

С.М. Марченко

Вплив етанолу на ендотелій легеневої артерії щура

Изучено влияние этанола на мембранный потенциал и внутриклеточную концентрацию Ca^{2+} ($[Ca^{2+}]_i$) в интактном эндотелии изолированной легочной артерии крысы. Показано, что этанол вызывает гиперполяризацию и двухфазное повышение $[Ca^{2+}]_i$ в эндотелии. Повышение $[Ca^{2+}]_i$ происходило за счет выделения Ca^{2+} из внутриклеточных депо и его входа из внеклеточной среды. Описанный эффект может объяснить вазодилататорное действие этанола на легочные артерии.

ВСТУП

Дія етанолу на організм не опосередковується специфічними рецепторами, тому надзвичайно різноманітна. Зокрема, повідомлялось, що етанол може викликати і вазоконстрикцію, і вазодилатацію в різних ділянках судинного русла [2-4,7,12]. Ці реакції можуть бути ендотелійзалежними та ендотелійнезалежними. При цьому етанол, як правило, діє як на ендотелій, так і на гладеньком'язові клітини судини. Картина ще більше ускладнюється тим, що етанол може впливати на нервові закінчення в стінці судини і гуморальну регуляцію судинного тонуусу [1,6]. Сумарна реакція судин на етанол визначається дією всіх цих факторів.

Щоб розібратись у механізмах дії алкоголю, слід вивчити його ефекти на більш простих системах, ніж організм чи орган. У цій роботі досліджено вплив етанолу на електричну та кальцієву сигналізацію в ендотелій легеневої артерії щура. Раніше повідомлялося, що етанол викликає ендотелійзалежне розслаблення легеневої артерії [4,7]. Внутрішньоклітинні механізми цієї реакції невідомі.

МЕТОДИКА

В експериментах були використані самці щурів масою 200-250 г. Легеневу артерію на-

різали на сегменти довжиною близько 2 мм, які зберігали у насиченому карбогеному модифікованому розчині Кребса наступного складу (в ммоль/л): NaCl – 118,3, NaHCO₃ – 25, KCl – 4,7, NaH₂PO₄ – 1,2, CaCl₂ – 2,5, MgCl₂ – 1,2, глюкоза – 11,1. До розчину додавали гентаміцин – 50 мкг/мл. Перед експериментом сегмент артерії розрізали вздовж і фіксували в камері об'ємом близько 100 мкл. Камеру перфузували розчином Кребса зі швидкістю 0,12 мл/хв.

Внутрішньоклітинну концентрацію іонів кальцію ($[Ca^{2+}]_i$) вимірювали флуорометрично, використовуючи кальційчутливий барвник фура-2 [5,11]. Сегменти легеневої артерії інкубували протягом 1 год у розчині фура-2 АМ (10 мкмоль/мл), після чого монтували в робочій камері, як описано вище. Світло від ксенонової лампи з довжиною хвиль 340 і 380 нм проектували на ендотелій через водоімерсійний об'єктив мікроскопа ("Нікон", Японія). Флуоресценцію препарату збирали через той же об'єктив, а її інтенсивність на довжині хвилі 500 нм вимірювали фотопомножувачем. $[Ca^{2+}]_i$ обчислювали, використовуючи відношення інтенсивностей флуоресценції при освітленні препарату світлом з довжиною хвиль 340 і 380 нм (F_{340}/F_{380}). Константа дисоціації комплексу Ca^{2+} -фура-2 приймалася рівною 224 нм [5]. Калі-

бровку сигналу досягали аплікацією іоніцину (10 мкмоль/л) при наявності $2,5 \text{ ммоль/л Ca}^{2+}$, а потім у безкальцієвому розчині. Автофлюоресценцію препарату визначали через аплікацію дигітоніну (50 мкмоль/л) у кінці експерименту.

Мембранний потенціал ендотелію вимірювали за допомогою методу перфорованого "patch-clamp" у режимі фіксації струму, за методикою, описаною раніше [8,9]. Піпетку заповнювали розчином, що містив (в ммоль/л): KCl – 140, NaCl – 10, NERES-КОН – 10 (рН 7,3). Експерименти було виконано при кімнатній температурі $20 - 22 \text{ }^\circ\text{C}$.

РЕЗУЛЬТАТИ

Стимулом для проведення цієї роботи, було те, що при використанні етанолу як розчинника спостерігалася гіперполяризація мембрани ендотелію, незалежно від хімічної природи розчиненої речовини. Контрольні експерименти показали, що етанол сам здатний викликати значну гіперполяризацію ендотелію (рис. 1). Цей ефект був дозозалежним і підвищувався при збільшенні концентрації етанолу в діапазоні від $0,02$ до 1% . При концентрації етанолу $0,5 \%$ мембранний потенціал зменшувався від контрольного значення -53 ± 4 до $-71 \text{ мВ} \pm 7 \text{ мВ}$ ($n=6$). Половинний ефект досягав при концентрації етанолу $0,23 \pm 0,07 \%$ ($n=5$).

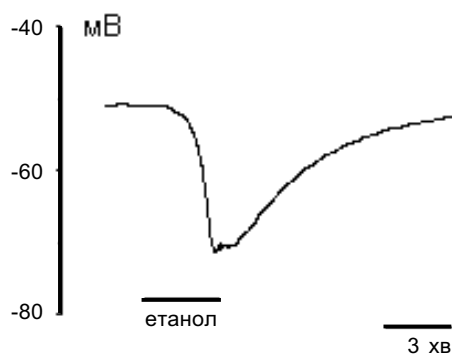


Рис. 1. Вплив етанолу на мембранний потенціал ендотелію легеневої артерії щура. Етанол в концентрації $0,5 \%$ аплікований на судину в момент, вказаний рискою під рисунком.

Гіперполяризація ендотелію, що викликала ацетилхоліном, АТФ і деякими іншими ендотелійзалежними вазодилататорами пов'язана з активацією кальційактивованих калієвих каналів, викликаной збільшенням $[\text{Ca}^{2+}]_i$ [8-10]. Цілком можливо, що етанол діє аналогічно, тому було вивчено його вплив на $[\text{Ca}^{2+}]_i$.

Концентрація Ca^{2+} в ендотелії легеневої артерії у спокої становила $0,086 \text{ мкмоль/л} \pm 0,013 \text{ мкмоль/л}$ ($n=9$). Етанол викликав значне збільшення $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (рис. 2, а). Ця реакція була двофазною і складалася з початкового піку, який змінювався спадом до більш-менш постійного рівня, що перевищував $[\text{Ca}^{2+}]_i$ в спокої. Середня максимальна амплітуда реакції на аплікацію $0,5 \%$ етанолу становила $0,71 \text{ мкмоль/л} \pm 0,13 \text{ мкмоль/л}$ ($n=6$). Концентрація Ca^{2+} через 10 хв після дії етанолу була $0,23 \text{ мкмоль/л} \pm 0,06 \text{ мкмоль/л}$ ($n=4$).

Збільшення $[\text{Ca}^{2+}]_i$ може відбуватись у результаті надходження Ca^{2+} з позаклітинного середовища, або його виділення із внутрішньоклітинних депо. У розчині Кребса, який не містив CaCl_2 , але містив 1 ммоль/л EGTA для зв'язування залишкового Ca^{2+} , етанол викликав короткочасне збільшення $[\text{Ca}^{2+}]_i$ в ендотелії, після чого його вміст зменшувався до значень, рівних або менших від контрольного рівня (див.рис. 2, б). Максимальна концентрація Ca^{2+} в цих експериментах становила $0,58 \text{ мкмоль/л} \pm 0,12 \text{ мкмоль/л}$ ($n=4$). Таким чином, етанол збільшував $[\text{Ca}^{2+}]_i$ в ендотелії, викликаючи як його вивільнення із внутрішньоклітинних депо, так і вхід із позаклітинного середовища.

ОБГОВОРЕННЯ

Слід відзначити, що етанол викликає підвищення внутрішньоклітинної концентрації Ca^{2+} в ендотелії легеневої артерії. Ця дія етанолу зумовлена як виділенням Ca^{2+} із внутрішньоклітинних депо, так і його входом із позаклітинного розчину. За аналогією з ацетилхоліном і АТФ [8-10], можна припусти-

ти, що викликана етанолом гіперполяризація пов'язана з активацією кальційактивованих калієвих каналів. Ендотеліальні клітини незбудливі. Існують переконливі дані, що ендотеліальні клітини хоча б великих судин позбавлені потенціалактивованих кальцієвих каналів. Вхід Ca^{2+} в ендотеліальні клітини здійснюється через потенціал незалежні канали, які активуються спустошенням кальцієвих депо [8,9,11]. Тому гіперполяризація підсилює кальцієвий сигнал внаслідок збільшення електрохімічного потенціалу Ca^{2+} і, таким чином, здійснює позитивний зворотний зв'язок.

Викликане етанолом розслаблення легеневої артерії ендотелійзалежне і частково блокується інгібітором NO синтази L-NAME [4]. Відомо, що збільшення $[\text{Ca}^{2+}]_i$ в ендотеліальних клітинах активує NO-синтазу. Підвищення $[\text{Ca}^{2+}]_i$ під дією етанолу дозволяє пояснити L-NAME-залежний компонент реакції легеневої артерії на етанол. У цій реакції також є компонент, що інгібується деполаризацією мембрани розчином KCl. Цей компонент вазодилатації може бути пов'язаний з наявністю електричного зв'язку між ендотелієм і гладеньком'язовими клітинами. Гіперполяризація ендотелію етанолом може

передаватися через міо-ендотеліальні контакти і гіперполяризувати гладеньком'язові клітини, викликаючи їх розслаблення.

У деяких працях повідомлялося, що етанол послаблює ендотелійзалежне розслаблення судин [1,6]. Як було показано вище, він викликає виділення Ca^{2+} із внутрішньоклітинних депо. Таким чином, етанол може зменшувати вміст Ca^{2+} у внутрішньоклітинних депо і, відповідно, вміст Ca^{2+} , що виділяється під дією вазодилаторів, що в свою чергу призводить до послаблення вазодилатації.

Наскільки описані в цій роботі ефекти етанолу притаманні ендотелію інших частин судинного русла залишається невідомим. Етанол викликає гіперполяризацію ендотелію аорти щура, що вказує на можливість того, що тут також присутній цей ефект. Згідно з різними публікаціями, етанол викликає ендотелійнезалежне скорочення або не впливає на тонус аорти щура [3,6]. Як уже відмічалося вище, етанол відрізняється широким спектром нерідко фізіологічно різнонаправлених дій. Тому не виключено, що в цьому випадку констрикторна дія етанолу на гладеньком'язові клітини аорти перевищує або врівноважує ефекти, пов'язані з його дією на ендотелій.

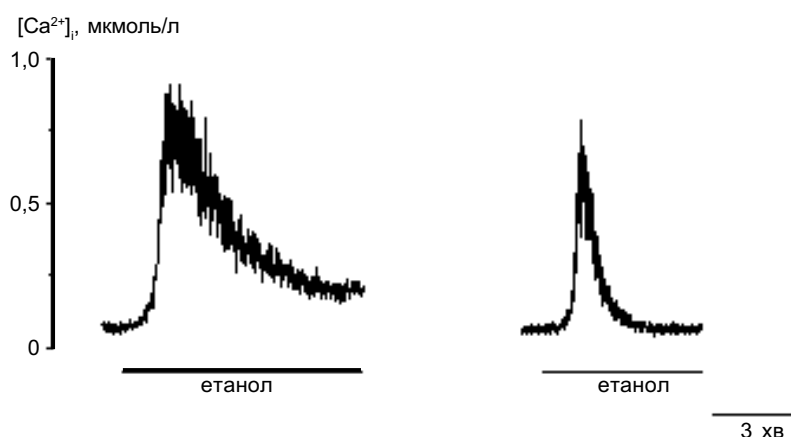


Рис. 2. Вплив етанолу на концентрацію внутрішньоклітинного Ca^{2+} в ендотелії легеневої артерії щура: а – у стандартному розчині Кребса (2 ммоль/л CaCl_2); б – безкальцієвому розчині Кребса, що містив 1 ммоль/л EGTA, який додавали для зв'язування залишкового Ca^{2+} . Концентрація етанолу – 0,5 %.

S.M.Marchenko

**EFFECTS OF ETHANOL ON
ENDOTHELIUM OF PULMONARY
ARTERY**

Effects of ethanol on membrane potential and intracellular calcium concentration in intact endothelium of isolated pulmonary arteries were investigated. Ethanol evoked hyperpolarization and biphasic increase in $[Ca^{2+}]_i$ in the endothelium due to both Ca^{2+} release from intracellular stores and Ca^{2+} entry from extracellular solution. These data allow endothelium-dependent dilation of pulmonary artery evoked by ethanol to be explained.

*A.A.Bogomoletz Institute of Physiology
National Academy of Sciences of Ukraine, Kiev*

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Criscione L., Powell J.R., Burdet R. et al. Alcohol suppresses endothelium-dependent relaxation in rat mesenteric vascular beds // *Hypertension*. – 1989. – **13**. - P. 964-7.
2. Farago M., Szabo C., Horvath I. et al. Differential vascular actions of ethanol in feline middle cerebral and mesenteric artery // *Acta. Physiol. Hung.* – 1991. – **78**. - P. 119-25.
3. Flesch M., Schwarz A., Bohm M. Effects of red and white wine on endothelium-dependent vasorelaxation of rat aorta and human coronary arteries // *Amer. J. Physiol.* – 1998. – **275**. - P. H1183-90.
4. Greenberg S.S., Xie J., Wang Y. et al. Ethanol relaxes pulmonary artery by release of prostaglandin and nitric oxide // *Alcohol*. – 1993. – **10**. - P. 21-9.
5. Gryniewicz G., Poenie M., Tsien R.Y. A new generation of calcium indicators with greatly improved fluorescent properties // *J. Biol. Chem.* – 1985. – **260**. - P. 3440-3450.
6. Hatake K., Wakabayashi I., Hishida S. Mechanism of inhibitory action of ethanol on endothelium-dependent relaxation in rat aorta // *Eur. J. Pharmacol.* – 1993. – **20**. - P. 441-444.
7. Lawrence R.N., Dunn W.R., Wilson V.G. Endothelium-dependent relaxation in response to ethanol in the porcine isolated pulmonary artery // *J. Pharm. Pharmacol.* – 1998. – **50**. - P. 885-90.
8. Marchenko S.M., Sage S.O. Electrical properties of resting and acetylcholine-stimulated endothelium in intact rat aorta // *J. Physiol.* – 1993. – **462**. - P. 735-751.
9. 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.
10. Marchenko S.M., Sage S.O. Calcium-activated potassium channels in the endothelium of intact rat aorta // *J. Physiol.* – 1996. – **492**. - P. 53-60.
11. Usachev Y.M., Marchenko S.M., Sage S.O. Cytosolic calcium concentration in resting and stimulated endothelium of excised intact rat aorta // *Ibid.* – 1995. – **489**. - P. 309-317.
12. Zhang A., Altura B.T., Altura B.M. Ethanol-induced contraction of cerebral arteries in diverse mammals and its mechanism of action // *Eur. J. Pharmacol.* – 1993. – **248**. - P. 229-36.

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

*Матеріал надійшов до
редакції 4.03.2002*