

П.К. Цапенко, Т.П. Лященко

## Зміни мембранного потенціалу гепатоцитів щурів під впливом вазопресину

*Досліджено основні електрофізіологічні властивості мембран гепатоцитів. Встановлено, що вольт-амперна характеристика клітин печінки має лінійну залежність. Це свідчить про відсутність електричної збудливості та важливу роль хемочутливих іонних каналів при розвитку електричних процесів на клітинній мембрані. Вивчали вплив вазопресину (ВП) на мембранний потенціал гепатоцитів щурів за допомогою мікроелектродної техніки. Показано, що ВП викликає гіперполяризацію мембран гепатоцитів, що відображає стимуляцію синтетичної активності клітин. Застосування ВП на тлі дії блокатора протейнінази С хелеритрину призводить до гіперполяризації мембран гепатоцитів, але меншої, ніж при застосуванні лише цього гормону. Цей факт доводить значну роль протейнінази С у реалізації ефектів ВП на гепатоцити та означає, що до цього процесу задучені й інші внутрішньоклітинні посередники. Таким чином, існує вірогідність, що аденілатциклаза опосередковує стимулювальний вплив гормону на жовчоутворювальну функцію гепатоцитів.*

*Ключові слова:* вазопресин, гепатоцит, мембранний потенціал, протейніназа С.

### ВСТУП

Функціонування найбільшої залози травного тракту – печінки, регулюється складними нейрогуморальними механізмами, серед яких важлива роль належить гормону нейрогіпофіза вазопресину (ВП). Було показано, що у культурі гепатоцитів і на ізольованій печінці ВП за фізіологічних концентрацій стимулює вихід кон'югованих жовчних кислот [9, 12]. Цей вплив здійснюється за участю вазопресинових рецепторів  $V_{1A}$ , оскільки застосування їхнього селективного антагоніста усувало стимулювальні ефекти ВП.

Наразі відомо три типи вазопресинових рецепторів:  $V_{1A}$ , зв'язування з яким викликає гідроліз інозитолтрифосфату ( $IP_3$ ) та підвищення внутрішньоклітинної концентрації  $Ca^{2+}$ ; цей тип рецепторів знайдено на мембрані гепатоцитів, тромбоцитів і гладеньком'язових клітин;  $V_2$ , зв'язування з ними активує аденілатциклазу та збільшення вмісту цАМФ; вважалося, що цей

тип рецепторів представлено лише в нирках, проте нині їх знайдено і в інших органах;  $V_{1B}$  ( $V_3$ ), що також пов'язаний з системою  $IP_3$ ; цей тип рецепторів знайдено у передньому відділі гіпофіза [6]. Згідно з джерелами літератури, гепатоцити є клітинами, котрі містять найбільшу кількість  $V_{1A}$ -рецепторів, які пов'язані з протейніназою С. Відомо, що гормони, вторинним посередником яких є остання, посилюють глікогеноліз і гліюконеогенез, а також інгібують жовчоутворення. І навпаки, гормони, які активують аденілатциклазу, послаблюють глікогеноліз і посилюють жовчоутворення [2, 3]. Виходячи з цього, можна зробити висновок, що ВП має стимулювати глікогеноліз і пригнічувати жовчоутворення, що підтверджують деякі автори [5, 15]. Проте існують дані і про стимулювальний вплив ВП на жовчоутворювальну функцію печінки [9, 12]. Крім того, описана можливість взаємодії сигнальних шляхів за участю фосфоліпази

© П.К. Цапенко, Т.П. Лященко

C та аденілатциклази у клітинах, що містили  $V_{1A}$ - та  $V_2$ -вазопресинові рецептори [8]. Враховуючи цей факт і нові відомості про локалізацію  $V_2$ -рецепторів не лише на клітинах нирок, як вважалося раніше, можна припустити можливість залучення декількох внутрішньоклітинних механізмів дії ВП у гепатоцитах [6]. Таким чином, визначення внутрішньоклітинних шляхів дії гормону дає змогу з'ясувати його вплив на згадані процеси у гепатоцитах.

Зв'язок мембранного потенціалу (МП) клітин із їх секреторною функцією досліджується досить довго. Показано кореляцію між зростанням МП секреторних клітин і посиленням їхньої секреторної активності (в тому числі й гепатоцитів), в той час як деполаризаційні зміни пов'язані зі зниженням такої активності та активацією трансмембранного транспорту [1, 2, 13]. Таким чином, зміни МП гепатоцитів указують на їх метаболічну та секреторну активність. Саме тому метою нашої роботи стало дослідження впливу ВП на електричну активність гепатоцитів і ролі протеїнкінази C у реалізації ефектів гормону.

## МЕТОДИКА

Досліди проводили на 10 лабораторних білих щурах масою 200–250 г, яких утримували в стандартних умовах віварію. Під час експерименту тварини знаходилися під тіопенталовим наркозом (5 мг/100 г маси тіла інтраперитонеально).

Вплив ВП на МП вивчали за допомогою мікроелектродної техніки методом печінкових слайсів [11]. У наркотизованих щурів печінку відмивали від крові за методикою Сеглена [10] та робили зрізи товщиною до 3 мм. Потім їх перфузували у експериментальній камері стандартним позаклітинним оптимальним для гепатоцитів сольовим розчином, температура якого була 37°C [2]; склад розчину був таким (ммоль/л): NaCl – 140, KCl – 4, CaCl<sub>2</sub> – 1,

MgCl<sub>2</sub> – 1, глюкоза – 10, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> – 1, HEPES – 10; рН 7,4 (NaOH).

Мікроелектроди виготовляли із боросилікатного скла на півавтоматі МЭ–4 та заповнювали 2,5 М розчином KCl у термостаті при 50°C протягом 10 год. Опір готових мікроелектродів становив 100–120 МОм. МП реєстрували за допомогою диференційного підсилювача, що був створений дослідно-конструкторським виробництвом Інституту фізіології ім. О.О.Богомольця НАН України на основі мікросхеми K140УД8Б. Сигнал від підсилювача спрямовувався через аналогово-цифровий перетворювач до комп'ютера, на якому реєструвався за допомогою спеціальної програми.

ВП ("Sigma", США) перфузували в максимально ефективній концентрації 100 нмоль/л [19]. Контролем був МП гепатоцитів до початку перфузії речовини. Для визначення ролі протеїнкінази C у реалізації ефектів ВП ми використовували її інгібітор хелеритрин ("Sigma", США). Печінковий зріз перфузували розчином з інгібітором (5 мкмоль/л) протягом 20 хв, після чого мікроелектрод вводили в клітину, а в перфузат додавали ВП в зазначеній вище концентрації. Хелеритрин у використаній нами концентрації повністю пригнічує активність ферменту [20]. Ми порівнювали МП у період після введення ВП у клітинах з пригніченою активністю протеїнкінази C та інтактних клітинах.

Вольт-амперну характеристику мембран гепатоцитів визначали, подразнюючи клітини електричним імпульсом від електростимулятора ЭСУ2, тривалість імпульсу становила 1 с. Вхідний опір мембран гепатоцитів R розраховували за формулою  $R = \Delta V / I$ , де I – сила струму, який подається зі стимулятора на клітину,  $\Delta V$  – зміна значення МП під впливом електричного імпульсу.

Результати було оброблено методами варіаційної статистики. Проводили тест

Шапіро–Уїлка, нормально розподілені результати обчислювали за критерієм t Стьюдента для залежних вибірок з урахуванням тесту Левена. Статистично значущими вважалися зміни при  $P < 0,05$ .

## РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Наші дослідження показали, що потенціал спокою гепатоцитів щурів становив  $22 \text{ мВ} \pm 4,5 \text{ мВ}$ , вхідний опір клітин –  $170 \text{ МОм} \pm 10,45 \text{ МОм}$ . Це узгоджується з літературними даними [4, 14]. Вольт-амперна характеристика гепатоцитів була лінійною (рис. 1), що свідчить про відсутність електричної збудливості гепатоцитів.

Проте слід відмітити деякі відхилення від лінійної залежності вольт-амперної характеристики в межах МП спокою, що говорить про певну залежність роботи іонних каналів від МП клітин у цьому діапазоні. Таке саме явище характерне і для гепатоцитів морських свинок і кролів [7]. Лінійна залежність вольт-амперної характеристики мембран гепатоцитів означає, що головну роль у змінах МП гепатоцитів відіграють не потенціалзалежні канали, а канали, асоційовані з рецепторами та внутрішньоклітинними посередниками.

Нами було встановлено, що ВП викликав статистично значущі гіперполяризаційні

зміни МП гепатоцитів з  $-20$  до  $-50 \text{ мВ}$  (рис. 2;  $P < 0,05$ ). Потенціал залишався на рівні приблизно  $-50 \text{ мВ}$  протягом усього часу дії речовини, тобто не спостерігалось реакції “вислизання”. Таким чином, наші результати свідчать, що ВП дійсно стимулює метаболічну активність гепатоцитів, активуючи процеси синтезу. Проте не можна стверджувати, що ця гіперполяризація пов’язана лише із активацією глюконеогенезу чи також з інтенсифікацією жовчоутворення.

Відомо, що ВП підвищує концентрацію  $\text{Ca}^{2+}$  в гепатоцитах за допомогою його виділення з кальцієвих депо та входом у клітину через депокеровані кальцієві канали [2]. Зростання ж внутрішньоклітинної концентрації  $\text{Ca}^{2+}$  викликає активацію кальційзалежних калієвих каналів, що й призводить до гіперполяризації мембран гепатоцитів [18]. Разом з тим такі зміни МП можуть бути викликані підвищенням внутрішньоклітинної концентрації цАМФ та активацією цАМФ-залежних хлоридних каналів [2]. Отже, постає питання, яким саме чином діє ВП на МП клітин печінки. Для його вирішення ми заблокували один з цих сигнальних механізмів, застосувавши хелеритрин.

Результати наших досліджень свідчать, що ВП викликає гіперполяризацію мембран

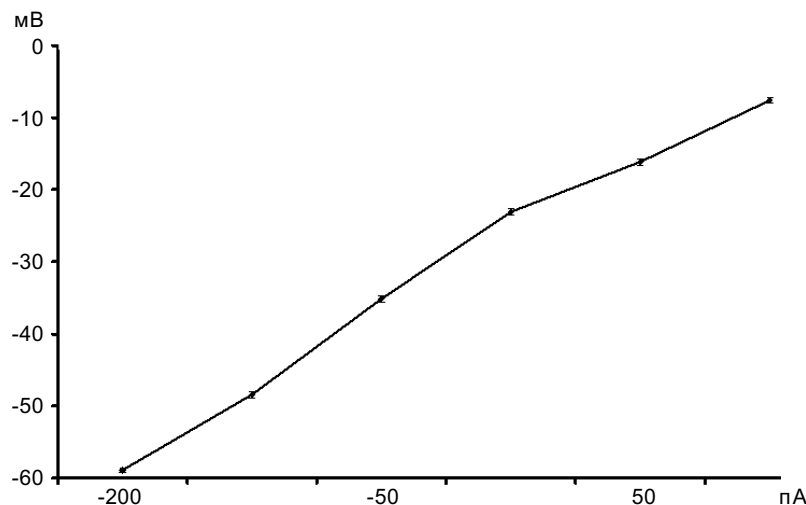


Рис. 1. Вольт-амперна характеристика мембран гепатоцитів щурів ( $n=15$ )

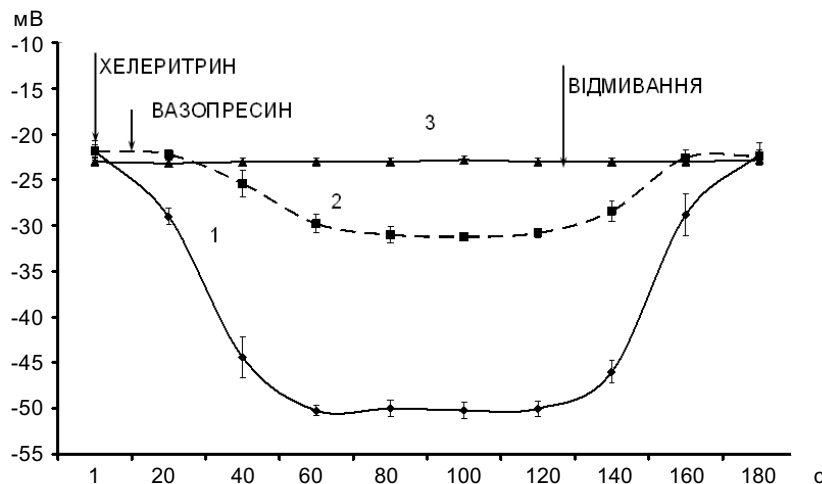


Рис. 2. Зміни мембранного потенціалу гепатоцитів щурів під впливом самого вазопресину та на тлі дії хелеритрину (n=15): 1 – перфузія вазопресину; 2 – перфузія вазопресину на тлі дії хелеритрину; 3 – перфузія хелеритрину

гепатоцитів ( $P < 0,05$ ), попередньо оброблених хелеритрином, але гіперполяризаційні зміни були меншими, ніж за умов дії ВП на інтактні клітини (див. рис. 2). Різниця між дією самого ВП та на тлі впливу хелеритрину була статистично значущою ( $P < 0,05$ ), що свідчить про важливу роль протеїнкінази С у реалізації впливу ВП на гепатоцити. Слід відмітити, що застосування самого хелеритрину не викликало змін МП гепатоцитів, тобто відмінності в дії ВП пов'язані саме з гормоном і його сигнальними шляхами (див. рис. 2).

Пригнічення активності протеїнкінази С не повністю усувало ефекти ВП, що вказує на залучення інших внутрішньоклітинних посередників гормону, можливо, аденілатциклази. Гіперполяризаційні зміни на мембрані гепатоцитів під впливом ВП на тлі хелеритрину свідчать про стимуляцію жовчотворення, однак така дія гормону в нормі може маскуватись або навіть повністю компенсуватись внаслідок активності протеїнкінази С, яка є інгібітором процесів утворення та виділення жовчі в гепатоцитах.

Таким чином, гормон нейрогіпофіза ВП посилює секреторну активність гепатоцитів головним чином через протеїнкіназу С, про що свідчить гіперполяризація їхніх мембран.

**П.К. Цапенко, Т.П. Лященко**

### ИЗМЕНЕНИЯ МЕМБРАННОГО ПОТЕНЦИАЛА ГЕПАТОЦИТОВ КРЫС ПОД ВОЗДЕЙСТВИЕМ ВАСОПРЕССИНА

Изучена вольт-амперная характеристика мембран гепатоцитов, показана ее линейная зависимость, что указывает на отсутствие электрической возбудимости клеток печени и важную роль хемочувствительных каналов при развитии электрических процессов на клеточной мембране. Проведены исследования влияния вазопрессина (ВП) на мембранный потенциал гепатоцитов крыс при помощи микроэлектродной техники. Оказывается ВП вызывает гиперполяризацию мембран гепатоцитов, что является показателем стимуляции гормоном синтетической активности клеток. Использование ВП на фоне действия блокатора протеинкиназы С хелеритрина вызывает гиперполяризационные изменения на мембране гепатоцитов, но меньшей величины, чем при воздействии только этого гормона. Этот факт свидетельствует о значительной роли протеинкиназы С в реализации эффектов ВП на гепатоциты и означает, что в этот процесс вовлечены и другие внутриклеточные посредники. Таким образом, существует вероятность участия в опосредовании стимулирующего действия ВП на желчеобразовательную функцию гепатоцитов аденилатциклазы.

Ключевые слова: вазопрессин, гепатоцит, мембранный потенциал, протеинкиназа С.

**P.K. Tsapenko, T.P. Liashchenko**

### EFFECT OF VASOPRESSIN ON THE MEMBRANE POTENTIAL OF RAT HEPATOCYTES

The current-voltage relationship of rat hepatocytes was

investigated and its linear dependence was shown. On liver slices, we have investigated the effects of vasopressin on membrane potential of rat hepatocytes using microelectrode technique. Vasopressin evoked membrane hyperpolarization to -50 mV, suggesting that vasopressin activated synthetic processes in hepatocytes. Vasopressin application together with the inhibitor of protein kinase C chelerythrine also caused hyperpolarization of hepatocytes, but membrane potential changes were of smaller amplitude. This fact suggests that although protein kinase C plays an important role in the realization of effects of vasopressin, there is, however, another signal transduction pathway of vasopressin in rat hepatocytes. If that pathway activates adenylatecyclase, vasopressin can stimulate bile formation in hepatocytes. This assumption should be verified.

Key words: vasopressin, hepatocytes, membrane potential, protein kinase C.

*Taras Shevchenko Kyiv National University*

### СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Фролькис В.В. Влияние активации биосинтеза белка на уровень мембранного потенциала клеток // Биофизика. – 1974. – **19**. – №3. – С.470–473.
2. Aromataris E.D., Roberts M.L., Barritt G.J., Rychkov G.Y. Glucagon activates  $Ca^{2+}$  and  $Cl^{-}$  channels in rat hepatocytes // J. Physiol. – 2006. – **573**. – Issue 3. – P.611–625.
3. Boyer J.L., Nathanson M.H. Bile formation // Shif. Des. liver. – Philadelphia. – 1999. – P.119–142.
4. Cohen A.J., Burczynski F.J., Rosser B.G., Lipschitz J., Minuk G.Y. The effects of various organ preservation solutions on hepatocyte membrane potentials, intracellular calcium concentrations, and outcome following liver transplantation // Amer. J.Surg. – 2000. – **179**(2). – P.154–160.
5. Dupont G., Tordjmann T., Clair C., Swillens S., Claret M., Combettes L. Propagation mechanisms of receptor-oriented intercellular calcium waves in hepatocytes // FASEB J. – 2000. – **14**. – P.279–289.
6. Ferguson J.W., Therapondos G., Newby D.E., Hayes P.C. Therapeutic role of vasopressin receptor antagonism in patients with liver cirrhosis // Clin. Sci. – 2003. – **105**. – P.1–8.
7. Field A.C., Jenkinson J.H. The effect of noradrenaline on the ion permeability of isolated mammalian hepatocytes, studied by intracellular recording // J. Physiol. – 1987. – **392**. – P.493–512.
8. Kingler C., Ancellin N., Barrault M.B., Morel A., Corman B. Potentiation of receptor-mediated cAMP production: role in the cross-talk between vasopressin V1a and V2 receptor transduction pathways // Biochem.J. – 1998. – **330**. – P.1023–1028.
9. Kuhn W.F., Gewirtz D.A. Stimulation of taurocholate and glycocholate efflux from the rat hepatocyte by arginine vasopressin // Amer. J.Physiol. Gastrointest. Liver Physiol. – 1990. – **254**, № 17. – P.732–740.
10. Li A.P. Human hepatocytes: isolation, cryopreservation and applications in drug development // Chem.-Biol. Interact. – 2007. – **168**(1). – P.16–29.
11. Lyall V., Croxton T.L., Armstrong W.M. Measurement of intracellular chloride activity in mouse liver slices with microelectrodes // Biochim. and Biophys. Acta. – 1987. – **903**(1). – P.56–67.
12. Nicou A., Serrier V., Prigent S., Boucherie S., Combettes L., Gillon G., Allonso G., Tordjmann Th. Hypothalamic vasopressin release and hepatocyte  $Ca^{2+}$  signaling during liver regeneration: an interplay stimulating liver growth and bile flow // FASEB J. – 2003. – **17**. – P.1901–1903.
13. Poisner R.H. The secretory process. Vol.2. The electrophysiology of the secretory cell. – Amsterdam: Elsevier, 1985. – 216 p.
14. Sawanabori T., Takanashi H., Hiraoka M., Iida Y., Kamisaka K., Maezawa H. Electrophysiological properties of isolated rat liver cells // J. Cell. Physiol. – 1989. – **139**. – № 3. – P.580–585.
15. Schmeisch A.P., de Oliveira D.S., Ide L.T., Suzuki-Kemmelmeier F., Bracht A. Zonation of the metabolic action of vasopressin in the bivascularily perfused rat liver // Regul. Pept. – 2005. – **129**. – P.233–243.
16. Serriere V., Berthon B., Boucherie S. Vasopressin receptor distribution in the liver controls calcium wave propagation and bile flow // FASEB J. – 2001. – **15**. – P.1484–1486.
17. Spruce B.A., McCulloch A.J., Burd J. The effect of vasopressin infusion on glucose metabolism in man // Clin.Endocrinol. – 1985. – **22**. – P.463–468.
18. Takanashi H., Sawanabori T., Kamisaka K., Maezawa H., Hiraoka M. Properties of single potassium channels in guinea pig hepatocytes // J. Cell Physiol. – 1994. – **161**(3). – P.537–543.
19. Tsuda A., Tanaka K.A., Huraux C., Szlam F., Sato N., Yamaguchi K., Levy J.H. The in vitro reversal of histamine-induced vasodilation in the human internal mammary artery // Anest. Analg. – 2001. – № 93. – P.1453–1459.
20. Yacoub D., Theoret J.-F., Villeneuve L., Abou-Saleh H. Mourad W., Allen B.G., Merhi Y. Essential Role of protein kinase C in platelet signaling, I1b3 activation and thromboxane A2 release // J. Biol. Chem. – 2006. – **281**. – Issue 40. – P.30024–30035.

*Київ. нац. ун-т імені Тараса Шевченка*  
E-mail: tsapenkopetr@yahoo.com

*Матеріал надійшов*  
*до редакції 05.01.2011*