

УДК 616.092

Изменения экспрессии генов серотониновых 5HT_{2A}-R и эндотелиновых ETA-R рецепторов как маркеры раннего старения аорты крысы

Кожевникова Л.М.¹, Суханова И.Ф.¹, Цорин И.Б.², Вититнова М.Б.², Крыжановский С.А.²¹ Федеральное государственное бюджетное научное учреждение

«Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии». 125315, Москва, ул. Балтийская, д. 8

² Федеральное государственное бюджетное научное учреждение

«Научно-исследовательский институт фармакологии имени В.В. Закусова», 125315, Москва, ул. Балтийская, д. 8

Возраст является основным фактором риска развития сердечно-сосудистых заболеваний. Однако механизмы влияния старения на развитие заболеваний до сих пор не понятны. Цель исследования — изучение влияния старения на функциональную активность и экспрессию рецепторов эндогенных вазоконстрикторов в аорте крысы. Методы. Исследования проводили на беспородных крысах-самцах в возрасте 4 и 12 мес. Силу сокращения изолированных фрагментов грудного отдела аорты измеряли в изометрическом режиме по методу Мульвани. Выделение РНК из аорты проводили с помощью набора GeneJET™, синтез кДНК — используя набор RevertAid™ H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit («Thermo Fisher Scientific», США), ПЦР-РВ проводили с помощью набора qPCRmix-HS («Евроген», Россия), используя праймеры и флуоресцентные зонды («ДНК-синтез», Россия), согласно протоколам производителей. Результаты. Ранними признаками старения сосудов является их сенситизация к вазоконстрикторному действию серотонина (5HT), обусловленная гиперэкспрессией гена рецепторов 5HT_{2A}-типа (194% от уровня в сосудах 4-мес. крыс). Чувствительность аорты по отношению к воздействию норадреналина, ангиотензина II, аргининвазопрессина и эндотелина-1 у крыс в возрасте 12 мес. остается такой же, как у молодых животных. Установлено, что в аорте стареющих крыс значительно снижается уровень мРНК эндотелиновых рецепторов ETA-типа (55%). Сохранение чувствительности сосудов к вазоконстрикторному действию ET1 при двукратном снижении экспрессии гена ETA-R косвенно свидетельствует об участии данных рецепторов не только в поддержании тонуса сосудов, но и в реализации других эффектов ET1. Заключение. Таким образом, повышение функциональной активности и экспрессии серотониновых 5HT_{2A}-R, а также гипоекспрессия эндотелиновых ETA-R являются ранними проявлениями старения аорты крыс и могут рассматриваться как маркеры возрастных изменений сосудов.

Ключевые слова: возраст; аорта; тонус сосудов; экспрессия генов; мРНК; рецепторы.

Для цитирования: Кожевникова Л.М., Суханова И.Ф., Цорин И.Б., Вититнова М.Б., Крыжановский С.А. Изменения экспрессии генов серотониновых 5HT_{2A}-R и эндотелиновых ETA-R рецепторов как маркеры раннего старения аорты крысы. Патогенез. 2018; 16(3): 94–97

DOI: 10.25557/2310-0435.2018.03.94-97

Для корреспонденции: Кожевникова Любовь Михайловна, e-mail: lubovmih@yandex.ru

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила: 02.09.2018

Changes in gene expression of serotonin 5HT_{2A}-R and endothelin ETA-R receptors as markers for early aging of rat aorta

Kozhevnikova L.M.¹, Sukhanova I.F.¹, Tsorin I.B.², Vititnova M.B.², Kryzhanovskii S.A.²¹ Institute of General Pathology and Pathophysiology, Baltijskaya Str. 8, Moscow 125315, Russian Federation² V.V. Zakusov Institute of Pharmacology, Baltijskaya Str. 8, Moscow 125315, Russian Federation

Age is the major risk factor for cardiovascular disease. However, mechanisms of the effect of aging on the disease development are still unclear. The aim of this study was to investigate the effect of aging on functional activity and expression of endogenous vasoconstrictor receptors in the rat aorta. **Methods.** The study was performed on mongrel male rats aged 4 and 12 months. Contraction force of fragments isolated from the thoracic aorta was measured in an isometric mode using the Mulvani method. RNA was isolated from the aorta using the GeneJET™ kit; cDNA synthesis was measured using the RevertAid™ H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Fisher Scientific, USA); PCR-RT was performed using the qPCRmix-HS kit (Evrogen, Russia) with primers and fluorescent probes (DNA synthesis, Russia) according to manufacturer's protocols. **Results.** Early signs of vascular aging included blood vessel sensitization to the vasoconstrictor effect of serotonin (5HT) due to overexpression of 5HT_{2A}-type receptors (194% of the level in blood vessels of 4-month old rats). The aorta sensitivity to norepinephrine, angiotensin II, arginine vasopressin, and endothelin-1 in 12-month old rats remained the same as in younger animals. The level of ETA-type endothelin receptor mRNA was significantly reduced in the aorta of ag-

ing rats (55%). Preservation of vascular sensitivity to the vasoconstrictor action of ET1 with a twofold decrease in the expression of the ETA-R gene indirectly indicated an involvement of these receptors not only in maintaining the vascular tone but also in mediating other ET1 effects. **Conclusion.** Therefore, increases in the functional activity and expression of serotonin 5HT_{2A}-R along with the hypoexpression of endothelin ETA-R are early manifestations of rat aorta aging and can be considered as markers for age-related changes in blood vessels.

Key words: age; aorta; vascular tone; gene expression; mRNA; receptors.

For citation: Kozhevnikova L.M., Sukhanova I.F., Tsorin I.B., Vititnova M.B., Kryzhanovskii S.A. [Changes in gene expression of serotonin 5HT_{2A}-R and endothelin ETA-R receptors as markers for early aging of rat aorta]. *Patogenez [Pathogenesis]*. 2018; 16(3): 94–97 (in Russian)

DOI: 10.25557/2310-0435.2018.03.94-97

For correspondence: Kozhevnikova Lubov' Mikhailovna, e-mail: lubovmih@yandex.ru

Funding. The study had no sponsorship.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Received: 02.09.2018

Введение

В настоящее время благодаря успехам медицины и повышению уровня жизни значительно увеличилась средняя продолжительность жизни, что привело к росту доли пожилых людей и обусловило необходимость решения многих социальных, экономических и медицинских вопросов, связанных со старением. Возраст является основным фактором риска развития неврологических и сердечно-сосудистых заболеваний в современном обществе. Установлено, что среди мужчин и женщин после 40 лет вероятность развития хронических сердечно-сосудистых заболеваний составляет 50%, гипертонии — 85%, а сердечной недостаточности — 20% [1, 2]. Однако механизмы влияния возраста на будущее развитие сердечно-сосудистых заболеваний полностью не понятны. Сложность решения данной медицинской проблемы заключается в том, что старение является естественным процессом угасания биологических функций и способности приспособляться к изменениям как внутренних, так внешних факторов среды на уровне всех систем и органов. В процессе старения прогрессирующее повреждение сосудов может быть даже при контролируемом артериальном давлении, и связано с ремоделированием сосудистой стенки и ее повышенной жесткостью. У молодых людей артериальное давление определяется в основном резистентностью периферических сосудов, в то время как у пожилых людей — в большей степени жесткостью магистральных сосудов [3]. В результате активации процессов ремоделирования увеличивается толщина стенок сосудов, нарушается их эластичность, обусловленная потерей эластина, увеличивается диаметр сосудов, что, по-видимому, является компенсаторной реакцией, направленной на поддержание просвета сосудов.

Возрастные изменения функции эндотелия сосудов характеризуются преобладанием вазоконстрикторной, прокоагулянтной, пролиферативной и провоспалительной активности над сосудорасширяющим, антикоагулянтным, антипролиферативным и противовоспалительным действием [4]. Полагают, что с возрастом снижается биодоступность NO в резистентных артериях в результате окислительного стресса, сниженной антиоксидантной активности, а также уменьшения синтеза тетрагидробиоптерина (BH₄) — важного кофактора генерации NO [5, 6]. Кроме того, показано, что у старых животных в гладкомышечных клетках сосудов уменьшается экспрессия растворимой гуанилатциклазы (sGC) — рецептора, опосредующего эффекты NO [7]. Наряду с нарушением эндотелий-зависимой релаксации сосудов с возрастом может изменяться передача сигнала от рецепторов вазоконстрик-

торных соединений [8]. Молекулярные механизмы, лежащие в основе старения сосудов, реализуются на уровне экспрессии генов и сигнальных каскадов [9]. *Цель исследования:* изучение влияния старения на функциональную активность и экспрессию рецепторов эндогенных вазоконстрикторов в аорте крысы.

Материалы и методы исследования

Эксперименты выполнены на беспородных крысах-самцах. Условия содержания животных соответствовали приказу МЗ РФ № 708н «Об учреждении правил лабораторной практики» от 23.08.2010 и этическим нормам, изложенным в Правилах лабораторной практики (GLP) Хельсинской декларации (2000).

Включенные в исследование животные были рандомизированы на 2 группы:

- 1-я группа — крысы в возрасте 4 мес. с массой тела 180–230 г (молодые, n = 20);
- 2-я группа — крысы в возрасте 12 мес. с массой тела 480–550 г (возрастные, n = 20).

Оценку влияния возраста на чувствительность сосудов к действию эндогенных вазоконстрикторов изучали на изолированных фрагментах аорты крыс. Животных наркотизировали 25%-ным раствором уретана (4 мл/кг). Затем крыс декапитировали, вскрывали грудную клетку, извлекали грудной отдел аорты и помещали его в охлажденный физиологический раствор Кребса—Хенсেলাйта. Сосуды очищали от жировой и соединительной ткани и нарезали на кольца шириной 1,5–2,0 мм. От каждого сосуда в эксперимент брали по 2 кольца. Кольцевые фрагменты сосудов крепили на держателях, помещенных в раствор Кребса—Хенсেলাйта (37°C), через который пропускали карбоген (смесь O₂ : CO₂ = 95 : 5%). Состав раствора Кребса—Хенсেলাйта в мМ: NaCl — 121; KCl — 4,69; KH₂PO₄ — 1,1; NaHCO₃ — 23,8; MgSO₄ — 1,6; CaCl₂ — 1,6; ЭДТА — 0,032; D-глюкоза — 8.

Силу сокращения изолированных фрагментов аорты измеряли в изометрическом режиме по методу Мульвани. Функциональную активность вазоконстрикторных рецепторов оценивали с помощью фармакологического анализа с применением селективных лигандов. Были использованы серотонин (5HT), норадреналин (NA), эндотелин-1 (ET1), аргининвазопрессин (AVP) и ангиотензин II (АТII) (Sigma, США). О целостности эндотелиального слоя сосудов судили по степени их расслабления на воздействие не гидролизуемого ацетилхолинэстеразами аналога ацетилхолина — карбахола (Sigma, США).

Молекулярные исследования. Для выделения РНК аорты отмывали от крови в физиологическом растворе натрия хлорида при +4°C, после чего сосуд помещали в раствор RNAlater (США, Ambion) и хранили до выделения РНК при температуре -20°C. Образцы, извлеченные из раствора RNAlater, освобождали от остатков жидкости и гомогенизировали при помощи фарфоровой ступки в жидком азоте. Выделение РНК из тканей левого желудочка сердца проводили с помощью набора GeneJET™ («Thermo Fisher Scientific», США) согласно протоколу производителя. Концентрацию суммарной РНК в образцах определяли на спектрофотометре NanoDrop® ND-1000 («Thermo Fisher Scientific Inc.», США). Выделенную суммарную РНК для предотвращения контаминации геномной ДНК обрабатывали ДНКазой I. Добавив все компоненты, смесь инкубировали при 37°C в течение 30 мин. Фермент инактивировали нагреванием при 65°C в течение 10 мин., предварительно добавив 25 мМ ЭДТА, из расчета 1 мкл на 10 мкл реакционной смеси, для предотвращения гидролиза РНК в процессе нагревания. Реакцию обратной транскрипции (синтез цепи комплементарной ДНК) проводили с использованием гексамерных Random праймеров и обратной транскриптазы M-MuLV в составе набора RevertAid™ H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit (США) в соответствии с протоколом производителя. Синтезированную кДНК хранили при -20°C. ПЦР-РВ проводили с помощью набора qPCRmix-HS

(«Евроген», Россия). Праймеры для генов были предоставлены ООО «ДНК-Синтез» с дополнительным праймером-зондом, содержащим флуоресцентный краситель FAM и его тушитель BHQ1 (Россия). В качестве гена «домашнего хозяйства» был использован ген β-актина. ПЦР-РВ проводили в 96-луночном ПЦР-планшете («Bio-Rad Laboratories, Inc.», США) на амплификаторе CFX96™ Real-Time PCR Detection Systems («Bio-Rad Laboratories, Inc.», США).

Статистика. Предварительную обработку результатов проводили с использованием программного обеспечения, приложенного к прибору. Дальнейшая обработка проводилась в приложении Microsoft Excel с использованием алгоритма $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Расчет уровня матричной РНК (мРНК) проводили с использованием алгоритма delta delta (Ct), в основу которого положены относительные изменения пороговых циклов (Ct) исследуемого и референсного гена в опытных и контрольных образцах. Статистическую значимость различий определяли с помощью t-критерия Стьюдента. Различия считали значимыми при $p \leq 0,05$.

Результаты исследования и обсуждение

В данной работе объектом наших исследований были сосуды относительно молодых крыс (приблизительное соответствие возрасту человека — 35–40 лет). Установлено, что чувствительность изолированных колец аорты, выделенных из организма крыс, достигших 12 мес. возраста, по отношению к действию эндотелина-1, норадреналина, ангиотензина II и аргининвазопрессина существенно не отличается от реакции сосудов молодых животных (4 мес.) (рис. 1). Вместе с тем, с увеличением продолжительности жизни животных повышается реактивность сосудов к вазоконстрикторному действию низких и средних концентраций серотонина (0,1–5 мкМ). Так, сила сокращения аорты на воздействие моноамина в концентрации 1 мкМ возрастает в 1,7 раза по сравнению с реакцией сосудов молодых крыс (535 ± 18 и 324 ± 13 мг соответственно, $p < 0,05$) (рис. 1).

У крыс в возрасте 12 мес. отмечается высокий уровень экспрессии гена серотониновых рецепторов 5HT2A-типа (возрастает в 1,9 раза относительно уровня в сосудах 4-мес. крыс) и низкий — для эндотелиновых рецепторов ETA-типа (снижается в 1,8 раза), посредством которых реализуются вазоконстрикторные эффекты серотонина и эндотелина-1 (рис. 2). По сравнению с молодыми крысами неизменным остается уровень мРНК для α_{1a} -AR, ангиотензиновых AT1A-R и незначительно возрастает для вазопрессиновых V1A-R (рис. 2).

Полученные в настоящем исследовании данные свидетельствуют о том, что у крыс в возрасте 12 мес. повышается чувствительность аорты только к действию 5HT и не изменяется по отношению к другим эндогенным вазоконстрикторам — NA, АТII, AVP и ET1. При этом гиперчувствительность к 5HT коррелирует с высоким уровнем экспрессии гена 5HT2A-R, посредством которых реализуется его вазоконстрикторный эффект.

У стареющих крыс почти в 2 раза уменьшается уровень мРНК для ETA-R, при этом сохраняется чувствительность к действию ET1 (рис. 1, 2). Полученные результаты согласуются с данными экспериментальных исследований на мышах [10]. Показано, что, по сравнению с сосудами молодых мышей (4 мес.), сила сокращения сонных артерий старых животных (24 мес.), значительно снижа-

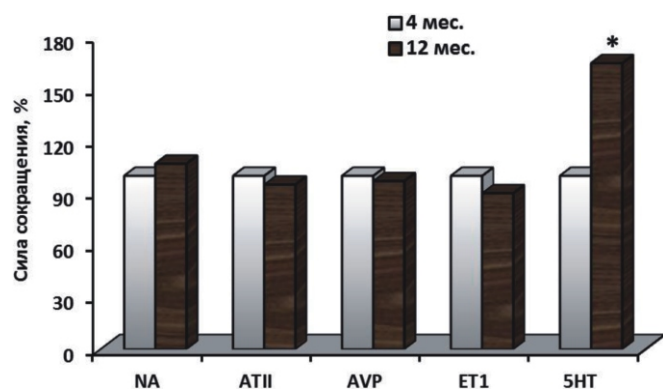


Рис. 1. Возрастные изменения сократимости изолированных колец аорты в ответ на воздействие эндотелина-1 (ET1, 0,005 мкМ), норадреналина (NA, 0,1 мкМ), серотонина (5HT, 1мкМ), ангиотензина II (ATII, 0,01 мкМ) и аргининвазопрессина (AVP, 0,01 мкМ). За 100% принята величина агонист-индуцированного сокращения колец аорты молодых крыс (4 мес.). * — $p < 0,05$ по сравнению с реакцией сосудов молодых крыс.

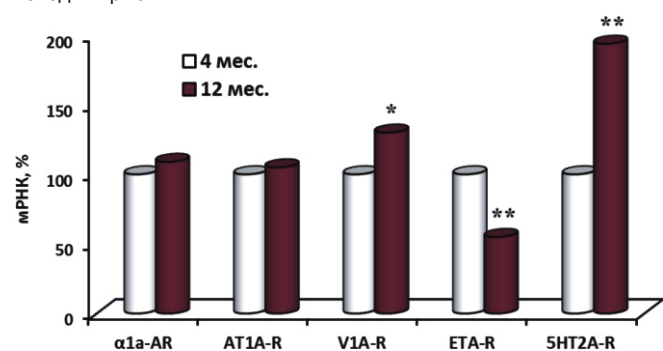


Рис. 2. Возрастные изменения уровня мРНК α_{1a} -адренорецепторов (α_{1a} -AR), ангиотензиновых (AT1A-R), вазопрессиновых (V1A-R), эндотелиновых (ETA-R) и серотониновых (5HT2A-R) рецепторов. * — $p < 0,05$; ** — $p < 0,01$ — значимость различий с показателями у молодых крыс (4 мес.).

ется в ответ на воздействие ЕТ1 и не меняется на АП1. При этом в сонных артериях старых мышей уменьшается экспрессия гена ЕТА-Р и увеличивается экспрессия гена ЕТВ-Р. Все это позволило авторам заключить, что ЕТ1, но не АП1, способствует функциональному старению сонных артерий мышей.

Выявленный факт значительного снижения экспрессии гена эндотелиновых рецепторов ЕТА-типа у относительно молодых крыс свидетельствует об их важной роли в процессах старения сосудов. Известно, что эффекты эндотелина-1 в сердечно-сосудистой системе определяются соотношением активностей рецепторов ЕТА-/ЕТВ-типа и дисбаланс этих рецепторов является патогенетическим фактором развития целого ряда заболеваний. Показано, что в процессе старения крыс (24 мес.) в сердце уменьшаются эффекты, опосредованные ЕТА-Р. Полагают, что со снижением содержания ЕТА-Р связаны возрастные структурные изменения миокарда [11]. По мнению авторов, оценка состояния эндотелиновой системы может быть надежным маркером возрастных физиопатологических процессов в сердце.

Заключение

Таким образом, ранними признаками старения сосудов являются гиперэкспрессия гена серотониновых рецепторов 5HT_{2A}-типа, приводящая к сенситизации сосудов к вазоконстрикторному действию 5HT, а также гипоэкспрессия гена эндотелиновых рецепторов ЕТА-типа. Сохранение чувствительности сосудов к вазоконстрикторному действию ЕТ1 при двукратном снижении уровня мРНК ЕТА-Р косвенно свидетельствует об участии данных рецепторов не только в поддержании тонуса сосудов, но в реализации других эффектов ЕТ1, в том числе в процессах ремоделирования сосудов.

Сведения об авторах:

Кожевникова Любовь Михайловна — доктор медицинских наук, главный научный сотрудник лаборатории хронического воспаления и микроциркуляции Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии»

Суханова Ирина Федоровна — кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории хронического воспаления и микроциркуляции Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии»

Цорин Иосиф Борисович — доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории фармакологического скрининга Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт фармакологии имени В.В. Закусова»

Вититнова Марина Борисовна — кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории фармакологического скрининга Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт фармакологии имени В.В. Закусова»

Крыжановский Сергей Александрович — доктор медицинских наук, заведующий лабораторией фармакологического скрининга Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт фармакологии имени В.В. Закусова»

References

1. Lakatta E.G., Levy D. Arterial and cardiac aging: major shareholders in cardiovascular disease enterprises: Part I: aging arteries: a «set up» for vascular disease. *Circulation*. 2003; 107(1): 139-146. PMID: 12515756
2. Lakatta E.G. So! What's aging? Is cardiovascular aging a disease? *J. Mol. Cell. Cardiol.* 2015; 83: 1-13. DOI: 10.1016/j.yjmcc.2015.04.005
3. Thijssen D.H., Carter S.E., Green D.J. Arterial structure and function in vascular ageing: are you as old as your arteries? *J. Physiol.* 2016; 594(8): 2275-2284. DOI: 10.1113/JP270597
4. Seals D.R., Jablonski K.L., Donato A.J. Aging and vascular endothelial function in humans. *Clin. Sci. (Lond)*. 2011; 120(9): 357-375. DOI: 10.1042/CS20100476
5. Rodriguez-Manas L., El-Assar M., Vallejo S., Lopez-Doriga P., Solis J., Petidier R., Montes M., Nevado J., Castro M., Gomez-Guerrero C., Peiro C., Sanchez-Ferrer C.F. Endothelial dysfunction in aged humans is related with oxidative stress and vascular inflammation. *Aging Cell*. 2009; 8(3): 226-238. DOI: 10.1111/j.1474-9726.2009.00466.x
6. Donato A.J., Morgan R.G., Walker A.E., Lesniewski L.A. Cellular and molecular biology of aging endothelial cells. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 2015; 89(Pt B): 122-135. DOI: 10.1016/j.yjmcc.2015.01.021
7. Chen L., Daum G., Fischer J.W., Hawkins S., Bochaton-Piallat M.L., Gabbiani G., Clowes A.W. Loss of expression of the beta subunit of soluble guanylyl cyclase prevents nitric oxide-mediated inhibition of DNA synthesis in smooth muscle cells of old rats. *Circ. Res.* 2000; 86(5): 520-525.
8. Westby C.M., Weil B.R., Greiner J.J., Stauffer B.L., De Souza C.A. Endothelin-1 vasoconstriction and the age-related decline in endothelium-dependent vasodilatation in men. *Clin. Sci. (Lond)*. 2011; 120(11): 485-491. DOI: 10.1042/CS20100475
9. Muslin A.J. MAPK signalling in cardiovascular health and disease: molecular mechanisms and therapeutic targets. *Clin. Sci. (Lond)*. 2008; 115: 203-218. DOI: 10.1042/CS20070430
10. Meyer M.R., Fredette N.C., Barton M., Prossnitz E.R. *Life Sci.* 2014; 118(2): 213-218. DOI: 10.1016/j.lfs.2016.02.041
11. Del Ry S., Maltinti M., Giannesi D., Cavallini G., Bergamini E. *Exp. Aging Res.* 2008; 34(3): 251-266. DOI: 10.1080/03610730802070233