

КОНВЕРГЕНЦИЯ ИОНОТРОПНЫХ И МЕТАБОТРОПНЫХ СИГНАЛЬНЫХ ПУТЕЙ ПРИ АКТИВАЦИИ P2X-РЕЦЕПТОРОВ ГЛАДКОМЫШЕЧНЫХ КЛЕТОК СОСУДОВ

Поступила 20.11.13

Ионотропные P2X-рецепторы (P2XR) участвуют в симпатическом контроле сосудистого тонуса, опосредуя вход ионов кальция в гладкомышечные клетки (ГМК), что приводит к деполяризации мембраны последних и активации потенциалуправляемых кальциевых каналов L-типа. Кроме того, ионы Ca^{2+} , вошедшие в клетку, запускают высвобождение Ca^{2+} из саркоплазматического ретикулума (СР) ГМК через риаудиновые рецепторы (RyR), усиливая кальциевые сигналы. Ранее мы обнаружили, что существенный вклад в P2XR-опосредованную кальциевую сигнализацию обеспечивает также высвобождение Ca^{2+} через инозитолтрифосфатные рецепторы (IP_3R). Это свидетельствует о вовлечении метаботропного сигнального пути в кальциевую сигнальную систему ионотропных P2XR. Используя конфокальную детекцию изменений внутриклеточной концентрации Ca^{2+} ($[Ca^{2+}]_i$) и аппликацию ингибиторов кальциевых каналов (никардипин, 5 мкМ), сарко-эндоплазматической кальциевой АТФ-азы SERCA (циклопиазоновая кислота, 10 мкМ), IP_3R (2-APB, 30 мкМ), RyRs (тетракаин, 100 мкМ) и фосфолипазы C (PLC; U-73122, 2.5 мкМ), мы оценивали относительное участие упомянутых четырех компонентов в увеличении $[Ca^{2+}]_i$ при активации P2XR, вызванной действием агониста данных рецепторов $\alpha\beta$ -меАТФ. Вклады трансмембранного входа кальция через каналы P2XR и кальциевые каналы были соизмеримыми ($11.0 \pm 1.4 \%$, $n = 14$ и $8.0 \pm 1.4 \%$, $n = 14$ соответственно). Вклад высвобождения Ca^{2+} через IP_3R оказался втрое бóльшим, чем вклад высвобождения Ca^{2+} через RyR ($41 \pm 5 \%$, $n = 26$ и $14 \pm 7 \%$, $n = 16$ соответственно). Блокирование кальциевых каналов приводило к семикратному уменьшению вклада IP_3R -опосредованного высвобождения Ca^{2+} (от 41 до 5.6 %); при этом вклад RyR-опосредованного высвобождения Ca^{2+} существенно не изменялся. Данный факт позволяет предположить наличие функциональной связи между активацией кальциевых каналов и функционированием метаботропного PLC/ IP_3 -опосредованного сигнального каскада. Сопоставимая эффективность ингибирования $\alpha\beta$ -меАТФ-индуцированных кальциевых ответов блокаторами PLC или IP_3R и никардипином также поддерживает эту гипотезу. Согласно полученным данным, увеличение $[Ca^{2+}]_i$ при активации P2XR является результатом не только P2XR-опосредованного входа Ca^{2+} , который запускает высвобождение Ca^{2+} через RyR, но и высвобождения Ca^{2+} через IP_3R . Последний процесс происходит за счет функционирования PLC-опосредованного пути, связан с активацией кальциевых каналов и обеспечивает доминирующий вклад в высвобождение Ca^{2+} из депо в случае активации упомянутых ионотропных рецепторов.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: конфокальная микроскопия, пуринорецепторы, потенциалуправляемые кальциевые каналы L-типа, IP_3 -рецепторы, риаудиновые рецепторы, артериальные гладкомышечные клетки.

¹ Институт физиологии им. А. А. Богомольца НАН Украины, Киев (Украина).

² Лилльский университет наук и технологий, Вильньов Даск (Франция).
Эл. почта: skhrist@biph.kiev.ua (К. Ю. Суханова).

ВВЕДЕНИЕ

В регуляции тонуса кровеносных сосудов симпатической нервной системой принимают участие ионотропные пуринорецепторы P2X (P2XR), которые находятся в мембранах сосудистых гладкомышечных клеток (ГМК) [1–3]. Эти рецепторы обладают неселективными катионными каналами, проницаемыми для Ca^{2+} , Na^+ и K^+ [4–6]. При активации данных рецепторов происходит деполяризация клетки, что, в свою очередь, приводит к открыванию потенциалуправляемых кальциевых каналов L-типа [7, 8]. В результате ионы кальция входят в клетку и через ионотропные кальцийпроницаемые P2XR, и через кальциевые каналы. Внутри клетки вошедшие ионы кальция инициируют процесс высвобождения кальция из саркоплазматического ретикулума (CP). Благодаря такому высвобождению внутриклеточная концентрация кальция ($[\text{Ca}^{2+}]_i$), от которой зависят сила сокращения ГМК и, в конце концов, величина просвета сосуда, многократно увеличивается. Этот механизм усиления кальциевого сигнала имеет непосредственное отношение к эффективности симпатической регуляции кровотока.

Известны два механизма высвобождения кальция из CP. Это кальцийиндуцируемое высвобождение Ca^{2+} (CICR) [9], которое опосредуется рианодиновыми рецепторами (RyR), и инозитолтрифосфат (IP_3)-опосредованное высвобождение кальция, которое обеспечивается IP_3 -рецепторами (IP_3R). В исследовании на сегментах мезентериальной артерии морской свинки, выполненном с использованием тензометрической методики [10], было подтверждено участие обоих упомянутых механизмов в усилении кальциевого сигнала в условиях активации ионотропных P2XR. При этом вовлечение IP_3 -опосредованного высвобождения кальция стало для нас несколько неожиданным, поскольку активация P2XR не связана с опосредованной G-белками активацией фосфолипазы C (PLC) и образованием IP_3 . В мультিকлеточных препаратах, однако, аппликация агониста P2XR может активировать пуринорецепторы, расположенные не только на ГМК, но и на пресинаптических нервных окончаниях. Кальций, вошедший в нервное окончание через P2XR, может вызывать высвобождение норадреналина и активацию метаботропных α_1 -адренорецепторов, присутствующих в мембранах ГМК [11, 12], с последующим IP_3 -опосредованным высвобождением Ca^{2+} из CP [13, 14]. Чтобы исключить подоб-

ную неопределенность, мы провели исследование P2XR-опосредованной кальциевой сигнализации на изолированных ГМК мезентериальной артерии, используя быструю конфокальную визуализацию изменений $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Мы анализировали относительный вклад в суммарный кальциевый сигнал трансмембранного входа кальция через P2XR и кальциевые каналы L-типа, а также процесс высвобождения кальция из CP через RyR и IP_3R . Полученные результаты свидетельствуют о способности кальциевых каналов через сигнальный путь $G_{q/11}/\text{PLC}/\text{IP}_3$ в существенной степени активировать высвобождение кальция из CP через IP_3R .

МЕТОДИКА

Изоляция ГМК. Опыты проводились на ГМК мезентериальной артерии морской свинки, изолированных с использованием ферментативно-механической методики [7]. Участок мезентериальной артерии третьего–седьмого порядка, очищенный от жировой и соединительной ткани, выдерживали при 37°C 18–20 мин в 1.0 мл раствора, содержащего в себе 1.0 мг коллагеназы (тип IA), 0.5 мг протеазы (тип X), 0.5 мг соевого ингибитора трипсина (тип II-S) и 1.0 мг бычьего сывороточного альбумина. Функционально полноценные изолированные миоциты получали после многократного пропускания ферментативно обработанной ткани через пастеровскую пипетку. Суспензию клеток хранили не более 8 ч после изоляции в камерах с нормальным раствором Кребса при температуре 4°C . Эксперименты проводили при комнатной температуре (20 – 25°C).

Визуализация изменений $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Изменения $[\text{Ca}^{2+}]_i$ визуализировали, используя высокоаффинный ($k_d = 526$ нМ) кальцийчувствительный флуоресцентный краситель Fluo-3 AM (максимумы абсорбции/эмиссии при длине волн 506 нм/526 нм). Краситель разводили в DMSO с добавлением детергента Pluronic F-127; раствор доводили до конечной концентрации 5 мкМ нормальным раствором Кребса. ГМК загружали красителем в течение 20 мин и отмывали 40 мин раствором Кребса при комнатной температуре для полной деэстерификации. Для предотвращения сокращений ГМК за 10 мин до начала измерений в камеру добавляли вортманнин (конечная концентрация 40 мкМ).

Конфокальные измерения. Экспериментальную

камеру с клетками размещали на предметном столике инвертированного микроскопа Axiovert 100 M, оснащенного лазерным сканером LSM 5 («Zeiss», ФРГ). Конфокальные изображения получали с помощью объектива Zeiss Plan-Apochromat 40×1.4 (масляная иммерсия). Визуализацию изменений $[Ca^{2+}]_i$ на субклеточном уровне производили в процессе последовательного двумерного сканирования при фиксированной фокусировке, что позволяло получать последовательность из 1000 двумерных (x-y) изображений с частотой 13–32 с⁻¹. Флуоресценцию Fluo-3 AM возбуждали с помощью ионного аргонового лазера (200 мВт, «Laser-Fertigung», ФРГ). Вызываемые действием агониста изменения $[Ca^{2+}]_i$ представляли графически в виде последовательности значений нормированной интенсивности флуоресценции Fluo-3 (F/F_0), усредненной в пределах конфокального оптического среза ГМК [15].

Растворы и реактивы. Для изолированных клеток использовали раствор Кребса следующего состава (в миллимолях на 1 л): NaCl – 120, KCl – 6, CaCl₂ – 2.5, MgCl₂ – 1.2, глюкоза – 12, HEPES – 10; рН доводили до 7.4 с помощью NaOH. Бескальциевый раствор соответствовал раствору Кребса для изолированных клеток, отличаясь отсутствием CaCl₂.

В работе использовались следующие реактивы: коллагеназа (тип IA), протеаза (тип X), соевый ингибитор трипсина (тип II-S) и бычий сывороточный альбумин («Invitrogen», Великобритания), Fluo-3 AM-ацетоксиметилловый эфир (Fluo-3 AM) и Pluronic F-127 («TefLabs» США), HEPES, диметилсульфоксид – DMSO, кофеин и вортманнин («Sigma», Великобритания), аденозин 5'-трифосфат, натриевая соль – АТФ, αβ-метиленаденозин 5'-трифосфат, литиевая соль – αβ-меАТФ, тетракаина гидрохлорид и никардипин («Sigma-Aldrich», США), 2-аминоэтоксидифенил борат (2-APB) и циклопазоновая кислота – ЦПК («Calbiochem», США).

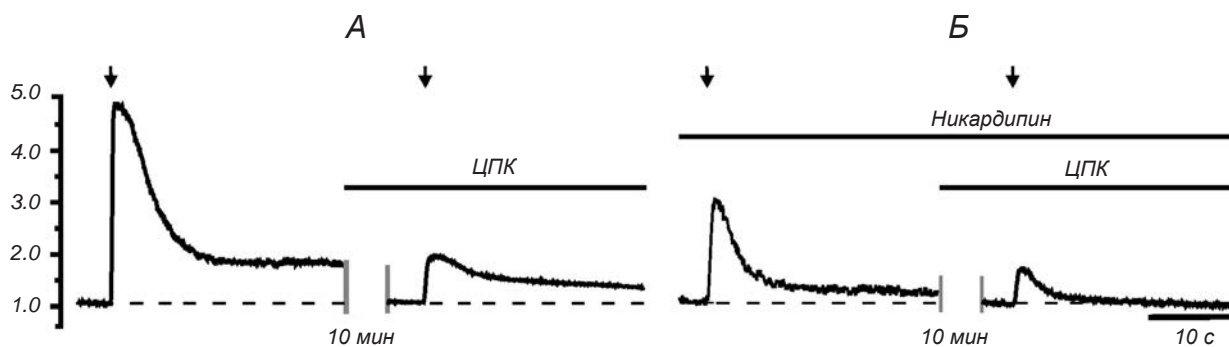
РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Для активации P2XR мы использовали кратковременную (300 мс) аппликацию 10 мкМ αβ-меАТФ (см. Методику). Последний является селективным агонистом P2X1R [6], которые экспрессированы в мезентериальной артерии в наибольшем количестве [16]. Поскольку для P2X1R характерны быстрая десенситизация и медленная кинетика восстановления [5, 6], повторные аппликации дан-

ного агониста производились не раньше чем через 10 мин (время, необходимое для завершения десенситизации рецепторов и перезаполнения внутриклеточных депо кальцием). Относительный вклад трансмембранного входа Ca²⁺ в суммарный кальциевый сигнал оценивался после предварительного опустошения CP, который является основным внутриклеточным запасником кальция. Для этого использовали ЦПК, которая обратимо блокирует Ca²⁺-АТФазу CP (SERCA), но не влияет на ионные каналы, в том числе на кальциевые каналы L-типа [17, 18]. Эффективность опустошения CP проверяли путем аппликации 3 мМ кофеина после 10-минутной инкубации клетки в растворе, содержащем в себе 10 мкМ ЦПК. После инкубации в таком растворе аппликация кофеина не вызывала никаких изменений $[Ca^{2+}]_i$ (данные не представлены). Последующая активация P2XR с помощью 10 мкМ αβ-меАТФ вызывала, однако, преходящее увеличение $[Ca^{2+}]_i$, обусловленное трансмембранным входом кальция через каналы P2XR и кальциевые каналы. Типичный вид кальциевых сигналов, вызванных аппликацией αβ-меАТФ до и после опустошения CP, показан на рис. 1, А.

Статистический анализ результатов, полученных на 24 клетках, показал, что в среднем только $19.0 \pm 0.8\%$ суммарного кальциевого сигнала при активации P2XR непосредственно обеспечиваются входом кальция через каналные структуры мембраны (собственно P2XR и кальциевые каналы). Таким образом, коэффициент усиления кальциевого сигнала за счет мобилизации высвобождения кальция из внутриклеточных запасников (оцененный на основе этих результатов как отношение полной амплитуды кальциевого сигнала к амплитуде, определяемой трансмембранным входом кальция) составляет порядка 5.3.

Для того, чтобы разграничить компоненты кальциевой сигнализации, которые обеспечиваются собственно P2XR и кальциевыми каналами, присутствующими в мембране ГМК, и оценить способность ионов Ca²⁺, входящих через эти пути, запускать высвобождение кальция из CP, мы применяли блокирование кальциевых каналов с помощью 5 мкМ никардипина и регистрировали суммарные кальциевые сигналы в ответ на аппликацию 10 мкМ αβ-меАТФ до и после опустошения CP с помощью 10 мкМ ЦПК (рис. 1, Б). В первом случае суммарный сигнал включал в себя как трансмембранный вход Ca²⁺ через P2XR, так и индуцированное им высвобождение Ca²⁺ из CP. Во втором



Р и с. 1. Влияние опустошения саркоплазматического ретикулума, обусловленного действием 10 мкМ циклопиазоновой кислоты (ЦПК), на кальциевые сигналы, вызванные аппликацией 10 мкМ $\alpha\beta$ -меАТФ (отмечено стрелками), до и после блокирования кальциевых каналов никардипином (5 мкМ).

Кальциевый сигнал в присутствии ЦПК отображает вклад трансмембранного входа кальция через P2XR-рецепторы и кальциевые каналы в контроле (А) или только (в присутствии никардипина) через P2XR (Б). По вертикали – нормированная интенсивность флуоресценции Fluo-3 (F/F_0).

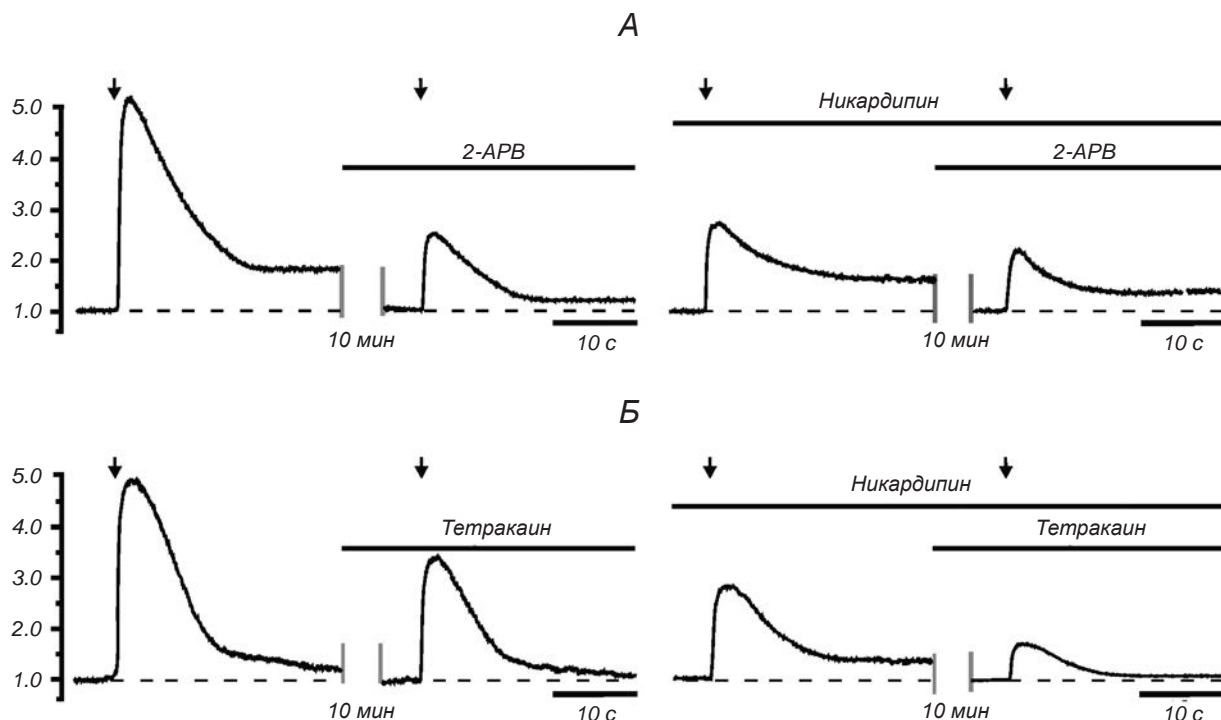
Р и с. 1. Вплив спустошення саркоплазматичного ретикулума, зумовленого дією 10 мкМ циклопіазонової кислоти (ЦПК), на кальцеві сигнали, викликані аплікацією 10 мкМ $\alpha\beta$ -меАТФ (позначено стрілками), до та після блокування кальцевих каналів никардипіном (5 мкМ).

же случае регистрировалась только та часть кальциевого сигнала, которая обеспечивалась трансмембранным входом Ca^{2+} через сами P2XR. Зарегистрированные кальциевые сигналы сравнивали с контрольными, полученными без добавления никардипина.

В условиях опустошения СР кальциевый сигнал, обусловленный трансмембранным входом Ca^{2+} , уменьшался от $19.0 \pm 0.8\%$ в контроле ($n = 24$) до $11.0 \pm 1.4\%$ в присутствии никардипина ($n = 14$). Эти результаты показывают, что каналы P2XR и кальциевые каналы обеспечивают примерно сопоставимые вклады в суммарный кальциевый сигнал; соответствующие компоненты составляют приблизительно 11 и 8%. В условиях интактности депо СР блокирование кальциевых каналов никардипином уменьшало суммарный кальциевый сигнал в среднем на $64 \pm 2\%$ ($n = 22$). Никардипинчувствительный компонент отображает суммарный вклад входа Ca^{2+} в клетку через кальциевые каналы и последующего высвобождения Ca^{2+} из СР, обусловленного активацией указанных каналов. Аналогично, никардипинустойчивый компонент, примерно равный 36%, отображает вклад ионов Ca^{2+} , вошедших в клетку через P2XR, плюс активируемое этим входом высвобождение кальция из СР через CICR-механизм. Полученные результаты свидетельствуют о том, что при активации P2XR вовлечение кальциевых каналов вследствие деполяризации мембраны ГМК обеспечивает почти вдвое более эффективную

кальциевую сигнализацию, чем собственно активация упомянутых рецепторов (P2XR). Соответствующие коэффициенты усиления кальциевых сигналов, обеспечиваемые двумя указанными путями трансмембранного входа Ca^{2+} и оцененные на основе полученных результатов, составляют приблизительно 8 и 3.3.

Существенно более высокая эффективность сигнализации, опосредуемой кальциевыми каналами, может быть объяснена вовлечением дополнительных механизмов высвобождения кальция из СР, отличающихся от таковых у P2XR. Чтобы проследить связь между механизмами трансмембранного входа Ca^{2+} и механизмами высвобождения Ca^{2+} из СР при активации P2XR, мы проанализировали действие двух ингибиторов, избирательно влияющих на RuR и IP_3R . Мы оценивали влияния 100 мкМ тетракаина [19] и 30 мкМ 2-APB [20] соответственно на суммарные кальциевые сигналы, вызванные аппликациями $\alpha\beta$ -меАТФ в контроле и после угнетения кальциевых каналов никардипином (рис. 2). Такой методический подход позволяет разграничить относительные вклады высвобождения Ca^{2+} , опосредуемого RuR и IP_3R , в суммарный кальциевый сигнал. Действительно, в присутствии тетракаина высвобождение Ca^{2+} происходит преимущественно через $\text{IP}_3\text{-R}$. Поэтому суммарный кальциевый сигнал в таких условиях состоит из вкладов трансмембранного входа Ca^{2+} и высвобождения Ca^{2+} через IP_3R . По нашим данным (рис. 2), тетракаинустойчивый



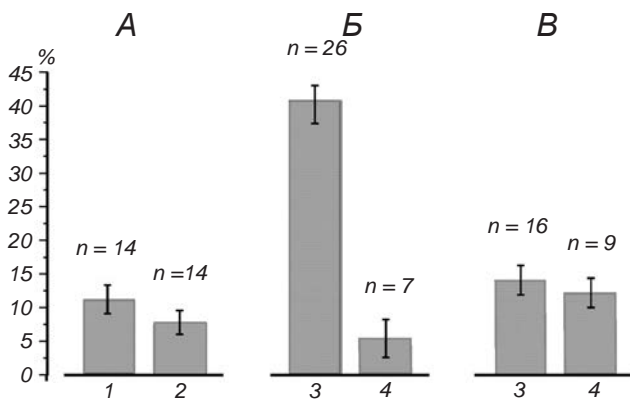
Р и с. 2. Влияние угнетения кальциевых каналов под действием 5 мкМ никардипина на высвобождение кальция из саркоплазматического ретикулума через рианодиновые рецепторы (RyR) и IP_3 -рецепторы (IP_3R) при активации P2X-рецепторов, вызванной аппликацией 10 мкМ $\alpha\beta$ -меАТФ (отмечено стрелками). Вклад RyR-опосредованного высвобождения кальция в суммарный кальциевый сигнал оценивали в условиях угнетения IP_3R под действием 30 мкМ 2-АПВ (А), а вклад IP_3R -опосредованного высвобождения – в условиях угнетения RyR под действием 100 мкМ тетракаина (Б). В обоих компонентах присутствует вклад трансмембранного входа кальция через P2XR и кальциевые каналы в контроле или только (в присутствии никардипина) через P2XR. По вертикали – то же, что и на рис. 1.

Р и с. 2. Вплив пригнічення кальцієвих каналів під дією 5 мкМ нікардипіну на вивільнення кальцію із саркоплазматичного ретикулума через ріанодинові (RyR) рецептори та IP_3 -рецептори (IP_3Rs) при активації P2X-рецепторів, що була викликана аплікацією 10 мкМ $\alpha\beta$ -меАТФ (позначено стрілками).

компонент составляет в среднем $60 \pm 5\%$ ($n = 26$). Аналогично, при блокировании IP_3 -рецепторов с помощью 2-АПВ вклад RyR-опосредованного высвобождения совместно с трансмембранным входом Ca^{2+} составляет $33 \pm 7\%$ ($n = 16$). Вычитание вклада трансмембранного входа Ca^{2+} , который составляет 19% в контроле и 11% в присутствии никардипина, позволяет оценить относительные вклады высвобождения Ca^{2+} через IP_3R и RyR как приблизительно 41 и 14% соответственно. Величины относительных вкладов в суммарный кальциевый сигнал за счет IP_3R - и RyR-опосредованного высвобождения Ca^{2+} в присутствии никардипина, оцененные способом, аналогичным описанному выше, и откорректированные по вкладу трансмембранного входа Ca^{2+} , составляют 5.6 и 11.7% соот-

ветственно. Результаты исследования подытожены на рис. 3.

В контрольных условиях, когда в пуринергической сигнализации задействованы и P2XR, и кальциевые каналы, последующее усиление кальциевого сигнала происходит с участием и IP_3R , и RyR. При этом вклад высвобождения Ca^{2+} через IP_3R примерно в три раза превосходит вклад такого высвобождения через RyR. После блокирования кальциевых каналов ситуация существенно изменяется. В присутствии никардипина IP_3 -опосредованное высвобождение кальция уменьшается примерно в семь раз (рис. 3, Б). В результате вклад такого процесса становится в два раза меньшим, чем вклад высвобождения кальция через RyR. В то же время RyR-опосредованное высвобождение Ca^{2+} прак-



Р и с. 3. Компоненты P2XR-опосредованной кальциевой сигнализации.

A – вклад трансмембранного входа кальция через P2X-рецепторы (1) и кальциевые каналы (2); *Б* – вклад высвобождения кальция через IP_3 -рецепторы в контроле (3) и после блокирования кальциевых каналов нифедипином (4); *В* – вклад высвобождения кальция через риаинодиновые рецепторы в контроле (3) и после блокирования кальциевых каналов нифедипином (4). По оси ординат – относительный вклад, % (за 100 % принята амплитуда сигнала в контроле).

Р и с. 3. Компоненти P2XR-опосередкованої кальцієвої сигналізації.

тически не изменяется (*B*). Небольшое снижение вклада RyR, по-видимому, связано с уменьшением интенсивности их активации через механизм CICR из-за прекращения входа Ca^{2+} через кальциевые каналы в присутствии нифедипина.

Полученные результаты показывают, что P2XR-опосредованная активация IP_3R в ГМК мезентериальной артерии критически зависит от активации кальциевых каналов. Способность кальциевых каналов, активированных либо деполяризацией, либо действием агониста, запускать опосредованную G-белком активацию PLC с последующим образованием IP_3 и высвобождением кальция через IP_3R была продемонстрирована на ряде ГМК сосудов [21]. Поэтому мы проверили возможность причастности PLC-опосредованной сигнальной цепочки к обнаруженному в нашем препарате высвобождению Ca^{2+} через IP_3R . С данной целью было проведено исследование влияния ингибитора указанной фосфолипазы U-73122 [22] на кальциевые сигналы, вызванные аппликацией $\alpha\beta$ -меАТФ. В присутствии 2.5 мкМ U-73122 амплитуда упомянутых сигналов уменьшалась в среднем на $65 \pm 5\%$ ($n = 5$). Этот факт свидетельствует о значительной зависимости IP_3R -опосредованного высвобождения кальция от активности PLC. Показательно, что ингибитор PLC

угнетает примерно такую же часть кальциевого сигнала, вызванного аппликацией $\alpha\beta$ -меАТФ, как и блокатор кальциевых каналов (нифедипин), и блокатор IP_3 -рецепторов (2-АРВ). Приведенные данные указывают на то, что IP_3 -опосредованное высвобождение Ca^{2+} является результатом активации кальциевых каналов L-типа и образования IP_3 через PLC-зависимый сигнальный путь. Такое метаботропное действие кальциевых каналов легко объясняет и механизм вовлечения высвобождения Ca^{2+} в пуриnergическую сигнализацию в исследуемых нами ГМК, и значительно более эффективное усиление кальциевой сигнализации вследствие активации кальциевых каналов, чем в случае вовлечения RyR. Согласно нашим результатам, RyR первично активируются преимущественно ионами Ca^{2+} , входящими в клетку через каналы P2XR. Об этом свидетельствует незначительное снижение вклада активации RyR в генерацию кальциевого сигнала при блокировании кальциевых каналов (*B*). Такой результат обуславливается специфическим пространственным распределением экспрессии RyR и IP_3R в ГМК мезентериальной артерии. Используя иммунофлуоресцентное мечение RyR и IP_3R , мы показали [10], что IP_3R экспрессируются преимущественно на элементах CP, находящихся непосредственно под мембраной, а RyR расположены глубже, на центральных и околядерных элементах CP. Такие особенности распределения способствуют эффективному накоплению IP_3 в микрообъемах между примембранным CP и мембраной, в которой расположены кальциевые каналы. Подобное накопление облегчает взаимодействие IP_3 с экспрессированными там IP_3R -рецепторами. В то же время взаимодействие вошедших в микрообъем ионов Ca^{2+} с отдаленными локусами расположения RyR оказывается существенно ограниченным из-за «экранирования» процесса диффузии примембранным CP [23]. Ограниченность участия ионов Ca^{2+} , вошедших через кальциевые каналы, в активации RyR, по-видимому, не распространяется на массивное высвобождение Ca^{2+} через IP_3R , опосредованное метаботропным аспектом функционирования кальциевых каналов. Вклад IP_3R -опосредованного высвобождения в активацию RyR можно оценить соответственно величине 2-АРВ-чувствительного компонента интегрального кальциевого сигнала, который составляет в среднем $67 \pm 7\%$ ($n = 16$). Этот компонент, в отличие от тетракаинустойчивого компонента, помимо вклада IP_3R -опосредованного высвобождения (41 %), включает в себя «добавку» за

счет активации RyR ионами Ca^{2+} , которые высвободились через IP_3R . Такая добавка составляет 26 %, и она может служить мерой перекрестной активации RyR и IP_3R . Подобное взаимодействие двух механизмов высвобождения кальция описано и для ГМК других типов [24, 25].

Таким образом, результаты настоящего исследования показали, что повышение $[Ca^{2+}]_i$ при активации P2XR происходит вследствие совместного вклада нескольких взаимосвязанных процессов. С одной стороны, это вход ионов Ca^{2+} из внеклеточной среды через P2XR и вызванное данным входом RyR-опосредованное высвобождение кальция из CP за счет механизма CICR. С другой стороны, это активация потенциалуправляемых кальциевых каналов L-типа в результате деполяризации, вызванной открыванием ионотропных P2XR. Благодаря присущей кальциевым каналам метаботропной функции они способны через сигнальный путь $G_{q/11}/PLC/IP_3$ существенно активировать IP_3 -опосредованное высвобождение Ca^{2+} из CP. Подобное IP_3R -опосредованное высвобождение данных ионов из CP при активации P2XR обеспечивает наиболее весомый вклад в кальциевую сигнализацию, в три раза превосходящий вклад исходного высвобождения Ca^{2+} через RyR. Механизм активации PLC-опосредованного высвобождения Ca^{2+} в результате функционирования потенциалуправляемых кальциевых каналов L-типа требует дальнейших исследований.

Исследование выполнялось согласно положениям Международной конвенции по защите животных, используемых в экспериментальных и других научных целях (Страсбург, 1985), а также соответственно положениям Комитетов по биоэтике Института физиологии им. А. А. Богомольца НАН Украины и Лилльского университета наук и технологий.

Авторы настоящей работы – К. Ю. Суханова, В. А. Бурый и Д. В. Гордиенко – подтверждают, что у них отсутствует конфликт интересов.

Х. Ю. Суханова¹, В. А. Бурый¹, Д. В. Гордиенко^{1,2}

КОНВЕРГЕНЦІЯ ІОНОТРОПНИХ ТА МЕТАБОТРОПНИХ СИГНАЛЬНИХ ШЛЯХІВ ПРИ АКТИВАЦІЇ P2X-РЕЦЕПТОРІВ ГЛАДЕНЬКОМ'ЯЗОВИХ КЛІТИН СУДИН

¹ Інститут фізіології ім. О. О. Богомольця НАН України, Київ (Україна).

² Лілльський університет наук та технологій, Вільньов Даск (Франція).

Резюме

Ионотропні P2X-рецептори (P2XR) беруть участь у симпатичному контролі судинного тону, опосередковуючи вхід іонів кальцію в гладеньком'язові клітини (ГМК), що призводить до деполяризації мембрани та активації потенціалкероаних кальцієвих каналів L-типу. Крім того, іони Ca^{2+} , що входять у клітину, запускають вивільнення Ca^{2+} із саркоплазматичного ретикулума (CP) ГМК через ріанодинові рецептори (RyR), підсилюючи кальцієві сигнали. Раніше ми виявили, що істотний внесок у P2XR-опосередковану кальцієву сигналізацію забезпечує також вивільнення Ca^{2+} через інозитолтрифосфатні рецептори (IP_3R). Це свідчить про залучення метаботропного сигнального шляху в кальцієву сигнальну систему іонотропних P2XR. Використовуючи конфокальну детекцію змін внутрішньоклітинної концентрації Ca^{2+} ($[Ca^{2+}]_i$) та апликацію інгібіторів кальцієвих каналів (нікардипін, 5 мкМ), сарко-ендоплазматичної кальцієвої АТФ-ази SERCA (циклопіазонова кислота, 10 мкМ), IP_3R (2-APB, 30 мкМ), RyR (тетракаїн, 100 мкМ) і фосфоліпази C (PLC, U-73122, 2.5 мкМ), ми оцінювали відносну участь згаданих чотирьох компонентів у збільшенні $[Ca^{2+}]_i$ при активації P2XR, викликаній дією агоніста даних рецепторів $\alpha\beta$ -меАТФ. Внески трансмембранного входу кальцію через канали P2XR і кальцієві канали були співставними ($11.0 \pm 1.4\%$, $n = 14$ і $8.0 \pm 1.4\%$, $n = 14$ відповідно). Внесок вивільнення Ca^{2+} через IP_3R виявився втричі більшим, ніж внесок вивільнення Ca^{2+} через RyR ($41 \pm 5\%$, $n = 26$ і $14 \pm 7\%$, $n = 16$ відповідно). Блокування кальцієвих каналів призводило до семиразового зменшення внеску IP_3R -опосередкованого вивільнення кальцію (з 41 до 5.6 %); при цьому внесок RyR-опосередкованого вивільнення Ca^{2+} істотно не змінювався. Даний факт дозволяє припустити наявність функціонального зв'язку між активацією кальцієвих каналів і функціонуванням метаботропного PLC/ IP_3 -опосередкованого сигнального каскаду. Співставна ефективність інгібування $\alpha\beta$ -меАТФ-індукованих кальцієвих відповідей блокаторами PLC або IP_3R і нікардипіном також підтримує цю гіпотезу. Згідно з отриманими даними, збільшення $[Ca^{2+}]_i$ при активації P2XR є результатом не тільки P2XR-опосередкованого входу Ca^{2+} , який запускає вивільнення Ca^{2+} через RyR, але й вивільнення Ca^{2+} через IP_3R . Останній процес відбувається за рахунок функціонування PLC-опосередкованого шляху, є пов'язаним з активацією кальцієвих каналів і забезпечує внесок у вивільнення Ca^{2+} із депо в разі активації згаданих іонотропних рецепторів.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. D. L. Kreulen, "Properties of the venous and arterial innervations in the mesentery," *J. Smooth Muscle Res.*, **39**, 269-279 (2003).
2. G. Burnstock and V. Ralevic, "New insights into the local regulation of blood flow by perivascular nerves and endothelium," *Br. J. Plast. Surg.*, **47**, 527-543 (1994).
3. W. Zang, J. Zacharia, C. G. Lamont, et al., "Sympathetically evoked Ca^{2+} signaling in arterial smooth muscle," *Acta Pharmacol. Sin.*, **27**, 1515-1525 (2006).

4. T. M. Egan, D. S. Samways, and Z. Li, "Biophysics of P2X receptors," *Pflügers Arch.*, **452**, 501-512 (2006).
5. B. S. Khakh, G. Burnstock, C. Kennedy, et al., "International Union of Pharmacology. XXIV. Current status of the nomenclature and properties of P2X receptors and their subunits," *Pharmacol. Rev.*, **53**, 107-118 (2001).
6. R. A. North, "Molecular physiology of P2X receptors," *Physiol. Rev.*, **82**, No. 4, 1013-1067 (2002).
7. D. V. Gordienko, A. V. Zholos, and T. B. Bolton, "Membrane ion channels as physiological targets for local Ca²⁺ signaling," *J. Microscopy*, **196**, No. 3, 305-316 (1999).
8. Z. Peng, A. Dang, and W. J. Arendshorst, "Increased expression and activity of phospholipase C in renal arterioles of young spontaneously hypertensive rats," *Am. J. Hypertens.*, **20**, 38-43 (2007).
9. M. Iino, "Calcium-induced calcium release mechanism in guinea pig taenia caeci," *J. Gen. Physiol.*, **94**, No. 2, 363-383 (1989).
10. Х. Ю. Суханова, В. А. Бурый, В. Ф. Сагач та ін., "Дія модуляторів кальцієвого метаболізму на скорочення мезентеріальної артерії морської свинки при активації P2X-рецепторів", *Фізіол. журн.*, **55**, № 4, 74-82 (2009).
11. K. Starke, I. von Kügelgen, B. Driessen, et al., "ATP release and its prejunctional modulation," *Ciba Found. Symp.*, **198**, 239-249 (1996).
12. D. Purves, G. J. Augustine, D. Fitzpatrick, et al., *Neuroscience*, Sinauer Ass. Inc., Publ. Sunderland (Massachusetts) (2004).
13. R. J. Evans and A. Surprenant, "Vasoconstriction of guinea-pig submucosal arterioles following sympathetic nerve stimulation is mediated by the release of ATP," *Br. J. Pharmacol.*, **106**, No. 2, 242-249 (1992).
14. G. Burnstock, "Physiology and pathophysiology of purinergic neurotransmission," *Physiol. Rev.*, **87**, No. 2, 659-797 (2007).
15. O. V. Povstyan, M. I. Harhun, and D. V. Gordienko, "Ca²⁺ entry following P2X receptor activation induces IP₃ receptor mediated Ca²⁺ release in renal resistance artery myocytes," *Br. J. Pharmacol.*, **162**, 1618-1638 (2011).
16. C. J. Lewis and R. J. Evans, "Comparison of P2X receptors in rat mesenteric, basilar and septal (coronary) arteries," *J. Auton. Nerv. Syst.*, **81**, Nos. 1/3, 69-74 (2000).
17. M. Suzuki, K. Muraki, Y. Imaizumi, et al., "Cyclopiazonic acid, an inhibitor of the sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-pump, reduces Ca²⁺-dependent K⁺ currents in guinea-pig smooth muscle cells," *Br. J. Pharmacol.*, **107**, 134-140 (1992).
18. V. Garaliene, V. Barsys, P. Jakuška, et al., "Action of calcium antagonists and agonists on isolated human thoracic arteries used for coronary artery bypass grafting," *Pharmacol. Res.*, **64**, 733-738 (2012).
19. A. Del Valle-Rodríguez, J. Lopez-Barneo, and J. Urena, "Ca²⁺ channel-sarcoplasmic reticulum coupling: a mechanism of arterial myocyte contraction without Ca²⁺ influx," *EMBO J.*, **22**, 4337-4345 (2003).
20. T. Maruyama, T. Kanaji, S. Nakade, et al., "2-APB, 2-aminoethoxydiphenyl borate, a membrane-penetrable modulator of Ins(1,4,5)P₃-induced Ca²⁺ release," *J. Biochem.*, **122**, 498-505 (1997).
21. J. Urena, A. Del Valle-Rodríguez, and J. Lopez-Barneo, "Metabotropic Ca²⁺ channel-induced calcium release in vascular smooth muscle," *Cell Calcium*, **42**, 513-520 (2007).
22. R. J. Smith, L. M. Sam, J. M. Justen, et al., "Receptor-coupled signal transduction in human polymorphonuclear neutrophils: effects of a novel inhibitor of phospholipase C-dependent processes on cell responsiveness," *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **253**, 688-697 (1990).
23. D. Poburko, N. Fameli, K. H. Kuo, et al., "Ca²⁺ signaling in smooth muscle: TRPC6, NCX and LNats in nanodomains," *Channels*, **2**, No. 1, 10-12 (2008).
24. L. A. Blatter and W. G. Weir, "Agonist-induced [Ca²⁺]_i waves and Ca²⁺-induced Ca²⁺ release in mammalian vascular smooth muscle cells," *Am. J. Physiol.*, **263**, 576-586 (1992).
25. F. X. Boittin, N. Macrez, G. Halet, et al., "Norepinephrine-induced Ca²⁺ waves depend on InsP₃ and ryanodine receptor activation in vascular myocytes," *Am. J. Physiol.*, **277**, 139-151 (1999).