

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

Порівняння дії ментолу та іциліну на викликані скорочення гладеньких м'язів сім'явивідної протоки нормальних і кастрованих щурів

Відомий екзогенний агоніст холододового рецептора TRPM8 ментол здатний пригнічувати KC1- і агоністактивовані скорочення гладеньких м'язів сім'явивідної протоки (vas deferens) щура. Щоб визначити залучення в ці ефекти саме TRPM8 порівняно вплив ментолу з дією більш TRPM8-специфічного агоніста іциліну на скорочення гладеньких м'язів простатної й епідидимальної ділянок vas deferens нормальних і кастрованих (60–137 діб) щурів, викликаних KC1 та дією агоністів М-холіно- та α -адренорецепторів карбахоліном (КХ) й норадреналіном (НА), відповідно. Пригнічувальна дія ментолу й іциліну на KC1-індуковані скорочення простатної ділянки як нормальних, так і кастрованих щурів мало відрізнялась і становила приблизно 50 %. Водночас кастрація призводила до появи КХ- та НА-індукованих скорочень, які частково пригнічувалися цими сполуками. У епідидимальній ділянці vas deferens контрольних тварин ментол набагато сильніше пригнічував KC1- та КХ-викликані скорочення, ніж іцилін, тоді як після кастрації вплив обох сполук практично не було. Оскільки сумарний вплив ментолу на скорочення зумовлений відносним внеском трьох його можливих ефектів: блокуванням потенціалзалежних кальцієвих каналів (ПЗКК) L-типу, зниженням наповнення кальцієвого депо саркоплазматичного ретикулума (СР) через активацію СР-резидентного TRPM8 та активацією входу кальцію через сарколемальний TRPM8, а іциліну тільки двома останніми, то наші результати свідчать, що в простатній ділянці vas deferens роль TRPM8 переважно зводиться до зменшення наповнюваності депо СР, а у епідидимальній – як до зменшення наповнюваності депо СР, так і до активації TRPM8-опосередкованого входу. Зниження циркулюючих андрогенів призводить до змін в ментол- та іцилінопосередкованій модуляції скорочень внаслідок зменшення експресії ПЗКК L-типу та збільшення експресії TRPM8.
Ключові слова: vas deferens, гладенькі м'язи, TRPM8, ментол, іцилін, норадреналін, карбахолін, кастрація.

ВСТУП

В нашій попередній роботі було показано пригнічення викликаних скорочень м'язових смужок сім'явивідної протоки (vas deferens) щура ментолом [2], що, за даними літератури й результатами власних досліджень, було пояснено частковим блокуванням цією холодімітуючою сполукою надходження кальцію в гладеньком'язові клітини (ГМК) через потенціалзалежні кальцієві канали (ПЗКК) L-типу[9] та зниженням

кальційіндукованого вивільнення Ca^{2+} (CICR – від англ. calcium-induced calcium release) з депо саркоплазматического ретикулума (СР). Оскільки нами також була виявлена експресія в мембрані СР ГМК vas deferens холододового рецептора TRPM8 [1], який є кальційпроникним катіонним каналом, чутливим до ментолу, то його ефект, принаймні, частково пов'язаний з активацією ментолом СР-резидентного TRPM8. Наслідком цього буде збільшення пасивних

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

втрата Ca^{2+} з депо, зниження його наповнюваності і, відповідно, зменшення кількості вивільненого Ca^{2+} в результаті CICR. Можливість експресії TRPM8 в мембрані CP і пов'язаний з цим його вплив на кальцієву сигналізацію були раніше продемонстровані на декількох типах клітин [12, 13]. Однак для більш обґрунтованих висновків щодо участі TRPM8 у модуляції скорочення vas deferens потрібне використання специфічних, порівняно з ментолом, інших його активаторів, наприклад, таких як іцилін.

Експресія TRPM8, принаймні, в такому андрогенчутливому органі, як простата залежить від наявності функціонального андрогенового рецептора (AR), тобто є андрогензалежною [4]. Vas deferens теж являє собою андрогензалежну тканину. Нами було показано зростання експресії мРНК як TRPM8, так і AR ГМК vas deferens при орхидектомії (кастрації) щурів порівняно з контролем [1]. З літературних джерел відомо, що після кастрації в мембрані ГМК vas deferens щурів спостерігається зменшення щільності дигідропіридинчутливих ПЗКК [5]. Отже, можна припустити, що зміна концентрації циркулюючих андрогенів у результаті кастрації позначиться на скорочувальних відповідях не тільки за участю ПЗКК L-типу, а й TRPM8, що дозволить краще зрозуміти роль останнього в модуляції скоротливої активності. Мета роботи – порівняти дію агоністів TRPM8-каналів селективного – іциліну та неспецифічного – ментолу на скорочення, викликаних гіперкалієвою деполяризацією (KCl) мембрани ГМК, або дією агоністів М-холіно- і α -адренорецепторів – карбахоліном (КХ) і норадреналіном (НА) гладеньких м'язів простатної та епідидимальної ділянок vas deferens щурів.

МЕТОДИКА

Експерименти проводили на м'язових смужках простатної і епідидимальної ділянок vas deferens самців нормальних (контроль) і кастрованих щурів 5–6-місяч-

ного віку. В дослідах використовували тварин на 60–137-ту добу після кастрації, яку проводили за загальноприйнятою методикою [14]. Приготування м'язових смужок (довжиною близько 10 мм) простатної та епідидимальної ділянок vas deferens і тензометричне вимірювання їх скоротливої активності не відрізнялись від описаних раніше [2]. Омиваючий розчин Кребса мав такий склад (ммоль/л): NaCl – 120,4, KCl – 5,9, NaHCO_3 – 15,5, Na_2PO_4 – 1,2, MgCl_2 – 1,2, глюкоза 11,5, CaCl_2 – 2,5; рН 7,3. Скоротливі реакції записували на жорсткий диск комп'ютера за допомогою програми pClamp 8 (Axon Instr., США) і паралельно на діаграмну стрічку самописця для подальшої обробки.

Аплікацію речовин проводили за допомогою їхнього додавання в певній концентрації до розчину Кребса, що омивав м'язові смужки. Ментол розводили в етанолі в базовій концентрації 100 ммоль/л, а іцилін – 10 ммоль/л і додавали до розчину Кребса до потрібної робочої концентрації. Всі реактиви від фірми “Sigma-Aldrich” (США).

Типовий експеримент починався записом контрольного скорочення у відповідь на 3-хвилинне прикладання гіперкалієвого розчину Кребса (KCl=60 ммоль/л, еквімолярна заміна NaCl), 4-хвилинне прикладання НА (10 мкмоль/л) або 4-хвилинне прикладання КХ (10 мкмоль/л). На 20-й хвилині відмивання препаратів нормальним розчином Кребса додавали іцилін (10 мкмоль/л) або ментол (100 мкмоль/л) і на 10-й хвилині їхньої дії знову реєстрували скорочення у відповідь на KCl або агоністи. Іцилін і ментол відмивали протягом 30 хв і потім проводили повторну аплікацію KCl або агоністів для визначення зворотності впливу холодимітуючих сполук на KCl- або агоністіндуковані скорочення. Якщо досліджувалися додаткові речовини, то їх прикладали протягом 20–30 хв до іциліну або ментолу, а потім разом з ними ще протягом 10 хв. Всі амплітуди скорочень нормували до контрольних значень, отриманих у відповідь на

гіперкалієву деполяризацію мембрани ГМК, НА або КХ до прикладання будь-якої з тестуючих речовин. Нормовані значення амплітуд скорочень, отримані в різних експериментах за однакових умов, усереднювали та наводили у вигляді діаграм (середнє значення \pm стандартна похибка).

РЕЗУЛЬТАТИ

Порівняння дії ментолу та іциліну на КС1-індуковані скорочення гладеньких м'язів vas deferens. Неспецифічний активатор TRPM8-каналів ментол пригнічував амплітуду КС1-індукованих скорочень м'язових смужок простатної ділянки vas deferens до $52\% \pm 4\%$ ($n=5$) від контролю, тоді як їх більш селективний агоніст іцилін виявився не таким ефективним, зменшуючи її до $63\% \pm 8\%$ ($n=12$; рис. 1,Б). В епідидимальній ділянці vas deferens різниця в пригнічуючій дії двох речовин на амплітуду скорочень, викликаних гіперкалієвою деполяризацією, була ще менше чутливішою: ментол її зменшував до $54\pm 5\%$ ($n=15$) від контролю, а іцилін – лише до $86\pm 4\%$ ($n=9$; див. рис. 1,Б).

Загальна пригнічувальна дія ментолу на КС1-індуковані скорочення може бути сумарним наслідком трьох його ефектів, описаних у літературі: 1) блокування потенціалзалежного входу кальцію через ПЗКК L-типу [11], 2) зменшення можливості вивільнення Ca^{2+} внаслідок CICR через активацію CP-резидентного TRPM8 та зростання TRPM8-опосередкованих пасивних втрат Ca^{2+} з депо [12], 3) активації сарколемального TRPM8 і збільшення входу кальцію через нього [7]. Оскільки для іциліну можливість блокування ПЗКК L-типу поки не описано, то виявлені відмінності в пригнічувальному впливі ментолу й іциліну на КС1-індуковані скорочення можуть бути пояснені особливостями дії цих сполук на ПЗКК L-типу. Той факт, що відсоткові співвідношення дії ментолу й іциліну в простатній та епідидимальній ділянках vas deferens відрізняються, свідчить про різний вне-

сок ПЗКК і TRPM8 в скорочення цих ділянок.

Порівняння дії ментолу та іциліну на агоністіндуковані скорочення гладеньких м'язів vas deferens. Оскільки у простатній ділянці vas deferens щура в нормі скорочувальні реакції на прикладання агоністів холіно- та адренорецепторів відсутні [3, 14], дослідження дії іциліну та ментолу на КХ- і НА-індуковані скорочення проводили виключно на препаратах епідидимальних ділянок.

КХ-викликані скорочення епідидимальної ділянки під впливом іциліну достовірно не відрізнялися – до $94\% \pm 7\%$ ($n=3$) від контролю, тоді як ментол їх зменшував до $68\pm 3\%$ ($n=6$; див. рис. 1,Б). Незначна пригнічувальна дія іциліну вказує або на незначну роль TRPM8-залежного зменшення наповнюваності депо CP ГМК в механізмі активації скорочення КХ, або на компенсацію зменшеної можливості вивільнення кальцію через TRPM8-опосередкований вхід. Водночас більша ефективність ментолу свідчить про те, що активація скорочення через M-холіноорецептори (згідно з літературними даними, vas deferens містить рецептори як M2-, так і M3-типу [8] супроводжується деполяризацією мембрани й надходженням кальцію через ПЗКК L-типу [16], які ментол здатний блокувати [11]. Це твердження добре узгоджується з виявленими нами відмінностями в дії іциліну та ментолу на скорочення цієї самої ділянки vas deferens, викликані гіперкалієвою деполяризацією, які за своєю природою майже повністю залежать від активації ПЗКК L-типу: ментол зменшував ці скорочення значно сильніше (до $54\% \pm 5\%$, $n=15$) ніж іцилін (до $86\% \pm 4\%$, $n=9$; рис. 1,Б).

Ицилін зменшував викликані НА скорочення гладеньких м'язів епідидимальної ділянки до $69\% \pm 5\%$ ($n=3$) від контролю, а ментол – до $61\% \pm 9\%$ ($n=6$); тобто відмінності в дії двох сполук виявилися статистично недостовірними (див. рис. 1,Б). Оскільки ментол здатний блокувати

потенціалзалежний вхід кальцію через ПЗКК L-типу [11], а іцилін ні, то це означає, що активація скорочення при дії НА майже цілком залежить від вивільнення кальцію з СР, наповнення якого зменшується внас-

лідок активації ментолом та іциліном СР-резидентного TRPM8.

Отже, різниця в пригнічувальній дії іциліну на КХ- і НА-викликані скорочення епідидимальної ділянки *vas deferens*, на

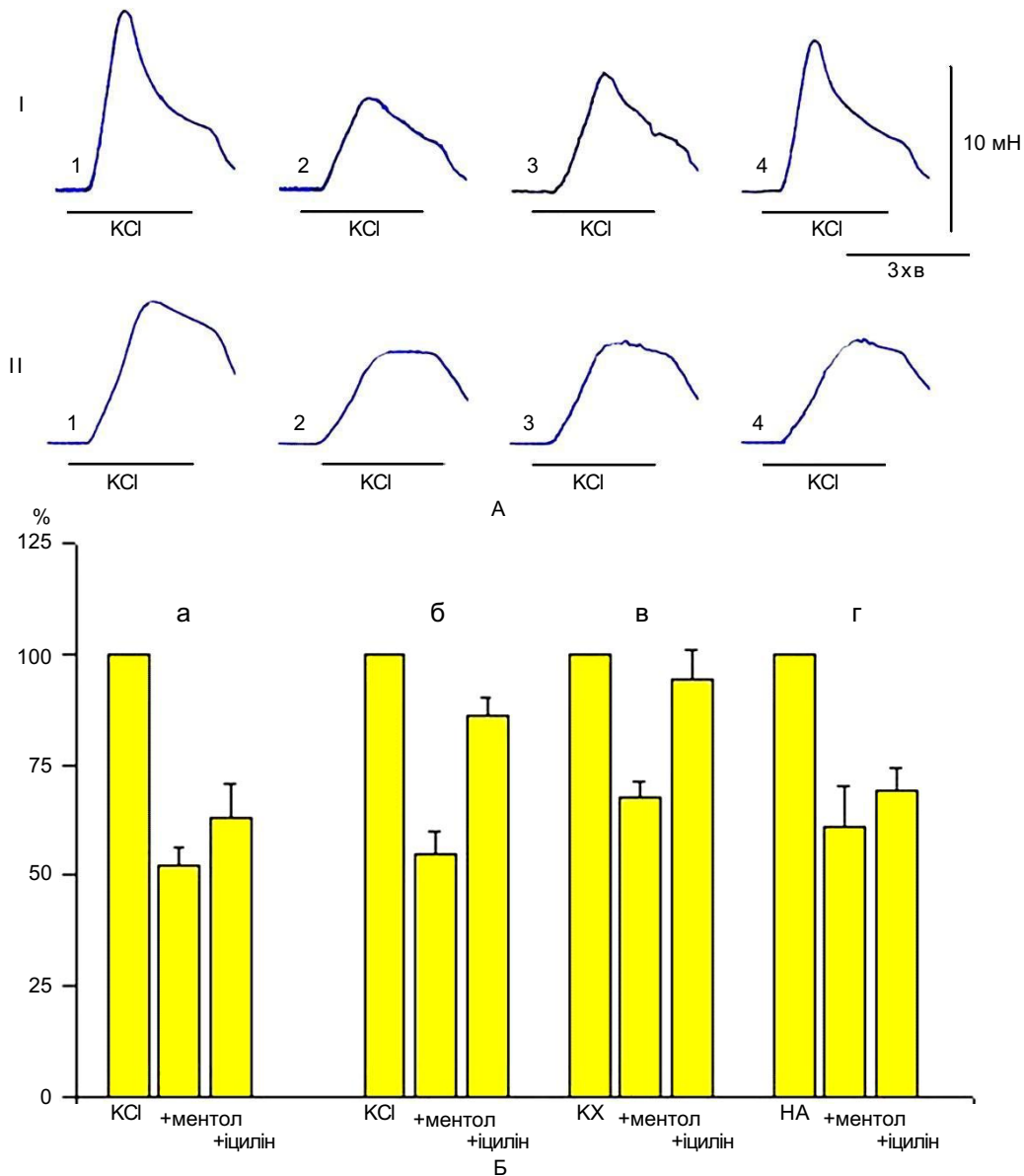


Рис. 1. Пригнічувальний вплив іциліну та ментолу на KCl- та агоністіндуковані скорочення гладеньких м'язів сім'явивідної протоки щура: А – оригінальні записи KCl-індукованих (60 ммоль/л KCl) скорочень м'язових смужок простатної (I) та епідидимальної (II) ділянок *vas deferens*: 1 – контроль, 2 – дія іциліну (10 мкмоль/л), 3, 4 – через 30 і 60 хв відмивання розчином Кребса, Б – діаграми відносних змін амплітуди KCl-індукованих скорочень простатної (а) та епідидимальної (б) ділянок *vas deferens* під впливом ментолу та іциліну; в, г – діаграми відносних змін амплітуди скорочень епідидимальної ділянки *vas deferens*, викликаних карбахоліном (КХ; 10 мкмоль/л, в) та норадреналіном (НА; 10 мкмоль/л, г) під впливом ментолу та іциліну

нашу думку, відображають відмінності в механізмах внутрішньоклітинної кальцієвої сигналізації при стимуляції α -адрено- і М-холінорецепторів і вказують на СР-резидентний TRPM8 як мішень дії цієї холодімітуючої сполуки. Активація СР-резидентного TRPM8 іциліном або ментолом призводить до збільшення пасивних втрат кальцію з СР, зменшення його наповнення і, відповідно, зниження кількості вивільненого кальцію при стимуляції α -адрено-рецепторів, як це передбачалося нами раніше [2]. У випадку з ментолом загальний ефект зумовлюється також блокуванням потенціалзалежного входу кальцію через ПЗКК L-типу. Нарешті, не виключено, що пригнічувальна дія ментолу принаймні частково може бути також зумовлена стимуляцією ним кальцієвої АТФази СР та посилення в результаті цього захоплення Ca^{2+} в СР [10].

Ефекти блокатора TRPM8-каналів капсазепіну на скорочення гладеньких м'язів vas deferens. Хоч специфічних блокаторів TRPM8 не існує, показано, що його функція може бути пригнічена капсазепіном [15], більше відомим як специфічний антагоніст TRPV1-каналів, що активуються високими температурами та капсаїцином. Прикладання капсазепіну (10 мкмоль/л) зменшувало КС1-викликане скорочення простатної ділянки vas deferens до $87\% \pm 7\%$ ($n=4$) порівняно з контролем (рис. 2,Г), що, очевидно, пояснюється здатністю капсазепіну блокувати не тільки TRPV1 і TRPM8, але й ПЗКК L-типу [6]. Однак слід зазначити, що в деяких експериментах капсазепін викликав збільшення (до 5–10 %) амплітуди КС1- і КХ-викликаних скорочень обох ділянок vas deferens. При сумісній дії капсазепіну й іциліну КС1-викликані скорочення цієї ділянки завжди блокувалися повністю. Повне блокування скорочення спостерігалось також у разі комбінації капсазепіну з ментолом (див. рис. 2,Г). Отже, всупереч очікуванням, капсазепін не тільки не усував пригні-

чувальну дію ментолу й іциліну на КС1-викликані скорочення простатної ділянки, як можна було б припустити, виходячи з того факту, що він є блокатором TRPM8, а навпаки, посилював цю дію. Пояснень цьому спостереженню можна висунути принаймні два. По-перше, може бути синергізм у блокувальній дії капсазепіну й ментолу (можливо, й іциліну) на ПЗКК L-типу, по-друге, капсазепін може не блокувати, а потенціювати ретикулярну ізоформу TRPM8, що є вкороченим сплайс-варіантом повнорозмірної, плазмолемальної ізоформи каналу [4], оскільки блокувальна дія капсазепіну була показана тільки для останньої.

Капсазепін сам по собі зменшував амплітуду КС1-викликаних скорочень також і епідидимальної ділянки vas deferens, однак це зменшення було не на стільки вираженим (до $92\% \pm 7\%$, $n=4$), як у простатній (до $87\% \pm 7\%$, $n=4$; див. рис. 2,Г). За наявності капсазепіну пригнічувальна дія як іциліну (до $62\% \pm 7\%$), так і ментолу (до $18\% \pm 9\%$) на амплітуду КС1-викликаних скорочень посилювалася порівняно з експериментами, коли використовували лише ці холодімітуючі сполуки (до 86 ± 4 і $54 \pm 5\%$ відповідно; див. рис. 1,Б).

КХ-викликане скорочення епідидимальної ділянки під впливом капсазепіну практично не змінювалося й становило $98\% \pm 4\%$ порівняно з контролем (див. рис. 2,В,Г). Однак при спільній дії капсазепіну й іциліну це скорочення зменшувалося до $49\% \pm 4\%$, тоді як один іцилін на нього статистично достовірно не впливав ($94\% \pm 7\%$, див. рис. 1,Б). Пригнічувальна дія ментолу на КХ-викликане скорочення за наявності капсазепіну також суттєво збільшувалася (до $13\% \pm 3\%$; див. рис. 2,В,Г) порівняно з дією одного ментолу (до $68\% \pm 3\%$; див. рис. 1,Б).

З огляду на наш попередній висновок про ключову роль ПЗКК-опосередкованого входу кальцію в механізмі активації скорочення епідидимальної ділянки vas deferens як гіперкалієвою деполяризацією, так і КХ,

якісний збіг результатів сумісного впливу капсазепіну з іциліном або ментолом на ці скорочення підтверджує припущення про те, що капсазепін, очевидно, має набагато складнішу фармакологічну дію. Крім TRPV1 і TRPM8, він включає також блокування ПЗКК L-типу і синергізм у дії з іциліном і, особливо, з ментолом. Не виключена також можливість відмінної дії капсазепіну на ретикулярну та плазмалемальну ізоформи TRPM8.

Вплив ментолу та іциліну на KCl- і агоністіндуковані скорочення гладеньких м'язів vas deferens кастрованих тварин. Результати попередніх [14] і проведених досліджень свідчать, що кастрація призво-

дить до набуття простатною ділянкою vas deferens щура здатності скорочуватись у відповідь на прикладання агоністів (рис. 3, А, Б), у той час як в епідидимальній ділянці амплітуда скорочувальних відповідей зменшується порівняно з контролем (рис. 4, А). Ці зміни пояснювалися регіональними особливостями у регуляції андрогенами молекулярних механізмів кальцієвої сигналізації по довжині vas deferens.

В наших попередніх дослідженнях було показано, що після кастрації у гладеньких м'язах vas deferens щурів збільшується експресія мРНК як TRPM8, так і андрогенового рецептора [1]. У зв'язку з цим можна припустити, що кастрація мала б

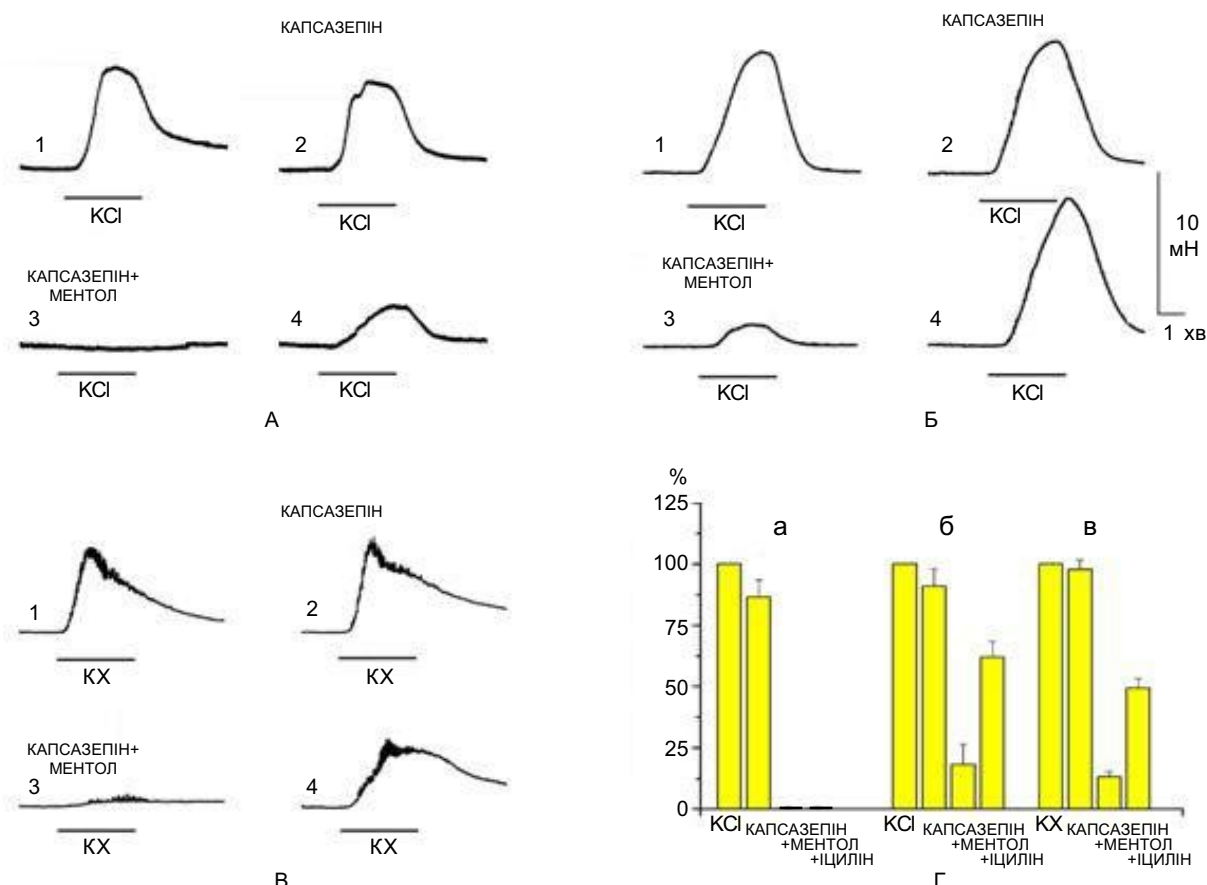


Рис. 2. Посилення пригнічувальної дії ментолу та іциліну на KCl- та агоністіндуковані скорочення гладеньких м'язів сім'явидної протоки (vas deferens) щура під впливом капсазепіну. Представлені криві (А, Б, В) та діаграми (Г) змін амплітуди скорочень простатної (А; Г,а) та епідидимальної (Б, В; Г,б,в) ділянок vas deferens, викликаних гіперкалієвою (60 ммоль/л KCl) деполаризацією (А, Б; Г,а,б) та карбахоліном (КХ; 10 мкмоль/л, В, Г,в) за наявності капсазепіну (10 мкмоль/л) і дії капсазепіну з ментолом (100 мкмоль/л) або іциліном (10 мкмоль/л). 1- контроль, 2 - дія капсазепіну, 3 - сумісна дія капсазепіну та ментолу, 4 - 30-та хвилина відмивання нормальним розчином Кребса

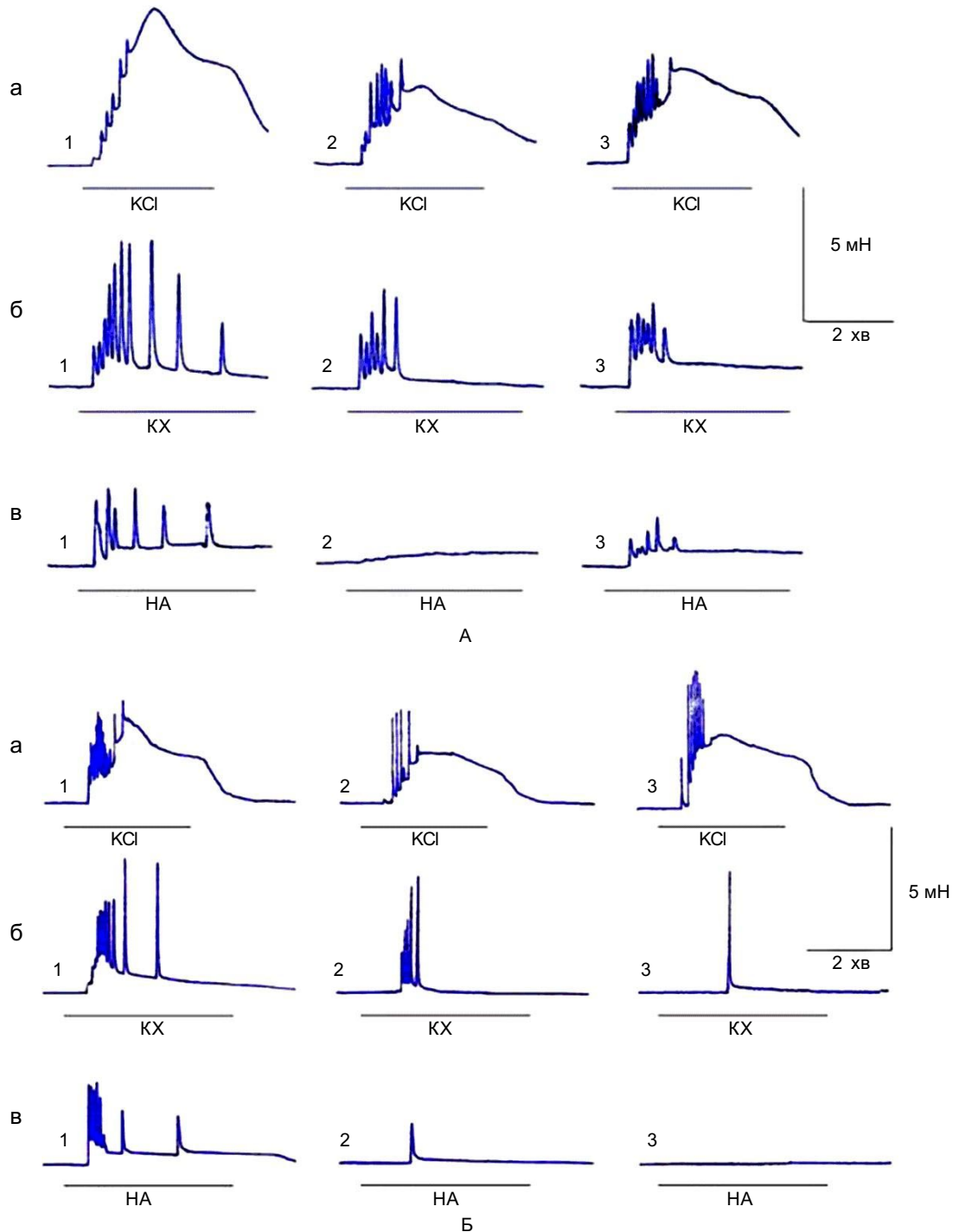


Рис. 3. Вплив ментолу та іциліну на викликані скорочення простатної ділянки сім'явидної протоки (vas deferens) кастрованих щурів. А, Б: приклади оригінальних записів КСІ- (а), карбахоліном (КХ, б) та норадреналіном (НА, в) індукованих скорочень м'язових смужок простатної ділянки vas deferens щура на 92-гу (А) та 127-му (Б) добу після кастрації за контрольних умов (1), на 10-й хвилині дії ментолу (А, 2) або іциліну (Б, 2) та через 30 хв відмивання нормальним розчином Кребса (3)

позначитися також і на ефективності модуляції іциліном і ментолом скоротливих відповідей.

Так, у кастрованих тварин під впливом ментолу амплітуда фазного і тонічного компонентів KCl-індукованих скорочень простатної ділянки зменшувалася до $58\% \pm 6\%$ ($n=10$), а іциліну – до $57\% \pm 13\%$ ($n=10$), тоді як у контролі відповідні

значення становили 52 ± 4 і $63\% \pm 8\%$. Слід зазначити, що частота та кількість осциляцій KCl- та агоністіндукованих скорочень під впливом ментолу та іциліну також зменшувалася (див. рис. 3, А, Б). Отже, показане раніше збільшення експресії мРНК TRPM8-каналів в гладеньких м'язах vas deferens внаслідок кастрації [1] помітно не позначається на пригніченні

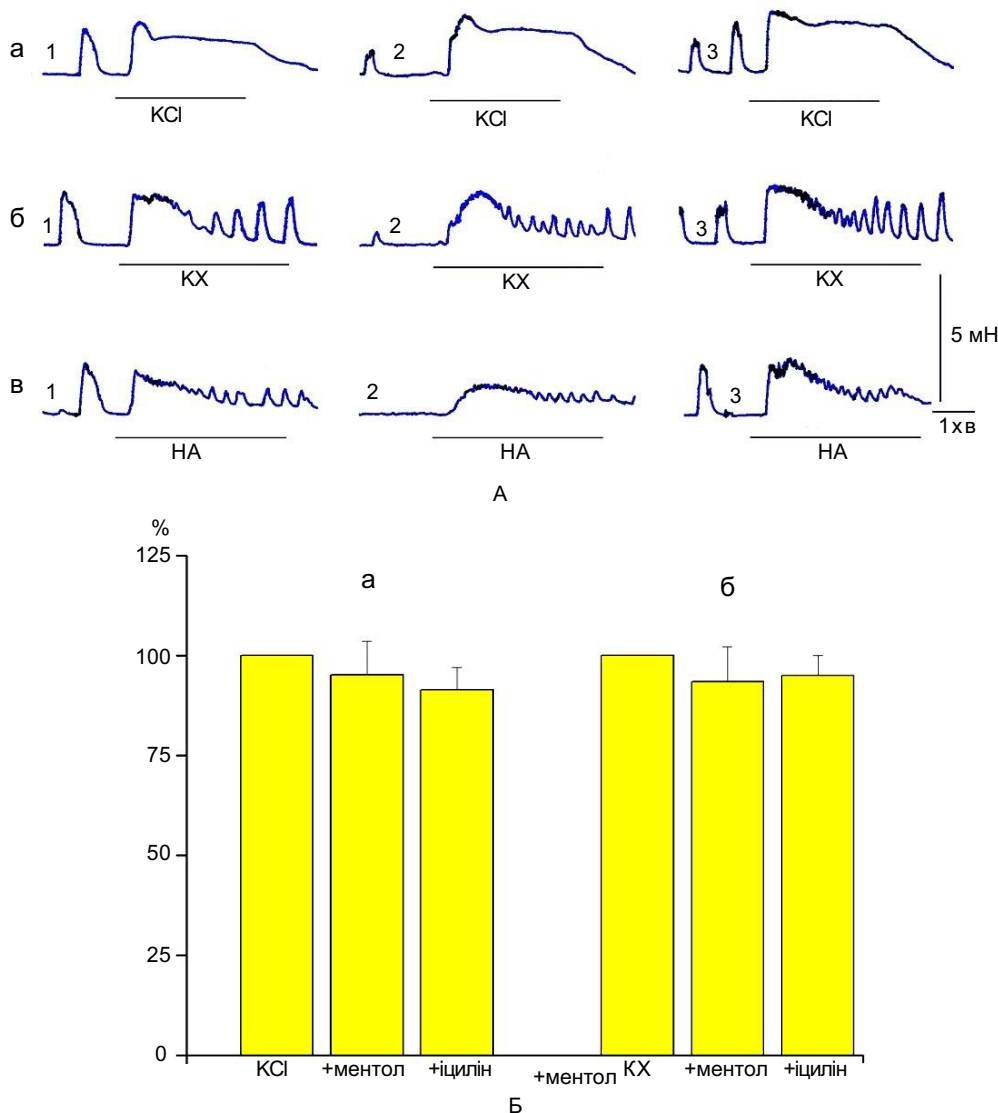


Рис. 4. Вплив ментолу та іциліну на викликані скорочення епідидимальної ділянки сім'явидної протоки (vas deferens) кастрованих щурів. А: оригінальні записи KCl (а) карбахоліном (КХ, б) і норадреналіном (НА, в) індукованих скорочень м'язових смужок епідидимальної ділянки vas deferens щура на 92-гу добу після кастрації за контрольних умов (1), на 10-й хвилині дії ментолу (2) та через 30 хвилин відмивання нормальним розчином Кребса (3); Б: діаграми, що ілюструють статистичну недостовірність змін амплітуд KCl- (а) та КХ- (б) індукованих скорочень м'язових смужок епідидимальної ділянки кастрованих щурів (60–137-ма доба, $n=10$) під дією ментолу, або іциліну

скорочень, викликаних гіперкалієвою деполаризацією, TRPM8 агоністами – іциліном і ментолом. Останнє може бути пов'язане з тим, що за умов значного зниження вмісту циркулюючих андрогенів новоекспресовані TRPM8-канали або є нефункціональними сплайс-варіантами, або порушується процес їх нормального мембранного транспорту й складання у функціональні тетрамери.

Під впливом ментолу КХ-індуковані скорочення простатної ділянки *vas deferens* зменшувалися, в той самий час НА-індуковані скорочення пригнічувалися цими агентами більш ефективно (див. рис. 3,Б).

В епідидимальній ділянці *vas deferens* кастрованих тварин, на відміну від простатної, пригнічувальна дія ментолу або іциліну на амплітуду викликаних скорочень практично усувалася (див. рис. 4,А,Б). Так, ментол зменшував скорочення у відповідь на гіперкалієву деполаризацію лише до $95 \pm 8 \%$ ($n=9$), а іцилін – до $91 \pm 6 \%$ ($n=12$; див. рис. 4,Б), тоді як у контрольній групі тварин відповідні значення становили $54 \pm 5 \%$ ($n=15$) і $86 \pm 4 \%$ ($n=9$; див. рис. 1,Б). Після кастрації амплітуда КХ-індукованих скорочень гладеньких м'язів епідидимальної ділянки під впливом ментолу та іциліну змінювалася лише до $93 \pm 9 \%$ ($n=5$) і $95 \pm 5 \%$ ($n=6$) відповідно (див. рис. 4,Б). Нагадаємо, що для контрольної групи тварин пригнічення ментолом було значно більшим (до $68 \pm 3 \%$, $n=6$), тоді як іцилін і в цьому разі помітною ефективністю не відзначався (до $94 \pm 7 \%$ ($n=3$; див. рис. 1,Б). Ментол та іцилін зменшували частоту й амплітуду спонтанних скорочень, причому цей вплив був повністю зворотнім (див. рис. 4,А).

Той факт, що кастрація призводила до переважного усунення дії ментолу, мало змінюючи вплив іциліну на амплітуду КСІ- і КХ-індукованих скорочень епідидимальної ділянки добре узгоджується з показаним раніше зниженням щільності дигідропіридинових рецепторів гладеньких м'язів *vas deferens* у таких щурів [5].

Очевидно, що таке зниження відображає реальне зменшення кількості функціональних ПЗКК L-типу, вхід Ca^{2+} через які є ключовим у КСІ- і КХ-індукованих скороченнях і які є мішенню блокувальної дії ментолу, але не іциліну. Але це припущення мало узгоджується з отриманими нами даними, які свідчать про підвищення ефективності дії НА та КХ на гладенькі м'язи простатної ділянки *vas deferens* щурів після кастрації.

ОБГОВОРЕННЯ

Ефективність іциліну в модуляції КСІ- і агоніствикликаних скорочень різних ділянок *vas deferens* щурів безумовно свідчить про залучення холододового рецептора TRPM8, для якого іцилін є специфічним агоністом у механізмі кальцієвої сигналізації, задіяній у активації цих скорочень. Таким чином отримані результати доводять, що експресія TRPM8, виявлена нами раніше у гладеньких м'язах *vas deferens* як на рівні мРНК, так і білка [1], має функціональне значення. Однак той факт, що поряд з переважною локалізацією TRPM8 білка в мембрані СР ГМК *vas deferens* він також може бути наявний і в сарколемі [1], що досить ускладнює інтерпретацію отриманих результатів. Дійсно, функціональним проявом активації СР-резидентного TRPM8 іциліном будуть збільшені пасивні втрати Ca^{2+} з СР і, відповідно, зменшене його вивільнення у відповідь на зовнішні стимули, які активують скорочення посередньо мобілізації депонованого кальцію. Результатом цього буде зменшення амплітуди викликаних скорочень, що нами і спостерігалось у більшості випадків. Якщо ж одночасно відбувається активація іциліном також і сарколемального TRPM8, то TRPM8-опосередкований вхід кальцію буде компенсувати зменшення його вивільнення і пригнічувальна дія іциліну на викликані скорочення буде зменшуватися. Таким чином, залежно від співвідношення СР-

резидентного та сарколемального TRPM8 так від того, наскільки стимул, який активує скорочення, задіює депонований кальцій модульовальний вплив іциліну на амплітуду викликаних скорочень, теоретично може коливатися в широких межах – від пригнічення до потенціації.

Дещо полегшити ситуацію з інтерпретацією результатів допомогло використання поряд із іциліном і ментолу, який, крім того, що він є агоністом TRPM8, проявляє також здатність блокувати ПЗКК L-типу [11]. При цьому схожість пригнічувальної дії ментолу та іциліну на амплітуду викликаних скорочень указує на незначне значення ПЗКК-опосередкованого входу кальцію та вагому роль його мобілізації в механізмі активації скорочень. Подібна ситуація спостерігається, наприклад, у випадку KCl-індукованого скорочення простатної та HA-індукованого скорочення епідидимальної (див. рис. 1,Б) ділянок *vas deferens*, пригнічення яких ментолом і іциліном, очевидно, відбувається внаслідок активації CP-резидентного TRPM8 та зменшення в результаті цього можливості вивільнення депонованого кальцію. Однак, якщо HA-індуковане скорочення епідидимальної ділянки може взагалі не вимагати змін мембранного потенціалу та залучення потенціалзалежного входу кальцію, то скорочення простатної ділянки, викликане гіперкалієвою деполяризацією, за своєю природою залежить від ПЗКК-опосередкованого входу. Тому для пояснення схожості пригнічувального впливу ментолу та іциліну на KCl-індуковане скорочення простатної ділянки доводиться також припустити великий коефіцієнт ампліфікації між потенціалзалежним входом та вивільненням Ca^{2+} при SICR, за якого навіть незначний вхід спричиняє потужне вивільнення.

На нашу думку, потенціація капсазепіном пригнічувальної дії ментолу та іциліну на KCl-індуковане скорочення

простатної ділянки (див. рис. 2) зумовлена як його синергізмом з ментолом (і, можливо, з іциліном) у блокуванні ПЗКК L-типу, так і стимуляцією (а не блокуванням) ним ретикулярної ізоформи TRPM8.

У тих же випадках, коли пригнічувальний вплив ментолу на викликані скорочення помітно перевищував вплив іциліну, – а це насамперед KCl- та KX-індуковане (див. рис. 1,Б) скорочення епідидимальної ділянки – доводиться припустити суттєву роль ПЗКК-опосередкованого входу кальцію, який блокується ментолом, але не іциліном в механізмі їх активації, а також наявність функціонального сарколемального TRPM8. Дійсно, активація тим же іциліном сарколемального TRPM8 буде мати протилежну спрямованість дії на амплітуду скорочень порівняно з активацією CP-резидентного TRPM8, тим самим зменшуючи результуючий пригнічувальний ефект іциліну аж до його зникнення або реверсії. Можливість локалізації білка TRPM8 не тільки в мембрані CP, а і у сарколемі ГМК *vas deferens* була нами показана імуноцитохімічними методами [1].

Нарешті, не виключено, що релаксуюча дія ментолу принаймні частково може бути також зумовлена стимуляцією ним кальцієвої АТФази CP (SERCA) та посилення в результаті цього захоплення Ca^{2+} в CP [10]. Можливість такої стимуляції була насамперед показана для жасмону (ефективні концентрації приблизно 10^{-4} моль/л), але при вищих концентраціях аналогічну дію може виявляти і ментол [10]. Для підтвердження чи спростування такого механізму потрібно проведення вимірювань цитоплазматичної та інтралюмінальної концентрації кальцію в ГМК.

Отже, наші результати, з одного боку, доводять залучення TRPM8 в модуляцію скорочень гладеньких м'язів *vas deferens*, а з другого – показують, що використання відомих фармакологічних засобів впливу на TRPM8 – ментолу, іциліну, капсазепіну

через множинність своїх дій дуже ускладнює інтерпретацію результатів. Наші результати також підтверджують зроблені раніше висновки щодо відмінностей як у механізмах активації скорочення різними стимулами, так одним і тим самим стимулом у різних ділянках *vas deferens* [3]. Цікавим є вплив кастрації на модуляцію амплітуди викликаних скорочень холодимітуючими сполуками. Відомо, що в результаті кастрації простатна ділянка *vas deferens* щура набуває здатності скорочуватись у відповідь на прикладання агоністів, а епідидимальна, навпаки, – зменшує амплітуду своїх агоністіндукованих скорочень [14]. Кастрація також знижує щільність дигідропіридинових рецепторів у *vas deferens* щура [5] та підвищення експресії мРНК TRPM8 [1]. При цьому, як показали наші експерименти, якісні та кількісні характеристики пригнічення КС1-індукованих скорочень простатної ділянки ментолом та іциліном не змінювалися порівняно з контролем. Більше того, характеристики пригнічення ментолом та іциліном КХ- та НА-індукованих скорочень, які стали можливими в результаті кастрації, мало відрізнялися від того, що спостерігалось для КС1-індукованих (див. рис. 3). Ці дані, з одного боку, підтвердили наш висновок про незначну роль ПЗКК-опосередкованого входу кальцію в механізмі активації скорочень простатної ділянки (адже щільність дигідропіридинових рецепторів при кастрації зменшилась [5], а на різниці в дії ментолу і іциліну це не позначилось), а з другого, – показали, що підвищення вмісту мРНК TRPM8 при кастрації [1] не транслюється у збільшення експресії функціонального каналу (хоч сильніша пригнічувальна дія ментолу та іциліну на НА-індуковані скорочення порівняно із КС1- та КХ-індукованими (див. рис. 3) вказує, що таке збільшення може бути).

В епідидимальній ділянці кастрація практично усувала дію ментолу на амплі-

туду КС1- і КХ-індукованих скорочень до рівня іциліну, який і у контрольних тварин був малоефективним. Це може відображати як зменшення кількості функціональних ПЗКК L-типу (тобто дигідропіридинових рецепторів) при кастрації [5], так і ймовірно деяке підвищення експресії функціонального сарколемального TRPM8 [1].

**И.А. Владимирова, И.Б. Филиппов,
Е.М. Кулиева, А. Юркевич, Р. Скрима,
Н. Преварская, Я.М. Шуба**

СРАВНЕНИЯ ДЕЙСТВИЯ МЕНТОЛА И ИСИЛИНА НА ВЫЗВАННЫЕ СОКРАЩЕНИЯ ГЛАДКИХ МЫШЦ СЕМЯВЫНОСЯЩЕГО КАНАЛА НОРМАЛЬНЫХ И КАСТРИРОВАННЫХ КРЫС

Исследовано влияние агонистов холодого рецептора TRPM8 ментола и исилина на сокращения гладких мышц (ГМ) простатного и эпидидимального участков семявыносящего протока (*vas deferens*) нормальных и орхидэктомированных (ОХ) в течение 60–120 сут крыс, вызванные гиперкалиевой деполяризацией (КС1), или приложением агонистов М-холино и α -адренорецепторов карбахолина (КХ) и норадrenalина (НА). В той или иной степени ментол и исилин угнетали все сократительные реакции ГМ *vas deferens*. Статистически достоверных отличий в угнетающем действии ментола и исилина на амплитуду КС1-вызванных сокращений ГМ простатного участка *vas deferens* контрольной группы животных (52 ± 4 и $63 \% \pm 8 \%$) и ОХ животных (58 ± 6 и $57 \% \pm 13 \%$) выявить не удалось. У контрольных животных КХ- и НА-вызванные сокращения в простатном участке практически отсутствовали, однако орхидэктомия приводила к их появлению. В ОХ животных как ментол, так и исилин уменьшали КХ-индуцированные сокращения простатного участка *vas deferens* примерно на половину – соответственно до 46 ± 15 и $47 \% \pm 19 \%$ от контроля, тогда как НА-индуцированные сокращения угнетались этими веществами более эффективно – соответственно до 22 ± 11 и $13 \% \pm 10 \%$ от контроля. Во всех случаях различия в действии ментола и исилина на ГМ простатного участка были статистически недостоверными. В эпидидимальном участке *vas deferens* животных контрольной группы ментол оказался более эффективным ингибитором сокращений по сравнению с исилином, снижая амплитуду КС1-, КХ- и НА-вызванных сокращений соответственно до 54 ± 5 , 70 ± 3 и $61 \% \pm 10 \%$ против 86 ± 4 , 94 ± 7 и $69 \% \pm 5 \%$ для исилина. Однако на этом участке, в отличие от простатного, орхидэктомия приводила к устранению угнетающего действия обеих веществ, в присутствии которых ответы

изменялись ститистически недостоверно до 91 % ± 95 % от контрольных значений. Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о том, что сокращения ГМ клеток (ГМК) *vas deferens*, вызванные как калиевой деполаризацией мембраны, так и агонистами холино- и адренорецепторов, могут модулироваться активацией TRPM8-каналов, а орхидэктомия и сопутствующее снижение уровня циркулирующих андрогенов, влияющие, как показано ранее, как на экспрессию, так и на функционирование TRPM8, достоверно не сказывается на эффективности угнетающего действия ментола и исилина в простатном участке, а в эпидидимальном, даже, приводит к его устранению.

Ключевые слова: *vas deferens*, гладкие мышцы, TRPM8, ментол, исилин, норадреналин, карбахолин, кастрация.

I.A. Vladimirova, I.B. Philippov, E.M. Kulieva, A. Jurkiewicz, R. Skryma, P. Prevarskaya, Y.M. Shuba

COMPARISON OF THE EFFECTS OF MENTHOL AND ILICIN ON THE KCL- AND AGONIST-INDUCED CONTRACTION OF THE SMOOTH MUSCLES STRIPS OF THE VAS DEFERENS OF NORMAL AND CASTRATED RATS

Non-specific TRPM8 agonist menthol was shown to inhibit voltage- and agonist-evoked contractions of the smooth muscle (SM) of rat *vas deferens*. Here we compared the action of menthol with the action of more specific TRPM8 agonist icilin on depolarization-(60 mM KCl), carbachol-(CCh) and noradrenalin-(Nor)-evoked contractions of the SM strips from the prostatic and epididymal portions of the *vas deferens* of normal and castrated (60-137 days) rats. Inhibitory action of menthol (100 μM) and icilin (10 μM) on the amplitude of KCl-, CCh- and Nor-induced contractions of normal as well as castrated rats was similar consisting about 50%, despite castration per se strongly potentiated CCh- and Nor-evoked contractions compared to the control animals. In the epididymal portion of the control animals menthol suppressed KCl- and CCh-evoked contractions by 46±5% and 32±3% and icilin by only 14±4% and 6±7%, respectively, whilst after castration both compounds became virtually ineffective. Considering that TRPM8 may localize in the sarcolemma and sarcoplasmic reticulum (SR) membrane and that menthol can also block voltage-gated calcium channels (VGCCs), our data indicate that in the prostatic portion TRPM8 modulates contractility by primarily decreasing the SR Ca²⁺ stores content, whilst in the epididymal one by both decreasing the SR filling and supporting Ca²⁺ entry. Drop in the circulation androgens as a result of castration changes the menthol- and icilin-mediated modulation of the rat *vas deferens* SM contractility via the decrease of the expression of L-type VGCCs and increase of the expression of TRPM8.

Key words: *vas deferens*, smooth muscle, TRPM8, menthol,

icilin, noradrenalin, carbachol, castration.

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; Department of Pharmacology, Escola Paulistana de Medicina, Universidade Federal de Sao Paulo, Brazil; Laboratoire de Physiologie Cellulaire, Universite des Sciences et Technologies de Lille, France

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Болдирев О.І., Соткіс Г.В., Кулієва С.М., Владимірова Й.А., Філіппов І.Б., Скрима Р., Преварська Н., Шуба Я.М. Експресія холодового рецептора TRPM8 у гладеньких м'язах сім'явидних протоків щурів // Фізіол. журн. – 2009. – 55, №5. – С. 17–27.
2. Філіппов І.Б., Владимірова Й.А., Кулієва С.М., Скрима Р., Преварська Н., Шуба Я.М. Модуляція скорочення гладеньких м'язів сім'явидних протоків щура агоністом TRPM8 каналів ментолом // Там само. – 2009. – 55, № 6. – С. 30–40.
3. 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.
4. Bidaux G., Flourakis M., Thebault S., Zholos A., Bech B., Gkika D., Roudbaraki M., Bonnal Y.-J., Mauroy B., Shuba Ya., Skryma R., Prevarskaya N. 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.
5. Castillo C.J., Lafayette S., Caricati-Neto A., Sette M., Jurkiewicz N.H., Garcia A.G., Jurkiewicz A. Low digidropyridine receptor density in *vas deferens* of castrated rats // *Brit. J. Pharmacol.* – 1992. – 105, №2. – P. 257–258.
6. 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 // *Ibid.* – 1997. – 121, №7. – P. 1461–1467.
7. 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.
8. Miranda H.F., Duran E., Fernandez E., Pinardi G. Muscarinic receptor subtypes in the bisected *vas deferens* of the rat // *Gen. Pharmacol.* – 1995. – 26, №2. – P. 387–391.
9. Rohacs T., Nilius B. Regulation of transient potential (TRP) channels by phosphoinositides // *Pflug. Arch.* – 2007. – 455, №1. – P. 157–168.
10. Starling A.P., Hughes G., East J.M., Lee A.G. Mechanism of stimulation of the calcium adenosinet-

- riphosphatase by jasmone // Biochemistry. – 1994 Mar 15; **33**(10). – P. 3023–3031.
11. 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.
 12. Thebault S., Lemonnier L., Bidaux G., Flourahis M., Bavancoffe A., Gordienko D., Roudbaraki M., Delcourt Ph., Panchin Yu., Shuba Ya., Skryma R., Prevarskaya N. 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**. – P. 39423–39435.
 13. Tsuzuki K., Xing H., Ling J., Gu L.G. Menthol-in-duced Ca²⁺ release from presynaptic Ca²⁺ stores potentiates sensory synaptic transmission // J Neurosci. – 2004. – **24**. – P. 762–771.
 14. Vladimirova I.V., Hirata H., Jurkiewicz N.H., Jurkiewicz A. Interconversion of agonist-induced responses of prostatic and epididymal portion of the rat vas deferens induced by castration // Neurophysiology (Kiev). – 2003. – **35**, №3/4. – P. 302–310.
 15. Voets T., Owsianik G., Nilius B. TRPM8 // Handb. Exp. Pharmacol. – 2007. – **179**. – P. 329–344.
 16. Zholos A.V. Regulation of TRP-like muscarinic cation current in gastrointestinal smooth muscle with special reference to PLC/Ins3/Ca²⁺ system // Acta Pharmacol. Sin. – 2006. – **27**, №7. – P. 833–842.

*Ин-т фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України, Київ;
Міжнарод. центр молекуляр. фізіології НАН України, Київ;
Держ. мед. ун-т Сан Пауло, Бразилія;
Лільськ. ун-т наук і технологій, Франція
E-mail: irinav@serv.biph.kiev.ua*

*Матеріал надійшов до
редакції 20.01.2010*