

Исследование источников ионов кальция, участвующих в активации сокращения гладких мышц основной артерии при действии серотонина

Н. И. Гокина, И. Г. Бутенко, А. В. Гурковская, М. Ф. Шуба

Наиболее характерной реакцией различных кровеносных сосудов на действие серотонина является вазоконстрикция, обусловленная в основном прямой активацией серотониновых рецепторов различного типа в мембране сосудистых гладкомышечных клеток (ГМК) [4, 12]. Ранее нами было показано, что сокращение, вызываемое серотонином, в ГМК мозговых артерий активируется преимущественно Ca^{2+} , поступающими в мышечные клетки из внеклеточной среды. Вход Ca^{2+} при этом осуществляется через рецепторуправляемые, а также инактивирующиеся и неинактивирующиеся потенциалуправляемые кальциевые каналы в мембране ГМК [2]. Для определения соотношения между потенциал- и рецепторуправляемым входом Ca^{2+} в мышечные клетки, а также выяснения роли внутриклеточного связанного кальция при действии серотонина, нами были проведены эксперименты с использованием блокаторов потенциал- и рецепторуправляемых кальциевых каналов и кофеина.

Методика

Исследования проводили на спиральных полосках (шириной около 0,5 мм) основной артерии мозга крупного рогатого скота с помощью модифицированного метода одностороннего сахарозного мостика [1]. Применяемые растворы Кребса и Рингера — Локка, а также экспериментальные условия были такими же, как и в предыдущих исследованиях [3]. Одновременную запись электрической и сократительной активности мышечных полосок производили с помощью автоматического потенциометра КСП-4. Цифровые значения представлены как средние $\pm \sigma$ (σ — ошибка среднего квадратичного отклонения), n — число наблюдений.

Результаты и их обсуждение

Серотонин (10^{-6} моль/л) вызывал деполяризацию ГМК, генерацию серии потенциалов действия (ПД) и сокращение мышечных полосок основной артерии (рис. 1, а). Для блокирования потенциалуправляемого входа Ca^{2+} в мышечные клетки были использованы верапамил и Co^{2+} . Как было показано нами ранее, верапамил (10^{-6} моль/л) полностью угнетал тонический компонент сокращения, активируемого калиевой деполяризацией ГМК мозговых артерий [3]. Поэтому в наших исследованиях верапамил использовали именно в такой концентрации. На рис. 1, а представлены результаты одного из экспериментов по изучению действия верапамила на электрические и сократительные реакции ГМК, вызываемые серотонином. Для сравнения показано также влияние верапамила на реакции той же мышечной полоски в ответ на увеличение концентрации K^+ в растворе Кребса до 60 ммоль/л. Как видно из рис. 1, а, 2, верапамил на 15-й минуте действия полностью блокировал тонический компонент сокращения, вызываемого K^+ . Значительно уменьшались амплитуда ПД и фазный компонент сокращения. На фоне верапамила серотонин вызывал меньшую, чем в контроле, деполяризацию ГМК, наблюдались угнетение ПД и уменьшение тонического сокращения мышечных полосок до $(35,2 \pm 2,3) \%$ исходного ($n=19$).

Аналогичная серия экспериментов была проведена с другим блокатором потенциалуправляемых кальциевых каналов — Co^{2+} , который также использовали в концентрации, необходимой для полного подавления тонического компонента сокращения, активируемого калиевой

деполяризацией ГМК. На рис. 1, б показаны сократительные реакции, вызываемые K^+ и серотонином, в нормальном растворе Рингера — Локка (рис. 1, б, 1) и на 5-й минуте действия Co^{2+} в концентрации 10^{-3} моль/л (рис. 1, б, 2). Как в случае с верапамилом, сокращение, активируемое серотонином, блокировалось только частично и составляло $(46,2 \pm 2,6) \%$ по отношению к контролю ($n=9$), в то время как сократительная реакция на действие K^+ угнеталась практически полностью.

Таким образом, на фоне действия верапамила и Co^{2+} сохранялось около 40 % сократительной реакции, вызываемой серотонином. В этих условиях сокращение может активироваться как за счет поступления Ca^{2+}

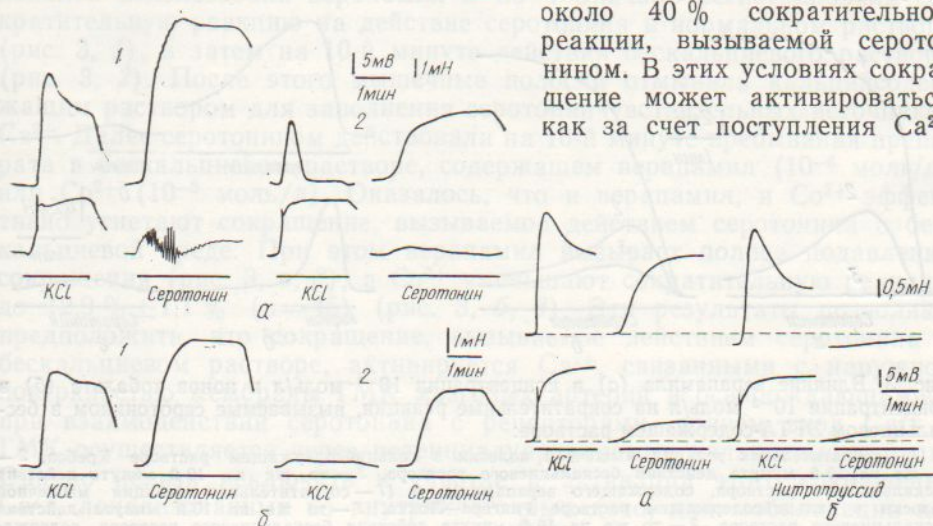


Рис. 1. Влияние верапамила (10^{-6} моль/л) и ионов кобальта (10^{-3} моль/л) на реакции мышечных полосок, вызванные ионами калия (60 ммоль/л) и серотонином (10^{-6} моль/л):

а — сократительные (вверху) и электрические (внизу) реакции ГМК на действие гиперкалиевого раствора и серотонина (1 — до действия, 2 — на 15-й минуте действия верапамила; б — сократительные реакции ГМК на действие гиперкалиевого раствора и серотонина (1 — до действия, 2 — на 10-й минуте действия ионов кобальта). Здесь и далее на рис. 2—4 чертой обозначено время действия веществ.

Рис. 2. Влияние нитропруссид натрия (10^{-6} моль/л) на сократительные (вверху) и электрические (внизу) реакции, вызванные ионами калия (60 ммоль/л) и серотонином (10^{-6} моль/л):

а — реакции на действие гиперкалиевого раствора и серотонина в нормальном растворе Кребса, б — то же на 10-й минуте действия нитропруссид натрия. Пунктирная линия — исходный уровень потенциала покоя и мышечного напряжения.

в ГМК через кальциевые каналы, управляемые серотониновыми рецепторами, так и за счет освобождения внутриклеточного или примембранно связанного кальция. Чтобы разграничить эти возможности, мы попытались заблокировать вход Ca^{2+} через рецепторуправляемые кальциевые каналы нитропруссидом натрия. В ряде работ показано, что нитропруссид натрия эффективно угнетает рецепторуправляемый вход Ca^{2+} в ГМК, активируемый норадреналином [8, 9, 14]. Известно, однако, что нитропруссид вызывает повышение содержания циклических нуклеотидов в ГМК, что в свою очередь может оказывать угнетающее действие на способность мышечных клеток к сокращению [10]. В связи с этим мы исследовали влияние нитропруссид натрия на электрические и сократительные реакции ГМК, вызываемые серотонином, и на реакции, наблюдаемые при действии K^+ . Результаты одного из экспериментов представлены на рис. 2.

Нитропруссид натрия (10^{-6} моль/л) вызывал расслабление мышечной полоски без изменения мембранного потенциала ГМК. На 10-й минуте его действия наблюдалось некоторое уменьшение амплитуды ПД и деполязации, вызываемой K^+ , а также уменьшение фазного и тонического компонентов калиевого сокращения до $(87,3 \pm 1,4)$ и $(91,5 \pm 2,2) \%$ соответственно ($n=15$). В то же время сократительная реакция на серотонин блокировалась практически полностью: до $5,9 \pm 1,4 \%$

исходной ($n=14$). Значительно уменьшалась также деполяризация ГМК в ответ на действие серотонина (рис. 2, б).

Проведенные эксперименты показали, что нитропруссид натрия не оказывает непосредственного влияния на активацию сократительного аппарата ГМК, так как на его фоне наблюдается лишь незначительное уменьшение фазного и тонического компонентов сокращения, вызываемого K^+ . Почти полное угнетение сократительной реакции на серотонин нитропруссидом натрия указывает на блокирование входа Ca^{2+} в ГМК.

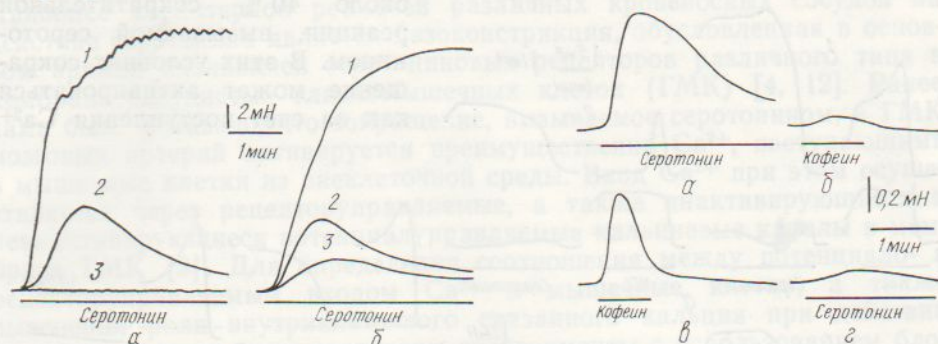


Рис. 3. Влияние верапамила (а) в концентрации 10^{-6} моль/л и ионов кобальта (б) в концентрации 10^{-3} моль/л на сократительные реакции, вызываемые серотонином в бескальциевом ЭГТА-содержащем растворе:

а (1 — сократительная реакция мышечной полоски в кальцийсодержащем растворе Кребса, 2 — то же на 10-й минуте действия бескальциевого раствора, 3 — то же на 10-й минуте действия бескальциевого раствора, содержащего верапамил); б (1 — сократительная реакция мышечной полоски в кальцийсодержащем растворе Рингера—Локка, 2 — то же на 10-й минуте действия бескальциевого раствора, 3 — то же на 10-й минуте действия бескальциевого раствора, содержащего ионы кобальта).

Рис. 4. Сократительные реакции мышечной полоски, вызванные действием кофеина и серотонина в бескальциевом ЭГТА-содержащем растворе:

а — реакция, вызванная действием серотонина на 5-й минуте перфузии мышечной полоски бескальциевым раствором; б — реакция, вызванная действием кофеина через 5 мин после отмыывания серотонина; в — реакция, вызванная действием кофеина на 5-й минуте перфузии мышечной полоски бескальциевым раствором; г — реакция, вызванная действием серотонина через 5 мин после отмыывания кофеина.

через рецептор- и потенциалуправляемые кальциевые каналы. Последнее, видимо, связано с тем, что нитропруссид натрия значительно уменьшает деполяризацию ГМК, вызванную серотонином.

Известно, что при удалении Ca^{2+} из наружной среды серотонин может вызывать сокращение ГМК мозговых артерий [2, 4, 5, 17]. Для выяснения вклада связанного кальция в активацию сокращения ГМК мозговых артерий при действии серотонина нами были исследованы сократительные реакции в бескальциевом ЭГТА-содержащем растворе. Серотонин (10^{-6} моль/л) на 15-й минуте действия бескальциевого раствора вызывал кратковременное сокращение, в котором быстрый фазный компонент составлял $(29,8 \pm 2,1) \%$, а медленно уменьшающийся тонический — $(11,1 \pm 1,1) \%$ максимального сокращения, регистрируемого в кальцийсодержащем растворе, $n=16$ (рис. 3, а, б, 2). Повторное добавление серотонина в бескальциевый раствор сопровождалось очень слабой сократительной реакцией, составляющей не более 5 % исходной. Для восстановления сократительной реакции на действие серотонина в бескальциевом растворе необходимо было провести кратковременную замену (в течение 5—10 мин) бескальциевого раствора кальцийсодержащим.

На основании полученных результатов можно заключить, что для поддержания длительного сокращения мышечных полосок, вызванного действием серотонина, необходимо поступление Ca^{2+} в ГМК из внеклеточной среды.

Наличие кратковременного сокращения мышечных полосок в бескальциевом растворе указывает на использование каких-то вне- или внутриклеточных источников связанного кальция, освобождающегося при взаимодействии серотонина с рецептором. Для определения лока-

лизации этих источников мы исследовали влияние блокаторов кальциевых каналов на сокращение мышечных полосок, вызываемое серотонином в бескальциевой среде. При этом предполагалось, что кальциевые антагонисты, которые препятствуют транслокации кальция через мембрану, не должны влиять на сокращение, для активации которого кальций мобилизуется из источников, расположенных внутри клетки или на внутренней поверхности мембраны. На рис. 3 показаны результаты экспериментов, в которых в качестве блокаторов кальциевых каналов использовали верапамил и Co^{2+} . Вначале регистрировали сократительную реакцию на действие серотонина в нормальном растворе (рис. 3, 1), а затем на 10-й минуте действия бескальциевого раствора (рис. 3, 2). После этого мышечные полоски отмывали кальцийсодержащим раствором для заполнения серотонинчувствительных источников Ca^{2+} . Далее серотонином действовали на 10-й минуте пребывания препарата в бескальциевом растворе, содержащем верапамил (10^{-6} моль/л) или Co^{2+} (10^{-3} моль/л). Оказалось, что и верапамил, и Co^{2+} эффективно угнетают сокращение, вызываемое действием серотонина в бескальциевой среде. При этом верапамил вызывает полное подавление сокращения (рис. 3, а, 3), а Co^{2+} уменьшают сократительную реакцию до $12,9\% \pm 1,1\%$ ($n=45$) (рис. 3, б, 3). Эти результаты позволяют предположить, что сокращение, вызываемое действием серотонина в бескальциевом растворе, активируется Ca^{2+} , связанными с наружной поверхностью мембраны ГМК мозговых артерий и освобождающимися при взаимодействии серотонина с рецепторами, причем вход Ca^{2+} в ГМК осуществляется через потенциалуправляемые кальциевые каналы. Однако нельзя исключить и участие в активации этого сокращения Ca^{2+} , локализованных во внутриклеточных депо, для мобилизации которых необходимо поступление в ГМК примембранно связанного кальция.

Известно, что в ГМК одним из источников связанного кальция является саркоплазматический ретикулум, освобождение кальция из которого можно вызвать кофеином [6, 7, 11]. Установлено, что в активации сокращения, вызываемого различными медиаторами в бескальциевой среде, могут принимать участие Ca^{2+} , мобилизуемые из кофеинчувствительного источника [7, 11]. Для того чтобы выяснить, используется ли кофеинчувствительный источник Ca^{2+} при активации ГМК мозговых артерий серотонином, мы провели эксперименты, результаты одного из которых представлены на рис. 4. На 5-й минуте действия бескальциевого раствора регистрировали сократительную реакцию на действие серотонина (рис. 4, а). После 5 мин последующего отмывания серотонина бескальциевым раствором кофеин вызывал незначительное сокращение мышечной полоски (рис. 4, б). При обратной постановке эксперимента, когда вначале вызывали реакцию на действие кофеина (рис. 4, в), серотонин также приводил к очень слабой сократительной реакции (рис. 4, г). Таким образом, активация сокращения мышечной полоски в бескальциевом растворе при действии серотонина и кофеина осуществляется за счет освобождения Ca^{2+} из одного и того же внутриклеточного источника. Однако внутриклеточные механизмы, приводящие к выходу Ca^{2+} из этих источников в миоплазму, неодинаковы. Кофеин вызывает сокращение скиннированных гладкомышечных клеток, что свидетельствует о прямом действии этого вещества на мембрану саркоплазматического ретикулума с последующим освобождением Ca^{2+} [11]. Медиаторы же способны вызвать сокращение ГМК только при взаимодействии со специфическими рецепторами в мембране мышечных клеток, так как скиннированные ГМК не сокращаются при их действии [11]. Предполагают, что мобилизация Ca^{2+} из внутриклеточных депо осуществляется вторичным посредником (или посредниками) в мышечных клетках, который образуется в результате сложных биохимических процессов, следующих за активацией рецепторов. Согласно имеющимся в литературе данным, таким посредником может быть инозитолтрифосфат [13, 15, 16, 18]. Возможно, что в ГМК

мозговых артерий для образования инозитолтрифосфата и последующего освобождения Ca^{2+} из внутриклеточных депо при действии серотонина необходимо прохождение примембранно связанных Ca^{2+} через потенциалуправляемые кальциевые каналы, блокируемые верапамилом и Co^{2+} .

В результате проведенных исследований можно заключить, что для поддержания длительной сократительной реакции ГМК мозговых артерий при действии серотонина необходимо поступление в мышечные клетки Ca^{2+} из внеклеточной среды. Около 60 % сокращения активируется Ca^{2+} , входящими в ГМК через потенциалуправляемые инактивирующиеся кальциевые каналы во время генерации ПД и неинактивирующиеся кальциевые каналы, открываемые деполяризацией, вызываемой действием серотонина. Активация остальной части сократительной реакции обеспечивается поступлением Ca^{2+} через рецепторуправляемые кальциевые каналы. В начальный период сокращения ГМК, вызываемого действием серотонина, используется также внутриклеточно связанный кальций, освобождающийся из кофеинчувствительного источника. Предполагается, что мобилизация внутриклеточного кальция осуществляется под влиянием вторичного посредника, для образования которого необходимо прохождение в мышечные клетки примембранно связанного кальция, освобождающегося при взаимодействии серотонина с рецептором.

STUDIES IN SOURCES OF CALCIUM IONS PARTICIPATING IN THE ACTIVATION OF SEROTONIN-INDUCED CONTRACTION OF SMOOTH MUSCLES IN THE BASILAR ARTERY

N. I. Gokina, I. G. Butenko, A. V. Gurkovskaya, M. F. Shuba

It is shown that Ca^{2+} input into smooth-muscular cells (SMC) from the extracellular medium which proceeds through the potential- and receptor-controlled calcium channels is necessary to maintain the long-term contractive response of the bovine basilar artery SMC to serotonin. In order to determine relation between the Ca^{2+} input through these channels as well as to elucidate significance of intracellular-bound calcium under serotonin action, examinations have been conducted using blocking agents of potential-controlled (verapamil, Ca^{2+}), receptor-controlled (sodium nitroprusside) calcium channels and caffeine. About 60 % of the contractive response is activated by Ca^{2+} entering the SMC through inactivating and non-inactivating potential-controlled calcium channels, the rest part of this response being ensured by Ca^{2+} arrival through receptor-controlled calcium channels. Intracellular-bound calcium releasing from the caffeine-sensitive source is used in the initial period of serotonin-induced SMC contraction.

A. A. Bogomoletz Institute of Physiology,
Academy of Sciences of the Ukrainian SSR, Kiev

1. Артеменко Д. П., Бурый В. А., Владимирова И. А., Шуба М. Ф. Модификация метода одинарного сахарозного мостика // Физиол. журн.— 1982.—28, № 3.— С. 374—380.
2. Гокина Н. И., Гурковская А. В., Бутенко И. Г., Шуба М. Ф. Исследование действия серотонина на электрогенез и сокращение гладких мышц основной артерии // Там же.— 1987.—33, № 4.— С. 48—53.
3. Гокина Н. И., Гурковская А. В., Шуба М. Ф. Исследование механизмов активации фазного и тонического сокращения гладких мышц мозговых артерий // Там же.— 1983.—29, № 6.— С. 684—690.
4. Мchedlishvili Г. И., Кометиани П. А., Ормоцадзе А. Г. Об участии ионов Ca^{2+} в формировании сосудистого тонуса и в констрикторном эффекте серотонина на внутренние сонные артерии // Бюл. эксперим. биологии и медицины.— 1971.—71, № 6.— С. 3—5.
5. Allen G. S., Gross C. J., Henderson L. M., Chou S. N. Cerebral arterial spasm. Part 4: In vitro effects of temperature, serotonin, analogues, large nonphysiological concentrations of serotonin and extracellular calcium and magnesium on serotonin-induced contractions of the canine basilar artery // J. Neurosurg.— 1976.—44, N 5.— P. 585—593.
6. Fredholm B. B. On the mechanism of action of theophylline and caffeine // Acta med. scand.— 1985.—217, N 2.— P. 149—153.