

УДК 615.357.03:617-001.36].015.4.076.9

5HT1В- и 5HT2В-рецепторы вызывают увеличение концентрации ионов кальция в эндотелиальных клетках кровеносных сосудов*

ТЕРЕХИНА И.Л.¹, НАДЕЕВ А.Д.², КОЖЕВНИКОВА Л.М.¹, ГОНЧАРОВ Н.В.², АВДОНИН П.В.^{1,3}

¹ — Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии» Российской академии медицинских наук, 125315, Москва, ул. Балтийская, 8

² — НИИ гигиены, профпатологии и экологии человека ФМБА России, Санкт-Петербург

³ — ФГБУ Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, Москва

Целью работы было изучение механизма сосудорасслабляющего действия 5HT1В- и 5HT2В-рецепторов серотонина. Эксперименты проводились на изолированной аорте крысы и на культивируемых эндотелиальных клетках (ЭК) из пуповинной вены человека и гладкомышечных клетках (ГМК) из аорты крысы. Для активации 5HT1В- и 5HT2В-рецепторов использовали их селективные агонисты CGS12066В и BW723С соответственно. Установлено, что CGS12066В и BW723С вызывают увеличение цитоплазматической концентрации ионов кальция ($[Ca^{2+}]_{цит}$) в ЭК. Эти эффекты CGS12066В и BW723С наблюдались в той же области концентраций, при которых они вызывают расслабление аорты крысы. Сделан вывод о том, что 5HT1В- и 5HT2В-рецепторы оказывают вазодилаторное действие о эндотелийзависимому механизму, в основе которого лежит увеличение $[Ca^{2+}]_{цит}$ в ЭК.

Ключевые слова: серотонин, 5HT1В- и 5HT2В-рецепторы, эндотелиальные клетки, аорта, кальций

Введение

Серотонин был открыт в конце тридцатых годов как содержащий аминокислотную группу фактор, секретируемый хромаффинными клетками и вызывающий сокращение гладких мышц кишечника [6]. В связи с этим его первым названием было энтерамин. Повторно серотонин был открыт в сыворотке крови через 13 лет [10]. Современное название он получил благодаря способности вызывать сокращение изолированных кровеносных сосудов. Серотонин по своей структуре представляет производное аминокислоты триптофана — 5-гидрокситриптамин (5HT) и оказывает действие на клетки через 7 типов 5HT-рецепторов, локализованных в плазматической мембране. Шесть из них относятся к суперсемейству гептаспиральных сопряженных с G-белками рецепторов (G protein-coupled receptors, GPCR), а 5HT3-рецепторы представляют собой катионные каналы. Помимо G-белков с 5HT-рецепторами непосредственно взаимодействуют другие регуляторные, адапторные и каркасные белки [13]. Несмотря на то, что влияние 5HT на изолированные сосуды было установлено сразу же после его обнаружения в сыворотке крови, функция и механизмы действия части экспрессирующихся в сосудах 5HT-рецепторов до конца не изучены. В кровеносных сосудах млекопитающих выявлены 5HT1А-, 5HT1В-, 5HT1D-, 5HT2А-, 5HT2В-, 5HT4- и 5HT7-рецепторы [7-9, 11, 12]. Наиболее исследована функция 5HT2А-рецепторов, которые локализованы в ГМК и обеспечивают сокращение сосудов *in vitro* под действием 5HT. По нашим данным, в аорте и брыжеечной артерии крысы вазоконстрикцию вызывают также

5HT1А-рецепторы. 5HT1А-рецепторы находятся в латентном состоянии и проявляют функциональную активность при совместном действии с пептидными вазоконстрикторами и при деполяризации плазматической мембраны [4, 5]. Нами установлено, что релаксацию изолированных аорты и брыжеечной артерии крысы вызывают агонисты 5HT1В-, 5HT2В-, 5HT4- и 5HT7-рецепторов [3]. 5HT4- и 5HT7-рецепторы серотонина сопряжены с Gs-белком и аденилатциклазой. Сосудорасслабляющее действие агонистов этих рецепторов можно объяснить активацией синтеза цАМФ в гладкомышечных клетках аорты и брыжеечной артерии. Ранее было показано, что повышение уровня цАМФ в клетках сосудистой стенки приводит к расслаблению аорты. Вопрос о механизме вазодилаторного действия агонистов 5HT1В- и 5HT2В-рецепторов оставался открытым. В настоящей работе нами установлено, что активация 5HT1В- и 5HT2В-рецепторов вызывает увеличение концентрации ионов кальция в цитоплазме эндотелиальных клеток. Это подтверждает ранее высказанное предположение о том, что вызываемое этими рецепторами расслабление происходит по эндотелийзависимому механизму.

Методы

Для активации исследуемых рецепторов использовали их селективные агонисты — CGS12066В для 5HT1В- и BW723С для 5HT2В-рецепторов. Силу сокращения изолированных кольцевых фрагментов аорты определяли в изометрическом режиме [2]. Изменения цитоплазматической концентрации ионов кальция ($[Ca^{2+}]_{цит}$) в эндотелиальных клетках (ЭК) и гладкомышечных клетках (ГМК)

* Работа поддержана грантами РФФИ №11-04-01520 и №11-04-01957.

под влиянием агонистов 5HT-рецепторов и других вазоактивных гормонов и нейротрансмиттеров регистрировали с помощью флуоресцентных зондов CalciumGreen и Fluo-4 соответственно. ГМК выделяли методом эксплантов из аорты крысы [5], ЭК получали из пуповинной вены человека с помощью коллагеназы [1]. Клетки ранних пассажей (ЭК 1—2 пассажей, ГМК 3—7 пассажей) высевали в 24- и 96-луночных планшетах, флуоресценцию регистрировали на микропланшетном флуоресцентном ридере Synergy 4 (BioTec).

Результаты исследования

Мы показали, что агонисты 5HT_{1B}- и 5HT_{2B}-рецепторов CGS12066B и BW723C вызывают расслабление колец аорты крысы, предсокращенных норадреналином и эндотелином-1 [3]. Эти данные приведены на рис. 1. Следует отметить, что CGS12066B и BW723C действовали обратимо, и их эффекты нельзя объяснить неспецифической активацией вазодилаторных мускариновых рецепторов для ацетилхолина, так как скополамин не блокировал действие лигандов серотониновых рецепторов. Можно также исключить конкуренцию за связывание с рецепторами вазоконстрикторных агонистов, поскольку вазодилаторный эффект воспроизводился на сосудах, предсокращенных различными соединениями. Оказалось, что агонисты 5HT_{1B}- и 5HT_{2B}-рецепторов вызывают вазорелаксацию по механизму, отличному от механизма действия ацетилхолина. Блокатор образования окиси азота в ЭК L-NAME устранял расслабление аорты под влиянием

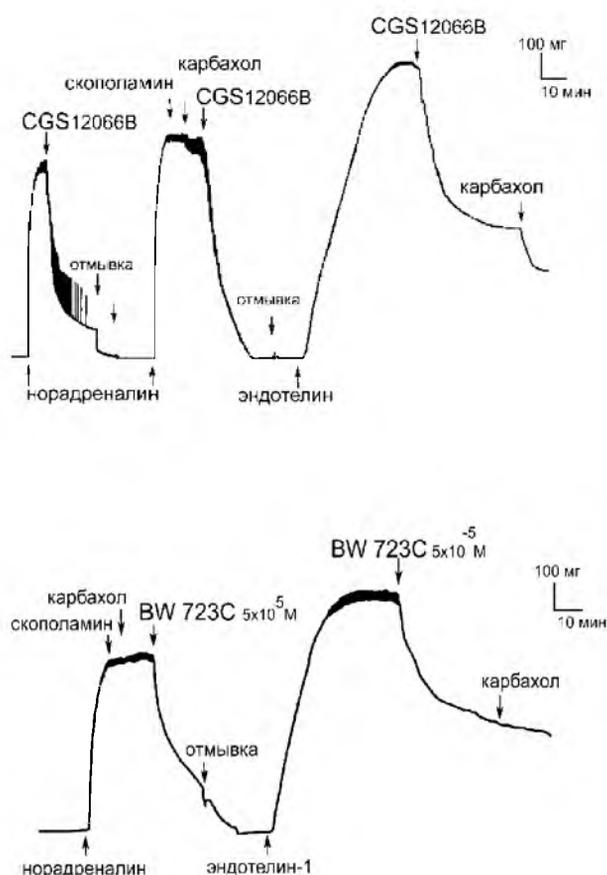


Рис. 1. Расслабление аорты под влиянием 10^{-5} M CGS12066B и 5×10^{-5} M BW723C. Концентрации норадреналина, скополамина, карбахола и эндотелина-1 составляли 10^{-7} , 10^{-5} , 10^{-5} и 10^{-7} M соответственно

карбахола, но не препятствовал действию CGS12066B и BW723C, добавляемых в концентрациях 10—100 мкМ.

Расслабление сосуда может осуществляться по эндотелийзависимому пути, когда при активации рецепторов в ЭК увеличивается секреция NO, простаглицлина (PGI_2) и/или гиперполяризующего фактора (endothelium derived hyperpolarizing factor — EDHF), либо в результате прямого воздействия вазоактивных соединений на ГМК. Образование и секреция расслабляющих факторов запускается при повышении $[Ca^{2+}]_{цит}$ в ЭК. Для оценки роли эндотелия в расслаблении сосуда под влиянием агонистов 5HT_{1B}- и 5HT_{2B}-рецепторов мы исследовали их влияние на кальциевые обмен в культивируемых ЭК. Как видно из данных, представленных на рис. 2, агонисты 5HT_{1B}- и 5HT_{2B}-рецепторов вызывают выраженный подъём $[Ca^{2+}]_{цит}$ в ЭК пуповинной вены человека в той же области концентраций, при которых они вызывают расслабление сосудов. Однако кальциевые сигналы, запускаемых 5HT-рецепторами, отличаются от кальциевых сигналов, вызванных активацией рецепторов тромбина и гистамина. Для 5HT_{1B}-рецепторов это очевидно (рис. 2А), а особенности в действии 5HT_{2B}-рецепторов можно видеть при развернутом масштабе времени (рис. 2Б). Скорость подъёма $[Ca^{2+}]_{цит}$ в ответ на воздействие BW 723C86 была

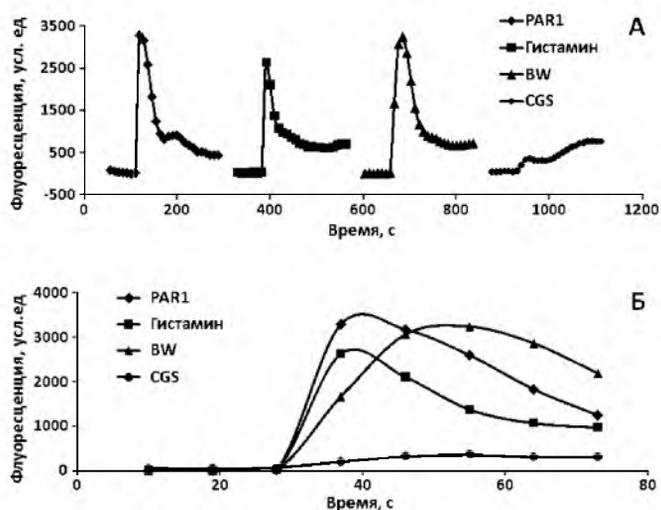


Рис. 2. Увеличение $[Ca^{2+}]_{цит}$ в ЭК пуповинной вены человека в ответ на активацию рецепторов тромбина (PAR1), гистамина, серотониновых рецепторов 5HT_{2B}- и 5HT_{1B}-типов. Рецепторы тромбина (protease activated receptors type I — PAR1) активировали добавлением пептидного лиганда SFLLRN (10 мкг/мл)

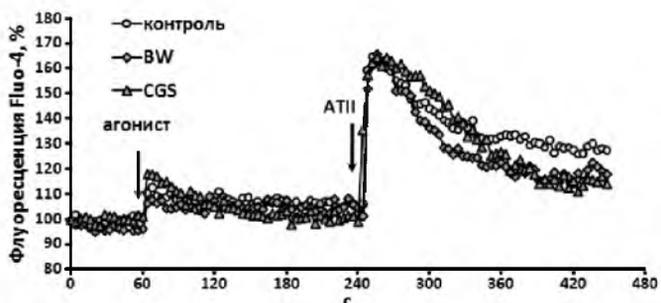


Рис. 3. Увеличение $[Ca^{2+}]_{цит}$ в ГМК аорты крысы под влиянием ангиотензина II (10^{-7} M) в отсутствие или в присутствии агонистов 5HT_{1B}- и 5HT_{2B}-рецепторов BW723C86 (100 мкМ) или CGS12066B (100 мкМ), добавлявшихся за 3 мин до ангиотензина II

по крайней мере в 2 раза меньше, чем при действии гистамина и агониста тромбиновых рецепторов SFLLRN. Мы предполагаем, что 5HT_{2B}-рецепторы в ЭК вызывают первую фазу кальциевого сигнала не через активацию фосфолипазы C, а путем открывания рианодиновых каналов, которые имеются в ретикулуме ЭК. Увеличение $[Ca^{2+}]_{цит}$ в ЭК под влиянием CGS12066B и BW723C свидетельствует о том, что эндотелий участвует в расслаблении сосудов при активации в нем 5HT_{1B}- и 5HT_{2B}-рецепторов. Вопрос о том, происходит ли это в результате секреции PGI₂ и/или EDHF, остаётся открытым.

Альтернативный механизм вазодилатации заключается в прямом воздействии агонистов на ГМК сосудов и подавлении реакции этих клеток на вазоконстрикторные гормоны и нейротрансмиттеры. Если CGS12066B и BW723C действуют не только через эндотелий, но также по этому пути, то можно ожидать подавления ими кальциевых сигналов в культивируемых ГМК аорты крысы. Мы не обнаружили на прирост $[Ca^{2+}]_{цит}$ в ответ на ангиотензин II (рис. 3). В ГМК уровень $[Ca^{2+}]_{цит}$ возрастал под влиянием 5HT, но его действие также не подавлялось CGS12066B и BW723C.

Обсуждение

Полученные данные указывают на существование в ЭК кровеносных сосудов 5HT_{1B}- и 5HT_{2B}-рецепторов, активация которых вызывает увеличение $[Ca^{2+}]_{цит}$. Ионы кальция стимулируют синтез и секрецию ЭК сосудорасслабляющих факторов. По-видимому, реакция сосудов как *in vivo*, так и *in vitro* определяется соотношением активности вазодилаторных и вазоконстрикторных 5HT-рецепторов. У изолированных сосудов главную роль играют вазоконстрикторные рецепторы — в первую очередь 5HT_{2A}-рецепторы. В норме при введении 5HT внутривенно функциональная активность вазодилаторных 5HT-рецепторов проявляется в большей степени, поэтому происходит снижение артериального давления. Возможно, это связано и с большей доступностью 5HT-рецепторов, расположенных в эндотелии по сравнению с 5HT-рецепторами ГМК сосудов. Соотношение функциональной активности разных

видов 5HT-рецепторов изменяется при патологических состояниях. Ранее нами было показано, что при травматическом шоке у крыс происходит инверсия ответа на 5HT — при его внутривенном введении вместо снижения происходит дозозависимый подъём артериального давления [2]. Сосуды, выделенные от животных с травматическим шоком, дают более сильное сокращение в ответ на 5HT. Выяснение механизмов регуляции экспрессии и функциональной активности разных видов 5HT-рецепторов может способствовать пониманию патогенеза заболеваний сердечно-сосудистой системы.

Список литературы

1. Гончаров Н.В., Сахаров И.Ю., Данилов С.М., Саканделидзе О.Г. // Бюл. эксперим. биол. и мед. — 1987. — Т. 103(9). — P. 376—378.
2. Кожевникова Л.М., Авдонин П.П., Суханова И.Ф., Авдонин П.В. // Бюл. эксперим. биол. и мед. — 2008. — Т. 145(3). — P. 298—301.
3. Кожевникова Л.М., Давыдова А.Г., Авдонин П.В. // Известия РАН. Серия биологическая. — 2009. — Т. 3. — P. 343—357.
4. Кожевникова Л.М., Авдонин П.В. // Известия РАН. Серия биологическая. — 2010. — Т. 1. — P. 1—10.
5. Кожевникова Л.М., Авдонин П.В. // Известия РАН. Серия биологическая. — 2011. — Т. 1. — P. 1—9.
6. Eispmeyer V., Vialli M. // Boll. d Soc. Med-chir. Pavia. — 1937. — Vol. 51. — P. 357—363.
7. Kato S., Kumamoto H., Hirano M., Akiyama H., Kaneko N. // Mol. Cell. Biochem. — 1999. — Vol. 199(1—2). — P. 57—61.
8. Martin G.R. // Pharmacol. Ther. — 1994. — Vol. 62(3). — P. 283—324.
9. Nilsson T., Longmore J., Shaw D., Pantev E., Bard J., Branchek T., Edvinsson L. // Eur. J. Pharmacol. — 1999. — Vol. 372(1). — P. 49—56.
10. Rapport M.M., Green A.A., Page I.H. // J. Biol. Chem. — 1948. — Vol. 176(3). — P. 1243—1251.
11. Ullmer C., Schmuck K., Kalkman H., Lubbert H. // FEBS Lett. — 1995. — Vol. 370(3). — P. 215—221.
12. Villalon C., Centurion D. // Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol. — 2007. — Vol. 376(1—2). — P. 45—63.
13. Xia Z., Sheffler D.J., Roth B.L. 5-HT Receptor-Associated Proteins (FRAPs): Relevance for Targeting, Trafficking, and Signal Transduction // The Serotonin Receptors: From Molecular Pharmacology to Human Therapeutics / Ed. by Bryan L. Roth. — Humana Press, 2006. — P. 257—276.

5HT_{1B}- and 5HT_{2B}-receptors of serotonin stimulate increase in cytoplasmic calcium concentrations in vascular endothelial cells

TEREKHINA I.L., NADEEV A.D., KOZHEVNIKOVA L.M., GONCHAROV N.V., AVDONIN P.V.

The aim of the work was to study the mechanism of vasodilatation mediated by 5HT_{1B}- and 5HT_{2B}-receptors of serotonin. The experiments were performed on isolated rat aorta and on cultured endothelial cells (EC) from human pulmonary vein and smooth muscle cells (SMC) from rat aorta. CGS12066B and BW723C were used for the activation of 5HT_{1B}- and 5HT_{2B}-receptors respectively. It was demonstrated that CGS12066B and BW723C induced elevation of free cytoplasmic calcium concentration ($[Ca^{2+}]_{цит}$) in EC. These effects of CGS12066B and BW723C were observed at concentrations at which they dilate aorta. It is concluded that 5HT_{1B}- and 5HT_{2B}-receptors cause vasodilatation according endothelium-dependent mechanism based on elevation of $[Ca^{2+}]_{цит}$ in EC.

Key words: serotonin, 5HT_{1B}- and 5HT_{2B}-receptors, endothelial cells, aorta, calcium