



УДК 616.34-002.44-092+616.345:616.13/14+616-008.831

© 2010

Г. М. Толстанова, Л. І. Остапченко

Роль D2-дофамінових рецепторів у механізмах проникності кровоносних судин товстої кишки при експериментальному виразковому коліті

(Представлено членом-кореспондентом НАН України С. О. Костеріним)

Відомо, що дофамін/D2-дофамінові рецептори (ДР) пригнічують VEGF-викликану проникність кровоносних судин на моделях раку. Рівень дофаміну знижений при запальних захворюваннях кишечника. Досліджено роль D2-ДР у регуляції проникності кровоносних судин товстої кишки при експериментальному виразковому коліті. Вперше було встановлено роль D2-ДР у регуляції проникності кровоносних судин слизової оболонки товстої кишки. Активація D2-ДР призвела до зменшення проникності кровоносних судин слизової оболонки товстої кишки, що збільшується при експериментальному виразковому коліті. Цей ефект пов'язаний зі зниженням активності Akt-залежного шляху трансдукції сигналу.

Запальні захворювання кишечника (виразковий коліт та хвороба Крона) відносяться до хронічних захворювань, які за тяжкістю перебігу та частотою ускладнень займають одне з основних місць серед захворювань шлунково-кишкового тракту [1]. Відомо, що порушення процесу ангіогенезу (формування нових кровоносних судин) є критичним компонентом патогенезу запальних захворювань кишечника. Було встановлено [2, 3], що фактор росту кровоносних судин (VEGF) як ключовий фактор росту судин [4] справляє патологічний вплив на процеси ангіогенезу при експериментальному виразковому коліті. Підвищений рівень VEGF збільшував проникність кровоносних судин та полегшував інфільтрацію запальних клітин у місці ураження кишечника, що сприяло хронічному перебігу хвороби.

Дослідженнями останніх років на моделях раку молочної залози та товстої кишки доведено, що нейромедіатор дофамін через активацію D2-дофамінових рецепторів (ДР) ендотеліальних клітин здатен пригнічувати VEGF-викликану проникність кровоносних судин [5, 6]. Більш того, у мишей з відсутнім геном D2-ДР ("knockout" миші) або мишей з фармакологічно зниженим рівнем дофаміну спостерігалось значне підвищення рівня фосфорилування рецептора, чутливого до VEGF-VEGFR-2, що є центральним компонентом у механізмі VEGF-викликаного проникності кровоносних судин. Активація D2-ДР, навпаки,

зменшувала фосфорилування VEGFR-2 та відповідно пригнічувала VEGF-стимульовану проникність кровоносних судин [6].

В ураженій слизовій хворих на запальній захворювання кишечника визначається знижений рівень попередника дофаміну 3,4-діоксифенілаланіну (L-DOPA) та дофаміну [7]. Подібний ефект спостерігається на експериментальних моделях виразкового коліту [8]. Крім того, у пацієнтів з рефракторною (нечутливою до традиційних схем лікування) хворобою Крона спостерігається поліморфізм у гені, що кодує D2-ДР. Поліморфізм був асоційований зі зниженням щільності D2-ДР [9].

Незважаючи на наявність цих досліджень, роль дофаміну/D2-ДР у патогенезі запальних захворювань кишечника та, зокрема, в регуляції проникності кровоносних судин при зазначеній патології залишається нез'ясованою. Мета авторів даного повідомлення — вивчення ролі D2-ДР у регуляції проникності кровоносних судин товстої кишки при експериментальному виразковому коліті.

Дослідження проведено на щурах самках лінії Sprague-Dawley масою 160–200 г. Виразковий коліт викликали одноразовим ректальним введенням 0,1 мл 6%-го розчину йодоацетаміду (Sigma, США), як описано в статті [2]. Контрольна група отримувала 0,1 мл метилцелюлози. Щурів умертвляли через 30 хв, 1, 2, 6 год після введення йодоацетаміду. Концентрацію загального білка вимірювали методом Бредфорда із застосуванням набору “Bio-Rad для білкового аналізу” (Bio-Rad, США). Експресію білків визначали методом Вестерн блот з використанням первинних антитіл проти тирозин гідроксилази (ТН) (1 : 1000), Src (1 : 1000), pSrc^{Tyr416} (1 : 750), Akt (1 : 500), pAkt^{Ser473} (1 : 500) (Cell signaling, США). Візуалізацію Вестерн блот проводили ECL-реагентом (Amersham Biosciences, США). Оптичну густину смужок імуноблотінгу вимірювали за допомогою програми Phoretix1D. Для кількісного аналізу проникності кровоносних судин товстої кишки нами використовувався метод екстракції фарби Еванса [3]. Селективні агоністи D2-ДР квінпірол (1 мг/100 г, *per. os.*) або бромокриптин (5 мг/100 г, *per. os.*) (Sigma, США) вводили щурам за 30 хв до ректального введення йодоацетаміду. Контрольній групі щурів вводили фізіологічний розчин. Щурів умертвляли через 30 хв або 1 год після введення йодоацетаміду.

Статистичні дані обробляли за тестом *t*-Стюдента. Дані представлені у вигляді $M \pm \sigma$, n — кількість тварин в групі. Статистично значущою для всіх показників вважали різницю $p \leq 0,05$.

Утворення ендogenous дофаміну в організмі людини та тварин залежить від рівня експресії ферменту ТН, який бере участь у перетворенні амінокислоти тирозину в дофамін і є показником ендogenous рівня дофаміну. В наших дослідках рівень експресії ТН у слизовій оболонці товстої кишки щурів незначно підвищувався через 30 хв після ректального введення йодоацетаміду та поступово знижувався з розвитком запалення (рис. 1). Отримані дані свідчать про порушення синтезу дофаміну при експериментальному виразковому коліті, що може бути причиною порушення регуляторного впливу дофаміну на проникність кровоносних судин при даній патології. Щоб перевірити участь D2-ДР у регуляції проникності кровоносних судин товстої кишки при експериментальному виразковому коліті, щурам перорально вводили селективні агоністи D2-ДР квінпірол або бромокриптин за 30 хв до ректального введення йодоацетаміду. Активація D2-ДР знижувала проникність фарби Еванса в слизову оболонку товстої кишки, що було ознакою зменшення проникності кровоносних судин. Цікаво, що ефект дії обох агоністів D2-ДР ставав більш виразним у часі. Хоча через 30 хв після введення йодоацетаміду квінпірол знижував проникність кровоносних судин, різ-

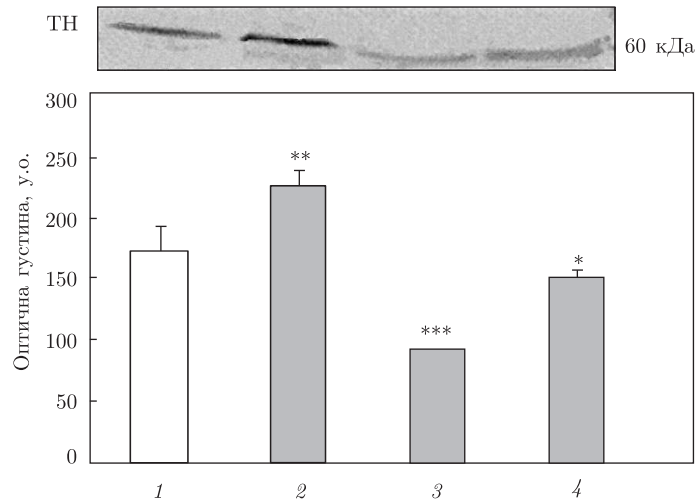


Рис. 1. Рівень експресії ТН гідроксилази у слизовій оболонці товстої кишки щурів за умов розвитку йодоацетамід-викликаного виразкового коліту:

1 — контроль; 2 — 30 хв після введення йодоацетаміду; 3 — 2 год; 4 — 6 год.

* — $p \leq 0,05$; ** — $p \leq 0,01$; *** — $p \leq 0,001$ відносно контролю

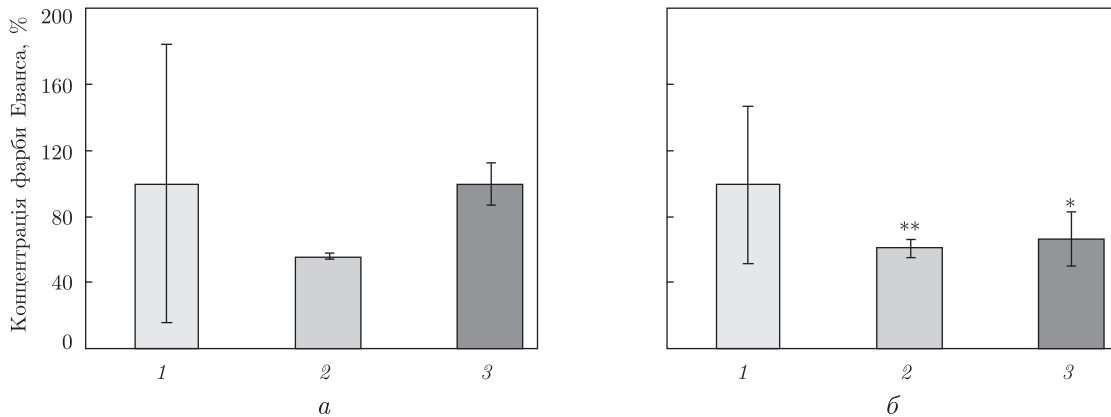


Рис. 2. Рівень проникності кровоносних судин слизової оболонки товстої кишки щурів через 30 хв (а) та 1 год (б) після введення 6% йодоацетаміду під дією агоністів D2-дофамінових рецепторів: 1 — контроль; 2 — квінірол (1 мг / 100 г); 3 — бромокриптин (5 мг / 100 г). * — $p \leq 0,01$; ** — $p \leq 0,01$ відносно контролю

ниця не досягала статистичної вірогідності. Навпаки, через 1 год дії йодоацетаміду, квінірол та бромокриптин майже вдвічі зменшували проникність кровоносних судин (рис. 2).

Відомо, що VEGF опосередковує свій вплив на проникність кровоносних судин через активацію VEGFR-2. Активування VEGFR-2 може запускати каскад внутрішньоклітинних реакцій, опосередкований фосфорилуванням протеїнкінази Src [10] або Akt [11], що в результаті призводить до зменшення адгезивних контактів між ендотеліальними клітинами та супроводжується збільшенням проникності кровоносних судин. Слід зазначити, що саме Akt-залежному шляху трансдукції сигналу надається перевага в опосередкуванні хронічної проникності судин [11]. Для перевірки участі Src- або Akt-залежного шляху трансдукції сигналу в опосередкуванні D2-ДР-впливу на проникність кровоносних судин було визначено рівень експресії загального білка Src і Akt та їх фосфорильованих форм на

фоні активації D2-ДР. В результаті проведених експериментів встановлено, що зниження проникності кровоносних судин на фоні активації D2-ДР квінпіролом не було пов'язане зі змінами в рівні експресії загального білка Src та його фосфорильованої форми. Навпаки, введення квінпіролу вірогідно зменшувало активність Akt, що виражалось у зниженні його фосфорилування в 2 рази ($p \leq 0,05$), хоча і не впливало на рівень загального білка Akt.

Таким чином, у ході досліджень нами вперше встановлено роль D2-ДР у регуляції проникності кровоносних судин слизової оболонки товстої кишки. Показано, що активація D2-ДР призводить до зменшення проникності кровоносних судин слизової оболонки товстої кишки, яка збільшується при експериментальному виразковому коліті. Цей ефект був пов'язаний зі зниженням активності Akt-залежного шляху трансдукції сигналу. Зниження ендogenous рівня дофаміну у випадку виразкового коліту свідчить про порушення регуляторної ланки в механізмі проникності кровоносних судин слизової оболонки товстої кишки при виразковому коліті, що може бути причиною збільшення інфільтрації запальних клітин та хронізації процесу запалення.

Роботу виконано в рамках програм фонду Цивільних досліджень розвитку США, згідно з договором M/203-2009.

1. Sandler R. S., Everhart J. E., Donowitz M. et al. The burden of selected digestive diseases in the United States // *Gastroenterology*. – 2002. – **122**. – P. 1500–1511.
2. Tolstanova G., Khomenko T., Deng X. et al. Neutralizing anti-vascular endothelial growth factor (VEGF) antibody reduces severity of experimental ulcerative colitis in rats: direct evidence for the pathogenic role of VEGF // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* – 2009. – **328**, No 3. – P. 749–757.
3. Scaldaferrri F., Vetrano S., Sans M. et al. VEGF-A links angiogenesis and inflammation in inflammatory bowel disease pathogenesis // *Gastroenterology*. – 2009. – **136**, No 2. – P. 585–595.
4. Carmeliet P., Ferreira V., Breier G. et al. Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele // *Nature*. – 1996. – **380**. – P. 435–439.
5. Sarkar C., Chakroborty D., Chowdhury U. R. et al. Dopamine increases the efficacy of anticancer drugs in breast and colon cancer preclinical models // *Clin. Cancer. Res.* – 2008. – **14**, No 8. – P. 2502–2510.
6. Sarkar C., Chakroborty D., Mitra R. B. et al. Dopamine in vivo inhibits VEGF-induced phosphorylation of VEGFR – 2, MAPK, and focal adhesion kinase in endothelial cells // *Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.* – 2004. – **287**, No 4. – P. 1554–1560.
7. Magro F., Vieira-Coelho M. A., Fraga S. et al. Impaired synthesis or cellular storage of norepinephrine, dopamine, and 5-hydroxytryptamine in human inflammatory bowel disease // *Dig. Dis. Sci.* – 2002. – **47**, No 1. – P. 216–224.
8. Magro F., Fraga S., Ribeiro T., Soares-da-Silva P. Decreased availability of intestinal dopamine in transmural colitis may relate to inhibitory effects of interferon-gamma upon L-DOPA uptake // *Acta. Physiol. Scand.* – 2004. – **180**, No 4. – P. 379–386.
9. Magro F., Cunha E., Araujo F. et al. Dopamine D2 receptor polymorphisms in inflammatory bowel disease and the refractory response to treatment // *Dig. Dis. Sci.* – 2006. – **51**, No 11. – P. 2039. – 2044.
10. Eliceiri B. P., Paul R., Schwartzberg P. L. et al. Selective requirement for Src kinases during VEGF-induced angiogenesis and vascular permeability // *Mol. Cell.* – 1999. – **4**, No 6. – P. 915–924.
11. Phung T. L., Ziv K., Dabydeen D. et al. Pathological angiogenesis is induced by sustained Akt signaling and inhibited by rapamycin // *Cancer Cell.* – 2006. – **10**, No 2. – P. 159–170.

G. M. Tolstanova, L. I. Ostapchenko

The role of D2-dopamine receptors in the mechanisms of colonic vascular permeability during experimental ulcerative colitis

Dopamine/D2-dopamine receptors inhibit VEGF-induced vascular permeability in the cancer models. Moreover, dopamine levels decrease during inflammatory bowel disease. The aim of the present study to investigate the role of D2-dopamine receptors in the colonic vascular permeability during experimental ulcerative colitis. We have shown for the first time that the activation of D2-dopamine receptors inhibits the colonic vascular permeability during 6% iodoacetamide-induced ulcerative colitis. This was accompanied by decreased Akt phosphorylation.