УДК 577.352

О.І. Бондаренко, В.Ф. Сагач

Електричні реакції ендотелію аорти щурів із спонтанною гіпертензією

Исследовали электрические реакции эндотелиальных клеток (ЭК) грудной аорты крыс с нормальным артериальным давлением линии Вистар (нормотензивных крыс, НТК) и крыс с наследственной спонтанной гипертензией (СГ). Среднее значение мембранного потенциала покоя ЭК крыс с СГ было значительно ниже (−35,2 мВ ± 1,2 мВ) по сравнению с клетками НТК (−44,3мВ±1,1 мВ). Деполяризация в ответ на суперфузию бескалиевого раствора препаратов НТК составляла 11,0 мВ ± 0,7 мВ, тогда как у животных с СГ этот показатель был 7,5 мВ ± 1,3 мВ, что свидетельствует об угнетении Na^+/K^+-помпы ЭК последних. Амплитуда ацетилхолининдуцированной гиперполяризации ЭК крыс с СГ была выше, чем у НТК и составляла 25 ± 1 и 19 мВ ± 1 мВ соответственно. Однако паттерн гиперполяризации ЭК крыс с СГ различался даже в пределах одного и того же препарата, чего не наблюдалось у препаратов аорты НТК. Сделан вывод, что угнетение эндотелийзависимого расслабления при действии ацетилхолина при наследственной гипертензии не связяно с угнетением амплитуды гиперполяризации ЭК, нарушения имеют место на уровне межклеточной сигнализации.

ВСТУП

Ендотелійзалежне розслаблення судин пригнічено за умов гіпертензії як *in vivo*, так і *in vitro*, що пов'язано з порушенням функціональної активності гладеньком'язових [4,5,20] та ендотеліальних клітин (ЕК) [18,19]. Зниження продукції вазодилататорних і збільшення продукції вазоконстрикторних факторів є головними проявами дисфункції ЕК при гіпертензії.

Мембранний потенціал (МП) має велике значення у фізіології та визначенні функціональної активності ЕК, регулюючи надходження Ca^{2+} [3] та L-аргініну [21] в ендотелій, а також контролюючи продукцію супероксид-аніона [17]. Гіперполяризація ЕК при дії вазодилататорних речовин, як відомо, забезпечує електрохімічний градієнт для надходження Ca^{2+}, який є необхідним для активації Ca^{2+}-залежної NO-синтази. Тому одним із можливих механізмів пригнічення продукції NO при гіпертензії може бути порушення здатності ЕК генерувати нормальну гіперполяризацію у відповідь на вазодилататорні речовини.

Нещодавно було продемонстровано, що коронарні артерії щурів, у яких викликали експериментальну ниркову гіпертензію зберігали нормальне розслаблення на ацетилхолін, а ЕК – нормальну гіперполяризацію [7]. У разі ж дії брадикініну та субстанції Р ендотелійзалежне розслаблення було пригнічено, але ці речовини викликали дуже малу гіперполяризацію (2 мВ) як при гіпертензії, так і в нормі. Це не дає змоги зробити висновок про порушення електричних відповідей ендотелію при гіпертензії і, якщо вони є, про характер цих порушень.

Тому метою нашої роботи було дослідження змін МП ЕК у відповідь на ацетилхолін у щурів із спадкоємною спонтанною гіпертензією (СГ).

МЕТОДИКА

Як уже було неодноразово показано, в тому числі і в нашій лабораторії [18, 19], спостері-

© О.І. Бондаренко, В.Ф. Сагач

гається суттєве пригнічення ендотелійзалежного розслаблення судинних смужок аорти щурів із СГ у відповідь на ацетилхолін. Тому дослідження були проведені на аорті щурів із СГ та щурів лінії Вістар із нормальним рівнем системного артеріального тиску (нормотензивних щурів, НТЩ) віком 6-7 місяця, яких наркотизували ефіром. Грудну частину аорти ізолювали, нарізали на сегменти довжиною 3-4 мм і зберігали у модифікованому розчині Кребса наступного складу (ммоль/л): NaCl - 118,3, $NaHCO_3$ - 25, KCl-4,7, NaH_2PO_4-1,2, $CaCl_2$ - 2,5, глюкоза – 10. Для уникнення бактеріального пошкодження у розчин додавали гентаміцин у концентрації 50 мкг/мл. У безкалієвому розчині концентрацію NaCl еквімолярно підвищували. Розчин аерували сумішшю 95%O_2 та 5%CO_2. 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.

МП ендотелію реєстрували засобом *patch-clamp* у конфігурації "ціла клітина". Піпетки заповнювали таким розчином (ммоль/л): KCl-140, NaCl-10, HEPES-10. До розчину додавали ністатин (200 мкг/мл). Експеримент проводили при 22-24° С.

РЕЗУЛЬТАТИ

Мембранний потенціал спокою (МПС) інтактного ендотелію грудної аорти НТЩ був у середньому −44,3 мВ ± 1,1 мВ (n=38), а щурів із СГ −35,2 мВ ± 1,2 мВ (n=26), що свідчить про значну деполяризацію (P<0,05) ендотелію останніх. Оскільки при гіпертензії порушується електрогенний іонний транспорт [13], одним із можливих пояснень цієї різниці може бути різний внесок Na^+-K^+-помпи в генерацію МПС ЕК НТЩ і щурів із СГ. Для оцінки цього внеску смужку перфузували розчином, що не містив іонів калію. У відповідь на суперфузію безкалієвого розчину спостерігалася деполяризація ендотелію середньою амплітудою 11,0 ± 0,7 (n=22) та 7,5 мВ ± 1,3 мВ (n=6;P<0,05) для НТЩ та щурів із СГ відповідно (рис.1). Таким чином, струм Na^+-K^+-помпи гіперполяризує мембрану ЕК НТЩ у середньому на 11 мВ, тоді як у щурів із СГ цей показник є достовірно меншим і дорівнює 7,5 мВ. Тому різниця у МП нестимульованого ендотелію НТЩ і щурів із СГ частково може бути пояснена пригніченням Na^+-K^+-помпи судинного ендотелію останніх.

Аплікація ацетилхоліну викликала початкову швидку гіперполяризацію ЕК середньою амплітудою 19 мВ ± 1 мВ (n=26) для НТЩ, після якої або спостерігалося плато, або значення МП, поступово зменшуючись, наближались до початкового рівня (рис.2). Швидкість, з якою МП наближався до початкового рівня (паттерн гіперполяризації), була різною у судинних препаратів від різних тварин, але мало відрізнялася в межах одного препарату у НТЩ, що узгоджується із попередніми дослідженнями [12]. Амплітуда ацетилхолініндукованої гіперполяризації щурів із СГ була вищою, ніж у НТЩ і дорівнювала в середньому 25 мВ ± 1 мВ (n=15; P<0,05). Паттерн гіперполяризації у щурів із СГ суттєво відрізнявся навіть у межах

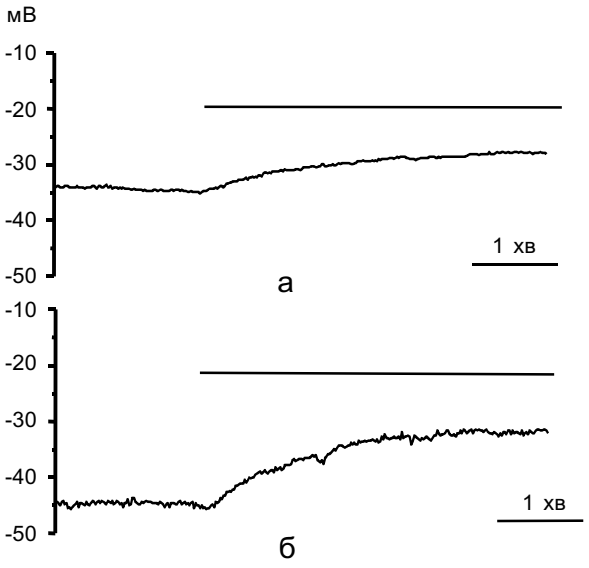

Рис.1 Вплив безкалієвого розчину на мембранний потенціал ендотелію аорти гіпертензивних (а) та нормотензивних (б) щурів.

одного препарату (див. рис.2). Ця особливість, поряд з низькими значеннями МПС і більш високою середньою амплітудою гіперполяризації у відповідь на суперфузію ацетилхоліну, відрізняла ендотелій щурів із СГ від ендотелію НТЩ.

ОБГОВОРЕННЯ

Хоча про пригнічення ендотелійзалежного розслаблення при спадкоємній гіпертензії неодноразово повідомлялося різними лабораторіями [10,18,19], даних щодо значень МПС ЕК та характер змін МП ендотелію під час його стимуляції при спадкоємній гіпертензії до цього часу в літературі немає. Декілька основних висновків можна зробити за результатами цієї роботи.

По-перше, ЕК щурів із СГ мають менш негативні значення МП, ніж НТЩ. Подібний вплив, але експериментально-викликаної ниркової гіпертензії на МП спостерігався у ЕК коронарної артерії [7]. Оскільки МПС контролює базальне надходження кальцію [3,8,15] і L-аргініну [21] в ендотелій, можна дійти висновку, що ці процеси пригнічені при спадкоємній гіпертензії. Аналогічно, можна також припустити збільшення продукції супероксид-аніона ендотелієм [17] за цих умов.

По-друге, при спадкоємній гіпертензії відбувається пригнічення активності Na^+-K^+-помпи ЕК. Наявність Na^+-K^+-обміну в ендотелії була неодноразово продемонстрована у попередніх дослідженнях як електрофізіологічними [6], так і біохімічними методами [11]. Усі роботи з виявлення внеска помпи у генерацію МП ЕК було виконано на ЕК культури і цей внесок оцінювався в середньому −8 мВ [6,15]. Отриманий нами внесок для НТЩ є дещо більшим (-11 мВ), що, можливо, пояснюється різним об'єктом дослідження чи відсутністю впливу умов культури в наших експериментах. Нами продемонстровано, що цей внесок за умов гіпертензії є достовірно меншим (-7,5 мВ). Тобто, можна зробити висновок про пригнічення помпи за умов гіпертензії, що узгоджується з даними біохімічних досліджень [11]. Але результати наших досліджень свідчать про те, що різницю в електрогенезі ЕК щурів із СГ і НТЩ не можна пояснити тільки зменшенням внеску помпи, оскільки воно забезпечує різницю при-

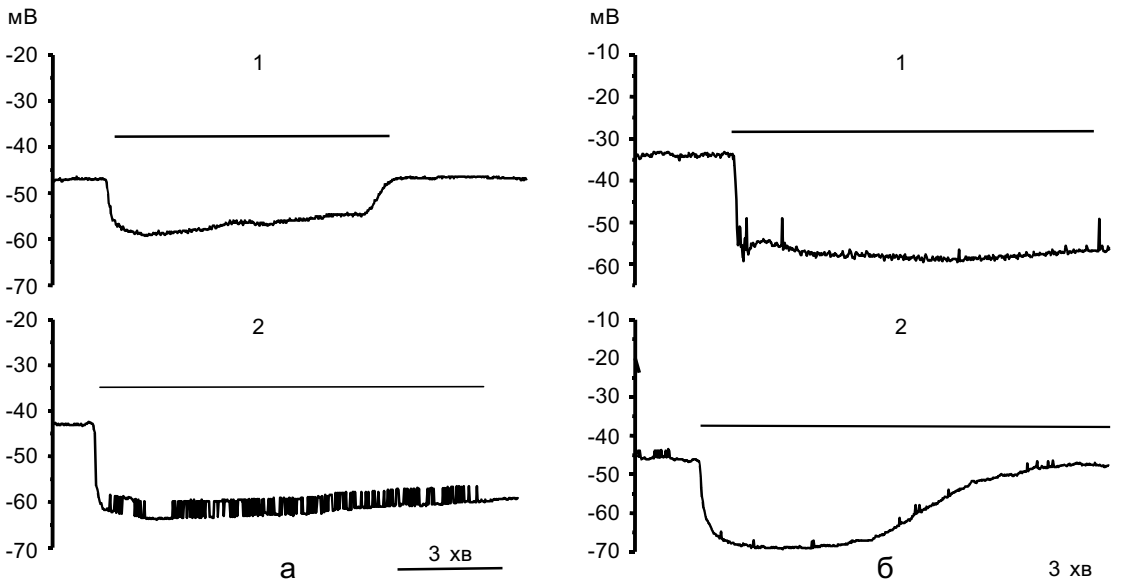

Рис.2. Варіанти (1,2) електричних реакцій на ацетилхолін ендотелію аорти нормотензивних (а) та гіпертензивних (б) щурів. Реєстрації від однієї судинної смужки нормотензивного щура (а1 та а2) демонструють однотипний паттерн гіперполяризації, тоді як він є різним на препаратах спонтанно-гіпертензивних щурів (б1 та б2).

близно в 3,5 мВ, в той час як різниця у середніх значеннях МП - близько 9 мВ. Очевидно, є інші механізми що забеспечують стійку деполяризацію ЕК при гіпертензії. Серед можливих чинників можуть бути зміни калієвої, натрієвої чи кальцієвої провідності, оскільки саме ці типи провідностей, як було показано раніше, забезпечують підтримання МПС ЕК [1,8,13].

Найнесподіванішим є те, що амплітуда ацетилхолін-індукованої гіперполяризації ЕК не менша за умов спадкоємної гіпертензії, а навіть більша. Відомо, що початкова фаза гіперполяризації пояснюється звільненням кальцію із внутрішньоклітинних кальцієвих депо та активацією кальційзалежних калієвих каналів [8,15]. Тому підвищення амплітуди гіперполяризації у щурів із СГ може пояснюватися збільшенням активності кальційзалежних калієвих каналів, що може відігравати компенсаторну роль, збільшуючи електрохімічний градієнт для надходження кальцію в ендотелій. Про збільшення при гіпертензії струму через кальційзалежні калієві канали гладеньком'язових клітин [14,16,] і калієвих струмів, викликаних гіпотонічним набряканням ЕК [9], повідомлялося раніше.

Ацетилхолініндуковані відповіді ЕК щурів із СГ відрізнялися за паттерном гіперполяризації навіть у межах одного судинного препарату, чого не спостерігалося у НТЩ. Оскільки ендотелій є моношаром електрично з'єднаних клітин, і у здорових тварин міжклітинна взаємодія не порушена, паттерн гіперполяризації за таких умов є дуже схожим. Тоді як у щурів із СГ він є різним, що свідчить про порушення міжклітинної взаємодії та кластеризацію шару ЕК при гіпертензії. Подібне спостерігали в нашій лабораторії в експериментах на старих тваринах [2].

Тобто, порушення відповіді ЕК при гіпертензії відбуваються як на рівні окремих клітин (зменшення значень МПС), так і на рівні міжклітинної взаємодії (різноманітність електричних відповідей). Причому зменшення амплітуди гіперполяризації ЕК при дії ацетилхоліну у СГ щурів не спостерігається, що свідчить про важливу роль міжклітинної сигналізації ендотелію в забезпеченні нормального ендотелійзалежного розслаблення судинних гладеньких м'язів.

A.I. Bondarenko, V.F. Sagach

ELECTRICAL RESPONSES OF AORTIC ENDOTHELIUM IN SPONTANEOUSLY-HYPERTENSIVE RATS

Endothelium-dependent relaxation is known to be depressed in arteries of SHR. We studied acetylcholine (Ach) -induced electrical responses of intact aortic endothelial cells from WKY rats and SHR using perforated patch-clamp method. Resting Em averaged -44,3±1,1 mV and -35,2±1,2 mV for WKY and SHR, respectively. Application of K^+ free solution depolarized endothelium by 11,0±0,7 mV and 7,5±1,3 mV ($p<0,05$) for WKY and SHR, respectively, showing inhibition of endothelial electrogenic Na^+/K^+ pump in SHR. The amplitude of Ach-induced hyperpolarization for WKY and SHR was 19±1 mV and 25±1 mV, respectively. However, the rate of its recovery was different within particular preparation taken from SHR whereas it was very similar within particular preparation from WKY rats, showing alterations in intercellular signaling in endothelium of SHR.

A.A.Bogomoletz Institute of Physiology

National Academy of Science of Ukraine, Kiev

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Бондаренко А.И., Сагач В.Ф. Модуляция мембранного потенциала клеток интактного эндотелия аорты морской свинки // Нейрофизиология.-1996.-**28**, N6.- С.260-266.
2. Ткаченко М.М., Яроцький В.В., Марченко С.М., Сагач В.Ф. Вплив ацетилхоліну та аденозинтрифосфату на мембранний потенціал інтактого ендотелію аорти щурів за умов старіння // Фізіол. журн.-2002.-**48**, N3.-С.3-8.
3. Busse R., Fichtner H., Luckhoff A., Kohlhardt M., Hyperpolarization and increased free calcium in acetylcholine-stimulated endothelial cells // Amer. J. Physiol.- 1988.- **255**.-H965-H969.
4. Cox R.H., Lozinskaya I., Dietz N.J. Differences in K+ current components in mesenteric artery myocytes from WKY and SHR //Amer. J. Hypertens.- 2001.- **14**, N9. P.897-907.
5. Dalle Lucca J.J., Borges A.C., Ponchirolli R., et al. Role of smooth muscle cell membrane potential in neointima formation in arteries of spontaneously

hypertensive rats // Pathophysiology.- 2001.- 7, N4.-P.245-250.
6. Daut J., Mehrke G., Nees S., Newman W.H. Passive electrical properties and electrogenic sodium transport of cultured quinea pig coronary endothelial cells // J. Physiol.-1988.-**402**.-P.237-254.
7. Gauthier K.M.,. Rusch N.J. Rat coronary endothelial cell membrane potential during hypertension // Hypertension.-2001.-**37**.-P.66-71.
8. Himmel H.M., Whorton A.R., Strauss H.C. Intracellular calcium, currents, and stimulus-response coupling in endothelial cells // Ibid.- 1993.- **21**.-P.112-127.
9. Kohler R., Distler A., Hoyer J. Increased mechanosensitive currents in aortic endothelial cells from genetically hypertensive rats // J. Hypertens.- 1999.- **17**, N3,-P.365-371.
10. Luscher R.F., Vanhoutte P.M. Endothelium-dependent contraction to acetylcholine in the aorta of the spontaneously hypertensive rat // Hypertension.-1986.-**8**.-P.344-348.
11. Manjeet S., Sim M.K. Decreased Na^+K^+ATPase activity in the aortic endothelium and smooth muscle of the spontaneously hypertensive rats // Clin. Exp. Hypertens.-1987.-**9**, N4. - P.797-812.
12. Marchenko S.M., Sage S.O. Electrical properties of resting and acetylcholine-stimulated endothelium in intact rat aorta // J.Physiol.-1993.- **462**, N3.-P.735-751.
13. Marin J., Redondo. Vascular sodium pump: endothelial modulation and alterations in some pathological processes and aging // Pharmacol. and Therapeut.-1999.-**84**.-P.249-271.
14. Martens J.R., Gelband C.H. Alterations in rat interlobar artery membrane potential and K^+ channels in genetic and nongenetic hypertension // Circulat. Res.- 1996.-**79**.-P.295-301.
15. Nilius B., Viana F., Droogmans G. Ion channels in vascular endothelium // Annu. Rev. Physiol. – 1997.-**59**.-P.145-170.
16. Rusch N.J, De Lucena R.G, Wooldridge T.A, et al. Ca^{2+}-dependent K^+ current is enhanced in arterial membranes of hypertensive rats // Hypertension.-1992.-**19**.-P.301-307.
17. 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.
18. Soloviev A.I., Stefanov A.V., Bazilyuk O.V, Sagach V.F. Phospholipid vesilcles (liposomes) restore endothelium-dependent cholinergic relaxation in thoracic aorta from spontaneously-hypertensive rats //J. Hypertension.– 1993.- **11**.-P.623-62**7.**
19. Vanhoutte P.M. Endothelial dysfunction in hypertension // Ibid.- 1996.-**14**.- S83-S93.
20. Wellman G.C., Cartin L., Eckman D.M., et al., Membrane depolarization, elevated Ca(2+) entry, and gene expression in cerebral arteries of hypertensive rats //Amer. J. Physiol. Heart Circulat. Physiol.- 2001.- **281**, N6.- H2559-2267.
21. 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**, N1,Pt 1.-L78-84

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

Матеріал надійшов до редакції 25.06.2002