

EGY ÚJ ANTIARITMIÁS VEGYÜLET (RGH-2957) MIKROELEKTROFIZIOLÓGIAI HATÁSÁNAK VIZSGÁLATA KÜLÖNBÖZŐ IZOLÁLT SZÍVPREPARÁTUMOKON

PARÓCZAI MARGIT, KÁRPÁTI EGON és KELEMEN KÁROLY
az orvostudományok doktora

Közlésre érkezett: 1982. VI. 15.

RGH-2957 egy heterobiciklusos vegyület (3-metil, 7-etil 9α , $4'$ -(Cl-benzoiloxi)-3,7-diazabicyclo [3.3.1.] nonan dihidroklorid), mely a farmakológiai vizsgálatok során hatékony antiaritmiás vegyületnek bizonyult. Korábban megállapítottuk, hogy helyi érzéstelenítő és Ca^{2+} -antagonista tulajdonságokkal rendelkezik (*Paróczai és mtsai*, közlés alatt). Hatásmechanizmusának pontosabb megismerése céljából megvizsgáltuk az RGH-2957 különböző szívpreparátumok transzmembrán potenciáljára gyakorolt hatását.

Módszerek

1. Kísérletek tengeri malac szívpreparátumokon

300–400 g súlyú tengeri malacok szívét $34\text{ }^{\circ}\text{C}$ -os, karbogénnel átáramoltatott Locke-oldatba helyeztük. A Locke-oldat összetétele: 125 mM NaCl, 5,6 mM KCl, 2,16 mM $CaCl_2$, 25 mM $NaHCO_3$, 11 mM glukóz. A bal pitvart vagy a jobb kamra egyik papilláris izmát a szív többi részétől elkülönítettük, és egy 3 ml térfogatú szervedénybe tettük endocardiális felszínével felfelé. 1 Hz frekvenciájú, 0,5 msec időtartamú, kétszeres küszöbfelesültségű impulzusokkal bipoláris platina elektródon keresztül ingereltük a preparátumot a transzmembrán potenciálokat 3 M KCl-dal töltött kapilláris mikroelektrodokkal regisztráltuk oszcilloszkóp képernyőn. Az akciós potenciál felszálló szárának differenciál hányadosát (dV/dt), azaz a maximális depolarizációs sebességet (V_{max}) elektronikus úton képeztük és az oszcilloszkóp másik sugarán regisztráltuk. Az egyensúlyi állapot beállása után a vegyületet növekvő koncentrációban tartalmazó Locke-oldattal inkubáltuk a preparátumot, és 30 perc múlva regisztráltuk az egyes paramétereket.

2. Kísérletek spontán működő sinus-csomón

1,5–2,0 kg-os nyulak jobb fülcséjét Locke-oldatba tettük, a sinus-csomót még éppen tartalmazó, kb. 10 mm hosszú és 3 mm széles szövetmintát

izoláltuk, és endocardiális felszínével felfelé a szervedényben rögzítettünk. Konvencionális mikroelektrodtechnikával regisztráltuk a pacemaker típusú akciós potenciálokat.

3. Kísérletek K^+ -depolarizált papilláris izmon

Tengeri malac papilláris izmot az előzőek szerint izoláltunk, normál Locke-oldatban 1 Hz frekvenciával ingereltük. Az egyensúlyi állapot beállása után 25 mM K^+ -tartalmú Locke-oldatba helyeztük, az ingerlő frekvenciát 0,3 Hz-re csökkentettük, az ingerfeszültséget a küszöbpotenciál tízszeresére növeltük. Az elektromos aktivitás megszűnése után 10^{-6} M izoprenalin hozzáadásával váltottuk ki a „lassú Ca^{2+} -akciós potenciálokat”. $2,3 \times 10^{-6}$ M RGH-2957 hatását 15 és 30 perces inkubálás után vizsgáltuk. A szignifikancia vizsgálatokat kétmintás „t”-teszttel végeztük.

1. táblázat

RGH-2957 hatása tengeri malac bal pitvar elektrofiziológiai paramétereire

		AP (mV)	RP (mV)	OS (mV)	APD (ms)			$V_{max} (v/s)$
					APD ₂₀	APD ₅₀	APD ₉₀	
Kontroll n=39	\bar{x} ±S.E.	99,0 1,25	78,5 0,74	20,5 1,22	23,7 2,5	43,6 3,14	64,2 3,66	141,8 5,00
2,3 μ mól/l RGH-2957 n=28	\bar{x}	90,8	75,4	15,4	26,9	48,9	73,7	103,6
	±S.E.	2,06	0,62	2,08	1,73	2,88	4,38	5,96
	%	91,7	96,0	75,4	113,7	112,2	114,8	73,0
	±S.E. p	2,08 0,001	0,80 0,005	10,16 0,05	7,31 n.sz.	6,60 n.sz.	6,83 n.sz.	4,20 0,001
11,6 μ mól/l RGH-2957 n=32	\bar{x}	93,0	78,2	14,8	30,3	51,2	81,7	63,9
	±S.E.	1,82	0,77	1,73	1,66	2,65	3,53	4,07
	%	93,9	99,6	72,5	127,8	117,6	127,2	45,1
	±S.E. p	1,84 0,01	0,98 n.sz.	8,43 0,01	7,02 0,025	6,06 n.sz.	5,50 0,005	2,86 0,001
23,3 μ mól/l RGH-2957 n=43	\bar{x}	85,8	76,6	9,2	30,0	49,2	82,8	34,2
	±S.E.	1,73	0,62	1,68	1,09	1,98	2,82	1,93
	%	86,6	97,5	45,0	126,5	112,9	128,9	24,1
	±S.E. p	1,75 0,001	0,79 n.sz.	8,18 0,001	6,91 0,01	4,53 n.sz.	4,39 0,001	1,36 0,001

AP = az akciós potenciál amplitúdó

RP = nyugalmi potenciál

OS = fordított potenciál

V_{max} = maximális depolarizációs sebesség

APD₂₀ = akciós potenciál időtartama 20%-os repolarizációig

APD₅₀ = akciós potenciál időtartama 50%-os repolarizációig

APD₉₀ = akciós potenciál időtartama 90%-os repolarizációig

Eredmények

1. RGH-2957 hatása tengeri malac preparátumokon

Az 1. táblázat mutatja az RGH-2957 különböző koncentrációinak hatását tengeri malac bal pitvarának akciós potenciál paramétereire. Mint látható, a vegyület elsődleges hatása a maximális depolarizációs sebesség, valamint a fordított potenciál értékének koncentráció-függő csökkentése. Az akciós potenciál amplitúdójának reduktója ez utóbbi hatásra vezethető vissza, mivel a nyugalmi potenciál értéke nem változik szignifikáns mértékben. Az akciós potenciál időtartamát csak nagyobb koncentrációkban prolongálja az RGH-2957, azonban nem találtunk egyértelmű dózishatás összefüggést.

A 2. táblázatban foglaltuk össze az RGH-2957 malac papilláris izom akciós potenciáljára kifejtett hatását. Kvalitatíve hasonló eredményeket kapunk, mint bal pitvaron, azonban a maximális depolarizációs sebességet és a fordított potenciált nagyobb mértékben csökkentette az RGH-2957 papilláris izmon. Az RGH-2957 papilláris izmon alacsony koncentrációban csaka repolarizáció kezdeti szakaszát lassítja (APD_{20}), míg nagyobb koncentrációkban a terminális repolarizáció időtartamát is megnövelte.

2. táblázat

RGH-2957 hatása tengeri malac papilláris izom elektrofiziológiai paramétereire

		AP (mV)	RP (mV)	OS (mV)	APD (ms)			V_{max} (v/s)
					APD_{20}	APD_{50}	APD_{90}	
Kontroll n=38	\bar{x} \pm S.E.	112,7 0,81	79,9 0,73	32,7 0,64	89,3 5,11	197,1 5,82	224,3 6,36	194,7 3,57
2,3 μ mól/l RGH-2957 n=38	\bar{x}	102,8	79,3	23,3	113,3	208,4	238,2	100,9
	\pm S.E.	1,70	0,54	1,48	7,16	4,70	4,50	2,82
	%	91,3	99,2	71,0	126,8	105,7	106,2	51,8
	\pm S.E.	1,53	0,68	4,51	7,38	2,40	2,01	1,45
	p	0,001	n.sz.	0,001	0,01	n.sz.	n.sz.	0,001
11,6 μ mól/l RGH-2957 n=35	\bar{x}	94,4	77,9	16,7	126,9	186,6	222,9	54,4
	\pm S.E.	1,70	0,63	1,72	5,46	8,00	6,66	2,14
	%	83,8	97,4	50,5	142,1	94,6	99,3	27,9
	\pm S.E.	2,26	0,74	5,26	5,14	3,17	3,74	5,76
	p	0,001	0,05	0,001	0,001	n.sz.	n.sz.	0,001
23,3 μ mól/l RGH-2957 n=32	\bar{x}	86,3	77,0	9,4	105,5	164,9	191,7	37,2
	\pm S.E.	2,15	0,72	1,88	3,97	5,91	6,30	2,27
	%	76,6	96,3	28,8	118,0	83,6	85,5	19,1
	\pm S.E.	1,89	0,79	5,76	4,45	2,81	2,81	1,17
	p	0,001	0,01	0,001	0,025	0,001	0,001	0,001

2. RGH-2957 hatása a sinus-csomó aktivitására

Nyúl jobb fülse sinus-csomójának pacemaker típusú akciós potenciálját kis amplitúdó, alacsony maximális diasztolés potenciál és lassú diasztolés depolarizáció jellemzi. A 3. táblázat mutatja $2,3 \times 10^{-6}M$ RGH-2957 hatását,

3. táblázat

RGH-2957 hatása nyúl sinus-csomó elektrofiziológiai paramétereire
(N = 6 kísérlet)

		AP	MDP	TP	SDD	Td	CL
		(mV)	(mV)	(mV)	(mV/s)	(ms)	(ms)
Kontroll	\bar{x} $\pm S.E.$	51,0 2,94	-55,5 2,63	-46,8 2,50	33,0 5,63	140,7 17,60	450,0 46,98
2,3 $\mu\text{mól/l}$ RGH-2957	\bar{x} $\pm S.E.$ % $\pm S.E.$ p	49,6 2,73 97,2 5,00 n.sz.	-53,6 2,13 96,6 4,21 n.sz.	-47,3 1,98 101,1 4,28 n.sz.	20,0 2,95 60,6 7,43 0,05	213,1 18,45 151,5 13,53 0,025	555,6 46,76 123,5 8,67 0,05

AP = akciós potenciál amplitúdó
MDP = maximális diasztolés potenciál
TP = küszöbpotenciál
SDD = lassú diasztolés depolarizáció
Td = akciós potenciál időtartama
CL = ciklus hossz

a sinus eredetű akciós potenciálokra. Mint látható, a vegyület megnöveli az akciós potenciál időtartamát és csökkenti a lassú diasztolés depolarizációt, ami a spontán sinus-frekvencia csökkenéséhez vezet.

Nem befolyásolja szignifikáns mértékben a küszöbpotenciál és a maximális diasztolés potenciál értékét, így a lassú diasztolés depolarizáció csökkenése azzal magyarázható, hogy hosszabb idő szükséges a küszöb potenciál eléréséhez.

3. RGH-2957 hatása K^+ -depolarizált papilláris izmon

25 mM K^+ -tartalmú Locke-oldatban a sejtek $-52,6 \pm 1,40$ mV-ra depolarizálódnak, és elektromos aktivitás még tízszeres küszöb feszültségű impulzusokkal sem váltható ki. $10^{-6}M$ izoprenalin hatására alacsony depolarizációs sebességű (V_{max}), nagy fordított potenciállal rendelkező „ Ca^{2+} -akciós potenciálok” keletkeznek. A 4. táblázatban tüntettük fel a $2,3 \times 10^{-6}M$ RGH-2957 „lassú akciós potenciálokra” kifejtett hatásait. Az eredmények azt mutatják, hogy a vegyülettel való 15 perces inkubálás hatására ezen akciós potenciálok amplitúdója, fordított potenciálja és depolarizációs sebessége

4. táblázat

RGH-2957 hatása a lassú „Ca²⁺-akciós potenciálokra tengeri malac papilláris izmon
(N = 6 kísérlet)

		AP	RP	OS	APD ₂₀	APD ₅₀	APD ₉₀	V _{max}
		(mV)	(mV)	(mV)	(ms)	(ms)	(ms)	(V/s)
Kontroll n=38	\bar{x} ±S.E. n=10	112,7 0,81	-79,9 0,73	32,7 0,64	89,3 5,11	197,1 5,82	224,3 6,36	194,7 3,57
25 mmól/l K ⁺ - Locke	\bar{x} ±S.E. n=18	—	-52,6 1,4	—	—	—	—	—
25 mmól/l K ⁺ + 1 μmól/l izoprenalin	\bar{x} ±S.E. n=10	72,8 1,45	-46,9 1,84	25,9 2,00	85,0 5,19	132,5 8,70	156,4 7,86	13,2 0,58
25 mmól/l K ⁺ + 1 μmól/l izo- prenalin + 2,3 μmól/l RGH-2957 15 perc	\bar{x} ±S.E. n=10	68,2 2,05	-52,2 3,19	16,0 3,24	106,5 4,41	148,5 7,19	175,0 7,03	8,0 0,73
25 mmól/l K ⁺ + 1 μmól/l izo- prenalin + 2,3 μmól/l RGH-2957 30 perc	\bar{x} ±S.E. n=10	—	-54,0 1,23	—	—	—	—	—
25 mmól/l K ⁺ + 2,3 μmól/l + 5 μmól/l izo- prenalin	\bar{x} ±S.E. n=10	68,4 1,78	-48,0 1,63	22,4 2,02	93,0 5,59	155,5 12,07	177,0 13,81	9,0 0,86

csökken, majd 30 percnyi inkubálás után az RGH-2957 teljesen megszüntet az akciós potenciálokat. Ilyen körülmények között az izoprenalin koncentrációjának növelésével (5×10^{-6} M) az elektromos aktivitás ismét kiváltható.

Megbeszélés

Néhány évvel ezelőtt állapították meg, hogy a szívizomsejtekben 2 fajta depolarizáló ionáram különböztethető meg; a Na⁺-ionok által mediált gyors depolarizáló áram, melyet a kinidin és más, 1. osztályba sorolt antiaritmiás szerek gátolnak (Vaughan Williams 1970), és a főleg Ca²⁺-ion vándorlásnak tulajdonított lassú depolarizáló áram, melyre a Ca²⁺-antagonista vegyületek

(4. osztály) fejtettek ki inhibitor hatást (*Singh és Vaughan Williams 1972*). Eredményeink azt mutatják, hogy az RGH-2957 $2,3 \times 10^{-6}$ – $2,3 \times 10^{-5}$ M koncentráció intervallumban koncentrációtól függő mértékben csökkenti az akciós potenciál amplitúdó, a fordított potenciál és a maximális depolarizációs sebesség nagyságát, elektromosan ingerelt bal pitvaron és papilláris izmon, hasonlóan a helyi érzéstelenítő tulajdonsággal rendelkező antiaritmiás vegyületekhez. *Weidmann (1955)* kimutatta, hogy a local-anesztetikumok hatása az akciós potenciál gyors depolarizációjáért felelős Na^+ -ionok beáramlásának gátlására vezethető vissza.

Korábbi kísérleteink szerint az RGH-2957 a lidocainhoz hasonló mértékű helyi érzéstelenítő hatással rendelkezik béka idegen. Vegyületünket hatékonyabbnak találtuk a V_{\max} csökkentésében papilláris izmon, mint bal pitvaron. Ezzel összhangban áll az a tény is, hogy a vezetési időt — mely szintén a helyi érzéstelenítő tulajdonság mértékeként tekinthető szívizmon (*Szekeres és Papp 1971*) — nagyobb mértékben prolongálta kamrai preparátumon, mint bal pitvaron. Valószínűleg a vegyület membrán depresszív hatásával magyarázható, hogy az RGH-2957 megnövelte az akciós potenciál időtartamát bal pitvaron, illetőleg a repolarizáció kezdeti szakaszát papilláris izmon.

Az akciós potenciál fordított potenciálja kapcsolatban áll a lassú „ Ca^{2+} -csatornák” aktivitásával (*Kelemen 1981*). Mivel az RGH-2957 dóziszfüggően csökkentette a fordított potenciál értéket, érdemesnek tartottuk megvizsgálni, hogyan hat vegyületünk a lassú „ Ca^{2+} -akciós potenciálokra”. Az irodalmi adatoknak megfelelően 25 mM K^+ -mal depolarizált preparátumon — ahol a gyors Na^+ -csatornák blokkoltak — izoprenalin helyreállítja az ingerlékenységet „lassú válasz” formájában. A katekolaminok ezen hatását azzal magyarázzák, hogy megnövelik a rendelkezésre álló lassú Ca^{2+} -csatornák számát a szívizomsajt membránban (*Pappano 1970, Shigenobu és Sperelakis 1972*).

Az RGH-2957 alacsony koncentrációban ($2,3 \times 10^{-6}$ M) gátolja a lassú Ca^{2+} -akciós potenciálokat, jelezve, hogy a vegyület befolyásolja a depolarizáció lassú mechanizmusát is. Alátámasztja ezt a megfigyelést az a tény is, hogy az RGH-2957 a Verapamilhoz hasonló Ca^{2+} -antagonista tulajdonsággal rendelkezik (*Paróczai és mtsai, közlés alatt*).

A sinus-csomó pacemaker típusú akciós potenciáljában szerepet tulajdonítanak a „lassú csatornákon keresztül” végbemenő Na^+ - és Ca^{2+} -ionok által mediált depolarizáló áramoknak (*Lenfant és mtsai 1972*), illetve a repolarizáció során fellépő késői kifelé irányuló K^+ -ionok által mediált áramoknak. A sinus akciós potenciál depolarizációs sebességének csökkenése — melyet az RGH-2957 jelenlétében megfigyeltünk — további bizonyíték arra, hogy vegyületünk befolyásolja a lassú csatornákon keresztül történő ionáramlásokat. Az RGH-2957 sinus eredetű akciós potenciálokra kifejtett hatása hasonló a Verapamillal pacemaker típusú sejteken végzett kísérletek eredményeihez (*Wit és Cranefield 1974*). Másrészt, a sinus akciós potenciál időtartamának

prolongálása, és a lassú diasztolés depolarizáció csökkentése arra utal, hogy az RGH-2957 hatással lehet a repolarizációért felelős ionáramokra is. Ez utóbbi mechanizmussal magyarázzák a propranolol (*Goupil és Lenfant* 1976) és a droperidol (*Dorticos és Garcia-Barreto* 1979) hatását is.

Összegezve: az eredmények azt mutatják, hogy az RGH-2957 mind a gyors, mind a lassú depolarizáció mechanizmusát befolyásolja és antiaritmiás aktivitása e hatásokra vezethető vissza.

Összefoglalás

Kimutattuk, hogy az antiaritmiás hatású RGH-2957 ($2,3 \times 10^{-6}$ – $2,3 \times 10^{-5}$ M) koncentrációtól függően csökkenti a transzmembrán akciós potenciál maximális depolarizációs sebességét izolált tengeri malac szív elektromosan ingerelt bal pitvarán és papilláris izmán, mely utóbbin hatása kifejezettebb. Nem befolyásolja a nyugalmi potenciál értékét és csak a repolarizáció kezdeti szakaszát prolongálja mindkét preparátumon szignifikáns mértékben.

25 mM K^+ -mal depolarizált papilláris izmon az izoprenalinnal kiváltott „ Ca^{2+} -akciós potenciálokat” $2,3 \times 10^{-6}$ M koncentrációban az RGH-2957 először gátolja, majd teljesen megszünteti.

A sinus-csomó akciós potenciáljának időtartamát az RGH-2957 megnyújtja, ugyanitt a lassú diasztolés depolarizáció sebességét csökkenti, mely a spontán frekvencia csökkenéséhez vezet.

IRODALOM

- Dorticos, F. R. és Garcia-Barreto, D.:* Arch. int. Pharmacodyn. **240**, 137 (1979).
Goupil, N. és Lenfant, J.: Europ. J. Pharmacol. **39**, 23 (1976).
Kelemen, K.: TIPS **2**, 101 (1981).
Lenfant, I., Mironnean, I. és Aka, I. K.: J. Physiol. (Paris) **64**, 5 (1972).
Pappano, A.: Circ. Res. **27**, 379 (1970).
Paróczai M., Kárpáti E. és Kelemen K.: Orvostudomány, **33** (1982).
Shigenobu, K. és Sperelakis, N.: Circ. Res. **31**, 932 (1972).
Singh, B. N. és Vaughan Williams, E. M.: Cardiovasc. Res. **9**, 69 (1972).
Szekeres, L. és Papp, I. Gy.: Experimental arrhythmic and antiarrhythmic drugs. Akadémiai Kiadó, Budapest, p. 287 (1971).
Vaughan Williams, S. M.: In: Symposium on Cardiac Arrhythmias (Ed.: E. Sandoe, E. Flensted-Jensen, K. K. Oleson). (AB. Astra. Sodertälje, Sweden), p. 449 (1970).
Weidmann, S.: J. Physiol. **129**, 568 (1955).
Wit, A. L. és Cranefield, P. F.: Circ. Res. **35**, 413 (1974).