

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 (СВ) рецепторов на сократимость изолированного перфузируемого сердца крысы во время глобальной ишемии и реперфузии. Перфузия раствором, содержащим селективный СВ-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 СВ1 рецепторов SR141716А и селективного агониста СВ2 рецепторов SR144528 не оказывает эффекта на сократимость миокарда во время реперфузии. Таким образом, настоящие результаты указывают, что стимуляция СВ рецепторов может усугублять реперфузионную сократительную дисфункцию сердца. Эндogenous каннабиноиды не участвуют сократительной дисфункции сердца во время ишемии/реперфузии сердца.

Ключевые слова: èàííäèéííèèäíá äááòí ò íäú, ñíèäð ò è í ñ ò ù ñäðäò, è ò á í èý, äàíäð ò óçèý, èçíèèäíäàíííá ñäðäò.

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 (СВ) 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 СВ рецепторов были обнаружены эндогенные агонисты СВ рецепторов: арахидонилэтаноламид (анан-дамид), 2-арахидонилглицерол и пальмитоилэтаноламид [8]. Установлено, что СВ рецепторы делятся на два типа: СВ1 и СВ2 [7]. Каннабиноидные рецепторы относят к семейству трансмембранных G₁₀-белок сопряженных рецепторов, активация которых способствует снижению активности аденилат-циклазы [9]. В миокарде СВ 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 перфузируемого 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 °С) раствором Кребса–Хензелейта. В восходящую дугу аорты вводили канюлю, через которую поступал изотонический раствор. Ретроградную перфузию сердца проводили по методу Лангендорфа под постоянным давлением 55 мм рт. ст. раствором Кребса–Хензелейта, насыщенным карбогеном (+37 °С, pH 7.4) и содержащим (в mM): NaCl – 120; KCl – 4.8; CaCl₂ – 2.0; MgSO₄ – 1.2; KH₂PO₄ – 1.2; NaHCO₃ – 20.0; D-глюкоза – 10.0. Для приготовления этого раствора применялись реактивы компании «ICN Biomedicals» (Costa Mesa, США). Раствор Кребса–Хензелейта и все реактивы готовились на деионизованной 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-carboxamid 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–Хензеляйта, 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]pyran-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–Хензеляйта, 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–Хензеляйта, 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, *à*). Брадикардия 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, *á*). К концу реперфузионного периода давление, развиваемое левым желудочком, несколько возросло, составив 50 % от исходных значений (рис. 1, *á*).

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, *à*). Максимальная скорость сокращения в начале реперфузии снизилась в среднем в 3.5 раза по отношению к доишемическим значениям этого показателя (31.4±2.2 мм рт. ст./с). К концу 30-й минуты реперфузии этот показатель составлял 50 % от исходных доишемических значений (рис. 2, *à*). Изменения максимальной скорости расслабления были аналогичны изменениям скорости сокращения (рис. 2, *á*).

Применение селективного агониста СВ рецепторов HU-210 (1 мкМ) не влияло на частоту сокращений изолированного сердца в период постишемической реперфузии (рис. 1, *à*). Динамика ЧСС в этой серии опытов статистически достоверно не отличалась от соответствующих изменений данного показателя в контроле (рис. 1, *à*). В ответ на активацию каннабиноидных рецепторов достоверных изменений КДД в реперфузионном периоде по отношению к контролю также не наблюдалось (рис. 1, *á*). 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, *á*).

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, *á*). 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, *á*), к концу эксперимента скорость сокращения увеличилась до соответствующих показателей в контроле (рис. 2, *á*). Динамика скорости расслабления в этой серии опытов была аналогичной изменениям скорости сокращений (рис. 2, *à*). 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, *à*).

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

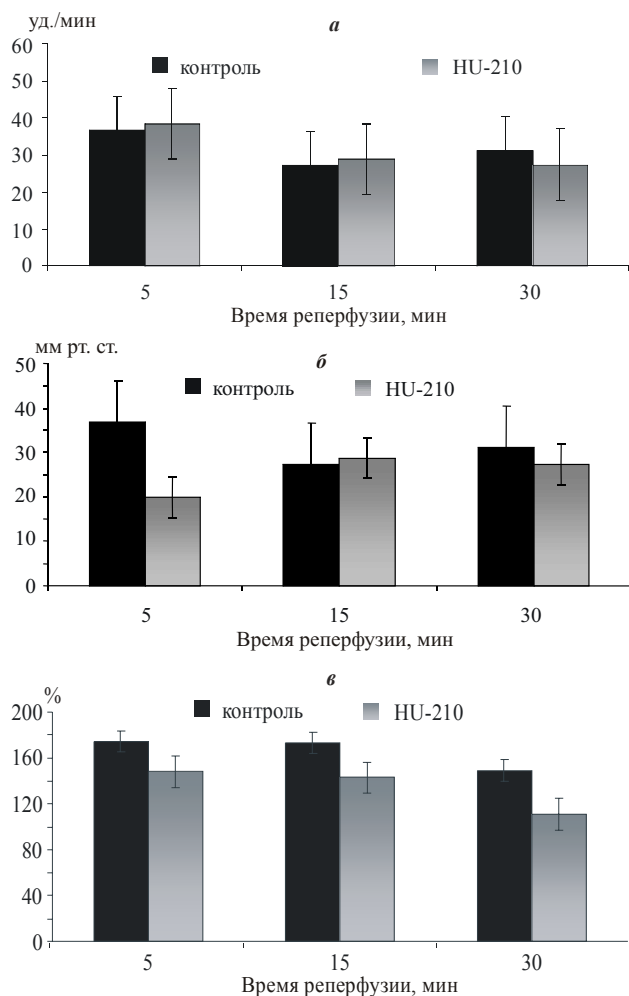


Рис. 1. Влияние селективного агониста каннабиноидных рецепторов HU-210 (1 мкМ) на частоту сердечных сокращений (а), давление, развиваемое левым желудочком (б), конечное диастолическое давление (в) в период 30-минутной постишемической реперфузии. * – $P < 0.05$ по сравнению с контролем.

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

Блокада СВ2 рецепторов путем 10-минутной реперфузии 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, δ). Как видим, динамика ЧСС и ДРЛЖ в этой серии экспериментов оказалась такой же, как в контроле. Изменения КДД на фоне блокады СВ2 рецепторов были также аналогичными динамике этого параметра в контроле (рис. 3). Скорости сокращения и расслабления также не отлича-

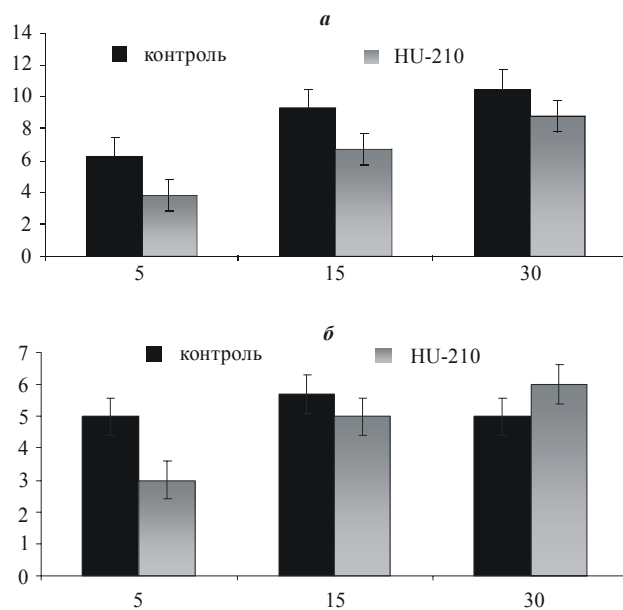


Рис. 2. Влияние селективного агониста каннабиноидных рецепторов HU-210 (1 мкМ) на максимальную скорость сокращения (а) и максимальную скорость расслабления (б) изолированного сердца крысы в период 30-минутной постишемической реперфузии. * – $P < 0.05$ по сравнению с контролем

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 ДЛРЖ, скорости сокращения и расслабления левого желудочка во время реперфузии. Следовательно, есть веские основания полагать, что активация СВ 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 преходящий характер инотропного эффекта HU-210 связан с диссоциацией комплекса HU-210-СВ рецептор или с десенситизацией СВ 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 СВ 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 СВ рецепторов принимает участие цАМФ. Основанием для подобного предположения

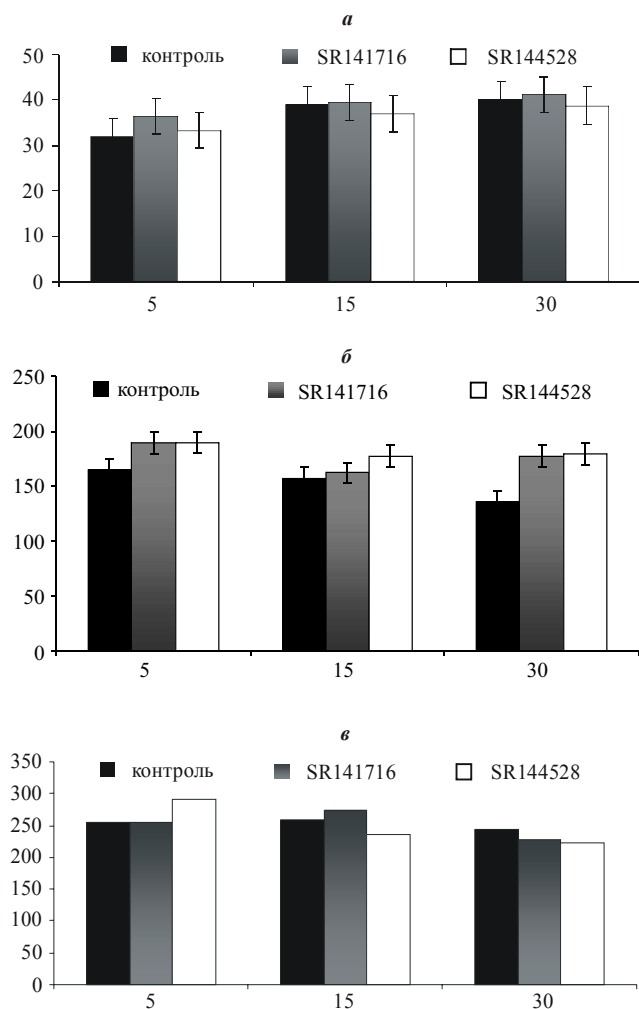


Рис. 3. Влияние антагонистов каннабиноидных рецепторов SR141716 и SR144528 (1мкМ) на частоту сердечных сокращений (а), давление развиваемое левым желудочком (б), конечное диастолическое давление (в) в период 30-минутной постишемической реперфузии. Пунктирной линией обозначены значения в контроле до ишемии

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 энзим-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

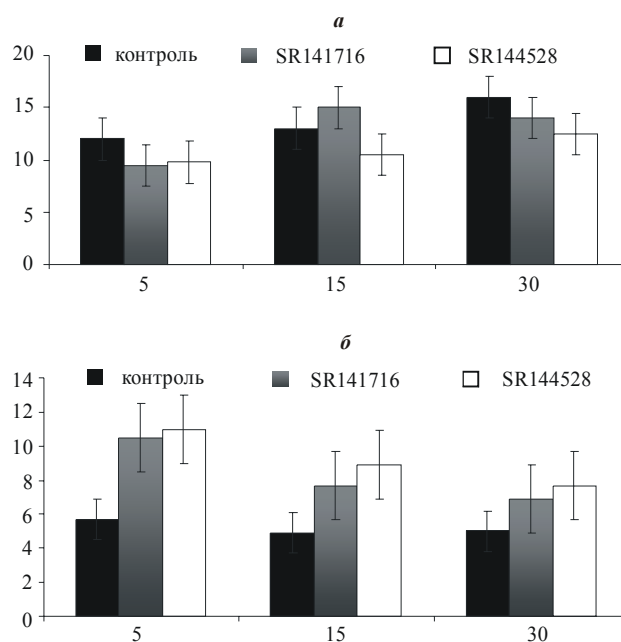


Рис. 4. Влияние селективного агониста каннабиноидных рецепторов SR141716 и SR144528 (1мкМ) на максимальную скорость сокращения (а) и максимальную скорость расслабления (б) изолированного сердца крыс в период 30-минутной постишемической реперфузии. Пунктирной линией обозначены значения в контроле до ишемии

на стимуляцию каннабиноидных рецепторов является результатом снижения продукции цАМФ.

Нами было установлено, что на фоне предварительной селективной блокады СВ1 рецепторов с достоверных изменений частоты и силы сердечных сокращений изолированного сердца в постишемический период не происходит. Селективная блокада СВ2 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 СВ1 или СВ2 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.

*Ἐπιπλέον, ἡ ἐπιλεκτικὴ ἐπιβλοκὰ τῶν CB1 ὑποδοχέων προκαλεῖται ἀλλαγὴ ἐν τῇ ἐπιπέδῳ τῆς αἰχμῆς τοῦ cAMP ἐν τῇ καρδίᾳ. Ἡ ἐπιλεκτικὴ ἐπιβλοκὰ τῶν CB2 ὑποδοχέων οὐ προκαλεῖται ἀλλαγὴ ἐν τῇ ἐπιπέδῳ τῆς αἰχμῆς τοῦ cAMP καὶ τῇ ἐπιπέδῳ τῆς δύναμης τῶν καρδιακῶν συστολῶν. Ἐπομένως, ἡ ἐπιβλοκὰ τῆς λειτουργίας τῆς καρδίας *in vitro* ἐν τῷ ἐπιπέδῳ τῆς αἰχμῆς τοῦ cAMP οὐ συνδέεται μετὰ τὴν ἐπιβλοκὰν τῶν CB1 ἢ CB2 ὑποδοχέων ἐνδογενῶν κανναβινοειδῶν.*

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.

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