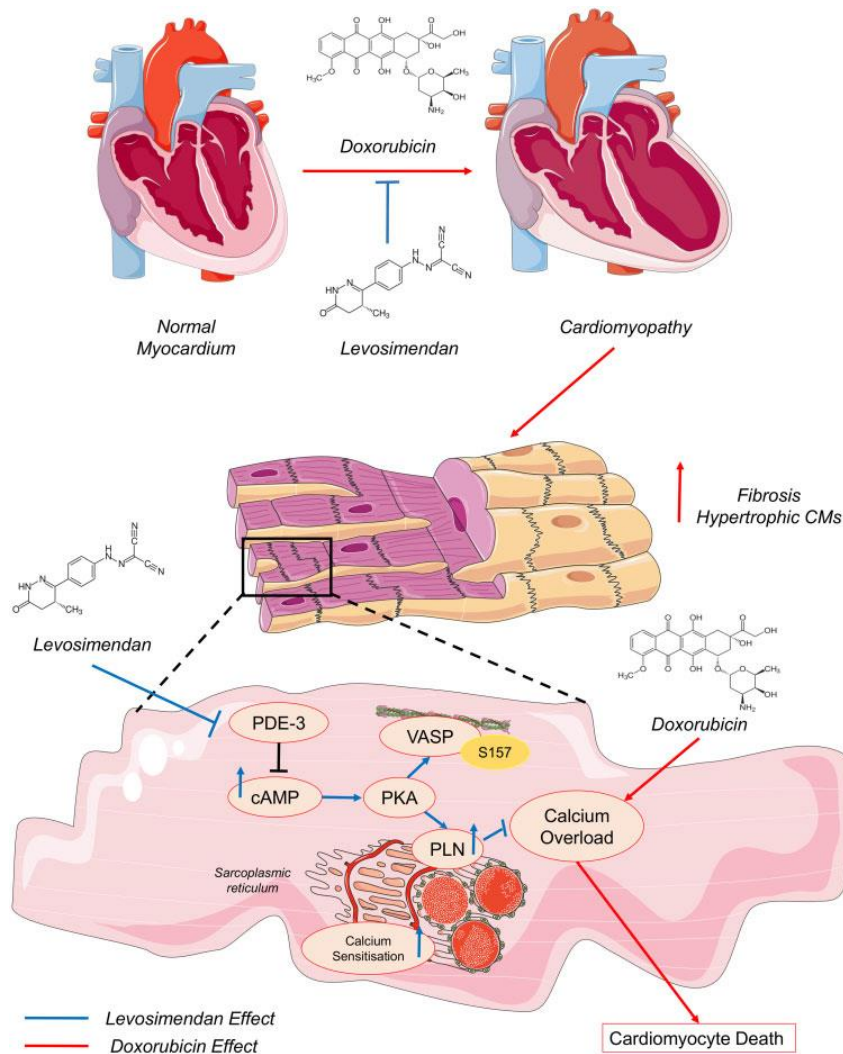




«ΜΕΤΑΒΟΝΟΜΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΗΣ ΔΡΑΣΗΣ ΤΗΣ ΛΕΒΟΣΙ-
ΜΕΝΤΑΝΗΣ ΣΤΗΝ ΠΡΟΚΑΛΟΥΜΕΝΗ ΑΠΟ ΔΟΞΟΡΟΥΒΙΚΙΝΗ
ΚΑΡΔΙΟΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑ»



(1)

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΔΙΠΛΩΜΑ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

ΜΑΡΚΟΥ ΛΑΟΥΤΣΕΛΝΤΑ

Επιβλέπουσα Καθηγήτρια: ΑΝΔΡΕΑΔΟΥ ΙΩΑΝΝΑ

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα εργασία αποτελεί διπλωματική εργασία στα πλαίσια του μεταπτυχιακού προγράμματος «Σχεδιασμός και Σύνθεση Φαρμακευτικών Ουσιών – Φαρμακολογία» του τμήματος Φαρμακευτικής.

Πριν την παρουσίαση της εργασίας, θα ήθελα να ευχαριστήσω ορισμένους ανθρώπους με τους οποίους συνεργάστηκα και έπαιξαν πολύ σημαντικό ρόλο στην πραγματοποίησή της.

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω την επιβλέπουσα καθηγήτρια της διπλωματικής εργασίας, κυρία Ανδρεάδου Ιωάννα για την πολύτιμη καθοδήγηση της και την εμπιστοσύνη και εκτίμηση που μου έδειξε.

Επιπλέον θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Καθηγητή κύριο Μικρό Εμμανουήλ, για τη βοήθεια και την καθοδήγηση σε ό,τι αφορά τη μεταβονομική και τον πυρηνικό μαγνητικό συντονισμό.

Στη συνέχεια θα ήθελα να ευχαριστήσω το μέλος ΕΔΙΠ κα Μπενάκη Δήμητρα η οποία συνέβαλε ουσιαστικά στην ολοκλήρωση αυτής της εργασίας, καθώς και τον Δρ Παναγιώτη Εφεντάκη για τη βοήθειά του στο εργαστηριακό κομμάτι της εργασίας.

Τέλος τις ευχαριστίες μου εκφράζω και στους καθηγητές κ. Ανδρεάδου Ιωάννα κ. Μικρό Εμμανουήλ και κ. Παπαπετρόπουλο που δέχτηκαν να είναι μέλη της τριμελούς επιτροπής αξιολόγησης της μεταπτυχιακής εργασίας.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ	2
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	5
ABSTRACT	6
ΕΙΣΑΓΩΓΗ	7
1. ΚΑΡΔΙΟΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑ.....	7
1.1 ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ ΠΡΟΚΛΗΣΗΣ ΚΑΡΔΙΟΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑΣ ΑΠΟ ΧΗΜΕΙΟΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΑ ΦΑΡΜΑΚΑ	8
1.1.1 ΑΜΕΣΗ ΠΡΟΚΛΗΣΗ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗΣ ΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑΣ	9
1.1.2 ΕΠΙΠΤΩΣΕΙΣ ΣΤΟ ΣΥΣΤΗΜΑ ΠΝΕΥΣΤΩΝ	10
1.1.3 ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΠΡΟΚΛΗΣΗΣ ΑΡΡΥΘΜΙΩΝ.....	10
1.1.4 ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΠΡΟΚΛΗΣΗΣ ΥΠΕΡΤΑΣΗΣ	10
2. ΑΝΘΡΑΚΥΚΛΙΝΕΣ ΚΑΙ ΚΑΡΔΙΟΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑ	11
2.1 ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ ΠΡΟΚΛΗΣΗΣ ΚΑΡΔΙΟΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑΣ ΑΠΟ ΑΝΘΡΑΚΥΚΛΙΝΕΣ	13
2.2 ΘΕΡΑΠΕΙΑ ΚΑΙ ΠΡΟΛΗΨΗ ΤΗΣ ΠΡΟΚΑΛΟΥΜΕΝΗΣ ΑΠΟ ΑΝΘΡΑΚΥΚΛΙΝΕΣ ΚΑΡΔΙΟΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑΣ	15
3. ΔΟΞΟΡΟΥΒΥΚΙΝΗ ΚΑΙ ΚΑΡΔΙΟΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑ.....	17
3.1 ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ ΚΑΡΔΙΟΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑΣ	18
3.1.1 ΑΝΑΣΤΟΛΗ ΤΟΠΟΪΣΟΜΕΡΑΣΗΣ 2β	19
3.1.2 ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟ ΣΤΡΕΣ	20
3.1.2 ΑΠΟΠΤΩΣΗ ΚΥΤΤΑΡΩΝ.....	22
3.1.3 ΕΝΔΟΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΑΠΟΡΡΥΘΜΙΣΗ ΤΟΥ ΚΥΚΛΟΥ ΤΟΥ ΑΣΒΕΣΤΙΟΥ ΑΣΒΕΣΤΙΟΥ	23
3.1.4 ΜΕΤΑΒΟΛΕΣ ΣΤΟΝ ΚΑΡΔΙΑΚΟ ΕΝΕΡΓΕΙΑΚΟ ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟ	24
4. ΛΕΒΟΣΙΜΕΝΤΑΝΗ.....	26
4.1 ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ ΔΡΑΣΗΣ	27
4.1.1 Η ΛΕΒΟΣΙΜΕΝΤΑΝΗ ΩΣ ΘΕΤΙΚΟ ΙΝΟΤΡΟΠΟ	28
4.1.2 Η ΛΕΒΟΣΙΜΕΝΤΑΝΗ ΩΣ ΑΓΓΕΙΟΔΙΑΣΤΑΛΤΙΚΟΣ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑΣ	29
4.1.3 ΑΝΑΣΤΟΛΗ ΦΩΣΦΟΔΙΕΣΤΕΡΑΣΗΣ 3.....	29
4.2 ΦΑΡΜΑΚΟΚΙΝΗΤΙΚΗ ΚΑΙ ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟΣ	30
5. ΜΕΤΑΒΟΛΟΜΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΚΑΙ NMR.....	31
5.1 Η ΜΕΘΟΔΟΣ NMR ΩΣ ΑΝΑΛΥΤΙΚΗ ΜΕΘΟΔΟΣ ΜΕΤΑΒΟΛΟΜΙΚΗΣ	33
5.2 ΜΕΤΑΒΟΛΟΜΙΚΗ ΚΑΙ ΚΑΡΔΙΑΚΕΣ ΠΑΘΗΣΕΙΣ	34
ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ	35
ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	37
1. ΧΟΡΗΓΟΥΜΕΝΑ ΦΑΡΜΑΚΑ	37
2. ΠΕΙΡΑΜΑΤΟΖΩΑ.....	37

3.	ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ	37
3.1	ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ	37
3.2	ΟΜΟΓΕΝΟΠΟΙΗΣΗ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ	38
3.3	ΕΚΧΥΛΙΣΗ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ	39
3.4	ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ NMR	39
4.	ΦΑΣΜΑΤΑ NMR	40
4.1	ΛΗΨΗ ΦΑΣΜΑΤΩΝ NMR	40
5.	ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ NMR	42
6.	ΧΗΜΕΙΟΜΕΤΡΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ NMR.....	43
6.1	ΑΝΑΛΥΣΗ ΚΥΡΙΩΝ ΣΥΝΙΣΤΩΣΩΝ (PCA).....	43
6.2	ΠΡΟΒΟΛΕΣ ΜΕΡΙΚΩΝ ΕΛΑΧΙΣΤΩΝ ΤΕΤΡΑΓΩΝΩΝ ΣΕ ΛΑΝΘΑΝΟΥΣΕΣ ΔΟΜΕΣ (PLS-DA)	44
6.3	ΜΕΘΟΔΟΣ OPLS	44
6.4	ΕΠΙΚΥΡΩΣΗ – ΈΛΕΓΧΟΣ	45
	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	46
1.	ΑΝΑΛΥΣΗ ΦΑΣΜΑΤΩΝ NMR.....	46
1.1	ΑΝΑΓΝΩΡΙΣΗ ΚΑΙ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΩΝ	46
1.2	ΑΠΟΔΟΣΗ ΚΟΡΥΦΩΝ ΣΤΟ ΦΑΣΜΑ NMR.....	49
2.	ΠΟΛΥΠΑΡΑΜΕΤΡΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΩΝ ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΚΩΝ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ.....	51
2.1	ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ PCA, PLS-DA ΜΕΤΑ ΑΠΟ ΚΑΝΟΝΙΚΟΠΟΙΗΣΗ ΒΑΣΙΖΟΜΕΝΗ ΣΤΗ ΣΥΝΟΛΙΚΗ ΕΝΤΑΣΗ	51
2.1.1	<i>ΑΝΑΛΥΣΗ PCA ΜΕΤΑ ΑΠΟ ΚΑΝΟΝΙΚΟΠΟΙΗΣΗ ΒΑΣΙΖΟΜΕΝΗ ΣΤΗ ΣΥΝΟΛΙΚΗ ΕΝΤΑΣΗ</i>	51
2.1.2	<i>ΑΝΑΛΥΣΗ PLS-DA ΜΕΤΑ ΑΠΟ ΚΑΝΟΝΙΚΟΠΟΙΗΣΗ ΒΑΣΙΖΟΜΕΝΗ ΣΤΗ ΣΥΝΟΛΙΚΗ ΕΝΤΑΣΗ</i>	53
2.1.2.1	<i>ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΟΜΑΔΩΝ CONTROL ΚΑΙ DXR</i>	54
2.1.2.2	<i>ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΟΜΑΔΩΝ DXR ΚΑΙ DXR-LEVOchr</i>	56
2.1.2.3	<i>ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΟΜΑΔΩΝ DXR ΚΑΙ DXR-LEVOac</i>	57
2.2	ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ PCA, PLS-DA ΜΕΤΑ ΑΠΟ ΚΑΝΟΝΙΚΟΠΟΙΗΣΗ PQN	60
2.3	ΜΟΝΟΠΑΡΑΜΕΤΡΙΚΗ ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ	69
	ΣΥΖΗΤΗΣΗ-ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	73
	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	79

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η δοξορουβικίνη (DXR), ένα κυτταροτοξικό αντιβιοτικό που χρησιμοποιείται στη θεραπεία διαφόρων ειδών καρκίνου, μπορεί να επιφέρει προοδευτική δυσλειτουργία της αριστερής κοιλίας προκαλώντας καρδιομυοπάθεια που τελικά οδηγεί σε μη αναστρέψιμη συμφορητική καρδιακή ανεπάρκεια (2). Η λεβοσιμεντάνη (LEVO) αποτελεί έναν καινοτόμο φάρμακο που συνδυάζει θετική ινότροπη και αγγειοδιασταλτική δράση και βελτιώνει την καρδιακή λειτουργία χωρίς ουσιώδεις μεταβολές στην κατανάλωση οξυγόνου από το μυοκάρδιο (3).

Προκειμένου να διαπιστωθεί η δράση της λεβοσιμεντάνης επί της καρδιοτοξικότητας που προκαλείται από τη δοξορουβικίνη, πραγματοποιήθηκε μεταβιομική ανάλυση του μυοκαρδίου της αριστερής κοιλίας σε 30 επίμυες. Οι επίμυες χωρίστηκαν σε 4 ομάδες. Στην ομάδα ελέγχου χορηγήθηκαν 10mL/kg i.p φυσιολογικού ορού. Στις υπόλοιπες τρεις ομάδες χορηγήθηκε DXR σε διαδοχικές δόσεις, ενώ σε δύο από τις τρεις χορηγήθηκε και λεβοσιμεντάνη είτε σε διαδοχικές δόσεις, είτε εφάπαξ. Πιο συγκεκριμένα, στις ομάδες που έλαβαν δοξορουβικίνη, αυτή χορηγήθηκε σε συνολική δόση 18 mg/kg i.p ισομοιρασμένη σε 6 δόσεις, ενώ οι δύο ομάδες που έλαβαν και λεβοσιμεντάνη, αυτή χορηγήθηκε σε συνολική δόση 24 μg/kg i.p ισομοιρασμένη σε 4 δόσεις στη μία ομάδα και εφάπαξ στην άλλη ομάδα. Σε όλους τους επίμυες πραγματοποιήθηκε ηχοκαρδιογραφία αριστερής κοιλίας ενώ στη συνέχεια τα πειραματόζωα θυσιάστηκαν και πραγματοποιήθηκε λήψη της αριστερής κοιλίας του μυοκαρδίου για περαιτέρω αναλύσεις. Ακολούθησε εκχύλιση και απομόνωση της πολικής φάσης, στην οποία έγινε και η ανάλυση του μεταβολικού προφίλ με τη βοήθεια του Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού.

Από τα αποτελέσματα προέκυψε ότι η λεβοσιμεντάνη μεταβάλλει τους ενεργειακούς μεταβολίτες αλλά δεν καταφέρνει να αναστείλει τον αναερόβιο μεταβολισμό που προκαλείται από τη δοξορουβικίνη. Η εφάπαξ χορήγηση της λεβοσιμεντάνης δείχνει να έχει καλύτερα αποτελέσματα στη βελτίωση της καρδιοτοξικότητας σε σχέση με τη διαδοχική χορήγηση. Τέλος, η λεβοσιμεντάνη φαίνεται να επάγει μονοπάτια διάσωσης που σχετίζονται με το νικοτιναμίδιο και την παρεμόδιση του μεταβολισμού των πουρινών.

ABSTRACT

Doxorubicin (DXR), a cytotoxic antibiotic used in the treatment of various cancers, can cause progressive left ventricular dysfunction causing cardiomyopathy that eventually leads to irreversible congestive heart failure (2). Levosimendan (LEVO) is an innovative drug that combines positive inotropic and vasodilator action and improves cardiac function without significant changes in myocardial oxygen consumption (3).

In order to determine the effect of levosimendan on doxorubicin-induced cardiotoxicity, a left ventricular myocardial analysis was performed in 30 rats. The rats were divided into 4 groups. The control group was administered 10mL / kg i.p saline. The other three groups received DXR in consecutive doses, while two of the three were given levosimendan either in consecutive doses or in single doses. More specifically, in the groups receiving doxorubicin, this was administered at a total dose of 18 mg / kg ip divided into 6 doses, while in the two groups of levosimendan, the drug was administered at a total dose of 24 µg / kg ip given in 4 doses in one group and once in the other group. All rats underwent left ventricular echocardiography and then the animals were sacrificed and the left ventricle of the myocardium was taken for further analysis. This was followed by extraction and isolation of the polar phase, in which the analysis of the metabolic profile was performed with the help of Nuclear Magnetic Resonance.

The results showed that levosimendan alters energy metabolites but fails to inhibit doxorubicin-induced anaerobic metabolism. Single-dose administration of levosimendan appears to have better results in improving cardiotoxicity than sequential administration. Finally, levosimendan appears to induce rescue pathways associated with nicotinamide and impair purine metabolism.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1. ΚΑΡΔΙΟΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑ

Η καρδιοτοξικότητα αποτελεί μια γνωστή και σημαντική παρενέργεια πολλών αντικαρκινικών φαρμάκων. Μπορεί να εμφανιστεί είτε αμέσως μετά τη χημειοθεραπεία είτε αργότερα και μπορεί να ποικίλει από μια δυσλειτουργία του μυοκαρδίου, ως την καρδιακή ανεπάρκεια ή ακόμα και θάνατο (2). Ο μηχανισμός της πρόκλησης καρδιοτοξικότητας κατά τη διάρκεια της χημειοθεραπείας και η ευαισθησία των ασθενών για την εμφάνιση της παραμένει ακόμα ασαφής (4,5). Μερικές μελέτες υποστηρίζουν ότι οι ασθενείς χωρίς ιστορικό καρδιαγγειακών παθήσεων μπορεί να εμφανίσουν συμπτωματική καρδιακή ανεπάρκεια που συνδέεται με τη δόση, γεγονός που οδηγεί σε μείωση της δόσης κατά τη χημειοθεραπεία και στη μείωση της αποτελεσματικότητας των χημειοθεραπευτικών φαρμάκων ή ακόμα και στη διακοπή της χημειοθεραπείας με κίνδυνο υποτροπής της νόσου (6).

Ακόμα όμως και κάτω από αυτές τις συνθήκες, υπάρχει κίνδυνος πρόκλησης καρδιοτοξικότητας κατά τη χημειοθεραπεία. Επιπλέον η αλλοίωση της καρδιάς μπορεί να εμφανιστεί νωρίς (κατά τη διάρκεια της θεραπείας), αργά (κατά τη διάρκεια του πρώτου έτους μετά τη θεραπεία) ή πολύ αργότερα (περισσότερο από ένα χρόνο μετά την ολοκλήρωση της θεραπείας) (7).

Η επιτροπή ανασκόπησης και αξιολόγησης της καρδιακής ανεπάρκειας (8) όρισε κλινικώς την καρδιοτοξικότητα που προκαλείται από τη χημειοθεραπεία ως εξής:

1. Μείωση του κλάσματος εξώθησης της αριστερής κοιλίας
2. Σημεία και συμπτώματα που σχετίζονται με την καρδιακή ανεπάρκεια
3. Μείωση του κλάσματος εξώθησης με ταυτόχρονα σημεία και συμπτώματα καρδιακής ανεπάρκειας (9).

Η καρδιακή δυσλειτουργία που σχετίζεται με τη χημειοθεραπεία μπορεί να είναι οξεία, υποξεία, χρόνια ή καθυστερημένη (10).

Η οξεία και υποξεία καρδιοτοξικότητα εμφανίζονται αμέσως μετά τη χορήγηση της θεραπείας ως και δύο εβδομάδες μετά την ολοκλήρωσή της και μπορεί να χαρακτηριστεί από διαφορετικούς τύπους αρρυθμίας, ανωμαλίες στην κοιλιακή επαναπόλωση και στο διάστημα QT, οξεία στεφανιαία σύνδρομα ή περικαρδιακή αντίδραση και αλλοίωση της λειτουργίας του μυοκαρδίου (10).

Η χρόνια καρδιοτοξικότητα αναφέρεται στις παρενέργειες που εμφανίζονται κατά τη διάρκεια του πρώτου έτους από τη ολοκλήρωση της θεραπείας και η καθυστερημένη σε διάστημα μεγαλύτερου του ενός έτους από την ολοκλήρωση της θεραπείας.

Καθώς το πιο χαρακτηριστικό σημείο της χρόνιας καρδιοτοξικότητας είναι η υποκλινική, ασυμπτωματική συστολική ή διαστολική καρδιακή δυσλειτουργία που μπορεί να οδηγήσει σε μη αντιστρεπτή καρδιακή ανεπάρκεια ή ακόμα και θάνατο, δεν υπάρχει ο ιδανικός ορισμός της καρδιοτοξικότητας και επομένως απαιτείται περαιτέρω έρευνα (11).

1.1 ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ ΠΡΟΚΛΗΣΗΣ ΚΑΡΔΙΟΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑΣ ΑΠΟ ΧΗΜΕΙΟΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΑ ΦΑΡΜΑΚΑ

Πολλές μελέτες έχουν αποδείξει την καρδιοτοξικότητα συγκεκριμένων κατηγοριών χημειοθεραπευτικών φαρμάκων (12). Συνοπτικά, η συμφορητική καρδιακή ανεπάρκεια και η δυσλειτουργία της αριστερής κοιλίας σχετίζονται με τη χρήση ανθρακυκλινών, μια αντίδραση αθροιστικής δόσης, συχνότερα παρατηρούμενη σε γυναίκες με ιστορικό καρδιακών παθήσεων και μετά από μεσοθωράκια ακτινοβολία (12). Η τραστουζουμάμπη (Herceptin), ένα μονοκλωνικό αντίσωμα της πρωτεΐνης HER 2, αυξάνει τον κίνδυνο καρδιοτοξικότητας εάν χορηγηθεί ταυτόχρονα με τις αντρακυκλίνες (13). Η 5-φθοροουρακίλη, ένα άλλο ευρέως χρησιμοποιούμενο χημειοθεραπευτικό φάρμακο, μπορεί να προκαλέσει ισχαιμία του μυοκαρδίου και αλλοίωση του ηλεκτροκαρδιογραφήματος στη φάση επαναπόλωσης (14). Μόρια, όπως τα βινκαλακαλοειδή ή οι ταξάνες, μπορεί να προκαλέσουν καρδιακή ανεπάρκεια, διαταραχές αγωγιμότητας και ρυθμού και ισχαιμία (12). Νευροσωματική ενεργοποίηση χωρίς άμεση πρόκληση καρδιοτοξικότητας μπορεί να οδηγήσει σε καρδιακή ανεπάρκεια σε

περίπτωση χρήσης κυκλοφωσφαμίδης ή μιτομυσίνης. Η χρήση της ταμοξιφαίνης, ενός εκλεκτικού αναστολέα του υποδοχέα οιστρογόνων, σχετίζεται με την αλλοίωση του μεταβολισμού χοληστερόλης καθώς και με σημαντικά αυξημένο κίνδυνο θρομβοεμβολικής νόσου και εγκεφαλικού επεισοδίου (14). Το αντίσωμα αντι-αγγειακού αυξητικού παράγοντα, bevacizumab, σχετίζεται επίσης με τον κίνδυνο θρομβοεμβολής, υπέρταση, ακόμη και πνευμονικό οίδημα (15). Επιπλέον, μπορεί να αναπτυχθεί δυσλειτουργία της αριστερής κοιλίας ή ακόμα και καρδιακή ανεπάρκεια, υπέρταση και αρρυθμίες σε ασθενείς που λαμβάνουν μονοκλωνικά αντισώματα, ή ιντερφερόνη-α, ένα βιολογικό παράγοντες που χρησιμοποιούνται επιπλέον στη θεραπεία του καρκίνου (12).

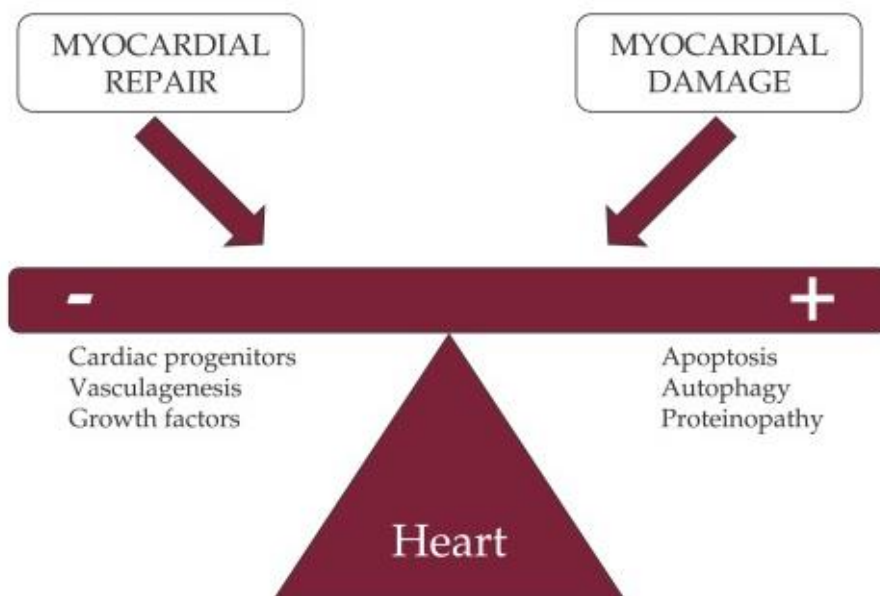
Οι πιθανοί μηχανισμοί μου φαίνεται ότι σχετίζονται με την εμφάνιση της καρδιοτοξικότητας είναι οι παρακάτω (16):

1. Άμεση πρόκληση κυτταρικής τοξικότητας με αθροιστική βλάβη του μυοκαρδίου, με αποτέλεσμα τόσο τη διαστολική, όσο και τη συστολική δυσλειτουργία
2. Επιδράσεις στο σύστημα της πήξης, με αποτέλεσμα την πρόκληση ισχαιμικών συμβάντων και θρομβογένεση.
3. Πρόκληση αρρυθμιών
4. Επίδραση στην πίεση του αίματος
5. Μυοκαρδιακή ή περικαρδιακή φλεγμονή

1.1.1 ΑΜΕΣΗ ΠΡΟΚΛΗΣΗ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗΣ ΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑΣ

Πολλά χημειοθεραπευτικά φάρμακα επάγουν την ταχεία απόπτωση ή νέκρωση των κυττάρων, αναστέλλουν την ανάπτυξη και καταστέλλουν την αγγειογένεση, ή την ικανότητα αποκατάστασης όχι μόνο στα πολλαπλασιαζόμενα κύτταρα, αλλά και στο μυοκάρδιο, οδηγώντας στην καρδιοτοξικότητα (5,17).

Οι ανθρακυκλίνες που χρησιμοποιούνται ευρέως στη χημειοθεραπεία, προκαλούν μιτοχονδριακή βλάβη, αλλαγές στην παραγωγή του ATP και κυτταρική απόπτωση σε συνδυασμό με την παραγωγή ελευθέρων ριζών οξυγόνου που επιδρούν στην κυτταρική μεμβράνη (18).



Εικόνα 1: Άμεσες επιδράσεις των χημειοθεραπευτικών φαρμάκων στο μυοκάρδιο που οδηγούν στην καρδιοτοξικότητα (18)

1.1.2 ΕΠΙΠΤΩΣΕΙΣ ΣΤΟ ΣΥΣΤΗΜΑ ΠΗΞΗΣ

Η χημειοθεραπεία μπορεί να προκαλέσει πήξη του αίματος, θρόμβωση και θρομβοεμβολικά επεισόδια, οδηγώντας σε καρδιαγγειακή και εγκεφαλοαγγειακή ισχαιμία (5). Επιπλέον η χημειοθεραπεία μπορεί να προκαλέσει βλάβη στα ενδοθηλιακά κύτταρα, ενεργοποιώντας τον καταρράκτη πήξης (5). Συνεπώς ο κίνδυνος θρομβοεμβολικών επεισοδίων αυξάνει σε ασθενείς με καθορισμένους παράγοντες κινδύνου και σε ασθενείς με μεταστατική νόσο.

1.1.3 ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΠΡΟΚΛΗΣΗΣ ΑΡΡΥΘΜΙΩΝ

Το πιο σημαντικό προ-αρρυθμογόνο αποτέλεσμα της χημειοθεραπείας παραμένει η παράταση του διαστήματος QT, η οποία μπορεί να εξηγηθεί από την αλληλεπίδραση των αντικαρκινικών φαρμάκων με τους διαύλους HERG K, επιτρέποντας την ταχεία μείωση της εισροής στο κύτταρο (19). Η κοιλιακή μαρμαρυγή είναι μια άλλη αρρυθμολογική παρενέργεια της χημειοθεραπείας, η οποία μπορεί να περιπλέξει το αποτέλεσμα των ασθενών με καρκίνο (20).

1.1.4 ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΠΡΟΚΛΗΣΗΣ ΥΠΕΡΤΑΣΗΣ

Η υπέρταση αποτελεί μια συνήθη παρενέργεια πολλών αντικαρκινικών φαρμάκων. Ο σχετικός μηχανισμός είναι η αναστολή της δραστηριότητας της συνθετάσης του

μονοξειδίου του αζώτου και η μείωση της παραγωγής μονοξειδίου του αζώτου, με σημαντική αύξηση της αγγειοσυστολής και της περιφερικής αγγειακής αντίστασης και της αρτηριακής πίεσης (21). Η υπέρταση μπορεί να συνυπάρχει με τον καρκίνο και κάποια στιγμή μπορεί να επιδεινωθεί με τη χημειοθεραπεία, με άμεση επίδραση στην κοιλιακή υπερτροφία και στην καρδιακή ανεπάρκεια (5).

2. ΑΝΘΡΑΚΥΚΛΙΝΕΣ ΚΑΙ ΚΑΡΔΙΟΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑ

Οι ανθρακυκλίνες ανήκουν στην κατηγορία των κυτταροστατικών αντιβιοτικών και χρησιμοποιούνται ευρέως τα τελευταία σαράντα χρόνια τόσο σε αιματολογικές κακοήθειες όσο και σε συμπαγείς όγκους με πολύ καλά αποτελέσματα. Βασική τους ανεπιθύμητη ενέργεια είναι η πρόκληση καρδιοτοξικότητας (22). Η καρδιοτοξικότητα που προκαλείται από τις ανθρακυκλίνες μπορεί να χωριστεί σε τέσσερις τύπους:

1. Οξεία καρδιοτοξικότητα που εμφανίζεται κατά τη διάρκεια της χορήγησης ανθρακυκλινών ή αμέσως μετά. Εμφανίζεται κυρίως μετά από μια ταχεία ενδοφλέβια έγχυση και χαρακτηρίζεται από διαστολή, υπόταση και παροδικές διαταραχές του καρδιακού ρυθμού (23).
2. Υποξεία καρδιοτοξικότητα. Ο τύπος αυτός καρδιοτοξικότητας είναι εξαιρετικά σπάνιος. Εκδηλώνεται ως ένα σύνδρομο περικαρδίτιδας-μυοκαρδίτιδας μέσα σε μία έως τρεις ημέρες από τη χορήγηση ανθρακυκλινών (24,25).
3. Χρόνια καρδιοτοξικότητα αναπτύσσεται εβδομάδες ή μήνες μετά την ολοκλήρωση της θεραπείας. Χαρακτηρίζεται από διευρυμένη καρδιομυοπάθεια με επακόλουθη εμφάνιση συσταλτικής δυσλειτουργίας στην αριστερή κοιλία. Και συμφορητική καρδιακή ανεπάρκεια.
4. Καθυστερημένη καρδιοτοξικότητα. Αυτός ο τύπος έχει περιγραφεί στις αρχές της δεκαετίας του '90, σε παιδιά που επιβίωσαν από τον καρκίνο. Έχει πλέον αποδειχθεί ότι η προκαλούμενη από ανθρακυκλίνες καρδιοτοξικότητα μπορεί να εκδηλωθεί και δεκαετίες μετά τη χορήγηση της αντικαρκινικής θεραπείας (26–28).

Ενώ η οξεία καρδιοτοξικότητα δεν έχει σημαντικές κλινικές επιδράσεις και συνήθως επιλύεται σύντομα μετά το τέλος της έγχυσης, η χρόνια και η καθυστερημένη καρδιοτοξικότητα είναι σοβαρές και κλινικά σημαντικές, επηρεάζοντας συνολικά τη νοσηρότητα και τη θνησιμότητα και απαιτούν μακροχρόνια θεραπεία.

Η πιθανότητα της εμφάνισης της χρόνιας καρδιοτοξικότητας και της συμφορητικής καρδιακής ανεπάρκειας που προκαλείται από τις ανθρακυκλίνες κυμαίνεται μεταξύ 1% έως 16% (29).

Η χορήγηση ανθρακυκλινών σχετίζεται με τη δόσοεξαρτώμενη βλάβη του μυοκαρδίου και θάνατο οδηγώντας σε δυσλειτουργία της αριστερής κοιλίας και καρδιακή ανεπάρκεια. Η συχνότητα εμφάνισης κλινικής καρδιακής ανεπάρκειας κατά τη θεραπεία με δοξορουβικίνη σε τρεις κλινικές μελέτες που περιελάμβαναν 630 ασθενείς με καρκίνο του μαστού και του πνεύμονα αυξήθηκε εκθετικά από 5% με αθροιστική δόση 400mg/m² σε 48% με αθροιστική δόση 700mg/m² (6). Σε χαμηλότερες δόσεις, τα αναφερόμενα ποσοστά καρδιοτοξικότητας ποικίλλουν, λόγω των μελετών που έχουν διεξαχθεί σε διαφορετικούς πληθυσμούς, διαφορετική περίοδο παρακολούθησης και λόγω του διαφορετικού ορισμού της καρδιοτοξικότητας (30).

Η καρδιομυοπάθεια που προκαλείται από τη χημειοθεραπεία είναι ένα φάσμα ασθενειών που κυμαίνεται από την ανάπτυξη καρδιακής ανεπάρκειας με συμπτώματα και κλινικά σημεία έως την ασυμπτωματική μείωση της συστολικής λειτουργίας που ποσοτικοποιείται μέσω μέτρησης του κλάσματος εξώθησης της αριστερής κοιλίας. Όταν συμπεριληφθεί η ασυμπτωματική μείωση της συστολικής λειτουργίας στον ορισμό της καρδιοτοξικότητας, ο αναφερόμενος ρυθμός καρδιακών συμβαμάτων στην προαναφερόμενη μελέτη ήταν πολύ υψηλότερος και επεκτάθηκε σε χαμηλότερες αθροιστικές δόσεις δοξορουβικίνης (6,30). Τα ποσοστά καρδιακών επεισοδίων στη θεραπεία ήταν 7%, 18% και 65% σε αθροιστικές δόσεις 150mg/m², 350mg/m² και 550mg/m², αντίστοιχα (6).

Η σχέση μεταξύ της ασυμπτωματικής μείωσης του κλάσματος εξώθησης της αριστερής κοιλίας μετά από θεραπεία με ανθρακυκλίνες και η επακόλουθη ανάπτυξη καρδιακής ανεπάρκειας δεν είναι πλήρως κατανοητή, αλλά η ασυμπτωματική δυσλειτουργία της αριστερής κοιλίας σχετίζεται με τον αυξημένο κίνδυνο μελλοντικής συμφορητικής καρδιακής ανεπάρκειας και θανάτου (31). Το κλάσμα εξώθησης της αριστερής κοιλίας είναι ένας ισχυρός προγνωστικός δείκτης σε ασθενείς με καρδιακή ανεπάρκεια (32) και οι αλλαγές που προκύπτουν από τη θεραπεία ή την εξέλιξη της νόσου συνδέονται στενά με τα αποτελέσματα (33). Η μακροχρόνια παρακολούθηση

των επιζώντων από καρκίνο στην παιδική ηλικία επιβεβαιώνει ότι οι παιδιατρικοί πληθυσμοί που λαμβάνουν χημειοθεραπεία με ανθρακυκλίνες φαίνεται να είναι ιδιαίτερα ευαίσθητοι και παρουσιάζουν αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης καρδιακής ανεπάρκειας δεκαετίες μετά τη θεραπεία καρκίνου (34).

Η ομάδα του Cardinale έδειξε πρόσφατα τη σημασία της παρακολούθησης με ηχοκαρδιογραφία για τον εντοπισμό της καρδιοτοξικότητας που σχετίζεται με την ανθρακυκλίνες σε 2625 ασθενείς με καρκίνο (74% γυναίκες, 51% καρκίνο του μαστού και 28% μη-Hodgkin's lymphoma) (35). Το κλάσμα εξώθησης της αριστερής κοιλίας αξιολογήθηκε κατά την έναρξη και κάθε 3 μήνες κατά τη διάρκεια της χημειοθεραπείας για τον πρώτο χρόνο και με έξι μηνιαίες σαρώσεις τα επόμενα 4 χρόνια. Η καρδιοτοξικότητα ορίστηκε ως μείωση κατά 10 εκατοστιαίες μονάδες στο κλάσμα εξώθησης της αριστερής κοιλίας και πτώση σε <50%. Η συχνότητα εμφάνισης καρδιοτοξικότητας ήταν 9% με το 98% των περιπτώσεων να εμφανίζουν τον πρώτο χρόνο. Ο διάμεσος χρόνος από την τελική δόση χημειοθεραπείας με ανθρακυκλίνες μέχρι την ανάπτυξη της καρδιοτοξικότητας ήταν 3,5 μήνες (35).

2.1 ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ ΠΡΟΚΛΗΣΗΣ ΚΑΡΔΙΟΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑΣ ΑΠΟ ΑΝΘΡΑΚΥΚΛΙΝΕΣ

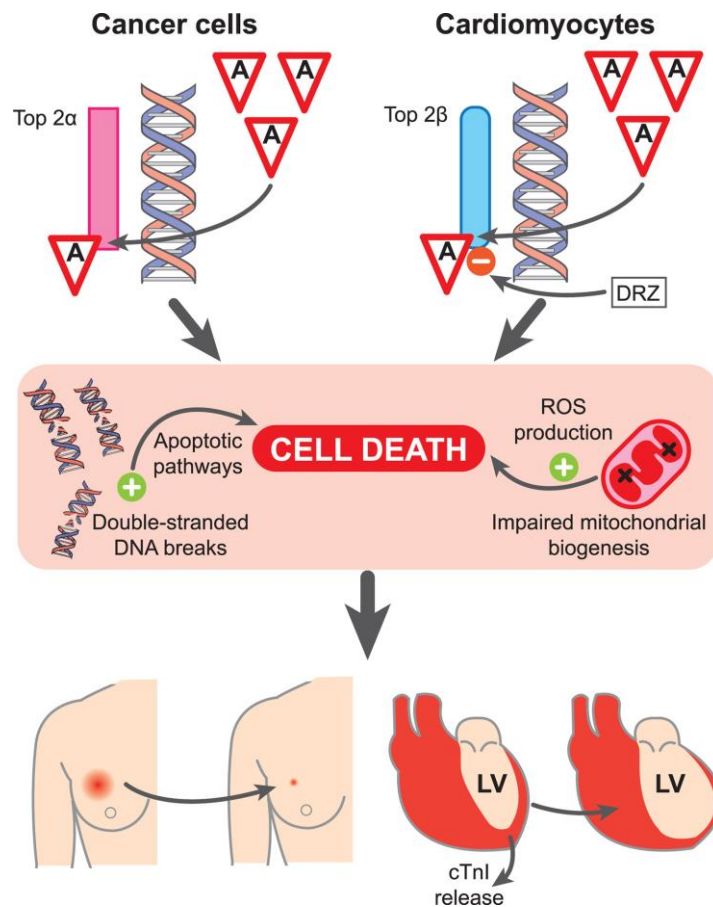
Οι ανθρακυκλίνες έχουν διάφορους μηχανισμούς δράσης για να παρεμποδίσουν την αντιγραφή των ταχέως πολλαπλασιασμένων καρκινικών κυττάρων. Με την παρεμβολή στα ζεύγη βάσεων DNA και τη σταθεροποίηση του συμπλόκου τοποϊσομεράσης (Top) 2α μετά τη διάσπαση του DNA, αυξάνουν τον κατακερματισμό του DNA και εμποδίζουν τη σύνθεση DNA και RNA (36).

Η κατανόηση του μηχανισμού που οδηγεί στην προκαλούμενη από ανθρακυκλίνες βλάβη του μυοκαρδίου επικεντρώνεται στον αυξημένο σχηματισμό των ελεύθερων ριζών οξυγόνου (ROS) και στοχοποιεί την τοποϊσομεράση 2β στα κύτταρα του μυοκαρδίου (εικόνα 2). Η συσσώρευση σιδήρου στα μιτοχόνδρια σχετίζεται με την ανακύκλωση και την αυξημένη παραγωγή ελευθέρων ριζών οξυγόνου (23).

Η παραγωγή ελευθέρων ριζών οξυγόνου είναι επιβλαβής, αλλά είναι αβέβαιο σε ποιο βαθμό μπορεί να προκαλέσει τη βλάβη που προκαλείται από ανθρακυκλίνες. Η ανα-

στολή της τοποϊσομεράσης 2β, η οποία λαμβάνει χώρα σε μη πολλαπλασιαστικά κύτταρα, συμπεριλαμβανομένου των καρδιομυοκυττάρων, θεωρείται ότι είναι ο βασικός μεσολαβητής της καρδιοτοξικότητας που προκαλείται από ανθρακυκλίνες (37).

Η αναστολή της τοποϊσομεράσης 2β στο κύτταρα του μυοκαρδίου προκαλεί διάσπαση του DNA. Αυτό είναι απαραίτητο για την ενεργοποίηση του p53 διαμεσολαβούμενου μονοπατιού απόπτωσης των κυττάρων (37).



Εικόνα 2: Μηχανισμός κυτταρικής βλάβης και θανάτου που προκαλείται από ανθρακυκλίνες σε καρκινικά κύτταρα και κύτταρα του μυοκαρδίου. Η θεραπευτική επίδραση των ανθρακυκλινών έναντι καρκινικών κυττάρων προκαλείται μέσω της αναστολής της Top 2α. Στα καρδιομυοκύτταρα, αναστέλλεται η Top 2β. Η αναστολή των τοποϊσομερασών 2 και στους δύο τύπους κυττάρων προκαλεί συσσώρευση διάσπασης DNA και μιτοχονδριακή δυσλειτουργία οδηγώντας σε ενεργοποίηση μονοπατιών κυτταρικού θανάτου και συσσώρευση ROS. Η πρώιμη καρδιακή βλάβη μπορεί να ανιχνευθεί μέσω ποσοτικού προσδιορισμού του κυκλοφορούντος cTnI. Η προστατευτική δράση της DRZ έναντι της καρδιοτοξικότητας της ανθρακυκλίνης πιστεύεται ότι μεσολαβείται σε μεγάλο βαθμό μέσω της αναστολής της σύνδεσης ανθρακυκλίνης στο Top 2β. cTnI, καρδιακή τροπονίνη I; DRZ, δεξαραζοξάνη; LV, αριστερή κοιλία; ROS, είδη αντιδραστικού οξυγόνου (30).

2.2 ΘΕΡΑΠΕΙΑ ΚΑΙ ΠΡΟΛΗΨΗ ΤΗΣ ΠΡΟΚΑΛΟΥΜΕΝΗΣ ΑΠΟ ΑΝΘΡΑΚΥΚΛΙΝΕΣ ΚΑΡΔΙΟΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑΣ

Μέχρι σήμερα δεν υπάρχει συγκεκριμένη θεραπεία για την προκαλούμενη από ανθρακυκλίνες καρδιοτοξικότητα. Αντί της θεραπείας, οι κλινικοί ιατροί στοχεύουν στην αποτροπή της επιδείνωσης της υπάρχουσας καρδιομυοπάθειας (38). Λαμβάνοντας υπόψη τη δυσκολία ή ακόμα και την αδυναμία της επιτυχημένης θεραπείας, η πρόληψη της καρδιοτοξικότητας είναι ζωτικής σημασίας.

Η πρώτη και προφανώς πιο αποτελεσματική μέθοδος είναι η μείωση της συνολικής δόσης (19,39). Η μείωση αυτή έχει μειώσει τη συχνότητα εμφάνισης καρδιακών συμβαμάτων που σχετίζονται με τις ανθρακυκλίνες, αλλά δεν έχει εξαλείψει πλήρως τον κίνδυνο καρδιοτοξικότητας (40). Γι' αυτό το λόγο τα σύγχρονα πρωτόκολλα θεραπείας χρησιμοποιούν λιγότερο συχνά σχήματα υψηλής δόσης (>400mg/m²).

Η προσαρμογή της δόσης μεταξύ των ανθρακυκλινών βασίζεται στην αιματολογική τοξικότητα (41). Θεωρείται ότι υπάρχει κάποια συσχέτιση μεταξύ της αιματολογικής και καρδιακής τοξικότητας, αλλά είναι δύσκολο να αποδειχτεί. Υπάρχουν κάποιες ενδείξεις που δείχνουν χαμηλότερα ποσοστά καρδιακής ανεπάρκειας μετά από χορήγηση επιρουβικίνης σε σχέση με τη χορήγηση δοξορουβικίνης, χωρίς να υπάρχει διαφορά στην αντικαρκινική απόκριση. Μια συστηματική ανασκόπηση του Cochrane, κατέληξε στο συμπέρασμα ότι δεν υπάρχουν επαρκή στοιχεία που να δείχνουν κλινικά σημαντικές διαφορές στην πρόκληση καρδιοτοξικότητας μεταξύ των παραγόντων ανθρακυκλινών σε ισοδύναμες δόσεις (42). Μια μεταγενέστερη ανάλυση περίπου 16.000 επιζώντων παιδιών από καρκίνο έφτασε στο συμπέρασμα ότι η δαουνορουβικίνη σχετίζεται με λιγότερη καρδιοτοξικότητα σε σχέση με τη δοξορουβικίνη (43). Η συνεχής έγχυση σχετίζεται με χαμηλότερη καρδιοτοξικότητα σε ασθενείς με σάρκωμα και λέμφωμα, αλλά όχι στα παιδιά με οξεία λεμφοβλαστική λευχαιμία (44,45).

Δεξαζοξάνη: Η δεξαζοξάνη έχει αποδεδειγμένη προστατευτική δράση έναντι της τοξικότητας που προκαλείται από τις ανθρακυκλίνες ελαχιστοποιώντας ή αποτρέποντας πλήρως την πτώση του κλάσματος εξώθησης της αριστερής κοιλίας και μειώνοντας την απελευθέρωση του καρδιακού δείκτη (42,46). Η δεξαζοξάνη απορροφάται

ταχέως από το μυοκάρδιο μετά την έγχυση και ανταγωνίζεται με θέσεις δέσμησης ATP στην τοποϊσομεράση 2β. Η δέσμηση της δεξραζοξάνης στην τοποϊσομεράση 2β θεωρείται ότι είναι ο κύριος μηχανισμός της προστατευτικής δράσης δημιουργώντας μια αλλαγή διαμόρφωσης η οποία αποτρέπει το σχηματισμό συμπλόκων με τις ανθρακυκλίνες και κατ' αυτό τον τρόπο μειώνει την καρδιοτοξικότητα (47,48). Βέβαια, οι ανησυχίες σχετικά με τον μετριασμό της αντικαρκινικής δράσης των ανθρακυκλινών και η υπόνοια για την πρόκληση δευτερογενών κοκοηθειών στο παιδικό λέμφωμα και στη λευχαιμία μετά από χορήγηση δεξραζοξάνης (49,50) οδήγησαν σε σύσταση για περιορισμένη χρήση σε ενήλικες με μεταστατικό καρκίνο του μαστού που λαμβάνουν υψηλότερη αθροιστική δόση ανθρακυκλίνης. Πρόσφατα σχόλια αμφισβήτησαν τα στοιχεία για δευτερογενείς κακοήθειες μετά από χορήγηση δεξραζοξάνης και ζήτησαν επανεξέταση των οδηγιών για να προταθεί μια ευρύτερη ένδειξη (9,51). Η επανεκτίμηση των πρώιμων δεδομένων μαζί με περαιτέρω ανάλυση των αποτελεσμάτων από ασθενείς <18 ετών που έλαβαν δεξραζοξάνη οδήγησε σε μια εκτεταμένη ένδειξη σε παιδιατρικούς ασθενείς που έλαβαν αθροιστικές δόσεις > 300 mg m² (52).

Β-αναστολείς, Αναστολείς μετατρεπτικού ενζύμου αγγειοτενσίνης (α-MEA), Αναστολείς υποδοχέων αγγειοτενσίνης II: Η θεραπευτική προσέγγιση στις περισσότερες μελέτες πρωτογενούς πρόληψης περιλαμβάνει τη χορήγηση καρδιοπροστατευτικής φαρμακευτικής αγωγής σε όλους τους ασθενείς που έλαβαν ανθρακυκλίνη. Αυτό διασφαλίζει οφέλη από την πρώιμη καρδιοπροστασία, αλλά απαιτείται υπερβολική θεραπεία με την έννοια ότι μόνο μια μειονότητα ασθενών θα αναπτύξει καρδιοτοξικότητα. Η πρόληψη της καρδιακής δυσλειτουργίας κατά τη διάρκεια της μελέτης ανοσοενισχυτικής θεραπείας με καρκίνο του μαστού (PRADA) ελέγχθηκε με εικονικό φάρμακο και χρησιμοποίησε καρδιακή μαγνητική τομογραφία για τον ποσοτικό προσδιορισμό της αλλαγής του κλάσματος εξώθησης της αριστερής κοιλίας σε ασθενείς με καρκίνο του μαστού (53). Ωστόσο, η συνολική μείωση του ποσοστικού κλάσματος εξώθησης της αριστερής κοιλίας στην ομάδα του εικονικού φαρμάκου ήταν μόνο 2,6 μονάδες. Η μελέτη PRADA τυχαιοποίησε 130 ασθενείς και απεικονίζει τον

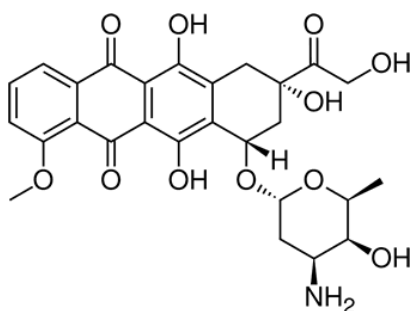
εντοπισμό της θεραπευτικής επίδρασης με μη επιλεκτική τυχαιοποίηση σε έναν σύγχρονο πληθυσμό ασθενών με καρκίνο του μαστού που έλαβε χαμηλότερες αθροιστικές δόσεις ανθρακυκλίνης (56% έλαβε <300 mg / m²) (53).

Μικρότερες τυχαιοποιημένες δοκιμές με καρβεδιλόλη, νεβιβολόλη και καρβαδιλόλη και εναλαπρίλη σε συνδυασμό έχουν δείξει παρόμοια προστασία από την πτώση του κλάσματος εξώθησης της αριστερής κοιλίας μετά από χορήγηση ανθρακυκλίνης σε σύγκριση με ασθενείς που δεν έλαβαν θεραπεία. Οι πληροφορίες σχετικά με τη διάρκεια της επίδρασης της θεραπείας είναι περιορισμένες λόγω της σύντομης παρακολούθησης (<6 μηνών) σε αυτές τις μελέτες (54–56).

Στατίνες: Η χορήγηση στατινών σχετίζεται με την προστασία από την καρδιοτοξικότητα που προκαλείται από τις ανθρακυκλίνες σε ζωικά μοντέλα. Τα προκλινικά στοιχεία και ο πιθανός μηχανισμός που συμπεριλαμβάνει τη διαμόρφωση της Rho GTPάσης αποτέλεσαν αντικείμενο πρόσφατης λεπτομερούς επισκόπησης. Σε αναδρομική ανάλυση οι στατίνες συνδέθηκαν με χαμηλότερο ποσοστό ανάπτυξης καρδιακής ανεπάρκειας σε ασθενείς με καρκίνο του μαστού που υποβλήθηκαν σε θεραπεία με ανθρακυκλίνη. Απαιτούνται περαιτέρω προοπτικές τυχαιοποιημένες μελέτες για να καταλάβουμε εάν αυτό είναι αποτέλεσμα μεσολαβούμενης από στατίνη ή αποτέλεσμα της ταυτόχρονης συνταγογράφησης άλλων καρδιοπροστατευτικών φαρμάκων, συμπεριλαμβανομένων β-αποκλειστών και α-MEA (57,58).

3. ΔΟΞΟΡΟΥΒΥΚΙΝΗ ΚΑΙ ΚΑΡΔΙΟΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑ

Η δοξορουβικίνη (doxorubicin, DXR) είναι ένας ανθρακυκλικός παράγοντας που είχε αρχικά εκχυλιστεί από τον μύκητα *Streptomyces peucetius var. caesius* το 1970 και σταδιακά χρησιμοποιήθηκε στη θεραπεία διαφόρων ειδών καρκίνου (59).



Εικόνα 3: Μοριακός τύπος Δοξορουβικίνης (7)

Τα φάρμακα που ανήκουν στις ανθρακυκλίνες και συγκεκριμένα η δοξορουβικίνη είναι από τα πιο αποτελεσματικά και ευρέως χρησιμοποιούμενα αντικαρκινικά φάρμακα (60).

Ο κύριος περιορισμός στη χρήση της οφείλεται τόσο στην οξεία όσο και στη χρόνια καρδιοτοξικότητα που προκαλεί και η αναπροσαρμογή της δόσης αποτελεί μέχρι και σήμερα τη μοναδική εφαρμογή για τη μείωση της τοξικότητας (61).

Πολύ πιο σοβαρή φαίνεται να είναι η χρόνια καρδιοτοξικότητα, η οποία μπορεί να εκδηλωθεί και δεκαετίες μετά τη θεραπεία. Χαρακτηρίζεται από προοδευτική δυσλειτουργία της αριστερής κοιλίας που οδηγεί σε μη αναστρέψιμη συμφορητική καρδιακή ανεπάρκεια (62).

Η προκαλούμενη από την DXR καρδιοτοξικότητα φαίνεται να είναι μια πολυπαραγοντική διαδικασία, που ως τελικό σκοπό έχει την απόπτωση του καρδιακού κυττάρου (63).

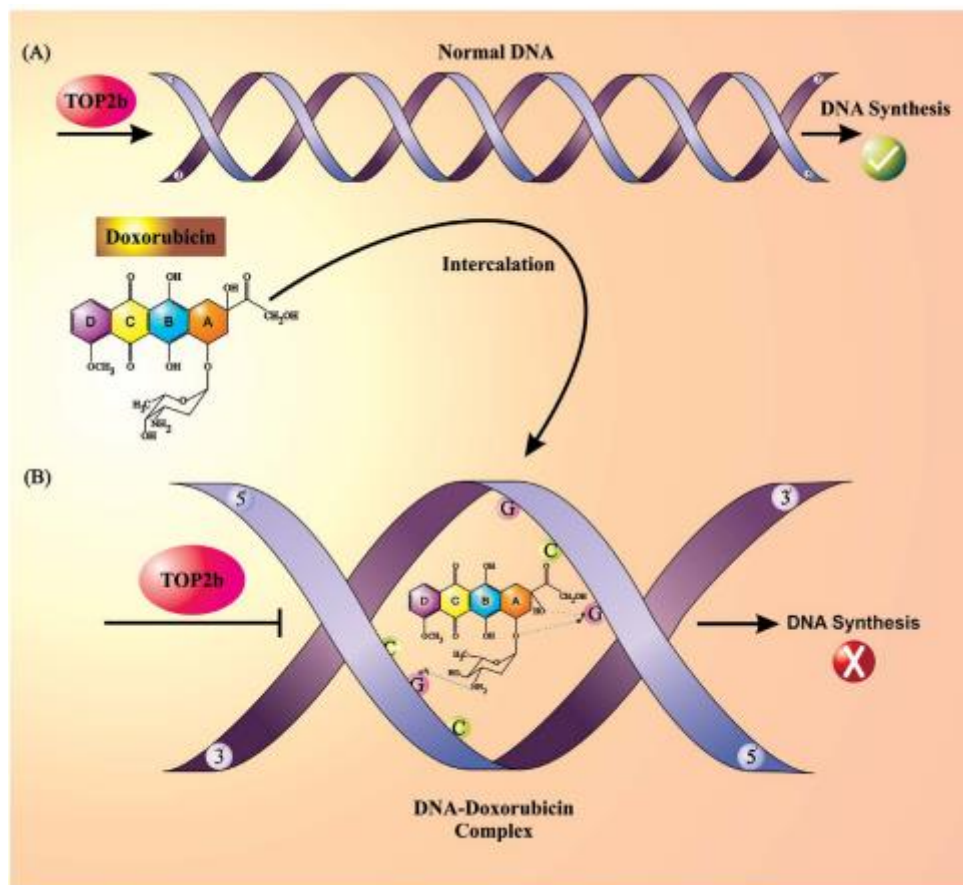
3.1 ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ ΚΑΡΔΙΟΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑΣ

Ο μηχανισμός καρδιοτοξικότητας της δοξορουβικίνης είναι αμφιλεγόμενος και έχουν προταθεί διάφορες θεωρίες:

- Αναστολή τοποϊσομεράσης β (64)
- Φαίνεται, ότι συνδέεται άμεσα με την αύξηση του καρδιακού οξειδωτικού στρες προκαλώντας αύξηση στις ενεργές μορφές οξυγόνου (*Reactive Oxygen Species, ROS*) (65).
- Η αλλοίωση των μυοϊνωδών κυττάρων και η απορρύθμιση του ενδοκυτταρικού ασβεστίου αποτελούν επίσης σημαντικούς μηχανισμούς καρδιοτοξικότητας (66).
- Η απόπτωση των καρδιακών κυττάρων που προκαλείται από τη δοξορουβικίνη αποτελεί έναν ακόμη μηχανισμό καρδιοτοξικότητας, ενώ επηρεάζονται παράλληλα και τα επιθηλιακά κύτταρα της καρδιάς (67).
- Επίσης, η καρδιοτοξικότητα προκαλείται εν μέρει και από αλλαγές στα άλατα φωσφορικών υψηλής ενέργειας (68).
- Οι μεταβολές στον ενεργειακό μεταβολισμό του μυοκαρδίου αποτελούν έναν ακόμη μηχανισμό καρδιοτοξικότητας προκαλούμενης από τη δοξορουβικίνη (69).

3.1.1 ΑΝΑΣΤΟΛΗ ΤΟΠΟΪΣΟΜΕΡΑΣΗΣ 2β

Η τοποϊσομεράση 2β έχει ταυτοποιηθεί ως μεσολαβητής καρδιοτοξικότητας που προκαλείται από δοξορουβικίνη σε ένα μοντέλο αρουραίου. Η τοποϊσομεράση 2β ξετυλίγει τους κλώνους του DNA κατά την αντιγραφή, τη μεταγραφή ή τον ανασυνδυασμό και υπάρχει σε όλα τα ήρεμα κύτταρα, συμπεριλαμβανομένων των κυττάρων του μυοκαρδίου. Η δοξορουβικίνη είναι γνωστή ως ένα δηλητήριο της τοποϊσομεράσης 2β που εμποδίζει τη σύνθεση του DNA με παρεμβολή στους κλώνους του DNA. Η τοποϊσομεράση 2β αλλάζει την τοπολογία του DNA, η οποία οδηγεί σε παροδική θραύση του διπλού κλώνου και της υπερρύθμισης του DNA που μπορεί να οδηγήσει σε θάνατο των κυττάρων του μυοκαρδίου (εικόνα 4) (64).



Εικόνα 4: Παρεμβολή της δοξορουβικίνης στο DNA A) Η τοποϊσομεράση 2β χαλαρώνει το υπερκάλυμμα DNA για να διευκολύνει την αντιγραφή και τη σύνθεση του DNA, B) η δοξορουβικίνη σχηματίζει ένα σύμπλοκο με το DNA μέσω της G και στους δύο κλώνους DNA και αποτρέπει τη δράση της τοποϊσομεράσης 2β και τη σύνθεση DNA. TOP2β: Τοποϊσομεράση 2β, G: γουανίνη, C: κυτοσίνη (64)

Η ενεργοποίηση της οδού P53 και της αποπτωτικής οδού έχει αποδειχθεί ότι ευθύνεται για την καρδιοτοξικότητα που προκαλείται από δοξορουβικίνη (70). Η τοποϊσομεράση 2β είναι απαραίτητη για την ενεργοποίηση του P53 ως απόκριση στη βλάβη του

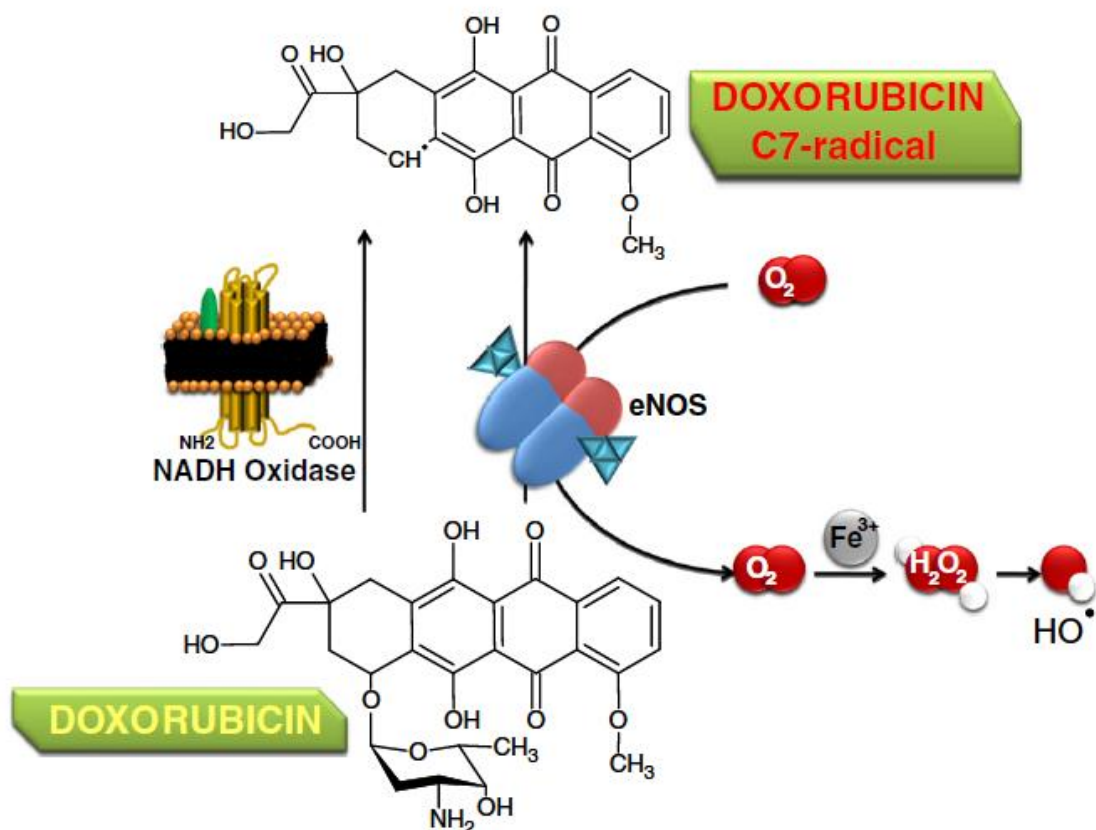
DNA που προκαλείται από τη δοξορουβικίνη στα καρδιομυοκύτταρα ενώ η παραγωγή ROS από τη δοξορουβικίνη οφείλεται στη μείωση της έκφρασης γονιδίων των αντιοξειδωτικών ενζύμων, τα οποία επίσης εξαρτώνται από την τοποϊσομεράση 2β (64).

3.1.2 ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟ ΣΤΡΕΣ

Η επαγωγή της παραγωγής των ελευθέρων ριζών (ROS) είναι ο πιο μελετημένος μηχανισμός μέσω του οποίου η δοξορουβικίνη επάγει την καρδιοτοξικότητα (67). Η δημιουργία δραστικών ελευθέρων ριζών γίνεται με δύο διαφορετικούς μηχανισμούς: ο πρώτος περιλαμβάνει την εμπλοκή οξειδοαναγωγικών ενζύμων ενώ ο δεύτερος εξαρτάται από τα ιόντα σιδήρου και τη δημιουργία συμπλόκων δοξορουβικίνης-σιδήρου.

Η αναγωγή του δακτυλίου C της DXR οδηγεί στη δημιουργία της αντίστοιχης κινόνης. Η αναγωγή αυτή καταλύεται από την οξειδάση της NADPH ή την eNOS. Αυτή η ημικινόνη υφίσταται περαιτέρω μετασχηματισμό σε μία ελεύθερη ρίζα στον C7, η οποία μπορεί να αλληλεπιδρά με το μοριακό οξυγόνο, καθώς και άλλα ενδοκυτταρικά μόρια, ιδιαίτερα τα λιπίδια. Η NADPH οξειδάση και η eNOS οξειδώνουν το NADPH ή το FAD / FMN ως δότες ηλεκτρονίων, αντίστοιχα. Το NADPH τροφοδοτεί δύο ηλεκτρόνια και το FAD / FMN μπορεί να παρέχει ένα ηλεκτρόνιο. Επειδή η δοξορουβικίνη είναι ένας ισχυρός δέκτης ηλεκτρονίων, μπορεί να "κλέψει" τα ηλεκτρόνια μακριά από τις φυσιολογικές αντιδράσεις παραγωγής μοριακού οξυγόνου και NO (71).

Παρουσία σιδήρου, η δοξορουβικίνη οδηγεί σε οξειδοαναγωγικό κύκλο, προκαλώντας υπέρμετρη παραγωγή ROS και κυτταρική καταστροφή. Η οξείδωση του άγλυκου τμήματος της δοξορουβικίνης οδηγεί στη δημιουργία ενεργής ημικινόνης που μπορεί αστραπιαία να μετατραπεί στη μητρική ένωση χρησιμοποιώντας O_2 ως δέκτη ηλεκτρονίων. Αυτός ο οξειδοαναγωγικός κύκλος οδηγεί στη δημιουργία ριζών ανιόντος υπεροξειδίου, τα οποία μετατρέπονται σε H_2O_2 αυθόρμητα ή μέσω της υπεροξειδικής δεσμουτάσης. Συνεπώς, το H_2O_2 μπορεί να μετατραπεί σε πολύ τοξικά υδροξυλικά παράγωγα παρουσία βαρέων μετάλλων, όπως ο σίδηρος, μέσω της αντίδρασης Fenton. Επιπλέον, η δοξορουβικίνη μπορεί να αντιδράσει απευθείας με το σίδηρο δημιουργώντας σύμπλοκο DXR-Fe, επιδρώντας στη μετατροπή Fe(II) σε Fe(III) και στην υπέρμετρη παραγωγή ROS (72).



Εικόνα 5: Μοριακή μετατροπή δοξορουβικίνης. Η δοξορουβικίνη μετατρέπεται σε ημικινόνη από την οξειδάση της NADPH ή την eNOS. Αυτή η ημικινόνη μετατρέπεται σε ελεύθερη ρίζα στον άνθρακα 7, η οποία αντιδρά με μοριακό οξυγόνο καθώς και με άλλα ενδοκυτταρικά μόρια (71)

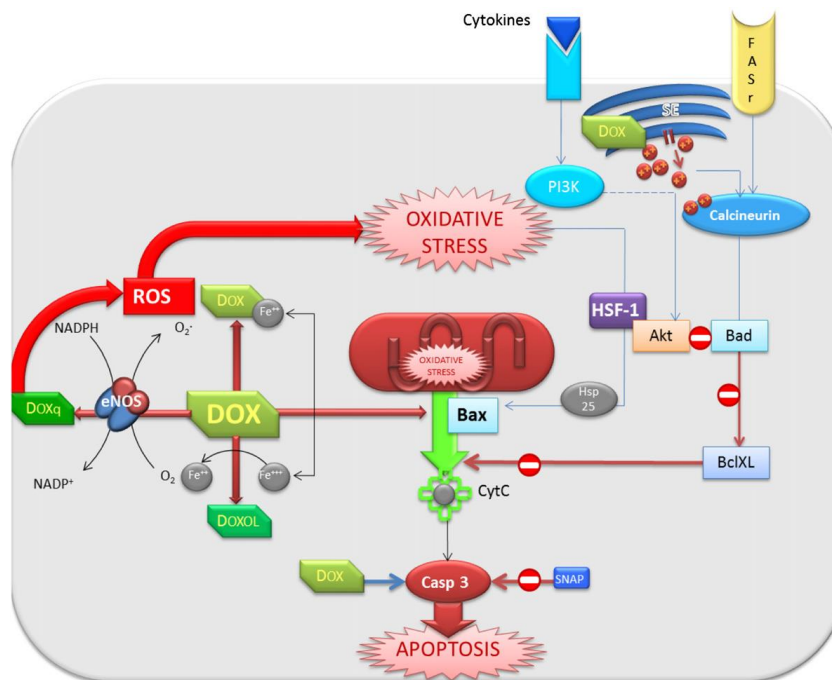
Το κατιονικό φάρμακο δοξορουβικίνη δεσμεύεται στην εσωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη σχηματίζοντας σύμπλεγμα με την καρδιολιπίνη (68). Οι πρωτεΐνες της αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων απαιτούν τη δέσμευση καρδιολιπίνης προκειμένου να λειτουργήσουν σωστά και καθώς η δοξορουβικίνη διακόπτει τη σύνδεση καρδιολιπίνης-πρωτεΐνης, αυτό έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή ρίζας ανιόντος υπεροξειδίου (O_2^-) (73). Άλλες μεμβρανικές πρωτεΐνες, όπως αυτές που είναι υπεύθυνες για τη μεταφορά της καρνιτίνης μπορεί επίσης να επηρεάζονται από τη δοξορουβικίνη συμβάλλοντας στη μείωση της μιτοχονδριακής λειτουργίας. Είναι εύλογο ότι αυτά τα γεγονότα αποδιοργανώνουν το μιτοχονδριακό –και κατ'επέκταση- κυτταρικό μεταβολισμό, καθώς τα μιτοχόνδρια παράγουν περισσότερο από το 90% του ATP που χρησιμοποιείται από τα καρδιομυοκύτταρα (69).

3.1.2 ΑΠΟΠΤΩΣΗ ΚΥΤΤΑΡΩΝ

Το οξειδωτικό στρες που προκαλείται από τη δοξορουβική ενεργοποιεί μηχανισμούς απόπτωσης. Στην απόπτωση των κυττάρων του μυοκαρδίου συμπεριλαμβάνονται τόσο τα ενδοκυτταρικά όσο και τα εξωκυτταρικά μονοπάτια. Παρακάτω παρατίθεται μια σχηματική απεικόνιση των αποπτικών μονοπατιών που εμπλέκονται στην προκαλούμενη από τη δοξορουβική καρδιοτοξικότητα. Στη φυσιολογική κατάσταση, οι προ-αποπτωτικοί μηχανισμοί βρίσκονται υπό των πλήρη έλεγχο των αντι-αποπτικών παραγόντων Bcl-2 και Bcl-xL. Η DXR διεγείρει την πρωτεΐνη Bcl-xS με προ-αποπτωτικές ιδιότητες. Επιπλέον η DXR επηρεάζει και τη λειτουργία την αντι-αποπτωτικής κινάσης Akt/PKB περιορίζοντας τα επίπεδα ενεργοποίησής της. Πέρα από τις ρυθμιστικές δράσεις της Akt στην ανάπτυξη, είναι πλέον γνωστός ο ρόλος της και στην κυτταροπροστασία στο μυοκάρδιο τόσο σε οξείες, όσο και σε χρόνιες βλάβες του μυοκαρδίου (64).

Ειδικότερα:

1. Αναστέλλει τα προ-αποπτωτικά μόρια και επάγει τη τη μιτοχονδριακή προστασία από την απόπτωση.
2. Ρυθμίζει την κυκλοφορία του ασβεστίου στα μυοκαρδιακά κύτταρα. Η Akt φαίνεται ότι ρυθμίζει τη συσταλτικότητα της καρδιάς μέσω L-τύπου διαύλων Ca^{2+} και του SERCA υποδοχέα. Επίσης επάγει τη φωσφορυλίωση του IP_3 υποδοχέα με αποτέλεσμα την απενεργοποίησή του και τη μερική προστασία του κυττάρου από την επαγόμενη από Ca^{2+} απόπτωση.
3. Προάγει την πρόσληψη της γλυκόζης και τη χρησιμοποίησή της.
4. Προωθεί τη γλυκονεογένεση μέσω φωσφορυλίωσης και απενεργοποίησης της GSK-3β (24).



Εικόνα 6: Αλληλεπίδραση μεταξύ της δοξορουβικίνης με τις διάφορες αποπτωτικές οδούς στο καρδιομυοκύτταρο. Η αριστερή πλευρά του σχήματος δείχνει πώς η δοξορουβικίνη αρχίζει να δημιουργεί ROS και την αποσύνδεση του eNOS σε μονομερή. Η δοξορουβικίνη εισέρχεται επίσης στα μιτοχόνδρια, προκαλώντας την απελευθέρωση της οξειδάσης του κυτοχρώματος C, και επίσης παρατείνει τον χρόνο ανοίγματος των καναλιών ασβεστίου στο σαρκοπλασματικό δίκτυο, το οποίο ενεργοποιεί την καλσινευρίνη. Η φωσφορυλίωση της Akt αναστέλλει την ενεργοποίηση Bad και είναι μια από τις κύριες αντι-αποπτωτικές οδούς. Το οξειδωτικό στρες ενεργοποιεί τον HSF-1 και παράγει περισσότερο Hsp25, το οποίο αυξάνει τις προ-αποπτωτικές πρωτεΐνες. Dox: doxorubicin, Doxol: doxorubicinol, Doxq: doxorubicin semiquinone, ROS:ελεύθερες ρίζες οξυγόνου, SE: σαρκοπλασματικό δίκτυο, HSF: θερμικός σοκ παράγοντας, Hsp: θερμική σοκ πρωτεΐνη, CytC: cytochrome C και Casp3: caspase 3 (24).

3.1.3 ΕΝΔΟΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΑΠΟΡΡΥΘΜΙΣΗ ΤΟΥ ΚΥΚΛΟΥ ΤΟΥ ΑΣΒΕΣΤΙΟΥ ΑΣΒΕΣΤΙΟΥ

Η προκαλούμενη από την DXR διατάραξη της ομοιόστασης του ασβεστίου (Ca^{2+}), είναι ένας ακόμα μηχανισμός καρδιοτοξικότητας. Η απορρύθμιση των ενδοκυτταρικών συγκεντρώσεων ασβεστίου είναι τόσο αποτέλεσμα όσο και αίτιο της παραγωγής ROS. Τα παραγόμενα ROS και H_2O_2 αλλάζουν την ομοιόσταση του ασβεστίου στα καρδιακά μυϊκά κύτταρα μέσω της διατάραξης της φυσιολογικής λειτουργίας του σαρκοπλασματικού δικτύου. Αυτό επιτυγχάνεται μέσω της διατάραξης της αντλίας Ca^{2+} -ATPase. Πολύ πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει ότι η προκαλούμενη από DXR παραγωγή ROS και η απόπτωση αναστέλλονται με μείωση των ενδοκυτταρικών επιπέδου Ca^{2+} όταν χορηγείται ένα χηλικό σύμπλοκο Ca^{2+} (74).

Επίσης αναστέλλει την αντλία Νατρίου-Καλίου στο σαρκόλειμμα, ενώ αυξάνει και τη δραστηριότητα των διαύλων ασβεστίου L-τύπου (75).

Όλες αυτές οι παρεμβάσεις της DXR μπορεί να οδηγήσουν σε υπερφόρτωση των καρδιακών κυττάρων με Ca^{2+} που με τη σειρά του οδηγεί σε υπερφόρτωση του μιτοχονδρίου, με αποτέλεσμα την αλλοίωση του ενεργειακού μεταβολισμού και την παραγωγή των ενεργών μορίων οξυγόνου (76).

Επίσης ρυθμίζει τη διαπερατότητα της μιτοχονδριακής μεμβράνης ανοίγοντας τους πόρους απελευθερώνοντας έτσι το κυτόχρωμα c, γεγονός που αποτελεί ένα κρίσιμο βήμα για την απόπτωση (77).

Έχει αποδειχθεί ότι η προκαλούμενη από την DXR αύξηση των συγκεντρώσεων του ενδοκυτταρικού ασβεστίου οφείλεται στην απελευθέρωση ασβεστίου από το σαρκοπλασματικό δίκτυο μέσω της διάνοιξης των RyR υποδοχέων (Ryanodine Receptors). Η κίνηση στην οποία μετατρέπεται η DXR μετά από οξείδωση είναι ικανή να ανοίξει τους διαύλους αυτούς μέσω οξείδωσης απαραίτητων θειολών στους RyR υποδοχείς (78).

3.1.4 ΜΕΤΑΒΟΛΕΣ ΣΤΟΝ ΚΑΡΔΙΑΚΟ ΕΝΕΡΓΕΙΑΚΟ ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟ

Η καρδιά απαιτεί μεγάλα ποσά ενέργειας για τη διατήρηση της λειτουργίας της. Το ATP αποτελεί την πιο σημαντική πηγή ενέργειας. Όμως οι ενδοκυτταρικές αποθήκες του είναι περιορισμένες. Επομένως, σε περιπτώσεις αυξημένων αναγκών, το ATP, μπορεί να συμπληρωθεί και από την φωσφοκρεατίνη (PCr).

Φαίνεται ότι η DXR μειώνει τα επίπεδα ενέργειας, και πιο συγκεκριμένα τα επίπεδα ATP και PCr (φωσφοκρεατίνης) (69).

Τόσο οι οξείες όσο και οι χρόνιες συνέπειες της χορήγησης δοξορουβικίνης περιλαμβάνουν μειωμένη μιτοχονδριακή λειτουργία με μειωμένη παραγωγή φωσφορικών αλάτων υψηλής ενέργειας και μειωμένες αναλογίες φωσφοκρεατίνης προς κρεατίνη (PCr / Cr), Φωσφοκρεατίνης προς ATP (PCr / ATP) και ATP προς ADP.

Η μιτοχονδριακή δυσλειτουργία μπορεί να επηρεάσει την ενεργειακή σηματοδότηση μέσω της εξαρτώμενης από το AMP πρωτεϊνικής κινάσης (AMPK) με αποτέλεσμα την αναστολή της οξείδωσης των λιπαρών οξέων και τη μειωμένη δραστηριότητα των μιτοχονδρίων (69).

Υπάρχουν διάφοροι μηχανισμοί ρύθμισης της παραγωγής και χρησιμοποίησης της ενέργειας στο εσωτερικό των κυττάρων. Το σημαντικότερο ποσοστό της ρύθμισης πραγματοποιείται με τη συνδυαστική δράση της CK και AMPK (69).

Η χορήγηση της DXR δεν μειώνει μόνο την γενική παραγωγή ενέργειας, αλλά μπορεί επίσης να οδηγήσει και σε πιο συγκεκριμένη βλάβη των ισοενζύμων της κρεατινικής κινάσης. Τόσο τα κυτοσολικά όσο και τα μιτοχονδριακά ισοένζυμα της κρεατινικής κινάσης μαζί με την κρεατίνη και τη φωσφοκρεατίνη παρέχουν έναν σημαντικό ρυθμιστή ενέργειας του κυττάρου και ένα ενεργειακό σύστημα μεταφοράς γεφυρώνοντας έτσι την παραγωγή και την κατανάλωση ενέργειας (24).

Η μιτοχονδριακή κρεατινική κινάση συνδέεται λειτουργικά με την οξειδωτική φωσφορυλίωση και μέρος της κυτοσολικής κρεατινικής κινάσης συνδέεται με την γλυκόλυση και με ποικίλα μονοπάτια κατανάλωσης ATP, συμπεριλαμβανομένου των κύριων μονοπατιών χρησιμοποίησης του ATP, όπως είναι:

- Η δραστηριότητα της ATPάσης στο σύστημα ακτίνης-μυοσίνης
- Η αντλία Ca^{2+} -ATPase του σαρκοπλασματικού δικτύου
- Η αντλία Na^+ - K^+ -ATPase στο σαρκόλειμμα

Η αναστολή των παραπάνω μονοπατιών μπορεί να οδηγήσει χρόνια υπερφόρτωση του κυττάρου με ασβέστιο με αποτέλεσμα διαταραχές στη συστολή και χάλαση του μυός και επομένως σε απόπτωση και κυτταρικό θάνατο (69).

Πιο συγκεκριμένα η DXR (19):

1. Αδρανοποιεί όλες τις ισομορφές της κρεατίνης λόγω της οξείδωσης των σουλφιδρικών ομάδων της κρεατίνης από τον κινονικό πυρήνα της DXR.
2. Παρεμποδίζει τη σύνδεση κυτοχρώματος C με την καρδιολιπίνη. Η καρδιολιπίνη είναι φωσφολιπίδιο που εντοπίζεται στη μεμβράνη του μιτοχονδρίου και αποτελεί πρωταρχικό στόχο για τις ελεύθερες ρίζες οξυγόνου. Η σύνδεση της DXR με την καρδιολιπίνη, προκαλεί μεταβολές στη λειτουργία των μιτοχονδριακών ενζύμων που συμμετέχουν στην αναπνευστική αλυσίδα, με τελικό αποτέλεσμα την παραγωγή ελευθέρων ριζών οξυγόνου.

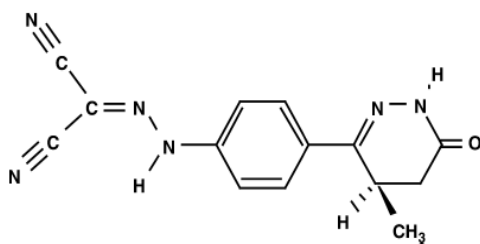
3. Εμποδίζει την ενεργοποίηση της AMPK. Η κινάση αυτή αποτελεί έναν πολύ σημαντικό ρυθμιστικό μηχανισμό της καρδιάς, καθώς είναι υπεύθυνη για την κυτταρική λειτουργία και τον μεταβολισμό. Ενεργοποιείται μέσω δύο μηχανισμών, οι οποίοι είναι ATP-εξαρτώμενοι και έχουν στόχο την αυξημένη παραγωγή ATP σε σχέση με την κατανάλωσή του. Αναλυτικότερα η κινάση AMPK:

- αυξάνει την οξείδωση των λιπαρών οξέων και διεγείρει την ενδοκυττάρια πρόσληψή τους μέσω της αυξημένης έκφρασης του υποδοχέα FAT/CD36. Τα λιπαρά οξέα αποτελούν την πιο σημαντική πηγή ενέργειας υπό αερόβιες συνθήκες. Με τη χορήγηση της DXR μειώνεται η οξείδωση των λιπαρών οξέων, πιθανόν λόγω αναστολής της φωσφορυλίωσης της ακέτυλο-CoA καρβοξυλάσης από την AMPK. Με τον τρόπο αυτό περιορίζεται η οξείδωση έναντι της βιοσύνθεσής τους.
- διεγείρει την πρόσληψη της γλυκόζης μέσω των υποδοχέων GLUT1 και GLUT4. Η DXR επιδρά στον καταβολισμό της γλυκόζης καθώς και στην ικανότητα πρόσληψής της από το κύτταρο, μέσω της αναστολής της AMPK.
- φωσφορυλιώνει και ενεργοποιεί την eNOS
- παρεμποδίζει τη γλυκονεογένεση μέσω φωσφορυλίωσης της συνθετάσης του γλυκογόνου (19).

4. ΛΕΒΟΣΙΜΕΝΤΑΝΗ

Η καρδιακή ανεπάρκεια (ΚΑ) είναι μια προοδευτική διαταραχή που χαρακτηρίζεται από μειωμένη καρδιακή λειτουργία και οδηγεί σε αυξημένη νοσηρότητα και θνητότητα και θνησιμότητα.

Παρόλη την εξέλιξη στη θεραπευτική και την αυξημένη χρήση φαρμάκων η ΚΑ παραμένει μια δύσκολη κλινική κατάσταση που συνήθως χρειάζεται υποστήριξη τόσο από ινότροπους παράγοντες όσο και από συσκευές υποβοήθησης της αριστερής κοιλίας (72). Θετικοί ινότροποι παράγοντες ενδείκνυνται σε ασθενείς με χρόνια και οξεία καρδιακή ανεπάρκεια. Οι διαθέσιμοι στην κλινική πράξη μέχρι τώρα θετικοί ινότροποι παράγοντες είναι οι κατεχολαμίνες όπως η δοβουταμίδη, οι αναστολείς φωσφοδιεστεράσης III (PDEIs) όπως η μιλρινόνη και οι παράγοντες ευαισθητοποίησης του ασβεστίου όπως είναι η λεβοσιμεντάνη (71).



Εικόνα 7: Μοριακός τύπος Λεβοσιμεντάνης (3)

Οι ευαισθητοποιητές ασβεστίου είναι μια νέα κατηγορία ινότροπων παραγόντων που αυξάνουν τη δύναμη της συστολής του μυοκαρδίου και την καρδιακή παροχή (71). Αυτοί οι παράγοντες είναι απαλλαγμένοι από τον κίνδυνο υπερφόρτωσης του μυοκαρδίου με ασβέστιο και επομένως δεν καταστρέφουν το μεταβολισμό των καρδιακών μυϊκών κυττάρων με την αύξηση της κατανάλωσης του οξυγόνου στο μυοκάρδιο. Η λεβοσιμεντάνη είναι από τους πιο καλά μελετημένους παράγοντες αυτής της κατηγορίας, μέσω πειραματικών και κλινικών δεδομένων που υποδεικνύουν τον καρδιοπροστατευτικό της ρόλο πέρα από την απλή αιμοδυναμική σταθεροποίηση (79).

4.1 ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ ΔΡΑΣΗΣ

Η λεβοσιμεντάνη συνδυάζει δύο κύριους μηχανισμούς δράσης.

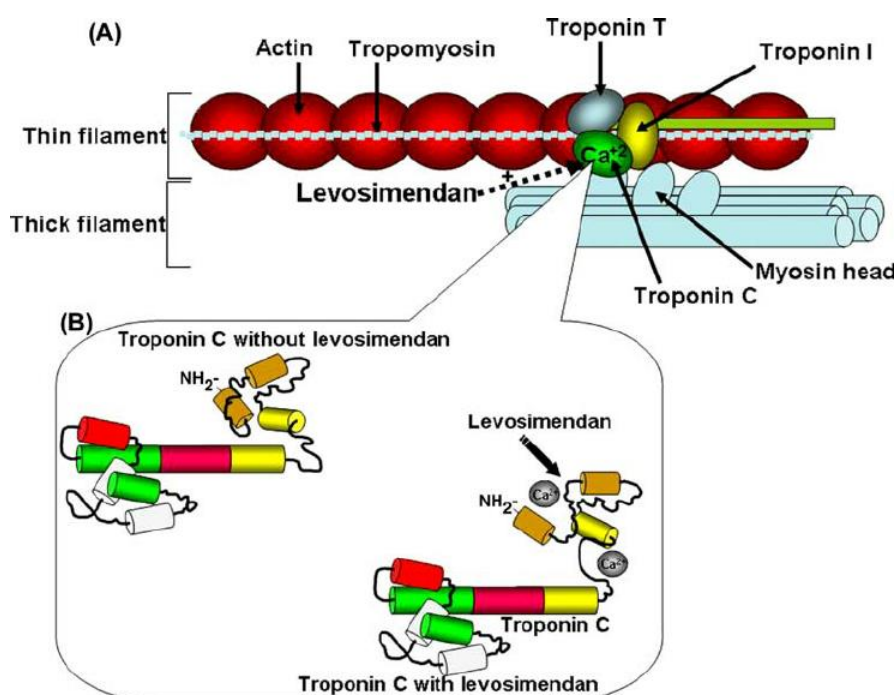
- Ευαισθητοποίηση ασβεστίου μέσω της σύνδεσης στην Τροπονίνη C των καρδιομυοκυττάρων
- Διάνοιξη εξαρτώμενων από το ATP διαύλων Καλίου

Είναι ένας εκλεκτικός αναστολέας της φωσφοδιεστεράσης 3 σε υψηλές δόσεις, ενώ σε θεραπευτικές δόσεις ο ινοτροπισμός της είναι ανεξάρτητος από την φωσφοδιεστεράση 3 και την παραγωγή c-AMP. Ενισχύει τη συστολική ικανότητα της καρδιας αυξάνοντας την ευαισθησία των μυοϊνιδίων στο Ca^{2+} και προκαλώντας τη σύνδεσή του με την τροπονίνη C. Δεν αυξάνει το κυτταρικό ασβέστιο που ευθύνεται για την αύξηση της θνητότητας. Επιπλέον δρα στους εξαρτημένους από το ATP διαύλους K^+ , προάγωντας τη διάνοιξή τους και προκαλώντας έτσι αρτηριακή, φλεβική και στεφανιαία διαστολή, οδηγώντας σε ελάττωση των περιφερικών αντιστάσεων και του μεταφορτίου. Τελικά προκαλεί αύξηση καρδιακής παροχής μέσω θετικής ινότροπης δράσης και περιφερικής αγγειοδιαστολής (80).

Η στεφανιαία αγγειοδιαστολή δεν επιτυγχάνεται μόνο μέσω διαύλων καλίου, αλλά και από την απελευθέρωση NO (80).

4.1.1 Η ΛΕΒΟΣΙΜΕΝΤΑΝΗ ΩΣ ΘΕΤΙΚΟ ΙΝΟΤΡΟΠΟ

Η λεβοσιμεντάνη ενισχύει τη συσταλτικότητα του μυοκαρδίου αυξάνοντας τη συγγένεια του ασβεστίου προς τα καρδιομυοκύτταρα κατά τη διάρκεια της συστολής, χωρίς να αυξάνει την ενδοκυτταρική συγκέντρωση ασβεστίου. Ειδικότερα συνδέεται στο Ν τελικό άκρο της τροπονίνης C, με τρόπο εξαρτώμενο από το ασβέστιο, ενώ η συγγένειά του αυξάνεται όσο αυξάνονται και οι συγκεντρώσεις ασβεστίου (συστολή). Η δέσμευση της λεβοσιμεντάνης με την τροπονίνη C, σταθεροποιεί τη διαμόρφωση του συμπλόκου ασβεστίου-Τροπονίνης C, η οποία μειώνει την αναστολή της Τροπονίνης I στην ακτίνης-μυοσίνη ATPase, προκαλώντας έτσι αύξηση του ρυθμού σχηματισμού συμπλόκου ακτίνης-μυοσίνης και επιβράδυνση του ρυθμού διάστασης (74).



Εικόνα 8: (A) Η λεβοσιμεντάνη ως ινότροπος παράγοντας. Η λεβοσιμεντάνη συνδέεται με την Τροπονίνη C κατά τη διάρκεια της συστολής, αυξάνοντας την ευαισθησία στα επίπεδα ασβεστίου. Έτσι αυξάνεται η δυνατότητα της συσταλτικότητας του μυοκαρδίου, χωρίς να επηρεάζει τη διαδικασία της διαστολής. (B) Με περισσότερες λεπτομέρειες, η λεβοσιμεντάνη οδηγεί σε άνοιγμα των ενεργών θέσεων της Τροπονίνης C, αυξάνοντας με αυτό τον τρόπο την ευαισθησία στο ασβέστιο (74).

4.1.2 Η ΛΕΒΟΣΙΜΕΝΤΑΝΗ ΩΣ ΑΓΓΕΙΟΔΙΑΣΤΑΛΤΙΚΟΣ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑΣ

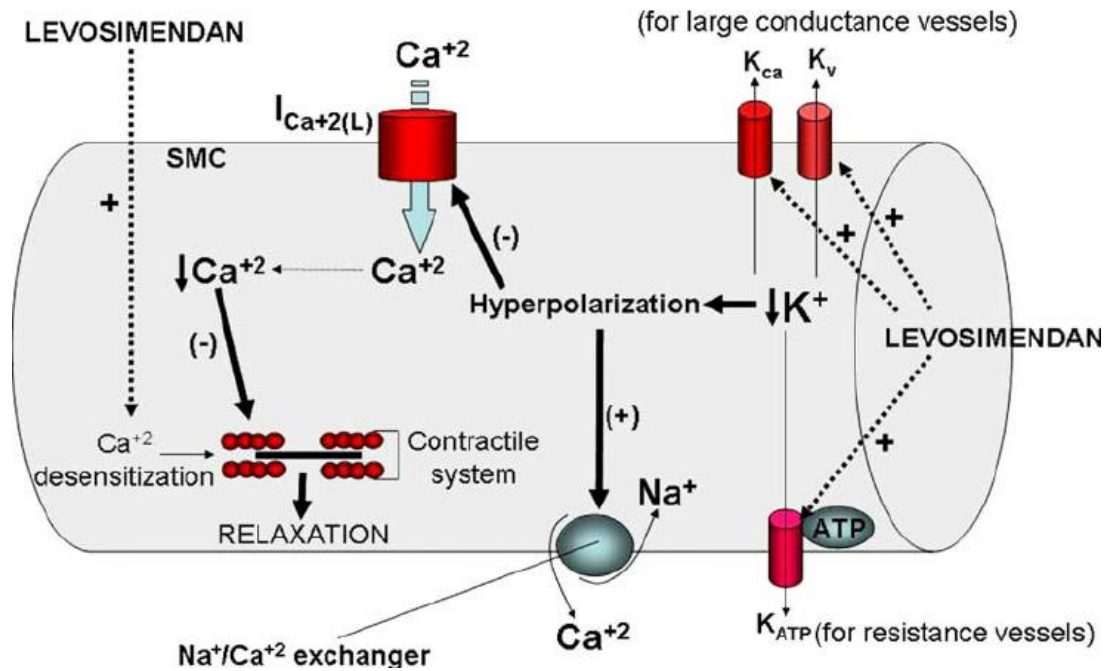
Η λεβοσιμεντάνη ενεργοποιεί επίσης την κυτταροπλασματική μεμβράνη και τους εξαρτώμενους από ATP διαύλους Καλίου, που επηρεάζουν τον αρτηριακό και σε μικρότερο βαθμό τον φλεβικό αγγειακό τόνο, συμβάλλοντας έτσι στην προστασία του μυοκαρδίου (76).

4.1.3 ΑΝΑΣΤΟΛΗ ΦΩΣΦΟΔΙΕΣΤΕΡΑΣΗΣ 3

Τόσο η λεβοσιμεντάνη, όσο και οι ενεργοί μεταβολίτες της έχουν δομικές ομοιότητες με τους αναστολείς των φωσφοδιεστερασών. Για το λόγο αυτό θεωρείται ότι δρουν και μέσω αναστολής των φωσφοδιεστερασών. Φαίνεται ότι αναστέλλει τη δράση των φωσφοδιεστερασών εκλεκτικά. Επίσης αυξάνει τα επίπεδα cAMP ενισχύοντας τον καρδιακό ρυθμό και το εύρος της ροής Ca^{2+} L-τύπου, υπονοώντας ότι τουλάχιστον σε πειραματικά μοντέλα η λεβοσιμεντάνη ασκεί μέρος της δράσης της μέσω μηχανισμού εξαρτώμενου από το cAMP (76). Η αναστολή της φωσφοδιεστεράσης 3 μπορεί να αυξήσει το ενδοκυτταρικό cAMP και συνεπώς το πλάτος του ενδοκυτταρικού ασβεστίου να είναι παρόμοιο με τα αποτελέσματα από τη δράση των β-αδρενεργικών αγωνιστών (77).

Άλλες μελέτες έχουν δείξει ότι η λεβοσιμεντάνη είτε δεν αυξάνει τα ενδοκυτταρικά επίπεδα ασβεστίου καθόλου, είτε δεν τα αυξάνει σε τέτοια επίπεδα ώστε να δικαιολογείται η θετική ινότροπη δράση της (81).

Είναι πιο πιθανό η λεβοσιμεντάνη να σχετίζεται με μέτρια αύξηση των επιπέδων ενδοκυτταρικού ασβεστίου το οποίο συμβάλλει εν μέρει στο θετικό ινότροπο αποτέλεσμα του φαρμάκου σε συνδυασμό με την ικανότητά του να βελτιώσει την ανταπόκριση στη συσπαστική ικανότητα του ασβεστίου.



Εικόνα 9: Η λεβοσιμεντάνη ως αγγειοδιασταλτικό. Σε μικρά αγγεία ανθεκτικότητας η λεβοσιμεντάνη διεγείρει τους διαύλους K^+ -ATPase, ενώ στα αγγεία αγωγιμότητας ενεργοποιεί τις αντλίες K^+ - Ca_2^+ και τους τασεοεξαρτώμενους διαύλους K^+ . Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την υπερπόλωση της μεμβράνης, εγκλοβίζοντας έτσι το ρεύμα του Ca_2^+ προς τα μέσα και ενισχύει την ανταλλαγή Νατρίου-Ασβεστίου μέσω της αντλίας Na^+ - Ca_2^+ . Αυτοί οι μηχανισμοί οδηγούν στη μείωση του ενδοκυτταρικού ασβεστίου οδηγώντας έτσι στη χάλαση (75).

Η έκταση στην οποία αυτή η αύξηση του ενδοκυτταρικού ασβεστίου μπορεί να εμφανίζει ανεπιθύμητες ενέργειες παραμένει ακόμα ασαφής (74).

4.2 ΦΑΡΜΑΚΟΚΙΝΗΤΙΚΗ ΚΑΙ ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟΣ

Η λεβοσιμεντάνη παρουσιάζει σημαντική βιοδιαθεσιμότητα, αλλά στην κλινική πρακτική έχει αναπτυχθεί μόνο για ενδοφλέβια εφαρμογή. Ο χρόνος ημιζωής της είναι περίπου μία ώρα ενώ η απομάκρυνση της υπολογίζεται σε περίπου 300mL/min (82). Μόνο ένα 4% του φαρμάκου παραμένει ελεύθερο στο πλάσμα καθώς πάνω από το 90% είναι συνδεδεμένο με την αλβουμίνη.

Η λεβοσιμεντάνη ακετυλιώνεται σε δύο βιολογικά δραστικούς μεταβολίτες, με πολύ μεγαλύτερους χρόνους ημιζωής. Περίπου το 40% των μεταβολιτών αυτών συνδέονται επίσης με την αλβουμίνη του πλάσματος. Φαρμακοκινητικές μελέτες έχουν δείξει ότι 24ωρη έγχυση λεβοσιμεντάνης επιτυγχάνει το μέγιστο 6nM ελεύθερης λεβοσιμεντάνης και 12nM ελεύθερων στο πλάσμα μεταβολιτών (83). Αυτές οι συγκεντρώσεις είναι μέγιστης σημασίας, καθώς οι φαρμακολογικές επιδράσεις αυτών των μορίων εξαρτώνται άμεσα από τις συγκεντρώσεις.

5. ΜΕΤΑΒΟΛΟΜΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΚΑΙ NMR

Το ταχέως αναπτυσσόμενο πεδίο της μεταβολομικής συνδυάζει στρατηγικές για τον εντοπισμό και την ποσοτικοποίηση των κυτταρικών μεταβολιτών χρησιμοποιώντας εξελιγμένες αναλυτικές μεθόδους σε συνδυασμό με την εφαρμογή στατιστικών και πολύ-παραμετρικών μεθόδων για την εξαγωγή πληροφορίας και την ερμηνεία των αποτελεσμάτων. Τις τελευταίες δύο δεκαετίες έγινε μεγάλη προσπάθεια ώστε να αναπτυχθούν αναλυτικές προσεγγίσεις για την ανάλυση των διαφορετικών κυτταρικών παραγόντων, όπως αυτά που προκύπτουν από την έκφραση γονιδίων, των πρωτεϊνών και των μεταβολιτών. Όλες αυτές οι προσεγγίσεις, οι λεγόμενες «omics», θεωρούνται σημαντικά εργαλεία για την κατανόηση της βιολογίας ενός οργανισμού και της απόκρισής του σε περιβαλλοντικά ερεθίσματα και τις γενετικές διαταραχές.⁶¹⁻⁶²

Οι μεταβολίτες θεωρείται ότι δρουν ως «γλώσσα» εκπέμποντας σήματα από το γενετικό υπόστρωμα στο περιβάλλον. Για το λόγο αυτό η μεταβολομική θεωρείται ότι παρέχει μια απευθείας εικόνα της φυσιολογικής και παθολογικής κατάστασης ενός οργανισμού (84).

Πληθώρα αναλυτικών τεχνολογιών έχουν αναπτυχθεί για την ανάλυση μεταβολιτών σε διαφορετικούς οργανισμούς, ιστούς ή υγρά.

Η φασματομετρία μάζας συζευγμένη με διαφορετικές τεχνικές χρωματογραφικού διαχωρισμού, όπως η υγρή ή αέρια χρωματογραφία και η φασματοσκοπία NMR, είναι τα κύρια εργαλεία για την ανάλυση μεγάλου αριθμού μεταβολιτών ταυτόχρονα.

Παρόλο που η τεχνολογία είναι εξαιρετικά εξελιγμένη και ευαίσθητη, εξακολουθούν να υπάρχουν λίγα αδύναμα σημεία στη μεταβολομική. Λόγω της τεράστιας ποικιλομορφίας των χημικών δομών και των μεγάλων διαφορών τους, δεν υπάρχει διαθέσιμη τεχνολογία για την ανάλυση ολόκληρου του μεταβολώματος. Συνεπώς, πρέπει να καθοριστούν ορισμένες συμπληρωματικές προσεγγίσεις για την εξαγωγή, ανίχνευση, ποσοτικοποίηση και αναγνώριση όσο το δυνατόν περισσότερων μεταβολιτών (85).

Μια άλλη πρόκληση στη μεταβολομική είναι να εξάγει την πληροφορία και να την ερμηνεύσει σε ένα βιολογικό πλαίσιο από το τεράστιο όγκο των δεδομένων που παράγονται από τις αναλύσεις υψηλής απόδοσης. Η εφαρμογή εξελιγμένων στατιστικών και πολυ-παραμετρικών μεθόδων ανάλυσης δεδομένων δεν ήταν μόνο μια συναρπαστική και απότομη διαδικασία μάθησης, αλλά απέδειξε επίσης ότι η σημερινή σκέψη πρέπει να αλλάξει και να ασχοληθεί με μεγάλα σύνολα δεδομένων και να διακρίνει μεταξύ του θορύβου και των πραγματικών πληροφοριών που σχετίζονται με το δείγμα (85).

Υπάρχουν τέσσερις εννοιολογικές προσεγγίσεις στη μεταβολομική: ανάλυση στόχων, προφίλ μεταβολίτη, μεταβολομική και μεταβολική αποτύπωση δακτυλικών αποτυπωμάτων. Η ανάλυση στόχου έχει εφαρμοστεί για πολλές δεκαετίες και περιλαμβάνει τον προσδιορισμό και την ποσοτικοποίηση ενός μικρού συνόλου γνωστών μεταβολιτών (στόχων) χρησιμοποιώντας μία συγκεκριμένη τεχνική ανάλυσης με τις καλύτερες επιδόσεις για τις ενώσεις που μας ενδιαφέρουν. Το μεταβολικό προφίλ, από την άλλη πλευρά, στοχεύει στην ανάλυση ενός μεγαλύτερου συνόλου ενώσεων, ταυτοποιημένων ή άγνωστων σε σχέση με τη χημική τους φύση. Αυτή η προσέγγιση έχει εφαρμοστεί σε πολλά διαφορετικά βιολογικά συστήματα που χρησιμοποιούν GC-MS, συμπεριλαμβανομένων φυτών, μικροβίων, ούρων και δειγμάτων πλάσματος.⁶⁶ Η μεταβολομική χρησιμοποιεί συμπληρωματικές αναλυτικές μεθοδολογίες, για παράδειγμα LC MS / MS, GC-MS ή / και NMR, προκειμένου να προσδιοριστούν και να ποσοτικοποιηθούν όσο το δυνατόν περισσότεροι μεταβολίτες, είτε ταυτοποιημένες είτε άγνωστες ενώσεις. Η τέταρτη εννοιολογική προσέγγιση είναι το μεταβολικό δακτυλικό αποτύπωμα (ή αποτύπωμα για εξωτερικούς και / ή εκκρινόμενους μεταβολίτες). Εδώ παράγεται ένα μεταβολικό προφίλ μάζας δείγματος και στη συνέχεια συγκρίνεται σε ένα μεγάλο δείγμα πληθυσμού για την εξέταση διαφορών μεταξύ των δειγμάτων. Όταν ανιχνεύονται σήματα που μπορούν να διακριθούν μεταξύ των δειγμάτων, οι μεταβολίτες αναγνωρίζονται και η βιολογική σημασία αυτής της ένωσης μπορεί να διασαφηνιστεί, μειώνοντας σημαντικά τον χρόνο ανάλυσης (86).

Η φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR) είναι μια τεχνική αναλυτικής χημείας που χρησιμοποιείται στον ποιοτικό έλεγχο και την έρευνα για τον

προσδιορισμό του περιεχομένου και της καθαρότητας ενός δείγματος καθώς και της μοριακής δομής του.

Χρησιμοποιώντας αυτή τη μέθοδο, αλλά και άλλες οργανικές μεθόδους, συμπεριλαμβανομένης της υπέρυθρης και της φασματομετρίας μάζας, οι επιστήμονες είναι σε θέση να προσδιορίσουν ολόκληρη τη δομή ενός μορίου. Παρακάτω θα επικεντρωθούμε στην φασματομετρία $^1\text{H-NMR}$ (μαγνητικό συντονισμό πρωτονίων). Ακόμη και αν υπάρχουν διάφορα είδη φασματομετρίας (C-NMR και N-NMR), το υδρογόνο (H-NMR) ήταν το πρώτο και το πιο κοινό άτομο που χρησιμοποιείται στη φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (87).

5.1 Η ΜΕΘΟΔΟΣ NMR ΩΣ ΑΝΑΛΥΤΙΚΗ ΜΕΘΟΔΟΣ ΜΕΤΑΒΟΛΟΜΙΚΗΣ

Η μεταβολομική αφορά τόσο τη στοχευμένη όσο και τη μη στοχευμένη ανάλυση των ενδογενών και των εξωγενών μικρών μορίων μεταβολιτών, και αποτελεί ένα πολλά υποσχόμενο εργαλείο για την ανακάλυψη βιοδεικτών.

Η μεταβολομική είναι ένα παγκόσμιο μεταβολικό προφίλ που χρησιμοποιεί αναλυτικά στοιχεία υψηλής ανάλυσης (τυπικά NMR και MS) μαζί με χημειομετρικά στατιστικά εργαλεία όπως η ανάλυση κύριων συστατικών (PCA) και τα μερικά ελάχιστα τετράγωνα (PLS), για να παράγουν μια ολοκληρωμένη εικόνα τόσο του ενδογενούς όσο και του ξеноβιοτικού μεταβολισμού. Τα μικρά μόρια, συμπεριλαμβανομένου των πεπτιδίων, αμινοξέων, νουκλεϊκών οξέων, υδαταναθράκων, οργανικών οξέων, βιταμινών, ανόργανων μορίων, δρουν ως μικροί βιοδείκτες που αντιπροσωπεύουν το λειτουργικό φαινότυπο στα κύτταρα, στους ιστούς ή στους οργανισμούς (88).

Ο διαχωρισμός και η ταυτοποίηση αυτών των μορίων είναι πλέον δυνατή με προηγμένες τεχνολογίες στη μεταβολομική. Οι τεχνολογίες αυτές, όπως αυτή του NMR, μπορούν να επιτύχουν την ανίχνευση των μεταβολιτών μέσα σε λίγα λεπτά. Η μέτρηση αυτών των μεταβολιτών χαμηλού μοριακού βάρους θα μπορούσε να προσφέρει βαθύτερες γνώσεις στους μηχανισμούς της επίδρασης του τρόπου ζωής και των διαιτητικών παραγόντων σε σχέση με συγκεκριμένες ασθένειες (87). Οι μεταβολίτες είναι βιολογικά χαρακτηριστικά τα οποία μετρούνται και αξιολογούνται ως δείκτες

φυσιολογικών βιολογικών και παθολογικών διεργασιών ή ως φαρμακολογικές αποκρίσεις σε μια θεραπευτική παρέμβαση που χρησιμοποιείται ευρέως στην κλινική πρακτική για κλινική διάγνωση (88,89).

Η μεταβολομική έχει εφαρμοστεί για τον καθορισμό μεταβολιτών που σχετίζονται με την πρόγνωση ή τη διάγνωση ασθενειών και θα μπορούσαν να παρέχουν μεγαλύτερη παθοφυσιολογική κατανόηση της νόσου. Αποτελεί ένα εργαλείο που χρησιμοποιείται για τη διερεύνηση των σύνθετων αλληλεπιδράσεων των μεταβολιτών με άλλους μεταβολίτες, αλλά και τον ρυθμιστικό ρόλο που παρέχουν οι μεταβολίτες μέσω αλληλεπίδρασης με γονίδια, μεταγραφές και πρωτεΐνες. Η εφαρμογή πρωτοποριακών αναλυτικών τεχνολογιών στη μέτρηση των μεταβολιτών και οι μεταβολές στις συγκεκριμένες μεταβολιτών υπό καθορισμένες συνθήκες βοήθησαν να διασαφηνιστούν οι επιδράσεις των διαταραχών σε διάφορες οδούς (90).

Η δοξορουβικίνη χρησιμοποιείται ευρέως για τη θεραπεία διαφόρων ειδών καρκίνου. Η μεταβολομική προσέγγιση με τη χρήση του Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού χρησιμοποιείται για τη διερεύνηση των μεταβολικών αλλαγών.

Η μεταβολομική είναι η πιο πρόσφατα αναπτυγμένη τεχνική «omics», μετά τη γονιδιωματική και την πρωτεωμική. Μελετά τόσο τη βιολογική δραστικότητα όσο και τη γονιδιακή ρύθμιση μέσω ανάλυσης ενδογενών μεταβολιτών που βρίσκονται τόσο σε βιολογικά υγρά όσο και σε ιστούς. Προσφέρει πλεονεκτήματα όπως η ανίχνευση υψηλής απόδοσης σε περιορισμένο χρόνο δειγματοληψίας και συνεπώς μπορεί να επιτρέψει τη διερεύνηση των αλλαγών τόσο στην βιολογική δραστικότητα όσο και στις επιδράσεις των φαρμάκων, που μπορεί να αντιπροσωπεύουν νέα μέσα για τη διερεύνηση της παθογένειας της προκαλούμενης από τη δοξορουβικίνη καρδομυοπάθειας (91).

5.2 ΜΕΤΑΒΟΛΟΜΙΚΗ ΚΑΙ ΚΑΡΔΙΑΚΕΣ ΠΑΘΗΣΕΙΣ

Δεδομένης της μεταβολικής βάσης πολλών καρδιακών παθήσεων, οι μεταβολικές αλλαγές θα μπορούσαν εύλογα να χρησιμοποιηθούν για την παρακολούθηση του κινδύνου, την κατανόηση των παθοφυσιολογικών μηχανισμών και την παρακολούθηση της θεραπείας.

Η μεταβολομική έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως τόσο σε in vitro όσο και σε in vivo μελέτες μεταβολικών καρδιαγγειακών νοσημάτων.

Σε πειράματα του εργαστηρίου μας έχουν ταυτοποιηθεί βιοδείκτες της DXR-επαγόμενης καρδιοτοξικότητας και έχει μελετηθεί η προστατευτική δράση που έχει μελετηθεί η προστατευτική δράση του φυσικού αντιοξειδωτικού ολεωρωπαΐνη (92).

Η εμπειρία έχει δείξει, ότι είναι απαραίτητο να εφαρμοστεί μια τεχνική που μπορεί να απεικονίσει σε σύντομο χρόνο και χωρίς μεγάλο κόστος ένα φάσμα πολλών διαφορετικών ιστών. Επιπλέον η μεταβολομική παρέχει τη δυνατότητα να απεικονίσει το μεταβολικό προφίλ των καρδιαγγειακών παθήσεων δημιουργώντας μοντέλα για την περιγραφή του γονότυπου (93).

ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Η καρδιοτοξικότητα αποτελεί γνωστή παρενέργεια πολλών κυτταροστατικών φαρμάκων και ειδικά των ανθρακυκλινών.

Όπως αναφέρθηκε προηγούμενα η δοξορουβικίνη ανήκει στην οικογένεια των κυτταροστατικών αντιβιοτικών και χρησιμοποιείται ως αντινεοπλασματικό φάρμακο. Ωστόσο η δράση της συνδέεται με την εκδήλωση καρδιοτοξικότητας, που μπορεί να οδηγήσει σε μη αναστρέψιμη καρδιακή ανεπάρκεια. Για την αντιμετώπιση της επαγόμενης ανεπάρκειας χορηγούνται φάρμακα όπως η λεβοσιμεντάνη η οποία αποτελεί ένα θετικά ινότροπο φάρμακο που χρησιμοποιείται στην κλινική πράξη.

Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η συμβολή στην μελέτη της δράσης της λεβοσιμεντάνης στην επαγόμενη από τη δοξορουβικίνη καρδιοτοξικότητα. Η καρδιακή ανεπάρκεια και ιδιαίτερα η επαγόμενη από την αντικαρκινική θεραπεία έχει προηγούμενα μελετηθεί στο εργαστήριο της Φαρμακολογίας του Τμήματος Φαρμακευτικής του ΕΚΠΑ τόσο σε επίπεδο μοριακών αναλύσεων όσο και σε επίπεδο ανάλυσης του μεταβολικού προφίλ.

Στα πλαίσια των συνεχιζόμενων μελετών στο αντικείμενο αυτό σχεδιάστηκε η μελέτη της επίδρασης της λεβοσιμεντάνης μετά από οξεία και χρόνια χορήγηση της δοξορουβικίνης. Η μελέτη πραγματοποιήθηκε σε πειραματόζωα τα οποία χωρίστηκαν σε τέσσερις ομάδες και συγκεκριμένα την ομάδα αναφοράς, την ομάδα στην οποία χορηγήθηκε δοξορουβικίνη και τις αντίστοιχες ομάδες στις οποίες συγχωρηγήθηκε δοξορουβικίνη και λεβοσιμεντανή σε οξύ και χρόνιο πείραμα.

Η παρούσα εργασία εξειδικεύεται στην μελέτη του μεταβολικού προφίλ των καρδιακών ιστών και αποτελεί ένα μέρος της συνολικής εικόνας για την επίδραση της λεβοσιμεντάνης. Η μεταβολομική ανάλυση η οποία παρουσιάζεται βασίστηκε στα φάσματα Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (NMR) των εκχυλισμάτων μυοκαρδίου και συνοδεύεται από πολυπαραμετρική στατιστική ανάλυση για την εξαγωγή των βασικών αλλαγών που υφίσταται ο μεταβολισμός λόγω της δοξορουβικίνης και της λεβοσιμεντάνης.

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. ΧΟΡΗΓΟΥΜΕΝΑ ΦΑΡΜΑΚΑ

Τα φάρμακα που χρησιμοποιήθηκαν για τους σκοπούς της μελέτης είναι τα κάτωθι:

A) Δοξορουβικίνη (Adriblastina® inj.sol 50mg/25ml, Pfizer Hellas)

B) Λεβοσιμεντάνη (Simdax® C/S inj.sol. 2.5mg/1ml, Orion Corporation)

Γ) Φυσιολογικός ορός 10mL/kg i.p

Δ) Κεταμίνη 100mg/kg ως αναισθητικό φάρμακο

2. ΠΕΙΡΑΜΑΤΟΖΩΑ

Για τους σκοπούς της μελέτης χρησιμοποιήθηκαν συνολικά τριάντα αρσενικοί Wistar επίμυες. Τα πειραματόζωα αυτά ελήφθησαν από το Ίδρυμα Ιατρολογικών Ερευνών της Ακαδημίας Αθηνών.

Στις εγκαταστάσεις του Ιδρύματος Ιατρολογικών Ερευνών 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. Όλα τα πειραματόζωα έλαβαν τη φροντίδα που απαιτείται με βάση τις Αρχές Εργαστηριακής Φροντίδας Ζώων.

3. ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

3.1 ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ

Για τους σκοπούς της μελέτης τα πειραματόζωα διαχωρίστηκαν σε τέσσερις διαφορετικές ομάδες.

A) Ομάδα Ελέγχου (Group A) : Χορήγηση Φυσιολογικού ορού 10mL/kg i.p σε συνολικό αριθμό 8 πειραματοζώων

Β) Ομάδα DXR+LEVOchr (Group B): Χορήγηση DXR συνολικής δόσης 18 mg/kg i.p ισομοιρασμένη σε 6 δόσεις και LEVO σε συνολική δόση 24 μg/kg 27 i.p ισομοιρασμένη σε 4 δόσεις σε συνολικά 7 πειραματόζωα.

Γ) Ομάδα DXR (Group C): Χορήγηση DXR συνολικής δόσης 18 mg/kg i.p ισομοιρασμένη σε 6 δόσεις σε συνολικό αριθμό 8 πειραματοζώων

Δ) Ομάδα DXR+LEVOac (Group E): Χορήγηση DXR συνολικής δόσης 18 mg/kg i.p ισομοιρασμένη σε 6 δόσεις και LEVO σε συνολική δόση 24 μg/kg 27 i.p άπαξ σε συνολικό αριθμό 7 πειραματοζώων.

Η συνολική διάρκεια της χορήγησης των φαρμάκων ήταν 14 ημέρες. Με το πέρας του διαστήματος αυτού, πραγματοποιήθηκε αφαίρεση του μυοκαρδίου του επίμυος.

Αρχικά πραγματοποιήθηκε ηχοκαρδιογράφημα με σκοπό τον έλεγχο της καρδιακής λειτουργίας. Στη συνέχεια χορηγήθηκε αναισθητικό φάρμακο κεταμίνη 100mg/kg και με τομή στη θωρακική κοιλότητα του επίμυος αφαιρέθηκε το μυοκάρδιο το οποίο τοποθετήθηκε απευθείας σε υγρό άζωτο για τη διατήρηση του ιστού.

Οι παγωμένοι ιστοί ομογενοποιήθηκαν και ακολούθησε εκχύλιση.

3.2 ΟΜΟΓΕΝΟΠΟΙΗΣΗ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ

Για την ομογενοποίηση χρησιμοποιήθηκαν τα παρακάτω υλικά:

1. Υγρό Άζωτο
2. Ξηρός Πάγος
3. Πορσελάνινο ιγδίο
4. Περιέκτες τύπου Eppendorfs

Κατά την ομογενοποίηση το δείγμα τοποθετήθηκε σε πορσελάνινο ιγδίο και καλύφθηκε απευθείας με υγρό άζωτο ώστε να μην αλλοιωθεί ο ιστός. Καθ' όλη τη διάρκεια της ομογενοποίησης το ιγδίο ήταν τοποθετημένο σε ξηρό πάγο. Στο τέλος της διαδικασίας ομογενοποίησης ο ιστός σε μορφή πούδρας τοποθετήθηκε σε τρία προζυγισμένα eppendorfs. Τα Eppendorfs ζυγίστηκαν και φυλάχθηκαν στους -80 °C μέχρι τη διαδικασία ης εκχύλισης.

Η ίδια διαδικασία πραγματοποιήθηκε για όλα τα δείγματα.

3.3 ΕΚΧΥΛΙΣΗ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ

Η διαδικασία εκχύλισης των δειγμάτων βασίστηκε στο πρωτόκολλο του KEUN.

Για την εκχύλιση πραγματοποιήθηκαν οι ακόλουθες διαδικασίες:

- Ένα 24ωρο πριν την εκχύλιση τοποθετήθηκαν 100mL MeOH και 100mL CHCl₃ στους -20 °C και ποσότητα HPLC-H₂O στους +4 °C.
- Έγινε μεταφορά των ιστών από τα eppendorfs σε falcons
- Στο falcon προστέθηκε ποσότητα CHCl₃/MeOH σε αναλογία 2:1
- Τα δείγματα τοποθετήθηκαν σε λουτρό υπερήχων για 1 min
- Στο falcon προστέθηκε ίση ποσότητα HPLC-H₂O
- Ακολούθησε ισχυρή ανάμιξη σε vortex για 1 min
- Παραμονή σε πάγο για 5 min
- Ακολούθησε φυγοκέντρηση για 20 min στις 10.000 στροφές
- Κατά την εκχύλιση απομονώθηκε και συλλέχθηκε η υδατική στιβάδα, η οποία τοποθετήθηκε σε γυάλινα φιαλίδια, ενώ η οργανική φάση απορρίφθηκε
- Στην εναπομένουσα ποσότητα δείγματος στο falcon προστέθηκε εκ νέου η ίδια ποσότητα των διαλυτών και ακολούθησε η προαναφερόμενη διαδικασία.

Η ίδια διαδικασία πραγματοποιήθηκε για όλα τα εξεταζόμενα δείγματα.

Παράλληλα κατασκευάστηκαν και τρία λευκά δείγματα.

Τα φιαλίδια με τη συνολική ποσότητα της υδατικής στιβάδας τοποθετήθηκαν σε Speed Vacuum Concentrator (GeneVac) και συμπυκνώθηκαν μέχρι ξηρού.

3.4 ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ NMR

Τα ξηρά υδατικά εκχυλίσματα ανασυστάθηκαν σε 680μL διαλύματος που αποτελείται από 10% ρυθμιστικό διάλυμα pH 7.4 (0.2 M Na₂HPO₄, 1 mM TSP, 3 mM NaN₃ και 100% D₂O) και 90% D₂O.

Στη συνέχεια μεταφέρθηκαν 550 μL σε ειδικό σωληνάριο NMR διαμέτρου 5mm.

4. ΦΑΣΜΑΤΑ NMR

4.1 ΛΗΨΗ ΦΑΣΜΑΤΩΝ NMR

Η λήψη των φασμάτων NMR έγινε σε φασματόμετρο Avance III 600 MHz της εταιρείας Bruker (Karlsruhe, Germany), εφοδιασμένο με αυτόματο δειγματολήπτη 60 θέσεων (Bruker Automatic Control Sampler, B-ACS 60) και ανιχνευτή διαμέτρου 5 mm με βαθμωτά πεδία στον άξονα του μαγνητικού πεδίου (z-gradients). Ο έλεγχος και η σταθεροποίηση της θερμοκρασίας στους 27 °C επιτεύχθηκε με την χρήση ειδικής μονάδας VT-3000 (Bruker Control Unit).

Η προετοιμασία λήψης των φασμάτων περιλαμβάνει τα εξής στάδια:

1. Έλεγχο της βαθμονόμησης της θερμοκρασίας με δείγμα δευτεριωμένης μεθανόλης που διατίθεται από τον κατασκευαστή.
2. Σε ένα από τα δείγματα της μελέτης επιτεύχθηκε η βέλτιστη ομοιογένεια του μαγνητικού πεδίου και προσδιορίστηκαν οι παράμετροι των φασμάτων. Οι παράμετροι αυτές αφορούν στον προσδιορισμό του χρόνου αποκατάστασης και τον απαραίτητο αριθμό επαναλήψεων (σαρώσεων) για τη μέγιστη δυνατή αξιοποίηση των πληροφοριών των φασμάτων.

Η λήψη των φασμάτων για το κάθε δείγμα περιελάμβανε την ακόλουθη διαδικασία:

1. Εισαγωγή του δείγματος στον μαγνήτη,
2. Παραμονή για χρόνο 5 min για την επίτευξη σταθερής θερμοκρασίας,
3. Προσδιορισμός παλμού 90°,
4. Λήψη των φασμάτων και
5. Μαθηματική επεξεργασία που πραγματοποιήθηκε από το πρόγραμμα ελέγχου του αυτόματου δειγματολήπτη ICONNMR σε συνεργασία με το πρόγραμμα TOPSPIN (v. 1.2, Bruker BioSpin GmbH) και περιελάμβανε μετασχηματισμό Fourier, διόρθωση φάσης, διόρθωση γραμμής βάσης, βαθμονόμηση του άξονα των χημικών μετατοπίσεων.

Για κάθε δείγμα ελήφθησαν: φάσμα πρωτονίου μίας διάστασης ($1D-H^1$ NOESY, παλμική αλληλουχία noesygrrr1D, βιβλιοθήκη Bruker) και δύο διαστάσεων (2D) J-resolved.

Οι παράμετροι των φασμάτων $1D-H^1$ NOESY ήταν οι ακόλουθες:

1. Ανάλυση (TD) 64k σημείων για φασματικό εύρος $SW=12335.5$ Hz (20.55 ppm),
2. 256 σαρώσεις, με χρόνο αποδιέγερσης (relaxation delay) $D1=10$ s, χρόνο συλλογής (acquisition time) $AQ=2.65$ s και χρόνο μίξης (mixing time) $D8=0.01$ s.
3. Σε όλα τα Σήματα Εξασθένισης Ελεύθερης Επαγωγής (Free Induction Decay, FID) πριν από το μετασχηματισμό Fourier εφαρμόστηκε ένας παραγοντικός συντελεστής διεύρυνσης των φασματικών γραμμών (line broadening) $LB=0.3$ Hz.

Τα φάσματα J-resolved ελήφθησαν με την παλμική αλληλουχία jresgrrrqr. Για κάθε φάσμα J-resolved πραγματοποιήθηκαν 2 επαναλήψεις, με ανάλυση 12288 σημείων σε φασματικό εύρος $SW=10000$ Hz. Ο χρόνος αποδιέγερσης ήταν $D1=1$ s και ο χρόνος συλλογής $AQ=0.61$ s.

Σε επιλεγμένα δείγματα πραγματοποιήθηκαν πειράματα δύο διαστάσεων (2D), ομοπυρηνικά $^1H-^1H$ COSY και TOCSY με κορεσμό της κορυφής του διαλύτη νερού, όπως και $^1H-^{13}C$ HSQC, για την επιβεβαίωση και απόκτηση επιπλέον πληροφοριών.

Το φάσμα COSY καταγράφηκε χρησιμοποιώντας κατάλληλη παλμική αλληλουχία εφαρμόζοντας βαθμωτό πεδίο σε σχήμα ημιτόνου (sine-shaped gradient pulse), με $TD=2048$ χρονικά σημεία και 256 FID στην δεύτερη διάσταση, ενώ $NS=4$ σαρώσεις χρησιμοποιήθηκαν για κάθε FID. Το φασματικό εύρος ήταν $SW=12019$ Hz, με περίοδο αποδιέγερσης $D1=4$ s και χρόνο συλλογής $AQ=0.08$ s.

Το φάσμα TOCSY ελήφθη με τη μέθοδο States-TPPI και παλμική αλληλουχία DIPSI2, με $TD=4096$ χρονικά σημεία και 256 FID στην δεύτερη διάσταση, ενώ $NS=16$ σαρώσεις χρησιμοποιήθηκαν για κάθε FID. Το φασματικό εύρος ήταν $SW=12019$ Hz, με περίοδο αποδιέγερσης $D1=4$ s και χρόνο συλλογής $AQ=0.17$ s.

Τέλος, το HSQC φάσμα καταγράφηκε με ευαισθησία φάσεως με την μέθοδο echo-antiecho-TPPI, με βαθμιδωτό πεδίο και επιλογή πολλαπλότητας και GARP αποσύζευξη άνθρακα. Το φασματικό εύρος ήταν SW=8417 Hz στην διάσταση F2 (^1H) και SW=27163 Hz στην F1 (^{13}C), με TD=1024 χρονικά σημεία και 256 FID στην δεύτερη διάσταση, ενώ NS=80 σαρώσεις χρησιμοποιήθηκαν για κάθε FID, με αδιαβατικό ανάστροφο παλμό και χρόνο αποδιέγερσης D1=1.5 s.

5. ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ NMR

Πριν από τη στατιστική ανάλυση και προκειμένου αυτή να καταστεί ευκολότερη, προηγήθηκε η επεξεργασία των δεδομένων του NMR μέσω κατάλληλου λογισμικού (AMIX, ver. 3.9.14).

Το λογισμικό Amix περιέχει μια συλλογή από ισχυρά εργαλεία που επιτρέπουν την αξιοποίηση των δεδομένων στο έπακρο. Παρέχει τη δυνατότητα για στατιστική και φασματοσκοπική ανάλυση και ενισχύει την έρευνα μικρών μορίων, όπως είναι η μεταβονομική.

Η φασματική περιοχή στην οποία ακολούθησε η στατιστική ανάλυση περιλαμβάνει την περιοχή από 0.84-9.40 ppm. Μέσα σε αυτά τα όρια αρχικά πραγματοποιήθηκε η αφαίρεση των παρακάτω κορυφών.

1. 4.70-4.90 ppm (οφείλεται στην κορυφή πρωτονίων του H_2O , το οποίο χρησιμοποιήθηκε ως διαλύτης)
2. 3.35-3.36 ppm (κορυφή σήματος πρωτονίων που ανήκει στο διαλύτη MeOH)
3. 2.83-2.86 ppm (άγνωστη επιμόλυνση που εμποδίζει τη στατιστική ανάλυση)
4. 2.68-2.79 ppm (κορυφή σήματος διαιθυλαμίνης και δορυφόροι)
5. 2.60-2.62 ppm (λόγω άγνωστης επιμόλυνσης)
6. 2.22-2.25 ppm (λόγω άγνωστης επιμόλυνσης)
7. 1.24-1.31 ppm (λόγω άγνωστης επιμόλυνσης)

Ο αποκλεισμός των παραπάνω περιοχών βασίστηκε στην παρατήρηση των φασμάτων με τη βοήθεια του προγράμματος TopSpin.

Τα φάσματα χωρίστηκαν σε περιοχές εύρους 0.02 ppm και υπολογίστηκε το ολοκλήρωμα των κορυφών συντονισμού που περιλαμβάνονται σε κάθε μία από αυτές μετατρέποντας έτσι τα φασματικά δεδομένα σε αριθμητικά. Στη συνέχεια έγινε κανονικοποίηση των δεδομένων με βάση τη συνολική ένταση του κάθε φάσματος (διαίρεση του ολοκληρώματος της κάθε περιοχής με το ολοκλήρωμα όλου του φάσματος) και το αρχείο που προέκυψε από την επεξεργασία χρησιμοποιήθηκε για τη στατιστική ανάλυση.

6. ΧΗΜΕΙΟΜΕΤΡΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ NMR

Προκειμένου να εξαχθούν πληροφορίες σχετικά με τις μεταβολές του μεταβολικού προφίλ μετά τη χορήγηση δοξορουβικίνης και μετά τη χορήγηση της λεβοσιμεντάνης και να εντοπιστούν οι μεταβολίτες που διαφοροποιούνται, πραγματοποιείται πολυπαραμετρική ανάλυση.

Στη μεταβιομική οι πιο συχνά χρησιμοποιούμενες τεχνικές αποτελούν:

1. Η Ανάλυση Κυρίων Συνιστωσών (PCA),
2. Προβολές Μερικών Ελαχίστων Τετραγώνων σε Λανθάνουσες Δομές (PLS-DA)
3. Η μέθοδος OPLS

6.1 ΑΝΑΛΥΣΗ ΚΥΡΙΩΝ ΣΥΝΙΣΤΩΣΩΝ (PCA)

Η ανάλυση κυρίων συνιστωσών είναι μία στατιστική διαδικασία η οποία μετατρέπει μία ομάδα τιμών (παρατηρήσεων) δυνητικά συσχετιζόμενων μεταβλητών σε μία ομάδα νέων τιμών μη γραμμικά συσχετιζόμενων μεταβλητών οι οποίες καλούνται κύριες συνιστώσες. Ο αριθμός των νέων μεταβλητών που προκύπτει είναι πολύ μικρότερος από τον αριθμό των αρχικών μεταβλητών. Η πρώτη συνιστώσα εξηγεί/περιγράφει τη μέγιστη δυνατή διακύμανση που υπάρχει μεταξύ των αρχικών μεταβλητών, η δεύτερη συνιστώσα, μη συσχετιζόμενη με την πρώτη, εξηγεί ένα σημαντικό μέρος της διακύμανσης, αλλά πάντα μικρότερο της πρώτης κοκ.⁷²

Το φάσμα NMR του εκχυλίσματος είναι μια παρατήρηση: ένας φορέας των μεταβλητών K , όπου κάθε φάσμα αντιπροσωπεύει ένα μεμονωμένο ιστό. Ολόκληρη η συλ-

λογή των παρατηρήσεων N σχηματίζει τον πίνακα των δεδομένων X . Η PCA προσδιορίζει έπειτα ένα συνδυασμό των μεταβλητών K ή των φασματικών χαρακτηριστικών που ορίζει το διαχωρισμό κλάσης.

6.2 ΠΡΟΒΟΛΕΣ ΜΕΡΙΚΩΝ ΕΛΑΧΙΣΤΩΝ ΤΕΤΡΑΓΩΝΩΝ ΣΕ ΛΑΝΘΑΝΟΥΣΕΣ ΔΟΜΕΣ (PLS-DA)

Αποτελεί επιβλεπόμενη μέθοδο ταξινόμησης. Το PLS-DA είναι μια τεχνική χημειομετρίας που χρησιμοποιείται για τη βελτιστοποίηση του διαχωρισμού μεταξύ διαφορετικών ομάδων δειγμάτων, η οποία επιτυγχάνεται συνδέοντας δύο μήτρες δεδομένων X και Y . Αυτή η προσέγγιση στοχεύει στη μεγιστοποίηση της συνδιακύμανσης μεταξύ των ανεξάρτητων μεταβλητών X και της αντίστοιχης εξαρτημένης μεταβλητής Y (τάξεις, ομάδες, δηλαδή οι στόχοι που κάποιος θέλει να προβλέψει) πολύ πολυδιάστατων δεδομένων με την εύρεση ενός γραμμικού υποσυνόλου των επεξηγηματικών μεταβλητών.

Αυτός ο νέος χώρος επιτρέπει την πρόβλεψη της μεταβλητής Y με βάση έναν μειωμένο αριθμό παραγόντων (συστατικά PLS ή αυτά που είναι επίσης γνωστά ως λανθάνουσες μεταβλητές). Αυτοί οι παράγοντες περιγράφουν τη συμπεριφορά των εξαρτημένων μεταβλητών Y και καλύπτουν το υποσέλιδο πάνω στο οποίο προβάλλονται οι ανεξάρτητες μεταβλητές X .

Αυτή η τεχνική παρέχει μια οπτική ερμηνεία σύνθετων συνόλων δεδομένων μέσω ενός γραφήματος χαμηλών διαστάσεων, εύκολα ερμηνεύσιμου αποτελέσματος, το οποίο απεικονίζει τον διαχωρισμό μεταξύ διαφορετικών ομάδων⁸⁵.

6.3 ΜΕΘΟΔΟΣ OPLS

Το OPLS (Orthogonal projections to latent structures) είναι μια μέθοδος παλινδρόμησης και πρόβλεψης

- Η παλινδρόμηση αφορά το πώς οι πληροφορίες διαφέρουν μεταξύ τους
- Πρόβλεψη: πόσο καλά υπολογίζονται οι γνωστές πληροφορίες

Η παλινδρόμηση συσχετίζει μία ή περισσότερες μεταβλητές X σε μία ή περισσότερες μεταβλητές Y .

Η μέθοδος OPLS βελτιώνει την ερμηνεία του μοντέλου,

- Διαχωρίζει την πληροφορία σε προβλέψιμη και μη συσχετιζόμενη.
- Βελτιώνει τη διαγνωστική ισχύ (score plot, loadings, s-plot).

Το πρώτο προβλέψιμο στοιχείο στην OPLS είναι μια γραμμή στον Χ χώρο με τη μέγιστη συν-διακύμανση και συσχέτιση μεταξύ Χ και Ψ μεταβλητών.

Τα πρόσθετα ορθογώνια στοιχεία είναι γραμμές στον Χ χώρο που δε σχετίζονται με το Ψ.

6.4 ΕΠΙΚΥΡΩΣΗ – ΈΛΕΓΧΟΣ

- R^2X : Κλάσμα του αθροίσματος των τετραγώνων (SS) όλων των μεταβλητών Χ που ερμηνεύεται από τη συγκεκριμένη κύρια συνιστώσα
- R^2X_{adj} : Κλάσμα της διακύμανσης όλων των μεταβλητών Χ που ερμηνεύεται από τη συγκεκριμένη κύρια συνιστώσα – κλάσμα προσαρμοσμένο ως προς τους βαθμούς ελευθερίας
- $R^2X(cum)$: Συνολικό SS όλων των μεταβλητών Χ που ερμηνεύεται από όλες τις κύριες συνιστώσες
- $R^2X_{adj}(cum)$: Η συνολική διακύμανση όλων των μεταβλητών Χ που ερμηνεύεται από όλες τις κύριες συνιστώσες- Συνολικό SS προσαρμοσμένο ως προς τους βαθμούς ελευθερίας
- Q^2 : Το κλάσμα της συνολικής διακύμανσης των Χ που μπορεί να προβλεφθεί σύμφωνα με τη διαδικασία cross-validation.
- Q^2_v : Το κλάσμα της διακύμανσης μιας μεταβλητής ΧΚ που μπορεί να προβλεφτεί σύμφωνα με τη διαδικασία cross-validation.
- $Q^2(cum)$: Το συνολικό Q^2 για όλες τις συνιστώσες.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

1. ΑΝΑΛΥΣΗ ΦΑΣΜΑΤΩΝ NMR

1.1 ΑΝΑΓΝΩΡΙΣΗ ΚΑΙ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΩΝ

Με τη βοήθεια του λογισμικού Chenomx NMR Suite 8.1 καθώς και με το TOPSPIN 3.5, έγινε η ταυτοποίηση 36 μεταβολιτών της υδατικής φάσης που απομονώθηκε κατά την εκχύλιση. Η ταυτοποίηση των μεταβολιτών επιβεβαιώθηκε από τα φάσματα *j-res*, σε περιοχές ισχυρής αλληλεπικάλυψης των κορυφών.

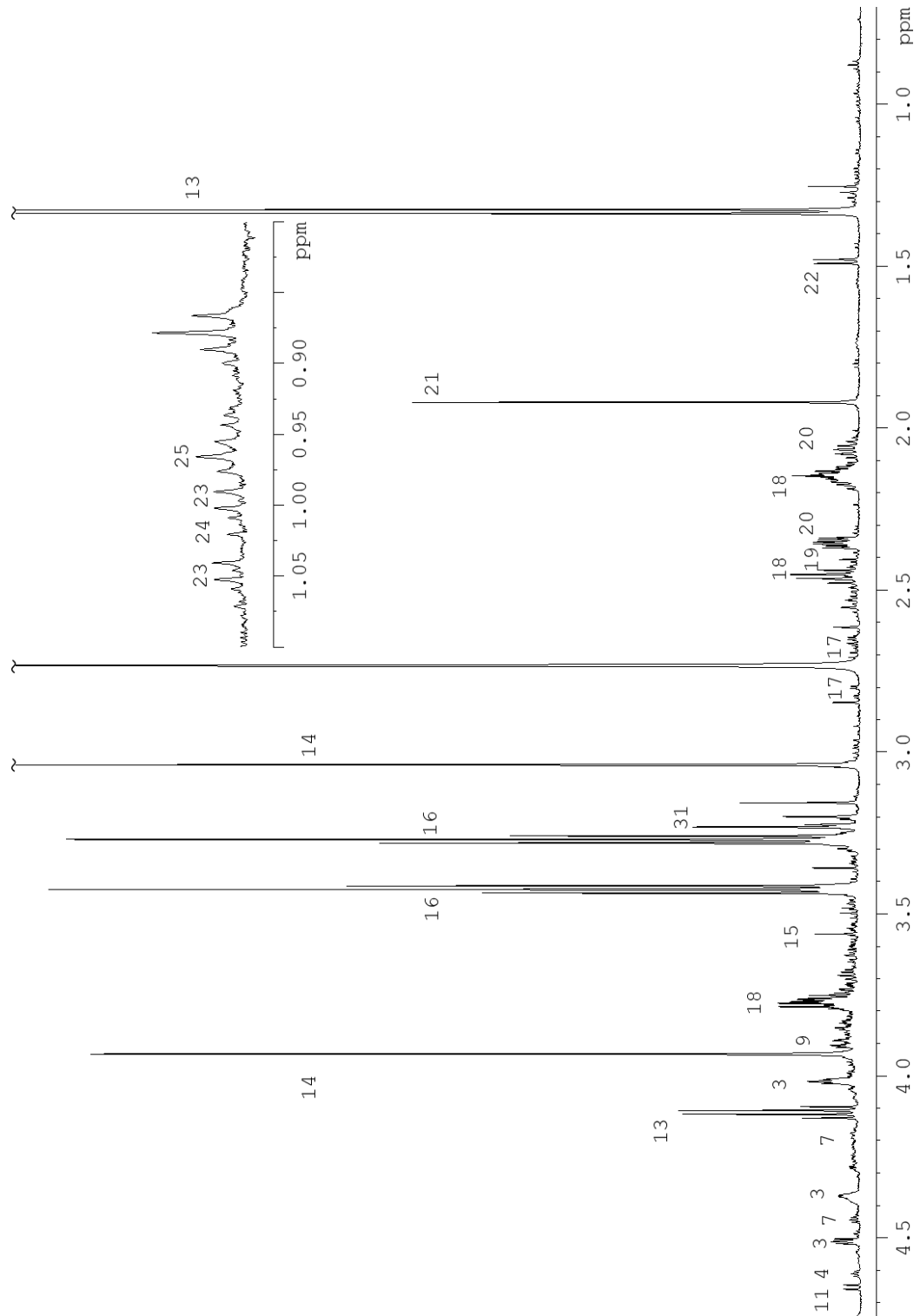
Πίνακας 1: Χημικές μετατοπίσεις και πολλαπλότητες κορυφών των ταυτοποιημένων μεταβολιτών

	Metabolites	$^1\text{H } \delta$	Multiplicity
1	NAD ⁺	9.35	s
		9.15	d
		8.84	d
		8.43	s
		8.18	s
		6.10	d
2	Niacinamide	6.04	d
		8.95	m
		8.72	dd
		8.25	m
3	Adenosine monophosphate	7.60	m
		8.61	s
		8.27	s
		6.15	d
		4.51	m
		4.37	m
		4.03	m
4	ADP	4.01	m
		8.54	s
		8.28	s
		6.15	d
5	ATP	4.61	t
6	Formic Acid	8.54	s
7	Inosine	8.46	s
		8.35	s
		8.24	s
		6.11	d
		4.44	dd
		4.28	m

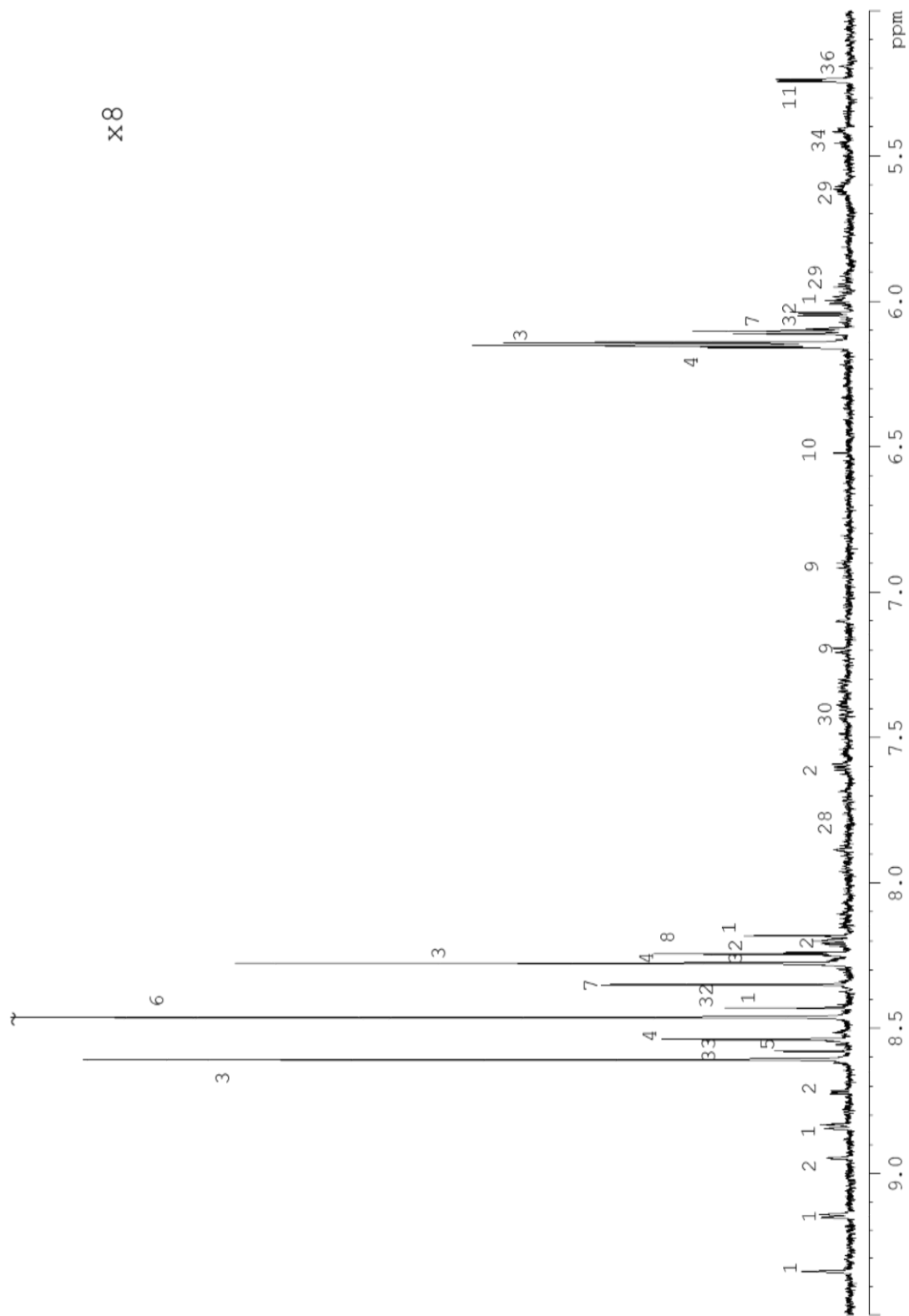
8	Oxypurinol	8.24	s
9	L-Tyrosine	7.19	dd
		6.90	dd
		3.93	q
		3.18	dq
		3.04	
10	Fumaric Acid	6.52	s
11	Glucose	5.24	d
		4.65	d
12	Glucose 6-Phosphate	5.24	d
		4.65	d
		3.99	m
		3.99	m
		3.57	m
13	L-Lactic Acid	4.11	m
		1.33	d
14	Creatine	3.93	s
		3.09	s
15	Glycine	3.56	s
16	Taurine	3.42	t
		3.27	t
17	L-Aspartic Acid	2.81	dd
		2.68	dd
18	L-Glutamine	3.77	t
		2.47	m
		2.44	m
		2.16	m
		2.13	m
19	Succinic Acid	2.41	s
20	L-Glutamic Acid	3.76	m
		2.77	m
		2.34	m
21	Acetic Acid	1.92	m
22	L-alanine	1.48	d
23	L-Valine	1.05	d
		0.99	d
24	L-Isoleucine	1.01	d
25	L-Leucine	0.96	d
		0.96	t
26	Malate	4.3	dd
		2.67	dd
27	Hypoxanthine	8.22	s
		8.18	s
28	Uracil	7.53	d
29	UDPs	5.99	dd

		5.62	m
30	Phenylalanine	7.43	m
		7.38	m
		7.34	d
31	L-Carnitine	4.56	μ
		3.42	μ
		3.40	μ
		3.23	s
		2.46	dd
		2.42	dd
32	Adenosine	8.35	s
		8.27	s
		6.09	d
		4.44	dd
		4.30	m
33	IMP	8.58	s
34	Glucose-1-Phosphate	5.46	m
35	Maltose	5.42	d
		5.41	d
		5.23	d
36	Mannose	5.19	m

1.2 ΑΠΟΔΟΣΗ ΚΟΡΥΦΩΝ ΣΤΟ ΦΑΣΜΑ NMR



Εικόνα 10: Περιοχή 4.99 -0.70 ppm φάσματος ¹H NMR μίας διάστασης δείγματος της ομάδας DXR+LEVOchr με την απόδοση κορυφών . 3: Adenosine monophosphate, 4: ADP,13: L-Lactic acid, 7: Inosine, 9: L-Tyrosine, 11: Glucose, 13:L-Lactic acid 14: Creatine, 15: Glycine, 16: Taurine, 17: L-Aspartic acid, 18: L-Glutamine, 19: Succinic acid, 20: L-Glutamic acid, 21: Acetic acid, 22: L-Alanine, 23: L-Valine, 24-Isoleucine, 25: L-Leucine, 31: L-Carnitine Η αρίθμηση είναι βάσει του Πίνακα 1.



Εικόνα 11: Περιοχή 9.50 -5.00 ppm φάσματος ^1H NMR μίας διάστασης δείγματος της ομάδας DXR+LEVOchr με την απόδοση κορυφών. 1: NAD⁺, 2: Niacinamide, 3: Adenosine monophosphate, 4: ADP, 5: ATP, 6: Formic acid, 7: Inosine, 8: Oxypurinol, 9: L-Tyrosine, 10: Fumaric acid, 11: Glucose, 12: Glucose-6-phosphate, 26: Malate, 27: Hypoxanthine, 28: Uracil, 29: UDPs, 30: Phenylalanine, 32: Adenosine, 33: IMP, 34: Glucose-1-Phosphate, 35: Maltose, 36: Mannose

2. ΠΟΛΥΠΑΡΑΜΕΤΡΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΩΝ ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΚΩΝ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ

Με τη βοήθεια του λογισμικού AMIX, τα φασματικά δεδομένα μετατράπηκαν αριθμητικά δεδομένα ώστε να είναι εφικτή η πολυπαραμετρική στατιστική ανάλυση. Η διαδικασία περιλαμβάνει την αφαίρεση από το σύνολο των φασμάτων περιοχών που δεν περιέχουν πληροφορίες για το υπό μελέτη σύστημα (Πειραματικό Μέρος, 5. Επεξεργασία Δεδομένων NMR, σελ. 29). Τέτοιες περιοχές περιλαμβάνουν υπολείμματα της κορυφής συντονισμού του διαλύτη και κορυφές που παρατηρούνται και στα λευκά δείγματα και προέρχονται από επιμολύνσεις των διαλυτών που χρησιμοποιήθηκαν κατά τη διαδικασία της εκχύλισης. Στη συνέχεια τα φάσματα χωρίζονται σε ισαπέχοντα τμήματα των 0.02 ppm και υπολογίζεται το ολοκλήρωμα των κορυφών της κάθε φασματικής περιοχής δημιουργώντας έτσι ένα σύνολο αριθμητικών δεδομένων τα οποία πλέον μπορούν να υποβληθούν σε στατιστική ανάλυση από το λογισμικό SIMCA P-11.5.

Πριν την πολυπαραμετρική ανάλυση απαιτείται προεπεξεργασία των δεδομένων προκειμένου να αντιμετωπιστούν προβλήματα διακύμανσης της συγκέντρωσης δειγμάτων που ανήκουν στην ίδια ομάδα, διαδικασία η οποία καλείται κανονικοποίηση. Η κανονικοποίηση ως προς τη συνολική ένταση του κάθε φάσματος αποτελεί συνήθως τακτική στα περισσότερα βιολογικά δείγματα.

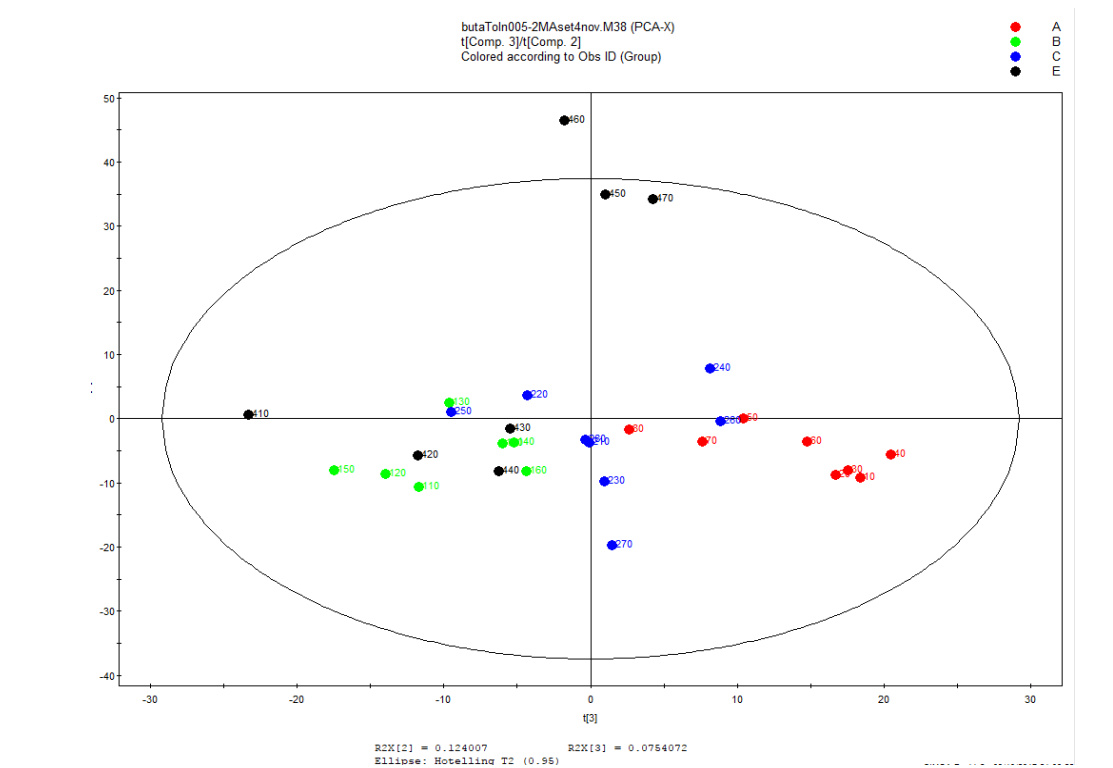
2.1 ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ PCA, PLS-DA ΜΕΤΑ ΑΠΟ ΚΑΝΟΝΙΚΟΠΟΙΗΣΗ ΒΑΣΙΖΟΜΕΝΗ ΣΤΗ ΣΥΝΟΛΙΚΗ ΕΝΤΑΣΗ

Η κανονικοποίηση της ολικής έντασης χρησιμοποιείται συχνά έτσι ώστε όλα τα φάσματα να αντιστοιχούν στην ίδια συνολική συγκέντρωση. Απλώς συνίσταται στην ομαλοποίηση της συνολικής έντασης κάθε μεμονωμένου φάσματος σε μια ίδια τιμή.

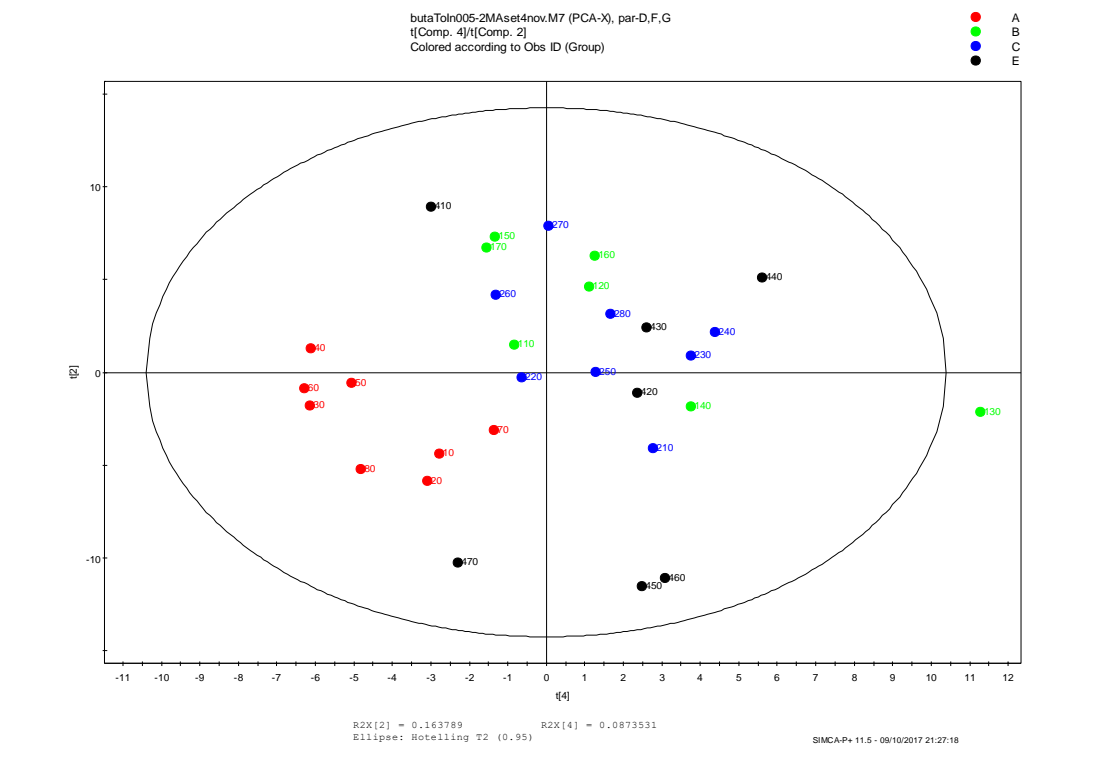
2.1.1 ΑΝΑΛΥΣΗ PCA ΜΕΤΑ ΑΠΟ ΚΑΝΟΝΙΚΟΠΟΙΗΣΗ ΒΑΣΙΖΟΜΕΝΗ ΣΤΗ ΣΥΝΟΛΙΚΗ ΕΝΤΑΣΗ

Τα δεδομένα υποβλήθηκαν σε ανάλυση κυρίων συνιστωσών, μη επιβλεπόμενη μέθοδος (PCA), και τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στις εικόνες 9 με κλιμάκωση UV και 10 με κλιμάκωση Pareto.. Στην περίπτωση της κλιμάκωσης UV, το μοντέλο που δημιουργήθηκε είχε 4 κύριες συνιστώσες με R^2X και Q^2 0.6 και 0.399 αντίστοιχα. Στην

κλιμάκωση Pareto, το μοντέλο περιγράφεται από 6 κύριες συνιστώσες με R^2X και Q^2 0.745 και 0,439 αντίστοιχα.



Εικόνα 12: Απεικόνιση ομάδων με τη μέθοδο PCA μετά από κλιμάκωση με UV



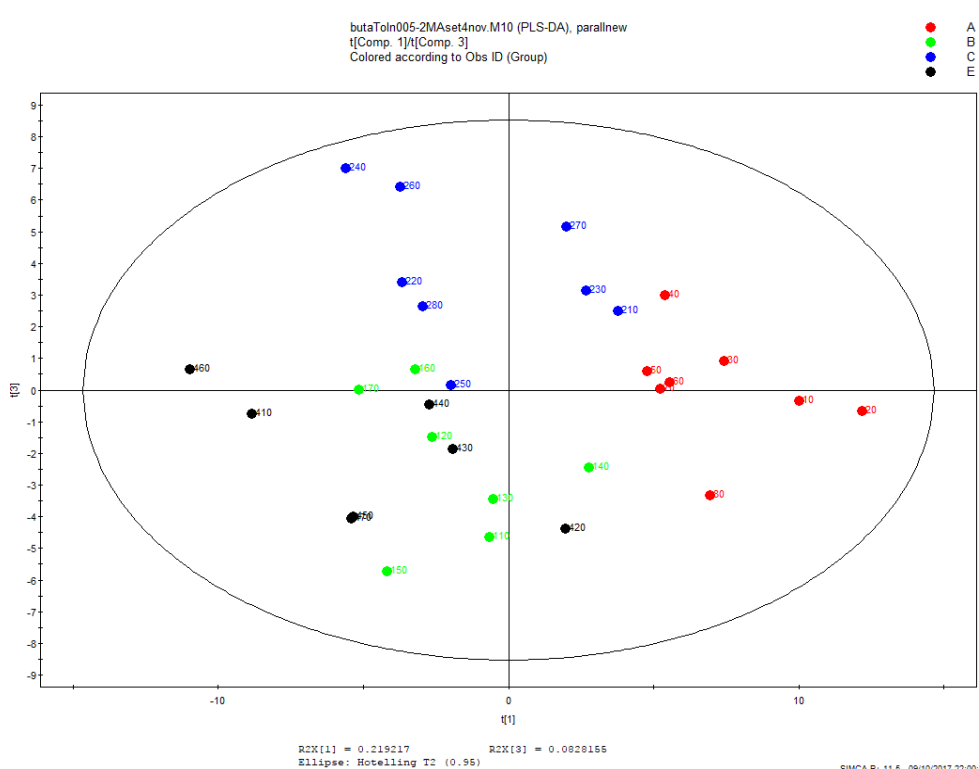
Εικόνα 13: Απεικόνιση των ομάδων με τη μέθοδο PCA μετά από κλιμάκωση Pareto

Από τις Εικόνες 9 και 10 δεν υπάρχει σαφής διαχωρισμός των ομάδων των δειγμάτων. Η ομάδα ελέγχου (Group-A) φαίνεται να παρουσιάζει κάποιου βαθμού ομαδοποίηση μόνο στην περίπτωση της κλιμάκωσης Pareto

Στην κλιμάκωση UV φαίνεται να υπάρχει διαφοροποίηση της ομάδας ελέγχου και της ομάδας; DXR-LEVOchr, ενώ στην κλιμάκωση pareto με τη χορήγηση της DXR διακρίνεται μετατόπιση του μεταβολικού προφίλ χωρίς όμως να υπάρχει σαφής ομαδοποίηση.

2.1.2 ΑΝΑΛΥΣΗ PLS-DA ΜΕΤΑ ΑΠΟ ΚΑΝΟΝΙΚΟΠΟΙΗΣΗ ΒΑΣΙΖΟΜΕΝΗ ΣΤΗ ΣΥΝΟΛΙΚΗ ΕΝΤΑΣΗ

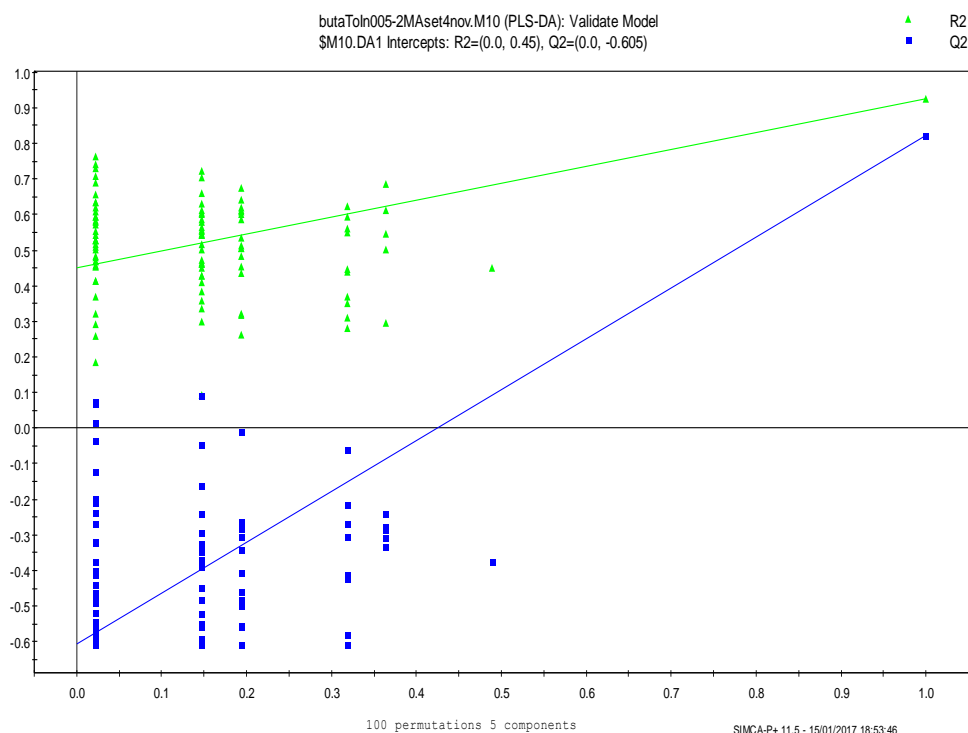
Στη συνέχεια χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος PLS-DA με σκοπό την επίτευξη καλύτερου διαχωρισμού των ομάδων



Εικόνα 14: Απεικόνιση των ομάδων με τη μέθοδο PLS-DA μετά από κλιμάκωση Pareto

Στην απεικόνιση αυτή στο σύνολο των μεταβλητών X, η R^2X είναι 0,639, η τιμή R^2Y είναι 0,738 και το κλάσμα της συνολικής διακύμανσης των X είναι Q^2 0.283. Στην παραπάνω εικόνα 11 οι ομάδες φαίνονται να ομαδοποιούνται και να ξεχωρίζουν καλύτερα σε σχέση με την μέθοδο PCA.

Στο παραπάνω μοντέλο (PLS-DA, κλιμάκωση Pareto), πραγματοποιήθηκε μεταθετικός έλεγχος με 100 τυχαίες μεταθέσεις, ώστε να αξιολογηθεί η προβλεπτική του ικανότητα. Από την εικόνα 12 φαίνεται ότι το μοντέλο είναι έγκυρο αφού $R^2=0.0$, 0.45 και $Q^2=0.0$, -0.605



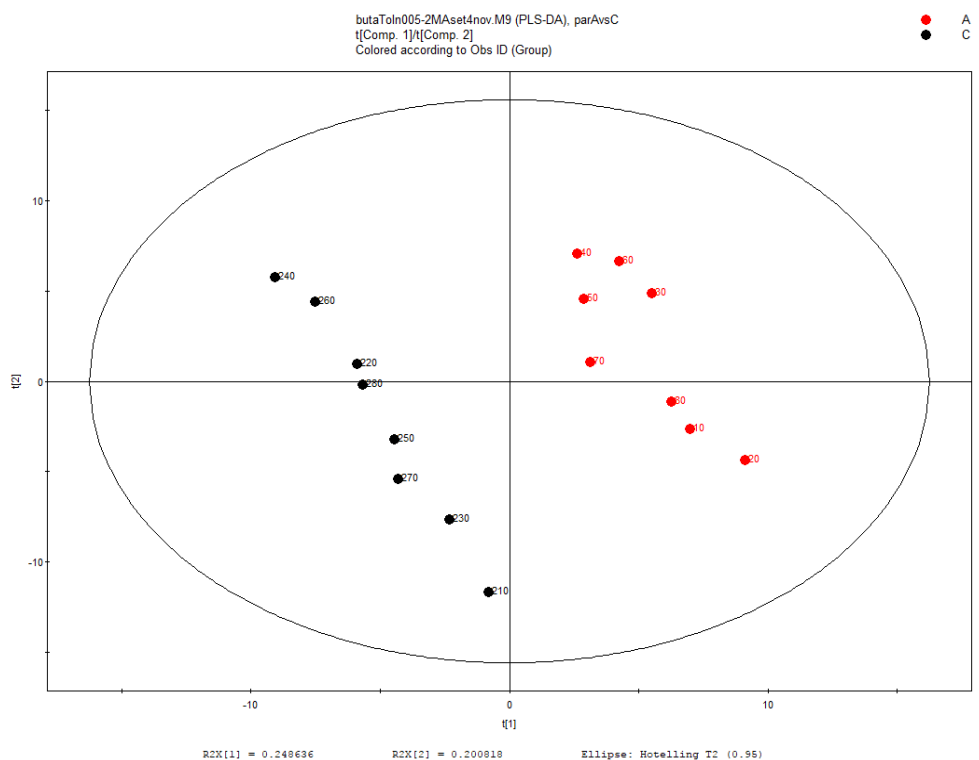
Εικόνα 15: Μεταθετικός Έλεγχος για το μοντέλο PLS-DA στην κλιμάκωση Pareto

2.1.2.1 ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΟΜΑΔΩΝ CONTROL ΚΑΙ DXR

Η απεικόνιση των ομάδων Control και DXR με τη μέθοδο PLS-DA, γίνεται με σκοπό να βρεθούν πιθανά δείγματα που απέχουν από το σύνολο (outliers).

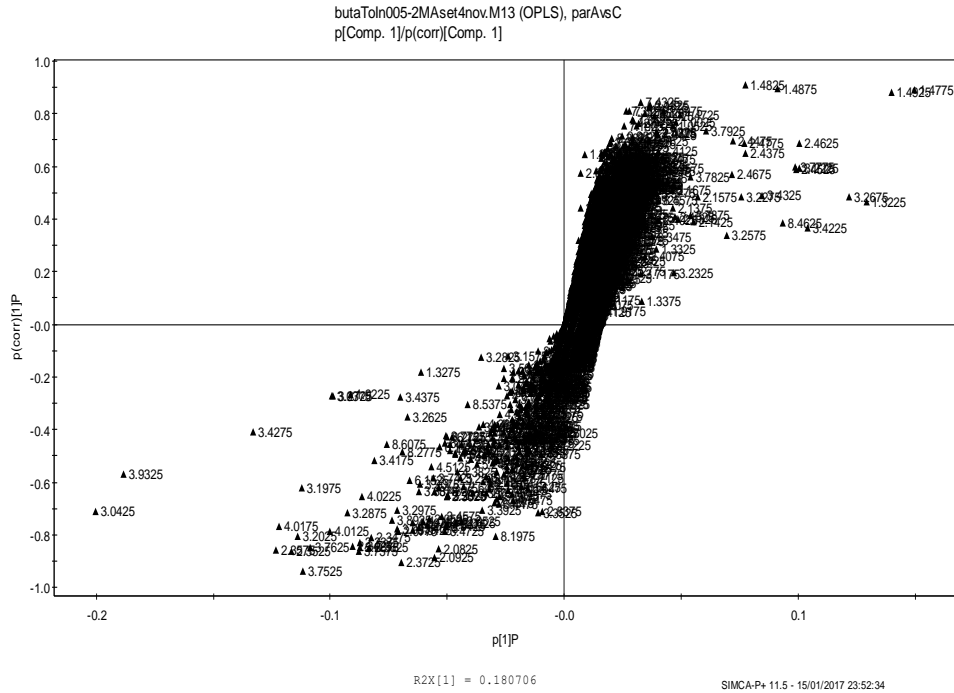
Οι μέθοδοι PLS-DA και OPLS χρησιμοποιήθηκαν για την καλύτερη διάκριση μεταξύ της ομάδας Control (group A) και DXR (group C).

Στα παρακάτω διαγράμματα φαίνεται η ομαδοποίηση των ομάδων Control και DXR με κλιμάκωση Pareto.



Εικόνα 16: Ομαδοποίηση ομάδας Control και DXR με κλιμάκωση Pareto (R^2X 0.449, R^2Y 0.976, Q^2 865)

Από το διάγραμμα S-Plot (διάγραμμα φορτίων ανά ζεύγη) φαίνονται οι χημικές μετατοπίσεις που διαφοροποιούν την ομάδα ελέγχου με την ομάδα της δοξορουβικίνης. Αντιστοιχώντας τις χημικές μετατοπίσεις μπορούμε να συμπεράνουμε ποιοι μεταβολίτες συντελούν στη διαφοροποίηση των δύο ομάδων.

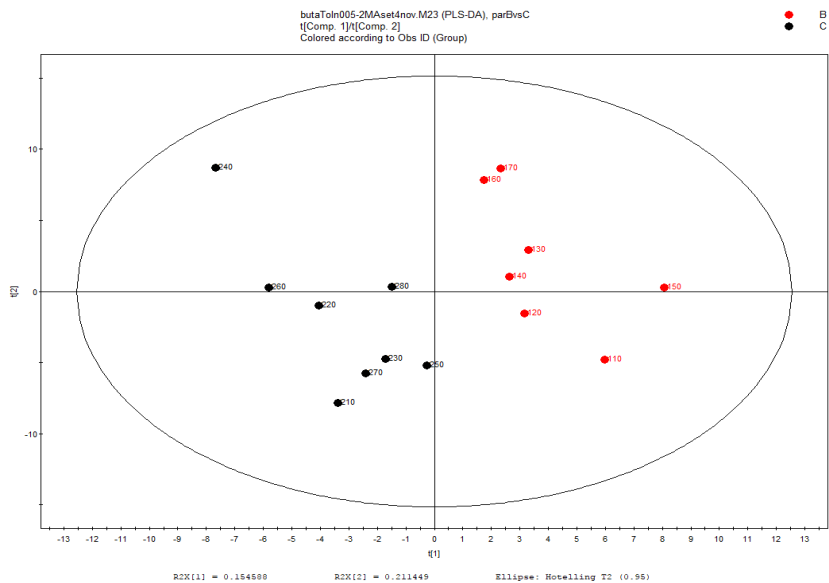


Εικόνα 17: Διάγραμμα S-PLOT μεταξύ των ομάδων Control και DXR

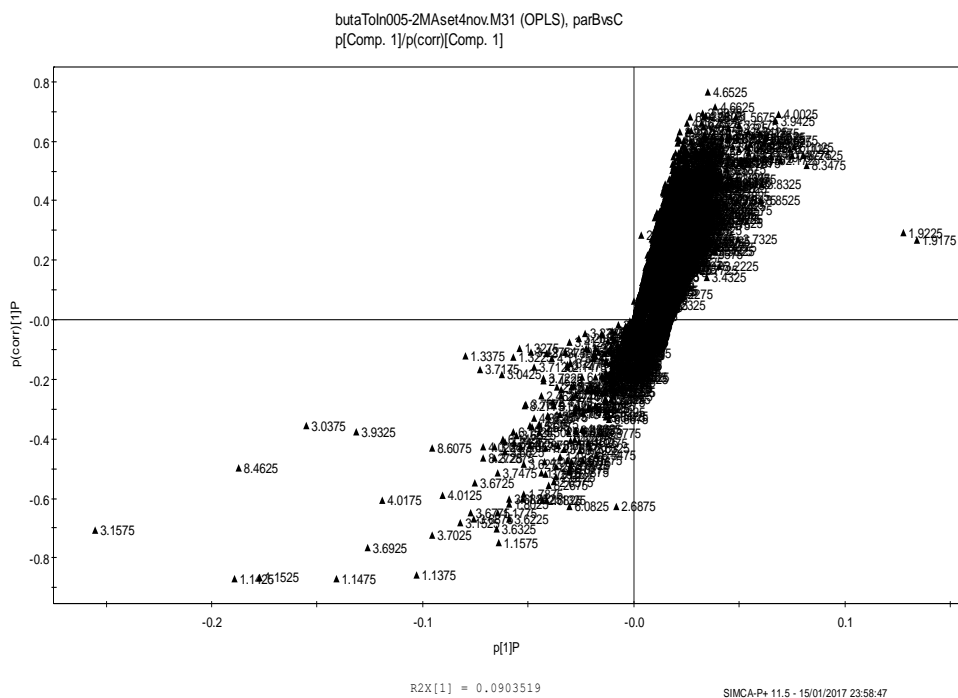
Στην ομάδα Control οι μεταβολίτες που προκαλούν τις διαφορές στις δύο ομάδες είναι: Κρεατίνη Ταυρίνη Ενώ στην ομάδα της DXR φαίνεται να αυξάνεται η Αλανίνη.

2.1.2.2 ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΟΜΑΔΩΝ DXR ΚΑΙ DXR-LEVOchr

Στα παρακάτω διαγράμματα φαίνεται η ομαδοποίηση των ομάδων DXR και DXR-LEVOchr με κλιμάκωση Pareto.



Εικόνα 18: Ομαδοποίηση ομάδας DXR και DXR-LEVOchr με κλιμάκωση Pareto (R^2X 0.366, R^2Y 0.877, Q^2 0.417)



Εικόνα 19: Διάγραμμα S-PLOT μεταξύ των ομάδων DXR και DXR-LEVOchr

Οι μεταβολίτες που προκαλούν τη διαφοροποίηση στην ομάδα του DXR-LEVOchr φαίνεται να είναι: το φορμικό οξύ και η κρεατίνη, ενώ στην ομάδα DXR το ακετόξυ οξύ.

2.1.2.3 ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΟΜΑΔΩΝ DXR ΚΑΙ DXR-LEVOac

Παρακάτω φαίνεται ο διαχωρισμός των ομάδων DXR και LEVOac με τη μέθοδο PLS-DA μετά από κλιμάκωση pareto.

Ενώ στην ομάδα DXR-LEVOac

1. Η κρεατίνη
2. Το γαλακτικό οξύ

Προκειμένου να γίνει πιο κατανοητός ο διαχωρισμός των τεσσάρων ομάδων και οι διαφορές μεταξύ των μεταβολιτών κατασκευάστηκε πίνακας z-score για τους μεταβολίτες που υπάρχουν στα δείγματα με βάση τους μεταβολίτες της ομάδας ελέγχου. Οι μεταβολίτες που εντοπίζονται σε μικρότερες συγκεντρώσεις σε σχέση με τις συγκεντρώσεις στην ομάδα ελέγχου, απεικονίζονται με αρνητικό αριθμό και μπλε χρώμα. Οι μεταβολίτες που βρίσκονται σε υψηλότερες συγκεντρώσεις εμφανίζονται με θετικό αριθμό και κόκκινο χρώμα.

Πίνακας 2: z-score των σχετικών μεταβολών ως προς την ομάδα ελέγχου που αφορούν στους ταυτοποιημένους μεταβολίτες. Οι τιμές προέκυψαν από την κανονικοποίηση με βάση την ολική ένταση

Metabolites	DXR	DXR+LEVOchr	DXR+LEVOac
L-Leucine	2.6	1.8	2.4
L-Isoleucine	2.0	1.4	1.3
L-Valine	3.7	2.8	2.6
L-Glutamine	2.0	2.6	2.9
L-Glutamic acid	-2.9	-3.3	-2.9
L- Aspartic acid	-0.1	-0.4	-1.3
Phenylalanine	2.3	0.5	0.4
L- Tyrosine	1.9	0.7	0.9
Glycine	-0.3	-0.5	-0.4
Creatine	-1.2	-0.8	-0.5
L-Alanine	2.7	2.1	2.3
Taurine	-0.2	0.0	-1.3
Maltose	0.7	-0.4	1.1
Mannose	1.2	0.0	2.5
Glucose ¹			
Glucose-1-phosphate	1.0	0.0	0.7
Glucose-6-phosphate ¹	2.6	-1.6	2.8
AMP	-1.0	-0.1	-2.3
ADP	-0.5	-0.4	-0.9
ATP	-0.5	-0.7	-0.7
IMP	-0.2	-0.3	0.5

UDPs ²	0.4	-0.6	2.0
Inosine	-0.2	1.0	-0.7
Adenosine			
Oxypurinol ¹	-0.8	-0.9	-2.7
NAD ⁺	0.2	-0.2	2.2
Niacinamide	-1.2	-1.6	4.0
Acetic acid	-0.2	-0.9	-0.6
Creatine	-1.2	-0.8	-0.5
L-Lactic acid	0.1	0.5	1.0
Succinic acid	0.9	0.9	2.4
Fumaric acid	0.8	1.8	2.1
Malate	0.1	0.5	0.5
Formic acid	0.9	2.2	1.6

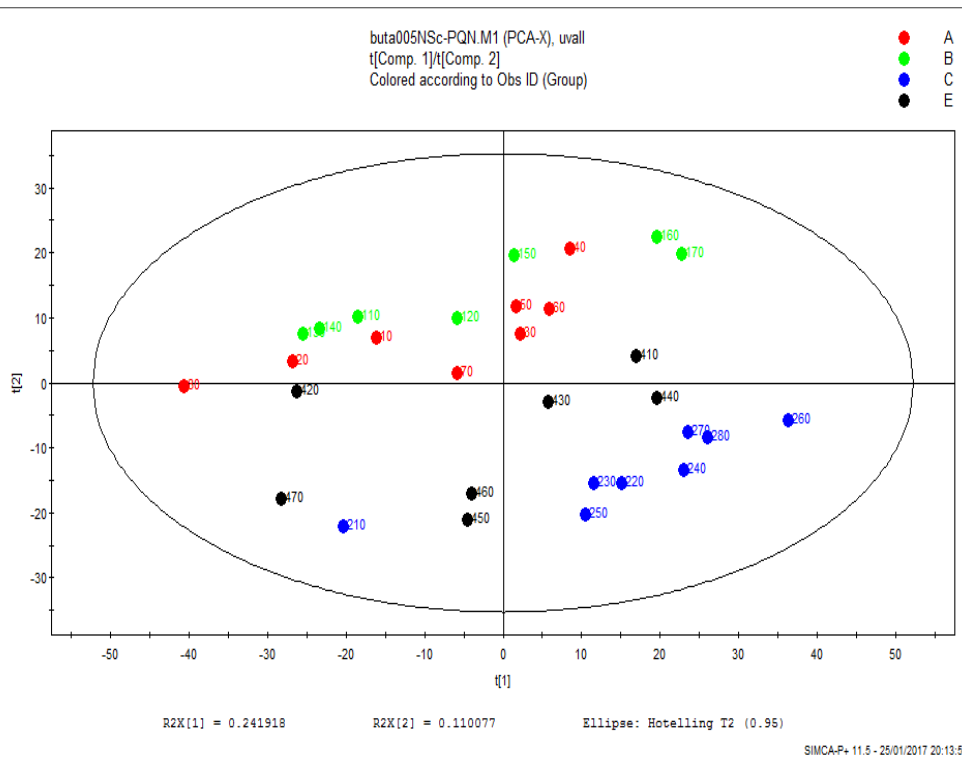
2.2 ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ PCA, PLS-DA ΜΕΤΑ ΑΠΟ ΚΑΝΟΝΙΚΟΠΟΙΗΣΗ PQN

Όπως παρατηρείται από τα μελέτη δεν παρατηρήθηκε καλός διαχωρισμός των ομάδων και εφαρμόστηκε μία επιπλέον μέθοδος κανονικοποίησης και πιο συγκεκριμένα η probabilistic quotient normalization (pqn). Η μέθοδος αυτή υποθέτει ότι οι βιολογικά ενδιαφέρουσες μεταβολές συγκέντρωσης επηρεάζουν μόνο τμήματα του φάσματος NMR, ενώ τα αποτελέσματα της αραιώσης θα επηρεάσουν όλα τα σήματα του μεταβολίτη. Η πιθανότητα κανονικοποίησης των συνόλων (PQN) αρχίζει με τον υπολογισμό ενός φάσματος αναφοράς που βασίζεται στο διάμεσο φάσμα. Στη συνέχεια, για κάθε μεταβλητή που ενδιαφέρει, υπολογίζεται το πηλίκο ενός δεδομένου φάσματος δοκιμής και του φάσματος αναφοράς και εκτιμάται ο μέσος όρος όλων των υπολοίπων. Τέλος, όλες οι μεταβλητές του φάσματος δοκιμής διαιρούνται με το μέσο πηλίκο.

2.2.1 ΑΝΑΛΥΣΗ PCA ΜΕΤΑ ΑΠΟ ΚΑΝΟΝΙΚΟΠΟΙΗΣΗ PQN

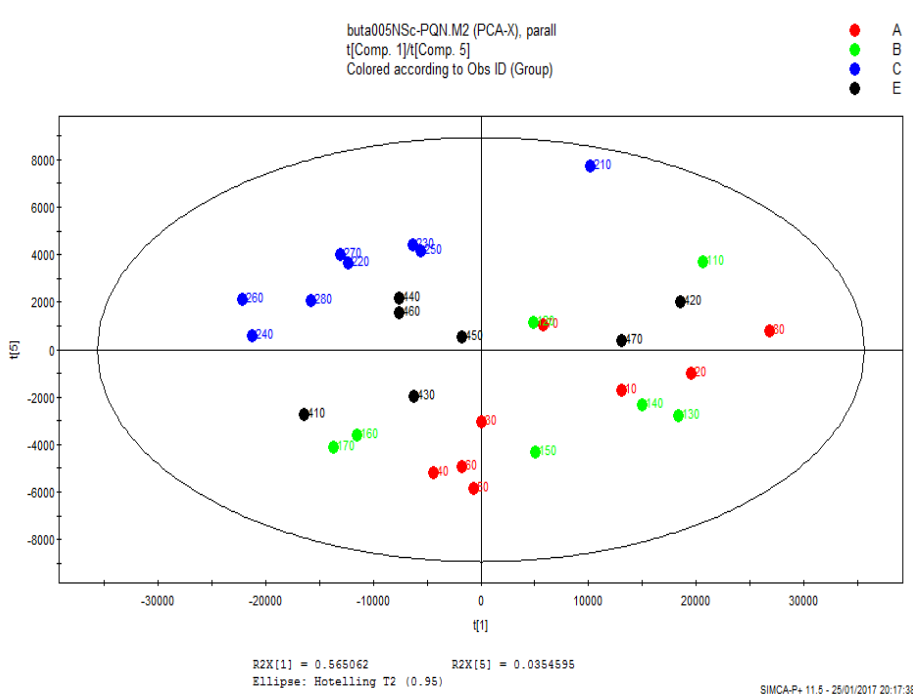
Η μη προβλεπόμενη στατιστική ανάλυση (PCA), πραγματοποιήθηκε και με τους δύο τρόπους κλιμάκωσης (UV & Pareto).

Για την απεικόνιση όλων των ομάδων του δείγματος στην κλιμάκωση UV, δημιουργήθηκαν 4 κύριες συνιστώσες με R^2X και Q^2 0,526 και 0,32 αντίστοιχα.



Εικόνα 22: Απεικόνιση ομάδων με τη μέθοδο PCA μετά από κλιμάκωση με UV

Ο διαχωρισμός όλων των ομάδων σε κλιμάκωση Pareto φαίνεται στην εικόνα 20. Για την καλύτερη απεικόνιση χρησιμοποιήθηκαν οι συνιστώσες t(1) και t(5) για τον Ψ και Χ άξονα αντίστοιχα. Το μοντέλο αυτό περιγράφει το σύνολο των δεδομένων σε ποσοστό R^2X 0,8319 με προβλεπτική ικανότητα Q^2 0.697.

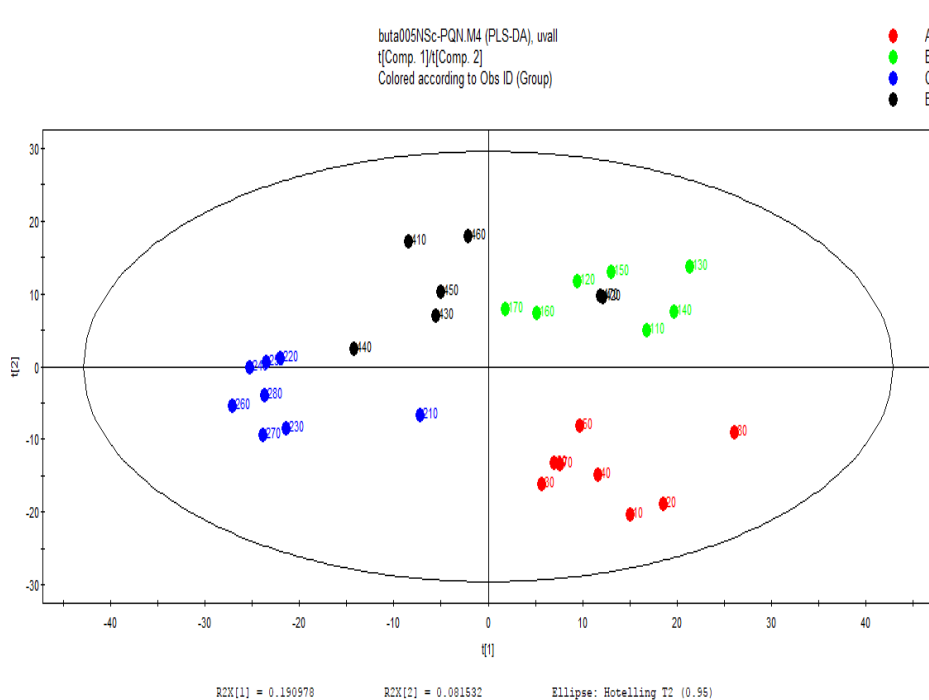


Εικόνα 23: Απεικόνιση ομάδων με τη μέθοδο PCA μετά από κλιμάκωση Pareto

Από την απεικόνιση των ομάδων τόσο μετά από κλιμάκωση UV όσο και μετά από κλιμάκωση Pareto ξεχωρίζει η ομάδα των επίμυων που έχουν λάβει δοξορουβικίνη, ενώ η ομάδα των επίμυων που έχει λάβει λεβοσιμεντάνη σε διαδοχικές δόσεις φαίνεται να έχει παρόμοια συμπεριφορά με την ομάδα ελέγχου (control).

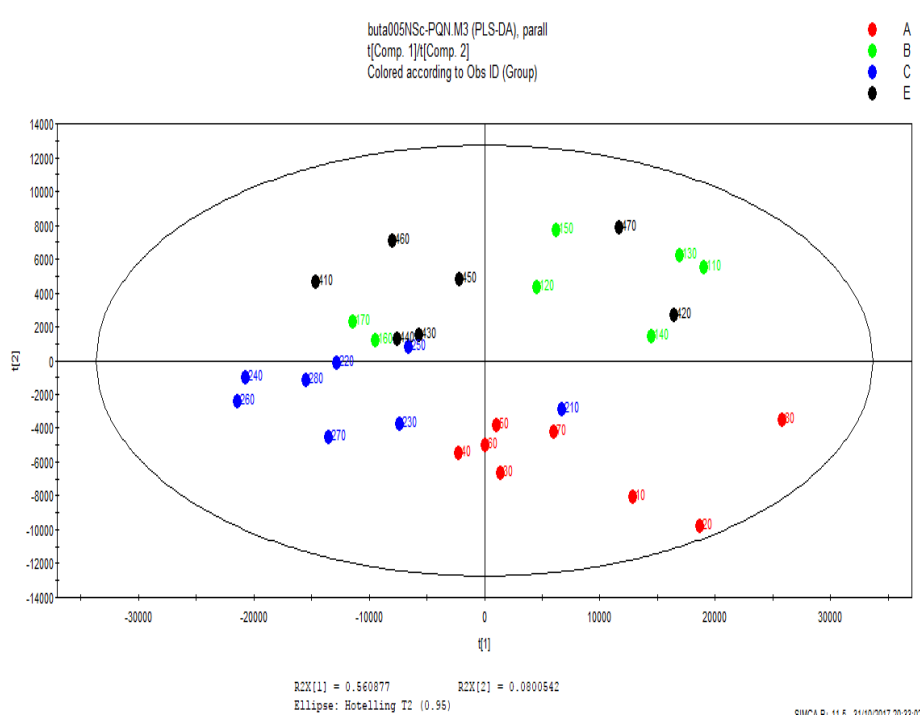
2.2.2 ΑΝΑΛΥΣΗ PLS-DA ΜΕΤΑ ΑΠΟ ΚΑΝΟΝΙΚΟΠΟΙΗΣΗ PQN

Η προβλεπόμενη στατιστική ανάλυση PLS-DA, πραγματοποιήθηκε επίσης σε κλιμάκωση UV και Pareto. Για την καλύτερη απεικόνιση και διάκριση των ομάδων στην κλιμάκωση UV χρησιμοποιήθηκαν οι συνιστώσες $t(1)$ και $t(2)$ για τον X και Y άξονα αντίστοιχα. Το μοντέλο περιγράφει το σύνολο των δεδομένων σε ποσοστό R^2X 0,594 και έχει προβλεπτική ικανότητα Q^2 0,785. Από το παρακάτω διάγραμμα φαίνεται ότι οι τα δείγματα της κάθε ομάδας ομαδοποιούνται. Η ομάδα της DXR (Group C) φαίνεται να εμφανίζει διαφορετική συμπεριφορά από την ομάδα ελέγχου (Group A) ενώ με την προσθήκη λεβοσιμεντάνης (Group B, E) υπάρχει μετατοπισμός στο μεταβολικό προφίλ, χωρίς όμως να πλησιάζει τη συμπεριφορά της ομάδας ελέγχου.



Εικόνα 24: Απεικόνιση ομάδων με τη μέθοδο PLS-DA μετά από κλιμάκωση UV

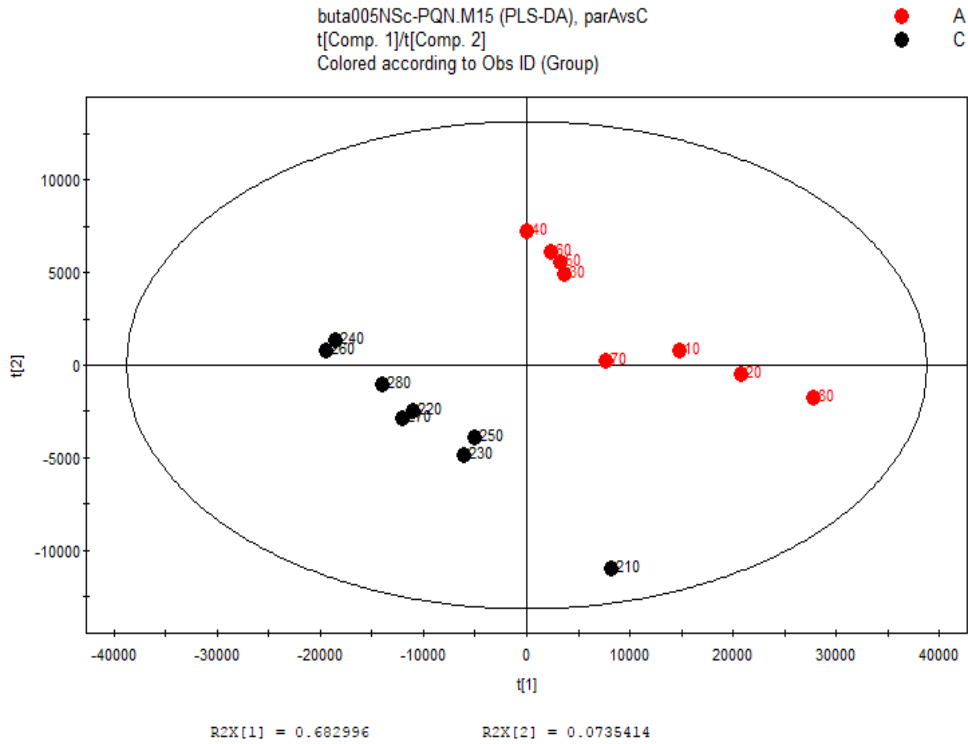
Παρόμοια εικόνα φαίνεται να έχουμε και στην κλιμάκωση Pareto (Εικόνα 22). Το μοντέλο αυτό περιγράφει το σύνολο των δεδομένων σε ποσοστό R^2X 0,775 με προβλεπτική ικανότητα Q^2 0,531 και για πιο ευκρινή απεικόνιση των ομάδων χρησιμοποιήθηκαν οι συνιστώσες $t(1)$ και $t(2)$ για τον Χ και Ψ άξονα αντίστοιχα.



Εικόνα 25: Απεικόνιση ομάδων με τη μέθοδο PLS-DA μετά από κλιμάκωση Pareto

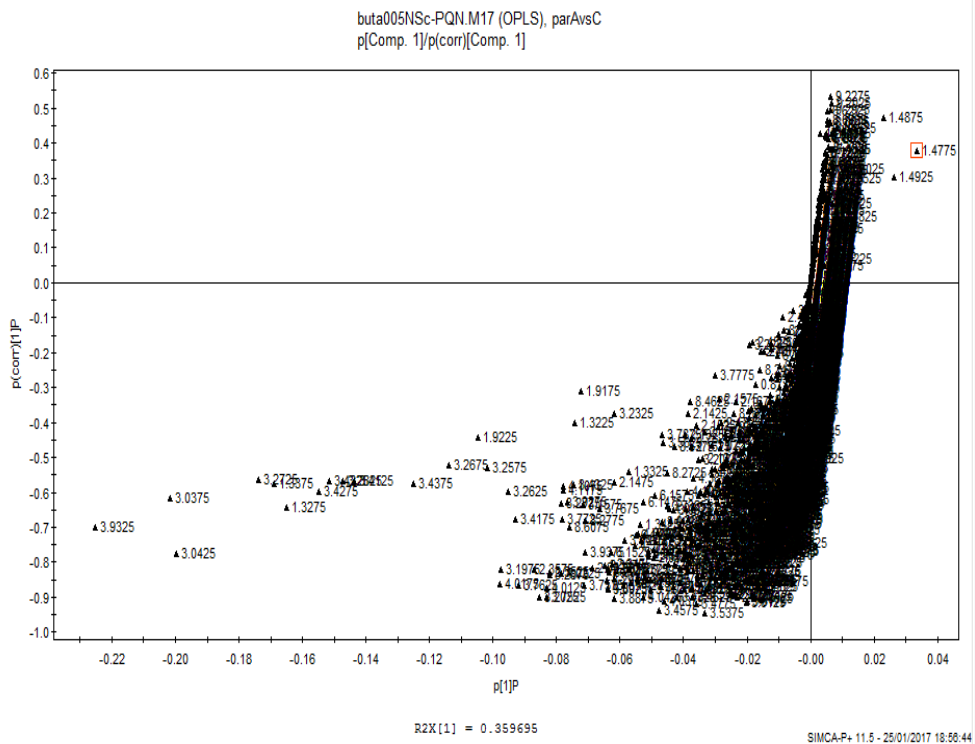
2.2.2.1 ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΟΜΑΔΩΝ CONTROL (group A) και DXR (group C)

Στα παρακάτω διάγραμμα φαίνεται η ομαδοποίηση των ομάδων Control και DXR με τη μέθοδο PLS-DA μετά από κλιμάκωση Pareto.



Εικόνα 26: Ομαδοποίηση ομάδας Control και DXR με κλιμάκωση Pareto (R^2X 0.797, R^2Y 0.97, Q^2 0.91)

Από το διάγραμμα S-Plot φαίνονται οι χημικές μετατοπίσεις που διαφοροποιούν την ομάδα ελέγχου με την ομάδα της δοξορουβικίνης.



Εικόνα 27: Διάγραμμα S-PLOT μεταξύ των ομάδων Control και DXR

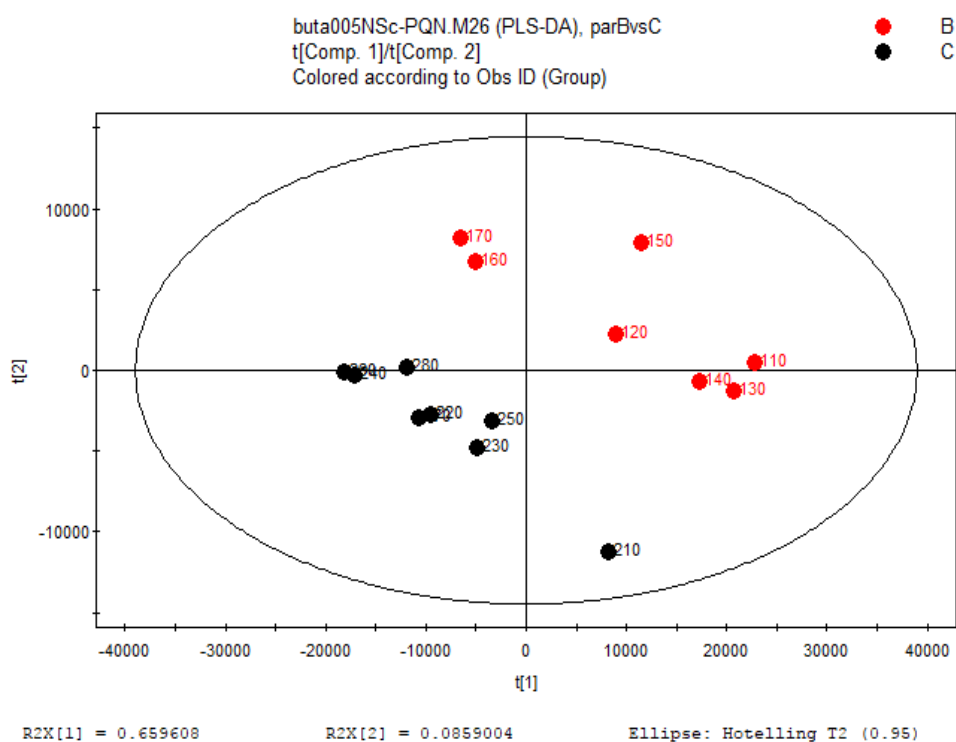
Βάσει της στατιστικής ανάλυσης η ομάδα Control χαρακτηρίζεται από υψηλή συγκέντρωση των μεταβολιτών:

1. Κρεατίνη,
2. Ταυρίνη,
3. Γαλακτικό Οξύ και
4. Ακετόξυ οξύ

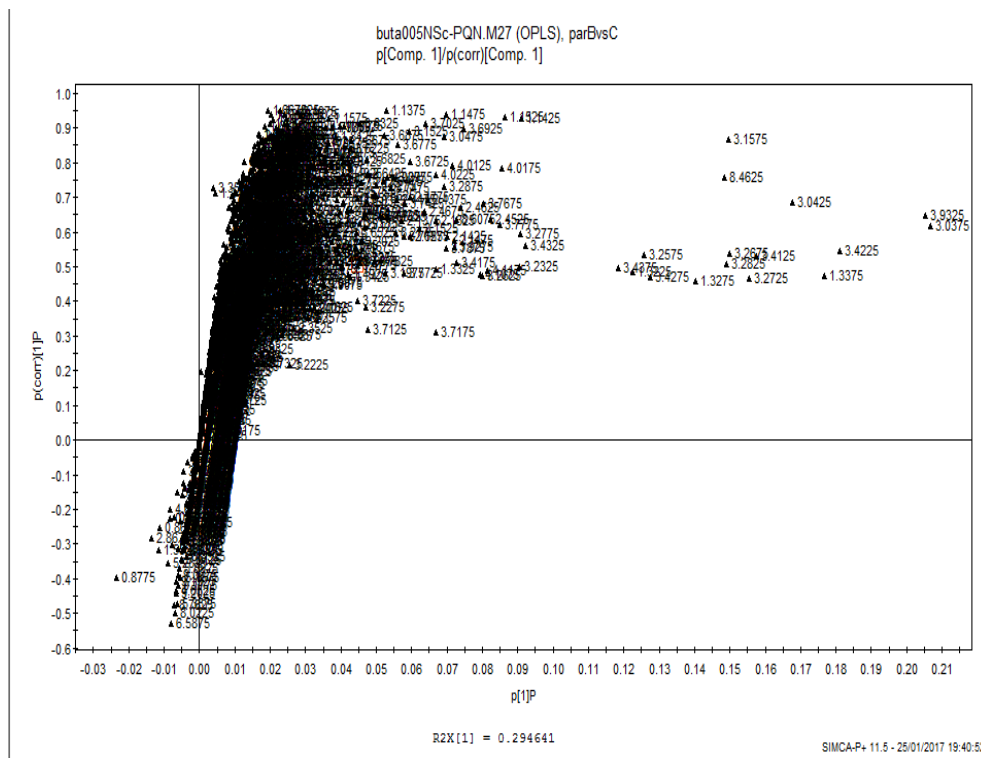
Στην ομάδα DXR φαίνεται ότι μόνο η Αλανίνη έχει υψηλότερη συγκέντρωση σε σχέση με την ομάδα ελέγχου.

2.2.2.2 ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΟΜΑΔΩΝ DXR ΚΑΙ DXR+LEVOchr

Ο διαχωρισμός απεικονίζεται μετά από κλιμάκωση Pareto.



Εικόνα 28: Ομαδοποίηση ομάδας DXR και DXR+LEVOchr με κλιμάκωση Pareto (R^2X 0.86, R^2Y 0.989, Q^2 0.947)



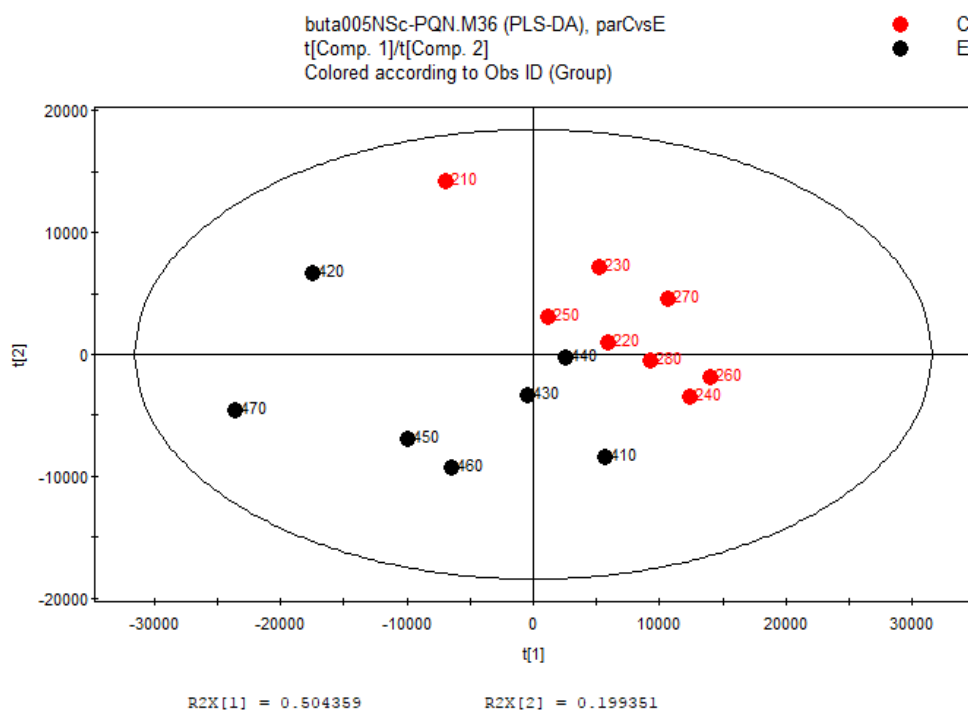
Εικόνα 29: Διάγραμμα S-Plot μεταξύ των ομάδων DXR+LEVOchr και DXR

Από το διάγραμμα S-Plot φαίνονται οι χημικές μετατοπίσεις που διαφοροποιούν την ομάδα της DXR με την ομάδα της DXR+LEVOchr.

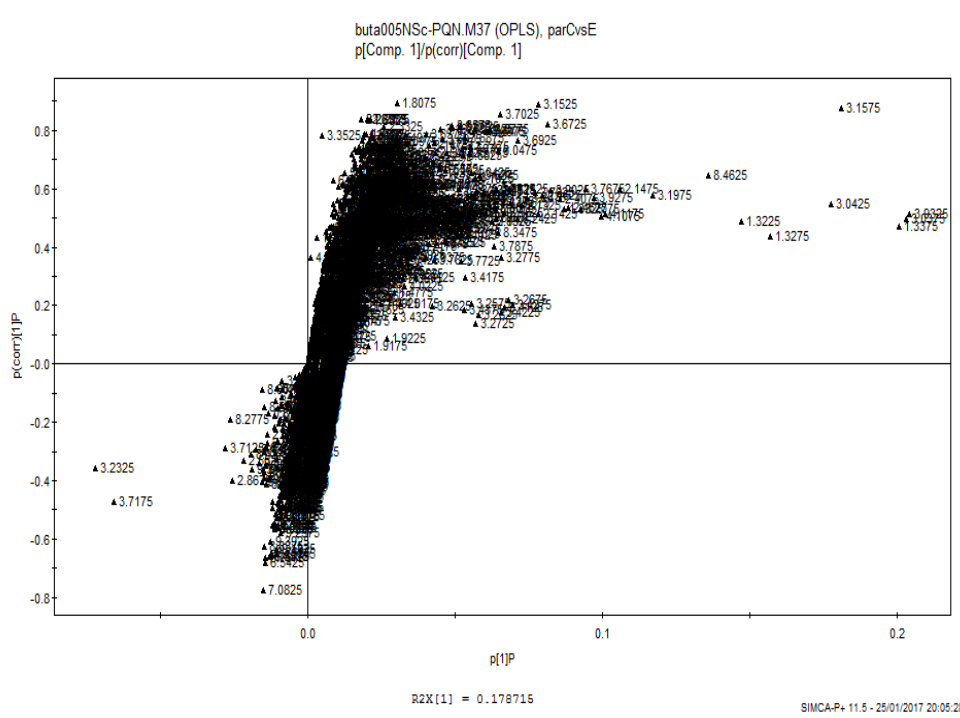
Οι μεταβολίτες που χαρακτηρίζουν την ομάδα DXR+LEVOchr και έχουν υψηλότερη συγκέντρωση σε σύγκριση με την ομάδα μονοχορήγησης DXR είναι οι παρακάτω:

1. Κρεατίνη,
2. Φορμικό Οξύ,
3. Ταυρίνη
4. Γαλακτικό Οξύ

2.2.2.3 ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΟΜΑΔΩΝ DXR ΚΑΙ DXR+LEVOac



Εικόνα 30: Ομαδοποίηση ομάδας DXR και DXR+LEVOac με κλιμάκωση Pareto (R^2X 0.791, R^2Y 0.919, Q^2 0.775)



Εικόνα 31: Διάγραμμα S-PLOT μεταξύ των ομάδων DXR+LEVOac και DXR

Στην ομάδα DXR φαίνεται να αυξάνεται η L-καρνιτίνη

Στην ομάδα DXR+LEVOac αυξάνονται οι: Κρεατίνη Φορμικό Οξύ και Γαλακτικό Οξύ

Στη συνέχεια απεικονίζονται οι διαφορές των μεταβολιτών στις ομάδες του δείγματος σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου μετά από κανονικοποίηση ρηη.

Πίνακας 3: z-score των σχετικών μεταβολών ως προς την ομάδα ελέγχου που αφορούν στους ταυτοποιημένους μεταβολίτες. Οι τιμές προέκυψαν από την κανονικοποίηση ρηη

Metabolites	DXR	DXR+LEVOchr	DXR+LEVOac
L-Leucine	-0.2	1.3	0.6
L-Isoleucine	-0.1	2.0	0.5
L-Valine	0.7	2.6	1.1
L-Glutamine	-0.5	1.8	1.0
L-Glutamic acid	-3.5	-2.5	-2.8
L- Aspartic acid	-2.1	-0.5	-2.6
Phenylalanine	0.4	1.0	-0.8
L- Tyrosine	-1.1	0.7	-0.4
Glycine	-0.8	-0.5	-0.6
Creatine	-1.9	-0.3	-0.9
L-Alanine	0.6	1.8	1.2
Taurine	-1.9	0.1	-1.3
Maltose	-1.2	-0.6	0.6
Mannose	-0.9	-0.1	1.9
Glucose ¹	-2.6	-2.8	-0.9
Glucose-1-phosphate	0.0	0.1	0.4
Glucose-6-phosphate ¹	-2.3	-0.7	-0.3
AMP	-2.2	-0.1	-2.8
ADP	-0.8	-0.3	-0.9
ATP	-0.9	-0.6	-0.9
IMP	-0.6	-0.3	0.3
UDPs ²	-0.8	-0.5	1.8
Inosine	-0.6	0.9	-0.8
Adenosine			
Oxypurinol ¹	-1.7	-0.7	-2.6
NAD+	-1.1	-0.2	1.3
Niacinamide	-3.5	-1.8	2.8
Acetic acid	-0.8	-0.7	-0.7
Creatine	-2.1	-0.4	-1.0
L-Lactic acid	-1.7	0.4	-0.2

Succinic acid	-0.3	0.8	1.6
Fumaric acid	-0.2	1.3	1.3
Malate	-1.0	0.3	-0.2
Formic acid	-0.5	2.9	1.2

Από τον Πίνακα των z-scores παρατηρείται ότι στην ομάδα της DXR παρουσιάζονται μειωμένοι σε σχέση με την ομάδα ελέγχου τα αμινοξέα γλουταμικό και ασπαρτικό οξύ, η κρεατίνη, κρεατινίνη, ταυρίνη, η γλυκόζη και η 6-φωσφορική γλυκόζη, καθώς και η οξυπυρινόλη, το νικοτιναμίδιο το AMP και το γαλακτικό οξύ. Η συγχορήγηση λεβοσιμεντάνης προκαλεί μικρή αύξηση του γαλακτικού οξέος σε σχέση με την ομάδα ελέγχου. Η χρόνια χορήγηση λεβοσιμεντάνης χαρακτηρίζεται από αύξηση των αμινοξέων ισολευκίνη, λευκίνη, βαλίνη και γλουταμίνη, καθώς και του φορμικού οξέος. Η εφάπαξ χορήγηση λεβοσιμεντάνης διαφοροποιείται από τις άλλες και προκαλεί αύξηση στο νικοτιναμίδιο, τα UDPs και την μαννόζη.

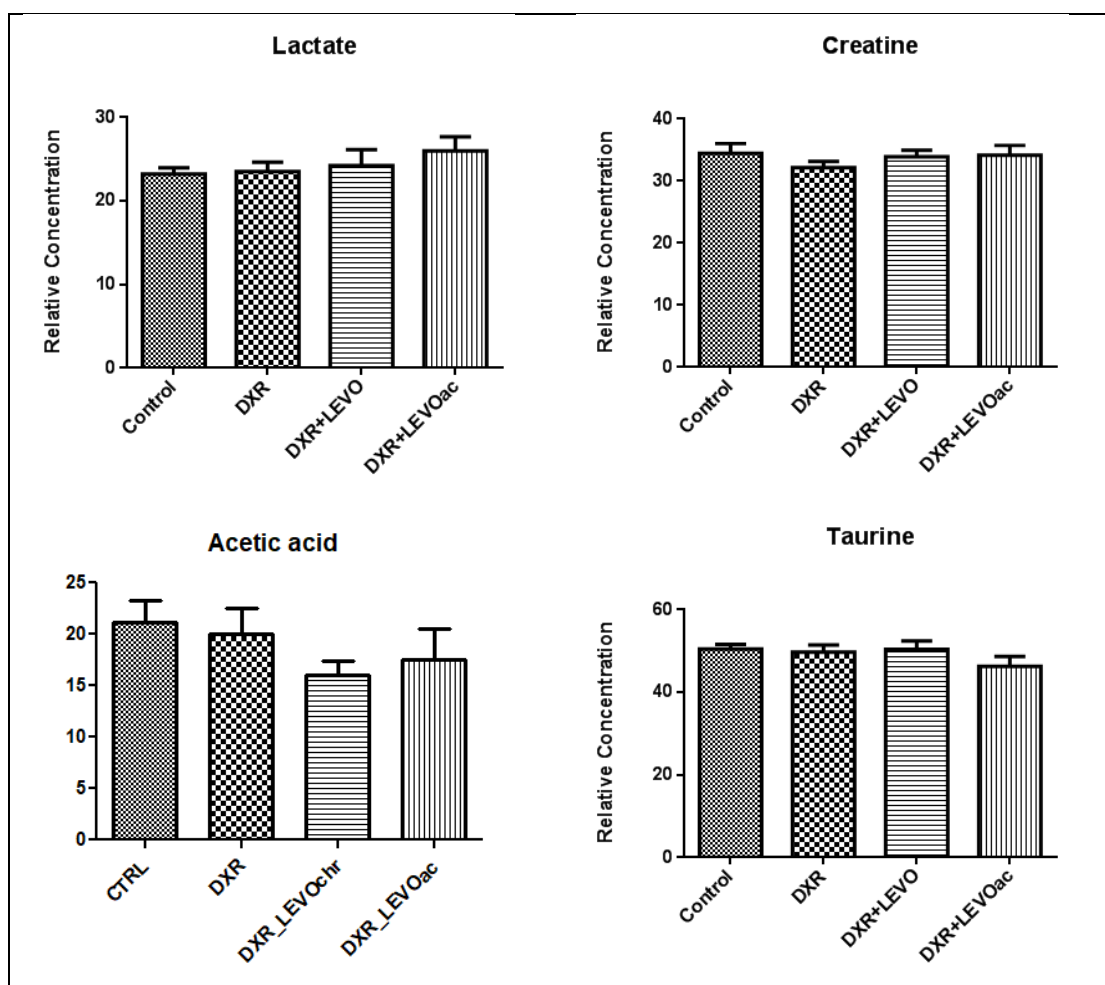
2.3 ΜΟΝΟΠΑΡΑΜΕΤΡΙΚΗ ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

Η μονοπαραμετρική στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων πραγματοποιήθηκε με τη χρήση ANOVA. Οι συγκρίσεις (μέση τιμή ± τυπικό σφάλμα) έγιναν μεταξύ των τεσσάρων διαφορετικών ομάδων των δειγμάτων. Οι σχετικές συγκεντρώσεις των μεταβολιτών παρουσιάζονται ως ιστογράμματα και σημειώνεται η στατιστική σημαντικότητα ($p < 0.05$).

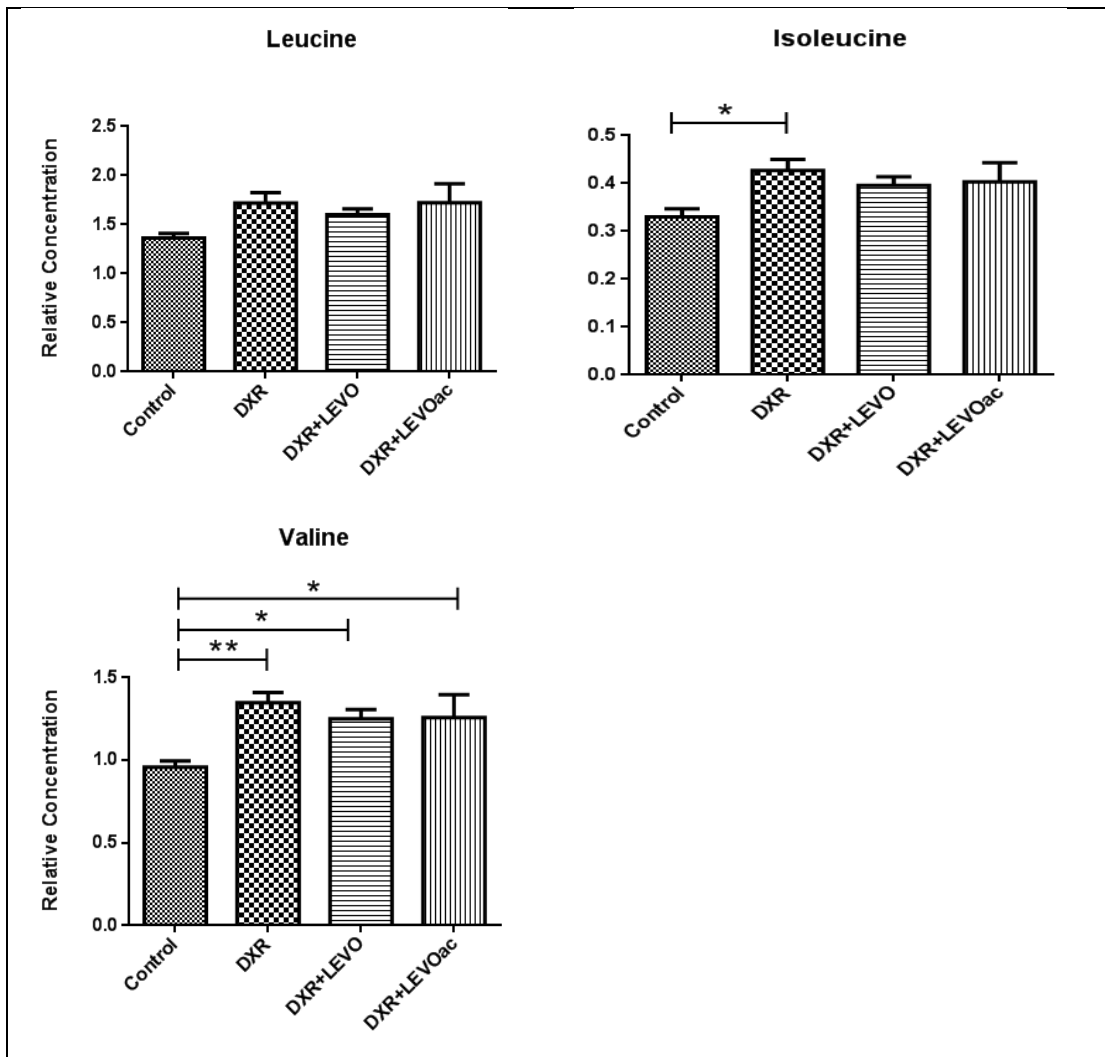
Στην Εικόνα 29 παρουσιάζονται το γαλακτικό και το οξικό οξύ, η κρεατίνη και η ταυρίνη, μεταβολίτες που δεν διαφοροποιούνται στατιστικά στις ομάδες μελέτης. Οι μεταβολές των αμινοξέων διακλαδισμένης αλυσίδας παρουσιάζονται στην Εικόνα 30 και παρουσιάζουν κοινή τάση η οποία χαρακτηρίζεται από μικρή αύξηση στην συγκέντρωσή τους στην ομάδα της DXR και μικρή μείωση με την χορήγηση της λεβοσιμεντάνης. Στατιστικά σημαντικές είναι οι μεταβολές μόνο στην περίπτωση της βαλίνης.

Στην περίπτωση της αλανίνης και της γλουταμίνης η DXR προκαλεί μικρή αλλά στατιστικά σημαντική αύξηση στην συγκέντρωσή τους σε σχέση με την ομάδα ελέγχου (Εικόνα 31). Η χορήγηση εφάπαξ αλλά και χρόνια λεβοσιμεντάνης, δεν τροποποιεί αυτή τη μεταβολή.

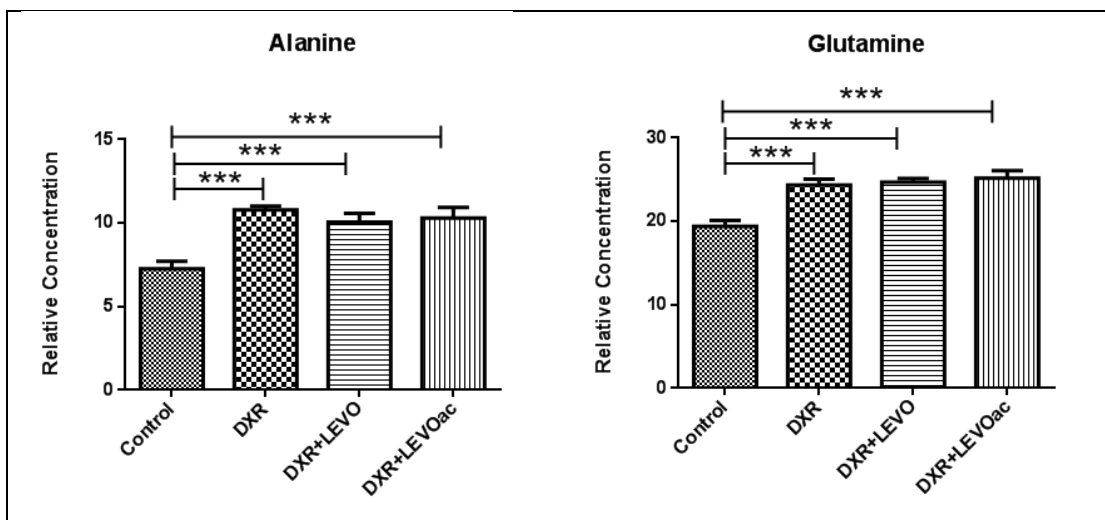
Όσον αφορά στα νουκλεοτίδια AMP, ADP και ATP παρατηρείται μείωση με την χορήγηση της DXR και η λεβοσιμεντανή προκαλεί ελαφριά περαιτέρω μείωση, με στατιστικά σημαντικές διαφορές της εφάπαξ χορήγησης σε σχέση με την ομάδα ελέγχου. Αντίθετη επίδραση παρατηρείται στην περίπτωση της ινοσίνης με την εφάπαξ χορήγηση λεβοσιμεντάνης να αυξάνει σημαντικά τη συγκέντρωση σε σχέση με την ομάδα ελέγχου. Το ίδιο παρατηρείται και για το νικοτιναμίδιο (Εικόνα 33). Τέλος, η εφάπαξ χορήγηση λεβοσιμεντάνης μειώνει στατιστικά σημαντικά τη συγκέντρωση του NAD+.



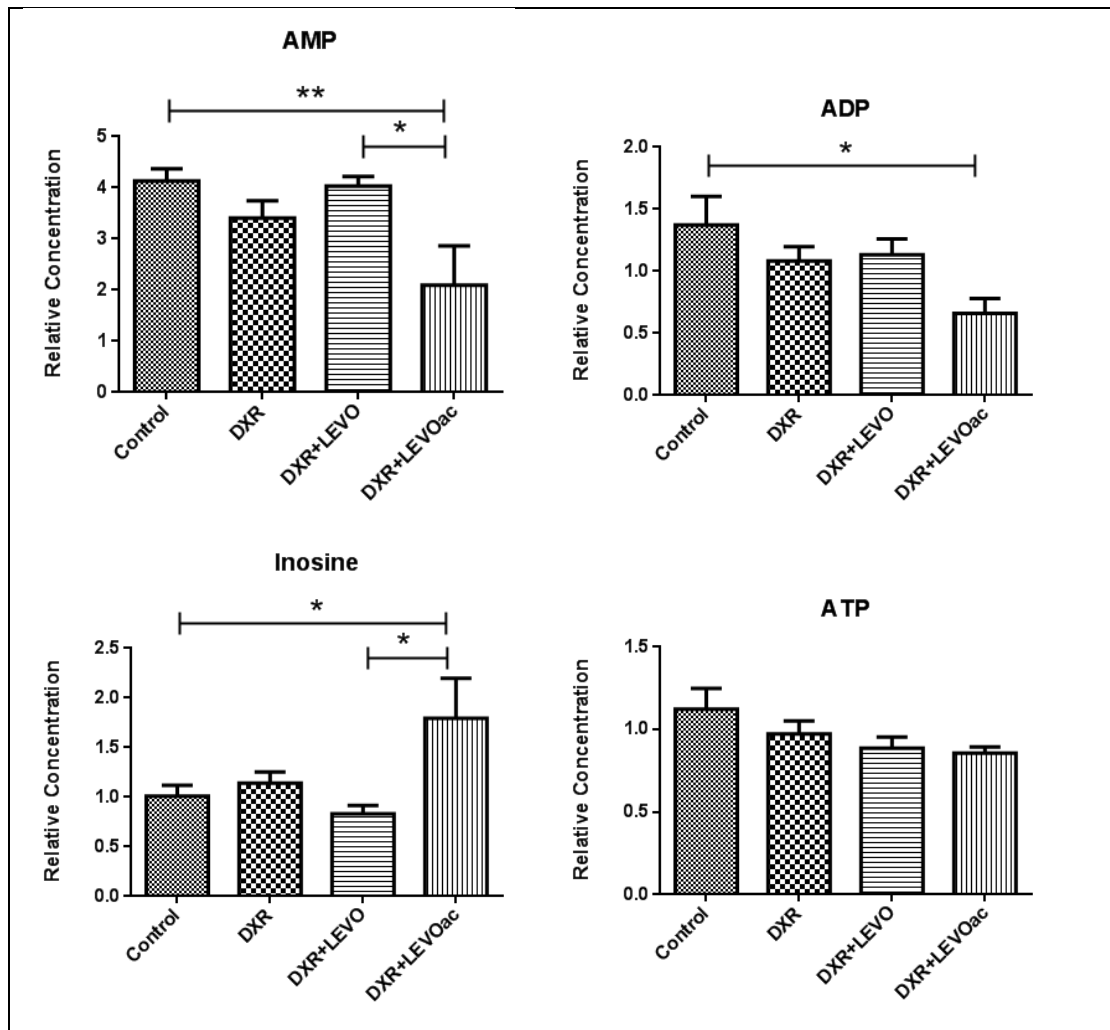
Εικόνα 32: Ιστόγραμμα απεικόνισης διαφοράς συγκέντρωσης και στατιστικής σημαντικότητας των μεταβολιτών που διαχωρίζουν τις ομάδες με τη μέθοδο orls



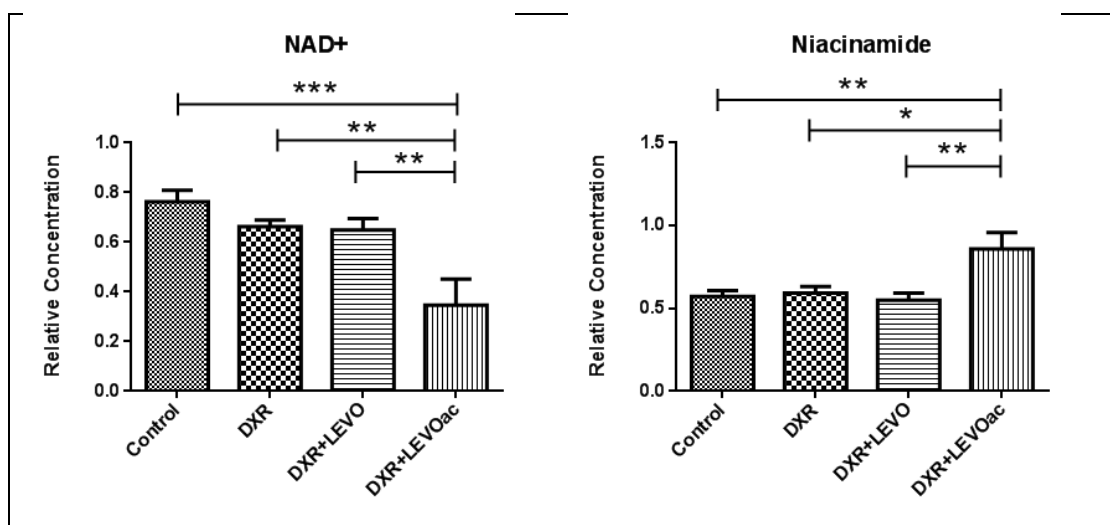
Εικόνα 33: Ιστόγραμμα απεικόνισης διαφοράς συγκέντρωσης και στατιστικής σημαντικότητας αμινοξέων διακλαδισμένης αλυσίδας



Εικόνα 34: Ιστόγραμμα διαφοράς συγκέντρωσης Αλανίνης και Γλουταμίνης



Εικόνα 35: Ιστόγραμμα μεταβολιτών που συμμετέχουν στην οξειδωτική φωσφορυλίωση



Εικόνα 36: Ιστόγραμμα μεταβολιτών για τη διαπίστωση στατιστικά σημαντικών διαφορών μεταξύ NAD⁺ και νικοτιναμίδιου

ΣΥΖΗΤΗΣΗ-ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Η χρήση των μεθόδων της πολυπαραμετρικής ανάλυσης παρέχει μια επισκόπηση όλων των μεταβλητών ταυτόχρονα και επιτρέπει με αυτό τον τρόπο την συσχέτιση μεταξύ τους των διαφορετικών ομάδων . Για τις ανάγκες του πειράματος και για την επίτευξη καλύτερου διαχωρισμού, πραγματοποιήθηκαν δύο κανονικοποιήσεις. Η πρώτη βασίστηκε στη συνολική ένταση και η δεύτερη στην πιθανότητα κανονικοποίησης συνόλων.

Ο διαχωρισμός με βάση τη μέθοδο PCA και μετά από κανονικοποίηση με βάση τη συνολική ένταση (εικόνες 12 & 13), δείχνει να υπάρχει μια τάση διαχωρισμού, χωρίς όμως οι ομάδες να διακρίνονται ξεκάθαρα. Με τη μέθοδο PLS-DA (εικόνα 14), διακρίνεται η ομάδα ελέγχου, καθώς και ομάδα της δοξορουβικίνης από τις ομάδες των επίμυων που έχουν λάβει και λεβοσιμεντάνη. Το μοντέλο επικυρώνεται και από τον έλεγχο των τυχαίων μεταθέσεων.

Αντίστοιχα, βασιζόμενοι στην πιθανότητα κανονικοποίησης συνόλων, με τη μέθοδο PCA φαίνεται να υπάρχει πιο σαφής διαχωρισμός σε σχέση με την προηγούμενη μέθοδο και φαίνεται ξεκάθαρα ότι η ομάδα της δοξορουβικίνης διαφέρει από την ομάδα ελέγχου και την ομάδα των επίμυων που έχουν λάβει λεβοσιμεντάνη σε χρόνια χορήγηση (εικόνες 22 & 23), ενώ, με τη μέθοδο PLS-DA οι διαφορές των ομάδων είναι ακόμα πιο διακριτές (εικόνες 24 & 25).

Από τη μονοπαραγοντική ανάλυση ANOVA, που πραγματοποιήθηκε μέσω του προγράμματος Graphpad, όσον αφορά τους μεταβολίτες που αναφέρθηκαν προηγουμένως ως κύριοι για το διαχωρισμό των ομάδων, φαίνεται πως οι διαφορές στη συγκέντρωση της αλανίνης είναι στατιστικά σημαντικές. Για τους άλλους μεταβολίτες, όπως είναι η κρεατίνη, η ταυρίνη και το γαλακτικό οξύ δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές.

Κατά τη διάρκεια της ισχαιμίας και της καρδιακής ανεπάρκειας, τα κύτταρα του μυοκαρδίου παρουσιάζουν μειωμένη ενέργεια με αποτέλεσμα τη μεταβολική και συστατική δυσλειτουργία. Σε κανονικές συνθήκες, τα λιπαρά οξέα, η γλυκόζη και το

γαλακτικό είναι τα κύρια οξειδωτικά καύσιμα στο μυοκάρδιο, ενώ τα αμινοξέα χρησιμεύουν δευτερευόντως ως οξειδωτικό καύσιμο. Ωστόσο, σε παθολογικές καταστάσεις, παρατηρούνται αυξημένες συγκεντρώσεις ορισμένων αμινοξέων ως συνέπεια μεταβολικής αναδιαμόρφωσης. Τα αμινοξέα εμπλέκονται σε μια ποικιλία βιοχημικών και φυσιολογικών δραστηριοτήτων, που εξουδετερώνουν τις επιβλαβείς κυτταρικές επιδράσεις της μειωμένης διαθεσιμότητας οξυγόνου. Αρκετά αμινοξέα είναι μια άμεση πηγή υποστρώματος για παραγωγή ενέργειας, και ρυθμίζουν τη δραστηριότητα ορισμένων ενζύμων που εμπλέκονται στον μεταβολισμό της γλυκόζης. Αυξάνουν τη συσταλτική απόδοση τόσο στο μυοκάρδιο ζώων όσο και στους ανθρώπους. Επιπλέον, τα αμινοξέα βελτιώνουν το οξειδωτικό στρες εξουδετερώνοντας τη δράση των ελεύθερων ριζών οξυγόνου, είτε ως πρόδρομοι της σύνθεσης γλουταθειόνης, είτε ως υπόστρωμα βιοσύνθεσης νιτρικού οξειδίου. Δρουν στην ενδοθηλιακή λειτουργία και αυξάνουν την πρωτεϊνική συνθετική αποτελεσματικότητα των μυοκαρδιακών κυττάρων ρυθμίζοντας την γονιδιακή έκφραση και την ορμονική δραστηριότητα (94).

Τα αμινοξέα διακλαδισμένης αλυσίδας (BCAA), όπως η λευκίνη, η ισολευκίνη και η βαλίνη, θεωρούνται ευρέως ότι έχουν αναβολικές επιδράσεις στον μεταβολισμό των μυϊκών πρωτεϊνών. *In vitro* μελέτες έχουν δείξει ότι τα αμινοξέα διακλαδισμένης αλυσίδας διεγείρουν τη σύνθεση πρωτεϊνών και παίζουν σημαντικό ρόλο στη διατήρηση της καρδιάς με ενέργεια (95). Οι επιδράσεις των αμινοξέων διακλαδισμένης αλυσίδας στη διέγερση της πρωτεϊνικής σύνθεσης και στην οξείδωση των αμινοξέων, καθώς και στον ενεργειακό μεταβολισμό, έχουν επίσης αναφερθεί σε *in vivo* μελέτες τόσο σε ζώα όσο και σε ανθρώπους (96).

Από τα αποτελέσματά μας φάνηκε ότι οι συγκεντρώσεις των αμινοξέων διακλαδισμένης αλυσίδας αυξάνονται μετά τη χορήγηση της δοξορουβικίνης και μάλιστα η διαφορά στην περίπτωση της ισολευκίνης και της βαλίνης είναι στατιστικά σημαντική σε σχέση με την ομάδα ελέγχου. Τα ευρήματα αυτά συμφωνούν με προηγούμενες κλινικές μελέτες (97–99) που αναφέρονται στη χρόνια καρδιοτοξικότητα που προκαλείται από τη δοξορουβικίνη. Οι ομάδες του Desai και Schnackenberg (97,99), επικεντρώθηκαν στον εντοπισμό μοριακών δεικτών στα πρώιμα στάδια της προκαλούμενης από τη δοξορουβικίνη καρδιοτοξικότητας μέσω μεταβιομικής ανάλυσης με τη

βοήθεια του πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού. Για το λόγο αυτό, χρησιμοποιήθηκαν αρσενικά ποντίκια B6C3F₁, στα οποία χορηγήθηκαν 3mg / kg δοξορουβικίνης ή αλατούχου άλατος μία φορά την εβδομάδα για 2, 3, 4, 6 και 8 εβδομάδες, με αποτέλεσμα αθροιστικές δόσεις δοξορουβικίνης 6, 9, 12, 18, και 24 mg / kg, αντίστοιχα. Τα ποντίκια υποβλήθηκαν σε ευθανασία μία εβδομάδα μετά την τελευταία δόση. Η καρδιοτοξικότητα παρατηρήθηκε στα ποντίκια που εκτέθηκαν σε 18mg / kg και υψηλότερη αθροιστική δόση δοξορουβικίνης. Από τα αποτελέσματα φάνηκε ότι πολλά αμινοξέα αυξήθηκαν σημαντικά στον καρδιακό ιστό στην ομάδα των επίμυων που είχαν λάβει δοξορουβικίνη. Τα αμινοξέα διακλαδισμένης αλυσίδας αυξήθηκαν επίσης σημαντικά ακόμα και στην ομάδα των επίμυων που έλαβαν αθροιστική δόση δοξορουβικίνης 6mg/kg. Η αύξηση αυτή μπορεί να υποδηλώνει τον καταβολισμό των πρωτεϊνών για παραγωγή ενέργειας. Η ομάδα του Sansbury (98) έχει αναφέρει επίσης την αύξηση των αμινοξέων αυτών στην καρδιακή ανεπάρκεια που σχετίζεται με το κλάσμα εξώθησης. Τα αυξημένα επίπεδα των αμινοξέων διακλαδισμένης αλυσίδας στο μυοκάρδιο των επίμυων που έχουν υποστεί αγωγή με δοξορουβικίνη μπορεί εν μέρει να οφείλονται σε μεταβολισμό της ενέργειας όπως υποδεικνύεται από μεταγραφικές αναλύσεις που έδειξαν σημαντική μείωση της έκφρασης ενός αριθμού γονιδίων που σχετίζονται με τον μεταβολισμό της ενέργειας (οξειδωτική φωσφορυλίωση, μεταβολισμός λιπαρών οξέων) (100).

Τα αμινοξέα αυτά είναι γνωστό ότι αποτελούν την κύρια πηγή αζώτου στη σύνθεση της γλουταμίνης και αλανίνης, τα οποία αποτελούν προϊόντα αναερόβιου μεταβολισμού, επομένως πιθανόν αποτελούν μια εναλλακτική πηγή ενέργειας με την ενίσχυση του αναερόβιου μεταβολισμού, γεγονός που υποδεικνύει ότι η δοξορουβικίνη επάγει την αναερόβια γλυκόλυση.

Η αλανίνη και η γλουταμίνη αυξάνονται σε όλες τις ομάδες σε σχέση με την ομάδα ελέγχου και οι διαφορές τους είναι στατιστικά σημαντικές.

Ενώ η φυσιολογική καρδιά απελευθερώνει την αλανίνη μόνο κατά τη διάρκεια του στρες και όχι στην ηρεμία, στην καρδιακή ανεπάρκεια απελευθερώνεται αλανίνη και στις δύο καταστάσεις σε μεγαλύτερη ποσότητα από την κανονική καρδιά. Η αυξημένη πρόσληψη γλουταμινικού και η απελευθέρωση αλανίνης, που σημειώθηκε στην

καρδιοτοξικότητα, υποδηλώνει μια μεταβολική προσαρμογή του μυοκαρδίου. Αυτό μπορεί να αποτελεί έναν μηχανισμό ικανό να εμποδίζει το πυροσταφυλικό, που προέρχεται από τη γλυκόλυση στην αλανίνη, μειώνοντας την ποσότητα του πυροσταφυλικού που μετατρέπεται σε γαλακτικό και οδηγεί σε καθαρή μείωση της συγκέντρωσης του γαλακτικού και των ανασταλτικών της επιδράσεων στη γλυκόλυση (101).

Η γλουταμίνη φαίνεται να παίζει ρόλο στη διατήρηση της κυτταρικής ισορροπίας οξειδοαναγωγής. Έχει αναφερθεί ότι η γλουταμίνη καθίσταται περιοριστική για τη σύνθεση της γλουταθειόνης κατά τη διάρκεια του στρες, όπως είναι η χημειοθεραπεία και ο οξειδωτικός τραυματισμός. Τα αυξημένα επίπεδα γλουταμίνης συσχετίζονται με την πρόληψη της υπεροξειδωσης των λιπιδίων, όπως παρατηρήθηκε στον καρδιακό ιστό των ζώων που έλαβαν δοξορουβικίνη (102).

Από τα αποτελέσματά μας φαίνεται ότι η χορήγηση της λεβοσιμεντάνης δεν μειώνει τα επίπεδα αλανίνης και γλουταμίνης, γεγονός που σημαίνει ότι δεν καταφέρνει να ανατρέψει την καρδιομυοπάθεια του μυοκαρδίου που προκαλείται από τη δοξορουβικίνη.

Στα πλαίσια της παρούσας εργασίας συγκρίναμε επίσης τα αποτελέσματα της χρόνιας χορήγησης λεβοσιμεντάνης σε σχέση με την εφάπαξ χορήγηση. Η επιλογή των δοσολογιών βασίστηκε στη δράση της λεβοσιμεντάνης, η οποία σε υψηλές δόσεις (24 μg/kg άπαξ) μπορεί να δράσει ως αναστολέας της φωσφοδιεστεράσης 3, ενώ σε χαμηλές δόσεις (αθροιστική δόση 24 μg/kg σε 6 δόσεις) μπορεί να δράσει ως ευαισθητοποιητής ασβεστίου (103). Αυτά τα δοσολογικά σχήματα φαίνεται ότι μπορούν να συμβάλλουν στην καταπολέμηση της προκαλούμενης από τη δοξορουβικίνη καρδιοτοξικότητας.

Η εφάπαξ χορήγηση της λεβοσιμεντάνης οδήγησε σε αύξηση της ινοσίνης συγκριτικά με την ομάδα ελέγχου και την ομάδα της DXR+LEVOchr.

Η ινοσίνη είναι ένα αγγειοδιασταλτικό (104). Η αγγειοδιαστολή που προκαλείται από την ινοσίνη οφείλεται εν μέρει μόνο στις αυξημένες μεταβολικές απαιτήσεις. Η ινοσίνη έχει άμεση δράση στη χαλάρωση των στεφανιαίων αρτηριών ανεξάρτητα από

το ινοτροπικό αποτέλεσμα. Τροποποιεί την ισορροπία μεταξύ προσφοράς και ζήτησης οξυγόνου που αντικατοπτρίζεται από μια ενδομυοκαρδιακή αναδιανομή οξυγόνου. Η ινοσίνη δρα στην στεφανιαία κυκλοφορία σαν «ρυθμιστής της μυοκαρδιακής λειτουργίας». Η θετική ινοτροπική δράση της ινοσίνης, η οποία έχει αποδειχθεί τόσο σε υγιείς όσο και σε παθολογικό μυοκάρδιο, δεν οφείλεται στη διέγερση των καρδιακών β-αδρενεργικών υποδοχέων, καθώς οι β-αποκλειστές δεν ανταγωνίζονται τη θετική ινοτροπική επίδραση της ινοσίνης. Αυτή η αύξηση της δυναμικής της συσταλτικότητας του μυοκαρδίου είναι εμφανής τόσο σε δυσλειτουργικές όσο και σε υγιείς περιοχές του μυοκαρδίου. Διάφορες κλινικές μελέτες επιβεβαιώνουν τη θετική ινοτροπική δράση της ινοσίνης, χωρίς καμία μεταβολή στο μετα-φορτίο, στο προ-φορτίο ή στον καρδιακό ρυθμό. Η θετική ινοτροπική δράση της ινοσίνης μπορεί επομένως να θεωρηθεί επιλεκτική (104). Ο μηχανισμός της ινοτροπικής διέγερσης που μπορεί να προκαλείται από την αυξημένη ινοσίνη μετά την εφάπαξ χορήγηση της λεβοσιμεντάνης, ενδέχεται να παίζει σημαντικό ρόλο στον περιορισμό της καρδιοτοξικότητας που προκαλείται από τη δοξορουβικίνη. Επίσης, Η ινοσίνη είναι βασικός μεταβολίτης στο μονοπάτι διάσωσης πουρινών. Το γεγονός αυτό υποδεικνύει ότι η εφάπαξ χορήγηση της λεβοσιμεντάνης παρεμβαίνει στο μεταβολισμό των πουρινών. Αυτό υποστηρίζεται επίσης και από τη συσσώρευση νικοτιναμιδίου και τη χρήση του NAD⁺, αποκαλύπτοντας ότι η λεβοσιμεντάνη μπορεί να προκαλέσει οδούς διάσωσης πουρινών με τρόπο που εξαρτάται από την αναλογία NAD⁺-Νικοτιναμιδίου.

Επιπλέον η εφάπαξ χορήγηση της λεβοσιμεντάνης οδήγησε σε μείωση της AMP και ADP, συγκριτικά με την ομάδα ελέγχου και την ομάδα της DXR+LEVOchr, ενώ τα επίπεδα της ATP παραμένουν σχεδόν σταθερά. Τα μειωμένα επίπεδα AMP μπορεί να οφείλονται στη δράση της λεβοσιμεντάνης ως αναστολέας φωσφοδιεστεράσης 3 σε υψηλές δόσεις, που έχει ως αποτέλεσμα τη συσσώρευση του cAMP στο μυοκάρδιο.

Η πρόκληση καρδιοτοξικότητας από τη δοξορουβικίνη, προκαλεί μείωση του NAD⁺ καθώς και του νικοτιναμιδίου. Με τη χορήγηση της λεβοσιμεντάνης και ιδιαίτερα της εφάπαξ δόσης αυξάνεται σημαντικά η συγκέντρωση του νικοτιναμιδίου μειώνοντας την αναλογία NAD⁺/Νικοτιναμίδιο ρυθμίζοντας έτσι την αναερόβια γλυκόλυση που προκαλείται από τη δοξορουβικίνη, ενώ το νικοτιναμίδιο εμπλέκεται και σε ενδογενείς αντιοξειδωτικούς αμυντικούς μηχανισμούς.

Συμπεραίνοντας, φάνηκε ότι η εφάπαξ χορήγηση της λεβοσιμεντάνης δείχνει να έχει καλύτερα αποτελέσματα στη βελτίωση της καρδιοτοξικότητας σε σχέση με τη επαναλαμβανόμενη χορήγηση. Επιπλέον, τόσο η εφάπαξ όσο και η επαναλαμβανόμενη χορήγηση λεβοσιμεντάνης παρουσίασαν το ίδιο αντιοξειδωτικό αποτέλεσμα όπως φάνηκε από τη μέτρηση της μαλονδιαλδεΐδης και των πρωτεϊνικών καρβονυλίων στο μυοκάρδιο των επίμυων. Τα αποτελέσματα αυτά υποδηλώνουν ότι παρόλο που οι ελεύθερες ρίζες οξυγόνου παίζουν σημαντικό ρόλο στην προκαλούμενη από τη δοξορουβική καρδιοτοξικότητα (105), οι μηχανισμοί πρόκλησης καρδιομυοπάθειας μπορεί να διαφέρουν και βασίζονται σε πρόσθετους μοριακούς στόχους οι οποίοι μπορεί να είναι ανεξάρτητοι από το οξειδωτικό στρες(24).

Τέλος, η επαγόμενη από τη δοξορουβική καρδιοτοξικότητα προκαλεί και διαταραχή της ομοιόστασης του Ca^{2+} (106). Είναι γνωστό ότι ένας από τους μηχανισμούς καρδιοπροστασίας της λεβοσιμεντάνης ασκείται μέσω της ρύθμισης του κύκλου του Ca^{2+} μέσω των μονοπατιών cAMP/PKA και cGMP/PKG. Η μεταβολομική ανάλυση έδειξε ότι η συσσώρευση ινοσίνης μετά από την εφάπαξ χορήγηση λεβοσιμεντάνης ακολουθεί το ίδιο μοτίβο με την cAMP και cGMP. Η συσσώρευση της ινοσίνης που αποτελεί βασικό μεσολαβητή στην οδό διάσωσης πουρινών υποδεικνύει ότι η εφάπαξ χορήγηση λεβοσιμεντάνης επάγει μονοπάτια παρεμπόδισης του μεταβολισμού των πουρινών. Αυτό υποστηρίζεται επιπλέον από τη συσσώρευση του νικοτιναμιδίου και τη χρήση του NAD⁺, αποκαλύπτοντας έτσι ότι η λεβοσιμεντάνη μπορεί να ασκήσει την καρδιοπροστατευτική της δράση με τρόπο εξαρτώμενο από την αναλογία NAD⁺-νικοτιναμίδιο.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Efentakis P, Varela A, Chavdoula E, Sigala F, Sanoudou D, Tenta R, et al. Levosimendan prevents doxorubicin-induced cardiotoxicity in time- and dose-dependent manner: implications for inotropy. *Cardiovasc Res*. 2020 Mar 1;116(3):576–91.
2. Doxorubicin. In: Wikipedia [Internet]. 2020 [cited 2020 Oct 14]. Available from: <https://en.wikipedia.org/w/index.php?title=Doxorubicin&oldid=982635979>
3. Levosimendan. In: Wikipedia [Internet]. 2020 [cited 2020 Oct 14]. Available from: <https://en.wikipedia.org/w/index.php?title=Levosimendan&oldid=963440289>
4. Thorn CF, Oshiro C, Marsh S, Hernandez-Boussard T, McLeod H, Klein TE, et al. Doxorubicin pathways: pharmacodynamics and adverse effects. *Pharmacogenet Genomics*. 2011 Jul;21(7):440–6.
5. Weiss RB. The anthracyclines: will we ever find a better doxorubicin? *Semin Oncol*. 1992 Dec;19(6):670–86.
6. Swain SM, Whaley FS, Ewer MS. Congestive heart failure in patients treated with doxorubicin: A retrospective analysis of three trials. *Cancer*. 2003 Jun 1;97(11):2869–79.
7. Horenstein MS, Vander Heide RS, L'Ecuyer TJ. Molecular Basis of Anthracycline-Induced Cardiotoxicity and Its Prevention. *Mol Genet Metab*. 2000 Sep;71(1–2):436–44.
8. Seidman A, Hudis C, Pierri MK, Shak S, Paton V, Ashby M, et al. Cardiac Dysfunction in the Trastuzumab Clinical Trials Experience. *J Clin Oncol*. 2002 Mar 1;20(5):1215–21.
9. Minotti G, Menna P, Salvatorelli E, Cairo G, Gianni L. Anthracyclines: Molecular Advances and Pharmacologic Developments in Antitumor Activity and Cardiotoxicity. *Pharmacol Rev*. 2004 Jun;56(2):185–229.
10. Gewirtz D. A critical evaluation of the mechanisms of action proposed for the antitumor effects of the anthracycline antibiotics adriamycin and daunorubicin. *Biochem Pharmacol*. 1999 Apr;57(7):727–41.
11. Doroshow JH. Role of hydrogen peroxide and hydroxyl radical formation in the killing of Ehrlich tumor cells by anticancer quinones. *Proc Natl Acad Sci*. 1986 Jun 1;83(12):4514–8.
12. Yeh ETH, Tong AT, Lenihan DJ, Yusuf SW, Swafford J, Champion C, et al. Cardiovascular Complications of Cancer Therapy: Diagnosis, Pathogenesis, and Management. *Circulation*. 2004 Jun 29;109(25):3122–31.
13. Popat S, Smith IE. Therapy Insight: anthracyclines and trastuzumab—the optimal management of cardiotoxic side effects. *Nat Clin Pract Oncol*. 2008 Jun;5(6):324–35.
14. Albini A, Pennesi G, Donatelli F, Cammarota R, De Flora S, Noonan DM. Cardiotoxicity of Anticancer Drugs: The Need for Cardio-Oncology and Cardio-Oncological Prevention. *JNCI J Natl Cancer Inst*. 2010 Jan 6;102(1):14–25.

15. Elice F, Jacoub J, Rickles FR, Falanga A, Rodeghiero F. Hemostatic complications of angiogenesis inhibitors in cancer patients. *Am J Hematol.* 2008 Nov;83(11):862–70.
16. Florescu M, Cinteza M, Vinereanu D. Chemotherapy-induced Cardiotoxicity. *Mædica.* 2013 Mar;8(1):59.
17. Xu MF, Tang PL, Qian ZM, Ashraf M. Effects by doxorubicin on the myocardium are mediated by oxygen free radicals. *Life Sci.* 2001 Jan;68(8):889–901.
18. Goormaghtigh E, Chatelain P, Caspers J, Ruyschaert JM. Evidence of a complex between adriamycin derivatives and cardiolipin: Possible role in cardiotoxicity. *Biochem Pharmacol.* 1980 Nov;29(21):3003–10.
19. Tokarska-Schlattner M, Wallimann T, Schlattner U. Alterations in myocardial energy metabolism induced by the anti-cancer drug doxorubicin. *C R Biol.* 2006 Sep;329(9):657–68.
20. Schlame M, Rua D, Greenberg ML. The biosynthesis and functional role of cardiolipin. *Prog Lipid Res.* 2000 May;39(3):257–88.
21. Kashfi K, Israel M, Sweatman TW, Seshadri R, Cook GA. Inhibition of mitochondrial carnitine palmitoyltransferases by adriamycin and adriamycin analogues. *Biochem Pharmacol.* 1990 Oct;40(7):1441–8.
22. Ventura-Clapier R, Garnier A, Veksler V. Energy metabolism in heart failure: Energy metabolism in heart failure. *J Physiol.* 2004 Feb 15;555(1):1–13.
23. Ichikawa Y, Ghanefar M, Bayeva M, Wu R, Khechaduri A, Prasad SVN, et al. Cardiotoxicity of doxorubicin is mediated through mitochondrial iron accumulation. *J Clin Invest.* 2014 Feb 3;124(2):617–30.
24. Octavia Y, Tocchetti CG, Gabrielson KL, Janssens S, Crijns HJ, Moens AL. Doxorubicin-induced cardiomyopathy: From molecular mechanisms to therapeutic strategies. *J Mol Cell Cardiol.* 2012 Jun;52(6):1213–25.
25. Carvalho RA, Sousa RPB, Cadete VJJ, Lopaschuk GD, Palmeira CMM, Bjork JA, et al. Metabolic remodeling associated with subchronic doxorubicin cardiomyopathy. *Toxicology.* 2010 Apr 11;270(2–3):92–8.
26. Nitobe J. Reactive oxygen species regulate FLICE inhibitory protein (FLIP) and susceptibility to Fas-mediated apoptosis in cardiac myocytes. *Cardiovasc Res.* 2003 Jan;57(1):119–28.
27. Kalivendi SV, Konorev EA, Cunningham S, Vanamala SK, Kaji EH, Joseph J, et al. Doxorubicin activates nuclear factor of activated T-lymphocytes and Fas ligand transcription: role of mitochondrial reactive oxygen species and calcium. *Biochem J.* 2005 Jul 15;389(2):527–39.
28. Holmberg SR, Williams AJ. Patterns of interaction between anthraquinone drugs and the calcium-release channel from cardiac sarcoplasmic reticulum. *Circ Res.* 1990 Aug;67(2):272–83.

29. Przygodzki T, Sokal A, Bryszewska M. Calcium ionophore A23187 action on cardiac myocytes is accompanied by enhanced production of reactive oxygen species. *Biochim Biophys Acta BBA - Mol Basis Dis.* 2005 Jun;1740(3):481–8.
30. Henriksen PA. Anthracycline cardiotoxicity: an update on mechanisms, monitoring and prevention. *Heart Br Card Soc.* 2018;104(12):971–7.
31. Wang TJ, Evans JC, Benjamin EJ, Levy D, LeRoy EC, Vasan RS. Natural history of asymptomatic left ventricular systolic dysfunction in the community. *Circulation.* 2003 Aug 26;108(8):977–82.
32. Pocock SJ, Wang D, Pfeffer MA, Yusuf S, McMurray JJV, Swedberg KB, et al. Predictors of mortality and morbidity in patients with chronic heart failure. *Eur Heart J.* 2006 Jan 1;27(1):65–75.
33. Kramer DG, Trikalinos TA, Kent DM, Antonopoulos GV, Konstam MA, Udelson JE. Quantitative Evaluation of Drug or Device Effects on Ventricular Remodeling as Predictors of Therapeutic Effects on Mortality in Patients With Heart Failure and Reduced Ejection Fraction. *J Am Coll Cardiol.* 2010 Jul;56(5):392–406.
34. Armenian SH, Hudson MM, Mulder RL, Chen MH, Constine LS, Dwyer M, et al. Recommendations for cardiomyopathy surveillance for survivors of childhood cancer: a report from the International Late Effects of Childhood Cancer Guideline Harmonization Group. *Lancet Oncol.* 2015 Mar;16(3):e123–36.
35. Cardinale D, Colombo A, Bacchiani G, Tedeschi I, Meroni CA, Veglia F, et al. Early detection of anthracycline cardiotoxicity and improvement with heart failure therapy. *Circulation.* 2015 Jun 2;131(22):1981–8.
36. Tewey K, Rowe T, Yang L, Halligan B, Liu L. Adriamycin-induced DNA damage mediated by mammalian DNA topoisomerase II. *Science.* 1984 Oct 26;226(4673):466–8.
37. Zhang S, Liu X, Bawa-Khalife T, Lu L-S, Lyu YL, Liu LF, et al. Identification of the molecular basis of doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Nat Med.* 2012 Nov;18(11):1639–42.
38. Petrosillo G, Ruggiero FM, Pistolese M, Paradies G. Ca²⁺-induced reactive oxygen species production promotes cytochrome c release from rat liver mitochondria via mitochondrial permeability transition (MPT)-dependent and MPT-independent mechanisms: role of cardiolipin. *J Biol Chem.* 2004 Dec 17;279(51):53103–8.
39. Favero TG, Zable AC, Abramson JJ. Hydrogen Peroxide Stimulates the Ca²⁺ Release Channel from Skeletal Muscle Sarcoplasmic Reticulum. *J Biol Chem.* 1995 Oct 27;270(43):25557–63.
40. Becker C, Sevilla L, Tomàs E, Palacin M, Zorzano A, Fischer Y. The Endosomal Compartment Is an Insulin-Sensitive Recruitment Site for GLUT4 and GLUT1 Glucose Transporters in Cardiac Myocytes. *Endocrinology.* 2001 Dec 1;142(12):5267–76.
41. Chow EJ, Chen Y, Kremer LC, Breslow NE, Hudson MM, Armstrong GT, et al. Individual prediction of heart failure among childhood cancer survivors. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol.* 2015 Feb 10;33(5):394–402.

42. van Dalen EC, Michiels EM, Caron HN, Kremer LC. Different anthracycline derivatives for reducing cardiotoxicity in cancer patients. *Cochrane Database Syst Rev*. 2010 Mar 17;(3):CD005006.
43. Feijen EAM, Leisenring WM, Stratton KL, Ness KK, van der Pal HJH, Caron HN, et al. Equivalence Ratio for Daunorubicin to Doxorubicin in Relation to Late Heart Failure in Survivors of Childhood Cancer. *J Clin Oncol*. 2015 Nov 10;33(32):3774–80.
44. Legha SS, Benjamin RS, Mackay B, Ewer M, Wallace S, Valdivieso M, et al. Reduction of doxorubicin cardiotoxicity by prolonged continuous intravenous infusion. *Ann Intern Med*. 1982 Feb;96(2):133–9.
45. Lipshultz SE, Lipsitz SR, Kutok JL, Miller TL, Colan SD, Neuberg DS, et al. Impact of hemochromatosis gene mutations on cardiac status in doxorubicin-treated survivors of childhood high-risk leukemia. *Cancer*. 2013 Oct 1;119(19):3555–62.
46. Chow EJ, Asselin BL, Schwartz CL, Doody DR, Leisenring WM, Aggarwal S, et al. Late Mortality After Dexrazoxane Treatment: A Report From the Children’s Oncology Group. *J Clin Oncol*. 2015 Aug 20;33(24):2639–45.
47. Bures J, Jirkovska A, Sestak V, Jansova H, Karabanovich G, Roh J, et al. Investigation of novel dexrazoxane analogue JR-311 shows significant cardioprotective effects through topoisomerase IIbeta but not its iron chelating metabolite. *Toxicology*. 2017 Dec;392:1–10.
48. Lyu YL, Kerrigan JE, Lin C-P, Azarova AM, Tsai Y-C, Ban Y, et al. Topoisomerase IIbeta mediated DNA double-strand breaks: implications in doxorubicin cardiotoxicity and prevention by dexrazoxane. *Cancer Res*. 2007 Sep 15;67(18):8839–46.
49. Tebbi CK, London WB, Friedman D, Villaluna D, De Alarcon PA, Constone LS, et al. Dexrazoxane-associated risk for acute myeloid leukemia/myelodysplastic syndrome and other secondary malignancies in pediatric Hodgkin’s disease. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2007 Feb 10;25(5):493–500.
50. Vrooman LM, Neuberg DS, Stevenson KE, Asselin BL, Athale UH, Clavell L, et al. The low incidence of secondary acute myelogenous leukaemia in children and adolescents treated with dexrazoxane for acute lymphoblastic leukaemia: a report from the Dana-Farber Cancer Institute ALL Consortium. *Eur J Cancer Oxf Engl* 1990. 2011 Jun;47(9):1373–9.
51. Vejpongsa P, Yeh ETH. Prevention of anthracycline-induced cardiotoxicity: challenges and opportunities. *J Am Coll Cardiol*. 2014 Sep 2;64(9):938–45.
52. European Medicines Agency. Dexrazoxane [Internet]. European Medicines Agency. 2018 [cited 2020 Oct 15]. Available from: <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/referrals/dexrazoxane>
53. Gulati G, Heck SL, Ree AH, Hoffmann P, Schulz-Menger J, Fagerland MW, et al. 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. *Eur Heart J*. 2016 Jun 1;37(21):1671–80.

54. Kalay N, Basar E, Ozdogru I, Er O, Cetinkaya Y, Dogan A, et al. Protective effects of carvedilol against anthracycline-induced cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol*. 2006 Dec 5;48(11):2258–62.
55. Kaya MG, Ozkan M, Gunebakmaz O, Akkaya H, Kaya EG, Akpek M, et al. Protective effects of nebivolol against anthracycline-induced cardiomyopathy: a randomized control study. *Int J Cardiol*. 2013 Sep 1;167(5):2306–10.
56. Bosch X, Rovira M, Sitges M, Domènech A, Ortiz-Pérez JT, de Caralt TM, et al. Enalapril and carvedilol for preventing chemotherapy-induced left ventricular systolic dysfunction in patients with malignant hemopathies: the OVERCOME trial (preventiOn of left Ven-tricular dysfunction with Enalapril and caRvedilol in patients submitted to intensive ChemOtherapy for the treatment of Malignant hEmopathies). *J Am Coll Cardiol*. 2013 Jun 11;61(23):2355–62.
57. Henninger C, Fritz G. Statins in anthracycline-induced cardiotoxicity: Rac and Rho, and the heartbreakers. *Cell Death Dis*. 2017 19;8(1):e2564.
58. Seicean S, Seicean A, Plana JC, Budd GT, Marwick TH. Effect of statin therapy on the risk for incident heart failure in patients with breast cancer receiving anthracycline chemotherapy: an observational clinical cohort study. *J Am Coll Cardiol*. 2012 Dec 11;60(23):2384–90.
59. Liu Q, Docherty JC, Rendell JCT, Clanachan AS, Lopaschuk GD. High levels of fatty acids delay the recovery of intracellular pH and cardiac efficiency in post-ischemic hearts by inhibiting glucose oxidation. *J Am Coll Cardiol*. 2002 Feb;39(4):718–25.
60. Young ME, Patil S, Ying J, Depre C, Singh Ahuja H, Shipley GL, et al. Uncoupling protein 3 transcription is regulated by peroxisome proliferator-activated receptor α in the adult rodent heart. *FASEB J*. 2001 Mar;15(3):833–45.
61. Fillmore N, Lopaschuk GD. Targeting mitochondrial oxidative metabolism as an approach to treat heart failure. *Biochim Biophys Acta BBA - Mol Cell Res*. 2013 Apr;1833(4):857–65.
62. Singal PK, Iliskovic N. Doxorubicin-Induced Cardiomyopathy. *N Engl J Med*. 1998 Sep 24;339(13):900–5.
63. Mitra MS, Donthamsetty S, White B, Latendresse JR, Mehendale HM. Mechanism of protection of moderately diet restricted rats against doxorubicin-induced acute cardiotoxicity. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2007 Nov 15;225(1):90–101.
64. Mobaraki M. Molecular Mechanisms of Cardiotoxicity: A Review on the Major Side-effect of Doxorubicin. *Indian J Pharm Sci*. 2017;10.
65. Cvetkovic' RS, Scott LJ. Dexrazoxane: A Review of its Use for Cardioprotection During Anthracycline Chemotherapy. *Drugs*. 2005;65(7):1005–24.
66. van Acker SA, Boven E, Kuiper K, van den Berg DJ, Grimbergen JA, Kramer K, et al. Monohydroxyethylrutoside, a dose-dependent cardioprotective agent, does not affect the antitumor activity of doxorubicin. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. 1997 Oct;3(10):1747–54.

67. Oliveira PJ, Bjork JA, Santos MS, Leino RL, Froberg MK, Moreno AJ, et al. Carvedilol-mediated antioxidant protection against doxorubicin-induced cardiac mitochondrial toxicity. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2004 Oct;200(2):159–68.
68. Li L, Takemura G, Li Y, Miyata S, Esaki M, Okada H, et al. Preventive Effect of Erythropoietin on Cardiac Dysfunction in Doxorubicin-Induced Cardiomyopathy. *Circulation*. 2006 Jan 31;113(4):535–43.
69. Fisher PW, Salloum F, Das A, Hyder H, Kukreja RC. Phosphodiesterase-5 Inhibition With Sildenafil Attenuates Cardiomyocyte Apoptosis and Left Ventricular Dysfunction in a Chronic Model of Doxorubicin Cardiotoxicity. *Circulation*. 2005 Apr 5;111(13):1601–10.
70. Nousiainen T, Jantunen E, Vanninen E, Remes J, Vuolteenaho O, Hartikainen J. Natriuretic peptides as markers of cardiotoxicity during doxorubicin treatment for non-Hodgkin's lymphoma. *Eur J Haematol*. 1999 Feb;62(2):135–41.
71. Parissis JT, Farmakis D, Nieminen M. Classical inotropes and new cardiac enhancers. *Heart Fail Rev*. 2007 Jun 12;12(2):149–56.
72. Felker GM, O'Connor CM. Inotropic therapy for heart failure: An evidence-based approach. *Am Heart J*. 2001 Sep;142(3):393–401.
73. Tatlıdede E, Şehirli Ö, Velioglu-Öğünç A, Çetinel Ş, Yeğen BÇ, Yarat A, et al. Resveratrol treatment protects against doxorubicin-induced cardiotoxicity by alleviating oxidative damage. *Free Radic Res*. 2009 Jan;43(3):195–205.
74. Haikala H, Linden IB. Mechanisms of action of calcium-sensitizing drugs. *J Cardiovasc Pharmacol*. 1995;26 Suppl 1:S10-19.
75. Antoniadis C, Tousoulis D, Koumallos N, Marinou K, Stefanadis C. Levosimendan: Beyond its simple inotropic effect in heart failure. *Pharmacol Ther*. 2007 May;114(2):184–97.
76. Raasmaja A. Biochemical mechanisms of the novel cardiotonic agent OR-1259. *J Mol Cell Cardiol*. 1991 Jul;23:S129.
77. Hasenfuss G, Mulieri LA, Leavitt BJ, Alpert NR. Influence of Isoproterenol on Contractile Protein Function, Excitation-Contraction Coupling, and Energy Turnover of Isolated Non-failing Human Myocardium. *J Mol Cell Cardiol*. 1994 Nov;26(11):1461–9.
78. Olson R, Vestal R, Shadle S, Charlier H, Cusack B. Doxorubicin Cardiac Dysfunction: Effects on Calcium Regulatory Proteins, Sarcoplasmic Reticulum, and Triiodothyronine. *Cardiovasc Toxicol*. 2005 Feb 1;5:269–83.
79. Parissis JT, Filippatos G, Farmakis D, Adamopoulos S, Paraskevaidis I, Kremastinos D. Levosimendan for the treatment of acute heart failure syndromes. *Expert Opin Pharmacother*. 2005 Dec;6(15):2741–51.
80. Μαυρουδή Μ, Αφθονίδης Ν-Λ, Αφθονίδης Δ. Ινóτροπη Υποστήριξη οξείας απορúθμισης χρόνιας καρδιακής ανεπάρκειας-Νεότερα Δεδομένα. 2009;2–3:95–101.

81. Brixius K, Reicke S, Schwinger RHG. Beneficial effects of the Ca²⁺ sensitizer levosimendan in human myocardium. *Am J Physiol-Heart Circ Physiol*. 2002 Jan 1;282(1):H131–7.
82. Kivikko M, Antila S, Eha J, Lehtonen L, Pentikäinen PJ. Pharmacokinetics of levosimendan and its metabolites during and after a 24-hour continuous infusion in patients with severe heart failure. *Int J Clin Pharmacol Ther*. 2002 Oct 1;40(10):465–71.
83. Kivikko M, Antila S, Eha J, Lehtonen L, Pentikäinen PJ. Pharmacodynamics and Safety of a New Calcium Sensitizer, Levosimendan, and Its Metabolites during an Extended Infusion in Patients with Severe Heart Failure. *J Clin Pharmacol*. 2002 Jan;42(1):43–51.
84. Gieger C, Geistlinger L, Altmaier E, Hrabé de Angelis M, Kronenberg F, Meitinger T, et al. Genetics Meets Metabolomics: A Genome-Wide Association Study of Metabolite Profiles in Human Serum. Gibson G, editor. *PLoS Genet*. 2008 Nov 28;4(11):e1000282.
85. Roessner U, Beckles DM. Metabolite Measurements. In: Schwender J, editor. *Plant Metabolic Networks* [Internet]. New York, NY: Springer New York; 2009 [cited 2020 Oct 14]. p. 39–69. Available from: http://link.springer.com/10.1007/978-0-387-78745-9_3
86. Fiehn O. Metabolomics – the link between genotypes and phenotypes. *Plant Mol Biol*. 2002;48:155–71.
87. What is NMR? [Internet]. [cited 2020 Oct 14]. Available from: <http://chem.ch.huji.ac.il/nmr/whatisnmr/whatisnmr.html>
88. Roessner U, Bowne J. What is metabolomics all about? *BioTechniques*. 2009 Apr;46(5):363–5.
89. Όξενκλιουν-Πετροπούλου Μ. Φασματομετρικές Μέθοδοι. Συμμετρία; 2008.
90. Holmes E, Loo RL, Stamler J, Bictash M, Yap IKS, Chan Q, et al. Human metabolic phenotype diversity and its association with diet and blood pressure. *Nature*. 2008 May;453(7193):396–400.
91. Neubauer S. The Failing Heart — An Engine Out of Fuel. *N Engl J Med*. 2007 Mar 15;356(11):1140–51.
92. Andreadou I, Papaefthimiou M, Zira A, Constantinou M, Sigala F, Skaltsounis A-L, et al. Metabonomic identification of novel biomarkers in doxorubicin cardiotoxicity and protective effect of the natural antioxidant oleuropein. *NMR Biomed*. 2009 Jul;22(6):585–92.
93. Waterman CL, Kian-Kai C, Griffin JL. Metabolomic strategies to study lipotoxicity in cardiovascular disease. *Biochim Biophys Acta BBA - Mol Cell Biol Lipids*. 2010 Mar;1801(3):230–4.
94. Marazzi G, Rosanio S, Caminiti G, Dioguardi FS, Mercurio G. The role of amino acids in the modulation of cardiac metabolism during ischemia and heart failure. *Curr Pharm Des*. 2008;14(25):2592–604.
95. Harper AE, Miller RH, Block KP. Branched-chain amino acid metabolism. *Annu Rev Nutr*. 1984;4:409–54.

96. Rannels DE, Hjalmarson AC, Morgan HE. Effects of noncarbohydrate substrates on protein synthesis in muscle. *Am J Physiol.* 1974 Mar;226(3):528–39.
97. Schnackenberg LK, Pence L, Vijay V, Moland CL, George N, Cao Z, et al. Early metabolomics changes in heart and plasma during chronic doxorubicin treatment in B6C3F1 mice. *J Appl Toxicol.* 2016;36(11):1486–95.
98. Sansbury BE, DeMartino AM, Xie Z, Brooks AC, Brainard RE, Watson LJ, et al. Metabolic analysis of pressure-overloaded and infarcted mouse hearts. *Circ Heart Fail.* 2014 Jul;7(4):634–42.
99. Vg D, J CK, V V, CI M, Eh H, T L, et al. Early biomarkers of doxorubicin-induced heart injury in a mouse model. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2014 Oct 23;281(2):221–9.
100. Vijay V, Moland CL, Han T, Fuscoe JC, Lee T, Herman EH, et al. Early transcriptional changes in cardiac mitochondria during chronic doxorubicin exposure and mitigation by dexrazoxane in mice. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2016 Mar 15;295:68–84.
101. Heger Z, Cernei N, Kudr J, Gumulec J, Blazkova I, Zitka O, et al. A Novel Insight into the Cardiotoxicity of Antineoplastic Drug Doxorubicin. *Int J Mol Sci.* 2013 Oct 31;14(11):21629–46.
102. Cao Y, Kennedy R, Klimberg VS. Glutamine protects against doxorubicin-induced cardiotoxicity. *J Surg Res.* 1999 Jul;85(1):178–82.
103. Edes I, Kiss E, Kitada Y, Powers FM, Papp JG, Kranias EG, et al. Effects of Levosimendan, a cardiotonic agent targeted to troponin C, on cardiac function and on phosphorylation and Ca²⁺ sensitivity of cardiac myofibrils and sarcoplasmic reticulum in guinea pig heart. *Circ Res.* 1995 Jul;77(1):107–13.
104. Aviado DM. Inosine : a naturally occurring cardiotonic agent. *J Pharmacol.* 1983;14 Suppl 3:47–71.
105. Carvalho FS, Burgeiro A, Garcia R, Moreno AJ, Carvalho RA, Oliveira PJ. Doxorubicin-induced cardiotoxicity: from bioenergetic failure and cell death to cardiomyopathy. *Med Res Rev.* 2014 Jan;34(1):106–35.
106. Kim Y, Ma A-G, Kitta K, Fitch SN, Ikeda T, Ihara Y, et al. Anthracycline-induced suppression of GATA-4 transcription factor: implication in the regulation of cardiac myocyte apoptosis. *Mol Pharmacol.* 2003 Feb;63(2):368–77.
107. Nieminen MS, Pollesello P, Vajda G, Papp Z. Effects of Levosimendan on the Energy Balance: Preclinical and Clinical Evidence. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2009 Apr;53(4):302–310.