργοποιεί την eNOS στις θέσεις Thr⁴⁹⁵ και Ser^{1177/1179}^{102,120}. Η ενεργοποίηση στη Ser¹¹⁷⁷ λαμβάνει χώρα τόσο στα ενδοθηλιακά κύτταρα όσο και στα μυοκαρδιακά κύτταρα. Η AMPK παίζει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της αγγειακής λειτουργίας και δομής^{126,127}. Το NO φαίνεται ότι συνεισφέρει στην AMPK προκαλούμενη αύξηση της πρόσληψης γλυκόζης στην καρδιά μέσω GLUT και της μετακίνησης του GLUT4^{120,126}. Έρευνα που διεξήχθη ανίχνευσε κάποια σύνδεση ανάμεσα στην AMPK και στην Akt όσον αφορά την ενεργοποίηση της eNOS. Μάλιστα απέδειξαν ότι η AMPK είναι upstream της Akt και ότι ασκεί επί αυτής

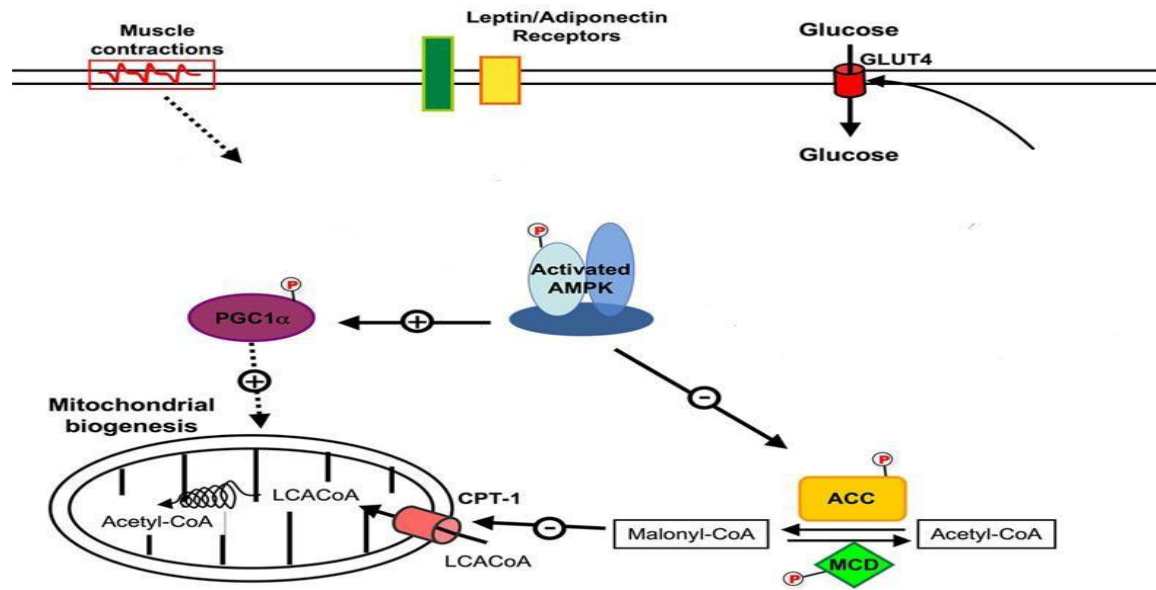
θετική ρύθμιση, με επακόλουθη την φωσφορυλίωση της eNOS στα ενδοθηλιακά κύτταρα. Το ακριβές μονοπάτι ήταν AMPK-Rac1-Akt-eNOS¹²⁸.

5) Προωθεί την μιτοχονδριακή βιογένεση μέσω διέγερσης του PGC-1α¹²².

6) Παρεμποδίζει τη γλυκογονογένεση. Αυτό συμβαίνει με απευθείας φωσφορυλίωση-απενεργοποίηση της συνθετάσης του γλυκογόνου στη Ser⁷, κάτι που οδηγεί σε περαιτέρω απενεργοποίηση μέσω φωσφορυλίωσης και στη Ser¹⁰¹²².

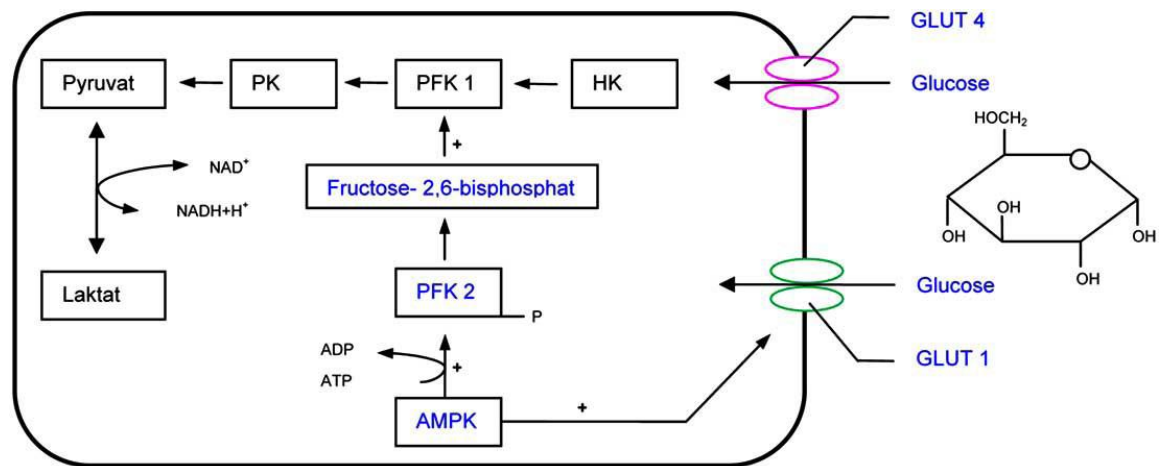
Η DXR μειώνει την έκφραση της AMPK πρωτεΐνης και την ενεργοποίησή της. Η καρδιά διαθέτει διάφορες μεταβολικές πορείες με στόχο την παραγωγή ATP. Τα λιπαρά οξέα αποτελούν την πιο σημαντική πηγή ενέργειας υπό αερόβιες συνθήκες. Κατά την εξέλιξη της μυοκαρδιοπάθειας και κυρίως στα πρώτα στάδια, υπάρχει μειωμένη οξείδωση λιπιδίων με μια μικρή αύξηση της χρησιμοποίησης της γλυκόζης ως αντιστάθμισμα. Η καρδιοτοξικότητα που προκαλείται από δοξορουβικίνη σχετίζεται με μειωμένη χρησιμοποίηση και των δύο παραπάνω υποστρωμάτων. Οι Wakasugi et al¹²⁹ απέδειξαν ότι σε ποντίκια που ελάμβαναν DXR, η οξείδωση λιπαρών οξέων και η γλυκόλυση περιορίζονται σημαντικά, με την πρώτη να επηρεάζεται λιγότερο.

α) Ο πιθανότερος μηχανισμός περιορισμού της οξείδωσης των λιπαρών οξέων είναι η αναστολή της φωσφορυλίωσης-απενεργοποίησης της ACC (άκυλο-CoA καρβοξυλάση) από την AMPK. Το ένζυμο ACC καταλύει την μετατροπή του acetyl-CoA σε malonyl-CoA, που αποτελεί υπόστρωμα για τη βιοσύνθεση των λιπαρών οξέων. Με τη δράση αυτή περιορίζεται η οξείδωση των λιπαρών οξέων έναντι της βιοσύνθεσής τους. Επιπρόσθετα, το malonyl-CoA δρα αναστέλλοντας την CPT-1 (carnitine palmitoyl transferase 1) που καταλύει τη μετατροπή της L-καρνιτίνης σε άκυλο-καρνιτίνη με ταυτόχρονη μετατροπή του ακέτυλο-CoA σε CoA. Αυτό το στάδιο είναι καθοριστικό για τη σύνδεση των λιπαρών οξέων με το CoA, την “ενεργοποίηση” και στη συνέχεια την οξείδωσή τους. Ακόμα, έχει δειχθεί ότι η DXR σχετίζεται και με μείωση των επιπέδων της L-καρνιτίνης^{120,124,125}.



Σχήμα 29. Αναπαράσταση της δράσης της AMPK στη μείωση της οξείδωσης των λιπαρών οξέων μέσω της ACC.

β) Η αδυναμία της καρδιάς να διατηρήσει τα επίπεδα κυτταρικής παραγωγής ενέργειας μέσω αυξημένης γλυκόλυσης, φαίνεται να οφείλεται στις επιπτώσεις της DXR στον καταβολισμό της γλυκόζης ή/και στην ικανότητα πρόσληψής της από το κύτταρο, μέσω αναστολής της AMPK. Στα μυοκαρδιακά κύτταρα, χορήγηση DXR οδήγησε σε μια παροδική αύξηση της πρόσληψης γλυκόζης η οποία ακολουθήθηκε από μια πολύ σημαντική μείωσή της. Αυτή η εφήμερη αύξηση της πρόσληψης γλυκόζης οφείλεται στους GLUT1 μεταφορείς γλυκόζης, ενώ οι GLUT4 παρέμειναν ανεπηρέαστοι. Ένας άλλος προτεινόμενος μηχανισμός αφορά την φωσφοφρουκτοκινάση (PFK), έναν πολύ σημαντικό ρυθμιστή της γλυκόλυσης. Όπως έχει αποδείχθει για τα μυοκαρδιακά κύτταρα, έκθεση σε DXR ταχέως μειώνει τα επίπεδα του mRNA της PFK καθώς παρεμποδίζει την ενεργοποίησή της από την AMPK¹²⁵.



Σχήμα 30. Ακριβείς δράσεις της AMPK στη γλυκόλυση. HK:hexokinase, PFK 1:phosphofructokinase-1, PFK 2:phospho-fructokinase-2, PK:pyruvatekinase, GLUT:glucose transporter ¹²⁵.

7.4.8 Αμεσές επιδράσεις στο μυοκάρδιο

Η DXR προκαλεί ταχεία και επιλεκτική μείωση της έκφρασης γονιδίων που σχετίζονται με τον καρδιακό μυ, δηλαδή την καρδιακή τροπονίνη I και T, α-ακτίνη και ελαφριά αλυσίδα της μυοσίνης, με αποτέλεσμα απώλεια μυϊκών ινών ^{90,112}. Αυτό γίνεται, με ρύθμιση στο επίπεδο της μεταγραφής και της μετάφρασης και με αυξημένη αποικοδόμηση των πρωτεϊνών. Είναι πιθανόν οι ανθρακυκλίνες να συνδέονται σε αλλοστερικές θέσεις του 20S πρωτεοσώματος, ενεργοποιώντας το και οδηγώντας έτσι στη συσσώρευση αποικοδομημένων πρωτεϊνών και στην απόπτωση ¹¹⁴. Η μύλυση είναι το συνδυαστικό αποτέλεσμα πολλών παραγόντων, συμπεριλαμβανομένου της αναστολής της πρωτεϊνικής σύνθεσης, μειωμένης έκφρασης και εκτεταμένης αποικοδόμησης πρωτεϊνών των μυών και ανεπαρκούς συναρμολόγησης σαρκομεριδίων. Η αποικοδόμηση της titin συνεισφέρει σε αυτό ^{130,131}. Η titin είναι πρωτεΐνη με σημαντικό ρόλο στη συγκρότηση σαρκομεριδίων από τα μυϊκά ινίδια και στη συσταλτική δραστηριότητα του μυοκαρδίου ¹¹².

Θα πρέπει να τονιστεί επίσης ότι η DXR μειώνει την έκφραση του GATA4, τόσο σε επίπεδο πρωτεΐνης όσο και σε επίπεδο mRNA, εμποδίζοντας τη σύνδεσή του με το DNA ^{112,132}. Το GATA4 εκφράζεται στα καρδιακά κύτταρα και είναι μεταγραφικός παράγοντας με σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση γονιδίων που σχετίζονται με την

απόπτωση. Καταπολεμά την απόπτωση με ρύθμιση της έκφρασης των γονιδίων των αντι-αποπτωτικών πρωτεϊνών Bcl-2 και Bcl-xL.

7.5 Φαρμακολογική αντιμετώπιση καρδιοτοξικότητας ανθρακυκλινών

Η θεραπεία της καρδιακής ανεπάρκειας από τις ανθρακυκλίνες δεν διαφέρει από αυτή των άλλων μορφών μυοκαρδιοπάθειας. Οι θεραπευτικοί χειρισμοί είναι λίγοι και με φτωχά αποτελέσματα ^{22,77}. Μια σκέψη των ερευνητών ήταν η συγχορήγηση των ανθρακυκλινών με παράγοντες που εξουδετερώνουν τις σχηματιζόμενες ελεύθερες ρίζες, άρα και την κύρια αιτία της καρδιοτοξικότητας, χωρίς όμως να επηρεάζουν την αντινεοπλασματική τους ιδιότητα ⁷⁷. Παρόλ' αυτά, η χορήγηση πολλών αντιοξειδωτικών παραγόντων σε κλινικές και πειραματικές μελέτες δεν έδωσαν τα αναμενόμενα θεραπευτικά αποτελέσματα όπως φαίνεται και από τον Πίνακα 4 ⁷⁷.

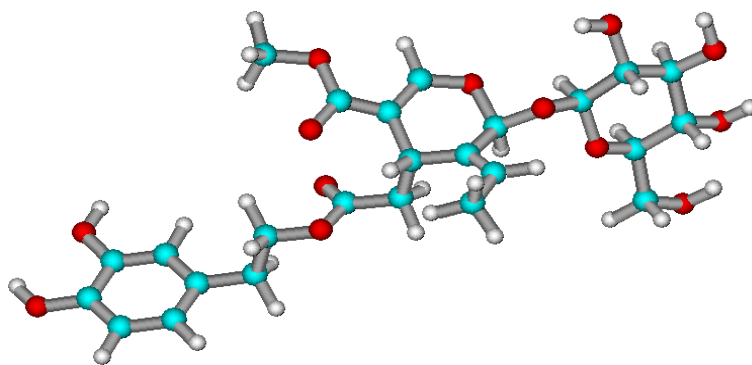
Agent	Class or action	Mechanism of action	Study subject
Dexrazoxane	Chelating agent	Prevents free radical formation; binds to iron; inhibits DNA topoisomerase	Humans
N-acetylcysteine	Mucolytic agent	Promotes endogenous antioxidant synthesis	Humans
Vitamin E	Nutrient	Antioxidant	Humans
Coenzyme Q10	Dietary supplement	Antioxidant	Humans
Carnitine	Dietary supplement	Antioxidant; transfer of long chain fatty acids into mitochondria	Humans
Probucol	Lipid-lowering drug	Promotes endogenous antioxidant synthesis	Animal model
Amifostine	Cytoprotective agent	Scavenges free radicals	Animal model
Carvedilol	β-Adrenergic antagonist	Prevents free radical formation; prevents depletion of endogenous antioxidants	Animal model
Vitamins A and C; carotenoids	Nutrient	Antioxidant	Animal model
Selenium	Trace element	Antioxidant; anticarcinogenic action	Animal model
Glutathione	Tripeptide thiol	Antioxidant	Animal model

Πίνακας 4: Μελέτες συγχορήγησης ανθρακυκλινών και αντιοξειδωτικών παραγόντων με σκοπό την μείωση της καρδιοτοξικότητάς τους ⁷⁷.

8. Ολευρωπαΐνη

Επιδημιολογικές μελέτες έχουν δείξει ότι οι καρδιαγγειακές νόσοι στην περιοχή της Μεσογείου είναι σημαντικά χαμηλότερης συχνότητας από την υπόλοιπη Ευρώπη ¹³². Το εύρημα αυτό έχει συσχετισθεί με την παραδοσιακή μεσογειακή διατροφή και την υψηλή κατανάλωση ελιών και ελαιόλαδου. Λεπτομερέστερα, στο τέλος της δεκαετίας του 1950 σχεδιάστηκε η μελέτη των «επτά χωρών» για να ερευνηθεί τις σχέσεις μεταξύ διατροφής και καρδιαγγειακής νόσου. Δεκαέξι ομάδες πληθυσμού επιλέχτηκαν σε Φιλανδία, Ελλάδα, Ιταλία, Ιαπωνία, Ολλανδία, Ηνωμένες Πολιτείες και Γιουγκοσλαβία. Τα δεδομένα της βασικής καταγραφής παρακολουθήθηκαν μετά από 5 και 10 έτη με επαναλαμβανόμενες καταγραφές ¹³³. Οι ομάδες διέφεραν στη μέση διατροφή. Ο μέσος όρος των θανάτων συσχετίζεται θετικά με το μέσο όρο της παρεχόμενης ενέργειας από τη διατροφή από τα κορεσμένα λιπαρά οξέα, αρνητικά με το μέσο όρο παρεχόμενης ενέργειας από τα μονοακόρεστα λιπαρά οξέα, και δεν συσχετιζόταν με την παρεχόμενη διατροφική ενέργεια από τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα, τις πρωτεΐνες, υδατάνθρακες και αλκοόλ. Η ολική θνητότητα ήταν αρνητικά συσχετιζόμενη με την αναλογία των μονοακόρεστων προς τα κορεσμένα λιπαρά οξέων. Το ελαϊκό οξύ ήταν το υπεύθυνο διατροφικό συστατικό για σχεδόν όλες τις σημαντικές διαφορές στα μονοακόρεστα λιπαρά οξέα ανάμεσα στις διάφορες περιοχές της μελέτης. Η θνησιμότητα από κάθε αιτία καθώς και η θνησιμότητα από στεφανιαία νόσο ήταν χαμηλότερη στις περιοχές όπου το ελαιόλαδο ήταν το κύριο λιπαρό διατροφικό συστατικό ¹³².

Ο κυριότερος δευτερογενής μεταβολίτης του ελαιόδένδρου (*Olea europaea*) είναι το σεκοιριδοειδές πολυφαινολικό μόριο ολευρωπαΐνη (Σχήμα 31) ¹³⁴ και η πλειονότητα των πολυφαινολών που υπάρχουν στο ελαιόλαδο και στον ελαιόκαρπο είναι προϊόντα της υδρόλυσής της όπως η υδροξυτυροσόλη.



Σχήμα 31. Τρισδιάστατη δομή της ολευρωπαΐνης (OLEU) .

Η πρώτη επίσημη αναφορά για τη χρήση των φύλλων της ελιάς στην ιατρική χρονολογείται από το 1854, όταν ο Hanbury ανέφερε στην επιθεώρηση *Pharmaceutical Journal* μια απλή συνταγή για τη χρήση του υδατικού εκχυλίσματος των φύλλων της ελιάς ως αντιπυρετικό. Από τις αρχές του 20^{ου} αιώνα υπάρχουν αναφορές στη βιβλιογραφία για την σύσταση και τη δράση των φύλλων της ελιάς. Ειδικότερα αναφέρονται η αντιοξειδωτική ¹³⁵, η αντιμικροβιακή ¹³⁶, η αντιυπερτασική ¹³⁶, η αγγειοδιασταλτική ¹³⁷ και η υπογλυκαιμική ¹³⁸ δράση για το εκχύλισμα των φύλλων ή για μεμονωμένα συστατικά του όπως η ολευρωπαΐνη.

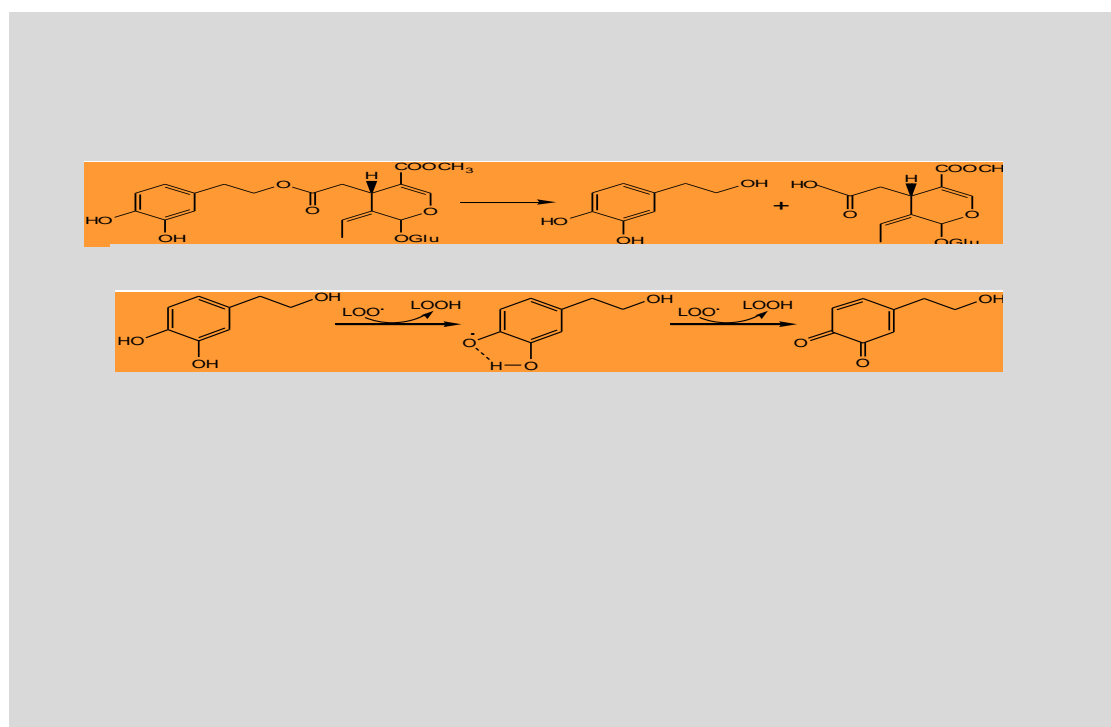
Το εκχύλισμα των φύλλων της ελιάς και η ίδια η ολευρωπαΐνη, έχει βρεθεί ότι έχουν ισχυρή μικροβιοκτόνο δράση *in vitro* ¹³⁶. Ειδικότερα το εκχύλισμα έχει βρεθεί ότι είναι αποτελεσματικό *in vitro* έναντι μεγάλου αριθμού μικροοργανισμών, όπως *Staphylococcus aureus* (σε χαμηλές συγκεντρώσεις μειώνει τον ρυθμό ανάπτυξης, σε υψηλότερες συγκεντρώσεις αναστέλλει την ανάπτυξη, ενώ αναστέλλει την παραγωγή εντεροτοξίνης Β, ανεξαρτήτως συγκέντρωσης), *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Haemophilus influenza*, *Salmonella* spp., *Bacillus cereus* (αναστέλλει την εκβλάστηση των σπόρων) κ.α., καθώς και αντιμυκητιακές ιδιότητες. Ωστόσο, δεν έχει επαρκώς αποδειχθεί η δραστηριότητα *in vivo*. Η αντιβακτηριακή δράση της ολευρωπαΐνης πιθανώς να οφείλεται στην ιδιότητα των φαινολικών ουσιών να παρεμποδίζουν το σχηματισμό κυτταρικού τοιχώματος με επακόλουθη διαρροή συστατικών του κυττάρου.

Μελέτες με πειραματόζωα έδειξαν ότι η ολευρωπαΐνη αυξάνει τη στεφανιαία ροή αίματος, ενώ παρατηρήθηκαν σημαντική αντιυπερτασική, αντιαρρυθμική καθώς και σπασμολυτική δράση σε κάποια είδη πειραματοζώων ¹³⁹.

Τα φύλλα της ελιάς, με τη μορφή εκχυλίσματος, έχουν χρησιμοποιηθεί στην παραδοσιακή ιατρική ως αντινεοπλασματικά. Η δράση αυτή των φύλλων παρουσιάζει εξαιρετικό ενδιαφέρον και αποτελεί τελευταία αντικείμενο περαιτέρω έρευνας ¹³⁵.

Κλινικά δεδομένα για τη χρήση των φύλλων της ελιάς στην θεραπεία της υπέρτασης, υπάρχουν ήδη από τη δεκαετία του 1950 ¹³⁶. Η ολευρωπαΐνη ως φυσικό αντιοξειδωτικό διατηρεί την ιδιότητά της αυτή in vivo παρέχοντας προστασία στον οργανισμό από πολλούς βλαβερούς παράγοντες ¹⁴⁰. Έτσι εμποδίζει την οξείδωση των χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεϊνών (LDL) εμπλουτίζοντας τα ήδη υπάρχοντα αποθέματά τους σε αντιοξειδωτικές ουσίες. Η οξείδωση των LDL έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή κυτταροτοξικών ουσιών, όπως τα λιπούπεροξειδία και θεωρείται ότι συμβάλλει στην εμφάνιση αθηροσκλήρωσης ¹⁴⁰. Η ολευρωπαΐνη δεσμεύει ελεύθερες ρίζες (Σχήμα 32), όπως ρίζα ανιόντος υπεροξειδίου ¹⁴⁰ και εμφανίζει αντι-εικοσανοειδική δράση αναστέλλοντας την παραγωγή 5-λιποξυγονάσης

141



Σχήμα 32. Μηχανισμός αντιοξειδωτικής δράσης της ολευρωπαΐνης.

Μειώνει κατά αυτό τον τρόπο τον κίνδυνο καρδιαγγειακών παθήσεων, όπως η στεφανιαία νόσος, και μερικών μορφών καρκίνου. Το χαμηλό ποσοστό καρδιαγγειακών παθήσεων σε μεσογειακές χώρες, όπου γίνεται μεγάλη κατανάλωση ελαιόλαδου επιβεβαιώνει το σημαντικό ρόλο των φαινολικών συστατικών του στην ανθρώπινη διατροφή ¹⁴⁰.

Επώαση LDL χοληστερόλης με ολερωπαΐνη και ή υδροξυτυροσώλη, βρέθηκε ότι μειώνει την απώλεια βιταμίνης E μετά από προσθήκη CuSO₄ και αναστέλλει το σχηματισμό προϊόντων λιπιδικής υπεροξειδωσής όπως ισοπροστάνια, λιποϋπεροξειδία και μηλονική διαλδεϋδη. Άλλες δράσεις των πολυφαινολών του φύλλου της ελιάς, περιλαμβάνουν την αναστολή της συγκόλλησης των αιμοπεταλίων, ελαττωμένη παραγωγή εικοσανοϊκού οξέος από ενεργοποιημένα λευκοκύτταρα και αυξημένη παραγωγή μονοξειδίου του αζώτου (NO) από μακροφάγα ποντικού μετά από επίδραση ενδοτοξίνης. Οι πρώτες δράσεις, πιθανόν να επιδρούν στο σχηματισμό θρόμβων και στη φλεγμονή ενώ η τελευταία πιθανόν να παίζει ρόλο στην προστασία κατά των παρασίτων ¹⁴⁰.

Η καρδιά είναι το πλέον ευαίσθητο όργανο σε πρόωρη γήρανση και οξειδωτικό στρες. Βασική και κλινική έρευνα έχει αποδείξει το συσχετισμό της βλάβης των ελευθέρων ριζών με την πρόοδο της καρδιαγγειακής νόσου. Το οξειδωτικό στρες μπορεί να είναι αποτέλεσμα ισχαιμίας του μυοκαρδίου, οξείας βλάβης από ισχαιμία-επαναιμάτωση ενδοθηλιακής βλάβης, και οξείας ή χρόνιας οξειδωτικής βλάβης, όπως για παράδειγμα στην οξεία καρδιοτοξικότητα που προκαλείται από τη χορήγηση ανθρακυκλινών ¹⁴².

Πρόσφατη μελέτη έχει δείξει ότι η συνεχής χορήγηση ολερωπαΐνης για 3 ή 6 εβδομάδες μειώνει σημαντικά την έκταση του εμφράγματος του μυοκαρδίου σε φυσιολογικούς κόνικλους που υποβλήθηκαν σε 30 λεπτά παρατεταμένης ισχαιμίας ακολουθούμενη από 3 ώρες επαναιμάτωσης, ενώ η υψηλότερη δόση μειώνει την έκταση του εμφράγματος σε υπερχοληστερολαιμικούς κόνικλους ¹⁴³. Η ολερωπαΐνη φαίνεται να προστατεύει το μυοκάρδιο από την οξειδωτική βλάβη της επαναιμάτωσης *in vivo*, και να μειώνει την ολική χοληστερόλη και τα τριγλυκερίδια στην κυκλοφορία ¹⁴³. Η μείωση της έκτασης του εμφράγματος από την ολερωπαΐνη μπορεί να είναι αποτέλεσμα πολλών μηχανισμών, όπως η εξάλειψη της βλάβης της επαναιμάτωσης (λόγω του μειωμένου οξειδωτικού στρες), ή βελτίωση της

ενδοθηλιακής λειτουργίας, είτε απευθείας είτε λόγω της υπολιπιδαιμίας, ή λόγω πιθανής ενεργοποίησης ενδοκυττάρων μεσολαβητών οι οποίοι καθιστούν την καρδιά περισσότερο ανθεκτική σε ισχαιμική προσβολή¹⁴³.

9. Μεταβονομική ανάλυση

9.1 Εισαγωγή στην μεταβονομική

Την τελευταία δεκαετία έχει σημειωθεί επανάσταση στην μελέτη των βιολογικών συστημάτων με την εξέλιξη των τεχνικών που αναφέρονται με τον γενικό όρο “omics technologies” και συγκεκριμένα: genomics, (γενομική), proteomics, (πρωτεομική), metabonomics (μεταβονομική).

Ο όρος μεταβονομική (metabonomics) χρησιμοποιείται για να αποδώσει την ταυτόχρονη ανάλυση πληθώρας μεταβολιτών σε βιολογικά υγρά και ιστούς με την χρήση κυρίως της Φασματομετρίας Μαζών (MS) ή την φασματοσκοπία του πυρηνικού μαγνητικού NMR και την ερμηνεία τους με πολυπαραμετρική στατιστική. Η μεταβονομική θεωρήθηκε ως μια καλή προσέγγιση για την κατανόηση πολλών βιολογικών επακόλουθων της χορήγησης διαφόρων ουσιών in vivo, ελαχιστοποιώντας τις απαιτήσεις και τον χρόνο που χρειάζονταν για απαντήσεις. Ο πρωταρχικός όρος της μεταβονομικής καθιερώθηκε από τον Nicholson ως «ο ποσοτικός προσδιορισμός της δυναμικής, πολυπαραμετρικής, μεταβολικής απόκρισης των ζωντανών συστημάτων σε παθοφυσιολογικά (θρεπτικά, ξενοβιοτικά, χειρουργικά ή τοξικά) ερεθίσματα ή γενετικές αλλοιώσεις»¹⁴⁴. Η μεταβονομική θεωρείται ως μια ολιστική προσέγγιση ενός βιολογικού συστήματος καθώς μπορεί να απεικονίσει το αποτέλεσμα όλων των βιοχημικών διεργασιών που συμβαίνουν περιγράφοντας το μεταβολικό φαινότυπο ή μεταβολότυπο δηλαδή το χημικό αποτύπωμα του οργανισμού. Η μεταβονομική προσέγγιση χρησιμοποιείται σε μελέτες διάγνωσης ασθενειών, σε κλινικές μελέτες για την παρακολούθηση φαρμακευτικής αγωγής και σε μελέτες τοξικότητας¹⁴⁵. Ως δείγματα για ανάλυση χρησιμοποιούνται βιολογικά υγρά (με τα ούρα και το πλάσμα του αίματος να είναι μεταξύ άλλων τα πλέον

συνήθη), ιστοί ή εκχυλίσματα ιστών (ήπατος, μυοκαρδίου κ.α.), και *in vitro* κυτταρικά συστήματα¹⁴⁶⁻¹⁴⁹.

Η ανάλυση της βιοχημικής σύστασης των βιολογικών υγρών αποτελεί την βάση για την εξαγωγή συμπερασμάτων για τις αλλαγές του μεταβολισμού και τις παθολογικές διεργασίες στον οργανισμό. Το βασικό πλεονέκτημα της είναι ότι σε πολύ σύντομο χρονικό διάστημα καταγράφεται η πληροφορία για την χημική σύσταση ενός βιολογικού δείγματος. Στα φάσματα MS ή ¹H-NMR απεικονίζεται η σχετική περιεκτικότητα εκατοντάδων μεταβολιτών που υπάρχουν στο δείγμα και μπορεί να αποτελέσει την συνολική εικόνα του μεταβολισμού του οργανισμού από τον οποίο προήλθε.

Για να καταστεί δυνατή η εξαγωγή της πληροφορίας που περιέχεται στα φάσματα πολύπλοκων μειγμάτων όπως είναι αυτά των βιολογικών υλικών πραγματοποιείται επεξεργασία των φασματοσκοπικών δεδομένων με κατάλληλες χημειομετρικές τεχνικές πολυπαραμετρικής στατιστικής ανάλυσης. Με τις τεχνικές αυτές μειώνεται ο αριθμός των διαστάσεων του πολυδιάστατου χώρου που αποτελεί το σύνολο των σύνθετων δεδομένων (π.χ., τιμές έντασης των φασματικών γραμμών) και είναι δυνατή η προβολή σε ένα διδιάστατο ή τρισδιάστατο χώρο. Με τον τρόπο αυτό επιτυγχάνεται μια απλή και εύχρηστη απεικόνιση οποιασδήποτε ομαδοποίησης ή διαφοράς των δειγμάτων με βάση το μεταβολικό προφίλ όπως αυτό αποτυπώνεται με τα φασματοσκοπικά χαρακτηριστικά. Η πλέον γνωστή πολυπαραμετρική τεχνική που έχει χρησιμοποιηθεί εκτενώς στη Μεταβολομική είναι η ανάλυση κύριων Συνιστωσών (Principal Component Analysis, PCA).

9.2 Εφαρμογές της μεταβολομικής στον ιστό μυοκαρδίου

Η εφαρμογή του NMR σε βιολογικά υγρά και ιστούς παρουσιάζει μεγάλη ανάπτυξη τα τελευταία χρόνια λόγω της άντλησης πληροφοριών για το μεταβολικό προφίλ το οποίο συνδέεται με παθολογικές καταστάσεις και με την τοξικότητα φαρμάκων.

Η φασματοσκοπία NMR αποτελεί μια δυναμική τεχνική που ερευνά ανωμαλίες που προκύπτουν στην εξέλιξη της καρδιακής ανεπάρκειας. Ο ενεργειακός μεταβολισμός της καρδιάς μπορεί να προσδιοριστεί χρησιμοποιώντας απομονωμένα μιτοχόνδρια ή ακόμη και ιστό καρδιάς.

Η τεχνική του ³¹P NMR είναι αναγνωρισμένη τις δύο τελευταίες δεκαετίες για την αποτίμηση του ενεργειακού μεταβολισμού του μυοκαρδίου τόσο *in vitro* όσο και

in vivo ¹⁵⁰, όπου επιτυγχάνεται ο προσδιορισμός του αδενοσινοτριφωσφορικού οξέος (ATP), του αδενοσινοδιφωσφορικού οξέος (ADP), της φωσφοκρεατίνης (PCr), και των ανόργανων φωσφορικών (Pi) στην καρδιά πειραματόζωων in situ και in vitro ¹⁵¹. Επίσης, είναι δυνατός ο προσδιορισμός του ενδοκυττάριου pH από την σύγκριση των χημικών μετατοπίσεων των ανόργανων φωσφορικών και της φωσφοκρεατίνης.

Ακόμα, με τη βοήθεια της φασματοσκοπίας ¹³C NMR έχουν συσχετιστεί οι αλλαγές του ενεργειακού μεταβολισμού στο μυοκάρδιο επιμύων με πειραματικά μοντέλα της υπερτροφίας της καρδιάς και της καρδιακής ανεπάρκειας ¹⁵⁰. Επιπλέον, η τεχνική ¹³C NMR χρησιμοποιείται προς μελέτη του κύκλου των τρικαρβοξυλικών οξέων και του in situ ενδοκυτταρικού μεταβολισμού της γλυκόζης ^{152,153}. Συγκεκριμένα έχουν γίνει μελέτες όπου γίνεται εμβολιασμός με υποστρώματα επισημασμένα με ¹³C σε απομονωμένες καρδιές επιμύων όπου είναι δυνατό να πραγματοποιηθεί ποσοτικοποίηση των ενδιάμεσων μεταβολιτών της καρδιάς.

Η τεχνική ¹H NMR έχει εφαρμοστεί στην μελέτη της συσσώρευσης ή της λιπόλυσης των τριγλυκεριδίων σε φυσιολογικό ή παθολογικό μυοκάρδιο επιμύων in vitro και in situ (perfused). Σε απομονωμένες καρδιές, έχει παρατηρηθεί ότι η υπερτριγλυκεριδεμία του μυοκαρδίου που προκαλείται από την χορήγηση ελαίου έχει σαν αποτέλεσμα την αύξηση του κυτταρικού όγκου, με συνέπεια την αύξηση των κορυφών της περιοχής ¹H NMR των λιπαρών οξέων ¹⁵⁴.

Έχει πραγματοποιηθεί μελέτη της διαφοροποίησης του μεταβολικού προφίλ τόσο σε καρδιακό ιστό όσο και σε μιτοχόνδρια καρδιάς σε επίμυες. Πιο συγκεκριμένα ελέγχονται οι ανωμαλίες του μεταβολισμού στο κύτταρο και στον ιστό. Στα μιτοχόνδρια παρατηρήθηκαν οι κορυφές του γαλακτικού οξέος της αλλανίνης, ταυρίνης, χολίνης, φωσφοχολίνης, κρεατίνης, γλυκίνης και λιπιδίων, ενώ στο εκχύλισμα μιτοχονδρίων παρατηρήθηκαν επιπλέον οι κορυφές της βαλίνης, μεθειονίνης, γλουταμίνης, ακετοξικού οξέος, ηλεκτρικού οξέος και ασπαρτικού οξέος. Επίσης μελετήθηκαν στο δεύτερο και τρίτο στάδιο της αναπνοής και παρατηρήθηκε ότι στο τρίτο στάδιο μειώθηκε η ένταση της κορυφής του ενδογενούς ηλεκτρικού οξέος ¹⁵⁵.

Έχει μελετηθεί το ανώμαλο λιπιδικό προφίλ σε δύστροφο μυοκάρδιο επιμύων με συνδυασμό φασματοσκοπίας ¹H NMR και με τη μέθοδο αναγνώρισης προτύπων. Παρατηρήθηκε αύξηση της ομάδας -CH₂ των λιπιδίων όπως επίσης του γαλακτικού οξέος και της θρεονίνης, ενώ παράλληλα σημειώθηκε μείωση της ομάδας -CH=CHCH₂CO των λιπιδίων ¹⁵⁶.

Η μεταβιομική προσέγγιση έχει επίσης εφαρμοστεί στην μελέτη καταστάσεων ισχαιμίας-επαναιμάτωσης του μυοκαρδίου σε κόνικλους σε διαφορά πειραματικά μοντέλα. Συγκεκριμένα έχουν μελετηθεί οι διαφορές στον μεταβολισμό που προκύπτουν από την ισχαιμική προετοιμασία (preconditioning). Βρέθηκε ότι, μεταβολές στο λόγο γαλακτικού/γλυκόζης και γαλακτικού+αλανίνης/οξικού οξέος υποδεικνύουν ότι κατά την ισχαιμία-επαναιμάτωση υφίσταται μείωση της αερόβιας γλυκόλυσης και ταυτόχρονη αύξηση του μεταβολισμού των λιπιδίων. Με την ισχαιμική προετοιμασία (preconditioning) οι μεταβολίτες αυτοί επανέρχονται στα αρχικά επίπεδα πριν την ισχαιμία και συσχετίζονται με την μείωση του εμφράγματος που η ισχαιμική προετοιμασία επιφέρει ¹⁵⁷.

Επίσης η μεταβιομική ανάλυση εκχυλισμάτων μυοκαρδίου επίμυων στους οποίους συγχωρηγήθηκε ολεωρωπαΐνη και αδριαμυκίνη έδειξε ότι αποκαθίσταται ο ενεργειακός μεταβολισμός ο οποίος διαταράσσεται κατά την οξεία καρδιοτοξικότητα που επάγεται από την αδριαμυκίνη ¹⁴². Η χορήγηση της ολεωρωπαΐνης μείωσε στατιστικά σημαντικά τα επίπεδα του ηλεκτρικού οξέος και των οξικών σε σχέση με την ομάδα της αδριαμυκίνης. Οι δύο αυτοί μεταβολίτες αποτελούν νέους βιοδείκτες και σχετίζονται με την διατάραξη του ενεργειακού μεταβολισμού που προκαλείται από την αδριαμυκίνη.

Επιπλέον, μεταβιομική μελέτη σε ορό αίματος κόνικλων στους οποίους χορηγήθηκε ολεωρωπαΐνη σε πειραματικό πρωτόκολλο ισχαιμίας επαναιμάτωσης έδειξε ότι επηρεάζει το μεταβολικό προφίλ, αποκαθιστώντας τους μηχανισμούς της αερόβιας γλυκόλυσης ¹⁴³. Ο μεταβολισμός του καρδιακού μυ πρέπει να παρέχει μεγάλα ποσά ενέργειας ώστε να είναι διαθέσιμα για την μηχανική λειτουργία της καρδιάς.

Έχουν πραγματοποιηθεί ποσοτικές μελέτες για το καρδιαγγειακό σύστημα, που με την βοήθεια της μεταβιομικής εξετάζουν τις αλλαγές των μεταβολιτών μικρού μοριακού βάρους. Το μεταβολικό προφίλ δίνει πληροφορίες για ένα μεγάλο αριθμό μεταβολιτών που συνδέονται με παθοφυσιολογικούς μηχανισμούς ¹⁵⁸. Πιο συγκεκριμένα έχει μελετηθεί η απώλεια της πρωτεϊνικής κινάσης C (PKC) σε επίμυες η οποία παίζει σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη των καρδιακών κυττάρων και παρατηρήθηκε ότι επηρεάζει και τον αερόβιο μεταβολισμό της γλυκόζης στα μυοκύτταρα μειώνοντας σημαντικά την αναλογία των τελικών προϊόντων της γλυκόλυσης (αλανίνη και γαλακτικό οξύ) προς το τελικό προϊόν του λιπιδικού μεταβολισμού (οξικό οξύ) ¹⁵⁹.

Τέλος, ευρεία εφαρμογή στην ιατρική έχει η *in vivo* φασματοσκοπία NMR (Magnetic Resonance Spectroscopy, MRS) όπου λαμβάνονται εικόνες υψηλής ευκρίνειας και ποιότητας χωρίς την επικυδυνότητα των ακτίνων X. Με την βοήθεια της τεχνικής ³¹P MRS ανιχνεύονται οι βιοχημικές ανωμαλίες με ποσοτικοποίηση των χαμηλών επιπέδων της ATP και φωσφοκρεατίνης, ή των υψηλών επιπέδων ADP και ανόργανου φωσφόρου που πιστεύεται ότι συνδέεται με το αίσθημα αδυναμίας και κούρασης στην καρδιακή ανεπάρκεια ¹⁶⁰.

B. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Η αδριαμυκίνη (DXR) αποτελεί έναν συχνά χρησιμοποιούμενο αντινεοπλασματικό παράγοντα, αλλά η χρήση της περιορίζεται από την εμφάνιση δόσοεξαρτώμενης καρδιομυοπάθειας και καρδιακής ανεπάρκειας. Η επαγόμενη από την αδριαμυκίνη καρδιοτοξικότητα συνδέεται με κακή πρόγνωση για τους ασθενείς, και η επιβίωση τους φαίνεται να είναι χειρότερη από εκείνη των ασθενών με ισχαιμική μυοκαρδιοπάθεια. Παρά τα 40 χρόνια έρευνας, η διαλεύκανση των μηχανισμών καρδιοτοξικότητας της αδριαμυκίνης αποτελεί πρόκληση ενώ μέχρι σήμερα δεν υπάρχει κάποια αποτελεσματική θεραπεία.

Ο σκοπός της παρούσας εργασίας είναι: 1) Η εκτενής μελέτη των πιθανών μηχανισμών εκδήλωσης καρδιακής ανεπάρκειας επαγόμενη από τη χορήγηση αδριαμυκίνης σε πειραματικό μοντέλο επίμυα υπό ελεγχόμενες συνθήκες πέρα του ήδη μελετημένου μηχανισμού καρδιοτοξικότητας, μέσω σχηματισμού ελεύθερων ριζών οξυγόνου (ROS), και η πιθανή σύνδεση των αξιολογούμενων μηχανισμών με τελικό στόχο την ανάπτυξη ενός ολιστικού μηχανισμού πρόκλησης καρδιακής ανεπάρκειας μετά από θεραπεία με αδριαμυκίνη.

Για την επίτευξη του σκοπού αυτού θα αξιολογήσουμε το στάδιο της καρδιακής ανεπάρκειας στο παρόν πειραματικό μοντέλο και στη συνέχεια θα μελετήσουμε τα πολλαπλά επίπεδα επίδρασης της αδριαμυκίνης με ιδιαίτερη έμφαση i) στους αποπτωτικούς μηχανισμούς του μυοκυττάρου μέσω ανίχνευσης αντιαποπτωτικών κινασών διάσωσης (Akt), ii) στην ομοιόσταση του NO και στον ρόλο της ενδοθηλιακής συνθέσεως του NO/ eNOS, η ενεργοποίηση και συμβολή της οποίας δεν έχει μελετηθεί σε προγενέστερες μελέτες και iii) διευρύνοντας τον μηχανισμό χρόνιας καρδιοτοξικότητας της αδριαμυκίνης θα μελετήσουμε τον ενεργειακό μεταβολισμό του μυοκαρδίου γνωρίζοντας τις σημαντικές αλλαγές που επέρχονται στις διαδικασίες παραγωγής ενέργειας σε καταστάσεις ισχαιμίας όπως συμβαίνει στην καρδιακή ανεπάρκεια. Οι αλλαγές στο μεταβολικό προφίλ των μυοκυττάρων θα διαλευκανθούν τόσο με την ανίχνευση κινασών αναφοράς της τροποποίησης του ενεργειακού μεταβολισμού (AMPK), όσο και με την εφαρμογή της μεταβονομικής που θα μας δώσει πολύτιμες πληροφορίες για τις οδούς που χρησιμοποιεί το μυοκύτταρο για να διατηρήσει τα υψηλά επίπεδα ενέργειας που χρειάζεται. Τέλος θα

προσπαθήσουμε να συνδέσουμε τα αυξημένα επίπεδα κυτοκινών και ενδοθηλίνης-1 που παρατηρούνται στην καρδιακή ανεπάρκεια με την διαταραχή της ομοιόστασης του μονοξειδίου του αζώτου (NO) και πιο συγκεκριμένα με την επαγωγίμη συνθετάση του NO (iNOS) η οποία σχετίζεται άμεσα με βλάβες στο καρδιαγγειακό σύστημα. Η ερευνά μας θα επεκταθεί και στην πιθανή αλληλεπίδραση των μονοπατιών μεταγωγής σήματος σχετιζόμενων με την απόπτωση (Akt), με τις οδούς τροποποίησης της ομοιόστασης του NO (eNOS) και των κινασών αναφοράς της τροποποίησης του ενεργειακού μεταβολισμού (AMPK).

2) Σημείο διαμάχης στην επιστημονική κοινότητα αποτελεί το γεγονός ότι υπάρχουν πλέον αρκετές μελέτες που αμφισβητούν την υπόθεση ότι οι σχηματιζόμενες ελεύθερες ρίζες αποτελούν τον πρωταρχικό και κυριότερο μηχανισμό πρόκλησης καρδιοτοξικότητας από την αδριαμυκίνη, γεγονός που επιβεβαιώνεται και από την χαμηλή αποτελεσματικότητα των χορηγούμενων αντιοξειδωτικών ουσιών. Κρίθηκε λοιπόν σκόπιμη και η περαιτέρω *in vivo* αξιολόγηση της πιθανής κάρδιοπροστατευτικής δράσης της ολευρωπαΐνης καθώς επίσης και της πιθανής επίδρασής της στον πολυπαραμετρικό μηχανισμό χρόνιας καρδιοτοξικότητας που επάγει η αδριαμυκίνη. Η ολευρωπαΐνη επιλέχτηκε με κριτήριο προγενέστερη μελέτη, της ερευνητικής μας ομάδας, στην οποία αποδεικνύεται η καρδιοπροστατευτική της δράση στην επαγόμενη από την αδριαμυκίνη οξεία καρδιοτοξικότητα.

2. ΥΛΙΚΑ & ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Πρωτόκολλο μελέτης

Για την μελέτη χρησιμοποιήθηκαν 90 αρσενικοί επίμυες τύπου Wistar οι οποίοι τυχαιοποιήθηκαν σε 6 ομάδες:

- 1) Ομάδα ελέγχου (**Control**),
- 2) Ομάδα **OLEU-1** στην οποία χορηγήθηκε συνολικά 1000 mg/kg ολευρωπαΐνης ενδοπεριτοναικά (i.p.) για 14 συνεχόμενες ημέρες,
- 3) Ομάδα **OLEU-2** στην οποία χορηγήθηκε συνολικά 2000 mg/kg ολευρωπαΐνης ενδοπεριτοναικά (i.p.) για 14 συνεχόμενες ημέρες,

- 4) Ομάδα **DXR** στην οποία χορηγήθηκαν i.p. 18 mg/kg DXR σε έξι ισόποσες δόσεις μέσα σε διάστημα δύο εβδομάδων,
- 5) Ομάδα **DXR-OLEU-1** στην οποία χορηγήθηκε συνολικά 1000 mg/kg ολευρωπαΐνης και 18 mg/kg DXR i.p. μέσα σε διάστημα δύο εβδομάδων,
- 6) Ομάδα **DXR-OLEU-2** στην οποία χορηγήθηκε συνολικά 2000 mg/kg ολευρωπαΐνης και 18 mg/kg DXR i.p. μέσα σε διάστημα δύο εβδομάδων.

Μετά το τέλος του πρωτοκόλλου εγχύσεων οι επίμυες αναισθητοποιήθηκαν και πραγματοποιήθηκε ηχοκαρδιογραφική εξέταση (Vivid-i, GE Healthcare με 12MHz probe). Στη συνέχεια οι επίμυες θυσιάστηκαν και ο καρδιακός ιστός ταχύτατα αφαιρέθηκε, εκπλύθηκε αμέσως με φυσιολογικό ορό και διατηρήθηκε σε καταψύκτη στους -70°C . Ένα μέρος από τα δείγματα καρδιακού ιστού χρησιμοποιήθηκαν για ιστολογική και ανοσοχημική αξιολόγηση, ενώ το υπόλοιπο χρησιμοποιήθηκε για την εκτίμηση της μηλονικής διαλδεύδης (MDA) και των πρωτεϊνικών καρβονυλίων (PCs) ως δείκτες οξειδωτικού στρες, της νιτροτυροσίνη (NT) ως δείκτη «nitrosative» στρες, της ιντερλευκίνης-6 (IL-6) and Big ενδοθηλίνης-1 (Big ET-1) που αποτελούν σημαντικούς δείκτες της καρδιακής αναδιαμόρφωσης, της iNOS και eNOS με την μέθοδο Western-Blot ως δείκτες φλεγμονής, της AMPK και Akt με την μέθοδο Western-Blot ως δείκτες του ενεργειακού μεταβολισμού και απόπτωσης αντίστοιχα, ενώ τέλος πραγματοποιήθηκε και ο προσδιορισμός των βιοδεικτών και μεταβολιτών μέσω φασματοσκοπία NMR η οποία αποτελεί αξιόπιστη μέθοδο για την μελέτη αλλαγών του μεταβολικού προφίλ του μυοκαρδίου.

2.2 Εργαστηριακές αναλύσεις

2.2.1 Ηχοκαρδιογραφική εξέταση

Τα πειραματόζωα μελετήθηκαν με 2D (δισδιάστατη) υπερηχοκαρδιογραφία για την οποία χρησιμοποιήθηκε ένας υπερηχοκαρδιογράφος GE VIVIDi με ηχομετατροπέα στα 11.5 MHz και όσο το δυνατόν υψηλότερο frame rate.

Οι επίμυες αναισθητοποιούνταν με κεταμίνη (100 mg/kg ενδοπεριτοναϊκά) και διατηρούνταν σε θερμαινόμενη πλάκα για τη λήψη των υπερηχοκαρδιογραφικών εικόνων.

Μελετήσαμε 2D-εικόνες της αριστερής κοιλίας κατά το βραχύ άξονα στο ύψος των θηλοειδών μυών στις οποίες εφαρμόσαμε M-mode για την πραγματοποίηση μετρήσεων οι οποίες βασίζονται στο μέσο όρο τουλάχιστον 3 καρδιακών κύκλων.

Κατά την διάρκεια της εξέτασης μετρήθηκε:

- 1) το πάχος προσθίου και οπισθίου τοιχώματος στη διαστολή,
- 2) η τελοδιαστολική και τελοσυστολική διάμετρος της αριστερής κοιλίας,
- 3) η μάζα της αριστερής κοιλίας,
- 4) και ο δείκτης κλασματικής βράχυνσης fractional shortening (FS) για την εκτίμηση της συστολικής λειτουργίας της αριστερής κοιλίας.

2.2.2 Ιστολογική αξιολόγηση

Τεμάχια πέντε (5) μm καρδιακού ιστού τα οποία είχαν μονιμοποιηθεί σε ουδέτερο ρυθμιστικό διάλυμα 4% φορμαλδεΰδη για 6 με 12 ώρες και είχαν εγκλεισθή σε παραφίνη αξιολογήθηκαν με τη χρώση αιματοξυλίνης-ηωσίνης. Η χρώση αυτή πρόκειται για συνδυασμό δύο χρωστικών, μιας βασικής της αιματοξυλίνης και μιας όξινης της ηωσίνης που έχει σαν αποτέλεσμα άλλα στοιχεία του ιστού να χρωματίζονται λόγω βασηοφιλίας με αιματοξυλίνη (πυρήνες, γλυκοζαμινογλυκάνες) μπλέ ή μωβ και άλλα λόγω οξυφιλίας με ηωσίνη (κυτταροπλασματικά συστατικά) ρόδινα.

2.2.3 Ομογενοποίηση καρδιακών ιστών

Για την εκτίμηση της μηλονικής διαλδεΰδης (MDA), των πρωτεϊνικών καρβονυλίων (PCs), της νιτροτυροσίνης (NT), της ιντερλευκίνης-6 (IL-6) and Big ενδοθηλίνης-1 (Big ET-1) τα δείγματα των καρδιακών ιστών αρχικά ομογενοποιήθηκαν ακολουθώντας τα παρακάτω βήματα:

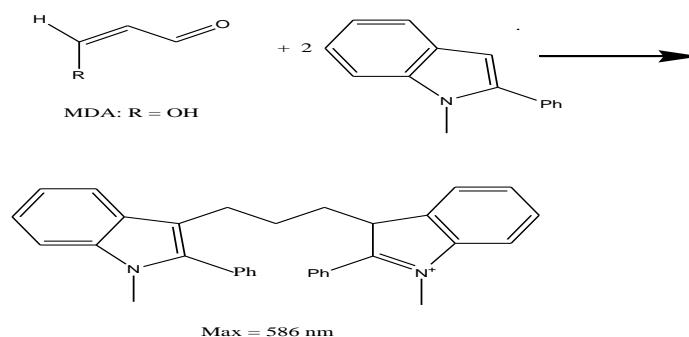
1. Ζυγίζουμε 120 με 180 mg καρδιακού ιστού πάνω σε κομμάτια διηθητικού χαρτιού και καταγράφουμε τα mg κάθε δείγματος.
2. Ξεπλένουμε τον καρδιακό ιστό με NaCl 0,9%.

3. Κόβουμε τον καρδιακό ιστό σε μικρά κομμάτια.
4. Εισάγουμε τον τεμαχισμένο ιστό στον ειδικό δοκιμαστικό σωλήνα και προσθέτουμε 1 ml ρυθμιστικού διαλύματος 20mM $(\text{HOCH}_2)_3\text{CNH}_2$ Tris το οποίο εξουδετερώθηκε με HCl έως την τιμή pH=7,4 σε αναλογία 1:10 w:v. για κάθε 100 mg ιστού.
5. Στη συνέχεια γίνεται ομογενοποίηση στον ομογενοποιητή.
6. Το ομογενοποιημένο δείγμα εισάγεται σε γυάλινο δοκιμαστικό σωλήνα και τοποθετείτε σε πάγο.
7. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στην φυγόκεντρο (εκδιαμέτρου αντίθετα τα ισοβαρή) και φυγοκεντρώνεται για 10 min στις 3.000 rpm και σε θερμοκρασία 4 °C.
8. Μετά το τέλος της φυγοκέντρησης το υπερκείμενο υγρό τοποθετείται σε επισημασμένα (όνομα και κωδικός) eppendorfs τα οποία εισάγονται στους -70 °C.

2.2.4 Μέτρηση μηλονικής διαλδεΐδης

2.2.4.1. Αρχή της μεθόδου

Τα επίπεδα της MDA προσδιορίστηκαν φασματοφωτομετρικά στα 586 nm και εκφράστηκαν σε micromolar (μM) (Oxford Biomedical Research Colorimetric Assay for lipid peroxidation) με κάποιες τροποποιήσεις. Στο Σχήμα 1 φαίνεται η αντίδραση της MDA με το N-μεθυλ-2-φαινυλ-ινδόλιο.



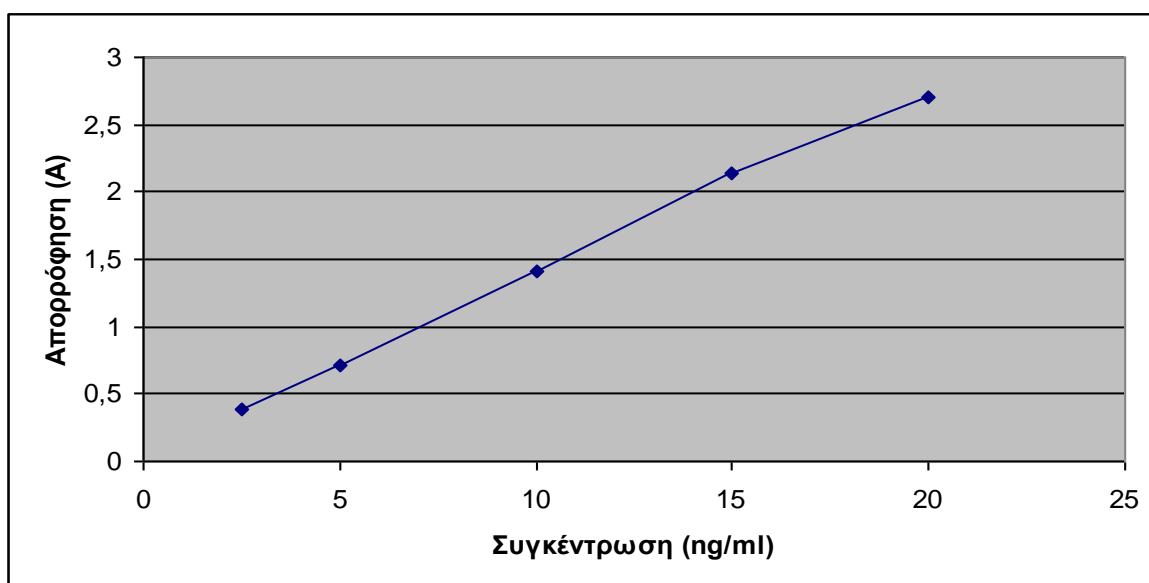
Σχήμα 1. Αντίδραση MDA με N-μεθυλ-2-φαινυλ-ινδόλιο.

2.2.4.2. Εκτέλεση προσδιορισμού

Η μέθοδος που ακολουθήθηκε είχε ως εξής: 0,65 ml διαλύματος 10,3 mM N-μεθυλ-2-φαινυλ-ινδολίου σε ακετονιτρίλιο προστέθηκαν σε 0,2 ml ομογενοποιημένου διαλύματος καρδιακού ιστού. Ακολούθησε προσθήκη διαλύματος 0,15 ml HCl 37%, οι δοκιμαστικοί σωλήνες πωματίσθηκαν και ανακινήθηκαν σε vortex για 3-4 δευτερόλεπτα και τοποθετήθηκαν για επώαση σε υδατόλουτρο στους 45 °C για 1 ώρα. Ακολούθησε ψύξη σε πάγο και φυγοκέντρηση των δειγμάτων για 15 λεπτά στις 3500 στροφές/λεπτό και στους 4 °C. Το υπερκείμενο υγρό φασματοφωτομετρήθηκε στα 586 nm. Η καμπύλη αναφοράς με διαλύματα γνωστής συγκέντρωσης MDA (από 2 έως 20 nmol/ml) χρησιμοποιήθηκε για την ποσοτικοποίηση.

Από την καμπύλη αναφοράς (Σχήμα 2) προέκυψε η εξίσωση:

$$Y = 0,0169(\pm 0,0325) + 0,1377(\pm 0,0026)X \text{ και } R^2 = 0,9988$$

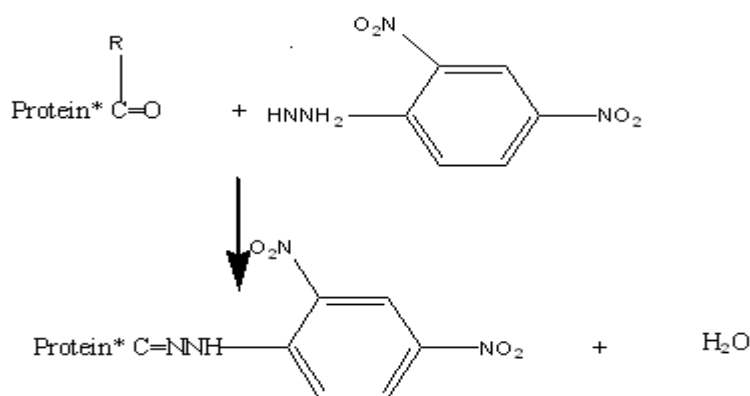


Σχήμα 2. Καμπύλη αναφοράς προτύπου διαλύματος MDA.

2.2.5 Μέτρηση πρωτεϊνικών καρβονυλίων

2.2.5.1. Αρχή της μεθόδου

Χρησιμοποιήθηκε η τεχνική του Levine και της ομάδας του τροποποιημένη¹⁶¹. Αρχή της μεθόδου είναι η αντίδραση της 2,4-δινιτροφαινυλδραζίνης (DNPH) με τα πρωτεϊνικά καρβονύλια, ο σχηματισμός μιας βάσης του Schiff και η παραγωγή υδραζόνης, η οποία αναλύεται φασματοφωτομετρικά στα 360 nm (Σχήμα 3).



Σχήμα 3. Αντίδραση DNPH με πρωτεϊνικά καρβονύλια.

2.2.5.2. Εκτέλεση προσδιορισμού

1. Σε δύο σωλήνες erpendorf μεταφέρθηκαν από 100 μl ομογενοποιημένου διαλύματος καρδιακού ιστού. Ο ένας σωλήνας περιείχε το δείγμα προς μελέτη και ο άλλος το control.
2. Στο άγνωστο προστέθηκαν 500 μl DNPH, ενώ στο control 500 μl διαλύματος υδροχλωρικού οξέος 2 N. Οι σωλήνες ανακινήθηκαν σε vortex για 3-4 δευτερόλεπτα.
3. Ακολούθησε επώαση στο σκοτάδι σε θερμοκρασία δωματίου για μία ώρα. Στη διάρκεια της μίας ώρας οι σωλήνες ανακινούνταν σε vortex για 3-4 δευτερόλεπτα κάθε 15 λεπτά.

4. Μετά το πέρας του χρόνου επώασης προστέθηκαν σε όλα τα δείγματα 600 μl διαλύματος τριχλωροξικού οξέως 20% και ακολούθησε ανακίνηση σε vortex για 3-4 δευτερόλεπτα. Τα δείγματα στη συνέχεια τοποθετήθηκαν στον πάγο για 5 λεπτά.
5. Έπειτα φυγοκεντρήθηκαν για 10 λεπτά στις 12200 rpm και στους 4 °C.
6. Μετά την αφαίρεση του υπερκείμενου, έγινε έκπλυση του pellet με 1 ml μείγματος αιθανόλης/οξικού αιθυλεστέρα (1:1, v/v), αποκόλληση του pellet από το τοίχωμα του σωλήνα με σπάτουλα και ανακίνηση σε vortex για 3-4 δευτερόλεπτα.
7. Ακολούθησε φυγοκέντρηση για 10 λεπτά στις 12200 rpm και στους 4 °C.
8. Τα βήματα 6,7 επαναλήφθηκαν 2 φορές.
9. Το υπερκείμενο αφαιρέθηκε και το pellet στέγνωσε στον αέρα για μιάμιση ώρα περίπου.
10. Έπειτα προστέθηκε 1 ml υδατικού διαλύματος γουανιδίνης 6 M, ακολούθησε ανακίνηση σε vortex για 3-4 δευτερόλεπτα, επώαση σε υδατόλουτρο για 30 λεπτά στους 45 °C και ψύξη όλο το βράδυ.
11. Το υπερκείμενο υγρό φασματοφωτομετρήθηκε στα 360 nm έναντι control HCl.
12. Τα αποτελέσματα εκφράστηκαν ως nmol protein carbonyl / mg protein, χρησιμοποιώντας το συντελεστή μοριακής απόσβεσης 22,000 M⁻¹ cm⁻¹.

2.2.5.3. Προσδιορισμός του πρωτεϊνικού περιεχομένου των pellets

Κατά τη διαδικασία έκπλυσης των pellets υπάρχει απώλεια πρωτεϊνών, γι' αυτό τα επίπεδα των πρωτεϊνών προσδιορίστηκαν στα pellets μετά τις εκπλύσεις ως εξής:

1. 5 μl ομογενοποιημένου διαλύματος καρδιακού ιστού αραιώθηκαν σε σωλήνα erpendorf με 45 μl νερού δις απεσταγμένου.
2. 10 μl από το προηγούμενο διάλυμα αραιώθηκαν με 90 μl νερού δις απεσταγμένου.
3. Στο νέο διάλυμα προστέθηκε 1 ml διαλύματος (1:5 αραιωμένο με νερό δις απεσταγμένο) του Biorad Bradford Assay.
4. Το υπερκείμενο φασματοφωτομετρήθηκε στα 595 nm. Ως τυφλό χρησιμοποιήθηκε δις απεσταγμένο ύδωρ.

2.2.6 Μέτρηση νιτροτυροσίνης

Τα επίπεδα της νιτροτυροσίνης μετρήθηκαν με τη μέθοδο του ενζυμικού ανοσοπροσδιορισμού ELISA (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay), σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή (OxisResearch, Portland, U.S.A).

2.2.6.1. Αρχή της μεθόδου

Το kit είχε διάταξη «σάντουιτς». Πάνω στα τοιχώματα των μικροβοθρίων της πλακέτας βρίσκονταν προσροφημένα μονοκλωνικά αντισώματα έναντι της προσδιοριζόμενης ουσίας. Λυοφιλοποιημένα διαλύματα γνωστών συγκεντρώσεων (standards) του αναλύτη παρέχονται μαζί με το kit. Ο αναλύτης ο οποίος περιεχόταν είτε στα διαλύματα γνωστής συγκέντρωσης είτε στα προς ανάλυση δείγματα συνδέθηκε με τα προσροφημένα αντισώματα και στη συνέχεια ένα πολυκλωνικό αντίσωμα συνδεδεμένο με βιοτίνη συνδέθηκε με τον παγιδευμένο αναλύτη. Κατόπιν, η streptavidin peroxidase συνδέθηκε με το συνδεδεμένο με βιοτίνη αντίσωμα. Μετά από προσθήκη του υποστρώματος τετραμεθυλοβενζιδίνη (TMB), το οποίο αντέδρασε με το ένζυμο, σχηματίστηκε κίτρινο προϊόν κατ' αναλογία της ποσότητας του αναλύτη στο δείγμα. Ο τερματισμός της αντίδρασης έγινε με προσθήκη οξέος και μετρήθηκαν οι οπτικές απορροφήσεις στα 450 nm. Με κάθε σετ δειγμάτων που αναλύθηκαν κατασκευάστηκε και μια καμπύλη αναφοράς.

2.2.6.2. Εκτέλεση προσδιορισμού

1. Πριν τον προσδιορισμό όλα τα αντιδραστήρια φέρονταν σε θερμοκρασία δωματίου.
2. Τα ομογενοποιημένα διαλύματα καρδιακού ιστού αραιώθηκαν 10x με working dilution buffer. Δηλαδή 10 μl ομογενοποιημένου διαλύματος αραιώθηκαν με 90 μl working dilution buffer. Το working dilution buffer προέκυψε από το dilution buffer που περιείχε το kit, έπειτα από αραιώση 1:10 με απιονισμένο νερό.
3. Η προετοιμασία των πρότυπων διαλυμάτων έγινε ως εξής: Στο πρότυπο διάλυμα νιτροτυροσίνης που περιείχε το kit προστέθηκαν 2,2 ml

απιονισμένου νερού και με αυτόν τον τρόπο προέκυψε διάλυμα 4,5 Μ. Σε 7 αριθμημένους σωλήνες erpendorf προστέθηκαν από 300 μl working dilution buffer. Σε έναν επιπλέον (όγδοο) σωλήνα προστέθηκαν 500 μl working dilution buffer. 150 μl πρότυπου διαλύματος νιτροτυροσίνης 4,5 Μ προστέθηκαν στον πρώτο σωλήνα και έγινε καλή ανακίνηση σε vortex. 150 μl από το περιεχόμενο του πρώτου σωλήνα μεταφέρθηκαν στο δεύτερο σωλήνα. Ακολούθησε διαδοχικά μεταφορά 150 μl από κάθε σωλήνα στον επόμενο. Στον όγδοο σωλήνα δεν προστέθηκε τίποτα και αυτός αποτέλεσε το τυφλό.

4. Τα πρότυπα διαλύματα και το τυφλό τοποθετήθηκαν στην πλάκα εις διπλούν. Οι σωλήνες erpendorf οι οποίοι περιείχαν τα δείγματα ανακινούνταν σε vortex για 3-4 δευτερόλεπτα για καλύτερη ομογενοποίηση. Στα μικροβοθρία της πλακέτας προστέθηκαν 100 μl πρότυπου διαλύματος, δείγματος ή control.
5. Η πλακέτα καλύφθηκε και αφέθηκε για επώαση 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου.
6. Μετά το πέρας του χρόνου επώασης πραγματοποιήθηκαν 4 εκλύσεις των μικροβοθρίων της πλακέτας με working dilution buffer σε ειδική πλυστική συσκευή. Ακολούθως, η πλακέτα αφέθηκε για διάστημα όχι μεγαλύτερο των 5 λεπτών να στραγγίξει από τυχόν απομένουσα υγρασία πάνω σε διηθητικό χαρτί. Η παρασκευή του working dilution buffer έγινε ως εξής: Το kit περιείχε dilution buffer (Tween-20) το οποίο αραιώθηκε με απεσταγμένο νερό 40 φορές (40x). Η ανακίνηση του διαλύματος που προέκυψε έγινε με προσοχή, προς αποφυγή αφρισμού. Ακολούθησε μεταφορά του διαλύματος στον ειδικό περιέκτη της πλυστικής συσκευής.
7. Μετά την πλύση προστέθηκαν στα μικροβοθρία 100 μl αντισώματος νιτροτυροσίνης.
8. Η πλακέτα καλύφθηκε και αφέθηκε για επώαση 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου.
9. Ακολούθησε νέος κύκλος 4 εκλύσεων των μικροβοθρίων της πλακέτας και απομάκρυνση της απομένουσας υγρασίας, όπως προηγουμένως.
10. Έπειτα έγινε προσθήκη 100 μl του ενζύμου streptavidin peroxidase.
11. Η πλακέτα καλύφθηκε και αφέθηκε για επώαση 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου.

12. Ακολούθησε νέος κύκλος 4 εκλύσεων των μικροβοθρίων της πλακέτας και απομάκρυνση της απομένουσας υγρασίας, όπως προηγουμένως.
13. Με ρυθμιζόμενη πολυκάναλη πιπέτα προστέθηκαν 100 μl TMB υποστρώματος.
14. Η πλακέτα καλύφθηκε και αφέθηκε για επώαση 30 λεπτά στο σκοτάδι.
15. Μετά το πέρας του χρόνου επώασης προστέθηκαν 100 μl διαλύματος τερματισμού της αντίδρασης κιτρικού οξέος 2 M. Η προσθήκη έγινε αρκετά γρήγορα ώστε να εξασφαλιστεί η σχεδόν ταυτόχρονη αδρανοποίηση του ενζύμου σε όλα τα μικροβοθρία και να τερματιστεί η παραγωγή του έγχρωμου προϊόντος της αντίδρασης.
16. Η απορρόφηση μετρήθηκε αμέσως στα 450 nm σε ειδικό φασματοφωτόμετρο. Το ειδικό λογισμικό της συσκευής χρησιμοποίησε δεδομένα από τα πρότυπα διαλύματα και τα τυφλά διαλύματα για να κατασκευάσει μια καμπύλη αναφοράς με βάση την οποία υπολογίστηκαν οι συγκεντρώσεις της νιτροτυροσίνης σε mmol/L.

2.2.7 Μέτρηση ιντερλευκίνης-6

Τα επίπεδα της ιντερλευκίνης-6 μετρήθηκαν με τη μέθοδο του ενζυμικού ανοσοπροσδιορισμού ELISA (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay), σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή (DIACLON, FRANCE).

2.2.7.1. Αρχή της μεθόδου

Το kit είχε διάταξη «σάντουιτς». Πάνω στα τοιχώματα των μικροβοθρίων της πλακέτας βρίσκονταν προσροφημένα μονοκλωνικά αντισώματα έναντι της προσδιοριζόμενης ουσίας. Λυοφιλοποιημένα διαλύματα γνωστών συγκεντρώσεων (standards) του αναλύτη παρέχονται μαζί με το kit. Ο αναλύτης ο οποίος περιεχόταν είτε στα διαλύματα γνωστής συγκέντρωσης είτε στα προς ανάλυση δείγματα συνδέθηκε με τα προσροφημένα αντισώματα και στη συνέχεια ένα πολυκλωνικό αντίσωμα συνδεδεμένο με βιοτίνη συνδέθηκε με τον παγιδευμένο αναλύτη. Κατόπιν, η streptavidin peroxidase συνδέθηκε με το συνδεδεμένο με βιοτίνη αντίσωμα. Μετά από προσθήκη του υποστρώματος τετραμεθυλοβενζιδίνη (TMB), το οποίο αντέδρασε με το ένζυμο, σχηματίστηκε κίτρινο προϊόν κατ' αναλογία της ποσότητας

του αναλύτη στο δείγμα. Ο τερματισμός της αντίδρασης έγινε με προσθήκη οξέος και μετρήθηκαν οι οπτικές απορροφήσεις στα 450 nm. Με κάθε σετ δειγμάτων που αναλύθηκαν κατασκευάστηκε και μια καμπύλη αναφοράς.

2.2.7.2. Εκτέλεση προσδιορισμού

1. Πριν τον προσδιορισμό όλα τα αντιδραστήρια φέρονταν σε θερμοκρασία δωματίου.
2. Τα ομογενοποιημένα διαλύματα καρδιακού ιστού αραιώθηκαν 10x με working dilution buffer. Δηλαδή 10 μl ομογενοποιημένου διαλύματος αραιώθηκαν με 90 μl working dilution buffer. Το working dilution buffer προέκυψε από το standard dilution buffer που περιείχε το kit, έπειτα από αραιώση 1:10 με απιονισμένο νερό.
3. Η προετοιμασία των πρότυπων διαλυμάτων έγινε ως εξής: Στο πρότυπο διάλυμα ιντερλευκίνης-6 που περιείχε το kit προστέθηκαν 2 ml απιονισμένου νερού και με αυτόν τον τρόπο προέκυψε διάλυμα 200 pg/ml. Σε 6 αριθμημένους σωλήνες erpendorf προστέθηκαν από 100 μl working dilution buffer. Σε έναν επιπλέον (έβδομο) σωλήνα προστέθηκαν 500 μl working dilution buffer. 100 μl πρότυπου διαλύματος νιτροτυροσίνης 200 pg/ml προστέθηκαν στον πρώτο σωλήνα και έγινε καλή ανακίνηση σε vortex. 100 μl από το περιεχόμενο του πρώτου σωλήνα μεταφέρθηκαν στο δεύτερο σωλήνα. Ακολούθησε διαδοχικά μεταφορά 100 μl από κάθε σωλήνα στον επόμενο. Στον όγδοο σωλήνα δεν προστέθηκε τίποτα και αυτός αποτέλεσε το τυφλό.
4. Τα πρότυπα διαλύματα και το τυφλό τοποθετήθηκαν στην πλάκα εις διπλούν. Οι σωλήνες erpendorf οι οποίοι περιείχαν τα δείγματα ανακινούνταν σε vortex για 3-4 δευτερόλεπτα για καλύτερη ομογενοποίηση. Στα μικροβοθρία της πλακέτας προστέθηκαν 100 μl πρότυπου διαλύματος, δείγματος ή control.
5. Μετά προστέθηκαν στα μικροβοθρία 50 μl αντισώματος ιντερλευκίνης-6.
6. Η πλακέτα καλύφθηκε και αφέθηκε για επώαση 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου.
7. Μετά το πέρας του χρόνου επώασης πραγματοποιήθηκαν 4 εκπλύσεις των μικροβοθρίων της πλακέτας με διαλύτη πλύσης (washing buffer) σε ειδική

πλυστική συσκευή. Ακολούθως, η πλακέτα αφέθηκε για διάστημα όχι μεγαλύτερο των 5 λεπτών να στραγγίξει από τυχόν απομένονσα υγρασία πάνω σε διηθητικό χαρτί. Η παρασκευή του washing buffer έγινε ως εξής: Το kit περιείχε dilution buffer (Tween-20) το οποίο αραιώθηκε με απεσταγμένο νερό με τελικό όγκο 2 L. Η ανακίνηση του διαλύματος που προέκυψε έγινε με προσοχή, προς αποφυγή αφρισμού. Ακολούθησε μεταφορά του διαλύματος στον ειδικό περιέκτη της πλυστικής συσκευής.

8. Έπειτα έγινε προσθήκη 100 μl του ενζύμου streptavidin peroxidase.
9. Η πλακέτα καλύφθηκε και αφέθηκε για επώαση 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου.
10. Με ρυθμιζόμενη πολυκάναλη πιπέτα προστέθηκαν 100 μl TMB υποστρώματος.
11. Η πλακέτα καλύφθηκε και αφέθηκε για επώαση 15 λεπτά στο σκοτάδι.
12. Μετά το πέρας του χρόνου επώασης προστέθηκαν 100 μl διαλύματος τερματισμού της αντίδρασης θειϊκού οξέος 2 M. Η προσθήκη έγινε αρκετά γρήγορα ώστε να εξασφαλιστεί η σχεδόν ταυτόχρονη αδρανοποίηση του ενζύμου σε όλα τα μικροβοθρία και να τερματιστεί η παραγωγή του έγχρωμου προϊόντος της αντίδρασης.
13. Η απορρόφηση μετρήθηκε αμέσως στα 450 nm σε ειδικό φασματοφωτόμετρο. Το ειδικό λογισμικό της συσκευής χρησιμοποίησε δεδομένα από τα πρότυπα διαλύματα και τα τυφλά διαλύματα για να κατασκευάσει μια καμπύλη αναφοράς με βάση την οποία υπολογίστηκαν οι συγκεντρώσεις της ιντερλευκίνης-6 σε pg/ml.

2.2.8 Μέτρηση Big ενδοθηλίνης-1

Τα επίπεδα της Big ενδοθηλίνης-1 μετρήθηκαν με τη μέθοδο του ενζυμικού ανοσοπροσδιορισμού ELISA (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay), σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή (BIOMEDICA, GERMANY).

2.2.8.1. Αρχή της μεθόδου

Το kit είχε διάταξη «σάντουιτς». Πάνω στα τοιχώματα των μικροβοθρίων της πλακέτας βρίσκονταν προσροφημένα μονοκλωνικά αντισώματα έναντι της

προσδιοριζόμενης ουσίας. Λυοφιλοποιημένα διαλύματα γνωστών συγκεντρώσεων (standards) του αναλύτη παρέχονται μαζί με το kit. Ο αναλύτης ο οποίος περιεχόταν είτε στα διαλύματα γνωστής συγκέντρωσης είτε στα προς ανάλυση δείγματα συνδέθηκε με τα προσροφημένα αντισώματα και στη συνέχεια ένα πολυκλωνικό αντίσωμα συνδεδεμένο με βιοτίνη συνδέθηκε με τον παγιδευμένο αναλύτη. Κατόπιν, η streptavidin peroxidase συνδέθηκε με το συνδεδεμένο με βιοτίνη αντίσωμα. Μετά από προσθήκη του υποστρώματος τετραμεθυλοβενζιδίνη (TMB), το οποίο αντέδρασε με το ένζυμο, σχηματίστηκε κίτρινο προϊόν κατ' αναλογία της ποσότητας του αναλύτη στο δείγμα. Ο τερματισμός της αντίδρασης έγινε με προσθήκηθειϊκού οξέος 2 M και μετρήθηκαν οι οπτικές απορροφήσεις στα 450 nm. Με κάθε σετ δειγμάτων που αναλύθηκαν κατασκευάστηκε και μια καμπύλη αναφοράς.

2.2.8.2. Εκτέλεση προσδιορισμού

1. Πριν τον προσδιορισμό όλα τα αντιδραστήρια φέρονταν σε θερμοκρασία δωματίου.
2. Τα πέντε πρότυπα διαλύματα ήταν έτοιμα και απλώς αραιώθηκαν με 0,5 ml απιονισμένου νερού με αποτέλεσμα να προκύψουν διαλύματα με συγκεντώσεις από 0 έως 9 fmol/ml. Το διάλυμα control αραιώθηκε με 0,5 ml απιονισμένου νερού.
3. Τα πρότυπα διαλύματα και το control τοποθετήθηκαν στην πλάκα εις διπλούν. Οι σωλήνες erpendorf οι οποίοι περιείχαν τα δείγματα ανακινούνταν σε vortex για 3-4 δευτερόλεπτα για καλύτερη ομογενοποίηση. Στα υπόλοιπα μικροβοθρία της πλακέτας προστέθηκαν 50 μl ομογενοποιημένου διαλύματος καρδιακού ιστού, ενώ σε ένα μικροβοθρίο δεν προστέθηκε τίποτα και αφορούσε το τυφλό.
4. Μετά προστέθηκαν στα όλα τα μικροβοθρία εκτός του τυφλού 200 μl αντισώματος Big ενδοθελίνης-1 το οποίο ήταν έτοιμο προς χρήση.
5. Η πλακέτα καλύφθηκε και αφήθηκε για επώαση 4 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου στο σκοτάδι.
6. Μετά το πέρας του χρόνου επώασης πραγματοποιήθηκαν 5 εκπλύσεις όλων των μικροβοθρίων της πλακέτας με διαλύτη πλύσης (washing buffer) σε ειδική πλυστική συσκευή. Ακολούθως, η πλακέτα αφήθηκε για διάστημα όχι μεγαλύτερο των 5 λεπτών να στραγγίξει από τυχόν απομένονσα υγρασία

πάνω σε διηθητικό χαρτί. Η παρασκευή του washing buffer έγινε ως εξής: Το kit περιείχε dilution buffer (Tween-20) το οποίο αραιώθηκε με απεσταγμένο νερό με τελικό όγκο 1 L. Η ανακίνηση του διαλύματος που προέκυψε έγινε με προσοχή, προς αποφυγή αφρισμού. Ακολούθησε μεταφορά του διαλύματος στον ειδικό περιέκτη της πλυστικής συσκευής.

7. Με ρυθμιζόμενη πολυκάναλη πιπέτα προστέθηκαν 200 μl TMB υποστρώματος σε όλα τα μικροβοθρία.
8. Η πλακέτα καλύφθηκε και αφέθηκε για επώαση 30 λεπτά στο σκοτάδι.
9. Μετά το πέρας του χρόνου επώασης προστέθηκαν 50 μl διαλύματος τερματισμού της αντίδρασης (stop solution) σε όλα τα μικροβοθρία. Η προσθήκη έγινε αρκετά γρήγορα ώστε να εξασφαλιστεί η σχεδόν ταυτόχρονη αδρανοποίηση του ενζύμου σε όλα τα μικροβοθρία και να τερματιστεί η παραγωγή του έγχρωμου προϊόντος της αντίδρασης.
10. Η απορρόφηση μετρήθηκε αμέσως στα 450 nm σε ειδικό φασματοφωτόμετρο. Το ειδικό λογισμικό της συσκευής χρησιμοποίησε δεδομένα από τα πρότυπα διαλύματα και τα τυφλά διαλύματα για να κατασκευάσει μια καμπύλη αναφοράς με βάση την οποία υπολογίστηκαν οι συγκεντρώσεις της Big ενδοθηλίνης-1 σε fmol/ml.

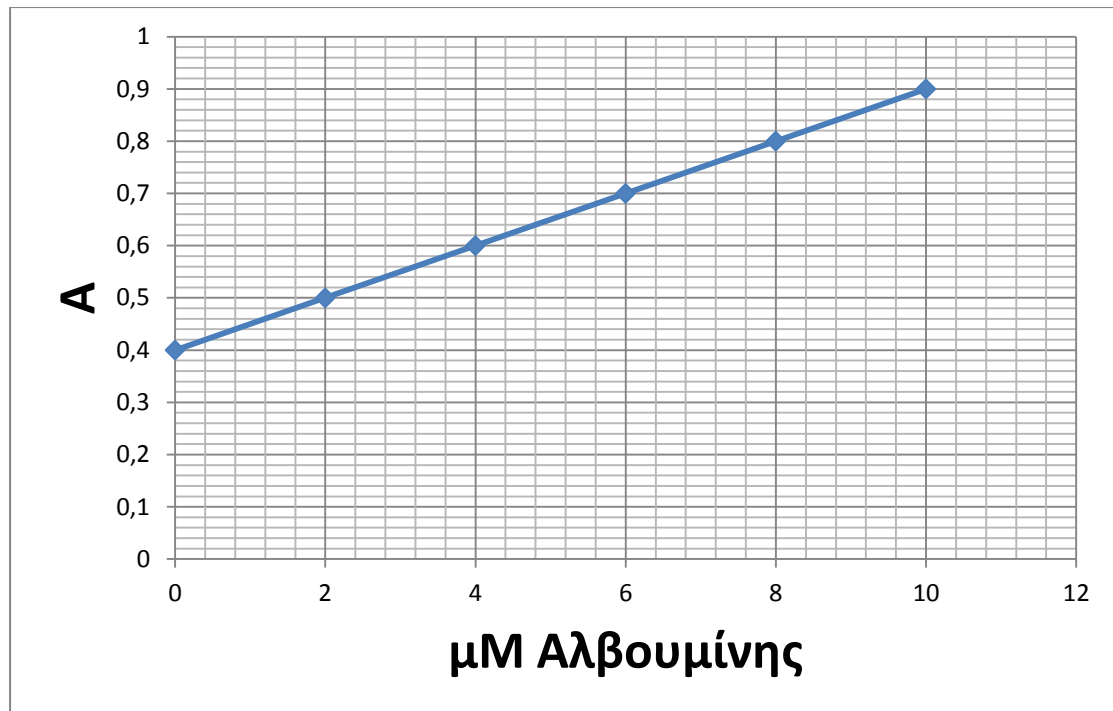
2.2.9 Προσδιορισμός πρωτεΐνης

Για τον προσδιορισμό της πρωτεΐνης 5 μl εκχυλίσματος ιστού, αραιώθηκαν με 45 μl ρυθμιστικού διαλύματος 20mM (HOCH₂)₃CNH₂ Tris το οποίο εξουδετερώθηκε με HCl έως την τιμή pH=7,4 σε αναλογία 1:10 w:v. Από το διάλυμα αυτό ελήφθησαν 10 μl και προστέθηκαν 90 μl H₂O και 1 ml διαλύματος χρωστικής (dye reagent BIO-RAD protein assay Phosphoric acid-Methanol). Το διάλυμα παρασκευάστηκε ως εξής: σε 8 ml H₂O διαλύθηκαν 2 ml από το αντιδραστήριο χρωστικής. Στο τελικό διάλυμα μετρήθηκε φασματοφωτομετρικά η απορρόφηση στα 595 nm.

Μια καμπύλη αναφοράς λήφθηκε από ένα με ακρίβεια παρασκευασμένο πρότυπο διάλυμα πρωτεΐνης αλβουμίνης (0, 1, 2, 3, 4, 5, 10μM) για ποσοτικοποίηση. Οι προσδιορισμοί για κάθε ομάδα έγιναν εις διπλούν.

Από την καμπύλη αναφοράς (Σχήμα 4) προέκυψε η εξίσωση:

$$Y = 0,44(\pm 0,012) + 0,061(\pm 0,0025)X \text{ και } R^2 = 0,993.$$



Σχήμα 4. Καμπύλη αναφοράς πρότυπου διαλύματος αλβουμίνης ως προς την απορρόφηση.

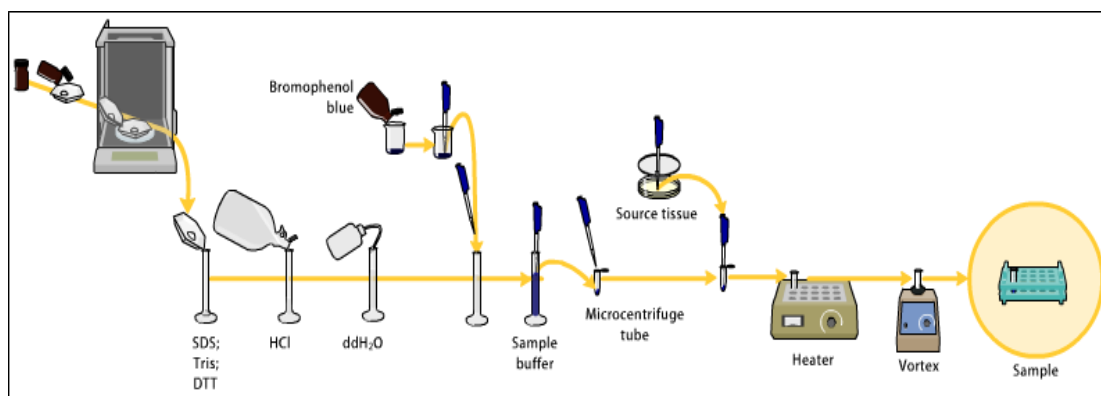
Μετά τον προσδιορισμό της πρωτεΐνης κάθε δείγματος έγινε αναγωγή των συγκεντρώσεων της μηλονικής διαλδεΰδης (MDA), των πρωτεϊνικών καρβονυλίων (PCs), της νιτροτυροσίνης (NT), της ιντερλευκίνης-6 (IL-6) και της Big ενδοθηλίνης-1 (Big ET-1) και εφράστηκαν ανά μιλιγραμμάριο πρωτεΐνης ιστού.

2.2.10 Western Blot

Είναι μια αναλυτική τεχνική που χρησιμοποιούμε για να ταυτοποιήσουμε συγκεκριμένες πρωτεΐνες σε ένα δείγμα ομογενοποιημένου ή από εκχύλισμα ιστού. Για να διαχωρίσουμε τις φυσικές ή μετουσιωμένες πρωτεΐνες χρησιμοποιούμε την τεχνική της ηλεκτροφόρησης σε πηκτή, με βάση το μήκος των πολυπεπτιδίων ή την τρισδιάστατη δομή των πρωτεϊνών. Οι πρωτεΐνες μετά μεταφέρονται σε μια ειδική μεμβράνη και επωάζονται με κατάλληλα αντισώματα ανάλογα με την πρωτεΐνη που θέλουμε να ταυτοποιήσουμε ¹⁶²⁻¹⁶⁷.

Η μέθοδος αυτή πρωτοεμφανίστηκε στο εργαστήριο του George Stark στο Stanford. Το όνομα western blot δόθηκε στην τεχνική από τον W. Newl Burnette λογοπαίγνιο έναντι στο southern blot, μια τεχνική αναγνώρισης DNA που είχε ανακαλυφθεί νωρίτερα από τον Edwin Southern. Η αναγνώριση του RNA ονομάζεται northern blotting και η αναγνώριση της μετα-μεταφραστικής τροποποίησης της πρωτεΐνης ονομάζεται eastern blotting ¹⁶²⁻¹⁶⁷.

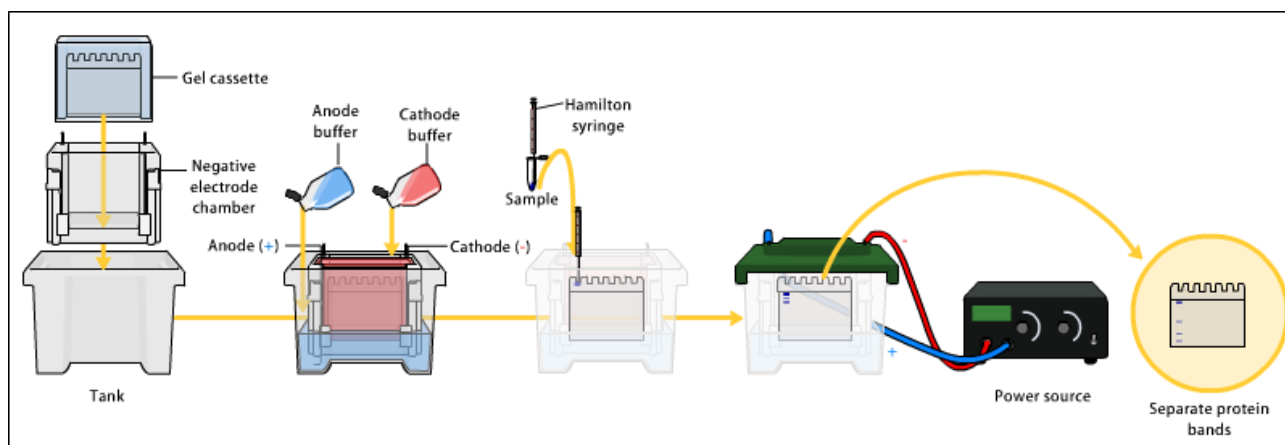
2.2.10.1. Ομογενοποίηση ιστών (δείγματα από τις βιοψίες)



Σχήμα 5. Διαδικασία ομογενοποίησης.

Ολόκληρος ιστός ή τμήματα αυτού τεμαχίζονται με νυστέρι, έπειτα κατεργάζονται σε ειδική συσκευή ομογενοποίησης και τα δείγματα ζυγίζονται. Η λύση των κυττάρων και η διαλυτοποίηση των ιστών προκαλείται από την χρήση διαφόρων διαλυμάτων, buffers (stock solution NaCl – Tris, EDTA, protease phosphatase). Συγκεκριμένα αναστολείς πρωτεασών και φωσφατασών προστίθενται συχνά στα διαλύματα αυτά για να αποτρέψουν την πέψη του δείγματος από τα ίδια του τα ένζυμα. Η ομογενοποίηση πραγματοποιείται στους 0°C για την αποφυγή μετουσίωσης των πρωτεϊνών. Κάθε δείγμα ομογενοποιείται δύο φορές. Στη συνέχεια ακολουθεί φυγοκέντρηση και βρασμός. Τα δείγματα φυλάσσονται στους -80°C και είναι έτοιμα για blotting. Ο προσδιορισμός της πρωτεΐνης των ιστών έγινε με τη μέθοδο Biorad ¹⁶²⁻¹⁶⁷.

2.2.10.2. Ηλεκτροφόρηση



Σχήμα 6 Διαδικασία ηλεκτροφόρησης.

Οι πρωτεΐνες του δείγματος διαχωρίζονται με τη διαδικασία ηλεκτροφόρησης. Η μέθοδος αυτή στηρίζεται στο φαινόμενο κατά το οποίο φορτισμένα μόρια και σωματίδια, μέσα σε υδατίνα διαλύματα και κάτω από την επίδραση ενός ηλεκτρικού πεδίου, κινούνται προς την κατεύθυνση του ηλεκτροδίου με το αντίθετο φορτίο. Λόγω των διαφορετικών φορτίων και μαζών, οι πρωτεΐνες θα κινηθούν στη γέλη με διαφορετικές ταχύτητες. Η διαφορετική ταχύτητα ανάπτυξης της κάθε πρωτεΐνης έχει σαν αποτέλεσμα αυτές να χωρίζονται σε ζώνες¹⁶⁸⁻¹⁷⁰.

Η ηλεκτροφορητική μέθοδος πρωτεϊνών που χρησιμοποιήθηκε κατά τη μελέτη αυτή είναι η ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου με χρήση SDS (SDS-PAGE). Οι πηκτές πολυακρυλαμιδίου είναι χημικά αδρανείς και διάφανες με πόρους που δημιουργούνται από τον πολυμερισμό των μονομερών ακρυλαμιδίου. Το μίγμα (ακρυλαμιδίου, Tris-HCl, SDS, APS, TEMED) χύνεται μέσα σε καλούπι (2 επίπεδα γυαλιά με σφραγισμένα τα πλαϊνά άκρα τους) και σχηματίζεται επίπεδη πηκτή, ενώ τα δείγματα τοποθετούνται σε οπές στο πάνω μέρος της πηκτής¹⁶⁸⁻¹⁷⁰.

Στην SDS-PAGE κατασκευάζονται δύο ειδών πηκτές με πολυακρυλαμιδίου και buffer: τα running και stacking gel. Το stacking gel έχει μικρότερη συγκέντρωση πολυακρυλαμιδίου και συνεπώς μεγαλύτερους πόρους από το running gel, στο οποίο γίνεται ο διαχωρισμός του δείγματος. Οι δυο αυτοί παράμετροι, δηλαδή η διαφορετική συγκέντρωση πολυακρυλαμιδίου και buffer επιτρέπει δείγματα με μεγάλους όγκους να συγκεντρωθούν στην πρώτη πηκτή (stacking gel) πριν εισέλθουν στη δεύτερη πηκτή όπου και θα διαχωριστούν¹⁶⁸⁻¹⁷⁰.

Running gel

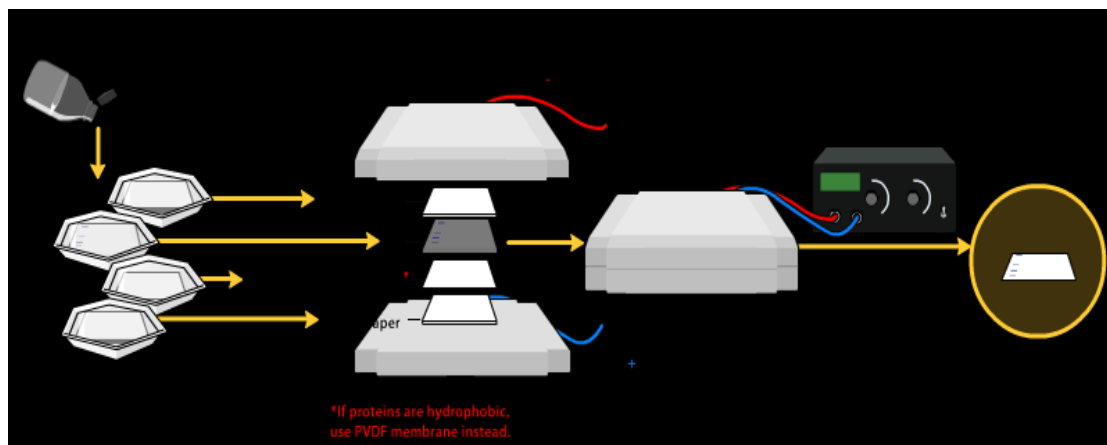
dH ₂ O (6ml)	Δις-απεσταγμένο νερό
Running gel base (4.5ml)	Πηκτή διαχωρισμού των πρωτεϊνών
30% Acrylamide (7.5ml)	Μονομερές πολυακρυλαμίδιου
Stir	
TEMED (20μl)	Συμπλοκοποιητής
Stir	
10% APS (100μl)	Καταλύει τον πολυμερισμό ακρυλαμίδιου προς δημιουργία πολυακρυλαμίδιου
Stir	

Stacking gel

dH ₂ O (3.5ml)	Δις-απεσταγμένο νερό
Stacking gel base (1.5ml)	Συγκεντρωτική πηκτή
30% Acrylamide (1ml)	Μονομερές πολυακρυλαμίδιου
8% Bromophenol blue (20μl)	Χρωστική
Stir	
TEMED (12μl)	Συμπλοκοποιητής
Stir	
10% APS (60μl)	Καταλύει τον πολυμερισμό ακρυλαμίδιου προς δημιουργία πολυακρυλαμίδιου
Stir	

Στην πρώτη οπή εισάγουμε το marker που είναι ένα μίγμα πρωτεϊνών με ορισμένα μοριακά βάρη, διαθέσιμο στο εμπόριο. Είναι έγχρωμος και διαμορφώνει ορατές μπάντες που μας βοηθούν να αναγνωρίσουμε τις πρωτεΐνες που αναπτύσσονται στα δείγματά μας¹⁶⁸⁻¹⁷⁰.

2.2.10.3. Διαδικασία Transportation

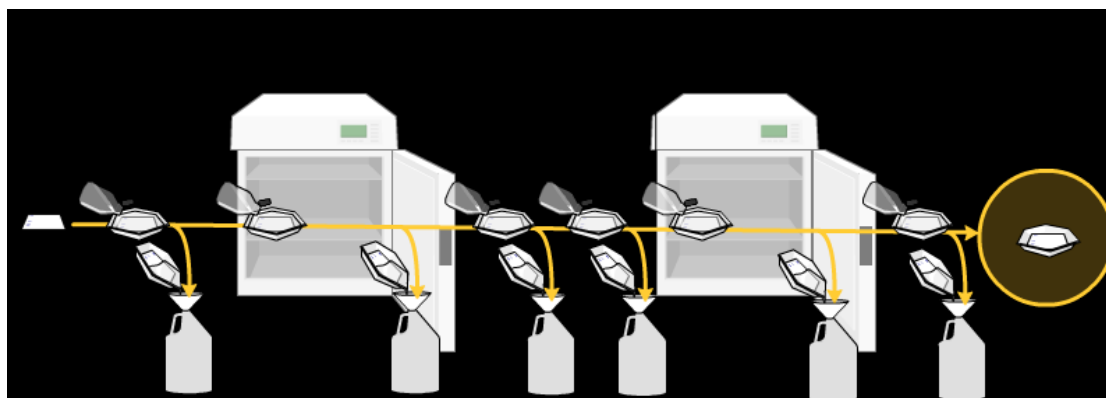


Σχήμα 7. Διαδικασία transportation.

Προκειμένου να συνδεθούν οι πρωτεΐνες με τα αντισώματα, μεταφέρονται από την πηκτή σε μία μεμβράνη νιτροκυτταρίνης. Η μέθοδος αυτή μεταφοράς ονομάζεται electro blotting και χρησιμοποιεί ηλεκτρικό ρεύμα για να τραβήξει τις πρωτεΐνες από την πηκτή στη μεμβράνη, διατηρώντας την οργάνωση που είχαν στην πηκτή. Η δέσμευση των πρωτεϊνών βασίζεται σε υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις καθώς και σε επιδράσεις φορτίων ανάμεσα στη μεμβράνη και την πρωτεΐνη¹⁶²⁻¹⁶⁷.

Η ομοιομορφία και το αποτέλεσμα της μεταφοράς των πρωτεϊνών από την πηκτή στην μεμβράνη ελέγχεται με χρώση Ponceau S. Λόγω της υψηλής ευαισθησίας και της υδατοδιαλυτότητας είναι εύκολος ο αποχρωματισμός της μεμβράνης¹⁶²⁻¹⁶⁷.

2.2.10.4. Διαδικασία μετά το Transportation



Σχήμα 8. Επώαση αντισωμάτων.

Λόγω της ικανότητας της μεμβράνης να συνδέεται με πρωτεΐνες (τόσο με τις πρωτεΐνες στόχους όσο και με τα αντισώματα), είναι σημαντικό να λαμβάνουμε μέτρα για να αποτρέψουμε την αλληλεπίδραση της μεμβράνης με τα αντισώματα που χρησιμοποιούνται για την ανίχνευση των πρωτεϊνών-στόχων. Η διαδικασία αυτή (παρεμπόδιση της μη-ειδικής σύνδεσης) ονομάζεται blocking και πραγματοποιείται τοποθετώντας τη μεμβράνη σε αραιό διάλυμα αλβουμίνης ορού βοοειδών (BSA)-Primary Antibody. Η πρωτεΐνη του διαλύματος συνδέεται με τις περιοχές της μεμβράνης όπου οι πρωτεΐνες-στόχοι δεν έχουν συνδεθεί. Έτσι, όταν προστίθεται το αντίσωμα, επισυνάπτει μόνο τις συγκεκριμένες πρωτεΐνες-στόχους¹⁶²⁻¹⁶⁷.

Μετά το τέλος της διαδικασίας blocking πραγματοποιούνται πλύσεις με TBS-Tween. Οι πλύσεις αυτές, που επαναλαμβάνονται και σε επόμενα στάδια είναι απαραίτητες για να απομακρύνουν αδέσμευτα αντιδραστήρια. Ανεπαρκείς πλύσεις καθιστούν το background έντονο, ενώ εκτεταμένες πλύσεις, μπορούν να μειώσουν την ευαισθησία λόγω έκλουσης του αντισώματος ή/και του αντιγόνου από τη μεμβράνη¹⁶²⁻¹⁶⁷.

Αφού εκπλυθούν οι μεμβράνες για την απομάκρυνση της περίσσειας του αντισώματος που δεν έχει συνδεθεί, η μεμβράνη εκτίθεται σε δεύτερο αντίσωμα (secondary antibody) το οποίο συνδέεται με ειδικές περιοχές του πρώτου αντισώματος. Τα αντισώματα αυτά είναι ειδικά για το κάθε είδος και αναφέρονται ως «anti-mouse», «anti-goat», κλπ. Τα αντισώματα αυτά προέρχονται από ζώα ή υβριδικές καλλιέργειες ζωικής προέλευσης¹⁶²⁻¹⁶⁷.

2.2.10.5. Μέθοδος χημειοφωταύγειας και ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων

Μετά την επώαση της μεμβράνης με τα αντισώματα, ακολουθεί επώαση της μεμβράνης με ειδικά διαλύματα ανίχνευσης, γνωστά ως ECL τα οποία θα επιτρέψουν την παρατήρηση των πρωτεϊνών σε φωτογραφικό φιλμ. Η εικόνα του φιλμ ακολούθως αναλύεται και αξιολογείται η συγκέντρωση των πρωτεϊνών οι οποίες έχουν ανιχνευθεί ¹⁶²⁻¹⁶⁷.

Η ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων πραγματοποιείται με το πρόγραμμα Image J και επιτρέπει τον προσδιορισμό πιθανών αλλαγών στα επίπεδα των συγκεκριμένων πρωτεϊνών.

2.2.10.6. Stripping

Η διαδικασία αυτή μας δίνει τη δυνατότητα να χρησιμοποιήσουμε τις ίδιες μεμβράνες, είτε για να αλλάξουμε αντίσωμα, είτε για να μετρήσουμε την ολική ή τη φωσφορυλιωμένη πρωτεΐνη. Η δυνατότητα αυτή είναι πολύ σημαντική καθώς μας κάνει οικονομία στη κατανάλωση των δειγμάτων αλλά και στο χρόνο. Κάθε μεμβράνη μπορεί να χρησιμοποιηθεί τρεις φορές ¹⁶²⁻¹⁶⁷.

2.2.11 Ανοσοϊστοχημική ανάλυση

Ανοσοϊστοχημεία είναι η εφαρμογή αρχών και τεχνικών βασισμένων στην ανοσολογία για τη μελέτη φυσιολογικών ή παθολογικών κυττάρων και ιστών. Βασίζεται στην αρχή της σύνδεσης αντιγόνου – αντισώματος. Ειδικά αντισώματα συνδεδεμένα με φθορίζοντα μόρια, ένζυμα ή ενζυματικά συστήματα εφαρμόζονται στους ιστούς και αναγνωρίζουν αντιγόνα – στόχους. Μετά τη σύνδεση αντιγόνου – αντισώματος, οι θέσεις εντοπισής τους γίνονται ορατές είτε λόγω του φθορίζοντος σήματος στο μικροσκόπιο ανοσοφθορισμού, είτε μέσω έντονης χρώσης με το κοινό μικροσκόπιο ¹⁷¹. Έχει το χαρακτηριστικό γνώρισμα ότι μπορεί να χρησιμοποιηθεί μόνο για ποιοτική και όχι για ποσοτική ανάλυση των αποτελεσμάτων της σε αντίθεση με την τεχνική Western Blot.

Πρώτοι οι Coons και οι συνεργάτες το 1955 επινόησαν την μέθοδο σήμανσης αντισωμάτων με φθορίζουσες χρωστικές, τα οποία ανίχνευαν αντιγόνα σε ιστικές τομές με μικροσκόπιο ανοσοφθορισμού κατόπιν επώσεως.

2.2.11.1. Μέθοδος

Η ανοσοϊστοχημική μέθοδος δίνει την δυνατότητα εκτίμησης, ανίχνευσης και κατανομής μιας πρωτεΐνης σε κυτταρικό-ιστικό επίπεδο. Η διαδικασία που ακολουθείται είναι η έμμεση μέθοδος της στρεπταβιδίνης-βιοτίνης-υπεροξειδάσης με χρωμογόνο την διαμινοβενζιδίνη (DAB). Τα στάδια της μεθόδου αυτής (Σχήμα 9) είναι τα εξής:

- Λήψη τομών παραφίνης των 5 μm που σκηνώθηκαν σε αντικειμενοφόρες πλάκες επικαλυμμένες με poly-L-lysine και θερμάνθηκαν για 30 λεπτά στους 60 °C.
- Εμβάπτιση σε ξυλόλη (2x 5 λεπτά) με σκοπό την αποπαραφίνωση.
- Εμβάπτιση σε σταδιακά ελαττούμενης συγκέντρωσης αλκοολούχα διαλύματα: 100% (2x 3 λεπτά), 95% (2x 3 λεπτά), 80% (1x 3 λεπτά), 70% (1x 3 λεπτά) και 50 % (1x 3 λεπτά) με σκοπό την ενυδάτωση.
- Παραμονή 15 λεπτών σε διάλυμα 0,3% H₂O₂ (υπεροξειδίου του υδρογόνου) σε σκοτεινό μέρος με σκοπό την αδρανοποίηση της ενδογενούς υπεροξειδάσης.
- Βράσιμο σε διάλυμα 10 mM κιτρικών ιόντων pH 6,0 υπό πίεση 1,2 Atm με στόχο την αποκάλυψη των αντιγονικών θέσεων. Η αποκάλυψη των αντιγονικών θέσεων έγινε λοιπόν με την θερμό-εξαρτώμενη μέθοδο της αντιγονικής ανάκτησης.
- Ξέπλυμα σε TBS για 30 λεπτά.
- Επώση με πρωτογενές αντίσωμα σε αραιώση 1:100 ολονύκτια στους 4 °C με σκοπό την ειδική δέσμευση αντισώματος-αντιγόνου (έπλυση σε TBS για 5 λεπτά).

- Επώαση με βιοτινυλιωμένο δευτερογενές αντίσωμα σε αραιώση 1:200 για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου με σκοπό την ειδική δέσμευση στο πρωτογενές αντίσωμα (ξέπλυμα σε TBS για 5 λεπτά).
- Επώαση με διάλυμα συμπλέγματος στρεπταβιδίνης-βιοτίνης-υπεροξειδάσης (απόθεμα διαλύματος βιοτίνης 1:100, απόθεμα διαλύματος στρεπταβιδίνης-υπεροξειδάσης 1:100) (Dako, Καλιφρονάς, Ελλάς) για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου με σκοπό την ειδική δέσμευση στο δευτερογενές αντίσωμα (ξέπλυμα σε TBS για 5 λεπτά).
- Επώαση σε διάλυμα χρωμογόνου DAB (3,3'διάμινοβενζιδίνης τετραυδροχλωριδίου) (DAB, Sigma, Ελλάς) μέχρι να διαπιστωθεί διαφορική χρώση (οπτική εικόνα του συμπλέγματος αντιγόνο – πρωτογενές αντίσωμα – δευτερογενές αντίσωμα – στρεπταβιδίνης – βιοτίνης – υπεροξειδάσης) (έκπλυση με νερό).
- Ιστολογική χρώση σε αιματοξυλίνη με σκοπό την γενική χρώση των πυρήνων.
- Πραγματοποίηση των σταδίων αφυδάτωσης και διαύγασης στους ίδιους χρόνους αλλά με ανάστροφη πορεία των σταδίων αποπαραφίνωσης και ενυδάτωσης.

2.2.11.2. Αντισώματα

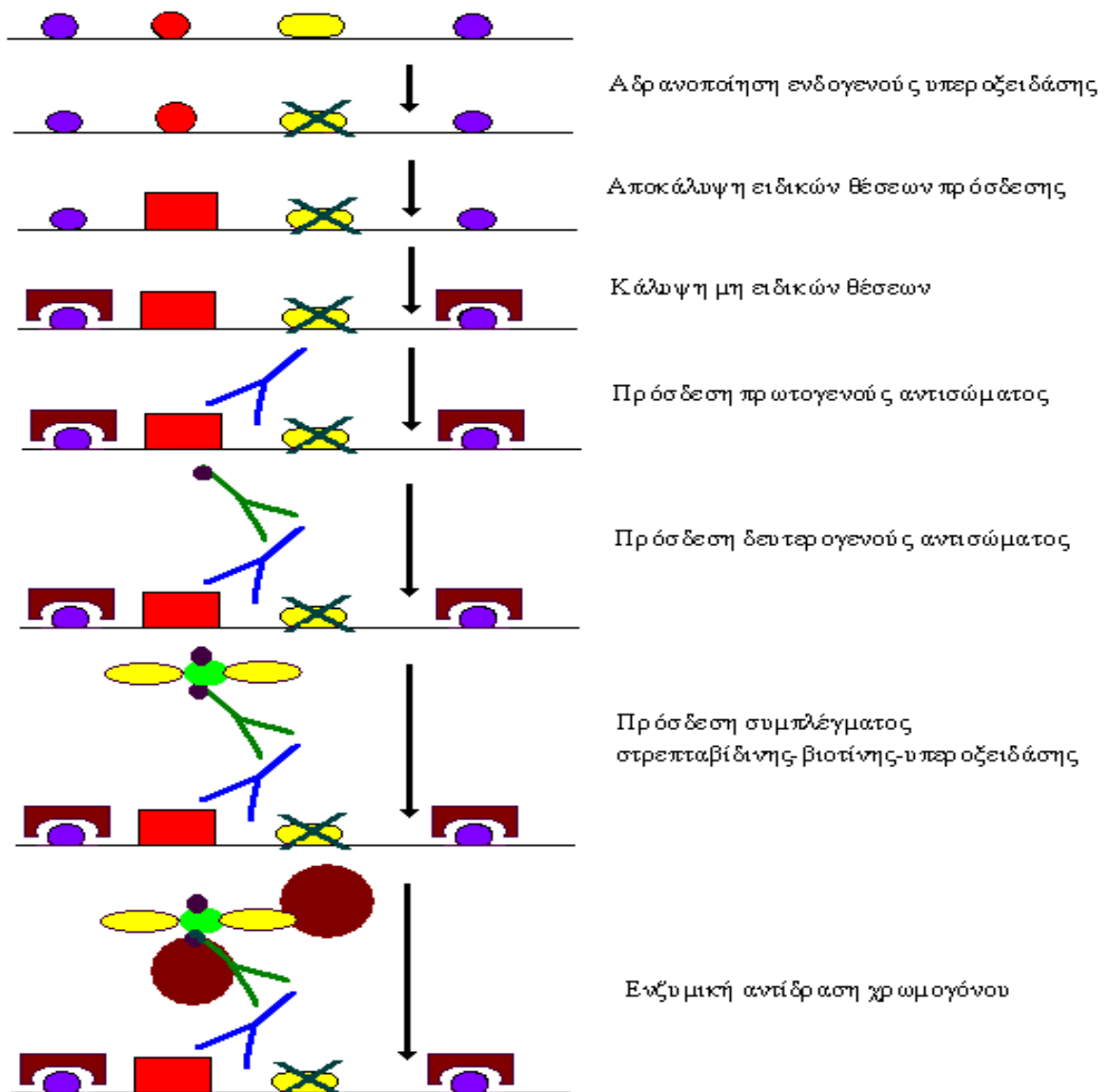
Για την ανοσοϊστοχημική ανάλυση της iNOS, eNOS και ET-1 χρησιμοποιήθηκαν τα ακόλουθα αντίσωμα: αντί-iNOS (Ab-1), αντί-eNOS (Ab-1) και αντί-ET-1(Ab-1) (πολυκλωνικά IgG κονίκλου με επίτοπο το καρβοξυ-τελικό άκρο για την iNOS, eNOS και ET-1 των ενεργοποιημένων μακροφάγων των επιμύων) (Lab Vision/ Neomarkers, Bioanalytica, Ελλάς).

2.2.11.3. Αξιολόγηση

Η χρώση του κυττάρου για iNOS, eNOS και ET-1 θεωρήθηκε θετική μόνον όταν ξεχώριζε το κυτταροπλασματικό σήμα. Το ποσοστό των θετικών κυττάρων υπολογίστηκε με αξιολόγηση 5 πεδίων κάτω από ενίσχυση εικόνας X 400 και θετικός δείκτης iNOS, eNOS και ET-1 για κάθε επίμυ, θεωρήθηκε ο μέσος όρος των θετικών κυττάρων. Δυο παρατηρητές ανεξάρτητα ανέλαβαν να εξετάσουν τα πλακίδια με την μικρότερη δυνατή μεταβλητότητα μεταξύ παρατηρητών.

2.2.11.4. Έλεγχος

Τομές από πνεύμονα αρουραίου χρησιμοποιήθηκαν ως μάρτυρας για την ανοσοϊστοχημική ανάλυση της iNOS, eNOS και ET-1 σύμφωνα με τον κατασκευαστή. Επιπλέον κυτταροπλασματικό σήμα από τα μακροφάγα χρησιμοποιήθηκε ως θετικό σημείο αναφοράς. Κάθε περίπτωση άνοσο-αντίδρασης με αντίσωμα από το αντίστοιχο στέλεχος IgG, χωρίς όμως σχετική ειδικότητα χρησιμοποιείται ως αρνητικό σημείο αναφοράς.



Σχήμα 9. Στάδια ανοσοϊστοχημικής μεθόδου.

2.2.12 Στατιστική ανάλυση αποτελεσμάτων

Όλα τα αποτελέσματα παρουσιάστηκαν ως μέσες τιμές \pm τυπικό σφάλμα. Οι συγκρίσεις των αριθμητικών μεταβλητών αναλύθηκαν μέσω One-way Analysis of Variance model (ANOVA) με διόρθωση Bonferroni και έπειτα με ανάλυση Turkey. Τιμή $p < 0,05$ θεωρήθηκε ως στατιστικά σημαντική.

2.2.13 Μεταβολομική

2.2.13.1. Προετοιμασία δειγμάτων για τη λήψη φασμάτων NMR

Ο ιστός της καρδιάς αφού ξεπάγωσε, πλύθηκε με φυσιολογικό ορό. Κάθε 100 mg του ιστού της καρδιάς ομογενοποιήθηκαν με 1 ml 6% υπερχλωρικού οξέος (HClO_4). Ακολούθησε φυγοκέντρηση στις 3000 rpm για 15 λεπτά σε θερμοκρασία 4°C και συλλέχθηκε το διαυγές υπερκείμενο υγρό το οποίο είναι το υδατοδιαλυτό εκχύλισμα του ιστού της καρδιάς. Στο υπερκείμενο πραγματοποιήθηκε εξουδετέρωση με διάλυμα 12,5% KOH και ρυθμίστηκε το pH στο 7. Ακολούθησε φυγοκέντρηση στις 3000 rpm για 15 λεπτά σε θερμοκρασία 4°C και συλλέχθηκε το διαυγές υπερκείμενο υγρό το οποίο λυοφιλοποιήθηκε. Το λυοφιλοποιημένο δείγμα ιστού καρδιάς διαλυτοποιήθηκε σε 1200 μl D_2O (δευτεριωμένο νερό). Για τη λήψη φασμάτων NMR χρησιμοποιήθηκαν 540 μl του προηγούμενου διαλύματος τα οποία τοποθετήθηκαν σε σωληνάκι του NMR και στα οποία προστέθηκαν 60 μl διαλύματος TSP 0,1% w/w (Trimethylsilyl propionate) ως εσωτερικό πρότυπο. Το διάλυμα του εσωτερικού προτύπου παρασκευάστηκε από αραιώση ενός αρχικού διαλύματος TSP 1% w/w σε D_2O . Το TSP, δηλαδή το νατριούχο άλας του 3-τριμεθυλσιλυλπροπιονικού οξέος με τις μεθυλενικές ομάδες δευτερίου ώστε να αποφύγουμε να δοθούν κορυφές στο φάσμα NMR, είναι η ένωση αναφοράς που χρησιμοποιείται κοινώς σε υδατικά μέσα.

2.2.13.2. Λήψη φασμάτων NMR

Όλα τα πειράματα NMR διεξήχθησαν στο φασματοόμετρο Bruker (Karlsruhe , Γερμανία) Avance III 600 MHz, χρησιμοποιώντας έναν αντίστροφο αισθητήρα ανίχνευσης των 5 mm, μια εξωτερική μονάδα για την σταθερότητα της θερμοκρασίας (BCU) και έναν αυτόματο δειγματολήπτη. Όλα τα δείγματα μετρήθηκαν στην θερμοκρασία των 300 K. Τα φάσματα ^1H -NMR 1D ελήφθησαν μέσω του πειράματος NOESYPR 1D. Για κάθε φάσμα συλλέχθηκε ένα σύνολο 128 σαρώσεων στα 64k σημείων για ένα φασματικό εύρος 20 ppm, χρησιμοποιώντας χρόνο καθυστέρησης χαλάρωσης 4 sec. και χρόνο απόκτησης 2,65 sec. Όλες οι FID που ελήφθησαν μετασχηματίστηκαν μέσω FT (Μετασχηματισμού Fourier).

Τα δισδιάστατα φάσματα 2D, τόσο τα ομοπυρηνικά (^1H - ^1H) COSY, TOCSY και JRES όσο και τα ετεροπυρηνικά (^1H - ^{13}C) HSQC (DEPT 135 – HSQC), ελήφθησαν για ένα επιλεγμένο δείγμα, για τη βοήθεια/επιβεβαίωση της αντιστοίχισης των συστημάτων spin στους μεταβολίτες.

2.2.13.3. Στατιστική επεξεργασία φασμάτων

2.2.13.3.1. Δημιουργία περιγραφικών μεταβλητών (AMIX)

Πριν την εφαρμογή των πολυπαραμετρικών μεθόδων ανάλυσης ζητείται ο μετασχηματισμός των φασμάτων NMR σε περιγραφικές μεταβλητές. Ο μετασχηματισμός του φάσματος σε μια σειρά μεταβλητών μπορεί να επιτευχθεί μέσω: α) της χρήσης της έντασης της κορυφής σε κάθε σημείο του φάσματος (peak picking), β) της χρήσης της έντασης μιας κορυφής αναφοράς. Η διαδικασία γίνεται με τη χρήση του προγράμματος software AMIX (Analysis of Mixtures version 2.7, Bruker Analytische Messtechnik). Πριν την επεξεργασία όλων των φασμάτων με το AMIX διορθώθηκε η βασική γραμμή με τη βοήθεια του software XWIN-NMR. Κάθε φάσμα υποδιαιρέθηκε σε υποπεριοχές (buckets) ορισμένου πλάτους 0,02 ppm. Το πλάτος κάθε υποπεριοχής επελέγη με τέτοιο τρόπο ώστε να μην είναι πολύ μεγάλο

και να είναι ευαίσθητο σε μικρές παραλλαγές. Η δημιουργία περιγραφικών μεταβλητών εμπεριέχει την εξομάλυνση των φασμάτων εξαιτίας χημικών μετατοπίσεων από παράγοντες όπως το pH. Θεωρητικά, σε κάθε υποπεριοχή θα είναι παρούσες οι ίδιες κορυφές, ανεξάρτητα από τις μικρές διακυμάνσεις του pH. Μετά την ολοκλήρωση της κάθε υποπεριοχής του φάσματος θα έχουμε λάβει ένα φάσμα τροποποιημένο με την μορφή ιστογράμματος.

Από το πρόγραμμα AMIX έχουν εξαιρεθεί: 1) η περιοχή του αιθέρα από 1,31 ppm έως 1,11 ppm (ο αιθέρας χορηγήθηκε στα πειραματόζωα για την θανάτωσή τους αλλά σε ποσότητες που δεν ήταν ίσες, λόγος για τον οποίο οι κορυφές του αιθέρα στα φάσματα δεν ήταν ταυτόσημες όσον αφορά στην ένταση και δεν ήταν πάντα παρούσες), 2) η περιοχή της γλυκόζης από 3,54 ppm έως 3,44 ppm (η κορυφή της γλυκόζης δεν ήταν παρούσα σε όλα τα φάσματα, και σε αυτά που ήταν παρούσα, παρουσίαζε αυξημένη μεταβλητότητα όσον αφορά στην ένταση), 3) η περιοχή από 3,73 ppm έως 3,69 ppm (σε αυτή την περιοχή εμφανίζεται μια άγνωστη μονή κορυφή) και 4) η περιοχή του ύδατος από 5,26 ppm έως 4,63 ppm.

Στη συνέχεια γίνεται η κανονικοποίηση των φασμάτων, με τέτοιο τρόπο ώστε να θεωρηθούν όλες οι μεταβλητές ίσης σημασίας και τα φάσματα συγκρίσιμα μεταξύ τους. Η κανονικοποίηση γίνεται διαιρώντας όλες τις τιμές των εντάσεων των κορυφών με την συνολική ένταση του φάσματος (sum of intensities). Στο τελικό αποτέλεσμα εφαρμόζεται ο πολλαπλασιαστικός παράγοντας (multiplication factor , συνήθως 1000), ο οποίος πολλαπλασιάζει όλες τις τιμές για να τις καταστήσει αναγνώσιμες. Στο τέλος της επεξεργασίας δημιουργήθηκε ένας πίνακας $m \times n$, όπου m είναι ο αριθμός των φασμάτων-δειγμάτων (παρατηρήσεις) και n είναι ο αριθμός των περιγραφικών μεταβλητών, δηλαδή οι τιμές ολοκλήρωσης των κορυφών που αντιστοιχούν στις υποπεριοχές. Ο πίνακας $m \times n$ είναι η βάση των δεδομένων και αντιπροσωπεύεται γεωμετρικά από ένα πολυδιαστατικό χώρο όπου οι μεταβλητές καθορίζουν τους άξονες και οι παρατηρήσεις αναπαρίστανται ως σημεία (ή ανύσματα).

Ο πίνακας $m \times n$ δημιουργήθηκε με το πρόγραμμα EXCEL και εισήχθη στο στατιστικό πακέτο SIMCA P-10,5 για την εξαγωγή των κυρίων συνιστωσών.

2.2.13.3.2. Μέθοδοι αναγνώρισης προτύπων (PR)

Όπως προαναφέρθηκε, η πολυπλοκότητα των φασμάτων NMR βιολογικών υγρών ή ιστών, καθιστά δύσκολη την εξαγωγή συμπερασμάτων σχετικά με τις αλλαγές των συγκεντρώσεων των μεταβολιτών σε παθολογικές καταστάσεις. Σε πολλές περιπτώσεις, η απλή παρατήρηση των φασμάτων δεν είναι επαρκής, και η αξιολόγηση των πληροφοριών είναι δυνατή μόνο με τη χρήση στατιστικών μεθόδων για την απόκτηση της καλύτερης πληροφορίας από τα φάσματα.

Οι τεχνικές PR¹⁷³ είναι στην πραγματικότητα πολυπαραμετρικές στατιστικές μέθοδοι που χρησιμοποιούνται για την ανάλυση των φασματικών δεδομένων, μειώνοντας την πολυπλοκότητά τους. Στις μεθόδους PR, κάθε φάσμα NMR θεωρείται ως αντικείμενο σε μια πολυδιαστατική ομάδα πολλών συντεταγμένων, οι τιμές των οποίων αντιστοιχούν σε συγκεντρώσεις μεταβολιτών ή στην φασματική ένταση κάθε σημείου. Έτσι, το φάσμα του βιολογικού υγρού ή του ιστού, αποτελεί το μεταβολικό αποτύπωμα του οργανισμού. Είναι πιθανόν πως οι αλλαγές που παρατηρούνται στο φάσμα, περιέχουν πληροφορίες χρήσιμες για την διάγνωση μιας παθολογικής κατάστασης.

Η διαίρεση του φάσματος σε υποπεριοχές έχει ως αποτέλεσμα το σχηματισμό ενός μεγάλου αριθμού μεταβλητών, οι οποίες πρέπει να μειωθούν για να μειωθεί η πολυπλοκότητά τους και να ανακτήσουμε χρήσιμες πληροφορίες. Χρησιμοποιούνται διάφοροι αλγόριθμοι για τη μείωση των μεταβλητών και στη συνέχεια αναπαρίστανται γραφικά υπό τη μορφή συστάδων (clusters) ή προτύπων (patterns).

2.2.13.3.3. Ανάλυση κύριων συνιστωσών

Μία από τις πιο εύκολες και πιο εύχρηστες μεθόδους PR είναι η PCA (Principal Component Analysis – Ανάλυση Κυρίων Συνιστωσών).¹⁷³ Η ανάλυση των κυρίων συνιστωσών (PCA) μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την προβολή ενός πολυδιάστατου χώρου σε ένα χώρο λιγότερων διαστάσεων, που καθορίζεται από τις κύριες συνιστώσες. Οι κύριες συνιστώσες αποτελούν γραμμικό συνδυασμό των αρχικών περιγραφικών μεταβλητών. Οι κύριες συνιστώσες χαρακτηρίζονται από ιδιοτιμές που προέρχονται από τον πίνακα $m \times n$ (όπου n είναι οι περιγραφικές μεταβλητές για κάθε ένα δείγμα από τα m δείγματα).

Οι κύριες συνιστώσες (PCs) ανταποκρίνονται σε λανθάνουσες μεταβλητές. Η προβολή των σημείων (δειγμάτων) στις νέες μεταβλητές δημιουργεί τον πίνακα των νέων συντεταγμένων (scores), και η γωνία των λανθανουσών μεταβλητών ως προς τις αρχικές μεταβλητές δημιουργεί τον πίνακα των φορτίων (loadings).

Για ένα σύνολο n περιγραφικών μεταβλητών είναι δυνατόν να προκύψουν n κύριες συνιστώσες. Ωστόσο ο αριθμός των κύριων συνιστωσών καθορίζεται από κριτήρια όπως οι ιδιοτιμές. Η γραφική απεικόνιση σε δύο διαστάσεις των δύο πρώτων κύριων συνιστωσών (PC1, PC2 ή t_1, t_2) προσφέρει τη σχέση μεταξύ των αντικειμένων. Τέτοιες γραφικές αναπαραστάσεις αποτελούν ένα απαραίτητο εργαλείο για την εκτίμηση του τρόπου ταξινόμησης στο επίπεδο των δειγμάτων – σημείων. Οι κύριες συνιστώσες προκύπτουν από το γραμμικό συνδυασμό των αρχικών περιγραφικών μεταβλητών και με κατάλληλους συντελεστές βαρύτητας έτσι ώστε κάθε κύρια συνιστώσα να είναι σε ορθή γωνία προς τις υπόλοιπες. Η πρώτη κύρια συνιστώσα είναι ο γραμμικός συνδυασμός των αρχικών μεταβλητών και περιέχει τη μέγιστη διακύμανση των δεδομένων. Η δεύτερη κύρια συνιστώσα είναι σε ορθή γωνία προς το πρώτο και περιέχει την αμέσως επόμενη περιγραφή των δεδομένων. Οι κύριες συνιστώσες που ακολουθούν περιγράφουν διαδοχικά όλο και μικρότερο ποσοστό των δεδομένων μέχρι που τελικά η τελευταία κύρια συνιστώσα θα περιγράψει τον θόρυβο (noise data).

Η ποιότητα του μοντέλου, υπολογίζεται από τον συντελεστή συσχέτισης, ενώ η αξιοπιστία του μοντέλου ελέγχεται με τη διαδικασία της διασταυρούμενης πιστοποίησης (cross validation). Σύμφωνα με αυτή τη διαδικασία, κάθε μοντέλο που προκύπτει από την ανάλυση των κύριων συνιστωσών αξιολογείται στη βάση των στατιστικών στοιχείων. Το βασικό στοιχείο για την αξιολόγηση της περιγραφικής ικανότητας του μοντέλου, είναι ο συντελεστής συσχέτισης R^2 .

2.2.13.3.4. Εξαγωγή κύριων συνιστωσών

Η γραφική απεικόνιση των συντεταγμένων των πρώτων δύο κυρίων συνιστωσών (PC1 ή t1 έως PC2 ή t2) απεικονίζει τη σχέση μεταξύ των αντικειμένων (scores) και δίνει πληροφορίες για τη σχέση μεταξύ τους.¹⁷⁴

Αυτά τα γραφήματα παρουσιάζουν τις ομάδες που έχουν δημιουργηθεί, τις ακραίες τιμές και τις ομοιότητες ή μη των δειγμάτων. Η γραφική παρουσίαση των φορτίων της πρώτης κύριας συνιστώσα σε σύγκριση με τη δεύτερη κύρια συνιστώσα (PC1/PC2 ή t1/t2) παρουσιάζει τη σχέση ανάμεσα στις περιγραφικές μεταβλητές. Ο συνδυασμός των δύο γραφημάτων δίνει πολύτιμες πληροφορίες όσον αφορά στις μεταβλητές που είναι υπεύθυνες για το σχηματισμό των ομάδων των δειγμάτων και για τη σχέση αυτών των μεταβλητών μεταξύ τους.

Με τη μέθοδο PCA επιτυγχάνεται η εμφάνιση των μέσων και των ισχυρών ακραίων τιμών, δηλαδή δειγμάτων με τιμές παρατήρησης που δεν προσαρμόζονται στο μοντέλο. Η αναγνώριση δειγμάτων με ισχυρές ακραίες τιμές, είναι απαραίτητη για τη σωστή αξιολόγηση των βάσεων δεδομένων, δεδομένου ότι έχουν την ικανότητα να αλλάξουν το μοντέλο προς τη δική τους κατεύθυνση. Η αναγνώρισή τους γίνεται με το τεστ του Hotelling, T^2 . Πρόκειται περί μίας γενίκευσης του student's t – test για την πολυμεταβλητή ανάλυση των δεδομένων. Η χρήση του τεστ του Hotelling σε συνδυασμό με την αναπαράσταση των scores ορίζει μία σχετική περιοχή στο 95% ή 99% της στάθμης εμπιστοσύνης. Στο στατιστικό πρόγραμμα SIMCA που χρησιμοποιήθηκε για την Ανάλυση Κύριων Συνιστωσών απεικονίζεται ο δισδιάστατος χώρος των προβολών και η έλλειψη που ορίζει τη περιοχή με βάση τη δοκιμασία του Hotelling. Παρατηρήσεις/δείγματα που βρίσκονται εκτός της ελλείψεως θεωρούνται ως ισχυρές ακραίες τιμές και πρέπει να αποκλειστούν.

2.2.13.3.5. Στατιστικά στοιχεία της μεθόδου PCA

Για κάθε κύρια συνιστώσα υπολογίζεται ο συντελεστής συσχέτισης ο οποίος, για την πλειοψηφία των συνιστωσών, προσαρμόζεται ως προς τους βαθμούς ελευθερίας.

R^2X : το ποσοστό των αθροισμάτων των τετραγώνων όλων των μεταβλητών X που ερμηνεύεται από τη συγκεκριμένη κύρια συνιστώσα.

R^2X adj: το ποσοστό της μεταβολής όλων των μεταβλητών X που ερμηνεύονται από τη συγκεκριμένη κύρια συνιστώσα. Η διακύμανση είναι το άθροισμα των τετραγώνων διορθωμένο για τους βαθμούς ελευθερίας.

R^2X (cum): το ποσοστό των αθροισμάτων των τετραγώνων όλων των μεταβλητών X που ερμηνεύεται από τα εξαχθέντα κύρια συστατικά.

R^2X adj (cum): το ποσοστό της συνολικής μεταβολής όλων των μεταβλητών X που ερμηνεύεται από όλες τις εξαχθείσες κύριες συνιστώσες.

Ο συντελεστής συσχέτισης R^2 πρέπει να τείνει στο 1, που είναι η ευνοϊκή του τιμή. Οι τιμές του R^2X και του R^2X adj αντανακλούν τη σπουδαιότητα μιας κύριας συνιστώσας στην περιγραφή του μοντέλου.

Q^2 : είναι ένας συντελεστής σχέσης που εκφράζει το ποσοστό της συνολικής μεταβολής των μεταβλητών X που προβλέπει την κύρια συνιστώσα. Αν η τιμή του Q^2 για τις μεταβλητές X είναι μεγαλύτερη από κάποιο όριο σημαντικότητας, αυτό η συνιστώσα είναι σημαντική. Επίσης υπολογίζεται το Q^2 (cum) που αντιπροσωπεύει την τιμή του συνολικού Q^2 για όλες τις εξαχθείσες συνιστώσες.

Για να θεωρηθεί μια συνιστώσα σημαντική, πρέπει να ισχύουν οι ακόλουθοι κανόνες:

1. $Q^2 > \text{Όριο}$. Το όριο αυξάνεται, αυξάνοντας τον αριθμό των συνιστωσών για να ερμηνεύσει την απώλεια των βαθμών ελευθερίας.

2. Η σημαντικότητα των κυρίων συνιστωσών ελέγχεται επίσης μέσω των ιδιοτιμών (eigenvalues). Η ιδιοτιμή ισοδυναμεί με το εύρος της κυρίας διαμέτρου των τιμών.

Μια κύρια συνιστώσα είναι σημαντική, όταν η ιδιοτιμή της είναι μεγαλύτερη του 2. Στο πρόγραμμα SIMCA η κύρια συνιστώσα εμφανίζεται με το σύμβολο R1, R2 και είναι σημαντική ως προς τον πρώτο και τον δεύτερο κανόνα, αντίστοιχα. Μια κύρια συνιστώσα, που δεν είναι σημαντική, εμφανίζεται με το σύμβολο NS (non significant), N3, N4 ή NE. Γενικά για να θεωρηθεί μια κύρια συνιστώσα ως σημαντική, αυτή πρέπει να συνεισφέρει στο μοντέλο τουλάχιστον το 10%.

Η ανάλυση των κυρίων συνιστωσών ανακτήθηκε μέσω του προγράμματος SIMCA. Διορθώθηκε η φάση και η βασική γραμμή μέσω κατάλληλων πολυωνυμικών συναρτήσεων, εισαγωγής των φασμάτων στο πρόγραμμα software AMIX, κανονικοποίηση ως προς την ολική ένταση (sum of intensities) και δημιουργίας υποπεριοχών πλάτους 0,02 ppm. Εισαγωγή στο στατιστικό πρόγραμμα SIMCA P-10,5. Στο πρόγραμμα SIMCA έγινε προσαρμογή της κλίμακας:

- Μέσω της επιλογής “center”. Ο μέσος όρος κάθε μεταβλητής εξάγεται από τις τιμές των δεδομένων για αυτή τη μεταβλητή. Ο σκοπός είναι να συγκεντρωθούν οι περιγραφικές μεταβλητές στο μέσο όρο (mean-centering).

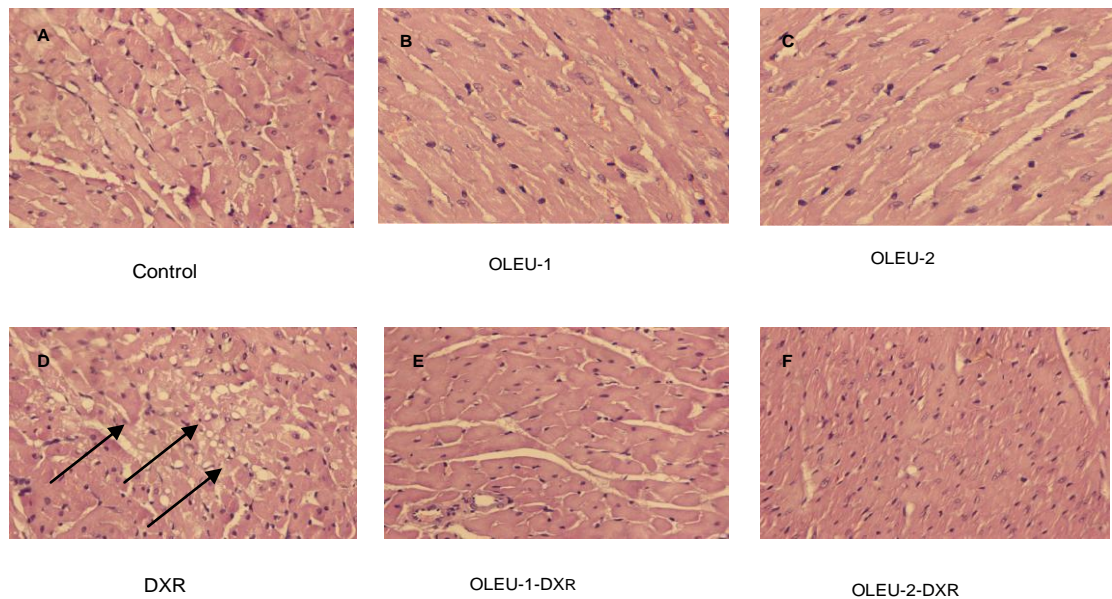
- Μέσω της εντολής “UV” (Unit Variance) όπου μια μεταβλητή “j” κεντράρεται και προσαρμόζεται η κλίμακα σύμφωνα με την διακύμανση των τιμών της ομάδα. Κατά την μετατροπή UV οι “μεγάλες” μεταβλητές περιορίζονται, και οι “μικρές” μεταβλητές μεγαλώνουν με τέτοιο τρόπο ώστε να δίνεται η ίδια δυνατότητα σε όλες τις μεταβλητές να επηρεάσουν την ανάλυση των δεδομένων.

- Μέσω της εντολής Par (Pareto) κάθε μεταβλητή είναι κεντραρισμένη. Η προσαρμογή της κλίμακας με το Pareto είναι μεταξύ μη μετασχηματισμού και του UV.

Αφού εξήχθησαν οι κύριες συνιστώσες, που θεωρούνται σημαντικά σύμφωνα με τους κανόνες, κατασκευάστηκε το διάγραμμα της απεικόνισης των συντεταγμένων των scores για τις κύριες συνιστώσες που είναι σημαντικές. Όπως προαναφέρθηκε, οι πρώτες δύο συνιστώσες εκφράζουν συνήθως τη μέγιστη διακύμανση των δεδομένων και θεωρούνται οι πιο αντιπροσωπευτικές για το μοντέλο. Λαμβάνονται τα διαγράμματα που αναπαριστούν την ταξινόμηση των υπό εξέταση δειγμάτων στο δισδιάστατο διάστημα (scores plot), και επιπλέον τα διαγράμματα των φορτίων (loadings) που αντιπροσωπεύουν τις μεταβλητές που είναι υπεύθυνες για το συγκεκριμένο διαχωρισμό.

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Ογδόντα δύο πειραματόζωα επιβίωσαν μετά το τέλος του πειραματικού μέρους της μελέτης. Η θνητότητα στην ομάδα της DXR ήταν 19% μετά το τέλος των χορηγήσεων. Η μορφολογία των καρδιακών ιστών ήταν φυσιολογική στην ομάδα ελέγχου καθώς και στις ομάδες OLEU-1 και OLEU-2 (Εικόνα 1). Αντίθετα στην ομάδα της DXR παρατηρήθηκαν αλλοιώσεις που περιελάμβαναν οίδημα, χρόνια φλεγμονή καθώς και κενотоπιώδη εκφύλιση των μυοκαρδιακών ιστών (Εικόνα 1). Τέλος, στις ομάδες DXR-OLEU-1 και DXR-OLEU-2 παρατηρήθηκε μόνο μια μικρή υπερτροφία των καρδιακών κυττάρων χωρίς όμως να συνυπάρχουν στοιχεία οιδήματος, χρόνιας φλεγμονής και κενотоπιώδους εκφύλισης, όπως αυτό φαίνεται στην Εικόνα 1.

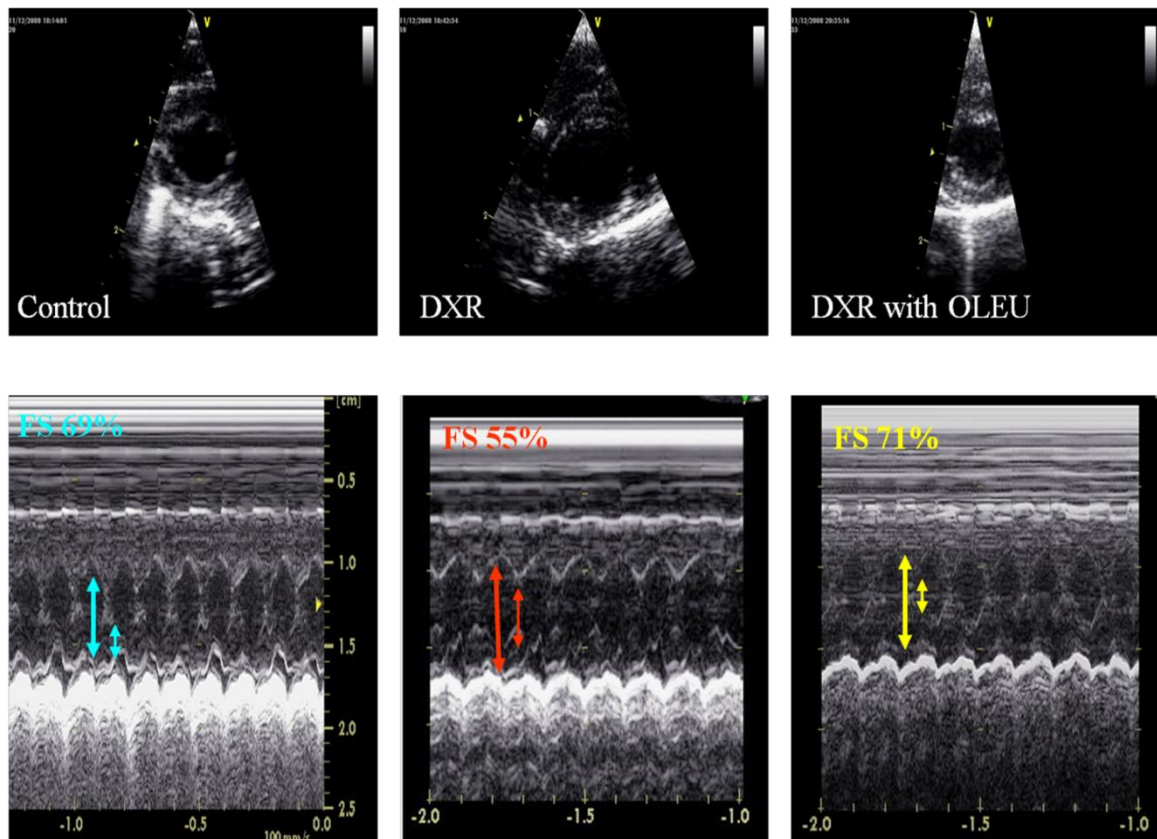


Εικόνα 1: Μορφολογία καρδιακών ιστών A) ομάδα ελέγχου (H&E x 400), B) ομάδα OLEU-1 με φυσιολογική μορφολογία καρδιακού ιστού (H&E x 400), C) ομάδα OLEU-2 με φυσιολογική μορφολογία καρδιακού ιστού (H&E x 400), D) ομάδα DXR με μορφολογία οιδήματος, χρόνιας φλεγμονής και εκφύλισης του καρδιακού ιστού (H&E x 400), E) ομάδα DXR-OLEU-1 με μικρή υπερτροφία του καρδιακού ιστού, χωρίς όμως να υπάρχουν στοιχεία χρόνιας φλεγμονής και εκφύλισης (H&E x 400), F) ομάδα DXR-OLEU-2 με πολύ μικρή υπερτροφία του καρδιακού ιστού, χωρίς όμως να υπάρχουν στοιχεία χρόνιας φλεγμονής και εκφύλισης (H&E x 400).

Στην ομάδα της DXR η υπερηχογραφική μελέτη (Εικόνα 2) κατέδειξε μείωση της μάζας της αριστερής κοιλίας, μείωση του κλάσματος εξώθησης της αριστερής κοιλίας, αύξηση της τελο-συστολικής διαμέτρου της αριστερής κοιλίας καθώς και διαφορετική καρδιακή αναδιαμόρφωση (Πίνακας 1). Αντίθετα, στις ομάδες OLEU-1 και OLEU-2 καθώς και στις ομάδες DXR-OLEU-1 και DXR-OLEU-2 ο υπερηχογραφικός έλεγχος δεν παρουσίασε καμία διαφοροποίηση συγκριτικά με την ομάδα ελέγχου όπως αυτό φαίνεται στον Πίνακα 1.

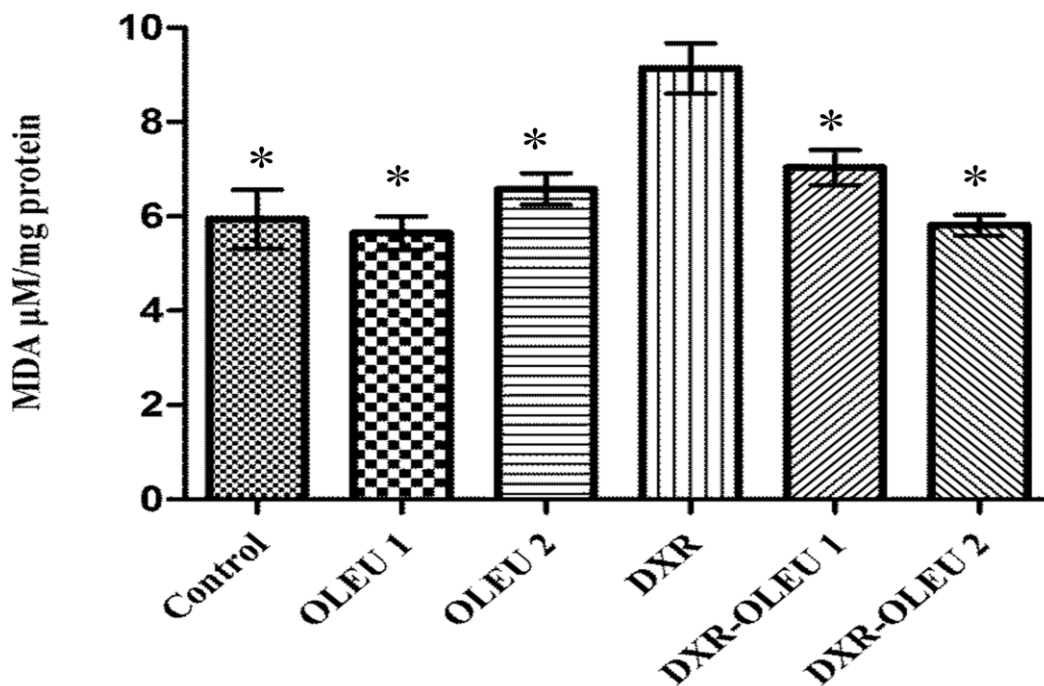
	Controls n=5	DXR n=8	OLEU-1- DXR n=5	OLEU-2- DXR n=5	OLEU-1 n=5	OLEU-2 n=5
Heart rate, bpm	472 (34)	337 (65) *	345 (15) *	386 (31) *	438 (43)	395 (72)
AWTd, mm	2.1 (0.2)	1.7 (0.4)	2.0 (0.2)	2.0 (0.1)	2.0 (0.1)	2.0 (0.4)
PWTd, mm	2.7 (0.5)	1.6 (0.3) *	2.1 (0.6)	1.9 (0.2)	2.6 (0.5)	2.3 (0.5)
LVDd, mm	4.9 (0.5)	5.0 (1.4)	5.0 (0.7)	5.2 (0.2)	4.4 (0.5)	4.2 (0.3)
LVDs, mm	2.0 (0.7)	2.9 (1.0)	2.0 (0.5)	1.9 (0.6)	1.9 (0.5)	1.7 (0.4)
FS, %	65.0 (8.2)	43.5 (7.0) *	61.1 (7.1)	71.0 (3.5)	68.9 (5.2)	71.67 (7.8)
LVmass, g	0.85 (0.13)	0.50 (0.22) *	0.65 (0.10)	0.67 (0.12)	0.72 (0.11)	0.69 (0.22)
R/H ratio	4.0 (1.5)	7.4 (2.9) *	5.2 (1.7)	5.8 (1.1)	3.5 (0.8)	3.5 (0.3)

Πίνακας 1: Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέση τιμή (SD). AWTd / PWTd, anterior / posterior wall thickness at end-diastole; LVDd / LVDs, left ventricular diameter at end-diastole / end-systole; FS, fractional shortening; LVmass, left ventricular mass; R/H ratio, an index of adverse cardiac remodeling. One-way ANOVA πραγματοποιήθηκε μεταξύ των ομάδων; unpaired t-test χρησιμοποιήθηκε για post-hoc σύγκριση με την ομάδα control. * $P < 0.05$ vs ομάδα control.



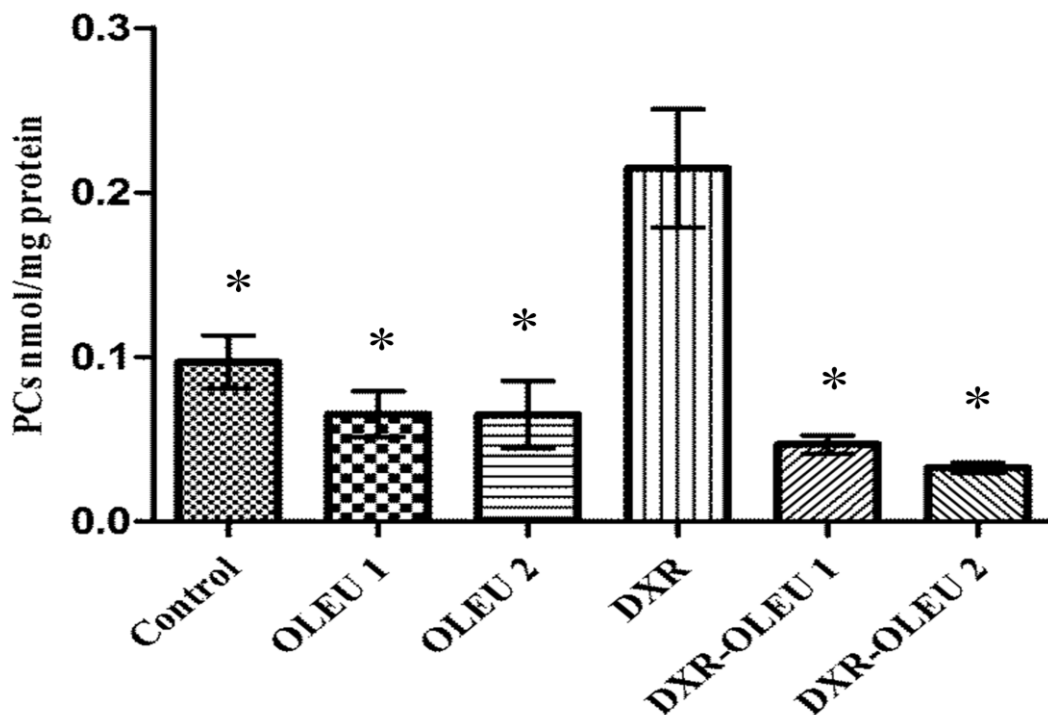
Εικόνα 2: Ηχοκαρδιογραφική εξέταση (Vivid-i, GE Healthcare με 12MHz probe). Στην 1^η σειρά αποικονίζονται οι 2D εικόνες από ένα πειραματόζωο της κάθε ομάδας, ενώ στη 2^η σειρά οι αντίστοιχες M-mode εικόνες.

Οι περισσότερες μελέτες δείχνουν ότι η μηλονική διαλδεύδη (MDA), που αποτελεί δείκτη της λιπιδικής υπεροξειδωσης, είναι αυξημένη στον ορό ασθενών με καρδιακή ανεπάρκεια και ότι μπορεί να θεωρηθεί ως αξιόπιστος και ανεξάρτητος προγνωστικός παράγοντας της θνητότητας σε ασθενείς με καρδιακή ανεπάρκεια ^{50,51}. Ο προσδιορισμός της MDA κατέδειξε ότι η χορήγηση της DXR αυξάνει σημαντικά τα επίπεδα της, τα οποία είναι μειωμένα στις ομάδες Control, OLEU-1, OLEU-2, DXR-OLEU-1 και DXR-OLEU-2 όπως φαίνεται στο Σχήμα 10.



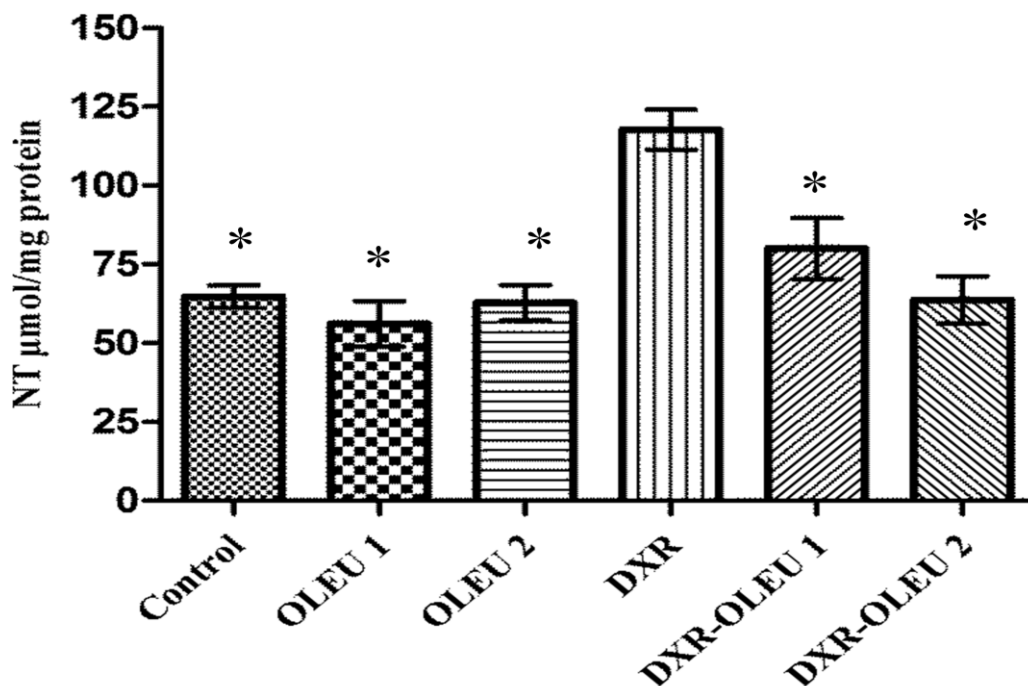
Σχήμα 10. Συγκέντρωση της μηλονικής διαλδεΰδης (MDA), δείκτης λιπιδικής υπεροξειδωσης στο μυοκάρδιο. Η χορήγηση της DXR αυξάνει σημαντικά τα επίπεδα της MDA, τα οποία μειώνονται στις ομάδες Control, OLEU-1, OLEU-2, DXR-OLEU-1 και DXR-OLEU-2 (*P<0.05).

Η αντίδραση των ελευθέρων ριζών του οξυγόνου με τις πρωτεΐνες οδηγούν στο σχηματισμό καρβονυλικών ενώσεων (αλδεύδες ή κετόνες) οι οποίες παράγονται στις πολυπεπτιδικές αλυσίδες ιδιαίτερα της προλίνης, της αργινίνης της λυσίνης και της θρεονίνης. Η οξειδωτική καταστροφή των πρωτεϊνών είναι επιβλαβής και έχει σημαντικό ρόλο στην παθογένεση αρκετών εκφυλιστικών ασθενειών, όπως την νόσο του αλτσχάιμερ, καταρράκτη, ρευματοειδή αρθρίτιδα, αθηροσκλήρυνση, καρδιακή ανεπάρκεια. Η μέτρηση των πρωτεϊνικών καρβονυλίων (PCs) μας έδειξε ότι η χορήγηση της DXR αυξάνει σημαντικά τα επίπεδά τους, τα οποία μειώνονται στις ομάδες Control, OLEU-1, OLEU-2, DXR-OLEU-1 και DXR-OLEU-2 όπως φαίνεται στο Σχήμα 11.



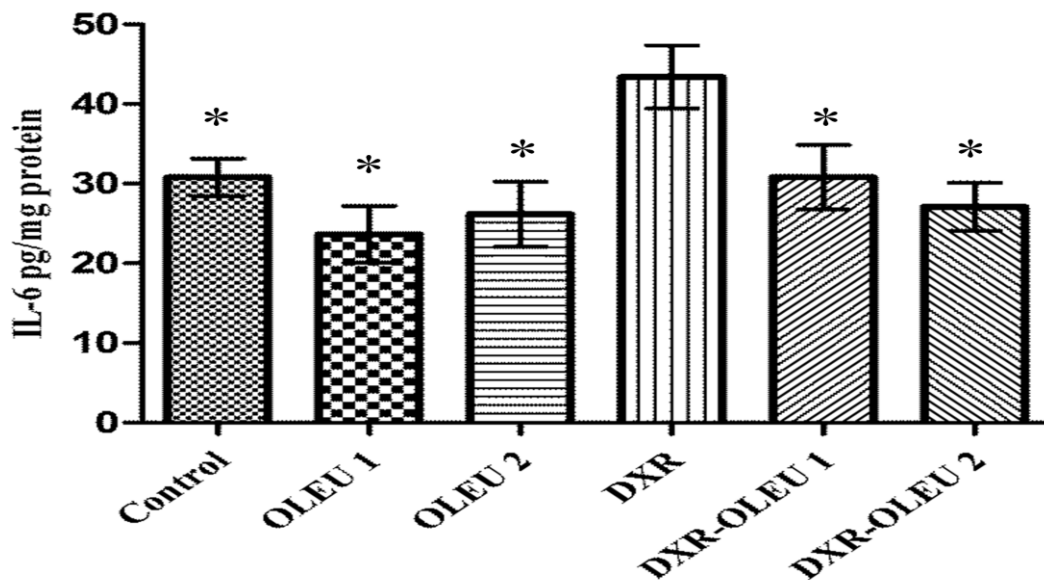
Σχήμα 11. Συγκέντρωση των πρωτεϊνικών καρβονυλίων (PCs), δείκτης πρωτεϊνικής οξείδωσης στο μυοκάρδιο. Η χορήγηση της DXR αυξάνει σημαντικά τα επίπεδα των PCs, τα οποία μειώνονται στις ομάδες Control, OLEU-1, OLEU-2, DXR-OLEU-1 και DXR-OLEU-2 (* $P < 0.05$).

Το NO μπορεί να αντιδράσει ταχέως με τα ανιόντα υπεροξειδίου και να παραχθεί το οξειδωτικό μόριο, υπεροξυνιτρώδες ανιόν (ONOO^-). Υψηλές συγκεντρώσεις του ONOO^- πιστεύεται ότι οξυγονώνουν τις θειόλες ή τους θειοαιθέρες, νιτρώνουν την τυροσίνη, νιτρώνουν και οξυγονώνουν την γουανοσίνη, αποικοδομούν τους υδατάνθρακες, επάγουν λιπιδική υπεροξείδωση και διασπούν το DNA. Ο προσδιορισμός της νιτροτυροσίνης (NT) κατέδειξε ότι η χορήγηση της DXR αυξάνει σημαντικά τα επίπεδά της, τα οποία μειώνονται στις ομάδες Control, OLEU-1, OLEU-2, DXR-OLEU-1 και DXR-OLEU-2 όπως φαίνεται στο Σχήμα 12.



Σχήμα 12. Συγκέντρωση της νιτροτυροσίνης (NT), δείκτης nitrosative stress στο μυοκάρδιο. Η χορήγηση της DXR αυξάνει σημαντικά τα επίπεδα της NT, τα οποία μειώνονται στις ομάδες Control, OLEU-1, OLEU-2, DXR-OLEU-1 και DXR-OLEU-2 (* $P < 0.05$).

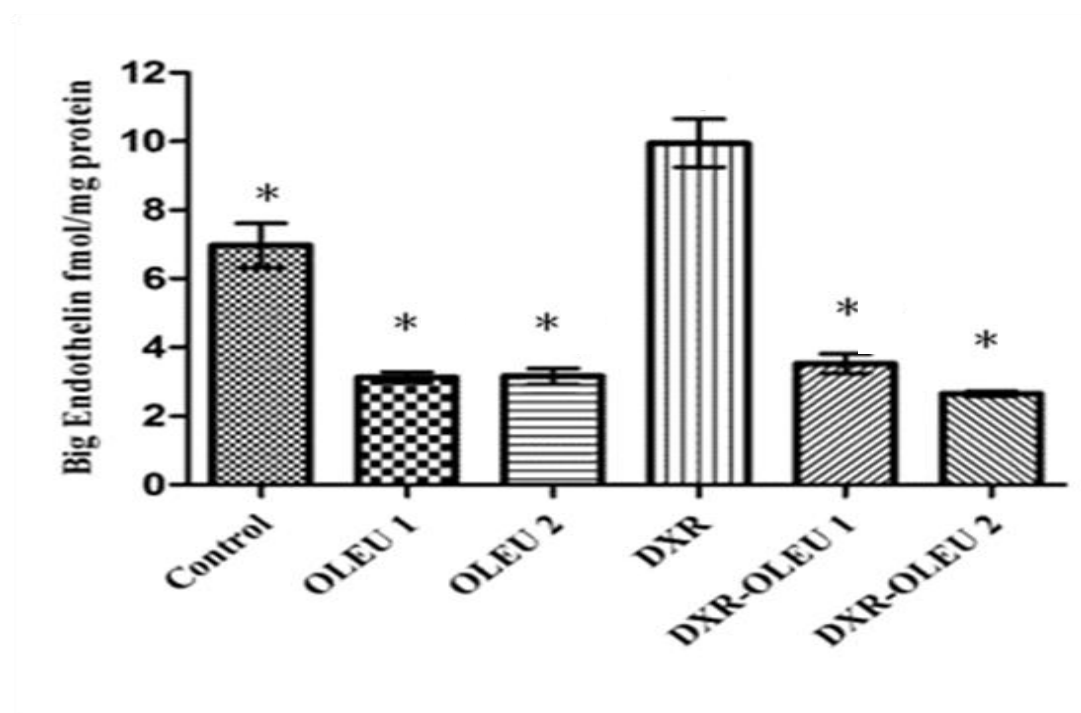
Η ιντερλευκίνη-6 (IL-6) είναι μία πλειοτροπική κυτοκίνη που ρυθμίζει ποικιλία γεγονότων, όπως την κυτταρική διαίρεση και διαφοροποίηση, την επιβίωση, αλλά και την απόπτωση των κυττάρων. Η IL-6 παίζει σημαντικό ρόλο κυρίως στη λειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος, στην αιμοποίηση και τη φλεγμονή. Οι περισσότερες μελέτες δείχνουν ότι η IL-6 είναι αυξημένη στον ορό ασθενών με καρδιακή ανεπάρκεια και ότι μπορεί να θεωρηθεί ως αξιόπιστος και ανεξάρτητος προγνωστικός παράγοντας της θνητότητας σε ασθενείς με καρδιακή ανεπάρκεια⁵⁶⁻⁵⁸. Ο προσδιορισμός της IL-6 κατέδειξε ότι η χορήγηση της DXR αυξάνει σημαντικά τα επίπεδά της, τα οποία μειώνονται στις ομάδες Control, OLEU-1, OLEU-2, DXR-OLEU-1 και DXR-OLEU-2 όπως φαίνεται στο Σχήμα 13.



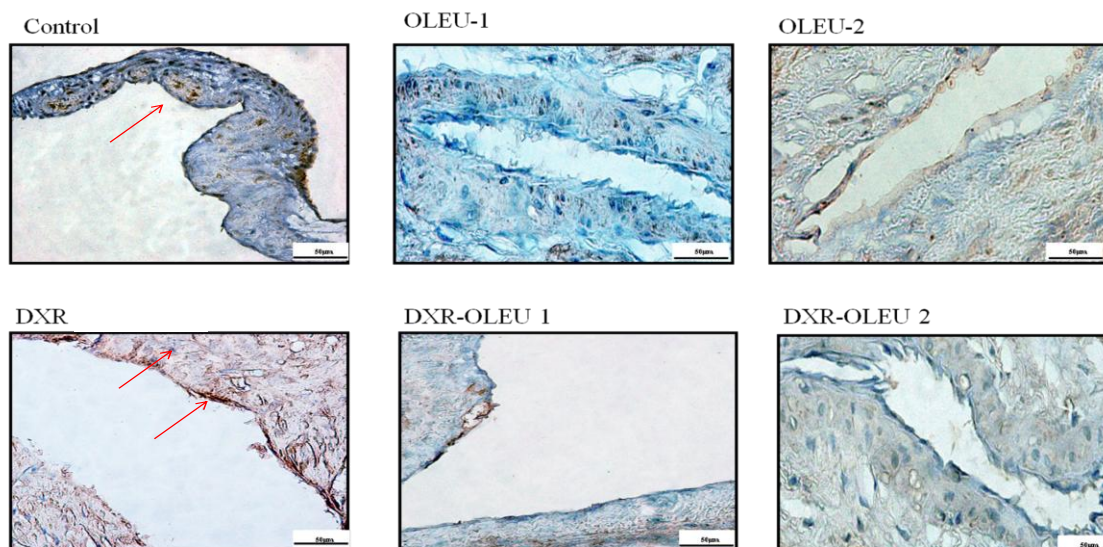
Σχήμα 13. Συγκέντρωση της ιντερλευκίνης-6 (IL-6), δείκτης απόπτωσης στο μυοκάρδιο. Η χορήγηση της DXR αυξάνει σημαντικά τα επίπεδα της IL-6, τα οποία μειώνονται στις ομάδες Control, OLEU-1, OLEU-2, DXR-OLEU-1 και DXR-OLEU-2 (*P<0.05).

Ο σχηματισμός της ενδοθηλίνης-1 (ET-1) (21 αμινοξέα) έπεται της σύνθεσης της Big ET-1, ενός πεπτιδίου 38 αμινοξέων, το οποίο προέρχεται από την προ-προενδοθηλίνη (212 αμινοξέα) έπειτα από διάσπαση από ειδικές ενδοπεπτιδάσες. Η δράση διαφόρων αγγειοδραστικών πεπτιδίων και αυξητικών παραγόντων μπορεί να επιτυγχάνεται μέσω παραγωγής της ET-1. Για παράδειγμα η αγγειοτασίνη II διεγείρει την υπερτροφία του μυοκαρδίου και σε ορισμένες περιπτώσεις τον αγγειακό πολλαπλασιασμό. Αναστολή της παραγωγής ή της δράσης της ET-1 μπορεί να αναστείλει την υπερτροφική δράση της αγγειοτασίνης II στο μυοκάρδιο. Ακόμη, η

ET-1 διεγείρει την μετατροπή της αγγειοτανσίνης I σε αγγειοτανσίνη II και συμβάλλει στην παραγωγή αλδοστερόνης μέσω αγγειοτανσίνης II. Οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ των δύο αυτών ορμονών είναι ιδιαίτερης σημασίας καθώς έχει αποδειχτεί ότι οι α-MEA επιμηκώνουν την επιβίωση ασθενών με αριστερή καρδιακή ανεπάρκεια έπειτα από οξύ έμφραγμα μυοκαρδίου. Η ενεργοποίηση του συστήματος της ET-1 είναι μερικώς υπεύθυνη για την αυξημένη περιφερική αγγειακή αντίσταση σε ασθενείς με καρδιακή ανεπάρκεια ⁵³. Η ET-1 συμβάλλει ισχυρά στην αγγειοσυστολή είτε άμεσα είτε μέσω ενεργοποίησης άλλων νευροορμονικών συστημάτων. Σε μοντέλα ζώων με καρδιακή ανεπάρκεια η μυοκαρδιακή παραγωγή ET-1 είναι ιδιαίτερα αυξημένη, όπως επίσης και αυτή της κυκλοφορίας ιδιαίτερα της πνευμονικής. Ο προσδιορισμός της Big ET-1 με eliza και τις ET-1 με ανοσοϊστοχημεία κατέδειξε ότι η χορήγηση της DXR αυξάνει σημαντικά τα επίπεδά της, τα οποία μειώνονται στις ομάδες Control, OLEU-1, OLEU-2, DXR-OLEU-1 και DXR-OLEU-2 όπως φαίνεται στο Σχήμα 14 και 15 αντίστοιχα.

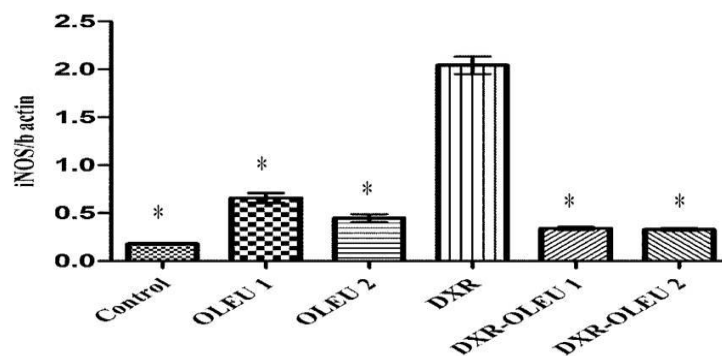
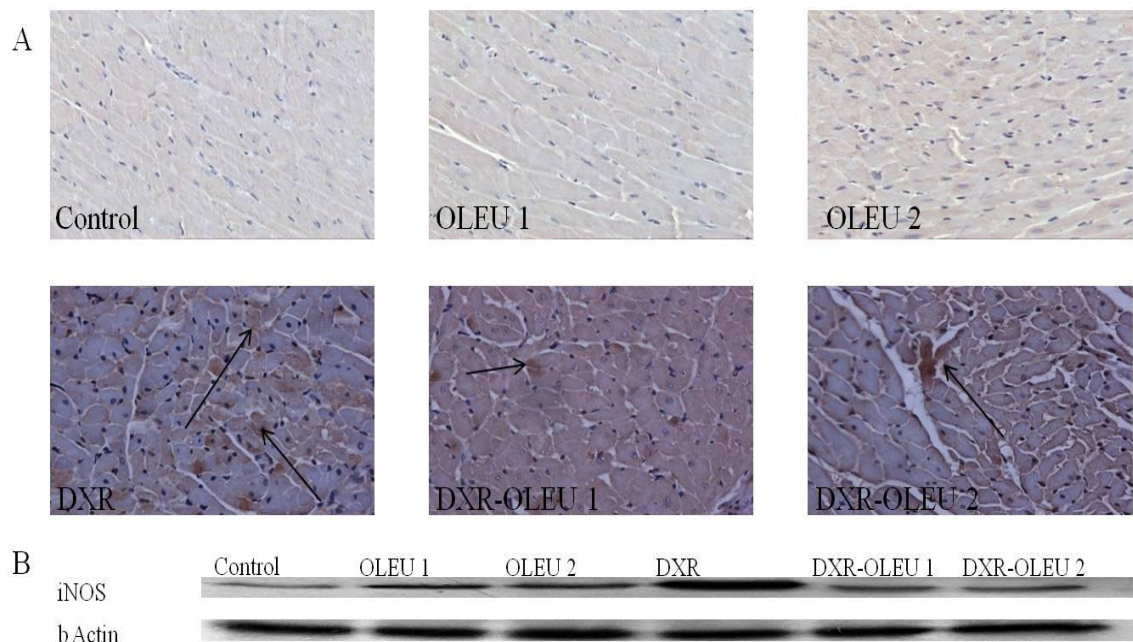


Σχήμα 14. Συγκέντρωση της Big endothelin-1 ως δείκτης απόπτωσης και αναδιαμόρφωσης στο μυοκάρδιο. Η χορήγηση της DXR αυξάνει σημαντικά τα επίπεδα της Big endothelin-1, τα οποία μειώνονται στις ομάδες Control, OLEU-1, OLEU-2, DXR-OLEU-1 και DXR-OLEU-2 (*P<0.05).



Σχήμα 15. Ανοσοϊστοχημική απεικόνιση της κυτταροπλασματικής ET-1 στις διαφορετικές ομάδες ελέγχου (400X). Η χορήγηση της DXR αυξάνει σημαντικά την έκφραση της ET-1 (καφέ χρώμα), τα οποία μειώνονται στις ομάδες Control, OLEU-1, OLEU-2, DXR-OLEU-1 και DXR-OLEU-2.

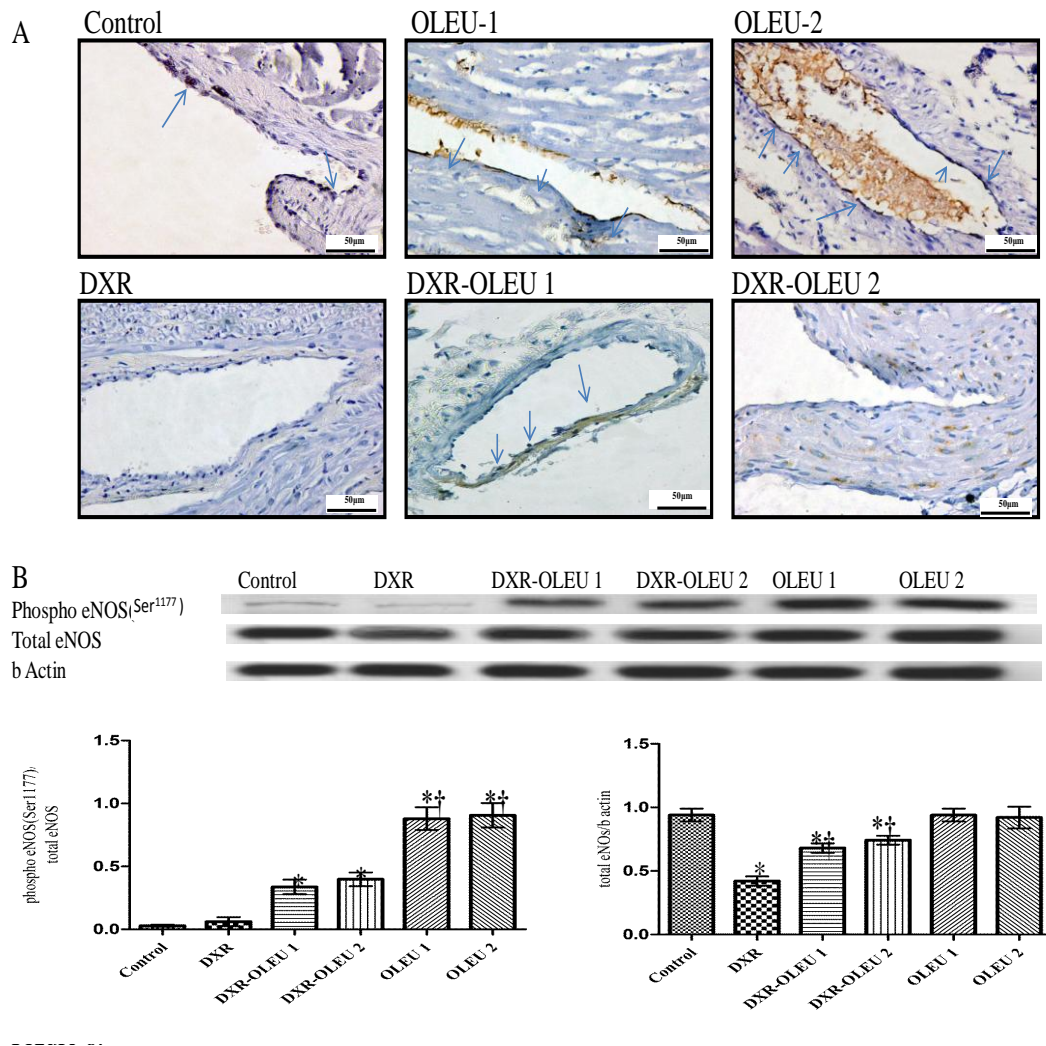
Η IL-6 ενεργοποιεί την επαγόμενη συνθάση του NO (iNOS). Πιστεύεται ότι το παραγόμενο NO μετά την επαγωγή της iNOS από τις κυταροκίνες σε συνδυασμό με την αυξημένη αγγειακή παραγωγή ελευθέρων ριζών οξυγόνου είναι μηχανισμός πρόκλησης απόπτωσης και ελαττωμένης βιοδιαθεσιμότητας του NO. Σε πρόσφατες μελέτες βρέθηκε ότι η έκφραση της iNOS είναι αυξημένη στο μυοκάρδιο ασθενών με σοβαρή καρδιακή ανεπάρκεια είτε αυτή οφείλεται σε ισχαιμική καρδιοπάθεια είτε σε βαλβιδική πάθηση⁹². Ο προσδιορισμός της έκφρασης της iNOS στα καρδιομυοκύτταρα με ανοσοϊστοχημική μέθοδο καθώς και με τη μέθοδο western blot κατέδειξε ότι η χορήγηση της DXR αυξάνει σημαντικά τα επίπεδά της, τα οποία μειώνονται στις ομάδες Control, OLEU-1, OLEU-2, DXR-OLEU-1 και DXR-OLEU-2 όπως φαίνεται στο Σχήμα 16.



Σχήμα 16. Εκτίμηση της iNOS με την μέθοδο της ανοσοϊστοχημείας και με την μέθοδο Western-Blot. Παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση στην έκφραση της iNOS στην ομάδα της DXR σε σύγκριση με την ομάδα των Control και στις ομάδες που χορηγήθηκε OLEU (* $P < 0.05$).

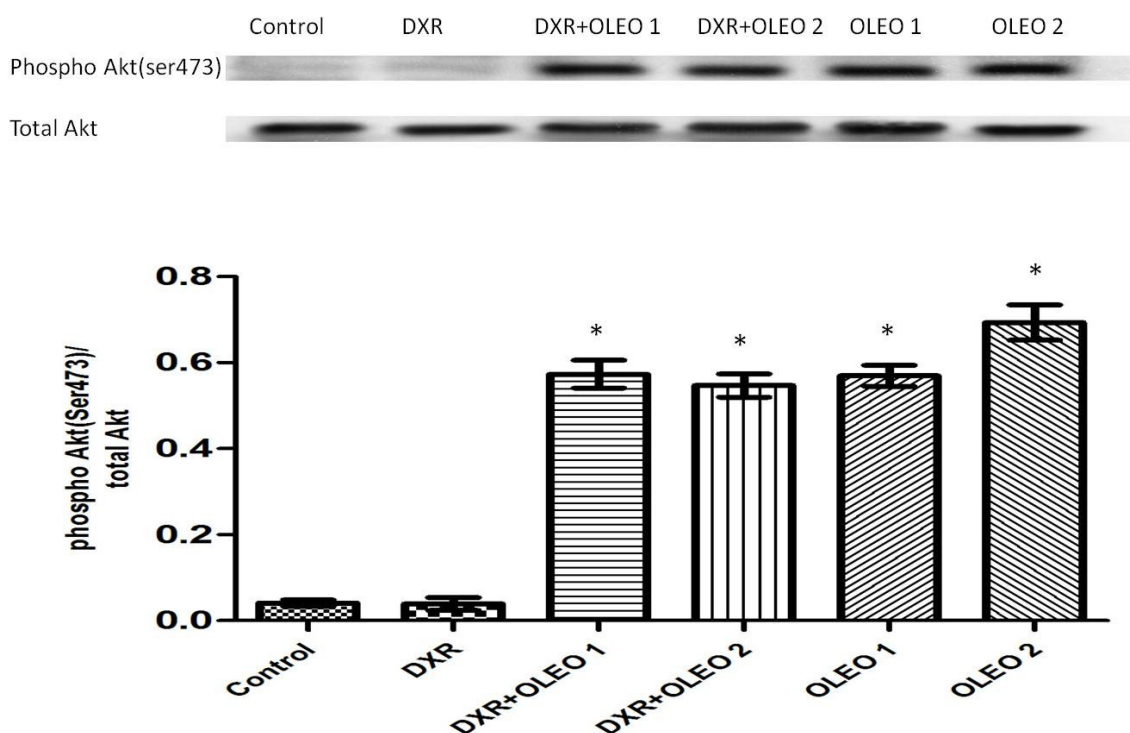
Η eNOS ισομορφή διαδραματίζει πολύ σημαντικό ρόλο στην ρύθμιση της καρδιαγγειακής λειτουργίας. Η μειωμένη έκφραση της ισομορφής αυτής στο μυοκαρδιακό ιστό έχει συσχετιστεί με την εκδήλωση της καρδιακής ανεπάρκειας. Ο προσδιορισμός της έκφρασης της eNOS στα καρδιομυοκύτταρα με ανοσοϊστοχημική μέθοδο καθώς και με τη μέθοδο western blot κατέδειξε ότι η χορήγηση της DXR

μειώνει σημαντικά τα επίπεδά της, τα οποία αυξάνονται στις ομάδες Control, OLEU-1, OLEU-2, DXR-OLEU-1 και DXR-OLEU-2 όπως φαίνεται στο Σχήμα 17.



Σχήμα 17. Ανοσοϊστοχημική απεικόνιση της κυτταροπλασματικής eNOS στις διαφορετικές ομάδες ελέγχου (400X). Στη ομάδα της DXR παρατηρείται πλήρης απουσία στην έκφραση της eNOS (καφέ χρώμα), σε αντίθεση με τις ομάδες Control, OLEU-1, OLEU-2, DXR-OLEU-1 και DXR-OLEU-2. Αντιπροσωπευτικά δείγματα Western blots και μέσος λόγος πυκνότητας των peNOS (Ser¹¹⁷⁷)/teNOS και teNOS/b-actin των ελεγχόμενων ομάδων. A)*P<0,05 vs control, DXR, +P<0,05 vs Control, DXR, DXR-OLEU-1, DXR-OLEU-2, B) *P<0,05 vs Control, OLEU-1, OLEU-2.

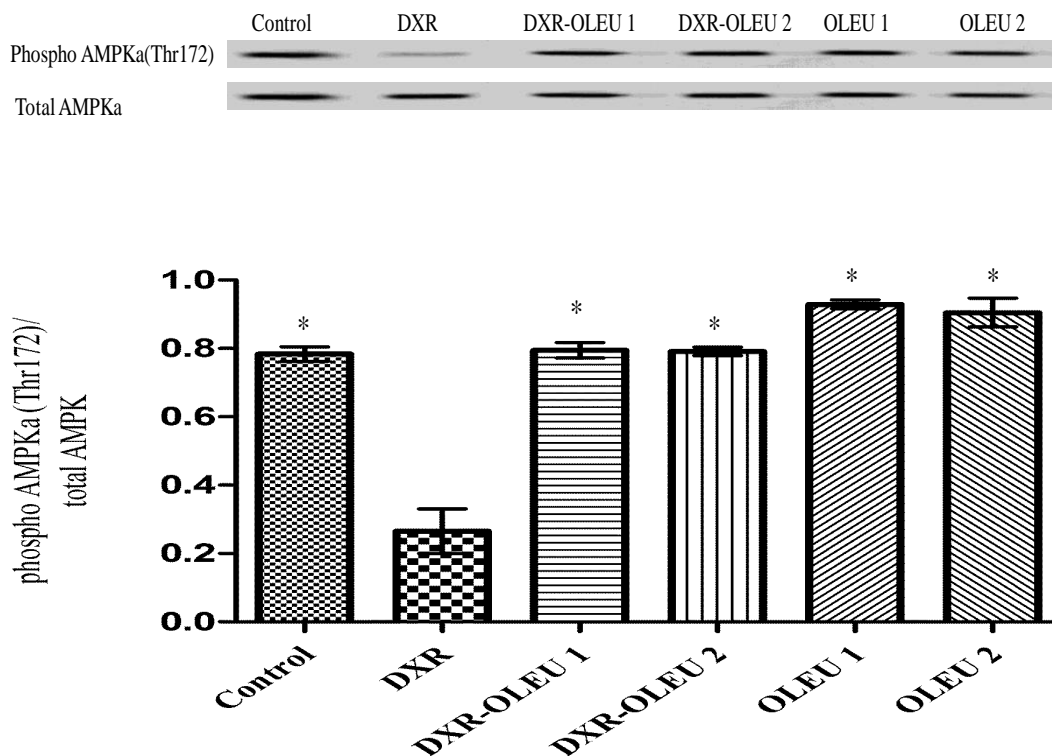
Η Akt κινάση πέρα απο την ρυθμιστική δράση στην ανάπτυξη των μυοκαρδιακών κυττάρων διαδραματίζει έναν πολύ σημαντικό ρόλο που αφορά στην αναστολή των προαποπτωτικών μορίων στα μυοκαρδιακά κύτταρα που συμβάλουν στην εκδήλωση της καρδιακής ανεπάρκειας. Ο προσδιορισμός του λόγου της pAkt (Ser⁴⁷³)/tAkt στα καρδιομυοκύτταρα με τη μέθοδο western blot κατέδειξε ότι η χορήγηση της DXR μειώνει σημαντικά τα επίπεδά της, σε σχέση με τις ομάδες OLEU-1, OLEU-2, DXR-OLEU-1 και DXR-OLEU-2 όπως φαίνεται στο Σχήμα 18.



Σχήμα 18. Αντιπροσωπευτικά δείγματα Western blots και μέσος λόγος πυκνότητας των pAkt (Ser⁴⁷³)/tAkt των ελεγχόμενων ομάδων. *P<0,05 vs Control, DXR.

Η AMPK κινάση ως ρυθμιστής του καρδιακού ενεργειακού μεταβολισμού έχει ως κύριο στόχο την προώθηση της παραγωγής ATP έναντι της χρησιμοποίησής του, διεργασία πολύ σημαντική στις αυξημένες ενεργειακές απαιτήσεις των μυοκαρδιακών κυττάρων. Ο προσδιορισμός του λόγου της pAMPK (Thr¹⁷²)/tAMPK στα καρδιομυοκύτταρα με τη μέθοδο western blot κατέδειξε ότι η χορήγηση της DXR

μειώνει σημαντικά τα επίπεδά της, σε σχέση με τις ομάδες Control, OLEU-1, OLEU-2, DXR-OLEU-1 και DXR-OLEU-2 όπως φαίνεται στο Σχήμα 19.



Σχήμα 19. Αντιπροσωπευτικά δείγματα Western blots και μέσος λόγος πυκνότητας των pAMPK (Thr¹⁷²)/tAMPK των ελεγχόμενων ομάδων. *P<0,05 DXR vs Control, DXR-OLEU-1, DXR-OLEU-2, OLEU-1, OLEU-2.

4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΜΕΤΑΒΟΝΟΜΙΚΗΣ

4.1 Μελέτη του μεταβολικού προφίλ υδατικού εκχυλίσματος ιστού καρδιάς επίμυων με NMR

4.1.1 Φάσμα ^1H – NMR υδατοδιαλυτού εκχυλίσματος καρδιακού ιστού της ομάδας ελέγχου (Control)

Η ανάλυση μέσω φασματοσκοπίας NMR βιολογικών υγρών και ιστών, βασίζεται στις αλλαγές του μεταβολικού προφίλ και μπορεί να βοηθήσει στην πρόβλεψη αποτελεσμάτων όπως η ανταπόκριση σε ένα φάρμακο, η πιθανή τοξικότητα ή η εξέλιξη μιας ασθένειας. Συνήθως τα φάσματα είναι πολύ περίπλοκα και έτσι η ταυτοποίηση των μεταβολιτών καταλήγει μια δύσκολη εργασία. Χαρακτηριστικά παραδείγματα αυτής της πολυπλοκότητας είναι τα φάσματα ούρων ¹⁷⁵, πλάσματος ¹⁷⁶, αλλά επίσης και εκχυλισμάτων ήπατος ^{176,177}. Αντιθέτως, στο φάσμα εκχυλίσματος καρδιακού ιστού ο αριθμός των μεταβολιτών, που είναι σε ποσότητα επαρκή για να μπορούν να ταυτοποιηθούν με την φασματοσκοπία NMR, μοιάζει να περιορίζεται και οι κορυφές να είναι σχετικά οξείες.

Ελήφθησαν φάσματα ^1H -NMR του υδατικού εκχυλίσματος καρδιακού ιστού από 6 φυσιολογικούς επίμυες τύπου Wistar ως ομάδα ελέγχου. Οι συνθήκες απόκτησης των φασμάτων ήταν πανομοιότυπες για όλα τα δείγματα. Στο Σχήμα 20 παρουσιάζεται ένα χαρακτηριστικό φάσμα της ομάδας των Control, στο οποίο η κορυφή στα 0 ppm αντιστοιχεί στο πρότυπο μέσω TSP.

Σχήμα 20. Φάσμα $^1\text{H-NMR}$ υδατικού εκχυλίσματος καρδιακού ιστού φυσιολογικού επίμου.

Οι δύο περιοχές της βάσης του φάσματος παρουσιάζονται στη συνέχεια ξεχωριστά, διαιρεμένες σε 3 φασματικές περιοχές για την καλύτερη διάκριση των κορυφών. Στο Σχήμα 21 παρουσιάζεται η αρωματική περιοχή του φάσματος του εκχυλίσματος καρδιακού ιστού από 6,00 ppm έως 9,00 ppm. Παρατηρούνται η κορυφές των μεταβολιτών, η ταυτοποίηση των οποίων έγινε σύμφωνα με τη βιβλιογραφία η οποία αναφέρεται σε εφαρμογές της φασματοσκοπίας NMR σε βιολογικά υγρά, και την βιβλιοθήκη του εργαστηρίου σύμφωνα με πειράματα spiked¹⁷⁸⁻¹⁸¹.

Σχήμα 21. Αρωματική περιοχή του φάσματος $^1\text{H-NMR}$ (6,00-9,00 ppm) του υδατικού εκχυλίσματος καρδιάς φυσιολογικού επίμου.

Παρατηρούνται οι εξής κορυφές: 1) στα 6,09 ppm η διπλή κορυφή της ινοσίνης, 2) στα 6,52 ppm η απλή κορυφή του φουμαρικού οξέος, 3) στα 6,91 ppm η πολλαπλή κορυφή της τυροσίνης, 4) στα 7,19 ppm η άλλη πολλαπλή κορυφή της τυροσίνης, 5) στα 7,35 ppm η πολλαπλή κορυφή της φαινυλαλανίνης, 5) στα 8,20 ppm η απλή κορυφή της ινοσίνης, 6) στα 8,34 ppm η άλλη μονή κορυφή της ινοσίνης, 7) στα 8,45 ppm η απλή κορυφή του μυρμηκικού οξέος και 8) στα 8,95 ppm η κορυφή του νικοτινικού οξέος.

Στο Σχήμα 22 παρουσιάζεται η αλειφατική περιοχή του φάσματος από 3,00 έως 4,00 ppm. Παρατηρούνται οι χαρακτηριστικές κορυφές των: 1) κρεατίνης στα 3,03 ppm, 2) χολίνης στα 3,23 ppm, 3) ταυρίνης στα 3,27 και 3,42 ppm, δύο τριπλέτες, 4) γλυκίνης στα 3,57 ppm, 5) γλυκερόλης στα 3,65 ppm, 6) ινοσίνης στην περιοχή μεταξύ 3,85-3,92 ppm, 7) κρεατίνης στα 3,93 ppm και 8) γαλακτικού στα 4,11 ppm.

Σχήμα 22. Αλειφατική περιοχή από 3,00 έως 4,00 ppm του φάσματος $^1\text{H-NMR}$ υδατικού καρδιακού εκχυλίσματος φυσιολογικού επίμου.

Στο Σχήμα 23 παρουσιάζεται η αλειφατική περιοχή του φάσματος από 1,00 έως 2,90 ppm. Παρατηρούνται οι χαρακτηριστικές κορυφές των: 1) ισολευκίνης, λευκίνης και βαλίνης στην περιοχή από 0,90 έως 1,05 ppm, 2) γαλακτικού στα 1,33 ppm, 3) αλανίνης στα 1,49 ppm, 3) οξικού στα 1,92 ppm, 4) γλουταμικού και γλουταμίνης στην περιοχή μεταξύ 2,07 και 2,17 ppm και στα 2,34 ppm του γλουταμικού, 5) σουκκινικού στα 2,39 ppm και 6) ασπαρτικού στα 2,62 και στα 2,82 ppm^{182,183}.

Σχήμα 23. Αλειφατική περιοχή από 1,00 έως 3,00 ppm του φάσματος $^1\text{H-NMR}$ υδατικού εκχυλίσματος καρδιάς φυσιολογικού επίμου.

Εκτός από τα παραπάνω φάσματα μίας διάστασης τα οποία ελήφθησαν για όλα τα δείγματα ελήφθησαν επίσης και ορισμένα φάσματα δύο διαστάσεων COSY, TOCSY, Jresolved και HSQC ώστε να καταστεί δυνατή η πλήρης αναγνώριση όλων των μεταβολιτών. Τυπικά δείγματα των φασμάτων αυτών φαίνονται στα Σχήματα 24 με 27.

Σχήμα 24. Φάσμα (^1H - ^1H) COSY υδατικού εκχυλίσματος καρδιάς φυσιολογικού επίμυ. Φαίνονται καθαρά οι κορυφές συσχέτισης του γαλακτικού στα 1,33 ppm και 4,11 ppm.

Σχήμα 25. Φάσμα $^1\text{H-NMR}$ Jresolved υδατικού εκχυλίσματος καρδιάς φυσιολογικού επίμυ. Στην επέκταση φαίνεται καθαρά η διπλή κορυφή του γαλακτικού στα 1,33 ppm και της αλανίνης στα 1,49 ppm.

Σχήμα 26. Φάσμα TOCSY υδατικού εκχυλίσματος καρδιάς φυσιολογικού επίμυ.

Σχήμα 27. Φάσμα DEPT135-HSQC υδατικού εκχυλίσματος καρδιάς φυσιολογικού επίμυ.

4.1.2 Σύγκριση μεταξύ των φασμάτων ^1H – NMR υδατικού καρδιακού εκχυλίσματος μαρτύρων, επιμύων στους οποίους χορηγήθηκε αδριαμυκίνη, επιμύων στους οποίους χορηγήθηκε αδριαμυκίνη και ολευρωπαΐνη και επίμυων στους οποίους χορηγήθηκε ολευρωπαΐνη

Η σύγκριση ανάμεσα στα φάσματα της ομάδας ελέγχου και στα φάσματα των άλλων ομάδων παρουσιάζεται στα Σχήματα 28,29 και 30.

Σχήμα 28. Σύγκριση ανάμεσα στα φάσματα $^1\text{H-NMR}$ υδατικού εκχυλίσματος καρδιάς. Αρωματική περιοχή.

Σχήμα 29. Σύγκριση ανάμεσα στα φάσματα $^1\text{H-NMR}$ υδατικού εκχυλίσματος καρδιάς. Αλειφατική περιοχή ανάμεσα στα 3,00 και 4,00 ppm.

Σχήμα 30. Σύγκριση ανάμεσα στα φάσματα $^1\text{H-NMR}$ υδατικού εκχυλίσματος καρδιάς. Αλειφατική περιοχή ανάμεσα στα 1,00 και 3,00 ppm.

Οι κορυφές των μεταβολιτών παραμένουν οι ίδιες σε όλα τα φάσματα, και δεν παρατηρούνται νέες κορυφές σε καμία από τις 6 ομάδες.

Από την σύγκριση των φασμάτων παρατηρείται αύξηση της έντασης των κορυφών του γαλακτικού, της αλανίνης, του σουκκινικού (ηλεκτρικού οξέος), της γλουταμίνης και της ταυρίνης στη ομάδα DXR στην οποία χορηγήθηκε αδριαμυκίνη, σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου. Επίσης, πάντα από τη σύγκριση ανάμεσα σε αυτές τις δύο ομάδες, παρατηρείται ότι στην ομάδα DXR μειώνονται οι εντάσεις των κορυφών του ακετοξικού, του γλουταμικού, του ασπαρτικού οξέος και του φορμικού οξέος.

Από τη σύγκριση των φασμάτων παρατηρείται επίσης πως στις ομάδες στις οποίες συγχρηγήθηκαν αδριαμυκίνη και ολευρωπαΐνη, υπάρχει μείωση της έντασης των κορυφών των μεταβολιτών που αυξήθηκαν στην ομάδα DXR.

Οι παρατηρούμενες μεταβολές μελετήθηκαν περαιτέρω με στατιστική επεξεργασία των φασμάτων και με ποσοτικό προσδιορισμό των ενδογενών μεταβολιτών.

4.2.1 Στατιστική ανάλυση PCA και PLS-DA

Η μεταβονομική ανάλυση του βιολογικού υλικού που βασίζεται στα φάσματα NMR μπορεί να διευκολυνθεί μέσω μεθόδων PR (Pattern Recognition). Δύο από αυτές τις μεθόδους είναι η ανάλυση των κύριων συνιστωσών PCA και η ανάλυση διάκρισης Partial Least Squares (μερικών ελάχιστων τετραγώνων) PLS-DA. Η πρώτη μέθοδος είναι μια μέθοδος μη επιβλεπόμενη ενώ η δεύτερη είναι μια μέθοδος επιβλεπόμενη, που σημαίνει πως η ταξινόμηση των δειγμάτων σε χωριστές ομάδες επιβάλεται στη δημιουργία του στατιστικού μοντέλου από εμάς.

Με τη στατιστική ανάλυση, είναι δυνατόν να εξαχθούν συμπεράσματα για τις ομοιότητες ή τις διαφορές των φασμάτων NMR των 6 ομάδων, λαμβάνοντας υπ' όψιν ολόκληρο το φάσμα και όχι συγκρίνοντας συγκεκριμένους μόνο μεταβολίτες. Με αυτό τον τρόπο είναι δυνατό να εξάγουμε την “κρυμμένη” πληροφορία που μπορεί να βρίσκεται στο φάσμα. Η παρουσίαση των διαγραμμάτων των scores των κύριων συστατικών, δίνει πληροφορίες για τις ομοιότητες ή τις διαφορές των φασμάτων, ενώ τα διαγράμματα των φορτίων δίνουν πληροφορίες για τις κορυφές NMR που είναι υπεύθυνες για την ομαδοποίηση. Εφαρμόστηκε ο μετασχηματισμός Pareto για την επίτευξη του καλύτερου διαχωρισμού των ομάδων .

Στη συνέχεια παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της εφαρμογής των στατιστικών μεθόδων στα φάσματα των δειγμάτων υδατικού εκχυλίσματος καρδιάς των 6 ομάδων που μελετήθηκαν.

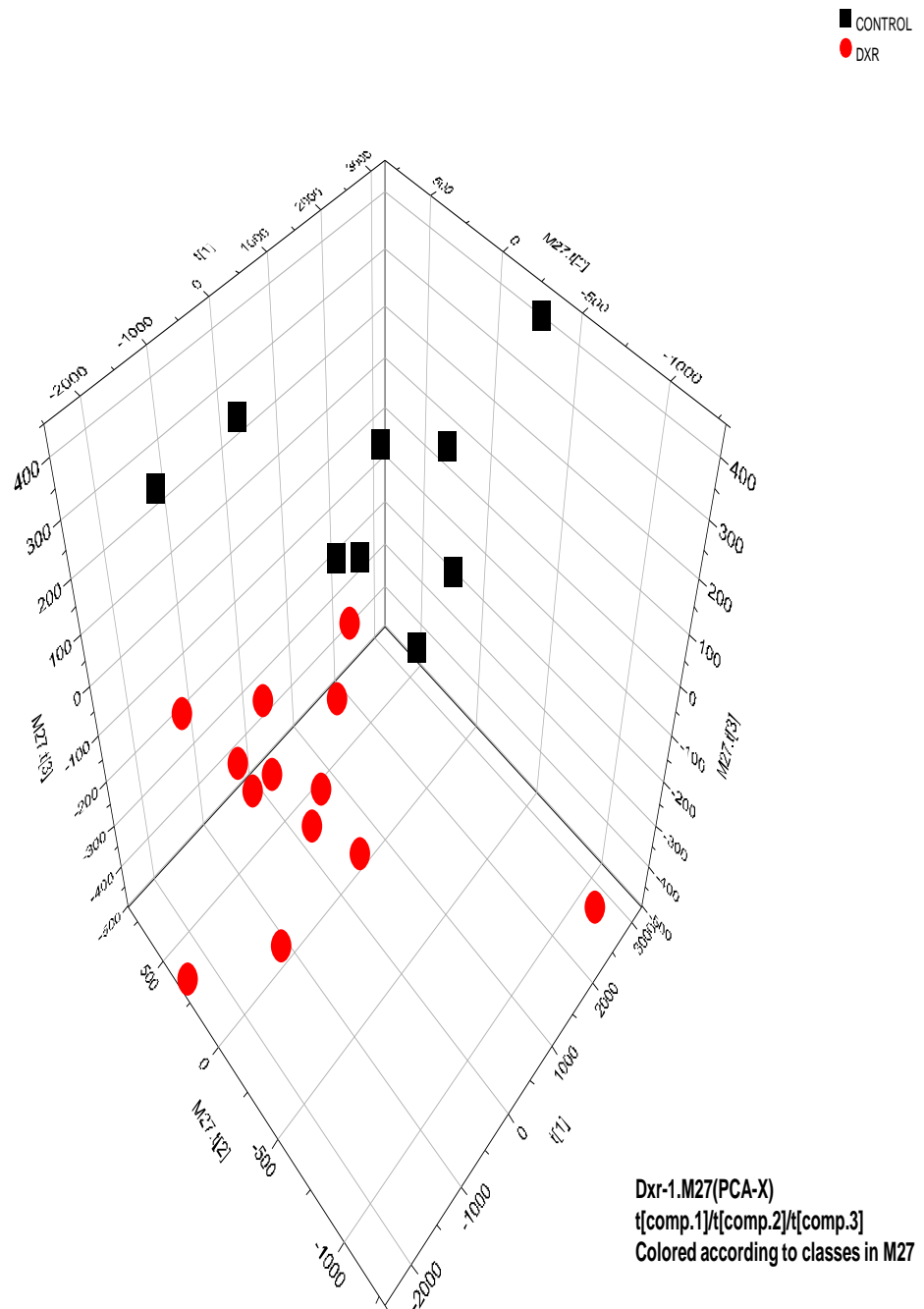
1) Σύγκριση μεταξύ της πρώτης ομάδας (Control) και της δεύτερης ομάδας (DXR).

Στο Σχήμα 31 παρουσιάζεται το διάγραμμα PCA και στο Σχήμα 32 το διάγραμμα PLS-DA των συντεταγμένων, με μετασχηματισμό Pareto, των φασμάτων $^1\text{H-NMR}$ της 1^{ης} ομάδας (Control) και της 2^{ης} ομάδας (DXR) στην οποία χορηγήθηκε αδριαμυκίνη.

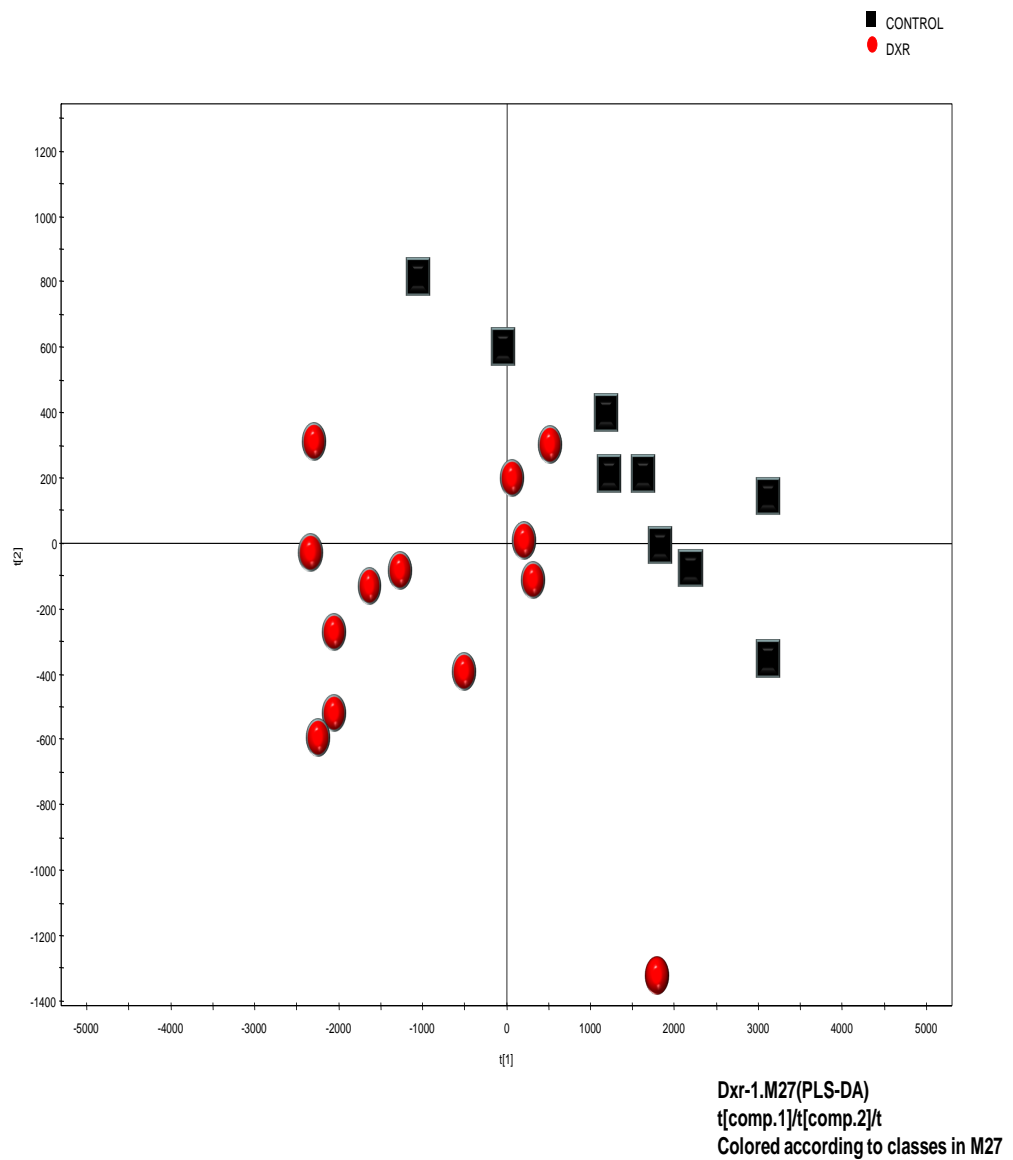
Παρατηρούμε την σαφή διάκριση ανάμεσα στην ομάδα Ελέγχου και στην ομάδα στην οποία χορηγήθηκε αδριαμυκίνη (DXR).

Το διάγραμμα των φορτίων (loadings), όπως προκύπτει από το πρόγραμμα SIMCA για το μοντέλο του Σχήματος 32, παρουσιάζεται στο Σχήμα 33.

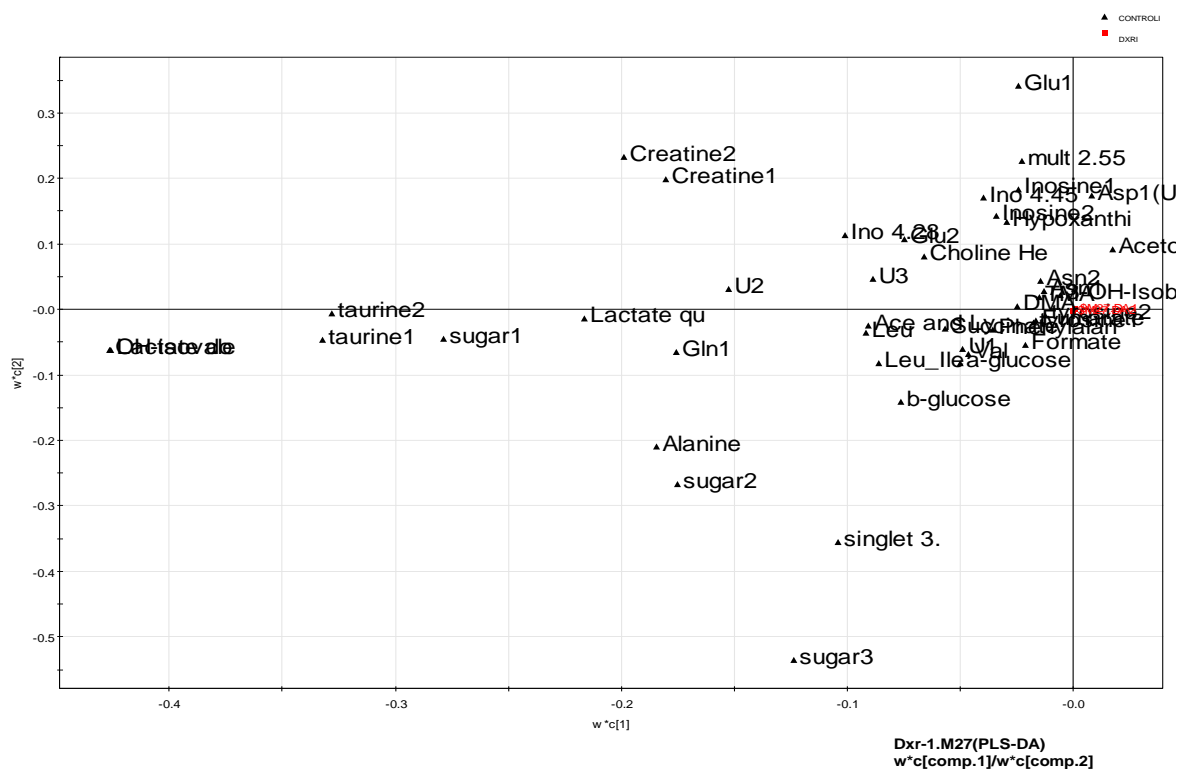
Από το διάγραμμα των φορτίων παρατηρείται πως η διάκριση οφείλεται στην κορυφή του γαλακτικού στα 1,33 και 4,11 ppm, στην κορυφή της ταυρίνης στα 3,27 και 3,42 ppm, στην κορυφή του γλουταμικού στα 2,35 ppm, στην κορυφή της χολίνης στα 3,25 ppm και στην κορυφή της κρεατίνης στα 3,93 ppm. Φαίνεται ότι οι περισσότεροι μεταβολίτες εμφανίζονται αυξημένοι μετά από χρόνια χορήγηση της DXR και επαγωγή καρδιακής ανεπάρκειας. Ο μόνος μεταβολίτης ο οποίος βρέθηκε να μειώνεται στην ομάδα της DXR ήταν το ακετοξικό.



Σχήμα 31. Διάγραμμα των συντεταγμένων PCA των φασμάτων της ομάδας των Control και των φασμάτων της ομάδας της DXR. Πλήρης διαχωρισμός των 2 ομάδων με βάση το μεταβολικό τους προφίλ ($PC_1=65\%$, $PC_2=9\%$, $Q^2=0,66$ και $R^2=0,82$).



Σχήμα 32. Διάγραμμα των συντεταγμένων PLS-DA των φασμάτων της ομάδας των Control και των φασμάτων της ομάδας της DXR ($PC_1=64\%$, $PC_2=10\%$, $Q^2=0,57$ και $R^2=0,74$).



Σχήμα 33. Διάγραμμα των φορτίων των φασμάτων της ομάδας των Control και των φασμάτων της ομάδας της DXR.

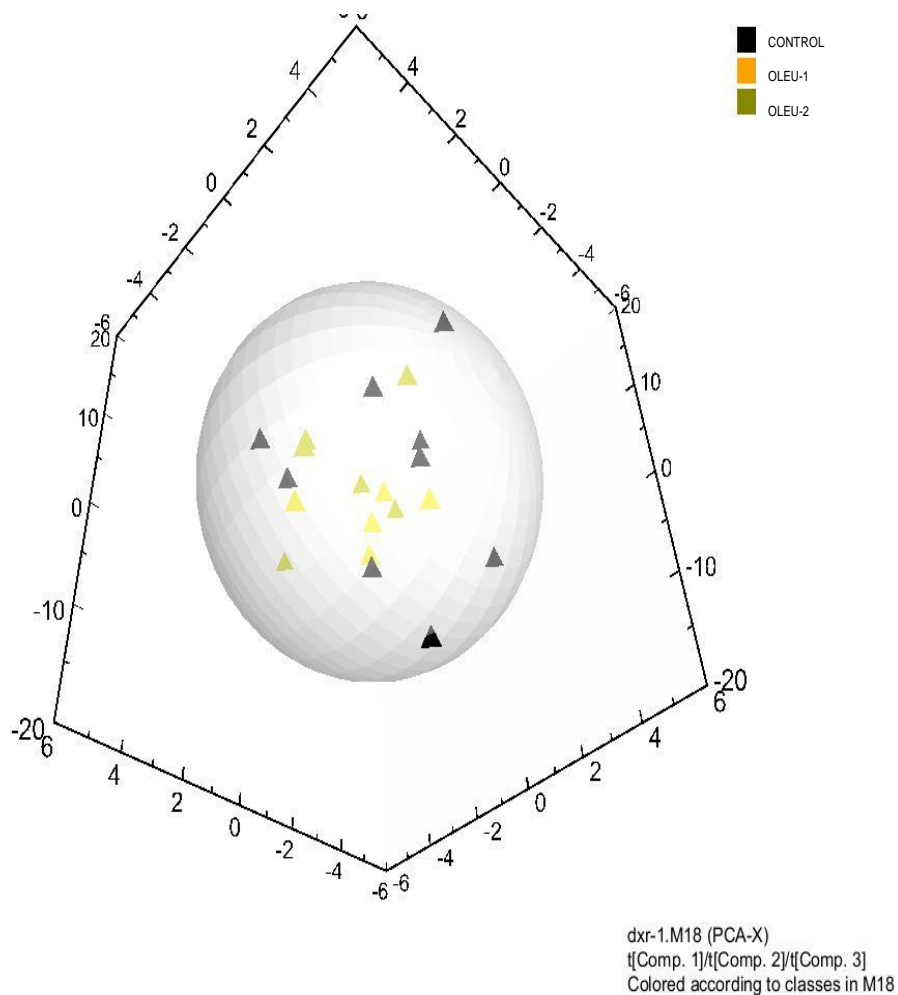
2) Σύγκριση μεταξύ της πρώτης ομάδας (Control) και των ομάδων στις οποίες χορηγήθηκε ολευρωπαΐνη α) σε χαμηλή δόση 1000 mg/kg (OLEU-1) (Ομάδα 5) και β) σε υψηλή δόση 2000 mg/kg (OLEU-2) (Ομάδα 6).

Στο Σχήμα 34 παρουσιάζεται το διάγραμμα PCA, με μετασχηματισμό Pareto, των φασμάτων $^1\text{H-NMR}$ της 1^{ης} ομάδας (Control) και της 5^{ης} ομάδας (OLEU-1) στην οποία χορηγήθηκε ολευρωπαΐνη σε χαμηλή δόση, 1000 mg/kg, και της 6^{ης} ομάδας (OLEU-2) στην οποία χορηγήθηκε ολευρωπαΐνη σε υψηλή δόση, 2000 mg/kg.

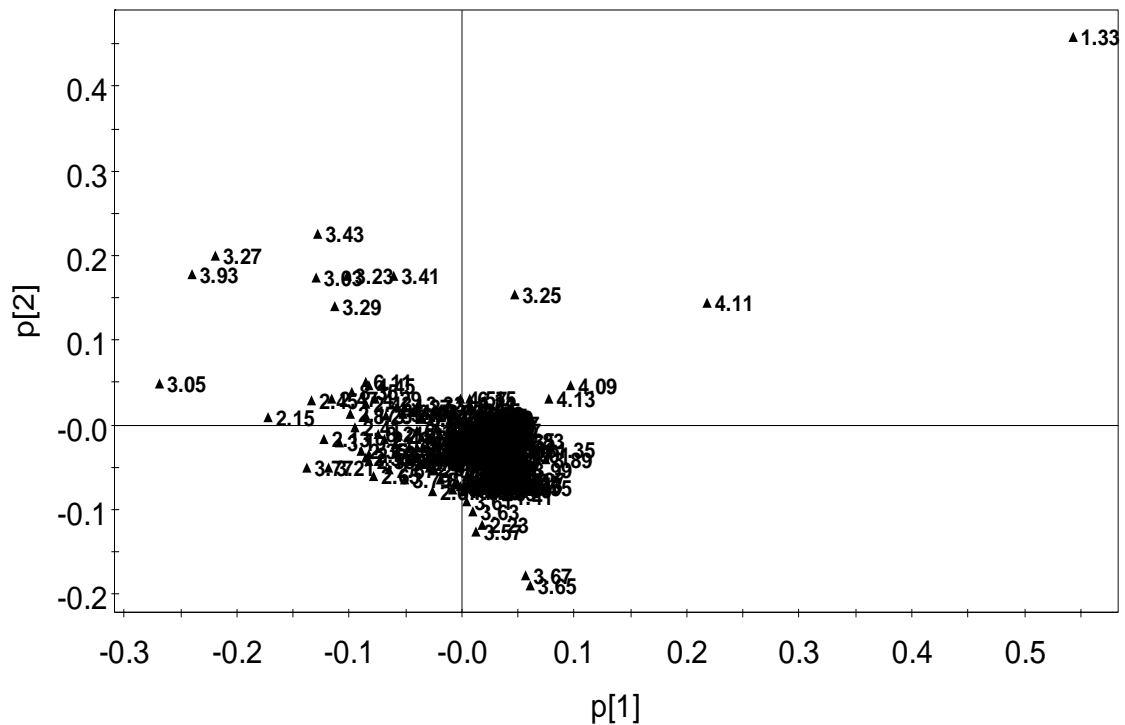
Δεν παρατηρείται διάκριση ανάμεσα στην ομάδα ελέγχου και στην ομάδα στην οποία χορηγήθηκε ολευρωπαΐνη 1000 mg/kg. Ενώ παρατηρείται μια μικρή αλλά όχι σαφής διάκριση ανάμεσα στην ομάδα ελέγχου και στην ομάδα στην οποία χορηγήθηκε ολευρωπαΐνη 2000 mg/kg.

Το διάγραμμα των φορτίων (loadings), όπως προκύπτει από το πρόγραμμα SIMCA για το μοντέλο του Σχήματος 34, παρουσιάζεται στο Σχήμα 35.

Από το διάγραμμα των φορτίων παρατηρείται πως η μικρή, αλλά όχι σαφής, διάκριση ανάμεσα στην ομάδα ελέγχου και την ομάδα OLEU-2 που οφείλεται στις κορυφές του γαλακτικού στα 1,33 και 4,11 ppm .



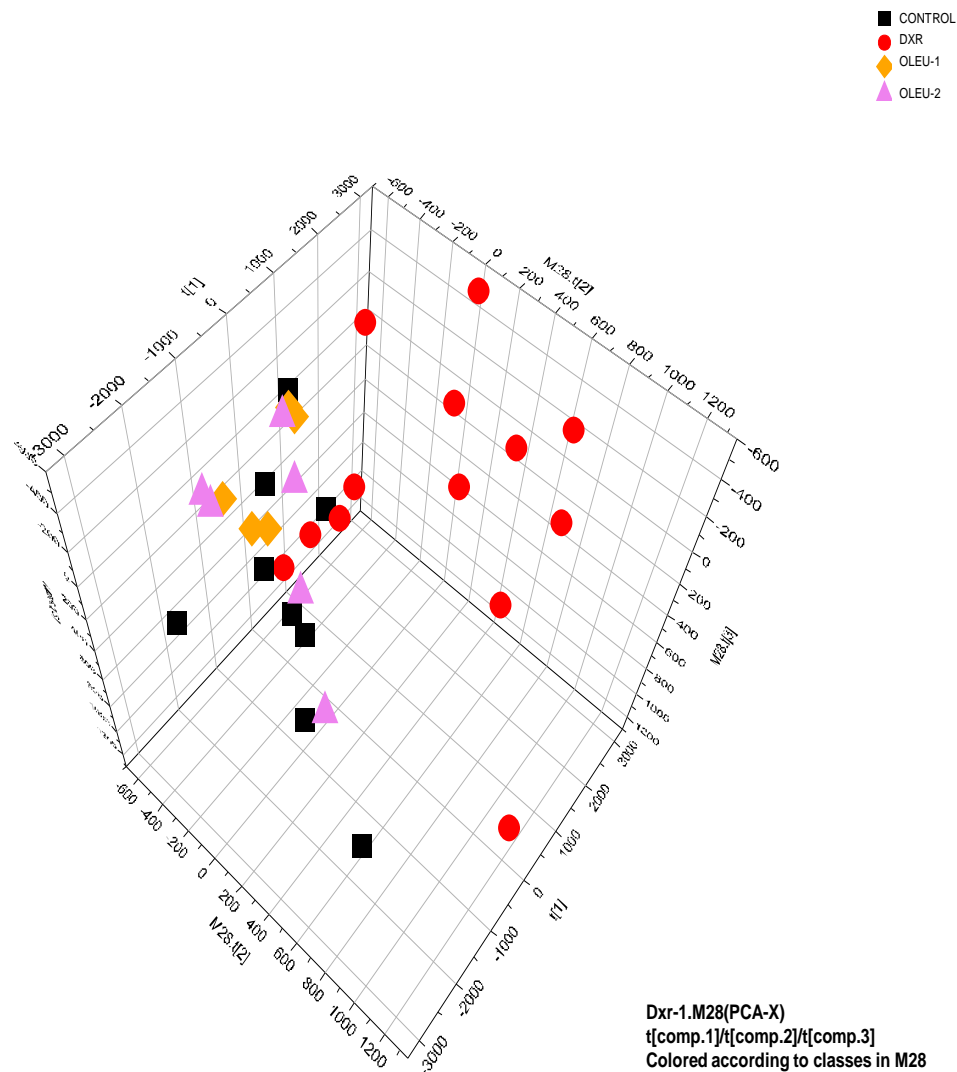
Σχήμα 34. Διάγραμμα των συντεταγμένων των φασμάτων της ομάδας των Control και των φασμάτων της ομάδας OLEU-1 και της ομάδας OLEU-2 ($PC_1=68\%$, $PC_2=8\%$, $Q^2=0,66$ και $R^2=0,84$).



Σχήμα 35. Διάγραμμα των φορτίων των φασμάτων της ομάδας των Control και των φασμάτων της ομάδας OLEU-1 και της ομάδας OLEU-2.

3) Σύγκριση μεταξύ της πρώτης ομάδας (Control), της δεύτερης ομάδας (DXR), της πέμπτης ομάδας (OLEU-1) και της έκτης ομάδας (OLEU-2).

Στο Σχήμα 36 παρουσιάζεται το διάγραμμα PCA στις 3 διαστάσεις. Σε αυτό το διάγραμμα παρατηρείται μια σαφής διάκριση ανάμεσα στην ομάδα ελέγχου (Control) και στην ομάδα της DXR. Επίσης, παρατηρείται μια σαφής διάκριση των ομάδων ελέγχου και DXR από τις ομάδες OLEU-1 και OLEU-2. Τέλος, οι ομάδες OLEU-1 και OLEU-2, μοιάζουν να καταλαμβάνουν γειτονικές θέσεις στο χώρο που οριοθετείται από την έλλειψη στο διάγραμμα.

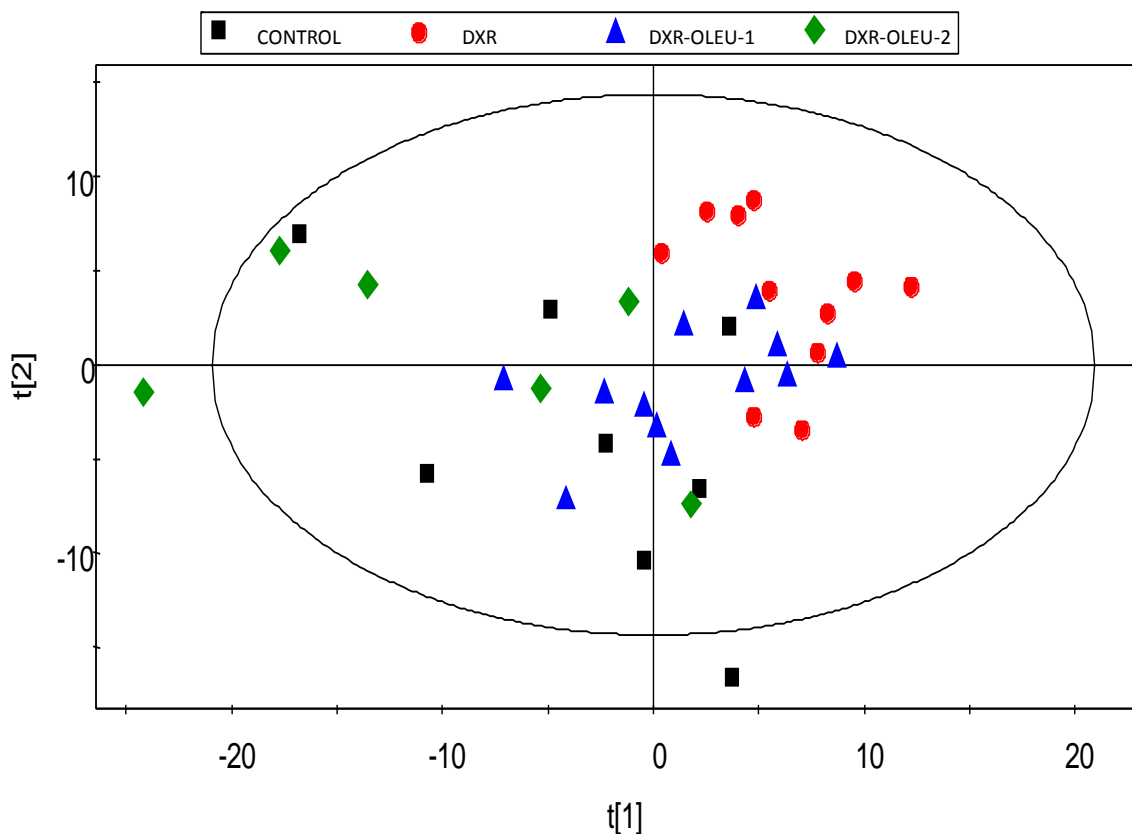


Σχήμα 36. Διάγραμμα 3D των συντεταγμένων των φασμάτων $^1\text{H-NMR}$ της 1^{ης} ομάδας (Control), της 2^{ης} ομάδας (DXR), της 5^{ης} ομάδας (OLEU-1) και της 6^{ης} ομάδας (OLEU-2) ($\text{PC}_1=67\%$, $\text{PC}_2=8\%$, $\text{Q}^2=0,71$ και $\text{R}^2=0,82$).

4) Σύγκριση ανάμεσα στην πρώτη ομάδα (Control), τη δεύτερη ομάδα (DXR), την τρίτη ομάδα (DXR-OLEU-1) και την τέταρτη ομάδα (DXR-OLEU-2).

Στο Σχήμα 37 παρουσιάζεται το διάγραμμα PCA, με μετασχηματισμό Pareto, των φασμάτων $^1\text{H-NMR}$ της 1^{ης} ομάδας (Control), της 2^{ης} ομάδας (DXR), στην οποία χορηγήθηκε αδριαμυκίνη, της 3^{ης} ομάδας (DXR-OLEU-1), στην οποία χορηγήθηκε αδριαμυκίνη και ολευρωπαΐνη, σε χαμηλή δόση, 1000 mg/kg, και της 4^{ης} ομάδας (DXR-OLEU-2), στην οποία χορηγήθηκε αδριαμυκίνη και ολευρωπαΐνη σε υψηλή δόση, 2000 mg/kg.

Παρατηρείται μια σαφής διάκριση ανάμεσα στην ομάδα Ελέγχου και την ομάδα DXR, στην οποία χορηγήθηκε αδριαμυκίνη. Επίσης, παρατηρείται μια σαφής διάκριση ανάμεσα στην ομάδα DXR και την ομάδα DXR-OLEU-2, στην οποία χορηγήθηκε αδριαμυκίνη και ολευρωπαΐνη σε υψηλή δόση, ενώ η ομάδα DXR-OLEU-2 φαίνεται καθαρά πως μετατοπίζεται προς την ομάδα ελέγχου. Παρατηρείται επίσης πως η ομάδα DXR-OLEU-1, στην οποία χορηγήθηκε αδριαμυκίνη και ολευρωπαΐνη σε χαμηλή δόση, δεν διακρίνεται ούτε από την ομάδα ελέγχου ούτε από την ομάδα DXR .



Σχήμα 37. Διάγραμμα των συντεταγμένων των φασμάτων $^1\text{H-NMR}$ της 1^{ης} ομάδας (Control), της 2^{ης} ομάδας (DXR), της 3^{ης} ομάδας (DXR-OLEU-1), και της 4^{ης} ομάδας (DXR-OLEU-2) ($\text{PC}_1=80\%$, $\text{PC}_2=5\%$, $Q^2=0,83$ και $R^2=0,95$).

5) Σύγκριση μεταξύ της πρώτης ομάδας (Control), της δεύτερης ομάδας (DXR) και της τρίτης ομάδας (DXR-OLEU-1).

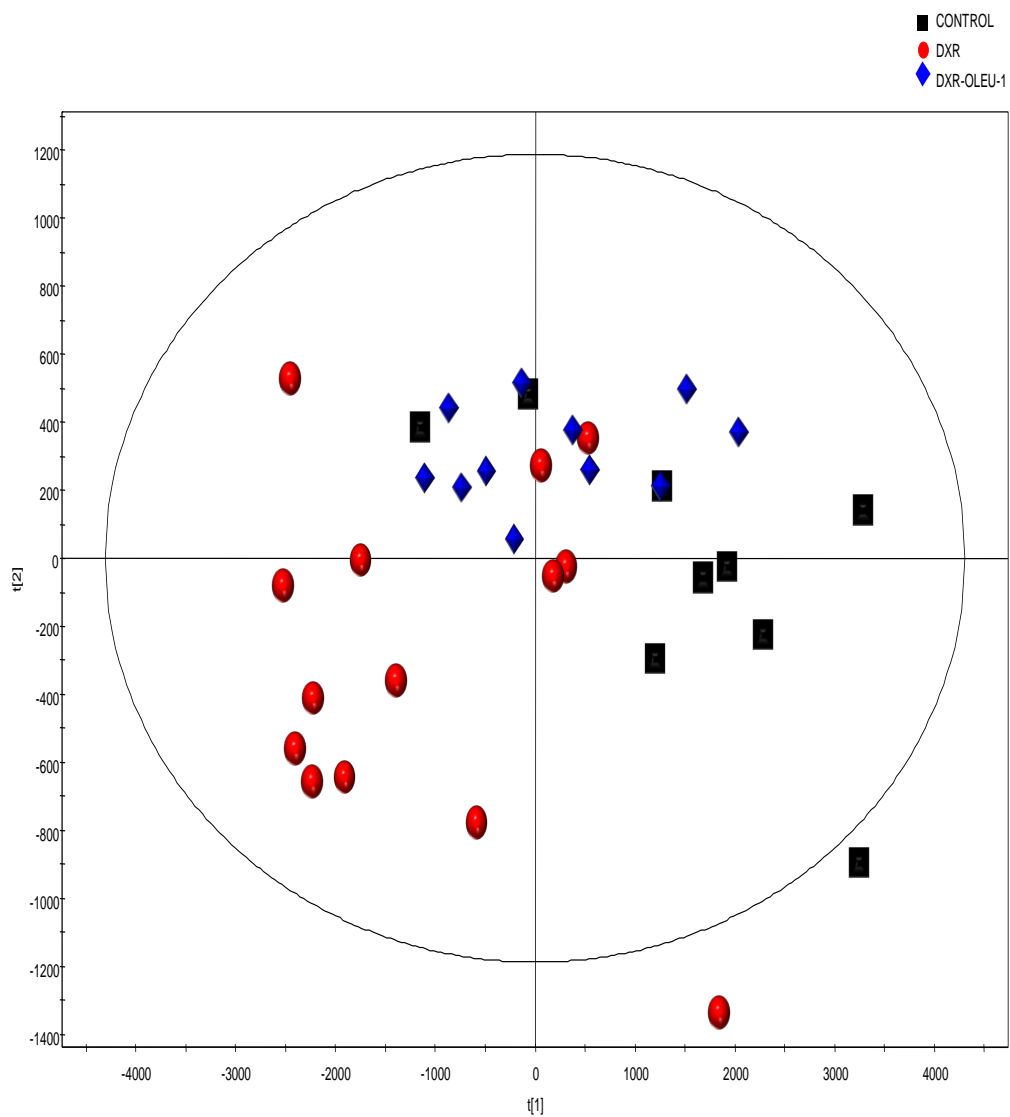
Στο Σχήμα 38 παρουσιάζεται το διάγραμμα PCA, με μετασχηματισμό Pareto, των φασμάτων $^1\text{H-NMR}$ της 1^{ης} ομάδας (Control), της 2^{ης} ομάδας (DXR), στην οποία χορηγήθηκε αδριαμκίνη, της 3^{ης} ομάδας (DXR-OLEU-1), στην οποία χορηγήθηκε αδριαμκίνη και ολευρωπαΐνη σε χαμηλή δόση 1000 mg/kg.

Παρατηρείται μια σαφής διάκριση ανάμεσα στην ομάδα ελέγχου και στην ομάδα DXR, στην οποία χορηγήθηκε αδριαμκίνη, και μια σαφής διάκριση ανάμεσα στην ομάδα DXR-OLEU-1, στην οποία χορηγήθηκε αδριαμκίνη και ολευρωπαΐνη σε χαμηλή δόση, από την ομάδα ελέγχου. Παράλληλα, δεν παρατηρείται σαφής διάκριση ανάμεσα στην ομάδα DXR-OLEU-1, στην οποία χορηγήθηκε αδριαμκίνη

και ολευρωπαΐνη σε χαμηλή δόση, από την ομάδα DXR, στην οποία χορηγήθηκε αδριαμυκίνη.

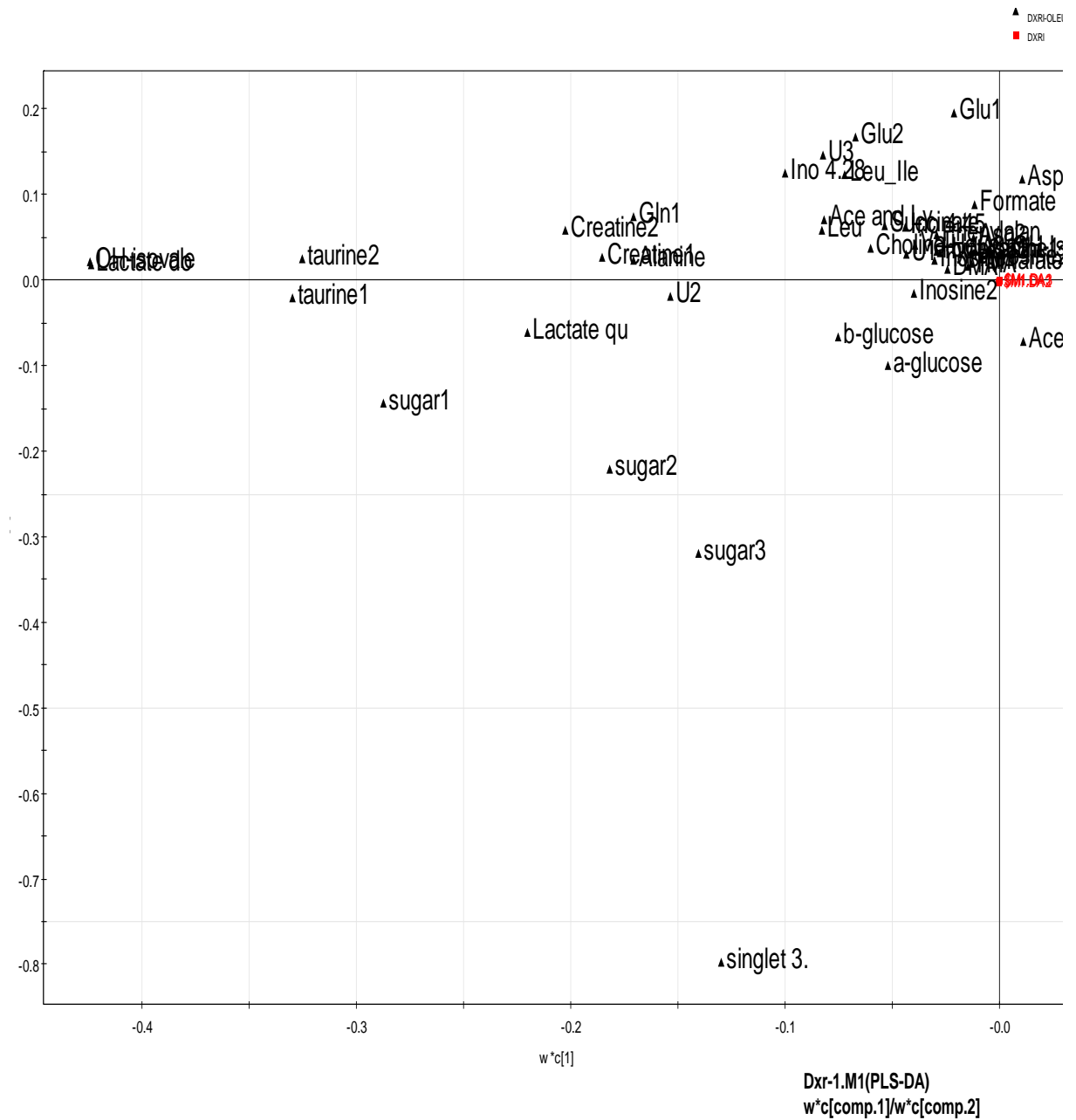
Το διάγραμμα των φορτίων (loadings), όπως προκύπτει από το πρόγραμμα SIMCA για το μοντέλο του Σχήματος 38, παρουσιάζεται στο Σχήμα 39.

Από το διάγραμμα των φορτίων παρατηρείται πως η σαφής διάκριση ανάμεσα στην ομάδα ελέγχου και στην ομάδα DXR οφείλεται στις κορυφές του γαλακτικού στα 1,33 και 4,11 ppm, της ταυρίνης στα 3,27 και 3,42 ppm και της αλανίνης στα 1,49 ppm, για την ομάδα DXR, και στην κορυφή της κρεατίνης στα 3,03 και στα 3,93 ppm, για την ομάδα ελέγχου. Παρατηρείται επίσης πως η διάκριση της ομάδας DXR-OLEU-1 από την ομάδα ελέγχου οφείλεται στις κορυφές της αλανίνης στα 1,49 ppm, του γλουταμικού στα 2,09 και στα 2,34 ppm, και της ινοσίνης στα 3,85-3,92 ppm.



Dxr-1.M1(PLS-DA)
 t[comp.1]/t[comp.2]/t
 Colored according to classes in M1

Σχήμα 38. Διάγραμμα PLS-DA των συντεταγμένων των φασμάτων $^1\text{H-NMR}$ της 1^{ης} ομάδας (Control), της 2^{ης} ομάδας (DXR) και της 3^{ης} ομάδας (DXR-OLEU-1) ($\text{PC}_1=80\%$, $\text{PC}_2=6,6\%$, $Q^2=0,22$ και $R^2=0,96$).



Σχήμα 39. Διάγραμμα των φορτίων των φασμάτων της ομάδας ελέγχου, DXR και DXR-OLEU-1.

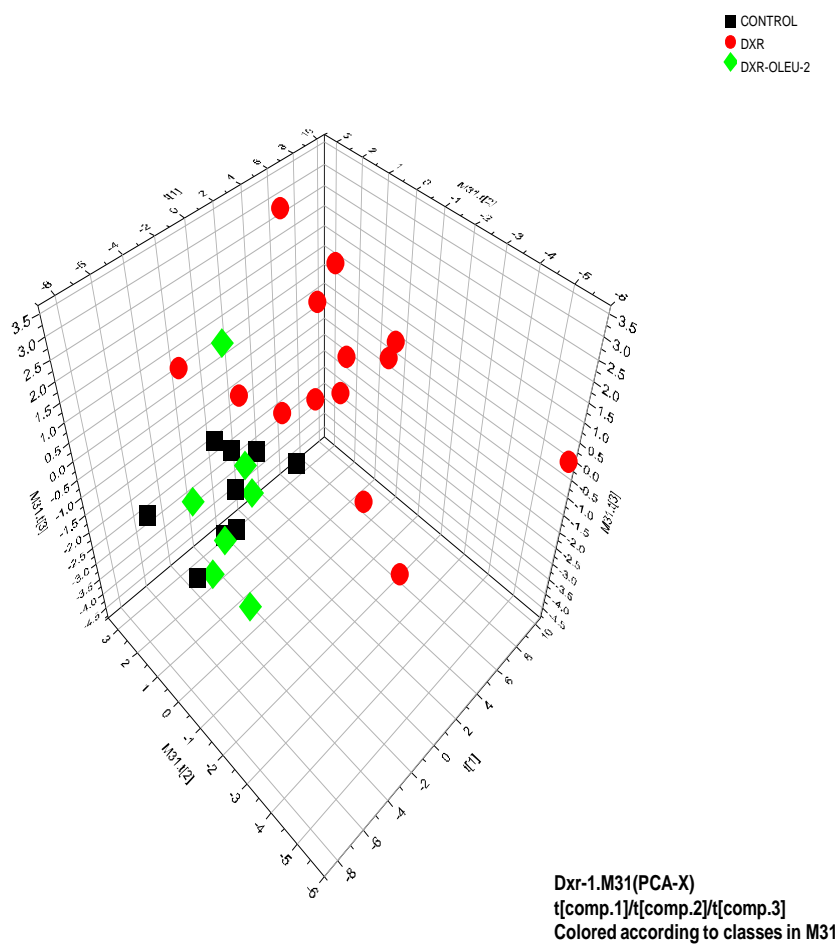
6) Σύγκριση ανάμεσα στην πρώτη ομάδα (Control), την δεύτερη ομάδα (DXR) και την τέταρτη ομάδα DXR-OLEU-2.

Στο Σχήμα 40 παρατηρείται το διάγραμμα PCA, με μετασχηματισμό Pareto, των φασμάτων $^1\text{H-NMR}$ της 1^{ης} ομάδας (Control), της 2^{ης} ομάδας (DXR), στην οποία χορηγήθηκε αδριαμυκίνη, της 4^{ης} ομάδας (DXR-OLEU-2), στην οποία χορηγήθηκε αδριαμυκίνη και ολευρωπαΐνη σε υψηλή δόση 2000 mg/kg.

Παρατηρείται μια σαφής διάκριση ανάμεσα στην ομάδα ελέγχου και την ομάδα DXR, στην οποία χορηγήθηκε αδριαμυκίνη, και μια σαφής διάκριση ανάμεσα στην ομάδα DXR-OLEU-2, στην οποία χορηγήθηκε αδριαμυκίνη και ολευρωπαΐνη σε υψηλή δόση, από την ομάδα ελέγχου και από την ομάδα DXR-OLEU-2, στην οποία χορηγήθηκε αδριαμυκίνη και ολευρωπαΐνη σε υψηλή δόση.

Το διάγραμμα των φορτίων (loadings), όπως προκύπτει από το πρόγραμμα SIMCA για το μοντέλο του Σχήματος 40, παρουσιάζεται στο Σχήμα 41.

Από το διάγραμμα των φορτίων παρατηρείται πως η σαφής διάκριση ανάμεσα στην ομάδα ελέγχου και την ομάδα DXR οφείλεται στις κορυφές του γαλακτικού στα 1,33 και 4,11 ppm, της ταυρίνης στα 3,27 και 3,42 ppm και της αλανίνης στα 1,49 ppm, για την ομάδα DXR, και στις κορυφές της κρεατίνης στα 3,03 και στα 3,93 ppm, της ινοσίνης στα 3,85-3,92 ppm και του γλουταμικού στα 2,09 και στα 2,34 ppm, για την ομάδα ελέγχου. Παρατηρείται επίσης πως η διάκριση της ομάδας DXR-OLEU-2 από την ομάδα ελέγχου και από την ομάδα DXR οφείλεται στην κορυφή της γλυκερόλης στα 3,65 ppm.



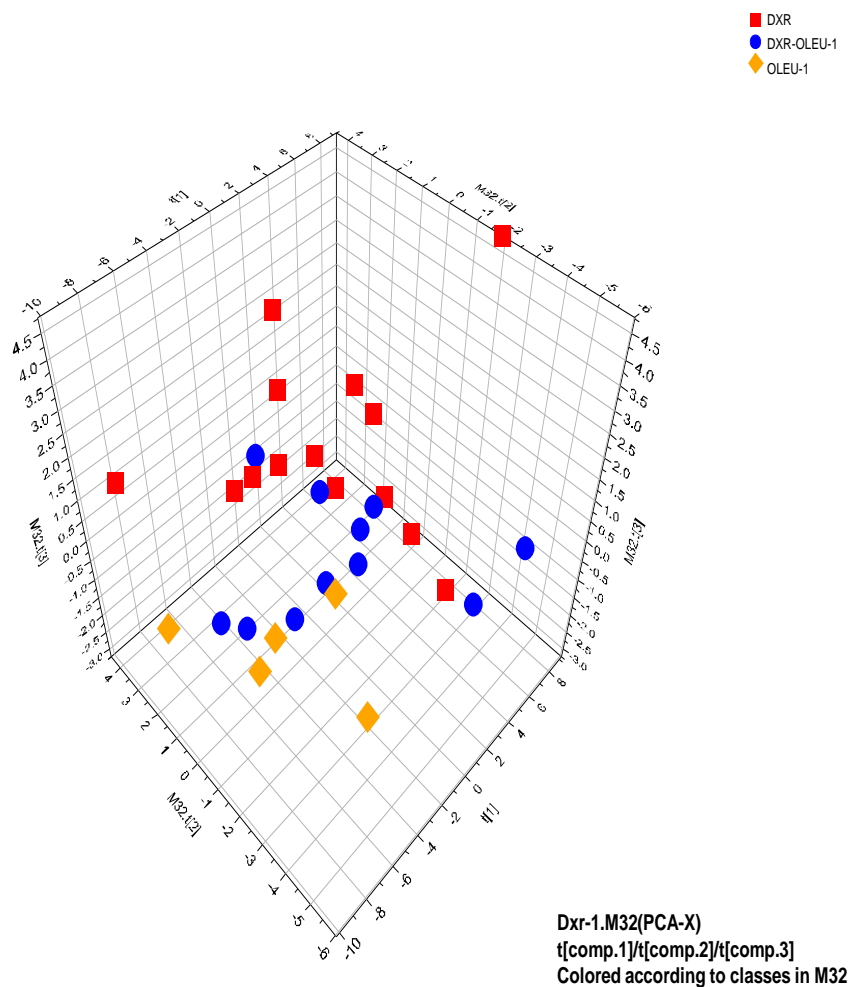
Σχήμα 40. Διάγραμμα των συντεταγμένων των φασμάτων $^1\text{H-NMR}$ της 1^{ης} ομάδας (Control), της 2^{ης} ομάδας (DXR) και της 4^{ης} ομάδας (DXR-OLEU-2) ($\text{PC}_1=68\%$, $\text{PC}_2=8\%$, $Q^2=0,67$ και $R^2=0,82$).

7) Σύγκριση ανάμεσα στη δεύτερη ομάδα (DXR), την τρίτη ομάδα (DXR-OLEU-1) και την πέμπτη ομάδα (OLEU-1).

Στο Σχήμα 42 παρουσιάζεται το διάγραμμα PCA, με μετασχηματισμό Pareto, των φασμάτων $^1\text{H-NMR}$ της 2^{ης} ομάδας (DXR), στην οποία χορηγήθηκε αδριαμυκίνη, της 3^{ης} ομάδας (DXR-OLEU-1), στην οποία χορηγήθηκε αδριαμυκίνη και ολευρωπαΐνη, σε χαμηλή δόση, 1000 mg/kg. Και της 5^{ης} ομάδας (OLEU-1), στην οποία χορηγήθηκε ολευρωπαΐνη σε χαμηλή δόση, 1000 mg/kg.

Παρατηρείται μια σαφής διάκριση ανάμεσα στην ομάδα DXR, στην οποία χορηγήθηκε αδριαμυκίνη, από την ομάδα DXR-OLEU-1, στην οποία χορηγήθηκε αδριαμυκίνη και ολευρωπαΐνη σε χαμηλή δόση και μια σαφής διάκριση ανάμεσα στην ομάδα DXR από την ομάδα OLEU-1, στην οποία χορηγήθηκε ολευρωπαΐνη σε χαμηλή δόση.

Το διάγραμμα των φορτίων (loadings), όπως προκύπτει από το πρόγραμμα SIMCA για το μοντέλο του Σχήματος 42, παρουσιάζεται στο Σχήμα 43. Από το διάγραμμα των φορτίων παρατηρείται πως η σαφής διάκριση ανάμεσα στην ομάδα DXR και την ομάδα DXR-OLEU-1 οφείλεται στις κορυφές της ταυρίνης στα 3,27 και 3,42 ppm, της αλανίνης στα 1,49 ppm και του γαλακτικού στα 1,33 και 4,11 ppm. Επίσης, παρατηρείται πως η διάκριση ανάμεσα στην ομάδα DXR και την ομάδα OLEU-1 οφείλεται στις κορυφές του γλουταμικού στα 2,35 ppm, της κρεατίνης στα 3,93 ppm και της ινοσίνης στα 8.24 ppm.



Σχήμα 42. Διάγραμμα των συντεταγμένων των φασμάτων $^1\text{H-NMR}$ της 2^{ης} ομάδας (DXR), της 3^{ης} ομάδας (DXR-OLEU-1) και της 5^{ης} ομάδας (OLEU-1) ($\text{PC}_1=59\%$, $\text{PC}_2=13\%$, $Q^2=0,68$ και $R^2=0,80$).

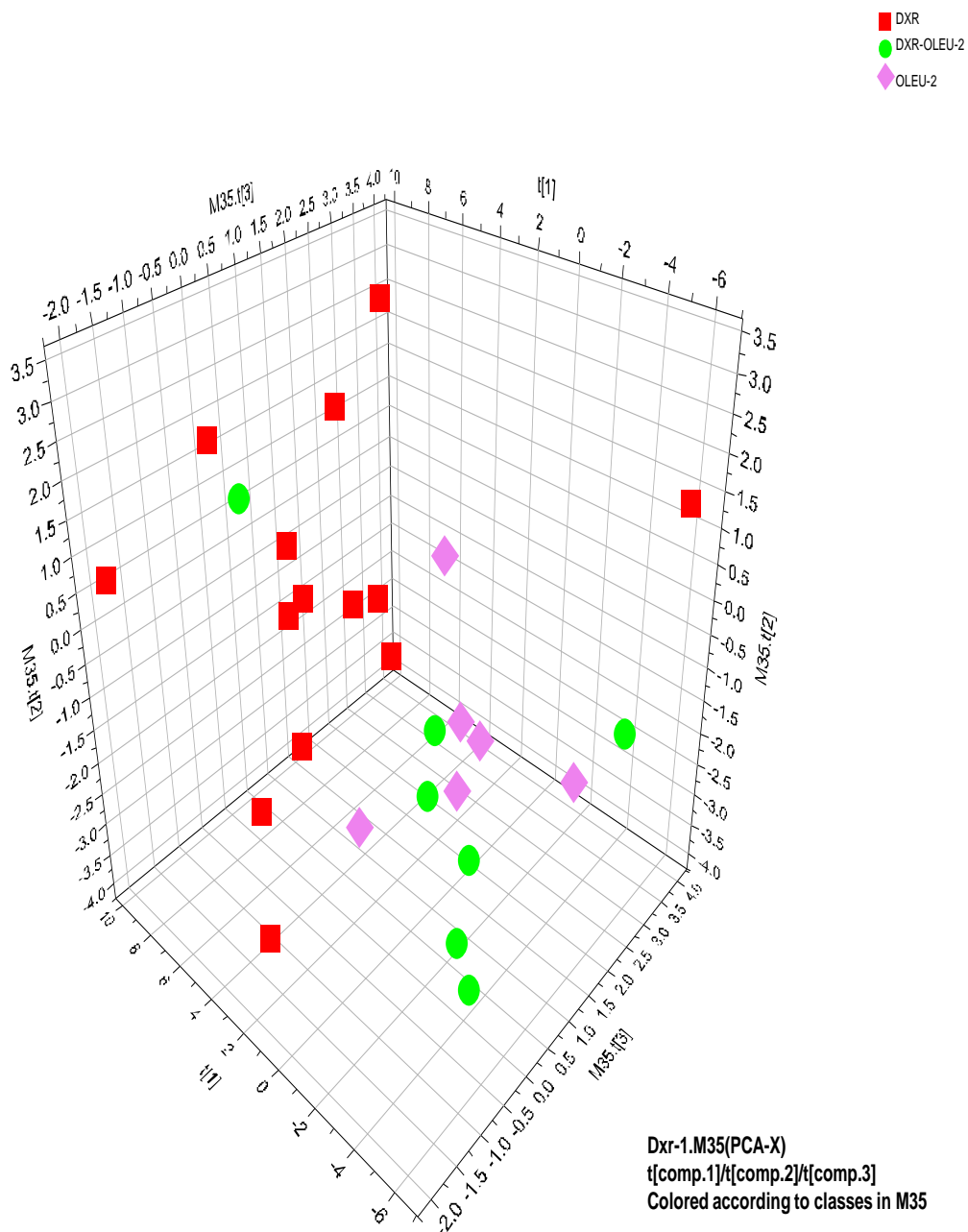
8) Σύγκριση μεταξύ της δεύτερης ομάδας (DXR), της τέταρτης ομάδας (DXR-OLEU-2) και της έκτης ομάδας OLEU-2.

Στο Σχήμα 44 παρουσιάζεται το διάγραμμα PCA, με μετασχηματισμό Pareto, των φασμάτων $^1\text{H-NMR}$ της 2^{ης} ομάδας (DXR), στην οποία χορηγήθηκε αδριαμυκίνη, της 4^{ης} ομάδας (DXR-OLEU-2), στην οποία χορηγήθηκε αδριαμυκίνη και ολευρωπαΐνη, σε υψηλή δόση, 2000 mg/kg. και της 6^{ης} ομάδας (OLEU-2), στην οποία χορηγήθηκε ολευρωπαΐνη σε υψηλή δόση, 2000 mg/kg.

Παρατηρείται μια σαφής διάκριση της ομάδας DXR, στην οποία χορηγήθηκε αδριαμυκίνη, από την ομάδα DXR-OLEU-2, στην οποία χορηγήθηκε αδριαμυκίνη και ολευρωπαΐνη σε υψηλή δόση και μια σαφής διάκριση της ομάδας DXR από την ομάδα OLEU-2, στην οποία χορηγήθηκε ολευρωπαΐνη σε υψηλή δόση.

Το διάγραμμα των φορτίων (loadings), όπως προκύπτει από το πρόγραμμα SIMCA για το μοντέλο του Σχήματος 44, παρουσιάζεται στο Σχήμα 45.

Από το διάγραμμα των φορτίων παρατηρείται πως η σαφής διάκριση ανάμεσα στην ομάδα DXR και την ομάδα DXR-OLEU-2 οφείλεται στις κορυφές της αλανίνης στα 1,49 ppm και του γαλακτικού στα 1,33 και στα 4,11 ppm. Επίσης, παρατηρείται πως η διάκριση ανάμεσα στην ομάδα DXR και την ομάδα OLEU-2 οφείλεται στις κορυφές του γλουταμικού στα 2,35 ppm και της κρεατίνης στα 3,93 ppm.



Σχήμα 44. Διάγραμμα των συντεταγμένων των φασμάτων $^1\text{H-NMR}$ της 2^{ης} ομάδας (DXR), της 4^{ης} ομάδας (DXR-OLEU-2) και της 6^{ης} ομάδας (OLEU-2) ($\text{PC}_1=69\%$, $\text{PC}_2=9\%$, $\text{Q}^2=0,71$ και $\text{R}^2=0,79$).

4.3.1 Ποσοτικός προσδιορισμός μεταβολιτών

Με βάση τα εμβαδά των κορυφών στα φάσματα NMR πραγματοποιήθηκε προσδιορισμός των Z-Scores μιας σειράς ενδογενών μεταβολιτών υδατικού εκχυλίσματος ιστού καρδιάς στις διάφορες ομάδες ως μέτρο των μεταβολών ως προς την ομάδα ελέγχου. Τα Z-Score υπολογίζονται με βάση τον τύπο (Ομάδα-Control)/Τυπικό σφάλμα των Control. Στον Πίνακα 2 παρουσιάζετε ο Πίνακας Z-Score ως προς την ομάδα των Control.

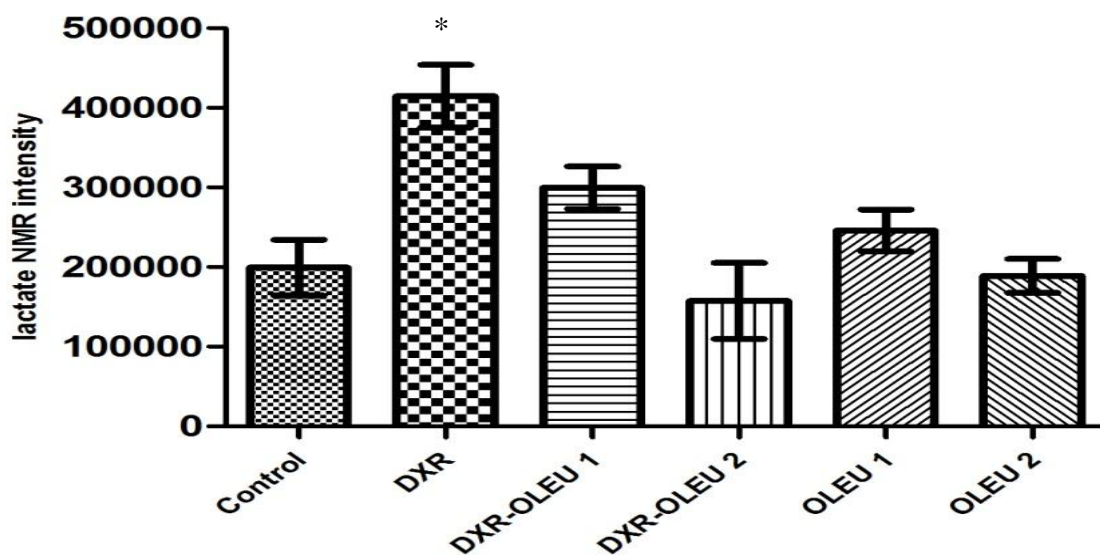
	DXR	DXR-OLEU-1	DXR-OLEU-2	OLEU-1	OLEU-2
ΑΛΑΝΙΝΗ	7,93	5,28	0,77	1,46	-0,95
ΓΛΟΥΤΑΜΙΝΙΚΟ ΟΞΥ	2,51	2,54	-1,2	2,15	-1,09
ΓΛΟΥΤΑΜΙΝΗ	5,13	3,34	-1,13	0,61	-1,43
ΓΑΛΑΚΤΙΚΟ ΟΞΥ	6,13	2,8	-1,18	1,33	-0,3
ΛΕΥΚΙΝΗ	4,3	2,97	-1,89	0,33	-1,91
ΦΑΙΝΥΛΑΛΑΝΙΝΗ	7,31	5,99	1,49	0,73	-0,29
ΗΛΕΚΤΡΙΚΟ ΟΞΥ	5,13	4,3	0,57	1,63	-0,51
ΤΑΥΡΙΝΗ	4,56	2,44	0,22	0,29	-0,71
ΑΚΕΤΟΞΙΚΟ ΟΞΥ	-1,39	-2,88	-5,33	-4,71	-2,88
ΒΑΛΙΝΗ	9,06	7,98	0,065	0,87	-1,41
ΓΛΥΚΟΖΗ	7,56	3,45	-1,01	1,07	1,74
ΥΠΟΞΑΝΘΙΝΗ	1,45	0,58	-1,43	-0,45	-2,17
ΑΣΠΑΡΑΓΙΝΙΚΟ ΟΞΥ	1,77	1,68	-1,33	0,79	-0,89
ΧΟΛΙΝΗ	1,94	1,08	-0,63	0,03	-1,93
ΚΡΕΑΤΙΝΗ	3,11	1,43	-0,90	0,48	-1,03
ΔΙΑΙΘΥΛΑΜΙΝΗ	3,05	1,84	-1,97	-0,67	-2,11
ΦΟΡΜΙΚΟ ΟΞΥ	3,78	7,35	2,21	0,86	-0,53
ΦΟΥΜΑΡΙΚΟ ΟΞΥ	6,37	6,01	3,04	0,78	-1,49
ΙΝΟΣΙΝΗ	1,21	0,14	-1,44	0,58	-1,25
3-ΟΗ-ΒΟΥΤΥΡΙΚΟ ΟΞΥ	1,05	1,59	-1,40	0,11	-1,52
ΤΡΙΜΕΘΥΛΑΜΙΝΗ	2,42	1,56	-0,41	0,82	-0,62
ΙΣΟΒΑΛΕΡΙΚΟ ΟΞΥ	5,68	3,07	-0,86	1,75	0,35

Πίνακας 2: Πίνακας Z-Score.

Στην συνέχεια παρουσιάζονται ιστογράμματα, τα οποία παρουσιάζουν τους μέσους όρους των δειγμάτων για κάθε στατιστικά σημαντικό ενδογενή μεταβολίτη, ανά ομάδα και με απόκλιση το τυπικό σφάλμα τους.

Οι συγκρίσεις των αριθμητικών μεταβλητών αναλύθηκαν μέσω One-way Analysis of Variance model (ANOVA) με διόρθωση Bonferroni και έπειτα με ανάλυση Turkey. Τιμή $P < 0,05$ θεωρήθηκε ως στατιστικά σημαντική.

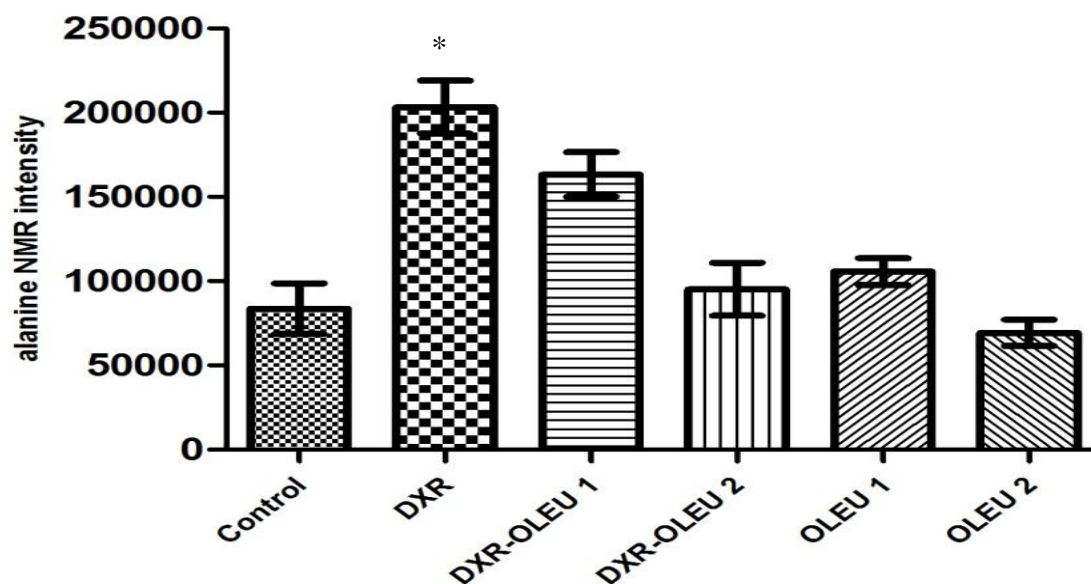
Στο Σχήμα 46 παρουσιάζονται οι μεταβολές που παρατηρήθηκαν όσον αφορά το γαλακτικό οξύ. Παρατηρούμε ότι στις ομάδες στις οποίες έχει χορηγηθεί ολευρωπαϊνή OLEU-1, OLEU-2, DXR-OLEU-1 και DXR-OLEU-2 μειώνεται στατιστικά σημαντικά η ποσότητα του γαλακτικού οξέος σε σχέση με την ομάδα στην οποία είχε χορηγηθεί αδριαμυκίνη (DXR). Επίσης παρατηρούμε την στατιστικά σημαντική αύξηση της ποσότητας του γαλακτικού οξέος στην ομάδα DXR σε σχέση με την ομάδα ελέγχου (Control).



Σχήμα 46. Γαλακτικό οξύ nmr intensity. * $P < 0,05$ vs all other groups.

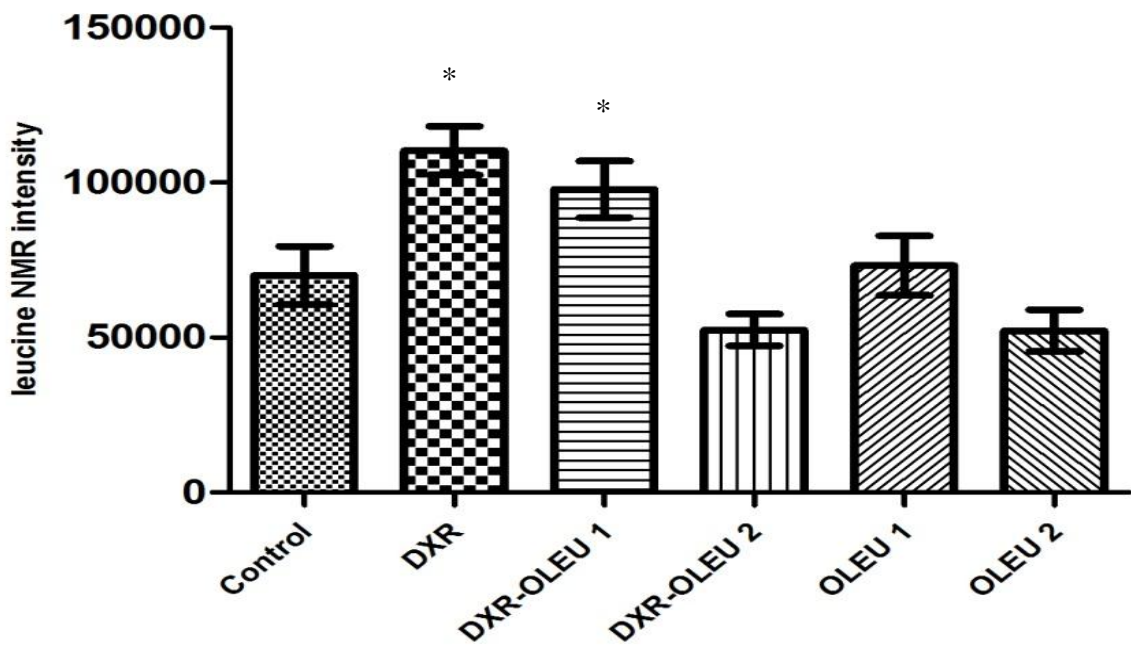
Στο Σχήμα 47 παρουσιάζονται οι μεταβολές που παρατηρήθηκαν όσον αφορά την αλανίνη. Παρατηρούμε ότι στις ομάδες στις οποίες έχει χορηγηθεί ολευρωπαϊνή OLEU-1, OLEU-2, DXR-OLEU-1 και DXR-OLEU-2 μειώνεται στατιστικά σημαντικά η ποσότητα της αλανίνης σε σχέση με την ομάδα στην οποία είχε χορηγηθεί αδριαμυκίνη (DXR). Επίσης παρατηρούμε την στατιστικά σημαντική

αύξηση της ποσότητας της αλανίνης στην ομάδα DXR σε σχέση με την ομάδα ελέγχου (Control).



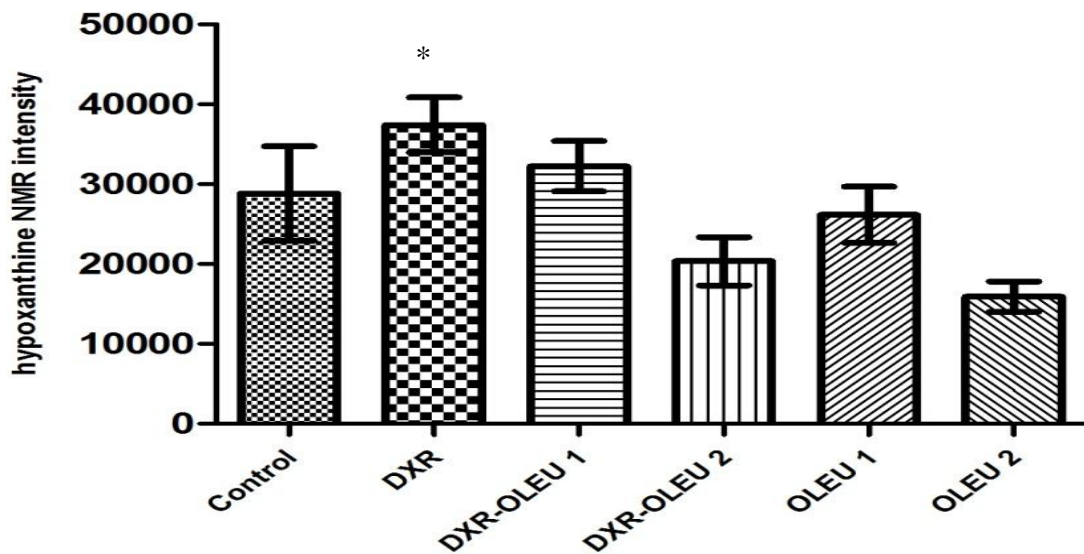
Σχήμα 47. Αλανίνη nmr intensity. *P<0,05 vs all other groups.

Στο Σχήμα 48 παρουσιάζονται οι μεταβολές που παρατηρήθηκαν όσον αφορά την λευκίνη. Παρατηρούμε ότι στις ομάδες OLEU-1, OLEU-2 και DXR-OLEU-2 μειώνεται στατιστικά σημαντικά η ποσότητα της λευκίνης σε σχέση με τις ομάδες DXR και DXR-OLEU-1. Επίσης παρατηρούμε την στατιστικά σημαντική αύξηση της ποσότητας της λευκίνης στην ομάδα DXR σε σχέση με την ομάδα ελέγχου (Control).



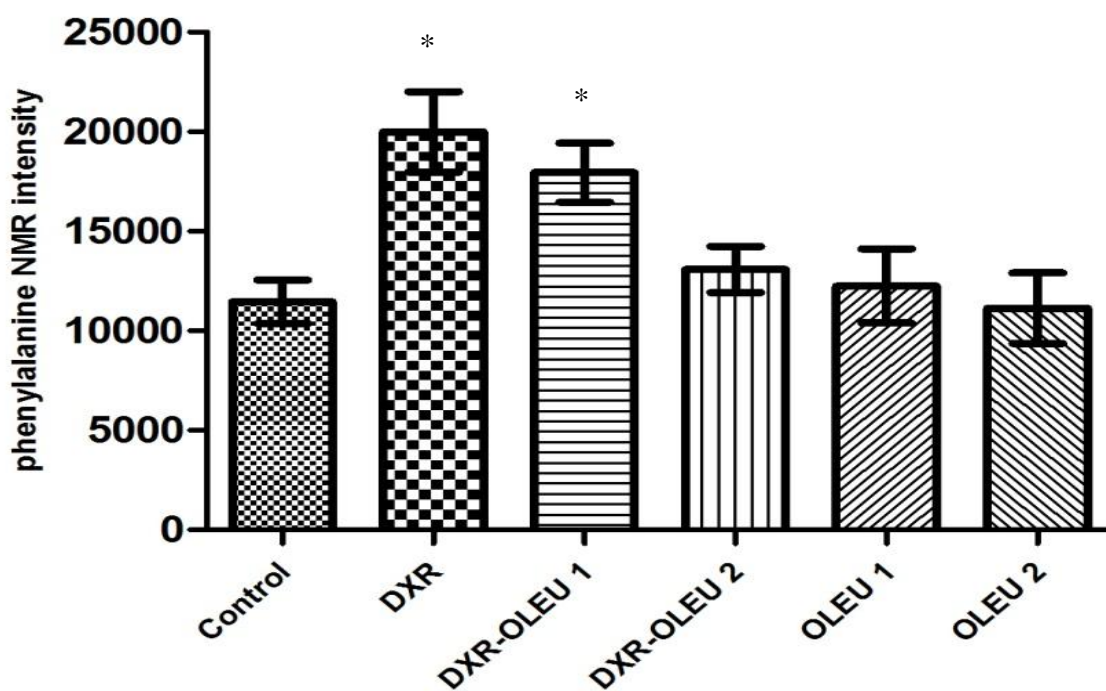
Σχήμα 48. Λευκίνη nmr intensity. *P<0,05 vs all other groups.

Στο Σχήμα 49 παρουσιάζονται οι μεταβολές που παρατηρήθηκαν όσον αφορά την υποξανθίνη. Παρατηρούμε ότι στις ομάδες OLEU-1, OLEU-2 και DXR-OLEU-2 μειώνεται σημαντικά η ποσότητα της υποξανθίνης σε σχέση με τις ομάδες DXR και DXR-OLEU-1. Επίσης παρατηρούμε σημαντική αύξηση της ποσότητας της υποξανθίνης στην ομάδα DXR σε σχέση με την ομάδα ελέγχου (Control).



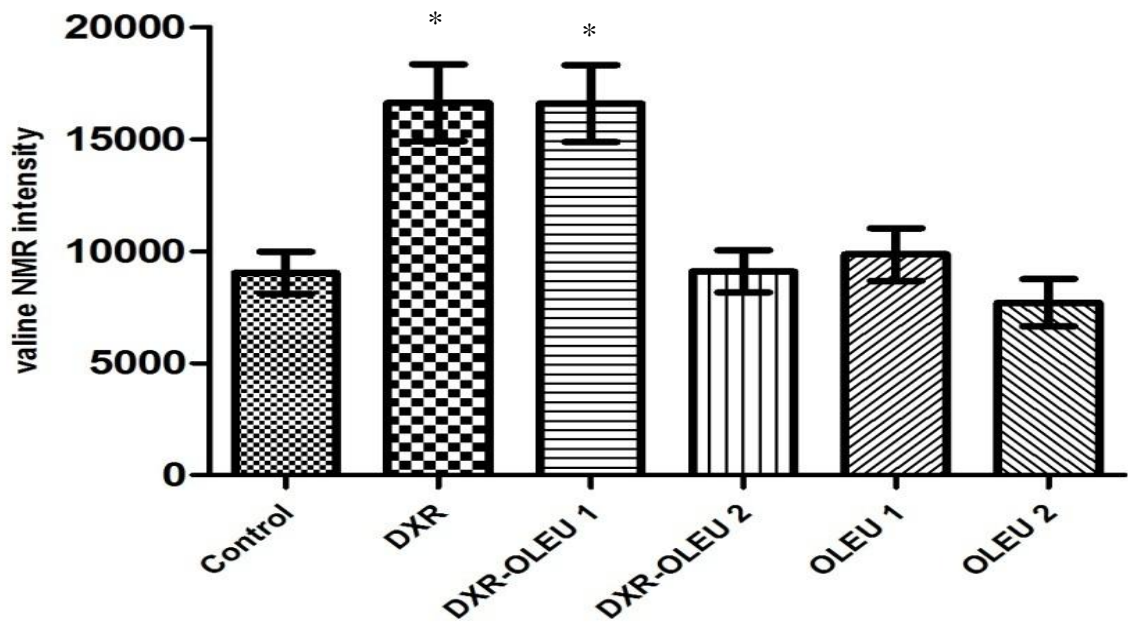
Σχήμα 49. Υποξανθίνη nmr intensity. *P<0,05 vs all other groups.

Στο Σχήμα 50 παρουσιάζονται οι μεταβολές που παρατηρήθηκαν όσον αφορά την φαινυλαλανίνη. Παρατηρούμε ότι στις ομάδες OLEU-1, OLEU-2 και DXR-OLEU-2 μειώνεται στατιστικά σημαντικά η ποσότητα της φαινυλαλανίνης σε σχέση με τις ομάδες DXR και DXR-OLEU-1. Επίσης παρατηρούμε την στατιστικά σημαντική αύξηση της ποσότητας της φαινυλαλανίνης στην ομάδα DXR σε σχέση με την ομάδα ελέγχου (Control).



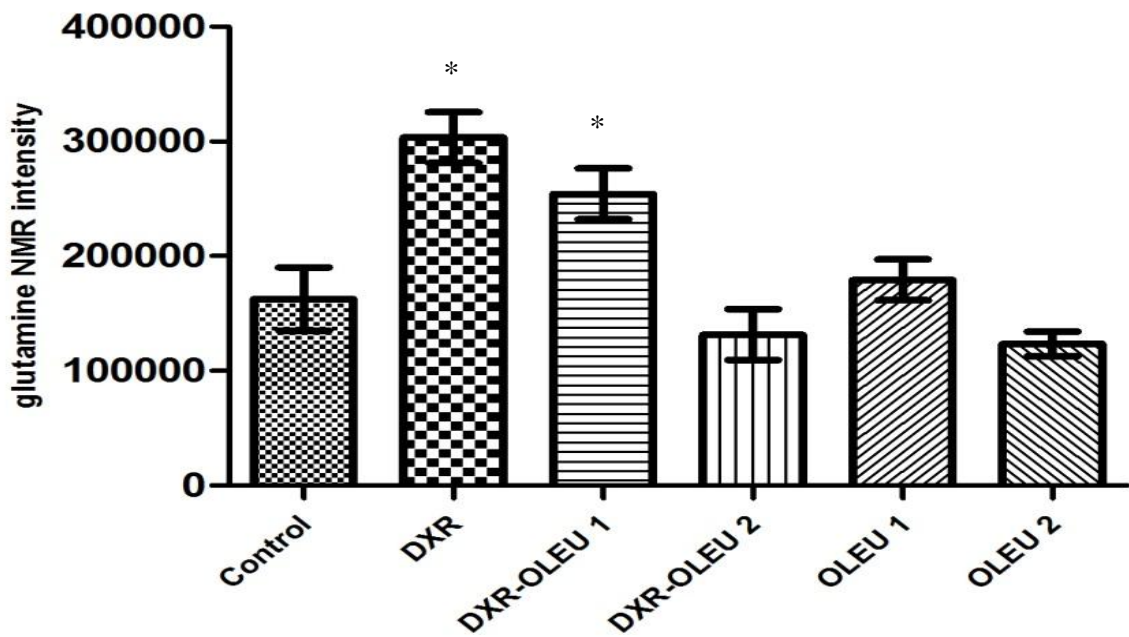
Σχήμα 50. Φαινυλαλανίνη nmr intensity. *P<0,05 vs all other groups.

Στο Σχήμα 51 παρουσιάζονται οι μεταβολές που παρατηρήθηκαν όσον αφορά την βαλίνη. Παρατηρούμε ότι στις ομάδες OLEU-1, OLEU-2 και DXR-OLEU-2 μειώνεται στατιστικά σημαντικά η ποσότητα της βαλίνης σε σχέση με τις ομάδες DXR και DXR-OLEU-1. Επίσης παρατηρούμε την στατιστικά σημαντική αύξηση της ποσότητας της βαλίνης στην ομάδα DXR σε σχέση με την ομάδα ελέγχου (Control).



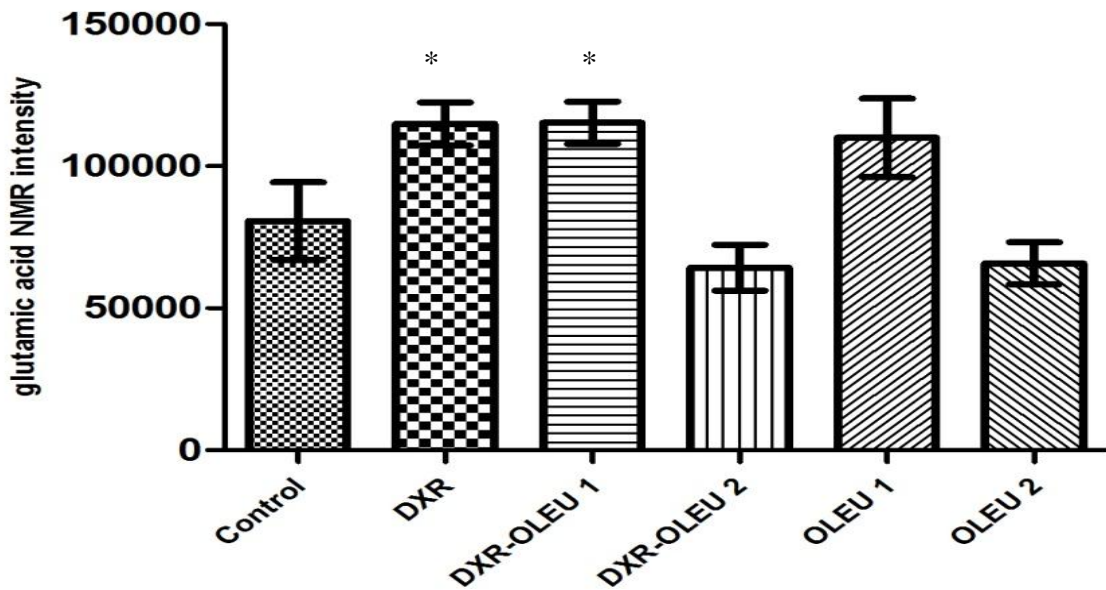
Σχήμα 51. Βαλίνη nmr intensity. *P<0,05 vs all other groups.

Στο Σχήμα 52 παρουσιάζονται οι μεταβολές που παρατηρήθηκαν όσον αφορά την γλουταμίνη. Παρατηρούμε ότι στις ομάδες OLEU-1, OLEU-2 και DXR-OLEU-2 μειώνεται στατιστικά σημαντικά η ποσότητα της γλουταμίνης σε σχέση με τις ομάδες DXR και DXR-OLEU-1. Επίσης παρατηρούμε την στατιστικά σημαντική αύξηση της ποσότητας της γλουταμίνης στην ομάδα DXR σε σχέση με την ομάδα ελέγχου (Control).



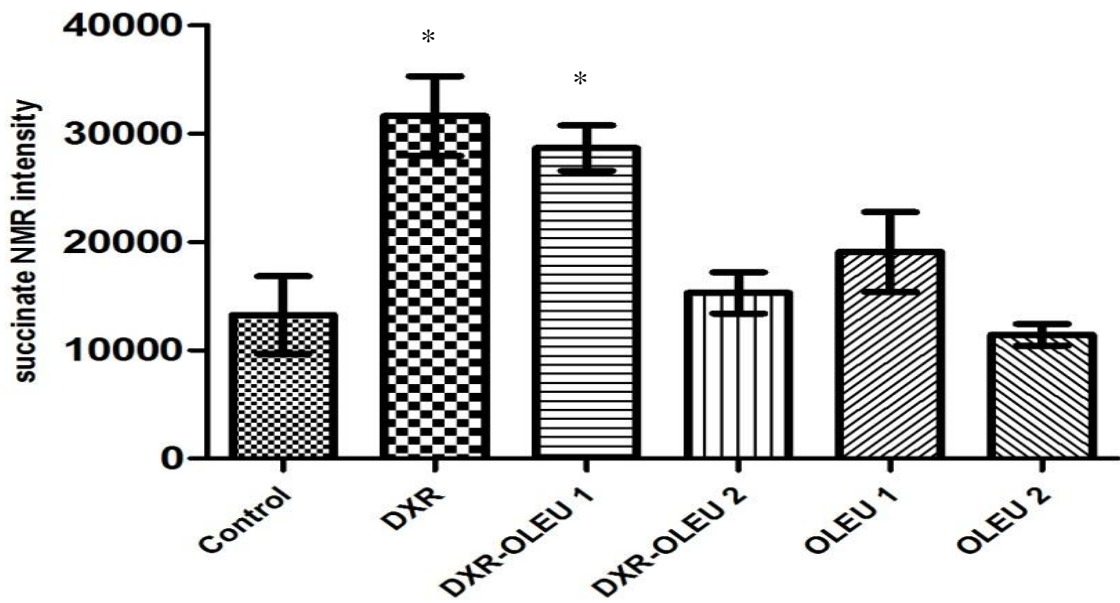
Σχήμα 52. Γλουταμίνη nmr intensity. *P<0,05 vs all other groups.

Στο Σχήμα 53 παρουσιάζονται οι μεταβολές που παρατηρήθηκαν όσον αφορά το γλουταμινικό οξύ. Παρατηρούμε ότι στις ομάδες OLEU-1, OLEU-2 και DXR-OLEU-2 μειώνεται στατιστικά σημαντικά η ποσότητα του γλουταμινικού οξέος σε σχέση με τις ομάδες DXR και DXR-OLEU-1. Επίσης παρατηρούμε την στατιστικά σημαντική αύξηση της ποσότητας του γλουταμινικού οξέος στην ομάδα DXR σε σχέση με την ομάδα ελέγχου (Control).



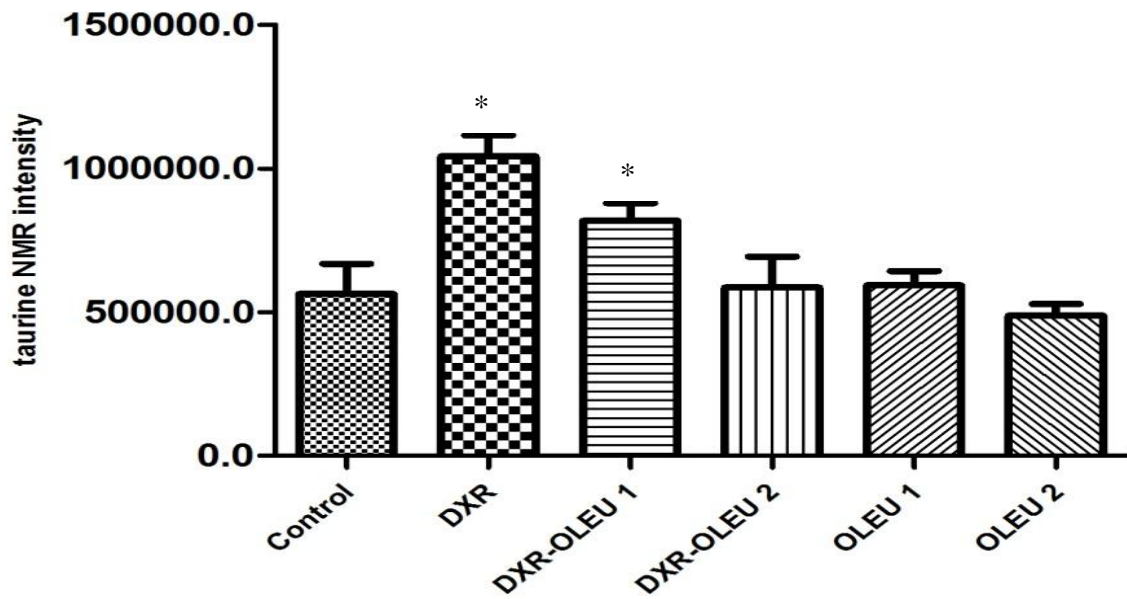
Σχήμα 53. Γλουταμινικό οξύ nmr intensity. *P<0,05 vs all other groups.

Στο Σχήμα 54 παρουσιάζονται οι μεταβολές που παρατηρήθηκαν όσον αφορά το ηλεκτρικό οξύ. Παρατηρούμε ότι στις ομάδες OLEU-1, OLEU-2 και DXR-OLEU-2 μειώνεται στατιστικά σημαντικά η ποσότητα του ηλεκτρικού οξέος σε σχέση με τις ομάδες DXR και DXR-OLEU-1. Επίσης παρατηρούμε την στατιστικά σημαντική αύξηση της ποσότητας του ηλεκτρικού οξέος στην ομάδα DXR σε σχέση με την ομάδα ελέγχου (Control).



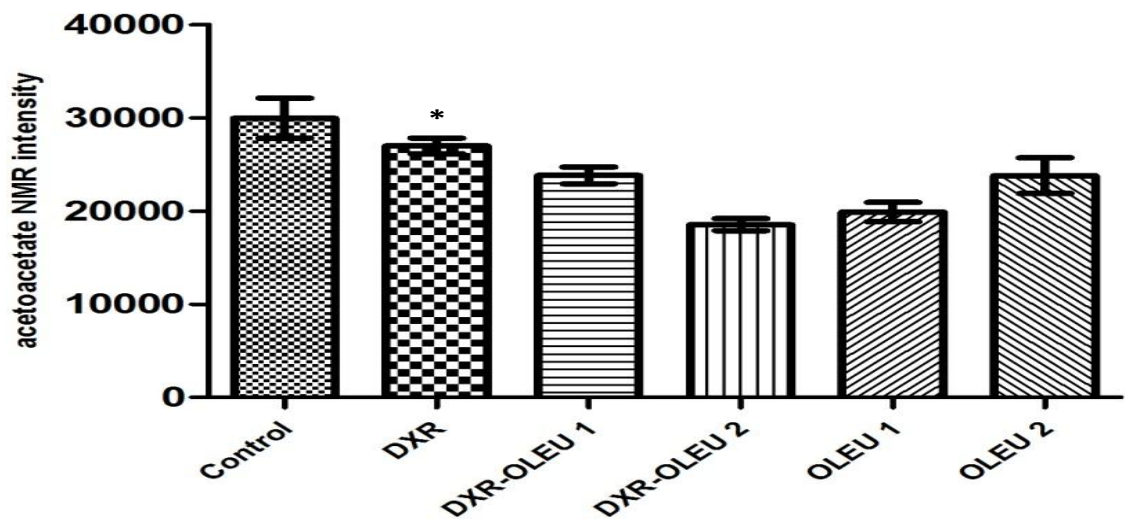
Σχήμα 54. Ηλεκτρικό οξύ nmr intensity. *P<0,05 vs all other groups.

Στο Σχήμα 55 παρουσιάζονται οι μεταβολές που παρατηρήθηκαν όσον αφορά την ταυρίνη. Παρατηρούμε ότι στις ομάδες OLEU-1, OLEU-2 και DXR-OLEU-2 μειώνεται στατιστικά σημαντικά η ποσότητα της ταυρίνης σε σχέση με τις ομάδες DXR και DXR-OLEU-1. Επίσης παρατηρούμε την στατιστικά σημαντική αύξηση της ποσότητας της ταυρίνης στην ομάδα DXR σε σχέση με την ομάδα ελέγχου (Control).



Σχήμα 55. Ταυρίνη nmr intensity. *P<0,05 vs all other groups.

Στο Σχήμα 56 παρουσιάζονται οι μεταβολές που παρατηρήθηκαν όσον αφορά το ακετοξικό οξύ. Επίσης παρατηρούμε στατιστικά σημαντική μείωση της ποσότητας του ακετοξικού οξέος στην ομάδα DXR σε σχέση με την ομάδα ελέγχου (Control).



Σχήμα 56. Ακετοξικό οξύ nmr intensity. *P<0,05 vs Control.

5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η παρούσα εργασία δείχνει για πρώτη φορά ότι η χορήγηση της OLEU σε επίμυες υπό DXR αντικαρκινική θεραπεία έχει καρδιοπροστατευτική δράση έναντι της επαγόμενης καρδιακής ανεπάρκειας. Ο υποκείμενος μηχανισμός είναι σύνθετος και εκτός της αντιοξειδωτικής δράσης περιλαμβάνει και τον περιορισμό των οδονηρών επιπτώσεων της αδριαμυκίνης στις πολύ σημαντικές για την απόπτωση, παραγωγή ενέργειας και καρδιακή λειτουργία πρωτεΐνες Akt, AMPK και eNOS αντίστοιχα.

Η μειωμένη παραγωγή του μονοξειδίου του αζώτου (NO) εμπλέκεται στις παθοφυσιολογικές αλλαγές που παρατηρούνται στην καρδιακή ανεπάρκεια και συνδέεται με μεταβολές του καρδιακού μεταβολισμού που συμβάλλουν στην εξέλιξη της νόσου ¹⁸⁴. Η αναστολή των NOS στην καρδιά έχει προταθεί σαν μια μορφή καρδιοπροστασίας από την επαγόμενη καρδιοτοξικότητα των ανθρακυκλινών ¹⁸⁵, ενώ είναι γνωστό ότι και οι 3 ισομορφές των NOS (iNOS, eNOS και nNOS) εκφράζονται στα ανθρώπινα καρδιακά κύτταρα. Το παραγόμενο NO από την iNOS φαίνεται ότι διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στους μηχανισμούς κυτταρικής βλάβης. Πιο συγκεκριμένα αναστέλλει τη γλυκόλυση, καταστρέφει τη σύνθεση του DNA και επάγει τον προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο ¹⁸⁶. Η DXR είναι ικανή να επάγει την σύνθεση του NO μέσω αύξησης της έκφρασης της iNOS, ενώ συμμετέχει, είτε απευθείας είτε μέσω της διαταραχής της ομοιοστασίας του σιδήρου, στον σχηματισμό ελεύθερων ριζών οξυγόνου (ROS) όπως της ρίζας ανιόντος υπεροξειδίου ($O_2^{\cdot-}$) ¹⁸⁶. Στη συνέχεια η αντίδραση μεταξύ του NO και της ρίζας $O_2^{\cdot-}$ οδηγεί στον σχηματισμό του υπεροξυνιτρώδες ανιόντος ($ONOO^{\cdot-}$), το οποίο αποτελεί έναν ισχυρό οξειδωτικό παράγοντα για τα κύτταρα και συνεισφέρει σημαντικά στην καρδιακή δυσλειτουργία, μέσω αύξησης των μεταλλοπρωτεϊνών και διάσπασης του κολλαγόνου ⁹². Στην παρούσα μελέτη ο προσδιορισμός της έκφρασης της iNOS στα καρδιομυοκύτταρα με ανοσοϊστοχημική μέθοδο καθώς και με τη μέθοδο western blot κατέδειξε ότι η χορήγηση της DXR αυξάνει στατιστικά σημαντικά τα επίπεδά της, τα οποία μειώνονται στις ομάδες Control, OLEU-1, OLEU-2, DXR-OLEU-1 και DXR-OLEU-2. Ο προσδιορισμός της νιτροτυροσίνης (NT) με elisa, ως δείκτη του παραγόμενου $ONOO^{\cdot-}$, κατέδειξε ότι η χορήγηση της DXR αυξάνει στατιστικά σημαντικά τα επίπεδα της, τα οποία μειώνονται στις ομάδες Control, OLEU-1, OLEU-2, DXR-OLEU-1 και DXR-OLEU-2. Λαμβάνοντας υπόψιν τα

αποτελέσματα του σχηματισμού της NT και της έκφρασης της iNOS για πρώτη φορά στην βιβλιογραφία γίνεται συσχετισμός της αύξησης της iNOS και του υπεροξυνιτρώδους ανιόντος στην χρόνια χορήγηση της DXR. Για την περαιτέρω επιβεβαίωση του οξειδωτικού μηχανισμού καρδιακής ανεπάρκειας της DXR μετρήσαμε τα επίπεδα της μηλονικής διαλδεύδης (MDA), που αποτελεί το τελικό προϊόν της λιπιδικής υπεροξειδωσης και έχει βρεθεί ότι τα επίπεδά της διαφέρουν σημαντικά μεταξύ υγιών ατόμων και ασθενών με καρδιακή ανεπάρκεια, ενώ επιπλέον συσχετίζονται με την ταξινόμηση κατά NYHA ^{55,56}. Επίσης προσδιορίσαμε και τα πρωτεϊνικά καρβονύλια (PCs) που αποτελούν δείκτη της οξειδωτικής καταστροφής των πρωτεϊνών. Τόσο τα επίπεδα της MDA όσο και των PCs παρουσίασαν στατιστικά σημαντική αύξηση στην ομάδα της DXR σε σχέση με την ομάδα Control και τις ομάδες που έλαβαν OLEU. Τα παραπάνω αποτελέσματα μας επιβεβαιώνουν την αντιοξειδωτική δράση της OLEU, στην χρόνια καρδιοτοξικότητα που επάγει η χορήγηση της DXR, μέσω μείωσης του νιτρο-οξειδωτικού και στρες.

Οι μελέτες που χρησιμοποιούν, είτε φαρμακολογική ρύθμιση ή γενετικά τροποποιημένα πειραματόζωα της eNOS έχουν οδηγήσει σε αντικρουόμενα αποτελέσματα ως προς την καρδιοπροστατευτική δράση της eNOS στην καρδιοτοξικότητα που επάγεται από την DXR. Μια πρόσφατη μελέτη δείχνει ότι η μειωμένη έκφραση της eNOS στο μυοκάρδιο έχει προστατευτικό χαρακτήρα στην επαγόμενη από την DXR καρδιακή βλάβη μειώνοντας την θνητότητα και το οξειδωτικό στρες και αυξάνοντας τον δείκτη κλασματικής βράχυνσης ¹⁸⁷, ενώ αντίθετα αποτελέσματα έδειξε η χορήγηση ενός μη ειδικού αναστολέα των NOS, του nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME), όπου η χορηγησή του αύξησε την θνητότητα και την ισχαιμία του μυοκαρδίου στην ομάδα της DXR ¹⁸⁸. Ωστόσο, και οι δύο παραπάνω μελέτες αναφέρονται σε οξεία καρδιοτοξικότητα καθώς χορηγήθηκε μία μόνο δόση DXR (20 ή 25 mg/Kg) και πέντε ημέρες αργότερα εκτιμήθηκε η καρδιακή λειτουργία και έγινε ο προσδιορισμός των βιοχημικών παραμέτρων. Μια μόνο πρόσφατη μελέτη, σε διαγονιδιακά ποντίκια, έχει διερευνήσει τον ρόλο της eNOS στην χρόνια καρδιοτοξικότητα που επάγεται από την DXR ¹⁸⁹. Η εργασία αυτή υποδεικνύει ότι η καρδιοπροστασία έναντι της DXR μπορεί να επιτευχθεί με εκλεκτική αναστολή της eNOS, ενώ η αναστολή της nNOS μπορεί να έχει σημαντική επιβλαβής επίδραση στο μυοκάρδιο ¹⁸⁹. Ωστόσο, στην παραπάνω μελέτη η DXR χορηγήθηκε σε μία συνολική δόση 12 mg/Kg μέσα σε διάστημα τεσσάρων εβδομάδων. Στην παρούσα εργασία είμαστε οι πρώτοι που προσδιορίσαμε

φωσφορυλίωση της eNOS στην Ser¹¹⁷ (peNOS) που αποτελεί την δραστική μορφή της eNOS. Σε αντίθεση με την εργασία του Deng et al ¹⁸⁹ στην παρούσα μελέτη τα αποτελέσματα της Western blot ανάλυσης εδείξαν ότι η ομάδα της DXR παρουσίασε μειωμένη έκφραση της peNOS. Η μειωμένη ενεργοποίηση της eNOS παράλληλα με το αυξημένο νιτρο-οξειδωτικό στρες καθώς και με την παθολογικά μειωμένη καρδιακή συσταλτικότητα, που εκτιμήθηκε με το δείκτη κλασματικής βράχυνσης, στην ομάδα της DXR δείχνουν τον σηματικό ρόλο που διαδραματίζει η peNOS στην διατήρηση της φυσιολογικής λειτουργίας του μυοκυττάρου μετά από χρόνια έκθεση στην DXR. Αντίθετα, η OLEU ασκεί προστατευτική δράση στην καρδιακή λειτουργία μέσω ενεργοποίησης της eNOS και καταστολής του νιτρο-οξειδωτικού στρες. Είναι αξιοσημείωτο το γεγονός ότι η συγχρόνηση της DXR με την OLEU (είτε OLEU-1 είτε OLEU-2) επανέφερε τα ποσοστά έκφρασης της συνθέτασης στα φυσιολογικά επίπεδα της ομάδας ελέγχου όπως φαίνεται με τα αποτελέσματα της ανοσοϊστοχημίας, ενώ η OLEU, όταν χορηγήθηκε μόνη της αύξησε περαιτέρω τα ποσοστά αυτά, υποδεικνύοντας ξεκάθαρα την ευεργετική συνολική της επίδραση επί της καρδιακής λειτουργίας. Τα αποτελέσματα αύξησης της έκφρασης της ολικής eNOS επιβεβαιώθηκαν και με μέτρηση της ολικής eNOS και κανονικοποίησή της με β-ακτίνη με χρήση Western blot ανάλυσης.

Η AMPK είναι μια σερίνη-θρεονίνη κινάση που διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην ρύθμιση της κυτταρικής λειτουργίας και του ενεργειακού μεταβολισμού. Ο κύριος στόχος της ενεργοποιημένης AMPK είναι η προώθηση της παραγωγής ATP έναντι της χρησιμοποίησης του ¹⁹⁰. Πολύ πρόσφατα έχει αποδειχθεί ότι η χορήγηση της DXR, σε συνολική δόση 12 mg/kg, για 2 εβδομάδες σε επίμυες είχε σαν αποτέλεσμα την αναστολή της φωσφορυλίωσης της AMPK στην Thr¹⁷² ¹¹⁹. Επιπλέον, έχει δειχθεί ότι η καρδιοπροστατευτική δράση της αδιπνεκτίνης στην επαγόμενη από την DXR χρόνια μυοκαρδιοπάθεια σχετίζεται με την οδό της ενεργοποίησης της AMPK ¹⁹¹. Επίσης, η AMPK φαίνεται να λειτουργεί ως ένας σημαντικός ρυθμιστής για άλλες οδούς σηματοδότησης. Το πιο γνωστό παράδειγμα είναι ότι η AMPK φωσφορυλιώνει την eNOS στην Ser¹¹⁷⁷, που οδηγεί στην ενεργοποίηση του ενζύμου ¹⁹². Το παραγόμενο NO από την eNOS φαίνεται να συνεισφέρει στην δράση της AMPK μέσω αύξησης της πρόσληψης γλυκόζης από τα μυοκαρδιακά κύτταρα ¹²⁶. Επιπλέον, έχει βρεθεί ότι η ενίσχυση της παραγωγής του NO, μέσω φωσφορυλίωσης της eNOS στην Ser¹¹⁷⁷, από τη μετορμίνη μέσω ενεργοποίησης της AMPK, έχει συμβάλει στην επιβράδυνση της εξέλιξης ενός μοντέλου καρδιακής ανεπάρκειας, μέσω

βηματοδότησης, σε σκύλους ¹⁹⁴. Τα ευρήματα μας βρίσκονται σε συμφωνία με τις προγενέστερες μελέτες που αναφέρονται, αφού διαπιστώσαμε ανασταλτική δράση επί της φωσφορυλίωσης της AMPK μετά τη θεραπεία με DXR, παράλληλα με την αναστολή της ενεργοποίησης της eNOS και την αύξηση του νιτρο-οξειδωτικού στρες. Η Akt κινάση ασκεί μία αντι-αποπτωτική δράση χάρη στην ικανότητά της να αναστέλλει προ-αποπτωτικά μόρια και να ενεργοποιεί αντι-αποπτωτικά ⁹⁷. Έχει αποδειχθεί ότι η ενεργοποίηση της Akt στην καρδιά προστατεύει την απόπτωση των μυοκύτταρων που επάγεται από την βλάβη της ισχαιμίας/επαναιμάτωσης σε ποντίκια *in vivo* ¹⁹⁴. Επιπλέον, η ενεργοποίηση της Akt ασκεί προστατευτική δράση αναστέλλοντας την μυοκαρδιακή απόπτωση η οποία επάγεται από την DXR *in vitro* ⁹⁶. Σε μια πολύ πρόσφατη μελέτη ¹¹⁹, σε αντίθεση με τα παραπάνω ευρήματα, αναφέρεται ότι μια συνολική δόση 12mg/kg DXR σε επίμυες που έλαβαν θεραπεία για 2 εβδομάδες οδήγησε σε φωσφορυλίωση της Akt στη Ser⁴⁷³. Στη συγκεκριμένη μελέτη η ενεργοποίηση της Akt στην ομάδα της DXR αποδόθηκε στο γονιδιοτοξικό στρες το οποίο όμως δεν διέφερε σε σχέση με την ομάδα των Control. Σε αντίθεση με τα αποτελέσματα της παραπάνω μελέτης, στην παρούσα εργασία με τη χρήση Western blot ανάλυσης δεν παρατηρήσαμε φωσφορυλίωσης της Akt στη Ser⁴⁷³ στους επίμυες που έλαβαν θεραπεία με DXR. Η ενεργοποίηση της Akt δεν επιβεβαιώθηκε και στην ομάδα των Control. Αντίθετα οι επίμυες που έλαβαν OLEU παρουσίασαν φωσφορυλίωση της Akt στη Ser⁴⁷³.

Στην παρούσα εργασία από τα αποτελέσματα της Western blot ανάλυσης, διαπιστώνουμε αρχικά ότι η DXR προκαλεί απενεργοποίηση της AMPK και μείωση της έκφρασης της eNOS συνθετάσης στο μυοκάρδιο επίμυων σε σχέση με τις ομάδες ελέγχου (control). Τα αποτελέσματα αποδεικνύουν την αρνητική επίδραση της DXR στον καρδιακό ενεργειακό μεταβολισμό (AMPK) και στην ομοιόσταση του NO, μορίου σημαντικού για την φυσιολογική καρδιακή λειτουργία (eNOS). Επιπλέον, μελετώντας και τις υπόλοιπες ομάδες παρατηρούμε ότι τόσο στην ομάδα DXR-OLEU-1 όσο και στην DXR-OLEU-2, οι αρνητικές επιδράσεις της DXR όχι μόνο μετριάστηκαν σε πολύ σημαντικό ποσό, αλλά και αντιστράφηκαν, υποδεικνύοντας με αυτόν τον τρόπο την καρδιοπροστατευτική δράση της OLEU στην επαγόμενη από την DXR καρδιακή ανεπάρκεια. Πιο συγκεκριμένα, η OLEU αύξησε τα ποσοστά φωσφορυλίωσης της Akt και της eNOS, ενώ επανέφερε την φωσφορυλίωση της AMPK σε επίπεδα ίδια με αυτά της ομάδας των Control, συντελώντας έτσι στην καλή καρδιακή λειτουργία και εμποδίζοντας την εκδήλωση και ανάπτυξη μη αναστρέψιμης

καρδιακής ανεπάρκειας. Η συνολικά θετική επίδραση της OLEU φαίνεται ξεκάθαρα και από τις ομάδες OLEU-1 και OLEU-2 όπου δεν υπήρχε συγχωρήγηση του αντικαρκινικού φαρμάκου. Στις ομάδες αυτές οι ευεργετικές δράσεις της OLEU ήταν πιο έντονες γιατί δεν υπήρχε ο ανασταλτικός παράγοντας της DXR.

Ο προσδιορισμός της Big ET-1 αποτελεί έναν αξιόπιστο δείκτη για την εκτίμηση της επαγόμενης από την DXR καρδιακής ανεπάρκειας ^{195,196}, ενώ η συσχέτιση της Big ET-1 με την δυσλειτουργία του συστήματος του NO είναι τεκμηριωμένη στην βιβλιογραφία ¹⁹⁷. Επιπλέον, πολλές μελέτες δείχνουν ότι η IL-6 είναι αυξημένη στον ορό ασθενών με καρδιακή ανεπάρκεια ⁶³, ενώ, παράλληλα, η συγκέντρωσή της αυξάνεται όσο πιο σοβαρή είναι η νόσος ⁶⁶. Σύμφωνα μάλιστα με πρόσφατες μελέτες, η IL-6 μπορεί να θεωρηθεί ως αξιόπιστος και ανεξάρτητος προγνωστικός παράγοντας της θνητότητας σε ασθενείς με καρδιακή ανεπάρκεια ¹⁹⁸. Επίσης, τα αυξημένα επίπεδα της IL-6 στην καρδιακή ανεπάρκεια είναι ανεξάρτητα από την αιτιολογία της νόσου ¹⁹⁹.

Τα αυξημένα επίπεδα της ET-1 σε ασθενείς με καρδιακή ανεπάρκεια φαίνεται να επάγουν την παραγωγή των φλεγμονωδών κυτοκινών και ειδικότερα της IL-6 από τα μακροφάγα ⁶⁰. Επιπλέον, οι κυτοκίνες φαίνεται να εμπλέκονται στην καταστολή του μυοκαρδίου και ο πιο σημαντικός μηχανισμός συνίσταται στην ενεργοποίηση της iNOS από την IL-6 ⁷¹. Η δράση αυτή παρατηρείται μετά από έκθεση αρκετών ωρών του μυοκαρδίου στις κυτοκίνες ⁷¹. Πιστεύεται ότι το παραγόμενο NO, μετά την επαγωγή της iNOS από τις κυτοκίνες, ελλοτώνει τόσο τη βασική όσο και την ενεργοποιημένη από τους β-αγωνιστές ινότροπη ανταπόκριση του μυοκαρδίου ⁷², μειώνοντας την ευαισθησία των ινιδίων του καρδιακού μυός στο Ca^{+2} ⁷¹. Έχει βρεθεί ότι οι κυτοκίνες προάγουν την απόπτωση στα μυοκαρδιακά κύτταρα μέσω ενός μηχανισμού που εξαρτάται από τη σφιγγοσίνη ⁷³. Πιθανόν παίζει ρόλο και η αυξημένη παραγωγή NO μέσω επαγωγής της iNOS από τις κυτοκίνες ⁷⁴. Επιπλέον οι κυτοκίνες φαίνεται να συμμετέχουν στις διαταραχές του ενδοθηλίου, που παρατηρούνται στην καρδιακή ανεπάρκεια, προκαλώντας μείωση των επιπέδων της ισομορφής eNOS, που ευθύνεται για την παραγωγή NO στο ενδοθήλιο ⁷⁵. Στην παρούσα εργασία στην ομάδα της DXR παρατηρήσαμε στατιστικά σημαντικά αυξημένα επίπεδα IL-6 σε σχέση με την ομάδα των Control και τις ομάδες που έλαβαν OLEU. Τα αυξημένα επίπεδα της IL-6 συσχετίζονται με την παράλληλη αύξηση των επιπέδων της ET-1 και iNOS καθώς και με την μειωμένη καρδιακή συσταλτικότητα που επιβεβαιώσαμε με υπερηχοκαρδιογραφική μελέτη στην ομάδα της DXR. Με

βάση τα παραπάνω δεδομένα μπορούμε να υποθέσουμε ότι η χορήγηση της DXR επάγει την έκκριση της IL-6 μέσω της ET-1, που έχει σαν αποτέλεσμα την καταστολή του μυοκαρδίου και την εκδήλωση καρδιακής ανεπάρκειας. Αντίθετα, η OLEU φαίνεται να δρά ως ανασταλτικός παράγοντας στην επαγόμενη από την DXR έκκριση της ET-1, ασκώντας έτσι προστατευτική δράση στην καταστολή της καρδιακής συσταλτικότητας από την DXR.

Η φασματοσκοπία NMR αποτελεί ένα σημαντικό εργαλείο στην ανάλυση βιολογικών δειγμάτων και την μελέτη παθολογικών καταστάσεων. Στην παρούσα εργασία στόχος μας ήταν η εφαρμογή της φασματοσκοπίας NMR κατ'αρχήν ως κλασσικής αναλυτικής τεχνικής για τον προσδιορισμό μικρού μοριακού βάρους μεταβολιτών στο υδατικό εκχύλισμα καρδιακού ιστού αλλά και σε ένα δεύτερο επίπεδο ο συνδυασμός της με τεχνικές παραμετρικής ανάλυσης όπως χρησιμοποιείται με επιτυχία τα τελευταία χρόνια στην Μεταβολομική. Η εφαρμογή πραγματοποιήθηκε για την απεικόνιση μέσα από τα φάσματα NMR σε πρώτο στάδιο της επίδρασης της DXR σε καρδιά επίμυος και σε δεύτερο για τις αλλαγές που παρατηρούνται με την χορήγηση της OLEU.

Εφαρμόζοντας στατιστική επεξεργασία των φασμάτων NMR με ανάλυση κυρίων συνιστωσών (PCA) με σκοπό να διερευνήσουμε πιθανές ομοιότητες ή διαφορές στο μεταβολικό προφίλ των ομάδων μας, παρατηρήσαμε σαφή διαχωρισμό στο μεταβολικό προφίλ μεταξύ της ομάδας των Control και της ομάδας της DXR, παρατήρηση η οποία είναι σύμφωνη και με προγενέστερες μελέτες^{142,200}. Επιπλέον, το μεταβολικό προφίλ των ομάδων που έλαβαν DXR και OLEU φαίνεται να πλησιάζει αυτό της ομάδας των Control. Οι μεταβολίτες που είναι υπεύθυνοι για το διαφορετικό μεταβολικό προφίλ μεταξύ της ομάδας των Control και της ομάδας της DXR είναι το γαλακτικό οξύ, η αλανίνη, η φαινυλαλανίνη, η υποξανθίνη, η λευκίνη, το ηλεκτρικό οξύ, η γλουταμίνη, το γλουταμινικό οξύ, η βαλίνη, η ταυρίνη και το ακετοξικό οξύ. Ολοί οι παραπάνω μεταβολίτες παρουσιάζονται αυξημένοι στην ομάδα της DXR εκτός από το ακετοξικό οξύ το οποίο μειώνεται.

Η καρδιά είναι ένα όργανο που βρίσκεται σε συνεχή μηχανική λειτουργία και μεταβολική δραστηριότητα. Τα κυριότερα καύσιμα του μυοκαρδίου είναι τα λιπαρά οξέα, η γλυκόζη και το γαλακτικό οξύ. Ο μεταβολισμός περιλαμβάνει τη μετατροπή του οξυγόνου και των θρεπτικών ουσιών σε ενέργεια με τη μορφή της τριφωσφορικής αδενοσίνης (ATP). Όλα τα καύσιμα διασπώνται σε ακέτυλο συνένζυμο A (CoA), το οποίο αποδίδει άτομα υδρογόνου (H) με διάφορες αφυδρογονάσεις, για να δώσουν τη

γένεση του συνενζύμου νικοτιναμιδο-αδενινοδινουκλεοτίδιο NADH_2 , το οποίο εισέρχεται στην αναπνευστική αλυσίδα για να παράγει ATP. Τα λιπαρά οξέα παράγουν επίσης το συνένζυμο φλαβινο-αδενινοδινουκλεοτίδιο FADH_2 από τη β-οξειδωση των λιπαρών οξέων, που επίσης εισέρχονται στην αναπνευστική αλυσίδα¹⁵⁷. Όταν η παροχή οξυγόνου είναι ανεπαρκής σε σχέση με τις απαιτήσεις, εξαιτίας ισχαιμίας, στην αρχή παρατηρούνται αναστρέψιμες και στη συνέχεια μη αναστρέψιμες αλλαγές του ενεργειακού μεταβολισμού οπότε επέρχεται η απόπτωση των μυοκυττάρων.

Τα αυξημένα επίπεδα γλυκόζης στην ομάδα της DXR σχετίζονται με την μειωμένη χρησιμοποίηση της γλυκόζης ως καυσίμου από τα μυοκύτταρα, παρατήρηση που είναι σύμφωνη με προγενέστερη μελέτη η οποία πραγματοποιήθηκε σε πειραματικό μοντέλο επίμουα χρόνιας χορήγησης DXR²⁰¹. Η παρατήρηση αυτή μπορεί να εξηγηθεί από το γεγονός ότι σε καταστάσεις βαριάς υποξίας και ισχαιμίας, το φαινόμενο Pasteur αναστέλλεται με αποτέλεσμα τα προϊόντα της γλυκόλυσης να συσσωρεύονται, και η χρήση της γλυκόζης να περιορίζεται²⁰². Το φαινόμενο Pasteur αποτελεί έναν ανατροφοδοτικό μηχανισμό της καρδιάς όπου σε κατάσταση ανοξίας διεγείρει την γλυκόλυση για την παραγωγή ATP. Αντίθετα σε συνθήκες ισχαιμίας η συσσώρευση γαλακτικού οξέος και πρωτονίων αναστέλλουν το φαινόμενο Pasteur παρά την ελλατωμένη περιεκτικότητα της καρδιάς σε ATP. Στην ομάδα της DXR η βαριά υποξία και ισχαιμία επιβεβαιώνεται από τα αποτελέσματα της μορφολογίας του καρδιακού ιστού και από την μειωμένη καρδιακή συσταλτικότητα που εκτιμήθηκε με τον δείκτη κλασματικής βράχυνσης.

Αποτελέσματα πρόσφατης μελέτης δείχνει μειωμένα επίπεδα γαλακτικού οξέος και αυξημένα επίπεδα αλανίνης και ηλεκτρικού οξέος σε επίμυες που έλαβαν μια μόνο δόση 20 mg/kg DXR σε σύγκριση με την ομάδα των Control²⁰⁰. Η συγκεκριμένη έρευνα υποθέτει ότι η μείωση του γαλακτικού οξέος στην ομάδα της DXR παρουσιάζεται εξαιτίας της μετατροπής του γαλακτικού οξέος σε πυροσταφυλικό οξύ από το ένζυμο αφυδρογονάση του γαλακτικού οξέος (LDH) στηρίζοντας την υποθεσή της σε μια πρόσφατη μελέτη που δείχνει ότι η οξεία χορήγηση της DXR επάγει τη σύνθεση του ενζύμου LDH στα καρδιομυοκύτταρα²⁰³. Σε αντίθεση με την παραπάνω υπόθεση, στην βιβλιογραφία υπάρχουν αναφορές όπου υποστηρίζουν ότι η δραστηριότητα της LDH στο μυοκάρδιο είναι αρκετά υψηλή ώστε μάλλον να μην υφίσταται η πιθανότητα αυτή να αποτελεί ρυθμιστική βαθμίδα για το μεταβολισμό του γαλακτικού οξέος από την καρδιά²⁰². Στην παρούσα εργασία η ομάδα της DXR

εμφάνισε αυξημένα επίπεδα γαλακτικού οξέος, ηλεκτρικού οξέος και αλανίνης. Τα αυξημένα επίπεδα των τριών μεταβολιτών, συμφωνούν και με πρόσφατη μελέτη στην οποία αξιολογήθηκε η καρδιοτοξικότητα μετά από χρόνια χορήγηση DXR ²⁰⁴ και υποδηλώνουν ότι η βαρεία υποξία και ισχαιμία οδηγεί τα μυοκύτταρα σε αναερόβιο μεταβολισμό με αποτέλεσμα την συσσώρευση του γαλακτικού οξέος, λόγω της μετατροπής του πυροσταφυλικού οξέος σε γαλακτικό οξύ, ενώ η αλανίνη παράγεται με τρανσαμίνωση του πυροσταφυλικού οξέος. Επίσης, σε μια προσπάθεια να αυξηθεί η παραγωγή ενέργειας (ATP) από τα μυοκύτταρα, κατά τον αναερόβιο μεταβολισμό, έχουμε τον σχηματισμό του ηλεκτρικού οξέος που είναι χαρακτηριστικό της πρωτεόλυσης ²⁰⁵. Τα αυξημένα επίπεδα του ηλεκτρικού οξέος, στην ομάδα της DXR, μπορούν να εξηγηθούν και από μία πρόσφατη μελέτη που δείχνει ότι η δραστηριότητα του ενζύμου αφυδρογονάση του ηλεκτρικού οξέος (SDH), η οποία είναι υπεύθυνη για τον μεταβολισμό του ηλεκτρικού οξέος, μειώνεται σε επίμυες που έλαβαν αγωγή με 18 mg/kg DXR μέσα σε διάστημα 2 εβδομάδων ²⁰⁶. Αντίθετα τα επίπεδα του γαλακτικού οξέος, ηλεκτρικού οξέος και της αλανίνης στις ομάδες που έλαβαν OLEU δεν διέφεραν σε σχέση με αυτά της ομάδας των Control. Από τα αποτελέσματα φαίνεται ότι στους επίμυες που χορηγήθηκε OLEU και DXR ο μηχανισμός της αερόβιας γλυκόλυσης δεν έχει διαταραχθεί καθώς δεν υπάρχουν στοιχεία που να υποδηλώνουν διαταραχή της συστατικότητας της αριστερής κοιλίας όπως επιβεβαιώνεται από τον δείκτη κλασματικής βράχυνσης και από την ιστολογική αξιολόγηση.

Τα αμινοξέα διακλαδισμένης αλύσου λευκίνη, βαλίνη και ισολευκίνη ασκούν αναβολικές δράσεις στο μυοκάρδιο επάγοντας την πρωτεϊνική σύνθεση και αναστέλλοντας την πρωτεόλυση ²⁰⁷. Ο μηχανισμός της αναβολικής δράσης περιλαμβάνει την ενεργοποίηση της πρωτεΐνης mTOR (mammalian target of rapamycin) ²⁰⁸. Η ενεργοποίηση της mTOR από τα αμινοξέα διακλαδισμένης αλύσου φαίνεται να σχετίζεται με την αναστολή της AMPK, κινάσης που διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην ρύθμιση του κυτταρικού μεταβολισμού ²⁰⁹. Έτσι, η AMPK αναστέλει την ενεργοποίηση της mTOR σε καταστάσεις ενεργειακού στρες, όπως συμβαίνει στην καρδιακή ανεπάρκεια, προσπαθώντας να εξοικονομήσει ενέργεια, αναστέλλοντας την πρωτεϊνοσύνθεση και επάγοντας την πρωτεόλυση ²¹⁰. Στην παρούσα μελέτη παρατηρήσαμε αυξημένα επίπεδα λευκίνης και βαλίνης στην ομάδα της DXR παράλληλα με την αναστολή της ενεργοποίησης της AMPK. Η παρατήρηση αυτή μπορεί να εξηγήσει τη δράση της DXR, μέσω της αύξησης των συγκεντρώσεων

της λευκίνης και βαλίνης, να αναστέλει τις καταβολικές οδούς και να διεγείρει τις αναβολικές οδούς στα καρδιακά κύτταρα που έχει σαν αποτέλεσμα την εξάντληση τον ήδη μειωμένων αποθεμάτων ενέργειας (ATP). Τα εξαντλημένα ενεργειακά αποθέματα στην ομάδα της DXR αποδεικνύονται από τα αυξημένα επίπεδα της υποξανθίνης που αποτελεί προϊόν καταβολισμού του ATP κατά την ισχαιμία ²¹¹.

Η φαινυλαλανίνη, το γλουταμινικό οξύ και η γλουταμίνη αποτελούν σημαντικές πηγές ενέργειας γιατί μπορούν να μετατραπούν σε βιομόρια, όπως το πυροσταφυλικό οξύ, το 2-οξογλουταρικό οξύ και το φουμαρικό οξύ, τα οποία εισέρχονται στον κύκλο του Krebs αποδίδοντας ενέργεια στο φυσιολογικό μυοκαρδιακό κύτταρο. Οι συγκεντρώσεις των ανωτέρω α-αμινοξέων ήταν υψηλότερες στην ομάδα της DXR σε σχέση με αυτές της ομάδας των Control, παρατήρηση η οποία συμφωνεί με τα αποτελέσματα μελέτης σε πειραματικό μοντέλο επίμυα χρόνιας χορήγησης DXR ²⁰¹.

Η συσσώρευση αυτών των αμινοξέων στην ομάδα της DXR φαίνεται να σχετίζεται με την μειωμένη μεταβολική δραστηριότητα του κύκλου του Krebs που οφείλεται στον αναερόβιο μεταβολισμό που προκλήθηκε από την DXR στα καρδιακά κύτταρα.

Τα ελεύθερα λιπαρά οξέα κατά τον αερόβιο μεταβολισμό οξειδώνονται αφού πρώτα ενεργοποιηθούν προσλαμβάνοντας CoA με αποτέλεσμα να σχηματίζονται λιπαρά άκυλο CoA παράγωγα. Στη συνέχεια τα μόρια των άκυλο CoA μεταφέρονται από το κυτοσόλιο προς τα μιτοχόνδρια, με μεταφορικό σύστημα που χρειάζεται καρνιτίνη. Έπειτα, τα μόρια των άκυλο CoA με μακριά αλυσίδα κατακερματίζονται προοδευτικά σε μονάδες ακέτυλο CoA από 2 άτομα άνθρακα η καθεμία, με β-οξείδωση, και τελικά το ακέτυλο CoA οξειδώνεται με τον κύκλο του κιτρικού οξέος ²⁰². Το ακετοξικό οξύ μαζί με τα την ακετόνη και το β-υδροξυ-βουτυρικό οξύ αποτελούν τα τελικά προϊόντα οξείδωσης των λιπαρών οξέων. Η διαταραχή της οξείδωσης των λιπαρών οξέων από την DXR έχει περιγραφεί σε προγενέστερες μελέτες στην βιβλιογραφία ²¹². Πιο συγκεκριμένα σε in vitro πειραματικό πρωτόκολλο η DXR ανέστειλε την ενεργοποίηση των λιπαρών οξέων που αποτελεί απαραίτητο βήμα για την β-οξείδωσή τους στα μιτοχόνδρια. Στην παρούσα μελέτη τα μειωμένα επίπεδα του ακετοξικού οξέος στην ομάδα της DXR σε σχέση με την ομάδα των Control και τις ομάδες που έλαβαν OLEU επιβεβαιώνουν τον περιορισμό της οξείδωσης των λιπαρών οξέων στο ισχαιμικό μυοκάρδιο.

Η ταυρίνη είναι ένα αμινοξύ που διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση του όγκου των μυοκυττάρων, στην μεταφορά ιόντων και στην συσταλτική λειτουργία της καρδιάς. Σύμφωνα όμως με πρόσφατες μελέτες οι παθολογικά αυξημένες

συγκεντρώσεις της στο μυοκάρδιο μπορεί να οδηγήσουν σε συσταλτική δυσλειτουργία της καρδιάς ως αποτέλεσμα της απορρύθμισης της ομοιόστασης του Ca^{+2} ²¹³. Πιο συγκεκριμένα, η ενδοκυττάρια αύξηση των επιπέδων της ταυρίνης στα μυοκύτταρα έχει σαν αποτέλεσμα την αύξηση του ενδοκυττάριου όγκου με ταυτόχρονη μείωση της ενδοκυττάριας συγκέντρωσης του ασβεστίου. Επίσης, η διόγκωση των μυοκυττάρων λόγω της ενδοκυττάριας αύξησης της συγκέντρωσης της ταυρίνης οδηγεί στην απενεργοποίηση των L-τύπου διαύλων Ca^{+2} της κυτταροπλασματικής μεμβράνης που συνεισφέρει στην περαιτέρω μείωση των ενδοκυττάριας συγκεντρώσεων ασβεστίου. Στην παρούσα μελέτη τα αυξημένα επίπεδα της ταυρίνης στην ομάδα της DXR σε σχέση με την ομάδα των Control και τις ομάδες που έλαβαν DXR και OLEU συμπίπτουν με την παθολογικά μειωμένη συσταλτικότητα του μυοκαρδίου που επιβεβαιώθηκε με υπερηχοκαρδιογραφία στους επίμυες που έλαβαν DXR.

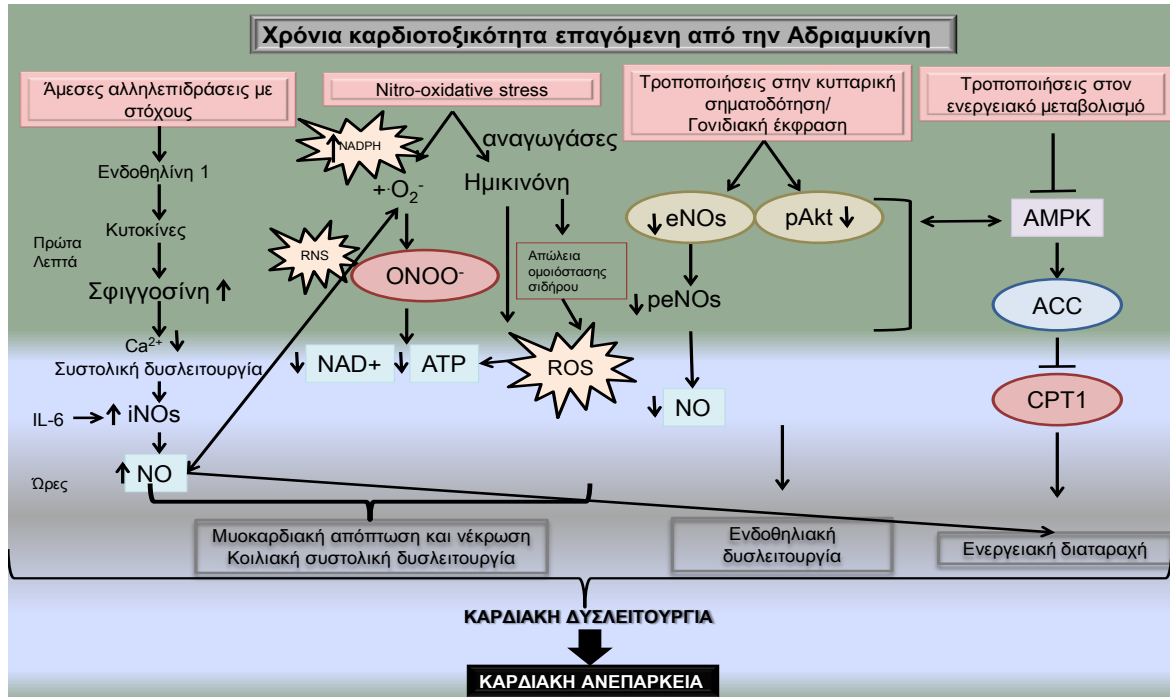
Όλοι οι παραπάνω μεταβολίτες με εξαίρεση το ακετοξικό οξύ, μειώνονται σημαντικά στις ομάδες DXR-OLEU-1 και DXR-OLEU-2, με μεγαλύτερη μείωση όταν χορηγήσαμε υψηλότερη δόση OLEU, πλησιάζοντας τα επίπεδα της ομάδας των Control. Η πτώση που παρατηρήθηκε στα επίπεδα των αμινοξέων, μπορεί να ερμηνευθεί από τα ευρήματα της Western blot ανάλυσης και πιο συγκεκριμένα από την φωσφορυλίωση που προκάλεσε η OLEU (είτε στις ομάδες OLEU-DXR είτε στις ομάδες OLEU) στην AMPK κινάση. Λόγω της προώθησης της ενεργοποίησης της AMPK εξηγείται και η περιορισμένη παρουσία γαλακτικού οξέος που αποδεικνύει την δράση της OLEU να προλαμβάνει την διατάραξη της αερόβιας γλυκόλυσης και της οξειδωσης των λιπαρών οξέων που επάγει η DXR. Αντίστοιχα, στις ομάδες OLEU-1 και OLEU-2 υπάρχει σχεδόν ταύτιση των επιπέδων των μεταβολιτών που ανιχνεύθηκαν στην ομάδα των Control.

Επίσης, στο σημείο αυτό είναι σημαντικό να τονιστεί το διαφορετικό μεταβολικό προφίλ του μυοκυττάρου στην χρόνια σε σχέση με την οξεία χορήγηση αδριαμυκίνης σε επίμυες. Πιο συγκεκριμένα, σε προγενέστερη μελέτη της ερευνητικής μας ομάδας έχουμε δείξει ότι η χορήγηση μίας δόσης 20 mg/kg DXR i.p. σε επίμυες οδήγησε σε αυξημένα επίπεδα του οξικού και ηλεκτρικού οξέος, σε μείωση των επιπέδων της βαλίνης και λευκίνης, ενώ τα επίπεδα του γαλακτικού οξέος και της γλυκόζης στον καρδιακό ιστό παρέμειναν αμετάβλητα σε σχέση με την ομάδα ελέγχου ¹⁴². Οι μεταβολές των παραπάνω αμινοξέων υποδεικνύουν την αναστολή της οξειδωσης των λιπαρών οξέων στο καρδιακό κύτταρο μετά την οξεία χορήγηση της DXR. Σε

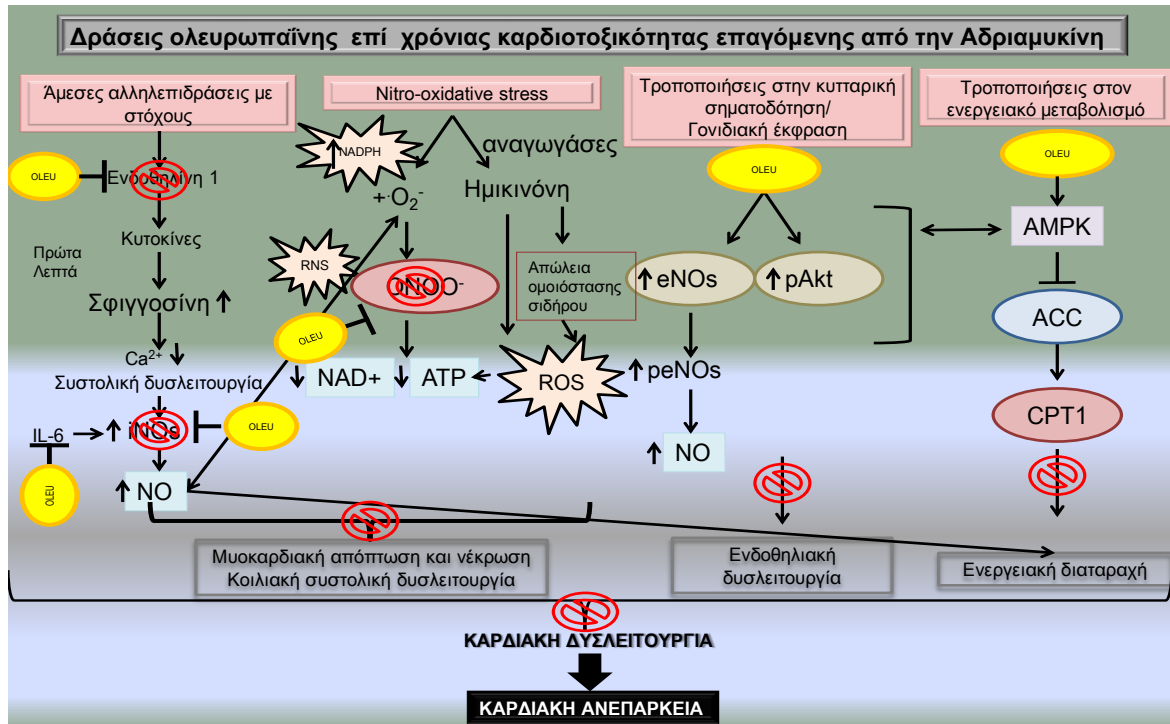
αντίθεση με την παρούσα εργασία, η οξεία χορήγηση της DXR δεν φαίνεται να επηρεάζει την αερόβια γλύκωση και για τον λόγο αυτό τόσο τα επίπεδα του γαλακτικού οξέος όσο και της γλυκόζης είναι παρόμοια με αυτά των μαρτύρων.

Σε αυτό το σημείο αξίζει να σημειωθεί και ένα επιπρόσθετο συμπέρασμα που μπορεί να εξαχθεί από τα αποτελέσματα της συνολικής πειραματικής διαδικασίας. Υπάρχουν πολλές έρευνες που επισημαίνουν την πιθανή εμπλοκή των σηματοδοτικών μονοπατιών της Akt και AMPK. Κάποιες παραθέτουν την AMPK ως upstream της Akt και μερικές άλλες το αντίστροφο. Μία έρευνα το 2009 ανακάλυψε ότι η AMPK δεν επάγει την φωσφορυλίωση της eNOS με άμεσο μόνο τρόπο αλλά και με έμμεσο, που περιλαμβάνει το σηματοδοτικό μονοπάτι της Akt¹³⁰. Ανεξάρτητα από την ακριβή σειρά των πρωτεϊνών αυτών στο σηματοδοτικό μονοπάτι, μπορούμε να πούμε ότι τα αποτελέσματα που πήραμε πιθανώς να δείχνουν διασταύρωση των μονοπατιών αυτών και μάλιστα με θετική ρύθμιση του ενός προς το άλλο. Η θετική επίδραση αυτή φαίνεται να σχετίζεται με την δράση της OLEU να ενεργοποιεί την eNOS και την Akt. Αυτό βέβαια για να επιβεβαιωθεί θα πρέπει να μελετηθεί εκτενέστερα σε μελλοντικές έρευνες.

Συνοψίζοντας, στο Σχήμα 57 παρουσιάζονται όλοι οι μηχανισμοί που απορρέουν από την παρούσα εργασία μέσω των οποίων η DXR επάγει την καρδιακή ανεπάρκεια, ενώ στο Σχήμα 58 παρουσιάζονται οι δράσεις της OLEU να προλαμβάνει την εκδήλωση της.



Σχήμα 57. Μηχανισμοί επαγωγής καρδιακής ανεπάρκειας από την DXR.



Σχήμα 58. Μηχανισμοί καρδιοπροστασίας της OLEU.

6. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑ

Συνοψίζοντας, η αμφισβήτηση στην υπόθεση ότι οι σχηματιζόμενες ελεύθερες ρίζες αποτελούν τον πρωταρχικό και κυριότερο μηχανισμό χρόνιας καρδιοτοξικότητας από την αδριαμυκίνη επιβεβαιώνεται από τα σηματοδοτικά μονοπάτια της Akt, AMPK, eNOS, iNOS, ET-1 και κυτοκινών η διατάραξη των οποίων από την αδριαμυκίνη επηρεάζει σε σημαντικό βαθμό την λειτουργία και υγεία του μυοκαρδίου. Η πρόκληση για τις επικείμενες μελέτες είναι όχι μόνο η ενεργοποίηση/απενεργοποίηση των πρωτεϊνών αυτών στο σωστό σημείο, αλλά και στο σωστό χρόνο και βαθμό προκειμένου να ενεργοποιηθούν/απενεργοποιηθούν τα μονοπάτια και να υπάρξουν σημαντικές θεραπευτικές επιλογές για την θεραπεία και διαχείριση των καρδιαγγειακών νόσων. Επίσης, διαπιστώνοντας την καρδιοπροστατευτική δράση της ολευρωπαΐνης μπορούμε να υποθέσουμε ότι ο μηχανισμός μέσω του οποίου δρα είναι σύνθετος και εκτός της αντιοξειδωτικής δράσης περιλαμβάνει και τον περιορισμό των οδυνηρών επιπτώσεων της αδριαμυκίνης στις πολύ σημαντικές για την απόπτωση, παραγωγή ενέργειας και καρδιακή λειτουργία πρωτεΐνες Akt, AMPK και eNOS αντίστοιχα. Επιπλέον, είναι σημαντικό να τονιστεί, παρόλο που δεν ήταν σκοπός της παρούσας εργασίας, ότι η αντιυπερτασική δράση της ολευρωπαΐνης, που αποτελεί την μοναδική έως και σήμερα επίσημη κλινική ενδειξή της, φαίνεται να σχετίζεται με την ενεργοποίηση της eNOS που έχει σαν επακόλουθο την απελευθέρωση του αγγειοδιασταλτικού παράγοντα NO.

Τέλος, θα είχε εξαιρετικό ενδιαφέρον και χρησιμότητα να σχεδιαστούν στο μέλλον κλινικές μελέτες οι οποίες θα αξιολογήσουν κατά πόσο η ολευρωπαΐνη θα μπορούσε να αποτελέσει μια βοηθητική θεραπευτική επιλογή στην ήδη εγκατεστημένη από την αδριαμυκίνη καρδιακή ανεπάρκεια.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- ¹ Harrison, Εσωτερική Παθολογία, 16^η Έκδοση, 2006. Εκδόσεις Παρισιάνου. Ι:753.
- ² Packer M. Survival in patients with chronic heart failure and its Potential modification by drug therapy. In: Cohn J.N. Drug Treatment of Heart Failure. Secaucus N.J. , ATC International, 1988; 273.
- ³ McMurray JJ et al : Epidemiology, aetiology, and prognosis of heart failure. Heart 2000;83:596.
- ⁴ Cowie MR, et al. The epidemiology of heart failure. Eur Heart J 1997; 18:208-225.
- ⁵ Χατσέρας Δημήτριος Ι., 1998. Εισαγωγή στην Κλινική Καρδιολογία, σύγχρονα δεδομένα. Ηλεκτρονική Έκδοση. Ηλεκτρονική σελίδα Πανεπιστημιακής Καρδιολογικής Κλινικής Δημοκρίτειου Πανεπιστημίου Θράκης. Κεφάλαια 7.
- ⁶ Zile MR et al: New concepts in diastolic dysfunction and diastolic heart failure. Circulation 2002; 105:1387, 1503.
- ⁷ CURRENT. Medical Diagnosis and Treatment. INTERNATIONAL EDITION. 2007; 10:396-404.
- ⁸ ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΗ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ. Stephen McPhee, Χαράλαμπος Μουτσόπουλος. Ιατρικές Εκδόσεις Λίτσας. 2000; 10:373,378.
- ⁹ ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΗ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ. Stephen McPhee, Χαράλαμπος Μουτσόπουλος. Ιατρικές Εκδόσεις Λίτσας. 2000; 10:371,377.
- ¹⁰ Poole-Wilson PA. Treatment of acute heart failure (Editorial). JAMA 2002;287: 1578-1580.
- ¹¹ Vander, Sherman, Luciano, M. Τσακόπουλος. Φυσιολογία του ανθρώπου. Εκδόσεις Πασχαλίδης. 8^η ΕΚΔΟΣΗ, Τόμος ΙΙ. 2001; 14:601,705.
- ¹² Κρεμαστινός Δημήτριος Θ. Καρδιολογία. Εκδόσεις Πασχαλίδης. 2005: 236.
- ¹³ Hunt SA et al: ACC/AHA Guidelines for the evaluation and management of chronic heart failure in the adult: executive summary. A report of the American College of Cardiology / American Heart Association Task Force on Practice Guidelines. J Am Coll Cardiol 2001;38:2101.
- ¹⁴ Laurence L. Brunton, John S. Lazo, Keith L. Parker. Goodman and Gilman's. The Pharmacological Basis of Therapeutics. Eleventh Edition. 2006;33:869-872.

- ¹⁵ Katz, A.M. The cardiomyopathy of overload: An unnatural growth response in the hypertrophied heart. *Ann. Intern. Med.*, 1994, 121:363-371.
- ¹⁶ Villarreal, F. *Interstitial Fibrosis in Heart Failure*. Springer, New York, 2005.
- ¹⁷ Lopaschuk D, Ussher J, Clifford D et al. Myocardial Fatty Acid Metabolism in Health and Disease. *Physiol Rev* 90: 207–258, 2010.
- ¹⁸ Janice M. Huss P. Mitochondrial energy metabolisms in heart failure: a question of balance. *J. Clin. Invest.* 115:547–555 (2005).
- ¹⁹ Ingwall J. Energy metabolism in heart failure and remodeling. *Cardiovascular Research* (2009) 81, 412–419.
- ²⁰ Ventura-Clapier R, Garnier A, Veksler V. Energy metabolism in heart failure. *J Physiol* 555.1 pp 1–13.
- ²¹ Wong F, Howie J, Petrie J et al. AMP-activated protein kinase pathway: a potential therapeutic target in cardio metabolic disease. *Clinical Science* (2009) 116, 607–620.
- ²² Kawasaki N, Leea J, Shimizu H et al. Cardiac energy metabolism at several stages of adriamycin-induced heart failure in rats. *International Journal of Cardiology* 55 (1996) 217-225.
- ²³ C. Carey, H. Lee, K. Woeltje. *Manual Θεραπευτικής*. 29^η έκδοση. Εκδόσεις Λίτσας. 2000; 6:187-203.
- ²⁴ Schindler T.H., Nitzche E.U., Munzel T., Olschewski M., Brink I., Jeserich M., Mix M., Buser P.T., Pfisterer M., Solzbach U., Just H. Coronary vasoregulation in patients with various risk factors in response to cold pressor testing: Contrasting myocardial blood flow responses to short and long-term vitamin C administration. *J Am Coll Cardiol* 42(5):814-822, 2003.
- ²⁵ Murphey L.G., Marrow J.D., Sawathiparnich P., Williams G.H., Vanghan D.E., Brown M.J., Acute angiotensin II increases plasma F2-isoprostanes in saltreplete human hypertensives. *Free Rad Biol Med* 35(7):711-718, 2003.
- ²⁶ Piconi L., Quagliario L., Ceriello A., Oxidative stress in diabetes. *Clin Chem Lab Med* 41(9): 1144-1149, 2003.
- ²⁷ Egashira K., Clinical importance of endothelial function in arteriosclerosis and ischemic heart disease. *Circ J* 66: 529-533, 2002.
- ²⁸ Keaney J.F. Jr., Larson M.G., Vasan R.S., Wilson P.W., Lipinske I., Corey D., Massaro J.M., Sutherland P., Vita J.A., Benjamin E.J., Framingham Study. Obesity

and systemic oxidative stress: clinical correlates of oxidative stress in the Framingham study. *Arterioscl Thromb Vasc Biol* 23: 434-439, 2003.

²⁹ Rajagopalan S., Meng X.P., Romasamy S., Harrison D.G., Galis Z.S., Reactive oxygen species produced by macrophage-derived foam cells regulate the activity of vascular matrix metalloproteinases in vitro. Implications for atherosclerotic plaque stability. *J Clin Invest* 98: 2572-2579, 1996.

³⁰ Luliano L., The oxidant stress hypothesis of atherogenesis. *Lipids* 36: 41-44, 2001.

³¹ Li P., Williams V., Liu L., Chen H., Sawamura T., Antakli T., Mehta J.L., LOX-1 inhibition in myocardial ischemia-reperfusion injury: modulation of MMP-1 and inflammation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 283: H1795-H1781, 2002.

³² Fayers K.E., Cummings M.H., Shaw K.M., Laight D.W., Nitrate tolerance and the links with endothelial dysfunction and oxidative stress. *Br J Clin Pharmacol* 56(6): 620-628, 2003.

³³ Altavilla D., Deodato B., Campo G.M., Arlotto M., Miano M., Squadritto G., Sanitta A., Cucinotta D., Ceccarelli S., Ferlito M., Tringeli M., Minutoli L., Caputi A.P., Squadritto F., IFRI042, a novel dual vitamin E-like antioxidant, inhibits activation of nuclear factor kappa B and reduces the inflammatory response in myocardial ischemia-reperfusion injury. *Cardiovasc Res* 47: 515-528, 2000.

³⁴ Karatzis E., Lekakis J., Papamichael C., Andreadou I., Cimponeriu A., Aznaouridis K., Papaioannou Th., Protogerou A., Mavrikakis M., Pravastatin rapidly induces a favorable effect on endothelial function in patients with unstable angina, independently from lipid peroxidation reduction. *Int. J. Cardiol.* In press.

³⁵ Halliwell B., *Biochem. Pharmacol.*, (1995), 49(10), 1341-1348.

³⁶ Roberfroid M., Calderon P.B., Marcel Dekker Inc., 1995, p. 193.

³⁷ Giordano F.J. Oxygen, oxidative stress, hypoxia, and heart failure. *J. Clin. Invest.* 2005; 115:500-508.

³⁸ Sawyer DB, Colucci WS. Mitochondrial oxidative stress in heart failure: Oxygen wastage revisited. *Circ Res* 2000; 86:119-120.

³⁹ Sheeran Freya, Pepe Salvatore. Energy deficiency in the failing heart: Linking increased reactive oxygen species and disruption of oxidative phosphorylation rate. *BBA-Bioenergetics* 2006; 1757(5-6):543-552.

⁴⁰ Kehrer, JP et al. (1987) Xanthine oxidase is not responsible for reoxygenation injury in isolated-perfused rat heart. *Free Rad. Res.* 19, 473.

- ⁴¹ Murohara T., Delyani J.A., Albelda S.M., Lefer A.M., Blockade of platelet endothelial cell adhesion molecule-1 protects against myocardial ischemia and reperfusion injury in cats. *J Immunol* 156: 3550-3557, 1996.
- ⁴² McArdle A., Pattwell D., Vasilaki A., Griffiths R.D., Jackson M.J., Contractile activity – induced oxidative stress: cellular origin and adaptive responses. *Am J Physiol Cell Physiol* 280: C621-C627, 2001.
- ⁴³ Murdoch CE, Zhang M et al. NADPH oxidase-dependent redox signalling in cardiac hypertrophy, remodelling and failure. *Cardiovascular Research* 2006; 71:208-215.
- ⁴⁴ Rueckschloss U., Dyerschmidt N., Morawietz H., NADPH oxidase in endothelial cells: impact on atherosclerosis. *Antiox. Redox. Signal.* 5(2): 171-180, 2003.
- ⁴⁵ Nakagami H., Takemoto M., Liao J.K., NADPH oxidase-derived superoxide anion mediates angiotensin II-induced cardiac hypertrophy. *J. Mol. Cell Cardiol.* I 35(7): 851-859, 2003.
- ⁴⁶ Landmesser U., Dikalov S., Price R., McCann L., Fukai T., Holland S.M., Mitch W.E., Harrison D.G., Oxidation of tetrahydrobiopterin leads to uncoupling of endothelial cell nitric oxide synthase in hypertension. *J Clin Invest* 111: 1201-1209, 2003.
- ⁴⁷ Moncada, S and Higgs, EA (1995) Molecular mechanisms and therapeutic strategies related to NO. *FASEB J.* 9, 1319.
- ⁴⁸ Snyder, SH (1995) NO endothelial NO. *Nature* 377, 196.
- ⁴⁹ Heymes C, Bendall JK, Ratajczak P, Cave AC, Samuel JL, Hasenfuss G, et al. Increased myocardial NADPH oxidase activity in human heart failure. *J Am Coll Cardiol* 2003; 41:2164-2171.
- ⁵⁰ Lopez Farre A, Casado S. Heart failure, redox alterations, and endothelial dysfunction. *Hypertension* 2001; 38:1400-1405.
- ⁵¹ Wattanapitayakul SK, Bauer JA. Oxidative pathways in cardiovascular disease: roles, mechanisms, and therapeutic implications. *Pharmacology & Therapeutics* 2001; 89: 187-206.
- ⁵² Pacher P, Schulz R, Liaudet L, Szabo C. Nitrosative stress and pharmacological modulation of heart failure. *Trends in pharmacological Sciences* 2005; 26(6):302-310.
- ⁵³ Forstermann U, Munzel T. Endothelial nitric oxide synthase in vascular disease: from marvel to menace. *Circulation* 2006; 113:1708-1714.

- ⁵⁴ Niki E., Yoshida Y., Saito Y., Noguchi N., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, (2005), 338, 668-676.
- ⁵⁵ Keith M, Geranmayen A, Sole MJ et al. Increased oxidative stress in patients with congestive heart failure. *J Am Coll Cardiol* 1998; 31:1352-1356.
- ⁵⁶ Polidori MC, Savino K, Alunni G et al. Plasma lipophilic antioxidants and malondialdehyde in congestive heart failure patients: relationship to disease severity. *Free Radic Biol Med* 2002; 32:148-152.
- ⁵⁷ Reznick AZ, Miao-Lin CE, Suzuki YJ et al. Modification of plasma proteins by cigarette smoke as measured by protein carbonyl formation. *Biochem. J.* 1992; 286:607-611.
- ⁵⁸ Fee A, Abraham E. Can we make sense out of cytokines? *Chest* 2000, 117:932-934.
- ⁵⁹ Sakai S, Miyauchi T, Sakurai T, et al. Endogenous endothelin-1 participates in the maintenance of cardiac function in rats with congestive heart failure: marked increase in endothelin-1 production in the failing heart. *Circulation.* 1996;93:1214–1222.
- ⁶⁰ McMillen MA, Huribal M, Cunningham ME, et al. Endothelin-1 increases intracellular calcium in human monocytes and causes production of interleukin-6. *Crit Care Med.*1995;23:34–40.
- ⁶¹ Mann D, Yaung J. Basic mechanisms in congestive heart failure. Recognizing the role of proinflammatory cytokines. *Chest* 1994, 105:897-904.
- ⁶² Levine B, Kalman J, Mayer L et al. Elevated circulating levels of tumor necrosis factor in sever chronic heart failure. *N Engl J Med* 1990,323:236-241.
- ⁶³ Torre-Amione G, Kapadia S, Benectid C et al. Proinflammatory cytokine levels in patients with depressed left ventricular ejection fraction: A report from the studies of Left Ventricular Dysfunction (SOLVD). *J Am Coll Cardiol* 1996, 27: 1201-1206.
- ⁶⁴ Ferrari R, Bachetti T, Confortini R et al. Tumor necrosis factor soluble receptors in patients with various degrees of congestive heart failure. *Circulation* 1995, 92:1479-1486.
- ⁶⁵ Anker S, Egerer K, Volk H et al. Elevated soluble CD 14 receptors and altered cytokines in chronic heart failure. *Am J Cardiol* 1997, 79:1426-1430.
- ⁶⁶ Tsutamoto T, Hisanaga T, Wada A et al. Interleukin-6 spillover in the periphera circulation increases with the severity of heart failure and the high plasma level of interleukin-6 is an important prognostic predictor in patients with congestive heart failure. *J Am Cardiol* 1998, 31:391-398.

- ⁶⁷ Koller-Strametz J, Pacher R, Frey B et al. Circulating tumor necrosis factor- α levels in chronic heart failure: relation to its soluble receptor II, interleukin-6 and neurohumoral variables. *J Heart Lung Transplant* 1998, 17:356-362.
- ⁶⁸ Yokoyama T, Vaca L, Rossen R et al. Cellular basis for negative inotropic effects of tumor necrosis factor- α in adult mammalian heart. *J Clin Invest* 1993, 92:2303-2312.
- ⁶⁸ Oral H, Dorn G, Mann D. Sphingosine mediates the immediate negative inotropic effects of tumor necrosis factor- α in the adult mammalian cardiac myocyte. *J Biol Chem* 1997, 272:4836-4842.
- ⁶⁹ Finkel M, Oddis C, Jacob T et al. Negative inotropic effects of cytokines on the heart mediated by nitric oxide. *Science* 1992, 257:387-389.
- ⁷⁰ Kelly R, Balligand J, Smith T. Nitric oxide and cardiac function. *Circ Res* 1996, 79:363-380.
- ⁷¹ Hare J, Loh E, Creager M et al. Nitric oxide inhibits the positive inotropic response to β -adrenergic stimulation in humans with left ventricular dysfunction. *Circulation* 1995, 92:2198-2203.
- ⁷² Oral H, Dorn G, Mann D. Sphingosine mediates the immediate negative inotropic effects of tumor necrosis factor- α in the adult mammalian cardiac myocyte. *J Biol Chem* 1997 2003; 41:2164-2171.
- ⁷³ Krown K, Page M, Nguyen C et al. Tumor necrosis factor α -induced apoptosis in cardiac myocytes: involvement of the sphingolipid signaling cascade in cardiac cell death. *J Clin Invest* 1996; 98:2854-2865.
- ⁷⁴ Kitajima I, Kawahara K, Nakajima T et al. Nitric oxide-mediated apoptosis in murine mastocytoma. *Biochem Biophys Res Commun* 1994; 204:244-251.
- ⁷⁵ Yoshizumi M, Perella M, Burnett J et al. tumor necrosis factor down-regulates an endothelial nitric oxide synthase mRNA by shortening its half-life. *Circ Res* 1993; 73:205-209.
- ⁷⁶ Flores E, Bistrain B, Pomposelli J et al. Infusion of tumor necrosis factor/cachectin produced muscle catabolism in the rat: asynergistic effect with interleukin-1. *J Clin Invest* 1989; 83:1614-1622.
- ⁷⁷ Singal PK, Iliskovic NN. Doxorubicin – induced cardiomyopathy. *N Engl J Med* 1998; 339:900-905.
- ⁷⁸ Doroshow JH. Doxorubicin-induced cardiac toxicity. *N Engl J Med* 1991; 324:843.

- ⁷⁹ Wojnowski L, Kulle B, Schirmer M, et al. NAD(P)H oxidase and multidrug resistance protein genetic polymorphisms are associated with doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Circulation* 2005; 112:3754.
- ⁸⁰ Luminari S, Montanini A, Caballero D, et al. Nonpegylate liposomal doxorubicin combination chemotherapy in elderly patients with diffuse large B-cell lymphoma: resultw from the phase II EURO 18 trial. *Ann Onco* 2010; 21: 1492.
- ⁸¹ Cardinale D, Sandri MT, Martinoni A, et al. Left ventricular dysfunction predicted by early troponin I release after high-dose chemotherapy. *J Am Coll Cardiol* 2000; 36:517.
- ⁸² Von Hoff DD, Layard MW, Basa P, et al. Risk factors for doxorubicin-induced congestive heart failure. *Ann Intern Med* 1979; 91:710.
- ⁸³ Bristow MR, Mason JW, Billingham ME, et al. Dose-effect and structure-function relationships in doxorubicin cardiomyopathy. *Am Heart J* 1981; 102:709.
- ⁸⁴ Singal P, Iliskovic N. Doxorubicin-induced cardiomyopathy. *The New England Journal of Medicine* 1998 vol.339 900-905.
- ⁸⁵ Simunek T, Sterba M, Popelova O et al. Anthracyclineinduced cardiotoxicity: Overview of studies examining the roles of oxidative stress and free cellular iron. *University in Prague Pharmacological Reports* 2009, 61, 154–171.
- ⁸⁶ Signal P, Iliskovic N, Li T et al. Adriamycin cardiomyopathy: pathophysiology and prevention. *FASEB J*. 11, 931-936 (1997).
- ⁸⁷ Mukhopadhyay P, Rajesh M, Batkai S et al.. Role of superoxide, nitric oxide, and peroxynitrite in doxorubicin-induced cell death in vivo and in vitro. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 296: H1466–H1483, 2009.
- ⁸⁸ Παπαθανασίου Α, Χάιδος Α, Γουδεβένος Ι. Cardiotoxicity induced by anthracyclines *Archives of Hellenic Medicine* 2001, 18(5):514-525.
- ⁸⁹ Diwakar J. Cardiotoxicity of doxorubicin and other anthracycline derivatives *Journal of Nuclear Cardiology* 2000;7:53-62.
- ⁹⁰ Minotti G, Menna P, Salvatorelli E et al. Anthracyclines: Molecular Advances and Pharmacologic Developments in Antitumor Activity and Cardiotoxicity. *Pharmacol Rev* 56:185–229, 2004.
- ⁹¹ Singal P, Iliskovic N, Li T et al. Heart failure due to doxorubicin. *Kuwait Medical Journal* 2001, 33 (2): 111-115.

- ⁹² Andreadou I, Sigala F., Iliodromitis E., et al. Acute doxorubicin cardiotoxicity is successfully treated with the phytochemical oleuropein through suppression of oxidative and nitrosative stress. *J.M.C. Cardiology*. 2007, 42:549-558.
- ⁹³ Nitobe J, Yamaguchi S, Okuyama M et al. Reactive oxygen species regulate FLICE inhibitory protein (FLIP) and susceptibility to Fas-mediated apoptosis in cardiac myocytes. *Cardiovascular Research* 57 (2003) 119–128.
- ⁹⁴ Venkatesan B, Prabhu S, Venkatachalam K et al. WNT1-Inducible Signaling Pathway Protein-1 Activates Diverse Cell Survival Pathways and Blocks Doxorubicin-induced Cardiomyocyte Death. *Cell Signal*. 2010 May ; 22(5): 809–820.
- ⁹⁵ Shiraishi I, Melendez J, Ahn Y et al. Nuclear Targeting of Akt Enhances Kinase Activity and Survival of Cardiomyocytes. *Circulation Research* 2004, 94:884-891.
- ⁹⁶ Negoro S, Tone H, Kunisada K et al. Glycoprotein 130 Regulates Cardiac Myocyte Survival in Doxorubicin-Induced Apoptosis Through Phosphatidylinositol 3-Kinase/Akt Phosphorylation and BclxL/Caspase-3 Interaction. *Circulation* 2001, 103:555-561.
- ⁹⁷ Taniyama Y, Walsh K. Elevated myocardial Akt signaling ameliorates doxorubicin-induced congestive heart failure and promotes heart growth. *J mol Cell Cardiol* 34, 1241-1247 (2002).
- ⁹⁸ Walsh K. Akt Signaling and Growth of the Heart. *Circulation* 2006, 113:2032-2034.
- ⁹⁹ Miyamoto S, Rubio M, Sussman M. Nuclear and mitochondrial signalling Akts in cardiomyocytes. *Cardiovascular Research* (2009) 82, 272–285.
- ¹⁰⁰ Shiojima I, Walsh K. Regulation of cardiac growth and coronary angiogenesis by the Akt/PKB signaling pathway. *Genes Dev*. 2006 20: 3347-3365.
- ¹⁰¹ Grahame D. Role of AMP-activated protein kinase in the metabolic syndrome and in heart disease. *FEBS Letters* 582 (2008) 81–89.
- ¹⁰² Michell B, Griffiths J, Mitchelhill K et al. The Akt kinase signals directly to endothelial nitric oxide synthase. *Current Biology* 1999, 9:845–848.
- ¹⁰³ Zou H, Li Y, Liu X, Wang X. An APAF-1.cytochrome c multimeric complex is a functional apoptosome that activates procaspase-9. *J Biol Chem*. 1999 Apr 23;274(17):11549-56.
- ¹⁰⁴ Drexler H. Nitric Oxide Synthases in the Failing Human Heart A Doubled-Edged Sword?. *Circulation*. 1999;99:2972-2975.

- ¹⁰⁵ Bredt D. Nitric oxide signaling specificity – the heart of the problem. *Journal of Cell Science* 116, 2003, 9-15.
- ¹⁰⁶ Fogli S, Nieri P, Cristina M. The role of nitric oxide in anthracycline toxicity and prospects for pharmacologic prevention of cardiac damage *FASEB J.* 18, 664–675 (2004).
- ¹⁰⁷ Mundle S, Gao X, Khan S et al. Two in situ labeling techniques reveal different patterns of DNA fragmentation during spontaneous apoptosis in vivo and induced apoptosis in vitro. *Anticancer Res.* 1995 Sep-Oct;15(5B):1895-904.
- ¹⁰⁸ Spallarossa P, Altieri P, Garibaldi S et al. Matrix metalloproteinase-2 and -9 are induced differently by doxorubicin in H9c2 cells: The role of MAP kinases and NAD(P)H oxidase. *Cardiovascular Research* 69 (2006) 736 – 745.
- ¹⁰⁹ Xu X, Persson H, Richardson D. Molecular Pharmacology of the Interaction of Anthracyclines with Iron. *Molecular Pharmacology* 68:261–271, 2005.
- ¹¹⁰ Minotti G, Cairo G, Monti E. Role of iron in anthracycline cardiotoxicity: new tunes for an old song? *FASEB J.* 13, 199–212 (1999).
- ¹¹¹ Thomas C, Aust S. Release of iron from ferritin by cardiotoxic anthracycline antibiotics. *Arch Biochem Biophys*, 1986, 248, 684–689.
- ¹¹² Yan X, Goukassian D, Morgan J. Neuregulin1-ErbB Signaling in Doxorubicin-Induced Cardiotoxicity. *Cardiotoxicity of Oncologic Treatments* 66-88.
- ¹¹³ Syntichaki P, Tavernarakis N. The biochemistry of neuronal necrosis: rogue biology? The calpain-cathepsin hypothesis *Nature Reviews Neuroscience* 2003, 4, 672-684.
- ¹¹⁴ Thorburn A, Frankel A. Apoptosis and anthracycline cardiotoxicity. *Mol Cancer Ther* 2006;5:197-199.
- ¹¹⁵ Delphy E, Hatem S, Andrieu N et al. Doxorubicin induces slow ceramide accumulation and late apoptosis in cultured adult rat ventricular myocytes. *Cardiovasc Res* 1999, 43:398-407.
- ¹¹⁶ Tokarska-Schlattner M, Zaugg M, Silva R et al. Acute toxicity of doxorubicin on isolated perfused heart: response of kinases regulating energy supply *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 289:H37-H47. 2005.
- ¹¹⁷ Gonzalez, Gottlieb. Cardiolipin: Setting the beat of apoptosis. *Apoptosis* (2007) 12:877–885.
- ¹¹⁸ Kagan V, Tyurin V, Jiang J et al (2005) Cytochrome c acts as a cardiolipin oxygenase

required for release of proapoptotic factors. *Nat Chem Biol* 1:223-232

¹¹⁹ Gratia S, Kay L, Potenza L et al. Inhibition of AMPK signaling by doxorubicin - at the crossroads of the cardiac responses to energetic, oxidative and genotoxic stress. *Cardiovascular Research Advance Access* published March 28, 2012 1-33.

¹²⁰ Young L, Baron J, Russell R. AMP-activated protein kinase: A key stress signaling pathway in the heart. *Trends Cardiovasc Med* 2005;15:110-118.

¹²¹ Carling D. The AMP-activated protein kinase cascade – a unifying system for energy control. *TRENDS in Biochemical Sciences* Vol.29 No.1 January 2004.

¹²² Grahame D, Sakamoto K. AMPK: A Key Sensor of Fuel and Energy Status in Skeletal Muscle. *Physiology* 21:48-60, 2006.

¹²³ Kahn B, Alquier T, Carling D et al. AMP-activated protein kinase: ancient energy gauge provides clues to modern understanding of metabolism *Cell Metab* 2005;1:15-25.

¹²⁴ Russell R, Coven J, Pypaert M et al. AMP-activated protein kinase mediates ischemic glucose uptake and prevents postischemic cardiac dysfunction, apoptosis, and injury. *J. Clin. Invest.* 114:495–503 (2004).

¹²⁵ Heidrich F, Schotola H, Popov A et al. AMPK – Activated Protein Kinase and its Role in Energy Metabolism of the Heart. *Current Cardiology Reviews*, 2010, 6, 337-342.

¹²⁶ Li J, Hu X, Selvakumar P et al. Role of the nitric oxide pathway in AMPK-mediated glucose uptake and GLUT4 translocation in heart muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 287:E834-E841, 2004.

¹²⁷ Chen Z, Mitchelhill K, Michell B et al. AMP-activated protein kinase phosphorylation of endothelial NO synthase. *FEBS Letters* 443 (1999) 285-289.

¹²⁸ Levine Y, Li G, Michel T. Agonist-modulated Regulation of AMP-activated Protein Kinase (AMPK) in Endothelial Cells. *The Journal of Biological Chemistry* Vol. 282, NO. 28, pp. 20351–20364, July 13, 2007.

¹²⁹ Wakasugi S, Fischman A, Babich J et al. Myocardial substrate utilization and left ventricular function in adriamycin cardiomyopathy. *J Nucl Med* 1993;34:1529-35.

¹³⁰ Gianni L, Herman E, Lipshultz S et al. Anthracycline Cardiotoxicity: From Bench to Bedside *J Clin Oncol.* 2008; 26(22): 3777–3784.

¹³¹ Lim C, Zuppinger C, Guo X, et al. Anthracyclines induce calpain-dependent titin proteolysis and necrosis in cardiomyocytes. *J Biol Chem* 2004;279:8290–8299.

- ¹³² Park A, Nagase H, Liu L et al. Mechanism of anthracycline-mediated downregulation of GATA4 in the heart. *Cardiovascular Research* (2011) 90, 97–104.
- ¹³² Keys, A., Menotti, A., Aravanis, C. (1984). The seven countries study: 2289 deaths in 15 years. *J. Prev. Med.* 13, 141-154.
- ¹³³ Kromhout, D., Keys, A., Aravanis, C., Buzina, R., et al. (1989). Food consumption patterns in the 1960s in seven countries. *Am. J. Clin. Nutr.*, 49, 889-894.
- ¹³⁴ Ranalli A., Contento S., Lucera L., et al. *Food Chem.*, (2006), 54, 434-440.
- ¹³⁵ Owen, R. W., A. Giacosa, W. E. Hull, et al (2000a). "The antioxidant/anticancer potential of phenolic compounds isolated from olive oil." *European Journal of Cancer*, 36(10): 1235-1247.
- ¹³⁶ Ghisalberti, E. L. (1998). "Biological and pharmacological activity of naturally occurring iridoids and secoiridoids." *Phytomedicine*, 5(2): 147-163.
- ¹³⁷ Pieroni, A., D. Heimler, L. Pieters, et al (1996). "In vitro anti-complementary activity of flavonoids from olive (*Olea europaea* L.) Leaves." *Pharmazie*, 51(10): 765-768.
- ¹³⁸ Gonzalez, M., A. Zarzuelo, M. J. Gamez, et al (1992). "Hypoglycemic activity of olive leaf." *Planta Med* 58(6): 513-515.
- ¹³⁹ Petkov, V. and P. Manolov (1972). "Pharmacological analysis of the iridoid oleuropein." *Arzneimittelforschung* 22(9): 1476-81.
- ¹⁴⁰ Visioli, F. and C. Galli (1998a). "The effect of minor constituents of olive oil on cardiovascular disease: new findings." *Nutr Rev* 56(5): 142-147.
- ¹⁴¹ Puerta, R. d. l., V. R. Gutierrez and J. R. Houtl (1999). "Inhibition of leukocyte 5-lipoxygenase by phenolics from virgin olive oil." *Biochem Pharmacol*, 57(4): 445-452.
- ¹⁴² Andreadou I, Papaefthimiou M, Zira A, et al. (2009). Metabonomic identification of novel biomarkers in doxorubicin cardiotoxicity and protective effect of the natural antioxidant oleuropein. *NMR in Biomedicine* 22, 585-592.
- ¹⁴³ Andreadou, I., Iliodromitis, E.K., Mikros, E., et al. (2006). The olive constituent oleuropein exhibits anti-ischemic, anti-oxidative and hypolipidemic effects in anesthetized rabbits. *J. Nutr.* 136, 2213-2219.
- ¹⁴⁴ Nicholson, J.K., Lindon, J.C., Holmes, E. (1999) Metabonomics: understanding the metabolic responses of living systems to pathophysiological stimuli via multivariate statistical analysis of biological NMR spectroscopic data. *Xenobiotica* 29, 1181–1189.

- ¹⁴⁵ Nicholson J.K., Connelly J., Lindon J.C., et al. (2002) *Nat. Rev. Drug Disc.* 1 153.
- ¹⁴⁶ Lindon J.C., Holmes E. and Nicholson J.K. (2007) *Metabonomics in pharmaceutical R & D*, *FEBS Journal* 274 1140–1151.
- ¹⁴⁷ Evilia R.F., *Anal. Letters*, (2001), 34(3), 227-236.
- ¹⁴⁸ Maniara G., Rajamoorthi K., Rajan S., et al. *Anal. Chem.*, (1998), **70**, 4921-4928.
- ¹⁴⁹ Griffiths L., Irving A.M., *Analyst.*, (1998), 123, 1061-1068.
- ¹⁵⁰ Seymour A-M.L., *Heart Lung. Circ.* (2003), 12(1), 25-30.
- ¹⁵¹ Dobson G.P., Himmelreich U., *Biochim. Biophys. Acta*, (2002), 1553, 261-267.
- ¹⁵² Damico L.A., White L.T., Yu Xin, et al. *J. Mol. Cell. Cardiol.*, (1996), 28, 989-999.
- ¹⁵³ Lopaschuk G.D., *J. Nucl. Cardiol.*, (1997),4(4), 316-328.
- ¹⁵⁴ Madden M.C., Van Winkle W.B., Vaughn J.M., et al. *J. Mol. Cell. Cardiol.*, (1993), 25, 587-597.
- ¹⁵⁵ Bollard M.E., Murray A.J., Clarke K., et al. *FEBS Letters*, (2003),553, 73-78.
- ¹⁵⁶ Griffin J.L., Williams H.J., Sang E., et al. *Magn. Reson. Med.*, (2001), 46, 249-255.
- ¹⁵⁷ Constantinou, M. A., Tsantili-Kakoulidou, A., Andreadou, et al. (2007) Application of NMR-based metabonomics to investigate the complexity emerged during ischemia-reperfusion in rabbits. Effect of preconditioning and exogenous intervention. *Eur J Pharm Sci*, 30: 303-314.
- ¹⁵⁸ Mayr M., Chung Y-L., Mayr U., et al. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol*, (2004),287, H937-H945.
- ¹⁵⁹ Mayr M., Mayr U., Chung Y-L., et al. *Proteomics*, (2004),4, 3751-3761.
- ¹⁶⁰ Beer M., *Eur. Radiol.*, (2004), 14, 1034-1047.
- ¹⁶¹ Levine RL, Garland D, Oliver CN, et al. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol* 1990; 186:464-478.
- ¹⁶² Hempelmann E, Schirmer RH, Fritsch G, et al (1987). "Studies on glutathione reductase and methemoglobin from human erythrocytes parasitized with *Plasmodium falciparum*". *Mol Biochem Parasitol.* 23 (1): 19–24.
- ¹⁶³ Towbin H, Staehelin T, Gordon J. (1979). "Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications.". *Proc Natl Acad Sci U S A.* 76 (9): 4350–4354.
- ¹⁶⁴ Renart J, Reiser J, Stark GR (1979). "Transfer of proteins from gels to diazobenzoyloxymethyl-paper and detection with antisera: a method for studying

antibody specificity and antigen structure.". *Proc Natl Acad Sci U S A.* 76 (7): 3116–3120.

¹⁶⁵ "Western blot antibody". *exactantigen.com*. Retrieved 2009-01-29.

¹⁶⁶ W. Neil Burnette (April 1981). "'Western blotting': electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate — polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A". *Analytical Biochemistry* (United States: Academic Press) 112 (2): 195–203. Retrieved 2008-04-03

¹⁶⁷ Ambroz K., (2006). "Improving quantification accuracy for Western blots" *Image Analysis* 09/2006.

¹⁶⁸ Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 227(5259), 680-685.

¹⁶⁹ Simpson, R.J. (2003) *Proteins and Proteomics: A laboratory manual.* Cold Spring Harbor Laboratory Press, USA.

¹⁷⁰ Westermeier, R. (1997) *Electrophoresis in practice.* 2nd edition. Weinheim, Germany.

¹⁷¹ Juan Rosai. *Ackerman's Surgical Pathology, Seventh Edition.* Mosby, St. Louis 1989, 35 – 42.

¹⁷² Gueron M. , Plateu P. , Decorps. M. , *Prog. NMR. Spec. ,*(1991),23,135-209.

¹⁷³ Lindon J. , Holmes E. , Nicholson J. *Prog. NMR Spec. ,* (2001) , 39 , 1-40 .

¹⁷⁴ Tsantili-Kakoulidou A. , *Appunti di Statistica-Chemiometria , Metodi Statistici Multiparametrici .*

¹⁷⁵ Signal P., Deally C., Weinberg L. *J.Moll.Cell.Cardiol.,* (1987) , 19 , 817-828 .

¹⁷⁶ Bollard M , Keum H., Beckonert O., et al. *Toxicol. Appl. Pharmacol . ,* (2005) , 204 , 135-151 .

¹⁷⁷ Waters N., Holmes E., Waterfield C., et al. *Biochem. Pharmacol. ,*(2002) , 64 , 67-77.

¹⁷⁸ Lindon J., Nicholson J., Everett J. *Annual Reports on NMR Spettroscopy ,*(1999),38,1-85.

¹⁷⁹ Holmes E., Foxall P., Sparaul M., et al. *J.C.,Pharm.Biomed.aNAL.,*(1997),15,1647-1659.

¹⁸⁰ Waters N., Holmes E., Waterfield C., et al. *Biochem.Pharmacol.,*(2002),64,67-77.

¹⁸¹ Nicholson J., Foxall P., Sparaul M., et al. *Anal.Chem.,*(1995),67,793.

¹⁸² Bollard M., Murray A., Clarke K., et al. *FEBS Letters,*(2003),553,73-78.

- ¹⁸³ Mayr M., Chung Y-L., Mayr U., et al. Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.,(2004),287,H937-H945.
- ¹⁸⁴ Lovric-Bencic M., Sikiric P., Hanzevacki JS., et al. Doxorubicin-congestive heart failure- increased big endothelin-1 plasma concentration: reversal by amlodipine, losartan and gastric pentadecapeptide BPC157 in rat and mouse. J Pharmacol Sci, 95: 19-26, 2-4.
- ¹⁸⁵ Fogli S, Nieri P, Breschi MC (2004) The role of nitric oxide in anthracycline toxicity and prospects for pharmacologic prevention of cardiac damage. Faseb J 18:664-675.
- ¹⁸⁶ Aldieri E, Bergandi L, Riganti C, et al. Doxorubicin induces an increase of nitric oxide synthesis in rat cardiac cells that is inhibited by iron supplementation. Toxicol Appl Pharmacol, 185: 85-90, 2002.
- ¹⁸⁷ Neilan TG, Blake SL, Ichinose F, et al. (2007) Disruption of nitric oxide synthase 3 protects against the cardiac injury, dysfunction, and mortality induced by doxorubicin. Circulation 116:506–514.
- ¹⁸⁸ Pacher P, Liaudet L, Bai P, et al. (2003) Potent metalloporphyrin peroxynitrite decomposition catalyst protects against the development of doxorubicin-induced cardiac dysfunction. Circulation 107:896–904.
- ¹⁸⁹ Deng S, Kruger A, Schmidt A, et al. Differential roles of nitric oxide synthase isozymes in cardio toxicity and mortality following chronic doxorubicin treatment in mice. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol. Jul;380(1):25-34,2009
- ¹⁹⁰ Hardie DG. AMP_activated protein kinase: an energy sensor that regulates all aspects of cell function. Genes Dev 2011, 25: 1895-1908.
- ¹⁹¹ Konichi M, Haraguchi G, Ohigashi H, et al. Adiponectin protects against doxorubicin-induced cardiomyopathy by anti-apoptotic effects through AMPK up-regulation. Cardiovasc Res, 2011, 89: 309-319.
- ¹⁹² Chen ZP, Mitchelhill KJ, Mitchell BJ, et al. AMP-activated protein kinase phosphorylation of endothelial NO synthase. FEBS Lett, 1999, 443: 285-289.
- ¹⁹³ Sasaki H, Asanuma H, Fujita M, et al. Metformin prevents progression of heart failure in dogs: role of AMP-activated protein kinase. Circulation, 2009, 119: 2568-2577.
- ¹⁹⁴ Fujio Y, Nguven T, Wencker D, et al. Akt promotes survival of cardiomyocytes in vitro and protects against ischemia-reperfusion injury in mouse heart. Circulation, 2000, 101: 660-667.

- ¹⁹⁵ Hulshman M, Stanek B, Frey B, et al, Exercise test, endothelin and prognosis in heart failure. *J Am Coll Cardiol*, 1998; 32: 1695-1700. *Circulation*, 2003; 108, Suppl. 1: 278-284.
- ¹⁹⁶ Pacher R, Stanek B, Hulshman M, et al. Prognostic impact of big endothelin-1 plasma concentration compared with invasive hemodynamic evaluation in severe heart failure. *J Am Coll Cardiol*, 1996; 27: 633-641.
- ¹⁹⁷ Wagner FD, Buz S, Knosalla C, et al. Modulation of circulating endothelin-1 and big endothelin by nitric oxide inhalation following left ventricular assist device implantation.
- ¹⁹⁸ Kell R, Haunstetter A, Dengler TJ, et al. Do cytokines enable risk stratification to be improved in NYHA functional class III patients? Comparison with other potential predictors of prognosis. *Eur Heart J* 2002, 23:70-78.
- ¹⁹⁹ Munger M, Johnson B, Amber IJ, et al. Circulating concentrations of proinflammatory cytokines in mild or moderate heart failure secondary to ischemic or idiopathic dilated cardiomyopathy. *Am J Cardiol* 1996, 77:723-727.
- ²⁰⁰ Tan G, Lou Z, Liao W, et al. Potential Biomarkers in Mouse Myocardium of Doxorubicin-Induced Cardiomyopathy: A Metabonomic Method and its Application. *PLoS one*.2011, 6(11).
- ²⁰¹ Wakasugi S, Fischman AJ, Babich JW, et al. Myocardial substrate utilization and left ventricular function in adriamycin cardiomyopathy. *J Nucl Med*. 1993;34:1529–1535.
- ²⁰² Opie L. *The Heart, Physiology and Metabolism*, Second Edition. 1991;10:250-295.
- ²⁰³ Kumar SN, Konorev EA, Aggarwal D, et al. Analysis of proteome changes in doxorubicin-treated adult rat cardiomyocyte. *J Proteomics*. 2011;74:683–697.
- ²⁰⁴ Carvalho R., Sousa R., Cadete V., et al. Metabolic remodeling associated with subchronic doxorubicin cardiomyopathy. *Toxicology* 270 (2010) 92-98.
- ²⁰⁵ Taegtmeyer H, Hems R, Krebs HA. Utilization of energy providing substances in the isolated working rat heart. *Biochem J* 1980;186:701-711.
- ²⁰⁶ Gnanapragasam A, Yogeeta S, Subhashini R, et al. Adriamycin induced myocardial failure in rats: protective role of *Centella asiatica*. *Mol Cell Biochem*. 2007;294:55–63.
- ²⁰⁷ Buse M.G., Reid S.S. (1975) Leucine. A possible regulator of protein turnover in muscle. *J Clin Invest* 56:1250–1261.

- ²⁰⁸ Anthony JC, Anthony TG, Kimball SR, et al. Signaling pathways involved in translational control of protein synthesis in skeletal muscle by leucine. *J Nutr.* 2001;131:S856–60.
- ²⁰⁹ Tracy G. Anthony and Joshua C. Anthony. AMPing Down Leucine Action in Skeletal Muscle. *J Nutr.* 138: 1887–94, 2008.
- ²¹⁰ Hardie DG, Sakamoto K. AMPK: a key sensor of fuel and energy status in skeletal muscle. *Physiology (Bethesda).* 2006;21:48–60.
- ²¹¹ Belzer FO, Southard JH. Principles of solid-organ preservation by cold storage. *Transplantation* 1988;45(4):673–676.
- ²¹² Bordoni A., Biagi P., Hrelia S. The impairment of essential fatty acid metabolism as a key factor in doxorubicin-induced damage in cultured rat cardiomyocytes. *Biochim Biophys Acta.* 1999;1440:100-106.
- ²¹³ Schaffer T, Takahashi K, Azuma J. Role of osmoregulation in the action of taurine. *Amino Acids,* 2000: 19: 527-546.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Εισαγωγή: Η ολευρωπαϊνή (*OLEU*) αποτελεί το κύριο πολυφαινολικό συστατικό της ελιάς. Διαθέτει αξιολογώτερες αντιοξειδωτικές ιδιότητες και έχει δειχθεί, μεταξύ άλλων, ότι εμφανίζει καρδιοπροστατευτική δράση. Η αδριαμυκίνη (*DXR*) αποτελεί έναν συχνά χρησιμοποιούμενο αντινεοπλασματικό παράγοντα, αλλά η χρήση της περιορίζεται από την εμφάνιση δόσοεξαρτώμενης καρδιομυοπάθειας και καρδιακής ανεπάρκειας. Ο σκοπός της παρούσας μελέτης είναι να αξιολογήσει την επίδραση της *OLEU* στην επαγόμενη από την *DXR* καρδιακή ανεπάρκεια *in vivo*.

Μέθοδος: Ενενήντα επίμυες τυχαιοποιήθηκαν σε 6 ομάδες: Ομάδα ελέγχου, *OLEU-1* και *OLEU-2* στις οποίες χορηγήθηκαν 1000 και 2000 mg/kg *OLEU* αντίστοιχα ενδοπεριτοναϊκά (*i.p.*) για 14 συνεχόμενες ημέρες, ομάδα *DXR* στην οποία χορηγήθηκαν *i.p.* 18 mg/kg *DXR* σε έξι ισόποσες δόσεις μέσα σε διάστημα δύο εβδομάδων, ομάδες *DXR-OLEU-1* και *DXR-OLEU-2* στις οποίες χορηγήθηκαν *OLEU* και *DXR* για 14 ημέρες όπως αναφέρεται ανωτέρω. Μετά το τέλος του πρωτοκόλλου εγχύσεων οι επίμυες αναισθητοποιήθηκαν και πραγματοποιήθηκε ηχοκαρδιογραφική εξέταση (Vivid-i, GE Healthcare με 12MHz probe). Στη συνέχεια οι επίμυες θυσιάστηκαν και ο καρδιακός ιστός ταχύτατα αφαιρέθηκε, εκπλύθηκε αμέσως με φυσιολογικό ορό και διατηρήθηκε σε καταψύκτη στους -70°C. Ένα μέρος από τα δείγματα καρδιακού ιστού χρησιμοποιήθηκαν για ιστολογική και ανοσοϊστοχημική αξιολόγηση, ενώ το υπόλοιπο χρησιμοποιήθηκε για την εκτίμηση της μηλονικής διαλδεύδης (MDA) και των πρωτεϊνικών καρβονυλίων (PCs) ως δείκτες οξειδωτικού στρες, της νιτροτυροσίνης (NT) ως δείκτη «nitrosative» στρες, της ιντερλευκίνης-6 (IL-6) and Big ενδοθηλίνης-1 (Big ET-1) που αποτελούν σημαντικούς δείκτες της καρδιακής αναδιαμόρφωσης, της iNOS και eNOS με την μέθοδο Western-Blot ως δείκτες φλεγμονής, της AMPK και Akt με την μέθοδο Western-Blot ως δείκτες του ενεργειακού μεταβολισμού και απόπτωσης αντίστοιχα, ενώ τέλος πραγματοποιήθηκε και ο προσδιορισμός των βιοδεικτών και μεταβολιτών μέσω φασματοσκοπία NMR η οποία αποτελεί αξιόπιστη μέθοδο για την μελέτη αλλαγών του μεταβολικού προφίλ του μυοκαρδίου.

Αποτελέσματα: Ογδόντα δύο πειραματόζωα επιβίωσαν μετά το τέλος του πειραματικού μέρους της μελέτης. Η θνητότητα στην ομάδα της *DXR* ήταν 19% μετά

το τέλος των χορηγήσεων. Η μορφολογία των καρδιακών ιστών ήταν φυσιολογική στην ομάδα των control καθώς και στις ομάδες *OLEU-1* και *OLEU-2*. Αντίθετα στην ομάδα της *DXR* παρατηρήθηκαν αλλοιώσεις που περιελάμβαναν οίδημα, χρόνια φλεγμονή καθώς και εκφύλιση των μυοκαρδιακών ιστών. Τέλος, στις ομάδες *DXR-OLEU-1* και *DXR-OLEU-2* παρατηρήθηκε μια μικρή υπερτροφία των καρδιακών ιστών χωρίς όμως να συνυπάρχουν στοιχεία οιδήματος, χρόνιας φλεγμονής και εκφύλισης. Στην ομάδα της *DXR* οι υπέρηχοι κατέδειξαν μείωση της μάζας της αριστερής κοιλίας, μείωση του κλάσματος εξώθησης της αριστερής κοιλίας, αύξηση της τελο-συστολικής διαμέτρου της αριστερής κοιλίας καθώς και τάση για καρδιακή αναδιαμόρφωση. Αντίθετα, στις ομάδες *OLEU-1* και *OLEU-2* καθώς και στις ομάδες *DXR-OLEU-1* και *DXR-OLEU-2* οι υπέρηχοι δεν παρουσίαζαν καμία διαφοροποίηση σε σχέση με την ομάδα των *Control*. Επιπλέον η *OLEU* μείωσε το οξειδωτικό και «nitrosative» στρες, που επάγεται από την χορήγηση της *DXR*, ενώ μείωσε και τα αυξημένα επίπεδα της Big ET-1 και IL-6 που επάγουν την έκφραση της iNOS και έχουν σαν αποτέλεσμα την καταστολή του μυοκαρδίου. Από τα αποτελέσματα της Western blot ανάλυσης, διαπιστώνουμε αρχικά ότι η *DXR* προκαλεί απενεργοποίηση των Akt και AMPK κινασών και της eNOS συνθάσης στο μυοκάρδιο σε σχέση με την ομάδα των *Control*. Τα αποτελέσματα αποδεικνύουν την αρνητική επίδραση της *DXR* στους αντί-αποπτωτικούς μηχανισμούς (Akt), στον καρδιακό ενεργειακό μεταβολισμό (AMPK) και την ομοιόσταση του NO, μορίου σημαντικού για την φυσιολογική καρδιακή λειτουργία (eNOS). Επιπλέον, μελετώντας και τις υπόλοιπες ομάδες παρατηρούμε ότι τόσο στην ομάδα *DXR-OLEU-1* όσο και στην *DXR-OLEU-2*, οι αρνητικές επιδράσεις της *DXR* όχι μόνο μετριάστηκαν σε πολύ σημαντικό ποσό, αλλά και αντιστράφηκαν, υποδεικνύοντας με αυτόν τον τρόπο την προληπτική δράση της *OLEU* στην επαγόμενη από την *DXR* καρδιακή ανεπάρκεια. Πιο συγκεκριμένα, η *OLEU* αύξησε τα ποσοστά φωσφορυλίωσης των τριών υπό μελέτη πρωτεϊνών, συντελώντας έτσι στην καλή καρδιακή λειτουργία και εμποδίζοντας την εκδήλωση και ανάπτυξη μη αναστρέψιμης καρδιακής ανεπάρκειας. Τέλος, εφαρμόζοντας στατιστική επεξεργασία των φασμάτων NMR με ανάλυση κυρίων συνιστωσών (PCA) παρατηρήσαμε σαφή διαχωρισμό στο μεταβολικό προφίλ μεταξύ της ομάδας των *Control* και της ομάδας της *DXR*. Το μεταβολικό προφίλ των ομάδων που έλαβαν *DXR* και *OLEU* φαίνεται να πλησιάζει αυτό της ομάδας των *Control*. Μελετώντας τους μεταβολίτες στην ομάδα της *DXR* παρατηρήσαμε αναστολή της οδού της αερόβιας γλυκόλυσης και της οξείδωσης των λιπαρών οξέων που φαίνεται

να σχετίζεται με την αναστολή της ενεργοποίησης της AMPK. Αντίθετα ο συνδυασμός της *DXR* με την *OLEU* φαίνεται προλαμβάνει την διαταραχή του ενεργειακού μεταβολισμού από την *DXR*.

Συμπέρασμα: Η παρούσα εργασία δείχνει για πρώτη φορά ότι η χορήγηση της *OLEU* σε επίμυες υπό *DXR* αντικαρκινική θεραπεία έχει καρδιοπροστατευτική δράση έναντι της επαγόμενης καρδιακής ανεπάρκειας. Ο υποκείμενος μηχανισμός είναι σύνθετος και εκτός της αντιοξειδωτικής δράσης περιλαμβάνει και τον περιορισμό των οδονηρών επιπτώσεων της αδριαμυκίνης στις πολύ σημαντικές για την απόπτωση, παραγωγή ενέργειας και καρδιακή λειτουργία πρωτεΐνες Akt, AMPK και eNOS αντίστοιχα.

ABSTRACT

Introduction: Oleuropein (*OLEU*) is a natural phenolic antioxidant, which is present in elevated concentration in olives, olive oil and olive tree leaves conferring protection to the heart. Adriamycin (*DXR*) is one of the most effective chemotherapeutic agents but with a dose-dependent induction of cardiomyopathy and heart failure. The aim of the present study was to evaluate the effect of *OLEU* in *DXR*-induced heart failure in vivo.

Methods: Ninety rats were randomly divided into 6 groups and treated as follows: *Control* group with no treatment, *OLEU-1* and *OLEU-2* groups, treated with 1000 and 2000 mg/Kg of *OLEU* respectively, given intraperitoneally (i.p.), for 14 consecutive days, *DXR* group treated with i.p. injection of 18mg/kg of *DXR*, divided into 6 equal doses and given over a period of 2 weeks, *DXR-OLEU-1* and *DXR-OLEU-2* groups, rats treated with *OLEU* and *DXR* for 14 days as previously described. At the end of the injection protocols the rats were anesthetized and subjected transthoracic echocardiographic examination (Vivid-i, GE Healthcare with a 12MHz probe). Then the rats were sacrificed and the hearts were rapidly excised for histological evaluation and immunohistochemical evaluation, while the remainder was used for the estimation of malondialdehyde (MDA) and protein carbonyls (PCs) as markers of oxidative stress, nitrotyrosine (NT) as index «nitrosative» stress, interleukin-6 (IL-6) and Big endothelin-1 (Big ET-1), which are important indicators of cardiac remodeling, eNOS and iNOS with Western-Blot method as inflammatory markers, AMPK and Akt with Western-Blot method as indicators of energy metabolism and apoptosis, respectively, and finally held and the identification of biomarkers and metabolites by NMR spectroscopy, which is a reliable method for the study of changes of the metabolic profiles of the cardiac cell.

Results: Eighty two rats completed the study. The mortality in the *DXR* group was 19% by end of the injection protocol. Normal morphology of the cardiac tissue was seen in the *Control* group and in groups *OLEU-1* and *OLEU-2*. Myocardium exhibited morphological changes in *DXR* group only including edema, chronic inflammation and degeneration of myocardial cells such as vacuolization. In the *DXR-OLEU-1* and *DXR-OLEU-2* groups mild hypertrophy without edema, inflammation

and myocardial degeneration was observed. *DXR* induced a small decrease in wall thickness, a decrease in left ventricular (LV) mass, a decrease in fractional shortening (an index of systolic function), an increase in end-systolic LV diameter, and a trend towards adverse cardiac remodeling. Combined *DXR-OLEU* and *OLEU* alone groups did not cause any change and the animals did not differ from the normal *Control*. Furthermore, *OLEU* reduced oxidative and «nitrosative» stress, induced by the administration of *DXR*, and reduced the increased levels of Big ET-1 and IL-6 that inducing the expression of iNOS and result in myocardial suppression. The results of Western blot analysis demonstrate that the administration of *DXR* causes deactivation of Akt and AMPK kinases and eNOS synthase in the myocardium in relation to the group of *Control*. The results demonstrate the adverse effect of *DXR* in anti-apoptotic mechanisms (Akt), in cardiac energy metabolism (AMPK) and homeostasis NO, molecule important for normal cardiac function (eNOS). Moreover, studying and the other groups observe that both the group of *DXR-OLEU-1* and the group of *DXR-OLEU-2*, the negative effects of *DXR* mitigated not only a very significant amount, but reversed, indicating thereby the preventive effect of the *OLEU* in *DXR*-induced heart failure. In particular, *OLEU* increased phosphorylation of three proteins, thereby contributing to good cardiac function and preventing the occurrence and development of irreversible heart failure. Finally, by applying statistical analysis of NMR spectra with principal components analysis (PCA) we observed a clear separation between the metabolic profile of the group of *Control* and the group of *DXR*. The metabolic profile of the groups that received *OLEU* and *DXR* seems to be approaching the group of *Control*. Studying metabolites of the group of *DXR* observed inhibition of aerobic glycolysis and oxidation of fatty acids that appears to be related to the inhibition of the activation of AMPK. Instead, the combination of the *DXR* and *OLEU* shown to prevents the disturbance of energy metabolism by *DXR*.

Conclusion: The present study shows for the first time that the administration of *OLEU* in rats under *DXR* anticancer therapy has cardioprotective effect against induced heart failure. The underlying mechanism is complex and beyond the antioxidant activity include reducing the effects of adriamycin in very important for apoptosis, energy production and cardiac function proteins Akt, AMPK and eNOS respectively.