

О.І. Бондаренко, В.Ф. Сагач

## Пригнічення ацетилхолініндукованої гіперполяризації ендотеліальних клітин аорти щурів під впливом сольової дієти та її відновлення при дії еналаприлу

*Исследовали возможные нарушения электрических ответов эндотелиальных клеток аорты крыс как один из механизмов угнетения эндотелийзависимого расслабления под влиянием солевой диеты (СД). Показано, что среднее значение мембранного потенциала эндотелиальных клеток аорты крыс, находящихся на СД ( $-40,6 \text{ мВ} \pm 2,3 \text{ мВ}$ ), существенно не отличалось от аналогичного показателя контрольной группы ( $-41,2 \text{ мВ} \pm 0,9 \text{ мВ}$ ), в то время как амплитуда ацетилхолининдуцированной гиперполяризации эндотелиальных клеток была значительно меньше ( $9,0 \text{ мВ} \pm 1,5 \text{ мВ}$ ) по сравнению с контролем ( $22,7 \text{ мВ} \pm 1,0 \text{ мВ}$ ). Назначение на фоне СД ингибитора ангиотензинпревращающего фермента эналаприла вело к увеличению амплитуды гиперполяризации ( $25,7 \text{ мВ} \pm 1,3 \text{ мВ}$ ) в ответ на действие ацетилхолина. Таким образом, СД угнетает гиперполяризацию эндотелиальных клеток аорты крыс при действии ацетилхолина, что может опосредовать уменьшение синтеза NO и эндотелийзависимого расслабления. Эналаприл предотвращает нарушения электрических ответов эндотелиальных клеток под влиянием СД.*

### ВСТУП

Як відомо дієта з підвищенням вмісту солі (NaCl) призводить до пригнічення ендотеліязалежного розслаблення судин у відповідь на дію вазоактивних речовин [20, 21, 25]. Подальші дослідження показали, що у щурів, які знаходилися на сольовій дієті (СД), спостерігалось пригнічення продукції NO при стимуляції холінергічних рецепторів ендотелію різних ділянок судинного русла, аорти включно [28, 34]. Ендотеліязалежні вазоактивні речовини і, зокрема, ацетилхолін, викликають гіперполяризацію ендотеліальних клітин (ЕК), яка стимулює надходження до них зовнішньоклітинного кальцію внаслідок підвищення електрохімічного градієнта. Збільшення концентрації внутрішньоклітинного кальцію в ЕК є визначальним моментом при стимуляції

продукції кальційзалежних вазодилаторних речовин. Однак питання щодо можливого порушення гіперполяризації ЕК у відповідь на дію вазоактивних речовин як один із механізмів пригнічення ендотеліязалежної релаксації та синтезу NO під впливом СД не з'ясовано. У попередніх дослідженнях нами було показано, що при станах, які супроводжуються ендотеліальною дисфункцією, а саме: при гіпертензії [1], діабеті [2], а також за умов старіння [3] спостерігаються порушення електричних реакцій інтактних ЕК у відповідь на введення ацетилхоліну. З іншого боку відомо, що антигіпертензивна терапія і, зокрема, інгібітори ангіотензинперетворювального ферменту (ІАФ), поліпшують функції ендотелію при станах, що супроводжуються її порушенням [7, 9, 18, 24, 29]. Тому першочерговою метою нашої роботи

© О.І. Бондаренко, В.Ф. Сагач

було дослідження можливих порушень електричних реакцій інтактного ендотелію шурів під впливом СД. Оскільки виявилось, що такі порушення дійсно спостерігаються, наступним завданням було дослідити можливість попередження зазначених порушень за допомогою ІАФ еналаприлу.

## МЕТОДИКА

Експерименти було проведено на щурах віком 4–6 міс. Тварини, які знаходилися упродовж 4 тиж перед початком електрофізіологічних експериментів, отримували з їжею 2 г/кг NaCl. Еналаприл призначали в дозі 25 мг/кг щодобово протягом усього терміну СД. Електрофізіологічні дослідження було проведено на ендотелії аорти шурів. Грудну частину аорти ізолювали, 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, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> – 1,2, CaCl<sub>2</sub> – 2,5, глюкоза – 10. Розчин аерували сумішшю 95% O<sub>2</sub> та 5% CO<sub>2</sub>. 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 ЕК реєстрували методом patch-clamp у режимі фіксації струму. Піпетки заповнювали таким розчином (ммоль/л): KCl – 140, NaCl – 10, EGTA – 0,5, NERES – 10. До розчину додавали нісатин (200 мкг/мл). Експерименти проводили при 22–24° С.

## РЕЗУЛЬТАТИ

У шурів контрольної групи мембранний потенціал спокою ЕК знаходився в межах від –29 до –53 мВ і середнє його значення становило –41,2 мВ ± 0,9 мВ (n=38). У групі шурів, яким призначалася СД, цей показник був у межах від –28 до –49 мВ, і середнє його значення (–40,6 мВ ± 2,3 мВ; n=10)

достовірно не відрізнялося від такого контрольної групи шурів (рис.1).

Суперфузія ацетилхоліном судинної смужки контрольної групи шурів викликала початкову швидку гіперполяризацію ЕК із середньою амплітудою 22,7 мВ ± 1,0 мВ (n=27), гіперполяризація сягала максимального рівня –63,6 мВ ± 1,1 мВ. Після цього спостерігалася фаза плато або значення мембранного потенціалу поступово зменшувались, наближалися до початкового рівня (рис.2 а, г).

В експериментальній групі шурів, яким призначалася СД, суперфузія смужки ацетилхоліном призводила до значно меншої гіперполяризації ЕК, амплітуда якої становила 9,0 мВ ± 1,5 мВ і сягала значень –53,7 мВ ± 2,6 мВ (n=6). Більше того, на відміну від контролю, гіперполяризація ЕК цієї групи шурів була транзйентною (див. рис.2 б).

У подальших експериментах досліджувався перебіг гіперполяризації ЕК у відповідь на ацетилхолін у групі шурів, яким разом із СД призначали еналаприл. Суперфузія ацетилхоліном судинної смужки цієї

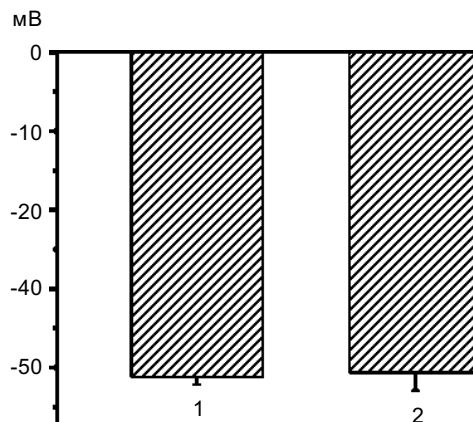


Рис.1. Вплив сольової дієти на мембранний потенціал нестимульованого ендотелію аорти шурів: 1 – контроль, 2 – дієта

групи щурів призводила до гіперполяризації ендотелію від  $-38,3 \pm 0,9$  до  $-64,2 \text{ мВ} \pm 1,6 \text{ мВ}$  із середньою амплітудою  $25,7 \text{ мВ} \pm 1,3 \text{ мВ}$  ( $n=6$ ) (див.рис. 2,в, г). Пролонгований характер гіперполяризації частково відновлювався. Тобто введення еналаприлу не призводило до суттєвих змін у мембранному потенціалі спокою ЕК, але попереджувало порушення гіперполяризації у відповідь на дію ацетилхоліну внаслідок СД.

## ОБГОВОРЕННЯ

Відомо, що дієта із підвищеним вмістом солі призводить до порушення ендотеліальної залежної релаксації у дослідних щурів без істотного підвищення артеріального тиску [11, 19, 28, 34]. Однак механізми, що лежать в основі цих спостережень, до кінця не з'ясовані. Так, повідомлялося, що такі

порушення функцій ендотелію можуть бути як наслідком пригнічення продукції NO [28, 34], так і результатом оксидативного стресу, викликаного підвищенням продукції супероксид-аніонів [20, 34], які, в свою чергу, реагують з NO, утворюючи пероксинітрит, і, таким чином, зменшують біологічну активність синтезованого NO. Тому доцільно було припустити, що пригнічення продукції NO за умов СД може пояснюватися зменшенням надходження субстратів для його синтезу. Оскільки надходження в ЕК кальцію та L-аргініну [32], які є необхідними для синтезу NO, а також продукція супероксид-аніона [22, 27] контролюються мембранним потенціалом, в даній роботі досліджено можливі зміни електричних реакцій інтактного ендотелію аорти щурів, що знаходилися на СД, у відповідь на дію ацетилхоліну.

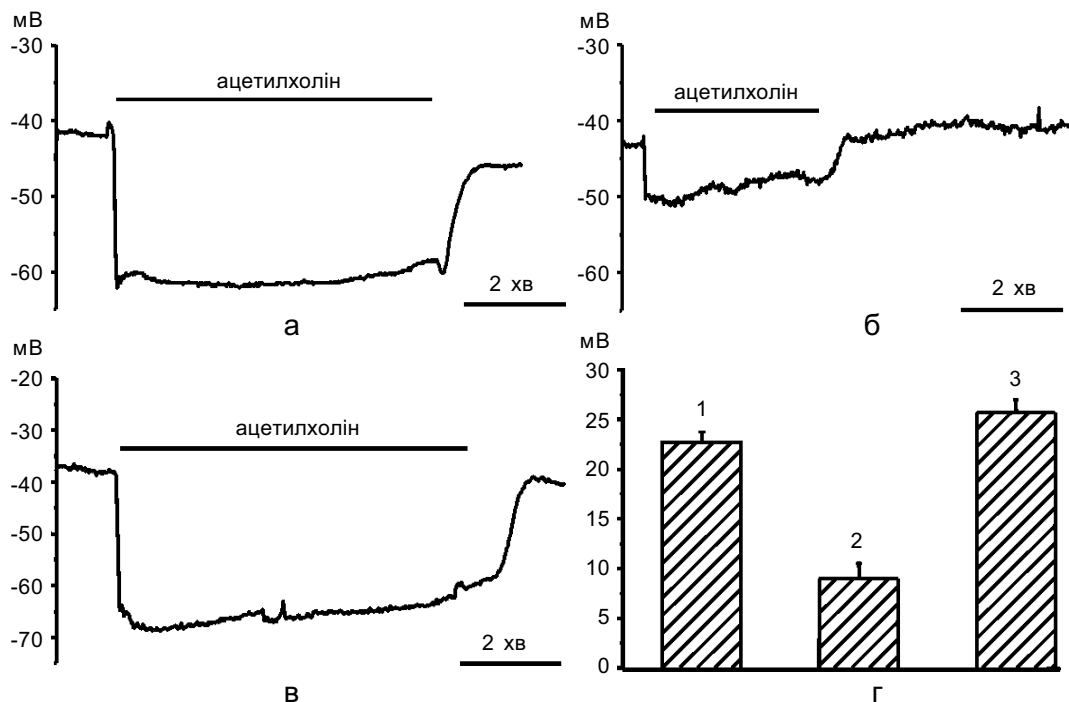


Рис.2. Пригнічення ацетилхолініндукованої гіперполяризації ендотеліальних клітин аорти щурів за умов сольової дієти (СД) та її відновлення під впливом еналаприлу: а – типова гіперполяризація контрольної групи щурів, б – пригнічення гіперполяризації внаслідок СД, в – відновлення гіперполяризації еналаприлом у групі щурів, які перебували на СД, г – статистична репрезентація змін амплітуди гіперполяризації ендотеліальних клітин у відповідь на ацетилхолін під впливом СД і СД на фоні еналаприлу: 1 – контроль, 2 – СД, 3 – СД і еналаприл

За результатами роботи можна зробити декілька висновків. По-перше, значення мембранного потенціалу нестимульованого ендотелію контрольної та «дослідної» груп щурів достовірно не відрізнялися, тобто нестимульоване надходження кальцію в ЕК, що контролюється мембранним потенціалом спокою, суттєво не змінюється внаслідок СД. Оскільки базальний рівень надходження кальцію в ЕК, як відомо, контролює базальне вивільнення NO, можна припустити, що за умов спокою цей показник не зменшується внаслідок СД.

По-друге, в нашій роботі вперше показано, що СД спричинює істотне пригнічення амплітуди та тривалості гіперполяризації ЕК у відповідь на ацетилхолін. Оскільки пролонгована гіперполяризація віддзеркалює надходження зовнішньоклітинного кальцію в ендотелій, транзйентний її характер та зменшення амплітуди у щурів, що знаходилися на СД, свідчить про пригнічення надходження іонів кальцію в ЕК під час їх стимуляції ацетилхоліном. Відомо, що початкова фаза гіперполяризації є результатом стимуляції кальційзалежних калієвих каналів внаслідок вивільнення внутрішньоклітинного кальцію з інозитолтрифосфатчутливих депо. Оскільки експресія  $M_3$ -холінорецепторів не змінюється під впливом СД [28], зменшення амплітуди гіперполяризації ЕК у відповідь на дію ацетилхоліну може свідчити як про порушення передачі сигналізації із холінорецепторів до G-протеїну, що призводить до пригнічення вивільнення кальцію із внутрішньоклітинних депо, так і про порушення активності кальційзалежних калієвих каналів плазматичної мембрани ЕК. Таким чином, порушення електричної сигналізації ЕК внаслідок СД можуть зумовлювати описане раніше пригнічення ендотелійзалежної релаксації та продукції NO ЕК церебральних артерій та аорти щурів, що знаходилися на такій дієті [28, 34]. Представлені дані суттєво розширюють сучасні уявлення

щодо механізмів пригнічення ендотелійзалежної релаксації під впливом СД і доводять, що серед цих механізмів спостерігаються не тільки зафіксоване іншими дослідниками збільшення продукції супероксид-аніона NO-синтазою [19, 34], котре призводить до зв'язування вільного NO, але й нездатність ЕК генерувати типовий перебіг гіперполяризації у відповідь на дію ацетилхоліну. Результати роботи збігаються з даними, отриманими раніше на гладеньком'язових клітинах артерій скелетних м'язів щурів [11], де було показано, що мембранний потенціал спокою не змінюється під впливом СД, в той час як амплітуда гіперполяризації у відповідь на вазодилататорні стимули суттєво пригнічується.

По-третє, в роботі продемонстровано, що ІАФ еналаприл, призначений *in vivo*, відновлював амплітуду та пролонгований характер ацетилхолініндукованої гіперполяризації ЕК аорти щурів, що знаходилися на СД. ІАФ, як відомо, широко застосовуються для лікування не тільки гіпертензії, а й інших серцево-судинних захворювань [8]. Літературні дані свідчать, що вони покращують ендотелійзалежне розслаблення судинних гладеньких м'язів у щурів із різними типами гіпертензії [9, 25], при експериментальному діабеті [4], атеросклерозі [10], а також за умов старіння [23]. Таке поліпшення супроводжується підвищенням продукції NO [17]. Більше того, повідомлялося, що ІАФ еналаприл [6] і раміприл [5] підсилюють ендотелійзалежне розслаблення аорти навіть у здорових щурів. Відомо, що ендотелійзалежна гіперполяризація є пригніченою при різних формах гіпертензії [12, 30], у щурів із експериментальним діабетом [14], а також у старих щурів з нормальним артеріальним тиском. [13]. Поліпшення ендотелійзалежного розслаблення судин у щурів зі спонтанним підвищенням артеріального тиску та у старих щурів після терапії ІАФ супроводжується відновленням ендотелійзалежної

гіперполяризації судинних гладеньких м'язів [15, 16, 24]. Але питання щодо можливої нормалізації електричних відповідей ЕК під впливом ІАФ залишалося нез'ясованим.

Хоча в роботі показано, що після терапії еналаприлом амплітуда гіперполяризації ЕК аорти щурів, які знаходилися на СД, у відповідь на дію ацетилхоліну збільшується, механізми дії ІАФ не є повністю зрозумілими. Так, повідомлялося, що ІАФ і еналаприл, зокрема, можуть виступати як антиоксиданти [31], а також пригнічувати надходження кальцію в судинні гладенькі м'язи [33]. З іншого боку відомо, що під впливом терапії інгібіторами ангіотензинових рецепторів, а також ангіотензинперетворювального ферменту пригнічені калієві струми міоцитів щурів із стрептозотоциніндукованим діабетом збільшуються [26]. Виявлення механізмів, що опосередковують пригнічення гіперполяризації ЕК у відповідь на дію ацетилхоліну під впливом СД і відтворення гіперполяризації внаслідок терапії ІАФ потребує подальших досліджень.

**A.I. Bondarenko, V.F. Sagach**

**ATTENUATION OF ACETYLCHOLINE-INDUCED  
HYPERPOLARIZATION OF AORTIC  
ENDOTHELIAL CELLS IN RATS FED  
BY HIGH-SALT DIET AND EFFECT OF ENALAPRIL**

High-salt diet is known to result in attenuation of endothelium-dependent relaxation in rat aorta. We investigated the possible alterations in electrical responses of rat aortic endothelial cells to acetylcholine as one of the eventual mechanisms that lead to inhibition of endothelium-dependent relaxation induced by high-salt diet. It was shown that endothelial resting membrane potential in rats fed by high-salt diet did not differ significantly from that observed in the control group ( $-40,6 \pm 2,3$  mV and  $-41,2 \pm 0,9$  mV, respectively). The amplitude of acetylcholine-induced hyperpolarization of endothelial cells in rats fed by high-salt diet was significantly attenuated ( $9,0 \pm 1,5$  mV vs  $22,7 \pm 1,3$  mV in the control group). The amplitude of hyperpolarization increased to  $25,7 \pm 1,3$  mV when high-salt diet was administered with enalapril, the angiotensin-converting enzyme inhibitor. We conclude that high-salt diet leads to attenuation of hyperpolarization of rat aortic endothelial cells in response to acetylcholine, that may mediate inhibition of NO synthesis and endothelium-dependent relaxation. Angiotensin-converting enzyme inhibitor enalapril prevents the observed

alterations in endothelial electrical responses induced by high-salt diet.

*O. O. Bogomolets Institute of Physiology National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv*

**СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ**

1. Бондаренко О.І., Сагач В.Ф. Електричні реакції ендотелію аорти щурів із спонтанною гіпертензією // *Фізіол. журн.* – 2002. – **48**, №4. – С. 75–79.
2. Бондаренко О.І., Присяжна О.Д., Сагач В.Ф. Електричні реакції інтактного ендотелію аорти щурів при експериментальному діабеті // *Там само.* – 2004. – **50**, №6. – С. 3–9.
3. Яроцкий В.В., Ткаченко М.Н., Сагач В.Ф. Электрические реакции эндотелия аорты крыс при действии ацетилхолина и АТФ в условиях старения // *Бюл. эксперим. биологии и медицины.* – 2003. – **135**, №3. – С. 257–260.
4. Baluchnejadmojarad T., Roghani M., Imani A. Protective effect of enalapril on vascular reactivity of the rat aorta // *Vasc. Pharmacol.* – 2004. – **40**. – P.301–307.
5. Berkenboom G., Brekine D., Unger P. et al. Chronic angiotensin-converting enzyme inhibition and endothelial function in rat aorta // *Hypertension.* – 1995. – №26. – P.738–743.
6. Bossaller C., Auch-Schwelk W., Weber F. et al. Endothelium-dependent relaxations are augmented in rats chronically treated with the angiotensin – converting enzyme inhibitor enalapril // *J. Cardiovasc. Pharmacol.* – 1992. – **20** (suppl. 9). – S91–95.
7. Clozel M., Kuhn H., Hefti F. Effects of angiotensin converting enzyme inhibitors and of hydralazine on endothelial function in hypertensive rats // *Hypertension.* – 1990. – **16**. – P.532–540.
8. Creager M.A., Roddy M.A. Effect of captopril and enalapril on endothelial function in hypertensive patients // *Ibid.* – 1994. – **24**. – P.499–505.
9. Dohi Y., Criscione L., Pfeiffer K., Lyscher T.F. Angiotensin blockade or calcium antagonists improve endothelial dysfunction in hypertension: studies in perfused mesenteric resistance arteries // *J. Cardiovasc. Pharmacol.* – 1994. – **24**. – P.372–379.
10. Ferrario C.M., Richmond R.S., Smith R. et al. Renin-angiotensin system as a therapeutic target in managing atherosclerosis // *Amer. J. Therap.* – 2004. – **11**(1). – P.44–53.
11. Frisbee J.C., Sylvester F.A., Lombard J.H. High-salt diet impairs hypoxia-induced cAMP production and hyperpolarization in rat skeletal muscle arteries // *Ibid.* – 2001. – **281**(4). – H1808–1815.
12. Fujii K., Tominaga M., Ohmori S. et al. Decreased endothelium-dependent hyperpolarization to acetylcholine in smooth muscle of the mesenteric artery of spontaneously-hypertensive rats // *Circulat. Res.* – 1992. – **70**. – P.660–669.

13. Fujii K., Ohmori S, Tominaga M. et al. Age-related changes in endothelium-dependent hyperpolarization in the rat mesenteric artery // *Amer. J. Physiol.* – 1993. – **265**. – H509–516.
14. 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.
15. Goto K., Fujii K., Onaka U., Abe I., Fujishima M. Renin-angiotensin system blockade improves endothelial dysfunction in hypertension // *Hypertension.* – 2000. – **36**(4). – P.575–580.
16. Goto K., Fujii K., Onaka U. et al. Angiotensin-converting enzyme inhibitor prevents age-related endothelium dysfunction // *Ibid.* – 2000. – **36**. – P.581–587.
17. Hatta T., Nakata T., Harada S. et al. Lowering of blood pressure improves endothelial dysfunction by increase of nitric oxide production in hypertensive rats // *Hypertens. Res.* – 2002. – **25**. – P.455–460.
18. Hayakawa H., Coffee K., Raij L. Endothelial Dysfunction and Cardiorenal Injury in Experimental Salt-Sensitive Hypertension. Effects of Antihypertensive Therapy // *Circulation.* – 1997. – **96**. – P.2407–2413.
19. Lenda D.M., Boegehold M.A. Effect of a high salt diet on oxidant enzyme activity in skeletal muscle microcirculation // *Amer. J. Physiol.* – 2002. – **282**. – H395–H402.
20. Lenda D.M., Sauls B.A., Boegehold M.A. Reactive oxygen species may contribute to reduced endothelium-dependent dilation in rats fed high salt // *Ibid.* – 2000. – **279**. – H7–14.
21. Lombard J.H., Sylvester F.A., Phillips S.A., Frisbee J.C. High-salt diet impairs vascular relaxation mechanisms in rats middle cerebral arteries // *Ibid.* – 2003. – **284**. – H1124–1133.
22. McCarty M.F. Endothelial membrane potential regulates production of both nitric oxide and superoxide—a fundamental determinant of vascular health // *Med. Hypotheses* – 1999. – **53**(4). – P.277–289.
23. Mukai Y., Shimokawa H., Higashi M. et al. Inhibition of renin-angiotensin system ameliorates endothelial dysfunction associated with aging in rats // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* – 2002. – **22**(9). – P.1445–1450.
24. Onaka U., Fujii K., Abe I., Fujishima M. Antihypertensive treatment improves endothelium-dependent hyperpolarization in the mesenteric artery of spontaneously hypertensive rats // *Circulation.* – 1998. – **98**. – P.175–182.
25. Quaschnig T., d'Uscio L.V., Shaw S., Luscher T.F. Vasopeptidase inhibition exhibits endothelial protection in salt-induced hypertension // *Hypertension.* – 2001. – **34**. – P.943–1113.
26. Shimoni Y. Inhibition of the formation or action of angiotensin II reverses attenuated K<sup>+</sup> currents in type 1 and type 2 diabetes // *J. Physiol.* – 2001. – **537**, №.1. – P. 83–92.
27. Sohn H.-Y., Keller M., Gloe T. et al. The small G-protein Rac mediates depolarization-induced superoxide formation in human endothelial cells // *J. Biol. Chem.* – 2000. – **275**. – P.18745–18750.
28. Sylvester F.A., Stepp D.W., Frisbee J.C., Lombard J.H. High salt diet depresses acetylcholine reactivity proximal to NOS activation in cerebral arteries // *Amer. J. Physiol.* – 2002. – **283**. – H353–363.
29. Takase H., Moreau P., Kӧng C.F. et al. Antihypertensive therapy prevents endothelial dysfunction in chronic nitric oxide deficiency: effect of verapamil and trandolapril // *Hypertension* – 1996. – **27**. – P.25–31.
30. Van de Voorde J., Vanheel B., Leusen I. Endothelium-dependent relaxation and hyperpolarization in aorta from control and renal hypertensive rats // *Circulat. Res.* 1992. – **70**(1). – P.1–8.
31. Wojakowski W., Gminski J., Siemianowicz K. et al. The influence of angiotensin converting enzyme inhibitors on lipid peroxidation in sera and aorta of rabbits in diet-induced hypercholesterolemia // *Int. J. Mol. Med.* – 2000. – **6**. – P. 591–594.
32. 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**. – L78–84.
33. Zhu Z., Tepel M., Neusser M. et al. Effect of captopril on vasoconstriction and Ca<sup>2+</sup> fluxes in aortic smooth muscle // *Hypertension.* – 1993. – **22**(6). – P.806–811.
34. Zhu J., Mori T., Tianjian H., Lombard J.H. Effect of high salt diet on NO release and superoxide production in rat aorta // *Amer. J. Physiol.* – 2004. – **286**. – H575–583.