



Lishmanov, Y. B., Maslov, L. N., Krylatov, A. V., & Khaliulin, I. (2017). ИМИТАЦИЯ ФЕНОМЕНА ИШЕМИЧЕСКОГО ПРЕКОНДИЦИОНИРОВАНИЯ ЧЕРЕЗ ВОЗДЕЙСТВИЕ НА КАННАБИНОИДНЫЕ РЕЦЕПТОРЫ: РОЛЬ ПРОТЕИИНАЗЫ С И NO-СИНТАЗЫ. *Neuroscience and Behavioral Physiology*, 47(1), 25-32. <https://doi.org/10.1007/s11055-016-0362-2>

Peer reviewed version

Link to published version (if available):  
[10.1007/s11055-016-0362-2](https://doi.org/10.1007/s11055-016-0362-2)

[Link to publication record on the Bristol Research Portal](#)  
PDF-document

This is the author accepted manuscript (AAM). The final published version (version of record) is available online via Springer at <https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs11055-016-0362-2> . Please refer to any applicable terms of use of the publisher.

## University of Bristol – Bristol Research Portal

### General rights

This document is made available in accordance with publisher policies. Please cite only the published version using the reference above. Full terms of use are available: <http://www.bristol.ac.uk/red/research-policy/pure/user-guides/brp-terms/>

ИМИТАЦИЯ ФЕНОМЕНА ИШЕМИЧЕСКОГО ПРЕКОНДИЦИОНИРОВАНИЯ ЧЕРЕЗ ВОЗДЕЙСТВИЕ НА КАННАБИНОИДНЫЕ РЕЦЕПТОРЫ: РОЛЬ ПРОТЕИНКИНАЗЫ C И NO-СИНТАЗЫ

Ю.Б. Лишманов<sup>1</sup>, Л.Н. Маслов<sup>1</sup>, А.В. Крылатов<sup>1</sup>, И.Г. Халиулин<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Федеральное государственное бюджетное учреждение «НИИ кардиологии», 634012 Томск, ул. Киевская 111А, Россия; <sup>2</sup>Университет Бристоля, Бристоль, Великобритания  
Email: maslov@cardio.tsu.ru

**Резюме.** Установлено, что стимуляция СВ1-рецепторов имитирует феномен прекондиционирования. Поскольку кардиопротекторный эффект каннабиноида HU-210 отмечается как в экспериментах *in vivo*, так и в опытах *in vitro*, есть основания полагать, что защитный эффект HU-210 опосредован через активацию кардиальных СВ1-рецепторов. Установлено, что кардиопротекторный эффект каннабиноида HU-210 связан со стимуляцией протеинкиназы C, в то время как NO-синтаза не участвует в защитном действии стимуляции СВ1-рецепторов.

**Ключевые слова:** сердце, ишемия, реперфузия, прекондиционирование, каннабиноиды, протеинкиназа C, NO-синтаза

MIMICKING ISCHEMIC PRECONDITIONING PHENOMENON THROUGH THE IMPACT ON THE CANNABINOID RECEPTORS: ROLE OF PROTEIN KINASE C AND NO-SYNTHASE

Yu.B. Lishmanov<sup>1</sup>, L.N. Maslov<sup>1</sup>, A.V. Krylatov<sup>1</sup>, I.G. Khaliulin<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Federal State Budgetary Scientific Institution «Research Institute for Cardiology», ul. Kievskaya 111A, 634012 Tomsk; <sup>3</sup>University of Bristol, Bristol, UK;

It was established that CB1-receptors stimulation mimic preconditioning phenomena. Since cardioprotective effect of cannabinoid HU-210 is occurred both in the experiments *in vivo* and in the experiments *in vitro* there are reasons to believe that protective effect of HU-210 is mediated via an activation of cardiac CB1-receptors. It is established that cardioprotective effect of cannabinoid HU-210 is depend upon a stimulation of protein kinase C whereas NO-synthase are not involved in protective impact of CB1-receptor stimulation.

**Key words:** heart, ischemia, reperfusion, preconditioning, cannabinoids, protein kinase C, NO-synthase

Известно, что единственным эффективным методом лечения острого инфаркта миокарда является восстановление коронарной перфузии в бассейне инфаркт-связанной коро-

нарной артерии [5, 8, 10]. Без реканализации этой артерии добиться ограничения размера инфаркта миокарда невозможно. К сожалению, ишемические и реперфузионные повреждения сердца развиваются очень быстро. Так, по данным нашей лаборатории, обширный очаг некроза у крыс возникает уже после 20-минутной коронароокклюзии и 3-часовой реперфузии [9]. В данной ситуации важно выиграть время и не допустить возникновения необратимых повреждений кардиомиоцитов до момента возобновления коронарного кровотока, поэтому неоценимую помощь в борьбе с острым инфарктом миокарда могли бы оказать фармакологические и немедикаментозные воздействия, направленные на повышение толерантности сердца к действию ишемии-реперфузии.

Одним из таких воздействий является открытый в 1986 г С.Е. Murry и соавт. [[../Users/maslov/sites/entrez24](http://..../Users/maslov/sites/entrez24)] феномен, названный «ишемическим прекондиционированием» (ИП, ischemic preconditioning). Суть этого феномена сводится к тому, что после 1–3 сеансов кратковременной ишемии и реперфузии миокард становится более устойчивым к действию длительной ишемии и реперфузии [24]. Кардиопротекторный эффект ИП сохраняется в эксперименте около 3 ч [7, 31]. Подобное прекондиционирование называют «ранним» или «классическим». «Золотым стандартом» прекондиционирования является уменьшение индекса «зона инфаркта/область риска» (ЗИ/ОР). Областью риска принято называть зону ишемии. К сожалению, прекондиционирование провоцирует возникновение желудочковых аритмий [22, [../Users/maslov/sites/entrez24](http://..../Users/maslov/sites/entrez24)], поэтому в настоящее время большое внимание уделяется поиску фармакологических агентов, имитирующих феномен ИП, но не вызывающих нарушений сердечного ритма [6]. Согласно нашим предварительным данным [1], таким препаратом может быть агонист каннабиноидных (СВ) рецепторов HU-210 [(6aR)-trans-3-(Dimethylheptyl)-6a,7,10,10a-tetrahydro-1-hydroxy-6,6-dimethyl-6H-dibenzo [b,d]pyran-9-methanol]. Мы предположили, что имитация феномена ИП под влиянием HU-210 происходит за счет стимуляции СВ-рецепторов и повышения активности протеинкиназы С и NO-синтазы, которые являются звеньями сигнального механизма прекондиционирования [7, 31].

Цель работы: изучить роль каннабиноидных рецепторов, протеинкиназы С и NO-синтазы в механизме HU-210-индуцированного повышения устойчивости сердца к действию ишемии и реперфузии.

## МЕТОДИКА

*Эксперименты in vivo* были проведены на крысах-самцах линии Вистар массой 250–300 г, наркотизированных с помощью внутрибрюшинного введения  $\alpha$ -хлоралозы в дозе 50 мг/кг. В ходе эксперимента осуществляли искусственную вентиляцию лёгких с

помощью модифицированного аппарата РО-6 предприятия «Красногвардеец» (Петербург, Россия). Правую сонную артерию канюлировали для измерения артериального давления (АД), которое регистрировали с помощью датчика давления SS13L «Biopac System Inc.» (Goleta, Калифорния, США), сопряженного с аппаратом для электрофизиологических исследований MP35 компании «Biopac System Inc.» (Goleta, США). Этот же аппарат использовали и для записи ЭКГ. Количественную обработку полученных данных осуществляли с помощью программного обеспечения INSTBSL-W компании «Biopac System Inc.» (Goleta, США).

Коронароокклюзию (45 мин) и реперфузию (2 ч) воспроизводили, используя технику, описанную ранее J.E. Schultz и соавт. [27]. Измерение очага инфаркта осуществляли, как предложено J.E. Schultz и соавт. [27]. После каждого эксперимента производили реокклюзию левой коронарной артерии и вводили внутривенно 10% раствор красителя Patent blue violet в дозе 40 мг/кг для окрашивания области левого желудочка с нормальным кровотоком. Крыс умертвляли с помощью инъекции 15% KCl. Сердце иссекали, выделяли левый желудочек и делали шесть поперечных срезов толщиной примерно в 1 мм. Эта процедура позволяла визуализировать неишемизированную область и область риска. Зону риска отделяли от интактного миокарда. Эту зону инкубировали 15 мин с 0,1% раствором нитротетразолия синего (НТС) в 100 мМ фосфатном буфере (pH = 7,4, +37°C). Краситель НТС является индикатором жизнеспособной и нежизнеспособной ткани. Он быстро восстанавливается дегидрогеназами, которые присутствуют в живом миокарде, поэтому ткань окрашивается в серебристый цвет. Поскольку нежизнеспособный, инфарцированный миокард не содержит дегидрогеназ, ткань сохраняет бледно-розовую окраску. Зону инфаркта ЗИ и ОР оценивали гравиметрически. Затем ЗИ рассчитывали в процентах от ОР (ЗИ/ОР) и в процентах от массы левого желудочка (ЗИ/ЛЖ). ЭКГ записывали в течение 45 мин ишемии и первых 10 мин реперфузии.

В работе был использован агонист CB1- и CB2-рецепторов HU-210 [25], который вводили внутривенно в дозе 0,1 мг/кг за 15 мин до коронароокклюзии. При выборе дозы препарата мы ориентировались на наши ранее опубликованные данные [1]. Антагонист CB1-рецепторов SR141716A (N-[piperidin-1-yl]-1-[1,2-dichlorophenyl]-4-methyl-1H-pyrazole-3-carboxamid HCl) вводили внутривенно в дозе 1 мг/кг за 25 мин до коронароокклюзии [13, 21]. Антагонист CB2-рецепторов SR144528 (N-(1S)-endo-1,3,3-trimethylbicyclo[2.2.1]hepta-2-yl]-5-(4-chloro-3-methylphenyl)-1-(4-methyl-benzyl)-pyrazole-3-carboxamide) вводили внутривенно в дозе 1 мг/кг за 25 мин до коронароокклюзии [18]. Ингибитор протеинкиназы С (ПКС) хелеритрин применяли в дозе 5 мг/кг за 25 мин до корона-

роокклюзии [17]. Ингибитор NO-синтазы L-NAME (N<sup>G</sup>-Nitro-L-Arginine methyl ester) вводили внутривенно в дозе 10 мг/кг за 25 мин до коронароокклюзии [15].

Хелеритрин был плохо растворим в воде при комнатной температуре, поэтому препарат растворяли в тёплом (+55°C) физиологическом растворе, а затем охлаждали раствор до +37°C. Каннабиноид HU-210, SR141716A и SR144528 растворяли в смеси Cremaphor EL/этанол/0,9%NaCl (1:1:18) [30]. Препарат L-NAME растворяли в физиологическом растворе. Все растворы готовили непосредственно перед использованием

*Эксперименты in vitro* проведены на изолированных сердцах крыс-самцов линии Вистар массой 250–300 г, наркотизированных этиловым эфиром. После извлечения сердца из грудной клетки его быстро переносили в ванночку с охлажденным до +4°C раствором Кребса-Хензеляйта до прекращения спонтанных сокращений. Затем в восходящую дугу аорты вводили канюлю, через которую выполняли ретроградную перфузию сердца раствором Кребса-Хензеляйта по методу Лангендорфа. Для приготовления оксигенированного перфузионного раствора (37°C, pH 7.4), содержащего (в mM): 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; глюкоза – 10,0, применяли реактивы компании «MP Biomedicals» (Ирвин, США). Раствор Кребса-Хензеляйта готовили на дистиллированной воде, которую подвергали дополнительной очистке на установке «Simplicity» компании «Millipore» (США).

Степень некротического повреждения кардиомиоцитов оценивали по уровню креатинфосфокиназы (КФК) в перфузате, оттекающем от сердца. Активность КФК определяли при помощи спектрофотометра «Smart Spec Plus» компании «Bio-Rad» (США), используя энзиматические наборы СК-NAc компании «Analiticon Biotechnologies» (Lichtenfeis, Германия). Конечный результат выражали в мкмоль НАДН/мин в пересчете на 1 г ткани миокарда. Для регистрации параметров сократимости сердца в полость левого желудочка вводили катетер с латексным баллончиком, заполненным дистиллированной водой, объем которой был достаточным для создания конечного диастолического давления на уровне 10-15 мм рт. ст. Насосную функцию сердца оценивали с помощью датчика давления SS13L компании «Biorac System Inc.» (Goleta, Калифорния, США), сопряженного с указанным баллончиком. В ходе опыта регистрировали частоту сердечных сокращений (ЧСС, уд/мин), давление, развиваемое левым желудочком (мм рт. ст.). Последнее вычисляли как разницу между систолическим и диастолическим давлением. В динамике эксперимента измеряли конечное диастолическое давление (КДД, мм рт. ст.).

Используемые в эксперименте препараты растворяли в диметилсульфоксиде. Исключение составлял L-NAME, его растворяли в растворе Кребса-Хензеляйта. Конечная концентрация диметилсульфоксида была равна 0,01%. В предварительных экспериментах

нами было показано, что в указанной концентрации диметилсульфоксид не влияет на ЧСС, сократимость миокарда и устойчивость сердца к действию ишемии и реперфузии. В работе был использован агонист СВ1- и СВ2-рецепторов HU-210 [25]. При выборе концентраций указанного СВ-агониста (0,1 мкМ/л и 1,0 мкМ/л) мы опирались на ранее опубликованные нами данные о кардиопротекторной активности HU-210 [3]. Для изучения роли СВ1- и СВ2-рецепторов в реализации кардиопротекторных эффектов каннабиноидов использовали селективный антагонист СВ1-рецепторов SR141716 в конечной концентрации 0,1 мкМ/л [2] и селективный антагонист СВ2-рецепторов SR144528 в конечной концентрации 0,1 мкМ/л [2]. Для изучения роли сигнальных систем были применены следующие фармакологические агенты: ингибитор протеинкиназы С (ПКС) хелеритрин (2 мкМ/л) [12]; ингибитор NO-синтазы L-NAME в концентрации 100 мкМ/л [11]. Схема экспериментов представлена на рис. 1. Как показано на рис. 1, перфузия сердца раствором, содержащими HU-210, продолжалась в течение 10 мин, затем следовала перфузия (10 мин) без препарата и только потом воспроизводили ишемию (45 мин) и реперфузию (30 мин). Подобный протокол эксперимента принято рассматривать, как моделирование ишемического preconditionирования [31].

Каннабиноид HU-210 был закуплен в компании «Tocris Bioscience» (Бристоль, Великобритания), cremophore EL, L-NAME, Patent blue violet, диметилсульфоксид и нитротетразолий синий были приобретены в концерне «Sigma-Aldrich» (США), хелеритрин был закуплен в компании «LC Laboratories Company» (США). Антагонисты СВ-рецепторов были любезно предоставлены доктором F. Barth концерн «Sanofi-Aventis» (Франция).

Анализ данных производили с помощью программы STATISTICA 6.0. Для оценки достоверности полученных данных использовали критерий Манна-Уитни. Статистически значимыми считались различия при  $p < 0,05$ . Результаты всех экспериментов представлены в виде  $M \pm m$ , где  $M$  – среднее арифметическое,  $m$  – стандартная ошибка среднего,  $n$  – объем анализируемой группы.

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Как показано на рис. 2, коронароокклюзия и последующая реперфузия *in vivo* вызывали формирование очага инфаркта, величина которого составила 58% от размеров зоны риска (группа контроля). Предварительное внутривенное введение HU-210 (0,1 мг/кг) обеспечивало достоверное уменьшение индекса ЗИ/ОР в 1,5 раза. Во время ишемии наблюдалось снижение систолического и среднего артериального давления (АД) на 10 мм рт. ст. У 90% крыс во время коронароокклюзии наблюдалось возникновение желудочковых аритмий (множественные желудочковые экстрасистолы, желудочковая тахикардия и

желудочковая фибрилляция). Во время реперфузии мы зарегистрировали только множественную желудочковую экстрасистолию у 7% особей (данные не представлены на рисунке). После применения HU-210 мы не зафиксировали изменений АД и частоты возникновения аритмий по сравнению с контролем (данные не представлены на рисунке).

Селективный антагонист CB1-рецепторов SR141716 полностью устранял инфаркт-лимитирующий эффект HU-210 (рис. 2), в то время как селективный антагонист CB2-рецепторов SR144528 таким действием не обладал. Сами по себе указанные антагонисты каннабиноидных рецепторов не влияли на соотношение ЗИ/ОР.

Наши дальнейшие исследования *in vivo* были направлены на изучение внутриклеточных сигнальных механизмов инфаркт-лимитирующего действия HU-210. Как показано на рис. 3, ингибитор ПКС хелеритрин устранял кардиопротекторный эффект HU-210, а введение ингибитора NO-синтазы L-NAME не отражалось на степени HU-210-индуцированного повышения устойчивости сердца к действию ишемии и реперфузии. Инъекция одного хелеритрина или одного L-NAME не влияла на индекс ЗИ/ОР.

В экспериментах *in vitro* нами было установлено, что активность КФК в перфузате, оттекающем от сердца, возрастает после воздействия 45-минутной глобальной ишемии в 4,5 раза по сравнению с исходными значениями (рис. 4), что свидетельствует о некрозе кардиомиоцитов. Десятиминутная перфузия сердца раствором Кребса-Хензелейта, содержащим HU-210 в концентрации 0,1 мкМ/л, способствовала снижению выброса КФК из миокарда во время реперфузии в 2 раза. Эти данные свидетельствуют об антинекротическом действии HU-210. Увеличение концентрации HU-210 до 1 мкМ/л не привело к усилению цитопротекторного эффекта использованного нами СВ-агониста (рис. 4).

В экспериментах на изолированном перфузируемом сердце мы обнаружили, что ишемия-реперфузия вызывает снижение ЧСС с  $202 \pm 12$  уд/мин до  $152 \pm 11$  уд/мин на 5 минуте реперфузии ( $p < 0,01$ ). Применение HU-210 в концентрации 0,1 мкМ/л усугубляло реперфузионную брадикардию, способствуя уменьшению ЧСС на 5 минуте реперфузии до  $98 \pm 11$  уд/мин ( $p < 0,01$  по сравнению с контролем). Увеличение концентрации HU-210 до 1 мкМ/л не приводило к усилению каннабиноид-индуцированной брадикардии.

Ишемия-реперфузия вызывала падение сократимости миокарда, о чём свидетельствовало снижение давления, развиваемого левым желудочком, с  $60 \pm 9$  мм рт. ст. исходно до  $41 \pm 9$  мм рт. ст. на пятой минуте реперфузии. Применение каннабиноида HU-210 не отражалось на силе сокращений левого желудочка, сниженной в условиях реперфузии.

Реперфузия (5 мин) вызывала увеличение КДД на 75 %, по сравнению с исходными значениями до ишемии ( $p < 0,01$ ). Каннабиноид HU-210 в концентрации 0,1 мкМ/л не влиял на реперфузионный подъем КДД, а в концентрации 1 мкМ/л HU-210 почти полно-

стью устранял повышение КДД во время реперфузии. Разница между контролем и группой с HU-210 была достоверной ( $p < 0,01$ ).

Каннабиноид HU-210 в концентрации 0,1 и 1,0 мкМ/л не влиял на частоту возникновения реперфузионных аритмий (данные не представлены на рисунке).

Исходя из полученных данных, в дальнейших экспериментах мы использовали HU-210 в концентрации 0,1 мкМ/л.

Используя антагонисты СВ-рецепторов, мы попытались выяснить рецепторную природу кардиопротекторного эффекта HU-210. Оказалось, что селективная блокада СВ1-рецепторов с помощью SR141716 полностью устраняла цитопротекторное действие HU-210 (рис. 5), в то время как антагонист СВ2-рецепторов SR144528 не влиял на защитный эффект названного каннабиноида. Применение только антагонистов никак не повлияло на реперфузионный выброс КФК из миокарда.

Внесение в перфузионный раствор перед моделированием ишемии ингибитора ПКС хелеритрина полностью устраняло кардиопротекторный эффект HU-210 (рис. 6). Добавление в перфузионный раствор ингибитора NO-синтазы L-NAME не устраняло HU-210-индуцированное повышение толерантности сердца к действию ишемии-реперфузии (рис. 6). Применение одного L-NAME или одного хелеритрина не влияло на уровень КФК в перфузате, оттекающем от сердца.

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Результаты наших экспериментов *in vivo* убедительно свидетельствуют о том, что инфаркт-лимитирующее действие HU-210 опосредовано через активацию СВ1-рецепторов, так как селективный антагонист последних SR141716 полностью устранял указанный эффект. Есть основания утверждать, что эндогенные каннабиноиды у неадаптированных животных не участвуют в регуляции толерантности сердца к действию ишемии-реперфузии, поскольку сами по себе антагонисты СВ-рецепторов не влияли на соотношение ЗИ/ОР. Ключевую роль в механизме кардиопротекторного влияния HU-210 играет протеинкиназа С. Аргументом в пользу такого умозаключения можно считать исчезновение инфаркт-лимитирующего эффекта HU-210 после применения ингибитора ПКС хелеритрина. Этот факт согласуется с общепринятой точкой зрения о том, что ПКС играет важную роль в механизмах ишемического прекодиционирования, а кардиопротекторный эффект веществ, имитирующих этот феномен, также связан с активацией протеинкиназы С [6, 7, 31]. В недавно опубликованной обзорной статье мы подробно изложили сведения о том, что помимо «классического» ИП существует и отсроченное прекодиционирование [4]. Суть этого феномена сводится к тому, что через 24 ч после последнего кратковремен-



ного сеанса коронароокклюзии наблюдается повторное повышение толерантности сердца к ишемии и реперфузии [4]. Ключевую роль в реализации отсроченного ИП играет NO-синтаза [4], поскольку ингибиторы NO-синтазы полностью устраняют инфаркт-лимитирующий эффект отсроченного прекондиционирования. Однако в механизмах кардиопротекторного эффекта раннего ИП этот фермент не участвует [23]. Результаты экспериментов *in vivo*, полученные в настоящем исследовании, позволяют нам утверждать, что инфаркт-лимитирующий эффект HU-210 не зависит от активации NO-синтазы. Этот факт говорит о том, что использование названного каннабиноида позволяет имитировать феномен классического прекондиционирования.

В экспериментах на изолированном перфузируемом сердце нами было установлено, что кардиопротекторный эффект HU-210 является следствием активации кардиальных CB1-рецепторов, поскольку этот эффект не проявлялся на фоне их селективной блокады. Вместе с тем, приведенные выше результаты настоящего исследования показывают, что эндогенные каннабиноиды не принимают участия в регуляции устойчивости изолированного сердца к патогенному действию ишемии-реперфузии у неадаптированных особей.

Как и в случае экспериментов *in vivo*, ингибирование ПКС хелеритрином устраняло HU-210-индуцированное повышение толерантности изолированного сердца к действию ишемии-реперфузии. Ингибитор же NO-синтазы L-NAME не влиял на кардиопротекторный эффект HU-210. Исходя из этого, можно утверждать, что NO-синтаза, в отличие от ПКС, не участвует в реализации кардиопротекторного эффекта HU-210.

Результаты наших экспериментов согласуются с данными других исследователей, обнаруживших аналогичный кардиопротекторный эффект у агонистов каннабиноидных рецепторов [14, 20, 28, 29]. Спорным остаётся вопрос о рецепторной природе такого эффекта каннабиноидов. Одни исследователи полагают, что кардиопротекторный эффект агонистов CB-рецепторов связан с активацией анандамидового рецептора [29], который не относится к CB1- и CB2-рецепторам. Другие считают, что инфаркт-лимитирующее действие каннабиноидов связано с активацией CB2-рецепторов [14, 28]. Третьи утверждают [20], что добиться повышения толерантности сердца к действию ишемии-реперфузии можно за счёт стимуляции как CB1-рецепторов, так и CB2-рецепторов. На основании полученных данных мы полагаем, что в регуляции устойчивости сердца к ишемии-реперфузии принимают участие только CB1-рецепторы. Причина противоречий в оценке рецепторной природы кардиопротекторного действия каннабиноидов остаётся неясной. Вполне возможно, что она кроется в использовании авторами разных агонистов CB-рецепторов.

При анализе публикаций, посвященных внутриклеточному сигналингу кардиопротекторного действия каннабиноидов, нам встретилась только одна статья, авторы которой

обнаружили, что кардиопротекторный эффект каннабиноида пальмитоилэтаноламида связан с активацией ПКС [19]. Этот факт согласуется с результатами наших исследований. Вместе с тем, следует отметить, что пальмитоилэтаноламид является агонистом каннабиноидного GPR55-рецептора и CB2-рецептора и не взаимодействует с CB1-рецепторами [16, 26]. Следовательно, есть веские основания полагать, что протекторный эффект пальмитоилэтаноламида связан с активацией GPR55- или CB2-рецепторов, а кардиопротекторное действие HU-210 является результатом оккупации CB1-рецепторов. Ключевую роль в механизме реализации инфаркт-лимитирующего действия обоих каннабиноидов, скорее всего, играет ПКС.

В 2007 г канадские физиологи [20] опубликовали результаты своих экспериментов на изолированном перфузируемом сердце крысы. Они воспроизводили 90-минутную ишемию низкого протока (low-flow ischemia), снижая коронарный проток до 0,6 мл/мин, после чего следовала 30-минутная реперфузия. Фармакологические агенты добавляли в перфузат за 5 мин до ишемии, перфузия с препаратами продолжалась на протяжении всего периода ишемии и заканчивалась в момент начала реперфузии, то есть общая продолжительность воздействия фармакологических агентов составляла 95 мин [20]. По их данным, размер соотношения ЗИ/ОР уменьшал селективный агонист CB1-рецепторов ACEA (arachidonyl-2-chloroethylamide) и селективный агонист CB2-рецепторов JWH015 (2-methyl-1-propyl-1H-indol-3-yl)-1-naphthalenylmethanone) [19, 20]. Инфаркт-лимитирующий эффект ACEA не проявлялся в условиях блокады NO-синтазы с помощью L-NAME, а кардиопротекторный эффект JWH015 в этих условиях сохранялся [20]. На первый взгляд, эти данные противоречат результатам наших исследований, которые говорят о том, что NO-синтаза не принимает участия в инфаркт-лимитирующем действии HU-210. Однако следует обратить внимание на то, что продолжительность воздействия HU-210 в наших исследованиях составляла 10 мин, а длительность перфузии сердца раствором, содержащим каннабиноидов, в опытах наших канадских коллег составляла 95 мин. Можно предположить, что каннабиноид-индуцированная активация NO-синтазы в кардиомиоцитах наблюдается только при длительной стимуляции CB1-рецепторов.

Таким образом, результаты наших исследований свидетельствуют о том, что стимуляция CB1-рецепторов представляет собой вариант фармакологической имитации феномена preconditionирования. Поскольку кардиопротекторный эффект каннабиноида HU-210 отмечается как в экспериментах *in vivo*, так и в опытах *in vitro*, есть основания полагать, что защитный эффект HU-210 опосредован через активацию кардиальных CB1-рецепторов. Полученные данные позволяют утверждать, что кардиопротекторный эффект

каннабиноида HU-210 связан со стимуляцией протеинкиназы C, в то время как NO-синтаза не участвует в защитном действии стимуляции CB1-рецепторов.

Статья подготовлена при поддержке Российского научного фонда грант 14-15-00008.

Авторы благодарят доктора F. Barth (Sanofi-Aventis, Франция) за предоставленные антагонисты каннабиноидных рецепторов.

Л.Н. Маслов

А.В. Крылатов

Ю.Б. Лишманов

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

[1] *Крылатов А.В., Бернацкая Н.А., Маслов Л.Н., Пертви Р.Дж., Мехоулам Р., Стефано Дж.Б., Шараевский М.А., Сальников О.М.* Повышение устойчивости сердца к аритмогенным воздействиям и уменьшение зоны ишемического некроза миокарда при активации каннабиноидных рецепторов. *Росс. физиол. жур.* 88 (5) : 560–567. 2002.

[2] *Крылатов А.В., Маслов Л.Н., Ласукова О.В., Пертви Р.Дж.* Антагонисты каннабиноидных рецепторов SR141716 и SR144528 проявляют свойства парциальных агонистов в экспериментах на изолированном перфузируемом сердце крысы. *Бюлл. exper. биол. и мед.* 139 (5) : 512–516. 2005.

[3] *Ласукова О.В., Маслов Л.Н., Ермаков С.Ю., Крауфорд Д., Барт Ф., Крылатов А.В., Хануи Л.О.* Роль каннабиноидных рецепторов в регуляции толерантности сердца к действию ишемии и реперфузии. *Известия РАН. Серия биол.* 35 (4) : 471–478. 2008.

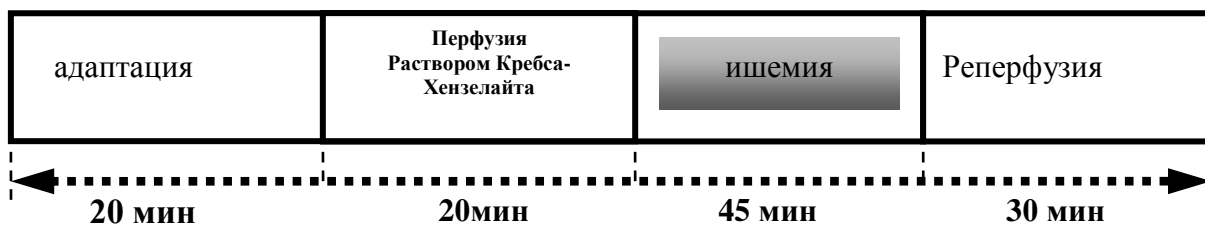
[4] *Лишманов Ю.Б., Маслов Л.Н., Криг Т., Халиулин И.Г.* Проблема конечного эффектора позднего ишемического прекондиционирования сердца. *Росс. Физиол. жур.* 96 (4) : 337-352. 2010.

[5] *Марков В.А., Рябов В.В., Максимов И.В., Вышков Е.В., Демьянов С.В., Сыркина А.Г., Белокопытова Н.В., Шурупов В.С., Оюнаров Э.О., Максимов А.И., Васильев А.Г.* Вчера, сегодня, завтра в диагностики и лечении острого инфаркта миокарда. *Сиб. мед. жур. (Томск).* 26 (2), Вып. 1: 8–14. 2011.

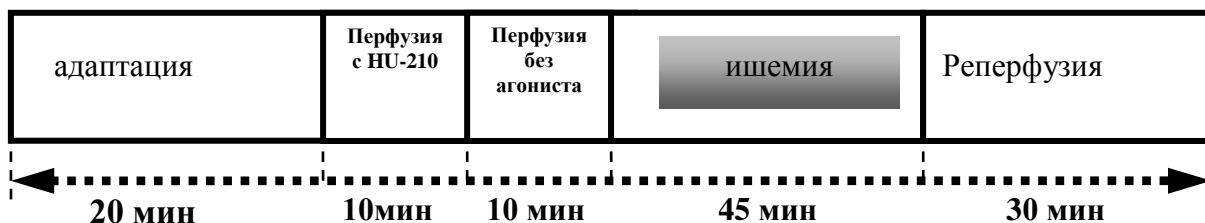
[6] *Маслов Л.Н.* Новые подходы к профилактике и терапии ишемических и реперфузионных повреждений сердца при остром инфаркте миокарда. *Сиб. мед. жур. (Томск).* 25 (2) Вып. 1: 17–24. 2010.

- [7] *Маслов Л.Н., Лишманов Ю.Б., Соленкова Н.В.* Адаптация миокарда к ишемии. Первая фаза ишемического preconditionирования. Успехи физиол. наук. 37 (3): 25–41. 2006.
- [8] *Рябов В.В., Оюнаров Э.О., Марков В.А.* Лечение острого инфаркта миокарда, осложненного рецидивирующей ишемией миокарда: сравнение эффективности двух стратегий – инвазивной и консервативной в сочетании с наружной контрпульсацией. Сиб. мед. жур. (Томск). 26 (2), Вып. 1: 42–47. 2011.
- [9] *Цибульников С.Ю.* Исследование рецепторной природы опиоидного компонента кардиопротекторного эффекта адаптации к хронической нормобарической гипоксии. Патогенез № 3: 69. 2011.
- [10] *Чазов Е.И.* Как уменьшить смертность от сердечно-сосудистых заболеваний. Тер. архив. 80 (8) : 11–16. 2008.
- [11] *Andelova E., Bartekova M., Pancza D.* The role of NO in ischemia/reperfusion injury in isolated rat heart. Gen. Physiol. Biophys. 24 (4) : 411–426. 2005.
- [12] *Bugge E., Ytrehus K.* Ischaemic preconditioning is protein kinase C dependent but not through stimulation of alpha adrenergic or adenosine receptors in the isolated rat heart. Cardiovasc. Res. 29 (3) : 401–406. 1995.
- [13] *Compton D.R., Aceto M.D., Lowe J., Martin B.R.* In vivo characterization of a specific cannabinoid receptor antagonist (SR141716A): inhibition of delta 9-tetrahydrocannabinol-induced responses and apparent agonist activity. J. Pharmacol. Exp. Ther. 277 (2) : 586–594. 1996.
- [14] *Di Filippo C., Rossi F., Rossi S., D'Amico M.* Cannabinoid CB2 receptor activation reduces mouse myocardial ischemia-reperfusion injury: involvement of cytokine/chemokines and PMN. J. Leukoc. Biol. 75 (3) : 453–459. 2004.
- [15] *Ebrahim Z., Yellon D.M., Baxter G.F.* Bradykinin elicits "second window" myocardial protection in rat heart through an NO-dependent mechanism. Am. J. Physiol. Heart Circ Physiol. 281 (3) : H1458–H1464. 2001.
- [16] *Facci L., Dal Toso R., Romanello S., Buriani A., Skaper S.D., Leon A.* Mast cells express a peripheral cannabinoid receptor with different sensitivity to anandamide and palmitoylethanolamide. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92 (8) : 33763–380. 1995.
- [17] *Fryer R.M., Schultz J.E.J., Hsu A.K., Gross G.J.* Importance of PKC and tyrosine kinase in single or multiple cycles of preconditioning in rat hearts Am. J. Physiol. 276 (4 Pt 2) : H1229–H1235. 1999.

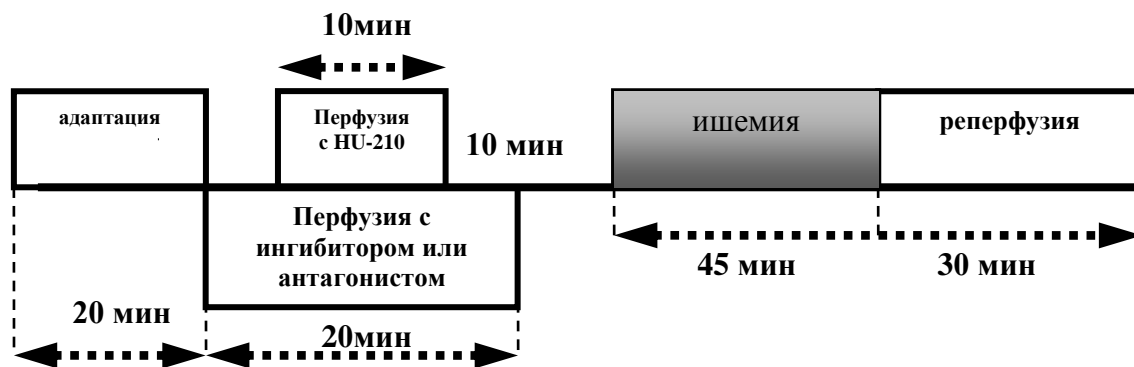
- [18] Hanus L., Breuer A., Tchilibon S., Shiloah S., Goldenberg D., Horowitz M., Pertwee R.G., Ross R.A., Mechoulam R., Fride E. HU-308: a specific agonist for CB2, a peripheral cannabinoid receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 96 (25) : 14228–14233. 1999.
- [19] Lepicier P., Bouchard J.F., Lagneux C., Lamontagne D. Endocannabinoids protect the rat isolated heart against ischaemia. *Br. J. Pharmacol.* 139 (4) : 805–815. 2003.
- [20] Lepicier P., Lagneux C., Sirois M.G., Lamontagne D. Endothelial CB1-receptors limit infarct size through NO formation in rat isolated hearts. *Life Sci.* 81 (17-18) :1373–1380. 2007.
- [21] Lichtman A.H., Wiley J.L., LaVecchia K.L., Neviasser S.T., Arthur D.B., Wilson D.M., Martin B.R. Effects of SR 141716A after acute or chronic cannabinoid administration in dogs. *Eur. J. Pharmacol.* 357 (2-3) : 139–148. 1998.
- [22] Lu H.R., Yang P., Remeysen P., Saels A., Dai D.Z., De Clerck F. Ischemia/reperfusion-induced arrhythmias in anaesthetized rats: a role of Na<sup>+</sup> and Ca<sup>2+</sup> influx. *Eur. J. Pharmacol.* 365 (2-3) : 233–239. 1999.
- [23] Marina Prendes M.G., González M., Savino E.A., Varela A. Role of endogenous nitric oxide in classic preconditioning in rat hearts. *Regul. Pept.* 139 (1-3) : 141-145. 2007.
- [24] Murry C.E., Jennings R.B., Reimer K.A. Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation.* 74 (5) : 1124–1136. 1986.
- [25] Pertwee R.G. Pharmacology of cannabinoid receptor ligands. *Curr. Med. Chem.* 6 (8) : 635–664. 1999.
- [26] Ryberg E., Larsson N., Sjögren S., Hjorth S., Hermansson N.O., Leonova J., Elebring T., Nilsson K., Drmota T., Greasley P.J. The orphan receptor GPR55 is a novel cannabinoid receptor. *Br. J. Pharmacol.* 152 (7) : 1092–1101. 2007.
- [27] Schultz J.E., Yao Z., Cavero I., Gross G.J. Glibenclamide induced blockade of ischemic preconditioning is time dependent in intact rat heart. *Am. J. Physiol.* 272 (6 Pt 2) : H2607–H2615. 1997.
- [28] Shmist Y.A., Goncharov I., Eichler M., Shneyvays V., Isaac A., Vogel Z., Shainberg A. Delta-9-tetrahydrocannabinol protects cardiac cells from hypoxia via CB2 receptor activation and nitric oxide production. *Mol. Cell. Biochem.* 283 (1-2) : 75–83. 2006.
- [29] Underdown N.J., Hiley C.R., Ford W.R. Anandamide reduces infarct size in rat isolated hearts subjected to ischaemia-reperfusion by a novel cannabinoid mechanism. *Br. J. Pharmacol.* 146 (6) : 809–816. 2005.
- [30] Welch S.P. Blockade of cannabinoid-induced antinociception by norbinaltorphimone, but not N,N-Diallyl-Tyrosine-Aib-Phenylalanine-Leucine, ICI 174,864 or naloxone in mice. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 265 (2) : 633–640. 1993.
- [31] Yellon D.M., Downey J.M. Preconditioning the myocardium: from cellular physiology



(a)



(б)



(в)

Рис. 1. Схема экспериментов, проводимых на изолированном сердце; а - контроль; б, в - опыт.

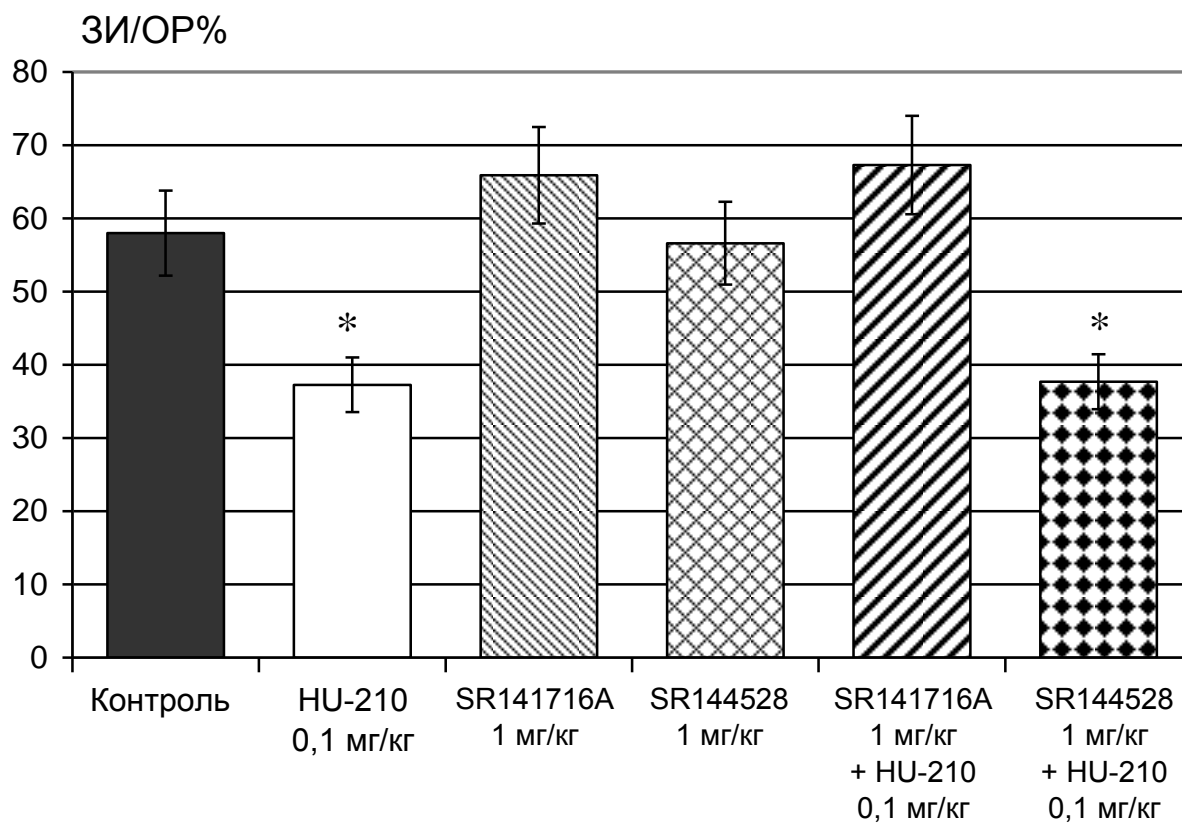


Рис. 2. Влияние агониста каннабиноидных рецепторов HU-210 (0,1 мг/кг) и антагонистов: CB1 рецепторов- SR141716A (1,0 мг/кг) и CB2 - SR144528 (1,0 мг/кг) на процентное отношение зоны некроза к зоне риска при экспериментальной модели инфаркта миокарда (45 минут ишемия с последующей 120 минутной реперфузией).

Примечание: \* - достоверность относительно контрольной группы  $p < 0,01$

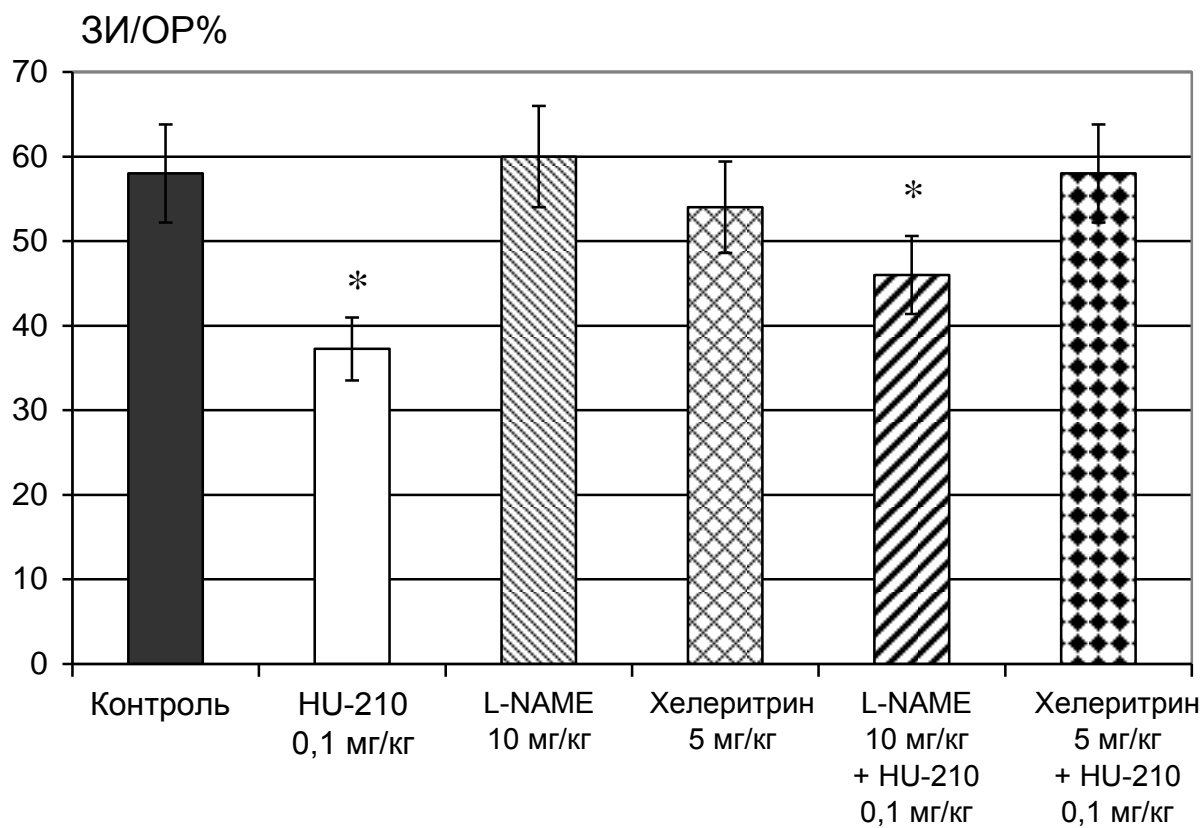


Рис. 3. Влияние агониста каннабиноидных рецепторов HU-210 (0,1 мг/кг) ингибиторов NO-синтазы L-NAME и протеинкиназы С хелеритрина на процентное отношение зоны некроза к зоне риска при экспериментальной модели инфаркта миокарда (45 минут ишемия с последующей 120 минутной реперфузией).

Примечание: \* - достоверность относительно контрольной группы  $p < 0,01$



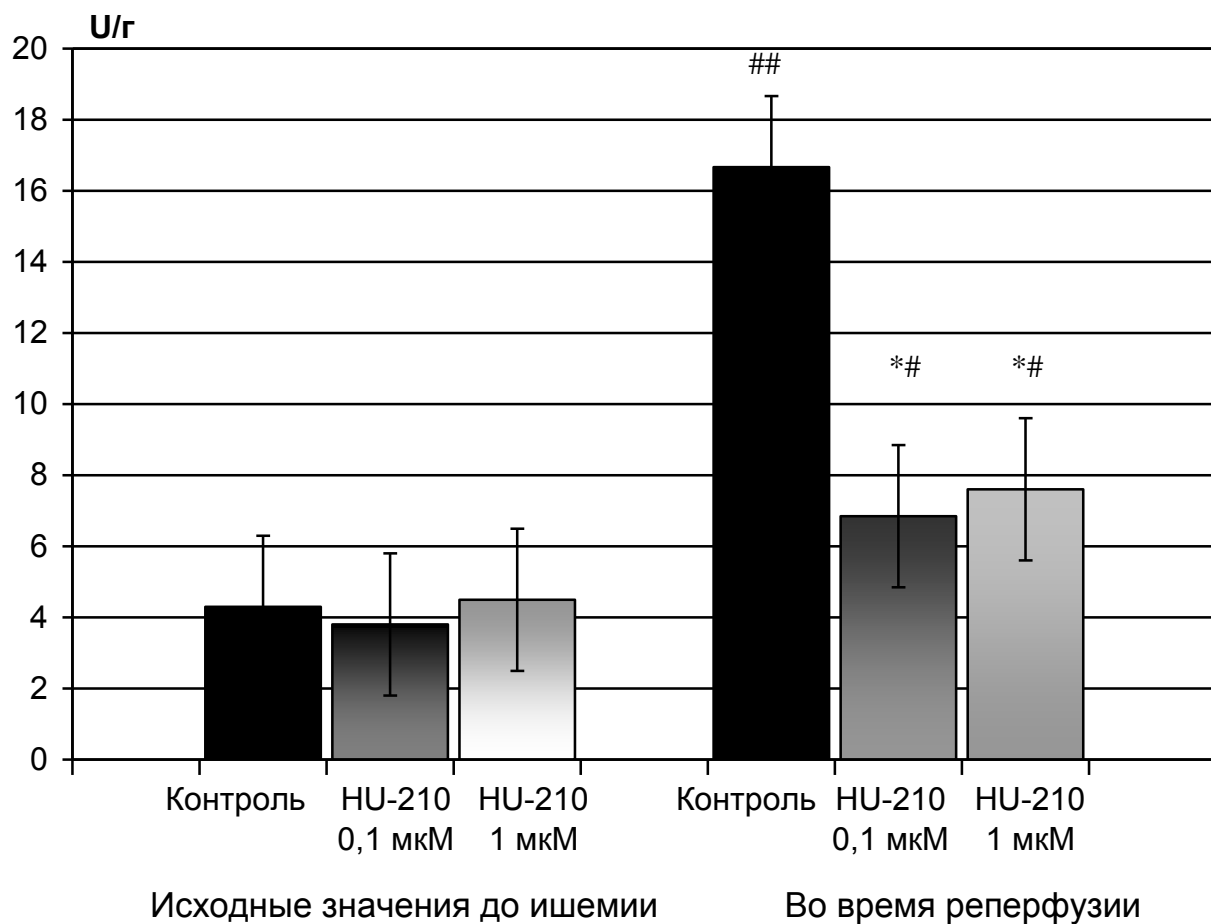


Рис. 4. Влияние HU-210 в концентрациях 0,1 мкМ и 1 мкМ на активность креатин-фосфокиназы в перфузионном растворе до ишемии и во время реперфузии.

Примечание: \* –  $P < 0,05$  по сравнению с контролем; # –  $P < 0,05$ ; ## –  $P < 0,01$  по сравнению с исходными значениями.

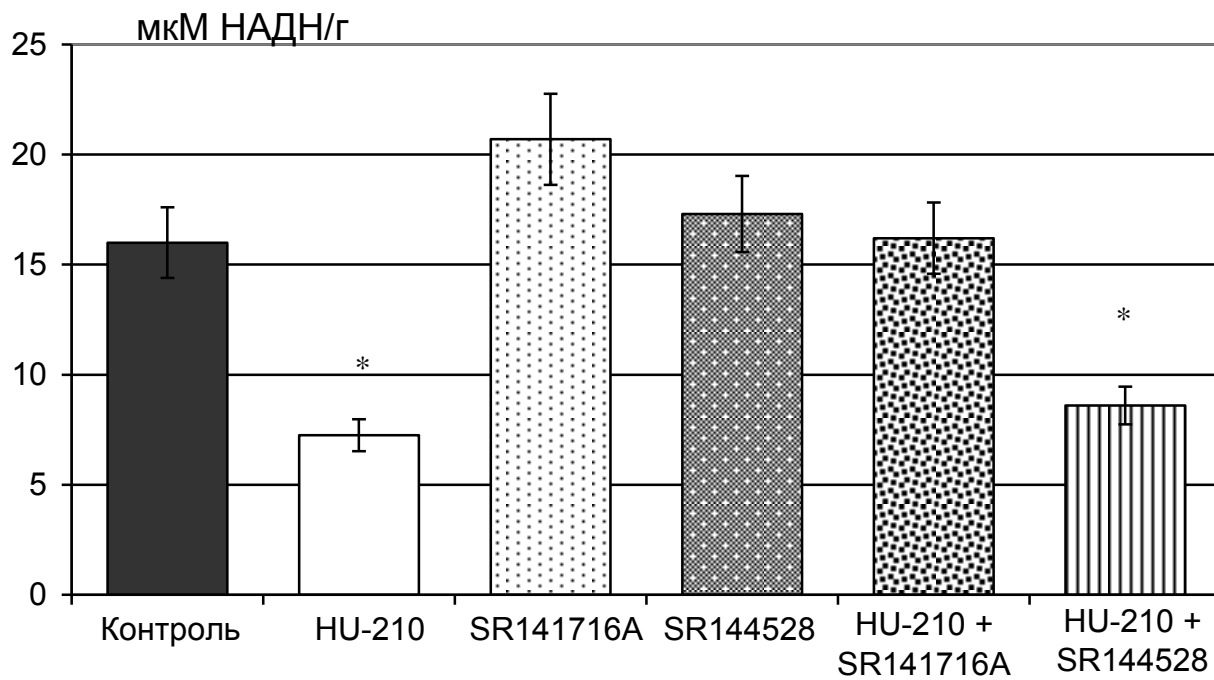


Рис. 5. Уровень КФК в перфузате во время реперфузии в сериях с применением агониста CB1- и CB2-рецепторов HU-210 (0,1 мкМ), антагониста CB1-рецепторов SR141716 (0,1 мкМ) и антагониста CB2-рецепторов SR144528 (0,1 мкМ). Примечание: \* –  $P < 0,05$  по сравнению с контролем.

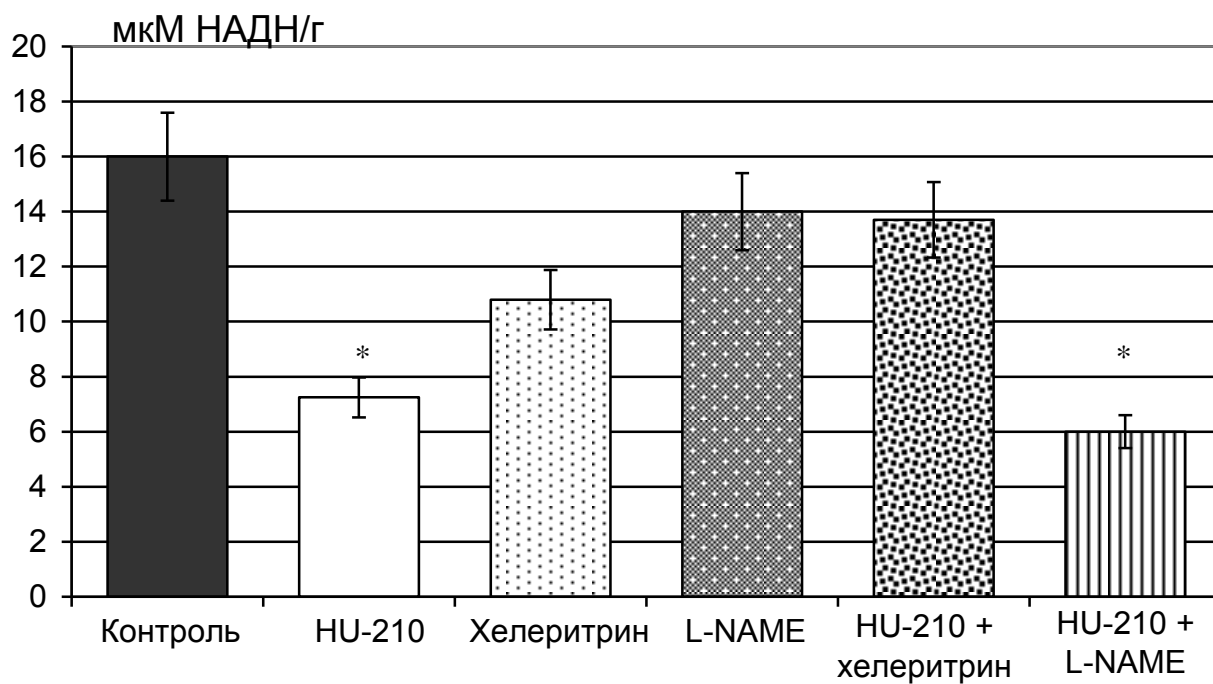


Рис. 6. Уровень КФК в перфузате во время реперфузии в сериях с применением агониста СВ1- и СВ2-рецепторов HU-210 (0,1 мкМ), антагониста СВ1-рецепторов SR141716 (0,1 мкМ) и антагониста СВ2-рецепторов SR144528 (0,1 мкМ). Примечание: \* –  $P < 0,05$  по сравнению с контролем.