



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ
ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΟΣ ΤΟΜΕΑΣ
ΚΑΡΔΙΟΛΟΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ

**ΕΝΔΟΘΗΛΙΝΗ ΚΑΙ
ΚΟΙΛΙΑΚΕΣ ΑΡΡΥΘΜΙΕΣ ΜΕΤΑ ΑΠΟ
ΟΞΥ ΕΜΦΡΑΓΜΑ ΤΟΥ ΜΥΟΚΑΡΔΙΟΥ**

Ο ΡΟΛΟΣ ΤΩΝ ΕΤΒ ΥΠΟΔΟΧΕΩΝ

ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ ΟΙΚΟΝΟΜΙΔΗΣ

Ιατρός

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2015

«Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από το τμήμα Ιατρικής 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. Οικονομίδη Δημητρίου: 8-11-2007

Ημερομηνία ορισμού Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής: 623^α/18-12-2007

Μέλη Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής:

Επιβλέπων

Κωλέττης Θεόφιλος, Επίκουρος Καθηγητής Καρδιολογίας

Μέλη

Μιχάλης Λάμπρος, Καθηγητής Καρδιολογίας

Κατσούρας Χρήστος, Επίκουρος Καθηγητής Καρδιολογίας

Ανασύσταση Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής: Αριθμ. Συνεδρ. 677^α/9-2-2010

Επιβλέπων

Κωλέττης Θεόφιλος, Αναπληρωτής Καθηγητής Καρδιολογίας

Μέλη

Μιχάλης Λάμπρος, Καθηγητής Καρδιολογίας

Γουδέβενος Ιωάννης Καθηγητής Παθολογίας-Καρδιολογίας

Ημερομηνία ορισμού θέματος: 15-1-2008

«Ενδοθελίνη και κοιλιακές αρρυθμίες στο έμφραγμα του μυοκαρδίου».

ΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΕΠΤΑΜΕΛΟΥΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ : 775^α/17-3-2015

1. Γουδέβενος Ιωάννης Καθηγητής Παθολογίας-Καρδιολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Παν/μίου Ιωαννίνων
2. Κιόρτσος Δημήτριος-Νικηφόρος Καθηγητής Φυσιολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Παν/μίου Ιωαννίνων
3. Κωλέττης Θεόφιλος Καθηγητής Καρδιολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Παν/μίου Ιωαννίνων
4. Μιχάλης Λάμπρος Καθηγητής Καρδιολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Παν/μίου Ιωαννίνων
5. Ψαρροπούλου Αικατερίνη Καθηγήτρια Φυσιολογία Ζώων του Τμήματος ΒΕΤ του Παν/μίου Ιωαννίνων
6. Αντωνίου Αικατερίνη Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Φαρμακολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Παν/μίου Ιωαννίνων
7. Χριστοφορίδης Σάββας Αναπληρωτής Καθηγητής Βιολογικής Χημείας του Τμήματος Ιατρικής του Παν/μίου Ιωαννίνων

Έγκριση Διδακτορικής Διατριβής με βαθμό «ΑΡΙΣΤΑ» στις 20-3-2015

ΠΡΟΕΔΡΟΣ ΤΟΥ ΤΜΗΜΑΤΟΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ
Πασχόπουλος Μηνάς
Καθηγητής Μαιευτικής-Γυναικολογίας



Αισθάνομαι την ανάγκη από τα βάθη της καρδιάς μου να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα Καθηγητή, κ. Κωλέττη Θεόφιλο για την καθημερινή του υποστήριξη και καθοδήγηση. Θέλω κυρίως να τον ευχαριστήσω για τα εφόδια που μου προσέφερε απλόχερα και για την ευκαιρία που μου έδωσε από τα φοιτητικά μου χρόνια να γνωρίσω την πειραματική καρδιολογία

Θα ήθελα να ευχαριστήσω επίσης τα μέλη της τριμελούς επιτροπής και συγκεκριμένα τον Καθηγητή, κ. Μιχάλη Λάμπρο και τον Καθηγητή, κ. Γουδέβενο Ιωάννη για τις πολύτιμες συμβουλές που μου έδωσαν καθόλη τη διάρκεια της ερευνητικής δραστηριότητας.

Τον διευθυντή μου, κ. Κυριακίδη Ζήωνα, διευθυντή της Καρδιολογικής Κλινικής του ΝΕΕΣ, για τις χρήσιμες γνώσεις και τις συμβουλές που μου προσέφερε.

Τους συναδέλφους μου, κ. Μπαλτογιάννη Ιωάννη και κ. Αγγελάκη Μαρία, για τις ώρες που πέρασαν εκπαιδεύοντάς με στα πρώτα βήματα της τεχνικής του πειράματος.

Τους κ Τσαλικάκη Δημήτριο και Τζάλλα Αλέξανδρο για τη συμμετοχή τους στη μελέτη και την ανάλυση των πειραματικών μετρήσεων.

Τις συναδέλφους μου, κ. Μεγάλου Αικατερίνη και κ. Βιλαέτη Αγάπη για την πολύτιμη βοήθεια και τις ευχάριστες ώρες που περάσαμε στο εργαστήριο.

Τον κ. Παπαλόη Απόστολο, Διευθυντή του πειραματικού ερευνητικού κέντρου της ELPEN AE, στο οποίο έλαβαν χώρα τα πειράματα για την πολύτιμη βοήθεια του, τις γνώσεις του στη τεχνογνωσία του πειράματος και την προσφορά υλικοτεχνικής υποδομής. Επίσης θερμές ευχαριστίες προς όλο το προσωπικό του πειραματικού κέντρου για τη βοήθεια του κατά τη διάρκεια των πειραμάτων.

Την υπεύθυνη συντονισμού της ερευνητικής ομάδα κ Γκόγκα Ελένη για την αμέριστη βοήθεια και την πολύτιμη συνεισφορά της στην ολοκλήρωση του έργου μου.

Τους καθηγητές μου και όλους όσους συνεισέφεραν στη μόρφωση και την εκπαίδευση μου

Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τους γονείς μου για τα πολύτιμα εφόδια που μου έδωσαν από την παιδική μου ηλικία μέχρι και τώρα και την αδερφή μου για τις πολύτιμες συμβουλές και τη συμπαράσταση της.

Στην οικογένεια μου

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Το οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου αποτελεί μία από τις βασικές αιτίες θανάτου παγκοσμίως. Η οξεία απόφραξη των στεφανιαίων αγγείων συχνά προκαλεί την γένεση κοιλιακών ταχυαρρυθμιών, που συνήθως έχουν ως συνέπεια τον αιφνίδιο καρδιακό θάνατο. Η παθοφυσιολογία της γένεσης των κοιλιακών αρρυθμιών λόγω μυοκαρδιακής ισχαιμίας είναι σύνθετη και πολλές πλευρές παραμένουν αδιευκρίνιστες. Έχει αποδειχθεί από κλινικές και πειραματικές μελέτες ότι η παραγωγή της ενδοθηλίνης-1 από τα μυοκαρδιακά κύτταρα των κοιλιών αυξάνεται σε σημαντικό επίπεδο σε πρώιμη φάση της οξείας μυοκαρδιακής απόφραξης. Έχει φανεί ότι, η ενδοθηλίνη-1 έχει σημαντική ηλεκτροφυσιολογική δράση και συμβάλει στην αύξηση της κοιλιακής αρρυθμογένεσης. Η ενδοθηλίνη-1 ασκεί τη δράση της μέσω δύο υποδοχέων, του A (ETA) και του B (ETB), αλλά ο ρόλος των ETB-υποδοχέων παραμένει αδιευκρίνιστος. Η ενδοθηλίνη-1, μέσω δράσης των ETA-υποδοχέων, παρατείνει την διάρκεια του δυναμικού ενεργείας και αυξάνει την διαπερατότητα των διαύλων ασβεστίου, προκαλώντας πρώιμες επαναπολώσεις και κοιλιακές ταχυκαρδίες μέσω εστιακής δράσης. Επιπρόσθετα, η ενδοθηλίνη-1 αυξάνει τη δραστηριότητα του συμπαθητικού νευρικού συστήματος. Το συμπαθητικό νευρικό σύστημα είναι γνωστό ότι συμμετέχει στην κοιλιακή αρρυθμογένεση κατά τη διάρκεια της οξείας ισχαιμίας του μυοκαρδίου.

Η παρούσα μελέτη έχει ως κύριο στόχο να μελετήσει το ρόλο των υποδοχέων της ενδοθηλίνης στην αναδιαμόρφωση της αριστερής κοιλίας και στις κοιλιακές αρρυθμίες και να διευκρινήσει επιπλέον τη δράση της ενδοθηλίνης στη κυτταρική ηλεκτροφυσιολογία.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	1
ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	7
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1^ο Η ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ ΤΗΣ ΕΝΔΟΘΗΛΙΝΗΣ	9
1.1 Γενικά	9
1.2 Η ενδοθηλίνη σε μοριακό επίπεδο	12
1.3 Βιοσύνθεση της ενδοθηλίνης.....	13
1.4 Υποδοχείς της ενδοθηλίνης.....	17
1.5 Φυσιολογικές ιδιότητες της ενδοθηλίνης.....	22
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2^ο ΠΑΘΟΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΟΣ ΡΟΛΟΣ ΤΗΣ ΕΝΔΟΘΗΛΙΝΗΣ	25
2.1. Πνευμονική υπέρταση και ενδοθηλίνη.....	26
2.2 Ενδοθηλίνη και υπέρταση.....	27
2.3 Επίδραση της ενδοθηλίνης στη νεφρική λειτουργία.....	28
2.4 Ενδοθηλίνη και αθηρωμάτωση.....	29
2.5 Ενδοθηλίνη και αναπνευστικό σύστημα.....	30
2.6 Ενδοθηλίνη και αυτοάνοσα νοσήματα	31
2.7 Ενδοθηλίνη και νεοπλασίες	31
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3^ο ΗΛΕΚΤΡΟΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΜΕΤΑΒΟΛΕΣ ΣΕ ΙΣΧΑΙΜΙΑ/ ΕΜΦΡΑΓΜΑ	33
<i>Αρρυθμίες φάσης I</i>	34
<i>Αρρυθμίες φάσης II</i>	37
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4^ο ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΟΥ ΑΥΤΟΝΟΜΟΥ ΝΕΥΡΙΚΟΥ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ ΣΤΗ ΚΟΙΛΑΚΗ ΑΡΡΥΘΜΙΟΓΕΝΕΣΗ .	39
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5^ο ΕΝΔΟΘΗΛΙΝΗ ΚΑΙ ΚΑΡΔΙΑ.....	43
5.1 Καρδιακή ανεπάρκεια και ενδοθηλίνη	43
5.2 Ενδοθηλίνη και οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου	45
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6^ο ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	53
ΒΑΣΙΚΗ ΥΠΟΘΕΣΗ ΚΑΙ ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ	53
<i>Υλικό και μέθοδοι</i>	55
<i>Αποτέσματα</i>	73
<i>Συζήτηση</i>	85
ΕΤΒ-ΥΠΟΔΟΧΕΙΣ ΚΑΙ ΣΥΜΠΑΘΗΤΙΚΗ ΔΡΑΣΤΗΡΙΟΤΗΤΑ	93
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7^ο ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑ	ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.1
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	113
ABSTRACT	115
ΑΝΑΦΟΡΕΣ-ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	117

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Το οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου αποτελεί μία από τις βασικές αιτίες θανάτου παγκοσμίως. Η οξεία απόφραξη των στεφανιαίων αγγείων συχνά προκαλεί την γένεση κοιλιακών ταχυαρρυθμιών, που συνήθως έχουν ως συνέπεια τον αιφνίδιο καρδιακό θάνατο. Η παθοφυσιολογία της γένεσης των κοιλιακών αρρυθμιών λόγω μυοκαρδιακής ισχαιμίας είναι σύνθετη και πολλές πλευρές παραμένουν αδιευκρίνιστες. Έχει αποδειχθεί από κλινικές και πειραματικές μελέτες ότι η παραγωγή της ενδοθηλίνης-1 από τα μυοκαρδιακά κύτταρα των κοιλιών αυξάνεται σε σημαντικό επίπεδο σε πρώιμη φάση της οξείας μυοκαρδιακής απόφραξης. Έχει φανεί ότι, η ενδοθηλίνη-1 έχει σημαντική ηλεκτροφυσιολογική δράση και συμβάλει στην αύξηση της κοιλιακής αρρυθμογένεσης. Η ενδοθηλίνη-1 ασκεί τη δράση της μέσω δύο υποδοχέων, του A (ETA) και του B (ETB), αλλά ο ρόλος των ETB-υποδοχέων παραμένει αδιευκρίνιστος. Η ενδοθηλίνη-1, μέσω δράσης των ETA-υποδοχέων, παρατείνει την διάρκεια του δυναμικού ενεργείας και αυξάνει την διαπερατότητα των διαύλων ασβεστίου, προκαλώντας πρώιμες επαναπολώσεις και κοιλιακές ταχυκαρδίες μέσω εστιακής δράσης. Επιπρόσθετα, η ενδοθηλίνη-1 αυξάνει τη δραστηριότητα του συμπαθητικού νευρικού συστήματος. Το συμπαθητικό νευρικό σύστημα είναι γνωστό ότι συμμετέχει στην κοιλιακή αρρυθμογένεση κατά τη διάρκεια της οξείας ισχαιμίας του μυοκαρδίου.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1^ο Η ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ ΤΗΣ ΕΝΔΟΘΗΛΙΝΗΣ

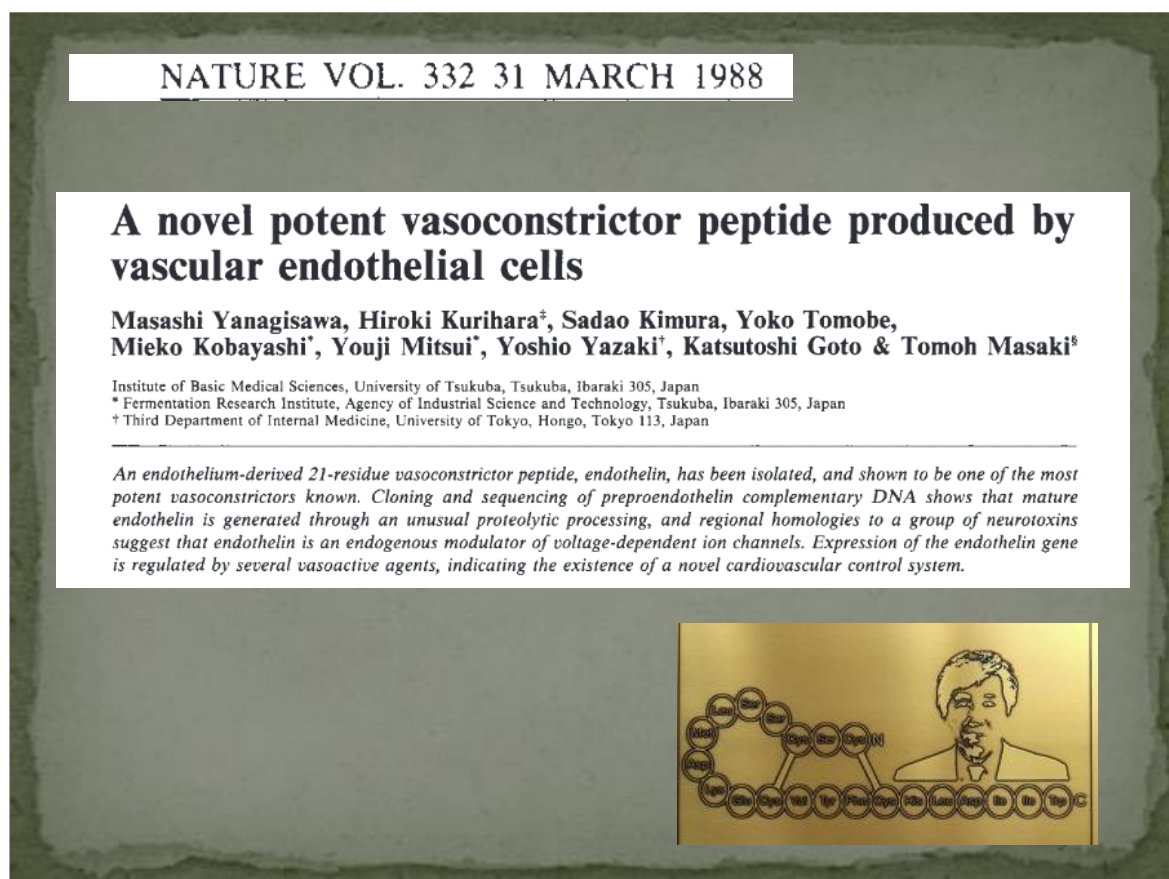
1.1 Γενικά

Η διευκρίνιση του ρόλου του ενδοθηλίου στη ρύθμιση της λειτουργίας και της δομής των αιμοφόρων αγγείων αποτελεί ένα πεδίο έντονης ερευνητικής δραστηριότητας από το 1966, όταν ο Florey διετύπωσε την αντίληψη ότι το ενδοθήλιο «ήταν κάτι περισσότερο από ένα εμπύρηνο περιτύλιγμα». Η ανακάλυψη στα τέλη της δεκαετίας του 1970 και στις αρχές της δεκαετίας του 1980 ότι τα ενδοθηλιακά κύτταρα συνθέτουν και απελευθερώνουν ισχυρές αγγειοδιασταλτικές (την προστακυκλίνη και το μονοξειδίο του αζώτου, αρχικά αναφερόμενο ως αγγειοδιασταλτικό παράγοντα που προέρχεται από το ενδοθήλιο, EDRF) και αγγειοσυσπαστικές ουσίες εισήγαγε ένα καινούριο μηχανισμό στη ρύθμιση του μυϊκού τόνου των αγγείων και άνοιξε νέα πεδία έρευνας στη βιολογία, την παθοφυσιολογία και την φαρμακολογία των αγγείων^[26]. Τα γεγονότα-σταθμοί που οδήγησαν στην ανακάλυψη του αγγειοσυσπαστικού παράγοντα που προέρχεται από το ενδοθήλιο (EDCF) ξεκίνησαν στα τέλη του 1982, έξι χρόνια μετά την ανακάλυψη της πρώτης αγγειοδραστικής ουσίας (προστακυκλίνη) και δύο χρόνια μετά τη δημοσίευση των Furchgott και Zawadzki^[32] ότι η παρουσία του ενδοθηλίου ήταν απαραίτητη για τη διασταλτική δράση της ακετυλοχολίνης σε απομονωμένο παρασκεύασμα αορτής κονίκλου. Αυτό το χρονικό διάστημα αποτέλεσε μία από τις πιο παραγωγικές και συναρπαστικές περιόδους στην ιστορία της βιολογίας των αγγείων και οδήγησε στην ανακάλυψη νέων μηχανισμών υπεύθυνων για τη ρύθμιση της λειτουργίας τους.

Πίνακας 1: Μελέτες που οδήγησαν στη διευκρίνιση του ρόλου του ενδοθηλίου

Έτος	Τίτλος μελέτης	Συγγραφείς
1982	In an attempt to bioassay EDRF from cultured EC a peptidergic EDCF was discovered	Agricola et al
1983	First report of endothelium-dependent vasoconstriction (by anoxia) in canine arteries	DeMey and Vanhoutte
1983/1984	Hypoxia-induced endothelium-dependent vasoconstriction in porcine pulmonary artery	Holden and McCall
1984/1985	First demonstration that a diffusible and transferable substance (EDCF) mediates hypoxia induced endothelium-dependent vasoconstriction in canine arteries	Rubanyi and Vanhoutte
1985	Publication of the discovery of the peptidergic EDCF	Hickey et al
1986	Demonstration of the in vivo hypertensive effect of purified peptidergic EDCF	Hom et al
1986	Confirmation of the peptidergic nature and vasoconstrictor activity of cultured EC-derived EDCF	Gillespie et al
1987	Confirmation of the nature and activity of the peptidergic EDCF	O'Brien et al
1988	Purification, sequencing and cloning of the peptidergic EDCF and naming it endothelin	Yanagisawa et al

Ήταν το 1988, όταν ο Yanagisawa και οι συνεργάτες του δημοσίευσαν τη χημική δομή ενός ισχυρά αγγειοσυσπαστικού παράγοντα.^[139] Αυτή η ουσία ήταν ένα πεπτίδιο, το οποίο ονομάστηκε ενδοθηλίνη-1 (ET-1).^[140] Δύο χρόνια αργότερα αναγνωρίστηκαν δύο υποδοχείς για την ET-1. Αμέσως μετά την ταυτοποίηση των ET_A και ET_B-υποδοχέων, οι Clozel και συν. παρουσίασαν το 1993 των πρώτο ανταγωνιστή των υποδοχέων ενδοθηλίνης που χορηγούταν από το στόμα (Ro 46-2005) και η ίδια ερευνητική ομάδα συνέχισε την μελέτη του, μέχρι να κυκλοφορήσει τελικά ο πρώτος ανταγωνιστής των υποδοχέων ενδοθηλίνης, το bosentan στα τέλη του 2001^[20].



Εικόνα1. Η δημοσίευση της ανακάλυψης της ενδοθηλίνης από τον Yanagisawa στο περιοδικό Nature το 1988.

1.2 Η ενδοθηλίνη σε μοριακό επίπεδο

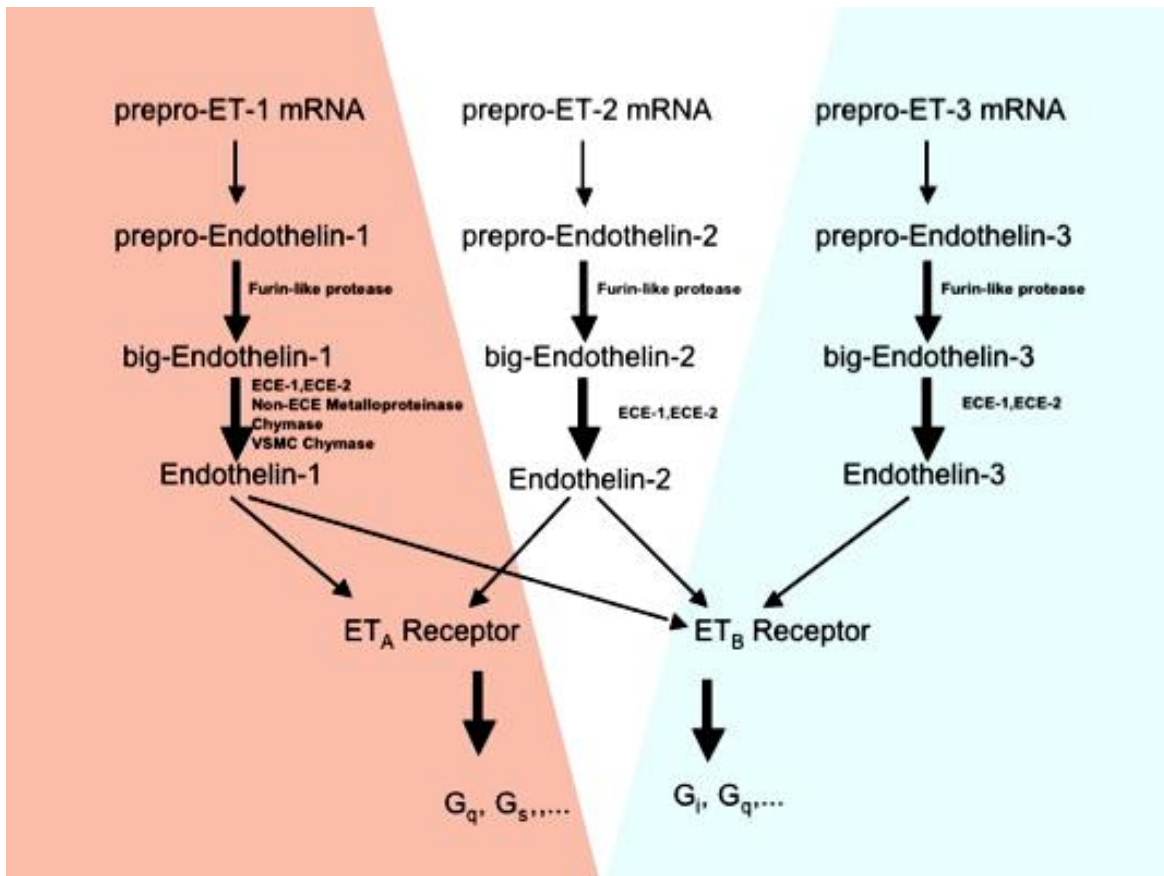
Η ενδοθηλίνη εκφράζεται μέσω τριών ισομορφών: την ET-1, την ET-2, και την ET-3. Το μόριο και των τριών ισομορφών αποτελείται από 21 αμινοξέα και έχει σχήμα αγκύλης που καταλήγει σε ένα καρβοξυλικό και ένα αμινικό άκρο.^[140] Περιλαμβάνει δύο διθειούχους δεσμούς που ενώνουν την κυστεΐνη στις θέσεις 1-15 και 3-11. Η μορφή του μορίου, το καρβοξυλικό και το αμινικό άκρο του επηρεάζουν ουσιωδώς τη δραστηριότητα της ενδοθηλίνης. Η αλληλουχία των αμινοξέων ασπαραγίνη, γλουταμίνη και φαινυλαλανίνη στις θέσεις 8, 10 και 14 αντίστοιχα είναι σημαντική για τη σύνδεση του μορίου της ενδοθηλίνης με τον υποδοχέα της. Η ET-1 διαφέρει από την ET-2 στο ότι στη θέση 6 η ET-1 περιέχει λευκίνη ενώ η ET-2 τρυπτοφάνη και στη θέση 7 η ET-1 περιέχει μεθειονίνη ενώ η ET-2 περιέχει λευκίνη. Η ET-3 έχει μεγαλύτερες διαφορές από τους δύο άλλους ισοτύπους. Πρόδρομες μορφές των ισοτύπων των ενδοθηλινών είναι οι προπροενδοθηλίνες (212 αμινοξέα) από τις οποίες προέρχονται οι προενδοθηλίνες ή μεγαλοενδοθηλίνες κατόπιν πρωτεολυτικής διάσπασης στις θέσεις 52-53 και 91-92 με τη δράση μιας ειδικής ενδοπεπτιδάσης. Οι προενδοθηλίνες (προ ET-1: 38 αμινοξέα, προ ET-2: 37 αμινοξέα και προ ET-3: 41 αμινοξέα) με τη δράση και των δύο τύπων του μετατρεπτικού ενζύμου της ενδοθηλίνης στα ζεύγη τρυπτοφάνη-βαλίνη για την προ ET-1 και την προ ET-2 και στα ζεύγη τρυπτοφάνη-ισολευκίνη για την προ ET-3 μετατρέπονται στις ώριμες μορφές τους. Η προπροενδοθηλίνη είναι ανενεργής ενώ η προενδοθηλίνη είναι δραστική, αλλά η *in vitro* δράση της είναι 100 φορές μικρότερη από εκείνη της ενδοθηλίνης. Η δράση της προενδοθηλίνης, *in vivo*, είναι όμοια με εκείνη της ενδοθηλίνης γεγονός που δείχνει ότι η προενδοθηλίνη σταδιακά μετατρέπεται σε ενδοθηλίνη.^[49,139,140]

Ενδοθηλίνη-1	Ενδοθηλίνη-2	Ενδοθηλίνη-3
Ενδοθηλιακά κύτταρα	Νεφρικά επιθηλιακά κύτταρα	Νευρώνες
Μυοκαρδιακά κύτταρα	Στρωματικά κύτταρα του γαστρεντερικού	Γλοιοκύτταρα
Λεία μυϊκά κύτταρα αορτής	Μυοκαρδιακά κύτταρα	Επινεφριδιακά κύτταρα
Νεφρικά επιθηλιακά κύτταρα	Τροφοβλάστες	Επιθηλιακά κύτταρα πνευμόνων
Νευρώνες	Αδενικά κύτταρα ενδομητρίου	Επιθηλιακά κύτταρα εντέρου
Αστροκύτταρα	Επιθηλιακά κύτταρα πνευμόνων	Νεφρικά επιθηλιακά κύτταρα
Νευροεκκριτικές απολήξεις της υπόφυσης		
Νεφρικά μεσαγγειακά κύτταρα		
Κύτταρα Sertoli		
Κύτταρα ενδομητρίου		
Επιθηλιακά κύτταρα μαστού		
Μυοϊνοβλάστες		
Επιθηλιακά κύτταρα χοληδόχου πόρου		

Πίνακας 2: Σημεία παραγωγής ισομορφών ενδοθηλίνης

1.3 Βιοσύνθεση της ενδοθηλίνης

Η σύνθεση της ενδοθηλίνης ακολουθεί τον τρόπο σύνθεσης των πρωτεϊνικών ορμονών. Έχουν αναγνωριστεί στον άνθρωπο τα υπεύθυνα γονίδια που περιέχουν τις γενετικές πληροφορίες για τη σύνθεση των προενδοθηλινών. Τα γονίδια αυτά εντοπίζονται σε διαφορετικό χρωμόσωμα, ανάλογα με τον ισότυπο της ενδοθηλίνης. Έτσι, το γονίδιο για την πρεπρο-ET-1 εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 6, για την πρεπρο-ET-2 στο 1 και για την πρεπρο-ET-3 στο χρωμόσωμα 20. ^[49,139,140]



Εικόνα 2. Βιολογική οδός σύνθεσης ενδοθηλίνης. (Εικόνα από *Can J Physiol Pharmacol* 2008; 86: 485-498.)

Από τα γονίδια αυτά, περισσότερο έχει μελετηθεί αυτό της ισόμορφης ET-1. Το γονίδιο για την προ-ET-1 αποτελείται από 5 εξόνια και 4 ιντρόνια που διανέμονται σε 6.836 ζεύγη βάσεων. Ένα από τα εξόνια, και συγκεκριμένα το δεύτερο στη σειρά, κωδικοποιεί την ενδοθηλίνη-1. Το πρώτο εξόνιο περιέχει την 5' ακωδικοποίητη αλληλουχία (268 νουκλεοτίδια) και την κωδικοποιή αλληλουχία για τα πρώτα 21 αμινοξέα της προ-ET-1. Το τρίτο εξόνιο κωδικοποιεί ένα πεπτίδιο σχετιζόμενο με την ενδοθηλίνη. Το τέταρτο εξόνιο περιέχει αλληλουχία που κωδικοποιεί τα αμινοξέα 131-178 της προ-ET-1. Το πέμπτο εξόνιο περιέχει την 3' ακωδικοποίητη περιοχή και τα 34 αμινοξέα του καρβοξυλικού άκρου της προ-ET-1. Στην 3' ακωδικοποίητη περιοχή υπάρχουν αλληλουχίες AU οι οποίες υπαισέρχονται στην εκλεκτική καθαίρεση του mRNA. Ο εκκινητής έχει τυπική αλληλουχία CAAT και TATA. Διαμέσου θέσεων του εκκινητού αυξητικοί παράγοντες ρυθμίζουν τη μεταγραφή του γόνου της ET-1.

Υπάρχουν πάρα πολλοί παράγοντες που ρυθμίζουν την παραγωγή των ET και διακρίνονται σε διεγερτικούς και ανασταλτικούς. [49,50,139,140]

Παράγοντες που προάγουν την σύνθεση της ET-1

Οι διεγερτικοί παράγοντες διακρίνονται σε τρεις κύριες κατηγορίες: αγγειοσυσπαστικοί/θρομβωτικοί παράγοντες, φλεγμονώδεις κυτοκίνες και φυσικοί παράγοντες. Συγκεκριμένα, η θρομβίνη, η αγγειοτενσίνη II, και η βαζοπρεσίνη (AVP), αυξάνουν την απελευθέρωση της ET-1 από τα ενδοθηλιακά κύτταρα, ενεργοποιώντας την φωσφολιπάση C, την πρωτεϊνική κινάση (PKC) και την έκφραση των γονιδίων της οικογένειας των AP-1 πρωτεϊνών (*c-fos/c-jun*) που ρυθμίζουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό.

Ένας άλλος αγγειοσυσπαστικός παράγοντας που διεγείρει την ET-1 είναι η 8-επιπροσταγλανδίνη F2α. Παράγεται από λιπιδική υπεροξείδωση και καταλυτική δράση ελεύθερων ριζών. Έτσι εξηγούνται οι αυξήσεις των επιπέδων της ET-1 σε καταστάσεις οξειδωτικής βλάβης. Οι φλεγμονώδεις κυτοκίνες, όπως η ιντερλευκίνη-1 και ο παράγων νέκρωσης των όγκων (TNF), αυξάνουν την παραγωγή της ET-1. Τέλος, αρκετοί φυσικοί παράγοντες ενεργοποιώντας την PKC αυξάνουν την απελευθέρωση της ET-1 από τα ενδοθηλιακά κύτταρα. Μεταξύ αυτών, περιλαμβάνονται η μηχανική τάση του κυττάρου, η πίεση χωρίς κυτταρική παραμόρφωση, και τα χαμηλά επίπεδα διατμητικής τάσης (<2 dynes/cm²). [49,139,140]

Παράγοντες που αναστέλλουν την σύνθεση της ET-1

Στους ανασταλτικούς παράγοντες περιλαμβάνονται ουσίες με αγγειοδιασταλτική και αντιθρομβωτική δράση της είναι η ηπαρίνη, η βραδυκίνη, η προσταγλανδίνη E2 και I2, η προστακυκλίνη, το μονοξειδίο του αζώτου, και το κολπικό νατριουρητικό πεπτίδιο. Όλοι αυτοί οι παράγοντες φαίνεται ότι δρουν διεγείροντας την παραγωγή του NO από τα ενδοθηλιακά κύτταρα ή/και της κυκλικής μονοφωσφορικής γουανοσίνης (cGMP).

Μεταβολισμός των ενδοθηλινών

Οι ενδοθηλίνες μεταβολίζονται γρήγορα από τους πνεύμονες (80-90%), τους νεφρούς, το ήπαρ, την καρδιά και τον σπλήνα. Έχουν περιγραφεί αρκετά ένζυμα κάθαρσης

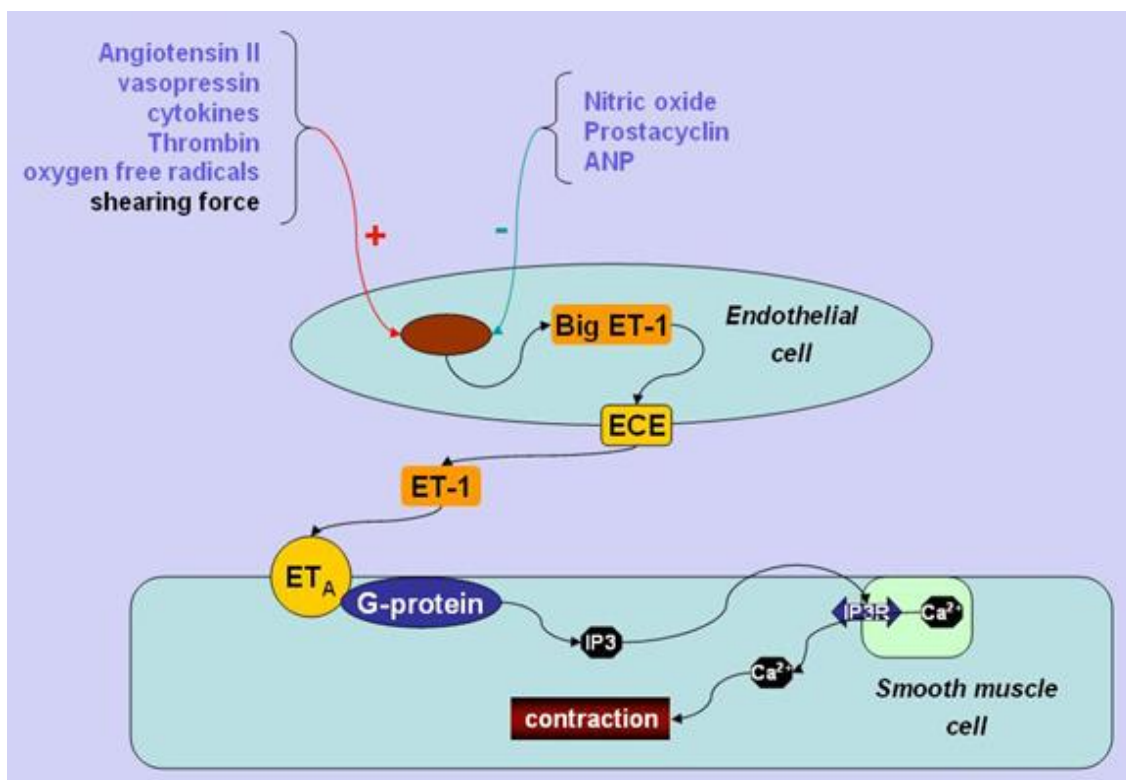
ενδοθηλίνης από τους νεφρούς, μεταξύ των οποίων περιλαμβάνονται μία ουδέτερη ενδοπεπτιδάση, μία πρωτεάση συνδεδεμένη με εγκεφαλινάση, μεταλλοπρωτεάσες και μία πρωτεΐνη προστατευτική των λυσοσωμάτων. Η σημασία όλων αυτών των πρωτεασών παραμένει αδιευκρίνιστη, όμως, πιθανότατα, η ουδέτερη ενδοπεπτιδάση είναι αυτή που συνεισφέρει ουσιαστικά στην κάθαρση της ET-1 από τους νεφρούς. Επίσης, είναι αξιοσημείωτο ότι ελάχιστη ποσότητα από την κυκλοφορούσα ET-1 απεκκρίνεται στα ούρα, εύρημα που υποδηλώνει ότι η ET-1 των ούρων αποδίδεται στην ενδογενή σύνθεσή της από τους νεφρούς.

Περίληπτικά, η παραγωγή της ET-1 περιλαμβάνει τα εξής στάδια:

- 1) Διέγερση του γονιδίου της ET-1, που βρίσκεται στον πυρήνα του ενδοθηλιακού κυττάρου.
- 2) Δημιουργία του mRNA της preproET-1, μιας πρόδρομης μορφής της.
- 3) Σύνθεση της preproET-1 στο κυτταρόπλασμα του κυττάρου.
- 4) Με την κατάλυση της preproET-1 από ένα ένζυμο δημιουργείται η Big ET-1.
- 5) Η τελευταία, ένα αμινοπεπτίδιο από 38 αμινοξέα διαχωρίζεται σε ET-1 μέσω του μετατρεπτικού ενζύμου της ET-1 (ECE-1) μιας υπερεκλεκτικής μεταλλοπρωτεϊνάσης.

Η ET-1 έχει **παρακρινή** και ενδεχομένως **ενδοκρινή** δράση. Γι αυτό τον λόγο, ο διαχωρισμός μεταξύ big-ET-1 και ET-1 χρειάζεται ιδιαίτερη προσοχή. Ιδιαίτερα τα ερεθίσματα που επιδρούν στην κάθαρση και λιγότερο στη σύνθεση του μορίου είναι από τους πιο σημαντικούς δείκτες της συγκέντρωσης του στο πλάσμα.

Παρά το γεγονός ότι οι βιολογικές επιδράσεις της ET-1 διαρκούν για πολύ μεγαλύτερο χρονικό διάστημα, ο χρόνος ημίσειας ζωής της είναι λιγότερο από δύο λεπτά. Αυτό οφείλεται στον μεταβολισμό και απέκκριση της από το πνευμονικό και νεφρικό αγγειακό δίκτυο. Αυτή η απέκκριση περιλαμβάνει δέσμευση της ουσίας από ETB-υποδοχείς που βρίσκονται στην επιφάνεια του κυττάρου, απορρόφηση και αποδόμησή της στα λυσοσώματα. Τα μόρια της ενδοθηλίνης αποδομούνται επίσης από ενδοπεπτιδάσες που βρίσκονται στο εγγύς εσπειραμένο σωληνάριο στους νεφρούς.



Εικόνα 3. Διάφορα ερεθίσματα προάγουν ή αναστέλλουν την παραγωγή της ET-1. (Εικόνα από cardio.bjmu.edu.cn)

1.4 Υποδοχείς της ενδοθηλίνης

Η ET-1 ασκεί τη δράση της μέσω της σύνδεσής της με δύο ειδικούς υποδοχείς, τους υποδοχείς-A (ETA) και τους υποδοχείς-B (ETB). Και οι δύο είναι πρωτεϊνικής φύσεως και βρίσκονται στη μεμβράνη των κυττάρων.^[24,82,88] Έχουν όμως διαφορετική μοριακή δομή και ξεχωριστές φαρμακολογικές ιδιότητες και λειτουργίες που βασίζονται κυρίως στην θέση τους.^[8,49]

Στον άνθρωπο διακρίνονται οι υποδοχείς A και B (ETA και ETB), έκφραση των οποίων προέρχεται, αντίστοιχα, από τα χρωμοσώματα 4 και 13. Απαρτίζονται, αντίστοιχα, από 427 και 442 αμινοξέα και ο μεν ETA συνδέεται ισχυρότερα με την ET-1 και ET-2, αντίθετα ο ETB συνδέεται ομότιμα με όλες. Διάφορες μελέτες υποστηρίζουν ότι μπορεί να υπάρχουν υποομάδες των υποδοχέων ETB, όμως δεν έχει αποσαφηνιστεί τυχόν

διαφοροποίηση στη δομή τους. Τμήματα του υπεύθυνου RNA των ETB ελέγχουν την σύνθεση δύο υποδοχέων μεγέθους 10 αμινοξέων, χωρίς όμως να έχει αποδειχθεί και διαφορετική μεταξύ τους λειτουργία. Έχει βρεθεί και ένας τρίτος τύπος υποδοχέων στο είδος *Xenopus laevis*, όχι όμως και στα θηλαστικά. Όλοι οι τύποι των υποδοχέων που αναφέρθηκαν ανήκουν στην οικογένεια των υποδοχέων των **συζευγμένων με G-πρωτεΐνη**. [8,17,49]

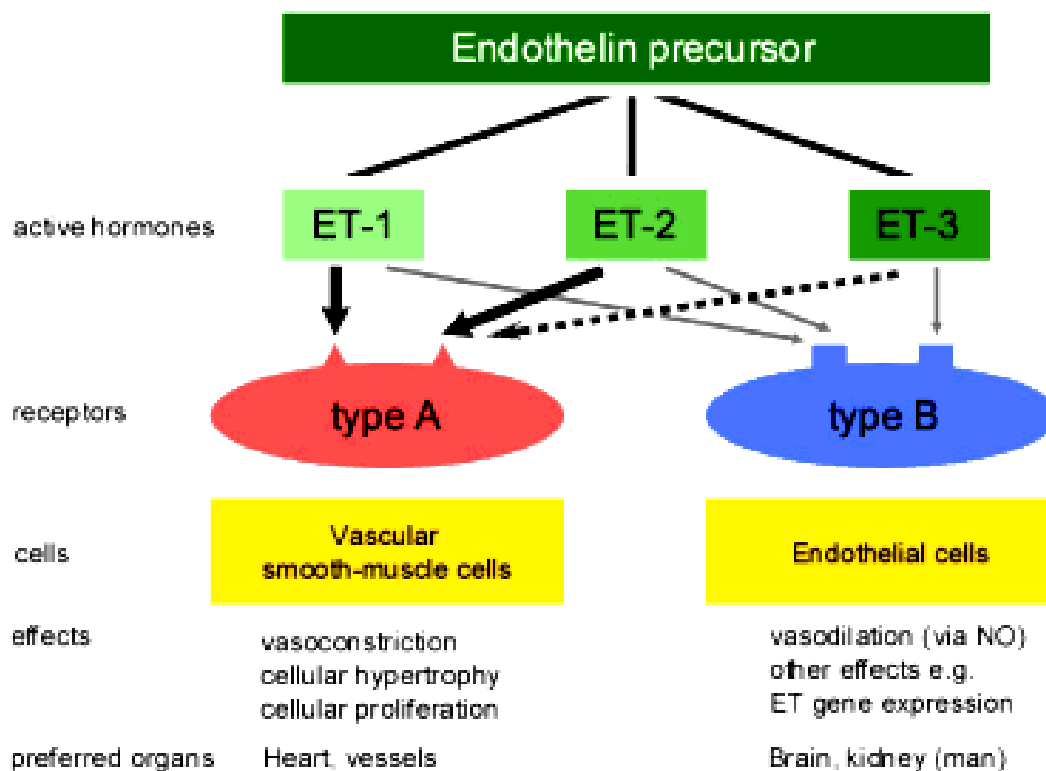
Η σύνδεση της ET-1 με τους υποδοχείς A και B έχει ως αποτέλεσμα σημαντική χρονική επιμήκυνση της βιολογικής της δράσης. Η τελευταία παρατηρείται ακόμη περισσότερο λόγω μακράς (>2 ώρες) σύνδεση της με τους ETA-υποδοχείς μετά την ενδοκύττωση. Αυτή η ιδιότητα της δράσης της ET-1 μέσω των ETA-υποδοχέων παρακωλύει την προσπάθεια αναστολής της δράσης της ET-1. Πρόσφατα όμως, έχει βρεθεί μία ομάδα ανταγωνιστών των υποδοχέων με μεγάλη εξειδίκευση, με τελικό αποτέλεσμα την μείωση της δράσης της ET-1. Όλη αυτή η ομάδα πρωτεϊνών και πεπτιδίων είναι πολλά υποσχόμενη στην θεραπεία νοσημάτων που σχετίζονται με αυξημένη παραγωγή της ET-1.

Η βιολογική δράση των ET είναι σε άμεση συνάρτηση με τον πληθυσμό του κάθε είδους υποδοχέα και είναι διαφορετική μεταξύ των διαφόρων ιστών και κυττάρων. Ο αριθμός των υποδοχέων μπορεί να αλλάζει, είναι ειδικός για τον κάθε υποδοχέα και τον κάθε είδους διαμορφωτή τους. Για παράδειγμα, η κυκλοσπορίνη δεν επηρεάζει τους ETA-υποδοχείς στα πειραματικά κύτταρα του μεσάγγειου, αλλά αυξάνει τους ETB-υποδοχείς. Αυτό φαίνεται να έχει λειτουργική συσχέτιση, μιας και οι ETB-υποδοχείς συνδέονται με την αυτό-επαγόμενη σύνθεση της ET-1. Οι ETB-υποδοχείς προάγουν την μίτωση των νεφρικών σωληναριακών κυττάρων και αποτελούν ένα αυτοαναγεννητικό σύστημα αποκατάστασης της ακεραιότητας των σωληναρίων μετά από ιστική βλάβη.

Η κατανομή των υποδοχέων των ενδοθηλινών είναι εκτεταμένη και κύρια σχετίζεται με τους τόπους παραγωγής τους. Οι ETA-υποδοχείς επικρατούν στις λείες μυϊκές ίνες των αγγείων των περισσότερων ειδών, συμπεριλαμβανομένου και του ανθρώπινου, ενώ δεν βρίσκονται στα ενδοθηλιακά κύτταρα. Οι ETB-υποδοχείς βρίσκονται στα ενδοθηλιακά κύτταρα και στις λείες μυϊκές ίνες των αγγείων και κυρίως της αορτής, του εγκεφάλου και των πνευμόνων. Οι ETB είναι οι κυριότεροι υποδοχείς των κυττάρων των νεφρικών σωληναρίων. Επιμέρους ανατομικά στοιχεία των νεφρών (αρτηριόλια, τριχοειδή των

σπειραμάτων και σωληνάρια της μυελώδους μοίρας) διαθέτουν υποδοχείς και των δύο τύπων.

Οι ETA-υποδοχείς προκαλούν αγγειοσυστολή, τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και την εναπόθεση θεμέλιας ουσίας. Σε ότι αφορά τους υποδοχείς ETB, έχει διαπιστωθεί ότι συνδέονται με αγγειοδιαστολή, ενώ στα ενδοθηλιακά κύτταρα προκαλούν απελευθέρωση προσταγλανδινών (PGI₂) και NO αντισταθμίζοντας έτσι την αγγειοσυσπαστική και πολλαπλασιαστική δράση της ET-1 μέσω των ETA-υποδοχέων. Τέλος, οι ETB-υποδοχείς επηρεάζουν την κάθαρση της ET-1.



Εικόνα 5.

Οι υποδοχείς της ενδοθηλίνης A και B παράγονται σε διαφορετικά σημεία. Οι A υποδοχείς κυρίως στα λεία μυϊκά κύτταρα των αγγείων, ενώ οι B στα ενδοθηλιακά κύτταρα. Έτσι, εξηγούνται εν μέρει και οι διαφορετικές τους δράσεις. Οι υποδοχείς A προκαλούν αγγειοσυσπασση, κυτταρική υπερτροφία και κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Οι B μπορεί να προκαλέσουν αγγειοδιαστολή, έκφραση του γονιδίου της ενδοθηλίνης κ.α.

Η σύνδεση της ET-1 με τους υποδοχείς της οδηγεί σε ενεργοποίηση του μονοπατιού της φωσφατιδυλικής ινοσιτόλης και φωσφολιπάσης C, καθώς και στην πυροδότηση ενδοκυττάρων διεργασιών, με βραχυπρόθεσμα και μακροπρόθεσμα αποτελέσματα. Τέτοια είναι η αύξηση των ενδοκυττάρων επιπέδων ασβεστίου, η ενεργοποίηση της πρωτεϊνικής κινάσης C και πυρηνικοί μηχανισμοί σήμανσης. Έτσι, σε φυσιολογικές συνθήκες, οι δράσεις της ET-1 οδηγούν σε διατήρηση του αγγειακού τόνου, σε διαφοροποίηση των ιστών και σε πολλαπλασιασμό των κυττάρων μέσω των ιδιοτήτων των υποδοχέων της. Οι ενδοθηλίνες ασκούν μια σειρά από φυσιολογικές λειτουργίες, συμπεριλαμβανομένης της ανάπτυξης κυττάρων της νευρικής ακρολοφίας και της νευροδιαβίβασης.^[8,59,134]

Υποδοχείς Ενδοθηλίνης-A

Οι ETA-υποδοχείς της ενδοθηλίνης έχουν δέκα φορές μεγαλύτερη συνδετική ικανότητα για την ET-1 από ότι για την ET-3 και εκφράζονται σε πολύ μεγάλο βαθμό στα αγγειακά λεία μυϊκά κύτταρα, στο ενδοθήλιο των αγγείων, (ιδιαίτερα στα νεφρικά αγγεία και στα αγγεία της πνευμονικής κυκλοφορίας), καθώς και στα μυοκαρδιακά κύτταρα, κοιλικά και κοιλιακά. Αυτοί οι υποδοχείς μεσολαβούν στην αγγειοσυσπαστική δράση της ET-1, στον αγγειακό πολλαπλασιασμό, στην υπερτροφία του μυοκαρδίου με ταυτόχρονη αρρυθμιογόνο δράση σ' αυτό. Ιδιαίτερα επίσης προκαλούν αγγειοσύσπαση στην πνευμονική κυκλοφορία, καθώς και αύξηση των αντιστάσεων των νεφρικών αγγείων.

Η αγγειοσύσπαση συνδέεται με την ικανότητα των υποδοχέων, που είναι συνδεδεμένοι με την ενδοθηλίνη, να ενεργοποιούν την φωσφολιπάση-C η οποία οδηγεί στον σχηματισμό της 1,4,5 τριφωσφορικής ινοσιτόλης και της διακυλ-γλυκερόλης. Οι σχηματισμοί αυτοί αυξάνουν την συγκέντρωση του ενδοκυττάρου ασβεστίου, το οποίο με τη σειρά του προκαλεί την αγγειοσύσπαση. Το NO βραχύνει την διάρκεια της αγγειοσύσπασης ενεργοποιώντας την επιστροφή του ενδοκυττάρου ασβεστίου στις βασικές του συγκεντρώσεις. Η διακυλ-γλυκερόλη και το ασβέστιο ενεργοποιούν την πρωτεϊνική κινάση C, η οποία είναι μεσολαβητής της μιτογόνου δράσεως της ET-1.

Υποδοχείς Ενδοθηλίνης-B

Οι υποδοχείς ενδοθηλίνης τύπου B εκφράζονται κυρίως στα ενδοθηλιακά, στα λεία μυϊκά κύτταρα των βρόγχων, στα αθροιστικά σωληνάκια των νεφρών και σε μικρότερο βαθμό στα αγγειακά λεία μυϊκά κύτταρα. Συνδέονται με την ET-1 και την ET-3 και μεσολαβούν στον αγγειακό πολλαπλασιασμό, στην κάθαρση της ET-1 από τους πνεύμονες, στην επαναρρόφηση ύδατος και νατρίου, καθώς και στην αγγειοδιαστολή. Επιπλέον, μπορεί να μεσολαβούν στην δραστηριοποίηση άλλων πεπτιδίων. Τα αποτελέσματα αυτής της δραστηριοποίησης των ETB-υποδοχέων είναι όμοια με αυτά των ETA-υποδοχέων στην ενεργοποίηση της δραστηριότητας της φωσφολιπάσης-C, στην δημιουργία της 1,4,5 τριφωσφορικής ινοσιτόλης και διακυλ-γλυκερόλης και κινητοποίησης του ασβεστίου.

Οι ETB-υποδοχείς ενεργοποιούν ανασταλτικές G-πρωτεΐνες, οι οποίες σε μερικά κύτταρα οδηγούν στην καταστολή της παραγωγής του c-AMP και στη δραστηριοποίηση της αντλίας Na^+/H^+ . Η σύνδεση της ET-3 στους ETB-υποδοχείς μπορεί να οδηγήσει σε αγγειοδιαστολή, η οποία οφείλεται στην αυξημένη παραγωγή NO και προστακυκλίνης, καθώς και στη δραστηριοποίηση των διαύλων καλίου.

Η δραστηριοποίηση των ETB-υποδοχέων από την ET-3 είναι κριτικής σημασίας για την φυσιολογική ανάπτυξη των κυττάρων που προέρχονται από πρόδρομα νευρικά κύτταρα. Τα επιδερμικά μελανοκύτταρα και οι γαγγλιακοί νευρώνες στο μεσεντέριο δεν λειτουργούν όταν οι ETB-υποδοχείς λειτουργούν υπολειμματικά ή όταν δεν παράγεται ET-3. Η κληρονομική νόσος του Hirschsprung (αγαγγλιονικό megacolon) στους ανθρώπους φαίνεται να συνδέεται με τη μετάλλαξη του γονιδίου του ETB-υποδοχέα, το οποίο μειώνει την κινητοποίηση του ασβεστίου στον εντερικό βλεννογόνο.

1.5 Φυσιολογικές ιδιότητες της ενδοθηλίνης-1

Η κατανόηση της ET-1 στην ανθρώπινη φυσιολογία προέρχεται, κυρίως από τη δημιουργία αγωνιστών, ουσιών δηλαδή που ευοδώνουν την δράση της, αλλά κυρίως ανταγωνιστών.

α) αγωνιστές της ET-1

Μέχρι σήμερα δεν έχει ανακαλυφθεί ένας εξειδικευμένος αγωνιστής για τους ETA-υποδοχείς. Όσον αφορά στους ETB-υποδοχείς, έχουν χρησιμοποιηθεί ως αγωνιστές η σαραφοτοξίνη, που βρίσκεται σε δηλητήριο φιδιού και η ET-3 ισομορφή, που έχει βρεθεί ότι έχουν μεγαλύτερη συγγένεια με τους ETB- από τους ETA-υποδοχείς.

Η ET-1 προκαλεί μια βραδεία δοσοεξαρτώμενη αγγειοσύσπαση που διατηρείται περίπου για δύο ώρες^[17]. Αυτή η απάντηση μετριάζεται από την έγχυση ενός ανταγωνιστή των ETA-υποδοχέων, γεγονός που καταδεικνύει ότι η αγγειοσύσπαση που προκαλεί η ET-1 ασκείται, κυρίως μέσω των ETA-υποδοχέων.^[49,50] Αυτή η δράση αντιρροπείται μερικώς από αγγειοδιαστολή που πιθανώς ευοδώνεται από τους ETB-υποδοχείς στα ενδοθηλιακά κύτταρα των αγγείων. Επίσης, η ET-1 προκαλεί μείωση της αιματικής ροής στα στεφανιαία αγγεία και στον κορεσμό του οξυγόνου στο στεφανιαίο κόλπο, ευρήματα που συνηγορούν υπέρ του ρόλου της ET-1 στην διατήρηση του στεφανιαίου αγγειακού τόνου.^[100]

β) ανταγωνιστές της ενδοθηλίνης

Προκλινικές και κλινικές μελέτες υποστηρίζουν τον παθογενετικό ρόλο της ET-1 σε μια πληθώρα παθήσεων. Το γεγονός αυτό ώθησε τους ερευνητές προς την κατεύθυνση ανεύρεσης ανταγωνιστών της ET-1 με σκοπό την αποκόμιση πιθανόν θετικών αποτελεσμάτων από τη χρήση τους σε κλινικό επίπεδο.

Οι ανταγωνιστές της ET-1 χωρίζονται σε δύο μεγάλες κατηγορίες: i) *στους αναστολείς του μεταρρεπτικού ενζύμου της ET-1 και ii) στους ανταγωνιστές των υποδοχέων της ET-1.*

i) *αναστολείς του μετατρεπτικού ενζύμου της ενδοθελίνης*

Η αναστολή του μετατρεπτικού ενζύμου της ET-1 (ECE) αποτρέπει τη μετατροπή της big-ET-1 σε ET-1 και προκαλεί αγγειοδιαστολή και υπόταση. Οι περισσότεροι αναστολείς του ECE, αναστέλλουν επίσης και τις ενδοπεπτιδάσες, ώστε να αναστέλλουν τόσο την παραγωγή ET-1 όσο και το μεταβολισμό των αγγειοδιασταλτικών μεσολαβητών που πιθανόν αποδομούνται από τις ενδοπεπτιδάσες. Τέτοιοι μεσολαβητές είναι το κοιλιακό νατριουρητικό πεπτίδιο και η βραδυκίνηνη.

ii) *ανταγωνιστές των υποδοχέων της ET-1.*

Οι ανταγωνιστές των υποδοχέων της ET-1 ταξινομούνται σε εκλεκτικούς των ETA-υποδοχέων ή εκλεκτικούς των ETB-υποδοχέων, ανάλογα με τη συγγένειά τους προς κάποιο τύπο υποδοχέα, ή τέλος σε μικτούς ανταγωνιστές, όταν δεν παρουσιάζουν κάποια ιδιαίτερη συγγένεια.

Οι δύο περισσότερο μελετημένοι ανταγωνιστές είναι το BQ-123 (εκλεκτικός ανταγωνιστής των ETA-υποδοχέων) και το BQ-788 (εκλεκτικός ανταγωνιστής των ETB-υποδοχέων). Όσον αφορά τους μικτούς ανταγωνιστές ένας μεγάλος αριθμός ουσιών έχει χρησιμοποιηθεί σε πειραματικές μελέτες, αλλά το Bosentan, ένας μη πεπτιδικός ανταγωνιστής που λαμβάνεται από του στόματος, ήταν το πρώτο της κατηγορίας αυτής που πήρε έγκριση για κλινική εφαρμογή από το Food and Drug Administration (FDA), καθώς και από την Europe's European Medicines Agency (EMA) για τη θεραπεία της πνευμονικής υπέρτασης. Η διάκριση μεταξύ εκλεκτικών και μικτών ανταγωνιστών δεν είναι καλά διευκρινισμένη, καθώς η εκλεκτικότητα είναι σχετική και δοσοεξαρτώμενη.^[45,49,50]

Η χορήγηση ανταγωνιστών των ETA-υποδοχέων σε υγιείς εθελοντές προκαλεί αγγειοδιαστολή. Όταν χορηγήθηκε συστηματικά ο εκλεκτικός ανταγωνιστής των ETA-υποδοχέων BQ-123 προκάλεσε μια δοσοεξαρτώμενη μείωση της αρτηριακής πίεσης και των αγγειακών αντιστάσεων^[122]. Το γεγονός αυτό δείχνει ότι η ET-1 συμβάλλει στη διατήρηση του αγγειακού τόνου και της αρτηριακής πίεσης μέσω των A υποδοχέων.

Η χορήγηση του εκλεκτικού ανταγωνιστή των ETB-υποδοχέων BQ-788 προκάλεσε μια ήπια αγγειοσύσπαση, καθώς και μικρή αύξηση της αρτηριακής πίεσης. Τούτο υποδηλώνει ότι οι B-υποδοχείς, που σχετίζονται με τη σύνθεση NO, διαδραματίζουν φυσιολογικά κάποιο αντισταθμιστικό ρόλο στους A-υποδοχείς για τη διατήρηση του αγγειακού τόνου^[46,125,131]. Έτσι, φαίνεται ότι η χορήγηση μικτού ανταγωνιστή των A και B υποδοχέων προκαλεί μικρότερη αγγειοδιαστολή και μικρότερη μείωση της αρτηριακής πίεσης. Επίσης, έχει αποδειχθεί ότι οι ανταγωνιστές των ETB-υποδοχέων αυξάνουν τη συγκέντρωση της ET-1 στο πλάσμα σε τρωκτικά και σε ανθρώπους, πιθανώς μειώνοντας την κάθαρσή της^[37,125].

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2^ο

ΠΑΘΟΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΟΣ ΡΟΛΟΣ ΤΗΣ ΕΝΔΟΘΗΛΙΝΗΣ

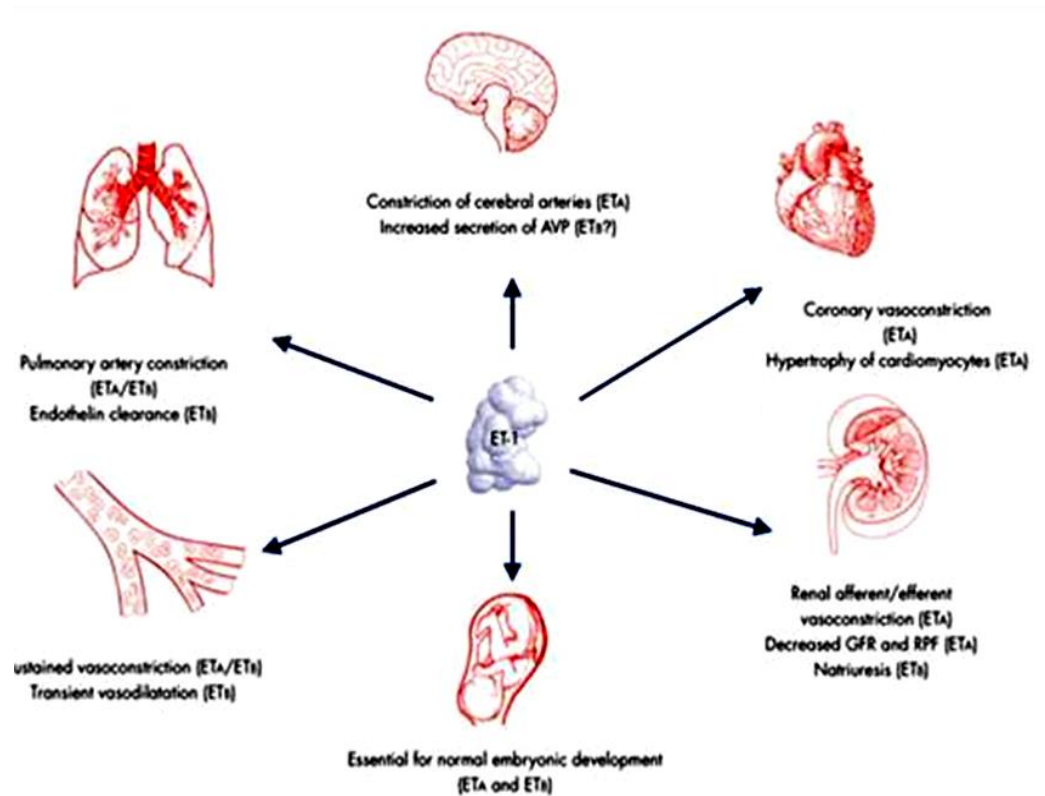
Μέσα στο σύντομο χρονικό διάστημα των τεσσάρων ετών μετά την ανακάλυψη της ενδοθηλίνης, οι υποδοχείς της είχαν ήδη ταυτοποιηθεί, με αποτέλεσμα να είναι διαθέσιμοι οι ανταγωνιστές τους για προκλινικές και κλινικές μελέτες.

Η πρώτη κλινική δοκιμή σε ασθενείς με συμφορητική καρδιακή ανεπάρκεια έγινε στις αρχές της δεκαετίας του 1990 στη Ζυρίχη και τα πρώτα αποτελέσματα δημοσιεύτηκαν το 1995. Παρ' όλα αυτά, χρειάστηκαν αρκετά χρόνια και πολλές ανεπιτυχείς κλινικές δοκιμές σε ασθενείς με καρδιακή ανεπάρκεια μέχρι η ιδέα του αποκλεισμού των υποδοχέων της ενδοθηλίνης να εδραιωθεί στην κλινική πράξη. Ήταν το 2001, όταν ένας μικτός ανταγωνιστής των υποδοχέων της ενδοθηλίνης, το bosentan (ο πρώτος per os ανταγωνιστής υποδοχέων ενδοθηλίνης), πήρε έγκριση για τη θεραπεία ασθενών με ιδιοπαθή πνευμονική υπέρταση. Από τότε, και άλλοι ανταγωνιστές των υποδοχέων της ενδοθηλίνης έχουν γίνει διαθέσιμοι για τη θεραπεία της πνευμονικής υπέρτασης.^[20]

Η έρευνα των προηγούμενων δεκαετιών χρησιμοποιώντας ανταγωνιστές των υποδοχέων της ενδοθηλίνης είχε ως αποτέλεσμα ένα τεράστιο όγκο πληροφοριών όσον αφορά στη κατανόηση του ρόλου της ενδοθηλίνης-1 και των υποδοχέων της στη φυσιολογία και την παθοφυσιολογία. Η γνώση αυτή προέρχεται τόσο από μελέτες σε ζωϊκά πρότυπα, όσο και από κλινικές δοκιμές. Οι ενδοθηλίνες, εκ των οποίων η ET-1 αντιπροσωπεύει την κυρίαρχη ισομορφή (Kedzierski και Yanagisawa 2001)^[59], μπορεί να θεωρηθούν ότι εκφράζονται παντού σαν ρυθμιστές που ασκούν παρακρινή και αυτοκρινή ρόλο, τόσο με ευεργετικά και επιβλαβή αποτελέσματα (Kedzierski και Yanagisawa 2001).^[59]

Στο αγγειακό σύστημα, η ενδοθηλίνη μέσω της ενεργοποίησης των ETA-υποδοχέων ασκεί αγγειοσυσπαστική δράση, και θεωρείται ο ισχυρότερος τέτοιος παράγοντας. Επίσης, η ET-1 συμβάλλει στην αθηρωμάτωση. Επιπρόσθετα, η ενδοθηλίνη συμμετέχει τόσο στην συσταλτικότητα του μυοκαρδίου, όσο και στην αρρυθμιογένεση και την αναδιαμόρφωση του μυοκαρδίου. Στο αναπνευστικό σύστημα, η ενδοθηλίνη διαδραματίζει ρυθμιστικό ρόλο στον τόνο των βρόγχων, καθώς και στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό στα

πνευμονικά αγγεία, συμμετέχοντας στη παθογένεση της πνευμονικής υπέρτασης. Επιπλέον η ενδοθηλίνη ελέγχει την απέκκριση ύδατος και άλατος και την οξεοβασική ισορροπία.



Εικόνα 6. Σχηματική απεικόνιση των δράσεων της ET-1

2.1. Πνευμονική υπέρταση και ενδοθηλίνη

Η πνευμονική υπέρταση προκαλείται από αύξηση των πνευμονικών αρτηριακών αντιστάσεων και περιλαμβάνει μία μεγάλη και ετερογενή ομάδα παθήσεων, οι οποίες την προκαλούν. Η αύξηση των αντιστάσεων στις πνευμονικές αρτηρίες οδηγεί σε υπερφόρτωση πίεσης της δεξιάς κοιλίας, ανεπάρκεια των βαλβίδων, καρδιακή ανεπάρκεια και τελικώς θάνατο. Η πνευμονική αρτηριακή υπέρταση (ΠΑΥ) είναι μία σπάνια νόσος με εκτιμώμενο επιπολασμό περί τα 30-50 περιστατικά ανά εκατομμύριο. Η

νόσος είναι πιο συχνή σε ορισμένες ομάδες υψηλού κινδύνου όπως σε ασθενείς με δρεπανοκυτταρική αναιμία, συστηματική σκλήρυνση, λοίμωξη από HIV-AIDS.^[39]

Η παθογένεση της ΠΑΥ είναι πολύ-παραγοντική, περιλαμβάνοντας την αυξημένη ενδοθηλίνη-1. Ως ένας ισχυρός αγγειοσυσπαστικός παράγοντας, η ET-1 ρυθμίζει τον πολλαπλασιασμό των λείων μυϊκών κυττάρων στα πνευμονικά αγγεία προάγοντας ταυτόχρονα τη φλεγμονή και την ίνωση. Η διαταραχή της ισορροπίας στη συγκέντρωση της θρομβοξάνης A₂ και της προσταγλαδίνης οδηγεί σε θρόμβωση, φλεγμονή και αγγειοσύσπαση.

Η πνευμονική κυκλοφορία είναι ιδιαίτερα ευαίσθητη στα αυξημένα επίπεδα ενδοθηλίνης-1, τα οποία σχετίζονται με την ανάπτυξη ΠΑΥ. Τα κυκλοφορούντα επίπεδα της ET-1 αποτελούν κακό προγνωστικό δείκτη για τη σοβαρότητα της νόσου.^[16] Η αυξημένη παραγωγή ενδοθηλίνης και η μεταβολή της έκφρασης των υποδοχέων της αποτελούν σημαντικούς παθογενετικούς παράγοντες.^[12,43,113]

2.2 Ενδοθηλίνη και υπέρταση

Η ανακάλυψη της ενδοθηλίνης προσέλυσε μεγάλο επιστημονικό ενδιαφέρον προσφέροντας νέες πληροφορίες για την παθογένεια της αρτηριακής υπέρτασης και κατά συνέπεια νέες προοπτικές στην αντιμετώπιση της. Ο ρόλος της ενδοθηλίνης στην αρτηριακή υπέρταση έχει εξετασθεί από ένα μεγάλο αριθμό μελετών.^[116,117] Διάφορα πειραματικά πρότυπα συσχετίζονται με αυξημένη δραστηριότητα της ET-1 στην αρτηριακή υπέρταση, ιδιαίτερα δε αυτά της αλατοεξαρτώμενης υπέρτασης, καθώς και της υπέρτασης μειωμένης ρενίνης. Στη θεραπεία της αρτηριακής υπέρτασης, η χρήση των ανταγωνιστών των υποδοχέων της ενδοθηλίνης ως μονοθεραπεία δεν είχε τα επιθυμητά αποτελέσματα.^[45,46] Παρόλα αυτά υπάρχουν μελέτες με αρκετά υποσχόμενα αποτελέσματα ως προς τη χρήση συνδυασμού των ανταγωνιστών υποδοχέων ενδοθηλίνης με τα κλασσικά αντιυπερτασικά. Όμως, ο ανταγωνισμός της ενδοθηλίνης είναι απίθανο να θεωρηθεί θεραπεία πρώτης εκλογής, αλλά θα μπορούσε να έχει κάποιο ρόλο στο μέλλον στη θεραπεία ασθενών υψηλού κινδύνου^[47,69,70].

2.3 Επίδραση της ενδοθηλίνης στη νεφρική λειτουργία

Οι επιδράσεις της ενδοθηλίνης-1 στους νεφρούς είναι σύνθετες. Η εξωγενής χορήγηση ET-1 επάγει την αγγειοσύσπαση στο νεφρικό φλοιό, αλλά προκαλεί αγγειοδιαστολή στο μυελό. Η αγγειοδιαστολή γίνεται μέσω των ETB-υποδοχέων, ενώ η αγγειοσύσπαση του φλοιού εξαρτάται από την ενεργοποίηση κυρίως των ETA-υποδοχέων. Η ενεργοποίηση των ETA-υποδοχέων εκτός από την αγγειοσύσπαση, προάγει το οξειδωτικό στρες, την φλεγμονή και την πρωτεϊνουρία. Αντίθετα, η ενεργοποίηση των ETB-υποδοχέων, εκτός από την αγγειοδιαστολή, ευθύνεται για την αναστολή της επαναρρόφησης νατρίου στα νεφρικά σωληνάκια. Συνεπώς, ο αποκλεισμός των ETB-υποδοχέων μπορεί να προκαλέσει νατριο-εξαρτώμενη υπέρταση.^[8,67]

Η έκφραση της ET-1 στα νεφρικά σωληνάκια ρυθμίζεται από την ποσότητα του νατρίου που διηθείται, από τους μιτοχονδριακούς ανταλλάκτες $\text{Na}^+/\text{Ca}^{++}$, και από την παραγωγή στεροειδών όπως η αλδοστερόνη, η οποία, σε φυσιολογικές συνθήκες, προκαλεί επαναρρόφηση νατρίου. Ο ρόλος της στην έκφραση της ET-1, προάγοντας την παραγωγή της και προκαλώντας νατριούρηση, θεωρείται πως προλαμβάνει την υπερβολική κατακράτηση νατρίου.

Ο εκλεκτικός ανταγωνισμός των ETA-υποδοχέων μειώνει οξέως την αρτηριακή πίεση, την πρωτεϊνουρία και την ταχύτητα παλμικού κύματος σε ασθενείς με χρόνια νεφρική ανεπάρκεια. Εντούτοις, σε ασθενείς με διαβητική νεφροπάθεια η χρόνια χορήγηση ανταγωνιστών δεν είχε επιθυμητά αποτελέσματα σύμφωνα με τη μελέτη ASCEND. Ένα άλλο πιθανό όφελος από τη χρήση ανταγωνιστών των υποδοχέων της ET-1 στη νεφρική ανεπάρκεια σχετίζεται με την πιθανή συμβολή της ET-1 στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων των παραθυρεοειδών, που μπορεί να οδηγήσει στην ανάπτυξη δευτεροπαθούς υπερπαραθυρεοειδισμού. Στοιχεία από πειραματικές μελέτες δείχνουν ότι οι ανταγωνιστές των ETA- και ETB-υποδοχέων μπορεί να αναστείλουν τον πολλαπλασιασμό των παραθυρεοειδών κυττάρων.

2.4 Ενδοθηλίνη και αθηρωμάτωση

Αυξανόμενα στοιχεία έχουν δείξει ότι η ενδοθηλίνη-1 εμπλέκεται στην ανάπτυξη της αθηροσκλήρωσης. Τόσο η ενδοθηλίνη-1 όσο και οι υποδοχείς της φαίνεται ότι υπερεκφράζονται σε βλάβες από πρότυπα πειραματόζων, όσο και σε αθηρωματικές αλλοιώσεις ανθρώπων.^[52] Αυξημένα επίπεδα ενδοθηλίνης-1 έχουν βρεθεί σε πειραματόζωα στα οποία χορηγήθηκε τροφή αυξημένη σε λιπαρά, όπως επίσης και στο πλάσμα ασθενών με δυσλιπιδαιμία. Πρόσφατα απεδείχθη σε μια πειραματική μελέτη, σε επίμυες με μετάλλαξη του γονιδίου της απολιποπρωτεΐνης E, ότι τα αυξημένα επίπεδα ενδοθηλίνης ευοδώνουν τη βιοσύνθεση λιπιδίων και επιταχύνουν την αθηρωμάτωση. Ακόμη, βρέθηκε αυξημένη έκφραση ET-1 και μετατροπικού ενζύμου της ET-1^[52] σε ενδοθηλιακά κύτταρα, λεία μυϊκά κύτταρα και μακροφάγα σε διαφορετικά στάδια της εξέλιξης της αθηρωματικής πλάκας.^[69,76]

Έχει περιγραφεί διαφορετική έκφραση των υποδοχέων της ενδοθηλίνης στην αθηροσκλήρυνση. Συγκεκριμένα, αυξημένος αριθμός ETB-υποδοχέων έχει βρεθεί σε αθηροσκληρωτικές αρτηρίες. Η έκφραση αυτή εντοπίζεται σε φλεγμονώδη κύτταρα (μακροφάγα, T λεμφοκύτταρα) και στις λείες μυϊκές ίνες των αγγείων. Έχει προταθεί, ότι τα αφρώδη κύτταρα και τα T-λεμφοκύτταρα ρυθμίζουν μια μετατροπή στην έκφραση από ETA σε ETB-υποδοχείς στις λείες μυϊκές ίνες του αγγειακού ενδοθηλίου.

Σε πειραματικά πρότυπα υπερχοληστερολαιμίας και αθηροσκλήρυνσης βρέθηκε ότι η χρήση ανταγωνιστών των υποδοχέων της ET-1 αυξάνει τη συγκέντρωση και τη δραστικότητα της συνθάσης του NO, βελτιώνοντας έτσι την αγγειοδιαστολή επαγόμενη από το NO, ενώ ταυτόχρονα μειώνει την εξέλιξη της αθηρωματικής πλάκας.^[128] Φάνηκε μάλιστα ότι το αποτέλεσμα από το διπλό αποκλεισμό των υποδοχέων ήταν σημαντικά καλύτερο από αυτό του εκλεκτικού αποκλεισμού των ETA. Επίσης, υπάρχει σημαντική συσχέτιση μεταξύ LDL και ενδοθηλίνης-1. Έχει φανεί ότι τόσο η LDL-χοληστερόλη προάγει την παραγωγή ενδοθηλίνης-1, όσο και ότι η ενδοθηλίνη-1 αυξάνει την πρόσληψη LDL στα ενδοθηλιακά κύτταρα, κυρίως μέσω των ETB-υποδοχέων. Επιπλέον, έχει αποδειχθεί ότι η μείωση της LDL μετά από αγωγή με στατίνες μείωσε την έκφραση του mRNA της πρεπρο-ET-1. Τα δεδομένα αυτά υποστηρίζουν τον ρόλο που πιθανά διαδραματίζει η ET-1 στη δυσλειτουργία του ενδοθηλίου και την πρόοδο της

αθηροσκλήρυνσης και καταδεικνύουν μια πιθανή θεραπευτική δράση των ανταγωνιστών της ET-1.^[7,9]

2.5 Ενδοθηλίνη και αναπνευστικό σύστημα

2.5.1 Ενδοθηλίνη-1 και Βρογχικό Άσθμα

Η ET-1 προκαλεί βρογχόσπασμο, ο οποίος πιθανώς να οφείλεται στη διέγερση παραγωγής θρομβοξάνης, με επακόλουθη ενεργοποίηση των υποδοχέων της θρομβοξάνης που βρίσκονται στα λεία μυϊκά κύτταρα των βρογχιολίων. Καλλιεργημένα ανθρώπινα επιθηλιακά κύτταρα βρογχιολίων εκκρίνουν ET-1, και το πεπτίδιο μπορεί να δεσμευτεί από γειτονικά λεία μυϊκά κύτταρα. Ασθενείς με άσθμα έχουν υψηλά επίπεδα ET-1 στο αίμα, στη σίελο και στο βρογχοκυψελιδικό έκπλυμα, σε σύγκριση με υγιή άτομα και ασθενείς με βρογχίτιδα. Σε ασθενείς με άσθμα που βρίσκονται σε ύφεση έπειτα από θεραπεία με από του στόματος γλυκοκορτικοειδή ή εισπνεόμενους β2-αγωνιστές, η συγκέντρωση της ET-1 στο βρογχικό έκπλυμα είναι μειωμένη κατά 75%.^[20]

2.5.2 Ενδοθηλίνη-1 και ARDS

Το ARDS (Acute Respiratory Distress Syndrome) αφορά σε μια ποικιλία οξέων βλαβών του πνεύμονα, τα οποία έχουν ως αποτέλεσμα τον περιορισμό της ανταλλαγής αερίων, την διαταραχή της μηχανικής των πνευμόνων. Η κλινική επιδείνωση του ARDS έχει συσχετιστεί με αυξημένα επίπεδα ET-1 στο αρτηριακό και φλεβικό αίμα. Η βλάβη του πνεύμονα τις περισσότερες φορές οφείλεται σε σήψη, αλλά μπορεί να προκληθεί από ποικίλες άλλες καταστάσεις. Σε ζωικά πρότυπα με βλάβη του πνεύμονα διαπιστώθηκε ότι η σήψη, μέσω ενδοτοξίνης που απελευθερώνεται κατά την διάρκεια αυτής, προκαλεί αύξηση των επιπέδων ET-1 στο πλάσμα. Είναι ενδιαφέρον το γεγονός ότι παρουσία BQ-123 αναστέλλεται η διαταραχή των αερίων αίματος και των δεικτών πνευμονικού οιδήματος οι οποίοι παρατηρούνται στα πειράματα αυτά.

2.6 Ενδοθηλίνη και αυτοάνοσα νοσήματα

Έχει αποδειχτεί από κλινικές μελέτες ότι η ενδοθηλίνη παίζει σημαντικό ρόλο στην παθογένεση πολλών ρευματικών παθήσεων. Αυτές περιλαμβάνουν συστηματικό Σκληρόδερμα (SSc) -γενικευμένο ή σύνδρομο CREST-, πρωτοπαθές και δευτεροπαθές φαινόμενο Raynaud, συστηματικό ερυθματώδη λύκο, νόσο του Buerger, αρτηρίτιδα Takayasu και πολυμυοσίτιδα. Επίσης, η ενδοθηλίνη-1 υπερεκφράζεται τόσο στα πρώιμα όσο και στα όψιμα στάδια της συστηματικής σκλήρυνσης. Αυξημένα επίπεδα ET-1 και των υποδοχέων της έχουν βρεθεί σε δερματικές βλάβες ασθενών με συστηματική σκλήρυνση, όπως και στα αγγεία, τους πνεύμονες και τους νεφρούς.

2.7 Ενδοθηλίνη και νεοπλασίες

Η ET-1 ασκεί δράσεις στα καρκινικά κύτταρα, όπως στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, την απόπτωση, την κυτταρική μετανάστευση και τη νεοαγγειογένεση. Έτσι, για παράδειγμα, σε ασθενείς με καρκίνο του προστάτη φάνηκε ότι η χορήγηση ενός εκλεκτικού ETA-υποδοχέα καθυστέρησε την πορεία της νόσου. Η χρήση των ανταγωνιστών ενδοθηλίνης ίσως έχει μελλοντικό ρόλο στην θεραπεία των νεοπλασιών.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3^ο

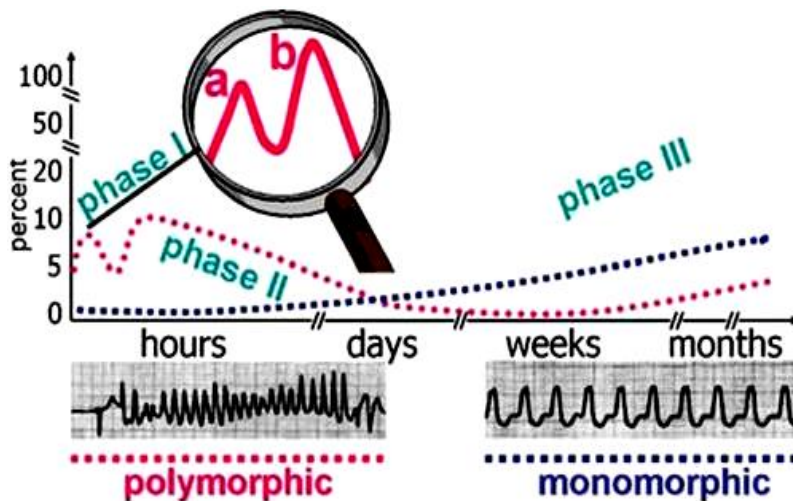
ΗΛΕΚΤΡΟΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΜΕΤΑΒΟΛΕΣ ΣΕ ΙΣΧΑΙΜΙΑ/ ΕΜΦΡΑΓΜΑ

Η απόφραξη μιας στεφανιαίας αρτηρίας προκαλεί σημαντικές μεταβολές στις ηλεκτροφυσιολογικές ιδιότητες των μυοκαρδιακών κυττάρων. Οι μεταβολές αυτές έχουν σαν συνέπεια την πρόκληση κολπικών, αλλά κυρίως κοιλιακών αρρυθμιών, με πολλούς μηχανισμούς. Οι ισχαιμικές αρρυθμίες εξαρτώνται από την έκταση και την εντόπιση της ισχαιμίας, από τη δράση του αυτόνομου νευρικού συστήματος, από την λειτουργική και δομική κατάσταση του μυοκαρδίου, καθώς και από τη λειτουργία των ιοντικών διαύλων.^[62,63,64]

Η εμφάνιση κοιλιακών αρρυθμιών μετά την ισχαιμία του μυοκαρδίου ακολουθεί μια διφασική κατανομή.^[95] Η ανομοιογενής χρονική κατανομή των κοιλιακών αρρυθμιών οφείλεται στους διαφορετικούς αρρυθμογενετικούς μηχανισμούς που δραστηριοποιούνται ανάλογα με τη χρονική διάρκεια της ισχαιμίας. Οι ισχαιμικές αρρυθμίες μπορούν να διαιρεθούν σε αυτές που εμφανίζονται τις πρώτες μία ή δύο ώρες (φάση I) από την έναρξη της ισχαιμίας και σε αυτές που εμφανίζονται μετά την τρίτη ώρα, μέχρι τις πρώτες 24-48 ώρες από την οξεία απόφραξη (φάση II). Ανάμεσα στις δύο αυτές φάσεις, για αδιευκρίνιστους ακόμα λόγους, μεσολαβεί ένα χρονικό διάστημα χαμηλής αρρυθμογένεσης. Οι ηλεκτροφυσιολογικές μεταβολές στην χρόνια φάση του εμφράγματος αναφέρονται σαν αρρυθμίες φάσης III.^[27,51]

Πειραματικά δεδομένα συνηγορούν υπέρ της θέωσης ότι και η φάση I μπορεί να διαιρεθεί σε δύο επιμέρους φάσεις (εικόνα 8), που ονομάζονται Ia και Ib, με ένα διάστημα χαμηλής αρρυθμογένεσης μεταξύ των επιμέρους φάσεων. Η φάση Ia εμφανίζεται μέσα σε δευτερόλεπτα ή λεπτά από την έναρξη της ισχαιμίας και διαρκεί περίπου 15 λεπτά, ενώ ακολουθεί η φάση Ib που διαρκεί έως το τέλος της φάσης I. Η ταξινόμηση αυτή είναι σύμφωνη με κλινικές και επιδημιολογικές παρατηρήσεις, όπου δείχνουν ότι ένα ποσοστό των ασθενών πεθαίνει αιφνίδια από κοιλιακή μαρμαρυγή σχεδόν αμέσως μετά την

απόφραξη της στεφανιαίας αρτηρίας ενώ ένα άλλο ποσοστό εμφανίζει κοιλιακές αρρυθμίες μετά από λίγη ώρα, συχνά μέσα στο ασθενοφόρο καθ' οδό προς το πλησιέστερο νοσοκομείο. Αντίθετα, οι κοιλιακές αρρυθμίες που εμφανίζονται κατά τη φάση II είναι αυτές που καταγράφονται ενδονοσοκομειακά τα δύο πρώτα εικοσιτετράωρα μετά την οξεία απόφραξη της στεφανιαίας αρτηρίας.^[19,101]



**Εικόνα 8.ΦΑΣΕΙΣ
ΑΡΡΥΘΜΙΟΓΕΝΕΣΣΗΣ ΜΕΤΑ ΟΞΥ
ΕΜΦΡΑΓΜΑ ΜΥΟΚΑΡΔΙΟΥ**

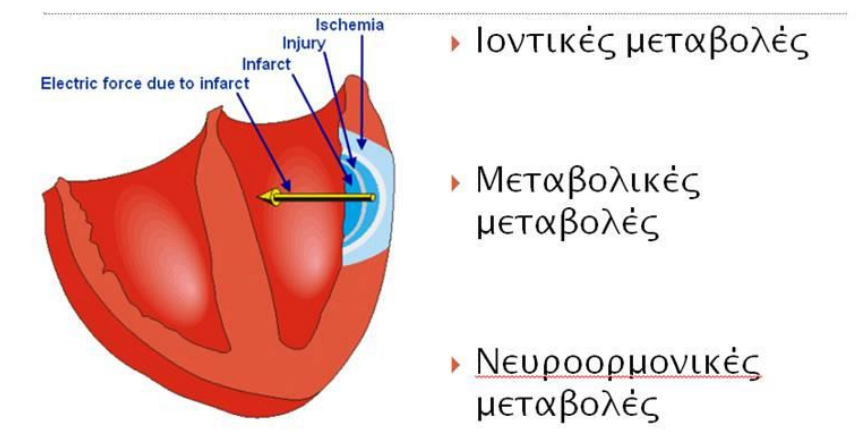
Οι ισχαιμικές κοιλιακές αρρυθμίες μπορούν να διαιρεθούν σε αρρυθμίες φάσης I, που εμφανίζονται τα πρώτα λεπτά από την έναρξη της ισχαιμίας (φάση Ια) μέχρι τις πρώτες 2 ώρες (φάση Ιβ) και σε αρρυθμίες φάσης II που εμφανίζονται από την 3^η μέχρι την 48^η ώρα. Η χρόνια φάση αναφέρεται σαν φάση III

3.1 Αρρυθμίες φάσης I

Η ισχαιμία μεταβάλλει τις ηλεκτρικές και μηχανικές ιδιότητες των μυοκαρδιακών κυττάρων. Προκαλεί πολλές παθοφυσιολογικές μεταβολές, οι οποίες μεταβάλλουν είτε τη συχνότητα εμφάνισης των πυροδοτών είτε τις ηλεκτροφυσιολογικές ιδιότητες του μυοκαρδίου, και να δημιουργήσουν τις συνθήκες ενός λειτουργικού κυκλώματος επανεισόδου. Η έναρξη των αρρυθμιών της φάσης I συνήθως πυροδοτείται από κάποια πρόωμη κοιλιακή συστολή ή από πολλές πρόωμες κοιλιακές συστολές στη σειρά.^[101]

Οι σημαντικότεροι παθοφυσιολογικοί μηχανισμοί κατά την οξεία φάση της ισχαιμίας είναι οι παρακάτω:

- A) Υπερκαλιαιμία
- B) Οξέωση
- Γ) Ενεργοποίηση διαύλων καλίου εξαρτώμενων από την τριφωσφορική αδενοσίνη
- Δ) Θρομβίνη



Εικόνα 9.

Οι πυροδοτούμενες από την ισχαιμία του μυοκαρδίου ηλεκτροφυσιολογικές αλλαγές που προκαλούν τις κοιλιακές αρρυθμίες είναι σύνθετες και δεν έχουν κατανοηθεί ακόμα καλά. Ποικίλοι μηχανισμοί ενεργοποιούνται όπως ιοντικές και μεταβολικές αλλαγές αλλά και ενεργοποίησή τόσο του τοπικού όσο και του συστηματικού νευροορμονικού

Υπερκαλιαιμία

Η κύρια ηλεκτροφυσιολογική μεταβολή της μυοκαρδιακής υποξίας που προκαλείται από την οξεία απόφραξη της στεφανιαίας αρτηρίας είναι η αύξηση της εξωκυττάριας συγκέντρωσης καλίου. Η μεταβολή αυτή εμφανίζεται μόλις 15 δευτερόλεπτα μετά από την έναρξη της ισχαιμίας και φτάνει στη μέγιστη τιμή της μετά από πέντε λεπτά. Αυτός θεωρείται ένας βασικός παθοφυσιολογικός μηχανισμός αρρυθμογένεσης κατά τη φάση Ια. Η αύξηση της εξωκυττάριας συγκέντρωσης ιόντων καλίου προκαλεί αύξηση της αγωγιμότητας της κυτταρικής μεμβράνης για τα ιόντα καλίου, με αποτέλεσμα την επιτάχυνση της επαναπόλωσης και την βράχυνση του δυναμικού ενεργείας. Η αύξηση της

εξωκυττάρια συγκέντρωσης ιόντων καλίου προκαλεί παράταση της ανερέθιστης περιόδου. Η μείωση της διάρκειας του δυναμικού ενεργείας σε συνδυασμό με την αύξηση της ανερέθιστης περιόδου έχει σαν αποτέλεσμα την παράταση της ανερέθιστης περιόδου και μετά το τέλος του δυναμικού ενεργείας.

Οξέωση

Οι άμεσες επιδράσεις της ισχαιμίας περιλαμβάνουν επίσης την οξέωση, απόρροια αυξημένης παραγωγής οξέων, λόγω στροφής από τον αερόβιο προς τον αναερόβιο μεταβολισμό. Η οξέωση προκαλεί μείωση της ευαισθησίας των συσταλτών πρωτεϊνών στο ασβέστιο, με αποτέλεσμα τη μείωση της ισχύος της μηχανικής συστολής. Λόγω της οξέωσης, μεταβάλλεται η λειτουργία ιοντικών διαύλων της κυτταρικής μεμβράνης, με τελικό αποτέλεσμα την αύξηση του εσώστροφου ρεύματος ασβεστίου. Η αυξημένη ενδοκυττάρια συγκέντρωση ιόντων ασβεστίου προκαλεί πρώιμες και όψιμες μετεκπολώσεις, καθώς και κοιλιακή ταχυκαρδία από πυροδοτούμενη δραστηριότητα.^[62,118]

Ενεργοποίηση των διαύλων καλίου εξαρτώμενων από την τριφωσφορική αδενοσίνη

Μια άλλη σημαντική ηλεκτροφυσιολογική μεταβολή σε κυτταρικό επίπεδο, ως αποτέλεσμα της ισχαιμίας, είναι η ενεργοποίηση των διαύλων καλίου εξαρτώμενων από την τριφωσφορική αδενοσίνη, οι οποίοι είναι ανενεργοί κάτω από φυσιολογικές συνθήκες. Η ενεργοποίηση αυτή προκαλεί ένα εξώστροφο ιοντικό ρεύμα καλίου, προκαλώντας αύξηση του διαστολικού δυναμικού της κυτταρικής μεμβράνης των ισχαιμικών κυττάρων, με αποτέλεσμα την εμφάνιση παθολογικού αυτοματισμού. Οι μεταβολές αυτές δεν είναι ομοιόμορφες στο ισχαιμικό μυοκάρδιο. Μεταβολές στις ηλεκτροφυσιολογικές ιδιότητες παρατηρούνται τόσο σε διάφορες περιοχές με διαφορετικό βαθμό ισχαιμίας, όσο και στην ίδια ισχαιμική περιοχή ανάμεσα στο επικάρδιο και το ενδοκάρδιο. Η αύξηση της εξωκυττάριας συγκέντρωσης ιόντων καλίου προκαλεί μείωση της ταχύτητας αγωγής, σε συνδυασμό με αύξηση της ανερέθιστης περιόδου, διαταραχές που δημιουργούν τις προϋποθέσεις σχηματισμού λειτουργικού κυκλώματος επανεισόδου.^[62]

Θρομβίνη

Ένας άλλος μηχανισμός αρρυθμογένεσης κατά τη φάση I της οξείας ισχαιμίας, είναι η αυξημένη παραγωγή θρομβίνης, προερχόμενη από τον σχηματισμού θρόμβου σε μια αθηρωματική πλάκα. Η θρομβίνη έχει αρρυθμογόνο δράση με δύο μηχανισμούς: *Πρώτον*, μέσω ενεργοποίησης της φωσφολιπάσης C, και, συνεπώς, απενεργοποίησης των διαύλων νατρίου και *δεύτερον*, μέσω ενεργοποίησης του ανταλλαγέα νατρίου/υδρογόνου. Αποτέλεσμα και των δύο μηχανισμών είναι η μείωση της ταχύτητας αγωγής.

3.2 Αρρυθμίες φάσης II

Αντλία νατρίου-καλίου

Κατά τη διάρκεια παρατεταμένης ισχαιμίας, προκαλείται εξάντληση των αποθεμάτων τριφωσφορικής αδενοσίνης και αναστολή της αντλίας νατρίου/καλίου. Αυτό οδηγεί σε αύξηση της εισροής ιόντων νατρίου κατά τη διάρκεια της διαστολής και αύξηση του παθολογικού αυτοματισμού. Κατά τη διάρκεια της ισχαιμίας του μυοκαρδίου συνυπάρχουν πολλοί παράγοντες που προκαλούν πρώιμες μετεκπολώσεις και πυροδοτούμενη δραστηριότητα, όπως αύξηση της τοιχωματικής τάσης, ιστική υποξία και υπερκατεχολαναιμία.

Ιοντικό ρεύμα βλάβης

Κατά τη διάρκεια παρατεταμένων περιόδων ισχαιμίας προκαλείται μερική εκπόλωση σε ορισμένα σημεία του μυοκαρδίου. Σε μερικώς εκπολωμένα κύτταρα, η μεταβολή του δυναμικού της κυτταρικής μεμβράνης αυξάνει την είσοδο ιόντων ασβεστίου, προκαλώντας αύξηση στην ενδοκυττάρια συγκέντρωσή τους, η οποία με τη σειρά της μπορεί να επιβραδύνει την αγωγή λόγω αύξησης της αντίστασης των χασματικών συνάψεων.

Κάθε χρονική στιγμή, υπάρχουν περιοχές στο ισχαιμικό μυοκάρδιο με διαφορετικές ταχύτητες αγωγής και διαφορετικές ανερέθιστες περιόδους. Λόγω της διαφοράς δυναμικού στη μεμβράνη κυττάρων από δύο μυοκαρδιακές περιοχές μπορεί να σχηματιστεί ροή

ιόντων από τα μερικώς εκπολωμένα προς τα λιγότερο εκπολωμένα κύτταρα. Η ροή αυτή ονομάζεται ιοντικό ρεύμα βλάβης. Αυτό το ρεύμα, σε συνδυασμό με τον σχηματισμό κυκλωμάτων επανεισόδου, συντελεί στην πρόκληση κοιλιακής ταχυκαρδίας.

Παθολογικός αυτοματισμός

Η ροή του ιοντικού ρεύματος βλάβης μεταξύ του μερικώς εκπολωμένου ισχαιμικού μυοκαρδίου και των κυττάρων με φυσιολογικό διαστολικό δυναμικό της κυτταρικής μεμβράνης προκαλεί παθολογικό αυτοματισμό. Οι ίνες του Purkinje που βρίσκονται στο υπενδοκάρδιο της ενδιάμεσης περιοχής μεταξύ του εμφράγματος και της υγιούς περιοχής εμφανίζουν μειωμένη ενδοκυττάρια συγκέντρωση καλίου, που προκαλεί χαμηλό δυναμικό στη μεμβράνη αυτών των κυττάρων. Αυτή η διαταραχή μπορεί να διατηρηθεί για πολλές ημέρες μετά την απόφραξη της στεφανιαίας αρτηρίας και ευθύνεται για επεισόδια επιταχυνόμενου ιδιοκοιλιακού ρυθμού που παρατηρούνται σε ασθενείς με έμφραγμα του μυοκαρδίου.^[62,95]

Λειτουργικά κυκλώματα επανεισόδου

Σε μερικώς εκπολωμένο ισχαιμικό μυοκάρδιο μπορούν να δημιουργηθούν συνθήκες κυκλώματος επανεισόδου. Στο μυοκάρδιο αυτό υπάρχουν κύτταρα με διαφορετικές τιμές διαστολικού δυναμικού της κυτταρικής μεμβράνης. Σε μια ισχαιμική περιοχή, μπορεί να υπάρχουν τμήματα βραδείας αγωγής και άλλα με αποκλεισμό αγωγής, που εξαρτώνται από το επίπεδο του δυναμικού ηρεμίας. Οι διαφορετικές ταχύτητες αγωγής και διαφορετικές ανερέθιστοι περίοδοι στις δύο περιοχές θέτουν τις προϋποθέσεις δημιουργίας λειτουργικού κυκλώματος επανεισόδου.^[62,95]

Αρρυθμίες από αυξημένη τοιχωματική τάση

Ένας άλλος μηχανισμός αρρυθμογένεσης κατά τη διάρκεια αυξημένης ισχαιμίας είναι αποτέλεσμα της ενεργοποίησης των υποδοχέων τάσης. Οι υποδοχείς αυτοί ενεργοποιούνται από την αυξημένη τοιχωματική τάση, λόγω μείωσης της συστολικής και διαστολικής λειτουργίας της αριστεράς κοιλίας από την ισχαιμία.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4^ο

ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΟΥ ΑΥΤΟΝΟΜΟΥ ΝΕΥΡΙΚΟΥ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ ΣΤΗΝ ΚΟΙΛΑΚΗ ΑΡΡΥΘΜΙΟΓΕΝΝΕΣΗ

Η αυτόνομη νεύρωση της καρδιάς αποτελείται από τη συμπαθητική και την παρασυμπαθητική, και εμφανίζει ασύμμετρη κατανομή. Τα δεξιά συμπαθητικά και παρασυμπαθητικά νεύρα επηρεάζουν περισσότερο το φλεβόκομβο, ενώ τα αριστερά περισσότερο τον κολποκοιλιακό κόμβο.^[62,118,137]

Συμπαθητική νεύρωση

Οι συμπαθητικές προγαγγλιακές ίνες που νευρώνουν την καρδιά ξεκινούν από τη θωρακική μοίρα του συμπαθητικού στελέχους και καταλήγουν στα αυχενικά γάγγλια και στο θωρακοαυχενικό γάγγλιο. Από τα γάγγλια αυτά εκπορεύονται νευρικές ίνες που ενώνονται με τις ίνες του πνευμονογαστρικού, και σχηματίζουν τα καρδιακά πλέγματα, τα οποία παρέχουν τις νευρικές απολήξεις της καρδιάς. Το συμπαθητικό νευρικό σύστημα αυξάνει την συχνότητα εκπόλωσης του φλεβόκομβου, όπως και τον αυτοματισμό των κολπικών και κοιλιακών μυοκαρδιακών κυττάρων. Επίσης, αυξάνει την ισχύ της μηχανικής συστολής και την ταχύτητα αγωγής στον κολποκοιλιακό κόμβο, μειώνοντας την ανερέθιστη περίοδο των κυττάρων του. Η επίδραση της διέγερσης του συμπαθητικού ασκείται μέσω της ενεργοποίησης των διαύλων ασβεστίου τύπου L. Η ενεργοποίηση του συμπαθητικού νευρικού συστήματος προάγει την φωσφορυλίωση πολλών ενδοκυττάρων πρωτεϊνών. Αυτό επιτυγχάνεται μέσω τόσο της πρωτεϊνικής κινάσης όσο και της καλμοδουλίνης. Οι υποδοχείς μέσω των οποίων ασκεί τη δράση του το συμπαθητικό σύστημα καλούνται αδρενεργικοί υποδοχείς, και ενεργοποιούνται από την επινεφρίνη και την νορεπινεφρίνη.

Οι αδρενεργικοί υποδοχείς βρίσκονται παντού στην καρδιά. Στο ενδοθήλιο των αγγείων οι α1-αδρενεργικοί υποδοχείς προκαλούν αγγειοσυσπαση. Στο μυοκάρδιο των κοιλιών, οι α1-αδρενεργικοί υποδοχείς συνδέονται με τις Gq-πρωτεΐνες, οι οποίες, μόλις ενεργοποιηθούν, διασπών την 4-5 διφωσφορική φωσφατιδυλινοσιτόλη σε διακυλγλυκερόλη και τριφωσφορική ινοσιτόλη.

Οι β-αδρενεργικοί υποδοχείς αποτελούν τους κύριους υποδοχείς του συμπαθητικού νευρικού συστήματος στη καρδιά. Στο φυσιολογικό μυοκάρδιο επικρατούν οι τύπου β1-αδρενεργικοί υποδοχείς, ενώ σε παθολογικές καταστάσεις, αυξάνεται η έκφραση των β2-αδρενεργικών υποδοχέων. Οι β2-αδρενεργικοί υποδοχείς συνδέονται είτε με τις ενδοκυττάριας πρωτεΐνες Gs είτε με τις Gi. Με αυτό τον τρόπο, ενεργοποιείται η αδενυλική κυκλάση και αυξάνονται τα επίπεδα της κυκλικής μονοφωσφορικής αδενοσίνης (cAMP), η οποία με τη σειρά της ενεργοποιεί την πρωτεϊνική κινάση A. Η τελευταία τροποποιεί τη διακίνηση του ασβεστίου.

Το συμπαθητικό νευρικό σύστημα επιταχύνει την ενεργητική χάλαση του μυοκαρδίου, μειώνοντας την ενδοκυττάρια συγκέντρωση ιόντων ασβεστίου μετά την ολοκλήρωση της μηχανικής συστολής. Η επιτάχυνση της ενεργητικής χάλασης προκαλείται από την φωσφορυλίωση της τροπονίνης I, επιταχύνοντας έτσι την αποδέσμευση του ασβεστίου από το σύμπλεγμα των τροπονινών. Κυρίως όμως, η φωσφορυλίωση της φωσφολαμβάνης επιταχύνει την επαναπρόσληψη ασβεστίου στο σαρκοενδοπλασματικό δίκτυο, αυξάνοντας το ασβέστιο που είναι διαθέσιμο για την επόμενη συστολή.

Ο ρόλος του συμπαθητικού νευρικού συστήματος στην αρρυθμογένεση κατά την οξεία ισχαιμία έχει περιγραφεί από πολλά χρόνια. Η αυξημένη έκκριση νορεπινεφρίνης και κυρίως επινεφρίνης από τον μυελό των επινεφριδίων προκαλεί αύξηση της ενδοκυττάριας συγκέντρωσης ιόντων ασβεστίου, και αρρυθμίες από πυροδοτούμενη δραστηριότητα λόγω πρώιμων και όψιμων μετεκπολώσεων. Επίσης, κατά την ισχαιμία προκαλούνται σημαντικές μεταβολές στην απέκκριση της νορεπινεφρίνης από τις νευρικές απολήξεις του συμπαθητικού νευρικού συστήματος. Η παρατεταμένη ισχαιμία προκαλεί αναστολή της επαναπρόσληψης νορεπινεφρίνης, με αποτέλεσμα την τεράστια αύξηση της εξωκυττάριας συγκέντρωσης της νορεπινεφρίνης.

Παρασυμπαθητική νεύρωση

Η παρασυμπαθητική νεύρωση της καρδιάς προέρχεται από το πνευμονογαστρικό νεύρο. Οι προγαγγλιακές καρδιακές ίνες του πνευμονογαστρικού καταλήγουν στο καρδιακό πλέγμα, από όπου εκπορεύεται η παρασυμπαθητική καρδιακή νεύρωση. Η διέγερση του δεξιού πνευμονογαστρικού νεύρου επιβραδύνει τη συχνότητα εκπόλωσης του φλεβόκομβου, προκαλώντας φλεβοκομβική βραδυκαρδία ή και φλεβοκομβική παύση. Η διέγερση του αριστερού πνευμονογαστρικού νεύρου κυρίως μειώνει την ταχύτητα αγωγής και αυξάνει την ανερέθιστη περίοδο του κολποκοιλιακού κόμβου. Οι υποδοχείς μέσω των οποίων ασκεί τη δράση του το παρασυμπαθητικό καλούνται μουσκαρινικοί υποδοχείς, οι οποίοι ενώνονται με την ακετυλχολίνη. Έχουν περιγραφεί τρεις τύποι μουσκαρινικών υποδοχέων. Ο πρώτος τύπος, M1, βρίσκεται στις νευρικές απολήξεις, ο δεύτερος τύπος, M2, στη καρδιά, και ο τρίτος, M3, στο αγγειακό ενδοθήλιο. Το κοιλιακό μυοκάρδιο έχει πολύ λίγους μουσκαρινικούς υποδοχείς. Οι μουσκαρινικοί υποδοχείς ενώνονται με τις πρωτεΐνες Gi, η ενεργοποίηση των οποίων αναστέλλει την αδενυλική κυκλάση.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5^ο

ΕΝΔΟΘΗΛΙΝΗ ΚΑΙ ΚΑΡΔΙΑ

5.1 Καρδιακή ανεπάρκεια και ενδοθηλίνη-1

Η χρόνια καρδιακή ανεπάρκεια είναι μια πολύ σημαντική αιτία νοσηρότητας και θνησιμότητας όσον αφορά τις παθήσεις του καρδιαγγειακού συστήματος. Στις περισσότερες περιπτώσεις, χαρακτηρίζεται από χαμηλή καρδιακή παροχή, που οδηγεί προοδευτικά σε αιμοδυναμικές και νευροορμονικές προσαρμογές, όπως η περιφερική αγγειοσύσπαση, η κατακράτηση άλατος και νερού, και η ενεργοποίηση του συμπαθητικού συστήματος και του συστήματος ρενίνης-αγγειοτενσίνης-αλδοστερόνης.

Το σύστημα της ενδοθηλίνης ενεργοποιείται στην καρδιακή ανεπάρκεια, όπως και άλλα συστήματα. Οι συγκεντρώσεις της big-ET-1 και της ET-1 στο πλάσμα έχουν συνδεθεί με κλινικές και αιμοδυναμικές μετρήσεις ιδιαίτερης σοβαρότητας για τους ασθενείς με χρόνια καρδιακή ανεπάρκεια, και έχουν αντιστρόφως ανάλογη σχέση με την πρόγνωση αυτών των ασθενών. Επιπρόσθετα, ενώ σε μία φυσιολογική καρδιά η ET-1 φαίνεται να ασκεί θετική ινότροπο δράση, σε μια καρδιά με ανεπάρκεια η χορήγηση ανταγωνιστών των υποδοχέων A της ET-1 μπορεί να αυξάνει τη συσταλτικότητα της, δείχνοντας ότι σε τέτοια περίπτωση η ET-1 μπορεί να έχει αρνητική ινότροπο δράση.

Ένας μεγάλος αριθμός κλινικών μελετών σε ασθενείς με καρδιακή ανεπάρκεια σταδίου III κατά WHO έχουν ολοκληρωθεί τόσο για την οξεία όσο και την χρόνια καρδιακή ανεπάρκεια. Ενώ οι πρώτες πειραματικές μελέτες είχαν ευνοϊκά αποτελέσματα, η έως σήμερα πληροφορία δεν δείχνουν ιδιαίτερα θετικά αποτελέσματα από τη χρήση ανταγωνιστών των υποδοχέων της ενδοθηλίνης σε αυτές τις καταστάσεις.^[80]

Η νταρουσεντάνη είναι ένας εκλεκτικός ανταγωνιστής των ETA-υποδοχέων, που χορηγείται per os, και έχει μελετηθεί τόσο σε σχέση με τις άμεσες όσο και με τις χρόνιες επιδράσεις σε ασθενείς με μετρίου βαθμού καρδιακή ανεπάρκεια.^[117] Σε πειραματικές μελέτες, βρέθηκε ότι ο παραπάνω ανταγωνιστής περιόρισε την προοδευτική επιδείνωση της καρδιακής λειτουργίας και βελτίωσε τις αιμοδυναμικές παραμέτρους και την

λειτουργία της αριστερής κοιλίας μετά έπειτα από απολίνωση των στεφανιαίων αρτηριών. Παρατηρήθηκε σημαντική μείωση των πνευμονικών και συστηματικών αγγειακών αντιστάσεων, και η καρδιακή παροχή βελτιώθηκε σημαντικά, χωρίς να αυξηθεί η νευροορμονική διέγερση. Με τη χορήγηση ενός περισσότερου εκλεκτικού ανταγωνιστή ETA-υποδοχέων σε κλινικές μελέτες, του BMS19388414, παρατηρήθηκε αιμοδυναμική βελτίωση, η οποία συσχετίστηκε με βελτίωση των συμπτωμάτων της καρδιακής ανεπάρκειας. Όπως με την νταρουσεντάνη, η ουσία ήταν καλώς ανεκτή και δεν προκάλεσε ηπατική δυσλειτουργία. Η μελέτη RITZ (Randomized Intravenous TeZosentan) αποτελείτο από μια ομάδα τεσσάρων διπλών τυφλών μελετών για την αξιολόγηση της δράσης του μικτού ανταγωνιστή των ETA-υποδοχέων και ETB-υποδοχέων υποδοχέων στην οξεία καρδιακή ανεπάρκεια. Εκτός από την RITZ-2 στην οποία το tezosentan σε δόση 50 mg βελτίωσε σημαντικά τον καρδιακό δείκτη και μείωσε την πίεση στα πνευμονικά τριχοειδή με ικανοποιητική ασφάλεια, οι άλλες μελέτες της σειράς αυτής απέτυχαν να δείξουν θετικά αποτελέσματα από τη χορήγηση ανταγωνιστών των υποδοχέων της ενδοθηλίνης.^[80,91]

Όσον αφορά στη χρόνια καρδιακή ανεπάρκεια, η πρώτη μελέτη φάσης III που αναφέρθηκε ήταν η ENCOR (ENrasentan Clinical Outcomes Randomised) στην οποία χρησιμοποιήθηκε ο μικτός ανταγωνιστής enrasentan. Η θεραπεία με enrasentan δεν βελτίωσε την κλινική κατάσταση αυτών των ασθενών. Αντίθετα, συσχετίστηκε με τρεις φορές μεγαλύτερο χρόνο νοσηλείας, τάση για μεγαλύτερη θνητότητα, ενώ το φάρμακο δεν ήταν καλά ανεκτό. Οι μελέτες ENABLE (Endothelin Antagonist Bosentan for Lowering cardiac Events) και EARTH (Endothelin Antagonist Receptor Trial in Heart failure) που ακολούθησαν είχαν επίσης απογοητευτικά αποτελέσματα. Κατά συνέπεια, το ενδιαφέρον για τη χρήση των ανταγωνιστών των υποδοχέων της ενδοθηλίνης στην καρδιακή ανεπάρκεια έχει μειωθεί.^[80]

5.2 Ενδοθηλίνη-1 και οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου

Πειραματικές^[79] και κλινικές^[87,94] μελέτες έχουν αποδείξει ότι η παραγωγή της ενδοθηλίνης-1 αυξάνεται εκσεσημασμένα κατά τη διάρκεια του οξέως εμφράγματος του μυοκαρδίου. Σε ασθενείς με ανεπίπλεκτο έμφραγμα, τα επίπεδα της ενδοθηλίνης-1 αυξάνονται μέσα σε λίγα λεπτά μετά την στεφανιαία απόφραξη, φτάνουν στην μέγιστη τιμή τους μετά από 6 ώρες, και σε 24 ώρες επιστρέφουν σε φυσιολογικές τιμές. Τα αυξημένα επίπεδα ενδοθηλίνης-1 στο πλάσμα κατά τη διάρκεια του οξέως εμφράγματος προέρχονται από αυξημένη παραγωγή τόσο στη καρδιά, όσο και εξωκαρδιακά.^[79,87]

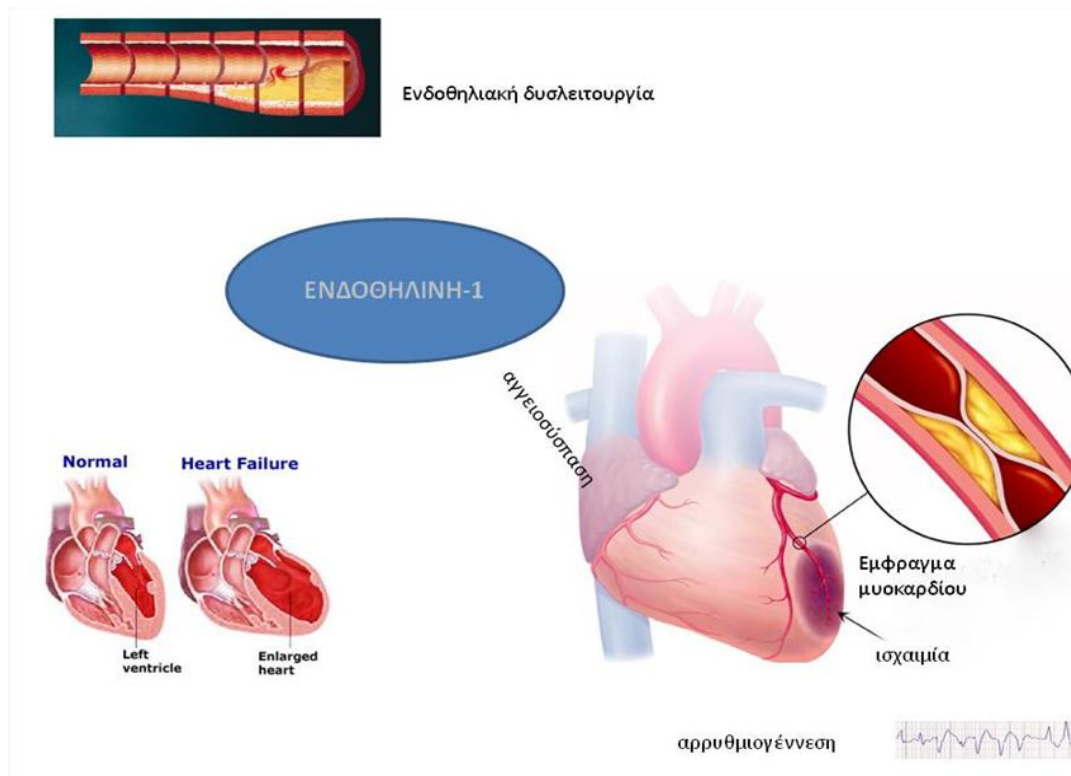
Η ενδοθηλίνη-1 έχει θετική ινότροπη δράση, και βελτιώνει τη δυσλειτουργία της αριστερής κοιλίας, η οποία προκαλείται από την οξεία στεφανιαία απόφραξη. Αυτή η δράση προκαλείται από ενίσχυση του ιοντικού ρεύματος ασβεστίου τύπου L, καθώς και από την επίταση της απελευθέρωσης του ασβεστίου από το σαρκοπλασματικό δίκτυο, η οποία ακολουθεί την ενεργοποίηση της πρωτεϊνικής κινάσης C. Παρόλα αυτά, η θετική ινότροπη δράση της ενδοθηλίνης σχετίζεται με πολλές δυσμενείς επιδράσεις.^[144] Έτσι, τα επίπεδα της ενδοθηλίνης-1 στο πλάσμα συσχετίζονται αντιστρόφως ανάλογα με την πρόγνωση.^[123]

Τις πρώτες ώρες μετά την οξεία απόφραξη, η ενδοθηλίνη-1 προκαλεί αγγειοσύσπαση των στεφανιαίων αρτηριών, αυξάνοντας έτσι την έκταση της μυοκαρδιακής περιοχής. Επιπλέον, η ενδοθηλίνη-1 ασκεί σημαντική αρρυθμογόνο δράση. Κατά συνέπεια οι δύο αυτές επιδράσεις της ενδοθηλίνης-1 είναι πιθανό να αυξάνουν τη θνητότητα κατά τη διάρκεια της οξείας φάσης του εμφράγματος του μυοκαρδίου.

Επιπρόσθετα με την επίδραση κατά τη διάρκεια της οξείας φάσης, η ενδοθηλίνη-1 φαίνεται να διαδραματίζει ρόλο και κατά τη χρόνια φάση του εμφράγματος του μυοκαρδίου. Όμως, οι μακροχρόνιες επιδράσεις της ενδοθηλίνης-1 στο εμφραγματικό μυοκάρδιο δεν είναι διευκρινισμένες, καθώς υπάρχουν αντικρουόμενα αποτελέσματα από προηγούμενες δημοσιευμένες μελέτες.^[20,35,91] Οι αυξητικές δράσεις της ET-1 καθώς και η προαγωγή της ίνωσης συμμετέχουν στη διαδικασία της επούλωσης της εμφραγματικής περιοχής. Η ικανότητα της εμφραγματικής ζώνης να εξισορροπεί την αυξημένη μυοκαρδιακή τάση είναι ύψιστης σημασίας, γιατί μειώνεται έτσι η πιθανότητα

δημιουργίας ανευρύσματος. Επιπλέον, η λέπτυνση και επιμήκυνση της εμφραγματικής ζώνης είναι ο βασικός μηχανισμός έναρξης της κοιλιακής αναδιαμόρφωσης, μιας παθοφυσιολογικής διαδικασίας που μπορεί να οδηγήσει σε χρόνια καρδιακή ανεπάρκεια.^[86]

Η παθολογική αρχιτεκτονική της αριστερής κοιλίας παρέχει υπόστρωμα για την δημιουργία μονόμορφης κοιλιακής ταχυκαρδίας, προερχόμενη από περιοχές του μυοκαρδίου μεταξύ του εμφραγματικού και του φυσιολογικού ιστού.^[124] Έχει αναφερθεί σε κλινικές μελέτες, ότι η αναδιαμόρφωση των κοιλιών είναι ένα σημαντικός προάγγελος αρρυθμιών σε άτομα που έχουν υποστεί έμφραγμα του μυοκαρδίου. Το μυοκάρδιο γύρω από την εμφραγματική ζώνη, αποτελούμενο από ινώδη ιστό και φυσιολογικά μυοκαρδιακά κύτταρα, χαρακτηρίζεται από διαφορετική ταχύτητα αγωγής και ανερέθιστη περίοδο.^[104,121] Σε μια πειραματική εργασία, βρέθηκε θετική επίδραση του διπλού ανταγωνισμού των υποδοχέων ενδοθηλίνης σε μετεμφραγματικούς επίμυες. Συγκεκριμένα, βελτίωσε τους αιμοδυναμικούς δείκτες, άμβλυσε την εμφάνιση καρδιακής ανεπάρκειας και πνευμονικού οιδήματος και αύξησε τους δείκτες επιβίωσης.^[20] Αντίθετα, σε άλλες μελέτες βρέθηκε δυσμενής επίδραση στην έκπτυξη της εμφραγματικής περιοχής και στην αναδιαμόρφωση μετά από εκλεκτικό ανταγωνισμό των ETA-υποδοχέων, καθώς και αυξημένα χρόνια θνητότητα μετά από χορήγηση μικτού αναστολέα των ETA-υποδοχέων και ETB-υποδοχέων. Έτσι, ο παθοφυσιολογικός ρόλος της ενδοθηλίνης -1 στην κοιλιακή αναδιαμόρφωση και στην αρρυθμογένεση της χρόνιας φάσης δεν είναι διευκρινισμένος.



Εικόνα 10. Δράσεις της ενδοθηλίνης στο καρδιαγγειακό σύστημα

5.3 Ηλεκτροφυσιολογικές ιδιότητες της ET-1

Επιπρόσθετα με την αγγειοσυσπαστική και την αυξητική της δράση, η ενδοθηλίνη-1 έχει σημαντικές ηλεκτροφυσιολογικές ιδιότητες.^[84] Υπήρξε αντιπαράθεση απόψεων στην βιβλιογραφία, σχετικά με το εάν αυτές οι επιδράσεις είναι άμεσες ή εάν αυτές είναι συνέπεια της επίτασης της μυοκαρδιακής ισχαιμίας.^[126] Σήμερα, η επικρατούσα άποψη είναι ότι οι δράσεις της ενδοθηλίνης στην αρρυθμογένεση πηγάζουν από ένα συνδυασμό και των δύο.^[132] Η απευθείας δράση της ενδοθηλίνης έχει δημοσιευτεί εδώ και πολύ καιρό, αλλά οι υποκείμενες διεργασίες παραμένουν αδιευκρίνιστες.^[141] Πρόσφατα στοιχεία ενοχοποιούν την ενδοκυττάρια οδό της 1,4,5-τριφωσφορικής ινοσιτόλης, σαν ένα σημαντικό μεσολαβητή των επιδράσεων της ενδοθηλίνης-1 σε κυτταρικό επίπεδο. Η υδρόλυση της 4,5 διφωσφορικής φωσφατιδυλινοσιτόλης από τη φωσφολιπάση C στο

εσωτερικό της κυτταρικής μεμβράνης αποδίδει δύο προϊόντα, την 1,4,5 τριφωσφορική ινοσιτόλη και την διακυλγλυκερόλη. Η 1,4,5 τριφωσφορική ινοσιτόλη είναι ευδιάλυτη στο νερό, διαχέεται στα κύτταρα και συνδέεται σε συγκεκριμένους υποδοχείς. Αυτοί οι υποδοχείς διευκολύνουν την απελευθέρωση ιόντων ασβεστίου από τον αυλό του σαρκοπλασματικού δικτύου στο κυτταρόπλασμα.^[109] Αυτή η δράση ασκείται τόσο στα κολπικά όσο και στα κοιλιακά μυοκαρδιακά κύτταρα. Επιπρόσθετα, η ενεργοποίηση αυτών των υποδοχέων, πιθανόν να προκαλεί απελευθέρωση ασβεστίου κατά τη διαστολή.

Η συγχρονισμένη απελευθέρωση ιόντων ασβεστίου από συστοιχίες των υποδοχέων της τριφωσφορικής ινοσιτόλης κατά τη διάρκεια της διαστολής οδηγεί σε ενδοκυττάρια κύματα ασβεστίου. Η ανάλυση αυτών των κυμάτων διαστολικού ασβεστίου, σε απομονωμένα μυοκαρδιακά κύτταρα των κοιλιών, αποκάλυψε σημαντικές διαφορές τόσο στην χρονική επίπτωση τους, όσο και στην έκταση τους, σε σύγκριση με αυτά που ελήφθησαν μετά από ισοπροτερενόλη.^[102] Αυτά τα μοναδικά χαρακτηριστικά των διαστολικών ρευμάτων ασβεστίου καταδεικνύουν ότι η αρρυθμογενετική δράση της ενδοθηλίνης-1 ασκείται, τουλάχιστον κατά ένα μέρος της, από την ενεργοποίηση της ενδοκυττάρου οδού της τριφωσφορικής ινοσιτόλης. Επιπρόσθετα, η αυξημένη απελευθέρωση ασβεστίου από το σαρκοπλασματικό δίκτυο κατά τη διάρκεια της συστολής πρέπει να συντελεί στην επιμήκυνση της διάρκειας του δυναμικού ενεργείας, οδηγώντας σε πρόωμη επαναπόλωση και σε κοιλιακές αρρυθμίες μέσω πυροδοτούμενης δραστηριότητας.^[84]

5.4 ET-1 και συμπαθητική διέγερση

Ένα σημαντικό κεφάλαιο των συνεπειών της αυξημένης παραγωγής της ενδοθηλίνης-1 κατά τη διάρκεια του οξέος εμφράγματος του μυοκαρδίου είναι η συσχέτιση του συστήματος της ενδοθηλίνης με το συμπαθητικό νευρικό σύστημα. Η σημασία της ενεργοποίησης του συμπαθητικού νευρικού συστήματος στην επίπτωση των κοιλιακών ταχυαρρυθμιών παρουσιάζει σημαντικό ερευνητικό ενδιαφέρον.^[118,136]

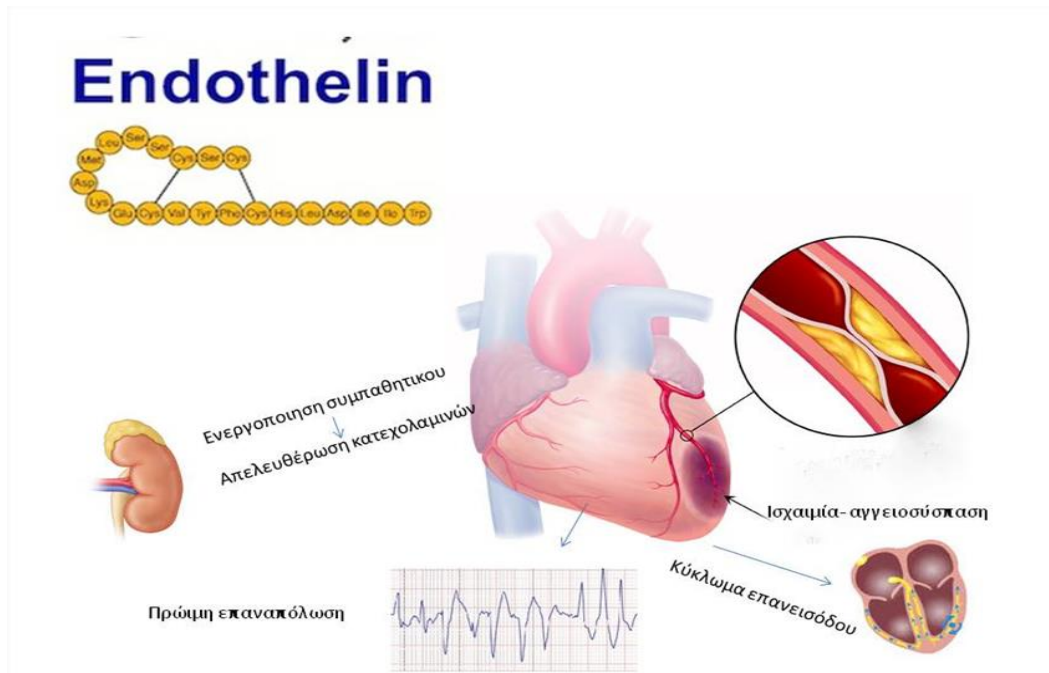
Η συσχέτιση της ενδοθηλίνης-1 και του συμπαθητικού νευρικού συστήματος είναι γνωστή από δεκαετίες, παρ' όλα αυτά, η διαδραστική τους σχέση κατά τη διάρκεια του εμφράγματος και τα συνεπαγόμενα αποτελέσματα παραμένουν αδιευκρίνιστα.^[136] Η συμπαθητική διέγερση από την ενδοθηλίνη-1 είναι πιθανό να συνεισφέρει στην κοιλιακή αρρυθμιογένεση κατά τη διάρκεια του οξέος εμφράγματος, ωστόσο δεν υπάρχουν αρκετά πειραματικά και κλινικά δεδομένα. Επιπλέον, η συνεισφορά των δυο (ETA και ETB) υποδοχέων στην ενεργοποίηση του συμπαθητικού κατά τη διάρκεια του οξέος εμφράγματος του μυοκαρδίου δεν είναι επαρκώς διερευνημένη. Η παθοφυσιολογική σύνδεση της ενδοθηλίνης με τα συμπαθητικό σύστημα φαίνεται να είναι παρούσα τόσο σε επίπεδο επινεφριδίων όσο και σε επίπεδο μυοκαρδίου.

Η ενδοθηλίνη-1 εμπλέκεται στη λειτουργία των επινεφριδίων και αυξάνει το ρυθμό έκκρισης αδρεναλίνης και νοραδρεναλίνης. Παρόλα αυτά, οι ETA και ETB-υποδοχείς φαίνεται να ασκούν αντίθετη δράση στο μυελό των επινεφριδίων.^[89] Σε ένα πειραματικό πρότυπο, η παραγωγή των κατεχολαμινών μειώθηκε μετά τη χορήγηση ενός εκλεκτικού αναστολέα των ETA-υποδοχέων, ενώ ο αναστολέας των ETB-υποδοχέων BQ-788 ήταν αναποτελεσματικός. Όμως, η ανασταλτική επίδραση του αποκλεισμού των ETA-υποδοχέων καταργήθηκε όταν είχε χορηγηθεί προηγουμένως BQ-788.^[89] Βασιζόμενη στην αλληλεπίδραση της ενδοθηλίνης με το συμπαθητικό νευρικό σύστημα σε επίπεδο μυοκαρδίου, πρόσφατη μελέτη δείχνει ότι και οι δύο υποδοχείς της ενδοθηλίνης βρίσκονται στις συμπαθητικές απολήξεις της αριστερής κοιλίας, και ρυθμίζουν την έκκριση της νορεπινεφρίνης.^[53] Σε ζωικό πρότυπο χοίρων, η εξωγενώς χορηγούμενη ενδοθηλίνη-1 αύξησε την έκκριση της νορεπινεφρίνης και τις κοιλιακές ταχυαρρυθμίες με ένα δοσο-εξαρτώμενο τρόπο. Αυτές οι επιδράσεις εξασθένησαν τόσο από τον εκλεκτικό αναστολέα των ETA-υποδοχέων, όσο και από την χορήγηση μικτού αναστολέα.^[53]

Κατά τη διάρκεια ισχαιμίας, βρέθηκαν σημαντικά αυξημένα επίπεδα νορεπινεφρίνης σε καρδιές επίμυων σε πειραματική διάταξη πάλλουσας καρδιάς σε συσκευή Langendorff.^[137] Η αυξημένη έκκριση νοραδρεναλίνης προκλήθηκε μέσω της αύξησης των επιπέδων της ενδοθηλίνης-1, όπως αποδεικνύεται από την μείωση της νορεπινεφρίνης μετά τον αποκλεισμό των υποδοχέων της ενδοθηλίνης. Σε αυτή τη μελέτη, ο εκλεκτικός αποκλεισμός των ETA-υποδοχέων είχε ως αποτέλεσμα την καταστολή της υπερέκκρισης

της νορεπινεφρίνης, με ή χωρίς ταυτόχρονο αποκλεισμό των ETB-υποδοχέων. Αντίθετα, μετά τον εκλεκτικό αποκλεισμό των ETB-υποδοχέων παρατηρήθηκε αυξημένη απελευθέρωση νορεπινεφρίνης. Αυτά τα ευρήματα αναπαρήχθησαν και σε επίμυες με συγγενή έλλειψη του ETB-υποδοχέα, οι οποίοι εμφάνισαν αυξημένη νοραδρεναλίνη, συγκριτικά με φυσιολογικούς επίμυες. Συμπερασματικά, φαίνεται ότι η ενδογενής ενδοθηλίνη-1 προκαλεί σημαντική έκκριση νοραδρεναλίνης από τις απολήξεις των συμπαθητικών νευρώνων σε ισχαιμικούς επίμυες, κυρίως μέσω ενεργοποίησης των ETA-υποδοχέων.^[137]

Εικόνα 11. Ενδοθηλίνη και αρρυθμιογένεση.



Το 2000 οι Crocket και συν. απέδειξαν ότι η χορήγηση sarafotoxin-6c, ενός αγωνιστή των ETB-υποδοχέων μείωσε την επίπτωση των κοιλιακών αρρυθμιών μετά από οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου τόσο σε ένα πειραματικό πρότυπο σε επίμυες in vivo, όσο και σε in vitro πειράματα με απομονωμένες καρδιές επίμυων.^[24] Σε μια άλλη πειραματική μελέτη σε κονίκλους, δεν φάνηκε η χορήγηση sarafotoxin-6c να ασκεί κάποια δράση, αφήνοντας

ανεπιρέαστα τόσο την επίπτωση των μετεμφραγματικών αρρυθμιών όσο και το μονοφασικό δυναμικό ενέργειας (Mc Cabe et al.).^[82] Αντίθετα οι Sharif και συν. βρήκαν ότι η αναστολή της δράσης των ETB-υποδοχέων, μετά τη χορήγηση του PD161721, μείωσε την επίπτωση των κοιλιακών αρρυθμιών μετά από οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου σε επίμυες, εύρημα που αποδίδει πιθανό αρρυθμογεννητικό ρόλο στους ETB-υποδοχείς.^[119] Ο ρόλος των ETB-υποδοχέων περιπλέκεται ακόμα περισσότερο, δεδομένου ότι οι περισσότερες μελέτες μέχρι στιγμής έχουν γίνει σε μοντέλα απομονωμένων καρδιών με αποτέλεσμα να μην λαμβάνεται υπόψη ο ρόλος του αυτόνομου νευρικού συστήματος. Επίσης, στο πειραματικό αυτό πρότυπο δεν παρατηρούνται αρρυθμίες κατά την όψιμη μετεμφραγματική περίοδο. Τέλος, οι μελέτες σε in vivo ζωικά πρότυπα έγιναν σε αναισθητοποιημένα πειραματόζωα, γεγονός που περιορίζει τις παρατηρήσεις σε ένα χρονικό διάστημα μετεμφραγματικά 1-2 ωρών.

Λόγω αυτών των περιορισμών, ο παθοφυσιολογικός ρόλος της ενδοθηλίνης-1 κατά τη διάρκεια του εμφράγματος του μυοκαρδίου διερευνήθηκε περαιτέρω.^[4] Εξετάστηκε η επίδραση του οξέως αποκλεισμού των ETA-υποδοχέων στο μέγεθος του εμφράγματος και στις κοιλιακές αρρυθμίες, και μελετήθηκαν οι πιθανοί παθοφυσιολογικοί μηχανισμοί. Για να αποσαφηνιστούν οι διαφορές που δημοσιεύτηκαν σε προηγούμενες μελέτες, εξετάστηκε η επίδραση της οξείας χορήγησης εκλεκτικού αναστολέα των ETA-υποδοχέων στη μέγιστη δοσολογία. Επίσης, επεκτάθηκε σημαντικά το χρονικό διάστημα της παρακολούθησης και καταγράφηκε το συνολικό φορτίο των αρρυθμιών κατά τη διάρκεια των πρώτων 24 ωρών μετά το οξύ έμφραγμα.^[4] Αυτή η μελέτη διεξήχθη σε 35 αρουραίους Wistar, οι οποίοι τυχαιοποιήθηκαν είτε στον εκλεκτικό ανταγωνιστή των ETA-υποδοχέων BQ-123 ή σε φυσιολογικό ορό και κατόπιν υπέστησαν απολίνωση της αριστερής στεφανιαίας αρτηρίας. Ένα ηλεκτροκαρδιογράφημα μιας απαγωγής καταγραφόταν συνεχώς για 24 ώρες μετά το έμφραγμα, χρησιμοποιώντας ένα εμφυτεύσιμο σύστημα τηλεμετρίας. Βρέθηκε χαμηλότερη επίπτωση των κοιλιακών αρρυθμιών και μικρότερη μέση διάρκεια των επεισοδίων στην ομάδα που έλαβε BQ-123, που είχε σαν αποτέλεσμα και τη μείωση της θνητότητας λόγω αρρυθμιών. Στην ομάδα ελέγχου, παρουσιάστηκε παράταση του μονοφασικού δυναμικού ενεργείας 24 ώρες μετά το έμφραγμα, ενώ στην ομάδα που πήρε BQ-123 παρέμεινε αμετάβλητο. Αυτά τα αποτελέσματα, σε συνδυασμό με προηγούμενα, μαρτυρούν μία απευθείας αντιαρρυθμική δράση του αποκλεισμού των

ΕΤΑ-υποδοχέων μετά το οξύ έμφραγμα.^[105,119] Παρόλα αυτά, η μειωμένη αρρυθμογένεση μετά από τον αποκλεισμό ΕΤΑ μπορεί επίσης να οφείλεται και στη μείωση της ισχαιμίας.

Για να εξεταστεί περαιτέρω ο ρόλος της ενδοθηλίνης-1 στην αρρυθμογένεση κατά το οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου και για να διερευνηθεί η επίδραση του διπλού αποκλεισμού, μελετήθηκαν οι επιδράσεις του bosentan, σε ένα πειραματικό πρότυπο εμφράγματος σε επίμυες.^[65] Μετά από θεραπεία 7 ημερών, τα πειραματόζωα υπέστησαν έμφραγμα του μυοκαρδίου και οι κοιλιακές αρρυθμίες αξιολογήθηκαν για 24 ώρες. Η διάρκεια του δυναμικού ενεργείας μετρήθηκε από μονοφασικές επικαρδιακές καταγραφές, και η ενεργοποίηση του συμπαθητικού αξιολογήθηκε από τη μεταβλητότητα της καρδιακού συχνότητας και από τις τιμές των επιπέδων κατεχολαμινών στον ορό. Συγκριτικά με την ομάδα ελέγχου, το bosentan μείωσε σημαντικά την συνολική διάρκεια των κοιλιακών αρρυθμιών κατά τη διάρκεια της όψιμης μετεμφραγματικής φάσης, με μικρή επίδραση κατά την πρόιμη φάση. Όπως και σε προηγούμενες μελέτες, αυτή η θεραπεία δεν επηρέασε το μέγεθος του εμφράγματος ούτε και τη συνολική θνητότητα. Η διάρκεια του δυναμικού ενεργείας στο 90% της επαναπόλωσης επιμηκύνθηκε στην ομάδα ελέγχου, εμφανίζοντας αυξημένη διασπορά επαναπόλωσης, αλλά διατηρήθηκε σταθερή στα πειραματόζωα που έλαβαν θεραπεία. Το bosentan μείωσε τα επίπεδα της νοραδρεναλίνης, αλλά αύξησε τα επίπεδα της αδρεναλίνης 24 ώρες μετά το έμφραγμα. Το χαμηλό φάσμα συχνοτήτων της μεταβλητότητας της καρδιακής συχνότητας, δείκτης ενεργοποίησης του συμπαθητικού νευρικού συστήματος, ήταν χαμηλότερο στα πειραματόζωα που χορηγήθηκε η ουσία. Επομένως, η διπλή αναστολή των υποδοχέων της ενδοθηλίνης-1 μειώνει τις κοιλιακές ταχυαρρυθμίες κατά τη διάρκεια του οξέος εμφράγματος χωρίς επαναιμάτωση, μέσω κυρίως της μείωσης της επαναπολωτικής ανομοιογένειας.^[65]

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6^ο

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

6.1 Βασική υπόθεση και σκοπός της μελέτης

Βασιζόμενοι στα στοιχεία που συνοψίστηκαν παραπάνω, μπορούμε να κάνουμε την υπόθεση ότι ο αποκλεισμός των υποδοχέων της ενδοθηλίνης-1 κατά τη διάρκεια του εμφράγματος μπορεί να έχει αντιαρρυθμική δράση. Προηγούμενες μελέτες που εξέτασαν αυτή την υπόθεση κατέληξαν σε αντικρουόμενα αποτελέσματα, παρ' όλα αυτά, η ποικιλία των πειραματικών πρωτοκόλλων που χρησιμοποιήθηκαν καθιστούν δύσκολη την εξαγωγή συμπερασμάτων. Επιπρόσθετα, όλες αυτές οι μελέτες είχαν σαν περιορισμό την μελέτη των κοιλιακών αρρυθμιών που εμφανίστηκαν μέχρι και 2 ώρες μετά το έμφραγμα.

Σκοπός της διατριβής ήταν να εξεταστεί και να διευκρινιστεί ο παθοφυσιολογικός ρόλος των ETB-υποδοχέων στην κοιλιακή αρρυθμογένεση κατά τη διάρκεια του οξέως εμφράγματος του μυοκαρδίου. Ειδικότερα μελετήσαμε τις ισχαιμικές κοιλιακές αρρυθμίες (κοιλιακές ταχυκαρδίες και κοιλιακή μαρμαρυγή) και παρατείναμε την χρονική περίοδο παρατήρησης στις 24 ώρες μετά το οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου. Για να διεισδύσουμε καλύτερα στους υποκείμενους μηχανισμούς εκτιμήσαμε την ενεργοποίηση του συμπαθητικού, μετρώντας ηλεκτροκαρδιογραφικούς δείκτες και επίπεδα κατεχολαμινών

6.2 ΥΛΙΚΟ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

6.2.1 Επιλογή είδους πειραματόζωου

Η μελέτη διενεργήθηκε σε δύο ομάδες επίμυων σε *in vivo* πειραματικό πρότυπο. Η μία ομάδα αποτελείτο από άγριου-τύπου επίμυες γένους Wistar και η δεύτερη από επίμυες με ομόζυγη συγγενή έλλειψη του γονιδίου του ETB-υποδοχέα της ενδοθηλίνης. Το συγκεκριμένο πρότυπο προσφέρει πολλά πλεονεκτήματα, δεδομένου ότι διαθέτει πολλές ομοιότητες με τον ανθρώπινο οργανισμό όσο αφορά στην κατανομή των μετεμφραγματικών αρρυθμιών^[27,51].

Η πειραματική απόφραξη της στεφανιαίας κυκλοφορίας μελετήθηκε, αρχικά, μόνο σε μεγάλα ζώα, όπως ο σκύλος, ο χοίρος ή το πρόβατο. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι η ανατομία της καρδιάς των ζώων αυτών προσομοιάζει ιδιαίτερα σε αυτή του ανθρώπου. Παρά το γεγονός αυτό, όμως, οι μελέτες στη φυσιολογία, στην παθολογία ή στη φαρμακολογία της στεφανιαίας κυκλοφορίας χρειάζονται ένα σημαντικό αριθμό πειραματόζωων προκειμένου να γίνουν εμφανείς στατιστικά σημαντικές διαφορές. Έτσι, η πειραματική καρδιολογία στράφηκε από πολύ νωρίς και σε άλλες λύσεις, όπως ο επίμυς, το πρότυπο που χρησιμοποιήθηκε στην διατριβή. Η μετεμφραγματική περίοδος στους επίμυες παρουσιάζει δύο διακριτές χρονικές περιόδους που εμφανίζουν υψηλό ποσοστό επεισοδίων κοιλιακής ταχυκαρδίας και μαρμαρυγής, όπως συμβαίνει και στον άνθρωπο.

Εκτός από τις ηλεκτροφυσιολογικές αυτές ομοιότητες, οι επίμυες παρέχουν ένα πειραματικό πρότυπο αξιόπιστο και επαναλήψιμο, με μικρές διακυμάνσεις στο προκαλούμενο μέγεθος του εμφράγματος. Για παράδειγμα, αν και οι μελέτες σε σκύλους έχουν προσφέρει πολύ στην βασική έρευνα, αυτό το πειραματικό πρότυπο παρουσιάζει σημαντικές διαφορές στη στεφανιαία ανατομία και το μέγεθος της παράπλευρης κυκλοφορίας, έχοντας ως αποτέλεσμα και ουσιαστικές διαφορές στη διατοιχωματικότητα και την έκταση των προκληθέντων εμφραγμάτων. Μικρές διαφορές στην παράπλευρη κυκλοφορία προκαλούν σημαντικές διαφορές στην αρρυθμιογένεση, ασκώντας σημαντικότερη επίδραση στο μέγεθος της ισχαιμικής περιοχής. Αντιθέτως, στους επίμυες προκαλείται μεγάλο διατοιχωματικό έμφραγμα με σταθερό και αναπαραγώγιμο τρόπο, εξαιτίας της έλλειψης σημαντικής παράπλευρης κυκλοφορίας.

Ένας πρόσθετος παράγοντας που καθιστά την επιλογή των επιμύων ιδανική είναι η ιδιότητά τους να εμφανίζουν συχνά κοιλιακές αρρυθμίες κατά τη διάρκεια ισχαιμίας, αλλά χωρίς αυτές να είναι σε υψηλό ποσοστό θανατηφόρες. Αυτό το φαινόμενο έχει συνδεθεί με το μικρό μέγεθος της καρδιάς και τις ηλεκτροφυσιολογικές της ιδιότητες. Έτσι, είναι εφικτή η μελέτη πολλών επεισοδίων κοιλιακών αρρυθμιών με μικρό αριθμό πειραματοζώων, αφού τα επεισόδια αυτά αυτοτερματίζονται σε μεγάλο ποσοστό. Επίσης, σημαντικό ρόλο παίζει και το γένος του επίμυος. Οι Sprague-Dawley επίμυες εμφανίζουν σημαντικά υψηλότερα μεγέθη εμφράγματος αλλά και ποσοστά θνητότητας, σε σύγκριση με τους Wistar επίμυες, με αποτέλεσμα η χρήση τους να περιορίζει σημαντικά τη μελέτη της δεύτερης αρρυθμογόνου φάσης μετά το έμφραγμα, αλλά και να απαιτεί και μεγαλύτερο αριθμό πειραματοζώων.

Το γένος των επίμυων με την ομόζυγη έλλειψη του γονιδίου του ETB-υποδοχέα που αποκαλείται και spotting lethal (sl), λόγω των χαρακτηριστικών κηλίδων στο τρίχωμα τους και της μεγάλης θνητότητας, φέρει μία φυσική μετάλλαξη στο γονίδιο των ETB-υποδοχέων, η οποία αναστέλλει την έκφραση λειτουργικών ETB-υποδοχέων.^[41,42] Οι επίμυες που είναι ομόζυγοι για αυτή τη μετάλλαξη (sl/sl) γεννιούνται με έλλειψη των νευρικών κυττάρων του εντέρου, αναπτύσσουν τοξικό megacolon και πεθαίνουν λόγω εντερικής απόφραξης μέσα στο πρώτο μήνα της ζωής τους. Οι Gariepy και συν. ανέπτυξαν ένα πειραματικό πρότυπο διαγονιδιακών sl/sl επίμυων, στο οποίο ένας υποκινητής ανθρώπινης β-υδροξυλάσης της ντοπαμίνης χρησιμοποιήθηκε για να εκφραστούν οι ETB-υποδοχείς, προκαλώντας φυσιολογική ανάπτυξη της νεύρωσης του πεπτικού σωλήνα. Οι συγκεκριμένοι επίμυες επιβιώνουν μέχρι την ενηλικίωση, αλλά είναι ανεπαρκείς ως προς την έκφραση των ETB-υποδοχέων στο καρδιαγγειακό σύστημα. Αυτό τους καθιστά εξαιρετικά πειραματικά πρότυπα στη μελέτη του παθοφυσιολογικού ρόλου των ETB-υποδοχέων^[14,15]. Επίσης, μπορούν να χρησιμοποιηθούν στη μελέτη του συμπαθητικού συστήματος από τη στιγμή που το επίπεδο της έκφρασης των ETB-υποδοχέων στα επινεφρίδια θεωρείται χαμηλό. Μια αποικία αυτών των επίμυων παραχωρήθηκε ευγενώς από τον καθηγητή M. Yanagisawa (Howard Hughes Medical Institute, Department of Molecular Genetics, University of Texas Southwestern Medical Center, Dallas, Texas, ΗΠΑ).

6.2.2 Πληθυσμός πειραματοζώων

Από τους 145 επίμυες που αρχικά περιελήφθησαν στη μελέτη, 13 απεβίωσαν κατά τη διάρκεια της διασωλήνωσης ή της χειρουργικής διαδικασίας. Δύο επιπλέον πειραματόζωα αποκλείστηκαν, λόγω ατελούς χειρουργικής απολίνωσης, με αποτέλεσμα να μην ανιχνευτεί έμφραγμα 24 ώρες μετά την απολίνωση. Έτσι, ο τελικός πληθυσμός της μελέτης αποτελούταν από 130 επίμυες, παρόμοιας ηλικίας ($22 \pm 0,1$ εβδομάδες) και βάρους (249 ± 2 γραμμάρια). Από τους 130 επίμυες, οι 66 (ηλικίας 20-23 εβδομάδων, βάρους 240 ± 2 γραμμάρια) ήταν άγριου-τύπου Wistar και οι 64 (ηλικίας 20-24 εβδομάδων, βάρους 259 ± 3 γραμμάρια) άνηκαν στην ομάδα με την φυσική μετάλλαξη του γονιδίου που εκφράζει τον ETB-υποδοχέα (sl/sl).

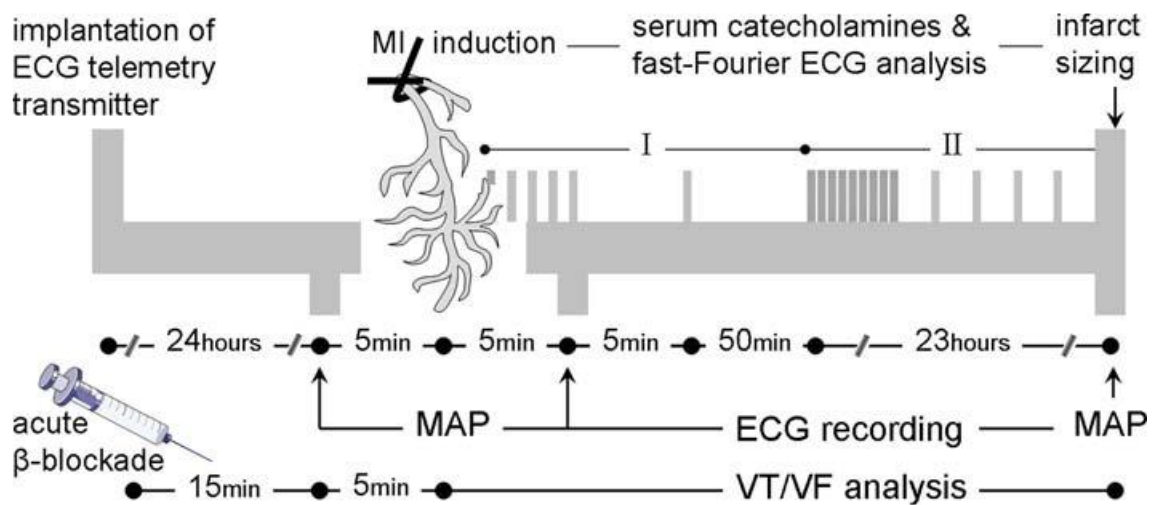
Τα πειραματόζωα τοποθετήθηκαν σε ατομικά κλουβιά και τηρήθηκαν αυστηρά όλες οι απαραίτητες συνθήκες φύλαξης από εξειδικευμένο προσωπικό. Η σχετική υγρασία, η θερμοκρασία και η κυκλική εναλλαγή σκότους/φωτός ελέγχονταν καθημερινά και στα πειραματόζωα χορηγείτο νερό και τροφή κατά βούληση. Οι κατευθυντήριες οδηγίες όπως ορίστηκαν διεθνώς σχετικά με τις αρχές φροντίδας πειραματόζωων (NIH publication No. 86-23, revised 1985, καθώς και στην Διακήρυξη του Ελσίνκι) τηρήθηκαν με ακρίβεια, όπως και η Οδηγία 63/2010 της Ευρωπαϊκής Ένωσης. Το πρωτόκολλο μελέτης έλαβε έγκριση από τις τοπικές αρχές (αρ αδειας :694/11-02-08).

6.2.3 Πρωτόκολλο της μελέτης

Τόσο στους επίμυες άγριου-τύπου όσο και στους sl/sl προκλήθηκε έμφραγμα του μυοκαρδίου. Εν συνεχεία, σε όλο τον πληθυσμό έγινε συνεχής ηλεκτροκαρδιογραφική καταγραφή για 24 ώρες ή μέχρι το θάνατο των πειραματόζωων. Μονοφασικά Δυναμικά Ενεργείας (ΜΔΕ) καταγράφηκαν αμέσως μετά το έμφραγμα, 5 λεπτά μετά το έμφραγμα και 24 ώρες μετά. Το μέγεθος του εμφράγματος μετρήθηκε σε όσους επίμυες επέζησαν μετά την 24 ωρη παρακολούθηση. Δείκτες της δράσης του συμπαθητικού υπολογίστηκαν από της ηλεκτροκαρδιογραφικές καταγραφές, χρησιμοποιώντας ανάλυση κατά Fourier.

Επιπλέον, μετρήθηκαν τα επίπεδα αδρεναλίνης και νοραδρεναλίνης πλάσματος με ανοσοιστοχημεία.

Για να διερευνήσουμε περισσότερο τη σημασία του συμπαθητικού συστήματος η επίπτωση των μετεμφραγματικών αρρυθμιών (KT/KM) εκτιμήθηκε μετά από οξεία χορήγηση αποκλειστή των β -αδρενεργικών υποδοχέων, σε συμπληρωματικά πειράματα. Το πρωτόκολλο παρουσιάζεται περιληπτικά στο παρακάτω σχήμα



Εικόνα 13. Περιληπτική αναπαράσταση πειραματικού πρωτοκόλλου

Αναισθησία

Οι επίμυες τοποθετούνταν σε έναν κλωβό ο οποίος δεχόταν παροχή ισοφλουρανίου 2%, όπου παρέμεναν για δύο με τρία λεπτά. Έτσι, οι επίμυες αναισθητοποιούνταν για βραχύ χρονικό διάστημα μέχρι την διασωλήνωση. Η διασωλήνωση γινόταν υπό λαρυγγοσκόπηση με εισαγωγή ενός φλεβικού καθετήρα 16G, που συνδεόταν με έναν αναπνευστήρα μικρών ζώων (ventilator model 7025, Ugo Basile, Comerio, VA, Italy), στις ακόλουθες ρυθμίσεις: εισπνεόμενος όγκος αέρα=3ml, συχνότητα=70 αναπνοές/λεπτό. Η ενδοτραχειακή διασωλήνωση επιβεβαιωνόταν με την έκπτυξη του θωρακικού τοιχώματος, σύμφωνα με τη συχνότητα του αναπνευστήρα. Τα πειραματόζωα παρέμεναν υπό αναισθησία με ένα μίγμα 100% O₂ και 2% ισοφλουράνιο.^[1,4,31]

Η επιλογή του τρόπου αναισθησίας επιλέχθηκε μετά από σύγκριση διαφόρων παραλλαγών του πειραματικού αυτού προτύπου, όπως ανακοινώθηκε στο Πανελλήνιο Καρδιολογικό Συνέδριο το 2003. Συγκεκριμένα, συγκρίθηκαν πέντε πειραματικά πρότυπα με διαφορές ως προς τρία σημεία: (i) τον αερισμό μέσω τραχειοστομίας ή διασωλήνωσης, με ή χωρίς οξυγόνο (ii) την αναισθησία είτε με ενδομυϊκή χορήγηση κεταμίνης με μιδαζολάμη (Κ-Μ) είτε με ισοφλουράνιο, και (iii) την προσπέλαση, μεταξύ μέσης στερνοτομής (ΜΣ) και πλάγιας θωρακοτομής (ΠΘ). Σε δείγμα 80 επίμυων, βρέθηκε μικρότερη θνητότητα στο πρότυπο που περιλαμβάνει πλάγια θωρακοτομή, διασωλήνωση και χορήγηση μίγματος O_2 και ισοφλουρανίου.



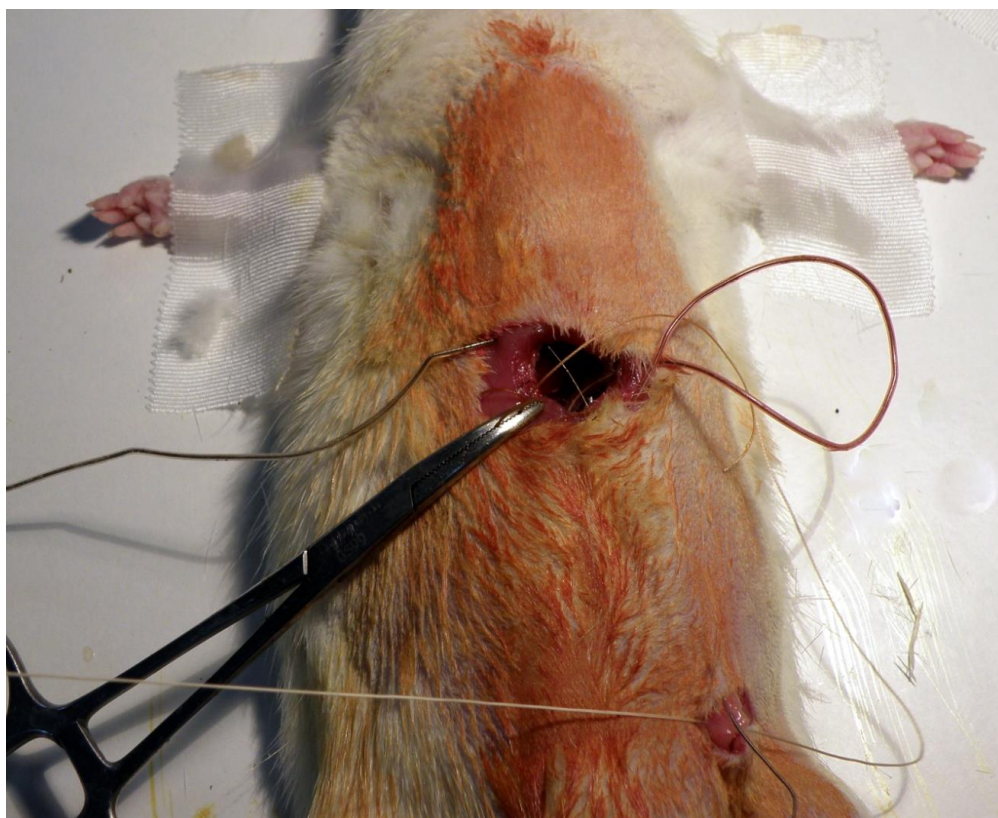
Εικόνα 14. Παράδειγμα διασωληνωμένου επίμυος

Εμφύτευση συστήματος τηλεμετρίας

Μία ημέρα πριν την πρόκληση του εμφράγματος, ένας πομπός συνεχούς καταγραφής ηλεκτροκαρδιογραφήματος (Dataquest, Data Sciences International, Transoma Medical, Arden Hills, MN, USA) εμφυτεύεται στη περιτοναϊκή κοιλότητα.^[1,95] Μετά από μέση τομή στην κοιλιακή χώρα και διάνοιξη της περιτοναϊκής κοιλότητας, τοποθετούταν σε αυτήν ένας μικρο-πομπός (TA11CA-F40 Data Sciences International), ο οποίος διαθέτει δύο ανοξείδωτα καλώδια, τα οποία καλύπτονται από σιλικόνη καθ'όλο το μήκος τους,

εκτός από τα 1 με 2 τελικά cm. Τα ηλεκτρόδια αυτά οδηγούνται υποδόρια κάτω από το δεξιό άνω άκρο και κάτω από δεξιό κάτω άκρο, αντίστοιχα, όπου και σταθεροποιούνται με λεπτά ράμματα. Οι επίμυες κατόπιν παρέμεναν σε ατομικούς κλωβούς, οι οποίοι τοποθετούνταν πάνω από πλάκες-δέκτες (RPC-1, Data Sciences International), οι οποίοι λάμβαναν συνεχώς σήμα, ανεξάρτητα από την κίνηση των πειραματοζώων.

Το λαμβανόμενο σήμα στη συνέχεια ενισχύεται και, μετά την εφαρμογή ηλεκτρονικού ηθμού στα 100 Hz (Data Exchange Matrix, Data Sciences International), ψηφιοποιείται και παρέχεται στον ηλεκτρονικό υπολογιστή ως συνεχής ροή δεδομένων. Με τη βοήθεια ειδικού προγράμματος (Dataquest Acquisition & Analysis System ART 2.2, Data Sciences International), η ψηφιοποίηση γίνεται με ακρίβεια 16 bit και το ηλεκτροκαρδιογράφημα μπορεί να αναπαρασταθεί σε πραγματικό χρόνο με δειγματοληψία 500 Hz, ενώ ταυτόχρονα τα δεδομένα αποθηκεύονται για περαιτέρω ανάλυση. Μετά την εμφύτευση του πομπού, ελεγχόταν η καταγραφή και πιστοποιείτο η λήψη ικανοποιητικού σήματος. Η καταγραφή του ηλεκτροκαρδιογραφήματος για κάθε επίμυ διήρκεσε 48 ώρες, ξεκινώντας 24 ώρες πριν την απολίνωση της αριστεράς στεφανιαίας αρτηρίας και τελειώνοντας 24 ώρες μετά.



Εικόνα 15. Παράδειγμα εμφύτευσης συστήματος τηλεμετρίας

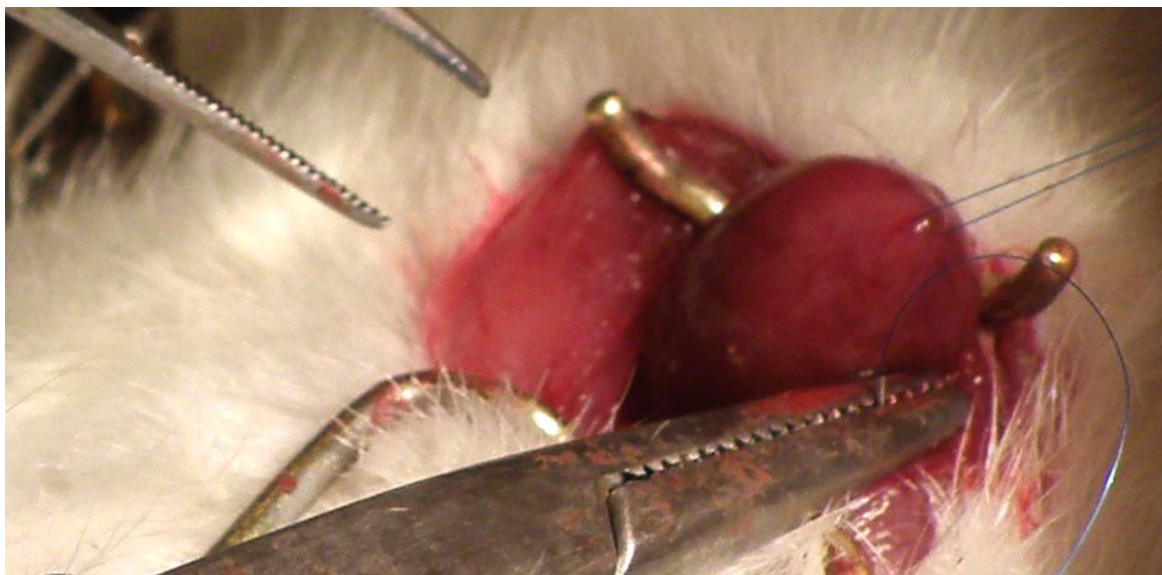
Πρόκληση εμφράγματος

24 ώρες μετά την εμφύτευση του συστήματος τηλεμετρίας, οι επίμυες αναισθητοποιούνταν εκ νέου με τον τρόπο που περιγράφηκε παραπάνω. Μέσω αριστερής θωρακοτομής, η καρδιά αποκαλυπτόταν και η αριστερή στεφανιαία αρτηρία απολινωνόταν με ένα ράμμα 6-0, που τοποθετούταν μεταξύ του κώνου της πνευμονικής αρτηρίας και του ωτίου του αριστερού κόλπου.^[1,31,95] Πιο συγκεκριμένα, μετά από αριστερή πλάγια θωρακοτομή, οι στιβάδες των θωρακικών μυών διαχωρίζονταν, αποκαλύπτοντας τον θωρακικό κλωβό. Αν συνέβαινε τραυματισμός της έσω μαστικής αρτηρίας, η αιμορραγία σταματούσε με την εφαρμογή ήπιας πίεσης. Με τη βοήθεια μιας κυρτής λαβίδας, τέμονταν οι μεσοπλεύριοι μύες (ανάμεσα στην 5η και 6η πλευρά), περίπου 2 mm αριστερά του στέρνου. Το χάσμα που δημιουργείται, διανοιγόταν με ήπιες πιεστικές κινήσεις με την χρήση κυρτής λαβίδας. Η 6^η πλευρά τέμονταν με ψαλίδι και σε περίπτωση που ακολουθούσε αιμορραγία από τη μεσοπλεύρια αρτηρία, αυτή ελεγχόταν με την εφαρμογή ήπιας πίεσης για λίγα δευτερόλεπτα.

Με τη βοήθεια λαβίδων, διαχωριζόταν το περικάρδιο. Ένα ράμμα 6-0 (ethicon) τοποθετούνταν στην κορυφή της καρδιάς, έτσι ώστε αυτή να ακινητοποιείται στη θωρακική κοιλότητα. Ένα ράμμα 6-0 (ethicon) εισαγόταν από την περιοχή έκφυσης του κώνου της πνευμονικής αρτηρίας, μέχρι την περιοχή του ωτίου του αριστερού κόλπου και ακολουθούσε περίσφιγξη του ράμματος. Έτσι, η αριστερή στεφανιαία αρτηρία αποφρασσόταν κοντά στην έκφυσή της, προκαλώντας μεγάλης έκτασης έμφραγμα. Ακολούθως, το θωρακικό τοίχωμα συρράπτονταν κατά δύο στρώματα και εφαρμοζόταν ελαφρά αμφοτερόπλευρη πίεση για την εκκένωση του πνευμοθώρακα, επειδή οι υπερκείμενοι ιστοί λειτουργούσαν ως βαλβίδα.

Μετά την πρόκληση του οξέος εμφράγματος του μυοκαρδίου σε επίμυες, παρατηρούνται αλλαγές τόσο όσον αφορά τη λειτουργικότητα της αριστερής κοιλίας (υποκινησία) όσο και στη μορφολογία της (οίδημα, αλλαγή χρώματος εμφραγματικής περιοχής). Ηλεκτροκαρδιογράφημα 6 απαγωγών διενεργούταν στους επίμυες αμέσως μετά το έμφραγμα και τη συρραφή της χειρουργικής τομής, και η ανάσπαση του ST διαστήματος χρησιμοποιούταν για να πιστοποιηθεί το έμφραγμα. Μετά τη διακοπή της αναισθησίας οι επίμυες ανακτούσαν τις αισθήσεις τους μέσα σε 2-3 λεπτά.

Σαν σημαντικό στοιχείο του πρωτοκόλλου, καμία προσπάθεια ανάνηψης δεν επιτρεπόταν καθ' όλη τη διάρκεια της μελέτης.



Εικόνα 16. Φωτογραφία από την διαδικασία απολίνωσης της αριστερής στεφανιαίας αρτηρίας

Θνητότητα

Η συνολική θνητότητα αναφέρεται για την 24-ωρη παρακολούθηση και χωριστά για τις φάσεις I και II. Ο θάνατος ταξινομείται σε ταχυαρρυθμικό και βραδυαρρυθμικό. Ο ‘ταχυαρρυθμικός’ θάνατος ορίζεται ως κοιλιακή ασυστολία, που έπεται ενός επεισοδίου κοιλιακής ταχυκαρδίας/κοιλιακής μαρμαρυγής και ο βραδυαρρυθμικός’ θάνατος ορίζεται ως κοιλιακή ασυστολία που έπεται πλήρους κολποκοιλιακού αποκλεισμού.^[1,31,95]

Μέγεθος του εμφράγματος

Στο τέλος του πειράματος, μετά την 24-ωρη παρακολούθηση, οι επίμυες αναισθητοποιούνταν και θανατώνονταν. Πιο συγκεκριμένα, γινόταν αποκλεισμός της αορτής με κυρτή λαβίδα και έγχυση γλωριούχου καλίου στην αριστερή κοιλία, έτσι ώστε η διακοπή της μηχανικής λειτουργίας της καρδιάς να επέλθει στη διαστολή. Ακολούθως, η καρδιά αφαιρούταν και αφού καταψύχεται στους -20°C για μια ώρα, τεμαχίζετο καθέτως

του μακρού (επιμήκους) άξονα σε πέντε τμήματα των 2mm. Κατόπιν, διαχωρίζοντο επιμελώς οι δύο κόλποι και η δεξιά κοιλία, ώστε να ληφθεί μόνο η μάζα της αριστεράς κοιλίας.

Τα τμήματα της αριστεράς κοιλίας εμβαπτίζοντο για 15-20 λεπτά σε διάλυμα με χλωριούχο τριφενυλτετραζόλιο (TTC) στους 37°C. Η μέθοδος του TTC είναι ικανή να ανιχνεύει την μυοκαρδιακή νέκρωση αφού περάσουν τουλάχιστον 3 ώρες από την έναρξη της ισχαιμίας στους επίμυες. Αυτή στηρίζεται στην ικανότητα των ενζύμων δεϋδρογενάσης να αντιδρούν με τα άλατα τετραζολίου και να σχηματίζουν μια επιφάνεια ροζ απόχρωσης. Έτσι, το ζωντανό μυοκάρδιο χρωματίζεται ροζ, ενώ οι νεκρωμένες περιοχές αναγνωρίζονται ως ελλείμματα χρωματισμού και εμφανίζονται λευκές. Μετά το πέρας της παραμονής τους στο ρυθμιστικό διάλυμα, τα ιστοτεμάχια εμβαπτίζοντο σε διάλυμα φορμόλης 10% για περίπου 20 λεπτά ώστε να μονιμοποιηθεί η χρώση. Στη συνέχεια, και αφού ο ιστός αποξηρανθεί, οι φέτες τοποθετούντο μεταξύ δύο αντικειμενοφόρων πλακών, με σταθερή μεταξύ τους απόσταση (~2 mm), και ακολουθεί σάρωση υψηλής ανάλυσης (Scanjet 4570c/5500c, Hewlett-Packard, Palo Alto, CA, USA) με ταυτόχρονη σάρωση ενός υποδεκάμετρου για διαβάθμιση. Με τη βοήθεια ενός ειδικού προγράμματος (Image Tool, University of Texas, USA), υπολογίζονται οι επιφάνειες της εμφραγματικής και μη περιοχής. Το άθροισμα των εμφραγματικών επιφανειών διαιρείται με τη συνολική επιφάνεια της αριστεράς κοιλίας, καθορίζοντας έτσι και το μέγεθος του εμφράγματος. Οι επίμυες με μέγεθος του εμφράγματος κάτω από 20% αποκλείστηκαν από τη μελέτη, καθώς η απολίνωση δεν θεωρήθηκε πλήρως επιτυχημένη. ^[1,31]



Εικόνα 17. Παράδειγμα ιστοτεμαχίου αριστερής κοιλίας. Το ζωντανό μυοκάρδιο χρωματίζεται ροζ, ενώ οι νεκρωμένες περιοχές αναγνωρίζονται ως ελλείμματα χρωματισμού και εμφανίζονται λευκές.

Υπολογισμός καρδιακής συχνότητας

Με τη βοήθεια του λογισμικού (Dataquest Acquisition & Analysis System ART 2.2, Data Sciences International), σε κάθε αποθηκευμένη σειρά δεδομένων εντοπίστηκαν τα επάρματα R και στη συνέχεια τα διαστήματα R-R. Παρέχοντας συγκεκριμένους περιορισμούς, ο αλγόριθμος του προγράμματος απέκλεισε τους παλμούς που δεν προέρχονταν από φλεβοκομβικά ερεθίσματα και υπολογίστηκε η μέση τιμή του διαστήματος R-R για χρονικά βήματα της τάξης των 5 λεπτών. Έτσι, καθορίστηκε η καρδιακή συχνότητα σε κάθε χρονική περίοδο μετά το έμφραγμα. Τέτοιοι υπολογισμοί έγιναν σε κάθε επίμυ ακριβώς τη στιγμή πριν το έμφραγμα, στο 5^ο, 30^ο και 60^ο λεπτό μετά από την πρόκλησή του, και ανά μία ώρα έκτοτε και μέχρι να ολοκληρωθεί το πείραμα.

Ανάλυση αρρυθμιών

Όλες οι αποθηκευμένες ηλεκτροκαρδιογραφικές καταγραφές αναλύθηκαν χωρίς επίγνωση της ομάδας που άνηκε το κάθε πειραματόζωο, σύμφωνα με τις οδηγίες του Lambeth

Conventions. Η διάρκεια κάθε επεισοδίου καθορίστηκε με τη βοήθεια της βαθμονομημένης κλίμακας που παρέχει το λογισμικό. Κοιλιακή ταχυκαρδία (ΚΤ) ορίστηκε ως η εμφάνιση 4 ή περισσότερων διαδοχικών πρώιμων κοιλιακών συστολών. Κοιλιακή μαρμαρυγή (ΚΜ) ορίστηκε η εμφάνιση ενός σήματος που αλλάζει από κύκλο σε κύκλο ως προς τη συχνότητα και τη μορφολογία ή ενός σήματος στο οποίο τα διάφορα συμπλέγματα QRS δεν μπορούν να ξεχωρίσουν μεταξύ τους^[133]. Παρά αυτούς τους ορισμούς, η διάκριση μεταξύ επεισοδίων κοιλιακής ταχυκαρδίας και κοιλιακής μαρμαρυγής κάποιες φορές είναι δύσκολη. Επιπλέον, πολλές φορές οι δύο ταχυαρρυθμίες μπορούν να μεταπέσουν η μία στην άλλη, χωρίς σαφές όριο μεταξύ τους. Για τους λόγους αυτούς, αποφασίσαμε να εκτιμήσουμε συνολικά το άθροισμα κοιλιακής ταχυκαρδίας/κοιλιακής μαρμαρυγής (ΚΤ/ΚΜ).^[1,31,95]

Χρησιμοποιήθηκαν δυο καλά μελετημένες μέθοδοι για την ανάλυση των αρρυθμιών.

- Σύμφωνα με τη πρώτη μέθοδο, υπολογίστηκε η διάρκεια των επεισοδίων κοιλιακής ταχυκαρδίας/κοιλιακής μαρμαρυγής για κάθε ωριαίο διάστημα, ως το άθροισμα της διάρκειας κάθε επεισοδίου που καταγράφηκε κατά τη διάρκεια αυτού του διαστήματος. Η κατανομή της ωριαίας διάρκειας των επεισοδίων κοιλιακής ταχυκαρδίας/κοιλιακής μαρμαρυγής διαιρέθηκε προς τον χρόνο επιβίωσης του πειραματόζωου. Επίσης, εφόσον διαφορετικοί παθοφυσιολογικοί μηχανισμοί είναι υπεύθυνοι για τις δύο διακριτές περιόδους που ακολουθούν την απόφραξη ενός στεφανιαίου αγγείου, η ανάλυση έγινε ξεχωριστά για κάθε μία από αυτές.^[95]
- Σύμφωνα με τη δεύτερη μέθοδο, χρησιμοποιήθηκε η αρρυθμική βαθμονόμηση (ή αρρυθμικό σκορ), ένας απλούστερος προσδιορισμός του συνολικού αρρυθμικού φορτίου. Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιεί ένα σύστημα βαθμονόμησης των αρρυθμιών που λαμβάνουν χώρα σε μια συγκεκριμένη χρονική περίοδο. Έτσι, σκορ 2 δίνεται για ένα αυτοανατασσόμενο επεισόδιο κοιλιακής ταχυκαρδίας/κοιλιακής μαρμαρυγής, 3 για δύο ή περισσότερα επεισόδια, συνολικής διάρκειας <60 δευτερολέπτων. Σκορ 4 δίνεται για επεισόδια συνολικής διάρκειας 60-119 δευτερολέπτων, 5 για επεισόδια >119 δευτερολέπτων, 6 για θανατηφόρο επεισόδιο κοιλιακής ταχυκαρδίας/κοιλιακής μαρμαρυγής που αρχίζει >15λεπτά μετά την πρόκληση του εμφράγματος, 7 για θανατηφόρο επεισόδιο που αρχίζει >4<14λεπτά μετά την πρόκληση του εμφράγματος,

8 για θανατηφόρο επεισόδιο που αρχίζει $>1<3$ λεπτά μετά την πρόκληση του εμφράγματος, 9 για θανατηφόρο επεισόδιο που αρχίζει <1 μετά την πρόκληση του εμφράγματος. Αυτή η μέθοδος επίσης συνυπολογίζει τις διαφορές στα ποσοστά θνητότητας, δίνοντας ένα σκορ 9 για το χρονικό διάστημα μετά από το θάνατο.^[25]

Δείκτες ενεργοποίησης του συμπαθητικού

Τις τελευταίες δεκαετίες, έχει εκδηλωθεί ιδιαίτερο ενδιαφέρον για τη μελέτη της μεταβλητότητας της καρδιακής συχνότητας (ΜΚΣ). Ως ΜΚΣ ορίζονται οι μεταβολές της χρονικής διάρκειας διαδοχικών καρδιακών κύκλων σε συνθήκες φλεβοκομβικού ρυθμού.^[72] Η μεταβλητότητα αυτή καθορίζεται από φυσιολογικούς μηχανισμούς, όπως π.χ. η αναπνευστική λειτουργία, το αυτόνομο νευρικό σύστημα, οι ιδιότητες του φλεβοκόμβου, αλλά και από παθολογικούς ή περιβαλλοντικούς εξωγενείς μηχανισμούς. Η μεταβλητότητα της καρδιακής συχνότητας είναι ένα χρήσιμο μέσο για την αξιολόγηση του αυτόνομου νευρικού συστήματος. Υπολογίζεται μέσω της μέτρησης των χρονικών διαστημάτων μεταξύ διαδοχικών συμπλεγμάτων QRS (RR διαστήματα). Η ακολουθία των RR διαστημάτων δεν είναι σταθερή, αλλά χαρακτηρίζεται από ταλαντώσεις-διακυμάνσεις γύρω από μία μέση τιμή, οι οποίες είναι αποτέλεσμα της διαρκούς ρύθμισης της καρδιάς και του κυκλοφορικού συστήματος από το αυτόνομο νευρικό σύστημα (ΑΝΣ). Επομένως, η ΜΚΣ αποτελεί ένα χρήσιμο εργαλείο για την μελέτη του ΑΝΣ.

Σε κάθε μέτρηση, χρησιμοποιήσαμε 60 επάρματα QRS, μετά από αποκλεισμό αυτών που δεν είχαν φλεβοκομβικό ρυθμό. Στο πεδίο των συχνοτήτων, χρησιμοποιήσαμε την τεχνική Welch υπολογισμού του περιοδογράμματος, και χωρίσαμε τα χρονοδιαστήματα σε σταθερό αριθμό τμημάτων που επικαλύπτονταν κατά 50%. Μετά την εφαρμογή παραθύρου του Hanning και αφαιρώντας τη μέση τομή υπολογίστηκε το τμηματικό περιοδογραμμα και η φασματική ισχύς όλων των τμημάτων. Κατά την ανάλυση κατά Fourier υπολογίστηκε η φασματική ισχύς σε συχνότητες $(\alpha) >0,5<0,8$ Hz και $(\beta) > 0,8$ Hz. Σαν δείκτες της δραστηριότητας του συμπαθητικού, παρουσιάσαμε το επί τοις εκατό ποσοστό της ισχύος στο φάσμα χαμηλών συχνοτήτων και το λόγο χαμηλών προς υψηλών συχνοτήτων.

Επίπεδα κατεχολαμινών ορού

Σε μία ξεχωριστή σειρά πειραμάτων, μετρήθηκαν επίπεδα κατεχολαμινών τόσο σε επίμυες άγριου-τύπου (n=15), όσο και στην ομάδα sl/sl (n=15). Σαν αναφορά, 6 επιπλέον επίμυες (3 από κάθε ομάδα) χειρουργήθηκαν εικονικά. Το αίμα συλλέχτηκε μετά από παρακέντηση της έσω σφαγίτιδας φλέβας, φυγοκεντρήθηκε άμεσα και ο ορός αποθηκεύτηκε στους -20°C. Οι μετρήσεις των κατεχολαμινών έγιναν μία ώρα μετά την απολίνωση της στεφανιαίας αρτηρίας. Εάν παρατηρούταν εκσεσημασμένη βραδυκαρδία που προανήγγελλε πιθανό θάνατο πριν το χρονικό όριο της 1 ώρας, τότε γινόταν άμεσα η παρακέντηση της έσω σφαγίτιδας. Τα επίπεδα επινεφρινης και νορεπινεφρίνης του ορού μετρήθηκαν με ανοσοιστοχημεία (BioSource Europe S.A., Nivelles, Belgium).

Κοιλιακές ταχυαρρυθμίες μετά από αποκλεισμό β-αδρενεργικών υποδοχέων

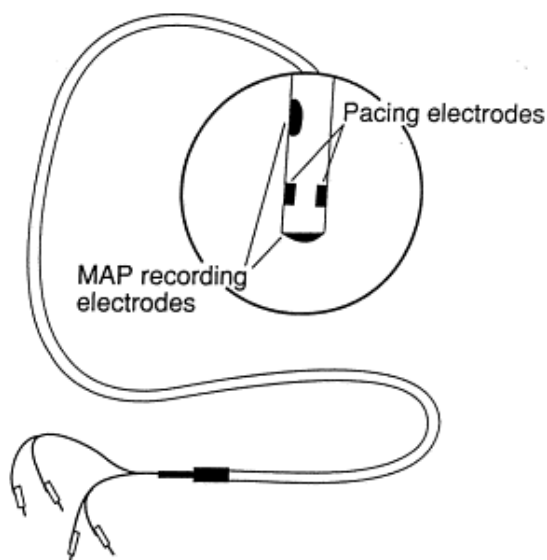
Για να διευκρινίσουμε περαιτέρω τον παθοφυσιολογικό ρόλο του συμπαθητικού συστήματος κατά τη διάρκεια του εμφράγματος του μυοκαρδίου, διενεργήσαμε μια ξεχωριστή ομάδα πειραμάτων, στα οποία οι επίμυες είχαν λάβει πριν την απολίνωση έναν αποκλειστή των β-αδρενεργικών υποδοχέων. Πιο συγκεκριμένα, τόσο στην ομάδα των επίμυων άγριου τύπου (n=20) όσο και των sl/sl (n=21) χορηγήθηκε ενδοφλεβίως προπρανολόλη, 15 λεπτά πριν το έμφραγμα του μυοκαρδίου. Ύστερα από χειρουργική αποκάλυψη, η έσω σφαγίτιδα καθετηριάστηκε και χορηγήθηκε προπρανολόλη ενδοφλεβίως (0,2 mg/kg) σε βραδεία έγχυση.^[14]

Καταγραφή μονοφασικών δυναμικών ενεργείας

Το μονοφασικό δυναμικό ενεργείας είναι η καταγραφή της συνισταμένης του δυναμικού της κυτταρικής μεμβράνης από μια ομάδα κυττάρων του ενδοκαρδίου ή του επικαρδίου. Η καταγραφή αυτή γίνεται με ειδικούς καθετήρες-ηλεκτρόδια, που διακρίνονται σε ενδοκαρδιακούς και επικαρδιακούς. Οι καθετήρες αυτοί περιλαμβάνουν δύο ηλεκτρόδια καταγραφής σε δύο άξονες, κάθετους μεταξύ τους. Η καταγραφή προσομοιάζει με το δυναμικό ενεργείας του κάθε κυττάρου της περιοχής που τοποθετείται ο καθετήρας. Η αρχή της μεθόδου στηρίζεται στην εκπόλωση που προκαλείται στα κύτταρα που

βρίσκονται ακριβώς κάτω από το ένα ηλεκτρόδιο λόγω της μηχανικής πίεσης. Η διαφορά του δυναμικού της κυτταρικής μεμβράνης μεταξύ των κυττάρων των δυο περιοχών που βρίσκονται κάτω από τα αντίστοιχα ηλεκτρόδια καταγράφεται από το δεύτερο ηλεκτρόδιο, άρα πρακτικά χρησιμοποιείται μία μόνο φάση.^[36]

Τα μονοφασικά δυναμικά ενέργειας είναι κατάλληλα για τη μελέτη των χαρακτηριστικών της τοπικής ηλεκτροφυσιολογίας σε κλινικό επίπεδο, και ιδίως της φάσης της επαναπόλωσης. Αυτό έχει καταστήσει τη χρήση των μονοφασικών δυναμικών ενέργειας μια σημαντική γέφυρα μεταξύ της βασικής και της κλινικής ηλεκτροφυσιολογίας.



Εικόνα 18. Καθετήρας για την μέτρηση ΜΔΕ που συνδυάζει και ηλεκτρόδια βηματοδότησης. Τα ηλεκτρόδια των ΜΔΕ κατασκευάζονται από AgCl σε μορφή σκόνης που επικάθεται σε ειδικό πολυμερές.

Είκοσι τέσσερις ώρες μετά την εμφύτευση του πομπού, οι επίμυες αναισθητοποιούνταν εκ νέου και εκτελούνταν αριστερή θωρακοτομή, με διαχωρισμό των θωρακικών μυών. Μετά την προσεχτική αφαίρεση του περικαρδίου καταγράφονταν επικαρδιακά μονοφασικά δυναμικά με τον ακόλουθο τρόπο:

Ένας επικαρδιακός καθετήρας (MAP probe, model 200, EP Technologies, Sunnyvale California, USA) τοποθετούνταν διαδοχικά στα πλάγια τοιχώματα της αριστερής και

δεξιάς κοιλίας με εφαρμογή ήπιας, σταθερής πίεσης. Με τον τρόπο αυτό μειωνόταν τα ηλεκτρικά παράσιτα. Το σήμα της λήψης αυτής ενισχυόταν με τη βοήθεια προενισχυτή (model 300 EP Technologies, Sunnyvale California, USA) και στη συνέχεια εφαρμόζετο ηλεκτρικός ηθμός στα 50Hz από έναν ψηφιακό καταγραφέα.

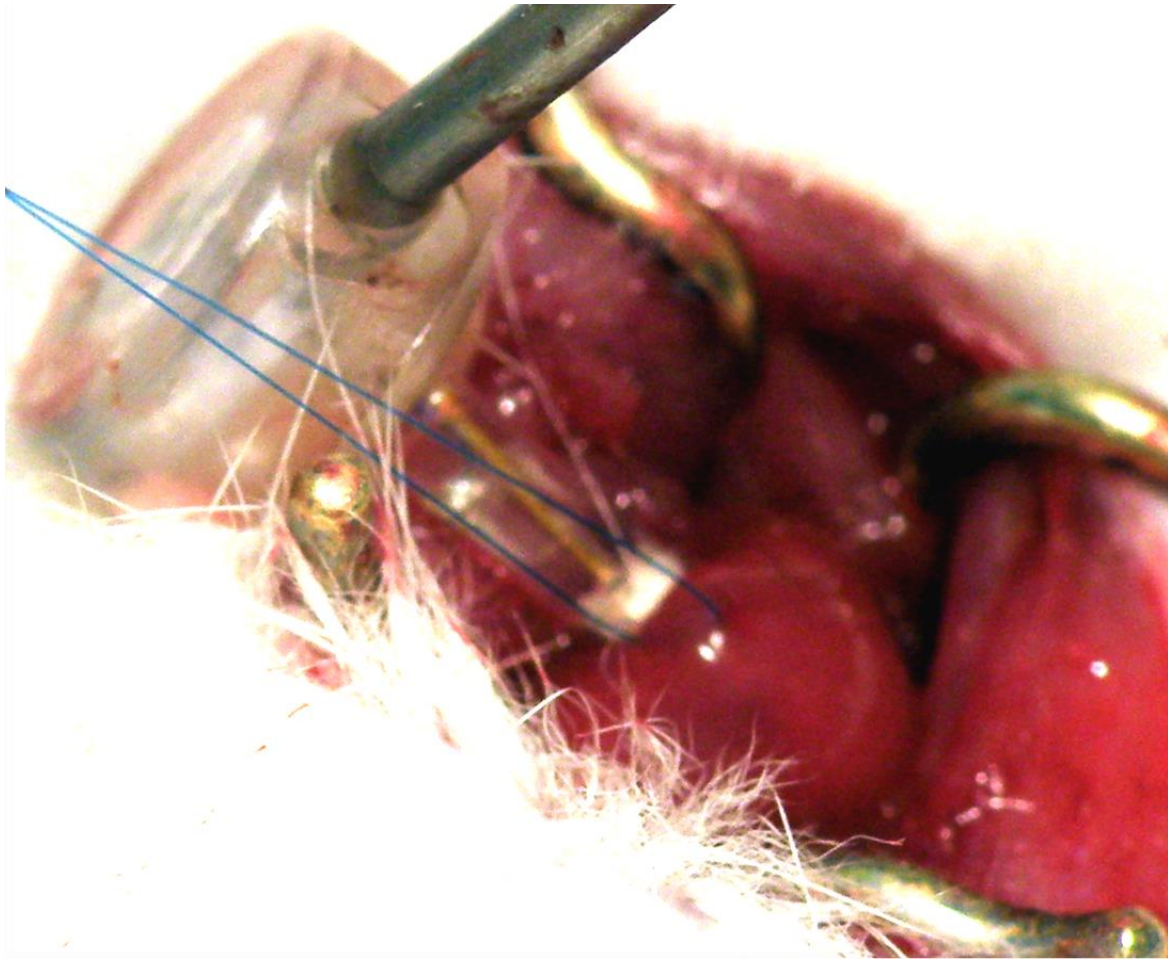
Μία συνεχής ροή δεδομένων αποθηκευόταν σε ηλεκτρονικό υπολογιστή, εξοπλισμένο με μετατροπέα αναλογικού σε ψηφιακό σήμα (BNC 2110, National Instruments Corporation, Dallas, TX, USA). Η λήψη ήταν συνεχής για περίπου δύο λεπτά, έως ότου να επιτευχθεί μια καθαρή από παράσιτα καταγραφή.

Το λογισμικό πρόγραμμα που χρησιμοποιήθηκε για τη λήψη των σημάτων αυτών στηρίχθηκε στην γλώσσα προγραμματισμού Labview 6.1. Το λογισμικό αυτό αξιολογήθηκε με τη χρήση παλμικής γεννήτριας ικανής να παράγει μια αλληλουχία τετραγωνικών κυμάτων με 1mV πλάτος. Επιπλέον, το πρόγραμμα αυτό επιτρέπει την ανάλυση των καταγραφών. Μετρήθηκε το μέγιστο πλάτος του σήματος και το 90% της διάρκειας της επαναπόλωσης (APD90).^[4,31]

Οι μετρήσεις αυτές πραγματοποιήθηκαν ως εξής:

- A) Πριν την πρόκληση του εμφράγματος
- B) Πέντε λεπτά μετά την πρόκληση του εμφράγματος
- Γ) Είκοσι τέσσερις ώρες μετά την πρόκληση του εμφράγματος.

Κατά τη διάρκεια της ανάλυσης των καταγραφών MAP, οι έκτοποι παλμοί εξαιρούνταν και αναλύονταν πενήντα συνεχείς φλεβοκομβικές συστολές ανά καταγραφή.



Εικόνα 19. Παράδειγμα καταγραφής μονοφασικών δυναμικών ενεργείας

Στατιστική ανάλυση

Όλες οι τιμές παρουσιάζονται ως μέσος όρος \pm τυπική απόκλιση, και, κατά περίπτωση, ως μέσος όρος \pm τυπικό σφάλμα. Οι διαφορές στις συνεχείς μεταβλητές συγκρίθηκαν με το Student's t-test. Οι μεταβολές τους στον χρόνο συγκρίθηκαν χρησιμοποιώντας την ανάλυση μεταβλητότητας για επαναλαμβανόμενες μετρήσεις, ακολουθούμενη από post hoc ανάλυση με την δοκιμασία κατά Duncan. Τα επεισόδια και οι διάρκειες των αρρυθμιών δεν ακολουθούσαν κανονική κατανομή, και, κατά συνέπεια, η σύγκριση έγινε με το με την δοκιμασία κατά Wald-Wolfowitz. Δημιουργήθηκαν καμπύλες επιβίωσης κατά Kaplan-

Meier και για τις δύο ομάδες πειραματοζώων, και συγκρίθηκαν χρησιμοποιώντας την δοκιμασία Wilcoxon κατά Peto και Peto. Ως επίπεδο σημαντικότητας ορίστηκε το 0,05.

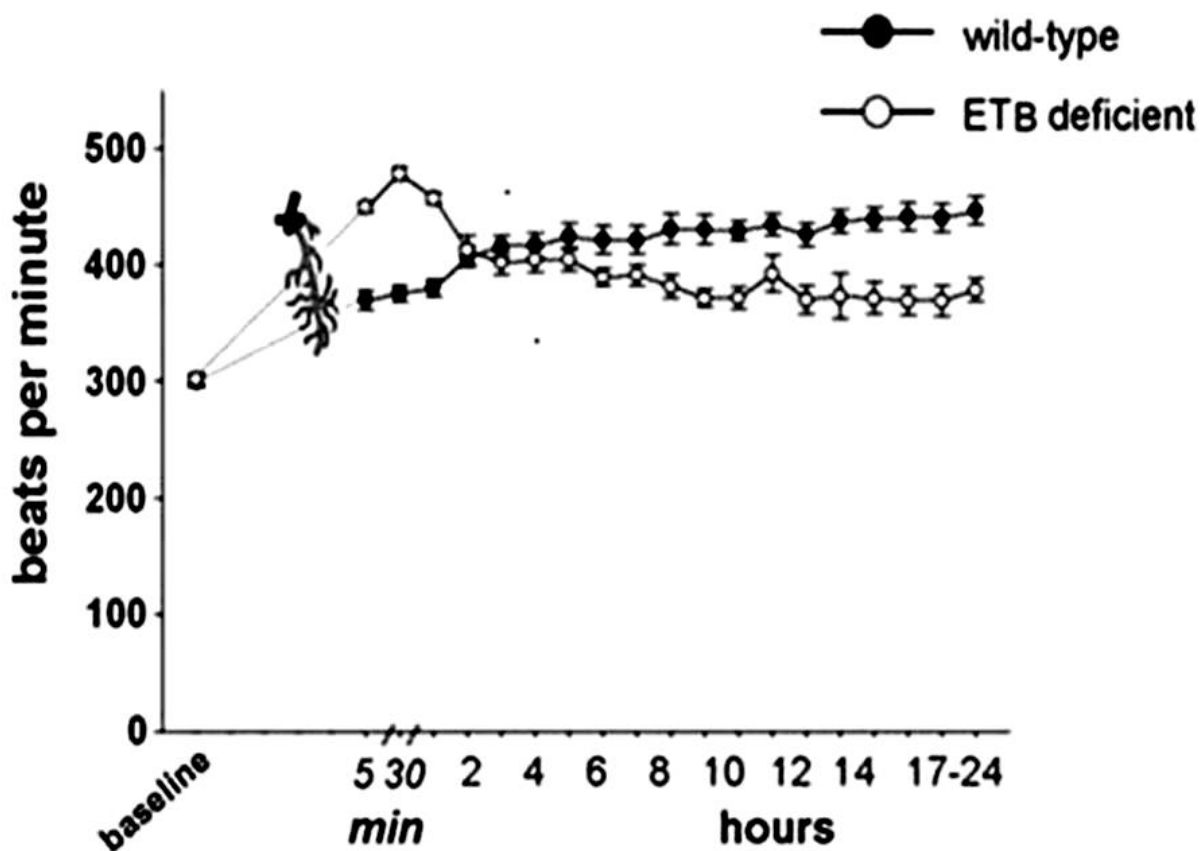
6.3 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

6.3.1 Έμφραγμα του μυοκαρδίου χωρίς αποκλεισμό των β-αδρενεργικών υποδοχέων

Αυτό το τμήμα της μελέτης διεξήχθη σε 83 επίμυες (43 άγριου-τύπου και 40 sl/sl).

Καρδιακή συχνότητα

Υπήρχε στατιστικά σημαντική διακύμανση ($F=19.3$, $p<0,0001$) στη καρδιακή συχνότητα κατά τη διάρκεια των καταγραφών ανάμεσα στις δυο ομάδες. Η καρδιακή συχνότητα ήταν υψηλότερη στην ομάδα sl/sl κατά τη διάρκεια της πρώτης ώρας και στην ομάδα των Wistar μετά την όγδοη ώρα της καταγραφής, όπως φαίνεται στην εικόνα 20.



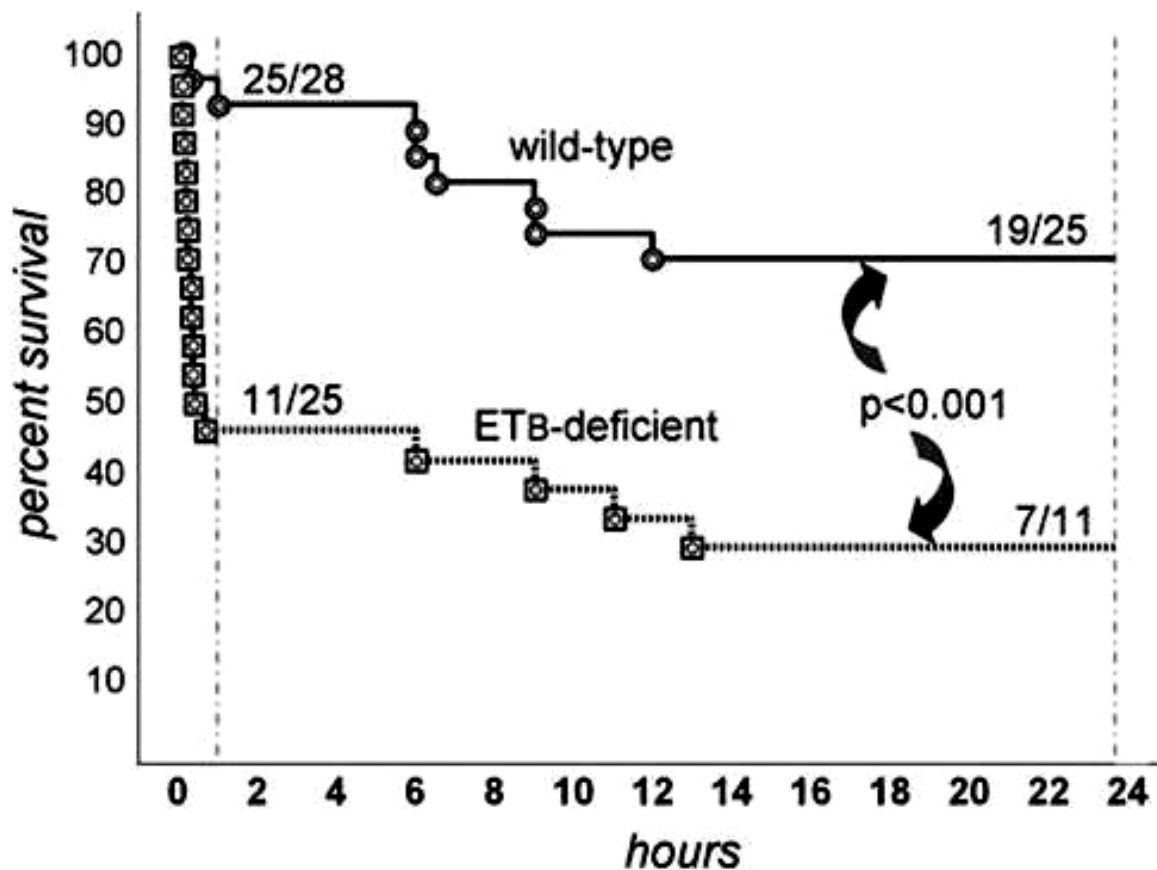
Εικόνα 20. Καρδιακή συχνότητα στις 2 ομάδες

Θνητότητα

Η συνολική θνητότητα μετά την 24-ωρη παρακολούθηση ήταν υψηλότερη ($p=0.0058$) στην ομάδα *sl/sl* (18/25, 72.0%) από την ομάδα άγριου-τύπου (9/28, 32.1%). Η διαφορά αυτή παρουσιάστηκε κυρίως κατά τη διάρκεια της φάσης I, αφού η θνητότητα ήταν υψηλότερη ($p=0.0009$) στους *sl/sl* επίμυες (14/25, 56%) από την ομάδα άγριου-τύπου (3/28; 10.7%). Κατά τη διάρκεια της φάσης II, η συνολική θνητότητα ήταν συγκρίσιμη ($p=0.45$) και στις δύο ομάδες. Οι τιμές ήταν 4/11 (36.3%) στους *sl/sl* επίμυες και 6/25 (24%) στους επίμυες άγριου-τύπου.

Ταχυαρρυθμικός θάνατος παρατηρήθηκε στους 16/18 (88,8%) θανάτους στους *sl/sl* επίμυες και στους 5/9 (55.5%) θανάτους στην ομάδα άγριου-τύπου, διαφορά που δεν ήταν στατιστικά σημαντική ($p=0.13$). Ο βραδυαρρυθμικός θάνατος ήταν συγκρίσιμος ($p=0.67$) στις δύο ομάδες. Οι καμπύλες κατά Kaplan-Meier για τη συνολική θνητότητα φαίνονται

στην εικόνα 21. Η σύγκριση των δύο καμπυλών ανέδειξε μεγαλύτερη θνητότητα ($p=0.00076$) στην ομάδα *sl/sl*.



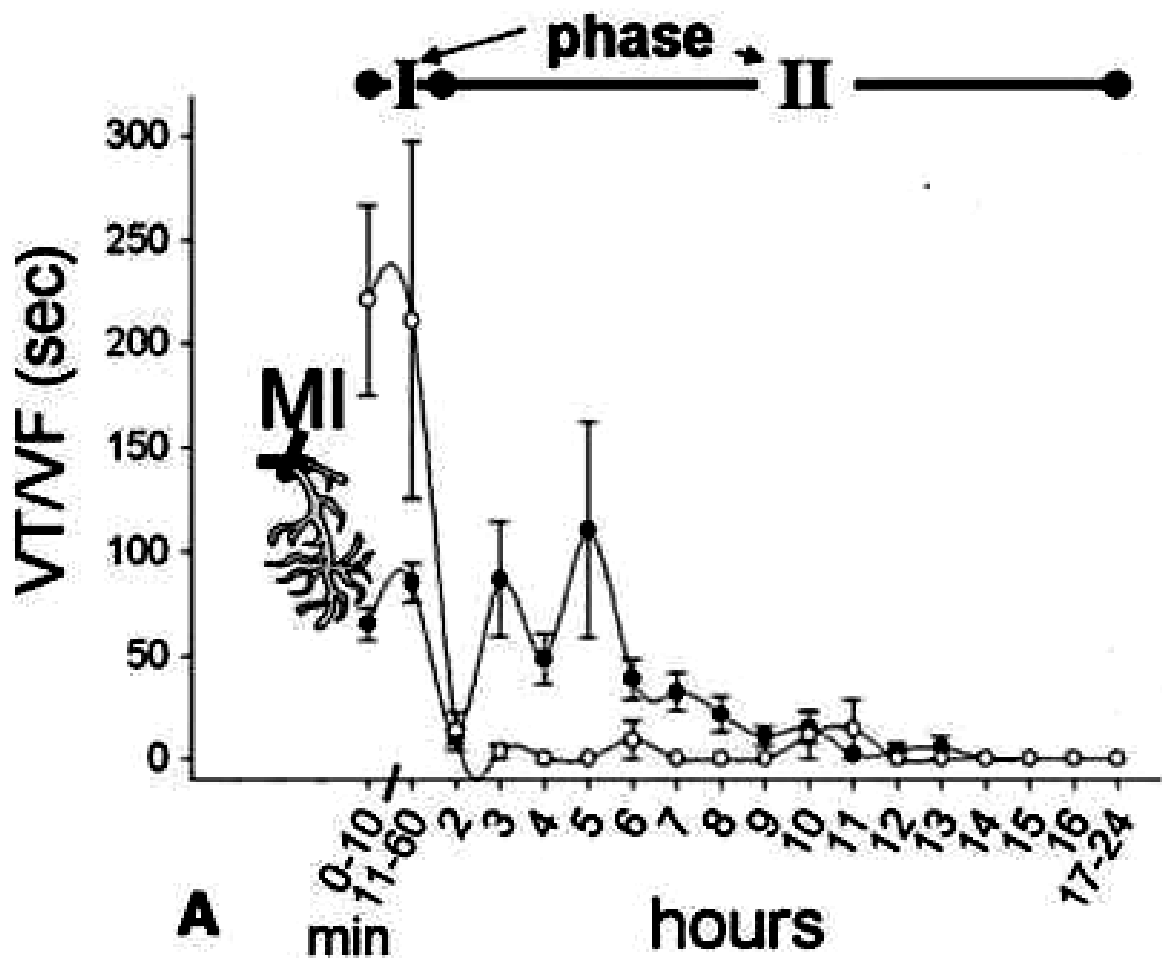
Εικόνα 21. Καμπύλες επιβίωσης κατά Kaplan-Meier. Η σύγκριση ανέδειξε μεγαλύτερη θνητότητα στην ομάδα *sl/sl*

Μέγεθος εμφράγματος

Το μέγεθος του εμφράγματος υπολογίστηκε για 25 επίμυες που επιβίωσαν. Το μέσο μέγεθος εμφράγματος ήταν σχεδόν ταυτόσημο και στις δύο ομάδες. Οι τιμές ήταν $31.5 \pm 0.8\%$ στην ομάδα *sl/sl*, και $32.4 \pm 1.1\%$ στην ομάδα άγριου-τύπου ($p=0.66$).

Κοιλιακές αρρυθμίες

Παρατηρήθηκε μια εκσεσημασμένη χρονική διακύμανση στη διάρκεια των επεισοδίων ΚΤ/ΚΜ μεταξύ των δύο ομάδων. Η ωριαία κατανομή των ΚΤ/ΚΜ ήταν υψηλότερη στην ομάδα sI/sI κατά τη διάρκεια της φάσης I, αλλά χαμηλότερη κατά τη διάρκεια της φάσης II. (εικόνα 22)



Εικόνα 22. Ωριαία κατανομή κοιλιακών ταχυκαρδιών. Η ωριαία κατανομή των ΚΤ/ΚΜ ήταν υψηλότερη στην ομάδα sI/sI κατά τη διάρκεια της φάσης I, αλλά χαμηλότερη κατά τη διάρκεια της φάσης II.

Φάση I

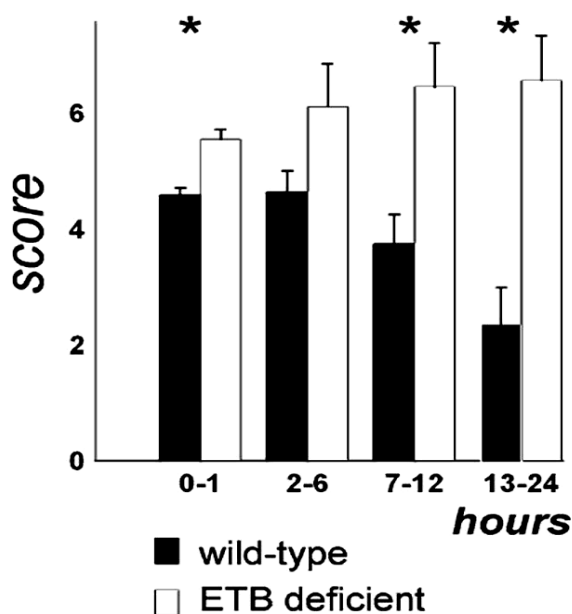
Κατά τη διάρκεια της φάσης I, η διάρκεια των επεισοδίων ΚΤ/ΚΜ ήταν μεγαλύτερη ($p=0.0087$) στην ομάδα sl/sl (381.5 ± 84.2 s) συγκριτικά με τους επίμυες άγριου-τύπου (147.1 ± 12.3 s). Αυτή η διαφορά παρέμεινε και μετά τη διόρθωση των τιμών ως προς τον χρόνο επιβίωσης. Η διάρκεια των επεισοδίων ΚΤ/ΚΜ (για κάθε ώρα ζωής) ήταν 1519.7 ± 421.3 s στους επίμυες sl/sl και 190.8 ± 34.6 s στην ομάδα των επίμυων άγριου-τύπου.

Φάση II

Κατά τη διάρκεια της φάσης II, η επίπτωση των ΚΤ/ΚΜ ήταν χαμηλότερη στην ομάδα των sl/sl, από την ομάδα άγριου-τύπου ($p=0.000091$). Οι τιμές αντίστοιχα ήταν 47.4 ± 19.1 s και 376.4 ± 87.1 s. Παρόλα αυτά, όταν η διάρκεια των επεισοδίων διορθώθηκε για τον χρόνο επιβίωσης, η διαφορά ήταν στα όρια της στατιστικής σημαντικότητας ($p=0.086$). Οι τιμές αντίστοιχα ήταν 4.2 ± 2.0 s και 27.7 ± 8.0 s.

Αρρυθμολογικό σκορ

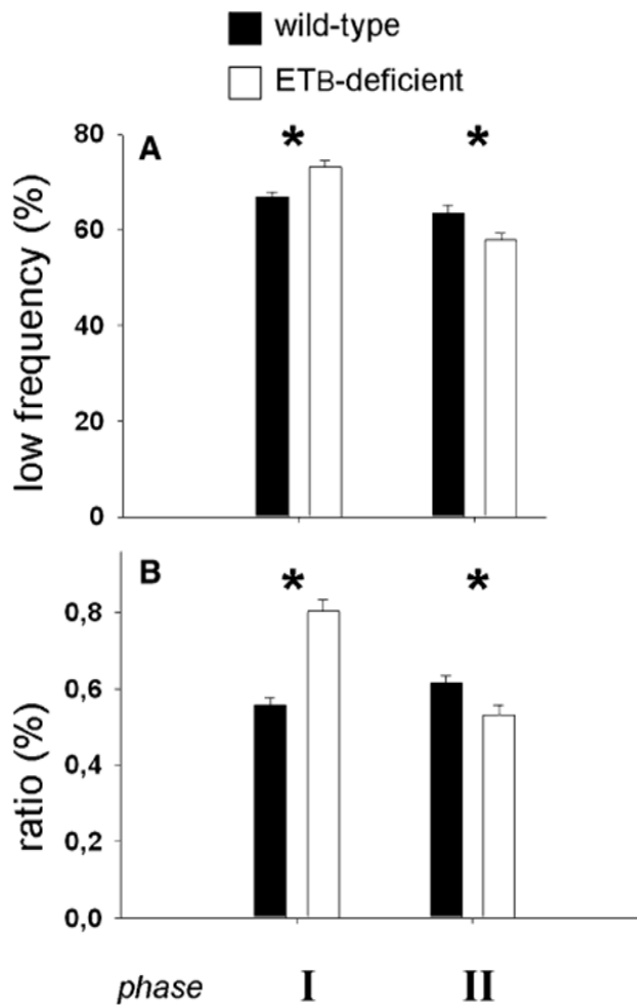
Στο χρονικό διάστημα 2-6 ώρες, το αρρυθμολογικό σκορ ήταν οριακά ($p=0.073$) υψηλότερο στην ομάδα sl/sl (6.12 ± 0.73) από τους επίμυες άγριου-τύπου (4.62 ± 0.38). Κατά τα υπόλοιπα χρονικά διαστήματα, το σκορ ήταν σημαντικά υψηλότερο ($p<0.01$) στην ομάδα των επίμυων sl/sl. Όλες οι τιμές φαίνονται στην εικόνα 23.



Εικόνα 23. Το αρρυθμολογικό σκορ ήταν μεγαλύτερο στην ομάδα sl/sl

Δείκτες συμπαθητικής δραστηριότητας

Βρέθηκε μια χρονική διακύμανση στους ηλεκτροκαρδιογραφικούς δείκτες συμπαθητικής δραστηριότητας ανάμεσα στις δύο ομάδες. Η δραστηριότητα του συμπαθητικού ήταν μεγαλύτερη στην ομάδα *sl/sl* κατά τη διάρκεια της φάσης I, αλλά μικρότερη κατά τη φάση II. Οι τιμές φαίνονται στην εικόνα 24.

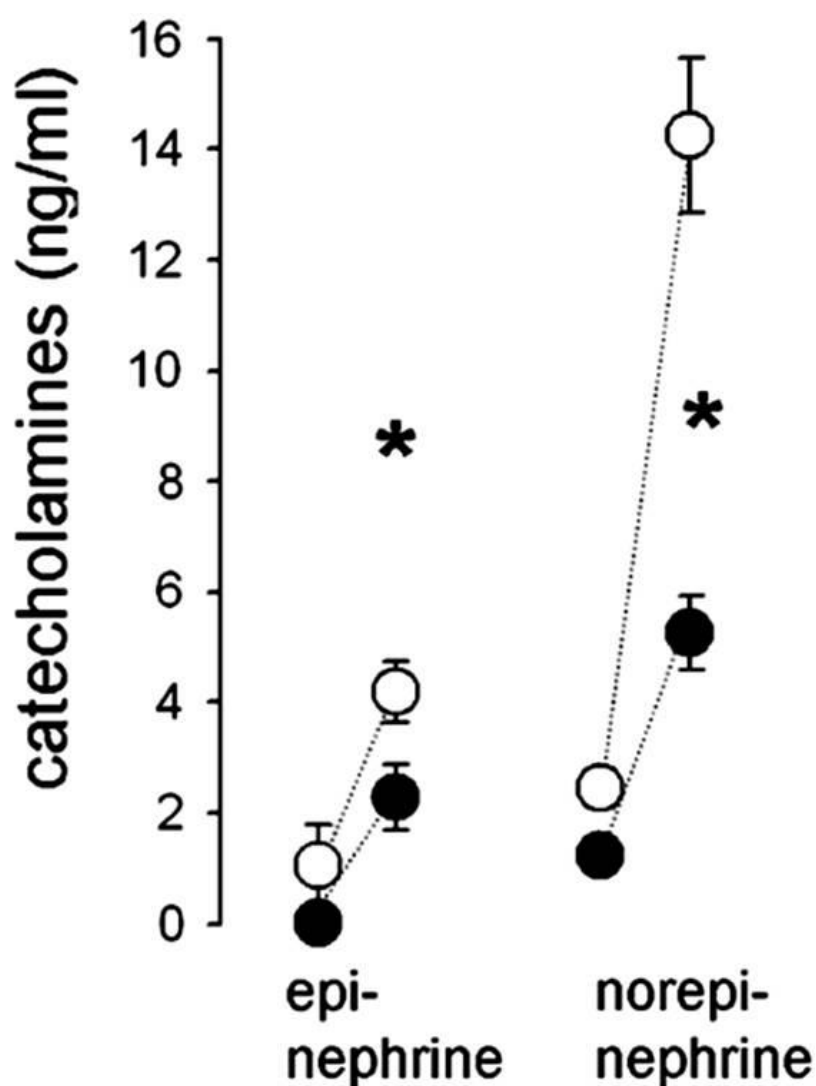


Εικόνα 24. Δείκτες συμπαθητικής δραστηριότητας.

*Η δραστηριότητα του συμπαθητικού ήταν μεγαλύτερη στην ομάδα *sl/sl* κατά τη διάρκεια της φάσης I, αλλά μικρότερη κατά τη φάση II.*

Επίπεδα κατεχολαμινών ορού

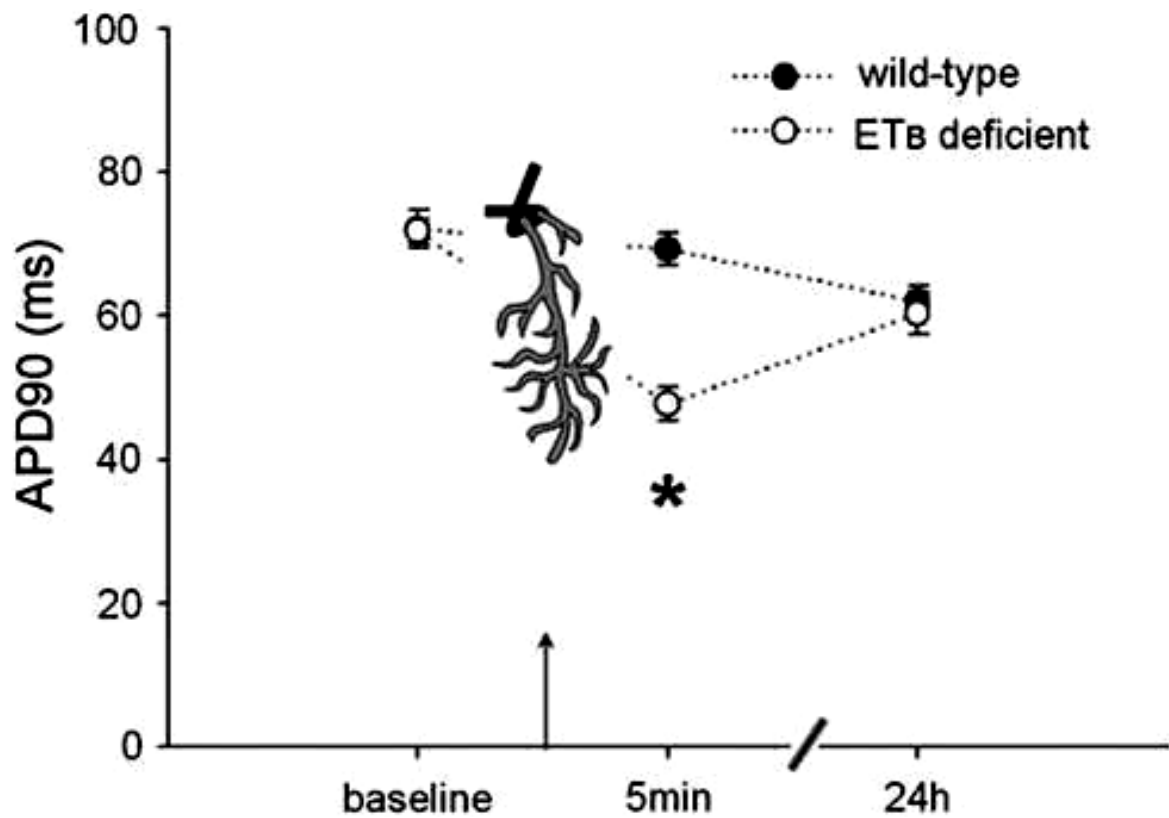
Τα επίπεδα επινεφρίνης μία ώρα μετά την απολίνωση ήταν υψηλότερα ($p=0.025$) στην ομάδα *sl/sl* (4.20 ± 0.54 ng/ml) από τους επίμυες άγριου-τύπου (2.30 ± 0.59 ng/ml). Ομοίως, τα επίπεδα νορεπινεφρίνης ήταν υψηλότερα για την ίδια χρονική φάση ($p<0.0001$) στην ομάδα *sl/sl* (14.24 ± 1.39 ng/ml) από τους επίμυες άγριου-τύπου (5.26 ± 0.67 ng/ml). Οι τιμές φαίνονται στην εικόνα 25.



Εικόνα 25. Επίπεδα κατεχολαμινών στον ορό. Τα επίπεδα επινεφρίνης μία ώρα μετά την απολίνωση ήταν υψηλότερα στην ομάδα *sl/sl* από τους *wild type*. Ομοίως και τα επίπεδα νορεπινεφρίνης ήταν υψηλότερα για την ίδια χρονική φάση στην ομάδα *sl/sl* από τους *wild-type*

Καταγραφή μονοφασικών δυναμικών ενεργείας

Οι μεταβολές στο APD90 κατά τη διάρκεια του χρόνου φαίνονται στην εικόνα 26. Πέντε λεπτά μετά την απολίνωση, το APD90 δεν μεταβλήθηκε στους επίμυες άγριου-τύπου, αλλά μειώθηκε στην ομάδα *sl/sl* ($p < 0.0001$). 24 ώρες μετά την απολίνωση, το APD90 ήταν συγκρίσιμο και στις δύο ομάδες.



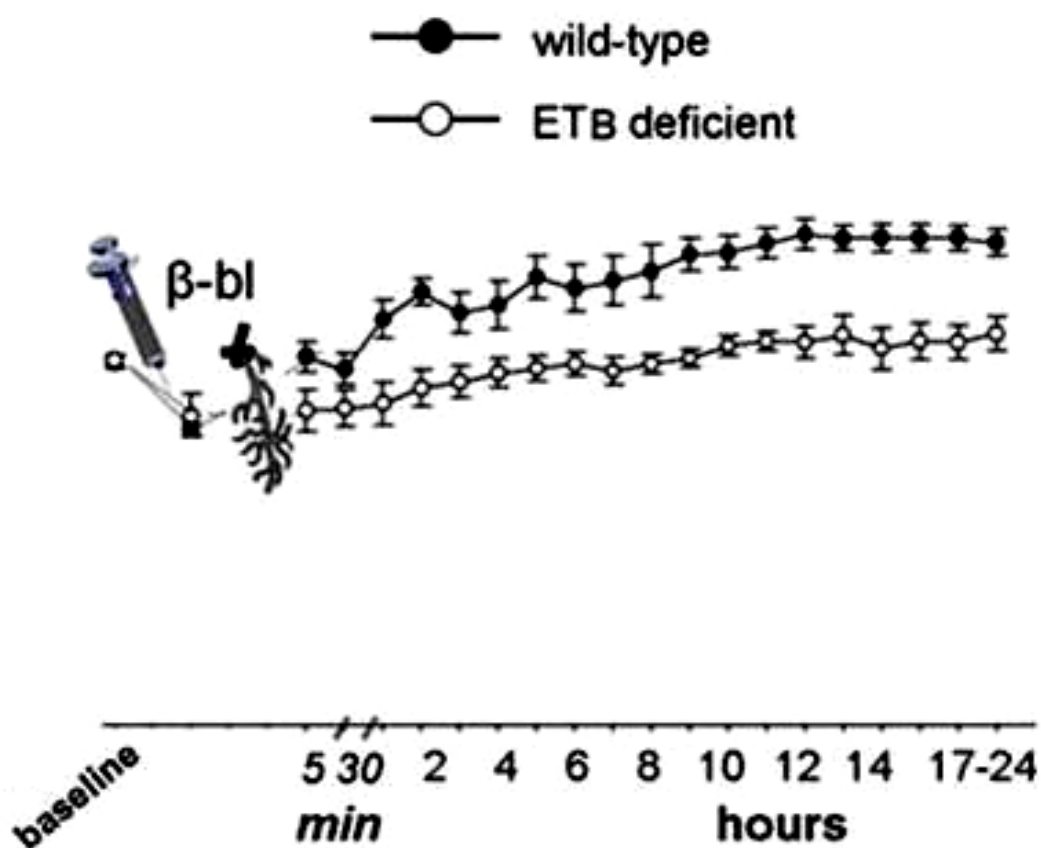
Εικόνα 26. Καταγραφή μονοφασικών δυναμικών. Παρατηρήθηκε σημαντική βράχυνση του APD90, 5 λεπτά μετά την απολίνωση στην ομάδα *sl/sl*

6.3.2 Έμφραγμα μυοκαρδίου με χορήγηση αποκλειστή β-αδρενεργικών υποδοχέων

Αυτό το τμήμα της μελέτης πραγματοποιήθηκε σε 41 επίμυες (20 άγριου τύπου και 21 τύπου sl/sl).

Καρδιακή συχνότητα

Οι μεταβολές της καρδιακής συχνότητας ακολούθησαν παρόμοιο πρότυπο και στις δύο ομάδες ($F=1.01$, $p=0.45$). Εντούτοις, η καρδιακή συχνότητα έτεινε να είναι χαμηλότερη στην ομάδα sl/sl την πρώτη ώρα μετά την απολίνωση (Εικόνα 20B).



Εικόνα 20B: Η καρδιακή συχνότητα με χορήγηση αποκλειστή β-αδρενεργικών υποδοχέων

Θνητότητα μετά τη αποκλειστή β-αδρενεργικών υποδοχέων

Μετά την οξεία χορήγηση προπρανολόλης, η συνολική θνητότητα (μετά την 24ωρη παρακολούθηση) ήταν σχεδόν ταυτόσημη στις δύο ομάδες, 12/21 (57.1%) στην ομάδα και 11/20 (55%) στην ομάδα άγριου-τύπου. Παρόμοια θνητότητα μεταξύ των δύο ομάδων παρατηρήθηκε κατά τη διάρκεια και των δύο φάσεων.

Κατά τη διάρκεια της φάσης I, η συνολική θνησιμότητα ήταν 10/21 (47.6 %) στους sl/sl επίμυες και 10/20 (50.0 %) στους επίμυες άγριου-τύπου. Κατά τη διάρκεια της φάσης II, η συνολική θνησιμότητα ήταν 2/11 (18.1 %) στην ομάδα sl/sl και 1/10 (10.0 %) στους επίμυες άγριου-τύπου. Ταχυαρρυθμικός θάνατος παρατηρήθηκε σε 8/12 (66.6 %) των θανάτων στην ομάδα sl/sl, και σε 8/11 (72.7%) στους επίμυες άγριου-τύπου. Και πάλι, αυτή η διαφορά δεν ήταν στατιστικά σημαντική ($p=0.55$). Όταν συγκρίθηκε το σύνολο των ποσοστών θνησιμότητας σε πειράματα με και χωρίς αποκλεισμό των β-αδρενεργικών υποδοχέων (χορηγούμενος πριν την επαγωγή του εμφράγματος του μυοκαρδίου), δεν βρέθηκαν σημαντικές διαφορές μεταξύ των ομάδων. Συγκεκριμένα, η συνολική θνησιμότητα στην ομάδα sl/sl ήταν συγκρίσιμη ($p=0.35$), χωρίς (18/25, 72.0 %) και με (12/21, 57.1%) προηγούμενο αποκλεισμό των β-αδρενεργικών υποδοχέων. Ομοίως, η συνολική θνησιμότητα σε επίμυες άγριου-τύπου ήταν συγκρίσιμη ($p = 0.14$) χωρίς (9/28, 32.1%) και με (11/20, 55.0%) προηγούμενο αποκλεισμό των β-αδρενεργικών υποδοχέων.

Κοιλιακές αρρυθμίες μετά από αποκλεισμό των β-αδρενεργικών υποδοχέων.

Η οξεία χορήγηση προπρανολόλης μείωσε την επίπτωση των ΚΤ/ΚΜ σε όλη την περίοδο παρακολούθησης. Εντούτοις, αυτό το αποτέλεσμα ήταν πιο εμφανές στην ομάδα sl/sl κατά τη διάρκεια της φάσης I. Ως αποτέλεσμα, η χρονική διακύμανση στη διάρκεια των επεισοδίων ΚΤ/ΚΜ μεταξύ των δύο ομάδων εξαφανίστηκε.

Φάση I

Κατά τη διάρκεια της φάσης I, υπήρχε μια τάση ($p=0.056$) προς χαμηλότερη διάρκεια ΚΜ/ΚΤ στην ομάδα sl/sl (30.09 ± 6.11), από ότι στους επίμυες άγριου-τύπου (40.94 ± 17.42 s). Ωστόσο, αυτή η διαφορά έγινε στατιστικά μη σημαντική ($p=0.18$), μετά την διόρθωση ως προς τον χρόνο επιβίωσης. Η διάρκεια των επεισοδίων ΚΜ/ΚΤ (ανά ώρα

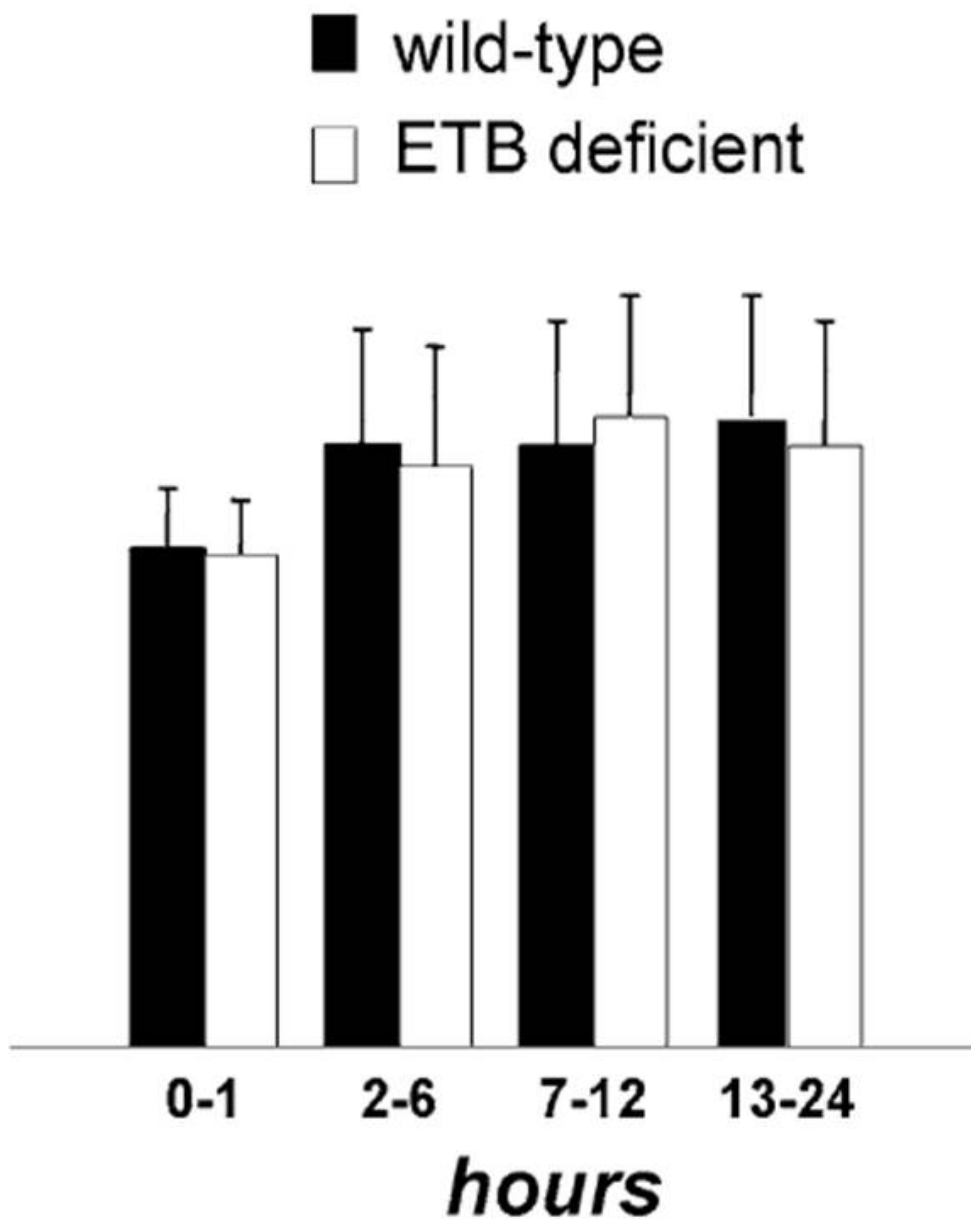
επιβίωσης) στην ομάδα sl/sl ήταν $53.38 \pm 13.12s$, και $94.15 \pm 37.95s$ στους επίμυες άγριου-τύπου.

Φάση II

Κατά τη διάρκεια της φάσης II, η επίπτωση των επεισοδίων ΚΤ/ΚΜ ήταν συγκρίσιμη στις δύο ομάδες ($p=0.49$). Οι τιμές ήταν $37.30 \pm 37.22s$ για την ομάδα sl/sl, και $22.70 \pm 20.09s$ για την ομάδα άγριου-τύπου. Η έλλειψη στατιστικά σημαντικής διαφοράς παρέμεινε και μετά τη διόρθωση ως προς τον χρόνο επιβίωσης. Οι τιμές ήταν, αντίστοιχα, $1.62 \pm 1.61s$ και $0.98 \pm 0.87s$.

Αρρυθμιολογικό σκορ μετά τον αποκλεισμό των β-αδρενεργικών υποδοχέων

Μετά την οξεία χορήγηση προπρανολόλης, το αρρυθμιολογικό σκορ ήταν παρόμοιο για τις δύο ομάδες, καθ' όλη την περίοδο παρακολούθησης (εικόνα 23B).



Εικόνα 23B: Αρρυθμολογικό σκορ για τις δύο ομάδες, καθ' όλη την περίοδο παρακολούθησης

6.4 Συζήτηση

Ο αιφνίδιος καρδιακός θάνατος υπολογίζεται ότι περιλαμβάνει το 50% των καρδιαγγειακών θανάτων στις Ηνωμένες Πολιτείες της Αμερικής, οι οποίοι υπολογίζονται σε 500000, ενώ παρόμοιοι αριθμοί ισχύουν και στην Ευρώπη.^[62,111] Το οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου είναι συχνά υπεύθυνο για αιφνίδιο καρδιακό θάνατο σε ασθενείς χωρίς προηγούμενο ιστορικό στεφανιαίας νόσου και στους οποίους ένα θανατηφόρο επεισόδιο κοιλιακής αρρυθμίας μπορεί να είναι η πρώτη κλινική εκδήλωση αθηρωμάτωσης των στεφανιαίων αρτηριών.^[112]

Η παθοφυσιολογία των κοιλιακών αρρυθμιών που επάγονται από ισχαιμία είναι πολύπλοκη και πολλές πτυχές παραμένουν αδιευκρίνιστες. Μέσα σε δευτερόλεπτα από την απόφραξη των στεφανιαίων αγγείων, μεταβολικές και ιοντικές αλλαγές λαμβάνουν χώρα τοπικά στο ισχαιμικό μυοκάρδιο. Οι αλλαγές αυτές έχουν σαν αποτέλεσμα την μεταβολή της αγωγιμότητας και της ανερέθιστης περιόδου, μεταβολές που, με την σειρά τους, ευνοούν την δημιουργία κοιλιακών ταχυαρρυθμιών με τον μηχανισμό της επανεισόδου.^[30]

Έχει αποδειχθεί πειραματικά, ότι η εμφάνιση κοιλιακών αρρυθμιών μετά από ισχαιμία του μυοκαρδίου ακολουθεί μία διφασική κατανομή.^[51] Τα υπάρχοντα δεδομένα καταδεικνύουν ότι μια αντίστοιχη καμπύλη πιθανόν να παρατηρείται και στους ανθρώπους.^[27] Αυτή η διάκριση είναι κλινικά χρήσιμη, επειδή οδηγεί σε διαφορετικές στρατηγικές αντιμετώπισης μετά το έμφραγμα. Κατά τη διάρκεια της φάσης II, οι ασθενείς κατά κανόνα νοσηλεύονται σε μονάδες εμφραγμάτων και λαμβάνουν κατάλληλη αντιαρρυθμική αγωγή για τις καταγραφόμενες αρρυθμίες. Αντίθετα, οι κοιλιακές αρρυθμίες της φάσης I συμβαίνουν συνήθως πριν φτάσει ο ασθενής σε θεραπευτικές μονάδες, και αποτελούν την κύρια αιτία εξωνοσοκομειακού αιφνιδίου θανάτου.^[62,63,64]

Τα αποτελέσματα της διατριβής καταδεικνύουν ότι οι ΕΤΒ-υποδοχείς εμπλέκονται στους μηχανισμούς αρρυθμογένεσης κατά το οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου. Όμως, ο παθοφυσιολογικός τους ρόλος ποικίλει, ανάλογα με τη χρονική περίοδο μετά την εγκατάσταση της ισχαιμίας. Βρέθηκε μια ευδιάκριτη χρονική διασπορά στην επίπτωση των επεισοδίων ΚΤ/ΚΜ στις δύο ομάδες επίμυων, με υπεροχή στην ομάδα sl/sl (με

έλλειψη ETB-υποδοχέων στο καρδιαγγειακό σύστημα) κατά τη φάση I, και στην ομάδα των αγρίου τύπου κατά τη διάρκεια της φάσης II. Η δραστηριότητα του συμπαθητικού ακολούθησε το ίδιο πρότυπο, προσδίδοντας στο αυτόνομο νευρικό σύστημα σημαντικό ρόλο στους μηχανισμούς αρρυθμογένεσης. Συνολικά, η σοβαρότητα των επεισοδίων ΚΤ/ΚΜ ήταν μεγαλύτερη στην ομάδα sl/sl, όπως αποδεικνύεται από το υψηλότερο αρρυθμιολογικό σκορ και από την αυξημένη θνητότητα.

Φάση I αρρυθμογένεσης

Στην διατριβή βρέθηκε μεγαλύτερη επίπτωση των επεισοδίων ΚΤ/ΚΜ στην ομάδα sl/sl κατά τη διάρκεια της φάσης I, καταδεικνύοντας έναν ευεργετικό ρόλο των ETB-υποδοχέων. Αυτό το αποτέλεσμα έρχεται σε συνάρτηση με τα αποτελέσματα των Crocket και συν., που απέδειξαν ότι η χορήγηση sarafotoxin 6c (S6c), ενός αγωνιστή των ETB-υποδοχέων μείωσε την επίπτωση των κοιλιακών αρρυθμιών μετά το οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου.^[24] Επιπλέον, σε απομονωμένες καρδιές κονίκλων ή χορήγηση ενός ανταγωνιστή των ETB-υποδοχέων επέτεινε την ηλεκτροφυσιολογική δράση της ενδοθηλίνης-1.^[82] Προηγούμενες εργασίες έδωσαν περισσότερες πληροφορίες σχετικά με αυτά τα ευρήματα.^[4,65] Η πρώτη μελέτη διεξήχθη σε 35 επίμυες τύπου Wistar, οι οποίοι τυχαιοποιήθηκαν είτε στον εκλεκτικό ανταγωνιστή των ETA-υποδοχέων BQ-123 ή σε φυσιολογικό ορό και κατόπιν υπέστησαν απολίνωση της αριστερής στεφανιαίας αρτηρίας. Βρέθηκε χαμηλότερη επίπτωση των κοιλιακών αρρυθμιών και μικρότερη μέση διάρκεια των επεισοδίων στην ομάδα που έλαβε BQ-123, εύρημα που είχε σαν αποτέλεσμα την μείωση της αρρυθμιολογικής θνητότητας. Στην ομάδα ελέγχου, παρουσιάστηκε παράταση του μονοφασικού δυναμικού ενεργείας 24 ώρες μετά το έμφραγμα, ενώ στην ομάδα που έλαβε θεραπεία με BQ-123 παρέμεινε αμετάβλητο. Αυτά τα αποτελέσματα υποδηλώνουν μίαν άμεση αντιαρρυθμική δράση του αποκλεισμού των ETA-υποδοχέων μετά το οξύ έμφραγμα. Εντούτοις, η μειωμένη αρρυθμογένεση μετά τον αποκλεισμό των ETA-υποδοχέων μπορεί επίσης να οφείλεται και στη μείωση της ισχαιμίας στην εμφραγματική περιοχή και γύρω από αυτήν.^[4]

Για να εξεταστεί περαιτέρω ο ρόλος της ενδοθηλίνης-1 στην αρρυθμογένεση κατά το οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου, καθώς και η επίδραση του διπλού αποκλεισμού (των ETA-υποδοχέων και ETB-υποδοχέων), μελετήθηκαν πρόσφατα οι δράσεις του bosentan στο

πειραματικό πρότυπο του επίμυος. Μετά από θεραπεία 7 ημερών per os, τα πειραματόζωα υποβλήθηκαν σε απολίνωση της αριστερής στεφανιαίας αρτηρίας και αξιολογήθηκαν οι κοιλιακές αρρυθμίες για 24 ώρες μετεμφραγματικά. Επίσης, μετρήθηκε η διάρκεια του δυναμικού ενεργείας από μονοφασικές επικαρδιακές καταγραφές και αξιολογήθηκε η ενεργοποίηση του συμπαθητικού συστήματος από την μεταβλητότητα της καρδιακής συχνότητας και από τις τιμές των επιπέδων κατεχολαμινών στον ορό. Συγκριτικά με την ομάδα ελέγχου, το bosentan μείωσε σημαντικά την συνολική διάρκεια των κοιλιακών αρρυθμιών κατά τη διάρκεια της όψιμης μετεμφραγματικής φάσης, με μικρή επίδραση κατά την πρώιμη φάση. Όπως και σε προηγούμενες μελέτες, η θεραπεία με bosentan δεν επηρέασε το μέγεθος του εμφράγματος, ούτε και την συνολική θνητότητα. Η διάρκεια του δυναμικού ενεργείας στο 90% της επαναπόλωσης επιμηκύνθηκε στην ομάδα ελέγχου, εμφανίζοντας αυξημένη διασπορά της επαναπόλωσης, αλλά παρέμεινε σταθερή στα πειραματόζωα που έλαβαν θεραπεία. Το bosentan μείωσε τα επίπεδα της νοραδρεναλίνης αλλά αύξησε τα επίπεδα της αδρεναλίνης 24 ώρες μετά το έμφραγμα. Το χαμηλό φάσμα συχνοτήτων της μεταβλητότητας της καρδιακής συχνότητας (μετά από ανάλυση κατά Fourier), ένας δείκτης δραστηριότητας του συμπαθητικού νευρικού συστήματος, ήταν μειωμένο στα ζώα που χορηγήθηκε η ουσία. Επομένως, ο αποκλεισμός των ETB-υποδοχέων και ETB-υποδοχέων της ενδοθηλίνης-1 μειώνει τις όψιμες κοιλιακές ταχυαρρυθμίες κατά τη διάρκεια του οξέος εμφράγματος χωρίς επαναιμάτωση. Ο κύριος μηχανισμός δράσης φαίνεται να είναι η αποτροπή της επαναπολωτικής ανομοιογένειας. Όμως, τα διαφορετικά θεραπευτικά αποτελέσματα στην ενεργοποίηση του συμπαθητικού νευρικού συστήματος κατά την πρώιμη φάση αμβλύνουν την αντιαρρυθμική δράση.^[65]

Τα αποτελέσματα της διατριβής, σε συνάρτηση με προηγούμενα αποτελέσματα, δείχνουν ότι οι ETB-υποδοχείς ανταγωνίζονται την αρρυθμογενετική δράση της ενδοθηλίνης 1 κατά τη διάρκεια της πρώιμης φάσης του εμφράγματος.

Μηχανισμοί αντιαρρυθμικής δράσης των ETB-υποδοχέων κατά τη διάρκεια της φάσης I

Στην διατριβή βρέθηκαν αυξημένοι δείκτες συμπαθητικής δραστηριότητας και υψηλότερα επίπεδα κατεχολαμινών κατά τη διάρκεια της φάσης I στην ομάδα sl/sl (με έλλειψη ETB-υποδοχέων στο καρδιαγγειακό σύστημα), από ότι στους επίμυες άγριου-τύπου. Έτσι, ελλείψει των ETB-υποδοχέων, η αυξημένη αρρυθμογένεση κατά τη διάρκεια φάσης I

είναι πιθανώς δευτερογενής, εξαιτίας της εντονότερης ενεργοποίησης του συμπαθητικού συστήματος. Το συμπέρασμα αυτό ενισχύεται από την επίδραση του αποκλεισμού των β-αδρενεργικών υποδοχέων για τη φάση I αρρυθμογένεσης, όπως αυτή παρατηρήθηκε στα πειράματα μας. Συγκεκριμένα, η εκσεσημασμένη διαφορά στην αρρυθμογένεση, λόγω της αυξημένης επίπτωσης της KT/KM στην ομάδα sl/sl, εξαφανίστηκε μετά την οξεία χορήγηση προπρανολόλης.

Είναι γνωστό εδώ και πολλά χρόνια ότι η ενδοθηλίνη-1 συμβάλλει στην ρύθμιση της ενεργοποίησης του συμπαθητικού νευρικού συστήματος, αλλά οι κύριοι παθοφυσιολογικοί μηχανισμοί και ο επιμέρους ρόλος των ETA και ETB-υποδοχέων κατά την διάρκεια της ισχαιμίας του μυοκαρδίου δεν έχουν αναλυθεί επαρκώς.^[136] Στα πειράματα μας, τόσο η καρδιακή συχνότητα και οι δείκτες καρδιακής μεταβλητότητας, όσο και τα επίπεδα νορεπινεφρίνης του ορού ήταν υψηλότερα στην ομάδα sl/sl κατά τη διάρκεια της φάσης I, με αποτέλεσμα την έντονη βράχυνση του APD90. Πολλά στοιχεία συνηγορούν υπέρ της άποψης ότι, η ενεργοποίηση του συμπαθητικού συστήματος είναι ένας σημαντικός αρρυθμογεννητικός μηχανισμός κατά τη διάρκεια του εμφράγματος του μυοκαρδίου, μέσω αύξησης του διαστολικού δυναμικού της κυτταρικής μεμβράνης των μυοκαρδιακών κυττάρων. Η μεταβολή αυτή βραχύνει το APD90, ενώ προκαλεί και διασπορά της επαναπόλωσης, οι οποίες μεταβολές δημιουργούν με την σειρά τους λειτουργικά κυκλώματα επανεισόδου που μπορεί να οδηγήσουν σε KT/KM.^[51,58,118]

Η ενεργοποίηση του συμπαθητικού συστήματος κατά τη διάρκεια του εμφράγματος του μυοκαρδίου συνίσταται στην οξεία συμπαθητική διέγερση στο κεντρικό νευρικό σύστημα, στην αυξημένη έκκριση κατεχολαμινών από τον μυελό των επινεφριδίων, και στην αυξημένη απελευθέρωση νορεπινεφρίνης από το μυοκάρδιο.

Η έκκριση νορεπινεφρίνης από τις συμπαθητικές νευρικές απολήξεις στο κοιλιακό μυοκάρδιο είναι περιπεπλεγμένη και η κατανόηση της παθοφυσιολογίας ατελής. Κατά τη διάρκεια της φάσης I, η απελευθέρωση της νορεπινεφρίνης συμβαίνει πρώτα μέσω εξωκυττάρωσης, ακολουθούμενη από την αναστροφή της λειτουργίας του μεταφορέα της νορεπινεφρίνης. Η τελευταία αυτή μεταβολή προάγει την μαζική απελευθέρωση της νορεπινεφρίνης. Μέσω των ETA-υποδοχέων, η ενδοθηλίνη-1 αυξάνει την απελευθέρωση

της νορεπινεφρίνης μέσω αναστροφής της λειτουργίας του μεταφορέα της νορεπινεφρίνης, αποτέλεσμα της συσσώρευσης νατρίου στους νευρώνες.^[34]

Παρά το πλήθος των διαθέσιμων πληροφοριών για τους ΕΤΑ-υποδοχείς, ελάχιστα στοιχεία υπάρχουν από *in vivo* πειράματα, σχετικά με τον ρόλο των ΕΤΒ-υποδοχέων στην ενεργοποίηση του συμπαθητικού κατά τη διάρκεια του εμφράγματος του μυοκαρδίου. Στα πειράματα μας, η εκσεσημασμένη διέγερση του συμπαθητικού συστήματος που παρατηρήθηκε στην ομάδα των επίμυων *sl/sl* (με έλλειψη των ΕΤΒ-υποδοχέων στο καρδιαγγειακό σύστημα) στην πρόιμη μετεμφοραγματική φάση καταδεικνύει ένα προστατευτικό ρόλο στους ΕΤΒ-υποδοχείς, σε συμφωνία με προηγούμενες μελέτες που έγιναν σε απομονωμένες καρδιές επίμυων. Σε μία μελέτη σε απομονωμένες πάλλουσες καρδιές (κατά την πειραματική διάταξη Langendorff), οι επίμυες με έλλειψη των ΕΤΒ-υποδοχέων στο καρδιαγγειακό σύστημα εμφάνισαν υπερβολική έκκριση νορεπινεφρίνης μετά από καθολική ισχαιμία, και αυτή η δράση καταργήθηκε μετά από εκλεκτικό αποκλεισμό των ΕΤΑ-υποδοχέων.^[137]

Πρόσφατα, οι Isaka και συν. έδειξαν ότι τόσο οι ΕΤΑ-υποδοχείς όσο και οι ΕΤΒ-υποδοχείς ανευρίσκονται στις συμπαθητικές νευρικές απολήξεις της αριστερής κοιλίας και ρυθμίζουν την απελευθέρωση νορεπινεφρίνης.^[53] Στα πειράματα τους σε απομονωμένες καρδιές ινδικών χοιριδίων, η εξωγενής χορήγηση ενδοθηλίνης 1 αύξησε την έκκριση νορεπινεφρίνης και τις κοιλιακές ταχυκαρδίες με δόσοεξαρτώμενο τρόπο, μέσω κυρίως της ενεργοποίησης των ΕΤΑ-υποδοχέων.^[53] Επιπλέον, σε συμφωνία με τα ευρήματα μας, βρέθηκε σημαντική αύξηση της απελευθέρωσης νορεπινεφρίνης μετά από εκλεκτικό αποκλεισμό των ΕΤΒ-υποδοχέων. Αν οι ΕΤΒ-υποδοχείς μειώνουν τη δραστηριότητα του συμπαθητικού απευθείας αναστέλλοντας την αντλία Na/H ^[53], ή έμμεσα μειώνοντας την έκκριση ET-1 ^[11] δεν είναι πλήρως διευκρινισμένο και ίσως αποτελεί αντικείμενο νεότερων μελετών.

Οι ρυθμιστικές δράσεις της ενδοθηλίνης στην ενεργοποίηση του συμπαθητικού δεν εξασκούνται μόνο στο μυοκάρδιο, αλλά επίσης και στα επινεφρίδια. Υπάρχουν ισχυρές ενδείξεις ότι η ET-1 εμπλέκεται στη ρύθμιση της έκκρισης κατεχολαμινών από τα επινεφρίδια.^[138] Σε συμφωνία με τις προαναφερθείσες παρατηρήσεις, διαφορετικές επιδράσεις των ΕΤΑ-υποδοχέων και ΕΤΒ-υποδοχέων φαίνεται να υπάρχουν και στα

επινεφρίδια.^[138] Έτσι, η ενεργοποίηση των ΕΤΑ-υποδοχέων κάτω από ισχαιμικές συνθήκες αυξάνει την έκκριση των κατεχολαμινών, ενώ οι ΕΤΒ-υποδοχείς ασκούν ανασταλτική δράση στην λειτουργία αυτήν.^[89]

Τα δεδομένα του πρώτου μέρους της διατριβής, εξεταζόμενα στο ίδιο πλαίσιο με προηγούμενα ευρήματα, υποδηλώνουν μια προστατευτική δράση των ΕΤΒ-υποδοχέων στην κοιλιακή αρρυθμογένεση κατά τη διάρκεια της φάσης I μετά από έμφραγμα του μυοκαρδίου. Αυτό το αποτέλεσμα φαίνεται να ασκείται κυρίως μέσω της μείωσης της συμπαθητικής διέγερσης, τόσο στο επίπεδο του μυοκαρδίου όσο και στο επίπεδο των επινεφριδίων. Έτσι, τα αυξημένα επίπεδα της νορεπινεφρίνης, που βρέθηκαν στην ομάδα sl/sl, μπορεί να είναι αποτέλεσμα της ενεργοποίησης του συμπαθητικού και στα δύο επίπεδα, αντικατοπτρίζοντας τη διπλή πηγή της νορεπινεφρίνης. Σε αντίθεση, τα ευρήματα όσο αφορά στα επίπεδα επινεφρίνης μεταξύ των δύο ομάδων επίμυων μπορεί να εξηγηθούν από την ανασταλτική δράση των ΕΤΒ-υποδοχέων μόνο στα επινεφρίδια.

Φάση αρρυθμογένεσης II

Ένα μάλλον απροσδόκητο αποτέλεσμα στα πειράματά μας ήταν η μειωμένη επίπτωση ΚΤ/ΚΜ στην ομάδα sl/sl κατά τη διάρκεια της φάσης II. Αυτό το εύρημα συνοδεύτηκε από χαμηλότερη καρδιακή συχνότητα και μειωμένη συμπαθητική δραστηριότητα όπως φαίνεται και από τους δείκτες μεταβλητότητας της καρδιακής συχνότητας.

Υπάρχουν περιορισμένα πειραματικά δεδομένα που αφορούν στην ενεργοποίηση του συμπαθητικού κατά την φάση II. Στη διατριβή, η χρήση ενός εμφυτεύσιμου συστήματος καταγραφής ηλεκτροκαρδιογραφήματος επέτρεψε την μακροπρόθεσμη αξιολόγηση του αυτόνομου νευρικού συστήματος σε πειραματόζωα, χωρίς τους περιορισμούς της αναισθησίας. Στην ομάδα επίμυων άγριου-τύπου, η συμπαθητική δραστηριότητα αυξήθηκε κατά τη διάρκεια της φάσης I και παρέμεινε αυξημένη και κατά τη διάρκεια της φάσης II. Αυτό το εύρημα ήταν συμβατό και με αποτελέσματα προηγούμενων μελετών.^[1,31,65] Αντίθετα, η ομάδα sl/sl παρουσίασε εκσεσημασμένη συμπαθητική δραστηριότητα κατά τη διάρκεια της φάσης I, η οποία ακολούθως μειώθηκε κατά τη φάση II. Παρά αυτές τις επισημάνσεις, αυτό το εύρημα μπορεί να θεωρηθεί ως

δευτερεύουσας σημασίας, λόγω της συγκρίσιμης θνητότητας στις δύο ομάδες επίμυων κατά τη διάρκεια αυτής της φάσης.

Η εξήγηση για τα ευρήματα μας είναι δύσκολη. Η πιο πιθανή φαίνεται να είναι η εξάντληση της νορεπινεφρίνης στις νευρικές απολήξεις. Η ακριβής διάρκεια που απαιτείται για να προκληθεί αυτό το αποτέλεσμα είναι άγνωστη, αλλά ίσως κυμαίνεται μεταξύ 30 και 60 λεπτών, ανάλογα με το είδος του πειραματόζωου και τις πειραματικές συνθήκες ισχαιμίας. Κατά συνέπεια, η εξάντληση των αποθεμάτων κατεχολαμινών στις νευρικές απολήξεις κατά τη διάρκεια της φάσης II στην ομάδα sI/sI, μπορεί να προκλήθηκε λόγω της αυξημένης συμπαθητικής διέγερσης κατά τη διάρκεια της φάσης I.^[19,33] Η μειωμένη επίπτωση αρρυθμιών κατά τη διάρκεια της φάσης II στην ομάδα sI/sI υπογραμμίζει το σύνθετο ρόλο της ET-1 κατά τη διάρκεια του εμφράγματος του μυοκαρδίου και υποσημαίνει την ανάγκη για περαιτέρω μελέτες.

Περιορισμοί της μελέτης

Η μελέτη μας είχε τους ακόλουθους περιορισμούς:

- 1) Στη διατριβή εξετάσαμε τον παθοφυσιολογικό ρόλο των ETB-υποδοχέων στην κοιλιακή αρρυθμιογένεση σε ένα πειραματικό πρότυπο μόνιμης απολίνωσης στεφανιαίων αγγείων σε επίμυες. Το πρωτόκολλο αυτό δεν επιτρέπει την αξιολόγηση της επίδρασης που έχει η επαναιμάτωση. Παρά τη διαδεδομένη εφαρμογή στρατηγικών επαναιμάτωσης, τα αποτελέσματά μας είναι κλινικά σχετικά, δεδομένου του σημαντικού ποσοστού των ασθενών (20-30%), οι οποίοι δεν αντιμετωπίζονται με επαναιμάτωση.
- 2) Οι μετρήσεις του μονοφασικού δυναμικού ενέργειας σε διάφορα χρονικά σημεία μετά την απολίνωση της στεφανιαίας θα επέτρεπε να διευκρινίσουμε λεπτομερέστερα τους υποκείμενους αρρυθμιολογικούς μηχανισμούς. Τέτοιες μετρήσεις όμως θα επηρέαζαν την καταγραφή των αρρυθμιών από την συνεχή λήψη ηλεκτροκαρδιογραφήματος.
- 3) Στην παρούσα μελέτη δεν εκτιμήσαμε την λειτουργικότητα της αριστερής κοιλίας σε καμία από τις δύο ομάδες. Δεδομένου ότι η δυσλειτουργία της αριστερής κοιλίας αποτελεί μια σημαντική αιτία ενεργοποίησης του συμπαθητικού, οι

διαφορές στη λειτουργικότητα της αριστερής κοιλίας μετά από το οξύ έμφραγμα στις δύο ομάδες ίσως παίζουν ρόλο για τις παρατηρούμενες διαφορές στην ενεργοποίηση του συμπαθητικού.

Συμπερασματικά, το πρώτο μέρος της διατριβής κατέδειξε τον παθοφυσιολογικό ρόλο των ΕΤΒ-υποδοχέων στην ενεργοποίηση του συμπαθητικού και την αρρυθμιογένεση κατά τη διάρκεια παρατεταμένης περιόδου παρακολούθησης μετά το έμφραγμα του μυοκαρδίου, ένα αντικείμενο που δεν είχε ερευνηθεί στο παρελθόν σε in vivo πειραματικά πρότυπα. Αν και τα δεδομένα από πειραματικές μελέτες πρέπει να επεκτείνονται στους ανθρώπους με προσοχή, θεωρούμε ότι τα ευρήματά μας συντελούν στην κατανόηση των μηχανισμών αρρυθμιογένεσης μετά από ισχαιμία.^[85]

6.5 ΔΕΥΤΕΡΟ ΜΕΡΟΣ: ΕΤΒ-ΥΠΟΔΟΧΕΙΣ ΚΑΙ ΣΥΜΠΑΘΗΤΙΚΗ ΔΡΑΣΤΗΡΙΟΤΗΤΑ

Στο δεύτερο μέρος της διατριβής, διερευνήσαμε περαιτέρω τον ρόλο των ΕΤΒ-υποδοχέων στην αρρυθμιογένεση μετά από οξύ έμφραγμα και την επίδραση τους στην ενεργοποίηση του συμπαθητικού. Επιπλέον στόχος μας ήταν να ερευνήσουμε τον παθοφυσιολογικό ρόλο των ΕΤΒ-υποδοχέων στον μυελό των επινεφριδίων, εστιάζοντας στην επίδραση τους στην αρρυθμιογένεση.

Τα πειραματικό πρωτόκολλο στο δεύτερο μέρος της διατριβής συμφωνεί με τις κατευθυντήριες οδηγίες της συνθήκης του Ελσίνκι, ακολουθώντας τις αρχές του παγκοσμίου οργανισμού υγείας, και εγκρίθηκε από τις αρμόδιες αρχές.. Επιπλέον, όλες οι πειραματικές διαδικασίες ήταν σε συμμόρφωση με την ευρωπαϊκή νομοθεσία (European Union directive for the protection of animals used for scientific purposes 609/1986, revised in 2010/63/EU).

Τα πειραματόζωα τοποθετήθηκαν ανά δύο σε κλωβούς και τηρήθηκαν αυστηρά όλες οι απαραίτητες συνθήκες φύλαξης από εξειδικευμένο προσωπικό. Η σχετική υγρασία, η θερμοκρασία και η κυκλική εναλλαγή σκότους/φωτός ελέγχονταν καθημερινά, και στα πειραματόζωα χορηγείτο νερό και τροφή κατά βούληση.

6.5.1 Πληθυσμός πειραματοζώων

Η μελέτη διεξήχθη σε 120 αρσενικούς επίμους, ηλικίας 17-22 εβδομάδων και βάρους 255-340g. Για να διατηρήσουμε τον πληθυσμό της μελέτης, τα πειραματόζωα αντικαθιστούνταν σε περίπτωση θανάτου λόγω αιμορραγίας ή χειρουργικών χειρισμών.

Για να μελετήσουμε τον παθοφυσιολογικό ρόλο των ΕΤΒ-υποδοχέων χρησιμοποιήθηκαν δύο είδη πειραματοζώων. Οι επίμους άγριου-τύπου και οι επίμους με συγγενή έλλειψη των ΕΤΒ-υποδοχέων (sl/sl). Το τελευταίο είδος και οι ιδιότητες του αναλύθηκαν στην περιγραφή του πρώτου μέρους της διατριβής^{41,42}.

6.5.2 Πειραματικό πρωτόκολλο στο δεύτερο μέρος της διατριβής

Το δεύτερο μέρος της διατριβής αποτελείται από δύο πρωτόκολλα:

- i. Στο πρώτο πρωτόκολλο, μελετήθηκαν οι δράσεις των ΕΤΒ-υποδοχέων στα επινεφρίδια, συγκρίνοντας την αρρυθμιογένεση σε τέσσερις ομάδες πειραματοζώων, άγριου-τύπου, ή sl/sl, με ή χωρίς επινεφριδιεκτομή. Η σύγκριση αυτή στοχεύει στον χαρακτηρισμό της συμμετοχής των επινεφριδίων στην αρρυθμιογένεση και επιτρέπει την ταυτοποίηση του ρόλου των ΕΤΒ-υποδοχέων στο επινεφρίδιο, έναντι αυτού στο μυοκάρδιο. Δεδομένου ότι η σημασία της δράσης του συμπαθητικού συστήματος μειώνεται μετά το πέρας της πρώιμης μετεμφραγματικής περιόδου ^[18], αποφασίσαμε να μελετήσουμε την επίπτωση των ΚΤ/ΚΜ για την πρώτη ώρα μετεμφραγματικά (φάση Ι).
- ii. Στο δεύτερο πρωτόκολλο, ερευνήσαμε τις δράσεις της φαρμακολογικής εξάντλησης κατεχολαμινών (από τις συμπαθητικές απολήξεις και τα κύτταρα χρωμαφίνης στον μυελό των επινεφριδίων) στην επίπτωση των ΚΤ/ΚΜ κατά τη διάρκεια του οξέως εμφράγματος του μυοκαρδίου στην ομάδα επίμυων άγριου-τύπου και στην ομάδα sl/sl.

Χρονικά διαστήματα

Όπως αναφέρθηκε και στο πρώτο μέρος της διατριβής ^[64], η επίπτωση των ΚΤ/ΚΜ αναφέρεται ξεχωριστά για τη φάση Ι (αναφέρεται στην ισχαιμία και την εγκατάσταση της νέκρωσης), για τη 2^η μέχρι την 11^η ώρα (φάση Ια) από την απολίνωση της στεφανιαίας και για την 12^η μέχρι την 24^η ώρα μετά την απολίνωση (φάση Ιβ) ^[28,62,64].

Επινεφριδιεκτομή

Η αμφοτερόπλευρη επινεφριδιεκτομή έγινε 3 ημέρες πριν την επαγωγή του εμφράγματος. Η διαδικασία διασωλήνωσης και αναισθησίας των πειραματοζώων ήταν η ίδια με αυτήν που ακολουθήθηκε στο πρώτο μέρος της διατριβής. Τα επινεφρίδια αφαιρούντο μέσω αμφοτερόπλευρων ραχιαίων μεσοπλευρίων τομών. Μετά την επινεφριδιεκτομή ακολουθούσε η χορήγηση υδροκορτιζόνης, σε δοσολογία 5μg/kg/ημέρα υποδορίως ^[104].

Εμφύτευση συστήματος τηλεμετρίας

Όπως και στο πρώτο μέρος της διατριβής, μία ημέρα πριν την πρόκληση του εμφράγματος, ένας πομπός συνεχούς καταγραφής ηλεκτροκαρδιογραφήματος (Dataquest, Data Sciences International, Transoma Medical, Arden Hills, MN, USA) εμφυτευόταν στη περιτοναϊκή κοιλότητα ^[1,4].

Χορήγηση ρεσερπίνης

Η φαρμακευτική εξάντληση των κατεχολαμινών έγινε με τη χορήγηση ρεσερπίνης ενδοπεριτοναϊκά, σε δοσολογία 0,15μg/kg, 24 ώρες πριν την πρόκληση του εμφράγματος ^[5]. Αυτή η αγωγή έχει αποδειχθεί ότι έχει ως αποτέλεσμα την δραστική εξάντληση των αποθηκών των κατεχολαμινών σε διάφορα όργανα, συμπεριλαμβανομένων των συμπαθητικών νευρικών απολήξεων στην καρδιά και των κύτταρων χρωμαφίνης στον μυελό των επινεφριδίων ^[81].

Πρόκληση εμφράγματος του μυοκαρδίου

Μετά την εμφύτευση του συστήματος τηλεμετρίας, οι επίμυες αναισθητοποιούνταν εκ νέου και υποβάλλονταν σε απολίνωση της αριστερής στεφανιαίας αρτηρίας με τον τρόπο που περιγράφηκε στο πρώτο μέρος της διατριβής ^[1,4,31,95]. Καμία προσπάθεια ανάνηψης δεν επιτρεπόταν καθ' όλη τη διάρκεια της μελέτης.

Καρδιακή συχνότητα

Με τη βοήθεια του λογισμικού (Dataquest Acquisition & Analysis System ART 2.2, Data Sciences International), σε κάθε αποθηκευμένη σειρά δεδομένων εντοπίστηκαν τα επάρματα R και στη συνέχεια τα διαστήματα R-R. Ο αλγόριθμος του προγράμματος απέκλεισε τους παλμούς που δεν προέρχονταν από φλεβοκομβικά ερεθίσματα και υπολογίστηκε η μέση τιμή του διαστήματος R-R για χρονικά διαστήματα των 5 λεπτών. Έτσι καθορίστηκε η καρδιακή συχνότητα σε κάθε χρονική περίοδο μετά το έμφραγμα. Τέτοιοι υπολογισμοί έγιναν σε κάθε επίμυ ακριβώς τη στιγμή πριν το έμφραγμα, στο 5°, 30° και 60° λεπτό μετά από την πρόκλησή του, και ανά μία ώρα έκτοτε, μέχρι να ολοκληρωθεί το πείραμα.

Ανάλυση αρρυθμιών

Η διάρκεια κάθε επεισοδίου καθορίστηκε με τη βοήθεια της βαθμολογημένης κλίμακας που παρέχει το λογισμικό. Κοιλιακή ταχυκαρδία (KT) ορίστηκε η εμφάνιση 4 ή περισσότερων διαδοχικών πρώιμων παλμών (πρώιμα συμπλέγματα QRS σε σχέση με το κύμα P). Κοιλιακή μαρμαρυγή (KM) ορίστηκε η εμφάνιση ενός σήματος που αλλάζει από κύκλο σε κύκλο ως προς τη συχνότητα και τη μορφολογία ή ενός σήματος στο οποίο τα διάφορα συμπλέγματα QRS δεν μπορούν να ξεχωρίσουν μεταξύ τους. Όπως και στο πρώτο μέρος της διατριβής, αναφέρεται συνολικά το άθροισμα KT/KM ^[1,4,31,95].

Ηλεκτροκαρδιογραφικοί δείκτες δραστηριότητας συμπαθητικού

Η δραστηριότητα του συμπαθητικού εκτιμήθηκε μέσω της μεταβλητότητας της καρδιακής συχνότητας^[72]. Αυτοί οι δείκτες υπολογίστηκαν ξεχωριστά για την κάθε φάση. Χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό Kubios HRV (version 2.1, Biosignal Analysis and Medical Imaging Group, Department of Applied Physics, University of Eastern Finland, Kuopio, Finland)^[92]. Σαν δείκτη της δραστηριότητας του συμπαθητικού, αναφέρουμε το λόγο του φάσματος χαμηλής συχνότητας προς το φάσμα υψηλής συχνότητας ^[64], που επιδεικνύει καλό συσχετισμό με τα επίπεδα κατεχολαμινών στον ορό όπως αποδείξαμε στο πρώτο μέρος της διατριβής^[93].

Μέτρηση μονοφασικών δυναμικών ενεργείας

Όπως και στο πρώτο μέρος, ένας επικαρδιακός καθετήρας (MAP probe, model 200, EP Technologies, Sunnyvale California, USA) τοποθετούνταν διαδοχικά στα πλάγια τοιχώματα της αριστερής και δεξιάς κοιλίας με εφαρμογή ήπιας, σταθερής πίεσης. Το σήμα της λήψης αυτής ενισχυόταν με τη βοήθεια προενισχυτή (model 300 EP Technologies, Sunnyvale California, USA). Αναλύθηκαν 50 φλεβοκομβικές συστολές ανά καταγραφή και υπολογίστηκε η διάρκεια τού μονοφασικού δυναμικού της αριστερής κοιλίας στο 90% (APD90) και στο 75% (APD75) της επαναπόλωσης. Οι υπολογισμοί έγιναν για καταγραφές πριν την απολίνωση και 5 λεπτά μετά από αυτήν. Η τυπική απόκλιση αυτών των μετρήσεων χρησιμοποιήθηκε σαν μέτρηση της διασποράς της επαναπόλωσης, ενώ οι καταγραφές τις δεξιάς κοιλίας παρείχαν τιμές αναφοράς^[31,36].

Μέτρηση της δραστηριότητας

Η επίπτωση και η σοβαρότητα της οξείας καρδιακής ανεπάρκειας εκτιμήθηκε μέσω της φυσικής δραστηριότητας που καταγράφηκε από το λογισμικό DSI. Αυτό το πρόγραμμα καταγράφει μεταβολές της ισχύος του σήματος, ανάλογα με την τοποθεσία του πειραματόζωου. Το σύνολο των μεταβολών ατών αντικατοπτρίζει τη συνολική δραστηριότητα του επίμυος^[64].

Στατιστική ανάλυση

Όλες οι τιμές αναφέρονται σαν μέσες, με σταθερή απόκλιση. Δημιουργήθηκαν καμπύλες επιβίωσης κατά Kaplan- Meier και εκτιμήθηκε η ετερογένεια με τη δοκιμασία χ^2 . Οι διαφορές μεταξύ των ομάδων εκτιμήθηκαν με τη δοκιμασία Wilcoxon, κατά Peto και Peto. Οι διαφορές στις συνεχείς μεταβλητές συγκρίθηκαν με τη δοκιμασία Student's t-test, ενώ οι διαφορές μεταξύ τριών ή τεσσάρων ομάδων συγκρίθηκαν χρησιμοποιώντας την ανάλυση μεταβλητότητας, ακολουθούμενη από την post hoc δοκιμασία πολλαπλών επιπέδων κατά Duncan. Η στατιστική σημαντικότητα ορίστηκε στο επίπεδο του 0.05.

6.5.3 Αποτελέσματα

Πρωτόκολλο επινεφριδιεκτομής

Σε αυτό το τμήμα της μελέτης περιελήφθησαν 60 επίμυες (αρσενικοί, ηλικίας 17-22 εβδομάδες). Δημιουργήθηκαν τέσσερις ομάδες, ως εξής:

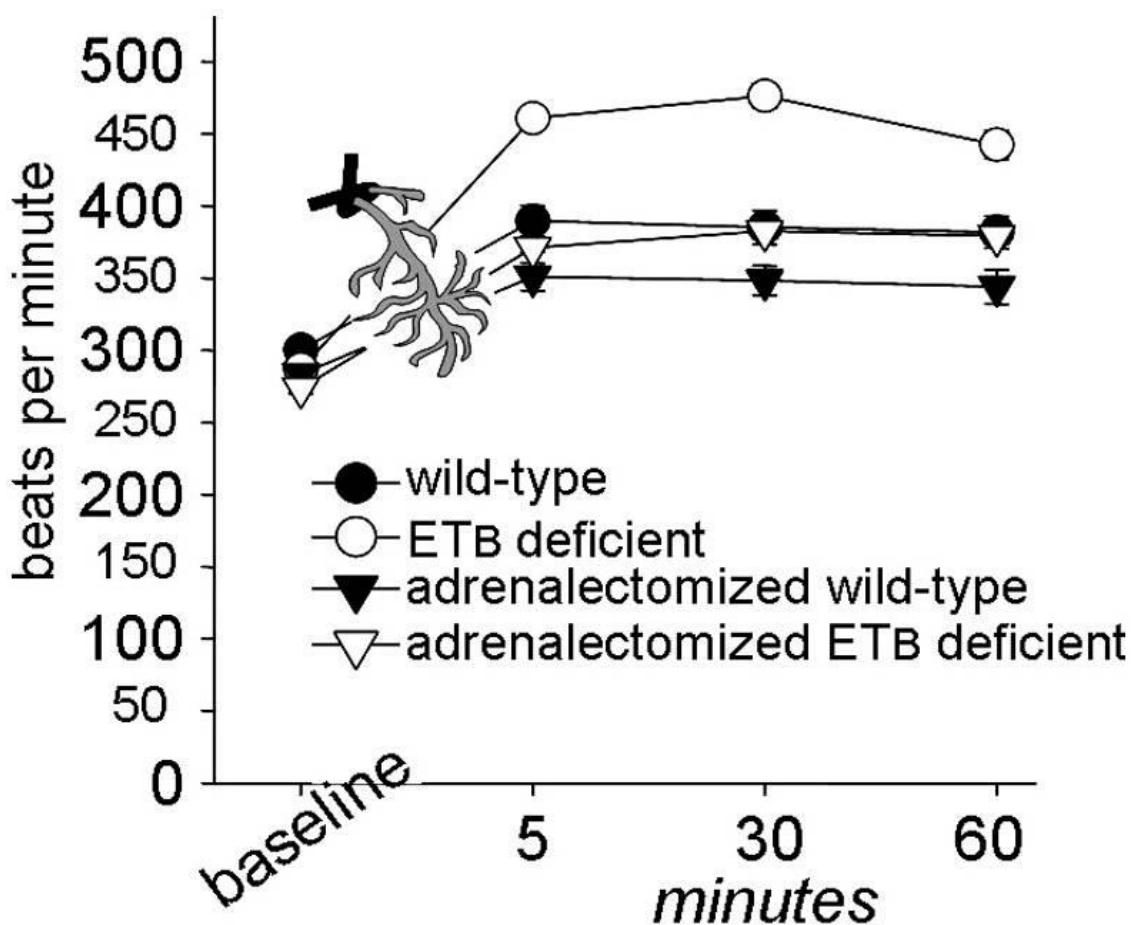
- i. Επίμυες άγριου-τύπου με επινεφριδιεκτομή (n=15, 288±6g)
- ii. Επίμυες άγριου-τύπου χωρίς επινεφριδιεκτομή (n=15, 286±4g)
- iii. Επίμυες sl/sl με επινεφριδιεκτομή (n=15, 287±6g)
- iv. Επίμυες sl/sl χωρίς επινεφριδιεκτομή (n=15, 282±4g)

Θνητότητα

Η θνητότητα μια ώρα μετά την απολίνωση ήταν 46% στην ομάδα sl/sl χωρίς επινεφριδιεκτομή, 26% στην ομάδα sl/sl με επινεφριδιεκτομή, 20% στην ομάδα άγριου-τύπου χωρίς επινεφριδιεκτομή και 26% στην ομάδα άγριου-τύπου με επινεφριδιεκτομή. Δεν παρουσιάστηκε στατιστικά σημαντική διαφορά ανάμεσα στις 4 ομάδες ($\chi^2=3.96$), ωστόσο υπήρχε μία στατιστική τάση ($p=0.092$) για υψηλότερη θνητότητα στην ομάδα sl/sl χωρίς επινεφριδιεκτομή, συγκριτικά με τους άγριου-τύπου επίμυες χωρίς επινεφριδιεκτομή.

Καρδιακή συχνότητα

Δεν βρέθηκε καμία διαφορά ανάμεσα στις 4 ομάδες για την καρδιακή συχνότητα πριν την απολίνωση. Όπως φαίνεται στην εικόνα 27, η καρδιακή συχνότητα αυξήθηκε σε όλες τις ομάδες μετά την απολίνωση της στεφανιαίας αρτηρίας. Η επινεφριδιεκτομή μείωσε την καρδιακή συχνότητα και στις δύο ομάδες μετά την απολίνωση, ωστόσο αυτή η δράση ήταν πιο εμφανής στην ομάδα sl/sl σε όλες τις φάσεις παρακολούθησης.



Εικόνα 27. Καρδιακή συχνότητα μετά από επινεφριδιεκτομή. Η καρδιακή συχνότητα αυξήθηκε σε όλες τις ομάδες μετά την απολίνωση της στεφανιαίας αρτηρίας. Η επινεφριδιεκτομή μείωσε την καρδιακή συχνότητα κυρίως στην ομάδα *sl/sl*

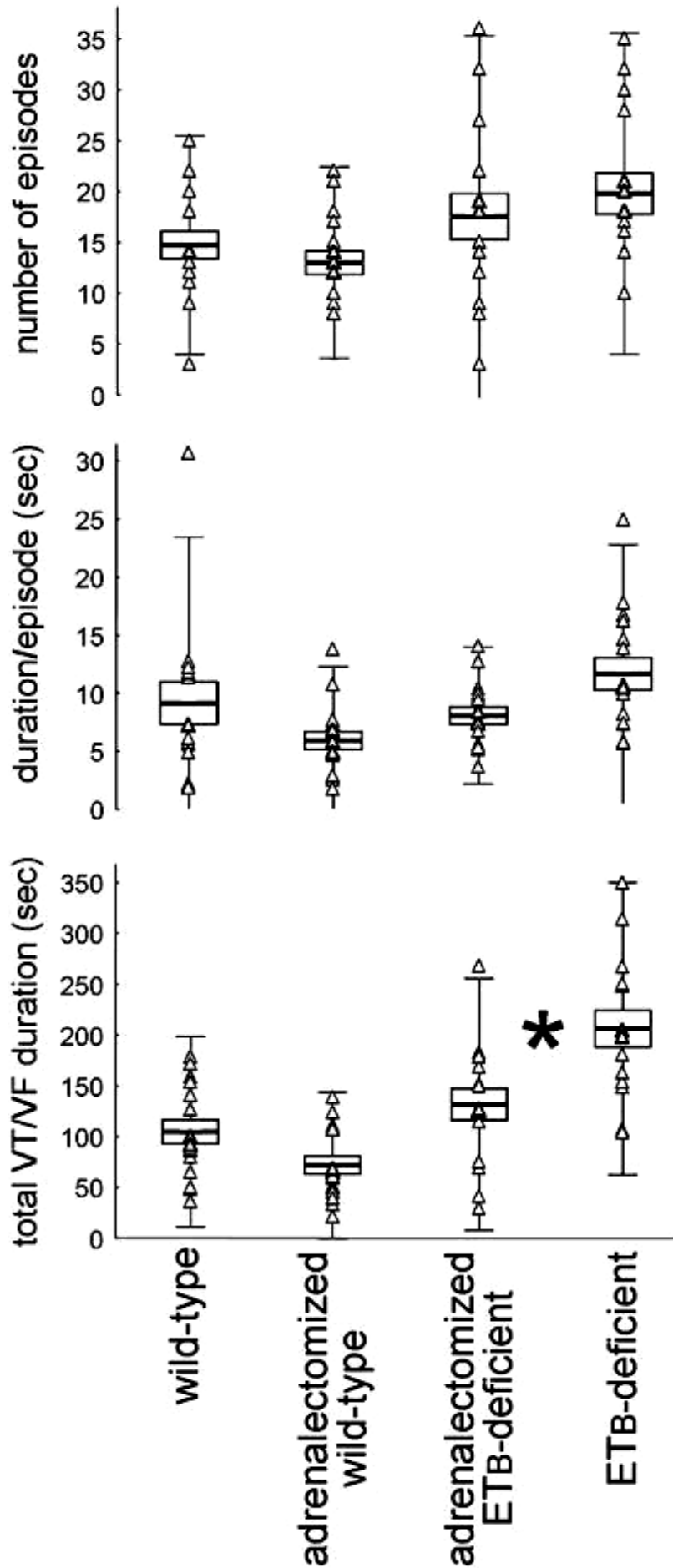
Επεισόδια ΚΤ/ΚΜ και χρονική διάρκεια

Ο αριθμός των επεισοδίων ΚΤ/ΚΜ και η συνολική τους χρονική διάρκεια κατά την φάση Ι φαίνονται στην εικόνα 28. Η επινεφριδιεκτομή δεν επηρέασε ($p=0.49$) τον αριθμό των επεισοδίων στους επίμυες άγριου-τύπου, ούτε τη διάρκεια τους ($p=0.11$). Ομοίως, δεν επηρέασε τον αριθμό των επεισοδίων ΚΤ/ΚΜ ούτε στην ομάδα *sl/sl*, υπήρχε όμως μια τάση μείωσης της μέσης διάρκειας των επεισοδίων στην ομάδα *sl/sl* με επινεφριδιεκτομή ($p=0.067$). Το εύρημα αυτό είχε σαν αποτέλεσμα, η συνολική διάρκεια των επεισοδίων στην ομάδα *sl/sl* με επινεφριδιεκτομή να είναι χαμηλότερη ($p<0.001$). Όταν η ομάδα των

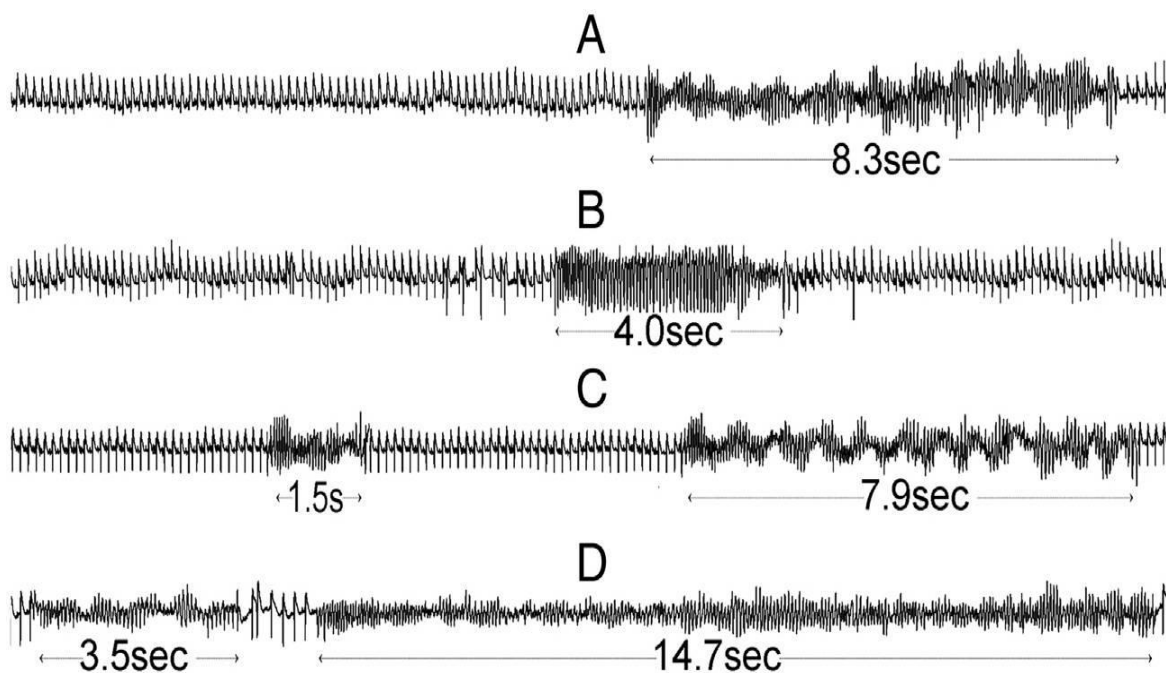
επίμυων άγριου-τύπου με επινεφριδικεκτομή συγκρίθηκε απευθείας με την ομάδα s1/s1 με επινεφριδικεκτομή, υπήρχε μία στατιστική τάση ($p=0.091$) για λιγότερα επεισόδια ΚΤ/ΚΜ στη πρώτη ομάδα (13.0 ± 1.2 έναντι 17.5 ± 2.2), με μικρότερη ($p=0.064$) μέση διάρκεια (5.91 ± 0.82 s έναντι 8.07 ± 0.76 s). Αυτές οι διαφορές είχαν σαν αποτέλεσμα χαμηλότερη ($p=0.0031$) συνολική διάρκεια επεισοδίων στην ομάδα επίμυων άγριου-τύπου με επινεφριδικεκτομή ($71.8\pm 9.3s$), συγκριτικά με την ομάδα s1/s1 με επινεφριδικεκτομή ($131.6\pm 16.0s$).

Ο αριθμός των επεισοδίων ΚΤ/ΚΜ, μέση διάρκεια επεισοδίου και η συνολική τους χρονική διάρκεια κατά τη φάσης I φαίνεται στην εικόνα 28.

Παραδείγματα καταγραφών φαίνονται στην εικόνα 29.



*Εικόνα 28. Αριθμός των επεισοδίων ΚΤ/ΚΜ, μέση διάρκεια επεισοδίου και η συνολική τους χρονική διάρκεια κατά τη διάρκεια της φάσης Ι. Παρατηρήθηκε χαμηλότερη συνολική διάρκεια επεισοδίων στην ομάδα αγρίου τύπου με επινεφριδικτομή συγκριτικά με την ομάδα *sl/sl* με επινεφριδικτομή. Η επινεφριδικτομή έδειξε να μειώνει σημαντικά τη συνολική διάρκεια αρρυθμιών στην ομάδα *sl/sl*.*



Εικόνα 29. Παράδειγμα καταγεγραμμένων αρρυθμιών στις τέσσερις ομάδες

Πρωτόκολλο ρεσερπίνης

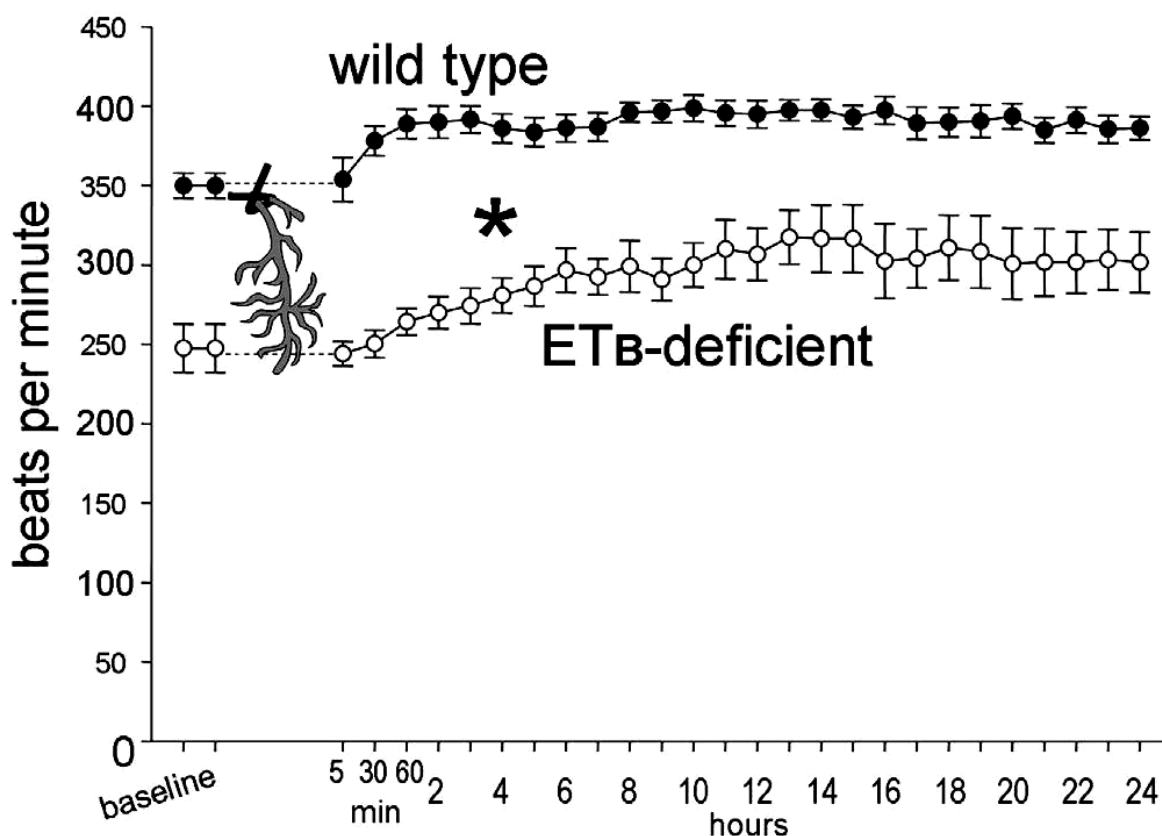
Το πρωτόκολλο της ρεσερπίνης περιελάμβανε 60 αρσενικούς επίμυες, ηλικίας 20-22 εβδομάδων. Από αυτούς, οι 30 ($280 \pm 3g$) ήταν άγριου-τύπου, και οι υπόλοιποι 30 ($283 \pm 22g$) άνηκαν στην ομάδα sl/sl.

Θνητότητα

Δεν παρατηρήθηκαν διαφορές στις καμπύλες Kaplan- Meier μεταξύ των δύο ομάδων μετά τη χορήγηση ρεσερπίνης ($p=0.88$).

Καρδιακή συχνότητα

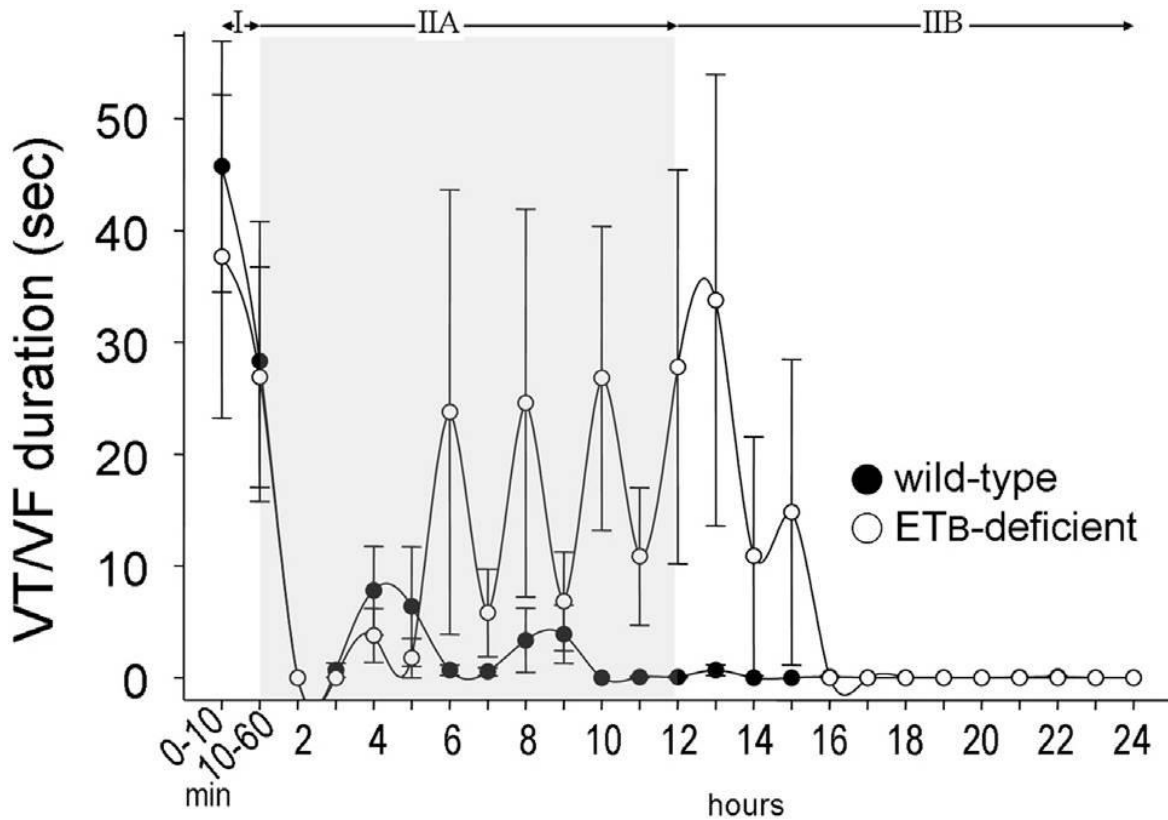
Σε σύγκριση με την ομάδα επίμυων άγριου-τύπου, η καρδιακή συχνότητα τόσο πριν την απολίνωση όσο και μετά το έμφραγμα του μυοκαρδίου ήταν χαμηλότερη στην ομάδα sl/sl καθόλη τη διάρκεια της παρακολούθησης (εικόνα 30),



Εικόνα 30. Καρδιακή συχνότητα μετά τη χορήγηση ρεσερπίνης. Η καρδιακή συχνότητα τόσο πριν την απολίνωση όσο και μετά το έμφραγμα του μυοκαρδίου ήταν χαμηλότερη στην ομάδα *sl/sl*

Διάρκεια επεισοδίων ΚΤ/ΚΜ

Η διάρκεια των επεισοδίων για κάθε ωριαίο διάστημα φαίνεται στην εικόνα 31. Κατά τη διάρκεια της πρώτης ώρας (φάση I), η διάρκεια των επεισοδίων ΚΤ/ΚΜ ήταν συγκρίσιμη στις δύο ομάδες ($p=0.72$). Στη φάση ΙΑ η συνολική διάρκεια των επεισοδίων ΚΤ/ΚΜ ήταν μεγαλύτερη ($p=0.049$) στην ομάδα *sl/sl* ($104.0 \pm 43.7s$) από την ομάδα άγριου-τύπου ($23.2 \pm 10.5s$). Ομοίως και για τη φάση ΙΙΒ, όπου η διάρκεια των επεισοδίων στην ομάδα *sl/sl* ήταν $87.2 \pm 42.8s$, έναντι $0.9 \pm 0.5s$ στην ομάδα άγριου-τύπου ($p=0.025$).



Εικόνα 31. Η συνολική διάρκεια των επεισοδίων ΚΤ/ΚΜ ήταν μεγαλύτερη στην ομάδα *sl/sl* κατά τις όψιμες φάσεις του εμφράγματος

Δραστηριότητα του συμπαθητικού συστήματος

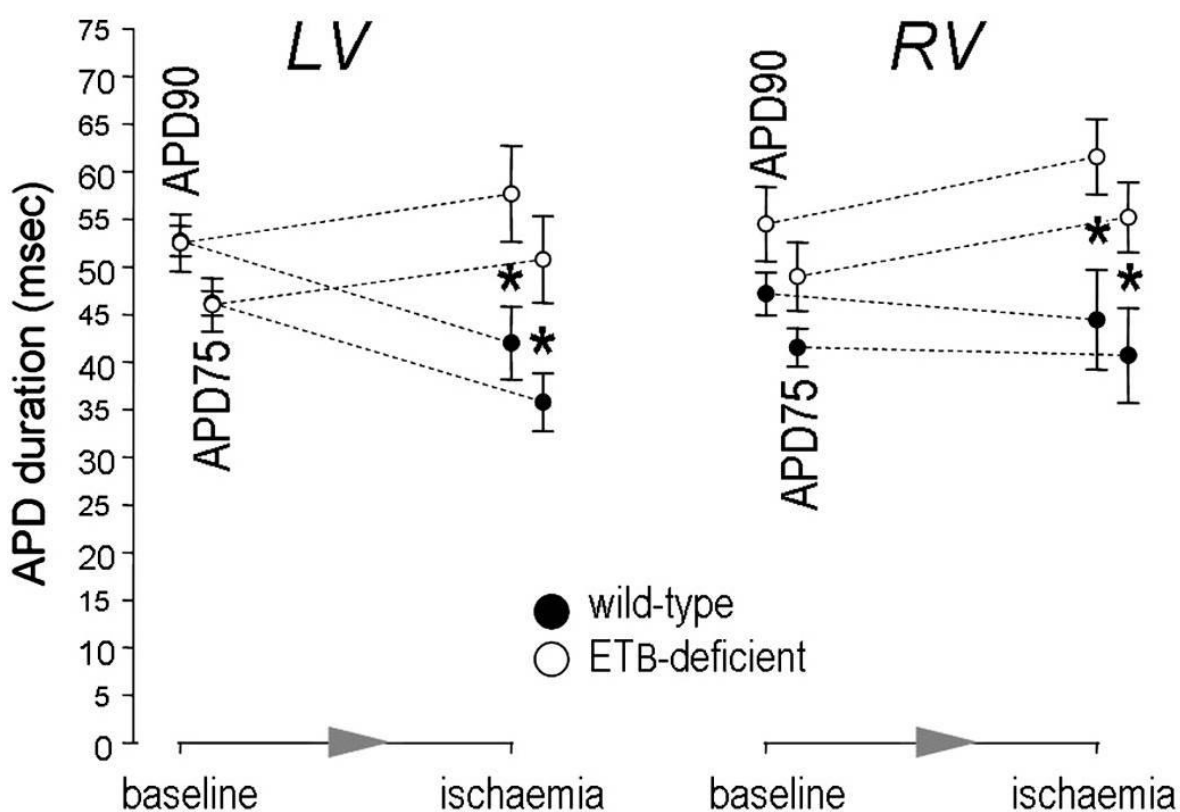
Η δραστηριότητα του συμπαθητικού συστήματος ήταν παρόμοια ($p=0.40$) στις δύο ομάδες (LF/HF: 0.95 ± 0.21 στην ομάδα *sl/sl*, έναντι 1.22 ± 0.22 στους επίμυες άγριου-τύπου) κατά τη διάρκεια της φάσης I. Αντίθετα, η δραστηριότητα του συμπαθητικού ήταν χαμηλότερη ($p=0.014$) στην ομάδα *sl/sl* (0.45 ± 0.09), από αυτήν στους επίμυες άγριου-τύπου (0.85 ± 0.09) κατά τη διάρκεια των φάσεων IIA και IIB (0.53 ± 0.07 έναντι 0.83 ± 0.09 , αντίστοιχα, $p=0.022$).

Καταγραφή μονοφασικών δυναμικών ενεργείας

Πριν την απολίνωση, δεν παρατηρήθηκαν διαφορές στο APD90 ή στο APD75 στην αριστερή ή στη δεξιά κοιλία. Κατά τη διάρκεια της ισχαιμίας, η διάρκεια και στις δύο

μετρήσεις ήταν μεγαλύτερη στην αριστερή κοιλία ($p=0.022$ and $p=0.012$, αντίστοιχα) και στη δεξιά κοιλία ($p=0.018$ and $p=0.031$, αντίστοιχα) για την ομάδα *sl/sl* συγκριτικά με την ομάδα επίμυων άγριου-τύπου (Εικόνα 32).

Η τυπική απόκλιση του APD90 (ως δείκτης διασποράς της επαναπόλωσης), 5 λεπτά μετά την απολίνωση, ήταν υψηλότερη ($p=0.0028$) στην ομάδα *sl/sl* ($3.22\pm 0.22\text{ms}$), συγκριτικά με τους επίμυες αγρίου-τύπου ($2.30\pm 0.15\text{ms}$).



Εικόνα 32: Πριν την απολίνωση δεν παρατηρήθηκαν διαφορές στο APD90 ή στο APD75 ούτε στην αριστερή ούτε στη δεξιά κοιλία. Κατά τη διάρκεια της ισχαιμίας, η διάρκεια και στις δύο μετρήσεις ήταν μεγαλύτερη στην αριστερή κοιλία και στη δεξιά κοιλία για την ομάδα *sl/sl* συγκριτικά με την ομάδα αγρίου τύπου.

Εκτίμηση της δραστηριότητας

Οι μετρήσεις της δραστηριότητας ήταν συγκρίσιμες στις δύο ομάδες κατά τη διάρκεια της φάσης I (456 ± 28 στην ομάδα *sl/sl* έναντι 471 ± 24 στους επίμυες αγρίου-τύπου, $p = 0.66$),

όπως και κατά τη διάρκεια της φάσης ΙΑ (469 ± 27 στην ομάδα s1/s1 έναντι 437 ± 36 στους επίμυες άγριου-τύπου, $p=0.89$) και κατά τη διάρκεια της φάσης ΙΒ (466 ± 26 στην ομάδα s1/s1, έναντι 436 ± 36 στους επίμυες άγριου-τύπου, $p=0.92$).

6.5.4 Συζήτηση

Από την πρώτη προσέγγιση το 1989 από τους Wennmalm και συν.^[136] μέχρι σήμερα, η διαδραστική επίδραση μεταξύ ET-1 και του συμπαθητικού νευρικού συστήματος κατά τη διάρκεια του εμφράγματος του μυοκαρδίου έχει προσελκύσει σημαντικό επιστημονικό ενδιαφέρον^[129]. Η βαθύτερη κατανόηση των υποκείμενων μηχανισμών μπορεί να προσφέρει σημαντική εμβάθυνση στους παθοφυσιολογικούς μηχανισμούς των ισχαιμικών αρρυθμιών, που συχνά οδηγούν σε αιφνίδιο καρδιακό θάνατο.

Στο δεύτερο μέρος της διατριβής εξετάσαμε τον ρόλο των ETB-υποδοχέων στην δραστηριότητα του συμπαθητικού συστήματος κατά τη διάρκεια του εμφράγματος του μυοκαρδίου, και τις επιπτώσεις του στην κοιλιακή αρρυθμογένεση. Η εργασία αυτή καταδεικνύει ότι οι ETB-υποδοχείς ρυθμίζουν την κοιλιακή αρρυθμογένεση κατά τη διάρκεια του εμφράγματος του μυοκαρδίου, ελέγχοντας την δραστηριότητα του συμπαθητικού συστήματος τόσο στο κοιλιακό μυοκάρδιο όσο και στο επίπεδο των επινεφριδίων.

ETB-υποδοχείς στα επινεφρίδια

Το οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου προκαλεί ενεργοποίηση του συμπαθητικού συστήματος, η οποία αυξάνει την αρρυθμογένεση^[118], ωστόσο η σχετική συμμετοχή της μυοκαρδιακής έναντι της επινεφριδιακής συμπαθητικής απόκρισης παραμένει ασαφής. Στα πειράματά μας, η αρρυθμογένεση μετά τη χορήγηση ρεσερπίνης (η οποία προκαλεί την εξάντληση των κατεχολαμινών τόσο στο επίπεδο των μυοκαρδιακών συμπαθητικών νευρικών απολήξεων όσο και στα κύτταρα χρωμαφίνης του μυελού των επινεφριδίων) ήταν χαμηλότερη συγκριτικά με αυτή που παρατηρήθηκε μετά από επινεφριδιεκτομή, η οποία με τη σειρά της ήταν χαμηλότερη από αυτή στις ομάδες ελέγχου. Αυτά τα ευρήματα υποδηλώνουν συμμετοχή τόσο του μυοκαρδίου όσο και του επινεφριδιακού ιστού στην

αρρυθμιογένεση φάσης I. Επιπλέον, τα ευρήματα στη καρδιακή συχνότητα και στα επεισόδια ΚΤ/ΚΜ στις δύο ομάδες πειραματοζώων υπογραμμίζουν ότι η συμμετοχή του επινεφριδιακού μυελού στην απόκριση του συμπαθητικού συστήματος και στην αρρυθμιογένεση μετά από οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου, εξαρτάται από τη ρύθμιση του από τους ΕΤΒ-υποδοχείς. Αυτό το συμπέρασμα έρχεται σε συμφωνία με προηγούμενη μελέτη^[65], όπου βρέθηκαν αυξημένα επίπεδα της αδρεναλίνης του πλάσματος μετά από διπλό (ΕΤΑ και ΕΤΒ) αποκλεισμό των υποδοχέων της ενδοθηλίνης.

Τα συμπεράσματα αυτά είναι επίσης σύμφωνα με αυτά των Nagayama και συν^[89]. Σε αυτή τη μελέτη, ο αποκλεισμός των ΕΤΑ-υποδοχέων ανέστειλε την έκλυση κατεχολαμινών, ωστόσο αυτή η αναστολή καταργήθηκε όταν οι επίμυες είχαν λάβει πρώτα αποκλειστή των ΕΤΒ-υποδοχέων. Τα παρόντα ευρήματα επεκτείνουν αυτές τις παρατηρήσεις, υποδεικνύοντας ότι η ενεργοποίηση των ΕΤΒ-υποδοχέων μετριάζει τη συμμετοχή των επινεφριδίων στην κοιλιακή αρρυθμιογένεση κατά τη διάρκεια του εμφράγματος του μυοκαρδίου. Επιπλέον, σε απουσία λειτουργικών ΕΤΒ-υποδοχέων, τα επινεφρίδια αυξάνουν την κοιλιακή αρρυθμιογένεση κατά τη διάρκεια του εμφράγματος του μυοκαρδίου, κυρίως επιμηκύνοντας τη διάρκεια των επεισοδίων ΚΤ/ΚΜ.^[96]

Τα πειράματα μας έριξαν περισσότερο φως στις περιορισμένες πληροφορίες που υπήρχαν μέχρι στιγμής για το ρόλο των επινεφριδίων κατά τη διάρκεια της ισχαιμίας και του οξέος εμφράγματος του μυοκαρδίου. Μια μικρή μελέτη σε αναισθητοποιημένες γάτες από τους Kuo και συν.^[73], είναι σε συμφωνία με τα ευρήματα μας, ενώ αντίστοιχο συμπέρασμα εξήχθη από τα ευρήματα μια κλινικής μελέτης όπου μελετήθηκε η ισχαιμία που προκλήθηκε από κολπική βηματοδότηση^[107]. Σε αυτή τη μελέτη, οι Remme και συν. βρήκαν αυξημένες τιμές νορεπινεφρίνης, αλλά όχι επινεφρίνης, κατά τη διάρκεια οξείας ισχαιμίας, καταδεικνύοντας κυρίως καρδιακή προέλευση στην ενεργοποίηση του συμπαθητικού.

Αντίθετα, σημαντικές αλλαγές και στις δύο κατεχολαμίνες επιδεικνύονται σε ασθενείς με οξύ πρόσθιο έμφραγμα, ενώ χαμηλότερες τιμές νορεπινεφρίνης παρατηρήθηκαν σε ασθενείς με οπίσθιο έμφραγμα (Slavikova και συν, 2007). Τα ευρήματα αυτά συνεπάγονται μια διπλή προέλευση, με τις τιμές της νορεπινεφρίνης να συσχετίζονται πιθανά με το μέγεθος της ισχαιμικής περιοχής.^[121]

Τα συμπεράσματα αναφορικά με τον ρόλο των επινεφριδίων στη γένεση των ισχαιμικών ΚΤ/ΚΜ είναι χρήσιμα στην έρευνα που αποσκοπεί στην διευκρίνιση των παραγόντων που ρυθμίζουν την απελευθέρωση κατεχολαμινών^[29]. Ανάμεσα στη πληθώρα των ουσιών που δρουν σαν ενδοκρινείς ή παρακρινείς μεσολαβητές της επινεφριδιακής δραστηριότητας, εκτιμούμε ότι ο ρόλος της ενδοθηλίνης-1 και των υποδοχέων της είναι σημαντικός και χρήζει περαιτέρω έρευνας.

ETB-υποδοχείς και αρρυθμογένεση φάσης I

Τόσο σε φυσιολογική όσο και σε ανεπαρκούσα αριστερή κοιλία, έχουν αποδειχθεί αντίθετες δράσεις των υποδοχέων ενδοθηλίνης στις μυοκαρδιακές συμπαθητικές νευρικές απολήξεις. Πιο συγκεκριμένα, οι Backs και συν. περιέγραψαν αναστολή της επαναπρόσληψης της νορεπινεφρίνης μέσω διέγερσης των ETΑ-υποδοχέων, καθώς και μείωση της απελευθέρωσης εξωκυττάριας νορεπινεφρίνης μέσω διέγερσης των ETB-υποδοχέων^[3]. Αυτές οι δράσεις επιβεβαιώθηκαν στην πρώιμη μετεμφραγματική φάση στα πειράματα μας, με τους ETB-υποδοχείς να ασκούν προστατευτική δράση στην δραστηριότητα του συμπαθητικού και στην συνεπακολουθούμενη αρρυθμογένεση.^[53,93,137]

Ένα ενδιαφέρον εύρημα στα πειράματα μας ήταν οι διαφορετικές αποκρίσεις στη διάρκεια των μονοφασικών δυναμικών ενεργείας μεταξύ της ομάδας sl/sl και της ομάδας επίμυων αγρίου-τύπου. Αυτές οι διαφορές παρατηρήθηκαν όχι μόνο στο ισχαιμικό μυοκάρδιο (του προσθιοπλάγιου τοιχώματος), αλλά και στις μετρήσεις αναφοράς στην δεξιά κοιλία. Η επιμήκυνση της διάρκειας του δυναμικού ενέργειας είχε προηγούμενα δημοσιευτεί σε απομονωμένα μυοκαρδιακά κύτταρα επίμυων μετά από εξάντληση κατεχολαμινών με ρεσερπίνη, κυρίως μέσω της μείωσης των παροδικών εξώστροφων ιοντικών ρευμάτων καλίου^[10]. Φαίνεται ότι το παροδικό εξώστροφο ιοντικό ρεύμα καλίου διαδραματίζει μεγάλο ρόλο τόσο στη μορφολογία όσο και στη διάρκεια του δυναμικού ενέργειας, συμμετέχοντας στη γένεση ηλεκτρικών μεταβολών^[142]. Παρόλα αυτά, θα πρέπει να σημειωθεί ότι οι αλλαγές στη διάρκεια των δυναμικών ενεργείας αντικατοπτρίζουν μία σύνθετη διαδραστική διαδικασία μεταξύ πολλών παραγόντων, που περιλαμβάνουν (ανάμεσα σε άλλους) την δραστηριότητα του συμπαθητικού συστήματος

και τις μεταβολές στους διαύλους ιόντων. Επιπλέον έρευνα και μελέτη είναι αναγκαίες προς αυτή την κατεύθυνση.

Βασιζόμενοι στα ευρήματα μας, εικάζουμε ότι η εξάντληση των αποθηκών κατεχολαμινών στην ομάδα επίμυων sl/sl μπορεί να είναι πιο σημαντική μετά τη χορήγηση ρεσερπίνης, παρά την απουσία διαφορών στους δείκτες δραστηριότητας του συμπαθητικού συστήματος κατά τη διάρκεια της φάσης I. Αυτή η θεώρηση ενισχύεται από:

(α) την αυξημένη μεταβολή των δυναμικών ενεργείας σε αυτή την ομάδα

(β) από τη χαμηλότερη καρδιακή συχνότητα πριν την επαγωγή του εμφράγματος και κατά τη διάρκεια της 24ωρης παρακολούθησης, και,

(γ) από τη χαμηλότερη δραστηριότητα του συμπαθητικού συστήματος στην ομάδα επίμυων sl/sl, που παρατηρήθηκε κατά τη διάρκεια της φάσης II, μετά τη χορήγηση ρεσερπίνης.

ETB-υποδοχείς και αρρυθμογένεση φάσης II

Ένα σημαντικό και ίσως απροσδόκητο εύρημα στα πειράματα μας ήταν η αυξημένη επίπτωση των KT/KM κατά τη διάρκεια της φάσης II στην ομάδα των επίμυων sl/sl. Αυτά τα ευρήματα δεν μπορούν να εξηγηθούν από αυξημένη επίπτωση καρδιακής ανεπάρκειας σε αυτή την ομάδα, δεδομένου ότι οι μετρήσεις φυσικής δραστηριότητας ήταν παρόμοιες στις δύο ομάδες. Επιπλέον, η αυξημένη αρρυθμογένεση παρατηρήθηκε παρά τη χαμηλότερη δραστηριότητα του συμπαθητικού στην ομάδα sl/sl. Αυτά τα ευρήματα έρχονται σε συμφωνία με προηγούμενα πειράματα σε απομονωμένες καρδιές επίμυων, υποδεικνύοντας ότι επιπρόσθετοι μηχανισμοί εμπλέκονται στην αρρυθμογένεση φάσης II^[18].

Οι υποκείμενοι μηχανισμοί για τις όψιμες κοιλιακές αρρυθμίες δεν είναι επαρκώς κατανοητοί αλλά φαίνονται να διαφέρουν από αυτούς της φάσης I.^[18,28,62,64] Η διατριβή καταδεικνύει ότι η ενδοθηλίνη-1 και οι υποδοχείς της εμπλέκονται στην κοιλιακή αρρυθμογένεση της φάσης II. Ο ρόλος της ενδοθηλίνης-1 και των υποδοχέων της καθίσταται πιο εμφανής μετά από εξάντληση των αποθηκών των κατεχολαμινών.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7^ο ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑ

Παρά τη σημαντική μείωση της ενδονοσοκομειακής θνητότητας τα τελευταία χρόνια, η πρόωμη θνητότητα του εμφράγματος του μυοκαρδίου, που προσδιορίζεται στο χρονικό διάστημα πριν της μεταφοράς των ασθενών σε εξειδικευμένη μονάδα εμφραγμάτων, παραμένει υψηλή. Σε αυτή τη φάση του εμφράγματος, οι θάνατοι οφείλονται κυρίως σε κακοήθεις κοιλιακές αρρυθμίες. Οι παθοφυσιολογικοί μηχανισμοί που οδηγούν στην γένεση αυτών των αρρυθμιών δεν έχουν κατανοηθεί επαρκώς, και πολλοί παράγοντες συμβάλλουν στην εμφάνισή τους. Ανάμεσα σε αυτούς, σημαντικό ρόλο φαίνεται να διαδραματίζει η ενδοθηλίνη-1.

Η ενδοθηλίνη-1, η οποία αναγνωρίστηκε από τον Yanagisawa το 1988, είναι ένα πεπτίδιο που αποτελείται από 21 αμινοξέα και έχει ισχυρή αγγειοσυσπαστική δράση. Η δράση της αυτή ασκείται μέσω δύο τύπων υποδοχέων, των ETA και ETB. Οι ETA-υποδοχείς βρίσκονται στην πλειονότητά τους στα λεία μυϊκά κύτταρα των αγγείων και στα μυοκαρδιακά κύτταρα, ευοδώνοντας την αγγειοσύσπαση, αλλά και τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Οι ETB-υποδοχείς βρίσκονται στα ενδοθηλιακά και στα λεία μυϊκά κύτταρα των αγγείων και στους ινοβλάστες.

Η παραγωγή της ενδοθηλίνης-1 αυξάνεται σημαντικά σε διάφορες παθολογικές καταστάσεις, ανάμεσα στις οποίες περιλαμβάνονται και τα οξέα στεφανιαία σύνδρομα. Αυξημένα επίπεδα ενδοθηλίνης-1 έχουν βρεθεί τόσο στο πλάσμα ασθενών με οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου, όσο και στην εμφραγματική περιοχή πειραματοζώων. Ο παθοφυσιολογικός ρόλος της ενδοθηλίνης-1 στο οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου παραμένει υπό διερεύνηση, όσον αφορά στο μέγεθος του εμφράγματος, στην αναδιαμόρφωση της αριστερής κοιλίας και στις επαγόμενες από ισχαιμία κοιλιακές ταχυαρρυθμίες.

Μια συνθέτη διαδραστική σχέση έχει περιγραφεί μεταξύ του συστήματος ενδοθηλίνης και της ενεργοποίησης του συμπαθητικού συστήματος, με σημαντική επίδραση στην αρρυθμιογένεση μετά από οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου. Η παρούσα μελέτη δείχνει έναν σημαντικό ρόλο των ETB-υποδοχέων στην κοιλιακή αρρυθμιογένεση κατά τη διάρκεια του οξέως εμφράγματος του μυοκαρδίου. Κατά την διάρκεια της πρόωμης φάσης, οι ETB-υποδοχείς μειώνουν την κοιλιακή αρρυθμιογένεση, κυρίως μέσω της άμβλυνσης της

ενεργοποίησης του συμπαθητικού συστήματος. Κατά τη διάρκεια των επόμενων σταδίων του οξέως εμφράγματος του μυοκαρδίου, η παθοφυσιολογική σημασία του ΕΤΒ-υποδοχέα φαίνεται να μειώνεται.

Ο ΕΤΒ-υποδοχέας ρυθμίζει επίσης την δραστηριότητα του συμπαθητικού συστήματος κατά τη διάρκεια του οξέως εμφράγματος και στο μυελό των επινεφριδίων. Αυτή η ρύθμιση έχει σημαντικές επιπτώσεις στις κοιλιακές ταχυαρρυθμίες κατά τη διάρκεια της πρώιμης μετεμφραγματικής φάσης. Είναι αναγκαίες περαιτέρω μελέτες σχετικά με τις ηλεκτροφυσιολογικές ιδιότητες της ενδοθηλίνης-1 και των υποδοχέων της κατά τη διάρκεια του εμφράγματος, το οποίο αντιμετωπίζεται με επαναιμάτωση. Η βαθύτερη γνώση των μηχανισμών που διέπουν την αρρυθμογένεση κατά τη διάρκεια του εμφράγματος του μυοκαρδίου μπορεί να οδηγήσει στη μείωση της θνητότητας που οφείλεται στα οξέα στεφανιαία σύνδρομα.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Το έμφραγμα του μυοκαρδίου επιπλέκεται συχνά από κοιλιακές αρρυθμίες που μπορούν να οδηγήσουν σε αιφνίδιο καρδιακό θάνατο. Το έμφραγμα του μυοκαρδίου αυξάνει την παραγωγή ενδοθηλίνης, ένα πεπτίδιο με έντονη αρρυθμογόνο δράση. Η ενδοθηλίνη-1, η οποία αναγνωρίστηκε από τον Yanagisawa το 1988, είναι ένα αμινοπεπτίδιο που αποτελείται από 21 αμινοξέα και έχει ισχυρή αγγειοσυσπαστική δράση. Η δράση της αυτή ασκείται μέσω δύο τύπων υποδοχέων, των **A** (ETA) και **B** (ETB). Η αρρυθμογόνος δράση της ET-1 μεσολαβείται κυρίως από τους ETA-υποδοχείς, ενώ ο ρόλος των ETB-υποδοχέων παραμένει αδιευκρίνιστος.

Στην διατριβή μελετήθηκε ο παθοφυσιολογικός ρόλος των ETB-υποδοχέων στην κοιλιακή αρρυθμογένεση κατά τη διάρκεια του οξέως εμφράγματος του μυοκαρδίου στο πειραματικό πρότυπο του επίμυος. Η επαγωγή του εμφράγματος έγινε μέσω απολίνωσης της στεφανιαίας αρτηρίας σε δύο ομάδες πειραματοζώων, σε επίμυες άγριου-τύπου (n=63) και σε επίμυες με ομόζυγωτική συγγενή έλλειψη των ETB-υποδοχέων (ομάδα sl/sl, n=61). Χρησιμοποιώντας ένα σύστημα τηλεμετρίας, τα επεισόδια κοιλιακής ταχυκαρδίας (KT) και κοιλιακής μαρμαρυγής (KM) εκτιμήθηκαν κατά τη διάρκεια της φάσης I (πρώτη ώρα) και κατά τη διάρκεια της φάσης II (2^η-24^η ώρα) μετά το οξύ έμφραγμα, με και χωρίς χορήγηση αποκλειστή β-αδρενεργικών υποδοχέων. Μετρήθηκαν μονοφασικά επικαρδιακά δυναμικά, ενώ οι δείκτες δραστηριότητας του συμπαθητικού εκτιμήθηκαν μέσω ανάλυσης της καρδιακής μεταβλητότητας με ανάλυση κατά Fourier, καθώς και με μέτρηση κατεχολαμινών μέσω ανοσοιστοχημείας.

Βρέθηκε έντονη χρονική διακύμανση στη διάρκεια των επεισοδίων KT/KM. Συγκεκριμένα, κατά τη διάρκεια της φάσης I, η διάρκεια των επεισοδίων KT/KM ήταν μεγαλύτερη στην ομάδα sl/sl από ότι στην ομάδα άγριου-τύπου, αλλά έτεινε να είναι χαμηλότερη στην ομάδα sl/sl από την ομάδα άγριου-τύπου κατά τη διάρκεια της φάσης II. Συνολικά, η σοβαρότητα των επεισοδίων KT/KM ήταν μεγαλύτερη στην ομάδα sl/sl, όπως στοιχειοθετείται από την υψηλότερη θνητότητα. Φάνηκε επίσης χρονική διακύμανση στην καρδιακή συχνότητα και στο λόγο συχνοτήτων χαμηλού προς υψηλού φάσματος στην ομάδα sl/sl, μετρήσεις που είχαν υψηλότερες τιμές κατά τη φάση I και χαμηλότερες κατά τη φάση II. Παρόμοια διακύμανση παρατηρήθηκε στα

επίπεδα των κατεχολαμινών στον ορό. Μετά τη χορήγηση αποκλειστή β-αδρενεργικών υποδοχέων, τα επεισόδια ΚΤ/ΚΜ όσο και η θνητότητα ήταν παρόμοια στις δύο ομάδες. Φαίνεται λοιπόν ότι οι ΕΤΒ-υποδοχείς μειώνουν την δραστηριότητα του συμπαθητικού και την αρρυθμιογένεση κατά την πρώιμη φάση του εμφράγματος, αλλά αυτή η επίδραση εξαφανίζεται στην όψιμη φάση.

Στην διατριβή διερευνήθηκε επίσης ο ρόλος των ΕΤΒ-υποδοχέων στην δραστηριότητα του συμπαθητικού που προέρχεται από τα επινεφρίδια ή από το μυοκάρδιο και την επίδραση τους στην αρρυθμιογένεση κατά τη διάρκεια οξέος εμφράγματος του μυοκαρδίου.

Μελετήσαμε δύο ομάδες επίμυων ($n = 120, 284 \pm 2$ g), δηλαδή άγριου-τύπου και sl/sl. Το έμφραγμα του μυοκαρδίου προκλήθηκε μετά από μόνιμη απολίνωση της αριστερής στεφανιαίας αρτηρίας. Οι κοιλιακές ταχυαρρυθμίες αξιολογήθηκαν από τη συνεχή ηλεκτροκαρδιογραφική καταγραφή. Η δραστηριότητα του συμπαθητικού εκτιμήθηκε από τους δείκτες της μεταβλητότητας του καρδιακού ρυθμού και αξιολογήθηκε μετά από επινεφριδιεκτομή ή την εξάντληση των αποθηκών κατεχολαμινών που προκλήθηκε μετά από χορήγηση ρεσερπίνης. Η οξεία ανεπάρκεια της αριστερής κοιλίας εκτιμήθηκε από τη συνολική δραστηριότητα των πειραματοζώων.

Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η επινεφριδιεκτομή μείωσε τη συνολική διάρκεια των ταχυαρρυθμιών (ΚΤ/ΚΜ) στην ομάδα sl/sl, αλλά η συχνότητα τους παρέμεινε υψηλότερη, σε σύγκριση με τους επίμυες άγριου-τύπου. Μετά τη χορήγηση ρεσερπίνης, οι δείκτες καρδιακής μεταβλητότητας και οι ταχυαρρυθμίες ήταν παρόμοιες στις δύο ομάδες κατά τη διάρκεια της πρώιμης φάσης. Κατά τη διάρκεια της εξέλιξης του εμφράγματος, η διάρκεια των ταχυαρρυθμιών ήταν μεγαλύτερη στην ομάδα sl/sl, παρά τη χαμηλότερη δραστηριότητα του συμπαθητικού. Η καρδιακή συχνότητα ήταν χαμηλότερη στην ομάδα sl/sl καθ' όλη τη διάρκεια της περιόδου παρατήρησης των 24 ωρών, ενώ η δραστηριότητα ήταν συγκρίσιμη στις δύο ομάδες.

Συμπεραίνεται ότι οι ΕΤΒ-υποδοχείς ρυθμίζουν την ενεργοποίηση του συμπαθητικού κατά τη διάρκεια του οξέος εμφράγματος του μυοκαρδίου όχι μόνο στο κοιλιακό μυοκάρδιο, αλλά επίσης και στα επινεφρίδια. Η ενεργοποίηση του συμπαθητικού αυξάνει σημαντικά τις κοιλιακές ταχυαρρυθμίες κατά την πρώιμη φάση, αλλά επιπρόσθετοι μηχανισμοί που αφορούν το σύστημα ενδοθηλίνης αποτελούν τους υποκείμενους μηχανισμούς όσο αφορά την αρρυθμιογένεση των όψιμων φάσεων.

ABSTRACT

The arrhythmogenic effects of endothelin-1 (ET-1) are mediated via ETA-receptors, but the role of ETB-receptors is unclear. We examined the pathophysiologic role of ETB-receptors on ventricular tachyarrhythmias (VT/VF) during myocardial infarction (MI). MI was induced by coronary ligation in two animal groups, namely in wild-type (n = 63) and in ETB-receptor-deficient (n = 61) rats. Using a telemetry recorder, VT/VF episodes were evaluated during phase I (the 1st hour) and phase II (2–24 h) post-MI, with and without prior β -blockade. Action potential duration at 90% repolarization (APD₉₀) was measured from monophasic epicardial recordings and indices of sympathetic activation were assessed using fast-Fourier analysis of heart rate variability. Serum epinephrine and norepinephrine were measured with radioimmunoassay. MI size was similar in the two groups. There was a marked temporal variation in VT/VF duration; during phase I, it was higher (p = 0.0087) in ETB-deficient (1,519 ± 421 s) than in wild-type (190 ± 34 s) rats, but tended (p = 0.086) to be lower in ETB-deficient (4.2 ± 2.0 s) than in wild-type (27.7 ± 8.0 s) rats during phase II. Overall, the severity of VT/VF was greater in ETB-deficient rats, evidenced by higher (p = 0.0058) mortality (72.0% vs. 32.1%). There was a temporal variation in heart rate and in the ratio of low- to high-frequency spectra, being higher (<0.001) during phase I, but lower (p<0.05) during phase II in ETB-deficient rats. Likewise, 1 h post-MI, serum epinephrine (p = 0.025) and norepinephrine (p<0.0001) were higher in ETB-deficient (4.20 ± 0.54, 14.24 ± 1.39 ng/ml) than in wild-type (2.30 ± 0.59, 5.26 ± 0.67 ng/ml) rats, respectively. After β -blockade, VT/VF episodes and mortality were similar in the two groups. The ETB-receptor decreases sympathetic activation and arrhythmogenesis during the early phase of MI, but these effects diminish during evolving MI.

In addition, we investigated the role of ETB-receptors on sympathetic activation originating from the adrenal gland or from the myocardium and its impact on arrhythmogenesis during acute myocardial infarction.

We studied two groups of rats (n = 120, 284 ± 2 g), namely wild-type and ETB-deficient. Myocardial infarction was induced by permanent ligation of the left coronary artery and ventricular tachyarrhythmias were evaluated from continuous electrocardiographic recordings. Sympathetic activation, measured by indices of heart

rate variability, was evaluated after adrenalectomy or catecholamine depletion induced by reserpine. Acute left ventricular failure was assessed by total animal activity.

Adrenalectomy decreased the total duration of tachyarrhythmias in ETB-deficient rats, but their incidence remained higher, compared to wild-type rats. After reserpine, heart rate variability indices and tachyarrhythmias were similar in the two groups during the initial, ischaemic phase. During evolving infarction, tachyarrhythmia duration was longer in ETB-deficient rats, despite lower sympathetic activation. Heart rate was lower in ETB-deficient rats throughout the 24-hour observation period, whereas activity was comparable in the two groups.

Endothelin-B (ETB) receptors modulate sympathetic activation during acute myocardial infarction not only in the ventricular myocardium, but also in the adrenal gland. Sympathetic activation markedly increases early-phase ventricular tachyarrhythmias, but other mechanisms involving the endothelin system underlie delayed arrhythmogenesis.

ΑΝΑΦΟΡΕΣ-ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Agelaki MG, Pantos C, Korantzopoulos P, et al.(2007) Comparative antiarrhythmic efficacy of amiodarone and dronedarone during acute myocardial infarction in rats. *Eur J Pharmacol* 564:150–157
2. Ahn D, Ge Y, Stricklett PK, et al. Collecting duct-specific knockout of endothelin-1 causes hypertension and sodium retention. *J Clin Invest* 2004;**114**:504–511.
3. Backs J, Bresch E, Lutz M, et al. Endothelin-1 inhibits the neuronal norepinephrine transporter in hearts of male rats. *Cardiovasc Res* 2005;**67**(2): 283–90.
4. Baltogiannis GG, Tsalikakis DG, Mitsi AC, et al. Endothelin receptor-A blockade decreases ventricular arrhythmias after myocardial infarction in rats. *Cardiovasc Res* 2005;**67**(4):647–54.
5. Banerjee A, Locke-Winter C, Rogers KB, et al. Preconditioning against myocardial dysfunction after ischemia and reperfusion by an alpha 1-adrenergic mechanism. *Circ Res* 1993;**73**(4):656–70.
6. Barst RJ, Langleben D, Frost A, et al. Sitaxsentan therapy for pulmonary arterial hypertension. *Am J Resp Crit Care Med* 2004;**169**:441–47.
7. Barton M, Haudenschild CC, d’Uscio LV, et al. Endothelin ETA receptor blockade restores NO-mediated endothelial dysfunction and inhibits atherosclerosis in apolipoprotein-E deficient mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;**95**:14367–372
8. Benigni A, Remuzzi G. Endothelin antagonists. *Lancet* 1999;**353**:133–8.
9. Bohm F, Ahlborg G, Johansson BL, et al. Combined endothelin receptor blockade evokes enhanced vasodilatation in patients with atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002;**22**:674–9.
10. Bru-Mercier G, Deroubaix E, Rousseau D, et al. Depressed transient outward potassium current density in catecholamine-depleted rat ventricular myocytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2002;**282**(4):H1237–47.
11. Brunner F, Doherty AM (1996) Role of ETB receptors in local clearance of endothelin-1 in rat heart: studies with the antagonists PD 155080 and BQ-788. *FEBS Lett* 396:238–242
12. Budhiraja R, Tuder RM, Hassoun PM. Endothelial dysfunction in pulmonary hypertension. *Circulation* 2004;**109**:159–165.

13. Campia U, Cardillo C, Panza JA. Ethnic differences in the vasoconstrictor activity of endogenous endothelin-1 in hypertensive patients. *Circulation* 2004;**109**:3191–5.
14. Campell CA, Parrat JR. (1983) The effect of beta-adrenoceptor blocking agents, with differing ancillary properties, on the arrhythmias resulting from acute coronary artery ligation in anaesthetized rats. *Br J Pharmacol* 79:939–946
15. Cardillo C, Kilcoyne CM, Waclawiw M, et al. Role of endothelin in the increased vascular tone of patients with essential hypertension. *Hypertension* 1999;**33**:753–8.
16. Channick RN, Simonneau G, Sitbon O, et al. Effects of the dual endothelin-receptor antagonist bosentan in patients with pulmonary hypertension: a randomized placebo-controlled study. *Lancet* 2001;**358**:1119–23
17. Clarke JG, Benjamin N, Larkin SW, et al. Endothelin is a potent long-lasting vasoconstrictor in men. *Am J Physiol* 1989;**257**:H2033–H2035.
18. Clements-Jewery H, Hearse DJ, Curtis MJ. Independent contribution of catecholamines to arrhythmogenesis during evolving infarction in the isolated rat heart. *Br J Pharmacol* 2002;**135**(3):807–15.
19. Clements-Jewery H, Hearse DJ, Curtis MJ. Phase 2 ventricular arrhythmias in acute myocardial infarction: a neglected target for therapeutic antiarrhythmic drug development and for safety pharmacology evaluation. *Br J Pharmacol* 2005;**145**(5): 551–64.
20. Clozel M, Qiu C, Qiu CS, et al. Short-term endothelin receptor blockade with tezosentan has both immediate and long-term beneficial effects in rats with myocardial infarction. *J. Am. Coll. Cardiol.* 39, 142-147 (2002).
21. Corr PB, Gillis RA, Autonomic neural influences on the dysrhythmias resulting from myocardial infarction. *Circ. Res.* 43, 1-9 (1978).
22. Cowburn PJ, Cleland JGF, McArthur JD, et al. Short-term haemodynamic effects of BQ-123, a selective endothelin ETA-receptor antagonist, in chronic heart failure. *Lancet* 1998;**352**:201–202.
23. Cowburn PJ, Cleland JG, McArthur JD, et al. Endothelin B receptors are functionally important in mediating vasoconstriction in the systemic circulation in patients with left ventricular systolic dysfunction. *J Am Coll Cardiol* 1999;**33**:932–8.

24. Crockett TR, Sharif I, Kane KA, et al.(2000) Sarafotoxin 6c protects against ischaemia-induced cardiac arrhythmias in vivo and in vitro in the rat. *J Cardiovasc Pharmacol* 36:S297–S299
25. Curtis MJ, Hearse DJ. Ischemia-induced and reperfusion induced arrhythmias differ in their sensitivity to potassium: implications for mechanisms of initiation and maintenance of ventricular fibrillation. *J Mol Cell Cardiol* 1989 Jan;21:21–40
26. De Mey JG, Vanhoutte PM. Heterogeneous behavior of the canine arterial and venous wall. Importance of the endothelium. *Circ Res.* 1982;51:439–447.
27. De Vreede-Swagemakers JJ, Gorgels AP, Duboisarbouw WI, et al. (1998) Circumstances and causes of out-of-hospital cardiac arrest in sudden death survivors. *Heart* 79:356–361
28. Di Diego JM, Antzelevitch C. Ischemic ventricular arrhythmias: experimental models and their clinical relevance. *Heart Rhythm* 2011;8(12):1963–8.
29. Douglas SA, Sreenivasan D, Carman FH, et al. Cytokine interactions with adrenal medullary chromaffin cells. *Cell Mol Neurobiol* 2010;30(8):1467–75.
30. Doggrell SA (2004) The endothelin system and its role in acute myocardial infarction. *Expert Opin Ther Targets* 8:191–201
31. Elaiopoulos DA, Tsalikakis DG, Agelaki MG, et al. (2007) Growth hormone decreases phase II ventricular tachyarrhythmias during acute myocardial infarction in rats. *Clin Sci (Lond)* 112:385–391
32. Ergul S, Parish DC, Puett D, et al. Racial differences in plasma endothelin-1 concentrations in individuals with essential hypertension. *Hypertension* 1996;28:652–5.
33. Esler M, Jennings G, Lambert G, et al. (1990) Overflow of catecholamine neurotransmitters to the circulation: source, fate, and functions. *Physiol Rev* 70:963–985
34. Fliegel L (2001) Regulation of myocardial Na/H exchanger activity. *Basic Res Cardiol* 96:301–305
35. Fraccarollo D, Gallupo P, Bauersachs J, et al., *Cardiovasc. Res.* 54, 559-567 (2002).
36. Franz MR. Current status of monophasic action potential recording: theories, measurements and interpretations. *Cardiovasc Res* 1999; 41(1):25–40.
37. Fukuroda T, Fujikawa T, Ozaki S, et al. Clearance of circulating endothelin-1 by ETB receptors in rats. *Biochem Biophys Res Commun* 1994; 199:1461–65.

38. Furchgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature*. 1980; 288:373–376.
39. Gaine S. Pulmonary hypertension. *JAMA* 2000; 284:3160–8.
40. Garjani A, Wainwright CL, Zeitlin IJ et al., *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 25, 634-642 (1995).
41. Gariépy CE, Williams SC, Richardson JA, et al. (1998) Transgenic expression of the endothelin-B receptor prevents congenital intestinal aganglionosis in a rat model of Hirschsprung disease. *J Clin Invest* 102:1092–1101
42. Gariépy CE, Ohuchi T, Williams SC, et al. (2000) Salt-sensitive hypertension in endothelin-B receptor- deficient rats. *J Clin Invest* 105:925–933
43. Giaid A, Yanagisawa M, Langleben D, et al. Expression of endothelin-1 in the lungs of patients with pulmonary hypertension. *N Engl J Med* 1993; 326:1732–9.
44. Givertz MM, Colucci WS, LeJemtel TH, et al. Acute endothelin A receptor blockade causes selective pulmonary vasodilatation in patients with chronic heart failure. *Circulation* 2000;101:2922–2927.
45. Goddard J, Webb DJ. Endothelin antagonists and hypertension: a question of dose? *Hypertension* 2002;40:e1–2.
46. Goddard J, Johnston NR, Hand MF, et al. Endothelin-A receptor antagonism reduces blood pressure and increases renal blood flow in hypertensive patients with chronic renal failure. *Circulation* 2004;109:1186–93.
47. Haak T, Jungmann E, Felber A, et al. Increased plasma levels of endothelin in diabetic patients with hypertension. *Am J Hypertens* 1992;5:161–66.
48. Halcox JP, Nour KR, Zalos G, et al. Coronary vasodilation and improvement in endothelial dysfunction with endothelin ETA receptor blockade. *Circ Res* 2001;89:969–76.
49. Haynes WG, Webb DJ. Endothelin as a regulator of cardiovascular function in health and disease. *J Hypertens* 1998;16:1081–98.
50. Haynes WG, Webb DJ. Contribution of endogenous generation of endothelin-1 to basal vascular tone. *Lancet* 1994;344:852–4.
51. Horacek T, Neumann M, Mutius S, et al. (1984) Nonhomogeneous epicardial changes and the bimodal distribution of early ventricular arrhythmias during acute coronary artery occlusion. *Basic Res Cardiol* 79:649–667

52. Ihling C, Szombathy T, Bohrmann B, et al. Coexpression of endothelin-converting enzyme-1 and endothelin-1 in different stages of human atherosclerosis. *Circulation* 2001;104:864–9.
53. Isaka M, Kudo A, Imamura M, et al. (2007) Endothelin receptors, localized in sympathetic nerve terminals of the heart, modulate norepinephrine release and reperfusion arrhythmias. *Basic Res Cardiol* 102:154–162
54. Iwasa S, Fan J, Shimokama T, et al. Increased immunoreactivity of endothelin-1 and endothelin B receptor in human atherosclerotic lesions. A possible role in atherogenesis. *Atherosclerosis* 1999;146:93–100.
55. Jeng AJ, Mulder P, Kwan AL, et al. Nonpeptidic endothelin-converting enzyme inhibitors and their potential therapeutic applications. *Can J Physiol Pharmacol* 2002;80:440–49.
56. Jessup M, Brozena S. Heart failure. *N Engl J Med* 2003;348:2007–18.
57. Kanosaka Y, Tokunaga H, Iwashita K, et al. Endothelin receptor antagonist prevents parathyroid cell proliferation of low calcium diet-induced hyperparathyroidism in the rat. *Endocrinology* 2001;142:407–13.
58. Kass RS, Wiegers SE. (1982) The ionic basis of concentration related effects of noradrenaline on the action potential of calf cardiac Purkinje fibres. *J Physiol (Lond)* 322:541–558.
59. Kedzierski RM, Yanagisawa M. Endothelin system: the double-edged sword in health and disease. *Ann Rev Pharmacol Toxicol* 2001;41:851–76.
60. Kiesecker C, Zitron E, Scherer D, et al. Regulation of cardiac inwardly rectifying potassium current IK1 and Kir2.x channels by endothelin-1. *J Mol Med (Berl)* 2006;84(1):46–56.
61. Kiowski W, Sutsch G, Hunziker P, et al. Evidence for endothelin-1-mediated vasoconstriction in severe chronic heart failure. *Lancet* 1995;346:732–6.
62. Kolettis TM. Coronary artery disease and ventricular tachyarrhythmia: pathophysiology and treatment. *Curr Opin Pharmacol* 2013;13(2):210–7.
63. Kolettis TM, Barton M, Langleben D, et al. Endothelin in coronary artery disease and myocardial infarction. *Cardiol Rev* 2013a;21(5):249–56.
64. Kolettis TM, Kontonika M, Valenti MC, et al. Arrhythmogenesis after acute myocardial necrosis with and without preceding ischemia in rats. *J Basic Clin Physiol Pharmacol* 2013b:1–11.

65. Kolettis TM, Baltogiannis GG, Tsalikakis DG, et al. (2008) Effects of dual endothelin receptor blockade on sympathetic activation and arrhythmogenesis during acute myocardial infarction in rats. *Eur J Pharmacol* 580:241–249
66. Kolettis TM, Kyriakides ZS, Leftheriotis D, et al. (2003) Electrophysiologic effects of endothelin receptor-A blockade in patients with coronary artery disease. *J Interv Card Electrophysiol* 8:173–179
67. Kohan DE. Endothelins in the kidney: physiology and pathophysiology. *Am J Kidney Dis* 1993;**22**:493–510.
68. Kowala MC, Murugesan N, Tellew J, et al. Novel dual action of an AT1 and ETA receptor antagonist reduces blood pressure in experimental hypertension. *J Pharmacol Exp Ther* 2004;**309**:275–84.
69. Kowala M, Rose P, Stein PD et al. Selective blockade of the endothelin subtype A receptor decreases early atherosclerosis in hamsters fed cholesterol. *Am J Pathol* 1995;**146**:819–26.
70. Krum H, Viskoper RJ, Lacourciere Y, et al. The effect of an endothelin receptor antagonist, bosentan, on blood pressure in patients with essential hypertension. Bosentan hypertension investigators. *N Engl J Med* 1998;338:784–90.
71. Kruger C, Landerer V, Zugck C, et al. The bradycardic agent zatebradine enhances baroreflex sensitivity and heart rate variability in rats early after myocardial infarction. *Cardiovasc Res* 2000;45(4):900–12.
72. Kruger C, Kalenka A, Haunstetter A, et al.(1997) Baroreflex sensitivity and heart rate variability in conscious rats with myocardial infarction. *Am J Physiol* 273:H2240–H2247
73. Kuo JS, Lin NN, ChengWY, et al. Effects of reducing sympathetic activities on acute myocardial ischemia in cats. *Chin J Physiol* 1993;36(2):101–7.
74. Kurihara Y, Kurihara H, Oda H, et al. Aortic arch malformations and ventricular septal defect in mice deficient in endothelin 1. *J Clin Invest* 1995;96:293–300.
75. Lee HW, Han TH, Yi KJ, et al. Time course of diurnal rhythm disturbances in autonomic function of rats with myocardial infarction. *Auton Neurosci* 2013;179(1–2):28–36.
76. Lerman A, Edwards BS, Hallet JW, et al. Circulating and tissue endothelin immunoreactivity in advanced atherosclerosis. *N Engl J Med* 1991;**325**:997–1001.
77. Loeffler BM. Endothelin-converting enzyme inhibitors: current status and perspectives. *J Cardiovasc Pharmacol* 2000;35 (suppl 2): 79-82

78. Loennechen JP, Stoylen A, Beisvag V, et al. (2001) Regional expression of endothelin-1, ANP, IGF-1, and LV wall stress in the infarcted rat heart. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 280:H2902–H2910
79. Louis A, Cleland JG, Crabbe S, et al. Clinical Trial Update: CAPRICORN, COPERNICUS, MIRACLE, STAF, RITZ-2 and REINASSANCE and cachexia and cholesterol in heart failure. *Eur J of Heart Failure* 2001;3:381–87.
80. Martinez-Olivares R, Villanueva I, Racotta R, et al. Depletion and recovery of catecholamines in several organs of rats treated with reserpine. *Auton Neurosci* 2006;128(1–2):64–9.
81. McCabe C, Hicks MN, Kane KA, et al. (2005) Electrophysiological and haemodynamic effects of endothelin ETA and ETB receptors in normal and ischaemic working rabbit hearts. *Br J Pharmacol* 146:118–128
82. MacCarthy PA, Grocott-Mason R, Prendergast BD et al. Contrasting inotropic effects of endogenous endothelin in the normal and failing human heart: studies with an intracoronary ETA receptor antagonist. *Circulation* 2000; 18:142–147.
83. Merkely B, Geller L, Toth M, et al. (1998) Mechanism of endothelin-induced malignant ventricular arrhythmias in dogs. *J Cardiovasc Pharmacol* 31:S437–S439
84. Miura T, Miki T (2008) Limitation of myocardial infarct size in the clinical setting: current status and challenges in translating animal experiments into clinical therapy. *Basic Res Cardiol* 103:501–513
85. Mitsi AC, Hatzistergos K, Baltogiannis, et al. *Med. Hypotheses*. 64, 582-585 (2005).
86. Miyauchi T, Yanagisawa M, Tomizawa T, et al. Increased plasma concentrations of endothelin-1 and big endothelin-1 in acute myocardial infarction. *Lancet* 1989;2(8653):53–4.
87. Molenaar P, O'Reilly G, Sharkey A, et al. (1993) Characterization and localization of endothelin receptor subtypes in the human atrioventricular conducting system and myocardium. *Circ Res* 72:526–538
88. Nagayama T, Kuwakubo F, Matsumoto T, et al. (2000) Role of endogenous endothelins in catecholamine secretion in the rat adrenal gland. *Eur J Pharmacol* 406:69–74

89. Nakov R, Pfarr E, Eberle S, et al. Darusentan: an effective endothelin A receptor antagonist for the treatment of hypertension. *Am J Hypertens* 2002; 15:583–9.
90. Nguyen QT, Cernacek P, Sirois MG et al. Long-term effects of nonselective endothelin A and B receptor antagonism in postinfarction rat: importance of timing. *Circulation* 2001; 104:2075–81.
91. Niskanen JP, Tarvainen MP, Ranta-Aho PO, et al. Software for advanced HRV analysis. *Comput Methods Programs Biomed* 2004;76(1):73–81.
92. Oikonomidis DL, Tsalikakis DG, Baltogiannis GG, et al. Endothelin-B receptors and ventricular arrhythmogenesis in the rat model of acute myocardial infarction. *Basic Res Cardiol* 2010;105(2):235–45.
93. Omland T, Lie RT, Aakvaag A, et al. (1994) Plasma endothelin determination as a prognostic indicator of 1-year mortality after acute myocardial infarction. *Circulation* 89:1573–1579
94. Opitz CF, Mitchell GF, Pfeffer MA, et al. Arrhythmias and death after coronary artery occlusion in the rat. Continuous telemetric ECG monitoring in conscious, untethered rats. *Circulation* 1995;92(2):253–61.
95. Opthof T, Coronel R, Vermeulen JT, et al. Dispersion of refractoriness in normal and ischaemic canine ventricle: effects of sympathetic stimulation. *Cardiovasc Res* 1993;27(11):1954–60.
96. Pacher R, Stanek B, Hulsmann M, et al. Prognostic impact of big endothelin-1 plasma concentrations compared with invasive hemodynamic evaluation in severe heart failure. *J Am Coll Cardiol* 1996;27:633–41.
97. Palmer RM, Ferrige AG, Moncada S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature*. 1987;327:524–526.
98. Parker JD, Thiessen JJ. Increased endothelin-1 production in patients with chronic heart failure. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2004;**286**:H1141–5.
99. Pernow J, Kaijser L, Lundberg JM, et al. Comparable potent coronary constrictor effects of endothelin-1 and big-endothelin-1 in humans. *Circulation* 1996;**94**:2077–82.
100. Pogwizd SM, Hoyt RH, Saffitz JE, et al., *Circulation*. 86, 1872-1887 (1992).
101. Proven A, Roderick HL, Conway SJ, et al. Inositol 1,4,5-trisphosphate supports the arrhythmogenic action of endothelin-1 on ventricular cardiac myocytes. *J Cell Sci* 2006;119(Pt 16):3363–75.

102. Rabelink TJ, Kaasjager KA, Stroes ES, et al. Endothelin in renal pathophysiology: from experimental to therapeutic application. *Kidney International* 1996;50:1827–33.
103. Rafiq K, Nakano D, Ihara G, et al. Effects of mineralocorticoid receptor blockade on glucocorticoid-induced renal injury in adrenalectomized rats. *J Hypertens* 2011;29(2):290–8.
104. Raschack M, Juchelka F, Rozek – Schaefer G. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 31, S145-S148 (1998).
105. Reisner Y, Meiry G, Zeevi-Levin N, et al. Impulse conduction and gap junctional remodelling by endothelin-1 in cultured neonatal rat ventricular myocytes. *J Cell Mol Med* 2009;13(3):562–73.
106. Remme WJ, Kruyssen DA, Look MP, et al. Systemic and cardiac neuroendocrine activation and severity of myocardial ischemia in humans. *J Am Coll Cardiol* 1994;23(1):82–91.
107. Richard V, Kaeffer N, Hogie M, et al. *Br. J. Pharmacol.* 113, 869-876 (1994).
108. Roderick HL & Bootman MD, *Biochem. Soc. Trans.* 31, 950-953 (2003).
109. Rosengren A, Wallentin L, Gitt K, et al. (2004) Sex, age, and clinical presentation of acute coronary syndromes. *Eur Heart J* 25:663–670
110. Rouleau JL, Talajic M, Sussex, et al. *J. Am. Coll. Cardiol.* 27, 1119-1127 (1996).
111. Rubart M, Zipes DP. Mechanisms of sudden cardiac death. *J Clin Invest* 2005;115(9): 2305–15.
112. Rubens C, Ewert R, Halank M, *et al.* Big endothelin-1 and endothelin-1 plasma levels are correlated with the severity of primary pulmonary hypertension. *Chest* 2001;**120**:1562–9.
113. Rubin LJ, Badesch DB, Barst RJ, et al. Bosentan therapy for pulmonary arterial hypertension. *N Engl J Med* 2002;346:896–903.
114. Sakai S, Miyauchi T, Kobayashi M, et al. Inhibition of myocardial endothelin pathway improves long-term survival in heart failure. *Nature* 1996;384:353–5
115. Schiffrin EL. Role of endothelin-1 in hypertension and vascular disease. *Am J Hypertens* 2001;**14**:83S–89S.
116. Schirger JA, Chen HH, Jougasaki M, et al. Endothelin A receptor antagonism in experimental congestive heart failure results in augmentation of the rennin-angiotensin system and sustained sodium retention. *Circulation* 2004;**109**:249–54.

117. Schomig A, Haass M, Richardt G. Catecholamine release and arrhythmias in acute myocardial ischaemia. *Eur Heart J* 1991;12(Suppl. F):38–47.
118. Sharif I, Kane KA, Wainwright CL (1998) Endothelin and ischaemic arrhythmias-antiarrhythmic or arrhythmogenic? *Cardiovasc Res* 39:625–632
119. Sitbon O, Badesch DB, Channick RN, et al. Effects of the dual endothelin receptor antagonist bosentan in patients with primary pulmonary hypertension: a 1-year follow-up study. *Chest* 2003;124:247–54.
120. Slavikova J, Kuncova J, Topolcan O. Plasma catecholamines and ischemic heart disease. *Clin Cardiol* 2007;30(7):326–30.
121. Spratt JC, Goddard J, Patel N, et al. Systemic ETA receptor antagonism with BQ-123 blocks ET-1 induced forearm vasoconstriction and decreases peripheral vascular resistance in healthy men. *Br J Pharmacol* 2001;134:648–54.
122. Stewart D, Kubac G, Costello KB et al., *J. Am. Coll. Cardiol.* 18, 38-43 (1991).
123. St John Sutton M, Lee D, Rouleau JL et al., *Circulation.* 107, 2577-2582 (2003).
124. Strachan FE, Spratt JC, Wilkinson IB, et al. Systemic blockade of the endothelin-B receptor increases peripheral vascular resistance in healthy men. *Hypertension* 1999;33:581–5.
125. Szabo T, Geller L, Merkely et al., *Life Sci.* 66, 2527-2541 (2000).
126. Taddei S, Viridis A, Ghiadoni L, et al. Vasoconstriction to endogenous endothelin-1 is increased in the peripheral circulation of patients with essential hypertension. *Circulation* 1999;100:1680–3.
127. Taner CB, Severson SR, Best PJ *et al.* Treatment with endothelin-receptor antagonists increases NOS activity in hypercholesterolaemia. *J Appl Physiol* 2001;90:816–20.
128. Tawa M, Yamamoto S, Ohkita M, et al. Endothelin-1 and norepinephrine overflow from cardiac sympathetic nerve endings in myocardial ischemia. *Cardiol Res Pract* 2012;2012:789071.
129. Vanhoutte PM, Rubanyi GM, Miller VM, et al. Modulation of vascular smooth muscle contraction by the endothelium. *Annu Rev Physiol.* 1986;48:307–320.
130. Verhaar MC, Strachan FE, Newby DE, et al. Endothelin-A receptor antagonist-mediated vasodilatation is attenuated by inhibition of nitric oxide synthesis and by endothelin-B receptor blockade. *Circulation* 1998;97:752–6.
131. Wainwright CL, McCabe C, Kane KA, *Cur. Vasc. Pharmacol.* 3, 333-341 (2005).

132. Walker MJ, Curtis MJ, Hearse DJ, et al (1988) The Lambeth conventions: guidelines for the study of arrhythmias in ischaemia infarction, and reperfusion. *Cardiovasc Res* 22:447–455
133. Webb DJ, Gray GA. Vascular biology of the endothelin system. In: Webb D, Valance P, eds. *Endothelial function in hypertension*. Berlin: Springer-Verlag, 1997:71–90.
134. Wei CM, Lerman A, Rodeheffer RJ, et al. Endothelin in human congestive heart failure. *Circulation* 1994;**89**:1580–1586.
135. Wennmalm A, Karwatowska-Prokopczuk E, Wennmalm M. Role of the coronary endothelium in the regulation of sympathetic transmitter release in isolated rabbit hearts. *Acta Physiol Scand* 1989;136(1):81–7.
136. Yamamoto S, Matsumoto N, Kanazawa M, et al. Different contributions of endothelin-A and endothelin-B receptors in postischemic cardiac dysfunction and norepinephrine overflow in rat hearts. *Circulation* 2005;111(3):302–9.
137. Yamaguchi N (1997) Role of ETA and ETB receptors in endothelin-1-induced adrenal catecholamine secretion in vivo. *Am J Physiol* 272:R1290–R1297
138. Yanagisawa M, Inoue A, Ishikawa T, et al. Primary structure, synthesis, and biological activity of rat endothelin, an endothelium-derived vasoconstrictor peptide. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1988;85:6964–6967.
139. Yanagisawa M, Kurihara H, Kimura S, et al. A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature*. 1988;332:411–415.
140. Yorikane R, Koike H, Miyake S, *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 17 (suppl 7), S159-S162 (1991).
141. Zhao Z, Xie Y, Wen H et al. Role of the transient outward potassium current in the genesis of early afterdepolarizations in cardiac cells. *Cardiovasc Res* 2012;95(3):308–16.
142. Zheng ZJ, Croft JB, Giles WH et al. *Circulation*. 104, 2158-2163 (2002).
143. Zolk O, Munzel F, Eschenhagen T, *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 286, H1248-H1257 (2004).