

Bestudering van de effecten van calciumantagonisten tijdens ischemie en reperfusie met behulp van NMR

T.J.C. Ruigrok,^{a,b} C.J.A. van Echteld,^a J.H. Kirkels,^a C. Borst,^b F.L. Meijler.^{a,b}

^a *Interuniversitair Cardiologisch Instituut Nederland;* ^b *Afdeling Cardiologie, Academisch Ziekenhuis, Utrecht*

Inleiding

Het principe van kernspinresonantie of NMR (nuclear magnetic resonance) wordt al meer dan 30 jaar in de chemie gebruikt bij de opheldering van moleculaire structuren en processen. De laatste jaren wordt NMR in toenemende mate ook in het medisch wetenschappelijk en diagnostisch onderzoek toegepast, waarbij een onderscheid gemaakt dient te worden tussen MRS (magnetic resonance spectroscopy) en MRI (magnetic resonance imaging). Bij beide toepassingen wordt door middel van radiogolven op non-destructieve en non-invasieve wijze informatie verkregen over lokale dichtheid en eigenschappen van bepaalde atoomkernen in biologisch materiaal dat zich in een sterk magneetveld bevindt. Met MRI worden afbeeldingen van weefsels en organen verkregen; MRS daarentegen levert een biochemische analyse van het onderzochte materiaal in de vorm van een spectrum.

Veel soorten atoomkernen gedragen zich als kleine staafmagneetjes, die zich in een sterk magneetveld op twee manieren kunnen richten: parallel of antiparallel aan het veld. Door een radiogolfpuls kunnen overgangen tussen deze twee oriëntaties tot stand gebracht worden. Na zo'n radiogolfpuls keren de kernen terug naar hun evenwichtssituatie en zenden daarbij ook weer radiogolven uit. De frequentie waarbij dit resonantieproces bij een bepaalde sterkte van het magneetveld plaatsvindt, hangt af van het soort atoomkern, bijvoorbeeld ^1H , ^{13}C of ^{31}P . De exacte resonantiefrequentie van een bepaald soort atoomkern, bijvoorbeeld ^{31}P , hangt af van de chemische omgeving van de kern. Deze voor de MRS belangrijke eigenschap staat bekend als de

chemische verschuiving (chemical shift). De relatief kleine verschillen in resonantiefrequentie die hierbij optreden, maken het mogelijk een biochemische analyse uit te voeren. Zo kunnen in een ^{31}P -NMR-spectrum van bijvoorbeeld een hart een aantal chemisch verschillende fosforkernen worden onderscheiden, zoals anorganisch fosfaat (P_i), creatinefosfaat (CP) en de drie fosfaatgroepen van adenosinetrifosfaat (ATP), die ieder als een afzonderlijke resonantiepiek in een frequentiespectrum voorkomen. Veranderingen van de pH kunnen ook aanleiding geven tot een verschuiving van de resonantiefrequentie, omdat binding van een waterstofion aan een fosfaatgroep de chemische omgeving van de fosforkern verandert. Andersom kan uit de resonantiefrequentie van bijvoorbeeld P_i de intracellulaire pH worden berekend. Een ander belangrijk gegeven is dat het NMR-signaal recht evenredig is met het aantal kernen dat zich in het detectiegebied bevindt. Dit laatste gegeven in combinatie met de chemische verschuiving stelt ons in staat om bijvoorbeeld in een geïsoleerd hart continu intracellulaire metaboliet-concentraties en pH vast te stellen. [1]

Ischemie van het hart heeft tot gevolg dat de concentraties van de energierijke fosfaten en de intracellulaire pH dalen. ^{31}P -NMR-spectroscopie is reeds een waardevol hulpmiddel gebleken om het effect van medicamenten zoals calciumantagonisten op de energiehuishouding van de hartspier tijdens ischemie en reperfusie te bestuderen. [2-5] Door ons werden de effecten van diltiazem tijdens ischemie en reperfusie bestudeerd in het geïsoleerde, volgens Langendorff geperfundeerde hart.

Methode

Geïsoleerde harten van Wistar ratten werden volgens Langendorff geperfundeed bij een constante druk van 75 mm Hg. Het perfusaat had de volgende samenstelling (mmol/l): NaCl, 124; KCl, 4,7; CaCl_2 , 1,3; MgCl_2 , 1,0; NaHCO_3 , 24,0; Na_2HPO_4 , 0,5; glucose, 11,0. Na verzadiging van het perfusaat met 95% O_2 en 5% CO_2 bedroeg de pH $7,35 \pm 0,05$ bij 37°C . De hartfrequentie bedroeg 300 slagen/ minuut. Hiertoe werd de rechter ventrikel via KCl-wick electrodes door een Grass S88 gestimuleerd. De mechanische activiteit werd continu geregistreerd met behulp van een dunne plastic catheter die door de apex in de linker ventrikel werd gebracht. [6]

Na 30 minuten controle perfusie werden de harten gedurende 30 minuten totaal ischemisch gemaakt en tenslotte gedurende 30 minuten gereperfundeed. De temperatuur van het hart werd gedurende het gehele experiment op 37°C gehouden. In de helft van de experimenten werd diltiazem (5×10^{-6} mol/l

1) gedurende de laatste 10 minuten voor ischemie aan het perfusaat toegevoegd.

Aan het begin van een experiment werden de harten in een glazen buis gebracht, die vervolgens in het magnetisch centrum van een 4,7 Tesla supergeleidende magneet werd geplaatst. ^{31}P -NMR-spectra (81,0 MHz) werden continu verkregen op een Bruker MSL 200 spectrometer. De spectra werden gedurende vijf minuten uit 128 scans verkregen. Intra- en extracellulaire pH werden berekend aan de hand van de chemische verschuiving van de P_i -pieken. Bij de berekening werd een titratiecurve gebruikt die gemaakt was met behulp van een oplossing van ATP (10 mmol/l), CP (10 mmol/l), P_i (10 mmol/l), NADPH (10 mmol/l), glucose-6P (10 mmol/l) en MgCl_2 (10 mmol/l).

Resultaten

Hieronder volgt de beschrijving van een tweetal experimenten (één zonder en één met diltiazem) uit een nog niet afgeronde studie.

Figuur 1 toont normale ^{31}P -NMR-spectra, verkregen tussen 25 en 30 minuten controle perfusie zonder (links) en met (rechts) diltiazem. Uit de positie van de extracellulaire P_i -piek werd berekend dat de extracellulaire pH in beide gevallen 7,4 bedroeg, i.e. de pH van het perfusaat. De intracellulaire pH bedroeg 7,1 respectievelijk 7,0. De opgebouwde druk in het onbehandelde hart bedroeg 90 mm Hg en in het behandelde hart 24 mm Hg, als gevolg van de negatief inotrope werking van diltiazem in de gebruikte concentratie.

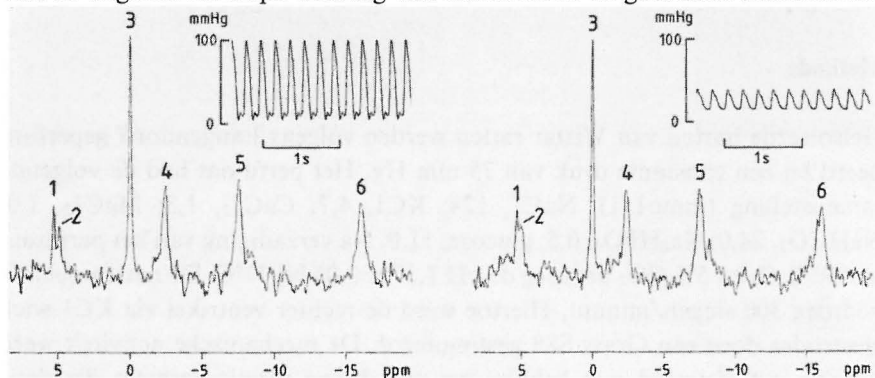


Fig. 1. Normale ^{31}P -NMR spectra verkregen tussen 25 en 30 minuten controle perfusie van een onbehandeld (links) en een met diltiazem ($5 \times 10^{-6} \text{mol/l}$) behandeld (rechts) rattehart. De spectra werden verkregen uit 128 scans. De volgende resonanties zijn herkenbaar: (1) extracellulair P_i , (2) intracellulair P_i , (3) CP, (4) γ -ATP, (5) α -ATP en (6) β -ATP. De drukregistraties zijn een momentopname, gemaakt tussen 25 en 30 minuten controle perfusie.

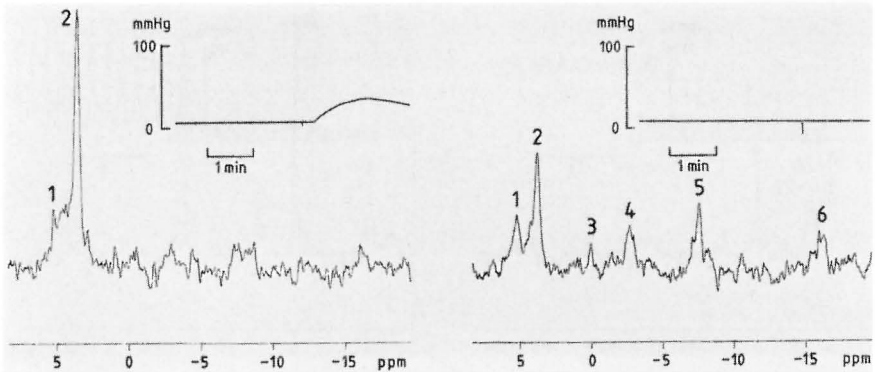


Fig. 2. ^{31}P -NMR-spectra en drukregistraties verkregen tussen 10 en 15 minuten totale, normotherme ischemie van een onbehandeld (links) en een met diltiazem behandeld (rechts) rattehart. De spectra werden verkregen uit 128 scans. De volgende resonanties zijn herkenbaar: (1) extracellulair P_i , (2) intracellulair P_i , (3) CP, (4) γ -ATP, (5) α -ATP en (6) β -ATP.

Tussen 10 en 15 minuten totale, normotherme ischemie waren in het spectrum van het onbehandelde hart geen pieken van energierijke fosfaten (CP en ATP) meer waarneembaar (Figuur 2, links). Hiervoor in de plaats was een grote intracellulaire P_i piek gekomen. De intracellulaire pH bedroeg 5,8. De drukregistratie toont het ontstaan van een ischemische contractuur in de 13de minuut na het stopzetten van de perfusie. Aan het eind van de periode van ischemie bedroeg de intracellulaire pH nog steeds 5,8 zoals bleek uit het laatste spectrum dat tijdens ischemie werd verkregen (niet getoond). Figuur 2 (rechts) laat zien dat in het hart dat met diltiazem werd behandeld, tussen de 10de en 15de minuut ischemie nog ATP en zelfs nog CP aanwezig was. De intracellulaire P_i piek was beduidend kleiner dan die van het onbehandelde hart. De intracellulaire pH bedroeg 6,2. De drukregistratie toont het uitblijven van ischemische contractuur. Aan het eind van de periode van ischemie waren in het behandelde hart de energierijke fosfaten verdwenen (niet getoond). De intracellulaire pH bedroeg toen 6,0 en de drukregistratie vertoonde nog steeds geen contractuur.

Figuur 3 toont de situatie tussen 25 en 30 minuten reperfusie. Er was enig herstel van CP, maar geen herstel van ATP in het onbehandelde hart (links). In het P_i -gebied was een viertal pieken te zien. Uit de posities van deze pieken werden de volgende pH-waarden berekend: 7,3 i.e. de extracellulaire pH (piek 1), en een pH-traject van 6 tot 7 met een prominente piek corresponderend

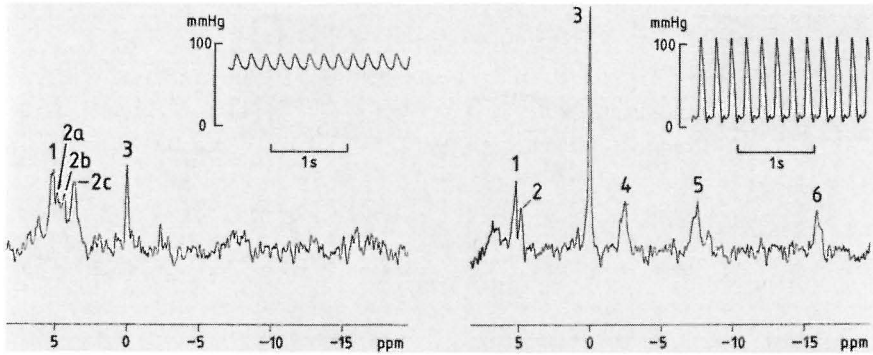


Fig.3. ^{31}P -NMR-spectra verkregen tussen 25 en 30 minuten reperfusie van een onbehandeld (links) en een met diltiazem behandeld (rechts) rattehart. De spectra werden verkregen uit 128 scans. De volgende resonanties zijn herkenbaar: (1) extracellulair P_i , (2a-c) intracellulair P_i , (3) CP, (4) γ -ATP, (5) α -ATP en (6) β -ATP. Let op het complexe patroon in het P_i -gebied. De drukregistraties zijn een momentopname, gemaakt tussen 25 en 30 minuten reperfusie.

met een pH van 6,1 (piek 2c). De P_i pieken waaruit de laatste pH-waarden werden berekend, worden toegeschreven aan gebieden met een verschillende mate van reperfusie. De drukregistratie laat een sterk verhoogde einddiastolische druk zien: 69 mm Hg. De opgebouwde druk bedroeg 18 mm Hg. In het behandelde hart (Figuur 3, rechts) werd een volledig herstel van CP en een redelijk herstel van ATP waargenomen. De pieken in het P_i -gebied vertoonden het zelfde beeld als voor de periode van ischemie. De extra- en intracellulaire pH bedroegen 7,3, respectievelijk 7,0. De drukregistratie vertoont een volledig herstel van de mechanische activiteit. De einddiastolische druk was niet verhoogd en de opgebouwde druk bedroeg 96 mm Hg.

Discussie

Onze resultaten tonen aan dat diltiazem ($5 \times 10^{-6} \text{ mol/l}$) in het geïsoleerde rattehart bescherming bood tegen een aantal van de gevolgen van totale, normotherme ischemie. De energierijke fosfaten raakten minder snel uitgeput, de intracellulaire pH vertoonde een geringere daling en het hart ontwikkelde geen ischemische contractuur. Tijdens reperfusie vond er een volledig herstel plaats van CP en de intracellulaire pH, en een redelijk herstel van ATP. Ook het herstel van de opgebouwde druk was volledig. In het onbehandelde hart, daarentegen, vertoonde het laatste reperfusie-spectrum een complex

patroon in het P_i -gebied (Figuur 3, links). Wij schrijven dit toe aan een inhomogene reperfusie van het hart. Het gedeelte dat niet gereperfundeerd werd zou dan verantwoordelijk zijn voor piek 2c (intracellulaire pH: 6,1). Het gedeelte dat goed gereperfundeerd werd en het overgangsgebied ertussen zou corresponderen met de andere P_i -pieken in het pH-traject van 6 tot 7. Een soortgelijk effect werd waargenomen door Bailey et al., die het herstel van geïsoleerde ratteharten na verschillende perioden van ischemie bestudeerden. [7] Onze resultaten komen in grote lijnen overeen met die van onze eerdere studies met nifedipine, [3,4] maar vertonen enige discrepantie met de resultaten van Lavanchy et al., die de effecten van diltiazem onderzochten. [5]

Diltiazem, evenals andere calciumantagonisten, vermindert de hoeveelheid calciumionen die tijdens excitatie via de calciumkanalen de hartspiercellen en de gladde spiercellen binnenstroomt. Waarschijnlijk zal de hierdoor veroorzaakte negatief inotrope werking van diltiazem voor een (belangrijk) deel verantwoordelijk zijn voor de verschillen die in vergelijking met het onbehandelde hart tijdens ischemie werden waargenomen: een minder snelle uitputting van CP en ATP, een geringere daling van de intracellulaire pH en het uitblijven van contractuur. Recente waarnemingen in ons laboratorium wijzen er echter op dat ook in afwezigheid van een negatief inotropoep effect, bepaalde calciumantagonisten een zekere mate van bescherming bieden tegen de gevolgen van ischemie, zelfs in het geïsoleerde hart.

Voor het betere herstel van de energiehuishouding en de mechanische activiteit tijdens reperfusie van het met diltiazem behandelde hart zijn een aantal mogelijke oorzaken aan te geven. Omdat in het behandelde hart de intracellulaire pH tijdens ischemie minder ver daalde dan in het onbehandelde hart, zal dit er toe geleid hebben dat tijdens reperfusie minder waterstofionen in de cel, via het H^+/Na^+ -uitwisselingsmechanisme in het sarcolemma, tegen natriumionen werden uitgewisseld. Dit zal vervolgens hebben geleid tot een geringer transport van calciumionen van de extra- naar de intracellulaire ruimte via het Na^+/Ca^{2+} -uitwisselingsmechanisme. Ook kan de hoeveelheid calciumionen die in de beginfase van reperfusie via de calciumkanalen de cellen binnenstroomt, in het behandelde hart kleiner zijn geweest doordat diltiazem nog aanwezig was. In het met diltiazem behandelde hart zal reperfusie dus minder aanleiding hebben gegeven tot een verstoring van de calciumhomeostase van de cellen en een daarmee gepaard gaande ont koppeling van de oxidatieve fosforylering van de mitochondriën. Een tweede mechanisme dat een belangrijke rol gespeeld kan hebben, is de vaatverwijdende werking van diltiazem. Dit effect zal zeker hebben bijgedragen tot een betere reperfusie

van het ischemische hart en tot een beter herstel van metabolisme en functie.

Momenteel wordt er in ons laboratorium ook gewerkt aan zend- en ontvangstspoelen die om het hart van een proefdier worden geïmplanteerd. Hierdoor zal het ons op korte termijn mogelijk zijn ³¹P-NMR-spectroscopie uit te voeren bij het hart in vivo.

Literatuur

1. Van Echteld, C.J.A. en Meijler, F.L. (1986). Nucleaire magnetische resonantie-spectroscopie in de geneeskunde: biochemie van het intacte weefsel. *Ned. Tijdschr. Geneeskd.* 130, 1595-1602.
2. Nunnally, R.L. en Bottomley, P.A. (1981). Assessment of pharmacological treatment of myocardial infarction by phosphorus-31 NMR with surface coils. *Science* 211, 177-180.
3. Ruigrok, T.J.C., Van Echteld, C.J.A., De Kruijff, B., Borst, C. en Meijler, F.L. (1983). Protective effect of nifedipine in myocardial ischemia assessed by phosphorus-31 nuclear magnetic resonance. *Eur. Heart J.* 4 (Supplement C), 109-113.
4. Ruigrok, T.J.C., Van Echteld, C.J.A., Borst, C. en Meijler, F.L. (1986). A phosphorus nuclear magnetic resonance study of the effect of nifedipine on intracellular pH during myocardial ischaemia and reperfusion. In: 6th International Adalat Symposium; New Therapy of Ischaemic Heart Disease and Hypertension (edited by Lichtlen, P.R.). *Excerpta Medica*, Amsterdam, 193-198.
5. Lavanchy, N., Martin, J. en Rossi, A. (1986). Effects of diltiazem on the energy metabolism of the isolated rat heart submitted to ischaemia: a ³¹P-NMR study. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 18, 931-941.
6. Neely, J.R. en Grotzohann, L.W. (1984). Role of glycolytic products in damage to ischemic myocardium; dissociation of adenosine triphosphate levels and recovery of function of reperfused ischemic hearts. *Circ. Res.* 55, 816-824.
7. Bailey, I.A., Seymour, A.L. en Radda, G.K. (1981). A ³¹P-NMR study of the effects of reflow on the ischemic rat heart. *Biochim. Biophys. Acta* 637, 1-7.