



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ**

**ΤΟΜΕΑΣ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΟΣ - ΚΛΙΝΙΚΟΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑΣ**

**«Μελέτη των καρδιαγγειακών και αιμοπεταλιακών επιδράσεων
τελικών καταβολικών προϊόντων των κατεχολαμινών με έμφαση στο
βανιλοαμυγδαλικό οξύ (VMA), *in vivo*»**

**Μιχάλης Κ. Κολεντίνης
ΙΑΤΡΟΣ**

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2013

«Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από την Ιατρική Σχολή του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων δεν υποδηλώνει αποδοχή των γνώμών του συγγραφέα Ν. 5343/32, άρθρο 202, παράγραφος 2 (νομική κατοχύρωση του Ιατρικού Τμήματος)»

Ημερομηνία αίτησης του κ. Κολεντίνη Μιχαήλ: 13-9-2007

Ημερομηνία ορισμού Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής: 613^α/2-10-2007

Μέλη Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής:

Επιβλέπων

Ευαγγέλου Άγγελος Καθηγητής φυσιολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Μέλη

Χαραλαμπίδης Κωνσταντίνος Αναπληρωτής Καθηγητής Φυσιολογίας με έμφαση στην κλινική-Λειτουργική Φυσιολογία Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Κιόρτσος Δημήτριος- Νικηφόρος Αναπληρωτής Καθηγητής Φυσιολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Ημερομηνία ορισμού θέματος: 4-6-2008

«Μελέτη των καρδιαγγειακών και αιμοπεταλιακών επιδράσεων τελικών καταβολικών προϊόντων των κατεχολαμινών με έμφαση στο βανλοαμυγδαλικό οξύ (VMA) in vivo»

Ημερομηνία 1ης Ανασυγκρότησης Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής: 658^α/7-4-2009

Μέλη Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής:

Επιβλέπων

Ευαγγέλου Άγγελος Καθηγητής φυσιολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Μέλη

Κωνσταντόπουλος Σταύρος Καθηγητής Παθολογίας –Πνευμονολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Κατσούρας Χρήστος Επίκουρος Καθηγητής Καρδιολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Ημερομηνία 2ης Ανασυγκρότησης Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής: 697^α/7-12-2010

Μέλη Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής:

Επιβλέπων

Ευαγγέλου Άγγελος Καθηγητής Φυσιολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Μέλη

Κωνσταντόπουλος Σταύρος Καθηγητής Παθολογίας –Πνευμονολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Καρκαμπούνας Σπυρίδωνας Επίκουρος Καθηγητής Φυσιολογίας με έμφαση στην Περιβαλλοντολογική Φυσιολογία Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Ημερομηνία 3ης Ανασυγκρότησης Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής: 721^α/11-10-2011

Μέλη Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής:

Επιβλέπων

Ευαγγέλου Άγγελος Καθηγητής Φυσιολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Μέλη

Κωλέττης Θεόφιλος Αναπληρωτής Καθηγητής Καρδιολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Καρκαμπούνας Σπυρίδωνας Επίκουρος Καθηγητής Φυσιολογίας με έμφαση στην Περιβαλλοντολογική Φυσιολογία Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

ΑΙΟΡΙΣΜΟΣ ΕΠΤΑΜΕΛΟΥΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ : 737^α/12-6-2012

| | |
|------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Ευαγγέλου Άγγελος | Καθηγητής Φυσιολογίας, Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων |
| Καλφακάκου Βασιλική | Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Φυσιολογίας, Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων |
| Κωλέττης Θεόφιλος | Αναπληρωτής Καθηγητής Καρδιολογίας, Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων |
| Βεζυράκη Πατρώνα | Επίκουρη Καθηγήτρια Φυσιολογίας, Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων |
| Καρκαμπούνας Σπυρίδων | Επίκουρος Καθηγητής Φυσιολογίας με έμφαση στην Περιβαλλοντολογική Φυσιολογία, Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων |
| Κατσούρας Χρήστος | Επίκουρος Καθηγητής Καρδιολογίας, Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων |
| Νάκα Αικατερίνη | Επίκουρη Καθηγήτρια Καρδιολογίας, Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων |

Έγκριση Διδακτορικής Διατριβής με βαθμό «ΑΡΙΣΤΑ» στις 11-12-2012

ΠΡΟΕΔΡΟΣ ΤΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΣΧΟΛΗΣ

Μαργαρίτα Τζαφλίδου

Καθηγήτρια Ιατρικής Φυσικής

Η Γραμματέας της Σχολής

ΜΑΡΙΑ ΚΑΠΙΤΟΠΟΥΛΟΥ

Αφιερώσεις

Στους γονείς μου,
Κωνσταντίνο και Βασιλική

στα αδέρφια μου,
Παναγιώτη, Χρήστο και Χαρά

«Επιστήμη ποιητική ευδαιμονίας»

Πλάτων

Πρόλογος

Το ανθρώπινο σώμα είναι μία λειτουργική οντότητα εκπληκτικής πολυπλοκότητας. Εκατό τρισεκατομμύρια κύτταρα συνεργάζονται ακατάπαυστα κάθε στιγμή της ώρας πραγματοποιώντας καταπληκτικές και, πολλές φορές, μυστηριώδεις λειτουργίες. Μόλις τον προηγούμενο αιώνα έθεσε η ανθρωπότητα τις βάσεις της κατανόησής του. Η εξέλιξη της ιατρικής και η παράλληλα ανάπτυξη άλλων επιστημών, όπως της μοριακής βιολογίας, της βιοχημείας και της φαρμακολογίας, επέτρεψαν την αποσαφήνιση των μηχανισμών της λειτουργίας πολλών ιστών και οργάνων στον ανθρώπινο οργανισμό.

Πολλά βιολογικά ενεργά μόρια εμπλέκονται στη διακυτταρική επικοινωνία. Τέτοια είναι οι κατεχολαμίνες, οι οποίες ρυθμίζουν πολλές βασικές ανθρώπινες λειτουργίες. Για αυτό, άλλωστε, υπήρξαν από τα πρώτα μόρια που μελετήθηκαν εκτενώς, ενώ η βιολογική τους σημασία στην ομοιόσταση του οργανισμού εξακολουθεί να μας εκπλήσει ακόμη και σήμερα.

Πολλές μελέτες έχουν καταδείξει ότι πολλοί τελικοί καταβολίτες βιολογικά ενεργών ουσιών οι οποίες παράγονται από τον ανθρώπινο οργανισμό εξακολουθούν να εκφράζουν κάποια δραστικότητα σε διάφορα συστήματα. Τέτοιοι καταβολίτες είναι αυτοί των στεροειδών ορμονών, της μελατονίνης, της βιταμίνης D, της διϋδροεπιανδροστερόνης καθώς και του αραχιδονικού οξέος. Παράλληλα, για όλα τα τελικά καταβολικά προϊόντα των κατεχολαμινών που έχουν μελετηθεί (μετανεφρίνη, νορμετανεφρίνη κ.ά.) έχουν διαπιστωθεί βιολογικές δράσεις.

Το βανιλοαμυγδαλικό οξύ μελετήθηκε σε πειράματα που διεξήχθησαν στο Εργαστήριο της Πειραματικής Φυσιολογίας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, στα οποία σημειώθηκε η βιολογική του δραστικότητα σε ανθρώπινα αιμοπετάλια. Η ιδιότητά του αυτή αποδόθηκε από τους μελετητές στον μεθόξυ φαινολικό δακτύλιο που βρίσκεται στο μόριό του. Η παρατήρηση αυτή έδωσε την ιδέα της περαιτέρω μελέτης του σε *in vivo*, πλέον, πειραματικά μοντέλα ενώ θα ήταν η πρώτη φορά που θα γινόταν μια τέτοια προσπάθεια. Καθώς πρόκειται για τελικό μεταβολίτη της επινεφρίνης και της νορεπινεφρίνης, οι οποίες επηρεάζουν έντονα το καρδιαγγειακό σύστημα, θεωρήθηκε σκόπιμο να μελετηθεί η επίδρασή του στο καρδιαγγειακό σύστημα επίμυων Wistar.

Ο σκοπός της παρούσης διατριβής είναι η επιπλέον κατανόηση του ρόλου του βανιλοαμυγδαλικού οξέος στη ρύθμιση της καρδιακής και αγγειακής λειτουργίας σε

φυσιολογικές και παθολογικές καταστάσεις (οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου) και η εύρεση των μηχανισμών που εξηγούν αυτό το ρόλο.

Θα ήθελα, κατ' αρχήν, να ευχαριστήσω θερμά τον επιβλέποντα της διατριβής μου Καθηγητή κ. Άγγελο Ευαγγέλου για τη δυνατότητα που μου προσέφερε να εργαστώ σε αυτό το δύσκολο ερευνητικό πεδίο, για την αμέριστη στήριξη και συμπαράσταση στις διάφορες δυσκολίες και, φυσικά, για την αδιάλειπτη και εμπειριστατωμένη επίβλεψη που μου προσέφερε όλα αυτά τα χρόνια.

Ευχαριστώ τον Επίκουρο Καθηγητή κ. Σπυρίδωνα Καρκαμπούνα, μέλος της τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής, για τις χρήσιμες υποδείξεις του στις πειραματικές διαδικασίες τις παρούσης διατριβής.

Θερμά ευχαριστήρια στον Καθηγητή κ. Θεόφιλο Κωλέττη, επίσης μέλος της τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής, για τις πολύτιμες υποδείξεις του στα πειραματικά πρωτόκολλα, τη στήριξη και ενασχόλησή του σε όλες τις φάσεις της διατριβής.

Δεν θα μπορούσα, φυσικά, να μην ευχαριστήσω ξεχωριστά τον Βιολόγο Ιωάννη Βεργινάδη καθώς και τον Κλινικό Διαιτολόγο-Διατροφολόγο Γιάννη Σίμο για την πολύτιμή βοήθειά τους στην υλοποίηση των πειραμάτων, τη συμβολή τους στην ανάλυση και συγγραφή των αποτελεσμάτων και την υποστήριξή τους σε κάθε βήμα αυτής της προσπάθειας.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω από καρδιάς τη Βιολόγο Ναταλία Τσίτου, όλα τα μέλη του εργαστηρίου της Φυσιολογίας, μέλη ΔΕΠ, μεταπτυχιακούς και διδακτορικούς φοιτητές και τα μέλη Ε.Τ.Ε.Π. και Ε.Ε.Δ.Ι.Π. για την άριστη συνεργασία μας.

Περιεχόμενα

| | |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Εισαγωγή..... | 3 |
| 1. Βιβλιογραφική ανασκόπηση | 3 |
| 1.1 Αυτόνομο νευρικό σύστημα..... | 3 |
| 1.1.1 Οργάνωση του ANΣ..... | 3 |
| 1.1.2 Ανατομία | 4 |
| 1.1.3 Φυσιολογία..... | 4 |
| 1.1.4 Αδρενεργικοί- Χολινεργικοί υποδοχείς | 5 |
| 1.1.5 Δράσεις..... | 6 |
| 1.1.6 Αυτόνομα καρδιαγγειακά αντανακλαστικά τόξα..... | 7 |
| 1.1.7 Μυελός των επινεφριδίων | 9 |
| 1.1.8 Κατεχολαμίνες- Σύνθεση και μεταβολισμός..... | 9 |
| 1.2 Χημική δομή και ιδιότητες του VMA..... | 13 |
| 1.2.1 Βανιλοειδή..... | 13 |
| 1.2.2 Υποδοχέας των βανιλοειδών - TRPV1- και αγωνιστές του..... | 14 |
| 1.2.3 Ο υποδοχέας TRPV1 και αυτόνομα αγγειοκινητικά αντανακλαστικά | 15 |
| 1.2.4 Το VMA ως διαγνωστικό εργαλείο..... | 16 |
| 1.2.5 Το VMA ως αντιαιμοπεταλιακός παράγοντας..... | 17 |
| 1.3 Ομοβανιλικό οξύ και τριμεταζιδίνη | 19 |
| 1.3.1 Ομοβανιλικό οξύ | 20 |
| 1.3.2 Τριμεταζιδίνη | 20 |
| 1.4 Οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου | 21 |
| 2. Σκοπός της εργασίας | 29 |
| 3. Υλικά και μέθοδοι | 31 |
| 3.1 In vivo | 31 |
| 3.1.1 Χημικά και αντιδραστήρια..... | 31 |
| 3.1.2 Αναισθησία..... | 32 |
| 3.1.3 Καθετηριασμός κοινής καρωτίδας..... | 33 |
| 3.1.4 Ηλεκτροκαρδιογράφημα και μέτρηση ενδαρτηριακής πίεσης..... | 34 |
| 3.1.5 Πειραματικό πρωτόκολλο - VMA, HVA, TMZ. | 35 |
| 3.1.6 Μελέτη επίδρασης VMA στη δραστικότητα της επινεφρίνης και ισοπροτερενόλης | 36 |
| 3.1.7 Μελέτη μέτρησης δραστικότητας VMA μετά από αμφοτερόπλευρη βαγοτομή..... | 37 |
| 3.1.8 Ενδοπεριτοναϊκή έγχυση VMA. | 38 |
| 3.1.9 Οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου | 38 |
| 3.2 Ex vivo | 44 |
| 3.2.1 Αιμοπεταλιακή συσσώρευση-ο ρόλος του Ca^{++} | 44 |
| 3.2.2 Μελέτη επίδρασης του VMA στη διακίνηση του Ca^{++} κατά τη δοκιμασία αιμοπεταλιακής συσσώρευσης..... | 45 |
| 3.3 In vitro | 47 |
| 3.3.1 Μέτρηση αντιοξειδωτικής ικανότητας του VMA με την μέθοδο TAC (Total Antioxidant Capacity) | 47 |
| 3.3.2 Μέτρηση οξείας τοξικότητας του VMA στο ήπαρ και στους νεφρούς | 48 |
| 3.4 Στατιστική ανάλυση αποτελεσμάτων..... | 48 |
| 4. Αποτελέσματα | 51 |
| 4.1 In vivo | 51 |
| 4.1.1 Επίδραση του VMA στην καρδιακή συχνότητα και την αρτηριακή πίεση | 51 |

| | |
|-------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 4.1.2 Επίδραση του HVA και της TMZ στην καρδιακή συχνότητα και αρτηριακή πίεση..... | 54 |
| 4.1.3 Δραστικότητα επινεφρίνης και ισοπροτερενόλης | 55 |
| 4.1.4 Δραστικότητα VMA μετά από αμφοτερόπλευρη βαγοτομή..... | 56 |
| 4.1.5 Ενδοπεριτοναϊκή έγχυση VMA..... | 58 |
| 4.1.6 Αποτελέσματα μετά από την πρόκληση οξέος εμφράγματος του μυοκαρδίου.. | 58 |
| 4.1.7 Πρόκληση αρρυθμιών με έγχυση αδρεναλίνης..... | 62 |
| 4.2 Ex vivo..... | 63 |
| 4.2.1 Αποτελέσματα αιμοπεταλιακής συσσώρευσης | 63 |
| 4.3 In vitro | 65 |
| 4.3.1 Αποτελέσματα μέτρησης Ολικής Αντιοξειδωτικής Ικανότητας | 65 |
| 4.3.2 Αποτελέσματα μέτρησης ηπατικών ενζύμων και κρεατινίνης..... | 65 |
| 5. Συζήτηση | 67 |
| 6. Συμπεράσματα..... | 75 |
| 7. Περιλήψεις..... | 77 |
| 8. Βιβλιογραφία | 79 |
| 9. Δημοσιεύσεις – Ανακοινώσεις | 91 |

Εισαγωγή

1. Βιβλιογραφική ανασκόπηση

1.1 Αυτόνομο νευρικό σύστημα

Το αυτόνομο νευρικό σύστημα (ΑΝΣ) είναι το τμήμα του κεντρικού νευρικού συστήματος (ΚΝΣ) που ελέγχει τις σπλαχνικές λειτουργίες του οργανισμού. Οι σημαντικότερες εξ' αυτών είναι η λειτουργία της καρδιάς, του πνεύμονα, του στομάχου, του εντέρου καθώς και ο αγγειακός τόνος. Άλλες λειτουργίες που ρυθμίζονται από το ΑΝΣ είναι η ενδοκρινής και εξωκρινής μοίρα πολλών αδένων και οργάνων (π.χ. σιελογόνοι αδένες, ιδρωτοποιί αδένες, πάγκρεας, στόμαχος), η αποβολή των ούρων από την ουροδόχο κύστη, η κινητικότητα του εντέρου και η στυτική λειτουργία. Το ΑΝΣ δρα αυτόνομα από τη συνειδητή ανώτερη εγκεφαλική λειτουργία (εγκεφαλικός φλοιός) και ρυθμίζει σε ελάχιστο χρόνο τις σπλαχνικές λειτουργίες ώστε να ανταποκριθούν ανάλογα στις εκάστοτε συνθήκες (παράγραφος 1.1.5).

1.1.1 Οργάνωση του ΑΝΣ

Το ΑΝΣ ενεργοποιείται μέσω πυρήνων που εδράζονται στον νωτιαίο μυελό, στο εγκεφαλικό στέλεχος και στον υποθάλαμο, ενώ δέχεται νύρωση και από τον κινητικό εγκεφαλικό φλοιό. Οι προσαγωγοί νευρώνες μεταφέρουν σήματα από τα περιφερικά όργανα όπως η καρδιά ή τα αγγεία προς τους αυτόνομους πυρήνες. Αυτοί, με τη σειρά τους, ενεργοποιούν αυτόνομα υποσυνείδητα αντανακλαστικά, ρυθμίζοντας έτσι τη λειτουργία των σπλαχνικών οργάνων. Το ΑΝΣ χωρίζεται δομικά και ανατομικά σε δύο συστήματα: Το Συμπαθητικό νευρικό σύστημα και το Παρασυμπαθητικό νευρικό σύστημα.

1.1.2 Ανατομία

Τα συμπαθητικά νεύρα εκβάλλουν από τις πρόσθιες ρίζες του νωτιαίου μυελού της θωρακικής (ΘΜΣΣ) και οσφυϊκής (ΟΜΣΣ) μοίρας της σπονδυλικής στήλης. Αποτελούνται από δύο νευρώνες: τον προσυναπτικό και τον μετασυναπτικό, σε αντίθεση με τον ένα μόνο νευρώνα των υπόλοιπων περιφερικών κινητικών νεύρων. Το σώμα του προσυναπτικού νευρώνα βρίσκεται στον νωτιαίο μυελό και ο νευράξονάς του καταλήγει στο νευρικό γάγγλιο του συμπαθητικού πλέγματος όπου συνάπτεται με τον μετασυναπτικό νευρώνα, των οποίων τα σώματα σχηματίζουν το γάγγλιο. Από εκεί οι νευράξονές τους, σχηματίζοντας νεύρα, καταλήγουν στα όργανα-στόχους.

Εξάιρεση αποτελεί ο μυελός των επινεφριδίων, ο οποίος δέχεται νευρώση απευθείας από προσυναπτικούς νευρώνες χωρίς τη μεσολάβηση του συμπαθητικού πλέγματος. Στον μυελό, οι απολήξεις των νευραξόνων συνάπτονται με ειδικά νευροενδοκρινικά κύτταρα που εκκρίνουν τις δύο βασικότερες κατεχολαμίνες: την επινεφρίνη και την νορεπινεφρίνη.

Το παρασυμπαθητικό νευρικό σύστημα αποτελείται από νεύρα που εκβάλλουν κυρίως από την αυχενική (ΑΜΣΣ) και δευτερευόντως από την ιεροκοκκυγική μοίρα της σπονδυλικής στήλης. Τα κυριότερα νεύρα που το αποτελούν είναι οι 3^η, 7^η, 9^η και 10^η εγκεφαλική συζυγία δηλαδή το κοινό κινητικό, το προσωπικό, το γλωσσοφαρυγγικό και το πνευμονογαστρικό νεύρο αντίστοιχα, ενώ ένα μόνο μικρό τμήμα του βρίσκεται στο ιερό πλέγμα και νευρώνει την ουροδόχο κύστη και τον σφιγκτήρα του πρωκτού. Ωστόσο, περίπου το 75% όλων των παρασυμπαθητικών ινών βρίσκονται στο πνευμονογαστρικό νεύρο, για αυτό και αυτό αποτελεί τον κύριο παράγοντα έκφρασης του (Guyton and Hall, 2006).

1.1.3 Φυσιολογία

Το ΑΝΣ, όπως έχει προαναφερθεί, είναι επί της ουσίας ένας σχηματισμός αποτελούμενος από νευρικά κύτταρα, τα οποία έχουν συγκεκριμένη ανατομική και λειτουργική διάταξη. Η διακυτταρική επικοινωνία συντελείται μέσω συγκεκριμένων νευροδιαβιβαστών, της

ακετυλοχολίνης και της νορεπινεφρίνης. Οι νευρώνες που εκκρίνουν ακετυλοχολίνη ονομάζονται χολινεργικοί ενώ όσοι εκκρίνουν νοραδρεναλίνη ονομάζονται αδρενεργικοί.

Οι προσυναπτικοί νευρώνες και των δύο αυτόνομων συστημάτων είναι αποκλειστικά χολινεργικοί διεγείροντας τους μετασυναπτικούς μέσω της ακετυλοχολίνης. Αντίστοιχα, οι μετασυναπτικοί είναι κυρίως αδρενεργικοί στο συμπαθητικό νευρικό σύστημα και χολινεργικοί στο παρασυμπαθητικό.

Οι νευροδιαβιβαστές αποθηκεύονται σε ειδικά κυστίδια στις νευρικές απολήξεις των νευρώνων. Ένα δυναμικό ενέργειας (EPSP-Excitatory PostSynaptic Potential) που εκπολώνει την νευρική κυτταρική μεμβράνη, επιτρέπει την είσοδο ιόντων ασβεστίου στο κυτταρόπλασμα έτσι ώστε τα κυστίδια συντήκονται με την κυτταρική μεμβράνη απελευθερώνοντας, έτσι, τους νευροδιαβιβαστές στη συναπτική σχισμή (Guyton and Hall, 2006).

1.1.4 Αδρενεργικοί- Χολινεργικοί υποδοχείς

Τα δύο αυτόνομα συστήματα πραγματώνουν τις δράσεις τους στα αντίστοιχα όργανα μέσω συγκεκριμένων υποδοχέων: τους αδρενεργικούς και τους χολινεργικούς υποδοχείς.

Οι αδρενεργικοί υποδοχείς που ενεργοποιούνται από τους συμπαθητικούς νευρώνες διαιρούνται αδρά, με τη σειρά τους, στους α_1 , α_2 , β_1 και β_2 . Η επινεφρίνη και η νορεπινεφρίνη, είναι αδρενεργικοί αγωνιστές διαφορετικής, ωστόσο, εκλεκτικότητας. Η επινεφρίνη διεγείρει, κυρίως, τους β υποδοχείς και λιγότερο τους α , ενώ το αντίθετο συμβαίνει με την νορεπινεφρίνη. Οι συγκριτικές δράσεις των δύο αυτών ουσιών στα διάφορα όργανα είναι συνάρτηση του τύπου και της συγκέντρωσης των υποδοχέων στον συγκεκριμένο ιστό. Ο Πίνακας 1 δείχνει τις δράσεις της διέγερσης των αδρενεργικών υποδοχέων.

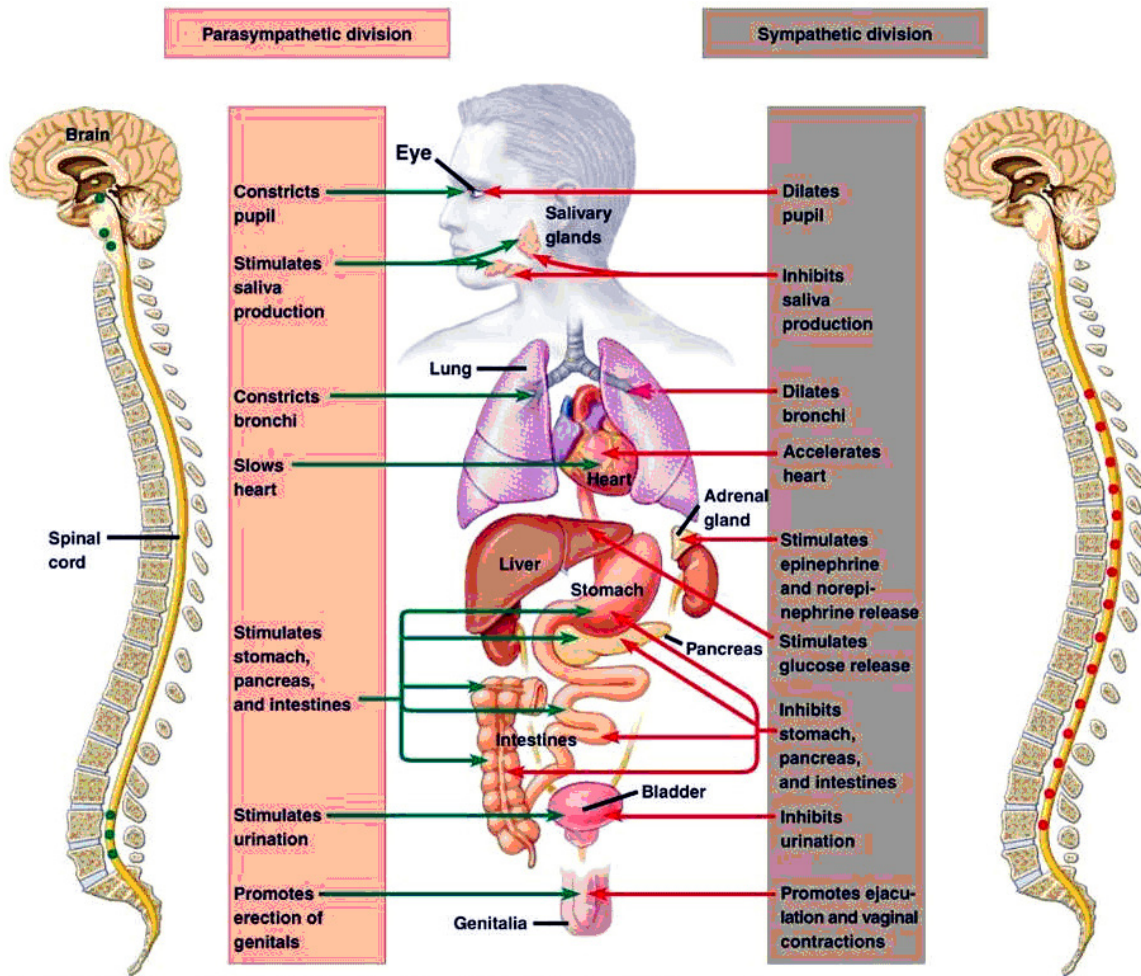
Η ακετυλοχολίνη συνδέεται με δύο τύπους υποδοχέων: τους μουσκαρινικούς και τους νικοτινικούς. Οι μουσκαρινικοί υποδοχείς εδράζονται στην κυτταρική μεμβράνη των κυττάρων των ιστών που διεγείρονται από τον μετασυναπτικό παρασυμπαθητικό νευρώνα ενώ οι νικοτινικοί ανευρίσκονται στα αυτόνομα γάγγλια ανάμεσα σε προ- και μετασυναπτικούς νευρώνες και των δύο αυτόνομων συστημάτων.

Πίνακας 1. Οι αδρενεργικοί υποδοχείς και η λειτουργία τους

| α υποδοχείς | β υποδοχείς |
|------------------------------|---------------------------------------|
| αγγειοσυσπαση | αγγειοδιαστολή (β_2) |
| μυδρίαση | θετική χρονότροπη δράση (β_1) |
| μείωση κινητικότητας εντέρου | θετική ινότροπη δράση (β_1) |
| σύσφιξη σφιγκτήρων | χάλαση της κύστης (β_2) |
| σύσπαση ανελκτήρα της τρίχας | βρογχοδιαστολή (β_2) |
| | γλυκογονόλυση (β_2) |
| | λιπόλυση (β_1) |
| | χαλάρωση εντέρου (β_2) |

1.1.5 Δράσεις

Η Εικόνα 1 δείχνει τις δράσεις του ΑΝΣ στα διάφορα όργανα- στόχους. Πρέπει να τονιστεί ότι οι δράσεις του συμπαθητικού και του παρασυμπαθητικού είναι αντίθετες στους ιστούς όπου εκφράζονται και τα δύο. Η βασική λειτουργία του συμπαθητικού είναι η δράση ‘μάχη ή φυγή’ που εκλύεται σε καταστάσεις σωματικού ή ψυχικού στρες. Αν και η δράση του μπορεί να είναι τοπική και να περιορίζεται σε ένα μόνο όργανο, όταν ο οργανισμός βρεθεί σε καταστάσεις φόβου, στρες και απειλητικές για τη ζωή προκαλείται μαζική ενεργοποίηση- εκπόλωση του συμπαθητικού. Αυτό το γεγονός επιτρέπει τη δυνατότητα διενέργειας έντονου μυϊκού έργου, όξυνση αισθήσεων και πνευματική διέγερση. Επιπλέον, αυξάνει την αρτηριακή πίεση μέσω αγγειοσυσπασης στα σπλαχνικά αγγεία και την καρδιακή παροχή λόγω θετικής ινότροπης και χρονότροπης δράσης στο μυοκάρδιο. Τέλος, διεγείρει τη διαδικασία της γλυκογονόλυσης και της γλυκονεογένεσης, αυξάνει τον κυτταρικό μεταβολισμό και την αιμάτωση του μυοκαρδίου και των γραμμωτών μυών ενώ παράλληλα επιφέρει πνευματική ενάργεια και μειώνει την ουδό του πόνου. Τέλος, η επινεφρίνη, αν και δεν αποτελεί αυτόνομο αιμοπεταλιακό αγωνιστή, εντούτοις ενισχύει τον καταρράκτη της αιμοπεταλιακής συσσώρευσης μέσω των α_2 αδρενεργικών υποδοχέων. Φαίνεται πως οι υποδοχείς αυτοί συνδέονται με G πρωτεΐνες οι οποίες οδηγούν στην αποκοκκίωση και στη συσσώρευση των αιμοπεταλίων (Haaland and Holmsen, 2011; Offermanns, 2006; Steen and al., 1993).



Εικόνα 1. Δράσεις του ΑΝΣ στα διάφορα όργανα-στόχους.

Αντίθετα, το παρασυμπαθητικό ευοδώνει την γενικότερη ηρεμία του οργανισμού και τη λειτουργία πολλών εξωκρινών αδένων. Αν και η δράση του στο καρδιαγγειακό σύστημα περιορίζεται, βασικά, στην ελάττωση της καρδιακής συχνότητας μέσω του πνευμονογαστρικού νεύρου εμπλέκεται, εντούτοις, σε διάφορα αντανακλαστικά τόξα που θα συζητηθούν εκτενέστερα παρακάτω (παράγραφος 1.1.6).

1.1.6 Αυτόνομα καρδιαγγειακά αντανακλαστικά τόξα

Η λειτουργία του καρδιαγγειακού συστήματος επηρεάζεται άμεσα από το ΑΝΣ μέσω συγκεκριμένων αντανακλαστικών τόξων που ως στόχο έχουν τη διατήρηση της αρτηριακής πίεσης σε φυσιολογικό εύρος ώστε να επιτελείται ικανοποιητικά η αιμάτωση

των ιστών. Λειτουργούν, κατά βάση, μέσω αρνητικής παλίνδρομης ρύθμισης. Τα κυριότερα είναι τα εξής:

A) Αντανακλαστικό των τασεοϋποδοχέων: Ειδικοί τασεοϋποδοχείς-ελεύθερες νευρικές απολήξεις βρίσκονται στα τοιχώματα των αρτηριών και ειδικότερα στο καρωτιδικό σωματίο και στο τοίχωμα του αορτικού τόξου. Αύξηση της αρτηριακής πίεσης αναστέλλει το συμπαθητικό νευρικό σύστημα και ενεργοποιεί το πνευμονογαστρικό νεύρο έτσι ώστε να προκληθεί αγγειοδιαστολή, βραδυκαρδία και μείωση της έντασης συστολής της καρδιάς.

B) Κολπικό αντανακλαστικό: Είναι αντανακλαστικό παρόμοιο με αυτό των τασεοϋποδοχέων. Εξειδικευμένα κύτταρα στους κόλπους του μυοκαρδίου απαντούν σε ταχεία αύξηση του ενδαγγειακού όγκου ενεργοποιώντας το παρασυμπαθητικό και αναστέλλοντας το συμπαθητικό ώστε να αποφευχθεί η απότομη αύξησή της αρτηριακής πίεσης.

Γ) Αντανακλαστικό κοιλιακής συμπίεσης: Η σύσπαση των κοιλιακών μυών και η αύξηση της ενδοκοιλιακής πίεσης αυξάνουν τη φλεβική επαναφορά στην καρδιά με αποτέλεσμα τη βελτιωμένη καρδιακή παροχή και αρτηριακή πίεση.

Δ) Αντανακλαστικό των Bezold-Jarisch: Πρόκειται για ένα ανασταλτικό αντανακλαστικό. Προσαγωγές νευρικές ίνες του πνευμονογαστρικού νεύρου που βρίσκονται στην αριστερή κοιλία της καρδιάς ενεργοποιούν το πνευμονογαστρικό και αναστέλλουν την συμπαθητική επίδραση στο μυοκάρδιο. Έτσι προκαλείται βραδυκαρδία, αγγειοδιαστολή και πτώση της αρτηριακής πίεσης.

E) Αντανακλαστικό Bainbridge: Εκλύεται όταν ειδικοί τασεοϋποδοχείς στους κόλπους ενεργοποιούνται από τη διάταση των κόλπων. Ερεθίσματα μεταφέρονται, μέσω του πνευμονογαστρικού, στον νευρικό φλοιό ο οποίος διεγείρει το ANΣ με αποτέλεσμα θετική ινότροπη και χρονότροπη δράση.

ΣΤ) Αντανακλαστικό του ενδαγγειακού όγκου: Είναι ένα αντανακλαστικό που δρα αντιρροπιστικά ως απάντηση στην αύξηση του ενδαγγειακού όγκου. Η διάταση των κόλπων προκαλεί αναστολή της έκκρισης της αντιδιουρητικής ορμόνης και διαστολή του προσαγωγού αρτηριδίου στους νεφρώνες. Ο συνδυασμός αυτός ελαττώνει τον ενδαγγειακό όγκο και, κατ'επέκταση, το καρδιακό έργο.

1.1.7 Μυελός των επινεφριδίων

Τα επινεφρίδια είναι ενδοκρινείς αδένες που χωρίζονται ανατομικά στον φλοιό και στον μυελό. Ο μυελός διεγείρεται από τους συμπαθητικούς νευρώνες και εκκρίνει τις δύο βασικές κατεχολαμίνες: την επινεφρίνη και την νορεπινεφρίνη. Η αναλογία παραγωγής τους είναι, κατά μέσο όρο, 80/20 υπέρ της επινεφρίνης. Όταν απελευθερώνονται στη κυκλοφορία εκφράζουν συστηματικές δράσεις μέσω των αδρενεργικών υποδοχέων, όπως έχει αναφερθεί στην παράγραφο 1.1.5. Η διάρκεια δράσης τους είναι βραχύβια, της τάξης των 5 έως 10 λεπτών καθώς μεταβολίζονται ταχύτατα.

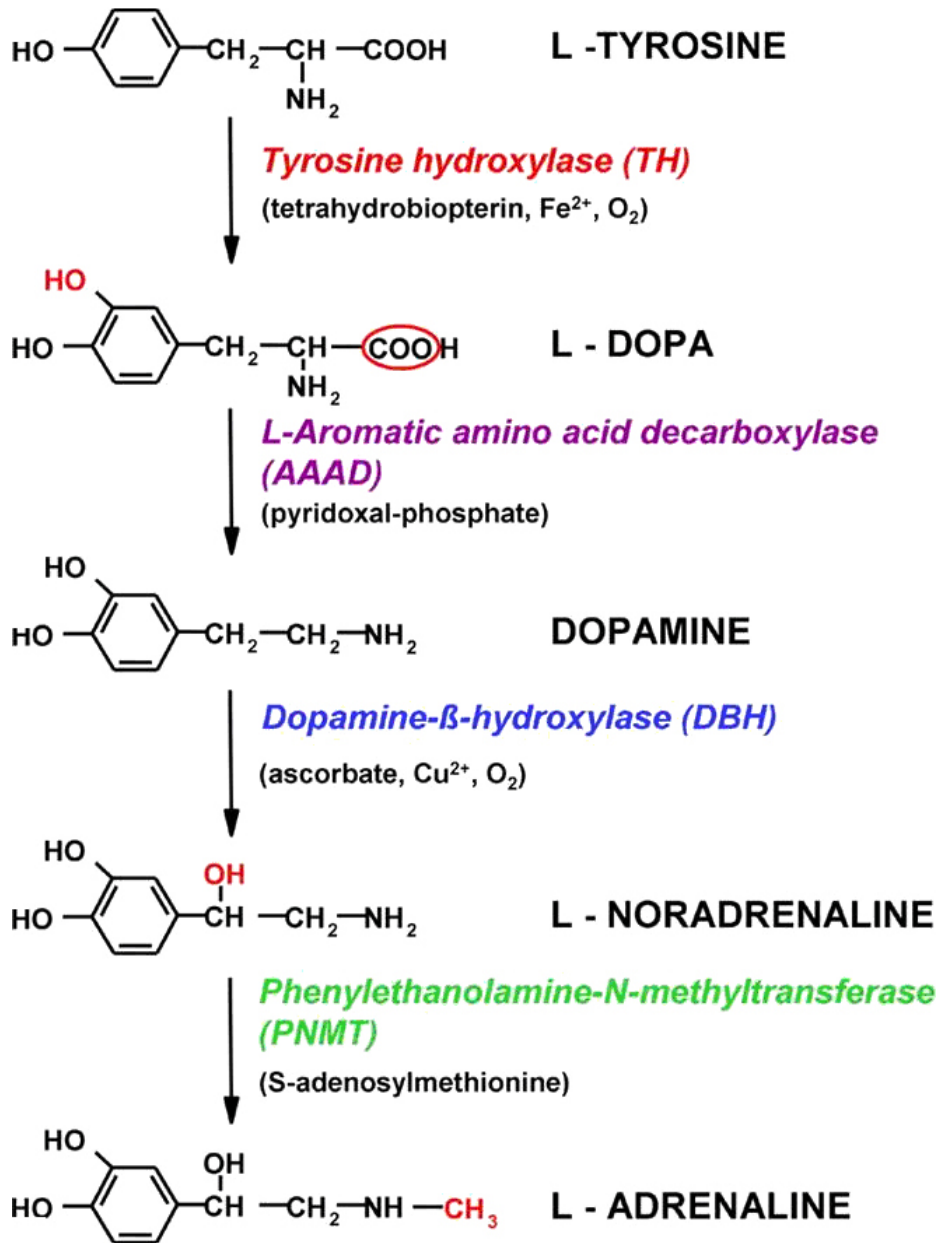
Η επινεφρίνη δρα κυρίως στους β υποδοχείς που εκφράζονται, πρωτίστως, στο μυοκάρδιο και στους βρόγχους προκαλώντας θετική ινότροπη και χρονότροπη δράση και βρογχοδιαστολή. Ταυτόχρονα αυξάνει τον μεταβολικό ρυθμό μέσω της γλυκονόλυσης στο ήπαρ και στον μυϊκό ιστό. Αντίθετα, η νορεπινεφρίνη δρα κυρίως στους α υποδοχείς αυξάνοντας τον αγγειακό τόνο και την αρτηριακή πίεση μέσω αγγειόσπασμου.

1.1.8 Κατεχολαμίνες- Σύνθεση και μεταβολισμός

Οι κατεχολαμίνες είναι μια ομάδα ενδογενών μορίων που ανήκουν σε ένα ευρύτερο σύνολο ενώσεων, τις βιογενείς αμίνες. Οι κατεχολαμίνες περιλαμβάνουν την επινεφρίνη, τη νορεπινεφρίνη και τη ντοπαμίνη. Η ντοπαμίνη δρα ως νευροδιαβιβαστής στο Κεντρικό Νευρικό Σύστημα (ΚΝΣ) σε κέντρα που ρυθμίζουν την συμπεριφορά, όπως την επιβράβευση, την υποκίνηση και την ενίσχυση συγκεκριμένων συμπεριφορικών προτύπων, καθώς και τον ύπνο, τη διάθεση, την προσοχή και τη μάθηση. Στη συστηματική κυκλοφορία ανάλογα με τη συγκέντρωσή της στο αίμα, η ντοπαμίνη παρουσιάζει θετική ινότροπη και χρονότροπη δράση στο μυοκάρδιο και ήπια διουρητική δράση ενώ έχει και αγγειοκινητικές ιδιότητες προκαλώντας αγγειοσύσπασση και συνοδό αύξηση της αρτηριακής πίεσης. Η ντοπαμίνη δρα σε κυτταρικό επίπεδο μέσω των ντοπαμινεργικών υποδοχέων D1, D2, D3, D4 και D5

Η βιοσύνθεση των κατεχολαμινών αναλύεται στην Εικόνα 2. Το πρόδρομο μόριο σύνθεσής τους είναι η L-τυροσίνη η οποία μετατρέπεται σε L-διϋδροξυφαιτυλαλανίνη (L-

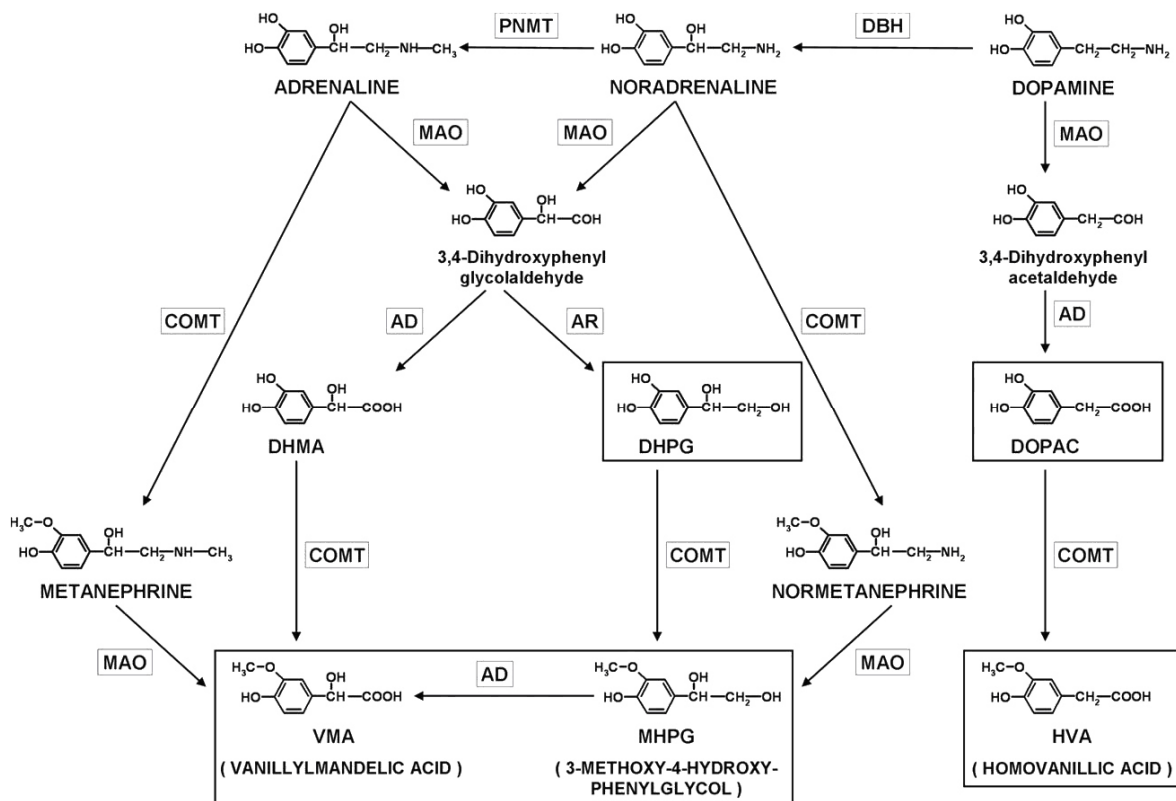
ντόπα) από τον ένζυμο υδροξυλάση της τυροσίνης. Η L-διϋδροξυφαινυλαλανίνη μεταβολίζεται περαιτέρω σε ντοπαμίνη η οποία, με τη σειρά της, μετατρέπεται σε νορεπινεφρίνη. Τέλος, η νορεπινεφρίνη καταλήγει στην επινεφρίνη στο τελικό στάδιο της σύνθεσής της.



Εικόνα 2. Οδός βιοσύνθεσης των κατεχολαμινών και τα ενζυμικά βήματά της (από Kvetnansky R et al., *Physiol Rev* 2009; 89: 535-606).

Οι κατεχολαμίνες έχουν πολύ μικρό χρόνο ημίσειας ζωής καθώς μεταβολίζονται ταχύτατα από τα ένζυμα μονοαμινοξυδάση (MAO) και κατεχολ-ο-μεθυλοτρανφεράση

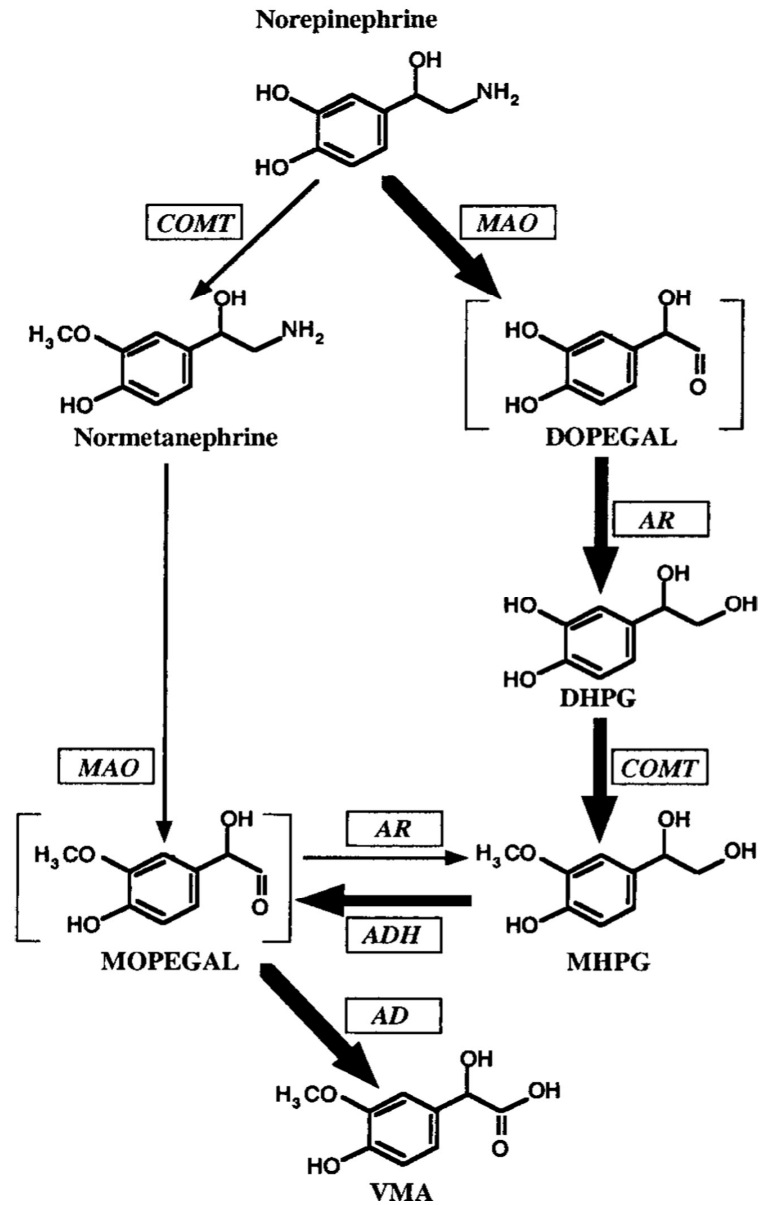
(COMT). Ο καταβολισμός των κατεχολαμινών επινεφρίνη και νορεπινεφρίνη (Εικόνα 3) έχει ως κυριότερα τελικά καταβολικά προϊόντα το βανυλοαμυγδαλικό ή βανιλομανδελικό οξύ (VMA), τη 3-μεθοξυ-4-υδροξυ-φαινυλ-γλυκόλη (MHPG), τη μετανεφρίνη (MTN) και τη νορμετανεφρίνη (NMN). Η ντοπαμίνη μεταβολίζεται, κυρίως, σε ομοβαλινικό οξύ (HVA) στο ΚΝΣ. Αν και υπάρχουν τρεις τουλάχιστον μεταβολικοί οδοί, η βασικότερη λαμβάνει χώρα στους συμπαθητικούς νευρώνες όσον αφορά την νορεπινεφρίνη και στον μυελό των επινεφριδίων για την επινεφρίνη (Εικόνα 3).



Εικόνα 3. Το κύριο μονοπάτι καταβολισμού των κατεχολαμινών. MAO, μονοαμινοξυδάση; COMT, κατεχολ-ο-μεθυλοτρανσφεράση; PNMT, φαινυλαιθανολαμιν-N-μεθυλοτρανσφεράση; DBH, ντοπαμινική β-υδροξυλάση; AD, αλδεϋδική δεϋδρογόνωση; AR, αλδεϋδική ρεδοκτάση; DHMA, 3,4 διϋδροξυμανδελικό οξύ; DHPG, 3,4 διϋδροξυ φαινυλγλυκόλη; DOPAC, 3,4 διϋδροξυφαινυλακετικό οξύ (από Kvetnansky R et al., *Physiol Rev* 2009; 89: 535-606).

Η Εικόνα 4 δείχνει τα μονοπάτια της βιοσύνθεσης του VMA. Πάνω από το 94% της συνολικής παραγωγής του VMA λαμβάνει χώρα στο ήπαρ το οποίο αποτελεί, ποσοτικά, τον βασικότερο μεταβολίτη της επινεφρίνης και της νορεπινεφρίνης. Το 87% της ποσότητας αυτής προέρχεται από την περαιτέρω αποδόμηση της MHPG και της 3,4

διϋδροξυ φαινυλγλυκόλης (DHPG), ενώ το υπόλοιπο προέρχεται, κυρίως, από τις MTN και NMN.

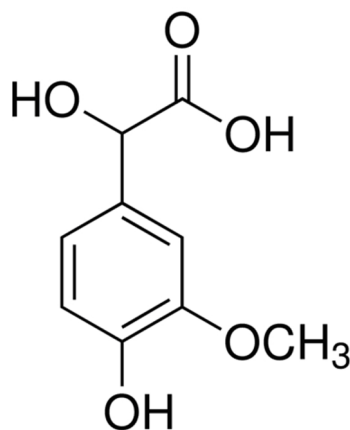


Εικόνα 4. Σύνθεση του VMA από τα τρία κύρια μονοπάτια μεταβολισμού της επινεφρίνης (E) και της νορεπινεφρίνης (NE). MTN, μετανεφρίνη; NMN, νορμετανεφρίνη; ADH, αλκοολική δεϋδρογένηση; AR, αλδεϋδική ρεδοκτάση; DHPG, 3,4 διϋδροξυ φαινυλγλυκόλη; MHPG, 3-μεθόξυ 4-υδροξυ-φαινυλγλυκόλη; MOPEGAL, 3-μεθόξυ 4-υδροξυ φαινυλγλυκολική αλδεϋδη; COMT, κατεχολ-ο-μεθυλοτρανφεράση; MAO, μονοαμινοξυδάση.

1.2 Χημική δομή και ιδιότητες του VMA

1.2.1 Βανιλοειδή

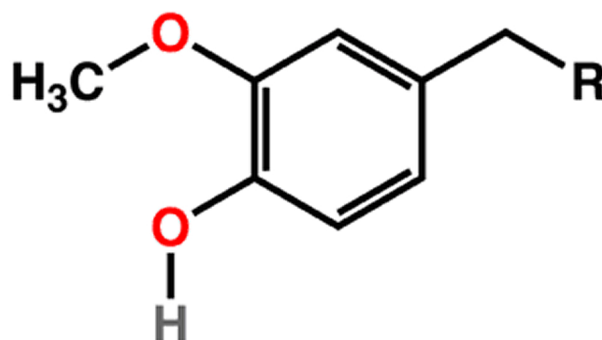
Το βανιλομανδελικό οξύ, ή 3-μεθόξυ-4-υδροξυμανδελικό οξύ (Εικόνα 5), είναι ένα μόριο που ανήκει στην κατηγορία των βανιλοειδών. Τα βανιλοειδή έχουν ως κοινό γνώρισμα την ύπαρξη ενός βανιλικού δακτύλιου (Εικόνα 6) ο οποίος προέρχεται από τον φαινολικό δακτύλιο. Άλλες ουσίες της οικογένειας αυτής περιλαμβάνουν την βανιλίνη, την καψαϊκίνη, τη νονιβαμίδα, την ανανταμίδα, την ρεσινιφερατοξίνη και το ομοβανιλικό οξύ.



Εικόνα 5. Χημική δομή του VMA. Διακρίνεται ο βανιλικός δακτύλιος με τη μεθόξυ ομάδα στη θέση 3 του δακτύλιου και την υδροξυλική ομάδα στη θέση 4.

Πολλές από τις ουσίες που φέρουν τον βανιλικό δακτύλιο εκφράζουν ποικίλες βιολογικές δράσεις. Μια τέτοια ουσία είναι η κουρκουμίνη, η οποία έχει αντιοξειδωτικές, αντιυπερτασικές καθώς και αντιαιμοπεταλιακές ιδιότητες σε μελέτες που διεξήχθησαν σε πειραματόζωα (Nakmareong et al., 2011; Srivastava et al., 1995). Αντίστοιχα χαρακτηριστικά εμφανίζει το βερατρικό οξύ το οποίο αποτελεί έναν αντιυπερτασικό και αντιοξειδωτικό παράγοντα (Saravanakumar and Raja, 2011). Η βανιλίνη αναστέλλει τη δράση της κυκλοξυγενάσης 2 (COX2) σε μακροφάγα δρώντας ως αντιφλεγμονώδης παράγοντας (Murakami et al., 2007). Τέλος, η νονιβαμίδα, η οποία ανήκει στην κατηγορία των βανιλοειδών, προκαλεί βραδυκαρδία, υπόταση και άπνοια σε επίμυες Wistar (Yeh and Chen, 1991). Είναι προφανές ότι ο βανιλικός δακτύλιος είναι μια βιολογικά ενεργή ομάδα

με ποικίλες δράσεις που εξαρτώνται, ωστόσο, και από τις υπόλοιπες ομάδες που συνδέονται με αυτόν.



Εικόνα 6. Ο βανιλικός δακτύλιος.

1.2.2 Υποδοχέας των βανιλοειδών - TRPV1- και αγωνιστές του.

Πρόκειται για έναν μη-εκλεκτικό μεταφορέα κατιόντων- Ca^{++} και Mg^{++} - ο οποίος εκφράζεται, κυρίως, σε νευρώνες τόσο του ΚΝΣ όσο και του Περιφερικού Νευρικού Συστήματος (ΠΝΣ). Ανήκει σε μια ευρύτερη κατηγορία υποδοχέων, τους TRPVs (Transient Receptor Potential Vanilloid) ή αλλιώς υποδοχείς των βανιλοειδών. Ο συγκεκριμένος υποδοχέας, ο TRPV1 (Transient Receptor Potential Vanilloid member 1) ονομάζεται και υποδοχέας της καψαϊκίνης διότι αυτή αποτελεί ισχυρότατο αγωνιστή του.

Στο ΠΝΣ εκφράζεται στους νευρώνες των γαγγλίων των οπισθίων νωτιαίων ριζών, στο γάγγλιο του τριδύμου νεύρου και στις απολήξεις ελευθέρων νευρικών ιών. Η διέγερσή του δημιουργεί αίσθημα πόνου και καύσου ενώ φαίνεται να εμπλέκεται στην παθογένεση του νευροπαθητικού και του χρόνιου άλγους (Vennekens et al., 2008). Ο υποδοχέας αυτός φαίνεται να ενεργοποιείται από διάφορα ενδογενή και εξωγενή χημικά και φυσικά ερεθίσματα. Τα κυριότερα αυτών είναι η θερμότητα (θερμοκρασία μεγαλύτερη των 43°C), το χαμηλό pH που απαντάται σε συνθήκες φλεγμονής και ιστικής βλάβης, καθώς και από ενδογενή κανναβιδοειδή όπως η ανανταμίδη και η N-αραχιδολ-ντοπαμίνη (Van Der Stelt and Di Marzo, 2004). Άλλους αγωνιστές των υποδοχέων αποτελούν τα εικοσανοειδή και τα λευκοτριένια, ουσίες που αποτελούν διαμεσολαβητές φλεγμονής στον ανθρώπινο οργανισμό (McNamara et al., 2005, Vigna et al., 2011).

Πολλοί από τους αγωνιστές του TRPV1 ανήκουν στην οικογένεια των βανιλοειδών, τα οποία έχουν ως κοινό γνώρισμα την παρουσία του βανιλικού δακτυλίου.

Η ευγενόλη εκφράζεται σε νευρώνες του τριδύμου νεύρου και εκλύει αντιδράσεις που διαμεσολαβούνται μέσω του TRPV1 (Yang, 2003), ενώ αναστέλλει τα σεοεξαρτώμενους ιοντικούς διαύλους Ca^{++} και Na^{+} στους νευρώνες αυτούς. Επίσης, ενεργοποιεί και άλλους υπότυπους των υποδοχέων των βανιλοειδών (Vetter and Lewis, 2011).

Αντίστοιχες ιδιότητες έχουν βρεθεί και για την γκουαϊακόλη, την πιπερίνη, η οποία αποτελεί συστατικό του μαύρου πιπεριού, καθώς και για την κουρκουμίνη (Vetter and Lewis, 2011). Πρέπει να τονιστεί ότι τα βανιλοειδή που αναφέρονται, εκτός από την καψαϊκίνη, εμφανίζουν καταπληκτικές ομοιότητες με το VMA όσον αφορά τη χημική δομή τους.

Η καψαϊκίνη αποτελείται, χημικά, από 3 υποομάδες: τον πολικό βανιλικό δακτύλιο, ένα ενδιάμεσο αμίδιο και μια αλειφατική λιπόφιλη ομάδα. Φαίνεται πως ο βανιλικός δακτύλιος σχηματίζει δεσμούς υδρογόνου με τον υποδοχέα και εμπλέκεται άμεσα στη σύνδεση των βανιλοειδών με τον TRPV1 (Pearce et al., 2004; Reilly and Yost, 2006; Wrigglesworth et al., 1996).

Στο ΚΝΣ, ο TRPV1 εκφράζεται σε διάφορες περιοχές όπως ο υποθάλαμος, ο εγκεφαλικός φλοιός, ο ιππόκαμπος, ο θάλαμος και η μέλαινα ουσία. Αθρόα συγκέντρωση του υποδοχέα απαντάται στον νωτιαίο κινητικό πυρήνα του πνευμονογαστρικού νεύρου γεγονός που σχετίζεται με την έκλυση συγκεκριμένων αγγειοκινητικών αντανακλαστικών.

1.2.3 Ο υποδοχέας TRPV1 και αυτόνομα αγγειοκινητικά αντανακλαστικά

Η μεσολάβηση του TRPV1 υποδοχέα στη ρύθμιση της καρδιακής συχνότητας και αρτηριακής πίεσης μέσω του ΑΝΣ έχει μελετηθεί μέσω της πρόσδεσης των TRPV1 αγωνιστών καψαϊκίνη και ρεσινιφερατοξίνη στους υποδοχείς αυτούς (Andresen et al., 2007; Sun et al., 2009).

Οι Coleridge and Coleridge (1980) έδειξαν ότι η καψαϊκίνη διεγείρει τις C προσαγωγές ίνες του πνευμονογαστρικού των καρδιακών κόλπων προκαλώντας, έτσι,

αντανακλαστικές ανασταλτικές μεταβολές στην καρδιακή συχνότητα και τη συστηματική αρτηριακή πίεση, ενώ οι απαγωγές ίνες δεν φαίνονται να επηρεάζονται.

Ο TRPV1 υποδοχέας φαίνεται επίσης να διαμεσολαβεί στη πρόκληση του αυτόνομου αντανακλαστικού Bezold-Jarisch (Aviado and Guevara, 2001; Boehm and Subista, 2002; Verberne et al., 2003). Η ενεργοποίησή του προκαλεί βραδυκαρδία, πτώση της αρτηριακής πίεσης και άπνοια και εκλύεται, φυσιολογικά, σε καταστάσεις όπως η ισχαιμία του μυοκαρδίου (Fu and Longhurst, 2009). Το πνευμονογαστρικό νεύρο διαδραματίζει κεντρικό ρόλο στην φυσιολογία του αντανακλαστικού αυτού. Πειράματα σε επίμυες έδειξαν ότι η αμφοτερόπλευρη βαγοτομή το αναστέλλει, γεγονός που καθιστά το πνευμονογαστρικό νεύρο μέσο έκφρασής του (Aviado and Guevara, 2001).

Φαίνεται πως τα βανιλοειδή αποτελούν μια ετερόκλητη ομάδα ενώσεων με ποικίλες βιολογικές δράσεις οι οποίες δεν οφείλονται μόνο στο βανιλικό δακτύλιο. Κάτι τέτοιο θα ήταν παράλογο εάν αναλογιστεί κανείς τη ποικιλομορφία και ετερογένεια των ενώσεων αυτών. Ωστόσο, ο βανιλικός δακτύλιος σχετίζεται με πολλές κοινές τους ιδιότητες, όπως η δημιουργία χημικών δεσμών με τον υποδοχέα TRPV1.

Επιπρόσθετα, ο TRPV1 υποδοχέας φαίνεται να βρίσκεται και στους απαγωγούς νευρώνες των τασεοϋποδοχέων του αορτικού τόξου και της ανιούσης αορτής (Sun and Li, 2009). Κάτι τέτοιο υποδηλώνει την ιδιαίτερη σημασία τους στη ρύθμιση της καρδιακής λειτουργίας και του αγγειακού τόνου μέσω αυτόνομων αντανακλαστικών.

1.2.4 Το VMA ως διαγνωστικό εργαλείο

Εδώ και χρόνια, το VMA χρησιμοποιείται ως διαγνωστικό μέσον για συγκεκριμένους νευροενδοκρινικούς όγκους. Τέτοιοι είναι το φαιοχρωμοκύττωμα και το νευροβλάστωμα (Bettex and Käser, 1962; Stenström and Waldenström, 1985). Το VMA, όπως προαναφέρθηκε, είναι ο βασικότερος μεταβολίτης των κατεχολαμινών και αποβάλλεται στα ούρα. Συγκεκριμένοι όγκοι που προέρχονται από νευροενδοκρινικά κύτταρα παράγουν κατεχολαμίνες οι οποίες μεταβολίζονται σε VMA και το οποίο ανιχνεύουμε ως έμμεσο δείκτη στα ούρα.

Το φαιοχρωμοκύττωμα είναι ένας όγκος προερχόμενος από τα χρωμαφινικά κύτταρα του μυελού των επινεφριδίων. Καρκινικές σειρές προερχόμενες από τα κύτταρα

αυτά παράγουν επινεφρίνη και νορεπινεφρίνη σε ποσότητες έως και 30πλάσιες από αυτές του φυσιολογικού μυελού. Η ποσότητα του VMA στα ούρα 24ώρου είναι ευθέως ανάλογη με την έκταση και τη συνολική μάζα του όγκου (Bettex and Käser, 1962).

Το νευροβλάστωμα είναι κακόηθες νεόπλασμα της παιδικής, κυρίως, ηλικίας προερχόμενος από αρχέγονα εξωδερμικά κύτταρα (νευροβλάστες) και μπορεί να αναπτυχθεί σε οποιοδήποτε σημείο του συμπαθητικού νευρικού συστήματος με μεγαλύτερη συχνότητα εμφάνισης τον μυελό των επινεφριδίων. Όπως και στο φαιοχρωμοκύττωμα έτσι και στο νευροβλάστωμα αυξάνει κατακόρυφα η αποβολή μέσω των ούρων του VMA αλλά και του HVA.

1.2.5 Το VMA ως αντιαιμοπεταλιακός παράγοντας

Η επινεφρίνη, όπως προαναφέρθηκε στην παράγραφο 1.1.5, φυσιολογικά υποβοηθά την αιμοπεταλιακή συσσώρευση. Αυτή η ιδιότητα φαίνεται να προέκυψε εξελικτικά λόγω της φύσης της δράσης των κατεχολαμινών. Όπως έχουμε προαναφέρει, η επινεφρίνη εκκρίνεται σε καταστάσεις όπου ο οργανισμός «μάχεται ή τρέπεται σε φυγή», καταστάσεις όπου η αιμορραγία είναι συχνό συνυπάρχον στοιχείο. Έτσι, είναι απόλυτα λογικό από εξελικτικής άποψης να συντείνει η επινεφρίνη στον καταρράκτη της αιμοπεταλιακής συσσώρευσης. Η διαδικασία αυτή συντελείται μέσω της πρόσδεσης της επινεφρίνης στους α_2 αδρενεργικούς υποδοχείς στην μεμβράνη του αιμοπεταλίου (Spalding and Vaitkevicius, 1998; Berlin et al., 1991). Εν συνεχεία ενεργοποιείται η φωσφολιπάση C η οποία, εν τέλει, αυξάνει τη διαπερατότητα της κυτταροπλασματικής μεμβράνης στο εξωκυττάριο Ca^{++} καθώς και την απελευθέρωση του ενδοκυττάρου Ca^{++} . Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την αλλαγή του σχήματος των αιμοπεταλίων και την αποκοκκίωσή τους με τελικό αποτέλεσμα τη συσσώρευσή τους.

Οι Evangelou et al. (1998) μελέτησαν την *ex vivo* δράση του VMA, καθώς και άλλων παραγώγων της επινεφρίνης σε αιμοπετάλια που είχαν διεγερθεί από επινεφρίνη και άλλους αγωνιστές. Το VMA όχι μόνο παρεμπόδισε την αιμοπεταλιακή συσσώρευση σε συγκέντρωση 10 μ M αλλά ανέστρεψε και τη δράση της επινεφρίνης σε ήδη ενεργοποιημένα αιμοπετάλια στην ίδια συγκέντρωση. Επίσης, ανέστειλε την αντίδραση λινολεϊκού οξέος-λιποξυγενάσης σε συγκέντρωση 0.1 μ M, γεγονός που ίσως ευθύνεται, εν

μέρει τουλάχιστον, για την αντιαμοπεταλιακή του ιδιότητα. Αξίζει να σημειωθεί ότι άλλοι μεταβολίτες των κατεχολαμινών που μελετήθηκαν, η DHPG και η 3,4 διϋδρόξυ φαινυλγλυκοκική αδλεϋδή (DHPGA), αλλά δεν περιείχαν τη βανιλική ομάδα στο μόριό τους δεν ανέστειλαν τη δράση της επινεφρίνης, ακόμη και σε συγκεντρώσεις 1mM. Ωστόσο, η μελέτη δεν προχώρησε σε *in vivo* παρατηρήσεις, αλλά αποτελεί τη μοναδική που έλεγξε το VMA ως αντιαμοπεταλιακό παράγοντα.

Αντιαμοπεταλιακές ιδιότητες έχουν ανευρεθεί και σε άλλα βανιλοειδή που έχουν μελετηθεί. Η καψαϊκίνη αναστέλλει σε μεγάλο βαθμό τη συσσώρευση που προκαλείται από το κολλαγόνο, τη θρομβίνη και, σε μικρότερο βαθμό, από ιονοφόρο ασβέστιο (Wang et al., 1984). Ο μηχανισμός φαίνεται να είναι η παρεμπόδιση της σύνθεσης της μαλονδιαδεϋδης (MDA) και της θρομβοξανής B₂ (TXB₂). Παρομοίως, η πιπερίνη ελάττωσε σε σημαντικό βαθμό τη δραστηριότητα διαφόρων αμοπεταλιακών αγωνιστών, εκτός της θρομβίνης (Park et al., 2007).

1.2.6 Προγενέστερες μελέτες

Ελάχιστες προσπάθειες διευκρίνισης των φαρμακευτικών δράσεων του VMA έχουν γίνει στο παρελθόν. Οι Lefkowitz and Haber (1971) μελέτησαν την τάση πρόσδεσης διαφόρων κατεχολαμινικών παραγώγων στους β-αδρενεργικούς υποδοχείς του κοιλιακού μυοκαρδίου σκύλων. Παρατήρησαν ότι τα παράγωγα που έφεραν το βανιλικό δακτύλιο δεν είχαν καμία τάση πρόσδεσης στους συγκεκριμένους υποδοχείς, σε αντίθεση με του καταβολίτες που έφεραν διϋδρόξυ φαινολικό δακτύλιο.

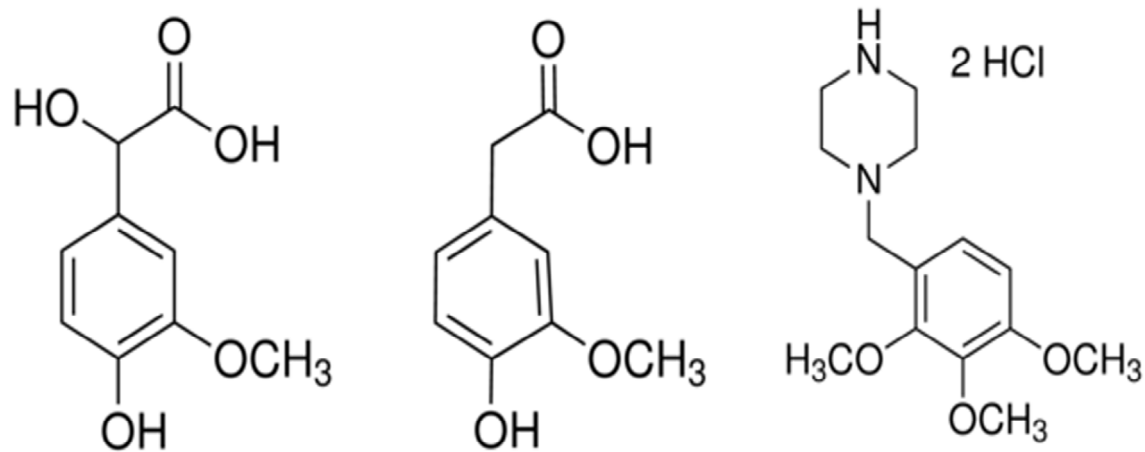
Επιπλέον, μελετήθηκε η ικανότητα αναστολής της ακετυλοχολινεστεράσης ανθρώπινων αμοπεταλιών από διάφορους κατεχολαμινικούς μεταβολίτες από τους Martinez de Melian and Farias (1980). Διαπιστώθηκε ότι μόνο καταβολίτες που φέρουν τον βανιλικό δακτύλιο, δηλαδή η μετανεφρίνη, η νορμετανεφρίνη και η 3-μεθοξυνοτοπαμίνη, ανέστειλαν τη δραστηριότητα του ενζύμου χωρίς, ωστόσο, να ισχύει κάτι τέτοιο για το VMA και το HVA.

1.3 Ομοβανιλικό οξύ και τριμεταζιδίνη

Στην παρούσα διδακτορική διατριβή ελέγχθηκε εάν άλλοι μεταβολίτες κατεχολαμινών που φέρουν τον βανιλικό δακτύλιο θα μπορούσαν εξ' ίσου να εκφράσουν βιολογικές δράσεις αντίστοιχες του VMA, εφόσον υπάρχουν. Για το σκοπό αυτό επιλέχθηκε το ομοβανιλικό οξύ (HVA), επίσης βανιλοειδές, το οποίο διαφέρει από το VMA μόνο κατά μια υδροξυλομάδα (-OH) (Εικόνα 7). Επιπλέον, είναι γνωστό ότι και άλλοι μεταβολίτες, όπως η MTN και η NMN, ασκούν ποικίλες βιολογικές δράσεις (Junstad et al., 1973; Iversen et al., 1966).

Η μελέτη των Evangelou et al. (1998) κατέδειξε ότι η τριμεταζιδίνη (TMZ), με τρεις μεθόξυ ομάδες στο μόριό της (Εικόνα 7), κατέχει ανάλογη αντισυσσωρευτική ιδιότητα με τους κατεχολαμινικούς μεταβολίτες. Ο λόγος που ελέγχθηκε το μόριο αυτό είναι διότι οι ερευνητές θέλησαν να συσχετίσουν τον αριθμό των μεθόξυ ομάδων στο φαινολικό δακτύλιο με την αύξηση της αντισυσσωρευτικής δυνατότητας, κάτι που όμως δεν επιβεβαιώθηκε από τις παρατηρήσεις τους.

Μια τέτοια υπόθεση ελέγχθηκε και στην παρούσα διατριβή, εάν δηλαδή συσχετίζεται ο αριθμός των μεθόξυ ομάδων στο φαινολικό δακτύλιο με βιολογική απάντηση σε *in vivo* πειράματα.



Βανιλοαμυγδαλικό
οξύ

Ομοβανιλικό
οξύ

Τριμεταζιδίνη

Εικόνα 7. Χημικές δομές των VMA, HVA και TMZ

1.3.1 Ομοβανιλικό οξύ

Όπως έχει προαναφερθεί, το HVA είναι ο βασικότερος μεταβολίτης της ντοπαμίνης και συντίθεται στο ΚΝΣ. Υψηλά επίπεδα ντοπαμίνης στον οργανισμό που απαντώνται σε παθολογικές καταστάσεις αυξάνουν την αποβολή του HVA στα ούρα. Για τον λόγο αυτό υψηλές συγκεντρώσεις του HVA στα ούρα αποτελούν έναν ειδικό δείκτη ανάπτυξης του φαιοχρωμοκυτώματος ή του νευροβλαστώματος, νευροενδοκρινείς όγκοι που εκκρίνουν κατεχολαμίνες. Επίσης, τα επίπεδά του στο πλάσμα χρησιμεύουν ως δείκτης παρακολούθησης της ντοπαμινεργικής δραστηριότητας στο ΚΝΣ, χρήσιμη για την παρακολούθηση καταστάσεων όπως η σχιζοφρένεια και το νευρικό stress (Sumiyoshi et al., 1998). Τέλος, το HVA χρησιμοποιείται ως δείκτης δραστηριότητας οξειδωτικών ενζύμων, όπως οι υπεροξειδάσες (Guilbault et al., 1967; Guilbault et al., 1968).

Διάφορα παράγωγα του HVA, όπως εστέρες και αμίδιά του, αποτελούν ισχυρούς αγωνιστές των υποδοχέων των βανιλοειδών σε *in vitro* πειράματα (Lee et al., 1999). Το γεγονός αυτό υποδηλώνει ότι ο βανιλικός δακτύλιος συσχετίζεται άμεσα με την σύνδεση των βανιλοειδών με αυτούς τους υποδοχείς. Παράλληλα, το HVA αποτελεί την πρόδρομη ουσία σύνθεσης της καψαϊκίνης και της ρεσινιφερατοξίνης, δύο από τους ισχυρότερους αγωνιστές των TRPV1 υποδοχέων.

1.3.2 Τριμεταζιδίνη

Η τριμεταζιδίνη (TMZ) χρησιμοποιείται σαν φαρμακευτική ουσία στην Ιατρική πράξη εδώ και αρκετά χρόνια και ειδικότερα στη θεραπεία της σταθερής στηθάγχης. Πρόκειται για έναν μεταβολικό παράγοντα ο οποίος μεταβάλλει τη χρήση του ενεργειακού υποστρώματος του κυττάρου όταν αυτό ισχαιμεί. Αναστέλλει την 3-ακετυλοσυνένζυμοΑ θιολάση στα μιτοχόνδρια με αποτέλεσμα τη μετατόπιση του κυττάρου από αναερόβιο σε αερόβιο μεταβολισμό. Το μιτοχόνδριο διασπά γλυκόζη αντί για ελεύθερα λιπαρά οξέα, κάτι που αποδίδει περισσότερη ενέργεια. Στο ισχαιμικό κύτταρο αυτή η μετατόπιση του μεταβολισμού βοηθά την αντοχή στην έλλειψη οξυγόνου.

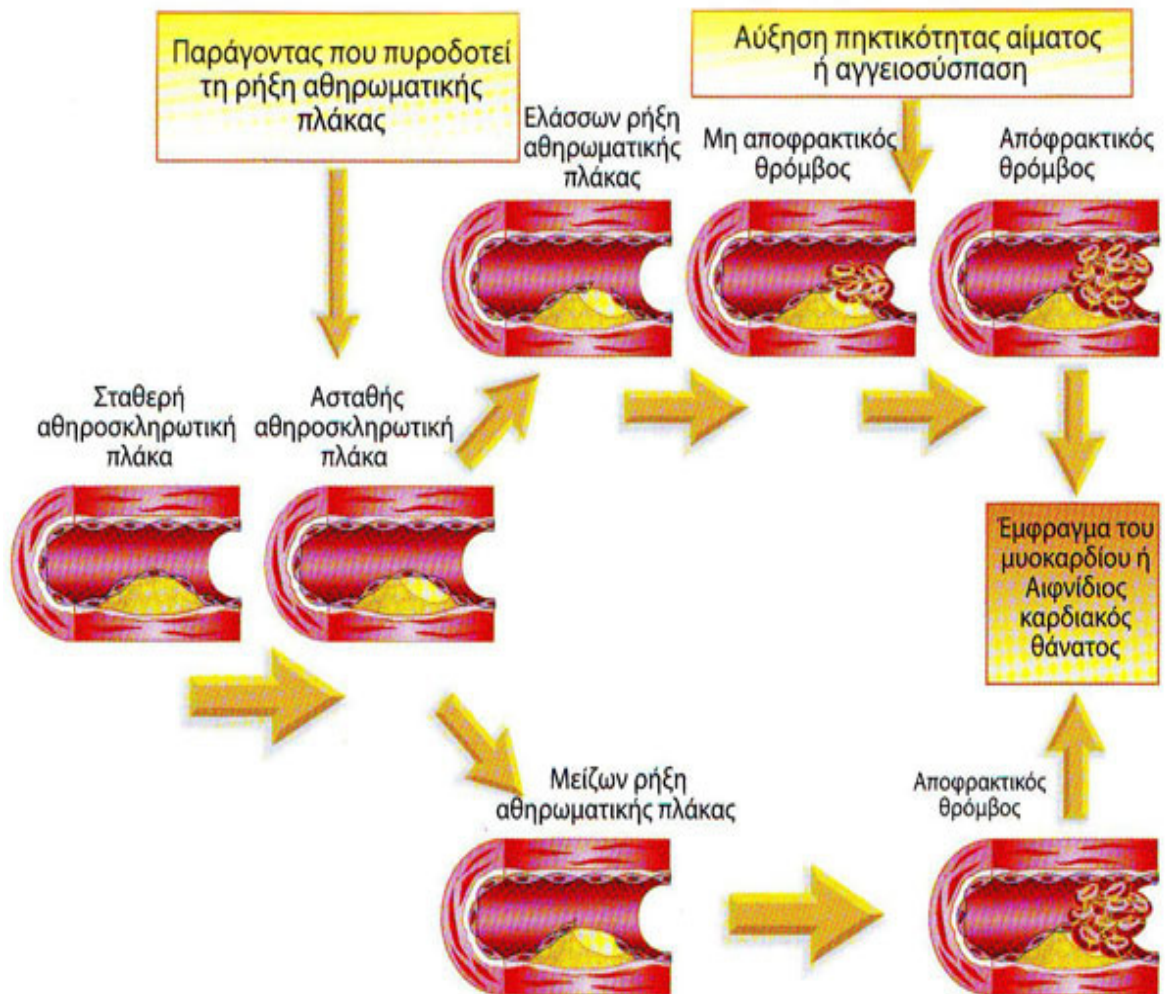
Έχει αποδειχθεί ότι σε ασθενείς με σταθερή στηθάγχη η TMZ μειώνει τη συχνότητα επεισοδίων, αυξάνει την ικανότητα άσκησης του ασθενούς πριν την εμφάνιση

συμπτωμάτων και ανακουφίζει από αυτά (Dalla Volta et al., 1990; Detry, 1993; Szwed et al., 2001). Επιπλέον, ασκεί προστατευτική δράση στα μυοκαρδιακά κύτταρα. Οι Fantini et al. (1994, 1997) έδειξαν ότι η TMZ αυξάνει την κυτταρική αντίσταση στο οξειδωτικό stress. Παράλληλα, καθυστερεί την εξάντληση της τριφωσφορικής αδενοσίνης (ATP) από το μυοκαρδιακό κύτταρο, προλαμβάνει τη συσσώρευση Ca^{++} και την ενδοκυττάρια οξείδωση αναστέλλοντας τη συσσώρευση ελευθέρων ριζών οξυγόνου (Di Napoli, 2008; El Banini et al., 2000; Lananchy et al., 1987; Renaud, 1996). Αυτή η καρδιοπροστατευτική επίδραση της TMZ είναι ιδιαίτερα επιθυμητή σε διαβητικούς ασθενείς με ισχαιμική μυοκαρδιοπάθεια, καθώς βελτιώνει τη λειτουργία της αριστερής κοιλίας, αφού συνλαμβάνουν ήδη αντιστηθαγγχικούς παράγοντες (Fragasso et al., 2003; Rosano et al., 2003). Είναι, επίσης, ενδιαφέρον ότι σε πειράματα που διεξήχθησαν σε ανθρώπους με οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου, η TMZ μεταστρέφει τη δραστηριότητα του ANS προς όφελος του παρασυμπαθητικού, χωρίς να είναι γνωστός ο ακριβής μηχανισμός (Kara et al., 2004; Ulgen et al., 2003).

Τα *ex vivo* αποτελέσματα των Evangelou et al. σχετικά με την αντιαιμοπεταλιακή δράση της TMZ επιβεβαιώνονται και σε *in vivo* πειραματικό μοντέλο από τους Belcher et al. (1992), οι οποίοι έδειξαν ότι η TMZ παρεμποδίζει το σχηματισμό θρόμβων στα στεφανιαία αγγεία μυοκαρδίου σκύλων. Στο ίδιο συμπέρασμα κατέληξαν και οι Shirahase et al. (1988), αν και απαιτούνται μεγάλες συγκεντρώσεις στο αίμα για να εκφράσει την αντιαιμοπεταλιακή της δράση.

1.4 Οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου

Το οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου (OEM) ανήκει στα Οξεία Στεφανιαία Σύνδρομα, μαζί με την ασταθή στηθάγχη και τον αιφνίδιο καρδιακό θάνατο. Πρόκειται για νέκρωση μίας περιοχής του μυοκαρδίου προκαλούμενη από την αιφνίδια διακοπή της αιματικής ροής προς το σημείο αυτό. Η ισχαιμία που παρατηρείται οφείλεται σε θρόμβο εντός του αυλού ενός στεφανιαίου αγγείου και το συνηθέστερο αίτιο σχηματισμού του είναι η ρήξη μιας ασταθούς αθηρωματικής πλάκας που έχει ήδη δημιουργηθεί στο αγγείο αυτό (Εικόνα 8).



Εικόνα 8. Παθοφυσιολογία του οξέος εμφράγματος του μυοκαρδίου. Η ρήξη μιας ασταθούς αθηρωματικής πλάκας αποφράσσει τον αυλό της στεφανιαίας αρτηρίας προκαλώντας ισχαιμία στο τμήμα του μυοκαρδίου που αιματώνεται από αυτή.

Το οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου αποτελεί μία από τις κυριότερες αιτίες θνητότητας και νοσηρότητας στον Δυτικό, κυρίως, κόσμο. Σύμφωνα με τη μελέτη HELIOS (2005-2006) η επίπτωση της νόσου είναι 18.5/10.000 κατοίκους ενώ ο επιπολασμός του είναι 20.000 νέες περιπτώσεις ετησίως. Η θνησιμότητά του είναι υψηλή, με το 1/3 των ασθενών να μην προλαβαίνει να λάβει τις πρώτες βοήθειες από εξειδικευμένο προσωπικό, ενώ οι μετεμφραγματικές επιπλοκές είναι πολλαπλές και συνήθως σοβαρές.

1.4.1 Μηχανισμοί κυτταρικής βλάβης κατά τη διάρκεια της μυοκαρδιακής ισχαιμίας

Η βλάβη στα καρδιακά κύτταρα ξεκινάει από την πρώτη στιγμή της διακοπής της καρδιακής παροχής προς αυτά. Σε κυτταρικό επίπεδο, επέρχεται μια πληθώρα μεταβολών οι σημαντικότερες από τις οποίες είναι οι εξής:

α) Μεταστροφή του κυτταρικού μεταβολισμού από αερόβιο σε αναερόβιο και παραγωγή γαλακτικού οξέος ως τελικό προϊόν (Orie, 1976).

β) Ενεργοποίηση των λυσοσωμάτων, βλάβη της κυτταροπλασματικής μεμβράνης και συνεχής και μη ελεγχόμενη είσοδος ιόντων, κυρίως Ca^{++} , στο κυτταρόπλασμα με αποτέλεσμα την πρόκληση κυτταρικού οιδήματος (De Zwaan et al., 2001).

γ) Αυξημένη είσοδο ιόντων Ca^{++} και Na^{+} στο κύτταρο, διαταραχή της λειτουργίας των ιοντικών διαύλων και της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης (De Zwaan et al., 2001; Oe et al., 1994).

δ) Ενεργοποίηση του συμπληρώματος μέσω της C αντιδρώσας πρωτεΐνης (CRP). Τα κλάσματα του συμπληρώματος επικάθονται στα καρδιακά κύτταρα μέσα στη εμφραγματική εστία (Hoffmeister, 1995; Lagrand, 1997; Vakeva et al., 1994; Yasuda et al., 1990).

ε) Απόπτωση του κυττάρου μέσω ενεργοποίησης αποπτωτικών γονιδίων και πρωτεϊνών (Known et al., 1996; Misao et al., 1996; Narula et al., 1996; Robaye et al., 1991; Shimizu et al., 1996; Yeh, 1997)

στ) Χημειοταξία ουδετερόφιλων και άλλων φλεγμονωδών κυττάρων (De Zwaan et al., 2001; Edwards, 1991)

1.4.2 Μηχανισμοί κυτταρικής βλάβης κατά τη διάρκεια της επαναιμάτωσης

Εάν γίνει θρομβόλυση, είτε με φυσικό τρόπο, είτε μηχανικά, ξεκινά η επαναιμάτωση του ισχαιμούντος ιστού. Παραδόξως, η διαδικασία της επαναγγείωσης μπορεί να προκαλέσει βλάβες στο καρδιακό κύτταρο και να εκλύσει διαδικασίες κυτταρικού θανάτου και απόπτωσης. Τέτοιοι μηχανισμοί είναι οι εξής:

α) Τοξική δράση ελευθέρων ριζών οξυγόνου (Oxygen Derived Free Radicals-ODFRs). Η αθρόα παροχή οξυγόνου μετά την επαναγγείωση αυξάνει κατακόρυφα την παραγωγή υπεροξειδίου του υδρογόνου και υπεροξειδιακού ανιόντος τα οποία καταλύουν την

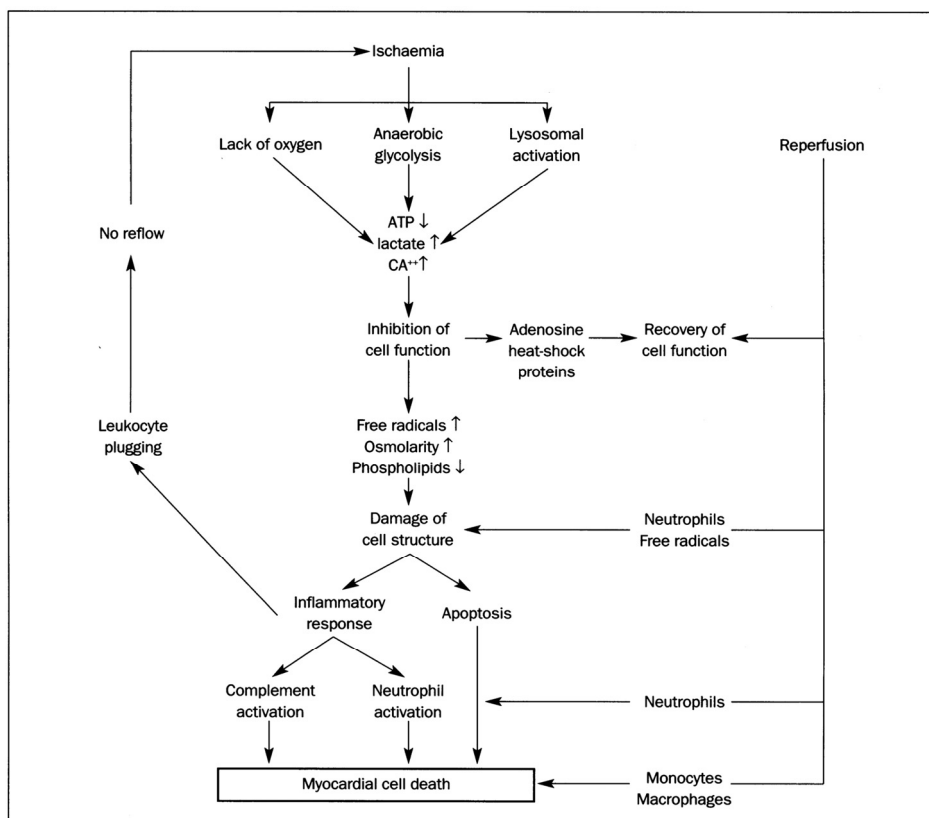
οξειδωση κυτταροπλασματικών φωσφολιπιδίων και πρωτεϊνών με αποτέλεσμα τον κυτταρικό θάνατο (Béard et al., 1994; Becker and Ambrosio, 1987; Kim et al., 1994; Roberts et al., 1990).

β) Υπερφόρτωση Ca^{++} από διαταραχή της ομοιοστασίας του λόγω ισχαιμίας. Η υπερφόρτωση αυτή οδηγεί σε δυσλειτουργία της συσταλτικότητας του καρδιακού κυττάρου και έκλυση αρρυθμιών (Moens et al., 2005; Orie, 1991).

γ) Ενεργοποίηση του συστήματος του συμπληρώματος, πυροδότηση του κύκλου του αραχιδονικού οξέος και χημειοταξία πολυμορφοπύρηνων. Αυτοί οι παράγοντες προάγουν περαιτέρω την κυτταρική βλάβη (Dreyer, 1991; Haworth, 2010; Kloner, 1991; Toki, 1988).

δ) Τοπική αιμοπεταλιακή συσσώρευση, δημιουργία μικροεμβόλων και διαταραχή της μικροκυκλοφορίας (Davies et al., 1986; Xiao et al., 2001).

Οι παθοφυσιολογικοί μηχανισμοί που εμπλέκονται στη κυτταρική βλάβη ισχαιμίας/επαναιμάτωσης συνοψίζονται στην Εικόνα 9.



Εικόνα 9. Παθογενετικός μηχανισμός της μεθισχαιμικής βλάβης στο μυοκάρδιο κατά την ισχαιμία/επαναιμάτωση (από De Zwaan et al., *Mechanisms of cell death in acute myocardial infarction: pathophysiological implications for treatment*, *Netherl. Heart J.*; 9(1): 30-44)

1.4.3 Οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου και ANΣ

Κατά τη διαδικασία εξέλιξης του OEM το μυοκάρδιο δέχεται τις επιδράσεις από το ANΣ το οποίο διαδραματίζει ξεχωριστό ρόλο στην εξέλιξή του.

Το Συμπαθητικό ασκεί σοβαρή επίδραση στο μυοκάρδιο κατά τη μετεμφραγματική περίοδο με συνοδό αύξηση των επιπέδων των κατεχολαμινών λίγα λεπτά μετά την εγκατάσταση του εμφράγματος (Jardine et al., 2005). Επιπλέον, η αυξημένη συμπαθητική δραστηριότητα βοηθάει στη δημιουργία θανατηφόρων κοιλιακών αρρυθμιών (κοιλιακή ταχυκαρδία-κοιλιακή μαρμαρυγή), όπως έχει αποδειχθεί σε *in vivo* πειραματικά μοντέλα πειραματόζωα (Jardine et al., 2007). Ασθενείς που υπέστησαν OEM είχαν αυξημένη συμπαθητική δραστηριότητα η οποία επέμεινε για αρκετό καιρό μετά το ισχαιμικό επεισόδιο και ίσως ευθύνεται, έως ένα βαθμό, για τα αυξημένα ποσοστά θνητότητας και αριστερής δυσλειτουργίας στους ασθενείς αυτούς (Graham et al., 2002; Graham et al., 2004). Επιπρόσθετα, η συμπαθητική δράση ευθύνεται εν μέρει και για την αυξημένη πιθανότητα αιφνιδίου θανάτου σε μετεμφραγματικούς ασθενείς (Barron and Lesh, 1996). Φαίνεται πως το ισχαιμικό μυοκάρδιο είναι ασταθές και πιο ευαίσθητο στη δράση των κατεχολαμινών έτσι ώστε να εκλύονται κακοήθεις κοιλιακές αρρυθμίες πιθανώς λόγω τοπικής δράσης της νορεπινεφρίνης στους α_1 αδρενεργικούς υποδοχείς (Barron and Lesh, 1996; Corr et al., 1986; Esler et al., 1997; Ferguson, 1993; Schömig et al., 1995; Schömig et al., 1991; Schwarz et al., 1982; Willich et al., 1993).

Παράλληλα, μελέτες έχουν καταδείξει την προστατευτική δράση του παρασυμπαθητικού στο ισχαιμόν μυοκάρδιο εκφραζόμενο μέσω των δύο πνευμονογαστρικών νεύρων. Οι Zuanetti et al. (1987) μελέτησαν τη διέγερση του παρασυμπαθητικού τόνου και την επίδρασή του στο μυοκάρδιο γάτας μετά από πρόκληση ισχαιμίας. Η αύξηση του τόνου του πνευμονογαστρικού ελάττωσε τη συχνότητα και τη βαρύτητα εμφάνισης κοιλιακών ταχυαρρυθμιών μόνο, όμως, κατά τη φάση της επαναιμάτωσης του καρδιακού μυός. Τα αποτελέσματα επιβεβαιώνονται και από άλλες έρευνες σε διάφορα πειραματικά μοντέλα (Farell et al., 1991; Myers et al., 1974; Miller et al., 1977). Έχουν προταθεί διάφοροι μηχανισμοί για να εξηγήσουν αυτό το φαινόμενο. Κατά τη φάση της ισχαιμίας, η μείωση της καρδιακής συχνότητας από την βαγοτονία φαίνεται πως ελαττώνει τις ανάγκες του μυοκαρδίου για οξυγόνωση (Shell and Sobel, 1973; Smith et al., 1973). Επιπλέον, η ισχαιμία αποσταθεροποιεί τα καρδιακά κύτταρα οδηγώντας τα σε μία κατάσταση αυξημένου αυτοματισμού κατά την επαναιμάτωση

(Jeroudi et al, 1994). Το stress του οξέος εμφράγματος οδηγεί σε αύξηση του τόνου του συμπαθητικού. Οι κατεχολαμίνες που εκκρίνονται προάγουν την ηλεκτρική ανισορροπία των καρδιακών κυττάρων μέσω αυξημένου αυτοματισμού ή μηχανισμού επανεισόδου (Murdock et al., 1980; Sheridan et al., 1980) ενώ η βαγοτονία καταστέλλει τα έκτοπα βηματοδοτικά κέντρα σταθεροποιώντας την κυτταρική μεμβράνη των κυττάρων αυτών.

Αναισθησία και καρδιαγγειακό σύστημα

Η αναισθησία είναι ένα σημαντικό μέρος σε όλες τις πειραματικές διαδικασίες που περιλαμβάνουν πειραματόζωα. Υπάρχουν δύο βασικοί τύποι αναισθητικών ουσιών: α) τα ενέσιμα που μπορούν να χορηγηθούν ενδοφλεβίως ή ενδομυϊκώς και β) τα εισπνεόμενα που παρέχονται με ειδικές συσκευές εισπνοής ή μετά από διασωλήνωση.

Δυστυχώς, τα αναισθητικά δεν είναι αδρανείς ουσίες. Αλληλεπιδρούν με πληθώρα βιολογικών συστημάτων και το καρδιαγγειακό είναι ένα από τα κυριότερα. Το γεγονός αυτό έχει ως αποτέλεσμα να αποτελούν παράγοντες λάθους στα πειραματικά μοντέλα επηρεάζοντας την αξιοπιστία πολλών αποτελεσμάτων και ο ερευνητής οφείλει να λαμβάνει υπόψη του αυτό τον παράγοντα κατά την ανάλυση των αποτελεσμάτων του.

Τα περισσότερα πτητικά αναισθητικά ασκούν επίδραση σε φυσιολογικές παραμέτρους του μυοκαρδίου. Συγκεκριμένα, καταστέλλουν την φλεβοκομβοκολπική αγωγή και ελαττώνουν την ταχύτητα αγωγής στον κολκοκοιλιακό κόμβο και στο δεμάτιο του His (Atlee et al., 1986; Hikasa et al., 1996). Επίσης, προκαλούν μείωση της καρδιακής συχνότητας, της συσταλτικότητας του μυοκαρδίου και της αρτηριακής πίεσης (Hayes et al., 1996) ενώ άλλα επιδρούν στα δυναμικά ενεργείας των καρδιακών κυττάρων (Hayes et al., 1996). Τέλος, ευαισθητοποιούν το μυοκάρδιο στην αρρυθμογόνο δράση των κατεχολαμινών και κυρίως της επινεφρίνης (Atlee et al., 1986; Hikasa et al., 1996). Η επινεφρίνη προάγει την είσοδο ιόντων K^+ στα καρδιακά κύτταρα ακολουθούμενη από μία αύξηση του ενδοκυττάρου Ca^{++} . Αυτή η αλληλουχία γεγονότων προάγει την πρόωμη εκπόλωση του κυττάρου και την έκλυση έκτοπων κολπικών και κοιλιακών συστολών (Masayoshi et al, 1987; Pettifer et al., 1997).

Στα πειράματα της παρούσας διατριβής χρησιμοποιήθηκε το πτητικό αναισθητικό ισοφλουράνιο. Το ισοφλουράνιο αποτελεί ένα από τα πιο αδρανή αναισθητικά όσον αφορά το καρδιαγγειακό σύστημα. Αν και διατηρεί κάποια αρνητική χρονότροπη, αρνητική

ινότροπη και υποτασική δράση δεν επιδρά στα δυναμικά ενεργείας ούτε ελαττώνει την ταχύτητα αγωγής στον κολποκοιλιακό κόμβο και στο δεμάτιο του His (Hayes et al., 1996; Hikasa et al., 1996). Πρέπει, ωστόσο, να σημειωθεί ότι αναμένεται σημαντική διακύμανση των ιδιοτήτων του από είδος σε είδος.

Στους επίμυες Wistar που χρησιμοποιήθηκαν για τη διεξαγωγή των πειραμάτων δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές μεταβολές και παρενέργειες στη λειτουργία του καρδιαγγειακού συστήματος από το ισοφλουράνιο. Παρά το stress των χειρουργικών χειρισμών δεν προκλήθηκαν αρρυθμίες, εκτός μόνο μια ήπια αλλά στατιστικά σημαντική βραδυκαρδία στο τέλος του πειράματος, κάτι που συνάδει με τις αναμενόμενες δράσεις του αναισθητικού. Η θνητότητα οφειλόμενη στη χρήση του ήταν μηδενική.

2. Σκοπός της εργασίας

Η παρούσα διδακτορική διατριβή έχει ως σκοπό να μελετήσει:

α) την επίδραση του VMA στη καρδιακή συχνότητα και την αρτηριακή πίεση σε επίμυες Wistar, β) τη δράση άλλων 3-μεθόξυ φαινολικών παραγώγων, του HVA και της TMZ στις ίδιες παραμέτρους, και τη πιθανή συσχέτισή τους με αυτή του VMA, γ) την ανεύρεση πιθανού μηχανισμού δράσης του δ) την επίδρασή του στο ισχαιμικό μυοκάρδιο μετά από οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου και τέλος ζ) τη διερεύνηση της πιθανότητας χρήσης της ως φαρμακευτική αγωγή σε συγκεκριμένες παθολογικές καταστάσεις.

3. Υλικά και μέθοδοι

3.1 In vivo

Η παρούσα διατριβή διεξήχθη σε 150 θηλυκούς επίμυες Wistar, ηλικίας 6 ± 1 μηνών και βάρους 250 ± 20 γραμμάρια. Τα πειραματόζωα τοποθετήθηκαν σε ειδικά κλουβιά (2 ανά κλουβί) σε χώρο με σταθερές συνθήκες υγρασίας (60-70%) και θερμοκρασίας ($20 \pm 2^\circ\text{C}$) και 12ωρο κύκλο ημέρας/νύχτας. Τα ζώα είχαν συνεχή πρόσβαση σε ενδεδειγμένη τροφή (Viozois A.E., Ήπειρος, Ελλάς) και νερό. Όλοι οι χειρισμοί έγιναν σύμφωνα με τις Ευρωπαϊκές Οδηγίες (Ευρωπαϊκή Οδηγία για την προστασία ζώων που χρησιμοποιούνται για πειραματικούς σκοπούς, 2010/63/EU) και με άδεια από τους αρμόδιους φορείς (αριθμός αδείας 20EEP02).

3.1.1 Χημικά και αντιδραστήρια

Τα υλικά και τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν για την ολοκλήρωση των πειραμάτων της παρούσης διδακτορικής διατριβής αναφέρονται παρακάτω, μαζί με τις συντομογραφίες τους (Πίνακας 2).

Πίνακας 2. Υλικά και αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν.

| Όνομασία (Αγγλικά) | Όνομασία (Ελληνικά) | Συντομογραφία | Εταιρία προμήθειας |
|---------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------|----------------------|-------------------------------|
| DL 4 hydroxy 3 methoxy vanillylmandelic acid | Βανιλοαμυγδαλικό οξύ | VMA | Sigma |
| Homovanillic acid | Ομοβανιλικό οξύ | HVA | Sigma |
| 1-(2,3,4 trimethoxybenzyl) Piperazine hydrochloride | Τριμεταζιδίνη | TMZ | Sigma |
| Isoflurane | Ισοφλουράνιο | - | Abbot |
| Diethyl ether | Διαιθυλαιθέρας | - | Sigma |
| (-)- Epinephrine | Επινεφρίνη | - | Sigma |
| (-)- Isoproterenol | Ισοπροτερενόλη | - | Sigma |
| Calcium Ionophore A23187 | Ιονοφόρο ασβέστιο | A23187 | Sigma |
| 8-(diethylamino) octyl 3,4,5 trimethoxybenzoate hydrochloride | 8 διαιθυλοαμινο οκτ 3,4,5 τριμεθόξυ βενζοϊκό οξύ | TMB-8 | Sigma |

| Όνομασία (Αγγλικά) | Όνομασία (Ελληνικά) | Συντομογραφία | Εταιρία προμήθειας |
|-------------------------------|-------------------------|---------------|-----------------------|
| Chromium superoxide hydrate | Υπεροξειδίο του χρωμίου | - | Sigma |
| 3 methyl 1 butanol | 3 μεθυλ 1 βουτανόλη | - | Sigma |
| Ammonium dichromate | Διχρωμικό αμμώνιο | - | Sigma |
| Sulfuric acid | Σουλφουρικό οξύ | - | Sigma |
| A- tokoferol | A-τοκοφερόλη | - | Sigma |
| Vicryl suture 3.0 | Ράμμα vicryl 3.0 | - | Abbot |
| Vicryl suture 7.0 | Ράμμα vicryl 7.0 | - | Abbot |
| 18 gauge intravenous catheter | Φλεβοκαθετήρας 18 gauge | - | Abbot |
| 26 gauge intravenous catheter | Φλεβοκαθετήρας 26 gauge | - | Abbot |
| 3 way stopcock | Αυλός 3 way | - | Abbot |
| Ringer's saline | Ορός Ringer's | - | Abbot |

3.1.2 Αναισθησία

Η πειραματική διάταξη για τη διατήρηση της αναισθησίας των επίμυων κατά τη διάρκεια των πειραμάτων παρουσιάζεται στην Εικόνα 10. Αποτελείται από μια φιάλη οξυγόνου, μια αναπνευστική συσκευή μηχανικού αερισμού συνεχών θετικών πιέσεων, ειδικό δοχείο αποθήκευσης του πτητικού αναισθητικού ισοφλουράνιο και έναν ειδικά τροποποιημένο φλεβοκαθετήρα 18 gauge για την στοματοτραχειακή διασωλήνωση του πειραμοτοζώου.



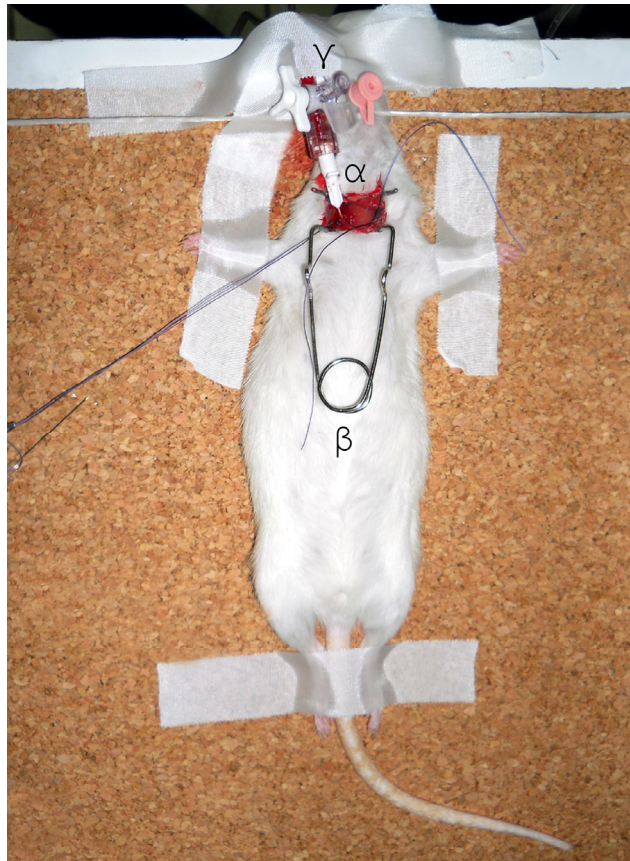
Εικόνα 10. Πειραματική διάταξη διατήρησης αναισθησίας στους επίμυες Wistar. α) φιάλη παροχής οξυγόνου β) ειδικό δοχείο παροχής ισοφλουρανίου γ) συσκευή μηχανικού αερισμού θετικών πιέσεων δ) συσκευή καταγραφής ηλεκτροκαρδιογραφήματος και αρτηριακής πίεσης ε) λαμπτήρας

Για την εισαγωγή των επίμυων στην αναισθησία χρησιμοποιήθηκε αιθέρας. Συγκεκριμένα, το κάθε πειραματόζωο τοποθετούνταν σε ένα ειδικό, για αυτό το σκοπό, γυάλινο δοχείο όπου είχε προηγουμένως τοποθετηθεί τολύπιο βάμβακος εμποτισμένο με 5 περίπου ml αιθέρα και μέσα σε 2-3 λεπτά το ζώο είχε αναισθητοποιηθεί. Στη συνέχεια, τοποθετούνταν σε ύπτια θέση πάνω σε ειδικό τραπέζι χειρουργικών χειρισμών (Εικόνα 10) όπου γινόταν διάνοιξη της στοματικής κοιλότητας και αποκάλυψη της τραχείας με τη χρήση μικροεργαλείου (βελονοκάτοχος mosquito). Πριν παρέλθει η δράση του αιθέρα (1-2 λεπτά) πραγματοποιούνταν στοματοτραχειακή διασωλήνωση του ζώου με τη χρήση του τροποποιημένου φλεβοκαθετήρα (18 gauge) που χρησίμευε ως τραχειοσωλήνας. Ο ρυθμός των αναπνοών είχε ρυθμιστεί στις 90 αναπνοές/λεπτό με όγκο 4.5 ml/αναπνοή. Επιπλέον στον ατμοσφαιρικό αέρα είχε προστεθεί οξυγόνο 100% με ρυθμό παροχής 0.3 ml/λεπτό ενώ το ισοφλουράνιο παρέχονταν στο μίγμα σε αναλογία 2.5% v/v. Το πειραματόζωο βρισκόταν σε πλήρη καταστολή μέσα σε λιγότερο από 5 λεπτά. Η συγκεκριμένη τεχνική αναισθησίας χρησιμοποιήθηκε σε όλα τα πειράματα που περιγράφονται στην παρούσα διατριβή.

3.1.3 Καθετηριασμός κοινής καρωτίδας

Με το πειραματόζωο πλήρως αναισθητοποιημένο και ευρισκόμενο σε ύπτια θέση, διενεργούνταν μια εγκάρσια τομή μερικών χιλιοστών με τη χρήση ειδικού ατραυματικού μικροεργαλείου στο ύψος σφαγιτιδικής εντομής. Έπειτα, πραγματοποιούνταν προσεχτικός διαχωρισμός της λιπώδους στιβάδας, της περιτονίας και των μυών και γινόταν αποκάλυψη και παρασκευή της δεξιάς κοινής καρωτίδας. Οι χειρουργικοί χειρισμοί ήταν ιδιαίτερα προσεχτικοί και ενδεδειγμένοι για την αποφυγή αιμορραγίας και τον πιθανό διαχωρισμό της μέσης και έσω στιβάδας της κοινής καρωτίδας. Αφού ευθιαζόταν η αρτηρία με ατραυματικό ράμμα (Vicryl suture 3.0) πραγματοποιούνταν καθετηριασμός με 26 gauge φλεβοκαθετήρα. Εν συνεχεία, ο καθετήρας συνδεόταν με έναν 3-way αυλό, ο οποίος είχε προηγουμένως ηπαρινιστεί, και αυτός με τη σειρά του με την συσκευή καταγραφής (Εικόνα 11). Σε όλα τα πειραματικά πρωτόκολλα (εκτός από τις μελέτες πρόκλησης αρρυθμιών και οξέος εμφράγματος μυοκαρδίου) οι ουσίες εγχέονταν ενδαρτηριακά και όχι, όπως συνηθίζεται, ενδοφλέβια. Ο λόγος για αυτό είναι ότι αφενός το πειραματόζωο

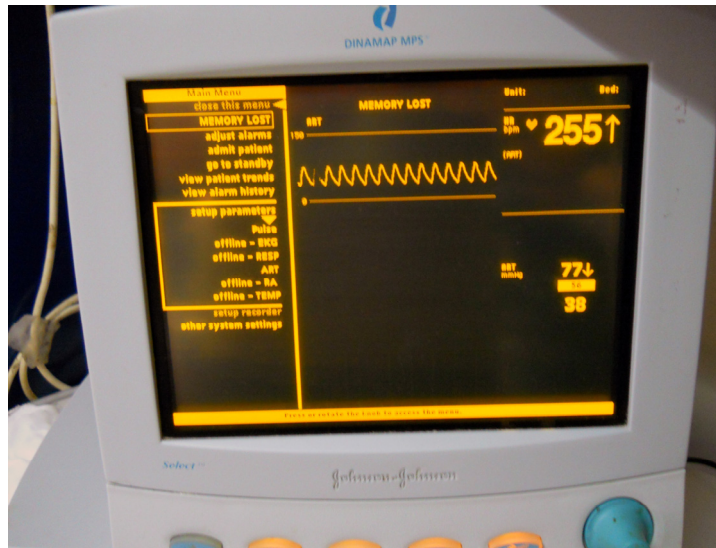
ήταν ήδη καθετηριασμένο στη δεξιά κοινή καρωτίδα, οπότε επιπρόσθετος ενδοφλέβιος καθετηριασμός θα ήταν άσκοπος και αφετέρου η βιοδιαθεσιμότητα των εγχοομένων ουσιών δεν επηρεάζεται από την οδό χορήγησης



Εικόνα 11. Πειραματικό πρωτόκολλο μέτρησης αρτηριακής πίεσης. Το πειραματόζωο είναι διασωληνωμένο με ειδικά τροποποιημένο 18 gauge φλεβοκαθετήρα. Η δεξιά κοινή καρωτίδα έχει καθετηριαστεί με 26 gauge φλεβοκαθετήρα και έχει συνδεθεί με τη συσκευή καταγραφής. α) 26 gauge φλεβοκαθετήρας στη δεξιά κοινή καρωτίδα β) διαστολέας γ) τροποποιημένος 18 gauge φλεβοκαθετήρας διασωλήνωσης.

3.1.4 Ηλεκτροκαρδιογράφημα και μέτρηση ενδαρτηριακής πίεσης

Η συσκευή καταγραφής (Dinamap MPS Select Portable patient monitor, Johnson & Johnson, USA) (Εικόνα 12) περιλαμβάνει την οθόνη αναγραφής των ενδείξεων, ειδικό καταγραφικό χαρτί για ανατύπωση των δεδομένων και υποδοχές περιφερικών καλωδίων για την προσαγωγή δεδομένων.



Εικόνα 12. Η συσκευή καταγραφής ηλεκτροκαρδιογραφικών και αιμοδυναμικών παραμέτρων (Dinamap MPS Select Portable patient monitor, Johnson & Johnson, USA). Στη φωτογραφία απεικονίζεται η καμπύλη μεταβολής της μέσης αρτηριακής πίεσης όπως καταγράφεται στη δεξιά κοινή καρωτίδα.

Τα καλώδια καταγραφής ηλεκτροκαρδιογραφήματος (ΗΚΓ) συνδεόταν στο πειραματόζωο, ειδικά τροποποιημένα ώστε να προσκολλώνται στο δέρμα του. Γινόταν συνεχής καταγραφή των κλασικών απαγωγών I, II, III, aVR, aVL, aVF καθ'όλη τη διάρκεια του πειράματος. Ταυτόχρονα, ο φλεβοκαθετήρας τοποθετημένος ήδη μέσα στον αυλό της κοινής καρωτίδας συνδεόταν με συγκεκριμένη διάταξη που περιελάμβανε έναν πιεζοηλεκτρικό κρύσταλλο ώστε να μετατρέπει τις ενδαρτηριακές πιέσεις σε ηλεκτρικό σήμα που αναγράφονταν συνεχώς στην οθόνη της συσκευής. Η συσκευή κατέγραφε την μέση, την συστολική και τη διαστολική αρτηριακή πίεση.

3.1.5 Πειραματικό πρωτόκολλο - VMA, HVA, TMZ.

Σκοπός του πρωτοκόλλου είναι η ανεύρεση πιθανής φαρμακευτικής δράσης του VMA διάφορες δοσολογίες, του HVA και της TMZ και ο συσχετισμός του αριθμού των μεθόξυ ομάδων στο φαινολικό δακτύλιο με την επίδραση στο καρδιαγγειακό σύστημα.

Για την πραγματοποίηση της πειραματικής διαδικασίας χρησιμοποιήθηκαν 48 θηλυκοί επίμυες Wistar. Τα πειραματόζωα τοποθετήθηκαν τυχαία σε 6 ομάδες, 8 ζώα η κάθε ομάδα. Οι ομάδες ήταν οι εξής: α) Ομάδα ελέγχου (OE) β) Πειραματική ομάδα που

έλαβε VMA σε δόση 1 mg/kg ΣΒ (OB1) γ) Πειραματική ομάδα που έλαβε VMA σε δόση 10 mg/kg ΣΒ (OB2) δ) Πειραματική ομάδα που έλαβε VMA σε δόση 100 mg/kg ΣΒ (OB3) ε) Πειραματική ομάδα που έλαβε HVA σε δόση 10 mg/kg ΣΒ (OO) και τέλος στ) Πειραματική ομάδα που έλαβε TMZ σε δόση 10 mg/kg ΣΒ (OT).

Η διαδικασία που ακολουθήθηκε ήταν η εξής: Μετά την αναισθητοποίηση του, το ζώο αφήνεται να ανακάμψει από το χειρουργικό στρες γύρω στα 20 λεπτά. Μετά το πέρας αυτού του χρόνου εγχέοταν μέσω του αυλού 3-way η προς εξέταση φαρμακευτική ουσία (το VMA, το HVA ή η TMZ). Η ουσία διαλυόταν σε 0.5 ml ορό Ringer's και η έγχυση διαρκούσε 1 λεπτό. Για την ομάδα ελέγχου γίνονταν έγχυση 0.5 ml ορού Ringer's χωρίς ουσία. Τα δεδομένα των μετρήσεων λαμβάνονταν κάθε 10 λεπτά για 60 λεπτά από τη στιγμή της έγχυσης.

3.1.6 Μελέτη επίδρασης VMA στη δραστικότητα της επινεφρίνης και ισοπροτερενόλης

Σκοπός της μελέτης είναι η διευκρίνιση του ρόλου του VMA ως αγωνιστής ή ανταγωνιστής των α και β αδρενεργικών υποδοχέων με τη χρήση ισχυρών αγωνιστών των υποδοχέων αυτών.

Για το συγκεκριμένο πρωτόκολλο χρησιμοποιήθηκαν 24 θηλυκοί επίμυες Wistar οι οποίοι χωρίστηκαν τυχαία σε 4 ομάδες (6 πειραματόζωα ανά ομάδα): α) Ομάδα ελέγχου όπου χορηγήθηκε επινεφρίνη χωρίς λήψη VMA (OA) β) Ομάδα ελέγχου όπου χορηγήθηκε ισοπροτερενόλη χωρίς λήψη VMA (OI) γ) Πειραματική ομάδα όπου χορηγήθηκε επινεφρίνη αφού προηγουμένως το πειραματόζωο είχε λάβει VMA σε δόση 10 mg/kg ΣΒ (OAB) και δ) Πειραματική ομάδα όπου χορηγήθηκε ισοπροτερενόλη αφού προηγουμένως ο επίμυς είχε λάβει VMA σε δόση 10 mg/kg ΣΒ (OIB).

Η διαδικασία αναισθησίας και καθετηριασμού περιγράφεται αναλυτικά στις παραγράφους 3.1.2 και 3.1.3. Οι ομάδες OA και OI αποτελούσαν ομάδες ελέγχου για το συγκεκριμένο πρωτόκολλο. Μετά την αναισθησία και την πάροδο 20 περίπου λεπτών χορηγούνταν αδρεναλίνη 40 μg/kg ΣΒ και ισοπροτερενόλη 0.5 μg/kg ΣΒ αντίστοιχα και έπειτα πραγματοποιούταν μετρήσεις της καρδιακής συχνότητας και της αρτηριακής πίεσης ανά 2 λεπτά για 8 λεπτά. Οι ουσίες αυτές ήταν διαλυμένες σε 0.2 ml ορό Ringer's που εγχέοταν bolus μέσω του 3-way ενδαρτηριακά σε διάστημα 10 δευτερολέπτων. Το VMA

είχε διαλυθεί σε 0.5 ml ορού Ringer's και χορηγήθηκε ενδαρτηριακά με ρυθμό έγχυσης 0.5 ml/λεπτό 20 λεπτά πριν τη χορήγηση αδρεναλίνης ή ισοπροτερενόλης για τις πειραματικές ομάδες. Αναφορικά με τις ομάδες ελέγχου, OA και OI, είχε προηγηθεί έγχυση 0.5 ml ορού Ringer's 20 λεπτά νωρίτερα. Η χορήγηση των αδρενεργικών αγωνιστών επαναλήφθηκε άλλη μια φορά μετά την πάροδο 30 λεπτών. Οι μετρήσεις διαρκούσαν μόνο 8 λεπτά γιατί οι ουσίες αυτές έχουν πολύ μικρό χρόνο ημιζωής και δραστηριότητα στο αίμα (Gyuton and Hall, 2006; Fregly et al., 1983) και η δράση τους φθίνει ταχύτατα (χρόνος ημιζωής 2 λεπτά). Για τον ίδιο λόγο έγιναν δύο μετρήσεις σε κάθε ζώο, εφόσον μετά την πάροδο 30 λεπτών η επινεφρίνη και η ισοπροτερενόλη δεν είχαν καμία δράση στο πειραματόζωο. Στο πρωτόκολλο αυτό πραγματοποιήθηκε συνεχής ηλεκτροκαρδιογραφική καταγραφή των κλασσικών απαγωγών και της αρτηριακής πίεσης.

3.1.7 Μελέτη μέτρησης δραστηριότητας VMA μετά από αμφοτερόπλευρη βαγοτομή

Σκοπός της μελέτης είναι η ανεύρεση πιθανής συσχέτισης του VMA με το παρασυμπαθητικό νευρικό σύστημα και η διερεύνηση της πιθανότητας δράσης του μέσω αυτού.

Για την υλοποίηση αυτού του πειραματικού πρωτοκόλλου χρησιμοποιήθηκαν 16 θηλυκοί επίμυες Wistar οι οποίοι κατηγοριοποιήθηκαν σε 2 ομάδες α) Ομάδα ελέγχου που περιελάμβανε βαγοτομημένα ζώα (BOE) και β) Ομάδα βαγοτομημένων ζώων που έλαβαν VMA σε δόση 10mg/kg ΣΒ (BOB).

Αφού τα ζώα αναισθητοποιήθηκαν όπως έχει ήδη περιγραφεί στην παράγραφο 3.1.2, διενεργήθηκε εγκάρσια τομή στο ύψος της σφαγιτιδικής εντομής μερικών χιλιοστών και έγινε προσεκτικός διαχωρισμός των εν τω βάθει στιβάδων του δέρματος, των περιτονιών και των μυών. Έπειτα, αποκαλύφθηκαν και παρασκευάστηκαν τα αγγειονευρώδη δεμάτια των κοινών καρωτίδων. Χρησιμοποιώντας ειδικά μικροεργαλεία, δύο ράμματα 7.0 vicryl διαπεράστηκαν ανάμεσα από την αριστερή και δεξιά κοινή καρωτίδα και τα αντίστοιχα πνευμονογαστρικά νεύρα. Ακολούθως, καθετηριάστηκε η δεξιά κοινή καρωτίδα και συνδέθηκαν τα καλώδια του ηλεκτροκαρδιογραφήματος. Έπειτα διενεργήθηκε αμφοτερόπλευρη βαγοτομή και το πειραματόζωο αφέθηκε να ανακάμψει από το χειρουργικό στρες για τουλάχιστον 10 λεπτά. Μετά την παρέλευση αυτού του

χρόνου, εγχύθηκε bolus σε διάστημα ενός λεπτού διάλυμα 0.5 ml Ringer's το οποίο περιείχε VMA (BOB) και 0.5 ml Ringer's για την BOE. Αμέσως ξεκίνησε η καταγραφή της καρδιακής λειτουργίας και της αρτηριακής πίεσης.

3.1.8 Ενδοπεριτοναϊκή έγχυση VMA.

Σκοπός του πρωτοκόλλου είναι η διαπίστωση εάν η ενδοπεριτοναϊκή έγχυση του VMA θα είχε την ίδια δραστικότητα με την ενδαρτηριακή ώστε να χορηγηθεί με αυτό τον τρόπο στα πειράματα πρόκλησης οξέος εμφράγματος του μυοκαρδίου. Λόγω των πολλών και στρεσογόνων χειρισμών κατά την πρόκληση εμφράγματος θεωρήθηκε σκόπιμο να μην καθετηριαστεί η κοινή καρωτίδα αποφεύγοντας άσκοπη επιβάρυνση του πειραματοζώου.

Χρησιμοποιήθηκαν 8 επίμυες Wistar ίδιας ηλικίας και ΣΒ όπως αυτά των προηγούμενων πειραμάτων στα οποία χορηγήθηκε VMA 10 mg/ kg ΣΒ. Η ουσία είχε διαλυθεί σε 0.5 ml ορό Ringer's και εγχύθηκε ενδοπεριτοναϊκά σε διάστημα ενός λεπτού. Τα αποτελέσματα συγκρίθηκαν με αυτά της OB2 στην οποία η έγχυση της ουσίας ήταν ενδαρτηριακή.

3.1.9 Οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου

3.1.9.1 Πρωτόκολλο πρόκλησης οξέος εμφράγματος του μυοκαρδίου-δραστικότητα VMA κατά την ισχαιμία/επαναιμάτωση.

Σκοπός του πρωτοκόλλου είναι η ανεύρεση πιθανής καρδιοπροστατευτικής δράσης του VMA κατά τη φάση της ισχαιμίας και επαναιμάτωσης που ακολουθούν το οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου.

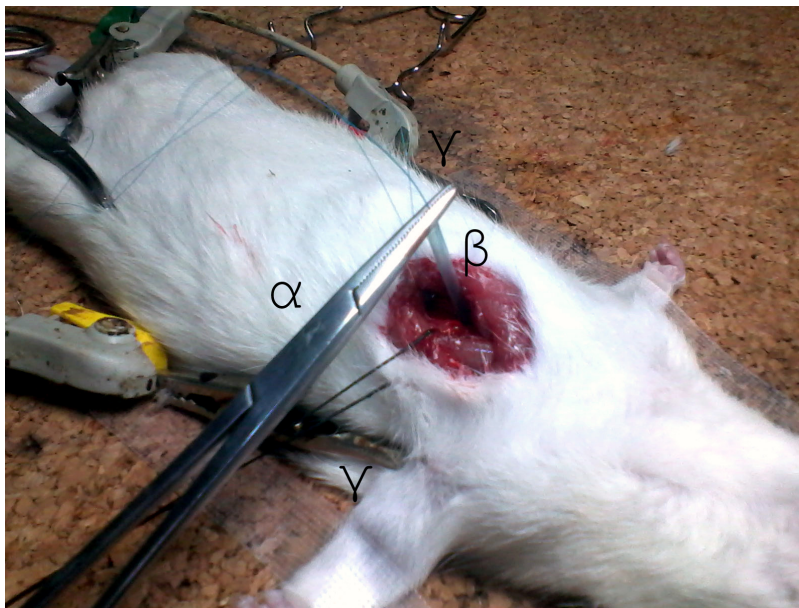
Η πρόκληση οξέος εμφράγματος του μυοκαρδίου (OEM) έγινε σύμφωνα με την τεχνική των Pfeffer et al (Pfeffer et al., 1979). Το πρωτόκολλο εφαρμόστηκε σε 34 θηλυκούς επίμυες Wistar ίδιων χαρακτηριστικών όπως και στα προαναφερθέντα πειράματα. Οι επίμυες χωρίστηκαν τυχαία σε 2 ομάδες: α) Ομάδα ελέγχου β) Πειραματική ομάδα που έλαβε VMA σε δόση 10 mg/ kg.

Η αναισθητοποίηση των ζώων πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με την μέθοδο που περιγράφεται στην παράγραφο 3.1.2. Αφού το πειραματόζωο ακινητοποιήθηκε, διενεργήθηκε αριστερή πλάγια θωρακοτομή με ειδικά ατραυματικά μικροεργαλεία. Οι επιπολής και εν τω βάθει ιστοί διαχωρίστηκαν επιμελώς αποφεύγοντας, έτσι, άσκοπη αιμορραγία. Ειδικός διαστολέας χρησιμοποιήθηκε για τον διαχωρισμό της 4^{ης} από την 5^η πλευρά έτσι ώστε να καταστεί δυνατή η πρόσβαση στον θωρακικό κλωβό του πειραματοζώου. Με τη χρήση μικρής λαβίδας mosquito απομονώθηκε η καρδιά και έγινε τομή στο περικάρδιο ώστε να αποκαλυφθεί το μυοκάρδιο ενώ ένα ράμμα 7.0 vicryl διαπεράστηκε ανάμεσα από τον κώνο της πνευμονικής αρτηρίας και το αριστερό ωτίο. Με αυτόν τον τρόπο απολινώνεται ο πρόσθιος κατιών κλάδος της αριστερής στεφανιαίας αρτηρίας. Σε όλα αυτά τα πειράματα έγινε η προσπάθεια να διενεργείται η απολίνωση στην ίδια ανατομική θέση ώστε να επιτυγχάνεται παρόμοια και επαναλήψιμη ισχαιμία. Το άγκιστρο του ράμματος αφαιρέθηκε και οι δύο άκρες του διαπεράστηκαν διαμέσου πλαστικού σωληνίσκου. Ανάμεσα από το ράμμα και το μυοκάρδιο εφαρμόστηκε μικρό τωλύπιο βάμβακος για την αποφυγή απευθείας βλάβης στον ιστό εκ πίεσεως. Τέλος, εφαρμόστηκε πίεση πάνω στον σωληνίσκο και προκλήθηκε ισχαιμία ενώ έγινε και συρραφή του θωρακικού τοιχώματος με ράμματα 4.0 vicryl. Η διαδικασία απεικονίζεται στην Εικόνα 13.

Η διαπίστωση της ισχαιμίας έγινε μέσω της απεικόνισης ηλεκτροκαρδιογραφικών αλλοιώσεων στη συσκευή καταγραφής που ήταν ήδη συνδεδεμένη. Τέτοιες είναι η ανόσπαση του ST διαστήματος που ήταν εμφανής στις απαγωγές I, II και III (Εικόνα 14). Από τη στιγμή αυτή άρχισε η καταγραφή του χρόνου της ισχαιμίας η οποία διήρκεσε 30 λεπτά. Μετά την πάροδο των 30 λεπτών διακόπηκε η άσκηση πίεσεως πάνω στην αρτηρία και ξεκίνησε η περίοδος επαναιμάτωσης του μυοκαρδίου η οποία διήρκεσε επίσης 30 λεπτά οπότε και σημειώθηκε η λήξη του πειράματος, συνολικά 60 λεπτά. Και για τις 2 ομάδες ζώων, πραγματοποιήθηκε ενδοπεριτοναϊκή έγχυση διαλύματος ορού Ringer's όγκου 1 ml με ρυθμό έγχυσης 1ml/λεπτό με VMA για την πειραματική ομάδα και χωρίς VMA για την ομάδα ελέγχου.

Πριν την έναρξη έγχυσης του διαλύματος Ringer's και αμέσως μετά την λήξη του πειράματος είτε στα 60 λεπτά είτε με τον θάνατο του πειραματοζώου, πραγματοποιήθηκε λήψη 0.5 ml αίματος από το πειραματόζωο (σύνολο 1 ml αίματος) που χρησιμοποιήθηκε για την μέτρηση της Ολικής Αντιοξειδωτικής Ικανότητας (Total Antioxidant Capacity-

TAC) του πλάσματος (βλέπε παράγραφος 3.3.1) ώστε να διαπιστωθεί εάν το VMA θα μπορούσε να μεταβάλλει την συνολική αντιοξειδωτική ικανότητα του πλάσματος.



Εικόνα 13. Πρόκληση OEM. Έχει γίνει αριστερή θωρακοτομή και απολίνωση του πρόσθιου κατιόντος κλάδου της αριστερης στεφανιαίας αρτηρίας. Τα άκρα του ράμματος διαπερνώνται μέσω πλαστικού σωληνίσκου και εφαρμόζεται πίεση με τη βοήθεια ενός βελονοκατόχου. α) βελονοκάτοχος β) πλαστικός σωληνίσκος διαμέσω του οποίου διέρχονται τα άκρα του ράμματος γ)τροποποιημένα άκρα του ηλεκτροκαρδιογράφου.

Η καταγραφή των ηλεκτροκαρδιογραφικών ευρημάτων αποτυπώθηκε σε καταγραφικό χαρτί καρδιογράφου καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος. Μετρήθηκαν 2 διαφορετικά είδη αρρυθμίας:

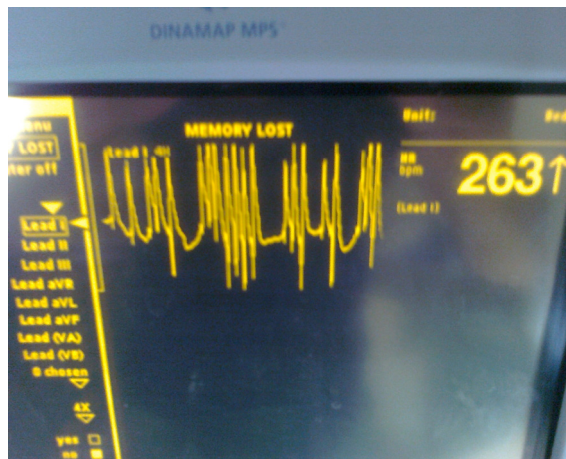
α) έκτακτες κοιλιακές συστολές (Premature Ventricular Contractions-PVC), οι οποίες είναι συστολές των κοιλιών από έκτοπο κοιλιακό βηματοδοτικό κέντρο.

β) κοιλιακές ταχυαρρυθμίες- κοιλιακή ταχυκαρδία (Ventricular Tachycardia-VT) και κοιλιακή μαρμαρυγή (Ventricular Fibrillation-VF). Ως κοιλιακή ταχυκαρδία ορίστηκε η εμφάνιση τεσσάρων συνεχόμενων έκτακτων κοιλιακών συστολών σύμφωνα με τα Lambeth Conventions (Walker et al., 1988) ενώ ως κοιλιακή μαρμαρυγή ορίστηκε ο ασυντόνιστος ινιδισμός των κοιλιών (Curtis et al., 1987).

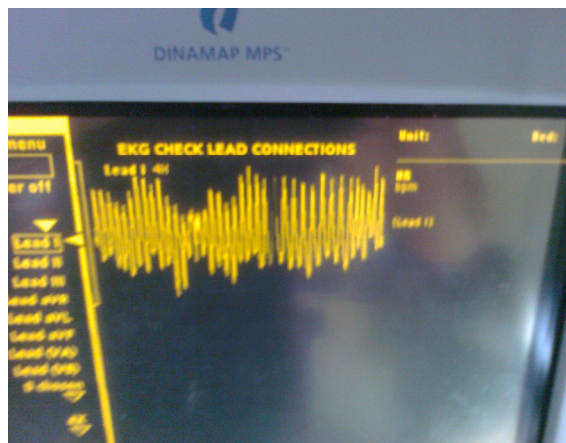
Επειδή ο διαχωρισμός της κοιλιακής ταχυκαρδίας (Εικόνες 15 και 16) από την μαρμαρυγή μπορεί να είναι δύσκολος, χρησιμοποιήθηκε ο όρος κοιλιακές ταχυαρρυθμίες που περιλαμβάνει αυτές τις δύο παθολογικές καταστάσεις και μετρήθηκαν ως μια ενιαία παθολογική οντότητα.



Εικόνα 14. Πρόκληση οξέος εμφράγματος του μυοκαρδίου: ανασπάσεις του διαστήματος ST στην απαγωγή II.



Εικόνα 15. Ριπή κοιλιακής ταχυκαρδίας στη απαγωγή I κατά τη διάρκεια της επαναϊμάτωσης.



Εικόνα 16. Κοιλιακή ταχυκαρδία στη απαγωγή I κατά τη διάρκεια της μυοκαρδιακής ισχαιμίας.

3.1.9.2 Curtis Score

Για τη συγκρισιμότητα των αποτελεσμάτων πρόκλησης αρρυθμίας κρίθηκε αναγκαίο να γίνει ποσοτικοποίησή τους. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκε το Curtis Score. Πρόκειται για μια κλίμακα ποσοτικοποίησης των αρρυθμιών που προκαλούνται από ισχαιμία αλλά και κατά τη διάρκεια της επαναιμάτωσης και προτάθηκε από τους Curtis et al (Curtis et al., 1987). Η βαρύτητα των αρρυθμιών αντικατοπτρίζεται στο μέγεθος του σκορ που έχει ως ελάχιστο το 1 και μέγιστο το 9 ενώ μετριέται πάντα η βαρύτερη δυνατή αρρυθμία. Το σκορ αναγράφεται στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 3).

Πίνακας 3. Curtis Score. Κλίμακα ποσοτικοποίησης αρρυθμιών που προκαλούνται από ισχαιμία. ΠΚΣ, πρώιμες κοιλιακές συστολές; ΚΤ, κοιλιακή ταχυκαρδία; ΚΜ, κοιλιακή μαρμαρυγή. (από Curtis MJ et al., *Models for the study of arrhythmias in myocardial ischaemia and infraction: the use of the rat. J Mol Cell Cardiol* 1987; 19: 399-419).

0= 0-49 ΠΚΣ

1= 50-499 ΠΚΣ

2= περισσότερες από 499 ΠΚΣ ή/και ένα επεισόδιο αυτόματα αναστρέψιμης ΚΤ ή ΚΜ

3= περισσότερα από ένα επεισόδια ΚΤ ή/και ΚΜ συνολικής διάρκειας μικρότερης των 60 sec

4= ΚΤ ή/και ΚΜ συνολικής διάρκειας από 60 έως 119 sec

5= ΚΤ ή/και ΚΜ συνολικής διάρκειας περισσότερης από 120 sec

6= Θανάσιμη ΚΜ που ξεκινάει σε περισσότερο από 15 λεπτά μετά την πρόκληση της ισχαιμίας

7= Θανάσιμη ΚΜ που ξεκινάει ανάμεσα από 4 και 14:59 λεπτά μετά την πρόκληση της ισχαιμίας

8= Θανάσιμη ΚΜ που ξεκινάει ανάμεσα από 1 και 3:59 λεπτά μετά την πρόκληση της ισχαιμίας

9= Θανάσιμη ΚΜ που ξεκινάει σε λιγότερο από 1 λεπτό μετά την πρόκληση της ισχαιμίας

3.1.10 Μελέτη αντιαρρυθμικής δράσης του VMA στην πρόκληση αρρυθμιών από έγχυση αδρεναλίνης.

Σκοπός του πρωτοκόλλου είναι η μελέτη του VMA ως πιθανό αντιαρρυθμικό παράγοντα κατά την έκθεση του μυοκαρδίου σε μεγάλες δόσεις επινεφρίνης, η οποία καθιστά το καρδιακό κύτταρο αρρυθμογόνο (Murdock et al., 1980; Sheridan et al., 1980).

Για το συγκεκριμένο πρωτόκολλο επιλέχθηκαν 20 θηλυκοί ενήλικοι επίμυες Wistar οι οποίοι χωρίστηκαν τυχαία σε 2 ομάδες: α) Ομάδα ελέγχου και β) Πειραματική ομάδα στην οποία είχε προηγηθεί ενδοφλέβια έγχυση VMA δοσολογίας 10 mg/kg ΒΣ.

Τα πειραματόζωα αναισθητοποιήθηκαν με την τεχνική που αναλύθηκε στην παράγραφο 3.1.2. Διενεργήθηκε εγκάρσια τομή 5 mm περίπου πάνω από τη σφαγιτιδική εντομή και 4-5 mm αριστερά από τη μέση γραμμή. Αποκαλύφθηκε και παρασκευάστηκε η αριστερή σφαγίτιδα φλέβα η οποία καθετηριάστηκε με έναν 20 gauge φλεβοκαθετήρα.

Για την πειραματική ομάδα έγινε bolus έγχυση VMA διαλυμένο σε 0.5 ml ορού Ringer's σε διάστημα 30 δευτερολέπτων ενώ για την ομάδα ελέγχου ορός χωρίς ουσία. Περίπου 20 λεπτά αργότερα πραγματοποιήθηκε ενδοφλέβια έγχυση αδρεναλίνης 8 µg/kg ΒΣ. Η επίδραση της επινεφρίνης στο μυοκάρδιο είναι ακαριαία λόγω των φαρμακοκινητικών της ιδιοτήτων. Επιπλέον, λόγω του μικρού χρόνου ημίσειας ζωής της στη συστηματική κυκλοφορία (2 λεπτά), η δράση της διαρκεί λιγότερο από 5 λεπτά. Μετά την πάροδο 10 λεπτών, στα οποία θεωρήθηκε ότι έχει πλήρως παρέλθει η επίδρασή της στο μυοκάρδιο, επαναλήφθηκε η χορήγηση αδρεναλίνης σε δοσολογία 16 µg/kg ΒΣ. Για κάθε 10 λεπτά, η δόση αυξανόταν προοδευτικά στα 32, 64, 128 και 256 µg/kg ΒΣ οπότε και σταματούσε η πειραματική διαδικασία..

Με κάθε νέα χορήγηση αδρεναλίνης γινόταν ηλεκτροκαρδιογραφική καταγραφή της καρδιακής λειτουργίας σε συσκευή καταγραφής και αποτυπώνονταν σε ειδικό χαρτί για 10 λεπτά μέχρι να επαναληφθεί η έγχυση. Στο πρωτόκολλο αυτό μελετήθηκαν τρία είδη αρρυθμίας: α) έκτακτες κολπικές συστολές, β) έκτακτες κοιλιακές συστολές και γ) κοιλιακή ταχυκαρδία- κοιλιακή μαρμαρυγή. Οι έκτακτες κολπικές συστολές είναι συστολές που προέρχονται από πρόωμη διέγερση ενός έκτοπου κολπικού κέντρου ενώ στις έκτακτες κοιλιακές η συστολή προέρχεται από ένα έκτοπο κοιλιακό κέντρο.. Ως κοιλιακή ταχυκαρδία ορίστηκε η εμφάνιση τεσσάρων συνεχόμενων έκτακτων κοιλιακών συστολών σύμφωνα με τα Lambeth Conventions ενώ ως κοιλιακή μαρμαρυγή ορίστηκε ο ασυντόνιστος ινιδισμός των κοιλιών (Walker et al., 1988).

3.2 Ex vivo

3.2.1 Αιμοπεταλιακή συσσώρευση-ο ρόλος του Ca^{++} .

Στα πειράματα της παρούσας διατριβής έγινε προσπάθεια να διευκρινιστεί εάν το VMA και το HVA παρεμβάλλονται με κάποιο τρόπο στη μεταγωγή του Ca^{++} κατά τη διαδικασία της αιμοπεταλιακής συσσώρευσης, είτε δεσμεύοντάς το, είτε παρεμβαλλόμενα σε κάποιο βήμα από τη στιγμή της κινητοποίησης του Ca^{++} . Τα αιμοπετάλια επιλέχθηκαν για τη διεξαγωγή πειραμάτων διερεύνησης του ρόλου του Ca^{++} διότι αποτελούν ένα αξιόπιστο και καλά μελετημένο κυτταρικό μοντέλο. Πρόκειται για κύτταρα τα οποία εκφράζουν την πλειονότητα των μεμβρανικών υποδοχέων που απαντώνται στα ενδοθηλιακά και μυοκαρδιακά κύτταρα.

Το Ca^{++} διαδραματίζει πρωταρχικό ρόλο στον καταρράκτη γεγονότων που ακολουθεί τη διέγερση των αιμοπεταλίων. Όταν ένας αιμοπεταλιακός αγωνιστής ενεργοποιήσει το αιμοπετάλιο, το εξωκυττάριο Ca^{++} (εξωγενές) εισέρχεται στα αιμοπετάλια ενώ παράλληλα κινητοποιείται και το ενδοκυττάριο (ενδογενές) Ca^{++} . Τα ιόντα ενεργοποιούν την αλλαγή του σχήματος των αιμοπεταλίων και την αποκοκκίωσή τους με τελική κατάληξη την αιμοπεταλιακή συσσώρευση. Τα αιμοπετάλια σχηματίζουν συσσωματώματα που καταλήγουν σε θρόμβους.

Η μέτρηση της συσσώρευσης γίνεται στο συσσωρευόμετρο. Πρόκειται για μία φωτομετρική συσκευή που ανιχνεύει τη μεταβολή στην απορρόφηση του φωτός όταν σχηματίζονται θρόμβοι αιμοπεταλίων. Η λειτουργία του περιγράφεται ως εξής: τοποθετούνται στη συσκευή δύο ειδικές κυβέτες εκ των οποίων η μία περιέχει 450 μl πλάσμα αίματος χαμηλής περιεκτικότητας σε αιμοπετάλια (PPP-Platelet Poor Plasma), ενώ η δεύτερη περιέχει 450 μl πλάσματος πλούσιο σε αιμοπετάλια (PRP-Platelet Rich Plasma). Το PPP δεν μπορεί να σχηματίσει θρόμβους, εφόσον περιέχει ελάχιστα αιμοπετάλια, και χρησιμεύει ως δείγμα ελέγχου. Αντίθετα, το PRP σχηματίζει μικρά συσσωματώματα αιμοπεταλίων όταν αυτά διεγερθούν από κάποιον αγωνιστή αιμοπεταλιακής συσσώρευσης. Η μείωση της απορρόφησης του φωτός που οφείλεται στα συσσωματώματα αυτά μετράται από το συσσωρευόμετρο.

Το καρβοξυλικό ιονοφόρο ασβέστιο είναι μια χηλοειδής ένωση η οποία ιονοφορεί ιόντα Ca^{++} και Mn^{++} διαμέσω βιολογικών μεμβρανών οι οποίες είναι φυσιολογικά

αδιαπέραστες από αυτά (Pressman, 1973; Reed and Lardy, 1972). Αυτή η ιδιότητά του το καθιστά ένα πολύ χρήσιμο εργαλείο σε πειραματικά πρωτόκολλα που προσπαθούν να εξακριβώσουν το ρόλο της μεταβολής αυτών των ιόντων στη φυσιολογία διάφορων βιολογικών διεργασιών (McLaughlin and Eisenberg, 1975).

Τα ιόντα Ca^{++} βρίσκονται και στον εξωκυττάριο (εξωγενές Ca^{++}) και στον ενδοκυττάριο χώρο (ενδογενές Ca^{++}). Το ιονοφόρο ασβέστιο κινητοποιεί το εξωγενές Ca^{++} ιονοφορόντας το μέσα στο κυτταρόπλασμα των αιμοπεταλίων και παράλληλα απελευθερώνει το ενδογενές Ca^{++} από τις αποθήκες του στο κυτοσόλιο (Feistein and Frazer, 1975; Gerrard et al., 1974). Για να διαπιστωθεί εάν το VMA και το HVA παρεμβάλλονται στη διακίνηση του εξωγενούς Ca^{++} και όχι του ενδογενούς, χρησιμοποιήθηκε στα πειράματα αιμοπεταλιακής συσσώρευσης το 8-δισαιθυλοαμινο-οκτ 3,4,5-τριμεθόξυ βενζοϊκό οξύ (TMB-8). Το TMB-8 είναι μία ουσία που δεσμεύει το ενδογενές Ca^{++} καθιστώντας το πολύτιμο στη μελέτη της δραστηριότητας μόνο του εξωγενούς Ca^{++} (Brand and Felber, 1984; Malagodi and Chiou, 1975; Shaw and Lyons, 1982).

3.2.2 Μελέτη επίδρασης του VMA στη διακίνηση του Ca^{++} κατά τη δοκιμασία αιμοπεταλιακής συσσώρευσης

Σκοπός της μελέτης είναι η συσχέτιση του VMA και του HVA με τη μεταγωγή του εξωγενούς και ενδογενούς Ca^{++} στα ανθρώπινα αιμοπετάλια. Μία πιθανή αλληλεπίδραση των ουσιών αυτών με το Ca^{++} θα μπορούσε να ερμηνεύσει την επίδρασή τους στο καρδιαγγειακό σύστημα, το οποίο επηρεάζεται σε μεγάλο βαθμό από την κίνηση των ιόντων Ca^{++} διαμέσω των κυτταρικών μεμβρανών στα μυοκαρδιακά και ενδοθηλιακά κύτταρα. Τα αιμοπετάλια αποτελούν ένα αξιόπιστο πειραματικό μοντέλο μελέτης τέτοιων επιδράσεων.

Για την διενέργεια της δοκιμασίας της αιμοπεταλιακής συσσώρευσης χρησιμοποιήθηκαν 8 υγιείς ενήλικες άντρες ηλικίας 30 ± 5 ετών. Ο λόγος για τον οποίο αποκλείστηκαν οι γυναίκες από το συγκεκριμένο πειραματικό πρωτόκολλο σχετίζεται με την διακύμανση των επιπέδων των οιστρογόνων στο αίμα τους, τα οποία επηρεάζουν την πήκτικότητα του αίματος. Οι εθελοντές είχαν ελεύθερο ιατρικό ιστορικό, δεν ελάμβαναν

φαρμακευτική αγωγή για οποιοδήποτε λόγο, ήταν μη καπνιστές και απείχαν από κατανάλωση οινοπνευματωδών ποτών για τουλάχιστον 10 ημέρες πριν την αιμοληψία. Η αιμοληψία πραγματοποιούνταν μια φορά την εβδομάδα. Χρησιμοποιήθηκαν ειδικά φιαλίδια που περιέχουν ως αντιπηκτικό κιτρικό οξύ σε συγκέντρωση 1ml κιτρικού οξέος/10 ml αίματος.

Η διαδικασία ήταν η εξής: έγινε αιμοληψία 20 ml αίματος από τον εθελοντή το οποίο χωρίστηκε ισόποσα σε ειδικά φιαλίδια. Εν συνεχεία, τα φιαλίδια φυγοκεντρήθηκαν στις 900 στροφές ανά λεπτό (rpm) για 20 λεπτά. Συγκεντρώθηκε το πλούσιο σε αιμοπετάλια πλάσμα (Platelet Rich Plasma- PRP), αποθηκεύτηκε σε πλαστικό δοχείο τύπου falcon και διατηρήθηκε στους 37°C μέχρι το τέλος του πειράματος. Το εναπομείναν αίμα ξαναφυγοκεντρήθηκε στις 3200 rpm για 15 λεπτά από το οποίο συγκεντρώθηκε το φτωχό σε αιμοπετάλια πλάσμα (Platelet Poor Plasma- PPP) σε ποσότητα 450 μl και το οποίο χρησιμοποιήθηκε για τη σωστή ρύθμιση (calibration) του συσσωρευόμετρου. Σε κάθε δοκιμασία συσσώρευσης χρησιμοποιήθηκαν ειδικές για τον τύπο του συσσωρευόμετρου κυψελίδες που περιείχαν 450 μl PRP η καθεμία. Πάντα είχε προστεθεί ειδικός πλαστικοποιημένος μαγνήτης που περιστρεφόταν στις 1500 rpm ώστε να γίνεται ανάδευση του πλάσματος προσομοιάζοντας, έτσι, τις συνθήκες της στροβιλώδους αιματικής ροής. Η πρώτη μέτρηση χρησιμοποιήθηκε ως έλεγχος μηδενισμού της συσκευής στην οποία η αιμοπεταλιακή συσσώρευση επέρχεται αυτόματα. Η δεύτερη μέτρηση έγινε για τον έλεγχο της δραστηριότητας του αιμοπεταλιακού διεγέρτη, που στο συγκεκριμένο πειραματικό πρωτόκολλο ήταν το ιονοφόρο ασβέστιο σε συγκέντρωση 20 μM.

Οι επόμενες μετρήσεις που διεξήχθησαν μέτρησαν τη δραστηριότητα του VMA και του HVA σε συγκεντρώσεις 3 mM ως αναστολείς της αιμοπεταλιακής συσσώρευσης με τον συγκεκριμένο διεγέρτη. Αντίστοιχα έγιναν και δοκιμές με τον διαλύτη των ουσιών αυτών, δηλαδή το δις απεσταγμένο νερό (ddH₂O), οι οποίες χρησίμευσαν ως ομάδα ελέγχου. Το ίδιο πρωτόκολλο επαναλήφθηκε με την παρουσία TMB-8 σε συγκέντρωση 1mM.

3.3 In vitro

3.3.1 Μέτρηση αντιοξειδωτικής ικανότητας του VMA με την μέθοδο TAC (Total Antioxidant Capacity)

Σκοπός της μέτρησης της TAC είναι εύρεση πιθανής σχέσης μεταξύ της καρδιοπροστατευτικής και της αντιοξειδωτικής ιδιότητας του VMA, εφόσον υπάρχουν. Όπως αναφέρεται και στη παράγραφο 1.4.2, οι ελεύθερες ρίζες οξυγόνου προκαλούν οξείδωση κυτταροπλασματικών λιπιδίων με αποτέλεσμα τον κυτταρικό θάνατο. Για το λόγο αυτό, ουσίες με γνωστή αντιοξειδωτική δράση ελαττώνουν την έκταση της βλάβης στο ισχαιμικό μυοκάρδιο.

Η μέτρηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας του VMA στο ddH₂O και στο πλάσμα των πειραματοζώων έγινε σύμφωνα με την μέθοδο του κυανού του CrO₅ που αναπτύχθηκε από τους Charalampidis et al. (2009). Η συγκεκριμένη μέθοδος χρησιμοποιεί ένα ισχυρό οξειδωτικό μέσον, το υπεροξείδιο του χρωμίου (Cr(O₂)₂ · H₂O) που έχει βαθυκόκκινο χρώμα και στηρίζεται στο γεγονός ότι το μέσον αυτό αποχρωματίζεται όταν έλθει σε επαφή με οποιαδήποτε αντιοξειδωτική ουσία. Ο βαθμός αποχρωματισμού που μετριέται σε ένα φασματοφωτόμετρο αντανακλά την αντιοξειδωτική ισχύ της υπό μέτρηση ουσίας.

Αναλυτικότερα, σε πλαστική κυβέτα χωρητικότητας 1 ml προστίθενται 240μl οργανικού διαλύτη (3 μεθυλ 1 βουτανόλη), 80 διαλύματος διχρωμικού αμμωνίου 0.02M, 80μL διαλύματος σουλφουρικού οξέος 0.025M και 4μL δείγματος. Έπειτα, η κυβέτα επωάζεται στο φασματοφωτόμετρο για 3 λεπτά ώστε να μηδενιστεί η ένδειξη και εν συνεχεία, αφού αφαιρεθεί από το φασματοφωτόμετρο, προστίθεται 4μL διαλύματος υπεροξειδίου του υδρογόνου συγκέντρωσης 1.6M. Ακολουθεί ελαφρά ανάδευση της κυβέτας και επανατοποθέτηση της στο φασματοφωτόμετρο για 3 λεπτά οπότε και καταγράφεται η ένδειξη της απορρόφησης. Για κάθε δείγμα γίνεται τριπλή επαλήθευση. Το ίδιο επαναλαμβάνεται και για το τυφλό (blank) και το πρότυπο (standard) διάλυμα στα οποία, αντί του δείγματος, προστίθενται στην κυβέτα 4μL οργανικού διαλύτη και 4μL διαλύματος α-τοκοφερόλης 0.1M, αντίστοιχα. Οι μετρήσεις πραγματοποιούνται στους 37°C και το μήκος κύματος έχει ορισθεί στα 569nm. Η αντιοξειδωτική ικανότητα του δείγματος συγκρίνεται με αυτήν του διαλύματος 0.1M α-τοκοφερόλης, και οι μονάδες μέτρησης moles/lit α-τοκοφερόλης υπολογίζονται από τον τύπο:

$$TAC_{\text{sample}} = [\alpha\text{-tocopherol}] \times [(\Delta A_{\text{blank}} - \Delta A_{\text{sample}}) / (\Delta A_{\text{blank}} - \Delta A_{\text{standard}})]$$

Με τη μέθοδο αυτή ελέγχθηκε η TAC του VMA σε διάλυμα διασπασταγμένου νερού (ddH₂O) σε συγκεντρώσεις 0.1 mM, 1mM και 10mM. Επίσης, μετρήθηκε και συγκρίθηκε η TAC πλάσματος από αίμα επίμυων από δύο ομάδες η οποίες είχαν υποστεί μυοκαρδιακή ισχαιμία: α) η πρώτη ομάδα είχε λάβει VMA σε δόση 10 mg/kg ΣΒ και β) η δεύτερη ομάδα δεν είχε λάβει ουσία και χρησίμευσε ως ομάδα ελέγχου.

3.3.2 Μέτρηση οξείας τοξικότητας του VMA στο ήπαρ και στους νεφρούς

Διεξήχθησαν μετρήσεις για να διαπιστωθεί η επίδραση του VMA στην ηπατική και νεφρική λειτουργία σε οξεία φάση, έως και 180 λεπτά μετά την έγχυση της ουσίας. Έτσι, υπολογίστηκαν τα επίπεδα των ηπατικών ενζύμων αλανινική τρανσαμινάση (ALT), ασπαρτική τρανσαμινάση (AST) και της κρεατινίνης.

Δεκαέξι θηλυκοί επίμυες Wistar τυχαιοποιήθηκαν σε 2 ισόποσες ομάδες των 8 πειραματοζώων: α) Ομάδα ελέγχου και β) Πειραματική ομάδα στην οποία εγχύθηκε ενδοφλέβια VMA σε δόση 10 mg/kg ΣΒ.

Τα πειραματόζωα αναισθητοποιήθηκαν και καθετηριάστηκε η αριστερή σφαγίτιδα φλέβα με έναν φλεβοκαθετήρα 20 gauge. Στη συνέχεια έγινε έγχυση 0.5 ml διαλύματος ουσίας bolus σε διάστημα ενός λεπτού. Δείγματα αίματος ελήφθησαν από τον φλεβοκαθετήρα 10 και 180 λεπτά μετά τη χορήγηση της ουσίας. Τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν στις 3200 rpm για 20 λεπτά και το πλάσμα συλλέχθηκε και διενεργήθηκε βιοχημική ανάλυση (Olympus AU2700 Biochemical Analyzer)..

3.4 Στατιστική ανάλυση αποτελεσμάτων

Η στατιστική σημαντικότητα ορίστηκε σε τιμές $p < 0.05$ ενώ όλα τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσοι όροι \pm τυπικό σφάλμα. Για την ανάλυση των στατιστικών διαφορών μεταξύ των ομάδων χρησιμοποιήθηκε το two-way ANOVA for repeated

measurements και το Bonferroni post hoc test για την σύγκριση των διαφορετικών χρονικών σημείων μεταξύ τους. Οι στατιστικές διαφορές μεταξύ των ομάδων στα *ex vivo* και *in vitro* πρωτόκολλα προσδιορίστηκαν με το Student's t-test. Για τα αποτελέσματα των πειραμάτων πρόκλησης αρρυθμιών όπου τα δεδομένα είναι μη παραμετρικά χρησιμοποιήθηκε το two-tailed Mann-Whitney U test ώστε να διαπιστωθούν τυχόν διαφορές μεταξύ των ομάδων. Όλες οι στατιστικές αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν με το στατιστικό πακέτο SPSS, έκδοση 16.0, Chicago, USA.

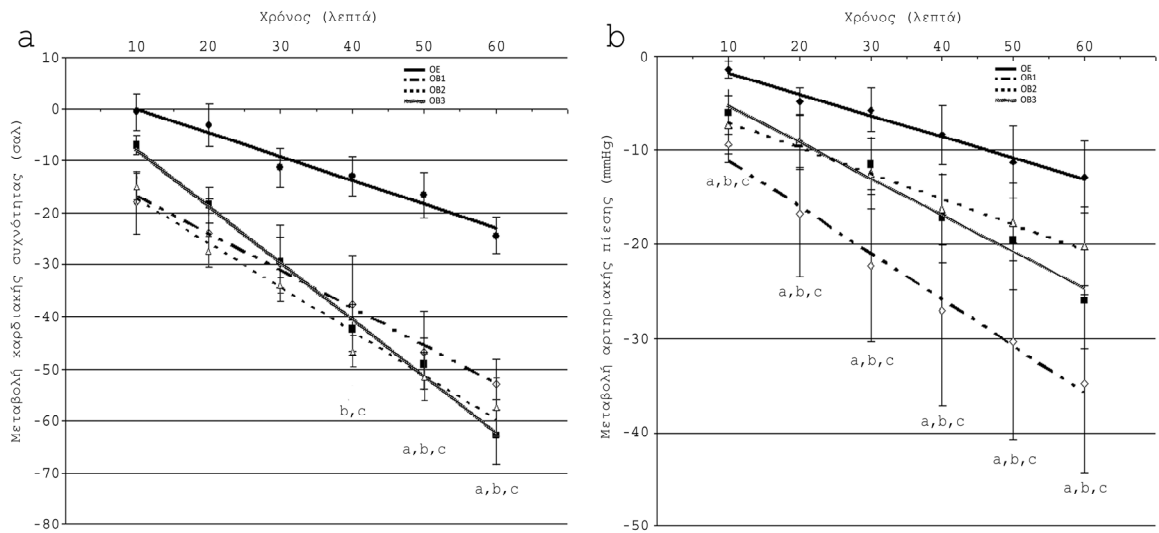
4. Αποτελέσματα

4.1 In vivo

4.1.1 Επίδραση του VMA στην καρδιακή συχνότητα και την αρτηριακή πίεση

Το Γράφημα 1 αναπαριστά την απόλυτη μείωση της καρδιακής συχνότητας στην ομάδα ελέγχου (OE) και στις πειραματικές ομάδες OB1, OB2 και OB3. Συγκεκριμένα, η μεταβολή για την OE ήταν 24.3 ± 3.5 σ.α.λ (σφύξεις ανά λεπτό) ενώ για τις OB1, OB2 και OB3 κυμάνθηκε στις 53 ± 4.9 , 63.1 ± 7.4 και 62.6 ± 5 σ.α.λ. αντίστοιχα. Η αρχική τιμή καρδιακής συχνότητας ανάμεσα στις ομάδες δεν διέφερε σε στατιστικά σημαντικό βαθμό, εντούτοις διέφερε στατιστικά σημαντικά ανάμεσα στην ομάδα ελέγχου και όλες τις πειραματικές ομάδες στο πέρας του πειράματος (60 λεπτά) και συγκεκριμένα ήδη μετά από 40 από την έναρξη της μέτρησης ($p= 0.0043$ για την OB1, $p= 0.038$ για την OB2, $p=0.0026$ για την OB3) (Γράφημα 1). Η εκατοστιαία πτώση της καρδιακής συχνότητας στις εν λόγω ομάδες ανήλθε στο 7.1% για την OE, 17.5% για την OB1, 17.9% για την OB2 και 18.9% για την OB3. Στον Πίνακα 4 αναγράφονται οι καρδιακές συχνότητες σε απόλυτες τιμές. Συνολικά παρατηρήθηκε μια τάση για δόσοεξαρτώμενη επίδραση της ουσίας στην καρδιακή συχνότητα, η οποία, ωστόσο, δεν αποδείχθηκε με στατιστική σημαντικότητα.

Αναφορικά με την μεταβολή της μέσης αρτηριακής πίεσης στις παραπάνω ομάδες η μέση πτώση της ήταν 12.9 ± 3.9 mmHg για την OE και 34.8 ± 9.5 , 20.2 ± 4.2 και 26.0 ± 5.1 mmHg για τις OB1, OB2 και OB3 αντίστοιχα. Η στατιστικά σημαντική μεταβολή ($p < 0.05$) παρατηρήθηκε από το 10^ο λεπτό μετά την έναρξη των μετρήσεων. Η απόλυτη πτώση της αρτηριακής πίεσης και οι απόλυτες τιμές της παρουσιάζονται στο Γράφημα 1 και στον Πίνακα 4 αντίστοιχα. Η μέση μείωση στις τιμές της συστολικής και διαστολικής πίεσης ήταν ανάλογη αυτής της μέσης αρτηριακής πίεσης.



Γράφημα 1. Μείωση της Καρδιακής Συχνότητας και της Μέσης Αρτηριακής Πίεσης στα ζώα που χορηγήθηκε VMA. OE, ομάδα ελέγχου; OB1, VMA 1mg/kg; OB2, VMA 10mg/kg; OB3, VMA 100mg/kg.

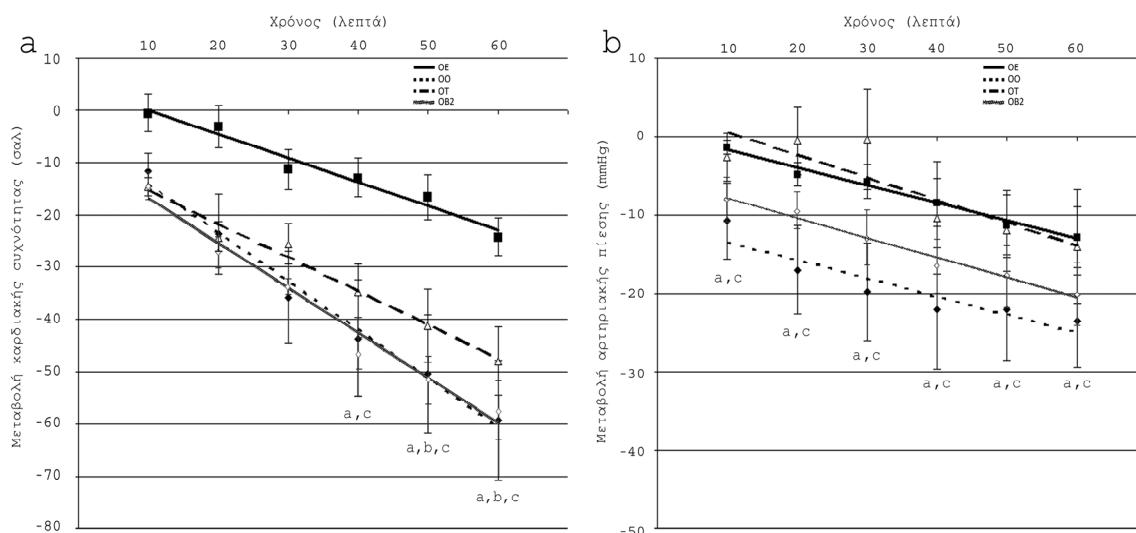
^a Στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των OB1 και OE; ^b Στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των OB2 και OE; ^c Στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των OB3 και OE.

Πίνακας 4. Μέση τιμή±τυπικό σφάλμα της Καρδιακής Συχνότητας (ΚΣ) και της Μέσης Αρτηριακής Πίεσης (ΜΑΠ) για το πρωτόκολλο μελέτης του VMA, HVA και TMZ, και τα πρωτόκολλα μελέτης της βαγοτομής και της αδρεναλίνης-ισοπροτερενόλης.* στατιστικά σημαντική διαφορά συγκριτικά με την ΟΕ, p<0.05.

| Πρωτόκολλο μελέτης VMA/HVA/TMZ | Ομάδα | ΚΣ | | | ΜΑΠ | | |
|-------------------------------------------------------|--------------------------------------|----------|----------|-----------|---------|---------|---------|
| | | 0 λ | 30 λ | 60 λ | 0 λ | 30 λ | 60 λ |
| OE | Ομάδα ελέγχου | 335±5.0 | 324±4.7 | 311±6.3 | 96±7.5 | 90±6.1 | 83±4.8 |
| OB1 | VMA 1 mg/kg | 303±7.3 | 273±8.2 | 250±9.7* | 91±10.3 | 69±4.0* | 57±2.0* |
| OB2 | VMA 10 mg/kg | 324±10.9 | 290±10.7 | 266±10.2* | 86±6.0 | 74±4.7* | 66±5.5* |
| OB3 | VMA 100 mg/kg | 328±10.0 | 299±6.2 | 266±6.2* | 101±7.0 | 89±6.6* | 75±8.9* |
| OO | HVA 10 mg/kg | 326±13.8 | 291±16.4 | 267±15.6* | 96±8.6 | 76±7.1* | 73±7.1* |
| OT | TMZ 5 mg/kg | 326±9.0 | 301±8.5 | 278±8.0* | 89±5.0 | 88±2.4 | 75±4.7 |
| Πρωτόκολλο βαγοτομής | | | | | | | |
| OE | Ομάδα ελέγχου | 0 λ | 30 λ | 60 λ | 0 λ | 30 λ | 60 λ |
| BOE | Ομάδα ελέγχου με βαγοτομή | 335±5.0 | 324±4.7 | 311±6.3 | 96±7.5 | 90±6.1 | 83±4.8 |
| BOB | Βαγοτομή - VMA 10 mg/kg | 311±7.4 | 280±7.9 | 267±7.1* | 87±7.7 | 74±7.7 | 69±5.9 |
| OB2 | VMA 10 mg/kg | 323±7.5 | 299±7.2 | 280±8.7* | 89±8.7 | 75±5.8 | 72±5.9 |
| | | 324±10.9 | 290±10.7 | 266±10.2* | 86±6.0 | 74±4.7* | 66±5.5* |
| Πρωτόκολλο μελέτης Αδρεναλίνης-Ισοπροτερενόλης | | | | | | | |
| OA | Αδρεναλίνη 40μg/kg | 0 λ | 2 λ | 8 λ | 0 λ | 2 λ | 8 λ |
| OAB | Αδρεναλίνη 40μg/kg-VMA 10 mg/kg | 293±10.7 | 290±10.3 | 279±9.7 | 63±2.0 | 155±6.4 | 57±1.5 |
| OI | Ισοπροτερενόλη 0.5μg/kg | 275±13.3 | 279±6.2 | 261±8.7 | 51±3.0 | 152±8.2 | 46±3.2 |
| OIB | Ισοπροτερενόλη 0.5μg/kg-VMA 10 mg/kg | 312±10.8 | 353±8.3 | 297±7.8 | 87±6.0 | 65±3.3 | 81±6.4 |
| | | 253±5.8 | 300±5.2 | 251±6.0 | 75±4.2 | 56±1.5 | 68±4.0 |

4.1.2 Επίδραση του HVA και της TMZ στην καρδιακή συχνότητα και αρτηριακή πίεση.

Η δραστηριότητα του HVA και της TMZ στις δύο παραμέτρους που μελετήθηκαν έγινε συγκριτικά με την ΟΕ και την ΟΒ2 αφού χρησιμοποιήθηκε η ίδια δοσολογία ουσίας, 10 mg/kg ΣΒ. Όπως φαίνεται και στο Γράφημα 2, το VMA, HVA και TMZ παρουσίασαν την ίδια δραστηριότητα όσον αφορά τη μείωση της καρδιακής συχνότητας, με το HVA να προκαλεί μία πτώση 18% ενώ η TMZ μια πτώση 15%. Σε απόλυτες τιμές παρατηρήθηκε πτώση 59.2 ± 11.4 σ.α.λ. για την ομάδα ΟΟ και 48 ± 6.6 σ.α.λ. για την ΟΤ. Οι αρχικές τιμές αναφοράς και για τις δύο παραμέτρους (baseline) δεν παρουσίασαν στατιστικά σημαντική διαφορά ανάμεσα στις ΟΟ, ΟΤ, ΟΒ2 και ΟΕ. Διέφεραν, ωστόσο, σε στατιστικά σημαντικό βαθμό στο τέλος του πειράματος μεταξύ της ΟΕ και όλων των υπόλοιπων πειραματικών ομάδων ($p= 0.0041$ για την ΟΟ, $p= 0.0044$ για την ΟΤ), κάτι που δεν ίσχυσε μεταξύ των πειραματικών ομάδων. Οι απόλυτες τιμές αναγράφονται στον Πίνακα 4.



Γράφημα 2. Μείωση της Καρδιακής Συχνότητας και της Μέσης Αρτηριακής Πίεσης στα ζώα που χορηγήθηκε VMA, HVA και TMZ. ΟΕ, ομάδα ελέγχου; ΟΒ2, VMA 10mg/kg; ΟΟ, HVA 10mg/kg; ΟΤ, TMZ 10mg/kg.

^a Στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των ΟΟ και ΟΕ; ^b Στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των ΟΤ και ΟΕ; ^c Στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των ΟΒ2 και ΟΕ.

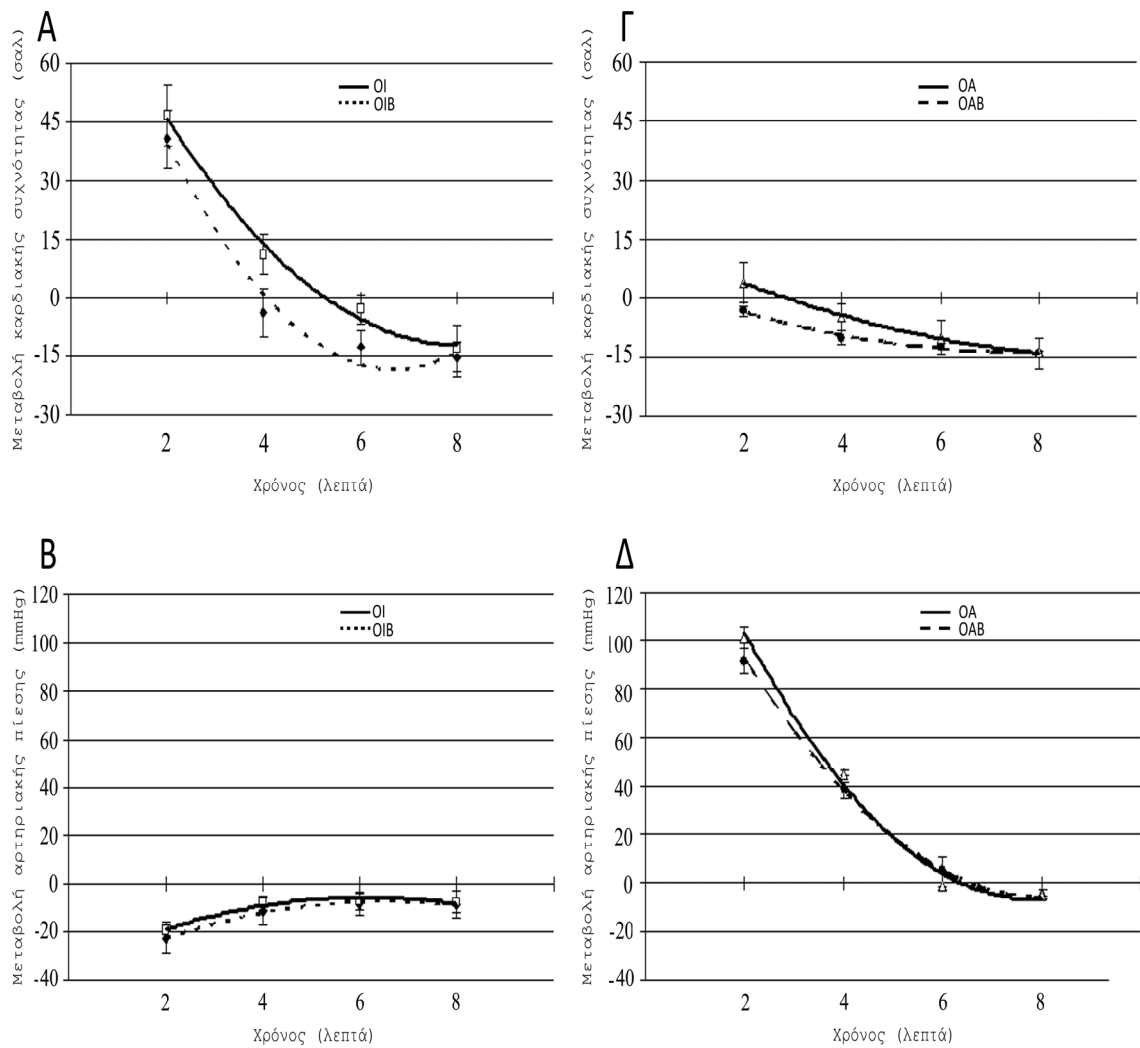
Οι αρχικές τιμές αναφοράς μεταξύ των ομάδων στη μέση αρτηριακή πίεση δεν εμφάνισαν στατιστικά σημαντική διαφορά. Ωστόσο στο πέρας του πειράματος οι τιμές μεταβλήθηκαν σε στατιστικά σημαντικό βαθμό για την ΟΟ ($p < 0.05$), κάτι που δεν παρατηρήθηκε στην ΟΤ ($p = 0.12$). Συγκεκριμένα, η μείωσή της ήταν 23.6 ± 5.87 mmHg και 14 ± 7.32 mmHg για την ΟΟ και ΟΤ αντίστοιχα (Γράφημα 2). Η εκατοστιαία πτώση ανήλθε στο 24% για την ΟΟ και στο 15.7% για την ΟΤ. Ανάλογα ήταν τα αποτελέσματα στην μέτρηση της συστολικής και της διαστολικής αρτηριακής πίεσης.

4.1.3 Δραστικότητα επινεφρίνης και ισοπροτερενόλης

Η ισοπροτερενόλη προκάλεσε απότομη, στατιστικά σημαντική ($p = 0.0016$) αύξηση της καρδιακής συχνότητας στα πρώτα 2 λεπτά μετά τη χορήγησή τους και στις ομάδες, ΟΙ και ΟΙΒ (Πίνακας 4). Ωστόσο, σε κανένα χρονικό σημείο του πειράματος δεν παρατηρήθηκε στατιστική σημαντικότητα στη διαφορά της συχνότητας ανάμεσα στις ομάδες ($p \gg 0.05$).

Η χορήγηση αδρεναλίνης στη ομάδα ελέγχου, ΟΑ, και στην πειραματική ομάδα, ΟΑΒ, δεν μετέβαλλε στην καρδιακή συχνότητα σε στατιστικά σημαντικό βαθμό ($p = 0.0022$). Επίσης, η μεταβολή στις τιμές της καρδιακής συχνότητας δεν διέφερε στατιστικά σημαντικά σε κανένα χρονικό σημείο του πειράματος για τις δύο ομάδες ($p \gg 0.05$) (Γράφημα 3).

Η μέση αρτηριακή πίεση αυξήθηκε στα πρώτα 2 λεπτά στις ομάδες ΟΑ και ΟΑΒ ($p < 0.05$) χωρίς, ωστόσο, να καταγραφεί κάποια στατιστικά σημαντική διαφορά ανάμεσα τους σε όλα τα χρονικά σημεία. Ανάλογα αποτελέσματα υπήρξαν και για τις ομάδες ΟΙ και ΟΙΒ. Οι μεταβολές και οι τιμές στην μέση αρτηριακή πίεση καταγράφονται στο Γράφημα 3 και στον Πίνακα 4 αντίστοιχα.



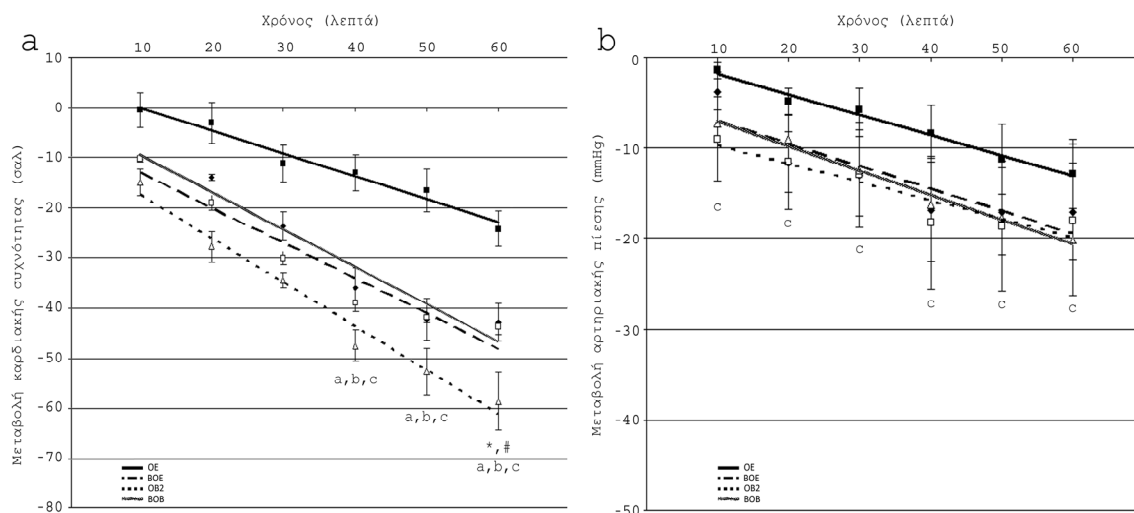
Γράφημα 3. Μεταβολή της Καρδιακής Συχνότητας και της Μέσης Αρτηριακής Πίεσης \pm σταθερή απόκλιση στις πειραματικές ομάδες και στις ομάδες ελέγχου στο πρωτόκολλο μελέτης ισοπροτερενόλης και αδρεναλίνης. OI, ομάδα ελέγχου- ισοπροτερενόλη; OIB, ισοπροτερενόλη + VMA 10mg/kg; OA, ομάδα ελέγχου- αδρεναλίνη; OAB, αδρεναλίνη + VMA 10mg/kg.

4.1.4 Δραστικότητα VMA μετά από αμφοτερόπλευρη βαγοτομή

Η μεταβολή της καρδιακής συχνότητας και της μέσης αρτηριακής πίεσης ανάμεσα στις ομάδες με βαγοτομημένα ζώα (BOE, BOB) έναντι των ομάδων με μη βαγοτομημένα ζώα (OE, OB2) φαίνεται στο Γράφημα 4. Η μέση πτώση της καρδιακής συχνότητας για την BOE και τη BOB μετά από 60 λεπτά καταγραφής διέφερε σε στατιστικά σημαντικό βαθμό

συγκρινόμενη με την ΟΕ αλλά και με την ΟΒ2. Αντίθετα, οι ΒΟΕ και ΒΟΒ δεν επέδειξαν κάποια διαφορά μεταξύ τους σε κανένα χρονικό σημείο ($p \gg 0.05$). Η μείωση της καρδιακής συχνότητας ανήλθε στο 14.1% για την ΒΟΕ και 13.3% για την ΒΟΒ, ενώ για τις ΟΕ και ΟΒ2 ήταν 7.1% και 17.9% αντίστοιχα. Πρέπει να τονιστεί ότι οι δύο ομάδες των βαγοτομημένων πειραματοζώων (ΒΟΕ, ΒΟΒ) δε διέφεραν μεταξύ τους σε κανένα χρονικό σημείο ($p > 0.05$).

Η ελάττωση της μέσης, συστολικής και διαστολικής αρτηριακής πίεσης δεν διέφερε στατιστικά σημαντικά σε καμία από της ομάδες σε σχέση με την ομάδα ελέγχου, εξαιρουμένης της ΟΒ2 όπως αναφέρθηκε στην παράγραφο 4.1.3. Επίσης, δεν παρατηρήθηκε καμία διαφορά στις τιμές της αρτηριακής σε οποιοδήποτε χρονικό σημείο του πειράματος ανάμεσα στις ομάδες ΒΟΕ και ΒΟΒ ($p \gg 0.05$). Οι απόλυτες τιμές της καρδιακής συχνότητας και της μέσης αρτηριακής πίεσης καταγράφονται στον Πίνακα 4.



Γράφημα 4. Μείωση της Καρδιακής Συχνότητας και της Μέσης Αρτηριακής Πίεσης στις βαγοτομημένες και μη βαγοτομημένες ομάδες πειραματοζώων. ΟΕ, ομάδα ελέγχου; ΟΒ2, VMA 10mg/kg; ΒΟΕ, ομάδα ελέγχου βαγοτομημένων ζώων; ΒΟΒ, βαγοτομημένα ζώα που έλαβαν VMA 10mg/kg.

^a Στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των ΒΟΒ και ΟΕ; ^b Στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των ΒΟΕ και ΟΕ; ^c Στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των ΟΒ2 και ΟΕ; * Στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των ΒΟΕ και ΟΒ2; [#] Στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των ΒΟΒ και ΟΒ2.

4.1.5 Ενδοπεριτοναϊκή έγχυση VMA

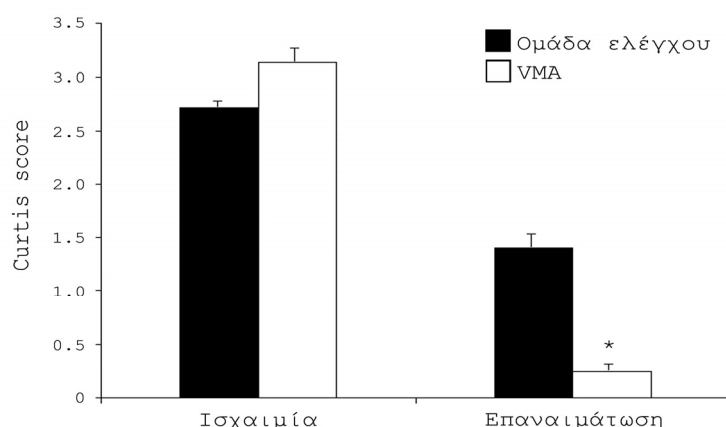
Η έγχυση του VMA ενδοπεριτοναϊκά σε δοσολογία 10 mg/kg ΣΒ προκάλεσε πτώση της καρδιακής συχνότητας κατά 20.1% (από 315±10.8 σ.α.λ στις 251±7.9 σ.α.λ.) και ήταν ανάλογη με την πτώση που παρατηρήθηκε στην ομάδα OB2, όπου η μείωση ήταν 17.9% (p=0.322).

Η μείωση της μέσης αρτηριακής πίεσης που καταγράφηκε ήταν 23±5.4 mmHg και 20±6.2 mmHg για την OB2 αντίστοιχα, χωρίς να κάποια στατιστικά σημαντική διαφορά ανάμεσα στις ομάδες (p=0.269).

4.1.6 Αποτελέσματα μετά από την πρόκληση οξέος εμφράγματος του μυοκαρδίου.

4.1.6.1 Curtis Score

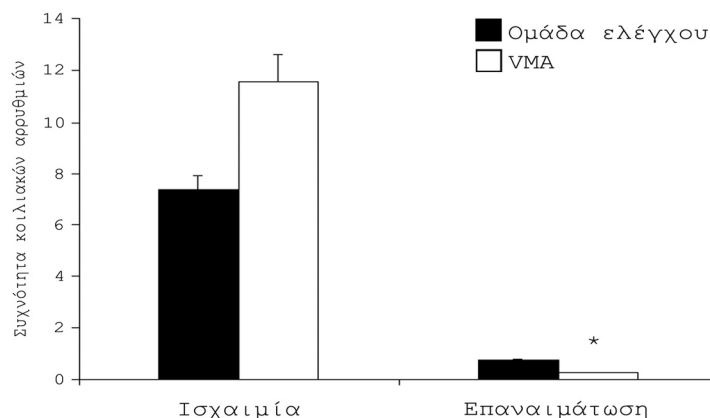
Το score αρρυθμιών ήταν παρόμοιο κατά τη φάση της ισχαιμίας για τις δύο ομάδες: 2.7±0.10 για την ομάδα ελέγχου και 3.1±0.16 για την πειραματική ομάδα (p=0.084). Αντιθέτως, το score διέφερε σε στατιστικά σημαντικό βαθμό ανάμεσα στις ομάδες όσον αναφορά τη φάση επαναιμάτωσης (p=0.032). Συγκεκριμένα, το score ήταν 1.4±0.20 για την ομάδα ελέγχου και 0.25±0.10 για την πειραματική ομάδα (Γράφημα 5).



Γράφημα 5. Curtis score για την ομάδα ελέγχου και την πειραματική ομάδα κατά την ισχαιμία και την επαναιμάτωση. Στατιστική σημαντικότητα στη διαφορά του σκορ ανάμεσα στις ομάδες παρατηρείται μόνο κατά τη φάση της επαναιμάτωσης. *, στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των ομάδων.

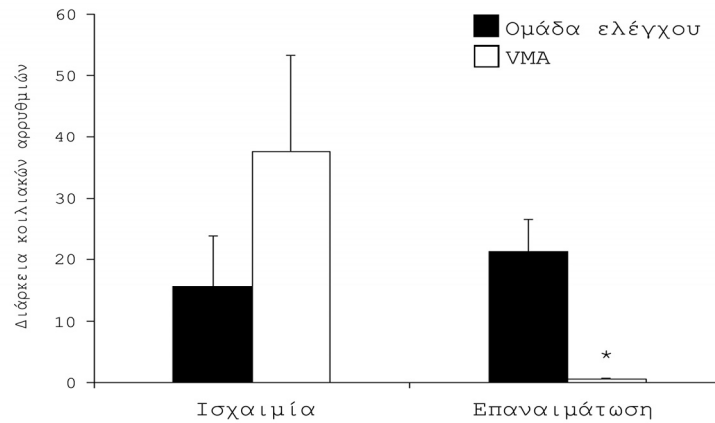
4.1.6.2 Κοιλιακές ταχυαρρυθμίες και πρώιμες κοιλιακές συστολές

Δεν παρατηρήθηκε κάποια στατιστικά σημαντική διαφορά στη συχνότητα και στη διάρκεια των κοιλιακών ταχυαρρυθμιών κατά τη φάση της ισχαιμίας ανάμεσα στις δύο ομάδες. Η συχνότητα ανήλθε στα 7.4 ± 0.5 επεισόδια για την ομάδα ελέγχου και στα 11.6 ± 1.0 επεισόδια για την πειραματική ομάδα ($p=0.269$), ενώ η διάρκειά τους ήταν 15.5 ± 8.3 και 37.6 ± 15.7 δευτερόλεπτα αντίστοιχα ($p=0.095$). Κατά τη φάση της επαναιμάτωσης, ο αριθμός και η διάρκεια τους ελαττώθηκαν σε στατιστικά σημαντικό βαθμό, τόσο μεταξύ των δύο φάσεων και για τις δύο ομάδες όσο και μεταξύ τους. Ο αριθμός των επεισοδίων ταχυαρρυθμίας ήταν 0.75 ± 0.04 επεισόδια για την ομάδα ελέγχου και 0.25 ± 0.03 επεισόδια για την πειραματική ομάδα ($p=0.028$). Αντίστοιχα, η διάρκειά τους ήταν 21.3 ± 5.3 και 0.6 ± 0.1 δευτερόλεπτα ($p=0.032$) (Γραφήματα 6 και 7).



Γράφημα 6. Συχνότητα εμφάνισης (σε αριθμό επεισοδίων) κοιλιακής ταχυκαρδίας-κοιλιακής μαρμαρυγής στις δύο ομάδες. *, στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των ομάδων.

Η συχνότητα εμφάνισης των πρώιμων κοιλιακών συστολών (ΠΚΣ) δεν παρουσίασε καμία στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των ομάδων, ούτε στη φάση της ισχαιμίας (47.6 ± 6.4 ΠΚΣ για την ομάδα ελέγχου και 83.3 ± 18 ΠΚΣ για την πειραματική ομάδα, $p=0.173$) ούτε στη φάση της επαναιμάτωσης (5.5 ± 2.3 ΠΚΣ για την ομάδα ελέγχου και 14.7 ± 6.1 ΠΚΣ για την πειραματική ομάδα, $p=0.218$).



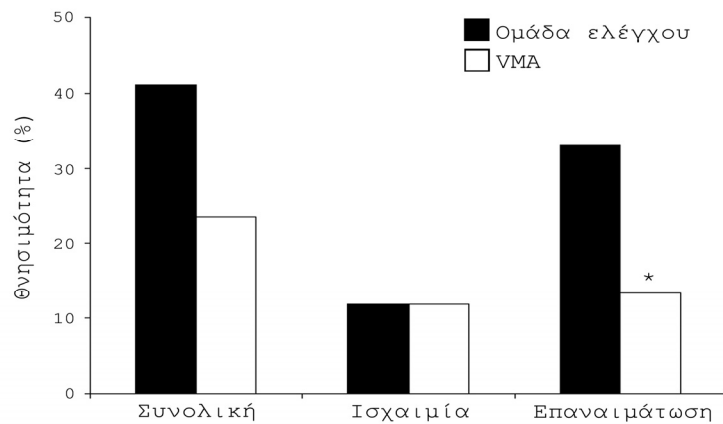
Γράφημα 7. Διάρκεια (σε δευτερόλεπτα) εμφάνισης κοιλιακής ταχυκαρδίας-κοιλιακής μαρμαρυγής στις δύο ομάδες. *, στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των ομάδων.

4.1.6.3 Θνησιμότητα- μέση επιβίωση-καρδιακή συχνότητα

Η συνολική θνησιμότητα και η μέση διάρκεια επιβίωσης δεν διέφεραν στατιστικά σημαντικά στα πειραματόζωα 9. Κατά την ισχαιμία, η θνησιμότητα ήταν 11.8% και για τις δύο ομάδες (2 από 17 ζώα). Στη φάση της επαναιμάτωσης, ωστόσο, η θνησιμότητα διέφερε σε στατιστικά σημαντικό βαθμό ανάμεσα στις δύο ομάδες ($p=0.046$) και ανήλθε στο 33% (5 από 15 ζώα) για την ομάδα ελέγχου και 13.3% (2 από 15 ζώα) για την πειραματική ομάδα (Γράφημα 8).

Η μέση διάρκεια επιβίωσης ήταν 46.5 ± 7.1 min για την ομάδα ελέγχου και 51.9 ± 7 min για την πειραματική ομάδα και δεν διέφεραν σε στατιστικά σημαντικό βαθμό ($p > 0.05$).

Τέλος, η καρδιακή συχνότητα μεταβλήθηκε στατιστικά σημαντικά και στις δύο ομάδες όσον αφορά τα χρονικά σημεία του πειράματος μεταξύ τους, χωρίς όμως να σημειωθεί κάποια διαφορά μεταξύ των ομάδων ($p > 0.05$) (Πίνακες 5 και 6).



Γράφημα 8. Θνησιμότητα των δύο ομάδων του πειράματος. α) συνολική β) κατά τη φάση της ισχαιμίας και γ) κατά τη φάση της επαναιμάτωσης. *, στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των ομάδων.

Πίνακας 5. Μεταβολή της καρδιακής συχνότητας, σε απόλυτη τιμή, της ομάδας ελέγχου κατά τη διάρκεια του πειράματος πρόκλησης ισχαιμίας-επαναιμάτωσης. Θ, θάνατος πειραματόζωου.

| Ομάδα ελέγχου | | | | | | | |
|--------------------|-----|------|------|------|------|------|------|
| Καρδιακή συχνότητα | | | | | | | |
| A/A | 0 λ | 10 λ | 20 λ | 30 λ | 40 λ | 50 λ | 60 λ |
| 1 | 330 | 330 | 300 | 280 | 262 | 240 | 232 |
| 2 | 315 | 300 | 285 | 265 | 253 | 244 | 235 |
| 3 | 333 | 320 | 60 | Θ | | | |
| 4 | 322 | 292 | 90 | 15 | Θ | | |
| 5 | 342 | 330 | 114 | 30 | Θ | | |
| 6 | 300 | 300 | 87 | 58 | Θ | | |
| 7 | 364 | 350 | 50 | 37 | Θ | | |
| 8 | 315 | 300 | 55 | 44 | 15 | 10 | 7 |
| 9 | 360 | 360 | 292 | Θ | | | |
| 10 | 320 | 320 | 310 | 294 | 264 | 259 | 250 |
| 11 | 355 | 340 | 180 | 35 | 15 | 10 | 10 |
| 12 | 342 | 340 | 300 | 32 | Θ | | |
| 13 | 335 | 330 | 310 | 300 | 295 | 292 | 285 |
| 14 | 310 | 300 | 274 | 250 | 20 | 12 | 4 |
| 15 | 330 | 330 | 193 | 117 | 93 | 87 | 71 |
| 16 | 327 | 322 | 200 | 127 | 101 | 68 | 50 |
| 17 | 342 | 324 | 186 | 106 | 83 | 77 | 52 |

Πίνακας 6. Μεταβολή της καρδιακής συχνότητας, σε απόλυτη τιμή, της πειραματικής ομάδας κατά τη διάρκεια του πειράματος πρόκλησης ισχαιμίας-επαναιμάτωσης. Θ, θάνατος πειραματόζωου.

| Πειραματική ομάδα | | | | | | | |
|--------------------|-----|------|------|------|------|------|------|
| Καρδιακή συχνότητα | | | | | | | |
| A/A | 0 λ | 10 λ | 20 λ | 30 λ | 40 λ | 50 λ | 60 λ |
| 1 | 315 | 300 | 300 | 292 | 271 | 269 | 240 |
| 2 | 300 | 293 | 292 | 275 | 255 | 250 | 246 |
| 3 | 342 | 320 | 300 | 289 | 248 | 190 | 180 |
| 4 | 322 | 310 | 100 | 55 | 35 | 19 | 15 |
| 5 | 334 | 325 | 73 | 58 | 25 | Θ | |
| 6 | 315 | 300 | 295 | 77 | 44 | 38 | 30 |
| 7 | 298 | 282 | 279 | Θ | | | |
| 8 | 352 | 340 | 70 | 10 | Θ | | |
| 9 | 344 | 330 | 180 | Θ | | | |
| 10 | 333 | 320 | 280 | 32 | 18 | 20 | 16 |
| 11 | 292 | 270 | 256 | 250 | 240 | 225 | 220 |
| 12 | 315 | 300 | 274 | 266 | 260 | 255 | 245 |
| 13 | 333 | 330 | 163 | 110 | 90 | 38 | 15 |
| 14 | 300 | 281 | 330 | 300 | 292 | 284 | 276 |
| 15 | 315 | 310 | 300 | 292 | 285 | 271 | 260 |
| 16 | 307 | 307 | 285 | 272 | 261 | 240 | 233 |
| 17 | 307 | 300 | 217 | 162 | 95 | 67 | 44 |

4.1.7 Πρόκληση αρρυθμιών με έγχυση αδρεναλίνης

Η έγχυση αδρεναλίνης ενδοφλέβια προκάλεσε κυρίως έκτοπες κολπικές συστολές και έκτοπες κοιλιακές, ενώ ελάχιστες ριπές κοιλιακής ταχυκαρδίας παρατηρήθηκαν. Η συχνότητα εμφάνισής τους μεταξύ της ομάδας ελέγχου και της πειραματικής ομάδας δεν διέφερε σε στατιστικά σημαντικό βαθμό ($p>0.05$). Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον Πίνακα 7.

Πίνακας 7. Συχνότητα εμφάνισης αρρυθμιών στις δυο ομάδες που μελετήθηκαν μετά από ενδοφλέβια έγχυση αδρεναλίνης σε δόση 2, 4, 8, 16, 32 και 64 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ΣΒ. Σε καμία δοσολογία δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά ανάμεσα στην ομάδα ελέγχου και την πειραματική ομάδα. CG, ομάδα ελέγχου; VMA πειραματική ομάδα; Εκ, έκτοπες κοιλικές συστολές; ΕΚ, έκτοπες κοιλιακές συστολές; ΡΚΤ, ριπές κοιλιακής ταχυκαρδίας; ΔΠ, δεν παρατηρήθηκαν.

| | | Εκ | ΕΚ | ΡΚΤ |
|------------------|-----|-----------------|-----------------|-----------------|
| 2 μg | CG | 0.63 \pm 0.14 | ΔΠ | ΔΠ |
| | VMA | 0.25 \pm 0.05 | 0.25 \pm 0.07 | ΔΠ |
| 4 μg | CG | 0.13 \pm 0.04 | ΔΠ | ΔΠ |
| | VMA | 0.38 \pm 0.07 | ΔΠ | ΔΠ |
| 8 μg | CG | 0.50 \pm 0.05 | 0.50 \pm 0.12 | 0.25 \pm 0.05 |
| | VMA | 1.00 \pm 0.20 | 0.25 \pm 0.04 | ΔΠ |
| 16 μg | CG | 1.50 \pm 0.11 | 0.83 \pm 0.20 | 0.63 \pm 0.14 |
| | VMA | 3.14 \pm 0.38 | 0.38 \pm 0.05 | ΔΠ |
| 32 μg | CG | 8.63 \pm 0.74 | 1.00 \pm 0.12 | 0.43 \pm 0.08 |
| | VMA | 10.0 \pm 0.90 | 1.00 \pm 0.14 | 0.13 \pm 0.04 |
| 64 μg | CG | 15.0 \pm 1.40 | 24.8 \pm 4.80 | 4.4 \pm 0.45 |
| | VMA | 15.4 \pm 1.20 | 26.6 \pm 4.30 | 2.4 \pm 0.39 |

4.2 Ex vivo

4.2.1 Αποτελέσματα αιμοπεταλιακής συσσώρευσης

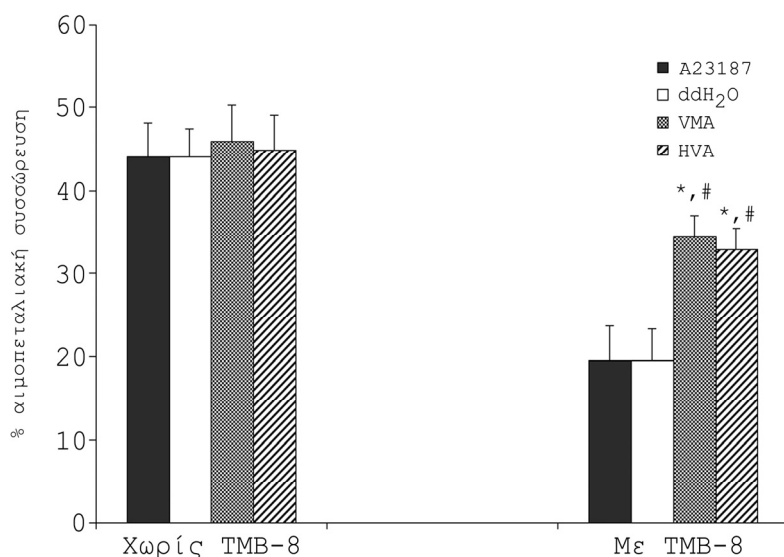
Το ιονοφόρο ασβέστιο προκάλεσε την αιμοπεταλιακή συσσώρευση σε ποσοστό 44 \pm 4.3% σε συγκέντρωση πλάσματος 20 μM . Δοκιμάστηκε η χορήγησή του σε δοσολογία έως 80 μM , ωστόσο η μέγιστη δράση του ως αιμοπεταλιακός αγωνιστής παρατηρήθηκε στα 20 μM .

Όταν το PRP επώαστηκε με VMA σε συγκέντρωση 3 mM κ έπειτα προστέθηκε το ιονοφόρο ασβέστιο καμία στατιστικά σημαντική μεταβολή δεν παρατηρήθηκε αφού η συσσώρευση κυμάνθηκε στο 46 \pm 4.4%. Το VMA προστέθηκε και σε μεγαλύτερες δοσολογίες χωρίς, ωστόσο, να επιφέρει καμία αναστολή της δράσης του ιονοφόρου

ασβεστίου. Τα αποτελέσματα ήταν ανάλογα όταν δοκιμάστηκε ως αιμοπεταλιακός αναστολέας το HVA (συσσώρευση $45 \pm 4.2\%$).

Όταν το PRP επώαστηκε με TMB-8 και έπειτα προστέθηκε το ιονοφόρο ασβέστιο η συσσώρευση κυμάνθηκε στο $19.6 \pm 4.1\%$, διαφέροντας σε στατιστικά σημαντικό βαθμό συγκριτικά με τη συσσώρευση χωρίς TMB-8 ($p=0.037$), προκαλώντας αναστολή συσσώρευσης 55.5% . Ανάλογο αποτέλεσμα παρατηρήθηκε όταν ο TMB-8 προστέθηκε 2 λεπτά μετά τη χορήγηση του ιονοφόρου ασβεστίου ($18.9 \pm 3.8\%$, $p=0.026$).

Έπειτα τα δείγματα επώαστηκαν με TMB-8 και VMA για 5 λεπτά πριν προστεθεί το ιονοφόρο ασβέστιο. Η συσσώρευση που παρατηρήθηκε ήταν $34.4 \pm 2.5\%$, δηλαδή αναστολή 22% , και ήταν στατιστικά σημαντική από αυτή που σημειώθηκε χωρίς VMA αλλά και μόνο με προσθήκη του αγωνιστή ($p < 0.05$). Το ίδιο αποτέλεσμα σημειώθηκε όταν το VMA προστέθηκε στα αιμοπετάλια, 10 λεπτά αφού είχε χορηγηθεί το ιονοφόρο ασβέστιο και ενώ είχαν επωαστεί με TMB-8 για 5 λεπτά. Η αιμοπεταλιακή αναστολή ήταν 25.5% . Παρόμοια αποτελέσματα παρατηρήθηκαν και για το HVA, το οποίο ανέστειλε την αιμοπεταλιακή συσσώρευση κατά 23% και 25% αντίστοιχα. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στο Γράφημα 9.



Γράφημα 9. Ποσοστό επί τοις εκατό της αιμοπεταλιακής συσσώρευσης με αγωνιστή το ιονοφόρο ασβέστιο (A23187), σε δείγματα επωασμένα με ddH₂O, VMA και HVA με ή χωρίς την παρουσία TMB-8. *, στατιστικά σημαντική διαφορά συγκριτικά με την ομάδα που επώαστηκε σε ιονοφόρο ασβέστιο; #, στατιστικά σημαντική διαφορά συγκριτικά με την ομάδα που επώαστηκε σε ιονοφόρο ασβέστιο και ddH₂O.

4.3 In vitro

4.3.1 Αποτελέσματα μέτρησης Ολικής Αντιοξειδωτικής Ικανότητας

Η μέτρηση της Ολικής Αντιοξειδωτικής Ικανότητας (Total Antioxidant Capacity-TAC) του VMA έγινε σε δύο ειδών δείγματα: α) σε δείγματα όπου ο διαλύτης ήταν δισαπεσταγμένο νερό (ddH₂O) και β) σε πλάσμα αίματος επίμυος στο οποίο είχε προηγουμένως χορηγηθεί VMA σε δοσολογία 10 mg/kg ΣΒ ενδοπεριτοναϊκά και σε πλάσμα αίματος επίμυος που δεν είχε λάβει VMA (ομάδα ελέγχου).

Στα δείγματα όπου ο διαλύτης ήταν ddH₂O, ελέγχθηκαν τρεις διαφορετικές συγκεντρώσεις της ουσίας: 0.1 mM, 1mM και 10mM. Η TAC του VMA και στις τρεις διαφορετικές συγκεντρώσεις κυμάνθηκε στα 16±3 mM α-τοκοφερόλης.

Στα δείγματα πλάσματος η συνολική TAC του πλάσματος μετρήθηκε και στις δύο ομάδες. Στην ομάδα ελέγχου, το ποσοστό της αντιοξειδωτικής ικανότητας ανήλθε στο 52.5 ± 9% στην αρχή του πειράματος και 54±13.5 στο τέλος αυτού. Αντίστοιχα για την πειραματική ομάδα, η TAC του πλάσματος ήταν 54±3.2 mM α-τοκοφερόλης στην αρχή της πειραματικής διαδικασίας και 54±5 mM α-τοκοφερόλης στο τέλος της. Τα αποτελέσματα στις δύο ομάδες δεν παρουσίασαν κάποια στατιστικά σημαντική διαφοροποίηση ($p \gg 0.05$).

4.3.2 Αποτελέσματα μέτρησης ηπατικών ενζύμων και κρεατινίνης

Η στάθμη των ηπατικών ενζύμων που ελήφθησαν 180 λεπτά μετά την έναρξη των μετρήσεων κυμάνθηκε στα ίδια επίπεδα, χωρίς καμία στατιστικά σημαντική μεταβολή και τις δύο ομάδες που ελέγχθηκαν ($p \gg 0.005$). Συγκεκριμένα, τα επίπεδα της ALT ήταν 69±2.3 iu/lit για την ομάδα ελέγχου και 75±2.6 iu/lit για την πειραματική ομάδα. Αντίστοιχα, τα επίπεδα της AST μετρήθηκαν στις 175±7.8 iu/lit για την ομάδα ελέγχου και στις 183±11.5 iu/lit για την πειραματική ομάδα.

Οι ίδιες παρατηρήσεις σημειώθηκαν και στις μετρήσεις της κρεατινίνης, χωρίς στατιστικά σημαντικές μεταβολές στις ομάδες ($p \gg 0.005$). Τα επίπεδα κρεατινίνης

καθορίστηκαν στα 0.78 ± 0.01 mg/lt στην ομάδα ελέγχου και 0.79 ± 0.02 mg/lt στην πειραματική ομάδα. Τα αποτελέσματα συνοψίζονται στον Πίνακα 8.

Πίνακας 8. Επίπεδα της κρεατινίνης, της ασπαρτικής και της αλανινικής τρανσαμινάσης στο αίμα των επίμυων 10 και 180 λεπτά μετά τη χορήγηση VMA.

| Χρόνος | Βιολογικός δείκτης | Ομάδα ελέγχου | Πειραματική ομάδα |
|---------------|---------------------------|----------------------|--------------------------|
| 10 λεπτά | Κρεατινίνη (mg/L) | 0.63 ± 0.01 | 0.66 ± 0.01 |
| | ALT (IU/L) | 64 ± 2.0 | 62 ± 1.6 |
| | AST (IU/L) | 162 ± 7.9 | 175 ± 7.8 |
| 180 λεπτά | Κρεατινίνη (mg/L) | 0.78 ± 0.01 | 0.79 ± 0.02 |
| | ALT (IU/L) | 69 ± 2.3 | 75 ± 2.6 |
| | AST (IU/L) | 175 ± 7.8 | 183 ± 11.5 |

5. Συζήτηση

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της παρούσης έρευνας, το VMA προκαλεί στατιστικά σημαντική βραδυκαρδία στα πειραματόζωα. Η πτώση της καρδιακής συχνότητας ανέρχεται στο 18% σε αντιδιαστολή με 7% πτώση της ομάδας ελέγχου. Η συγκεκριμένη βιολογική απάντηση παρατηρείται σε χορήγηση VMA σε ποσότητα 1mg/kg ΣΒ ή και περισσότερη, ενώ η μεταβολή δε φαίνεται να είναι δοσοεξαρτώμενη. Αν και η ποσότητα ουσίας που απαιτείται για την πρόκληση της βραδυκαρδίας είναι πολύ μεγάλη, αναλογιζόμενοι τη φυσιολογική τιμή του VMA στον οργανισμό (έχει τουλάχιστον 10000 φορές μεγαλύτερη συγκέντρωση στο πλάσμα των πειραματοζώων), δεν πρέπει να αποτελεί έκπληξη. Το VMA είναι ένα απολύτως ανενεργό μόριο στις συνήθεις συγκεντρώσεις που ανευρίσκεται στον οργανισμό. Δεν αποτελεί τίποτα περισσότερο από ένα ανενεργό κατάλοιπο του μεταβολισμού των κατεχολαμινών. Παράλληλα, παρατηρήθηκε αισθητή μείωση της μέσης αρτηριακής πίεσης από το πρώτο 10λεπτο μετά την έναρξη των μετρήσεων γεγονός που υποδηλώνει σαφή συσχέτιση της ουσίας με μηχανισμούς που επηρεάζουν ταυτόχρονα τον αγγειακό τόνο και την καρδιακή συχνότητα. Είναι, επίσης, ενδιαφέρον ότι η αρτηριακή πίεση επηρεάστηκε άμεσα, σε αντίθεση με την καρδιακή συχνότητα.

Η ήπια βραδυκαρδία που παρατηρήθηκε στην ομάδα ελέγχου σχετίζεται, πιθανώς, με το αναισθητικό που χρησιμοποιήθηκε, το ισοφλουράνιο. Διάφορες μελέτες έχουν καταδείξει την αρνητική χρονότροπη και υποτασική του δράση (Hayes et al., 1996; Hikasa et al., 1996) σε διάφορα *in vivo* πειραματικά μοντέλα, παρατήρηση που επιβεβαιώθηκε και στα πειράματα της παρούσης διατριβής. Εξάλλου, το stress του καρωτιδικού καθετηριασμού και της όποιας απώλειας αίματος κατά τους χειρισμούς που διεξήχθησαν όφειλε να επιφέρει αντίθετα αποτελέσματα, μέσω συμπαθητικής διέγερσης, και κάθε άλλο παρά ερμηνεύει αυτή την παρατήρηση υποδηλώνοντας ότι η απάντηση αυτή είναι φαρμακευτικής αιτιολογίας.

Το HVA προκάλεσε μεταβολή στην καρδιακή συχνότητα και στην αρτηριακή πίεση παρόμοια με αυτή του VMA. Η παρατήρηση αυτή είναι, ίσως, αναμενόμενη αναλογιζόμενοι ότι τα μόρια τους είναι σχεδόν πανομοιότυπα, διαφέροντας μόνο κατά μία υδροξυλική ομάδα, ενώ φέρουν και τα δύο τον ίδιο βανιλικό δακτύλιο. Πειράματα των

Evangelou et al. (1998) πάνω σε ουσίες που φέρουν έναν 3-μεθόξυ-φαινολικό δακτύλιο έδειξαν ότι τέτοιες ουσίες αναστέλλουν την αιμοπεταλιακή συσσώρευση σε παρόμοιες συγκεντρώσεις, κάτι που δεν κατάφεραν να προκαλέσουν ουσίες που, ενώ έφεραν φαινολικό δακτύλιο, αυτός δεν είχε μεθόξυ ομάδα στην θέση 3 του δακτυλίου. Υπήρξε, εύλογα, η υπόθεση ότι η μεθόξυ ομάδα στη θέση 3 είναι αυτή που καθορίζει, σε μεγάλο τουλάχιστον βαθμό, τη βιολογική δράση των ουσιών αυτών. Η TMZ η οποία περιέχει στο μόριό τις έναν φαινολικό δακτύλιο με 3 μεθόξυ ομάδες παρουσίασε ανάλογη βραδυκαρδική δράση με το VMA και το HVA χωρίς, ωστόσο, να παρατηρηθούν αγγειοκινητικές ιδιότητες. Η έλλειψη δίδυμης δράσης της με τις προηγούμενες δύο ουσίες υπονοεί διαφορετικό μηχανισμό δράσης που δεν εξαρτάται μόνο από το φαινολικό δακτύλιό της. Περαιτέρω έρευνα απαιτείται για την αποσαφήνιση του ρόλου του 3 μεθόξυ φαινολικού δακτυλίου στα διάφορα βιολογικά συστήματα.

Το VMA δεν μετέβαλλε την απάντηση του καρδιαγγειακού συστήματος των πειραματοζώων στη χορήγηση α κ β αγωνιστών. Το γεγονός αυτό υποδηλώνει ότι όχι μόνο δεν συνδέεται με τους αδρενεργικούς υποδοχείς, αλλά δεν παρεμβάλλεται σε κανένα βήμα της ενδοκυττάριας σειράς γεγονότων που ακολουθεί την ενεργοποίηση ενός αδρενεργικού υποδοχέα (Graham et al., 1996; Kobilka, 1992). Την άποψη αυτή στηρίζει και η έρευνα των Gerd et al. (1987) οι οποίοι μελέτησαν την ικανότητα σύζευξης διαφόρων κατεχολαμινικών παραγώγων με τους αδρενεργικούς υποδοχείς στα μονοκύτταρα λευκοκύτταρα. Το VMA, όπως και το HVA, επέδειξαν πολύ χαμηλή ικανότητα πρόσδεσης με τους υποδοχείς αυτούς και δεν μετέβαλλαν την παραγωγή ουσιών που συνδέονται με την ενεργοποίηση των β υποδοχέων, όπως το κυκλικό AMP. Οι Lefkowitz και Haber (1971) κατέληξαν στο ίδιο συμπέρασμα όσον αφορά τα μυοκαρδιακά κύτταρα των κοιλιών. Πιθανώς να συμβαίνει το ίδιο και στα κύτταρα του φλεβοκόμβου και του ενδοθηλίου, εφόσον η καρδιακή συχνότητα που καθορίζεται από τη βηματοδότηση του φλεβοκόμβου καθώς και η αρτηριακή πίεση δεν μεταβλήθηκε στην έγχυση των α κ β αγωνιστών.

Τα αποτελέσματα των πειραμάτων με τα πειραματόζωα που είχαν υποστεί αμφοτερόπλευρη βαγοτομή διευκρινίζουν περισσότερο τον πιθανό μηχανισμό δράσης του VMA. Τα ζώα της ομάδας ελέγχου των πειραμάτων αυτών (BOE) έδειξαν διαφορετική συμπεριφορά συγκριτικά με την ομάδα ελέγχου (OE), όπως έχει καταγραφεί και σε παλαιότερες μελέτες (Zefirov and Svyatova, 1997; Sitdikov et al., 2000). Ωστόσο, οι δύο ομάδες των βαγοτομημένων ζώων δεν παρουσίασαν καμία στατιστικά σημαντική διαφορά

μεταξύ τους όσον αφορά την καρδιακή συχνότητα και την αρτηριακή πίεση. Το VMA δεν προκάλεσε καμία καρδιαγγειακή απόκριση στην πειραματική ομάδα βαγοτομημένων ζώων (BOB) και οι μεταβολές στις παραμέτρους που μελετήθηκαν ήταν σχεδόν πανομοιότυπες στις ομάδες BOE και BOB. Τα δεδομένα αυτά οδηγούν στην εύλογη υπόθεση ότι το VMA εκφράζει τη δράση του μέσω του παρασυμπαθητικού νευρικού συστήματος, δηλαδή του πνευμονογαστρικού νεύρου, αν και ο ακριβής μηχανισμός δράσης δεν είναι εντελώς ξεκάθαρος και μόνο υποθέσεις μπορούν να γίνουν προς αυτή την κατεύθυνση.

Το VMA ανήκει χημικά σε μία ευρύτερη ομάδα ενώσεων, τα βανιλοειδή. Κοινό τους γνώρισμα είναι η ύπαρξη ενός ή περισσότερων βανιλικών δακτυλίων (3 μεθόξυ φαινολικός δακτύλιος) στο μόριό τους. Στην ομάδα αυτή ανήκουν μόρια, όπως η καψαϊκίνη και η ρεσινιφερατοξίνη, οι οποίες είναι γνωστό ότι επιδρούν πάνω στο μυοκάρδιο μέσω συγκεκριμένου υποδοχέα, του TRPV1 (Vennekens et al., 2008). Ο υποδοχέας αυτός εμπλέκεται στην έκλυση διαφόρων αυτόνομων αντανακλαστικών, όπως το αντανακλαστικό των τασεοϋποδοχέων και το αντανακλαστικό Bezold-Jarisch, των οποίων φορέας έκφρασης αποτελεί το πνευμονογαστρικό νεύρο. Είναι πιθανό ότι το VMA προκαλεί μια ήπια αντίδραση τύπου Bezold-Jarisch μέσω της πρόσδεσής του στους TRPV1 υποδοχείς. Ο βανιλικός δακτύλιος του μορίου του πιθανώς προσδένεται στον TRPV1 κατ' ανάλογο τρόπο με άλλα βανιλοειδή, αναπαράγοντας κάποιο αγγειοκινητικό αντανακλαστικό τύπου Bezold-Jarisch. Αν και δεν παρατηρήθηκε υπόπνοια στα πειράματα, λόγω της τεχνικής αναισθησίας που εφαρμόστηκε, η γρήγορη έναρξη δράσης της ουσίας, η παρουσία παρασυμπαθητικομιμητικής δράσης και η συγγενεία της με άλλα βανιλοειδή-αγωνιστές του TRPV1 αποτελούν ισχυρές ενδείξεις που υποστηρίζουν αυτή την άποψη. Αυτή η υπόθεση είναι πιθανό να ισχύει και για το HVA λόγω παρόμοιων χημικών, *in vivo* και *ex vivo* ιδιοτήτων. Δεν έχουν ακόμη εκπονηθεί έρευνες ώστε να μελετηθούν αυτές τις ουσίες σε μοριακό και κυτταρικό επίπεδο, ένα ελκυστικό θέμα για μελλοντικά ερευνητικά πρωτόκολλα.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, το VMA επιδεικνύει ισχυρή αντιαρρυθμική δράση στις ταχυαρρυθμίες επαναιμάτωσης, δηλαδή κοιλιακή ταχυκαρδία και κοιλιακή μαρμαρυγή, μειώνοντας τη συχνότητα και τη διάρκειά τους. Ο αριθμός των πρώιμων κοιλιακών συστολών και η μέση διάρκεια επιβίωσης δεν είχαν κάποια στατιστικά σημαντική διαφοροποίηση ανάμεσα στις ομάδες. Σημαντική παρατήρηση αποτελεί η μείωση της θνησιμότητας κατά τη φάση της επαναιμάτωσης που φαίνεται να σχετίζεται με την αντιαρρυθμική του ιδιότητα.

Κεντρικό ρόλο στις δράσεις αυτές φαίνεται να παίζουν οι ιδιότητες του VMA. Οι Evangelou et al. (1998) έδειξαν ότι το VMA αναστέλλει τη δραστικότητα της λιποξυγενάσης στα αιμοπετάλια. Η λιποξυγονάση είναι ένα σημαντικός παράγοντας ο οποίος διαμεσολαβεί στην φλεγμονή των μυοκαρδιακών κυττάρων που ακολουθεί μετά από ισχαιμία (Haworth et al., 2010; Toki et al., 1988). Το ένζυμο αυτό είναι απαραίτητο για τη σύνθεση αραχιδονικού οξέος, το οποίο συμμετέχει στην οξείδωση των λιπαρών οξέων της κυτταροπλασματικής μεμβράνης των καρδιακών κυττάρων που επισυμβαίνει κυρίως κατά τη φάση της επαναιμάτωσης (Haworth et al., 2010). Πρόσφατες μελέτες επισημαίνουν ότι αναστολείς της λιποξυγονάσης και των λευκοτριενίων, τα οποία είναι επίσης φλεγμονώδεις διαμεσολαβητές, ασκούν προστατευτική δράση στο μυοκάρδιο από τραύμα επαναιμάτωσης μέσω του ίδιου μηχανισμού (Parkhomenko et al., 2005). Πιθανότατα το VMA αναστέλλει τη λιποξυγονάση και στα μυοκαρδιακά κύτταρα.

Η ενεργοποίηση του παρασυμπαθητικού συστήματος επίσης προστατεύει το μυοκάρδιο από βλάβη και αρρυθμίες ισχαιμίας και επαναιμάτωσης, υποβοηθώντας την ηλεκτρική σταθεροποίηση της κυτταροπλασματικής μεμβράνης. Οι Myers et al. (1974) έδειξαν ότι η βαγοτονία δεν ελαττώνει τις πρώιμες κοιλιακές συστολές και επηρεάζει μόνο τις κοιλιακές ταχυαρρυθμίες, παρατήρηση που επιβεβαιώθηκε από τα πειράματα της παρούσης έρευνας. Παράλληλα ελαττώνει την απόπτωση των μυοκαρδιακών κυττάρων μετά από ισχαιμία (Katare et al., 2009). Αν και δεν έγινε ποσοτικοποίηση βιοχημικών παραμέτρων που συσχετίζονται με την μυοκαρδιακή νέκρωση (τροπονίνη, CK-MB), τα πειραματικά δεδομένα υποστηρίζουν την υπόθεση ότι η παρασυμπαθητικομιμική ιδιότητα του VMA αποτελεί τον σημαντικότερο, ίσως, παράγοντα κατά της αρρυθμογένεσης.

Σημαντικός παράγοντας στον καταρράκτη της κυτταρικής απόπτωσης κατά τη φάση της επαναιμάτωσης είναι και η παραγωγή ελευθέρων ριζών οξυγόνου (ODFRs) που συσσωρεύονται κατά τη φάση της ισχαιμίας. Το VMA έδειξε περιορισμένη *in vitro* αντιοξειδωτική ιδιότητα ενώ στα *in vivo* πειράματα δεν αναφέρθηκαν ανάλογα αποτελέσματα. Επομένως η δράση του στο ισχαιμικό μυοκάρδιο δεν μπορεί να αποδοθεί στην παρεμπόδιση των ODFRs.

Η επινεφρίνη χρησιμοποιήθηκε για να προκαλέσει αρρυθμίες στο μυοκάρδιο των επίμυων. Η σύνδεση της στους β υποδοχείς αυξάνει τη διαπερατότητα της μεμβράνης σε ιόντα, κυρίως στο K^+ και στο Ca^{++} . Έτσι, τα μυοκαρδιακά κύτταρα, τα οποία έχουν την ικανότητα βηματοδότησης εκπολώνονται ευκολότερα δημιουργώντας νέες εστίες

βηματοδότησης και προκαλώντας έκτοπες συστολές, είτε στους κόλπους είτε στις κοιλίες. Το VMA δεν επέδρασε καθόλου σε αυτόν το μηχανισμό υποδηλώνοντας ότι όχι μόνο δε συνδέεται αγωνιστικά ή ανταγωνιστικά με τους β υποδοχείς του μυοκαρδίου, αλλά και ότι δεν εμποδίζει τη μετακίνηση αυτών των ιόντων μέσω της κυτταροπλασματικής μεμβράνης.

Σε ανάλογο συμπέρασμα μας οδηγούν και τα πειράματα της αιμοπεταλιακής συσσώρευσης. Το ιονοφόρο ασβέστιο ιονοφορεί τα ιόντα Ca^{++} διαμέσω ημιδιαπερατών μεμβρανών. Αυτό περιλαμβάνει τόσο την κυτταροπλασματική, όσο και τις μεμβράνες του κυτοσολίου, ιονοφορώντας το εξωκυττάριο αλλά και το ενδοκυττάριο Ca^{++} . Όταν τα αιμοπετάλια επώαστηκαν σε VMA και έπειτα προστέθηκε το ιονοφόρο ασβέστιο καμία μεταβολή στην αιμοπεταλιακή συσσώρευση δεν παρατηρήθηκε. Συνεπώς, το VMA δεν δεσμεύει με κάποιο τρόπο το ελεύθερο ιονισμένο Ca^{++} , που είναι και η δραστική μορφή του, είτε πρόκειται για εξωκυττάριο είτε για ενδοκυττάριο. Η προσθήκη του TMB-8 στη δοσολογία που χρησιμοποιήθηκε είχε ως στόχο τη δέσμευση του ενδοκυτταρίου ελεύθερου Ca^{++} . Πράγματι, ο TMB-8 ανέστειλε σε ποσοστό 60% περίπου τη συσσώρευση όπως αναμενόταν. Αυτό συνέβη διότι το ιονοφόρο ασβέστιο κινητοποίησε μόνο το εξωγενές Ca^{++} . Ωστόσο, όταν προστέθηκε VMA σε αιμοπετάλια που είχαν επωαστεί με ιονοφόρο ασβέστιο και με TMB-8, η αιμοπεταλιακή συσσώρευση αυξήθηκε συγκριτικά με την αναμενόμενη, αν και σαφώς υπολειπόταν τη συσσώρευση χωρίς TMB-8. Φαίνεται πως το VMA ανέστειλε τη σύνδεση του TMB-8 με το ενδοκυτταριο Ca^{++} με άγνωστο μηχανισμό. Παρόμοια παρατήρηση σημειώθηκε και για το HVA στις ίδιες συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκε το VMA, υποδεικνύοντας ότι η παρόμοια βιολογική τους συμπεριφορά *in vivo* και *ex vivo* συνδέεται άμεσα με τον κοινό βανιλικό δακτύλιο στο μόριό τους.

Η Ολική Αντιοξειδωτική Ικανότητα (TAC) του VMA μετρήθηκε τόσο *in vitro* όσο και *in vivo*. Στην *in vitro* μελέτη, η TAC 0.1 mM VMA ισούται με 0.02 mM α-τοκοφερόλης. Αυτό σημαίνει ότι στις ίδιες συγκεντρώσεις η TAC του VMA αντιστοιχεί στο 20% της TAC της α-τοκοφερόλης. Αντίθετα, στα *in vivo* πειράματα, το VMA δεν μετέβαλλε την TAC του αίματος όταν χορηγήθηκε σε δόσεις 10 mg/kg ΣΒ. Το αποτέλεσμα αυτό δηλώνει ότι οι συστηματικές δράσεις της ουσίας, κυρίως στο μεθισχαιμικό μυοκάρδιο, δεν οφείλονται στην ικανότητά του να δεσμεύει ODFRs αλλά ότι μάλλον εμπλέκονται άλλοι μηχανισμοί.

Τέλος, αν και η ουσία χορηγήθηκε σε υψηλές δόσεις δεν επηρέασε την ηπατική ή την νεφρική λειτουργία. Τα επίπεδα των ηπατικών ενζύμων και της κρεατινίνης ήταν αμετάβλητα στην πειραματική ομάδα συγκριτικά με την ομάδα ελέγχου, τουλάχιστον στα πρώτα 180 λεπτά για τα οποία έγιναν μετρήσεις. Η έλλειψη της οξείας τοξικότητας πιθανότατα συνδέεται με το γεγονός ότι το VMA δεν μεταβολίζεται περαιτέρω από κανένα ενζυμικό σύστημα, ώστε να παράγει τοξικά προϊόντα. Επίσης, απεκκρίνεται σχεδόν εξ' ολοκλήρου στον εγγύς εσπειραμένο σωληνάριο της σπειραματικής συσκευής, με αποτέλεσμα την ταχύτατη απομάκρυνσή του στα ούρα. Αξίζει να σημειωθεί ο χρόνος ημίσειας ζωής του *in vivo* είναι, στον άνθρωπο, μόλις 32 λεπτά. Επομένως, μετά τη χορήγηση της δόσης των 10 mg/kg ΣΒ απαιτούνται περίπου 8 ώρες για την αποκατάσταση των φυσιολογικών του επιπέδων στο πλάσμα του αίματος.

Εντούτοις θα πρέπει να αναφερθούν και κάποιοι περιορισμοί της παρούσης έρευνας. Καταρχάς, δεν υπάρχει σαφής απόδειξη παρά μόνο ενδείξεις σχετικά με τον μηχανισμό δράσης του VMA στο μυοκάρδιο και στα αγγεία. Το γεγονός ότι ενεργοποιεί το παρασυμπαθητικό νευρικό σύστημα εξηγεί σε μεγάλο βαθμό τις παρατηρήσεις των πειραμάτων, αλλά περαιτέρω μελέτη σε μοριακό επίπεδο είναι απαραίτητη για την αποσαφήνιση του ρόλου του. Επιπλέον, η έρευνα επικεντρώθηκε κυρίως στο VMA αφήνοντας στην άκρη άλλους σημαντικούς κατεχολαμινικούς μεταβολίτες, όπως η μετανεφρίνη και η νορμετανεφρίνη. Επίσης, οι συγκεντρώσεις της ουσίας που χρησιμοποιήθηκαν υπερβαίνουν κατά πολύ (τουλάχιστον κατά 10000 φορές) αυτές που φυσιολογικά ανευρίσκονται στο αίμα, ακόμη και σε παθολογικές καταστάσεις οι οποίες δεν ξεπερνούν τα 30 nM (Goldstein et al., 2003; Eisenhofer et al., 2002). Προκαταρκτικά πειράματα έδειξαν ότι σε ποσότητες μικρότερες από 1 mg/kg ΣΒ το VMA δεν μεταβάλλει, πρακτικά, την καρδιακή συχνότητα και την αρτηριακή πίεση. Τέλος, θα ήταν σκόπιμο να μελετηθούν περισσότεροι παράμετροι του καρδιαγγειακού συστήματος αλλά και άλλες συστηματικές δράσεις της ουσίας.

Συμπερασματικά, το VMA είναι ένα ενδογενές προϊόν τελικού καταβολισμού βιολογικά πολύ δραστηκών μορίων. Αν και σε συγκεντρώσεις πλάσματος εντός φυσιολογικών ορίων είναι παντελώς ανενεργό, σε υψηλές δόσεις προκαλεί ήπια βραδυκαρδία και ελάττωση της μέσης αρτηριακής πίεσης. Ο μηχανισμός φαίνεται να είναι η παρασυμπαθητική διέγερση, πιθανότατα μέσω των TRPV1 υποδοχέων των βανιλοειδών που βρίσκονται σε απαγωγές νευρικές παρασυμπαθητικές ίνες. Επιπρόσθετα, προστατεύει το μυοκάρδιο από επικίνδυνες αρρυθμίες επαναιμάτωσης ενώ παράλληλα

ασκεί αντιαμοπεταλιακή δράση, αναστέλλοντας τη λιποξυγονάση στα ανθρώπινα αιμοπετάλια. Σημαντικό στοιχείο επίσης είναι η μείωση της θνησιμότητας κατά την επαναιμάτωση μετά από οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου. Πέραν του γεγονότος ότι τα αποτελέσματα της παρούσης έρευνας διευκρινίζουν περαιτέρω τη βιολογική συμπεριφορά κάποιων τελικών καταβολικών προϊόντων, εγείρουν την πιθανότητα χρήσης του VMA ως πιθανή φαρμακευτική ουσία. Η τριπλή ιδιότητά του- παρασυμπαθητικομιμητικό, αντιαρρυθμικό, αντιαμοπεταλιακό- καθώς και ο μικρός χρόνος ημίσειας ζωής του και η έλλειψη τοξικότητας το καθιστούν υποψήφιο προς μελέτη για την αντιμετώπιση αρρυθμιών στην οξεία φάση του οξέος εμφράγματος του μυοκαρδίου μετά από την επαναιμάτωση. Περαιτέρω έρευνα είναι απαραίτητη για τη διευκρίνηση του ακριβούς μηχανισμού δράσης του σε κυτταρικό και μοριακό, πλέον, επίπεδο καθώς και για την εύρεση άλλων συστηματικών δράσεων.

6. Συμπεράσματα

Από την παρούσα διδακτορική διατριβή μπορούμε να εξάγουμε τα ακόλουθα συμπεράσματα:

1. Το VMA, χορηγούμενο ενδαρτηριακά σε επίμυες, προκαλεί ήπια βραδυκαρδία και ελαττώνει την μέση αρτηριακή πίεση σε δοσολογία μεγαλύτερη από 1mg/kg ΣΒ και με τρόπο μη δοσοεξαρτώμενο.
2. Παρόμοια δράση έχει το HVA και η TMZ, η οποία έχει, ωστόσο, μηδαμινή επίδραση στα αγγεία.
3. Η βραδυκαρδία που εκλύεται προκαλείται μέσω διέγερσης του πνευμονογαστρικού νεύρου.
4. Δεν προσδέεται στους α και β αδρενεργικούς υποδοχείς του μυοκαρδίου και του ενδοθηλίου.
5. Μειώνει τη διάρκεια και τη συχνότητα θανατηφόρων κοιλιακών ταχυαρρυθμιών σε επίμυες κατά τη φάση της επαναιμάτωσης μετά από ισχαιμία του μυοκαρδίου, ελαττώνοντας αντίστοιχα και τη θνησιμότητα.
6. Παρουσιάζει ήπια αντιοξειδωτική ικανότητα *in vitro* αλλά όχι *in vivo*.
7. Δεν αναστέλλει τη μετακίνηση ιόντων Ca^{++} διαμέσω κυτταρικών μεμβρανών στα αιμοπετάλια.
8. Δεν εμφανίζει οξεία τοξικότητα στο ήπαρ και στους νεφρούς έως και 180 λεπτά μετά την ενδοφλέβια χορήγησή του.

7. Περίληψεις

Περίληψη στην Ελληνική

«Μελέτη των καρδιαγγειακών και αιμοπεταλιακών επιδράσεων τελικών καταβολικών προϊόντων των κατεχολαμινών με έμφαση στο βανιλοαμυγδαλικό οξύ (VMA), *in vivo*.»

Το βανιλοαμυγδαλικό οξύ (VMA) είναι το κυριότερο τελικό καταβολικό προϊόν της αποδόμησης της επινεφρίνης και της νορεπινεφρίνης. Πρόσφατες μελέτες του εργαστηρίου μας κατέδειξαν τη δυνατότητα του να αναστέλλει την αιμοπεταλιακή συσσώρευση σε διεγερμένα ανθρώπινα αιμοπετάλια. Παράλληλα, πολλοί τελικοί καταβολίτες βιολογικά ενεργών μορίων ασκούν ποικίλες βιολογικές δράσεις.

Στην παρούσα διατριβή μελετήθηκε η επίδραση του VMA στο καρδιαγγειακό σύστημα πειραματοζώων καθώς και ο πιθανός μηχανισμός δράσης του. Παράλληλα μελετήθηκε, σε μικρότερο βαθμό, και το ομοβαλινικό οξύ (HVA), τελικός καταβολίτης της ντοπαμίνης.

Τα *in vivo* πειράματα έδειξαν ότι το VMA και το HVA ασκούν αρνητική χρονότροπο δράση στο μυοκάρδιο των επίμυων, ενώ ελάττωσαν και την μέση αρτηριακή πίεση. Η συγκέντρωση του VMA δεν φαίνεται να επηρεάζει ιδιαίτερα τη δραστηριότητά του. Επιπρόσθετα, παρατηρήθηκε ελάττωση της εμφάνισης επικίνδυνων κοιλιακών αρρυθμιών (κοιλιακή ταχυκαρδία-κοιλιακή μαρμαρυγή) καθώς και της θνησιμότητας κατά την περίοδο της επαναιμάτωσης σε επίμυες που είχαν υποστεί οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου.

Αναφορικά με τον μηχανισμό δράσης του, δεν παρατηρήθηκε καμία συσχέτισή του με τους α και β αδρενεργικούς υποδοχείς ενώ η δραστηριότητά του εξαφανίστηκε σε βαγοτομημένα ζώα. Επιπλέον, στα *ex vivo* και *in vitro* πειράματα που ακολούθησαν, το VMA δεν αλληλεπίδρασε με το εξω- και ενδοκυττάριο Ca^{++} στα ανθρώπινα αιμοπετάλια ενώ δεν παρουσίασε καμία ηπατοτοξική και νεφροτοξική δράση στα πρώτα 180 λεπτά της παρατήρησης.

Το VMA φαίνεται πως ασκεί μια παρασυμπαθητικομιμητική δράση στο μυοκάρδιο και στα αγγεία και το HVA πιθανώς να επιδρά μέσω του ίδιου μηχανισμού. Παράλληλα, η αντιαρρυθμογόνο ικανότητά του αύξησε την επιβίωση των πειραματοζώων μετά από οξύ στεφανιαίο σύνδρομο η οποία δεν συνδέεται με την ήπια αντιοξειδωτική του ιδιότητα.

Περίληψη στην αγγλική

«Study of the effects of catecholamine end metabolites on cardiovascular parameters and platelet function, emphasizing on vanillylmandelic acid, *in vivo*.»

Vanillylmandelic acid (VMA) is the main epinephrine and norepinephrine end metabolite. Recent studies in our laboratory have pointed out its ability to blunt and invert platelet aggregation in human platelets activated by several agonists. At the same time, many other end-metabolites of biologically active molecules are known to interact in various biological systems.

In this PhD thesis, the effects of VMA on several cardiovascular parameters in rat models and its possible mechanism of action were studied. Homovanillic acid (HVA), a dopamine end metabolite, was also studied to a lesser extent.

In vivo experiments showed that VMA and HVA reduce the heart rate and the mean arterial pressure in rats, an effect which was mildly dose-dependent. Further more, when VMA was injected in rats that were subjected to acute myocardial infarction, results indicated a reduced incidence and severity of fatal ventricular tachyarrhythmias (ventricular tachycardia-ventricular fibrillation) and mortality, during the reperfusion period.

With respect to its mechanism of action, no binding affinity of VMA to α or β adrenergic receptors was noted, while its bradycardic effect was blunted in vagotomized animals. *Ex vivo* and *in vivo* experiments suggested that VMA did not interact to extra- or intracellular Ca^{++} uptake in human platelets and showed no liver or renal toxicity during 180 minutes of observation.

In conclusion, VMA and possibly HVA seem to exert a parasympathomimetic action on rat myocardium and blood vessels. Its anti arrhythmogenic efficacy reduced fatal arrhythmias and mortality, a property not attributed to its faint antioxidant capacity.

8. Βιβλιογραφία

1. Andresen MC, Doyle MW, Bailey TW et al. TRPV1 in central cardiovascular control. Discerning the C-fiber afferent pathway. Molecular sensors for cardiovascular homeostasis 2007 ed.: Springer-Verlag New York Inc.
2. Atlee JL, Brownlee SW, Burstrom RE. Conscious –state comparisons of the effects of inhalation anesthetics on specialized atrioventricular conduction times in dogs. *Anesthesiology* 1986;64:703-10.
3. Aviado DM, Guevara Aviado D. The Bezold-Jarisch reflex. A historical perspective of cardiopulmonary reflexes. *Ann NY Acad Sci* 2001;940:48-58.
4. Béard T, Carrié D, Boyer MJ et al. Production of oxygen free radicals in myocardial infarction treated by thrombolysis. Analysis of glutathione peroxidase, superoxide dismutase and malondialdehyde *Arch Mal Coeur Vaiss.* 1994;87(10):1289-96.
5. Becker LC, Ambrosio G. Myocardial consequences of reperfusion. *Prog Cardiovasc Dis.* 1987;30(1):23-44.
6. Belcher PR, Drake-Holland AJ, Hynd JW et al. Effects of trimetazidine on *in vivo* coronary arterial platelet thrombosis. *Drugs Ther* 1993;7(1): 149-157.
7. Berlin I, Crespo-Laumonier B, Cournot A et al. The alpha 2-adrenergic receptor antagonist yohimbine inhibits epinephrine-induced platelet aggregation in healthy subjects. *Clin Pharmacol Ther* 1991;49(4):362-369.
8. Better M, Käser H. Diagnostic and prognostic value of the determination of urinary output of vanillyl-mandelic acid in tumours of the sympathetic nervous system. *Arch Dis Child* 1962;37:138-141.
9. Boehm S, Kubista H. Fine tuning of sympathetic transmitter release via ionotropic and metabotropic presynaptic receptors. *Pharmacol Review* 2002;54:43-99.
10. Brand MD, Felber SM. The intracellular calcium antagonist TMB-8 18-(NN-diethylamino)octyl-3,4,5-trimethoxybenzoate inhibits mitochondrial ATP production in rat thymocytes. *Biochem J* 1984;224:1027-1030.
11. Charalampidis PS, Veltsistas P, Karkabounas S et al. Blue CrO₅ assay: A novel spectrophotometric method for the evaluation of the antioxidant and oxidant

- capacity of various biological substances. *Eur J Medic Chem* 2009;44(10):4162-4168.
12. Coleridge HM, Coleridge JCG. Cardiovascular afferents involved in regulation of peripheral vessels. *Annu Rev Physiol* 1980;42:413–427.
 13. Corr PB, Yamada KA, Witkowski FX. Mechanisms controlling cardiac autonomic function and their relation to arrhythmogenesis. In: Fossard HA et al., editor, *The heart and cardiovascular system*, New York: Raven Press, 1986, pp. 1343-1374.
 14. Curtis MJ, Macleod BA, Walker MJ. Models for the study of arrhythmias in myocardial ischaemia and infarction: the use of the rat. *J Mol Cell Cardiol.* 1987;19(4):399-419.
 15. Dalla-Volta S, Maraglino P, Della-Valentina P et al. Comparison of trimetazidine with nifedipine in effort angina: a double-blind crossover study. *Cardiovasc Drugs Ther* 1990;4: 853-859.
 16. Davies MJ, Thomas AC, Knapman PA et al. Intramyocardial platelet aggregation in patients with unstable angina suffering sudden ischemic cardiac death. *Circulation.* 1986;73(3):418-27.
 17. De Zwaan C, Daemen MJAP, Hermens WTh. Mechanisms of cell death in acute myocardial infarction: pathophysiological implications for treatment. *Netherlands Heart J* 2001;9(1):30-44.
 18. Detry JM. Clinical features of an anti-anginal drug in angina pectoris. *Eur Heart J* 1993;14: 18–24.
 19. Di Napoli P. Anti-ischemic cardioprotection with trimetazidine. *Heart Metab* 2008;41:25-29.
 20. Dreyer WJ, Michael LH, West MS et al. Neutrophil accumulation in ischemic canine myocardium. Insights into time course, distribution, and mechanism of localization during early reperfusion. *Circulation.* 1991;84(1):400-11.
 21. Edwards WD. Pathology of myocardial infarction and reperfusion. In: Gersh BJ, Rahimtoola SH, eds. *Acute Myocardial Infarction*. New York, NY: Elsevier, 1991.
 22. Eisenhofer G, Kopin JK, Goldstein DS. Catecholamine Metabolism: A Contemporary View with Implications for Physiology and Medicine. *Pharmacol Rev.* 2004;56: 331-349.

23. El Banini H, Bernard M, Baetz D et al. Changes in intracellular sodium and pH during ischemia-reperfusion are attenuated by trimetazidine. Comparison between low- and zero-flow ischemia. *Cardiovasc Res* 2000;47: 688–696.
24. Esler M, Kaye D, Lambert G, Esler D et al. Adrenergic nervous system in heart failure. *Am J Cardiol* 1997;80(11A):7-14.
25. Evangelou AM, Malamas MP, Vezyraki P et al. Is epinephrine-induced platelet aggregation autoregulated by its metabolic degradation products in vivo? *In Vivo* 1998;12(3):321-325.
26. Fantini E, Athias P, Demaison L et al. Protective effects of trimetazidine on hypoxic cardiac myocytes from the rat. *Fundam Clin Pharmacol* 1997;11: 427–439.
27. Fantini E, Demaison L, Sentex E et al. Some biochemical aspects of the protective effect of Trimetazidine on rat cardiomyocytes during hypoxia and reoxygenation. *J Mol Cell Cardiol* 1994;26: 949–958.
28. Farrell TG, Paul V, Cripps TR et al. Baroreflex sensitivity and electrophysiological correlates in patients after acute myocardial infarction.
29. Feinstein MB, Frazer C. Human platelet secretion and aggregation induced by calcium ionophores. *J Gen Physiol* 1975;66:561-81.
30. Ferguson DW. Sympathetic mechanisms in heart failure. Pathophysiological and pharmacological implications. *Circulation* 1993;87(Suppl 7):68-75.
31. Fragasso G, Piatti PM, Monti L, et al. Short- and long-term beneficial effects of trimetazidine in patients with diabetes and ischemic cardiomyopathy. *Am Heart J* 2003;146: E18.
32. Fregly MJ, Threatte RM, Barney CC et al. Effect of acute administration of isoproterenol and angiotensin II, separately and in combination, on water intake and blood pressure of rats. *Brain Res Bull* 1983;10(3):327-332.
33. Fu LW, Longhurst JC. Regulation of cardiac afferent excitability during ischaemia. *Handb Exp Pharmacol* 2009;194:185-225.
34. Gerd LAM, Lenz T, Lernhardt U et al. Sulfoconjugated catecholamines: lack of b-adrenoreceptor binding and adenylate cyclase stimulation in human mononuclear leucocytes. *Eur J Pharmacol* 1987;143: 179-188.
35. Gerrard JM, White JG, Rao GH. Effects of the Ionophore A23187 on the blood platelets II. Influence on ultrastructure. *Am J Pathol.* 1974;77(2):151-66.

36. Goldstein DS, Eisenhofer G, Kopin IJ. Sources and significance of plasma levels of catechols and their metabolites in humans. *J Pharmacol Exp Ther* 2003;305: 800-811.
37. Graham LN, Smith PA, Stoker JB et al. Sympathetic neural hyperactivity and its normalization following unstable angina and acute myocardial infarction. *Clin Sci* 2004;106:605-11.
38. Graham LN, Smith PA, Stoker JB et al. Time course of sympathetic neural hyperactivity after uncomplicated acute myocardial infarction. *Circulation* 2002;106:793-7.
39. Graham RM, Perez DM, Hwa J, Piascik MT. Alpha 1-adrenergic receptor subtypes. Molecular structure, function, and signaling. *Circ Res.* 1996;78(5):737-49.
40. Guilbault GG, Brignac PJ, Zimmer M. Homovanillic acid as a fluorometric substrate for oxidative enzymes. Analytical applications of the peroxidase, glucose oxidase, and xanthine oxidase systems. *Anal Chem* 1968;40(1):190-196.
41. Guilbault GG, Kramer DN, Hackley EB. New substrate for fluorometric determination of oxidative enzymes. *Anal Chem* 1967;39(2):271-271.
42. Guyton AC, Hall JE. The autonomic nervous system and the adrenal medulla. In: Belfus Linda, editor. *Textbook of medical physiology*, 11th ed. Philadelphia, Pennsylvania. Elsevier, 2006. pp 748-759.
43. Guyton AC, Hall JE. The nervous system: C. motor and integrative neurophysiology. *Textbook of Medical Physiology* 11th ed, 2006: pg 752.
44. Haaland HD, Holmsen H. Potentiation by adrenaline of agonist-induced responses in normal human platelets in vitro. *Platelets* 2011;22(5): 328-337.
45. Haworth RA, Potter KT, Russel DC. Role of arachidonic acid, lipoxygenase and mitochondrial depolarization in reperfusion arrhythmias. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2010;299:165–174.
46. Hayes ES, Barrett TD, Burill DE et al. Effects of halothane and isoflurane on rat ventricular action potentials recorded *in situ*. *Life Sci* 1996;58(16):1375-85.
47. Hikasa Y, Okabe C, Takase K et al. Ventricular arrhythmogenic dose of adrenaline during sevoflurane, isoflurane and halothane anaesthesia either with or without ketamine or thiopentone in cats. *Res Veter Sci* 1996;60:134-7.

48. Hoffmeister HM, Jur M, Wendel HP et al. Alterations of coagulation and fibrinolytic and kallikrein-kin in systems in the acute and postacute phases in patients with unstable angina pectoris. *Circulation* 1995;91:2520-7.
49. Iversen LL, Fischer JE, Axelrod J. Enhancement of H³-Norepinephrine uptake in rat tissues by O-methylated metabolites of catecholamines. *J Pharmacol Exp Ther* 1966;154: 56-63.
50. Jardine DL, Charles CJ, Ashton RK et al. Increased cardiac sympathetic nerve activity following acute myocardial infarction in a sheep model. *The J Physiol* 2005;565:325-333.
51. Jardine DL, Charles CJ, Frampton CM et al. Cardiac sympathetic nerve activity and ventricular fibrillation in a conscious sheep model. *Am J Physiol- Heart Circ Physiol* 2007;293:433-9.
52. Jeroudi MO, Hartley CJ, Bolli R. reperfusion injury: Role of oxygen radicals and potential therapy with antioxidants. *Am J Cardiol* 1994;73:2B-7B.
53. Junstad M, Stjärne L, Wennmalm A. On the relative importance of extra-neuronal uptake of noradrenaline released by nerve stimulation in the rabbit heart. *Acta Physiol. Scand.* 1973;88: 67-70.
54. Kara AF, Demirürek S, Çelik A et al. Effect of trimetazidine on myocardial preconditioning in anesthetized rats. *Eur J Pharmacol* 2004;503:135-145.
55. Katare RG, Ando M, Kakinuma Y et al. Vagal nerve stimulation prevents reperfusion injury through inhibition of opening of mitochondrial permeability transition pore independent of the bradycardiac effect. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2009;137:223-231.
56. Kim KB, Chung HH, Kim MS et al. Changes in the antioxidative defensive system during open heart operations in humans. *Ann Thorac Surg.* 1994;58(1):170-5.
57. Kloner RA, Giacomelli F, Alker KJ et al. Influx of neutrophils into the walls of large epicardial coronary arteries in response to ischemia/reperfusion. *Circulation.* 1991;84(4):1758-72.
58. Known KA, Page MT, Nguyen C et al. Tumor necrosis factor alpha-induced apoptosis in cardiac myocytes. Involvement of the sphingolipid signalling cascade in cardiac cell death. *J Clin Invest* 1996;98:2854-65.
59. Kobilka B. Adrenergic receptors as models for G protein-coupled receptors. *Annu Rev Neurosci* 1992;15:87-114.

60. LagrandWK, Niessen HW, Wolbink GH et al. C-reactive protein colocalizes with complement in human hearts during acute myocardial infarction. *Circulation* 1997;95:97-103.
61. Lavanchy N, Martin J, Rossi A. Anti-ischemic effect of trimetazidine: ³¹P-NMR spectroscopy in the isolated rat heart. *Arch Int Pharmacodyn* 1987;286: 97–110.
62. Lee J, Park SU, Kim JY et al. 3-Acyloxy-2-phenalkylpropyl amides and esters of homovanillic acid as novel vanilloid receptor agonists. *Bioorg Medic Chem Lett* 1999;9:2909-2914.
63. Lefkowitz RJ, Haber E. A fraction of the ventricular myocardium that has the specificity of the cardiac beta-adrenergic receptor. *Proc Nat Acad Sci* 1971;68(8): 1773-1777.
64. Lefkowitz, RJ, Haber, E. A fraction of the ventricular myocardium that has the specificity of the cardiac beta-adrenergic receptor. *Proc Nat Acad Sci* 1971;68: 1773-1777
65. Malagodi MH, Chiou CY. Studies on the mechanism of action of a new Ca-2+ antagonist, 8-(N,N-diethylamino)octyl 3,4,5-trimethoxybenzoate hydrochloride in smooth and skeletal muscles. *Br J Pharmacol* 1975;53(2):279-285.
66. Martínez de Melián, E, Farías, RN. Inhibition of acetylcholinesterase by 3-methoxy catecholamine derivatives. *FEBS Lett* 1980;121: 37-40.
67. Masayoshi A, Sugiyama S, Ogawa K at al. Mechanism of cardiac arrhythmias induced by epinephrine in dogs with hypokalemia. *J Am Coll CardioI* 1986;8:1373-9.
68. McLaughlin S, Eisenberg M. Antibiotics and membrane biology. *Ann Rev Biophys Bioeng* 1975;4:335-366.
69. McNamara FN, Randall A, Gunthorpe MJ. Effects of piperine, the purgent component of black pepper, at the human vanilloid receptor (TRPV1). *Br J Pharmacol* 2005;144:781-790.
70. Miller RR, Olson HG, Vera Z et al. Clinical evaluation of the enhancement of vagal tone in acute myocardial infarction by edrophonium hydrochloride: Effects on ventricular arrhythmias, His bundle electrography and left ventricular function. *Am Heart J* 1977;93:222-8.

71. Misao J, Hayakawa Y, Ohno M et al. Expression of bcl-2 protein, an inhibitor of apoptosis, and Bax, an accelerator of apoptosis, in ventricular myocytes of human hearts with myocardial infarction. *Circulation* 1996;94:1506-12.
72. Moens AL, Claeys MJ, Timmermans JP et al. Myocardial ischaemia/reperfusion injury, a clinical view on a complex pathophysiological process. *Int J Cardiol* 2005;100:179-190.
73. Murakami Y, Hirata A, Ito S et al. Re-evaluation of Cyclooxygenase-2 inhibiting activity of vanillin and guaiacol in macrophages stimulated with lipopolysaccharide. *Anticancer research* 2007;27(2):801-807.
74. Murdock DK, Loeb JM, Euler DE et al. Electrophysiology of coronary reperfusion. A mechanism for reperfusion arrhythmias. *Circulation* 1980;61:175-182.
75. Myers RW, Pearlman AS, Hyman RM et al. Beneficial effects of vagal stimulation and bradycardia during experimental acute myocardial ischemia. *Circulation* 1974;49:943-9.
76. Nakmareong S, Kukongviriyapan U, Pakdeechote P, et al. Antioxidant and vascular protective effects of curcumin and tetrahydrocurcumin in rats with L-NAME-induced hypertension. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. of Pharmacol.* 2011;383(5): 519-29.
77. Narula J, Haider N, Virmani R et al. Apoptosis in myocytes in end-stage heart failure. *N Engl J Med* 1996;335:1182-9.
78. Oe H, Kuzuya T, Hoshida S, Nishida M, Hori M, Kamada T, et al. Calcium overload and cardiac myocyte cell damage induced by arachidonate lipoxygenation. *Am J Physiol* 1994;267:H1396-402.
79. Offermanns S. Activation of platelet function through G protein-coupled receptors. *Circ Res* 2006;99: 1293-1304.
80. Opie LH. Effects of regional ischemia on metabolism of glucose and fatty acids: relative rates of aerobic and anaerobic energy production during myocardial infarction and comparison with effect of anoxia. *Circ Res* 1976;38(Suppl 1):52-68.
81. Opie LH. Role of calcium and other ions in reperfusion injury. *Cardiovasc Drugs Ther.* 1991;5 (Suppl 2):237-47.
82. Park BS, Son DJ, Park YH et al. Antiplatelet effects of acidamides isolated from the fruits of *Piper longum* L. *Phytomedicine* 2007;14(12): 853-855.

83. Parkhomenko A, Kozhukhov S, Gurjeva O. Clinical efficacy of intravenous lipoxygenase inhibitor quercetin in patients with acute ST-segment elevation myocardial infarction: results of a prospective randomized open-label trial. *Semin Cardiol* 2005;11(4):154-158.
84. Pearce LV, Petukhov PA, Szabo T et al. Eviodiamine functions as an agonist for the TRPV1. *Org Biomol Chem* 2004;2(16): 2281-2286.
85. Pettifer G, Dyson D, McDonnell W. The Arrhythmogenic Dose of Epinephrine in Halothane and isoflurane anesthetized dogs: an assessment of repeatability. *Can J Vet Res* 1997; 61: 221-226.
86. Pfeffer MA, Pfeffer JM, Fishbein MC et al. Myocardial infarct size and ventricular function in rats. *Circ Res* 1979;44:503-512.
87. Pressman BC. Properties of ionophores with broad range cation selectivity. *Fed Proc* 1973;32(6):1698-703.
88. Reed PW, Lardy HA. A23187: a divalent cation ionophore. *J Biol Chem* 1972;247(21):6970-7.
89. Reilly CA, Yost GS. Metabolism of capsaicinoids by P450 enzymes: a review of recent findings on reaction mechanisms, bio-activation, and detoxification processes. *Drug Metab Rev* 2006;38(4): 685-706.
90. Renaud JF. Internal pH, Na⁺ and Ca⁺⁺ regulation by trimetazidine during cardiac cell acidosis. *Cardiovasc Drugs Ther* 1996;1: 677-686.
91. Robaye B, Mosselmans R, Fiers W et al. Tumor necrosis factor induces apoptosis (programmed cell death) in normal endothelial cells in vitro. *Am J Pathol* 1991;138:447-53.
92. Roberts MJ, Young IS, Trouton TG et al. Transient release of lipid peroxides after coronary artery balloon angioplasty. *Lancet* 1990;336(8708):143-5.
93. Rosano G, Vitale C, Sposato B, et al. Trimetazidine improves left ventricular function in diabetic patients with coronary artery disease: a double-blind placebo-controlled study. *Cardiovasc Diabetol* 2003;2: 16-24.
94. Saravanakumar M, Raja B. Veratric acid, a phenolic acid attenuates blood pressure and oxidative stress in I-NAME induces hypertensive rats. *Eur J Pharm* 2011; 671(1-3): 87-94.
95. Schömig A, Haass M, Richardt G. Catecholamine release and arrhythmias in acute myocardial ischaemia. *Eur Heart J*. 1991;12 Suppl F:38-47.

96. Schömig A, Richardt G, Kurz T. Sympatho-adrenergic activation of the ischemic myocardium and its arrhythmogenic impact. *Herz.* 1995;20(3):169-86.
97. Schwartz PJ, La Rovere MT, Vanoli E. Autonomic nervous system and sudden cardiac death. Experimental basis and clinical observations for post-myocardial infarction risk stratification. *Circulation* 1992;85:177-191.
98. Shaw JO, Lyons RM. Requirements for different Ca²⁺ pools in the activation of rabbit platelets: I. Release reaction and protein phosphorylation. *BBA* 1982;714:492-9.
99. Shell WE, Sobel BE. Deleterious effects of increased heart rate on infarct size in the conscious dog. *Am j Cardiol* 1973;31:474-9.
100. Sheridan DJ, Penkoske PA, Sobel BE et al. Alpha Adrenergic Contributions to Dysrhythmia during Myocardial Ischemia and Reperfusion in Cats. *J Clin Invest* 1980;65:161-171.
101. Shimizu S, Eguchi Y, Kamiike W et al. Bcl-2 expression prevents activation of the ICE protease cascade. *Oncogene* 1996;12:2251-7.
102. Shirahase H, Suzuki Y, Osumi S et al. Inhibitory effects of trimetazidine dihydrochloride on aggregation, serotonin release and malondialdehyde production in rabbit platelet. *Jpn J Pharmacol* 1988;47(1): 29-34.
103. Sitdikov FG, Gil'mutdinova RI, Minnakhmetov RR et al. Assymetrical effects of vagus nerves on functional parameters of rat heart in postnatal ontogeny. *Bull Exp Biol Med* 2000;130(7): 10-13.
104. Smith ER, Redwood DR, McCarron WE et al. Coronary Artery Occlusion in the Conscious Dog : Effects of Alterations in Arterial Pressure Produced by Nitroglycerin, Hemorrhage, and Alpha-Adrenergic Agonists on the Degree of Myocardial Ischemia. *Circulation* 1973;47:51-57.
105. Spalding A, Vaitkevicius H, Dill S. Mechanism of Epinephrine-Induced Platelet Aggregation. *Hypertension* 1998;31:603-607.
106. Srivastava KC, Bordia A, Verma SK. Curcumin, a major component of food spice Turmeric (*Curcuma longa*) inhibits aggregation and alters eicosanoid metabolism in human blood platelets. *Prostaglandins, Leukot. and Essent. Fat. Acids* 1995;52(4): 223-7.
107. Steen VM, Holmsen H, Aarbakke G. The platelet-stimulating effect of adrenaline through α_2 -adrenergic receptors requires simultaneous activation by a true

- stimulatory platelet agonist. Evidence that adrenaline per se does not induce human platelet activation in vitro. *Thromb Haemost* 1993;70(3): 506-513.
108. Stenström G, Waldenström J. Positive correlation between urinary excretion of catecholamine metabolites and tumour mass in pheochromocytoma. *Acta Med Scand* 1985;217:73-77.
 109. Sumiyoshi T, Yotsutsuji T, Kurachi M et al. Effect of Mental Stress on Plasma Homovanillic Acid in Healthy Human Subjects. *Neuropharmacology* 1998;19:70-73.
 110. Sun H, Li DP, Chen SR et al. Sensing of blood pressure increase by transient potential vanilloid 1 receptors on baroreceptors. *J Pharmacol Exp Therap* 2009;331:851-859.
 111. Szwed H, Sadowski Z, Elikowski W et al. Combination treatment of stable angina effort using trimetazidine and metoprolol: results of a randomised, double-blind, multicentre study (TRIMPOL II). *Eur Heart J* 2001;22: 2267–2274.
 112. Toki Y, Hieda N, Torii T et al. The effects of lipoxigenase inhibitor and peptidoleukotriene antagonist on myocardial injury in a canine coronary occlusion-reperfusion model. *Prostaglandins*. 1988;35(4):555-71.
 113. Ulgen MS, Akdemir O, Toprak N. The effects of trimetazidine on heart rate variability and signal-averaged electrocardiography in early period of acute myocardial infarction. *Inter J Cardiol* 2001;77:255-262.
 114. Vakeva A, Morgan BP, Tikkanen I et al. Time course of complement activation and inhibitor expression after ischemic injury of rat myocardium. *Am J Pathol* 1994;144:1357-68.
 115. Van Der Stelt M, Di Marzo V. Endovanilloids. Putative endogenous ligands of transient receptor potential vanilloid 1 channels. *Eur J Biochem* 2004;271:1827-1834.
 116. Vennekens R, Owsianik G, Nilius B. Vanilloid Transient Receptor Potential Cation Channel: An Overview. *Current Pharm. Design* 2008;14:18-31.
 117. Verberne AJM, Saita M, Sartor DM. Chemical stimulation of vagal afferent neurons and sympathetic vasomotor tone. *Brain Res Rev* 2003;41:288-305.
 118. Vetter I and Lewis RJ. Natural product ligands or TRP channels. From: *Transient Receptor Potential Channels*. Ed. Shahidul Islam, 2011. Springer, London.

119. Vigna SR, Shahid RA, Nathan JD et al. Leukotriene B4 Mediates Inflammation via TRPV1 in Duct Obstruction-Induced Pancreatitis in Rats. *Pancreas* 2011;40(5):708-714.
120. Walker MJA, Curtis MJ, Hearse DJ et al. The Lamberth Conventions: guidelines for the study of arrhythmias in ischaemia, infarction and reperfusion. *Cardiov Res* 1988;22:447-455.
121. Wang JP, Hsu MF, Teng CM. Antiplatelet effect of capsaicin. *Thromb Res* 1984;36(6): 497-507.
122. Willich SN, Maclure M, Mittleman M et al. Sudden cardiac death. Support for a role of triggering in causation. *Circulation* 1993;87:1442–1450.
123. Wrigglesworth R, Walpole CS, Bevan S et al. Analogues of capsaicin with agonist activity as novel analgesic novels: structure-activity studies. 4. Potent, orally activated analgesics. *J Med Chem* 1996;39(25): 4942-4951.
124. Xiao CY, Hara A, Yuhki K et al. Roles of prostaglandin I(2) and thromboxane A(2) in cardiac ischemia/reperfusion injury: a study using mice lacking these receptors. *Circulation*. 2001;104(18):2210-5.
125. Yang BH, Piao ZG, Kim YB et al. Activation of vanilloid receptor 1 (VR1) by eugenol. *J Dent Res* 2003;82: 781-785.
126. Yasuda M, Takeuchi K, Hiruma M et al. The complement system in ischemic heart disease. *Circulation* 1990;81:156-63.
127. Yeh ETH. Life and death in the cardiovascular system. *Circulation* 1997;95:782-6.
128. Yeh JL, Chen IJ. Cardiovascular effects of nonivamide succinate. *Kaohsiung J. Med. Sci.* 1991;7(4):173-182.
129. Zefirov TL, Svyatova NV. Effect of vagotomy on heart rate in intact and sympathectomized rats of different age. *Bull Exp Biol Med* 1997;124(7): 21-24.
130. Zuanetti G, De Ferrari GM, Priori SG et al. Protective effect of vagal stimulation on reperfusion arrhythmias in cats. *Circulation Res* 1987;61: 429-5.

9. Δημοσιεύσεις – Ανακοινώσεις

Δημοσιεύσεις (1):

Michalis K. Kolentinis, Ioannis I. Verginadis, Yannis V. Simos, Natalia Tsitou, Spyridon C. Karkabounas, Theofilos M. Kolettis, Angelos M. Evangelou. Cardiovascular effects of vanillylmandelic acid in rats. *European Journal of Pharmacology*. Accepted January 2013.