

ОГЛЯДИ

УДК 577.171.5:577.352.4

ОКСИТОЦИН ТА ЙОГО РОЛЬ У КОНТРОЛІ ВНУТРІШНЬОКЛІТИННОГО РІВНЯ ІОНІВ КАЛЬЦІЮ В МІОМЕТРІЇ

С. Г. ШЛИКОВ

Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України, Київ;
e-mail: sshlykov@biochem.kiev.ua

В огляді висвітлено сучасні дані щодо молекулярних та мембранних механізмів дії утеротонічного пептидного гормону окситоцину на гомеостаз Ca^{2+} у міоцитах матки та активність систем пасивного та активного транспортування цього катіону, локалізованих в субклітинних структурах міометрія.

*Встановлені біохімічні механізми активації окситоцином та тапсигаргіном транспортування Ca^{2+} до цитоплазми клітин міометрія. Такий процес надходження іонів кальцію з позаклітинного простору одержав назву *saracitative cation entry* (SCE), або такий, який активується спустошенням внутрішньоклітинних кальцієвих пулів. Показано, що клітини міометрія невагітних жінок та клітинна лінія RHM1-41 з міометрія вагітних жінок експресують *mRNA hTrpC1*, 3, 4, 6, 7.*

Синтетичний аналог діацилгліцеролу OAG спричинює виникнення осциляцій концентрації Ca^{2+} у клітинах міометрія. Інгібітори протеїнкінази C не впливають на здатність OAG спричинювати осциляції концентрації Ca^{2+} . Зроблено висновок, що дія синтетичного аналога діацилгліцеролу OAG у клітинах міометрія не опосередковується активацією протеїнкінази C.

Результати експериментів, що були виконані на фракції везикул плазматичних мембран міометрія, показали, що окситоцин не впливає на базальну кальцієву проникність цієї мембрани. Встановлено, що пептидний гормон частково інгібує накопичення Ca^{2+} у фракції плазматичних мембран міометрія. Окситоцин також частково гальмує активність кальцієвої помпи саркоплазматичного ретикулума матки.

Запропонована концептуальна схема регуляції окситоцином обміну Ca^{2+} в міометрії.

Ключові слова: Ca^{2+} , окситоцин, міометрій, TrpC-канали, мітохондрії, саркоплазматичний ретикулум.

Окситоцин – це пептидний гормон (октапептид), що регулює різноманітні процеси. Найважливішою дією окситоцину є його вплив на контрактильну активність матки [1]. Вперше окситоцин екстрагували із задньої долі гіпофіза людини у 1906 році [2]. Хімічну структуру окситоцину визначили майже п'ятдесят років потому, у 1953 році [3]. Після встановлення утеротонічної дії цього гормону, екстракт гіпофіза почали використовувати для зупинки післяпологових кровотеч [4], а згодом – окситоцин для стимуляції пологової діяльності [5]. Останнім часом стало відомо, що окситоцин має ширший спектр дії: окрім модуляції скоротливої активності матки протягом вагітності, окситоцин, наприклад, також впливає на виділення молока в період лактації [6]. Більш того, широке розповсюдження

окситоцинових рецепторів у мозку підкреслює його роль як центрального нейротрансмітера, що опосередковує репродуктивні процеси, такі як: сексуальна поведінка, партнерські взаємовідносини, материнство [7]. Проте окситоцин привертає увагу дослідників, перш за все, як потужний утеротонічний агент.

Сьогодні для ініціації пологів, а також для зупинки післяпологових кровотеч широко використовуються синтетичні аналоги окситоцину. З іншого боку, відомо, що стимуляція окситоцинових рецепторів може бути причиною передчасних пологів. Атозібан, найпотужніший антагоніст рецепторів окситоцину [8, 9], рекомендовано до використання у 29 країнах з метою запобігання передчасним пологам. Однак широке клінічне використання окситоцину та антагоністів окситоцинових рецепторів

не знімає численних питань стосовно молекулярних та клітинних механізмів дії окситоцину на скоротливу активність матки.

Отже, окситоцин діє на різноманітні фізіологічні процеси в організмі людини. Окрім регуляції процесів, пов'язаних з репродукцією у багатьох видів, найважливішою дією окситоцину є його вплив на контрактильну активність матки. Скорочувальний ефект окситоцину забезпечується різноманітними шляхами, які включають в себе як спустошення саркоплазматичного ретикулу (СР), так і вхід Ca^{2+} до клітини крізь кальцієві канали [10–13].

Ca^{2+} відіграє центральну роль у регуляції скорочення м'язових клітин, у тому числі і клітин міометрія [14–17], що забезпечує процес скорочення матки в цілому. Сьогодні переконаливо доведено, що обов'язковою передумовою скорочення гладеньком'язових клітин (ГМК) є збільшення внутрішньоклітинної концентрації Ca^{2+} ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) [18–20]. Збільшення $[\text{Ca}^{2+}]_i$ у цитоплазмі приводить до утворення комплексу Ca^{2+} -кальмодулін, який активує кіназу легких ланцюгів міозину. Кіназа легких ланцюгів міозину фосфорилує легкий ланцюг 20 кДа міозину, що, у свою чергу, збільшує аденозинтрифосфатазну активність міозину (АТР-ази міозину), що й призводить до скорочення. Зниження $[\text{Ca}^{2+}]_i$ спричинює дефосфорилування легких ланцюгів міозину відповідною фосфатазою та розслаблення ГМК. Проте слід зауважити, що активність кінази та фосфатази легких ланцюгів міозину регулюється також і іншими внутрішньоклітинними сигнальними шляхами [17,20–22].

Вхід Ca^{2+} до клітини відбувається за участю Ca^{2+} -каналів, які поділені на три основних класи: потенціалкеровані, лігандзалежні та потенціалнезалежні [21,23]. Потенціалкеровані Ca^{2+} канали L-типу відіграють домінуючу роль у регуляції тривалого скорочення міометрія, що оцінювали за ефектами інгібіторів каналів цього типу, таких як ніфедипін та нітредипін [22,23]. У клітинах міометрія щурів експресуються також кальцієві канали T-типу [24]. Інгібування каналів цього типу призводило до гальмування скоротливої активності смужок міометрія жінок та блокади спайкової компоненти електричного сигналу [25].

Існує точка зору, що потенціалкеровані кальцієві канали L-типу відіграють вирішальну роль у забезпеченні надходження Ca^{2+} до клітин міометрія [26]. Проте у своїй роботі ми використовували клітини лінії РНМ1, що були одержані з міометрія вагітних жінок, де канали цього типу практично відсутні [26]. Все

ж таки, окситоцин збільшував надходження Ca^{2+} з позаклітинного простору до цих клітин [20,26,27]. Отже, окситоцин, вірогідно, стимулював інший тип Ca^{2+} -каналів, можливо таких, що забезпечують ємніснооперований шлях.

Останні 10 років маємо істотне збільшення інформації стосовно молекулярних механізмів надходження Ca^{2+} до клітин. Значною мірою це зумовлено відкриттям каналів, які отримали назву «transient receptor potential channels», або Trp-канали [28]. TrpC-канали були вперше описані у фоторецепторах *Drosophila*, де вони утворюють чутливий до світла іонний канал [29]. Згодом TrpC-канали було також знайдено у ссавців [30]. Подальші дослідження привели до відкриття інших представників класу Trp-каналів. На сьогоднішній день на основі амінокислотної гомологічності Trp-канали поділяють на сім підкласів: TrpC (canonical), TrpM (melastatin), TrpV (vallinoid), TrpA (ankyrin), TrpP (polycystin), TrpML (mucolipin) та TrpN-підкласи (NOMP, No mechanopotential) [28]. TrpC (canonical) та TrpM (melastatin) підкласи каналів налічують відповідно 7 та 8 різних каналів (TrpC1-7; TrpM1-8). TrpV (vallinoid) підклас налічує 6 різних каналів TrpV1-6. Вважають, що канали TrpV1, TrpV2 та TrpV4 беруть участь у механотрансдукції [31]. TrpA (ankyrin) має лише одного представника (TrpA1) у ссавців. TrpP (polycystin) та TrpML (mucolipin) підкласи кожний з яких представлений 3 членами, які знаходять у ссавців, – недостатньо охарактеризовані, проте зацікавленість дослідників до них зростає, оскільки деякі з них причетні до низки захворювань. TrpN-підкласи (NOMP, No mechanopotential) нещодавно було ідентифіковано у риб (*Danio rerio*), дрозофіли та хробаків і позиціонуються як механочутливі канали [32,33].

У кожній субодиниці Trp-каналу у структурі є шість трансмембранних доменів (S1-6), у формуванні пори беруть участь 5-й та 6-й домени [34]. Структуру однієї субодиниці каналу подано на рис. 1.

Усі функціонально охарактеризовані Trp-канали проникні для Ca^{2+} , за винятком TrpM4 та TrpM5, що проникні лише для моновалентних катіонів [28]. Більшість Trp-каналів не є Ca^{2+} -селективними та проникні для Na^+ у співвідношенні ($P_{\text{Ca}}/P_{\text{Na}}$) від 0,3 до 10. Винятком є тільки TrpV5 та TrpV6 – два високоселективних Ca^{2+} -канали зі співвідношенням $P_{\text{Ca}}/P_{\text{Na}} > 100$. Trp-канали відкриваються внаслідок дії різних чинників, наприклад, внаслідок зміни температури або після хімічного/осмотичного стресу. Деякі Trp-канали, ймовірно, знаходяться у

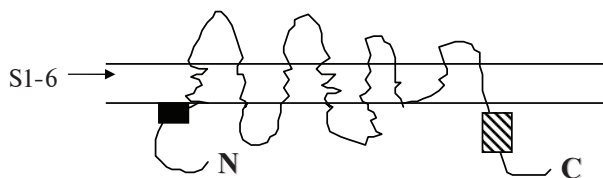


Рис. 1. Структура однієї субодиниці Trp-каналу: S1-6 – шість трансмембранних доменів; 5-й та 6-й домени, що утворюють пору; N, C – кінці субодиниці каналу

відкритому стані, тоді як інші відкриваються після спустошення внутрішньоклітинних депо. Тип функціонування Trp-каналів активно дискутується [35,36]. Збільшення $[Ca^{2+}]$ відбувається не тільки через надходження Ca^{2+} з позаклітинного простору, а й унаслідок спустошення кальцієвих депо гладеньких м'язів (ГМ), таких як апарат Гольджі, ендоплазматичний ретикулум (ЕР) або саркоплазматичний ретикулум (СР). Здебільшого Trp-канали знаходять у плазматичній (зовнішній) мембрані клітин [28]. Проте деякі Trp-канали, такі як TrpP2, TrpV1 або TrpM8, виявлено в незначній кількості на мембранах внутрішньоклітинних органел, що свідчить про можливість функціонування їх як каналів, що вивільнюють Ca^{2+} [28,37].

На сьогодні TrpC-канали є найдослідженішою групою серед представників цього класу. Сім TrpC-протеїнів мають схожу структуру, до їхнього складу входять 700–1000 амінокислотних залишків. Чотири TrpC-протеїни утворюють функціонально активний канал. Вважають, що гетеро- або гомоолігомерний протеїновий склад TrpC-каналів може визначати їхню тканинну або клітинну специфічність [30,37].

TrpC-канали не є селективними для Ca^{2+} , а співвідношення проникності Ca^{2+} до Na^{+} (P_{Ca}/P_{Na}) суттєво відрізняється між різними членами цієї групи. Так, наприклад, цей показник для TrpC4 та TrpC5, що були експресовані в гетерологічну систему, змінювався від 1 до 9 [38–40]. Можливо це пояснюється різними властивостями TrpC-каналів за умов експресії в гетерогенних системах. Загалом, TrpC-канали – це канали, що активуються після стимуляції рецепторів, що, у свою чергу, зумовлює зміну активності різних ізоформ протеїнкінази С (PKC). TrpC3, -6 та -7 активуються діацилгліцеролом (DAG, ДАГ) і, що вкрай важливо, така активація може відбуватися без участі протеїнкінази С [41–44]. І навпаки, TrpC1, -4, -5 канали, що також активуються рецепторін-

дукованою PKC, зовсім нечутливі до дії ДАГ [41,45]. Однак механізм, за яким стимуляція фосфоліпази С (Фл-С) спричинює активацію цих каналів, поки що має дуже великі розбіжності у тлумаченні [37, 38,41–44].

У ГМ TrpC-протеїни виконують низку важливих функцій, таких як: клітинна міграція, ріст та диференціація, проліферація, модуляція мембранного потенціалу, скорочення гладеньких м'язів [46–54]. TrpC-канали виявляють різні властивості, що залежать від специфічних TrpC-субодиниць асоційованих у тетрамери [49,55–57]. Частина TrpC-протеїнів які мають домени, що зв'язують кальмодулін або інозитол-1,4,5-трисфосфат, зв'язуються з іншими протеїнами [58]. Члени родини TrpC-протеїнів TrpC 3/6/7 асоціюються один з одним так само, як TrpC 1/4/5. Переважна більшість результатів вказують на те, що протеїни різних груп не взаємодіють між собою [59,60], проте автори деяких публікацій стверджують, що така взаємодія можлива [61]. Активація TrpC-каналів приводить до входу катіонів, що, у свою чергу, впливає на рівень мембранного потенціалу і, як наслідок, змінюється активність потенціалзалежних катіонних каналів [53]. Родина TrpC протеїнів (TrpC1-7) відіграє важливу роль у ємніснооперованому вході Ca^{2+} [49,56,58,62–65]. Не виключають участі TrpC-каналів у виникненні різних форм захворювань, наприклад астми [66].

Концентрація кальцію у клітинах міометрія контролюється різними сигнальними шляхами [20,26,67]. До останніх належить і стимульоване окситоцином зростання рівня Ca^{2+} . Як саме окситоцин сприяє підвищенню рівня Ca^{2+} у клітинах міометрія? Відомо, що окситоцин не проникає до внутрішньоклітинного середовища, а взаємодіє зі своїм рецептором на поверхні клітин [17,21]. Наявність рецепторів до цього пептидного гормону на поверхні клітин міометрія було встановлено досить давно [68]. Відомо також, що чутливість міометрія до окситоцину значно збільшується під час вагітності. Частково це пояснюється збільшенням експресії окситоцинових рецепторів. Так, показано, що експресія окситоцинових рецепторів у жіночому міометрії від початку і до кінця вагітності збільшується у 150 разів [69]. Зв'язування окситоцину зі своїм рецептором, який, у свою чергу, зв'язується з одним із підкласів G-протеїнів – $G_{\alpha q/11}$, призводить до активації фосфоліпази C_{β} (PLC_{β}). Активація фосфоліпази C_{β} веде до зростання кількості інозитол-1,4,5-трисфосфату (IP_3). Відомо, що у мембранах СР клітин міометрія розташо-

вані IP_3 -залежні кальцієві канали. Збільшення концентрації IP_3 відкриває ці канали та звільняє Ca^{2+} із внутрішньоклітинного депо. Зумовлене окситоцином спустошення CP сприяє збільшенню надходження Ca^{2+} до клітин з позаклітинного простору за участю Trp -каналів [17,21].

За допомогою полімеразної ланцюгової реакції нами було показано, що у міометрії жінок та у клітинній лінії РНМ1-41 з міометрія вагітних жінок експресуються гени всіх $TrpC$ -протеїнів, за винятком $TrpC 2$ (експресію mRNA $TrpC5$ було встановлено пізніше), (рис. 2) [70]. Експресія відповідних протеїнів була підтверджена вестерн-блотаналізом. Аналогічні результати були одержані іншими дослідниками [71,72]. Було також встановлено, що експресія $TrpC$ -каналів у міометрії жінок змінюється у період вагітності та пологів [72]. Цей факт вказує на можливу роль $TrpC$ -каналів під час нормального, фізіологічного перебігу вагітності та, можливо, в ініціації пологів.

Було показано, що експресія $hTrpC3/6/7$ протеїнів у клітинах призводить до їхньої активації діацилгліцеролом [41,73,74]. РНМ1-41 клітини експресують mRNA усіх трьох $hTrpC$, також $hTrpC3$ і $hTrpC6$ протеїни [27,70]. Ми встановили, що клітини РНМ1-41 відповідали на дію проникливого до клітин аналога діацилгліцеролу – OAG (100 мкМ) – швидкою зміною $[Ca^{2+}]_i$. Також показано, що надекспресія $hTrpC3$ у клітини лінії РНМ1-41 значно збільшує надходження Ca^{2+} до клітин як у разі дії тапсигаргіну, так і за дії окситоцину. Відповідно на дію OAG є осциляції $[Ca^{2+}]_i$, які з часом

зникають, що можливо пов'язано, з метаболічними перетвореннями OAG (рис. 3). Ми також дослідили індуковане OAG надходження Ca^{2+} у клітини РНМ1-41, куди надекспресували $hTrpC3$. Контрольні клітини, які експресують тільки eGFP, відповідають на дію OAG (100 нМ) у спосіб, що не відрізняється від такого в неінфікованих клітинах. Надекспресія $hTrpC3$ у клітинах РНМ1-41 збільшує OAG-стимульовану відповідь у клітинах, що надекспресують eGFP разом з $hTrpC3$, практично у два рази по відношенню до клітин, що експресують тільки eGFP [27,70]. Інгібітори ємніснооперованого надходження Ca^{2+} – SKF 96365 (0,1 мкМ) та Gd^{3+} (10 мкМ) блокують OAG-стимульовані зміни $[Ca^{2+}]_i$. Для того, щоб встановити роль протеїнкінази C у виникненні OAG-індукованих осциляцій $[Ca^{2+}]_i$ у клітинах РНМ1-41, ми дослідили ефекти низки інгібіторів РКС [75,76]. Встановлено, що OAG-індуковані осциляції $[Ca^{2+}]_i$ не інгібуються у разі застосування попередньої інкубації (15–45 хв) із широким спектром інгібіторів протеїнкінази C: стауроспорином (staurosporine) (1 мкМ, інгібування більшості ізоформ РКС), калфостином C (calphostin C) (100 нМ), хелеритрин хлоридом (chelerytrine chloride) (5 мкМ), Gö 6976 (1 мкМ, інгібітор Ca^{2+} -залежної РКС α та β_1), Ro 32-0432 (1 мкМ, інгібітор РКС α , β_1 , β_{11} та ϵ), Gö 6983 (1 мкМ) (інгібітор РКС α , β , γ , δ та ζ), бісіндолілмалеїмідом I (bisindolylmaleimide I) (0,5 мкМ, високоселективний інгібітор РКС α , β_1 , β_{11} , γ , δ та ϵ), або у разі комбінації декількох інгібіторів [21,44]. Ми використали ще один варіант доказу того, що РКС не бере участь

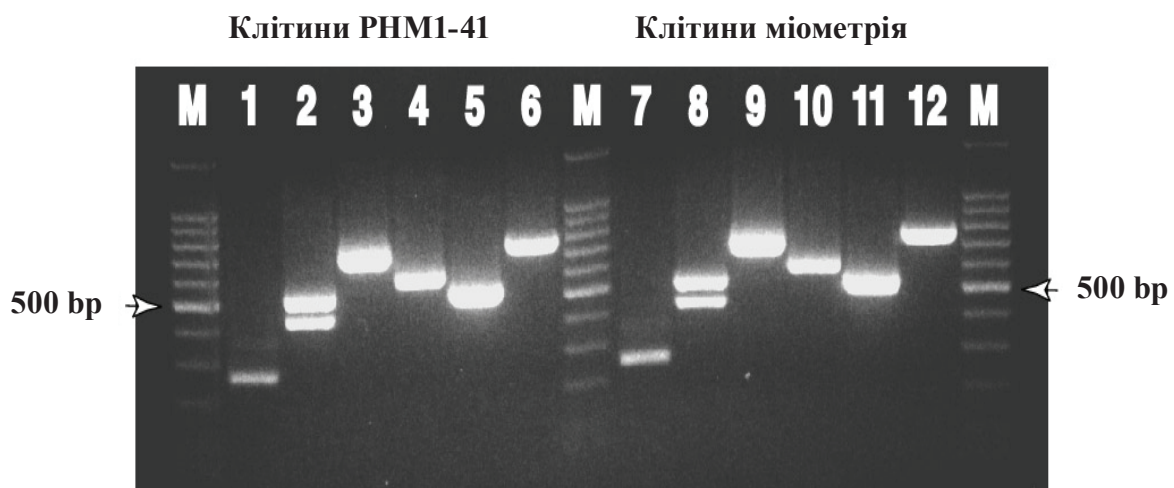


Рис. 2. Електрофореграма Trp mRNA: mRNA $hTrpC1$ (лінії 1 та 7), сплайсові варіанти $hTrpC1$ (лінії 2 та 8), $hTrpC3$ (лінії 3 та 9), $hTrpC4$ (лінії 4 та 10), $hTrpC6$ (лінії 5 та 11), $hTrpC7$ (лінії 6 та 12) відповідних розмірів, що присутні як у міометрії вагітних жінок, так і у лінії РНМ1-41 (bp – кількість пар нуклеотидів)

у цих процесах. Суть експерименту полягає в тому, що клітини міометрія інкубували впродовж 15 годин у присутності в середовищі інкубації 100 нМ PDBu (phorbol-12,13-dibutyrate), що є активатором РКС, для зниження її активності. Подібна обробка інтактних клітин ЗТЗ призводить до прогресивного зниження загальної активності РКС [77]. Після такої обробки клітин РНМ1-41 ОАГ (100 мкМ) індукує виникнення осциляцій у $[Ca^{2+}]_i$. Тобто додавання форболового ефіру не привносить змін у виникнення осциляцій $[Ca^{2+}]_i$.

Таким чином, ми показали, що РКС не задіяна в активації TrpC-каналів та виникненні осциляцій $[Ca^{2+}]_i$ у клітинах РНМ1-41. Індуковане діацилгліцеролом збільшення Ca^{2+}_i повністю залежить від наявності позаклітинного Ca^{2+} [21,44]. Так, у наших експериментах встановлено, що додавання ОАГ (100 мкМ) призводить до виникнення осциляцій $[Ca^{2+}]_i$ в ГМК в умовах використання Ca^{2+} -вмісного середовища [44]. Дані літератури свідчать, що осциляції $[Ca^{2+}]_i$ можуть бути пов'язані з цик-

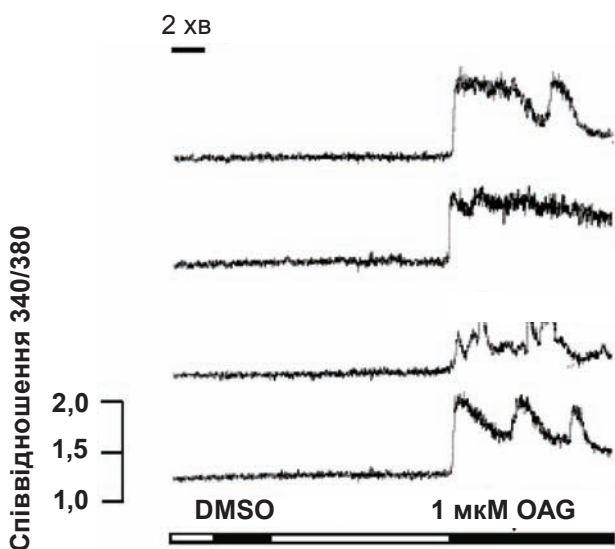


Рис. 3. Дія синтетичного аналогу діацилгліцеролу ОАГ (100 мкМ) на клітини лінії РНМ1-41. Додавання диметилсульфоксиду (DMSO) до середовища інкубації клітин не впливає на зміни концентрації Ca^{2+} у клітинах. DMSO використовували для приготування розчину ОАГ. Концентрація позаклітинного Ca^{2+} – 1 мМ (представлені зміни у співвідношенні інтенсивності флуоресценції кальцієвого зонду Fura-2 при довжині хвилі 340(F1)/380(F2) нм в індивідуальних клітинах). Чорним кольором у прямокутнику позначено час знаходження відповідного реагенту у розчині, що омиває клітини

лом вивільнення та реаккумуляції катіона у СР [78,79]. З метою тестування такої можливості інкубували клітини жіночого міометрія з тапсигаргіном – селективним інгібітором Ca^{2+} -помпи СР, дія якого призводить до спустошення цього пулу. За відсутності позаклітинного Ca^{2+} , додавання в середовище аналога діацилгліцеролу ОАГ (100 мкМ) у присутності тапсигаргіну не спричинювало виникнення Ca^{2+} -осциляцій доти, доки ми не додавали до розчину інкубації клітин 1 мМ Ca^{2+} . Тобто для виникнення осциляцій $[Ca^{2+}]_i$ у клітинах міометрія після дії ОАГ абсолютно необхідний позаклітинний кальцій [21,44]. Індивідуальні РНМ1-41 клітини відповідають на дію ОАГ (100 мкМ) клітинно-специфічним профілем $[Ca^{2+}]_i$ осциляцій, які класифіковані у декілька груп. Групи зі специфічним профілем осциляцій $[Ca^{2+}]_i$ досить близькі за кількістю клітин: регулярні осциляції (regular oscillations) з поступовим поверненням до базового рівня – $22 \pm 2\%$; осциляції зі збільшеним базовим рівнем (oscillations with an elevated baseline) – $18 \pm 4\%$; поодинокі осциляції (single oscillations) – $22 \pm 5\%$; осциляції зі сталим тонічним рівнем (sustained tonic elevation) – $23 \pm 5\%$; осциляції або відповіді зі складнішим профілем – $17 \pm 2\%$. Клітини культури міометрія жінок мали подібний до клітин РНМ1-41 профіль осциляцій [44].

ОАГ (100 мкМ) також стимулює надходження іонів Sr до клітин РНМ1-41 та у клітини культури міометрія жінок. Відсоток розподілу індивідуальних клітин подібний до того, який спостерігали у разі надходження у клітини Ca^{2+} . Лантанод Gd^{3+} (10 мкМ) практично повністю блокує транспортування іонів Sr та Ca до клітин РНМ1-41.

Добре відомо, що рівень Ca^{2+} у клітинах залежить як від активності систем, що забезпечують його надходження до цитоплазми, так і від активності систем, що забезпечують вивільнення катіона з цитоплазми. До останніх належать системи активного транспортування Ca^{2+} , так звані Ca^{2+} -помпи, які розташовані у ПМ та СР [10,14]. З'ясувалося, що вплив окситоцину на клітини міометрія супроводжується також частковим інгібуванням активності цих pomp: Ca^{2+} -помпи та (Ca^{2+},Mg^{2+}) -АТФ-ази ПМ [14,80,81] та Ca^{2+} -помпи СР міометрія [82]. Зокрема, нами встановлено, що окситоцин приблизно на 30% інгібує активність Ca^{2+} -помпи ПМ. Попередня інкубація смужок матки протягом 15 хв у розчині (37 °С), що вміщує окситоцин 10^{-7} М, з наступною гомогенізацією тканини в середовищі такого самого складу, без пептидного гормону, призводило до зни-

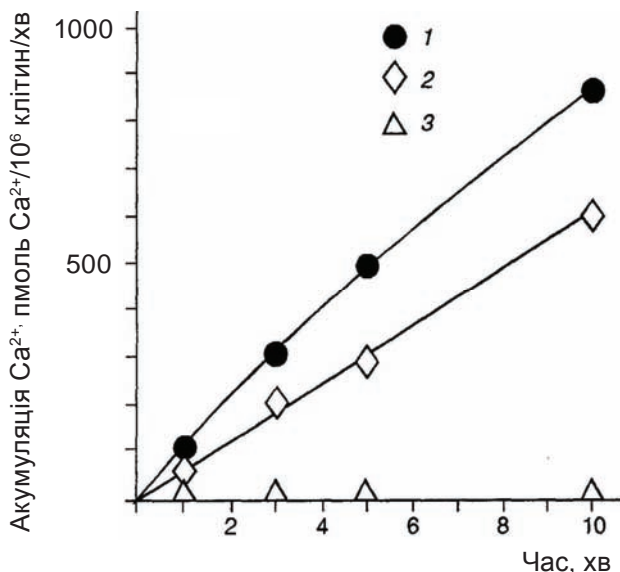


Рис. 4. Вплив окситоцину на кінетику акумуляції Ca^{2+} у СР клітин міометрія. Середовище інкубації: дигітонін (0,1 мг/мл), АТР (3 мМ), Mg^{2+} (3 мМ), рутенієвий червоний (10 мкМ) та оксалат калію (10 мМ) (типовий графік): 1 — без попередньої інкубації клітин з окситоцином (контроль); 2 — попередня інкубація клітин з окситоцином (100 нМ); 3 — з додаванням 50 нМ тапсигаргіну без або з попередньою інкубацією клітин з окситоцином

ження Mg^{2+} , АТР-залежного накопичення Ca^{2+} у фракції везикул сарколеми, одержаної з цих препаратів. Контрольні смужки також інкубували протягом 15 хв, але середовище інкубації не містило окситоцину. При цьому слід зазначити, що внесення окситоцину до середовища інкубації (10^{-6} М) не стимулювало пасивного вивільнення Ca^{2+} із везикул сарколеми (час інкубації 15 хв), який досліджували з використанням ізотопної техніки ($^{45}\text{Ca}^{2+}$) в умовах рівності концентрацій Na^+ (150 мМ) та K^+ (100 мМ) усередині та ззовні мембранних пухирців, тобто за ізотонічних умов. Внесення в середовище інкубації кальцієвого іонофору А23187 (1 мкМ) — фактора порушення бар'єрної (відносно Ca^{2+}) функції мембрани — індукувало швидке вивільнення попередньо накопиченого Ca^{2+} з внутрішньовезикулярного простору: вже на першій хвилині інкубації з везикул вивільнюється близько 90% Ca^{2+} , що знаходився у везикулах до ізотонічного розведення їх. Внесення окситоцину до середовища інкубації (10^{-7} М) не стимулювало пасивного вивільнення Ca^{2+} з везикул сарколеми.

Таким чином, окситоцин, як такий, не впливає на базальну проникність ПМ клітин

міометрія (принаймні в концентрації 100 нМ) [83]. Отже, результати, які були одержані у відділі біохімії м'язів Інституту біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України [10,83–85], а також результати, одержані авторами [86], свідчать про те, що окситоцин частково пригнічує Mg^{2+} , АТР-залежну акумуляцію Ca^{2+} у фракції везикул сарколеми міометрія в умовах, що забезпечують взаємодію пептиду з відповідними рецепторами на поверхні ГМК — за внесення гормону в розчин для преінкубації інтактних смужок ГМ або гомогенізації тканини.

Суспензія міоцитів, оброблених розчином дигітоніну (0,1 мг/мл), була використана нами для вивчення властивостей кальцієвої помпи ретикулула міометрія, а також чутливості цієї Ca^{2+} -транспортувальної системи до різних ефекторів, зокрема, до утеротонічного пептидного гормону окситоцину. Передобробка інтактних міоцитів розчином окситоцину (100 нМ) протягом 5 хв до внесення дигітоніну та АТР у Mg^{2+} - та оксалатвмісне середовище попередньої інкубації призводило до зниження (на 20–25%) нечутливої до дії рутенієвого червоного Mg^{2+} , АТР-залежної акумуляції Ca^{2+} в оброблених дигітоніном клітинах міометрія відносно контрольного рівня (рис. 4) [82].

Інгібуючий ефект окситоцину на акумуляцію Ca^{2+} у хімічно перфорованих міоцитах спостерігається і за попередньої інкубації (5 хв) інтактних ГМК з окситоцином (100 нМ) з наступним відмиванням. Тапсигаргін повністю інгібує чутливу до дії окситоцину компоненту Mg^{2+} , АТР-залежної акумуляції Ca^{2+} у клітинах міометрія. Цей ефект опосередковує, можливо, попередню взаємодію окситоцину з поверхнею інтактних міоцитів, на якій, як відомо, ідентифіковані його рецептори [87]. Одержані результати вказують на те, що стимулятор скорочення матки, окситоцин, частково інгібує також і Mg^{2+} , АТР-залежну кальцієву помпу СР клітин міометрія.

Отже, окситоцин сприяє збільшенню концентрації іонізованого Ca^{2+} у клітинах міометрія декількома шляхами. З одного боку, зв'язування окситоцину з рецептором на поверхні клітин міометрія сприяє збільшенню вивільнення Ca^{2+} із внутрішньоклітинних депо та надходження з позаклітинного простору, з іншого боку, реєструється зменшення активності систем енергозалежного викиду цього катіона.

На основі одержаних результатів, а також даних інших лабораторій, запропоновано узагальнений біохімічний механізм впливу окситоцину на внутрішньоклітинний кальцієвий

ротної реаккумуляції в СР. Отже, часткове інгібування окситоцином активності кальцієвих pomp ПМ та СР має сприяти подовженню часу існування підвищеної концентрації вільного кальцію у клітинах міометрія, що, безперечно, має велике значення для нормального функціонування матки в період пологів та післяпологовий період.

ОКСИТОЦИН И ЕГО РОЛЬ В КОНТРОЛЕ ВНУТРИКЛЕТОЧНОГО УРОВНЯ ИОНОВ КАЛЬЦИЯ В МИОМЕТРИИ

С. Г. Шлыков

Институт биохимии им. А. В. Палладина
НАН Украины, Киев;
e-mail: sshlykov@biochem.kiev.ua

Работа посвящена обсуждению молекулярных и мембранных механизмов действия утеротонического пептидного гормона окситоцина на гомеостаз Ca^{2+} в миоцитах матки и активность систем пассивного и активного транспорта этого катиона, локализованных в субклеточных структурах миометрия.

Установлены биохимические механизмы активации окситоцином и тапсигаргином дополнительного входа Ca^{2+} в цитоплазму клеток миометрия. Такой транспорт Ca^{2+} из внеклеточной среды получил название sarcositative cation entry (SCE), или такой, который активируется опустошением внутриклеточных кальциевых пулов. Было показано, что в клетках миометрия небеременных женщин, а также клетках культуры PHM1-41 из миометрия беременных женщин присутствуют mRNA hTrpC1,3,4,6,7.

Синтетический аналог диацилглицерола (OAG) вызывает осцилляции концентрации Ca^{2+} в клетках миометрия. Ингибиторы протеинкиназы С не влияли на способность OAG вызывать осцилляции концентрации Ca^{2+} . Сделан вывод о том, что действие синтетического аналога диацилглицерола в клетках миометрия не опосредуется активацией протеинкиназы С.

На основании результатов экспериментов, проведенных на фракции везикул плазматических мембран миометрия, сделан вывод о том, что окситоцин не влияет на пассивный выход Ca^{2+} из везикул. Показано, что пептидный гормон частично ингибирует накопление Ca^{2+} во фракции везикул плазматических мембран миометрия. Окситоцин также частично ингибирует активность кальциевой помпы саркоплазматического ретикула клеток миометрия.

Предложена концептуальная схема регуляции окситоцином обмена Ca^{2+} в миометрии.

Ключевые слова: Ca^{2+} , окситоцин, миометрий, TrpC-каналы, митохондрии, саркоплазматический ретикулум.

OXYTOCIN AND ITS ROLE IN THE CONTROL OF INTRACELLULAR LEVEL OF CALCIUM IONS IN THE MYOMETRIUM

S. G. Shlykov

Palladin Institute of Biochemistry, National
Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv;
e-mail: sshlykov@biochem.kiev.ua

S u m m a r y

The work deals with the study of molecular and membrane mechanisms of uterotonic peptide hormone oxytocin action on Ca ions homeostasis in the uterus myocytes and activity of passive and active transport systems of this cation, localized in the myometrium subcellular structures.

Biochemical mechanisms of additional Ca^{2+} influx into the myometrium cells from extracellular environment activated by oxytocin and thapsigargin were determined. Such Ca^{2+} influx has got the name of sarcositative cation entry (SCE), or which is activated by intracellular store depletion (store-operated calcium entry). It was shown that cells from the nonpregnant human myometrium and PHM1-41 cells (immortalized pregnant human myometrial cells) expressed endogenous hTrpC1, 3, 4, 6 and 7 mRNA. The membrane-permeable derivative of diacylglycerol (OAG) stimulated an increase in oscillations of intracellular free Ca^{2+} concentration in PHM1-41 and myometrium cells. OAG-induced Ca^{2+} -oscillations were not affected by inhibition of PKC. It was proved that hTrpC channels take part in the regulation of free Ca ions concentration in the myometrium cells.

On the basis of results of experiments, conducted on myometrium plasma membrane fraction, the conclusion was made that oxytocin does not influence the passive Ca^{2+} efflux. It was shown that peptide hormone partially inhibited Ca^{2+} accumulation in plasma membrane fraction. Oxytocin also partially inhibited endoplasmic reticulum calcium pump activity of the myometrium cells.

The conceptual pattern of myometrial Ca^{2+} exchange regulation by oxytocin is offered.

Key words: Ca^{2+} , oxytocin, myometrium, TrpC channels, mitochondria, sarcoplasmic reticulum.

1. *Shmygol A., Gullam J., Blanks A., Thornton S.* // *Acta Pharmacol. Sin.* – 2006. – **27**, N 7. – P. 827–832.
2. *Dale H. H.* // *J. Physiol.* – 1906. – **34**. – P. 163–206.
3. *Du Vigneaud V., Resler S., Trippett S.* // *J. Biol. Chem.* – 1953. – **205**. – P. 949–957.
4. *Blair Bell W.* // *Br. Med. J.* – 1909. – **2**. – P. 1609–1613.
5. *Theobald G. W., Robards M. F., Suter T.* // *J. Obstet. Gynecol. Br. Common.* – 1969. – **76**. – P. 385–390.
6. *Nishimori K., Young L. J., Guo Q. et al.* // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1996. – **93**. – P. 11699–11704.
7. *Young L. J., Wang Z., Insel T. R.* // *Trends. Neurosci.* – 1998. – **21**. – P. 71–75.
8. French/Australian Atosiban Investigators Group // *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* – 2001. – **98**, N 2. – P. 177–185.
9. The Worldwide Atosiban vs β -agonists Study Group. // *BJOG.* – 2001. – **108**. – P. 133–142.
10. Костерин С. А. Транспорт кальция в гладких мышцах. – К.: Наук. думка, 1990. – С. 1–215.
11. Шуба М. Ф., Гокина Н. И., Гуровская А. В. Механизмы возбуждения и сокращения гладких мышц мозговых сосудов. – К.: Наук. думка, 1991. – С. 168 с.
12. *Walsh M. P.* // *Can. J. Physiol. Pharmacol.* – 1994. – **72**. – P. 919–936.
13. *Kosterin S. A., Burdyga Th. V., Fomin V. P., Grover A. K.* Mechanisms of Ca^{2+} transport in myometrium // *Control of Uterine Contractility* / Eds. R. E. Garfield, T. N. Tabb. – CRC Press, Boca Raton, Ann Arbor, London, Tokyo, 1994. – P. 129–153.
14. *Sanborn B. M., Anwer K., Wen Y. et al.* // *Modification of Ca^{2+} regulatory systems* / In: R. E. Garfield and T. N. Tabb, editor. *Control of Uterine Contractility*. Boca Raton, FL: CRC Press; 1994. – P. 105–128.
15. *Horowitz A., Menice C. B., Laporte R., Morgan K. G.* // *Physiol. Rev.* – 1996. – **76**, N 4. – P. 967–1003.
16. *Young R. C.* // *Ann. N.Y. Acad. Sci.* – 2007. – **1101**. – P. 72–84.
17. *Sanborn B. M.* // *Semin. Cell Dev. Biol.* – 2007. – **18**, N 3. – P. 305–314.
18. Шуба М. Ф. // *Физиол. журн.* – 1981. – **27**, № 4. – С. 533–541.
19. *McKillen K., Thornton T., Taylor C. W.* // *Am. J. Physiol.* – 1999. – **276**, N 2. – P. E345–E351.
20. *Sanborn B. M.* // *Exp. Physiol.* – 2001. – **86**. – P. 223–237.
21. *Sanborn B. M., Ku Chun-Ying., Shlykov S. G., Babich L. G.* // *J. Soc. Gynecol. Invest.* – 2005. – N 12. – P. 479–486.
22. *Wray S., Jones K., Kupittayanant S. et al.* // *Ibid.* – 2003. – **10**. – P. 252–264.
23. *Sanborn B. M.* // *Ibid.* – 2000. – **7**. – P. 4–11.
24. *Ohkubo T., Kawarabayashi T., Inoue Y., Kitamura K.* // *Gynecol. Obstet. Invest.* – 2005. – **59**. – P. 80–85.
25. *Young R., Zhang P.* // *J. Soc. Gynecol. Investig.* – 2005. – **12**. – P. 7–12.
26. *Sanborn B. M., Dodge K., Monga M. et al.* // *Adv. Exp. Med. Biol.* – 1998. – **449**. – P. 277–286.
27. *Shlykov S. G., Yang M., Alcorn J. L., Sanborn B. M.* // *Biol. Reprod.* – 2003. – **69**. – P. 647–655.
28. *Nilius B., Owsianik G., Voets T., Peters J. A.* // *Physiol. Rev.* – 2007. – **87**, N 1. – P. 165–217.
29. *Montell C., Rubin G. M.* // *Neuron.* – 1989. – **2**. – P. 1313–1323.
30. *Nilius B., Droogmans G.* // *Physiol. Rev.* – 2001. – **81**. – P. 1415–1459.
31. *Yin J., Kuebler W. M.* // *Cell Biochem. Biophys.* – 2010. – **56**, N 1. – P. 1–18.
32. *Sidi S., Friedrich R. W., Nicolson T.* // *Science.* – 2003. – **301**. – P. 96–99.
33. *Walker R. G., Willingham A. T., Zuker C. S.* // *Ibid.* – 2000. – **287**. – P. 2229–2234.
34. *Dietrich A., Kalwa H., Guderman T.* // *Thromb. Haemost.* – 2010. – **103**. – P. 262–270.
35. *Kiselyov K., Patterson R. L.* // *Front. Biosci.* – 2009. – **14**. – P. 45–58.
36. *Nilius B.* // *Sci. STKE.* – 2004. – P. pe36.
37. *Vassort G., Alvarez J.* // *Can. J. Physiol. Pharmacol.* – 2009. – **87**. – P. 100–107.
38. *Okada T., Shimizu S., Wakamori M. et al.* // *J. Biol. Chem.* – 1998. – **273**. – P. 10279–10287.
39. *Philipp S., Cavalie A., Freichel M. et al.* // *EMBO J.* – 1996. – **15**. – P. 6166–6171.
40. *Schaefer M., Plant T. D., Obukhov A. G. et al.* // *J. Biol. Chem.* – 2000. – **275**. – P. 17517–17526.
41. *Hofmann T., Obukhov A. G., Schaefer M. et al.* // *Nature.* – 1999. – **397**. – P. 259–263.
42. *Ma H. T., Patterson R. L., van Rossum D. B. et al.* // *Science.* – 2000. – **287**. – P. 1647–1651.
43. *Ma H. T., Venkatachalam K., Parys J. B., Gill D. L.* // *J. Biol. Chem.* – 2002. – **277**. – P. 6915–6922.
44. *Shlykov S. G., Sanborn B. M.* // *Cell Calcium.* – 2004. – **36**. – P. 157–164.
45. *Venkatachalam K., Zheng F., Gill D. L.* // *J. Biol. Chem.* – 2003. – **278**. – P. 29031–29040.
46. *Birnbaumer L.* // *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* – 2009. – **49**. – P. 395–426.

47. Inoue Y., Nakao K., Okabe K. // *Am. J. Obstet. Gynecol.* – 1990. – **162**. – P. 1090–1098.
48. Malysz J., Donnelly G., Huizinga J. D. // *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* – 2001. – **280**. – P. G439–G448.
49. Minke B., Cook B. // *Physiol. Rev.* – 2002. – **82**. – P. 429–472.
50. Abramowitz J., Birnbaumer L. // *FASEB J.* – 2009. – **23**, N 2. – P. 297–328.
51. Walker R. L., Hume J. R., Horowitz B. // *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* – 2001. – **280**. – P. C1184–C1192.
52. Wayman C. P., McFadzean I., Gibson A., Tucker J. F. // *Br. J. Pharmacol.* – 1997. – **121**. – P. 1301–1308.
53. Welsh D. G., Morielli A. D., Nelson M. T., Brayden J. E. // *Circ. Res.* – 2002. – **90**. – P. 248–250.
54. Zitt C., Halaszovich C. R., Luckhoff A. // *Prog. Neurobiol.* – 2002. – **66**. – P. 243–264.
55. Lintschinger B., Balzer-Geldsetzer M., Baskaran T. et al. // *J. Biol. Chem.* – 2000. – **275**. – P. 27799–27805.
56. Montell C., Birnbaumer L., Flockerzi V. // *Cell.* – 2002. – **108**. – P. 595–598.
57. Trebak M., Vazquez G., Bird G. S., Putney J. W. Jr. // *Cell Calcium.* – 2003. – **33**. – P. 451–461.
58. Birnbaumer L., Yidirim E., Abramowitz J. // *Ibid.* – P. 419–432.
59. Goel M., Sinkins W. G., Schilling W. P. // *J. Biol. Chem.* – 2002. – **277**. – P. 48303–48310.
60. Hofmann T., Schaefer M., Schultz G., Gudermann T. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2002. – **99**. – P. 7461–7466.
61. Strubing C., Krapivinsky G., Krapivinsky L., Clapham D. E. // *J. Biol. Chem.* – 2003. – **278**. – P. 39014–39019.
62. Birnbaumer L., Boulay G., Brown D. et al. // *Recent Prog. Horm. Res.* – 2000. – **55**. – P. 127–161.
63. Clapham D. E. // *Nature.* – 2003. – **426**. – P. 517–524.
64. McFadzean I., Gibson A. // *Br. J. Pharmacol.* – 2002. – **135**. – P. 1–13.
65. Di A., Malik A. B. // *Curr. Opin. Pharmacol.* – 2009. – **10**. – P. 1–6.
66. Consoul B., Nilius B., Vennekens R. // *Clin. Exp. Allergy.* – 2009. – **39**, N 10. – P. 1456–1466.
67. Wray S. // *Am. J. Physiol.* – 1993. – **264**, N 1. – P. 1–18.
68. Soloff M. S., Schroeder B. T., Chakraborty J., Pearlmutter A. F. // *Federation Proc.* – 1977. – **36**. – P. 1861–1866.
69. Jeng Y. J., Soloff S. L., Anderson G. D., Soloff M. S. // *Endocrinology.* – 2003. – **144**, N 1. – P. 61–68.
70. Yang M., Gupta A., Shlykov S. G. et al. // *Biol. Reprod.* – 2002. – **67**. – P. 988–994.
71. Babich L. G., Ku C. Y., Young H. W. et al. // *Ibid.* – 2004. – **70**. – P. 919–924.
72. Dalrymple A., Slater D. M., Beech D. et al. // *Mol. Hum. Reprod.* – 2002. – **8**. – P. 946–951.
73. Trebak M., St. J. Bird G., McKay R. R. et al. // *J. Biol. Chem.* – 2003. – **278**. – P. 16244–16252.
74. Tu P., Kunert-Keil C., Lucke S., Brinkmeier H., Bouron A. // *J. Neurochem.* – 2009. – **108**, N 1. – P. 126–138.
75. Eude I., Paris B., Cabrol D. et al. // *Biol. Reprod.* – 2000. – **63**. – P. 1567–1573.
76. Hurd W. W., Fomin V. P., Natarajan V. et al. // *Am. J. Obstet. Gynecol.* – 2000. – **183**. – P. 1525–1531.
77. Rodriguez-Pena A., Rozengurt E. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 1984. – **120**. – P. 1053–1059.
78. Berridge M. J., Galione A. // *FASEB J.* – 1988. – **2**. – P. 3074–3082.
79. Missiaen L., Van Acker K., Parys J. B. et al. // *J. Biol. Chem.* – 2001. – **276**. – P. 39161–39170.
80. Шинлова О. П., Фомин В. П., Костерин С. А. // *Укр. біохім. журн.* – 1987. – **59**, № 2. – С. 75–79.
81. Soloff M. S., Sweet P. // *J. Biol. Chem.* – 1982. – **257**, N 18. – P. 10687–10693.
82. Шлыков С. Г., Бабич Л. Г., Ровенец Н. А., Костерин С. А. // *Укр. біохім. журн.* – 1996. – **68**, № 5. – С. 25–34.
83. Шлыков С. Г., Бурдыга Ф. В., Марченко С. Н. и др. // *Биофизика.* – 1993. – **38**, № 1. – С. 160–167.
84. Степанковская Г. К., Шинлова О. П., Фомин В. П. и др. // *Укр. біохім. журн.* – 1989. – **61**, № 5. – С. 109–112.
85. Костерин С. А., Курский М. Д., Браткова Н. Ф. // *Вопр. мед. химии.* – 1985. – **31**, № 2. – С. 97–102.
86. Enyedi A., Brandt J., Minami J. and Peniston J. T. // *Biochem. J.* – 1989. – **261**, N 1. – P. 23–28.
87. Леви Дж. Взаимодействие гормонов с рецепторами. – М.: Мир, 1979. – С. 433 с.

Отримано 18.03.2010