

С.М. Марченко

Порівняльна характеристика електрофізіологічних властивостей ендотеліальних клітин артерій

В експериментах на ізольованих артеріях миши, крысы, морской свинки и кролика проведено сравнительное исследование электрофизиологических свойств интактных эндотелиальных клеток. Показано, что эндотелиальные клетки всех изученных артерий электрически связаны и обладают близкими по значениям мембранными потенциалами. Ацетилхолин и АТФ вызывали во всех артериях как эластического, так и мускульного типа, однотипные электрические реакции, состоявшие из гиперполяризации и последующей деполяризации эндотелия. Межвидовые различия заключались в характерной для каждого вида животных амплитуде и продолжительности различных фаз электрических реакций.

ВСТУП

Ендотеліальні клітини кровоносних судин є незбудливими, проте існують всі підстави вважати, що мембранний потенціал відіграє важливу роль у регуляції їх функцій. По-перше, він підтримує електрохімічний градієнт для кальцію, впливаючи на внутрішньоклітинну концентрацію його іонів ($[Ca^{2+}]_i$) і регулюючи активність NO-синтази. По-друге, зміни мембранного потенціалу ендотеліальних клітин можуть електротонічно передаватися через міо-ендотеліальні щільові контакти в гладеньком'язові клітини, впливаючи на їх мембранний потенціал і регулюючи таким чином їх електричну збудливість. У результаті цього, мембранний потенціал ендотелію бере участь як в NO-залежній, так і в NO-незалежній регуляції судинного тонуса.

Надзвичайно суперечливими залишаються дані про величину потенціалу спокою ендотеліальних клітин та їх зміни під впливом вазоактивних факторів. Дослідження, проведені на інтактному ендотелії ізольованої грудної аорти щура і кроля показали, що ендотеліальні клітини *in situ* мають стабільний, характер-

ний для них негативний потенціал [1-4]. Такими ж однотипними є і реакції ендотеліальних клітин аорти на вазоактивні агоністи.

Залишається невідомим, наскільки властивості ендотеліальних клітин грудної аорти справедливі для ендотеліальних клітин інших судин. Це питання тим більше є актуальним, що дослідження на культивованих ендотеліальних клітинах свідчить про велику варіабельність їх властивостей [5]. З метою з'ясування цього питання ми досліджували електрофізіологічні властивості інтактних ендотеліальних клітин різних артерій лабораторних тварин.

МЕТОДИКА

Експерименти проведено на загальній сонній і хвостовій артеріях щурів, загальній сонній артерії і грудній аорті морських свинок, грудній аорті мишей і загальній сонній і коронарній артеріях кроля.

Мембранний потенціал ендотелію артерій реєстрували методом, розробленим раніше для реєстрації мембранного потенціалу аорти щура [3]. Ізольовані артерії очищали від прилеглої тканини і нарізали на сегменти завдовжки

3-4 мм, які зберігали в модифікованому розчині Кребса наступного складу (в ммоль/л): NaCl - 118,3, NaHCO₃ - 25, KCl - 4,7, NaH₂PO₄ - 1,2, MgSO₄ - 1,2, CaCl₂ - 2,5, глюкоза - 11,1, феноловий червоний - 0,02. Для того щоб відвернути бактеріальне пошкодження судини, в розчин додавали гентаміцин у концентрації 50 мкг/мл. Розчин безперервно аерувався сумішшю 95% O₂ і 5% CO₂. Перед експериментом сегменти аорти розрізали вздовж і приколювали люмінальною поверхнею вгору до дна експериментальної камери об'ємом 100-150 мкл і перфузували розчином Кребса зі швидкістю 0,12 мл/хв.

Мембранний потенціал ендотелію реєстрували методом "patch clamp" у конфігурації "ціла клітина". Реєструвальні піпетки заповнювали розчином наступного складу (в ммоль/л): KCl - 140, HEPES-NaOH - 10; рН 7,3. Перед заповненням піпетки до розчину додавали ністатин у концентрації 200-300 мкг/мл. Електричний контакт з ендотелієм, як правило, створювався через декілька хвилин після формування гігаомного контакту з мембраною клітини. Експерименти проводили при 20 -22°C. Фармакологічні агенти аплікували перфузією робочої камери.

РЕЗУЛЬТАТИ

Як було показано раніше, умови експерименту і, зокрема, склад внутрішньоклітинних роз-

чинів могли суттєво впливати на електрофізіологічні властивості ендотеліальних клітин, тому в цій роботі всі експерименти проведено за однакових умов, ідентичних тим, в яких раніше досліджували властивості ендотеліальних клітин аорти щурів і кролів [1, 4].

Досліджено ендотеліальні клітини загальної сонної артерії щурів, морських свинок і мишей і коронарної артерії кролів. Ендотеліальні клітини всіх досліджених судин мали вхідний опір, який варіював у межах від 36 до 48 МОм (таблиця). Низький вхідний опір інтактних ендотеліальних судин вказує на наявність добре розвинутої системи електричних контактів між клітинами артерій.

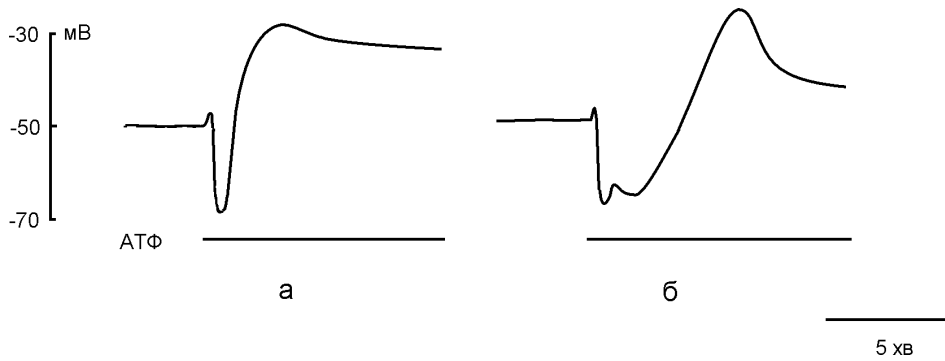
Мембранні потенціали інтактних ендотеліальних клітин варіювали в різних артеріях від -47 до -51 мВ (див. таблицю). Ці значення близькі до значень мембранного потенціалу ендотеліальних клітин грудної аорти щурів, виміряних за ідентичних умов. Відмінності у значеннях мембранних потенціалів різних артерій однієї і тієї ж тварини були невеликими і статистично недостовірними. Це дає нам змогу припускати, що потенціали спокою ендотеліальних клітин всіх макроциркуляторних судин близькі між собою і є спільною властивістю цих клітин.

Електричні реакції ендотелію загальної сонної та хвостової артерій щурів на ацетилхолін і АТФ були подібними до реакцій на ці речовини ендотелію грудної аорти щурів у

Мембранні потенціали спокою інтактного ендотелію різних судин

Судини	Вхідний опір, МОм	Мембранний потенціал, мВ
Загальна сонна артерія щура (n=7)	38 ± 14	50 ± 3
Хвостова артерія щура (n=8)	42 ± 9	48 ± 4
Загальна сонна артерія морської свинки (n=4)	36 ± 12	46 ± 2
Грудна аорта морської свинки (n=5)	45 ± 11	47 ± 3
Грудна аорта миші (n=4)	48 ± 15	51 ± 2
Загальна сонна артерія кроля (n=4)	41 ± 12	50 ± 3
Коронарна артерія кроля (n=5)	39 ± 10	51 ± 4
Грудна аорта кроля (n=58)	36 ± 12	47 ± 5

Примітка: n – кількість досліджених тварин.



Електричні реакції ендотелію загальної сонної артерії кроля (а) і щура (б) на АТФ (100 мкмоль/л).

тих же тварин ($n=7$ і $n=8$ відповідно). Електричні реакції ендотелію загальної сонної артерії і грудної аорти морських свинок ($n=5$) і загальної сонної і каротидної артерії ($n=4$) і грудної аорти ($n=12$) кролів були якісно схожими з реакціями на ці речовини ендотеліальних клітин аорти щурів, відрізняючись від них тільки вираженістю окремих фаз. Як і в аорті щурів, електричні реакції на вазодилататори складались із початкової гіперполяризації з наступною деполяризацією. І реакції на АТФ мали більш глибоку фазу деполяризації. Як і в багатьох ендотеліальних клітинах аорти фазі гіперполяризації, викликаній АТФ, у більшості випадків передувала короткострокова (5-10 с) деполяризація ендотелію на 2-3 мВ. Відмінності між електричними реакціями, що викликані ацетилхоліном і АТФ в ендотеліальних клітинах артерій щурів та інших тварин, заключались в тому, що ацетилхолін не викликав в ендотелії аорти морських свинок і кролів деполяризації вищої від потенціалу спокою, тоді як реакції на АТФ мали дуже коротку фазу гіперполяризації (рисунок). Так, середня тривалість фази гіперполяризації, викликаній АТФ в артеріях щурів і кролів становила $3,2 \pm 0,4$ ($n=35$) і $0,35 \text{ хв} \pm 0,1 \text{ хв}$ ($n=19$) відповідно. Таким чином, спільний патерн електричних реакцій ендотеліальних клітин на ендотеліозалежні вазодилататори був ідентичним у різних тварин. Він складався із початкової гіперполяризації, яка змінювала-

ся, залежно від виду тварин, на більш або менш глибоку деполяризацію.

ОБГОВОРЕННЯ

Вхідний опір ендотеліальних клітин був близько декількох десятків мегаом. Таке досить низьке значення вхідного опору вказує на наявність вискоефективних електричних зв'язків між ендотеліальними клітинами. Ендотелій, очевидно, являє собою синцитіум клітин, в якому мембранний потенціал і електричні реакції ендотелію на агоністи формуються не на рівні окремих клітин, а представляють сумарну реакцію великих груп ендотеліальних клітин. Результатом цього є функціональна інтеграція ендотелію [8].

Мембранні потенціали ендотелію всіх артерій, досліджених у роботі, були практично однаковими, незалежно від виду тварин. Можна припустити, що мембранний потенціал у діапазоні від -45 до -50 мВ характерний для всіх ендотеліальних клітин артерій ссавців. Наявні в літературі дані вимірів мембранного потенціалу ендотелію *in situ* підтверджують цю гіпотезу [1, 3-7, 9, 10]. Особливий інтерес представляють відомості про мембранний потенціал ендотеліальних клітин артеріол. Мембранний потенціал ендотелію артеріол защічних мішків золотистих хом'ячків становив -48 – -52 мВ [7], тобто, був близьким до мембранного потенціалу ендотелію

великих артерій. В іншій роботі вимірювався мембранний потенціал ендотелію артеріол мезентерію морських свинок який був близьким до -45 мВ [9]. Недавно було виміряно мембранний потенціал ендотеліальних клітин артеріол легень щурів [6]. У дорослих тварин він був також близько -45 мВ, тобто, в обох випадках він наближався до значень, виміряних нами в великих судинах. Враховуючи те, що описані вище вимірювання зроблено в різних експериментальних умовах, можна зробити висновок, що потенціали спокою ендотеліальних клітин артерій, незалежно від функціональної спеціалізації і виду тварин, дуже близькі за значеннями.

Наявні в нашому розпорядженні дані про дію агоністів на ендотелій *in situ* також свідчать про велику схожість ендотеліальних клітин різноманітних артерій. Спільний характер цих реакцій однаковий, проте помітні міжвидові відмінності в тривалості і величині різних фаз реакції. У цих експериментах спостерігалися великі відмінності тривалості та величини викликаного АТФ гіперполяризації в ендотеліальних клітинах артерій щурів і кролів. Літературні дані також вказують на принципову схожість реакцій на агоністи *in situ*. В артеріолах мезентерію морських свинок ацетилхолін викликав двофазну гіперполяризацію, ідентичну тій, що спостерігалася в наших експериментах [7,9,10]. Автори, ймовірно, не проводили тривалих аплікацій ацетилхоліну, тому невідомо, чи є деполяризаційна фаза у цих реакціях, але наведені в цій статті ілюстрації показують помітне збільшення мембранного потенціалу в кінці аплікації ацетилхоліну, що свідчить про те, що і в цій судині більш тривала його аплікація ймовірно могла викликати деполяризацію. В цілому, наявні дані дозволяють зробити висновок, що електричні реакції ендотеліальних клітин артерій ссавців *in situ* на ацетилхолін і АТФ носять однотипний характер.

S. M. Marchenko

COMPARATIVE STUDY OF ELECTROPHYSIOLOGICAL PROPERTIES OF ARTERIAL ENDOTHELIAL CELLS

The electrophysiological properties of intact endothelial cells of isolated arteries from mice, rats, guinea pigs and rabbits have been studied. Endothelial cells in all studied arteries were electrically coupled and had similar membrane potentials. The electrical responses to acetylcholine and ATP in the arteries of both elastic and muscular type were qualitatively similar, but varied among species in the length and amplitude of different stages of the responses.

A.A. Bogomoletz Institute of Physiology

National Academy of Sciences 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**, №1. – С. 9-16.
2. Marchenko, S.M., Sage, S.O. Calcium-activated potassium channels in the endothelium of intact rat aorta // J. Physiol. – 1996. – **492**. – P. 53-60.
3. Marchenko S.M., Sage S.O. Electrical properties of resting and acetylcholine-stimulated endothelium in intact rat aorta // Ibid. - 1993. - **462**. - P. 735-751.
4. Marchenko S.M., Sage S.O. Mechanism of acetylcholine action on membrane potential of endothelium of intact rat aorta // Amer. J. Physiol. - 1994. - **266**. - P. H2388-H2395.
5. Nilius B., Viana F., Droogmans G. Ion channels in vascular endothelium // Annu. Rev. Physiol. - 1997. - **59**. - P. 145-70.
6. Olschewski A., Olschewski H., Brau M.E. et al. Basic electrical properties of *in situ* endothelial cells of small pulmonary arteries during postnatal development // Amer. J. Respir. Cell. Mol. Biol. – 2001. – **25**, №3. – P. 285-90.
7. Segal S.S., Beny J.L. Intracellular recording and dye transfer in arterioles during blood flow control // Amer. J. Physiol. - 1992. - **263**. – P. H1-H7.
8. Usachev Y.M., Marchenko S.M., Sage S.O. Cytosolic calcium concentration in resting and stimulated endothelium of excised intact rat aorta // J. Physiol. - 1995. – **489**. - P. 309-317.
9. Yamamoto Y., Fukuta H., Nakahira Y., Suzuki H. Blockade by 18 β -glycyrrhetic acid of intercellular electrical coupling in guinea-pig arterioles // J. Physiol. - 1998. - **511**. – P. 501-13.

10. Yamamoto Y., Imaeda K., Suzuki H. Endothelium-dependent hyperpolarization, intercellular electrical coupling in guinea-pig mesenteric arterioles // Ibid. - 1999. - **514**. - P. 505-13.

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

*Матеріал надійшов до
редакції 4.03.2002*