

В. В. Яроцький, В. Ф. Сагач, С. М. Марченко

Електричні властивості інтактного ендотелію аорти кроля

В експериментах на інтактном ендотелію грудної аорти кролика досліджена іонна природа мембранного потенціала покоя ендотелію і його реакції на вазодилататори і вазоконстриктори. Установлено, що в формуванні потенціала покоя ендотелію бере участь калієва і натрієва, але не хлорна провідність мембрани. Ацетилхолін викликає гіперполяризацію ендотелію, АТФ — трьохфазну реакцію, що складається з невеликої кратковременної деполяризації, гіперполяризації і довготривалої деполяризації ендотелію. Норадреналін і серотонін деполяризували мембрану ендотелію.

Вступ

Мембранний потенціал судинного ендотелію є важливим елементом регуляторних механізмів, що контролюють перебіг судинних реакцій на різних етапах — від зміни концентрації внутрішньоклітинного кальцію і синтетичної активності ендотелію, до передачі сигналу від ендотелію до гладеньких м'язів [3, 6, 20, 21]. Хоча дослідженню мембранного потенціалу судинного ендотелію присвячено багато робіт, існує ще чимало питань щодо його природи. У формуванні мембранного потенціалу беруть участь іони калію, натрію і хлору, але літературні дані про їх роль суперечливі. Так, деякі автори виділяють два типи судинного ендотелію, у яких формування мембранного потенціалу контролюється переважно калієвою [4, 9] або хлорною провідністю [5, 7, 13, 15, 17].

Багато досліджень проведено щодо впливу агоністів на мембранний потенціал ендотелію. Відомо, що всі вони викликають складну відповідь, початковою фазою якої є гіперполяризація [4, 9, 10, 13, 18]. Наступні фази відповіді мембранного потенціалу на дію агоністів мають відмінності, а механізми її реалізації залишаються до кінця не з'ясованими [16, 23].

Показано, що дія вазоконстрикторів викликає деполяризацію судинного ендотелію [11]. Висловлюється припущення, що деполяризація є результатом впливу гладеньких м'язів через gap junction на ендотелій. З'ясування фізіологічного значення і механізмів впливу гладеньких м'язів на ендотелій потребують додаткових досліджень.

Завдяки міжэндотеліальним зв'язкам судинний ендотелій функціонує як єдиний орган [19]. Мембранний потенціал судинного ендотелію досліджували в основному або на щойно ізольованих клітинах, або на культурі ендотеліальних клітин, що, по-перше, порушує цілісне функціонування ендотелію, по-друге, усуває взаємозв'язок ендотелію із судинними гладенькими м'язами. Крім того, в культурі ендотелій не підпадає під вплив диференціюючих факторів, що є *in vivo*. До таких факторів можуть відноситись

© В. В. Яроцький та ін.

місцеві гормони, гемодинамічний вплив напруги зсуву і розтягу тощо. Тому інтерпретація результатів є утрудненою. Дослідження мембранного потенціалу інтактного ендотелію найповніше відображають його поведінку *in situ*.

Метою нашої роботи було вивчення властивостей інтактного ендотелію грудної аорти кроля.

Методика

Досліди проведено на самцях кролів породи шиншила масою 2–2,5 кг, яким вводили гепарин у вушну артерію із розрахунку 0,5 мл/кг безпосередньо перед проведенням повітряної емболії. Нами проведено попередні дослідження, які виявили, що гепарин в таких концентраціях не впливає на мембранний потенціал інтактного ендотелію і, водночас, запобігає згортанню крові на поверхні ендотелію.

Грудну частину аорти 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, Na₂H₂PO₄ – 1,2, CaCl₂ – 2,5, MgSO₄ · 7H₂O – 1,2, глюкоза – 11,1, гентаміцин – 50 мкг/мл. Модифікований розчин Кребса аерувався сумішшю повітря (95 %) та CO₂ (5 %). Перед дослідом сегмент аорти розрізали вздовж і закріплювали в камері об'ємом близько 100 мкл. Камеру перфузували розчином Кребса зі швидкістю 0,6 мл/хв.

Мембранний потенціал ендотелію вимірювали з використанням методу перфорованого patch-clamp у режимі фіксації струму за методикою, яку було описано раніше [9, 10]. Піпетки заповнювали розчином, що містив (ммоль/мл): KCl – 149; NaCl – 10; HEPES-KOH – 10 (рН 7,3). Дослідження проводили при 20–24 °С.

Калієвий рівноважний потенціал розраховували за формулою Нернста:

$$E_K = \frac{RT}{F} \ln \frac{[K]_o}{[K]_i},$$

де $[K]_o$, $[K]_i$ – концентрації калію у позаклітинному та внутрішньоклітинному розчинах відповідно.

Відношення провідностей P_{Na}/P_K і P_{Cl}/P_K вираховували з рівняння Ходжкіна – Каца:

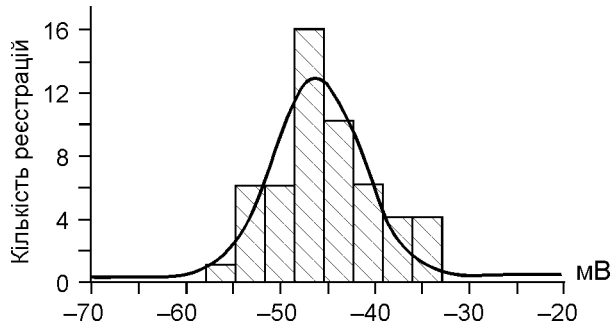
$$E = \frac{RT}{F} \ln \frac{[K]_o P_K + [Na]_o P_{Na} + [Cl]_o P_{Cl}}{[K]_i P_K + [Na]_i P_{Na} + [Cl]_i P_{Cl}},$$

де $[K]_o$, $[Na]_o$, $[Cl]_o$ – концентрації іонів калію, натрію, хлору в позаклітинному середовищі, $[K]_i$, $[Na]_i$, $[Cl]_i$ – концентрації у внутрішньоклітинному середовищі відповідно.

Результати

Мембранний потенціал нестимульованого ендотелію. Мембранний потенціал спокою інтактного нестимульованого ендотелію грудної аорти кроля протягом експерименту відзначалася високою стабільністю. Отримані значення мембранного потенціалу коливалися в межах від –58 до –35 мВ

Рис. 1. Гістограма розподілу мембранного потенціалу спокою, апроксимований розподілом Гаусса.



($n = 53$). При реєстрації мембранного потенціалу від одного препарату значення його показників відрізнялись у середньому на величину, яка не перевищувала 2 мВ; аналогічно, різниця у реєстраціях від різних препаратів, що походили із однієї судини, не перевищувала 4 мВ. Середнє значення мембранного потенціалу ендотелію було $-46,75 \text{ мВ} \pm \pm 5,11 \text{ мВ}$. Розподіл мембранного потенціалу спокою був одномодовий і задовільно апроксимувався розподілом Гаусса (рис. 1).

Вплив іонів калію на формування мембранного потенціалу спокою ендотелію. Для дослідження цього питання у перфузуючому розчині іони натрію еквімолярно заміщувалися іонами калію. Перфузія препарату розчином із підвищеною концентрацією калію (20, 40, 60 ммоль/л) викликала деполяризацію мембрани ендотелію, яка підвищувалася зі збільшенням концентрації калію у перфузуючому розчині. На рис. 2 показано теоретично розраховане за формулою Нернста значення калієвого рівноважного потенціалу і експериментально отримані значення мембранного потенціалу при різних концентраціях іонів калію (20, 40, 60 ммоль/л). Як видно з рис. 2 при підвищенні концентрації іонів калію у перфузуючому розчині значення мембранного потенціалу інтактного ендотелію грудної аорти кроля наближалось до калієвого рівноважного потенціалу.

Вплив іонів натрію та хлору на формування мембранного потенціалу спокою. При низьких концентраціях калію значення мембранного потенціалу значно відрізняється від калієвого рівноважного потенціалу, можливо, ця різниця зумовлена вкладом у мембранний потенціал натрієвої або хлорної провідності. Для перевірки вкладу натрієвої провідності у формування мембранного потенціалу ендотелію у перфузуючому розчині 59 ммоль/л NaCl еквімолярно заміщувались на N-метил-D-глюкамін; аналогічно, для дослідження впливу хлорної провідності 59 ммоль/л NaCl еквімолярно заміщувалися на натрій оксибутират. У випадку заміщення іонів натрію мембрана ендотелію гіперполяризувалася на $4,3 \text{ мВ} \pm \pm 1,6 \text{ мВ}$ ($n = 3$), заміна іонів хлору практично не змінювала значення мембранного

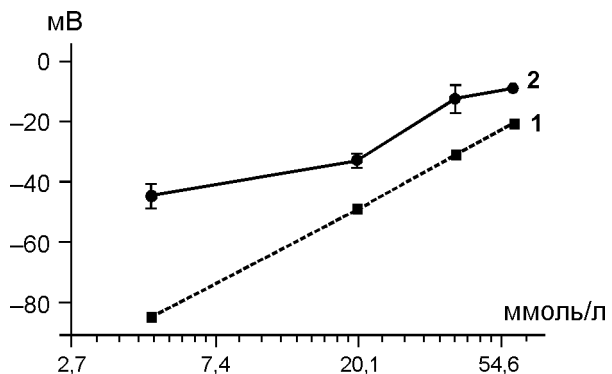


Рис. 2. Значення мембранного потенціалу при різних концентраціях калію: 1 — розраховане теоретично, 2 — експериментально отримане.

потенціалу ендотелію грудної аорти кроля ($n = 5$). Із отриманих результатів розраховано відношення проникностей P_{Na}/P_K (0,115) і P_{Cl}/P_K (0).

Реакції мембранного потенціалу на ацетилхолін (АЦХ) і аденозинтрифосфат (АТФ). Для аплікацій використовували АЦХ у концентрації 1 мкмоль/л і АТФ — 10 мкмоль/л. Обидва агоністи викликали складну відповідь, початковою фазою якої була швидка гіперполяризація, наступні фази відповіді носили різний характер (рис. 3). Так, у реакції на АЦХ початкова швидка гіперполяризація була $13,1 \text{ мВ} \pm 5,1 \text{ мВ}$, а наступні фази реакції можна розділити на дві групи. До першої групи ($n = 7$) відносяться відповіді, у яких швидка гіперполяризація змінювалася на підвищення мембранного потенціалу, після чого його значення виходило на плато гіперполяризації (див. рис. 3, *a*). У другій групі ($n = 2$) реакція проходила у два етапи: після швидкої гіперполяризації спостерігалася її плато (див. рис. 3, *a*). Спільним для усіх реакцій мембранного потенціалу на АЦХ є те, що значення мембранного потенціалу протягом реакції на АЦХ завжди було менше від значення мембранного потенціалу нестимульованого ендотелію.

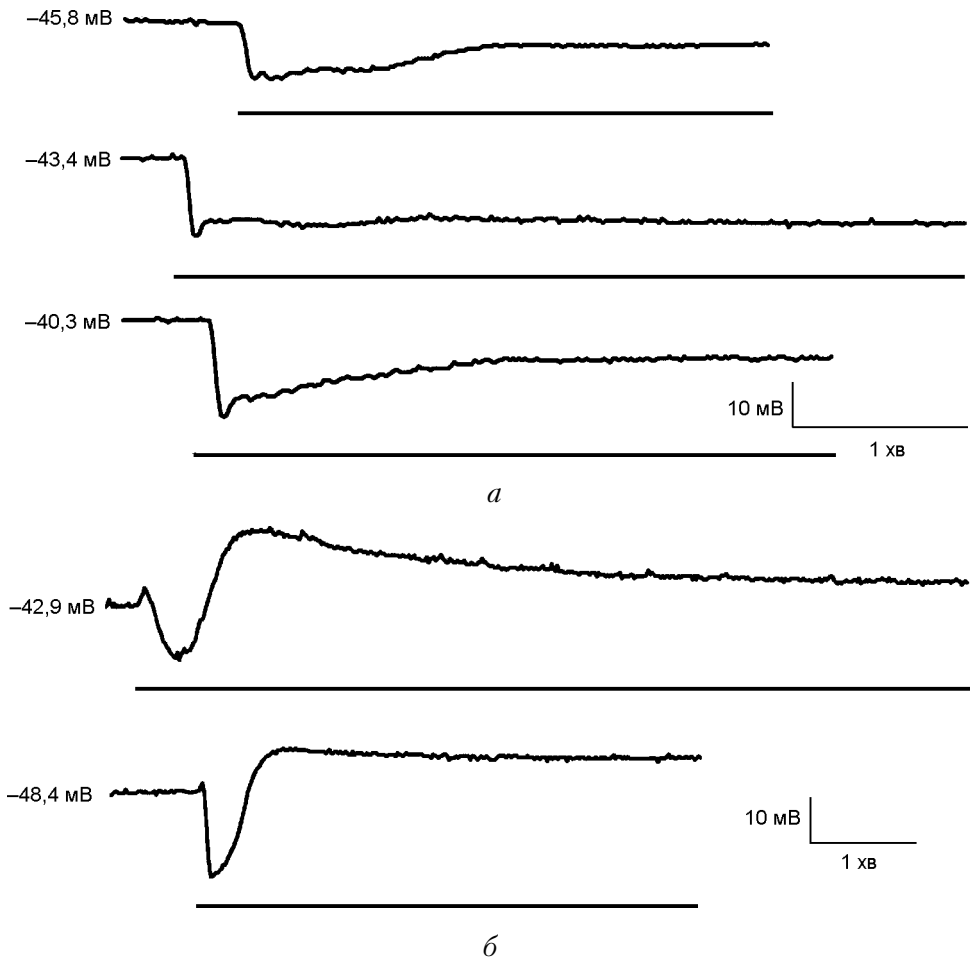


Рис. 3. Типові електричні реакції ендотелію на ацетилхолін (*a*) та на аденозинтрифосфат (*б*).

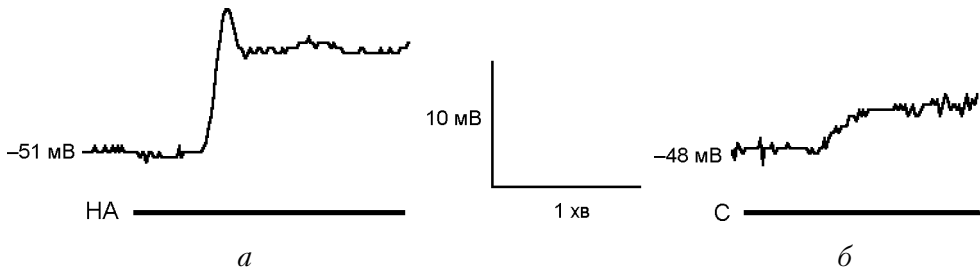


Рис. 4. Відповідь мембранного потенціалу ендотелію на норадреналін (а, 0,5 мкмоль/л); і на серотонін (б, 0,1 мкмоль/л).

В реакції мембранного потенціалу ендотелію на АТФ швидкій гіперполяризації ($9,7 \text{ мВ} \pm 5,7 \text{ мВ}$) передувала швидка деполяризація (1–5 мВ) мембрани. Далі гіперполяризація змінювалася швидкою деполяризацією, після якої відбувалась часткова реполяризація мембрани (див. рис. 3, б). Хоча якісно характер реакції на АТФ у всіх реєстраціях однаковий, умовно можна виділити дві групи відповідей, для яких співвідношення максимальних величин гіперполяризації і деполяризації менше ($n = 4$) або більше ($n = 2$) від одиниці (див. рис. 3, б). Затримка початку електричної реакції ендотелію на АЦХ і АТФ є співрозмірними.

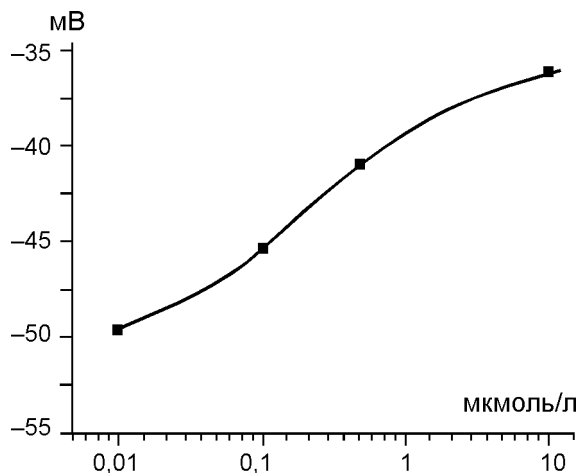
Реакції мембранного потенціалу ендотелію на вазоконстриктори.

Для дослідження цих реакцій ми використовували норадреналін у концентраціях 0,01; 0,1; 0,5; 10 мкмоль/л і серотонін у концентраціях 0,1 і 0,5 мкмоль/л. Реакцією на норадреналін була дозозалежна деполяризація мембрани ($n = 7$), яка спостерігалася при концентраціях норадреналіну $\geq 0,01$ мкмоль/л і входила в насичення при концентраціях від 10 мкмоль/л (рис. 4, а). Крива доза – ефект з високим ступенем точності апроксимувалася сигмоїдою (рис. 5). Слід відмітити, що крутизна деполяризації була досить значною, в той час як сама реакція наставала через 25–30 с після початку аплікації норадреналіну (для порівняння, реакція на АЦХ і АТФ починалася через 8–12 с після початку аплікації). Подібно до норадреналіну, серотонін також викликав деполяризацію ($n = 2$), при цьому за кінетикою реакція на серотонін була дуже схожою на відповідь на норадреналін (див. рис. 4, б).

Обговорення

Описані в літературі дані про мембранний потенціал ендотеліальних клітин мають істотні відмінності. Отримані нами результати вказують на те, що

Рис. 5. Типовий вплив різних концентрацій норадреналіну (квадратик) на мембранний потенціал ендотелію, апроксимований сигмоїдою у напівлогарифмічному масштабі.



значення мембранного потенціалу інтактного ендотелію мають одномодовий, а не двомодовий характер, який спостерігається у культивованому ендотелії [13], і аж ніяк не набувають позитивних значень [7]. Значення мембранного потенціалу інтактною грудної аорти кроля корелюють із результатами, отриманими на інтактному ендотелії грудної аорти щура як за характером розподілу, так і за середнім значенням [9]. Очевидно, що культура ендотеліальних клітин є невдалою моделлю для вивчення електрофізіологічних процесів у ендотеліальних клітинах, інтактний ендотелій є більш відповідним процесам *in vivo*.

Основний вклад у формування потенціалу спокою, як правило, вносять іони калію, натрію та хлору. Було висловлено припущення, що у формуванні мембранного потенціалу культивованих ендотеліальних клітин основний вклад вносять іони калію або хлору, чи вклади калію та хлору є співрозмірними, при цьому натрієва провідність може становити лише від 3 до 30 % [15]. Наші результати засвідчили, що співвідношення $P_{Na}/P_K = 0,115$ і $P_{Cl}/P_K = 0$, тобто, у формуванні мембранного потенціалу інтактного ендотелію грудної аорти кроля основну роль відіграють іони калію, а хлорна практично відсутня. Вклад натрієвої провідності у формування мембранного потенціалу був значним. Дійсно, у разі високих концентрацій калію у перфузуючому розчині мембранний потенціал наближався до значення калієвого рівноважного потенціалу, що вказує на калієву природу мембранного потенціалу (див. рис.1). Проте при низьких концентраціях калію значення мембранного потенціалу істотно відрізняється від калієвого рівноважного потенціалу. Мабуть, шунтування мембранного потенціалу іонами натрію відбувається через неселективні катіонні канали, які були знайдені як в інтактному ендотелії, так і в культивованих ендотеліальних клітинах [1, 2, 8].

Реакція ендотелію на АЦХ викликала, в цілому, гіперполяризацію мембрани, при цьому первинною реакцією була швидка гіперполяризація. Численні дослідження доводять, що швидка гіперполяризація є результатом вивільнення кальцію із внутрішньоклітинних депо і активації кальційчутливих калієвих каналів [5, 10, 19]. Гіперполяризація мембрани інтактного ендотелію грудної аорти кроля за своєю кінетикою й амплітудою корелює з реєстраціями, отриманими на судинному ендотелії іншого видового походження [5, 9, 10, 19]. На відміну від реакцій, які спостерігались в ендотелії аорти щура, в наших експериментах АЦХ не викликав деполаризацію ендотелію вище від потенціалу спокою і ендотелій залишався гіперполяризованим протягом усієї аплікації агоніста. Оскільки фаза плато гіперполяризації потребує входу кальцію з позаклітинного середовища [19], можна припустити, що він здійснюється через кальцієві канали [14]. Реакція мембранного потенціалу на АТФ складалась із невеликої початкової деполаризації, яка змінювалася гіперполяризацією. На відміну від електричних реакцій на АЦХ, реакція ендотелію на АТФ завжди завершувалася деполаризацією мембрани порівняно з потенціалом спокою. Відомо, що швидка гіперполяризація мембрани на дію АТФ зумовлена вивільненням кальцію із кальцієвих депо і активацією кальційзалежних калієвих каналів [19]. Незначна початкова деполаризація, яку ми спостерігали, може бути зумовлена активацією катіонних каналів через P2X-пуринорецептори, які

могли знаходитись як в ендотелії, так і в гладеньких м'язах аорти [22, 23]. Механізми, відповідальні за деполяризацію, викликану вазодилататорами, поки що невідомі. Найбільш імовірно, що за деполяризацію відповідальні активація малоселективних катіонних і/або інактивація калієвих каналів.

Важливу роль у судинних реакціях відіграють вазоконстриктори. Ми досліджували вплив норадреналіну та серотоніну на мембранний потенціал ендотелію. Отримані реєстрації свідчать, що ендотеліальна мембрана деполяризувалася. Реакція носила дозозалежний характер, крива доза — ефект добре апроксимувалася сигмоїдою. Норадреналін і серотонін діють переважно на гладеньком'язові клітини. Можна припустити, що норадреналін і серотонін викликає деполяризацію гладеньком'язових клітин, яка передається через gap junction на ендотелій, як і в грудній аорті щура [11]. Початок реакції на вазоконстриктори наступав значно пізніше, ніж при реакції на вазодилататори у разі великої крутизни деполяризації. Слід гадати, що затримка пов'язана із дифузиею вазоконстриктора вглиб судини до гладеньком'язових клітин.

Отже, електрофізіологічні властивості інтактного ендотелію аорти кроля були подібні до властивостей інтактного ендотелію аорти щура [9, 11, 19]. Основні відмінності заключались у кількісних відмінностях фаз електричних реакцій на вазодилататори.

V. V. Yarotskiy, V. F. Sagach, S. M. Marchenko

THE ELECTRICAL PROPERTIES OF INTACT RABBIT AORTIC ENDOTHELIUM

The ionic nature of membrane potential and electrical reactions to vasodilators and vasoconstrictors of intact endothelium of rabbit aorta have been investigated. It has been shown that K^+ and Na^+ , but not Cl^- permeability form membrane resting potential. The endothelium was hyperpolarized by ACh. ATP produced the triphasic reaction of short small depolarization, hyperpolarization followed by depolarization. Both noradrenalin and serotonin evoked depolarization.

*A.A. Bogomoletz Institute of Physiology
National Academy of Science of Ukraine, Kiev*

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Adams D.J., Barakeh J., Laskey R., Van Breemen C. Ion channels and regulation of intracellular calcium in vascular endothelial cells // *FASEB J.* — 1989. — **3**. — P.2389-2400.
2. Brauneis U., Gatmaitan Z., Arias I.M. Serotonin stimulated a Ca^{2+} permeant nonspecific cation channel in hepatic endothelial cells // *Biochem. Biophys. Res.* — 1992. — **186**. — P.1560-1566.
3. Busse R., Fichtner H., Luckhoff A., Kohlhardt M. Hyperpolarisation and increased free calcium in acetylcholine-stimulated endothelial cell // *Amer. J. Physiol.* — 1988. — **255**. — H965-H969.
4. Carter T.D., Ogden D. Acetylcholin-stimulated changes of membrane potential and intracellular Ca^{2+} concentration recorded in endothelial cells in situ in the isolated rat aorta // *Pflug. Arch.* — 1994. — **428**, N 5-6. — P.476-484.

5. *Chen G., Cheung D.W.* Effect of K(+)-channel blockers on ACh-induced hyperpolarisation and relaxation in mesenteric arteries // *Amer. J. Physiol.* — 1997. — **275**, N5, Pt 2. — P.H2306-2312.
6. *Inagami T., Naruse M., Hoover R.* Endothelium as an endocrine organ // *Annu. Rev. Physiol.* — 1995. — **77**. — P. 171-189.
7. *Fransen P., Sys S.U.* K⁺ and Cl⁻ contribute to resting membrane conductance of cultured porcine endocardial endothelial cells // *Amer. J. Physiol.* — 1997. — **272**, N4, Pt 2. — P.H1770-1779.
8. *Marchenko S.M., Sage S.O.* A novel mechanosensitive cationic channel from the endothelium of rat aorta // *J. Physiol.* — 1997. — **498**. — P.419-425.
9. *Marchenko S.M., Sage S.O.* Electrical properties of resting and acetylcholin-stimulated endothelium in intact rat aorta // *Ibid.* — 1993. — **462**. — P.735-751.
10. *Marchenko S.M., Sage S.O.* Mechanism of acetylcholine action on membrane potential of endothelium of intact rat aorta // *Amer. J. Physiol.* — 1994. — **266**. — P.H2388-H2395.
11. *Marchenko S.M., Sage S.O.* Smooth muscle cells affect endothelial membrane potential in rat aorta // *Ibid.* — 1994. — **267**, N2. — P.H804-811.
12. *McCarty M.F.* Endothelial membrane potential regulates production of both nitric oxide and superoxide — a fundamental determinant of vascular health // *Med. Hypotheses.* — 1999. — **53**, N4. — P.277-289.
13. *Mehrke G., Pohl U., Daut J.* Effect of vasoactive agonists on the membrane potential of cultured bovine aortic and guinea-pig coronary endothelium // *J. Physiol.* — 1991. — **439**. — P.277-299.
14. *Nilius B.* Signal transduction in vascular endothelium: the role of intracellular calcium and ion channels // *Verh. K. Acad. Geneesk Belg.* — 1998. — **60**, N3. — P.215-250.
15. *Nilius B., Viana F., Droogman G.* Ion channels in vascular endothelium // *Annu. Rev. Physiol.* — 1997. — **59**. — P.145-170.
16. *Nishijama M., Hashitani H., Fukuta H. et al.* Potassium channels activated in the endothelium-dependent hyperpolarisation in guinea-pig coronary artery // *J. Physiol.* — 1998. — **510**, N2. — P.455-465.
17. *Ono K., Nakao M., Iijima T.* Chloride-sensitive nature of histamine-induced Ca²⁺ entry in cultured humanaortic endothelial cells // *Ibid.* — **511**, N 3. — P.837-849.
18. *Quignard J.F., Feletou M., Edwards G. et al.* Role of endothelial cell hyperpolarisation in EDHF-mediated responses in the guinea-pig carotid artery // *Brit. J. Pharmacol.* — 2000. — **129**, N6. — P.1103-1112.
19. *Usachev Y.M., Marchenko S.M., Sage S.O.* Cytosolic calcium concentration in resting and stimulated endothelium of excised intact rat aorta // *J. Physiol.* — 1995. — **489**, N2. — P.309-317.
20. *Yamamoto K., Korenaga R., Kamiya A. et al.* // P2X(4) receptors mediate ATP-induced calcium influx in human vascular endothelial cells // *Amer. J. Physiol. Heart Circulat. Physiol.* — 2000. — **279**, N1. — P.H285-292.
21. *Yamamoto Y., Imaeda K., Suzuki H.* Endothelium-dependent hyperpolarisation and intercellular electrical coupling in guinea-pig mesenteric arterioles // *J. Physiol.* — 1999. — **514**, N2. — P.505-513.
22. *Yamamoto K., Korenaga R., Kamiya A. et al.* P2X(4) receptors mediate ATP-induced calcium influx in human vascular endothelial cells // *Amer. J. Physiol. Heart Circulat. Physiol.* — 2000. — **279**, N1. — P.H285-292.
23. *Zunkler B.J., Grafe M., Henning B. et al.* Effect of P2 purinoreceptor agonists on membrane potential and intracellular Ca²⁺ of human cardiac endothelial cells // *Pharmacol. and Toxicol.* — 1999. — **85**, N1. — P.7-15.