

ASPECTE PRIVIND ACȚIUNEA UNOR BLOCANTE ALE CANALELOR CALCIULUI ASUPRA CONTRACȚIEI MIOMETRIALE *IN VITRO*

M.C. Constantinescu*, A. Zugravu*, M. Isvoranu*, C.I. Russ*

REZUMAT

Nifedipina, un blocant al canalelor calciului cu structura dihidropiridinică, este utilizată din ce în ce mai des în tratamentul nașterii premature. Nifedipina este tot atât de eficientă ca β mimeticele pentru deprimarea activității uterine și are potențial teratogen și fetotoxic redus. Coarnele uterine provenind de la femele negestante de șobolan Wistar au fost montate în baia de organ și au fost lăsate să își recapete activitatea spontană. Ulterior au fost expuse concentrațiilor crescătoare de nifedipină și verapamil. Atât nifedipina cât și verapamilul au relaxat fragmentele uterine *in vitro*. Pe baza acestui studiu, se pare că tocoliza cu verapamil ar fi mai eficientă decât cea cu nifedipină.

Cuvinte cheie: nifedipină, verapamil, contracție miometrială, *in vitro*, tocoliză.

ABSTRACT

The effects of some calcium channel blockers on *in vitro* myometrial contractility

Nifedipine, a dihydropyridine calcium entry blocker, has been used with increasing frequency in the treatment of preterm labour. Nifedipine is as effective as β mimetics in decreasing uterine activity and it has little teratogenic or fetotoxic potential. Uterine horns from non pregnant female Wistar rats were suspended in organ chambers for isotonic measurements and were allowed to recover spontaneous activity. Afterwards they were exposed to increasing concentrations of nifedipine and verapamil. Both nifedipine and verapamil relaxed myometrial strips *in vitro*. On the basis of this study, it appears that tocolysis with verapamil is more efficacious than with nifedipine.

Key words: nifedipine, verapamil, myometrial contraction, *in vitro*, tocolysis.

Nivelul calciului intracelular determină direct contractilitatea mușchiului neted și, implicit, a miometrului. Scăderea disponibilului de calciu intracelular este asociată cu relaxare. Oscilațiile calciului citosolic sunt, la rândul lor, sub directă influență a influxului de calciu extracelular, precum și a procesului de eliberare a calciului din reticulul sarcoplasmatic. Posibilitatea ca blocantele canalelor calciului să reprezinte o variantă terapeutică pentru nașterea prematură este subiect de cercetare de aproape 20 de ani, atât la om cât și la animal, atât *in vivo* cât și *in vitro*. În anul 1980 Ulmsten, în Danemarca, face primul studiu cu nifedipină *in vivo*, în scop tocolitic.

Dintre blocantele canalelor calciului, nifedipina este cel mai des utilizată ca tocolitic deoarece blocarea calcică realizată prin ea este reversibilă, nu determină tahifilaxie (semnalată în cazul diltiazemului) și nu are, practic, proprietăți deprimante miocardice (spre deosebire de verapamil) (Childress, 1994). În plus, nifedipina s-a dovedit cel puțin tot atât de eficientă ca și β_2 adrenomimeticele, din punct de vedere tocolitic (Hollingsworth 1994, Saade 1994, Childress 1994 și alții). Multă vreme nifedipina a fost blamată pentru o eventuală scădere a fluxului utero-placentar, cu risc consecutiv de acidoză fetală. În prezent, în urma mai multor studii de măsurare a fluxului uterin prin ecografie Doppler, se consideră că la femeie acesta nu pare a fi afectat negativ de către nifedipină (Childress, 1994). Nifedipina nu are efect teratogen sau fetotoxic, iar copiii mamelor tratate cu nifedipină au avut o dezvoltare cel puțin tot atât de bună ca cea a copiilor proveniți de la mame care au primit alt tratament tocolitic (Ferguson 1990, Smith 1993).

Amlodipina (Lechner și col., 1996) determină o relaxare

promptă, excelentă, a fragmentelor miometriale *in vitro*, iar nicardipina, într-un studiu randomizat efectuat pe 90 de paciente cu amenințare de naștere prematură, s-a dovedit tot atât de eficientă ca salbutamolul (Janet 1997). Diltiazemul dovedește activitate tocolitică asupra contracțiilor miometriale spontane (Hollingsworth 1994), cât și împotriva efectului uterotonic al radiațiilor χ (Elsayed, 1996).

Material și metodă

Au fost efectuate experimente *in vitro*, în baie de organ cu capacitatea de 10 ml, asupra coarnelor uterine provenind de la femele negestante de șobolan Wistar, cu greutate între 150 - 200 g. Au fost asigurate hrană și apă în condiții satisfăcătoare. Animalele au fost sacrificate prin sângerare, fără administrarea vreunui anesteziec (inhalator sau injectabil) în prealabil. Pentru baia de organ a fost folosită soluția De Jalon, menținută la 37°C, pH între 7,2 - 7,4 și barbotată în permanență cu curent de aer. Pentru conservare (la 4°C și întuneric) a fost folosită soluția Tyrode. S-au administrat în baia de organ substanțele de studiat (nifedipină - Sigma Chemicals, USA și verapamil - Isoptin, Knoll, Germania) în diluții succesive, în soluție apoasă (100 μ l), astfel încât izotonia soluției fiziologice să nu fie modificată, iar concentrația substanței în baia de organ să crească în progresie geometrică. Concentrațiile analizate sunt calculate în baia de organ (pentru nifedipină: 1, 10 și 100 μ g/ml; pentru verapamil: 0,1, 1 și 10 μ g/ml). S-a analizat efectul concentrațiilor cumulative ale substanțelor menționate asupra activității miometriale spontane. Pentru înregistrarea activității miometriale s-a utilizat un sistem BIOPAC (BIOPAC Systems, CA, USA), cu transductor prin

*Dr. Maria Cristina Constantinescu, dr. Aurelian Zugravu, dr. Mihai Isvoranu, dr. Cristina Ioana Russ, - Catedra de Farmacologie, UMF „Carol Davila” București

deplasare (TSD 100) și modul de amplificare (DA 100A). Stocarea datelor a fost computerizată și s-a făcut sub forma unui traseu în care a fost înregistrată amplitudinea contracțiilor (milimetri) versus timp (minute), cu ajutorul programului Acqknowledge și a unui computer compatibil IBM 486. Au fost ulterior analizați următorii parametri ai contracției uterine: tonus minim (bazal), tonus mediu, frecvență, amplitudine și viteză de contracție. Prelucrarea datelor a fost realizată în programul EXCEL 7.0 pentru Windows'95, iar pentru analiza statistică a rezultatelor au

fost folosite în funcție de caz: testul t heteroscedastic, testul t pe perechi și regresia liniară. Valoarea $p \leq 0,05$ a fost considerată semnificativă statistic.

Rezultate

În traseele de mai jos se poate analiza comportamentul activității miometriale spontane sub influența celor două blocante ale canalelor calciului:

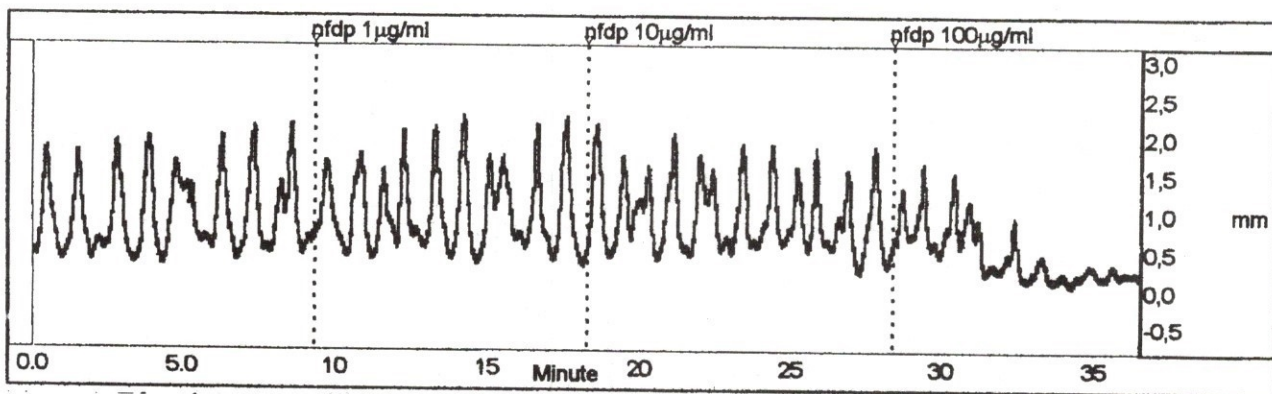


Figura 1: Efectul concentrațiilor cumulative de nifedipină asupra activității miometriale spontane

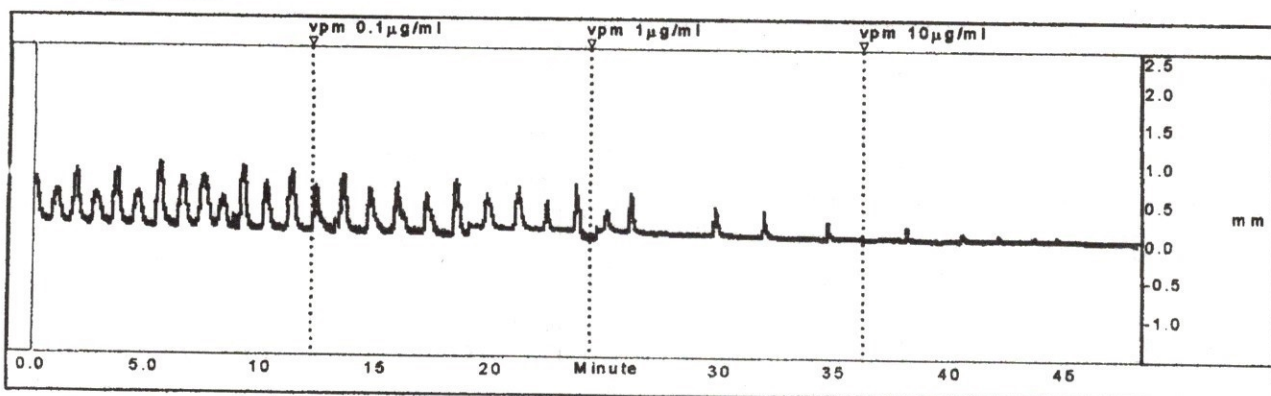


Figura 2: Efectul concentrațiilor cumulative de verapamil asupra activității miometriale spontane

În cazul nifedipinei, tonusul minim (bazal) a fost parametrul cel mai puternic influențat, el scăzând de la $94 \pm 12,865$ din valoarea inițială pentru $1 \mu\text{g/ml}$ până la $1,54 \pm 0,75\%$ din valoare inițială pentru $100 \mu\text{g/ml}$ nifedipină în baia de organ, pentru care $p < 0,01$. Frecvența contracțiilor miometriale spontane, deși a scăzut liniar cu creșterea concentrației pe nifedipină

($p = 0,007$), a fost mai puțin influențată decât amplitudinea contracțiilor (vezi tabelul nr. 1). Scăderea frecvenței a fost semnificativă statistic pentru toate concentrațiile de nifedipină ($p < 0,05$), iar cea a amplitudinii a fost semnificativă ($p < 0,04$) pentru concentrațiile de 10 și $100 \mu\text{g/ml}$ nifedipină în baia de organ.

Conc. [$\mu\text{g/ml}$]	Ton min %	Ton med %	Frecvența %	Amplit. %	Viteza %
1	$94 \pm 12,86$	$93,78 \pm 4,46$	$91,37 \pm 4,24$	$88,17 \pm 6,79$	$79,05 \pm 3,9$
10	$58,82 \pm 11,2$	$82,05 \pm 3,92$	$88,99 \pm 3,92$	$86,09 \pm 4,72$	$78,76 \pm 4,42$
100	$1,54 \pm 0,45$	$26,63 \pm 2,34$	$37,98 \pm 9,32$	$67,74 \pm 11,43$	$57,98 \pm 6,61$

Tabelul nr. 1. Efectul concentrațiilor cumulative de nifedipină asupra activității miometriale spontane. Conc [mg/ml] = concentrația de nifedipină; ton min. = tonus minim; ton med = tonus mediu; amplit. = amplitudine. Datele din tabel sunt prezentate sub forma: medie \pm eroare standard, din valoarea inițială. Valorile inițiale ale parametrilor (în absența nifedipinei) au fost considerate 100%.

În cazul verapamilului, frecvența a fost parametrul cel mai puternic influențat, scăderea ei fiind semnificativă statistic pentru toate concentrațiile de verapamil studiate, cu $p < 0,003$, cel puțin. Tonusul minim a fost parametrul cel

mai puțin influențat, dar scăderea lui s-a făcut liniar cu creșterea concentrației de verapamil ($p < 0,006$). Datele obținute sunt prezentate în tabelul nr. 2.

Conc [$\mu\text{g/ml}$]	Ton min %	Ton med %	Frecvența %	Amplit %	Viteza %
0,1	96,49 \pm 0,81	94,87 \pm 1,2	78,54 \pm 5,73	88,16 \pm 7,47	77,68 \pm 3,03
1	93,92 \pm 1,78	88,9 \pm 2,25	34,72 \pm 6,62	55,16 \pm 9,07	54,93 \pm 8,59
10	69,92 \pm 2,84	60,1 \pm 4,83	15,56 \pm 4,23	21,72 \pm 6,32	21,6 \pm 6,55

Tabelul nr. 2. Efectul concentrațiilor cumulative de verapamil asupra activității miometriale spontane. Conc [$\mu\text{g/ml}$] = concentrația de verapamil; ton min = tonus minim; ton med = tonus mediu; amplit = amplitudine. Datele din tabel sunt prezentate sub forma: medie \pm eroare standard din valoarea inițială. Valorile inițiale ale parametrilor (în absența verapamilului) au fost considerate 100%.

Discuții și concluzii

Ambele blocante ale canalelor calciului au avut efecte deprimante directe asupra activității miometriale spontane, deși în măsură diferită, așa după cum reiese și din tabelele de mai sus.

Pentru a putea stabili eficiența tocolitică a celor două substanțe analizate, ținând seama și de concentrațiile la care acestea au realizat efectele, am reprezentat grafic curbele efect (de scădere) versus logaritmul de concentrație, pentru toți parametrii studiați. Vom prezenta în continuare trei (cele mai sugestive) dintre graficele astfel obținute: pentru tonusul minim (bazal), pentru frecvență și pentru amplitudinea contracțiilor.

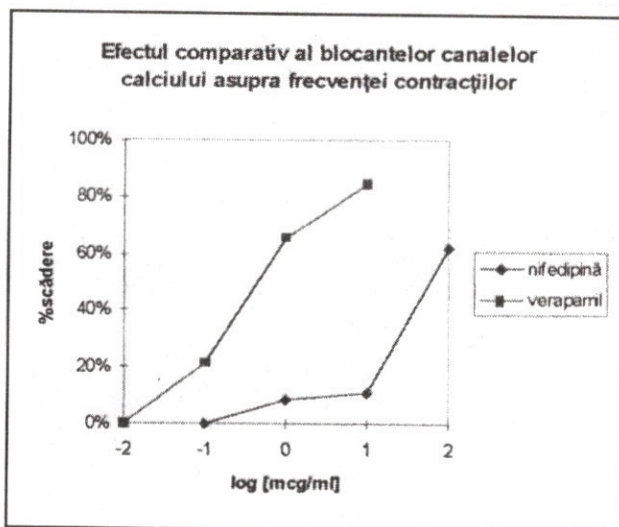


Figura 4 - Efectul comparativ al blocantelor canalelor calciului asupra frecvenței contracțiilor

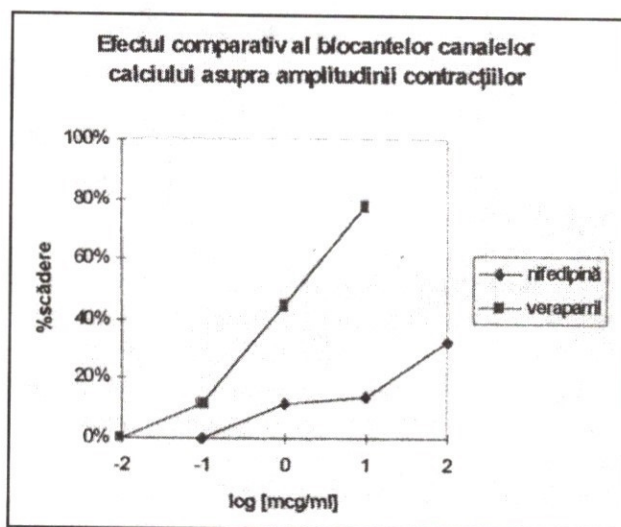


Figura 5 - Efectul comparativ al blocantelor canalelor calciului asupra amplitudinii contracțiilor

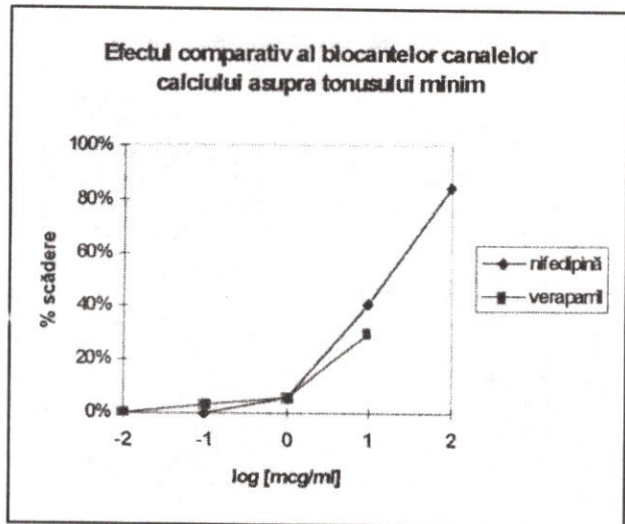


Figura 3 - Efectul comparativ al blocantelor canalelor calciului asupra tonusului minim

În aceste grafice se observă două aspecte:

- nifedipina a fost mai eficientă decât verapamilul pentru scăderea tonusului minim (bazal), dar domeniul concentrațiilor eficiente ale acesteia se situează la valori superioare față de cel al verapamilului;
- pentru scăderea frecvenței și amplitudinii contracțiilor uterine, verapamilul a fost net superior ca eficiență nifedipinei, la concentrații mai mici.

Din studiul nostru se desprinde clar concluzia că, *in vitro*, verapamilul are efect deprimant uterin mai important și la concentrații mai mici decât nifedipina, folosită în prezent ca tocolitic. Cu alte cuvinte, putem spune că raportul eficiență/potență a înclinat în favoarea verapamilului. În consecință, dacă verapamilul este utilizat clinic pentru combaterea tahicardiei materne și/sau fetale induse de un tocolitic β_2 adrenomimetic (direct și/sau reflex), trebuie obligatoriu ținut cont de proprietățile lui deprimante uterine, de posibilitatea sumării efectelor miometrice ale celor două tipuri de medicamente, și de riscul - implicit - de prelungire a travaliului.

BIBLIOGRAFIE

1. **Asboth G., Phaneuf S., Europe-Finner GN, Toth M., Bernal AL:** Prostaglandin E2 activates phospholipase C and elevates intracellular calcium in cultured myometrial cells: Involvement of EP1 and EP3 receptor subtypes. *Endocrinology* 1996, 137 (6), p. 2572 - 9
2. **Bird L.M., Anderson NC et al:** The effects of aminophylline and nifedipine on contractility of isolated pregnant myometrium, *Am J. Obstet Gynecol* 1987, 157, p. 171 - 7
3. **Childress CH, Katz VL:** Nifedipine and its indications in obstetrics and gynecology, *Obstet. Gynecol* 1994, apr. 83 (4) p. 616 - 24
4. **Constantinescu Maria Cristina:** Controlul farmacologic al dinamicii uterine, *Teză de doctorat*, UMF Carol Davila, București, 1998
5. **Davis W.B., Wells SR, Kuller J.A., Thorp JM Jr.:** Analysis of the risks associated with calcium channel blockade: implications for the obstetrician-gynecologist, *Obstet Gynecol Surv* 1997, 52 (3) p. 198 - 201
6. **Elsayed EM; Ramadam L.A., Abdel Aziz A.A., Moustafa AM., Hamada F.M.:** The effect of thiola, piroxicam and diltiazem on the uterine contractility of gamma-irradiated rats, *Pharmacol Res, Nov-Dec* 1996, 34 (5 - 6), p. 231 -
7. **Ferguson J.E., Dyson D.C. et al.:** A comparison of tocolysis with nifedipine and ritodrine: analysis of efficacy and maternal, fetal and neonatal outcome, *Am. J. Obstet. Gynecol* 1990, 163, p. 105 - 11
8. **Fischer M., Grotta J.:** New uses for calcium channel blockers, *Therapeutic implications, Drugs* 1993, dec. 46 (6) 961 - 75
9. **Glock J.L., Morales W.J.:** Efficacy and safety of nifedipine versus magnesium sulphate in the management of preterm labour, a randomised study, *Am. J. Obstet. Gynecol*, 1993, 169 (4) p. 960 - 4
10. **Goodman & Gilman's:** The pharmacological basis of therapeutics; *Ninth edition, Mc Graw-Hill*, 1996
11. **Hollingsworth M., Downing S., Cheuk J.M.S. et al.:** Pharmacological strategies for uterine relaxation, *In: Garfield R.E., Tabb: Control of uterine contractility Boca Raton*, 1994
12. **Jannet D., Abankawa A., Guyard B., Carbonne B., Marpeau L, Milliez J.:** Nicardipine versus salbutamol in the treatment of premature labor. A prospective randomized study, *Eur. J., Obstet., Gynecol. Reprod. Biol* 1997, 73 (1), p 11 - 6
13. **Katzung B.G.:** Basic and Clinical Pharmacology, *Seventh edition, Appleton & Lange*, 1998
14. **Kupferminc M., Lessing J.B., Yaron Y., Peyser M.R.:** Nifedipine versus ritodrine for suppression of preterm labor. *Br J. Obstet Gynecol* 1993 dec. 100 (12) p. 1090 - 4
15. **Lechner W., Bergant A., Solder E., Kolle D.:** Effect of the calcium antagonist amlodipine on non-vascular smooth muscle exemplified by the uterus, *Wien Med Wochenschr* 1996, 146 (17), p. 466 - 8
16. **Lechner W., Keene F., Marth C. et al.:** Calcium and calmodulin antagonism for inhibition of uterine contractions. *Arch Gynecol. Obstet*, 1989, 28 (3), 144 - 6
17. **Meyer W.R., Randall HW, Graves WL.:** Nifedipine versus ritodrine for suppressing preterm labor, *J. Reprod. Med* 1990; 35; p. 649 - 53
18. **Murray C., Haverkamp A.D. și al.:** Nifedipine for treatment of preterm labor: a historic prospective study, *Am. J. Obstet. Gynecol*, 1992, 167, p. 52 - 56
19. **Naze S., Le Stunff H., Dokhac L., Thomas G., Harbon S.:** Activation of phospholipase C by endothelin 1 in rat myometrium. Role of calcium and protein kinase C. *J. pharmacol Exp. Ther.* 1997, apr. 281 (1), p. 15 - 23
20. **Philippe M., Basa A.:** Effects of sodium and calcium channel blockade on cytosolic calcium oscillations and phasic contractions of myometrial tissue. *J. Soc. Gynecol Investig Mar-Apr* 1997, 4, (2), p. 72 - 7
21. **Pirhonen J.P., Erkola R.U., Ekblad U.U.:** Uterine and fetal flow velocity waveforms in hypertensive pregnancy: the effect of a single dose of nifedipine. *Obstet. Gynecol* 1990, 76 (1) p. 37 - 41
22. **Saade G.R., Taskin O., Belfort M.A., Erturan B., Moise K.J. Jr.:** In vitro comparison of four tocolytic agents, alone and in combination. *Obstet. Gynecol* 1994, sept. 84 (3) p. 374 - 8
23. **Săvineanu JP., Marthan R.:** Modulation of the calcium sensitivity of the smooth muscle contractile apparatus: molecular mechanisms, pharmacological and pathophysiological implication, *Fundal Clin. Pharmacol* 1997, 11 p. 289 - 99
24. **Sharma S., Gupta U.:** Effect of calcium channel blockers and salbutamol on oxytocin and PGF2alpha induced uterine contractions in rats. *Indian J. Exp. Biol.* 1993 aug 31 (8) , p. 687 - 90
25. **Smith C.S., Woodland M.B.:** Clinical comparison of oral nifedipine and subcutaneous terbutaline for initial tocolysis. *Am. J. Perinatol* 1993, iul 10 (4) p 280-4
26. **Snyder S.W., Cardwell M.S.:** Neuromuscular blockade with magnesium sulfate and nifedipine; *Am. J. Obstet. Gynecol* 1989, 161, 35 - 6.
27. **Wilson T.W., Quest D.W.:** Comparative pharmacology of calcium antagonists, *Can J. Cardiol* 1995 mar 11 (3), p. 243 - 9
28. **Yamashita T., Masuda Y., Tanaka S.:** Potassium channel openers relax A23187 - induced nifedipine - resistant contraction of rat aorta, *J. Cardiovasc. Pharmacol* 1994 dec. 24 (6) p. 914 - 20