

# ФАРМАКОЛОГИЯ СЕРДЕЧНО-СОСУДИСТОЙ СИСТЕМЫ

## ОПОСРЕДУЮЩАЯ РОЛЬ NO-СИНТАЗЫ, ПРОТЕИНКИНАЗЫ С И $K_{ATФ}$ -КАНАЛОВ В РЕАЛИЗАЦИИ КАРДИОПРОТЕКТОРНОГО ДЕЙСТВИЯ КАННАБИНОИДА HU-210

Л. Н. Маслов<sup>1</sup>, О. В. Ласукова<sup>1</sup>, А. В. Крылатов<sup>1</sup>, Л. Хануш<sup>2</sup>, Ю. Б. Лишманов<sup>1</sup>

Показано, что перфузия изолированного сердца крысы раствором, содержащим агонист СВ1- и СВ2-рецепторов HU-210 в концентрациях 0,1 или 1 мкМ/л, в течение 10 мин за 20 мин до глобальной ишемии (45 мин) и реперфузии (30 мин) способствует снижению уровня креатинкиназы в перфузате, оттекающем от сердца, в 2 раза. Установлено, что блокада  $K_{ATФ}$ -каналов глибенкламидом (1 мкМ/л) или ингибирование протеинкиназы С хелеритрином (2 мкМ/л) устраняет кардиопротекторный эффект HU-210. Ингибитор NO-синтазы L-NAME (1 мкМ/л) не влиял на антинекротический эффект HU-210. Следовательно, внутриклеточный сигнальный механизм кардиопротекторного эффекта СВ-агониста HU-210 реализуется за счет активации  $K_{ATФ}$ -каналов и протеинкиназы С без участия NO-синтазы.

**Ключевые слова:** сердце, ишемия, реперфузия, каннабиноидные рецепторы

### ВВЕДЕНИЕ

Острый инфаркт миокарда (ОИМ) продолжает оставаться одной из главных причин смертности среди взрослого населения России [1, 4, 7]. Единственным эффективным методом лечения ОИМ является реканализация инфаркт-связанной коронарной артерии, что достигается с помощью тромболитика или коронарной ангиопластики [4, 7]. Проблема заключается в том, что необратимые повреждения кардиомиоцитов возникают быстро. Так, обширный очаг некроза формируется уже после 20-минутной ишемии и последующей 3-часовой реперфузии [6]. Между тем, в российской клинической практике больной поступает в стационар обычно через 2,5 – 2,8 ч от момента возникновения ангинозного приступа [4]. В этой ситуации существенный инфаркт-лимитирующий эффект могло бы дать применение препаратов, повышающих устойчивость сердца к ишемическим и реперфузионным повреждениям. На наш взгляд, определенный интерес в этом отношении представляют агонисты каннабиноидных (СВ) рецепторов. Так, один из них — соединение HU-210 — в экспериментах на крысах оказывал, по нашим данным, инфаркт-лимитирующий эффект [2] и повышал устойчивость изолированного перфузируемого сердца к действию ишемии-реперфузии [3]. Однако внутриклеточный сигнальный механизм кардиопротекторного действия HU-210 оставался неизученным. Опираясь на литературные данные о молекуляр-

ном механизме действия каннабиноидов [10], мы предположили, что в этом процессе могут участвовать NO-синтаза,  $ATФ$ -чувствительные  $K^+$ -каналы ( $K_{ATФ}$ -каналы) и протеинкиназа С.

Целью работы явилось исследование роли NO-синтазы, протеинкиназы С,  $K_{ATФ}$ -каналов в реализации кардиопротекторного эффекта агониста каннабиноидных рецепторов HU-210.

### МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Эксперименты выполнены на изолированных перфузируемых сердцах крыс-самцов линии Вистар. Сердце, выделенное из грудной клетки, помещали в ванночку со льдом и через канюлю, введенную в восходящую часть дуги аорты, перфузировали раствором Кребса-Хензелята по методу Лангендорфа. Для приготовления оксигенированного раствора (+ 37 °С, pH 7,4) использовали реактивы компании “MP Biomedicals” (Ирвин, США): NaCl — 120, CaCl<sub>2</sub> — 2, NaHCO<sub>3</sub> — 20, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> — 1,2, MgSO<sub>4</sub> 1,2, глюкоза — 10 (мМ). Раствор Кребса-Хензелята готовили на дистиллированной воде, которую подвергали дополнительной очистке на установке “Simplicity” компании “Millipore” (США).

Препараты, используемые в качестве фармакологических инструментов, растворяли в диметилсульфоксиде и добавляли в перфузионный раствор в конечной концентрации 0,01 %. Исключение составлял L-NAME (N<sup>G</sup>-Nitro-L-Arginine methyl ester), который растворяли в буфере Кребса-Хензелята. В предварительных экспериментах нами показано, что в указанной концентрации диметилсульфоксид не влияет на частоту сердечных сокращений, сократимость миокар-

<sup>1</sup> ФГБУ “НИИ кардиологии” СО РАМН, 634012, Томск, ул. Кивевская, 111А.

<sup>2</sup> Институт Исследования Лекарств, Еврейский университет Иерусалима, Иерусалим, Израиль  
E-mail: maslov@cardio.tsu.ru

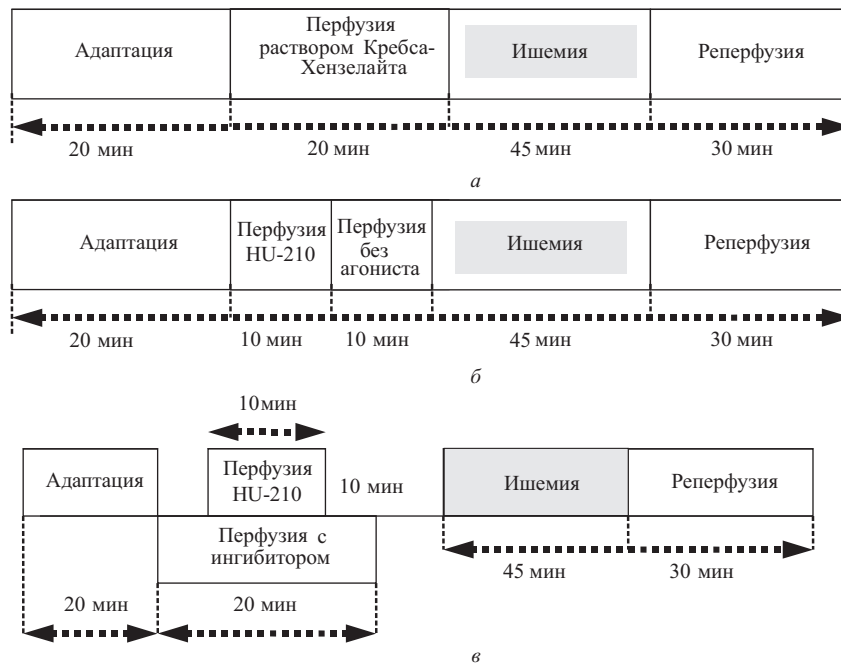


Рис. 1. Схема экспериментов, проводимых на изолированном сердце: а — контроль; б, в — опыт.

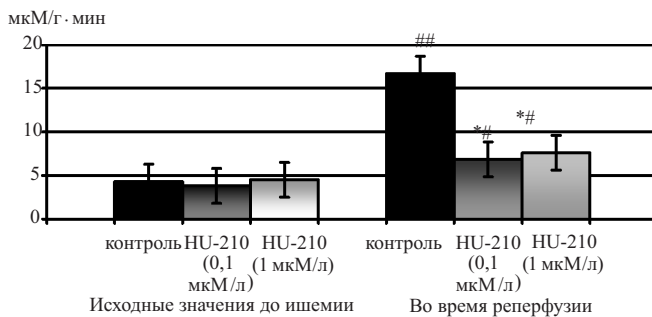


Рис. 2. Влияние агониста каннабиноидных рецепторов HU-210 в концентрациях 0,1 мкМ/л и 1 мкМ/л на активность креатинфосфокиназы в перфузионном растворе до ишемии и во время реперфузии.

\* —  $p < 0,05$  по сравнению с контролем; #  $p < 0,05$ ; ## —  $p < 0,01$  по сравнению с исходными значениями.

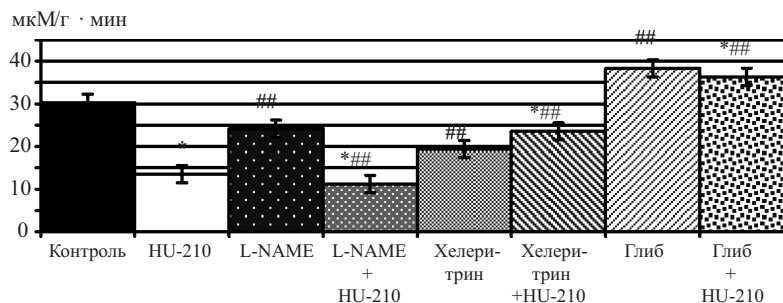
да и устойчивость сердца к действию ишемии и реперфузии. В работе был использован агонист СВ1- и СВ2-рецепторов HU-210 {(6aR)-trans-3-(Dimethylheptyl)-6a,7,10,10a-tetrahydro-1-hydroxy-6,6-dimethyl-6H-benzo-[b,d]pyran-9-methanol} [14]. При выборе концентраций указанного СВ-агониста (0,1 мкМ/л и 1 мкМ/л) мы опирались на ранее опубликованные нами данные о кардиопротекторной активности HU-210 [3].

Для изучения роли сигнальных систем были применены следующие фармакологические агенты: ингибитор протеинкиназы С хелеритрин (2 мкМ/л) [9]; блокатор сарколеммальных и митохондриальных  $K_{ATP}$ -каналов глибенкламид (1 мкМ/л) [12]; ингибитор NO-синтазы L-NAME в концентрации 100 мкМ/л [8]. Схема экспериментов представлена на рис. 1.

В конце каждого эксперимента в перфузате, собранном за 30 мин реперфузии, определяли активность креатинфосфокиназы (КФК) с помощью стандартных наборов “СК NAC” компании “Analiticon” (Германия). Активность КФК определяли на спектрофотометре “Smart Spec Plus” компании “Bio-Rad” (США). Конечный результат выражали в мкмоль НАДН/мин в пересчете на 1 г ткани сердца за 30 мин реперфузии (U/г). Каннабиноид HU-210 был закуплен в компании “Tocris Bioscience” (Великобритания), L-NAME и глибенкламид — в корпорации “Sigma-Aldrich” (США), а хелеритрин в компании “LC Laboratories Company” (США). Анализ данных производили с помощью программы STATISTICA 6.0. Для оценки достоверности полученных данных использовали критерий Манна-Уитни. Статистически значимыми считали различия при  $p < 0,05$ . Результаты всех экспериментов представлены в виде  $M \pm m$ , где  $M$  — среднее арифметическое,  $m$  — стандартная ошибка среднего,  $n$  — число наблюдений.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Как показано на рис. 2, после 45-минутной тотальной ишемии с последующей реперфузией в растворе, оттекающем от изолированного сердца, наблюдалось повышение активности КФК в 4,5 раза по сравнению с исходными значениями. Введение в перфузат HU-210 в концентрации 0,1 мкМ/л способствовало снижению реперфузионного уровня КФК на 47 % в перфузате, оттекающем от сердца, по сравнению с контролем. Данный факт свидетельствует, по нашему мнению, о том, что каннабиноид HU-210 препятствует некрозу



**Рис. 3.** Влияние ингибитора NO-синтазы L-NAME (1 мкМ/л), ингибитора протеинкиназы С хелеритрина (2 мкМ/л), блокатора  $K_{ATP}$ -каналов глибенкламида (1 мкМ/л) и агониста каннабиноидных рецепторов HU-210 (0,1 мкМ/л) на активность креатинфосфокиназы в перфузионном растворе во время реперфузии.

\* —  $p < 0,05$  по сравнению с контролем; ## —  $p < 0,01$  по сравнению с исходными значениями. Глиб — глибенкламид.

кардиомиоцитов во время тотальной ишемии и реперфузии изолированного сердца. В случае применения HU-210 в концентрации 1 мкМ усиления кардиопротекторного эффекта не происходило, поэтому в дальнейших экспериментах мы использовали HU-210 в концентрации 0,1 мкМ/л.

Из литературы известно, что каннабиноиды могут активировать синтез окиси азота [10], который играет важную роль в повышении устойчивости миокарда к ишемическим воздействиям [8]. Нами были проведены эксперименты с использованием блокатора NO-синтазы L-NAME, который добавляли в перфузионный раствор в конечной концентрации 100 мкМ/л непосредственно перед стимуляцией СВ-рецепторов. Оказалось, что в этом случае кардиопротекторный эффект HU-210 сохранялся (рис. 3), при этом изолированное применение L-NAME не сопровождалось изменением уровня КФК. Следовательно, кардиопротекторный эффект HU-210 не был связан с активацией NO-синтазы.

В обзоре, подготовленном D. M. Yellon и J. M. Downey [15], приводятся данные о том, что протеинкиназа С (ПКС) катализирует фосфорилирование ряда белков, обеспечивающих повышенную устойчивость сердца к ишемическим и реперфузионным воздействиям. Результаты проведенных нами экспериментов показали, что на фоне блокады протеинкиназы С хелеритрином кардиопротекторный эффект СВ-агониста HU-210 не проявлялся, а применение хелеритрина без HU-210 не оказывало достоверного эффекта реперфузионного выброса креатинкиназы (рис. 3).

Существуют и достаточно аргументированные предположения о том, что одним из белков-мишеней, которые реализуют участие ПКС в формировании адаптивной реакции сердца в ответ на чередование коротких циклов ишемии и реперфузии, являются  $K_{ATP}$ -каналы [5, 15]. Нам экспериментально удалось обнаружить и доказать участие  $K_{ATP}$ -каналов в реализации кардиопротекторного эффекта СВ-агониста HU-210. Так, если применение HU-210 в концентрации 0,1 мкМ/л сопровождалось снижением реперфузионного выброса КФК в 2 раза, то на фоне блокады

$K_{ATP}$ -каналов глибенкламидом кардиопротекторного эффекта названного СВ-агониста не наблюдалось (рис. 3). Само по себе применение глибенкламида не оказывало достоверного влияния на уровень КФК в растворе, оттекающем от сердца (рис. 3).

Из полученных данных следует, что ведущую роль в реализации кардиопротекторного эффекта СВ-агониста HU-210 играет ПКС. P. Lericieг и соавт. [11] также обнаружили, что кардиопротекторный эффект каннабиноида пальмитоилэтаноламида связан с активацией ПКС. Однако механизм, с помощью которого протеинкиназа С опосредует цитопротекторное действие, до настоящего времени до конца не изучен. Это связано, прежде всего, с тем, что остаётся неизвестной конкретная цепочка биохимических процессов, которые следуют за активацией этого фермента. Достаточно вспомнить, что ПКС фосфорилирует огромное количество внутриклеточных белков [13]. Полагают [15], что одной из мишеней ПКС является  $K_{ATP}$ -канал. В наших экспериментах был подтвержден факт участия  $K_{ATP}$ -каналов в реализации кардиопротекторного эффекта СВ-агониста HU-210. Согласно нашей рабочей гипотезе, события в клетке развиваются следующим образом: HU-210 → СВ-рецепторы → ПКС →  $K_{ATP}$ -каналы → повышение толерантности сердца к действию ишемии и реперфузии.

## ВЫВОДЫ

1. Агонист СВ1- и СВ2-каннабиноидных рецепторов HU-210 способствует повышению толерантности изолированного перфузируемого сердца к действию ишемии и реперфузии.
2. В реализации кардиопротекторного эффекта HU-210 участвуют протеинкиназа С и  $K_{ATP}$ -каналы.
3. В механизме HU-210-индуцированного повышения устойчивости сердца к действию ишемии и реперфузии не участвует NO-синтаза.

Работа подготовлена при поддержке Федерального агентства по науке и инновациям: государственный контракт № 02.740.11.0714, контракт № 11.519.11.2016, № 11.519.11.2028, РФФИ гранты:

10-04-00288, 11-04-00467, 11-04-98001, 11-04-98000, 11-04-98004, 12-04-91152. Авторы выражают признательность за техническую помощь Данильченко Н. А., Нарыжной Н. В.

## ЛИТЕРАТУРА

1. А. А. Гарганеева, С. А. Округин, Ю. И. Зяблов, *Сиб. мед. журн. (Томск)*, Вып. 1, **25**(2), 44 – 48 (2010).
2. А. В. Крылатов, Н. А. Бернацкая, Л. Н. Маслов и др., *Рос. физиол. журн.*, **88**(5), 560 – 567 (2002).
3. О. В. Ласукова, Л. Н. Маслов, С. Ю. Ермаков и др., *Известия РАН. Серия биол.*, **35**(4), 471 – 478 (2008).
4. В. А. Марков, В. В. Рябов, И. В. Максимов и др., *Сиб. мед. журн. (Томск)*, Вып. 1, **26**(2), 8 – 14 (2011).
5. Л. Н. Маслов, *Сиб. мед. журн. (Томск)*, Вып. 1, **25**(2), 17 – 24 (2010).
6. С.Ю. Цибульников, *Патогенез*, № 3, 69 (2011).
7. Е. И. Чазов, *Тер. арх.*, **80**(8), 11 – 16 (2008).
8. E. Andelova, M. Bartekova, D. Pancza, *Gen. Physiol. Biophys.*, **24**(4), 411 – 426 (2005).
9. E. Bugge, K. Ytrehus, *Cardiovasc. Res.*, **29**(3), 401 – 406 (1995).
10. A. C. Howlett, *Handb. Exp. Pharmacol.*, **168**, 53 – 79 (2005).
11. P. Lepicier, J. F. Bouchard, C. Lagneux, *Br. J. Pharmacol.*, **139**(4), 805 – 815 (2003).
12. J. R. McCullough, D. E. Normandin, M. L. Conder, *Circ. Res.*, **69**, 949 – 958 (1991).
13. H. Mellor, P. J. Parker, *Biochem. J.*, **332**(Pt 2), 281 – 292 (1998).
14. R. G. Pertwee, *Curr. Med. Chem.*, **6**(8), 635 – 664 (1999).
15. D. M. Yellon, J. M. Downey, *Physiol. Rev.*, **83**(4), 1113 – 1151 (2003).

Поступила 01.06.12

## MEDIATED ROLE OF NO-SYNTASE, PROTEIN KINASE C AND K<sub>ATP</sub>-CHANNELS IN REALIZATION OF CARDIOPROTECTIVE IMPACT OF CANNABINOID HU-210

L. N. Maslov<sup>1</sup>, O. V. Lasukova<sup>1</sup>, A. V. Krylatov<sup>1</sup>, L. Hanuš<sup>2</sup>, and Yu. B. Lishmanov<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Federal State Budgetary Institution “Research Institute for Cardiology” of Siberian Branch under the Russian Academy of Medical Sciences, ul. Kyevsкая 111A, Tomsk, 634012, Russia

<sup>2</sup> Institute for Drug Research, Hebrew University of Jerusalem, Ein Kerem, Jerusalem, Israel

It was shown that perfusion of the isolated heart of rat with solution containing the CB1- and CB2-receptor agonist HU-210 at concentrations of 0.1 or 1.0 μM/L for a duration of 10 min at 20 min before global ischemia (45 min) and reperfusion (30 min) promotes a twofold decrease in creatine kinase levels in coronary effluent. It was established that K<sub>ATP</sub> channel blockade by glibenclamide (1 μM/L) or inhibition of protein kinase C (2 μM/L) by chelerythrine abolishes the cardioprotective effect of HU-210. The inhibitor of NO synthase L-NAME (1 μM/L) had no effect on the anti-necrotic effect of HU-210. Thus, the intracellular signaling mechanism of the cardioprotective effect of the CB-agonist HU-210 involves the activation of K<sub>ATP</sub> channels and protein kinase C without the participation of NO-synthase.

**Key words:** Heart; ischemia; reperfusion; cannabinoid receptors