

І.Б. Філіппов, І.А. Владимірова, Є.М. Кулієва, Р. Скрима, Н. Преварская, Я.М. Шуба

Модуляція скорочення гладеньких м'язів сім'явивідних протоків щура агоністом TRPM8-каналів ментолом

TRPM8 – це неселективний, кальційпроникний катіонний канал, який активується помірним охолодженням і хімічними сполуками-імітаторами холоду – ментолом, іциліном, евкалиптолом. Експресія TRPM8 була виявлена в гладеньком'язових клітинах сім'явивідних протоків щура з переважною локалізацією TRPM8-білка в мембрані саркоплазматичного ретикулума (СР). У цій роботі ми дослідили вплив неспецифічного агоніста TRPM8-каналу – ментолу на скорочення гладеньких м'язів епідидимальної та простатної ділянок сім'явивідних протоків щура, викликаних гіперкалієвим (KCl) розчином Кребса або прикладанням агоністів М-холіно- і адренорецепторів – карбахоліну та норадреналіну. Ментол (0,1–1 ммоль/л) практично не змінював вихідний тонус, але дозалежно пригнічував викликані KCl, карбахоліном і норадреналіном скорочення гладеньких м'язів сім'явивідних протоків на 30–50 %. На тлі дії блокатора Ca^{2+} -АТФази СР – циклопіазонієвої кислоти (10 мкмоль/л) пригнічувальний вплив ментолу на KCl-індуковане скорочення посилювався, а на агоністіндуковане – децю послаблювався. Неспецифічний блокатор TRPM8-каналу капсазепін (10 мкмоль/л) не усував, а збільшував гальмівну дію ментолу на викликані скорочення. Наші результати припускають, що пригнічення скорочення ментолом реалізується безпосередньо двома механізмами – частковим блокуванням надходження кальцію через потенціалзалежні кальцієві канали L-типу та зменшенням кальцієвої ємності депо СР. Останній механізм може, принаймні частково, опосередковуватися СР-резидентним TRPM8-каналом, який при активації ментолом призводить до збільшення пасивних втрат Ca^{2+} із депо СР і, як наслідок, до зниження вивільнення кальцію при активації скорочення.

Ключові слова: щур, гладенькі м'язи сім'явивідних протоків, холододовий рецептор TRPM8, саркоплазматичний ретикулум, скорочення, карбахолін, норадреналін.

ВСТУП

У попередній нашій роботі показано, що гладенькі м'язи сім'явивідних протоків щура експресують TRPM8-канали [1]. Завдяки своїй переважній локалізації в плазматичній мембрані (ПМ) сенсорних нейронів і здатності бути активованим у відповідь на зниження температури або прикладання хімічних сполук – аналогів охолодження – ментолу, іциліну, евкалиптолу тощо TRPM8-канали більш відомі як молекулярні сенсори охолодження, що беруть участь у

перетворенні холододових стимулів у електрохімічну форму, яка може розповсюджуватися в інтегративні центри ЦНС [2–5]. Водночас фізіологічна роль TRPM8-каналів у клітинах тканин внутрішніх органів теплокровних тварин, до яких відносяться і гладенькі м'язи сім'явивідних протоків, вивчена недостатньо. Наші попередні дослідження показали, що в гладеньком'язових клітинах (ГМК) сім'явивідних протоків TRPM8-канал переважно локалізований в саркоплазматичному ретикулумі (СР) [1].

© І.Б. Філіппов, І.А. Владимірова, Є.М. Кулієва, Р. Скрима, Н. Преварская, Я.М. Шуба

Мета цієї роботи – дослідити вплив неспецифічного агоніста TRPM8-каналу ментолу на скоротливу активність гладеньких м'язів двох ділянок сім'явивідних протоків щура у відповідь на деполяризацію мембрани ГМК, викликану підвищенням зовнішньої концентрації K^+ (гіперкалієвий розчин Кребса) або прикладанням агоністів М-холіно- й адренорецепторів карбахоліну та норадреналіну.

МЕТОДИКА

Досліди проведено на гладеньких м'язах сім'явивідної протоки щура, яку розрізали вздовж осі й очищали від епітеліального шару, після чого з її простатної та епідидимальної ділянок готували смужки завдовжки до 10 мм. Середню частину сім'явивідної протоки між обома ділянками довжиною приблизно 10 мм не досліджували. М'язові смужки з одного боку прикріплювали до тензOMETричного датчика сили, а з другого – нерухомо закріплювали в камері та надавали пасивного навантаження в 1 г. Перед дослідом їх витримували протягом однієї години у розчині Кребса такого складу (ммоль/л): NaCl – 120,4, KCl – 5,9, NaHCO₃ – 15,5, NaH₂PO₄ – 1,2, MgCl₂ – 1,2, глюкоза – 11,5, CaCl₂ – 2,5, рН 7,3. Аплікацію досліджуваних речовин проводили додавання їх до проточного розчину Кребса, яким омивалися смужки при 35°C. Скорочення реєстрували за допомогою тензOMETричного методу та неперервно записували на діаграмну стрічку самописця і паралельно на жорсткий диск комп'ютера з використанням програми pClamp 8 (“Axon Instr.”, США) для подальшої обробки. Ментол розводили в базовій концентрації етанолу 1 моль/л і додавали до розчину Кребса в необхідній концентрації. Всі досліджувані речовини були від фірми “Sigma-Aldrich” (США).

Типовий експеримент складався з запису контрольного скорочення у відповідь на короткочасне (3 хв) прикладання гіперка-

лієвого розчину Кребса ($[K^+]=60$ ммоль/л) або норадреналіну (10 мкмоль/л), чи карбахоліну (10 мкмоль/л). На 20-й хвилині відмивання препаратів розчином Кребса додавали ментол (100 мкмоль/л) і на 10-й хвилині перфузії проводили аплікацію активатора скорочення. Препарати відмивали протягом 30 хв, після чого проводили повторну аплікацію активатора скорочення. При досліджуванні впливу додаткової речовини, її вносили в омиваючий розчин Кребса за 10–20 хв до прикладання ментолу і, відповідно, на 10–20-й хвилинах їх сумісної дії викликали скорочення.

РЕЗУЛЬТАТИ

Вплив ментолу на КСІ та агоністіндуковані скорочення. Ментол у концентрації 100 мкмоль/л не викликав суттєвих змін вихідного м'язового напруження ізольованих гладеньких м'язів як простатної, так і епідидимальної ділянок сім'явивідних протоків. Збільшення концентрації ментолу до 1 ммоль/л призводило до статистично недостовірного зниження напруження м'язових смужок. Незмінний вихідний рівень напруження при дії ментолу може свідчити про те, що сам по собі він не викликає активації скорочення і, очевидно, суттєво не впливає на базальний вміст внутрішньоклітинного кальцію в ГМК сім'явивідної протоки. Водночас відомо, що ментол може викликати вивільнення кальцію як із ізольованого СР, так і внутрішньоклітинних депо у клітинах ліній НЕК-293, карциноми простати LNCaP, CHO та COS [6–8], причому таке вивільнення може бути як TRPM8-опосередкованим, так і TRPM8-незалежним.

Незважаючи на відсутність впливу ментолу на вихідний рівень напруження ГМК сім'явивідної протоки, його преаплікація в концентрації 0,1–1 ммоль/л протягом 10 хв призводила до концентраційнозалежного зменшення амплітуди скорочення,

викликаного гіперкалієвим розчином Кребса в усіх досліджуваних препаратах обох ділянок (рис. 1). При цьому спостерігалася значна варіабельність ефектів ментолу на індуковане гіперкалієвим розчином Кребса скорочення в різних експериментах. За наявності 0,1 ммоль/л ментолу мінімальне та максимальне значення змін амплітуди скорочення для простатної частини становило 41,2 та 61,5 %, а для епідидимальної ділянки сім'явидної протоки – 8,8 та 85,9 % відповідно порівняно з контролем. Це свідчить про наявність неконтрольованих факторів, які можуть позначатися на ефектах ментолу. Також було виявлено, що дія ментолу не залежить від наявності чи відсутності епітелію, що вказує на його вплив безпосередньо на ГМК. Слід зазначити, що ментол приблизно однаковою мірою пригнічував амплітуду фазного та тонічного компонентів КС1-викликаного скорочення в обох ділянках сім'явидної протоки. Відомо, що КС1 у використаній концентрації деполяризує мембрану ГМК, максимально активуючи вхід Ca^{2+} через потенціалзалежні кальцієві канали (ПЗКК) L-типу мембрани міоцитів [9]. Оскільки в літературі є дані про здатність ментолу блокувати ПЗКК L-типу [10], тому не виключено, що

одним із механізмів дії цієї сполуки на КС1-індуковане скорочення є пригнічення саме цього шляху надходження кальцію. Одночасно не можна виключити й іншого механізму, пов'язаного зі впливом ментолу на вивільнення та/або захоплення кальцію внутрішньоклітинними депо. Дійсно, наші результати з імунофлюорисцентного мічення ментолчутливого каналу TRPM8 у ГМК сім'явидної протоки вказують на його переважну локалізацію в СР [1], де він так, як це було показано для деяких типів клітин ([8]), може функціонувати як кальцієвий канал мембрани ендоплазматичного ретикулума (ЕР), через який депонований Ca^{2+} може вивільнитися при активації TRPM8.

Для того, щоб з'ясувати участь мобілізації внутрішньоклітинного кальцію в гальмівній дії ментолу, були проведені експерименти, в яких скорочення активували за допомогою агоніста адренорецепторів норадреналіну або агоніста М-холінорецепторів карбахоліну. Їх аплікація викликала скорочення гладеньких м'язів, яке у більшості випадків було подібне до зубчастого тетанусу (рис. 2). Оскільки гладенькі м'язи з простатної ділянки сім'явидної протоки були малочутливими до дії агоністів мускаринових та адренорецепторів,

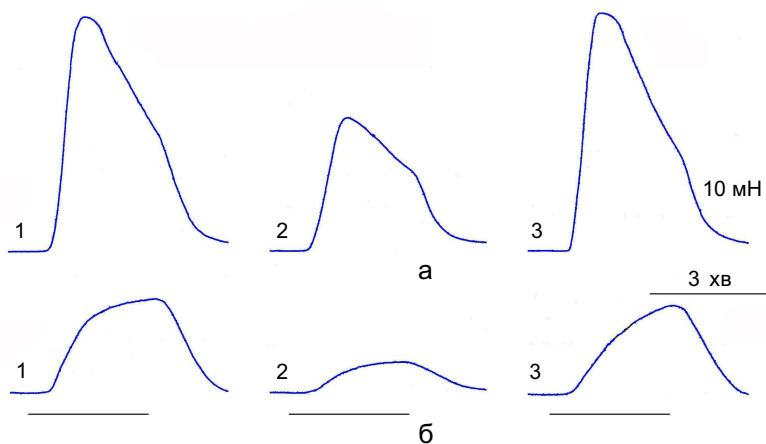


Рис. 1. Зменшення амплітуди КС1-індукованого скорочення простатної (а) та епідидимальної (б) ділянок сім'явидної протоки щура під впливом ментолу: 1 – скорочення в контролі, викликане додаванням у розчин Кребса КС1 (60 ммоль/л); 2 – КС1-індуковане скорочення на тлі 10-хвилинної преаплікації ментолу (100 мкмоль/л); 3 – КС1-індуковане скорочення на 30-й хвилині відмивання препаратів

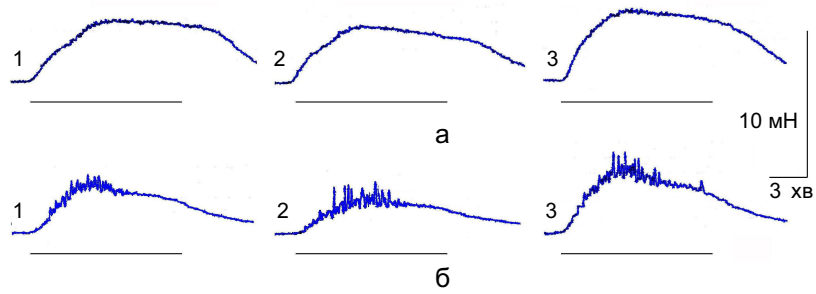


Рис. 2. Дія ментолу на норадреналін - і карбахолінвикликані скорочення (а, б відповідно): 1 – аплікація норадреналіну (10 мкмоль/л) і карбахоліну (10 мкмоль/л), (а, б відповідно); 2 – скорочення, викликані агоністами на 10-й хвилині дії ментолу (100 мкмоль/л); 3 – скорочення, викликані агоністами на 30-й хвилині відмивання препаратів розчином Кребса

більшість експериментів з карбахоліном і норадреналіном були проведені на гладеньких м'язах епідидимальної ділянки сім'явидної протоки. Збільшення концентрації ментолу (1 ммоль/л) призводило до посилення його пригнічувальної дії (рис. 3). Відмив (протягом 30 хв) смужок від ментолу часто супроводжувався збільшенням максимальної амплітуди скорочень на дію норадреналіну та карбахоліну в серед-

ньому на 15 % відносно контролю. Підсумовуючи отримані результати слід зазначити, що преінкубація гладеньких м'язів з ментолом (0,1 ммоль/л) протягом 10 хв призводила до зменшення амплітуди КС1-викликаного скорочення в простатній та епідидимальній ділянках до 52 ± 4 (n=5) та $54 \% \pm 5$ (n=15) відповідно, порівняно з контролем, а норадреналін- та карбахолініндукованого скорочення до $61 \pm 9,2$ (n=6)

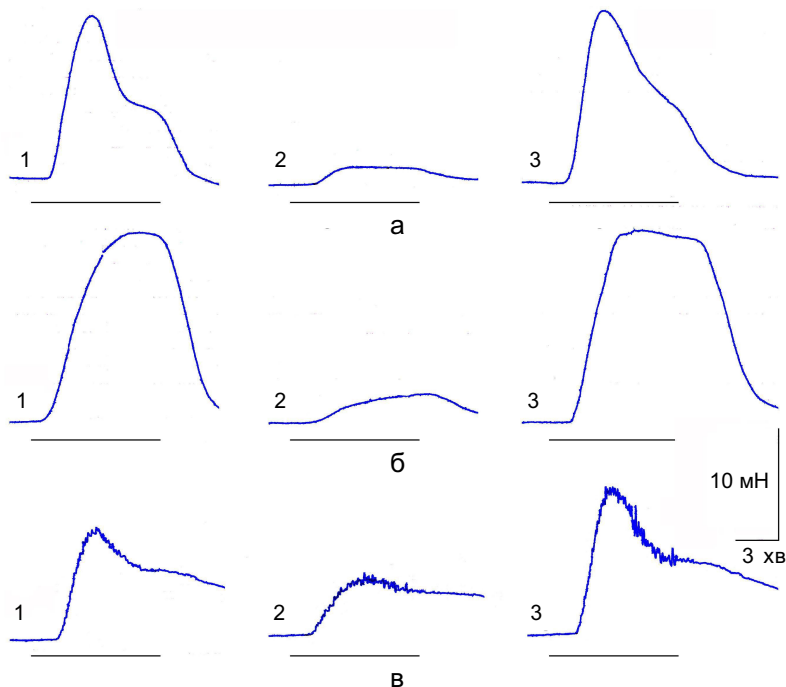


Рис. 3. Пригнічення КС1- (а) і карбахолініндукованих (а, б) скорочень обох ділянок сім'явидної протоки щура під впливом ментолу в концентрації 1 ммоль/л: а – простатна, б, в – епідидимальна ділянки сім'явидної протоки щура; 1 – скорочення у контролі; 2 – пригнічення викликаних скорочень гладеньких м'язів на 10-й хвилині дії ментолу (1 ммоль/л); 3 – скорочення, викликані на 30-й хвилині відмивання препаратів розчином Кребса

і $70 \pm 3,3 \%$ ($n=6$) відповідно (рис. 4,а,б).

Залучення фосфоліпази С та інозитолтрифосфатзалежного депо ГМК в ефекти ментолу. Відомо, що активація скорочення гладеньких м'язів нейромедіаторами призводить до мобілізації кальцію із інозитолтрифосфат- і ріанодинчутливого внутрішньоклітинного кальцієвого депо СР ГМК [11]. В останньому випадку мобілізація Ca^{2+} відбувається за механізмом кальцій-індукованого кальцієвого вивільнення – CICR (від англ. calcium-induced calcium release). Для того, щоб виявити участь інозитолтрифосфатного ($I\Phi_3$) шляху в ефектах ментолу, нами були проведені експерименти за умови блокування фосфоліпази С (ФЛС) – ферменту, який каталізує гідроліз фосфатиділінозитолбіфосфату ($\Phi I\Phi_2$) з утворенням $I\Phi_3$ у відповідь на стимуляцію метаботропних рецепторів. Блокування ФЛС також дало б змогу виявити можливу участь $\Phi I\Phi_2$ у спостережуваних ефектах ментолу, оскільки відомо, що $\Phi I\Phi_2$ є ко-активатором TRPM8 [12].

Підвищення вмісту $\Phi I\Phi_2$ внаслідок зменшення його гідролізу та пригнічення утворення $I\Phi_3$ при використанні блокатора ФЛС – U73122 (10 мкмоль/л) виявило тенденцію до послаблення інгібуючої дії ментолу на КС1-викликане скорочення,

причому, якщо на смужках з епідидимальної ділянки таке послаблення було статистично недостовірним, то для простатної ділянки воно сягало порогу статистичної достовірності (див. рис. 4,а). Проте U73122 статистично достовірно не впливав на амплітуду скорочувальних відповідей на норадреналін і карбахолін, але за наявності ментолу спостерігалось зменшення цих відповідей практично до того самого рівня, що і без цього блокатора (див. рис. 4,б).

Розділення шляхів входу та вивільнення кальцію в ефектах ментолу. Пригнічення ментолом амплітуди скорочень, викликаних різними стимулами (гіперкалієвим розчином Кребса або агоністами), може реалізуватись як блокуванням ним входу кальцію, так і посиленням втрат Ca^{2+} з СР внаслідок активації СР-резидентного TRPM8 і зменшення на цій основі ступеня його наповнення і, відповідно, кількості Ca^{2+} , який бере участь у мобілізації за механізмом CICR. Для з'ясування цих можливостей ми провели експерименти з використанням блокатора Ca^{2+} -АТФази СР/ЕР – циклопіазонієвої кислоти (ЦПК). Остання призводить до повного спустошення через блокування зворотного захоплення кальцію, що дає змогу виключити в ефектах ментолу механізми, залежні від функціонування СР.

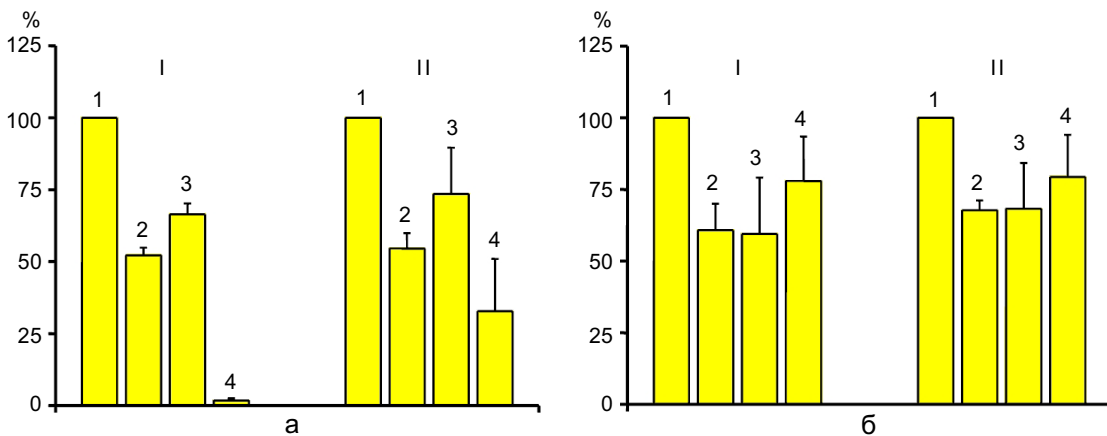


Рис. 4. Діаграма усереднених значень зменшення амплітуд КС1- (а) і агоністіндукованих (б) скорочень гладеньких м'язів обох ділянок сім'явидної протоки щура під впливом ментолу (100 мкмоль/л) за наявності блокаторів фосфоліпази С або Ca^{2+} -АТФази саркоплазматичного ретикулума: 1 – контроль, 2 – ментол, 3 – ментол і U3122 (100 мкмоль/л), 4 – ментол і циклопіазонова кислота (100 мкмоль/л); на а: I - простатна ділянка, II - епідидимальна ділянка; на б: I - норадреналін, II - карбахолін

Преінкубація м'язових смужок сім'явидної протоки у розчині Кребса з ЦПК (10 мкмоль/л) протягом 20 хв суттєво не змінювала їх вихідний тонус. Водночас амплітуда скорочень, викликаних гіперкалієвим розчином Кребса, норадреналіном і карбахоліном на 20-й хвилині дії ЦПК збільшувалася в середньому на 50 % у порівнянні з контролем, очевидно, внаслідок усунення захоплення Ca^{2+} СР і підвищення, через це його цитозольної концентрації при активації входу (рис. 5). На тлі дії ЦПК ментол продовжував спричиняти зменшення амплітуди всіх скорочувальних відповідей. Однак треба зазначити, що величина цього зменшення суттєво залежала від типу активуючого стимулу та ділянки сім'явидної протоки (див. рис. 4,а,б). Так, гіперкалієве скорочення пригнічувалося ментолом за наявності ЦПК, навіть сильніше, ніж без неї. Причому, якщо на простатній ділянці КС1-індуковане скорочення виявлялося практично повністю заблокованим (до $2\% \pm 1\%$; див. рис. 4,а), то на епідидимальній ділянці ця різниця, хоч і сягала близько 20 %, була статистично недостовірною ($32\% \pm 18\%$, $n=5$) зі ЦПК порівняно з ($54\% \pm 5\%$, $n=15$) без неї. Оскільки за

наявності ЦПК єдиним джерелом кальцію для активації скорочення під час КС1-деполяризації мембрани ГМК є його вхід, то ці результати, з одного боку, підтверджують відому з літератури здатність ментолу блокувати ПЗКК L-типу, через які, в основному, Ca^{2+} надходить до ГМК сім'явидної протоки [13], а з другого, – вказують на те, що у простатній ділянці ПЗКК L-типу є практично єдиним шляхом надходження кальцію при деполяризації, тоді як у епідидимальній також існують додаткові джерела входу [11].

Результати сумісної дії ЦПК і ментолу на КС1-викликане скорочення дають змогу також зробити висновок про те, що у простатній ділянці більш ефективно реалізується спряження входу кальцію з його вивільненням з СР – СІСР. Адже у відсутності ЦПК, коли можливість для вивільнення кальцію з СР зберігається, ментол пригнічує скорочення тільки на $\sim 48\%$ (тобто до $52\% \pm 3\%$, $n=15$), див. рис. 4,а). Проте за наявності ЦПК ментол практично повністю блокує вхід кальцію, що витікає з повного пригнічення скорочення. Очевидно, що у епідидимальній ділянці таке спряження є менш ефективним.

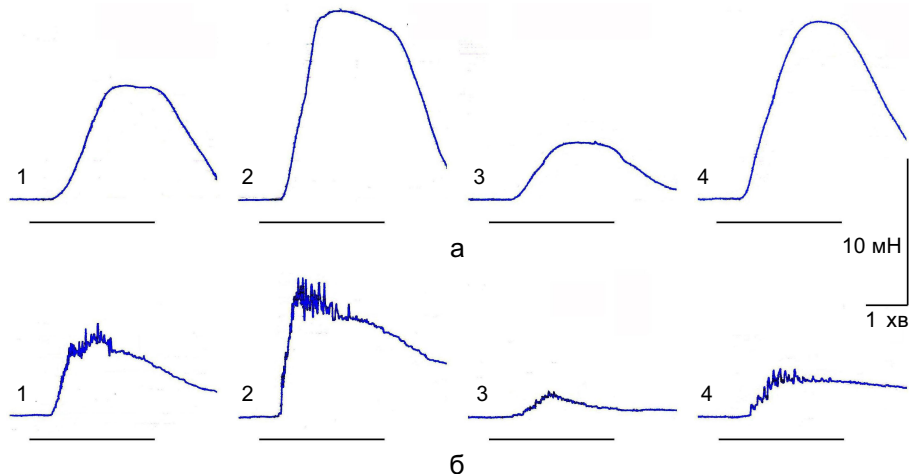


Рис. 5. Вплив блокування зворотного захоплення кальцію саркоплазматичним ретикулом циклопіазонієвої кислоти на ефекти ментолу: а – КС1-, б – карбахолініндуковані скорочення епідидимальної ділянки, 3 – зменшення амплітуди скорочень на 10-й хвилині дії ментолу (10 мкмоль/л) і циклопіазонієвої кислоти (40 хв); 4 – скорочення на 30-й хвилині відливу препаратів розчином Кребса

При використанні агоністів як активаторів скорочення, результати сумісної дії ЦПК та ментолу виявилися дещо іншими. Так, порівняння скоротливих реакцій епідидимальної ділянки сім'явивідної протоки на дію норадреналіну і карбахоліну показало, що без ЦПК ментол їх пригнічує до 61 ± 9 ($n=6$) і $70 \% \pm 3 \%$ ($n=6$) відповідно відносно контролю, тоді як за наявності ЦПК інгібуюча дія ментолу дещо зменшувалася, складаючи лише 78 ± 15 ($n=5$) і $79 \% \pm 15 \%$ ($n=5$) відповідно порівняно з контролем (див. рис. 4,6). Хоч це зменшення і досягало рівня статистичної достовірності, виявлена тенденція дає можливість стверджувати, що, по-перше, у разі дії агоністів частка входу кальцію через ПЗКК L-типу за наявності ментолу є набагато меншою, ніж у разі КС1-деполяризації і, по-друге, що при дії ментолу сумарна роль СР при активації скорочення агоністами, очевидно, продовжує зводитися переважно до захоплення кальцію, хоч співвідношення між СІСР і захопленням дещо змінюється.

У баланс цитоплазматичного кальцію ($[Ca^{2+}]_{цит}$), необхідного для скорочення, роблять внесок вхід ($[Ca^{2+}]_{вх}$), СІСР ($[Ca^{2+}]_{СІСР}$) та зворотне захоплення ($[Ca^{2+}]_{зах}$), а тому його можна записати як:

$$[Ca^{2+}]_{цит} = [Ca^{2+}]_{вх} + [Ca^{2+}]_{СІСР} - [Ca^{2+}]_{зах}$$

При блокуванні Ca^{2+} -АТФази СР як $[Ca^{2+}]_{СІСР}$, так і $[Ca^{2+}]_{зах}$ стають рівними нулю (депо спустошується), а тому $[Ca^{2+}]_{цит} = [Ca^{2+}]_{вх}$. Зростання при цьому амплітуди скорочень свідчить, що в контрольних умовах СР працює переважно на захоплення кальцію, тобто $[Ca^{2+}]_{СІСР} < [Ca^{2+}]_{зах}$.

Дійсно, відношення амплітуд скорочення на норадреналін і карбахолін при спустошенні СР (тобто за наявності ЦПК) і при функціональному дає можливість припустити, що зменшення відносної ролі СР в агоніствикликаному скороченні під дією ментолу полягає в активації ним СР-резидентного, холод-ментолчутливого TRPM8-каналу. Останнє призводить до

збільшення пасивних втрат кальцію з СР, зниження його наповнення і, відповідно, до зменшення внеску вивільненого кальцію у скоротливу реакцію гладеньких м'язів сім'явивідної протоки.

Вплив блокування TRPM8-каналів на ефекти ментолу. Щоб впевнитися в тому, що ефекти ментолу реалізуються саме через СР-резидентний TRPM8-канал, ми використали неспецифічний блокатор цього каналу – капсазепін [5]. Преінкубація гладеньких м'язів простатної й епідидимальної ділянок сім'явивідної протоки протягом 30 хв у розчині Кребса з капсазепіном (10 мкмоль/л) статистично не достовірно зменшувало амплітуду скорочень, викликаних КС1 і карбахоліном (рис.6,а,в, 2) На відміну від цього, не очікувано, при сумісній дії капсазепіну та ментолу, КС1-індуковане скорочення м'язових смужок простатної ділянки практично повністю пригнічувалося (див. рис. 6,а, 3). Перфузія гладеньких м'язів епідидимальної ділянки ментолом на тлі дії капсазепіну (30 хв) також призводила до пригнічення амплітуди скорочень у відповідь на КС1 до 18 ± 8 ($n=5$) і карбахолін до $13 \% \pm 2 \%$ ($n=5$) відносно контролю (див. рис. 6, б,в, 3). Таким чином, на тлі капсазепіну гальмівна дія ментолу не усувається, як можна було б сподіватися з того факту, що капсазепін є блокатором TRPM8-каналу, а навпаки, значно підсилюється, що вказує на синергізм дії цих сполук. Для пояснення цього спостереження можна висунути принаймні дві гіпотези. Перша полягає в тому, що ГМК сім'явивідної протоки експресують СР-резидентну ізоформу TRPM8, яка не блокується, а навпаки, потенціюється капсазепіном, адже свідчення про наявність специфічної сплайс-ізоформи TRPM8 у СР існують [14]. Оскільки блокувальна дія капсазепіну відноситься тільки до класичної ізоформи TRPM8, яка експресується в плазматичній мембрані [5], то не виключено, що СР-резидентна ізоформа може синергічно активуватися ментолом і капсазепіном, тим

самим призводити до ще більших пасивних втрат кальцію з СР і зменшення його наповнення. Друга гіпотеза полягає у синергічному блокуванні капсазепіном і ментолом ПЗКК L-типу, які забезпечують вхід кальцію в ГМК сім'явивідної протоки. Дійсно, як ментол [10], так і капсазепін [15] здатні блокувати ПЗКК, а тому при сумісному прикладанні їх блокувальна дія може

значно посилюватися. На користь такого пояснення говорить той факт, що КС1-індуковане скорочення за наявності капсазепіну та ментолу пригнічується повністю, тобто на 100 %. Але незмінність скорочувальних відповідей при дії лише капсазепіну ставить під сумнів вищенаведене припущення. Якщо б ці сполуки діяли тільки через зменшення наповнення СР Ca^{2+} депо, то значна частка

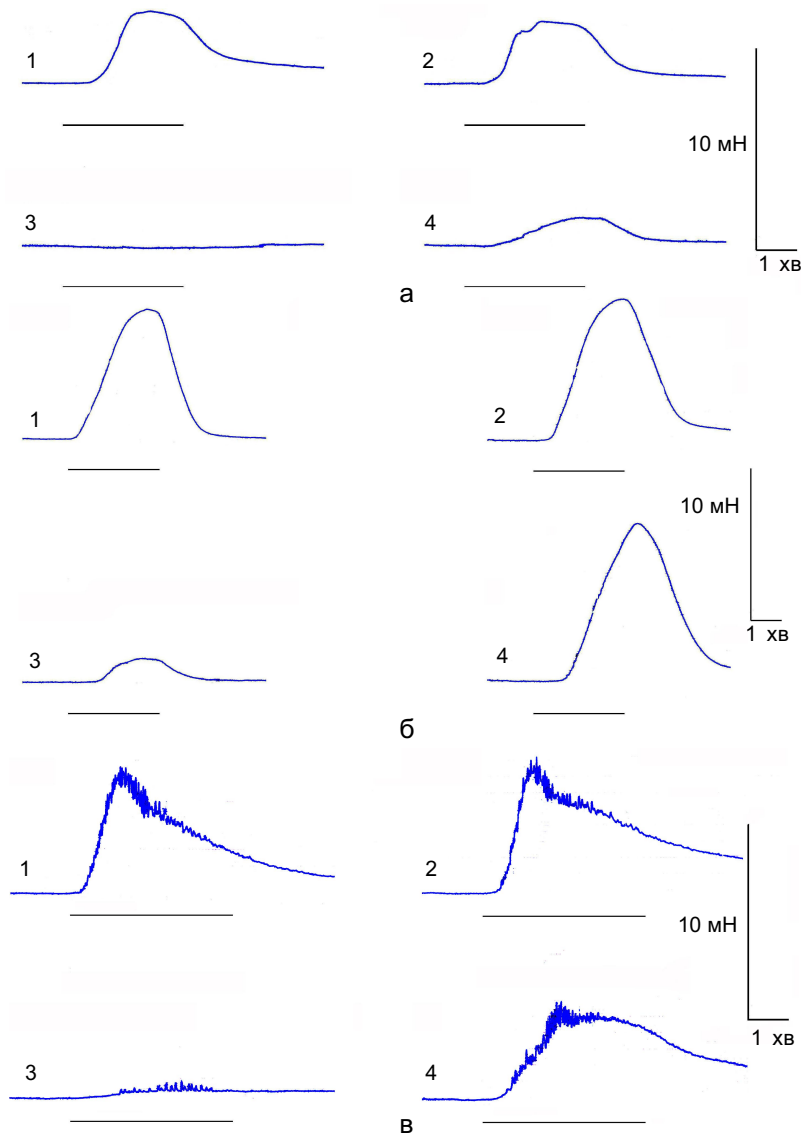


Рис. 6. Посилення пригнічувальної дії ментолу на КС1- (а, б) і карбахолініндуковані (в) скорочення м'язових смужок простатної й епідидимальної ділянок сім'явивідної протоки щура за умов блокування TRPM8-каналів неспецифічним інгібітором капсазепіном: а – КС1, б – карбахолін; 1 – скорочення епідидимальної ділянки сім'явивідної протоки у контролі; 2 – збільшення амплітуди скорочень за наявності циклопіазонієвої кислоти (10 мкмоль/л); 3 – посилення пригнічувальної дії ментолу (10 мкмоль/л) на тлі преінкубації препаратів у розчині Кребса с капсазепіном; 4 – відмивання препаратів розчином Кребса протягом 30 хв

скорочення повинна була б залишитися за рахунок збереження потенціалзалежного входу кальцію. Не виключено також, що мішенями синергічної дії капсазепіну і ментолу є і СР-резидентна ізоформа TRPM8 і ПЗКК L-типу.

ОБГОВОРЕННЯ

Проведені нами дослідження показали, що ментол може суттєво модулювати скоротливі відповіді гладеньких м'язів сім'явидної протоки, викликані як деполяризацією мембрани ГМК, так і агоністами адрено- і М-холінорецепторів. За рахунок своїх властивостей ментол може безпосередньо модулювати скоротливу активність, а саме: блокування потенціалзалежного входу кальцію до клітин [10], активація холод-ментолчутливого кальційпроникного TRPM8-каналу [2–5], а також активація TRPM8-залежного [8, 14] і TRPM8-незалежного [6, 7] вивільнення кальцію з СР. Наші результати показують, що пригнічення скорочення ментолом опосередковується двома механізмами – частковим блокуванням надходження Ca^{2+} через ПЗКК L-типу до ГМК і зменшенням ємності кальцієвого депо СР. Останній механізм принаймні може опосередковуватися СР-резидентним холод-ментолчутливим TRPM8-каналом, який при своїй активації призводитиме до збільшення пасивних втрат Ca^{2+} з СР, зменшення його ємності і, як наслідок, до зниження CICR. Наші експерименти, хоч і не виключають TRPM8-незалежний вплив ментолу на функціональний стан СР, проте вказують на TRPM8-канал як важливу складову регуляції скоротливої активності гладеньких м'язів сім'явидних протоків. Фізіологічне значення такої регуляції поки невідоме. Для остаточного визначення функціональної ролі TRPM8 у регуляції скорочення гладеньких м'язів сім'явидних протоків потрібні додаткові дослідження.

Слід зазначити, що пригнічення ментолом і ще одним агоністом холодного ре-

цептора іциліном скоротливої активності і пов'язаного з нею підвищення цитозольної концентрації кальцію було також продемонстровано для гладеньких м'язів трахеї [16]. Автори роблять висновок, що цей ефект лежить в основі полегшувальної дії ментолу щодо таких респіраторних синдромів, як кашель і спазм, однак не пов'язують його з функціонуванням TRPM8, висловлюючи припущення про наявність ще якогось, поки невідомого холодного рецептора.

Отримані нами результати припускають, що пригнічення скорочення ментолом опосередковується двома механізмами – частковим блокуванням надходження кальцію через потенціалзалежні кальцієві канали L-типу та зменшенням кальцієвої ємності депо СР. Причому останній механізм принаймні частково може опосередковуватися СР-резидентним холод-ментолчутливим TRPM8-каналом, який при своїй активації буде призводити до збільшення пасивних втрат Ca^{2+} із кальцієвого депо СР ГМК і, як наслідок, зменшення амплітуди скорочення.

Робота виконана за часткової підтримки гранту INTAS 05-1000008-8223.

И.Б. Филиппов, И.А. Владимирова, Е.М. Кулиева, Р. Скрыма, Н. Преварская, Я.М. Шуба

МОДУЛЯЦІЯ СОКРАЩЕННЯ ГЛАДКИХ М'ЯЗЦЬ СЕМ'ЯВИВОДЯЩИХ ПРОТОКОВ КРЫСИ АКТИВАТОРОМ TRPM8-КАНАЛОВ МЕНТОЛОМ

TRPM8 является неселективным, кальцийпроницаемым катионным каналом, который активируется умеренным охлаждением и химическими соединениями-имитаторами холода – ментолом, исилином, эвкалиптолом. Экспрессия TRPM8 была обнаружена в гладкомышечных клетках семявыводящих протоков крысы с преимущественной локализацией TRPM8-белка в мембране саркоплазматического ретикулума (СР). В данной работе мы исследовали влияние неспецифического агониста TRPM8-канала ментола на сокращения гладких мышц эпидидимального и простатного участков семявыводящих протоков крысы, вызванные гиперкалиевым (KCl) раствором Кребса или приложением агонистов М-холино- и адренорецепторов карбахолина и норадrenalина. Ментол (0,1–1 ммоль/л) практически не изменял исходный тонус, однако дозависимо угнетал вызванные KCl, карбахолином и норадrenalином сокращения гладких мышц семявыво-

дящих протоков на 30–50 %. На фоне действия блокатора Ca^{2+} -АТФазы CP – циклопиазониевой кислоты (10 мкмоль/л) угнетающее влияние ментола на KCl-индуцированное сокращение усиливалось, а на агонистиндуцированное – несколько ослаблялось. Неспецифический блокатор TRPM8-канала капсазепин (10 мкмоль/л) не устранял, а увеличивал угнетающее действие ментола на вызванные сокращения. Наши результаты предполагают, что угнетение сокращений ментолом реализуется посредством двух механизмов: частичным блокированием поступления кальция через потенциалзависимые кальциевые каналы L-типа и уменьшением емкости кальциевого депо CP. Последний механизм, по крайней мере, может частично опосредоваться CP-резидентным TRPM8-каналом, который при активации ментолом будет увеличивать пассивные потери Ca^{2+} из депо CP и, как следствие, снижать освобождение кальция при активации сокращения.

Ключевые слова: крыса, гладкие мышцы семявыводящих протоков, холодовый рецептор TRPM8, саркоплазматический ретикулум, сокращение, деполяризация, карбахолин, норадrenalин.

**I.B. Phylippov, I.A. Vladimirova, E.M. Kulieva,
R. Skryma, N. Prevarskaya, Ya.M. Shuba**

MODULATION OF THE CONTRACTIONS OF THE SMOOTH MUSCLES OF THE RAT VAS DEFERENS BY TRPM8 CHANNEL ACTIVATOR MENTHOL

TRPM8 is nonselective, Ca^{2+} permeable cationic channel, which is activated by innocuous cold and by chemical drugs imitators of cooling, menthol, icilin and eucalyptol. TRPM8 expression was detected in the smooth muscle cells of the rat vas deference with preferential localization of the TRPM8 protein to the membrane of sarcoplasmic reticulum (SR). In the present work we have studied the effects of TRPM8 channel agonist, menthol, on the contractions of the smooth muscle strips of the epididimal and prostatic portions of the rat vas deferens evoked by potassium rich (KCl) Krebs solution and by muscarinic or adrenergic agonists carbachol (CCh) or noradrenalin (Nor). Menthol (0.1-1 mmol/l) per se virtually unaffected the basal tone, but inhibited in a dose-dependent manner KCl-, CCh- and Nor-evoked contractions of both parts of the vas deference by 30-50%. Blockade of the Ca^{2+} -ATPase of the SR with cyclopiazonic acid (CPA, 10 $\mu\text{mol/l}$) enhanced inhibitory action of menthol on KCl-induced contractions, but slightly decreased inhibition by menthol of agonist-induced ones. Nonspecific TRPM8 blocker, capsazepine (10 $\mu\text{mol/l}$), did not eliminate, but augmented inhibitory action of menthol on all types of contractions. Our data propose that menthol inhibits contractions via two mechanisms: partial blockade of Ca^{2+} entry via the voltage-gated, L-type calcium channels and a decrease of the calcium storage capacity of the SR. The latter mechanism at least in part is mediated by the SR-resident TRPM8 channel, which by activation of menthol leads to the

enhancement of passive leak of Ca^{2+} from the SR and reduction in the amount of the releasable calcium during activation of contractions.

Key words: rat, smooth muscle vas deferens, cold receptor TRPM8, sarcoplasmic reticulum, contraction, carbachol, noradrenalin.

O.O.Bogomoletz Institute of Physiology, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv;

International Center of Molecular Physiology, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv;

Laboratoire de Physiologie Cellulaire, Universite des Sciences et Technologies de Lille, France

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Болдырев А.И., Соткис А.В., Кулієва Е.М. и др. Экспрессия холодового рецептора TRPM8 в гладких мышцах семявыносящих протоков крысы // *Фізіол. журн.* – 2009. – **55**, № 5 – С.
2. Amobi N.I., Smith I.C. Different actions in the rat prostatic and epididymal vas deferens of cyclopiazonic acid or ryanodine on noradrenaline-induced contractions // *Gen. Pharmacol.* – 1999. – **32**, № 2. – P. 271–278.
3. Bidaux G., Flourakis M., Thebault S. et al. Prostate cell differentiation status determines transient receptor potential melastatin member 8 channel subcellular localization and function // *J. Clin. Invest.* – 2007. – **117**, № 6. – P. 1647–1657.
4. Daniels R.L., Takashima Y., McKemy D.D. Activity of the neuronal cold sensor TRPM8 is regulated by phospholipase C via the phospholipid phosphoinositol 4,5-bisphosphate // *J. Biol. Chem.* – 2009. – **284**, № 3. – P. 1570–1582.
5. Docherty R.J., Yeats J.C., Piper A.S. Capsazepine block of voltage-activated calcium channels in adult rat dorsal root ganglion neurones in culture // *Brit. J. Pharmacol.* – 1997. – **121**, № 7. – P. 1461–1467.
6. Ganitkevich V.Ya., Shuba M.F., Smirnov S.V. Calcium-dependent inactivation of potential-dependent calcium inward current in an isolated guinea-pig smooth muscle cell // *J. Physiol.* – 1987. – **392**. – P. 431–449.
7. Ito S., Kume H., Shiraki A. et al. Inhibition by the cold receptor agonists menthol and icilin of airway smooth muscle contraction // *Pulm. Pharmacol. Ther.* – 2008. – **21**, № 5. – P. 812–817.
8. Kraft R., Harteneck C. The mammalian melastatin-related transient receptor potential cation channels: an overview // *Pflug. Arch.* – 2005. – **451**, № 1. – P. 204–211.
9. Langton P.D., Huddart H. Voltage and time dependency of calcium mediated phasic and tonic responses in rat vas deferens smooth muscle the effect of some calcium agonist and antagonist agents // *Gen. Pharmacol.* – 1988. – **19**, № 6. – P. 775–787.
10. Mahieu F., Owsianik G., Verbert L. et al. TRPM8-independent menthol-induced Ca^{2+} release from endo-

- plasmic reticulum and Golgi // J. Biol. Chem. – 2007. – **282**, № 5. – P. 3325–3336.
11. McKemy D.D., Neuhausser W.M., Julius D. Identification of a cold receptor reveals a general role for TRP channels in thermosensation // Nature. – 2002. – **416**(6876). – P. 52–58.
12. Palade P. Drug-induced Ca²⁺ release from isolated sarcoplasmic reticulum. II. Releases involving a Ca²⁺-induced Ca²⁺ release channel // J. Biol. Chem. – 1987. – **262**, № 13. – P. 6142–6148.
13. Peier A.M., Moqrich A., Hergarden A.C. et al. A TRP channel that senses cold stimuli and menthol // Cell. – 2002. – **108**, № 5. – P. 705–715.
14. Swandulla D., Carbone E., Schafer K., Lux H.D. Effect of menthol on two types of Ca currents in cultured sensory neurons of vertebrates // Pflug. Arch. – 1987. – **409**. – P. 52–59.
15. Thebault S., Lemonnier L., Bidaux G. et al. Novel role of cold/menthol-sensitive transient receptor potential melastatine family member 8 (TRPM8) in the activation of store-operated channels in LNCaP human prostate cancer epithelial cells // J. Biol. Chem. – 2005. – **280**, № 47. – P. 39423–39435.
16. Voets T, Owsianik G, Nilius B. TRPM8 // Handb. Exp. Pharmacol. – 2007. – 179. – P. 329–344.

*Ин-т фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України, Київ;
Міжнарод. центр молекуляр. фізіології НАН України, Київ;
Лільськ. ун-т наук та технологій, Франція
E-mail: phil@biph.kiev.ua; irinav@biph.kiev.ua*

*Матеріал надійшов до
редакції 15.04.2009*