

Экспериментальные статьи

ЕГОРОВА А. А., ПЕТУНОВ С. Г.,
АВРАМЕНКО Е. А.

Источники кальция, активируемые гистамином и серотонином при стимуляции сократительной активности лимфатических сосудов белой крысы

Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И. М. Сеченова, Санкт-Петербург
e-mail: office@iephb.ru, itilia@mail.ru

Реферат

Гистамин и серотонин стимулируют сократительную активность лимфатических сосудов вследствие повышения концентрации цитозольного кальция. Гистамин активирует поступление Ca^{2+} из внеклеточного пространства и внутриклеточных IP_3 -чувствительных депо. Серотонин в низких концентрациях активирует поступление Ca^{2+} из интерстициального пространства и внутриклеточных IP_3 -чувствительных депо, высокие концентрации серотонина стимулируют также и риадинчувствительные депо.

Ключевые слова: лимфатические сосуды, гистамин, серотонин, кальций.

Egorova A. A., Petunov S. G., Avramenko E. A.

Activated histamine and serotonin, intracellular and extracellular sources of calcium for the stimulation of contractile activity of lymphatic vessels of white rats

The Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry, Saint-Petersburg
e-mail: office@iephb.ru, itilia@mail.ru

Abstract

Histamine and serotonin stimulate the rate of lymphatic vessel pumping by the increasing cytosolic Ca^{2+} concentration. Histamine increases the movement of Ca^{2+} through plasma membrane ligand or voltage gated Ca^{2+} channels and thorough release of Ca^{2+} from internal IP_3 -sensitive stores. Serotonin in low concentrations increases the movement of Ca^{2+} through plasma membrane ligand or voltage gated Ca^{2+} channels and the movement of Ca^{2+} from internal IP_3 -sensitive stores and in higher concentrations use also ryanodine sensitive stores.

Keywords: lymphatic vessels, histamine, serotonin, calcium.

Введение

Лимфатическая система играет важную роль в процессах микроциркуляции, обеспечивая поддержание постоянства гидратации интерстициального пространства посредством изменения сократительной активности миоцитов лимфатических сосудов (ЛС). Компонентами последней являются фазная активность, определяющая пропульсионную способность ЛС, и тоническая активность, обуславливающая сопротивление лимфоток [2].

Параметры сократительной активности лимфатических сосудов могут существенно изменяться под влиянием вазоактивных веществ, к которым относят гистамин и серотонин (5-НТ) [1, 2, 3, 9]. Одним из механизмов стимуляции сократительной активности миоцитов лимфатических сосудов является повышение концентрации цитозольного Ca^{2+} вследствие его поступления из интерстициального пространства и внутриклеточных депо [6, 23]. Механизмы увеличения концентрации Ca^{2+} в цитозоле в результате активации фармакомеханического сопряжения под

действием вазоактивных веществ, приводящих к стимуляции сократительной активности ЛС, остаются во многом не ясными.

Цель исследования

Установление источников кальция, активируемых гистамином и серотонином, для стимуляции сократительной активности лимфатических сосудов.

Материал и методы исследования

Эксперименты проводились на изолированных перфузируемых раствором Кребса сегментах переднего брыжеечного лимфатического протока белой крысы в рабочей камере установки Pressure Myograph System 110P (Danish Myo Technology). Длина исследуемого канюлированного сегмента лимфатического сосуда составила 5–7 мм, давление в сосудистом сегменте поддерживалось на уровне 6,5 см вод. ст., что соответствует гидродинамическим условиям в данном участке сосудистого русла [11]. Регистри-

ровали продольное напряжение гладкомышечного препарата в изометрических условиях. В качестве датчика напряжения использовали механоэлектрический преобразователь установки Pressure Myograph System 110P. Тестируемые вещества, растворенные в предварительно проаэрированном растворе Krebsa (pH 7,4), поступали в рабочую камеру посредством суперфузии. Температура в рабочей камере поддерживалась на уровне $37,5 \pm 0,5$ °C. Изучали влияние гистамина ("Sigma-Aldrich", США) в концентрациях 10^{-9} – 10^{-7} М, серотонина (5-НТ) ("Sigma-Aldrich", США) в концентрациях 10^{-8} – 10^{-4} М. Механизмы действия биогенных аминов изучали с использованием блокатора медленных кальциевых каналов L-типа нифедипина (10^{-6} М) ("Sigma-Aldrich", США), блокатора рианодинчувствительных депо-рианоидина ($5 \cdot 10^{-6}$ М) ("Sigma-Aldrich", США) [15] и инозитолтрифосфатных депо – гепарина (5 Ед/мл) ("Sigma-Aldrich", США) [6, 12].

Статистическую обработку материалов проводили с использованием методов описательной и аналитической статистики в программе «Graph Pad Prism 5.04». За критический уровень значимости принимали $p=0,05$. Для описания центральной тенденции использовали значение среднего арифметического, в качестве меры рассеяния данных применяли стандартное отклонение. Данные внутри группы сравнивали с помощью Т-критерия Вилкоксона.

Результаты исследования и их обсуждение

В экспериментах использовались изолированные сегменты лимфатических сосудов (лимфангионы) переднего брыжеечного протока крысы, обладающие фазной активностью (73 % от всех исследованных лимфангионов, $n=63$). Частота фазной активности лимфангионов составила $14,1 \pm 3,3$ мин⁻¹, амплитуда одиночных сокращений в разных сериях экспериментов варьировала в диапазоне от $104,9 \pm 7,3$ до $235,5 \pm 6,3$ мкН.

Применение низких концентраций гистамина (10^{-9} – 10^{-7} М) приводило к увеличению частоты фазной активности лимфатических сосудов на 46,1–22,7% в сравнении с их спонтанной активностью. В условиях применения нифедипина (10^{-6} М, $n=10$) стимулирующее влияние низких концентраций гистамина было менее выраженным (рис. 1, 2). Частота фазной активности лимфангионов в данных условиях увеличивалась на 8,3–13,3 %, и это изменение было статистически значимым ($p=0,006$ – $0,03$ соответственно) по отношению к исходному уровню спонтанных сокращений. В тестируемых концентрациях гистамин в заданных условиях не вызывал достоверного увеличения амплитуды одиночных сокращений по отношению к фоновому значению параметра.

Поскольку применение нифедипина уменьшало стимулирующее действие низких концентраций гистамина, но не исключало полностью, было проведено исследование других возможных источников поступления кальция в цитозоль при действии тестируемого препарата. В гладкомышечных клетках биологических объектов наиболее выраженным

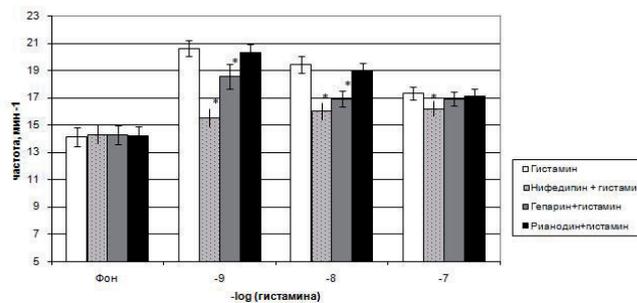


Рис. 1. Действие гистамина на частоту сокращений лимфангионов в условиях блокады различных путей поступления ионов кальция в цитозоль: * — статистически значимые различия по сравнению с исходной активностью, $p < 0,05$

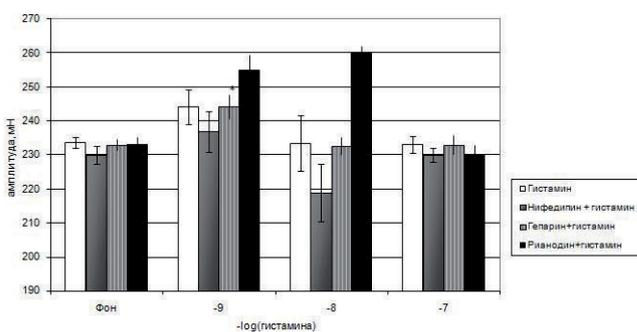


Рис. 2. Действие гистамина на амплитуду сокращений лимфангионов в условиях блокады различных путей поступления ионов кальция в цитозоль: * — статистически значимые различия с исходной активностью, $p < 0,05$

механизмом фармакомеханического сопряжения является IP_3 -зависимый путь поступления кальция [6], поэтому для изучения его роли при стимуляции сократительной активности лимфангионов биогенными аминами мы использовали блокатор IP_3 -зависимых депо гепарин в концентрации 5 Ед/мл.

При применении гепарина низкие концентрации гистамина проявляли менее выраженное стимулирующее влияние, которое, однако, полностью не нивелировалось ($n=10$) (рис. 1, 2). Действие гистамина в концентрациях 10^{-9} и 10^{-8} М приводило к увеличению частоты сократительной активности ЛС, которое составило в среднем не более 10,5–15,5 %. В этих же условиях гистамин в концентрации 10^{-7} М не вызывал статистически значимых хронотропных реакций ($p=0,34$). Действие низких концентраций гистамина при применении блокатора IP_3 -рецепторов вызывало увеличение амплитуды фазных сокращений лимфатического сосуда, которое составило в среднем 5,9–8,2 % по отношению к исходному ($p > 0,05$).

В гладкомышечных клетках лимфатических сосудов обнаружены регуляторные компоненты, подобные выявленным в поперечно-полосатых миоцитах, в которых выход кальция из внутриклеточных хранилищ связан с активацией рианодинзависимых механизмов [18]. В наших экспериментах ингибирование рианодинчувствительных депо не приводило к изменению реакций лимфатических сосудов на действие гистамина во всем диапазоне исследуемых концентраций ($n=10$) (рис. 1, 2).

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

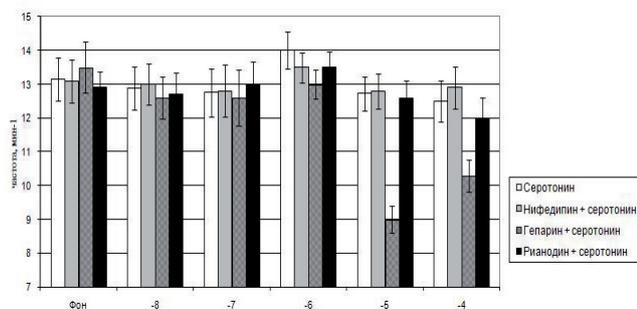


Рис. 3. Действие серотонина на частоту сокращений лимфангионов в условиях блокады различных путей поступления ионов кальция в цитозоль

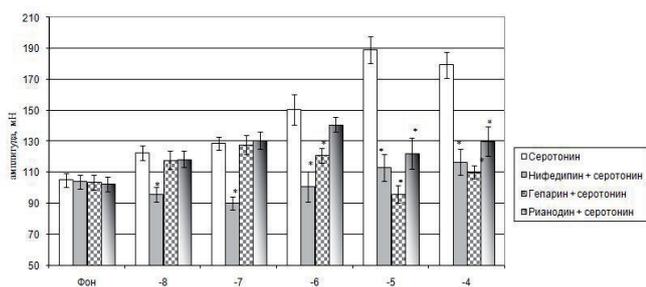


Рис. 4. Действие серотонина на амплитуду сокращений лимфангионов в условиях блокады различных путей поступления ионов кальция в цитозоль: * — статистически значимые различия с активностью при изолированном действии серотонина, $p < 0,05$

Стимулирующее действие серотонина в диапазоне концентраций 10^{-8} – 10^{-4} М в условиях блокады медленных кальциевых каналов нифедипином полностью отсутствовало ($n=10$) (рис. 3, 4): амплитуда и частота фазной активности практически не отличались от таковых в интактных сосудах ($p > 0,05$).

Исследование возможного участия внутриклеточных источников кальция, активируемых действием серотонина, показало, что использование гепарина (5 Ед) приводило к уменьшению стимулирующего влияния 5-НТ на лимфатические сосуды. Отмеченный эффект проявлялся при действии высоких концентраций 5-НТ (10^{-6} – 10^{-4} М, $n=10$) (рис. 3, 4). В этих условиях амплитуда одиночных сокращений лимфангионов была ниже на 24,4, 97,3 и 62,8 % по сравнению с таковой при изолированном использовании 5-НТ в тех же концентрациях соответственно ($p < 0,05$). Частота фазной активности лимфатических сосудов в этих условиях достоверно была меньше, чем при изолированном применении серотонина в концентрациях 10^{-5} и 10^{-4} М, и составила 70,7 и 82,4 % соответственно ($p < 0,05$). Действие низких концентраций 5-НТ на фоне гепарина не вызывало статистически значимых изменений моторики лимфангионов по сравнению с изолированным действием серотонина.

Изучение вклада рианодинзависимого депо ионов кальция в стимулирующий эффект 5-НТ показало, что влияние низких концентраций серотонина (10^{-8} –

10^{-6} М) на фоне рианодина в концентрации $5 \cdot 10^{-6}$ М практически не отличается от такового при изолированном использовании серотонина ($n=10$) (рис. 3, 4). При применении высоких концентраций 5-НТ (10^{-5} и 10^{-4} М) в этих условиях стимулирующее влияние было сниженным: увеличение амплитуды фазных сокращений составило по отношению к фоновой величине в среднем 16,3 и 23,9 % соответственно ($p < 0,05$). Изменение частоты одиночных сокращений лимфангионов хотя и имело тенденцию к уменьшению, однако было статистически незначимым.

Одна из функций лимфатической системы — дренажная — осуществляется эффективно только при наличии лимфотока, адекватного уровню лимфообразования. Оба процесса существенно изменяются под действием биогенных аминов — гистамина, выделяющегося при дегрануляции тучных клеток, и серотонина, главным источником которого в интерстициальном пространстве являются тромбоциты [20, 24].

Одним из сигнальных механизмов, обеспечивающих модулирование сократительной активности лимфатических сосудов, является изменение концентрации внутриклеточного кальция, который может поступать из эндоплазматического ретикулума, интерстициального пространства и через плотные контакты из других клеток [13]. Стимулирующее сократительную активность миоцитов влияние исследуемых вазоактивных веществ связано с повышением концентрации Ca^{2+} в цитозоле в результате его поступления из интерстициального пространства и внутриклеточных источников [7, 8, 14]. При этом увеличение частоты фазной активности в большей степени определяется поступлением внеклеточного кальция через потенциалзависимые каналы, а прирост амплитуды зависит от степени активации внутриклеточных депо [13]. Н1-опосредованное стимулирующее действие низких концентраций гистамина проявлялось в большей степени в виде увеличения частоты фазных сокращений и было связано с поступлением ионов кальция из интерстициального пространства через медленные Ca^{2+} -каналы L-типа, что подтверждалось уменьшением констрикторного влияния тестируемого вещества при применении нифедипина. Сходные результаты получены на других гладкомышечных объектах: констрикторная реакция изолированной пупочной артерии человека была вызвана гистамининдуцированным поступлением внеклеточного кальция непосредственно в гладкомышечные клетки, что подтверждалось снижением стимулирующего влияния в бескальциевом растворе и после применения блокатора кальциевых каналов L-типа [4]. Стимулирующее влияние низких концентраций гистамина также было связано с активацией IP_3 -зависимых депо, что подтверждается уменьшением его влияния при применении его блокатора — гепарина. Подобные результаты получены с использованием методики микроскопии на культуре эндотелиальных и гладкомышечных клеток легочной артерии человека [16]. В этих исследованиях было показано, что повышение концентрации цитозольного кальция в миоцитах и эндотелиоцитах

под действием гистамина наблюдается в условиях бескальциевого раствора благодаря поступлению из внутриклеточных депо. Это подтверждалось отсутствием увеличения концентрации цитозольного кальция в условиях применения ингибитора Ca^{2+} -АТФазы мембраны эндоплазматического ретикулама циклопиазоновой кислоты. Гистамин активирует в миоцитах в основном IP_3 -зависимый путь поступления Ca^{2+} . В эндотелиоцитах использование ингибиторов Ca^{2+} -АТФазы мембраны эндоплазматического ретикулама циклопиазоновой кислоты и тапсигарина, а также блокаторов рианодинных источников Ca^{2+} — кофеина и рианоидина — не приводило к полному прекращению гистамининдуцированных осцилляций ионов кальция, что свидетельствует, по мнению авторов, о наличии в эндотелиоцитах другого типа депо кальция [16].

Действие серотонина (10^{-5} М) приводит к развитию высокоамплитудных сокращений ЛС, составивших в среднем 55,6 % от пикового значения активного напряжения и 90,7 % от плато напряжения, полученного для ЛС данного региона при использовании гиперкалиевого раствора и субстанции Р [27]. Отмеченное влияние серотонина на ЛС было связано частично с активацией медленных каналов L-типа, что подтверждалось уменьшением влияния 5-НТ в условиях применения нифедипина. Сходные реакции были получены ранее на изолированной общей сонной артерии крысы: эндотелийнезависимое стимулирующее влияние серотонина, вызванное действием на 5-НТ2-рецепторы, которое авторы связывали с активацией потенциалзависимых Ca^{2+} -каналов L-типа, уменьшалось в условиях применения нифедипина [21]. Подобные результаты наблюдались также на миоцитах изолированной дорзальной вены руки человека — стимулирующее действие 5-НТ блокировалось применением нифедипина и нимодипина [19]. В коронарных сосудах собаки повышение концентрации цитозольного Ca^{2+} под действием серотонина осуществлялось посредством поступления из интерстициального пространства через потенциалзависимые каналы L-типа и полностью блокировалось применением верапамила и неспецифического блокатора серотониновых и α -адренорецепторов метисергида [5]. Исследуемые механизмы стимулирующего влияния являются различными у сосудов, осуществляющих функцию реабсорбции: констрикторное влияние серотонина на изолированные яремные вены морской свинки и подкожную вену кролика осуществляется посредством активации другого типа рецепторов — 5-НТ1D α и 5-НТ1D β — и не связано с активацией кальциевых каналов [22]. Эксперименты показали, что стимулирующее влияние 5-НТ на ЛС осуществляется посредством поступления внеклеточного кальция и активации внутриклеточных источников. Эффект низких концентраций серотонина связан с активацией

ЕГОРОВА А. А., ПЕТУНОВ С. Г., АВРАМЕНКО Е. А.

цией входа внеклеточного Ca^{2+} и внутриклеточных IP_3 -зависимых источников кальция. Стимулирующее влияние высоких концентраций 5НТ в большей степени определяется вкладом IP_3 -зависимых депо, что подтверждается отсутствием стимулирующего влияния низких концентраций серотонина и ингибирующим амплитуду сократительной активности ЛС в условиях блокады гепарином. Подобные реакции на лимфатических сосудах брыжеечного региона крысы ранее показаны не были, однако на других объектах исследования, в частности, на изолированной коронарной артерии свиньи. Сократительный ответ объекта, опосредованный действием серотонина на 5-НТ2А- и 5-НТ2В-рецепторы, осуществлялся благодаря использованию IP_3 -зависимого депо ионов кальция эндоплазматического ретикулама, активация которого осуществлялась в результате открытия Ca^{2+} -активируемых Cl^- -каналов [17].

При действии высоких концентраций серотонина (10^{-5} – 10^{-4} М), помимо вышеописанных источников кальция, дополнительно активируются рианодинзависимые депо, что подтверждается уменьшением констрикторного влияния 5-НТ на фоне действия рианоидина.

Подобный механизм показан также в гладкомышечных клетках желудка крысы: истощение рианодинчувствительных депо приводило к уменьшению констрикторного влияния серотонина, опосредованного 5-НТ2В-типом рецепторов [10]. Механизм внутриклеточной сигнализации авторы связывали с повышением активности протеинкиназы С. Исследование рианодинзависимого механизма действия серотонина на брыжеечных лимфатических сосудах морской свинки показало, что для данного объекта подобный механизм для 5-НТ не характерен. [25]. По-видимому, различие в механизмах действия серотонина на ЛС брыжейки морской свинки связано с преобладанием в мембранах последних IP_3 -рецепторов, которых в 9–10 раз больше, чем рианодинных [26].

Выводы

1. Гистамин и серотонин стимулируют сократительную активность лимфатических сосудов белой крысы, мобилизуя внутриклеточный и внеклеточный источники кальция.

2. Стимулирующий эффект низких концентраций гистамина в большей степени осуществляется посредством входа внеклеточного кальция через медленные каналы L-типа и активации IP_3 -чувствительных депо Ca^{2+} .

3. Стимулирующее сократительную активность действие низких концентраций серотонина связано с поступлением внеклеточного кальция через медленные каналы L-типа. В более высоких концентрациях серотонин дополнительно активирует рианодинзависимые и IP_3 -чувствительных внутриклеточных депо Ca^{2+} .

Литература

1. Егорова, А. А. Влияние серотонина на лимфатические сосуды белой крысы: роль эндотелия / А. А. Егорова // Регионарное кровообращение и микроциркуляция. — 2011. — № 1 (37). — С. 79–82.
2. Орлов, П. С. Лимфатические сосуды / П. С. Орлов. — Л.: Наука, 1983. — 252 с.
3. Петунов, С. Г. Действие гистамина на спонтанные сокращения брыжеечных лимфатических сосудов и узлов белых крыс: эндотелийзависимые реакции / С. Г. Петунов // Доклады академии наук. — 2009. — № 1. — С. 281–285.
4. Atalik, K. E. Effects of cooling on histamine-induced contractions of human umbilical artery: the role of ion channels / K. E. Atalik [et al] // Methods Find. Exp. Clin. Pharmacol. — 2007. — № 29 (9). — P. 619–623.
5. Barrett, J. A. Effects of nitroglycerin, dipyridamole, nifedipine, verapamil and diltiazem on canine coronary arterial rings contracted with 5-hydroxytryptamine and anoxia / J. A. Barrett // Pharmacology. — 1986. — № 33 (3). — P. 139–147.
6. Berridge, M. J. Inositol trisphosphate and calcium signaling / M. J. Berridge // Nature. — 1993. — № 361. — P. 315–325.
7. Bertil, H. Ion Channels of Excitable Membranes / H. Bertil. — Third Edition. — University of Washington, 2001. — 814 p.
8. Chalmers, S. Ion channels in smooth muscle: regulation by the sarcoplasmic reticulum and mitochondria / S. Chalmers // Cell. Calcium. — 2007. — № 42 (4–5). — P. 447–466.
9. Chan, A. K. 5-HT decreases contractile and electrical activities in lymphatic vessels of the guinea-pig mesentery: role of 5-HT 7-receptors / A. K. Chan // Br. J. Pharmacol. — 2003. — № 139 (2). — P. 243–254.
10. Cox, D. A. 5-HT_{2B} receptor signaling in the rat stomach fundus: dependence on calcium influx, calcium release and protein kinase C / D. A. Cox, M. L. Cohen // Behav. Brain. Res. — 1996. — № 73 (1–2). — P. 289–292.
11. Gashev, A. A. Inhibition of the active lymph pump by flow in rat mesenteric lymphatics and thoracic duct / A. A. Gashev // J. Physiol. — 2002. — № 540. — P. 1023–1037.
12. Ghosh, T. K. Competitive, reversible, and potent antagonism of inositol 1,4,5-trisphosphate-activated calcium release by heparin / T. K. Ghosh [et al] // J. Biol. Chem. — 1988. — № 263 (23). — P. 11075–11079.
13. Hideaki, K. Calcium movements, distribution, and functions in smooth muscle / K. Hideaki [et al] // Pharm. Rev. — 1997. — № 49 (2). — P. 157–230.
14. Imtiaz, M. S. Synchronization of Ca²⁺ oscillations: a coupled oscillator-based mechanism in smooth muscle / M. S. Imtiaz [et al]. — 2010. — № 277 (2). — P. 278–285.
15. Laver, D. R. Ca²⁺ stores regulate ryanodine receptor Ca²⁺ release channels via luminal and cytosolic Ca²⁺ sites / D. R. Laver // Clin. Exp. Pharmacol. Physiol. — 2007. — № 34 (9). — P. 889–896.
16. Mauban, J. R. Histamine-mediated increases in cytosolic [Ca²⁺] involve different mechanisms in human pulmonary artery smooth muscle and endothelial cells / J. R. Mauban [et al] // Am. J. Physiol. Cell. Physiol. — 2006. — № 290 (2). — P. C325–C336.
17. Montiel, C. Serotonergic effects of dotarizine in coronary artery and in oocytes expressing 5-HT₂ receptors / C. Montiel [et al] // Eur. J. Pharmacol. — 1997. — № 332 (2). — P. 183–193.
18. Muthuchamy, M. Molecular regulation of lymphatic contractility / M. Muthuchamy, D. Zawieja // Ann N.-Y. Acad. Sci. — 2008. — № 1131. — P. 89–99.
19. Panconesi, A. Effects of calcium antagonists on serotonin and noradrenaline venoconstriction in humans / A. Panconesi // Clin. Pharmacol. Ther. — 1988. — № 43 (4). — P. 442–448.
20. Plaku, K. J. Mast cell degranulation alters lymphatic contractile activity through action of histamine / K. J. Plaku, P. Y. von der Weid // Microcirculation. — 2006. — № 13 (3). — P. 219–227.
21. Radenkoviä, M. Contribution of thromboxane A₂ in rat common carotid artery response to serotonin / M. Radenkoviä // Sci. Pharm. — 2010. — № 78 (3). — P. 435–443.
22. Razzaque, Z. Differences in the effects of ketanserin and GR127935 on 5-HT-receptor mediated responses in rabbit saphenous vein and guinea-pig jugular vein / Z. Razzaque, J. Longmore, R. G. Hill // Eur. J. Pharmacol. — 1995. — № 283 (1–3). — P. 199–206.
23. Thorneloe, K. S. Ion channels in smooth muscle: regulators of intracellular calcium and contractility / K. S. Thorneloe // Can. J. Physiol. Pharmacol. — 2005. — № 83 (3). — P. 215–242.
24. Vanhoutte, P. M. Platelet-derived serotonin, the endothelium, and cardiovascular disease / P. M. Vanhoutte // J. Cardiovasc. Pharmacol. — 1991. — № 17 (5). — P. 6–12.
25. Von der Weid, P. Y. Spontaneous transient depolarizations in lymphatic vessels of the guinea pig mesentery: pharmacology and implication for spontaneous contractility / P. Y. Von der Weid [et al] // Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol. — 2008. — № 295 (5). — P. H1989–H2000.
26. Wibo, M. Comparative localization of inositol 1,4,5-trisphosphate and ryanodine receptors in intestinal smooth muscle: an analytical subfractionation study / M. Wibo, T. Godfraind // Biochem. J. — 1994. — № 297. — P. 415–423.
27. Zhang, R. Z. Length-tension relationships of small arteries, veins, and lymphatics from the rat mesenteric microcirculation / R. Z. Zhang [et al] // Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol. — 2007. — № 292 (4). — P. H1943–H1952.