

С. М. Марченко

Катіонний канал низької провідності в інтактному ендотелії аорти щура

В изолированных patches люминальной мембраны эндотелиальных клеток аорты крысы методом patch-clamp обнаружен ранее не описанный ионный канал. Проводимость канала составляла 5,4 пСм. Канал был в равной степени проницаем для Na^+ и K^+ и практически не проницаем для Cl^- . Время жизни канала составляло 46 мс. Время жизни и вероятность открытого состояния канала не зависели от мембранного потенциала. Малоселективный катионный канал может вызывать деполяризацию эндотелиальных клеток, влияя таким образом на сократимость сосуда.

ВСТУП

Електрофізіологічні властивості ендотеліальних клітин можуть істотно впливати на скоротливу активність судин за допомогою не менше, ніж двох механізмів. По-перше, мембранний потенціал модулює кальцієвий струм в ендотеліальних клітинах, регулюючи таким чином кальційзалежні внутрішньоклітинні процеси і, зокрема, активність NO-синтази [10]. Крім цього, ендотеліальні клітини можуть через міоендотеліальні контакти безпосередньо впливати на мембранний потенціал гладеньком'язових клітин, модулюючи активність потенціалактивованих кальцієвих каналів [3, 7, 11].

Різноманітні іонні канали було описано в культивованих ендотеліальних клітинах [9]. Дослідження ендотеліальних клітин *in situ* показали, що вони мають набір каналів суттєво відмінних від клітин у культурі. Зокрема, в інтактному ендотелії аорти щура були знайдені кальційактивовані калієві канали і механочутливі мало селективні катіонні канали, що відрізнялися за властивостями від аналогічних каналів культивованих ендотеліальних клітин [6, 8]. У цій роботі в ендотеліальних клітинах аор-

ти щура *in situ* ми виявили раніше не описаний низькопровідний малоселективний катіонний канал.

МЕТОДИКА

Експерименти проведено на грудній аорті щурів. Поодинокі іонні канали ендотелію артерій реєстрували дещо видозміненим методом, розробленим раніше [4, 6, 8]. Ізольовані артерії очищали від прилеглої тканини і нарізали на сегменти завдовжки 3 – 4 мм, які зберігали в модифікованому розчині Кребса наступного складу (в ммоль/л): NaCl – 118,3, NaHCO_3 – 25, KCl – 4,7, NaH_2PO_4 – 1,2, MgSO_4 – 1,2, CaCl_2 – 2,5, глюкоза – 11,1, феноловий червоний – 0,02. Для того, щоб відвернути бактеріальне пошкодження судини, до розчину додавали гентаміцин у концентрації 50 мкг/мл. Розчин безперервно аерувався сумішшю 95 % O_2 і 5 % CO_2 . Перед експериментом сегменти аорти розрізали вздовж і приколювали люмінальною поверхнею вверх до дна експериментальної камери об'ємом 100 – 150 мкл і перфузували розчином Кребса зі швидкістю 0,12 мл/хв.

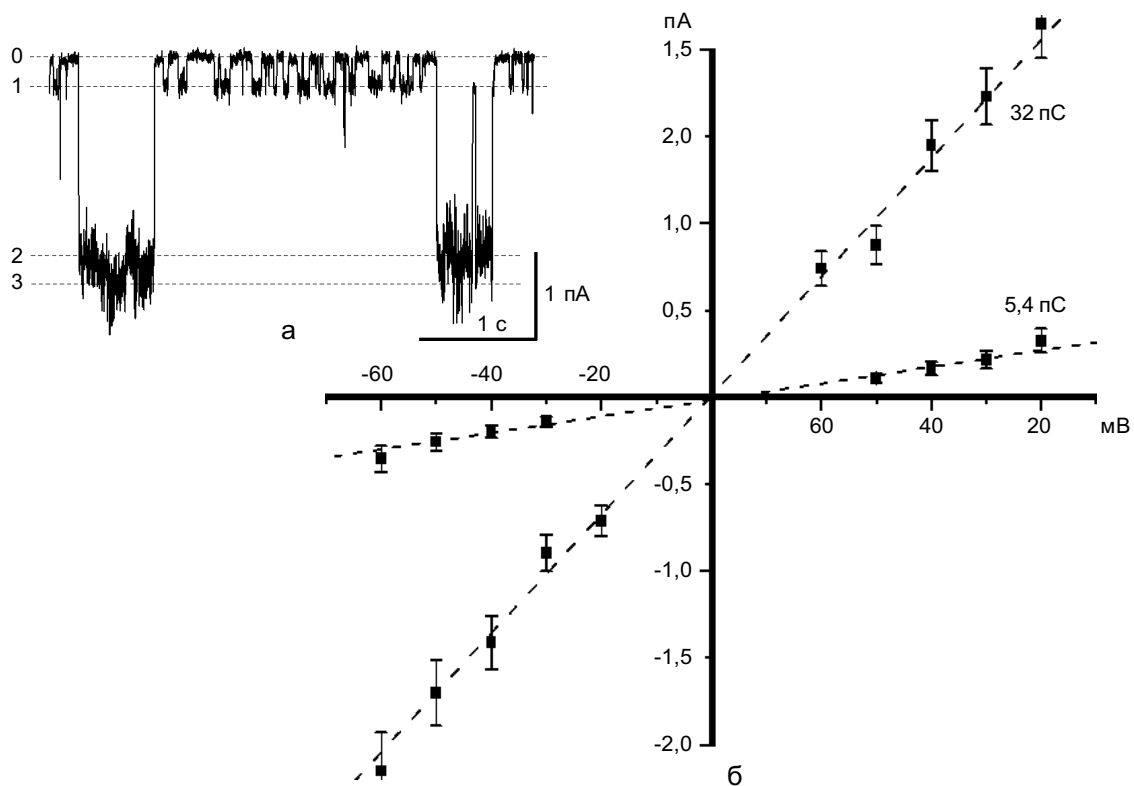
Поодинокі іонні канали реєстрували в ізольованих inside-out patches люмінальної мембрани ендотелію методом patch clamp. Реєструвальні піпетки заповнювали розчином, що містив (в ммоль/л): NaCl – 140, KCl – 10, HEPES – КОН – 10; рН 7,3. Зовнішній розчин складався з (в ммоль/л): KCl – 140, HEPES – NaOH – 10; рН 7,3. Експерименти проводили при 20 – 22°C.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

За відсутності Ca^{2+} у внутрішньоклітинному розчині в ізольованих мембранних patches люмінальної мембрани ендотеліальних клітин спостерігалися два типи іонних каналів (рисунок, а). Вольт-амперні характеристики обох каналів були лінійними в діапазоні -60 – +60 мВ (див. рисунок,

б). Провідності каналів становили $31,3 \pm 1,5$ і $5,4 \text{ пС} \pm 0,4 \text{ пС}$ ($n=6$). За умов, коли зовнішній бік мембрани омивався розчином, що містив Na^+ , а внутрішньоклітинний – розчином, що містив K^+ , потенціали реверсії обох каналів були близькими до 0 мВ (див. рисунок, б). Ці результати вказують на те, що вони є або неселективними катіонними каналами з однаковою провідністю для K^+ і Na^+ , або хлорними каналами.

Для з'ясування іонної селективності Cl^- і K^+ у розчині, що омиває внутрішню поверхню мембрани, заміщували еквімолярною кількістю більш великих іонів. Заміщення 100 ммоль/л Cl^- на аспартат не впливало ні на амплітуду поодиноких каналів, ні на їх потенціал реверсії. Разом з тим заміщення 100 ммоль/л K^+ на N-метил-D-глюкамін (NMDG) зсувало вольт-



Катіонні канали люмінальної мембрани інтактного ендотелію аорти щура:

а – механоактивовані і низькопровідні катіонні канали, зареєстровані в одному і тому ж мембранному patch; цифрами зліва позначено число відкритих каналів; підтримуючий потенціал – -60 мВ; б – вольт-амперні характеристики механоактивованого (32 пС) і низькопровідного (5,4 пС) катіонних каналів.

амперну характеристику більшого і меншого каналів вправо до $24,3 \pm 1,2$ і $23,4 \text{ мВ} \pm 1,7 \text{ мВ}$, відповідно ($n=3$). Це свідчить про те, що обидва зареєстровані нами канали є катіонними і мають однакову проникність для Na^+ і K^+ і низьку проникність для NMDG ($P_{\text{NMDG}}:P_{\text{Na}} < 0,1$).

Позитивний тиск збільшував, а негативний зменшував імовірність відкритого стану каналу з провідністю 31 пСм . Значення провідності та модуляція механічним стресом дозволяє ідентифікувати цей канал як механочутливий, раніше описаний нами в інтактному ендотелії аорти щура [8].

Малоселективний катіонний канал із провідністю $5,4 \text{ пСм}$ раніше не був описаний в ендотеліальних клітинах. Середній час життя катіонного каналу низької провідності $46 \text{ мс} \pm 16 \text{ мс}$ ($n=743$). Гістограма часу закритого стану каналу апроксимувалася двома експонентами зі сталими часу $4,8 \pm 1,2$ і $55,5 \text{ мс} \pm 13,5 \text{ мс}$ ($n=743$). Канал блокувався іонами гадолінію у високій концентрації (100 мкмоль/л).

Хоча як механочутливий, так і катіонний канал низької провідності зустрічалися в одних і тих же patches, мали подібну іонну селективність і блокувалися лантаноїдами у високій концентрації, вони не були підрівнями одного і того ж каналу. На користь цього свідчать наступні спостереження. По-перше, деякі patches містили тільки один із цих каналів. По-друге, якщо в patches були обидва канали то відбувалося випадкове накладання струмів через індивідуальні канали. Ніколи не спостерігалось безпосередніх переходів із відкритого стану одного каналу у відкритий стан іншого. Крім цього, канал низької провідності не був чутливим до механічної стимуляції.

Таким чином, у люмінальній мембрані інтактних ендотеліальних клітин аорти щура нами описано новий малоселективний катіонний канал низької провідності. Фі-

зіологічна роль цього каналу нині достовірно невідома. Відсутність селективних блокаторів цих каналів утруднює вивчення їх функціональної ролі. Однак, враховуючи властивості цих каналів і електрофізіологію ендотеліальних клітин, ми можемо висловити деякі припущення.

Численні ендотелійзалежні вазодилатори викликають *in situ* двофазну реакцію, що складається із початкової гіперполяризації, яка змінюється деполяризацією ендотеліальних клітин [1, 4, 5]. Відомо, що гіперполяризація ендотеліальних клітин пов'язана з активацією кальційактивованих калієвих каналів внаслідок підвищення внутрішньоклітинної концентрації Ca^{2+} [6, 10]. Механізми деполяризації ендотеліальних клітин не до кінця зрозумілі. Показано, що деполяризація частково пов'язана з каналами, що активуються циклічними нуклеотидами [2]. Оскільки блокада аденілатциклази лише зменшує, але не усуває деполяризаційну фазу реакції на агоністи, повинні існувати певні, поки що не ідентифіковані додаткові механізми. Відносно висока проникність катіонного каналу низької провідності для Na^+ дозволяє припустити, що цей канал також може брати участь у деполяризації ендотеліальних клітин під впливом агоністів.

Деполяризація зменшує надходження Ca^{2+} в ендотеліальні клітини та модулює в них кальційзалежні процеси і, зокрема, синтез NO [9, 10]. Крім цього, зміни мембранного потенціалу ендотеліальних клітин можуть передаватися через міоендотеліальні контакти в гладеньком'язові клітини судини, модулюючи в них потенціал-активовані кальцієві канали [3, 7]. Через ці два механізми катіонні канали низької провідності можуть брати участь у регуляції судинного тону судин. В обох випадках активація малоселективних катіонних каналів, описаних у цій роботі, буде сприяти вазоконструкції.

S. M. Marchenko

LOW-CONDUCTANCE CATIONIC CHANNELS IN INTACT ENDOTHELIUM OF RAT AORTA

A new low-conductance cationic channel has been recorded with the patch-clamp technique in excised patches of the luminal membrane of intact endothelial cells. The channel had conductance of 5.4 pS and the lifetime of 46 ms. It was equally permeable for Na⁺ and K⁺, but impermeable to Cl⁻. The lifetime and probability of the open state of the channel were independent of the membrane potential.

A. A. Bogomoletz Institute of Physiology

National Academy of Sciences of Ukraine, Kiev

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Яроцький В.В., Сагач В.Ф., Марченко С.М. Електричні властивості інтактного ендотелію аорти кроля // *Фізіол. журн.* – 2001. – **47**, № 1. – С. 9 – 16.
2. Яроцький В.В., Сагач В.Ф., Марченко С.М. Вплив циклічних нуклеотидів на мембранний потенціал інтактного ендотелію ізольованої аорти кроля // *Там само.* – 2001. – № 6. – С. 3 – 9.
3. Beny J.L., Pacicca C. Bidirectional electrical communication between smooth muscle, endothelial cells in the pig

coronary artery // *Amer. J. Physiol.* – 1994. – **266**. – P. H1465 – H1472.

4. Marchenko, S.M., Sage, S.O. Electrical properties of resting and acetylcholine-stimulated endothelium in intact rat aorta // *J. Physiol.* – 1993. – **462**. – P. 735 – 751.
5. 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.
6. Marchenko, S.M., Sage, S.O. Calcium-activated potassium channels in the endothelium of intact rat aorta // *J. Physiol.* – 1996. – **492**. – P. 53 – 60.
7. Marchenko, S.M., Sage, S.O. Smooth muscle cells affect endothelial membrane potential in rat aorta // *Amer. J. Physiol.* – 1994. – **267**. – P. H804 – H811.
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. Nilius B., Droogmans G. Ion channels and Their Functional Role in vascular endothelium // *Pysiol. Rev.* – 2001. – **81**, №4. – P. 1415 – 1459.
10. 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**. – P. 309 – 317.
11. Yamamoto Y., Imaeda K., Suzuki H. Endothelium-dependent hyperpolarization, intercellular electrical coupling in guinea-pig mesenteric arterioles // *J. Physiol.* – 1999. – **514**. – P. 505 – 513.

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

Матеріал надійшов до редакції 5.06.2002