

**Egyetemi doktori (Ph.D.) értekezés tézisei**

---

**Helyi érzéstelenítőszeres szívelektrofiziológiai  
hatásai**

Dr. Szabó Adrienne

Témavezetők: Dr. Nánási Péter és Dr. Márton Ildikó



DEBRECENI EGYETEM  
Klinikai Orvostudományok Doktori Iskola

Debrecen, 2010.

## Impresszum

### **HELYI ÉRZÉSTELENÍTŐSZEREK SZÍVELEKTROFIZIOLÓGIAI HATÁSAI**

Értekezés a doktori (Ph.D.) fokozat megszerzése érdekében  
a klinikai orvostudományok tudományágban

Írta: Dr. Szabó Adrienne

**Készült a Debreceni Egyetem Klinikai Orvostudományok Doktori Iskolája  
Fogorvostudományi Kutatások program keretében**

Témavezető: Dr. Nánási Péter és Dr. Márton Ildikó

A doktori szigorlati bizottság:           elnök: Prof. Dr. Berta András, az MTA doktora  
tagok: Prof. Dr. Papp Zoltán, sz MTA doktora  
Dr. Babik Barna, Ph.D.

A doktori szigorlat időpontja: 2011. április 18. 11.00 óra

Az értekezés bírálói:                   Dr. Virág László, Ph.D.  
Dr. Szentmiklósi József, kandidátus

A bírálóbizottság:                   elnök: Prof. Dr. Berta András, az MTA doktora  
tagok: Dr. Virág László, Ph.D.  
Dr. Szentmiklósi József, kandidátus  
Prof. Dr. Papp Zoltán, az MTA doktora  
Dr. Babik Barna, Ph.D.

Az értekezés védésének időpontja: 2011. április 18. 13.00 óra

# 1. BEVEZETÉS

A helyi érzéstelenítők egyes diagnosztikus beavatkozások alkalmával, műtétek során, valamint a posztoperatív, a szülészeti és a krónikus fájdalom csillapításában bírnak kiemelt jelentőséggel. Nélkülözhetetlen gyógyszerek a fogorvosi gyakorlatban, hiszen a fogászati és a szájsebészeti ambuláns műtétek kevés kivételtől eltekintve helyi érzéstelenítésben történnek. Ezen beavatkozások során a megfelelő érzéstelenítőszer helyes megválasztása különösen nagy jelentőséggel bír, hiszen a fog eredetű betegségek igen intenzív fájdalmat okoznak, amit a szükségessé váló kezeléstől való félelem még tovább fokoz. A jelenleg használt és általában biztonságosnak tartott helyi érzéstelenítők alkalmazásának legsúlyosabb életveszélyes szövődménye a szisztémás, központi idegrendszeri és kardiális toxicitás, ami miatt alkalmazásuk nagy körültekintést igényel.

## 1.1. A lokálanesztetikumok fiziko-kémiai tulajdonságai és az érzéstelenítő hatás kapcsolata

A klinikumban jelenleg használt helyi érzéstelenítők egy tercier aminből és egy, az előbbihez alifás intermedier láncon keresztül észter- vagy amidkötéssel kapcsolódó, szubsztituált aromás gyűrűből álló, egymástól jelentősen eltérő farmakokinetikai és farmakodinamikai tulajdonságokkal rendelkező aminoészter illetve aminoamid vegyületek. Az aromás gyűrű biztosítja a biológiai membránokon való átjutáshoz szükséges zsírolékonyságot. Ez a tulajdonság fokozható a gyűrű szubsztituálásával vagy az alkilánc növekvő hosszával, és arányos a vegyület relatív érzéstelenítő és toxikus potenciáljával. Fehérjekötő képességük a kötőhelyükhöz való kötődés erősségével és így a hatástartammal arányos. A receptorról történő leválás a molekulásúly csökkenésével egyre gyorsabbá válik. Az érzéstelenítő hatás kialakulásához szükséges, a vegyület tercier, töltés nélküli, membránpermeábilis formába való átalakulásának idejét a szöveti pH-val együtt a vegyület  $pK_a$ -ja szabja meg. A lidocain kivételével a helyi érzéstelenítők a molekulában lévő aszimmetrikus, négy különböző szubsztituenshez kapcsolódó szénatom miatt két, tükörszimmetrikus térbeli elrendeződésű enantiomer (S és R) formájában léteznek, melyek fizikokémiai tulajdonságaik megegyeznek, ugyanakkor

eltérő térbeli struktúrájukból fakadóan alapvetően különbözhet a receptorukhoz való affinitásuk.

### **1.2. A helyi érzéstelenítők hatása az idegrostokon**

Az afferens (szenzoros) és efferens (motoros) információ átvitele gyors és nagy hatótávú jelátvitelt tesz szükségessé, ami az inger hatására fellépő transzmembrán ionáramok keletkezésén, a minden vagy semmi jellegű elektromos válasz, az akciós potenciál kialakulásán és tovaterjedésén keresztül valósul meg. A lokálanesztetikumok reverzibilis módon felfüggesztik az akciós potenciálok kialakulását és tovaterjedését az idegeken. Az érzéstelenítés során előbb az éles fájdalom, majd a hőérzés, a tapintás, végül a motoros rostok működése iktatódik ki. Az egyes érzékqualitások érzéstelenítő szerekkel szembeni érzékenysége elsősorban az ideg által vezetett impulzusok frekvenciájától függ, a legkisebb ingerületvezetési sebességgel rendelkező rostok a legrezisztensebbek. A különböző típusú rostok a helyi érzéstelenítőkre nézve eltérő érzékenységgű ioncsatornákat expresszálnak, de a klinikailag észlelt blokádnak erősségét a gyógyszer több, különböző vastagságú anatómiai rétegen történő áthaladásának jellemzői is jelentősen befolyásolhatják.

### **1.3. A feszültségfüggő nátriumcsatorna működése**

A lokálanesztetikumok az akciós potenciál kialakulását és tovaterjedését az idegsejteken a feszültségfüggő nátriumcsatornákon keresztül folyó gyors nátriumáram gátlása révén függesztik fel. A nátriumcsatorna egy, az ionszelektivitásért, ionvezetésért és a sejtmembrán feszültségváltozásainak érzékeléséért felelős alfa, és egy modulációs szereppel bíró béta alegységből felépülő transzmembrán glikoprotein molekula. A különböző szövetek aminosav szekvenciájukat tekintve nagyfokú homológiával jellemezhető különböző alfa alegység izoformákat expresszálnak. A nátriumcsatornák dinamikus, konformációjukat a membrán feszültségváltozásaira változtató molekulák, melyeknek egy zárt, egy nyitott, egy gyors és több lassú inaktivációs állapotát tételezik fel. Depolarizáció hatására a nyugalmi membránpotenciálon zárt állapotú csatornában a feszültség-szenzor elmozdulása a csatorna megnyílását eredményező konformációváltozást indít el és a sejtbe nátriumionok lépnek be. Kb. 1,5 ms-on belül a nátriumionok beáramlása a pórus citoplazma felőli végén lévő gyors

inaktivációs kapu bezáródása következtében gyakorlatilag megszűnik, olyan nem-vezető, inaktivált állapot jön létre, melyből a csatorna nem képes közvetlenül újra nyitott állapotba jutni mindaddig, amíg a membrán nem repolarizálódik. Hosszan tartó depolarizáció hatására a csatornák különböző lassú inaktivációs állapotokba kerülnek. A lassú inaktivációt az ioncsatorna konformációs változása jellemezi és az ingerlékenység szabályozásában játszhat szerepet.

#### **1.4. A helyi érzéstelenítők hatása a nátriumcsatornákra**

A helyi érzéstelenítők fiziológias körülmények között túlnyomórészt pozitív töltésű kation és töltés nélküli szabad bázis formájában vannak jelen. A zsíroldékony neutrális molekulák csatornabéli kötőhelyüket a membrán lipidfázisán keresztül a gyorsabb hidrofób útvonalon, míg a töltéssel rendelkezők a csatorna citoplazma felőli nyitott szájadékan keresztül, a lassúbb hidrofil útvonalon érik el. A helyi érzéstelenítők feszültségfüggő nátriumcsatornákra gyakorolt gátló hatásának két formája ismert. A feszültségfüggő nátriumcsatorna aktiválódásakor a nyitott, citoplazma felőli kapun belépő kvaterner formájú helyi érzéstelenítő molekula a szelektív filter alatt lévő kötőhelyéhez vándorol, ahol a nyitott csatornában töltést hordozó alkilamino része van der Waals erők révén egy - valamennyi csatornaizozóformában nagyfokban konzervatív - fenilalanin, míg aromás csoportja egy ugyancsak konzervatív tirozin oldallánccal lép kapcsolatba. A szer a csatornában aszimmetrikusan elhelyezkedve, részben a pórust mechanikusan beszűkítve, részben pozitív elektrosztatikus gátat létrehozva megakadályozza a nátriumionok áthaladását. A szelektív filter melletti oldallánccal kölcsönhatásba lépve a lassú inaktivációs konformáció valamint a feszültség-szenzor stabilizálásával a helyi érzéstelenítőszer a csatorna kapuzási folyamatait is módosítja. A helyi érzéstelenítők a nyitott illetve inaktivált állapotú csatornákhöz általában nagyobb affinitással kötődnek, mint a zárt állapotúakhoz, így ismétlődő ingerlés hatására egyre több csatorna köt gyógyszert, ezért a gátlás egyre mélyül. Így jön létre a magasabb frekvenciák esetén megnyilvánuló frekvenciafüggő, más néven use-dependens, vagy fázisos gátlás. A csatorna zárt állapotában a konzervatív fenilalanin molekula hozzáférhetetlen a helyi érzéstelenítő számára, ugyanakkor lipofil kapcsolat alakul ki a csatornát bélelő oldallánccal és a neutrális terciér amin között, létrehozva az alacsony ingerlő frekvenciák mellett is kialakuló, de viszonylag magas szerkoncentrációt igénylő tónusos vagy nyugalmi gátlást, amit

a zárt állapotú csatornához való alacsony affinitású kötődés jellemez, és amely a feszültség-szenzor működését nem érinti. A hidrofób molekulákra erősebb tónusos, míg a töltéssel rendelkezőkre markánsabb use-dependens hatás jellemző.

### **1.5. A helyi érzéstelenítők farmakokinetikai tulajdonságai**

A lokálanesztikumok terápiás hatása, az ideg ingerületvezetésének felfüggesztése a szer lokális koncentrációjától függ. A fiziko-kémiai tulajdonságaikon túl a bejuttatás helyének az idegektől való távolsága, az adott testtájon az érzettség mértéke, a zsírszövet mennyisége és a perctérfogat együttesen határozzák meg a helyi gyógyszer koncentrációt csökkentő szisztémás felszívódás mértékét. A beadás után a plazmában elért csúcskoncentrációjuk függ az alkalmazott dózistól, a beadás és felszívódás sebességétől, a gyógyszer fehérjékhez történő kötődésétől, megoszlásától és a szervezetből való eliminációjától.

### **1.6. A helyi érzéstelenítők szisztémás toxicitása**

A véráramba jutó helyi érzéstelenítőszer valamennyi ingerlékeny struktúrával kapcsolatba kerül, így a relatív vagy abszolút túladagolás következtében a vérkeringésben jelenlévő szabad gyógyszer-molekulák a központi idegrendszeri - és kardiotoxicitás kialakulásához vezetnek. A toxicitás mértéke a szer hatáserősségétől és az érpályában jelenlévő szabad gyógyszer-szinttől függ. A központi idegrendszeri tünetek alacsonyabb plazmaszint mellett lépnek fel, a kérgi gátló neuronok bénulása okozta excitatórikus, konvulzív stádiumot a generalizált idegrendszeri gátlás követi hypoventillációval, majd légzésbénulással és kómával. A helyi érzéstelenítők plazmaszintje tovább emelkedve kardiotoxicitást okoz. A szív-érrendszerre gyakorolt hatásuk részben indirekt, a központi idegrendszer által mediált bifázisos válasz: az excitatórikus fázisra jellemző stimuláló hatás hiperdinamiás keringésben, majd a magasabb gyógyszer-szintek hatására kialakuló központi idegrendszeri depresszió bradycardiában és hipotóniában nyilvánul meg. Az egyes helyi érzéstelenítők aneszteziológiai potenciáljuk arányában különböző mértékű, szívizomra gyakorolt közvetlen hatásai sejtszinten a kardiális akciós potenciálokra és az azokat kialakító ionáramokra irányuló hatások eredményeként jönnek létre.

### 1.7. A szívizomsejtek akciós potenciálja és az azt kialakító ionáramok

Az akciós potenciál a sejtmembránban lévő idő- és feszültségfüggő nátrium-, kálium- és kalciumcsatornák konduktancia változásainak eredményeként jön létre. A -80 mV nyugalmi potenciállal rendelkező kamrai izomsejteken az inger hatására létrejön az akciós potenciál kb. 200 V/s maximális depolarizációs sebességgel jellemezhető felszálló ága (0. fázis), amely kb. 30-40 mV túllövést ér el. A felszálló ágat rövid korai repolarizáció követi (1. fázis), amely különösen intenzív az subepicardialis és midmyocardialis kamrai sejteken. A subepicardialis sejteken akár 20-30 mV nagyságot elérő korai repolarizációt egy újabb depolarizációs fázis követi, jellegzetes spike-and-dome morfológiát hozva létre. A platófázist (2. fázis) a membránpotenciál lassú repolarizációja jellemzi. A platófázisnak a terminális repolarizáció (3. fázis) vet véget, amelynek végére a membránpotenciál a nyugalmi értékre tér vissza (4. fázis).

Az akciós potenciál felszálló ágát szívizomban is a feszültségfüggő nátriumcsatornákon létrejövő, befelé irányuló nátriumáram ( $I_{Na}$ ) hozza létre, kevesebb, mint 1 ms alatt 110-120 mV feszültségváltozást eredményező nátriumáram irányul a sejtbe. Ezt követően a csatornák gyorsan inaktiválódnak, csak a negatív membránpotenciál értékeknél bekövetkező inaktivációból való visszatérést követően képesek újra megnyílni. A steady-state aktivációs és inaktivációs görbék átfedésének megfelelő szűk membránpotenciál tartományban kis amplitúdójú nátriumáram, az úgynevezett window nátriumáram észlelhető. Az  $I_{Na}$  klasszikus gátlószerei a tetrodotoxin, a saxitoxin, továbbá a helyi érzéstelenítők.

A korai repolarizációt létrehozó tranziens kifelé irányuló áram ( $I_{to}$ ) egyik, az intracelluláris kalciumkoncentrációtól független, de 4-aminopyridinre érzékeny káliumáram komponense ( $I_{to1}$ ) maga is legalább két különböző káliumcsatorna izoforma működése révén jön létre (kutyában és emberben dominánsan Kv4.3 és Kv1.4). Az  $I_{to}$  jelentősége a korai repolarizáció kialakításában és ezáltal a megfelelő mértékű kalciumbelépéshez szükséges elektromos hajtóerő fenntartásában van.

A befelé és kifelé irányuló áramok finom egyensúlya áll fent az akciós potenciál platófázisa alatt. Depolarizált feszültségértékek mellett a feszültségfüggő kalciumcsatornán keresztül az extracelluláris térből a sejtbe irányuló L-típusú kalciumáram ( $I_{Ca}$ ) valamint a repolarizáló hatású, főleg a gyors késői egyenirányító káliumcsatornákon keresztül kifelé folyó káliumáram ( $I_{Kr}$ ) párhuzamosan aktív. A platófázis elején az  $I_{to}$  is csekély mértékben hozzájárulhat a kifelé irányuló

áramokhoz, míg a befelé irányuló áramok közül a window nátriumáram játszik még szerepet a platófázis alakításában, és ezen keresztül az akciós potenciál időtartamának meghatározásában.

Az  $I_{Ca}$  aktivációs küszöbe kb. -25 mV-nál van, maximumát 0 mV körüli feszültségnél éri el. A szívizomban az  $I_{Ca}$  az extracelluláris térből történő kalciumbelépés fő mechanizmusa. A következményes intracelluláris kalcium koncentráció ( $[Ca^{2+}]_i$ ) növekedés indukálja a rianodin receptorokon keresztüli kalcium felszabadulást a szarkoplazmatikus retikulum kalciumraktáraiból. A megnövekedett intracelluláris  $Ca^{2+}$  koncentráció lehetővé teszi a  $Ca^{2+}$  ionoknak a troponin C molekulához kötődését, megindítva ezzel a kontraktilis apparátus működését. A diasztole alatt az intracelluláris  $Ca^{2+}$  koncentráció lecsökken, mivel jelentős része visszapumpálódik a szarkoplazmatikus retikulum raktáraiba. Az  $I_{Ca}$  jellemző gátlószerei a nifedipin-származékok, a verapamil és a diltiazem.

A repolarizáció alatt aktiválódó késői egyenirányító káliumáram két komponensből áll: az áram gyors ( $I_{Kr}$ ) és lassú ( $I_{Ks}$ ) komponensét különböztetjük meg. A fiziológias kamrai repolarizációban fő szerepet játszó  $I_{Kr}$  áramért felelős csatornákat a pórusformáló HERG alegység és az ehhez kapcsolódó regulatórikus alegység, a MIRP1 fehérje alkotja. Az  $I_{Kr}$  -40 mV membránpotenciál felett aktiválódik. C-típusú inaktivációja következtében a csatorna markánsan befelé egyenirányít. Szelektív gátlószere a dofetilid, a d-sotalol és az E4031 kódjelű vegyület.

A KCNQ1 gén által kódolt Kv7.1 csatorna fehérje (korábbi elnevezése KvLQT1) és a minK alegységek együttesen alkotják az  $I_{Ks}$  áramot létrehozó csatornát. Emberi szíven az  $I_{Ks}$  a plató fázis alatt nagyon lassan aktiválódik, majd viszonylag gyorsan, néhány száz ms alatt deaktiválódik. Az  $I_{Ks}$  aktiválódásának az akciós potenciál megnyúlása esetén, a további extrém megnyúlás megelőzésében tulajdonítanak szerepet, így az  $I_{Ks}$  áramot jelen ismereteink szerint inkább a repolarizációs rezerv részeként, semmint a repolarizációt vezérlő áramként képzeljük el. Az áram szelektív gátlószere a chromanol 293B.

Az  $I_{K1}$  befelé egyenirányító káliumáram az akciós potenciálok közötti erősen negatív nyugalmi membránpotenciál kialakításáért felelős. A befelé történő egyenirányító sajátsága teszi lehetővé, hogy a csatornák a nyugalmi potenciál közelében nyitva legyenek, de depolarizáció hatására záródjanak. Az  $I_{K1}$  fontos szerepet játszik a terminális repolarizáció felgyorsításában és teljessé tételében is.

Az áram háttérében kutyában és emberben a Kir2.1 a domináns csatorna izoforma. Az  $I_{K1}$  áramnak nincs teljesen szelektív gátlószere, de 50  $\mu\text{M}$   $\text{BaCl}_2$  alkalmazásával viszonylag szelektív gátlás érhető el.

## 1.8. Új helyi érzéstelenítők a klinikai gyakorlatban

### 1.8.1. *Ropivacain* (N-2,6-dimethylphenyl-1-propylpiperidine-2-carboxamid)

Az első olyan, kizárólag S sztereoizomert tartalmazó hosszú hatású helyi érzéstelenítő, amelyet célzottan az alacsonyabb kardiotoxicitás reményében fejlesztettek ki. Kisebb lipidszolubilitással és fehérjekötő képességgel valamint szignifikánsan rövidebb terminális féléletidővel rendelkezik, mint a bupivacain. Klinikai alkalmazás során ekvipotens dózisban adva a két szer hasonló tulajdonságokkal rendelkezik. Általánosan elfogadott, hogy a ropivacain hasonló aneszteziológiai potenciálja mellett a bupivacainhoz képest alacsonyabb kardiotoxikus potenciállal bír. Ennek ellenére széleskörű alkalmazása során a ropivacain-anesztézia kapcsán is többször közöltek szívmegállást illetve súlyos arrhythmia kialakulását, melyek nagy gyógyszer mennyiségek beadását igénylő eljárások során vagy érbe történő véletlen befecskendezés következtében alakultak ki.

Állatkísérletekben különböző állatfajokból izolált szívkészítményeken a ropivacain gyengébb negatív inotróp és kronotróp hatást mutatott, mint a bupivacain és kevésbé volt arrhythmogen. Bár a ropivacain ekvipotens adagjait tesztelve a ropivacain kevésbé tűnt kardiotoxikusnak, mint a bupivacain, a szubletális dózisok alkalmazása mennyiségileg és minőségileg hasonló hemodinamikai változásokat okozott. Ezzel szemben, intrakoronáriálisan alkalmazva a kamrai ingerületvezetést a bupivacain erősebben gátolta. Széles körű alkalmazása, az önkénteseken és különböző kísérleti állatokon végzett részletes vizsgálatok ellenére kevés adat áll rendelkezésre a molekula sejtszintű kardiális hatásaira vonatkozóan. A ropivacain negatív inotróp hatása mellett use-dependens módon csökkentette a szívizomsejteken a depolarizáció maximális sebességét ( $V_{\text{max}}$ ), melyet egyenesen arányosnak tartunk a gyors nátriumáram sűrűségével. Ezen hatása gyengébb volt, mint a bupivacainé, de erősebb, mint a lidocainé. A ropivacain a lidocainhoz képest alacsonyabb frekvenciáktól kezdve csökkentette a depolarizáció maximális

sebességét. A nátriumcsatornáról való leválási időállandóját sokkal hosszabbnak találták, mint a lidocainét, bár rövidebbnek, mint a bupivacainét.

A ropivacain több humán klónozott kardiális ioncsatorna működését, így az  $I_{to}$  molekuláris bázisát képző Kv4.3/KChIP csatornát valamint a pitvari szívizom egyik fontos repolarizáló áramát, az  $I_{Kur}$  áramot mediáló Kv1.5 csatornát a rutin klinikai alkalmazás során mért plazmaszinteknél magasabb koncentrációknál gátolta. Toxikológiailag releváns koncentrációban, a bupivacainéval azonos hatékonysággal gátolta a humán  $I_{Kr}$  áram hátterében álló HERG csatornákat. Tengerimalacból izolált kamrai szívizomsejteken a ropivacain csökkentette az  $I_{Na}$  és az  $I_{Ca}$  áramok nagyságát, de nem befolyásolta szignifikánsan az  $I_K$  és  $I_{K1}$  áramokat. Ezek az ioncsatornákra irányuló gátló hatások hozzájárulhatnak a ropivacainnal kiváltható kardiotoxicitáshoz.

### **1.8.2. Articain** ( (RS)-methyl 4-methyl-3-(2-propylaminopropanoylamino)thiophene-2-carboxylate)

Az articain racem keverék, egyedülálló az amid típusú helyi érzéstelenítők között, mert egy zsírolékonyságot fokozó tiofén gyűrűt tartalmaz, észtercsoportja pedig lehetővé teszi az észterázok hatására bekövetkező hidrolízist a plazmában és a szövetekben. A lidocainnal összehasonlítva a hasonló érzéstelenítő hatás mellett sem lokális, sem szisztémás nem kívánatos hatásai vonatkozásában nem találtak számottevő eltérést. Plazmafehérje-kötése 70 %-os, az articain jobban diffundál a csontba és légyszövetekbe, mint más anesztetikumok. Bár elsősorban a fogászati alkalmazása elterjedt, a lidocainéhoz képest gyorsabb hatása, rövidebb eliminációja, valamint alacsony plazmakoncentrációja miatt az ambuláns sebészet során alkalmazott regionális anesztéziában is előnyös lehet a használata.

Lényeges, hogy eddig az irodalomban nem jelent meg közlemény articain okozta szívmegeállásról, fogászati alkalmazása során a kardiovaszkuláris rendszerre nem gyakorolt szignifikáns gátló hatást. A klinikai plazmaszintet tízszeresen meghaladó koncentrációban az articain szignifikánsan kisebb mértékben volt kardiodepresszív, mint a bupivacain ötszörös koncentrációban. Széleskörű alkalmazása ellenére az articain sejtszintű szívelekrofiziológiai hatásairól alig tudunk valamit. Egy korai közleményben csökkentette a nyúl kamrai akciós potenciáljának amplitúdóját és a depolarizáció sebességét. A HERG csatornákat a klinikailag releváns koncentrációkban nem gátolta az articain. Kevés ismeret áll rendelkezésünkre az

articain más ingerlékeny struktúrákra kifejtett hatásainak vonatkozásában is. Nyúl haráncsíkt izomsejteken gátolta a szarkoplazmatikus retikulum  $\text{Ca}^{2+}$ -függő ATP-áz aktivitását, csökkentve a kalciumionok kötődését a nagy affinitású transzport helyekhez, és a  $\text{Ca}^{2+}$ -visszavétel sebességét. Mindez elhúzó izomspazmushoz vezethet, ha a szer az izomba diffundál.

## 2. CÉLKITŰZÉSEK

Az articain és a ropivacain viszonylag rövid ideje használt érzéstelenítőszer a klinikai gyakorlatban. Széles körű használatuk és általában alacsonyabbnak tartott kardiotoxikus potenciáljuk ellenére kevés releváns adat áll rendelkezésünkre celluláris szintű kardiális hatásaik vonatkozásában. Jelen vizsgálataink célja az articain és a ropivacain várható sejtszintű szívelektrofiziológiai hatásaira vonatkozó adatok nyérése kutyaszívből izolált kamrai izomsejteken, mert a kutya szívizomsejtek elektrofiziológiai tulajdonságait tartják a leginkább hasonlónak a humán cardiomyocytákéhoz az ionáramok megoszlását és kinetikáját tekintve. Vizsgálataink során az alábbi fontosabb kérdésekre kerestünk választ:

1. Milyen koncentrációfüggő hatást gyakorol az articain és ropivacain a szívizomsejtek elektromos folyamataira?
2. Ezen belül hogyan befolyásolja az articain és a ropivacain az akciós potenciál alakját (korai repolarizáció mélysége, platófázis magassága) és jellegzetes paramétereit (amplitúdó, depolarizációs sebesség, időtartam) különböző ingerlő frekvenciák mellett?
3. Az akciós potenciál alakváltozásainak hátterében milyen, az akciós potenciál kialakításában résztvevő ionáramok módosulása áll?
4. Milyen hatást gyakorol az articain és a ropivacain a myocardium kalcium-homeosztázisára (intracelluláris  $\text{Ca}^{2+}$ -tranziensek nagysága, a  $\text{Ca}^{2+}$ -felszabadulás és -visszavétel sebessége) és kontraktilitására?
5. A többi, a klinikai gyakorlatban használt helyi érzéstelenítővel összehasonlítva milyen proarrhythmias kockázattal kell számolnunk a rutin klinikai alkalmazás illetve véletlen érpályába történt beadás esetén?

### **3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK**

#### **3.1. Kamrai szívizomsejtek izolálása kutyából**

Az állatok altatását követően a szíveket gyorsan eltávolítottuk és Tyrode oldatba helyeztük. A bal elülső leszálló koszorúért kanuláltuk, a szívizomsejteket a szegmentperfúziós technika alkalmazásával, enzimátikus kezeléssel nyertük. A preparátumot  $\text{Ca}^{2+}$ -mentes tápoldattal 5 percig perfundáltuk, majd ezt 1 mg/ml kollagenázzal és 0,2 % bovin szérum albuminnal kiegészített, 50  $\mu\text{M}$   $\text{Ca}^{2+}$ -tartalmú oldattal végzett átáramoltatás követte 30 percig. A bal kamrafal megemésztett részeit kis kockákra vágtuk és az eljárás végén nyert sejtszuspenziót többször átmosva a  $\text{Ca}^{2+}$ -koncentrációt fokozatosan 2,5 mM-ra visszaállítottuk. A sejteket felhasználásukig 15 °C hőmérsékleten tároltuk.

#### **3.2. Akciós potenciál elvezetése intracelluláris mikroelektróda technikával**

Valamennyi elektrofiziológiai mérést 37 °C hőmérsékleten végeztük. Az egyértelmű harántcsíkolatot mutató, téglalap alakú élő sejteket egy oxigénizált Tyrode oldattal folyamatosan átáramoltatott plexiüvegből készült mérőkádban ülepítettük. Az akciós potenciál elvezetését Axoclamp 2B típusú erősítő bemenetéhez kapcsolt hegyes üveg mikroelektróda segítségével végeztük. A sejteket az elektródán keresztül 1 Hz frekvenciával folyamatosan ingereltük 1 ms időtartamú négyszög impulzusokkal. Az alkalmazott kísérleti feltételek mellett az akciós potenciál időtartamának időfüggő változásai 60 percen belül elhanyagolható mértékűek voltak. Az artocain és a ropivacain koncentrációfüggő hatásainak vizsgálatakor a szerek koncentrációját kumulatív módon növeltük 1 és 300  $\mu\text{M}$  között. Valamennyi koncentrációt 3 percig alkalmaztuk, majd az ezt követő, gyógyszermentes Tyrode oldattal történő kimosás 10 percig tartott. Ezek az inkubációs és kimosási periódusok elegendőek voltak a steady-state szerhatások kialakulásához illetve azok gyakorlatilag teljes reverzibilitásához. A frekvenciafüggő mérések esetén 5 s ciklushosszon kezdtük az ingerlést, majd legalább 5 perc ekvilibrációs periódust követően a ciklushosszat fokozatosan csökkentettük. Az akciós potenciálokat 200 kHz mintavételezési frekvencia mellett Digidata 1200

tipusú analóg-digitális konverter segítségével digitalizáltuk és az analízisig számítógép merevlemezén tároltuk.

### **3.3. Ionáramok mérése konvencionális voltage clamp technikával**

A sejteket oxigenizált Tyrode oldattal perfundáltuk 37 °C hőmérsékleten. A membránáramokat Axopacth 2B erősítővel vezettük el a patch clamp technika teljes sejt konfigurációját használva. Miután enyhe szívással 1-10 GΩ ellenállású kapcsolatot, ún. gigaseal alakítottunk ki, az elektróda hegye alatt lévő membránt további szívással vagy 1-5 ms időtartamú, 1,5 V nagyságú elektromos impulzusokkal felszakítottuk. A soros ellenállás jellegzetesen 4-8 MOhm volt, amit a mérés előtt általában 50% és 80% közötti szinten kompenzáltunk. A kísérleteket kihagytunk az értékelésből, ha a soros ellenállás magas volt vagy a mérés alatt jelentősen növekedett. A mintavételezést AxonpClamp 6.0 program segítségével végeztük 100 kHz frekvencián. A mért ionáramokat minden esetben a sejt kapacitására normalizáltuk, melyet minden sejten egy rövid, -10 mV-ról -20 mV-ra történő hiperpolarizáló impulzus segítségével határoztunk meg.

### **3.4. Ionáramok mérése akciós potenciál clamp technikával**

A gigaseal kapcsolat kialakítása után és a sejtbe való betörést követően a Tyrode oldattal perfundált szívizomsejtekről az akciós potenciálokat áram clamp üzemmódban vezettük el. A sejteket az elektródán keresztül folyamatosan 1 Hz frekvenciával ingereltük oly módon, hogy legalább 1-2 ms eltérés legyen a stimulus artefaktum és az akciós potenciál felszálló ága között. Minden sejtről 10 egymást követő akciós potenciált vezettünk el, amelyeket digitalizáltunk és on-line átlagoltunk. Ezt az átlagolt jelet, mint parancsjelet alkalmaztuk ugyanazon sejten változatlan frekvenciával, miután az erősítőt feszültség clamp üzemmódba kapcsoltuk. Az ilyen körülmények között elvezetett áramjel a nulla-szint közelében futó vízszintes vonal volt, leszámítva az akciós potenciál felszálló szárának megfelelő rövid szakaszt, ahol a feszültségkontroll nem volt megfelelő. Valamely ionáram vizsgálatakor az adott áram specifikus gátlószerét alkalmaztuk. Ilyenkor a vizsgált áramot az erősítőnek kell pótolnia, ami membránáramként jelenik meg, az eredetivel ellentétes előjellel. Ezt az analízis során a konvencionális polaritásnak megfelelően megfordítottuk.

Az articaint és a ropivacaint 10  $\mu\text{M}$  és 1000  $\mu\text{M}$  közötti koncentrációkban kumulatív módon alkalmaztuk. A szerek által gátolt ionáramokat úgy határoztuk meg, hogy a szer hozzáadása után nyert áramgörbéből kivontuk a szer adása előtt elvezetett áramjelet. Ez a művelet három, jól elkülönülő csúccsal jellemezhető összetett áramprofil eredményezett: a legkorábban jelentkező kifelé irányuló áramcsúcsot  $I_{\text{to}}$ -ként, az ezt követően kialakuló befelé irányulót  $I_{\text{Ca}}$ -ként, míg a terminális repolarizációval szinkron megjelenő késői kifelé irányuló áramcsúcsot az  $I_{\text{Kr}}$  és  $I_{\text{K1}}$  keverékeként azonosítottuk.

### **3.5. A kontraktilis erő mérése**

Az 1 mm-nél kisebb átmérőjű vékony kamrai trabekulákat folyamatosan perfundáltuk 37 °C hőmérsékletű Krebs oldattal, amelynek pH-ját 7,4  $\pm$ 0.05 értékre állítottuk be. A kontrakciós erőt egy mikromanipulátorhoz rögzített kapacitív mechano-elektromos transzducer segítségével határoztuk meg. Valamennyi preparátum a maximális erőt eredményező nyugalmi hosszra lett beállítva. A preparátumokat a mérés előtt 60 percig hagytuk stabilizálódni 2 másodperc ingerlési ciklushossz mellett. Az articain és a ropivacain kumulatíván növekvő koncentrációit alkalmaztuk (minden koncentrációt 20 percig), majd 60 perc kimosás következett. Az adatokat 1 kHz mintavételi frekvencia mellett Digidata 1200 analóg-digitális konverter segítségével digitalizáltuk, majd számítógép merevlemezén rögzítettük, ahol azokat a későbbi feldolgozásig tároltuk.

### **3.6. Intracelluláris $\text{Ca}^{2+}$ -tranziensek elvezetése**

A sejten belüli  $\text{Ca}^{2+}$ -koncentráció változásait egy ratiometriás alapú kalciumszenzitív festék, a Fura-2 fluoreszcenciájának követésével határoztuk meg 37°C hőmérsékleten. Az izolált szívizomsejteket szobahőmérsékleten 3  $\mu\text{M}$  Fura-2-acetoximetilésztert tartalmazó Tyrode oldatban. Pluronic F-127 jelenlétében inkubáltuk 10 percig. Ezután, valamint a festék legalább 30 percig tartó deészterifikációját követően a sejteket a felhasználásig 15 C°-on tároltuk. A sejteket platinából készült elektródapár segítségével 1 Hz frekvenciával ingereltük. A festéket xenon ívlámpából származó 340 nm és 380 nm hullámhosszúságú fényvel gerjesztettük, az emittált fényt fotoelektron-sokszorozó segítségével 510 nm-en detektáltuk. Az intracelluláris szabad  $\text{Ca}^{2+}$ -szinteket a nem specifikus háttér fluoreszcencia korrekcióját követően, a 340 nm és 380 nm hullámhosszakon történt

gerjesztés után kapott fluoreszcencia intenzitások hányadosaként határoztuk meg, mindig 10 egymást követő  $[Ca^{2+}]_i$ -tranzienst átlagolva össze. Az articain és ropivacain kumulatív módon növekvő koncentrációit (minden koncentrációt 3 percig) vizsgáltuk, majd a sejteket 10 percig Tyrode oldattal mostuk.

### **3.7. Nehéz SR vezikulák preparálása**

A szarkoplazmatikus retikulum terminális ciszternáinak membránjából lefűződött nehéz SR vezikulákat a kutya bal kamra izomzatából izoláltuk. A szövetminták homogenizációját és 4500 g-n végzett centrifugálást követően a nyers mikroszómákat a felülúszóból 40000 g-n végzett centrifugálással tovább tisztítottuk. Az aktomiozin szennyeződést 600 mM KCl oldatban végzett oldással távolítottuk el, a mikroszóma frakciót 109000 g-n végzett centrifugálással nyertük. A pelletet újraszuszpendáltuk, majd 20-45 %-os lineáris cukorgradiensre rétegeztük. A nehéz SR vezikulákat a folyamatos cukorgradiens 36-38 %-os régiójából nyertük, majd 0,4 M cukorban 10 mM K-PIPES-ben (pH=7,0) azokat reszuszpendáltuk. A preparátumban a fehérje koncentrációját Biuret módszerrel határoztuk meg.

### **3.8. ATP-áz aktivitás meghatározása**

Az ATP-áz aktivitást kapcsolt enzim assay technikával határoztuk meg 37 °C hőmérsékleten (pH=7,5). A teljes hidrolitikus aktivitást a NADH elnyelési hullámhosszánál (340 nm) észlelt fényintenzitás változásaként mértük. A nehéz SR vezikulák teljes hidrolitikus aktivitása 2,7 - 2,82 IU között mozgott, a  $Ca^{2+}$ -függő ATP-áz aktivitást a teljes hidrolitikus aktivitás 5 mM thapsigargin által gátolt részeként identifikáltuk. A szert 5 perccel az enzimaktivitás mérés kezdete előtt adtuk a preparátumhoz. A vizsgálatot  $Ca^{2+}$  és EGTA adott keverékének jelenlétében végeztük, amellyel a becsült szabad  $Ca^{2+}$ -koncentrációt 2,4  $\mu$ M értékre állítottuk be, ahol a SERCA aktivitása maximális volt.

### **3.9. $Ca^{2+}$ -felvétel és $Ca^{2+}$ -felszabadulás mérése nehéz SR vezikulákon**

A szarkoplazmatikus retikulum nehéz vezikuláiba történő  $Ca^{2+}$ -felvétel és felszabadulás meghatározását a  $Ca^{2+}$ -érzékeny antipirilazo III festék segítségével végeztük. Az elnyelést 710 nm-en SPEX spektrofotométerrel mértük. A  $Ca^{2+}$ -felvétel mérésekor a vezikulákat articain vagy ropivacain jelenlétében aktívan töltöttük fel  $Ca^{2+}$ -mal 37 °C hőmérsékleten 1mM ATP/MgCl<sub>2</sub> és 0,25 mM antipirilazo III tartalmú

pufferban. A feltöltést 100  $\mu\text{M}$   $\text{CaCl}_2$ -nak a közeghez adása indította el, a felvétel sebességét az extravezikuláris  $\text{Ca}^{2+}$ -koncentráció csökkenéseként monitoroztuk. Az abszorpciós szignált  $\text{CaCl}_2$  ismételt hozzáadásával kalibráltuk.

A  $\text{Ca}^{2+}$ -felszabadulás mérésekor a vezikulákat 200  $\mu\text{M}$   $\text{CaCl}_2$  jelenlétében egy éjszakán át inkubálva, passzív módon töltöttük fel  $\text{Ca}^{2+}$ -mal. A  $\text{Ca}^{2+}$ -felszabadulást artocain illetve ropivacain adott koncentrációival történt 5 perces előinkubációt követően 0,3 mM thymol hozzáadása indította el. A  $\text{Ca}^{2+}$ -felszabadulás kezdeti sebességét az extravezikuláris  $\text{Ca}^{2+}$ -koncentráció növekedéséből határoztuk meg.

### **3.10. Analízis**

A mérések során nyert adatokat átlagoltuk és kiszámítottuk a standard errorrt (SE). Az átlagértékek különbségeinek megítélésére ANOVA-t és Student-féle t próbát illetve Dunnett tesztet használtunk. A kapott eredményeket  $p < 0,05$  esetén tekintettük szignifikánsnak. A kumulatív dózis-hatás görbéket az adatok Hill egyenlettel történő illesztésével nyertük, az  $\text{EC}_{50}$  félgátló koncentrációkat és a Hill koefficienseket ezekből határoztuk meg.

### **3.11. Vegyszerek**

Az artocaint (Ultracain 5 ml 2 %-os oldat) az Aventis Pharma Deutschland GmbH-től szereztük be. A ropivacaint (Naropin 20 ml 7,5 mg/ml) az AstraZeneca AB-től vásároltuk és a felhasználás napján frissen készítettük Tyrode oldattal a végső koncentrációig hígítva. A többi vegyszer a Sigma Aldrich Co.-tól származott.

## **4. EREDMÉNYEK**

### **4.1. Az artocain hatása az akciós potenciál paramétereire**

Az 1Hz frekvenciával ingerelt kutya kamrai szívizomsejteken az artocain koncentrációfüggő módon módosította az akciós potenciál morfológiáját, csökkentette az akciós potenciál amplitúdóját, a depolarizáció maximális sebességét ( $V_{\text{max}}$ ), a korai repolarizáció amplitúdóját, az akciós potenciál időtartamát (APD) és plató-depressziót okozott. Az akciós potenciál időtartamának a rövidülése és a  $V_{\text{max}}$

csökkenése 10  $\mu\text{M}$  ill. 30  $\mu\text{M}$  koncentrációktól volt szignifikáns. A  $V_{\text{max}}$  értékeket a Hill egyenlethez illesztve 162 $\pm$ 30  $\mu\text{M}$  félgátló koncentrációt és 1,16 $\pm$ 0,03 Hill koefficienszt kaptunk. A fenti hatások mindegyike reverzibilis volt 5 perc articainmentes Tyrode oldattal történő mosást követően.

#### 4.2. Frekvenciafüggő sajátosságok

Mind a depolarizáció maximális sebességének ( $V_{\text{max}}$ ) csökkenése, mind az akciós potenciál időtartamának articain okozta megrövidülése frekvenciafüggő volt. Míg az első hatás a magasabb frekvenciánál volt kifejezettebb (normál frekvenciafüggés), addig az utóbbi az alacsonyabb frekvenciák mellett volt hangsúlyosabb (fordított frekvenciafüggés). Mindkét tulajdonság jellemzője az ionsatorna-gátlóknak, beleértve számos helyi érzéstelenítőt. A  $V_{\text{max}}$  és az akciós potenciál időtartam restitúciós kinetikájának meghatározása során a sejteket 1 Hz frekvenciával 20 alapstimulusból álló ingersorozattal ingereltük. Valamennyi sorozatot egyetlen extrastimulus követett folyamatosan növekvő kapcsolási intervallumokkal. Az extrastimulust követően az alapingersorozatot megismételtük. Így minden huszadik alap akciós potenciált egy-egy extra akciós potenciál követett, egyre hosszabb diasztolés intervallumokkal. A diasztolés intervallumot a sorozat utolsó alap akciós potenciáljának 90 %-os repolarizációs szintjétől az extra akciós potenciál felszálló száráig eltelt időként definiáltuk. A leghosszabb, 5 s diasztolés intervallumot követően a depolarizáció maximális sebességére ( $V_{\text{max}}$ ) vonatkozóan mért 16,2 $\pm$ 2 %-os tónusos gátlás mellett egyre nagyobb frekvenciafüggő gátlás alakult ki a diasztolés időközök rövidülésével. A frekvencia-függő  $V_{\text{max}}$ -gátlás offset kinetikáját az articain mérési eredmények alapján monoexponenciális függvény illesztésével határoztuk meg. Az articain leválási időállandója 92 $\pm$ 20ms-nak adódott. Ez rövidebb, mint amit más helyi érzéstelenítő szerek esetében tapasztaltak. Az akciós potenciál időtartamának restitúciós görbéi articain jelenlétében laposak voltak. Ez arra utal, hogy a különböző diasztolés időközöket követően kiváltott akciós potenciálok időtartama részlegesen elvesztette a normál Tyrode oldatban észlelt természetes frekvenciafüggő sajátosságát.

### 4.3. Az artocain hatása a szívizomsejtek ionáramaira konvencionális voltage clamp körülmények között

Ezekben a kísérletekben az artocain koncentrációfüggő hatásait tanulmányoztuk a szívizomsejtek egyes ionáramaira konvencionális voltage clamp technikával, kumulatív módon növelve a szerkoncentrációt a 10 és 1000  $\mu\text{M}$  közötti tartományban.

Az L-típusú  $\text{Ca}^{2+}$ -áramot ( $I_{\text{Ca}}$ ) a sejtek  $-40$  mV tartó potenciálról  $+5$  mV-ra történő, 200 ms hosszúságú depolarizációjával aktiváltuk. A Tyrode oldat 3 mM 4-aminopyridin, 1  $\mu\text{M}$  E4031 és 30  $\mu\text{M}$  chromanol 293B elegyét tartalmazta a különböző káliumáramok gátlása céljából. Az artocain koncentrációfüggő módon gátolta a  $\text{Ca}^{2+}$ -áramot, mely gátló hatást  $471 \pm 75$   $\mu\text{M}$   $\text{EC}_{50}$  és  $1,07 \pm 0,14$  Hill koefficiens értékekkel jellemeztünk az adatok Hill egyenlethez történő illesztésével.

A tranziens káliumáramot ( $I_{\text{to}}$ ) a  $-80$  mV potenciálon tartott sejtek 200 ms időtartamú,  $+50$  mV-ra történő depolarizálásával aktiváltuk. Minden tesztimpulzust egy-egy 5 ms időtartamú  $-40$  mV-ra történő depolarizáció előzött meg a  $\text{Na}^+$ -áram inaktiválása céljából, míg a  $\text{Ca}^{2+}$ -áramot 1  $\mu\text{M}$  nisoldipin hozzáadásával gátoltuk. Az artocain koncentrációfüggő módon gátolta az  $I_{\text{to}}$  áramot, mely gátló hatást  $365 \pm 62$   $\mu\text{M}$   $\text{EC}_{50}$  és  $1,02 \pm 0,04$  Hill koefficiens értékekkel írtunk le.

A befelé egyenirányító káliumáramot ( $I_{\text{K1}}$ ) a  $-80$  mV-on tartott sejtek  $-135$  mV-ra történő hiperpolarizációjával vizsgáltuk. A steady-state áramot 400 ms után határoztuk meg. Az artocain  $\text{EC}_{50} = 372 \pm 46$   $\mu\text{M}$  félgátló koncentrációval valamint  $1,63 \pm 0,09$  Hill koefficienssel jellemezhető módon gátolta az  $I_{\text{K1}}$  áramot.

A késői egyenirányító káliumáram gyors komponensét ( $I_{\text{Kr}}$ ) a  $-80$  mV potenciálon tartott sejtek  $+40$  mV-ra történő 1 s időtartamú depolarizációjával aktiváltuk. Az áram nagyságát a  $-30$  mV-ra történő repolarizációt követően rögzített farokáram amplitúdójával jellemeztük. A  $\text{Ca}^{2+}$ -áramot 1  $\mu\text{M}$  nisoldipinnel, míg a késői egyenirányító áram lassú komponensét 30  $\mu\text{M}$  chromanol 293 B-vel gátoltuk. Az  $I_{\text{Kr}}$  farokáramok amplitúdói progresszíven csökkentek az artocain egyre növekvő koncentrációinak hatására. Az  $\text{EC}_{50}$  értéke  $278 \pm 79$   $\mu\text{M}$ , a Hill-koefficiens nagysága  $0,96 \pm 0,14$  volt.

A késői egyenirányító kálium áram lassú komponensét ( $I_{\text{Ks}}$ ) szintén farokáramként értékeltük. Az áramot a sejtek 3 s hosszú,  $+50$  mV-ra történő depolarizálásával aktiváltuk, a farokáram amplitúdóját a repolarizációt követően a  $-40$  mV tartópotenciálon mértük. A  $\text{Ca}^{2+}$ -áramot 1  $\mu\text{M}$  nisoldipin, az  $I_{\text{Kr}}$  áramot 1  $\mu\text{M}$

E4031 segítségével gátoltuk. Az  $I_{Ks}$  gátlás vonatkozásában a félhatásos koncentráció  $326 \pm 65 \mu\text{M}$ , a Hill koefficiens  $0,87 \pm 0,07$  volt.

#### **4.4. Az articain ionáramokra gyakorolt hatása akciós potenciál clamp körülmények között**

A konvencionális és az akciós potenciál voltage clamp technikákkal összehasonlítva egy ionáram profilja jelentősen különbözhet. Az akciós potenciál clamp technika előnye, hogy az valamely szernek a nettó membránáramra gyakorolt hatását rögzíti, ezáltal több ioncsatornára gyakorolt szerhatást tudunk párhuzamosan monitorozni. Ez a technika lehetővé teszi továbbá a valódi áram profilok megjelenítését is az akciós potenciál alatt. Amennyiben egy szer több ionáramra is fejt ki gátló hatást, mint pl. az articain, ilyenkor több csúcs jelenik meg az áramjelen, valamennyi egy-egy ioncsatorna ujjlenyomata. A legkorábban jelentkező korai kifelé irányuló áramcsúcs az  $I_{to}$  gátlását, míg a befelé irányuló áramcsúcs a  $\text{Ca}^{2+}$ -áram gátlását jelzi. A késői kifelé irányuló áramcsúcs az akciós potenciál terminális repolarizációjával esik egybe, ezt az  $I_{K1}$  és az  $I_{Kr}$  3:1 arányban alkotják. Az articain szignifikánsan gátolta az  $I_{to}$ ,  $I_{Ca}$ ,  $I_{K1}$  és  $I_K$  áramokat. A fenti áramok gátlása az articain koncentrációjának  $1000 \mu\text{M}$  koncentrációig történő emelésével párhuzamosan fokozódott és nagymértékben reverzibilis volt. A konvencionális feszültség clamp mérések eredményeivel szemben, ahol a legmagasabb  $\text{EC}_{50}$  értéket az  $I_{Ca}$  vonatkozásában kaptuk,  $100 \mu\text{M}$  articaine erőteljesebb gátlást gyakorolt az  $I_{Ca}$  -ként azonosított befelé irányuló áramcsúcsra a késői kifelé irányuló áramcsúcsához képest.

#### **4.5. A ropivacain hatása az akciós potenciál paramétereire**

A ropivacain kezelés - az articainhoz hasonlóan - koncentrációfüggő változásokat okozott a szívműködés akciós potenciáljának alakjában és jellemző paramétereiben, beleértve a depolarizáció maximális sebességének ( $V_{max}$ ) csökkenését, az akciós potenciál időtartamának rövidülését, a korai repolarizáció amplitúdójának csökkenését és a plató depresszióját. Ezen hatások közül a korai repolarizáció amplitúdójának és a depolarizáció maximális sebességének a csökkenése  $10 \mu\text{M}$  koncentrációtól, míg az akciós potenciál rövidülése  $30 \mu\text{M}$ -tól volt statisztikailag szignifikáns. A  $V_{max}$  értékeket a Hill egyenlethez illesztve  $81 \pm 7 \mu\text{M}$

$EC_{50}$  értéket kaptunk, míg a Hill koefficiens  $1,02 \pm 0,08$  volt. A depolarizáció maximális sebességének ( $V_{max}$ ) és a korai repolarizáció gátlása teljesen reverzibilis volt 10 perces mosás után. Érdekes módon az  $APD_{90}$  feltűnő rebound jelenséget mutatott: a normál szint fölé nőtt a ropivacain-mentes Tyrode oldattal történt mosást követően. Az akciós potenciál amplitúdója  $100 \mu\text{M}$  ropivacain hatására  $114,6 \pm 2,2$  mV értékről  $100,8 \pm 2,8$  mV értékre csökkent, ami  $113,8 \pm 2,9$  mV értékre tért vissza a 10 perces kimosást követően. Bár a ropivacain nem okozott statisztikailag szignifikáns változásokat a sejtek nyugalmi membránpotenciáljában, a  $100 \mu\text{M}$  feletti koncentrációk esetén depolarizációs tendencia volt megfigyelhető.

#### 4.6. Frekvenciafüggő sajátosságok

A ropivacain hatására kialakuló  $V_{max}$ -csökkenés és akciós potenciál rövidülés frekvenciafüggő volt. A depolarizáció maximális sebességének ( $V_{max}$ ) a csökkenése a magasabb ingerlési frekvenciáknál erősödött, ami a ropivacain  $\text{Na}^+$ -csatornákra gyakorolt use-dependens hatásának tulajdonítható. Ezzel szemben az akciós potenciál időtartamának (APD) rövidülése alacsonyabb ingerlési frekvenciák mellett volt kifejezettebb, és teljesen hiányzott 1 s alatti ciklushosszak esetén. Ez a fordított frekvenciafüggő hatás számos ioncsatorna-gátlószer általános tulajdonsága, és a kisebb nettó kifelé irányuló árammal magyarázható, amely a hosszabb ciklusok során észlelt hosszabb akciós potenciálok platója alatt folyik. Feltételezhető, hogy a ropivacain rövidítő hatásának oka az  $I_{Ca}$  valamint a window  $I_{Na}$  gátlása. A depolarizáció maximális sebességének ( $V_{max}$ ) és az akciós potenciál időtartam (APD) restitúciós kinetikájának meghatározásakor a restitúciós görbéken minden extra akciós potenciál  $V_{max}$  illetve APD értékét a megfelelő diasztolés intervallum függvényében ábrázoltuk. A leghosszabb diasztolés intervallumnak megfelelően a depolarizáció maximális sebességére vonatkozóan mért  $37 \pm 1\%$  tónusos gátlás mellett a diasztolés időköz csökkenésével jellegzetes frekvenciafüggő gátlás volt megfigyelhető. A frekvenciafüggő  $V_{max}$  gátlás offset kinetikáját exponenciális illesztéssel határoztuk meg. A ropivacain leválási időállandója  $340 \pm 40$  ms-nak adódott. Az APD-diasztolés intervallum kapcsolatát ábrázoló görbék  $100 \mu\text{M}$  ropivacain jelenlétében laposak voltak, és szemben a kontroll görbékkel, amikor az APD a diasztolés intervallum hosszabodásával jelentős mértékben növekedett, az  $APD_{50}$  értékek ( a repolarizáció 50%-s szintjén mért akciós potenciál időtartam) a ropivacain jelenlétében a diasztolés intervallum növekedésével csökkentek.

#### **4.7. A ropivacain hatása a szív ionáramaira konvencionális voltage clamp körülmények között**

A ropivacain számos ionáramot gátolt koncentrációfüggő módon. A ropivacain koncentrációját kumulatív módon növeltük 10  $\mu\text{M}$  és 1000  $\mu\text{M}$  között, a gátló hatásokat Hill egyenlettel illetve meghatároztuk az  $\text{EC}_{50}$  értékét és a Hill koefficiensét. A mérésekhez használt feszültséglépcsők és ioncsatorna-gátlószerrek megfeleltek az articainnal végzett kísérletek során alkalmazott protokolloknak. A vizsgált ionáramok mindegyikét 250  $\mu\text{M}$  és 400  $\mu\text{M}$  közötti  $\text{EC}_{50}$  értékekkel gátolta a ropivacain - kivéve az  $I_{\text{Ks}}$  áramot, ahol  $106 \pm 18 \mu\text{M}$  félhatásos koncentrációt kaptunk. A Hill koefficiens nagysága minden esetben 1 körüli érték volt, jelezvén, hogy a ropivacain valószínűleg egyetlen kötőhelyhez kötődve fejti ki hatását a kardiális ionáramokra. A ropivacain jelenlétében megfigyelt ioncsatorna-gátlások jelentős különbségeket mutattak a hatás kimoshatósága szempontjából. A  $I_{\text{to}}$  áramra irányuló gátlás a kimosás első 3 percében gyakorlatilag teljesen megszűnt. A  $I_{\text{Ca}}$  gátlása nem volt teljesen reverzibilis, bár az áram a 10 perc kimosást követően a kezelés előtti szint 80 %-ára tért vissza. Ezzel szemben az  $I_{\text{Kr}}$ ,  $I_{\text{Ks}}$  - és különösen az  $I_{\text{K1}}$  - áramok esetében csak lassú és részleges helyreállást találtunk a 10 perces kimosási időszakban.

#### **4.8. A ropivacain ionáramokra gyakorolt hatásai akciós potenciál voltage clamp körülmények között**

Az articainhoz hasonlóan a ropivacain hatását akciós potenciál clamp körülmények között is megvizsgáltuk. A ropivacain koncentrációját 10  $\mu\text{M}$ -tól kiindulva féldekádonként növeltük 1000  $\mu\text{M}$ -ig. Az egyes áramok jellegzetes „ujjlenyomatait” figyelembe véve az  $I_{\text{to}}$ ,  $I_{\text{Ca}}$ ,  $I_{\text{Kr}}$  és  $I_{\text{K1}}$  áramokra irányuló gátló hatások a ropivacain koncentrációjának fokozásával erősödtek. A befelé irányuló áramcsúcs ( $I_{\text{Ca}}$ ) és a késői kifelé irányuló áramcsúcsok ( $I_{\text{K1}} + I_{\text{Kr}}$ ) megjelenése közel szimmetrikusan történt, ami megfelel a hasonló  $\text{EC}_{50}$  értékeknek.

#### **4.9. Az articaain és a ropivacain hatása a kontraktilitásra**

Mind az articaain, mind a ropivacain koncentrációfüggő módon negatív inotróp hatást gyakorolt a 0,5 Hz állandó frekvenciával ingerelt kamrai trabekulákra. Ez a hatás statisztikailag szignifikáns volt 10  $\mu\text{M}$  koncentrációtól, és a kontraktilis erő

gyakorlatilag teljes gátlását figyeltük meg 1000  $\mu\text{M}$  koncentrációnál. A gyógyszermentes Tyrode oldattal történő kimosást követően az articain és a ropivacain hatása részlegesen reverzibilis volt: a kontrakciós erő az articain esetében a kontroll érték  $73\pm 21$  %-ára, a ropivacain esetében  $85\pm 10$  %-ára tért vissza a 60 perces mosást követően. A kontrakciós görbe alakját enyhén módosították a szerek nagy koncentrációi. Egy kicsiny, de statisztikailag szignifikáns megnyúlást észleltünk a félrelaxációs időben 300  $\mu\text{M}$  ropivacain ( $75,2\pm 2$  ms-ról  $88\pm 4$  ms-ra) illetve articain ( $74\pm 4$  ms-ról  $85\pm 6$  ms-ra) jelenlétében. Nem volt változás a maximális kontrakció eléréséhez szükséges időben 300  $\mu\text{M}$  articain adása előtt és után ( $100\pm 5$  és  $102\pm 10$  ms). A ropivacain azonos koncentrációja mellett a megfelelő értékek  $91\pm 6$  ms és  $95\pm 4$  ms voltak. A szereknek a kontraktilitásra gyakorolt gátló hatását a Hill egyenlet segítségével jellemeztük. Az articain esetében a félhatásos gátló koncentráció  $73,7\pm 10,4$   $\mu\text{M}$ , míg a ropivacain esetében  $72,8\pm 14,1$   $\mu\text{M}$  volt, a megfelelő Hill koefficiensek  $0,81\pm 0,08$  illetve  $1,08\pm 0,19$  voltak. Nem volt statisztikailag szignifikáns különbség a két szer kontraktilis paraméterekre gyakorolt hatásai között.

#### **4.10. Az articain és a ropivacain hatása az intracelluláris $\text{Ca}^{2+}$ -tranziensekre**

Izolált kutya kamrai szívizomsejteken mindkét szer koncentrációfüggő módon csökkentette a szisztolés  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  értékeket valamint a  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -tranziensek amplitúdóját. Ez a hatás 10  $\mu\text{M}$  vagy magasabb koncentrációk esetén szignifikáns volt, de a diasztolés  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  értékeket egyik szer sem befolyásolta szignifikáns módon. Mindkét szer  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -tranziensre gyakorolt gátló hatása teljes mértékben reverzibilis volt. A  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -tranziens amplitúdókat a Hill egyenlettel megillesztve az articain esetében  $87,4\pm 12$   $\mu\text{M}$ , a ropivacain esetében  $99,3\pm 17$   $\mu\text{M}$  félgátló koncentrációkat kaptunk  $0,87\pm 0,09$  illetve  $0,96\pm 0,15$  Hill koefficiens értékkel.

Magasabb koncentrációban mindkét szer a  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -tranziensek relaxációjának mérsékelt megnyúlását eredményezte. Míg 300  $\mu\text{M}$  articain illetve ropivacain szignifikánsan növelte a monoexponenciális illesztéssel nyert lecsengési időállandót ( $200\pm 22$  ms-ról  $284\pm 40$  ms-ra, illetve  $199\pm 20$  ms-ról  $326\pm 39$  ms-ra), ez a hatás 100  $\mu\text{M}$  koncentrációnál nem volt szignifikáns. A két szer hatását összehasonlítva nem találtunk szignifikáns különbségeket.

#### **4.11. Az articain és a ropivacain hatása a nehéz SR vezikulák $\text{Ca}^{2+}$ -felvételére és $\text{Ca}^{2+}$ -felszabadulására**

Az articain és a ropivacain mérsékelt, de statisztikailag szignifikáns csökkenést okozott a nehéz SR ( szarkoplazmatikus retikulum ) vezikulák  $\text{Ca}^{2+}$ -felvételében és  $\text{Ca}^{2+}$ -leadásában a 300  $\mu\text{M}$ -os valamint ennél magasabb koncentrációnál, kisebb koncentrációknál viszont egyik szer sem befolyásolta sem a  $\text{Ca}^{2+}$ -felvétel sem a  $\text{Ca}^{2+}$ -leadás nagyságát. Ebben a vonatkozásban nem volt szignifikáns különbség a ropivacain és az articain hatása között. A csökkent  $\text{Ca}^{2+}$ -felvételt a szarkoplazmatikus retikulumban lévő  $\text{Ca}^{2+}$ -ATP-áz aktivitásának arányos gátlása kísérte, ami 200  $\mu\text{M}$  koncentrációtól szignifikáns volt. Bár ezek a változások viszonylag csekély amplitúdójúak voltak, az articain koncentrációjának 200  $\mu\text{M}$  fölé történő emelése nem fokozta tovább sem a  $\text{Ca}^{2+}$ -felvételre sem az ATP-áz aktivitásra kifejtett gátló hatást. Ezzel szemben a ropivacain ATP-áz aktivitásra gyakorolt hatása nem telítődött az alkalmazott legmagasabb 1000  $\mu\text{M}$ -os koncentráció mellett sem.

## **5. MEGBESZÉLÉS**

A helyi érzéstelenítők hatásának alapvető mechanizmusa az idegsejtek  $\text{Na}^+$ -csatornáinak gátlása révén az ingerület terjedésének megakadályozása. A lokálanesztetikumok legnagyobb hátránya éppen a szelektivitás hiánya. A különböző feszültségfüggő  $\text{K}^+$ -áramok ( $I_{\text{to}}$ ,  $I_{\text{Kr}}$ ,  $I_{\text{Ks}}$ ) gátlása azáltal fokozhatja az érzéstelenítő hatást, hogy az akciós potenciál időtartamát megnyújtva megnövelik az inaktivált  $\text{Na}^+$ -csatorna populációt. A nyugalmi potenciál fenntartásában fontos szerepet játszó  $I_{\text{K1}}$  áram gátlása enyhén depolarizáló hatású, amely szintén kedvez az inaktivált állapotban lévő  $\text{Na}^+$ -csatornák akkumulációjának. A feszültségfüggő nátriumcsatornák nem kizárólag az idegrostok sejtmembránjában, hanem egyéb excitábilis sejteken is jelenlévő struktúrák. Az abszolút, illetve véletlen érbeadás vagy hirtelen felszívódás okozta relatív túladagolás következtében a szisztémás keringésbe bejutó helyi érzéstelenítőszeresek legsúlyosabb mellékhatásukként központi idegrendszeri és kardiális toxicitást idéznek elő. A többféle támadáspont minden helyi érzéstelenítő jellemző tulajdonsága - hasonlóan a szívizomra ható legtöbb antiarrhythmias vegyülethez. Nem meglepő tehát, hogy a helyi érzéstelenítő

szereknek többféle mechanizmusú antiarrhythmias hatásai lehetnek, ugyanakkor potenciális proarrhythmias aktivitásukat - amely kardiotoxikus hatásuk lényeges eleme - is a különféle ioncsatornákra irányuló gátló hatások okozzák.

### **5.1. Az articain akciós potenciál paramétereire gyakorolt hatásai összhangban vannak a voltage clamp technikával nyert adatokkal**

Tanulmányunkban elsőként elemeztük az articain celluláris szívelektrofiziológiai hatásait. Eredményeink azt mutatták, hogy az articain koncentrációfüggő módon számos ionáramot gátol, ami az akciós potenciál alakjának megváltozásában is tükröződik. A depolarizáció maximális sebességének ( $V_{max}$ ) és az akciós potenciál amplitúdójának a csökkenése nyilvánvaló következménye a  $Na^+$ -áram gátlásának, ugyanis a  $V_{max}$  értéke szívizmon a  $Na^+$ -áramsűrűséggel egyenesen arányos. Az articain a leghatékonyabban a  $Na^+$ -áramot gátolta, tekintettel a  $V_{max}$ -gátlásra kapott 162  $\mu M$  félgátló koncentrációra. Az articain okozta frekvenciafüggő  $V_{max}$ -gátlás különösen gyors offset kinetikát mutatott, 91 ms leválási időállandóval. Ismereteink szerint ez a leggyorsabb leválási időállandó, amit kardiális szövetekben a gyors  $Na^+$ -áram gátlásával kapcsolatban leírtak. Mindez azt sugallja, hogy az articainnak a Vaughan-Williams osztályozás szerinti 1.B antiarrhythmias tulajdonságai lehetnek. Az  $I_{Na}$  gátlása valószínűleg szerepet játszik az akciós potenciál articain okozta megrövidülésében is, ez a hatás már a viszonylag alacsony, 10  $\mu M$ -os koncentrációtól szignifikáns volt, ahol az articain még nem okozott szignifikáns mértékű  $V_{max}$ -gátlást. Nem példa nélküli, hogy egy szer megfelelően alacsony koncentrációban gátolja a window  $Na^+$ -áramot, míg a gyors  $Na^+$ -áram és a depolarizáció maximális sebessége ( $V_{max}$ ) érintetlenek maradnak. Az akciós potenciál articain okozta megrövidülésében valószínűleg szerepet játszó másik tényező az  $I_{Ca}$  gátlása. Bár az articain az  $I_{Ca}$ -ot viszonylag magas  $EC_{50}$  értékkel gátolta hagyományos feszültség clamp körülmények között, az akciós potenciál clamp kísérletek során az articain már alacsonyabb koncentrációban (30-100  $\mu M$  között) is markáns gátló hatást fejtett ki az  $I_{Ca}$ -nak tartott, befelé irányuló áramcsúcsra. Mivel az  $I_{Na}$ -ra és  $I_{Ca}$ -ra irányuló gátló hatás összességében erősebb, mint a kálium-áramokra gyakorolt gátló hatás, az akciós potenciál articain hatására megrövidül. A plató articain jelenlétében megfigyelt süllyedése szintén az  $I_{Ca}$  gátlásának a következménye. A korai repolarizáció amplitúdójának csökkenése az  $I_{to}$  áram gátlásával magyarázható, ezt a konvencionális és akciós potenciál voltage

clamp technikákkal egyaránt demonstráltuk. Az articain ioncsatorna-gátló hatásának lehetséges mechanizmusát illetően arra a következtetésre jutunk, hogy a szer (az  $I_{K1}$  kivételével) valószínűleg valamennyi csatornafehérjén egyetlen kötőhellyel kapcsolódik - erre utal a Hill koefficiensek 1-hez közeli értéke.

## 5.2. Az articain szívhatásainak összevetése más érzéstelenítők hatásaival

Amint azt a voltage clamp mérések kimutatták, a különböző ionáramokra vonatkozó  $EC_{50}$  értékek az articain esetében 200 és 500  $\mu M$  közötti koncentráció tartományban vannak. A bupivacain a depolarizáció maximális sebességét ( $V_{max}$ ) az  $I_{to}$  és az  $I_{Ca}$  áramokat az articainnál erősebben gátolja. Irodalmi adatok szerint 1  $\mu M$  bupivacain a depolarizáció maximális sebességét ( $V_{max}$ ) 26%-kal csökkentette, az  $I_{to}$  bupivacain okozta gátlását 22  $\mu M$   $EC_{50}$  értékkel lehetett jellemezni, 10  $\mu M$  bupivacain 22% -kal csökkentette az  $I_{Ca}$  -t. Az articainhoz hasonlóan a lidocain is gátolja a gyors nátrium áramot ( $I_{Na}$ ), (95  $\mu M$  valamint 226  $\mu M$   $EC_{50}$  értékeket jelentettek), míg az  $I_{Ca}$ -ra nézve a lidocain félgátló koncentrációja több mint egy nagyságrenddel alacsonyabb, mint az articainé. Az articainnal ellentétben sem a lidocain sem a bupivacain nem gátolja a  $I_{K1}$  áramot 1000  $\mu M$  koncentrációig. Érdeemes megjegyezni - hogy szemben az eddig taglalt különbségekkel - csak viszonylag csekély különbséget találtak az említett szerekkel érzéstelenített betegek plazmájában mért csúcskoncentrációkban: ezek az értékek a bupivacainra nézve 3-6  $\mu M$ , az articain esetében 6-7  $\mu M$ , a lidocain esetén 5-10  $\mu M$  voltak.

A lidocain hatékony 1.B osztályba tartozó antiarrhythmias szer, melynek többek között negatív inotróp hatása is van, míg a bupivacain magasabb koncentrációkban proarrhythmiasnak bizonyult. Ellentétben a lidocainnal és a bupivacainnal, eddig még nem közöltek végzetes kardiovaszkuláris szövődményt az articainnal kapcsolatban. Mivel a statisztikailag szignifikáns változásokat okozó articain koncentrációk vizsgálatunkban magasabbak voltak, mint általában az articainnal kezelt betegek vérében mért csúcskoncentrációk, valószínűnek látszik, hogy ez a szer normál érzéstelenítés során nem okoz durva változásokat az emberi szív elektromos aktivitásában. Bár az articain a szívizom több ionáramát is gátolta magasabb koncentrációkban, az akciós potenciál időtartamot rövidítő hatása viszonylag mérsékelt volt, és ami még fontosabb, ez a hatás 100-300  $\mu M$  között telítődni látszik. Ezzel összhangban, akciós potenciál clamp körülmények között e tartomány felett észleltük a legélesebb növekedést a késői kifelé irányuló áramcsúcs

articain okozta gátlásában. Mindez arra utal, hogy a növekvő gyógyszerkoncentrációk esetén a kifelé irányuló áramok egyre kifejezettebb gátlása kivédi az akciós potenciál időtartamának további rövidülését, ami a refrakter periódus lerövidülése miatt arrhythmogén lenne. Az articain ezen tulajdonsága a többi helyi érzéstelenítővel összehasonlítva kisebb proarrhythmias kockázatot jósol egy esetleges véletlen érpályába jutás okozta mérgezés vagy túladagolás esetén.

### 5.3. A ropivacain szívhatásainak jellemzői

Kísérleteink alapján született az első olyan publikáció, amelyben a ropivacain kardiális ionáramokra gyakorolt hatásait kutya kamrai szívizomsejteken vizsgálták. Ez azért lényeges, mert jelenlegi ismereteink szerint a kutyaszív akciós potenciálja, valamint a háttérben lévő ionáramok denzitása és megoszlása hasonlít legjobban a humán szívre jellemző paraméterekhez. Eredményeink azt mutatják, hogy a ropivacain - a bupivacainhoz hasonlóan - koncentrációfüggő módon számos ionáramot gátol, ami az akciós potenciál jellemző paramétereinek változását vonja maga után. A ropivacain is a legerősebben a  $\text{Na}^+$ -áramot gátolta, tekintetbe véve az 1 Hz-nél a depolarizáció maximális sebessége ( $V_{\max}$ -gátlás) vonatkozásában kapott 81  $\mu\text{M}$   $\text{EC}_{50}$  értéket. Ez összhangban van mások voltage clamp technikával nyert eredményeivel. Ugyanakkor, ha a ropivacain általunk meghatározott  $\text{EC}_{50}$  értékét (81  $\mu\text{M}$ ) a bupivacainéhoz hasonlítjuk (41  $\mu\text{M}$ ), a ropivacainnak a  $\text{Na}^+$ -áramra gyakorolt gátló hatása gyengébb. Hasonló következtetéseket vontak le mások multicelluláris tengerimalac preparátumokon végzett  $V_{\max}$  mérések eredményeiből. Ami a nátriumcsatornáról történő disszociáció sebességét illeti, az általunk mért 340 ms leválási időállandó jól megfelel egy átlagos 1.B osztályú antiarrhythmicumnak. A window  $I_{\text{Na}}$ -ra és az L-típusú  $\text{Ca}^{2+}$  áramra gyakorolt gátló hatás valószínűleg hozzájárult az akciós potenciál rövidüléséhez és a platófázis süllyedéséhez. A korai repolarizáció amplitúdójának csökkenését a  $I_{\text{Na}}$  és a  $I_{\text{to}}$  ropivacain okozta gátlása magyarázhatja.

Jól ismert,  $\text{Na}^+$ -áramot gátló hatása mellett megmutattuk, hogy a ropivacain más inward és outward áramokat is gátol, úgymint az  $I_{\text{Ca}}$ ,  $I_{\text{to}}$ ,  $I_{\text{Kr}}$ ,  $I_{\text{Ks}}$  és  $I_{\text{K1}}$  ionáramokat. Elektrofiziológiai adataink klinikai relevanciáját csak akkor tudjuk helyesen megbecsülni, ha a kísérleteinkben használt koncentrációkat az érzéstelenített betegek plazma ropivacain szintjeivel hasonlítjuk össze. A ropivacain csúcskoncentrációja a plazmában az érzéstelenítés során elérheti a 2,6-2,9 mg/l

értéket, amely kb. 10-12  $\mu\text{M}$  koncentrációnak felel meg. Bár a legalacsonyabb, a  $V_{\text{max}}$  és a korai repolarizáció nagyságában statisztikailag szignifikáns változást okozó koncentráció 10  $\mu\text{M}$  volt vizsgálatunkban, a ropivacain nem valószínű, hogy jelentősen befolyásolja a szív elektrogenézisét a neuraxialis ill. regionális anesztézia alkalmazása során jellemzően előforduló plazmaszintek esetén. De mire lehet számítani egy esetleges ropivacain túladagolás vagy véletlen érpályába adás esetén? Ilyen körülmények között sokkal magasabb plazmaszintek fordulhatnak elő: pl. 40  $\mu\text{M}$ , ha a 14 liter teljes extracelluláris folyadéktérrel számolunk, vagy 180  $\mu\text{M}$ , ha csak a 3 liter plazmatérfogatra vonatkoztatunk a 7,5 mg/ml koncentrációjú ropivacain 20 ml-ét tartalmazó ampulla intravénás befecskendezése esetén. Bár a ropivacainnak a különböző ionáramokra ( $I_{\text{Ca}}$ ,  $I_{\text{Kr}}$ ,  $I_{\text{K1}}$  és  $I_{\text{to}}$ ) nézve kapott félgátló koncentrációi egy viszonylag szűk, 250-400  $\mu\text{M}$  közötti tartományban voltak, az akciós potenciál platófázisa alatt a befelé irányuló áramok gátlása a ropivacain esetében erősebbnek tűnik, mint a kifelé irányuló áramokra gyakorolt gátló hatás. Mindezzel összhangban az akciós potenciál időtartamát a ropivacain különösen hosszabb ciklushosszak mellett rövidítette.

Érdekes módon, a ropivacain kimosása az akciós potenciál időtartamának a kontroll értéken túli megnyúlását eredményezte. Ezt a rebound hatást a különböző ioncsatornákról való kimosás eltérő kinetikájával lehet magyarázni, amint ezt a ropivacainnal demonstráltuk. A  $V_{\text{max}}$  (amely az  $I_{\text{Na}}$  elfogadott indikátora) és az  $I_{\text{to}}$  esetében a gátlás teljesen reverzibilis volt, az  $I_{\text{Ca}}$  amplitúdója is 10 percen belül 80 %-ban visszatért. Ezzel ellentétben, a repolarizációért felelős többi áram (az  $I_{\text{Kr}}$ ,  $I_{\text{Ks}}$  és még inkább az  $I_{\text{K1}}$ ) csak lassú és részleges helyreállást mutatott a 10 perces kimosás során. A reverzibilitásbeli különbségek oka nem ismert, talán a kötőhelyek eltérő intramolekuláris elhelyezkedése állhat a háttérben. Érdeemes megjegyezni, hogy az  $I_{\text{K1}}$  áramért felelős Kir csatornák molekuláris szerkezete alapvetően más, mint a többi vizsgált ioncsatornáké. A kifelé irányuló áramok kimosás során is megmaradó részleges gátlásának következményeként az akciós potenciál időtartama a mosás alatt megnyúlt. Ez a megfigyelés arra utal, hogy valószínűleg az érzéstelenítést követően a gyógyszer eliminációjának egész ideje alatt a normálisnál hosszabb akciós potenciál időtartamokkal kell számolni, ami fokozott proarrhythmias kockázatot jelent különösen a long-QT szindróma öröklött és szerzett formáiban szenvedő betegek számára. Ezen betegek csökkent repolarizációs rezervvel rendelkeznek a kifelé irányuló áramok relatív deficitje miatt, ezért esetükben

könnyebben alakulhat ki az akciós potenciál időtartamának további megnyúlása, ami torsades de pointes típusú kamrai arrhythmia kialakulásával fenyegető korai utódepolarizációt eredményezhet. Jóllehet a  $I_{Ks}$  normál szívfrekvenciánál csak csekély hatással van a repolarizációra, a repolarizációs rezerv fontos komponense. A ropivacain viszonylag magas  $I_{Ks}$ -t gátló potenciálja miatt ( $EC_{50} = 106 \mu M$ ), azoknál a már csökkent repolarizációs rezervvel rendelkező betegeknél is, akiknek nyugalomban normális az akciós potenciál időtartama, megnövekedhet az arrhythmia kockázata. Ezt látszik alátámasztani, hogy több esetben jelentettek kamrai fibrillációt és szívmegállást a ropivacain alkalmazásával kapcsolatban - hasonlóan a bupivacain-érzéstelenítés során előfordult esetekhez. Ezzel összhangban, celluláris elektrofiziológiai vizsgálataink nem igazoltak alapvető minőségi különbségeket a ropivacain és a bupivacain kardiális hatásaiban. A bupivacain a ropivacainnál erősebb ioncsatorna gátló szer, ugyanakkor terápiás adagja is ennek megfelelően alacsonyabb.

Következtetésként azt mondhatjuk, hogy bár a ropivacain általában nem okoz kardiális mellékhatásokat a normál populációban történő rendszeres alkalmazása során, speciális körülmények- mint pl. véletlen intravénás injekció, túladagolás, vagy az arrhythmia iránt fogékony betegek- esetén használata különleges figyelmet igényel, nemcsak az érzéstelenítés során, hanem a posztoperatív időszakban is.

#### **5.4. Az articaín és a ropivacain negatív inotróp hatásának mechanizmusa**

Az articaín és a ropivacain koncentrációfüggő módon csökkentette a kontraktilis erőt és a  $[Ca^{2+}]_i$ -tranziensek amplitúdóját kutya kamrai szívizomsejteken. Nem találtunk szignifikáns különbséget az articaín és a ropivacain kontraktilitásra illetve a  $[Ca^{2+}]_i$ -tranziensekre gyakorolt hatásai között, ami arra utal, hogy hasonló mértékű lehet a két gyógyszer kardiodepresszív hatása. A bupivacainnal összevetve az articaínnak gyengébb kardiodepresszív hatást jósolhatunk, mivel kutyaszívből izolált kamrai sejteken a bupivacain sokkal erősebben gátolta a  $Ca^{2+}$ -áramot, mint a ropivacain vagy az articaín. A ropivacain negatív inotróp hatását kutya, nyúl és tengerimalac preparátumokon mások is szignifikánsan gyengébbnek találták, mint a bupivacainét.

A kontraktilitásra és a  $[Ca^{2+}]_i$ -tranziensekre gyakorolt gátló hatás  $10 \mu M$  koncentrációnál statisztikailag szignifikáns volt, és nagyon hasonló koncentrációfüggést mutatott: a megfelelő  $EC_{50}$  értékek  $74 \mu M$  illetve  $87 \mu M$  voltak

az articain esetében, míg a ropivacain félgátló koncentrációi 73 illetve 99  $\mu\text{M}$  voltak. Mindebből arra lehet következtetni, hogy a csökkent kontraktilitás oka a  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -tranziensek csökkenése lehet. Az L-típusú  $\text{Ca}^{2+}$ -áram gátlása valamivel magasabb koncentrációkat igényelt, 30  $\mu\text{M}$  értéktől volt csak szignifikáns és a félhatásos dózisok is közel voltak a 300  $\mu\text{M}$ -hoz. Az  $I_{\text{Ca}}$ -gátlás nagyságrendje jó összhangban van kutyán illetve tengerimalacon mások által kapott korábbi eredményekkel. A  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -tranziensek csökkenése a szarkoplazmatikus retikulumban a  $\text{Ca}^{2+}$ -felszabadulás és/vagy a  $\text{Ca}^{2+}$ -felvétel megváltozott kinetikájával vagy a felszíni membránon keresztül történő  $\text{Ca}^{2+}$ -fluxus változásaival magyarázható. Mivel a 200  $\mu\text{M}$ -alatti koncentrációk esetén egyik gyógyszer sem módosította a  $\text{Ca}^{2+}$ -felszabadulást és újrafelvételt a nehéz SR vezikulákban, és a SERCA ATP-áz aktivitást is érintetlenül hagyta, a transzmembrán  $\text{Ca}^{2+}$ -mozgás megváltozása állhat a negatív inotróp hatás hátterében. Ez összhangban van az  $I_{\text{Ca}}$  articain és ropivacain jelenlétében észlelt csökkenésével, bár 10  $\mu\text{M}$  koncentrációnál az  $I_{\text{Ca}}$  gátlása nem volt szignifikáns, szemben a  $\text{Ca}^{2+}$ -tranziens és a kontraktilitás szignifikáns csökkenésével. Ezért valószínűnek tartjuk, hogy a ropivacain és articain negatív inotróp hatásában a szerek által alacsony koncentrációban kifejtett nátriumcsatorna-gátlás is szerepet játszik. Mind a ropivacain, mind az articain alacsony koncentrációban csökkentette a depolarizáció maximális sebességét a szívizom feszültségfüggő nátriumcsatornára gyakorolt gátló hatása révén. A következményes intracelluláris  $\text{Na}^+$  koncentráció ( $[\text{Na}^+]_i$ ) csökkenés a  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  exchangeren keresztül fokozza a  $\text{Ca}^{2+}$  effluxot és csökkenti a  $\text{Ca}^{2+}$  influxot. A  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -tranziensek csökkent amplitúdójának és az ezt kísérő csökkent kontraktilitásnak a magyarázata a kisebb nettó transzmembrán  $\text{Ca}^{2+}$ -beáramlás következtében a szarkoplazmatikus retikulumban létrejövő csökkent kalciumtartalom lehet.

### **5.5. Helyi érzéstelenítők hatása a szarkoplazmatikus retikulum $\text{Ca}^{2+}$ -homeosztázisára**

Bár 300  $\mu\text{M}$  alatti koncentrációban sem az articain, sem a ropivacain nem befolyásolta a  $\text{Ca}^{2+}$ -felszabadulást és a  $\text{Ca}^{2+}$ -felvételt az általunk vizsgált kutya nehéz SR vezikulákban, a fenti paramétereket magasabb koncentrációkban mindkét szer szignifikánsan gátolta a SERCA ATP-áz aktivitás ezzel együtt jelentkező csökkentésével együtt. Ebből a szempontból a két gyógyszer eltérő módon hatott.

Az articain okozta gátlás 0,5 mM érték körül telítődött, maximális nagysága kb. 20 % volt, míg a ropivacain esetében a gyógyszer növekvő koncentrációival a gátló hatás progresszívan emelkedett, hasonlóan a lidocain kutya SR ATP-ázra gyakorolt hatásához. Ahogy ez várható volt, az ATP-áz aktivitás gátlása jó korrelációt mutatott a  $\text{Ca}^{2+}$ -felvétel gátlásával. Ugyanakkor nincs magyarázat a magas articain és ropivacain koncentrációknak a  $\text{Ca}^{2+}$ -visszavételre és felszabadulásra gyakorolt hasonló hatására. A ropivacainnak és az articainnak a RyR2-ra gyakorolt hatására vonatkozó irodalmi adatok hiányában csak a más helyi érzéstelenítők hasonló hatásaival tudjuk eredményeinket összevetni. A procain és a QX222 csökkentették a RYR2 csatornák konduktanciáját birkában, a tetracain és a bupivacain pedig csökkentette a ryanodin kötődését a sertés szarkoplazmatikus retikulum vezikuláiban. A tetracain kivételével melynek  $\text{EC}_{50}$  értéke 100  $\mu\text{M}$  volt, ezen hatások mindegyike csak mM-os koncentrációban volt megfigyelhető, ami a helyi érzéstelenítők és a RYR2 közötti nem specifikus kölcsönhatásra utal.

## 5.6. Klinikai következtetések

A jelen adatok klinikai jelentőségét csak a kísérletekben használt szerkoncentrációkat az articainnal és ropivacainnal kezelt betegek plazmájában az érzéstelenítés alatt mért gyógyszer szintekkel összehasonlítva tudjuk értékelni. A plazmában mért csúcskoncentrációk mind az articain, mind a ropivacain esetében jellemzően 6-7  $\mu\text{M}$  voltak [243, 244], bár a ropivacain nagy dózisainak alkalmazását követően 10-12  $\mu\text{M}$  koncentrációt is mértek [246, 247]. Mivel a legalacsonyabb, a kontrakciós erőt és a  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  tranziens amplitúdóját szignifikánsan csökkentő koncentráció 10  $\mu\text{M}$  volt vizsgálatunkban, sem az articain, sem a ropivacain nem valószínű, hogy jelentősen megváltoztatná a szívizom  $\text{Ca}^{2+}$  homeosztázisát és kontraktilitását a neuroaxialis vagy regionális érzéstelenítés kapcsán jellemző plazmaszintek esetén. Ugyanakkor a túladagolás vagy véletlen intravénás injekció okozta intoxikáció esetén a plazmaszintek átmenetileg 100  $\mu\text{M}$  felé emelkedhetnek. Ezek a koncentrációk erőteljesen ronthatják a szívizom mechanikai működését.

## 6. ÖSSZEFOGLALÁS

Az articain és a ropivacain a klinikai gyakorlatban viszonylag rövid ideje alkalmazott helyi érzéstelenítőszer. Széleskörű használatuk ellenére keveset tudunk sejtszintű szívhatásairól. Munkánkban ezért célul tűztük ki az articain és a ropivacain celluláris szintű szívelektrofiziológiai hatásainak vizsgálatát kutyából izolált kamrai szívizomsejteken, egy olyan preparátumon, amelyet a humán szív legjobb jelenlegi modelljének tartanak.

Az articain és ropivacain koncentrációfüggő módon megváltoztatták az akciós potenciálok alakját és jellemző paramétereit: csökkentették az akciós potenciál amplitúdóját és a depolarizáció maximális sebességét, általában rövidítették az akciós potenciál időtartamát, csökkentették a korai repolarizáció nagyságát és plató-depressziót okoztak. A  $\text{Na}^+$ -csatornákra irányuló gátló hatást - a depolarizáció maximális sebességének ( $V_{\text{max}}$ ) csökkenése alapján jellemezve - az articain esetében  $162 \pm 30 \mu\text{M}$ , míg a ropivacain esetén  $81 \pm 7 \mu\text{M}$   $\text{EC}_{50}$  értékeket kaptunk 1 Hz ingerlő frekvencia mellett. E tónusos gátlás mellett gyors offset kinetikájú frekvenciafüggő  $V_{\text{max}}$ -gátlást lehetett megfigyelni mindkét szer jelenlétében, amelyet az articain esetén  $91 \pm 20$  ms, míg a ropivacain esetén  $340 \pm 40$  ms leválási időállandóval jellemeztünk.

Feszültség clamp körülmények között az articain és a ropivacain számos ionáramot gátolt. A gátlás erősségét rendre az alábbi  $\text{EC}_{50}$  értékekkel jellemeztük articain és ropivacain esetén:  $I_{\text{Ca}}$   $471 \pm 75$  és  $263 \pm 67 \mu\text{M}$ ,  $I_{\text{to}}$   $365 \pm 62$  és  $384 \pm 75 \mu\text{M}$ ,  $I_{\text{Kr}}$   $278 \pm 79$  és  $303 \pm 47 \mu\text{M}$ ,  $I_{\text{Ks}}$   $326 \pm 65$  és  $106 \pm 18 \mu\text{M}$ ,  $I_{\text{K1}}$   $372 \pm 46$  és  $372 \pm 35 \mu\text{M}$ . A Hill koefficiensek 1-hez közeli értéke egy-egy jól definiált kötőhely részvételére utal. Az egyes ioncsatornákra irányuló gátló hatásokat akciós potenciál voltage clamp technikával is igazoltuk.

Az articain és ropivacain tranziensek amplitúdójának koncentrációfüggő csökkenését okozta ( $\text{EC}_{50} = 87,4 \pm 12$  és  $99,3 \pm 17 \mu\text{M}$ ), ami összhangban volt a kontraktilitás gátlásával ( $\text{EC}_{50} = 73,7 \pm 10$  és  $72,8 \pm 14 \mu\text{M}$ ). Sem az articain, sem a ropivacain nem befolyásolta közvetlenül a szarkoplazmatikus retikulum vezikuláiba történő  $\text{Ca}^{2+}$ -visszavétel, illetve az onnan történő  $\text{Ca}^{2+}$ -felszabadulás sebességi állandóit  $300 \mu\text{M}$  koncentráció alatt. Az articain és a ropivacain negatív inotróp hatásai nagyságrendileg hasonlóak voltak, és főként a nettó transzmembrán  $\text{Ca}^{2+}$

beáramlás csökkenésének tulajdoníthatók. Az articain és ropivacain negatív inotróp hatásai között nem találtunk számottevő minőségi különbséget.

Mivel a klinikailag releváns mikromoláris koncentrációtartományban sem az articain sem a ropivacain nem okozott szignifikáns változásokat a sejtek elektromos és mechanikai paramétereiben, arra következtetünk, hogy mindkét szer biztonságosan alkalmazható. Az articain és a ropivacain a szív akciós potenciálját és ionáramait csak a terápiás szinteknél magasabb, túladagolással vagy vénába történő véletlen bejuttatással elérhető koncentrációk esetén gátolja. Ilyen körülmények között az articain esetében kevesebb mellékhatásra számíthatunk mint a ropivacain túladagolásakor, ráadásul a ropivacain esetében fokozott proarrhythmias kockázat várható az anesztéziát követő rövidebb időszakban is.

## 7. Új eredmények

Közleményünkben elsőként elemeztük az articain celluláris szívelektrofiziológiai hatásait. Az articain koncentrációfüggő módon csökkenti az akciós potenciál időtartamát, amplitúdóját, a depolarizáció maximális sebességét ( $V_{max}$ ), a korai repolarizáció nagyságát és plató-depressziót okoz. A tónusos  $V_{max}$ -gátlás mellett egy gyors kinetikájú frekvenciafüggő  $V_{max}$ -gátlás is kialakul. A klinikai alkalmazás szempontjából releváns plazmaszinteknél magasabb koncentrációkban az articain számos ionáramot ( $I_{Ca}$ ,  $I_{to}$ ,  $I_{K1}$ ,  $I_{Kr}$ ,  $I_{Ks}$ ) gátol, a befelé és kifelé irányuló áramokra viszonylag kiegyensúlyozott hatást gyakorolva. Ez utóbbi miatt az akciós potenciál morfológiájának csak mérsékelt változása várható egy esetleges túladagolás esetén.

Elsőként vizsgáltuk a ropivacain kardiális ionáramokra kifejtett hatásait kutya kamrai szívizmon, egy olyan modellen, amelynek akciós potenciálja és az annak háttérében lévő ionáramok denzitása és megoszlása nagyon hasonlít a humán szív megfelelő jellemzőire. A ropivacain a  $Na^+$ -áramra gyakorolt jól ismert gátló hatásán kívül az akciós potenciál háttérében álló egyéb befelé és kifelé irányuló ionáramokat ( $I_{Ca}$ ,  $I_{to}$ ,  $I_{Kr}$ ,  $I_{Ks}$ ,  $I_{K1}$ ) is gátolja. A klinikai alkalmazás során mért plazmaszintek felett - pl. esetleges túladagolás esetén - szívritmuszavarokra lehet számítani az anesztézia közben és főleg után, mivel a ropivacain hatásának eliminációja a befelé és kifelé irányuló áramok vonatkozásában kiegyensúlyozatlan.

Elsőként vizsgáltuk az articain negatív inotróp hatásának mechanizmusát. Az articain és a ropivacain reverzibilis és koncentrációfüggő módon csökkenteti a  $[Ca^{2+}]_i$ -tranziens amplitúdóját, amely összhangban van a kontraktilis erő csökkenésével. Sem az SR-ből történő  $Ca^{2+}$ -felszabadulás, sem az oda történő  $Ca^{2+}$ -visszavétel, sem az SR ATP-áz aktivitása nem változik szignifikánsan 200  $\mu M$  alatti articain és ropivacain koncentrációk jelenlétében. Mivel az articain és a ropivacain hasonló affinitással gátolja az L-típusú  $Ca^{2+}$ -áramot, a szerek hasonló nagyságú negatív inotróp hatását elsősorban a transzmembrán  $Ca^{2+}$ -belépés csökkenésével magyarázzuk, bár valószínűleg a  $Na^+$ -belépés gátlása is hozzájárul az intracelluláris  $Ca^{2+}$ -készletek csökkenéséhez.

## 7. A téziseket megalapozó közlemények

**Szabó A** , Szentandrassy N, Birinyi P, Horváth B, Szabó G, Bányász T, Márton I, Nánási PP, Magyar J. Effects of articaine on action potential characteristics and the underlying ion currents in canine ventricular myocytes. Br J Anaesth. 2007; 99:726-33 [IF=2,948]

**Szabó A** , Szentandrassy N, Birinyi P, Horváth B, Szabó G, Bányász T, Márton I, Magyar J, Nánási PP. Effects of ropivacaine on action potential configuration and ion currents in isolated canine ventricular cardiomyocytes. Anesthesiology. 2008; 108:693-702 [IF=5,124]

Szentandrassy N, **Szabó A** , Almássy J, Jóna I, Horváth B, Szabó G, Bányász T, Márton I, Nánási PP, Magyar J. Effects of articaine and ropivacaine on calcium handling and contractility in canine ventricular myocardium. Eur J Anaesthesiol. 2010; 27:153-61 [IF=1,55]

**8. Cardiac electrophysiological effects of local anesthetics by Szabó Adrienne**  
**University of Debrecen Medical and Health Science Center, Faculty of Dentistry**  
**Supervisors: Nánási Péter and Márton Ildikó**  
**Doctoral School of Clinical Medicine. Program X.**

**Summary**

The cellular cardiac electrophysiological effects of articaine and ropivacaine were analyzed in isolated canine cardiomyocytes.

Both drugs caused concentration-dependent changes in the action potential configuration: decrease in their amplitude and the maximum velocity of depolarization, shortening of the action potential, suppression of phase 1 repolarization, and depression of plateau. Characterization of the block of sodium channels by the decrease in maximal rate of depolarization at 1 Hz pacing frequency yielded an  $EC_{50}$  of  $162 \pm 30 \mu\text{M}$ , and  $81 \pm 7 \mu\text{M}$  for articaine and ropivacaine respectively. The frequency-dependent  $V_{\text{max}}$  blockade was characterized by an offset time constant of  $91 \pm 20 \text{ ms}$ , and  $340 \pm 40 \text{ ms}$  for articaine and ropivacaine respectively. Under voltage clamp conditions a variety of ion currents were blocked by articaine and ropivacaine, inhibition of different ion channels was also demonstrated under action potential voltage clamp. Articaine and ropivacaine caused a concentration-dependent reduction in amplitude of  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  transients ( $EC_{50} = 87,4 \pm 12$  és  $99,3 \pm 17 \mu\text{M}$ ), which was congruent with the suppression of contractility ( $EC_{50} = 73,7 \pm 10$  és  $72,8 \pm 14 \mu\text{M}$  for articaine and ropivacaine respectively). Neither of drugs influenced directly the  $\text{Ca}^{2+}$  release and  $\text{Ca}^{2+}$  reuptake at concentrations lower than  $300 \mu\text{M}$ . No significant differences were found between the negative inotropic effects of articaine and ropivacaine.

Neither articaine nor ropivacaine caused significant changes in the electrophysiological and mechanical parameters of the cells in clinically relevant micromolar concentrations. During articaine intoxication fewer side-effects can be expected than following ropivacaine overdose. An increased proarrhythmic risk may be anticipated in the case of ropivacaine even in the postoperative recovery period.

**Key words:** *articaine, ropivacaine, cardiomyocytes, action potential, ion currents, contractility, calcium transients, calcium handling, overdose*

**Kulcsszavak:** *articain, ropivacain, szívizomsejtek, akciós potenciál, ionáramok, kontraktilitás, kalcium tranziens, kalcium homeosztázis, túladagolás*

