

Kannabinoid Reseptör Antagonistleri AM251 ve AM630'un Anestezi Altındaki Sıçanlarda İskemi/Reperfüzyon ile Uyarılan Aritmiler Üzerine Etkileri

Salih ERDEM , Ersöz GONCA

Bülent Ecevit Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Zonguldak, Türkiye

ÖZ

Amaç: Bu çalışmanın amacı AM251(kannabinoid-1 reseptör antagonisti) ve AM630'un (kannabinoid-2 reseptör antagonisti) anestezi altındaki sıçanlarda iskemi/reperfüzyon (I/R) ile uyarılan aritmiler üzerine etkilerini araştırmaktır.

Gereç ve Yöntemler: Wistar Albino türü erkek sıçanlar 3 gruba ayrıldı: I) Kontrol (n=13), II) AM251 (n=17) ve III) AM630 (n=17). AM251 ve AM630 1mg/kg dozda intravenöz yolla ligasyondan 10 dakika önce verildi. Üretan ile anestezi edilen sıçanlarda sol ana koroner arter bağlanarak 6 dakika iskemi, tıkanan damar gevşetilerek 10 dakika reperfüzyon yapıldı. Tüm gruplardaki deneklerde iskemi ve reperfüzyon periyotlarında ventriküler aritmi süreleri, EKG'de QRS, Q-T ve P-R aralıkları, kalp atımı ve ortalama arteriyal kan basıncı hesaplandı.

Bulgular: AM251 reperfüzyon periyodunda ölüm oranını, ventriküler taşikardi ve ventriküler fibrilasyonun görülme sıklığını, ventriküler fibrilasyon süresi, toplam aritmi süresi ve aritmi skorunu kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde artırdı (p<0.05).

Sonuç: Kannabinoid-1 reseptör antagonisti AM251 I/R ile uyarılan aritmileri artırdı. Kannabinoid-2 reseptör antagonisti AM630 ise herhangi bir etki göstermedi. Bu sonuçlar endojen kannabinoidlerin KB1 reseptör aktivasyonu yoluyla ventriküler aritmilerin oluşumunu azaltıcı bir role sahip olabileceğini göstermektedir.

Anahtar sözcükler: AM251, AM630, Kannabinoidler, İskemi/reperfüzyon aritmileri

The Effects of Cannabinoid Receptor Antagonists AM251 and AM630 on Ischemia/Reperfusion-Induced Arrhythmias in Anesthetized Rats

ABSTRACT

Aim: The aim of this study is to investigate the effects of AM251 (cannabinoid-1 receptor antagonist) and AM630 (cannabinoid-2 receptor antagonist) on ischemia/reperfusion (I/R)-induced arrhythmias in anesthetized rats.

Materials and Methods: Wistar Albino male rats were divided into 3 groups: I) Control (n = 13), II) AM251 (n = 17) and III) AM630 (n = 17). AM251 and AM630 were administered intravenously at 1 mg / kg dose 10 minutes prior to ligation. In the anesthetized rats with urethan, the left main coronary artery was ligated to perform the ischemia for 6 minutes, the occluded artery was loosened and reperfusion was performed for 10 minutes. Ventricular arrhythmia durations, QRS, Q-T and P-R intervals in ECG recordings, heart rate and mean arterial blood pressure were calculated in ischemia and reperfusion period in all in all groups of rats.

Results: The AM251 significantly increased mortality, the incidence of ventricular tachycardia and ventricular fibrillation, the duration of total arrhythmia and the ventricular fibrillation and the arrhythmia scores compared to the control group (p<0.05).

Conclusion: The cannabinoid-1 receptor antagonist AM251 increased I/R-induced arrhythmias. The cannabinoid-2 receptor antagonist AM630 did not show any effect. These results demonstrate that endogenous cannabinoids may have a role in the reducing the generation of ventricular arrhythmias via KB1 receptor activation.

Key Words: AM251, AM630, Cannabinoids, Ischemia/reperfusion arrhythmias

DOI: 10.25048/tjdo.2018.27

Yazışma Adresi / Correspondence Address:

Ersöz GONCA

Bülent Ecevit Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Zonguldak, Türkiye
Tel: +90(543) 639 53 74 • E-posta: ersozgonca67@hotmail.com

Geliş tarihi / Received : 21.03.2018
Revizyon tarihi / Revision : 03.04.2018
Kabul tarihi / Accepted : 14.04.2018

<http://turkjod.beun.edu.tr>

GİRİŞ

Koroner damarların tıkanması sonucunda meydana gelen iskemi miyokardiyal dokuda hasara ve ventriküler aritmilere neden olur. Hastaneye ulaştırılabilen hastalarda tıkalı koroner damar trombolitik tedavi ve/veya anjiyoplasti ile açılarak miyokardiyal hasarın büyümesi önlenmeye çalışılır. Ancak bu girişim sonucu iskemik dokunun tekrar kanlanması (reperfüzyon) ölümcül ventriküler aritmilere neden olabilmektedir. Bu tür aritmilere iskemi/reperfüzyon (I/R) aritmileri denir (1). I/R aritmilerinin oluşumunun önlenmesi için yeni ve etkili tedavi yolları bulmak amacıyla deneysel hayvan modellerinde araştırmalar yapılmaktadır (2,3)

Kannabinoid reseptörleri ve endokannabinoidleri içeren endokannabinoid sistem iştah, ağrı duyumu, duygu durum ve bellek gibi etkinliklerde görev alır (4). Kannabinoidler farmakolojik olarak aktif moleküllerdir. Bitkisel kannabinoid, endokannabinoid ve sentetik kannabinoidler olmak üzere üç ana gruba ayrılırlar (5). Miyokardiyal hücrelerde kannabinoid 1 (KB₁) ve kannabinoid 2 (KB₂) olmak üzere iki ayrı reseptörü tespit edilmiştir (6-9). Ayrıca kannabinoidler ile G protein bağlı reseptör 55 (GPR 55) arasında antagonistik bir ilişkinin olduğu gösterilmiştir (10). Endokannabinoid sistemin aterosklerotik plak oluşumu, kalp atımı, kan basıncı ve enerji metabolizması üzerine etkileri olduğu gösterilmiştir (11,12). Kannabinoidlerin, KB₁ reseptörleri aracılığıyla miyokardiyal kasılmayı azaltıcı, koroner kan akımını artırıcı ve hipotansiyon etkilerinin olduğu bildirilmiştir (13).

KB₁ ve KB₂ reseptör antagonistleri kullanılarak endokannabinoid sistemin ventriküler aritmilerin oluşumundaki rolü araştırılmaktadır. Hepburn ve ark. (14) anestezi altındaki sıçanlarda bir seçici KB₁ reseptör antagonisti AM251'in miyokardiyal iskemi ile uyarılan ventriküler aritmileri azalttığını göstermiştir. Andrag ve Curtis (15) ise izole sıçan kalbinde AM251'in ventriküler fibrilasyon sıklığını akut iskeminin geç döneminde artırdığı göstermiştir. Hajrasouliha ve ark. (16) ise bir seçici KB₂ reseptör antagonisti AM630'un miyokardiyal iskemi ile uyarılan ventriküler aritmileri etkilemediğini göstermişlerdir (16). Çalışmamızda AM251 ve AM630'un, I/R ile uyarılan ventriküler aritmiler üzerine etkisi ilk kez araştırılmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEMLER

Bu çalışmada 270-300 gram ağırlığında 59 adet wistar albino türü erkek sıçanlar kullanıldı. Deney hayvanları Kobay Deney Hayvanları Laboratuvarı Sanayi ve Ticaret Anonim Şirketi'nden (Ankara/Türkiye) satın alındı. Hayvanlar uygun koşullarda muhafaza edildi (ısı: 21±2°C, nem: %40-%65 ve 12 saat aydınlık/karanlık döngüsü). Standart pelet yem ile beslenerek istedikleri kadar şebeke suyu verildi. Bu çalışmada uygulanan tüm deneysel operasyonlar Bülent

Ecevit Üniversitesi Yerel Etik Kurulu (HADYEK) tarafından onaylandı (protokol no:2015-18-02/09).

Çalışmaya başlamadan önce hayvanlar tesadüfi olarak seçilerek 3 grup oluşturuldu;

I. Kontrol (n=13)

II. AM251 (KB₁ reseptör antagonisti) (n=17)

III. AM630 (KB₂ reseptör antagonisti) (n=17)

AM251 KB₁ seçici reseptör antagonisti, AM630'un ise KB₂ seçici reseptör antagonisti olduğu gösterilmiş olup (17,18), uygulanan dozları ve veriliş zamanı için benzer çalışmalar temel alındı (14,16). AM251 ve AM630 (Sigma Chemical Co.; St. Louis, MO, ABD) 1mg/kg/ml dozda intravenöz yolla ligasyondan 10 dakika önce bolus olarak verildi. Kontrol grubuna ilaçların çözücüsü olan dimetilsülfoksit (DMSO) aynı miktarda verildi.

Cerrahi işlemler

Hayvanlar 1.5 g/kg dozda ip. yolla verilen üretan ile anestezi edildi. Deney süresince sıçanlar beden ısılarını 37±1 °C' de sabit tutmak için, rektal sıcaklık ölçümü yapan ısı tablası üzerine sabitlendi (RTC 9404-A, Commat Ltd, Ankara, Türkiye). Suni solunum için trakeotomi yapıldı. Sol karotid arter içinde heparin (100 IU/mL) bulunan bir tüp ile kanüle edildi. Basıncı transdüseri kullanılarak arteriyel kan basıncı ölçümü yapıldı (Kan basıncı ölçüm cihazı, SS 13 L, Biopac Sistemleri, Kaliforniya, ABD). Torakotomi sonrası kalp dışarı alındı ve sol ana koroner arterin altından 5/0'lık ipek sütür geçirildi. Kalp tekrar göğüs kafesine koyulduktan sonra rodent solunum cihazına bağlandı (solunum hızı: 60 kez/dk, soluk hacmi: 1.5 ml/100g) (Deney hayvanı solunum cihazı; SAR 830, Life Science, Kaliforniya, ABD). Elektrokardiyogram (EKG) ölçümü için deri altına elektrotlar yerleştirildi. Kalp atımının ve kan basıncının bazal değerlere dönmesi için 10 dakika beklenildi. Sol koroner arter altından geçirilmiş olan ipek sütür bağlanarak 6 dakika iskemi ve sütür çözülerek 10 dakika reperfüzyon uygulandı. İskemi ve reperfüzyon periyodunda EKG ve arteriyel kan basıncı kayıt edildi (Veri Ölçüm Sistemleri MP35, Veri Toplama ve Analiz Biopac Sistemleri, Goleta, Kaliforniya, ABD).

Koroner arter ligasyonunun başarılı bir şekilde uygulandığı tüm deneklerde EKG'de ST-segment yükselmesi ve QRS genliklerinde artış gözlemlendi. Tüm sıçanlarda ligasyonu takiben ortalama arteriyel kan basıncın (OAKB)'da ligasyon öncesine göre % 20-25 oranında bir azalma görüldü.

Risk alanı ölçümü için reperfüzyon periyodu sonunda çıkarılan kalpler 5 mL 37°C serum fizyolojik ile perfüze edildi. İpek sütür tekrar bağlandı. Sol koroner arter ligasyonu yapıldıktan sonra kalp aort yoluyla 2 mL % 96'lık etanol ile perfüze edildi. Etanolün ulaştığı miyokardiyal doku beyaz

bir renk alırken, tıkalı sol koronerin beslediği alan orijinal doku renginde (kırmızı) kaldı. İnce uçlu bir makas ile ayrılan risk bölgesi elektronik hassas terazi ile tartıldı. Risk bölgesinin ağırlığının toplam ventrikül ağırlığına yüzde oranı hesap edildi (2).

Ligasyon öncesinde OAKB 70 mmHg'nın altında olan ve/veya devam eden aritmisi olan hayvanlar ile risk alanı %40'ın altında olan deneklere ligasyon uygulanmadı ve bu denekler değerlendirme dışı bırakıldı.

Aritmi Analizi

EKG kayıtlarından iskemi ve reperfüzyon periyodunda aritmilerin tipleri, aritmi süreleri, aritmilerin başlangıç ve bitiş zamanları ve aritmik periyot (başlangıç ve bitiş zamanı arasındaki zaman aralığı) analiz edildi. Ventriküler aritmi tipleri; ventriküler prematüre kasılma (VPK), ventriküler taşikardi (VT) ve ventriküler fibrilasyon (VF) olarak Lambeth antlaşmasına göre tespit edildi (19). Aritmi şiddetinin bir ölçüsü olan aritmi skoru, her denek için aritmi tipi ve görüldüğü sürenin uzunluğu dikkate alınarak Lepran ve ark. (20) tarafından belirlenen sıklaya göre şu şekilde belirlendi; (0): Hiç aritmi yok, (1): 10 sn den az süreli VPK veya VT, (2): 11-30 sn süreli VPK veya VT, (3): 31-90 sn süreli VPK veya VT, (4): 91-180 sn süreli VPK veya VT ya da 10 sn den az süreli VF, (5): 180 sn den uzun süreli VPK veya 10 sn den uzun süreli VF, (6): Dönüşümsüz VF.

Hemodinamik ve Elektrofizyolojik Analiz

Tüm gruplarda iskemi ve reperfüzyon periyotları boyunca dakika kalp atım sayısı ve arteriyel kan basıncı; ligasyon öncesi, iskeminin 1, 3, 5. ve reperfüzyonun 1, 3, 5, 7 ve 9. dakikalarında düzenli aralıklarla tespit edildi (Veri Ölçüm Sistemleri MP35, Veri Toplama ve Analiz Biopac Sistemleri, Goleta, Kaliforniya, ABD).

AM251 ve AM630'un aritmiler üzerine etkisinde olası elektrofizyolojik etkilerini değerlendirmek için QRS, Q-T ve P-R aralıkları ölçüldü. EKG kayıtlarından Q-T, P-R ve QRS aralıkları ligasyon öncesi ve ligasyonun 1, 3 ve 5. dakikalarında ölçüldü. Kalp hızı arttıkça ölçülen Q-T uzunluğu kısalmış. Bu nedenle kalp hızının QT üzerine

etkisini ortadan kaldırmak için QT'nin düzeltilmiş biçimi olan QTc değeri Bazett formülüne göre hesaplandı (21).

İstatistiksel Analiz

Veriler GraphPad Software yazılım programı (GraphPad Prism versyon 5, San Diego, CA, ABD) kullanılarak değerlendirildi. Gruplar arasında karşılaştırma için veriler önce Kolmogorov-Smirnov testi ile analiz edilerek normal dağılıma uyup uymadığı saptandı. Normal dağılım gösteren grupların karşılaştırılmasında Tek Yönlü Varyans Analizi ve Tukey post hoc testi, diğerleri için Kruskal-Wallis test ile Dunn post hoc testi kullanıldı. Ligasyonda kayıt edilen kalp atımı ve kan basıncı değerlerini bazal değerlerle karşılaştırmak için Student t test kullanıldı. Ölüm oranı ve aritmi sıklığı Fisher kesinlik testi ile analiz edildi. Sonuçlar Ortalama±Standart hata (S±H) olarak verildi. P<0.05 istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

BULGULAR

Hemodinamik Veriler

Tüm gruplarda ligasyonunun 1. 3. ve 5. dakikalarında ölçülen OAKB değerleri ligasyon öncesi bazal değerlere göre anlamlı azaldı (P<0.05). AM251 verilen grupta bazalda ölçülen kan basıncı değeri ilaç öncesine (-10) göre anlamlı artış gösterdi (P<0.05). İskemi ve reperfüzyon boyunca ölçülen kan basıncı değerlerinde gruplar arasında bir farklılık görülmedi (Tablo 1) (Şekil 1). AM630 verilen grupta ligasyonun 3. ve 5. dakikalarında kalp atım hızı bazal değerlere göre anlamlı azaldı (P<0.05). Ligasyon öncesi, ligasyon ve reperfüzyon boyunca ölçülen kalp atım hızı gruplar arasında anlamlı bir değişim göstermedi (Tablo 2) (Şekil 2).

Ventriküler Aritmiler

Ligasyon periyodunda gözlenen aritmilerin süre ve sıklığında gruplar arasında anlamlı bir fark görülmedi (Bulgular verilmedi). Reperfüzyon periyodunda ise AM251 verilen grupta ölüm oranı, VF ve VT görülme sıklığı, VF süresi, toplam aritmi süresi ve aritmi skoru kontrol grubuna göre anlamlı artış gösterdi (P<0.05) (Tablo 3).

Tablo 1: AM251 ve AM630'un ligasyon öncesi ve iskemi/reperfüzyon periyotlarında ölçülen ortalama arteriyel kan basıncına (mmHg) etkisi

Gruplar	-10	-5	Bazal	Lig 1	Lig 3	Lig 5	Rep 1	Rep 3	Rep 5	Rep 7	Rep 9
Kontrol	82±4	80±5	86±3	60±6*	50±7*	50±6*	62±4	65±3	63±3	60±6	52±6
AM251	90±9	117±4	118±4#	93±3*	98±4*	97±10*	94±14	76±16	81±10	76±9	82±8
AM630	81±4	80±4	83±4	57±6*	49±8*	47±8*	49±8	62±10	65±10	63±10	61±9

-10: Ligasyondan 10 dakika önce (ilaçlar verilmadan önce), -5: Ligasyondan 5 dakika önce, **Bazal (0):** Ligasyon başlangıç, **Lig 1:** Ligasyonun 1. dakikası, **Lig 3:** Ligasyonun 3. dakikası, **Lig 5:** Ligasyonun 5. dakikası, **Rep 1:** Reperfüzyonun 1. dakikası, **Rep 3:** Reperfüzyonun 3. dakikası, **Rep 5:** Reperfüzyonun 5. dakikası, **Rep 7:** Reperfüzyonun 7. dakikası, **Rep 9:** Reperfüzyonun 9. dakikası. *P<0.05 bazala göre. #P<0.05 ilaç öncesine (-10) göre. Değerler ortalama ± standart hata (SH) olarak verilmiştir.

Elektrofizyolojik Veriler

QRS uzunlukları tüm gruplarda ligasyonun 1. 3. ve 5. dakikalarında ligasyon öncesi bazal değerlere göre anlamlı olarak arttı ($P<0.05$) (Tablo 4), (Şekil 3A). Ligasyon öncesi ve ligasyon boyunca ölçülen Q-T uzunluğu ve QTc, AM630 verilen grupta kontrol grubuna göre anlamlı artış gösterdi ($P<0.05$) (Tablo 4), (Şekil 3B, C). P-R uzunluğu AM251 verilen grupta ligasyon öncesinde ve ligasyonun 1. dakikasında kontrole göre anlamlı arttı ($P<0.05$) (Tablo 4), (Şekil 3D).

TARTIŞMA

KB₁ reseptör antagonisti AM251 1mg/kg dozda miyokardiyal iskemi reperfüzyon sonrası ölüm oranı, ventriküler aritmilerin süre ve sıklığını artırdı. Hepburn ve ark. (14) aynı modelde yapmış olduğu çalışmada, AM251'in iske-miyle uyarılan ventriküler aritmilerin sayısı ve sıklığını azalttığını bildirmiştir. Bu çalışmada çalışmamızdan farklı olarak AM251'in iskemi ile uyarılan aritmiler üzerine etkisi araştırılmıştır. Hajrasouliha ve ark. (16) anestezi altındaki sıçanlarda yapmış olduğu çalışmada, AM251'in iskemi ve

Tablo 2: AM251 ve AM630'un ligasyon öncesi ve iskemi/reperfüzyon periyotlarında ölçülen kalp atımına (atım/dk) etkisi.

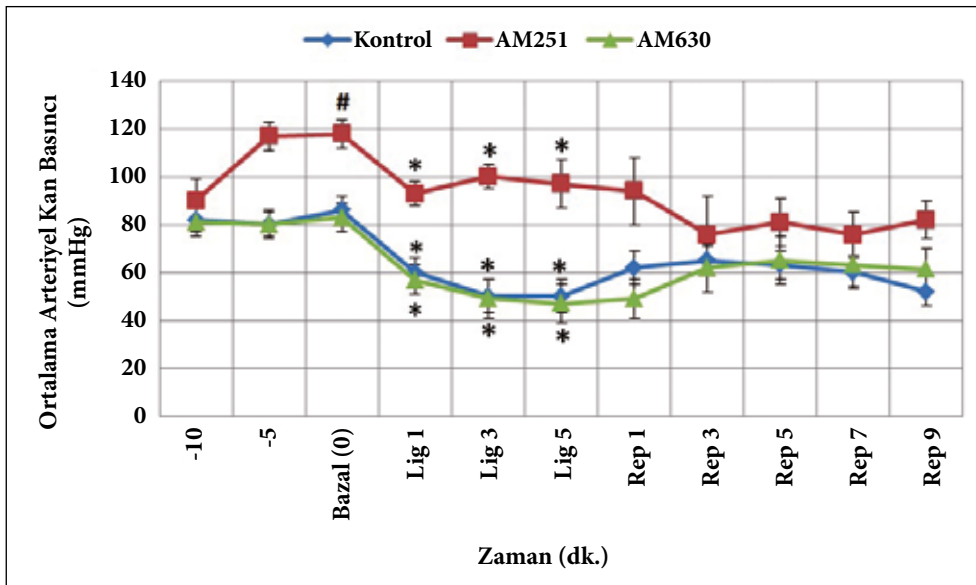
Gruplar	-10	-5	Bazal	Lig 1	Lig 3	Lig 5	Rep 1	Rep 3	Rep 5	Rep 7	Rep 9
Kontrol	364±14	361±16	367±18	357±19	338±21	337±18	309±22	309±22	308±24	301±21	301±22
AM251	334±13	381±11	385±14	373±21	381±11	380±12	357±12	364±10	359±11	349±15	340±23
AM630	319±26	327±27	335±25	314±41	260±63*	245±62*	279±52	294±66	290±50	292±55	290±52

-10: Ligasyondan 10 dakika önce (ilaçlar verilmadan önce), -5: Ligasyondan 5 dakika önce, **Bazal**: Ligasyon başlangıç, **Lig 1**: Ligasyonun 1. dakikası, **Lig 3**: Ligasyonun 3. dakikası, **Lig 5**: Ligasyonun 5. dakikası, **Rep 1**: Reperfüzyonun 1. dakikası, **Rep 3**: Reperfüzyonun 3. dakikası, **Rep 5**: Reperfüzyonun 5. dakikası, **Rep 7**: Reperfüzyonun 7. dakikası, **Rep 9**: Reperfüzyonun 9. dakikası. * $P<0.05$ bazala göre. Değerler ortalama ± standart hata (SH) olarak verilmiştir.

Tablo 3: AM251 ve AM630'un reperfüzyon periyodu boyunca görülen aritmiler üzerine etkisi.

Gruplar	N	Risk Bölgesi (%)	Ölüm Oranı (n/%)	Aritmilerin görülme sıklığı (N/%)			Aritmi Süreleri (sn)				Aritmi Skoru
				VF	VT	VPK	VF	VT	VPK	Toplam	
Kontrol	13	45±1	1/8	2/15	6/46	12/92	1±1	12±6	5±2	19±7	3.2±0.6
AM251	17	44±1	9/53*	12/71*	17/100*	17/100	12±9*	26±9	7±2	44±11*	5.3±0.3*
AM630	17	44±1	2/12	4/24	4/24	16/94	5±4	18±11	2±1	25±16	2.8±0.8

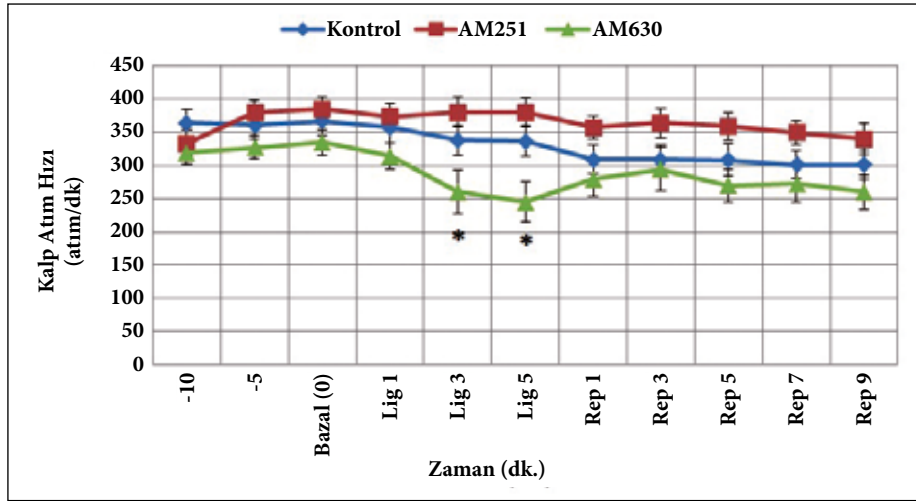
N: Ligasyon öncesi hayvan sayısı n: Ligasyon periyodundan sonra ölen hayvan sayısı. N:Aritmilerin görülme sayısı, VF: Ventriküler fibrilasyon; VT: Ventriküler taşikardi; VPK: Ventriküler premature kasılma (ekstrasistol, salvo, bigemini); **Toplam**: VF, VT ve diğer tip aritmilerin toplam uzunluğu. * $P<0.05$ kontrole göre. Değerler ortalama ± standart hata (SH) olarak verildi.



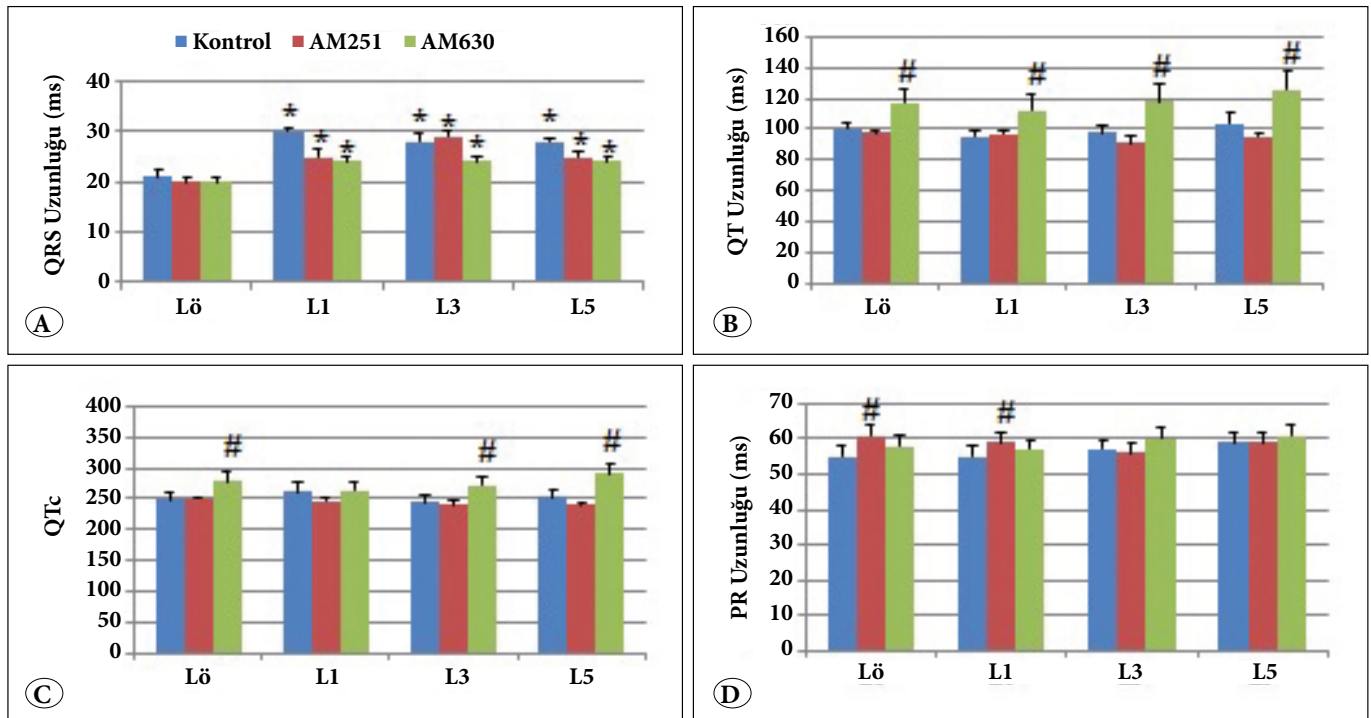
Şekil 1: AM251 ve AM630'un ligasyon öncesi ve iskemi/reperfüzyon periyotlarında ölçülen ortalama arteriyel kan basıncı (mmHg) değerlerine etkisi. -10: İlaçların verildiği zaman, **bazal (0)**: Ligasyon öncesi, **Lig 1**: Ligasyonun 1. dakikası, **Lig 3**: Ligasyonun 3. dakikası, **Lig 5**: Ligasyonun 5. dakikası, **Rep 1**: Reperfüzyonun 1. dakikası, **Rep 3**: Reperfüzyonun 3. dakikası, **Rep 5**: Reperfüzyonun 5. dakikası, **Rep 7**: Reperfüzyonun 7. dakikası, **Rep 9**: Reperfüzyonun 9. dakikası * $p < 0.05$ ilaç öncesi (-10)'a göre. * $p < 0.05$ bazala (0) göre.

iskemi/reperfüzyonla uyarılan ventriküler aritmiler üzerine bir etkisinin olmadığını göstermiştir. Andrag ve Curtis (15) ise izole sıçan kalbinde yaptığı çalışmada AM251'in iskeminin geç periyodunda VF süre ve sıklığını artırdığı, reperfüzyon periyodunda ise aritmi oluşumunu etkilemediğini göstermiştir. Bu çalışmalarda çalışmamızdan farklı olarak AM251 reperfüzyon aritmilerinin oluşumunu etkilememiştir. Sonuçlardaki bu farklılık uygulanan iskemi sürelerinin çalışmamızdan farklı olması ile açıklanabilir. Reperfüzyon aritmilerinin araştırıldığı çalışmalarda reperfüzyon periyo-

dundan önce uygulanan iskemik periyodun süresi reperfüzyon aritmilerinin oluşumu için gerekli koşulları sağlayabilecek uzunlukta tutulmaktadır. Bu tür deneysel çalışmalarda iskemi periyodunun uzunluğu, 5, 6 veya 7 dakika olarak uygulanmaktadır (2,3,22). Çalışmamızda iskemi süresi 6 dakika olarak uygulanmıştır. Bu çalışmalarda uygulanan iskemi süresi ise reperfüzyon periyodunda yeterli sayıda ventriküler aritmi oluşumunu sağlamayacak uzunluktaki, sırasıyla 30 dakika ve 1 saat sürelerde uygulanmıştır (15,16).



Şekil 2: AM251 ve AM630'un ligasyon öncesi ve iskemi/reperfüzyon periyotlarında ölçülen kalp atım hızı (atım/dakika) değerlerine etkisi. -10: İlaçların verildiği zaman, **bazal (0):** Ligasyon öncesi, **Lig 1:** Ligasyonun 1. dakikası, **Lig 3:** Ligasyonun 3. dakikası, **Lig 5:** Ligasyonun 5. dakikası, **Rep 1:** Reperfüzyonun 1. dakikası, **Rep 3:** Reperfüzyonun 3. dakikası, **Rep 5:** Reperfüzyonun 5. dakikası, **Rep 7:** Reperfüzyonun 7. dakikası, **Rep 9:** Reperfüzyonun 9. dakikası. *p<0.05 bazala (0)'a göre.



Şekil 3: AM251 ve AM630'un elektrofizyolojik etkileri. AM251 ve AM630'un QRS uzunluklarına etkisi (A), AM251 ve AM630'un QT uzunluklarına etkisi (B), AM251 ve AM630'un QTc uzunluğuna etkisi (C), AM251 ve AM630'un P-R aralıklarına etkisi (D). *P<0.05: ligasyon öncesine göre, #P<0.05: kontrole göre. L0: Ligasyon öncesi, L1: Ligasyonun 1. dakikası, L3: Ligasyonun 3. dakikası, L5: Ligasyonun 5. dakikası.

Tablo 4: AM251, AM630'un QRS, QT, PR uzunluklarına ve QTc değerine etkisi.

Gruplar	Bazal			Lig 1			Lig 3			Lig 5						
	QRS	PR	QT	QRS	PR	QT	QRS	PR	QT	QRS	PR	QT				
Kontrol	21±1	55±1	100±5	249±12	30±1*	55±1	95±4	262±11	28±2*	57±2	98±2	244±10	28±1*	58±2	104±6	253±15
AM251	20±1	61±2*	98±2	250±6	25±1*	59±2*	97±3	246±7	29±2*	56±1	91±3	240±7	25±1*	59±2	95±4	241±7
AM630	20±2	58±1	117±8*	279±13*	24±1*	57±1	112±9*	264±13	24±1*	60±1	118±9*	272±13*	24±1*	61±2	126±10*	291±16*

Bazal : Ligasyon başlangıç, **Lig 1:** Ligasyonun 1. dakikası, **Lig 3:** Ligasyonun 3. dakikası, **Lig 5:** Ligasyonun 5. dakikası. QTc: Bazett formülüne göre hesaplanmıştır. * P<0.05 ligasyon öncesine göre. # P<0.05 kontrole göre. Değerler ortalama ± standart hata (SH) olarak verilmiştir.

Son zamanlarda yapılan bir çalışmada, kalp iskemisi sırasında endojen olarak meydana gelen kannabinoidlerin sempatik sinir liflerinde bulunan KB₁ reseptörlerinin aktivasyonu aracılığıyla noradrenalin salınımını bloke ettiği gösterilmiştir (23). Çalışmamızda AM251 ile sağlanan KB₁ reseptör blokajı aşırı noradrenalin salınımına neden olmuş olabilir. Noradrenalin salınımındaki artış geç ard-depolarizasyon (GAD) tetikleme aktivitesi yoluyla ventriküler aritmilerin oluşumunu artırmış olabilir (24).

Miyokardiyal iskemide reperfüzyon sırasında meydana gelen lisofosfatidilinositol (LPI) GPR55 reseptörlerinin ligantıdır (25). LPI GPR55 reseptör aktivasyonuna neden olarak hücre içi Ca²⁺ miktarını artırır. Ca²⁺ aşırı yüklenmesinin ise nekroz, apoptoz ve ventriküler aritmileri artırdığı bilinmektedir (26). Son zamanlarda yapılan çalışmalarda AM251'in de LPI'ya benzer şekilde GPR55 reseptörlerini aktive ettiği gösterilmiştir (10,27). Çalışmamızda da AM251 GPR55 reseptör aktivasyonu yoluyla miyokardiyal hücrelerde Ca²⁺ iyonunun aşırı yüklenmesine neden olmuş olabilir. Hücrelerde meydana gelen aşırı Ca²⁺ iyon yüklemesi GAD tipi tetikleme aktivitesi yoluyla aritmi oluşumunu artırmış olabilir (24,28).

Çalışmamızda AM251 ile sağlanan KB₁ reseptör blokajı reperfüzyon ile uyarılan aritmileri artırıcı etki gösterirken, Hajrasouliha ve ark. (14) yapmış oldukları çalışmalarda AM251'in iskemiyile uyarılan aritmilerin oluşumunu etkilemediğini bildirmişlerdir. İskemi ve reperfüzyon ile uyarılan aritmilerin mekanizmalarının farklı oluşu sonuçlardaki bu farklılığı açıklayabilir (29). Reperfüzyon aritmilerinin oluşumunda etken olan mekanizma tetikleme aktivitesi iken iskemide aritmilerinin oluşumunda ise daha çok tekrar giriş (re-entry) mekanizması sorumludur. Çalışmamızda gösterilen AM251'in proaritmik etkisinde reperfüzyon aritmilerinin oluşumunda etken olan Ca²⁺ aşırı yüklenmesi ve epinefrin deşarjına bağlı tetikleme aktivitesi belirleyici rol oynamış olabilir.

Gonca ve Darıcı (30) KB₁ ve KB₂ reseptör agonisti kannabidiol'ün I/R ile uyarılan aritmilere karşı koruyucu etkili olduğunu göstermişlerdir. Krylatov ark. (31) seçici olmayan KB₁ ve KB₂ reseptör agonisti HU-210'un antiaritmik etkisinin KB₂ aktivasyonuna bağlı olduğunu göstermiştir. Benzer şekilde Lepicier ve ark. (32) da yapmış oldukları çalışmada egzojen olarak verilen bir KB₂ reseptör agonisti olan JWH015'nin reperfüzyon aritmilerine karşı koruyucu etki gösterdiğini bildirmiştir. Bu sonuçlar endojen kannabinoidlerin KB₂ reseptör aktivasyonu yoluyla aritmi oluşumunu baskılayabileceğini düşündürmektedir. Ancak Hajrasouliha ve ark. (16) KB₂ reseptör antagonisti AM630'un iskemiyile uyarılan aritmiler üzerine bir etkisinin olmadığını rapor etmişlerdir. Andrag ve Curtis (15) ise bir *in vitro* çalışmada AM630'un iskemide periyodunda ventriküler aritmilerin süresini etkilemediğini göstermiştir. Benzer

şekilde çalışmamızda da AM630 iskemi reperfüzyonla uyarılan ventriküler aritmilerin oluşumu üzerine anlamlı bir etki göstermemiştir. Bu sonuç KB_2 reseptörlerinin endojen kannabinoidler yoluyla uyarılmasının ventriküler aritmilerin patofizyolojisinde önemli bir rolünün olmadığını göstermektedir.

Çalışmamızda AM251 P-R aralığını artırmıştır. Bir endojen kannabinoid olan anandamid'in KB_1 reseptör aktivasyonu yoluyla kardiyak L-tipi Ca^{2+} kanallarını aktive ettiği gösterilmiştir (33). Kardiyak L-tipi Ca^{2+} kanallarının blokajı ise P-R aralığını artırır (34). Çalışmamızda da AM251 ile bloke olan KB_1 reseptörleri, endojen kannabinoidlerin L-tipi Ca^{2+} kanallarını aktive edici yönde etkisini azaltarak, kardiyak L-tipi Ca^{2+} kanallarının blokajına yol açmış olabilir. L-tipi Ca^{2+} kanallarının blokajı ise P-R uzunluğunu artırmış olabilir.

Çalışmamızda AM630 Q-T uzunluklarını artırdı. Q-T uzunluğundaki artış repolarizasyondan sorumlu olan K^+ kanallarının blokajına bağlıdır. Repolarizasyondan sorumlu olan K^+ akımlarını geçici dışa doğru K^+ akımları (Ito), içeri doğrultucu potasyum akımları (IK1), gecikmiş dışa doğrultucu potasyum akımlarının (IK)) bloke eden ilaçlar sıçanlarda kayıtlı edilen EKG'de Q-T süresini uzatır (35,36). Bu ilaçların aksiyon potansiyel süresini uzatarak akut koroner ligasyonda ventriküler aritmileri baskıladığı bildirilmiştir (37). Ancak çalışmamızda AM630 Q-T uzunluklarını artırmamasına rağmen ventriküler aritmileri azaltmamıştır. Tsuchihashi ve Curtis (38) yapmış oldukları çalışmada repolarizasyon periyodunun uzaması ile sonuçlanan Ito akım blokajının kalp hızını yavaşlatabileceğini ileri sürmüştür. Çalışmamızda AM630 verilen grupta ligasyon periyodunda kalp atımı bazal değerlere göre anlamlı azalma göstermiştir. AM630'un kalp atımını azaltıcı etkisi repolarizasyon periyodunun ve Q-T süresinin uzaması ile sonuçlanan bir kanalın blokajıyla gerçekleşmiş olabilir. Çalışmamızda iskemi periyodunda ölçülen QRS uzunlukları ligasyon öncesine göre anlamlı artış göstermiştir. İskemik miyokardiyal hücrelerde aksiyon potansiyel süresinin uzamasına bağlı olarak miyokardiyal kas kitlesi içinde impuls iletimi yavaşlar. Bunun sonucunda iskemiye bağlı olarak QRS aralıklarında uzama beklenir (30).

Çalışmamızda AM251 kan basıncını artırıcı etki göstermiştir. Sonuçlarımızla uyumlu olarak Wagner ve ark. (39) bir KB_1 antagonisti olan rimonabant'ın kan basıncını artırdığını göstermiştir. Kannabinoidler KB_1 reseptörleri aracılığıyla, sistemik vazodilatör etki göstererek vasküler direnci azaltır, kalp kasılması için negatif inotropik etki üretir (40). Çalışmamızda AM251 ile sağlanan KB_1 reseptör blokajı sistemik kannabinoidlerin bu reseptörler aracılığıyla gerçekleştirdiği hipotansiv etkiyi bloke ederek kan basıncını artırıcı yönde etki göstermiş olabilir.

Bu sonuçlar iskemi ve reperfüzyon periyodunda meydana gelen endojen kannabinoidlerin KB_1 reseptör aktivasyonu yoluyla aritmileri azaltıcı etkiye sahip olabileceğini ve KB_2 reseptörlerinin patofizyolojisinde herhangi bir etkisinin bulunmadığını göstermektedir. Ancak her iki ilacın da kannabinoid reseptörleri dışında farklı hedef reseptörleri olabilir. Bu nedenle endojen kannabinoidlerin aritmi patofizyolojisindeki rolünü aydınlatmak amacıyla KB_1 ve KB_2 reseptör delesyonu yapılarak elde edilen transgenik deney hayvanlarında araştırmalar, farklı seçici agonist ve antagonistleri içeren kapsamlı çalışmaların yapılmasına ihtiyaç duyulmaktadır.

TEŞEKKÜR

Bu çalışmanın yapılması için Bülent Ecevit Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğünden finansal destek sağlanmıştır (BAP No:2016-84906727-01)

Çıkar çatışması: Tüm yazarlar çıkar çatışması olmadığını beyan eder.

KAYNAKLAR

1. Ferrari R, et al. Reperfusion damage- a story of success, failure, and hope. *Circ J.* 2017;81(2):131-141.
2. Gonca E, et al. Cardioprotective effect of zileuton: A 5-lipoxygenase inhibitor against myocardial ischemia/reperfusion injury. *Turkish Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery.* 2017;25(2):273-281.
3. Gonca E. The effects of zileuton and montelukast in reperfusion-induced arrhythmias in anesthetized rats. *Curr Ther Res Clin Exp.* 2013;75:27-32.
4. Howlett AC, et al. Cannabinoid physiology and pharmacology: 30 years of progress. *Neuropharmacology.* 2004;47:345-358.
5. Ben Amar M. Cannabinoids in medicine: A review of their therapeutic potential. *J Ethnopharmacol.* 2006;105(1-2):1-25.
6. Bisogno T, et al. Molecular targets for cannabidiol and its synthetic analogues: Effect on vanilloid VR1 receptors and on the cellular uptake and enzymatic hydrolysis of anandamide. *British Journal of Pharmacology.* 2001;134(4):845-852.
7. Gebremedhin D, et al. Cannabinoid CB1 receptor of cat cerebral arterial muscle functions to inhibit L-type Ca^{2+} channel current. *The American Journal Physiology.* 1999;276:2085-2093.
8. Liu J, et al. Functional CB1 cannabinoid receptors in human vascular endothelial cells. *The Biochemical Journal.* 2000;346:835-840.
9. Di Marzo V. The endocannabinoid system: Its general strategy of action, tools for its pharmacological manipulation and potential therapeutic exploitation. *Pharmacological Research.* 2009;60(2):77-84.

10. Walsh SK, et al. Pharmacological profiling of the hemodynamic effects of cannabinoid ligands: A combined in vitro and in vivo approach. *Pharmacol Research Perspect.* 2015;3(3):1-17.
11. Cunha P, et al. Endocannabinoid system in cardiovascular disorders - new pharmacotherapeutic opportunities. *Journal of Pharmacy & Bioallied Science.* 2011;3(3):350-360.
12. Wagner JA, et al. CB(1) cannabinoid receptor antagonism promotes remodelling and cannabinoid treatment prevents endothelial dysfunction and hypotension in rats with myocardial infarction. *British Journal Pharmacology.* 2003;138:1251-1258.
13. Batkai S, et al. Cannabinoid antagonist SR-141716 inhibits endotoxic hypotension by a cardiac mechanism not involving CB1 or CB2 receptors. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology.* 2004;287(2):595-600.
14. Hepburn CY, et al. Cannabidiol as an antiarrhythmic, the role of the CB1 receptors. *Heart.* 2011;97(24):8.
15. Andrag E, Curtis MJ. Feasibility of targeting ischemia-related ventricular arrhythmias by mimicry of endogenous protection by endocannabinoids. *British Journal of Pharmacology.* 2013;169(8):1840-1848.
16. Hajrasouliha AR, et al. Endogenous cannabinoids contribute to remote ischemic preconditioning via cannabinoid CB2 receptors in the rat heart. *European Journal of Pharmacology.* 2007;579: 246-252.
17. Hosohata K, et al. AM630 is a competitive cannabinoid receptor antagonist in the guinea pig brain. *Life Sciences.* 1997;61(9):115-118.
18. Lan R, et al. Structure-activity relationships of pyrazole derivatives as cannabinoid receptor antagonists. *Journal of Medicinal Chemistry.* 1999;42:769-776.
19. Curtis MJ, et al. The Lambeth Conventions (II): Guidelines for the study of animal and human ventricular and supraventricular arrhythmias. *Pharmacology & Therapeutics.* 2013;139(2):213-248.
20. Lepran I, et al. Coronary artery ligation, early arrhythmias, and determination of the ischemic area in conscious rats. *Journal Pharmacological Methods.* 1983;9(3):219-230.
21. Bazett HC. An analysis of the time relationships of electrocardiograms. *Annals of Noninvasive Electrocardiology.* 2006;2(2):177-194.
22. Gulcu-Bulut N, et al. Pretreatment with stellate ganglion blockade before ischemia reduces infarct size in rat hearts. *Saudi Medical Journal.* 2010;31(2):148-152.
23. Rudz R, et al. Acute myocardial infarction inhibits the neurogenic tachycardic and vasopressor response in rats via presynaptic cannabinoid type 1 receptor. *Journal Pharmacol Experimental Therapeutics.* 2012;343:198-205.
24. Faber GM, Rudy Y. Calsequestrin mutation and catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia: A simulation study of cellular mechanism. *Cardiovasc Research.* 2007;75(1):79-88.
25. Oka S, et al. Identification of GPR55 as a lysophosphatidylinositol receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 2007;362:928-934.
26. Robertson-Gray OJ, et al. Exogenous lysophosphatidylinositol exacerbates myocardial tissue injury via a GPR55 dependent mechanism. *Heart.* 2014;100(4).
27. Ryberg E, et al. The orphan receptor GPR55 is a novel cannabinoid receptor. *British Journal of Pharmacology.* 2007;152(7):1092-2101.
28. Kalogeris T, et al. Cell biology of ischemia/reperfusion injury. *Int Rev Cell Mol Biol.* 2012;298:229-317.
29. Pogwizd SM, Corr PB. Electrophysiologic mechanisms underlying arrhythmias due to reperfusion of ischemic myocardium. *Circulation.* 1987;76(2):404-426.
30. Gonca E, Darici F. The effect of cannabidiol on ischemia/reperfusion-induced ventricular arrhythmias: The role of adenosine A1 receptors. *Journal of Cardiovascular Pharmacology and Therapeutics.* 2014;20(1):76-83.
31. Krylatov AV, et al. Activation of type II cannabinoid receptors improves myocardial tolerance to arrhythmogenic effects of coronary occlusion and reperfusion. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine.* 2001;131(6):523-525.
32. Lepicier P, et al. Endothelial CB1-receptors limit infarct size through NO formation in rat isolated hearts. *Life Science.* 2007;81:1373-1380.
33. Qian Li, et al. Electrophysiological effects of anandamide on rat myocardium. *British Journal Pharmacology.* 2009;158(8):2022-2029.
34. Farkas A, et al. Inadequate ischaemia-selectivity limits the antiarrhythmic efficacy of mibefradil during regional ischaemia and reperfusion in the rat isolated perfused heart. *Br J Pharmacol.* 1999;128(1):41-50.
35. Rees SA, Curtis MJ. Pharmacological analysis in rat of the role of the ATP-sensitive potassium channel as a potential target for antifibrillatory intervention in acute myocardial ischaemia. *J Cardiovasc Pharmacol.* 1995;26:280-288.
36. Rees SA, Curtis MJ. Which cardiac potassium channel subtype is the preferable target for suppression of ventricular arrhythmias? *Pharmacol Ther.* 1996;69:199-217.
37. Tamargo J, et al. Pharmacology of cardiac potassium channels. *Cardiovasc Research.* 2004;62(1):9-33.
38. Tsuchihashi K, Curtis MJ. Influence of tedisamil on the initiation and maintenance of ventricular fibrillation: Chemical defibrillation by Ito blockade? *J Cardiovasc Pharmacol.* 1991;18:445-456.
39. Wagner JA, et al. Hemodynamic effects of cannabinoids: Coronary and cerebral vasodilatation mediated by cannabinoid CB1 receptors. *European Journal Pharmacol.* 2001;423:203-210.
40. Pacher P, et al. Blood pressure regulation by endocannabinoids and their receptors. *Neuropharmacology.* 2005;48(8):1130-1138.