

ДОСЛІДЖЕННЯ КІНЕТИЧНИХ ЗАКОНОМІРНОСТЕЙ ВПЛИВУ ОКСИДУ АЗОТУ НА ВИКЛИКАНІ ОКСИТОЦИНОМ СКОРОЧЕННЯ ГЛАДЕНЬКИХ М'ЯЗІВ МІОМЕТРІЯ

Тонус і скоротлива активність гладеньких м'язів матки регулюється рядом гуморальних чинників і нейромедіаторів, серед яких визначальну роль відіграють утеротонічний гормон окситоцин і токолітичний месенджер оксид азоту. У роботі було здійснено дослідження закономірностей впливу донора оксиду азоту нітропрусиду натрію (НПН, 100 мкМ) на спонтанні та викликані окситоцином скорочення поздовжніх гладеньких м'язів матки щурів. Скоротливу активність досліджували тензометрично в ізометричному режимі; аналіз кінетичних властивостей скорочень здійснювали із розрахунком нормованих максимальних швидкостей окремо фаз скорочення (V_{nc}) і розслаблення (V_{nr}).

НПН знижував тонус гладеньком'язових препаратів та змінював спонтанну скоротливу активність, спричиняючи вірогідне зменшення амплітуди і частоти скорочень; при цьому мало місце пришвидшення фази розслаблення окремих скорочень (збільшення параметра V_{nr}). Також НПН спричиняв зниження сили окситоцин-індукованих (0,1 МО) скорочень, не впливаючи на характер наростання сили скоротливих відповідей (параметр V_{nc} залишався на рівні контрольних показників), але значно прискорюючи їх розслаблення (збільшення параметра V_{nr} у середньому втричі). У роботі обговорюються ймовірні механізми, які лежать в основі дії НПН на кінетичні параметри скорочень гладеньких м'язів міометрія.

Ключові слова: гладенькі м'язи, міометрій, оксид азоту, окситоцин, скорочення, механокінетичні параметри

Постановка проблеми. Порушення скоротливої функції гладеньких м'язів міометрія лежать в основі таких досить поширених загрозливих патологій вагітності і пологів, як гіпо- і гіпертонус матки, невиношуваність плоду та передчасні пологи. Загалом, у великій кількості випадків ці патології можуть призводити до загибелі дитини і становлять загрозу життю жінок [6].

Тонус і скоротлива активність гладеньких м'язів матки регулюється рядом гуморальних чинників і нейромедіаторів, серед яких, зокрема, простагландини, ацетилхолін і окситоцин є активаторними, тоді як ендогенними міорелаксантами є, наприклад, прогестерон і оксид азоту (NO). Окситоцин – найбільш потужний утеротонічний гормон, який секретується гіпоталамусом і через кровоток потрапляє в судинне русло матки. Також на пізніх термінах вагітності окситоцин напружують клітини децидуальної оболонки, а збільшення його концентрації стимулює початок пологів [9]. NO є іншим важливим ендогенним фактором, який регулює скорочувальну активність і тонус гладеньких м'язів матки [1]. Залежно від фізіологічного стану або патологій ендогенними NO-синтазами синтезується різна кількість оксиду азоту, змінюючи характер спонтанних скорочень гладеньком'язових клітин [4].

Тож значний практичний інтерес становлять дослідження, направлені на встановлення особливостей місцевої регуляції скоротливої функції цих гладеньких м'язів з метою визначення оптимального режиму корегування таких порушень.

Аналіз останніх досліджень і публікацій. В умовах *in vitro* окситоцин у низьких концентраціях призводить до підвищення частоти спонтанних скорочень гладеньких м'язів, а за високих – індукує розвиток фазного скорочення, яке переходить в тонічне з посиленою спонтанною активністю на його фоні. Ці ефекти забезпечуються внаслідок каскаду внутрішньоклітинних перетворень, що індукуються після взаємодії окситоцину зі специфічними метаболічними рецепторами. В клітинах міометрія щурів ці рецептори переважно спряжені з $G\alpha_q$ -білками (опосередковуючи активацію

фосфоліпази C- β і синтез вторинних посередників діацилгліцеролу і інозитол-1,4,5-трифосфату), але також здатні частково активувати $G\alpha_i$ - (інгібуючи аденілатциклазу) та $G\alpha_h$ -білки (стимулюючи фосфоліпазу C- δ) [11]. Також окситоцин додатково здатен стимулювати синтез вторинного посередника циклічної АДФ-рибози (активуючи ріанодинові рецептори саркоплазматичного ретикулуму) [3]. Крім Ca^{2+} -залежних ефектів, окситоцин стимулює Ca^{2+} -незалежний шлях активації скорочення (внаслідок активації протеїнкінази ERK1/2).

На сьогодні існують достатньо неоднорідні дані щодо механізмів впливу підвищення концентрації NO на скорочувальну активність гладеньких м'язів. Ефекти оксиду азоту в міюцитах матки реалізуються за двома шляхами: опосередкованим активацією гуанілатциклази (цГМФ-залежно) та безпосередньою модифікацією клітинних білків (цГМФ-незалежно), причому другий шлях, на відміну від переважної більшості інших вісцеральних гладеньких м'язів, значно превалює [1, 8].

Мета статті. Встановити закономірності змін кінетичних параметрів спонтанних і окситоцин-викликаних скорочень гладеньких м'язів міометрія в присутності підвищених концентрацій оксиду азоту.

Методика

Експерименти проводили на ізольованих препаратах поздовжніх гладеньких м'язів рогів матки щурів. М'язові смужки (середній розмір - 2x10 мм) розміщували у робочій камері об'ємом 2 мл з проточним розчином Кребса (швидкість протікання - 5 мл/хв), термостатованій при 37 °С. Препарату надавали пасивний натяг (10 мН) і залишали на 1 год (до появи спонтанних скорочень постійної амплітуди і частоти). Реєстрацію здійснювали за допомогою електричного потенціометра Н 339.

У дослідах використовували нормальний розчин Кребса (НРК) з концентрацією складових (в ммоль/л): NaCl - 120,4; KCl - 5,9; NaHCO₃ - 15,5; NaH₂PO₄ - 1,2; MgCl₂ - 1,2; CaCl₂ - 2,5; глюкоза - 11,2; рН 7,4. Активацію скорочень здійснювали розчином окситоцину (0,1 МО, виробництва ЗАТ «Біолік», м. Харків) в НРК. У якості донора NO використовували нітропрурид натрію (НПН). Внесення НПН в середовище інкубації гладеньком'язових препаратів здійснювали за 20-30 хвилин до індукування окситоцинових скорочень.

Аналіз кінетичних властивостей скорочень здійснювали відповідно до методу, описаного раніше [5]. В процесі аналізу скоротливих відповідей здійснювали лінеаризацію фаз скорочення і розслаблення в координатах $\{ \ln[(f_m - f)/f]; \ln t \}$, де f – миттєва (в момент часу t) сила, f_m – максимальна сила, τ – характеристичний час (чисельно дорівнює часу, в який спостерігається напівмаксимальне значення сили $1/2 f_m$), n – логарифмічний коефіцієнт крутизни механокінетичної кривої. Час, в який досягається f_m , приймався початковою точкою відліку фази розслаблення $t = 0$; поточному значенню часу t відповідало значення миттєвої сили f . За фазу розслаблення приймали фрагмент скоротливої відповіді після досягнення ею f_m , а фазою скорочення вважали частину механограми від початку зміни сили до f_m .

Відповідно до методу [5] проводили розрахунок незалежних від f_m показників – нормованих на значення f_m максимальних швидкостей розслаблення та скорочення (враховуючи відсутність принципових відмінностей між характером протікання фаз скоротливої відповіді м'язів) V_n :

$$V_n = \left| - (1/f_m) (df/dt) = \frac{(n-1)^{\frac{n-1}{n}} \cdot (n+1)^{\frac{n+1}{n}}}{4n\tau} \right| .$$

Для встановлення кількісних змін у кінетиці окситоцин-індукованих скоротливих відповідей відповідно до формули розраховували нормовані максимальні швидкості фаз скорочення (V_{nc} – від початку зростання напруження м'язового препарату до максимуму) та розслаблення (V_{nr} – від максимуму до повернення напруження препарату на базальний рівень).

Статистичний аналіз здійснювали методами варіаційної статистики з використанням програми OriginPro 8. У всіх випадках достовірними вважали результати при $P < 0,05$. Результати експериментів представлені як середнє \pm стандартна похибка середнього.

Результати та їх обговорення

Внесення донора оксиду азоту НПН (100 мкМ) в омиваючий розчин супроводжувалось зниженням тонузу гладеньком'язових препаратів, яке досягало свого стаціонарного рівня протягом 2-4 хв і далі було постійним (Рис. 1). На фоні зниженого тонузу також спостерігалось пригнічення спонтанної скоротувальної активності м'язів. За даних умов мало місце вірогідне зниження амплітуди спонтанних скорочень у середньому на 43 %, тоді як їх частота зменшувалась близько чверті. Також під дією НПН зазнавав змін характер окремих спонтанних скорочень: відмічалось пришвидшення ходу фази розслаблення без зміни фази наростання сили (V_{nc} вірогідно не відрізнялась відносно контрольних значень). Проведений відповідно до методу [5] кінетичний аналіз дозволив виявити вірогідне підвищення нормованої максимальної швидкості фази розслаблення (V_{nr}) у середньому на 24%.

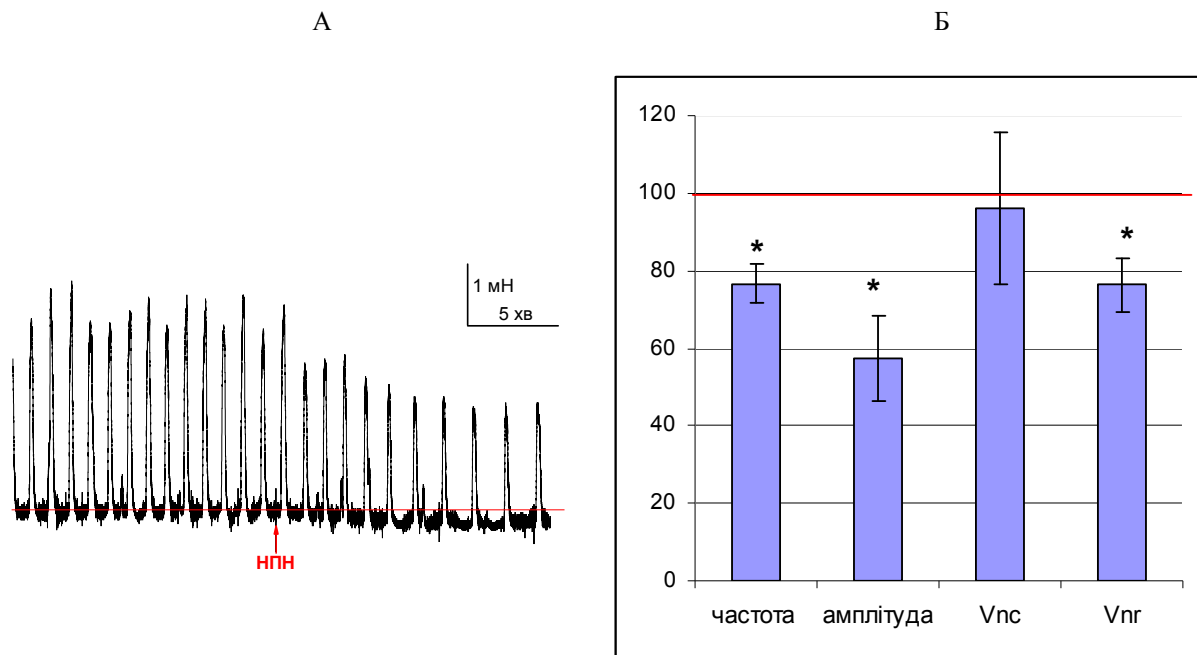


Рис.1. Спонтанна скоротувальна активність гладеньких м'язів міометрія щурів та вплив на неї донора оксиду азоту нітропрусида натрію (НПН, 100 мкМ): А – типова механограма (червоною лінією показано контрольний рівень тонузу препарату); Б – усереднені ефекти дії НПН на амплітуду і механокінетичні параметри спонтанних скорочень (за 100% прийнято відповідні контрольні значення).

Нітропрусид натрію також спричиняв пригнічення окситоцин-викликаних (0,1 МО) скорочень. За даних умов спостерігались зниження амплітуди (у середньому на 32% порівняно контролем) та модуляція характеру розвитку скоротливої відповіді (Рис. 2). Проведення кінетичного аналізу показало, що як і у випадку спонтанних скорочень, НПН не змінював показник нормованої максимальної швидкості наростання сили (V_{nc}), але індукував значне збільшення показника V_{nr} (з $0,34 \pm 0,06$ хв⁻¹ у контролі до $0,11 \pm 0,03$ хв⁻¹ у присутності НПН). Таким чином, внесення в омиваючий гладеньком'язові препарати розчин донора NO дозволило пришвидшити їх розслаблення приблизно в три рази.

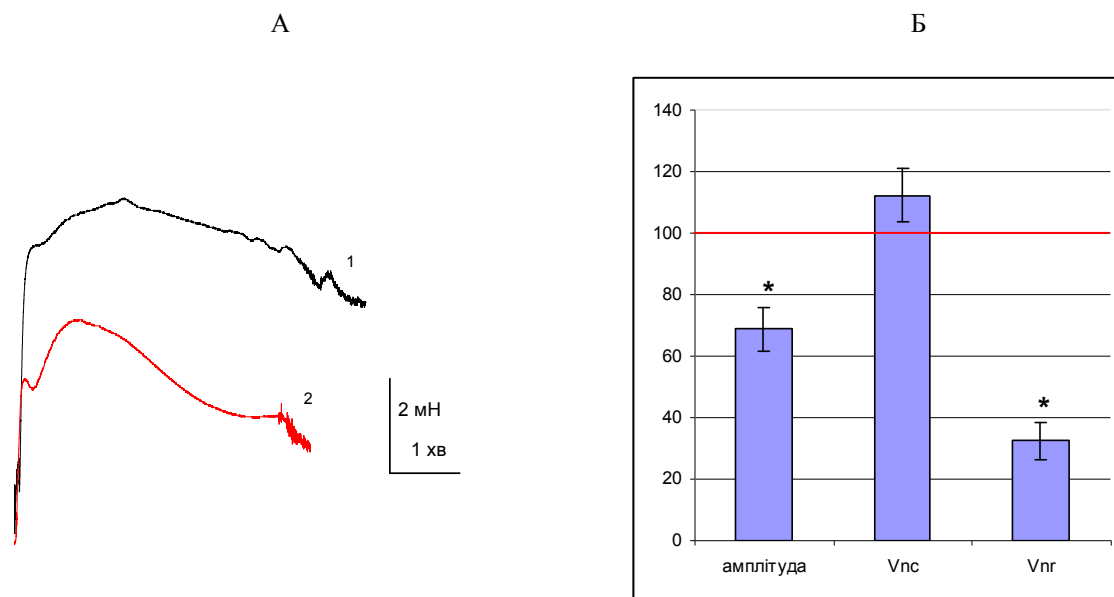


Рис.2. Модуляція нітропрусидом натрію (100 мкМ) окситоцин-викликаних (0,1 МО) скорочень гладеньких м'язів міометрія щурів: А – механограми скорочень (1 – контрольне скорочення, 2 – скорочення в умовах попередньої інкубації гладеньком'язових смужок у присутності НПН); Б - усереднені ефекти дії НПН на амплітуду і механокінетичні параметри окситоцинових скорочень (за 100% прийнято відповідні контрольні значення).

Варто відзначити, що підвищення концентрації НПН (500 мкМ) спричиняло модуляцію спонтанних і викликаних окситоцином скорочень на рівні, аналогічному до дії цієї сполуки в концентрації 100 мкМ, тоді як у випадку використання концентрації НПН 1 мМ спонтанна активність пригнічувалась практично повністю.

Можна міркувати про механізми, які задіяні у реалізації ефектів нітропрусиду натрію на скорочувальну активність гладеньких м'язів міометрія щурів. Відомо, що цих м'язах залежно від гормонального статусу і функціональної активності (невагітний стан або окремі періоди вагітності) у різному співвідношенні експресуються усі три ізоформи NO-синтаз (ендотеліальна, нейрональна та індукцйбельна), регулюючи, таким чином, тонус і збудливість міометрія. Тому оксид азоту в м'язах матки відіграє фізіологічно значущу роль. Внутрішньоклітинна дія NO переважно не залежить від синтезу цГМФ, тобто полягає у безпосередній модифікації білків міоциту. Важливим шляхом, яким реалізується розслаблюючий ефект NO в гладеньких м'язах, зокрема матки, є пряма активація Ca^{2+} -залежних K^+ -каналів високої провідності (BK_{Ca}) [7]. Тому, ймовірно, що одержане у роботі зниження тонусу препаратів і пригнічення скорочень відбувається за участі цього механізму. Оскільки відомо, що ці канали практично не залучені до регуляції спонтанної активності в м'язах матки невагітних

щурів [2], можна припустити, що саме із різною мірою активації V_{Ca} пов'язана значна відмінність між показниками V_{nr} у випадку спонтанних і викликаних окситоцином скорочень.

Варто відзначити, що у роботі було використано донор оксиду азоту НПН, який здатен продукувати не тільки NO, але й його редокс-форми (зокрема, катіон NO^+). Відомо, що NO^+ в гладеньких м'язах матки здатен перетворюватись у високотоксичний іон нітрозонію (NO_2^+), який нітрозилує фенольні і сульфгідрильні групи білків [1]. Дійсно, відомо, що таким шляхом через взаємодію з суттєвими сульфгідрильними групами в активному центрі молекули індукується зниження ензиматичної активності скоротливого білка міозину [10]. Оскільки молекули NO здатні вільно проникати в клітини, ймовірно, що цей шлях може бути залучений у пригнічення спонтанних і викликаних окситоцином скорочень.

Висновки

Встановлено, що донор оксиду азоту нітропрусид натрію знижує тонус, вірогідно пригнічує окситоцин-індуковані скорочення гладеньких м'язів міометрія щурів та модулює характер розвитку цих скоротливих відповідей, спричиняючи значне (втричі) збільшення швидкості розслаблення. Отже, можна передбачити, що локальне підвищення концентрації NO є важливим токолітичним чинником для нормалізації скоротливої функції гладеньких м'язів матки за її гіпертонусу.

Література

1. Данилович Ю.В. Оксид азоту як регулятор внутрішньоклітинного кальцієвого гомеостазу в міоцитах матки / Ю.В. Данилович // Український біохімічний журнал. - 2012. - Т. 84, № 3. - С. 5-25.
2. Aaronson P.I. A role for voltage-gated, but not Ca^{2+} -activated, K^+ -channels in regulating spontaneous contractile activity in myometrium from virgin and pregnant rats / Philip Irving Aaronson, Uzma Sarwar et al. // British Journal of Pharmacology. - 2006. - V.147. - P. 815-824.
3. Barata H. The role of cyclic-adp-ribose-signaling pathway in oxytocin-induced Ca^{2+} transients in human myometrium cells / Hosana Barata, Michael Thompson, Weronika Zielinska, Young S. Han et al. // Endocrinology. - 2004. - V. 145 (2). - P. 881-889.
4. Bulbul A. The role of nitric oxide in the effects of ovarian steroids on spontaneous myometrial contractility in rats / Bulbul A., Yagc A., Altunbas K., Sevimli A., Celik H.A., Karadeniz A., Akdag E. // Theriogenology. - 2007. - Vol. 68. - P. 1156-1168.
5. Burdyga Th.V. Kinetic analysis of smooth muscle relaxation / Burdyga Th.V., Kosterin S.A. // General Physiology and Biophysics. - 1991. - V.10. - P. 589-598.
6. Wray S. The physiological basis of uterine contractility: a short review / Wray S., Kupittayanant S., Shmygol A., Smith R. D., Burdyga T. // Experimental Physiology. - 2001. - V. 86, № 2. - P. 239-246.
7. Buxton I.L.O. NO-induced relaxation of labouring and non-labouring human myometrium is not mediated by cyclic GMP / Iain L.O. Buxton, Robert A. Kaiser, Nicholas A. Malmquist, Stephen Tichenor // British Journal of Pharmacology. - 2001. - V. 134. P. 206-214.
8. Hoffmann P. Effects of L-arginine and sodium nitroprusside on the spontaneous contractility of human non-pregnant uterus / P. Hoffmann, F. Stanke-Labesque, R. Fanchin, N. Dilai, J.C. Pons, J.M. Ayoubi // Human Reproduction. - 2003. - V.18, №1. - P. 148-151.
9. Mitchell B.F. Oxytocin and its receptor in the process of parturition / Mitchell B.F., Schmid B. // Journal of the Society for Gynecologic Investigation. - 2001. - V. 8, № 3. - P. 122-133.
10. Perkins W.J. Skeletal muscle force and actomyosin ATPase activity reduced by nitric oxide donor / William J. Perkins, Young-Soo Han, Gary C. Sieck // Journal of Applied Physiology. - 1997. - V. 83. - P. 1326-1332.
11. Sanborn B.M. Hormonal signaling and signal pathway crosstalk in the control of myometrial calcium dynamics / Barbara M. Sanborn // Seminars in Cell & Developmental Biology. - 2007. - V. 18 (3). - P. 305-314.

Аннотація. Цимбалюк О.В. Изучение кинетических закономерностей влияния оксида азота на вызванные окситоцином сокращения гладких мышц миометрия.

Тонус и сократительная активность гладких мышц матки регулируется рядом гуморальных факторов и нейромедиаторов, среди которых определяющую роль играют

утеротонический гормон окситоцин и токолитический мессенджер оксид азота. В работе было проведено исследование закономерностей влияния донора оксида азота нитропруссид натрия (НПН, 100 мкМ) на спонтанные и вызванные окситоцином сокращения продольных гладких мышц матки крыс. Сократительную активность исследовали тензометрически в изометрическом режиме, анализ кинетических свойств сокращений осуществляли с расчетом нормированных максимальных скоростей отдельно фаз сокращения (V_{nc}) и расслабления (V_{nr}).

НПН снижал тонус гладкомышечных препаратов и менял спонтанную сократительную активность, вызывая достоверное уменьшение амплитуды и частоты сокращений, при этом имело место ускорение фазы расслабления отдельных сокращений (увеличение параметра V_{nr}). Также НПН вызывал угнетение силы окситоцин-индуцированных (0,1 МЕ) сокращений, не влияя на характер нарастания силы сократительных ответов (параметр V_{nc} оставался на уровне контрольных показателей), но значительно ускоряя их расслабление (увеличение параметра V_{nr} в среднем в три раза). В работе обсуждаются возможные механизмы, лежащие в основе действия НПН на кинетические параметры сокращений гладких мышц миометрия.

Ключевые слова: гладкие мышцы, миометрия, оксид азота, окситоцин, сокращение, механокинетиические параметры

Summary. Tsymbalyuk O.V. Kinetic analysis of the influence of nitric oxide on oxytocin-induced contractions of the myometrium smooth muscles.

Tone and contractile activity of uterus smooth muscles regulated by a number of humoral factors and neurotransmitters, including the decisive role played by the uterotonic hormone oxytocin and tocolytic messenger nitric oxide. Were examined of the influence of nitric oxide donor sodium nitroprusside (SNP, 100 μ M) on spontaneous and oxytocin-induced contractions of the rat uterus longitudinal smooth muscles. Contractile activity studied tensometrically in isometric mode, analysis of the kinetic properties of contractions performed the calculation of the normalized maximal velocity speed of contraction (V_{nc}) and relaxation (V_{nr}) phases.

SNP lowered the tone of smooth muscle preparations and changed the spontaneous contractile activity, causing a significant decrease in the amplitude and frequency of contractions, while there has been an acceleration of the relaxation phase separate contractions (increasing the value V_{nr}). SNP also caused a reduction in force oxytocin-induced (0.1 IU) contractions without affecting the nature of force development of the contractile responses (V_{nc} parameter remained at control level), but significantly accelerating their relaxation (increasing the value V_{nr} an average of three times). This paper discusses the possible mechanisms underlying the actions of SNP on the kinetic parameters of smooth muscle contractions of the myometrium.

Key words: smooth muscle, myometrium, nitric oxide, oxytocin, contraction, mechanokinetic parameters

Київський національний університет імені Тараса Шевченка

Одержано редакцією 12.12.2012
Прийнято до публікації 9.01.2013