

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

Вплив циклічних нуклеотидів на мембранний потенціал інтактного ендотелію ізольованої аорти кроля

В работе исследовано влияние повышения внутриклеточной концентрации циклических нуклеотидов на мембранный потенциал интактного эндотелия изолированной аорты кролика. Аппликации мембранопроникающего аналога циклического аденозинмонофосфата (цАМФ) букладезина, блокаторов фосфодиэстераз 3-изобутил-1-метилксантина (ИБМХ) и теофиллина деполаризовали эндотелиальную мембрану. ИБМХ-вызванная деполаризация существенно меньше деполаризации, индуцированной теофиллином, что указывает на присутствие в эндотелии фосфодиэстераз, нечувствительных к ИБМХ. Неселективный блокатор протеинкиназ Н-7 не влиял на развитие ИБМХ-вызванной деполаризации и на мембранный потенциал нестимулированного эндотелия. Показано корреляцию между ИБМХ-вызванной деполаризацией и фазой деполаризации, вызванной действием аденозинтрифосфата (АТФ).

ВСТУП

Синтез оксиду азоту (NO) судинним ендотелієм внаслідок дії агоністів (наприклад, ацетилхоліну чи аденозинтрифосфату) ініціюється підвищенням концентрації внутрішньоклітинного кальцію ($[Ca^{2+}]_i$) [13]. Збільшення $[Ca^{2+}]_i$ зумовлює активацію кальційзалежних калієвих каналів, які вже ідентифіковано в судинному ендотелії [6], що призводить до швидкої гіперполяризації мембрани [4,15]. Це, в свою чергу, сприяє надходженню зовнішньоклітинного кальцію всередину ендотеліальних клітин і підсилює кальцієвий сигнал. Проте у наступних після швидкої гіперполяризації відповідях на агоністи можлива деполаризація ендотеліальної мембрани [1,14]. Тривале підвищення $[Ca^{2+}]_i$ може спричинити низку незворотних реакцій, які в кінцевому результаті призведуть до загибелі клітини. Тому повинні існувати клітинні механізми, які спочатку обмежують вхід зовнішньоклітинного кальцію, а потім відновлюють

$[Ca^{2+}]_i$ до значення, характерного для нестимульованого ендотелію.

Відомо, що із дев'яти типів аденілатциклаз три є кальцій/кальмодулінзалежні. Розповсюдження аденілатциклаз в ендотеліальних клітинах залишається поки що невивченим питанням. Існують лише окремі роботи, які вказують на наявність кальційрегульованих аденілатциклаз в ендотелії [5,20]. Проте цілком імовірно, що підвищення концентрації внутрішньоклітинного кальцію може підвищувати активність аденілатциклаз.

Було висловлено припущення про можливу роль циклічних нуклеотидів як вторинних месенджерів у розвитку деполаризації: підвищення вмісту циклічного аденозинмонофосфату (цАМФ) і/або циклічного гуанозинмонофосфату (цГМФ) може викликати деполаризацію мембрани судинного ендотелію.

У нашій роботі ми досліджували вплив збільшення внутрішньоклітинної концентрації циклічних нуклеотидів на мембранний потенціал ендотеліальних клітин і взаємозв'язок циклічних нуклеотидів і фази деполаризації

зації, викликаной аденозинтрифосфатом (АТФ).

МЕТОДИКА

Дослідження проводили на інтактному ендотелії ізольованої грудної частини аорти кроля.

В експериментах були використані самці кролів породи шиншила масою 2 - 2,5 кг, яким вводили гепарин у вушну артерію (0,5мл/кг) безпосередньо перед проведенням повітряної емболії.

Грудну частину аорти 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, Na₂H₂PO₄ – 1,2, CaCl₂ – 2,5, MgSO₄ · 7H₂O – 1,2, глюкоза – 11,1. До розчину Кребса додавали гентаміцин – 50мкг/мл. Модифікований розчин Кребса аерувався сумішшю повітря (95%) та CO₂ (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 містив (ммоль/мл): KCl – 149; NaCl – 10; NEPES-KOH – 10; рН 7,3. Дослідження проводили при температурі 20 – 24 °С.

Як блокатори фосфодіестераз використовували ізобутилметилксантин (ІВМХ) у концентраціях 50 мкмоль/л, 1 ммоль/л і теофілін у концентрації 10 ммоль/л (обидва препарати фірми “Sigma”, США). Для збільшення внутрішньоклітинного вмісту цАМФ використовували мембранопроникаючий аналог цАМФ N⁶,2'-0-дибутираладенозин 3':5'-циклічний монофосфат (букладезин) у концентрації 10 ммоль/л (фірма “Sigma”, США). Донором NO був нітропрурид натрію у концентрації 10 мкмоль/л та 100 мкмоль/л.

РЕЗУЛЬТАТИ

Реакція мембранного потенціалу на підвищення внутрішньоклітинної концентрації циклічних нуклеотидів. Для дослідження реакції мембранного потенціалу на зміну внутрішньоклітинної концентрації циклічних нуклеотидів у судинному ендотелії ми провели три серії експериментів. У першій серії збільшення внутрішньоклітинного вмісту цАМФ досягалося аплікацією мембранопроникаючого аналога цАМФ букладезину, а в другій і третій серіях аплікацією малоселективних блокаторів фосфодіестераз ІВМХ і теофіліну.

Спільним для всіх трьох серій експериментів є те, що збільшення внутрішньоклітинної концентрації циклічних нуклеотидів викликало деполяризацію мембрани ендотелію. Проте кожна серія мала і характерні відмінності. Так, аплікація букладезину викликала деполяризацію на 8,7 мВ ± 1 мВ (n=7) і завершувалася при досягненні максимального значення деполяризації, відмивання препарату призводило до незначної гіперполяризації мембрани на 5,7 мВ ± 2,0 мВ (рис. 1, а). Аплікація 50 мкмоль/л ІВМХ також викли-

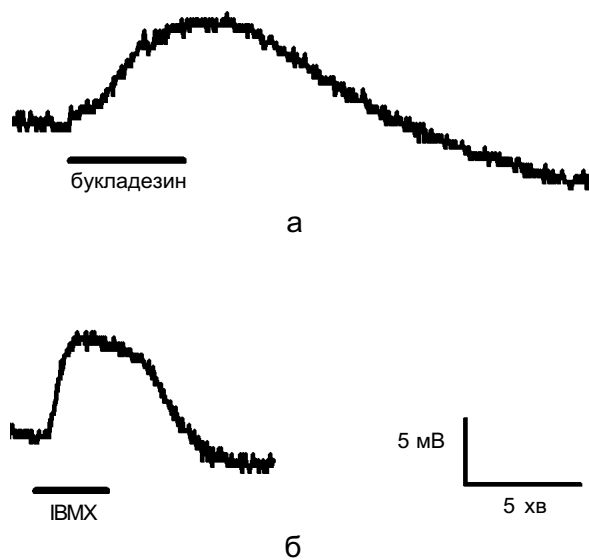


Рис. 1. Реакція мембранного потенціалу ендотелію на аплікацію букладезину (10 ммоль/л) (а) та ІВМХ (50 мкмоль/л) (б).

кала деполяризацію ендотеліальної мембрани на $7,3 \text{ мВ} \pm 1,8 \text{ мВ}$ ($n=8$), яка потім змінювалася на реполяризацію. Відмивання препарату викликало незначну гіперполяризацію мембрани на $2,1 \text{ мВ} \pm 0,6 \text{ мВ}$ (див. рис. 1,б). У відповідь на аплікацію теофіліну розвивалася деполяризація ендотеліальної мембрани на $19 \text{ мВ} \pm 3,9 \text{ мВ}$ ($n=8$) (рис.2), при цьому в трьох випадках спостерігалися незначні осциляції мембранного потенціалу в ділянці плато деполяризації (див. рис.2,б), які блокувалися при одночасній аплікації теофіліну і верапамілу у концентрації 100 мкмоль/л (див.рис.2,3) і відновлювались при повторній аплікації теофіліну після тривалої відмивки.

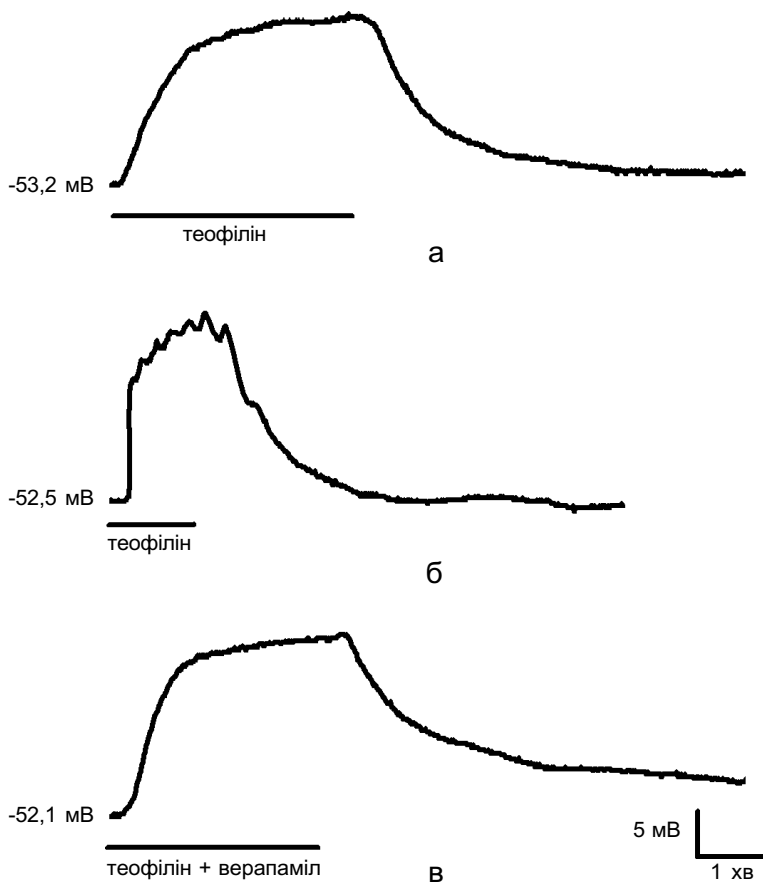


Рис. 2. Деполяризація мембрани ендотелію під впливом теофіліну (10 ммоль/л) (а). У момент виходу на плато деполяризації під впливом теофіліну (10 ммоль/л) іноді спостерігалися осциляції (б), які блокувалися верапамілом (100 мкмоль/л) (в).

Реакція мембранного потенціалу на нітропрусид натрію. Для з'ясування, чи бере участь у розвитку деполяризації, описаної в попередніх серіях експериментів, активація розчинної гуанілатциклази і, як наслідок, збільшення внутрішньоклітинного вмісту цГМФ ми аплікували на судинний препарат донор оксиду азоту нітропрусид натрію у концентрації 10 мкмоль/л ($n=5$) та 100 мкмоль/л ($n=5$). У жодному з випадків не спостерігалось змін мембранного потенціалу.

Вплив блокатора протеїнкіназ Н-7 на мембранний потенціал. Для з'ясування участі у розвитку деполяризації протеїнкінази, активовані циклічними нуклеотидами, ми провели серію експериментів, у яких на фоні IBMX-викликаній деполяризації аплікували неселективний блокатор протеїнкіназ Н-7 (100 мкмоль/л). При цьому практично не спостерігалось впливу Н-7 ($n=5$) на IBMX-викликану реакцію мембранного потенціалу (див. рис.3,а). Аплікація Н-7 ($n=5$) у випадку нестимульованого ендотелію практично не викликала змін мембранного потенціалу (див. рис.3,б).

Взаємозв'язок АТФ-викликаній фази деполяризації і IBMX-викликаній деполяризації. Для дослідження цього питання протягом однієї реєстрації аплікували АТФ (100 мкмоль/л) і після відмивки IBMX (1 ммоль) ($n=7$). В обох випадках концентрацію брали з розрахунком, щоб деполяризація становила максимально можливе значення. Встановлено, що аплікація АТФ викликала відповідь, складовою частиною якої була деполяризація мембрани з максимальним значен-

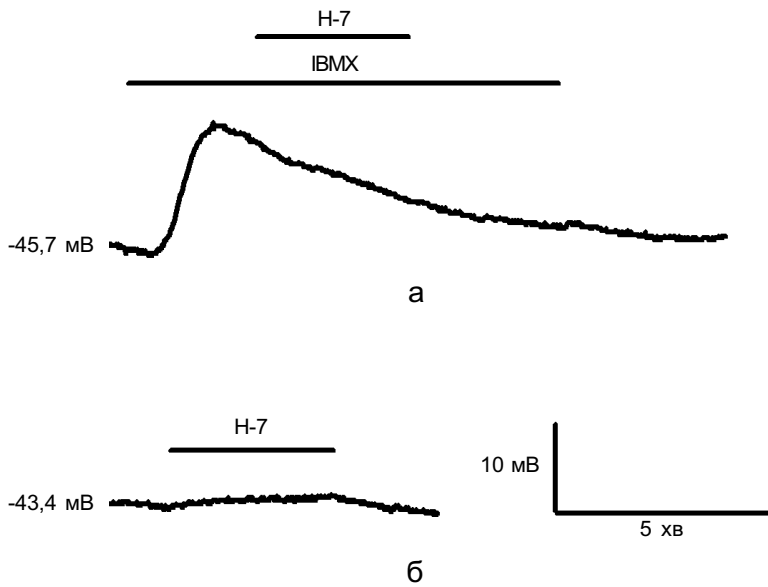


Рис. 3. Вплив блокатора протеїнкінази Н-7 (100 мкмоль/л) на розвиток деполяризації під впливом ІВМХ (1 моль/л) (а) та на мембранний потенціал нестимульованого ендотелію (б).

ням $7,5 \text{ мВ} \pm 2,3 \text{ мВ}$, аналогічно аплікація ІВМХ викликала деполяризацію мембрани, максимум якої був $8,8 \text{ мВ} \pm 3,0 \text{ мВ}$. У результаті було побудовано розподіл максимальної амплітуди деполяризації ендотеліальної мембрани відносно потенціалу спокою від порядкового номера експерименту (рис.4), який демонструє зв'язок між реакціями, викликаними АТФ і ІВМХ. Визначено коефіцієнт кореляції ($k=0,8$).

ОБГОВОРЕННЯ

Серії наших експериментів продемонстрували можливість розвитку деполяризації

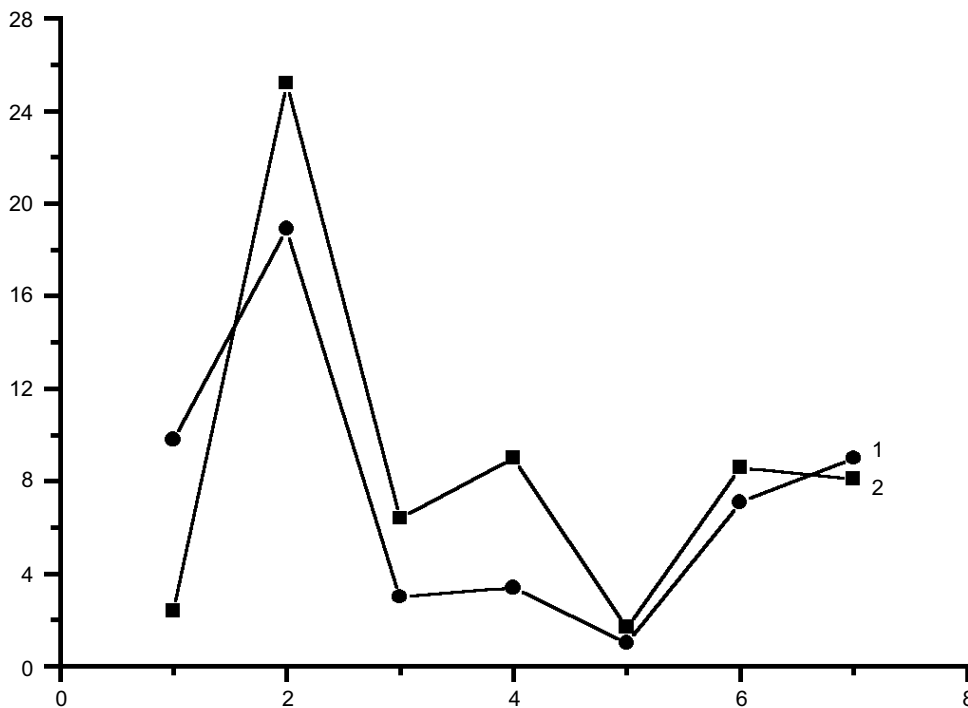


Рис. 4. Розподіл пар значень максимальної амплітуди деполяризації викликані АТФ (100 мкмоль/л) (1) і ІВМХ (1 моль/л) (2). За віссю абсцис – максимальна амплітуда деполяризації, за віссю ординат – порядковий номер випробування.

ендотеліальної мембрани у відповідь на підвищення внутрішньоклітинного вмісту циклічних нуклеотидів. Очевидно, основний внесок у розвиток деполяризації дає підвищення концентрації цАМФ у цитозолі. На це вказує подібність у кінетиці й амплітуді реакції ендотеліальної мембрани у відповідь на аплікацію мембранопроникаючого аналога цАМФ букладезину і малоселективного блокатора фосфодіестераз IBMX. Відсутність змін у мембранному потенціалі на дію донора NO нітропрусида натрію свідчить про те, що розчинна гуанілатциклаза (рГЦ) не бере участі у розвитку деполяризації ендотеліальної мембрани. Існують дані, що рГЦ взагалі відсутня в ендотелії [25].

Аналогічно до IBMX теофілін також викликав деполяризацію судинного ендотелію. Майже двократна різниця у амплітуді реакцій на IBMX і теофілін може пояснюватись тим, що IBMX блокує не всі типи фосфодіестераз, які представлені в ендотелії. Взагалі, питання поширення фосфодіестераз в ендотелії залишається, фактично, не дослідженим. З літературних даних відомо, що фосфодіестерази типу 8A, 8B, 9A зовсім нечутливі до IBMX [10,11,18]. Тому цілком логічним є припущення, згідно з нашими результатами, про існування в ендотелії фосфодіестераз, які нечутливі до IBMX. Дійсно, фаза реполяризації мембрани у відповідь на аплікацію IBMX і незначна гіперполяризація на відмітку судинного препарату можуть бути зумовлені підвищенням активності IBMX-нечутливих фосфодіестераз, як результат підвищення внутрішньоклітинної концентрації циклічних нуклеотидів. Ще одним доказом на користь даної гіпотези є повна відсутність фази реполяризації і відмітка судинного препарату до початкового значення мембранного потенціалу у відповідь на аплікацію теофіліну.

Осциляції, які виникали в окремих випадках у відповідь на аплікацію теофіліну свідчать про складний характер взаємодії кальцієвої сигнальної системи із системою циклічних нуклеотидів. Дійсно, аденілатцик-

лази I,III,VIII є кальцій/ кальмодулінзалежними [3, 21 - 24, 26], як і фосфодіестераза 1A,1B,1C [17,19,27]. Тому відповідь на питання про природу осциляцій мембранного потенціалу під час деполяризації, викликані теофіліном, підлягає сумніву до моменту з'ясування поширеності певних видів аденілатциклази і фосфодіестераз у судинному ендотелії. Крім того, не виключена можливість модулюючого впливу цАМФ на $[Ca^{2+}]_i$ [7].

Серія експериментів із неселективним блокатором протеїнкінази H-7 продемонструвала, що в механізмах, відповідальних за розвиток деполяризації ендотеліальної мембрани протеїнкінази не беруть участі. Не виключено, що в ендотеліальній мембрані експресовано іонні канали, у яких ворітний механізм чутливий до циклічних нуклеотидів. Такі канали вже описано в інших тканинах [2,9,12,28], цілком можливе їх існування в ендотелії.

Реакція мембранного потенціалу судинного ендотелію на агоністи досить складна, однією з фаз її може бути деполяризація мембрани. Наші попередні дослідження свідчили, що АТФ здатний викликати складну відповідь, однією з фаз якої є деполяризація і наступна реполяризація мембрани [1]. Аналіз пар відповідей мембранного потенціалу на АТФ і IBMX, отриманих від одних і тих же препаратів, показав, що існує кореляція між відповідями на АТФ і IBMX. Це доводить те, що механізм/механізми розвитку деполяризації у відповідь на дію агоністів включають в себе циклічні нуклеотиди.

Підвищення внутрішньоклітинної концентрації циклічних нуклеотидів і розвиток деполяризації у відповідь на дію агоністів можуть виконувати в комплексі важливу регуляторну функцію: деполяризація ендотеліальної мембрани зменшує вхід кальцію в цитозоль ендотелію, а циклічні нуклеотиди підвищують активність ендотеліальної NO-синтази [8,16]. У загальному, цілком імовірним є функціонування наступної схеми відповіді ендотелію на дію агоністів: початкова швидка гіперполяризація збільшує $[Ca^{2+}]_i$, що при-

зводить до активації кальмодулінчутливої NO-синтази, одночасно активуються кальмодулінчутливі аденілатциклази, що спричинює збільшення внутрішньоклітинного вмісту цАМФ, дія якого, з одного боку зменшує $[Ca^{2+}]_i$, а з іншого – підвищує активність NO-синтази, що в кінцевому результаті підтримує синтез NO на певному рівні. Наступна реполяризація мембрани пов'язана з дією фосфодіестераз.

V.V.Yarotsky, V.F.Sagach, S.M.Marchenko

THE INFLUENCE OF CYCLIC NUCLEOTIDES ON THE MEMBRANE POTENTIAL OF INTACT ENDOTHELIUM OF ISOLATED RABBIT AORTA

The influence of intracellular cyclic nucleotides concentration increase on the membrane potential of intact endothelium of isolated rabbit aorta has been investigated. Both applications of bucladesine, an adenosine 3',5'-cyclic monophosphate (cAMP) membrane permeable analogue, and phosphodiesterase blockers 3-isobutyl-1-methylxanthine (IBMX) and theophylline depolarized endothelial membrane. IBMX-induced depolarization was significantly smaller than theophylline-induced depolarization. It could be explained by the existence of IBMX-insensitive phosphodiesterases. Non-selective protein kinase blocker H-7 did not affect on the both IBMX-stimulated and non-stimulated membrane potential of aortic endothelium. It has been shown that the IBMX-induced depolarization and ATP-induced depolarization correlate with high correlation coefficient.

A.A.Bogomoletz Institute of Physiology

National Academy of Science 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**, № 5. – С.9-16.
2. Barnstable C.J. Cyclic nucleotide-gated nonselective cationic channels – a multifunctional gene family // *EXS.* – 1993. – **66**. – P.121-133.
3. Cali J.J., Zwaagstra J.C., Mons N. et al. Type VIII adenylyl cyclase A Ca^{2+} /calmodulin stimulated enzyme expressed in discrete regions of rat brain // *J. Biol. Chem.* – 1994. – **269**. – P.12190-12195.

4. Chen G., Cheung D.W. Effect of K(+)-channel blockers on Ach-induced hyperpolarisation and relaxation in mesenteric arteries // *Amer. J. Physiol.* – 1997. – **275**, N 5, Pt2. – H2306-2312.
5. Chetham P.M., Guldemeester H.A., Mons N. et al. Ca(2+)-inhibitable adenylyl cyclase and pulmonary permeability // *Ibid.* – 1997. – **273**, (1 Pt 1). – L22-30.
6. Colden Stanfield M., Shilling W.P., Ritchie A.K. et al. Bradykinin-induced increases in cytosolic calcium and ionic currents in cultured bovine aortic endothelial cells // *Circulat. Res.* – 1987. – **61**. – P.632-640.
7. Cooper D.M., Mons N., Karpen J.W. Adenylyl cyclase and interaction between calcium and cAMP signalling // *Nature.* – 1995. – **374**. – P.421-424.
8. Ferro A, Queen L.R., Priest R.M. et al. Activation of nitric oxide synthase by beta 2-adrenoceptors in human umbilical vein endothelium in vitro // *Br. J. Pharmacol.* – 1999. – **126(8)**. – P.1872-80.
9. Firestein S., Zufall F. The nucleotide gated channel of olfactory receptor neurons // *Semin. Cell Biol.* – 1994. – **5**. – P.39-46.
10. Fisher D.A., Smith J.F., Pillar J.S. et al. Isolation and characterization of PDE8A a novel human cAMP-specific phosphodiesterase // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 1998. – **246**. – P.570-577.
11. Fisher D.A., Smith J.F., Pillar J.S. et al. Isolation and characterization of PDE9A a novel human cGMP-specific phosphodiesterase // *J. Biol. Chem.* 1998. – **273**. – P.15559-15564.
12. Kaupp U.B. The cyclic nucleotide-gated channels of vertebrate photoreceptors and olfactory epithelium // *Trends Neurosci.* – 1991. – **14**. – P.150-157.
13. Lopez-Jaramillo P., Gonzalez M.C., Palmer R.M., Moncada S. The crucial role of physiological Ca^{2+} concentrations in the production of endothelial nitric oxide and the control of vascular tone // *Br. J. Pharmacol.* – 1990. – **101(2)**. – P.489-493.
14. Marchenko S.M., Sage S.O. Electrical properties of resting and acetylcholin-stimulated endothelium in intact rat aorta // *J. Physiol.* – 1993. – **462**. – 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. – H2388-2395.
16. Rebich S., Devine J.O., Armstead W.M. Role of nitric oxide and camp in beta-adrenoceptor-induced pial artery vasodilatation // *Ibid.* – 1995. – **268**, (3 Pt 2). – H1071-6.
17. Rybalkin S.D., Beavo J.A. Multiplicity within cyclic nucleotide phosphodiesterases // *Biochem. Soc. Trans.* – 1996. – **24**. – P.10005-10009.
18. Soderling S.H., Bayuga S.J., Beavo J.A. Cloning and characterization of cAMP-specific cyclic nucleotide phosphodiesterase // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1998. – **95**. – P.8991-8996.

19. Sonnenburg W.K., Rybalkin S.D., Bromfeld K.E. et al. Identification, quantification, and cellular location of PD1 calmodulin stimulated cyclic nucleotide phosphodiesterase // *Methods Enzymol.* – 1998. – **14**. – P.3-19.
20. Stevens T., Nakahashi Y., Cornfield D.N. et al. Ca(2+)-inhibitable adenylyl cyclase modulates pulmonary artery endothelial cell cAMP content and barrier function // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1995. – **92(7)**. – P.2696-2700.
21. Tang W.-J., Krupinski J., Gilman A.G. Expression and characterization of calmodulin-activated (type I) adenylyl cyclase // *J.Biol.Chem.* – 1991. – **34**. – P.14563-14572.
22. Tang W.-J., Yan S.-Z., Drum C.L. Class III adenylyl cyclase-regulation and underlying mechanisms // *Adv.Second Messenger Phosphoprotein Res.* – 1997. – **32**. – P.137-151.
23. Vorherr T., Knopfel L., Hoftmann et al. The calmodulin binding domain of nitric oxide synthase and adenylyl cyclase // *Biochemistry.* – 1993. – **32**. – P.6081-6088.
24. Wei J., Wayman G., Storm D.R. Phosphorylation and inhibition of type III adenylyl cyclase by calmodulin-dependent protein kinase II *in vivo* // *J.Biol.Chem.* – 1996. – **271**. – P.24231-24235.
25. Wu S., Moore T.M., Brough G.T. et al. Cyclic nucleotide-gated channels mediate membrane depolarization following activation of store-operated calcium entry in endothelial cells // *Ibid.* – 2000. – **275**. – P.18887-18896.
26. Wu Z., Wong S.T., Storm D.R. Modification of the calcium and calmodulin sensitivity of the type I adenylyl cyclase by mutagenesis of its calmodulin binding domain // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 1993. – **237**. – P.251-256.
27. Yan C., Zhao A.Z., Bentley J.K., Beavo J.A. The calmodulin dependent phosphodiesterase gene PDE1C encodes several functionally different splice variant in a tissue specific manner // *J.Biol. Chem.* – 1996. – **271**. – P.25699-25706.
28. Yau K.W., Baylor D.A. Cyclic GMP-activated conductance of retinal photoreceptor cells // *Annu.Rev.Neurosci.* – 1989. – **12**. – P.289-327.

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

*Матеріал надійшов
до редакції 4.09.2001*