

Beszámoló

Krónikus kalcium antagonistá kezelés hatása a szívizomra OTKA nyilvántartási szám: T 73160

A beszámoló készítésekor elsősorban a project megvalósítása során már publikált adatainkból és eredményeinkből levonható következtetéseinket részletezem, mintegy szintetizálva az egyes publikációk eredményeit. A konkrét adatok megtalálhatóak a közleményekben és a részjelentésekben.

A project célja az volt, hogy megvizsgáljuk, milyen hatással van a kalcium antagonistá krónikus adagolása a szívizom L-típusú kalcium-csatornáinak molekuláris biológiai és elektrofiziológiai sajátosságaira. A rágcsálókön végzett tájékozáó kísérleteink eredményei arra utaltak, a szívizomsejtek a kalcium homeosztázis szabályozása során nem csak az egyes ioncsatornákon átfolyó ionáramot regulálják, hanem hosszú távon a felszíni membránban helyet foglaló, működő ioncsatorná számát is módosítják.

Immunbiokémiai ill. immunhisztokémiai módszerekkel, voltage-clamp technikákkal tanulmányoztuk kalcium antagonistá krónikus adagolásának hatásait egészséges kutya kamrai preparátumokon. A kísérleteket kutya szívizomsejteken végeztük, mert ezen preparátumok elektrofiziológiai paraméterei nagymértékben hasonlítanak a humán szívizoméhoz, szemben a rágcsálók szívizmával.

1. Munkánk során kétféle kalcium antagonistát használtunk, a verapamilt és a nifedipint. A verapamil állandó vérszintjét, a kezelés során, a kísérleti állatok hasüregébe helyezett ozmotikus pumpa biztosította, amelyből egyenletesen és folyamatosan áramlik ki a szer. A nifedipin adagolása egyszerűbb, a kísérleti állatokat napi 1 tbl/nap Adalat GITS 60 retard filmtablettával kezeltük 4 héten keresztül, amiből szintén folyamatosan szívódik fel a nifedipin. Ez esetben a serum nifedipin koncentrációját nagynyomású folyadékromatográffal folyamatosan monitoroztuk. Megállapítottuk, hogy a nifedipin vérszintje nem változott szignifikáns mértékben a 4 hetes kezelés során, a kezelés megkezdése után 1 héttel $30,3 \pm 5,9$ ng/ml-t mértünk, a 4 hetes kezelés végén a serum nifedipin koncentrációja $37,3 \pm 9,23$ ng/ml volt.

A verapamil a kalciumcsatornákon kívül a szívizomsejtek nátrium és káliumcsatornáinak működését is befolyásolja. A nifedipin, a verapamilnál szelektívebb kalcium antagonistá, viszont a nifedipin esetében számolnunk kellett a szer vasculáris hatásaival is. Ennek megfelelően a kísérleti állatok EKG paramétereit és vérnyomás értékeit folyamatosan ellenőriztük. Megállapítottuk, hogy az alkalmazott kalcium antagonisták egyike sem okozott szignifikáns eltérést a kutyák EKG paramétereiben. A nifedipin kezelt kutyák esetén mind a systolés, mind a diastolés nyomásértékek szignifikáns csökkenését tapasztaltuk. Az izolált szívizomsejtek kapacitásának mérésével megállapítottuk, hogy sem a verapamil sem pedig a nifedipin kezelés nem változtatta meg szignifikánsan a szívizomsejtek méretét.

2. A kalciumáram mérése során megállapítottuk, hogy a nifedipin kezelést követően (4 hét) a kalciumáram (I_{Ca-L}) amplitúdója a bal kamra mindhárom rétegében szignifikánsan nagyobbak bizonyult, átlagosan $48 \pm 13\%$ -kal, a kontroll állatokéhoz képest. A krónikus kalcium antagonistá kezelés a pozitívabb

membránpotenciálok irányába mozdította a kalciumáram steady-state inaktivációjának feszültségfüggését a szívizom mindhárom rétegében. Ugyanakkor, az összegyűjtött szövetmintákból meghatározva a kalcium csatorna alfa alegységének ($Ca_v1.2$) mennyiségét azt tapasztaltuk, hogy az optikai denzitás értékek szignifikánsan kisebbek voltak a krónikusan kalcium antagonistával kezelt kutyák epi- és endo-cardiális rétegeiben, mint a kezeletlen kutyákból származó mintákban. A midmyocardiumból származó minták esetében viszont nem tapasztaltunk szignifikáns eltérést a normalizált optikai denzitás értékekben a kezelt és kezeletlen csoportok között. Az immunfluorescens vizsgálatokkal is hasonló eredményre jutottunk, nevezetesen, az L-típusú kalciumcsatorna elleni antitesttel történő jelölés után, a nifedipin kezelt állatok szívizomsejtjeinek felszíni membránjában kisebb mértékű fluoreszcencia intenzitást detektáltunk, mint a kezeletlen állatokban.

2. A tapasztalt I_{Ca-L} növekedés alapján azt vártuk, hogy nőni fog az az akciós potenciálok időtartama ugyanúgy, mint ahogyan azt a BAY K 8644 kezelést követően tapasztaltuk. Ezzel szemben, az akciós potenciál paramétereinek analízise alapján megállapítottuk, hogy az I_{Ca-L} amplitúdó növekedés ellenére, a krónikus nifedipin kezelés nem változtatta meg szignifikáns mértékben sem a kutya szívizomsejtek akciós potenciáljának az időtartamát (APD_{50} és APD_{90}) sem pedig ezen paraméterek diasztolés intervallum függését.

A BAY K 8644 kezelt kutya kamrai preparátumokon azt tapasztaltuk, hogy az APD növelése kifejezettebb volt az alacsonyabb ingerlési frekvenciákon. A BAY K 8644-en kívül teszteltünk további akciós potenciál időtartamot növelő és csökkentő molekulát is (Veratrin, $BaCl_2$, dofetilid) és megállapítottuk, hogy valamennyi molekula hatása fordítottan arányos az ingerlő impulzusok frekvenciájával. Megállapítottuk továbbá azt is, hogy az APD időtartamának változása annál nagyobb mértékű, minél hosszabb a kiindulási APD érték. Ebből arra következtettünk, hogy a különböző molekulák esetén megfigyelt fordított frekvenciafüggő hatás a sejtmembrán intrinsic sajátosága.

Az akciós potenciál mérések alapján feltételeztük, hogy a kalciumáram növekedés nyújtó hatását, a szívizom repolarizációjában résztvevő ionáramok kompenzálhatják. Ennek bizonyítására megvizsgáltuk a krónikus kalcium antagonistá kezelést káliumáramokra is. Megállapítottuk, hogy 4 hét nifedipin kezelés nem változtatta meg szignifikánsan a káliumáramok (I_{to} , I_{Kr} , I_{K1}) amplitúdóját és kinetikai paramétereit.

A kontroll szívizomsejtekre jellemző, hogy a beta-adrenerg agonista kezelés hatására megnő mind az L-típusú kalciumáram mind a késői káliumáram lassú komponensének (I_{Ks}) az amplitúdója. Kísérleteinkkel bizonyítottuk, hogy, a nem-specifikus beta-adrenerg agonista izoproterenol, szignifikánsan növeli a késői káliumáram gyors komponensének (I_{Kr}) az amplitúdóját is kutya szívizmon. Az izoproterenol I_{Kr} és I_{Ks} növelő hatása kivédhető volt szelektív β_1 receptor blokkoló, vagy PKA inhibitorok alkalmazásával. Az EPAC útvonal gátlása, vagy a PKC inhibitorok alkalmazása (chelerythin, bisindolylmaleimid I) viszont hatástalannak bizonyultak. Ezekből az eredményekből arra következtettünk, hogy a beta-adrenerg stimuláció elsősorban a PKA jelátviteli útvonalon keresztül befolyásolja a vizsgált ionsatornákat. A krónikus kalcium antagonistá kezelést követően viszont az izoproterenol nem tudta tovább növelni az I_{Ca-L} -t.

3. Az akciós potenciál paramétereinek mérésével párhuzamosan, fluorescens festékek alkalmazásával mértük az intracelluláris kalcium koncentráció változásait is. Bár az intracelluláris kalciumtranziensek amplitúdója változatlan maradt, szignifikánsan csökkent a nyugalmi fluoreszcencia mértéke, ami csökkent nyugalmi kalcium szintre utal. A kalcium eltávolító mechanizmusok aktivitásának jellemzéséhez a kalcium tranziensek leszálló szárát monoexponenciális függvényel illesztettük. Megállapítottuk, hogy a kalcium-tranziensek relaxációja szignifikánsan gyorsult a nifedipin kezelés hatására, ugyanakkor, a krónikus kalcium antagonistá kezeléssel nem változtatta meg a szívműködés kontraktilis filamentumainak kalcium érzékenységét.

A kalcium homeosztázis további fontos szereplője a $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ cseremechanizmus (NCX). Az NCX áram inward és outward komponensét, mint nikkellel szenzitív áramot detektáltuk. Eredményeink azt mutatják, hogy a nifedipin kezelés az NCX outward komponensét jelentősen nem változtatta meg, ezzel szemben az áram inward komponensében szignifikáns változás következett be, a denzitás $-0,39 \pm 0,20$ pA/pF-ről $-0,70 \pm 0,31$ pA/pF-ra változott. Ezen utóbbi mechanizmus magyarázatot adhat a kalciumtranziensek relaxációjának gyorsulására

Eredményeink fontosak lehetnek azokban az esetekben, amikor a hosszan tartó IV-es típusú antiaritmiás kezelésben részesülők terápiája módosítására szorul, mivel a kalcium-csatorna antagonistá elhagyásával a hirtelen megnövekedő kalciumáram-denitás, illetve kalciumion-koncentráció aritmiát válthat ki.

A krónikus kalcium antagonistá kezeléssel nemcsak a szívműködés, hanem az ér simaizomsejtekre is hat. Ezt támasztja alá az a megfigyelésünk, hogy a kezelt állatok szisztolés és diasztolés vérnyomás értékei folyamatosan csökkennek négyhetes kezelés során. Bár a jelenlegi OTKA projekt hivatalosan lezárult, de a kísérleteket tovább folytatjuk, a projekt során felvetődött újabb kérdések tisztázására, valamint a kísérleteket szeretnénk kiterjeszteni az ér simaizomsejtek irányába is.