

Електричні реакції ендотеліальних клітин *in situ* при дії АТФ

В экспериментах с использованием метода *patch-clamp* были исследованы изменения мембранного потенциала (МП) эндотелиальных клеток (ЭК) *in situ* аорты морской свинки при действии АТФ. Показано, что внеклеточный АТФ вызывает комплексные изменения МП ЭК: начальную кратковременную деполяризацию с последующей более длительной гиперполяризацией. В условиях хелатирования внеклеточного кальция, а также в присутствии внеклеточного никеля, длительность гиперполяризации при добавлении в раствор АТФ уменьшалась. При хелатировании внутриклеточного кальция АТФ вызывал деполяризацию ЭК, которая не наблюдалась в отсутствие внеклеточного натрия. Гиперполяризацию при добавлении в раствор АТФ не отмечали также после опустошения внутриклеточных кальциевых депо. Сделан вывод, что гиперполяризация в ответ на АТФ инициируется высвобождением кальция из внутриклеточных депо и активацией кальцийзависимых калиевых каналов, пролонгированная фаза гиперполяризации обеспечивается поступлением внеклеточного кальция в ЭК, а начальная деполяризация - поступлением внеклеточного натрия в ЭК.

Вступ

Як відомо, зовнішньоклітинний АТФ викликає істотно функціональні зміни у більшості типів клітин, що є наслідком взаємодії цього сполучення з Р₂-пуринорецепторами. У судинній системі АТФ спричиняє як вазоконстрикторні, так і вазодилаторні реакції судин різних типів. Констрикторні ефекти АТФ пов'язані з безпосередньою стимуляцією пуринорецепторів судинних гладеньких м'язів [1, 2]. АТФ-залежна дилатація судин, головним чином, пов'язана зі стимуляцією Р₂-пуринорецепторів судинних ендотеліальних клітин [7, 13]. Одним із джерел АТФ у судинній системі є тромбоцити та еритроцити, які здатні вивільнювати АТФ і АДФ [4]. АТФ разом із серотоніном знаходиться в гранулах тромбоцитів й виділяється під час їх агрегації. Це дозволяє припустити, що значний вміст АТФ може накопичуватися локально в місцях формування тромбів і запалень. Підраховано, що під час дегрануляції $3 \cdot 10^8$ тромбоцитів, які містяться у 1 мл крові, концентрація АТФ/АДФ у плазмі збільшується до 50 мкмоль/л [10]. Ендотелій також є джерелом АТФ, що було доведено за допомогою імуноцитохімічного забарвлення у комбінації з електронною мікроскопією [5]. У судинній системі АТФ може також звільнятися як котрансмітер з периваскулярних нервів. АТФ, що вивільнюється з периваскулярних нервів, викликає скорочення судинних гладеньких м'язів

внаслідок стимуляції їх вивільнюється інтраклітинні ендотеліальних клітин (ЕК) чутливих внутрішньоклітинний подальший синтез і вив [3] та оксиду азоту [6]

Надходження іонів каліємними мембранного пророхімічний градієнт для культивування відбувається акцій ЕК [8]. Однак відповідей ЕК проводили клітинах. Тому, метою ЕК під впливом зовнішніх

Методика

Експерименти проводили на аорту занурювали у модифікований розчин К довжиною 3-4 мм. Перед фіксували в експеримент перфузували розчином К

МП відводили від інтра *patch-clamp* у режимі фік тозодем забезпечували з концентрація яких у ріл вали розчином такого складу ЕГТА-0,5, рН 7,3. Опір

Внутрішньоклітинний к ної смужки в розчині, п непроникливого хелатора

Результати

Суперфузія судинної см мкмоль/л), викликала гіп стерігалася деполяризація Амплітуда АТФ-індукован ла концентраційнозалежні АТФ викликали гіперпол (n = 11); та 19,4 мВ ± 1 розчином, що містить 1 гіперполяризацію ЕК, у т та 10 мкмоль/л аденозин

Для виявлення вкладу стимуляції ендотеліальних ні зміни МП у безкаль

внаслідок стимуляції їх P_{2x} -пуринорецепторів, у той час як АТФ, що вивільнюється інтралюмінально, діє на P_{2y} та P_{2n} -пуринорецептори ендотеліальних клітин (ЕК), що викликає вивільнення кальцію із IP_3 чутливих внутрішньоклітинних депо ЕК, надходження його ззовні та подальший синтез і вивільнення вазоактивних агентів: простагліцину [3] та оксиду азоту [6].

Надходження іонів кальцію в ЕК значною мірою регулюється коливаннями мембранного потенціалу (МП) ЕК, які змінюють електрхімічний градієнт для іонів кальцію. Відомо також, що за умов культивування відбувається порушення функцій та електричних реакцій ЕК [8]. Однак дослідження АТФ-індукованих електричних відповідей ЕК проводилося, головним чином, на культивованих клітинах. Тому, метою роботи було дослідження змін МП інтактних ЕК під впливом зовнішньоклітинного АТФ.

Методика

Експерименти проводили на морських свинках масою 300-350 г. Грудну аорту занурювали у насичений карбогеном (95 % O_2 , 5 % CO_2) модифікований розчин Кребса. Аорту нарізали на кільцеві сегменти довжиною 3-4 мм. Перед експериментом сегмент розрізали і полосу фіксували в експериментальній камері об'ємом близько 100 мкл, яку перфузували розчином Кребса зі швидкістю 1 мл/хв.

МП відводили від інтактного ендотелію аорти за допомогою методу *patch-clamp* у режимі фіксації струму [8]. Електричний контакт з цитозолем забезпечували за допомогою ністатину або амфотерицину В, концентрація яких у піпетці становила 200 мкг/мл. Піпетки заповнювали розчином такого складу (в ммоль/л) KCl-140, HEPES-10, NaCl-5, EGTA-0,5, pH 7,3. Опір піпеток після заповнення був 5-7 МОм.

Внутрішньоклітинний кальцій в ЕК хелатували преінкубацією судинної смужки в розчині, що містив 20 мкмоль/л ВАРТА-АМ - мембранопроникливого хелатора іонів кальцію, - впродовж 20 хв при 37 °С.

Результати

Суперфузія судинної смужки розчином, що містив АТФ (10-100 мкмоль/л), викликала гіперполяризацію, перед якою досить часто спостерігалася деполяризація амплітудою в декілька мілівольт (рис. 1, а,б). Амплітуда АТФ-індукованої гіперполяризації ендотеліальних клітин мала концентраційнозалежний характер. Так, 10, 50 та 100 мкмоль/л АТФ викликали гіперполяризацію $11,4 \pm 1,6$, ($n = 12$); $18,2 \pm 1,8$ ($n = 11$); та $19,4 \pm 1,8$ мВ ($n = 12$). Суперфузія судинної смужки розчином, що містить 10 мкмоль/л аденозиндифосфату, викликала гіперполяризацію ЕК, у той час як 10 мкмоль/л аденозинмонофосфату та 10 мкмоль/л аденозину не викликали змін МП ЕК.

Для виявлення вкладу кальцієвої провідності у зміни МП під час стимуляції ендотеліальних клітин АТФ, досліджувались АТФ-індуковані зміни МП у безкальцієвому розчині (з додаванням 0,5 ммоль/л

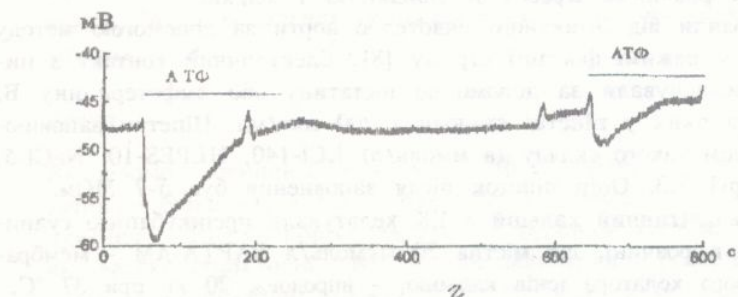
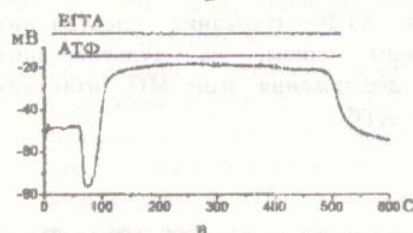
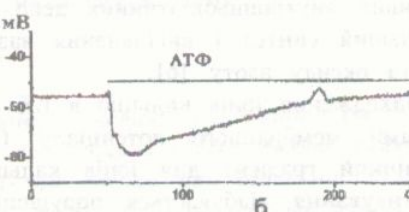
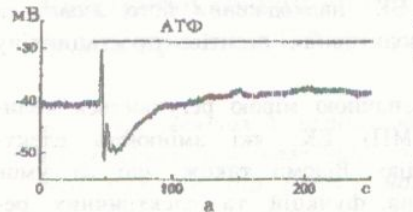


Рис. 1. АТФ-індуковані зміни мембранного потенціалу ендотеліальних клітин: а, б - у присутності Ca^{2+} , в - у відсутності Ca^{2+} , з - десенситизація відповіді на АТФ.

ЕГТА). За цих умов тривалість гіперполяризації істотно зменшувалася (див. рис. 1, в). Досить часто у безкальцієвому розчині після гіперполяризації МП встановлювався на значеннях, менших за початкові. Подальше додавання кальцію у розчин викликало гіперполяризацію ЕК (до початкового рівня МП). У присутності 2,0 ммоль/л Ni^{2+} , який блокує надходження кальцію в ендотелій, тривалість АТФ-індукованої гіперполяризації також зменшувалася. Це свідчить про те, що надходження кальцію в ЕК призводить до пролонгованої гіперполяризації. Повторні апплікації АТФ через 10 хв викликали гіперполяризацію меншої амплітуди, що може пояснюватися десенситизацією пуринорецепторів до АТФ (див. рис. 1, з).



Рис. 2. АТФ-індуковані зміни мембранного потенціалу ендотеліальних клітин.

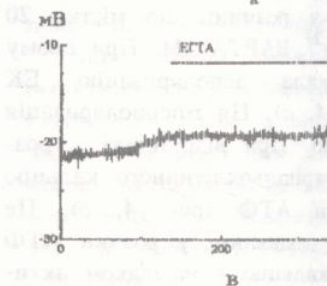
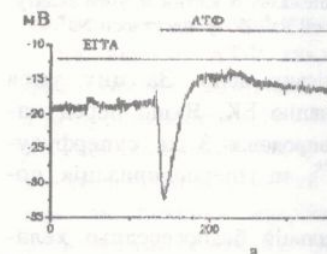


Рис. 3. АТФ-індуковані зміни мембранного потенціалу ендотеліальних клітин: а - перша відповідь після суперфузії, б - друга відповідь після суперфузії, в - третя відповідь після суперфузії.

У присутності блокатора додавання 100 мкмоль/л зацію ендотеліальних кліт (n = 3) (рис. 2).

Як відомо, АТФ виклик клітинних депо ЕК. Д кальцію в індукованні ел застосовано два підходи. Е мкмоль/л АТФ у безкаль

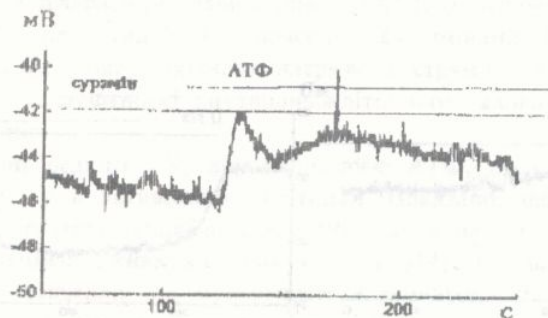


Рис. 2. АТФ-індуковані зміни мембранного потенціалу ендотеліальних клітин у присутності сураміну.

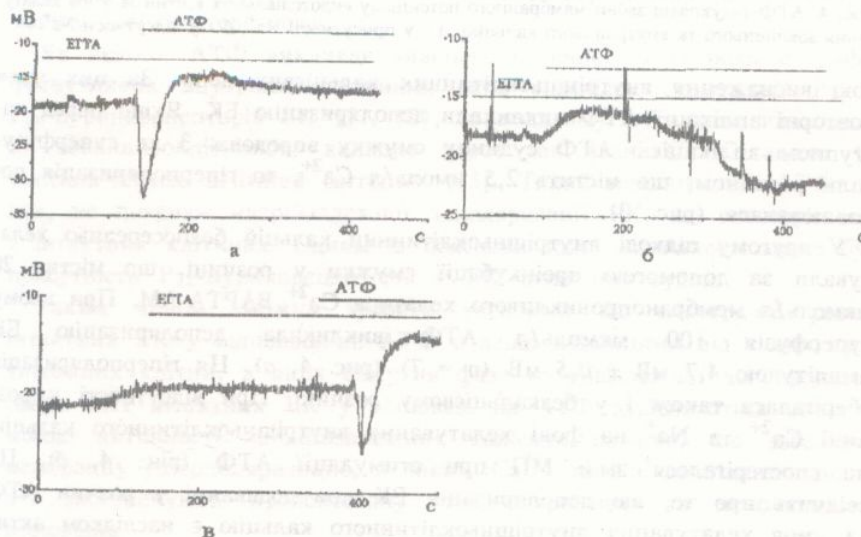


Рис. 3. АТФ-індуковані зміни мембранного потенціалу ендотеліальних клітин під час послідовних аплікацій АТФ у безкальцієвому розчині: а - перша відповідь, б - друга відповідь, в - третя відповідь після суперфузії розчином, що містить Ca^{2+} .

У присутності блокатора P_2 -пуринорецепторів сураміну (10 мкмоль/л) додавання 100 мкмоль/л АТФ у суперфузат спричинювало деполяризацію ендотеліальних клітин середньою амплітудою $4,0 \text{ мВ} \pm 0,6 \text{ мВ}$ ($n = 3$) (рис. 2).

Як відомо, АТФ викликає також вивільнення кальцію з внутрішньоклітинних депо ЕК. Для визначення ролі внутрішньоклітинного кальцію в індуванні електричних реакцій ЕК у відповідь на АТФ, застосовано два підходи. В першому проводили повторні аплікації 100 мкмоль/л АТФ у безкальцієвому розчині з інтервалом у 15 хв з ме-

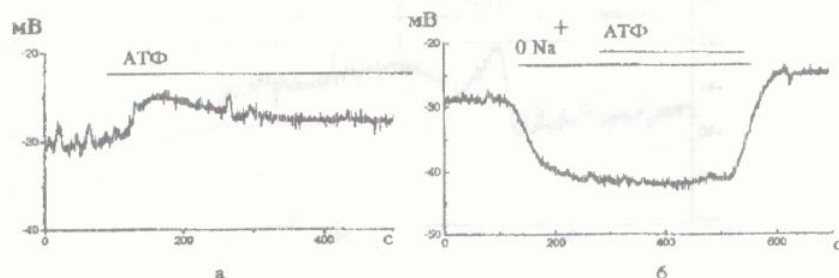


Рис. 4. АТФ-індуковані зміни мембранного потенціалу ендотеліальних клітин за умов хелатування зовнішнього та внутрішнього кальцію: а - у присутності Na^+ , б - у відсутності Na^+ .

тою виснаження внутрішньоклітинних кальцієвих депо. За цих умов повторні аплікації АТФ викликали деполаризацію ЕК. Якщо перед наступною аплікацією АТФ судинну смужку впродовж 3 хв суперфузували розчином, що містить $2,5 \text{ мМоль/л } \text{Ca}^{2+}$, то гіперполяризація поновлювалася (рис. 3).

У другому підході внутрішньоклітинний кальцій безпосередньо хелатували за допомогою преінкубації смужки у розчині, що містив 20 мкмоль/л мембранопроникливого хелатора Ca^{2+} ВАРТА-АМ. При цьому суперфузія 100 мкмоль/л АТФ викликала деполаризацію ЕК амплітудою $4,7 \text{ мВ} \pm 0,5 \text{ мВ}$ ($n = 7$) (рис. 4, а). Ця гіперполяризація зберігалася також і у безкальцієвому розчині. При відсутності у розчині Ca^{2+} та Na^+ на фоні хелатування внутрішньоклітинного кальцію не спостерігалася змін МП при стимуляції АТФ (рис. 4, б). Це свідчить про те, що деполаризація ЕК при додаванні у розчин АТФ за умов хелатування внутрішньоклітинного кальцію є наслідком активації натрієвої провідності.

Обговорення

У цій роботі вперше досить докладно проаналізовано АТФ-індуковані зміни МП інтактних ЕК. Показано, що вивільнення кальцію з внутрішньоклітинних депо призводить до гіперполяризації ЕК. Оскільки амплітуда гіперполяризації залежить від концентрації внутрішньоклітинного кальцію, можна зробити висновок, що гіперполяризація забезпечується активністю кальційзалежних калієвих каналів. Як свідчать результати дослідження, у безкальцієвому розчині, а також у присутності іонів нікелю, які блокують надходження в ендотелій іонів кальцію, тривалість гіперполяризації істотно зменшувалася, тобто пролонгована гіперполяризація віддзеркалює надходження кальцію в ЕК. Наведені результати, таким чином, свідчать про тісний взаємозв'язок МП і $[\text{Ca}^{2+}]_i$ у ЕК. Початковий пік та фаза плато гіперполяризації

корелюють з двофазним, але не всі флуктуації АТФ викликає появу в відсутності хелатування деполаризацію.

Електричні реакції ЕК таким чином, у культивованих ЕК, призводить до гіперполяризації кальційзалежних каналів не залежала від пояснювалася вивільнення не спостерігалася у приєднання зовнішньоклітинного кальцію надходженням натрійзалежної деполаризації наших, не спостерігалася.

Як відомо, АТФ викликає фатчутливіх внутрішньоклітинних P_{2u} -пуринорецепторів ЕК. Наявність зовнішньоклітинного «calcium-release activated current» (CRAC), не пояснює натрієвої деполаризації в інтактних клітинах. Однією з причин є присутність P_{2x} -пуринорецепторів.

Таким чином, можна зробити висновок, що інтактних ЕК у відповідь на АТФ стимуляцію. Зміни МП інтактних ЕК можуть бути активності кальційзалежних каналів мембрану гіперполяризація, які забезпечують пролонговану відповідь.

A.I. Bondarenko, V.F. Sagach

ELECTRICAL RESPONSES OF INTACT ENDOTHELIAL CELLS TO ATP

The changes in the membrane potential of endothelial cells from guinea pig aorta were studied in response to ATP stimulation. Extracellular calcium was removed by buffering with EGTA. Changes in endothelial membrane potential were recorded. Subsequent maintained hyperpolarization was observed as well as addition of extracellular calcium. After the buffering of intracellular calcium, the hyperpolarization which was maintained in the presence of sodium. The hyperpolarization was emptying of intracellular calcium. The hyperpolarization in response to ATP stimulation was maintained in the presence of extracellular calcium.

корелюють з двофазним підвищенням $[Ca^{2+}]_i$ у відповідь на АТФ. Однак не всі флуктуації МП пояснюються змінами $[Ca^{2+}]_i$, оскільки АТФ викликає появу вхідного натрієвого струму, який забезпечує у відсутності хелатування внутрішньоклітинного кальцію короточасну деполаризацію.

Електричні реакції ЕК, викликані дією АТФ, досліджувалися, головним чином, у культивованих клітинах. Показано, що аплікація АТФ призводить до гіперполяризації ЕК [9], яка є наслідком двофазної активації кальційзалежних калієвих каналів [14]. Перша фаза такої активації не залежала від присутності зовнішньоклітинного кальцію та пояснювалася вивільненням внутрішньоклітинного кальцію. Друга фаза не спостерігалась у присутності Co^{2+} та La^{2+} , які блокують надходження зовнішньоклітинного кальцію в ендотелій, та пояснювалася виключно надходженням зовнішньоклітинного кальцію. Фаза натрійзалежної деполаризації ЕК у цих експериментах, на відміну від наших, не спостерігалася.

Як відомо, АТФ викликає вивільнення іонів Ca із інозитолтрифосфатчутливих внутрішньоклітинних депо внаслідок стимуляції P_{2u} та P_{2u} -пуринорецепторів ЕК [11, 12], та подальшу активацію надходження зовнішньоклітинного кальцію через так звані CRAC-канали (від «calcium-release activated current») [15]. Такий механізм дії АТФ, однак, не пояснює натрійзалежної деполаризації ЕК, що спостерігається в інтактних клітинах. Одним із пояснень такої відмінності може бути присутність P_{2u} -пуринорецепторів у ЕК інтактних судин.

Таким чином, можна зробити висновок, що електричні реакції інтактних ЕК у відповідь на АТФ є дещо відмінними від таких культивованих клітин, в яких відсутня фаза натрійзалежної деполаризації. Зміни МП інтактних ЕК у відповідь на АТФ здійснюються за допомогою активності кальційзалежних калієвих каналів, що забезпечує мембранну гіперполяризацію, а також Ca^{2+} - та Na^{+} -провідних каналів, які забезпечують протонговану гіперполяризацію та деполаризацію відповідно.

A.I.Bondarenko, V.F.Sagach

ELECTRICAL RESPONSES OF *IN SITU* ENDOTHELIAL CELLS TO ATP

The changes in the membrane potential (MP) of *in situ* endothelial cells from guinea pig aorta was studied using patch-clamp technique under ATP stimulation. Extracellular ATP is shown to evoke the complex changes in endothelial MP: initial short-lived depolarization and subsequent maintained hyperpolarization. Extracellular calcium buffering as well as addition of extracellular Ni^{2+} made the hyperpolarization shorter. After the buffering of intracellular calcium ATP addition evoked only depolarization which was not observed in the absence of extracellular sodium. The hyperpolarization under ATP stimulation was absent after emptying of intracellular calcium stores. It was concluded that hyperpolarization in response to ATP is initiated by calcium release from

intracellular stores followed by activation of calcium-dependent potassium channels, the maintained phase of hyperpolarization is provided by extracellular calcium entry and initial depolarization by extracellular sodium entry into EC.

A.A.Bogomolets Institute of Physiology
National Academy of Sciences of Ukraine, Kiev

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Benham C.D. ATP-activated channels gate calcium entry in single smooth muscle cells dissociated from rabbit ear artery // J.Physiol. - 1989. - 419. - P. 689-701.
2. Burnstock G. Dual control of local blood flow by purines // Ann. NY. Acad. Sci. - 1990. - 603. - P. 31-45.
3. Carter T.D., Pearson J.D. Regulation of prostacyclin synthesis in endothelial cells. News Physiol. Sci. - 1992. - 7. - P. 64-69.
4. Houston D.S., Shepherd J.T., Vanhoutte P.M. Adenine nucleotides, serotonin, and endothelium-dependent relaxations to platelets // Amer. J. Physiol. - 1985. - 248. - P. H389-H395.
5. Kifor I., Dzau V.J. Endothelial renin-angiotensin pathway: Evidence for intracellular synthesis and secretion of angiotensin // Circ. Res. - 1987. - 60. - P. 422-428.
6. Long C.J., Stone T.W. The release of endothelium-derived relaxant factor is calcium dependent // Blood vessels. - 1985. - 22. - P. 205-208.
7. Luckoff A., Busse R. Increased free calcium in endothelial cells under stimulation with adenine nucleotides // J.Cell. Physiol. - 1986. - 126. - P. 414-420.
8. Marchenko S.M., Sage S.O. Electrical properties of resting and acetylcholine-stimulated endothelium in intact rat aorta // J.Physiol. - 1993. - 462. - P. 735-756.
9. Mehrke G., Daut J. The electrical response of cultured coronary endothelial cells to endothelial-dependent vasodilators // Ibid. - 1990. - 430. - P. 251-272.
10. Meyers K.M., Holmsen H., Seachord C.L. Comparative study of platelet dense granule constituents // Amer. J.Physiol. - 1982. - 243. - P. R454-R461.
11. Motte S., Piroton S., Boeynaems J.M. Heterogeneity of ATP receptors in aortic endothelial cells. Involvement of P_{2y} and P_{2u} receptors in inositol phosphate response // Circ. Res. - 1993. - 72. - P. 504-510.
12. O'Connor S.E., Dainty I.A., Leff P. Further subclassification of ATP receptor based on agonist studies // Trends Pharmacol. Sci. - 1991. - 12. - P. 137-141.
13. Pearson J.D., Gordon J.L. P₂-purinoceptors in the blood vessel wall // Biochem. Pharmacol. - 1986. - 38. - P. 4153-4163.
14. Sauve R., Parent L., Simoneau C., Roy G. External ATP triggers a biphasic activation process of a calcium-dependent K⁺ channel in cultured bovine aortic endothelial cells // Pflugers Arch. - 1988. - 412. - P. 469-481.
15. Vaca L., Kunze D.L. Depletion of intracellular stores activates a Ca²⁺ selective channel in vascular endothelium // Amer. J. Physiol. - 1994. - 267. - P. C1501-1505.

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

Матеріал надійшов
до редакції 00.04.98

УДК 612.453:612.015.348:615.252.453]-092

І.П.Пастер, М.Д.Тронько

Вплив хлоритану на син- в клітинах надниркових новонароджених поросят

В опытах на первичной культуре изучение влияния хлоритана на функции коры надпочечников кортикоцитах новорожденных труп которых находят в трансплантационного материковой недостаточности. Изучение с хлоританом (концентрация - 1-10000 нг/мл) на отрицательное дозозависимое тимидина и ³H-уридина в нисимальной концентрации преимущественно. Достоверный эффект хлоритана (синтез белков 10-100 нг/мл и состав) дается возможный механизм процессы в клетках надпочечников.

Вступ

Хлоритан (2-о-хлорфеніл-2-п-специфічний інгібітор функції) вживається в клінічній практиці і також гормонально-активних тикостеромах [3, 6, 7]. Однак варіабельна і залежить від багатьох факторів виду надниркової тканини та є вивчення впливу хлоритану поросят, органі та клітинні широкі застосування як транскрипції хронічної надниркової недостаточності, приводу хвороби Кушінга, виділення і хромафінної тканини; тяжкої бронхіальної астми, неспецифічної потреби тривала глюкокортикоїд лікування виникла вторинна недостаточність.

Метою нашої роботи було вивчення впливу хлоритану на синтез нуклеїнових кислот і білка в клітинах надниркових поросят.