

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

## Вплив ацетилхоліну та аденозинтрифосфату на мембранний потенціал інтактного ендотелію аорти щурів за умов старіння

*Исследовано изменение электрических реакций интактного эндотелия изолированной аорты крыс в условиях старения. Показано, что значение мембранного потенциала покоя эндотелия у старых крыс (24 - 26 мес) существенно выше, чем у животных (6 мес) контрольной группы. В ответах на ацетилхолин и аденозинтрифосфат у старых крыс не наблюдалось характерного для контрольной группы животных типичного течения реакций. Потеря типичности ответов на ацетилхолин и АТФ при старении указывают на нарушение связей между эндотелиальными клетками, что приводит к функциональной кластеризации последних. Полученные результаты указывают на возможный механизм снижения продукции и высвобождения мощного вазодилататора – оксида азота вследствие изменения электрических свойств эндотелия при старении.*

### ВСТУП

Старіння викликає незворотні зміни в серцево-судинній системі, і, в першу чергу, вони стосуються ендотеліозалежної регуляції судинного тонуусу [3, 16]. Відомо, що ендотеліозалежне розслаблення при дії ацетилхоліну, яке реалізується через синтез і вивільнення вазоактивних факторів ендотеліального походження, а саме оксиду азоту (NO) та ендотеліального фактора гіперполяризації (ЕФГ), в процесі старіння стає суттєво меншим [2, 6, 11, 12, 19, 20]. Пригнічення з віком ендотеліозалежного розслаблення при дії ацетилхоліну характерне для ємнісних [10, 12, 13] і для резистивних [16] судин. Аналогічний ефект пригнічення ендотеліозалежного розслаблення за умов старіння характерний і при дії таких агоністів, як аденозинтрифосфат (АТФ) [11] і гістамін [17].

Продукція оксиду азоту при дії ацетилхоліну, АТФ, гістаміну, брадикініну здійснюється за участю кальційзалежного фер-

менту – ендотеліальної NO-синтази (eNOS). Остання активується у разі підвищення внутрішньоклітинної концентрації іонів кальцію [1, 23] внаслідок швидкого їх вивільнення із внутрішньоклітинних депо, активації кальційзалежних калієвих каналів, гіперполяризації ендотеліальної мембрани і призводить до збільшення вхідного потоку  $Ca^{2+}$  в ендотеліоцити [18]. Нині чітко не з'ясовано механізми депресії ендотеліозалежного розслаблення за умов старіння. Однак більшість авторів схиляються до думки, що цей феномен може бути результатом зменшення вивільнення NO [5, 9] і/або зменшення активності eNOS [7, 8]. Не виключено, що зменшення продукції та вивільнення NO є результатом змін електрофізіологічних властивостей ендотеліальної мембрани.

Метою нашої роботи було дослідити можливі зміни деяких електричних властивостей ендотелію ізольованої аорти щурів за умов старіння.

**МЕТОДИКА**

В експериментах були використані самці щурів лінії Вістар-Кіото віком 6 міс (контроль) та 24 – 26 міс (старі тварини). Досліди проводили на інтактному ендотелії ізольованого відділу грудної аорти.

Грудний відділ аорти нарізали на сегменти довжиною 3-4 мм і зберігали у модифікованому розчині Кребса наступного складу (ммоль/л): NaCl – 118,3, NaHCO<sub>3</sub> – 25, KCl – 4,7, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> – 1,2, CaCl<sub>2</sub> – 2,5, MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O – 1,2, глюкоза – 11,1. До розчину додавали гентаміцин – 50 мкг/мл. Модифікований розчин Кребса аерували сумішшю повітря (95 %) та CO<sub>2</sub> (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 [14, 15]. Піпетки заповнювали розчином, що містить (ммоль/мл): KCl – 149, NaCl – 10, HE-PES-KOH – 10 (рН-7,3). Дослідження проводили при 20 – 24 С°. У дослідах були використані ацетилхолін та АТФ фірми “Sigma” (США).

Статистичну обробку експериментальних результатів проводили за допомогою програми “ORIGIN 6.0”.

**РЕЗУЛЬТАТИ**

Першочергово було досліджено характерні значення мембранного потенціалу нестимульованого інтактного ендотелію. Виявилося, що для контрольної групи тварин значення мембранного потенціалу спокою становило -39,5 – -48,1 мВ, а середнє значення -43,6 мВ ± 3,0 мВ (n=13). Для старих тварин ці показники становили -46 – -15 мВ і -28 мВ ± 9 мВ (n=23) відповідно. Тобто, середнє значення мембранного потенціалу спокою інтактного ендотелію старих щурів було достовірно вищим,

ніж у молодих. Слід відмітити, що навіть при різних реєстраціях від однієї судинної смужки у старих тварин значення мембранного потенціалу відрізнялося до 10 мВ, тоді як у молодих тварин цей показник ніколи не перевищував 4 мВ.

Наступним кроком досліджень було вивчення електричних реакцій інтактного ендотелію на такі вазодилататори, як ацетилхолін (1 мкмоль/л) і АТФ (100 мкмоль/л). Експериментальні результати показали, що у контрольній групі тварин ацетилхолін викликав у всіх, без винятку, реєстраціях двофазну відповідь (рис. 1, а - в), початковою фазою якої була швидка гіперполяризація на 22,0 мВ ± 3,2 мВ (n=5), яка змінювалася на плато гіперполяризації. У старих тварин ацетилхолін також викликав двофазну відповідь (рис.2, а - в). Першою фазою реакції також була швидка гіперполяризація на 27 мВ ± 9 мВ (n=12), проте наступні фази відповіді могли демонструвати розвиток плато гіперполяризації (n=6) і деполяризацію ендотеліальної мембрани (n=6). Але особливо слід відмітити, що такі відмінності у реакціях спостерігалися навіть при різних реєстраціях від однієї судинної смужки. У контрольній групі реакція на АТФ також мала подібно до ацетилхоліну початковою фазою швидку гіперполяризацію на 9,9 мВ ± 1,9 мВ (n=5), після якої розвивалася деполяризація (див. рис. 1, г-е). Хоча в старих тварин АТФ також викликав початкову гіперполяризацію на 22,6 мВ ± 5,6 мВ (n=12) і наступною фазою також була деполяризація (див. рис. 2, г-е), але перебіг останньої сильно відрізнявся як за кінетикою, так і за амплітудою навіть при різних реєстраціях від однієї судинної смужки.

**ОБГОВОРЕННЯ**

Отримані результати демонструють, що мембранний потенціал нестимульованого інтактного ендотелію ізольованого відділу грудної аорти старих щурів є достовірно вищим. Його значення змінюються в значно ширшому

діапазоні порівняно з результатами контрольних тварин. Мембранний потенціал спокою не має широкого діапазону значень не лише у молодих щурів [14], а й у кролів [4]. Виходячи із того, що продукція оксиду азоту залежить від внутрішньоклітинної концентрації  $\text{Ca}^{2+}$  та із залежності останньої від значення мембранного потенціалу ендотелію, можна сказати, що базальна продукція та вивільнення NO будуть меншими у старих тварин, ніж у молодих. Окрім того, мембранний потенціал ендотелію може впливати через електричний зв'язок між ендотелієм і гладенькими м'язами на значення мембранного потенціалу останнього, підвищуючи його за умов старіння. Зменшення продукції оксиду азоту та підвищення значення мембранного

потенціалу гладеньком'язових клітин призведуть до підвищення базального тону судин.

Однак дуже цікавим виявився той факт, що електричні реакції інтактного ендотелію на ацетилхолін та АТФ у старих щурів не мали типового перебігу навіть при різних реєстраціях від однієї судинної смужки, і водночас для контрольних тварин всі реакції були однотипними. Взагалі, для молодих і дорослих тварин характерна висока стабільність і типовість електричних реакцій на ацетилхолін та АТФ [4, 14, 15]. Отже, можна стверджувати, що ендотелій старих тварин дійсно змінює свої функціональні властивості. Дійсно, для молодих тварин характерна просторово - часова синхронізація кальцієвого й

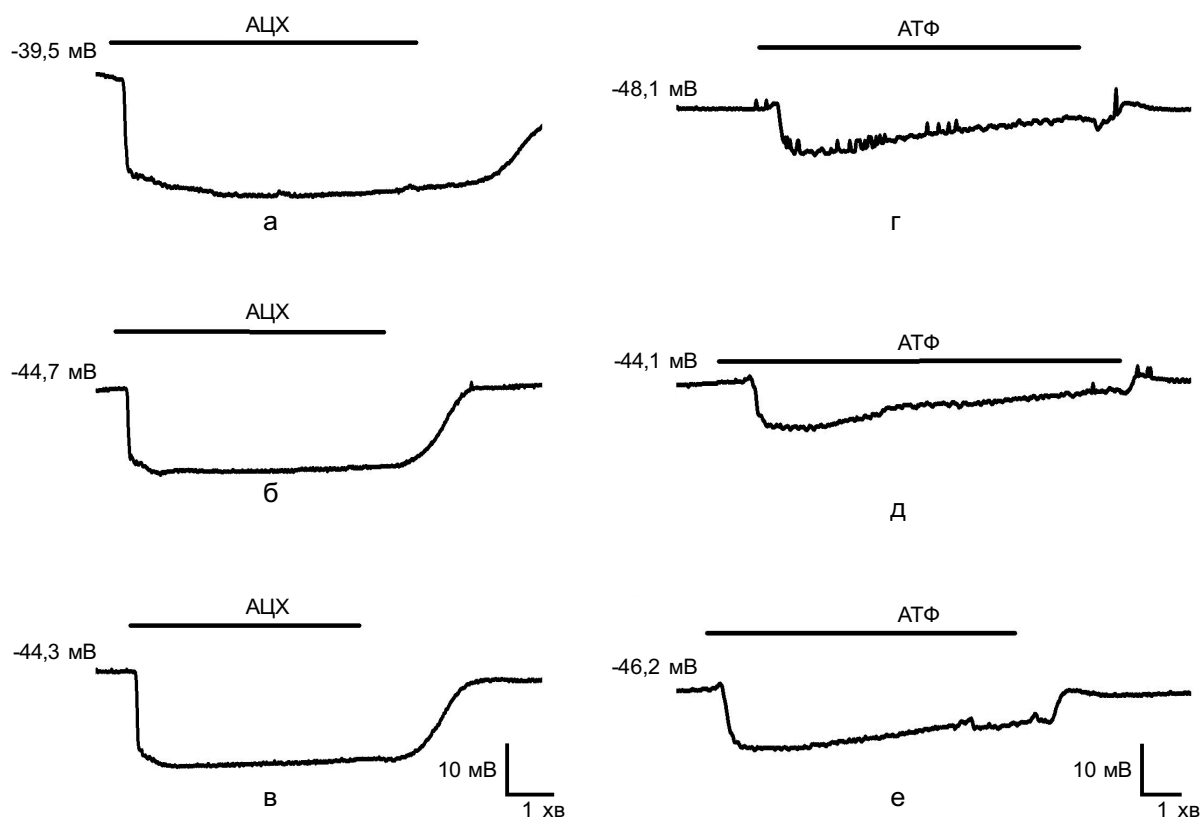


Рис. 1. Відповідь мембранного потенціалу інтактного ендотелію ізольованого відділу грудної аорти щурів контрольної групи (6 міс) на 1 мкмоль/л ацетилхоліну (а-в) та 100 мкмоль/л аденозинтрифосфату (г-е). Реакції отримані при реєстраціях від однієї судинної смужки і демонструють однотипність відповідей.

електричного сигналу [22]. Ця особливість судинного ендотелію зумовлена, в першу чергу, ендотелій-ендотеліальними електричними контактами. Таким чином, ендотелій являє собою суцільний моношар, який функціонує як єдиний орган і типово відповідає на різноманітні стимули. Виходячи із отриманих результатів, можна висунути гіпотезу про те, що в процесі старіння ендотелій-ендотеліальні контакти ушкоджуються, або ж частина ендотелію перестає нормально функціонувати. Тобто, функціонально формуються кластери

ендотеліальних клітин, кожен з яких і демонстрував у наших експериментах специфічні реакції на ацетилхолін та АТФ.

Враховуючи і високе значення мембранного потенціалу спокою інтактного ендотелію аорти щурів, і його можливу кластеризацію за умов старіння, можна сказати, що це є один із можливих механізмів депресії ендотелійзалежного розслаблення при дії ацетилхоліну чи АТФ у старих щурів, який направлений на зменшення продукції [7, 8] і вивільнення [5, 9, 21] оксиду азоту.

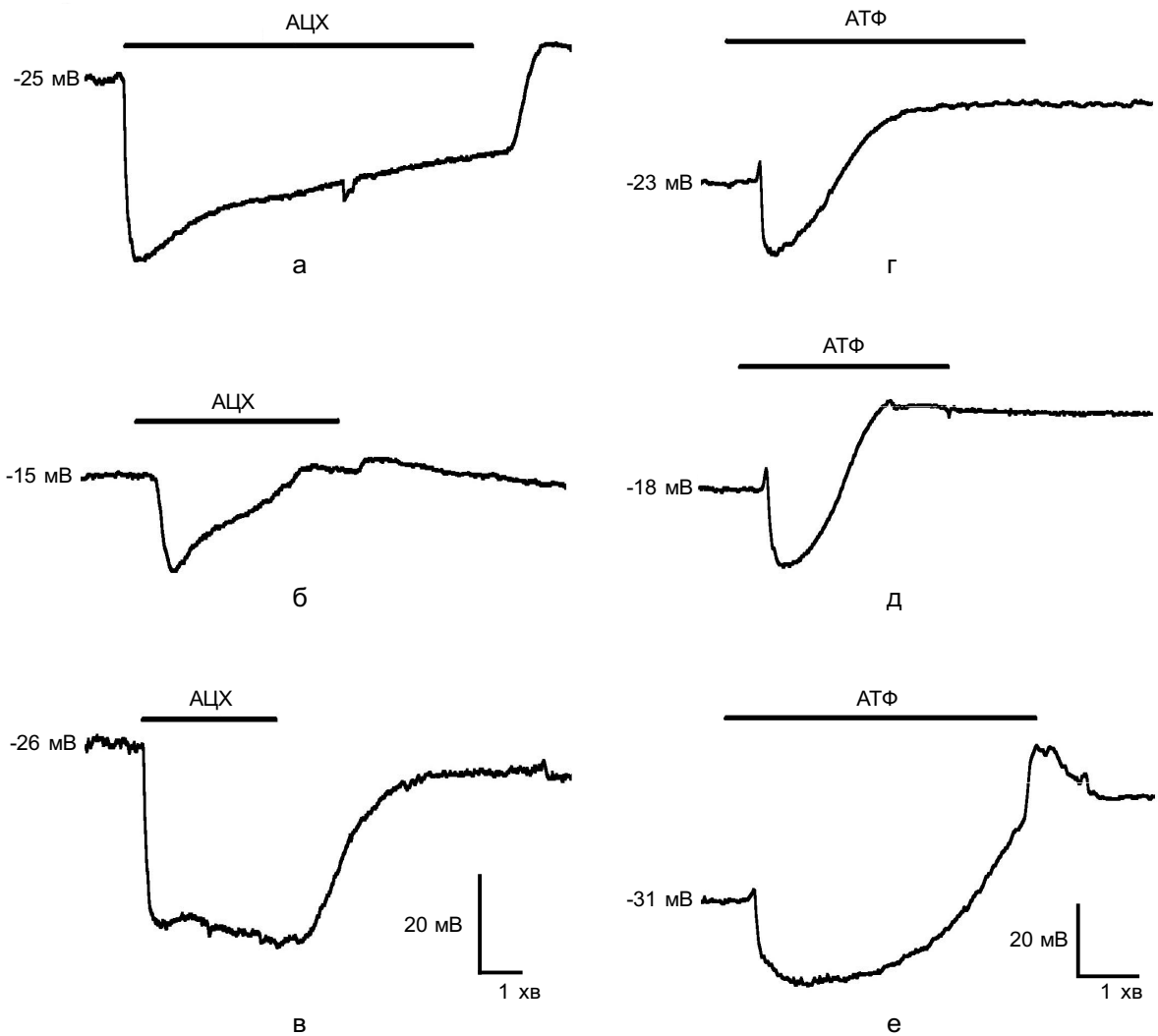


Рис. 2. Реакція мембранного потенціалу інтактного ендотелію ізольованого відділу грудної аорти старих щурів (24 – 26 міс) на 1 мкмоль/л ацетилхоліну (а-в) та 100 мкмоль/л аденозинтрифосфату (г-е). Реакції отримані при реєстраціях від однієї судинної смужки і демонструють порушення однотипності відповідей як за амплітудою, так і за кінетикою.

Роботу виконано за підтримки Державного фонду фундаментальних досліджень України (проект 05.07/00159).

**M.N. Tkachenko, V.V. Yarotsky,  
S.M. Marchenko, V.F. Sagach**

**EFFECT OF ACETYLCHOLINE AND  
ADENOSINE TRIPHOSPHATE ON  
MEMBRANE POTENTIAL OF THE INTACT  
ENDOTHELIUM OF RAT AORTA IN  
AGING**

Changes in the electric reactions of intact endothelium of isolated rat aorta were studied in conditions of aging. A value of resting membrane potential of endothelium of old rats (24-26 mo) was significantly greater, than in control group of animals (6 mo). In responses to acetylcholine and ATP the old rats did not show a typical course of reactions, which was peculiar to control animals. Inability of old rats to produce a typical response to acetylcholine and ATP may signify a disturbance of links between endothelial cells, which resulted in functional clusterization of the latter. The data obtained suggest a possible mechanism of decrease in production and release of potent vasodilator – nitric oxide – due to changes that occur in the electric properties of endothelium in aging.

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

**СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ**

1. Реутов В.П., Сорокина Е.Г., Охотин В.Е., Косицын Н.С. Циклические превращения оксида азота в организме млекопитающих. – М.: Наука, 1997. – 158 с.
2. Ткаченко М.М. Оксид азота та судинна регуляція // Журн. АМН України. – 1997. – 3, № 2. – С. 241-254.
3. Фролькис В.В., Безруков В.В., Кульчицкий О.К. Старение и экспериментальная патология сердечно-сосудистой системы. – К.: Наук. думка, 1994. – 248 с.
4. Яроцький В.В., Сагач В.Ф., Марченко С.М. Електричні властивості інтактного ендотелію аорти кроля // Фізіол. журн. – 2001. – 47, № 1. – С. 9-16.
5. Alvarez de Sotomayor M., Stoclet J.C., Andrian-tsitohaina R. Effect of ageing on the endothelium-dependent vasorelaxation induced by acetylcholine in rat mesenteric arteries. - In: Endothelium-Derived Hyperpolarizing Factor / Ed. P.M.Vanhoutte. - Harwood Academic Publishers, Amsterdam, 1999. - P. 323-332.
6. Atkinson J., Tatchum-Talom R., Capdeville-Atkinson C. Reduction of endothelial function with age in the mesenteric arterial bed of the normotensive rat // Br. J. Pharmacol. – 1994. – 111, № 4. – P. 1184-1188.
7. Cernadas M.R, Sanchez de Miguel L., Garcia-Duran M. et al. Expression of constitutive and inducible nitric oxide synthases in the vascular wall of young and aging rats // Circulat. Res. – 1998. – 83, № 3. – P. 279-286.
8. Chou T.C., Yen M.N., Li C.Y., Ding Y.A. Alterations of nitric oxide synthase expression with aging and hypertension in rats // Hypertension. – 1998. – 31, № 2. – P. 643-648.
9. Dohi Y., Lüscher T.F. Aging differentially affects direct and indirect actions of endothelin-1 in perfused mesenteric arteries of the rat // Br. J. Pharmacol. – 1990. – 100, № 4. – P. 889-893.
10. Egashira K., Inou T., Hirooka Y. et al. Effects of age on endothelium-dependent vasodilation of resistance coronary artery by acetylcholine in humans // Circulat. – 1993. – 88, № 1. – P. 77-81.
11. Hongo K., Nakagomi T., Kassel N.F. et al. Effects of aging and hypertension on endothelium-dependent vascular relaxation in rat carotid artery // Stroke. – 1988. – 19, № 7. – P. 892-897.
12. Koga T., Takata Y., Kobayashi K. et al. Ageing suppresses endothelium-dependent relaxation and generates contraction mediated by the muscarinic receptors in vascular smooth muscle of normotensive Wistar-Kyoto and spontaneously hypertensive rats // J. Hypertension. – 1988. – 6, Suppl. 4. – P. S243-245.
13. Kung C.N.F., Lüscher T.F. Different mechanisms of endothelial dysfunction with aging and hypertension in rat aorta // Hypertension. – 1995. – 25, № 2. – P. 194-200.
14. Marchenko S.M., Sage S.O. Electrical properties of resting and acetylcholine-stimulated endothelium in intact rat aorta // J. Physiol. – 1993. – 462, № 3. – P. 735-751
15. Marchenko S.M., Sage S.O. Mechanism of acetylcholine action on membrane potential of endothelium of intact rat aorta // Amer. J. Physiol. – 1994. – 266, № 5. – P. H2388-95.
16. Matz R.L., Schott C., Stoclet J.C., Andrian-tsitohaina R. Age-related endothelial dysfunction with respect to nitric oxide, endothelium-derived hyperpolarizing factor and cyclooxygenase products // Physiol. Res. – 2000. – 49, № 1. – P. 11-18.
17. Moritoki H., Hosoki E., Ishida Y. Age-related decrease in endothelium-dependent dilator response to histamine in rat mesenteric artery // Eur. J. Pharmacol. – 1986. – 126, № 1-2. – P. 61-67.
18. Nilius B., Viana F., Droogmans G. Ion channels in vascular endothelium // Annu. Rev. Physiol. –

1997. – 59, № 2. – P. 145-170.
19. Shimizu I., Toda N. Alterations with age of the response to vasodilator agents in isolated mesenteric arteries of the beagle // Br. J. Pharmacol. – 1986. – **89**, № 4. – P. 769-778.
20. Taddei S., Virdis A., Mattei P. et al. Aging and endothelial function in normotensive subjects and patients with essential hypertension // Circulat. – 1995. – **91**, № 7. – P. 1981-1987.
21. Tschudi M.R., Barton M., Bersinger N.A. et al. Effect of age on kinetics of nitric oxide release in rat aorta and pulmonary artery // J. Clin. Invest. – 1996. – **98**, № 4. – P. 899-905.
22. 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**, № 2. – P. 309-317.
23. Vane J.R., Botting R.M. Control of the circulation by vasoactive mediators from endothelial cells // J. Lipid Mediat. Cell Signal. – 1994. – **9**, № 1. – P. 1-8.

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

*Матеріал надійшов  
до редакції 15.04.2002*