

*Επιθεώρηση
Κλινικής Φαρμακολογίας
και Φαρμακοκινητικής*

ΕΠΙΘΕΟΡΕΣΕ ΚΛΙΝΙΚΕΣ ΦΑΡΜΑΚΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΦΑΡΜΑΚΟΚΙΝΗΤΙΚΕΣ
REVIEW OF CLINICAL PHARMACOLOGY AND PHARMACOKINETICS
ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΕΚΔΟΣΗ

ΤΟΜΟΣ 25, 2007 ❁ No 1

*8^η Επιστημονική Ημερίδα
Φαρμακολογίας*

Οργανώνεται από την

Ελληνική Εταιρεία Φαρμακολογίας
24 Φεβρουαρίου 2007, Αθήνα, Ελλάς

8th Pharmacology Symposium

Organized by the

Hellenic Society of Pharmacology

24 February 2007, Athens, Greece

Επιθεώρηση Κλινικής Φαρμακολογίας και Φαρμακοκινητικής

ΕΠΙΤΗΘΕΟΡΕΣΕ ΚΛΙΝΙΚΕΣ ΦΑΡΜΑΚΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΦΑΡΜΑΚΟΚΙΝΗΤΙΚΕΣ
REVIEW OF CLINICAL PHARMACOLOGY AND PHARMACOKINETICS
ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΕΚΔΟΣΗ

ΤΟΜΟΣ 25, 2007 ❁ No 1

ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΗ ΔΙΕΥΘΥΝΣΗ: Καθηγ. ΣΤΑΥΡΟΣ Τ. ΠΛΕΣΣΑΣ και Δρ ΧΑΡΑΛΑΜΠΟΣ Τ. ΠΛΕΣΣΑΣ
ΣΥΝΤΑΚΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

- | | |
|---|--|
| Καθ. ΑΓΛΑΪΑ ΑΘΑΝΑΣΙΑΔΟΥ (Πάτρα) | Καθ. ΙΩΑΝΝΗΣ ΜΑΝΤΑΣ (Αθήνα) |
| Δρ ΜΙΧΑΛΗΣ ΑΛΕΞΗΣ (Αθήνα) | Επικ. Καθ. ΕΥΑΓΓΕΛΟΣ ΜΑΝΩΛΟΠΟΥΛΟΣ (Αλεξανδρού-
πολις) |
| Καθ. ΙΩΑΝΝΗΣ ΑΝΔΡΟΥΛΑΚΗΣ (Αθήνα) | Καθ. ΜΙΧΑΛΗΣ ΜΑΡΑΓΚΟΥΔΑΚΙΣ (Πάτρα) |
| Καθ. ΦΡΑΓΚΙΣΚΗ ΑΝΘΟΥΛΗ-ΑΝΑΓΝΩΣΤΟΠΟΥΛΟΥ (Αθήνα) | Καθ. ΜΑΡΙΟΣ ΜΑΡΣΕΛΟΣ (Ιωάννινα) |
| Δρ ΓΕΩΡΓΙΟΣ ΑΣΗΜΑΚΟΠΟΥΛΟΣ (Αθήνα) | Καθ. ΙΩΑΝΝΗΣ ΜΑΤΣΟΥΚΑΣ (Πάτρα) |
| Αν. Καθ. ΕΥΤΥΧΙΑ ΑΣΠΡΟΔΙΝΗ (Λάρισα) | Καθ. ΑΧΙΛΛΕΑΣ ΜΠΕΝΑΚΗΣ (Λάρισα) |
| Δρ ΑΝΤΩΝΙΟΣ ΑΥΓΕΡΙΝΟΣ (Αθήνα) | Δρ ΕΛΕΥΘΕΡΙΟΣ Ε. ΝΤΟΥΝΗΣ (Αθήνα) |
| Αν. Καθ. ΑΘΑΝΑΣΙΟΣ ΒΑΛΑΒΑΝΙΔΗΣ (Αθήνα) | Αν. Καθ. ΖΩΗ ΠΑΠΑΔΟΠΟΥΛΟΥ-ΝΤΑΙΦΩΤΗ (Αθήνα) |
| Αν. Καθ. ΑΝΔΡΕΑΣ ΓΙΑΚΟΥΜΕΤΤΗΣ (Αλεξανδρούπολις) | Δρ ΝΙΚΟΣ ΟΙΚΟΝΟΜΑΚΟΣ (Αθήνα) |
| Καθ. ΕΛΕΝΗ ΓΙΑΜΑΡΕΛΛΟΥ (Αθήνα) | Καθ. ΝΙΚΟΛΑΟΣ ΠΑΛΛΗΚΑΡΑΚΗΣ (Πάτρα) |
| Καθ. ΓΕΩΡΓΙΟΣ ΓΙΟΦΤΣΟΣ (Λαμία) | Καθ. ΓΕΩΡΓΙΟΣ ΠΑΝΑΓΙΩΤΑΚΗΣ (Πάτρα) |
| Καθ. ΑΧΙΛΛΕΑΣ ΓΡΑΒΑΝΗΣ (Ηράκλειο) | Δρ ΝΙΚΗ ΓΕΩΡΓΑΤΟΥ-ΠΑΠΑΓΕΩΡΓΙΟΥ (Αθήνα) |
| Επ. Καθ. ΑΝΝΑ ΔΕΛΤΣΙΔΟΥ (Λαμία) | Καθ. ΚΩΣΤΑΣ ΠΑΠΑΔΟΠΟΥΛΟΣ (Θεσσαλονίκη) |
| Επ. Καθ. ΕΛΕΝΗ ΘΕΟΔΟΣΟΠΟΥΛΟΥ (Αθήνα) | Αν. Καθ. ΑΝΔΡΕΑΣ ΠΑΠΑΓΕΤΡΟΠΟΥΛΟΣ (Πάτρα) |
| Αν. Καθ. ΧΑΡΙΣ ΚΑΡΑΓΕΩΡΓΙΟΥ (Αθήνα) | Επ. Καθ. ΠΑΝΑΓΙΩΤΗΣ ΠΛΕΣΣΑΣ (ΗΠΑ) |
| Καθ. ΠΑΝΑΓΙΩΤΗΣ ΚΑΡΑΓΙΑΝΝΑΚΟΣ (Αθήνα) | Καθ. ΓΕΩΡΓΙΟΣ ΠΟΛΥΧΡΟΝΟΠΟΥΛΟΣ (Αθήνα) |
| Αν. Καθ. ΓΕΩΡΓΙΟΣ ΚΑΡΑΚΙΟΥΛΑΚΗΣ (Θεσσαλονίκη) | Καθ. ΕΥΑΓΓΕΛΙΑ ΠΡΩΤΟΠΑΠΑ (Αθήνα) |
| Επ. Καθ. ΘΕΟΦΑΝΗΣ ΚΑΤΟΣΤΑΡΑΣ (Αθήνα) | Καθ. ΝΙΚΟΣ ΣΑΚΕΛΛΑΡΙΔΗΣ (Λάρισα) |
| Καθ. ΒΑΣΙΛΙΚΗ ΚΕΦΑΛΑ (Αθήνα) | Καθ. ΚΩΣΤΑΣ ΣΕΚΕΡΗΣ (Αθήνα) |
| Καθ. ΕΛΕΝΗ ΚΙΝΤΖΙΟΥ (Αθήνα) | Καθ. ΓΡΗΓΟΡΙΟΣ ΣΚΑΛΚΕΑΣ (Αθήνα) |
| Καθ. ΒΑΣΙΛΕΙΟΣ ΚΟΚΚΑΣ (Θεσσαλονίκη) | Αν. Καθ. ΜΑΡΙΑ ΜΥΡΩΝΙΔΟΥ-ΤΖΟΥΒΕΛΕΚΗ (Θεσσαλο-
νίκη) |
| Αν. Καθ. ΠΑΝΑΓΙΩΤΑ ΓΑΛΑΝΟΠΟΥΛΟΥ-ΚΟΥΒΑΡΗ (Αθήνα) | Καθ. ΓΕΩΡΓΙΟΣ ΤΟΛΗΣ (Αθήνα) |
| Επ. Καθ. ΕΡΙΕΤΤΑ ΚΟΥΡΤΗ (Αθήνα) | Καθ. ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ ΤΡΙΧΟΠΟΥΛΟΣ (Αθήνα) |
| Καθ. ΧΑΡΙΛΑΟΣ ΚΟΥΤΗΣ (Αθήνα) | Καθ. ΑΣΤΕΡΙΟΣ ΤΣΙΦΤΣΟΓΛΟΥ (Θεσσαλονίκη) |
| Δρ ΠΑΝΑΓΙΩΤΑ ΚΡΗΤΙΚΟΥ (Αθήνα) | Καθ. ΒΑΣΙΛΙΚΗ ΜΗΡΤΣΟΥ-ΦΙΔΑΝΗ (Θεσσαλονίκη) |
| Αν. Καθ. ΜΙΧΑΛΗΣ ΚΥΡΙΑΚΙΔΗΣ (Αθήνα) | Καθ. ΧΡΙΣΤΟΔΟΥΛΟΣ ΦΛΩΡΔΕΛΛΗΣ (Πάτρα) |
| Καθ. ΑΛΚΙΒΙΑΔΗΣ ΚΩΣΤΑΚΗΣ (Αθήνα) | |
| Επ. Καθ. ΧΑΡΙΣ ΛΙΑΠΗ (Αθήνα) | |
| Επ. Καθ. ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΣ ΜΑΛΛΙΟΣ (Αθήνα) | |

Articles published in this Journal are **Indexed** or **Abstracted** in:

• **Chemical Abstracts** • **Elsevier' Bibliographic Databases: Scopus, EMBASE, EMBiology, Elsevier BIOBASE, Compendex, GEOBASE, FLUIDEX, TEXTILES**

Επιθεώρηση Κλινικής Φαρμακολογίας και Φαρμακοκινητικής
EPITHEORESE KLINIKES FARMAKOLOGIAS KAI FARMAKOKINETIKES
REVIEW OF CLINICAL PHARMACOLOGY AND PHARMACOKINETICS
ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΕΚΔΟΣΗ – GREEK EDITION



Ιατροφαρμακευτική Έκδοση
Εφηρμοσμένης Φαρμακολογίας, Φαρμακοκινητικής και Θεραπευτικής



Ιδιοκτήτης-Υπεύθυνος κατά το Νόμο: Ελένη Πλέσσα και ΣΙΑ Ε.Ε.
Μιχαλακοπούλου 145, 11527 Αθήνα, Ελλάδα, Τηλ.-Fax (0030)2107784700
Email: stplessas@hotmail.com



Articles published in this Journal are **Indexed** or **Abstracted** in:

- **Chemical Abstracts**
- **Elsevier' Bibliographic Databases: Scopus, EMBASE, EMBiology, Elsevier BIOBASE, Compendex, GEOBASE, FLUIDEX, TEXTILES**



ΚΑΝΟΝΙΣΜΟΣ ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΩΝ

Η *Επιθεώρηση Κλινικής Φαρμακολογίας και Φαρμακοκινητικής, Ελληνική Έκδοση*, δημοσιεύει άρθρα επισκόπησης και ενημέρωσης, πρωτότυπες ερευνητικές εργασίες και κλινικές μελέτες που έχουν άμεση σχέση με το φάρμακο και τη Θεραπευτική, αλλά και με επιστημονικούς τομείς που το επηρεάζουν. Οι εργασίες αυτές δεν πρέπει να έχουν δημοσιευθεί σε άλλα περιοδικά.

Οι εργασίες που αποστέλλονται στον Εκδότη για δημοσίευση κρίνονται από τη Συντακτική Επιτροπή ή από άλλους ειδικούς επιστήμονες.

Γλώσσα του περιοδικού είναι η δημοτική, χωρίς λεκτικές ακρότητες. Τα κείμενα, γραμμένα στο μονοτονικό σύστημα, πρέπει να αποστέλλονται σε τρία αντίτυπα και να συνοδεύονται με εύκαμπτο δίσκο ηλεκτρονικού υπολογιστή.

Στην πρώτη σελίδα σημειώνονται ο τίτλος της εργασίας και τα ονόματα των συγγραφέων. Στις πρωτότυπες ερευνητικές και κλινικές εργασίες αναφέρεται και το κέντρο προέλευσης. Κάθε εργασία συνοδεύεται με ευρεία περίληψη στα ελληνικά και σε μία επίσημη γλώσσα της Ευρωπαϊκής Ένωσης, μαζί με τον τίτλο και τα ονόματα των συγγραφέων στη γλώσσα αυτή.

Οι βιβλιογραφικές παραπομπές φέρουν συνεχή αρίθμηση. Σε κάθε παραπομπή αναφέρονται κατά σειρά τα επώνυμα και τα αρχικά των ονομάτων των συγγραφέων, ο τίτλος της εργασίας, το περιοδικό, ο τόμος, η πρώτη και τελευταία σελίδα και το έτος δημοσίευσης.

Τα φάρμακα πρέπει να αναφέρονται με την κοινόχρηστη ονομασία τους και οι χημικές ουσίες και οι αναλυτικές τεχνικές ολογράφως.

ΤΟΜΟΣ 25, 2007 ❁ No 1

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΡΟΣΚΕΚΛΗΜΕΝΟΣ ΟΜΙΛΗΤΗΣ	
M. GÖTHERT.....9	<i>Τροποποίηση του ηπατικού μεταβολισμού της τεστοστερόνης και μπουφουραλόλης μετά από έκθεση σε stress</i>
<i>Actions of cannabinoids via serotonin₃ (5-HT₃) receptors and potential therapeutic implications</i>	
ΑΝΑΡΤΗΜΕΝΕΣ ΕΡΓΑΣΙΕΣ	
K. ΑΠΟΣΤΟΛΑΚΗΣ, Γ. ΚΩΣΤΟΠΑΝΑΓΙΩΤΟΥ, Α. ΖΑΡΡΟΣ, Ε. ΓΚΡΟΥΖΜΑΝ, Μ. ΚΑΤΡΑΜΑΔΟΥ και Χ. ΚΑΡΑΓΕΩΡΓΙΟΥ.....11	X. ΔΟΚΟΣ και Μ. ΜΥΡΩΝΙΔΟΥ-ΤΖΟΥΒΕΛΕΚΗ...38
<i>Προγνωστική αξία των επιπέδων των κυτοκινών στον ορό ασθενών με σηπτική καταπληξία</i>	
E. ΑΡΓΥΡΙΑΔΟΥ, Α. ΑΜΑΝΙΤΗ, Χ. ΠΟΥΡΖΙΤΑΚΗ, Α. ΖΑΡΑΛΙΔΟΥ, Κ. ΚΑΡΑΚΟΥΛΑΣ και Δ. ΒΑΣΙΛΑΚΟΣ.....14	<i>Η ανασταλτική δράση των μη στεροειδών αντιφλεγμονωδών φαρμάκων στην πύρωση των καταγμάτων</i>
<i>Επίδραση της ενδοφλέβιας παρεκοξίμης στις ανάγκες σε οπιοειδή στα πλαίσια πολυπαραγοντικής μετεγχειρητικής αναλγησίας σε ασθενείς που υποβλήθηκαν σε θωρακοτομή</i>	
Ο. ΑΣΗΜΑΚΗ, Ν. ΣΑΚΕΛΛΑΡΙΔΗΣ και Δ. ΜΑΓΚΟΥΡΑ.....17	K. ΔΡΟΣΟΠΟΥΛΟΣ, Ε. ΟΙΚΟΝΟΜΟΥ, Φ. ΨΑΧΟΥΛΙΑ, Α. ΒΟΥΛΓΑΡΗ, Β. ΚΟΣΜΙΔΟΥ, Λ. ANDERA και Α. ΠΙΝΤΖΑΣ.....40
<i>Διενεργοποίηση του υποδοχέα του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα EGFR από αγωνιστές του κανναβινοειδούς υποδοχέα CB1</i>	
Σ. ΑΣΛΑΝΙΔΗΣ, Α. ΠΥΡΠΑΣΟΠΟΥΛΟΥ, Σ. ΣΤΕΡΓΙΟΠΟΥΛΟΣ, Α. ΤΡΙΑΝΤΑΦΥΛΛΟΥ και Χ. ΖΑΜΠΟΥΛΗΣ.....19	<i>Ο νέος αντικαρκινικός παράγοντας TRAIL (Tumour Necrosis Factor-Related Apoptosis-Inducing Ligand) προκαλεί επιλεκτική απόπτωση σε καρκινικά κύτταρα του παχέος εντέρου</i>
<i>Εμφάνιση ψωριασικόμορφων εξανθημάτων σε ασθενείς υπό αντι-TNFα αγωγή</i>	
P. ΒΑΒΕΤΣΗ, Π. ΠΟΛΥΖΟΥ, Χ. ΠΑΠΑΝΑΣΤΑΣΟΠΟΥΛΟΥ, Γ. ΔΟΥΓΕΚΟΥ και Ν.Μ. ΣΙΤΑΡΑΣ.....22	Σ. ΘΕΟΦΙΛΟΠΟΥΛΟΣ, Ε. ΤΣΙΡΙΜΟΝΑΚΗ, Ν. ΣΑΚΕΛΛΑΡΙΔΗΣ και Δ. ΜΑΓΚΟΥΡΑ.....42
<i>Γλυκοζαμινογλυκάνες πλευριτικού υγρού</i>	
A. ΒΑΣΙΛΑΚΗ.....25	<i>Η πρωτεϊνική κίνηση C και το Ras ρυθμίζουν τη φονιδιακή έκφραση του ντοπαμινεργικού δείκτη TH και του νοραδρενεργικού δείκτη DBH</i>
<i>Μελέτη της επίδρασης ανοξίας και υπογλυκαιμίας στην έκφραση νευρωνικών δεικτών σε αμφιβληστροειδή και ιππόκαμπο επίμυος: Ανάπτυξη ex vivo μοντέλου ισχαιμίας</i>	
E.-M. ΓΕΩΡΓΑΝΤΑ και Ζ. ΓΕΩΡΓΟΥΣΗ.....28	K. ΘΕΡΜΟΥ, Ν. ΜΑΣΤΡΟΔΗΜΟΥ, Μ. ΠΑΠΑΖΟΓΛΟΥ, Κ. ΑΝΤΩΝΙΟΥ, Γ. ΠΑΝΑΓΗΣ, Σ. ΒΛΑΧΟΥ, Β. ΝΑΧΜΙΑΣ, Α. ΜΕΝΝΙΣΙΟΥ, Μ. ΓΙΑΝΝΗ, Μ.Π. ΚΟΝΔΥΛΗΣ, Δ. ΠΑΠΑΧΑΤΖΗΣ και Χ. ΣΠΥΡΑΚΗ...44
<i>Σχηματισμός πολυ-πρωτεϊνικών συμπλόκων μεταξύ του δ-οπιοειδούς υποδοχέα, των Gβγ υπομονάδων και της STAT5B οδηγεί σε φωσφορυλίωση της STAT5B</i>	
E.Χ. ΓΙΑΝΝΑΚΟΠΟΥΛΟΥ και Α. ΤΥΛΙΓΑΔΑ.....30	<i>Φαρμακολογικός και συμπεριφερικός χαρακτηρισμός νέων αναλόγων για τους CB1 και CB2 υποδοχείς των κανναβινοειδών</i>
<i>Φαρμακολογικό preconditioning στην απόκριση των ευκαρυωτικών κυττάρων στο οξειδωτικό stress: Βήμα προς βήμα αξιολόγηση της μεθοδολογίας</i>	
A. ΓΟΥΛΑΣ, Μ. ΚΟΣΜΙΔΟΥ, Δ. ΜΟΥΛΥΒΑ, Λ. ΦΙΔΑΝΗ, Α. ΧΑΤΖΗΤΟΛΙΟΣ και Β. ΜΗΡΤΣΟΥ.....33	M. ΙΟΡΔΑΝΙΔΟΥ, Ι. ΠΕΤΡΙΔΗΣ, Μ.Β. ΒΑΣΙΛΕΙΑΔΗΣ, Κ. ΑΡΒΑΝΙΤΙΔΗΣ, Γ. ΜΠΟΥΓΙΟΥΚΑΣ, Α. ΤΑΥΡΙΔΟΥ και Ε.Γ. ΜΑΝΩΛΟΠΟΥΛΟΣ.....46
<i>Μελέτη συσχέτισης κοινών πολυμορφισμών των πονιδίων GST T1 και GST M1 με την ανταπόκριση δυσλιπιδαιμικών ασθενών στην ατορβαστατίνη</i>	
E.-Π. ΔΑΣΚΑΛΟΠΟΥΛΟΣ, Μ. INGELMAN-SUNDBERG, M.A. LANG, Μ. ΜΑΡΣΕΛΟΣ και Μ. ΚΩΝΣΤΑΝΤΗ.....35	<i>Συγκριτική μελέτη της συχνότητας του πολυμορφισμού -759C/T του 5-HT_{2C} υποδοχέα σε υγιείς εθελοντές, σε ασθενείς με σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2 και σε ασθενείς με στεφανιαία νόσο στον Ελληνικό πληθυσμό</i>
<i>Φαρμακευτική αγωγή ψυχογηριατρικών ασθενών σε τμήμα βραχείας νοσηλείας ψυχιατρικού νοσοκομείου</i>	

Φ. ΚΙΑΓΙΑΔΑΚΗ και Κ. ΘΕΡΜΟΥ.....57	Μ. ΜΥΡΩΝΙΔΟΥ-ΤΖΟΥΒΕΛΕΚΗ και Χ. ΔΟΚΟΣ...84
<i>Πρόκληση in vivo ισχαιμίας με διεγερτικά αμινοξέα και μελέτη της προστατευτικής δράσης της σωματοστατίνης στον αμφιβληστροειδή του αρουραίου</i>	<i>Η ζικωνοτιδή και οι φαρμακολογικές ιδιότητες της οικογένειας των κωνοτοξινών</i>
Φ. ΚΙΑΓΙΑΔΑΚΗ, Ε. ΚΟΥΛΑΚΗΣ και Κ. ΘΕΡΜΟΥ..60	Γ. ΠΑΠΑΖΗΣΗΣ, Α. ΜΑΣΤΡΟΓΙΑΝΝΗ, Κ. ΚΑΤΣΙ-ΓΙΑΝΝΟΠΟΥΛΟΣ και Α. ΚΑΡΑΣΤΕΡΓΙΟΥ.....86
<i>Η ενεργοποίηση του D1 υποδοχέα και η cGMP τροποποιούν την απελευθέρωση και εναπόθεση γλυκοζαμινογλυκανών από κακοήθη κύτταρα μεσοθελώματος</i>	<i>Θεραπευτική προσέγγιση σε συννοσηρότητα ψυχαναγκαστικής καταναγκαστικής διαταραχής και σχιζοφρένειας: Αποτελεσματικότητα και ανεπιθύμητες ενέργειες της Κλοζαπίνης και της Χλωριμιπραμίνης</i>
Ι. ΚΛΑΓΚΑΣ, Δ. ΖΑΡΔΑΒΑΣ, J. ZHONG, Μ. ROTH, Γ. ΚΑΡΑΚΙΟΥΛΑΚΗΣ και Ε. ΠΑΠΑΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΥ.....62	Π. ΠΑΠΑΪΩΑΝΝΙΔΟΥ, Α. SΑΒΟ, Ε. ΚΑΡΑΜΑΝΛΗΣ, Α. RASKOVIC, L. PEJAKOV, Α. MILICIC, Z. TOMIC, Ο. HORVAT, D. KASTRATONIC και Ν. ΧΑΡΛΑΥΤΗΣ.....89
<i>Επίδραση του ειδικού αναστολέα τυροσινικής κινάσης του υποδοχέα του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα Gefitinib στην έκκριση και εναπόθεση γλυκοζαμινογλυκανών από κακοήθη κύτταρα μεσοθελώματος</i>	<i>Περιεχειρητική χημειοπροφύλαξη στη γενική Χειρουργική στην Ελλάδα, στη Σερβία και στο Μόντε Νέγκρο</i>
Χ. ΚΟΝΤΟΓΙΩΡΓΗΣ, Δ. ΧΑΤΖΗΠΑΥΛΟΥ-ΛΙΤΙΝΑ, Δ. ΚΑΠΟΥΚΡΑΝΙΔΟΥ, Β. ΣΤΕΡΓΙΟΥ-ΜΙΧΑΗΛΙΔΟΥ και Κ. ΚΑΛΛΑΡΑΣ.....64	Ν. ΠΙΤΣΙΚΑΣ, Σ. ΖΗΣΟΠΟΥΛΟΥ, Π.Α. ΤΑΡΑΝΤΙΛΗΣ, Χ.Δ. ΚΑΝΑΚΗΣ, Μ.Γ. ΠΟΛΥΣΙΟΥ και Ν. ΣΑΚΕΛΛΑΡΙΔΗΣ.....92
<i>Νέο αζωμεθινικό κουμαρινικό παράγωγο με αντιοξειδωτική - αντιφλεγμονώδη - αντιθρομβωτική δράση. Δράση σε δείκτες φλεγμονής</i>	<i>Επίδραση του δραστικού συστατικού του Crocus Sativus L., Κροκίνη επί της αναγνωριστικής και χωρικής μνήμης του επίμυος</i>
Π.Ν. ΚΟΥΡΟΥΝΑΚΗΣ, Ε.Α. ΡΕΚΚΑ, Δ. ΓΑΛΑΝΑΚΗΣ, Χ. ΔΟΥΛΓΚΕΡΗΣ, Ι. ΣΙΣΚΟΥ, Κ. ΤΣΙΑΚΙΤΖΗΣ, Α.Π. ΚΟΥΡΟΥΝΑΚΗ και Α. ΓΑΒΑΛΑΣ.....67	Χ. ΠΟΥΡΖΙΤΑΚΗ, Ι. ΚΛΑΓΚΑΣ, Α. ΚΑΪΔΟΓΛΟΥ, Γ. ΤΖΗΜΑΓΙΩΡΓΗΣ και Α. ΚΡΙΤΗΣ.....94
<i>Δομικές τροποποιήσεις κλασικών μη στεροειδών αντιφλεγμονωδών μπορούν να οδηγήσουν στην ανακάλυψη καλύτερων φάρμακων για νόσους της σύγχρονης κοινωνίας</i>	<i>Κασπασο-εξαρτώμενος και μη κυτταρικός θάνατος σε PC12 κύτταρα και PC12 κύτταρα υπο την επίδραση NGF μετά από διεγερσιμοζικήτητα υπό την επίδραση γλουταμινικού οξέος.</i>
Μ. ΚΩΝΣΤΑΝΤΗ, Γ. ΡΕΝΤΕΣΗ, Μ. ΜΑΡΣΕΛΟΣ και Μ.Α. LANG.....69	Χ. ΠΟΥΡΖΙΤΑΚΗ, Ι. ΚΛΑΓΚΑΣ, Α. ΣΙΟΓΚΑ, Γ. ΤΖΗΜΑΓΙΩΡΓΗΣ και Α. ΚΡΙΤΗΣ.....98
<i>Οι ντοπαμινεργικοί D₂-υποδοχείς του παγκρέατος ρυθμίζουν την καταστολή μέσω ινσουλίνης της έκφρασης των κυτοχρωμάτων CYP2E1 και CYP2B1/2</i>	<i>Η νευροπροστατευτική δράση αναστολέα των ασπαρτυλπρωτεασών σε PC12 κύτταρα και PC12 κύτταρα υπό την επίδραση NGF μετά από στέρηση οξυγόνου και γλυκόζης</i>
Λ. ΛΕΟΝΤΙΑΔΗΣ και Ζ. ΓΕΩΡΓΟΥΣΗ.....72	Γ. ΡΑΓΙΑ, Ε. ΝΙΚΟΛΑΪΔΗΣ, Κ.Ι. ΑΡΒΑΝΙΤΙΔΗΣ, Α. ΤΑΥΡΙΔΟΥ, Γ. ΜΠΟΥΓΓΙΟΥΚΑΣ και Ε.Γ. ΜΑΝΩΛΟΠΟΥΛΟΣ.....102
<i>Η RGS4 πρωτεΐνη προσδένεται στα καρβοξυτελικά άκρα των μ- και δ-οπιοειδών υποδοχέων</i>	<i>Συχνότητες εμφάνισης των πολυμορφισμών των γονιδίων του συστήματος ρενίνης-αγγειοτενσίνης σε υγιείς και σε ασθενείς με στεφανιαία νόσο και νόσο των καρδιακών βαλβίδων στον Ελληνικό Πληθυσμό</i>
Χ. ΛΙΑΠΗ, Ε. ΦΕΣΚΟΥ, Α. ΖΑΡΡΟΣ και Σ. ΤΣΑΚΙΡΗΣ.....75	Α. ΣΙΔΕΡΗΣ, Π. ΠΙΤΥΧΟΥΤΗΣ, Ε. ΓΡΙΒΑ, Ν. ΚΟΚΡΑΣ, Ι. ΜΕΣΣΑΡΗ, Χ. ΚΑΡΑΓΕΩΡΓΙΟΥ και Ζ. ΠΑΠΑΔΟΠΟΥΛΟΥ-ΝΤΑΪΦΩΤΗ.....105
<i>Ο ρόλος της ομοκυστεΐνης, της L-αλανίνης και της L-φαινυλαλανίνης στην επίδραση της χρόνιας διατροφικής έλλειψης χολίνης επί της δραστηριότητας της ακετυλχολινεστεράσης και της (Na⁺,K⁺)-ΑΤΡάσης εγκεφάλου επίμυων</i>	<i>Φυλετικές διαφορές στη συμπεριφορική και νευροχημική ανταπόκριση μετά από έκθεση σε Κάδμιο</i>
Α. ΜΑΡΑΖΙΩΤΗ, Χ. ΣΠΥΡΑΚΗ και Κ. ΘΕΡΜΟΥ...78	Ν. ΣΤΕΦΑΝΟΥ, Χ. ΔΟΚΟΣ και Μ. ΜΥΡΩΝΙΔΟΥ-ΤΖΟΥΒΕΛΕΚΗ.....108
<i>Η χορήγηση της σωματοστατίνης στην κοιλιακή χώρα σφάιρα ενεργοποιεί GABA-εργικές οδούς και επάγει την έκφραση του C-FOS γονιδίου σε εγκεφαλικές περιοχές που εμπλέκονται στον έλεγχο της κίνησης</i>	<i>Φαρμακευτική φροντίδα: Ο νέος ρόλος του σύγχρονου κλινικού φαρμακοποιού</i>
Ν. ΜΑΣΤΡΟΔΗΜΟΥ και Κ. ΘΕΡΜΟΥ.....80	Θ. ΣΤΡΟΥΜΠΙΝΗ, Μ. ΤΡΑΠΑΛΗ, Χ. ΛΙΑΠΗ, Ι. ΔΟΝΤΑ, Α. ΠΕΡΕΛΑΣ, Μ. ΠΟΥΛΑΚΟΥ, Δ. ΠΕΡΡΕΑ και Π. ΓΑΛΑΝΟΠΟΥΛΟΥ.....111
<i>Επίδραση του SIN-1 και της 8-Br-cGMP στη Χημική ισχαιμία στον αμφιβληστροειδή αρουραίου</i>	<i>Επίδραση σιμπουτραμίνης στην πρόσληψη τροφής, στο σωματικό βάρος και στα επίπεδα ρεζιστίνης και TNF-α του ορού σε επίμυος τρεφόμενους με δύο ισοθερμικές δίαιτες</i>
Α. ΜΑΤΡΑΛΗΣ, Ε. ΡΕΚΚΑ και Α. ΚΟΥΡΟΥΝΑΚΗ..82	
<i>Σχεδιασμός νέων υποχοληστερολαιμικών μορίων με αντιφλεγμονώδη δράση</i>	

Χ. ΤΑΧΟΥ, Χ. ΠΟΥΡΖΙΤΑΚΗ, Γ. ΔΕΡΜΑΤΗΣ, Ν. ΡΑΙΚΟΣ, Ε. ΤΣΟΥΚΑΛΗ και Δ. ΚΟΥΒΕΛΑΣ.....	114	<i>Μεταβολισμός και ανίχνευση της κοκαΐνης σε σίελο και πλάσμα</i>	<i>Η επίδραση των κανναβινοειδών στην κινητική συμπεριφορά σε δυο φαινοτύπους επιμύων</i>
Ε. ΦΡΑΓΚΟΥ και Ν. ΜΑΣΟΥΡΙΔΟΥ.....	116	<i>Αυτοπεπτική ικανότητα καρκινικού ιστού (μαστού Ανθρώπου) υπό την επίδραση Αναστολέων αυτοπεψίας (αδενίνης, αδενοσίνης, 3-μεθυλαδενίνης) in vitro</i>	Θ.Α. ΨΑΡΡΑ, Γ.Χ. ΜΠΑΤΖΙΑΣ, Τ.Λ. ΡΕΕΤΕΡΣ και Μ. ΚΟΥΤΣΟΒΙΤΗ-ΠΑΠΑΔΟΠΟΥΛΟΥ.....
Ο. ΧΟΥΛΙΑΡΑ, Κ. ΑΝΤΩΝΙΟΥ, Α. ΠΟΛΥΣΙΔΗ, Σ. ΓΚΟΥΝΤΑΣ, Ζ. ΠΑΠΑΔΟΠΟΥΛΟΥ-ΝΤΑΪΦΩΤΗ, Μ. ΜΑΡΣΕΛΟΣ και Χ. ΣΠΥΡΑΚΗ.....	119		121
			<i>Επίδραση της θεοφυλλίνης και των μεταβολιτών της στο ανιόν κόλον του κουνελιού</i>
			Φ. ΨΑΧΟΥΛΙΑ, Σ. ΜΟΥΜΤΖΗ, Ε. ΟΙΚΟΝΟΜΟΥ και Α. ΠΙΝΤΖΑΣ.....
			124
			<i>Η πολυφαινόλη κερκετίνη προκαλεί την αποικοδόμηση της ογκοπρωτεΐνης Ras και αυτοφαγικό θάνατο σε καρκινικά κύτταρα του παχέος εντέρου</i>
			ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΥΓΓΡΑΦΕΩΝ.....
			126

Επιθεώρηση Κλινικής Φαρμακολογίας και Φαρμακοκινητικής
EPITHEORESE KLINIKES FARMAKOLOGIAS KAI FARMAKOKINETIKES
REVIEW OF CLINICAL PHARMACOLOGY AND PHARMACOKINETICS
ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΕΚΔΟΣΗ – GREEK EDITION



Journal of Applied Pharmacology and Current Therapeutics Reviews,
Review Articles on Drugs and Drugs Therapy, Original Papers and
Practical Therapeutics Articles



Published by PHARMAKON-Press
145 Michalakopoulou str., 115 27 Athens, GREECE
Tel.-Fax (0030)2107784700; Email:stplessas@hotmail.com



Articles published in this Journal are **Indexed** or **Abstracted** in:

• **Chemical Abstracts**

- **Elsevier' Bibliographic Databases: Scopus, EMBASE, EMBiology, Elsevier BIOBASE, Compendex, GEOBASE, FLUIDEX, TEXTILES**



EDITORS-IN-CHIEF: Prof. STAVROS T. PLESSAS MD and Dr CHARALAMPOS T. PLESSAS

EDITORIAL BOARD

- | | |
|--|--|
| Dr MICHAEL ALEXIS (Athens) | Assoc. Prof. MICHAEL KYRIAKIDES (Athens) |
| Prof. FRAGISKI ANTHOULI-ANAGNOSTOPOULOU (Athens) | Assist. Prof. CHARIS LIAPI (Athens) |
| Prof. JOHN ANDROULAKIS (Athens) | Assist. Prof. CONSTANTINE MALLIOS (Athens) |
| Dr GEORGE ASIMAKOPOULOS (Athens) | Assist. Prof. EVANGELOS MANOLOPOULOS (Alexandroupolis) |
| Prof. AGLAIA ATHANASIADOU (Patra) | Prof. JOHN MANTAS (Athens) |
| Assoc. Prof. EUTYCHIA ASPRODINI (Larissa) | Prof. MICHAEL MARAGOUDAKIS (Patra) |
| Dr ANTHONY AVGERINOS (Athens) | Prof. MARIOS MARSELOS (Ioannina) |
| Prof. ACHILLES BENAKIS (Larissa) | Prof. JOHN MATSOUKAS (Patra) |
| Assoc. Prof. HARIS CARAGEORGIOU (Athens) | Dr NIKOS OIKONOMAKOS (Athens) |
| Assoc. Prof. ZOE PAPADOPOULOU-DAIFOTI (Athens) | Prof. NIKOLAS PALLIKARAKIS (Patra) |
| Assist. Prof. ANNA DELTSIDOU (Lamia) | Prof. GEORGE PANAYIOTAKIS (Patra) |
| Dr ELEFTERIOS DOUNIS (Athens) | Prof. KOSTAS PAPADOPOULOS (Thessaloniki) |
| Prof. VASSILIKI MIRTSSOU-FIDANI (Thessaloniki) | Dr NIKI GEORGATOU-PAPAGEORGIOU (Athens) |
| Prof. CHRISTODOULOS FLORDELLIS (Patra) | Assoc. Prof. ANDREAS PAPAPETROPOULOS (Patra) |
| Assoc. Prof. PANAGIOTA GALANOPOULOU-KOUVARI (Athens) | Assist. Prof. PANAYOTIS PLESSAS (USA) |
| Prof. HELEN GIAMARELLOU (Athens) | Prof. GEORGE POLICHRONOPOULOS (Athens) |
| Prof. GEORGE GIOFTSOS (Lamia) | Prof. EVANGELIA PROTOPAPA (Athens) |
| Prof. ACHILLEAS GRAVANIS (Heraklion) | Prof. NIKOS SAKELLARIDIS (Larissa) |
| Prof. GEORGE KARAKIULAKIS (Thessaloniki) | Prof. CONSTANTINE SEKERIS (Athens) |
| Prof. PANAYOTIS KARAYANNAKOS (Athens) | Prof. GREGORY SKALKEAS (Athens) |
| Assist. Prof. THEOFANIS KATOSTARAS (Athens) | Assist. Prof. HENEN THEODOSOPOULOU (Athens) |
| Prof. VASSILIKI KEFALA (Athens) | Prof. GEORGE TOLIS (Athens) |
| Prof. HELEN KINTZIOU (Athens) | Prof. DIMITRIOS TRICHOPOULOS (Athens) |
| Prof. BASILE KOKKAS (Thessaloniki) | Prof. ASTERIOS TSIFTSOGLOU (Thessaloniki) |
| Prof. ALKIVIADIS KOSTAKIS (Athens) | Assoc. Prof. MARIA MIRONIDOU-TZOUVELEKI (Thessaloniki) |
| Assist. Prof. ERIETTA KOURTI (Athens) | Assoc. Prof. ATHANASIOS VALAVANIDIS (Athens) |
| Prof. CHARILAOS KOYTIS (Athens) | Assoc. Prof. ANDREAS YIACOUMETTIS (Alexandroupolis) |
| Dr PANAGIOTA KRITIKOU (Athens) | |

VOLUME 25, 2007 ❁ No 3

CONTENTS

INVITED SPEAKER

- M. GÖTHERT.....9
Actions of cannabinoids via serotonin₃ (5-HT₃) receptors and potential therapeutic implications

POSTERS PRESENTATION

- C. APOSTOLAKIS, G. KOSTOPANAGIOTOU, A. ZARROS, E. GKROUZMAN, M. KATRAMADOU and H. CARAGEORGIOU.....11

Prognostic value of serum cytokines' levels in patients undergoing septic shock

- E. ARGYRIADOU, E. AMANITI, CH. POURZITAKI, A. ZARALIDOU, K. KARAKOULAS and D. VASILAKOS.....14

Intravenous parecoxib during postoperative multimodal analgesia after thoracotomy: Impact on opioid needs and postoperative complications

- O. ASIMAKI, N. SAKELLARIDIS and D. MANGOURA.....17

Transactivation of epidermal growth factor receptor EGFR by CB1 cannabinoid receptor agonists

- S. ASLANIDIS, A. PYRPASOPOULOU, S.L. STERGIPOULOS, A. TRIANTAFYLLOU and C. ZAMBOULIS.....19

Psoriasisiform lesions in patients receiving anti-TNF α treatment

- R. VAVETSI, P. POLIZOU, C. PAPANASTASOPOULOU, G. DOUGEKOU and N.M. SITARAS...22

Glycosaminoglycans in pleural effusions

- A. VASILAKI.....25

Effect of anoxia and hypoglycaemia on the expression of neuronal cell markers in the rat retina and hippocampus: Development of a rat ex vivo ischemia model

- I.-M. GEORGANDA and Z. GEORGOUSI.....28

Functional complexes between δ -opioid receptor, G β y and STAT5B are implicated in STAT5B phosphorylation

- E.CH. YIANNAKOPOULOU and E. TILIGADA.....30**

Pharmacological preconditioning in the oxidative stress response of eukaryotic cells: In process method validation

- A. GOULAS, M. KOSMIDOU, D. MOLYVA, L. FIDANI, A. HATZITOLIOS and V. MIRTSSOU.....33

An association study of the GST T1 and GST M1 null polymorphisms with the response of Greek dyslipidemic patients to atorvastatin

- E.-P. DASKALOPOULOS, M. INGELMAN-SUNDBERG, M.A. LANG, M. MARSELOS and M. KONSTANDI.....35

Stress modifies testosterone and bufuralol metabolism in the rat liver

- CH. DOKOS and M. MIRONIDOU-TZOUVELEKI.....38

The inhibitory effect of non-steroidal anti-inflammatory drugs in fracture healing

- S. THEOFILOPOULOS, E. TSIRIMONAKI, N. SAKELLARIDIS and D. MANGOURA.....42

PKC and Ras differentially regulate gene expression of the dopaminergic marker TH and noradrenergic marker DBH

- K. THERMOS, N. MASTRODIMOU, M. PAPANAGIOTOU, K. ANTONIOU, G. PANAGIS, S. VLACHOU, V. NAHMIAS, A. MENISSIOU, M. GIANNI, M.P. KONDYLIS, D. PAPAHAJIS and C. SPYRAKI.....44

Pharmacological and behavioral characterization of novel ligands for CB1 and CB2 cannabinoid receptors

- M. IORDANIDOU, J. PETRIDIS, K. VASSILIADIS, K. ARVANITIDIS, G. BOUGIOUKAS, A. TAURIDOU and V.G. MANOLOPOULOS.....46

Comparative study of frequency of the polymorphism -759 C/T of the 5 HT2C receptor in healthy volunteers, in patients with type II diabetes mellitus and in patients with coronary artery disease in the Greek population

- D. KAPOUKRANIDOU, I. KALPIDIS, E. AMANITI, D. KOUVELAS, D. VASILAKOS and M. ALBANI...49

Muscle regeneration following local anesthetic myotoxic insult. Morphometric evaluation

- H. CARAGEORGIOU, C. PANTOS, A. ZARROS, V. STOLAKIS, I. MOUROUZIS, D. COKKINOS and S. TSAKIRIS.....52

Effect of experimental hyper- and hypo-thyroidism on acetylcholine-sterase, (Na⁺,K⁺)- and Mg²⁺-AT-Pase activities of adult rat brain regions

- K. KATSIGIANNPOULOS, G. PAPAISIS, I. PANTOULARIS, A. MASTROGIANNI and A. KARASTERGIOU.....55

Pharmacotherapy in psychogeriatric patients in acute ward of a psychiatric hospital

- F. KIAGIADAKI and K. THERMOS.....57

Neuroprotective Role of somatostatin in an in vivo model of retinal ischemia

- F. KIAGIADAKI, E. KOULAKIS and K. THERMOS.....60

D1 receptor activation and cGMP modulate somatostatin release in the rat retina

- J. KLANGAS, D. ZARDAVAS, J. ZHONG, M. ROTH, G. KARAKIULAKIS and E. PAPANAGIOTOU.....62

The effect of the highly selective epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor gefitinib on

<i>glycosaminoglycan synthesis by human malignant mesothelioma cells</i>	
A.C. KONTOGIORGIS, D.HADJIPAVLOU-LITINA, D. KAPOUKRANIDOU, B. STERGIU-MICHAILIDOU and K. KALLARAS.....	64
<i>New azomethine coumarinic derivative with antioxidant - antiinflammatory - antithrombotic activity on inflammatory indicators</i>	
P.N. KOUROUNAKIS, E.A. REKKA, D. GALANAKIS, C. DOULGERIS, I. SISKOU, K. TSIAKITZIS, A.P. KOUROUNAKIS and A. GAVALAS.....	67
<i>Structural modification of non steroidal anti-inflammatory drugs can lead to the discovery of better agents against diseases of modern societies</i>	
M. KONSTANDI, G. REDESI, M. MARSELOS and M.A. LANG.....	69
<i>Pancreatic D₂-dopaminergic receptors regulate the insulin-induced down-regulation of cytochromes CYP2E1 and CYP2B1/2</i>	
L.J. LEONTIADIS and Z. GEORGOUSI.....	72
<i>RGS4 protein interacts with the carboxyl-terminal tails of the μ- and δ-opioid receptors</i>	
C. LIAPI, I. FESKOU, A. ZARROS and S. TSAKIRIS.....	75
<i>The role of homocysteine, L-alanine and L-phenylalanine in the effect of chronic dietary choline deprivation on rat brain acetylcholinesterase and (Na⁺,K⁺)-ATPase activities</i>	
A. MARAZIOTI, C. SPYRAKI and K. THERMOS...78	
<i>Local administration of somatostatin in the VP Activates GABA-ergic pathways and induces c-FOS expression in brain areas implicated in motor control</i>	
N. MASTRODIMOU and K. THERMOS.....	80
<i>Effect of SIN-1 and 8-Br-cGMP in chemical ischemia in rat retina</i>	
A.MATRALIS, E. REKKA and A. KOUROUNAKIS.....	82
<i>Design of novel hypochole-sterolemic derivatives with anti-inflammatory activity</i>	
M. MIRONIDOU-TZOUVELEKI and Ch. DOKOS.....	84
<i>Ziconotide and the pharmacological properties of conotoxins family</i>	
G. PAPAISIS, A. MASTROGIANNI, K. KATSI-GIANNOPOULOS and A. KARASTERGIU.....	86
<i>Treatment Approach in case of comorbidity of obsessive-compulsive disorder in schizophrenia: Efficacy and side effects of clozapine and chlorimipramine</i>	
P. PAPAIOANNIDOU, A. SABO, E. KARAMANLIS, A. RASKOVIC, L. PEJAKOV, A. MILICIC, Z. TOMIC, O. HORVAT, D. KASTRATOVIC and N. HARLAFTIS.....	89
<i>Peri-operative chemoprophylaxis in general surgery in Greece, Serbia and Montenegro</i>	
N. PITSIKAS, S. ZISOPOULOU, P.A. TARANTILIS, C.D. KANAKIS, M.G. POLISSIOU and N. SAKEL-LARIDIS.....	92
<i>Effects of the active constituent of Crocus Sativus L. Crocin on recognition and spatial rats' memory</i>	
C. POURZITAKI, I. KLAGAS, A. KAIDOGLOU, G. TZIMAGIORGIS and A. KRITIS.....	94
<i>Caspase dependent and independent cell death in naïve and NGF treated PC12 cells after glutamate induced exitotoxicity</i>	
C. POURZITAKI, I. KLAGAS, A. SIOGA, G. TZIMAGIORGIS and A. KRITIS.....	98
<i>Aspartyl-protease inhibition rescues naïve and NGF treated PC12 cells from death after oxygen and glucose deprivation</i>	
G. RAGIA, E. NIKOLAIDIS, K.I. ARVANITIDIS, A. TAVRIDOU, G. BOUGIOUKAS and V.G. MANOLOPOULOS.....	102
<i>Frequencies of renin-angiotensin system gene polymorphisms in healthy subjects and coronary artery disease and heart valve disease patients in a sample of the Greek population</i>	
A.C. SIDERIS, P. PITYCHOUTIS, E. GRIVA, N. KOKRAS, I. MESSARI, H. CARAGEORGIU and Z. PAPADOPOULOU-DAIFOTI.....	105
<i>Sex differences in behavioural and neurochemical responses following Cadmium exposure</i>	
N. STEPHANOU, Ch. DOKOS and M. MIRONIDOU-TZOUVELEKI.....	108
<i>Pharmaceutical care: the new role of modern clinical pharmacist</i>	
TH. STROUBINI, M. TRAPALI, CH. LIAPI, I. DON-TAS, A. PERELAS, M. POULAKOU, D. PERREA AND P. GALANOPOULOU.....	111
<i>Effects of Sibutramine treatment on food intake, body weight, resistin and TNF-α serum levels of rats fed with two isocaloric diets</i>	
H. TACHOU, C. POURZITAKI, G. DERMATIS, N. RAIKOS, E. TSOUKALI and D. KOUVELAS.....	114
<i>Cocaine metabolism and detection in saliva and blood</i>	
H. FRANGOU and N. MASOURIDOU.....	116
<i>Autophagic activity of breast cancer under the influence of autophagic inhibitors (adenine, adenosine, 3-methyladenine) in vitro</i>	
O. CHOULIARA, K. ANTONIOU, A. POLISSIDIS, S. GOUDAS, Z. PAPADOPOULOU-DAIFOTI, M. MARSELOS and C. SPYRAKI.....	119
<i>The effects of cannabinoids on motor activity in two phenotypes of rats</i>	
T.A. PSARRA, G.C. BATZIAS, T.L. PEETERS and M. KOUTSOVITI-PAPADOPOULOU.....	121
<i>Differential effects of theophylline and its metabolites on the rabbit ascending colon</i>	
LIST OF AUTHORS.....	126

Actions of Cannabinoids *via* Serotonin₃ (5-HT₃) Receptors and Potential Therapeutic Implications

M. Göthert

Institute of Pharmacology and Toxicology, University of Bonn, Reuterstrasse 2b, D-53113, Germany

Cannabinoid research has been stimulated by the identification and the molecular and functional characterization of two classes of cannabinoid (CB) receptors, termed CB₁ and CB₂, as well as by discovery of endogenous CB receptor ligands such as anandamide. The CB₁ receptor occurs in nervous tissue whereas CB₂ receptor is expressed by immune cells.

Evidence has been accumulated in recent years that the effects of cannabinoids in the nervous system are mediated not only by CB₁ receptors but that, in addition, ligand- and voltage-gated ion channels are targets of endogenous and exogenous cannabinoid receptor agonists. In view of a common functional role of cannabinoid receptor agonists and 5-HT₃ receptor antagonists in the control of, e.g., emesis and perception of pain, putative actions of cannabinoids at this serotonin receptor became particularly interesting. The 5-HT₃ receptor is exceptional among the serotonin receptor types in that it is a ligand-gated ion channel. Such channels are generally known to be endowed with allosteric modulatory sites. To check the possibility of an allosteric modulation of 5-HT₃ receptors by cannabinoids, excised outside-out patches from HEK293 cells stably transfected with the human (h) 5-HT_{3A} receptor cDNA were used to determine the effects of cannabinoid receptor ligands on the 5-HT-induced current using the patch clamp technique. The 5-HT-induced current was inhibited by cannabinoid receptor agonists such as anandamide, delta⁹-tetrahydrocannabinol (THC) and WIN55,212-2. The potency of anandamide in inhibiting 5-HT-induced current was even higher than its affinity for CB₁ and CB₂ receptors in radioligand binding studies. WIN55,212-2 caused noncompetitive inhibition of the 5-HT-induced current. The inhibition was stereoselective since WIN55,212-3, an enantiomer of WIN55,212-2, did not affect the 5-HT-induced current. The CB₁ receptor antagonist rimonabant (SR141716A) failed to counteract the inhibitory effect of WIN55,212-2, thus excluding an involvement of CB₁ receptors. The latter possibility was also ruled out by radioligand binding studies on membranes of the HEK293 cells.

Taking together, these data indicate that cannabinoids stereoselectively inhibit current through recombinant h5-HT_{3A} receptors independently of cannabinoid receptors. Probably the cannabinoids act as allosterically at a modulatory site of the h5-HT_{3A} receptor. When considering the high potency

of the endogenous agonist anandamide at this site, the latter may be tonically activated by anandamide and, hence, anandamide may play a physiological role by mediating a regulatory effect on the functional state of 5-HT₃ receptor. In line with data mentioned so far, WIN55,212-2 inhibited 5-HT-induced current through native 5-HT₃ receptor channels of N1E-115 cells composed of 5-HT_{3A} and 5-HT_{3B} subunits. A cannabinoid receptor-independent inhibition by anandamide was also found in *Xenopus* oocytes transfected with cDNA of mouse 5-HT₃ receptor. Since endocannabinoids also modulate, although at different potency, the function of another cysteine-loop ligand-gated ion channel, i.e. the α_7 nicotine receptor, chimera constructed between 5-HT₃ and α_7 nicotine receptors should be helpful to identify the critical region of the receptor at which the cannabinoids act. One step further ahead, site-directed mutagenesis will be suitable to identify the amino acid(s) at which the ligands bind.

In addition, evidence has been presented that cannabinoid-induced allosteric modulation of 5-HT₃ receptor function is operative in mammalian tissue (rat nodose ganglion) and in whole animals *in vivo*, in particular in anaesthetized rats pretreated with CB₁ receptor antagonist rimonabant. In such animals, activation of the 5-HT₃ receptors on cardiac afferent vagal nerves by bolus injection of phenylbiguanide induced the Bezold-Jarisch reflex, i.e. a decrease in heart rate. This effect was inhibited by WIN55,212-2 but not by WIN55,212-3. Analogously, cannabinoid-induced allosteric modulation of 5-HT₃ receptor function also seems to be involved in CB₁ receptor-independent inhibition of cocaine-induced hyperlocomotion of rats and THC-induced analgesic effect in mice.

As already mentioned, THC shares the antiemetic effect of 5-HT₃ receptor antagonists. Furthermore, it should be noted in context of the analgesic effect of THC that 5-HT₃ receptors occur at high density in regions which are involved in the control of pain. Accordingly it is conceivable that the allosteric site, *via* which cannabinoids modulate 5-HT₃ receptor function, may become a target of new analgesic and antiemetic drugs. In this context it should be kept in mind that pharmacological fine tuning of ligand-gated ion channel can be achieved by allosteric rather than orthosteric ligands.

Προγνωστική Αξία των Επιπέδων των Κυτοκινών στον Ορό Ασθενών με Σηπτική Καταπληξία

Κ. Αποστολάκης¹, Γ. Κωστοπαναγιώτου², Α. Ζάρρος¹, Ε. Γκρούζμαν¹, Μ. Κατραμάδου¹ και Χ. Καραγεωργίου¹

¹Εργαστήριο Πειραματικής Φαρμακολογίας, Ιατρική Σχολή Πανεπιστημίου Αθηνών, Αθήνα, Ελλάδα, ²Β' Κλινική Αναισθησιολογίας, Ιατρική Σχολή Πανεπιστημίου Αθηνών, Πανεπιστημιακό Γενικό Νοσοκομείο Αττικόν, Χαϊδάρη, Ελλάδα

ΕΙΣΑΓΩΓΗ - ΣΚΟΠΟΣ

Μεταξύ των αρνητικών προγνωστικών δεικτών για την επιτυχή έκβαση μίας βαριάς κλινικής καταστάσεως, όπως η σηπτική καταπληξία, συγκαταλέγονται, μεταξύ άλλων, και τα επιμόνως αυξημένα επίπεδα της καχεκτίνης (TNF ή νεκρωτικού παράγοντα των όγκων) και της ιντερλευκίνης (IL, ιδίως της IL-1) στον ορό (1). Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η διερεύνηση της σχέσεως διαφόρων κυτοκινών με την εξέλιξη και την έκβαση ασθενών με σηπτική καταπληξία. Συγκεκριμένα, μελετήθηκε η σημασία των επιπέδων της ιντερλευκίνης-1β (IL-1β), της ιντερλευκίνης-6 (IL-6), της ιντερλευκίνης-8 (IL-8), της ιντερλευκίνης-10 (IL-10), της ιντερλευκίνης-11 (IL-11) και του νεκρωτικού παράγοντα των όγκων-α (TNF-α) για την εκτίμηση της έκβασης (επιβίωση ή μη) μίας καταστάσεως σηπτικής καταπληξίας.

ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

Μελετήθηκαν 29 ασθενείς με σηπτική καταπληξία (16 άρρηνες και 13 θήλειες) ηλικίας 25-100 ετών, με μέση ηλικία τα 72 έτη. Τα δείγματα ελήφθησαν από ασθενείς του Γενικού Νοσοκομείου Αθηνών *Η Παμμακάριστος*. Οι αιμοληψίες έγιναν κατά τη διάγνωση της σηπτικής καταπληξίας (1η ημέρα) και κατά την 4η ημέρα εξέλιξης αυτής. Όλες οι δειγματοληψίες διεξήχθησαν τις πρωινές ώρες (έως τις 11 πμ). Μετρήθηκαν (με ανοσοενζυματική μέθοδο) έξι σημαντικές, συμμετέχουσες στον καταρράκτη της σήψης κυτοκίνες (IL-1β, IL-

6, IL-8, IL-10, IL-11, TNF-α). Οι αυτές κυτοκίνες μετρήθηκαν και σε 16 υγιείς μάρτυρες (χωρίς κάποια σοβαρή υποκείμενη νόσο), κατόπιν συναινέσεως τους. Οι τιμές που ακολουθούν αφορούν στη μέση τιμή των επιπέδων των κυτοκινών που καταγράφησαν. Η στατιστική επεξεργασία έγινε συμφώνως με τις μεθόδους Mann-Whitney, Wilcoxon signed rank test και Spearman's rank correlation. Μη στατιστικώς σημαντικές θεωρήθηκαν οι διαφορές για τις οποίες η τιμή p είναι μεγαλύτερη του 0,05.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Τα επίπεδα της IL-1β στους υγιείς μάρτυρες ήταν μηδενικά, ενώ στους ασθενείς με σηπτική καταπληξία άγγιζαν τα 37,2 pg/ml (την 1η ημέρα) και εν συνεχεία μειώνονταν στα 3,25 pg/ml (την 4η ημέρα). Οι επιβιώσαντες έφεραν χαμηλότερα επίπεδα IL-1β κατά την 1η ημέρα συγκριτικά με αυτούς που τελικά απεβίωσαν (17,29 pg/ml έναντι 47,1 pg/ml, αντίστοιχα). Δεν σημειώνεται, ωστόσο, κάποια στατιστικώς σημαντική συσχέτιση των επιπέδων αυτών με την έκβαση της νόσου. Την 4η ημέρα τα επίπεδα IL-1β είναι εξίσου χαμηλά και στις δύο υποομάδες ασθενών (επιβιώσαντες και μη).

Τα επίπεδα της IL-6 στους υγιείς μάρτυρες ήταν μηδενικά, ενώ στους ασθενείς με σηπτική καταπληξία άγγιζαν τα 105 pg/ml (την 1η ημέρα) και εν συνεχεία μειώνονταν στα 40,2 pg/ml (την 4η ημέρα). Οι επιβιώσαντες έφεραν υψηλότερα επίπεδα IL-6 κατά την 1η ημέρα συγκριτικά με αυτούς που τελικά απεβίωσαν (119,6 pg/ml

έναντι 93,1 pg/ml, αντίστοιχα). Το ίδιο παρετηρήθη και την 4η ημέρα (55,4 pg/ml έναντι 26,1 pg/ml, αντίστοιχα). Οι διαφορές των επιπέδων της IL-6 μεταξύ υγιών και ασθενών είναι στατιστικώς σημαντικές, τόσο κατά την 1η όσο και κατά την 4η ημέρα. Η κυριότερη δράση της ιντερλευκίνης-6 συνίσταται στη διέγερση των ηπατοκυττάρων προς παραγωγή πρωτεϊνών οξείας φάσεως (2).

Η IL-8 παρουσίασε αυξημένα επίπεδα στον ορό ασθενών (198,4 pg/ml) την 1η ημέρα, συγκριτικά με αυτά των υγιών μαρτύρων (10,3 pg/ml). Εν συνεχεία, τα επίπεδα της IL-8 ελαττώθηκαν (99,4 pg/ml). Στους επιβιώσαντες, τα επίπεδα της IL-8 μειώθηκαν μεταξύ 1ης και 4ης ημέρας (από 322 pg/ml σε 94,8 pg/ml), ενώ στους αποβιώσαντες τα αντίστοιχα επίπεδα αυξήθηκαν (από 83,5 pg/ml σε 105,2 pg/ml). Δεν παρατηρήθηκε κάποια στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ επιβιωσάντων και μη.

Τα επίπεδα της IL-10 στους υγιείς μάρτυρες ήταν μηδενικά, ενώ στους ασθενείς με σηπτική καταπληξία άγγιζαν τα 89,5 pg/ml (την 1η ημέρα) και εν συνεχεία μειώνονταν στα 51,2 pg/ml (την 4η ημέρα). Οι επιβιώσαντες έφεραν χαμηλότερα επίπεδα IL-10 κατά την 1η ημέρα συγκριτικά με αυτούς που τελικά απεβίωσαν (69,7 pg/ml έναντι 107,9 pg/ml, αντίστοιχα). Την 4η ημέρα τα επίπεδα της IL-10 μειώθηκαν δραματικά μόνο στους επιβιώσαντες ασθενείς (σε 3,21 pg/ml έναντι 99,2 pg/ml των αποβιωσάντων). Το γεγονός αυτό καταδεικνύει ότι η IL-10 θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί ως προγνωστικός δείκτης για την έκβαση της νόσου. Είναι γνωστό πως η ιντερλευκίνη-10 κατέχει σύνθετο ρόλο στο φαινόμενο της σηπτικής καταπληξίας, με άλλοτε ανασταλτική και άλλοτε επαγωγική δράση (ανάλογα με τη φάση εξέτασης της) (3).

Η IL-11 παρουσίασε αυξημένα επίπεδα στον ορό των υγιών μαρτύρων (28 pg/ml) σε σχέση με αυτά των ασθενών με σηπτική καταπληξία (20,97 pg/ml). Οι επιβιώσαντες παρουσίασαν μικρή πτώση των επιπέδων της IL-11 μεταξύ 1ης και 4ης ημέρας (από 21,71 pg/ml σε 18,64 pg/ml), ενώ οι αποβιώσαντες παρουσίασαν μικρή άνοδο (από 20,27 pg/ml σε 26,93 pg/ml), αντίστοιχα. Την 4η ημέρα παρατηρείται στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ των επιπέδων της IL-11 των επιβιωσάντων και των μη επιβιωσάντων, γεγονός που θα πρέπει να θεωρηθεί ως ένδειξη πιθανής προγνωστικής χρησιμότητας του παράγοντα αυτού.

Τα επίπεδα του TNF-α στους υγιείς μάρτυρες ήταν κατά μέσο όρο 5,69 pg/ml, ενώ στους ασθενείς με σηπτική καταπληξία άγγιζαν τα 224 pg/ml (την 1η ημέρα) και εν συνεχεία μειώνονταν στα 166 pg/ml (την 4η ημέρα). Οι επιβιώσαντες έφεραν υψηλότερα επίπεδα TNF-α συγκριτικά με τους μη επιβιώσαντες, τόσο κατά την 1η όσο και κατά την 4η ημέρα (282 και 230 pg/ml έναντι 170 και 102 pg/ml, αντίστοιχα).

Επιπλέον, βρέθηκαν θετικές (στατιστικώς σημαντικές) συσχετίσεις μεταξύ TNF-α και IL-1β, IL-10 και IL-1β, καθώς και μεταξύ IL-10 και TNF-α, στους ασθενείς με σηπτική καταπληξία κατά την 1η ημέρα. Αρνητική συσχέτιση εντοπίστηκε μεταξύ των IL-6 και IL-8 κατά την 4η ημέρα. Στους επιβιώσαντες κατεγράφη αρνητική συσχέτιση μεταξύ IL-6 και IL-1β (1ης ημέρας), IL-10 και IL-6 (1ης ημέρας), καθώς και μεταξύ IL-6 και IL-8 (4ης ημέρας).

Τέλος, χρησιμοποιώντας το πρότυπο της λογιστικής παλινδρόμησης, ανευρέθη σημαντική εξάρτηση μεταξύ επιβιωσάντων ή μη επιβιωσάντων και κυτοκινών (IL-1β, IL-6, IL-8, IL-10 και TNF-α): το ποσοστό επιτυχούς πρόβλεψης της ατυχούς έκβασης μίας καταστάσεως σηπτικής καταπληξίας αγγίζει το 86,7%, ενώ το αντίστοιχο ποσοστό για τους επιβιώσαντες αγγίζει το 78,6%.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΠΑΡΑΠΟΜΠΕΣ

1. Πρεκατές Α.: Προσέγγιση της σήψης και της καταπληξίας. Στο: Ρούσσος Χ. (επιμ.): Εντατική Θεραπεία. Τόμος II, σελ. 519-542, Ιατρικές Εκδόσεις Π.Χ. Πασχαλίδης, Αθήνα, 2000
2. Γερμενής Α.Ε.: Ιατρική Ανοσολογία. Σελ. 124-142, Εκδόσεις Παπαζήση, Αθήνα, 2000
3. Latifi S.Q., O'Riordan M.A., Levine A.D.: Interleukin-10 controls the onset of irreversible septic shock. *Infect. Immun.* 70: 4441-4446 (2002)

Prognostic Value of Serum Cytokines' Levels in Patients Undergoing Septic Shock

C. Apostolakis¹, G. Kostopanagiotou², A. Zarros¹, E. Gkrouzman¹, M. Katramadou¹ and H. Carageorgiou¹

¹Department of Experimental Pharmacology, Medical School, University of Athens, Athens, Greece; ²Second Department of Anaesthesiology, Medical School, University of Athens, *At-tikon* Hospital, Haidari, Greece

Key words: Cytokines, septic shock, prognostic value

Correspondence: Assoc. Prof. Haris Carageorgiou, Department of Experimental Pharmacology, Medical School, University of Athens, 75 Mikras Asias str., 11527, Goudi, Athens, Greece. Tel.: +30-210-7462562, Fax: +30-210-7462554, e-mail: xkarag@med.uoa.gr

SUMMARY: The aim of this work was to investigate the possible role of several cytokines in the prognosis of a septic shock state. Cytokine serum levels were

determined in 29 patients undergoing septic shock and 13 healthy volunteers. Interleukin-1 β (IL-1 β), interleukin-6 (IL-6) and interleukin-8 (IL-8) do not seem to have any relevance to the septic shock outcome (survival or death). On the contrary, low interleukin-10 (IL-10) serum levels seem to be a prognostic factor of a pleasant outcome in septic shock patients. A similar phenomenon was recorder as concerns the levels of interleukin-11 (IL-11). Tumor-necrosis-factor- α (TNF- α) seems to be a protective factor towards septic shock: higher TNF- α levels seem to contribute to the survival of these patients.

ΕΠΙΘΕΩΡΗΣΗ ΚΛΙΝΙΚΗΣ ΦΑΡΜΑΚΟΛΟΓΙΑΣ
ΚΑΙ ΦΑΡΜΑΚΟΚΙΝΗΤΙΚΗΣ 25: 14-16 (2007)
©ΦΑΡΜΑΚΟΝ-Τύπος

Επίδραση της Ενδοφλέβιας Παρεκοξίμπης στις Ανάγκες σε Οπιοειδή στα Πλαίσια Πολυπαραγοντικής Μετεγχειρητικής Αναλγησίας σε Ασθενείς που Υποβλήθηκαν σε Θωρακοτομή.

Ε. Αργυριάδου¹, Α. Αμανίτη¹, Χ. Πουρζιτάκη², Α. Ζαραλίδου¹, Κ. Καρακούλας¹ και Δ. Βασιλάκος¹

¹Κλινική Αναισθησιολογίας και Εντατικής Θεραπείας, ²Εργαστήριο Πειραματικής Φαρμακολογίας, Ιατρική Σχολή, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο, Θεσσαλονίκη, Ελλάδα

ΕΙΣΑΓΩΓΗ - ΣΚΟΠΟΣ

Τα μη στεροειδή αντιφλεγμονώδη φάρμακα (ΜΣΑΦ) έχουν χρησιμοποιηθεί κατά την περιεγχειρητική περίοδο ως συμπληρωματικοί αναλγητικοί παράγοντες. Εν τούτοις, η έλλειψη σκευασμάτων ΜΣΑΦ που να χορηγούνται ενδοφλεβίως καθώς και η προκαλούμενη διαταραχή της λειτουργικότητας των αιμοπεταλίων έχουν εμποδίσει την ευρεία χρήση τους. Η εισαγωγή στην κλινική πράξη των εκλεκτικών αναστολέων της κυκλο-οξυγενάσης 2 (Cox-2 inhibitors) οι οποίοι στερούνται αντιπηκτικής δράσης, ιδιαίτερα δε της παρεκοξίμπης, η οποία διατίθεται σε μορφή προς ενδοφλέβιο έγχυση, κατέστησε τους παράγοντες αυτούς περισσότερο κατάλληλους για χρήση στην περιεγχειρητική περίοδο (1). Ωστόσο, δεν υπάρχουν μελέτες στη βιβλιογραφία που να εξετάζουν τον πιθανά ευεργετικό τους ρόλο σε μείζονες επεμβάσεις όπως είναι οι θωρακοτομές.

Σκοπός της παρούσας μελέτης είναι η διερεύνηση της επίδρασης της ενδοφλεβίως χορηγούμενης παρεκοξίμπης κατά την περιεγχειρητική περίοδο σε ασθενείς που υποβάλλονται σε επεμβάσεις θωρακοτομής στα πλαίσια ενός πολυπαραγοντικού σχήματος αναλγησίας.

ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

Στη μελέτη συμπεριελήφθησαν 40 ασθενείς, ηλικίας 13-73 ετών, που υποβλήθηκαν σε επεμ-

βάσεις θωρακοτομής. Σε όλους τους ασθενείς χορηγήθηκαν οι ίδιοι παράγοντες εισαγωγής και διατήρησης στην αναισθησία. Οι ασθενείς χωρίστηκαν τυχαία σε δύο ομάδες. Στην ομάδα Α (N=20) χορηγήθηκαν δύο δόσεις παρεκοξίμπης ενδοφλεβίως, η μία 30 λεπτά προ της αποδιδωσοληνώσεως και η άλλη 12 ώρες μετά, ενώ στην ομάδα Β (N=20) χορηγήθηκε φυσιολογικός ορός σε όγκο ίσο με τον όγκο της χορηγηθείσας παρεκοξίμπης, τις ίδιες χρονικές στιγμές. Όλοι οι ασθενείς μετά την ανάνησή τους από την αναισθησία είχαν δυνατότητα αυτο-χορήγησης μορφίνης ενδοφλεβίως μέσω συστήματος αντλίας ελεγχόμενης από τον ασθενή αναλγησίας (PCA pump). Η συγκεκριμένη αντλία είχε ρυθμιστεί έτσι ώστε να χορηγεί δόση μορφίνης ίση με 1 mg σε κάθε επίκληση του ασθενή, ενώ η ίδια η αντλία δεν επέτρεπε τη χορήγηση δεύτερης δόσης μέχρις παρόδου χρονικού διαστήματος ίσου με 15 min. Όλοι οι ασθενείς είχαν εκπαιδευθεί στη χρήση της αντλίας προ της επεμβάσεως. Σε όλους τους ασθενείς καταγράφηκαν τα δημογραφικά στοιχεία (φύλο, ηλικία, βάρος), η διάρκεια της επέμβασης και η ποιότητα της αναλγησίας. Για την εκτίμηση της τελευταίας χρησιμοποιήθηκε η υποκειμενική κλίμακα αυτοεκτίμησης της έντασης του πόνου VAS (visual analog scale). Η τελευταία αποτελείται από ευθεία γραμμή μήκους 10 cm, βαθμονομημένη ανά 1 cm, στα άκρα της οποίας είναι γραμμένες οι εκφράσεις καθόλου

πόνος και ο πιο δυνατός πόνος που μπορείτε να φανταστείτε. Με τη χρήση της γραμμής αυτής ο ασθενής καλείται να σημειώσει πάνω στην ευθεία το σημείο που αντιστοιχεί στο πόνο που νιώθει (2). Τέλος σε κάθε ασθενή εκτιμήθηκε η συνολική κατανάλωση μορφίνης. Για τη στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκαν οι δοκιμασίες t-test, Chi-square, Kruskal Wallis και ANOVA. Το επίπεδο της στατιστικής σημαντικότητας ορίστηκε στο $\alpha < 0,05$.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Οι δύο ομάδες δεν διέφεραν στατιστικά ως προς την ηλικία, το βάρος και την αναλογία ανδρών γυναικών (Πίνακας 1).

Πίνακας 1
Δημογραφικά στοιχεία

	Ηλικία (M.O. \pm T.A.)	Φύλο (Α / Γ)	Βάρος (M.O. \pm T.A.)
Ομάδα Α	58,25 \pm 15,90	13 / 7	66,75 \pm 11,9
Ομάδα Β	61,40 \pm 11,21	11 / 9	71,84 \pm 16,9

Στον Πίνακα 2 παρουσιάζονται οι μέσες τιμές και οι τυπικές αποκλίσεις των τιμών της κλίμακας VAS στη πορεία του χρόνου για τις δύο ομάδες μελέτης. Η στατιστική ανάλυση κατέδειξε σημαντικά χαμηλότερες τιμές VAS κατά τις χρονικές στιγμές μελέτης t=12 hrs ($p=0,015$) και t=24 hrs ($p=0,01$), ενώ κατά τις χρονικές στιγμές t=4 hrs και t=48 hrs δεν καταγράφηκαν σημαντικές διαφορές ($p > 0,05$).

Πίνακας 2
Τιμές της κλίμακας πόνου μεταξύ των ομάδων

	VAS (M.O. \pm T.A.)			
	4 ώρες	12 ώρες	24 ώρες	48 ώρες
Ομάδα Α	3,30 \pm 1,05	3,30 \pm 0,67	3,20 \pm 0,63	2,70 \pm 0,82
Ομάδα Β	3,80 \pm 0,91	4,50 \pm 1,08	4,90 \pm 1,44	3,20 \pm 1,03

Πίνακας 3
Κατανάλωση μορφίνης μεταξύ των ομάδων

	Κατανάλωση μορφίνης mg (M.O. \pm T.A.)			
	4 ώρες	12 ώρες	24 ώρες	48 ώρες
Ομάδα Α	4,3 \pm 2,40	6,6 \pm 2,50	10,6 \pm 3,40	13,3 \pm 3,80
Ομάδα Β	4,7 \pm 1,63	8,3 \pm 2,58	13,9 \pm 4,72	23,5 \pm 12,51

Στον Πίνακα 3 παρουσιάζονται οι μέσες τιμές και οι τυπικές αποκλίσεις της συνολικής κατανάλωσης μορφίνης σε mg για τις δύο ομάδες για τις χρονικές περιόδους μελέτης.

Η στατιστική ανάλυση κατέδειξε σημαντικά χαμηλότερες τιμές κατανάλωσης μορφίνης για την ομάδα Α σε σχέση με την ομάδα Β, κατά τις χρονικές στιγμές t= 24hrs ($p=0,045$) και t=48 hrs ($p=0,009$). Όσον αφορά στη συχνότητα εμφάνισης μείζονων και ελασσόνων μετεγχειρητικών επιπλοκών, δεν καταγράφηκαν στατιστικώς σημαντικές διαφορές μεταξύ των δύο ομάδων ($p > 0,05$).

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η ανάλυση των αποτελεσμάτων έδειξε ότι η παρεκοξίμη είναι σε θέση να οδηγήσει σε μείωση της κατανάλωσης μορφίνης. Η διαφορά αυτή έγινε αντιληπτή στις 12 ώρες μετά την επέμβαση, δηλαδή στη φάση χορήγησης της δεύτερης δόσης, και όχι στις 4 ώρες πιθανώς και λόγω του γεγονότος ότι η παρεκοξίμη, όπως και όλοι οι αναστολείς της κυκλοοξυγενάσης είναι σε θέση να αντιμετωπίσουν αποτελεσματικά τον σωματικό πόνο και σε μικρότερο βαθμό τον σπλαχνικό. Κατά συνέπεια, τις πρώτες ώρες μετά την επέμβαση, όπου οι ασθενείς δεν έχουν ακόμη κινητοποιηθεί, η παρεκοξίμη δεν φαίνεται να προσφέρει πλεονέκτημα, σε σχέση με τα ενδοφλεβίως χορηγούμενα οπιοειδή. Εξ άλλου, οι δύο χορηγηθείσες δόσεις της παρεκοξίμης δεν φαίνεται να προσφέρουν αναλγησία πέραν των 12 ωρών. Συνεπώς, η χορήγηση παρεκοξίμης σε δύο δόσεις κατά την περιεγχειρητική περίοδο μειώνει τη συνολική απαίτηση σε οπιοειδή.

Όσον αφορά στις επιπλοκές, η μελέτη δεν κατέδειξε σημαντικές διαφορές μεταξύ των δύο ομάδων, τόσο στις ελάσσονες που σχετίζονται με τη χρήση οπιοειδών, όπως ο έμετος και ο κνησμός, όσο και στις μείζονες. Τα αποτελέσματα αυτά έρχονται σε συμφωνία με άλλες μελέτες που εξέτασαν τη χρήση της παρεκοξίμης κατά τη μετεγχειρητική περίοδο (3), καταδεικνύοντας την ασφάλειά της ως προς τον κίνδυνο θρομβοεμβολικών επεισοδίων, ακόμα και σε μείζονες επεμβάσεις, όπως είναι οι θωρακοτομές. Ωστόσο ο σχετικά μικρός αριθμός ασθενών απαιτεί την περαιτέρω έρευνα προκειμένου να τεκμηριωθεί η ασφάλειά της σε αυτού του είδους τις επεμβάσεις.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΠΑΡΑΠΟΜΠΕΣ

1. Kranke P., Morin A., Roewer N., Eberhart L.: Patients' global evaluation of analgesia and safety of injected parecoxib for postoperative pain: A quantitative systematic review. *Anesth. Analg.* 99: 797-806 (2004)
2. Gracely R.H.: Methods of testing pain mechanisms in normal man. In: Textbook of Pain (P.D. Wall, R. Meltzack, eds). 2nd ed., pp. 257-268, Churchill Livingstone, New York, 1989
3. Nussmeier N., Whelton A., Brown M., Joshi G.P., Langford R., Singla N.K., Boye M., Verburg K.: Safety and efficacy of the cyclooxygenase-2 inhibitors parecoxib and valdecoxib after noncardiac surgery. *Anesthesiology* 104: 518-526 (2006)

Intravenous Parecoxib during Postoperative Multimodal Analgesia after Thoracotomy: Impact on Opioid Needs and Postoperative Complications

Argyriadou E.¹, Amaniti E.¹, Pourzitaki Ch.², Zoralidou A.¹, karakoulas K.¹, Vasilakos D.¹

¹Department of Anesthesiology, ²Laboratory of Experimental Pharmacology, School of Medicine, Aristotle University, Thessaloniki, Greece

Key words: Parecoxib, thoracotomy, multimodal analgesia, opioid, complications

SUMMARY. Selective COX-2, especially intravenous administered parecoxib, is considered as suitable drug for the management of postoperative pain, due to antiplatelet sparing action. Nevertheless, there were no studies in the literature evaluating their potential beneficial role in major operations. Goal of the present

study was the investigation of the impact of perioperatively-administered parecoxib during multimodal analgesic technique following thoracotomies. Forty patients, aged 13-73, underwent thoracotomy under the standard anesthetic regimen. Afterwards, patients were assigned into two groups to receive either two doses of 40 mg parecoxib i.v. (group A) or normal saline (group B). The first dose was administered one hour after commencement of the procedure, while the second dose was after operation completion. All patients had access to intravenous morphine through patient-controlled analgesia pump after recovery from anesthesia. Patients were evaluated during postoperative period for pain intensity. Postoperative pain was assessed using 0-10 visual analog scale. Furthermore, total morphine consumption and major and minor complications were also studied through the first 48 hours postoperatively. Differences between groups were compared using t-test, chi square test, ANOVA and Kruskal Wallis tests. Level of significance was set at $\alpha < 0.05$. Groups were comparable regarding demographic data and frequency of postoperative complications. VAS scale was significant lower at group A for the time periods $t=12h$ ($p=0,015$) and $t=24h$ ($p=0,010$), while differences observed at time period στιγμές $t=4h$ and $t=48h$ were not significant ($p > 0,05$). Regarding morphine consumption over time, statistical analysis revealed significant differences between groups for the time periods $t=24h$ ($p=0,045$) and $t=48h$ ($p=0,009$). In conclusion, parecoxib administered intravenously seemed to contribute to pain control improvement and lower opioid consumption during multimodal analgesic technique after thoracotomy. Furthermore, parecoxib administration didn't cause severe complications. Further studies are necessary to confirm its safety for postoperative pain management following major operations.

Διενεργοποίηση του Υποδοχέα του Επιδερμικού Αυξητικού Παράγοντα EGFR από Αγωνιστές του Κανναβινοειδούς Υποδοχέα CB₁

Όλγα Ασημάκη¹, Νικόλαος Σακελλαρίδης² και Δήμητρα Μάγκουρα¹

¹Κέντρο Νευροεπιστημών, Ίδρυμα Ιατροβιολογικών Ερευνών της Ακαδημίας Αθηνών, Αθήνα, Ελλάς ²Εργαστήριο Φαρμακολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Λάρισα, Ελλάς

ΕΙΣΑΓΩΓΗ - ΣΚΟΠΟΣ

Τα κανναβινοειδή χρησιμοποιούνται ως θεραπευτικές ουσίες από την αρχαιότητα. Ο πρόσφατος προσδιορισμός του ενδογενούς συστήματος των κανναβινοειδών στον εγκέφαλο, συγκεκριμένα η υψηλή έκφραση του CB₁ υποδοχέα (CB₁R) στο Κεντρικό Νευρικό Σύστημα και η ανακάλυψη των ενδογενών αγωνιστών έχουν υποδείξει πως το Νευροτροποποιητικό Σύστημα των κανναβινοειδών παίζει σημαντικό ρόλο σε πολλούς φυσιολογικούς μηχανισμούς, όπως η μνήμη και ταυτόχρονα δημιουργεί προσδοκίες θεραπείας για ευρύ φάσμα ασθενειών, από διαταραχές άγχους μέχρι κινητικά σύνδρομα και τραύματα. Η δράση τους είναι αποτέλεσμα μεταγραφικής και μεταφραστικής δραστηριότητας που συμβαίνει μετά την εκλεκτική σύνδεση ειδικών κανναβινοειδών αγωνιστών στον CB₁R και την πυροδότηση μονοπατιών μεταγωγής σήματος. Η ενδοκυττάρια σηματοδότηση από αυτόν το διαμεμβρανικό υποδοχέα, που συνδέεται με G-πρωτεΐνες, περιλαμβάνει ενεργοποίηση της ρυθμιζόμενης από εξωκυτταρικά μηνύματα πρωτεϊνικής κινάσης, ή ERK, αλλά ο μηχανισμός της δεν είναι ακόμα κατανοητός.

Προκειμένου να διερευνηθούν οι μοριακοί μηχανισμοί που συνδέουν την ενεργοποίηση του CB₁ υποδοχέα με την ενεργοποίηση της PKC και της ERK, δημιουργήσαμε κλώνους της κυτταρικής σειράς SHSY-5Y νευροβλαστώματος.

ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ - ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Οι κλώνοι της κυτταρικής σειράς SHSY-5Y νευροβλαστώματος, μετά από διαμόλυνση με το αντίστοιχο cDNA και επιλογή με ένα δεύτερο γονίδιο που προσφέρει ανθεκτικότητα στη νεομυκίνη, υπερεκφράζουν σταθερά EGFP-CB₁R περίπου 8 φορές περισσότερο από τα γονεϊκά κύτταρα. Πρώτα διαπιστώθηκε, με παρατήρηση του EGFP φθορισμού και του φθορισμού μετά από ανοσοκυτταροχημεία με αντισώματα ειδικά για τον CB₁R, αλλά και SDS-PAGE ανάλυση, ότι ο EGFP-CB₁R γλυκοζυλιώνεται και εκφράζεται στην πλασματική μεμβράνη. Στη συνέχεια, χρησιμοποιώντας τεχνικές ανοσοαποτύπωσης και ανοσοκαταβύθισης σε ομογενοποιημένα από κύτταρα που είχαν προηγουμένως ενεργοποιηθεί, δείξαμε ότι ο αγωνιστής του CB₁R μεθανανδαμίνη (methanandamide) [9 μM] προκάλεσε τη φωσφορυλίωση πολλών πρωτεϊνών και ειδικότερα του ίδιου του EGFR και της κινάσης της τυροσίνης SRC, στις τυροσίνες 1148 και 416 αντίστοιχα, καθώς και της ERK2. Η ειδική αυτή φωσφορυλίωση, που είναι αποδεικτική της ενεργοποίησης των σηματοδοτικών αυτών κινασών, αυξανόταν σταδιακά από 0-15 λεπτά και ήταν αναστρέψιμη από ειδικούς CB₁R και EGFR ανταγωνιστές (AM251 και AG1478).

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Τα παραπάνω αποτελέσματα ενισχύουν την υπόθεση ότι ο μηχανισμός ενεργοποίησης της

ERK από τον CB₁R σε νευρωνικό κυτταρικό περιβάλλον επιτυγχάνεται μέσω της διενεργοποίησης του EGFR (χρηματοδότηση από 03ΕΔ778 έργο του ΠΕΝΕΔ 2003 της ΓΓΕΤ).

Transactivation of Epidermal Growth Factor Receptor EGFR by CB₁ Cannabinoid Receptor Agonists

Olga Asimaki¹, Nikolaos Sakellaris² and Dimitra Mangoura¹

¹Center for Neurosciences, Foundation for Biomedical Research of the Academy of Athens, Athens, Greece

²Department of Pharmacology, School of Medicine, University of Thessaly, Larissa, Greece

Key words: Epidermal Growth Factor Receptor, CB₁, cannabinoid receptor agonists

SUMMARY. Cannabinoids have long been used as therapeutic agents. The recent identification of the endogenous cannabinoid system in the brain, namely the abundance of the CB₁ receptor (CB₁R) in the CNS and the discovery of the endogenous ligands, has suggested that the cannabinoid neuro-modulatory system plays important roles in many physiological processes, such as in memory, as well as holds therapeutic promise in a wide range of

diseases ranging from mood and anxiety disorders to movement disorders and spinal cord injury. The CB₁ receptor exerts its effects through several signalling events, which include the activation of the extracellular signal-regulated kinase, or ERKs. The mechanism by which this G-protein coupled receptor triggers ERK activation is not, however, well understood. To investigate the molecular events coupling CB₁ activation to PKC and ERK activation, we generated clonal SHSY-5Y neuroblastoma cell lines which stably overexpress EGFP-CB₁R and assessed whether this coupling could be mediated via transactivation of growth factor receptors with intrinsic tyrosine kinase activity. We first established using both immunoprecipitation and immunocytochemistry and GFP fluorescent imaging that the EGFP-CB₁R was properly glycosylated and targeted to plasma membranes. We now report that the CB₁R agonist methanandamide specifically stimulated, in a time-dependent manner, tyrosine phosphorylation of several cellular proteins, including phosphorylation of the EGF receptor and Src kinase on tyrosine residues 1148 and 416, respectively, and of ERK₂. These effects were abolished by the specific CB₁ antagonist AM251 and by the EGFR antagonist AG1478. These data provide first evidence that in a neuronal cellular background, the CB₁R intracellular signalling engages the specific transactivation of the tyrosine kinase EGF receptor to regulate ERK activation and downstream transcriptional events.

Εμφάνιση Ψωριασικόμορφων Εξανθημάτων σε Ασθενείς υπό Αντι-TNFα Αγωγή

Σπύρος Ασλανίδης, Αθηνά Πυρπασοπούλου, Σωτήρης Στεργιόπουλος, Αρετή Τριανταφύλλου και Χρύσανθος Ζαμπούλης

Β' Προπαιδευτική Παθολογική Κλινική, ΓΝΘ *Ιπποκράτειο*, Ιατρική Σχολή, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο, Θεσσαλονίκη, Ελλάδα

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η αναστολή της δράσης του TNFα ως θεραπευτική προσέγγιση έχει αποδειχτεί ιδιαίτερα αποτελεσματική και ασφαλής στην αντιμετώπιση ποικιλίας ρευματολογικών νοσημάτων (ρευματοειδούς αρθρίτιδας, αγκυλωτικής σπονδυλοαρθρίτιδας, ψωριασικής αρθρίτιδας, ψωρίασης κ.λπ.). Στις πιο συχνές ανεπιθύμητες ενέργειες που παρατηρούνται σε ασθενείς υπό αντι-TNFα αγωγή συγκαταλέγονται διάφορες δερματικές αντιδράσεις (δερματικές λοιμώξεις, έκζεμα/ τοπικές αλλεργικές αντιδράσεις, εξανθήματα που σχετίζονται με τη χορήγηση του φαρμάκου, εκδήλωση αγγειίτιδας, δερματικός ερυθματώδης λύκος και δερματικά νεοπλασμάτα). Η εμφάνιση ψωριασικόμορφων εξανθημάτων σε αυτούς τους ασθενείς, ιδιαίτερα απουσία προηγούμενου ιστορικού ψωρίασης, αποκτά ιδιαίτερο κλινικό και επιστημονικό ενδιαφέρον, δεδομένης της αποτελεσματικότητας των εν λόγω φαρμακευτικών παραγόντων στην αντιμετώπιση της ψωρίασης.

Σκοπός της εργασίας αυτής είναι η καταγραφή της εμφάνισης ψωριασικόμορφων εξανθημάτων σε ασθενείς που λαμβάνουν αντι-TNFα παράγοντες στη Β' Προπαιδευτική Παθολογική Κλινική του Νοσοκομείου *Ιπποκράτειου* Θεσσαλονίκης ως θεραπευτική αγωγή για διάφορα ρευματολογικά νοσήματα.

ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ – ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Σε 8 ασθενείς από σύνολο 200 ασθενών υπό αγωγή με υποδόρια ή ενδοφλέβια χορηγούμενους αντι-TNFα παράγοντες (adalimumab, infliximab)

για διαφορετικά πρωτοπαθή ρευματολογικά νοσήματα (ρευματοειδή αρθρίτιδα, αγκυλωτική σπονδυλοαρθρίτιδα, αγγειίτιδα Behçet) εμφανίστηκαν ψωριασικόμορφα εξανθήματα είτε υπό μορφή υπερκερατωσικών πλακών (τριχωτού κεφαλής, αγκώνων) είτε υπό μορφή φυλκταίνωσης παλαμών – πελμάτων (rustulosis palmaris plantaris) (Πίνακας 1). Η εμφάνιση των εξανθημάτων αυτών δεν φαινόταν να σχετίζεται με την ηλικία των ασθενών ή την προηγηθείσα διάρκεια αγωγής, ενώ παρατηρήθηκε συχνότερα στο γυναικείο σε σχέση με το αντρικό φύλο (7:2). Στις περισσότερες περιπτώσεις το εξάνθημα υποχώρησε με τοπικούς φαρμακευτικούς παράγοντες (αντιψωριασικές αλοιφές) ή την προσθήκη ανοσοκατασταλτικής αγωγής (κυκλοσπορίνη) χωρίς να χρειαστεί διακοπή της αντι-TNFα αγωγής. Σε έναν ασθενή διεκόπη η αγωγή λόγω μεγάλης έκτασης της δερματικής προσβολής.

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Ο TNF-α φαίνεται να αποτελεί σημαντική κυτοκίνη για πολλούς παθοφυσιολογικούς μηχανισμούς που ενέχονται στην παθογένεια της ψωρίασης, συμπεριλαμβανομένης της υπερκερατώσεως, της δυσλειτουργίας του ενδοθηλίου και της ενεργοποίησης των T μνημονικών κυττάρων. Διάφοροι αναστολείς του TNFα έχουν χρησιμοποιηθεί επιτυχώς για την αντιμετώπιση της ψωρίασης/ψωριασικής αρθρίτιδας, συμπεριλαμβανομένων και ορισμένων σπάνιων μορφών αυτής, όπως της ψωριασικής ονυχοπαχυδερμοποστίτιδας (POPP). Το τελευταίο διάστημα έχει αρχίσει να δημοσιοποιείται ολοένα μεγαλύτερος

αριθμός περιστατικών εμφάνισης ψωρίασης ή ψωριασικόμορφων εξανθημάτων σε ασθενείς υπό αγωγή με ανταγωνιστές του TNFα. Η ενδιαφέρουσα αυτή παρατήρηση, ότι φαρμακευτικοί παράγοντες που χρησιμεύουν στην αντιμετώπιση της ψωρίασης μπορεί να επάγουν ψωρίαση, είναι ενδεικτική ότι ο ρόλος του TNFα στην παθογένεια αυτής της φλεγμονώδους δερματικής νόσου μπορεί να είναι πιο πολύπλοκος απ' όσο γνωρίζουμε. Μία θεωρία η οποία έχει προταθεί προκειμένου να εξηγήσει το παράδοξο αυτό φαινόμενο υποστηρίζει ότι ένας υποπληθυσμός των ασθενών υπό αγωγή με αντι-TNFα παράγοντες μπορεί να είναι πιο επιρρεπής στο

να εμφανίσει φλυκταίνωση παλαμών πελμάτων, οντότητα η οποία σχετίζεται με χαμηλότερα ποσοστά έκφρασης TNFα. Η εξήγηση όμως αυτή, και αν ακόμη ισχύει, δεν καλύπτει όλες τις περιπτώσεις εμφάνισης ψωριασικόμορφων εξανθημάτων (και στη δική μας περίπτωση οι 5 μόνο από τους 9 ασθενείς εμφάνισαν αυτού του τύπου τη δερματική προσβολή). Είναι δεδομένο λοιπόν ότι χρειάζεται περισσότερη έρευνα για την ταυτοποίηση του παθοφυσιολογικού μηχανισμού που είναι υπεύθυνος για αυτό το φαινόμενο και τον προσδιορισμό της πιο ενδεδειγμένης θεραπευτικής αντιμετώπισής του.

Πίνακας 1 . Δημογραφικά στοιχεία, πρωτοπαθές νόσημα, αγωγή/ διάρκεια αγωγής, τύπος προσβολής και αντιμετώπιση των ασθενών που εμφάνισαν ψωριασικόμορφα εξανθήματα υπό αντι-TNFα αγωγή

Φύλο/ Ηλικία	Πρωτοπαθής νόσος	Αντι-TNFα παράγοντας	Διάρκεια Αγωγής (μήνες)	Τύπος προσβολής	Ουχο-δυστροφία	Αντιμετώπιση
1 Θήλυ/ 64	Ρευματοειδής Αρθρίτιδα	adalimumab	18	Πλάκες αγκώνων/ τριχωτού κεφαλής	ναι	Τοπικοί παράγοντες
2 Θήλυ/ 70	Ρευματοειδής Αρθρίτιδα	adalimumab	8	Φλυκταίνωση πελμάτων	ναι	Τοπικοί παράγοντες
3 Θήλυ/ 24	Αγκυλωτική Σπονδυλαρθρίτιδα	infliximab	8	Φλυκταίνωση παλαμών	όχι	Προσθήκη κυκλοσπορίνης
4 Θήλυ/ 29	Ρευματοειδής Αρθρίτιδα	infliximab	24	Πλάκες τριχωτού κεφαλής/ εφηβαίου	όχι	(-)
5 Άρρεν/ 63	Ρευματοειδής Αρθρίτιδα	infliximab	40	Φλυκταίνωση παλαμών/ αγκώνων	όχι	Προσθήκη κυκλοσπορίνης
6 Θήλυ/ 76	Ρευματοειδής Αρθρίτιδα	infliximab	18	Πλάκες αγκώνων	όχι	Τοπικοί παράγοντες
7 Θήλυ/ 63	Ρευματοειδής Αρθρίτιδα	infliximab	14	Πλάκες τριχωτού κεφαλής	όχι	(-)
8 Άρρεν/ 60	Αγγειίτιδα Behcet	infliximab	1.5	Φλυκταίνωση παλαμών/ πελμάτων	όχι	Διακοπή αντι-TNFα αγωγής

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΠΑΡΑΠΟΜΠΕΣ

Bongartz T., Harle P., Friedrich S., et al.: Successful treatment of psoriatic onychopachydermo periostitis (POPP) with adalimumab. *Arthritis Rheum.* 52: 280-282 (2005)
Chaudhari U., Romano P., Mulcahy L.D., et al.: Efficacy and safety of infliximab monotherapy for plaque-type psoriasis: a randomised trial. *Lancet* 357: 1842-1847 (2001)
Gladman D.D., Mease P.J., Cifaldi M.A., et al.: Adalimumab improves joint- and skin-related functional impairment in patients with psoriatic arthritis: Patient-reported outcomes of the Adalimumab Effectiveness in Psoriatic Arthritis Trial (ADEPT). *Ann. Rheum. Dis.*: first release Nov 9 (2006)
Leonardi C.L., Powers J.L., Matheson R.T., et al.: Etanercept psoriasis study group. Etanercept as monotherapy in patients with psoriasis. *N. Engl. J. Med.* 349: 2014-2022 (2003)

Mease P.J., Antoni C.E.: Psoriatic arthritis treatment: biological response modifiers. *Ann. Rheum. Dis.* 64(Suppl 2): ii78-82 (2005)
Schottelius A.J., Moldawer L.L., Dinarello C.A., et al.: Biology of tumor necrosis factor-alpha-implications for psoriasis. *Exp. Dermatol.* 13: 193-222 (2004)

Psoriasiform lesions in patients receiving anti-TNFα treatment

Spyros Aslanidis, Athina Pырpasopoulou, Sotiris I, Stergiopoulos, Areti Triantafyllou, Chryssanthos Zamboulis

B' Propedeutic Department of Internal Medicine, Hippokraton General Hospital, School of Medicine, Aristotle University of Thessaloniki, GR-54124 Thessaloniki, Greece

Key words: Psoriasis, anti-TNF α treatment, adverse event

SUMMARY. Tumor necrosis alpha blockade has proved to be very effective in the treatment of several autoimmune disorders, including rheumatoid arthritis, ankylosing spondylitis, inflammatory bowel diseases and psoriatic arthritis/ psoriasis. Skin abnormalities represent a significant proportion of the adverse events linked to the use of anti TNF- α agents, mainly in the form of skin infections, eczema, drug-related eruptions, vasculitis, cutaneous lupus erythematosus and skin malignancies. Lately, a continuously growing number of cases describing psoriasis development during TNF- α antagonist therapy are being reported, raising the possibility of a direct causative relationship of these agents with the induction or exacerbation of psoriasis. We report the development of psoriasiform lesions (plaques or palmoplantar pustulosis) in a series of 8

patients from a total of 200 patients receiving anti-TNF α agents for a variety of rheumatological conditions at our center. The puzzling observation that medications used to treat psoriasis may induce psoriasis suggests a complex role for TNF- α antagonists in the pathogenesis of this inflammatory skin disease. The underlying mechanism responsible for this adverse event of the treatment remains unclear. A possible explanation might be that a subpopulation of patients under anti-TNF α treatment is prone to develop palmoplantar pustulosis, a condition which is characterized by lower levels of TNF α expression, a hypothesis which however, even if proven, would not account for all of the cases encountered. Further investigation is warranted towards identification of the pathophysiologic mechanism responsible for this phenomenon, and to determine the best therapeutic strategy for this condition regardless of the continuation or not of the TNF- α antagonist regimen.

ΕΠΙΘΕΩΡΗΣΗ ΚΛΙΝΙΚΗΣ ΦΑΡΜΑΚΟΛΟΓΙΑΣ
ΚΑΙ ΦΑΡΜΑΚΟΚΙΝΗΤΙΚΗΣ 25: 22-24 (2007)
©ΦΑΡΜΑΚΟΝ-Τύπος

Γλυκοζαμινογλυκάνες Πλευριτικού Υγρού

Ροζίνα Βαβέτση, Παρασκευή Πολύζου, Χρυσάνθη Παπαναστασοπούλου, Γεωργία Δουγέκου και Νικόλαος Μ. Σιταράς

Εργαστήριο Πειραματικής Φαρμακολογίας, Ιατρική Σχολή Αθηνών, Αθήνα, Ελλάδα

ΕΙΣΑΓΩΓΗ - ΣΚΟΠΟΣ

Στη διερεύνηση της πλευριτικής συλλογής πρωταρχικό ρόλο παίζει η κατάταξη της σε εξίδρωμα ή διίδρωμα. Με βάση τα κριτήρια κατά Light (1,2), η πλευριτική συλλογή χαρακτηρίζεται ως εξίδρωμα εάν ισχύει τουλάχιστον ένα από τα παρακάτω: α) σχέση ολικού λευκώματος πλευριτικού υγρού/ολικό λεύκωμα ορού $>0,5$ (TPR $>0,5$), β) σχέση γαλακτικής δεϋδρογενάσης (LDH) πλευριτικού υγρού/γαλακτική δεϋδρογενάση ορού $>0,6$ (LDHR $>0,6$) και γ) LDH πλευριτικού υγρού μεγαλύτερο από τα 3/4 της ανώτερης φυσιολογικής τιμής της LDH του ορού (PL-LDH $>3/4S$ -LDH). Εναλλακτικά, τα τελευταία χρόνια έχουν προταθεί μετρήσεις νέων παραμέτρων για το διαχωρισμό εξιδρωμάτων-διιδρωμάτων, όπως αυτό της χοληστερίνης του πλευριτικού υγρού (PF-CHOL) με βάση το οποίο η πλευριτική συλλογή χαρακτηρίζεται ως εξίδρωμα εάν α) PF-CHOL >45 mg/dl, ή β) PF-CHOL >60 mg/dl (3).

Οι γλυκοζαμινογλυκάνες (GAGs) αποτελούν μη διακλαδιζόμενες αλυσίδες από επαναλαμβανόμενα μόρια δισακχαριτών που είναι ομοιοπολικά συνδεδεμένες με πρωτεϊνικό πυρήνα, σχηματίζοντας μακρομοριακές ενώσεις, τις πρωτεογλυκάνες (PGs). Η παρουσία τους έχει μελετηθεί εκτενώς σε πολλές παθήσεις. Η παρουσία τους στο πλευριτικό υγρό οφείλεται στην παραγωγή τους φυσιολογικά από τα κύτταρα του μεσοθηλίου της πλευρικής κοιλότητας και μεγάλες ποσότητες από αυτές, κυρίως υαλουρονικό οξύ και θειική χονδροϊτίνη, έχουν ήδη εντοπιστεί σε πλευριτικές συλλογές (4). Αποτελέσματα ωστόσο που αφορούν το ρόλο του υαλουρονικού οξέος του πλευριτικού υγρού σε κακοήθειες είναι αντιφατικά (5,6).

Στην παρούσα εργασία εξετάσαμε α) τη σχέση των γλυκοζαμινογλυκανών του πλευριτικού υγρού (PF-GAGs) και του πλάσματος (S-GAGs) με τα ήδη υπάρχοντα κριτήρια διαχωρισμού εξιδρωμάτων-διιδρωμάτων και β) το λόγο γλυκοζαμινογλυκάνες πλευριτικού υγρού/γλυκοζαμινογλυκάνες πλάσματος (PF-GAGs/S-GAGs) μεταξύ διιδρωμάτων και εξιδρωμάτων.

ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

Δείγματα πλευριτικού υγρού και ορού ελήφθησαν από 54 ασθενείς (31 άνδρες και 23 γυναίκες με μέσο όρο ηλικίας $65,37 \pm 15,87$), οι οποίοι υποβάλλονταν για παρακέντηση είτε για διαγνωστικό, είτε για θεραπευτικό σκοπό, στην Πανεπιστημιακή Πνευμονολογική κλινική του ΠΓΝ Νοσημάτων Θώρακος Σωτηρία. Όλοι οι ασθενείς βρίσκονταν υπό παρακολούθηση για τουλάχιστον τρεις μήνες, ή μέχρι την τελική κλινική διάγνωση του αιτίου του πλευριτικού υγρού. Πέραν του συνήθους κλινικοεργαστηριακού ελέγχου, για τους σκοπούς της μελέτης προσδιορίστηκαν και στον ορό και στο πλευριτικό υγρό η ολική πρωτεΐνη (TP), η γλυκόζη (GLU), η γαλακτική δεϋδρογενάση (LDH), η χοληστερίνη (CHOL), και τα τριγλυκερίδια.

Η απομόνωση των γλυκοζαμινογλυκανών ορού και πλευριτικού υγρού έγινε με τη μέθοδο Hata (7). Ο ποσοτικός προσδιορισμός των γλυκοζαμινογλυκανών έγινε σύμφωνα με τη φωτομετρική μέθοδο των Bitter-Muir (8).

Η στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων έγινε με τη στατιστική μέθοδο independent two-sided Student's t-test και οι συσχετίσεις με δεικτική συσχέτιση κατά Pearson.

Πίνακας 1
Ευαισθησία, ειδικότητα και ακρίβεια των κριτηρίων διαχωρισμού διϊδρωμάτων-εξιδρωμάτων, συμπεριλαμβανομένου και του λόγου PF-GAGs/S-GAGs

	Τελική Διάγνωση	Κριτήρια κατά Light'	CHOL>60	CHOL>45	PF-GAGs/S-GAGs
Εξιδρώματα	49	49	35	43	49
Διϊδρώματα	5	5	19	11	5
Σύνολο	54	54	54	54	54
Ευαισθησία	100%	96%	73%	84%	96%
Ειδικότητα	100%	80%	100%	80%	80%
Ακρίβεια	100%	94%	76%	83%	94%

Πίνακας 2
Μέση τιμή γλυκοζαμινογλυκανών πλευριτικού υγρού σε εξιδρώματα και διϊδρώματα ± SE, με βάση την τελική διάγνωση

	Εξιδρώματα	Διϊδρώματα	p
PF-GAGs	n=5 16,6 ± 1,46*	n=49 5,4 ± 0,86	0,006

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Από τα πλευριτικά υγρά 5 αποδείχθηκαν διϊδρώματα και 49 εξιδρώματα. Με την εφαρμογή των κριτηρίων Light, 51 από τα 54 περιστατικά κατανεμήθηκαν σωστά, δίνοντας 94% ακρίβεια στις προβλέψεις. Με βάση το κριτήριο PF-CHOL >45 mg/dl, το ποσοστό αυτό βρέθηκε 83%, και 76% όταν PF-CHOL >60 mg/dl. Η ευαισθησία και η ειδικότητα των κριτηρίων Light ήταν 96% και 80% αντίστοιχα, ενώ το κριτήριο PF-CHOL >45 mg/dl έδωσε ευαισθησία 84% και ειδικότητα 80%. Για PF-CHOL >60 mg/dl, τα ποσοστά αυτά υπολογίστηκαν σε 73% και 100%, αντίστοιχα (Πίνακας 1).

Με βάση το 1^ο κριτήριο κατά Light, τα επίπεδα των γλυκοζαμινογλυκανών του ορού εμφάνισαν μέτρια αρνητική συσχέτιση με τις τιμές TPR ($r = -0,325$, $p < 0,05$). Αντιθέτως οι γλυκοζαμινογλυκάνες του πλευριτικού υγρού δεν εμφάνισαν καμία συσχέτιση. Καμία στατιστικώς σημαντική σχέση δεν παρατηρήθηκε μεταξύ τιμών LDHR και γλυκοζαμινογλυκανών ορού ή πλευριτικού υγρού κατά την εφαρμογή του 2^{ου} κριτηρίου κατά Light. Με βάση το 3^ο κριτήριο Light, παρατηρήθηκε στατιστικώς σημαντική θετική συσχέτιση μεταξύ τιμών PL-LDH και γλυκοζαμινογλυκανών πλευριτικού υγρού, ($r = 0,392$, $p = 0,022$), όχι όμως και με τις γλυκοζαμινογλυκάνες του ορού. Όσον αφορά τα κριτήρια της χοληστερίνης, δεν παρατηρήθηκε καμία στατιστικώς σημαντική σχέση μεταξύ τιμών PF-CHOL και γλυκοζαμινογλυκα-

νών ορού ή γλυκοζαμινογλυκανών πλευριτικού υγρού.

Στην ομάδα των εξιδρωμάτων, αρνητική συσχέτιση στατιστικώς σημαντική ($r = -0,360$, $p = 0,011$) βρέθηκε μεταξύ γλυκοζαμινογλυκανών και γλυκόζης πλευριτικού υγρού, ενώ τα επίπεδα των τριγλυκεριδίων του ορού και οι γλυκοζαμινογλυκάνες του ορού βρέθηκε να συσχετίζονται θετικά ($r = 0,465$), σε επίπεδο σημαντικότητας $p = 0,001$.

Με βάση την τελική διάγνωση, η μέση τιμή των γλυκοζαμινογλυκανών του πλευριτικού υγρού στα διϊδρώματα και εξιδρώματα ήταν $5,4 \pm 0,86$ $\mu\text{g/ml}$ και $16,6 \pm 1,46$ $\mu\text{g/ml}$, αντίστοιχα, με τον λόγο PF-GAGs/S-GAGs να παρουσιάζεται σημαντικά υψηλότερος στα εξιδρώματα ($p=0,006$) (Πίνακας 2). Με όριο (επίπεδο cut off) 0,6, ο λόγος PF-GAGs/S-GAGs εμφάνισε ευαισθησία 96%, ειδικότητα 80% και ακρίβεια 94%, ποσοστά που αναλογούν ακριβώς στα κριτήρια κατά Light (Πίνακας 1).

Υπάρχει χρησιμότητα των αποτελεσμάτων αυτών; Εξ αιτίας του μικρού αριθμού των διϊδρωμάτων (μόνο 5 σε σύγκριση με τα 49 εξιδρώματα), περαιτέρω μελέτη είναι απαραίτητη προκειμένου να εξεταστεί ο πιθανός ρόλος των γλυκοζαμινογλυκανών σαν επιπρόσθετη, αξιόπιστη παράμετρος στο διαχωρισμό διϊδρωμάτων-εξιδρωμάτων.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΠΑΡΑΠΟΜΠΕΣ

1. Light R.W.: Useful tests on the pleural fluid in the management of patients with pleural effusions. *Curr. Opin. Pulm. Med.* 5: 245-249 (1999)
2. Light R.W., Macgregor M.I., Luchsinger P.C.: Pleural effusions: the diagnostic separation of transudates and exudates. *Ann. Intern. Med.* 77: 507-513 (1972)
3. Valdes L.P.A., Suarez J., et al.: Cholesterol: a useful parameter for distinguishing between pleural exudates and transudates. *Chest* 99: 1097-1102 (1991)

4. Nakano T., et al.: Glycosaminoglycans in malignant pleural mesothelioma. *Cancer* 57: 106-110 (1986)
5. Atagi S., et al.: Utility of hyaluronic acid in pleural fluid for differential diagnosis of pleural effusions: Likelihood ratios for malignant mesothelioma. *Jpn J. Clin. Oncol.* 27: 293-297 (1997)
6. Thylen A., et al.: Immunohistochemical differences between hyaluronan- and non-hyaluronan-producing malignant mesothelioma. *Eur. Respir. J.* 10: 404-408 (1997)
7. Hata R.I., et al.: Acidic glycosaminoglycans in urine, serum and myocardium of aged patients with myocardial infarction. *J. Mol. Cell Cardiol.* 9: 541-550
8. Bitter T.M.H.: A modified uronic acid carbazole reaction. *Anal. Biochem.* 4: 330-334 (1962)

Glycosaminoglycans in Pleural Effusions

Rozina Vavetsi, Paraskeui Polizou, Chrysanthi Papanastasopoulou, Georgia Dougekou and Nikolaos M. Sitaras

Department of Experimental Pharmacology, School of Medicine, University of Athens, Greece

Key words: Glycosaminoglycans, pleural effusions

SUMMARY. Pleural effusions have been classically divided into transudates and exudates. Various criteria

have been used. Light et al criteria seem to be the most accepted. Glycosaminoglycans (GAGs) have been detected during pleural fluid analysis in various cases. In this work we investigated: a) whether and in what way pleural fluid GAGs (PF-GAGs) and serum GAGs (S-GAGs) correlate with established criteria used to indicate an exudate and b) if the ratio PFGAGs/SGAGs differs between exudate and transudate groups. Lactic acid dehydrogenase (LDH), total protein (TP), cholesterol (CHOL), glucose (GLU), triglycerides and GAG levels were measured in pleural fluids and serum from 54 patients with pleural effusions. GAGs were determined by a photometric method. PF-GAGs were significantly correlated with pleural LDH, and pleural glucose. S-GAGs were significantly correlated with TP values and serum triglycerides. Based on final diagnosis, the mean value of PF-GAG levels in transudate and exudate patients was $5.4 \pm 0.86 \mu\text{g/ml}$ and $16.6 \pm 1.46 \mu\text{g/m}$, respectively, with the PF-GAG/S-GAG ratio being significantly higher in exudates than transudates ($p=0.006$). Interestingly, with a cutoff level of 0.6, the PF-GAG/S-GAG ratio had a sensitivity of 96%, a specificity of 80% and an accuracy of 94%, matching exactly the corresponding percentages of Light's criteria. Due to the small number of transudates further investigation is needed in order to explore the possible role of GAGs as another reliable parameter in the distinction between transudates and exudates.

Μελέτη της Επίδρασης Ανοξίας και Υπογλυκαιμίας στην Έκφραση Νευρωνικών Δεικτών σε Αμφιβληστροειδή και Ιππόκαμπο Επίμυος: Ανάπτυξη *ex vivo* Μοντέλου Ισχαιμίας

Άννα Βασιλάκη

Εργαστήριο Φαρμακολογίας, Ιατρική Σχολή, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Παπακυριαζή 22, 41222, Λάρισα, Ελλάς

ΓΕΝΙΚΑ - ΣΚΟΠΟΣ

Για να διατηρηθεί η σωστή λειτουργία του νευρικού συστήματος απαιτείται συνεχή παροχή οξυγόνου και γλυκόζης. Η *ισχαιμία* στο νευρικό ιστό, προκαλεί μια πλειάδα γεγονότων τα οποία οδηγούν στο θάνατο των νευρικών κυττάρων (1-3). Σκοπός της παρούσας εργασίας αποτέλεσε η δημιουργία ενός *ex vivo* πειραματικού μοντέλου ισχαιμίας, για τη μελέτη της επίδρασης των επιμέρους χαρακτηριστικών της ισχαιμίας (ανοξία και υπογλυκαιμία) στο νευρικό ιστό με απώτερο στόχο, την χρήση αυτού του μοντέλου στην μελέτη της πιθανής νευροπροστατευτικής δράσης διαφόρων φαρμάκων.

ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

Το πρωτόκολλο που ακολουθήθηκε ήταν μια παραλλαγή αυτού των Izumi και συν., 2001 (4). Συγκεκριμένα, απομονώθηκαν οι οφθαλμοί και ο ιππόκαμπος Wistar αρουραίων ηλικίας 30±3 ημερών και τοποθετήθηκαν στον πάγο σε διάλυμα τεχνικού εγκεφαλονωτιαίου υγρού: (artiCSF γλυκόζης: 126 mM NaCl, 3 mM KCl, 2,4 mM CaCl₂, 1,5 mM MgCl₂, 1,2 mM NaH₂PO₄, 25,9 mM NaHCO₃, 11 mM D(+) Γλυκόζη, pH 7.3) στο οποίο γινόταν παροχή 95%O₂/5%CO₂. Μετά την απομόνωση του αμφιβληστροειδή και το κόψιμο του πρόσθιου ιπποκάμπου σε τομές πάχους 500 μm, οι ιστοί προεπώσθησαν για 30 min σε artiCSF στους 37 °C στο οποίο είχε προηγου-

μένως γίνει παροχή 95%O₂/5%CO₂ για περισσότερο από μία ώρα. Τέλος, για τη μελέτη της επίδρασης της ανοξίας και της υπογλυκαιμίας οι ιστοί επωάσθησαν για 45 min στους 37 °C σε artiCSF γλυκόζης στο οποίο είχε προηγουμένως γίνει παροχή 95%O₂/5%CO₂ (ομάδα ελέγχου) ή 95%N₂/5%CO₂ (ανοξία) ή τέλος, σε artiCSF σουκρόζης (αντικατάσταση της D(+) Γλυκόζη με σουκρόζη) στο οποίο είχε προηγουμένως γίνει παροχή 95%O₂/5%CO₂ (υπογλυκαιμία). Κατά τη διάρκεια του πειράματος κάθε 15 min και για 10 sec στα διαλύματα γινόταν παροχή 95%O₂/5%CO₂ (προεπώαση, ομάδα ελέγχου και υπογλυκαιμίας) ή 95%N₂/5%CO₂ (ανοξία).

Για τη μελέτη της επίδρασης ανοξίας και υπογλυκαιμίας στην έκφραση νευρωνικών δεικτών οι ιστοί μονιμοποιήθηκαν για 1 ώρα σε διάλυμα 4% παραφορμαλδεΐδης και επωάσθησαν για 16-18 ώρες σε διάλυμα 30% σουκρόζης για την επίτευξη κρυστοπροστασίας. Στην συνέχεια, ελήφθησαν τομές πάχους 10 μm στις οποίες πραγματοποιήθηκαν μελέτες ανοσοφθορισμού. Το πρωτόκολλο που χρησιμοποιήθηκε ήταν σύμφωνο με προηγούμενες μελέτες μας (5). Στα πειράματα αυτά, χρησιμοποιήθηκαν αντισώματα έναντι της ακετυλοτρανσφεράση της χολίνης (ChAT: 1/100, Chemicon), του γ-αμινο-βουτυρικό οξέος (GABA: 1/500, Sigma), της νευρωνικής συνθάσης της ελεύθερης ρίζας του μονοξειδίου του αζώτου (bNOS: 1/3000, Sigma) και της ελαφριάς αλυσίδας νευροϊνιδίου (NF-L: 1/500, Chemicon).

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ - ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Σε ό,τι αφορά τον αμφιβληστροειδή και την έκφραση της ChAT στους ιστούς της ομάδας ελέγχου επιβεβαιώθηκε η παρουσία του ενζύμου σε σώματα και αποφύσεις βραχύνων κυττάρων στην εσωτερική κοκκώδη στιβάδα και σε έκτοπα βραχύνια κύτταρα στη στιβάδα των γαγγλιακών κυττάρων. Η εφαρμογή υπογλυκαιμικών συνθηκών είχε σαν αποτέλεσμα την έκφραση του ενζύμου μόνο σε περιορισμένο αριθμό σωματιών έκτοπων βραχύνων κυττάρων στη στιβάδα των γαγγλιακών κυττάρων και σε αποφύσεις βραχύνων κυττάρων στην εσωτερική δικτυωτή στιβάδα, ενώ η εφαρμογή ανοξίας είχε σαν αποτέλεσμα τον περιορισμό της έκφρασης του ενζύμου μόνο σε αποφύσεις βραχύνων κυττάρων στην εσωτερική δικτυωτή στιβάδα. Τα αποτελέσματά αυτά είναι σε συμφωνία με μελέτες πρόκλησης ισχαιμίας τόσο με εφαρμογή χημικών ουσιών *in vitro*, όσο και με αύξηση της ενδοφθάλμιας πίεσης *in vivo* (6-8).

Στους ιστούς της ομάδας ελέγχου διαπιστώθηκε επίσης η παρουσία GABA σε σώματα και αποφύσεις βραχύνων κυττάρων. Η επίδραση υπογλυκαιμίας και ανοξίας είχαν σαν αποτέλεσμα την μείωση της έκφρασης του GABA στις αποφύσεις των βραχύνων κυττάρων ενώ, δεν παρατηρήθηκε έκφραση του νευροδιαβιβαστή στα σώματα των κυττάρων αυτών. Συγκριτικά, η μείωση της έκφρασης του GABA ήταν πολύ μεγαλύτερη στην περίπτωση της ανοξίας από ό,τι στην περίπτωση της υπογλυκαιμίας. Τα αποτελέσματα αυτά συμφωνούν με τη μείωση της έκφρασης των επίπεδων των mRNA των ισομορφών GAD-65 και GAD-67 της γλουταμικής αποκαρβοξυλάσης (δείκτες των GABAεργικών βραχύνων κυττάρων) η οποία παρατηρείται ως και 72 ώρες μετά την πρόκληση ισχαιμίας με αύξηση της ενδοφθάλμιας πίεσης *in vivo* (8).

Αντίθετα με την έκφραση των ChAT και GABA, η έκφραση της νευρωνικής μορφής του ενζύμου συνθάση της ελεύθερης ρίζας του μονοξειδίου του αζώτου (bNOS) σε σώματα και αποφύσεις βραχύνων κυττάρων του αμφιβληστροειδή δεν φαίνεται να επηρεάζεται με *ex vivo* εφαρμογή ανοξίας και υπογλυκαιμίας. Στη βιβλιογραφία υπάρχει μόνο μια μελέτη σχετικά με τις πιθανές αλλαγές της έκφρασης του γονιδίου του bNOS μετά από επίδραση ισχαιμίας στον αμφιβληστροειδή. Συγκεκριμένα, ο Dijk και συν. διαπίστωσαν ότι έως και 72 ώρες μετά από ισχαιμική προσβο-

λή και επαναιμάτωση, παρουσιάζεται μικρή μείωση του mRNA της bNOS, η οποία ωστόσο δεν είναι στατιστικά σημαντική (8).

Η ελαφριά αλυσίδα του νευροϊνιδίου (NF-L) αποτελεί δείκτη απώλειας των γαγγλιακών κυττάρων του αμφιβληστροειδή μετά από ισχαιμικό shock (9). Στις μελέτες μας δεν παρατηρήθηκε αλλαγή στην έκφραση του NF-L, μετά από επίδραση ανοξίας ή υπογλυκαιμίας γεγονός που οφείλεται πιθανά σε απουσία σημαντικής δράσης της ισχαιμίας στα γαγγλιακά κύτταρα υπό τις συγκεκριμένες πειραματικές συνθήκες.

Σε ό,τι αφορά στον ιππόκαμπο, εξ άλλου, δεν παρατηρήθηκε διαφορά στην έκφραση του GABA μετά την επίδραση υπογλυκαιμίας ή ανοξίας. Σε όλες τις περιπτώσεις το GABA εντοπίστηκε στα κυτταρικά σώματα των ενδονευρώνων του ιππόκαμπου και στις αποφύσεις τους. Το γεγονός αυτό οφείλεται είτε στο ότι τα συγκεκριμένα κύτταρα δεν επηρεάζονται από την εγκεφαλική ισχαιμία (10) είτε στο ότι μελετήθηκαν εν τω βάθει τομές του ιππόκαμπου, οι οποίες ίσως να μη δέχτηκαν το ίδιο έντονο ισχαιμικό shock, όπως οι επιφανειακές τομές λόγω του πάχους (500 μm) του αρχικού ιστού.

Συμπερασματικά, η συγκεκριμένη μελέτη οδήγησε στην ανάπτυξη ενός εύχρηστου *ex vivo* πειραματικού μοντέλου για τη διερεύνηση της επίδρασης των επιμέρους χαρακτηριστικών της ισχαιμίας (ανοξία και υπογλυκαιμία) στον αμφιβληστροειδή αρουραίου το οποίο δίνει τη δυνατότητα μελέτης της πιθανής νευροπροστατευτικής δράσης διαφόρων φαρμάκων στον ιστό. Περαιτέρω μελέτες είναι απαραίτητες για την εφαρμογή του συγκεκριμένου μοντέλου στην μελέτη της ισχαιμίας στον ιππόκαμπο.

Ευχαριστίες: Η συγκεκριμένη εργασία χρηματοδοτήθηκε από το υπουργείο Εθνικής Παιδείας (Πρόγραμμα: Πυθαγόρας II).

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΠΑΡΑΠΟΜΠΕΣ

1. Benveniste H., et al.: *J. Neurochem.* 43: 1369-1374 (1984)
2. Beal M.F.: *The Neuroscientist* 3: 21-27 (1997)
3. Osborne N.N., et al.: *Retinal Eye Res.* 23: 91-147 (2004)
4. Izumi Y., et al.: *J. Neurosci. Methods* 108: 49-55 (2001)
5. Vasilaki A., et al.: *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 42: 1600-1609 (2001)
6. Mastrodimou N., et al.: *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 37: 44-53 (2005)
7. Dijk F., Kamphuis W.: *Brain Res.* 1026: 205-217 (2004)
8. Dijk F. et al.: *Brain Res.* 1026: 194-204 (2004)

9. Chidlow G., Osborne N.N.: *Brain Res.* 963: 298-306 (2003)
 10. Bering R., et al.: *Exp. Brain Res.* 115: 423-429 (1997)

Effect of anoxia and hypoglycaemia on the expression of neuronal cell markers in the rat retina and hippocampus: Development of a rat *ex vivo* ischemia model

Anna Vasilaki

Laboratory of Pharmacology, Faculty of Medicine, University of Thessaly, 22 Papakyriazi str., 41222 Larissa, Greece

Key words: Anoxia, hypoglycaemia, neuronal cell markers, rat, *ex vivo* ischemia model

SUMMARY. Neuronal ischemia leads to neuronal cells death due to glucose and oxygen deprivation. The goal of this study was the development of a rat *ex vivo* ischemia model for the differential identification of anoxic and hypoglycaemic actions of ischemia on neuronal tissues which could subsequently used for the screening of possible neuroprotective agents.

Methods: The protocol used was a slight modification of one previously reported. In brief, the retina and 500 μ m thick hippocampal sections were preincubated for 30min in artificial cerebrospinal fluid pH 7.3 (artiCSF) previously buffered with 95%O₂/5%CO₂. Tis-

ues were subsequently incubated in artiCSF previously buffered with 95%O₂/5%CO₂ (control and hypoglycaemia) or 95%N₂/5%CO₂ (anoxia) in the presence (control and anoxic conditions) or absence of glucose (hypoglycaemia: replacement with sucrose). The effect of anoxia and hypoglycaemia on neuronal cell markers' expression was studied immunohistochemically using antibodies against choline acetyl-transferase (ChAT), γ -amino-butyric acid (GABA), neuronal nitric oxide synthase (bNOS) and neurofilament light (NF-L).

Results/Conclusions: In the retina, *ex vivo* hypoglycaemic treatment led to the decrease of ChAT and GABA immunoreactivity in amacrine cells. This decrease was more profound under anoxic conditions. bNOS and NF-L retinal expression as well as GABA hippocampal expression did not seem to be affected by either treatment. As far as ChAT, GABA and bNOS immunoreactivity are concerned our results were in agreement with previous studies of *in vivo* pressure-induced and *in vitro* chemical-induced retinal ischemia as well as transient cerebral ischemia. On the other hand, NF-L expression failed to correlate to the decrease of NF-L mRNA levels observed after pressure-induced retinal ischemia/reperfusion. Although further studies are necessary for the assessment of the hypoglycaemia/hypoxia effects on the hippocampal neuronal marker expression this study led to the development of a convenient *ex vivo* retinal model for the screening of possible neuroprotective agents.

ΕΠΙΘΕΩΡΗΣΗ ΚΛΙΝΙΚΗΣ ΦΑΡΜΑΚΟΛΟΓΙΑΣ
ΚΑΙ ΦΑΡΜΑΚΟΚΙΝΗΤΙΚΗΣ 25: 28-29 (2007)
©ΦΑΡΜΑΚΟΝ-Τύπος

Σχηματισμός Πολυ-πρωτεϊνικών Συμπλόκων μεταξύ του δ-Οπιοειδούς Υποδοχέα, των Gβγ Υπομονάδων και της STAT5B Οδηγεί σε Φωσφορυλίωση της STAT5B

Ειρήνη-Μαρία Γεωργαντά και Ζαφειρούλα Γεωργούση*

Εργαστήριο Κυταρικής Σηματοδότησης και Μοριακής Φαρμακολογίας, Ινστιτούτο Βιολογίας, Εθνικό Κέντρο Έρευνας Φυσικών Επιστημών Δημόκριτος, Αγία Παρασκευή Αττικής 15310. *iro@bio.demokritos.gr

ΕΙΣΑΓΩΓΗ - ΣΚΟΠΟΣ

Φαρμακολογικά, βιοχημικά και μοριακά δεδομένα υποστηρίζουν την ύπαρξη τριών τύπων οπιοειδών υποδοχέων, των μ, δ και κ (μ-OR, δ-OR και κ-OR), οι οποίοι ανήκουν στην υπεροικογένεια των υποδοχέων που συζευγνυνται με G πρωτεΐνες (GPCR) και μεσολαβούν σε ποικίλες λειτουργίες του νευρικού συστήματος (1). Προηγούμενες μελέτες του εργαστηρίου μας έδειξαν πως ο μεταγραφικός παράγοντας STAT5A αλληλεπιδρά με τον μ-οπιοειδή υποδοχέα και φωσφορυλιώνεται έπειτα από την ενεργοποίησή του τόσο με μορφίνη όσο και με το οπιοειδές πππίδιο DAMGO (2).

Βασιζόμενοι σε αυτές τις παρατηρήσεις, ελέγξαμε α) αν και ο δ-οπιοειδής υποδοχέας έχει τη δυνατότητα να αλληλεπιδρά με ίδια ή συγγενή μέλη της οικογένειας των STAT5 πρωτεϊνών και β) αν η ενεργοποίηση του δ-οπιοειδούς υποδοχέα οδηγεί σε παρόμοια σηματοδοτικά μονοπάτια με εκείνα του μ-OR. Τέλος, γ) ελέγξαμε κατά πόσο το διμερές Gβγ, το οποίο αλληλεπιδρά με τον δ-οπιοειδή υποδοχέα (3), επάγει την πρόσδεση των STAT5 μεταγραφικών παραγόντων στο καρβοξυτελικό άκρο του δ-OR.

ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

Κυτταροκαλλιέργειες: Χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα Neuro-2A, που προέρχονται από νευροβλάστωμα ποντικού και HEK293 επιθηλιακά μετα-

σχηματισμένα κύτταρα από ανθρώπινο νεφρό. Τα κύτταρα αναπτύσσονται σε 75 cm² φλάσκες, σε DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) με 10% βόειο ορό, 2 mM γλουταμίνη, 100 units/ml πενικιλίνη και 100 μg/ml στρεπτομυκίνη. Τα κύτταρα καλλιεργούνται σε επωαστήρα, παρουσία 5% CO₂, στους 37°C, όπως περιγράφεται από τις Μορου & Georgoussi (4).

Μέθοδοι συν-ανοσοκατακρήμνισης: HEK293 κύτταρα, σταθερά επιμολυσμένα με το δ-οπιοειδή υποδοχέα που είναι σηματοδοτημένοι με τον flag αντιγονικό επίτοπο και που εκφράζουν ενδογενώς τη STAT5β πρωτεΐνη λύνονται με ρυθμιστικό διάλυμα λύσης Igepal 1% παρουσία αναστολέων. Περίπου 500 μg από τα κυτταρικά λύματα επωάζονται με κατάλληλα, ανά περίπτωση, αντισώματα. Ο διαχωρισμός των πρωτεϊνών, η ανίχνευση και η εμφάνιση του αποτυπώματος γίνονται με τη μέθοδο που περιγράφεται από τις Mazarakou & Georgoussi (4).

In vitro πειράματα πρόσδεσης GST συντηγμένων πρωτεϊνών (GST pull downs): Τα GST pull down πειράματα διεξάγονται όπως περιγράφεται από τους Georgoussi et al. (3).

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ - ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Με γνώμονα το γεγονός ότι και οι τρεις υπότυποι μ, δ και κ των οπιοειδών υποδοχέων μοιράζονται το μοτίβο YXXL (αμινοξέα 317-320 για τον δ-OR), το οποίο ευθύνεται για την πρόσδεση

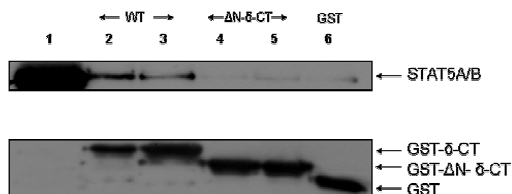
των STAT5 παραγόντων, εφαρμόστηκαν πειράματα συν-ανοσοκατακρήμνισης και *in vitro* πειράματα πρόσδεσης (pull down), χρησιμοποιώντας μια χιμαιρική πρωτεΐνη, η οποία περιέχει το καρβοξυτελικό άκρο (αμινοξέα 310-372) του δ-οπιοειδούς υποδοχέα συντηγμένου με τη γλουταθειόνη S-τρανσφεράση (GST) (GST-δ-CT) (Σχήμα 1, διαδρομές 2,3) και μια μεταλλαγμένη χιμαιρική πρωτεΐνη από την οποία απουσιάζουν τα 26 πρώτα αμινοξέα του καρβοξυτελικού άκρου, που σχηματίζουν την 8^η έλικα και περιέχουν την αλληλουχία YXXL (GST-ΔN-δ-CT), τα οποία έδειξαν την άμεση πρόσδεση της STAT5B στην περιοχή αυτή (Σχήμα1, σύγκριση διαδρομών 2,3 με 4,5). Πειράματα συν-ανοσοκατακρήμνισης, παρουσία των αντισωμάτων Stat5B, Gβ και flag (για τον δ-OR), απέδειξαν την άμεση αλληλεπίδραση του διμερούς των Gβγ υπομονάδων με τον δ-οπιοειδή υποδοχέα και τη δημιουργία ενός λειτουργικού συμπλόκου μεταξύ των STAT5B και Gβγ. Στην παρούσα μελέτη αποδείχτηκε, επίσης, ότι η ενεργοποίηση του δ-OR παρουσία του οπιοειδούς πεπτιδίου DSLET ή της μορφίνης σε κύτταρα HEK293, τα οποία εκφράζουν ενδογενώς τη STAT5B και έχουν επιμολυν-

θεί μόνιμα με τον δ-οπιοειδή υποδοχέα, οδηγεί σε φωσφορυλίωση της STAT5B.

Τα αποτελέσματα αυτά υποδηλώνουν την ύπαρξη νέου μηχανισμού σηματοδότησης, στον οποίο ο σχηματισμός πολυ-πρωτεϊνικών συμπλόκων μεταξύ της STAT5B, του δ-οπιοειδούς υποδοχέα και πρωτεϊνών όπως οι Gβγ υπομονάδες των G πρωτεϊνών, οδηγούν στη φωσφορυλίωση του STAT5B μεταγραφικού παράγοντα σε κύτταρα HEK293.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΠΑΡΑΠΟΜΠΕΣ

1. Law P.Y., Wong Y.H., Loh H.H.: Molecular mechanisms and regulation of opioid receptor signaling. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 40: 389-430 (2000)
2. Georgoussi Z., Leontiadis L., Mazarakou G., Merkouris M., Hyde K., Hamm H.: Selective interactions between G protein subunits and RGS4 with the C-terminal domains of the mu- and delta-opioid receptors regulate opioid receptor signaling. *Cell Signal.* 18: 771-782 (2006)
3. Mazarakou G., Georgoussi Z.: STAT5A interacts with and is phosphorylated upon activation of the mu-opioid receptor. *J. Neurochem.* 93: 918-931 (2005)
4. Morou E., Gergoussi Z.: Expression of the third intracellular loop of the delta-opioid receptor inhibits signaling by opioid receptors and other G protein-coupled receptors. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 315: 1368-79 (2005)



Σχήμα 1: Άμεση αλληλεπίδραση της STAT5B με το καρβοξυτελικό άκρο του δ-οπιοειδούς υποδοχέα

Functional Complexes between δ-Opioid Receptor, Gβγ and STAT5B are Implicated in STAT5B Phosphorylation

Irene-Maria Georganda and Zafiroula Georgoussi*

Laboratory of Cellular Signaling and Molecular Pharmacology, Institute of Biology, National Center for Scientific Research *Demokritos*, Aghia Paraskevi Attikis 15310, Athens, Greece

*iro@bio.demokritos.gr

Key words: δ-Opioid receptor, Gβγ, STAT5B, phosphorylation, functional complexes

SUMMARY. In the present study, we demonstrate that activation of the δ-opioid receptor (δ-OR) with either the δ specific opioid agonist DSLET or morphine leads

to STAT5B tyrosine phosphorylation in HEK293 cells stably transfected with the δ-opioid receptor and endogenously expressing STAT5B. Moreover, we demonstrate, by pull-down experimentation, employing a fusion peptide encompassing the C-terminal region of the δ-opioid receptor, that STAT5B interacts directly with the C-terminal tail of the δ-opioid receptor. On the other hand, using a truncated version of the C-terminal tail of δ-opioid receptor that lacks the first 26 amino acids indicated that STAT5B interacts within helix 8 of δ-opioid receptor. Immunoprecipitation studies showed that STAT5B co-precipitates with δ-OR, confirming the interaction of STAT5B with the receptor. Additional co-immunoprecipitation experiments indicated the direct binding of Gβγ subunits to δ-OR and STAT5B. Collectively, our data demonstrate that the ternary functional complexes formed between δ-OR, Gβγ and STAT5B after δ-OR activation mediate STAT5B phosphorylation.

Φαρμακολογικό Preconditioning στην Απόκριση των Ευκαρυωτικών Κυττάρων στο Οξειδωτικό Stress: Βήμα προς Βήμα Αξιολόγηση της Μεθοδολογίας

Ευγενία Χ. Γιαννακοπούλου^{1*} και Αικατερίνη Τυλιγάδα¹

¹Εργαστήριο Πειραματικής Φαρμακολογίας, Ιατρική Σχολή, Πανεπιστήμιο Αθηνών, Μ. Ασίας 75, 11527 Αθήνα, Ελλάδα, *Μεταδιδακτορική υπότροφος του Ιδρύματος Κρατικών Υποτροφιών

ΓΕΝΙΚΑ - ΣΚΟΠΟΣ

Ως οξειδωτικό stress (OS) ορίζεται η διαταραχή της ισορροπίας μεταξύ προ-οξειδωτικών και αντιοξειδωτικών ουσιών και οφείλεται σε αυξημένη παραγωγή ελευθέρων ριζών ή/και σε ανεπάρκεια των κυτταρικών αντιοξειδωτικών μηχανισμών (1). Έχει καταστεί πλέον αποδεκτός ο ρόλος του OS στην παθοφυσιολογία πολλών ασθενειών, συμπεριλαμβανομένων των καρδιαγγειακών νοσημάτων, του σακχαρώδη διαβήτη, των νόσων Alzheimer και Parkinson, της προεκλαμψίας, της φλεγμονής σε ορισμένες μορφές καρκίνου και της διεργασίας της γήρανσης (2). Κατά την απόκριση των κυττάρων στο OS, ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει σήμερα η μελέτη της επίδρασης φαρμακολογικών δραστικών ουσιών (φαρμακολογικό preconditioning) στην ενεργοποίηση προσαρμοστικών και προστατευτικών κυτταρικών μηχανισμών, οι οποίοι αποκτούν σημασία κατά τη θεραπευτική προσέγγιση των νοσημάτων αυτών. Περιορισμένες μελέτες πραγματοποιούνται σε ανθρώπινο αίμα, ενώ τα *in vivo* πειραματικά δεδομένα προέρχονται κυρίως από πειραματόζωα, όπου η αξιολόγηση γίνεται μόνο με βιοχημικούς δείκτες και είναι πρακτικά δύσκολο να προσδιορισθεί τόσο η επιβίωση κατά το OS, όσο και οι υποκείμενοι κυτταρικοί μηχανισμοί. Ο μονοκυττάριος ευκαρυωτικός οργανισμός *Saccharomyces cerevisiae* αποτελεί πειραματικό πρότυπο εκλογής στις μελέτες της κυτταρικής φαρμακολογίας, επειδή είναι απλός, εύχρηστος, χαμηλού κόστους, πολ-

λαπλάσιάζεται ταχέως και οι βασικοί ενδοκυτταριοί μηχανισμοί, η κυτταρική διαίρεση και ο μεταβολισμός εμφανίζονται εξελικτικώς συντηρητικοί μεταξύ της ζύμης και των ανώτερων ευκαρυωτικών οργανισμών (3). Σκοπός της μελέτης ήταν ο προσδιορισμός των βέλτιστων πειραματικών συνθηκών για τη διερεύνηση της επίδρασης του φαρμακολογικού preconditioning κατά την απόκριση των κυττάρων στο OS στον *S. Cerevisiae*.

ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

Μία 2ήμερη αποικία του *S. cerevisiae* ATCC 2366 επώασθη σε 5ml θρεπτικού υλικού [YEPD: σε (w/v) 0,3% yeast extract, 0,5% mycological peptone, 1% dextrose, Oxoid] στους 27 °C για 2 hrs και 0,1 ml της 1:10 αραιώσης αυτής επώαστηκαν σε τελικό όγκο 2ml YEPD στους 27 °C για 22 hrs (μεταλογαριθμική φάση) (4). Για τη μελέτη του ήπιου, καθώς και του ισχυρού, εν δυνάμει θανατηφόρου OS, οι καλλιέργειες έλαβαν κατά τη μεταλογαριθμική φάσης της ανάπτυξης 0,15-45 mM H₂O₂, για 15 min - 3hrs. Το φαρμακολογικό preconditioning πραγματοποιήθηκε με την επώαση των κυττάρων παρουσία των κλασσικών αντιοξειδωτικών ουσιών N-ακετυλοκυστεΐνης (NAC, 30 mM) και οξειδωμένης γλουταθειόνης (GSSG, 0,5-2,5 mM) για 1hr. Η δυνατότητα επαγωγής προσαρμοστικών μηχανισμών σε επακόλουθο ισχυρό OS διερευνήθηκε με την υποβολή των κυττάρων σε 1,5 mM H₂O₂ μετά το ήπιο OS ή φαρμακολογικό stress. Η

απόκριση των κυττάρων του σακχαρομύκητα αξιολογήθηκε με τη επακόλουθη ικανότητα πολλαπλασιασμού τους (βιωσιμότητα) σε δείγματα των καλλιιεργειών που επιστρώθηκαν, μετά από κατάλληλη αραίωση, σε τρυβλία με στερεό θρεπτικό υλικό [YA: YEPD και 1,5% (w/v) yeast agar, Oxoid] και καταμέτρηση του αριθμού των αποικιών που σχηματίστηκαν (CFUs) μετά από επώαση 48 hrs. Ο αριθμός των CFUs σε κάθε τρυβλίο εκφράστηκε ως % των CFUs στους μάρτυρες, οι οποίοι θεωρήθηκε ότι εκφράζουν βιωσιμότητα 100%. Ως μάρτυρες ορίστηκαν οι καλλιέργειες μεταλογαριθμικής φάσης στις οποίες δεν είχε χορηγηθεί οποιαδήποτε ουσία. Το κάθε πείραμα επαναλήφθηκε τουλάχιστον 3 φορές και τουλάχιστον 2 τρυβλία επιστρώνονταν για κάθε δείγμα.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ - ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Στο *S. cerevisiae*, το OS πραγματοποιήθηκε με επώαση των κυττάρων παρουσία της οξειδωτικής ουσίας H₂O₂ και η απόκριση των κυττάρων προσδιορίστηκε μέσω της βιωσιμότητας, η οποία αποτελεί αξιόπιστο και διεθνώς αποδεκτό δείκτη αξιολόγησης μιας παρέμβασης σε έναν κυτταρικό πληθυσμό. Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, η βιωσιμότητα στο σακχαρομύκητα μπορεί να προσδιοριστεί με χρώση των κυττάρων με κυανό του μεθυλενίου, με ημιποσοτικό προσδιορισμό του πολλαπλασιασμού μετά από επίστρωση σε τρυβλία διαιρεθέντα σε ίσα τμήματα (streaking) ή με την καταμέτρηση της ικανότητας σχηματισμού CFUs σε YA (5,6). Η χρώση με κυανό του μεθυλενίου, αν και εύκολη, γρήγορη και οικονομική, δεν εφαρμόστηκε τελικά λόγω της υψηλής συχνότητας εμφάνισης ψευδώς αρνητικών αποτελεσμάτων, τα οποία αποδόθηκαν στη χημική αλληλεπίδραση μεταξύ της χρωστικής και των οξειδωτικών ουσιών (7). Η ημιποσοτική εκτίμηση του πολλαπλασιασμού των κυττάρων, αν και επέτρεπε την ταυτόχρονη μελέτη μεγάλου αριθμού δειγμάτων και είχε άριστη επαναληψιμότητα και υψηλή ευαισθησία, η ειδικότητά της ήταν χαμηλή με αποτέλεσμα η εφαρμογή της μεθόδου να περιορισθεί σε πιλοτικά πειράματα για τον έλεγχο (screening) της σχέσης δόσης-αποτελέσματος. Βέλτιστη κρίθηκε η καταμέτρηση της ικανότητας σχηματισμού CFUs, επειδή είχε άριστη επαναληψιμότητα, υψηλή ευαισθησία, αλλά και ειδικότητα. Η ανεύρεση της κατάλληλης αραίωσης, διαφορετικής για κάθε

δείγμα, που επέτρεπε την ανάπτυξη μετρίσιμου αριθμού CFUs σε κάθε τρυβλίο ήταν ένας από τους βασικούς περιορισμούς στη μεθοδολογία. Μεγαλύτερος των 100-300 αριθμός αποικιών δεν ήταν δυνατό να μετρηθεί τόσο λόγω αλληλοεπικάλυψης των CFUs ή σχηματισμού τάπητα όσο και της παρουσίας δυσδιάκριτων μικρών αποικιών. Μικρότερος αριθμός περιόριζε την αξιοπιστία των στατιστικών αναλύσεων.

Όπως για κάθε πειραματικό πρότυπο, έτσι και η διερεύνηση του φαρμακολογικού preconditioning στο σακχαρομύκητα προϋποθέτει την εύρεση των βέλτιστων παραμέτρων που προσδιορίζουν τόσο το εν δυνάμει θανατηφόρο, όσο και το ήπιο OS, οι οποίες είναι διαφορετικές για κάθε στέλεχος. Κατά το ισχυρό OS, η αποδεκτή βιωσιμότητα ορίστηκε σε 10-30%, έτσι ώστε να είναι δυνατή η ανίχνευση όχι μόνο ανταγωνιστικών αλλά και συνεργικών δράσεων με αυτή του H₂O₂, μέσω αύξησης ή περαιτέρω μείωσης της βιωσιμότητας, αντιστοίχως. Το H₂O₂, σε συγκεντρώσεις 0,45-45 mM, μείωσε την ικανότητα πολλαπλασιασμού και τη βιωσιμότητα των κυττάρων, η δράση του ήταν δοσοεξαρτώμενη και χρονοεξαρτώμενη και ανιχνεύθηκε τουλάχιστον 30 min μετά τη χορήγηση του. Η βιωσιμότητα κυμάνθηκε από 50±4.3% μετά από επώαση με 0,45 mM H₂O₂ για 1hr έως <1% παρουσία > 4,5 mM H₂O₂ για 1hr. Επίσης, η χορήγηση 0,45-4,5 mM H₂O₂ οδήγησε στην εμφάνιση ποικίλου μεγέθους CFUs. Με βάση τα παραπάνω, ως βέλτιστες πειραματικές συνθήκες ισχυρού OS επιλέχθηκαν η επώαση των κυττάρων σε 1,5 mM H₂O₂ και για 1hr. Όσον αφορά το ήπιο OS, η ανεύρεση των κατάλληλων συγκεντρώσεων των οξειδωτικών ουσιών εμφάνισε μεθοδολογικά προβλήματα που προέκυψαν από το γεγονός ότι μία οξειδωτική ουσία σε όσο χαμηλή συγκεντρωμένη και αν χορηγηθεί, είναι δυνατόν να εμφανίσει τοξική δράση. Μετά από μία σειρά σχετικών πειραμάτων, η επώαση με 0,15 mM H₂O₂ για 1hr, όπου η βιωσιμότητα ήταν 70-90%, έδειξε τη βέλτιστη απόκριση για τη μελέτη του ήπιου OS.

Τέλος, το πειραματικό πρότυπο αξιολογήθηκε με τη διενέργεια φαρμακολογικού preconditioning με τις κλασσικές αντιοξειδωτικές ουσίες NAC και GSSG. Σε συγκεντρώσεις 30 mM και 0,5-2,5 mM, αντίστοιχα, οι NAC και GSSG σχεδόν τριπλασίασαν τη βιωσιμότητα των κυττάρων μετά από ισχυρό OS συγκριτικά με αυτή των κυττάρων που υποβλήθηκαν σε OS χωρίς προη-

γηθέν φαρμακολογικό preconditioning, προκάλεσαν, δηλαδή επαγωγή των προσαρμοστικών μηχανισμών έναντι επακόλουθου ισχυρού OS, αποτέλεσμα που ήταν σύμφωνο με τα βιβλιογραφικά δεδομένα (9).

Συμπερασματικά, οι βέλτιστες πειραματικές συνθήκες για τη διερεύνηση της επίδρασης του φαρμακολογικού preconditioning κατά την απόκριση των κυττάρων του *S. cerevisiae* ATCC 2366 στο OS, όπως περιγράφονται σε αυτή τη μελέτη, ελαχιστοποιούν την πιθανότητα εμφάνισης ψευδώς θετικών και αρνητικών αποτελεσμάτων.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΠΑΡΑΠΟΜΠΕΣ

1. Klatt P., Lamas S.: Regulation of protein function by S-glutathiolation in response to oxidative and nitrosative stress. *Eur. J. Biochem.* 267: 4928-4944 (2000)
2. Costa V., Moradas Ferreira P.: Oxidative stress and signal transduction in *Saccharomyces cerevisiae*: insights into ageing, apoptosis and disease. *Mol. Aspects Med.* 22: 217-246 (2001)
3. Tiligada E., Miligkos V., Delitheos A.: Cross talk between cellular stress, cell cycle and anticancer agents: Mechanistic aspects. *Curr. Med. Chem. Anti-cancer Agents* 2: 553-566 (2002)
4. Tiligada E., Miligkos V., Ypsilantis E., et al.: Molybdate induces thermotolerance in yeast. *Lett. Appl. Microbiol.* 29: 77-80 (1999)
5. Yiannakopoulou E.Ch., Delitheos A., Tiligada E.: Dose-dependent effect of non-steroidal anti-inflammatory agents on the cellular stress response *Epitheor. Klin. Farmacol. Farmakokinet.* 23: 39-41(2005)
6. Tiligada E., Giannakakou P., Karavokyros I., et al.: Effect of calcium channel blockers on the actions of various antitumor agents in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Appl. Bacteriol.* 81: 481-485 (1996)
7. Yiannakopoulou E.Ch., Tiligada E.: Acetaminophen modulates the oxidative stress response in eucaryotic cells *Rev. Clin. Pharmacol. Pharmacokinet. Intern. Ed.* 20: 125-127 (2006)
8. Thakare S.R.: Catalytic degradation of methylene blue by Fenton like system: model to the environmental reaction. *J. Environ. Sci.* 16: 285-7 (2004)
9. Jamieson DJ. Oxidative stress responses of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 14: 1511-1527 (1998)

Pharmacological Preconditioning in the Oxidative Stress Response of Eukaryotic Cells: *In Process* Method Validation

Eugenia Ch. Yiannakopoulou^{1*} and Ekaterini Tiligada¹

¹Department of Pharmacology, Medical School University of Athens, M. Asias 75, GR-11527 Athens, Greece; *Postdoctoral Research Scholar of the National Scholarship Foundation

Key words: Oxidative stress, pharmacological preconditioning, N-acetyl-cysteine, glutathione, stress response, yeast

SUMMARY. Cellular damage caused by free radicals is referred to as oxidative stress (OS). OS is implicated in a number of pathophysiological states, including cardiovascular diseases, diabetes, Parkinson's and Alzheimer disease, inflammation and cancer, as well as in ageing processes; their progress being frequently modified by the pharmacological modulation of the OS response (pharmacological preconditioning). The aim of this study was the *in process* validation of methodological issues that arose during the investigation of the effect of pharmacological preconditioning on the OS response. Experiments were carried out using the unicellular eukaryote *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 2366, which is an accepted experimental model for the characterisation of the highly conserved stress response. Various concentrations of the oxidizing agent H₂O₂ were administered for different time periods. The OS response was evaluated by determining cell viability *via* the ability of yeast cells to form colony forming units after the OS. However, prior to reaching firm conclusions on the consequences of the response in eukaryotic cells, the optimal experimental conditions needed to be determined "in process" for the elimination of false positive and false negative results. The optimal experimental conditions were established as follows: (a) for the lethal OS, incubation of post-logarithmic yeast cultures in the presence of 1.5mM H₂O₂ for 1h; (b) for the mild OS, incubation in the presence of 0.15mM H₂O₂ for 1h. The validity of these conditions was confirmed through the investigation of pharmacological preconditioning with the classical antioxidants N-acetyl-cysteine and glutathione.

Μελέτη Συσχέτισης Κοινών Πολυμορφισμών των Γονιδίων GST T1 και GST M1 με την Ανταπόκριση Δυσλιπιδαιμικών Ασθενών στην Ατορβαστατίνη

Αντώνης Γούλας¹, Μαρία Κοσμίδου², Δήμητρα Μολυβά¹, Λιάνα Φιδάνη³, Απόστολος Χατζητόλιος² και Βασιλική Μήρτσου¹

¹Εργαστήριο Πειραματικής Φαρμακολογίας, ³Εργαστήριο Γενικής Βιολογίας, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο, Θεσσαλονίκη, Ελλάδα, ²¹ Προπαιδευτική Παθολογική Κλινική Νοσοκομείου ΑΧΕΠΑ, Θεσσαλονίκη, Ελλάδα

ΕΙΣΑΓΩΓΗ - ΣΚΟΠΟΣ

Οι S-τρανσφεράσες της γλουταθειόνης (GSTs) είναι οικογένεια αντιοξειδωτικών ενζύμων που καταλύουν τη βιομετατροπή φαρμάκων και ξενοβιοτικών παραγόντων. Δύο κοινοί πολυμορφισμοί στα γονίδια *GST T1* και *GST M1* έχουν συσχετιστεί τελευταία με αυξημένους δείκτες φλεγμονής και λιπιδικής υπεροξειδωσης σε άτομα με σακχαρώδη διαβήτη (1) και με τον κίνδυνο στεφανιαίας νόσου και εμφράγματος του μυοκαρδίου (2). Στα πλαίσια της αναζήτησης γενετικών παραγόντων που διαφοροποιούν την ανταπόκριση δυσλιπιδαιμικών ασθενών στη θεραπεία με στατίνες και δεδομένου ότι στις τελευταίες έχουν αποδοθεί και αντιφλεγμονώδεις, καθώς και αντιοξειδωτικές ιδιότητες (3), διερευνήσαμε την πιθανή συσχέτιση ανάμεσα στη κατανομή των πολυμορφισμών *GSTT1-1/0* και *GSTM1-1/0* και στις μεταβολές σε λιπιδαιμικούς δείκτες μετά από θεραπεία με ατορβαστατίνη, σε ομάδα ασθενών από τη βόρεια Ελλάδα.

ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

Τα χαρακτηριστικά των ασθενών κατά την έναρξη της μελέτης παρουσιάζονται στον Πίνακα 1. Όλοι οι ασθενείς εξετάστηκαν στα εξωτερικά ιατρεία της 1^{ης} Προπαιδευτικής Κλινικής του Νοσοκομείου ΑΧΕΠΑ (Νοέμβριος 2004 – Μάιος 2006) και υποβλήθηκαν σε θεραπεία με 10 mg ατορβαστατίνη, άπαξ ημερησίως, για 12 εβδομά-

δες. Κριτήρια συμμετοχής στη μελέτη: χοληστερόλη (CHOL) >200 mg/dL, LDL-χοληστερόλη (LDL-C) >130 mg/dL, τριακυλογλυκερόλες (TG) <250 mg/dL. Κριτήρια αποκλεισμού: ασταθής/μη ελεγχόμενη στεφανιαία νόσος, δευτεροπαθής δυσλιπιδαιμία, σακχαρώδης διαβήτης, διαταραγμένη ηπατική ή νεφρική λειτουργία. Κανένας από τους ασθενείς δεν είχε λάβει αντιλιπιδική ή αντιυπερτασική αγωγή στο παρελθόν. Ο γονοτυπικός έλεγχος των πολυμορφισμών *GST M1-1/0* και *GST T1-1/0* διεξήχθη, όπως έχει περιγραφεί πρόσφατα (4). Η ανάλυση της συσχέτισης των πολυμορφισμών με τις διαφορές στα επίπεδα των λιπιδίων και λοιπών εργαστηριακών παραμέτρων έγινε με μια στατιστική μέθοδο ανάλυσης της συν-διακύμανσης (ANCOVA) χρησιμοποιώντας την ηλικία, το φύλο, το κάπνισμα και την ύπαρξη αρτηριακής υπέρτασης ως συμμεταβλητές (SPSS 12.0).

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ - ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Μετά από 12 εβδομάδες θεραπείας παρουσιάστηκε στατιστικά σημαντική ελάττωση στις τιμές CHOL (36,8%, $P < 0,0005$), LDL-C (49,1%, $P < 0,0005$), TG (22,5%, $P < 0,0005$) και απολιποπρωτεΐνης αρσB (33%, $P < 0,0005$). Οι μεταβολές των τιμών HDL-χοληστερόλης (HDL-C), απολιποπρωτεΐνης αρσA-I και C-αντιδρώσας πρωτεΐνης (CRP) δεν ήταν στατιστικά σημαντικές στο σύνολο των ασθενών, ενώ διαστρωμάτωση σύμφωνα με τον GST γονότυπο έδειξε σημαντι-

κή επίδραση του πολυμορφισμού GST M1-0 στη μεταβολή των επιπέδων apoA-I (Πίνακας 2). Η αύξηση των επιπέδων της apoA-I έχει προταθεί ότι ελαττώνει το οξειδωτικό στρες και την έκταση της ενδοαγγειακής φλεγμονής σε ασθενείς υψηλού κινδύνου για καρδιαγγειακή νόσο, πιθανόν μέσω ενός μηχανισμού αναδιαμόρφωσης των σωματιδίων της HDL που οδηγεί σε ενίσχυση των αντιθηρογενών ιδιοτήτων αυτών των λιποπρωτεϊνών (3). Συνεπώς, μια ερμηνεία των αποτελεσμάτων της παρούσας μελέτης είναι ότι η θεραπεία με χαμηλές (10 mg) δόσεις atorvasτατίνης ενδέχεται να ευεργετεί ιδιαίτερα δυσλιπιδαιμικούς ασθενείς που φέρουν τον GST M1 null γονότυπο.

Πίνακας 1

Χαρακτηριστικά δυσλιπιδαιμικών ασθενών κατά την έναρξη της μελέτης

Συνολικός αριθμός ασθενών	55
Ηλικία, έτη	49,3±9,7
Φύλο	27 άνδρες, 28 γυναίκες
BMI, kg/m ²	27,8±3,1
Καπνιστές	45,5%
Υπερτασικοί	52,7%
CHOL, mg/dL	284,24±25,9
LDL-C, mg/dL	199,71±26,1
HDL-C, mg/dL	50,71±13,0
TG, mg/dL	167,73±53,9
apoA-I, mg/dL	132,2±24,1
apoB, mg/dL	140,9±23,0
CRP, mg/L	0,46±0,69
GST T1	1: 80,8%, 0: 19,2%
GST M1	1: 56,6%, 0: 43,4%

Πίνακας 2

Μεταβολές στα επίπεδα απολιποπρωτεϊνών μετά τη χορήγηση atorvasτατίνης

Γονότυπος	n	apoA-I	apoB
GST T1	52	0,9±24,0	-47,2±23,9
1	42	1,8±24,2	-47,0±24,1
0	10	-3,1±23,8	-48,2±24,0
P		0,567	0,891
GST M1	53	0,5±23,9	-47,3±23,6
1	30	-5,7±20,3	-42,4±26,2
0	23	8,5±26,3	-53,7±18,4
P		0,031	0,084
		0,046*	0,227*

*Προσαρμοσμένη τιμή με τη χρήση της ηλικίας, του φύλου, της υπέρτασης και του καπνίσματος ως συμμεταβλητών.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΠΑΡΑΠΟΜΠΕΣ

- Hayek T., Stephens J.W., Hubbart C.S., et al.: A common variant in the glutathione S transferase gene is associated with elevated markers of inflammation and lipid peroxidation in subjects with diabetes mellitus. *Atherosclerosis* 184: 404-412 (2006)
- Wilson M.H., Grant P.J., Kain K., et al.: Association between the risk of coronary artery disease in South Asians and a deletion polymorphism in glutathione S-transferase M1. *Biomarkers* 8: 43-50 (2003)
- Kontush A., Chapman M.J.: Functionally defective high-density lipoprotein: a new therapeutic target at the crossroads of dyslipidemia, inflammation and atherosclerosis. *Pharmacol. Rev.* 58: 342-374 (2006)
- Joseph T., Chacko P., Wesley R., et al.: Germline genetic polymorphisms of CYP1A1, GSTM1 and GSTT1 genes in Indian cervical cancer: associations with tumor progression, age and human papillomavirus infection. *Gynecol. Oncol.* 101: 411-417 (2006)

An Association Study of the GST T1 and GST M1 null Polymorphisms with the Response of Greek Dyslipidemic Patients to Atorvastatin

A. Goulas¹, M. Kosmidou², D. Molyva¹, L. Fidani³, A. Hatzitolios², V. Mirtsou¹

- Laboratory of Experimental Pharmacology, Medical School, Aristotle University, Thessaloniki, Greece
- 1st Propedeutic Department of Internal Medicine, AHEPA Hospital, Thessaloniki, Greece
- Laboratory of General Biology, Medical School, Aristotle University, Thessaloniki, Greece

Key words: GST T1 genes, GST M1 genes, polymorphisms, atorvastatin, dyslipidaemia, Greek patients

SUMMARY: The objective of this study was to examine the possible association of the GST T1 and/ or GST M1 null polymorphisms with the lipid response of Greek patients to atorvastatin. Lipid levels were determined at baseline and following 12 weeks of treatment with a daily dose of 10 mg atorvastatin. Treatment resulted in statistically significant decreases of total cholesterol, LDL-cholesterol, triacylglycerols and apoB serum levels. While no statistically significant increases were detected in the total cohort of patients with respect to either HDL-cholesterol or apoA-I levels, the latter appeared to be significantly increased in those patients which carry the GST M1 null genotype.

Τροποποίηση του Ηπατικού Μεταβολισμού της Τε- στοστερόνης και Μπουφουραλόλης μετά από Έκθε- ση σε Stress

Ευάγγελος-Παναγιώτης Δασκαλόπουλος¹, Magnus Ingelman-
 Sundberg², Matti A. Lang³, Μάριος Μαρσέλος¹ και Μαρία
 Κωνσταντή^{1*}

¹Εργαστήριο Φαρμακολογίας, Ιατρική Σχολή, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων, Ιωάννινα GR-45110, Ελλάς. ²Karolinska Institutet, Dept of Physiology and Pharmacology, Medical School, Stockholm, Sweden ³Division of Biochemistry, Faculty of Pharmacy, University of Uppsala, Box578S75123, Uppsala, Sweden

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Τα ένζυμα που ανήκουν στις υποοικογένειες CYP3A, CYP2A, CYP2C και CYP2D συγκαταλέγονται στις σημαντικότερες ισομορφές κυτοχρωμάτων που εμπλέκονται στον ηπατικό μεταβολισμό πληθώρας φαρμάκων και τοξικών ουσιών και ως εκ τούτου επηρεάζουν την αποτελεσματικότητα και τοξικότητα των φαρμάκων που μεταβολίζονται από αυτά. Πάνω από το 60% των συνολικών κυτοχρωμάτων που εκφράζονται στο ήπαρ ανήκει στην υποοικογένεια CYP3A, τα οποία εμπλέκονται, μεταξύ άλλων, στη μεταβολική ενεργοποίηση χημικών καρκινογόνων, όπως οι αφλατοξίνες B1, το 7,8-διολικό παράγωγο του βενζο(α)πυρενίου, το νιτροχρυσένιο, το αμινοχρυσένιο και ο χημειοθεραπευτικός παράγωγος μορφολινοδορουμπικίνη (1,2). Οι ισομορφές των κυτοχρωμάτων της υποοικογένειας CYP2D μεταβολίζουν περίπου το 20% των σημαντικότερων συνταγογραφούμενων φαρμάκων, όπως και πολλά άλλα φάρμακα τα οποία ακόμη βρίσκονται στο στάδιο της ανάπτυξης. Μεταξύ αυτών, ο μεταβολισμός των φαινοθειαζινών, της αλοπεριδόλης και της ρισπεριδόνης, νευροληπτικών φαρμάκων, ελέγχεται στο ήπαρ από αυτό το κυτόχρωμα (3). Προηγούμενες μελέτες έδειξαν ότι οι κατεχολαμίνες και τα συστήματα που συνδέονται με τους αντίστοιχους υποδοχείς εμπλέ-

κονται στη ρύθμιση της έκφρασης των κυτοχρωμάτων CYP1A1, CYP1A2, CYP2B1, CYP2B2 και CYP2E1. Συγκεκριμένα, μείωση των κεντρικών κατεχολαμινών και ειδικά της νοραδρεναλίνης ή δέσμευση των κεντρικών α₁-αδρενεργικών υποδοχέων, αύξησε την έκφραση του CYP1A2 και CYP1A1 σε συνθήκες επαγωγής με B(α)P (4,5). Η βασική έκφραση των κυτοχρωμάτων CYP2B1/2 και CYP2E1 επίσης μεταβάλλεται μετά από φαρμακολογικούς χειρισμούς που τροποποιούν τις κατεχολαμίνες ή τους αδρενεργικούς υποδοχείς. Αξίζει να σημειωθεί ότι στην περίπτωση αυτών των κυτοχρωμάτων, ο ρόλος της ντοπαμίνης και συγκεκριμένα των D₂-υποδοχέων είναι πολύ σημαντικός. Στην μελέτη αυτή διερευνήθηκε ο ρόλος του ψυχολογικού stress στην ρύθμιση των κυτοχρωμάτων CYP3A, CYP2A, CYP2D και CYP2C σε ήπαρ επιμύων.

ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

Στη μελέτη αυτή χρησιμοποιήθηκαν αρσενικοί ενήλικοι επίμυες Wistar (Kuo/10a/rr), ηλικίας 2-3 μηνών. Η θερμοκρασία του περιβάλλοντος διατηρούνταν σταθερή (20 °C) και υπήρχε κυκλική εναλλαγή φωτός/σκότους ανά 12 ώρες. Η παροχή ύδατος και φαγητού για τα πειραματόζωα ήταν *ad libidum*. Όλα τα πειράματα στα πειραματόζωα έχουν ελεγχθεί και εγκριθεί από την το-

πική επιτροπή, ενώ η έρευνα έχει διεξαχθεί σύμφωνα με τις Ευρωπαϊκές διατάξεις περί της χρήσης και φροντίδας των πειραματοζώων (86/609-ΕΕC).

Σε αυτή την έρευνα χρησιμοποιήθηκαν 6 επίμυες ανά ομάδα. Οι επίμυες που υποβλήθηκαν σε stress παρέμειναν υπό περιορισμό (restraint stress) για 5 συνεχείς ημέρες και για 60 λεπτά την ημέρα. Την 5^η ημέρα του πειράματος οι επίμυες θυσιάστηκαν και τμήματα ήπατος αφαιρέθηκαν για την απομόνωση μικροσωματίων. Οι δραστηκότητες των κυτοχρωμάτων CYP3A1/2, CYP2A, CYP2C και CYP2D1/4 προσδιορίστηκαν με τεχνικές HPLC, όπως περιγράφονται από τους Westlind et al. (6) και Crespi et al. (7), αντίστοιχα. Στη περίπτωση των CYP3A1/2, CYP2A, CYP2C χρησιμοποιήθηκε ως υπόστρωμα η τεστοστερόνη και στην περίπτωση του CYP2D1/4 η μπουφουραλόλη. Με Western blot έγινε η ανάλυση των πρωτεϊνών. Τα δεδομένα αξιολογήθηκαν με ANOVA και αντίστοιχο t-test.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ - ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι το stress αύξησε τα επίπεδα της υδροξυ-μπουφουραλόλης, της 6β- και 7α-υδροξυ-τεστοστερόνης, ενώ δεν επηρέασε τα επίπεδα της 2α- και 16α-υδροξυ-τεστοστερόνης. Οι μεταβολές στα επίπεδα της πρωτεΐνης ακολούθησαν εκείνες της ενζυμικής δραστηκότητας. Φαίνεται ότι το stress ενισχύει την έκφραση του κυτοχρώματος CYP2D1/4 που καταλύει το μεταβολισμό της μπουφουραλόλης (P<0,05), του κυτοχρώματος CYP3A1/2 που είναι υπεύθυνο για το σχηματισμό της 6β-υδροξυ-τεστοστερόνης (P<0,05) και του CYP2A στο

οποίο οφείλεται ο σχηματισμός της 7α-υδροξυ-τεστοστερόνης (P<0,001). Το stress αποδεικνύεται για μια ακόμη φορά ότι να είναι ρυθμιστικός παράγων της έκφρασης ενζύμων μεταβολισμού φαρμάκων και τοξικών ουσιών, που μπορεί να παρεμβαίνει στην αποτελεσματικότητα της φαρμακευτικής αγωγής, αλλά και στην φαρμακοτοξικότητα

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΠΑΡΑΠΟΜΠΕΣ

1. Gonzalez F.J., Gelboin H.V.: Role of human cytochromes P450. In: The Metabolic Activation of Chemical Carcinogens and Toxins. *Drug Metabol. Rev.* 26: 165-183 (1994)
2. Wilkinson G.R.: Cytochrome P4503A (CYP3A) metabolism: Prediction of *in vivo* activity in humans. *J. Pharmacokin. Biopharmac.* 24(5): (1996)
3. Daniel W.A., Haduch A., Wojcikowski J.: Inhibition of rat liver CYP2D *in vitro* and after 1-day and long-term exposure to neuroleptics *in vivo*-possible involvement of different mechanisms. *Eur. Neuropsychopharmacol.* 15: 103-110 (2005)
4. Konstandi M., Kostakis D., Harkitis P., Johnson E.O., Marselos M., Adamidis K., Lang M.A.: Benzo(alpha)pyrene-induced up-regulation of CYP1A2 gene expression: role of adrenoceptor-linked signaling pathways. *Life Sciences* 20;79: 331-341 (2006)
5. Konstandi M., Kostakis D., Harkitis P., Marselos M., Johnson E.O., Adamidis K., Lang M.A.: Role of adrenoceptor-linked signaling pathways in the regulation of CYP1A1 gene expression. *Biochem. Pharmacol.* 15;69: 277-287 (2005)
6. Westlind A., Loftberg L., Tindberg N., Andersson T.B., Ingelman-Sundberg M.: Interindividual differences in hepatic expression of CYP3A4: Relationship to genetic polymorphism in the 5'-upstream regulatory region. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 259: 201-205 (1999)
7. Crespi C.L., Chang T.K., Waxman D.J.: CYP2D6-dependent bufuralol 1'-hydroxylation assayed by reverse-phase ion-pair high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *Methods Mol. Biol.* 320: 121-125 (2006)

Ομάδες	OH-μπουφουραλόλη Fluorescence $\times 10^{-6}$ / min/mg πρωτεΐνης	2α-OH-τεστοστερόνη pmoles/min/mg πρωτεΐνης	6β-OH-τεστοστερό- νη pmoles/min/mg πρωτεΐνης	16α-OH-τεστοστερό- νη pmoles/min/mg πρωτεΐνης	7α-OH-τεστοστερό- νη pmoles/min/mg πρωτεΐνης
Control	2,5 \pm 0,2	925,9 \pm 47,3	804,3 \pm 42,7	951,8 \pm 65,9	515,8 \pm 58
Stres	3,4 \pm 0,3*	959,6 \pm 87,5	1053,5 \pm 103*	917,9 \pm 83,3	1042,1 \pm 60,7***

Stress Modifies Testosterone and Bufuralol Metabolism in the Rat Liver

Evangelos-Panagiotis Daskalopoulos¹, Magnus Ingelman-Sundberg², Matti A. Lang³, Marios Marselos¹ and Maria Konstandi^{1*}

¹Dept of Pharmacology, Medical School, University of Ioannina, Ioannina GR-451 10, Greece

²Karolinska Institutet, Dept of Physiology and Pharmacology, Medical School, Stockholm, Sweden

³ Division of Biochemistry, Faculty of Pharmacy, University of Uppsala, Box578S75123, Uppsala, Sweden

Key words: Testosterone, bufuralol, metabolism, stress, rat liver

SUMMARY. Cytochromes CYP3A, CYP2A, CYP2C και CYP2D are involved in the metabolism of numerous drugs and toxic compounds, such as environmental pollutants, pre-carcinogens and carcinogens. Stress increases the vulnerability of the exposed organism in developing cancer and immune diseases. The present study investigated the effect of psychological stress in the regulation of the afore-mentioned drug-metabolizing enzymes. For this purpose, repeated restraint

stress was employed as experimental model of stress. The data showed that stress up-regulated the bufuralol 1'-hydroxylase, 7a-, and 6b-testosterone hydroxylase activities that are catalysed by cytochromes CYP2D1/4, CYP3A1/2 and CYP2A, respectively. In contrast, stress did not affect 2a- and 16a-testosterone hydroxylase activities. Changes in apoprotein levels followed those of enzymatic activities. It appears that stress may modify the expression of several significant drug-metabolizing enzymes, thus affecting the effectiveness and toxicity of the drug therapy.

ΕΠΙΘΕΩΡΗΣΗ ΚΛΙΝΙΚΗΣ ΦΑΡΜΑΚΟΛΟΓΙΑΣ
ΚΑΙ ΦΑΡΜΑΚΟΚΙΝΗΤΙΚΗΣ 25: 38-39 (2007)
©ΦΑΡΜΑΚΟΝ-Τύπος

Η Ανασταλτική Δράση των μη Στεροειδών Αντιφλεγμονωδών Φαρμάκων στην Πώρωση των Καταγμάτων

Δόκος Χαράλαμπος και Μυρωνίδου-Τζουβελέκη Μαρία

Εργαστήριο Φαρμακολογίας, Ιατρική Σχολή, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο, Θεσσαλονίκη, Ελλάδα

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Τα μη στεροειδή αντιφλεγμονώδη φάρμακα (ΜΣΑΦ) χρησιμοποιούνται για τις εξής ιδιότητες που προσφέρουν: αναλγησία, αντιφλεγμονώδη δράση και πτώση του πυρετού (ανιπυρετικά). Είναι αναστολείς του ενζύμου κυκλοοξυγενάση (ισομορφές COX-1 και COX-2) υπεύθυνου για τη μετατροπή των προσταγλανδινών από το αραχιδονικό οξύ (φωσφολιπιδική προέλευση). Η COX-1 είναι υπεύθυνη για την παραγωγή προσταγλανδινών που προστατεύουν το γαστρικό βλεννογόνο, επάγουν την καλή λειτουργία των νεφρών και των αιμοπεταλίων (παραγωγή θρομβοξάνιου A₂). Η COX-2 συμβάλλει στην παραγωγή προσταγλανδινών που μεσολαβούν στη φλεγμονή, τον πόνο και τη νεφρική λειτουργία (έκκριση ρενίνης). Τα ΜΣΑΦ συνταγογραφούνται ευρέως στην καθημερινή κλινική πράξη παρά τις ανεπιθύμητες ενέργειες που παρουσιάζουν (γαστρορραγία, πεπτικά έλκη, αγγειοοίδημα κ.τ.λ) (1,2).

ΧΡΗΣΗ ΤΩΝ ΚΛΑΣΙΚΩΝ ΜΣΑΦ ΣΤΗΝ ΠΩΡΩΣΗ ΚΑΤΑΓΜΑΤΩΝ

Η επούλωση του κατάγματος αποτελεί διαδικασία που ρυθμίζεται από τοπικούς και μη τοπικούς παράγοντες. Περιλαμβάνει τα εξής στάδια: (α) δημιουργία θρόμβου και συσώρευση μακροφάγων (β) τα νεκρά άκρα του κατάγματος απορροφούνται από οστεοκλάστες και δημιουργία του κάλου εντός του αιματώματος και της ενδομελικής κοιλότητας (γ) σχηματισμός οστίτη ιστού δημιουργώντας γέφυρες μεταξύ των σχι-

σμών του κατάγματος, (δ) συμπλήρωση των γεφυρών (ε) τέλος, αναδιαμόρφωση του οστού και παρουσία της φυσιολογικής μικροαρχιτεκτονικής του οστού (Εικόνα 1) (3,4).

Η χρήση των κλασικών ΜΣΑΦ στην αντιμετώπιση του πόνου και της φλεγμονής σε κατάγματα, σε ολικές αποκαταστάσεις ισχύου χωρίς βιολογικό τσιμέντο, σε τραυματισμούς μαλακών μορίων και σπονδυλικής στήλης παραμένει θέμα αμφιλεγόμενο. Μελέτες δείχνουν πως οι ουσίες ινδομεθακίνη, ναπροξένη, δικλοφενάκη και κετορολάκη επιδρούν ανασταλτικά στον αναγεννητικό μηχανισμό του οστού. Επιβραδύνουν τη διαδικασία αποκατάστασης του οστού, αναστέλλουν την αναδιαμόρφωση του Χαβερσιανού δικτύου, με αποτέλεσμα να έχουμε μικρή εναπόθεση ανόργανων αλάτων (5). Τα ΜΣΑΦ και ιδιαίτερα η κετορολάκη αναστέλλει και καθυστερεί τη δημιουργία νέου οστού αυξάνοντας έτσι κατά 5 φορές την πιθανότητα εμφάνισης ψευδοάρθρωσης (5,6).

ΧΡΗΣΗ ΤΩΝ ΝΕΩΝ COX-2 ΑΝΑΣΤΟΛΕΩΝ ΣΤΗΝ ΠΩΡΩΣΗ ΚΑΤΑΓΜΑΤΩΝ

Μελέτες σε ζώα εργαστηρίου εμπλέκουν και τους νέους εκλεκτικούς αναστολείς της COX-2 (κοξίμπες) όπου φαίνεται να έχουν την ίδια ενέργεια στα οστά με τα κλασικά ΜΣΑΦ, τα οποία αναστέλλουν τη διαδικασία επούλωσης και δημιουργίας νέου οστού. Εν τούτοις δεν έχουν βρεθεί ακόμη επαρκή στοιχεία που να συσχετίζουν τη μη αναδιαμόρφωση του οστού και τη χρήση κοξίμπων σε κατάγματα (5,7). Οι αναστολείς της COX-2 συνταγογραφούνται από τους ειδικούς

για την αντιμετώπιση του πόνου μετά από κάκωση. Υπάρχουν μόνο ενδείξεις μέσω διαγονιδιακών μοντέλων ζώων εργαστηρίου (null COX-1, COX-2) και ελάχιστων αναδρομικών μελετών σε ασθενείς (retrospective studies) (8-10). Έτσι η χορήγηση των εκλεκτικών αναστολέων της COX-2 θα πρέπει να αποφεύγεται (5).

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Η χρήση των ΜΣΑΦ είναι αμφιλεγόμενη όσον αφορά το θέμα πώρωσης των καταγμάτων. Οι μελέτες που έχουν γίνει σε κλινικά περιστατικά είναι ελάχιστες και έχουν κυρίως το χαρακτήρα αναδρομικής μελέτης. Οι μελέτες σε ζώα εργαστηρίου υποδεικνύουν τη μη χορήγηση ΜΣΑΦ κατά την περίοδο επούλωσης των καταγμάτων. Περαιτέρω μελέτες θα διαλευκάνουν τους μοριακούς μηχανισμούς της ανασταλτικής δράσης των ΜΣΑΦ στην αναδιοργάνωση του οστού στα κατάγματα.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΠΑΡΑΠΟΜΠΕΣ

1. Brunton L., Lazo J., Parker K.: Analgesic-antipyretic and anti-inflammatory agents and drugs employed in the treatment of gout. In: Goodman and Gillman's: The Pharmacological Basis of Therapeutics. Chapter 27, McGraw-Hill, 2005
2. Katzung G.B. (ed.): Nonsteoidal anti-inflammatory drugs, disease-modifying antirheumatic drugs, nonopioid analgesics and drugs used in gout. Basic and Clinical Pharmacology. Chapter 36, Lange Medical Book, McGraw - Hill, 2004
3. Dandy J.D., Edwards J.D.: Essential Orthopaedics and Trauma. Churchill Livingstone, 2003
4. McRae R.: Pocketbook of Orthopaedics and Fractures. Churchill Livingstone, 2006
5. Seidenberg B.A, An H.Y.: Is there an inhibitory effect of COX-2 inhibitors on bone healing? *Pharmacol. Res.* 50: 151-156 (2004)
6. Nazon D., Abergel G., Hatem M.C.: Critical care in orthopedic and spine surgery. *Crit. Care Clin.* 19: 33-53 (2003)
7. Mullis H.B., Copland T.S., Weinhold S.P., Miclau T., Lester E.G., Bos D.G.: Effect of COX-2 inhibitors in non-steroidal anti-inflammatory drugs on a mouse fracture model. *Injury* 37: 827-837 (2006)

8. Simon A.M., Manigrasso M.B., O' Connor J.P.: Cyclooxygenase-2 function is essential for bone fracture healing. *J. Bone Miner. Res.* 17: 977-978 (2002)
9. Zhang X., Schwarz E.M., Young D.A., Puzas J.E., Roiser R.N., O'Keffe R.J.: Cyclooxygenase-2 regulates mesenchymal cell differentiation into the osteoblast lineage and is critically involved in bone repair. *J. Clin. Invest.* 109: 1405-1415 (2002)
10. Adohpson P., Abbaszadeghan H., Jonsson U., Dalen N., Sjoberg H.E., Kalen S.: No effects of piroxicam on osteopenia and recovery after Colles' fracture. *Arch. Orthop. Trauma Surg.* 112: 127-130 (1993)

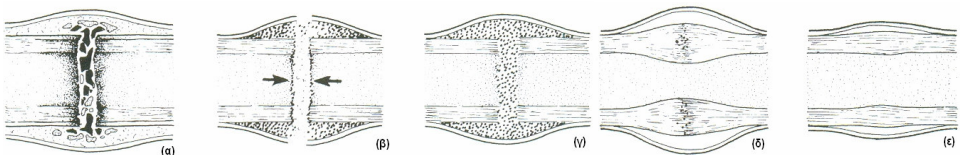
The Inhibitory Effect of Non-steroidal Anti-inflammatory Drugs in Fracture Healing

Ch. Dokos and M. Mironidou-Tzouveleki

Laboratory of Pharmacology, Medical School, Aristotle Univesity, Thessaloniki, Greece

Key words: Non-steroidal anti-inflammatory drugs, fracture healing

SUMMARY. Non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) are widely prescribed for their characteristic pharmacological properties: they are good analgesic, antipyretic and anti-inflammatory agents. NSAIDs are inhibitors of cyclo-oxygenase enzyme (COX-1, COX-2 isomorphs) that regulates the production of prostaglandins from arachidonic acid (phospholipid derivative). Fracture healing is a complex procedure that is induced by topical and non-topical factors regulated by signal transduction pathways. Classical NSAIDs like indomethacin, ketorolac, diclofenac reduce the production of new bone tissue in fractures. Experimental models indicate that there is poor mineralization of demineralized bone matrix grafts and Harvesian remodeling. New COX-2 selective inhibitors (coxibs) are still under research for their inhibitory effect in fracture healing. Seeking answers for the complex phenomenon of inhibition of bone healing, transgenic mice (null COX-1 and COX-2) are widely used so as to define the molecular and pharmacological basis. Although NSAIDs are prescribed for their analgesic and anti-inflammatory effects in fractures, it is best to avoid their use.



Εικόνα 1: Διαδικασία επούλωσης κατάγματος κατά διαδοχικά στάδια σχηματισμού νέου οστού

ΕΠΙΘΕΩΡΗΣΗ ΚΛΙΝΙΚΗΣ ΦΑΡΜΑΚΟΛΟΓΙΑΣ
ΚΑΙ ΦΑΡΜΑΚΟΚΙΝΗΤΙΚΗΣ 25: 40-41 (2007)
©ΦΑΡΜΑΚΟΝ-Τύπος

Ο Νέος Αντικαρκινικός Παράγοντας TRAIL (Tumour Necrosis Factor-Related Apoptosis-Inducing Ligand) Προκαλεί Επιλεκτική Απόπτωση σε Καρκινικά Κύτταρα του Παχέος Εντέρου

Κωνσταντίνος Δροσόπουλος, Ευτυχία Οικονόμου, Φαίη Ψαχούλια, Αγγελική Βούλγαρη, Βιβή Κοσμίδου, Ladislav Andera¹ και Αλέξανδρος Πίντζας (apint@eie.gr)

Εργαστήριο Γονιδιακής Ρύθμισης, Ινστιτούτο Βιολογικών Ερευνών και Βιοτεχνολογίας, Εθνικό Ίδρυμα Ερευνών, Βασ. Κων/νου 48, 11635 Αθήνα, Ελλάς; ¹Laboratory of Cell Signaling and Apoptosis, Institute of Molecular Genetics, Czech Academy of Sciences, Videnska 1083, CZ-14220 Prague, Czech Republic

ΕΙΣΑΓΩΓΗ - ΣΚΟΠΟΣ

Τα τελευταία χρόνια, μεγάλο μέρος της επιστημονικής κοινότητας έχει επικεντρωθεί στην εύρεση στοχευμένων αντικαρκινικών φαρμάκων. Η αποφυγή της απόπτωσης θεωρείται ως απαραίτητη προϋπόθεση για την καρκινική εξαλλαγή. Ο προσδιορισμός των μονοπατιών της απόπτωσης άνοιξε τον δρόμο για την ανάπτυξη παραγόντων που στοχεύουν είτε στην φαρμακευτική επαγωγή της απόπτωσης είτε στην αναστολή πρωτεϊνών που αποτρέπουν την αποπτωτική διαδικασία στα καρκινικά κύτταρα. Πολλοί από αυτούς τους παράγοντες βρίσκονται ήδη στα πρώτα στάδια κλινικών δοκιμών.

Τα πρωτο-ογκογονίδια *RAS* βρίσκονται συχνά μεταλλαγμένα σε διάφορους καρκίνους του ανθρώπου, ενώ συμμετέχουν και στη σηματοδότηση από υποδοχείς παραγόντων ανάπτυξης που επίσης παρουσιάζουν συχνά αλλαγές σε πολυούς τύπους καρκίνου.

Σε αυτήν την εργασία μελετήσαμε τους μηχανισμούς επαγωγής απόπτωσης από την TRAIL χρησιμοποιώντας ανθρώπινες κυτταρικές σειρές, προερχόμενες από το παχύ έντερο, οι οποίες αντιπροσωπεύουν τα διάφορα στάδια της καρκινογένεσης. Επιπλέον μελετήσαμε την επίδραση των ογκογονιδίων *RAS*, τα οποία παίζουν σημαντικό ρόλο στην καρκινική εξαλλαγή ενεργοποιώντας σειρά από μονοπάτια σηματοδότησης,

στην ανταποκρισιμότητα των κυττάρων στην TRAIL.

Η μελέτη μας έδειξε ότι η παρουσία των μεταλλαγμένων *RAS* ευαισθητοποιεί κύτταρα μέσου αδενώματος του παχέος εντέρου του ανθρώπου στην απόπτωση από την TRAIL. Συγκεκριμένα, η υπερέκφραση των ογκογονιδίων *Ki-RAS* και *Ha-RAS* προκάλεσε την αύξηση των υποδοχέων του TRAIL, DR4 και DR5, κατά τρόπο εξαρτώμενο από την κίνηση MEK.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Τα αποτελέσματα έδειξαν τα ακόλουθα. (α) Η TRAIL επάγει την απόπτωση μόνο στις κυτταρικές σειρές που προέρχονται από αδενοκαρκίνωμα (πιθανός ρόλος των επίπεδων των υποδοχέων της TRAIL). (β) Η TRAIL επάγει άμεση και συνεχή ενεργοποίηση των ERK1/2, κατά τρόπο εξαρτώμενο από την MEK, η οποία ακολουθείται από υψηλά επίπεδα mRNA του πρωτο-ογκογονιδίου *c-FOS* και των υποδοχέων DR4 και DR5. (γ) Η ενεργότητα των ERK1/2 ελέγχει την έκφραση των υποδοχέων DR4 και DR5. (δ) Επίδραση των ογκογονιδίων *RAS* στην ανταπόκριση των Caco2 στην TRAIL και στην έκφραση των υποδοχέων DR4 και DR5. (ε) Η υπερέκφραση των ογκογονιδίων *K-RAS* και *H-RAS* προκαλεί την υπερέκφραση των DR4 και DR5 σε επίπεδο mRNA και πρωτεΐνης

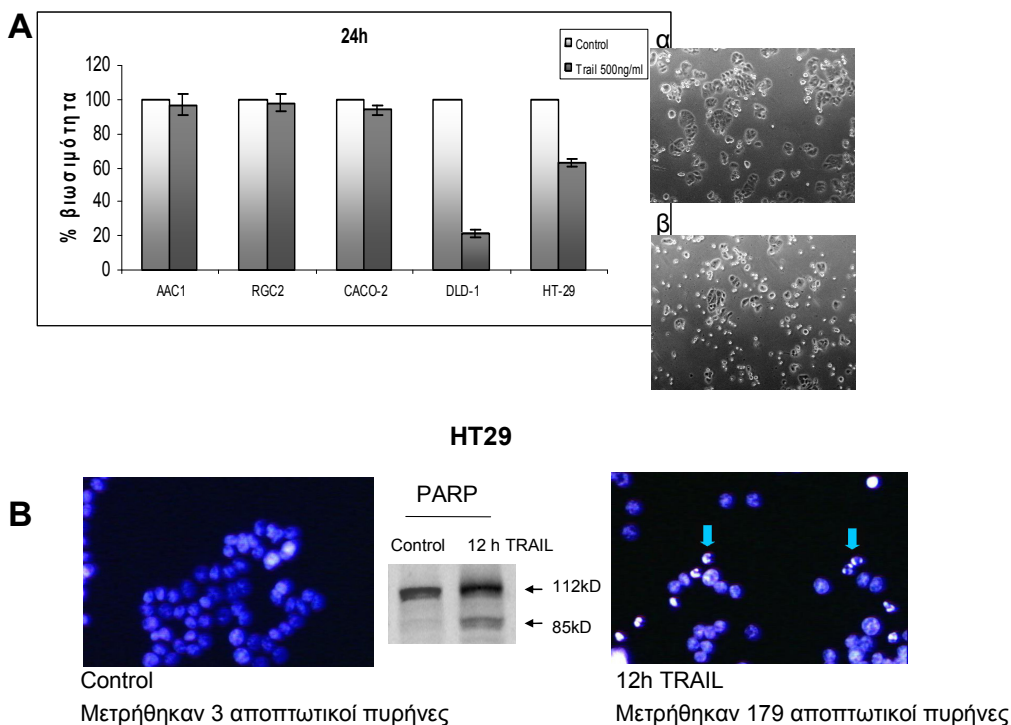
Ανάλυση γονιδιακών μικροσυστοιχιών και επικύρωση των αποτελεσμάτων

Με σκοπό να προσδιοριστούν τα γονίδια που επηρεάζονται ως αποτέλεσμα της υπερέκφρασης της K-RASV12 ή της H-RASV12 διεξάχθηκαν αναλύσεις γονιδιακών μικροσυστοιχιών (2). Χρησιμοποιήθηκαν δυο διαφορετικά συστήματα: το Clontech Atlas cancer cDNA (με 588 γονίδια) και το RZPD's Onco Set 1 (με 1544 γονίδια). Η ανάλυση γονιδιακών μικροσυστοιχιών έγινε τόσο στους κλώνους στην καλλιέργεια όσο και στους όγκους που προέκυψαν από των εμβολιασμό των κλώνων στα ποντίκια. Γενικά, τα γονίδια τα οποία βρέθηκαν να έχουν παρόμοια ρύθμιση και από τα δύο ογκογονίδια ήταν λιγότερα από εκείνα που βρέθηκαν να έχουν διαφορεική ρύθμιση, ενώ κάποιες διαφορές παρουσιάστηκαν ανάμεσα στους κλώνους στην καλλιέργεια και τους αντίστοιχους όγκους στα ποντίκια. Επισημαίνεται ότι η K-RASV12 βρέθηκε να ρυθμίζει γονίδια που έχουν κυρίως να κάνουν με σηματοδότηση από κυτοκίνες, με την κυτταρική προσκόλληση και την ανάπτυξη του επιθηλίου του παχέος εντέ-

ρου. Η H-RASV12 βρέθηκε να ρυθμίζει γονίδια που έχουν κυρίως να κάνουν με την μορφολογία των κυττάρων, με την μετάσταση και με γονίδια που εμπλέκονται στην μετάβαση από επιθηλιακό σε μεσεγχυματικό φαινότυπο. Αξιοσημείωτο είναι ότι και τα δυο ογκογονίδια βρέθηκαν να επάγουν την έκφραση γονιδίων που εμπλέκονται στην αγγειοποίηση και στην προώθηση του καρκίνου, όπως τα γονίδια για τον υποδοχέα του VEGF και του TGFβ.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΠΑΡΑΠΟΜΠΕΣ

1. Drosopoulos K., Roberts M., Cermak L., Sasazuki T., Shirasawa S., Andera L., Pintzas, A.: Oncogenic Ras transformation sensitizes human colon cancer cells to TRAIL induced apoptosis by upregulating DR4 and DR5 receptors through a MEK dependent pathway. *J. Biol. Chem.* 280: 22856-22867. (2005)
2. Roberts M., Drosopoulos K., Vasileiou I., Stricker M., Taoufik E., Maercker C., Guialis A., Alexis M., Pintzas A.: Microarray analysis of the differential transformation mediated by kirsten and harvey ras oncogenes in a human colon adenocarcinoma cell line. *Int. J. Cancer.* 118: 616-627 (2006)



ΕΠΙΘΕΩΡΗΣΗ ΚΛΙΝΙΚΗΣ ΦΑΡΜΑΚΟΛΟΓΙΑΣ
ΚΑΙ ΦΑΡΜΑΚΟΚΙΝΗΤΙΚΗΣ 25: 42-43 (2007)
©ΦΑΡΜΑΚΟΝ-Τύπος

Η Πρωτεϊνική Κινάση C και το Ras Ρυθμίζουν τη Γονιδιακή Έκφραση του Ντοπαμινεργικού Δείκτη TH και του Νοραδρενεργικού Δείκτη DBH

Σπύρος Θεοφιλόπουλος^{1,2}, Εμμανουέλλα Τσιριμονάκη¹, Νικόλαος Σακελλαρίδης² και Δήμητρα Μάγκουρα¹

¹ Κέντρο Νευροεπιστημών, Ίδρυμα Ιατροβιολογικών Ερευνών της Ακαδημίας Αθηνών, GR-11527, Αθήνα, Ελλάς. ² Εργαστήριο Φαρμακολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Λάρισα, Ελλάς

ΕΙΣΑΓΩΓΗ - ΣΚΟΠΟΣ

ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

Έχουμε αναπτύξει για πρώτη φορά σταθερές κυτταρικές σειρές από ανθρώπινα εμβρυϊκά κύτταρα από αμνιακό υγρό (AF) και έχουμε τεκμηριώσει ότι τα κύτταρα αυτά (AFCs) εκφράζουν πολλά από τα γονίδια που ορίζουν προγονικούς ντοπαμινεργικούς νευρώνες. Συνεπώς τα AFCs αποτελούν μοναδικό μοντέλο για τη μελέτη της ανάπτυξης του ντοπαμινεργικού νευρωνικού φαινότυπου. Το μεταγραφικό πρόγραμμα του ντοπαμινεργικού, αλλά και του συγγενούς του νοραδρενεργικού φαινότυπου είναι ρυθμιζόμενο με μεγάλη ακρίβεια κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης, από τη δράση αγωνιστών σε μεμβρανικούς υποδοχείς που ενεργοποιούν σηματοδοτικά μονοπάτια και τελικά τη μεταγραφή των απαραίτητων για τον κάθε φαινότυπο γονιδίων.

Η έκφραση του γονιδίου της υδροξυλάσης της τυροσίνης (TH), που είναι το περιοριστικό της αντίδρασης (rate-limiting) ένζυμο στη βιοσύνθεση της ντοπαμίνης, έχει δείχθει προηγούμενα σε κυτταρικές σειρές από νευροβλαστώματα ότι ρυθμίζεται από υποδοχείς που δρουν μέσω της πρωτεϊνικής κινάσης C (PKC) ή της σηματοδότησης μέσω Ras.

Προκειμένου, συνεπώς, να εξετάσουμε την υπόθεση αυτή αφ' ενός στο AFC προ-ντοπαμινεργικό μοντέλο και αφ' ετέρου παρακάμπτοντας τους περιορισμούς με τη χρήση αγωνιστών, τροποποιήσαμε φαρμακολογικά ή γενετικά το κάθε σηματοδοτικό μόριο PKC και Ras.

Συγκεκριμένα, μειώσαμε την έκφραση της κυρίαρχης ισομορφής PKC-α με μακροχρόνια (24 ώρες) έκθεση των κυττάρων στον εστέρα της φορβόλης TPA (12-O-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate), υπερεκφράσαμε το Ras με διαμόλυνση, ή μειώσαμε την ενεργοποίηση Ras υπερεκφράζοντας την GRDI περιοχή της πρωτεΐνης νευροινιδίνης, που είναι μια ισχυρή Ras GAP. Στη συνέχεια μελετήσαμε με τη μέθοδο ποσοτικής RT-PCR τα επίπεδα μεταγραφής της TH, του δείκτη του νοραδρενεργικού φαινότυπου DBH, μίας πρωτεΐνης που είναι μεταγραφικός κόμβος στη διαφοροποίηση σε ντοπαμινεργικό φαινότυπο, δηλαδή της Nurr1, της GRDI και II, του μεταφορέα μονοαμινών VMAT2 και των ειδικών νευρωνικών δεικτών Tau, β-τουμπουλίνης, Ptx3 και συνταξίνης.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ - ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Δείξαμε ότι η επίδραση με TPA προκάλεσε την αύξηση της μεταγραφής της TH και της Nurr1 σε ποσοστό μεγαλύτερο του 80%, ενώ το GRDI μείωσε σχεδόν όλη την έκφραση της TH. Επίσης, ενώ η υπερέκφραση του Ras δεν είχε κανένα αποτέλεσμα στην έκφραση του TH, προκάλεσε τη de novo έκφραση της DBH. Η έκφραση της VMAT2 αυξήθηκε με όλες τις μοριακές επεξεργασίες, ενώ έκφραση των Tau, β-τουμπουλίνης και συνταξίνης δεν άλλαξε σε καμία συνθήκη. Ενδιαφέρον είχε ότι έκθεση των κυττάρων σε

κυτοχλασίνη, που διαταράσσει μικρο-ινίδια ακτίνης, προκάλεσε σημαντική μείωση κατά 50% στην έκφραση των Nurr1 και Ptx3 σε σύγκριση με το δείγμα ελέγχου, αλλά προκάλεσε τετραπλάσια αύξηση στην έκφραση του VMAT2. Συνοπτικά, τα αποτελέσματά μας δείχνουν ότι η PKC και το Ras διαδραματίζουν σημαντικούς, αλλά διαφορετικούς ρόλους στη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης του ντοπαμινεργικού δείκτη TH και του νοραδρενεργικού δείκτη DBH κατά τη διάρκεια της νευρωνικής διαφοροποίησης.

PKC and Ras Differentially Regulate Gene Expression of the Dopaminergic Marker TH and Noradrenergic Marker DBH

Spyros Theofilopoulos^{1,2}, Emmanouella Tsimonaki¹, Nikolaos Sakellaridis² and Dimitra Mangoura¹

¹Center for Neurosciences, Foundation for Biomedical Research of the Academy of Athens, GR-11527 Athens, Greece; ²Department of Pharmacology, School of Medicine, University of Thessaly, Larissa, Greece

Key words: Protein kinase C, Ras, gene expression, dopaminergic marker TH, nor-adrenergic marker DBH

SUMMARY. We have successfully established for the first time in the literature cell lines from human fetal cells derived from the amniotic fluid (AF) and have documented that these cells may progress and stably express many of the same genes which define pro-

genitor dopaminergic neurons. AF cells (AFCs) may thus provide an excellent model for studying the development of dopaminergic neurons. The dopaminergic and noradrenergic transcriptional program is highly regulated during development and in the adult, in response to activation of membrane receptor signalling cascades. Gene expression of tyrosine hydroxylase (TH), the rate-limiting enzyme in dopamine synthesis, is known to be regulated by receptors that act through protein kinase C (PKC) or Ras signaling. Therefore, we pharmacologically or genetically manipulated each signalling molecule by downregulating PKC with long term (24 h) exposure of cells to the phorbol ester TPA (12-O-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate), by overexpressing Ras with transfection, or by downregulating activated Ras by overexpressing the GRDI domain of the neurofibromin protein, a potent Ras GAP. We found that treatment with TPA increased transcription of both TH and Nurr1 (a transcriptional 'hub' for the acquisition of a dopaminergic phenotype) by over 80%, whereas GRDI blocked almost all TH expression. Moreover, while Ras overexpression had no effect on these two genes, it induced the de novo expression of the noradrenergic phenotype marker DBH. Expression of VMAT2 increased with all molecular manipulations, while expression of several neuronal markers, namely Tau, b-tubulin, and syntaxin, was not affected by any condition. Interestingly, treatment of AFCs with cytochalasin, which disrupts microfilaments, caused a 50% decrease in Nurr1 transcript compared to control, a 4-fold increase in VMAT2 message, and a 40% decrease in Ptx3 message. Taken together, these studies suggest that PKC and Ras have important yet differential roles in regulating gene expression of the dopaminergic marker TH and noradrenergic marker DBH during neuronal progression.

ΕΠΙΘΕΩΡΗΣΗ ΚΛΙΝΙΚΗΣ ΦΑΡΜΑΚΟΛΟΓΙΑΣ
ΚΑΙ ΦΑΡΜΑΚΟΚΙΝΗΤΙΚΗΣ 25: 44-45 (2007)
©ΦΑΡΜΑΚΟΝ-Τύπος

Φαρμακολογικός και Συμπεριφερικός Χαρακτηρισμός Νέων Αναλόγων για τους CB1 και CB2 Υποδοχείς των Κανναβινοειδών

Κυριακή Θερμού¹, Νίκη Μαστροδήμου¹, Μαρία Παπάζογλου¹, Κατερίνα Αντωνίου², Γιώργος Παναγιής³, Στέλλα Βλαχού³, Βικτώρια Ναχμιάς⁴, Αριστοτέλης Μεννισίου⁴, Μαρία Γιάννη⁴, Μιχάλης Π. Κονδύλης⁵, Δημήτρης Παπαχατζής⁴ και Χριστίνα Σπυράκη^{†6}

¹Εργαστήριο Φαρμακολογίας, Τομέας Βασικών Επιστημών, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Κρήτης, Ηράκλειο, Ελλάδα. ²Εργαστήριο Φαρμακολογίας, Ιατρική Σχολή, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων, Ιωάννινα, Ελλάδα. ³Τμήμα Ψυχολογίας, Πανεπιστήμιο Κρήτης, Ρέθυμνο, Ελλάδα. ⁴Ινστιτούτο Οργανικής Χημείας, Εθνικό Ίδρυμα Ερευνών, Αθήνα, Ελλάδα. ⁵Bristol-Myers Squibb, ⁶Εργαστήριο Φαρμακολογίας, Ιατρική Σχολή, Πανεπιστημίου Αθηνών, Αθήνα, Ελλάδα

ΣΚΟΠΟΣ

Σκοπός της εργασίας αυτής ήταν η σύνθεση νέων αναλόγων της τετραυδροκανναβινόλης με υψηλή συγγένεια και εκλεκτικότητα για τους CB₁ και CB₂ υποδοχείς, χωρίς εξαρτησιογόνο δυναμικό.

ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

Πραγματοποιήθηκε η σύνθεση νέων αναλόγων της τετραυδροκανναβινόλης και προσδιορίστηκε η συγγένεια και η αποτελεσματικότητά τους προς τους υποδοχείς CB₁ και CB₂ των κανναβινοειδών. Πραγματοποιήθηκαν μελέτες δέσμευσης σε μεμβράνες φλοιού και hCB₂ κυττάρων χρησιμοποιώντας το ραδιενεργό [³H]CP 55,940, ενώ, για τα πειράματα της αποτελεσματικότητας, χρησιμοποιήθηκε το ραδιενεργό [³⁵S]GTPγS και μεμβράνες από κύτταρα Sf9 CB₁ και Sf9 CB₂. Επιπρόσθετα έγιναν πειράματα συμπεριφοράς με σκοπό να εξετάσουμε τις πιθανές ενισχυτικές δράσεις ενός αναλόγου, του DPG-4, στο πρότυπο ενδοκρανιακού αυτοερεθισμού και τις δράσεις του στην αυθόρμητη κινητική δραστηριότητα.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Μελετήθηκαν δώδεκα νέα ανάλογα τα οποία παρουσίασαν χαμηλή, ενδιάμεση και υψηλή συγγένεια και αποτελεσματικότητα για τους υποδοχείς CB₁/CB₂. Το ανάλογο DPG-4 το οποίο παρουσίασε υψηλή συγγένεια [K_i (nM) 0.26 CB₁; 0.12 CB₂] μελετήθηκε περαιτέρω για την αποτελεσματικότητά του και τις συμπεριφορικές του δράσεις. Το DPG-4 αύξησε την βασική δέσμευση της [³⁵S]GTPγS σε μεμβράνες από Sf9 CB₁ και Sf9 CB₂ κύτταρα [EC₅₀ 3.3x10⁻⁶M και 2.0x10⁻⁴M, Emax 209 and 194%, αντίστοιχα], σε συμφωνία με τις τιμές για τον CB₁/CB₂ αγωνιστή WIN 55,212-2.

Το DPG-4 προκάλεσε μείωση στην αυθόρμητη κινητική δραστηριότητα, ενώ δεν αύξησε την αποτελεσματικότητά της ενίσχυσης του εγκεφαλικού ερεθισμού. Οι συμπεριφορικές δράσεις του DPG-4 προσομοιάζουν τις αντίστοιχες μετά από τη χορήγηση WIN-55212,2.

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Οι φαρμακολογικές μελέτες υποστηρίζουν τη σύνθεση νέων αναλόγων των κανναβινοειδών με υψηλή συγγένεια και εκλεκτικότητα για τους υπο-

δοχείς CB₁/CB₂. Οι φαρμακολογικές και συμπεριφορικές μελέτες υποδεικνύουν ότι το DPG-4 δρα ως αγωνιστής των CB₁ υποδοχέων, πιθανότατα χωρίς να έχει εξαρτησιογόνο δυναμικό. Μελέτες σε εξέλιξη, στις οποίες συμπεριλαμβάνονται και συγκριτικές μελέτες νέων αναλόγων των κανναβινοειδών, θα βοηθήσουν στη διαλεύκανση των σχέσεων δομής-δράσης που μπορεί να οδηγήσει στην ανάπτυξη φαρμάκων με καινοτόμες φαρμακολογικές ιδιότητες.

Pharmacological and Behavioral Characterization of Novel Ligands for CB₁ and CB₂ Cannabinoid Receptors

K. Thermos¹, N. Mastrodimou¹, M. Papazoglou¹, K. Antoniou², G. Panagis³, S. Vlachou³, V. Nahmias⁴, A. Menissiou⁴, M. Gianni⁴, M.P. Kondylis⁵, D. Papahatjis⁴ and C. Spyrali^{6†}

¹Laboratory of Pharmacology, Department of Basic Sciences, Faculty of Medicine, University of Crete, Heraklion, Crete, Greece; ²Laboratory of Pharmacology, School of Medicine, University of Ioannina, Ioannina, Greece; ³Department of Psychology, University of Crete, Rethimno, Crete, Greece; ⁴Institute of Organic Pharmaceutical Chemistry, National Hellenic Research Foundation (NHRF), Athens, Greece; ⁵Bristol-Myers Squibb; ⁶Laboratory of Pharmacology,

School of Medicine, University of Athens, Athens, Greece

Key words: Cannabinoid receptors, novel ligands, behavior

SUMMARY. Derivatives of tetrahydrocannabinol were synthesized and evaluated for CB₁/CB₂ receptor affinity and activity. Radioligand binding studies were performed using cortical membranes (CB₁ receptors), hCB₂ cell membranes and [³H]CP 55,940 as the radioligand. [³⁵S]GTPγS binding assays assessed the activity of the ligands in Sf9 CB₁ and Sf9 CB₂ cell membranes. Twelve new agents (DPGs) were tested and selectivity, for both CB₁ and CB₂ receptors with high, intermediate and low affinities and activities, was established. DPG-4 that displayed high affinity for CB₁/CB₂ receptors [K_i (nM) 0.26 CB₁; 0.12 CB₂] was chosen for further activity studies. DPG4 increased basal [³⁵S]GTPγS binding in Sf9 CB₁ and Sf9 CB₂ cell membranes [EC₅₀ 3.3x10⁻⁶M and 2.0x10⁻⁴M, Emax 209 and 194 %, respectively], similar to the values found for WIN 55,212-2. Behavioral experiments, such as assessment of spontaneous locomotion and self-stimulation paradigm were conducted. DPG-4 suppressed spontaneous motor activity in an open field chamber, while it did not potentiate the rewarding efficacy of intracranial self-stimulation. This behavioural profile was comparable to that observed following WIN-55212,2 administration. The pharmacological and behavioural studies support that DPG-4 acts as an agonist for the CB₁ receptor, possibly without any abuse potential. Further studies, including comparisons between the new cannabinoid analogues are under way, in order to establish structure-activity relationships that might be useful in developing drugs with promising pharmacological properties. [Supported by a GSRT-EU grant YB60]

ΕΠΙΘΕΩΡΗΣΗ ΚΛΙΝΙΚΗΣ ΦΑΡΜΑΚΟΛΟΓΙΑΣ
ΚΑΙ ΦΑΡΜΑΚΟΚΙΝΗΤΙΚΗΣ 25: 46-48 (2007)
©ΦΑΡΜΑΚΟΝ-Τύπος

Συγκριτική Μελέτη της Συχνότητας του Πολυμορφισμού -759C/T του 5-HT2C Υποδοχέα σε Υγιείς Εθελοντές, σε Ασθενείς με Σακχαρώδη Διαβήτη Τύπου 2 και σε Ασθενείς με Στεφανιαία Νόσο στον Ελληνικό Πληθυσμό

Μαρία Ιορδανίδου¹, Ιωάννης Πετρίδης¹, Μιχαήλ Β. Βασιλειάδης², Κώστας Αρβανιτίδης¹, Γεώργιος Μπουγιούκας³, Άννα Ταυρίδου¹ και Ευάγγελος Γ. Μανωλόπουλος¹

¹Εργαστήριο Φαρμακολογίας, Ιατρική Σχολή, Δημοκρίτειο Πανεπιστήμιο Θράκης, Αλεξανδρούπολη, Ελλάς, ²Διαβητολογικό Ιατρείο Κρατικής Παθολογικής Κλινικής και ³Πανεπιστημιακή Καρδιοθωρακοχειρουργική Κλινική Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Αλεξανδρούπολης, Αλεξανδρούπολη, Ελλάς

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η σεροτονίνη (5-υδροξυτρυπταμίνη, 5-HT) είναι νευροδιαβιβαστής που δρα μέσω σύνδεσης με G-πρωτεΐνη. Ο υποδοχέας 5-HT_{2C} είναι ένα από τα δεκατέσσερα είδη υποδοχέων σεροτονίνης και εκφράζεται στο Κεντρικό Νευρικό Σύστημα. Το γονίδιο του 5-HT_{2C} υποδοχέα εντοπίζεται στο Χ φυλετικό χρωμόσωμα (Χq24) και η πρωτεΐνη που κωδικοποιεί αποτελείται από 460 αμινοξέα. Τόσο φαρμακολογικές όσο και γενετικές προσεγγίσεις της ανάλυσης της λειτουργίας του 5-HT_{2C} υποδοχέα αποκαλύπτουν ότι συμβάλλει σημαντικά στη σεροτονινεργική ρύθμιση πολλών διαδικασιών συμπεριφοράς και φυσιολογίας, όπως είναι η ρύθμιση της όρεξης (ευαισθησία στην παχυσαρκία και αυξημένος δείκτης μάζας σώματος), η ομοιοστασία της γλυκόζης και η ενεργειακή αποδοτικότητα της σωματικής δραστηριότητας (1). Η άποψη ότι η σεροτονίνη εμπλέκεται στη ρύθμιση της όρεξης ενισχύεται από το γεγονός ότι αγωνιστές του υποδοχέα 5-HT_{2C} προκαλούν απώλεια βάρους (2).

Ο -759C/T είναι σημειακός νουκλεοτιδικός πολυμορφισμός που προκύπτει από την αντικατάσταση της κυτοσίνης (C) από θυμιδίνη (T) στη θέση -759 στην 5' αμετάφραστη περιοχή. Αυτή

η περιοχή του πολυμορφισμού περιέχει ρυθμιστικές και μεταγραφικές περιοχές (3), οι οποίες μπορούν να καταλήξουν σε τροποποιήσεις στην έκφραση του γονιδίου. Ο πολυμορφισμός αυτός έχει μελετηθεί εκτεταμένα σε σχέση με την αύξηση του βάρους σε ψυχωσικούς ασθενείς μετά από θεραπεία με αντιψυχωσικά φάρμακα (4). Συγκεκριμένα, παρατηρήθηκε αυξημένη συχνότητα του T αλληλομόρφου σε ασθενείς με σχιζοφρένεια που λάμβαναν χλωροπρομαζίνη, ρισπεριδόνη, κλοζαπίνη (5) και ολανζαπίνη (6) και δεν παρουσίασαν σημαντική αύξηση του βάρους τους (>7%) σε σχέση με το αρχικό και προτάθηκε ότι το C αλληλόμορφο σχετίζεται με την αύξηση του βάρους και του BMI σε αυτούς τους ασθενείς (7,8).

Πολύ ολίγα δεδομένα υπάρχουν για τη σχέση του -759C/T πολυμορφισμού με την παχυσαρκία, το διαβήτη και τις καρδιαγγειακές νόσους σε μη ψυχωσικά άτομα. Το αλληλόμορφο C βρέθηκε ότι είναι συχνότερο σε παχύσαρκα άτομα (9), καθώς και σε άτομα με σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2 (ΣΔ2) (10,11). Η συχνότητα του T αλληλομόρφου ήταν μεγαλύτερη σε άτομα με φυσιολογικό βάρος σώματος, κάτι που προτείνει την προστατευτική επίδραση αυτού του πολυμορ-

φισμού από την παχυσαρκία και κατά συνέπεια τον ΣΔ2 και τη στεφανιαία νόσο (ΣΝ).

Ο σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η εύρεση της συχνότητας εμφάνισης του πολυμορφισμού -759C/T του 5-HT2C υποδοχέα σε υγιείς, σε ασθενείς σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2 και σε ασθενείς με στεφανιαία νόσο στην Ελλάδα.

ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

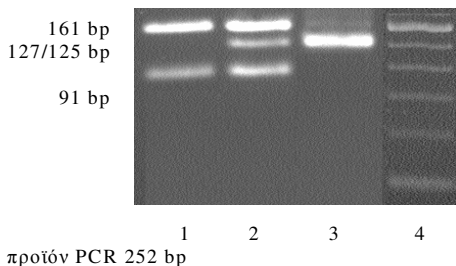
Στη μελέτη συμμετείχαν 150 άτομα ελληνικής καταγωγής, από τους οποίους οι 50 ήταν υγιείς εθελοντές, οι 50 είχαν σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2 (ΣΔ2) και οι 50 ήταν ασθενείς με στεφανιαία νόσο. Όλοι οι συμμετέχοντες ενημερώθηκαν για τη μελέτη και έδωσαν τη γραπτή συγκατάθεση τους. Η πειραματική διαδικασία περιλάμβανε την απομόνωση γενωμικού DNA από περιφερικό αίμα και έπειτα την τυποποίηση του πολυμορφισμού -759C/T του 5-HT2C υποδοχέα με τη μέθοδο PCR-RFLP.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ – ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον Πίνακα 1. Η συχνότητα του T αλληλομόρφου στο γενικό πληθυσμό (19,2%) συμφωνεί με την αντίστοιχη του Ευρωπαϊκού πληθυσμού (17,4%) και στους ασθενείς με ΣΔ2 και στους ασθενείς με στεφανιαία νόσο είναι 8,5% και 17,7% αντίστοιχα. Η μικρότερη συχνότητα του T αλληλομόρφου στους ασθενείς με ΣΔ2 προτείνει την πιθανή συσχέτιση αυτού του αλληλομόρφου με την προστασία από εκδήλωση ΣΔ2. Η προστατευτική επίδραση του T αλληλομόρφου ίσως συσχετίζεται με τα μεγαλύτερα μεταγραφικά επίπεδα αυτού του γονιδίου, το οποίο συμβάλλει εν μέρει στη ρύθμιση της όρεξης, καταλήγοντας σε μεγαλύτερη αντοχή στην παχυσαρκία. Ωστόσο, στους ασθενείς με στεφανιαία νόσο δεν παρατηρήθηκε κάποια διαφορά στη συχνότητα εμφάνισης του πολυμορφισμού συγκριτικά με το γενικό πληθυσμό. Η μελέτη βρίσκεται σε εξέλιξη με την προσθήκη περισσότερων ατόμων στις υπό μελέτη ομάδες.

Πίνακας 1

Πληθυσμός	Υγιείς		ΣΔ2		ΣΝ	
	Ανδρες	Γυναίκες	Ανδρες	Γυναίκες	Ανδρες	Γυναίκες
CC/C	82,3%	66,6%	88,8%	87,5%	81,6%	66,7%
CT	-	27,3%	-	9,4%	-	33,3%
TT/T	17,7%	6,1%	11,2%	3,1%	18,4%	-



Σχήμα 1. Aci I PCR-RFLP ανάλυση του πολυμορφισμού -759C/T του 5-HT2C σε πεηκτή αραρόζης 2% με Aci I. 1: TT / T homozygous (161bp – 91bp), 2: CT heterozygous (161bp – 127bp – 92bp), 3: CC / C wild-type (127bp), 4: 25bp ladder

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΠΑΡΑΠΟΜΠΕΣ

- Giorgetti M., Tecott L.H.: Contributions of 5-HT(2C) receptors to multiple actions of central serotonin systems. *Eur. J. Pharmacol.* 488(1-3): 1-9 (2004)
- Smith B.M., Thomsen W.J., Grottick A.J.: The potential use of selective 5-HT2C agonists in treating obesity. *Expert. Opin. Investig. Drugs.* 15: 257-266 (2006)
- Shih J.C., Zhu Q., Chen K.: 1996. Determination of transcription initiation sites and promoter activity of the human 5-HT2A receptor gene. *Behav. Brain Res.* 73: 59-62 (1996)
- Reynolds G.P., Hill M.J., Kirk S.L.: The 5-HT2C receptor and antipsychotic-induced weight gain – mechanisms and genetics. *J. Psychopharmacol.* 20: 15-17 (2006)
- Miller D.D., Ellingrod V.L., Holman T.L., Buckley P.F., Arndt S.: Clozapine-induced weight gain associated with the 5HT2C receptor -759C/T polymorphism. *Am. J. Med. Genet. Part B (Neuropsych. Genet.)* 133B: 97-100 (2005)
- Ellingrod V.L., Perry P.J., Ringold J.C., Lund B.C., Bever-Stille K., Fleming F., Holman T.L., Miller D.: Weight gain associated with the -759C/T polymorphism of the 5HT2C receptor and olanzapine. *Am. J. Med. Genet. Part B (Neuropsych. Genet.)* 134: 76-78 (2005)
- Reynolds G.P., Zhang A.J., Zhang X.B.: Association of antipsychotic drug-induced weight gain with a 5-HT2C receptor gene polymorphism. *Lancet* 359: 2086-2087 (2002)
- Reynolds G.P., Zhang Z., Zhang X.: Polymorphism of the promoter region of the serotonin 5-HT2C receptor gene and clozapine-induced weight gain. *Am. J. Psychiatry* 160: 677-679 (2003)
- Pooley E.C., Fairburn C.G., Cooper Z., Sodhi M.S., Cowen P.J., Harrison P.J.: A 5-HT2C receptor promoter polymorphism (HTR2C - 759C/T) is associated with obesity in women, and with resistance to weight loss in heterozygotes. *Am. J. Med. Genet. B Neuropsychiatr. Genet.* 126: 124-127 (2004)
- Yuan X., Yamada K., Ishiyama-Shigemoto S., Koyama Q., Nonaka K.: Identification of polymorphic loci in the promoter region of the serotonin 5-HT2C receptor gene and their association with obesity and type II diabetes. *Diabetologia* 43: 373-376 (2000)
- Ellingrod V.L., Miller D., Ringold J.C., Perry P.J.: 2004. Distribution of the serotonin 2C (5HT2C) receptor gene -759C/T polymorphism in patients with schizophrenia and normal controls. *Psychiatr. Genet.* 14: 93-95 (2004)

Comparative Study of Frequency of the Polymorphism -759 C/T of the 5-HT_{2C} Receptor in Healthy Volunteers, in Patients with Type II Diabetes Mellitus and in Patients with Coronary Artery Disease in the Greek Population

Maria Iordanidou¹, John Petridis¹, Kostas Vassiliadis², Kostas Arvanitidis¹, George Bougioukas³, Anna Tauridou¹ and Vangelis G. Manolopoulos¹

¹Laboratory of Pharmacology, Medical School, Democritus University of Thrace, Alexandroupolis, Greece; ²Outpatient Diabetic Medical Clinic and ³Cardiothoracic Surgery Clinic, Academic General Hospital of Alexandroupolis, Alexandroupolis, Greece

Key words: 5-HT_{2C} receptor gene polymorphism, type II diabetes mellitus, coronary artery disease, Greek population

Introduction: 5-HT_{2C} receptor is one of fourteen 5-HT receptor subtypes expressed in the CNS and its gene is located in the X-chromosome (Xq24). Both pharmacological and genetic studies reveal that it contributes substantially to the serotonergic regulation of a wide

variety of behavioral and physiological processes such as feeding and glucose homeostasis. The polymorphism -759C/T in the serotonin 2C (5HT_{2C}) receptor promoter region has been associated with the development of type II diabetes mellitus and obesity in normal subjects, with the frequency of the T allele being higher in subjects without diabetes mellitus and obesity. Furthermore, the 5-HT_{2C}-receptor gene -759C/T polymorphism has been associated with antipsychotic agents-induced weight gain. The T allele may be a protective factor for the development of weight gain in schizophrenic patients.

Objective: To determine the distribution of the -759C/T polymorphism of the 5HT_{2C} receptor among normal controls, in patients with type II diabetes mellitus and in patients with coronary artery disease in the Greek population.

Methods: In this study participated 50 healthy volunteers, 50 patients with type II diabetes mellitus and 50 with coronary artery disease. The experimental process included the extraction of genomic DNA from peripheral blood and then its analysis for the -759C/T polymorphism of the 5-HT_{2C} receptor using PCR-RFLP method.

Results - Discussion: In the group of healthy volunteers the frequency of T-allele in normal controls (19.2%) is in accordance to that reported in European populations and in patients with type II diabetes mellitus and in patients with coronary artery disease is 8.5% and 17.7%, respectively.

Αναγέννηση του Μυός μετά από Επίδραση Τοπικού Αναισθητικού. Μορφομετρική Ανάλυση

Δ. Καπουκρανίδου¹, Ι. Καλπιδης¹, Α. Αμανίτη², Δ. Κούβελας³, Δ. Βασιλάκος² και Μ. Αλμπάνη¹

¹Εργαστήριο Πειραματικής Φυσιολογίας, ²Κλινική Αναισθησιολογίας, ³Εργαστήριο Πειραματικής Φαρμακολογίας, Ιατρική Σχολή, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο, Θεσσαλονίκη, Ελλάδα

ΓΕΝΙΚΑ - ΣΚΟΠΟΣ

Η μυοτοξική δράση των τοπικών αναισθητικών είναι γνωστή από καιρό τόσο σε πειραματόζωα όσο και στον άνθρωπο. Όλα τα τοπικά αναισθητικά, που έχουν μελετηθεί ως σήμερα, προκαλούν κυτταροτοξική βλάβη μετά από άμεση εφαρμογή τους στο μυϊκό ιστό, η δε δράση τους αυτή έχει αποδοθεί στη διαταραχή της διακίνησης του ενδοκυττάριου ασβεστίου (1). Αν και η βλάβη θεωρείται συνήθως αναστρέψιμη, αναφέρονται στη βιβλιογραφία περιστατικά, όπου η εφαρμογή τοπικών αναισθητικών οδηγεί σε μακροχρόνιες αλλοιώσεις (2). Στην παρούσα εργασία έγινε μορφομετρική ανάλυση μυών επιμύων, στους οποίους είχε προηγουμένα εφαρμοσθεί τοπικό αναισθητικό, ώστε να διερευνηθούν μεταβολές του μεγέθους και του ποσοστού των τύπων των μυϊκών ινών, στη φάση όπου θεωρείται ότι έχει ολοκληρωθεί η αναγέννηση τους.

ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

Εξετάσθηκαν 10 άρρενες επίμυες βάρους 163-191 g της φυλής Wistar. Οι επίμυες διαβίωναν σε ειδικά διαμορφωμένους χώρους σταθερής θερμοκρασίας 21 °C, με 12ωρη εναλλαγή φωτός/σκότους και ελεύθερη πρόσβαση σε τροφή και νερό. Μετά από αναισθησία με ένυδρο χλωράλη (4% w/v, I.P.), οι επίμυες χωρίστηκαν σε δύο ομάδες των πέντε ατόμων και υποβλήθηκαν σε ενδομυϊκή έγχυση τοπικού αναισθητικού. Τα τοπικά αναισθητικά ήταν τα ακόλουθα. Στην πρώτη ομάδα έγινε έγχυση 100 μl ροπιβακαΐνης 0,750%

w/v (ομάδα R075) και στη δεύτερη ομάδα έγινε έγχυση 100 μl ροπιβακαΐνης 0,375% w/v (ομάδα R0375). Σε όλες τις περιπτώσεις η έγχυση έγινε κατά μήκος του επιμήκους άξονα του προσθίου κνημιαίου μυός του αριστερού άκρου με τη χρήση βελόνης 27G. Ο πρόσθιος κνημιαίος μυς του άκρου που δεν υποβλήθηκε σε διήθηση χρησιμοποιήθηκε ως μυς αναφοράς (ομάδα control). Τέσσερις εβδομάδες μετά τη διήθηση οι επίμυες θυσιάστηκαν, οι μύες παρασκευάστηκαν, καταψύχθηκαν στους -70 °C, κόπηκαν με τη χρήση ψυκτικού μικροτόμου σε τομές πάχους 10 μm κατά τον εγκάρσιο άξονα και τέλος χρώσθηκαν με όξινη ΑΤΡάση. Στη συνέχεια τα μορφομετρικά χαρακτηριστικά εκτιμήθηκαν με τη χρήση οπτικού μικροσκοπίου με ενσωματωμένη ψηφιακή κάμερα μέσω της οποίας η εικόνα μεταφερόταν στο υπολογιστικό σύστημα KS 300 imaging system release 3.0. Η λήψη των μορφομετρικών χαρακτηριστικών έγινε μέσω ειδικού προγράμματος βάσει του λογισμικού του συστήματος ανάλυσης εικόνας. Για κάθε μία από τις ομάδες έγινε τυχαία επιλογή δέκα οπτικών πεδίων που αντιστοιχούσαν στο μέσο των εγκαρσίων τομών της γαστέρας. Στα δέκα οπτικά πεδία εκτιμήθηκαν τα μορφομετρικά χαρακτηριστικά περιμέτρου και επιφάνεια για κάθε τύπο μυϊκών ινών (Τύπος I, Τύπος IIa, Τύπος IIb), κατά τον εγκάρσιο άξονα. Οι διαφορές μεταξύ των ομάδων εκτιμήθηκαν με χρήση της δοκιμασίας t-test για ανεξάρτητα ζεύγη τιμών, ενώ το επίπεδο της στατιστικής σημαντικότητας ορίστηκε στο $p < 0,05$.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Οι ομάδες που μελετήθηκαν ήταν συγκρίσιμες ως προς την ηλικία και το βάρος των επίμυων. Στον Πίνακα 1 παρουσιάζονται οι μέσες τιμές και οι τυπικές αποκλίσεις της επιφάνειας των μυϊκών ινών των τριών προς εξέταση ομάδων.

Πίνακας 1
Επιφάνεια μυϊκών ινών ανά τύπο και ομάδα

Ομάδα	Επιφάνεια μm^2 (Μ.Ο. \pm Τ.Α.)		
	Ίνες τύπου I	Ίνες τύπου IIa	Ίνες τύπου IIb
R075	895,76 \pm 238,66	905,43 \pm 229,20	1470,10 \pm 491,22
R0375	837,41 \pm 192,64	887,00 \pm 206,85	1377,82 \pm 432,92
Control	575,58 \pm 158,89	814,67 \pm 210,41	1317,66 \pm 451,10

Η στατιστική ανάλυση έδειξε σημαντικά μεγαλύτερες τιμές επιφάνειας των μυϊκών ινών τύπου I για τις ομάδες R075 και R0375 σε σχέση με την ομάδα control ($p=0,00$ και στις δύο περιπτώσεις) καθώς και σημαντικά μεγαλύτερες τιμές για τις ίνες τύπου I της ομάδας R075 σε σχέση με την ομάδα R0375 ($p=0,044$). Όσον αφορά στις ίνες τύπου IIa, η ανάλυση έδειξε σημαντικά μεγαλύτερη επιφάνεια για τις ομάδες R075 και R0375 σε σχέση με την ομάδα control ($p=0,00$ και στις δύο περιπτώσεις). Αντιθέτως, η σύγκριση μεταξύ των τιμών επιφάνειας των ομάδων R075 και R0375 δεν έδειξε στατιστικώς σημαντικές διαφορές ως προς τις ίνες IIa ($p=0,344$). Τέλος, η σύγκριση των επιφανειών των ινών IIb μεταξύ των ομάδων έδειξε στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των ομάδων R075-control, R0375-control καθώς και R075- R0375 ($p=0,00$, $p=0,014$ και $p=0,01$, αντιστοίχως). Στον Πίνακα 2 παρουσιάζονται οι μέσες τιμές και οι τυπικές αποκλίσεις των περιμέτρων των τύπων μυϊκών ινών των ομάδων μελέτης.

Πίνακας 2:
Περίμετρος μυϊκών ινών ανά τύπο και ομάδα

Περίμετρος μm (Μ.Ο. \pm Τ.Α.)

Ομάδα	Ίνες τύπου I	Ίνες τύπου IIa	Ίνες τύπου IIb
R075	120,42 \pm 17,33	120,65 \pm 15,56	156,95 \pm 26,70
R0375	118,55 \pm 14,60	121,89 \pm 15,44	155,23 \pm 26,90
Control	96,56 \pm 13,97	116,00 \pm 15,95	149,95 \pm 27,90

Η στατιστική ανάλυση για τις ίνες τύπου I έδειξε στατιστικώς σημαντικές διαφορές μεταξύ των περιμέτρων των ομάδων R075-control ($p=0,00$),

R0375-control ($p=0,00$), όχι όμως μεταξύ των ομάδων R075-R0375 ($p=0,104$). Όσον αφορά τη μελέτη της περιμέτρου των ινών IIa, ομοίως δεν καταγράφηκαν στατιστικώς σημαντικές διαφορές μεταξύ των ομάδων R075-R0375 ($p=0,375$) ενώ η σύγκριση των ομάδων R075 και R0375 με την ομάδα control κατέδειξε σημαντικές διαφορές ($p=0,02$ και $p=0,00$, αντιστοίχως). Τέλος, η μελέτη των ινών IIb οδήγησε στην καταγραφή σημαντικών διαφορών μεταξύ των ομάδων R075-control ($p=0,00$), R0375-control ($p=0,00$), όχι όμως και των ομάδων R075-R0375 ($p=0,261$).

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η εφαρμογή της μορφομετρικής ανάλυσης καθιστά δυνατή τη μέτρηση μεταβολών των μυϊκών ινών. Συγκεκριμένα, η σύγκριση των ομάδων R075 και R0375 με την ομάδα control κατέδειξε σε όλες τις περιπτώσεις μεγαλύτερες τιμές επιφάνειας και περιμέτρου όλων των τύπων μυϊκών ινών σε σχέση με την ομάδα control. Φαίνεται ότι η εφαρμογή των τοπικών αναισθητικών οδηγεί σε μεταβολές του μεγέθους των μυϊκών ινών μετά πάροδο τεσσάρων εβδομάδων από τη διήθηση, στη χρονική δηλαδή περίοδο όπου η αναγέννηση του μυός θεωρείται ότι έχει ολοκληρωθεί και ο μυς θεωρείται πλέον ότι έχει φυσιολογική δομή (3). Ωστόσο δεν είναι γνωστό αν οι μεταβολές που ανιχνεύονται σε αυτή τη φάση αποτελούν απλώς ένα στάδιο της αναγέννησης του μυός ή πρόκειται για μονιμότερες μεταβολές που επάγονται από την επίδραση του τοπικού αναισθητικού. Περαιτέρω μελέτες είναι απαραίτητες προκειμένου να παρατηρηθεί η πορεία της αναγέννησης του διηθημένου με τοπικά αναισθητικά μύος σε απώτερο χρόνο. Ταυτόχρονα απαιτούνται περαιτέρω μελέτες προκειμένου να διερευνηθεί το κατά πόσο οι παρατηρηθείσες μικροσκοπικές μεταβολές επηρεάζουν την λειτουργικότητα του μυός.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΠΑΡΑΠΟΜΠΕΣ

1. Zink W., Graf BM.: Local anesthetic myotoxicity. *Reg. Anesth. Pain Med.* 29: 333-340 (2004)
2. Hogan Q., Dotson R., Erickson S., Kettler R., Hogan K.: Local anesthetic myotoxicity: A case and review. *Anesthesiology* 80: 942-947 (1994)
3. Amaniti E., Drampa , Kouzi-Koliakos, et al.: Ropivacaine myotoxicity after single intramuscular injection in rats. *Eur. J. Anaesthesiol.* 23: 130-135 (2005)

Muscle Regeneration following Local Anesthetic Myotoxic Insult. Morphometric Evaluation

D. Kapoukranidou¹, I. Kalpidis¹, E. Amaniti²,
D. Kouvelas³, D. Vasilakos² and M. Albani¹

¹Laboratory of Experimental Physiology, ²Department of Anesthesiology, ³Laboratory of Experimental Pharmacology, School of Medicine, Aristotle University, Thessaloniki, Greece

Key words: Local anesthetic, myotoxicity, muscle regeneration, morphometric evaluation

SUMMARY. Local anesthetic myotoxicity is a complication following muscle infiltration. Although it is considered reversible over a period of one month, cases of permanent damage have been reported. The aim of the present study was the morphometric evaluation of muscle regeneration after local anesthetic infiltration. The left tibialis anterior muscle of ten male Wistar rats was injected with either 100 µl of ropivacaine 0.75%

(R075 group) or 100 µl of ropivacaine 0.375% (R0375 group), while the contralateral muscle was used as control. Four weeks later, the rats were sacrificed; the muscles were dissected, frozen, cut into 10 µm thick sections, stained using acid ATPase and examined using light microscope with a computer imaging system for morphometric analysis. Sections were evaluated morphometrically regarding fiber cross-section area and fiber perimeter for the three muscle fiber types (Type I, Type IIa, Type IIb). Differences among groups were evaluated using independent t-test. Considering fiber perimeter, analysis showed greater values for R075 vs control and R0375 vs control for all fiber types, while R075 vs R0375 comparisons did not reveal significant differences for any of the examined fiber types. In conclusion, four weeks after local anesthetic application regenerated muscle fibers still showed morphological differences regarding morphometric parameters. These differences could be either an intermediate step of the regeneration process or a more permanent lesion. Furthermore, they could be associated with impaired function.

Επίδραση του Πειραματικού Υπερ- και Υπο-θυρεοειδισμού επί της Δραστικότητας της Ακετυλχολινεστεράσης, της (Na⁺,K⁺)- και της Mg²⁺-ΑΤΡάσης Εγκεφαλικών Δομών Ενηλίκων Επιμύων

Χ. Καραγεωργίου¹, Κ. Πάντος¹, Α. Ζάρρος^{1,2}, Β. Στολάκης³, Ι. Μουρούζης¹, Δ. Κόκκινος⁴ και Σ. Τσακίρης²

¹Εργαστήριο Πειραματικής Φαρμακολογίας και ²Εργαστήριο Πειραματικής Φυσιολογίας, Ιατρική Σχολή Πανεπιστημίου Αθηνών, Αθήνα, Ελλάδα, ³Τμήμα Βιολογικών Εφαρμογών και Τεχνολογιών, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων, Ιωάννινα, Ελλάδα, ⁴Ωνάσειο Καρδιοχειρουργικό Κέντρο, Α΄ Καρδιολογική Κλινική, Αθήνα, Ελλάδα

ΣΚΟΠΟΣ

Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η διερεύνηση της επιδράσεως του πειραματικώς επαγόμενου υπερ- και υπο-θυρεοειδισμού επί της δραστικότητας της ακετυλχολινεστεράσης (AChE), της (Na⁺,K⁺)-ΑΤΡάσης και της Mg²⁺-ΑΤΡάσης, τεσσάρων δομών εγκεφάλου ενηλίκων επιμύων (μετωπιαίου φλοιού, ιπποκάμπτου, υποθαλάμου και παρεγκεφαλίδας).

ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

Εχρησιμοποιήθησαν 120 άρρενες ενήλικες Wistar επίμυες (240±25 g b.w.) που κατανεμήθηκαν σε 4 ομάδες των 30 επιμύων: α) ομάς μαρτύρων (Μ) (NaCl 0,9% για 14 ημέρες), β) ομάς υπερθυρεοειδικών (ΥΠΕΡ) (θυροξίνη 25 μg/100g σωματικού βάρους, υποδορίως, καθημερινά για 14 ημέρες) (1), γ) ομάς άνευ αγωγής μάρτυρες (ΑΑΜ) και δ) ομάς υποθυρεοειδικών (ΥΠΟ) (από του στόματος χορήγηση προπυλθειουρακίλης 0,05% για 21 ημέρες) (2). Τα πειραματόζωα θυσιάστηκαν με αποκεφαλισμό, ολόκληρος ο εγκέφαλος αφαιρέθηκε ταχύτατα και απομονώθηκαν οι προς εξέταση δομές. Ακολούθησε η ομογενοποίηση και η φυγοκέντρηση του ιστού σύμφωνα με τη διαδικασία που περιγράφεται σε προηγούμενη δημοσίευση μας (3).

Στο προκύπτον υπερκείμενο υγρό, προσδιορίσθηκε: α) η συγκέντρωση της πρωτεΐνης συμφώνως προς τη μέθοδο των Lowry και συν. (4), β) η δραστικότητα της AChE συμφώνως προς τη μέθοδο των Ellman και συν. (5) και γ) η δραστικότητα της (Na⁺,K⁺)- και της Mg²⁺-ΑΤΡάσης συμφώνως προς τη μέθοδο των Bowler και Tirri (6). Κατά τη στατιστική ανάλυση χρησιμοποιήθηκε το Student's t-test. Όλες οι αναφερόμενες τιμές εκφράζονται ως μέσοι όροι ± τυπικές αποκλίσεις. Η στατιστικώς σημαντική τιμή ορίστηκε για τιμές p<0,05.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ - ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Τα αποτελέσματα της επιδράσεως των μεταβολών της θυρεοειδικής καταστάσεως επί της δραστικότητας της AChE παρουσιάζονται στον πίνακα 1. Στον πίνακα 2 παρουσιάζονται τα αντίστοιχα αποτελέσματα σχετικά με τη δραστικότητα της (Na⁺,K⁺)-ΑΤΡάσης. Δεν παρατηρήθηκαν στατιστικώς σημαντικές μεταβολές σε ό,τι αφορά τη δραστικότητα της Mg²⁺-ΑΤΡάσης.

Από τα δεδομένα μας προκύπτει ότι οι θυρεοειδικές ορμόνες επηρεάζουν τις εξετασθείσες παραμέτρους κατά τρόπο ειδικό της εκάστοτε δομής και της εκάστοτε επικρατούσας καταστάσεως. Ο μετωπιαίος φλοιός επηρεάζεται μόνο από τον υποθυρεοειδισμό, ενώ τα ένζυμα του

ιπποκάμπου και της παρεγκεφαλίδας επηρεάζονται κατά τον ίδιο τρόπο τόσο από τον υπερ-όσο και από τον υπο-θυρεοειδισμό. Τα εξετασθέντα ένζυμα του υποθαλάμου δεν φαίνεται να επηρεάζονται από τις καταστάσεις αυτές (τουλάχιστον όχι από το συγκεκριμένο τρόπο επαγωγής των θυρεοειδικών αυτών καταστάσεων).

Τα αποτελέσματα αυτά έρχονται να συμπληρώσουν τα αντίστοιχα ευρήματα μας σε ολικό εγκέφαλο (7), όπου η δραστηριότητα της AChE είχε βρεθεί μειωμένη τόσο στον υπερ- όσο και στον υπο-θυρεοειδισμό, η δραστηριότητα της (Na⁺,K⁺)-ΑΤΡάση είχε βρεθεί μειωμένη στον υπερ- και αυξημένη στον υπο-θυρεοειδισμό, ενώ η Mg²⁺-ΑΤΡάση είχε παρουσιάσει αύξηση στη δραστηριότητά της υπό συνθήκες υποθυρεοειδισμού.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΠΑΡΑΠΟΜΠΕΣ

1. Pantos C.I., Cokkinos D.D., Tzeis S.M., Malliopolou V., Mourouzis I.S., Carageorgiou H.C., Limas C., Varonos D., Cokkinos D.V.: Hyperthyroidism is associated with preserved preconditioning capacity but intensified and accelerated ischemic contracture in rat heart. *Basic Res. Cardiol.* 94: 254-260 (1999)

- Pantos C., Malliopolou V., Mourouzis I., Sfakianoudis K., Tzeis S., Doumba P., Xinaris C., Cokkinos A.D., Carageorgiou H., Varonos D.D., Cokkinos D.V.: Propylthiouracil-induced hypothyroidism is associated with increased tolerance of the isolated rat heart to ischaemia-reperfusion. *J. Endocrinol.* 178: 427-435 (2003)
- Carageorgiou H., Tzotzes V., Pantos C., Mourouzis C., Zarros A., Tsakiris S.: In vivo and in vitro effects of cadmium on adult rat brain total antioxidant status, acetylcholinesterase, (Na⁺,K⁺)-ATPase and Mg²⁺-ATPase activities: protection by L-cysteine. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* 94: 112-118 (2004)
- Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J.: Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265-275 (1951)
- Ellman G.L., Courtney K.D., Andres V.Jr., Featherstone R.M.: A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.* 7: 88-95 (1961)
- Bowler K., Tirri R.: The temperature characteristics of synaptic membrane ATPases from immature and adult rat brain. *J. Neurochem.* 23: 611-613 (1974)
- Carageorgiou H., Pantos C., Zarros A., Mourouzis I., Varonos D., Cokkinos D., Tsakiris S.: Changes in antioxidant status, protein concentration, acetylcholinesterase, (Na⁺,K⁺)-, and Mg²⁺-ATPase activities in the brain of hyper- and hypothyroid adult rats. *Metab. Brain Dis.* 20: 129-139 (2005)

Πίνακας 1

Μεταβολές στη δραστηριότητα της AChE εγκεφαλικών δομών ενηλίκων επιμύων

Δραστηριότητα AChE (Δ OD /min x mg πρωτεΐνης)

Ομάδα	ΜΦ	ΙΠΠΟ	ΥΠΟΘ	ΠΑΡΕΓΚ
M	0,358 ± 0,014	0,326 ± 0,009	0,614 ± 0,025	0,474 ± 0,014
ΥΠΕΡ	0,373 ± 0,019 (NS) (+4%)	0,398 ± 0,016 *** (+22%)	0,632 ± 0,024 (NS) (+3%)	0,365 ± 0,017 *** (-23%)
AAM	0,368 ± 0,018	0,330 ± 0,013	0,620 ± 0,029	0,463 ± 0,018
ΥΠΟ	0,284 ± 0,009 *** (-23%)	0,399 ± 0,019 *** (+21%)	0,621 ± 0,031 (NS) (0%)	0,384 ± 0,020 *** (-17%)

***p<0,001, NS: μη στατιστικώς σημαντικό, ΜΦ: μετωπιαίος φλοιός, ΙΠΠΟ: ιπποκάμπτος, ΥΠΟΘ: υποθάλαμος, ΠΑΡΕΓΚ: παρεγκεφαλίδα.

Πίνακας 2

Μεταβολές στη δραστηριότητα της Na⁺,K⁺-ΑΤΡάσης εγκεφαλικών δομών ενηλίκων επιμύων

Δραστηριότητα Na⁺,K⁺-ΑΤΡάσης (μιοι Pi/h x mg πρωτεΐνης)

Ομάδα	ΜΦ	ΙΠΠΟ	ΥΠΟΘ	ΠΑΡΕΓΚ
M	4,34 ± 0,26	5,50 ± 0,38	4,14 ± 0,33	6,42 ± 0,57
ΥΠΕΡ	4,40 ± 0,22 (NS) (+1%)	2,92 ± 0,26 *** (-47%)	4,35 ± 0,28 (NS) (+5%)	4,75 ± 0,29 *** (-26%)
AAM	4,50 ± 0,30	5,65 ± 0,33	4,40 ± 0,26	6,00 ± 0,48
ΥΠΟ	2,91 ± 0,21 *** (-35%)	3,22 ± 0,22 *** (-43%)	4,30 ± 0,35 (NS) (-2%)	4,38 ± 0,35 *** (-27%)

***p<0,001, NS: μη στατιστικώς σημαντικό, ΜΦ: μετωπιαίος φλοιός, ΙΠΠΟ: ιπποκάμπτος, ΥΠΟΘ: υποθάλαμος, ΠΑΡΕΓΚ: παρεγκεφαλίδα.

Effect of Experimental Hyper- and Hypothyroidism on Acetylcholinesterase, (Na⁺,K⁺)- and Mg²⁺-ATPase Activities of Adult Rat Brain Regions

H. Carageorgiou¹, C. Pantos¹, A. Zarros^{1,2}, V. Stolakis³, I. Mourouzis¹, D. Cokkinos⁴ and S. Tsakiris²

¹Department of Experimental Pharmacology, and ²Department of Experimental Physiology, Medical School, University of Athens, Athens, Greece, ³Department of Biological Applications and Technology, Science and Technology School, University of Ioannina, Ioannina, Greece, ⁴Onassis Cardiac Surgery Center, First Cardiology Department, Athens, Greece

Key words: AChE, (Na⁺,K⁺)-ATPase, Mg²⁺-ATPase, rat, brain, hyperthyroidism, hypothyroidism,

Correspondence: Assoc. Prof. Haris Carageorgiou, Department of Experimental Pharmacology, Medical School, University of Athens, 75 Mikras Asias str., GR-11527, Goudi, Athens, Greece. Tel.: +30-210-7462562, Fax: +30-210-7462554, e-mail: xkarag@med.uoa.gr

SUMMARY. The aim of this work was to investigate how the metabolic reactions could affect the activities of acetylcholinesterase (AChE), (Na⁺,K⁺)-ATPase and Mg²⁺-ATPase in the brain regions (frontal cortex,

hippocampus, hypothalamus and cerebellum) of hyper- and hypothyroid adult male rats. Hyperthyroidism was induced in rats by subcutaneous administration of thyroxine (25µg/100g body weight) once daily for 14 days, while hypothyroidism was induced by oral administration of propylthiouracil (0.05%) for 21 days. The enzyme activities were evaluated spectrophotometrically in the homogenated brain regions of 10 three-animal pools. In hyperthyroidism, AChE activity was found significantly increased in the hippocampus (+22%), decreased in the cerebellum (-23%) and remained unchanged in the frontal cortex and the hypothalamus. (Na⁺,K⁺)-ATPase was significantly inhibited in the hyperthyroid rat hippocampus (-47%) and cerebellum (-26%), with no significant changes in the hypothalamus and the frontal cortex. In hypothyroidism, AChE activity was found significantly increased in the hippocampus (+21%), decreased in the frontal cortex (-23%) and cerebellum (-17%), while it remained unchanged in the hypothalamus. (Na⁺,K⁺)-ATPase was significantly inhibited in the hypothyroid rat frontal cortex (-35%), hippocampus (-43%) and cerebellum (-27%), while no significant changes were recorded in the hypothalamus. Mg²⁺-ATPase was found unaltered in all regions of both hyper- and hypothyroid rat brains. Our data revealed that thyroid hormones affect the examined adult rat brain parameters, in a region- and state-specific way. Frontal cortex was affected only by hypothyroidism, while hippocampal and cerebellar enzymes were affected in a similar way by hyper- and hypothyroidism. The examined rat hypothalamic enzymes do not seem to be affected (at least under the experimental procedures followed).

Φαρμακευτική Αγωγή Ψυχογηριατρικών Ασθενών σε Τμήμα Βραχείας Νοσηλείας Ψυχιατρικού Νοσοκομείου

Κωνσταντίνος Κατσιγιαννόπουλος, Γεώργιος Παπαζήσης, Ιωάννης Παντουλάρης, Αναστασία Μαστρογιάννη και Αναστασία Καραστεργίου

Δ' Τμήμα Βραχείας Νοσηλείας, Ψυχιατρικό Νοσοκομείο Θεσσαλονίκης, Ελλάς

ΕΙΣΑΓΩΓΗ - ΣΚΟΠΟΣ

Οι ψυχικές διαταραχές στους ηλικιωμένους οφείλονται στην αλληλεπίδραση οργανικών με ψυχολογικούς και κοινωνικούς παράγοντες, ενώ αναγνωρίζονται οι ιδιαίτερες θεραπευτικές και νοσηλευτικές ανάγκες τους. Οι κύριοι στόχοι της φαρμακοθεραπείας αυτών των ασθενών είναι η βελτίωση της ποιότητας ζωής, η παραμονή τους στην κοινότητα και η αποφυγή τοποθέτησής τους σε οίκους ευγηρίας ή η παραμονή τους για μεγάλο διάστημα εντός νοσοκομείου. Αναφέρεται βιβλιογραφικά ότι οι ψυχογηριατρικοί ασθενείς είναι ιδιαίτερα ευαίσθητοι στην εμφάνιση φαρμακευτικών παρενεργειών, ιδίως του τύπου των εξωπυραμιδικών εκδηλώσεων, ενώ η συχνή συνύπαρξη άλλων σωματικών παθήσεων μπορεί να περιπλέξει τη θεραπεία. Έτσι, στόχος είναι η χρησιμοποίηση της μικρότερης δυνατής δόσης ψυχοτρόπων φαρμάκων για την επίτευξη του μέγιστου θεραπευτικού αποτελέσματος.

Σύγκριση της ψυχοφαρμακολογικής θεραπείας των πρώτων εισαγωγών ψυχογηριατρικών ασθενών (ηλικία >60 έτη) σε τμήμα Βραχείας Νοσηλείας Ψυχιατρικού Νοσοκομείου, σε δύο διαφορετικές χρονικές περιόδους με διαφορά μιας δεκαετίας.

ΥΛΙΚΟ - ΜΕΘΟΔΟΣ

Πραγματοποιήθηκε αναδρομική μελέτη των πρώτων εισαγωγών ψυχογηριατρικών ασθενών κατά τα έτη 2003-05 και 1993-05 στο Δ' Τμήμα

Βραχείας Νοσηλείας του Ψυχιατρικού Νοσοκομείου Θεσσαλονίκης. Μελετήθηκαν κλινικά χαρακτηριστικά και διερευνήθηκαν τυχόν διαφοροποιήσεις της φαρμακευτικής αγωγής.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Την τριετία 1993-95 νοσηλεύτηκαν (πρώτες εισαγωγές) 51 ασθενείς (26 άνδρες και 25 γυναίκες) άνω των 60 ετών, ενώ την τριετία 2003-05 44 (24 άνδρες και 20 γυναίκες). Δεν διαφοροποιούνται σημαντικά μέσα στο χρόνο χαρακτηριστικά όπως η αιτία παραπομπής (κυρίως διαταραχές συμπεριφοράς, με αυξανόμενη όμως την αυτοκαταστροφικότητα), η συνύπαρξη σωματικής νόσου, η διάγνωση εξόδου (ψυχωτική, συναισθηματική ή γνωστική διαταραχή). Σε ό,τι αφορά την ψυχοφαρμακολογική θεραπεία, σημαντική είναι η μείωση της χρήσης τυπικών αντιψυχωτικών (1993-95: 76%, 2003-05:44%) και αντικαταθλιπτικών φαρμάκων (1993-95: 24%, 2003-05: 7%). Αντίθετα παρατηρείται αύξηση της χρήσης των άτυπων αντιψυχωτικών φαρμάκων (1993-95: 0%, 2003-05: 32%).

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Η βραχεία θεραπεία ψυχογηριατρικών ασθενών σε μη εξειδικευμένα τμήματα ψυχιατρικών νοσοκομείων παραμένει ένα λεπτό και δυσεπίλυτο πρόβλημα. Παρά την εμφάνιση των άτυπων αντιψυχωτικών, η χρήση των τυπικών αντι-

ψυχωτικών (δοκιμασμένων για πολλά χρόνια) παραμένει κυρίαρχη. Η χρήση πάντως των άτυπων αντιψυχωτικών, πολλά από τα οποία εμφανίζουν σημαντική επίδραση και στη συναισθηματική σφαίρα, μείωσε τη χρήση αμιγώς αντικαταθλιπτικών φαρμάκων σε συγκεκριμένες ομάδες ψυχογηριατρικών ασθενών.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΠΑΡΑΠΟΜΠΕΣ

1. Clement J.P., Leger J.M.: Psychiatric disorders in non demented elderly people. *Bull. Acad. Natl. Med.* 190: 1175-1185 (2006)
2. Holmes J., Bentley K., Cameron I.: A UK survey of psychiatric services for older people in general hospitals. *Int. J. Geriatr. Psychiatry* 18: 716-721 (2003)
3. Draper B.: The elderly admitted to a general hospital psychiatry ward. *Aust. N. Z. J. Psychiatry* 28: 288-297 (1994)

Pharmacotherapy in Psychogeriatric Patients in Acute Ward of a Psychiatric Hospital

K. Katsigiannopoulos, G. Papazisis, I. Pantoularis, A. Mastrogianni and A. Karastergiou

D' Acute Ward, Psychiatric Hospital of Thessaloniki, Thessaloniki, Greece

Key words: Pharmacotherapy, psychogeriatric patients, acute ward, psychiatric hospital

Correspondence address: Dr Georgios Papazisis, Psychiatric Hospital of Thessaloniki, Thessaloniki Greece. gpapaz@med.auth.gr

SUMMARY. The main aim of pharmacotherapy in psychogeriatric patients is the improvement of quality of life and the avoidance of hospitalization. Pharmaceutical side effects, especially extrapyramidal manifestations, are appearing more often in this population of psychiatric patients. The comorbidity with other chronic diseases is also quite common. The aim of this study was to examine the differences of psychopharmacotherapy in first admissions of geriatric patients (age>60 years) in acute ward of a Psychiatric hospital in different time periods with difference of one decade. The study was conducted in the D' Acute Ward of the Psychiatric Hospital of Thessaloniki. First admissions during 1993-95 and first admissions during 2003-05 were retrospectively studied. The clinical characteristics of the patients and the psychopharmacotherapy were recorded. During the years 1993-95, 51 first admissions of psychogeriatric patients were recorded (26 men, 25 women). During 2003-2005 the first admissions were 44 (24 men, 20 women). No statistically significant differences in characteristics, such as the reason of admission, the comorbidity and the main psychiatric diagnosis were noted. Concerning the psychopharmacotherapy, a reduction in the use of typical antipsychotics (1993-95: 76%, 2003-05:44%) and antidepressants (1993-95: 24%, 2003-05:7%) during 2003-2005 was observed. An increased use of atypical antipsychotics was also noted during the same period (1993-95: 0%, 2003-05:32%). The results of the study suggest that typical antipsychotics are still the main therapy for psychogeriatric patients admitted in a psychiatric hospital. Moreover, in specific groups of these patients, the use of antidepressants has been decreased.

Πρόκληση *in vivo* Ισχαιμίας με Διεγερτικά Αμινοξέα και Μελέτη της Προστατευτικής Δράσης της Σωματοστατίνης στον Αμφιβληστροειδή του Αρουραίου

Φ. Κιαγιαδάκη και Κ. Θερμού

Εργαστήριο Φαρμακολογίας, Τομέας Βασικών Επιστημών, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Κρήτης, Ηράκλειο, 71110, Κρήτη, Ελλάς

ΕΙΣΑΓΩΓΗ - ΣΚΟΠΟΣ

Η αμφιβληστροειδική ισχαιμία είναι η υποκείμενη αιτία πολλών ασθενειών του οφθαλμού και οδηγεί στην καταστροφή των νευρώνων και τελικά στην τύφλωση. Η σωματοστατίνη έχει δείχθει ότι έχει νευροπροστατευτικές δράσεις σε διαφορετικά παραδείγματα νευροτοξικότητας στο Κεντρικό Νευρικό Σύστημα, όπως στην επαγόμενη από το NMDA νευροτοξικότητα σε καλλιέργειες φλοιού (1) και στην απόφραξη της μέσης εγκεφαλικής αρτηρίας (2). Επίσης, η σωματοστατίνη και οι ss_2 αγωνιστές της αναστέλλουν τη νευροαγγείωση επαγόμενη από την ισχαιμία (3,4) και προστατεύουν τον αμφιβληστροειδή σε μοντέλο χημικής ισχαιμίας στον αρουραίο (5). Ωστόσο, η δράση της σωματοστατίνης σε άλλα μοντέλα ισχαιμίας, που αποτελούν τη βάση της παθοφυσιολογίας διαφορετικών νόσων του αμφιβληστροειδούς, όπως και οι μηχανισμοί που εμπλέκονται, δεν έχουν μελετηθεί επαρκώς. Η παρούσα μελέτη σκοπό είχε την ανάπτυξη ενός *in vivo* μοντέλου ισχαιμίας- διεγερτοτοξικότητας και τον προσδιορισμό της νευροπροστατευτικής δράσης της σωματοστατίνης και των αναλόγων της στην αμφιβληστροειδική ισχαιμία.

ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

Χρησιμοποιήθηκαν αρσενικοί και θηλυκοί ενήλικοι αρουραίοι Sprague Dawley (βάρους 250-300 g) ή Brown Norway (βάρους 150-200 g). Οι συνθήκες διατήρησης των ζώων, όπως και όλες οι διαδικασίες που υπέστησαν αυτά, ήταν σύμ-

φωνες με Ευρωπαϊκή Οδηγία (86/609/EEC). Μετά την αναισθητοποίησή τους (με ξυλαζίνη 14.55 mg/kg και κεταμίνη 200 mg/kg), τα ζώα δέχτηκαν στο ένα μάτι ενδοβολβικές εγχύσεις των διεγερτικών αμινοξέων AMPA (42 nM/μάτι) και NMDA (42 nM/μάτι) και στο άλλο μάτι PBS (50 mM, ως εσωτερικός μάρτυρας), όγκου 5μl/μάτι με ροή 1μl/min με τη βοήθεια στερεοταξικού εξοπλισμού, μικροαντλίας και 27G βελόνας. Τα ζώα που δέχτηκαν εγχύσεις AMPA (42 nM) θανατώθηκαν μετά από 1, 2, 4, 8, 16, 30 ημέρες και αυτά που τους χορηγήθηκε NMDA (42 nM) θανατώθηκαν μετά από 1 ή 8 ημέρες. Σε καθεμία από τις παραπάνω ομάδες υπήρχε τουλάχιστον 1 ζώο που πήρε PBS (50 mM) και στα δύο μάτια (ως μάρτυρας της εκάστοτε ομάδας). Επίσης, σε ομάδα ζώων χορηγήθηκε PBS (50 mM) και στα δύο μάτια και θανατώθηκαν την ίδια ημέρα της έγχυσης (ως μάρτυρας στη ημέρα 0). Προκειμένου να μελετηθεί η προστασία του αμφιβληστροειδούς από τη διεγερτοτοξικότητα που προκλήθηκε την 1^η κιόλας ημέρα μετά την έγχυση με AMPA (42 nM), τα ζώα δέχτηκαν ενδοφθάλμια συγχορήγηση AMPA και αναλόγου του ss_2 υποδοχέα της σωματοστατίνης (AMPA 42 nM + L-779,976 10^{-5} M ή AMPA 42 nM + L-779,976 10^{-4} M) και θανατώθηκαν μετά από 1 ημέρα. Με την εκτέλεση ανοσοϊστοχημείας σε κρουτομές μελετήθηκε η αλλαγή της έκφρασης διαφόρων κυτταρικών δεικτών του αμφιβληστροειδούς (ChAT, PKC, MAP1A, NF-L, TH, Recoverin, bNOS). Με ιστοχημική χρώση cresyl violet μελετήθηκαν οι αλλαγές στο εύρος των εσωτερικών

σιβιάδων του ιστού (μορφομετρία), ενώ με τη χρώση TUNEL προσδιορίστηκε η απώλεια των κυττάρων λόγω αποπτωτικών διαδικασιών.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Το διεγερτικό αμινοξύ AMPA (42 nM) προκάλεσε απώλεια των αμακρινικών κυττάρων του αμφιβληστροειδούς που εκφράζουν την ακετυλοτρανσφεράση της χολίνης [ChAT ανοσοδραστικότητα (ΑΔ)] από την 1^η μέχρι και την 30^η ημέρα μετά την έγχυση. Το NMDA (42 nM) μείωσε σε μεγάλο βαθμό τον αριθμό των χολινεργικών κυττάρων την 1^η ημέρα, αλλά το σήμα επανήλθε την 8^η ημέρα. Οι μετέπειτα ανοσοϊστοχημικές μελέτες εστιάστηκαν στην ομάδα της μιας ημέρας. Εκτός των χολινεργικών κυττάρων, το AMPA (42 nM) προκάλεσε απώλεια των αμακρινικών κυττάρων του αμφιβληστροειδούς που εκφράζουν την συνθετάση του μονοξειδίου του αζώτου (bNOS ΑΔ), ενώ δεν επηρέασε καθόλου τα δίπολα κύτταρα που συνδέονται με τα ραβδία (PKC ΑΔ) και με τα κωνία (recoverin ΑΔ), τα γαγγλιακά κύτταρα (MAP1A ΑΔ) και τους άξονές τους (NF-L ΑΔ) και τα ντοπαμινεργικά κύτταρα (TH ΑΔ). Με τη χρώση TUNEL επιβεβαιώθηκε η επίτευξη ισχαιμίας επαγόμενης από το διεγερτικό αμινοξύ AMPA. Η συγχωρήγηση του sst₂ αναλόγου L-779,976 (10⁻⁴ M) προστάτευσε τον αμφιβληστροειδή από τη διεγερτοζική, σύμφωνα με την ChAT ΑΔ, bNOS ΑΔ και τη χρώση TUNEL. Διαπιστώθηκαν παρόμοια ανοσοϊστοχημικά αποτελέσματα και στα δύο είδη αρουραίων που χρησιμοποιήθηκαν. Οι μέχρι τώρα μορφομετρικές αναλύσεις υποστηρίζουν μείωση του εύρους των εσωτερικών σιβιάδων του αμφιβληστροειδούς, ωστόσο επιπλέον μελέτες πρέπει να πραγματοποιηθούν για τη στατιστική επιβεβαίωση αυτών των αποτελεσμάτων.

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Τα αποτελέσματα υποστηρίζουν ότι η ενδοβολβική έγχυση του διεγερτικού αμινοξέος AMPA στα 42 nM είναι ικανή να προκαλέσει *in vivo* ισχαιμία μέσα σε 24 ώρες κι επομένως να αποτελέσει καλό μοντέλο αμφιβληστροειδικής ισχαιμίας στον αρουραίο. Το σωματοστατινεργικό ανάλογο L-779,976 συγχωρηγούμενο με το διεγερτοζικό αμινοξύ στο υαλώδες επανέφερε τον ιστό στη φυσιολογική κατάσταση, υποστηρίζοντας τη συμμετοχή της σωματοστατίνης στην αναστολή της επαγόμενης από την ισχαιμία βλά-

βης και καταστροφής των νευρώνων του αμφιβληστροειδούς. Τα αποτελέσματα αυτά δείχνουν για πρώτη φορά τη νευροπροστατευτική δράση αναλόγου της σωματοστατίνης, χορηγούμενου στο υαλώδες, στην αμφιβληστροειδική ισχαιμία και συνηγορούν υπέρ της χρήσης σωματοστατινεργικών αναλόγων στη θεραπεία των αμφιβληστροπαθειών. Πειράματα βρίσκονται σε εξέλιξη με σκοπό τη μελέτη της νευροπροστατευτικής δράσης του sst₂ αναλόγου χορηγούμενου σε διαφορετικούς χρόνους (π.χ. μετά την πρόκληση ισχαιμίας) και μέσω εναλλακτικών οδών χορήγησης. Επιπλέον, σημαντικό στόχο των μελετών αυτών αποτελεί η διαλεύκανση του μηχανισμού της νευροπροστατευτικής δράσης της σωματοστατίνης.

Η μελέτη αυτή χρηματοδοτήθηκε από την ΓΓΕΤ (Πρόγραμμα ΠΕΝΕΔ2003)

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΠΑΡΑΠΟΜΠΕΣ

1. Forloni G., Lucca E., Angeretti N., Chiessa R., Vezzani A.: *J. Neurochem.* 68: 319-327 (1997)
2. Rauca C., Schafer K., Holt V.: *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 360: 633-638 (1999)
3. Smith L.E.H., Kopchick J.J., Chen W., Knapp J., Kinose F., Daley D., Foley E., Smith R.G., Schaeffer J.M.: *Science* 276: 1706-1709 (1997)
4. Higgins R.D., Yan Y., Schrier B.K.: *Exp. Eye Res.* 74: 553-559 (2002)
5. Mastrodimou N., Lambrou G.N., Thermos K.: *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 371: 44-53 (2005)

Neuroprotective Role of Somatostatin in an *in vivo* Model of Retinal Ischemia

F. Kiagiadaki and K. Thermos

Laboratory of Pharmacology, Department of Basic Sciences, Faculty of Medicine, University of Crete, Heraklion GR-71110, Crete, Hellas

Key words: Somatostatin, neuroprotection, ischemia, retina

SUMMARY. Retinal ischemia is the underlying cause of many ocular diseases and leads to neuronal damage and blindness. Somatostatin has been shown to have neuroprotective effects in different paradigms of neurotoxicity in the central nervous system, such as NMDA-induced neurotoxicity in cortical cultures and in middle cerebral artery occlusion. Somatostatin and its sst₂ agonists inhibited the ischemia-induced neovascularization and protected the retina in a rat model of chemical ischemia. The aim of the present study was

to develop an *in vivo* model of excitotoxicity-induced ischemia in the retina and to investigate the neuroprotective effect of somatostatin and its analogs. Adult female and male Sprague Dawley (250-300 g) or Brown Norway (150-200 g) rats were employed. The housing conditions and all procedures employed were in accordance to the European Communities Council Directive (86/609/EEC). The excitatory amino acids AMPA (42 nmol/eye) or NMDA (42 nmol/eye) were injected intravitreally in one eye, while the other eye received PBS (50 mM). The animals that received AMPA (42 nmol) were euthanized after 1, 2, 4, 8, 16 and 30 days, those that received NMDA (42 nmol) were euthanized after 1 or 8 days. A group of animals received AMPA (42 nmol) and the sst₂ analog L-779, 976 (10⁻⁵M or 10⁻⁴M) and was euthanized after 1 day. Immunohistochemical studies were employed to examine retinal cell loss. These demonstrated the loss of retinal cholinergic amacrine cells [ChAT immunoreactivity (IR)] in the AMPA (42 nmol) treated groups from

the 1st till the 30th day post injection. The NMDA treatment decreased the number of the ChAT-IR cells at the 1st day but had no effect at 8th day after the injection. In addition, AMPA (42 nmol) caused a substantial loss of bNOS-expressing amacrine cells at the 1st day after treatment. In contrast, other retinal cells such as rod and cone bipolar cells (PKC and recoverin IR, respectively), ganglion cells (MAP1A IR) and their axons (NF-L IR) and the dopaminergic cells (TH IR) were not affected by the AMPA (42 nmol) treatment. TUNEL staining confirmed the AMPA-induced retinal ischemia. The sst₂ analog L-779, 976 (10⁻⁴M) protected the retina from the excitotoxicity according to ChAT IR, bNOS IR and TUNEL staining. Similar data were obtained in both animal species used. These results demonstrate for the first time the neuroprotective actions of a somatostatin analog injected intravitreally and support the further study of the use of somatostatinergic analogs as therapeutics in retinopathies.

ΕΠΙΘΕΩΡΗΣΗ ΚΛΙΝΙΚΗΣ ΦΑΡΜΑΚΟΛΟΓΙΑΣ
ΚΑΙ ΦΑΡΜΑΚΟΚΙΝΗΤΙΚΗΣ 25: 60-61 (2006)
©ΦΑΡΜΑΚΟΝ-Τύπος

Η Ενεργοποίηση του D₁ Υποδοχέα και η cGMP Τροποποιούν την Απελευθέρωση της Σωματοστατίνης στον Αμφιβληστροειδή του Αρουραίου

Φ. Κιαγιάδακη, Ε. Κουλάκης και Κ. Θερμού

Εργαστήριο Φαρμακολογίας, Τομέας Βασικών Επιστημών, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Κρήτης, Ηράκλειο, 71110, Κρήτη, Ελλάδα

ΕΙΣΑΓΩΓΗ – ΣΚΟΠΟΣ

Η σωματοστατίνη (SRIF), η ντοπαμίνη (DA) και το μονοξειδίο του αζώτου (NO) είναι νευροτροποποιητές του κυκλώματος του αμφιβληστροειδούς (1). Πρόσφατα, δείχθηκε ότι η σωματοστατίνη επηρεάζει την απελευθέρωση της DA και του NO ενεργοποιώντας ειδικούς υποδοχείς (sst₁ και sst₂) στον αμφιβληστροειδή του αρουραίου (2,3), ενώ το NO έχει δείχτει ότι μειώνει την απελευθέρωση της ντοπαμίνης στον αμφιβληστροειδή του βοδιού (4). Επομένως, ίσως ισχύει κάποιος μηχανισμός ανάδρομης ετερορύθμισης της σύνθεσης και απελευθέρωσής τους που θα έχει σαν αποτέλεσμα τη ρύθμιση του αμφιβληστροειδικού κυκλώματος και των διαδικασιών της όρασης. Η παρούσα μελέτη σκοπό είχε να ερευνήσει το ρόλο της ντοπαμίνης και του μονοξειδίου του αζώτου στην απελευθέρωση της σωματοστατίνης στον αμφιβληστροειδή του αρουραίου.

ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

Χρησιμοποιήθηκαν θηλυκοί Sprague Dawley αρουραίοι (βάρους 250-300 g). Οι συνθήκες διατήρησης των ζώων, όπως και όλες οι διαδικασίες που υπέστησαν αυτά, ήταν σύμφωνες με Ευρωπαϊκή Οδηγία (86/609/EEC). Οι αμφιβληστροειδείς αποκολλήθηκαν μηχανικά από τα μάτια, επώαστηκαν σε θρεπτικό υλικό Medium-199 με βακιτρακίνη (1 mg/ml) για 1 ώρα σε 37 °C και 5% CO₂ (3). Για να εξετάσουμε τη δράση της ντοπαμίνης στην απελευθέρωση της σωματοστατίνης, οι έκτοπες καλλιέργειες των αμφιβληστροειδών επώαστηκαν σε φρέσκο θρεπτικό υλικό

για 1 ώρα παρουσία DA (10, 100 και 200 μM), απομορφίνης (μη εκλεκτικός D₁/D₂ αγωνιστής, 0,50, 1,0 και 10 μM), A68930 (εκλεκτικός D₁ αγωνιστής, 0,50, 1,0 και 10 μM), κουινπιρόλης (εκλεκτικός D₂ αγωνιστής, 0,50, 1,0 και 10 μM) και σουλπιρίδης (εκλεκτικός D₂ ανταγωνιστής, 100 και 200 μM). Για να εξετάσουμε τη δράση του μονοξειδίου του αζώτου στην απελευθέρωση της σωματοστατίνης οι έκτοπες καλλιέργειες των αμφιβληστροειδών επώαστηκαν σε φρέσκο θρεπτικό υλικό για 1 ώρα παρουσία αργινίνης (η πρώτη ύλη για τη σύνθεση του NO, 62,5, 125, 250 και 500 μM), νιτροπρωσσιδίου του νατρίου (δότης του NO, 125, 250, 500 και 1000 μM), SIN-1 (δότης του NO, 100μM) και 8-Bromo-cGMP (ανάλογο της cGMP, 250μM). Στη συνέχεια τα δείγματα ετοιμάστηκαν για την ποσοτικοποίηση των επιπέδων της SRIF με τη χρήση ραδιοανοσοανάλυσης. Για τη στατιστική επεξεργασία των δεδομένων χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της ανάλυσης διακύμανσης μονής κατεύθυνσης (one-way ANOVA).

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Η ντοπαμίνη και η απομορφίνη αύξησαν τα επίπεδα της σωματοστατίνης με τη μορφή ανάστροφης κωδωνοειδούς καμπύλης. Ο εκλεκτικός D₁ αγωνιστής A68930 αύξησε τα επίπεδα της σωματοστατίνης κατά τρόπο εξαρτώμενο από τη συγκέντρωση, ενώ ο D₂ εκλεκτικός αγωνιστής κουινπιρόλη δεν είχε δράση. Η σουλπιρίδη αύξησε τα επίπεδα της σωματοστατίνης κατά στατιστικά σημαντικό τρόπο στη συγκέντρωση των 200 μM. Η αργινίνη και το SNP δεν είχαν καμία

δράση στα επίπεδα της σωματοστατίνης, ενώ το SIN-1 και η 8-Bromo-cGMP έδωσαν στατιστικά σημαντική μείωση.

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Μέσω των φαρμακολογικών δεδομένων που παρουσιάζονται, προτείνεται ότι η ντοπαμίνη επηρεάζει την απελευθέρωση της σωματοστατίνης ενεργοποιώντας τους D₁ υποδοχείς. Η δράση της σουλπιριδής εκφράζει την αναστολή των D₂ αυτοϋποδοχέων και την αύξηση της απελευθέρωσης της ντοπαμίνης, η οποία θα μπορούσε στη συνέχεια να ενεργοποιήσει τους D₁ υποδοχείς. Τα δεδομένα που αφορούν στη δράση του μονοξειδίου του αζώτου στα επίπεδα της σωματοστατίνης υποστηρίζουν μηχανισμό που μεσολαβείται άμεσα από την cGMP. Το SIN-1 έχει διπλό ρόλο, αφ' ενός αυξάνει τα επίπεδα του NO και αφ' ετέρου επηρεάζει άμεσα τη διαλυτή γουανυλική κυκλάση. Μελέτες είναι σε εξέλιξη προκειμένου να χαρακτηριστεί περαιτέρω το νευροχημικό κύκλωμα του αμφιβληστροειδούς στο οποίο περιλαμβάνονται οι αλληλεπιδράσεις της ντοπαμίνης, του μονοξειδίου του αζώτου και της σωματοστατίνης.

Αυτή η μελέτη συγχρηματοδοτήθηκε από το πρόγραμμα ΠΥΘΑΓΟΡΑΣ.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΠΑΡΑΠΟΜΠΕΣ

1. Thermos K.: *Vis. Res.* 43: 1805-1815 (2003)
2. Kouvidi E., Papadopoulou-Daifoti Z., Thermos K.: *Neurosci. Lett.* 391: 82-86 (2006)
3. Vasilaki A., Mouratidou M., Schulz S., Thermos K.: *Neuropharmacol.* 43: 899-909 (2002)
4. Bugnon O., Schaad NC., Schorderet M.: *Neuroreport* 5: 401-404 (1994)

D₁ Receptor Activation and cGMP Modulate Somatostatin Release in the Rat Retina

F. Kiagiadaki, E. Koulakis and K. Thermos

Laboratory of Pharmacology, Department of Basic Sciences, Faculty of Medicine, University of Crete, Heraklion, GR-71110, Crete, Greece

Key words: cGMP, dopamine receptor (D₁), somatostatin, rat, retina

SUMMARY. Somatostatin (SRIF), dopamine (DA) and nitric oxide (NO) are neuromodulators of retinal circuitry. Recently, we have shown that SRIF influences the release of both DA and NO by activating specific receptors (sst₁ and sst₂) in rat retina, while NO has been shown to decrease DA release in the bovine retina. The above triad may provide a feedback loop for the regulation of each others' synthesis and release that could result in the fine tuning of retinal circuitry and vision processes. The present study investigated the role of DA and NO in the modulation of SRIF release in rat retina. Female Sprague Dawley rats (250-300 g) were employed. The housing conditions and all procedures employed were in accordance to the European Communities Council Directive (86/609/EEC). Retinas were mechanically detached from the eyecup, incubated in Medium-199 with bacitracin (1 mg/ml) for one hour at 37°C and 5% CO₂ and ex vivo experiments were performed. To examine the effect of DA on SRIF release, retinal explants were incubated in fresh medium for one hour in the presence of DA (10, 100 and 200 μM), apomorphine (nonselective D₁/D₂ agonist, 0.50, 1.0, 10 μM), A68930 (D₁ selective agonist, 0.50, 1.0, 10 μM), quinpirole (D₂ selective agonist, 0.50, 1.0, 10 μM), and sulpiride (D₂ selective antagonist, 100, 200 μM). To examine the effect of NO on SRIF release, retinal explants were incubated in fresh medium for one hour in the presence of arginine, the starting material for NO synthesis, (62.5, 125, 250, 500 μM), SNP (NO donor, 125, 250, 500, 1000 μM), SIN-1 (NO donor, 100 μM) and 8-Bromo-cGMP (250 μM). Samples were subsequently prepared for the quantification of the SRIF levels using radioimmunoassay. Statistical analysis of the data was performed using a one-way ANOVA with posthoc analysis (Dunnett). Dopamine and apomorphine increased SRIF levels in a reversed bell curve manner. The selective D₁ agonist A68930 increased SRIF levels in a concentration dependent manner, while the D₂ selective agonist quinpirole had no effect. Sulpiride increased SRIF levels in a statistically significant manner at the concentration of 200 μM. Arginine and SNP had no effect on SRIF levels, while SIN-1 and 8-Bromo-cGMP produced a statistically significant decrease. The pharmacological evidence presented suggests that DA influences SRIF release by activating D₁ receptors. The effect of sulpiride suggests an inhibition of D₂ autoreceptors and an increase of DA release that could subsequently activate D₁ receptors. The data, pertaining to NO's effect on SRIF levels, support a direct cGMP mediated effect. SIN-1 has a dual role, namely increasing NO levels and also directly influencing the soluble guanylate cyclase. Studies are in progress to characterize further the retinal neurochemical circuitry involved in the interactions of DA, NO and SRIF.

Επίδραση του Ειδικού Αναστολέα Τυροσινικής Κινάσης του Υποδοχέα του Επιδερμικού Αυξητικού Παράγοντα Gefitinib στην Έκκριση και Εναπόθεση Γλυκοζαμινογλυκανών από Κακοήθη Κύτταρα Μεσοθηλιώματος

I. Κλάγκας¹, Δ. Ζαρδαβάς¹, J. Zhong², M. Roth², Γ. Καρακιουλάκης¹ και Ε. Παπακωνσταντίνου¹

¹Εργαστήριο Φαρμακολογίας, Ιατρική σχολή, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο, Θεσσαλονίκη, Ελλάδα. ²Department of Pharmacology and The Woolcock Institute of Medical Research, University of Sydney, NSW 2006, Australia

ΕΙΣΑΓΩΓΗ - ΣΚΟΠΟΣ

Σε πολλά νεοπλασμάτα, όπως στα κακοήθη μεσοθηλιώματα, έχει διαπιστωθεί αυξημένη έκφραση ή/και ενεργοποίηση - φωσφορυλίωση του υποδοχέα του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (EGFR - Epidermal Growth Factor Receptor). Η ενεργοποίηση του EGFR επιτυγχάνεται με την πρόσδεση ομόλογου προσδέματος στο εξωκυττάριο τμήμα του, με αποτέλεσμα το σχηματισμό ομοδιμερών ή ετεροδιμερών με άλλα μέλη της οικογένειας, κάτι που καταλήγει στη φωσφορυλίωση-ενεργοποίηση του ενδοκυττάριου τμήματός του, που παρουσιάζει δράση τυροσινικής κινάσης. Η ύπαρξη του EGFR έχει συσχετιστεί με αναστολή των μηχανισμών απόπτωσης των καρκινικών κυττάρων, νεο-αγγειογένεση και μεταστατική διασπορά. Το gefitinib ανήκει στους αναστολείς τυροσινικών κινασών, μια οικογένεια χημικών ουσιών που αποτέλεσαν μια από τις πρώτες θεραπείες νεοπλασματικών παθήσεων που στοχεύουν σε μοριακό επίπεδο και έχουν πάρει έγκριση για κάποιες μορφές καρκίνου. Πρόκειται για μόριο χαμηλού μοριακού βάρους που συνδέεται αντιστρεπτά με το ενδοκυττάριο τμήμα του EGFR, το τμήμα εκείνο που παρουσιάζει τη δράση τυροσινικής κινάσης, αναστέλλοντας την αυτοφωσφορυλίωσή του και άρα κατ'επέκταση παρεμποδίζοντας τη μεταγωγή του σήματος στον πυρήνα που προκύπτει από την

ενεργοποίηση του EGFR υποδοχέα. Οι κλινικές μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί ως τώρα αφορούν πλειάδα συμπαγών όγκων, όπως όγκους ΓΕΣ, μαστού, κεφαλής και τραχήλου, παγκρέατος, μεσοθηλιώματος, κ.τ.λ., ενώ αρχικά εγκρίθηκε για αντιμετώπιση προχωρημένου μη μικροκυτταρικού καρκίνου του πνεύμονα.

Στη μελέτη αυτή διερευνήθηκε η επίδραση του gefitinib στην έκκριση και εναπόθεση γλυκοζαμινογλυκανών (GAGs) από ανθρώπινα μεσοθηλιακά κύτταρα καθώς και από κύτταρα μεσοθηλιώματος παρουσία των αυξητικών παραγόντων TGF-β (μετασχηματίζων αυξητικός παράγοντας) και PDGF-BB (αιμοπεταλιακός αυξητικός παράγοντας).

ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

Τα κύτταρα επώαστηκαν παρουσία του gefitinib και των αυξητικών παραγόντων TGF-β και PDGF-BB για 24 και 48 h. Μετά το τέλος της επώασης το υπερκείμενο των κυτταρικών καλλιέργειών και το κυτταρικό στρώμα συλλέχθηκαν ξεχωριστά και οι GAGs απομονώθηκαν ύστερα από απομάκρυνση των λιπιδίων, εξαντλητική πρωτεόλυση, επεξεργασία με NaBH₄ και καταβύθιση με αιθυλική αλκοόλη. Ο ποσοτικός προσδιορισμός των GAGs έγινε με χρωματομετρικό προσδιορισμό των ουρονικών οξέων. Ο διαχωρισμός των GAGs επιτεύχθηκε με ηλεκτροφόρηση σε μεμβράνες οξικής κυτταρίνης και ο χα-

ρακτηρισμός τους χρησιμοποιώντας ειδικά ένζυμα που διασπούν τις GAGs.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Διαπιστώθηκε ότι τα μεσοθηλιακά κύτταρα εκκρίνουν υαλουρονικό οξύ (HA), θειική ηπαράνη (HS) και θειική χονδροϊτίνη. Οι ίδιες GAGs βρέθηκαν και στο κυτταρικό στρώμα των μεσοθηλιακών κυττάρων. Όσον αφορά τα κακοήθη κύτταρα του μεσοθηλιώματος βρέθηκε ότι εκκρίνουν και εναποθέτουν στον εξωκυττάριο χώρο κυρίως HA και HS. Οι αυξητικοί παράγοντες TGF- β και PDGF-BB επάγουν τόσο την έκκριση όσο και την εναπόθεση GAGs και στους δυο τύπους κυττάρων. Το gefitinib αναστέλλει, κατά δσοεξαρτώμενο τρόπο, την έκκριση και εναπόθεση όλων των GAGs από τα μεσοθηλιακά κύτταρα, αλλά κυρίως του HA από τα κύτταρα του μεσοθηλιώματος. Επί πλέον, το gefitinib αναστέλλει την επαγωγική δράση των αυξητικών παραγόντων TGF- β και PDGF-BB όσον αφορά στην έκκριση και εναπόθεση GAGs στα κύτταρα που μελετήθηκαν.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Σε προηγούμενες μελέτες έχει διατυπωθεί η άποψη ότι ο βαθμός κακοήθειας του μεσοθηλιώματος σχετίζεται με αυξημένη έκκριση και εναπόθεση HA από τα καρκινικά κύτταρα του μεσοθηλιώματος και ότι το HA επάγει τον πολλαπλασιασμό και τη μεταναστευτική ικανότητα των κυττάρων του μεσοθηλιώματος. Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης υποδεικνύουν ότι κατά την αντιμετώπιση του μεσοθηλιώματος με τον ειδικό αναστολέα τυροσινικής κινάσης του EGFR, gefitinib, μειώνεται τόσο η έκκριση όσο και η εναπόθεση του HA από τα κύτταρα του μεσοθηλιώματος και ενδεχόμενα αυτό να συνεισφέρει στην ευεργετική δράση του φαρμάκου στο κακόηθες μεσοθηλιώμα.

The Effect of the Highly Selective Epidermal Growth Factor Receptor Tyrosine Kinase Inhibitor Gefitinib on Glycosaminoglycan Synthesis by Human Malignant Mesothelioma Cells

J. Klangas¹, D. Zardavas¹, J. Zhong², M. Roth², G. Karakioulakis¹ and E. Papakonstantinou¹

¹Laboratory of Pharmacology, School of Medicine, Aristotle University of Thessaloniki, ²Department of Pharmacology and The Woolcock Institute of Medical Research, University of Sydney, NSW 2006, Australia

Key words: Epidermal growth factor receptor, tyrosine kinase inhibitor, gefitinib, glycosaminoglycans, human mesothelioma

SUMMARY. Malignant mesothelioma is a highly treatment-resistant fatal disease, which has been shown, in most cases, to be associated with elevated amounts of hyaluronic acid (HA), a non sulfated glycosaminoglycan, in pleural effusion. The epidermal growth factor receptor (EGFR) is a transmembrane receptor tyrosine kinase of the HER family and play an important role in the proliferation and metastasis of tumor cells. It is frequently overexpressed in common solid tumors and has become a favoured target for orally administered small-molecule and antibody-based therapy.

In the present study, we investigate the effect of the highly selective epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor gefitinib, on glycosaminoglycans synthesis by human malignant mesothelioma and mesothelial cells. For this reason, cells were incubated with gefitinib in the presence of the growth factors TGF- β and PDGF-BB, for 24 and 48 h. At the end of the incubation period the total GAGs were isolated and purified from the culture supernatants and the cell fractions (cells associated with the deposited extracellular matrix) by ethanol precipitation after extensive treatment with pronase, DNase and alkali borohydride. A quantitative measurement of GAGs was performed by measuring their content of uronic acids colorimetrically. GAGs were separated by electrophoresis on cellulose acetate membranes and characterized using specific GAG-degrading enzymes.

We found that mesothelial cells secrete HA, heparan sulfate (HS) and chondroitin sulfate. The same GAGs were also found in the cell-associated fraction. Malignant mesothelioma cells secrete and deposit in the extracellular matrix HA and HS. TGF- β and PDGF-BB significantly stimulated the secretion and deposition of GAGs in both mesothelial and mesothelioma cells. Gefitinib inhibited the secretion and deposition of GAGs from both cell types, in a dose-dependent manner, mainly, by downregulating the synthesis of HA, an effect that was most prominent in malignant mesothelioma cells. Furthermore, gefitinib inhibited the stimulatory effect of TGF- β and PDGF-BB on GAG synthesis by mesothelial and mesothelioma cells.

Our results indicate that treatment of malignant mesothelioma with gefitinib may result in decreased synthesis of HA by mesothelioma cells. Since elevated amounts of HA have been correlated with increased malignancy of mesothelioma cells the inhibitory effect of gefitinib on HA synthesis may have an additional beneficiary effect on tumor cell proliferation and migration in the treatment of malignant mesothelioma.

ΕΠΙΘΕΩΡΗΣΗ ΚΛΙΝΙΚΗΣ ΦΑΡΜΑΚΟΛΟΓΙΑΣ
ΚΑΙ ΦΑΡΜΑΚΟΚΙΝΗΤΙΚΗΣ 25: 64-66 (2007)
©ΦΑΡΜΑΚΟΝ-Τύπος

Νέο Αζωμεθινικό Κουμαρινικό Παράγωγο με Αντιοξειδωτική - Αντιφλεγμονώδη - Αντιθρομβωτική Δράση. Δράση σε Δείκτες Φλεγμονής

Χ. Κοντογιώργης¹, Δ. Χατζηπαύλου-Λίτινα¹, Δ. Καπουκρανίδου²,
Β. Στεργίου-Μιχαηλίδου² και Κ. Καλλαράς²

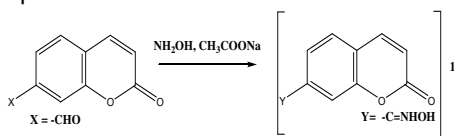
¹Εργαστήριο Φαρμακευτικής Χημείας, Τμήμα Φαρμακευτικής, ²Εργαστήριο Φυσιολογίας, Ιατρική Σχολή, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο, 54124 Θεσσαλονίκη, Ελλάδα

ΕΙΣΑΓΩΓΗ - ΣΚΟΠΟΣ

Η αντιφλεγμονώδης δράση των κουμαρινών (1) έχει μελετηθεί σε βάθος και έχουν γίνει αρκετές προσπάθειες τόσο σε φυσικά προϊόντα, όσο και σε συνθετικά. Εκτενής μελέτη διαφόρων κουμαρινικών παραγώγων πραγματοποιήθηκε με το πρότυπο της καραγεννίνης που οδήγησε σε σημαντικά αποτελέσματα (1). Μελέτες έχουν αποδείξει ότι η κουμαρίνη και τα παράγωγά της αναστέλλουν τη βιοσύνθεση των προσταγλανδινών μέσω της δράσης τους στην κυκλοξυγονάση, αλλά και στη λιποξυγονάση (1). Η αντιφλεγμονώδης δράση των βενζοπυρανονών σχετίζεται με τη δυνατότητά τους να λειτουργούν ως σαρωτές ελευθέρων ριζών με βάση τα πειράματα που έγιναν, τόσο από την αλληλεπίδραση με την ελεύθερη σταθερή ρίζα (DPPH), όσο και από τη δράση στη λιπιδική υπεροξειδωση και στην υπεροξειδική δεσμουτάση, αποδεικνύοντας ότι αρκετά κουμαρινικά παράγωγα εμφανίζουν και σημαντική αντιοξειδωτική δράση. Πρόσφατα (2,3) ανακοινώθηκε η σύνθεση αζωμεθινικών κουμαρινικών παραγώγων με αντιφλεγμονώδη και ανασταλτική δράση επί της λιποξυγονάσης και επί διαφόρων σερινοπρωτεασών. Ο ρόλος της λιποξυγονάσης στη αθηρωμάτωση έχει αποδειχθεί. Η πήξη και η φλεγμονή είναι διαδικασίες στενά συνδεδεμένες. Τα ενδοθηλιακά κύτταρα των αγγείων συμμετέχουν στις διαδικασίες αυτές. Η θρομβίνη θεωρείται ως μεσολαβητής της φλεγμονής, επειδή η έκθεση σε μεγάλες συγκεν-

τρώσεις θρομβίνης συνοδεύεται από γρήγορη αύξηση της διαπερατότητας του ενδοθηλίου. Επομένως τα μόρια αυτά, λόγω των ιδιοτήτων που έχουν, θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν ως εκλεκτικοί αναστολείς της θρομβίνης στην αντιπηκτική θεραπεία.

Στην εργασία αυτή έγινε *in vitro/in vivo* διερεύνηση της αντιφλεγμονώδους δράσης ενός νέου αζωμεθινικού κουμαρινικού παράγωγου (Ω_2) (Σχήμα 1), σε δείκτες φλεγμονής σε υπερχοληστεριναιμικούς ενήλικες κόνικλους λευκής φυλής (NZY) μετά από επταήμερη καθημερινή χορήγηση.



Σχήμα 1. Η δομή του αζωμεθινικού κουμαρινικού παράγωγου Ω_2

ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

Στη μελέτη χρησιμοποιήθηκαν 8 λευκοί ενήλικες κόνικλοι (NZY). Για διάστημα 120 ημερών τα ζώα ελάμβαναν ειδικά επεξεργασμένη τροφή εμπλουτισμένη με καθαρή 2% χοληστερόλη (Dolder/Switzerland) καθώς και καλαμποκέλαιο 6%, με στόχο τα πειραματόζωα να καταστούν υπερχοληστεριναιμικά. Την πρώτη ημέρα, πριν από την έναρξη της υπερχοληστεριναιμικής διαίτας, έγινε λήψη φλεβικού αίματος προκειμένου να

προσδιοριστούν αιματολογικές παράμετροι (γενική αίματος, προθρομβίνη, ινωδογόνο) των πειραματόζων καθώς και βιοχημικές παράμετροι (χοληστερίνη, τριγλυκερίδια, ολικές πρωτεΐνες ορού αίματος). Στα ίδια δείγματα προσδιορίστηκαν C_3 , C_4 , CRP, α_1 -αντιθρυψίνη-(AAT), απτογλοβίνη ή απποσφαιρίνη-(HPT). Οι πρωτεΐνες οξείας φάσης (CRP, AAT- α_1 -αντιθρυψίνη, (HPT)-απτογλοβίνη-απποσφαιρίνη) καθώς και οι παράγοντες του συμπληρώματος C_3 , C_4 , είναι δυνατόν να ενεργοποιηθούν κατά τη διάρκεια μιας αντίδρασης αμύνης του οργανισμού. Στο τέλος των 120 ημερών και αφού έγινε και πάλι λήψη αίματος για τους αντίστοιχους προσδιορισμούς, τα πειραματόζα χωρίστηκαν σε 2 ομάδες αποτελούμενες από 4 πειραματόζα η κάθε μία. Στην πρώτη ομάδα έγινε χορήγηση της ουσίας Ω_2 , (σε δόση 0,004 mmol/ml/kg σωματικού βάρους) για διάστημα επτά ημερών. Τα ζώα ζυγίζονταν καθημερινά ώστε να διαμορφωθεί η δόση της χορηγούμενης κάθε φορά ουσίας. Η δεύτερη ομάδα αποτέλεσε την ομάδα των μαρτύρων στην οποία χορηγήθηκε μόνο ο υγρός φορέας. Στο τέλος της χορήγησης έγινε και πάλι λήψη αίματος για επανάληψη των προηγούμενων προσδιορισμών ώστε να μελετηθεί συγκριτικά η δράση της χορηγούμενης ουσίας (Πίνακας 1).

Πίνακας 1
Ομάδες πειραματόζων και αιμοληψίες

ΟΜΑΔΑ 1 ^η (N=4)			ΟΜΑΔΑ 2 ^η (N=4)		
Χορήγηση Ω_2 (N ₁ =7)			Μάρτυρες (N ₁ =7)		
Χρόνος αιμοληψιών (N ₂ =3)			Χρόνος αιμοληψιών (N ₂ =3)		
1	A ₁	B ₁	5	A ₅	B ₅
2	A ₂	B ₂	6	A ₆	B ₆
3	A ₃	B ₃	7	A ₇	B ₇
4	A ₄	B ₄	8	A ₈	B ₁₈

N = αριθμός πειραματόζων

N₁ = ημέρες χορήγησης,

N₂ = αριθμός αιμοληψιών

1,2,3,...8 = λήψη αίματος κατά την έναρξη του πειράματος,

A₁, A₂,...A₈ = λήψη αίματος μετά την επίτευξη υπερχοληστεριναιμίας

B₁, B₂,...B₈ = λήψη αίματος μετά τη λήξη της χορήγησης της φαρμακευτικής ουσίας.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Τα αποτελέσματα υποβλήθηκαν σε μη παραμετρική ANOVA επαναλαμβανόμενων μετρήσεων (Friedman's Rank Test). Από την επεξεργασία προέκυψε ότι οι παράγοντες C_4 και AAT (α_1 -αντιθρυψίνη) έδειξαν στατιστικά σημαντική διαφορά ($p < 0,05$), παρά το μικρό αριθμό των πειραματόζων. Οι υπόλοιποι παράγοντες, με πιο εμφανή των C-αντιδρώσα πρωτεΐνη, τείνουν να βελτιώνουν τις τιμές τους μετά τη χορήγηση της φαρμακευτικής ουσίας.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Συνολικά, η υπό δοκιμασία ένωση φαίνεται να επηρεάζει ευνοϊκά δείκτες φλεγμονής, γεγονός που ενθαρρύνει την περαιτέρω ενδεδειγμένη μελέτη της.

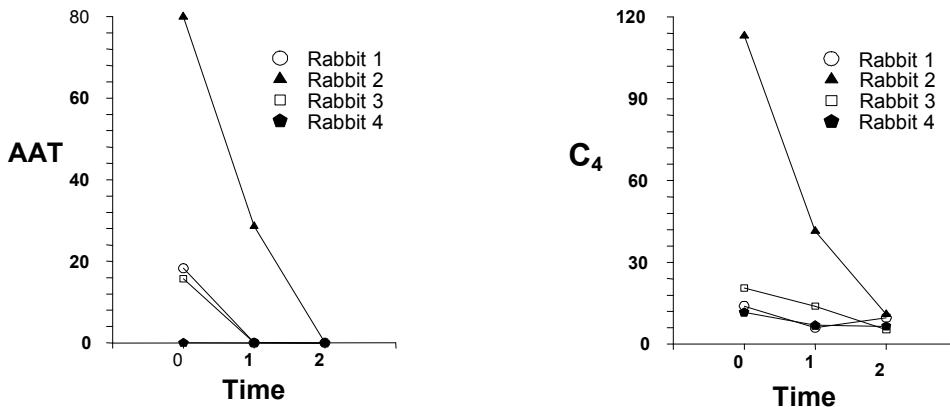
Πίνακας 2
Επίπεδα βιοχημικών παραμέτρων

Αιμοληψία	C_3	C_4	CRP	AAT	HPT
1	<5,83	14	1,46	18,30	7,76
A ₁	6,90	6,02	1,43	<10	<5,83
B ₁	<5,83		0,188	<10	<5,83
2	94,6	113	1,24	79,90	46,70
A ₂	39,80	41,5	1,47	28,60	<5,83
B ₂	<5,83	10,90	5,25	<10	<5,83
3	<5,83	20,60	1,37	15,70	<5,83
A ₃	12,60	13,90	29,50	<10	<5,83
B ₃	9,31	5,35	0,81	<10	<5,83
4	10,90	11,70	1,09	<10	0
A ₄	<5,83	6,93	1,72	<10	<5,83
B ₄	<5,83	6,57	0,49	<10	<5,83

Τιμές αναφοράς: C_3 = 79-152 mg/dl, C_4 = 16-38 mg/dl, CRP = 0 – 0,8 mg/dl, AAT = 88 – 274 mg/dl, HPT = 36-195 mg/dl

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΠΑΡΑΠΟΜΠΕΣ

1. Litinas et al.: *Curr. Pharm. Des.* 30: 3813 (2004)
2. Kontogiorgis C., Hadjipavlou D.: *Biorg. Med. Chem. Lett.* 14: 611-614 (2004)
3. Kontogiorgis C.: PhD Thesis, 2004



Σχήμα 2. Συγκεντρώσεις του AAT και C₄ κατά κόνικλο σε διαφορετικές χρόνους αιμοληψίας (1 = κατά την έναρξη του πειράματος, 2 = μετά την επίτευξη υπερχοληστεριναϊμίας, 3 = μετά τη λήξη της χορήγησης της φαρμακευτικής ουσίας Ω₂)

New Azomethine Coumarinic Derivative with Antioxidant - Antiinflammatory - Antithrombotic Activity. Activity on inflammatory indicators

A.C. Kontogiorgis¹, D.Hadjipavlou-Litina¹, D. Kapoukranidou², B. Stergiou-Michailidou² and K. Kallaras²

¹Department of Pharmaceutical Chemistry, School of Pharmacy, ²Department of Physiology, School of Medicine, Aristotelian University of Thessaloniki, Thessaloniki 54124, Greece

Key words: Inflammation, azomethine coumarinic derivative

Correspondence address: D.Hadjipavlou-Litina, email: hadjipav@pharm.auth.gr

SUMMARY. Inflammation might play an important role in the initiation, progression of cardiovascular diseases (CVDs) and blood coagulation cascade. The designation of CVD as a chronic inflammatory process is further supported by evidence that the risk factors for CVD cause endothelial cells throughout the vascular tree to assume an inflammatory phenotype. These activated endothelial cells characteristically exhibit oxidative stress and increased adhesiveness for circulating leukocytes. Although initial efforts to define the mechanisms underlying the inflammatory phenotype in diseased endothelial cells have focused on the linkage

between oxidative stress and adhesion molecule activation/expression, recent work has implicated a variety of additional factors that can modulate the magnitude and/ or nature of the inflammatory responses in CVD. Activation of blood coagulation and thrombin formation accompany inflammation, wound healing, atherogenesis and other processes induced by endothelial injury. Coumarins comprise a large class of phenolic substances in plants. Coumarins' natural and synthetic derivatives were found to possess significant anti-inflammatory and antioxidant activities. Many coumarin compounds are recognized as lipoxygenase and cyclooxygenase inhibitors. In this study we tested the effect of a new azomethine coumarin derivative (Ω₂), designed and synthesized as possible anti-inflammatory and antioxidant agent, on several inflammatory indices in male cholesterol-loaded (feeding with 2% cholesterol and 6% corn oil for 120 days) atherosclerotic NZW rabbits. Blood samples for lipids and anti-inflammatory indices [C3, C4, CRP, α1-antithrypsin (AAT), haptoglobin (HAT)] were taken before and after feeding, as well as 7-days after the daily administration of substance Ω₂ (0.004 mmol/ml/kg body weight). The results were analyzed by the Friedman's rank test. In general treatment with the Ω₂ azomethine coumarin derivative induced significant decreases (p<0.05) of C₄ and AAT levels. All other parameters measured tended to decrease, without, though, significant differences. It is concluded that the tested compound shows satisfactory antiinflammatory activity and it must be investigated thoroughly.

Δομικές Τροποποιήσεις Κλασικών μη Στεροειδών Αντιφλεγμονωδών Μπορούν να Οδηγήσουν στην Ανακάλυψη Καλύτερων Φάρμακων για Νόσους της Σύγχρονης Κοινωνίας

Π.Ν. Κουρουνάκης¹, Ε.Α. Ρέκκα¹, Δ. Γαλανάκης¹, Χ. Δουλγκέρης¹, Ι. Σίσκου¹, Κ. Τσιακιτζής¹, Α.Π. Κουρουνάκη² και Α. Γαβαλάς¹

¹Τομέας Φαρμακευτικής Χημείας, Τμήμα Φαρμακευτικής, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο, Θεσσαλονίκη, Ελλάς. ²Τομέας Φαρμακευτικής Χημείας, Τμήμα Φαρμακευτικής, Πανεπιστήμιο Αθηνών. Αθήνα, Ελλάς

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Στις σύγχρονες κοινωνίες, νοσηρότητα και θνησιμότητα από καρδιαγγειακά και νευροεκφυλιστικά, τύπου Alzheimer (SDAT), νοσήματα αυξάνονται ραγδαία και απαιτούν άμεση ανάπτυξη καλύτερων και ασφαλέστερων θεραπευτικών μέσων. Κοινό παθοφυσιολογικό εύρημα αθηρωμάτωσης και SDAT είναι η φλεγμονή στο τοίχωμα των αγγείων ή ορισμένων περιοχών του εγκεφάλου, αντιστοίχως. Τα γνωστά μη στεροειδή αντιφλεγμονώδη φάρμακα (NSAIDs) έχουν ως πολύ συχνή και επικίνδυνη ανεπιθύμητη ενέργεια την γαστρεντερική (GI) τοξικότητα. Η ιδιότητα αυτή είναι δύσκολο να διαχωρισθεί από τη φαρμακολογική τους δράση, διότι βασίζεται στον ίδιο μοριακό μηχανισμό.

ΣΚΟΠΟΣ - ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

Βασιζόμενοι, λοιπόν, στη δομή ορισμένων NSAIDs και τροποποιώντας αυτήν, έτσι ώστε το νέο μόριο να αποκτά αντιοξειδωτική, αντι-δυσλιπιδαιμική και νοοτρόπο δράση, ενώ θα διατηρεί τον αντιφλεγμονώδη χαρακτήρα και θα παρουσιάζει μειωμένη GI τοξικότητα, συνθέσαμε ενώσεις με τις παραπάνω βιολογικές ιδιότητες.

Η γενική δομή τους ήταν: NSAID-προλίνη-αντιοξειδωτικό.

- NSAID = δικλοφαινάκη, ναπροξένη, ιβουπροφαίνη
- Προλίνη = L-προλίνη, ενωμένη διπώς αμιδικά
- Αντιοξειδωτικό = κυστεαμίνη, αιθυλεστέρας κυστεΐνης

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Δύο ενώσεις ελέγχθηκαν για προστατευτική δράση έναντι οξειδωτικής βλάβης εγκεφάλου, μετά από ισχαιμία – επαναιμάτωση. Και οι δύο ενώσεις βρέθηκε ότι προστατεύουν αποτελεσματικά τον εγκέφαλο από οξειδωτική βλάβη. Τα απότέλεσμά του φαρμακολογικού ελέγχου έδειξαν ότι οι αναμενόμενες ιδιότητες εκφράζονται στις νέες ενώσεις και μάλιστα, σε αρκετές περιπτώσεις, σε μεγαλύτερο βαθμό σε σύγκριση με το μητρικό NSAID αναφοράς.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Τα αποτελέσματα αυτά δείχνουν ότι ακολουθήσαμε σωστή οδό για το σχεδιασμό των ενώσεων, βασιζόμενοι στην παθοβιοχημεία της νόσου. Οι ενώσεις αυτές θα μπορούσαν να θεωρηθούν επιτυχείς οδηγόι δομές για την ανάπτυξη μέσων προς αντιμετώπιση υπερχοληστερολαιμίας και SDAT.

Structural Modification of Non Steroidal Anti-Inflammatory Drugs Can Lead to the Discovery of Better Agents against Diseases of Modern Societies

P.N. Kourounakis¹, E.A. Rekka¹, D. Galanakis¹, C. Doulgeris¹, I. Siskou¹, K. Tsiakitzis¹, A.P. Kourounakis² and A. Gavalas¹

¹Department of Pharmaceutical Chemistry, School of Pharmacy, Aristotelian University, Thessaloniki, Greece; ²Department of Pharmaceutical Chemistry, School of Pharmacy, University of Athens, Athens, Greece

Key words: Non steroidal anti-inflammatory drugs, structural modification, therapeutic agents, diseases, modern societies

SUMMARY. In modern societies, morbidity caused by cardiovascular diseases and neurodegeneration of Alzheimer's type (SDAT) is rapidly increased. Therefore, these conditions demand the discovery of better

and safer therapeutic agents. A common pathophysiological deviation of both atheromatosis and SDAT is inflammation of the vessel wall and of certain regions of the brain, respectively. The non steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) share a common, quite dangerous side effect, the high gastrointestinal (GI) toxicity. This undesired side effect of NSAIDs is hard to be separated from their therapeutic property, because both are due to the same molecular mechanism of action. Based on the above, we modified the structures of certain NSAIDs, so that the novel molecules would keep the anti-inflammatory action and, in addition, they would acquire antioxidant, anti-dyslipidemic activity and nootropic properties, while they would have low GI toxicity. The pharmacological testing demonstrated that these compounds possessed all the expected properties, i.e. anti-inflammatory, antioxidant, anti-dyslipidemic action and low GI toxicity. They also protected the brain from oxidative injury after an ischemia/reperfusion challenge. These results indicate that we have followed the correct way in the design of these compounds. Thus, they can be considered as successful lead compounds for the development of agents against hypercholesterolemia and SDAT.

Οι Ντοπαμινεργικοί D₂-Υποδοχείς του Παγκρέατος Ρυθμίζουν την Καταστολή μέσω Ινσουλίνης της Έκφρασης των Κυτοχρωμάτων CYP2E1 και CYP2B1/2

Μαρία Κωνσταντή^{1*}, Γεωργία Ρέντση¹, Μάριος Μαρσέλος¹ και Matti A. Lang²

¹Εργαστήριο Φαρμακολογίας, Ιατρική Σχολή, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων, Ιωάννινα GR-45110, Ελλάδα

²University of Uppsala, Faculty of Pharmacy, Division of Biochemistry, Uppsala, Box 578S75123, Sweden

ΕΙΣΑΓΩΓΗ - ΣΚΟΠΟΣ

Τα κυτοχρώματα CYP2E1 και CYP2B1/2 εμπλέκονται στον μεταβολισμό πληθώρας φαρμάκων, περιβαλλοντικών ρύπων, τοξικών ουσιών και καρκινογόνων (1,2). Ειδικά το κυτόχρωμα CYP2E1 συχνά οδηγεί στον σχηματισμό ελευθέρων ριζών (ROS) που εμπλέκονται σε κυτταρικές βλάβες και προκαλούν νόσους, όπως ο καρκίνος και η κίρρωση του ήπατος (2,3). Υπάρχουν ενδείξεις ότι παράγοντες, που επηρεάζουν την έκφραση του CYP2E1, μεταβάλλουν την τοξικότητα υποστρωμάτων που μεταβολίζονται από το CYP2E1, όπως η αιθυλική αλκοόλη, το βενζόλιο, ορισμένες νιτροζαμίνες, αλογονομένα αλκάνια και φάρμακα (1). Αναφέρθηκε πρόσφατα ότι η έκφραση του CYP2E1 ευρίσκεται υπό τον έλεγχο ενδοκυτταρικών οδών σήμανσης που ρυθμίζονται από την ινσουλίνη (4,5). Είναι γνωστό, ότι η ντοπαμίνη αναστέλλει την έκκριση της ινσουλίνης σε απάντηση στα αυξημένα επίπεδα γλυκόζης του πλάσματος (6). Η δράση της αυτής της ντοπαμίνης πιθανώς ελέγχεται από τους D₂-υποδοχείς που εκφράζονται στα βήτα κύτταρα του παγκρέατος.

Ο σκοπός της μελέτης αυτής ήταν να διερευνήσουμε τον ρόλο της ντοπαμίνης και ειδικότερα των D₂-υποδοχέων στη ρύθμιση των κυτοχρωμάτων CYP2E1 και CYP2B1/2. Τα ντοπαμινεργικά συστήματα τροποποιήθηκαν με χορήγηση

L-DOPA σε συνδυασμό με βενζεραζίδη (αναστολέας περιφερικής αποκαρβοξυλάσης της L-DOPA) και με τον εκλεκτικό D₂-ανταγωνιστή, σουλπιρίδη. Διερευνήθηκε επίσης ο ρόλος της ντοπαμίνης και των D₂-υποδοχέων στη ρύθμιση της επαγωγής των κυτοχρωμάτων CYP2E1 και CYP2B1/2 με φαινοβαρβιτάλη.

ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

Ενήλικες αρσενικοί επίμυες Wistar (Κuo/Io/rr) χρησιμοποιήθηκαν σε αυτή τη μελέτη. Αυτοί διέμεναν σε χώρο υπό εναλλαγή φωτός-σκότους ανά 12 ώρες. Σε 5 επίμυες χορηγήθηκε L-DOPA (Roche, Switzerland; 50mg/kg b.w., i.p.) μαζί με υδροχλωρική βενζεραζίδη (Roche, Switzerland; 12,5 mg/kg b.w., i.p.) καθημερινά επί δύο φορές και για τέσσερις ημέρες. Η σουλπιρίδη (Sigma, USA; 12 mg/kg b.w., i.p.) χορηγήθηκε σε 5 επίμυες επίσης δύο φορές την ημέρα και για 4 ημέρες. Οι μάρτυρες έλαβαν φυσιολογικό ορρό. Όλοι οι επίμυες θυσιάστηκαν στο τέλος του πειράματος, δύο ώρες μετά την τελευταία χορήγηση φαρμάκου και τμήματα ήπατος εξήχθησαν για την απομόνωση μικροσωματίων σύμφωνα με την μέθοδο του Lang και των συνεργατών του (7). Οι πρωτείνες προσδιορίστηκαν με την μέθοδο του Lowry και των συνεργατών του (8). Η μικροσωματική δραστικότητα της υδροξυλάσης της π-νιτροφαινόλης (PNP), που εξαρτάται από το

CYP2E1, προσδιορίστηκε σύμφωνα με την μέθοδο που περιγράφηκε από τους Reinke και Moyer (1). Η δραστηριότητα της αποκαρβοξυλάσης της πεντοξυρεσορουφίνης (PROD), που καταλύεται από το κυτόχρωμα CYP2B1/2, προσδιορίστηκε φθορισμομετρικά σε μικροσωμάτια ήπατος χρησιμοποιώντας σαν υπόστρωμα την 7-πεντοξυρεζορουφίνη (Burke and Majer, 1975). Οι πρωτεΐνες αναλύθηκαν με Western blot.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ - ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η σουλπιρίδη, εκλεκτικός D₂-ανταγωνιστής, αύξησε τα επίπεδα της ινσουλίνης του πλάσματος, γεγονός που συνοδεύτηκε από καταστολή της βασικής έκφρασης των κυτοχρωμάτων CYP2E1 και CYP2B1/2. Αξίζει επίσης να σημειωθεί, ότι η επαγωγή των δραστηριοτήτων PNP και PROD που προκάλεσε η φαινοβαρβιτάλη, κατεστάλη από τη σουλπιρίδη. Η CYP2E1 αποπρωτεΐνη επίσης κατεστάλη από τη σουλπιρίδη σε επίμυες που πήραν φαινοβαρβιτάλη, όχι όμως και η CYP2B1/2. Η L-DOPA δεν επηρέασε τα επίπεδα της ινσουλίνης, τη βασική και επηγμένη έκφραση του CYP2E1, κατέστειλε, όμως, την έκφραση του CYP2B1/2. Είναι πιθανόν, ότι η ντοπαμίνη ρυθμίζει, μέσω των παγκρεατικών D₂-υποδοχέων, την κατασταλτική επίδραση της ινσουλίνης στην έκφραση των κυτοχρωμάτων CYP2E1 και CYP2B1/2. Αυτή η υπόθεση υποστηρίζεται από το γεγονός ότι η ντοπαμίνη αναστέλλει την έκκριση της ινσουλίνης σε απάντηση στα υψηλά επίπεδα γλυκόζης στο πλάσμα μέσω των D₂-υποδοχέων που εκφράζονται στα βήτα κύτταρα του παγκρέατος. Η ρύθμιση του CYP2B1/2 φαίνεται να ρυθμίζεται και κεντρικά από τη ντοπαμίνη μέσω πιθανώς των D₁-υποδοχέων.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑ

Τα αποτελέσματα αυτής της μελέτης δείχνουν το σημαντικό ρόλο της ντοπαμίνης και ειδικά των D₂-υποδοχέων στη ρύθμιση της έκφρασης των κυτοχρωμάτων CYP2E1 και CYP2B1/2. Αυτή η ρύθμιση φαίνεται να γίνεται μέσω της ινσουλίνης, η οποία έχει ανασταλτικό ρόλο. Η επαγωγή των κυτοχρωμάτων αυτών με φαινοβαρβιτάλη, επίσης τροποποιείται από τη ντοπαμίνη μέσω ινσουλίνης.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΠΑΡΑΠΟΜΠΕΣ

1. Reinke L.A., Moyer M.J.: p-Nitrophenol hydroxylation. A microsomal oxidation which is highly inducible by ethanol. *Drug Metab. Dispos.* 13: 548-552 (1985)
2. Gonzalez F.J.: Role of cytochromes P450 in chemical toxicity and oxidative stress: studies with CYP2E1. *Mutation Res.* 569: 101-110 (2005)
3. Ingelman-Sundberg M. Human drug metabolising cytochrome P450 enzymes: properties and polymorphisms. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 369(1): 89-104 (2004)
4. Woodcroft K.J., Hafner M.S., Novak R.F.: Insulin signaling in the transcriptional and posttranscriptional regulation of CYP2E1 expression. *Hepatology* 35: 263-273 (2002)
5. Moncion A., Truong N.T., Garrone A., Beaune P., Barouki R., De Waziers I.: Identification of a 16-nucleotide sequence that mediates post-transcriptional regulation of rat CYP2E1 by insulin. *J. Biol. Chem.* 277: 45904-45910 (2002)
6. Rubi B., Ljubovic S., Pournourmohammadi S., Carobbio S., Armanet M., Bartley C., Maechler P.: Dopamine D₂-like receptors are expressed in pancreatic beta cells and mediate inhibition of insulin. *Endocrinology* 146: 3266-3276 (2005)
7. Lang M.A., Gielen J.E., Nebert D.W.: Genetic evidence for many unique liver microsomal P-450 mediated monooxygenase activities in heterogenic stock mice. *J. Biol. Chem.* 256: 12068-12075 (1981)
8. Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randal R.J.: Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265-275 (1951)

	Μάρτυρες	L-DOPA	Σουλπιρίδη	Φαινοβαρβιτάλη	Φαινοβαρβιτάλη L-DOPA	Φαινοβαρβιτάλη Σουλπιρίδη
Ινσουλίνη pg/ml	0,39±0,02	0,36±0,05	1,26±0,18**	0,64±0,06*	0,46±0,06	1,47±0,21**
PNP pmoles/mg protein	343,1±29	310,2±46	85,4±33,5**	966,3±37**	855±39**	916,4±59,8**
PROD pmoles/min/mg	2,4±0,1	2,95±0,26	0,74±0,02**	56,2±4,7**	32,5±5*	40,9±2,4*

Pancreatic D₂-Dopaminergic Receptors Regulate the Insulin-induced Down-regulation of Cytochromes CYP2E1 and CYP2B1/2

Maria Konstandi^{1*}, Georgia Redesi¹, Marios Marselos¹ and Matti A. Lang²

¹Department of Pharmacology, Medical School, University of Ioannina, Ioannina GR-45110, Greece

²Division of Biochemistry, Faculty of Pharmacy, University of Uppsala, Uppsala, Box 578S75123, Sweden

Key words: Pancreas, D₂-receptors, cytochromes CYP2E1, cytochromes CYP2B1/2, insulin, down-regulation

SUMMARY. Cytochromes CYP2E1 and CYP2B1/2 catalyse the metabolism of a wide spectrum of drugs and toxic compounds including carcinogens and pro-

carcinogens, among others. Insulin is involved in the regulation of the expression of both cytochromes. The aim of the present study was to investigate the mechanism that underlies the insulin-induced regulation of these genes. It was found that dopamine via pancreatic D₂-receptors regulates the response of insulin in the increased plasma glucose levels. The D₂-antagonist sulpiride increased plasma insulin levels, an event that was followed by a down-regulation of the constitutive cytochrome CYP2E1 and CYP2B1/2 expression. On the other hand, the phenobarbital-induced CYP2E1-catalysed p-nitrophenol hydroxylase (PNP) and CYP2B1/2-catalysed pentoxyresorufin 7-hydroxylase (PROD) activities were suppressed by sulpiride. CYP2E1 apoprotein levels were also markedly suppressed, whereas CYP2B1 apoprotein levels remained unaffected. L-DOPA did not affect insulin levels, constitutive and phenobarbital-induced CYP2E1 expression. However, the drug suppressed the phenobarbital-induced PROD activity and CYP2B1/2 protein levels. In conclusion, the role of pancreatic dopaminergic D₂-receptors is profoundly determinant in the regulation of the cytochromes CYP2E1 and CYP2B1/2 by insulin.

ΕΠΙΘΕΩΡΗΣΗ ΚΛΙΝΙΚΗΣ ΦΑΡΜΑΚΟΛΟΓΙΑΣ
ΚΑΙ ΦΑΡΜΑΚΟΚΙΝΗΤΙΚΗΣ 25: 72-74 (2007)
©ΦΑΡΜΑΚΟΝ-Τύπος

Η RGS4 Πρωτεΐνη Προσδένεται στα Καρβοξυτελικά Άκρα των μ- και δ-Οπιοειδών Υποδοχέων

Λεωνίδα Λεοντιάδης και Ζαφειρούλα Γεωργούση*

Εργαστήριο Κυτταρικής Σηματοδότησης και Μοριακής Φαρμακολογίας, Ινστιτούτο Βιολογίας, Εθνικό Κέντρο Έρευνας Φυσικών Επιστημών Δημόκριτος, 153 10, Αγ. Παρασκευή, Ελλάδα. *iro@bio.demokritos.gr

ΕΙΣΑΓΩΓΗ - ΣΚΟΠΟΣ

Οι οπιοειδείς υποδοχείς (μ-, δ-, κ-) ανήκουν στους υποδοχείς που συζεύγνυται με G πρωτεΐνες (G protein coupled receptors, GPCRs) και ενεργοποιούνται από ενδορφίνες, διάφορα οπιοειδή πεπτιδία ή και αλκαλοειδή μεσολαβώντας σε ποικιλία φυσιολογικών αποκρίσεων στο νευρικό σύστημα, όπως είναι το αίσθημα του πόνου, η μνήμη και η μάθηση. Οι οπιοειδείς υποδοχείς συζεύγνυται κυρίως με τις G_i/G_o πρωτεΐνες και η αλληλεπίδραση αυτή έχει ως κύριο αποτέλεσμα την καταστολή της ενεργότητας της αδενυλικής κυκλάσης, πέραν όμως αυτής της λειτουργίας οι οπιοειδείς υποδοχείς παίζουν ρόλο και στη ρύθμιση διαφόρων καναλιών ιόντων και άλλων συστημάτων τελεστών (1). Προηγούμενες μελέτες του εργαστηρίου μας έχουν δείξει τη σημασία της τρίτης ενδοκυτταρικής θηλιάς και του καρβοξυτελικού άκρου των οπιοειδών υποδοχέων στην αλληλεπίδραση των υποδοχέων αυτών με G πρωτεΐνες, αλλά και με νέες κυταροπλασματικές πρωτεΐνες (2-5).

Οι RGS πρωτεΐνες (regulator of G protein signalling) είναι νέα κατηγορία πρωτεϊνών, οι οποίες αλληλεπιδρούν με την Gα υπομονάδα των G πρωτεϊνών και επιταχύνουν το ρυθμό υδρόλυσης του GTP σταματώντας τη μεταφορά του ερεθίσματος από τους υποδοχείς στους τελεστές, μεταβάλλοντας την αποτελεσματικότητα και την κινητική μετάδοσης της πληροφορίας των GPCRs. Τελευταία δεδομένα δηλώνουν ότι οι RGS πρωτεΐνες λειτουργούν επίσης ως πλατφόρμες για τη δημιουργία πρωτεϊνικών ικριω-

μάτων και εμπλέκονται στη σηματοδότηση των GPCRs.

Σκοπός της παρούσας μελέτης είναι να διαπιστώσουμε την αλληλεπίδραση των RGS πρωτεϊνών με τους οπιοειδείς υποδοχείς και να εξηγήσουμε τις λειτουργικές συνέπειες αυτής της αλληλεπίδρασης στην κυτταρική σηματοδότηση των οπιοειδών υποδοχέων. Συγκεκριμένα, στόχος μας είναι να πιστοποιήσουμε την αλληλεπίδραση της RGS4 πρωτεΐνης με τα καρβοξυτελικά άκρα των μ- και δ- οπιοειδών υποδοχέων και την πιθανή δημιουργία ενός συμπλόκου σηματοδότησης, όπως και να χαρτογραφήσουμε τα ακριβή σημεία επαφής αυτής της πρωτεΐνης στα καρβοξυτελικά άκρα.

ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

Δημιουργία GST (glutathione-S-transferase) συτηγμένων πρωτεϊνών

Τα καρβοξυτελικά άκρα των μ- και δ- οπιοειδών υποδοχέων καθώς και ελλειματικά τμήματά τους δημιουργήθηκαν από το cDNA των υποδοχέων με τη χρήση PCR. Στη συνέχεια οι αλληλουχίες εισήχθησαν σε φορέα pGEX 5x3 για επισήμανση των πεπτιδίων με GST στο N-άκρο.

Έκφραση πρωτεΐνης

Οι Θετικοί κλώνοι μετασηματίστηκαν σε κύτταρα *E. coli* (BL21-SI) όπως περιγράφεται από τις Mazaraku and Georgoussi (4).

In vitro πειράματα GST πρόσδεσης

Οι GST-συντηγμένες πρωτεΐνες ακινητοποιήθηκαν σε σφαιρίδια σεφαρόζης-γλουταθειόνης και επώαστηκαν με τις επιθυμητές πρωτεΐνες, ενώ ακολούθησαν πλύσεις και έκλουση των συμπλεγμάτων όπως περιγράφεται στο Georgoussi (3).

Ανοσοκατακρήμνιση πρωτεϊνικών συμπλόκων

Κύτταρα HEK293, που εκφράζουν σταθερά τον *myc* επισημασμένο μ -OR, διαμολύνθηκαν παροδικά με HA επισημασμένη RGS4. 72 ώρες μετά τη διαμόλυνση, τα κύτταρα επώαστηκαν παρουσία ή απουσία αγωνιστή DAMGO για 5 λεπτά. Στη συνέχεια τα κύτταρα λύθηκαν με διάλυμα λύσης όπως αναφέρεται στις Mazarakou and Georgoussi (4).

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ – ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Σχηματισμός λειτουργικών συμπλόκων μεταξύ της RGS4, του μ -OR και της G α σε κύτταρα HEK293

Σε προσπάθεια να μελετήσουμε κατά πόσο η RGS4 μπορεί να δημιουργήσει λειτουργικά σύμπλοκα με τον μ -OR και τις G α υπομονάδες, χρησιμοποιήσαμε HEK293 κύτταρα που εκφράζουν σταθερά τον *myc*- μ -OR και παροδικά την HA-RGS4. Μετά από ενεργοποίηση με τον αγωνιστή DAMGO (μ -οπιοειδής αγωνιστής) ή τον παράγοντα AMF, τα κυτταρικά λύματα ανοσοκατακρήμνιστηκαν με ένα αντι-*myc* αντίσωμα. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η HA-RGS4 αλληλεπιδρά με τον μ -OR, με τρόπο ανεξάρτητο από τον αγωνιστή. Για να προσδιορίσουμε, αν η G α αλληλεπιδρά με την RGS4, πραγματοποιήθηκαν παρόμοια πειράματα χρησιμοποιώντας ένα αντι-G α αντίσωμα, τα οποία πιστοποίησαν την δημιουργία σταθερών συμπλόκων μεταξύ της RGS4 και της G α . Τα παραπάνω δεδομένα αποδεικνύουν τη δημιουργία σταθερών συμπλόκων μεταξύ της RGS4, G α και του μ -OR σε κύτταρα HEK293.

Χαρτογράφηση των θέσεων αλληλεπίδρασης των μ - και δ - καρβοξυτελικών άκρων με την RGS4

Με δεδομένο ότι η RGS4 αλληλεπιδρά με τα καρβοξυτελικά άκρα του μ - και δ -OR, θελήσαμε

να προσδιορίσουμε τα ακριβή σημεία αλληλεπίδρασης στα καρβοξυτελικά αυτά τμήματα. Για το σκοπό αυτό δημιουργήσαμε GST-συντηγμένα πεπτιδία που περιλαμβάνουν ελλειμματικά τμήματα των καρβοξυτελικών άκρων των υποδοχέων, όπως τα ακόλουθα.

α) Πεπτιδίο 26 αμινοξέων, που εμπεριέχει δομικό μοτίβο 20 αμινοξέων (έλικα 8), συντηρημένο μεταξύ των μ - και δ -υποδοχέων (SCLNPVLYAFLDENFKRCRFREFCIPTS) και το ορίσαμε ως Δ C- μ -CT,

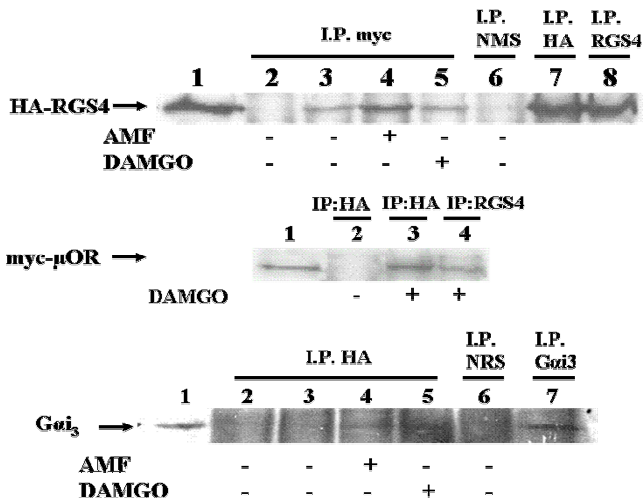
β) Ένα πεπτιδίο που αποτελείται από τα υπόλοιπα αμινοξέα του καρβοξυτελικού άκρου του μ -υποδοχέα και δεν περιλαμβάνει την συντηρημένη αλληλουχία (πεπτιδίο Δ N- μ -CT) και τέλος

γ) Ένα πεπτιδίο για τον δ - υποδοχέα που δεν περιλαμβάνει την συντηρημένη αλληλουχία (πεπτιδίο Δ N- δ -CT).

In vitro πειράματα πρόσδεσης αυτών των πεπτιδίων σε σφαιρίδια γλουταθειόνης έδειξαν ότι η RGS4 είναι σε θέση να προσδένεται στο πρώτο, συντηρημένο τμήμα Δ C- μ -CT με την ίδια συγγένεια όπως και σε ολόκληρο το μ -CT. Αντίθετα, καμιά πρόσδεση της RGS4 δεν παρατηρήθηκε στα μη συντηρημένα καρβοξυτελικά τμήματα Δ N- μ -CT και Δ N- δ -CT. Τα αποτελέσματα αυτά αναδεικνύουν τη σημασία της έλικας 8 στην πρόσδεση της RGS4 στο καρβοξυτελικό τμήμα των οπιοειδών υποδοχέων.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΠΑΡΑΠΟΜΠΕΣ

1. Law P.Y., Wong Y.H., Loh H.H.: Molecular mechanisms and regulation of opioid receptor signaling. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 40: 389-430 (2000)
2. Georgoussi Z., Merkouris M., Mullaney I., Megaritis G., Carr C., Zioudrou C., Milligan C.: Selective interactions of μ -opioid receptors with Pertussis toxin-sensitive G proteins: involvement of the third intracellular loop and the c-terminal tail in coupling. *Biochim. Biophys. Acta* 1359: 263-274 (1997)
3. Georgoussi Z., Leontiadis L., Mazarakou G., Merkouris M., Hyde K., Hamm H.: Selective interactions between G protein subunits and RGS4 with the C-terminal domains of the μ - and delta-opioid receptors regulate opioid receptor signaling. *Cell Signal.* 18: 771-782 (2006)
4. Mazarakou G., Georgoussi Z.: STAT5A interacts with and is phosphorylated upon activation of the μ -opioid receptor. *J. Neurochem.* 93: 918-931 (2005)
5. Morou E., Gergoussi Z.: Expression of the third intracellular loop of the delta-opioid receptor inhibits signaling by opioid receptors and other G protein-coupled receptors. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 315: 1368-1379 (2005)



RGS4 Protein Interacts with the Carboxyl-terminal Tails of the μ- and δ-Opioid Receptors

Leonidas J. Leontiadis and Z. Georgoussi*

Laboratory of Cellular Signaling and Molecular Pharmacology, Institute of Biology, National Center for Scientific Research *Demokritos*, GR-15310, Athens, Greece. *iro@bio.demokritos.gr

Key words: Opioid receptors, RGS proteins, protein-protein interaction

SUMMARY. Opioid receptors (μ-, δ-, κ-) belong to the superfamily of G protein coupled receptors (GPCRs) and modulate a variety of physiological responses in the nervous system. Opioid receptor signaling mechanisms have demonstrated the carboxyl-terminal tails (CT) of these receptors are critical in mediating the signal through the G proteins and are also known to

mediate protein-protein interactions by recruiting novel cytoplasmic proteins (2,4). Regulator of G protein signaling (RGS) proteins are molecules that serve as GTPase activating proteins and effector antagonists acting upon members of G proteins. Recent observations reveal that these proteins can directly interact with GPCRs to modulate signalling events and serve as scaffolds regulating their function. In order to map opioid receptor subdomains important for interaction and begin to identify components of a putative signal transduction complex mediated by these intracellular domains, we focused on the carboxyl-tails of the μ- and δ- opioid receptors and generated glutathione-S-transferase (GST) fusion proteins encompassing whole or parts of these domains to be used as probes to screen for new interacting proteins. In this respect we were able to demonstrate for the first time that a) RGS4 protein forms stable heterotrimeric complexes with μ- opioid receptor and Gα and b) the conserved part of μ- and δ- carboxyl-tails (helix VIII) is essential for RGS4 binding.

Ο Ρόλος της Ομοκυστεΐνης, της L-Αλανίνης και της L-Φαινυλαλανίνης στην Επίδραση της Χρόνιας Διατροφικής Έλλειψης Χολίνης επί της Δραστικότητας της Ακετυλχολινεστεράσης και της (Na⁺,K⁺)-ΑΤΡάσης Εγκεφάλου Επιμύων

Χ. Λιάπη¹, Ε. Φέσκου¹, Α. Ζάρρος² και Σ. Τσακίρης²

¹Εργαστήριο Πειραματικής Φαρμακολογίας και ²Εργαστήριο Πειραματικής Φυσιολογίας Ιατρικής Σχολής, Πανεπιστήμιο Αθηνών, Αθήνα, Ελλάδα

ΣΚΟΠΟΣ

Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η μελέτη της επίδρασης της χρόνιας διατροφικής έλλειψης χολίνης (ΧΕΧ) επί της δραστικότητας της ακετυλχολινεστεράσης (ΑChE) και της (Na⁺,K⁺)-ΑΤΡάσης εγκεφάλου επιμύων, καθώς και του ρόλου της ομοκυστεΐνης (Hcy), της L-αλανίνης (Ala) και της L-φαινυλαλανίνης (Phe) στην επίδραση αυτή.

ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

Χρησιμοποιήθηκαν Wistar επίμυες και των δύο φύλων, που κατανεμήθηκαν σε 4 ομάδες: α) ομάς αρρένων μαρτύρων (ΑΜ) (εξισορροπημένη διατροφή καθ' όλη τη διάρκεια της ζωής τους), β) ομάς θηλέων μαρτύρων (ΘΜ) (εξισορροπημένη διατροφή καθ' όλη τη διάρκεια της ζωής τους), γ) ομάς αρρένων χρονίως στερουμένων τη χολίνη (ΑΧΕΧ) (διατροφική έλλειψη χολίνης καθ' όλη τη διάρκεια της ενδομήτριας και εξωμήτριας ζωής τους) και δ) ομάς θηλέων χρονίως στερουμένων τη χολίνη (ΘΧΕΧ) (διατροφική έλλειψη χολίνης καθ' όλη τη διάρκεια της ενδομήτριας και εξωμήτριας ζωής τους). Πιο αναλυτικά, η ΧΕΧ διήρκεσε από τη στιγμή της σύλληψης των εξετασθέντων επιμύων, μέχρι και την ηλικία των 6 εβδομάδων μετά τη γέννηση, οπότε και τα πειραματόζωα θυσιάστηκαν με αποκεφαλισμό και ολόκληρος ο εγκέφαλος αφαιρέθηκε ταχύτατα. Ακολούθησε η ομογενοποίηση και η φυγοκέντρηση του ιστού σύμφωνα με τη διαδικασία που περιγρά-

φεται σε προηγούμενη δημοσίευσή μας (1). Στο προκύπτον υπερκείμενο υγρό, προσδιορίσθηκε: α) η συγκέντρωση της πρωτεΐνης σύμφωνα με τη μέθοδο των Lowry και συν. (2), β) η δραστικότητα της ΑChE σύμφωνα με τη μέθοδο των Ellman και συν. (3) και γ) η δραστικότητα της (Na⁺,K⁺)-ΑΤΡάσης σύμφωνα με τη μέθοδο των Bowler και Tirri (4). Παράλληλα, διεξήχθησαν και *in vitro* πειράματα με την προσθήκη Hcy, Ala ή/και Phe (σε συγκεντρώσεις 0,3 mM, 1,2 mM και 1,2 mM αντίστοιχα) και την επώαση του ιστού κατά το πρότυπο αναλόγων πειραμάτων (5,6) για τη διερεύνηση του ρόλου των παραγόντων αυτών στην υπό διερεύνηση ενζυμική ανταπόκριση.

Κατά τη στατιστική ανάλυση χρησιμοποιήθηκε το Student's t-test. Όλες οι αναφερόμενες τιμές εκφράζονται ως μέσοι όροι ± τυπικές αποκλίσεις. Η στατιστικώς σημαντική τιμή ορίστηκε για τιμές $p < 0,05$.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ - ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Τα αποτελέσματα της επίδρασης της ΧΕΧ επί της δραστικότητας της ΑChE και της (Na⁺,K⁺)-ΑΤΡάσης παρουσιάζονται στον πίνακα 1. Δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές αποκλίσεις μεταξύ αρρένων και θηλέων της αυτής ομάδας. Σε ό,τι αφορά τη δραστικότητα της ΑChE, η προσθήκη Hcy αυξάνει ($p < 0,001$) τη δραστικότητα της ΑChE του ομογενοποιημένου εγκεφάλου των μαρτύρων, ενώ η προσθήκη Phe τη μειώνει ($p < 0,01$). Ο συνδυασμός και των δύο έχει ως

αποτέλεσμα τη μη στατιστικώς σημαντική μεταβολή της δραστηριότητας του ενζύμου στους μάρτυρες. Η προσθήκη Ala δεν μεταβάλλει τη δραστηριότητα της AChE μαρτύρων, ενώ ο συνδυασμός της με Hcy οδηγεί σε ανάλογα αποτελέσματα, εξουδετερώνοντας τη δράση της Hcy. Η προσθήκη Phe ή Ala σε ομογενοποίηση ιστού προερχόμενου από επίμυες, που έχουν υποστεί XEX, δεν οδηγεί σε καμία στατιστικώς σημαντική μεταβολή της δραστηριότητας της AChE.

Σε ό,τι αφορά τη δραστηριότητα της (Na⁺,K⁺)-ATPάσης, η προσθήκη Hcy αυξάνει (p<0,001) τη δραστηριότητα της (Na⁺,K⁺)-ATPάσης του ομογενοποιημένου εγκεφάλου των μαρτύρων, ενώ η προσθήκη Phe τη μειώνει (p<0,01). Ο συνδυασμός και των δύο έχει ως αποτέλεσμα τη μη στατιστικώς σημαντική μεταβολή της δραστηριότητας του ενζύμου στους μάρτυρες. Η προσθήκη Ala μειώνει (p<0,01) τη δραστηριότητα της (Na⁺,K⁺)-ATPάσης των μαρτύρων, ενώ ο συνδυασμός της

με Hcy οδηγεί σε μη στατιστικώς σημαντική διαφοροποίηση από την αρχική δραστηριότητα, επιφέροντας αλληλοεξουδετέρωση μεταξύ της δράσης της Hcy και της Ala. Η προσθήκη Phe ή Ala σε ομογενοποίηση ιστού προερχόμενου από επίμυες, που έχουν υποστεί XEX, οδηγεί σε στατιστικώς σημαντική (p<0,01) μείωση της δραστηριότητας της (Na⁺,K⁺)-ATPάσης, στα επίπεδα των μαρτύρων περίπου.

Συμπερασματικά, η XEX οδηγεί σε στατιστικώς σημαντική αύξηση τόσο της AChE (+20%, p<0,001), όσο και της (Na⁺,K⁺)-ATPάσης (+35%, p<0,001). Η Hcy θα μπορούσε να προσομοιάσει αυτές τις μεταβολές (τουλάχιστον υπό τις συγκεκριμένες *in vitro* συνθήκες), ενώ τόσο η Phe, όσο και η Ala δρουν προστατευτικά έναντι της επιδράσεως της XEX επί της δραστηριότητας των εξετασθέντων ενζύμων.

Πίνακας 1

Μεταβολές στη δραστηριότητα της AChE και της (Na⁺,K⁺)-ATPάσης εγκεφάλου επιμύων μετά από διατροφική στέρηση χολίνης (κατά την κύηση, το θηλασμό και 3 εβδομάδες ακόμα). ***p<0,001

Ομάδες	Δραστηριότητα	
	AChE (ΔOD /min x mg πρωτεΐνης)	Na ⁺ ,K ⁺ -ATPάση ($\mu\text{mol Pi/h x mg πρωτεΐνης}$)
Άρρενες Μάρτυρες (AM) Θήλειες Μάρτυρες (ΘΜ)	1.038 ± 0.041 1.012 ± 0.032	3.65 ± 0.30 3.63 ± 0.36
Άρρενες XEX (AXEX) Θήλειες XEX (ΘXEX)	1.235 ± 0.059 *** (+19%) 1.214 ± 0.050 *** (+20%)	4.89 ± 0.41 *** (+34%) 4.94 ± 0.45 *** (+36%)

The Role of Homocysteine, L-Alanine and L-Phenylalanine in the Effect of Chronic Dietary Choline Deprivation on Rat Brain Acetylcholinesterase and (Na⁺,K⁺)-ATPase Activities

C. Liapi¹, I. Feskou¹, A. Zarros² and S. Tsakiris²

¹Department of Experimental Pharmacology, and
²Department of Experimental Physiology, Medical School, University of Athens, Athens, Greece

Key words: Homocysteine, L-alanine, L-phenylalanine, chronic dietary choline deprivation, acetylcholinesterase (AChE), (Na⁺,K⁺)-ATPase, rat brain

Correspondence: Assist. Prof. Charis Liapi, Department of Experimental Pharmacology, Medical School, University of Athens, 75 Mikras Asias str., 11527, Goudi, Athens, Greece. Tel.: +30-210-7462531, Fax: +30-210-7462554, e-mail: cliapi@med.uoa.gr

SUMMARY: The aim of this work was to investigate the role of homocysteine (Hcy), L-alanine (Ala) and L-phenylalanine (Phe) in the effect of chronic dietary choline deprivation (CCD) on the activities of acetylcholinesterase (AChE) and (Na⁺,K⁺)-ATPase in the rat brain. Male and female Wistar rats were continuously kept off choline during their gestational period, as well as during the first six weeks of their post-gestational life. The animals were sacrificed by decapitation and their whole brains were rapidly removed and homogenated. Their enzyme activities were measured spectrophotometrically. Moreover, *in vitro* experiments were conducted in order to estimate the effects of Hcy (0.3 mM), Ala (1.2 mM) and/or Phe (1.2 mM) on the

above parameters. It is concluded that CCD leads to a statistically significant increase of both AChE (+20%, $p < 0.001$) and $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$ (+35%, $p < 0.001$) activities. The *in vitro* experiments showed that Hcy could simulate these changes (at least under the examined *in vitro* conditions), while both Phe and Ala act protectively against the CCD-induced effects on the examined rat brain enzyme activities.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΠΑΡΑΠΟΜΠΕΣ

1. Carageorgiou H., Tzotzes V., Pantos C., Mourouzis C., Zarros A., Tsakiris S.: In vivo and in vitro effects of cadmium on adult rat brain total antioxidant status, acetylcholinesterase, $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$ and $\text{Mg}^{2+}\text{-ATPase}$ activities: protection by L-cysteine. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* 94: 112-118 (2004)
2. Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J.: Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265-275 (1951)
3. Ellman G.L., Courtney K.D., Andres V.Jr., Featherstone R.M.: A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.* 7: 88-95 (1961)
4. Bowler K., Tirri R.: The temperature characteristics of synaptic membrane ATPases from immature and adult rat brain. *J. Neurochem.* 23: 611-613 (1974)
5. Tsakiris S., Schulpis K.H., Papaconstantinou E.D., Tsakiris T., Tjamouranis I., Giannoulia-Karantana A.: Erythrocyte membrane acetylcholinesterase activity in subjects with MTHFR 677C→T genotype. *Clin. Chem. Lab. Med.* 44: 23-27 (2006)
6. Schulpis K.H., Giannoulia-Karantana A., Papaconstantinou E.D., Parthimos T., Tjamouranis I., Tsakiris S.: Erythrocyte membrane $\text{Na}^+, \text{K}^+\text{-ATPase}$ and $\text{Mg}^{2+}\text{-ATPase}$ activities in subjects with methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) 677C→T genotype and moderate hyperhomocysteinaemia. The role of L-phenylalanine and L-alanine. *Clin. Chem. Lab. Med.* 44: 423-427 (2006)

ΕΠΙΘΕΩΡΗΣΗ ΚΛΙΝΙΚΗΣ ΦΑΡΜΑΚΟΛΟΓΙΑΣ
ΚΑΙ ΦΑΡΜΑΚΟΚΙΝΗΤΙΚΗΣ 25: 78-79 (2007)
©ΦΑΡΜΑΚΟΝ-Τύπος

Η Χορήγηση της Σωματοστατίνης στην Κοιλιακή Ωχρά Σφαίρα Ενεργοποιεί GABA-Εργικές Οδούς και Επάγει την Έκφραση του C-FOS Γονιδίου σε Εγκεφαλικές Περιοχές που Εμπλέκονται στον Έλεγχο της Κίνησης

Αντωνία Μαραζιώτη^{1,2}, Χριστίνα Σπυράκη^{†2} και Κυριακή Θερμού¹

¹Εργαστήριο Φαρμακολογίας, Τομέας Βασικών Επιστημών, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Κρήτης, Ηράκλειο, Κρήτη, ²Εργαστήριο Φαρμακολογίας, Ιατρική Σχολή, Πανεπιστήμιο Αθηνών, Αθήνα, Ελλάς

ΕΙΣΑΓΩΓΗ - ΣΚΟΠΟΣ

Οι υποδοχείς της σωματοστατίνης εντοπίζονται σε πυρήνες των βασικών γαγγλίων που εμπλέκονται στον έλεγχο της κίνησης. Η χορήγηση της σωματοστατίνης στην κοιλιακή ωχρά σφαίρα προκαλεί μείωση της κινητικής δραστηριότητας στον επίμυ. Σκοπό της παρούσας εργασίας αποτελεί η μελέτη (α) της εμπλοκής του GABAεργικού συστήματος στη δράση της σωματοστατίνης στην κινητική δραστηριότητα και (β) των αλλαγών της νευρωνικής δραστηριότητας σε διαφορετικές εγκεφαλικές περιοχές μετά από την έγχυση σωματοστατίνης στην κοιλιακή ωχρά σφαίρα.

ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

Για τα πειράματα χρησιμοποιήθηκαν αρσενικοί ενήλικοι Sprague Dawley επίμυες. Με στερεοταξική χειρουργική εμφυτεύτηκαν αμφίπλευρα στην κοιλιακή ωχρά σφαίρα 2 κάνουλες χορήγησης φαρμάκου. Ακολούθησε αμφίπλευρη έγχυση σωματοστατίνης (240 ng/0.5μl/side) ή φυσιολογικού ορού (control) και το κάθε ζώο τοποθετήθηκε στον κλωβό μέτρησης για 60min όπου μετρήθηκε η κινητικότητά του. Μετά το πέρας του συμπεριφορικού πειράματος, στα ζώα χορηγήθηκαν σωματοστατίνη ή φυσιολογικός ορός. Ακολούθησε απομόνωση των εγκεφάλων, κόψιμο σε τομές και πραγματοποίηση c-fos ανοσοιστοχημείας.

Προκειμένου να μελετηθεί η εμπλοκή του GABAεργικού συστήματος στη δράση της σωματοστατίνης, GABA-A (μπικουκουλλίνη, bicuculline) και GABA-B (φακλοφαίνη, phaclofen) ανταγωνιστές χορηγήθηκαν ενδοπεριτοναϊκά (10 mg/kg) ή ενδοεγκεφαλικά στον επικλινή πυρήνα (120 ng/0.5μl/side) και μετρήθηκε η επίδρασή τους στην επαγόμενη από τη σωματοστατίνη κινητική δραστηριότητα.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Η σωματοστατίνη, χορηγούμενη στην κοιλιακή ωχρά σφαίρα, προκάλεσε στατιστικά σημαντική μείωση της κινητικής δραστηριότητας στον επίμυ. Η μπικουκουλλίνη, είτε φακλοφαίνη, χορηγούμενες ανεξάρτητα, είτε ενδοπεριτοναϊκά είτε ενδοεγκεφαλικά στον επικλινή πυρήνα, δεν επηρέασαν την κινητική δραστηριότητα στον επίμυ. Και οι δύο ανταγωνιστές, χορηγούμενοι ενδοπεριτοναϊκά πριν την έγχυση της σωματοστατίνης στην κοιλιακή ωχρά σφαίρα, ανέστρεψαν πλήρως τη δράση της στην κινητικότητα. Ωστόσο, όταν χορηγήθηκαν ενδοεγκεφαλικά στον επικλινή πυρήνα πριν τη χορήγηση της σωματοστατίνης στην κοιλιακή ωχρά σφαίρα, η μπικουκουλλίνη ανέστρεψε πλήρως την προκαλούμενη από τη σωματοστατίνη μείωση της κινητικότητας, ενώ η φακλοφαίνη δεν είχε καμία επίδραση στην δράση της σωματοστατίνης. Η έκφραση του c-

fos γονιδίου αυξήθηκε στατιστικώς σημαντικά στην M1 κινητική περιοχή του φλοιού, στο ραβδωτό, στον επικλινή πυρήνα, στην κοιλιακή καλυπτρική περιοχή και στον ιππόκαμπο, αλλά όχι στο βασικό πυρήνα του Meynert, περιοχή που χρησιμοποιήθηκε σαν περιοχή ελέγχου.

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η παρούσα μελέτη αποδεικνύει την εμπλοκή του GABAεργικού συστήματος στη δράση της σωματοστατίνης στην κοιλιακή ωχρά σφαίρα. Περαιτέρω μελέτες βρίσκονται σε εξέλιξη ώστε να διαλευκανθεί πλήρως το νευρωνικό κύκλωμα μέσω του οποίου η ενεργοποίηση των υποδοχέων σωματοστατίνης στην κοιλιακή ωχρά σφαίρα ελαττώνει την κινητική δραστηριότητα.

Η έρευνα αυτή χρηματοδοτείται από το European Social Fund and National Resources, Heraklitos

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΠΑΡΑΠΟΜΠΕΣ

1. Marazioti A., Kastellakis A., Antoniou K., Papasava D., Thermos K.: Somatostatin receptors in the ventral pallidum/substantia innominata modulate rat locomotor activity. *Psychopharmacology 181*: 319-326 (2005)

Local Administration of Somatostatin in the VP Activates GABA-ergic Pathways and Induces c-FOS Expression in Brain Areas Implicated in Motor Control

A. Marazioti^{1,2}, C. Spyraiki^{†2} and K. Thermos¹

¹Laboratory of Pharmacology, Department of Basic Sciences, Faculty of Medicine, University of Crete, Heraklion, Greece; ²Laboratory of

Pharmacology, School of Medicine, University of Athens, Athens, Greece

Key words: Somatostatin, ventral pallidum, GABA-ergic pathways, c-FOS expression, brain, motor control

SUMMARY. Somatostatin (SRIF) receptors have been localized in nuclei of the basal ganglia implicated in motor control. Somatostatin infusion in the ventral pallidum (VP) attenuated the locomotor activity of the rat. The aim of the present study was to investigate a) the involvement of the GABAergic system in SRIF's action on locomotor activity and b) the resultant changes in neuronal activity in different brain regions after SRIF infusion into the VP. Male Sprague-Dawley rats, 300-350 g, were used for all experiments. Guide cannulae were implanted bilaterally into the VP. SRIF (120, 240 ng/0.5 µl/side) or saline were infused bilaterally in the VP of the rat and locomotor activity was measured for 60min using a rectangular activity cage. After the behavioral evaluation, brains were processed for c-fos like immunoreactivity. In order to examine the basal ganglia circuitry implicated in SRIF's effects, GABA-A (Bicuculline) and GABA-B (phaclofen) antagonists were administered i.p (10 mg/kg/ml) or directly into the Nac (120 ng/side) and their effect on SRIF's actions monitored. SRIF infused in the VP decreased the locomotor activity of the rat in a statistically significant manner. Bicuculline and phaclofen administered alone, ip or into the Nac, did not influence the locomotor activity of the rat. Bicuculline and phaclofen's administration (ip) prior to SRIF's infusion in the VP reversed the SRIF mediated decrease in locomotor activity. Similarly, bicuculline, administered into the Nac reversed the SRIF mediated decrease in locomotor activity, while phaclofen's infusion in the Nac had no effect on SRIF's actions. C-fos expression was increased in the M1 motor region of the prefrontal cortex, striatum, NAc, VTA and hippocampus, but not in the Nucleus Basalis of Meynert, an area used as a control. The present study provides evidence implicating GABA-A and GABA-B receptors in SRIF's actions in the VP. Investigations are in progress in order to elucidate further the neuronal circuitry via which somatostatin receptor activation mediates the attenuation of locomotor activity.

ΕΠΙΘΕΩΡΗΣΗ ΚΛΙΝΙΚΗΣ ΦΑΡΜΑΚΟΛΟΓΙΑΣ
ΚΑΙ ΦΑΡΜΑΚΟΚΙΝΗΤΙΚΗΣ 25: 80-81 (2007)
©ΦΑΡΜΑΚΟΝ-Τύπος

Επίδραση του SIN-1 και της 8-Br-cGMP στη Χημική Ισχαιμία στον Αμφιβληστροειδή Αρουραίου

N. Μαστροδήμου και Κ. Θερμού

Εργαστήριο Φαρμακολογίας, Τομέας Βασικών Επιστημών, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Κρήτης, Ηράκλειο, 71110, Κρήτη, Ελλάς

ΣΚΟΠΟΣ

Η αμφιβληστροειδική ισχαιμία παρατηρείται σε πολλές αμφιβληστροπάθειες και αποτελεί την κύρια αιτία τύφλωσης. Η σωματοστατίνη είναι νευροπεπτιδίο που εντοπίζεται στον αμφιβληστροειδή και δρα ως νευροδιαβιβαστής, νευροτροποποιητής ή τροφικός παράγοντας. Η σωματοστατίνη έχει δείχθει ότι έχει νευροπροστατευτικές δράσεις σε διαφορετικά παραδείγματα νευροτοξικότητας στο κεντρικό νευρικό σύστημα, όπως στην επαγόμενη από το NMDA νευροτοξικότητα σε καλλιέργειες φλοιού (1) και στην απόφραξη της μέσης εγκεφαλικής αρτηρίας (2). Στον αμφιβληστροειδή, η σωματοστατίνη προστατεύει τους νευρώνες σε μοντέλο χημικής ισχαιμίας στον αρουραίο (3). Βιβλιογραφικές αναφορές υποστηρίζουν ότι χαμηλές συγκεντρώσεις μονοξειδίου του αζώτου δρουν νευροπροστατευτικά στον αμφιβληστροειδή (4,5). Πρόσφατες μελέτες στο εργαστήριό μας έδειξαν ότι η σωματοστατίνη μέσω ενεργοποίησης των $ss2_2$ υποδοχέων αυξάνει την παραγωγή του μονοξειδίου του αζώτου (NO) (6) και της cGMP (7). Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν να μελετηθεί ο ρόλος του NO και της cGMP στην προστασία του αμφιβληστροειδή από τη χημική ισχαιμία, ως πιθανός μηχανισμός των νευροπροστατευτικών δράσεων της σωματοστατίνης.

ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

Μετά την θανάτωση θηλυκών αρουραίων Sprague-Dawley, αφαιρέθηκαν τα μάτια και τοποθετήθηκαν σε 0,1 M ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών οξέων pH 7,4 (PB: NaH_2PO_4/K_2HPO_4), αφαιρέθηκε ο πρόσθιος πόλος, ενώ ο

αμφιβληστροειδής χιτώνας, το μελάγχρουν επιθήλιο και ο σκληρός χιτώνας ξεπλύθηκαν καλά σε 0,1 M PBS για 15 λεπτά. Ακολούθησε επώαση με PBS που περιείχε ιωδοοξικό οξύ 5 mM, κυανιούχο νάτριο 25 mM (μίγμα χημικής ισχαιμίας) και αργινίνη (0,05, 0,125, 0,25, 0,5, 1, 2 mM) ή νιτροπρουσίδιο του νατρίου (SNP; 0,25, 0,5, 1, 2 mM) ή SIN-1 (0,1, 0,3, 1 mM) ή 8-Br-cGMP (0,1, 0,5, 1 mM) μαζί με το μίγμα της χημικής ισχαιμίας, για 2x30 λεπτά, ενώ στη συνέχεια ακολούθησε επώαση μόνο με τα παραπάνω αντιδραστήρια σε PBS για 2x30 λεπτά και ξέπλυμα των ιστών σε PBS για 15 λεπτά. Όλες οι επωάσεις έγιναν στους 37 °C σε ατμόσφαιρα 5% CO₂ - 95% αέρα, υπό ήπια ανάδευση. Έπειτα οι ιστοί μονιμοποιήθηκαν για να μελετηθούν ανοσοϊστοχημικά. Το αντίσωμα έναντι στην ακετυλοτρανσφεράση της χολίνης (ChAT) χρησιμοποιήθηκε ως δείκτης της ισχαιμίας, ενώ η χρώση TUNEL ως δείκτης των αποπτωτικών κυττάρων.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Στους ιστούς που είχαν επωαστεί με το μίγμα της χημικής ισχαιμίας δεν παρατηρήθηκε ChAT ανοσοδραστικότητα. Η αργινίνη και το νιτροπρουσίδιο δεν απέτρεψαν τη χημική ισχαιμία σε καμία από τις συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκαν. Οι ουσίες SIN-1 και 8-Br-cGMP προστατεύσαν τον αμφιβληστροειδή από την χημική ισχαιμία κατά ένα συγκεντρωσο-εξαρτώμενο τρόπο και στις συγκεντρώσεις 0,1 mM και 0,5 mM, αντίστοιχα, επανέφεραν σχεδόν πλήρως την ChAT ανοσοδραστικότητα. Τα αποτελέσματα αυτά επιβεβαιώθηκαν από τη χρώση TUNEL, όπου στις χαμηλές συγκεντρώσεις δεν παρατηρήθηκαν αποπτωτικά κύτταρα, ενώ στις μεγάλού-

τερες συγκεντρώσεις παρατηρήθηκε μεγάλος αριθμός νεκρών κυττάρων. Η ουσία SIN-1 στη συγκέντρωση 3 mM και απουσία του μίγματος της χημικής ισχαιμίας προκάλεσε τη μείωση της ChAT ανοσοδραστικότητας και αύξηση της χρώσης TUNEL.

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η ουσία SIN-1 έχει διπλό ρόλο. Αυξάνει τα επίπεδα του μονοξειδίου του αζώτου και ενεργοποιεί άμεσα τη γουανυλική κυκλάση αυξάνοντας τα επίπεδα της cGMP. Τα παραπάνω αποτελέσματα συνγορούν υπέρ ενός cGMP-εξαρτώμενου μηχανισμού στη νευροπροστασία έναντι της χημικής ισχαιμίας στον αμφιβληστροειδή και πιθανώς να αποτελεί τον μηχανισμό μέσω του οποίου η σωματοστατίνη πραγματοποιεί τις νευροπροστατευτικές της δράσεις στο μοντέλο της χημικής ισχαιμίας. Πειράματα βρίσκονται σε εξέλιξη για τη διαλεύκανση αυτής της υπόθεσης.

Η μελέτη συγχρηματοδοτήθηκε από το πρόγραμμα ΠΥΘΑΓΟΡΑΣ, European Social Fund and National Resources.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΠΑΡΑΠΟΜΠΕΣ

1. Forloni G., Lucca E., Angeretti N., Chiessa R., Vezanni A.: *J. Neurochem.* 68: 319-327 (1997)
2. Rauca C., Schafer K., Hóllt V.: *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 360: 633-638 (1999)
3. Mastrodimou N., Lambrou G.N., Thermos K.: *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 371:44-53 (2005)
4. Ando A., Yang A., Nambu H., Campo Chiaro P.A.: *Mol. Pharmacol.* 62: 539-544 (2002)
5. Guimaraes C.A., Assrey J., Linden R.: *J. Neurochem.* 76: 1233-1241 (2001)
6. Vasilaki A., Mouratidou M., Schulz S., Thermos K.: *Neuropharmacology* 43: 899-909 (2002)
7. Masrodidou N., Kiagiadaki F., Hodjarova M., Karagianni E., Thermos K.: *Regul. Pept.* 133: 41-46 (2006)

Effect of SIN-1 and 8-Br-cGMP in Chemical Ischemia in Rat Retina

N. Mastrodimou and K. Thermos

Laboratory of Pharmacology, Department of Basic Sciences, Faculty of Medicine, University of Crete, Heraklion, Crete

Key words: SIN-1, 8-Br-cGMP, chemical ischemia, rat, retina

SUMMARY. The neuropeptide somatostatin is present in the retina and is believed to function as a neurotransmitter, neuromodulator or trophic factor. Its actions are mediated by specific receptors (sst₁-sst₅) belonging to the GPCR family. Somatostatin has also been shown to have neuroprotective properties against excitatory neurotoxicity via a cGMP mechanism. In the retina, the sst₂ selective analogs and cortistatin protected against chemical ischemia. Ischemia is the underlying cause of many retinopathies. Agents that interfere with and/or protect against the ischemic insult will be very useful in their therapeutic treatment. The understanding of the mechanisms involved in the neuroprotection properties of somatostatin will aid its use as a putative therapeutic. Data from the literature have suggested that small concentrations of nitric oxide (NO) may provide neuroprotection in the retina. Recent data from our laboratory have shown that somatostatin's activation of sst₂ receptors increased nitric oxide and cGMP levels in rat retina. The above evidence provided the impetus for the investigation of the neuroprotective role of NO and cGMP in the retina, as a possible mechanism of somatostatin's actions against chemical ischemia. Eye cups of female Sprague-Dawley rats were incubated with PBS alone or in the presence of iodoacetic acid (IAA; 5mM) and sodium cyanate (NaCN; 25 mM) (chemical ischemia mixture). Arginine (0.05, 0.125, 0.25, 0.5, 1, 2 mM), sodium nitropruside (SNP; 0.25, 0.5, 1, 2 mM), SIN-1 (0.1, 0.3, 1 mM) or 8-Br-cGMP (0.1, 0.5, 1 mM) were co incubated with the chemical ischemia mixture for 60 min, followed by a second 60 min incubation with these agents in PBS, at 5%CO₂/air, 37°C. The eye cups were subsequently fixed and sectioned for ChAT (choline acetyltransferase), a marker for cholinergic neurons and TUNEL staining. The chemical ischemia mixture abolished ChAT immunoreactivity in the retina. Arginine and SNP had no effect when co incubated with the ischemia mixture. SIN-1 and 8-Br-cGMP had a dose dependent protective effect with the small concentrations (0.1 mM and 0.5 mM, respectively), protecting the retina from the ischemic insult. Co incubation of the high concentrations of SIN-1 or 8-Br-cGMP and the chemical ischemia mixture increased TUNEL staining depicting cell death. SIN-1 (3 mM) alone decreased the number of cells labelled with ChAT and increased TUNEL staining in the retina, while SIN-1 (1 mM) had no effect. The data, pertaining to NO's effect on SRIF levels, support a direct cGMP mediated effect. SIN-1 has a dual role, namely increasing NO levels and directly influencing the soluble guanylate cyclase. These results suggest that a cGMP mechanism is involved in the neuroprotection against ischemic insults in the retina and possibly mediates somatostatin's neuroprotective effects. Experiments are in progress to prove this conjecture.

ΕΠΙΘΕΩΡΗΣΗ ΚΛΙΝΙΚΗΣ ΦΑΡΜΑΚΟΛΟΓΙΑΣ
ΚΑΙ ΦΑΡΜΑΚΟΚΙΝΗΤΙΚΗΣ 25: 82-83 (2007)
©ΦΑΡΜΑΚΟΝ-Τύπος

Σχεδιασμός Νέων Υποχοληστερολαιμικών Μορίων με Αντιφλεγμονώδη Δράση

A. Ματραλής¹, E. Ρέκκα² και A. Κουρουνάκη¹

Τομέας Φαρμακευτικής Χημείας, Τμήμα Φαρμακευτικής, ¹Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών, ²Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο, Θεσσαλονίκη, Ελλάδα

ΕΙΣΑΓΩΓΗ - ΣΚΟΠΟΣ

Αυξημένα και οξειδωμένα επίπεδα LDL-χοληστερόλης καθώς και φλεγμονώδης απόκριση εμπλέκονται, μεταξύ άλλων, στην παθολογία της αθηρωσκήληρυνσης. Σκοπός της έρευνάς μας είναι η ανάπτυξη βιοδραστικών ενώσεων που να απευθύνονται σε μία ή περισσότερες από αυτές τις αιτίες της πολυπαραγοντικής αυτής νόσου. Προτείνουμε ως θεραπευτική προσέγγιση την ανάπτυξη μορίων που συνδυάζουν στη δομή τους τμήμα με υποχοληστερολαιμικές-υπολιπιδαιμικές-αντιοξειδωτικές ιδιότητες (1,4-οξαζίνη) και τμήμα (υποκατεστημένη -ή μη- ναφθυλοή 4-κυκλοξυλοφαινυλομάδα) που αναμένεται να προσδώσει αντιφλεγμονώδη δράση.

Τα έξι νέα παράγωγα που συντέθηκαν μελετήθηκαν ως προς την αντιοξειδωτική τους δράση, την υπολιπιδαιμική, την ανασταλτική δράση επί του εξειδικευμένου προς βιοσύνθεση χοληστερόλης ενζύμου *συνθετάση του σκουαλενίου*, καθώς και την αντιφλεγμονώδη δράση τους.

ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

Η σύνθεση των νέων παραγώγων έγινε με τροποποίηση κλασικών μεθόδων οργανικής συνθετικής χημείας.

Η αντιοξειδωτική δράση των παραγώγων εκτιμήθηκε *in vitro* από την προστασία που προσέφεραν έναντι λιπιδικής υπεροξειδωσης μικροσωμικών μεμβρανών ήπατος επιμύων επαγόμενης από Fe²⁺/ασκορβικό.

Η αναστολή της δράσης του ενζύμου *συνθετάση του σκουαλενίου* μελετήθηκε *in vitro* σε ηπατικά μικροσώματα επιμύων.

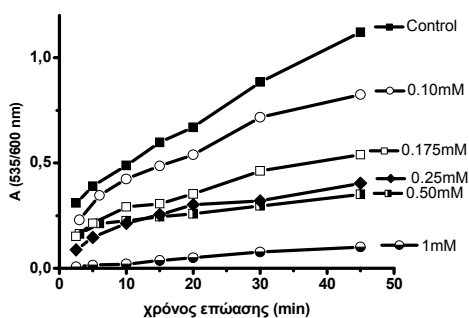
Η υπολιπιδαιμική δράση εκτιμήθηκε *in vivo*, στο πρότυπο υπερλιπιδαιμικού επίμυα (κατόπιν χορήγησης tyloxarol).

Η αντιφλεγμονώδης δράση εκτιμήθηκε *in vivo* ως αναστολή του οιδήματος άκρου ποδός επιμύων επαγόμενο από καραγενίνη.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ - ΣΥΖΗΤΗΣΗ

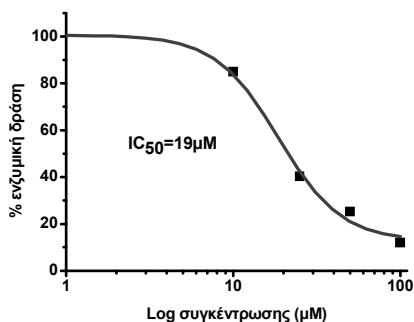
Τα νέα παράγωγα ταυτοποιήθηκαν φασματοσκοπικά (¹H-NMR) και με στοιχειακή ανάλυση. Η απόδοση της σύνθεσης κυμάνθηκε από 60-75%.

Όλα τα παράγωγα ανέστειλαν τη λιπιδική υπεροξειδωση *in vitro* (Πίνακας 1, Σχήμα 1). Την καλύτερη δράση παρουσίασε το παράγωγο 3 με IC₅₀ 185 μΜ.



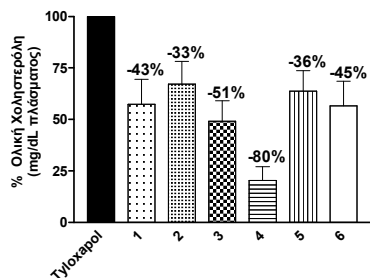
Σχήμα 1: Πορεία της λιπιδικής υπεροξειδωσης στο χρόνο παρουσία συγκεντρώσεων της ένωσης 3

Όλες οι ενώσεις έδειξαν καλή αναστολή του ενζύμου *συνθετάση του σκουαλενίου* (SQS) με εύρος IC₅₀ που φαίνεται στον Πίνακα 1 και το Σχήμα 2. Την καλύτερη αλληλεπίδραση με το ένζυμο παρουσίασε η ένωση 6 με IC₅₀ 19 μΜ.



Σχήμα 2: Μείωση της ενζυμικής δράσης της συνθεάσης του σκουαλενίου αυξανόμενης της συγκέντρωσης της ένωσης 6

Όλες οι ενώσεις παρουσίασαν πολύ καλή υποχοληστερολαιμική και υπολιπιδαιμική δράση (Σχήμα 3) σε δόση 56 μmol/kg, μειώνοντας τα επίπεδα ολικής χοληστερόλης, LDL-χοληστερόλης και τριγλυκεριδίων στο πλάσμα του αίματος υπερλιπιδαιμικών επιμύων. Το πιο δραστικό παράγωγο από όσα μελετήθηκαν είναι το 4.



Σχήμα 3: Η % μείωση της ολικής χοληστερόλης, που παρουσίασαν οι ενώσεις χορηγούμενες σε υπερλιπιδαιμικούς επίμυες (tyloxazol).

Πίνακας 1

Τιμές IC_{50} των ενώσεων 1-6 ως προς την αναστολή λιπιδικής υπεροξειδωσης και αναστολή της συνθεάσης του σκουαλενίου ηπατικών μικροσωμικών μεμβρανών. Αντιφλεγμονώδης δράση των ενώσεων 4 και 6 ως % αναστολή οίδηματος άκρου ποδός επιμύων επαγόμενο από καραγενίνη και τιμές $ClogP$ όλων των ενώσεων

Ένωση	SQS IC_{50} (μM)	Λιπιδική Υπεροξειδωση IC_{50} (μM)	%Μείωση οίδηματος (σε δόση 300 $\mu mol/kg$)	$ClogP$
1	48	600	54	3,81
2	139	450		3,17
3	42	185	63	5,26
4	80	700	36	4,61
5	40	210	53	3,61
6	19	390	40	3,09

Από τις νέες ενώσεις εξετάστηκαν οι 4 και 6 οι οποίες εμφάνισαν καλή αντιφλεγμονώδη δράση στο ζωικό πρότυπο που χρησιμοποιήσαμε (Πίνακας 1).

Συμπερασματικά, τα νέα παράγωγα συνδυάζουν αντιοξειδωτική, ανασταλτική επί του ενζύμου συνθεάσης του σκουαλενίου, υπολιπιδαιμική και αντιφλεγμονώδη δράση. Ο συνδυασμός των ιδιοτήτων τους καθιστά αυτές τις ενώσεις καλά υποψήφια αντιαθηρωματικά μόρια.

Design of Novel Hypochole-Sterolemic Derivatives with Anti-Inflammatory Activity

A.Matralis¹, E. Rekka², A. Kourounakis¹

Departments of Medicinal Chemistry, School of Pharmacy, ¹University of Athens; ²Aristotelian University, Thessaloniki, Greece

Key words: Hypochole-sterolemic derivatives, inflammation

Correspondence: Angeliki Kourounakis, Dept. of Medicinal Chemistry, School of Pharmacy, University of Athens, Panepistimiopolis, 15771 Zografou, Greece, angeliki@pharm.uoa.gr

SUMMARY. Elevated levels of LDL-cholesterol, oxidative modification of LDL as well as inflammatory responses are involved in the development and progression of atherosclerosis. Our aim is to develop bioactive molecules that address several aspects of this multifactorial disorder. We designed, synthesized and studied novel 1,4-oxazine derivatives that combine structural moieties with potential hypocholesterolemic, hypolipidemic, antioxidant as well as anti-inflammatory activity. The six new derivatives that were synthesized were studied *in vitro* and *in vivo* for their pharmacological activity. They were found to inhibit rat hepatic microsomal lipid peroxidation (IC_{50} =700-185 μM) as well as the activity of squalene synthase (IC_{50} =139-19 μM), the enzyme that catalyzes the first committed step towards cholesterol biosynthesis. Further, after administration to hyperlipidemic rats, they reduced plasma levels of total cholesterol, LDL-cholesterol as well as triglycerides up to 80%. The anti-inflammatory activity of selected derivatives was evaluated in the rat paw-oedema assay and found to be significant (ca. 40% reduction of oedema). The combined activities of these compounds provide them with potential antiatherosclerotic activity.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΠΑΡΑΠΟΜΠΕΣ

Kourounakis A., et al.: *Drug Develop. Res.* 41: 9 (1999)
 Chrystselis M., et al.: *J. Med. Chem.* 43: 609 (2000)
 Galanakis D., et al.: *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 14: 3639 (2004)

ΕΠΙΘΕΩΡΗΣΗ ΚΛΙΝΙΚΗΣ ΦΑΡΜΑΚΟΛΟΓΙΑΣ
ΚΑΙ ΦΑΡΜΑΚΟΚΙΝΗΤΙΚΗΣ 25: 84-85 (2007)
©ΦΑΡΜΑΚΟΝ-Τύπος

Η Ζικωνοτίδη και οι Φαρμακολογικές Ιδιότητες της Οικογένειας των Κωνοτοξινών

Μυρωνίδου-Τζουβελέκη Μαρία και Δόκος Χαράλαμπος

Εργαστήριο Φαρμακολογίας, Ιατρική Σχολή, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο, Θεσσαλονίκη, Ελλάδα

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

ΦΑΡΜΑΚΟΛΟΓΙΚΕΣ ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ ΤΗΣ ΖΙΚΩΝΟΤΙΔΗΣ

Η θαλάσσια Φαρμακολογία αποτελεί νέο κλάδο της Φαρμακολογίας που ασχολείται με την αντίχνευση και παραγωγή νέων ουσιών από τα βάθη των ωκεανών. Η ιστορία της οικογένειας *Coniidae* ξεκίνησε στα μέσα του 1960-70 με τον Ender και συν. που απομόνωσαν το θανασιμο δηλητήριο των σαλιγκαριών που βρίσκονται στους ωκεανούς εδώ και 50 εκατομμύρια χρόνια. Αρχικά συλλέγονταν για το πανέμορφο κέλυφός τους (Εικόνα1), εντός του οποίου υπάρχει ασκός με το δηλητήριο που με τη σειρά του μέσω ενός πόρου συνδέεται με την προβοσκίδα-καρφί. Έτσι μπορεί και παραλύει τα θύματά του. Τα συστατικά του δηλητηρίου τους είναι πρωτεΐνες και μικρά πεπτιδία (1-4).

Τα μικρά πεπτιδία χωρίζονται σε δύο μεγάλες κατηγορίες. Τα πεπτιδία με ένα ή χωρίς δισουλφιδικό δεσμό και οι κωνοτοξίνες (μικρά πεπτιδία με 2 ή και περισσότερους δισουλφιδικούς δεσμούς) τα οποία απομονώθηκαν με τεχνικές μοριακής Βιολογίας (cDNA βιβλιοθήκες). Παλαιότερα οι ερευνητές χρησιμοποιούσαν την υγρή χρωματογραφία για μελέτη των κλασμάτων του δηλητηρίου. Η καθιέρωση της μοριακής κωνοτοξικολογίας ξεκίνησε με τα πειράματα ενός φοιτητή του Craig Clark στο πανεπιστήμιο της Utah. Μελετήθηκαν οι επιδράσεις των κωνοτοξινών σε διάφορους υποδοχείς έως ότου αναπαράχθηκε η πρώτη συνθετική κωνοτοξίνη από το δηλητήριο του *Conus magus* (ο μαγικός κώνος), η ζικωνοτίδη. Όπως είπε ο Craig Clark τα σαλιγκάρια της θάλασσας αποτελούν τους νευροφαρμακολόγους της φύσης (5).

Η ζικωνοτίδη, μία MVIIA ω-κωνοτοξίνη, συνδέεται και αποκλείει με τρόπο εκλεκτικό και αναστρέψιμο τον ευαίσθητο δυναμικά ελεγχόμενο N-τύπο δίαυλο ιόντων ασβεστίου. Συνδέεται πιο ισχυρά με τον N-τύπο από ό,τι με τους άλλους έξι τύπους (L, T, O, P, Q και R). Παράλληλα δεν ασκεί δράση σε κανένα άλλο υποδοχέα του νευρώνα (οπιοειδών, χολινεργικών κ.ά). Ως αποτέλεσμα της σύνδεσης με τον δίαυλο ιόντων ασβεστίου μπλοκάρεται η μεταβίβαση του νευροδιαβιβαστή από την προσαγωγό νευρική απόληξη στο πρόσθιο κέρασ του νωτιαίου μυελού της σπονδυλικής στήλης. Το πεπτιδίο της ζικωνοτίδης έχει τρεις δισουλφιδικούς δεσμούς που προσφέρουν σταθερότητα στο μόριό του (Εικόνα 2) (6,7).

Η ζικωνοτίδη πλεονεκτεί έναντι των οπιοειδών και μη οπιοειδών αναλγητικών σε θέματα ανάπτυξης ανοχής και τοξικότητας. Χρησιμοποιείται συνήθως για περιπτώσεις χρόνιου πόνου που παρουσιάζει ανοχή σε κάθε άλλη ουσία σήμερα (π.χ. μορφίνη). Δίδεται σε ασθενείς με AIDS, σε διάφορους τύπους καρκίνου (μαστού, γαστρεντερικού), σε ρευματικά νοσήματα κ.ά. Έρευνες υποδεικνύουν τη χρήση της πέραν του χρόνιου πόνου (οξύς, νευροπαθής) και σε νευρολογικές καταστάσεις που συνδέονται με μεταλλάξεις των διαύλων ιόντων (channelopathies). Στις κυριότερες ανεπιθύμητες ενέργειες συγκαταλέγονται ζάλη, ναυτία, κεφαλαλγία, υπνηλία και η νωθρότητα (6,8,9). Μετά την ζικωνοτίδη, νέοι ορίζοντες ανοίγονται, λοιπόν, στη θεραπευτική χρήση της οικογένειας των κωνοτοξινών σε διάφορες ασθέ-

νεις του ανθρώπου. Είναι μία νέα κατηγορία ουσιών που εν δυνάμει αποτελούν θεραπευτικούς παράγοντες σε ασθένειες όπως η υπέρταση, νευροεκφυλιστικά σύνδρομα (Alzheimer), επιληψία κ.ά, δρώντας εκλεκτικά σε υποδοχείς ή/και διαύλους ιόντων (6,8).

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΠΑΡΑΠΟΜΠΕΣ

1. Brown M. Killer snails ease the pain. *DDT* 7: 885-886 (2002)
2. Πάπυρος Λαρούς-Μπριτάνικα 37: 97 (1985)
3. Πάπυρος Λαρούς-Μπριτάνικα 16: 204-208 (1980)
4. Ο βίος των ζώων. Εκδόσεις Ελευθερουδάκης. Σελ., 99-100, Αθήνα, 1932
5. Stix G.: A toxin against pain. *Scientific American* 292: 70-75 (2005)
6. Harvey L.A.: Toxins 'R' Us: more pharmacological tools from nature's superstore. *Trends Pharmacol. Sci.* 23(5): 201-203 (2002)
7. Olivera M.B., Cruz J.L.: Conotoxins, in retrospect. *Toxicol* 39:7-14 (2001).
8. Sharp D. Novel pain relief via marine snails. *Lancet* 366(9484): 439-440 (2005)
9. Monograph of Prialt® (ziconotide) by Elan Pharmaceutical Inc, 2005

Ziconotide and the pharmacological properties of conotoxins family

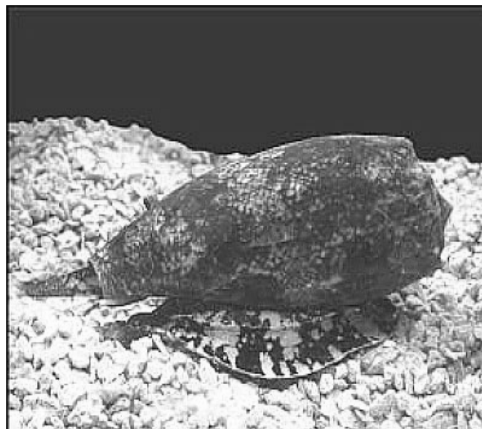
M. Mironidou-Tzouveleki and Ch. Dokos

Laboratory of Pharmacology, Medical School, Aristotle University, Thessaloniki, Greece

Key words: Conotoxins, ziconotide, Pharmacology

SUMMARY. Marine pharmacology is a new branch of pharmacology with great perspectives. From the depths of the ocean, conus snails from the *Conus* ssp produce a deadly venom that paralyzes their victim. This venom is isolated and the fractions are produced

with molecular biology's techniques (cDNA libraries). The first commercial conotoxin was ziconotide, an MVIIA ω -conotoxin. It binds reversible and selectively to N-type voltage-sensitive calcium channels of the primary nociceptive afferents nerves (A- δ and C) in the superficial layers (Rexed laminae I and II) of the dorsal horn in the spinal cord promoting analgesia. Ziconotide is used for the management of severe/resistant neuropathic and chronic pain that does not respond to other forms of treatment. It has well tolerance in contrast with morphine and other opioid substances and low toxicity because it acts in picomolar and nanomolar level. Studies indicate that ziconotide may be used for neuropathic pain, acute pain conditions and neuronal disorders. Adverse effects include nausea, somnolence, asthenia, nystagmus and dizziness. In research conotoxins family is a new promising drug class, with great therapeutic value in hypertension, neuronal conditions (Alzheimer), epilepsy e.t.c.



Εικόνα 1: *Conus textile*: το πρώτο σαλιγκάρι της θάλασσας που μελετήθηκε για τις κονοτοξίνες α- και ψ-τάξεως

Cys-Lys-Gly-Lys-Gly-Ala-Lys-Cys-Ser-Arg-Leu-Met-Tyr-Asp-Cys-Cys-Thr-Gly-Ser-Cys-Arg-Ser-Gly-Lys-Cys-amide

Εικόνα. 2: Η χημική δομή του πεπτιδίου της ζικωνοτίδης

ΕΠΙΘΕΩΡΗΣΗ ΚΛΙΝΙΚΗΣ ΦΑΡΜΑΚΟΛΟΓΙΑΣ
ΚΑΙ ΦΑΡΜΑΚΟΚΙΝΗΤΙΚΗΣ 25: 86-88 (2007)
©ΦΑΡΜΑΚΟΝ-Τύπος

Θεραπευτική Προσέγγιση σε Συννοσηρότητα Ψυχαναγκαστικής Καταναγκαστικής Διαταραχής και Σχιζοφρένειας: Αποτελεσματικότητα και Ανεπιθύμητες Ενέργειες της Κλοζαπίνης και της Χλωριμιπραμίνης

Γεώργιος Παπαζήσης, Αναστασία Μαστρογιάννη, Κωνσταντίνος Κατσιγιαννόπουλος και Αναστασία Καραστεργίου

Δ' Τμήμα Βραχείας Νοσηλείας, Ψυχιατρικό Νοσοκομείο Θεσσαλονίκης, Ελλάδα

ΓΕΝΙΚΑ - ΣΚΟΠΟΣ

Η θεραπευτική αντιμετώπιση στην περίπτωση συννοσηρότητας Ψυχαναγκαστικής-Καταναγκαστικής Διαταραχής (ΨΚΔ) και σχιζοφρένειας αποτελεί πρόκληση δεδομένου ότι οι δυο αυτές διαταραχές έχουν σημαντικές νευροβιολογικές και νευροανατομικές περιοχές αλληλεπικάλυψης (1). Σκοπός της εργασίας είναι η μελέτη της θεραπευτικής προσέγγισης ασθενών με διάγνωση ΨΚΔ σε συννοσηρότητα με σχιζοφρένεια με την αφορμή ενός τέτοιου περιστατικού νεαρού άνδρα που νοσηλεύτηκε στο Δ' Τμήμα Βραχείας Νοσηλείας του Ψυχιατρικού Νοσοκομείου Θεσσαλονίκης.

ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗΣ ΤΟΥ ΠΕΡΙΣΤΑΤΙΚΟΥ

Νεαρός 21 ετών εισήχθη εκούσια λόγω αύξησης των καθημερινών καταναγκαστικών πράξεών του στις οποίες αφιέρωνε τουλάχιστον 2 ώρες ημερησίως, έξαρσης της επιθετικότητας κατά των γονέων του και επίταση των παραληρητικών του ιδεών.

Κατά τη συνέντευξη ο ασθενής παρουσίαζε διαταραχές του ειρμού της σκέψης, παραληρητικές ιδέες δίωξης, συσχέτισης, επίδρασης, διαβάσματος μυαλού, καθώς και οπτικές και ακουστικές ψευδαισθήσεις. Επίσης, ανέφερε πολλές ιδεοληψίες και καταναγκαστικές κινήσεις (πλύσιμο, καταμέτρηση, τοποθέτηση αντικειμένων). Το σκορ του στην Yale-Brown Obsessive-Compul-

sive Scale ήταν 27. Σύμφωνα με το ιστορικό του, σε ηλικία 12 ετών εμφάνισε σταδιακή απόσυρση από τις κοινωνικές και σχολικές του δραστηριότητες σε συνδυασμό με ψυχωτικά στοιχεία, ενώ εγκατέλειψε το σχολείο. Περίπου την ίδια χρονική περίοδο παρουσίασε ιδεοληψίες και καταναγκαστικές πράξεις στις οποίες αφιέρωνε σταδιακά αυξανόμενα χρονικά διαστήματα κάθε ημέρα. Από τότε μέχρι την ενηλικίωσή του νοσηλεύτηκε αρκετές φορές για βραχεία χρονικά διαστήματα σε Παιδοψυχιατρική Κλινική.

Με βάση το ιστορικό και την κλινική του εικόνα τέθηκε η διάγνωση σχιζοφρένειας αδιαφοροποίητου τύπου σε συννοσηρότητα με ΨΚΔ. Κατά την εισαγωγή του ήταν σε αγωγή με 400 mg κλοζαπίνη, 30 mg ζουκλοπενθιζόλη και 20 mg παροξετίνη. Θεραπευτικά επιχειρήθηκε αρχικά να αυξηθεί η δόση της κλοζαπίνης ώστε να ελεγχθούν τα έντονα ψυχωτικά στοιχεία. Ωστόσο η αύξηση αυτή προκάλεσε σοβαρή αύξηση των ψυχαναγκαστικών-καταναγκαστικών συμπτωμάτων (ΨΚΣ). Η αντικατάσταση της κλοζαπίνης με άλλο άτυπο αντιψυχωτικό δεν μπόρεσε να ελέγξει ικανοποιητικά την ψυχωτική συμπτωματολογία του ασθενή και τελικά η δόση σταθεροποιήθηκε στα 400 mg κλοζαπίνης ημερησίως. Για τον έλεγχο των ΨΚΣ αντικαταστάθηκε ο αναστολέας επαναπρόσληψης της σεροτονίνης (SSRI) παροξετίνη από το τρικυκλικό αντικαταθλιπτικό χλωριμιπραμίνη. Ωστόσο, ενώ η συνιστώμενη μέση ημερήσια δόση της χλωριμιπραμίνης για έλεγχο των ΨΚΣ είναι 225 με 300 mg, ο ασθενής σε δό-

ση άνω των 150 εμφάνιζε επίταση της ψύχωσης του. Τελικά, μετά από νοσηλεία 2 μηνών η αγωγή του διαμορφώθηκε σε 400 mg κλοζαπίνη, 160 mg ζιπρασιδόνη και 150 mg χλωριμιπραμίνη ημερησίως με μερική ύφεση των ψυχωτικών του στοιχείων και περιορισμό των ΨΚΣ (Y-BOCS score:20).

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Το ποσοστό συννοσηρότητας της ΨΚΔ στη σχιζοφρένεια κυμαίνεται περίπου στο 14% (2). Οι διαταραχές αυτές εμφανίζουν σημαντικές περιοχές αλληλεπικάλυψης σε νευροανατομικό (μετωπιαίος φλοιός, βασικά γάγγλια, θάλαμος) και νευροβιολογικό επίπεδο (εμπλοκή συστήματος σεροτονίνης και ντοπαμίνης) (1). Το σεροτονινεργικό σύστημα διαδραματίζει βασικό ρόλο στην ΨΚΔ γι' αυτό και τα αντικαταθλιπτικά φάρμακα είναι αποτελεσματικά στη θεραπεία της. Το τρικυκλικό αντικαταθλιπτικό χλωριμιπραμίνη απέκτησε πρώτο ένδειξη για τη θεραπεία της ΨΚΔ σε δόση άνω των 225 mg ημερησίως και αργότερα ο SSRI παροξετίνη. Ωστόσο όλα τα αντικαταθλιπτικά σε υψηλές δόσεις μπορούν να εμφανίσουν ως ανεπιθύμητη ενέργεια ψυχωτική συμπτωματολογία.

Το νεώτερο άτυπο αντιψυχωτικό φάρμακο κλοζαπίνη θεωρείται ιδιαίτερα αποτελεσματικό σε ανθεκτικές ψυχώσεις, ωστόσο υπάρχουν ορισμένες αναφορές στην παγκόσμια βιβλιογραφία πως εκλύει ή επιτείνει ήδη υπάρχοντα καταναγκαστικά συμπτώματα, όπως και στην περίπτωση που προαναφέρθηκε (3). Η κλοζαπίνη εμφανίζει μεγάλη συγγένεια σύνδεσης και ανταγωνισμού με τους D₂ υποδοχείς της ντοπαμίνης, αλλά και με τους 5-HT_{2A} και 5-HT_{2C} υποδοχείς της σεροτονίνης. Το εύρημα ότι η μακροχρόνια χρήση της κλοζαπίνης μπλοκάρει τους 5-HT_{2C} υποδοχείς οδηγεί στην υπόθεση ότι η υπερευσαισθησία των υποδοχέων αυτών ενδεχομένως να ευθύνεται για εμφάνιση ΨΚΣ μετά από χορήγηση κλοζαπίνης. Εξ άλλου, η κλοζαπίνη εμφανίζει την παράδοση αντίδραση να είναι αποτελεσματική σε περιπτώσεις αμιγούς ΨΚΔ που δεν συνοδεύεται από ψυχωτικά στοιχεία (4). Για το λόγο αυτό ασθενείς με συννοσηρότητα ΨΚΔ και σχιζοφρένειας πιθανόν να αντιπροσωπεύουν έναν ξεχωριστό τύπο σχιζοφρένειας που δεν κατατάσσεται στους ήδη υπάρχοντες, τον σχιζο-ψυχαναγκαστικό (5), χρήζουν συνεπώς ιδιαίτερης θεραπευτικής προσέγγισης για την επι-

τυχή αντιμετώπιση της μεικτής τους συμπτωματολογίας.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΠΑΡΑΠΟΜΠΕΣ

1. Tibbo P., Kroetsch M., Chue P., Warneke L.: Obsessive-compulsive disorder in schizophrenia. *J. Psychiatr. Res.* 34: 139-146 (2000)
2. Matthew B., Wayne G., Wilfred A., Rhiannon B., Rush J.: Obsessive compulsive symptoms in schizophrenia: Frequency and clinical features. *Schizophr. Res.* 76: 309-316 (2005)
3. Lykouras L., Alevizos B., Michalopoulou P., Rabavilas A.: Obsessive-compulsive symptoms induced by atypical antipsychotics: a review of the reported cases. *Prog. Neuro-psychopharmacol. Biol. Psychiatry* 27: 333-346 (2003)
4. Sareen J., Kirshner A., Lander M., Kjernisted K.D., Eleff M.K., Reiss J.P.: Do antipsychotics ameliorate or exacerbate obsessive compulsive disorder symptoms? A systematic review. *J. Affect. Disord.* 82: 167-174 (2004)
5. Bottas A., Cooke R.G., Richter MA.: Comorbidity and pathophysiology of obsessive-compulsive disorder in schizophrenia: is there evidence for a schizo-obsessive subtype of schizophrenia? *J. Psychiatry Neurosci.* 30: 187-93 (2005)

Treatment Approach in Case of Comorbidity of Obsessive-Compulsive Disorder in Schizophrenia: Efficacy and Side Effects of Clozapine and Chlorimipramine

G. Papazisis, A. Mastrogianni, K. Katsigiannopoulos and A. Karastergiou
D' Acute Ward, Psychiatric Hospital of Thessaloniki, Greece

Key words: Schizophrenia, obsessive-compulsive disorder, treatment, clozapine, chlorimipramine, side effects

Correspondence address: Dr Georgios Papazisis, Psychiatric Hospital of Thessaloniki, Greece
gpapaz@med.auth.gr

SUMMARY. Treatment of OCD in comorbidity with schizophrenia is a therapeutic challenge because these disorders have notable neurobiological and neuroanatomical areas of overlap. Atypical antipsychotics have a paradoxical efficacy in pure OCD but there are some case reports of exacerbation of OCS in schizophrenic patients with comorbid OCD. In our case report a young man who was diagnosed with both Schizophrenia (undifferentiated type, continuous) and Obsessive – Compulsive disorder (Y-BOCS score: 27) was treated with a combination of antipsychotic and antidepressant medication in high daily doses. Clozapine, an atypical antipsychotic, successfully reduced the psy-

chotic symptoms but in doses over 400 mg/day was worsening the OCS (Y-BOCS score 31). Chlorimipramine is suggested to be effective in OCD in doses over 225mg/day but in our case doses over 150 mg/day resulted to a rapid deterioration of psychotic symptoms. Thus a second atypical antipsychotic (ziprasidone at 160 mg/day) was added in the treatment and a lessening of both the psychotic and the compulsive symptoms to a more tolerable level has been achieved. Clozapine demonstrates binding affinity and antagonism for the D2 dopamine receptors but also for the 5-HT_{2A} and 5-HT_{2C} receptor. The serotonergic (5-HT)

system is known to play a major role in OCD, and antidepressants are effective agents in the treatment of OCD. The finding that long term clozapine use blocks 5-HT_{2C} receptors leads to the hypothesis that supersensitivity of the 5-HT_{2C} receptor may be responsible for clozapine-induced OCS. The paradox is the efficacy of clozapine in the treatment of pure OCD without psychotic symptoms. Thus, patients with comorbid OCD and Schizophrenia may represent a special subtype of schizophrenia population, the schizo-obsessive subtype, which requires distinct therapeutic approaches.

Περιεγχειρητική Χημειοπροφύλαξη στη Γενική Χειρουργική στην Ελλάδα, στη Σερβία και στο Μόντε Νέγκρο

Π. Παπαϊωαννίδου¹, Α. Sabo², Ε. Καραμανλής³, Α. Raskovic², L. Rejakov⁴, Α. Milicic⁵, Ζ. Tomic², Ο. Horvat², D. Kastratovic⁶ και Ν. Χαρλαύτης³

¹Εργαστήριο Φαρμακολογίας και ³¹ Χειρουργική Κλινική, Νοσοκομείο ΑΧΕΠΑ, Ιατρική Σχολή, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο, Θεσσαλονίκη, Ελλάδα, ²Department of Pharmacology, Toxicology and Clinical Pharmacology και ⁵General Surgery Department, Medical School, University of Novi Sad, Serbia, ⁴Department of Anesthesia and Internal Care Unit και ⁶General and Thoracic Surgery Department, Clinical Center Podgorica, Montenegro

ΣΚΟΠΟΣ

Η εργασία αυτή αποτελεί μέρος μιας πολυκεντρικής μελέτης που διεξάγεται στις χώρες της Ευρώπης, με σκοπό την επίβλεψη της αντιμικροβιακής χημειοπροφύλαξης στη Χειρουργική, και απώτερο στόχο την έκδοση οδηγιών σε τοπικό επίπεδο και τη βελτίωση της ποιότητας της περιεγχειρητικής χημειοπροφύλαξης. Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν να συγκριθούν οι συνήθειες των χειρουργών στο θέμα της παρεντερικής περιεγχειρητικής χημειοπροφύλαξης στη Γενική Χειρουργική σε τρία μεγάλα Νοσοκομεία της Ελλάδας, της Σερβίας και του Monte Negro και να ελεγχθεί η τήρηση των οδηγιών και η ποιότητα της εφαρμοζόμενης χημειοπροφύλαξης.

ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

Στη μελέτη έλαβαν μέρος η ¹ Πανεπιστημιακή Χειρουργική Κλινική του Νοσοκομείου ΑΧΕΠΑ Θεσσαλονίκης, η Γενική Χειρουργική Κλινική του Νοσοκομείου του Novi Sad και η Κλινική Γενικής Χειρουργικής και Χειρουργικής Θώρακος του Νοσοκομείου της Podgorica του Monte Negro. Οι χειρουργοί των ανωτέρω κλινικών απάντησαν

στο ίδιο ερωτηματολόγιο, με το οποίο διερευνήθηκε η συμμόρφωση στις προτεινόμενες οδηγίες και οι επιλογές των χειρουργών κατά την Περιεγχειρητική Χημειοπροφύλαξη στις καθαρές και στις δυνητικά μολυσμένες χειρουργικές επεμβάσεις, τόσο σε ασθενείς που εμφάνιζαν χαμηλό, όσο και σε ασθενείς που εμφάνιζαν υψηλό κίνδυνο για ανάπτυξη μετεγχειρητικής λοίμωξης. Ελέγχθηκαν τα εξής θέματα: 1) η εφαρμογή ή όχι χημειοπροφύλαξης, 2) η διάρκεια και ο χρόνος έναρξης της χημειοπροφύλαξης και 3) το είδος των αντιβιοτικών που χρησιμοποιούνται σε κάθε είδος χειρουργικής επέμβασης.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ – ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Εφαρμογή περιεγχειρητικής χημειοπροφύλαξης

Στις καθαρές επεμβάσεις.- Σύμφωνα με τις οδηγίες (1-3), στο Νοσοκομείο του Monte Negro δεν εφαρμόζεται παρεντερική χημειοπροφύλαξη σε όλες τις καθαρές επεμβάσεις.

Αντίθετα με τις οδηγίες, στο Νοσοκομείο ΑΧΕΠΑ της Θεσσαλονίκης και στο Νοσοκομείο του Novi Sad εφαρμόζεται παρεντερική χημειοπροφύλαξη, όταν ο κίνδυνος για μετεγχειρητική λοίμωξη είναι υψηλός. Όταν ο κίνδυνος για με-

τεγχειρητική λοίμωξη είναι χαμηλός, στο Νοσοκομείο του Novi Sad εφαρμόζεται χημειοπροφύλαξη στις επεμβάσεις κήλης του κοιλιακού τοιχώματος και στο Νοσοκομείο ΑΧΕΠΑ εφαρμόζεται χημειοπροφύλαξη στις επεμβάσεις μαστού και κήλης του κοιλιακού τοιχώματος.

Στις δυνητικά μολυσμένες χειρουργικές επεμβάσεις.- Εφαρμόζεται χημειοπροφύλαξη σχεδόν σε όλες τις περιπτώσεις. Όταν ο κίνδυνος για ανάπτυξη μετεγχειρητικής λοίμωξης είναι χαμηλός, στο Νοσοκομείο του Novi Sad δεν εφαρμόζεται χημειοπροφύλαξη στις επεμβάσεις του οισοφάγου και στο Νοσοκομείο της Podgorica δεν εφαρμόζεται χημειοπροφύλαξη στις εγχειρήσεις στομάχου, δωδεκαδακτύλου, λεπτού εντέρου και διαφραγματοκήλης.

Διάρκεια και χρόνος έναρξης της Χημειοπροφύλαξης

Στις καθαρές επεμβάσεις.- Η διάρκεια της χημειοπροφύλαξης συνήθως δεν υπερβαίνει το ανώτατο επιτρεπόμενο όριο των 24 ωρών, με εξαίρεση τις επεμβάσεις κήλης του κοιλιακού τοιχώματος στο Νοσοκομείο του Novi Sad.

Στις δυνητικά μολυσμένες χειρουργικές επεμβάσεις.- Η διάρκεια της χημειοπροφύλαξης ποικίλλει στα διάφορα Νοσοκομεία: Στο Νοσοκομείο ΑΧΕΠΑ δεν υπερβαίνει τις 24 ώρες, με εξαίρεση τις επεμβάσεις υψηλού κινδύνου του παγκρέατος. Στο Νοσοκομείο του Novi Sad συνήθως δεν υπερβαίνει τις 24 ώρες στις επεμβάσεις χαμηλού κινδύνου, ενώ υπερβαίνει τις 24 ώρες στις περισσότερες επεμβάσεις υψηλού κινδύνου. Στο Νοσοκομείο της Podgorica υπερβαίνει τις 24 ώρες σε όλες τις επεμβάσεις.

Σύμφωνα με τις οδηγίες, η Χημειοπροφύλαξη αρχίζει, τις περισσότερες φορές, πριν από την εγχείρηση, συνήθως κατά την έναρξη της αναισθησίας. Στις εγχειρήσεις του οισοφάγου οι Σέρβοι χειρουργοί αρχίζουν τη χημειοπροφύλαξη κατά τη διάρκεια της επέμβασης, γεγονός που αυξάνει τον κίνδυνο ανάπτυξης μετεγχειρητικής λοίμωξης.

Αντιβιοτικά που χρησιμοποιούνται στην Χημειοπροφύλαξη

Στις περισσότερες περιπτώσεις χρησιμοποιούνται οι ενδεδειγμένες β-λακτάμες. Οι προτιμήσεις

στα εν χρήσει αντιβιοτικά διαφέρουν στις τρεις Χώρες. Οι Έλληνες χειρουργοί χρησιμοποιούν κεφαλοσπορίνες β' γενιάς, αμινοπενικιλίνη με ή χωρίς αναστολέα των β-λακταμασών και καρβοξυπενικιλίνη με αναστολέα των β-λακταμασών. Οι Σέρβοι χειρουργοί χρησιμοποιούν κεφαλοσπορίνες α', β' και γ' γενιάς (κεφοταξίμη και κεφτριαξόνη). Οι χειρουργοί του Monte Negro χρησιμοποιούν κεφαζολίνη ή αμινοπενικιλίνη ή κεφτριαξόνη. Στις περιπτώσεις που υπάρχει κίνδυνος μόλυνσης με αναερόβια, η μετρονιδαζόλη προστίθεται στη χημειοπροφύλαξη από τους Έλληνες και τους Σέρβους χειρουργούς ή χρησιμοποιείται ως μονοπροφύλαξη από τους χειρουργούς του Monte Negro. Η μονοπροφύλαξη με μετρονιδαζόλη, αν και λιγότερο αποτελεσματική, αποτελεί αποδεκτή οικονομική εναλλακτική λύση. Όμως, η χρήση κεφαλοσπορίνης γ' γενιάς στα νοσοκομεία της Σερβίας και του Monte Negro είναι αδικαιολόγητη και αποτελεί σοβαρή παρέκκλιση από τις οδηγίες, η οποία μπορεί να οδηγήσει στην ανάπτυξη ανθεκτικών στελεχών των μικροβίων.

Η εφαρμογή παρεντερικής περιεγχειρητικής χημειοπροφύλαξης είναι απαραίτητη για την αποφυγή της ανάπτυξης μετεγχειρητικής λοίμωξης και την ελάττωση της μετεγχειρητικής νοσηρότητας και θνησιμότητας. Κατά την εφαρμογή της χημειοπροφύλαξης θα πρέπει να λαμβάνονται υπ' όψιν τοπικοί παράγοντες μικροβιακής αντοχής στα αντιβιοτικά, οι συνθήκες αντισηψίας στο χειρουργείο, η ανάπτυξη ανθεκτικών στελεχών και υπερλοιμώξεως και το κόστος της χημειοπροφύλαξης. Θα πρέπει πάντοτε να λαμβάνεται υπ' όψιν ότι ο στόχος της περιεγχειρητικής χημειοπροφύλαξης δεν είναι να θεραπεύσει τη λοίμωξη, αλλά να προφυλάξει από τη μόλυνση. Πρέπει να επιστρατεύονται στο έπακρο όλα προφυλακτικά μέσα, όπως η εφαρμογή ορθής αντισηψίας και η χρήση γαντιών, για τον περιορισμό στο ελάχιστο της εφαρμοζόμενης παρεντερικής χημειοπροφύλαξης και την κατά το δυνατόν ελάττωση του κινδύνου ανάπτυξης μικροβιακής αντοχής.

Στην παρούσα εργασία παρατηρήθηκαν παρεκκλίσεις από τις οδηγίες και στα τρία νοσοκομεία που συμμετείχαν στη μελέτη. Στις περισσότερες περιπτώσεις οι παρεκκλίσεις αυτές μπορούν να αποδοθούν στην ανασφάλεια των χειρουργών σχετικά με την ορθή εφαρμογή αντισηψίας στα χειρουργεία. Αδικαιολόγητη, όμως, είναι

η χρήση κεφαλοσποσπορίνης γ' γενιάς στα νοσοκομεία της Σερβίας και του Monte Negro.

Αν και υπάρχουν μεγάλες διαφορές στην ποιότητα της εφαρμοζόμενης περι-εγχειρητικής χημειοπροφύλαξης στις διάφορες χώρες που συμμετέχουν στη μελέτη (4-7), παρεκκλίσεις από τις οδηγίες, οι οποίες δεν δικαιολογούνται από τοπικούς παράγοντες, παρατηρούνται σε όλες τις περιπτώσεις. Είναι αναγκαία η παρέμβαση των φαρμακολόγων για τη διόρθωση τέτοιων φαινομένων και για την εφαρμογή ορθής αντιμικροβιακής χημειοπροφύλαξης.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΠΑΡΑΠΟΜΠΕΣ

1. Bratzler D.W., Houck P.M. Antimicrobial prophylaxis for surgery: an advisory statement from the National Surgical Infection Prevention Project. *Am. J. Surgery* 189: 395-404 (2005)
2. American Society of Health-System Pharmacists: ASHP therapeutic guidelines on antimicrobial prophylaxis in surgery. *Am. J. Health Syst. Pharm.* 56: 1839-1888 (1999)
3. Antimicrobial prophylaxis in surgery. *Med. Lett. Drugs Ther.* 43: 92-97 (2001)
4. Papaioannidou P., Kambaroudis A., Loncar-Stojiljkovic D., Stojiljkovic M.P., Gerasimidis T.: Peri-operative chemoprophylaxis in general surgery departments in Denmark and Greece. *Rev. Clin. Pharmacol. Pharmacokinet.* 20: 286-288 (2006)
5. Papaioannidou P., Nanassis K., Vlahovic-Palcevski V., Ledic D., Tsiotsopoulos Ph.: Chemoprophylaxis in Neurosurgery Departments in Croatia and Greece. *Rev. Clin. Pharmacol. Pharmacokinet.* 20: 289-91 (2006)
6. Papaioannidou P.G., Vavilis D., Vlahovic-Palcevski V., Smiljan-Severinski N., Tartzis V., Bontis I.: Peri-Operative chemoprophylaxis In Obstetrics and Gynecology In Croatia and Greece. Abstracts of the 19th European Congress on Surgical Infections, p. 94, 2006
7. Papaioannidou P., Kambaroudis A., Vlahovic-Palcevski V., Velickovic-Radovanovic R., Pejic R., Petrovic J., Gerasimidis T.: Chemoprophylaxis in General Surgery Departments in Croatia, Serbia and Greece. *Acta Pharmacologica Clinica* 27(Suppl 1): 205 (2006)

Peri-operative Chemoprophylaxis in General Surgery in Greece, Serbia and Montenegro

P. Papaioannidou¹, A. Sabo², E. Karamanlis³, A. Raskovic², L. Pejakov⁴, A. Milicic⁵, Z. Tomic², O. Horvat², D. Kastratovic⁶ and N. Harlaftis³

¹Department of Pharmacology and ³1st Surgery Department, AHEPA Hospital, Medical School, Aristotle University, Thessaloniki, Greece, ²Department of Pharmacology, Toxicology and Clinical Pharmacology and ⁵General Surgery Department, Medical School, University of Novi Sad, Serbia, ⁴Department of Anesthesia and Internal Care Unit and ⁶General and Thoracic Surgery Department, Clinical Center Podgorica, Montenegro

Key words: General Surgery, peri-operative chemoprophylaxis, Greece, Serbia, Montenegro

SUMMARY: The aim of the present study was to compare the application and the quality of parenteral peri-operative Chemoprophylaxis in General Surgery Departments of three major Hospitals in Greece, Serbia and Montenegro, and to check if the recommended guidelines for Surgical Chemoprophylaxis are met.

Methods: All the surgeons replied to the same questionnaire, which checked: 1) application of chemoprophylaxis, 2) duration and time of initiation of chemoprophylaxis and 3) the kind of antibiotics used.

Results: A different practice on application and quality of parenteral peri-operative chemoprophylaxis was observed in each hospital. Chemoprophylaxis was applied in most cases, and in Serbia and Greece even in clean surgery. In Montenegro chemoprophylaxis was not applied in clean surgery. In Greece the duration of chemoprophylaxis did not exceed 24 hours, in Serbia it exceeded 24 hours in many cases and in Monte Negro it exceeded 24 hours in all cases. Chemoprophylaxis was initiated during pre-induction to anesthesia. The recommended β -lactams and metronidazole were used in most cases but in Serbia and Montenegro 3rd generation cephalosporins were used in many cases of clean contaminated surgery.

Conclusion: Non-conformance to the guidelines was observed in peri-operative chemoprophylaxis in the three surgery departments in Greece, Serbia and Montenegro.

ΕΠΙΘΕΩΡΗΣΗ ΚΛΙΝΙΚΗΣ ΦΑΡΜΑΚΟΛΟΓΙΑΣ
ΚΑΙ ΦΑΡΜΑΚΟΚΙΝΗΤΙΚΗΣ 25: 92-93 (2007)
©ΦΑΡΜΑΚΟΝ-Τύπος

Επίδραση του Δραστικού Συστατικού του *Crocus Sativus L.*, Κροκίνη επί της Αναγνωριστικής και Χωρικής Μνήμης του Επίμουσ

Νικόλαος Πιτσίκας¹, Στυλιανή Ζησοπούλου¹, Πέτρος Α. Ταραντίλης², Χαράλαμπος, Δ. Κανάκης², Μόσχος Γ. Πολυσιού² και Νικόλαος Σακελλαρίδης¹

¹Εργαστήριο Φαρμακολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Λάρισα, Ελλάς. ²Εργαστήριο Χημείας, Γενικό Τμήμα, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Αθήνα, Ελλάς

ΓΕΝΙΚΑ - ΣΚΟΠΟΣ

Ο κρόκος (*Crocus Sativus L.*) είναι φυτό που καλλιεργείται σε πολλές περιοχές του κόσμου (Μαρόκο, Ισπανία, Ιταλία, Ελλάδα, Ιράν κ.λ.π.). Τα αποξηραμένα στίγματα του άνθους περιέχουν σημαντικές ποσότητες χρωστικών υδατοδιαλυτών ουσιών που καλούνται κροκίνες. Πληθώρα επιστημονικών προκλινικών ερευνών αποδεικνύουν ότι αυτή η δρoγή παρουσιάζει αντιφλεγμονώδεις, αναλγητικές και αντιοξειδωτικές ιδιότητες. Πρόσφατα η εμπλοκή της στις διαδικασίες μάθησης και μνήμης έχει προταθεί.

Η παρούσα μελέτη σχεδιάστηκε με σκοπό να διαλευκανθεί ο ακριβής ρόλος της κροκίνης στις διαδικασίες μάθησης και μνήμης.

ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

Για την επίτευξη αυτού του στόχου θα χρησιμοποιηθούν τα πειραματικά πρότυπα μελέτης των γνωσιακών λειτουργιών, όπως είναι οι διατάξεις της αναγνώρισης των αντικειμένων και μίας νέας μορφής του υδάτινου ακτινωτού λαβύρινθου. Η πρώτη πειραματική διάταξη αξιολογεί την αναγνωριστική μνήμη στα πειραματόζωα. Ο υδάτινος ακτινωτός λαβύρινθος αξιολογεί τη χωρική αναφορική και τη χωρική λειτουργική μνήμη.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Σε μια πρώτη σειρά πειραμάτων, η χορήγηση της κροκίνης (15 και 30 mg/kg, ενδοπεριτοναϊκά)

αμέσως μετά από το πρώτο στάδιο της πειραματικής δοκιμασίας, εξάλειψε τα χρονοεξαρτώμενα ελλείμματα αναγνωριστικής μνήμης στον επίμου, προτείνοντας ότι ρυθμίζει τους μηχανισμούς καταγραφής και ανάκλησης πληροφοριών. Σε μια δεύτερη μελέτη, χορήγηση της κροκίνης (κυρίως 30, αλλά και σε μικρότερο βαθμό 15 mg/kg, ενδοπεριτοναϊκά) επιτυχώς ανταγωνίστηκε ελλείμματα χωρικής μάθησης και μνήμης οφειλόμενα στη χορήγηση του μουσκαρινικού ανταγωνιστή σκοπολαμίνη (0,2 mg/kg, ενδοπεριτοναϊκά).

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Τα ευρήματα μας αυτά καταδεικνύουν ότι η κροκίνη εμπλέκεται στους μηχανισμούς που διέπουν την αναγνωριστική και διάφορες μορφές της χωρικής μνήμης (αναφορική και λειτουργική).

Effects of the Active Constituent of *Crocus Sativus L.* Crocin on Recognition and Spatial Rats' Memory

Nikolaos Pitsikas¹, Styliani Zisopoulou¹, Petros A. Tarantilis², Charalabos D. Kanakis², Moschos G. Polissiou² and Nikolaos Sakellariadis¹

¹Department of Pharmacology, School of Medicine, University of Thessaly, Larissa, Greece.

²Laboratory of Chemistry, Department of Sci-

ence, Agricultural University of Athens, Athens Greece

Key words: *Crocus Sativus* L., crocin, active constituent, rat, recognition, memory

SUMMARY. *Crocus Sativus* L. is a plant cultivated in various parts of the world. Its involvement in learning and memory processes has been proposed. The present study was designed to investigate in the rat the effects of the active constituent of *Crocus Sativus* L., crocin on recognition and spatial memory. For this aim, the object recognition task which evaluates non spatial working memory and a novel version of the radial water maze which assesses spatial reference and spatial

working memory were chosen. In the first study, post-training administration of crocin (15 and 30 mg/kg) counteracted extinction of recognition memory in the normal rat, suggesting that crocin modulates storage and/or retrieval of information. In a subsequent study, pre-training treatment with crocin (30 mg/kg and to some extent also 15 mg/kg) attenuated the scopolamine (0.2 mg/kg)-induced performance deficits in a new paradigm assessing spatial reference and spatial working memory in rodents. The present results support and extend the enhancing effects of crocin on memory and demonstrate also its implication in the mechanisms underlying recognition and spatial memory.

ΕΠΙΘΕΩΡΗΣΗ ΚΛΙΝΙΚΗΣ ΦΑΡΜΑΚΟΛΟΓΙΑΣ
ΚΑΙ ΦΑΡΜΑΚΟΚΙΝΗΤΙΚΗΣ 25: 94-97 (2007)
©ΦΑΡΜΑΚΟΝ-Τύπος

Κασπασο-εξαρτώμενος και μη Κυτταρικός Θάνατος σε PC12 Κύτταρα και PC12 Κύτταρα υπό την Επίδραση NGF μετά από Διεγερσιμοτοξικότητα υπό την Επίδραση Γλουταμινικού Οξέος

Χ. Πουρτζιάκη¹, Ι. Κλάγκας¹, Α. Καϊδόγλου², Γ. Τζημαγιώργης³ και Α. Κριτής^{4*}

¹Εργαστήριο Φαρμακολογίας, ²Εργαστήριο Ιστολογίας-Εμβρυολογίας, ³Εργαστήριο Βιοχημείας, ⁴Εργαστήριο Φυσιολογίας, Ιατρική Σχολή, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο, Τ.Θ. 54124 Θεσσαλονίκη, Ελλάδα

ΕΙΣΑΓΩΓΗ - ΣΚΟΠΟΣ

Η εισροή ασβεστίου μέσω των υποδοχέων του γλουταμινικού οξέος και των τασεοεξαρτατώμενων καναλιών του ρυθμίζει σειρά λειτουργικών και δομικών απαντήσεων στους νευρώνες. Εν τούτοις, η τοξική εισροή ασβεστίου μπορεί να πυροδοτήσει θανατηφόρες βιοχημικές αντιδράσεις στις οποίες συμμετέχουν ομάδες αποδομητικών ενζύμων (πρωτεάσες και ενδονουκλεάσες) καθώς και η αυξημένη σύνθεση ελευθέρων ριζών οξυγόνου. Οι βιοχημικές αυτές αντιδράσεις τραυματίζουν και εκφυλίζουν τους νευρώνες. Οι ίδιοι μηχανισμοί εμπλέκονται, τόσο στις οξείες (αγγειακό εγκεφαλικό, τραυματισμός), όσο και στις χρόνιες νευροεκφυλιστικές ασθένειες (νόσος Alzheimer και νόσος του Huntington) (1-3). Υπάρχουν στοιχεία που καταδεικνύουν ότι πολλαπλές φυσιολογικές και παθοφυσιολογικές διαδικασίες του εγκεφάλου διαμορφώνονται από μια λεπτή ισορροπία μεταξύ των δραστηριοτήτων των πρωτεασών και των αναστολέων τους.

Τα καρκινικά κύτταρα PC12 (κύτταρα φαιοχρωμοκυτώματος από επίμυες) αποτελούν ένα ιδιαίτερα χρήσιμο μοντέλο μελέτης κυτταρικού θανάτου από διεγερσιμοτοξικότητα που προκαλεί υπερέκθεση των νευρώνων σε γλουταμινικό οξύ (4). Τα PC12 κύτταρα έχουν την ιδιότητα να αποκτούν νευρωνικό χαρακτήρα μετά από την καλλιέργειά τους παρουσία νευρικού αυξητικού παράγοντα (NGF), μετατρέποντας το φαινότυπο

τους από αδιαφοροποίητα καρκινικά κύτταρα σε διαφοροποιημένα νευρωνικά (5,6).

Στην παρούσα εργασία διερευνήθηκε η διαδικασία επιβίωσης των αδιαφοροποίητων PC12 και διαφοροποιημένων νευρικών κυττάρων μετά από έκθεσή τους σε υψηλές συγκεντρώσεις γλουταμινικού. Η διεγερσιμοτοξικότητα με γλουταμινικό μελετήθηκε σε συνδυασμό με την αναστολή των κασπασών που συμμετέχουν στη διαδικασία της πρωτεόλυσης, η οποία σχετίζεται με τον αποπτωτικό θάνατο, με την προσθήκη του αναστολέα των κασπασών zVAD-fmk (7).

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Καλλιέργειες Κυττάρων

Τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν με κύτταρα φαιοχρωμοκυτώματος επίμυων PC12 (ευγενική προσφορά Ιωσήφ Παπαματθαϊάκη IMBB, ΙΤΕ, Ηράκλειο Κρήτης) τα οποία επιλέχθηκαν λόγω της ικανότητάς τους να διαφοροποιούνται σε νευρωνικά με την επίδραση του NGF. Τα PC12 κύτταρα καλλιεργήθηκαν σε επικαλυμμένες με κολλαγόνο φλάσκες (Corning) σε θρεπτικό υλικό Dulbecco's Modified Eagle Medium με υψηλή συγκέντρωση γλυκόζης (DMEM- 45000 mg/ml glucose, Gibco), με 5% εμβρυϊκό ορό βοοειδούς (Gibco), 15% ορό αλόγου (Gibco) και 100 U/ml πενικιλίνη, 100 μg/ml στρεπτομυκίνη και 25 μg/ml αμφοτερικίνη (Gibco). Οι καλλιέργειες διατηρούνταν σε περιβάλλον με 5% CO₂ - 95%

υγροποιημένο αέρα στους 37 °C. Το θρεπτικό υλικό ανανεώνονταν κάθε 3-4 ημέρες. Για τη διαφοροποίηση με τον NGF, τα PC12 κύτταρα τοποθετήθηκαν σε 96-well plates (10⁵ κύτταρα/well) και καλλιεργήθηκαν σε πλήρες θρεπτικό υλικό Dulbecco's Modified Eagle Medium με χαμηλή συγκέντρωση γλυκόζης (DMEM 10000 mg/ml glucose) με 100 ng/ml ανασυνδυασμένο 2.5S NGF από επίμυες (R&D). Το θρεπτικό υλικό και ο NGF ανανεώνονταν κάθε 2-3 ημέρες. Οι πειραματικές διαδικασίες πραγματοποιούνταν εις τριπλούν μετά από 7-8 ημέρες καλλιέργειας με NGF.

Τοξικότητα με Γλουταμινικό οξύ

Για τη πρόκληση διεγερσιμοτοξικότητας με γλουταμινικό, τα PC12, αλλά και διαφοροποιημένα με NGF κύτταρα, καλλιεργήθηκαν σε πλήρες θρεπτικό υλικό DMEM με χαμηλή συγκέντρωση γλυκόζης (DMEM 10000 mg/ml glucose). Στο θρεπτικό υλικό προστέθηκε γλουταμινικό (Sigma) διαλυμένο αρχικά σε στείρο ύδωρ και στη συνέχεια σε θρεπτικό υλικό σε δύο ακραίες συγκεντρώσεις 0,5 μM και 10 μM για 3 ώρες.

Κυτταρική Επιβίωση

Η ακεραιότητα της κυτταρικής λειτουργίας διαπιστώθηκε με τη δοκιμασία του MTT (βρωμιούχο 3-[4,5-διμεθυλθιαζολ-2-υλ]-2,5-διφενυλτετραζολιο, Sigma-Aldrich). Η συγκεκριμένη δοκιμασία βασίζεται στην ικανότητα του μιτοχονδριακού ενζύμου σουκινική αφυδρογονάση να μετατρέπει το κίτρινο τετραζολικό άλας του MTT σε μπλε MTT formazan κρυστάλλους στα ζώντα κύτταρα (8,9). Ο βαθμός της μετατροπής αυτής παρέχει ένδειξη μιτοχονδριακής μεταβολικής λειτουργίας. Η ουσία MTT διαλύεται σε PBS και στη συνέχεια σε

θρεπτικό υλικό DMEM. Μετά την έκθεση των κυττάρων στις προαναφερθείσες συγκεντρώσεις γλουταμινικού και για χρονικό διάστημα 3 ωρών, τα κύτταρα ξεπλύθηκαν με θρεπτικό υλικό DMEM και επωάστηκαν για 4 ώρες με 1 mg/ml MTT στους 37 °C. Στη συνέχεια η απορρόφηση του MTT στα 570 nm υπολογίστηκε με τη μέθοδο ELISA (Stat Fax – 2100, Awareness Technology Inc. USA)

Αναστολή των Κασπασών

Η δράση των κασπασών, μετά την επίδραση των δύο συγκεντρώσεων του γλουταμινικού στα κύτταρα, μελετήθηκε με την προσθήκη της ουσίας zVAD-fmk (*N*-βενζυλοξυκαρβονυλ-Βαλ-Αλα-Ασπ-φλουορομεθυλκετονη, Sigma) ενός καθολικού αναστολέα των κασπασών (3). Ο συγκεκριμένος αναστολέας αποθηκεύθηκε ως 500x διάλυμα σε DMSO (διμεθυλοσουλφοξείδιο) και χρησιμοποιήθηκε σε συγκεντρώσεις 10 μM και 50 μM στα PC12 και στα υπό την επίδραση NGF κύτταρα 60 λεπτά πριν την επίδραση του γλουταμινικού.

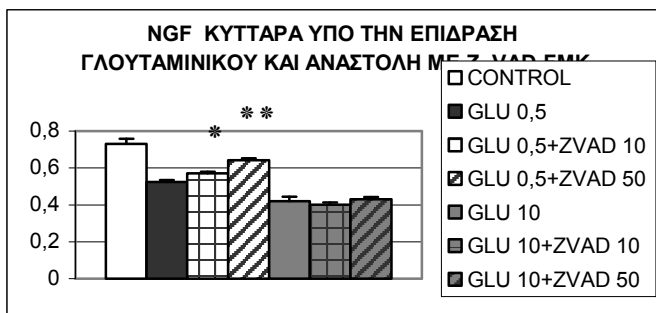
Στατιστική Μέθοδος

Τα αποτελέσματα αναλύθηκαν με το λογισμικό SPSS 14.0, με τη μέθοδο της ανάλυσης διακύμανσης (ANOVA) και στη συνέχεια πραγματοποιήθηκαν πολλαπλές συγκρίσεις με τις δοκιμασίες LSD και Dunett σε 95% διαστήματα αξιοπιστίας. Τα δεδομένα παρουσιάζονται ως μέσος όρος Μ.Ο. κάθε πειραματικής διαδικασίας όπου $n \geq 3$. Οι διαφορές επισημαίνονται ως * $p = 0,05$, ** $p = 0,01$ και *** $p = 0,001$ σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ



Εικόνα 1. Μετά από 3 ώρες επίδρασης του γλουταμινικού ο αναστολέας zVAD-fmk αναστέλλει τον κυτταρικό θάνατο στα κύτταρα PC12 με στατιστικώς σημαντική διαφορά $p < 0,001$. Η αναστολή συμβαίνει μόνο στη συγκέντρωση 0,5 μM γλουταμινικού και αφορά στη συγκέντρωση 50 μM του zVAD-fmk.



Εικόνα 2. Μετά από 3 ώρες επίδρασης του γλουταμινικού ο αναστολέας zVAD-fmk αναστέλλει τον κυτταρικό θάνατο στα κύτταρα PC12 υπό την επίδραση NGF. Η αναστολή συμβαίνει μόνο για τη συγκέντρωση 0,5 μM γλουταμινικού και αφορά στη συγκέντρωση 50μM του zVAD-fmk με στατιστικώς σημαντική διαφορά $p < 0,001$. Στη συγκέντρωση 10 μM του zVAD-fmk έχουμε λιγότερο ισχυρή αναστολή $p < 0,05$.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Και οι δύο συγκεντρώσεις γλουταμινικού οξέος που χρησιμοποιήθηκαν υπήρξαν ικανές να προκαλέσουν διεγερσιμοτοξικότητα τόσο στα PC12 κύτταρα όσο και στα PC12 κύτταρα μετά από επίδραση NGF. Ωστόσο στη συγκέντρωση 10 μM, αν και παρατηρήθηκε κυτταρικός θάνατος, δεν παρατηρήθηκε καμία επίδραση από την αναστολή της δράσης των κασπασών. Αυτό μπορεί να οφείλεται στο γεγονός ότι στην υψηλή αυτή συγκέντρωση γλουταμινικού ενεργοποιούνται διαδικασίες κυτταρικού θανάτου στις οποίες δεν εμπλέκονται οι κασπάσες και είναι σύμφωνο με παρατηρήσεις άλλων ερευνητών (10).

Στην συγκέντρωση των 0,5 μM γλουταμινικού προκλήθηκε κυτταρικός θάνατος τόσο σε κύτταρα PC12 όσο και κύτταρα PC12 μετά από επίδραση NGF. Το είδος του κυτταρικού θανάτου αυτού αναστέλλεται μερικώς με τη χρήση του zVAD-fmk, ενός καθολικού αναστολέα της δράσης των κασπασών. Τα αποτελέσματα αυτά δείχνουν ότι τουλάχιστον σε κάποιο σημείο της διαδικασίας του κυτταρικού θανάτου (κάτω από τις συγκεκριμένες συνθήκες) ενεργοποιούνται αποπτωτικές διαδικασίες.

Το γεγονός ότι σε δύο διαφορετικές συγκεντρώσεις γλουταμινικού, τα κύτταρα (και τα PC12 και τα PC12 με NGF) επιστρατεύουν διαφορετικές διαδικασίες κυτταρικού θανάτου (μια κασπασο-εξαρτώμενη και μια κασπασο-ανεξάρτητη) δηλώνει ότι το φαινόμενο του κυτταρικού θανάτου για το νευρικό σύστημα είναι υψηλής οργάνωσης και χρειάζεται ενδελεχή μελέτη ώστε να αποσαφηνιστεί πλήρως ο ρόλος των πρωτε-

ών στον κυτταρικό θάνατο των νευρικών κυτάρων.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΠΑΡΑΠΟΜΠΕΣ

1. Choi D.W.: Glutamate neurotoxicity and diseases of the nervous system. *Trends Neurosci.* 11: 465-469 (1988)
2. Saito K.I, Elce J.S., Hamos J.E., Nixon R.A.: Widespread activation of calcium-activated neutral proteinase (calpain) in the brain in Alzheimer disease: A potential molecular basis for neuronal degeneration. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 2628-2632 (1993)
3. Siesjo B.K.: Cell damage in the brain: a speculative synthesis. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 1: 155-185 (1981)
4. Greene L.A., Aletta J.M., Rukenstein A., Green S.H.: PC12 pheochromocytoma cells: culture, nerve growth factor treatment, and experimental exploitation. *Methods Enzymol.* 147: 207-216 (1987)
5. Vaux D.L., Korsmeyer S.J.: Cell death in development. *Cell* 96: 245-254 (1999)
6. Evan G., Littlewood T.: A matter of life and cell death. *Science* 281: 1317-1322 (1998)
7. Rami A., Ferger D., Krieglstein J.: Blockade of calpain proteolytic activity rescues neurons from glutamate excitotoxicity. *Neurosci. Res.* 27: 93-97 (1997)
8. Denizot F., Lang R.: Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. *J. Immun. Methods* 89: 271-277 (1986)
9. Hansen M.B., Nielsen S.E., Berg K.: Re-examination and further development of a precise and rapid dye method for measuring cell growth/cell killing. *J. Immunol. Methods* 119: 203-210 (1989)
10. Roth J.A., Feng L., Walowitz J., Browne R.W.: Manganese-induced rat pheochromocytoma (PC12) cell death is independent of caspase activation. *J. Neurosci. Res.* 15;61(2): 162-171 (2000)

Caspase Dependent and Independent Cell Death in Naïve and NGF Treated PC12 Cells after Glutamate Induced Exitotoxicity

C. Pourzitaki¹, I. Klagas¹, A. Kaidoglou², G. Tzimagiorgis³ and A. Kritis^{4*}

¹Laboratory of Pharmacology, ²Laboratory of Histology-Embryology, ³Laboratory of Biochemistry and ⁴Laboratory of Physiology, Medical School, P.O. Box 54124, Aristotle University, Thessaloniki, Greece

Key words: Apoptosis, glutamate, exitotoxicity, PC12, NGF, z-VAD-fmk

**Correspondence address: A. Kritis, Laboratory of Physiology, Medical School, P.O. Box 54124, Aristotle University, Thessaloniki, Greece
email Kritis@med.auth.gr*

SUMMARY. Calcium influx through glutamate receptors and voltage-dependent channels mediates an array of functional and structural responses in neurons. However, unrestrained calcium influx can trigger potentially lethal biochemical pathways that involve degradative enzymes (e.g. proteases and endonucleases) and/or increased synthesis of oxygen free radicals which injure and damage neurons. Such mecha-

nisms are implicated in both acute (stroke, trauma) and chronic (Alzheimer's and Huntington's disease) neurodegenerative disorders. In the present study we investigated the molecular response of central nervous system to glutamate induced exitotoxicity using PC12 cell cultures. These chromaffinergic transformed cells upon treatment with nerve growth factor (NGF), differentiate to a sympathetic phenotype expressing neurites and excitability. PC12-cells were cultured in full medium DMEM at 37°C with 5% CO₂. To cause exitotoxicity from glutamate, undifferentiated and NGF-treated PC12 cultures in DMEM with low glucose concentrations have been exposed for 3h to glutamate in two concentrations (0,5 µM and 10 µM). We investigated the involvement of proteolysis in cell death induced by glutamate toxicity, using a pan – caspase inhibitor z-VAD-fmk. Cell viability was estimated by a colorimetric method using MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)- 2,5-diphenyl tetrazolium bromide]. We found that 50 µM z-VAD-fmk protects against cell death induced by low glutamate concentrations at PC12 cells while in NGF treated cells the 10 µM concentration is also significantly effective. In higher though glutamate concentrations cell death of both naïve and NGF treated PC12 cells seem to follow a caspase independent pathway. More work in this field is needed to elucidate the mechanisms that PC12 employ to effect cell death in different situations.

ΕΠΙΘΕΩΡΗΣΗ ΚΛΙΝΙΚΗΣ ΦΑΡΜΑΚΟΛΟΓΙΑΣ
ΚΑΙ ΦΑΡΜΑΚΟΚΙΝΗΤΙΚΗΣ 25: 98-101 (2007)
©ΦΑΡΜΑΚΟΝ-Τύπος

Η Νευροπροστατευτική Δράση Αναστολέα των Ασπαρτυλ-πρωτεασών σε PC12 Κύτταρα και PC12 Κύτταρα υπό την Επίδραση NGF μετά από Στέρση Οξυγόνου και Γλυκόζης

Χ. Πουρζιτάκη¹, Ι. Κλάγκας¹, Α. Σιόγκα², Γ. Τζημαγιώργης³ και Α. Κριτής^{4*}

¹Εργαστήριο Φαρμακολογίας, ²Εργαστήριο Ιστολογίας-Εμβρυολογίας, ³Εργαστήριο Βιοχημείας, ⁴Εργαστήριο Φυσιολογίας, Ιατρική Σχολή, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο, Τ.Θ. 54124 Θεσσαλονίκη, Ελλάς

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Οι λειτουργικές διαταραχές του Κεντρικού Νευρικού Συστήματος μετά από υποξία πιθανώς να οφείλονται είτε σε κυτταρικό θάνατο των νευρωνικών κυττάρων είτε σε αλλαγές στο νευροχημικό προφίλ τους που εμπλέκονται στη διαδικασία του κυτταρικού θανάτου. Τα καρκινικά κύτταρα PC12 (κύτταρα φαιοχρωμοκυτώματος από επίμυες) αποτελούν ένα ιδιαίτερα χρήσιμο μοντέλο μελέτης της σχέσης υποξίας και στέρσης γλυκόζης με τον κυτταρικό θάνατο (1). Τα PC12 κύτταρα έχουν την ιδιότητα να αποκτούν νευρωνικό χαρακτήρα μετά την καλλιέργειά τους με νευρικό αυξητικό παράγοντα (NGF), μετατρέποντας το φαινότυπό τους από αδιαφοροποιητά καρκινικά κύτταρα σε διαφοροποιημένα νευρωνικά (2).

Ο προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος (απόπτωση) και η νέκρωση σχετίζονται τόσο με φυσιολογικές κυτταρικές διαδικασίες όσο και με παθολογικές καταστάσεις ενός κυττάρου. Στην παρούσα εργασία διερευνήθηκε η διαδικασία επιβίωσης των αδιαφοροποιητών PC12 και διαφοροποιημένων νευρικών κυττάρων υπό στέρση γλυκόζης και οξυγόνου, μετά από αναστολή της διαδικασίας της πρωτεόλυσης, η οποία σχετίζεται με τον μη αποπτωτικό θάνατο, δηλαδή τη διαδικασία της κυτταρικής νέκρωσης, με την

προσθήκη του αναστολέα των ασπαρτυλ-πρωτεασών Pepstatin A (3,4).

Η παθολογική αύξηση του ενδοκυττάρου ασβεστίου, η οποία καταλήγει στην ενεργοποίηση ενζύμων που συμμετέχουν στους μηχανισμούς πρόκλησης κυτταρικής βλάβης, αποτελεί το κρίσιμο σημείο της συσχέτισης του νευρωνικού κυτταρικού θανάτου με την υποξία ή την ισχαιμία (5,6).

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Καλλιέργειες Κυττάρων

Τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν με κύτταρα φαιοχρωμοκυτώματος επίμυων PC12 τα οποία επιλέχθηκαν λόγω της ικανότητάς τους να διαφοροποιούνται σε νευρωνικά με την επίδραση του NGF. Τα PC12 κύτταρα καλλιεργήθηκαν σε επικαλυμμένες με κολλαγόνο φλάσκες (Corning) σε θρεπτικό υλικό Dulbecco's Modified Eagle Medium με υψηλή συγκέντρωση γλυκόζης (DMEM- 45000 mg/ml glucose) (Gibco) με 5% εμβρυϊκό ορό βοοειδούς (Gibco), 15% ορό αλόγου (Gibco) και 100 U/ml πενικιλίνη, 100 µg/ml στρεπτομυκίνη και 25 µg/ml αμφοτερικίνης (Gibco). Οι καλλιέργειες διατηρούνταν σε περιβάλλον με 5% CO₂ - 95% υγραποιημένο αέρα στους 37 °C. Το θρεπτικό υλικό ανανεώνονταν κάθε 3-4 ημέρες. Για τη διαφοροποίηση με τον NGF τα PC12 κύτταρα τοποθετήθηκαν σε 96-

well plates (10⁵ κύτταρα/well) και καλλιέργηθηκαν σε πλήρες θρεπτικό υλικό Dulbecco's Modified Eagle Medium με χαμηλή συγκέντρωση γλυκόζης (DMEM 10000 mg/ml glucose) με 100 ng/ml ανασυνδυασμένο 2.5S NGF από επίμυες (R&D). Το θρεπτικό υλικό και ο NGF ανανεώνονταν κάθε 2-3 ημέρες. Οι πειραματικές διαδικασίες πραγματοποιούνταν εις τριπλούν μετά από 7-8 ημέρες καλλιέργειας με NGF.

Στέρηση Γλυκόζης

Για τη στέρηση γλυκόζης, PC12 αλλά και διαφοροποιημένα με NGF κύτταρα καλλιέργηθηκαν με πλήρες θρεπτικό υλικό DMEM χωρίς γλυκόζη για 12 ώρες, ενώ τα κύτταρα που ανήκαν στην ομάδα ελέγχου καλλιέργηθηκαν με θρεπτικό υλικό χαμηλής συγκέντρωσης γλυκόζης (DMEM 1000 mg/ml).

Υποξία

Οι κυτταρικές καλλιέργειες τοποθετήθηκαν σε θάλαμο επώασης 3 αερίων Forma Scientific σε συνθήκες μείγματος αερίων με 2% O₂, 5% CO₂, 93% N₂ για 12 ώρες. Τα κύτταρα της ομάδας ελέγχου διατηρήθηκαν σε φυσιολογικές συνθήκες (5% CO₂ - 95% υγροποιημένος αέρας).

Κυτταρική Επιβίωση

Η ακεραιότητα της κυτταρικής λειτουργίας διαπιστώθηκε με τη δοκιμασία του MTT (βρωμιούχο 3-[4,5-διμεθυλθιαζολ-2-υλ]-2,5-διφενυλτετραζολιο, Sigma-Aldrich). Η συγκεκριμένη δοκιμασία βασίζεται στην ικανότητα του μιτοχονδριακού ενζύμου σουκινική αφυδρογονάση να μετατρέπει το κίτρινο τετραζολικό άλας του MTT σε μπλε MTT formazan κρυστάλλους στα ζώντα κύτταρα (7,8).

Ο βαθμός της μετατροπής αυτής παρέχει ένδειξη μιτοχονδριακής μεταβολικής λειτουργίας. Το MTT διαλύεται σε PBS και στη συνέχεια σε θρεπτικό υλικό DMEM. Μετά τη στέρηση των κυττάρων από οξυγόνο και γλυκόζη έγινε επώαση τους για 4 ώρες με 1mg/ml MTT στους 37 °C στο θάλαμο επώασης με τις φυσιολογικές συνθήκες. Στη συνέχεια η απορρόφηση του MTT στα 570 nm υπολογίστηκε με τη μέθοδο ELISA (Stat Fax - 2100, Awareness Technology Inc. USA)

Αναστολή των Ασπαρτυλ-Πρωτεασών

Η δράση των ασπαρτυλ-πρωτεασών, μετά την επίδραση της στέρησης οξυγόνου και γλυκόζης στα κύτταρα, μελετήθηκε με την προσθήκη της ουσίας Pepstatin A (Sigma), ενός αναστολέα των λυσοσωμικών ασπαρτυλ-πρωτεϊνών (9). Ο αναστολέας Pepstatin A αποθηκεύθηκε ως 500x διάλυμα σε DMSO (διμεθυλοσουλφοξείδιο) και χρησιμοποιήθηκε σε συγκεντρώσεις 1 μM και 5 μM στα PC12 και στα υπό την επίδραση NGF κύτταρα 30 λεπτά πριν την στέρηση οξυγόνου και γλυκόζης.

Στατιστική Μέθοδος

Τα αποτελέσματα αναλύθηκαν με το λογισμικό SPSS 14.0, με τη μέθοδο της ανάλυσης διακύμανσης (ANOVA) και στη συνέχεια πραγματοποιήθηκαν πολλαπλές συγκρίσεις με τις δοκιμασίες LSD και Dunett σε 95% διαστήματα αξιοπιστίας. Τα δεδομένα παρουσιάζονται ως μέσος όρος M.O. κάθε πειραματικής διαδικασίας όπου $n \geq 3$. Οι διαφορές επισημαίνονται ως * $p < 0.05$, ** $p = 0,01$ και *** $p = 0,001$ σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου.

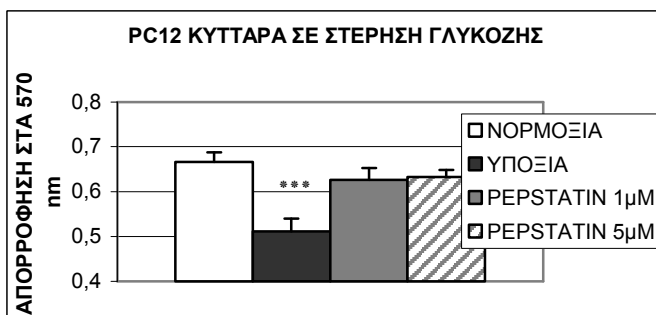
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ



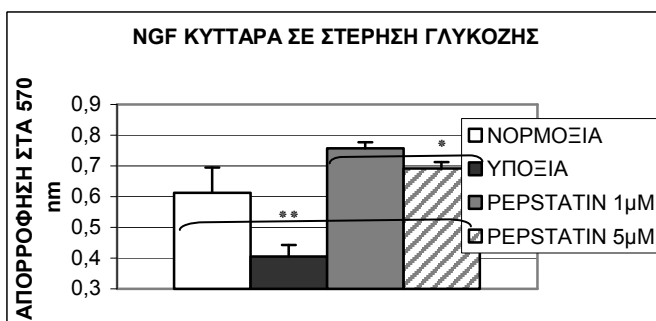
Σχήμα 1. Μετά από 12 ώρες στέρησης οξυγόνου με χαμηλή συγκέντρωση γλυκόζης ο αναστολέας Pepstatin A αναστέλλει τον κυτταρικό θάνατο στα κύτταρα PC12 με στατιστικώς σημαντική διαφορά $p < 0,001$. Η αναστολή είναι περισσότερο ισχυρή στη συγκέντρωση 1 μM σε σύγκριση με εκείνη των 5 μM $p < 0,05$.



Σχήμα 2. Μετά από 12 ώρες στέρησης οξυγόνου με χαμηλή συγκέντρωση γλυκόζης ο αναστολέας Pepstatin A αναστέλλει τον κυτταρικό θάνατο στα κύτταρα PC12 υπό την επίδραση NGF με στατιστικώς σημαντική διαφορά $p < 0,01$. Η αναστολή είναι της ίδιας σημαντικότητας και στις δύο συγκεντρώσεις.



Σχήμα 3. Μετά από 12 ώρες στέρησης οξυγόνου και γλυκόζης ο αναστολέας Pepstatin A αναστέλλει τον κυτταρικό θάνατο στα κύτταρα PC12 με στατιστικώς σημαντική διαφορά $p < 0,001$. Η αναστολή είναι της ίδιας σημαντικότητας και στις δύο συγκεντρώσεις.



Σχήμα 4. Μετά από 12 ώρες στέρησης οξυγόνου και γλυκόζης ο αναστολέας Pepstatin A αναστέλλει τον κυτταρικό θάνατο στα κύτταρα PC12 υπό την επίδραση NGF με στατιστικώς σημαντική διαφορά $p < 0,01$. Η αναστολή είναι περισσότερο ισχυρή στη συγκέντρωση 1 µM σε σύγκριση με εκείνη των 5 µM $p < 0,05$.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Η μεθοδολογία που ακολουθήθηκε είχε σκοπό να δημιουργήσει ένα μοντέλο κατάλληλο για τη μελέτη του κυτταρικού θανάτου που επάγεται μετά από υποξία σε νευρικά κύτταρα. Τα απο-

τελέσματά μας δηλώνουν ότι η υποξία από μόνη της στο σύστημά μας είναι ικανή να προκαλέσει κυτταρικό θάνατο, αλλά συνοδευόμενη από στέρηση γλυκόζης (ως μοναδικής πηγής ενέργειας) δημιουργεί ένα περισσότερο αξιόπιστο σύστημα

για τη μελέτη του κυτταρικού θανάτου από υποξία.

Οι ασπαρτυλ-πρωτεάσες είναι ένζυμα του λυσοσωματίου και δεν συμμετέχουν στη διαδικασία της απόπτωσης. Το γεγονός ότι ο αναστολέας Pepstatin A προστατεύει από τον κυτταρικό θάνατο μετά από υποξία δηλώνει ότι τόσο τα PC12 κύτταρα όσο και τα PC12 με την επίδραση του NGF, κάτω από τις πειραματικές μας συνθήκες, υπόκεινται σε κυτταρικό θάνατο οφειλόμενο σε νέκρωση και όχι σε απόπτωση.

Το γεγονός, ότι σε υψηλότερες συγκεντρώσεις αναστολέα διαπιστώσαμε μικρότερη προστασία από το κυτταρικό θάνατο μετά από υποξία, μπορεί να οφείλεται ότι στις συγκεντρώσεις αυτές ο διαλύτης (DMSO) μπορεί να έφτασε σε οριακή συγκέντρωση για τη επιβίωση των κυττάρων (10).

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΠΑΡΑΠΟΜΠΕΣ

1. Charlier N., Leclere N., Felderhoff U., Heldt J., Kietzmann Th., Obladen M., Gross J.: Hypoxia-induced cell death and changes in hypoxia-inducible factor-1 activity in PC12 cells upon exposure to nerve growth factor. *Mol. Brain Res. 104*: 21–30 (2002)
2. Greene L.A., Aletta J.M., Rukenstein A., Green S.H.: PC12 pheochromocytoma cells: culture, nerve growth factor treatment, and experimental exploitation. *Methods Enzymol. 147*: 207–216 (1987)
3. Vaux D.L., Korsmeyer S.J.: Cell death in development. *Cell 96*: 245–254 (1999)
4. Evan G., Littlewood T.: A matter of life and cell death. *Science 281*: 1317–1322 (1998)
5. Choi D.W., Hartley D.M.: Calcium and glutamate-induced cortical neuronal death. In: (S.G. Waxman, ed.) *Molecular and Cellular Approaches to the Treatment of Neurological Disease*. Pp. 23–34, Raven Press, New York, 1993
6. Hossmann K.-A.: Glutamate-mediated injury in focal cerebral ischemia: the excitotoxin hypothesis revised. *Brain Pathol. 4*: 23–36 (1994)
7. Denizot F., Lang R.: Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. *J. Immunol. Methods 89*: 271–277 (1986)
8. Hansen M.B., Nielsen S.E., Berg K.: Re-examination and further development of a precise and rapid dye method for measuring cell growth/cell killing. *J. Immunol. Methods 119*: 203–210 (1989)
9. Ishihara K., Ohsawa Y., Kanamori S., Shibata M., Waguri S., Sato N., Gotow T., Watanabe T., Momoi T., Urase K., Kominami E., Uchiyama Y.: Regulation of a novel pathway for cell death by lysosomal aspartic and cysteine proteinases. *Neuroscience 91*: 233–49 (1999)
10. Santos N.C., Figueira-Coelho J., Martins-Silva J., Saldanha C.: Multidisciplinary utilization of dimethyl sulfoxide: pharmacological, cellular, and molecular aspects *Biochem. Pharmacol. 65*: 1035–1041 (2003)

Aspartyl-protease Inhibition Rescues Naïve and NGF treated PC12 Cells from Death after Oxygen and Glucose Deprivation.

C. Pourzitaki¹, I. Klagas¹, A. Sioga², G. Tzi-magiorgis³ and A. Kritis^{4*}

¹Laboratory of Pharmacology, ²Laboratory of Histology-Embryology, ³Laboratory of Biochemistry and ⁴Laboratory of Physiology, Medical School, Aristotle University, Thessaloniki, Greece

Keywords: Necrosis, hypoxia, glucose deprivation, PC12, NGF, Pepstatin A

Correspondence address: A. Kritis, ⁴Laboratory of Physiology, Medical School, P.O. Box 54124, Aristotle University, Thessaloniki, Greece
email Kritis@med.auth.gr

SUMMARY. Oxygen and glucose deprivation are severe conditions that induce cell death following neuronal loss to the developing nervous system. In the present study we investigated the response of the central nervous system under ischemia and glucose deprivation using PC12 cells cultures. These chromaffinergic transformed cells, are glucose- and oxygen-sensitive and upon treatment with nerve growth factor (NGF), differentiate to a sympathetic phenotype expressing neurites and excitability. PC12-cells were cultured in full medium DMEM at 37 °C with 5% CO₂. To cause hypoxia and glucose deprivation, undifferentiated and NGF-treated PC12 cells cultures have been exposed for 16h to a mixture of N₂/CO₂ (93:5%), resulting in hypoxia (2% O₂) and to a DMEM medium without glucose. We investigated the involvement of proteolysis in the cell death induced by hypoxia, using an aspartyl-protease inhibitor Pepstatin A. Cell viability was estimated by a colorimetric method using MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide. Pepstatin A provides a statistically significant inhibition of cell death in naive and NGF treated PC12 cells after oxygen and glucose deprivation especially in the concentration of 1 μM compared to that of 5 μM. More over Pepstatin A as an inhibitor of lysosomal aspartyl-proteases signifies that the effected cell death is due to necrotic rather apoptotic procedures. This is of vital importance and needs to be further investigated in order to understand the nature of events following an ischemic-hypoxic episode in the nervous system. The employment of necrotic rather than apoptotic procedures as shown in our experimental conditions can alter the pharmacological approach to treat hypoxia in the nervous system.

ΕΠΙΘΕΩΡΗΣΗ ΚΛΙΝΙΚΗΣ ΦΑΡΜΑΚΟΛΟΓΙΑΣ
ΚΑΙ ΦΑΡΜΑΚΟΚΙΝΗΤΙΚΗΣ 25: 102-104 (2007)
©ΦΑΡΜΑΚΟΝ-Τύπος

Συχνότητες Εμφάνισης των Πολυμορφισμών των Γονιδίων του Συστήματος Ρενίνης-Αγγειοτενσίνης σε Υγιείς και σε Ασθενείς με Στεφανιαία Νόσο και Νόσο των Καρδιακών Βαλβίδων στον Ελληνικό Πληθυσμό

Γ. Ράγια¹, Ε. Νικολαΐδης², Κ.Ι. Αρβανιτίδης¹, Α. Ταυρίδου¹, Γ. Μπουγιούκας² και Ε.Γ. Μανωλόπουλος¹

Τμήματα ¹Φαρμακολογίας και ²Καρδιοθωρακικής Χειρουργικής, Ιατρική Σχολή, Δημοκρίτειο Πανεπιστήμιο Θράκης, Αλεξανδρούπολη, Ελλάς

ΕΙΣΑΓΩΓΗ - ΣΚΟΠΟΣ

Το σύστημα ρενίνης-αγγειοτενσίνης-αλδοστερόνης (Renin-Angiotensin-Aldosterone System - RAAS) αποτελεί ένα από τα πιο σημαντικά συστήματα ομοιόστασης της πίεσης του αίματος, καθώς έχει καθοριστικό ρόλο στη διατήρηση του αγγειακού τόνου, την καρδιακή λειτουργία και στη βέλτιστη ομοιόσταση άλατος και ύδατος (1). Το RAAS εμπεριέχει έναν καταρράκτη πεπτιδικών ορμονών των οποίων η σύνθεση αρχικά πυροδοτείται από την απελευθέρωση της ρενίνης από τους νεφρούς. Η ρενίνη δρα τοπικά στους νεφρούς και στην κυκλοφορία, ώστε να κόψει το υπόστρωμα αγγειοτενσινογόνο (Angiotensinogen AGT), το οποίο εκκρίνεται από το ήπαρ, οδηγώντας στο βιολογικά ανενεργό πεπτιδίο αγγειοτενσίνης I. Στη συνέχεια η αγγειοτενσίνη I μετατρέπεται, στο κυκλοφορούν αίμα, στο οκταπεπτιδίο αγγειοτενσίνης II από το ένζυμο που μετατρέπει την αγγειοτενσίνη I (Angiotensin I Converting Enzyme - ACE). Η αγγειοτενσίνη II προσδένεται επιλεκτικά στην υψηλής συγγένειας περιοχή πρόσδεσης του υποδοχέα τύπου 1 της αγγειοτενσίνης (Angiotensin II Type 1 Receptor, AT1R), που βρίσκεται σε ποικίλους ιστούς και ασκεί τη βιολογική της ενεργότητα, αυξάνοντας τον όγκο αίματος και διατηρώντας τη φυσιολογική πίεση του αίματος σε υποτασικές καταστάσεις, οδηγώντας στην παραγωγή της αλδοστερόνης (2). Τα κύρια συστατικά του RAAS εμφανίζουν πολυμορφισμούς που αποτελούν αντικείμενο μελετών προκειμένου να καθοριστεί η συμμετοχή τους

στην παθογένεση καρδιαγγειακών νόσων, όπως το έμφραγμα του μυοκαρδίου, η στεφανιαία νόσος, η νόσος των καρδιακών βαλβίδων. Ο κύριος πολυμορφισμός στο γονίδιο ACE εντοπίζεται στο ιντρόνιο 16 και έγκειται στην εισαγωγή ή απαλοιφή (Insertion/Deletion - I/D) 287bp. Το D αλληλόμορφο σχετίζεται με αυξημένα επίπεδα του ενζύμου ACE στο πλάσμα (3). Στο εξόνιο 2 του γονιδίου του AGT εντοπίζονται δύο πολυμορφισμοί που οδηγούν σε αντικατάσταση αμινοξέων στη θέση 235 (M235T) και 174 (T174M) της αμινοξικής αλληλουχίας. Το αλληλόμορφο 235T σχετίζεται με αυξημένα επίπεδα ενζύμου AGT στο πλάσμα (4). Στην 3' μη μεταφραζόμενη περιοχή του γονιδίου AT1R ο πολυμορφισμός A1166C οδηγεί σε έκφραση υποδοχέα με μειωμένη ευαισθησία (5). Τα αλληλόμορφα ACE D, AGT 235T, AGT 174M και AT1R 1166C έχουν χαρακτηριστεί ως πιθανοί γενετικοί παράγοντες κινδύνου για ανάπτυξη διαφόρων καρδιαγγειακών νόσων.

Σκοπός της παρούσας μελέτης είναι η εύρεση της συχνότητας εμφάνισης των πολυμορφισμών αυτών σε υγιείς εθελοντές και σε ασθενείς με στεφανιαία νόσο και νόσο των καρδιακών βαλβίδων στον Ελληνικό πληθυσμό.

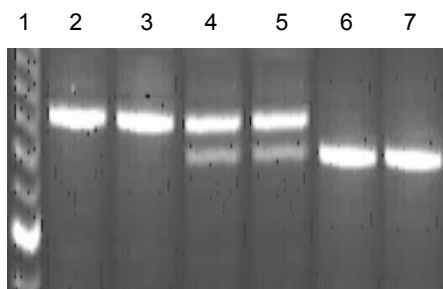
ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

Στην παρούσα μελέτη συμμετείχαν 90 ασθενείς με στεφανιαία νόσο, 21 ασθενείς με νόσο των καρδιακών βαλβίδων και 137 υγιείς εθελοντές. Από τα δείγματα αυτά απομονώθηκε γενω-

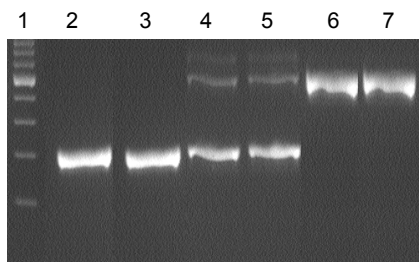
μικό DNA και από αυτό αναλύθηκαν με τη μέθοδο PCR ο πολυμορφισμός ACE I/D και με επαναληπτική PCR τα ομόζυγα DD δείγματα (6), ενώ οι πολυμορφισμοί AGT M235T και T174M και AT1R A1166C αναλύθηκαν με τη μέθοδο PCR-RFLP (7,8).

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Η συχνότητα των γονοτύπων ACE DD, ID και II στους ασθενείς με στεφανιαία νόσο ήταν 34,44%, 50% και 15,56% αντίστοιχα, στους ασθενείς με νόσο των καρδιακών βαλβίδων 28,57%, 61,9% και 9,53% αντίστοιχα, ενώ στην ομάδα ελέγχου η συχνότητα ήταν 32,12%, 47,45% και 20,43% αντίστοιχα. Η συχνότητα των γονοτύπων AGT M235M, M235T και T235T στους



Εικόνα 1α: PCR καθορισμός των ACE γονοτύπων. 1: 100bp ladder, 2-3: ομόζυγα DD δείγματα, 4-5: ετερόζυγα ID δείγματα και 6-7: ομόζυγα II δείγματα, αντίστοιχα



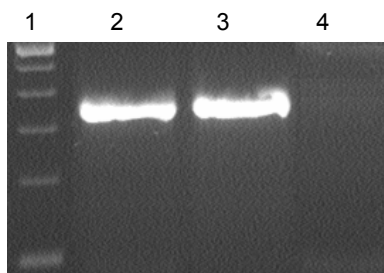
Εικόνα 2α: PCR-RFLP ανάλυση του πολυμορφισμού AGT M235T. 1: 25bp ladder, 2-3 ομόζυγα MM δείγματα, 4-5 ετερόζυγα MT δείγματα και 6-7 ομόζυγα TT δείγματα, αντίστοιχα

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

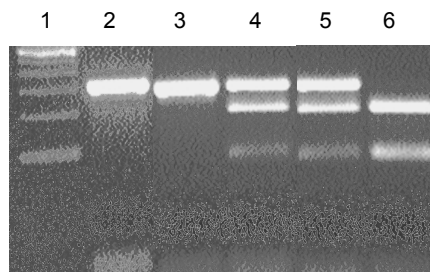
Η συχνότητα εμφάνισης των υπό μελέτη πολυμορφισμών δεν διέφερε μεταξύ των ομάδων των ασθενών και της ομάδας ελέγχου, ενώ δεν παρατηρήθηκε διαφορά στη συχνότητα των πολυμορφισμών μεταξύ των δύο φύλων. Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης σχετικά με τη

ασθενείς με στεφανιαία νόσο ήταν 21,11%, 67,78% και 11,11% αντίστοιχα, στους ασθενείς με νόσο των καρδιακών βαλβίδων ήταν 23,81%, 66,67% και 9,52% αντίστοιχα, ενώ στην ομάδα ελέγχου η συχνότητα των γονοτύπων ήταν 21,90%, 63,50% και 14,60% αντίστοιχα. Τέλος, η συχνότητα των γονοτύπων T174T, T174M και M174M στους ασθενείς με στεφανιαία νόσο ήταν 77,78%, 22,22% και 0% αντίστοιχα, στους ασθενείς με νόσο των καρδιακών βαλβίδων ήταν 76,19%, 23,81% και 0% αντίστοιχα, ενώ στην ομάδα ελέγχου η συχνότητα ήταν 75,91%, 23,36% και 0,73% αντίστοιχα.

Για τον πολυμορφισμό AT1R A1166C δεν έχει ολοκληρωθεί η ανάλυση όλων των δειγμάτων.



Εικόνα 1β: PCR έλεγχος των ομόζυγων DD δειγμάτων.



Εικόνα 2β: PCR-RFLP ανάλυση του πολυμορφισμού AGT T174M. 1: 100bp ladder, 2- 3: ομόζυγα TT δείγματα, 4-5: ετερόζυγα TM δείγματα και 6-7 ομόζυγα MM δείγματα, αντίστοιχα

συχνότητα εμφάνισης των πολυμορφισμών ACE I/D, AGT M235T και T174M συμφωνούν με άλλες ανεξάρτητες μελέτες στον Ελληνικό πληθυσμό (9,10). Κατατάσσοντας τους ασθενείς με στεφανιαία ανά φύλο και σύμφωνα με τη βαρύτητα της νόσου (1 αγγείο - 2 αγγεία - 3 αγγεία), οι γυναίκες ασθενείς είχαν πιο κοινό τον γονότυπο AGT 174TM σε περιπτώσεις ολιγότερο σοβαρής

νόσου (1 αγγείο - 2 αγγεία) [$p < 0,05$]. Κατατάσσοντας επιπλέον τους ασθενείς με στεφανιαία νόσο ανά φύλο και σύμφωνα με τα κλινικά τους χαρακτηριστικά (διαβήτης, υπέρταση, κάπνισμα, έμφραγμα του μυοκαρδίου) οι γυναίκες ασθενείς με συνοδό νόσο διαβήτη είχαν πιο συχνό το αλληλόμορφο ACE I [$p = < 0,05$]. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης οι κύριοι πολυμορφισμοί του συστήματος RAAS δεν σχετίζονται με την παθογένεση νόσων του καρδιαγγειακού, άποψη που είναι σύμφωνη και με άλλες μελέτες (11), αλλά έρχονται σε αντίθεση με αντίστοιχες μελέτες άλλων ευρωπαϊκών πληθυσμών (12).

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΠΑΡΑΠΟΜΠΕΣ

- Kardia S.L., et al.: Epistatic effects between two genes in the renin-angiotensin system and systolic blood pressure and coronary artery calcification. *Med. Sci. Monit.* 12(4): CR150-158 (2006)
- Reudelhuber T.L.: The renin-angiotensin system: peptides and enzymes beyond angiotensin II. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* 14: 155-159 (2005)
- Rigat B., et al.: PCR detection of the insertion/deletion polymorphism of the human angiotensin converting enzyme gene (DCP1) (dipeptidyl carboxypeptidase 1). *Nucleic Acids Res.* 20: 1433 (1992)
- Jeunemaitre X., et al.: Haplotypes of angiotensinogen in essential hypertension. *Am. J. Hum. Genet.* 60: 1448-1460 (1997)
- Bonnardeaux A., et al.: Angiotensin II type 1 receptor gene polymorphisms in human essential hypertension. *Hypertension* 24: 63-69 (1994)
- Lindpaintner K., et al.: A prospective evaluation of an angiotensin-converting-enzyme gene polymorphism and the risk of ischemic heart disease. *N. Engl. J. Med.* 332: 706-711 (19952)
- Losito A., et al.: Polymorphism of renin-angiotensin system genes in dialysis patients--association with cerebrovascular disease. *Nephrol. Dial. Transplant.* 17: 2184-2188 (2002)
- Solari V., Puri P.: Genetic polymorphisms of angiotensin system genes in congenital diaphragmatic hernia associated with persistent pulmonary hypertension. *J. Pediatr. Surg.* 39: 302-306; discussion 302-306 (2004)
- Andrikopoulos G.K., et al.: The paradoxical association of common polymorphisms of the renin-angiotensin system genes with risk of myocardial infarction. *Eur. J. Cardiovasc. Prev. Rehabil.* 11: 477-483 (2004)
- Vassilikioti S., et al.: Angiotensin converting enzyme gene polymorphism is not related to essential hypertension in a Greek population. *Am. J. Hypertens.* 9: 700-702 (1996)
- Arca M., et al.: Angiotensin-converting enzyme gene polymorphism is not associated with coronary atherosclerosis and myocardial infarction in a sample of Italian patients. *Eur. J. Clin. Invest.* 28: 485-490 (1998)
- Seckin D., et al.: The relationship between ACE insertion/deletion polymorphism and coronary artery disease with or without myocardial infarction. *Clin. Biochem.* 39: 50-54 (2006)

Frequencies of Renin-Angiotensin System Gene Polymorphisms in Healthy Subjects and Coronary Artery Disease and Heart Valve Disease Patients in a Sample of the Greek Population.

G. Ragia¹, E. Nikolaidis², K.I. Arvanitidis¹, A. Tavridou¹, G. Bougioukas² and V.G. Manolopoulos¹

Departments of Pharmacology¹ and Cardiothoracic Surgery², Democritus University of Thrace Medical School, Alexandroupolis, Greece

Key words: ACE, AGT, gene polymorphisms, RAAS, cardiovascular diseases, Greek population

SUMMARY. Angiotensin-I converting enzyme (ACE) and Angiotensinogen (AGT) are main components of the Renin-Angiotensin-Aldosterone System (RAAS) and have an important role in blood pressure regulation. A main polymorphism (Insertion/Deletion) in the ACE gene, two polymorphisms (M235T and T174M) in the AGT gene and a polymorphism in the AT1R gene (A1166C) have been considered as risk factors for numerous cardiovascular disease, such as myocardial infarction, coronary artery disease and heart valve disease. In the present study we report on the frequencies of these gene polymorphisms in the healthy population as well as in patients with coronary artery disease and heart valve disease in Greece.

Material and Methods: 90 subjects with coronary artery disease, 21 subjects with heart valve disease and 137 subjects of volunteers were included in the study. Genomic DNA was extracted and analyzed using the PCR method for the ACE I/D polymorphism and the PCR-RFLP method for the AGT M235T and T174M and AT1R A1166C polymorphisms.

Results: In the group of patients with coronary artery allele, heart valve disease and in the general population the prevalence of ACE D allele was 58.08%, 59.62% and 56.04% respectively, the prevalence of the AGT 235T allele was 45.45%, 42.31% and 47.32% respectively and the prevalence of the AGT 174M allele was 11.62%, 11.54% and 11.41% respectively. We are currently analyzing all the samples for the presence of the AT1R A1166C polymorphism.

Conclusions: No significant differences were found among the different groups and no gender differences were observed on the prevalence of the analyzed polymorphisms.

Acknowledgments: G. Ragia is a recipient of a pre-doctoral fellowship from the Greek State Scholarship Foundation (IKY).

Φυλετικές Διαφορές στη Συμπεριφορική και Νευροχημική Ανταπόκριση μετά από Έκθεση σε Κάδμιο

A. Σίδερης, Π. Πιτυχούτης, Ε. Γρίβα, Ν. Κόκρας, Ι. Μεσσάρη, Χ. Καραγεωργίου, Ζ. Παπαδοπούλου-Νταϊφώτη

Εργαστήριο Πειραματικής Φαρμακολογίας, Ιατρική Σχολή, Πανεπιστήμιο Αθηνών, Αθήνα, Ελλάς

ΕΙΣΑΓΩΓΗ - ΣΚΟΠΟΣ

Είναι γνωστό ότι το κάδμιο (Cd) είναι νευροτοξικό μέταλλο, το οποίο, ακόμη και σε χαμηλές δόσεις, ασκεί αρνητική επίδραση στο Κεντρικό Νευρικό Σύστημα. Όπως προκύπτει από διάφορες εργασίες, το Cd επηρεάζει τη δραστικότητα του μονοαμινοεργικού συστήματος, συναρτίζει της δόσης και της διάρκειας έκθεσης σε αυτό (1,2). Διάφοροι ερευνητές υποστηρίζουν ότι το Cd διεγείρει τη σύνθεση μονοαμινοξάνων της βιοχημικής οδού που ρυθμίζεται από την καλμοντουλίνη. Αυξημένα επίπεδα μονοαμινοξάνων ενδέχεται να προκύψουν και από την αναστολή της δράσης διαφόρων ενζύμων που εμπλέκονται στον καταβολισμό τους, όπως οι μονοαμινοξειδάσες (3). Τα δισθενή μέταλλα, όπως το Cd, εναποτίθενται σε μεγαλύτερο βαθμό στον ιππόκαμπο σε σχέση με άλλες περιοχές του εγκεφάλου (4), ενώ μεταβολές που παρατηρούνται στη συμπεριφορά, ύστερα από έκθεση σε βαρέα μέταλλα, έχουν συσχετισθεί με δυσλειτουργία του ιπποκάμπου. Επιπλέον, έχει αναφερθεί σεξουαλικός διμορφισμός, όσον αφορά στην εναπόθεση και τοξικότητα του Cd (5).

Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η διερεύνηση των επιδράσεων στη συμπεριφορά και στη λειτουργία του σεροτονινεργικού συστήματος στον ιππόκαμπο αρσενικών και θηλυκών επιμύων, μετά από έκθεση δεκαεπτά ημερών σε Cd. Επιπλέον, μελετήθηκε η επίδραση της L-κυστεΐνης (Cys), η οποία θεωρείται ότι σχηματίζει σταθερά σύμπλοκα με το Cd, επιταχύνοντας την απέκκρισή του και ελαττώνοντας τη συγκέντρωσή του στους ιστούς (6).

ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

Χρησιμοποιήθηκαν 24 αρσενικοί επίμυες της σειράς Wistar, βάρους 230 ± 20 g και 24 θηλυκοί επίμυες της ίδιας σειράς, βάρους 205 ± 16 g. Τα πειραματόζωα διαβιούσαν ανά 4 σε ειδικούς κλωβούς, σε σταθερά κλιματιζόμενο χώρο, με εναλλαγή φωτός-σκότους ανά 12 ώρες και με ελεύθερη πρόσβαση σε τροφή και νερό. Τα πειραματόζωα χωρίστηκαν σε 3 ομάδες αρσενικών και 3 ομάδες θηλυκών επιμύων, 8 ανά ομάδα. Οι ομάδες των αρσενικών και θηλυκών μαρτύρων λάμβαναν ημερησίως, για χρονική περίοδο 14 ημερών, φυσιολογικό ορό (NaCl 0,9%) ενδοπεριτοναϊκώς. Αντιστοίχως, χορηγήθηκε 0,5 mg/kg Cd ενδοπεριτοναϊκώς σε αρσενικούς και θηλυκούς επίμυες X 14 ημέρες, ενώ σε 2 άλλες ομάδες αρσενικών και θηλυκών επιμύων έγινε συγχρήγηση Cd (0,5 mg/kg) + Cys (7 mg/kg) ενδοπεριτοναϊκώς για το ίδιο χρονικό διάστημα. Ακολούθησε περίοδος 24ωρης έκπλυσης των ουσιών και τα πειραματόζωα θυσιάστηκαν με αποκεφαλισμό την 15^η ημέρα. Στην συνέχεια αφαιρέθηκε ο εγκέφαλος, απομονώθηκε ταχύτατα σε πάγο η περιοχή του ιπποκάμπου και μετά από κατάλληλη επεξεργασία αποθηκεύτηκαν τα δείγματα στους -80°C για να προσδιοριστούν εντός 30 ημερών τα επίπεδα της σεροτονίνης (5-HT) και του μεταβολίτη της, 5-υδροξυ-ινδολεξικού οξέος (5-HIAA), με τη βοήθεια Υγρής Χρωματογραφίας Υψηλής Απόδοσης με ηλεκτροχημικό ανιχνευτή (HPLC-ED). Επίσης προσδιορίστηκαν τα βάρη του θύμου αδένος και των επινεφριδίων των πειραματοζώων. Την 7^η και 14^η ημέρα του πειράματος, τα πειραματόζωα υπο-

βλήθηκαν σε δοκιμασία ανοικτού πεδίου-Open Field Test (OFT), ενώ διενεργείτο καθημερινή λήψη κολπικού επιχρίσματος από τα θηλυκά πειραματόζωα για τον προσδιορισμό της φάσης του κύκλου. Η στατιστική επεξεργασία έγινε με two-way ANOVA, ακολουθούμενες από ξεχωριστές one-way ANOVA και κατάλληλες post-hoc αναλύσεις. Τιμές του p μικρότερες του 0,05 θεωρήθηκαν στατιστικώς σημαντικές.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ - ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Στο Open Field Test παρατηρήθηκε στατιστικώς σημαντική μείωση της κινητικότητας των πειραματοζώων και στα δύο φύλα τα οποία έλαβαν κάδμιο, η οποία συνοδεύτηκε από αυξημένη απραξία και μειωμένη όσμηση και αυτοπεριποίηση. Η συγχρόνηση κυστεΐνης ομαλοποίησε τις συμπεριφορικές μεταβολές που παρατηρήθηκαν μετά τη χορήγηση καδμίου, αλλά μόνο στα θηλυκά πειραματόζωα.

Στα θηλυκά πειραματόζωα, ο κύκλος παρουσίασε επιμήκυνση στα πειραματόζωα που ελάμβαναν επί 14 ημέρες έκδοχο, πιθανώς λόγω των στρεσογόνων χειρισμών του πειράματος. Η χορήγηση καδμίου προκάλεσε μικρή ελάττωση σε αυτή την επιμήκυνση, αλλά όχι σε στατιστικώς σημαντικά επίπεδα. Αντίθετα η συγχρόνηση κυστεΐνης επανέφερε τον κύκλο στα φυσιολογικά επίπεδα, δηλαδή σε αυτά πριν από την έναρξη των πειραματικών χειρισμών.

Το σχετικό βάρος του θύμου αδένα (βάρος θύμου αδένα/βάρος σώματος) δεν παρουσίασε στατιστικώς σημαντικές μεταβολές στις ομάδες των αρσενικών επιμύων. Αντιθέτως, στην ομάδα των θηλυκών πειραματοζώων στην οποία χορηγήθηκε Cd, το σχετικό βάρος του θύμου αδένα μειώθηκε στατιστικώς σημαντικά σε σχέση με την ομάδα των θηλυκών μαρτύρων. Η συγχρόνηση κυστεΐνης επανέφερε το σχετικό βάρος του θύμου αδένα προς τα επίπεδα των μαρτύρων, αλλά μόνο στα θηλυκά.

Το σχετικό βάρος των επινεφριδίων (βάρος επινεφριδίων/βάρος σώματος) βρέθηκε στατιστικώς σημαντικά αυξημένο μετά από χορήγηση καδμίου, τόσο στα αρσενικά όσο και στα θηλυκά πειραματόζωα. Η συγχρόνηση κυστεΐνης επανέφερε το βάρος των επινεφριδίων στα φυσιολογικά επίπεδα μόνο στα θηλυκά πειραματόζωα. Ας σημειωθεί ότι τα βάρος των επινεφριδίων των θηλυκών της ομάδας ελέγχου ήταν μεγαλύτερο της αντίστοιχης των αρσενικών, γεγονός που πι-

θανώς συνδέεται με την στρεσογόνο διαδικασία του πειραματικού χειρισμού όπως παρατηρήθηκε και στον προσδιορισμό του κύκλου.

Ο ρυθμός ανακύκλωσης της 5-HT στον ιππόκαμπο υπολογίστηκε με τη χρήση του λόγου 5-HIAA/5-HT, που θεωρείται ενδεικτικός της σεροτονινεργικής δραστηριότητας. Δεν παρουσιάστηκαν στατιστικώς σημαντικές μεταβολές στα επίπεδα του 5-HIAA μεταξύ των ομάδων. Αντίθετα, τα επίπεδα της 5-HT στον ιππόκαμπο των θηλυκών μαρτύρων βρέθηκαν στατιστικώς σημαντικά αυξημένα σε σχέση με τους αρσενικούς μάρτυρες. Κατά συνέπεια ο ρυθμός ανακύκλωσης της 5-HT στα θηλυκά βρέθηκε στατιστικά σημαντικά μειωμένος, γεγονός που πιθανώς επίσης να συνδέεται με τη μειωμένη απαντητικότητα του σεροτονινεργικού συστήματος των θηλυκών στη στρεσογόνο διαδικασία. Η χορήγηση καδμίου δεν μετέβαλε ουσιαδώς το ρυθμό ανακύκλωσης της σεροτονίνης τόσο στα αρσενικά όσο και στα θηλυκά πειραματόζωα, ενώ η συγχρόνηση κυστεΐνης μετέβαλλε τον ρυθμό ανακύκλωσης της 5-HT προς την αντίθετη κατεύθυνση. Περαιτέρω ανάλυση των προκαταρκτικών νευροχημικών αποτελεσμάτων αναμένεται να επιβεβαιώσει τον σεξουαλικό διμορφισμό του σεροτονινεργικού συστήματος του ιπποκάμπου (7) και τη διαφορετική απάντηση του φύλλου τόσο στη χορήγηση καδμίου όσο και στη συγχρόνηση κυστεΐνης.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΠΑΡΑΠΟΜΠΕΣ

1. Sharp T., Bramwell S.R., Grahame-Smith D.G.: Release of endogenous 5-hydroxytryptamine in rat ventral hippocampus evoked by electrical stimulation of the dorsal raphe nucleus as detected by microdialysis: sensitivity to tetrodotoxin, calcium and calcium antagonists. *Neuroscience* 39: 629-637 (1990)
2. Andersson H., Petersson-Grawe K., Lindqvist E., Luthman J., Oskarsson A., Olson L.: Low-Level Cadmium Exposure of Lactating Rats Causes Alterations in Brain Serotonin Levels in the Offspring. *Neurotoxicol. Teratol.* 19: 105-115 (1997)
3. Leung T.K.C., Lim L., Lai J.C.K.: Differential effects of metal ions on type A and type B monoaminoxidase activities in rat brain and liver mitochondria. *Metab. Brain Dis.* 7: 139-146 (1992)
4. Stoltenburg-Didinger G.: Neuropathology of the hippocampus and its susceptibility to neurotoxic insult. *Neurotoxicology* 15: 445-450 (1994)
5. Baker T.K., Van Vooren H.B., Smith W.C., Carfagna M.A.: Involvement of calcium channels in the sexual dimorphism of cadmium-induced hepatotoxicity. *Toxicol. Lett.* 137: 185-192 (2003)
6. Carageorgiou H., Tzotzes V., Sideris A., Zarros A., Tsakiris S.: Cadmium effects on brain acetylcholinesterase activity and antioxidant status of adult rats: Modulation by

Zinc, Calcium and L-Cysteine co-Administration. *Bas. Clin. Pharmacol. Toxicol.* 97: 320-324 (2005)

7. Drossopoulou G., Antoniou K., Kitraki E., Papathanasiou G., Papalexi E., Dalla C., Papadopoulou-Daifoti Z.: Sex differences in behavioral, neurochemical and neuroendocrine effects induced by the forced swim test in rats. *Neuroscience* 126: 849-857 (2004)

Sex Differences in Behavioural and Neurochemical Responses Following Cadmium Exposure

A.C. Sideris, P. Pitychoutis, E. Griva, N. Kokras, I. Messari, H. Carageorgiou and Z. Papadopoulou-Daifoti

Department of Experimental Pharmacology, Medical School, University of Athens, Athens, Greece

Key words: Cadmium, sex differences, behaviour

SUMMARY. Cadmium (Cd), a neurotoxic metal, affects the activity of monoaminergic system and stimulates monoamines synthesis. Behavioural alterations following heavy metal exposure have been related to hippocampal dysfunction, while sexual differences in Cd toxicity have been reported. The present study aimed to detect the effects of exposure to Cd, on operant behaviour, HPA and HPT axis and on hippocampal serotonergic function in both sexes. Furthermore, we investigated the effects of L-Cysteine (Cys) that is believed to decrease tissue Cd levels. Six groups (8

animals/group) of adult male and female Wistar rats were treated i.p. once daily for 14 days with either NaCl 0.9%, Cd 0.5 mg/kg or Cd 0.5 mg/kg + Cys 7 mg/kg. Female rats were cycling normally (4–5 days of estrous cycle) at the beginning of the experiment and were characterized by an equal distribution of different stages of estrous cycle. All rats were killed 24 hrs after last injection. Hippocampal tissue levels of the serotonin (5-HT) and its metabolite 5-hydroxyindoleacetic acid (5-HIAA) were assayed using HPLC. A decrease in total mobility in both sexes which was followed by increased standing was observed in Cd treated rats. Stereotypic behaviours, i.e. sniffing and grooming were also decreased in Cd treated rats. Cys co-administration normalised all behavioural effects seen after Cd administration but only in female rats. Female vehicle-treated rats presented oestrus cycle abnormalities possibly due to handling procedure. Cd-treated rats showed the same disruption but the Cd+Cys group presented a largely normal oestrous cycle. Adrenal index was increased in Cd and Cd+Cys males compared to the male controls. On the contrary the adrenal index was increased in Cd-treated females and Cys restored adrenal index to vehicle levels. In Cd female rats the thymus index was decreased compared to the female controls. Cys treatment normalised thymus index only in female rats. There were no differences in thymus index in any male rat groups. Preliminary neurochemical results are seemingly in line with the behavioural results and indicate the sexual dimorphism of the hippocampal serotonergic system in vehicle treated rats as well as in Cd or Cd+Cys treated rats.

ΕΠΙΘΕΩΡΗΣΗ ΚΛΙΝΙΚΗΣ ΦΑΡΜΑΚΟΛΟΓΙΑΣ
ΚΑΙ ΦΑΡΜΑΚΟΚΙΝΗΤΙΚΗΣ 25: 108-110 (2007)
©ΦΑΡΜΑΚΟΝ-Τύπος

Φαρμακευτική Φροντίδα: Ο Νέος Ρόλος του Σύγχρονου Κλινικού Φαρμακοποιού

Νίκη Στεφάνου, Χαράλαμπος Δόκος, Μαρία Μυρωνίδου-Τζουβελέκη

Εργαστήριο Φαρμακολογίας, Ιατρική Σχολή, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο, Θεσσαλονίκη, Ελλάδα

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Ο όρος φαρμακευτική φροντίδα διατυπώθηκε για πρώτη φορά το 1975 από τον Mikeal και τους συνεργάτες του (1). Ο πιο αποδεκτός ορισμός του όρου *Φαρμακευτική φροντίδα* βασίζεται στην ερμηνεία που δόθηκε το 1990 από τους Hepler και Strand (2), τον οποίο το 1998 βελτίωσε ο Διεθνής Οργανισμός Φαρμακοποιών (International Pharmaceutical Federation), διαμορφώνοντάς τον ως εξής: *Φαρμακευτική φροντίδα είναι η συστηματική καταγραφή και βελτίωση της χρήσης των φαρμάκων από τους ασθενείς, σε φαρμακείο, έτσι ώστε να επιτευχθούν τα επιθυμητά θεραπευτικά αποτελέσματα και να βελτιωθεί η ποιότητα ζωής* (3).

Η διαδικασία της φαρμακευτικής φροντίδας περιλαμβάνει τα εξής στάδια (3-8):

- χρονολογική αρχειοθέτηση των συνταγογραφημένων φαρμάκων (drug history) και των ειδικών ευαισθησιών του ασθενούς,
- ανάπτυξη θεραπευτικού πλάνου,
- εξακρίβωση και αντιμετώπιση προβλημάτων που σχετίζονται με διάφορα φαρμακευτικά σχήματα, όπως τοξικότητα, ανεπιθύμητες ενέργειες, αντενδείξεις, αλληλεπιδράσεις (drug-related problems),
- έλεγχο της καταλληλότητας των επιλεγμένων φαρμακευτικών ουσιών, της ιδανικής δοσολογίας και της οδού χορήγησης του φαρμάκου,
- καταγραφή των παρεχόμενων υπηρεσιών και εκτίμηση των αποτελεσμάτων,
- βελτίωση των ειδικών συμπτωμάτων και άλλων παραμέτρων της ασθένειας, καθώς και καλύτερευση της ποιότητας ζωής.

Το ιστορικό του ασθενούς, το οποίο πρέπει να έχει κάθε φαρμακοποιός που θέλει να συμμετέχει στην παραπάνω συνεργασία, πρέπει να περιλαμβάνει:

- δημογραφικά στοιχεία (ονοματεπώνυμο, ηλικία, φύλο κ.τ.λ.),
- ιστορικό καπνίσματος, αλκοολισμού, χρήσης καφεΐνης και εξαρτησιογόνων ουσιών,
- αποτελέσματα εργαστηριακών και άλλων εξετάσεων (6-8).

ΒΑΣΙΚΕΣ ΑΡΧΕΣ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗΣ ΦΡΟΝΤΙΔΑΣ

Αυτές πρέπει να περιλαμβάνουν τα ακόλουθα.

Εδραίωση και διατήρηση ανθρώπινης σχέσης μεταξύ ασθενούς και φαρμακοποιού

Η σχέση ασθενούς και φαρμακοποιού πρέπει να βασίζεται στην αμοιβαία εμπιστοσύνη, την φροντίδα, τον ανοιχτό διάλογο και την από κοινού λήψη αποφάσεων. Ο φαρμακοποιός διατηρεί κατάλληλη στάση ευαισθησίας για τη βελτίωση της υγείας του ασθενούς και χρησιμοποιεί όλες τις επαγγελματικές του γνώσεις και ικανότητες προς όφελος του τελευταίου. Ο ασθενής σε αντάλλαγμα αποδέχεται και παρέχει προσωπικές πληροφορίες συμμετέχοντας έτσι στο θεραπευτικό πλάνο.

Συγκέντρωση, οργάνωση, αρχειοθέτηση ιατρικών πληροφοριών που σχετίζονται με κάθε ασθενή

Ο φαρμακοποιός πρέπει να συγκεντρώνει και να διατηρεί υποκειμενικές και αντικειμενικές πληροφορίες που αφορούν:

- την κατάσταση της υγείας του ασθενούς και το ιστορικό της παρούσας ασθένειας,
- το φαρμακευτικό ιστορικό,
- το ιστορικό κοινωνικής συμπεριφοράς, διατροφής και άσκησης,
- την οικονομική κατάσταση (ασφαλιστικό ταμείο).

Πηγές των πληροφοριών αυτών μπορεί να είναι ο ίδιος ο ασθενής, το οικείο του περιβάλλον, οι ιατρικές αναφορές και οι εκτιμήσεις άλλων φαρμακοποιών. Καθώς οι πληροφορίες αυτές θα αποτελέσουν τη βάση των αποφάσεων, που αφορούν την ανάπτυξη και την τροποποίηση του θεραπευτικού πλάνου, πρέπει να είναι ακριβείς, ολοκληρωμένες, σωστά αρχειοθετημένες, ώστε να είναι εύκολα προσβάσιμες και να συμπληρώνονται με τυχόν νέα στοιχεία. Τέλος, πρέπει να αναπτυχθούν κατάλληλα συστήματα για τη διαφύλαξη των προσωπικών δεδομένων (επαγγελματικό απόρρητο). Οι πληροφορίες αυτές είναι δυνατόν να δίνονται σε τρίτους μόνο με εξουσιοδότηση του ασθενούς ή αν το απαιτεί ο νόμος (2,6).

Εκτίμηση των ιατρικών πληροφοριών και ανάπτυξη του φαρμακευτικού πλάνου σε συνεργασία με τον ασθενή

Ο φαρμακοποιός πρέπει, σε συνεργασία με τον ασθενή και τον ιατρό, να αναπτύσσει ένα κατευθυνόμενο φαρμακευτικό πλάνο. Κατά τον σχεδιασμό του, ελέγχει τις ψυχικές και κοινωνικές όψεις της ασθένειας, την πιθανή σχέση μεταξύ κόστους και/ή πολυπλοκότητας της θεραπείας, καθώς επίσης τυχόν αδυναμία του ασθενούς να ανταπεξέλθει στη θεραπεία. Ο ασθενής είναι απαραίτητο να πληροφορείται για τις διάφορες, θετικές ή αρνητικές, πτυχές της θεραπείας και για περιπτώσεις, όπου, σύμφωνα με την κρίση του φαρμακοποιού, γίνεται τροποποίηση του θεραπευτικού πλάνου. Οι αλλαγές αυτές πρέπει να αναλύονται διεξοδικά στον ασθενή, στο επίπεδο που αυτός μπορεί να τις κατανοήσει. Το τελικό θεραπευτικό πλάνο καταγράφεται στο φαρμακευτικό αρχείο του φαρμακοποιού, μετά τη συγκατάθεση του θεράποντα ιατρού (2,6, 9,10).

Ο φαρμακοποιός ελέγχει, αναλύει και μετατρέπει το θεραπευτικό σχήμα όπως είναι αναγκαίο σε συνεργασία με τον ιατρό

Ο φαρμακοποιός προτείνει αλλαγές στο θεραπευτικό σχήμα, εφ' όσον είναι απαραίτητο, για να διατηρηθεί ή να αυξηθεί η ασφάλεια και η απο-

τελεσματικότητα της φαρμακευτικής θεραπείας και να ελαττωθεί το γενικότερο κόστος. Η πρόοδος του ασθενούς καταγράφεται στο φαρμακευτικό αρχείο και οι πληροφορίες αυτές είναι στη διάθεση του ασθενούς και του θεράποντα ιατρού. Η ανταλλαγή πληροφοριών μεταξύ φαρμακοποιού και ιατρού εξασφαλίζει τη συνεχή και καλύτερη φροντίδα του ασθενούς (6,11-13).

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΠΑΡΑΠΟΜΠΕΣ

1. Mikeal R.L., Brown T.P., Lazarus H.L., Visnon M.C.: Quality of pharmaceutical care in hospitals. *Am. J. Hosp. Pharm.* 3: 567-574 (1975)
2. Hepler C.D., Stand L.M.: Opportunities and responsibilities in pharmaceutical care. *Am. J. Pharm. Educ.* 53: 7S-15S (1989)
3. International Pharmaceutical Federation: Statement on Pharmaceutical Care. September 1998. Available at www.fip.nl
4. Grealey G.E., Sturgess I.K., McElnay J.C., Hughes C.M.: Pharmaceutical care programmes for the elderly: economic issues. *Pharmacoeconomics* 21: 455-465 (2003)
5. Tanna N.: Progress made towards implementing pharmaceutical care. *Pharmaceut. J.* 269: 166-169 (2002)
6. Berenguer B., La Casa C., De la Matta M.J., Martin-Calero M.J.: Pharmaceutical care: past, present and future. *Curr. Pharm. Des.* 10: 3931-3946 (2004)
7. Irska J., Hansford D., Jamieson D., Arris F., Cromarty J.: Delivering pharmaceutical care: what does it involve? *Int. J. Pharm. Pract.* 9(suppl): R36 (2001).
8. Liekweg A., Westfield M., Jaedhe V.: From oncology pharmacy to pharmaceutical care: new contributions to multidisciplinary cancer care. *Support Cancer Care* 12(2): 73-79 (2004)
9. Nichols-English G., Poirer S.: Optimizing adherence to pharmaceutical care plans. *J. Am. Pharm. Assoc.* 40: 475-485 (2000)
10. Strand L.M., Cipolle R.J., Morley P.C.: *Pharmaceutical Care: An Introduction*. Boston, Massachusetts, Houghton Mifflin, 1979
11. Bootman J.L., William F.M., Raymond J.T.: *Pharmacoeconomics: Historical perspective*. *Ann. Pharmacoth.* 40: 518-19 (2006)
12. Sarah C., Tulip P.C., Campbell D., Walters P.: Pharmaceutical care: cultural, practice and professional perspective. *Int. J. Pharm. Pract* 10(suppl): R93 (2002)
13. Gkagkalidis K., Altsitsiadis E., Kalousis K., Kavvadias T., Mironidou-Tzouveleki M.: Purchasing medication without medical prescription: which factors lead people to such behavior. *Scientific Annals of Medical School, AUTH* 32(2): 41-47 (2005)

Pharmaceutical Care: The New Role of Modern Clinical Pharmacist

N. Stephanou, Ch. Dokos and M. Mironidou-Tzouveleki

Laboratory of Pharmacology, Medical School, Aristotle University, Thessaloniki, Greece

Key words: Pharmaceutical care, clinical pharmacist

SUMMARY. The term *pharmaceutical care* was first defined by Mikeal IK et al in 1987 following by the International Pharmaceutical Federation which established the official term of pharmaceutical care (1998). Pharmaceutical care is a new branch of pharmacy science that involves the collaboration between patient, pharmacist and doctor. Studies indicate that there are communication obstacles between doctor and patient in treatment guidelines. The pharmacist in pharmaceutical care gives directions for life quality and ease of

the patient and also collaborates with patient and doctor so as to design, improve and record the pharmaceutical plan. He also informs patients about all the aspects of pharmaceutical plan (e.g. dose, adverse effects, duration of treatment, routes of administration) and supports patients anytime. So the pharmacist must be well informed about all the drug fact sheets through journals and online libraries. Keeping a good record of all patients' details is vital in pharmaceutical care procedure. After communication with doctor he will modify and guide patients for their treatment. Nowadays pharmaceutical care is a major part of pharmacy's involvement in patient's life quality.

Επίδραση Σιμπουτραμίνης στην Πρόσληψη Τροφής, στο Σωματικό Βάρος και στα Επίπεδα Ρεζιστίνης και TNF-α του Ορού σε Επίμυς Τρεφόμενους με δύο Ισοθερμιδικές Δίαιτες

Θ. Στρουμπινή¹, Μ. Τράπαλη¹, Χ. Λιάπη¹, Ι. Δοντά², Α. Περέλας², Μ. Πουλάκου², Δ. Περρέα² και Π. Γαλανοπούλου¹

¹Εργαστήριο Πειραματικής Φαρμακολογίας, ²Εργαστήριο Πειραματικής Χειρουργικής και Χειρουργικής Ερευνής Ν.Σ. Χρηστέας, Ιατρική Σχολή, Πανεπιστήμιο Αθηνών, Αθήνα, Ελλάς

ΕΙΣΑΓΩΓΗ – ΣΚΟΠΟΣ

Η σύγχρονη αντίληψη για το λιπώδη ιστό υπαγορεύει, ότι δεν αποτελεί απλά έναν παθητικό αποθηκευτικό ιστό, αλλά ένα ιδιαίτερα ενεργό ενδοκρινές όργανο. Οι ορμόνες που εκκρίνονται από τα λιποκύτταρα έχουν συνολικά ονομασθεί λιποκίνες και σε αυτές περιλαμβάνονται, μεταξύ άλλων, η λεπτίνη, ο TNF-α και η ρεζιστίνη (1,2). Όλες οι λιποκίνες έχει αποδειχθεί, ότι παίζουν σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της διατροφικής συμπεριφοράς και, κατά συνέπεια, στην εκδήλωση της παχυσαρκίας, αλλά και στην ευαισθησία του οργανισμού στην ινσουλίνη, με αποτέλεσμα να εμπλέκονται στην παθογένεια του σακχαρώδους διαβήτη τύπου 2 και του μεταβολικού συνδρόμου (3,4). Ο TNF-α και η ρεζιστίνη, μάλιστα, έχει αποδειχθεί ότι αυξάνονται σε καταστάσεις παχυσαρκίας (5,6). Η σιμπουτραμίνη, εκλεκτικός αναστολέας επαναπρόσληψης της σεροτονίνης και της νορ-αδρεναλίνης, που μειώνει το σωματικό βάρος, ελαττώνοντας την πρόσληψη τροφής και αυξάνοντας τη θερμογένεση, χρησιμοποιείται για την αντιμετώπιση της παχυσαρκίας (7,8).

Ο σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν να διερευνηθεί:

α) η επίδραση του είδους της προσλαμβανόμενης τροφής στα επίπεδα της ρεζιστίνης και του TNF-α στον ορό επιμύων, τρεφόμενων με δύο

ισοθερμιδικές δίαιτες, μιας δίαιτας πλούσιας σε λίπος και μιας δίαιτας πλούσιας σε υδατάνθρακα και

β) αν οι πιθανές τροποποιήσεις στην πρόσληψη τροφής και στο ρυθμό αύξησης του σωματικού βάρους, που προκαλούνται από κάθε διαίτα, μπορούν να συσχετιστούν με τα επίπεδα της ρεζιστίνης και του TNF-α στον ορό, υπό την επίδραση σιμπουτραμίνης.

ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

Για την παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν 42 αρσενικοί επίμυες, γένους Wistar, ηλικίας 2 μηνών και βάρους 180 περίπου γραμμαρίων, που για μια εβδομάδα εγκλιματίστηκαν στις συνθήκες του εργαστηρίου (12ώρος κύκλος φως-σκοτάδι, θερμοκρασία περιβάλλοντος 26 °C και 45% υγρασία περίπου). Μετά το τέλος της εβδομάδας εγκλιματισμού, τα ζώα τοποθετήθηκαν σε ατομικούς κλωβούς και ταξινομήθηκαν σε δύο ομάδες (ανά 21 ζώα) Α και Β, ανάλογα με την ισοθερμιδική διαίτα (4,2 kcal/g τροφής), που τους χορηγήθηκε για τις επόμενες 13 εβδομάδες και την οποία λάμβαναν ελεύθερα. Στην ομάδα Α χορηγήθηκε τροφή πλούσια σε λίπος, που περιείχε 40% βαμβακέλαιο και στην ομάδα Β τροφή πλούσια σε υδατάνθρακα, που περιείχε 68% σουκρόζη. Από την 10^η μέχρι την 13^η εβδομάδα, τα ζώα κάθε ομάδας διαιρέθηκαν περαιτέρω σε

τρεις υποομάδες (ανά 7 ζώα), ενώ συνεχίστηκε κανονικά η χορήγηση κάθε διαίτας. Σε δύο υποομάδες (α_1 , β_1) χορηγούνταν καθημερινά φυσιολογικός ορός ενδοπεριτοναϊκά, σε δύο άλλες (α_2 , β_2) διάλυμα υδροχλωρικής σιμπουτραμίνης σε φυσιολογικό ορό, σε δόση 5 mg/kg, και σε δύο υποομάδες (α_3 , β_3) διάλυμα υδροχλωρικής σιμπουτραμίνης σε δόση 10 mg/kg. Η πρόσληψη τροφής μετριόταν καθημερινά την τελευταία εβδομάδα του πειράματος και ο ρυθμός αύξησης του βάρους υπολογίστηκε με βάση το σωματικό βάρος των ζώων, που μετριόταν κάθε εβδομάδα, σε όλη τη διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας. Την τελευταία ημέρα του πειράματος έγινε ευθανασία των ζώων, υπό αναισθησία (μείγμα κεταμίνης και ξυλαζίνης 1:0,1 mg/kg, το οποίο τους χορηγήθηκε ενδομυϊκά). Ακολούθησε λήψη αίματος από την κάτω κοίλη φλέβα, ο ορός του οποίου χρησιμοποιήθηκε για την μέτρηση της ρεζιστίνης και του TNF- α με ανοσοενζυμική μέθοδο ELISA, χρησιμοποιώντας kits των εταιρειών BioVenter και Diaclone, αντίστοιχα. Τα αποτελέσματα εκφράστηκαν ως μέσοι όροι \pm σταθερό σφάλμα.

Για την στατιστική ανάλυση χρησιμοποιήθηκαν οι δοκιμασίες Student t-test και ANOVA με το test bonferroni για πολλαπλές συγκρίσεις. Για την διερεύνηση των πιθανών συσχετίσεων χρησιμοποιήθηκε ο συντελεστής συσχέτισης κατά Pear-son. Στατιστικά σημαντικό θεωρήθηκε κάθε $p < 0,05$.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ – ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Πρόσληψη τροφής

Η ποσότητα της προσλαμβανόμενης τροφής ήταν σημαντικά αυξημένη στις υποομάδες α_1 ($p=0,017$) και α_2 ($p<0,001$) σε σχέση με τις υποομάδες β_1 και β_2 , αντίστοιχα. Στατιστικά σημαντική μείωση της ποσότητας της προσλαμβανόμενης τροφής παρατηρήθηκε στην υποομάδα α_3 (τροφή πλούσια σε λίπος και σιμπουτραμίνη 10 mg/kg) συγκρινόμενη με την υποομάδα α_1 ($p=0,014$).

Ρυθμός αύξησης του σωματικού βάρους

Ο ρυθμός αύξησης του σωματικού βάρους ήταν σημαντικά υψηλότερος σε όλες τις υποομάδες της ομάδας A ($p<0,001$) σε σχέση με αυτές της ομάδας B. Στατιστικά σημαντική μείωση του ρυθμού αύξησης του σωματικού βάρους παρατηρήθηκε στην υποομάδα α_3 σε σύγκριση με την υποομάδα α_1 ($p=0,05$).

TNF- α

Τα επίπεδα του TNF- α στον ορό ήταν σημαντικά μεγαλύτερα σε όλες τις υποομάδες της ομάδας A ($p=0,004$) σε σχέση με τις αντίστοιχες της B. Δεν βρέθηκε διαφοροποίηση στα επίπεδα του TNF- α στον ορό στην ομάδα A ή B μετά την χορήγηση της σιμπουτραμίνης.

Ρεζιστίνη

Η συγκέντρωση της ρεζιστίνης στον ορό ήταν σημαντικά μεγαλύτερη στις υποομάδες της ομάδας A ($p=0,036$) σε σχέση με τις αντίστοιχες της B. Η χορήγηση σιμπουτραμίνης δεν επηρεάζει με στατιστικά σημαντικό τρόπο τα επίπεδα της ρεζιστίνης στον ορό και στις δύο εξεταζόμενες ομάδες πειραματοζώων.

Συσχετίσεις

Στατιστικά σημαντική θετική συσχέτιση υπάρχει μεταξύ των επιπέδων του TNF- α και της ρεζιστίνης στον ορό ($r=0,497$ $p=0,001$), στο σύνολο των πειραματοζώων που μελετήθηκαν.

Σύμφωνα με τα παραπάνω αποτελέσματα, η χορήγηση λιπαρής διαίτας συνεπάγεται αυξημένη θερμιδική πρόσληψη, υψηλότερο ρυθμό αύξησης του σωματικού βάρους και μεγαλύτερη συγκέντρωση TNF- α και ρεζιστίνης στον ορό των πειραματοζώων σε σχέση με τη χορήγηση υδατανθρακικής διαίτας, ευρήματα σύμφωνα με βιβλιογραφικά δεδομένα (9,10). Η αύξηση των επιπέδων του TNF- α και της ρεζιστίνης στο ορό αποδίδεται, προφανώς, σε πρωτογενή επίδραση της πλούσιας σε λίπος διαίτας και όχι σε δευτερογενή συνέπεια του υψηλότερου ρυθμού αύξησης του σωματικού βάρους, που παρουσιάζουν τα ζώα αυτά. Η συγκεκριμένη υπόθεση ενισχύεται από την ανυπαρξία στατιστικά σημαντικής συσχέτισης μεταξύ της συγκέντρωσης του TNF- α ή της ρεζιστίνης στον ορό και της ποσότητας της προσλαμβανόμενης τροφής ή του ρυθμού αύξησης του σωματικού βάρους των ζώων. Επομένως, μπορεί να θεωρηθεί, ότι η αύξηση των επιπέδων των δύο λιποκινών οφείλεται στο είδος της προσλαμβανόμενης διαίτας, δηλαδή στο λίπος.

Η σιμπουτραμίνη, στη δόση των 10 mg/kg, μειώνει την προσλαμβανόμενη ποσότητα της λιπαρής τροφής, καθιστώντας την ίση με εκείνη της πλούσιας σε υδατάνθρακα τροφής. Φαίνεται ότι η σιμπουτραμίνη, σε αυτή τη δόση, εξομαλύνει τη διατροφική συμπεριφορά των τρεφόμενων με πλούσια σε λίπος διαίτα ζώων, επιτυγχάνον-

τας σημαντικό θερμοδικό περιορισμό. Επίσης, αυτή ελαττώνει το ρυθμό αύξησης του σωματικού βάρους, χωρίς ωστόσο να επηρεάζει τα επίπεδα του TNF- α και της ρεζιστίνης στον ορό των συγκεκριμένων πειραματοζώων. Συνεπώς, η μείωση της ποσότητας της προσλαμβανόμενης τροφής και του ρυθμού αύξησης του σωματικού βάρους αποδίδεται στις γνωστές επιδράσεις της σιμπουτραμίνης στο αίσθημα του κορεσμού και στη θερμογένεση, χωρίς να εμπλέκονται στον μηχανισμό δράσης της ο TNF- α ή η ρεζιστίνη (11).

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΠΑΡΑΠΟΜΠΕΣ

1. Vernon R.G., et al.: Signals of obesity. *Dom. Animal Endocrinol.* 21: 197-214 (2001)
2. Ahima R.S., et al.: Adipose tissue as an endocrine organ. *Trends Endocrinol. Metab.* 11: 327-332 (2000)
3. Matsuzawa Y., et al.: Molecular mechanism of metabolic syndrome X: contribution of adipocytokines, adipocyte-derived bioactive substances. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 892: 146-154 (1999)
4. Motojima K.: The physiological role of resistin and its connection with metabolic diseases. *J. Endocrinol. Invest.* 26: 1171-1173 (2003)
5. Steppan C.M., et al.: The hormone resistin links obesity to diabetes. *Nature* 409: 307-312 (2001)
6. Moller D.E., et al.: Potential role of TNF- α in the pathogenesis of insulin resistance and type 2 diabetes. *Trends Endocrinol. Metab.* 11: 212-217 (2000)
7. McNeely W., et al.: Sibutramine: a review of its contribution to the management of obesity. *Drugs* 56: 1093-1124 (1998)
8. Connoley I.P., et al.: Thermogenic effects of sibutramine and its metabolites. *Br. J. Pharmacol.* 126: 1487-1495 (1999)
9. Mito N., et al.: Change of cytokine balance in diet-induced obese mice. *Metabolism* 49: 1296-1300 (2000)
10. Asensio C., et al.: Changes in glycemia by leptin administration or high-fat feeding in rodent models of obesity/type 2 diabetes suggest a link between resistin expression and control of glucose homeostasis. *Endocrinology* 145: 2206-2213 (2004)
11. Stroubini Th., et al.: Resistin, TNF- α , insulin, glucose serum levels and body weight-increasing rate changes in rats fed with high-fat diet under Sibutramine treatment. Presentation at the 15th World Congress of Pharmacology, Beijing, China, 2006

Effects of Sibutramine Treatment on Food Intake, Body Weight, Resistin

and TNF- α Serum Levels of Rats Fed with two Isocaloric Diets

Th. Stroubini¹, M. Trapali¹, Ch. Liapi¹, I. Dontas², A. Perelas², M. Poulakou², D. Perrea² and P. Galanopoulou¹

Laboratories ¹Experimental Pharmacology, ²Experimental Surgery and Surgical Research *Christeas Hall*, Medical School, Athens University, Athens, Greece

Key words: Sibutramine, Resistin, TNF- α , diet, rat

SUMMARY. Resistin, an adipocyte hormone, has been implicated in the pathogenesis of obesity and considered as a possible link between obesity and insulin resistance. TNF- α , a cytokine involved in both cachexia and obesity, is a key modulator of adipocyte metabolism, with a direct role in several insulin-mediated processes, including glucose homeostasis and lipid metabolism. The physiological effect of resistin is similar to that of TNF- α in many ways. Sibutramine (S), an antiobesity drug, promotes weight loss by enhancing satiety and increasing thermogenesis. The aim of this study was to investigate: a) the effect of diet on resistin and TNF- α levels in serum of rats fed with two isocaloric diets: High-Fat Diet (HFD) and High-Carbohydrate Diet (HCD) b) if eventual changes on food intake and body weight-increasing rate (BW-IR) caused by each diet, could be correlated to serum resistin and TNF- α levels under sibutramine treatment. 2 Groups of male Wistar rats (n=42) were fed with HFD or HCD for 13 weeks. The last 3 weeks each Group divided into 3 subgroups received: S 5 mg/kg, S 10 mg/kg or vehicle. Daily food intake, BW-IR, serum resistin and TNF- α levels were measured. HFD intake increased food intake, BW-IR, resistin and TNF- α levels compared to HCD. Sibutramine at 10 mg/kg decreased food intake and BW-IR compared to vehicle in rats fed with HFD. No changes on resistin and TNF- α levels in both groups after sibutramine treatment were observed. A positive correlation between resistin and TNF- α was found in all rats studied. Results suggest that S exerts its observed effects without involvement of TNF- α and resistin changes caused by the two isocaloric diets.

ΕΠΙΘΕΩΡΗΣΗ ΚΛΙΝΙΚΗΣ ΦΑΡΜΑΚΟΛΟΓΙΑΣ
ΚΑΙ ΦΑΡΜΑΚΟΚΙΝΗΤΙΚΗΣ 25: 114-115 (2007)
©ΦΑΡΜΑΚΟΝ-Τύπος

Μεταβολισμός και Ανίχνευση της Κοκαΐνης σε Σίελο και Πλάσμα

Χ. Τάχου¹, Χ. Πουρζιτάκη², Γ. Δερμάτης¹, Ν. Ράικος¹, Ε. Τσούκαλη¹ και Δ. Κούβελας²

¹Εργαστήριο Ιατροδικαστικής και Τοξικολογίας, ²Εργαστήριο Φαρμακολογίας, Ιατρική Σχολή, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο, Θεσσαλονίκη, Ελλάδα

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η κοκαΐνη αποτελεί μία από τις συχνότερα χρησιμοποιούμενες παράνομες εξαρτησιογόνες ουσίες παγκοσμίως. Η ανίχνευσή της σε βιολογικά υγρά χρηστών είναι μείζονος σημασίας για τους κλινικούς ιατρούς, αλλά και τους ιατροδικαστές. Ως σίελο ορίζεται το ολικό υγρό της στοματικής κοιλότητας. Τα κυριότερα πλεονεκτήματα της χρήσης του για την ανίχνευση και τον ποσοτικό προσδιορισμό εξαρτησιογόνων ουσιών έναντι άλλων βιολογικών υγρών, όπως το αίμα και τα ούρα, είναι η εύκολη πρόσβαση στη στοματική κοιλότητα και η ταχεία λήψη του (1). Η μη επεμβατική μέθοδος λήψης του το καθιστά πολύτιμο στην κλινική πρακτική, αλλά και στα ιατροδικαστικά εργαστήρια. Ο σκοπός της παρούσας εργασίας είναι ο έλεγχος του σιέλου, ως αξιόπιστου βιολογικού υλικού στην τοξικολογία με τη συγκριτική μελέτη των συγκεντρώσεων του μεταβολίτη της κοκαΐνης βενζουλοεγκονίνη (benzoylecgonine) που ανιχνεύθηκαν στο σίελο και το πλάσμα χρηστών ως και 5 ώρες μετά τη χρήση της.

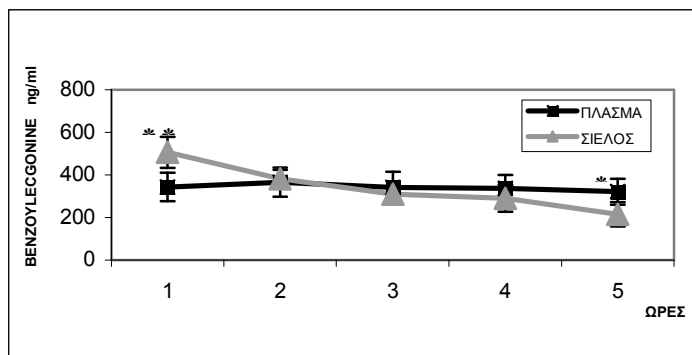
ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Στην εργασία συμπεριλήφθηκαν 10 εξαρτημένοι από την κοκαΐνη χρήστες, με πρόσφατο ιστορικό χρήσης της συγκεκριμένης ουσίας, οι οποίοι υπέγραψαν έντυπο συγκατάθεσης συμμετοχής τους. Πραγματοποιήθηκε συλλογή δειγμάτων αίματος και σιέλου (2 ml) ανά 60 min και για συνολικό χρονικό διάστημα 5 ωρών. Τα δείγματα σιέλου λήφθηκαν με διέγερση των σιελογόνων αδένων των χρηστών με όξινη ουσία. Τα δείγματα

αίματος φυγοκεντρήθηκαν και παραλήφθηκε το πλάσμα. Στη συνέχεια έγινε ο προσδιορισμός σε όλα τα δείγματα της συγκέντρωσης του μεταβολίτη βενζουλοεγκονίνη της κοκαΐνης, σε όλα τα δείγματα, με τη μέθοδο της πολυενζυμικής ανοσοϊστοχημείας (enzyme-multiplied immunoassay technique - EMIT). Για τη μέθοδο αυτή χρησιμοποιήθηκε πολυκλωνικό αντίσωμα σεσημασμένο με την αφυδρογονάση της β-φωσφορικής γλυκόζης (2-4).

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Ο μεταβολίτης της κοκαΐνης βενζουλοεγκονίνη είναι ανιχνεύσιμος στο πλάσμα και στο σίελο σε διαφορετικές συγκεντρώσεις για κάθε χρονική περίοδο. Κατά την πρώτη ώρα μετά τη χρήση της κοκαΐνης η συγκέντρωση του μεταβολίτη της στο σίελο είναι ιδιαίτερος αυξημένη στους 7 από τους 10 χρήστες, ενώ στο πλάσμα μόλις στους 2, με στατιστική σημαντικότητα $p=0,027$ (δοκιμασία Wilcoxon's signed rank). Από τη 2^η μέχρι την 4^η ώρα μετά τη χρήση, οι συγκεντρώσεις του μεταβολίτη βενζουλοεγκονίνη στο σίελο και το πλάσμα είναι παρόμοιες, με στατιστικώς σημαντική συσχέτιση $p<0,01$ (δοκιμασία Pearson). Πέντε ώρες μετά τη χρήση, η συγκέντρωσή του μεταβολίτη στο πλάσμα είναι στατιστικώς σημαντικά μεγαλύτερη, συσχετιζόμενη με εκείνη στο σίελο (8 στους 10 χρήστες) με στατιστική σημαντικότητα $p=0,027$ (δοκιμασία Wilcoxon's signed rank). Στο Σχήμα 1 απεικονίζονται οι συγκεντρώσεις του μεταβολίτη βενζουλοεγκονίνη στο πλάσμα και στο σίελο στο σύνολο των χρηστών για το χρονικό διάστημα των 5 ωρών.



ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Ο σίελος αποτελεί σημαντικό συμπληρωματικό βιολογικό υγρό ανίχνευσης και προσδιορισμού τοξικών ουσιών. Το γεγονός αυτό οφείλεται στην περιορισμένη γνώση που υπάρχει σχετικά με τις δυνατότητες χρήσης του. Οι νέες τεχνικές που έχουν αναπτυχθεί για τη συλλογή, τη λήψη, αλλά και την ανάλυσή του το καθιστούν πολύτιμο διαγνωστικό μέσο (2,4). Στην παρούσα εργασία η συγκέντρωση του μεταβολίτη βενζοϋλεγκονίνης της κοκαΐνης στο σίελο αποδείχθηκε ισχυρώς συσχετιζόμενη με εκείνη του πλάσματος ιδιαίτερα για τις πρώτες 4 ώρες μετά τη χρήση της. Τα αποτελέσματά μας καταδεικνύουν ότι η λήψη σιέλου ως ταχεία και αναίμακτη μέθοδος είναι σε θέση να αποτελέσει πολύτιμη τεχνική ανάλυσης και προσδιορισμού της κοκαΐνης και ομολόγων ουσιών, στην τοξικολογία, αλλά και την κλινική φαρμακολογία συγκρινόμενη με τη χρήση άλλων βιολογικών υγρών (5).

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΠΑΡΑΠΟΜΠΕΣ

1. Yacoubian G.S., Jr, Wish E.D., Perez D.M.: A comparison of saliva testing to urinalysis in an arrestee population. *J. Psychoactive Drugs* 33: 289-294 (2001)
2. Speckl I., Hallbach J., Guder W.G., Meyer L.V., Zilker T.: Detection of cocaine and its metabolites in saliva and urine by gc/ms during clinical drug withdrawal. *J. Toxicol. Clin. Toxicol.* 37: 441-445 (1999)
3. Moolchan E.T., Cone E.J., Wstadik A., Huestis M.A., Preston K.L.: Cocaine and metabolite elimination patterns in chronic cocaine users during cessation: plasma and saliva analysis. *J. Anal. Toxicol.* 24: 458-466 (2000)
4. Samyn N., van Haeren C.: On-site testing of saliva and sweat with Drugwipe and determination of concentrations of drugs of abuse in saliva, plasma and urine of suspected users. *Int. J. Legal Med.* 113: 150-154 (2000)

5. Jenkins A.J., Oyler J.M., Cone E.J.: Comparison of heroin and cocaine concentrations in saliva with concentrations in blood and plasma. *J. Anal. Toxicol.* 19: 359-374 (1995)

Cocaine metabolism and detection in saliva and blood

H. Tachou¹, C. Pourzitaki², G. Dermatis³, N. Raikos¹, E. Tsoukali¹ and D. Kouvelas²

¹Laboratory of Forensic Medicine and Toxicology and ²Laboratory of Pharmacology, Medical School, Aristotle University, Thessaloniki, Greece

Key words: Cocaine, benzoylecgonine, saliva, plasma, metabolism, detection

SUMMARY. Saliva is a valuable biological liquid for forensic toxicology because of its combination of non invasive sampling, no requirements for special facilities and no intrusion of privacy. The aim of this research was to investigate the correlation between cocaine's metabolite benzoylecgonine detected concentration in saliva and plasma. Samples were taken from 10 cocaine's addicts every 60 minutes for 5 hours and analyzed with the enzyme-multiplied immunoassay technique (EMIT). The results indicate that there is statistically significant higher concentration of benzoylecgonine in saliva than plasma during the first hour after drug use, while there is statistically significant correlation between them from 2nd to 4th hour. Our results indicate that saliva could be useful as an analytical tool in toxicology and clinical pharmacology for cocaine's metabolite benzoylecgonine detection especially for acute sampling and concomitantly with recorded drug concentrations in other fluids as plasma or urine.

ΕΠΙΘΕΩΡΗΣΗ ΚΛΙΝΙΚΗΣ ΦΑΡΜΑΚΟΛΟΓΙΑΣ
ΚΑΙ ΦΑΡΜΑΚΟΚΙΝΗΤΙΚΗΣ 25: 116-118 (2007)
©ΦΑΡΜΑΚΟΝ-Τύπος

Αυτοπεπτική Ικανότητα Καρκινικού Ιστού (Μαστού Ανθρώπου) υπό την Επίδραση Αναστολέων Αυτοπεψίας (Αδενίνης, Αδενοσίνης, 3-Μεθυλαδενίνης) *in vitro*

Ε. Φράγκου και Ν. Μασουρίδου

Εργαστήριο Γενικής Βιολογίας, Ιατρική Σχολή, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο, Θεσσαλονίκη, Ελλάς

ΣΚΟΠΟΣ

Χρησιμοποιήσαμε αναστολείς των πρώιμων σταδίων της αυτοπεψίας (αδενίνη, αδενοσίνη και 3-μεθυλαδενίνη), για να μελετήσουμε *in vitro*, την αυτοπεπτική ικανότητα καρκινικού ιστού ανθρώπου (καρκίνο μαστού) σε σχέση με τον περιβάλλοντα φυσιολογικό ιστό με τη διαδικασία της αυτόλυσης, σε συνθήκες στέρησης τροφής και ενέργειας, σε όξινο pH (5,0), τόσο σε ομοιογενοποίηση, όσο και σε λυσοσωματικό κλάσμα με κυτταροδιάλυμα. Ορισμένες ιδιότητες των λυσοσωματίων επηρεάζονται από το όξινο περιβάλλον pH (1), όπως η ενδοκυττάρια κατανομή αυτών, καθώς και η έκκριση λυσοσωματικών ενζύμων. Το κύριο μέρος της εναλλαγής των πρωτεϊνών ή της διάσπασης ειδικών ενζύμων επιτυγχάνεται με τη λυσοσωματική διαδικασία (2). Ορισμένοι λυσοσωματικοί μηχανισμοί μετέχουν στα αρχικά στάδια διαφορετικών ανασταλτικών επιδράσεων, όπως για παράδειγμα στην αυτοπεψία (autophagy) (3) και συγκεκριμένα στη μακρο- και μικρο-πεψία (4).

ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

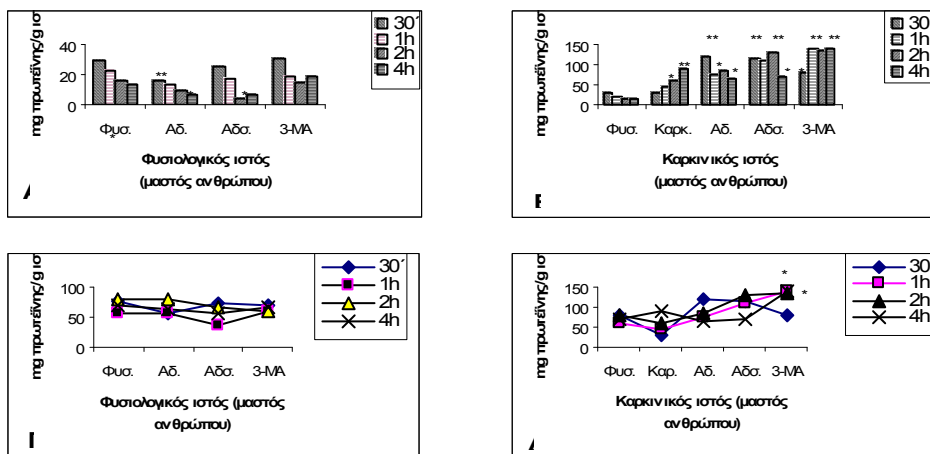
Δείγματα (10) από καρκινικό ιστό (μαστού ανθρώπου), καθώς και από τον περιβάλλοντα φυσιολογικό ιστό 0,2 g ομοιογενοποιήθηκαν με ομοιογενοποιητή Polytron Kinematica σε διάλυμα KCl 0,15 M και επαναιωρήθηκαν σε ρυθμιστικό διάλυμα κιτρικού οξέος - Na₂HPO₄, pH 5,0. Δοκιμάστηκαν αναστολείς της αυτοπεψίας

αδενίνη, αδενοσίνη (50 Mm), 3-μεθυλαδενίνη (3-MA, 10 mM) τόσο σε ομοιογενοποίηση, όσο και σε λυσοσωματικό κλάσμα (5). Μετά από επώαση 30', 1, 2, 4 ώρες, σε 37 °C, 0,1 ml κάθε δείγματος χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό των πρωτεϊνών σύμφωνα με τη μέθοδο Bradford (6), τροποποιημένη κατά Bearden (7). Η λυσοσωματική διάσπαση είναι δυνατόν να μετρηθεί με την αυτοπεψία (8).

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Τα ευρήματα της μελέτης της αυτοπεψίας εκφράζονται με τις τιμές της ολικής διάσπασης των πρωτεϊνών στους αντίστοιχους χρόνους επώασης (30', 1, 2, 4 ώρες) σε σχέση με την ολική αρχική περιεκτικότητα πρωτεϊνών (0 ώρα επώαση) του καρκινικού και φυσιολογικού ιστού (μαστού ανθρώπου) σε όξινο pH (5,0). Η αυτοπεπτική ικανότητα εκφράζεται με την εκατοστιαία διάσπαση των πρωτεϊνών σε σχέση με το αρχικό ολικό ποσό των πρωτεϊνών (0 ώρες επώαση).

Βρέθηκε: α) αυξημένη διάσπαση πρωτεϊνών στον καρκινικό ιστό στο ομοιογενοποίημα (Σχήμα 1B) ιδιαίτερα μετά από 4 ώρες επώασης, η οποία ήταν πιο χαρακτηριστική στο λυσοσωματικό κλάσμα + ριβοσωμάτια + κυτταροδιάλυμα (Σχήμα 1Δ), β) αυξημένη αυτοπεπτική ικανότητα στον καρκινικό ιστό τόσο στο ομοιογενοποίημα (Πίνακας 1), όσο και στο λυσοσωματικό κλάσμα+ριβοσωμάτια+κυτταροδιάλυμα (Πίνακας 2).



Σχήμα 1. Επίδραση αναστολέων αυτοπεψιάς στη διάσπαση πρωτεϊνών φυσιολογικού Α, και καρκινικού ιστού Β (μαστού ανθρώπου), σε pH 5,0 στο ομοιογενποίημα και στα λυσοσωμάτια + κυτταροδιάλυμα + μικροσωμάτια Γ, Δ. Οι τιμές παριστάνουν τους μέσους όρους από 10 πειράματα. Στατιστικά σημαντικά σύμφωνα με τη διαδικασία "t", όπου *** $p \leq 0,001$, ** $p \leq 0,002$, * $p \leq 0,01$.

Πίνακας 1

Αυτοπεπτική ικανότητα (μαστού ανθρώπου) υπό την επίδραση αδενίνης, αδενοσίνης και 3-μεθυλαδενίνης, σε pH 5,0 (ομοιογενποίημα)

Ωρες επώασης	Φυσιολογικό	Αδενίνη	Αδενοσίνη	3 - MA
0	209,29	216,87	221,22	215,91
30'	237,76 12% ↓	200,72 8% ↑	246,8 10% ↑	184,5 17% ↑
1h	230,71 9% ↑	205,72 5% ↑	238,86 7% ↑	195,3 10% ↑
2h	226,87 8% ↑	225,96 4% ↓	225,49 2% ↑	201,58 7% ↑
4h	226,87 6% ↑	222,95 3% ↓	227,84 3% ↑	195,6 10% ↑
Ωρες επώασης	Καρκινικό	Αδενίνη	Αδενοσίνη	3 - MA
0	320,32	305,37	328,77	314,20
30'	290,1 10% ↑	183,1 67% ↑	212,5 55% ↑	237,9 32% ↑
1h	275,6 16% ↑	234,1 30% ↑	223,2 47% ↑	168,8 86% ↑
2h	260,5 23% ↑	217,8 40% ↑	199,1 65% ↑	184,7 99% ↑
4h	230,5 39% ↑	242,2 26% ↑	256,2 28% ↑	175,2 79% ↑

Πίνακας 2

Αυτοπεπτική ικανότητα (μαστού ανθρώπου) υπό την επίδραση αδενίνης, αδενοσίνης και 3-μεθυλαδενίνης, σε pH 5,0 (λυσοσωματιακό κλάσμα + κυτταροδιάλυμα + ριβοσωμάτια)

Ωρες επώασης	Φυσιολογικό	Αδενίνη	Αδενοσίνη	3 - MA
0	286,34	281,50	274,50	285,13
30'	210,5 36%	225,1 25%	199,6 37%	217,8 31%
1h	228,7 25%	228,2 23%	238,4 15%	295,9 26%
2h	204,4 40%	200,8 40%	205,9 33%	293,2 28%
4h	215,4 33%	218,1 29%	216,9 26%	219,2 30%
Ωρες επώασης	Καρκινικό	Αδενίνη	Αδενοσίνη	3 - MA
0	269,40	273,31	256,57	273,94
30'	208,90 29%	208,90 31%	208,90 23%	210,24 30%
1h	168,60 60%	170,71 60%	169,52 51%	160,91 76%
2h	138,80 94%	138,80 96%	142,61 70%	135,41 102%
4h	126,85 112%	130,50 109%	131,71 94%	125,15 118%

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Το κύριο μέρος της εναλλαγής των πρωτεϊνών ή της διάσπασης ειδικών ενζύμων επιτυγχάνεται με τη λυσοσωματική διαδικασία (2). Ορισμένοι λυσοσωματικοί μηχανισμοί μετέχουν στα αρχικά στάδια διαφορετικών ανασταλτικών επιδράσεων, όπως π.χ. στην αυτοπεψία (3) και συγκεκριμένα στη μακρο- και μι-κροπεψία (4).

Η αύξηση της αυτοπεπτικής ικανότητας που παρατηρήθηκε στον καρκινικό ιστό σε όξινο pH αποδόθηκε: α) στην ανακατανομή των πρωτεολυτικών ενζύμων, λόγω χαμηλού pH, β) στην μεταβολή ορισμένων ιδιοτήτων των λυσοσωματίων, λόγω όξινου pH (8), και γ) στη δέσμευση λυσοσωματικών ενζύμων με μεμβράνες και ενεργοποίηση αυτών (8,9).

Από τα ευρήματα μας προκύπτει ότι η μελέτη αυτή μπορεί να αποτελέσει στόχο για διόρθωση της ικανότητας αυτής των καρκινικού ιστού, καθώς η αυτοπεπτική ικανότητα των καρκινικών κυττάρων σχετίζεται με το φαινόμενο της διείσδυσης.

Οι τμές αντιπροσωπεύουν τους μέσους όρους από 10 πειράματα και εκφράζουν την περιεκτικότητα των ιστών σε πρωτεΐνες (mg πρωτεΐνης/g ιστού). Η αυτοπεπτική ικανότητα εκφράζεται με την επί τοις % διάσπαση των πρωτεϊνών στους αντίστοιχους χρόνους (30', 1, 2, 4 ώρες) σε σχέση με την περιεκτικότητα πρωτεϊνών σε 0 ώρες επώαση.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΠΑΡΑΠΟΜΠΕΣ

1. Heuser J.: Changes in lysosome shape and distribution correlated with changes in cytoplasmic pH. *J. Cell Biol.* 108: 855-864 (1989)
2. Frangou-Massourides H.: Intracellular proteolysis. Annual of the Faculty of Medicine, Aristotle University of Thessaloniki, Greece. No 165. Monograph.
3. Gordon P.B., Seglen P.O.: Exogenous control of intracellular protein catabolism. In: *Proteolytic Enzymes a Practical Approach* (Beynon R.J., Bond J.S., eds). Pp. 201-210, IRL Press, New York, 1989
4. Mortimore G.E., Kadowaki M.: Autophagy: Its mechanism and regulation. In: *Cellular proteolytic systems* (Ciechanover A.J., Schwartz A.L., eds). Pp. 65-87, Wiley-Liss, New York, 1944
5. Nordlie R.C., Lardy H.A.: Subcellular distribution of rat liver PPIase activity. *Bioch. Biophys. Acta* 50: 189-191 (1961)
6. Bradford M.: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein using the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254 (1976)
7. Bearden J.C.: Quantitation of submicrogram quantities of protein by an improved protein-dye binding assay. *Biochim. Biophys. Acta* 533: 525-529 (1978)
8. Seglen P.O.: Inhibitors of lysosomal function. In: *Methods in Enzymology* (Fleischer S., Fleischer B., eds). Pp. 737-764, Academic Press, New York, 1983
9. Rozhin J., Sameni M., Zieger G., Sloane B.F.: Pericellular pH affects distribution and secretion of cathepsin B in malignant cells. *Cancer Res.* 54: 6517-6525 (1994)

Autophagic Activity of Breast Cancer under the Influence of Autophagic Inhibitors (Adenine, Adenosine, 3-Methyladenine) *in vitro*

H. Frangou and N. Masouridou

Department of General Biology, Medical School, Aristotle University of Thessaloniki, Greece

Key words: Breast cancer, autophagic inhibitors, adenine, adenosine, 3-methyladenine, *in vitro*

SUMMARY. Pericellular pH affect some properties of lysosomes. The aim of the present work was to elucidate if some specific inhibitors of autophagy influence lysosomal protein degradation in human breast cancer tissue *in vitro*, at acidic pH, in comparison to the surrounding normal tissue. We used nutritionally deprived conditions in order to stimulate autophagy. Human tissue specimens (0.2 g) from breast cancer as well as specimens from surrounding "normal" tissue were homogenized in KCl (0.15 M), 1;10 wt/vol. Adenine, adenosine (50 mM), 3-methyladenine (10 mM) were added in tissue homogenates after 30', 1, 2, 4 hours of incubation at 37 °C. The same inhibitors were studied in lysosomal fraction (+cytosol+microsomes). Samples of 0.1 ml were assayed for protein. The lysosomal degradation can largely be accounted by autophagy (Seglen). Autophagic activity was measured as percentage of protein degradation during the time of incubation (30', 1, 2, 4 hours) in correlation with the tissue protein content at 0 hour of incubation. Neoplastic human breast tissue indicated enhanced autophagic activity under the influence of specific inhibitors, in comparison to the surrounding "normal" tissue; which may be associated with intracellular lysosomes translocation, membrane bound proteolytic enzymes and their activation at acidic pH. We suggest that this system may be a possible target for autophagic activity restoration in some cancer cells and tissues.

Η Επίδραση των Κανναβινοειδών στην Κινητική Συμπεριφορά σε δύο Φαινοτύπους Επιμύων

Ο. Χουλιάρα¹, Κ. Αντωνίου¹, Α. Πολυσιδη², Σ. Γκούντας¹, Ζ. Παπαδοπούλου-Νταϊφώτη², Μ. Μαρσέλος¹ και Χ. Σπυράκη^{2†}

¹Εργαστήριο Φαρμακολογίας, Ιατρική Σχολή, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων, 45110 Ιωάννινα, Ελλάς. ²Εργαστήριο Φαρμακολογίας, Ιατρική Σχολή, Πανεπιστήμιο Αθηνών, 11527 Αθήνα, Ελλάς

ΕΙΣΑΓΩΓΗ - ΣΚΟΠΟΣ

Είναι αξιοσημείωτο ότι τα πειραματόζωα και ειδικότερα οι επίμυες χωρίζονται ανάλογα με την ένταση της κινητικής τους συμπεριφοράς σε μη οικείο περιβάλλον σε δύο φαινοτύπους, τους χαμηλά και τους υψηλά ανταποκρινόμενους (Low Responders [LR] και High Responders [HR], αντίστοιχα) (1-3) Οι διαφορές μεταξύ HR και LR σε πειραματικές διαδικασίες που ελέγχουν τις ιδιότητες ψυχοδιεγερτικών ουσιών έχουν συσχετιστεί με διαφορές ως προς την ευαισθησία των επιμύων αυτών στη χορήγηση των ουσιών. Συγκεκριμένα, πειραματόζωα που επέδειξαν υψηλότερη εξερευνητικότητα σε μη οικείο περιβάλλον παρουσίασαν και μεγαλύτερη ευαισθησία στη χορήγηση ψυχοδιεγερτικών σε σχέση με τα πειραματόζωα χαμηλής ανταπόκρισης (1,2). Οι διαφορές αυτές των δύο φαινοτύπων έχουν συσχετιστεί με αντίστοιχες λειτουργικές διαφορές σε νευρωνικούς μηχανισμούς που ενδεχομένως εμπλεκονται στο παθοφυσιολογικό υπόστρωμα της εξάρτησης (1,4,5). Αρκετές μελέτες έχουν επικεντρωθεί στην επίδραση των κανναβινοειδών στην κινητικότητα επιμύων, αλλά τα αποτελέσματα παραμένουν αντιφατικά. Δεν έχουν, όμως, μελετηθεί οι δράσεις των κανναβινοειδών στην κινητικότητα επιμύων των δύο παραπάνω φαινοτύπων.

Η παρούσα μελέτη σκοπεύει να εξετάσει το φαρμακολογικό αποτέλεσμα της Δ⁹-τετραυδροκανναβινόλης (Δ⁹-THC) και ενός αγωνιστή των υποδοχέων των κανναβινοειδών, WIN 55,212-2

(WIN) στην κινητικότητα ήδη διαφοροποιημένων επιμύων με βάση την εξερευνητικότητα τους σε μη οικείο περιβάλλον.

ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

Χρησιμοποιήθηκαν αρσενικοί επίμυες Sprague-Dawley ηλικίας 75-100 ημερών και βάρους 250-300 g οι οποίοι τοποθετήθηκαν σε ανοικτό κλωβό κινητικής δραστηριότητας για περίοδο 15 λεπτών και με κριτήριο την κάθετη δραστηριότητά τους διαχωρίστηκαν σε δύο πληθυσμούς (HR/LR). Στη συνέχεια, 20-25 ημέρες αργότερα, τα πειραματόζωα επαναεισήχθησαν στον πειραματικό κλωβό μετά τη χορήγηση Δ⁹-THC (0, 0,75, 1,5 mg/kg i.p.) και WIN (0, 0,1, 0,3 mg/kg, i.p., n = 9-12 επίμυες για κάθε δοσολογική ομάδα επιμύων). Εκτιμήθηκε η κινητικότητά τους, κάθετη και οριζόντια, χρησιμοποιώντας ένα αυτόματο σύστημα καταγραφής διαφόρων συμπεριφορικών μεταβλητών σε πειραματικό κλωβό ανοικτού πεδίου (ENV515, Activity Monitor, version 5, Med Associates).

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ – ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η χορήγηση THC όσο και η χορήγηση WIN κατά τις υψηλότερες δόσεις, προκάλεσε μείωση σε συνιστώσες της κινητικής συμπεριφοράς ανοικτού πεδίου στους HR και LR επίμυες. Ιδιαίτερα έκδηλη υποκινητικότητα παρατηρήθηκε, όμως, μετά από τη χορήγηση WIN.

Τα αποτελέσματα ειδικότερα για τους δύο φαινοτύπους έδειξαν υψηλή οριζόντια και κάθετη

δραστηριότητα στο ανοικτό πεδίο κατά την πρώτη τους έκθεση στους HR συγκριτικά με τους LR επίμυες. Η διαφοροποίηση αυτή διατηρήθηκε μετά τη χορήγηση THC καθώς οι HR παρουσιάζουν πολύ μεγαλύτερη δραστηριότητα, οριζόντια και κάθετη, σε σχέση με τους LR, ιδιαίτερα κατά τη δόση 0,75 mg/kg, ενώ για το WIN η διαφοροποίηση αυτή διατηρήθηκε κυρίως ως προς την κάθετη κινητικότητα για τη δόση 0,1 και 0,3 mg/kg.

Συμπερασματικά, θα μπορούσε να υποστηριχθεί ότι οι δύο φαινότυποι πειραματοζώων παρουσιάζουν διαφορετικό προφίλ κινητικής δραστηριότητας μετά από χορήγηση κανναβινοειδών.

Συνοπτικός πίνακας παρουσίασης της επίδρασης THC και WIN στην κινητική συμπεριφορά των HR/LR επιμύων

THR			WIN		
HR+LR	LR	HR	HR+LR	LR	HR
Vehicle 0,75 1,5*	↓ ↓	↑ ↑	Vehicle 0,1 0,3*	↓ ↓	↑ ↑

* ΓΓΕΤ, ΠΕΝΕΔ (Ο3ΕΔ768)

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΠΑΡΑΠΟΜΠΕΣ

1. Piazza P.V., Deminiere J.M., Le Moal M., Simon H.: Factors that predict individual vulnerability to amphetamine self-administration. *Science* 245: 1511-1513 (1989)
2. Piazza P.V., Rouge-Pont F., Deminiere J.M., Kharoubi M., Le Moal M., Simon H.: Dopaminergic activity is reduced in the prefrontal cortex and increased in the nucleus accumbens of rats predisposed to develop amphetamine self-administration. *Brain Res.* 567: 169-174 (1991)
3. Antoniou K., Papathanasiou G., Panagis G., Nomikos G.G., Hyphantis T., Papadopoulou-Daifoti Z.: Individual responses to novelty predict qualitative differences in d-amphetamine-induced open field but not reward-related behaviors in rats. *Neuroscience* 123: 613-623 (2004)
4. Cools A.R., Ellenbroek B.A., Gingras M.A., Engbersen A., Heeren D.: Differences in vulnerability and susceptibility to dexamphetamine in Nijmegen high and low responders to novelty: a dose-effect analysis of spatio-temporal programming of behaviour. *Psychopharmacology (Berl)* 132: 181-187 (1997)
5. Ranaldi R., Baucu P., McCormick S., Cools A.R., Wise R.A.: Equal sensitivity to cocaine reward in addiction-prone and addiction-resistant rat genotypes. *Behav. Pharmacol.* 12: 527-534 (2001)

The Effects of Cannabinoids on Motor Activity in two Phenotypes of Rats

O. Chouliara¹, K. Antoniou¹, A. Polissidis², S. Goudas¹, Z. Papadopoulou-Daifoti², M. Marselos¹ and C. Spyraiki²

¹Department of Pharmacology, Medical School, University of Ioannina, GR-45110 Ioannina, Greece; ²Department of Pharmacology, Medical School, University of Athens, GR-11527 Athens, Greece

Key words: Cannabinoids, motor activity, rat, phenotypes

SUMMARY. Differences in the motor activity of rats exposed to a novel environment have been associated with differences in sensitivity to psychostimulants. In particular, animals that show a higher response to novelty also exhibit a higher susceptibility to psychostimulants as compared with those showing a lower response. In the present study, we profiled the behavioral response of two phenotypes (High responders - HR and Low responders-LR rats) during exposure to a novel environment and in response to Δ^9 -tetrahydrocannabinol (Δ^9 -THC) and a cannabinoid receptor agonist, WIN 55,212-2 (WIN). Male Sprague-Dawley rats were used and spontaneous motor activity was registered for 15 min using an automated system and an open field apparatus (ENV515, Activity Monitor, version 5, Med Associates). Rats were differentiated as HR and LR based on their vertical activity. 20 days later, the rats were injected intraperitoneally (i.p.) with Δ^9 -THC (0, 0.75, 1.5 mg/kg) and WIN (0, 0.1, 0.3 mg/kg, n=9-12 rats for each drug dose of HR and LR rats) and spontaneous motor activity (vertical/horizontal) was registered. THC and WIN administration induced a decrease in motor activity at the higher doses; an effect that was more pronounced following WIN administration. HR rats displayed increased ambulatory and vertical activity as compared with LR rats. This differentiation was observed after THC administration since HR rats displayed higher scores in motor activity especially at the dose of 0.75 mg/kg. This differentiation was also seen following WIN administration, as far as vertical activity is concerned. The above results suggest that HR and LR can be further differentiated in response to cannabinoid administration.

Επίδραση της Θεοφυλλίνης και των Μεταβολιτών της στο Ανιόν Κόλον του Κουνελιού

Θ.Α. Ψαρρά¹, Γ.Χ. Μπατζιάς¹, Τ.Λ. Peeters² και Μ. Κουτσοβίτη-Παπαδοπούλου¹

¹Εργαστήριο Φαρμακολογίας, Κτηνιατρική Σχολή, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο, Θεσσαλονίκη, Ελλάδα.

²Εργαστήριο πεπτιδίων του εντέρου, Ιατρική Σχολή, Πανεπιστήμιο της Λουβαίνης, Βέλγιο

ΕΙΣΑΓΩΓΗ - ΣΚΟΠΟΣ

Η θεοφυλλίνη είναι μη εκλεκτικός αναστολέας των φωσφοδιεστερασών και χορηγείται κυρίως ως βρογχοδιασταλτικό για τη θεραπεία του άσθματος και της χρόνιας αποφρακτικής πνευμονοπάθειας. Ωστόσο, κατά τη διάρκεια θεραπείας με θεοφυλλίνη έχουν αναφερθεί διάφορες ανεπιθύμητες ενέργειες στον άνθρωπο και στα ζώα. Σε αυτές συμπεριλαμβάνονται γαστρεντερικές διαταραχές, όπως γαστροοισοφαγική παλινδρόμηση, έμετος, σπασμός του στομάχου και διάρροια (1). Η θεοφυλλίνη μεταβολίζεται στο ήπαρ σε 3-μεθυλοξανθίνη, 1,3-διμεθυλοουρικό οξύ και 1-μεθυλοξανθίνη, η οποία τελικά μεταβολίζεται σε 1-μεθυλοουρικό οξύ (2). Δεν υπάρχουν πειραματικά δεδομένα αναφορικά με το πώς επηρεάζουν οι μεταβολίτες της θεοφυλλίνης την κινητικότητα του παχέος εντέρου, ενώ *in vitro* μελέτες αναφέρουν ότι η θεοφυλλίνη προκαλεί μη χολινεργική χαλάρωση στο κόλον του κουνελιού (3), όπως επίσης στο κόλον (4) και στην κολική ταινία ινδικού χοιριδίου (5).

Η παρούσα εργασία σχεδιάστηκε για να μελετηθεί η επίδραση της θεοφυλλίνης και των μεταβολιτών της στο ανιόν κόλον κουνελιού και να διερευνηθεί ο μηχανισμός της δράσης τους.

ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

Στους πειραματισμούς χρησιμοποιήθηκαν ταινίες ανιόντος κόλου (μήκους ενός εκατοστού) κουνελιού. Τα παρασκευάσματα αναρτιόνταν σε υδατόλουτρο απομονωμένων οργάνων που πε-

ριείχε θρεπτικό διάλυμα Tyrode θερμοκρασίας 37 °C. Η οξυγόνωση του θρεπτικού υγρού γινόταν με αέριο μίγμα carbogen (95%O₂-5%CO₂). Οι ανταποκρίσεις των παρασκευασμάτων καταγράφονταν σε φυσιογράφο δια μέσου ιστοτονικών μυογράφων. Μελετήθηκαν οι ανταποκρίσεις των παρασκευασμάτων στη θεοφυλλίνη και στους μεταβολίτες της απουσία και παρουσία ορισμένων ανταγωνιστών. Συγκεκριμένα, ως ανταγωνιστές χρησιμοποιήθηκαν ο α-αδρενεργικός αναστολέας φαιντολαμίνη, ο β-αδρενεργικός αναστολέας προπρανολόνη, η αντιχολινεργική ουσία ατροπίνη, η συναπτολυτική ουσία εξαμεθώνιο, καθώς και ο αναστολέας της συνθάσης του μονοξειδίου του αζώτου (NO) N_ω-Nitro-L-Arginine Methylester (L-NAME).

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ – ΣΥΖΗΤΗΣΗ

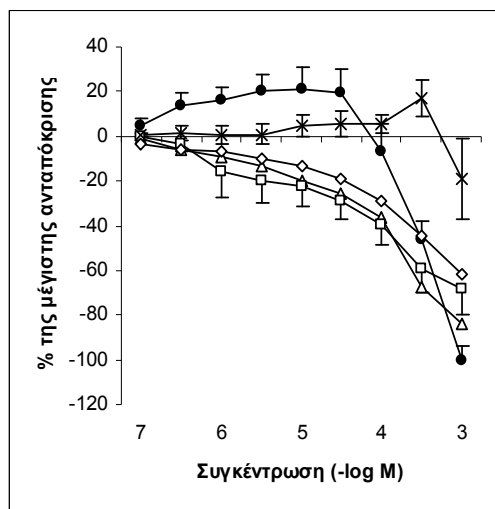
Η θεοφυλλίνη, σε συγκεντρώσεις που κυμαίνονταν από 10⁻⁷ έως 3x10⁻⁵ M, προκάλεσε μικρή αύξηση στο βασικό τόνο των παρασκευασμάτων του ανιόντος κόλου, ενώ σε συγκεντρώσεις μεγαλύτερες από 10⁻⁴ M μείωσε το εύρος των συσπάσεων και προκάλεσε σταθερή και παρατεταμένη μείωση του βασικού τόνου.

Η 1-μεθυλο-ξανθίνη, η 3-μεθυλοξανθίνη και το 1,3-διμεθυλοουρικό οξύ δεν αύξησαν το βασικό τόνο σε καμία από τις συγκεντρώσεις που εξετάστηκαν, ενώ σε συγκεντρώσεις μεγαλύτερες από 10⁻⁷ M μιμήθηκαν τη χαλαρωτική ενέργεια της θεοφυλλίνης.

Το 1-μεθυλουρικό οξύ σε συγκεντρώσεις μέχρι 3×10^{-4} M, είτε δεν επηρέασε, είτε αύξησε το βασικό τόνο, ενώ σε υψηλότερες συγκεντρώσεις προκάλεσε χαλάρωση, η οποία ήταν μικρότερη εκείνης που προκάλεσαν η θεοφυλλίνη και οι άλλοι μεταβολίτες.

Στη συγκέντρωση 10^{-3} M οι ανταποκρίσεις των παρασκευασμάτων στη 1-μεθυλοξανθίνη, στη 3-μεθυλοξανθίνη, στο 1,3-διμεθυλουρικό οξύ και στο 1-μεθυλουρικό οξύ ήταν 84%, 69%, 62% και 19%, αντίστοιχα, της ανταπόκρισης των παρασκευασμάτων στην ίδια συγκέντρωση θεοφυλλίνης.

Η ατροπίνη ανταγωνίστηκε τη συσπαστική ενέργεια της θεοφυλλίνης. Αντίθετα, η χαλάρωση που προκάλεσαν είτε η θεοφυλλίνη, είτε οι μεταβολίτες της διατηρήθηκε παρουσία των αδρενεργικών και των χολινεργικών ανταγωνιστών και δεν επηρεάστηκε ούτε από τη χορήγηση εξαμεθωνίου ούτε από τη χορήγηση του αναστολέα της συνθάσης του μονοξειδίου του αζώτου L-NAME.



Καμπύλες ανταπόκρισης του απομονωμένου ανιόντος κόλου κουνελιού στη θεοφυλλίνη (●, n=8), στην 1-μεθυλοξανθίνη (Δ, n=7), στην 3-μεθυλο-ξανθίνη (□, n=6), στο 1,3-διμεθυλουρικό οξύ (◇, n=8) και στο 1-μεθυλουρικό οξύ (×, n=7). Οι τιμές εκφράζονται % της μέσης μέγιστης ανταπόκρισης των παρασκευασμάτων στη θεοφυλλίνη. Κάθε τιμή εκφράζεται σε $mean \pm SEM$.

Ο επικρατέστερος από τους προταθέντες μηχανισμούς αναφορικά με τη χαλαρωτική ενέργεια της θεοφυλλίνης στις λείες μυϊκές ίνες είναι η ανασταλτική επίδρασή της στις φωσφοδιεστε-

ράσες (ένζυμα που διασπούν τα κυκλικά νουκλεοτιδία cAMP και cGMP), η οποία οδηγεί τελικά σε αυξημένα ενδοκυτταρικά επίπεδα των κυκλικών νουκλεοτιδίων. Η θεοφυλλίνη, ως μη εκλεκτικός αναστολέας των φωσφοδιεστερασών, ενδέχεται να αυξάνει τα ενδοκυτταρικά επίπεδα και των δύο νουκλεοτιδίων. Το γεγονός, όμως, ότι το NO είναι εκείνο το οποίο αυξάνει τα ενδοκυτταρικά επίπεδα του cGMP, σε συνδυασμό με το εύρημα αυτής της μελέτης, ότι το L-NAME δεν ανταγωνίζεται τη χαλάρωση που προκαλούν τόσο η θεοφυλλίνη, όσο και οι μεταβολίτες της, οδηγούν στο συμπέρασμα ότι η χαλαρωτική ενέργεια της μητρικής ουσίας και των μεταβολιτών της είναι προϊόν της ανασταλτικής τους επίδρασης στους τύπους των φωσφοδιεστερασών που διασπούν το cAMP και όχι το cGMP.

Συμπερασματικά, το ανιόν κόλον του κουνελιού παρουσιάζει διαφορετική ευαισθησία στην επίδραση της θεοφυλλίνης και των μεταβολιτών της 1-μεθυλοξανθίνη, 3-μεθυλοξανθίνη και 1,3-διμεθυλουρικό οξύ, ενώ δεν επηρεάζεται σημαντικά από το 1-μεθυλουρικό οξύ. Η θεοφυλλίνη μέχρι κάποια συγκεκριμένη συγκέντρωση διεγείρει την κινητικότητα του ανιόντος κόλου του κουνελιού, πιθανώς μέσω ενός χολινεργικού μηχανισμού, ενώ σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις προκαλεί μετασυναπτική, μη αδρενεργική, μη χολινεργική χαλάρωση, η οποία είναι συγκρίσιμη με αυτή που προκαλούν η 1-μεθυλοξανθίνη, η 3-μεθυλοξανθίνη και το 1,3-διμεθυλουρικό οξύ. Υπάρχουν ενδείξεις ότι η χαλάρωση που προκαλούν η θεοφυλλίνη και οι μεταβολίτες της στο ανιόν κόλον του κουνελιού είναι αποτέλεσμα κυτταρικών λειτουργιών που πυροδοτεί το κυκλικό AMP, τα ενδοκυτταρικά επίπεδα του οποίου αυξάνονται λόγω της ανασταλτικής επίδρασης της θεοφυλλίνης και των μεταβολιτών της στις φωσφοδιεστεράσες του κατιόντος κόλου.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΠΑΡΑΠΟΜΠΕΣ

1. Fredholm B.B.: *Prog. Clin. Biol. Res.* 158: 331-354 (1984)
2. McManus M.E., Miners J.O., Gregor D., Stupans I., Birgett D.J.: *J. Pharm. Pharmacol.* 40: 388-391 (1988)
3. Tonini M., Onori L., Lecchini S., Frigo G., Perucca E., Crema A.: *Eur. J. Pharmacol.* 82: 21-28 (1982)
4. Poch G., Umfaher W.: *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 293: 257-268 (1976)
5. Pfaffman M.A., McFarland S.A.: *Eur. J. Pharmacol.* 23: 147-152 (1973)

Differential Effects of Theophylline and its Metabolites on the Rabbit Ascending Colon

T.A. Psarra¹, G.C. Batzias¹, T.L. Peeters² and M. Koutsoviti-Papadopoulou¹

¹Laboratory of Pharmacology, Veterinary Faculty, Aristotle University, Thessaloniki, Greece; ²Gut Peptide Laboratory, Faculty of Medicine, University of Leuven, Leuven, Belgium

Key words: Theophylline, theophylline metabolites, ascending colon, rabbits

SUMMARY. Administration of theophylline (THEO) may have gastrointestinal adverse effects. Experimental evidence for the effects of THEO and its metabolites, 1-methylxanthine (1-MX), 3-methylxanthine (3-MX), 1,3-dimethyluric acid (1,3-DMU) and 1-methyluric acid (1-MU), on the intestinal motility is very limited. The differential effects of THEO and its metabolites on the rabbit ascending colon strips and the mechanism of their action were examined in the present study. THEO, at concentrations from 10^{-7} to 3×10^{-5} M, produced a slight increase in the basal tone, while at concentrations higher than 10^{-4} M it reduced the phasic contractions and produced a sustained decrease in the basal tone. 1-MX, 3-MX and 1,3-DMU did

not increase the basal tone at any concentration tested, while at concentrations higher than 10^{-7} M, they mimicked the relaxing effect of THEO. 1-MU either did not affect or it increased the basal tone up to the concentration of 3×10^{-4} M, while at higher concentrations it produced a relaxing effect, weaker than the one produced by THEO and the other metabolites. The responses of the preparations to 1-MX, 3-MX, 1,3-DMU and 1-MU at the concentration of 10^{-3} M, compared to the response of the tissue to THEO at the same concentration, were 84%, 69%, 62% and 19%, respectively. The THEO-induced contractile effect was atropine-sensitive, while the THEO- and its metabolites-induced relaxing effect was maintained under non-adrenergic non-cholinergic (NANC) conditions and it was not affected either by the ganglion blocker hexamethonium or by L-NAME, an inhibitor of nitric oxide synthase. In conclusion, the rabbit ascending colon exhibits differential sensitivity to THEO and its metabolites 1-MX, 3-MX and 1,3-DMU, while it is not significantly influenced by 1-MU. THEO up to a certain concentration stimulates the ascending colon motility probably *via* a cholinergic mechanism, while, as the concentration rises, it produces a post-synaptic, NANC relaxing effect, which is shared by 1-MX, 3-MX and 1,3-DMU. The relaxing effect may be due to cAMP elevation mediated through the inhibitory action of THEO and its metabolites on the PDEs present in the ascending colon.

ΕΠΙΘΕΩΡΗΣΗ ΚΛΙΝΙΚΗΣ ΦΑΡΜΑΚΟΛΟΓΙΑΣ
ΚΑΙ ΦΑΡΜΑΚΟΚΙΝΗΤΙΚΗΣ 25: 124-125 (2007)
©ΦΑΡΜΑΚΟΝ-Τύπος

Η Πολυφαινόλη Κερκετίνη Προκαλεί την Αποικοδόμηση της Ογκοπρωτεΐνης Ras και Αυτοφαγικό Θάνατο σε Καρκινικά Κύτταρα του Παχέος Εντέρου

Φ. Ψαχούλια, Σ. Μουμτζή, Ε. Οικονόμου και Α. Πίντζας

Εργαστήριο Γονιδιακής Ρύθμισης, Ινστιτούτο Βιολογικών Ερευνών και Βιοτεχνολογίας, Εθνικό Ίδρυμα Ερευνών, Βασ. Κων/νου 48, 11635 Αθήνα, Ελλάδα

ΣΚΟΠΟΣ

Βασιζόμενοι σε επιδημιολογικές μελέτες καθώς και σε *in vitro* πειράματα που αναδεικνύουν τις πολυφαινόλες ως πολλά υποσχόμενους αντικαρκινικούς παράγοντες του καθημερινού μας διατροφολογίου, μελετήσαμε τις ιδιότητες της κερσετίνης (3,3',4',5,7-πενταυδροξυφλαβόνη) ως πιθανό παράγοντα χημειοπροστασίας στην πρόληψη ή την εξέλιξη του καρκίνου του παχέος εντέρου. Η κερσετίνη έχει δείχθει ότι μπορεί να τροποποιεί τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, την επιβίωση και την κυτταρική διαφοροποίηση, καθώς και να στοχεύει μόρια-κλειδιά για την εκδήλωση καρκινικών ιδιοτήτων. Για το λόγο αυτό, εξετάσαμε τη επίδραση της πολυφαινόλης σε καρκινικές ιδιότητες κυττάρων του παχέος εντέρου, καθώς και σε ένα *in vitro* σύστημα χημειοπροστασίας.

ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

Τα κύτταρα που χρησιμοποιήσαμε έχουν διαφορετικό προφίλ μεταλλαγών και αυτό μας επέτρεψε να συσχετίσουμε τη διαφορετική δράση της κερσετίνης στα κύτταρα αυτά με τις μεταλλαγές που φέρουν και κυρίως με τις μεταλλαγές στο πρωτο-ογκογονίδιο RAS, το οποίο παρουσιάζεται μεταλλαγμένο στο 50% περίπου των όγκων του παχέος εντέρου. Το αποτέλεσμα της δράσης της κερσετίνης στο ογκογονίδιο RAS μελετήθηκε και με τη βοήθεια της χρήσης συστημάτων συνεχούς ή κατά συνθήκη έκφρασης του ογκογονιδίου σε ανθρώπινα επιθηλιακά κύτταρα.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Τα πειράματα έδειξαν ότι τα καρκινικά κύτταρα του παχέος εντέρου είχαν διαφορετική ευαισθησία στην κερσετίνη. Η ευαισθησία αυτή εξηγείται κυρίως με την τροποποίηση του κυτταρικού κύκλου. Η κερσετίνη λειτούργησε ανασταλτικά στην εκδήλωση καρκινικών ιδιοτήτων των κυττάρων του παχέος εντέρου. Συγκεκριμένα, εμπόδισε: τη δημιουργία αποικιών σε μαλακό άγαρ, τη μετανάστευση των κυττάρων σε φιμπρονεκτίνη και την οργάνωση του κυτταροσκελετού. Ο μετασχηματισμός των κυττάρων του παχέος εντέρου από το ογκογονίδιο RAS, καθώς και η απαλοιφή του ογκογονιδίου τροποποίησε το αποτέλεσμα της επίδρασης της κερσετίνης στον κυτταρικό θάνατο. Συγκεκριμένα, φάνηκε ότι το ογκογονίδιο ευαισθητοποιεί τα κύτταρα στην επαγόμενη από την κερσετίνη μειωμένη βιωσιμότητα. Η κερσετίνη προκάλεσε επιλεκτική ελάττωση στα επίπεδα της ογκοπρωτεΐνης Ras, ενώ δεν έδειξε επίδραση στη φυσιολογική, μη μεταλλαγμένη πρωτεΐνη. Με τη χρήση επαγόμενου συστήματος της έκφρασης του RAS ογκογονιδίου δείξαμε ότι η κερσετίνη αναιρεί τις ιδιότητες που προσδίδει το ογκογονίδιο Ha-RAS στα κύτταρα.

Επιπλέον, δείξαμε πως η κερσετίνη επιταχύνει την αποικοδόμηση της ογκοπρωτεΐνης Ras μέσω της δράσης του 26s προτεασώματος. Η κερσετίνη επάγει αυτοφαγικό κυτταρικό θάνατο σε κύτταρα που υπερεκφράζουν το ογκογονίδιο Ha-RAS. Η ικανότητα της κερσετίνης να προτιμά για αποικοδόμηση ειδικά τις ογκοπρωτεΐνες Ki- και

Ha-Ras προσφέρει στην πολυφαινόλη το πλεονέκτημα να μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τη στόχευση των τύπων του καρκίνου που προκαλούνται από την ενεργοποίηση του RAS.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΠΑΡΑΠΟΜΠΕΣ

1. Campbell P.M., Der C.J.: Oncogenic Ras and its role in tumor cell invasion and metastasis. *Semin. Cancer Biol.* 14: 105-114 (2004)
2. Furuta S., Hidaka E., Ogata A., Yokota S., Kamata T.: (2004) RAS is involved in the negative control of autophagy through the class I PI3-kinase. *Oncogene* 23: 3898-3904 (2004)
3. Gozuacik D., Kimchi A.: Autophagy as a cell death and tumor suppressor mechanism. *Oncogene* 23: 2891-2906 (2004)
4. Gustin D.M., Brenner D.E.: (2002) Chemoprevention of colon cancer: current status and future prospects. *Cancer Metastasis Rev.* 21: 323-348 (2002)
5. Opirari A.W., Jr, Tan L, Boitano A.E., Sorenson D.R., Aurora A., Liu J.R.: Resveratrol-induced autophagocytosis in ovarian cancer cells. *Cancer Res.* 64: 696-703 (2004)
6. Psahoulia F.H., Moumtzi S., Roberts M.L., Sasazuki T., Shirasawa S., Pintzas A.: Quercetin mediates rapid degradation of oncogenic Ras proteins and causes autophagy in Ha-RAS-transformed human colon cancer cells. *Carcinogenesis*, In press (2006)

ΠΙΝΑΚΑΣ ΣΥΓΓΡΑΦΕΩΝ

- ANDERA L. 40
 GÖTHERT M. 9
 HORVAT O. 89
 INGELMAN-SUNDBERG M. 35
 KASTRATOVIC D. 89
 LANG M.A. 35,69
 MILICIC A. 89
 PEETERS T.L. 121
 PEJAKOV L. 89
 RASKOVIC A. 89
 ROTH M. 62
 SABO A. 89
 TOMIC Z. 89
 ZHONG J. 62
 ΑΛΜΠΑΝΗ Μ. 49
 ΑΜΑΝΙΤΗ Α. 14,49
 ΑΝΤΩΝΙΟΥ Κ. 42,117
 ΑΠΟΣΤΟΛΑΚΗΣ Κ. 11
 ΑΡΒΑΝΙΤΙΔΗΣ Κ.46
 ΑΡΒΑΝΙΤΙΔΗΣ Κ.Ι. 102
 ΑΡΓΥΡΙΑΔΟΥ Ε. 14
 ΑΣΗΜΑΚΗ Ο. 17
 ΑΣΛΑΝΙΔΗΣ Σ. 19
 ΒΑΒΕΤΣΗ Ρ. 22
 ΒΑΣΙΛΑΚΗ Α. 25
 ΒΑΣΙΛΑΚΟΣ Δ. 14,49
 ΒΑΣΙΛΕΙΑΔΗΣ Μ.Β. 46
 ΒΛΑΧΟΥ Σ. 44
 ΒΟΥΛΓΑΡΗ Α. 40
 ΓΑΒΑΛΑΣ Α. 67
 ΓΑΛΑΝΑΚΗΣ Δ. 67
 ΓΑΛΑΝΟΠΟΥΛΟΥ Π. 111
 ΓΕΩΡΓΑΝΤΑ Ε.Μ. 28
 ΓΕΩΡΓΟΥΣΗ Ζ. 28,72
 ΓΙΑΝΝΑΚΟΠΟΥΛΟΥ Ε.Χ. 30
 ΓΙΑΝΝΗ Μ. 44
 ΓΚΟΥΝΤΑΣ Σ. 119
 ΓΚΡΟΥΖΜΑΝ Ε. 11
 ΓΟΥΛΑΣ Α. 33
 ΓΡΙΒΑ Ε. 105
 ΔΑΣΚΑΛΟΠΟΥΛΟΣ Ε.-Π. 35
 ΔΕΡΜΑΤΗΣ Γ. 114
 ΔΟΚΟΣ Χ. 38,84,108
 ΔΟΝΤΑ Ι. 111
 ΔΟΥΓΕΚΟΥ Γ. 22
 ΔΟΥΛΓΚΕΡΗΣ Χ. 67
 ΔΡΟΣΟΠΟΥΛΟΣ Κ. 40
 ΖΑΜΠΟΥΛΗΣ Χ. 19
 ΖΑΡΑΛΙΔΟΥ Α. 14
 ΖΑΡΔΑΒΑΣ Δ. 62
 ΖΑΡΡΟΣ Α. 11,52,75
 ΖΗΣΟΠΟΥΛΟΥ Σ. 92
 ΘΕΟΦΙΛΟΠΟΥΛΟΣ Σ. 42
 ΘΕΡΜΟΥ Κ. 44,57,60,78,80
 ΙΟΥΡΔΑΝΙΔΟΥ Μ. 46
 ΚΑΪΔΟΓΛΟΥ Α. 94
 ΚΑΛΛΑΡΑΣ Κ. 64
 ΚΑΛΠΙΔΗΣ Ι. 49
 ΚΑΝΑΚΗΣ Χ.Δ. 92
 ΚΑΠΟΥΚΡΑΝΙΔΟΥ Δ. 49,64
 ΚΑΡΑΓΕΩΡΓΙΟΥ Χ. 11,52,105
 ΚΑΡΑΚΙΟΥΛΑΚΗΣ Γ. 62
 ΚΑΡΑΚΟΥΛΑΣ Κ. 14
 ΚΑΡΑΜΑΝΛΗΣ Ε. 89
 ΚΑΡΑΣΤΕΡΓΙΟΥ Α. 55,86
 ΚΑΤΡΑΜΑΔΟΥ Μ. 11
 ΚΑΤΣΙΓΙΑΝΝΟΠΟΥΛΟΣ Κ. 55, 86
 ΚΙΑΓΙΑΔΑΚΗ Φ. 57,60
 ΚΛΑΓΚΑΣ Ι. 62,94,98
 ΚΟΚΚΙΝΟΣ Δ. 52
 ΚΟΚΡΑΣ Ν. 105
 ΚΟΝΔΥΛΗΣ Μ.Π. 44
 ΚΟΝΤΟΓΙΩΡΓΗΣ Χ. 64
 ΚΟΣΜΙΔΟΥ Β. 40
 ΚΟΣΜΙΔΟΥ Μ. 33
 ΚΟΥΒΕΛΑΣ Δ. 49,114
 ΚΟΥΛΑΚΗΣ Ε. 60
 ΚΟΥΡΟΥΝΑΚΗ Α. 67,82
 ΚΟΥΡΟΥΝΑΚΗΣ Π.Ν. 67
 ΚΟΥΤΣΟΒΙΤΗ-ΠΑΠΑΔΟΠΟΥ-
 ΛΟΥ Μ. 121
 ΚΡΙΤΗΣ Α. 94,98
 ΚΩΝΣΤΑΝΤΗ Μ. 35,69
 ΚΩΣΤΟΠΑΝΑΓΙΩΤΟΥ Γ. 11
 ΛΕΟΝΤΙΑΔΗΣ Λ. 72
 ΛΙΑΠΗ Χ. 75,111
 ΜΑΓΚΟΥΡΑ Δ. 17,42
 ΜΑΝΩΛΟΠΟΥΛΟΣ Ε.Γ. 46,102
 ΜΑΡΑΖΙΩΤΗ Α. 78
 ΜΑΡΣΕΛΟΣ Μ. 35,69,119
 ΜΑΣΟΥΡΙΔΟΥ Ν. 116
 ΜΑΣΤΡΟΓΙΑΝΝΗ Α. 55,86
 ΜΑΣΤΡΟΔΗΜΟΥ Ν. 44,80
 ΜΑΤΡΑΛΗΣ Α. 82
 ΜΕΝΝΙΣΙΟΥ Α. 44
 ΜΕΣΣΑΡΗ Ι. 105
 ΜΗΡΤΣΟΥ Β. 33
 ΜΟΛΥΒΑ Δ. 33
 ΜΟΥΜΤΖΗ Σ. 124
 ΜΟΥΡΟΥΖΗΣ Ι. 52
 ΜΠΑΤΖΙΑΣ Γ.Χ. 121
 ΜΠΟΥΓΙΟΥΚΑΣ Γ. 46,102
 ΜΥΡΩΝΙΔΟΥ-ΤΖΟΥΒΕΛΕΚΗ Μ.
 38,84,108
 ΝΑΧΜΙΑΣ Β. 44
 ΝΙΚΟΛΑΪΔΗΣ Ε. 102
 ΟΙΚΟΝΟΜΟΥ Ε. 40,124
 ΠΑΝΑΓΗΣ Γ. 44
 ΠΑΝΤΟΣ Κ. 52
 ΠΑΝΤΟΥΛΑΡΗΣ Ι. 55
 ΠΑΠΑΔΟΠΟΥΛΟΥ-ΝΤΑΪΦΩΤΗ
 Ζ. 105,119
 ΠΑΠΑΖΗΣΗΣ Γ. 55,86
 ΠΑΠΑΖΟΓΛΟΥ Μ. 44
 ΠΑΠΑΪΩΑΝΝΙΔΟΥ Π. 89
 ΠΑΠΑΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΥ Ε. 62
 ΠΑΠΑΝΑΣΤΑΣΟΠΟΥΛΟΥ Χ. 22
 ΠΑΠΑΧΑΤΖΗΣ Δ. 44
 ΠΕΡΕΛΑΣ Α. 111
 ΠΕΡΡΕΑ Δ. 111
 ΠΕΤΡΙΔΗΣ Ι. 46
 ΠΙΝΤΖΑΣ Α. 40,124
 ΠΙΤΣΙΚΑΣ Ν. 92
 ΠΙΤΥΧΟΥΤΗΣ Π. 105
 ΠΟΛΥΖΟΥ Π. 22
 ΠΟΛΥΣΙΔΗ Α. 119
 ΠΟΛΥΣΙΟΥ Μ.Γ. 92
 ΠΟΥΛΑΚΟΥ Μ. 111
 ΠΟΥΡΖΙΤΑΚΗ Χ. 14,94,98,114
 ΠΥΡΡΑΣΟΠΟΥΛΟΥ Α. 19
 ΡΑΓΙΑ Γ. 102
 ΡΑΙΚΟΣ Ν. 114
 ΡΕΚΚΑ Ε.Α. 68,82
 ΡΕΝΤΕΣΗ Γ. 69
 ΣΑΚΕΛΛΑΡΙΔΗΣ Ν. 17,42,92
 ΣΙΔΕΡΗΣ Α. 105
 ΣΙΟΓΚΑ Α. 98
 ΣΙΣΚΟΥ Ι. 67
 ΣΙΤΑΡΑΣ Ν.Μ. 22
 ΣΠΥΡΑΚΗ Χ.† 44,78,119
 ΣΤΕΡΓΙΟΠΟΥΛΟΣ Σ. 19
 ΣΤΕΡΓΙΟΥ-ΜΙΧΑΗΛΙΔΟΥ Β. 64
 ΣΤΕΦΑΝΟΥ Ν. 108
 ΣΤΟΛΑΚΗΣ Β. 52
 ΣΤΡΟΥΜΠΙΝΗ Θ. 111
 ΤΑΡΑΝΤΙΛΗΣ Π.Α. 92
 ΤΑΥΡΙΔΟΥ Α. 46,102
 ΤΑΧΟΥ Χ. 114
 ΤΖΗΜΑΓΙΩΡΓΗΣ Γ. 94,98
 ΤΡΑΠΑΛΗ Μ. 111
 ΤΡΙΑΝΤΑΦΥΛΛΟΥ Α. 19
 ΤΣΑΚΙΡΗΣ Σ. 52,75
 ΤΣΙΑΚΙΤΖΗΣ Κ. 67
 ΤΣΙΡΙΜΟΝΑΚΗ Ε. 42
 ΤΣΟΥΚΑΛΗ Ε. 114
 ΤΥΛΙΓΑΔΑ Α. 30
 ΦΕΣΚΟΥ Ε. 75
 ΦΙΔΑΝΗ Λ. 33
 ΦΡΑΓΚΟΥ Ε. 116
 ΧΑΡΛΑΥΤΗΣ Ν. 89
 ΧΑΤΖΗΠΑΥΛΟΥ-ΛΙΤΙΝΑ Δ. 64
 ΧΑΤΖΗΤΟΛΙΟΣ Α. 33
 ΧΟΥΛΙΑΡΑ Ο. 119
 ΨΑΡΡΑ Θ.Α. 121
 ΨΑΧΟΥΛΙΑ Φ. 40,124

