Summary

Mitoxantrone (MTO) is a synthetic anticancer drug derived from anthracendion. The clinical use of MTO is limited by its cardiotoxic effects. Until now, the exact mechanisms of the cardiotoxicity of MTO is still unclear. In an attempt to understand the cellular processes associated with MTO cardiotoxicity, the effects of MTO on the electrical and contractile properties, membrane muscarinic receptors and intracellular calcium concentration in isolated cardiac preparations were investigated in the present study.

In both the isolated guinea-pig papillary muscles and ventricular myocytes, 30 µM MTO induced a time-dependent prolongation of action potential duration (APD) which was occasionally accompanied by early afterdepolarizations. The APD prolonging effect of MTO displayed reverse rate-dependence and was preserved in the presence of 10 µM tetrodotoxin, a specific Na^+ channel blocker.

Under the whole-cell voltage clamp, both the inward rectifier K^+ current (I_{K1}) and the delayed rectifier K^+ current (I_K) of guinea-pig ventricular myocytes were significantly depressed by 30 µM MTO. The rapidly activating component of I_K (I_{Kr}) seemed to be preferentially blocked by MTO. The transient outward current (I_{to}) in rat ventricular myocytes was not affected by MTO.

30 µM MTO had no direct effect on the L-type Ca^{2+} current ($I_{Ca(L)}$), but reversed the inhibitory effect of 1 µM carbamylcholine but not of the A_1-adenosine receptor agonist (-)-N^6-phenylisopropyladenosine (1 µM) on $I_{Ca(L)}$ enhanced by 50 nM isoproterenol in guinea-pig ventricular myocytes. In guinea-pig atrial myocytes, 30 µM MTO inhibited by 93% the muscarinic receptor gated K^+ current ($I_{K,ACh}$) evoked by 1 µM carbamylcholine, whereas $I_{K,ACh}$ elicited by 100 µM GTPγS, a nonhydrolyzable GTP analogue, was only decreased by 12%. The specific binding of [^{3}H]QNB, a muscarinic receptor ligand, to human atrial membranes was concentration-dependently displaced by MTO (1-1000 µM).

In right ventricular papillary muscles, 30 µM MTO increased isometric force of contraction in a time-dependent manner. The force of contraction was increased about 3-fold within 4 h. This positive inotropic effect was accompanied by a prolongation of the time to peak force and relaxation time. An elevation of resting tension could be observed when the muscles were treated with MTO for over 4 h.

In isolated ventricular myocytes, 30 µM MTO caused an increase of cell shortening by 77% and a simultaneous prolongation of APD by 19% within 30 min. Peak amplitude of the

intracellular Ca^{2+} transients as measured by a fluorescent Ca^{2+} indicator fura-2 was also increased by 10%. The contribution of APD prolongation to the enhancement of cell shortening induced by MTO was assessed by clamping control myocytes with action potentials of various duration. Prolongation of APD_{90} by 24% led to an increase of cell shortening by 13%. When the cells were clamped by an action potential with constant APD, MTO still caused an increase of cell shortening by 59% within 30 min. No increase of the peak intracellular Ca^{2+} transients, however, were observed under this condition.

It is concluded that MTO (1) directly blocks cardiac muscarinic receptors; (2) prolongs APD by inhibition of I_{K1} and I_{Kr} ; (3) produces a positive inotropic effect by prolonging APD and by increasing the sensitivity of the contractile proteins to calcium; (4) causes an attenuation of cardiac muscle relaxation. The antimuscarinic effect of MTO might induce tachycardia due to the enhancement of sympathetic activity. The pronounced prolongation of APD with the occasionally occurring early afterdepolarizations may underline the clinically observed dysrhythmias in patients during MTO therapy. Although the positive inotropic effect seems to be irrelevant to the cardiotoxicity of MTO, the pronounced lengthening of relaxation time and increase in resting tension could be detrimental to the heart by impairing ventricular filling.

Zusammenfassung

Mitoxantron (MTO) ist ein synthetisches Anthrachinon-Derivat mit ausgeprägter zytostatischer Wirksamkeit. Der therapeutische Einsatz von MTO wird allerdings durch seine kardiotoxischen Wirkungen eingeschränkt, die sich akut in Form von Rhythmusstörungen und in einer später auftretenden Herzinsuffizienz äußern. Bislang sind die Wirkungsmechanismen der Kardiotoxizität von MTO auf zellulärer Ebene noch nicht untersucht worden. In der vorliegenden Arbeit wurden deshalb die akuten Effekte von MTO auf die elektromechanische Kopplung isolierter Herzmuskelzellen mit Hilfe der patch-clamp Technik, des fluoreszierenden Kalzium-Indikators Fura-2 und der Kontraktilitätsmessung untersucht. Außerdem wurde die Wechselwirkung zwischen MTO und kardialen m-Cholinozeptoren durch Radioliganden-Bindungsstudien analysiert. Die Untersuchungen sollen dazu beitragen, die zellulären Mechanismen der kardiotoxischen Wirkungen von MTO besser zu verstehen. Die Versuche wurden hauptsächlich an ventrikulären Kardiomyozyten des Meerschweinchens durchgeführt.

An isolierten Papillarmuskeln und ventrikulären Kardiomyozyten induzierte MTO (30 µM) eine zeitabhängige Verlängerung der Dauer des Aktionspotentials (APD). Nach einer 3-stündigen Einwirkzeit betrug die Verlängerung der APD an Papillarmuskeln im Mittel 32%. Die APD-Verlängerung unter MTO zeigte eine umgekehrte Frequenz-Abhängigkeit, d.h., der Ausmaß der APD-Verlängerung nahm mit Erhöhung der Reizfrequenz ab. An Kardiomyozyten führte MTO innerhalb von 60 min zu einer Verlängerung der APD um 60%. Frühe Nachdepolarisationen konnten an einigen Zellen beobachtet werden. Vorbehandlung der Kardiomyozyten mit 10 µM Tetrodotoxin, einem spezifischen Na^+-Kanal-Blocker, hatte keinen Einfluß auf die APD-verlängernde Wirkung von MTO. Die Experimente mit Tetrodotoxin zeigen, daß ein residueller Na^+-Einwärtstrom für die APD-Verlängerung nicht verantwortlich war.

Um die APD-verlängernde Wirkung von MTO aufzuklären, wurde der Einfluß von MTO auf Kaliumauswärtsströme untersucht. An ventrikulären Kardiomyozyten wurde sowohl der einwärts gleichrichtende K^+-Strom (I_{K1}) als auch der verzögert gleichrichtende K^+-Strom (I_K) durch 30 µM MTO innerhalb von 60 min um ca. 50% gehemmt. Experimente, in denen die schnell aktivierende Komponente von I_K (I_{Kr}) direkt gemessen wurde, zeigten, daß der Effekt von MTO I_{Kr}-spezifisch war. Der transiente K^+-Auswärtstrom (I_{to}) ventrikulärer Kardiomyozyten der Ratte wurde durch MTO nicht beeinflußt. Diese Experimente wurde an

der Ratte durchgeführt, da an dieser Spezies wie auch am Mensch diese K^+-Stromkomponente nachweisbar ist. Meerschweinchen zeigt kein I_{to}. MTO hatte auch keine direkte Wirkung auf den spannungsabhängigen Kalziumeinwärtsstrom (I_{Ca}).

Sowohl funktionelle Experimente an Acetylcholin-induziertem K^+-Strom ($I_{K,ACh}$) an Vorhofzellen als auch Radioliganden-Bindungsstudien mit [^{3}H]-QNB an menschlichen Vorhofmembranen zeigten, daß MTO ein Antagonist an kardialen m-Cholinozeptoren ist, d.h. atropinartige Wirkung besitzt.

An isometrisch sich kontrahierenden Papillarmuskeln konnte für MTO überraschenderweise eine konzentrationsabhängige positiv inotrope Wirkung nachgewiesen werden, die sich langsam über mehreren Stunden entwickelte. Die Kontraktionskraft wurde durch 30 µM MTO innerhalb von 4 Stunden um das fast 3-fache verstärkt. Parallel zur inotropen Wirkung kam es zu einer signifikanten Verlängerung der Gesamtkontraktionsdauer, ein Effekt, der sowohl auf eine Verlängerung der Anstiegszeit (um 31%) als auch der Erschlaffungszeit (um 47%) zurückzuführen war. Wurden die Muskeln länger als 4 Stunden mit 30 µM MTO behandelt, entwickelte sich häufig im Anschluß an die positiv inotrope Wirkung eine Kontraktur (Erhöhung der muskulären Ruhespannung), die von einer Abnahme des Kontraktionsmaximums begleitet war.

An isotonisch sich verkürzenden ventrikulären Myozyten führte 30 µM MTO innerhalb von 30 min zu einer Verstärkung der Zellverkürzung um 77%. Gleichzeitig wurde die APD um 19% verlängert, und die Amplitude des intrazellulären Ca^{2+}-Transienten um 10% erhöht. Um herauszufinden, in welchem Ausmaß die Verlängerung des Aktionspotentials zur positiv inotropen Wirkung von MTO beiträgt, wurden die Myozyten durch Aktionspotentiale unterschiedlicher Dauer stimuliert, und die dadurch induzierte Zellverkürzung gemessen. Es zeigte sich, daß eine Verlängerung der APD um 24% nur zu einer Verstärkung der Zellverkürzung um 13% führte. Wurden die Myozyten durch ein Aktionspotential konstanter Dauer stimuliert, zeigte MTO immer noch einen positiv inotropen Effekt, die Zellverkürzung nahm innerhalb von 30 min um 59% zu, während der intrazelluläre Ca^{2+}-Transienten unbeeinflußt blieb. Diese Befunde zeigen, daß die Verstärkung der Kontraktion in Anwesenheit von MTO nur teilweise auf einer Verlängerung der APD beruht. Ein wesentlicher Teil der positiv inotropen Wirkung ist demnach auf eine direkte Wechselwirkung zwischen MTO und den kontraktilen Proteinen der Herzmuskelzelle zurückzuführen.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß MTO folgende Wirkungen auf Herzmuskelzellen besitzt: (1) Blockade von m-Cholinozeptoren; (2) Verlängerung des Aktionspotentials als

Folge einer Hemmung von I_{K1} und I_{Kr}; (3) Verstärkung der Muskelkontraktion als Resultat der Verlängerung der APD und einer erhöhten Kalziumempfindlichkeit der kontraktilen Proteine; (4) Verzögerung der Muskelrelaxation. Einige der Effekte könnten für die in der Klinik beobachtete kardiotoxische Wirkungen verantwortlich sein. Die atropinartige Wirkung von MTO könnte zu tachykarden Episoden führen. Frühe Nachdepolarisationen als Folge der APD-Verlängerung sind möglicherweise Ursprung für die unter MTO-Behandlung immer wieder beobachteten Arrhythmien. Ferner würde eine Verlängerung der Kontraktionsdauer und die Manifestation einer Kontraktur zu einer deutlichen Beeinträchtigung der Ventrikelfunktion führen.