

О.І. Бондаренко, В.Ф. Сагач

Участь мітохондрій у гіперполяризації ендотеліальних клітин при дії ацетилхоліну

Исследована роль агентов, деполяризующих митохондрии, в модуляции гиперполяризации эндотелиальных клеток аорты крысы, индуцированной ацетилхолином. В качестве агентов использованы протонофор СССР и ингибитор комплекса I электронно-транспортной цепи ротенон. Показано, что оба агента существенно угнетают пролонгированную гиперполяризацию в ответ на действия ацетилхолина, в то время как пероксид водорода гиперполяризовал мембрану эндотелиальных клеток. Сделан вывод, что транспорт кальция в митохондрии играет важную роль в модуляции электрических реакций на ацетилхолин эндотелиальных клеток. Угнетение пролонгированной гиперполяризации при действии ацетилхолина в присутствии СССР и ротенона не связано с увеличением продукции свободных радикалов митохондриями.

ВСТУП

Відомо що кальцій надходить у незбудливі клітини головним чином через депокеровані канали так званій ємнісний кальцієвий). Цей процес пригнічується під час значного підвищення концентрації субплазмалемального кальцію [10, 11], тому підтримання депокерованого надходження кальцію у клітини передбачає механізм регуляції вмісту субплазмалемального кальцію, який запобігав би кальційзалежній інактивації цих каналів. Так, на підтримку цього припущення кількома лабораторіями за допомогою флуоресцентних зондів було показано, що деполяризація мітохондрій протонофорами призвела до пригнічення депокерованого надходження кальцію у незбудливі клітини [10, 13]. Це дало змогу припустити, що мітохондрії здійснюють контроль за станом депокерованих каналів за допомогою активації кальцієвого уніпортеру.

З іншого боку, надходження кальцію в ендотелій при дії ацетилхоліну супровод-

жується пролонгованою гіперполяризацією, яка значно підсилює його надходження у клітини внаслідок підвищення електрохімічного градієнта [7, 14]. Пролонгована гіперполяризація ендотеліальних клітин аорти щурів при дії ацетилхоліну віддзеркалює надходження кальцію через депокеровані канали [6], Na^+ - Ca^{2+} -обмінник [6], а також є результатом стимуляції натрієвої помпи [3]. Роль флуктуацій мембранного потенціалу в регуляції депокерованого надходження кальцію продемонстрована в експериментах, проведених у розчині з високою концентрацією калію та за умов деполяризації клітин patch-піпеткою. За таких умов надходження кальцію в ендотелій суттєво пригнічується [14]. Проте питання щодо ролі мітохондрій у регуляції електричних відповідей ендотеліальних клітин не є достатньо вивченим. Враховуючи вищенаведене, мета нашої роботи полягала в дослідженні впливу агентів, що викликають деполяризацію мітохондрій – протонофора СССР та інгібітора комплексу

© О.І. Бондаренко, В.Ф. Сагач

І електронно-транспортного ланцюга ротеону, на індуковану ацетилхоліном гіперполяризацію ендотеліальних клітин, а також виявлення ролі вільних радикалів у можливному ефекті агентів, що деполяризують мітохондрії, на викликану ацетилхоліном мембранну гіперполяризацію ендотеліальних клітин аорти щурів.

МЕТОДИКА

Дослідження були проведені на інтактному ендотелії аорти щурів віком 3–5 міс. Грудну частину аорти ізолювали, 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, глюкоза – 10. Розчин аерували сумішшю 95% O₂ та 5% CO₂. 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 ендотелію реєстрували методом перфорованого patch-clamp

у режимі фіксації струму. Піпетки заповнювали таким розчином (ммоль/л): KCl – 140, NaCl – 10, HEPES – 10. До розчину додавали ністатин (200 мкг/мл). Експерименти проводили при 23–25° С.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Середнє значення мембранного потенціалу ендотеліальних клітин аорти щурів було $-44,1 \text{ мВ} \pm 1,4 \text{ мВ}$. Ацетилхолін (2 мкмоль/л) гіперполяризував ендотеліальні клітини до $-64,8 \text{ мВ} \pm 1,4 \text{ мВ}$ ($n=32$). Гіперполяризація мала пролонгований характер при наявності Ca²⁺ (рис. 1,а). Ацетилхолін у безкальцієвому розчині викликав транзйентну гіперполяризацію, подальше додавання Ca²⁺ призводило до повторної пролонгованої гіперполяризації ($n=5$; див. рис. 1,б).

Блокатор кальційзалежних калієвих каналів тетраетиламоній (10 ммоль/л) пригнічував гіперполяризацію ендотеліальних клітин у відповідь на дію ацетилхоліну з $21,4 \pm 2,0$ до $4,1 \text{ мВ} \pm 2,2 \text{ мВ}$ ($n=10$; рис. 2). Ці результати підтверджують, що пролон-

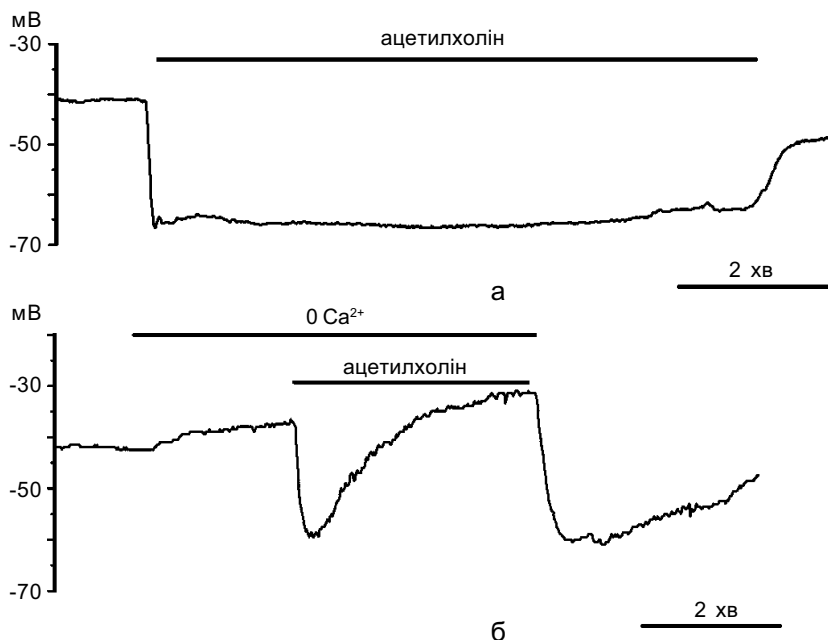


Рис. 1. Залежність пролонгованої фази ацетилхолініндукованої гіперполяризації від надходження зовнішньоклітинного кальцію в ендотеліальні клітини: а – контроль, б – після вилучання зовнішньоклітинного кальцію. Подальше додавання кальцію у розчин призводить до повторної гіперполяризації при відсутності ацетилхоліну

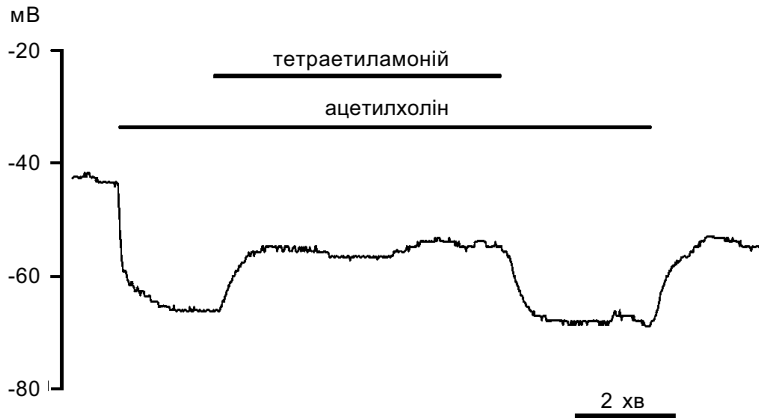


Рис. 2. Пригнічення пролонгованої гіперполяризації ендотеліальних клітин за допомогою блокатора кальційзалежних калієвих каналів тетраетиламонію (10 ммоль/л)

гована гіперполяризація ендотелію під час дії ацетилхоліну віддзеркалює надходження кальцію ззовні та значною мірою забезпечується активністю кальційзалежних калієвих каналів.

Для дослідження можливої ролі мітохондрій у підтриманні пролонгованої гіперполяризації ендотеліальних клітин у першій серії експериментів досліджували вплив протонатора СССР на індуковану ацетил-

холіном гіперполяризацію ендотеліальних клітин. Додавання у суперфузуючий розчин під час фази плато гіперполяризації СССР (2 мкмоль/л) призводило до її пригнічення з $23,2 \pm 2,8$ до $11,3 \text{ мВ} \pm 2,1 \text{ мВ}$ ($n=5$; рис. 3,а).

При додаванні у суперфузуючий розчин ротенону (10 мкмоль/л), інгібітора комплексу I електронно-транспортного ланцюга, який деполяризує мітохондрії за допомогою накопичення в них протонів, пролон-

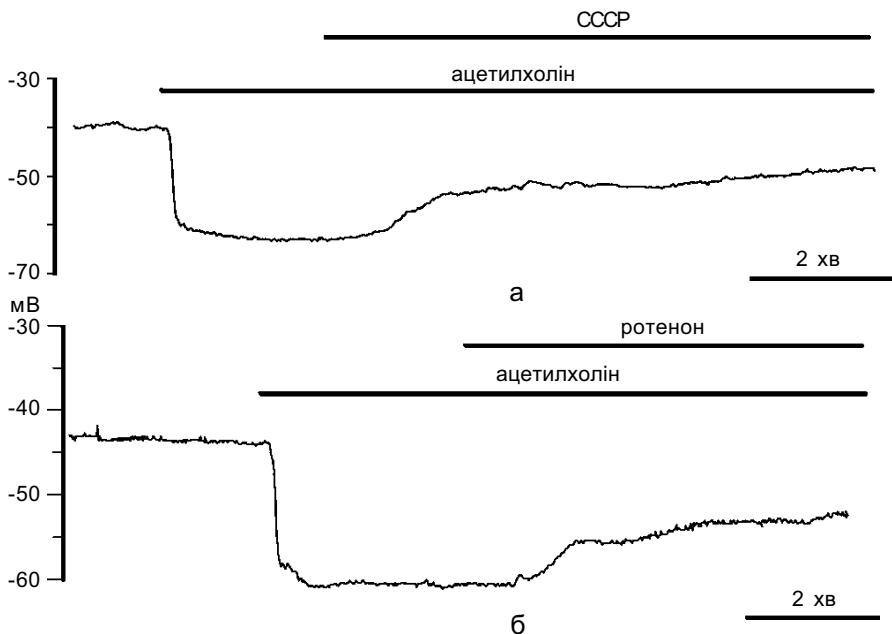


Рис. 3. Вплив агентів, що пригнічують здатність мітохондрій захоплювати кальцій, на ацетилхолініндуковану гіперполяризацію ендотелію: а – протонатор СССР (2 мкмоль/л); б – ротенон (10 мкмоль/л) – інгібітор комплексу I електронно-транспортного ланцюга

гована гіперполяризація у відповідь на дію ацетилхоліну також пригнічувалася (з $21,7 \pm 1,3$ до $14,6 \text{ мВ} \pm 1,9 \text{ мВ}$ ($n=4$; рис. 3,б). Ці експерименти свідчать про те, що деполяризація мітохондрій за допомогою різних за хімічною структурою та механізмом дії агентів спричинює пригнічення пролонгованої гіперполяризації ендотеліальних клітин у відповідь на дію ацетилхоліну.

Деполяризація мітохондрій, як відомо, призводить не тільки до пригнічення активності кальцієвого уніпортеру, але й до підвищення продукції вільних радикалів. Щоб виявити, чи пригнічує деполяризація мітохондрій кальційзалежні калієві канали в ендотеліальних клітинах через підвищення продукції вільних радикалів, у наступних експериментах досліджували вплив пероксиду водню (H_2O_2) на мембранний потенціал ендотеліальних клітин. Додавання у суперфузуючий розчин H_2O_2 (200 мкмоль/л) призводило до гіперполяризації ендотеліальних клітин з амплітудою $14,2 \text{ мВ} \pm 5,4 \text{ мВ}$ ($n=5$). Подальше додавання ацетилхоліну після завершення H_2O_2 -індукованої гіперполяризації викликало депресію гіперполяризувальної відповіді на вплив ацетилхоліну до $5,3 \text{ мВ} \pm 1,4 \text{ мВ}$ (рис.4). Ці експерименти свідчать про те, що 1) електричні реакції у відповідь на дію ацетилхоліну та пероксид водню реалізуються через спільний механізм, а саме

завдяки стимуляції кальційзалежних калієвих каналів; 2) пригнічення ендотеліальної гіперполяризації за допомогою протонофора СССР і ротенону не реалізується завдяки стимуляції продукції вільних радикалів.

Результати нашого дослідження продемонстрували, що протонофор СССР і ротенон, – агенти, котрі викликають деполяризацію мітохондрій [5, 8], пригнічують пролонговану гіперполяризацію ендотеліальних клітин аорти щурів у відповідь на дію ацетилхоліну. Оскільки пролонгована гіперполяризація значною мірою забезпечується активністю кальційзалежних калієвих каналів, яка контролюється субплазмолемальним кальцієм [12], наші результати вказують на активну роль мітохондрій у регуляції субплазмолемального кальцію ендотеліальних клітин аорти щурів. Флуктуації мембранного потенціалу ендотелію, як відомо, тісно пов'язані з надходженням у клітини кальцію завдяки змінам електрохімічного градієнта для іонів кальцію. Тому результати нашої роботи свідчать про регуляторну роль мітохондрій не тільки в регуляції депокерованого надходження кальцію в ендотелій, але й у регуляції надходження кальцію в ендотелій за електрохімічним градієнтом через неселективні канали витоку. Хоча з'ясування остаточних механізмів такої регуляції потребує подальших досліджень, події можуть

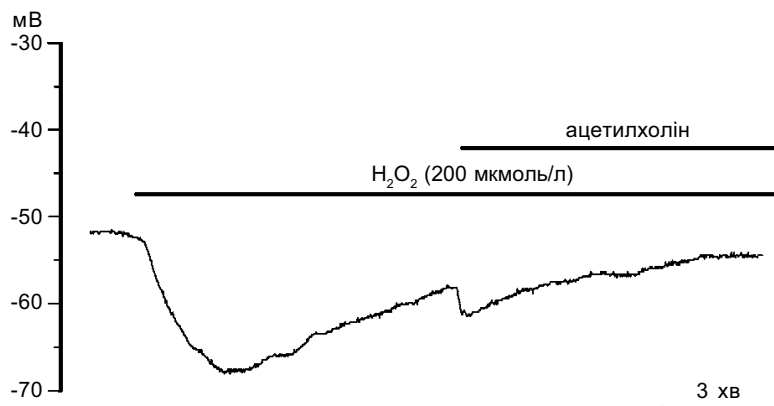


Рис. 4. Вплив пероксиду водню (200 мкмоль/л) на мембранний потенціал та ацетилхолініндуковану гіперполяризацію ендотеліальних клітин

розвиватися у двох напрямках. За першим, участь мітохондрій може полягати в активному захопленні кальцію, який надходить в ендотелій через депокеровані канали та Na^+ - Ca^{2+} -обмінник, що призводить до запобігання кальційзалежної інактивації цих каналів і пролонгації таким чином депокерованого надходження кальцію в ендотелій [10, 11, 13]. Також можливим є механізм, коли під час глобального підвищення концентрації внутрішньоклітинного кальцію мітохондрії захоплюють його з цитозолу та вивільнюють у субплазмолемальний простір, стимулюючи локальне підвищення концентрації кальцію і кальційзалежні калієві канали. Таким чином, два можливих різнонаправлених процеси з боку мітохондрій (депонування та вивільнення кальцію у субплазмолемальному просторі) можуть пояснювати ефект пролонгації ендотеліальної гіперполяризації у відповідь на дію ацетилхоліну.

Як відомо, ціла низка серцево-судинних захворювань, а також старіння пов'язані з порушенням функції мітохондрій [9]. Наші попередні дослідження показали, що порушення електричної сигналізації ендотелію супроводжують гіпертензію, експериментальний діабет, а також старіння [1, 2, 4]. Тому не виключено, що в основі цих спостережень можуть бути порушення здатності мітохондрій захоплювати кальцій внаслідок деполізації ендотеліальних клітин.

Таким чином, у роботі вперше показано, що пролонгована гіперполяризація ендотеліальних клітин у відповідь на дію ацетилхоліну залежить від функціонального стану мітохондрій. Отримані результати вказують на те, що транспорт кальцію в мітохондрії відіграє важливу роль у модуляції електричних реакцій ендотеліальних клітин.

A.I. Bondarenko, V.F. Sagach

ROLE OF MITOCHONDRIA IN REGULATION OF ENDOTHELIAL HYPERPOLARIZATION TO ACETYLCHOLINE

We investigated the regulation of sustained endothelial hyper-

polarization to acetylcholine in the rat aortic endothelial cells by mitochondria. Protonofore CCCP and rotenone, an electron transport chain complex I inhibitor, agents that cause mitochondria depolarization, inhibited the sustained hyperpolarization of endothelial cells. This effect was unlikely to be mediated by the free radicals since hydrogen peroxide was shown to hyperpolarize endothelial cells. It is concluded that mitochondrial Ca^{2+} uptake is essential in prolongation of endothelial hyperpolarization to acetylcholine.

O.O. Bogomoletz 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. 3–8.
3. Бондаренко О.І., Сагач В.Ф. Роль Na^+ - K^+ -АТФази в електрогенезі ендотеліальних клітин аорти // *Там само.* – 2006. – **52**, №3. – С. 34–41.
4. 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.
5. Bernardi P. Mitochondrial transport of cations: channels, exchangers and permeability transition // *Physiol. Rev.* – 1999. – **79**. – P.1127–1155.
6. Bondarenko A. Sodium-calcium exchanger contributes to membrane hyperpolarization of intact endothelial cells from rat aorta during acetylcholine stimulation // *Brit. J. Pharmacol.* – 2004. – **143**. – P.9–18.
7. Busse R., Fichter H., Luckhoff A., Kohlhardt M. Hyperpolarization and increased free calcium in acetylcholine-stimulated endothelial cells // *Amer. J. Physiol.* – 1988. – **255**. – H965–H969.
8. Cheranov S.Y., Jaggar J.H. Mitochondrial modulation of Ca^{2+} sparks and transient KCa currents in smooth muscle cells of rat cerebral arteries // *J. Physiol.* – 2004. – **556**. – P.755–771.
9. Csizsar A., Labinsky N., Orosz Z., Ungvari Z. Altered mitochondrial energy metabolism may play a role in vascular aging // *Med. Hypotheses.* – 2006. Jun 2.
10. Gilibert J.A., Parekh A.B. Respiring mitochondria determine the pattern of activation and inactivation of the store-operated Ca^{2+} current $\text{I}(\text{CRAC})$ // *EMBO J.* – 2000. – **19**. – P.6401–6407.
11. Gilibert J.A., Bakowski D., Parekh A.B. Energized mitochondria increase the dynamic range over which inositol 1,4,5-trisphosphate activates store-operated calcium influx // *Ibid.* – 2001. – **20**. – P.2672–2679.
12. Frieden M., Malli R., Samardzija M. et al. Subplasma

- malemmal endoplasmic reticulum controls K(Ca) channel activity upon stimulation with a moderate histamine concentration in a human umbilical vein endothelial cell line // J. Physiol. – 2002. – **540**. – P.73–84.
13. Hoth M., Button D.C., Lewis R.S. Mitochondrial control of calcium-channel gating: a mechanism for sustained signaling and transcriptional activation in T lymphocytes // Proc.Natl.Acad.Sci.USA. – 2000. – **97**. – P.10607–10612.
14. Nilius B., Droogmans G. Ion channels and their functional role in vascular endothelium // Physiol. Rev. – 2001. – **81**. – P. 415–459.

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

*Матеріал надійшов до
редакції 30.06.2006*