

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

А.В.Крылатов*, Р.В.Ужаченко*, Л.Н.Маслов**, Н.А.Бернацкая*, Ю.К.Подоксенов**,
Р.Г.Пертви⁺, А.Макриянис***, Р.Мехоулам⁺⁺

КАННАБИНОИД HU-210 ПОВЫШАЕТ УСТОЙЧИВОСТЬ СЕРДЦА К АРИТМОГЕННЫМ ВОЗДЕЙСТВИЯМ

*Томский государственный педагогический университет; **НИИ кардиологии ТНЦ СО РАМН,
+Абердинский Университет, Абердин, Великобритания; ***Университет Коннектикута, Сторс (Storrs),
США; ++Иерусалимский университет, Иерусалим, Израиль

Обнаружен антиаритмический эффект селективного агониста каннабиноидных рецепторов HU-210 в условиях коронароокклюзии и реперфузии. Кроме того, данный каннабиноид устраняет электрическую нестабильность сердца в условиях уже сформировавшегося постинфарктного кардиосклероза.

Ключевые слова: каннабиноиды, аритмии, постинфарктный кардиосклероз.

It has been found antiarrhythmic effect of selective cannabinoid receptor agonist HU-210 at coronary artery occlusion and reperfusion. The HU-210 increased the ventricular fibrillation threshold in rats with post-infarction cardiac fibrosis.

Key words: cannabinoids, arrhythmias, post-infarction cardiac fibrosis.

Известные на сегодняшний день антиаритмические препараты, к сожалению, не всегда оказывают необходимый лечебный эффект [2]. К тому же, они обладают рядом побочных эффектов, в том числе отрицательным инотропным и собственным проаритмогенным действиями, что, несомненно, снижает их терапевтическую ценность [2]. Так, препараты III класса, способны индуцировать ранние постдеполяризации и триггерную активность миокарда [1].

Передозировка этими препаратами приводит к развитию полиморфной желудочковой тахикардии типа «пируэт» (torsade de points), которая, в свою очередь, легко переходит в желудочковую фибрилляцию [1]. Следует отметить, что побочное действие антиаритмиков III класса в экспериментальных условиях обычно моделируют при помощи блокатора потенциалзависимых K⁺-каналов CsCl, удлиняющего реполяризацию кардиомиоцитов и индуцирующего ранние постдеполяризации и триггерную активность миокарда [6].

Учитывая вышесказанное, очевидно, что разработка эффективных и лишенных побочных эффектов антиаритмических препаратов остается актуальной задачей современной аритмологии. В этом отношении, на наш взгляд, достаточно перспективными являются агонисты каннабиноидных (CB) рецепторов, поскольку, как нами было установлено ранее, один из каннабиноидов HU-210 обладает высокой антиаритмической активностью на модели адреналиновых аритмий [3]. Вместе с тем, оставалось неизвестным, будет ли этот фармакологический агент оказывать антиаритмический эффект на других моделях нарушений сердечного ритма, обладает ли он собственной проаритмогенной активностью.

Целью настоящего исследования явилось: изучить влияние синтетического агониста CB₁ и CB₂ рецепторов HU-210 на устойчивость сердца к аритмогенному действию острой коронароокклюзии, реперфузии, постинфарктного кардиосклероза и CsCl.

МАТЕРИАЛИ МЕТОДЫ

Эксперименты были выполнены на крысах-самцах линии Вистар массой 200-250 г, наркотизированных кетамин (5 мг/кг внутривенно). Нарушения сердечного ритма моделировали путём наложения лигатуры на левую коронарную артерию (10 мин) с последующим восстановлением коронарного кровотока (реперфузия 10 мин) [12], а также при помощи блокатора потенциалзависимых K⁺-каналов CsCl [6]. Используемая нами доза CsCl (500 мг/кг внутривенно) была подобрана в ходе предварительных экспериментов и обеспечивала возникновение жизнеугрожающих желудочковых нарушений ритма у 90–95% экспериментальных животных. В течение всего эксперимента животные находились на искусственной вентиляции, которую осуществляли при помощи аппарата РО-2 (Санкт-Петербург, Россия).

Запись ЭКГ производилась во втором грудном отведении в течение 10 мин острой ишемии и 10 мин реперфузии, а в случае моделирования аритмий при помощи CsCl – 10 мин после инъекции препарата. При анализе ЭКГ принимали во внимание число животных без желудочковых аритмий (БЖА), со множественными желудочковыми экстрасистолами (МЖЭ), эпизодами желудочковой тахикардии (ЖТ), полиморфной желудочковой тахикардии типа «пируэт» (torsade de points) и фибрилляцией желудочков (ЖФ). Запись и обработку данных ЭКГ осуществляли при помощи усилителя биопотенциалов (УБФ4-03, Россия) и компьютера IBM 486 с использованием оригинального пакета прикладных программ.

В отдельной серии опытов у экспериментальных животных моделировали постинфарктный кардиосклероз [5]. Крысам под эфирным наркозом вскрывали грудную клетку, пересекая два ребра (четвертое и пятое). Затем осуществляли перикардиотомию и перевязку левой передней нисходящей коронарной арте-

рии. Далее рану послойно ушивали, предварительно удалив воздух из грудной полости [5]. Выживших крыс использовали для определения порога фибрилляции желудочков (ПФЖ) через 6 недель после коронароокклюзии, когда, согласно данным литературы, завершается формирование постинфарктного кардиосклероза [5]. Оценку электрической стабильности миокарда осуществляли по величине ПФЖ, за который принимали минимальную силу тока (mA), необходимую для возникновения ФЖ [10].

В настоящей работе нами были использованы следующие лиганды СВ рецепторов: синтетический агонист СВ₁ и СВ₂ рецепторов HU-210 ((6aR)-trans-3-(1,1-Dimethylheptyl)-6a,7,10,10a-tetrahydro-1-hydroxy-6,6-dimethyl-6H-dibenzo[b,d]pyran-9-methanol) [11], селективный антагонист СВ₁-рецепторов SR141716A (N-[piperidin-1-yl]-1-[1,2-dichlorophenyl]-4-methyl-1H-pyrazole-3-carboxamid HCl) [9] и селективный антагонист СВ₂-рецепторов SR144528 (N-(1S)-endo-1,3,3-trimethylbicyclo[2.2.1]heptan-2-yl]-5-(4-chloro-3-methylphenyl)-1-(4-methyl-benzyl)-pyrazole-3-carboxamide) [4]. Препарат HU-210 был любезно предоставлен компанией «Tocris Cookson Ltd.» (Bristol, U.K.). Антагонисты каннабиноидных рецепторов были синтезированы др. V. Parker из Research Triangle Institute (Research Triangle Park, США). Хлористый цезий был приобретен в компании ICN Biomedicals Inc., а кетамин закуплен на Московском эндокринном заводе.

Все лиганды каннабиноидных рецепторов растворяли *ex tempore* в смеси этанол : Cremaphore EL : 0,9% раствор NaCl в соотношении 1:1:18. Препарат HU-210 (100 мкг/кг) вводили внутривенно за 15 мин до нанесения аритмогенного воздействия, а SR141716A (3 мг/кг), SR144528 (1 мг/кг) - в бедренную вену за 25 мин до острой ишемии миокарда. В отношении используемых доз лигандов СВ рецепторов, способа их растворения и тактики введения мы руководствовались данными литературы об антиаритмической и кардиоваскулярной активности этих препаратов [4, 9]. Контролем служила группа животных, которым перед коронароокклюзией внутривенно вводили смесь, состоящую из этанола, Cremaphore EL и 0,9% раствора NaCl в соотношении 1:1:18. Полученные результаты обрабатывали статистически, используя метод χ^2 и t-критерий Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В результате проведенных экспериментов было установлено, что 10-минутная коронароокклюзия вызывает появление в 77% случаев МЖЭ, при этом у 54% особей наблюдались эпизоды жизнеугрожающих аритмий (ЖТ и ЖФ). Лишь у 15% животных полностью отсутствовали какие-либо нарушения ритма сердца (табл. 1). Реперфузия увеличивала частоту встречаемости отдельных форм желудочковых аритмий. Так, МЖЭ наблюдались в 88% случаев, а ЖТ и ЖФ обнаруживались у 77% экспериментальных животных. Только у 12% особей вообще отсутствовали нарушения сердечного ритма (табл. 1).

Смешанный агонист СВ₁ и СВ₂ рецепторов HU-210 уменьшал частоту встречаемости желудочковых аритмий как при кратковременной ишемии, так и при реперфузии миокарда (табл. 1). В частности, во время коронароокклюзии МЖЭ и ЖТ встречались всего у 7% крыс, а полностью отсутствовали нарушения ритма сердца в 86% случаев. При реперфузии у 36% животных наблюдалось возникновение МЖЭ, 7% - ЖТ, а для 64% выборки было показано полное отсутствие желудочковых аритмий (табл. 1).

Следующим этапом исследований стало изучение вклада каждого из подтипов каннабиноидных рецепторов в реализацию антиаритмического эффекта HU-210. Высокоселективный антагонист СВ₁ рецепторов SR141716A не влиял на защитное действие изучаемого нами препарата, в то время как избирательная блокада СВ₂ рецепторов при помощи SR144528 полностью нивелировала проаритмический эффект HU-210 (табл. 1). Необходимо отметить, что сами антагонисты СВ рецепторов в наших опытах не оказывали достоверного влияния на частоту возникновения желудочковых аритмий при коронароокклюзии и реперфузии миокарда (табл. 1).

Для того, чтобы выяснить, способен ли HU-210 оказывать избирательное защитное действие в отношении реперфузии уже после ишемического повреждения, активатор каннабиноидных рецепторов вводили за 2 мин до восстановления коронарного кровотока. В этих условиях антиаритмическое действие каннабиноида отсутствовало (табл. 1).

Таблица 1.

Влияние лигандов СВ-рецепторов на ишемические и реперфузионные аритмии.

	ИШЕМИЯ 10 мин			РЕПЕРФУЗИЯ 10 мин		
	БЖА n (%)	МЖЭ n (%)	ЖТ n (%)	БЖА n (%)	МЖЭ n (%)	ЖТ n (%)
Контроль (n=26)	4 (15%)	20 (77%)	14 (54%)	3 (12%)	23 (88%)	20 (77%)
HU-210 (0,1 мг/кг) (n=14)	12 (86%)**	1 (7%)**	1 (7%)**	10 (64%)**	4 (36%)**	1 (7%)**
SR-141 (3 мг/кг) (n=14)	2 (14%)	12 (86%)	8 (57%)	2 (14%)	12 (86%)	11 (79%)
SR-144 (1мг/кг) (n=14)	2 (14%)	11 (79%)	7 (50%)	2 (14%)	12 (86%)	10 (71%)
HU-210+SR-141 (n=14)	12 (86%)**	2 (14%)**	2 (14%)*	12 (86%)**	2 (14%)**	2 (14%)**
HU-210+SR-144 (n=14)	3 (21%)	11 (79%)	7 (50%)	2 (14%)	12 (86%)	10 (71%)
HU-210 (0,1 мг/кг) (n=13) ¹	4 (31%)	9 (69%)	8 (62%)	3 (23%)	10 (77%)	8 (62%)

где, n-количество животных, БЖА - без желудочковых аритмий, МЖЭ - множественные желудочковые экстрасистолы, ЖТ - желудочковая тахикардия, ¹ - за две минуты до реперфузии, *p<0,01; **p<0,001 по отношению к контролю, в скобках указан процент животных (от общего количества крыс в группе) с нарушениями ритма или без аритмий

В следующей серии экспериментов, мы изучали влияние исследуемого каннабиноида на электрическую стабильность сердца при постинфарктном кардиосклерозе. На рис. 1 видно, что порог ПФЖ у интактных крыс составлял $13,7 \pm 1,2$ мА. Постинфарктный кардиосклероз вызывал достоверное снижение величины ПФЖ до $8,1 \pm 0,4$ мА. Препарат HU-210, введенный внутривенно за 15 мин до кардиостимуляции, повышал значение ПФЖ на 64% по сравнению с группой контроля, представленной крысами с постинфарктным кардиосклерозом ($p < 0,001$), приближая, таким образом, ПФЖ к величине выборки интактных особей (рис. 1).

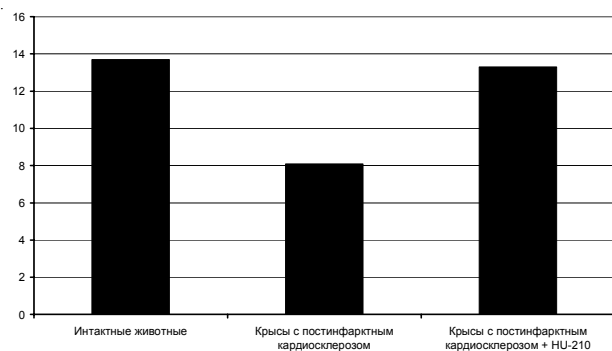


Рис. 1. Влияние HU-210 (0,1 мг/кг) на порог фибрилляции желудочков в условиях постинфарктного кардиосклероза у крыс.

Кроме того, оставался невыясненным тот факт, будет ли оказывать каннабиноид защитное действие на модели CsCl-индуцируемых аритмий, связанных с нарушением K^+ -тока и, соответственно, процесса реполяризации [6]. В результате проведенных исследований было показано, что блокатор потенциалзависимых K^+ -каналов CsCl при внутривенном введении индуцирует у 100% крыс возникновение МЖЭ (рис. 2). При этом у 93% животных возникала ЖТ, 14% - транзиторная ЖФ. Следует отметить, что у 64% крыс наблюдались полиморфные ЖТ типа torsade de points (рис. 2). Препарат HU-210 в дозе 0,1 мг/кг, при которой СВ-агонист оказывал антиаритмический эффект при ишемии, реперфузии и постинфарктном кардиосклерозе, достоверно не влиял на частоту встречаемости CsCl-индуцируемых желудочковых аритмий (рис. 2).

В результате проведенных экспериментов было показано, что синтетический СВ₁- и СВ₂-агонист

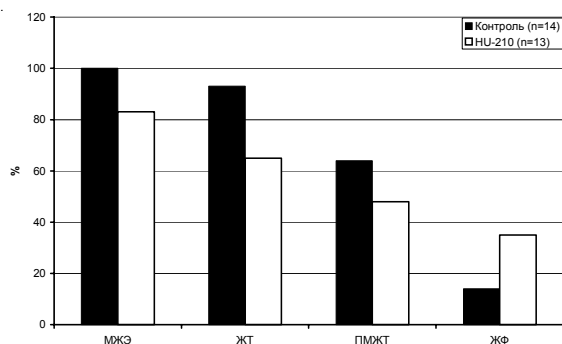


Рис. 2. Влияние HU-210 (0,1 мг/кг) на частоту CsCl-индуцированных аритмий. МЖЭ – множественные желудочковые экстрасистолы, ЖТ – желудочковая тахикардия, ПМЖТ – полиморфная желудочковая тахикардия, ЖФ – желудочковая фибрилляция.

HU-210 оказывает антиаритмический эффект при острой коронароокклюзии и реперфузии и способен повышать ПФЖ в условиях уже сформировавшегося рубца при постинфарктном кардиосклерозе. Вместе с тем, HU-210 не оказывает влияния в отношении CsCl-индуцируемых желудочковых аритмий. Защитный эффект каннабиноида при ишемии и реперфузии миокарда связан со стимуляцией СВ₂ рецепторов, поскольку их блокада с помощью SR144 полностью устраняла выявленный эффект.

Каков механизм антиаритмического действия каннабиноида HU-210? Известно, что каннабиноиды способны снижать содержание цАМФ в различных клетках путем ингибирования аденилатциклазы [11]. Поскольку избыточное накопление этого циклонуклеотида в кардиомиоцитах в условиях ишемии и реперфузии является одной из причин возникновения желудочковой тахикардии и фибрилляции [8], то можно предположить, что угнетение аккумуляции цАМФ в миоплазме, опосредованное активацией СВ рецепторов, будет способствовать повышению резистентности сердца к аритмогенному действию коронароокклюзии и реперфузии. Косвенным подтверждением этого предположения могут служить опубликованные нами ранее данные о высокой антиаритмической активности HU-210 в условиях стимуляции аденилатциклазы экзогенным адреналином [3].

В заключении хотелось бы подчеркнуть, что каннабиноид HU-210 способен не только предупреждать аритмии, вызванные кратковременной коронароокклюзией и последующей реперфузией, но и устранять электрическую нестабильность в условиях уже сформировавшегося «рубцового миокарда» при постинфарктном кардиосклерозе и при этом не усиливать аритмогенный эффект CsCl. Антиаритмический эффект HU-210 связан с активацией периферических СВ₂ рецепторов. Эти факты говорят о перспективности поиска новых антиаритмических препаратов среди селективных агонистов СВ₂ рецепторов, лишенных центральных психотропных эффектов.

ВЫВОДЫ

1. Внутривенное введение каннабиноида HU-210 перед коронароокклюзией повышает устойчивость сердца к аритмогенному действию острой ишемии и реперфузии по СВ₂-рецептор-зависимому механизму.
2. Инъекция препарата HU-210 после коронароокклюзии за 2 мин до возобновления коронарного кровотока не влияет на частоту реперфузионных аритмий.
3. Каннабиноид HU-210 устраняет электрическую нестабильность сердца в условиях уже сформировавшегося постинфарктного кардиосклероза.
4. СВ-агонист HU-210 не влияет на частоту возникновения CsCl-индуцируемых аритмий.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ, гранта Министерства образования РФ и гранта Регионального общественного фонда содействия отечественной медицине. Авторы выражают признательность др. Kevin Gormley (NIDA, США) за предоставленные антагонисты СВ рецепторов и член-корр. РАМН Ю.Б. Лишманову за обсуждение полученных данных.

ЛИТЕРАТУРА

1. Кушаковский М.С. Аритмии сердца, Спб: Фолиант, 1998.
2. Мазур Н.А., Абдалла А. Фармакотерапия аритмий. М.: Изд-во «Оверлей», 1995. 224с.
3. Угдыжекова Д.С., Маймескулова Л.А., Давыдова Ю.Г. Каннабиноид HU-210 увеличивает устойчивость сердца к аритмогенному действию адреналина и аконитина. Вестник аритмологии. 2000; N19. С.68-71.
4. Bouaboula M., Desnoyer N., Carayon P., Combes T., Casellas P. G₁ protein modulation induced by a selective inverse agonist for the peripheral cannabinoid receptor CB₂: Implication for intracellular signalization cross-regulation. Molecular Pharmacol. 1999; 55: 473-480.
5. Hale S.L., Kloner R.A. Left ventricular topographic alterations in the completely healed rat infarct caused by early and late coronary artery reperfusion. Am. Heart J. 1988; 116: 1508-1513.
6. Isenberg G. Cardiac Purkinje fibers: Cesium as a tool to block inward rectifying potassium currents. Pflugers Archiv.Eur.J.Physiol. 1976; 365: 99-106.
7. Jones R.T. Cardiovascular effects of cannabinoids In: Marihuana 84, Harvey D.J. ed. Oxford: IRL Press. 1984; 325-334.
8. Lubbe W.F., Podzuweit T., Opie L.H. Potential arrhythmogenic role of cyclic adenosine monophosphate (AMP) and cytosolic calcium overload: Implications for prophylactic effects of beta-blockers in myocardial infarction and proarrhythmogenic effects of phosphodiesterase inhibitors. J. Am. Coll. Cardiol. 1992; 19(7): 1622-1633.
9. Mansbach R.S., Rovetti C.C., Winston E.N., Lowe J.A. Effects of the cannabinoid CB₁ receptor antagonist SR141716A on the behavior of pigeons and rats. Psychopharmacology 1996; 124: 315-322.
10. Maslov L.N., Lishmanov Yu.B. The antiarrhythmic effect of D-Ala², Leu⁵, Arg⁶-encephalin and its possible mechanism. Int. J. Cardiology 1993; 40: 89-94.
11. Pertwee R.G. Pharmacology of cannabinoid receptor ligands. Current Medical Chemistry 1999; 6: 635-664.
12. Schultz J.E.J., Hsu A.K., Nagase H., Gross G.J. TAN-67, a d₁-opioid receptor agonist, reduces infarct size via activation of G_{i/o} proteins and K_{ATP} channels. Am.J.Physiol. 1998; 274: H909-H914.

КАННАБИНОИД HU-210 ПОВЫШАЕТ УСТОЙЧИВОСТЬ СЕРДЦА К АРИТМОГЕННЫМ ВОЗДЕЙСТВИЯМ

А.В.Крылатов, Р.В.Ужаченко, Л.Н.Маслов, Н.А.Бернацкая, Ю.К.Подоксенев, Р.Г.Пертви, А.Макрияннис, Р.Мехоулам

Показано, что предварительное внутривенное введение селективного агониста каннабиноидных рецепторов HU-210 (0,1 мг\кг) за 15 мин до коронароокклюзии приводит к снижению желудочковых аритмий, вызванных ишемией (10 мин) и последующей реперфузией (10 мин) у крыс, наркотизированных кетаминном. Антагонист CB₂ рецепторов SR144528 (1 мг\кг) полностью устранял антиаритмический эффект HU-210. В то время как предварительная инъекция селективного блокатора SR141716A (3 мг/кг) на каннабиноид-опосредованное повышение устойчивости сердца к аритмогенному действию ишемии и реперфузии. При введении исследуемого каннабиноида за 2 мин до реперфузии (через 8 мин после коронароокклюзии) антиаритмический эффект отсутствовал. HU-210 (0,1 мг/кг) устраняет электрическую нестабильность сердца в условиях уже сформированного постинфарктного кардиосклероза, но не влияет на аритмии, вызванные блокатором потенциалзависимых K⁺-каналов CsCl. Таким образом, мы полагаем, что антиаритмический эффект HU-210 опосредуется активацией CB₂ рецепторов и не зависит от K⁺-каналов.

CANNABINOID HU-210 INCREASES CARDIAC RESISTANCE TO ARRHYTHMOGENIC INFLUENCES

A.V.Krylatov, R.V.Uzhachenko, L.N.Maslov, N.A.Bernathkaya, Yu.K.Podoksenov, R.Pertwee, A.Makriyannis, R.Mechoulam

The previous intravenous (i.v.) administration of the selective cannabinoid (CB) receptor agonist, HU-210, at a dose of 0.1 mg/kg 15 min before coronary artery occlusion decreased the incidence of ischaemic (10 min) and reperfusion (10 min) arrhythmias in rats anesthetized with ketamine. The pretreatment with the selective CB₂ receptor antagonist, SR144528, at a dose of 1 mg/kg i.v. completely abolished this antiarrhythmic effect. By contrast, the selective CB₁ receptor antagonist, SR141716A, at a dose of 3 mg/kg had no effect on the HU-210-induced cardiac resistance to arrhythmogenic action of ischaemia and reperfusion. If the cannabinoid was administered 2 min before reperfusion (8 min after coronary artery ligation), it had no antiarrhythmic effect. The HU-210 (0.1 mg/kg i.v.) increased the ventricular fibrillation threshold in rats with post-infarction cardiac fibrosis but had no effect on the incidence of arrhythmias induced by K⁺ channel inhibitor CsCl. It is concluded that antiarrhythmic effect of HU-210 is mediated via CB₂ receptor activation but not via K⁺ channels.