

KONCENTRACIJA ADRENALINA I NORADRENALINA U SERUMU PASA POD DEJSTVOM BLOKATORA KALCIJUMOVIH KANALA

AUTORI

Milanović T.¹, Mirić D.¹, Kisić B.¹, Dragojević I.¹, Pavlović A.²

¹Institut za biohemiju, Medicinski fakultet Univerziteta u Prištini

²Hirurška klinika, Medicinski fakultet Univerziteta u Prištini

KORESPONDENT

Tamara Milanović

Medicinski fakultet Kosovska Mitrovica

tamaramatic87@yahoo.com

SAŽETAK

Najvažnija osobina kalcijumovih kanala je selektivno regulisanje spore ulazne struje kalcijuma u ćelije tkiva sa tendencijom sporog rasta akcionog potencijala. U takva tkiva spadaju glatki mišići krvnih sudova, kardiociti i srčani nodusi (AV i SA čvor). Različiti antagonisti kalcijuma imaju i različita dejstva na pomenuta tkiva, jer su im i hemijski sastavi različiti. Najčešće su u upotrebi Verapamil, Nifedipin i Diltiazem. Njihova zajednička osobina je blokiranje kalcijumovih kanala, što izaziva vazodilataciju krvnih sudova, negativno inotropno i negativno hronotropno dejstvo. *Naime, blokiranjem ulaska Ca kroz spore kanale miofibrila glatkih mišića, antagonisti kalcijuma smanjuju količinu raspoloživog kalcijuma za kontrakciju, što izaziva vazodilataciju.*

Verapamil je jedan od najpoznatijih i najčešće upotrebljanih antagonista kalcijuma. Elektrofiziološki, on inhibiše akcione potencijale nodusa srca, a pogotovu AV čvora, gde je za depolarizaciju najbitniji spori ulazak kalcijuma. Produženjem efektivnog refraktarnog perioda SA čvora, smanjuje frekvencu generisanja impulsa tj. srčanu frekvencu, a produženjem efektivnog refraktarnog perioda u AV čvoru usporava rad komora u slučaju flatera i fibrilacije pretkomora.

U sinaptičkim završecima se nalaze molekuli kalcijum-vezujućeg proteina kalmodulina. Svaki kalmodulin može vezati četiri kalcijumova jona, nakon čega prelazi u aktivan kalcijum-kalmodulin kompleks koji aktivira protein kinazu. Aktivirana protein kinaza pokreće egzocitozu neurotransmitera u sinaptičku pukotinu. Osim što aktivira protein kinazu, kalcijum-kalmodulin kompleks pokreće i aktivnost kalcijumove pumpe presinaptičke membrane, koja ispumpava kalcijum iz presinaptičkog završetka, čime se prekida dalja egzocitoza neurotransmitera u sinaptičku pukotinu.

Imajući u vidu činjenicu, da je otvaranje kalcijumskih kanala na membrani presinaptičkog završetka neophodno da se iz vezikula oslobodi neurotransmiter, cilj našeg rada je bio da proučimo, da li verapamil svoje efekte ostvaruje i na membrani presinaptičkih završetka simpatičkog nervnog sistema, prateći pri tom nivo kateholamina u serumu. Eksperiment je izveden na 6 odraslih, zdravih pasa, koji su nakon 10-to minutne infuzije 0,9% NaCl tretirani i.v. bolus injekcijama verapamila, sukcesivno, u tri navrata, na svakih 5 minuta, sve do pojave znakova intoksikacije, što se manifestovalo bradikardijom, poremećajem srčanog ritma i padom arterijskog krvnog pritiska. Krv za određivanje kateholamina je uzimana sukcesivno, na svakih pet minuta, neposredno pre davanja nove doze verapamila.

Verapamil, administriran i.v. značajno smanjuje koncentraciju adrenalina i noradrenalina u serumu pasa.

Ključne reči: verapamil, noradrenalin, adrenalin

ENGLISH

THE CONCENTRATION OF ADRENALINE AND NORADRENALINE IN THE SERUM OF DOGS UNDER THE INFLUENCE OF CALCIUM CHANNELS BLOCKERS

Milanović T.¹, Mirić D.¹, Kisić B.¹, Dragojević I.¹, Pavlović A.²

¹Institute of Biochemistry, Faculty of Medicine, University of Pristina

²Surgical Clinic, Faculty of Medicine, University of Pristina

SUMMARY

The most important characteristic of calcium channels is selective regulation of slow incoming stream of calcium into the cell tissue providing the slow increasement of action potential. Such tissues include smooth muscles of blood vessels, cardiocytes and heart noduses (AV and SA node). Different calcium antagonists have different effects on previous tissues due to their different chemical formula. Verapamil, Nifedipin and Diltiazem are the most frequently used of all. Their commonest characteristic is blocking the calcium channels causing vasodilatation of blood vessels as well as negative inotropic

and chronotropic influence. By blocking the incoming calcium through slow channels of myofibrils of smooth muscles, the antagonists of calcium decrease the quantity of available calcium for contraction which causes vasodilatation.

The most famous and most frequently used calcium antagonist is Verapamile. In terms of electrophysiology, Verapamile inhibits action potentials of heart nodules, especially the AV node, where the slow incoming of calcium is the most important for depolarization. Prolongation of the effective refractory period of SA node causes the heart frequency decrease while prolongation of the effective refractory period of AV node slows down the work of chambers in case of flutter and fibrillation of atriums.

The molecules of calcium-binding protein called kalmodulin are located in synaptic endings. Each kalmodulin can bond four calcium ions providing transfer into active calcium-kalmodulin complex which activates the kinase protein. Activated kinase protein starts the exocytosis of neurotransmitters into synaptic gap. Apart from activating kinase protein, calcium-kalmodulin complex also starts the activity of calcium pump presynaptic membrane which pumps calcium out of presynaptic ending stopping the further exocytosis of neurotransmitters into synaptic gap.

Taking into consideration the fact that opening the calcium channels on membrane of presynaptic ending is necessary to free the neurotransmitter out of the vesicle, the aim of our work is to study whether Verapamile has effects on the membrane of presynaptic endings of sympathetic nervous system checking the level of catecholamine in serum. The experiment was conducted in 6 healthy dogs which were, after 10-minute infusion (0.9% NaCl), treated with intravenous bolus verapamile injections in three occasions, in every 5 minutes, until the first signs of intoxication had appeared. This caused bradycardia, heart rhythm disorder and blood pressure drop. In order to determine the level of catecholamine, blood was taken sequentially, in every 5 minutes, before the new dose of verapamile was given.

Verapamile (given intravenous) significantly decreases the concentration of adrenaline and noradrenaline in the serum of dogs.

Key words: verapamile, noradrenaline, adrenaline.

UVOD

Najvažnija osobina kalcijumovih kanala je selektivno regulisanje spore ulazne struje kalcijuma u ćelije tkiva sa tendencijom sporog rasta akcionog potencijala. U takva tkiva spadaju glatki mišići krvnih sudova, kardiociti i srčani nodusi (AV i SA čvor). Različiti antagonisti kalcijuma imaju i različita dejstva na pomenuta tkiva, jer su im i hemijski sastavi različiti. Najčešće su u upotrebi Verapamil, Nifedipin i Diltiazem. Verapamil je derivat papaverina, Nifedipin derivat dihidropiridina a Diltiazem derivat benzodiazepina. Njihova zajednička osobina je blokiranje kalcijumovih kanala, što izaziva vazodilataciju krvnih sudova, negativno inotropno i negativno hronotropno dejstvo. Naime, blokiranjem ulaska Ca^{2+} kroz spore kanale miofibrila glatkih mišića, antagonisti kalcijuma smanjuju količinu raspoloživog kalcijuma za kontrakciju, što izaziva vazodilataciju. (1)

Ispitivanjem načina delovanja antagonista kalcijuma pomoću radioaktivnih liganda i drugih metoda, utvrđeno je da na ćelijskoj membrani postoje posebna mesta za koja se oni vezuju. Gustina mesta njihovog vezivanja menja se u zavisnosti od vrste tkiva, starosti organizma, raznih patoloških stanja, delovanje hormona itd. Identifikovane su čak i podjedinice kao sastavni delovi mesta za vezivanje antagonista kalcijuma. Izolovani i purifikovani delovi membrane uzeti su sa žive ćelije i ugrađeni u veštačku membranu. Na taj način je rekonstruisan kalcijumski selektivni kanal koji reaguje na voltažnu aktivaciju i antagoniste. (2)

Receptori za antagoniste kalcijuma, slično beta adrenergičkim receptorima, pod određenim uslovima i uticajima menjaju svoju gustinu i aktivnost u ćelijskoj membrani. Oni mogu da se povuku iz aktivnog stanja ili da se umnože po jedinici površine membrane.

Antagonisti kalcijuma smanjuju prolazak jona Ca^{2+} kroz ćelijsku membranu, odnosno kroz kalcijumove kanale. Na taj način smanjuju raspoloživi kalcijum za interakciju sa troponinom u srčanom mišiću i kalmodulinom u glatkim mišićima. Antagonisti kalcijuma nemaju uticaja na skeletne mišiće, jer u njima kalcijumski kanali nisu od velikog

značaja za započinjanje mišićne kontrakcije. Zahvaljujući ovoj osobini antagonisti kalcijuma imaju negativan inotropni efekat na srčani mišić, dok istovremeno relaksiraju glatke mišiće krvnih sudova (vazodilatacija).

U sinaptičkim završecima se nalaze i molekuli kalcijum-vezujućeg proteina kalmodulina. Svaki kalmodulin može vezati četiri kalcijumova jona, nakon čega prelazi u aktivan kalcijum-kalmodulin kompleks koji aktivira protein kinazu. Aktivirana protein kinaza pokreće egzocitozu neurotransmitera u sinaptičku pukotinu. Osim što aktivira protein kinazu, kalcijum-kalmodulin kompleks pokreće i aktivnost kalcijumove pumpe presinaptičke membrane, koja ispušćava kalcijum iz presinaptičkog završetka, čime se prekida dalja egzocitoza neurotransmitera u sinaptičku pukotinu.

Izraz blokatori kalcijumovih kanala nije sasvim tačan, jer u stvari, oni ne blokiraju te kanale, već samo skraćuju period vremena u kome su oni propustljivi za kalcijumove jone.

Verapamil je jedan od najpoznatijih i najčešće upotrebljivanih antagonista kalcijuma. Elektrofiziološki, on inhibiše akcione potencijale nodusa srca, a pogotovu AV čvora, gde je za depolarizaciju najbitniji spori ulazak kalcijuma. Produženjem efektivnog refraktarnog perioda SA čvora, smanjuje frekvencu generisanja impulsa tj. srčanu frekvencu, a produženjem efektivnog refraktarnog perioda u AV čvoru usporava rad komora u slučaju flatera i fibrilacije predkomora. (7)

Dejstvo verapamila, primenjenog intravenski, ima hipotenzivni učinak koji dostiže vrhunac posle 5 minuta, a gubi dejstvo posle 10 do 12 minuta. Međutim, najjače dejstvo ovog leka na AV čvor ispljava se posle 10 do 15 minuta i traje oko 6 sati. Poluživot eliminacije traje oko 2 do 3 sata.

Intravenska primena verapamila: daju se spore infuzije u dozi od 0,001 do 0,005 mg/kg/min ili u obliku i.v. bolus injekcija od 5 do 10 mg što se može ponoviti za 10 minuta ako je potrebno. U slučaju pojave toksičnih efekata verapamila u obliku srčane insuficijencije i hipotenzije kao i poremećaja AV sprovođenja, može se dati kalcijum glukonat (1-2 g i.v.) koji međutim nije efikasan ako nastupi AV-blok. Tada se može dati atropin (1 mg i.v.) ili glukagon (50-150 mg/kg/h). (1)

CILJ ISTRAŽIVANJA

Imajući u vidu činjenicu, da je otvaranje kalcijumskih kanala na membrani presinaptičkog završetka neophodno da se iz vezikula oslobodi neurotransmiter, cilj našeg rada je bio da proučimo, da li verapamil svoje efekte ostvaruje i na membrani presinaptičkih završetaka simpatičkog nervnog sistema, prateći pri tom nivo kateholamina u serumu.

MATERIJAL I METODE RADA

Pre izvođenja eksperimenta dobijeno je odobrenje Etičkog komiteta Medicinskog fakulteta Univerziteta u Prištini.

Eksperiment je izveden na 6 odraslih, zdravih pasa, različitog pola i rase, T.M. od 14-20 kg. Psi su bili smešteni u štali za eksperimentalne životinje, gde su gladovali 24h (izuzev vode) pre eksperimenta. 15 min. pre početka eksperimenta svaki pas je anesteziran i.m. injekcijom Ketamina (30mg/kg/tm), i premešten u eksperimentalnu laboratoriju. Zatim je životinja postavljena na operacioni sto u desni bočni položaj pogodan za kompresiju sternuma i defibrilaciju. Nakon brijanja prekordijalnog predela, postavljene su samolepljive elektrode koje su povezane sa monitorom, gde je kontinuirano praćen EKG u drugom prekordijalnom odvodu. Nakon brijanja ingvinalnog predela, pristupalo se hirurškom prepariranju arterije i vene femoralis. Palpacijom u ingvinalnom predelu nađe se puls arterije femoralis, i makazama preseče koža i fascija. Pažljivo se razdvoji m.sartorius i m. adductor magnus, između kojih se nalazi idući put upolje femoralna vena, arterija i nerv. Arterija i vena se izoluju i kroz ispreparisanu arteriju femoralis se ubaci kateter u abdominalnu aortu. Drugi kraj katetera se preko transdjusera poveže sa monitorom za direktno - invazivno merenje krvnog pritiska. Arterijska linija se održava propiranjem katetera sa 0,9% NaCl u kome se nalazi Heparin (5000 i.j./250 ml NaCl). Kroz venu femoralis je ubačen centralni venski kateter uvenu cavu caudalis. Venska linija je služila za davanje potrebnih medikamentata, a održavala se sporom infuzijom 0,9% NaCl. Za sve ovo vreme pas je na spontanom disanju uz očuvani laringealni i faringealni refleks. Nakon toga se pristupalo endotrahealnoj intubaciji. Uz pomoć laringoskopa, endotrahealni tubus sa kafom (No 7-7,5) je ubačen u traheju neposredno iznad karine, kaf se napumpa da nalegne na zidove traheje i spreči vraćanje vazduha, kao i slivanje sekreta, i eventualno regurgitovanog želudačnog sadržaja u traheo-bronhijalno stablo. Uz pomoć AMBU-balona, i auskultacijom levog i desnog plućnog krila proceni se dubina postavljenog endotrahealnog tubusa, koji se zatim fiksira zavojem i flasterom. Anestezija se produbi i.v. davanjem Ketamina (2mg/kg/t.m.), a mišićna relaksacija se izazivala Pavulonom (0,1mg/kg/t.m.). Nakon toga je pas preveden na mehaničku ventilaciju po tipu kontrolisanog disanja preko respiratora (Simens-Servo ventilator). Na monitoru se registruje rad srca, tj. frekvencija i ritam.

Sve životinje su nakon uvođenja u anesteziju prvih 10 minuta tretirane 0,9% NaCl u sporom infuziji, 15-20 kapi/min, da bi se hemodinamski stabilizovale. Na kraju 10-to minutnog tretmana 0,9% NaCl, uzimana je krv za određivanje kateholamina. Ove varijable su služile kao bazalne vrednosti na osnovu kojih je vršeno upoređivanje kasnije registrovanih varijabli.

Nakon 10-to minutne infuzije 0,9% NaCl, životinje su tretirane i.v. bolus injekcijama verapamila, (Amp.verapamil 5mg) sukcesivno, u tri navrata, na svakih 5 minuta, sve do

pojave jasno izraženih znakova intoksikacije blokatorom kalcijumovih kanala, što se manifestovalo bradikardijom, hipotenzijom i poremećajem srčanog ritma. Krv za određivanje kateholamina uzimana je sukcesivno na svakih 5 minuta, neposredno pre davanja nove doze verapamila.

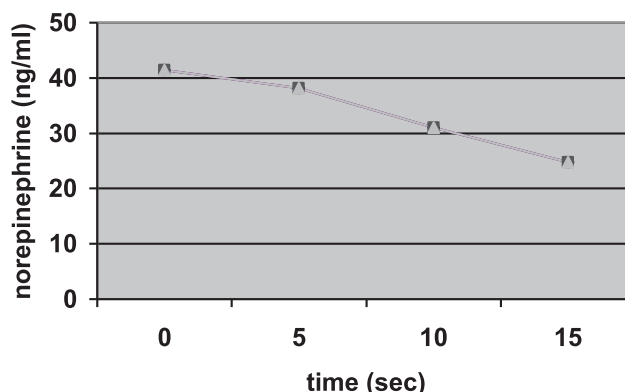
Nakon toga, su životinje tretirane i.v. bolus injekcijama atropina, nakon čega su hemodinamski stabilizovane, probuđene iz anestezije, intubirane i vraćene u štalu za eksperimentalne životinje.

Očitavanje kateholamina iz seruma je vršeno pomoću spektrofotofluorimetra, a koncentracija kateholamina u serumu je izražavana u ng/ml.

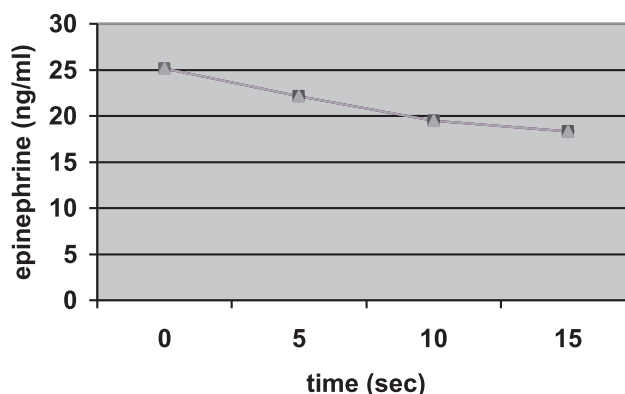
Svi rezultati su statistički obrađeni studentovim t-testom, Hi-kvadrat testom i analizom varijanse.

REZULTATI

Kontrolna vrednost koncentracije noradrenalina u serumu prosečno iznosi 41,30 ng/ml. U toku tretmana verapamilom koncentracija noradrenalina u serumu značajno opada, da bi na kraju tretmana verapamilom prosečno iznosila 24,75 ng/ml, što je za 39,8% niže u odnosu na kontrolnu vrednost. Ovo smanjenje noradrenalina u serumu pod dejstvom verapamila je statistički visoko značajno ($p < 0,001$) (graf., tab.)



Kontrolna vrednost koncentracije adrenalina u serumu prosečno iznosi 25,16 ng/ml. U toku tretmana verapamilom dolazi do značajnog pada koncentracije adrenalina, da bi na kraju tretmana verapamilom koncentracija adrenalina prosečno iznosila 18,32 ng/ml, što je za 26% manje u odnosu na kontrolnu vrednost. Ovo smanjenje adrenalina pod dejstvom verapamila je visoko statistički značajno ($p < 0,01$). (graf., tab.)



DISKUSIJA

Može se zapaziti, da u toku tretmana verapamilom dolazi do značajnog smanjenja koncentracije adrenalina i noradrenalina u serumu. Pad vrednosti adrenalina i noradrenalina pod dejstvom verapamila, ukazuje na značaj jona kalcijuma za održavanje normalnog nivoa kateholamina u serumu. Blokodom kalcijumovih kanala u meduli nadbubrežne žlezde i simpatikusnim neuronima inhibisano je oslobađanje kateholamina. Ovo je u saglasnosti sa nalazima iz literature. (6,7) Značaj ovog saznanja ogleda se u tome, da visoke doze verapamila dovode do insuficijencije KVS ne samo inhibicijom rada srca i vazodilatacijom, već i inhibicijom oslobađanja kateholamina, čime se umanjuje efekat

simpatikusnih kompenzatornih mehanizama koji se uključuju pri srčanoj insuficijenciji.

ZAKLJUČAK

Znatno veće doze verapamila od terapijskih, administriranog i.v. značajno smanjuju koncentraciju adrenalina i noradrenalina u serumu pasa.

Može se zaključiti da je transport jona kalcijuma kroz presinaptičku membranu simpatičkih završetaka i ćelija medule nadbubrežne žlezde značajan za održavanje normalne koncentracije kateholamina u serumu.

LITERATURA

1. Nagulić S.: Kardiologija - (1 izdanje) Beograd; Zavod za udžbenike i nastavna sredstva - Beograd. 1991
2. Mujović V., Tomislav Jovanović i Saško D. Velkovski.; Novine o signalnim mehanizmima srca: ligand-receptor kompleks i efektorni mehanizmi. Istitiut za fiziologiju Medicinskog fakulteta u Beogradu. KARDIOLOGIJA- 1997 / 1-2.
3. Doyon-S;Roberts -JR TI: the use of glucagons in a case of calcium channel blocker overdose. AD: Department of EmergencyMedicine, Mercy Catholic Medical Center, Philadelphia SO: Ann-Emerg-Med, 1993 jul; 22(7): 1229-33
4. Koch-AR, Vogelaers-DP; Decrayenaere-JM, Callens-B; Verstraete-A, Buylaert-WA TI: Fatal intoxication with amlodipin. AD: Department of intensive Care, University Hospital Ghent, Belgium, SO.J-Toxicol-Clin-Toxiol. 1995, 33(3)n 253-6
5. Shrier-I; Magder-S: Effects of nifedipine on vascular waterfall and arterial resistance in canine hindlimb. Am-J-Physiol. 1995 Jan; 268(1 Pt 2): H371-6
6. Kline-JA; Leonova-E; Raymond-RM: beneficial myocardial metabolic effects of insulin during verapamil toxicity in the anesthetized canine. Crit-Care-Med. 1995 Jul; 23(7): 1251-63
7. Tuncok-Y; Apaydin-S; Gidener-S; Guvent-H; Oto-O; Ates-M; Gure-A : The effects of amrinone and glucagons on verapamil-induced myocardial depression in a rat isolated heart model. Gen-Pharmacol. 1997 May; 28(5); 773-6
8. Anna S. Cohen, MRCP, PhD, Manjit S. Matharu, MRCP, PhD and Peter J. Goadsby, MD, PhD, DSc: Electrocardiographic abnormalities in patients with cluster headache on verapamil therapy. Neurology, 2007;69:668-675