

АНАНДАМИД И R-(+)МЕТАНАНДАМИД ПРЕДУПРЕЖДАЮТ РАЗВИТИЕ ИШЕМИЧЕСКИХ И РЕПЕРFUЗИОННЫХ АРИТМИЙ У КРЫС ПОСРЕДСТВОМ СТИМУЛЯЦИИ СВ₂-РЕЦЕПТОРОВ

А. В. Крылатов¹, Р. В. Ужаченко¹, Л. Н. Маслов¹, Д. С. Угдыжекова², Н. А. Бернацкая², Р. Г. Пертви³, Дж. Б. Стефано⁴, А. Макриянис⁵

Предварительное системное введение эндогенного каннабиноида анандамида (10 мг/кг) или его синтетического аналога R-(+)-метанандамида (5 мг/кг) предотвращает развитие ишемических и реперфузионных аритмий у крыс. Предварительная инъекция антагониста СВ₁-рецепторов SR141716 (3 мг/кг) не изменяла антиаритмического действия обоих каннабиноидов. Блокада СВ₂-рецепторов с помощью SR144528 (1 мг/кг) полностью устраняла антиаритмический эффект анандамида и R-(+)-метанандамида. Антагонисты СВ-рецепторов как таковые неэффективны в отношении аритмий. Предполагается, что стимуляция СВ₂-рецепторов повышает устойчивость сердца к аритмогенному действию ишемии и реперфузии.

Ключевые слова: каннабиноиды, анандамид, R-(+)-метанандамид, аритмии

ВВЕДЕНИЕ

Многие из применяемых в настоящее время антиаритмических средств обладают собственной аритмогенной активностью, поэтому нередко фармакотерапия нарушений ритма сердца не приводит к положительным результатам. Это обстоятельство стимулировало интерес исследователей к соединениям, которые традиционно не рассматривались в качестве противоаритмических препаратов, например, к каннабиноидам [2]. Они обладают выраженной кардиоваскулярной активностью [14], способны модулировать состояние вегетативной нервной системы, которая во многом определяет электрическую стабильность сердца [1, 9]. Способность каннабиноидов снижать активность аденилатциклазы ведет к уменьшению синтеза цАМФ [6], играющего важную роль в аритмогенезе [9]. Эндогенный агонист каннабиноидных (СВ) рецепторов арахидонилэтаноламид (анандамид) ингибирует потенциалзависимые Ca²⁺-каналы L-типа в гладких мышцах артерий [7]. Таким образом, каннабиноиды могут имитировать действие аденоблокаторов и антагонистов кальция. Следовательно, есть основания полагать, что они обладают антиаритмической активностью. Однако данные о способности каннабиноидов ингибировать аденилатциклазу и блокировать потенциалзависимые Ca²⁺-каналы были получены в экспериментах на нейрональных клетках и гладких мышцах артерий. Пока не ясно, имеют ли место эти эффекты в кардиомиоцитах. Если да, то логично предположить, что анандамид

и его синтетический аналог R-(+)-метанандамид могут оказывать антиаритмический эффект в условиях моделирования острой ишемии миокарда и последующего восстановления коронарного кровотока. В пользу этого говорит обнаруженный ранее на модели адреналиновых и аконитиновых аритмий антиаритмический эффект синтетического агониста СВ₁- и СВ₂-рецепторов NU-210 [2].

Цель работы: изучить влияние анандамида и R-(+)-метанандамида на толерантность сердца к аритмогенному действию коронароокклюзии и реперфузии, а также попытаться выяснить рецепторную природу антиаритмического действия каннабиноидов.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Эксперименты выполняли на крысах-самцах линии Вистар массой 200–250 г, наркотизированных хлоралозой (100 мг/кг внутривенно) и кетамин (5 мг/кг внутривенно). Моделью нарушений сердечного ритма служила 10-минутная острая ишемия миокарда, которую вызывали посредством перевязки левой коронарной артерии с последующим восстановлением коронарного кровотока (реперфузия 10 мин) [12]. Во время эксперимента животным осуществляли искусственную вентиляцию легких при помощи аппарата РО-2 (Россия). Мониторинг и запись ЭКГ проводили во втором грудном отведении в течение 10-минутной коронароокклюзии и последующей 10-минутной реперфузии. При анализе ЭКГ подсчитывали процент животных, у которых не возникали нарушения ритма (БЖА), с множественными желудочковыми экстрасистолами (МЖЭ), эпизодами желудочковой тахикардии (ЖТ) и желудочковой фибрилляции (ЖФ). Запись и обработку данных ЭКГ осуществляли при помощи усилителя биопотенциалов (УБФ4–03, Россия) и компьютера IBM 486 с использованием оригинального пакета прикладных программ. Интервал

¹ НИИ кардиологии Томского научного центра СО РАМН, Томск, 634050, ул. Киевская, 111.

² Томский государственный педагогический университет, Томск.

³ Абердинский Университет, Абердин, Великобритания.

⁴ Отдел хирургии, Гос. Университет Нью-Йорка, Нью-Йорк, США.

⁵ Коннектикутский Университет, Сторс (Storrs), США.

Q-T_c, скорректированный по частоте сердечных сокращений (ЧСС), рассчитывали согласно рекомендациям A. Van de Water и соавт. [13].

В настоящей работе использованы эндогенный агонист CB₁ и CB₂-рецепторов анандамид в дозе 10 мг/кг [5], R-(+)-метанандамид (R-(+)-arachidonil-1'-hydroxy-2'-propylamide) [3] (5 мг/кг), селективный антагонист CB₁-рецепторов SR141716A (N-[piperidin-1-yl]-1-[1,2-dichlorophenyl]-4-methyl-1H-pyrazole-3-carboxamid HCl) [10] и селективный антагонист CB₂-рецепторов SR144528 (N-(1S)-endo-1,3,3-trimethylbicyclo[2.2.1]hepta-2-yl]-5-(4-chloro-3-methylphenyl)-1-(4-methylbenzyl)-pyrazole-3-carboxamide) [4]. Антагонисты каннабиноидных рецепторов синтезированы V. Parker в Research Triangle Institute (Research Triangle Park, США), анандамид и R-(+)-метанандамид — в лаборатории A. Makriyannis (University of Connecticut, Storrs, США), хлоралоза и cremaphore EL закуплены в компании "Sigma Chem. Co" (St. Louis, США), кетамин — на Московском эндокринном заводе. Арахидоновая кислота предоставлена S. W. Tam из компании "NitroMed, Inc" (Bedford, США). Все лиганды каннабиноидных рецепторов растворяли *ex tempore* в смеси: этанол : Cremaphore EL: 0,9 % раствор NaCl в соотношении 1:1:18. Анандамид, R-(+)-метанандамид и арахидоновую кислоту (10 мг/кг) вводили внутривенно за 10 мин до коронароокклюзии, SR141716A (3 мг/кг), SR144528 (1 мг/кг) — в бедренную вену за 25 мин до ишемии. В отношении используемых доз лигандов CB-рецепторов, способа их растворения и тактики введения, руководствовались данными литературы о кардиоваскулярной и антиноцицептивной активности этих препаратов [4, 10]. Контролем служила группа животных, которым перед коронароокклюзией внут-

ривенно вводили растворитель, состоящий из смеси: этанол : cremaphore EL : 0,9% раствор NaCl в соотношении 1:1:18. Полученные результаты обрабатывали статистически, используя метод χ^2 .

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

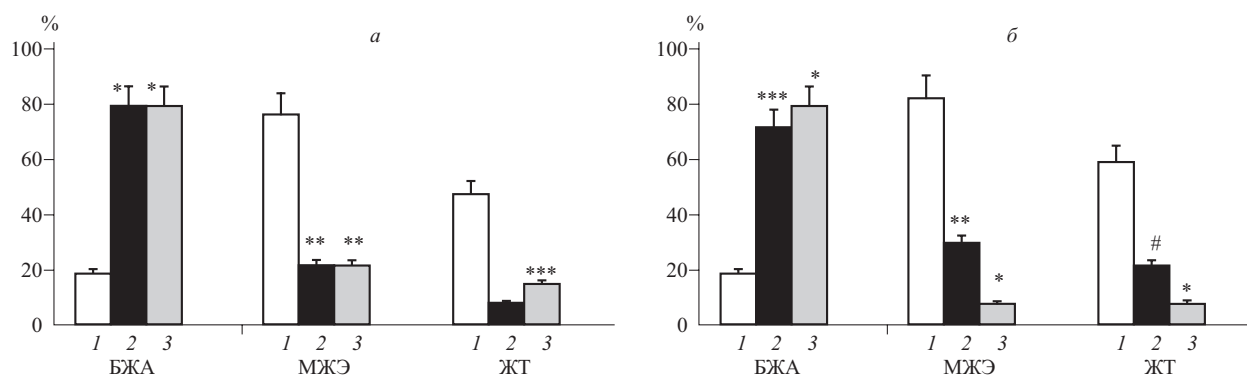
Окклюзия левой коронарной артерии вызывала множественные желудочковые экстрасистолы у 76% крыс контрольной группы (рисунок, а). При этом эпизоды угрожающих аритмий (ЖТ и ЖФ) выявлялись у 47% особей из общего числа животных. Последующее восстановление коронарного кровотока оказывало еще более выраженный аритмогенный эффект (рисунок, б). Так, реперфузионные желудочковые тахикардии и фибрилляция регистрировались, соответственно, у 59 и 32% животных контрольной группы. У большинства особей ЖТ и ЖФ носили кратковременный обратимый характер и заканчивались восстановлением нормального синусового ритма или переходом в менее тяжелую форму аритмий — желудочковую экстрасистолию.

Установлено, что анандамид увеличивает резистентность сердца к аритмогенному действию коронароокклюзии (рисунок, а) и постишемической реперфузии (рисунок, б). Так, предварительная инъекция каннабиноида снижала частоту возникновения МЖЭ и ЖТ, соответственно, до 21 и 7% и увеличивала в 4 раза количество животных, у которых отсутствовали желудочковые нарушения ритма сердца во время 10-минутной ишемии. Аналогичная картина наблюдалась после внутривенного введения энзиморезистентного аналога эндогенного CB-агониста R-(+)-метанандамид (рисунок, а). Предварительная инъекция анандамид способствовала повышению толерантности сердца к

Влияние арахидоновой кислоты и лигандов CB-рецепторов на частоту возникновения ишемических и реперфузионных аритмий у крыс

Препарат	Ишемия 10 мин			Реперфузия 10 мин		
	БЖА	МЖЭ	ЖТ	БЖА	МЖЭ	ЖТ
Контроль (n = 17)	3 (18)	13 (76)	8 (47)	3 (18)	14 (82)	10 (59)
Арахидоновая кислота, 10 мг/кг (n = 14)	2 (14)	11 (79)	7 (50)	3 (21)	11 (79)	9 (64)
SR141716A, 3 мг/кг (n = 14)	2 (14)	12 (86)	8 (57)	2 (14)	12 (86)	11 (79)
SR144528, 1 мг/кг (n = 14)	2 (14)	11 (79)	7 (50)	2 (14)	12 (86)	10 (71)
Анандамид, 10 мг/кг + SR141716A (n = 14)	10 (71)**	4 (29)**	3 (21)	11 (79)*	3 (21)*	2 (14)***
Анадамид + SR144528 (n = 14)	4 (29)	9 (64)	7 (50)	3 (21)	10 (71)	9 (64)
R-(+)-метанандамид, 5 мг/кг + SR141716A (n = 13)	9 (69)*	4 (31)**	2 (15)	9 (69)*	3 (23)*	2 (15)**
R-(+)-метанандамид + SR144528 (n = 14)	1 (7)	13 (93)	8 (57)	2 (14)	2 (86)	11 (79)

Примечание. Различия статистически значимы между контрольной группой (введение растворителя) и группами животных, которым предварительно вводили препараты (критерий χ^2) при: * $p < 0,001$; ** $p < 0,01$, *** $p < 0,025$. БЖА — без желудочковых аритмий, МЖЭ — множественные желудочковые экстрасистолы, ЖТ — желудочковая тахикардия. Анандамид, R-(+)-метанандамид и арахидоновую кислоту вводили за 10 мин до коронароокклюзии. Антагонисты CB-рецепторов вводили за 25 мин до коронароокклюзии. n — количество животных в группе. В скобках указан процент животных с аритмиями от общего количества особей в группе или процент крыс, устойчивых к аритмогенному действию коронароокклюзии и реперфузии.



Влияние анандамида и R-(+)-метанандамида на частоту возникновения ишемических аритмий (а) и реперфузионных аритмий (б) у крыс.

БЖА — без желудочковых аритмий, МЖЭ — множественные желудочковые экстрасистолы, ЖТ — желудочковая тахикардия. 1 — контроль, 2 — анандамид (10 мг/кг) за 10 мин до ишемии, 3 — R-(+)-метанандамид (5 мг/кг) за 10 мин до ишемии. Различия статистически значимы по отношению к контролю при: * — $p < 0,001$; ** — $p < 0,01$; *** — $p < 0,025$; # — $p < 0,05$

аритмогенному действию реперфузии. Подтверждением тому служило отсутствие у 10 из 14 крыс каких-либо нарушений сердечного ритма, а также то, что только у 3 животных развивалась желудочковая тахикардия (рисунок, б). В условиях возобновления кровоснабжения миокарда R-(+)-метанандамид также проявлял антиаритмическое действие, которое было более выраженным по сравнению с эффектом анандамида (рисунок, б).

Поскольку анандамид является дериватом арахидоновой кислоты в отдельной серии экспериментов исследовали влияние последней на характер ишемических и реперфузионных аритмий. Оказалось, что арахидоновая кислота не оказывает влияния на устойчивость сердца к аритмогенному действию коронароокклюзии и постшемической реперфузии (таблица).

Анандамид и R-(+)-метанандамид являются агонистами как CB_1 -, так и CB_2 -рецепторов, поэтому мы попытались выяснить, с активацией какого типа каннабиноидных рецепторов связан обнаруженный антиаритмический эффект каннабиноидов. Селективный антагонист CB_1 -рецепторов SR141716A не повлиял на антиаритмический эффект анандамида и его синтетического аналога при коронароокклюзии и последующей реперфузии (таблица). Предварительное введение CB_2 -антагониста SR144528 полностью устраняло защитный эффект агонистов CB -рецепторов (таблица). Изложенные данные позволяют говорить о том, что антиаритмический эффект анандамида и R-(+)-метанандамида связан со стимуляцией CB_2 -рецепторов.

Инъекции CB_1 -антагониста SR141716A или блокаатора CB_2 -рецепторов SR144528 сами по себе не влияли на частоту возникновения ишемических и реперфузионных аритмий (таблица). Данный факт служит свидетельством того, что эндогенные каннабиноиды не играют существенной роли в возникновении нарушений сердечного ритма, индуцированных в наших опытах коронароокклюзией и последующей реперфузией.

Анандамид в первые 5 мин после внутривенного введения вызывал у интактных животных снижение ЧСС на 10% по сравнению с исходным показателем (данные не представлены в таблице). Брадикардия сопровождалась удлинением интервала P-Q на 20%. Уже к 10-й минуте после инъекции эндоканнабиноида эти параметры не отличались от контрольных значений. R-(+)-метанандамид не оказывал достоверного влияния на электрофизиологические параметры сердца у интактных животных.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что анандамид и его синтетический аналог R-(+)-метанандамид увеличивают устойчивость сердца к аритмогенному действию ишемии (рисунок, а) и реперфузии (рисунок, б). Антиаритмический эффект данных каннабиноидов не связан с продуктами метаболизма анандамида, поскольку арахидоновая кислота, которая образуется в результате энзиматического гидролиза последнего и R-(+)-метанандамида, не оказывала влияния на устойчивость сердца к ишемическим и реперфузионным аритмиям (таблица).

CB_2 -рецепторы, в отличие от CB_1 -рецепторов, которые обнаруживаются преимущественно в центральной нервной системе [8], локализованы в периферических органах. В экспериментах с интрацеребровентрикулярным введением CB -агониста HU-210 на модели адреналиновых и аконитиновых нарушений ритма защитный эффект отсутствовал [2], что согласуется с нашими предположениями о важной роли периферических CB_2 -рецепторов.

Остаются неизученными клеточные и молекулярные механизмы, участвующие в реализации антиаритмического эффекта анандамида или R-(+)-метанандамида. Недавно обнаружена способность анандамида ингибировать потенциалзависимые Ca^{2+} -каналы L-типа [7]. Подобный эффект лежит в основе действия антиаритмических препаратов IV класса, которые вызывают брадикардию и удлинение интервала Q-T [1]. Однако кальциевые каналы, скорее всего, не принимают

участия в реализации противоаритмического действия каннабиноидов, поскольку инъекция анандамида в наших экспериментах вызывала лишь кратковременную брадикардию, исчезающую еще до коронароокклюзии, а R-(+)-метанандамид не оказывал влияния на параметры ЭКГ интактных животных, что, видимо, связано с использованием меньшей дозы этого СВ-агониста (5 мг/кг) по сравнению с анандамидом (10 мг/кг). Вместе с тем известно, что каннабиноиды снижают активность аденилатциклазы, что приводит к уменьшению синтеза цАМФ, являющегося, согласно данным некоторых исследователей, эндогенным аритмогенным фактором [9]. В отношении анандамида получены данные, согласно которым при активации СВ-рецепторов этим эндоканнабиноидом происходит ингибирование аденилатциклазы через G_i-белок [6]. В таком случае механизм антиаритмического действия анандамида можно сравнить с эффектом β-адреноблокаторов. Кроме того, обнаружено, что анандамид активизирует пресинаптические СВ-рецепторы адренергических нейрональных терминалей сосудов и сердца, ограничивая тем самым выброс норадреналина из симпатических аксонов [14]. Снижение симпатического влияния на миокард при действии анандамида может повышать толерантность сердца к аритмогенному действию ишемии и реперфузии, сопровождающихся чрезмерной активацией симпатoadrenalовой системы [9].

Выводы

1. Эндогенный агонист каннабиноидных рецепторов анандамид и его синтетический аналог R-(+)-метанандамид увеличивают устойчивость сердца к аритмогенному действию ишемии и реперфузии.

2. Антиаритмический эффект каннабиноидов связан с активацией СВ₂-рецепторов.

Работа выполнена при поддержке РФФИ (грант 01-04-48025).

Авторы выражают признательность Kevin Gormley (NIDA, США) и S. W. Tam за предоставленные антагонисты СВ-рецепторов и арахидоновую кислоту. Исследования Roger Pertwee поддержаны фондом The Wellcome Trust grant 047980. Авторы выражают признательность Ю. Б. Лишманову за обсуждение полученных данных.

ЛИТЕРАТУРА

1. Н. А. Мазур, А. Абдалла, *Фармакотерапия аритмий*, Оверлей, Москва (1995).
2. Д. С. Угдыжекова, Л. А. Маймескулова, Ю. Г. Давыдова, *Вестн. аритмол.*, **19**, 68 – 71 (2000).
3. V. Abadji, S. Lin, G. Taha, et al, *J. Med. Chem.*, **37**, 1889 – 1893 (1994).
4. M. Bouaboula, N. Desnoyer, P. Carayon, et al., *Mol. Pharmacol.*, **55**, 473 – 480 (1999).
5. W. A. Devane, L. Hanus, A. Breuer, et al., *Science*, **258**, 1946 – 1949 (1992).
6. C. C. Felder, E. M. Briley, J. Axelrod, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90**, 7656 – 7660 (1993).
7. D. Gebremedhin, A. R. Lange, W. B. Campbell, et al., *Am. J. Physiol.*, **276**(45) 2085 – 2093 (1999).
8. A. C. Howlett, *Handbook of Substance: Neurobehavioral Pharmacology*, Tarter, et al. (ed.) Plenum press, New York (1998), 113 – 129.
9. W. F. Lubbe, T. Podzuweit, and L. H. Opie, *J. Am. Coll. Cardiol.*, **19**(7), 1622 – 1633 (1992).
10. R. S. Mansbach, C. C. Rovetti, E. N. Winston, and J. A. Lowe, *Psychopharmacology*, **124**, 315 – 322 (1996).
11. M. R. Rosen, *Antiarrhythmic drugs. Mechanisms of Fntiarrhythmic and Proarrhythmic actions*, New York (1995) pp. 393 – 404.
12. J. E. J. Schultz, A. K. Hsu, H. Nagase, and G. J. Gross, *Am. J. Physiol.*, **274**, H909 – H914 (1998).
13. A. Van de Water, J. Verheyen, R. Xhonneux, and R. S. Reneman, *J. Pharmacol. Meth.*, **22**, 207 – 217 (1989).
14. K. Varga, K. D. Lake, D. Huangfu, et al., *Hypertension*, **28**, 682 – 686 (1996).

Поступила 19.04.2001

R-(+)-METHANANDAMIDE AND ANANDAMIDE PREVENT A DEVELOPMENT OF ISCHEMIC AND REPERFUSION ARRHYTHMIAS IN RATS VIA CB₂ RECEPTOR STIMULATION

A. V. Krylatov¹, R. V. Uzhachenko¹, L. N. Maslov¹, D. S. Ugdyzhekova², N. A. Bernathkaya², R. Pertwee³, G. B. Stefano⁴, A. Makriyannis⁵

¹ Laboratory of Experimental Cardiology, Institute of Cardiology, Kievskaya 111, 634050 Tomsk, Russia;

² Pedagogical University, Tomsk;

³ Department of Biomedical Sciences, Institute of Medical Sciences University of Aberdeen, UK;

⁴ Department of Surgery, State University of New York at Stony Brook, NY USA;

⁵ School of Pharmacy, University of Connecticut, Storrs, USA

It has been found that prior intravenous administration of the endocannabinoid anandamide (10 mg/kg) or its synthetic analogue R-(+)-methanandamide (5 mg/kg) prevents a development of ischemic and reperfusion arrhythmias in rats. The prior injection of the CB₁ receptor antagonist, SR 141716A (3 mg/kg), did not affect the antiarrhythmic action of both cannabinoids. Pretreatment with the CB₂ receptor antagonist, SR 144528 (1 mg/kg), completely abolished antiarrhythmic effect of anandamide and R-(+)-methanandamide. Both CB antagonist had no effect on the arrhythmias itself. Pretreatment with the NO-synthase inhibitor, L-NAME (50 mg/kg), had no effect on the antiarrhythmic action of cannabinoids. We therefore conclude that CB₂ receptor stimulation increases the heart tolerance to ischemic and reperfusion arrhythmias.