

2017

«Μεταβολομική Ανάλυση επίδρασης της Λεβοσιμεντάνης στην οξεία καρδιοτοξικότητα από Δοξορουβικίνη. Μελέτη σε επίμυες»

Αντόπας Αλέξανδρος

Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών

15/2/2017

**ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗ ΣΧΟΛΗ**

ΤΟΜΕΑΣ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ



ΜΕΤΑΒΟΝΟΜΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΗΣ ΛΕΒΟΣΙΜΕΝΤΑΝΗΣ ΣΤΗΝ ΟΞΕΙΑ ΚΑΡΔΙΟΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑ ΑΠΟ ΔΟΞΟΡΟΥΒΙΚΙΝΗ. ΜΕΛΕΤΗ ΣΕ ΕΠΙΜΥΕΣ.

ΑΝΤΥΠΑΣ ΑΛΕΞΑΝΔΡΟΣ

Φαρμακοποιός

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΔΙΠΛΩΜΑ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ
ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ – ΕΛΕΓΧΟΣ ΠΟΙΟΤΗΤΑΣ

ΑΘΗΝΑ 2017

Επιβλέποντες Καθηγητές:

Ιωάννα Ανδρεάδου, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια του Τομέα Φαρμακευτικής Χημείας ΕΚΠΑ

Εμμανουήλ Μικρός, Καθηγητής του Τομέα Φαρμακευτικής Χημείας ΕΚΠΑ

Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή:

- Εμμανουήλ Μικρός, Καθηγητής του Τομέα Φαρμακευτικής Χημείας ΕΚΠΑ
- Ιωάννα Ανδρεάδου, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια του Τομέα Φαρμακευτικής Χημείας ΕΚΠΑ
- Ευάγγελος Γκίκας, Επίκουρος Καθηγητής του Τομέα Φαρμακευτικής Χημείας ΕΚΠΑ

Ευχαριστίες

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια κα. Ιωάννα Ανδρεάδου, η οποία και μου ανέθεσε το θέμα της παρούσας εργασίας. Η εμπιστοσύνη της και η υποστήριξή της από τα πρώτα βήματα της πορείας μου στον ερευνητικό κόσμο μέχρι και την ολοκλήρωση αυτής της διπλωματικής εργασίας, ήταν συνεχείς.

Στη συνέχεια, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Καθηγητή κ. Εμμανουήλ Μικρό, για την ευκαιρία που μου έδωσε να ασχοληθώ με τον Πυρηνικό Μαγνητικό Συντονισμό καθώς και για τις επισημάνσεις, την βοήθεια και την υπομονή του κατά την εκπόνηση της εργασίας.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω τον Επικουρο Καθηγητή κ. Ευάγγελο Γκίκα, μέλος της τριμελούς επιτροπής, για την υποστήριξη και για τις επισημάνσεις του.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες θα ήθελα να εκφράσω στην Δρ. Δήμητρα Μπενάκη για την πολύτιμη βοήθειά της σε κάθε στάδιο της παρούσας εργασίας. Τόσο στην προετοιμασία των δειγμάτων όσο και στην λήψη αλλά και επεξεργασία των φασμάτων NMR η βοήθεια και η εμπειρία της ήταν ανεκτίμητες.

Δεν θα μπορούσα να μην ευχαριστήσω τον υποψήφιο διδάκτορα Παναγιώτη Εφεντάκη για τον χρόνο του και την βοήθειά του τόσο στο εργαστηριακό κομμάτι της συνεργασίας μας όσο και στο επίπεδο της επεξεργασίας και επεξήγησης των αποτελεσμάτων της παρούσας εργασίας.

Θα ήταν σφάλμα μου αν δεν ευχαριστούσα τις εργοδότες μα πάνω απ' όλα συναδέλφους φαρμακοποιούς, κα Ρέμυ Μαυρομάτη και κα Βάσια Καλπογιάννη για την υποστήριξη και την υπομονή τους καθόλη την περίοδο του ΠΜΣ.

Ευχαριστώ επίσης τους φίλους μου Εύη Βαρβαρέσου, Άγγελο Καλλέργη, Παναγιώτη Κιοσπέ και Μανώλη Οθήτη για την πολύτιμη φιλία τους, την υποστήριξή τους και την παρουσία τους όλα αυτά τα χρόνια.

Τέλος, θέλω να ευχαριστήσω μέσα από την καρδιά μου τους γονείς μου και τον αδελφό μου για την δύναμη, την στήριξη, την αγάπη και την ενέργεια που μου έδωσαν και μου δίνουν όλα αυτά τα χρόνια για να πραγματοποιήσω κάθε μου όνειρο.

Σας Ευχαριστώ..

«Σοφία γὰρ μόνον τῶν κτημάτων ἀθάνατον»

Ισοκράτης, Λόγοι, Προς Δημόνικον,1.19

Περιεχόμενα

Περιεχόμενα	6
Περίληψη	8
Abstract	10
ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	12
1. Καρδιοτοξικότητα από Δοξορουβικίνη	13
1.1 Δοξορουβικίνη.....	13
1.2 Χρήσεις της Δοξορουβικίνης στην κλινική πράξη.....	13
1.3 Τοξικότητα Δοξορουβικίνης - Γενικά (15)	14
• Ήπαρ	14
• Νεφροί	15
• Εγκέφαλος	15
• Λοιπά σημεία τοξικότητας	15
1.4 Καρδιοτοξικότητα από Δοξορουβικίνη.....	15
1.5 Μηχανισμός Επαγωγής της Καρδιοτοξικότητας.....	17
1.6 Αντιμετώπιση Καρδιοτοξικότητας.....	18
1.6.1 Έρευνα Καρδιοπροστατευτικών Θεραπειών	18
1.6.2 Ελευρωπαΐνη και Καρδιοτοξικότητα	20
1.6.3 Η κατάσταση σήμερα..	21
2. Λεβοσιμεντάνη	22
2.1 Φαρμακοδυναμικό Προφίλ (49)	22
2.2 Διάνοιξη Μιτοχονδριακών Διαύλων K _{ATP}	23
2.3 Καρδιοπροστατευτική Δράση της Λεβοσιμεντάνης	25
2.4 Τελευταία δεδομένα για την Λεβοσιμεντάνη	27
ΣΚΟΠΟΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ	28
ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	29
1. Χορηγούμενες ουσίες	30
1.1 Δοξορουβικίνη (DXR)	30
1.2 Λεβοσιμεντάνη (LEVO)	30
1.3 5-Υδροξυδεκανοϊκό Οξύ (5-HD)	31
1.4 Υπόλοιπες ουσίες που χορηγήθηκαν.....	31
2. Πρωτόκολλο	32

2.1 Πειραματόζωα	32
2.2 Πειραματική Διαδικασία	33
2.3 Προκατεργασία Δειγμάτων	34
2.3.1 Ομογενοποίηση Μυοκαρδιακού Ιστού	34
2.3.2 Εκχύλιση Δειγμάτων	34
2.3.3 Προετοιμασία Δειγμάτων NMR	35
2.4 Πυρηνικός Μαγνητικός Συντονισμός (NMR)	35
2.4.1 Βασικές Αρχές NMR (69)	35
2.4.2 Καταγραφή φάσματος NMR	37
2.4.3 Χαρακτηριστικά Μεθόδου	39
2.5 Λήψη Φασμάτων NMR	39
2.6 Εξαγωγή Δεδομένων NMR	40
3. Ανάλυση Δεδομένων NMR	41
3.1 Προεπεξεργασία	41
3.2 Χημειομετρική Ανάλυση	42
3.3 Επικύρωση Πολυπαραμετρικών Χημειομετρικών Μοντέλων	43
3.3.1 Διαγνωστικές Παράμετροι	43
3.3.2 Διασταυρούμενη Επικύρωση (Cross-Validation, CV) και Μεταθετικός Έλεγχος (Permutation Test)	45
4. Αποτελέσματα	46
4.1 Απόδοση Κορυφών	46
4.2 Χημειομετρική Ανάλυση δεδομένων NMR	55
4.2.1 Αποτελέσματα PCA	55
4.2.2 Αποτελέσματα PLS-DA	57
4.2.3 Αποτελέσματα oPLS	60
4.2.4 Διάγραμμα Heatmap	65
4.2.5 Στατιστική Ανάλυση Ανοva	66
4.3 Συζήτηση – Ερμηνεία Αποτελεσμάτων	68
4.4 Επίλογος και Συμπεράσματα	72
Βιβλιογραφία	73

Περίληψη

Η Δοξορουβικίνη (DXR) είναι ένα ευρέως χρησιμοποιούμενο αντικαρκινικό φάρμακο όμως η δράση του συνοδεύεται από καρδιοτοξικότητα η οποία μπορεί να καταλήξει σε μη αντιστρεπτή καρδιακή ανεπάρκεια. Η Λεβοσιμεντάνη (LEVO) είναι ένα φάρμακο με ινότροπη και αγγειοδιασταλτική δράση, ενδείκνυται για τη βραχυχρόνια θεραπεία της σοβαρής χρόνιας καρδιακής ανεπάρκειας, καθώς επίσης και σε περιπτώσεις όπου η συμβατική θεραπεία κρίνεται αναποτελεσματική.

Στην παρούσα εργασία, μελετάται η δράση της λεβοσιμεντάνης (LEVO) στην χρόνια καρδιακή ανεπάρκεια, σε σχέση με την καρδιοτοξικότητα που επάγεται από την δοξορουβικίνη (DXR). Η εργασία αναφέρεται στην μεταβολομική ανάλυση, με την χρήση NMR, του μυοκαρδιακού ιστού επίμυων μετά από συνδυασμένη χορήγηση λεβοσιμεντάνης και δοξορουβικίνης.

Για την μελέτη χρησιμοποιήθηκαν 40 αρσενικοί Wistar επίμυες οι οποίοι τυχαιοποιήθηκαν σε 5 ομάδες. Στην ομάδα Control χορηγήθηκε μόνο N/S 0.9% 10mL/kg i.p, στην ομάδα DXR χορηγήθηκε DXR 20 mg/kg, i.p., στην ομάδα DXR+LEVOA χορηγήθηκε LEVO 12 μg/kg i.p. και στη συνέχεια DXR 20 mg/kg, i.p., στην ομάδα DXR+LEVOB χορηγήθηκε LEVO 24 μg/kg i.p. και στη συνέχεια DXR 20 mg/kg, i.p, στην ομάδα DXR+LEVOB+5-Υδροξυδεκανοϊκό οξύ (5-HD) χορηγήθηκε LEVO 24 μg/kg i.p. και στη συνέχεια DXR 20 mg/kg, i.p, το 5-HD χορηγείται και τις τρεις μέρες του πειράματος σε δόση 40 mg/kg*d i.p. με την πρώτη δόση να χορηγείται αμέσως πριν την LEVO και την DXR.

Σε όλους τους επίμυες, μετά την ολοκλήρωση του πρωτοκόλλου χορηγήσεων (DXR, LEVO, 5-HD & N/S) και ενόσω βρίσκονταν υπό αναισθησία πραγματοποιήθηκε ηχοκαρδιογράφημα, έπειτα θωρακοτομή και απομάκρυνση του μυοκαρδίου. Στην συνέχεια ακολούθησε εκχύλιση των μυοκαρδιακών ιστών (σύστημα CHCl₃/MeOH/H₂O) και προσδιορισμός των μεταβολικών τους προφίλ με την χρήση Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (NMR) όπως και πολυπαραμετρικής στατιστικής ανάλυσης στα υδατικά εκχυλίσματα τους.

Τα αποτελέσματα μετά από ανάλυση του μεταβολικού προφίλ των πειραματόζων έδειξαν ότι η συγχορήγηση DXR και LEVO μεταβάλλει τους ενεργειακούς μεταβολίτες (ATP, ADP, AMP, IMP & Inosine), καθώς και μεταβολίτες σχετικούς με την γλυκόλυση (glucose, alanine, lactate). Παρατηρείται η μείωση του NAD⁺ και αύξηση του νικοτιναμιδίου. Τα δια-

κλαδισμένα αμινοξέα leucine, valine, isoleucine είναι αυξημένα σε όλες τις ομάδες σε σχέση με τα control.

Τα αποτελέσματα αυτά δείχνουν ότι η λεβοσιμεντάνη μπορεί να επάγει μιτοχονδριακά μεταβολικά μονοπάτια διάσωσης με την μεταβολή του λόγου NAD⁺/nicotinamide τα οποία σχετίζονται με την προστασία των καρδιομυοκυττάρων ενώ ταυτόχρονα μεταβάλλονται οι ενεργειακοί μεταβολίτες. Παράλληλα αναστέλλει την αναερόβια γλυκόλυση που επάγεται από την δοξορουβικίνη, ενώ δεν καταφέρνει να αναστείλει τον πιθανό καταβολισμό των πρωτεϊνών του μυοκαρδίου.

ΛΕΞΕΙΣ-ΚΛΕΙΔΙΑ: Δοξορουβικίνη (DXR), Λεβοσιμεντάνη (LEVO), 5-Υδροξυδεκανοϊκό οξύ (5HD), Μεταβολομική, Καρδιοτοξικότητα, Καρδιοπροστασία

Abstract

Doxorubicin (DXR) is a widely used antineoplastic drug whose action is followed by cardiotoxicity which in turn may lead to irreversible heart failure. Levosimendan (LEVO) is an inotropic and vasodilator drug, indicated for the short-term treatment of chronic heart failure as well as in cases where conventional treatment is considered ineffective.

In this study, the effect of levosimendan (LEVO) on chronic heart failure in relation to doxorubicin-induced cardiotoxicity (DXR) is examined. We present, the NMR based metabonomic analysis, of rat myocardial tissue after combined administration of levosimendan and doxorubicin.

Methods: 40 male Wistar rats were randomized into 5 groups. Control group received only N/S 0.9% 10 mL/kg i.p., DXR group received DXR 20 mg/kg i.p., DXR+LEVOA group was treated with LEVO 12 µg/kg i.p. and then received DXR 20 mg/kg i.p., DXR+LEVOB group was treated with LEVO 24 µg/kg i.p. and then received DXR 20 mg/kg, i.p., DXR+LEVOB+5-Hydroxydecanoic acid (5-HD) group was treated with LEVO 24 µg/kg i.p. and then received DXR 20 mg/kg, i.p., 5-HD was administered all three days of the test at a dose of 40 mg/kg*d i.p. The first dose of 5-HD should be given immediately before LEVO and DXR.

Right after the administration protocol (DXR, LEVO, 5-HD & N/S), while being anaesthetized, an echocardiogram was performed on all rats,. Then, through chest incision, hearts were removed and myocardial tissues were extracted (CHCl₃/MeOH/H₂O system). Metabolic profiles of the aqueous extracts were determined using Nuclear Magnetic Resonance (NMR) and analyzed using multivariate statistical analysis.

The metabolic profile analysis showed that cotreatment with DXR & LEVO alters the energy metabolites (ATP, ADP, AMP, IMP & Inosine) as well as metabolites related to glycolysis (glucose, alanine, lactate). Most importantly NAD⁺ was decreased while niacinamide was increased. The BCAA (leucine, valine, isoleucine) are increased in all groups compared to control.

The above results imply that in group DXR+LEVOB, mitochondrial metabolic salvage pathways are triggered as revealed by NAD⁺/niacinamide ratio change, which is related to cardiomyocyte protection, while preventing doxorubicin-induced anaerobic glycolysis. LEVO however fails to inhibit the potential catabolism of myocardial proteins.

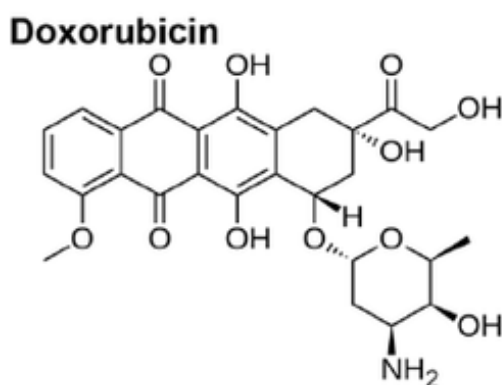
KEY-WORDS: Doxorubicin (DXR), Levosimendan (LEVO), 5-Hydroxydecanoic acid, Metabonomics, Cardiotoxicity, Cardioprotection

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. Καρδιοτοξικότητα από Δοξορουβικίνη

1.1 Δοξορουβικίνη

Η ιστορία της Δοξορουβικίνης (Doxorubicin, DXR) ξεκινά μετά το έναυσμα που δόθηκε το 1940 από τον Waksman όταν αυτός απομόνωσε την ακτινομυκίνη (1). Επόμενος σταθμός, κατά την δεκαετία του '50, η απομόνωση, από ένα νέο γένος του βακτηρίου *Streptomyces peucetius* το οποίο παρήγαγε μία κόκκινη χρωστική, της δαυνορουβικίνης ενός αντιβιοτικού που βρέθηκε να είναι δραστικό έναντι όγκων σε μύες (2) (3). Τέλος, το 1969 μετά από τροποποίηση με γενετικές επεμβάσεις, απομονώθηκε και διευκρινίστηκε η δομή ενός νέου παρόμοιου αντιβιοτικού, από το βακτήριο *Streptomyces peucetius var. Caesius*. Αρχικά ονομάστηκε αδριαμυκίνη, αργότερα όμως μετονομάστηκε σε δοξορουβικίνη (4). Η δοξορουβικίνη παρουσίασε υψηλότερο θεραπευτικό δείκτη από την δαυνορουβικίνη αν και διατήρησε την επαγόμενη καρδιοτοξικότητά της (5). Έκτοτε περισσότερα από 2000 ανάλογα της δοξορουβικίνης έχουν αναπτυχθεί με το τελευταίο το GPX-150 (Υδροχλωρική 5-ίμινο-13-δεοξυ-δοξορουβικίνη) να βρίσκεται αυτή την στιγμή στην Φάση 2 των κλινικών δοκιμών για ασθενείς με σάρκωμα μαλακών ιστών (6).



Εικόνα 1: Η μοριακή δομή της δοξορουβικίνης περιλαμβάνει ένα τετρακυκλικό δακτύλιο με δύο από τις διαδοχικές ομάδες να είναι σύστημα κινόνης-υδροκινόνης και ένα σάκχαρο, την δαυνοσαμίνη, να πρόσκειται στον Α δακτύλιο με γλυκοσιδικό δεσμό (7).

1.2 Χρήσεις της Δοξορουβικίνης στην κλινική πράξη

Η δοξορουβικίνη χορηγείται επιτυχώς σε πληθώρα καρκίνων. Έχει μεγάλο εύρος χρήσεων, αντιμετωπίζοντας καρκίνους τόσο σε ενήλικες όσο και σε παιδιά, περιλαμβάνοντας και συμπαγείς όγκους και αιματολογικές κακοήθειες (8) (9). Χρησιμοποιείται συνήθως για την θεραπεία της οξεί-

ας λευχαιμίας (10), του καρκίνου του μαστού (11) του μικροκυτταρικού καρκινώματος του πνεύμονα (SCLC), του υποτροπιάζοντα καρκίνο ωοθηκών, του μεταστατικού καρκινώματος ουροδόχου κύστεως, και παιδιατρικών συμπαγών όγκων (7), του λεμφώματος Non-Hodgkin (12), της νόσου Hodgkin (13) και σαρκωμάτων των μαλακών ιστών (14).

Ανθρακυκλίνη	Ενδειξη	Εφόρου ζωής αθροιστική δόση
Δοξορουβικίνη (Αδριαμυκίνη)	Καρκίνος κύστεως, καρκίνος μαστού, ενδομήτριος καρκίνος, ηπατοβλάστωμα, λευχαιμία, μικροκυτταρικό καρκίνωμα του πνεύμονα (SCLC), λέμφωμα, πολλαπλό μυέλωμα, νευροβλάστωμα, οστεοσάρκωμα, καρκίνος ωοθηκών, καρκίνος προστάτη, σάρκωμα, όγκος του Wilms	450mg/m ²
Λιποσωμακική Δοξορουβικίνη (Doxil)	Σάρκωμα Kaposi-σχετιζόμενο με AIDS, πολλαπλό μυέλωμα, καρκίνος των ωοθηκών	550mg/m ²
Δαυνορουβικίνη (Cerubidine)	Οξεία λεμφοβλαστική λευχαιμία, Οξεία μυελογενής λευχαιμία	400mg/m ² σε ενήλικες που κάνουν ακτινοθεραπείες στο θώρακα, 550mg/m ² σε ασθενείς με παράγοντες ρίσκου καρδιοτοξικότητας
Επιρουβικίνη (Elice)	Καρκίνος του μαστού, οισοφαγικός καρκίνος, γαστρικός καρκίνος	>900mg/m ²
Ιδαρουβικίνη (Idamycin)	Οξεία μυελογενής λευχαιμία	>160mg/m ²

Πίνακας 1: Συνοπτικός πίνακας ενδείξεων χρήσης της δοξορουβικίνης στην κλινική πράξη.

1.3 Τοξικότητα Δοξορουβικίνης - Γενικά (15)

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, η κύριες ανεπιθύμητες ενέργειες των ανθρακυκλινών είναι οι πολυκατευθυνόμενες κυτταροτοξικές δράσεις, με την καρδιοτοξικότητα να είναι η πιο έντονη. Δυστυχώς η δοξορουβικίνη δεν στοχεύει εκλεκτικά τον όγκο και μπορεί να επηρεάσει την ανάπτυξη και άλλων κυττάρων στο σώμα.

- **Ήπαρ**

Αρχικά, γνωστό για την μεταβολική και αποτοξινωτική του δραστηριότητα, το ήπαρ συμπεριφέρεται στην δοξορουβικίνη ακριβώς όπως σε ό,τι άλλο. Μεταβολίζοντας τις υψηλές συγκεντρώσεις της δοξορουβικίνης, ένας τεράστιος αριθμός ενεργών ριζών οξυγόνου (ROS) παράγεται. Συνεπώς οι ROS προκαλούν έναν υπέρμετρο αριθμό βλαβών που ποικίλλουν από βλάβες σε DNA, λιπιδική υπεροξειδωση, μείωση των επιπέδων την βιταμίνης E, μείωση της ανηγμένης γλουταθειόνης (GSH) και πρόκληση ανισορροπίας στις οξειδωτικές διαδικασίες.

- **Νεφροί**

Όταν η τοξικότητα χτυπά τους νεφρούς, η δοξορουβικίνη είναι γνωστό πως προκαλεί νεφροπάθεια και πρωτεϊνουρία. Η νεφροπάθεια που προκαλείται από την δοξορουβικίνη συμβαίνει όταν το φάρμακο παρεμβαίνει με την φυσιολογική λειτουργία των μιτοχονδρίων, μειώνοντας την δραστηριότητα των συμπλεγμάτων I και IV των μιτοχονδρίων. Σε αντίθεση με το ήπαρ, η ικανότητα των νεφρών να αναγεννώνονται είναι μηδαμινή, μειώνοντας την ικανότητα για αυτοϊαση όταν τα σπειράματα έχουν υποστεί βλάβη (15).

- **Εγκέφαλος**

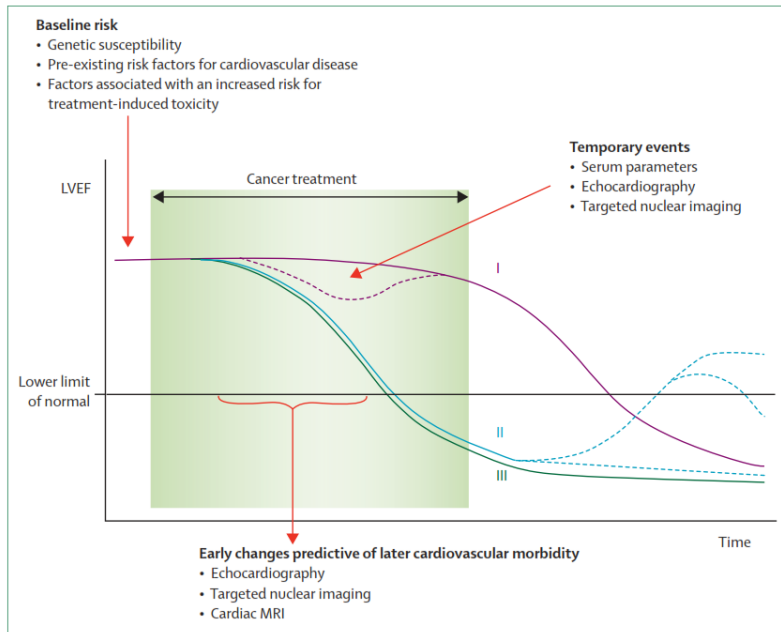
Ερευνώντας την τοξικότητα της δοξορουβικίνης στον εγκέφαλο, είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι η τοξικότητα που προκαλείται στον εγκέφαλο είναι έμμεση επειδή η δοξορουβικίνη δεν είναι ικανή να περάσει τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό (16) (17).

- **Λοιπά σημεία τοξικότητας**

Κάποιοι ασθενείς έχουν παρουσιάσει και άλλες ανεπιθύμητες ενέργειες από την θεραπεία με δοξορουβικίνη όπως π.χ. δερματικές αλλοιώσεις. Η δοξορουβικίνη επίσης είναι γνωστό ότι προκαλεί πυρετό, κνίδωση και αναφυλαξία που σχετίζονται με υπερευαισθησία. Περαιτέρω περιστατικά έχουν δείξει ότι η δοξορουβικίνη επηρεάζει το γαστρεντερικό σύστημα προκαλώντας στους ασθενείς έμετο και βλεννογονίτιδα κατά την διάρκεια των πρώτων σταδίων της θεραπείας (5-10 ημέρες) (15).

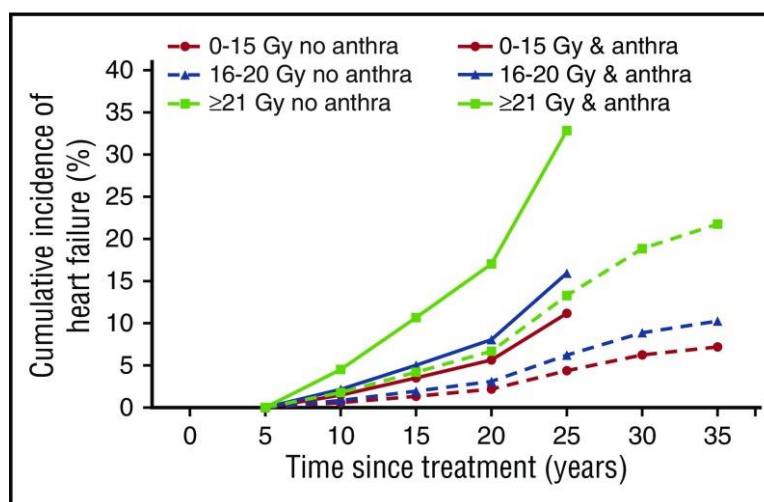
1.4 Καρδιοτοξικότητα από Δοξορουβικίνη

Η καρδιοτοξικότητα που επάγεται από τις ανθρακυκλίνες μπορεί να εκδηλωθεί είτε ως οξεία είτε ως χρόνια/επιβραδυνόμενη. Η οξεία βλάβη συμβαίνει άμεσα μετά από μία δόση ή θεραπεία, με τις κλινικές εκδηλώσεις να φαίνονται από λίγα λεπτά έως και μία εβδομάδα μετά από την θεραπεία (18). Χρονίως οι εκδηλώσεις (ανάπτυξη της καρδιοτοξικότητας εντός 1 έτους από την θεραπεία) οδηγούν σε χρόνια διατακτική καρδιομυοπάθεια στους ενήλικες ασθενείς και σε περιορισμένη καρδιομυοπάθεια στους παιδιατρικούς ασθενείς (19) (20). Ως επιβραδυνόμενη επιβραδυσμένη και προοδευτική, η καρδιοτοξικότητα καταλήγει σε κοιλιακές δυσλειτουργίες, καρδιακή ανεπάρκεια και αρρυθμίες, χρόνια ή και δεκαετίες μετά την λήξη της χημειοθεραπείας, υποδηλώνοντας έτσι την ανάγκη για συνεχή παρακολούθηση της καρδιακής λειτουργίας σε ασθενείς που έλαβαν ανθρακυκλίνες (20) (21).



Εικόνα 2: Η καρδιοτοξικότητα μπορεί να είναι οξεία (καμπύλες II & III), με έναρξη ακόμα και κατά την διάρκεια της αντικαρκινικής θεραπείας, ή επιβραδυσμένη/χρόνια (καμπύλη I) με έναρξη μήνες ή και χρόνια μετά την λήξη της θεραπείας με ανθρακυκλίνες. Το αποτέλεσμα είναι μη αντιστρεπτή καρδιακή ανεπάρκεια. (22)

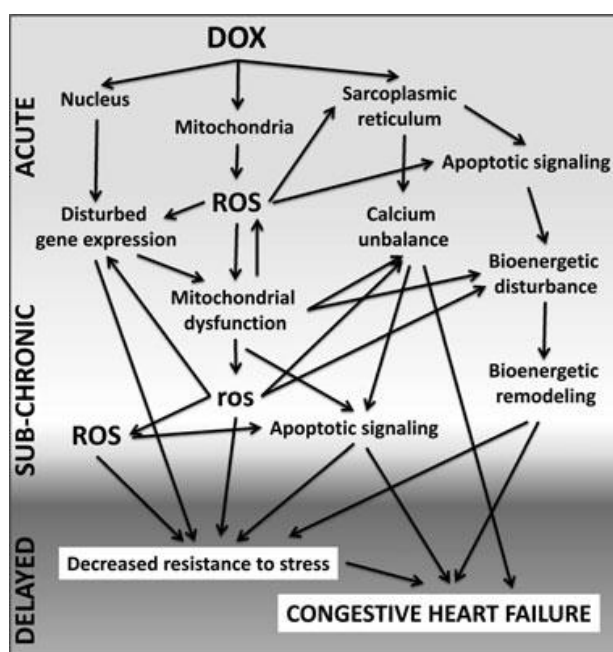
Παρόλα αυτά, οι παρενέργειες των ανθρακυκλινών είναι συνήθως δόσοξεαρτώμενες και πιο συχνά ανιχνεύονται μήνες, χρόνια ακόμα και δεκαετίες μετά την έκθεση στο φάρμακο (23) (24). Χαρακτηριστικά το ποσοστό πρόκλησης καρδιακής ανεπάρκειας δεκαπλασιάζεται (από 2% σε 20% όταν η αθροιστική δόση αλλάξει από 300 mg/m² σε >550 mg/m²) (25).



Εικόνα 3: Διάγραμμα αθροιστικής συχνότητας της καρδιακής ανεπάρκειας μετά από 5-25 χρόνια από την λήξη της χημειοθεραπείας με DXR (με ή χωρίς ακτινοθεραπεία) (26).

1.5 Μηχανισμός Επαγωγής της Καρδιοτοξικότητας

Όσον αφορά στους μηχανισμούς που προκαλούν την καρδιοτοξικότητα έχουν αναφερθεί αρκετοί. Περιλαμβανομένων του αυξημένου οξειδωτικού stress, της αναστολής της τοποϊσομεράσης II, της άμεσης αναστολής σημαντικών μεταφορέων που αφορούν στην ιοντική ομοιόσταση (όπως η $\text{Na}^+\text{-K}^+$ ATPάση, η Ca^{2+} ATPάση), οι οποίοι οδηγούν σε αλλαγές στην κυτταρική συγκέντρωση του ασβεστίου, αυξημένη άθροιση σιδήρου, μιτοχονδριακή ανεπάρκεια, αναστολή της σύνθεσης των νουκλεϊκών οξέων και των πρωτεϊνών, απελευθέρωση αγγειοδραστικών αμινών, αλλαγές στην αδρενεργική λειτουργία, λυσοσωμικές αλλαγές και απόπτωση (27) (28) (29) (30).



Εικόνα 4: Σχεδιαγραμματική απεικόνιση της πολυπλοκότητας των μηχανισμών που εμπλέκονται στην DOX-καρδιοτοξικότητα από την οξεία έως την επιβραδυσμένη φάση. Χαρακτηριστική η επίδραση τόσο των ελευθέρων ριζών οξυγόνου όσο και της ενεργοποίησης αποπτωτικών μονοπατιών (25).

Βιβλιογραφικά πολλοί μηχανισμοί φαίνεται να εμπλέκονται στην ανάπτυξη της καρδιοτοξικότητας από την DOX (κατά την οξεία, υποχρόνια και χρόνια φάση), γεγονός που υποδεικνύει ότι η αιτία της είναι πολυπαραγοντική και σύνθετη, όμως οι περισσότερες από αυτές τις αλλαγές αποδίδονται στην παραγωγή ελευθέρων ριζών οξυγόνου, μιτοχονδριακών και πρόωρων μεταβολικών διαταραχών καθώς και ενεργοποίηση αποπτωτικών μονοπατιών (27).

1.6 Αντιμετώπιση Καρδιοτοξικότητας

Έχουν διερευνηθεί αρκετές καρδιοπροστατευτικές τεχνικές και θεραπείες για την καρδιοτοξικότητα από τις ανθρακυκλίνες. Αυτές περιλαμβάνουν αλλαγές στο σχήμα της θεραπείας, χορήγηση αντιοξειδωτικών, καθαριστές ελευθέρων ριζών, ανταγωνιστές του συστήματος ρενίνης-αγγειοτασίνης, καρδιοεκλεκτικούς β-αναστολείς έως και στατίνες. Ενώ οι μέθοδοι αυτές φαίνονται πολλά υποσχόμενες στις μελέτες σε πειραματόζωα, οι κλινικές μελέτες φέρνουν ανάμεικτα αποτελέσματα (31).

Guidelines for stopping treatment in the event of reduced function based on Herceptin Adjuvant (HERA) trial protocol is as follows:			
Asymptomatic patients			
LVEF	Absolute decrease of <10%	Absolute decrease of 10–15%	Absolute decrease of ≥16%
Within normal limits	Continue	Continue	Hold*
1–5% below normal limits	Continue	Hold*	Hold*
>6% below normal limits	Continue*	Hold*	Hold*

Πίνακας 2: Κατευθυντήριες οδηγίες για την συνέχιση ή διακοπή της χημειοθεραπείας βάσει της καρδιακής λειτουργίας (32).

1.6.1 Έρευνα Καρδιοπροστατευτικών Θεραπειών

Στην προσπάθεια εύρεσης καρδιοπροστατευτικών θεραπειών έναντι της καρδιοτοξικότητας που επάγεται από τις ανθρακυκλίνες, αρχικά διερευνάται η χρήση διαφοροποιημένων αναλόγων της δοξορουβικίνης όπως η επιρουβικίνη και η λιπιδωμιακή δοξορουβικίνη που είναι σχετικά λιγότερο καρδιοτοξικές από την συμβατική δοξορουβικίνη (33).

Η χρήση N-ακετυλοκυστεΐνης (NAC) έχει υποτεθεί πως θα μπορούσε να βοηθήσει χάρις στις αντιοξειδωτικές της ιδιότητες. Παρόλα αυτά οι κλινικές μελέτες απέτυχαν να δείξουν κάποιο όφελος από την NAC στην πρόληψη ή την αναστροφή της καρδιοτοξικότητας (34) (35).

Οι ανταγωνιστές ασβεστίου όπως η βεραπαμίλη έχουν μελετηθεί επίσης χωρίς να δείξουν στατιστικά σημαντικά αποτελέσματα μεταξύ των ομάδων που ελέγχθηκαν (36).

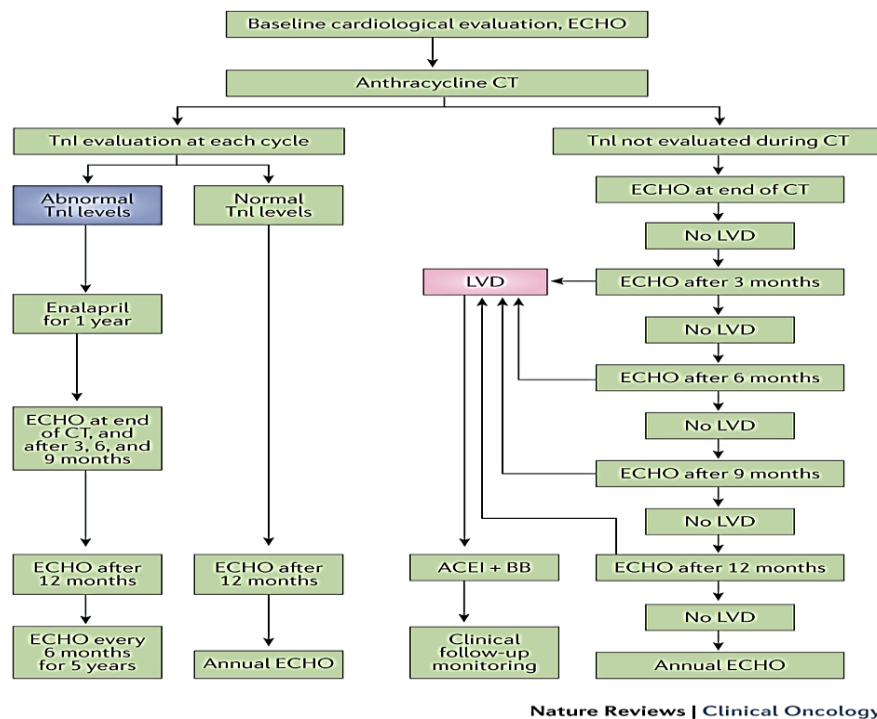
Ένας άλλος ευρέως-φάσματος κυτταροπροστατευτικός παράγοντας, η αμιφοσίνη, έδειξε ελπιδοφόρα αποτελέσματα στις μελέτες σε πειραμα-

τόζωα, αποτελέσματα που δεν μεταφέρθηκαν και στο κλινικό επίπεδο (37) (15).

Το συνένζυμο Q10 έχει μελετηθεί επίσης με καλά αποτελέσματα έναντι της καρδιοτοξικότητας, χωρίς αυτά όμως να έχουν επαναληφθεί σε μεγαλύτερες μελέτες (38).

Η δεξραζοξάνη έχει μελετηθεί εκτενώς (39), (16) για τις καρδιοπροστατευτικές της ιδιότητες με τα αποτελέσματα των δοκιμών σε πειραματόζωα να είναι ανάμεικτα. Βέβαια είναι και ο μόνος παράγοντας δέσμευσης σιδήρου που έχει εγκριθεί για την κλινική χρήση σε ασθενείς με καρκίνο (του μαστού) που ακολουθούν θεραπεία σε δοσολογία μεγαλύτερη των 300 mg/m².

Επιπρόσθετα, και οι στατίνες έχουν χρησιμοποιηθεί για τις αντιφλεγμονώδεις και αντιοξειδωτικές δράσεις τους (17) χωρίς αξιόλογα (στατιστικά σημαντικά) αποτελέσματα. Σίγουρα όμως δεν παρατηρήθηκε επιδείνωση της με την παράλληλη χρήση τους (40) (41).



Εικόνα 5: Πρωτόκολλο φαρμακευτικής αντιμετώπισης της καρδιοτοξικότητας που προκαλείται από την DXR με την χρήση Αναστολέων MEA ή/και β-αποκλειστών.

Η καρβεδιλόλη, είναι ένας μη εκλεκτικός β-αποκλειστής με μερική ανταγωνιστική δράση. Αναστέλλει επίσης την NADH αφυδρογονάση,

που βρίσκεται στο σύμπλεγμα I των μιτοχονδρίων και έχει αντιοξειδωτική δράση. Δικαιολογημένα λοιπόν, έχει γίνει επίκεντρο του ενδιαφέροντος στις μελέτες για την καρδιοπροστασία που μπορεί να επιφέρει στην καρδιοτοξικότητα που επάγει η δοξορουβικίνη, με ή χωρίς την παράλληλη χρήση αναστολέων του μετατρεπτικού ενζύμου της αγγειοτασίνης (AMEA).

Παράλληλα και η νεμπιβολόλη, ένας εκλεκτικός β1-αποκλειστής με αγγειοδιασταλτικές ιδιότητες, έδειξε αυξημένη συσταλτικότητα στις μελέτες σε πειραματόζωα, και καρδιοπροστασία έναντι ομάδας placebo σε μελέτη ασθενών με καρκίνο του μαστού που έλαβαν δοξορουβικίνη (42).

Πρόσφατα, μελέτη (PRADA) έλεγξε τις καρδιοπροστατευτικές ιδιότητες των φαρμάκων καντεσαρτάνη και μετοπρολόλη σε ασθενείς με αρχικό καρκίνο μαστού που λάμβαναν χημειοθεραπεία FEC (fluorouracil, epirubicin, cyclophosphamide) (43).

Η τεχνική της απομακρυσμένης ισχαιμικής προετοιμασίας (Remote Ischemic Conditioning) βρίσκεται σε φάση ελέγχου και σε ογκολογικούς ασθενείς (44). Αν και ο μηχανισμός της τεχνικής αυτής δεν είναι πλήρως κατανοητός, φαίνεται πως η καρδιοπροστασία που επιφέρει ενεργοποιεί τα κοινά μονοπάτια επιβίωσης που τελικά ρυθμίζουν κοινούς μηχανισμούς στην βλάβη από την ισχαιμία-επαναιμάτωση και την καρδιοτοξικότητα από ανθρακυκλινες όπως η υπερφόρτωση ασβεσίου, η λιπιδική περοξείδωση, η γένεση ROS και η μιτοχονδριακή λειτουργία (45).

1.6.2 Ελευρωπαΐνη και Καρδιοτοξικότητα

Επί της καρδιοτοξικότητας που προκαλείται από την DXR έχει γίνει έρευνα για την δράση ενός φαινολικού συστατικού που βρίσκεται στα φύλλα της ελιάς, της ελευρωπαΐνης (oleuropein,OLEU).

Αρχικά τα πρώτα αποτελέσματα (46)σε αρουραίους έδειξαν ότι η OLEU μείωσε τα επίπεδα των CPK, CPK-MB, LDH, AST και ALT καθώς επίσης και την λιπιδική περοξείδωση, το περιεχόμενο σε PCs, την συγκέντρωση NT και την επαγωγή της iNOS στο μυοκαρδιακό ιστό, που επιφέρει η καρδιοτοξικότητα από την DXR. Παρατηρήθηκε δηλαδή μια ευρύτερη καταστολή του οξειδωτικού και νιτροξειδωτικού stress. Δίνοντας έτσι το προφίλ ενός συστατικού που μπορεί να ασκήσει καρδιοπροστατευτική δράση επί της καρδιοτοξικότητας.

Δεδομένων αυτών των στοιχείων, το ίδιο εργαστήριο προχώρησε και σε μεταβιομική μελέτη της δράσης της OLEU επί της οξειάς καρδιοτοξικότητας από την DXR (47). Τα αποτελέσματα έδειξαν καρδιοπροστατευτική δράση της OLEU μέσω εξισορρόπησης του διαταραγμένου ενεργειακού μεταβολισμού. Παράλληλα προσδιορίστηκαν ως βιοδείκτες της καρδιοτοξικότητας το ηλεκτρικό και οξικό οξύ ενώ φάνηκε ότι η OLEU επαναφέρει τα επίπεδα των μεταβολιτών σε εκείνα των ομάδων έλεγχου.

Σε πιο πρόσφατη μελέτη τους (48), έγινε μεταβιομικός έλεγχος της δράσης της OLEU και επί της χρόνιας καρδιοτοξικότητας από την DXR. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η DXR κατείχε υψηλότερα επίπεδα οξειδωτικού και νιτροξειδωτικού stress σε σχέση με την ομάδα ελέγχου και την ομάδα της OLEU. Παράλληλα η DXR έδειξε έντονες μεταβολικές αλλαγές που υποδεικνύουν διαταραγμένο ενεργειακό μεταβολισμό και πρωτεϊνική βιοσύνθεση. Ενώ η χορήγηση της OLEU έδειξε να αποτρέπει τις δομικές, λειτουργικές και ιστοπαθολογικές δράσεις της χρόνιας καρδιοτοξικότητας από την DXR.

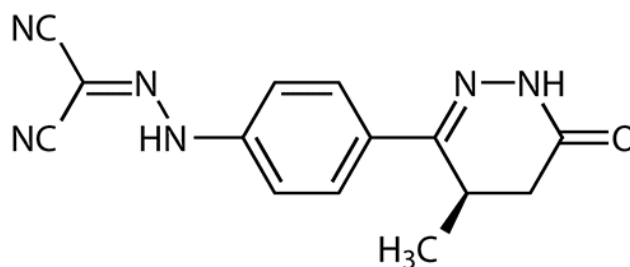
1.6.3 Η κατάσταση σήμερα..

Συμπερασματικά πρέπει να σημειωθεί ότι, αν και έχει γίνει εκτενής έρευνα για την εύρεση αποτελεσματικής θεραπείας της καρδιομυοπάθειας που προκαλείται από την δοξορουβικήνη, καμία θεραπευτική ή προφυλακτική προσέγγιση δεν έχει ενταχθεί στη κλινική πράξη (15). Γεγονός που δεν σημαίνει όμως ότι δεν πρέπει να συνεχιστεί η έρευνα αφού με τον συνεχώς αυξανόμενο πληθυσμό ασθενών που νικούν τον καρκίνο υπάρχει ισχυρό κίνητρο να γίνουν κι άλλες κλινικές δοκιμές για την καρδιοπροστασία στον καρκίνο ώστε να αποτρέψουμε τον σημερινό ογκολογικό ασθενή να γίνει ο αυριανός καρδιολογικός ασθενής.

2. Λεβοσιμεντάνη

2.1 Φαρμακοδυναμικό Προφίλ (49)

Η Λεβοσιμεντάνη (LEVO) είναι ένας πρώτης-τάξης καρδιοπροστατευτικός “ινοδιασταλτικός” (inodilator) (50) παράγοντας. Ανήκει στην κατηγορία των ευαισθητοποιητών ασβεστίου. Επί του παρόντος ενδείκνυται για την οξεία μη αντιρροπούμενη καρδιακή ανεπάρκεια.



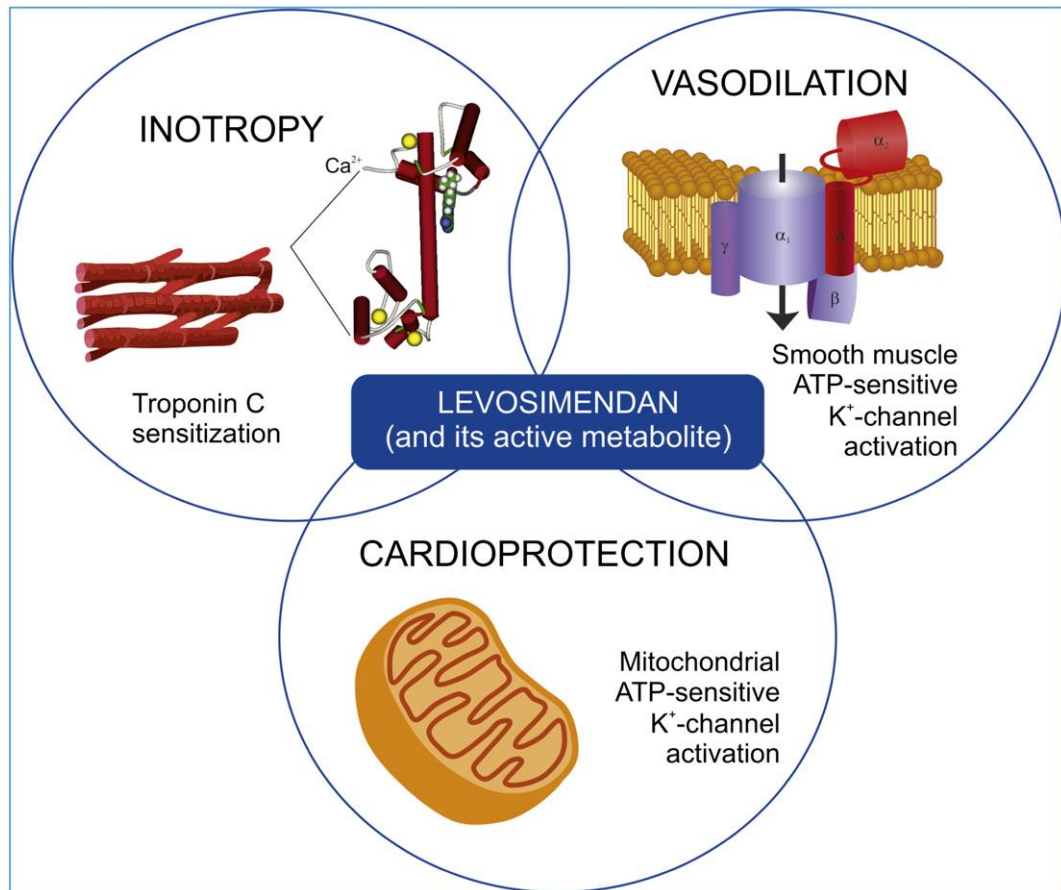
Εικόνα 6: Μοριακή δομή λεβοσιμεντάνης (LEVO)

Οι διακριτοί μηχανισμοί δράσης της που σχετίζονται με την ανακούφιση των συμπτωμάτων κατά την προχωρημένη καρδιακή ανεπάρκεια είναι:

1. Η θετική **ινότροπη** δράση που ασκείται μέσω της πρόσδεσης στην τροπονίνη C, καταλήγοντας σε αύξηση της ευαισθητοποίησης του μυονηματίου στο ασβέστιο (51).
2. Η **αγγειοδιασταλτική** δράση που ασκείται μέσω της διάνοιξης των ATP-εξαρτώμενων διαύλων καλίου (K_{ATP}) στις λείες μυϊκές ίνες (52).
3. Η **καρδιοπροστατευτική** δράση που έχει επάγοντας την διάνοιξη των μιτοχονδριακών K_{ATP} διαύλων (53).
4. Σε υψηλές δόσεις δρα και ως αναστολέας της φωσφοδιεστεράσης III (54).

Τα κλινικά δεδομένα από την χρήση της λεβοσιμεντάνης σε ασθενείς με καρδιακή ανεπάρκεια επιβεβαιώνουν συνεχώς την βελτίωση των συμπτωμάτων της οξείας καρδιακής ανεπάρκειας, την καλυτέρευση των αιμοδυναμικών σημείων και της ευεργετικής δράσης επί των νευροορμονικών επιπέδων (49).

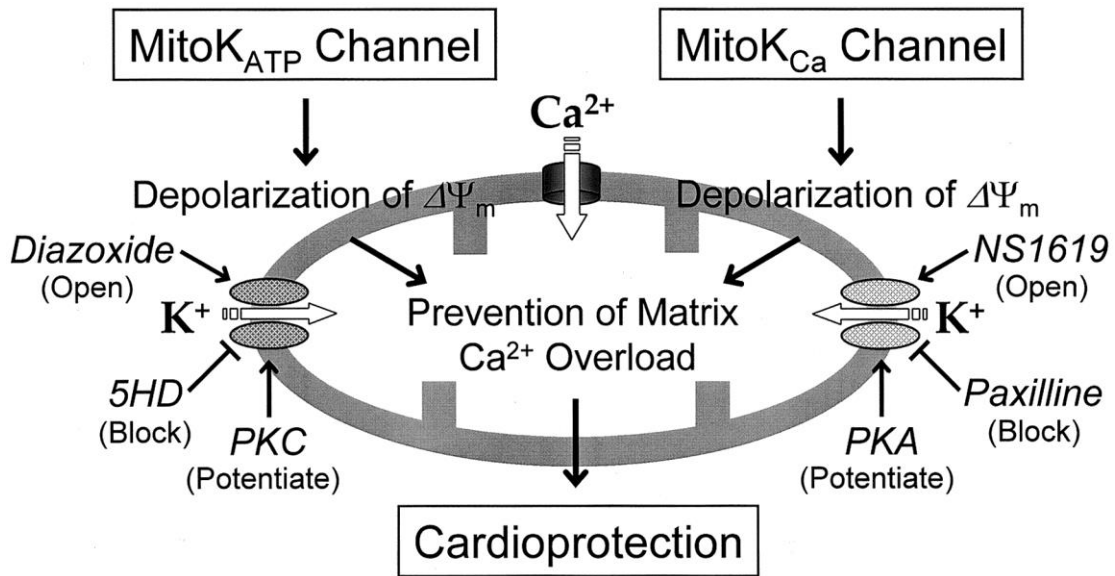
Οι ανακουφιστικές δράσεις της λεβοσιμεντάνης είναι εμφανείς μετά από 1-2 ώρες από την χορήγηση και διατηρούνται χάρις στον σχηματισμό ενός ενεργού μεταβολίτη του OR-1896, ο οποίος έχει έναν χρόνο ημιζωής 72 ωρών. Παράλληλα πρέπει να σημειωθεί πως οι ευεργετικές δράσεις της λεβοσιμεντάνης μεσολαβούνται χωρίς αξιοσημείωτη αύξηση στην κατανάλωση οξυγόνου από το μυοκάρδιο ή αύξηση στην ενδοκυττάρια συγκέντρωση ασβεστίου (49).



Εικόνα 7: Κύριοι μηχανισμοί δράσης της λεβοσιμεντάνης και του ενεργού μεταβολίτη της (55).

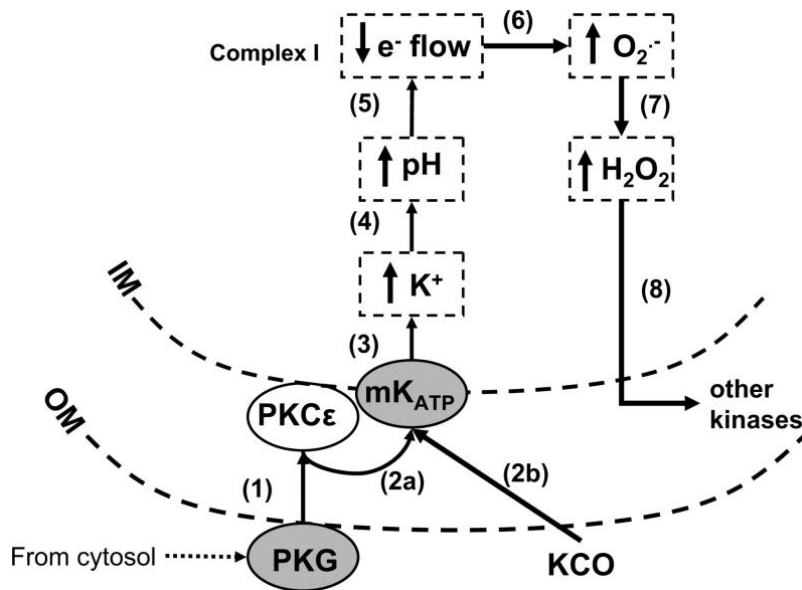
2.2 Διάνοιξη Μιτοχονδριακών Διαύλων K_{ATP}

Αποτελεί κοινώς αποδεκτό δεδομένο ότι η διάνοιξη των μιτοχονδριακών- K_{ATP} διαύλων (mito K_{ATP}) συνδέεται με την καρδιοπροστασία. Μάλιστα έχει αναφερθεί ότι η λεβοσιμεντάνη επάγει την διάνοιξη των mito K_{ATP} διαύλων τόσο στο ήπαρ όσο και στο μυοκάρδιο και έχει προταθεί και ως καρδιοπροστατευτικός μηχανισμός συνδεόμενος με την ισχαιμική προετοιμασία ως απάντηση στο οξειδωτικό stress. Ο μηχανισμός της καρδιοπροστατευτικής δράσης περιλαμβάνει την παρεμπόδιση της υπερφόρτωσης του μιτοχονδριακού Ca^{2+} , την διατήρηση των υψηλής ενέργειας φωσφορικών, την επαναφορά και σταθεροποίηση του δυναμικού της μιτοχονδριακής μεμβράνης και την ρύθμιση του μιτοχονδριακού όγκου. Με αυτόν τον τρόπο είναι δυνατόν να εξηγηθεί και ο καρδιοπροστατευτικός ρόλος της λεβοσιμεντάνης (56).



Εικόνα 8: Σχηματική αναπαράσταση του μηχανισμού προστασίας που μεσολαβείται από τους mitoK_{Ca} και $\text{mitoK}_{\text{ATP}}$ διαύλους. Η διάνοιξη των διαύλων αυτών μειώνει την εισροή του Ca^{2+} εξασθαινώντας έτσι την μιτοχονδριακή υπερφόρτωση Ca^{2+} και οδηγώντας τελικά σε καρδιοπροστασία. (57)

Παράλληλα, η διάνοιξη των $\text{mitoK}_{\text{ATP}}$ διαύλων οδηγεί στην ενδομιτοχονδριακή παραγωγή ελευθέρων ριζών οι οποίες επίσης δρουν σηματοδοτικά στην ενεργοποίηση ενός καταρράκτη κινασών που σηματοδοτούν την καρδιοπροστασία (58) (59). Βιβλιογραφικά μάλιστα στις μελέτες που ελέγχεται η δράση παραγόντων που επάγουν την διάνοιξη των $\text{mitoK}_{\text{ATP}}$ διαύλων, χρησιμοποιείται ως αναστολέας της διάνοιξής τους το 5-Υδροξυδεκανοϊκό Οξύ (5-HD).



Εικόνα 9: $\text{MitoK}_{\text{ATP}}$ -εξαρτώμενη παραγωγή ROS που οδηγεί στην ενεργοποίηση μονοπατιών συνδέονται με την καρδιοπροστασία (58) (59).

2.3 Καρδιοπροστατευτική Δράση της Λεβοσιμεντάνης

Δεδομένης της διπλής δράσης της λεβοσιμεντάνης (Θετικά ινότροπο και αγγειδιασταλτικό) έχουν γίνει πολλές μελέτες για την δράση που έχει στην καρδιακή ανεπάρκεια σε διαφορετικού προφίλ καρδιολογικούς ασθενείς. Τα αποτελέσματα που έχουν παραχθεί από τις μελέτες αυτές είναι πολύ ενθαρρυντικά για τους ασθενείς με καρδιακή ανεπάρκεια αφού δείχνουν την δράση της σε αρκετά σημεία της καρδιακής ανεπάρκειας.

Αρχικά, παρατηρήθηκε η αιμοδυναμική βελτίωση καθώς και η αντιοξειδωτική και αντιφλεγμονώδης δράση της λεβοσιμεντάνης σε ασθενείς με προχωρημένη αντιρροπούμενη καρδιακή ανεπάρκεια. Γεγονός που φάνηκε και από τα μειωμένα επίπεδα των MDA, IL-6 και BNP (60) σε σχέση με την ομάδα ελέγχου (Πίνακας 3).

Effects of levosimendan and dobutamine therapy on circulating cytokines, MDA and hemodynamic response and on percentage variation of the above variables compared to baseline values

Variables*	Levosimendan			Dobutamine		
	Baseline	48 h	5 days	Baseline	48 h	5 days
BNP (pg/ml)	1136.3 ± 93.7	744.1 ± 100 ^a	446 ± 119.3 ^a	1581.4 ± 371.2	1437.4 ± 370	1801 ± 550.1
MDA (μM)	3 ± 0.3	2.9 ± 0.3	2.3 ± 0.2 ^a	3.2 ± 0.3	3.4 ± 0.5	3.7 ± 0.5
Percentage variation		-7.9 ± 9.9	-21.8 ± 5.1 ^b		5.2 ± 10.3	14.9 ± 8.5
IL-6 (pg/ml)	8.6 ± 1.5	6.1 ± 1.4	4.8 ± 1.3 ^a	7.9 ± 1.1	10.9 ± 2.6	13.1 ± 2.7
Percentage variation		-15.2 ± 23.7	-38.8 ± 12.5 ^b		36.3 ± 19.7	70.2 ± 24
TNF-α (pg/ml)	30.9 ± 5.8	36.9 ± 8.9	27.9 ± 7.7	34.6 ± 7.3	27.5 ± 7.8	33.4 ± 8.1
Percentage variation		67.6 ± 46.9	-4.8 ± 23.1		-9.7 ± 20	38.3 ± 40.7

BNP=brain natriuretic peptide; MDA=malondialdehyde; IL-6=interleukin-6; TNF-α=tumor necrosis factor α.

^a Significantly different from baseline, $p < 0.05$.

^b Significantly different from dobutamine, $p < 0.05$.

Πίνακας 3: Χαρακτηριστική αντιοξειδωτική και αντιφλεγμονώδης δράση της LEVO (60)

Στην συνέχεια σε επόμενη μελέτη, σε ασθενείς με προχωρημένη καρδιακή ανεπάρκεια, η χορήγηση λεβοσιμεντάνης έδειξε γενικότερη βελτίωση του αιμοδυναμικού προφίλ ενώ δεν αύξησε τους δείκτες οξειδωτικού και νιτροξειδωτικού stress (MDA και Nitrotyrosine), υποδεικνύοντας έτσι καρδιοπροστατευτικές δράσεις στην προχωρημένη χρόνια καρδιακή ανεπάρκεια (61)(Πίνακας 4).

Clinical, echocardiographic and biochemical markers before and after each therapeutic intervention

Variable	Levosimendan (n = 26)		Placebo (n = 13)	
	Before	After	Before	After
NYHA class	3.6 ± 0.3	2.8 ± 0.4 [*]	3.1 ± 0.4	3.2 ± 0.5
Heart rate (beats/min)	72 ± 7	74 ± 9	70 ± 8	73 ± 7
Systolic blood pressure (mmHg)	105 ± 11	101 ± 13	103 ± 13	102 ± 15
LVEF (%)	26 ± 7	30 ± 7 [*]	25 ± 7	25 ± 6
E/E'	20.3 ± 8.5	14.8 ± 7.7 [*]	19.4 ± 9.5	18.2 ± 11.2
BNP (pg/ml)	1089 ± 541	716 ± 494 [*]	945 ± 410	1021 ± 552
cGMP (nmol/l)	49.2 ± 3.2	51.2 ± 5.4	50.3 ± 10.1	44 ± 4.2
Nitrotyrosine (nmol/l)	19.1 ± 6.5	23.4 ± 8.8	25.0 ± 8.4	33.0 ± 10.9 [†]
Malondialdehyde (μmol/l)	2.7 ± 0.1	2.8 ± 0.1	2.4 ± 0.2	3.1 ± 0.2 [*]
Protein carbonyls (nmol/mg protein)	3.6 ± 0.7	3.9 ± 0.6	3.2 ± 0.3	5.6 ± 0.6 [†]

Values are expressed as mean ± S.D., except for variables: cGMP, nitrotyrosine, malondialdehyde and protein carbonyls that are expressed as means ± S.E.M.
^{*}Significantly different vs. the corresponding value before therapy in the same group, at the level of ^{*}0.01 or [†]0.05 (paired *t*-test or Wilcoxon's paired test).

Πίνακας 4: Βελτίωση αιμοδυναμικού προφίλ και καταστολή νιτροξειδωτικού stress της LEV (61)

Σε μία επόμενη μελέτη ανασκόπησης για την λεβοσιμεντάνη και τις δράσεις της στην καρδιακή ανεπάρκεια (62), παρατηρήθηκε η καρδιοπροστατευτική δράση της λεβοσιμεντάνης με αναστολή της απόπτωσης, καταστολή οξειδωτικού και νιτροξειδωτικού stress καθώς και πληθώρα ευεργετικών δράσεων επί της καρδιακής ανεπάρκειας όπως η βελτίωση της διαστολικής λειτουργίας, της ενδοθηλιακής λειτουργίας όπως και η ενίσχυση παραγωγής NO (Πίνακας 5).

Biologic mechanisms that lead to beneficial effects of levosimendan on the failing heart.

- Anti-stunning, preconditioning effect
- Anti-inflammatory properties
- Suppression of oxidative and nitrosative stress
- Downregulation of apoptotic cell death
- Improvement of endothelial function/enhancement of NO production
- Improvement of diastolic function
- Improvement of right ventricular–pulmonary arterial coupling

Πίνακας 5: Το σύνολο των ευεργετικών δράσεων της LEVO στην καρδιακή ανεπάρκεια (62)

2.4 Τελευταία δεδομένα για την Λεβοσιμεντάνη

Η λεβοσιμεντάνη έχει εγκριθεί σε πολλές χώρες παγκοσμίως για την οξεία αντιρροπούμενη καρδιακή ανεπάρκεια με χαμηλή καρδιακή παροχή. Βασιζόμενοι στο σύνολο των μέχρι τώρα δεδομένων, πέρα από το τυπικό σενάριο της χαμηλής καρδιακής παροχής, το φάρμακο αυτό αναμένεται να έχει ευνοϊκές δράσεις και σε άλλες καταστάσεις που σχετίζονται με την οξεία αντιρροπούμενη καρδιακή ανεπάρκεια, περιλαμβανομένων των οξέων στεφανιαίων συνδρόμων, του υπαραχνοειδούς αιματώματος και της καρδιοχειρουργικής επέμβασης, είτε με κανονική οργανική λειτουργία είτε με πεπλεγμένη νεφρική δυσλειτουργία, ηπατική βλάβη ή καρδιογενές σόκ και πολυοργανική δυσλειτουργία.

Έχοντας υπόψη λοιπόν το σύνολο των δεδομένων που έχει συσσωρευτεί όπως αναφέρεται αναλυτικά και στην επισκόπηση του 2016 από τους *Farmakis et al (55)*, η λεβοσιμεντάνη έχει ευνοϊκές δράσεις σε αρκετές καταστάσεις πέρα από την καρδιακή ανεπάρκεια. Μπορεί να παρέχει προστασία στην νεφρική, ηπατική, εγκεφαλική και σπονδυλική λειτουργία σε περιπτώσεις βλάβης ισχαιμίας-επαναιμάτωσης. Επιπλέον η λεβοσιμεντάνη μπορεί να αποδειχθεί δραστική π.χ. κατά την διάρκεια εγκεφαλικής βλάβης, αναπνευστικής δυσλειτουργίας, σηπτικού σοκ, προχωρημένης καρδιακής ανεπάρκειας, καθώς και κατά την απομάκρυνση από την μηχανική αναπνευστική υποστήριξη. Τα προαναφερθέντα αποτελούν πεδία έντονου ερευνητικού ενδιαφέροντος και προσφέρονται για κλινικές δοκιμές. Προκλινικά στοιχεία υπάρχουν σε αρκετά από αυτά τα πεδία.

Μάλιστα η καρδιοπροστατευτική δράση της Λεβοσιμεντάνης έναντι της επαγόμενης από δοξορουβικίνη καρδιοτοξικότητας είναι ένα πολύ ενδιαφέρον πεδίο για την εξέλιξη των γνώσεων μας επί των δράσεων της λεβοσιμεντάνης καθώς και για την διερεύνηση ενδεχόμενων νέων ενδείξεών της.

ΣΚΟΠΟΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Η εργασία αφορά στην μεταβολομική μελέτη μυοκαρδιακού ιστού πειραματόζωων στα οποία έχει συγχορηγηθεί DXR και LEVO. Η Μεταβολική ανάλυση περιλαμβάνει την περιεκτική και ποσοτική ανάλυση του μεταβολώματος με τον όρο μεταβόλωμα να ορίζεται ως «..το σύνολο των μεταβολιτών που παράγεται από έναν οργανισμό..» (63). Ο Nicholson και η ομάδα του αρχικά εισήγαγαν τον όρο μεταβονομική ή αλλιώς «την ποσοτική μέτρηση των πολυπαραμετρικών μεταβολικών απαντήσεων ενός ζώντος οργανισμού σε παθοφυσιολογικά ερεθίσματα ή γενετική τροποποίηση» (64). Αυτός ο όρος επικεντρώνεται στην κατανόηση συστηματικών αλλαγών μέσα στον χρόνο σε πολύπλοκα πολυκυτταρικά συστήματα και εφαρμόζεται κυρίως στην ποσοτική ανάλυση μεταβολιτών σε απάντηση κάποιας ασθένειας. Η μεταβολομική αναζητά να περιγράψει την σύνθεση πολύπλοκων βιολογικών δειγμάτων και ορίζεται ως «η μη προκατειλημμένη ταυτοποίηση και ποσοτικοποίηση όλων των μεταβολιτών σε ένα βιολογικό σύστημα» (65).

Με σκοπό την απόκτηση αξιόπιστων και έγκυρων μεταβονομικών δεδομένων, είναι σημαντικό να χρησιμοποιηθούν τεχνικές με υψηλή ευαισθησία και εκλεκτικότητα και τεχνικές που θα είναι ικανές να ανιχνεύουν την πλειονότητα των μεταβολιτών για ένα δεδομένο βιολογικό δείγμα και να παρέχουν υψηλού βαθμού αναπαραγώγιμα δεδομένα κατά προτίμηση με χαμηλό κόστος.

Στην παρούσα μελέτη έχει χρησιμοποιηθεί η Φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR) μια από τις κύριες τεχνικές που χρησιμοποιούνται στις μεταβολομικές μελέτες. Η μελέτη αφορά σε πρωτόκολλο στο οποίο συγκρίνονται οι χορηγήσεις της DXR, της LEVO και της συγχορήγησης DXR+LEVO.

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. Χορηγούμενες ουσίες

Βάσει του σκοπού της μελέτης, την επίδραση της λεβοσιμεντάνης στην επαγόμενη από την δοξορουβικίνη καρδιοτοξικότητα, χορηγήθηκαν στα πειραματόζωα οι παρακάτω ουσίες. Κάθε μία επιτελώντας έναν διακριτό ρόλο στο πειραματικό πρωτόκολλο.

1. Δοξορουβικίνη (DXR), αντικαρκινικό φάρμακο
2. Λεβοσιμεντάνη (LEVO), καρδιοτονωτικό φάρμακο
3. 5-Υδροξυδεκανοϊκό οξύ (5-HD), εκλεκτικός ανταγωνιστής των μιτοχονδριακών K_{ATP} διαύλων

1.1 Δοξορουβικίνη (DXR)

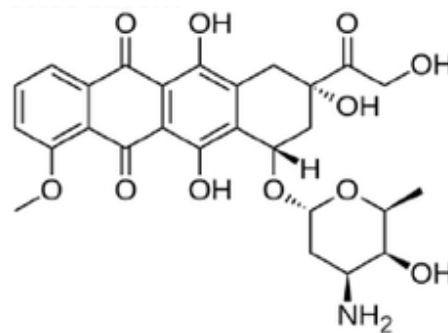
Χημ. Τύπος: $C_{27}H_{29}NO_{11}$

Μορ. Βάρος: 543.51926 g/mol

Σ.τ.: 230°C

Χρώμα: Κόκκινο

Κατά IUPAC: (7S,9S)-7-[(2R,4S,5S,6S)-4-amino-5-hydroxy-6-methyloxan-2-yl]oxy-6,9,11-trihydroxy-9-(2-hydroxyacetyl)-4-methoxy-8,10-dihydro-7H-tetracene-5,12-dione



1.2 Λεβοσιμεντάνη (LEVO)

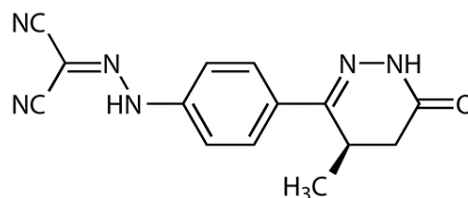
Χημ. Τύπος: $C_{14}H_{12}N_6O$

Μορ. Βάρος: 280.28468 g/mol

Σ.τ.: 210-214° C

Χρώμα: Κίτρινο

Κατά IUPAC: 2- [[4- [(4R)-4-methyl-6-oxo-4,5-dihydro-1H-pyridazin-3-yl] phenyl] hydrazinylidene] propanedinitrile



1.3 5-Υδροξυδεκανοϊκό Οξύ (5-HD)

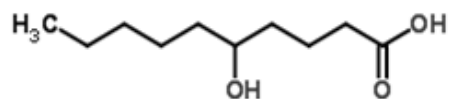
Χημ. Τύπος: $C_{10}H_{19}O_3$

Μορ. Βάρος: 187.25606 g/mol

Σ.τ.: 154-155° C

Χρώμα: Λευκό-μπεζ

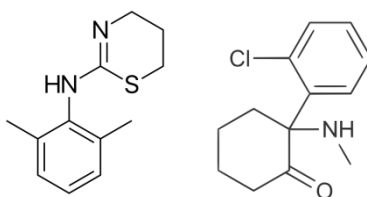
Κατά IUPAC: 5-Υδροξυ-Δεκανοϊκό Οξύ



1.4 Υπόλοιπες ουσίες που χορηγήθηκαν

Στην ομάδα A (CONTROL) χορηγήθηκε φυσιολογικός ορός (διάλυμα NaCl 0,9%) 10ml/kg, i.p. εφάπαξ.

Οι επίμυες πριν θυσιαστούν αναισθητοποιήθηκαν με 25mg/kg ξυλαζίνη i.p. (Rompun 100mg/mL) για να ηρεμήσουν και 100mg/kg κεταμίνη i.p. (Ketaset 20mg/mL) ώστε να ναρκωθούν.



Εικόνα 10: Αριστερά η δομή της Ξυλαζίνης, δεξιά η δομή της Κεταμίνης

2. Πρωτόκολλο

2.1 Πειραματόζωα

Τα χρησιμοποιούμενα πειραματόζωα είναι υγείς, αρσενικοί, λευκοί, Wistar επίμυες (*Rattus norvegicus*), ηλικίας 9-10 εβδομάδων. Στεγάζονται στις εγκαταστάσεις της Μονάδας Ζωικών Προτύπων του Ιδρύματος Ιατροβιολογικών Ερευνών της Ακαδημίας Αθηνών (ΙΙΒΕΑΑ) και ο κωδικός εγκατάστασης εκτροφής ή προμήθειας σύμφωνα με το ΠΔ 56/2013 (για μύες, επίμυες) είναι EL25BIO001.

Στις εγκαταστάσεις αυτές πληρούνται τα κριτήρια του Π.Δ. 56/2013. Υπάρχουν ελεγχόμενες συνθήκες περιβάλλοντος (θερμοκρασία 21-22°C, υγρασία 50±10%), εναλλαγές αέρα ανά ώρα και 12:12 ώρες φωσ-σκοτάδι. Τα ζώα βρίσκονται υπό συνεχή κτηνιατρική παρακολούθηση.

Η μελέτη πραγματοποιήθηκε στις εγκαταστάσεις του Ιδρύματος Ιατροβιολογικών Ερευνών της Ακαδημίας Αθηνών (Σωράνου Εφεσίου 4, 11527 Αθήνα) στο Κέντρο Πειραματικής Χειρουργικής & Μεταφραστικής Έρευνας όπου είναι διαθέσιμος πλήρης εξοπλισμός πειραματικού χειρουργείου που μπορεί να υποστηρίξει άσηπτες χειρουργικές επεμβάσεις διαφόρων ειδικοτήτων. Διαθέτει μονάδα αναισθησίας, μονάδα ανάνηψης καθώς και μονάδα παρακολούθησης των ζωτικών λειτουργιών των ζώων κατά τη διάρκεια των χειρουργικών επεμβάσεων.

Το συγκεκριμένο είδος πειραματόζωου επιλέχθηκε διότι οι επίμυες είναι θηλαστικά και δεδομένου αυτού, τα συστήματά τους αναμένονται να αντιδρούν στην χορήγηση φαρμακολογικών παραγόντων με παρόμοιο τρόπο με εκείνο ενός ανθρώπου. Στην έρευνα του καρδιαγγειακού συστήματος, ο επίμυς είναι ένα από τα πιο ευρέως χρησιμοποιούμενα μοντέλα πειραματισμού (66). Αρκετές μελέτες αναπτύχθηκαν για την αναπαραγωγή των καρδιαγγειακών νοσηροτήτων στο είδος αυτό, όπως η συστηματική και πνευμονική υπέρταση, η καρδιακή υπερτροφία και ανεπάρκεια και το οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου (67). Επίσης αποτελούν μοντέλα εκλογής στα πειράματα που αφορούν μακροπρόθεσμες μελέτες επιβίωσης (68).

2.2 Πειραματική Διαδικασία

Τα πειραματόζωα τυχαιοποιήθηκαν σε 5 ομάδες:

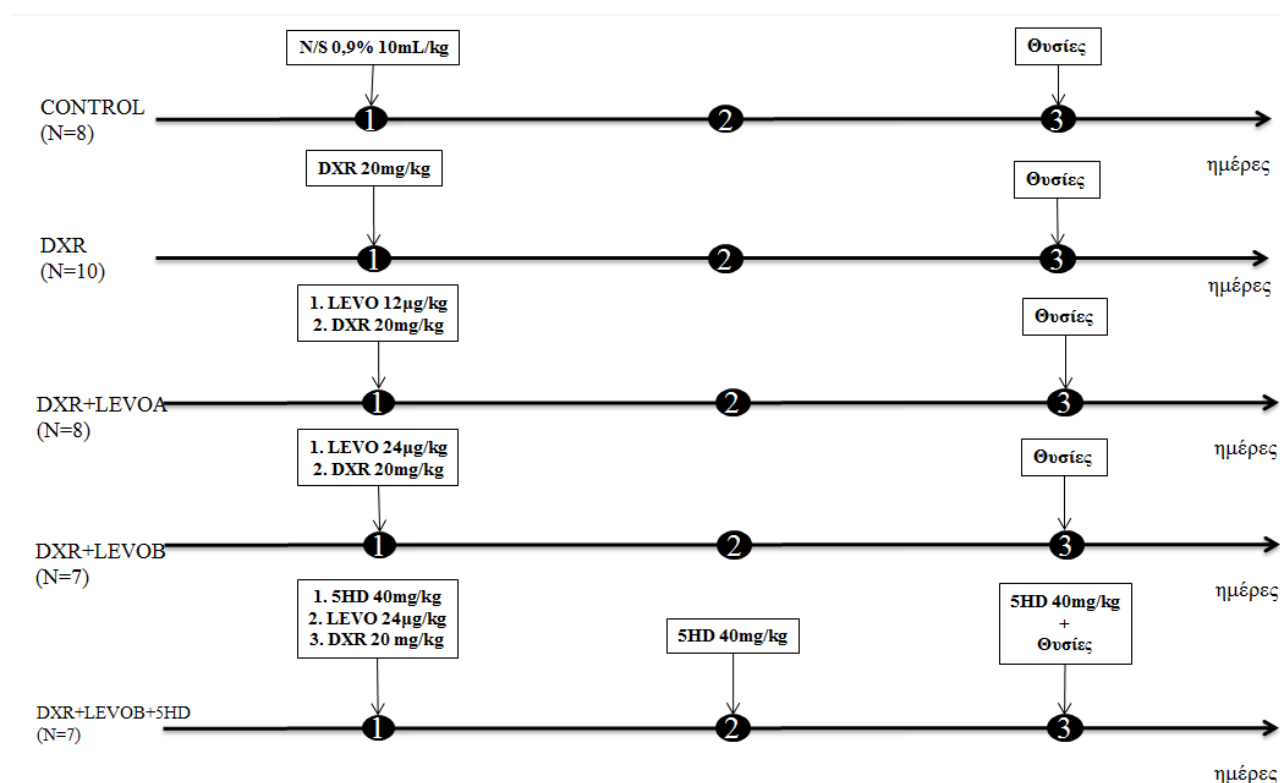
Ομάδα Α: Ομάδα Ελέγχου (CONTROL) (n=8): Καμία παρέμβαση, χορήγηση φυσιολογικού ορού 10mL/kg i.p. .

Ομάδα Β: Ομάδα Δοξορουβικίνης (DXR) (n=10): Χορήγηση μιας δόσης δοξορουβικίνης 20 mg/kg, i.p. .

Ομάδα C: Ομάδα DXR+LEVOA (n=8): Χορήγηση λεβοσιμεντάνης 12 μg/kg i.p. και στη συνέχεια χορήγηση δοξορουβικίνης 20 mg/kg, i.p. .

Ομάδα D: Ομάδα DXR+LEVOB (n=7): Χορήγηση λεβοσιμεντάνης 24 μg/kg i.p. και στη συνέχεια χορήγηση δοξορουβικίνης 20 mg/kg, i.p. .

Ομάδα E: Ομάδα DXR+LEVOB+5HD (n=7): Χορήγηση λεβοσιμεντάνης σε 24 μg/kg i.p. και στη συνέχεια χορήγηση δοξορουβικίνης 20 mg/kg, i.p. . Το 5-Υδροξυδεκανοϊκό οξύ (5-HD) χορηγείται και τις τρεις μέρες του πειράματος σε δόση 40 mg/kg*d i.p. με την πρώτη δόση να χορηγείται αμέσως πριν την λεβοσιμεντάνη και τη δοξορουβικίνη.



Εικόνα 11: Απεικόνιση πειραματικού πρωτοκόλλου 72 ωρών (χορήγησης ουσιών & θυσιών πειραματόζωων)

Εβδομήντα δύο ώρες μετά τη χορήγηση της δοξορουβικίνης (για τις ομάδες B,C,D & E) και φυσιολογικού ορού (για την ομάδα A) τα πειραματόζωα αναισθητοποιήθηκαν μέσω i.p. χορήγησης κεταμίνης (100 mg/kg) και ξυλαζίνης (25mg/kg). Αρχικά, πραγματοποιήθηκε ηχοκαρδιογράφημα για τον προσδιορισμό της λειτουργικότητας του μυοκαρδίου. Ενώ τα ζώα βρίσκονταν υπό αναισθησία πραγματοποιήθηκε θωρακοτομή για λήψη του μυοκαρδίου και ευθανασία με αφαιμάξη. Το μυοκάρδιο απομακρύνθηκε από το πειραματόζωο προκειμένου να προσδιοριστούν οι διαφορές στο μυοκαρδιακό μεταβόλωμα έπειτα από την χορήγηση της λεβοσιμεντάνης σε σχέση με τις υπόλοιπες ομάδες.

2.3 Προκατεργασία Δειγμάτων

2.3.1 Ομογενοποίηση Μυοκαρδιακού Ιστού

Ο μυοκαρδιακός ιστός ομογενοποιείται με τη χρήση υγρού αζώτου και ξηρού πάγου για την αποφυγή καταστροφής μέρους των πρωτεϊνών. Μέρος του δείγματος φέρεται σε γουδί πορσελάνης (με θερμοκρασία από -50°C έως -80°C). Διαβρέχεται αυτόματα με υγρό άζωτο και με τη χρήση υπέρου μετατρέπεται σε κόνιν, που διαχωρίζεται σε τρία errendorfs, σε ποσότητες που ζυγίζουν περίπου 100mg, τα οποία άμεσα τοποθετούνται στους -80°C .

2.3.2 Εκχύλιση Δειγμάτων

Διάλυμα παγωμένου $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (σε αναλογία 2:1) προστίθεται σε κάθε δείγμα παγωμένης κόνεως σε ποσότητα 1 mL/100 mg κόνεως. Το διάλυμα έπειτα τοποθετείται σε παγωμένο λουτρό υπερήχων για 5 min. Στην συνέχεια, προστίθεται ποσότητα HPLC- H_2O που αναλογεί σε 1000 μL ανά 100 mg κόνεως ιστού και το όλο αφού ομογενοποιηθεί με την χρήση vortex και παραμένει για 15 min σε πάγο, φυγοκεντρείται για 10 min στις 6000 rpm σε θερμοκρασία 4°C . Έχοντας πλέον διαχωριστεί οι δύο φάσεις (CHCl_3 και $\text{H}_2\text{O}/\text{MeOH}$) απομακρύνονται για φύλαξη στους -20°C οπότε και η παραπάνω διαδικασία της εκχύλισης επαναλαμβάνεται για να μεγιστοποιηθεί η απόδοση της εκχύλισης και να παραληφθούν περισσότεροι μεταβολίτες. Το δεύτερο μέρος της εκχύλισης προστίθεται στο πρώτο. Οι διαλύτες μετά απομακρύνονται από τα εκχυλίσματα με την χρήση Speed Vacuum Concentrator (GeneVac) και τα ξηρά πλέον εκχυλίσματα αποθηκεύονται στους -80°C μέχρι να αναλυθούν. (Το πρωτόκολλο εκχύλισης βασίστηκε στο πρωτόκολλο παλαιότερης μελέτης του εργαστηρίου (48)).

2.3.3 Προετοιμασία Δειγμάτων NMR

Τα ξηρά εκχυλίσματα των υδατικών φάσεων των μυοκαρδιακών ιστών ανασυντίθενται σε τελικό όγκο 680 μL με 612 μL D_2O και 68 μL ρυθμιστικού διαλύματος pH 7.4 (1.5M $\text{KH}_2\text{PO}_4 / \text{D}_2\text{O}$, 2 mM NaN_3 ως συντηρητικό εξαιτίας των αντιμικροβιακών του ιδιοτήτων και 0,1% TSP (3-(trimethylsilyl)propionic acid- d_4 , Aldrich 269913) ως εσωτερικό πρότυπο. Από το διάλυμα που προέκυψε παρελήφθησαν 550 μL που μεταφέρθηκαν σε NMR σωληνίσκο διαμέτρου 5 mm.

2.4 Πυρηνικός Μαγνητικός Συντονισμός (NMR)

2.4.1 Βασικές Αρχές NMR (69)

Η φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού σχετίζεται με την αλληλεπίδραση της πυρηνικής μαγνητικής διπολικής ροπής σε εφαρμοζόμενο μαγνητικό πεδίο με την ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία. Η πυρηνική μαγνητική διπολική ροπή προκαλείται από την ιδιοπεριστροφή (spin) του πυρήνα. Συγκεκριμένα, η πυρηνική μαγνητική διπολική ροπή μ εξαρτάται από το πυρηνικό σπίν I .

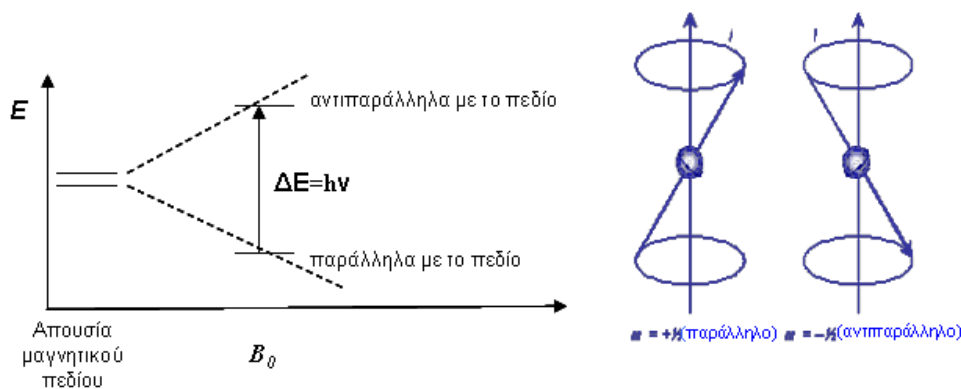
$$\mu = \gamma I \frac{h}{2\pi} \quad (1)$$

Ο συντελεστής αναλογίας γ ονομάζεται γυρομαγνητικός λόγος, σχετίζεται με την κατανομή της μάζας και του φορτίου στον πυρήνα, επομένως η τιμή του εξαρτάται από το είδος του πυρήνα.

Ένας πυρήνας με πυρηνικό μαγνητικό spin I μπορεί να λάβει $(2I+1)$ προσανατολισμούς όταν βρίσκεται σε εξωτερικό μαγνητικό πεδίο. Οι πυρήνες που συνήθως παρατηρούνται με φασματοσκοπία NMR είναι αυτοί του πρωτονίου ^1H και του άνθρακα ^{13}C με πυρηνικό spin $I=1/2$. Με εφαρμογή εξωτερικού μαγνητικού πεδίου B_0 , η πυρηνική μαγνητική ροπή δύναται να λάβει δύο προσανατολισμούς, παράλληλα ή αντιπαράλληλα προς τη φορά του πεδίου ενώ εξαναγκάζεται σε μεταπτωτική κίνηση γύρω από το άνυσμα του μαγνητικού πεδίου με χαρακτηριστική για τον κάθε πυρήνα συχνότητα ιδιοπεριστροφής (συχνότητα Larmor).

$$\omega = \gamma B_0 \quad (2)$$

Οι δύο αυτοί προσανατολισμοί αντιστοιχούν σε δύο ενεργειακές στάθμες, τη βασική και τη διεγερμένη (Εικόνα 12).



Εικόνα 12: (Αριστερά): Ενεργειακή διαφορά (ΔE) μεταξύ των καταστάσεων πυρηνικής ιδιοπεριστροφής σε συνάρτηση της έντασης του εφαρμοζόμενου μαγνητικού πεδίου, (Δεξιά): Μεταπτωτική κίνηση πυρήνα γύρω από το άνωσμα του μαγνητικού πεδίου

Η ενεργειακή διαφορά των δύο σταθμών είναι ανάλογη της έντασης του μαγνητικού πεδίου

$$\Delta E = \frac{h\gamma B_0}{2\pi} = h\nu \quad (3)$$

και η κατανομή του πληθυσμού στις στάθμες ακολουθεί την κατανομή Boltzmann:

$$\frac{n_1}{n_2} = e^{\frac{-\Delta E}{kT}} \quad (4)$$

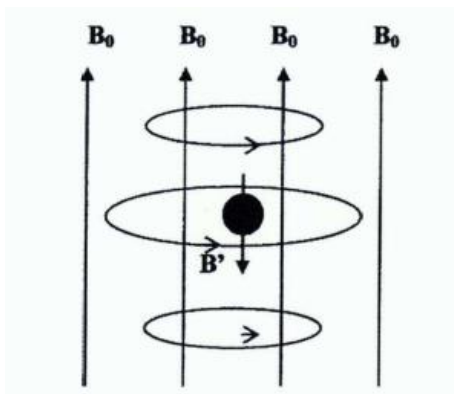
όπου (n_1) ο πληθυσμός της βασικής στάθμης και (n_2) αυτός της διεγερμένης, με την χαμηλότερη ενεργειακή στάθμη να περιέχει ελάχιστα περισσότερους πυρήνες.

Ο πληθυσμός των δύο σταθμών δύναται να εξισωθεί με απορρόφηση ενέργειας ίσης προς την ενεργειακή διαφορά των δύο σταθμών ΔE . Την ενέργεια αυτή μπορεί να παράσχει ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία συχνότητας ίση με τη συχνότητα Larmor του πυρήνα (έτσι κατανοείται ο χρησιμοποιούμενος όρος “συντονισμός”).

$$\nu = \left| \frac{\gamma}{2\pi} \right| B_0 \quad (5)$$

Από τη σχέση (5) προκύπτει ότι, για δεδομένη τιμή έντασης μαγνητικού πεδίου, η τιμή του γυρομαγνητικού λόγου, γ καθορίζει τη συχνότητα της H/M ακτινοβολίας που απαιτείται για τη διέγερση και παρατήρηση του κάθε πυρήνα. Έτσι, σε μαγνητικό πεδίο 1,4 Tesla οι πυρήνες υδρογόνου συντονίζονται σε συχνότητα 60MHz ενώ σε πεδίο 2,3 Tesla συντονίζονται σε συχνότητα 100MHz. Επίσης, αν και ο ^{13}C έχει το ίδιο σπιν με του ^1H

απορροφά σε συχνότητα 4 φορές μικρότερη λόγω του ότι έχει κατά 4 φορές μικρότερο γυρομαγνητικό λόγο.

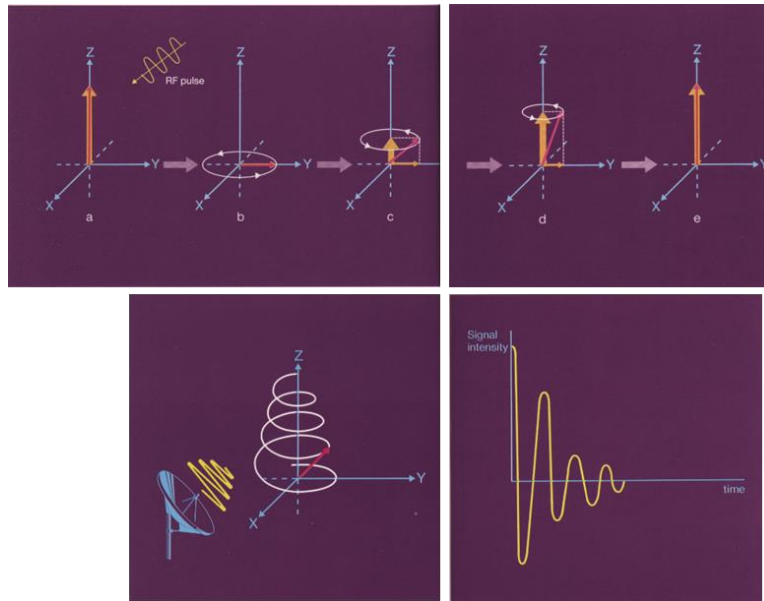


Εικόνα 13: Ηλεκτρονική προστασία του πυρήνα ((69) (70))

Κάθε πυρήνας σε ένα μόριο βρίσκεται σε διαφορετικό ηλεκτρονικό περιβάλλον και επομένως “προστατεύεται” σε διαφορετικό βαθμό, με αποτέλεσμα την ανίχνευση σήματος διαφορετικής συχνότητας για κάθε πυρήνα. Όλοι οι πυρήνες περιβάλλονται από ηλεκτρόνια και όταν ασκηθεί ένα εξωτερικό μαγνητικό πεδίο σε κάποιο μόριο, τα ηλεκτρόνια δημιουργούν τα δικά τους μαγνητικά πεδία τα οποία δρουν αντίθετα προς το εφαρμοζόμενο πεδίο. Επομένως ο πυρήνας υφίσταται τη λεγόμενη ηλεκτρονική προστασία η οποία είναι τόσο μεγαλύτερη όσο μεγαλύτερη είναι η ηλεκτρονική πυκνότητα γύρω από τον πυρήνα. Διαφορετική συχνότητα απορρόφησης σε συγκεκριμένη ένταση μαγνητικού πεδίου, εμφανίζουν και ομοειδείς πυρήνες και σε αυτή ακριβώς την αρχή στηρίζεται η φασματοσκοπία NMR.

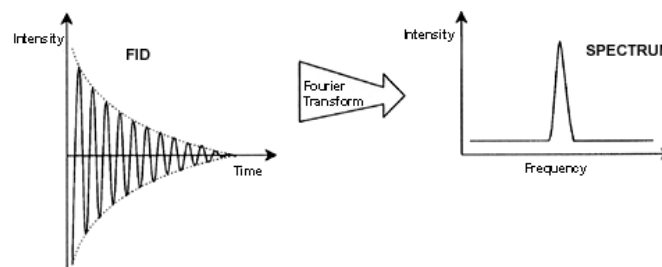
2.4.2 Καταγραφή φάσματος NMR

Για την καταγραφή ενός μονοδιάστατου φάσματος NMR αφού ισορροπήσει το δείγμα εφαρμόζεται ραδιοσυχνότητα (παλμός, RF pulse) μερικών δευτερολέπτων, η οποία προκαλεί την απόκλιση της μαγνήτισης των πυρήνων, που βρίσκονταν στην κατάσταση ισορροπίας, σε κατάλληλη θέση για ανίχνευση (απόσβεση μαγνήτισης). Η επίδραση του παλμού στοχεύει στη μεταφορά της μαγνήτισης από τον άξονα z στο επίπεδο xy (Εικόνα 14). Η μετάπτωση $y \rightarrow xz$ αυτή έχει ως συνέπεια την μετέπειτα εκπομπή σήματος όπου η μαγνήτιση καταγράφεται ως συνάρτηση του χρόνου.



Εικόνα 14: (Πάνω) Απόκλιση της μαγνήτισης από τον άξονα z στο επίπεδο xy και η μετέπειτα μετάρπτωση $y \rightarrow xz$ (Κάτω) Εκπομπή σήματος και η συνάρτηση ελεύθερης επαγόμενης απόσβεσης (FID) ως φθίνουσα ταλάντωση (71)

Η συνάρτηση αποδιέγερσης της μαγνήτισης του πυρήνα με το χρόνο καλείται ελεύθερη απόσβεση επαγωγής (Free Induction Decay, FID) και έχει τη μορφή μιας φθίνουσας ταλάντωσης. Ο μετασχηματισμός Fourier της FID αποδίδει το μονοδιάστατο NMR φάσμα (72) (73) (Εικόνα 15).



Εικόνα 15: Μετασχηματισμός Fourier της FID ώστε να προκύψει το μονοδιάστατο φάσμα NMR. Από συνάρτηση έντασης/χρόνου μετατρέπεται σε έντασης/συχνότητας. (74)

Τα φάσματα μιας διάστασης (one dimension, 1D) ^1H NMR παρουσιάζουν πολυπλοκότητα λόγω της αλληλεπικάλυψης των μεταβολιτών, γεγονός που δυσκολεύει την ταυτοποίηση και την ποσοτικοποίηση των μεταβολιτών (75) (76) και καθιστά απαραίτητη τη λήψη ομοπυρηνικού φάσματος δύο διαστάσεων (two dimensions, 2D). Το ομοπυρηνικό πείραμα 2D J-resolved (Jres) είναι ένα ψευδοπείραμα δύο διαστάσεων που αποτελεί πολύ χρήσιμο εργαλείο στη διαδικασία απόδοσης των σημάτων. Στον δεύτερο (κάθετο) άξονα του φάσματος αναπτύσσονται οι

συσχετίσεις J κάθε πυρήνα, με αποτέλεσμα στον οριζόντιο άξονα των χημικών μετατοπίσεων να παραμένουν κορυφές χωρίς σχάσεις. Το φάσμα που προκύπτει χαρακτηρίζεται από ελάχιστες αλληλεπικαλύψεις κορυφών συγκριτικά με το αντίστοιχο φάσμα ^1H .

2.4.3 Χαρακτηριστικά Μεθόδου

Η μέθοδος NMR έχει ένα εγγενές πρόβλημα, την σχετικά χαμηλή ευαισθησία. Η τεχνολογική ανάπτυξη όμως που περιλαμβάνει υπεραγωγίμους κρουγονικούς αισθητήρες (ανιχνευτές που ψύχονται σε θερμοκρασίες κοντά στο απόλυτο μηδέν), αυξανόμενης έντασης μαγνητικά πεδία (επί του παρόντος 900MHz) και μικρού όγκου μικροαισθητήρες, συνεχίζει να βελτιώνει την ευαισθησία της φασματοσκοπίας NMR (77) (78) (79) (80).

Η φασματοσκοπία NMR επίσης κατέχει ένα εύρος μοναδικών πλεονεκτημάτων έναντι άλλων τεχνικών, όπως ότι:

1. Διατηρεί μία αμίμητη διεργαστηριακή αναπαραγωγιμότητα,
2. Πολύ συχνά τα δείγματα λαμβάνονται με ελάχιστο ή μη επεμβατικό τρόπο (αίμα, ούρα, σπερματικό υγρό),
3. Απαιτεί μικρές ποσότητες δείγματος και καθόλου ή ελάχιστη προετοιμασία των δειγμάτων,
4. Είναι ταχεία
5. Δεν είναι καταστρεπτική

Είναι επομένως δυνατόν να συλλεχθούν πολλαπλά δείγματα από τα ίδια άτομα σε κάποια χρονική περίοδο και έτσι να χαρτογραφηθούν οι μεταβολικές αλλαγές που λαμβάνουν χώρα υπό κάποιες συγκεκριμένες παθοφυσιολογικές συνθήκες. Άλλο ένα μοναδικό χαρακτηριστικό της μεθόδου είναι το γεγονός ότι τα δείγματα μπορούν να επαναχρησιμοποιηθούν για μελλοντικές αναλύσεις πχ transcriptomics, proteomics, metabonomics κλπ. (80)

2.5 Λήψη Φασμάτων NMR

Όλα τα φάσματα ελήφθησαν στο φασματοσκόπιο Avance III 600MHz (Bruker GmbH, Germany) που είναι εξοπλισμένο με ένα αυτόματο δειγματολήπτη 60 θέσεων (B-ACS 60). Οι μετρήσεις έγιναν σε θερμοκρασία 300 K (27°C). Η προετοιμασία για τη λήψη του πειράματος βελτιστοποιήθηκε για το πρώτο δείγμα και η διαδικασία πραγματοποιήθηκε αυτοματοποιημένα για όλες τις υπόλοιπες μετρήσεις, μέσω του προγράμματος ICONNMR suite (TOPSPIN 1.2 version, Bruker BioSpin GmbH). Τα φάσματα που ελήφθησαν ήταν 1D (noesygppr1D) και 2D J-resolved (jresgppraf).

Τα φάσματα 1D ^1H NMR ελήφθησαν με την εφαρμογή παλμικής αλληλουχίας 1D NOESY (noesygpr1D), με κορεσμό της κορυφής του νερού (water presaturation) (25 Hz) κατά τη διάρκεια της αποδιέγερσης και του χρόνου μίξης με στόχο την εξάλειψη της κορυφής συντονισμού του νερού. Στο φάσμα 1D NOESY ελήφθησαν 256 σαρώσεις, με ανάλυση 66K σημείων και για φασματικό εύρος 12335.5 Hz, με χρόνο αποδιέγερσης (relaxation delay) 8.0 s, χρόνο λήψης του φάσματος (acquisition time) 2.70 s και χρόνο μίξης (mixing time) 0.01 s. Η πλήρως αυτοματοποιημένη επεξεργασία των φασμάτων εμπεριείχε τη βαθμονόμηση της κλίμακας ορίζοντας τα 0.0 ppm με την κορυφή των ^1H του μορίου αναφοράς TSP και τη διόρθωση της γραμμής βάσης και της φάσης.

Το ομοπυρηνικό 2D πείραμα J-resolved (jresgprqf) έχει μικρή χρονική διάρκεια και έτσι ήταν εφικτή η λήψη του για κάθε δείγμα. Τα φάσματα J-resolved ελήφθησαν με 2 σαρώσεις και ανάλυση 12K σημείων σε φασματικό εύρος 10000 Hz, με χρόνο αποδιέγερσης (relaxation delay) 1 s και χρόνο λήψης (acquisition time) 0.6 s.

2.6 Εξαγωγή Δεδομένων NMR

Η προετοιμασία των φασμάτων NMR, ώστε να ακολουθήσει η στατιστική τους ανάλυση, έγινε μέσω του ειδικού λογισμικού AMIX v. 3.9.12 με το οποίο πραγματοποιήθηκε η αναγωγή (data reduction ή bucketing) των δεδομένων σε ισαπέχοντα τμήματα (buckets). Το bucketing έγινε σε όλη την έκταση του φάσματος (0.60 - 9.40 ppm) χωρίζοντας το σε ισαπέχοντα (1700) τμήματα εύρους 0.005 ppm.

Από το φάσμα αφαιρέθηκαν οι περιοχές του υπολειμματικού νερού (δ 4.66 – 4.82 ppm), και της διμεθυλαμίνης (δ 2.70 - 2.79 ppm), ενώ ως επιμολύνσεις που βρέθηκαν και στο τυφλό δείγμα αφαιρέθηκαν οι περιοχές (δ 2.22 – 2.24 ppm), (δ 1.24 – 1.26 ppm), (δ 1.17 – 1.20 ppm) . Σε κάθε τμήμα έγινε ολοκλήρωση των κορυφών που περιέχονται στο φάσμα για κάθε δείγμα. Η κανονικοποίηση των δεδομένων έγινε με βάση τη συνολική ένταση (Total Intensity) κάθε φάσματος με τη βοήθεια του AMIX. Με τον τρόπο αυτό δημιουργήθηκε ένας πίνακας δεδομένων ο οποίος χρησιμοποιήθηκε στην στατιστική ανάλυση.

3. Ανάλυση Δεδομένων NMR

Οι αναλυτικές τεχνικές, όπως το NMR, παράγουν ένα τεράστιο αριθμό πολύπλοκων δεδομένων. Για να εξαχθούν ουσιώδεις πληροφορίες, τα ακατέργαστα πρώτα δεδομένα πρέπει να προεπεξεργαστούν. Η σωστή προετοιμασία των πρώτων δεδομένων είναι απαραίτητη για την απόκτηση έγκυρων και χρήσιμων πληροφοριών.

Τα δεδομένα αυτά στην συνέχεια υποβάλλονται στις μεθόδους της Χημειομετρίας, την εφαρμογή δηλαδή στατιστικών μεθόδων σε χημικά συστήματα με σκοπό την εξαγωγή χρήσιμων πληροφοριών.

Η Χημειομετρία είναι αναπόσπαστο και ουσιώδες κομμάτι της μεταβιονομικής μιας και η φασματοσκοπία NMR παράγει δεδομένα πολλών διαστάσεων με σχετικά λίγες παρατηρήσεις (δείγματα) σε σχέση με τις μεταβλητές (κορυφές ή μεταβολίτες), κάνοντας με τον τρόπο αυτό τέτοιου είδους δεδομένα ιδανικά για Πολυπαραμετρική Στατιστική Ανάλυση. Ο στόχος των εργαλείων της πολυπαραμετρικής στατιστικής ανάλυσης είναι η μείωση της πολυπλοκότητας ή των διαστάσεων των δεδομένων σε έναν πιο άμεσα διαχειρίσιμο και αντιληπτό αριθμό δύο ή τριών διαστάσεων. Η χρήση μεθόδων πολυπαραμετρικής ανάλυσης παρέχει μια επισκόπηση όλων των μεταβλητών ταυτόχρονα, επιτρέπει την αξιολόγηση των συσχετισμών ομάδων, και των ακραίων τιμών και παρέχει σταθμισμένους μέσους όρους που αναδεικνύουν τη συστηματική διακύμανση (systematic variation) και τη μείωση των επιπτώσεων του θορύβου (81).

Τα βασικά στάδια μιας μεταβιονομικής ανάλυσης είναι: 1) Η προεπεξεργασία, 2) Η επεξεργασία, 3) Η επικύρωση και 4) Η ερμηνεία των αποτελεσμάτων.

3.1 Προεπεξεργασία

Η προεπεξεργασία περιλαμβάνει τις διορθώσεις της γραμμής βάσης (baseline correction) και της φάσης (phase correction), την βαθμονόμηση του φάσματος βάσει εσωτερικού προτύπου, την εξάλειψη περιττών χωρίς πληροφορία (redundant region elimination) και τέλος, την ομαλοποίηση (normalization). Για τη διόρθωση της φάσης υπάρχουν μέθοδοι που διορθώνουν τόσο τις κορυφές όσο και τη γραμμή βάσης. Η υψηλή ανάλυση των φασμάτων NMR καθιστά απαραίτητη τη διαδικασία μείωσης των δεδομένων (data reduction), ώστε να είναι εφικτός ο

χειρισμός τους. Στην συνέχεια έγινε τεμαχισμός των φασμάτων σε υπο-περιοχές (buckets) με συγκεκριμένο εύρος 0,0050 ppm.

Στην συνέχεια στις περιοχές που απομένουν ακολούθησε ολοκλήρωση των κορυφών ως προς την ολική ένταση του φάσματος. Οι παραπάνω διαδικασίες τεμαχισμού και ολοκλήρωσης έγιναν με την βοήθεια του προγράμματος AMIX.

3.2 Χημειομετρική Ανάλυση

Στην Μεταβονομική οι εκτενέστερα χρησιμοποιούμενες τεχνικές βασίζονται στην εξαγωγή «λανθανουσών» μεταβλητών με τρόπο είτε επιβλεπόμενο είτε μη επιβλεπόμενο. Οι μη επιβλεπόμενες μέθοδοι, από τις οποίες η πιο λειτουργική και εύκολα εφαρμόσιμη είναι η **Ανάλυση Κυρίων Συνιστωσών (Principal Component Analysis, PCA)**, μπορούν να μειώσουν την πολυπλοκότητα των δεδομένων χωρίς πρότερη γνώση της τάξης ή της κατηγορίας στην οποία ανήκουν τα δεδομένα, εξάγοντας έτσι τις κύριες πηγές διακύμανσης (81).

Η PCA είναι εξαιρετικά χρήσιμη στην «ανακάλυψη» έκτροπων τιμών όπως επίσης και για την εσωτερική ομαδοποίηση (clustering) των δειγμάτων, με το τελευταίο να είναι ανεκτίμητο εργαλείο για την μεταγενέστερη ταυτοποίηση των βιολογικών χαρακτηριστικών εντός ομαδοποιημένων δειγμάτων.

Αντιθέτως, η **Παλινδρόμηση Μερικών Ελαχίστων Τετραγώνων με Διακρίνουσα Ανάλυση PLS-DA (Partial Least Square Regression-Discriminant Analysis, PLS-DA)** και η **Μέθοδος Ορθογώνιας – PLS (Orthogonal Partial Least Square Regression, OPLS)** είναι συχνά χρησιμοποιούμενες επιβλεπόμενες μέθοδοι και είναι ικανές να βρουν βασικές συσχετίσεις μεταξύ δύο μητρών (πινάκων): μία μήτρα **X** που περιλαμβάνει ανεξάρτητες μεταβλητές (π.χ. τιμές φασματικής έντασης) από τα δείγματα και μία **Y** μήτρα που περιλαμβάνει εξαρτημένες μεταβλητές (π.χ. ομάδα, τάξη, γένος, απάντηση σε θεραπεία) (82) (83).

Άρα, η PLS-DA και O-PLS χρησιμοποιούνται συχνά για την αναγνώριση βιοδεικτών και διακυμάνσεων μεταξύ των διαφορετικών ομάδων π.χ. υγιών vs ασθενών. Με την χρήση της PCA, PLS-DA και της O-PLS, υπάρχει το ρίσκο της υπερπροσαρμογής των δεδομένων, γι αυτό και είναι απαραίτητη η αυστηρή στατιστική επικύρωση.

3.3 Επικύρωση Πολυπαραμετρικών Χημειομετρικών Μοντέλων

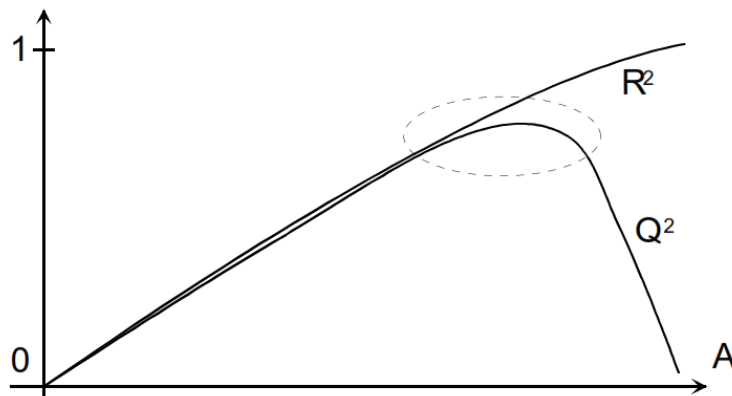
3.3.1 Διαγνωστικές Παράμετροι

Πολύ συχνά είναι απαραίτητος ο έλεγχος των στατιστικών μοντέλων που προκύπτουν βάσει κάποιων διαγνωστικών παραμέτρων.

- Η παράμετρος Hotelling's T^2 δείχνει τις έκτροπες τιμές που εμφανίζονται στις παρατηρήσεις (scores) και έχουν ισχυρή επίδραση στο μοντέλο «τραβώντας» το σύνολο των σημείων προς το μέρος τους. Το Hotelling's T^2 είναι μια γενίκευση του Student's t-test, ενώ όταν συνδυαστεί με τις παρατηρήσεις (scores) καθορίζει την κανονική περιοχή που ανταποκρίνεται σε όρια εμπιστοσύνης 95% ή 99%.
- Οι παράμετροι που δείχνουν την επεξηγούμενη διακύμανση μιας μεταβλητής και λαμβάνουν τιμές από 0 (καθόλου επεξήγηση) έως και 1 (μέγιστη επεξήγηση) είναι:
 - το R^2X είναι το ποσοστό των αθροισμάτων των τετραγώνων όλων των μεταβλητών X που ερμηνεύονται από τη συγκεκριμένη κύρια συνιστώσα.
 - το R^2X_{adj} είναι το ποσοστό της διακύμανσης όλων των μεταβλητών X που ερμηνεύονται από τη συγκεκριμένη κύρια συνιστώσα. Η διακύμανση είναι το άθροισμα των τετραγώνων διορθωμένο για τους βαθμούς ελευθερίας.
 - το $R^2X(cum)$ είναι το ποσοστό των αθροισμάτων των τετραγώνων όλων των μεταβλητών X που ερμηνεύεται από τις εξαχθείσες κύριες συνιστώσες (ο όρος που περιγράφει το μοντέλο που προκύπτει).
 - το $R^2 X_{adj}(cum)$ είναι το ποσοστό της συνολικής διακύμανσης όλων των μεταβλητών X που ερμηνεύεται από τις εξαχθείσες κύριες συνιστώσες.
 - Το R^2X δείχνει επίσης την ικανότητα προσαρμογής του μοντέλου (goodness of fit) δηλαδή του πόσο καλά μπορούν να αναπαραχθούν μαθηματικά τα δεδομένα του συνόλου εκμάθησης (training set).

- Η προβλεπτική ικανότητα του μοντέλου (goodness of prediction) καθορίζεται από τον παράγοντα Q^2X με την τεχνική της διασταυρούμενης επικύρωσης (cross validation, CV).
 - το Q^2 είναι ο διασταυρούμενος συντελεστής συσχέτισης, που εκφράζει το ποσοστό της συνολικής διακύμανσης των X , που προβλέπει την κύρια συνιστώσα. Αν το Q^2 για τις μεταβλητές X είναι μεγαλύτερο από κάποιο όριο σημαντικότητας, η συνιστώσα αυτή είναι σημαντική.
 - το $Q^2(\text{cum})$ είναι το συνολικό Q^2 για όλες τις εξαχθείσες συνιστώσες.

Οι παράμετροι R^2X και Q^2X απεικονίζουν εντελώς διαφορετικές συμπεριφορές όσο η πολυπλοκότητα του μοντέλου αυξάνεται. Η ικανότητα προσαρμογής, R^2X , κυμαίνεται μεταξύ των τιμών 0 και 1, το 0 δείχνει καθόλου προσαρμογή και το 1 τέλεια προσαρμογή. Το R^2X πλησιάζει την μονάδα όσο το μοντέλο γίνεται πιο πολύπλοκο. Η ικανότητα πρόβλεψης, Q^2X , συμπεριφέρεται διαφορετικά και δεν πλησιάζει τη μονάδα με την αύξηση της πολυπλοκότητας.



Διάγραμμα 1: Το «οριακό σημείο» μεταξύ της καλής προσαρμογής (goodness of fit, R^2) και της καλής πρόβλεψης (goodness of prediction, Q^2). Ο κάθετος άξονας απεικονίζει την επεξηγούμενη ή προβλεπόμενη διακύμανση ενώ ο οριζόντιος πολυπλοκότητα του μοντέλου.

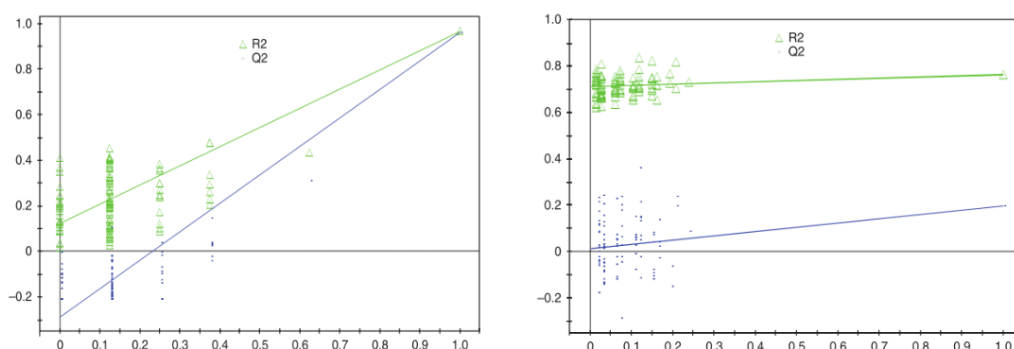
Κατά την εκτίμηση των ανωτέρω παραμέτρων R^2X & Q^2X , πρέπει να σημειωθεί ότι:

- Χωρίς υψηλό R^2X δεν μπορούμε να λάβουμε υψηλό Q^2X
- Γενικά τιμές $Q^2X > 0,5$ θεωρούνται καλές και τιμές $Q^2X > 0,9$ θεωρούνται άριστες, αν και σχετίζονται με την εκάστοτε εφαρμογή
- Η διαφορά των τιμών R^2X και Q^2X δεν πρέπει να είναι πολύ μεγάλη, ιδανικά να μην υπερβαίνει τις 0,2-0,3 μονάδες

3.3.2 Διασταυρούμενη Επικύρωση (Cross-Validation, CV) και Μεταθετικός Έλεγχος (Permutation Test)

Η **διασταυρούμενη επικύρωση (Cross-Validation)**, αποτελεί μια εκτίμηση της δυνατότητας πρόβλεψης του μοντέλου και συνεπικουρεί στην επιλογή του αριθμού των κύριων συνιστωσών. Η εφαρμογή της μεθόδου οδηγεί στο διαχωρισμό του δειγματοχώρου σε 7 τμήματα, αφαιρείται το πρώτο έβδομο από τα δεδομένα και επανυπολογίζονται οι συνιστώσες του μοντέλου. Η διαδικασία επαναλαμβάνεται για κάθε ένα από τα επτά υποσύνολα των δεδομένων. Οι προβλέψεις συγκρίνονται με τον αρχικό δειγματοχώρο και υπολογίζεται το άθροισμα των τετραγώνων των υπολοίπων.

Το αξιόπιστο μοντέλο πρέπει να παρουσιάζει τιμές $R^2X(cum) > 0.5$ για τον έλεγχο προσαρμοστικότητας (goodness of fit) και $Q^2(cum) > 0.5$ για την ικανότητα πρόβλεψης (predictive ability). Παράλληλα, η διαφορά ανάμεσα στα δύο μεγέθη πρέπει να είναι: $R^2X(cum) - Q^2(cum) < 0.2$. Ένας περιορισμός της διασταυρούμενης αξιολόγησης είναι πως αξιολογεί μόνο την προβλεπτική ικανότητα, χωρίς να δηλώνει την στατιστική σημαντικότητα της υπολογισμένης προβλεπτικής ικανότητας.



Εικόνα 16: Διαγράμματα επικύρωσης μοντέλου PLS-DA με την μέθοδο του μεταθετικού ελέγχου. Αριστερά φαίνεται ένα έγκυρο μοντέλο, δεξιά ένα υπερπροσαρμοσμένο μοντέλο.

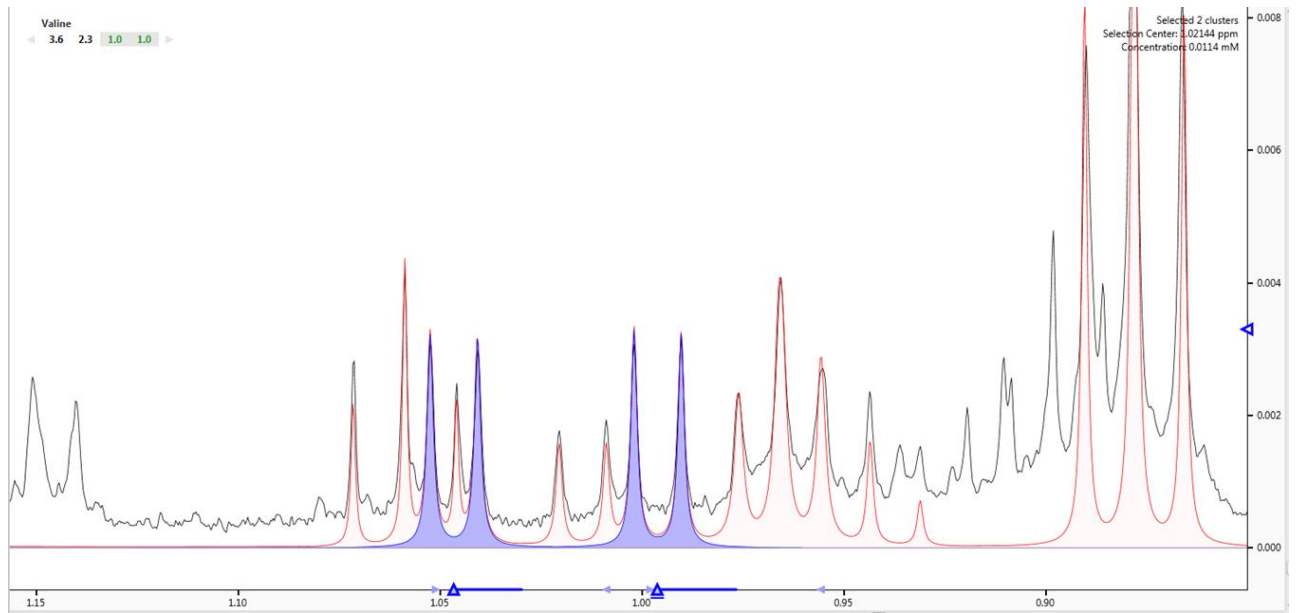
Ο **μεταθετικός έλεγχος (Permutation Test)** διασφαλίζει την αξιοπιστία των μοντέλων. Η μέθοδος εξάγει νέα μοντέλα υπολογίζοντας ξανά τους συντελεστές R^2Y και Q^2Y . Διατηρώντας τη μήτρα X ανέπαφη, οι εξαρτημένες μεταβλητές της μήτρας Y αναδιατάσσονται τυχαία αρκετές φορές (25-100). Κάθε φορά εξάγεται ένα νέο μοντέλο για τη μήτρα δεδομένων X και την αναδιατεταγμένη μήτρα Y και υπολογίζονται οι τιμές R^2Y και Q^2Y . Όλες οι τιμές R^2 και Q^2 των μετατεθειμένων δεδομένων πρέπει να είναι χαμηλότερες από τις αντίστοιχες των μη-μετατεθειμένων μοντέλων. Εάν

δεν συμβαίνει αυτό, το μοντέλο χαρακτηρίζεται ως υπέρ-προσαρμοσμένο. Επίσης, η γραμμή που ενώνει το πραγματικό σημείο Q^2 με το κέντρο βάρους της ομάδας των μετατεθειμένων τιμών Q^2 πρέπει να παρουσιάζει αρνητικό σημείο τομής στον άξονα. Το διάγραμμα αναδιάταξης καταγράφει την κατανομή των τιμών αυτών σε σχέση με το συντελεστή συσχέτισης μεταξύ των "πραγματικών" Y και αναδιατεταγμένων Y δεδομένων και επιτρέπει τον έλεγχο της εγκυρότητας του αρχικού αδιατάρακτου μοντέλου.

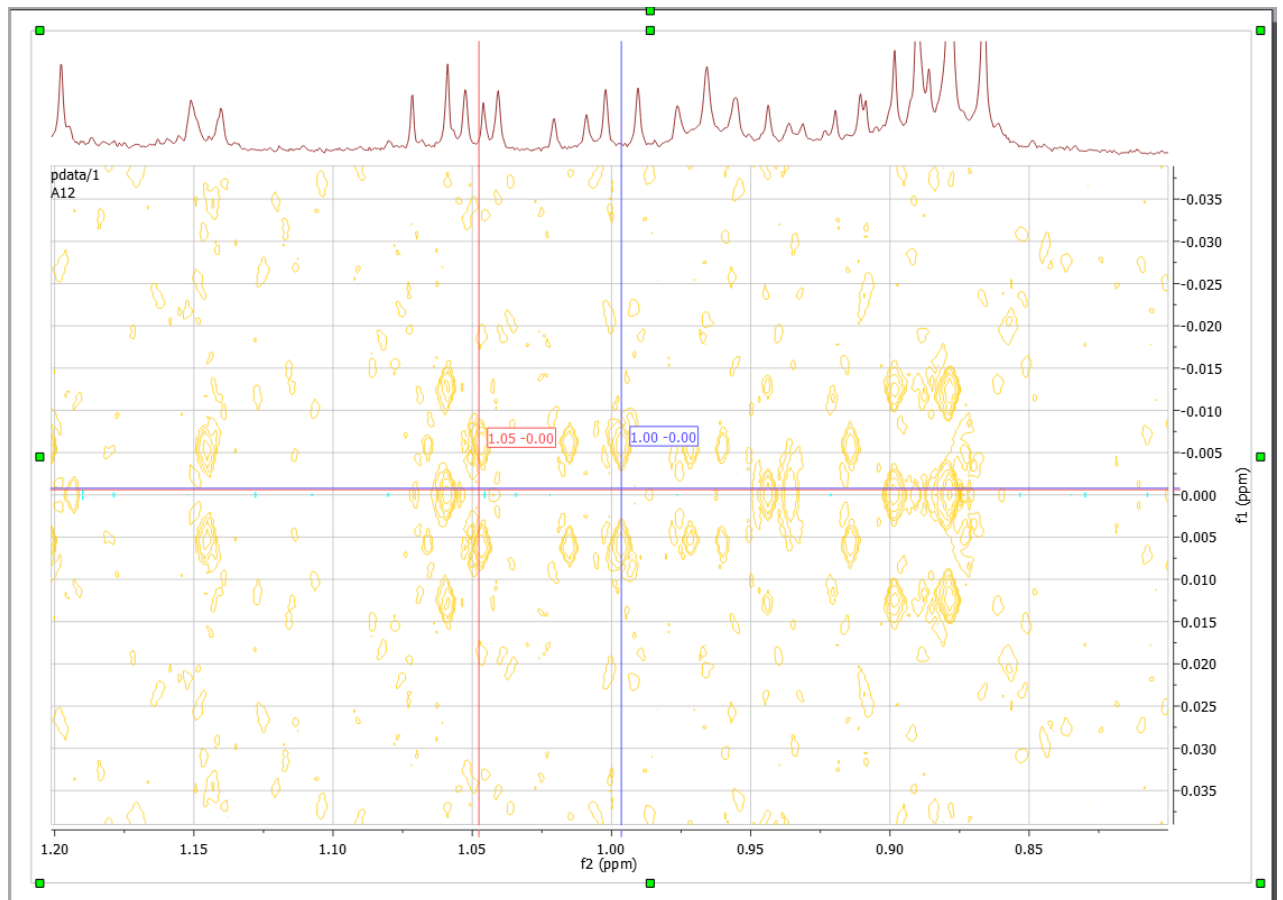
4. Αποτελέσματα

4.1 Απόδοση Κορυφών

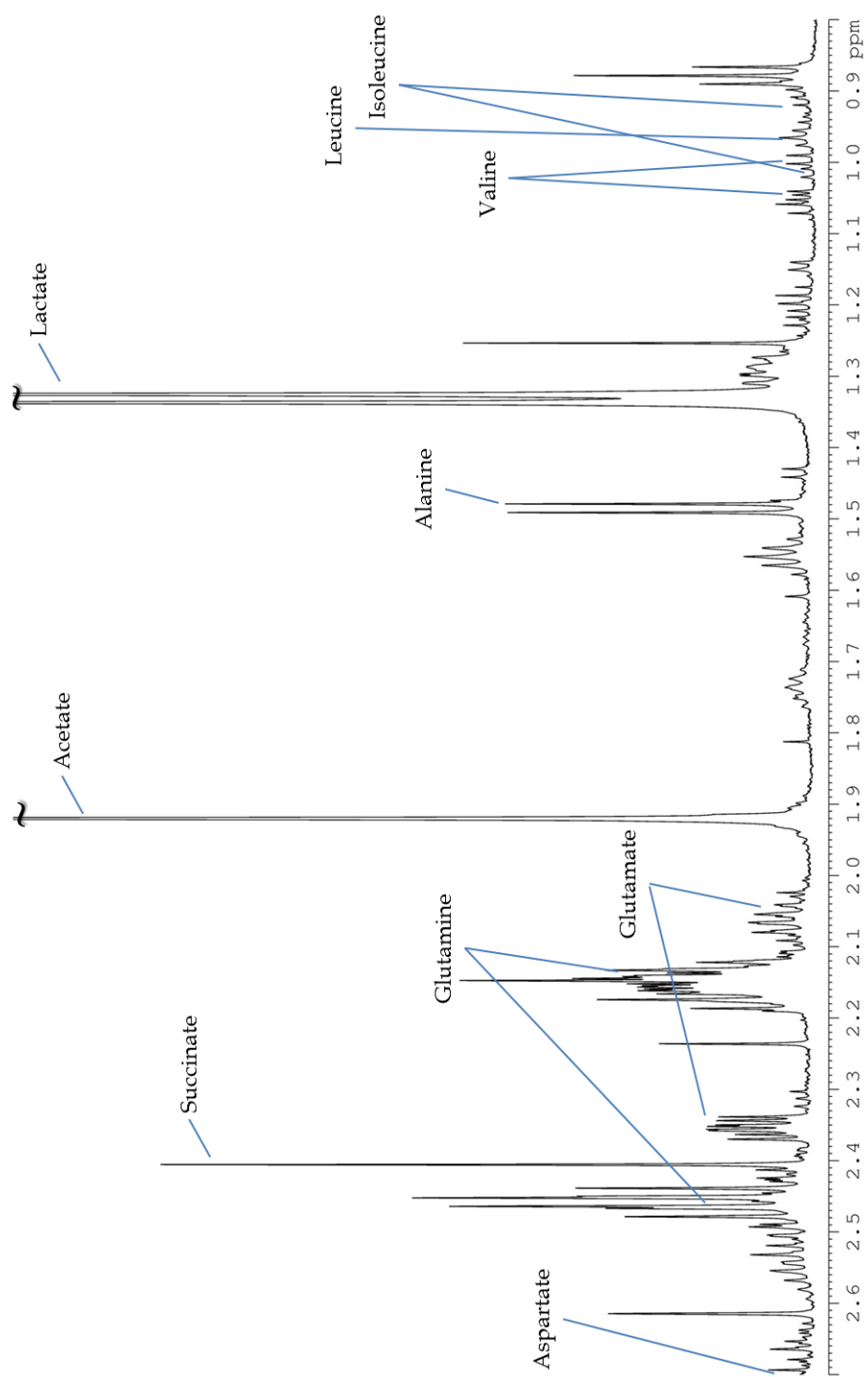
Για την ταυτοποίηση των μεταβολιτών στα φάσματα NMR χρησιμοποιήθηκε το ειδικό λογισμικό Chenomx NMR Suite v. 7.7 (Εικόνα 17), καθώς και η διαδικτυακή βάση δεδομένων HMDB (The Human Metabolome Database)¹⁴². Πολύτιμο εργαλείο ήταν επίσης το λογισμικό TopSpin με τη βοήθεια του οποίου έγινε η προβολή των φασμάτων όπως και το λογισμικό MestReNova (Εικόνα 19) όπου έγινε η προβολή των δισδιάστατων φασμάτων J-res ώστε να επιδοθεί η σωστή πολλαπλότητα στον σωστό μεταβολίτη.



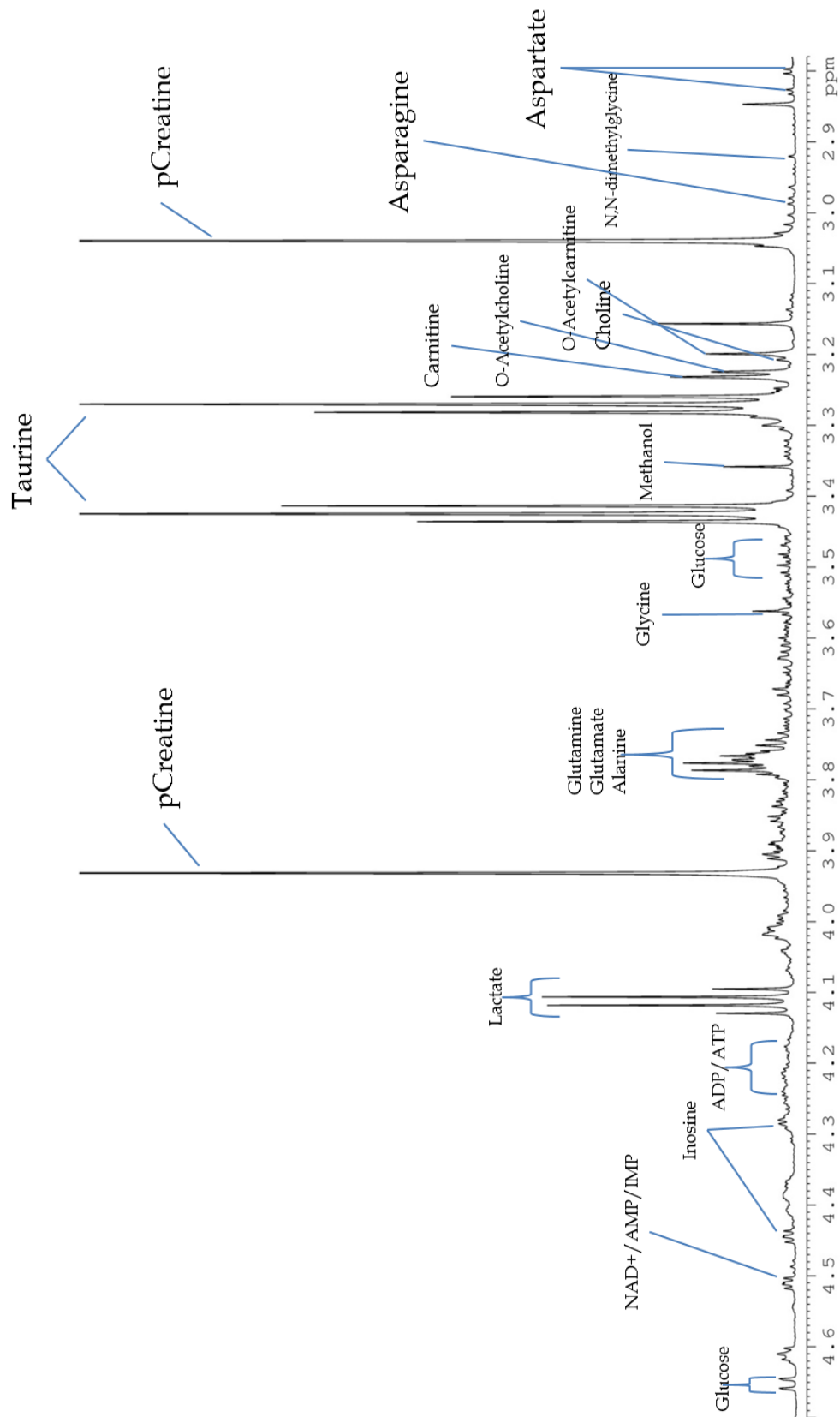
Εικόνα 17: Λογισμικό ChenomX NMR Suite v7.7. Χαρακτηριστικό στιγμιότυπο απόδοσης κορυφών του φάσματος NMR στο αμινοξύ βαλίνη



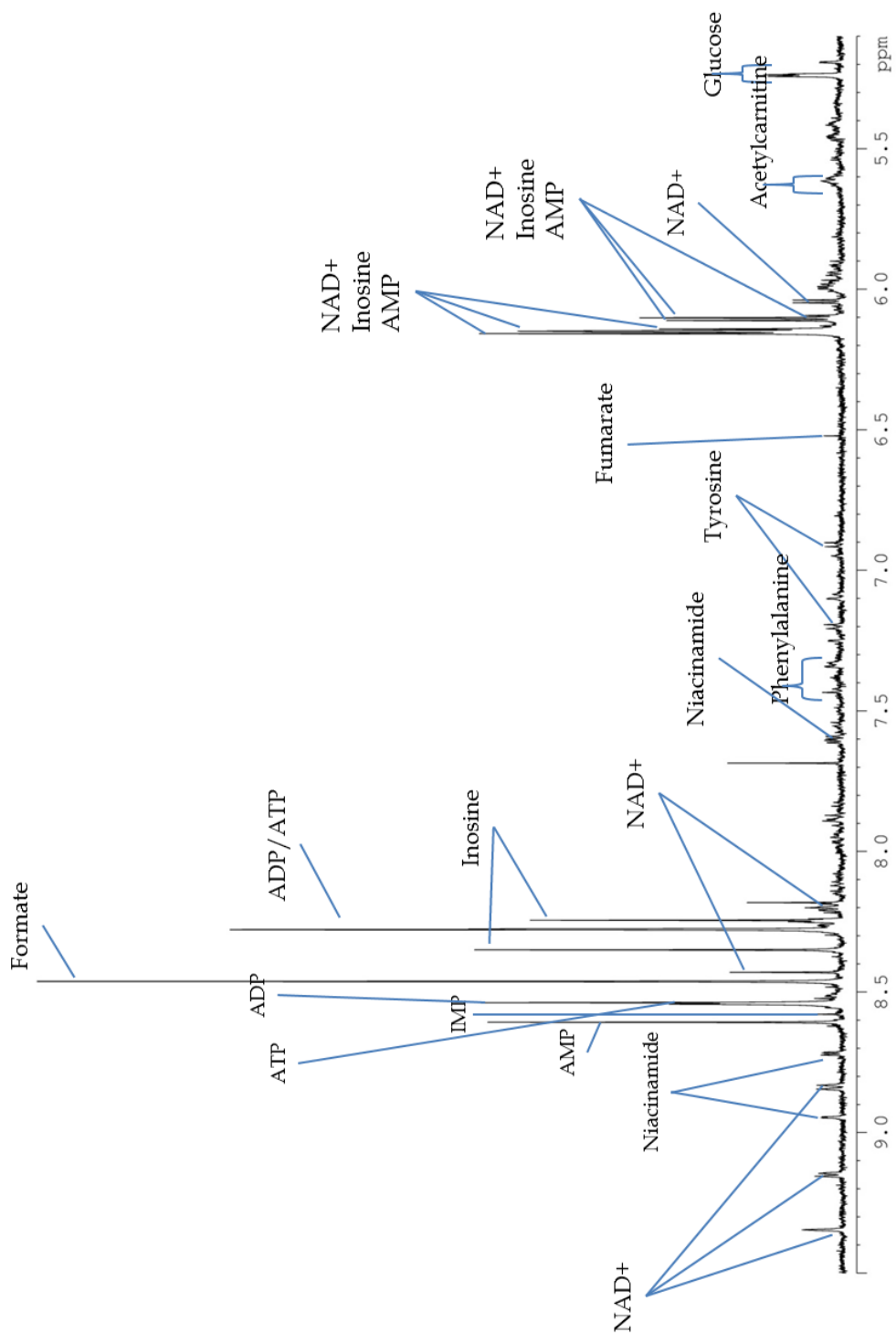
Εικόνα 18: Εικόνα από το ομοπυρηνικό διδιάστατο φάσμα J-res, όπου γίνεται η ορθή αντιστοίχιση των διπλών κορυφών του αμινοξέως βαλίνη.



Εικόνα 19: Απόδοση κορυφών στην αλειφατική περιοχή του φάσματος του δείγματος Β6. Παρατηρούνται οι μεταβολίτες: 1.Ισολευκίνη, 2.Λευκίνη, 3.Βαλίνη, 4.Γαλακτικό οξύ, 5.Αλανίνη, 6.Οξικό οξύ, 7. Γλουταμικό οξύ, 8.Γλουταμίνη, 9.Ηλεκτρικό οξύ, 10. Ασπαρτικό οξύ



Εικόνα 20: Απόδοση κορυφών στην αλειφατική περιοχή του φάσματος του δείγματος Β6. Παρατηρούνται οι μεταβολίτες: 11.Ασπαραγίνη, 12.N,N-διμεθυλογλυκίνη, 13.Φωσφορική Κρεατίνη, 14.Χολίνη, 15.Ακετυλοκαρνιτίνη, 16.Ακετυλοχολίνη, 17.Καρνιτίνη, 18.Ταυρίνη, 19.Μεθανόλη, 20.Γλυκόζη, 21.Γλυκίνη, 22.Ινοσίνη



Εικόνα 21: Απόδοση κορυφών στην αρωματική περιοχή του φάσματος του δείγματος Β6. Παρατηρούνται οι μεταβολίτες: 23.NAD+, 24.AMP, 25.Φουμαρικό οξύ, 26.Τυροσίνη, 27.Φαινυλαλανίνη, 28.Νικοτιναμίδιο, 29.ADP, 30.ATP, 31.IMP, 32.Μυρμηκικό οξύ

Οι μεταβολίτες που ταυτοποιήθηκαν στα φάσματα που ελήφθησαν (Εικόνες 20-21-22) φαίνονται στον Πίνακα 6, όπου δίνεται η αντίστοιχη χημική μετατόπιση καθώς και η πολλαπλότητα της κάθε κορυφής.

A/A	Μεταβολίτης	Χημική Μετατόπιση (ppm)	Πολλαπλότητα κορυφών
1	Ισολευκίνη	0.94	t
		1.01	d
		1.24	m
		1.45	m
		1.96	m
		3.66	d
2	Λευκίνη	0.96	d
		0.97	d
		1.67	m
		1.69	m
		1.73	m
		3.72	q
3	Βαλίνη	1.00	d
		1.04	d
		2.26	s
		3.60	d
4	Γαλακτικό Οξύ	1.33	d
		4.11	q
5	Αλανίνη	1.49	d
		3.79	q
6	Οξικό Οξύ	1.92	s
7	Γλουταμικό Οξύ	2.16	m
		2.13	m
		2.34	m
		2.37	m
		3.76	q
8	Γλουταμίνη	2.12	m
		2.16	m
		2.43	m
		2.47	m
		3.77	t
9	Ηλεκτρικό Οξύ	2.40	s
10	Ασπαρτικό Οξύ	2.68	dd
		2.81	dd
		3.90	dd
11	Ασπαραγίνη	2.87	dd
		2.96	dd
		4.00	q

A/A	Μεταβολίτης	Χημική Μετατόπιση (ppm)	Πολλαπλότητα κορυφών
12	N,N-Διμεθυλογλυκίνη	2.92	s
		3.71	s
13	Φωσφορική Κρεατίνη	3.04	s
		3.94	s
14	Χολίνη	3.21	s
15	Ο-Ακετυλοκαρνιτίνη	2.14	s
		2.51	q
		2.64	q
		3.20	s
		3.57	dd
		3.83	q
		5.60	m
16	Ο-Ακετυλοχολίνη	4.54	m
		3.73	m
		3.22	s
		2.14	s
17	Καρνιτίνη	2.42	dd
		2.46	dd
		3.23	s
		3.40	m
		3.42	m
		4.56	m
18	Ταυρίνη	3.27	t
		3.42	t
19	Μεθανόλη	3.35	s
20	Γλυκόζη	3.25	dd
		3.40	t
		3.42	m
		3.47	m
		3.50	t
		3.54	q
		3.71	t
		3.72	q
		3.77	q
		3.83	m
		3.84	m
		3.90	dd
		4.65	d
5.23	d		

A/A	Μεταβολίτης	Χημική Μετατόπιση (ppm)	Πολλαπλότητα κορυφών
21	Γλυκίνη	3.56	s
22	Ινοσίνη	4.28	dd
		4.44	dd
		6.11	d
		8.24	s
		8.35	s
23	NAD+	9.34	s
		9.14	d
		8.83	dt
		8.42	s
		8.19	q
		8.18	s
		6.08	d
		6.04	d
		4.54	m
		4.51	q
		4.48	t
		4.42	q
		4.38	m
		4.36	m
		4.24	m
		4.22	m
		4.20	m
24	AMP	4.00	m
		4.02	m
		4.36	m
		4.51	q
		6.14	d
		8.27	s
		8.61	s
25	Φουμαρικό Οξύ	6.52	s
26	Τυροσίνη	7.20	dd
		6.90	dd
		3.93	q
		3.18	dq
		3.04	

A/A	Μεταβολίτης	Χημική Μετατόπιση (ppm)	Πολλαπλότητα κορυφών
27	Φαινυλαλανίνη	7.43	m
		7.38	m
		7.33	dd
		3.99	dd
28	Νικοτιναμίδιο	8.94	m
		8.71	dd
		8.24	m
		7.60	ddd
29	ADP	8.53	s
		8.27	s
		6.15	d
		4.61	t
		4.38	m
		4.22	m
		4.19	m
30	ATP	8.54	s
		8.27	s
		6.15	d
		4.61	q
		4.40	m
		4.28	m
		4.24	m
31	IMP	8.35	s
		8.24	s
		6.10	d
		4.51	q
		4.36	m
		4.04	m
		4.01	m
32	Μυρμηκικό Οξύ	8.46	s

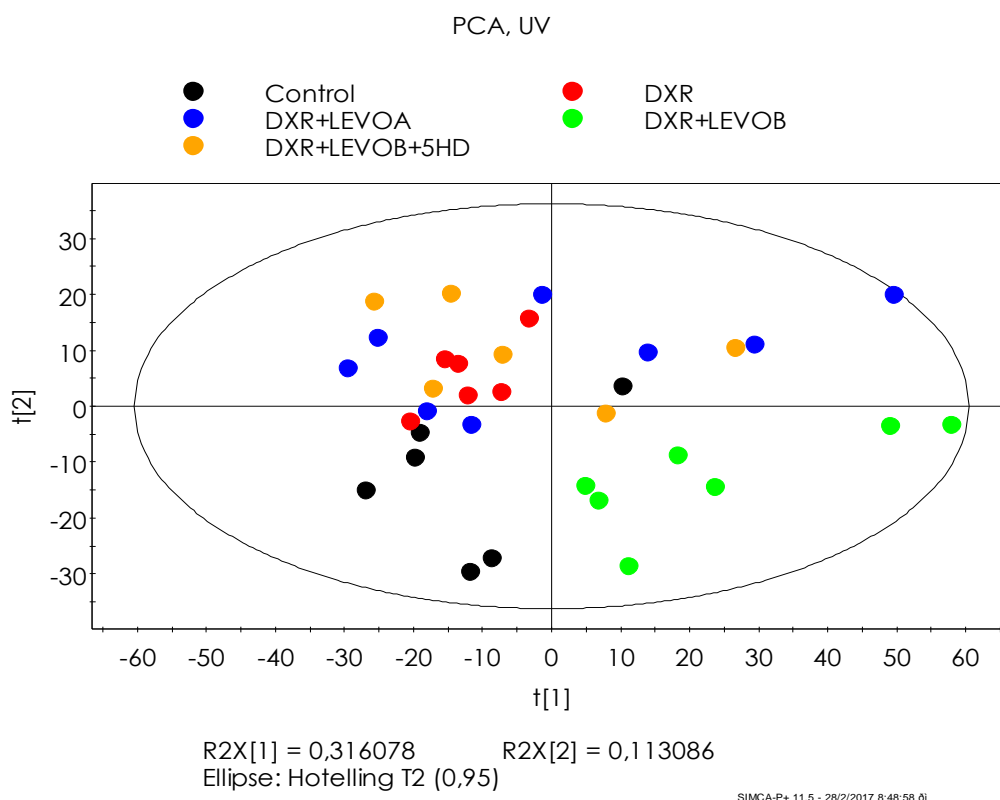
Πίνακας 6: s: singlet (απλή) / d: doublet (διπλή) / t: triplet (τριπλή) / q: quartet (τετραπλή) / m: multiplet (πολλαπλή)/dd: doublet of doublets (διπλή διπλών) / ddd: doublet of doublet of doublet (διπλή διπλών διπλών)

4.2 Χημειομετρική Ανάλυση δεδομένων NMR

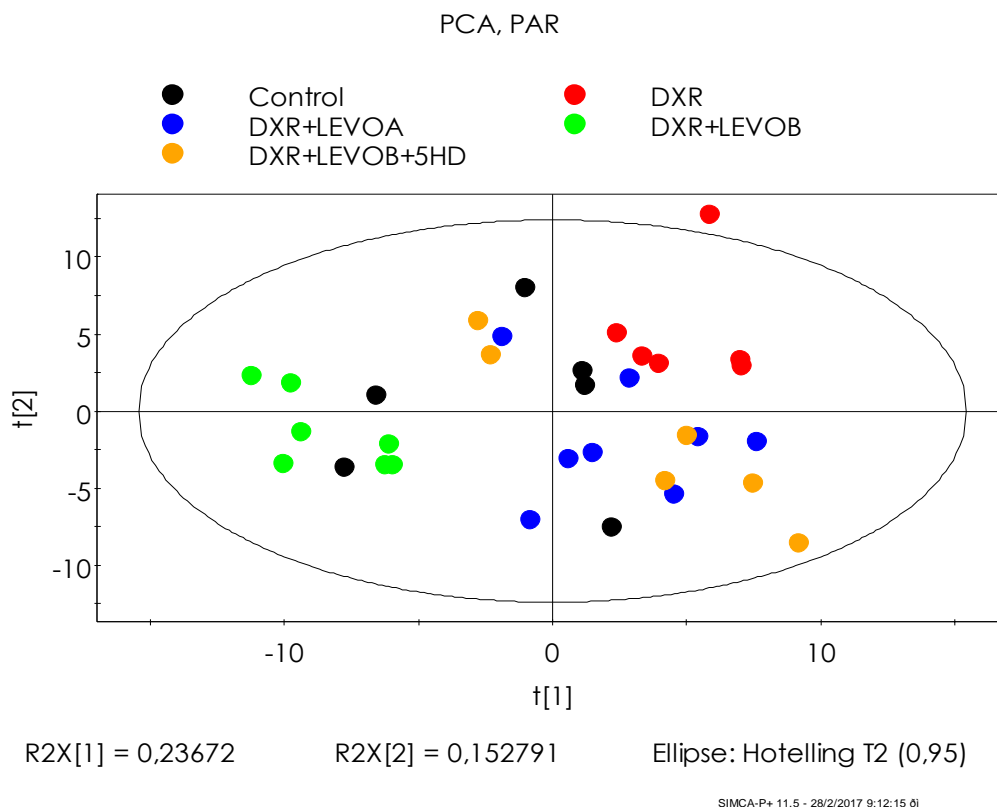
Στα δεδομένα, όπως αυτά εξήχθησαν έπειτα από την διαδικασία του bucketing, εφαρμόστηκε πολυπαραμετρική στατιστική ανάλυση μέσω του λογισμικού SIMCAP+11.5.

4.2.1 Αποτελέσματα PCA

Αρχικά, πραγματοποιήθηκε η μη επιβλεπόμενη μέθοδος PCA στην οποία χρησιμοποιήθηκαν και οι δύο τρόποι κλιμάκωσης (UV και Pareto). Στην κλιμάκωση UV (Εικόνα 22) οι τιμές R^2 και Q^2 ήταν 0.610 και 0.381 αντίστοιχα, με 5 κύριες συνιστώσες. Για την κλιμάκωση Pareto (Εικόνα 23) οι τιμές R^2 και Q^2 ήταν 0.522 και 0.287 αντίστοιχα, με 3 κύριες συνιστώσες.



Εικόνα 22: Απεικόνιση παρατηρήσεων PCA των δεδομένων NMR μετά από κλιμάκωση με UV



Εικόνα 23: Απεικόνιση παρατηρήσεων PCA των δεδομένων NMR μετά από κλιμάκωση με Par

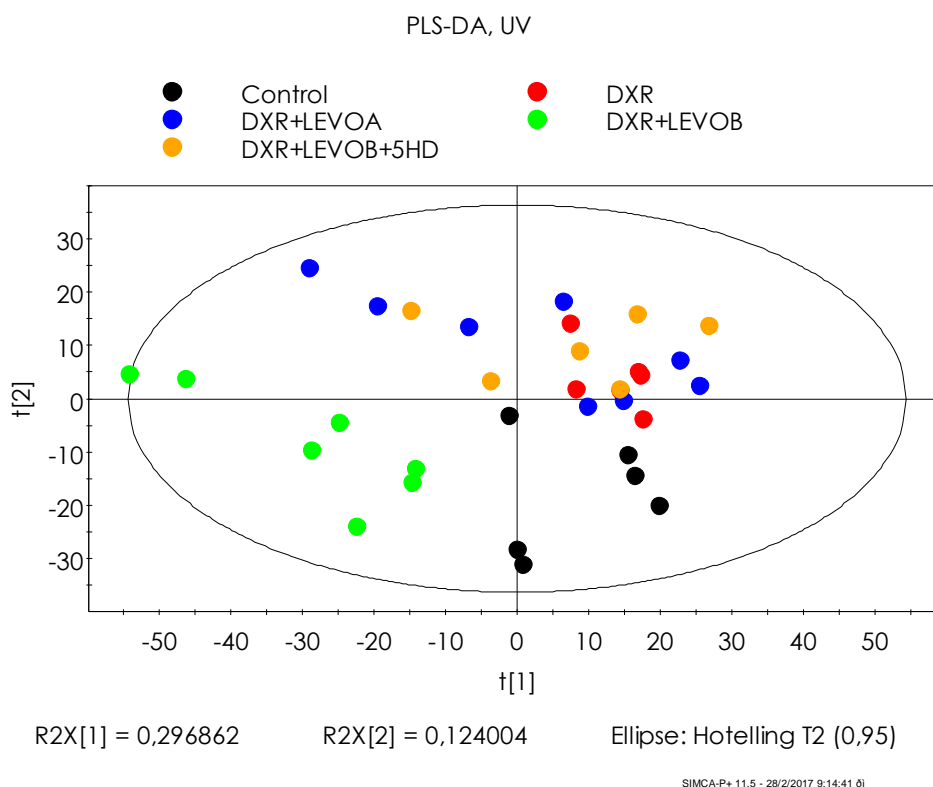
Από την μέθοδο της PCA, παρατηρείται ότι υπάρχει εμφανής διαχωρισμός στο μεταβολικό προφίλ των αουραιών της ομάδας DXR+LEVOB, από τις υπόλοιπες ομάδες και με τις δύο κλιμακώσεις (Εικόνες 22 & 23). Παρατηρείται επίσης και μία τάση των παρατηρήσεων, ανά ομάδα, ανταπόκρισης στην χορήγηση της LEVO.

Όπως φαίνεται ξεκάθαρα και στην εικόνα 23, η ομάδα Control διαχωρίζεται επαρκώς από τις υπόλοιπες ομάδες. Στην συνέχεια παρατηρούμε πως η χορήγηση της DXR μετατοπίζει το προφίλ των πειραματόζων. Έπειτα, η ομάδα στην οποία χορηγήθηκε και LEVO σε μικρή δόση φαίνεται να διασπείρεται στον χώρο που βρίσκεται η ομάδα της DXR, ενώ η χορήγηση της μεγάλης δόσης της LEVO μετατοπίζει πλήρως τις παρατηρήσεις μακριά από τις υπόλοιπες ομάδες. Στην συνέχεια παρατηρείται επαναφορά των παρατηρήσεων στον χώρο των ομάδων DXR & DXR+LEVOA, μετά από χορήγηση του 5HD για την ομάδα DXR+LEVOB+5HD.

Ο διαχωρισμός που παρατηρείται μεταξύ των ομάδων στην PCA, είναι εξαιρετικά σημαντικός γιατί βασίζεται μόνο σε εγγενή χαρακτηριστικά των δειγμάτων καθώς δεν υπάρχει καμία πληροφορία για τις ομάδες των δεδομένων (αφού πρόκειται για μία μη επιβλεπόμενη τεχνική).

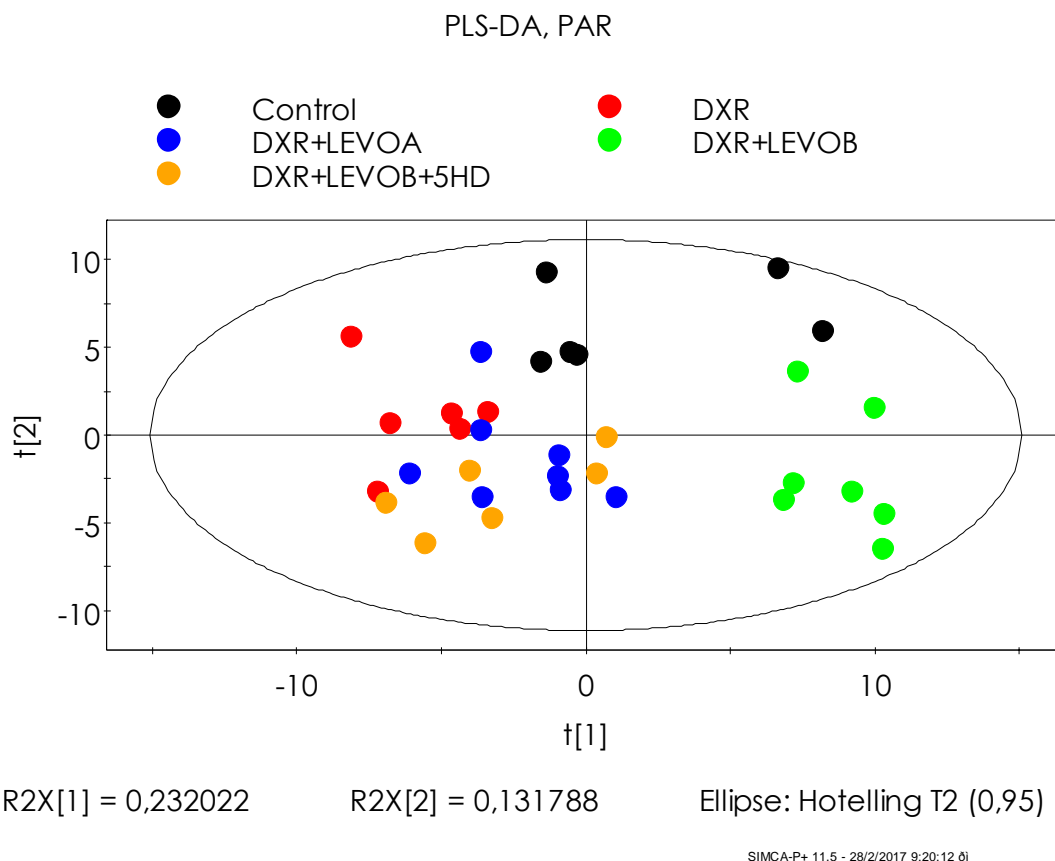
4.2.2 Αποτελέσματα PLS-DA

Στη συνέχεια ακολούθησε η επιβλεπόμενη μέθοδος PLS-DA με κλιμάκωση UV (Εικόνα 24) και Pareto (Εικόνα 25). Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιείται για την βελτίωση του διαχωρισμού σε όλα τα δείγματα. Για την κλιμάκωση UV οι τιμές R^2X , R^2Y και Q^2 είναι 0.540, 0.602 και 0.290 αντίστοιχα, με 4 συνιστώσες. Για την κλιμάκωση Par, οι τιμές R^2X , R^2Y και Q^2 είναι 0.489, 0.508 και 0.342, με 3 κύριες συνιστώσες.



Εικόνα 24: Απεικόνιση παρατηρήσεων PLS-DA των δεδομένων NMR μετά από κλιμάκωση με UV

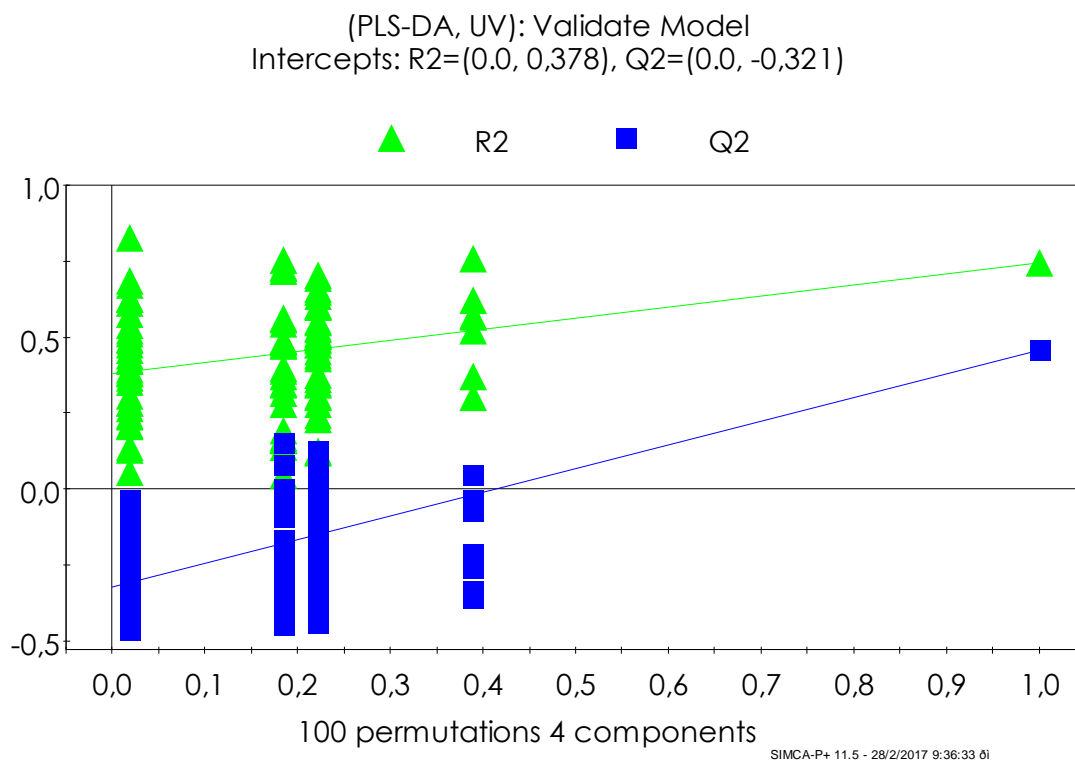
Με την εφαρμογή της μεθόδου PLS-DA (εικόνες 25 & 26), είδαμε και πάλι πολύ καλό διαχωρισμό μεταξύ των ομάδων (και με τις δύο κλιμακώσεις) αντίστοιχο της PCA. Επειδή όμως τα μοντέλα PLS-DA κινδυνεύουν από υπερπροσαρμογή πολλές φορές, έτσι προχωρήσαμε σε έλεγχο τυχαίων μεταθέσεων (εικόνες 27 & 28) οπότε και κρίθηκαν έγκυρα τα μοντέλα.



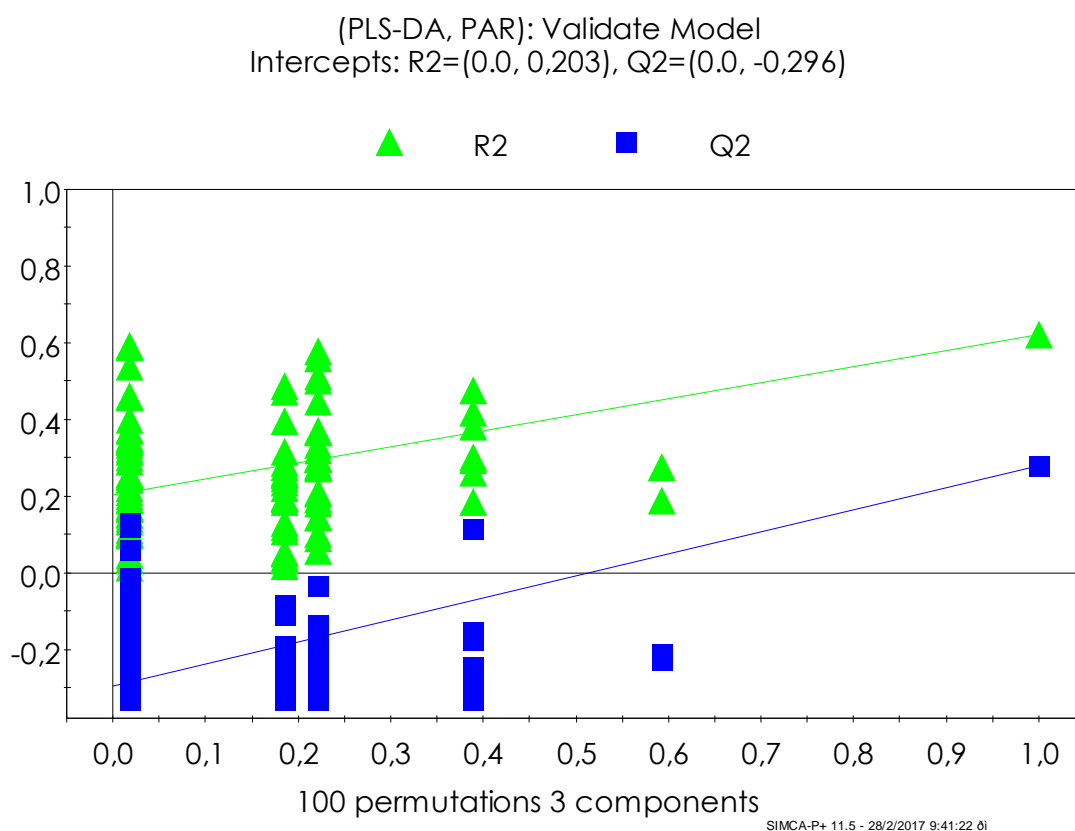
Εικόνα 25: Απεικόνιση παρατηρήσεων PLS-DA των δεδομένων NMR μετά από κλιμάκωση με Par

Πραγματοποιήθηκε έτσι, επικύρωση με μεταθετικό έλεγχο, επιτρέποντας 100 τυχαίες μεταθέσεις, στα μοντέλα PLS-DA και των δύο κλιμακώσεων (UV & Pareto) ώστε να αξιολογηθεί η προβλεψιμότητά τους. Τα διαγράμματα επικύρωσης φαίνονται στις εικόνες 26 & 27.

Στην κλιμάκωση UV (εικόνα 26) οι τομές ήταν $R^2=(0.0, 0.378)$, $Q^2=(0.0, -0.321)$, ενώ στην κλιμάκωση Pareto (εικόνα 27) οι τομές ήταν $R^2=(0.0, 0.203)$, $Q^2=(0.0, -0.296)$. Οπότε και τα παραπάνω μοντέλα θεωρούνται έγκυρα.



Εικόνα 26: Μεταθετικός έλεγχος 100 τυχαίων μεταθέσεων για το μοντέλο PLS-DA (UV).



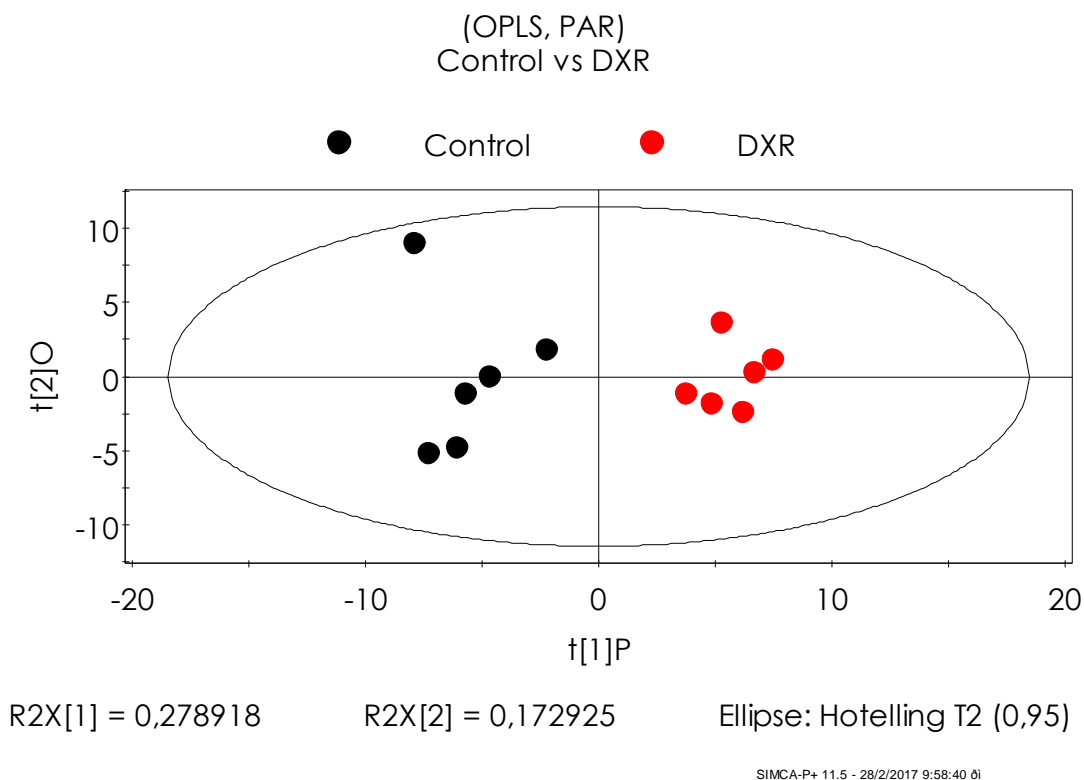
Εικόνα 27: Μεταθετικός έλεγχος 100 τυχαίων μεταθέσεων για το μοντέλο PLS-DA (Par).

Η δράση της LEVO επί της καρδιοτοξικότητας, που προκαλεί η DXR, φαίνεται να αλλάζει το μεταβολομικό προφίλ του μυοκαρδίου των πειραματόζων. Χαρακτηριστικό που γίνεται φανερό από την μετατόπιση που προαναφέρθηκε στο διάγραμμα παρατηρήσεων στην PCA και στην PLS-DA.

Τους μεταβολίτες όμως που προκαλούν τις διαφοροποιήσεις αυτές ώστε να μετατοπίζουν τα προφίλ των ομάδων διερευνήσαμε μέσα από την μέθοδο oPLS (εικόνες 29, 31 & 33) και την βοήθεια του Heatmap (εικόνα 34), που ακολουθούν.

4.2.3 Αποτελέσματα oPLS

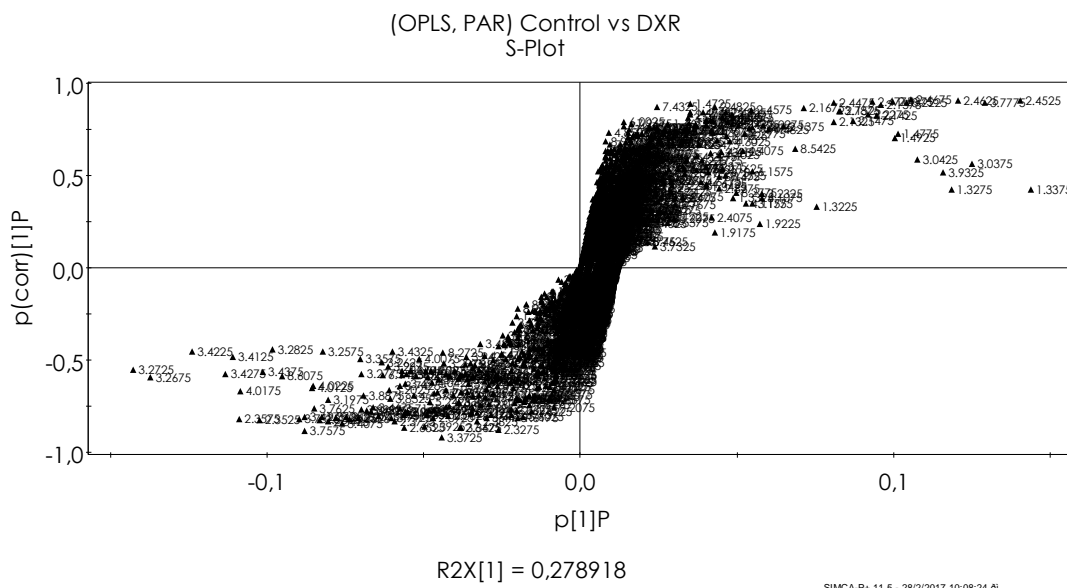
Πραγματοποιήθηκε λοιπόν, στατιστική ανάλυση με την επίσης επιβλεπόμενη μέθοδο oPLS. Το μοντέλο oPLS εφαρμόστηκε μεταξύ ζευγών ομάδων. Αυτή η μέθοδος υποδεικνύει τις σημαντικότερες διαφορές στα μεταβολικά προφίλ μεταξύ των ομάδων. Στις εικόνες 28,30 και 32 παρουσιάζονται τα διαγράμματα παρατηρήσεων ανά ζεύγη ομάδων.



Εικόνα 28: Απεικόνιση παρατηρήσεων μεθόδου oPLS ομάδων Control vs DXR. $R^2X = 0.452$, $R^2Y = 0.929$, $Q^2 = 0.699$

Παράλληλα στις εικόνες 29,31 και 33 παρουσιάζονται και τα αντίστοιχα διαγράμματα φορτίων ανά ζεύγη ομάδων, τα επονομαζόμενα και “S-

plots” λόγω της χαρακτηριστικής σιγμοειδούς μορφής που παίρνουν. Από αυτά τα διαγράμματα είναι εύκολο να διακρίνει κανείς ποιες χημικές μετατοπίσεις, μεταβολίτες δηλαδή, διαφοροποιούν τις ομάδες μεταξύ τους. Όσο πιο μακριά από τον άξονα y βρίσκεται μία χημική μετατόπιση, τόσο περισσότερο συμβάλλει στον διαχωρισμό των ομάδων ενώ όσο περισσότερο απέχει από τον x τόσο πιο αξιόπιστη θεωρείται. Άρα μελετώνται αυτές που βρίσκονται στο κάτω αριστερό και άνω δεξιό τεταρτημόριο του διαγράμματος.



Εικόνα 29: Διάγραμμα φορτίων S, μεθόδου oPLS μεταξύ των ομάδων Control vs DXR

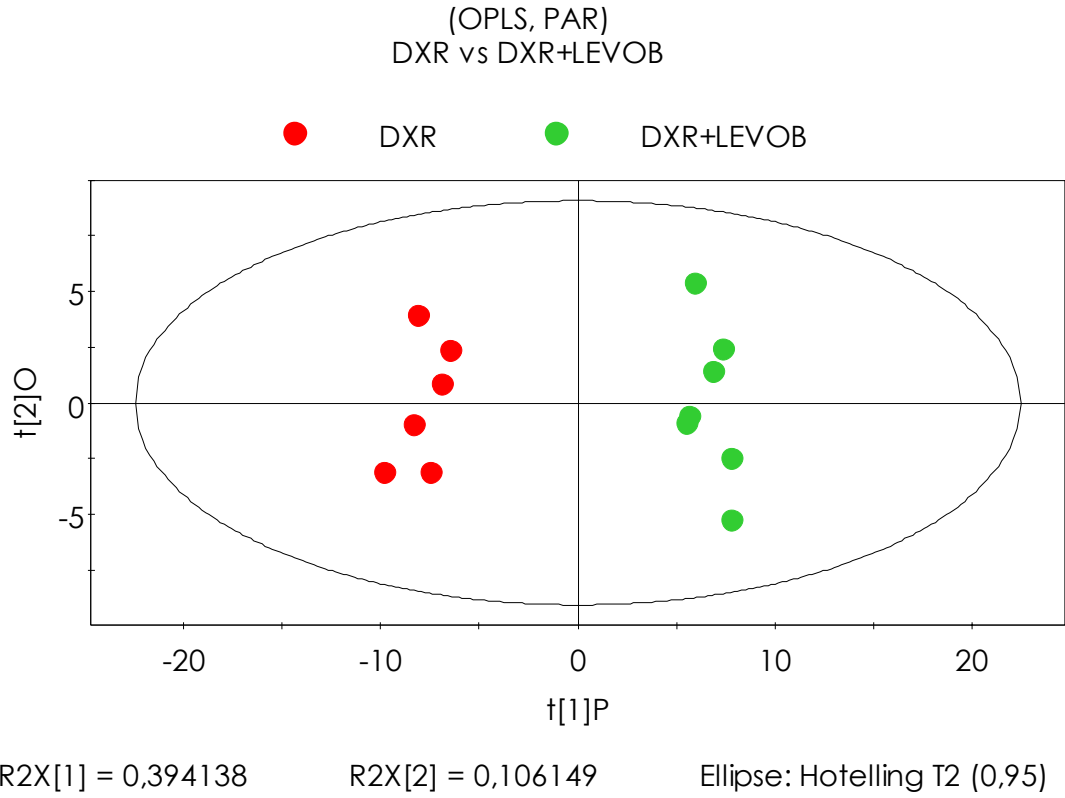
Η αντιστοίχιση των χημικών μετατοπίσεων που διακρίνονται στο διάγραμμα-S (Εικόνα 29) στους μεταβολίτες που διαφοροποιούν την ομάδα **Control** από την **DXR** έδειξε τα παρακάτω:

Στην ομάδα **Control** οι μεταβολίτες που αυξάνονται είναι οι:

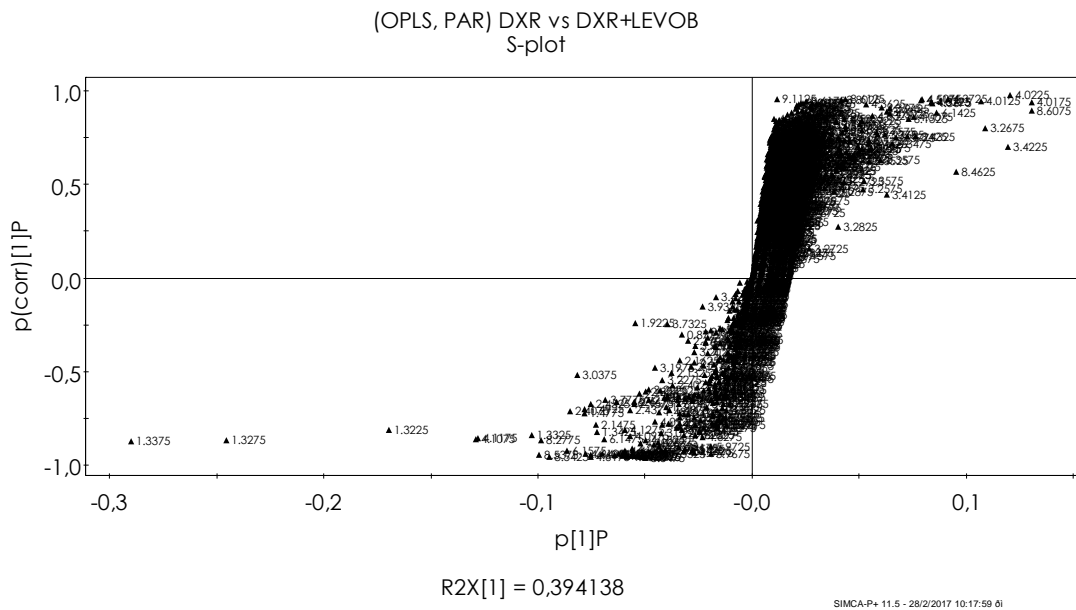
- AMP
- Γλουταμικό οξύ
- Ακετυλοκαρνιτίνη

Στην ομάδα **DXR** οι μεταβολίτες που αυξάνονται είναι οι:

- Φωσφορική Κρεατίνη
- ATP
- Γλουταμίνη
- Γαλακτικό οξύ
- Αλανίνη



Εικόνα 30: Απεικόνιση παρατηρήσεων μεθόδου oPLS ομάδων DXR vs DXR+LEVOB
 $R^2X = 0.500$, $R^2Y = 0.981$, $Q^2 = 0.920$



Εικόνα 31: Διάγραμμα φορτίων S, μεθόδου oPLS μεταξύ των ομάδων DXR vs DXR+LEVOB

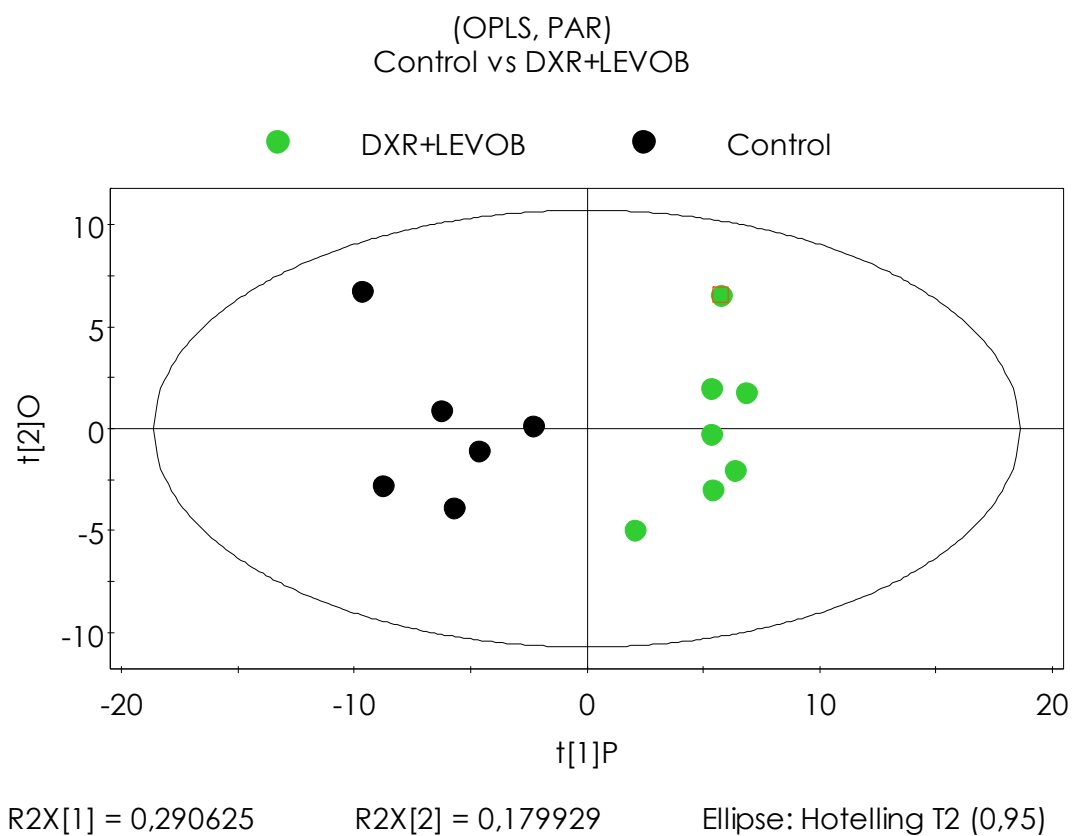
Η αντιστοίχιση των χημικών μετατοπίσεων που διακρίνονται στο διάγραμμα-S (Εικόνα 31) στους μεταβολίτες που διαφοροποιούν την ομάδα **DXR** από την **DXR+LEVOB** έδειξε τα παρακάτω:

Στην ομάδα **DXR** οι μεταβολίτες που αυξάνονται είναι οι:

- Γαλακτικό οξύ
- ADP
- ATP

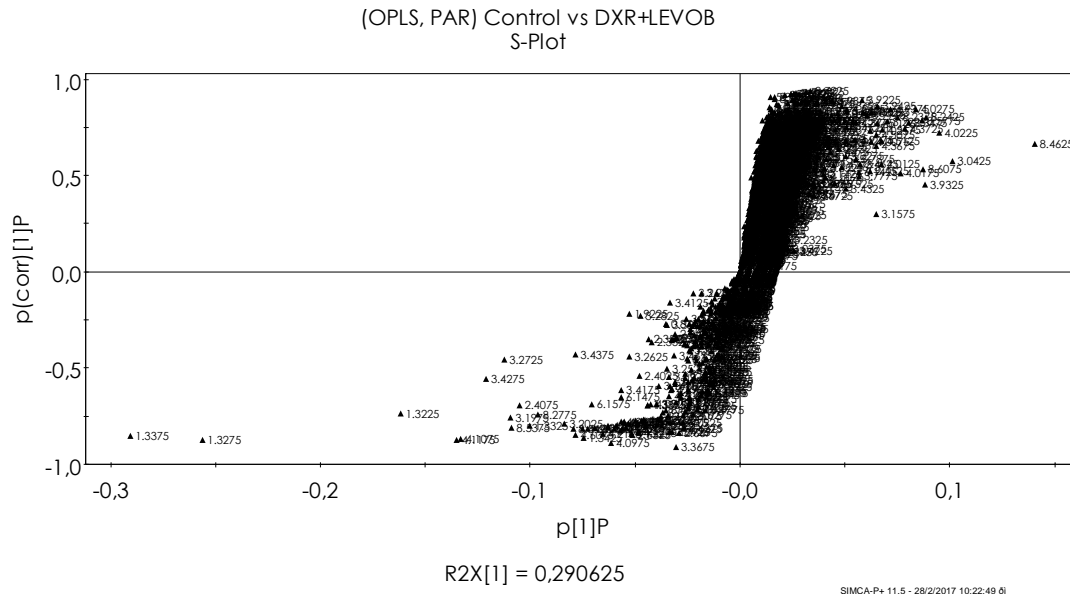
Στην ομάδα **DXR+LEVOB** οι μεταβολίτες που αυξάνονται είναι οι:

- AMP
- Μυρμηκικό οξύ



SIMCA-P+ 11.5 - 28/2/2017 10:02:24 01

Εικόνα 32: Απεικόνιση παρατηρήσεων μεθόδου oPLS ομάδων Control vs DXR+LEVOB
 $R^2X= 0.471$, $R^2Y= 0.895$, $Q^2=0.646$



Εικόνα 33: Διάγραμμα φορτίων S, μεθόδου oPLS μεταξύ των ομάδων Control vs DXR+LEVOB

Η αντιστοίχιση των χημικών μετατοπίσεων που διακρίνονται στο διάγραμμα-S (Εικόνα 33) στους μεταβολίτες που διαφοροποιούν την ομάδα **Control** από την **DXR+LEVOB** έδειξε τα παρακάτω:

Στην ομάδα **Control** οι μεταβολίτες που αυξάνονται είναι οι:

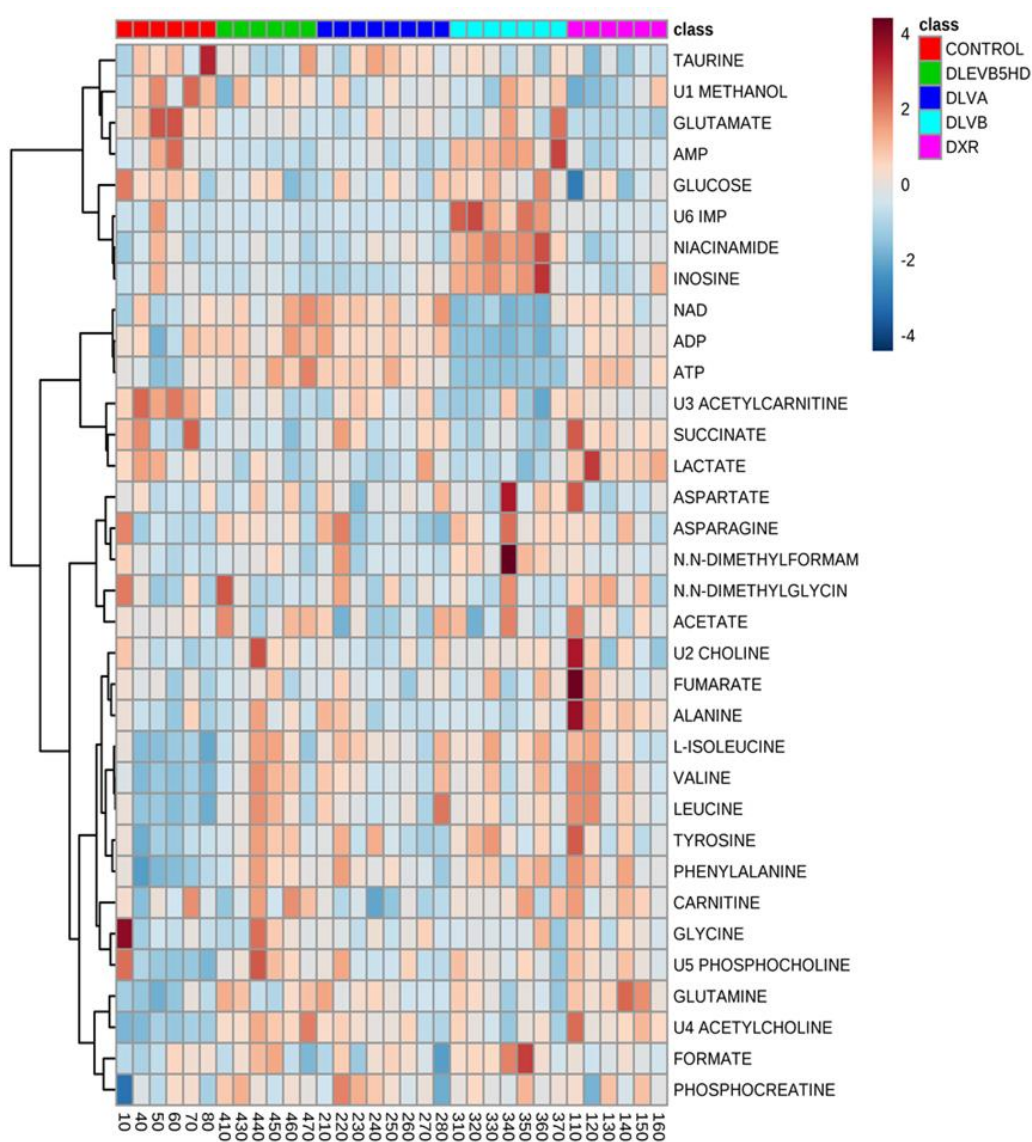
- Γαλακτικό οξύ
- Ηλεκτρικό οξύ
- Ακετυλοκαρνιτίνη
- ADP

Στην ομάδα **DXR+LEVOB** οι μεταβολίτες που αυξάνονται είναι οι:

- Μυρμηκικό οξύ
- AMP
- Ινοσίνη
- Φωσφορική Κρεατίνη
- IMP

4.2.4 Διάγραμμα Heatmap

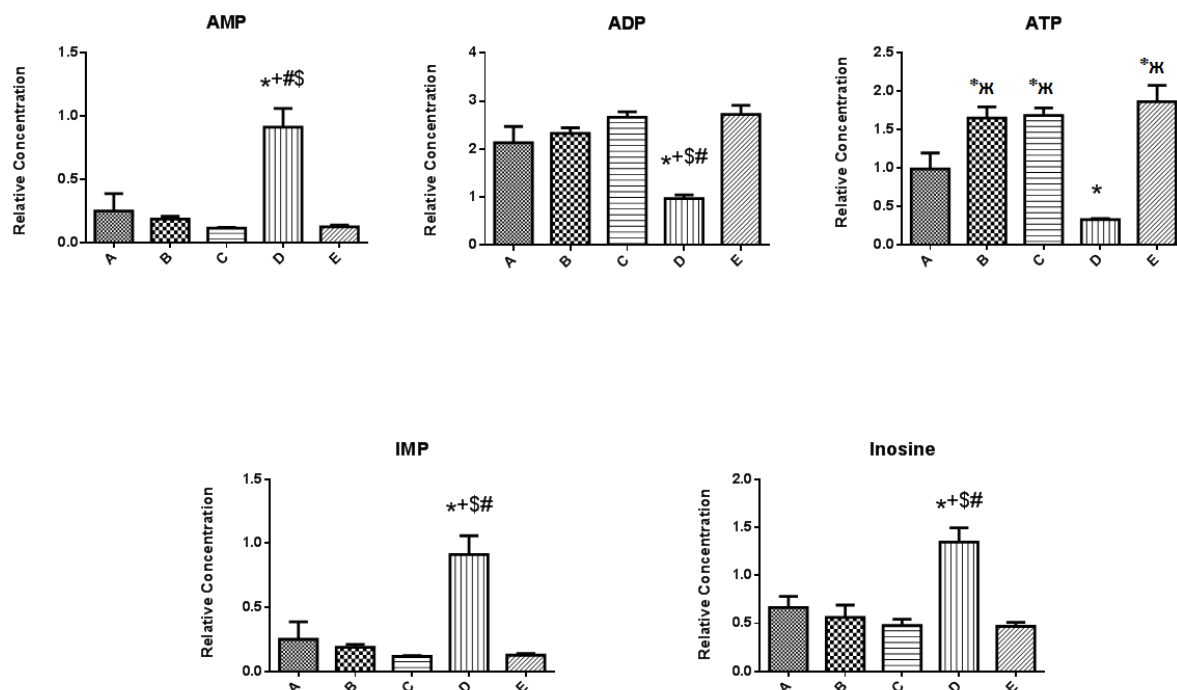
Στην συνέχεια, παρατίθεται το Heatmap για τους μεταβολίτες που παρατηρήθηκαν στα φάσματα NMR. Χρησιμοποιήθηκε η διαδικτυακή πλατφόρμα MetaboAnalyst 3.0 για την δημιουργία του διαγράμματος. Για τους μεταβολίτες χρησιμοποιήθηκε η κλιμάκωση Pareto που προσφέρει η πλατφόρμα. Η απόσταση μετρήθηκε σύμφωνα με την μέθοδο Pearson και ο αλγόριθμος ομαδοποίησης ήταν ο Ward.



Εικόνα 34: Μέσω του συγκεκριμένου διαγράμματος η αυξομείωση των σημαντικότερων σύμφωνα με τον αλγόριθμο μεταβλητών, ανά ομάδες. Μπλε μαρτυρά χαμηλή συγκέντρωση και σκούρο κόκκινο υποδεικνύει υψηλή.

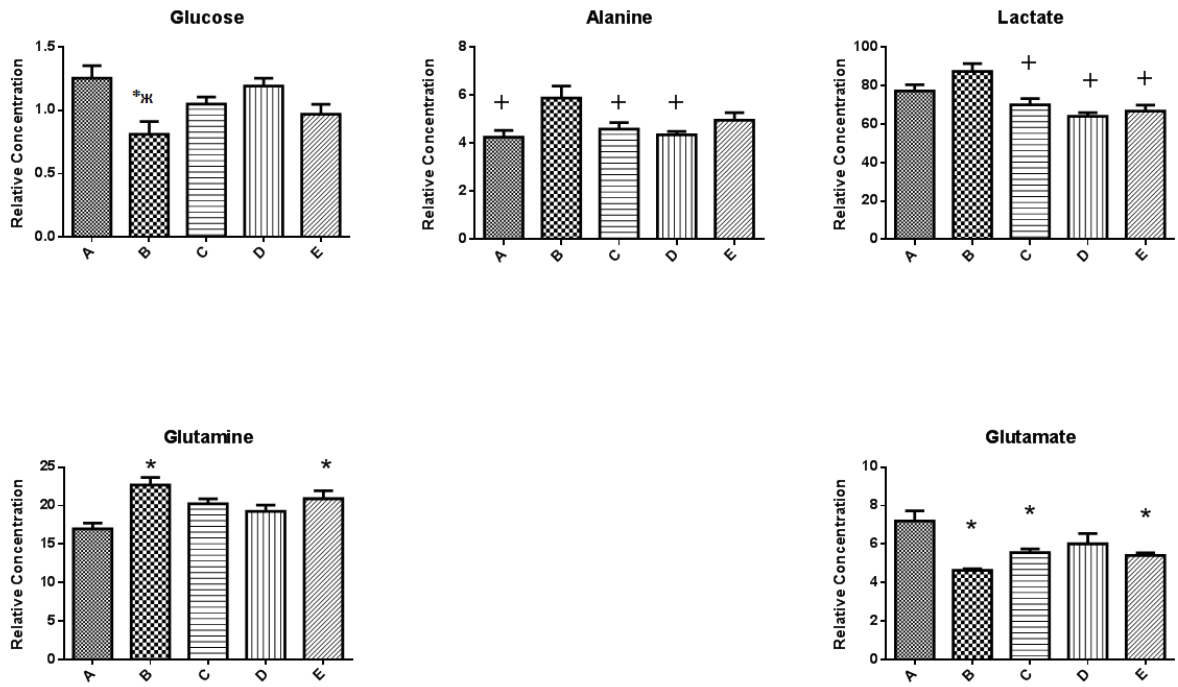
Στην συνέχεια προχωρήσαμε σε στατιστική ανάλυση ANOVA για να διαπιστωθεί εάν οι διαφορές μεταξύ των μεταβολιτών που εμφανίζονται μεταξύ των ομάδων στο διάγραμμα Heatmap είναι και στατιστικά σημαντικές.

4.2.5 Στατιστική Ανάλυση Ανοπα

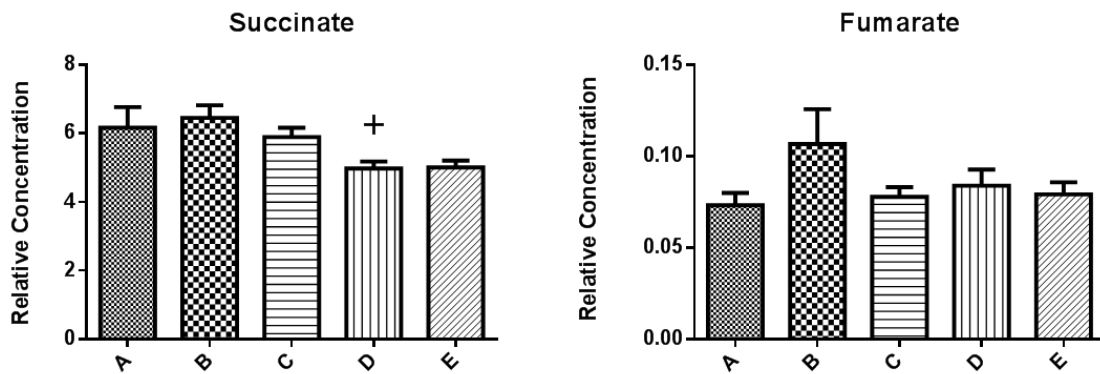


Εικόνα 35: Ιστογράμματα στατιστικής ανάλυσης ANOVA για την ανακάλυψη στατιστικά σημαντικών διαφορών των ενεργειακών μεταβολιτών μεταξύ των ομάδων (A: Control, B: DXR, C: DXR+LEVOA, D: DXR+LEVOB, E:DXR+LEVOB+5HD). * $p < 0,05$ vs A, $^{\#}p < 0,05$ vs B, $^{\$}p < 0,05$ vs C, $^{*#}p < 0,05$ vs D, $^{\$}p < 0,05$ vs E.

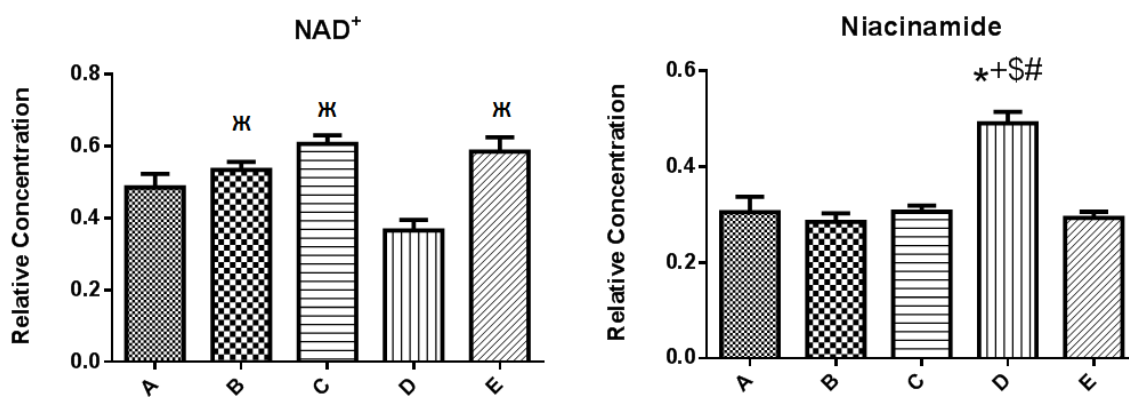
Αρχικά ελέγχθηκαν οι ενεργειακοί μεταβολίτες (Εικόνα 35) οι οποίοι από την μέθοδο oPLS (μεταξύ ζευγών ομάδων) αλλά και από το Heatmap είχαν έντονες αυξομειώσεις μεταξύ των δειγμάτων/ομάδων. Στην συνέχεια προχωρήσαμε και στον έλεγχο των μεταβολιτών που σχετίζονταν με τον μεταβολισμό της γλυκόζης στο κύτταρο (glucose, alanine, lactate) καθώς και οι μεταβολίτες που σχετίζονται άμεσα ή έμμεσα με τον κύκλο TCA όπως φουμαρικό οξύ και ηλεκτρικό οξύ, γλουταμίνη, γλουταμινικό, NAD⁺, νικοτιναμίδιο και διαφοροποιούνται μεταξύ των ομάδων (Εικόνα 36, 37, 38). Τα αμινοξέα διακλαδισμένης αλυσού (BCAAs) επίσης φαίνονται στο Heatmap να αυξομειώνονται μεταξύ των ομάδων έτσι έγινε στατιστικός έλεγχος και σε αυτά (Εικόνα 37) ώστε να διαπιστωθεί αν υπάρχει κάποια στατιστικά σημαντική διαφορά.



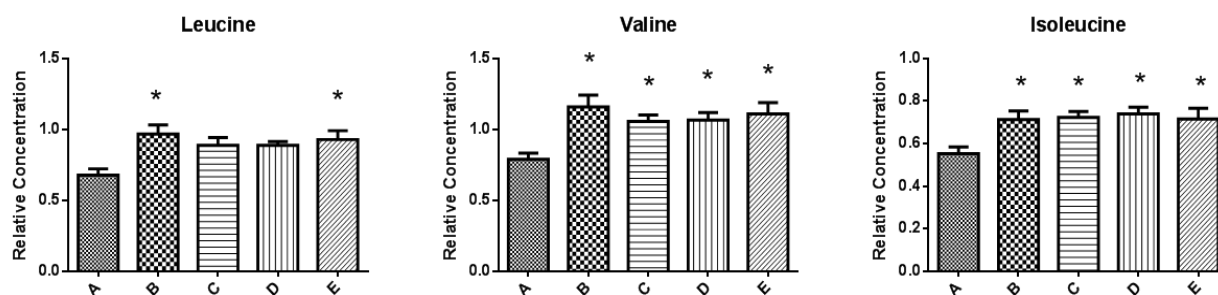
Εικόνα 36: Ιστογράμματα στατιστικής ανάλυσης ANOVA για την ανακάλυψη στατιστικά σημαντικών διαφορών μεταβολιτών που εμπλέκονται στην κυτταρική αναπνοή μεταξύ των ομάδων (A: Control, B: DXR, C: DXR+LEVOA, D: DXR+LEVOB, E:DXR+LEVOB+5HD). * $p < 0,05$ vs A, + $p < 0,05$ vs B, $\mathbb{K} p < 0,05$ vs D.



Εικόνα 37: Ιστογράμματα στατιστικής ανάλυσης ANOVA για την ανακάλυψη στατιστικά σημαντικών διαφορών του ηλεκτρικού και του φουμαρικού οξέος, μεταξύ των ομάδων (A: Control, B: DXR, C: DXR+LEVOA, D: DXR+LEVOB, E:DXR+LEVOB+5HD). * $p < 0,05$ vs B



Εικόνα 38: Ιστογράμματα στατιστικής ανάλυσης ANOVA για την ανακάλυψη στατιστικά σημαντικών διαφορών του NAD⁺ και του νικοτιναμιδίου, μεταξύ των ομάδων (A: Control, B: DXR, C: DXR+LEVOA, D: DXR+LEVOB, E:DXR+LEVOB+5HD). *p<0,05 vs A, †p<0,05 vs B, #p<0,05 vs C, *p<0,05 vs D, ‡p<0,05 vs E.

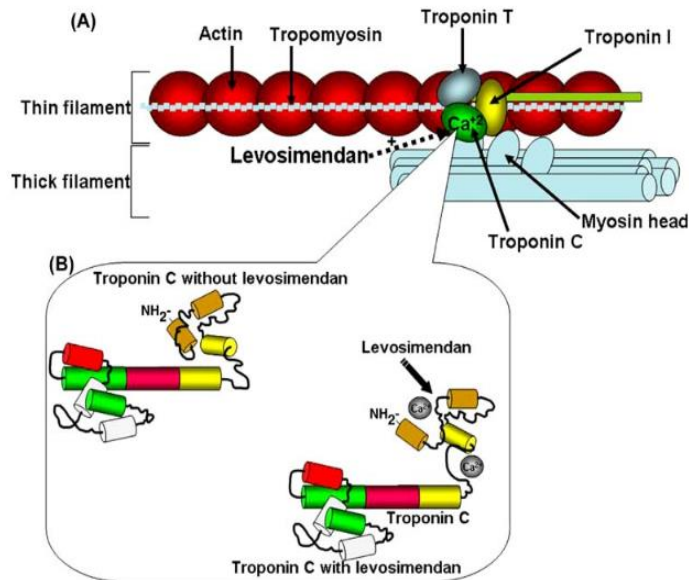


Εικόνα 39: Ιστογράμματα στατιστικής ανάλυσης ANOVA για την ανακάλυψη στατιστικά σημαντικών διαφορών των αμινοξέων διακλαδισμένης αλύσου μεταξύ των ομάδων(A: Control, B: DXR, C: DXR+LEVOA, D: DXR+LEVOB, E:DXR+LEVOB+5HD). *p<0,05 vs A

4.3 Συζήτηση – Ερμηνεία Αποτελεσμάτων

Η στατιστική σημασία των διαφορών των μεταβολιτών μεταξύ των ομάδων που διαπιστώνεται με την ανάλυση ANOVA(Εικόνες 35-39), κάνει εφικτή την απόδοση και βιοχημικής ερμηνείας στις διαφοροποιήσεις αυτές των μεταβολιτών.

Οι ενεργειακοί μεταβολίτες AMP, ADP, ATP όπως και τα IMP και Ινοσίνη, έχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές στην ομάδα DXR+LEVOB σε σχέση με τις ομάδες Control και DXR (Εικόνα 35). Αυξημένα φαίνονται τα AMP, IMP και Ινοσίνη στην ομάδα DXR+LEVOB σε σχέση με την ομάδα DXR. Στον αντίποδα βρίσκονται τα ADP & ATP τα οποία παρουσιάζουν ακριβώς αντίθετη συμπεριφορά στις αντίστοιχες ομάδες.

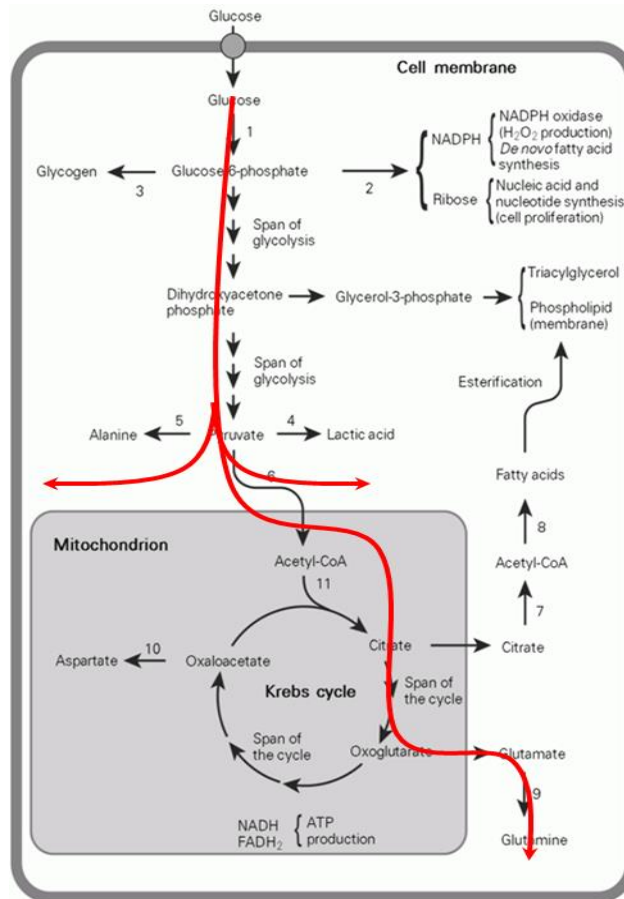


Εικόνα 40: Μηχανισμός δράσης LEVO επί της συσταλτικής συσκευής (56)

Είναι γνωστό ότι στην συσταλτική συσκευή των καρδιομυοκυττάρων η μυοσίνη φέρει μία κεφαλή που αποτελείται από μία ATPάση (62). Γνωστό είναι επίσης ότι η συστολή επιτυγχάνεται μέσω ενεργοποίησης του συστήματος μυοσίνης-τροπονινών κατά Ca^{2+} -εξαρτώμενο τρόπο (84). Έχουμε αναφέρει προηγουμένως ότι η κύρια δράση της LEVO είναι η ευαισθητοποίηση της τροπονίνης-C στο ασβέστιο με επακόλουθη αύξηση της συστολής (Εικόνα 40) (56).

Τα παραπάνω αποτελέσματα δείχνουν ότι στην ομάδα DXR+LEVOB λόγω της θετικής ινότροπης δράσης της LEVO επάγεται η κατανάλωση του ATP, γεγονός που υποκινεί τον ενδογενή μηχανισμό *de novo* βιοσύνθεσης AMP, από τα πρόδρομα μόρια IMP και ινοσίνη. Έτσι παρατηρείται αυξημένο AMP, IMP, ινοσίνη και μειωμένο το ATP (Εικόνα 35).

Συνεχίζοντας, παρατηρείται μειωμένη συγκέντρωση της γλυκόζης στην ομάδα DXR (Εικόνα 36) όπως και στους υπόλοιπους μεταβολίτες που αφορούν στην αναερόβια γλυκόλυση (Αλανίνη, Γαλακτικό οξύ).



Εικόνα 41: Γλυκόλυση, κύκλος TCA και μεταβολίτες που εμπλέκονται.

Παρατηρείται όμως και η επαναφορά στα επίπεδά τους όταν χορηγείται και η LEVOB (Εικόνα 36). Αυτά τα δεδομένα οδηγούν στο συμπέρασμα ότι η LEVO αναστέλλει την αναερόβια γλυκόλυση που επάγεται από την DXR.

Παράλληλα, αν και τα BCAAs (εικόνα 39) δεν φαίνονται να παρουσιάζουν σημαντικές διαφορές πέρα από την ομάδα control έναντι των λοιπών ομάδων παρόλα αυτά η διατήρηση των επιπέδων τους ενδέχεται να υποδεικνύει ένα σημαντικό στοιχείο που παρατηρείται στην καρδιοτοξικότητα. Μπορεί να υποθεθεί ότι η αύξηση των αμινοξέων αυτών υποδηλώνει καταβολισμό των πρωτεϊνών του μυοκαρδίου. Αυτό συμβαίνει σε μία προσπάθεια να αντλήσει πηγές ενέργειας το ανεπαρκές μυοκάρδιο από όπου μπορεί.

Όπως παρατηρείται επίσης από την συσσώρευση του νικοτιναμίδιου και την μειωμένη συγκέντρωση του NAD⁺ (Εικόνα 38), η LEVO μπορεί να επάγει μιτοχονδριακά μεταβολικά μονοπάτια διάσωσης. Τα αποθέματα του NAD⁺ εξαντλούνται στην ομάδα DXR+LEVOB ενώ το πρόδρομο μόριο το νικοτιναμίδιο σχηματίζεται ώστε να καλυφθούν οι ανάγκες σε NAD⁺ (85) (86).

Τέλος, παρατηρείται ότι η LEVO μειώνει τα επίπεδα του ηλεκτρικού οξέος και μειώνει και τα επίπεδα του φουμαρικού οξέος (Εικόνα 37), μια διαδικασία που συνδέεται με την επαγωγή αντιοξειδωτικών μηχανισμών και με την αναστολή της γήρανσης στα καρδιομυοκύτταρα (87) (88).

4.4 Επίλογος και Συμπεράσματα

Η Δοξορουβικίνη (DXR) αποτελεί ένα αντινεοπλασματικό φάρμακο ευρέως χρησιμοποιούμενο στην καθημερινή κλινική πρακτική. Ωστόσο η αντικαρκινική του δράση συνοδεύεται από την εμφάνιση καρδιοτοξικότητας, η οποία μπορεί να καταλήξει σε μη αντιστρεπτή καρδιακή ανεπάρκεια.

Η Λεβοσιμεντάνη (LEVO) είναι ένα φάρμακο με ινóτροπη και αγγειοδιασταλτική δράση, ενδείκνυται για τη βραχυχρόνια θεραπεία της σοβαρής χρόνιας καρδιακής ανεπάρκειας, καθώς επίσης και σε περιπτώσεις όπου η συμβατική θεραπεία κρίνεται αναποτελεσματική.

Το εργαστήριό μας συνδυάζοντας την μέχρι τώρα εμπειρία που έχει τόσο στην καρδιοτοξικότητα που επάγεται από την δοξορουβικίνη όσο και από την δράση της λεβοσιμεντάνης στην σοβαρή χρόνια καρδιακή ανεπάρκεια, προχώρησε στην μεταβολομική μελέτη με την χρήση NMR της επίδρασης της λεβοσιμεντάνης στην οξεία καρδιοτοξικότητα από την δοξορουβικίνη.

Τα αποτελέσματα μετά από ανάλυση του μεταβολικού προφίλ των πειραματόζωων έδειξαν ότι η λεβοσιμεντάνη μεταβάλλει του ενεργειακούς μεταβολίτες. Η λεβοσιμεντάνη φαίνεται ότι μπορεί να επάγει μιτοχονδριακά μεταβολικά μονοπάτια διάσωσης με την μεταβολή του λόγου NAD⁺/niacinamide ο οποίος σχετίζεται με την προστασία των καρδιομυοκυττάρων. Παράλληλα φαίνεται πως αναστέλλει την αναερόβια γλυκόλυση που επάγεται από την δοξορουβικίνη ενώ δεν καταφέρνει να αναστείλει τον πιθανό καταβολισμό των πρωτεϊνών του μυοκαρδίου.

Συνολικά, πρέπει να σημειωθεί πως η λεβοσιμεντάνη είναι ένα πολύ ελπιδοφόρο φάρμακο για την πρόληψη ή και θεραπεία της καρδιοτοξικότητας ενώ οι μελέτες πρέπει να συνεχιστούν ώστε να βελτιστοποιηθούν όλες οι παράμετροι στο θεραπευτικό της σχήμα.

Βιβλιογραφία

1. **Waksman S.A., Woodruff H.B.,** Bacteriostatic and bacteriocidal substances produced by soil actinomycetes. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*. 1940, 45, σσ. 609-614.
2. **Weiss R.B.** The anthracyclines: will we ever find a better doxorubicin? *Seminars in Oncology*. 1992, Τόμ. 19, 6, σσ. 670-686.
3. **Baruffa G.** Clinical trials in Plasmodium falciparum malaria with a on-g-acting sulphonamide. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine & Hygiene*. 1966, Τόμ. 60, 2, σσ. 222-224.
4. **Arcamone F., Cassinelli G., Fantini G., Grein A., Orezzi P., Pol C., Spalla C.,** Adriamycin, 14-hydroxydaunomycin, a new antitumor antibiotic from *S. peuceetius*. *Biotechnology and Bioengineering*. 1969, Τόμ. 11, 6, σσ. 1101-1110.
5. **Di Marco A., Gaetani M., Scarpinato B.,** Adriamycin (NSC-123,127): a new antibiotic with antitumor activity. *Cancer Chemotherapy Reports*. 1969, Τόμ. 53, 1, σσ. 33-37.
6. GEM Pharmaceuticals. *GPX-150 for Oncology*. [Ηλεκτρονικό] <http://gempharmaceuticals.com/gpx-150-for-oncology.shtml>.
7. **Marina N.M., Cochrane D., Harney E., Zomorodi K., Blaney S., Winick N., Bernstein M., Link M.P.,** Dose escalation and pharmacokinetics of pegylated liposomal doxorubicin (Doxil) in children with solid tumors: a pediatric oncology group study. *Clinical Cancer Research: An official journal of the American Association for Cancer Research*. 2002, Τόμ. 8, 2, σσ. 413-418.
8. **Minotti G., Menna P., Salvatorelli E., Cairo G., Gianni L.,** Anthracyclines: molecular advances and pharmacologic developments in antitumor activity and cardiotoxicity. *Pharmacological Reviews*. 2004, Τόμ. 56, 2, σσ. 185-229.
9. **Keizer H.G., Pinedo H.M., Schuurhuis G.J., Joenje H.,** Doxorubicin (adriamycin): a critical review of free radical-dependent mechanisms of cytotoxicity. *Pharmacology & Therapeutics*. 1990, Τόμ. 47, 2, σσ. 219-231.
10. **Ruggiero A., De Rosa G., Rizzo D., Leo A., Maurizi P., De Nisco A., Vendittelli F., Zuppi C., Mordente A., Riccardi R.,** Myocardial performance index and biochemical markers for early detection of doxorubicin-induced cardiotoxicity in children with acute lymphoblastic leukaemia. *International Journal of Clinical Oncology*. 2013, Τόμ. 18, 5, σσ. 927-933.
11. **Batist G., Barton J., Chaikin P., Swenson C., Welles L.,** Myocet (liposome-encapsulated doxorubicin citrate): a new approach in breast cancer therapy. *Expert Opinion on Pharmacotherapy*. 2002, Τόμ. 3, 12, σσ. 1739-1751.

12. **Guo B., Zhu H.-L., Li S.-X., Lu X.-C., Fan H.,** Individualized Liposomal Doxorubicin-Based Treatment in Elderly Patients with Non-Hodgkin's Lymphoma. *Onkologie*. 2011, Τόμ. 34, σσ. 1087-1093.
13. **Weekes C.D., Vose J.M., Lynch J.C., Weisenburger D.D., Bierman P.J., Greiner T., Bociek G., Enke C., Bast M., Chan W.C., Armitage J.O., Nebraska Lymphoma Study Group.,** Hodgkin's disease in the elderly: improved treatment outcome with a doxorubicin-containing regimen. *Journal of Clinical Oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2002, Τόμ. 20, 4, σσ. 184-188.
14. **Carvalho C., Santos R.X., Cardoso S., Correia S., Oliveira P.J., Santos M.S., Moreira P.I.,** Doxorubicin: the good, the bad and the ugly effect. *Current Medicinal Chemistry*. 2009, Τόμ. 16, 25, σσ. 3267-3285.
15. **Dragojevic-Simic V.M., Dobric S.L., Bokonjic D.R., Vucinic Z.M., Sinovec S.M., Jacevic V.M., Dogovic N.P.,** Amifostine protection against doxorubicin cardiotoxicity in rats. *Anti-cancer Drugs*. 2004, Τόμ. 15, 2, σσ. 169-178.
16. **Popelová O., Sterba M., Simůnek T., Mazurová Y., Guncová I., Hroch M., Adamcová M., Gersl V.,** Deferiprone does not protect against chronic anthracycline cardiotoxicity in vivo. *The Journal of Experimental Pharmacology and Therapeutics*. 2008, Τόμ. 326, 1, σσ. 259-269.
17. **Schupp N., Schmid U., Heidland A., Stopper H.,** Rosuvastatin protects against oxidative stress and DNA damage in vitro via upregulation of glutathione synthesis. *Atherosclerosis*. 2008, Τόμ. 199, 2, σσ. 278-287.
18. **Horenstein M.S., Vander Heide R.S., L'Ecuyer T.J.,** Molecular basis of anthracycline-induced cardiotoxicity and its prevention. *Molecular Genetics and Metabolism*. 2000, Τόμ. 71, 1-2, σσ. 436-444.
19. **Buzdar A.U., Marcus C., Smith T.L., Blumenschein G.R.,** Early and delayed clinical cardiotoxicity of doxorubicin. *Cancer*. 1985, Τόμ. 55, 12, σσ. 2761-2765.
20. **Steinherz L.J., Steinherz P.G., Tan C.T., Heller G., Murphy M.L.,** Cardiac toxicity 4 to 20 years after completing anthracycline therapy. *JAMA*. 1991, Τόμ. 266, 12, σσ. 1672-1677.
21. **Pai V.B., Nahata M.C.,** Cardiotoxicity of chemotherapeutic agents: incidence, treatment and prevention. *Drug Safety*. 2000, Τόμ. 22, 4, σσ. 263-302.
22. **Altena R., Perik P.J., van Veldhuisen D.J., de Vries E.G.E., Gietema J.A.,** Cardiovascular toxicity caused by cancer treatment: strategies for early detection. *Lancet Oncology*. 2009, Τόμ. 10, 4, σσ. 391-399.
23. **Bigotte L., Olsson Y.,** Cytofluorescence localization of adriamycin in the nervous system. *Acta Neuropathologica*. 1982, Τόμ. 58, 193, σσ. 193-202.

24. **Tangpong J., Cole M.P., Sultana R., Joshi G., Estus S., Vore M., St Clair W., Ratanachaiyavong S., St Clair D.K., Butterfield D.A.,** Neurobiology of Disease. 2006, Τόμ. 23, 1, σσ. 127-139.
25. **Carvalho F.S., Burgeiro A., Garcia R., Moreno A.J., Carvalho R.A., Oliveira P.J.,** Doxorubicin-induced cardiotoxicity: from bioenergetic failure and cell death to cardiomyopathy. *Medicinal Research Reviews*. 2014, Τόμ. 34, 1, σσ. 106-135.
26. **van Nimwegen F.A., Ntentas G., Darby S.C., Schaapveld M., Hauptmann M., Lugtenburg P.J., Janus C.P.M., Daniels L., van Leeuwen F.E., Cutter D.J., Aleman B.M.P.,** Risk of heart failure in survivors of Hodgkin lymphoma: effects of cardiac exposure to radiation and anthracyclines. *Blood*. 2017, Τόμ. 129, 16, σσ. 2257-2265.
27. **Singal P.K., Li T., Kumar D., Danelisen I., Iliskovic N.,** Adriamycin-induced heart failure: mechanism and modulation. *Molecular and Cellular Biochemistry*. 207, 2000, Τόμ. 1-2, σσ. 77-86.
28. **Cardoso S., Santos R.X., Carvalho C., Correia S., Pereira G.C., Pereira S.S., Oliveira P.J., Santos M.S., Proença T., Moreira P.I.,** Doxorubicin increases the susceptibility of brain mitochondria to Ca²⁺-induced permeability transition and oxidative damage. *Free Radical Biology and Medicine*. 2008, Τόμ. 15, 45, σσ. 1395-1402.
29. **Outomuro D., Grana D.R., Azzato F., Milei J.,** Adriamycin-induced myocardial toxicity: new solutions for an old problem? *International Journal of Cardiology*. 2007, Τόμ. 117, 1, σσ. 6-15.
30. **Hurley L.H.** DNA and its associated processes as targets for cancer therapy. *Nature Reviews. Cancer*. 2002, Τόμ. 2, 3, σσ. 188-200.
31. **McGowan J.V., Chung R., Maulik A., Piotrowska I., Walker J.M., Yellon D.M.,** Anthracycline Chemotherapy and Cardiotoxicity. *Cardiovascular Drugs and Therapy*. 2017, Τόμ. 31, 1, σσ. 63-75.
32. **Pfeffer B., Tziros C., Katz R.J.,** Current concepts of anthracycline cardiotoxicity: pathogenesis, diagnosis and prevention. *The British Journal of Cardiology*. 2009, Τόμ. 16, 2, σσ. 85-89.
33. **Smith L.A., Cornelius V.R., Plummer C.J., Levitt G., Verrill M., Canney P., Jones A.,** Cardiotoxicity of anthracycline agents for the treatment of cancer: systematic review and meta-analysis of randomised controlled trials. *BMC Cancer*. 2010, Τόμ. 10, σ. 337.
34. **Dresdale A.R., Barr L.H., Bonow R.O., Mathisen D.J., Myers C.E., Schwartz D.E., d'Angelo T., Rosenberg S.A.,** Prospective randomized study of the role of

N-acetyl cysteine in reversing doxorubicin-induced cardiomyopathy. *American Journal of Clinical Oncology*. 1982, Τόμ. 5, 6, σσ. 657-663.

35. **Myers C., Bonow R., Palmeri S., Jenkins J., Corden B., Locker G., Doroshov J., Epstein S.,** A randomized controlled trial assessing the prevention of doxorubicin cardiomyopathy by N-acetylcysteine. *Seminars in Oncology*. 1983, Τόμ. 10, 1, σσ. 53-55.

36. **Kraft J., Grille W., Appelt M., Hossfeld D.K., Eichelbaum M., Koslowski B., Quabeck K., Kuse R., Büchner T., Hiddemann W.,** Effects of verapamil on anthracycline-induced cardiomyopathy: preliminary results of a prospective multicenter trial. *Haematology and Blood Transfusion*. 1990, Τόμ. 33, σσ. 566-570.

37. **Nazeyrollas P., Frances C., Prevost A., Costa B., Lorenzato M., Kantelip J.P., Elaerts J., Millart H.,** Efficiency of amifostine as a protection against doxorubicin toxicity in rats during a 12-day treatment. *Anticancer Research*. 2003, Τόμ. 23, 1A, σσ. 405-409.

38. **Iarussi D., Auricchio U., Agretto A., Murano A., Giuliano M., Casale F., Indolfi P., Iacono A.,** Protective effect of coenzyme Q10 on anthracyclines cardiotoxicity: control study in children with acute lymphoblastic leukemia and non-Hodgkin lymphoma. 1994, Τόμ. 15, σσ. 207-212.

39. **Ammar el-S.M., Said S.A., Suddek G.M., El-Damarawy S.L.,** Amelioration of doxorubicin-induced cardiotoxicity by deferiprone in rats. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*. 2011, Τόμ. 89, 4, σσ. 269-276.

40. **Acar Z., Kale A., Turgut M., Demircan S., Durna K., Demir S., Meriç M., Ağaç M.T.,** Efficiency of atorvastatin in the protection of anthracycline-induced cardiomyopathy. *Journal of the American College of Cardiology*. 2011, Τόμ. 58, 9, σσ. 988-989.

41. **Seicean S., Seicean A., Plana J.C., Budd G.T., Marwick T.H.,** Effect of statin therapy on the risk for incident heart failure in patients with breast cancer receiving anthracycline chemotherapy: an observational clinical cohort study. *Journal of the American College of Cardiology*. 2012, Τόμ. 60, 23, σσ. 2384-2390.

42. **Kaya M.G., Ozkan M., Gunebakmaz O., Akkaya H., Kaya E.G., Akpek M., Kalay N., Dikilitas M., Yarlioglues M., Karaca H., Berk V., Ardic I., Ergin A., Lam Y.Y.,** Protective effects of nebivolol against anthracycline-induced cardiomyopathy: a randomized control study. *International Journal of Cardiology*. 2013, Τόμ. 167, 5, σσ. 2306-2310.

43. **Gulati G., Heck S.L., Ree A.H., Hoffmann P., Schulz-Menger J., Fagerland M.W., Gravdehaug B., von Knobelsdorff-Brenkenhoff F., Bratland Å., Storås T.H., Hagve T.A., Røsjø H., Steine K., Geisler J., Omland T.,** Prevention of cardiac

dysfunction during adjuvant breast cancer therapy (PRADA): a 2 × 2 factorial, randomized, placebo-controlled, double-blind clinical trial of candesartan and metoprolol. *European Heart Journal*. 2016, Τόμ. 37, 21, σσ. 1671-1680.

44. **Chung R., Maulik A., Hamarneh A., Hochhauser D., Hausenloy D.J., Walker J.M., Yellon D.M.,**. Effect of Remote Ischaemic Conditioning in Oncology Patients Undergoing Chemotherapy: Rationale and Design of the ERIC-ONC Study--A Single-Center, Blinded, Randomized Controlled Trial. *Clinical Cardiology*. 2016, Τόμ. 39, 2, σσ. 72-82.

45. **Li C., Xu M., Wu Y., Li Y.S., Huang W.Q., Liu K.X.,**. Limb remote ischemic preconditioning attenuates lung injury after pulmonary resection under propofol-remifentanyl anesthesia: a randomized controlled study. *Anesthesiology*. 2014, Τόμ. 121, 2, σσ. 249-259.

46. **Andreadou I., Sigala F., Iliodromitis E.K., Papaefthimiou M., Sigalas C., Aligiannis N., Savvari P., Gorgoulis V., Papalabros E., Kremastinos D.T.,** Acute doxorubicin cardiotoxicity is successfully treated with the phytochemical oleuropein through suppression of oxidative and nitrosative stress. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. 2007, 42, σσ. 549-555.

47. **Andreadou I., Papaefthimiou M., Zira A., Constantinou M, Sigala F.,** Metabonomic identification of novel biomarkers in doxorubicin cardiotoxicity and protective effect of the natural antioxidant oleuropein. *NMR in Biomedicine*. 2009, 22, σσ. 585-592.

48. **Andreadou I., Mikros E., Ioannidis K., Sigala F., Naka K., Kostidis S., Tenta R., Kavantzias N., Bibli S.-I., Gikas E., Skaltsounis L., Kremastinos D.T., Iliodromitis E.K.,** Oleuropein prevents doxorubicin-induced cardiomyopathy interfering with signaling molecules and cardiomyocyte metabolism. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. 2014, 69, σσ. 4-16.

49. **Fruhwald S., Pollesello P., Fruhwald F.,** Advanced heart failure: an appraisal of the potential of levosimendan in this end-stage scenario and some related ethical considerations. *Expert Review of Cardiovascular Therapy*. 2016, Τόμ. 14, 12, σσ. 1335-1349\7.

50. **Parissis J.T., Farmakis D., Nieminen M.,** Classical inotropes and new cardiac enhancers. *Heart Failure Reviews*. 2007, Τόμ. 12, 2, σσ. 149-156.

51. **Szilágyi S., Pollesello P., Levijoki J., Kaheinen P., Haikala H., Edes I., Papp Z.,** The effects of levosimendan and OR-1896 on isolated hearts, myocyte-sized preparations and phosphodiesterase enzymes of the guinea pig. *European Journal of Pharmacology*. 2004, Τόμ. 486, 1, σσ. 67-74.

52. **Yokoshiki H., Katsube Y., Sunagawa M., Sperelakis N.,** Levosimendan, a novel Ca²⁺ sensitizer, activates the glibenclamide-sensitive K⁺ channel in rat

arterial myocytes. *European Journal of Pharmacology*. 1997, Τόμ. 333, 2-3, σσ. 249-259.

53. **Kopustinskiene D.M., Pollesello P., Saris N.E.,** Potassium-specific effects of levosimendan on heart mitochondria. *Biochemichal Pharmacology*. 2004, Τόμ. 68, 5, σσ. 807-812.

54. **Pollesello P., Papp Z., Papp J.G.,** Calcium sensitizers: What have we learned over the last 25 years? *International Journal of Cardiology*. 2016, Τόμ. 203, σσ. 543-548.

55. **Farmakis D., Alvarez J., Gal T.B., et al.** Levosimendan beyond inotropy and acute heart failure: Evidence of pleiotropic effects on the heart and other organs: An expert panel position paper. *International Journal of Cardiology*. 2016, Τόμ. 222, σσ. 303-312.

56. **Antoniades C., Tousoulis D., Koumallos N., Marinou K., Stefanadis C.,** Levosimendan: Beyond its simple inotropic effect in heart failure. *Pharmacology & Therapeutics*. 2007, Τόμ. 114, σσ. 184-197.

57. **Sato T., Saito T., Saegusa N., Nakaya H.,** Mitochondrial Ca²⁺-activated K⁺ channels in cardiac myocytes: a mechanism of the cardioprotective effect and modulation by protein kinase A. *Circulation*. 2005, Τόμ. 111, 2, σσ. 198-203.

58. **Andrukhiv A., Costa A.D., West I.C., Garlid K.D.,** Opening mitoKATP increases superoxide generation from complex I of the electron transport chain. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*. 2006, Τόμ. 291, 5, σσ. 2067-2074.

59. **Garlid A.O., Jaburek M., Jacobs J.P., Garlid K.D.,** Mitochondrial reactive oxygen species: which ROS signals cardioprotection? *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*. 2013, Τόμ. 305, 7, σσ. H960-H968

60. **Avgeropoulou C., Andreadou I., Markantonis-Kyroudis S., Demopoulou M., Missovoulos P., Androulakis A., Kallikazaros I.,** The Ca²⁺-sensitizer levosimendan improves oxidative damage, BNP and pro-inflammatory cytokine levels in patients with advanced decompensated heart failure in comparison to dobutamine. *European Journal of Heart Failure*. 2005, Τόμ. 7, σσ. 882-887.

61. **Parissis J.T., Andreadou I., Markantonis S.L., Bistola V., Louka A., Pyriochou A., Paraskevaidis I., Filippatos G., Iliodromitis E.K., Kremastinos D.T.,** Effects of Levosimendan on circulating markers of oxidative and nitrosative stress in patients with advanced heart failure. *Atherosclerosis*. 2007, Τόμ. 195, 2, σσ. e210–e215.

62. **Parissis J.T., Andreadou I., Bistola V., Paraskevaïdis I., Filippatos G., Kremastinos D.T.,** Novel biologic mechanisms of levosimendan and its effect on the failing heart. *Expert Opinion on Investigational Drugs*. 2008, Τόμ. 17, 8, σσ. 1143-1150.
63. **Flehn O.** Metabolomics: the link between genotypes and phenotypes. *Plant Molecular Biology*. 2002, 48, σσ. 155-171.
64. **Nicholson J.K., Lindon J.C., Holmes E.** 'Metabonomics': understanding the metabolic responses of living systems to pathophysiological stimuli via multi-variate statistical analysis of biological NMR spectroscopic data. *Xenobiotica*. 1999, 29, σσ. 1181-1189.
65. **Ellis D.I., Dunn W.B., Griffin J.L., Allwood J.W., Goodacre R.** Metabolic fingerprinting as a diagnostic tool. *Pharmacogenomics*. 2007, 8, σσ. 1243-1266.
66. **Gill T.J., Smith G.J., Wissler R.W., Kunz H.W.,** The Rat as an Experimental Animal. *Science*. 1989, Τόμ. 245, 4915, σσ. 269-276.
67. **Doggrell S.A., Brown L.,** Rat models of hypertension, cardiac hypertrophy and failure. *Cardiovascular Research*. 1998, Τόμ. 39, 1, σσ. 89-105.
68. **Hasenfuss G.** Animal models of human cardiovascular disease, heart failure and hypertrophy. *Cardiovascular Research*. 1998, σσ. 60-76.
69. **Μικρός Ε.** Σημειώσεις του Μαθήματος Φασματοσκοπικές Μέθοδοι στην Οργανική Χημεία. Αθήνα : ΕΚΠΑ.
70. **Hore P.J.** *Nuclear Magnetic Resonance*. s.l.: OXFORD SCIENCE PUBLICATIONS, 1995.
71. **Deb P.S.** in SlideShare. [Ηλεκτρονικό] 18 Ιούνιος 2010. <https://www.slideshare.net/drpsdeb/mri-basics>.
72. **Λαιμού Δ.** Σύνθεση γραμμικών,κυκλικών αναλόγων της GnRH (Gonadotropin releasing hormone) και παραγώγων τους με κυκλοδεξτρίνη καθώς και διαμορφωτική μελέτη αυτών με χρήση πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR) και τεχνικών μοριακής μοντελοποίησης (molecular modeling). Πάτρα : Διδακτορική Διατριβή, 2012.
73. **Ernst R.R., Bodenhausen G., Wokaun A.** *Principles of Nuclear Magnetic Resonance in One and Two Dimensions*. Oxford: OXFORD SCIENCE PUBLICATIONS, 1987.
74. **Butler E.** *AVANCE SGU Based Frequency Generation Beginners Guide, English Version*. 2003.

75. **Pavia D.L., Lampman G.M., Kriz G.S., Vyvyan J.R.** *Introduction to Spectroscopy*. Washington, USA : Brooks/Cole, 2009.
76. **Savorani F., Rasmussen M.A., Mikkelsen M.S., Engelsen S.B.,** A primer to nutritional metabolomics by NMR spectroscopy and chemometrics. *Food Research International*. 2013, 54, σσ. 1131-1145.
77. **Jeannerat D., Furrer J.,** NMR Experiments for the Analysis of mixtures. Beyond 1D 1H spectra. *Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening*. 2012, 15, σσ. 15-35.
78. **Gruetter R., Weisdorf S.A., Rajanayagan V., Terpstra M., Merkle H., Truwit C.L., Garwood M., Nyberg S.L., Ugurbil K.,** Resolution Improvements in in Vivo 1H NMR Spectra with Increased Magnetic Field Strength. *Journal of Magnetic Resonance*. 1998, 135, σσ. 260-264.
79. **Grimes J.H., O'Connell T.M.,** The application of micro-coil NMR probe technology to metabolomics of urine and serum. *Journal of Biomolecular NMR*. 2011, 49, σσ. 297-305.
80. **Bjerrum T.J.** *Metabolomics, Methods in Molecular Biology*. New York : Springer, Humana Press, 2015.
81. **Eriksson L., Andersson P.L., Johansson E., Tysklind M.,** Megavariate analysis of environmental QSAR data. Part I – A basic framework founded on principal component analysis (PCA), partial least squares (PLS), and statistical molecular design (SMD). *Molecular Diversity*. 2006, Τόμ. 10, 2, σσ. 169-186.
82. **Bylesjö M., Rantalainen M., Cloarec O., Nicholson J.K., Holmes E., Trygg J.,** OPLS discriminant analysis: combining the strengths of PLS-DA and SIMCA classification. *Journal of Chemometrics*. 2006, Τόμ. 20, 8-10, σσ. 341-351.
83. **Trygg J., Wold S.,** Orthogonal projections to latent structures (O-PLS). *Journal of Chemometrics*. 2002, Τόμ. 16, σσ. 119-128.
84. **Cooper Geoffrey M.** Actin, Myosin, and Cell Movement. *The Cell, A Molecular Approach*. s.l. : Sunderland (MA): Sinauer Associates, 2000.
85. **Nelson D.L., Cox M.M.,** *Lehninger Principles of Biochemistry*. New York : W.H. Freeman, 2005.
86. **Salway J.G.** *Metabolism at a glance*. s.l. : Wiley-Blackwell, 2004.
87. **Fedotchevaa N.I., Sokolovb A.P., Kondrashovaa M.N.,** Nonezymatic formation of succinate in mitochondria under oxidative stress. *Free Radical Biology and Medicine*. 2006, 1, σσ. 56-64.
88. **Zheng L., Cardaci S., Jerby L., MacKenzie E.D., Sciacovelli M., Johnson T.I , Gaude E, King A., Leach J.D.G., RuAngelie E.-E., Hedley A., Morrice N.A.,**

Kalna G., Blyth K., Ruppin E., Frezza C., Gottlieb E., Fumarate induces redox-dependent senescence by modifying glutathione metabolism. *Nature Communications*. 2015, Τόμ. 23, 6.

89. **Garland K.P., Sanins S.M., Nicholson J.K.** Pattern recognition analysis of high resolution ¹H NMR spectra of urine. A nonlinear mapping approach to the classification of toxicological data. *NMR in Biomedicine*. 1990, 3, σσ. 166-172.

90. **Gika H.G., Theodoridis G.A., Plumb R.S., Wilson I.D.** Current practice of liquid chromatography–mass spectrometry in metabolomics and metabonomics. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2014, 87, σσ. 12-25.

91. **Emwas A.-H.M., Salek R.M., Griffin J.L., Merzaban J.** NMR-based metabolomics in human disease diagnosis: applications, limitations, and recommendations. *Metabolomics*. 2013, 9, σσ. 1048-1072.

92. **Cauchi M., Fowler D.P., Walton C., Turner C., Jia W., Whitehead R.N., Griffiths L., Dawson C., Bai H., Waring R. H., Ramsden D.B., Hunter J.O., Cole J.A., Bessant C.** Application of gas chromatography mass spectrometry (GC–MS) in conjunction with multivariate classification for the diagnosis of gastrointestinal diseases. *Metabolomics*. 2014, 6, σσ. 1113–1120.

93. **Wang X., Li K., Adams E., Van Schepdael A.** Capillary electrophoresis-mass spectrometry in metabolomics: the potential for driving drug discovery and development. *Current Drug Metabolism*. 2013, 14, σσ. 807–813 .

94. **Bjerrum J.T., Nielsen O.H., Wang Y.L., Olsen J.** Technology insight: metabonomics in gastroenterology-basic principles and potential clinical applications. *Nature Clinical Practise Gastroenterology and Hepatology*. 2008, 5, σσ. 332-343.