

К МЕХАНИЗМУ АНТИАРИТМИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ ЭНДОГЕННОГО АГОНИСТА ORL1 РЕЦЕПТОРОВ НОЦИЦЕПТИНА

Л. Н. Маслов^{1,2}, А. В. Крылатов¹, Ю. Б. Лишманов¹, Х. Бергер³, Дж. Кало⁴,
Л. Ма⁵, Н. В. Соленкова², Д. Л. Стахеев²

Предварительное внутривенное введение (в/в) селективного агониста ORL1 рецепторов ноцицептина (орфанин FQ) в дозе 0,4 мг/кг предупреждает развитие аконитин-индуцированных аритмий как у крыс, наркотизированных диэтиловым эфиром, так и у животных, наркотизированных хлоралозой. Предварительное введение L-NAME (50 мг/кг) полностью устраняет этот эффект орфанина FQ. Предварительная инъекция индометацина (10 мг/кг) ослабляет этот эффект, но не устраняет его полностью. Предварительное введение гексаметония (10 мг/кг) или глибенкламида (3 мг/кг) не оказывает никакого влияния на ноцицептин-индуцированную толерантность сердца к аритмогенному действию аконитина. Интрацеребровентрикулярная (и.ц.в.) инфузия орфанина FQ (36 мкг) так же предупреждает появление аконитин-индуцированных аритмий. Гексаметоний полностью устранял этот эффект. Авторы полагают, что в основе антиаритмического действия ноцицептина при в/в и и.ц.в. введении лежат разные механизмы. При в/в введении антиаритмический эффект орфанина FQ связан с активацией NO-синтазы и циклооксигеназы. В реализации центрального антиаритмического эффекта ноцицептина участвует вегетативная нервная система.

Ключевые слова: антиаритмическое действие, опиоидные рецепторы, ноцицептин

ВВЕДЕНИЕ

Ранее было установлено, что эндогенный агонист опиоид-подобных рецепторов (opioid receptor like, ORL1) ноцицептин (орфанин FQ) при внутривенном введении избирательно повышает устойчивость сердца к аритмогенному действию аконитина, но при этом не влияет на частоту и характер нарушений сердечного ритма, вызванных введением токсических доз адреналина и CaCl₂ [4]. Известно, что аритмогенный эффект аконитина является результатом замедления процесса инактивации быстрых Na⁺-каналов [1], что позволяет обсуждать роль последних в качестве точки приложения модулирующего влияния агониста ORL1 рецепторов. Кроме того, нами было установлено, что ноцицептин вызывает расширение комплекса QRS [4], то есть оказывает эффект аналогичный действию антиаритмиков I класса, которые, как известно, ингибируют Na⁺-каналы [2]. Обнаруженный антиаритмический эффект орфанина FQ не зависел от состояния вегетативной нервной системы [4]. Сопоставление этих фактов позволило нам предположить, что антиаритмическое действие ноцицептина также является результатом блокады Na⁺-тока. Вместе с тем возможность того, что орфанин FQ, подобно тетродотоксину, непосред-

венно взаимодействует с белками Na⁺-каналов представляется нам маловероятной. По всей видимости, передача сигнала от ORL1 рецептора к этим каналам осуществляется с помощью внутриклеточных мессенджеров. Кроме того, существуют данные о том, что ноцицептин может активировать АТФ-зависимые K⁺-каналы (K_{ATP}-каналы), K_{Ca}-каналы и усиливать K⁺-ток задержанного выпрямления [5, 9]. Подобный эффект также может способствовать повышению резистентности сердца к аритмогенному действию аконитина, поскольку усиление K⁺-тока вызывает гиперполяризацию клеточных мембран, в то время как аконитин вызывает снижение потенциала покоя [1]. Следовательно, антиаритмическое действие орфанина FQ может быть и результатом усиления K⁺-тока. Молекулярная структура ноцицептинового рецептора гомологична структуре опиоидных рецепторов [9]. В этой связи следует отметить, что некоторые кардиоваскулярные эффекты опиоидных пептидов являются результатом активации NO-синтазы и зависят от синтеза простаноидов [3, 6]. Следовательно, в реализации антиаритмического эффекта ноцицептина могут принимать участие процессы, зависимые от NO-синтазы и циклооксигеназы. Кроме того, существуют данные о том, что кардиоваскулярные эффекты опиоидов во многом определяются типом анестезии [13]. Так, например, опиоидная брадикардия на фоне барбитала сменяется тахикардией при использовании в качестве анестетика хлоралозы [13]. В уже упоминавшейся нашей работе, посвященной антиаритмической активности ноцицептина, для наркоза был использован диэтиловый эфир [4], и оставалось неизвестным, в какой мере выявленный эффект зависит от типа анестезии.

¹ НИИ кардиологии СО РАМН, Томск, 634050, ул. Киевская, 111, Email: Maslov@cardio.tsu.ru.

² Томский государственный педагогический университет.

³ Институт Молекулярной фармакологии, Берлин, Германия.

⁴ Отдел эксперим. и клин. медицины, Университет, Феррара, Италия.

⁵ Национальная лаборатория мед. нейробиологии, Университет Фудана, Шанхай, Китай.

Исходя из сказанного, в представленной работе мы исследовали: участие циклооксигеназы, NO-синтазы, а также АТФ-зависимых K^+ -каналов (K_{ATP} -каналов) в механизме антиаритмического действия ноцицептина на примере аконитиновых аритмий; вклад центральных и периферических рецепторов ноцицептина в регуляцию резистентности миокарда к аритмогенному действию аконитина; значение типа анестезии в реализации антиаритмического эффекта орфанина FQ.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Эксперименты выполняли на крысах линии Вистар массой 250 – 300 г, наркотизированных α -хлоралозой (100 мг/кг внутривенно) или диэтиловым эфиром. Нарушения сердечного ритма вызывали при помощи внутривенного введения аконитина (100 мкг/кг). Затем в течение 5 мин после инъекции регистрировали ЭКГ во II грудном отведении с помощью усилителя биопотенциалов (УБФ4 – 03, Россия) и компьютера IBM 486 с использованием оригинального пакета прикладных программ. При анализе ЭКГ принимали во внимание интервал времени (латентный период) от момента инъекции аконитина до появления желудочковой тахикардии или фибрилляции.

Ноцицептин *ex tempore* растворяли в 0,9 % растворе NaCl и вводили внутривенно в дозах 0,4 мг/кг за 10 мин до инъекции аконитина. При выборе доз орфанина FQ, мы исходили из опубликованных ранее данных об антиаритмическом эффекте этого препарата [4]. Для блокады циклооксигеназы экспериментальным животным внутривенно вводили индометацин в дозе 5 мг/кг за 30 мин до инъекции аконитина [3]. Индометацин предварительно растворяли в этаноле и затем разводили физиологическим раствором до конечной концентрации 5 мг/мл, при этом концентрация этилового спирта в растворе не превышала 0,1 %. Ингибитор NO-синтазы N^G -Nitro-L-arginine methyl ester hydrochloride (L-NAME) вводили внутривенно в дозе 50 мг/кг за 25 мин до аконитина [6]. Селективный блокатор K_{ATP} -каналов глибенкламид вводили в дозе 0,3 мг/кг внутривенно за 45 мин до инъекции аконитина [14]. Предварительно глибенкламид растворяли в 45 % водном растворе 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin. Для оценки вклада вегетативной нервной системы в реализацию антиаритмического эффекта ноцицептина использовали гексаметоний, который вводили внутривенно в дозе 10 мг/кг за 15 мин до инъекции орфанина FQ.

Эксперименты с интрацеребровентрикулярным введением орфанина FQ были выполнены на крысах-самцах линии Вистар массой 250 – 300 г. В боковой желудочек мозга крыс за 5 – 7 дней до индукции аритмий имплантировали полую канюлю из нержавеющей стали, которую фиксировали на поверхности черепа с помощью стоматологического цемент-фосфата. Операцию выполняли под барбитуровым наркозом (50 мг/кг внутривенно) с помощью стереотаксического аппарата СЭЖ-5 (НПО “Конструктор”, Украина). При этом использовали следующие координаты: AP – 1,5 мм, L + 2,0 мм, V – 3,5 мм относительно брегмы [11]. Перед декапитацией всем животным для уточнения локализации канюли производили интрацеребровентрикулярное введение 5 мкл метиленового синего. Орфин FQ *ex tempore* растворяли в 0,9 % растворе NaCl, а затем инфузирова-ли в объеме 10 мкл со скоростью 5 мкл/мин за 30 мин до введения аконитина в дозе 36 мкг на крысу. Налоксон (2 мг/кг) вводили внутривенно за 15 мин до инфузии ноцицептина.

Ноцицептин (Phe-Gly-Gly-Phe-Thr-Gly-Ala-Arg-Lys-Ser-Ala-Arg-Lys-Leu-Ala-Asp-Phe) был синтезирован в Institute of Molecular Pharmacology (Германия). Аконитин, хлоралоза, гексаметоний, налоксон, индометацин, глибенкламид, L-NAME, 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin были закуплены в компании “Sigma-RBI” (США).

Результаты обрабатывали с помощью методов вариационной статистики для несвязанных между собой величин, используя *t*-критерий Стьюдента.

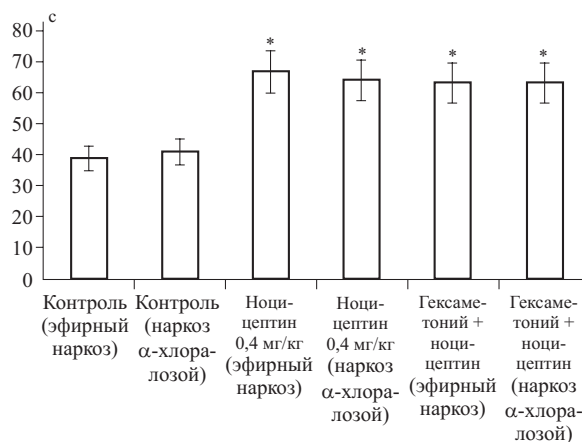


Рис. 1. Влияние ноцицептина (0,4 мг/кг внутривенно) на среднюю величину латентного периода от момента окончания инъекции аконитина до появления желудочковых аритмий у животных, наркотизированных диэтиловым эфиром или α -хлоралозой.

* — различия достоверны по отношению к контролю, $p < 0,001$.

Здесь и на рис. 2 и 3 в контрольных группах — 20 животных, в опытных — 16.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Как показано на рис. 1, в среднем через 39 с после внутривенного болюсного введения аконитина у крыс, наркотизированных диэтиловым эфиром, развивались желудочковые аритмии. Средняя величина латентного периода у животных, наркотизированных хлоралозой, составила 41 с. Эти различия между группами не были статистически значимыми. Введение ноцицептина способствовало увеличению продолжительности латентного периода в среднем на 65 % в обеих группах. Инъекция гексаметония не повлияла на величину этого показателя как у животных, наркотизированных диэтиловым эфиром, так и у крыс, которым вводили хлоралозу (данные не представлены на рисунке), и не оказала достоверного влияния на длительность латентного периода у крыс, получавших орфин FQ.

Интрацеребровентрикулярная инфузия ноцицептина способствовала увеличению продолжительности латентного периода до появления аконитиновых аритмий в 1,8 раза (рис. 2). Данный эффект исчезал после инъекции гексаметония, но сохранялся после блокады опиоидных рецепторов налоксоном.

Как представлено на рис. 3, ингибитор циклооксигеназы индометацин на 22 % ослаблял антиаритмический эффект ноцицептина, но не устранял его полностью. Блокада NO-синтазы с помощью L-NAME обеспечила полное исчезновение антиаритмического эффекта орфанина FQ, а инъекция селективного ингибитора K_{ATP} -каналов глибенкламида не повлияла на ноцицептин-индуцированное повышение устойчивости миокарда к аритмогенному влиянию аконитина. Инъекция L-NAME или индометацина не повлияла на токсическое действие аконитина, в то время как гли-

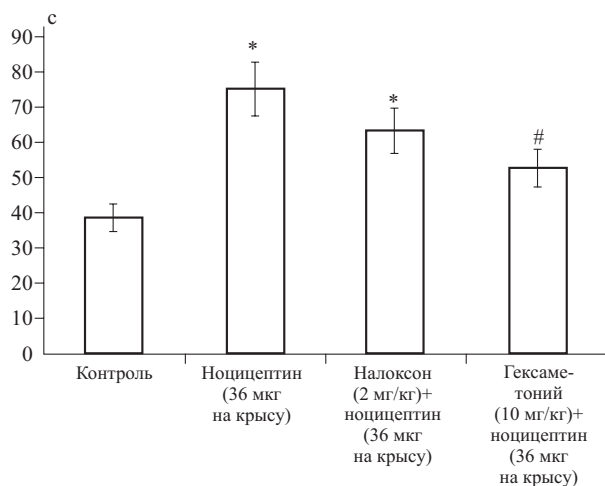


Рис. 2. Влияние налоксона и гексаметония на ноцицептин-опосредованное (36 мкг на крысу, интрацеребровентрикулярно) увеличение латентного периода аконитин-индуцированных аритмий.

Различия достоверны по отношению: * — к контролю, $p < 0,001$, # — к ноцицептину, $p < 0,05$.

бенкламид увеличивал латентный период до появления аконитиновых аритмий на 16 %.

Полученные в настоящей работе результаты совпадают с опубликованными ранее данными о том, что ноцицептин повышает резистентность сердца к аритмогенному действию аконитина [4]. Указанный эффект не зависел от типа примененного анестетика, поскольку наблюдался как в условиях анестезии диэтиловым эфиром, так и при использовании хлоралозы.

Антиаритмический эффект ноцицептина при внутривенном введении, по всей видимости, связан с активацией ORL1 рецепторов, селективным агонистом которых он является [9]. При этом есть основания считать, что речь идет о периферической локализации указанных рецепторов. Гематоэнцефалический барьера (ГЭБ) практически не проницаем для большинства пентапептидов и гексапептидов [11]. Ноцицептин же является гептадекапептидом, поэтому нам представляется маловероятным, что он способен преодолевать ГЭБ при внутривенном введении. Казалось бы, наши собственные результаты противоречат подобному утверждению, поскольку орфанин FQ при интрацеребровентрикулярной инфузии также увеличивал резистентность сердца к патогенному влиянию аконитина. Однако в данном случае антиаритмический эффект устранялся с помощью блокады периферических вегетативных ганглиев гексаметонием. Следует обратить внимание на то, что ганглиоблокатор не влиял на антиаритмическое действие ноцицептина при внутривенной инъекции последнего. Следовательно, ноцицептин-индуцированное повышение резистентности сердца к аритмогенному влиянию аконитина может достигаться при активации как центральных, так и периферических ORL1 рецепторов. В первом случае антиаритмический эффект орфанина FQ зависит от из-

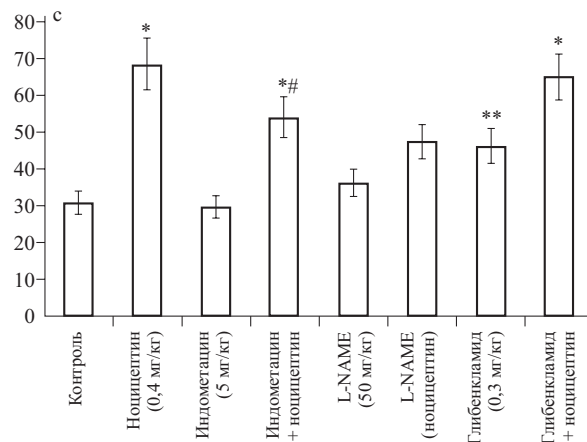


Рис. 3. Влияние индометацина, L-NAME и глибенкламида на ноцицептин-опосредованное (0,4 мг/кг внутривенно) увеличение латентного периода аконитин-индуцированных аритмий.

Различия достоверны по отношению: * — к контролю, $p < 0,001$, ** — к контролю, $p < 0,01$, # — к ноцицептину, $p < 0,01$.

менения состояния вегетативной нервной системы. Во втором случае автономная нервная система не играет заметной роли, что согласуется с ранее опубликованными данными [4]. Антиаритмический эффект орфанина FQ при интрацеребровентрикулярной инфузии не связан с опиоидными рецепторами (ОР), поскольку налоксон его не устраняет. Ранее нами было показано, что антиаритмическое действие ноцицептина при внутривенной инфузии также не зависит от “оккупации” ОР [4].

Каков же в таком случае механизм антиаритмического действия ноцицептина при системном введении? Прежде чем ответить на этот вопрос, необходимо сказать несколько слов о природе аритмогенного эффекта аконитина. Известно, что этот токсин нарушает процесс инактивации быстрых Na^+ -каналов [1]. Подобный эффект обеспечивает перегрузку кардиомиоцитов ионами натрия, усиление $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ обмена и, как следствие избыточное поступление в миоплазму Ca^{2+} из внеклеточной среды. В результате этого формируется кальциевая перегрузка клеток сердца, что, само по себе, может способствовать появлению ранних последеполяризации и триггерного автоматизма [15]. Можно было бы предположить, что орфанин FQ ингибирует $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ обмен. Однако против подобного утверждения говорит тот факт, что ноцицептин не влияет на устойчивость сердца к аритмогенному действию CaCl_2 [4]. В исследованиях W. M. Armstead (1999) было показано, что сосудорасширяющий эффект ноцицептина устраняется блокатором K_{ATP} -каналов глибенкламидом [5]. Однако антиаритмическое действие орфанина FQ, скорее всего, не связано с активацией этих каналов, так как глибенкламид его не изменяет.

В то же время, ингибитор NO-синтазы L-NAME полностью устраняет ноцицептин-индуцированную устойчивость сердца к аритмогенному влиянию аконо-

нитина. Возможность взаимодействия ORL1 рецепторов и NO-синтазы представляется нам вполне возможной, поскольку существуют данные об участии NO-синтазы в реализации гипотензивного эффекта ноцицептина при внутривенном введении [8]. Кроме того, результаты исследований R. Pabla и M. J. Curtis (1995) свидетельствуют, что эндогенная окись азота, синтезируемая NO-синтазой обеспечивает резистентность сердца к аритмогенному действию коронароокклюзии и реперфузии [10]. Сопоставление приведенных фактов позволяет нам утверждать, что антиаритмический эффект ноцицептина связан с активацией NO-синтазы.

Кроме того, антиаритмическое действие орфанина FQ зависит от активности циклооксигеназы. Это основано на том факте, что ингибитор этого фермента индометацин частично ослаблял защитный эффект ноцицептина. Вместе с тем циклооксигеназа, по всей видимости, играет второстепенную роль в реализации антиаритмического влияния ноцицептина на сердце, поскольку ее предварительная блокада индометацином не приводила к полному исчезновению антиаритмического эффекта орфанина FQ. Возможность участия простаноидов в формировании ноцицептин-индуцированной толерантности сердца к аритмогенному действию аконитина представляется нам вполне вероятным, поскольку антиаритмические свойства многих простаноидов общеизвестны [7].

ВЫВОДЫ

1. Ноцицептин повышает резистентность сердца к аритмогенному влиянию аконитина при внутривенном и при интрацеребровентрикулярном введении.

2. Повышение устойчивости миокарда к аритмогенному действию аконитина в ответ на внутримозговую инфузию орфанина FQ связано с изменением состояния вегетативной нервной системы.

3. Антиаритмический эффект ноцицептина при внутривенном введении связан с активацией NO-синтазы и циклооксигеназы.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ, гранта Министерства образования РФ и гранта Регионального общественного фонда содействия отечественной медицине.

ЛИТЕРАТУРА

1. М. Лаздинский, Дж. Ф. Рено, *Физиология и патофизиология сердца*, Н. Сперелакис (ред), Медицина, Москва (1990), сс. 593 – 617.
2. Н. А. Мазур, А. Абдалла, *Фармакотерапия аритмий*, Оверлей, Москва (1995).
3. Л. Н. Маслов, Н. В. Нарыжная, Н. Л. Барбараш, Ю. Б. Лишманов, *Рос. физиол. ж.*, **83**(3), 43 – 50 (1997).
4. Л. Н. Маслов, А. В. Крылатов, Ю. Б. Лишманов, Э. Альбрехт, *Экспер. и клин. фармакол.*, **62**(5), 21 – 24 (1999).
5. W. M. Armstead, *Brain Res.*, **835**(2), 315 – 23 (1999).
6. H. C. Champion and P. J. Kadowitz, *Am. J. Physiol.*, **274**, H1690 – 1697 (1998).
7. M. J. Curtis, M. K. Pugsley, and M. J. A. Walker, *Cardiovasc. Res.*, **27**(5), 703 – 719 (1993).
8. B. Lin, R. Waterman, and H. Lipton, *Life Sci.*, **66**(6): PL99 – 104 (2000).
9. J.-C. Meunier, *Eur. J. Pharmacol.*, **340**, 1 – 15 (1997).
10. R. Pabla and M. J. Curtis, *Circ. Res.*, **77**, 984 – 992 (1995).
11. W. M. Partridge, *The Neuronal Microenvironment.*, Ed. H. F. Cserr., Acad Sci., New York, 231 – 249 (1986).
12. G. Paxinos and C. Watson, *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*, Academic Press, New York (1982).
13. G. E. Sander, R. F. Lowe, M. B. Given, and T. D. Giles, *Am. J. Cardiol.*, **64**, 44C – 50C (1989).
14. J. E. J. Schultz, Z. Yao, I. Caverro, and G. J. Gross, *Am. J. Physiol.*, **272**, H2607 – H2615 (1997).
15. A. L. Wit and M. R. Rosen, *Am. Heart J.*, **106**(4), Part 2, 798 – 811 (1983).

Поступила 04.11.02.

THE MECHANISM OF ANTIARRHYTHMIC ACTION OF THE ENDOGENOUS ORL1 RECEPTOR AGONIST NOCICEPTIN

L. N. Maslov^{1,2}, A. V. Krylatov¹, Yu. B. Lishmanov¹, H. Berger³, G. Calo⁴, L. Ma⁵, N. V. Solenkova², and D. L. Stakheev²

¹ Department of Biochemistry, Siberian State Medical University, Moskovskii trakt 2, Tomsk, 634050 Russia;

² Laboratory of Experimental Cardiology, Institute of Cardiology, Tomsk Scientific Center, Siberian Division, Russian Academy of Medical Sciences, ul. Kievskaya 111, Tomsk, 634050 Russia;

³ Research Institute of Molecular Pharmacology, Berlin, Germany;

⁴ Department of Experimental and Clinical Medicine, Section of Pharmacology, University of Ferrara, Ferrara, Italy;

⁵ National Laboratory of Medical Neurobiology, Fudan University Medical Center, Shanghai, China

Prophylactic intravenous (i.v.) injections of a selective agonist of ORL1 receptors nociceptin (orphanin FQ) in a dose of 0.4 mg/kg prevented the development of aconitine-induced arrhythmia in rats narcotized with diethyl ether or chloralose. Pretreatment with L-NAME (50 mg/kg) completely abolished this effect of orphanin FQ, while the pretreatment with indomethacin (10 mg/kg) only attenuated the agonist effect, rather than abolished it completely. At the same time, pretreatment with hexamethonium (10 mg/kg) or glibenclamide (3 mg/kg) had no effect on the nociceptin-dependent cardiac tolerance to the arrhythmogenic action of aconitine. Intracerebroventricular (i.c.v.) infusion of orphanin FQ (36 µg) also prevented the onset of aconitine-induced arrhythmia, but this effect was completely abolished by hexamethonium. It is concluded that the antiarrhythmic action of nociceptin with respect to aconitine-induced arrhythmia upon i.v. and i.c.v. administration is explained by different mechanisms. In the former case, the effect of orphanin FQ is related to the activation of NO synthase and cyclooxygenase, while the central action involves the vegetative nervous system.