

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

Вплив агоністів адренорецепторів і циклічних нуклеотидів на мембранний потенціал ізольованого шару ендотеліальних клітин аорти кроля

В работе исследовано влияние агонистов адренорецепторов и повышения концентрации циклических нуклеотидов на мембранный потенциал изолированного слоя эндотелиальных клеток аорты кролика. Агонист α_1 -адренорецепторов фенилэфрин вызывал глубокую деполяризацию интактного эндотелия, но практически не влиял на мембранный потенциал изолированного слоя эндотелиальных клеток. Неселективный агонист адренорецепторов норадреналин, агонист β -адренорецепторов изопроterenол и малоселективный блокатор фосфодиэстераз изобутилметилксантин (ИБМХ) сильно деполяризовали изолированный слой эндотелиальных клеток. Результаты указывают на то, что повышение уровня циклических нуклеотидов деполяризует эндотелий; циклические нуклеотиды участвуют в развитии деполяризации эндотелия, вызванной норадреналином.

ВСТУП

Відомо, що ендотеліальні і гладеньком'язові клітини (ГМК) утворюють між собою міоендотеліальні контакти [10]. Зміни мембранного потенціалу ГМК можуть електротонічно передаватися через ці контакти на ендотеліальні клітини [4,8,11,12]. З іншого боку, можливі явища передачі електричного сигналу від ендотелію до ГМК через міоендотеліальні з'єднання. Існує думка, що NO-незалежний механізм розслаблення судин за допомогою ендотеліозалежного фактора гіперполяризації може бути не лише хімічним агентом, на роль якого претендують метаболіти арахідонової кислоти, а й електротонічною передачею змін мембранного потенціалу, яку викликають нейрогуморальні речовини, від ендотелію до гладеньких м'язів [6,7,9]. Прямим доказом існування електротонічної передачі від ендотелію до гладеньких м'язів стали експерименти, в яких аплікація струму негативного значення в ендотелію викликала гіперполяризацію гладеньких м'язів,

позитивного - деполяризувала мембрану ГМК [5]. У першому випадку спостерігалася дилатація судини, в другому – констрикція.

Наші попередні дослідження електричних реакцій інтактного ендотелію ізольованої аорти кроля показали, що підвищення внутрішньоклітинної концентрації циклічних нуклеотидів викликало деполяризацію мембрани ендотеліальних клітин [2]. Зважаючи на те, що циклічні нуклеотиди відіграють важливу роль у скороченні - розслабленні ГМК і, що електричний зв'язок між ендотелієм і ГМК у судинному препараті не порушувався, залишається відкритим питання про роль ендотелію і ГМК в цАМФ- і/або цГМФ-викликаній деполяризації.

На інтактному ендотеліі ізольованої аорти кроля було показано, що норадреналін може викликати деполяризацію ендотеліальної мембрани [3]. Проте відомо, що активація β -адренорецепторів може призводити до підвищення внутрішньоклітинної концентрації цАМФ. З іншого боку, норадреналін є вазоконстриктором і викликає деполяриза-

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

цію ГМК [1]. Необхідно з'ясувати, чи норадреналін діє безпосередньо на ендотелій, чи електрична реакція є результатом електротонічної передачі на ендотелій реакції гладеньких м'язів.

Метою нашої роботи було встановити роль ендотелію в розвитку деполяризації інтактного ендотелію ізольованої судини.

МЕТОДИКА

Експерименти проведено на самцях кролів породи шиншила масою 2-2,5кг, яким вводили гепарин (0,5 мл/кг) у вушну артерію безпосередньо перед проведенням повітряної емболії.

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, NaH₂PO₄ – 1,2, CaCl₂ – 2,5, MgSO₄ · 7H₂O – 1,2, глюкоза – 11,1. До розчину додавали гентаміцин – 50мкг/мл. Модифікований розчин Кребса аерувався сумішшю повітря (95%) та CO₂ (5%).

Ізольований шар ендотеліальних клітин отримували відокремленням за допомогою мікроінструментів ендотелію із шаром сполучної тканини, яка безпосередньо прилягає до нього від ГМК 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 [8,9]. Піпетки заповнювали розчином, що містив (ммоль/мл): KCl – 149; NaCl – 10; HEPES-KOH – 10 (рН 7,3). Дослідження проводили при 20 – 24° С.

РЕЗУЛЬТАТИ

Для коректної інтерпретації результатів електричних реакцій, отриманих від шару ізольованих від ГМК ендотеліальних клітин необхідно мати критерій якості ізоляції. Та-

ким критерієм може бути реакція мембранного потенціалу на вплив селективного агоніста α_1 -адренорецепторів фенілефрин. В ендотелії α_1 -адренорецептори практично відсутні. Тому першочергово ми намагалися заереєструвати електричну реакцію мембранного потенціалу на фенілефрин від інтактного ендотелію ізольованої аорти. Виявилось, що фенілефрин (0,1 мкмоль/л, n=7) викликав глибоку деполяризацію на 17,3 мВ±2,6 мВ, яка супроводжувалась осциляціями (рис. 1,а). У випадку ізольованого ендотелію фенілефрин у тій же концентрації викликав незначну повільну деполяризацію на 0,6 мВ±0,2 мВ. Осциляції при цьому не спостерігалися. Таким чином, ми розглядали та аналізували лише ті препарати ізольованого ендотеліального шару, які вкладались у зазначені межі значень амплітуди деполяризації ендотелію на фенілефрин (див.рис. 1,б).

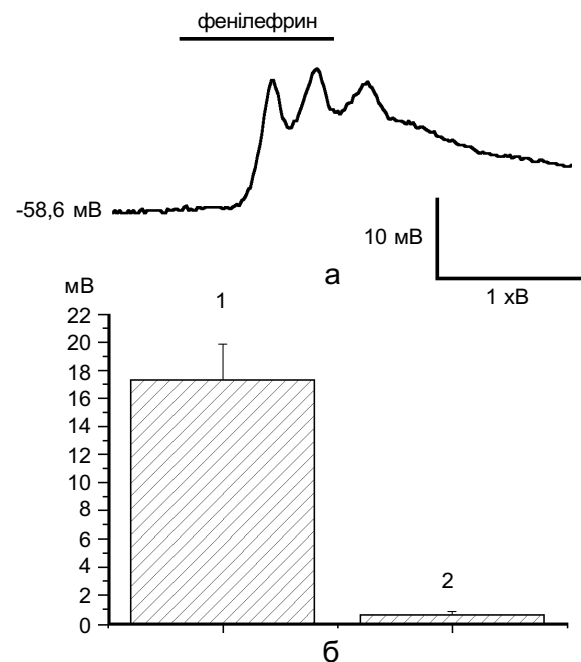


Рис.1. Вплив фенілефрину на мембранний потенціал ендотелію аорти кроля: а – типова реакція мембранного потенціалу інтактного ендотелію ізольованої аорти кроля на фенілефрин (0,1 мкмоль/л); б – максимальні значення деполяризації, викликані фенілефрином 1 – інтактний ендотелій, 2 – ізольований шар ендотеліальних клітин.

Підвищення внутрішньоклітинної концентрації циклічних нуклеотидів у ендотеліюцитах ми досягали аплікацією малоселективного блокатора фосфодіестераз ізобутилметилксантину (ІВМХ) (1 ммоль/л). У результаті розвивалася деполяризація на $19,7 \text{ мВ} \pm 3,5 \text{ мВ}$ (рис. 2, $n=6$). Тривала аплікація ІВМХ до 3 хв викликала після швидкої деполяризації реполяризацію мембрани ендотеліальних клітин (рис. 3,а).

Аплікація норадреналіну (10 мкмоль/л) призводила до деполяризації шару ендотеліальних клітин (див.рис. 3,б) на $11,8 \text{ мВ} \pm 5,1 \text{ мВ}$.

Відомо, що норадреналін є неселективним агоністом адренорецепторів. Вищеописані результати вказують нам на те, що в ендотелії дійсно практично відсутні α_1 -адренорецептори. Проте вклад β -адренорецепторів у розвиток деполяризації мембрани інтактного ендотелію ізольованої судини залишається недослідженим. Ми використовували агоніст β -адренорецепторів ізопротеренол для з'ясування цього питання. Виявилось, що аплікація ізопротеренолу (100 мкмоль/л, $n=5$) викликала за своїм характером реакцію, схожу до дії ІВМХ та норадреналіну – спостерігалася деполяризація на $14,2 \text{ мВ} \pm 5,6 \text{ мВ}$ (див.рис.3,в).

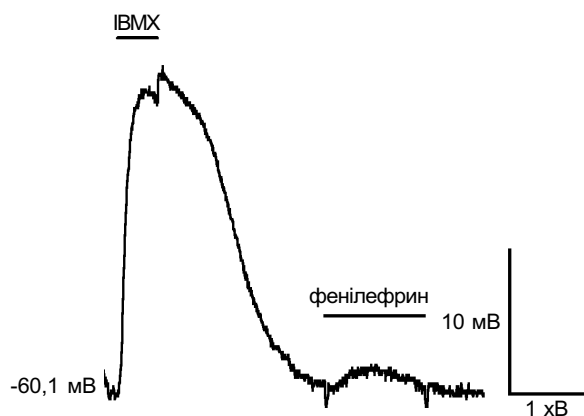


Рис.2. Типова реакція мембранного потенціалу ізольованого шару ендотеліальних клітин на аплікацію блокатора фосфодіестераз ІВМХ (1 ммоль/л). Показано також, що фенілефрин (0,1 мкмоль/л) практично не впливає на мембранний потенціал.

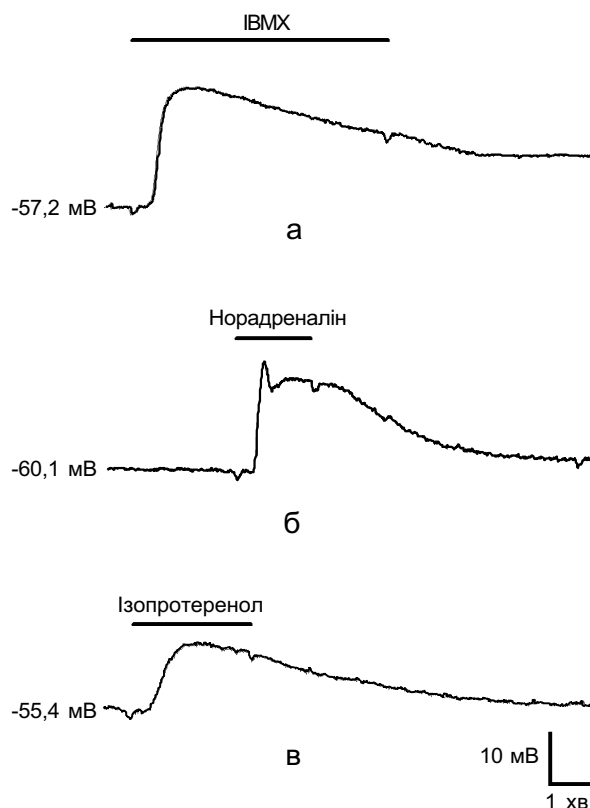


Рис.3. Типові реакції мембранного потенціалу ізольованого шару ендотеліальних клітин на аплікацію ІВМХ (а), норадреналіну (б) та ізопротеренолу (с).

ОБГОВОРЕННЯ

Зміни мембранного потенціалу ендотелію, які спостерігаються при стимуляції біологічно активними речовинами інтактного ендотелію ізольованої судини, можуть генеруватися в ГМК і електротонічно передаватися через міо-ендотеліальні контакти до ендотелію. З отриманих результатів видно, що селективний агоніст α_1 -адренорецепторів фенілефрин деполяризував мембрану саме ГМК, а не ендотелію. Ізольований від ГМК шар ендотеліальних клітин не реагував на аплікацію фенілефрину. Наші результати свідчать, що в ендотелії грудної аорти кроля практично відсутні α_1 -адренорецептори.

Попередні дослідження впливу підвищення внутрішньоклітинної концентрації

циклічних нуклеотидів на мембранний потенціал інтактного ендотелію грудної аорти кроля демонстрували нам розвиток деполяризації мембрани у відповідь на аплікацію блокатора фосфодіестераз IBMX чи мембранопроникного аналога цАМФ букладезину [2]. Нами висловлено припущення, що ці реакції відбуваються саме в ендотелії. Реакції, отримані на препаратах ізольованого шару ендотеліальних клітин, підтвердили таку гіпотезу. Характер розвитку деполяризації ізольованого ендотелію у відповідь на аплікацію IBMX досить точно відтворював реакцію, зафіксовану від інтактного ендотелію. Проте деполяризація ізольованого ендотелію була більше ніж у два рази вища (для порівняння, деполяризація інтактного ендотелію становила $8,8 \text{ мВ} \pm 3,0 \text{ мВ}$). Поки що пояснити цю відмінність важко, але цілком можливо, що у випадку інтактного судинного ендотелію ми спостерігаємо часткове шунтування деполяризації ендотелію гладенькими м'язами.

Раніше отримані нами реакції мембранного потенціалу інтактного ендотелію ізольованої аорти кроля на норадреналін також демонстрували розвиток деполяризації [3]. Активація β -адренорецепторів може призводити до збільшення внутрішньоклітинної концентрації цАМФ. Оскільки попередні результати чітко демонструють, що останній деполяризує судинний ендотелій, слід очікувати, що в розвитку його електричних реакцій на норадреналін є внесок, зумовлений цАМФ, концентрація котрого в цитозолі ендотеліоцитів збільшується. Дійсно, аплікація агоніста β -адренорецепторів ізопротеренолу викликала деполяризацію, схожу до такої ізольованого ендотелію норадреналіном та IBMX. Це дає нам підстави говорити про участь одних і тих самих механізмів у розвитку деполяризації ендотелію на норадреналін та IBMX.

Отримані результати дозволяють стверджувати, що розвиток деполяризації ендотелію на дію норадреналіну *in situ* опосередковується непростим механізмом. Складовими частинами цього механізму є деполяризація гладеньких м'язів судин і ендотелію. Який

із цих компонентів має більший внесок, а який менший – це питання поки що залишається відкритим. Можна лише сказати точно, що сумарний ефект не є адитивним. Про це свідчить хоча б те, що на інтактному ендотелії ізольованої судини ми спостерігаємо деполяризацію, викликану фенілефріном, більшу, ніж норадреналіном [3].

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

INFLUENCE OF ADRENOCEPTOR AGONISTS AND CHANGES IN INTRACELLULAR CYCLIC NUCLEOTIDE CONCENTRATION ON THE MEMBRANE POTENTIAL OF ISOLATED ENDOTHELIAL CELL LAYER FROM RABBIT AORTA

The influence of adrenoceptor agonists and changes in the intracellular cyclic nucleotide concentration on the membrane potential of an isolated endothelial cell layer from rabbit aorta has been investigated. The α_1 -adrenoceptor agonist phenylephrine evoked deep depolarization of the endothelium of an intact aorta, but had a little effect on the membrane potential of the isolated endothelium. The nonselective adrenoceptor agonist noradrenaline, the β -adrenoceptor agonist isoproterenol and the inhibitor of phosphodiesterases IBMX all strongly depolarized the isolated endothelium. These data suggest that the rise in cyclic nucleotide concentration depolarizes endothelial cells, and this fact may account for the noradrenaline-induced depolarization of the endothelium through β -adrenoceptors.

A.A.Bogomoletz Institute of Physiology

National Academy of Science of Ukraine, Kiev

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Шуба М.Ф., Кочемасова Н.Г. Физиология сосудов гладких мышц. - К.: Наук. думка, 1998. – 252 с.
2. Яроцкий В.В., Сагач В.Ф., Марченко С.М. Влияние циклических нуклеотидов на мембранный потенциал интактного эндотелия изолированной аорты кролика. - В кн.: Функциональная роль монооксида азота и пуринов. - Минск.: БизнеСофсет, 2001. – 216 с.
3. Яроцкий В.В., Сагач В.Ф., Марченко С.М. Электрические свойства интактного эндотелия аорты кроля // Физиол. журн. – 2001. – 47. – С. 9-16.

4. Beny J.-L. Electrical coupling between smooth muscle cells and endothelial cells in pig coronary arteries // Pflugers Archiv. – 1997. – 433. – P. 364-367.
5. Emerson G.G., Segal S.S. Electrical coupling between endothelial cells and smooth muscle cells in hamster feed arteries: role of vasomotor control // Circulat.Res. – 2000. – 87(6). – P. 427-428.
6. Feletou M., Vanhoutte P.M. The third pathway: endothelium-dependent hyperpolarisation // J. Physiol.Pharmacol. – 1999. – 50(4). – P.525-534.
7. Hill C.E., Hickey H., Sandow S.L. Role of gap junction in acetylcholine -induced vasodilation of proximal and distal arteries of the rat mesentery // J.Auton.Nerv.Syst. – 2000. – 81(1-3). – P. 122-127.
8. Marchenko S.M., Sage S.O. Smooth muscle cells affect endothelial membrane potential in rat aorta // Amer. J. Physiol. – 1994. – 267. – P. H804-H811.
9. Sandow S.L., Hill C.E. Incidence of myoendothelial gap junctions in the proximal and distal mesenteric arteries of the rat is suggestive of a role in endothelium-derived hyperpolarizing factor-mediated responses // Circulat. Res. – 2000. – 86(3). – P. 341-346.
10. Spagnoli L.G., Villaschi S., Neri L., Palmieri G. Gap junction in myo-endothelial bridges of rabbit carotid arteries // Experientia. – 1982. – 38. – P. 124-125.
11. von der Weid P.-Y., Beny J.-L. Simultaneous oscillations in the membrane potential of pig coronary artery endothelial and smooth muscle cells // J.Physiol. – 1993. – 471. – P. 13-24.
12. Yamamoto Y., Fukuta H., Nakahira Y., Suzuki H. Blockade by 18b-glycyrrhetic acid intercellular electrical coupling in guinea-pig arterioles // J.Physiol. – 1998. – 511, N 2. – P. 501-508.

*Ин-т фізіології ім.О.О.Богомольця НАН
України*

*Матеріал надійшов
до редакції 13.12.2001*