

DOI: 10.30906/0869-2092-2019-82-2-7-10

## 17 $\beta$ -ЭСТРАДИОЛ УМЕНЬШАЕТ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ ИЗОЛИРОВАННЫХ ЛЕГОЧНЫХ СОСУДОВ К СЕРОТОНИНУ У ОВАРИОЭКТОМИРОВАННЫХ САМОК КРЫС С ГИПОКСИЧЕСКОЙ ФОРМОЙ ЛЕГОЧНОЙ ГИПЕРТОНИИ

Н. В. Панькова, М. М. Артемьева, Н. А. Медведева<sup>1</sup>

Изучено влияние экзогенного и эндогенного эстрадиола на реактивность изолированных сосудов малого круга кровообращения у самок крыс линии Вистар с легочной гипертензией (ЛГ). ЛГ моделировали хронической прерывистой гипобарической гипоксией (10 ч/сут, 14 дней, O<sub>2</sub> = 10 %). Сосудосуживающий эффект серотонина изучали с помощью проточной перфузии легочной артерии 3-го порядка. Как овариоэктомия, так и введение эстрадиола (15 мкг/кг/сут 28 дней) у контрольных животных не влияли на ответ легочных сосудов на серотонин. Само развитие ЛГ также не изменяло чувствительность сосудов к серотонину. Однако величина максимального ответа на серотонин резко возрастала в 2,6 раза ( $p < 0,05$ ) у овариоэктомированных самок с ЛГ по сравнению с нормоксическими животными. Экзогенный эстрадиол у овариоэктомированных самок с ЛГ уменьшал ответ сосудов на серотонин до значений контроля. По-видимому, протективный эффект эстрадиола можно объяснить уменьшением количества рецепторов к серотонину в гладких мышцах сосудов.

**Ключевые слова:** легочная гипертензия; эстрадиол; овариоэктомия; серотонин; легочная артерия; прерывистая гипоксия; самки.

### ВВЕДЕНИЕ

Согласно клиническим данным, мужская популяция населения в репродуктивном возрасте в большей степени подвержена заболеваниям сердечно-сосудистой системы (ССС) по сравнению с женской [12]. Это связывают с протективной ролью женского полового гормона эстрадиола на состояние ССС. Показано, что эстрогены увеличивают синтез оксида азота в эндотелии сосудов и таким образом понижают сосудистое сопротивление и артериальное давление. Эффект опосредуется активацией специфических рецепторов к эстрадиолу обоих типов ER $\alpha$  и ER $\beta$  и рецептора GPR30, расположенных в эндотелии сосудов [13]. Однако связь между содержанием эстрогенов и состоянием ССС не настолько однозначна. Известно, что смертность женщин от сердечно-сосудистых заболеваний не возрастает и в период постменопаузы, когда уровень содержания эстрадиола в крови значительно снижается [9]. Кроме того, существуют заболевания ССС, которыми страдают в основном женщины. В частности, такой патологией является легочная гипертензия (ЛГ) [8]. Данное явление получило название “эстрадиоловый парадокс”, механизм возникновения которого остается неясным. Одна из форм ЛГ — гипоксическая форма ЛГ (ГЛГ) — возникает при хроническом недостатке кислорода во вдыхаемом воздухе или нарушении транспортной системы кислорода в организме. При гипоксии в сосудах легких возникает вазоконстрикция [10]. При хроническом недостатке кислорода эта реакция приводит к гипертрофии сосудистой стенки, возрастанию сосудистого тонуса и сосудистого сопротивления [14, 15]. Показа-

но, что и в этих условиях эстрадиол вызывает эндотелий-зависимое расширение как в легочных сосудах, так и в системных [1]. Однако вопрос об изменении реактивности легочных сосудов животных с ГЛГ к сосудосуживающим факторам практически не изучен. Основным вазоконстриктором в сосудах легких, в отличие от системных сосудов, является серотонин [11]. Было показано, что у мышей с гиперэкспрессией транспортера серотонина возникает легочная гипертензия, что свидетельствует о возможном участии серотонина в развитии ЛГ [6, 18, 19]. В связи с этим целью данного исследования было изучение влияния эндогенного и экзогенного эстрадиола на реактивность изолированных сосудов малого круга кровообращения к серотонину у самок крыс Вистар с гипоксической формой ЛГ.

### МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследование проводили на 42 половозрелых самках крыс линии Вистар массой 180 – 200 г (Москва, виварий НИИ общей патологии и патофизиологии). Животных содержали в условиях 12-часового светового дня со свободным доступом к воде и пище. В гипоксической части эксперимента свободный доступ к корму и воде у животных был только в ночное время суток (12 ч). Работу с животными проводили согласно требованиям Council Directive 86/609/ЕЕС.

В эксперименте было 6 групп самок крыс по 6 – 8 животных в каждой группе. 70 % всех самок гонадоэктомировали (билатеральная овариоэктомия). Остальным животным проводили ложную операцию. Спустя 2 недели после овариоэктомии половине прооперированных животных начинали вводить подкожно 17 $\beta$ -эстрадиол в дозе 15 мкг/кг/сут (Sigma, Китай) для изучения влияния экзо-

<sup>1</sup> Биологический факультет МГУ имени М. В. Ломоносова, Россия, Москва, Ленинские Горы, дом 1/12.

генного эстрадиола на реактивность легочных сосудов к сосудосуживающим факторам. Дозу эстрадиола подбирали предварительно по изменению массы матки, так как матка является основным органом-мишенью для этого гормона. В предыдущих исследованиях нами было показано, что масса матки у овариоэктомированных самок крыс почти в 4 раза меньше, чем у неовариоэктомированных, а хроническое введение эстрадиола в дозе 15 мкг/кг в течение 28 дней возвращает массу матки к норме. В связи с этим нами был сделан вывод о том, что у овариоэктомированных животных наблюдается уменьшение содержания эндогенного эстрадиола [3]. Другая половина прооперированных животных ежедневно получала растворитель эстрадиола 1,2-пропиленгликоль (Sigma-Aldrich, Германия) в объеме 0,4 мл/кг/сут. Введение веществ продолжали в течение 28 дней. Через 1 мес после операции овариоэктомированных и интактных животных делили на 2 большие группы. Одну часть животных подвергали воздействию хронической прерывистой гипобарической гипоксии на 10 ч в день в течение 2 недель с уровнем содержания кислорода в камере 10 % для моделирования гипоксической формы легочной гипертензии. В гипобарической камере постоянно находилось 24 животных для того, чтобы уровень CO<sub>2</sub> был постоянен в течение всего эксперимента. Другую часть животных оставляли в условиях вивария (контрольные, нормоксические группы). Контроль уровня кислорода в гипобарической камере осуществляли с помощью датчика кислорода “Клевер В” (Россия, АО “НПП Дельта”). Таким образом, в исследовании принимало участие 6 групп самок, из которых 3 были контрольные (нормоксические): 1) контрольные ложнопериовариованные (К,  $n = 6$ ); 2) контрольные овариоэктомированные (КО,  $n = 8$ ); 3) контрольные овариоэктомированные с введением экзогенного 17 $\beta$ -эстрадиола (КОЭ,  $n = 7$ ) и, соответственно, три гипоксические: 4) Г,  $n = 8$ ; 5) ГО,  $n = 6$ ; 6) ГОЭ,  $n = 7$ . На 14 – 16 сут после начала гипоксического воздействия (или через 41 – 43 дня после операции) в фазу диэструса у всех животных под уретановым наркозом (1,2 г/кг, 0,6 г/мл) измеряли систолическое правожелудочковое давление (СПЖД), по величине которого судили о развитии легочной гипертензии. Для этого вводили катетеры в яремную вену до правого желудочка (PE-50, ЗАО Медсил, Россия). Регистрацию проводили с помощью датчиков STATNAM (США) и программы DAQ-LVL-2013. Для человека показателем развития ЛГ является повышение давления в правом желудочке сердца больше 25 мм рт. ст. в спокойном состоянии. У бодрствующих крыс симптомом разви-

тия ЛГ является подъем давления в правом желудочке в среднем выше 35 мм рт. ст. в зависимости от линии крыс [18]. У животных под наркозом эта величина будет определяться типом наркотического воздействия. Под уретановым наркозом, который использовался в нашем исследовании, в норме величина СПЖД в среднем составляла 30 мм рт. ст., а возрастание СПЖД на 5 и более мм рт. ст. свидетельствовало о развитии ЛГ [2]. Далее животных декапитуировали и выделяли легочную артерию 3-го порядка. Изолированные сосуды перфузировали физиологическим раствором Кребса — Хенслийта с постоянным расходом 2 мл/мин. В качестве сосудосуживающего препарата использовали растворы серотонина (Sigma, Китай) в диапазоне концентраций от  $3 \cdot 10^{-8}$  М до  $10^{-5}$  М, которые готовили на стерильном физиологическом растворе Кребса — Хенслийта. О реакции сосуда судили по изменению перфузионного давления, которое регистрировали в программе PowerGraph 3.0 с помощью датчиков STATNAM (США). Статистическую обработку результатов проводили с помощью статистических пакетов Statistica 8.0 (StatisticalInc, США) и Prism 6.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Увеличение систолического давления в правом желудочке сердца (СПЖД) при хроническом действии гипоксии является одним из показателей развития ЛГ. В табл. 1 приведены величины СПЖД для всех экспериментальных групп.

Как видно из табл. 1, у контрольных животных овариоэктомия приводила к достоверному ( $p < 0,05$ ) увеличению СПЖД на 46 % ( $p < 0,05$ ), а введение эстрадиола уменьшало эту величину лишь на 12 % ( $p < 0,05$ ). Таким образом, можно заключить, что в норме эндогенный эстрадиол обладает более выраженным протективным действием, чем при хроническом введении экзогенного эстрадиола в дозе 15 мкг/кг.

При хроническом действии гипоксии величина СПЖД статистически значимо увеличивалась во всех гипоксических группах ( $p < 0,05$ ), что говорит о развитии ЛГ. Овариоэктомия этих животных приводила к увеличению степени развития ЛГ. СПЖД у этих животных увеличивалась на 24 % по сравнению с группой Г, что говорит о том, что и в случае развития ЛГ эндогенный эстрадиол оказывает протективное действие на состояние ССС. Однако введение экзогенного эстрадиола не оказывало влияния на развитие ЛГ.

Для изучения возможного вклада в развитие ЛГ изменения реактивности легочных сосудов к сосудосуживающим агентам проводили изучение дозозависимой реакции изолированных перфузируемых сосудов на серотонин. Кривые сосудосуживающих ответов легочных сосудов на серотонин показаны на рисунке.

В перфузируемых легочных сосудах нормотензивных самок (контроль) всех экспериментальных групп усредненный ответ на серотонин в концентрации  $10^{-5}$  М колебался в интервале от 14,0 до 15,6 мм рт. ст. и статистически не отличался между группами. Расчет ЕС<sub>50</sub> для реакции на серотонин, проведенный с помощью программы Prism 6.0, также не выявил статистически значимых раз-

Таблица 1. Систолическое давление в правом желудочке сердца самок крыс исследованных групп ( $M \pm SEM$ )

Группа	Интактные	Овариоэктомированные	Овариоэктомия + эстрадиол
Контроль (К)	30,0 $\pm$ 2,0	43,9 $\pm$ 2,7 <sup>#</sup>	38,6 $\pm$ 1,5 <sup>#</sup>
Гипоксия (Г)	59,5 $\pm$ 4,9*	73,9 $\pm$ 6,0*	75,9 $\pm$ 9,8*

Примечание: попарное сравнение групп по тесту Манна — Уитни ( $p < 0,05$ ).

\* По сравнению с соответствующей негипоксической группой.

<sup>#</sup> По сравнению с контрольной (интактной) группой ряда.

личий между экспериментальными группами животных, находившихся в условиях нормального содержания кислорода (табл. 2). Таким образом, в норме как эндогенный, так и экзогенный эстрадиол не оказывают влияния на реактивность легочных сосудов на серотонин. По-видимому, серотонин не участвует в увеличении величины СПЖД у нормоксических самок крыс при их овариоэктомии.

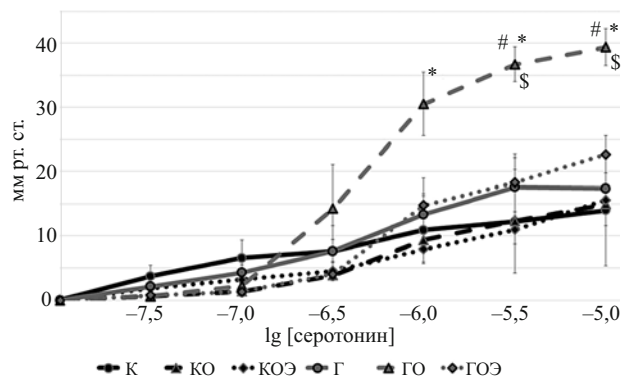
При изучении дозозависимого эффекта на серотонин в изолированных перфузируемых сосудах легких самок крыс с ГЛГ было показано, что группа гипертензивных самок с нормальным уровнем содержания эстрадиола (группа Г) статистически значимо не отличалась от контрольных групп. Овариоэктомия животных (группа ГО) приводила к статистически значимому увеличению максимального сосудосуживающего ответа на серотонин в 2 раза в диапазоне концентраций от  $10^{-6}$  до  $10^{-5}$  М ( $p < 0,05$ ) по сравнению с группой Г, при этом наблюдалась тенденция к увеличению величины  $EC_{50}$  (рисунок, табл. 2).

Хроническое введение эстрадиола овариоэктомированным самкам крыс с ГЛГ (группа ГОЭ) вызывало достоверное ( $p < 0,05$ ) уменьшение максимальной суживающей реакции на серотонин в концентрации  $10^{-5}$  М на 42 % по сравнению с группой ГО. При этом она достоверно не отличалась от группы с нормальным уровнем эстрадиола (группа Г), хотя по среднему значению превышала ее на 31 %. Статистический анализ данных по  $EC_{50}$  реакции на серотонин не выявил достоверных различий, однако нужно отметить, что овариоэктомированные группы контрольных самок приводила к возрастанию величины  $EC_{50}$  в 6,7 раза.

Таким образом, можно предположить, что гонадоэктомия, вызывающая уменьшение содержания эндогенного эстрадиола у самок с ГЛГ, приводит к увеличению количества серотониновых рецепторов, на что указывает возрастание максимальной реакции, и к уменьшению чувствительности к серотонину (тенденция к увеличению  $EC_{50}$ ), что коррелирует с увеличением величины СПЖД у этих животных, т.е. степени развития ГЛГ по одному из показателей.

Эти данные позволяют заключить, что увеличение чувствительности к серотонину вносит свой вклад в возрастание степени развития ГЛГ у этих животных.

Хроническое введение эстрадиола овариоэктомированным самкам крыс, по-видимому, стимулирует уменьшение количества рецепторов к серотонину и уменьшение их чувствительности к последнему, но не вызывает изменение СПЖД, что может быть связано с недостаточной силой воздействия или отсутствия его цикличности, которое наблюдается у животных с интактными яичниками. На взаимосвязь эффектов эстрадиола и серотонина



Сосудосуживающий эффект серотонина ( $3 \cdot 10^{-8} - 10^{-5}$  М) на изолированные сегменты легочных артерий самок крыс популяции Вистар.

По оси ординат — прирост перфузионного давления, мм рт. ст.; по оси абсцисс — логарифм концентрации серотонина в перфузионном растворе. Контрольные ложнооперированные (К), контрольные овариоэктомированные (КО), контрольные овариоэктомированные с введением экзогенного  $17\beta$ -эстрадиола (КОЭ), гипоксические ложнооперированные (Г), гипоксические овариоэктомированные (ГО), гипоксические овариоэктомированные с введением экзогенного  $17\beta$ -эстрадиола (ГОЭ).

\* Достоверное ( $p < 0,05$ ) увеличение ответа у ГО группы по сравнению с КО; # достоверное ( $p < 0,05$ ) увеличение ответа у ГО группы по сравнению с Г; \$ достоверное ( $p < 0,05$ ) увеличение ответа у ГО группы по сравнению с ГОЭ.

указывают работы, в которых показано, что увеличение экспрессии транспортера серотонина или использование его активатора у самок мышей с ГЛГ приводит к усилению выраженности ГЛГ. У самцов подобного эффекта не наблюдалось [5, 18]. Авторы делают вывод о том, что только в женском организме развитие ЛГ имеет серотонин-зависимый механизм. Появились исследования, указывающие на взаимосвязь между эстрадиолом и серотонином через изменение экспрессии микро РНК (miRNA) и их участие в патогенезе легочной гипертонии [4]. Эстрадиол уменьшает экспрессию miRNA-96, что стимулирует увеличение экспрессии серотониновых рецепторов типа 1В, которые вызывают ремоделирование сосудистой стенки, в частности, пролиферацию гладкомышечных клеток, что может привести к развитию ЛГ [16]. Все приведенные выше данные показывают, что эстрадиол и серотонин способствуют развитию ГЛГ у мышей. Однако в экспериментах на самцах крыс показано протективное действие эстрадиола на развитие монокроталиновой ЛГ [7]. По-видимому, есть видовые различия в проявлении ЛГ. Иммунохимическое исследование эстрадиоловых рецепторов, локализованных в слое гладкой мышцы легочных сосудов человека, выявило экспрессию  $ER\alpha$ ,  $ER\beta$ , GPR30 рецепторов и их колокализацию с серотониновым транспортером. Экспрессия белка  $ER\alpha$  рецептора была

Таблица 2. Величина  $EC_{50}$  для реакции на серотонин ( $3 \cdot 10^{-8} - 10^{-5}$  М) изолированных перфузируемых легочных сосудов крыс всех экспериментальных групп, рассчитанная в программе Prism 6

Показатель	Группа					
	К	КО	КОЭ	Г	ГО	ГОЭ
$EC_{50}$	$1,14 \cdot 10^{-7}$	$7,64 \cdot 10^{-7}$	$12,6 \cdot 10^{-7}$	$3,035 \cdot 10^{-7}$	$4,47 \cdot 10^{-7}$	$7,9 \cdot 10^{-7}$

выше в гладкой мышце легочных сосудов у женщин с ГЛГ, по сравнению с пациентами мужчинами, и серотонин приводил к усилению тяжести ГЛГ у крыс. Показана и обратная зависимость. [17]. В нашей работе мы получили увеличение реактивности к серотонину легочных сосудов самок крыс с ГЛГ, которое наблюдается у животных после овариэктомии. Основываясь на данных о кокализации эстрадиоловых рецепторов и серотонинового транспортера и их взаимодействии [17], можно предположить, что хроническое уменьшение циркулирующего эстрадиола приводит к увеличению как количества, так и чувствительности эстрадиоловых рецепторов на мембране гладкомышечных клеток, что, согласно имеющимся литературным данным, стимулирует экспрессию рецепторов к серотонину и приводит к потенцированию ГЛГ. Можно предположить, что протективный эффект эндогенного эстрадиола при ЛГ связан не только с синтезом эндотелий-зависимых релаксирующих факторов, как это было показано в большом количестве исследований, но и с уменьшением реактивности к главному сосудосуживающему агенту для легочной системы — серотонину.

## ВЫВОДЫ

1. В норме (нормоксические животные) реактивность изолированных легочных сосудов 3-го порядка самок крыс Вистар к серотонину в концентрациях  $3 \cdot 10^{-8}$  –  $10^{-5}$  М не зависит от концентрации эстрадиола в крови животного.

2. У овариэктомированных самок крыс с гипоксической формой легочной гипертензии, по сравнению с неовариэктомированными, реакция изолированных легочных сосудов на серотонин в концентрации  $10^{-5}$  М возрастает в 2,26 раза ( $p < 0,05$ ), что сопровождается увеличением систолического давления в правом желудочке сердца на 24 % ( $p < 0,05$ ).

3. Хроническое введение  $17\beta$ -эстрадиола овариэктомированным самкам крыс с гипоксической формой ЛГ приводит к уменьшению ответа изолированных легочных сосудов 3-го порядка на серотонин в концентрациях  $3 \cdot 10^{-6}$  –  $10^{-5}$  М на 48 % ( $p < 0,05$ ).

## ЛИТЕРАТУРА

1. М. М. Артемьева, Ю. О. Ковалева, О. С. Медведев и др., *Бюл. эксперим. биол. и мед.*, **159**(4), 414 – 418 (2015).
2. М. П. Давыдова, А. Б. Постников, К. Б. Дьяконов и др., *Рос. физиол. ж. им. И. М. Сеченова*, **89**(12), 1516 – 1522 (2003).
3. Н. В. Панькова, М. М. Артемьева, Н. А. Медведева, *Эксперим. и клин. фармакол.*, **80**(1), 9 – 13 (2017).
4. P. Caruso, M. MacLean, R. Khanin, et al., *Vasc. Biol.*, **30**, 716 – 723 (2010).
5. Y. Dempsie, N. MacRitchie, K. White, et al., *Cardiovasc. Res.*, **99**, 24 – 34 (2013).
6. A. K. Johansen, A. Dean, I. Morecroft, et al., *Pulm Circ.*, **6**(1), 82 – 92 (2016).
7. T. Lahm, M. Albrecht, A. Fisher, et al., *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, **185**(9), 965 – 980 (2012).
8. T. Lahm, R. M. Tuder, I. Petrace, *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.*, **307**, 7 – 26 (2014).
9. P. Y. Liu, A. K. Death, D. J. Handelsman, *Endocrine Rev.*, **24**, 313 – 340 (2003).
10. A. B. Lumb, P. Slinger, *Anesthesiology*, **122**(4), 932 – 946 (2015).
11. M. R. MacLean, Y. Dempsie, *The Serotonin Hypothesis of Pulmonary Hypertension Revisited. In Advances in Experimental Medicine and Biology*, United States (2010), pp. 309 – 322.
12. L. Pilote, K. Dasgupta, V. Guru, et al., *Can. Med. Assoc. J.*, **176**, 1 – 44 (2007).
13. E. R. Prossnitz, J. B. Arterburn, *Pharmacol. Rev.*, **67**, 505 – 540 (2015).
14. L. C. Ou, G. L. Sardella, J. C. Leiter, et al., *J. Appl. Physiol.*, **77**(1), 427 – 33 (1994).
15. L. A. Shimoda, S. S. Laurie, *J. Appl. Physiol.*, **116**(7), 867 – 874 (2014).
16. E. Wallace, N. W. Morrell, X. D. Yang, et al., *Am. J. Resp. Crit. Care Med.*, **191**, 1432 – 1442 (2015).
17. A. F. Wright, M. A. Ewart, K. Mair, et al., *Cardiovasc Res.*, **106**, 206 – 216 (2015).
18. K. White, L. Loughlin, Z. Maqbool, et al., *Physiol. Genomics*, **43**(8), 417 – 437 (2011).
19. K. White, Y. Dempsie, M. Nilsen, et al., *Cardiovasc. Res.*, **90**(2), 373 – 382 (2011).

Поступила 31.01.19

## ENDOGENIC ESTRADIOL DECREASES RESPONSE OF PULMONARY VESSELS TO SEROTONIN IN OVARIECTOMIZED FEMALE WISTAR RATS WITH HYPOXIC PULMONARY HYPERTENSION

N. V. Pan'kova, M. M. Artem'eva, and N. A. Medvedeva

Faculty of Biology, Moscow State University, Vorob'evy Gory 1/12, Moscow, 119991 Russia

This work was aimed at studying the effect of exogenous and endogenous estradiol on the reactivity of isolated pulmonary artery in female Wistar rats with pulmonary hypertension (PH) induced by exposure to hypobaric hypoxia (10 h a day, 2 weeks, O<sub>2</sub> concentration reduced to 10%). Response of perfusion pressure of isolated pulmonary artery to vasoconstrictor serotonin ( $3.3 \cdot 10^{-8}$  –  $10^{-5}$  i) was measured. Both ovariectomy and administration of estradiol (15 mg/kg) in normoxic animals did not change the response of pulmonary vessels to serotonin. The development of PH did not change sensitivity to serotonin. However, pulmonary vessels of gonadectomized rats with PH demonstrated the increase of vasoconstriction in response to the serotonin by 2,6 times ( $\delta < 0.05$ ) compared to other groups of animals. Exogenous estradiol in female rats with PH reduced the response to serotonin down to the values of normoxic rats. Thus, the protective effect of estradiol may be associated with a decrease in the number of serotonin receptors in vessels of smooth muscles.

**Keywords:** pulmonary hypertension; estradiol; ovariectomy; serotonin; pulmonary artery; hypoxia; female rats.