

УДК 577.21:616; 577.2:591.2

Л. Н. Маслов, А. В. Крылатов, О. В. Ласукова, И. Г. Халиулин

## КАННАБИНОИДЕРГИЧЕСКАЯ РЕГУЛЯЦИЯ СОКРАТИМОСТИ СЕРДЦА ПРИ ИШЕМИИ/РЕПЕРФУЗИИ

Авторы исследовали влияние селективных лигандов каннабиноидных (CB) рецепторов на сократимость изолированного перфузионного сердца крысы во время глобальной ишемии и реперфузии. Перфузия раствором, содержащим селективный CB-агонист HU-210, усугубляла реперфузионную сократительную дисфункцию сердца. Этот каннабиноид во время реперфузии уменьшал давление, развиваемое левым желудочком, максимальную скорость сокращения и расслабления сердца, но не оказывал эффекта на частоту сердечных сокращений и конечное диастолическое давление. Отрицательный инотропный эффект HU-210 был транзиторным и исчезал после 5-минутной реперфузии. Предварительное введение селективного агониста CB1 рецепторов SR141716A и селективного агониста CB2 рецепторов SR144528 не оказывает эффекта на сократимость миокарда во время реперфузии. Таким образом, настоящие результаты указывают, что стимуляция CB рецепторов может усугублять реперфузионную сократительную дисфункцию сердца. Эндогенные каннабиноиды не участвуют в сократительной дисфункции сердца во время ишемии/реперфузии сердца.

**Ключевые слова:** еаі іааәті еәдәтіндең одаеөзегі, SR141716A, SR144528, HU-210, миокард, сократимость, ишемия, реперфузия.

Общеизвестно, что ишемия и реперфузия приводят к развитию сократительной дисфункции миокарда [1], которая достаточно часто нивелирует положительный эффект тромболитической терапии у больных с острым инфарктом миокарда и осложняет течение послеоперационного периода у кардиохирургических больных [2]. Лекарственных средств, способных эффективно устранять и предупреждать появление этой грозной патологии, не существует. Во многом это может быть связано с недостаточностью наших знаний о патогенезе «реперфузионного оглушения» сердца. В частности, практически не изучена роль эндогенных каннабиноидов в механизме формирования сократительной дисфункции миокарда. Между тем литературные данные говорят о том, что агонисты каннабиноидных (CB) рецепторов могут оказывать отрицательный инотропный эффект как *in vitro* [3, 4], так и *in vivo* [5, 6] и, следовательно, могут участвовать в возникновении реперфузионного снижения сократимости миокарда.

Каннабиноидные рецепторы были открыты в ткани мозга крыс в 1998 г. [7]. Практически одновременно с открытием CB рецепторов были обнаружены эндогенные агонисты CB рецепторов: арахидонилэтаноламид (анан-дамид), 2-арахидонилглицерол и пальмитоилэтаноламид [8]. Установлено, что CB рецепторы делятся на два типа: CB1 и CB2 [7]. Каннабиноидные рецепторы относят к семейству трансмембранных G<sub>i/o</sub>-белок сопряженных рецепторов, активация которых способствует снижению активности аденилат-циклазы [9]. В миокарде CB рецепторы были идентифицированы А. Bonz и соавт. в 2003 г. [3]. Известно и то, что каннабиноиды оказывают гипотензивный и отрицательный хронотропный эффект при системном введении [5, 6]. Есть единичные работы, свидетельствующие о влиянии каннабиноидов на сократимость изолированного перфузионного сердца [3, 4,

10, 11]. Однако до настоящего времени нет единого мнения о роли этих соединений в регуляции инотропной функции сердца при ишемии/реперфузии.

Целью исследования явилось изучение роли каннабиноидных рецепторов в регуляции сократимости миокарда при ишемии/реперфузии.

### Методика

Исследования были проведены на изолированных сердцах крыс-самцов массой 250–300 г линии Вистар. После торакотомии сердце быстро извлекали, помещали в ванночку с охлажденным (+4 °C) раствором Кребса–Хензелайта. В восходящую дугу аорты вводили катетер, через которую поступал изотонический раствор. Ретроградную перфузию сердца проводили по методу Лангendorфа под постоянным давлением 55 мм рт. ст. раствором Кребса–Хензелайта, насыщенным карбогеном (+37 °C, pH 7.4) и содержащим (в мМ): NaCl – 120; KCl – 4.8; CaCl<sub>2</sub> – 2.0; MgSO<sub>4</sub> – 1.2; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> – 1.2; NaHCO<sub>3</sub> – 20.0; D-глюкоза – 10.0. Для приготовления этого раствора применялись реактивы компании «ICN Biomedicals» (Costa Mesa, США). Раствор Кребса–Хензелайта и все реактивы готовились на дейонизованной воде, которая подвергалась очистке на установке «Simplicity» компании Millipore (Millipore, Франция).

Для измерения параметров сократительной функции в полость левого желудочка вводили катетер с латексным баллончиком. Баллончик заполняли водой, устанавливая диастолическое давление в желудочке на уровне 10–15 мм рт. ст. Показателями насосной функции сердца служили: частота сердечных сокращений (ЧСС, уд./мин); давление, развиваемое левым желудочком (ДРЛЖ, мм рт. ст.); максимальная скорость сокращения (МСС, мм рт. ст./с); максимальная скорость расслабления (МСР, мм рт. ст./с). Давление, развиваемое левым желудочком, вычисляли как разницу между систолическим и конечным диасто-

лическим давлением (КДД, мм рт. ст.). В качестве блокаторов СВ рецепторов использовали: селективный антагонист СВ1 рецепторов SR141716A (N-[piperidin-1-yl]-1-[1,2-dichlorophenyl]-4-methyl-1H-pyrazole-3-сабоxamid HCl) [12] и селективный антагонист СВ2 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) [13]. Эти препараты растворяли в диметилсульфоксиде (DMSO) и после стабилизационного периода добавляли в перфузионный раствор в конечной концентрации 1 мкМ/л. Отдельно была проведена серия с DMSO, который добавляли в конечной концентрации не более 0.01 %. Оказалось, что DMSO в указанной концентрации не влияет на сократимость сердца. После 10-минутной перфузии сердца раствором Кребса–Хензелайта, содержащим один из антагонистов, регистрировали параметры сократимости. Антагонисты СВ рецепторов были синтезированы в Research Triangle Institute (Research Triangle Park, США). Активацию СВ-рецепторов проводили *in vitro* путем добавления в перфузионный раствор селективного агониста СВ рецепторов HU-210 ((6aR)-trans-3-(1,1-Dimethylheptyl)-6a,7,10,10a-tetrahydro-1-hydroxy-6,6-dimethyl-6H-dibenzo[b,d]пурин-9-methanol) в конечной концентрации 1 мкМ/л [14]. Препарат разводили в DMSO непосредственно перед экспериментом. После 20-минутной адаптации сердца перфузировали в течение 10 мин раствором Кребса–Хензелайта, содержащим HU-210, и 10 мин без препарата. Затем следовал 45-минутный период тотальной нормотермической ишемии и 30-минутной реперфузии. Контролем служили изолированные сердца крыс, которые перфузировали раствором Кребса–Хензелайта, содержащим DMSO в конечной концентрации не более 0.01 % по той же схеме, что и HU-210. Селективный агонист СВ рецепторов HU-210 был синтезирован компанией Tocris Cookson (Bristol, Великобритания).

Полученные данные обработаны статистически с применением t-критерия Стьюдента и критерия Манна–Уитни.

## Результаты исследования

В контрольной серии экспериментов возобновление коронарной перфузии после 45 мин тотальной ишемии приводило к развитию депрессии сократимости. Так, ЧСС, составляющая до моделирования тотальной ишемии 223±10 уд./мин, в период реперфузии снизилась в 1.5–2 раза (рис. 1, а). Bradикардия сохранялась до конца реоксигенации. Сила сокращений изолированного сердца в доишемическом периоде равнялась 80.4±4.2 мм рт. ст., на 5-й минуте реперфузии этот показатель достигал 30 % от исходного доишемического уровня (рис. 1, а). К концу реперфузионного периода давление, развиваемое левым же-лудочком, несколько возросло, составив 50 % от исходных значений (рис. 1, а).

Тотальная ишемия способствовала почти двукратному росту конечного диастолического давления по отношению к исходному уровню. После возобновления коронарной перфузии изолированного сердца наблюдалось увеличение КДД на всем протяжении реперфузионного периода (рис. 1, а). Максимальная скорость сокращения в начале реперфузии снизилась в среднем в 3.5 раза по отношению к доишемическим значениям этого показателя ( $31.4\pm2.2$  мм рт. ст./с). К концу 30-й минуты реперфузии этот показатель составлял 50 % от исходных доишемических значений (рис. 2, а). Изменения максимальной скорости расслабления были аналогичны изменениям скорости сокращения (рис. 2, а).

Применение селективного агониста СВ рецепторов HU-210 (1 мкМ) не влияло на частоту сокращений изолированного сердца в период постишемической реперфузии (рис. 1, а). Динамика ЧСС в этой серии опытов статистически достоверно не отличалась от соответствующих изменений данного показателя в контроле (рис. 1, а). В ответ на активацию каннабиноидных рецепторов достоверных изменений КДД в реперфузионном периоде по отношению к контролю также не наблюдалось (рис. 1, а). В то же время предварительная активация СВ рецепторов сопровождалась кратковременным угнетением сократимости изолированного сердца в реперфузионном периоде с последующим восстановлением этого параметра до соответствующих контрольных величин (рис. 1, а).

Так, на 5-й минуте реперфузии ДРЛЖ оказалось в 1.5 раза ниже аналогичных значений в контроле, а к 15-й и 30-й минутам сила сокращений изолированного сердца возросла до соответствующих значений контрольной серии (рис. 1, а). Кроме того, в ответ на активацию каннабиноидных рецепторов отмечалось и более медленное восстановление скорости сокращений по сравнению с контролем. Так, на 5-й минуте реперфузии этот параметр был в 2 раза ниже, чем в контроле (рис. 2, а), к концу эксперимента скорость сокращения увеличилась до соответствующих показателей в контроле (рис. 2, а). Динамика скорости расслабления в этой серии опытов была аналогичной изменениям скорости сокращений (рис. 2, а). В начале реперфузии, на 5-й минуте, МСР была в 1.5 раза меньше, чем в контроле, но уже к 15-й и 30-й минутам произошло увеличение скорости расслабления до контрольных значений (рис. 2, а).

Следующей задачей данного исследования было изучение вклада эндогенных агонистов СВ рецепторов в регуляцию инотропной функции сердца в условиях ишемии и последующей реперфузии.

В ходе экспериментов было установлено, что на фоне предварительной блокады СВ1 рецепторов с помощью SR141716A (1 мкМ) достоверных изменений частоты и силы сердечных сокращений изолированного сердца в постишемический период не происходит. Динамика этих показателей на всем протяжении

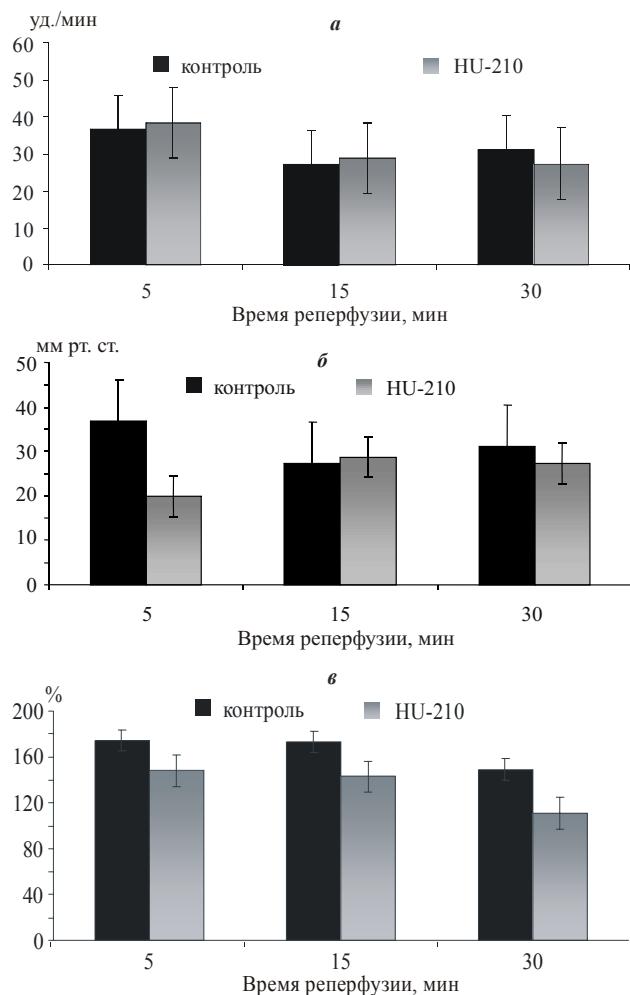


Рис. 1. Влияние селективного агониста каннабиноидных рецепторов HU-210 (1 мкМ) на частоту сердечных сокращений (а), давление, развиваемое левым желудочком (б), конечное диастолическое давление (в) в период 30-минутной постишемической реперфузии. \* – P<0.05 по сравнению с контролем.

реперфузии остается такой же, как и в контрольной серии экспериментов (рис. 3, *а*–*д*). Применение SR141716A (1 мкМ) не привело к каким-либо заметным, в сравнении с этим же показателем в контроле, изменениям КДД (рис. 3, *а*). В проведенных экспериментах нами не было обнаружено и достоверных изменений скоростей сокращения и расслабления по отношению к контролю (рис. 2).

Блокада CB2 рецепторов путем 10-минутной перфузии изолированного сердца раствором, содержащим SR144528 в конечной концентрации 1 мкМ, также не выявила достоверных изменений частоты и силы сердечных сокращений в сравнении с аналогичными показателями в контроле на всем протяжении 30-минутной реперфузии (рис. 3, *а*). Как видим, динамика ЧСС и ДРЛЖ в этой серии экспериментов оказалась такой же, как в контроле. Изменения КДД на фоне блокады CB2 рецепторов были также аналогичными динамике этого параметра в контроле (рис. 3). Скорости сокращения и расслабления также не отличались

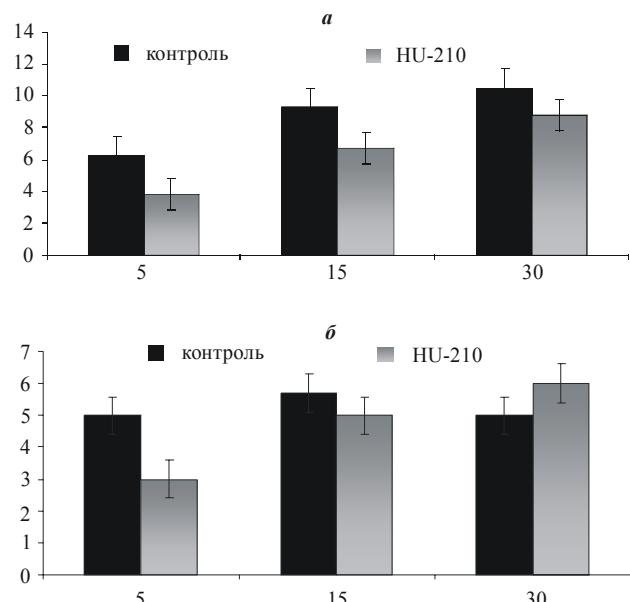


Рис. 2. Влияние селективного агониста каннабиноидных рецепторов HU-210 (1 мкМ) на максимальную скорость сокращения (а) и максимальную скорость расслабления (б) изолированного сердца крыс в период 30-минутной постишемической реперфузии. \* – P<0.05 по сравнению с контролем

лись от соответствующих показателей контрольной серии на всем протяжении реперфузионного периода (рис. 4).

#### Обсуждение результатов

Таким образом, результаты проведенных нами экспериментов указывают на то, что стимуляция каннабиноидных рецепторов миокарда сопровождается снижением ДРЛЖ, скорости сокращения и расслабления левого желудочка во время реперфузии. Следовательно, есть веские основания полагать, что активация CB рецепторов усугубляет реперфузионную сократительную дисфункцию сердца. Этот отрицательный инотропный эффект носит транзиторный характер, поскольку уже к 15-й минуте реоксигенации наблюдается восстановление этих показателей. Мы полагаем, что переходящий характер инотропного эффекта HU-210 связан с диссоциацией комплекса HU-210-CB рецептор или с десенсилизацией CB рецепторов, поэтому отрицательное инотропное действие HU-210, отмеченное в условиях нормоксии, ослабевает к 15-й минуте реперфузионного периода. Наши данные согласуются с результатами W. R. Ford и соавт. [4]. Эти исследователи установили, что активация CB рецепторов приводит к снижению силы и скорости сердечных сокращений интактного изолированного сердца крысы [4]. Результаты нашей работы позволяют утверждать, что отрицательное инотропное действие каннабиноидов сохраняется и в условиях возобновления коронарной перфузии.

Мы полагаем, что в реализации инотропных эффектов агониста CB рецепторов принимает участие цАМФ. Основанием для подобного предположения

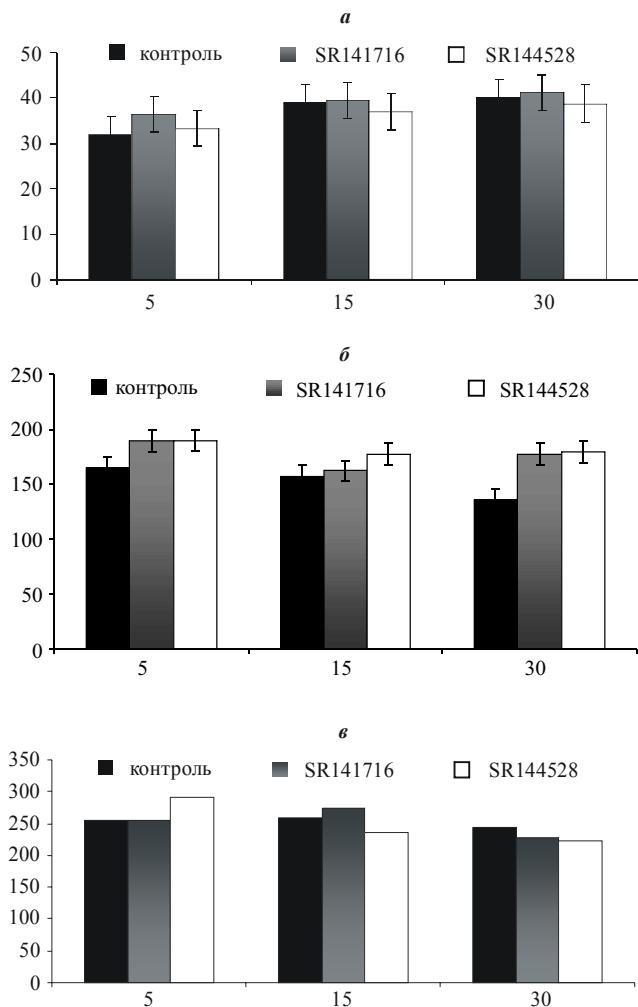


Рис. 3. Влияние антагонистов каннабиноидных рецепторов SR141716 и SR144528 (1мкМ) на частоту сердечных сокращений (а), давление развиваемое левым желудочком (б), конечное диастолическое давление (в) в период 30-минутной постишемической реперфузии. Пунктирной линией обозначены значения в контроле до ишемии

явились данные ряда авторов о дозозависимом ингибировании синтеза цАМФ в клетке в ответ на стимуляцию СВ рецепторов [9]. Кроме того, существуют публикации о том, что 8-бром-цАМФ (синтетический энзимо-устойчивый аналог цАМФ) увеличивает силу сокращений изолированной папиллярной мышцы морской свинки, а также ускоряет ее сокращение и расслабление [15]. Следовательно, можно предположить, что падение силы сокращений, уменьшение скорости сокращения и расслабления сердца в ответ

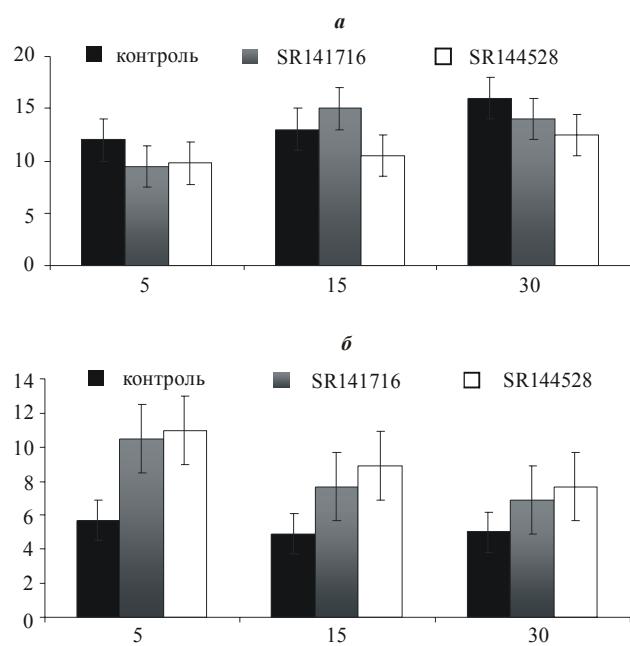


Рис. 4. Влияние селективного агониста каннабиноидных рецепторов SR141716 и SR144528 (1мкМ) на максимальную скорость сокращения (а) и максимальную скорость расслабления (б) изолированного сердца крыс в период 30-минутной постишемической реперфузии. Пунктирной линией обозначены значения в контроле до ишемии

на стимуляцию каннабиноидных рецепторов является результатом снижения продукции цАМФ

Нами было установлено, что на фоне предварительной селективной блокады CB1 рецепторов с достоверных изменений частоты и силы сердечных сокращений изолированного сердца в постишемический период не происходит. Селективная блокада CB2 рецепторов также не вызвала достоверных изменений ЧСС и силы сердечных сокращений. Следовательно, нарушение насосной функции сердца *in vitro* в реперфузионном периоде также не связано с активацией CB1 или CB2 рецепторов эндогенными каннабиноидами.

Таким образом, стимуляция СВ рецепторов *in vitro* усугубляет нарушения сократимости сердца при ишемии/реперфузии. Эндогенные каннабиноиды не участвуют в формировании реперфузионной сократительной дисфункции изолированного перфузируемого миокарда.

Đâáí ò à áû i íééíá íðè í iáäååðæ êå áðàíò à í è íé-  
 ñòåðñòåà íáðàç íâåíèÿ è íàöêè ĐÔ (đåå. <sup>1</sup> 2.1.1/530)  
 Đîññèéñéíâåò í iáðàç íâåíèÿ è íàöêè ĐÔ (đåå. <sup>1</sup> 2.1.1/530)  
 Ôåäååðåëüí íâåò áååí òñòååà í iáðàç íâåíèÿ è íàöêè ĐÔ (đåå. <sup>1</sup> 2.1.1/530)

## Литература

1. Литвицкий П. Ф. Патогенетические и адаптивные изменения в сердце при его региональной ишемии и последующем возобновлении коронарного кровотока // Пат. физ. эксперим. тер. 2002. № 2. С. 2–12.
  2. Дебейки М. А., Готто А. М. Новая жизнь сердца / Пер. с англ. под ред. Р. С. Акчурина. М., 1998. 500 с.
  3. Bonz A., Laser M., Kullmer S. et al. Cannabinoids acting on CB1 receptors decrease contractile performance in human atrial muscle // J. Cardiovasc. Pharmacol. 2003, V. 41, N 4, P. 657–664.

4. Ford W. R., Honan S. A., White R., Hiley C.R. Evidence of a novel site mediating anandamide-induced negative inotropic and coronary vasodilatator responses in rat isolated hearts // Br. J. Pharmacol. 2002. V. 135. P. 1191–1198.
5. Cavero I., Lokhandwala M. F., Buckley J. P., Jandhyala B. S. The effect of (-)-Д<sup>9</sup>-trans-tetrahydrocannabinol on myocardial contractility and venous return in anaesthetized dogs // Eur. J. Pharmacol. 1974. V. 29. N 1. P. 74–82.
6. Vidrio H. et al. Cardiovascular effects of (-)-11-OH-D<sup>8</sup>-tetrahydrocannabinol-dimethylheptyl in rats // J. Cardiovasc. Pharmacol. 1996. V. 28. P. 332–336.
7. Howlett A. C., Barth F., Bonner T. I. et al. International Union of Pharmacology. XXVII. Classification of cannabinoid receptors // Pharmacol. Rev. 2002. V. 54. N 2. P. 161–202.
8. Felder C. C., Veluz J. S., Williams H. L. et al. Cannabinoid agonists stimulate both receptor- and non-receptor-mediated signal transduction pathways in cells transfected with and expressing cannabinoid receptor clones // Mol. Pharmacol. 1992. V. 42. P. 838–845.
9. Howlett A. C., Champion T. M., Wilker G. H., Mechoulam R. Stereochemical effects of 11-OH-Д<sup>8</sup>-tetrahydrocannabinol-dimethylheptyl to inhibit adenylate cyclase and bind to the cannabinoid receptor // Neuropharmacology. 1990. V. 29. P. 161–165.
10. Li D. M. F. The lack of β-adrenoceptor involvement in the cardiac action of Δ<sup>1</sup>-tetrahydrocannabinol in rats // Clin. Exp. Pharmacol. Physiol. 1980. V. 7. P. 23–29.
11. Smiley K. A. et al. Effects of cannabinoids on the perfused rat heart // Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol. 1976. V. 14. P. 659–675.
12. Mansbach R. S., Rovertti 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. V. 124. P. 315–322.
13. Bouaboula M., Desnoyer N., Carayon P. et al. G<sub>i</sub> protein modulation induced by a selective inverse agonist for the peripheral cannabinoid receptor CB2: Implication for intracellular signalization cross-regulation // Mol. Pharmacol. 1999. V. 55. P. 473–480.
14. Mechoulam R., Feigenbaum J. J., Lander N. et al. Enantiomeric cannabinoids: Stereospecificity of psychotropic activity // Experientia. 1990. V. 44. P. 762–764.
15. Korth M., Engels J. Inotropic and electrophysiological effects of 8-substituted cyclic AMP analogues on guinea-pig papillary muscle // Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 1987. V. 335. P. 77–85.

Маслов Л. Н., доктор медицинских наук, профессор

**НИИ кардиологии ТНЦ СО РАМН**

ул. Киевская, 111, г. Томск, Россия, 634012.

E-mail: maslov@cardio.tsu.ru

Крылатов А. В., кандидат медицинских наук

**НИИ кардиологии ТНЦ СО РАМН**

ул. Киевская, 111, г. Томск, Россия, 634012.

E-mail: maslov@cardio.tsu.ru

Ласукова О. В., младший научный сотрудник

**НИИ кардиологии ТНЦ СО РАМН**

ул. Киевская, 111, г. Томск, Россия, 634012.

E-mail: maslov@cardio.tsu.ru

Халиулин И. Г., кандидат медицинских наук

**University of Bristol**

University Walk, Bristol, BS8 1TD UK.

E-mail: I.Khaliulin@bristol.ac.uk

Ìàðåðèëå ìîñðôïèë â ðåãàëëþ 12.01.2009

*L. N. Maslov, A. V. Krylatov, O. V. Lasukova, I. G. Khaliulin*

## CANNABINOIDERGIC REGULATION OF CARDIAC CONTRACTILITY DURING ISCHEMIA/REPERFUSION

Authors studied an impact of selective ligands of cannabinoid (CB) receptors on the contractility of the isolated perfused rat heart during global ischemia and reperfusion. A perfusion by solution containing the selective CB-agonist HU-210 exacerbated a cardiac contractility dysfunction. This cannabinoid decreased the left ventricular developed pressure, the maximal rate of contraction and relaxation of the heart during reperfusion but had no effect on the heart rate and the end diastolic pressure. Negative inotropic effect of HU-210 was transient and disappeared after 5 min reperfusion. The pretreatment with the selective CB1 receptor antagonist SR141716A and the selective CB2 receptor antagonist SR144528 had no effect on the myocardial contractility during reperfusion. In conclusion, the present results indicate that CB receptor stimulation can exacerbate reperfusion contractility dysfunction of the heart. Endogenous cannabinoids are not involved in the development of myocardial contractility dysfunction during ischemia/reperfusion of the heart.

**Key words:** cannabinoid receptors, cardiac contractility, ischemia, reperfusion, isolated heart.

Maslov L. N.

**SI RI for cardiology TSC SB RAMS**

st. Kievskaya, 111a, Tomsk, Russia, 634012.

E-mail: maslov@cardio.tsu.ru

Krylatov A. V.

**SI RI for cardiology TSC SB RAMS**

st. Kievskaya, 111a, Tomsk, Russia, 634012.

E-mail: maslov@cardio.tsu.ru

Lasukova O.V.

**SI RI for cardiology TSC SB RAMS**

st. Kievskaya, 111a, Tomsk, Russia, 634012.

E-mail: maslov@cardio.tsu.ru

Khaliulin I. G.

**University of Bristol**

University Walk, Bristol, BS8 1TD UK.

E-mail: I.Khaliulin@bristol.ac.uk