

С. М. Марченко

## Електрофізіологічні властивості інтактних ендотеліальних клітин порожнистої вени щура

*В изолированной нижней полой вене крысы методом patch-clamp регистрировался мембранный потенциал эндотелиальных клеток. Потенциал покоя эндотелиальных клеток составлял  $69 \text{ мВ} \pm 2 \text{ мВ}$  и был примерно на  $20 \text{ мВ}$  более негативен, чем в эндотелиальных клетках артерий. В 40% изученных препаратов наблюдались спонтанные осцилляции мембранного потенциала эндотелиальных клеток. Показано, что осцилляции представляют собой генерируемые в гладкой мышце сосуда кальциевые потенциалы действия, электротонически передающиеся в эндотелиальные клетки.*

### ВСТУП

Мембранний потенціал ендотеліальних клітин відіграє подвійну фізіологічну роль. По-перше, він модулює надходження  $\text{Ca}^{2+}$  в ендотеліальні клітини, регулюючи таким чином кальційзалежні внутрішньоклітинні процеси і, зокрема, синтез NO [3, 9]. По-друге, завдяки міоендотеліальним щільним контактам, він впливає на мембранний потенціал гладеньком'язових клітин, беручи участь в NO-незалежній регуляції судинного тонуусу [6, 11].

Дані про електрофізіологічні властивості ендотеліальних клітин вен, отримані на клітинних культурах, досить суперечливі. У роботах, проведених на інтактному ендотелії артерій, було переконливо показано, що властивості ендотеліальних клітин *in situ* можуть суттєво відрізнятися від властивостей цих клітин у культурі [1, 2, 4–11]. Причиною цього, найімовірніше, є те, що в культурі відсутні численні диференціувальні фактори, які визначають фенотип ендотеліальних клітин. Властивості ендотеліальних клітин вен *in situ* до цього часу практично не вивчалися. Мета нашої роботи - дослідити електрофізіологічні властивості інтактних ендоте-

ліальних клітин нижньої порожнистої вени щура.

### МЕТОДИКА

Експерименти проведено на нижній порожнистій вені щурів віком від 3 тиж до 2 міс. Мембранний потенціал ендотелію вени реєстрували, з деякими модифікаціями, методом, розробленим раніше для реєстрації мембранного потенціалу аорти щура [3]. Ізольовані вени 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,  $\text{NaHCO}_3$  – 25, KCl – 4,7,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  – 1,2,  $\text{MgSO}_4$  – 1,2,  $\text{CaCl}_2$  – 2,5, глюкоза – 11,1, феноловий червоний – 0,02. Для того, щоб запобігти бактеріальному пошкодженню судин, в розчин додавали гентаміцин у концентрації 50 мкг/мл. Розчин безперервно аерували сумішшю 95%  $\text{O}_2$  і 5%  $\text{CO}_2$ . Перед експериментом сегменти вени розрізали вздовж і приколювали люмінальною поверхнею в верх до дна експериментальної камери місткістю 100–150 мкл і перфузували розчином Кребса зі швидкістю 0,1 – 0,2 мл/хв.

© С. М. Марченко

Мембранний потенціал ендотелію реєстрували методом *patch-clamp* у конфігурації “ціла клітина”. Реєструвальні піпетки заповнювали розчином наступного складу (в ммоль/л): KCl – 140, NEPES-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. Фармакологічні агенти аплікували перфузією робочої камери. Експерименти проводили при 20 – 22°C.

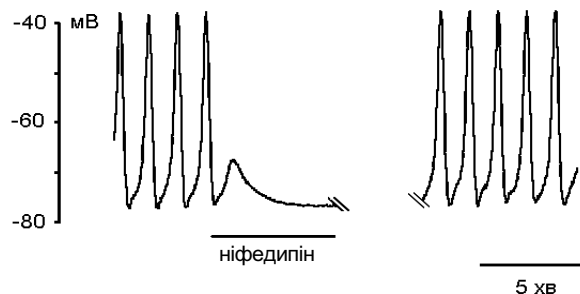
## РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Для контролю вхідного опору ендотелію протягом усього періоду реєстрації на препарат подавалися невеликі імпульси струму, які підбиралися за величиною так, щоб викликати зміни мембранного потенціалу 2 – 4 мВ. Після утворення гігаомного контакту та встановлення електричного контакту з цитоплазмою вхідний опір поступово зменшувався протягом 5 – 10 хв, після чого залишався стабільним під час усього подальшого експерименту (до 1 год). Вхідний опір ендотеліальних клітин варіював у межах від 8 до 28 МОм. Реєстрація завжди здійснювалася від клітин, розташованих на поверхні судини. Поверхня судини в експериментах *patch-clamp* легко детектувалася за збільшеннями опору піпетки при дотику останньої до судини. Низький вхідний опір при наявності низького негативного мембранного потенціалу вказує на реєстрацію від клітин, сполучених ефективними електричними зв'язками. Беручи до уваги поверхневе розташування, цими клітинами могли бути тільки ендотеліальні клітини.

У 6 препаратах нестимульовані ендотеліальні клітини мали стабільний мембранний потенціал, який змінювався у різних клітин від –65 до –73 мВ, середнє значення –69 мВ ± 2 мВ (n=35). Ця величина приблизно на 20 мВ нижча, ніж виміряний за тих же умов

мембранний потенціал ендотеліальних клітин аорти щура та інших артерій [1, 2, 4–11].

У 4 досліджених тварин спостерігалися спонтанні осциляції мембранного потенціалу ендотеліальних клітин нижньої порожнистої вени амплітудою 30 – 45 мВ (рисунок). Кінетика цих осциляцій була аналогічна такій осциляцій мембранного потенціалу ендотелію, які викликалися АЦХ і АТФ [4, 5, 9], але різко відрізнялася від осциляцій, що викликалися вазоконстрикторами [6]. Щоб зрозуміти природу спонтанних осциляцій мембранного потенціалу, ми дослідили деякі їх властивості. Модулятор ріанодинових рецепторів ріанодин (10 мкмоль/л; n=4); не впливав на спонтанні осциляції мембранного потенціалу ендотелію. Це говорить проти участі ріанодинчутливих кальцієвих депо в генерації осциляцій. Видалення позаклітинного Ca<sup>2+</sup> і неселективний блокатор кальцієвих каналів Ni<sup>2+</sup> (2 ммоль/л) швидко і зворотно блокували ці осциляції. Таким чином, як і осциляції мембранного потенціалу, викликані вазодилататорами, спонтанні осциляції мембранного потенціалу порожнистої вени повністю залежали від входу Ca<sup>2+</sup> із позаклітинного середовища. Однак на відміну від викликаних АЦХ осциляцій, спонтанні осциляції блокувалися також ніфедипіном (1 мкмоль/л; n=3) і верапамілом (100 мкмоль/л; n=2), що вказує на участь потенціалкерованих кальцієвих каналів L-типу в генерації осциляцій. NO-продукуючий агент нітропрусид натрію (1 мкмоль/л; n=3) також блокував ці осциляції.



Інгібування осциляцій мембранного потенціалу ендотелію нижньої порожнистої вени щура ніфедипіном (10 мкмоль/л).

Ендотеліальні клітини всіх досліджених макросудин позбавлені потенціалкерованих кальцієвих каналів, у той же час ці канали широко розповсюджені в гладеньком'язових клітинах. Це дозволяє припустити, що осциляції в нижній порожнистій вені генеруються в гладеньком'язових клітинах судини і електротонічно передаються в ендотеліальні клітини через міоендотеліальні контакти. Подібне явище було нами вперше виявлено в аорті щура, де осциляції мембранного потенціалу в ендотеліальних клітинах викликаються вазоконстрикторами, що діють на гладенькі м'язи [6]. Для перевірки цього припущення ендотелій був механічно ізольований від гладеньком'язових клітин вени. В цьому препараті мембранний потенціал ендотеліальних клітин був постійним ( $-66 - -71$  мВ), незважаючи на наявність високоамплітудних осциляцій в інтактній судині ( $n=3$ ).

Пасивні властивості ендотеліальних клітин нижньої порожнистої вени щура, досліджені в цій роботі, багато в чому аналогічні властивостям інтактних ендотеліальних клітин аорти щура [4–6]. Як і в аорті, ендотеліальні клітини нижньої порожнистої вени мають надзвичайно низький вхідний опір. Це вказує на наявність низькоомних електричних зв'язків між великими групами ендотеліальних клітин. Особливістю ендотеліальних клітин нижньої порожнистої вени був дуже низький мембранний потенціал спокою ендотеліальних клітин вени. Нами було показано раніше, що мембранний потенціал ендотеліальних клітин артерій становить приблизно  $-45 - -50$  мВ і слабо відрізняється у різних артеріях [1]. Мембранний потенціал венозних ендотеліальних клітин, виміряний за тих самих експериментальних умов, виявився приблизно на 20 мВ більш негативним, ніж артеріальних. Іншою особливістю венозних ендотеліальних клітин виявилася наявність у 4 із 10 тварин спонтанних осциляцій мембранного потенціалу. За амплітудою і часовим перебігом ці осциляції дуже нагадують викликані ацетилхоліном чи АТФ осциляції мембранного потенціалу, описані нами в ендотелії аорти [4, 5, 9].

Але на відміну від останніх, в їх генерації беруть участь потенціалкеровані кальцієві канали і, як було показано, є причини вважати, що ці осциляції генеруються в гладеньком'язових клітинах судини і електротонічно передаються в ендотелій через міоендотеліальні щільні контакти. Таким чином, як і в аорті ендотелій і гладеньком'язові клітини судини нижньої порожнистої вени мають ефективні електричні зв'язки.

**S. M. Marchenko**

### **ELECTROPHYSIOLOGICAL PROPERTIES OF VENOUS ENDOTHELIAL CELLS**

Membrane potential has been recorded from endothelial cells of the rat inferior vena cava. The resting membrane potential of venous endothelial cells was  $69 \pm 4$  mV, which was about 20 mV more negative than resting potential of rat arterial endothelial cells measured under the same experimental conditions. 40% of the vein studied demonstrated spontaneous oscillations of endothelial membrane potential. These oscillations were found to be  $Ca^{2+}$  action potentials generated in the vein smooth muscle and electrotonically transferred into the endothelial cells.

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

### **СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ**

1. Марченко С. М. Порівняльна характеристика електрофізіологічних властивостей ендотеліальних клітин артерій // *Фізіол. журн.* – 2002. – **48**, №. – С. 82-87.
2. Яроцький В.В., Сагач В.Ф., Марченко С.М. Електричні властивості інтактного ендотелію аорти кроля // *Там само.* – 2001. – **47**, №1. – С. 9-16.
3. Busse R., Fichtner H., Luckhoff A., Kohlhardt M. Hyperpolarisation increased free calcium in acetylcholine-stimulated endothelial cells // *Amer. J. Physiol.* – 1988. – **255**. – P. H965-969.
4. 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.
5. 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.

6. Marchenko, S.M., Sage, S.O. Smooth muscle cells affect endothelial membrane potential in rat aorta // *Ibid.* – 1994. – **267**. – P. H804–H811.
7. Marchenko, S.M., Sage, S.O. Calcium-activated potassium channels in the endothelium of intact rat aorta // *J. Physiol.* – 1996. – **492**. – P. 53–60.
8. 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. 285–290.
9. 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.
10. Yamamoto Y., Fukuta H., Nakahira Y., Suzuki H. Blockade by 18 $\beta$ -glycyrrhetic acid of intercellular electrical coupling in guinea-pig arterioles // *Ibid.* – 1998. – **511**. – P. 501–513.
11. Yamamoto Y., Imaeda K., Suzuki H. Endothelium-dependent hyperpolarization, intercellular electrical coupling in guinea-pig mesenteric arterioles // *Ibid.* – 1999. – **514**. – P. 505–513.

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

*Матеріал надійшов до  
редакції 3.06.2002*