

Ю.В. Данилович, В.А. Тугай

Вплив активних сполук азоту та кисню на рН міоплазми клітин міометрія

На моделі суспензії миоцитів матки крыс с использованием флуоресцентного BCECF-AM установлено, что „кажущееся” значение внеклеточного рН (pH_i) для этого объекта составляет $6,72 \pm 0,02$ при внеклеточном рНo равном 7,4 (25°C ; $n=5$). Активация клеток 0,1 ммоль/л карбахолом сопровождается повышением pH_i цитозоля до значений $6,81 \pm 0,01$. Этот процесс с разной эффективностью подавляется блокаторами калиевых и водородных каналов: 0,1 ммоль/л 4-аминопиридином, тетраэтиламмонием и кадмием. Блокаторы пассивного транспорта H^+ полностью не ингибируют индуцированное агонистом защелачивание миоплазмы, что может свидетельствовать в пользу существования неканальной компоненты пассивного транспорта H^+ через плазматическую мембрану. Проведенными экспериментами установлено, что донор NO (нитропруссид натрия, 0,1 ммоль/л) и NO_2^- (10 нмоль/л) приводили к существенному повышению рН миоплазмы клеток миометрия, индуцированное карбахолом. В наших экспериментах также показано, что 10 нмоль/л H_2O_2 повышал pH_i миоцитов, активированных карбахолом. Высказано предположение о возможности влияния исследуемых соединений на системы транспорта Ca^{2+} в миоцитах путем изменения рН миоплазмы.

ВСТУП

Значення рН цитозолю (pH_i) завжди менше, внаслідок проходження окисних процесів від рН позаклітинного простору (pH_o) [9]. Тобто на плазматичній мембрані клітини може існувати градієнт протонів, вектор якого спрямований у позаклітинне середовище. Активація цілої низки клітин, зокрема електророзбудливих, супроводжується залуженням цитозолю через посилення транспорту протонів за градієнтом концентрації. Передбачається, що цей транспорт опосередковується або калієвими, або специфічними водневими каналами [14]. Підвищення рН міоплазми гладеньком'язових клітин індукує звільнення Ca^{2+} з саркоплазматичного ретикулума та посилює утворення комплексу Ca^{2+} – кальмодулін, що безпосередньо ініціює скорочення. Крім того, за цих умов активуються кальційзалежні калієві канали плазматичної мембрани [3, 9,

23]. Тобто H^+ -обмін може бути тісно пов'язаний з передачею кальцієвого сигналу в міоцитах, зокрема в міометрії матки, який характеризується інтенсивним окисним метаболізмом і коливальними змінами pH_i під час контрактильної активності [21].

Результати сучасних досліджень дають змогу передбачити важливу роль активних метаболітів азоту та кисню в регуляції скоротливої активності матки, зокрема в період прогестеронової блокади, яка забезпечує довготривале розслаблення міометрія під час вагітності [11, 13, 18, 20, 22]. Одним з найбільш функціонально-активних метаболітів азоту є оксид азоту (NO), його стабільним похідним виступає нітрит-аніон (NO_2^-); важливим активним метаболітом кисню є пероксид водню (H_2O_2) [1, 2, 7, 16]. Зазначені речовини метаболічно зв'язані між собою [2, 7, 16] і можуть легко дифундувати з ендометрія матки, де утворюються за дії прогестерону, до міометрія

[5]. В міометрії вони можуть безпосередньо впливати на транспорт H^+ , а це, в свою чергу – на концентрацію Ca^{2+} в міоплазмі та, ймовірно, призведе до зміни скоротливої активності.

Метою цієї роботи було дослідити вплив активних метаболітів азоту та кисню на рН цитозоля клітин міометрія.

МЕТОДИКА

Виділення суспензії інтактних міоцитів з міометрії щурів. Суспензію гладеньком'язових клітин матки невагітних щурів, естрогенізованих за 16 год до забору тканини, одержували з використанням колагенази і соєвого інгібітора трипсину за допомогою методу Молларда та співавт. [10].

У 1 мл отриманої клітинної суспензії містилося в середньому $6,58 \cdot 10^6$ міоцитів; кількість життєздатних клітин становила 90–95 % від загальної кількості клітин (цю характеристику визначали при фарбуванні клітинного препарату вітальним барвником трипановим синім). Підрахунок загальної кількості клітин і кількості життєздатних клітин проводили з використанням гемоцитометра (камери Горяєва).

Визначення внутрішньоклітинного рН міоцитів з використанням флуоресцентного зонда BCECF-AM. Процедура навантаження зондом відповідала вищенаведеній з незначними модифікаціями [19]. Режим вимірювання був таким: λзбудження=506 нм (ширина щілини 3 нм), λфлуоресценції=530 нм (ширина щілини 10 нм). За умов використання режиму однохвильової флуориметрії неможливо отримати „абсолютне” значення pH_i , а лише „уявне”. Калібровку сигналу флуоресценції проводили на початку кожного експерименту з використанням протонофору 2,4-динітрофенолу (0,05 %), рН позаклітинного середовища задавалося НЕРЕС-трис-буфером і становило 6,0–7,25. За таких умов pH_i рН_o врівноважується і дає можливість калібрувати сигнал у коор-

динатах „значення розрахованого pH_i – величина умовного сигналу”. Методом найменших квадратів виводили рівняння прямої $y(x)=ax + b$ ($R = 0,9$), з якого вираховували значення pH_i в експерименті, реєструючи умовну величину сигналу флуоресценції.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

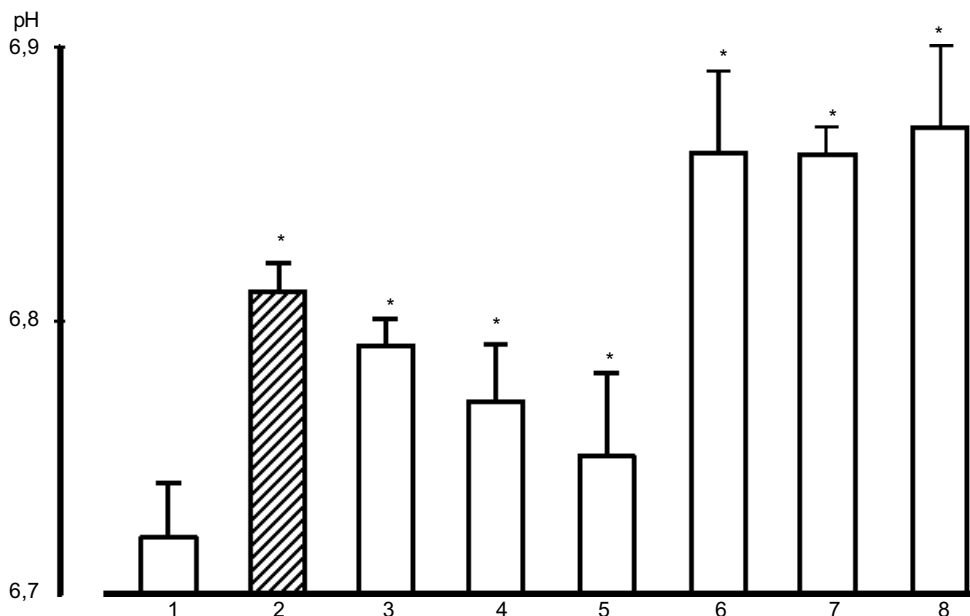
На моделі суспензії міоцитів матки щурів з використанням флуоресцентного pH_i -зонда BCECF-AM встановлено, що уявне значення pH_i становить $6,72 \pm 0,02$, рН_o 7,4 при 25 °С у середовищі Хенкса ($n=5$). Ці результати можуть свідчати про існування градієнта протонів на плазматичній мембрані, вектор якого спрямований у позаклітинне середовище. Активація клітин 0,1 ммоль/л карбахолом призводить до достовірного відносно попереднього значення ($P>0,05$) підвищення pH_i до уявного значення $6,81 \pm 0,01$ ($n=5$). Цей процес з різною ефективністю пригнічувався блокаторами калієвих і водневих каналів [3, 14]: 0,1 ммоль/л 4-амінопіридином, тетраетиламонієм та кадмієм (рисунок). Блокатори транспорту H^+ повністю не пригнічують індуковане агоністом залуження міоплазми, що може свідчати на користь неканальної компоненти транспорту H^+ крізь плазматичну мембрану. Дійсно, в плазматичній мембрані міометрія існує $Ca^{2+} - H^+$ -обмін [6], який активується холіноміметиками [3]. Мабуть, саме тому в нашому експерименті іони кадмію більш інтенсивно пригнічують залуження pH_i , оскільки є одночасно блокаторами транспорту Ca^{2+} і H^+ [3, 14]. Таким чином, існує феномен посилення виходу іонів водню з міоплазми у позаклітинне середовище за активації клітин.

Проведеними експериментами встановлено, що донор NO (нітропрурид натрію, 0,1 ммоль/л) та NO_2^- (10 нмоль/л) призводили до суттєвого підвищення рН міоплазми

клітин міометрія, індукованого карбахолом (див. рисунок). В раніше проведених дослідях на моделі правильно орієнтованих везикул плазмолемі міометрія, нами показано посилення транспорту H^+ з везикул при дії досліджуваних сполук [4]. Тобто підвищення pH_i на міоцитах може бути пояснено безпосереднім впливом активних метаболітів азоту на транспорт H^+ в плазматичній мембрані.

Особлива увага дослідників щодо ролі H_2O_2 в регуляції транспорту K^+ та H^+ почала проявлятися після відкриття НАДФН-оксидазного комплексу в багатьох типах нефагоцитуючих клітин (епітелій легень, кровоносні судини, нервова тканина) [8]. З'ясувалося, що активність НАДФН-оксидази асоційована з появою спрямованого з клітини водневого струму, який ефективно пригнічувався Zn^{2+} та Cd^{2+} [15, 17]. В еозинофілах виявлено спряжену з НАДФН-оксидазою провідність H^+ , яка мала дуже низький поріг активації, повільно інактивувалася, стимулювалася ГТФγS і

Ca^{2+} , інгібувалася Zn^{2+} та реагентами на гістидинову групу. Запропонована фізіологічна роль провідності H^+ полягає у виведенні H^+ з цитозолу, продукованого НАДФН-оксидазою та проходженням реакцій пентозофосфатного шунта [17]. Дискутуються питання щодо механізмів спряження НАДФН-оксидазного комплексу та каналу H^+ . Припускають, що одна з субодиниць НАДФН-оксидази має його властивості [15, 17]. З іншого боку, запропонована модель просторового відокремлення цих двох структур. Висунута гіпотеза стосовно фізіологічної ролі посилення провідності мембрани до моновалентних катіонів при дії H_2O_2 в повітроносних шляхах. Припускається, що НАДФН-оксидаза виступає сенсором O_2 в нейроепітеліальних тільцях легень і клітинах каротидного синуса. При підвищенні концентрації O_2 спостерігається інтенсивна продукція O_2/H_2O_2 НАДФН-оксидазою, а H_2O_2 посилює активність калієвих каналів, що блокує збудження плазмолемі і активує вивільнення клітина-



Уявна величина pH_i міоплазми виміряна в суспензії міоцитів з використанням флуоресцентного зонда BCECF-AM: 1 – базальний рівень в неактивованих міоцитах; 2 – за стимуляції 0,1 ммоль/л карбахолом; 3 – пригнічення стимулювального ефекту карбахолу 0,1 ммоль/л 4-амінопіридином; 4 – 0,1 ммоль/л тетраетиламонієм; 5 – 0,1 ммоль/л кадмієм; 6 – додавання 0,1 ммоль/л нітропрусиду натрію на фоні стимулювального ефекту карбахолу; 7 – додавання 10 нмоль/л нітрит-аніонів за попередніх умов; 8 – додавання 10 нмоль/л пероксиду водню за попередніх умов; pH_o 7,4, $t=25^\circ C$, * зміни достовірні відносно досліді (2); $P<0,05$, $n=5$

ми серотоніну – медіатора розслаблення [8]. Наведені дані свідчать на користь ролі H_2O_2 в регуляції проникності плазмалеми для моновалентних катіонів. Але стосовно міометрія таких відомостей немає. В наших експериментах встановлено, що H_2O_2 в концентрації 10 нмоль/л підвищував pH_i міоцитів, активованих карбахолом (див. рисунок). У попередній роботі показано, що пероксид водню може посилювати мембранний транспорт H^+ за градієнтом концентрації у везикульованій фракції плазматичної мембрани міометрія [4]. Тобто підвищення pH міоплазми можна пояснити посиленням транспорту H^+ з клітини при дії H_2O_2 . Слід зазначити, що у везикульованій фракції плазматичної мембрани дія останнього пригнічувалася дитіотриїтолом, що дає змогу зв'язати ефект H_2O_2 з окисненням поверхневих SH-груп мембрани [4]. Це припущення відповідає дії H_2O_2 в біологічних системах.

Наведені результати при екстраполяції в фізіологічні умови, яку необхідно здійснювати дуже обережно, оскільки досліди проведені *in vitro*, дозволяють припустити, що одним із механізмів релаксуючого впливу активних метаболітів азоту та кисню на міоцити є гіперполяризація плазматичних мембран за допомогою посилення транспорту з цитозолу моновалентних катіонів. Цей механізм описаний іншими авторами для калієвих каналів [12]. Дійсно, короткотривале підвищення pH_i за активації клітини, яке супроводжується збільшенням концентрації Ca^{2+} в цитозолі, ініціює транспорт моновалентних катіонів через кальційзалежні калієві канали [23]. З іншого боку, підвищення pH_i результує вивільнення Ca^{2+} з ретикулярних депо [9]. Тобто можна припустити, що дія активних метаболітів азоту та кисню спрямована як на регуляцію розвитку кальцієвого сигналу, так і на його термінацію, і рівновага в цих процесах буде зміщуватися залежно від конкретної фізіологічної ситуації.

Iu. V. Danylovych, V.A. Tugai

INFLUENCE OF OXYGEN AND NITROGEN ACTIVE COMPOUNDS ON PH VALUE IN UTERUS MYOCYTES

In suspension from a rat uterus using fluorescent pH_i probe BCECF-AM was established that the „apparent” pH_i value for this object was $6,72 \pm 0,02$ at $pH_o = 7,4$ ($t = 25^\circ C$, $n=5$). Cell activation by 0,1 mM carbachol was accompanied by a rise in cytosolic pH up to $6,81 \pm 0,01$. This process with different efficiency was inhibited by blockers of K^+ - and H^+ -channels: 0,1 mM 4-amidopyridine, tetraethylammonium and cadmium. The blockers of passive H^+ -transport do not inhibit completely alkalization of myoplasm that can testify in the favor of the non-channel way of passive transport H^+ through plasmalemma. It was established that NO (0,1 mM sodium nitroprusside) and NO_2^- (10 nM) significantly enhanced the carbachol-induced rise of myoplasm pH in the cells from myometrium. It also was shown that carbachol-induced pH_i in myocytes was increased by the addition of 10 nM H_2O_2 . It was suggested that the studied compounds could influence Ca^{2+} transport systems by changing pH in myocytes.

A. V. Palladin Institute of Biochemistry National Academy of Science of Ukraine, Kyiv

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Волин М. С., Дэвидсон К. А., Камински П. М. и др. Механизмы передачи сигнала оксидант-оксид азота в сосудистой ткани // Биохимия. – 1998. – **63**, № 7. – С. 958–965.
2. Гордеева А.В., Звягильская Ю.А., Лабас Ю.А. Взаимосвязь между активными формами кислорода и кальцием в живых клетках // Биохимия. – 2003. – **8**, вып. 10. – С. 1318–1322.
3. Данилович Ю. В. Властивості та роль Ca^{2+}/H^+ -обміну плазмалеми міометрія: Автореф. дис. ... канд. біол. наук. – К., 2001. – 20 с.
4. Данилович Ю.В. Вплив активних сполук азоту та кисню на обмін Ca^{2+} та H^+ через плазматичну мембрану клітин біометрія // Укр. біохім. журн. – 2001. – **73**, №4. – С. 49–54.
5. Данилович Ю.В. Вплив стероїдних гормонів і окситоцину на утворення NO і H_2O_2 в ендометрії // Там само. – 2004. – **76**, №1. – С. 88–96.
6. Костерин С. А., Фомин В. П., Червоненко И. Б., Шинлова О. П. ДрН-индуцируемый транспорт Ca^{2+} во фракции везикул плазматической мембраны гладкомышечных клеток // Биохимия. – 1990. – **55**, вып. 1. – С 73–79.
7. Реутов В. П., Сорокина Е. Г., Охотин В. Е., Косицын Н. С. Циклические превращения оксида азота в организме млекопитающих. – М.: Наука, 1997. – 156 с.
8. Скулачев В. П. H_2O_2 -сенсоры легких и кровеносных сосудов и их роль в антиоксидантной защите

- організма // Біохімія. – 2001. – **66**, вып. 10. – С. 1425–1429.
9. Тугай В. А. Регуляторная роль протона в мембранных процессах мышечной клетки. – К.: Наук. думка, 1993. – 118 с.
10. Шинлова О. П. Транспорт Ca^{2+} в суспензии миоцитов и во фракции везикул сарколеммы миомерия // Автореф. дис. ... канд. биол. наук. – К., 1992. – 22 с.
11. Bani D., Vaccari M. C., Nistri S. Relaxin up-regulates the nitric oxide biosynthetic pathway in the mouse uterus: involvement in the inhibition of myometrial contractility // *Endocrinology*. – 1999. – **140**, №10. – P. 4434–4441.
12. Bolotina V. M., Najibis S., Palacino I. I. Nitric oxide directly activates calcium-dependent potassium channels in vascular smooth muscle // *Nature*. – 1994. – **365**, №2. – P. 850–853.
13. Gruber W. F., Tchugguel W., Huber I. C. Progesteron and nitric oxide systems // *Zentralbl Gynakol.* – 1997. – **119**, №2. – P. 12–16.
14. Lukacs G. L., Kapus A., Nanda A. Proton conductance of the plasma membrane: properties, regulation, and functional role // *Amer. J. Physiol.* – 1993. – **265**, №1. – С. 3–14.
15. Mankelov T. J., Henderson L. M. Inhibition of the neutrophil NADPH oxidase and associated H^+ channel by diethyl pyrocarbonate (DEPC), a histidine-modifying agent evidence for at least two target sites // *Biochem. J.* – 2001. – **358**, №7. – P. 315–324.
16. Matoba T., Shimakawa H. Hydrogen peroxide is an endothelium-derived hyperpolarizing factor in animals and humans // *J. Pharmacol. Sci.* – 2003. – **92**, №1. – P. 1–6.
17. Maturana A., Arnandea U. S., Ryser S., Baufi B. Heme histidine ligands within gp91phox modulate proton conduction by the phagocyte NADPH oxidase // *J. Biol. Chem.* – 2001. – **276**, №32. – P. 30277–30284.
18. Rytlewski K., Zdebski Z. Nitric oxide of the mechanisms that prevent changes that occur during pregnancy // *Ginekol. Pol.* – 2001. – **72**, №9. – P. 738–743.
19. Siskind M.S., McCoy C.E. Regulation of intracellular calcium by cell pH in a smooth muscle cells // *Amer. J. Physiol.* – 1989. – **256**, №25. – C234–C240.
20. Sladek S. M., Magness R. R., Conrad K. P. Nitric oxide and pregnancy // *Ibid.* – 1997. – **272**, №41. – R441–R463.
21. Taggart M., Wray S. Simultaneous measurements of intracellular pH and contraction in uterine smooth muscle // *Pflugers Arch.* – 1993. – **423**, №1. – P. 527–529.
22. Yallampalli C., Dong Y. L., Cangula P. R., Fang L. Role and regulation of nitric oxide in the uterus during pregnancy and parturition // *J. Soc. Gynecol. Investig.* – 1998. – **5**, №2. – P. 58–67.
23. Zholos A. V., Bolton T. B. G-protein control of voltage dependence as well as gating of muscarinic metabotropic channels in guinea-pig ileum // *J. Physiol.* – 1994. – **478**, №2. – P. 195–202.