

Interactions biophysiques membranaires de l'amiodipine et propriétés antioxydantes

R. Preston Mason,¹ Mark W. Trumbore² et Pamela E. Mason¹

1 Institut de Recherche Cardiovasculaire et Pulmonaire, Département de Médecine et de Biochimie, MCP Hahnemann University School of Medicine, Pittsburgh, Pennsylvanie, Etats-Unis

2 Institut National du Cancer, National Institute of Health, Bethesda, Maryland, Etats-Unis

Abstract

Membrane Biophysical Interactions of Amlodipine Result in Antioxidant Properties

Objective: To assess the potential benefits of the antioxidant activity of certain pharmacological agents that may be beneficial in the treatment of cardiovascular disease, including coronary heart disease and heart failure, by reducing irreversible cell injury due to oxyradical damage.

Methods: The antioxidant activities of representative calcium antagonists were examined and correlated with the molecular membrane interactions of the compounds, as measured by radioligand binding assays and high resolution differential scanning calorimetry.

Results: The results of these experiments show a direct relationship between the antioxidant activities of the calcium antagonists and their affinity for the membrane lipid bilayer, as well as their ability to modulate membrane thermodynamic properties (amlodipine > verapamil >> diltiazem). The charged 1,4-dihydropyridine calcium antagonist amlodipine had the highest affinity for the membrane bilayer (K_p10^4) and produced the largest changes in membrane thermodynamic properties, including a reduction in the thermal phase transition temperature (-11%), enthalpy (-14%) and cooperative unit size (-59%), relative to control phosphatidylcholine liposomes.

Conclusions: These findings indicate that lipophilic calcium antagonists inhibit lipid peroxidation in cellular membranes as a result of modulating physico-chemical properties of the membrane lipid bilayer, independently of calcium channel inhibition. The antioxidant activity of highly lipophilic calcium antagonists, such as amlodipine, may contribute to new cytoprotective mechanisms of action in cardiovascular disease.

Résumé

Objectif: Evaluer les bénéfices potentiels de l'effet antioxydant de certains médicaments dans le traitement des maladies cardiovasculaires notamment les atteintes des artères coronaires et l'insuffisance cardiaque, par la diminution des lésions cellulaires irréversibles dues à l'atteinte oxydative.

Méthodes: L'action antioxydante de certains inhibiteurs calciques a été étudiée et corrélée aux effets moléculaires membranaires du composé. Celle-ci a été mesurée à l'aide de tests de liaison utilisant des radioligands et par calorimétrie à balayage différentiel à haute résolution.

Résultats: Les résultats de ces expériences montrent un lien direct entre les actions antioxydantes des inhibiteurs calciques et leur affinité pour la double couche lipidique de la membrane ainsi que leur capacité à moduler les propriétés thermodynamiques de la membrane (amlodipine > vérapamil >> diltiazem). L'amlodipine, inhibiteur calcique 1,4-dihydropyridine, a montré la plus forte affinité membranaire ($K_p 10^4$) et a entraîné les plus fortes modifications des propriétés thermodynamiques de la membrane, notamment une réduction de la température de transition de phase thermique (-11%), de l'enthalpie (-14%) et du nombre de molécules passant simultanément la transition de phase (-59%), par rapport au contrôle par liposomes phosphatidylcholines.

Conclusions: Ces données montrent que les inhibiteurs calciques lipophiles inhibent la peroxydation lipidique dans les membranes cellulaires du fait de leurs propriétés physico-chimiques de modulation de la double couche lipidique des membranes, indépendamment de l'inhibition des canaux calciques. L'effet antioxydant des inhibiteurs calciques fortement lipophiles tels que l'amlodipine, pourrait contribuer à de nouveaux mécanismes cytoprotecteurs dans les maladies cardiovasculaires.

Les lésions des membranes cellulaires induites par les radicaux libres jouent un rôle important dans la physiopathologie des lésions tissulaires aiguës (atteintes ischémiques) et chroniques (athérosclérose, insuffisance cardiaque). Dans le myocarde lésé, l'augmentation des taux de composés de superoxydes (O_2^-) et de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) forment des radicaux hydroxyles fortement réactifs (OH^\cdot) en présence d'éléments métalliques tels que le fer. Ces radicaux libres interagissent avec des acides gras phospholipidiques polyinsaturés et des acides aminés oxydables dans les membranes, entraînant ainsi une augmentation de la perméabilité membranaire. La rupture de l'équilibre ionique et du métabolisme cellulaire qui en résulte entraîne une perte de l'intégrité membranaire et une atteinte cellulaire irréversible.^[1-3] Les molécules telles que le probucol, qui inhibent la peroxydation lipidique, ont montré un effet antiathérogène dans divers modèles expérimentaux.^[4-8] De plus, d'importantes études épidémiologiques ont montré des baisses marquées de la morbimortalité associée

aux maladies coronariennes après augmentation de l'apport d'antioxydants dans l'alimentation (tableau I).^[9-13]

Les inhibiteurs calciques constituent une classe de médicaments très variée du point de vue chimique et pharmacologique. Ils agissent en modulant le flux transmembranaire de Ca^{2+} dans les cellules contractiles vasculaires. Ces composés se lient de façon fortement spécifique et réversible aux canaux calciques voltage-dépendants dans le sarcolemme de certaines cellules contractiles à des concentrations nanomolaires.^[14] Plusieurs études ont pu montrer que ces agents, largement utilisés dans le traitement de l'hypertension et de l'angor, possèdent également des propriétés antioxydantes dose-dépendantes dans diverses préparations cellulaires.^[15-17] L'inhibition de la peroxydation lipidique par certains inhibiteurs calciques pourrait contribuer aux mécanismes d'athéroprotection dans la mesure où l'atteinte oxydative des membranes et des lipoprotéines constitue une des premières étapes du développement de l'athérome.^[6,18-21] La peroxydation lipidique contribue également aux

Tableau I. Etudes épidémiologiques sur la relation entre l'α-tocophérol (vitamine E) et les maladies coronariennes (d'après Stampfer et al.,^[9] Rimm et al.,^[10] Enstrom et al.,^[12] et Losonczy et al.^[13])

Etude	Population étudiée	Observations
Nurses' Health Study ^[9]	87 245 infirmières américaines	Relation inverse entre les maladies coronariennes et la prise d'α-tocophérol
Health Professionals' Follow-up Study ^[10]	39 910 hommes américains, professionnels de santé	Relation inverse entre la survenue d'événements coronariens et la prise d'α-tocophérol
Etude NHANES 1 ^[12]	11 349 hommes et femmes américains	Relation inverse entre la mortalité cardiovasculaire et la prise d'acide ascorbique (vitamine C)
Losonczy et al. ^[13]	11 178 américains âgés	Moins d'événements coronariens chez les sujets sous α-tocophérol que chez ceux qui ne le prennent pas

NHANES 1 = First National Health and Nutrition Examination Survey.

mécanismes lésionnels cellulaires irréversibles associés aux lésions tissulaires du myocarde.^[22] En se répartissant dans les compartiments hydrophobes des membranes cellulaires et des lipoprotéines, les inhibiteurs calciques lipophiles peuvent piéger les radicaux libres par des mécanismes de don d'électrons et de résonance des radicaux, rompant ainsi la réaction en chaîne de peroxydation lipidique.^[15-17]

Les trois classes d'inhibiteurs calciques qui ont été largement étudiées sont les 1,4-dihydropyridines, les phénylalkylamines et les benzothiazépines, représentées respectivement par la nifédipine, le vérapamil et le diltiazem. L'amiodipine est un inhibiteur calcique dihydropyridine de troisième génération à durée d'action intrinsèquement longue du fait de son affinité relativement élevée pour les compartiments lipophiles des tissus.^[23-26] Outre ses propriétés hémodynamiques, l'effet inhibiteur de l'amiodipine sur la prolifération des cellules musculaires lisses après une forte augmentation des taux de cholestérol et stimulation mitogénique a pu être démontré.^[27] De plus, sur les cellules endothéliales, l'amiodipine inhibe l'action toxique induite par les cytokines, indépendamment de la modulation des canaux calciques.^[28] Lors de l'étude PRAISE (Prospective Randomized Amlodipine Survival Evaluation)-1, l'amiodipine, à l'inverse des autres inhibiteurs calciques, a eu un effet favorable sur un sous-groupe de patients présentant une cardiomyopathie dilatée, processus pathologique caractérisé par une apoptose étendue et un stress oxydatif.^[22,29,30]

Parmi les patients traités par l'amiodipine, il y a eu une réduction de 31% des événements fatals dans le sous-groupe présentant une cardiomyopathie dilatée non-ischémique. Le mécanisme à l'origine de l'effet bénéfique de l'amiodipine chez ces patients ne serait pas lié spécifiquement aux effets hémodynamiques de ce composé mais pourrait être dû aux effets cellulaires directs et notamment à la modulation de la production d'oxyde nitrique et à l'inhibition du stress oxydatif.^[28,31]

Afin d'étudier ces éventuels nouveaux mécanismes cytoprotecteurs de l'amiodipine, des analyses ont été réalisées sur des préparations membranaires isolées enrichies en acides gras polyinsaturés. Dans des conditions identiques, l'action antioxydante de l'amiodipine a été comparée à celle d'autres inhibiteurs calciques (félodipine, nitrendipine, vérapamil et diltiazem) ainsi qu'à un inhibiteur de l'enzyme de conversion, le captopril. Les interactions membranaires physico-chimiques des inhibiteurs calciques de référence ont été évaluées directement dans les doubles couches lipidiques membranaires par calorimétrie à balayage différentiel à haute résolution. Les résultats de cette étude permettent de mieux comprendre les mécanismes de cytoprotection de l'amiodipine, indépendants de son effet modulateur sur les canaux calciques.^[17]

Matériel et méthodes

Les composés dimyristoyl-phosphatidylcholine (DMPC), 1 - palmitoyl - 2 - oléoyl-phosphatidylcholine (POPC) et dioléoyl-phosphatidylcholine

(DOPC) ont été fournis par Avanti Polar Lipids, Inc. (Alabaster, AL, Etats-Unis). Pfizer Central Research (Groton, CT, Etats-Unis) a procuré l'amiodipine bésylate. Le vérapamil et le diltiazem ont été obtenus chez Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, Etats-Unis). Amersham (Amersham, GB) a fourni le vérapamil, le diltiazem et l'amiodipine marqués au tritium.

Activité antioxydante sur la membrane microsomiale

Des membranes microsomiales hépatiques de rats Sprague-Dawley (200 à 300g ; Charles River, MA, Etats-Unis) ont été préparées par centrifugation différentielle selon la technique déjà décrite.^[15] Les effets de l'amiodipine, du vérapamil et du diltiazem (20 à 200 µmol/L) sur la peroxydation lipidique induite par les radicaux libres dans les membranes microsomiales ont été étudiés dans une solution tampon de KCl 120 mmol/L, saccharose 50 mmol/L et phosphate de potassium 10 mmol/L, (pH 7,2). Les microsomes hépatiques (0,3mg de protéine/ml) ont été préalablement incubés avec chaque molécule pendant 30 minutes à 37°C avant addition des composés à radicaux libres. La peroxydation lipidique a été initiée par addition de dihydroxyfumarate (DHF) [0,83 mmol/L] et de Fe-ADP (0,025 mmol/L de FeCl₃ chélatisé à 0,25 mmol/L d'ADP). La peroxydation lipidique a été mesurée en fonction du taux de formation de complexes d'acide thiobarbiturique (TBA)-composé réactif comme déjà décrit.^[4,16] Afin d'éviter toute formation de peroxyde non-spécifique, 0,01% d'hydroxytoluène butylaté (BHT) a été ajouté au cours de l'étape de chauffage à 80°C. A des concentrations ≤ 200 µmol/L, aucun des inhibiteurs calciques n'a eu d'impact sur le test TBA-malonaldialdéhyde (MDA).

Calorimétrie à balayage différentiel

La technique de calorimétrie à balayage différentiel a été utilisée pour contrôler et analyser le contenu des vésicules de DMPC multilamellaires préparées de la façon suivante. Le lipide

DMPC a été utilisé en raison de sa température de transition (T_m) de phase thermique bien définie de 22,9°C. Pour la préparation des vésicules, des quantités aliquotes de 100µl d'une solution de DMPC 0,03 mol/L dans du chloroforme ont subi une dessiccation par évaporation sous azote jusqu'à obtention d'une couche mince et le solvant résiduel a été éliminé sous vide. Le lipide ainsi déshydraté a ensuite été réhydraté pendant 10 minutes à 50°C dans 100µl d'une solution tampon (HEPES 0,5 mmol/L, NaCl 2,0 mmol/L, pH 7,3) contenant diverses concentrations de diltiazem, de nisoldipine ou de nifédipine, puis centrifugé pendant 1 minute afin de former des vésicules multilamellaires. Des quantités aliquotes de vésicules (15µl) contenant 0,300mg de lipides ont été placées dans des coupelles de calorimètre à balayage, fermées hermétiquement. L'essai a été réalisé avec le calorimètre à balayage modèle DSC 2910 Differential Scanning Calorimeter de TA Instruments (New Castle, DE, Etats-Unis). Les données ont été évaluées à l'aide du système d'analyse thermique, Thermal Analyst 2000 de TA Instruments. Le calorimètre a été étalonné pour les valeurs de départ, le flux thermique et la température selon un standard Indium de masse connue. La vitesse de balayage a été de 2°C/minute, débutant à 6°C et finissant à 29,5°. Une solution tampon de 15µl a servi de référence.

Coefficient de distribution membranaire du médicament

Le coefficient de distribution membranaire ($K_{P[mem]}$) correspond à la répartition (exprimée en masse) du médicament dans la membrane par rapport à la solution tampon à l'équilibre. Cette valeur est l'expression de l'affinité ou du caractère lipophile du médicament pour la double couche lipidique membranaire. Les coefficients de distribution à l'équilibre pour l'amiodipine, le vérapamil et le diltiazem radiomarqués ont été mesurés dans les vésicules multilamellaires DOPC avec un rapport molaire cholestérol/phospholipides de 0,3/1. Des quantités spécifiques de cholestérol et de phospholipides ont été mélangées dans un tube

à essai en verre puis centrifugées et portées à dessiccation sous un flux d'azote jusqu'à obtention d'une couche mince. Une solution tampon tris (NaCl 150 mmol/L, Tris HCl 10 mmol/L, pH 7,0) a été ajoutée de manière à obtenir une concentration lipidique de 2,0 mg/ml puis la solution a été centrifugée à température ambiante (au-dessus de la T_m de phase thermique) afin de créer des vésicules multilamellaires. Les composés réactifs contenant des analogues médicamenteux radio-marqués ($5,0 \times 10^{-10}$ mol/L) avec ou sans DOPC (20,0 mg/L) ont été incubés à température ambiante pendant 30 minutes avant filtration. La concentration finale en éthanol dans les mélanges réactifs était inférieure à 0,001%. Une séparation rapide entre fraction libre du médicament et fraction liée à la membrane a été réalisée à l'aide de techniques de filtration rapide.^[14] Des analyses statistiques ont été faites afin d'évaluer les paramètres de liaison non-spécifique des dihydro-pyridines à l'équilibre. Trois essais comportant chacun 12 échantillons ($n = 36$) ont été réalisés pour les expériences avec le [³H]diltiazem et le [³H]vérapamil tandis que deux essais ($n = 24$) ont été effectués avec l'amiodipine tritiée. Pour chaque groupe d'expériences, les valeurs $K_{P[\text{mem}]}$ ont été obtenues et la déviation standard de la moyenne a été calculée.

Résultats

Activité antioxydante sur la membrane microsomiale

Le taux de formation de peroxyde lipidique microsomial a été d'environ 1,75 nmol d'équivalents MDA par minute lors de ces expériences. Les effets antioxydants des inhibiteurs calciques ont été exprimés sous forme d'un pourcentage d'inhibition de la formation de MDA et ce, en com-

paraison avec les échantillons témoins (tableau II). Les trois inhibiteurs calciques ont produit une inhibition de la peroxydation lipidique qui s'est avérée être concentration-dépendante. Pour chaque concentration testée, l'activité antioxydante a été, dans l'ordre, la suivante : amiodipine > vérapamil >> diltiazem. Les concentrations requises pour inhiber 50% (CI_{50}) de la formation de peroxyde lipidique ont été estimées à 59 µmol/L (amiodipine), 290 µmol/L (vérapamil) et ≥ 1000 µmol/L (diltiazem).

Calorimétrie à balayage différentiel

L'amiodipine, le vérapamil et le diltiazem ont modifié de manière dose-dépendante les propriétés thermotropiques membranaires des double couches membranaires de DMPC. La T_m de phase gel-cristaux liquides des échantillons témoins a été de 22,9°C, l'enthalpie de transition a été de 33,0 J/g et la valeur correspondant au nombre de molécules passant simultanément la transition de phase a été de 259. Par rapport aux échantillons témoins, tous les médicaments ont modifié la T_m des vésicules DMPC (-11% à -3%) et ont totalement aboli la phase de prétransition quelqu'ait été le rapport molaire médicament/lipides. Seule l'amiodipine a modifié significativement l'enthalpie (ΔH) associée à la T_m (-14%). Les baisses de ΔH sont dues à l'incapacité d'une partie des molécules du système à participer à la transition de phase thermique. Les trois inhibiteurs calciques étudiés ont diminué le nombre de molécules passant simultanément la transition de phase thermique à des niveaux allant de -59% à -19%.

Coefficients de distribution médicament/membrane

Les valeurs $K_{P[\text{mem}]}$ à l'équilibre du diltiazem, du vérapamil et de l'amiodipine ont été mesurées

Tableau II. Inhibition de la formation de malonaldialdéhyde (MDA) dans les microsomes hépatiques [les valeurs représentent la moyenne \pm DS ($n = 3$ à 5)]

Concentration du médicament	Amlodipine (% d'inhibition)	Diltiazem (% d'inhibition)	Vérapamil (% d'inhibition)
20 µmol/L	25 ± 4	5 ± 2	13 ± 2
60 µmol/L	49 ± 6	17 ± 3	27 ± 6
200 µmol/L	83 ± 7	28 ± 4	44 ± 8

et comparées (tableau III).^[14] Ces mesures ont été réalisées sur des liposomes composés de cholestérol et de DOPC avec un rapport molaire de 0,3/1, rapport comparable à celui rencontré dans les membranes des cellules plasmatiques des mammifères. Les valeurs $K_{P[\text{mem}]}$ pour ces composés ont été significativement différentes, allant de 600 ± 30 pour le diltiazem à $22\,000 \pm 700$ pour l'amiodipine. Ces mesures indiquent qu'à l'état d'équilibre, la concentration en amiodipine dans la double couche lipidique de la membrane est 10^4 fois plus importante que celle qui se trouve dans la solution tampon aqueuse environnante.

Discussion

Les résultats de cette étude montrent que les inhibiteurs calciques considérés ici ont des effets antioxydants membranaires différents (amiodipine > vérapamil >> diltiazem) et qui seraient, au vu des modifications des propriétés thermodynamiques de la membrane induites par les médicaments, attribuables aux modifications des propriétés physicochimiques de la double couche lipidique membranaire. De plus, les $K_{P[\text{mem}]}$ à l'équilibre pour les inhibiteurs calciques étudiés ont varié de 10^2 (diltiazem) à 10^3 (vérapamil) et à 10^4 (amiodipine).^[13,14] A de telles concentrations, il est possible que les inhibiteurs calciques se combinent de manière très efficace avec les radicaux libres rompant ainsi la réaction en chaîne de la peroxydation lipidique dans les préparations membranaires et lipoprotéiques.^[4,5,11] L'administration prolongée d'un inhibiteur calcique serait susceptible d'entraîner son accumulation dans les membranes cellulaires à des taux dépassant de plusieurs ordres de grandeur les concentrations plasmatiques du médicament.^[13,14] Enfin, l'inhibition par les inhibiteurs calciques des atteintes oxydatives s'est produite indépendamment de leur action sur le flux des canaux calciques. Ceci a été confirmé

par la persistance de leur activité antioxydante dans les membranes microsomiales hépatiques, qui sont dépourvues de canaux calciques voltage-dépendants.

La calorimétrie à balayage différentiel à haute résolution a permis de mettre en évidence la capacité des inhibiteurs calciques à modifier les propriétés thermotropiques des couches lipidiques des membranes et ce, en corrélation avec leur activité antioxydante. Les effets les plus marqués sur les propriétés thermodynamiques des couches lipidiques membranaires ont été observés avec l'amiodipine. Plus particulièrement, l'amiodipine a diminué la température de la transition de phase thermique, l'enthalpie de la transition de phase thermique et le nombre de molécules passant simultanément cette transition de phase thermique. Ces résultats montrent que l'amiodipine modifie de façon significative les liaisons intermoléculaires entre phospholipides. A concentration égale, les effets sur l'enthalpie du vérapamil et du diltiazem n'ont pas été significatifs alors que les modifications de la T_m de phase thermique sont nettement moins marquées que celles observées avec l'amiodipine. Les différences d'effet thermotropique membranaire de ces composés peuvent être expliquées par leur affinité membranaire relative et sont comparables à celles observées avec d'autres composés qui se concentrent spécifiquement dans la moitié supérieure de la chaîne hydrocarbonée des couches lipidiques, jouxtant la tête polaire des phospholipides.^[17]

La capacité que possède l'amiodipine à moduler les propriétés biophysiques et thermodynamiques des membranes confirme les résultats d'études antérieures utilisant la diffraction à angle étroit des rayons-X.^[24] Les résultats des analyses de diffraction des rayons-X sont conformes au modèle moléculaire qui place la fonction aminée chargée de l'amiodipine près des groupes de charge opposée au sein du groupe principal de phospholipides, alors que la partie hydrophobe de l'amiodipine est enfouie dans la chaîne hydrocarbonée de la membrane. Un tel modèle pourrait permettre de prédire que la localisation du cycle chlorophényl

Tableau III. Coefficients de distribution membranaire des inhibiteurs calciques [les valeurs représentent la moyenne \pm DS ($n = 12$) (données modifiées d'après Janis et al.^[14])

Amlodipine	Diltiazem	Vérapamil
$22\,000 \pm 700$	600 ± 30	2700 ± 400

de l'amiodipine se trouve à proximité des liaisons polyinsaturées des phospholipides membranaires, cibles importantes pour la peroxydation. La fonction conjuguée du cycle phénol de l'amiodipine à cet emplacement serait favorable au captage des radicaux libres par des mécanismes de don d'électrons et de résonance des radicaux. De plus, l'insertion de l'amiodipine dans la couche lipidique de la membrane entraînerait une modification des liaisons des composés phospholipidiques, phénomène confirmé par les résultats thermodynamiques. L'ensemble de ces données vient étayer l'hypothèse selon laquelle les activités antioxydantes des inhibiteurs calciques en général, et de l'amiodipine en particulier, pourraient avoir un lien direct avec les modifications fondamentales dans l'organisation et les propriétés thermodynamiques des couches lipidiques membranaires.

Conclusion

Ces données mettent en évidence la capacité des inhibiteurs calciques à inhiber la peroxydation lipidique de la membrane de manière dose-dépendante et indépendamment de leur impact sur les canaux calciques. Le mécanisme de cette activité antiperoxydante lipidique des inhibiteurs calciques est directement lié aux effets des composés sur les propriétés physicochimiques de la membrane, tels qu'ils ont été mesurés par calorimétrie à balayage différentiel. L'amiodipine, inhibiteur calcique 1,4-dihydropyridine a montré les effets les plus marqués sur les propriétés thermodynamiques de la membrane en raison de son action sur une région spécifique de la chaîne hydrocarbonée de la membrane à des concentrations relativement élevées ($K_p > 10^4$). L'effet antioxydant de l'amiodipine pourrait contribuer à amplifier ses effets cliniques bénéfiques dans le traitement des cardiomyopathies non-ischémiques et l'athérosclérose.^[17]

Références

- Halliwell B, Chirico S. Lipid peroxidation: Its mechanism, measurement and significance. Am J Clin Nutr 1993; 57 5 Suppl.: 715S-25
- Farber JL, Kyle ME, Coleman JB. Biology of disease: Mechanisms of cell injury by activated oxygen species. Lab Invest 1990; 62: 670-9
- Porta EA. Role of oxidative stress in the aging process. In: Chow CK, editor. Cellular antioxidant defence mechanisms. Vol 3. Boca Raton: CRC Press, 1988: 1-52
- Carew TE, Schwenke DC, Steinberg D. Antithrombotic effect of probucol unrelated to its hypcholesterolemic effect: evidence that antioxidants *in vivo* can selectively inhibit low density lipoprotein degradation in macrophage-rich fatty streaks and slow the process of atherosclerosis in the Watanabe heritable hyperlipidemic rabbit. Proc Natl Acad Sci USA 1987; 84: 7725-9
- Diaz MN, Frei B, Vita JA, et al. Antioxidants and atherosclerotic heart disease. N Engl J Med 1997; 337: 408-16
- Henry PD. Antiperoxidative actions of calcium antagonists and atherogenesis. J Cardiovasc Pharmacol 1991; 18: S6-S10
- Parker RA, Sabrah T, Cap M, et al. Relation of vascular oxidative stress, α -tocopherol and hypercholesterolemia to early atherosclerosis in hamsters. Arterioscler Thromb Vasc Biol 1995; 15: 349-58
- Tardif JC, Cote G, Lesperance J, et al. Probucol and multivitamins in the prevention of restenosis after coronary angioplasty. Multivitamins and Probucol Study Group. N Engl J Med 1997; 337: 365-72
- Stampfer MJ, Hennekens CH, Manson JE, et al. Vitamin E consumption and the risk of coronary disease in women. N Engl J Med 1993; 328 (20): 1444-9
- Rimm EB, Stampfer MJ, Ascherio A, et al. Vitamin E consumption and the risk of coronary heart disease in men. N Engl J Med 1993; 328 (20): 1450-6
- Stephens NG, Parsons A, Schofield PM, et al. Randomised controlled trial of vitamin E in patients with coronary disease: Cambridge Heart Antioxidant Study (CHAOS). Lancet 1996; 347: 781-6
- Enstrom JE, Kanim LE, Klein MA. Vitamin C intake and mortality among a sample of the United States population. Epidemiology 1992; 3: 194-202
- Losonczy KG, Harris TB, Havlik RJ. Vitamin E and vitamin C supplement use and the risk of all-cause and coronary heart disease mortality in older persons: The Established Populations for Epidemiologic Studies of the Elderly. Am J Clin Nutr 1996; 64: 190-6
- Janis RA, Silver PJ, Triggle DJ. Drug action and cellular calcium regulation. Adv Drug Res 1987; 16: 309-591
- Janero DR, Burghardt B. Antiperoxidant effects of dihydropyridine calcium antagonists. Biochem Pharmacol 1989; 38: 4344-8
- Mak IT, Weglicki WB. Comparative antioxidant activities of propranolol, nifedipine, verapamil and diltiazem against sarcolemmal membrane lipid peroxidation. Circ Res 1990; 66: 1449-52
- Mason RP, Walter MF, Trumbore MW, et al. Membrane antioxidant effects of the charged dihydropyridine calcium antagonist amiodipine. J Mol Cell Cardiol 1999; 31 (1): 275-81
- Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis – an update. N Engl J Med 1986; 314: 488-500
- Lichtlen PR, Hugenholtz PG, Rafflenbeul W, et al. Retardation of coronary artery disease in humans by the calcium-channel blocker nifedipine: results of the INTACT study (International Nifedipine Trial on Atherosclerosis Therapy). Cardiovasc Drugs Ther 1990; 4: S1047-S68
- Keogh AM, Schroeder JS. A review of calcium antagonists and atherosclerosis. J Cardiovasc Pharmacol 1990; 16: S28-S35

21. Steinberg D. Antioxidants and atherosclerosis: a current assessment. *Circulation* 1991; 84: 1420-5
22. Diaz-Velez CR, Garcia-Castineiras S, Mendoza-Ramos E, et al. Increased malondialdehyde in peripheral blood of patients with congestive heart failure. *Am Heart J* 1996; 131: 146-52
23. Burges RA, Gardiner DG, Gwilt M, et al. Calcium channel blocking properties of amlodipine in vascular smooth muscle and cardiac muscle in vitro: evidence for voltage modulation of vascular dihydropyridine receptors. *J Cardiovasc Pharmacol* 1987; 9: 110-9
24. Mason RP, Campbell SF, Wang SD, et al. Comparison of location and binding for the positively charged 1,4-dihydropyridine calcium channel antagonist amlodipine with uncharged drugs of this class in cardiac membranes. *Mol Pharmacol* 1989; 36: 634-40
25. Mason RP, Rhodes DG, Herbette LG. Re-evaluation equilibrium and kinetic binding parameters for lipophilic drugs based on a structural model for drug interaction with biological membranes. *J Med Chem* 1991; 34: 869-77
26. Mason RP. Membrane interaction of calcium channel antagonists modulated by cholesterol. Implications for drug activity. *Biochem Pharmacol* 1993; 45: 2173-83
27. Tulenko TN, Laury-Kleinert L, Walter MF, et al. Cholesterol, calcium and atherosclerosis: is there a role for calcium channel blockers in atheroprotection? *Int J Cardiol* 1997; 62 (2 Suppl.): 55S-66S
28. Mason RP. Cytoprotective properties of a long-acting calcium channel blocker: New mechanism of action. *Am J Hypertens* 1998; 11: 245A
29. Packer M, O'Connor CM, Ghali JK, et al. Effect of amlodipine on morbidity and mortality in severe chronic heart failure. Prospective Randomized Amlodipine Survival Evaluation Study Group. *N Engl J Med* 1996; 335: 1107-14
30. Narula J, Haider N, Virmani R, et al. Apoptosis in myocytes in end-stage heart failure. *N Engl J Med* 1996; 335: 1182-9
31. Zhang X, Hintze TH. Amlodipine releases nitric oxide from canine coronary microvessels: an unexpected mechanism of action of a calcium channel-blocking agent. *Circulation* 1998; 97: 576-80

Correspondance et offprints : *R. Preston Mason*, Cardiovascular and Pulmonary Research Institute, 320 East North Avenue 15 South Tower, Pittsburgh, PA 15212-4772, USA.
E-mail : Mason@pgh.auhs.edu