

Участие серотониновых рецепторов 2В-типа в регуляции внутриклеточных АФК

Научный руководитель – Авдонин Павел Владимирович

Труфанов С.К.¹, Рыбакова Е.Ю.², Авдонин П.П.³

1 - Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, Москва, Россия, *E-mail: Gad.91@inbox.ru*; 2 - Московская государственная академия тонкой химической технологии, Москва, Россия, *E-mail: alenka3107@mail.ru*; 3 - Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, Москва, Россия, *E-mail: ppavdonin@gmail.com*

Серотонин (5-гидрокситриптамин (5-НТ)) обнаружен в желудочно-кишечном тракте, центральной нервной системе и кровотоке, прежде всего в тромбоцитах. 5-НТ, высвобождаемый из активированных тромбоцитов, регулирует функцию клеток гладкой мускулатуры сосудов посредством активации его рецепторов, связанных с G-белком.

Серотониновые рецепторы (5-НТ₂) модулируют множество физиологических процессов, от восприятия и эмоций до сокращения сосудов и гладких мышц. Рецепторы 5-НТ_{2В} экспрессируются как в эндотелиальных, так и в гладкомышечных клетках сосудов. Ранее было показано, что агонист рецептора 5-НТ_{2В} BW723С86 вызывает увеличение концентрации внутриклеточной H₂O₂. Для её измерения использовался внутриклеточный зонд DCF (H2DCFDA) в концентрации 2мкМ. Измерения проводились с помощью микропланшетного спектрофлуориметра Synergy-4. Однако DCF не является специфичным к H₂O₂, поэтому был использован белок HyPer, который обладает высокой специфичностью к H₂O₂, не продуцирует АФК под действием света и не чувствителен к супероксиду, окисленному глутатиону, оксиду азота и пероксинитриту.

В экспериментах использовались эндотелиальные клетки сосудов человека (HUVES) из 2-5 пассажей, выделенные из пупочной вены и культивированные в 48 луночных планшетах. Для экспрессии HyPer в клетках было использовано 3 вектора, кодирующих HyPer, слитый с сигналом локализации в цитоплазме, ядре и митохондриях. Векторы HyPer были доставлены в клетки с помощью трансфекции наборами lipofectamine 2000 или jetPEITM-HUVES с использованием стандартных протоколов. Измерения проводились на микроскопе Leica DMI6000. Для измерения использовалось 2 канала: проходящий свет и флуоресценция (фильтр-куб на 360 нм). В экспериментах использовался BW723С86 с конечной концентрацией 100мкМ, а также H₂O₂ с конечной концентрацией 100мкМ для контроля.

Эксперименты показали достоверное увеличение концентрации H₂O₂ после добавления BW723С86. Однако этот рост был неравномерным. В ядре он составлял 36% от ответа на воздействие H₂O₂, в цитоплазме - 30%, в митохондриях - 37%.