

A rofecoxib rejtett kardiotoxikus hatásának vizsgálata ex vivo és in vitro iszkémia/reperfúziós modellekben

Kiss Bernadett¹, Brenner Gábor¹, Huszt Zoltán², Varga Richárd Sándor², Makkos András¹, Baczkó István², Görbe Anikó¹, Gircz Zoltán¹, Varró András², Ferdinandy Péter¹

¹Semmelweis Egyetem, AOK Farmakológiai és Farmakoterápiás Intézet, Budapest
²Szegedi Tudományegyetem AOK Farmakológiai és Farmakoterápiás Intézet, Szeged

Kulcsszavak: rejtett kardiotoxikus hatás, szimulált iszkémia/reperfúzió, szívizomsejt, papillaris izom

A gyógyszerek piacról történő visszavonásának 60%-aért, a kardiális iszkémias eseménnyel összefüggő gyógyszer-mellékhatások felelősek. Ezen mellékhatások összességét, melyek csak a már károsodott szívben nyilvánulnak meg, mint például az iszkémia/reperfúziós károsodás (IRK), nevezzük a gyógyszerek rejtett kardiotoxikus hatásának. Azonban ezen mellékhatásokra a jelenleg alkalmazott gyógyszerbiztonsági vizsgálatok során nem derül fény. Jelen munkánkban célul tűztük ki, hogy az IRK ex vivo és in vitro modelleiben mutassuk ki egy teszt molekula, a nem-steroid gyulladáscsökkentő rofecoxib rejtett kardiotoxikus hatását. Ex vivo vizsgálatainkban him Wistar patkányok szívéből izolált papillaris izomrostok akciós potenciál paramétereit vizsgáltuk meg. A preparátumokat 1 és 10 μ M rofecoxibbal és annak vívőanyagával kezeltük normoxiás és szimulált iszkémia/reperfúziós (sI/R) rendszerben. In vitro kísérleteinket felnőtt him Wistar patkányokból izolált kardiomiocitákon végeztük. A sejteket 0,1, 0,3, 1, 3 és 10 μ M rofecoxibbal vagy vívőanyagával előkezeltük, majd normoxiás és sI/R körülményeknek tettük ki a sejteket. Végül a szívizomsejtek életképességét calcein festéssel határoztuk meg.

Papillaris izmokban a rofecoxib előkezelés sI/R jelenlétében dóziszfüggő módon növelte az akciós potenciál hosszát 90%-os repolarizációnál a szimulált reperfúzió végére. Felnőtt patkány kardiomiocita sejtkultúrákban a rofecoxib előkezelés növelte a sejtek életképességét mind normoxiás mind sI/R körülmények között. Kimutattuk, hogy a rofecoxib rejtett kardiotoxikus hatással rendelkezik, nyújtotta az akciós potenciál hosszát sI/R-t követően. Izolált szívizomsejteken azonban a hatóanyag protektívnek bizonyult. Eredményeink alapján elmondható, hogy sI/R protokoll alkalmazásával kimutatható a gyógyszerek rejtett kardiotoxicitása, de ezen hatások nem minden modellben jelentkeznek.

Investigation of the hidden cardiotoxic effect of rofecoxib in ex vivo and in vitro simulated ischemia/reperfusion models

Bernadett Kiss¹, Gábor Brenner¹, Zoltán Huszt², Richárd Sándor Varga², András Makkos¹, István Baczkó², Anikó Görbe¹, Zoltán Gircz¹, András Varró², Péter Ferdinandy¹

¹Semmelweis University, Department of Pharmacology and Pharmacotherapy, Budapest

²Department of Pharmacology and Pharmacotherapy, Albert Szent-Györgyi Clinical Center, University of Szeged, Szeged

Keywords: hidden cardiotoxic effect, simulated ischemia/reperfusion, cardiomyocyte, papillary muscle

Side effects of drugs related to myocardial ischemia are responsible for 60% withdrawal of drugs from the market. Side effects, which observed only in the already damaged heart, like ischemia/reperfusion injury (IRI), are named as the hidden cardiotoxic effect of drugs. However, currently used drug safety tests are not suitable for exploration of these side effects. The aim of present study was to detect the possible hidden cardiotoxic effect of rofecoxib, a non-steroid anti-inflammatory test drug in IRI models ex vivo and in vitro.

Action potential parameters of papillary muscles isolated from male Wistar rats were tested ex vivo. Preparations are treated with 1 and 10 μ M rofecoxib and its vehicle in normoxia and simulated ischemia-reperfusion (sI/R). Cardiomyocytes isolated from male Wistar rats were tested in vitro. The cells were pre-treated with 0,1, 0,3, 1, 3 and 10 μ M of rofecoxib and its vehicle and then the cells were exposed to normoxic and sI/R conditions. Viability of the cells was determined by calcein assay.

In papillary muscles, the rofecoxib pretreatment in sI/R prolonged the action potential at 90% of repolarization by the end of simulated reperfusion in a dose-dependent manner. Rofecoxib pretreatment increased the viability of the cells in adult rat cardiomyocyte cultures both in normoxic and in sI/R conditions.

We have shown that rofecoxib has hidden cardiotoxic effect, as it prolonged the action potential after sI/R. The agent was protective in isolated cardiomyocytes. According to our results, the hidden cardiotoxic effects of drugs can be detected by using sI/R protocol, however, these effects cannot be observed in each models.

A késői egyenirányító káliumáram lassú komponensének szabályozása a szívizom adrenerg adaptációja során

Kiss Dénes Zsolt¹, Kurtán Bettina¹, Veress Roland¹, Baranyai Dóra¹, Kovács Zsigmond¹, Dienes Csaba Bálint¹, Szentandrassy Norbert², Bányász Tamás¹, Magyar János³, Nánási Péter Pál², Horváth Balázs¹

¹Debreceni Egyetem, Általános Orvostudományi Kar, Élettani Intézet

²Debreceni Egyetem, Fogorvostudományi Kar, Fogorvosi Élettani és Gyógyszer-tani nem önálló Tanszék

³Debreceni Egyetem, Általános Orvostudományi Kar, Élettani Intézet, Sportélettani Tanszék, Debrecen

Kulcsszavak: késői egyenirányító káliumáram, adrenerg adaptáció, elektrofiziológia

Bevezetés és célkitűzés: A β -adrenerg receptorok (β -AR) akut stimulációjának hatására a kamrai szívizomsejtek akciós potenciálja (AP) rövidül. Ezt a hatást a káliumáramok β -adrenerg jelátviteli út általi szabályozása okozza. Célunk az volt, hogy megvizsgáljuk a proteinkináz A (PKA) és a kalcium/kalmodulin-függő proteinkináz II (CaMKII) szerepét akései egyenirányító káliumáram lassú komponensének (IKs) β -AR aktiválás hatására bekövetkező szabályozásában.

Módszerek: Kísérleteinket kutyák bal kamrájából származó izolált szívizomsejteken végeztük. Az IKs áramprofilját egy kanonikus kamrai AP alatt határoztuk meg, ún. AP feszültség clamp körülmények között, öt kísérleti csoportban.

[1] Tyrode oldat (CTRL),
[2] 10 nM isoproterenollal történt β -AR stimuláció után (ISO),
[3] 1 μ M KN-93-mal történt CaMKII gátlás (KN-93),
[4] gátolt CaMKII mellett β -AR stimuláció (KN-93+ISO),
[5] 3 μ M H-89-cel gátolt PKA mellett β -AR stimuláció (H-89+ISO).

Eredmények: Az IKs legnagyobb áramsűrűsége kb. 6-szor, míg az IKs által szállított töltés mintegy 8-szor akkora volt az ISO csoportban, mint CTRL vagy KN-93 körülmények között. A KN-93+ISO csoportban az IKs mintegy 60%-kal kisebb amplitúdójú volt és nagyjából feleannyi töltést szállított, mint az ISO csoportban. A H-89+ISO csoportban az IKs nagyjából 30%-kal kisebbnek adódott és 40%-kal kevesebb töltést szállított, mint az ISO csoportban. Megfigyeltük továbbá, hogy β -AR stimuláció hatására az IKs az AP során mintegy 40 ms-mal korábban érte el a legnagyobb áramsűrűségét, mint kontrollkörülmények között. Az áramcsúcs korábbra tolódását mind a PKA, mind a CaMKII gátlása mérsekelte.

Összegzés: Eredményeink alapján a PKA mellett a CaMKII is fontos szerepet játszik az IKs β -AR stimuláció hatására bekövetkező szabályozásában. Az Emberi Erőforrások Minisztériuma UNKP-18-2 és UNKP-18-4 kódszámú Új Nemzeti Kiválóság Programjának támogatásával készült.

Regulation of the delayed rectifier potassium current during the adrenergic adaptation of cardiomyocytes

Dénes Zsolt Kiss¹, Bettina Kurtán¹, Roland Veress¹, Dóra Baranyai¹, Zsigmond Kovács¹, Csaba Bálint Dienes¹, Norbert Szentandrassy², Tamás Bányász¹, János Magyar³, Péter Pál Nánási², Balázs Horváth¹

¹Faculty of Medicine, University of Debrecen, Department of Physiology

²University of Debrecen, Faculty of Dentistry, Department of Dental Physiology and Pharmacology

³Faculty of Medicine, University of Debrecen, Department of Physiology, Division of Sport Physiology, Debrecen

Keywords: delayed rectifier potassium current, adrenergic adaptation, electrophysiology

Adaptation of the human heart to physical activity is a complex mechanism that includes the change of heart rate, morphology and duration of the action potential (AP) among others. Stimulation of β -adrenergic receptors (β -AR) causes the shortening of the duration of the AP of ventricular cardiomyocytes. This effect is caused by the regulation of the potassium currents by the β -adrenergic signaling pathway.

Our aim was to investigate the role of protein kinase A (PKA) and calcium/calmodulin-dependent protein kinase II (CaMKII) in the regulation of the slow component (IKs) of the delayed rectifier potassium current under β -AR activation. Our experiments were performed on isolated canine cardiomyocytes from the left ventricle. The IKs current profile was determined under a "canonical" ventricular AP. We used "AP voltage clamp" conditions in five experimental groups:

[1] Tyrode Solution (CTRL),
[2] after β -AR stimulation with 10 nM isoproterenol (ISO),
[3] CaMKII inhibition with KN-93 of 1 μ M (KN-93),
[4] β -AR stimulation with inhibited CaMKII (KN-93 + ISO),
[5] β -AR stimulation with 3 μ M H-89 inhibited PKA (H-89 + ISO).

The highest current density of IKs was approximately 6 times higher and the charge delivered by IKs was about 8 times larger in the ISO group than in CTRL or KN-93 conditions. In the KN-93 + ISO group, IKs amplitude was about 60% smaller and delivered about half the total charge compared to the ISO group. In the H-89+ISO group, IKs was about 30% smaller and delivered 40% less total charge than in the ISO group. It was also observed that β -AR stimulation resulted in IKs reaching its highest current density by about 40 ms earlier during the AP than under control conditions. This shift of the current peak was reduced by both PKA and CaMKII inhibition.

Based on our results, CaMKII plays an important role in regulating IKs by β -AR stimulation.

Supported by the UNKP-18-2 and UNKP-18-4 New National Excellence Program of the Ministry of Human Capacities.

A fizikai edzés hatására létrejövő pitvari remodelláció vizsgálata sportszív kisállatmodelljében

Oláh Attila¹, Barta Bálint András¹, Sayour Alex Ali¹, Urbán Edina², Virág-Tulassay Eszter¹, Ruppert Mihály¹, Merkely Béla³, Radovits Tamás³

¹Semmelweis Egyetem, Városmajori Szív- és Érgyógyászati Klinika, Kardiológia, Budapest

²Semmelweis Egyetem, Városmajori Szív- és Érgyógyászati Klinika, Budapest

Kulcsszavak: sportszív, in vivo elektrofiziológia, pitvari effektív refrakter periódus, pitvari remodeláció

Bevezetés: Habár a rendszeres fizikai edzés számos kardiovaszkuláris előnnyel jár, a hosszú ideig tartó, intenzív testedzés által a pitvarban létrejövő változások nem egyértelműek. Céltűzésünk volt a hosszú távú fizikai edzés által okozott pitvari remodeláció jellemzését adni mindkét nemből, sportszív patkánymodelljén.

Módszerek: Patkányainkat nőstény edzett (NE), nőstény kontroll (NKO), him edzett (HE) és him kontroll- (HKO) csoportra osztottuk. Az edzett állatok 12 héten át rendszeres úszóedzést végeztek, majd szivultrahangos vizsgálatot végeztünk a bal pitvari változások leírása céljából. In vivo pitvari elektrofiziológiai vizsgálatot végeztünk, majd pitvari génexpressziós vizsgálatokat végeztünk.

Eredmények: A post-mortem mért pitvari izomtömeg adatok jelentős hipertrofiát igazoltak (tibiahosszra normalizált pitvari tömeg: 18.6 ± 2.7 g/cm NE, 10.3 ± 1.0 g/cm NKO, 23.7 ± 2.2 g/cm HE, 15.8 ± 1.9 g/cm HKO), az echokardiográfiás vizsgálatok során enyhe mértékű pitvari dilatáció és a kontrakció javulása volt megfigyelhető mindkét nemből. A testedzés hatására bradikardia és a P-hullám megnagyobbodása mellett a jobb pitvari effektív refrakter periódus megnyúlása volt megfigyelhető. A sinuscsomó helyreállási idő nem mutatott változást, valamint nem tudtunk kiváltani jelentős számú ritmuszavart pitvari ingerléssel egyik csoportban sem. Az antioxidáns enzimek (NOX2, SOD2) pitvari génexpressziója emelkedett mindkét nemből. A jelentős mértékű pitvari hipertrofia ellenére a patológiás remodelációra jellemző (ANF), valamint a proinflammatorikus (TNF α) és profibrotikus (TGF β) markerek sem mutattak változást. Emellett a pitvari depolarizációt és repolarizációt jellemző ioncsatornák kifejeződésének változásait találtuk.

Következtetések: Adataink arra utalnak, hogy a rendszeres fizikai edzés által kialakuló pitvari hipertrofia nem jár körös elektromos átépüléssel, valamint az oxidatív stressz ellenére gyulladáshoz vagy profibrotikus válaszreakció nem mutatkozik.

Investigation of atrial remodeling induced by exercise training in a rodent model of athlete's heart

Attila Oláh¹, Bálint András Barta¹, Alex Ali Sayour¹, Edina Urbán², Eszter Virág-Tulassay¹, Mihály Ruppert¹, Béla Merkely², Tamás Radovits²

¹Semmelweis University, Heart and Vascular Center, Cardiology, Budapest

²Semmelweis University, Heart and Vascular Center, Budapest

Keywords: athlete's heart, in vivo electrophysiology, atrial effective refractory period, atrial remodeling

Purpose Although regular exercise training is associated with cardiovascular benefits, the atrial alterations induced by long-term physical exercise still need to be elucidated. We aimed at investigating exercise-induced atrial remodeling in a rat model of athlete's heart and determining sex-specific differences.

Methods Age-matched young adult rats were divided into female exercised (FEx), female control (FCo), male exercised (MEx) and male control (MCo) groups. After exercised animals completed a 12-week-long swim training protocol, echocardiography was used to describe atrial alterations. In vivo electrophysiologic investigation was performed by programmed stimulation with an octapolar catheter inserted into the right atrium and atrial gene expression analysis was carried out.

Results: Post-mortem atrial weight data confirmed marked atrial hypertrophy (atrial weight to tibial length: 18.6 ± 2.7 g/cm FEx, 10.3 ± 1.0 g/cm FCo, 23.7 ± 2.2 g/cm MEx, 15.8 ± 1.9 g/cm MCo), while echocardiography data showed slight atrial dilatation and improved contraction in both exercised groups. Exercise-training was associated with bradycardia, P-wave enlargement and prolonged right atrial effective refractory period (RAERP). Sinus node recovery time (SNRT) did not differ between groups and we could not induce significant number of arrhythmias by programmed stimulation in any groups. We found increased atrial gene expression of antioxidant enzymes (NOX2, SOD2) in both genders. Despite the marked atrial hypertrophy, no gene expression alteration was found regarding markers that describe pathological remodeling (ANF), proinflammatory (TNF α) and profibrotic (TGF- β , MMP-2) processes. We found altered expression of ion channels participating in atrial depolarization and repolarization.

Conclusions Our data suggests that exercise-induced atrial hypertrophy is not associated with harmful electrical remodeling and no inflammatory or profibrotic response was observed in the atrium of exercised rats.

Az Na/Ca kicserélő szerepe a Ca²⁺-vezérelt alternánsok kialakulásában kutya és humán miokardiumban

Szlovák Jozefina¹, Tóth Noémi¹, Gazdag Péter¹, Prorok János¹, Kohajda Zsófia¹, Pollesello Piero², Papp Gyula¹, Varró András¹, Nagy Norbert¹

¹Szegedi Tudományegyetem ÁOK Farmakológiai és Farmakoterápiai Intézet, Szeged

²Orion Pharma, Espoo, Finland

Kulcsszavak: Alternáns, akciós potenciál, ORM-10962, Ca-transziens

Ca²⁺-vezérelt alternánsoknak nevezzük az akciós potenciál (AP) hosszának (APD) és a Ca²⁺ felszabadulások amplitúdójának parallel oszcillációját, amelynek hátterében az APD restitúciót és a Ca²⁺ homeosztázis instabil működését feltételezzük. Kiemelt jelentőségű lehet a mechanizmusban a szarkolemma Na⁺/Ca²⁺ kicserélője (NCX) amely kapcsolatot teremt a membránpotenciál változások és a Ca²⁺ ciklus között. Ennek direkt vizsgálata azonban eddig nehézségekbe ütközött megfelelően szelektív gátlószert hiányában. Kísérleteink célja, az NCX szerepének megismerése az alternánsok folyamatában, illetve az esetleges terápiás alkalmazás lehetőségének becslése egy új, szelektív NCX gátlószert az ORM-10962 segítségével kutya és humán szívműködésben.

Az AP mérés konvencionális mikroelektrodd technikával segítségével történt, az ionáramokat patch-clamp technikával detektáltuk, míg az intracelluláris Ca²⁺-transziensek fluoreszcens optikai módszerrel rögzítettük.

Az APD értékek kutyá és humán szívműködésben egyaránt jelentős alternálást mutáltak 250 ms-nál gyorsabb frekvenciákon, amelyet 1 μ M ORM-10962 alkalmazása jelentősen gátolt. Izolált sejteken a magas frekvenciájú, de nem alternáló AP parancsjel nem okozta a Ca²⁺-felszabadulások alternálását, azonban az alternáló AP parancsjel jelentős ionáram és Ca²⁺-felszabadulás alternálást okozott amelyet a szelektív NCX gátlás szignifikánsan csökkentett.

Kísérleti elrendezésünkben a Ca²⁺-felszabadulások és az APD alternálását az oszcilláló diasztolés intervallum miatt létrejövő alternáló forward NCX és L-típusú Ca²⁺ áram (ICaL) okozta. A szelektív NCX gátlás a forward áram csökkentésével, és a magasabb intracelluláris Ca²⁺ miatt létrejövő szupresz-száll ICaL áram révén csökkentette az influx-efflux egyensúlyt és szignifikánsan csökkenti az APD alternálás mértékét. Ezért a preventív alkalmazott szelektív NCX gátlás csökkenti az APD alternálás talaján kialakult ritmuszavarok incidenciáját.

The role of Na/Ca exchanger in the Ca-governed alternants in dog and human myocardium Abstract:

Jozefina Szlovák¹, Noémi Tóth¹, Péter Gazdag¹, János Prorok¹, Zsófia Kohajda¹, Piero Pollesello², Gyula Papp¹, András Varró¹, Norbert Nagy¹

¹Department of Pharmacology and Pharmacotherapy, Albert Szent-Györgyi

Clinical Center, University of Szeged, Szeged

²Orion Pharma, Espoo, Finland

Keywords: Alternants, action potential, ORM-10962, Ca-transient

The Ca²⁺-governed alternants means a parallel oscillation of the action potential duration

(APD) and the Ca²⁺ transient amplitude. The underlying mechanisms could be the restitution properties of the APD and intracellular Ca²⁺ mismanagement. The Na⁺/Ca²⁺ exchanger (NCX) provides an important link between the membrane potential changes and Ca²⁺ cycle therefore may have significant role in this mechanism. However, direct experiments have been hampered so far because of the lack of an appropriately selective NCX inhibitor. We aimed to characterize the role of NCX in the mechanism of alternants and to estimate the potential therapeutic potential of selective NCX inhibition by using a novel inhibitor ORM-10962 in canine and human ventricular myocytes.

The APs were measured by conventional microelectrode technique, the ionic currents were monitored by the patch-clamp technique while intracellular Ca²⁺ movements were recorded with fluorescent optical methods.

The APs showed considerable APD alternants in frequencies faster than 250 ms, which were markedly suppressed after application of 1 μ M ORM-10962. In isolated cells, high frequency but not alternating action potential as a command potential was unable to cause oscillation of the Ca²⁺ releases. However, the alternating AP signal resulted marked oscillation of ion currents and Ca²⁺ releases, which were suppressed by selective NCX inhibition.

In our study the alternation of APD and Ca²⁺ releases are primarily initiated by the oscillation of the forward NCX and the L-type Ca²⁺ current (ICaL) via the alternating diastolic interval. Selective inhibition of NCX reduces the forward NCX current, thus increases the intracellular Ca²⁺ level which suppresses the ICaL. As a result, decreases the influx-efflux imbalance which significantly reduces the alternation rate of APD. Therefore preventive application of selective NCX inhibition may be able to suppress the arrhythmia incidence based on APD alternants.

A BAPTA kalcium kelátor sejtpermeabilis acetoxi-metilészter (BAPTA-AM) formájának hatása az akciós potenciál időtartamára kutya kamrai szívműködésben

Veress Roland¹, Szentandrassy Norbert², Baranyai Dóra¹, Kistamás Kornél¹, Dienes Csaba Bálint¹, Hézsó Tamás¹, Magyar János¹, Bányász Tamás¹, Nánási Péter Pál¹, Horváth Balázs¹

¹Debreceni Egyetem, Általános Orvostudományi Kar, Élettani Intézet

²Debreceni Egyetem, Fogorvostudományi Kar, Fogorvosi Élettani és Gyógyszer-tani nem önálló Tanszék

³Debreceni Egyetem, Általános Orvostudományi Kar, Élettani Intézet, Sportélettani Tanszék, Debrecen

Kulcsszavak: BAPTA-AM, intracelluláris kalcium, kalcium kelátor

A sejtszintű vizsgálatokban az intracelluláris kalciumkoncentrációt ([Ca²⁺]_i) gyakran pufferezzük a BAPTA kalcium kelátor sejtpermeabilis acetoxi-metilészter (BAPTA-AM) formájának alkalmazásával, azonban kevés adat áll rendelkezésünkre a BAPTA-AM közvetlen elektrofiziológiai hatásairól. Ezért vizsgálatunk célja az extracellulárisan alkalmazott BAPTA-AM szívműködésben akciós potenciál időtartamára (APD) gyakorolt hatásainak vizsgálata volt.

Kísérleteinket enzimatikusan izolált kutya kamrai myocytákban végeztük. Az akciós potenciálokat hegyes mikroelektroddá technikával rögzítettük. A BAPTA-AM késői egyenirányító káliumáram gyors komponensére (IKr) kifejtett hatását hagyományos feszültség-clamp (VC) és akciós potenciál feszültség-clamp (APVC) technikák alkalmazásával vizsgáltuk.

Az APD BAPTA jelenlétében nem változott szignifikánsan, míg 5 μ M BAPTA-AM megnyújtotta és az A23187 kalcium ionofor rövidítette időfüggő módon. A BAPTA-AM APD meghosszabbító hatása nisoldipin jelenlétében erősen csökkent, és