

О.І. Бондаренко, О.Д. Присяжна, В.Ф. Сагач

Електричні реакції інтактного ендотелію аорти щурів при експериментальному діабеті

Исследовали изменения электрических свойств эндотелиальных клеток грудной аорты крыс со стрептозотоцининдуцированным диабетом. Среднее значение мембранного потенциала нестимулированного эндотелия аорты у этих крыс было значительно ниже ($-32,7 \text{ мВ} \pm 0,8 \text{ мВ}$) по сравнению с контрольными животными ($-41,2 \text{ мВ} \pm 0,9 \text{ мВ}$). Ацетилхолин (2 мкмоль/л) у крыс с диабетом вызывал гиперполяризацию эндотелиальных клеток до $-57,6 \text{ мВ} \pm 1,1 \text{ мВ}$ ($n=38$), тогда как в контрольной группе она достигала значительно более негативных значений ($-64,4 \text{ мВ} \pm 0,9 \text{ мВ}$). При этом амплитуда гиперполяризации у крыс с диабетом ($24,9 \text{ мВ} \pm 1,1 \text{ мВ}$) и в контрольной группе ($23,2 \text{ мВ} \pm 0,9 \text{ мВ}$) достоверно не отличались. Сделан вывод, что эндотелий аорты крыс с экспериментальным диабетом имеет менее негативные значения мембранного потенциала как в условиях покоя, так и при стимуляции эндотелия ацетилхолином, что может уменьшать базальное и стимулированное поступление кальция в эндотелий, и таким образом опосредовать угнетение эндотелийзависимого расслабления при стрептозотоцининдуцированном диабете.

ВСТУП

Відомо, що одним із проявів діабету є судинні порушення. Так, розслаблення судинних смужок у відповідь на дію ацетилхоліну є пригніченим за умов експериментального діабету в різних ділянках судинного русла [2–4, 8, 11], що пов'язано з порушенням функціональної активності ендотеліальних клітин. Ендотеліозалежне розслаблення судин у відповідь на дію ацетилхоліну, як відомо, реалізується за допомогою оксиду азоту, простагландину, а також ендотеліального фактора, що гіперполяризує гладенькі м'язи, природа якого ще остаточно не вивчена. Синтез ендотелієм вазодилаторних речовин є кальційзалежним процесом, надходження кальцію в ендотелій, в свою чергу, контролюється мембранним потенціалом, який регулює електрохімічний градієнт для надходження кальцію у клітини [9]. Крім того, мембранний потенціал регулює тран-

спорт L-аргініну [17] в ендотелій. Тому серед можливих причин депресії ендотеліозалежного розслаблення при діабеті може бути порушення здатності ендотеліальних клітин генерувати типову для здорових тварин гіперполяризацию у відповідь на дію ацетилхоліну. Відомо, що гіперполяризация ендотелію є необхідною умовою ендотеліозалежної гіперполяризації гладеньких м'язів завдяки стимуляції синтезу кальційзалежних вазоактивних речовин, а також електротонічної передачі сигналу гладеньким м'язам через міоендотеліальні контакти. Хоча пригнічення ендотеліозалежної гіперполяризації при експериментальному діабеті було продемонстровано раніше у дослідях на мезентеріальній артерії щурів [6, 16], експериментальні дані стосовно можливих змін електричних реакцій ендотеліальних клітин за умов експериментального діабету значно розширили б уявлення щодо механізмів депресії ендотеліозалежного розслаблення при діабеті. Раніше ми відмічали зміни у

© О.І. Бондаренко, О.Д. Присяжна, В.Ф. Сагач

мембранному потенціалі та електричних реакціях ендотелію аорти у щурів зі спонтанною гіпертензією у відповідь на суперфузію ацетилхоліну [1].

Метою цієї роботи було дослідження електричних реакцій інтактного ендотелію аорти щурів із експериментальним діабетом у відповідь на дію ацетилхоліну.

МЕТОДИКА

Для відтворення стрептозотоциніндукованого цукрового діабету щурам-самцям віком 4 міс і масою 200–250 г було введено внутрішньоочеревинно стрептозотин («Sigma», США) з розрахунку 50 мг/кг. Для дослідів використовували тварин через 8–10 тиж після введення препарату [12]. Контроль вмісту глюкози здійснювали глюкометром «Медісенс» («Abbot», США). Мелатонін вводили внутрішньоочеревинно з розрахунку 10 мг/кг за 60 хв до початку експерименту. Електрофізіологічні експерименти проводили на ізольованих препаратах грудного відділу аорти щурів. Грудну частину аорти ізолювали, нарізали на сегменти довжиною 3–4 мм і зберігали у модифікованому розчині Кребса наступного складу (ммоль/л): NaCl – 118,3, NaHCO₃ – 25, KCl – 4,7, NaH₂PO₄ – 1,2, CaCl₂ – 2,5, глюкоза – 10. Розчин аерували сумішшю 95 % O₂ та 5 % CO₂. Перед експериментом сегмент аорти розрізали вздовж і закріплювали в камері об'ємом близько 100 мкл, яку перфузували розчином Кребса зі швидкістю 0,5 мл/хв.

Мембранний потенціал ендотелію реєстрували методом перфорованого patch-clamp у режимі фіксації струму. Піпетки заповнювали таким розчином (ммоль/л): KCl – 140, NaCl – 10, NERES – 10. До розчину додавали ністатин (200 мкг/мл). Експерименти проводили при 23–25 °С.

РЕЗУЛЬТАТИ

Вміст глюкози крові у щурів з діабетом був 21,1 ммоль/л ± 6,7 ммоль/л, а у щурів

контрольної групи 6,4 ммоль/л ± 0,6 ммоль/л. Першочерговим завданням було виявити, чи є суттєві відмінності у характерних значеннях мембранного потенціалу нестимульованого ендотелію між щурами дослідної і контрольної груп. Виявилось (рис. 1), що для щурів контрольної групи мембранний потенціал ендотеліальних клітин в умовах спокою становив $-41,2 \text{ мВ} \pm 0,9 \text{ мВ}$ і знаходився в межах -29 – -53 мВ ($n=38$). Досліди на щурах із експериментальним діабетом показали, що мембранний потенціал спокою ендотеліальних клітин був достовірно менш негативним ($-32,7 \text{ мВ} \pm 0,8 \text{ мВ}$; $n=38$) і знаходився в межах від -19 до -40 мВ . При цьому в щурів із діабетом різниця значень мембранного потенціалу спокою при реєстрації від однієї судинної смужки могла дорівнювати 14 мВ, у той час як у щурів контрольної групи вона не перевищувала 5 мВ.

При дослідженні електричних реакцій як агоніст застосовувався вазодилататор ацетилхолін (2 мкмоль/л). Суперфузія судинної

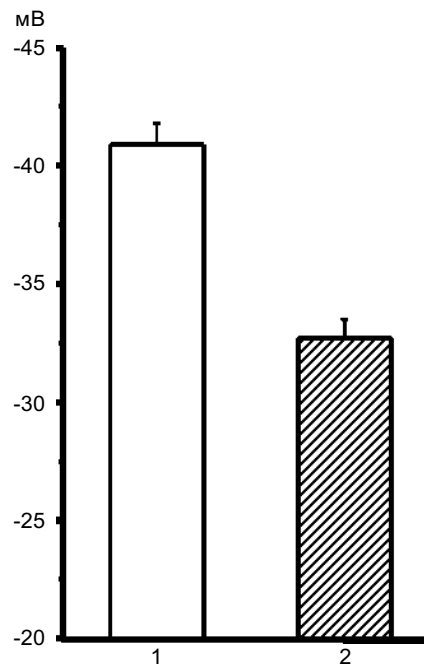


Рис. 1. Значення мембранного потенціалу нестимульованого ендотелію аорти щурів контрольної групи (1) та після індукції діабету (2)

смужки розчином, що містить цей препарат викликала початкову швидку гіперполяризацію, за якою спостерігалось плато гіперполяризації (рис. 2,а). У тварин контрольної групи гіперполяризація сягала $-64,1 \text{ мВ} \pm 0,9 \text{ мВ}$ ($n=39$), а її амплітуда – $-23,2 \text{ мВ} \pm 0,9 \text{ мВ}$. Відмив ацетилхоліну призводив до повернення значень мембранного потенціалу до рівня потенціалу спокою.

Експерименти на щурах з діабетом показали, що ацетилхолін викликав гіперполяризацію ендотеліальних клітин до $-57,6 \text{ мВ} \pm$

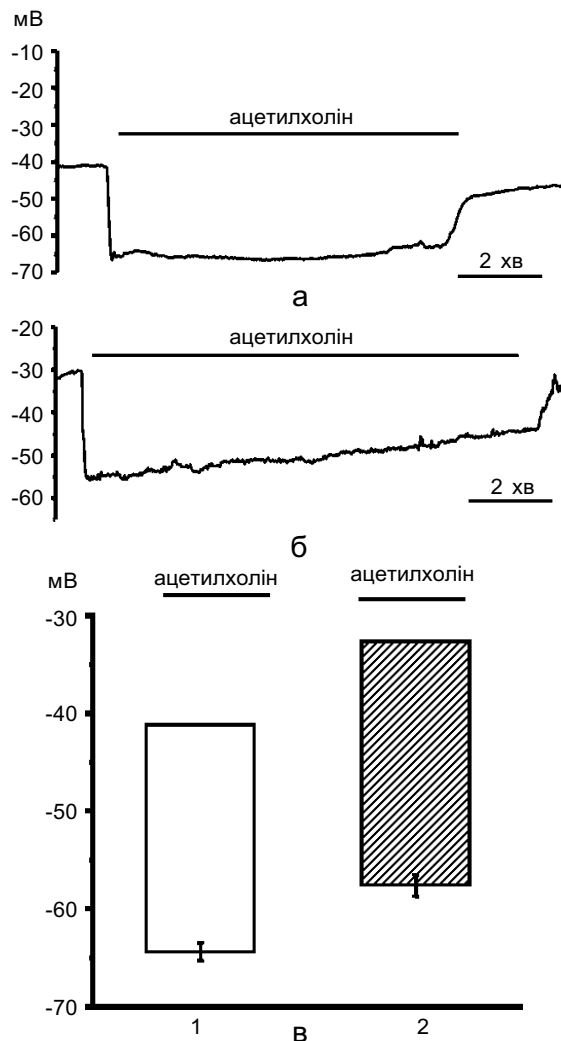


Рис. 2. Типові електричні відповіді ендотеліальних клітин на ацетилхолін в контролі (а) за умов діабету (б); в – статистична репрезентація експериментів зображених на а і б. 1 – значення мембранного потенціалу контрольної групи, 2 – після індукції діабету

$1,1 \text{ мВ}$ ($n=38$), що є достовірно меншим значенням, ніж у щурів контрольної групи. Проте амплітуди гіперполяризації ендотеліальних клітин аорти щурів із стрептозоточиіндукованим діабетом ($24,9 \text{ мВ} \pm 1,1 \text{ мВ}$) і щурів контрольної групи достовірно не відрізнялися ($P=0.129$). Гіперполяризація ендотеліальних клітин тварин з діабетом, поступово зменшуючись, як правило, не мала фази плато, але ніколи не була транзієнтною (див. рис. 2,в).

Одноразова ін'єкція тролоксу, як було роказано раніше [2], призводить до часткової нормалізації ендотеліозалежного розслаблення аорти щурів із стрептозоточиіндукованим діабетом. Однак введення тролоксу *in vivo* не відновлювало ні мембранний потенціал ($-34,7 \text{ мВ} \pm 0,6 \text{ мВ}$; $n=7$), ні ацетилхолініндуковану гіперполяризацію ендотелію (до $-52,6 \text{ мВ} \pm 1,9 \text{ мВ}$; $n=6$) щурів із діабетом. Тобто, часткове поліпшення ендотеліозалежного розслаблення після введення тролоксу не пов'язано зі змінами електричних властивостей ендотеліальних клітин.

ОБГОВОРЕННЯ

Хоча феномен пригнічення при діабеті ендотеліозалежної релаксації різних ділянок судинного русла, аорти включно, спостерігався в багатьох дослідах [2–4, 8, 11], механізми, що лежать в основі цього пригнічення, остаточно не вивчені. Так, пригнічення релаксації у відповідь на дію ацетилхоліну може відбуватися завдяки різним механізмам: порушенню функції ендотеліальних клітин генерувати типові гіперполяризаційні відповіді, що запобігає надходженню кальцію в ендотелій і знижує продукцію кальційзалежних вазодилаторів, деструкції NO завдяки оксидативному стресу, змінам у чутливості гладеньких м'язів до NO або ж підвищенню продукції вазоконстрикторів ендотелієм за умов діабету. Оскільки релаксація смужки аорти

у щурів з діабетом у відповідь на нітропрурид натрію не є пригніченою [3, 8], можна зробити висновок, що чутливість гладеньких м'язів аорти до NO не змінюється при діабеті.

Результати нашого дослідження демонструють, що існує суттєва різниця у значеннях мембранного потенціалу спокою між ендотеліальними клітинами аорти щурів дослідної та контрольної груп: при діабеті мембранний потенціал є суттєво нижчим. Оскільки базальне надходження кальцію в ендотелій, що опосередковує базальне вивільнення NO, контролюється мембранним потенціалом спокою, менш негативні значення мембранного потенціалу нестимульованого ендотелію аорти при діабеті можуть призводити до зменшення базальної продукції та вивільнення NO. Оскільки мембранний потенціал ендотеліальних клітин може електротонічно передаватися до гладеньком'язових клітин, то зменшення його значень може опосередковувати більш деполаризований мембранний потенціал гладеньком'язових клітин, і, як наслідок, підвищення судинного тонуусу, що спостерігається при діабеті. Відомо, що калієва провідність відіграє провідну роль у підтримці мембранного потенціалу спокою ендотелію [10]. Тому менш негативні значення мембранного потенціалу ендотелію при діабеті можуть вказувати на зниження активності калієвих каналів, що узгоджується з даними, отриманими раніше [7].

Результати нашої роботи свідчать про те, що амплітуда гіперполяризації ендотеліальних клітин у відповідь на дію ацетилхоліну не зменшується у щурів з діабетом, тобто серед механізмів депресії ендотеліальної залежного розслаблення аорти при діабеті навряд чи є зміни кількості мускаринових рецепторів ендотеліальних клітин, або порушення передачі сигналу через G-протеїни. Оскільки гіперполяризація ендотелію є рушійною силою для надходження у клітини кальцію при їх стимуляції вазоди-

лататорними речовинами, а також враховуючи те, що гіперполяризація у щурів із стрептозотоциніндукованим діабетом не сягає пікових значень, характерних для ендотелію тварин контрольної групи, можна дійти висновку щодо зменшення надходження кальцію в ендотеліальні клітини аорти при стимуляції їх ацетилхоліном. Це, в свою чергу, має сприяти зниженню продукції та вивільнення NO при діабеті. Отримані результати, таким чином, підтверджують наші попередні висновки щодо зниження продукції NO за умов експериментального діабету, що базуються на зниженні вмісту стабільних окисневих форм NO: нітрит- і нітрат-аніонів [3].

Однак результати, отримані нами на ендотелії аорти щурів з діабетом відрізняються від таких, що були отримані на інтактних ендотеліальних клітинах мезентеріальної артерії щурів, де гіперполяризація при діабеті у відповідь на вплив ацетилхоліну є вдвічі меншою за контрольну [15]. Ці відмінності демонструють варіабельність механізмів, що лежать в основі депресії ендотеліальної залежної релаксації при діабеті в різних ділянках судинного русла. Оскільки мембранний потенціал нестимульованого ендотелію був менш негативним у тварин з діабетом, можна дійти висновку, що механізми, залучені до підтримки мембранного потенціалу спокою ендотелію аорти є більш чутливими до діабету, ніж механізми генерації гіперполяризації (стимуляція кальційзалежних калієвих каналів завдяки підвищенню концентрації внутрішньоклітинного кальцію).

Дані попередніх досліджень свідчать, що пригнічення ендотеліальної залежного розслаблення судинних смужок аорти щурів з діабетом може сягати близько 80 % [3]. Проте результати цієї роботи демонструють, що хоча фаза плато у більшості відведень не спостерігалася, гіперполяризація ендотелію аорти тварин з діабетом не є транзйентною. Враховуючи те, що тривала

гіперполяризація ендотелію залежить від надходження кальцію у клітини, можна припустити, що ознак істотного пригнічення механізмів надходження кальцію в ендотелій аорти шурів із експериментальним діабетом, яке б пояснювало таке потужне пригнічення ендотелійзалежного розслаблення, не спостерігається. Таким чином, додаткові механізми, а саме деструкція NO завдяки оксидативному стресу [5] чи підвищення продукції вазоконстрикторів [13, 14] можуть повною мірою пояснити супресію ендотелійзалежної релаксації при діабеті. Це підтверджують експерименти, де застосували тролокс і мелатонін для зменшення наслідків оксидативного стресу у шурів із експериментальним діабетом [2]. Однак згідно з нашими результатами, ін'єкція тролоксу шурам з діабетом не відновлювала значень мембранного потенціалу ендотеліальних клітин ні за умов спокою, ні при стимуляції їх ацетилхоліном. Проте ендотелійзалежне розслаблення частково (до 58 %) нормалізувалось у попередніх дослідженнях [2] після ін'єкції тролоксу.

Таким чином, у роботі продемонстровано, що за умов експериментального діабету спостерігається зниження мембранного потенціалу ендотелію аорти шурів за умов спокою та при стимуляції його ацетилхоліном, що сприяє пригніченню надходження кальцію в ендотелій та депресії ендотелійзалежного розслаблення. Ефективність тролоксу як антиоксиданта у поліпшенні ендотелійзалежного розслаблення аорти при діабеті не пов'язано з нормалізацією електричних властивостей ендотелію.

O.I. Bondarenko, O.D. Prisyazhna, V.F. Sagach

ELECTRICAL RESPONSES OF INTACT AORTIC ENDOTHELIAL CELLS IN STREPTOZOTOCIN-INDUCED DIABETIC RATS

The changes in electrical properties of intact aortic endothelial cells from streptozotocin-induced diabetic rats were investigated. The mean resting membrane potential of

unstimulated endothelium was significantly less negative (-32.7 ± 0.8 mV) as compared with the aged-matched control group (-41.2 ± 0.9 mV). In diabetic rat aortic strips, acetylcholine ($2 \mu\text{M}$) hyperpolarized endothelial cells to -57.6 ± 1.1 mV, whereas in control group the hyperpolarization reached -64.4 ± 0.9 mV. The amplitude of the hyperpolarization in diabetic rats, however, was not significantly different from the control group (24.9 ± 1.1 mV and 23.2 ± 0.9 mV, respectively). It was concluded that endothelial cells of diabetic rat aorta have less negative membrane potential values at rest and during acetylcholine stimulation that may partially account for the suppressed endothelium-dependent relaxation in streptozotocin-induced diabetic rats.

Bogomoletz Institute of Physiology National Academy of Sciences of Ukraine

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Бондаренко О.І., Сагач В.Ф. Електричні реакції ендотелію аорти шурів із спонтанною гіпертензією // Фізіол. журн. – 2002. – **48**, №4. С. 75–79.
2. Присяжная А.Д., Ткаченко М.Н., Коцюрба А.В., Сагач В.Ф. Нарушение NO-зависимого механизма сосудистой реактивности при экспериментальном сахарном диабете. – В кн.: Труды III международной научно-практической конференции «Дисфункция эндотелия: экспериментальные и клинические исследования». 18–20 мая 2004 г. – Витебск, 2004 г. – С. 113–116.
3. Сагач В.Ф., Ткаченко М.М., Присяжна О.Д. та ін. Зміни вазодилаторних реакцій судинних гладеньких м'язів та системи оксиду азоту за умов експериментального цукрового діабету // Фізіол. журн. – 2003. – **49**, №4. – С. 24–32.
4. De Vriese A., Verbeuren T., Van de Voorde J., Lameire N., Vanhoutte P. Endothelial dysfunction in diabetes // Brit. J. Pharmacol. – 2000. – **130**. – P. 963–974.
5. Hattori Y., Kawasaki H., Abe K., Kanno M. Superoxide dismutase recovers altered endothelium-relaxation in diabetic rat aorta // Amer. J. Physiol. – 1991. – **261**. – P. H1086–H1094.
6. Fukao M., Hattori Y., Kanno M. et al. Alterations in endothelium-dependent hyperpolarization and relaxation in mesenteric arteries from streptozotocin-induced diabetic rats // Brit. J. Pharmacol. – 1997. – **121**. – P. 1383–1391.
7. Kamata K., Miyata N., Kasuya Y. Functional changes in potassium channels in aortas from rats with streptozotocin-induced diabetes // Eur. J. Pharmacol. – 1989. – **18**. – №166. – P. 319–323.
8. Kamata K., Miyata N., Kasuya Y. Impairment of endothelium-dependent relaxation and changes in levels of cyclic GMP in aorta from streptozotocin-induced diabetic rats // Brit. J. Pharmacol. – 1989. – **97**. – P. 614–618.
9. Luckhoff A., Busse R. Calcium influx into endothelial cells and formation of endothelium-derived relaxing

- factor is controlled by the membrane potential // Pflug. Arch. – 1990. – **416**. – P. 305–311.
10. Nilius, B., Droogmans, G. Ion channels and their functional role in vascular endothelium // Physiol. Rev. – 2001. – **81**. – P. 415–459.
 11. Oyama Y., Kawasaki H., Hattori Y., Kanno M. Attenuation of endothelium-dependent relaxation in aorta from diabetic rats // Eur. J. Pharmacol. – 1986. – **132**. – P. 75–78.
 12. Pieper G.M. Enhanced, unaltered and impaired nitric oxide-mediated endothelium-dependent relaxation in experimental diabetes mellitus: importance of disease duration // Diabetologia. – 1999. – **42**. – P. 204–213.
 13. Shimizu K., Muramatsu M., Kakegawa Y., Asano H., Toki Y., Miyazaki Y., Okumura K., Hashimoto H., Ito T. Role of prostaglandin H2 as an endothelial-derived contracting factor in diabetic state // Diabetes. – 1993. – **42**. – P. 1246–1252.
 14. Takeda Y., Miyamori I., Yoneda T. Takeda R., Production of endothelin-1 from the mesenteric arteries of streptozotocin-induced diabetic rats // Life Sci. – 1991. – **48**. – P. 2553–2556.
 15. Tare M., Coleman H.A., Parkington H.C. Regional differences in the regulation of vascular smooth muscle relaxation by the endothelium in health and in diabetes // Neurophysiology. – 2003. – **35**(3–4). – P. 372.
 16. Wigg S.J., Tare M., Tonta, M.A. et al. Comparison of effects of diabetes mellitus on an EDHF-dependent and EDHF-independent artery // Amer. J. Physiol. – 2001. – **281**. – P. H232–H240.
 17. Zharikov S.I., Herrera H., Block E.R. Role of membrane potential in hypoxic inhibition of L-arginine uptake by lung endothelial cells // Amer. J. Physiol. – 1997. – **272**, №1, Pt 1. – P. L78–84.

Ін-т фізіології ім. О.О.Богомольця НАН України, Київ

Матеріал надійшов до редакції 18.09.2004