

Х.Ю. Суханова, В.А. Бурий, В.Ф. Сагач, Т.Б. Болтон, Д.В. Гордієнко

## Дія модуляторів кальцієвого метаболізму на скорочення мезентеріальної артерії морської свинки при активації P2X-рецепторів

*АТФ викликає зміни судинного тонуусу через активацію P2X- та P2Y-пуринорецепторів. Щоб оцінити відносний внесок іонів кальцію, які надходять через потенціалкеровані кальцієві канали L-типу та вивільнюються із саркоплазматичного ретикулула (СР) за механізмом CICR (від англ. Ca<sup>2+</sup>-induced Ca<sup>2+</sup>-releas) при активації P2X-рецепторів, ми аплікували агоніст P2X-рецепторів  $\alpha, \beta$ -мЕАТФ (10 мкмоль/л) і реєстрували зміни амплітуди фазного ізометричного скорочення кільцевих деендотелізованих сегментів за наявності блокуаторів інозитолтрифосфатних (IP<sub>3</sub>)- (60 мкмоль/л 2-аміноетоксидифенілборат) або ріанодинових рецепторів (100 мкмоль/л тетракаїну) в поєднанні з маніпулюванням надходження внутрішньоклітинного Ca<sup>2+</sup> через кальцієві канали L-типу за допомогою нікардипіну (5 мкмоль/л). Ми виявили, що активація P2X-рецепторів призводить до вивільнення Ca<sup>2+</sup> через обидва типи рецепторів – IP<sub>3</sub>- і ріанодинові. Крім того, кальцій, який надходить через канали L-типу також бере участь у вивільненні Ca<sup>2+</sup> із СР, можливо, через CICR-механізм. Проте фазне скорочення за наявності нікардипіну було менш чутливе до блокування IP<sub>3</sub>-, ніж ріанодинових рецепторів (47,1±9,5 і 22,9 % ± 1,4 % порівняно з 38,3±9,6 та 51,8 % ± 7,8 % у розчині Кребса без нікардипіну для інгібіторів IP<sub>3</sub>- та ріанодинових рецепторів відповідно). Отримані результати дають підставу припустити, що IP<sub>3</sub>-рецептори більш доступні для Ca<sup>2+</sup>, які надходять через потенціалзалежні кальцієві канали L-типу, ніж ріанодинові рецептори. Це припущення підкріплюється дослідженнями з використанням імунофлуоресцентного забарвлення IP<sub>3</sub>- і ріанодинових рецепторів. Конфокальна візуалізація забарвлених рецепторів виявила, що елементи СР, які знаходяться безпосередньо під мембраною, збагачені IP<sub>3</sub>-, а ріанодинові рецептори розташовані переважно на центральних і навколядерних елементах СР.*

*Ключові слова:* гладенькі м'язи судин, пуринорецептори, IP<sub>3</sub>-рецептори, ріанодинові рецептори, потенціалзалежні кальцієві канали L-типу, конфокальна мікроскопія.

### ВСТУП

Скорочення резистивних артерій регулюються симпатичною нервовою системою, одним з основних нейропередавачів якої є аденозинтрифосфат (АТФ) [5, 17]. Перші докази того, що останній викликає скоротливу реакцію кровоносних судин через активацію хемокерованих кальцій-проникних каналів були отримані на гладеньком'язових клітинах (ГМК) церебральної артерії та ворітної вени ще в 80-х роках минулого століття. Тоді ж було дове-

дено, що завдяки деполяризації, яка виникає внаслідок активації АТФ-рецепторів, до участі в скоротливій реакції залучаються ще й потенціалкеровані кальцієві канали L-типу VGCCs (від англ. voltage-gated Ca<sup>2+</sup> channels) [7, 10]. Пізніше на ГМК вушної артерії було показано, що АТФ-активовані рецептори є іонними каналами, проникними до Ca<sup>2+</sup> [2, 21]. Наразі виявлено два підсімейства поверхневих пуринорецепторів – іонотропні рецептори-P2X, які являють собою неселективний катіонний канал і метаботропні рецептори-P2Y, які не

© Х.Ю. Суханова, В.А. Бурий, В.Ф. Сагач, Т.Б. Болтон, Д.В. Гордієнко

проникні для іонів і пов'язані з клітинними G-білками. P2Y-рецептори виявлено на клітинах ендотелію кровоносних судин. Стимуляція цих рецепторів призводить до вивільнення оксиду азоту та вазодилатації.

P2X-рецептори були ідентифіковані у плазматичній мембрані ГМК внутрішніх органів і судин. Вони опосередковують скоротливі відповіді цих тканин. Нині відомо сім генів (P2X<sub>1-7</sub>), що кодують субодиниці, з яких складаються P2X-рецептори. Кожен такий рецептор може мати в своєму складі декілька однакових або різних субодиниць, які формують відповідно гомо- або гетеромерний іонний канал, що відкривається у відповідь на зв'язування з зовнішньоклітинними молекулами АТФ [4, 16]. Хоча досліді на нативних гладеньком'язових препаратах не дають змоги однозначно ідентифікувати з яких субодиниць складаються АТФ-рецептори, їх фармакологічні властивості переважно схожі з гомомерними P2X<sub>1</sub>-рецепторами [12, 14].

Усі P2X-рецептори проникні до одновалентних катіонів і мають значну проникність до іонів кальцію [16]. Кальцій, що проходить в клітину через активовані P2X-рецептори та кальцієві канали, викликає подальше вивільнення Ca<sup>2+</sup> із внутрішньоклітинних депо. Це може відбуватися завдяки механізму кальційіндукованого вивільнення Ca<sup>2+</sup> CICR (від англ. Ca<sup>2+</sup>-induced Ca<sup>2+</sup>-release) через ріанодинові рецептори або через активацію інозитолтрифосфатних рецепторів (IP<sub>3</sub>R-рецептори) саркоплазматичного ретикулула (СР).

Мета нашої роботи, використовуючи селективний агоніст P2X<sub>1</sub>-рецепторів та антагоністи IP<sub>3</sub>- і ріанодинових рецепторів та VGCCs, охарактеризувати відносний внесок різних механізмів мобілізації [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>, які залучаються до активації фазних скорочень мезентеріальної артерії морської свинки у відповідь на стимуляцію P2X-пуринорецепторів.

## МЕТОДИКА

Досліді було проведено на ізольованих кільцевих сегментах і на поодиноких ГМК мезентеріальної артерії морської свинки масою 250–350 г.

*Реєстрація скорочення.* Кільцеві сегменти мезентеріальної артерії 2-го та 3-го порядку довжиною близько 2 мм і діаметром до 0,5 мм натягували з силою до 5 мН у проточній камері об'ємом 50 мкл при 36°C. Ендотелій кожного кільця руйнували механічно.

Скоротливі відповіді реєстрували в режимі, близькому до ізометричного, за допомогою тензометричного датчика, сигнал з якого оцифровували за допомогою аналогово-цифрового перетворювача L761 («L-Card», Росія) і в цифровій формі зберігали для подальшого аналізу.

*Ізоляція ГМК.* Сегменти мезентеріальної артерії довжиною 2–3 мм після 10-хвилинної інкубації в безкальцієвому розчині переносили до розчину, який містив соєвий інгібітор трипсину, колагеназу (тип 1А) та бичачий альбумін (усе в концентрації 0,1 %), і витримували при 36 °С упродовж 25 хв. Далі сегменти тканини відмивали від ферментів протягом 10 хв при кімнатній температурі. Ізольовані клітини отримували піпетуванням та переносили в експериментальні камери, де вони зберігалися при 4°C у нормальному розчині Кребса. Експерименти проводили при кімнатній температурі (20–25 °С) протягом 8 год після ізоляції клітин.

*Конфокальна мікроскопія.* Експериментальну камеру з ГМК розташовували на столику інвертованого мікроскопа «Axiovert 200 M», приєднаного до конфокального лазерного сканера LSM 510 META з комп'ютеризованим керуванням («Zeiss, Oberkochen», Німеччина). Конфокальні флуоресцентні зображення отримували за допомогою об'єктива Zeiss plan-Apochromat 63x1,4 Ч.А. (масляна імерсія). Флуо-

ресцентний сигнал збирали з фокального оптичного шару товщиною 0,7–1,0 мкм у середині глибини клітини.

Щоб уникнути перехресного засвічування флюоресценції у експериментах з подвійним імунозabarвленням і забарвленням CP, ми використовували флюоресцентні барвники з чітко розмежованими спектральними характеристиками: Alexa Fluor 488 (максимуми абсорбції/емісії становлять 495 нм / 519 нм), Alexa Fluor 633 (максимуми абсорбції/емісії становить 632 нм / 647 нм) та Brefeldin A BODIPY 558/568 (максимуми абсорбції/емісії становить 558 нм / 568 нм).

Детальний протокол завантаження барвників для візуалізації CP і просторової організації  $IP_3$ - і ріанодинових рецепторів у ГМК був описаний нами в попередній публікації [10].

*Розчини.* В дослідах з тензометричними вимірюваннями використовували розчин Кребса такого складу (ммоль/л): NaCl – 120, KCl – 5,9,  $NaHCO_3$  – 15,5,  $NaH_2PO_4$  – 1,2,  $MgCl_2$  – 1,2,  $CaCl_2$  – 2,5, глюкоза – 11,5.

Для ізольованих клітин використовували розчин Кребса такого складу (ммоль/л): NaCl – 120, KCl – 6,  $CaCl_2$  – 2,5,  $MgCl_2$  – 1,2, глюкоза – 12, Нерес – 10, рН доводили до 7,4 за допомогою NaOH.

Безкальцієвий розчин готували на основі розчину Кребса для ізольованих клітин без додавання  $CaCl_2$ .

У роботі використовували реактиви: аденозин 5'-трифосфат, натрієву сіль;  $\alpha, \beta$ -метиленаденозин-5'-трифосфат ( $\alpha, \beta$ -меАТФ), літієву сіль; («Sigma», США), тетракаїн гідрохлорид, нікардипін («Sigma-Aldrich», США); 2-аміноетоксидифенілборат (2-АРВ, «Calbiochem», США).

За виключенням АТФ і  $\alpha, \beta$ -меАТФ, всі реактиви розводили в перфузуючому розчині Кребса в необхідній концентрації. Для раціонального використання агоніста  $P2X_1$ -рецепторів  $\alpha, \beta$ -меАТФ, його аплікацію здійснювали за допомогою ін'єкції

(200 мкл) в трубку, через яку перфузуючий розчин надходить у робочу камеру. Тривалість ін'єкції була підібрана так, щоб вона закінчувалася після завершення фазного скорочення. Таким самим чином проводили аплікацію АТФ. Концентрація кожного з агоністів у розчині була підібрана, щоб викликати субмаксимальне фазне скорочення і становила 1 ммоль/л для АТФ чи 10 мкмоль/л для  $\alpha, \beta$ -меАТФ. Оскільки для  $P2X$ -рецепторів характерна тривала десенситизація, подальші аплікації агоністів проводили через інтервали, не коротші ніж 25 хв. Щоб пересвідчитися в відтворюваності результатів, контрольну аплікацію  $\alpha, \beta$ -меАТФ проводили двічі. За контрольну амплітуду приймали середні значення фазних скорочень двох послідовних аплікацій. Амплітуду фазного скорочення за наявності антагоністів нормували до усередненої контрольної амплітуди.

## РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

*Скоротливі відповіді м'язових смужок мезентеріальної артерії на дію АТФ та  $\alpha, \beta$ -меАТФ*

Аплікація неселективного агоніста пуринорецепторів, АТФ чи селективного агоніста  $P2X_1$ -рецепторів,  $\alpha, \beta$ -меАТФ у перфузуючий розчин призводила до швидкого фазного скорочення. При цьому чутливість препарату до  $\alpha, \beta$ -меАТФ була на 2 порядки вищою, ніж до АТФ. Однакові за амплітудою фазні скорочення викликали 1 ммоль/л розчином АТФ чи 10 мкмоль/л розчином  $\alpha, \beta$ -меАТФ. Крім того, реакція на АТФ мала дещо більшу тривалість і меншу швидкість активації та спаду: час до піку  $16,2 \pm 0,5$  с ( $n = 7$ ) та  $12,3 \pm 0,8$  с ( $n = 6$ ) при стимуляції АТФ та  $\alpha, \beta$ -меАТФ відповідно; загальна тривалість при напівмаксимальній амплітуді становила  $64,4 \pm 0,5$  с ( $n = 7$ ) та  $39,4 \pm 0,3$  с ( $n = 6$ ) при стимуляції АТФ та  $\alpha, \beta$ -меАТФ відповідно. Значно нижча ефективність АТФ порівняно

з його метаболічно стабільним аналогом  $\alpha, \beta$ -меАТФ пояснюється метаболічним руйнуванням АТФ нуклеотидазами, які зберігають активність в артеріальних препаратах [2, 21].

Хоча  $P2X_1$ -рецептори швидко десенситизуються, вони встигають започаткувати низку складних процесів, кінцевим результатом яких є скорочення. Тому тривалість скоротливої реакції на дію  $\alpha, \beta$ -меАТФ відображує взаємодію та часовий хід усіх таких процесів. Більша тривалість фазного скорочення на дію АТФ може означати залучення до процесу не тільки  $P2X_1$ -, але і інших  $P2$ -рецепторів, до яких АТФ є агоністом. В артеріальних ГМК шурів було виявлено ко-експресію  $P2X_1$ -,  $P2X_4$ - і  $P2X_5$ -рецепторів [13, 15]. Хоча в мезентеріальній артерії домінуючою була експресія  $P2X_1$ -рецепторів, наявні субодиноці інших можуть об'єднуватися з  $P2X_1$ -субодиноціями, утворюючи гетеромерні рецептори з дещо уповільненою десенситизацією [18].

Тому подальше дослідження ми обмежили застосуванням лише селективного агоніста  $P2X_1$ -рецепторів –  $\alpha, \beta$ -меАТФ [16]. Однак навіть після такого обмеження реакція ГМК на активацію  $P2X$ -рецепторів залишається досить складною, оскільки до неї залучаються декілька механізмів. Збільшення проникності мембрани до  $Na^+$ ,  $K^+$  і  $Ca^{2+}$  при активації катіонного каналу, яким є  $P2X$ -рецептор, викликає деполяризацію мембрани. Деполяризація, в свою чергу, активує вхід  $Ca^{2+}$  в клітину через VGCCs. Первинне збільшення  $[Ca^{2+}]_i$  завдяки входу через  $P2X$ -рецептори і VGCCs може підсилюватися внаслідок вивільнення  $Ca^{2+}$  із СР за механізмом CICR. Тому застосування інгібіторів ріанодинових та  $IP_3$ -рецепторів може пролити світло на особливості залучення вивільнення  $Ca^{2+}$  з внутрішньоклітинних депо до АТФ індукованої реакції. З іншого боку, застосування інгібіторів VGCCs може допомогти розмежувати ефекти, що викли-

каються  $Ca^{2+}$ , який входить у клітину через пуринорецептори та  $Ca^{2+}$ , який входить через кальцієві канали L-типу.

На рис. 1,а,в показані типові результати дослідів, в яких визначалася роль  $IP_3$ - і ріанодинових рецепторів у вивільненні  $Ca^{2+}$  із СР після стимуляції  $P2X_1$ -рецепторів 10 мкмоль/л  $\alpha, \beta$ -меАТФ. Для цього в омиваючий розчин Кребса на 25 хв додавали блокатор ріанодинових (100 мкмоль/л тетракаїну) або  $IP_3$ -рецепторів (60 мкмоль/л 2АРВ), і вимірювали частку від контрольної реакції, що залишалася стійкою до дії блокатора.

Значне зменшення амплітуди фазного скорочення за наявності антагоністів  $IP_3$ - і ріанодинових рецепторів вказує на те, що вони обидва відіграють важливу роль у механізмах, що залучаються до пуринергічної регуляції системи кровообігу. При цьому більша частка ( $61,7 \% \pm 9,6 \%$ ) скоротливої реакції виявилася чутливою до пригнічення  $IP_3$ -рецепторів, в той час як ріанодинові рецептори були відповідальні за  $48,2 \% \pm 7,8 \%$  скоротливої реакції (див. рис.1,б,г). Перевищення сумою двох часток рівня 100 % свідчить про кооперативність цих процесів, тобто, що  $Ca^{2+}$ , який вивільнюється через  $IP_3$ -рецептори, залучається до вивільнення  $Ca^{2+}$  через ріанодинові рецептори і/або навпаки. Подібна перехресна взаємодія цих рецепторів спостерігалася в ГМК ворітної вени [9].

Участь  $IP_3$ -рецепторів у скоротливих реакціях, що викликаються агоністом  $P2X_1$ -рецепторів була неочікуваною, оскільки активація іонотропного рецептора  $P2X_1$  не передбачає утворення  $IP_3$ , який би активував  $IP_3$ -рецептори. Однак відомо, що АТФ вивільнюється із симпатичних нервових закінчень разом із ко-трансмітером норадреналіном [4]. Нервові терміналі облаштовані численними рецепторами, в тому числі і  $P2X_1$ -рецепторами, через які АТФ впливає на вивільнення медіаторів [20]. При аплікації  $\alpha, \beta$ -меАТФ активуються іонотроп-

ні  $P2X_1$ -рецептори не тільки на мембрані ГМК, але й на нервових терміналях.  $Ca^{2+}$ , який входить через  $P2X_1$ -рецептор в нервову термінал, спричинює вивільнення норадреналіну, що активує метаботропні  $\alpha$ -адренорецептори ГМК з подальшим утворенням  $IP_3$ . Така схема може пояснити виявлений нами механізм залучення  $IP_3$ -рецепторів у скоротливих реакціях мезентеріальної артерії на АТФ.

Важливою властивістю  $IP_3$ -рецепторів є те, що їх активація та пригнічення регулюється  $[Ca^{2+}]_i$ . По суті, вони є кальційактивованим кальцієвим каналом, а  $IP_3$  активує рецептори головним чином через зменшення їх чутливості до пригнічення іонами кальцію не змінюючи при цьому властивості активації [2, 6]. Це уможлиблює їх роботу як CICR-каналів навіть без обов'язкового збільшення внутрішньоклітинної концентрації  $IP_3$ , але за умови наявності факторів, що підвищують чутливість активації рецепторів до  $Ca^{2+}$ . Одним із таких факторів може бути АТФ,

яка при фізіологічних рівнях внутрішньоклітинної концентрації викликає потенціацію активації  $IP_3$ -рецепторів кальцієм.  $IP_3$  і АТФ діють разом як алостеричні регулятори, які підлаштовують чутливість, відповідно, пригнічення й активації рецептора до  $[Ca^{2+}]_i$  [6].

Серед інших факторів, що контролюють регуляцію  $IP_3$ -рецепторів, слід виділити кальмодулін [11], сімейство кальційзв'язувальних протеїнів CaBP [22] і ще цілу низку модулаторних протеїнів, які забезпечують внутрішньоклітинну кальцієву сигналізацію [5].

Встановлення детального механізму, що може бути відповідальним за вивільнення  $Ca^{2+}$  через  $IP_3$ -рецептори після активації  $P2X$ -рецепторів, потребує подальших досліджень.

На рис. 2 показані результати досліджень дії блокаторів  $IP_3$ - і ріанодинових рецепторів на  $\alpha, \beta$ -меАТФ-індуковане ізометричне фазне скорочення, як і на рис.1, але за наявності антагоніста кальцієвих

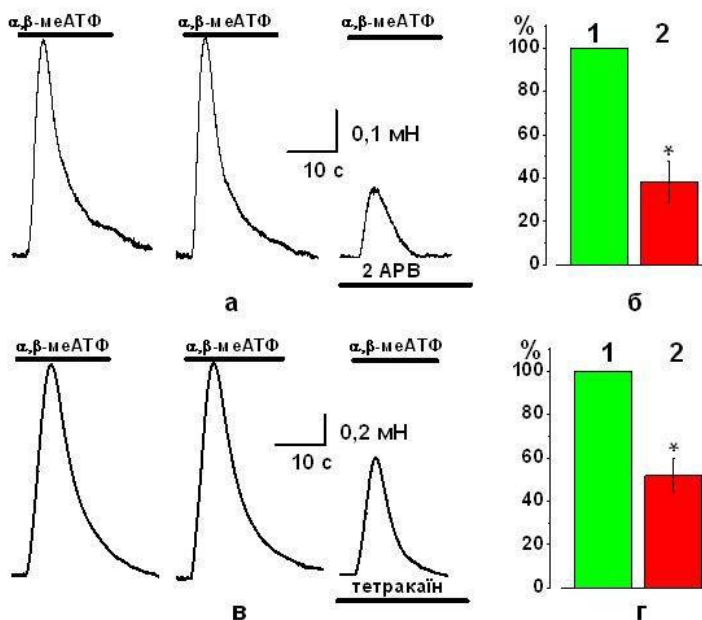


Рис. 1. Вплив 2АРВ (а, б) та тетракаїну (в, г) – блокаторів інозитолтрифосфатних ( $IP_3$ )- та ріанодинових рецепторів на фазне скорочення, що викликається агоністом  $P2X_1$ -рецепторів. Для кожного з блокаторів показані типові записи скорочення (а, в) та усереднені результати (б, г) ( $n=6$ ,  $*P < 0,05$ ); 1 – амплітуда контрольного скорочення в розчині Кребса; 2 – амплітуда скорочення після дії відповідного блокатора

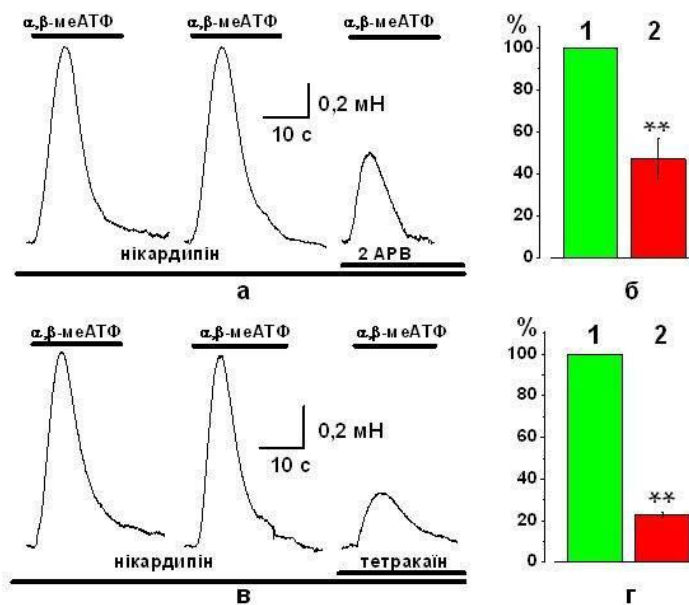


Рис. 2. Вплив 2АРВ (а, б) та тетракаїну (в, г) – блокаторів інозитолтрифосфатних ( $IP_3$ )- та ріанодинових рецепторів на фазне скорочення, що викликається агоністом  $P2X_1$ -рецепторів за наявності блокатора потенціалзалежних кальцієвих каналів L-типу (нікардипіну). Для кожного з блокаторів показані типові записи скорочення (а, в) та усереднені результати (б, г) ( $n=6$ ,  $**P < 0,01$ ); 1 – амплітуда контрольного скорочення в присутності нікардипіну; 2 – амплітуда скорочення після дії відповідного блокатора

каналів L-типу нікардипіну (5 мкмоль/л). Порівняння результатів з нікардипіном може допомогти виявити особливості залучення іонів кальцію, що проникають через різні канали поверхневої мембрани, до вивільнення  $Ca^{2+}$  через ріанодинові і  $IP_3$ -рецептори СР. Якщо ці рецептори однаково досяжні для іонів кальцію, що входять у клітину через  $P2X$ -рецептор чи кальцієвий канал, то обмеження входу  $Ca^{2+}$  через один з цих шляхів призводило б до однакового зменшення CICR без зміни відносного внеску кожного з рецепторів у загальне скорочення. Результати наших досліджень показують (рис. 3), що це не так. Після обмеження входу  $Ca^{2+}$  через VGCCs, на 29 % збільшується відносний внесок ріанодинових рецепторів у скорочення, що викликане активацією  $P2X_1$ -рецепторів. Це може означати, що активація вивільнення  $Ca^{2+}$  із внутрішньоклітинних депо іонами кальцію, які входять через VGCCs, опосередковується переважно  $IP_3$ -рецепторами.

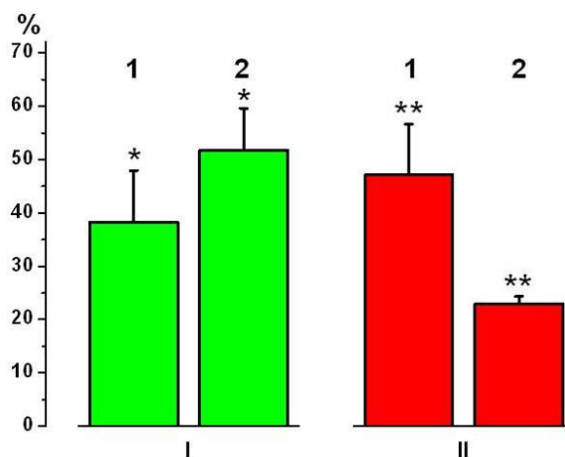


Рис. 3. Зменшення відносного вкладу інозитолтрифосфатних ( $IP_3$ )-рецепторів у фазне скорочення, що викликається агоністом  $P2X_1$ -рецепторів при обмеженні входу  $Ca^{2+}$  через потенціалзалежні кальцієві канали нікардипіном; за 100 % прийнято вихідне скорочення згідно з протоколом: I – діаграми усереднених амплітуд скорочення без нікардипіну ( $n=6$ ,  $*P < 0,05$ ); II – діаграми усереднених амплітуд скорочення за наявності нікардипіну ( $n=6$ ,  $**P < 0,01$ ). 1 – амплітуда скорочення за наявності 2АРВ, 2 – амплітуда скорочення за наявності тетракаїну

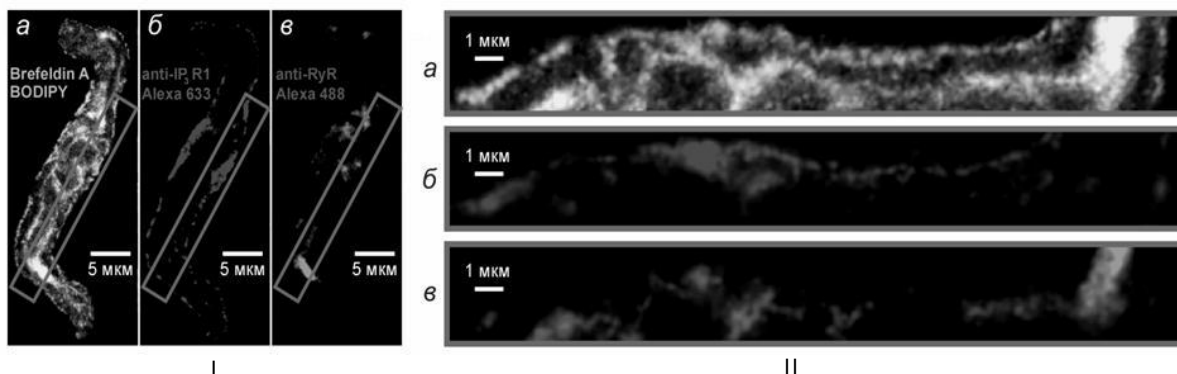


Рис. 4. Конфокальне зображення просторової організації саркоплазматичного ретикулума (СР) (I, панель а) та розподілу IP<sub>3</sub>-рецепторів типу 1 у субплазмолемальному СР (I, панель б) і ріанодинових рецепторів у глибинних елементах СР (I, панель с) гладеньком'язових клітин мезентеріальної артерії морської свинки; II – збільшені зображення прямокутної ділянки (що виділена на панелі I) відповідних конфокальних зображень після повороту на 120° проти годинникової стрілки

При блокуванні цих каналів внесок останніх зменшується настільки, що більш вагомим стає вивільнення Ca<sup>2+</sup> через ріанодинові рецептори.

Слід відмітити, що іони кальцію, які входять через VGCCs більш ефективно взаємодіють з IP<sub>3</sub>-, ніж з ріанодиноними рецепторами. Структурним підґрунтям для кращої досяжності IP<sub>3</sub>-рецепторів іонами кальцію, які входять через VGCCs, могла б бути просторова ко-локалізація цих каналів у мембрані і IP<sub>3</sub>-рецепторів СР під мембраною. Модель такої ко-локалізації була раніше запропонована для клубочкових клітин [19].

Для визначення просторового розташування IP<sub>3</sub>- і ріанодинових рецепторів у ГМК, ми провели імунофлуоресцентне дослідження з використанням антитіл, специфічних для цих рецепторів. Візуалізація розподілу антитіл за допомогою конфокальної мікроскопії (рис. 4) показала, що IP<sub>3</sub>-рецептори розташовані переважно в субплазмолемальному СР, в той час як ріанодинові рецептори виявляються здебільшого в СР, що розташований ближче до центру клітини. Таким чином, IP<sub>3</sub>-рецептори дійсно можуть бути легше досяжними для іонів кальцію, які входять через VGCCs поверхневої мембрани. Вони мо-

жуть відігравати роль підсилювачів кальцієвого сигналу, оскільки вивільнений через них кальцій буде започатковувати подальше вивільнення із глибше розташованого СР через ріанодинові рецептори [10].

*Дослідження були підтримані грантами від The Wellcome Trust (075112) and British Heart Foundation (PG/08/062/25382).*

**К.Ю. Суханова, В.А. Бурый, В.Ф. Сагач, Т.Б. Болтон, Д.В. Гордиенко**

#### **ДЕЙСТВИЕ МОДУЛЯТОРОВ КальциЕВОГО МЕТАБОЛИЗМА НА СОКРАЩЕНИЕ МЕЗЕНТЕРИАЛЬНОЙ АРТЕРИИ МОРСКОЙ СВИНКИ ПРИ АКТИВАЦИИ P2X-РЕЦЕПТОРОВ**

АТФ вызывает изменения сосудистого тонуса через активацию P2X-и P2Y-пуринорецепторов. Чтобы оценить относительный вклад Ca<sup>2+</sup>, входящих через потенциал-зависимые кальциевые каналы L-типа и высвобождающихся из саркоплазматического ретикулума (СР) через механизм CICR (от англ. Ca<sup>2+</sup>-induced Ca<sup>2+</sup>-release) при активации P2X-рецепторов, мы апплицировали агонист P2X-рецепторов α,β-меАТФ (10 мкмоль/л) и регистрировали изменения амплитуды фазового изометрического сокращения кольцевых дезнотелиализованных сегментов в присутствии блокаторов инозитолтрифосфатных (IP<sub>3</sub>)-рецепторов (60 мкмоль/л 2-аминоэтоксидифенилборат) или ріанодиноних рецепторов (100 мкмоль/л тетракаина) в сочетании с манипулированием поступления внеклеточного Ca<sup>2+</sup> через кальциевые каналы L-типа с помощью никардипина (5 мкмоль/л). Мы

обнаружили, что активация P2X-рецепторов приводит к высвобождению  $\text{Ca}^{2+}$  через оба типа рецепторов –  $\text{IP}_3$ - и риадиноновые рецепторы. Кроме того, кальций, входящий через каналы L-типа также участвует в высвобождении  $\text{Ca}^{2+}$  из СР, предположительно через CICR-механизм. Однако фазное сокращение в присутствии никардицина было менее чувствительно к блокированию  $\text{IP}_3$ - чем риадиноновых рецепторов ( $47,1 \pm 9,5$  и  $22,9 \% \pm 1,4$  % по сравнению с  $38,3 \pm 9,6$  и  $51,8 \% \pm 7,8$  % в растворе Кребса без никардицина для ингибиторов  $\text{IP}_3$ - и риадиноновых рецепторов соответственно). Эти результаты позволяют предположить, что  $\text{IP}_3$ -рецепторы более доступны для ионов кальция, входящих через потенциалзависимые кальциевые каналы L-типа, чем риадиноновые рецепторы. Это предположение подкрепляется исследованиями с использованием иммунофлуоресцентного окрашивания  $\text{IP}_3$ - и риадиноновых рецепторов. Конфокальная визуализация окрашенных рецепторов показала, что элементы СР, находящиеся непосредственно под мембраной, обогащены  $\text{IP}_3$ -рецепторами, а риадиноновые рецепторы расположены преимущественно на центральных и околоядерных элементах СР.

Ключевые слова: гладкие мышцы сосудов, пурино-рецепторы,  $\text{IP}_3$ -рецепторы, риадиноновые рецепторы, потенциалзависимые кальциевые каналы L-типа, конфокальная микроскопия.

**K.Yu.Sukhanova, V.A.Bouriy,  
V.F.Sagach, T.B.Bolton D.V.Gordienko**

#### **EFFECTS OF $\text{Ca}^{2+}$ METABOLISM DRUGS ON PURINERGIC CONTRACTIONS OF THE GUINEA-PIG SMALL MESENTERIC ARTERIES**

ATP evokes changes in the vascular tone through the activation of P2X and P2Y purinoceptors. To evaluate relative contribution of  $\text{Ca}^{2+}$  entry through the L-type voltage-gated calcium channels and  $\text{Ca}^{2+}$ -induced  $\text{Ca}^{2+}$ -release (CICR) mechanisms in initiation of vascular smooth muscle contraction induced by P2XR activation, we have applied P2X receptor agonist -meATP (10  $\mu\text{M}$ ) and measured changes in phasic isometric tension of endothelium-denuded mesenteric artery rings in the presence of antagonists  $\text{IP}_3$ Rs (60  $\mu\text{mol/l}$  APB) or RyRs (100  $\mu\text{mol/l}$  tetracaine) combined with on-off modulation of the L-type calcium channels by nifedipine (5  $\mu\text{M}$ ). We found that activation of P2XRs results in  $\text{Ca}^{2+}$  release from SR through both  $\text{IP}_3$ Rs and RyRs. In addition,  $\text{Ca}^{2+}$  entry via L-type  $\text{Ca}^{2+}$  channels also participates in  $\text{Ca}^{2+}$  release from SR presumably through CICR mechanism. However, the phasic contractions in the presence of nifedipine were found to be less sensitive to inhibition of  $\text{IP}_3$ Rs than RyRs ( $47,1 \pm 9,5$  % and  $22,9 \pm 1,4$  % comparing to  $38,3 \pm 9,6$  % and  $51,8 \pm 7,8$  % in control solution for  $\text{IP}_3$ R and RyR inhibition, respectively). This finding suggests that  $\text{Ca}^{2+}$  entered the cell through L-type  $\text{Ca}^{2+}$  channels, has easier access to  $\text{IP}_3$ Rs than to RyRs. This suggestion is further supported by immunostaining  $\text{IP}_3$ Rs and

RyRs. Confocal imaging revealed that sub-PM SR elements are enriched with  $\text{IP}_3$ Rs, while RyRs are predominantly located in the central/ perinuclear SR elements.

Key words: vascular smooth muscle, purinergic receptors,  $\text{IP}_3$  receptors, ryanodine receptors, L-type voltage-gated calcium channels, confocal microscopy.

*O.O.Bogomoletz Institute of Physiology, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv;*

*Ion Channel and Cell Signalling Centre, Division of Basic Medical Sciences, St. George's University*

#### **СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ**

1. Гурковская А.В., Гокина Н.И. Ионный механизм возбуждающего действия АТФ на гладкие мышцы сосудов // Физиол. журн. – 1987. – **33**, №2. – С. 45–51.
2. Benham C.D., Tsien R.W. A novel receptor-operated  $\text{Ca}^{2+}$ -permeable channel activated by ATP in smooth muscle // Nature. – 1987. – **328**. – P. 275–78.
3. Berridge M.J., Lipp P., Bootman M.D. The versatility and universality of calcium signalling // Nat. Rev. Mol. Cell Biol. – 2000. – **1**. – P. 11–21.
4. Burnstock G. Physiology and pathophysiology of purinergic neurotransmission // Physiol. Rev. – 2007. – **87**, №2. – P. 659–797.
5. Choe C., Ehrlich B.E. The inositol 1,4,5-trisphosphate receptor ( $\text{IP}_3$ R) and its regulators: sometimes good and sometimes bad teamwork // Sci.Signal. – 2006. – **363**. – P. 15.
6. Evans R.J., Surprenant A. Vasoconstriction of guinea-pig submucosal arterioles following sympathetic nerve stimulation is mediated by the release of ATP // Brit. J. Pharmacol. – 1992. – **106**, №2. – P. 242–249.
7. Foskett J.K., White C., Cheung K.H. et al. Inositol trisphosphate receptor  $\text{Ca}^{2+}$  release channels // Physiol. Rev. – 2007. – **87**, №2. – P. 593–658.
8. Gokina N.I., Gurkovskaya A.V. Effect of ATP and adenosine on spontaneous electrical and contractile activity of portal-vein smooth-muscle cells // Bull. Exp. Biol. and Med. – 1981. – **92**, №9 – P. 1141–1144.
9. Gordienko D.V., Bolton T.B. Crosstalk between ryanodine receptors and  $\text{IP}_3$  receptors as a factor shaping spontaneous  $\text{Ca}^{2+}$ -release events in rabbit portal vein myocytes // J. Physiol. – 2002. – **542**. – P. 743–762.
10. Gordienko D.V., Harhun M.I., Kustov M.V. et al. Subplasmalemmal [ $\text{Ca}^{2+}$ ]<sub>i</sub> upstroke in myocytes of the guinea-pig small intestine evoked by muscarinic stimulation:  $\text{IP}_3$ R-mediated  $\text{Ca}^{2+}$ -release induced by voltage-gated  $\text{Ca}^{2+}$  entry // Cell Calcium. – 2008. – **43**, №2. – P. 122–141.
11. Kasri N.N., Torok K., Galione A. et al. Endogenously bound calmodulin is essential for the function of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor // J. Biol. Chem. – 2006. – **281**, №13. – P. 8332–8338.



12. Lewis C.J., Evans R.J. Comparison of P2X receptors in rat mesenteric, basilar and septal (coronary) arteries // J. Auton. Nerv. Syst. – 2000. – **81**, №1–3. – P. 69–74.
13. Lewis C.J., Evans R.J. Lack of run-down of smooth muscle P2X receptor currents recorded with the amphotericin permeabilized patch technique, physiological and pharmacological characterization of the properties of mesenteric artery P2X receptor ion channels // Brit. J. Pharmacol. – 2000. – **131**, №8. – P. 1659–1666.
14. Mironneau J., Coussi F., Morel J.L. et al. Calcium signalling through nucleotide receptor P2X<sub>1</sub> in rat portal vein myocytes // J. Physiol. Online. – 2001. – **536**, №2. – P.339–50.
15. Nori S., Fumagalli L., Bo X. et al. Coexpression of mRNAs for P2X<sub>1</sub>, P2X<sub>2</sub> and P2X<sub>4</sub> receptors in rat vascular smooth muscle: an in situ hybridization and RT-PCR study // J. Vascular. Res. – 1998. – **35**, №3. – P.179–85.
16. North R.A. Molecular physiology of P2X receptors // Physiol. Rev. – 2002. – **82**, №4. – P. 1013–1067.
17. Ramme D., Regenold J.T., Starke K. et al. Identification of the neuroeffector transmitter in jejunal branches of the rabbit mesenteric artery // Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol. – 1987. – **336**, №3. – P. 267–273.
18. Roberts J., Vial C., Digby H.R. et al. Molecular properties of P2X receptors // Pflug. Arch. Europ. J. Physiol. – 2006. – **452**, №5. – P. 486–500.
19. Spat A., Rohacs T., Hunyady L. Plasmalemmal dihydropyridine receptors modify the function of subplasmalemmal inositol 1,4,5-trisphosphate receptors: a hypothesis // Cell Calcium. – 1994. – **15**, №5. – P. 431–437.
20. Starke K., von Kugelgen I., Driessen B. et al. ATP release and its prejunctional modulation // Ciba Found. Symp. – 1996. – **198**. – P. 239–249.
21. Vial C., Evans R. J. P2X<sub>1</sub> receptor-deficient mice establish the native P2X receptor and a P2Y<sub>6</sub>-like receptor in arteries // Mol. Pharmacol. – 2002. – **62**, №6. – P. 1438–1445.
22. Yang J., McBride S., Mak D.-O.D. et al. Identification of a family of calcium sensors as protein ligands of inositol trisphosphate receptor Ca<sup>2+</sup> release channels // Proc. Nat. Acad. Sci. – 2002. – **99**, №11. – P. 7711–7716.

*Ин-т фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України, Київ;  
Лондон, ун-т Св. Георгія, Великобританія  
E-mail: skhivist@biph.kiev.ua*

*Матеріал надійшов до  
редакції 15.01.2009*