

Р.І. Янчій, О.М.Калейнікова, Т.Ю.Вознесенська, Т.В.Блашків, Ю.П. Бідзіля

Скоротливість міометрія миші в умовах зміни функціонального стану мітохондрій

Досліджено особливості скоротливості міометрія миші в експериментальних умовах змін функціонального стану мітохондрій, а також аргінази II і NO-синтази. Встановлено, що скоротлива активність міометрія миші детермінується функціональним станом мітохондрій. Аспартатні мітохондріальні переносники є NO-залежними, але не залежать від входу Ca^{2+} через кальцієвий уніпортер. У їх роботі активно бере участь мітохондріальний мембранний потенціал та неспецифічна провідність мітохондрій.

Ключові слова: міометрій, амплітуда скорочень міометрія, мітохондріальні переносники.

ВСТУП

Відомо, що скоротлива активність міометрія матки важлива як для транспорту гамет, так і для імплантації та розвитку ембріонів. Порушення функціонування міометрія (дискоординація, пригнічення чи посилення скорочень) визнається як важлива клінічна проблема, зокрема протягом вагітності та під час пологів [8, 19]. Вважають, що скоротливість гладеньких м'язів і матки зокрема залежить від функціонування іонно-транспортних та ферментативних систем клітинних органел тощо [12, 16]. На сьогодні особливості скоротливості міометрія в умовах зміни функціонального стану мітохондрій не досліджено.

Представлені в літературі значення скоротливості міометрія матки відрізняються, що пов'язане як з різноманітністю методик, так і умов проведення дослідів. Для вирішення проблеми уніфікації отриманих даних дослідження міометрія, запропоновано використовувати індекс скоротливості [добуток амплітуди скорочення (F_{max}) та відношення швидкості скорочення до швидкості розслаблення (CV_{max}/RV_{max}), мН], як інтегральний показник, що дає змогу адекватно оцінювати скоротливу активність міометрія незалежно від співвідношення

скоротливої та сполучної тканини в межах смужки [9]. Раніше нами було показано, що у мишей на 4–5-ту добу гестації зменшується, а на 10–11-ту добу збільшується індекс скоротливості [3]. Амплітуда скорочення, як важлива складова в розрахунку індексу скоротливості, при оцінці токолітичних та уротонічних ефектів різноманітних речовин на міометрій потребує подальшого детального вивчення. В літературі є дані досліджень часових, або темпоральних, особливостей пермабілізованих волокон скелетних м'язів [11, 12, 16, 17]. Однак відсутні дані про зміну у часі амплітуди скорочень смужки міометрія миші в експериментальних умовах порушення функціонального стану мітохондрій.

Метою нашої роботи було дослідження амплітуди скорочень ізольованих смужок міометрія миші в умовах зміни функціонального стану мітохондрій (інгібування кальцієвого уніпортера і аспартатного мітохондріального переносника, активація мітохондріальних пор, а також інгібування аргінази II та NO-синтази).

МЕТОДИКА

Для аналізу, оцінки та характеристики механічної активності смужки міометрія застосо-

ували метод фазно-графічного аналізу [9]. Амплітуда скорочення – це один з показників скоротливої активності міометрія.

Дослідження проведені на невагітних (8 тиж, 16–18 г) самицях мишей лінії СВА з дотриманням усіх вимог щодо роботи з лабораторними тваринами (Міжнародна конвенція, Страсбург, 1986). В день експерименту видаляли матку і поміщали в розчин Кребса (4 °С). Для реєстрації сили спонтанних, ізометричних скорочень смужки міометрія вирізали вздовж із рогів матки під мікроскопом МБС-10 (довжиною до 10 мм і шириною не більше ніж 1 мм) переносили в камеру, фіксували і з'єднували із консолю механоелектричного перетворювача сили в електричний сигнал. Камеру перфузували розчином Кребса. Силу ізометричних скорочень реєстрували за допомогою швидкодіючого самописця Н3021-3. Рівномірність перфузії препарату омиваючими розчинами забезпечувалася перистальтичним насосом НП-1М. Здійснювали термостатування розчинів в експериментальній плексигласовій камері. У дослідах використовували розчин Кребса (ммоль/л): NaCl – 120; KCl – 5,9; NaHCO₃ – 15,5; NaH₂PO₄ – 1,2; MgCl₂ – 1,2; CaCl₂ – 2,5; глюкоза – 11,5. Блокатор кальцієвого уніпортеру (RuR), який додавали до розчину Кребса, отримуючи розчин з кінцевою концентрацією діючої речовини 1 мкмоль/л; інгібітор мітохондріального мембранного потенціалу (FCCP) з кінцевою концентрацією діючої речовини 4 мкмоль/л; інгібітор аспартатного мітохондріального переносника піридоксал-5'-фосфат (інгібітор аспаратамінотрансферази) – (PPT; 30 мкмоль/л); неспецифічний блокатор NO-синтаз (L-NAME; 0,1 ммоль/л); специфічний блокатор аргіназ (L-норвалін; 50 мкмоль/л); інгібітор відкривання мітохондріальних пор (циклоспорин А; 15 ммоль/л). Усі препарати були фірми «Sigma» (США).

Для статистичної обробки результатів використовували пакет програм Origin 8Pro (OriginLab Corp., North., MA, USA) та Excel.

Достовірність різниці середніх значень визначали за критерієм *t* Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Встановлено, що в умовах дії PPT амплітуда скорочення зменшувалася на 4-й хвилині до $19,85 \pm 1,67$ мН, з 8-ї до 20-ї хвилини вона була від $18,96 \pm 1,24$ до $17,84 \pm 1,64$ мН ($P < 0,01$) порівняно з контролем ($22,31 \pm 1,98$ мН). При дії RuR на 4-й хвилині цей показник не вірогідно зростав ($23,65 \pm 2,10$ мН), тоді як на 8-й хвилині він зменшувався і на 20-й хвилині становив $18,07 \pm 1,29$ і $16,95 \pm 2,01$ мН відповідно ($P < 0,05$).

У разі сумісної дії PPT і RuR амплітуда скорочень з 2-ї по 8-му хвилину зменшувалася з $19,18 \pm 1,24$ до $17,72 \pm 1,68$ мН порівняно з контролем ($P < 0,01$), тоді як з 10-ї по 20-ту хвилини вона становила $14,05 \pm 1,78$ мН.

Показано, що в умовах комплексної дії PPT та FCCP (рис. 1) амплітуда зменшувалася ($P < 0,01$) на 4-й та 6-й хвилинах і становила $16,27 \pm 1,37$ та $6,91 \pm 1,19$ мН відповідно порівняно із контрольним значенням, проте вірогідно не відрізнялася від дії самого FCCP. З 8-ї по 20-ту хвилину цей показник зменшувався ($P < 0,001$) від $2,23 \pm 0,94$ до $1,56 \pm 0,54$ мН. Преінкубація із циклоспорином А, в умовах сумісної дії PPT та FCCP, зменшувала амплітуду ($P < 0,01$) на 4-й та 6-й хвилинах ($13,82 \pm 1,17$ та $5,80 \pm 1,14$ мН відповідно). З 8-ї по 20-ту хвилини цей показник зменшувався ($P < 0,001$) від $2,01 \pm 0,58$ до $1,33 \pm 0,52$ мН.

В умовах дії L-NAME амплітуда збільшувалася ($P < 0,05$) від 6-ї до 20-ї хвилини і становила від $26,10 \pm 1,94$ до $26,55 \pm 1,72$ мН. При дії L-норваліну вона зменшувалася ($P < 0,01$) починаючи з 6-ї хвилини і 20-ї – від $17,84 \pm 1,64$ до $16,95 \pm 1,81$ мН. У разі сумісного впливу L-NAME та L-норваліну амплітуда вірогідно не відрізнялася від контрольних значень. Встановлено, що в умовах дії PPT і L-норваліну (рис. 2) вона зменшувалася на 26 % з 4-ї до 20-ту хвилини.

Отже, нами досліджено особливості

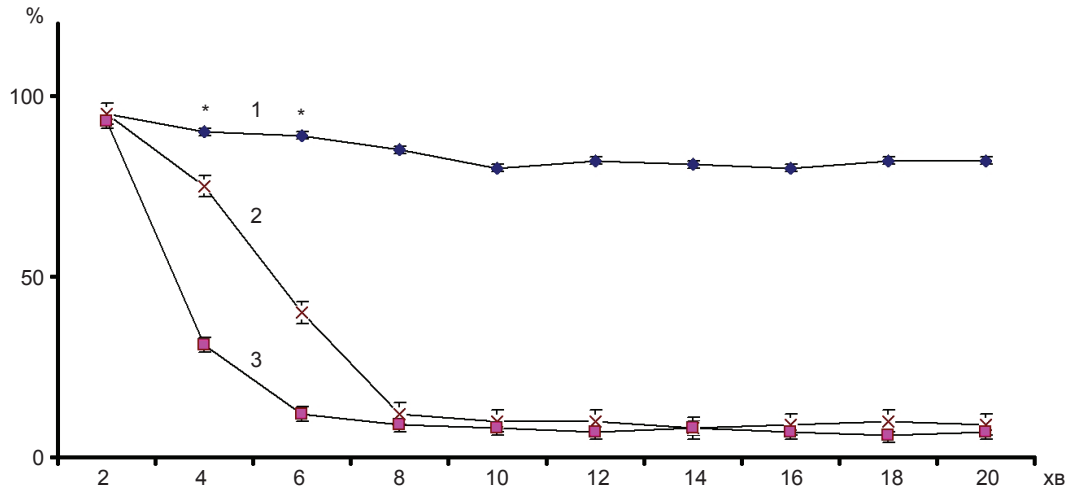


Рис. 1. Зміни в часі амплітуди скорочень міометрія в умовах впливу інгібіторів мітохондріальних переносників та мітохондріального мембранного потенціалу. За віссю абсцисс – часові проміжки (хв), за віссю ординат – амплітуда скорочень міометрія (% відносно контрольних): 1 – інгібітор аспартатного мітохондріального переносника (PPT); 2 – інгібітор мітохондріального мембранного потенціалу (FCCP); 3 – інгібітор аспартатного мітохондріального переносника та інгібітор мітохондріального мембранного потенціалу (PPT і FCCP). * $P < 0,01$ - вірогідність відмінностей відносно контролю

скоротливості міометрія миші в умовах дії інгібітора мітохондріальних переносників, активатора мітохондріальних пор, інгібіторів кальцієвого уніпортеру, аргінази і NO-синтази.

Відомо, що мітохондрії модулюють кальцієві сигнали [7], а кальцій надходить у

мітохондрії залежно від значення їхнього мембранного потенціалу через кальцієвий уніпортер. Захоплення субстрату може активуватися за допомогою механізму, що не вимагає входу Ca^{2+} у мітохондрії, але пов'язаний з активністю кальційзалежних мітохондріальних переносників [15].

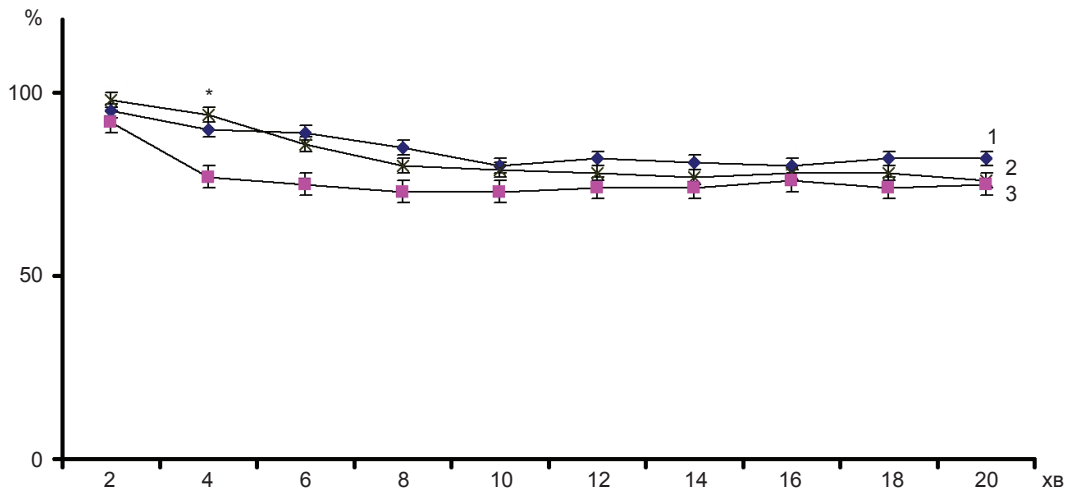


Рис. 2. Динаміка в часі амплітуди скорочень міометрія в умовах впливу інгібіторів мітохондріальних переносників мітохондріальної аргінази. За віссю абсцисс – часові проміжки (хв), за віссю ординат – амплітуда скорочень міометрія (% відносно контрольних): 1 – інгібітор аспартатного мітохондріального переносника (PPT); 2 – L-норвалін; 3 – інгібітор аспартатного мітохондріального переносника (PPT) і L-норвалін. * $P < 0,01$ – вірогідність відмінностей відносно контролю

Активно вивчають малат-аспартатні мітохондріальні переносники в мозку людини [13], печінки мишей [20], серці щурів [14]. Встановлено, що їх функціонування регулюється кальцієм [4]. Раніше було показано вплив різних інгібіторів мітохондріальних переносників на здатність ооцитів мишей до мейотичного дозрівання [1, 2]. Досліджено зразки міометрія людини на кінець вагітності [18].

Наші результати стосовно амплітуди скорочень міометрія миші дають підстави сформулювати наступні твердження: 1) функціональний стан міометрія залежить від роботи аспартатного мітохондріального переносника; 2) мітохондріальні переносники, мабуть, не залежать від входу Ca^{2+} через кальцієвий уніпортер, але діють залежно від мітохондріального мембранного потенціалу та неспецифічної провідності (мітохондріальних пор); 3) мітохондріальні переносники, ймовірно, є NO-залежними (від аргіназного шляху його утворення).

Відомо, що оксид азота (NO) наявний у багатьох тканинах. Це важливий між- та внутрішньоклітинний посередник, задіяний у регуляції численних фізіологічних процесів. Показано, що оваріальні гормони можуть регулювати експресію ізоформ NO-синтаз (ендотеліальної та індукційної) в матці мишей протягом їх естрального циклу [21]. Експресія білка аргінази II (мітохондріальної) значно знижена під час ранніх строків вагітності й поступово зростає до кінця строку і після пологів [10]. Відомо, що NO-синтази конкурують з аргіназами за L-аргінін, а гідрокси-L-аргінін, як проміжна ланка у виробництві NO з L-аргініну, є потужним інгібітором аргінази [6], тому положення про те, що виробництво NO переважно залежить від L-аргініну, доступного для NO-синтази, тоді як аргіназний шлях це ендогенна негативно керуюча ланка регуляції загального виробництва NO. Все це вище сказане - для міометрія миші потребує уточнення.

Таким чином, досліджено особливості скоротливості міометрія миші в експериментальних умовах змін функціонального стану

мітохондрій та аргінази II і NO-синтази. Встановлено, що скоротлива активність міометрія миші детермінується функціональним станом мітохондрій. Аспартатні мітохондріальні переносники є NO-залежними, але не залежать від входу Ca^{2+} через кальцієвий уніпортер. У їх роботі бере активну участь мітохондріальний мембранний потенціал та неспецифічна провідність мітохондрій.

**Р.И. Янчий, О.Н.Калейникова,
Т.Ю.Вознесенская, Т.В.Блашкив, Ю.П. Бидзиля**

СОКРАЩЕНИЕ МИОМЕТРИЯ МЫШИ В УСЛОВИЯХ ИЗМЕНЕНИЯ ФУНКЦИОНАЛЬНОГО СОСТОЯНИЯ МИТОХОНДРИЙ

Исследованы особенности сокращения миометрия мыши в экспериментальных условиях изменения функционального состояния митохондрий: фармакологическое ингибирование кальциевого унипортера и аспартатного митохондриального переносчика, активация митохондриальных пор, а также ингибирование аргиназы II и NO-синтазы. Показано, что сокращение миометрия зависит от функционирования аспартатного митохондриального переносчика, сами переносчики не зависят от входа Ca^{2+} через унипортер. Однако в их работе принимают участие митохондриальный мембранный потенциал и поры неспецифической проводимости. Митохондриальные переносчики - NO-зависимы.

Ключевые слова: миометрий, амплитуда сокращений миометрия, митохондриальные переносчики.

**R.I. Yanchiy, O.N.Kalejnikova,
T.Yu.Voznesenskaya, T.V.Blashkiv, Yu.P. Bidzilya**

MICE MYOMETRIAL CONTRACTIVITY FEATURES IN CONDITIONS OF MITOCHONDRIAL FUNCTIONAL CHANGES

It has been investigated the temporal amplitude features of mice myometrium in conditions of action mitochondrial carriers inhibitor, the mitochondrial pore activator, calcium uniporters inhibitor. For the first time it is established that the functional condition of myometrium depends on a mitochondrial carriers functioning; the mitochondrial carrier is NO-dependent itself (on arginase way of its formation); the carrier functions depending on mitochondrial membrane potential and mitochondrion nonspecific conductivity (mitochondrial pores).

Key words: miometrium, amplitude of contraction, mitochondrial carriers.

O.O. Bogomoletz Institute of Physiology National Academy of Science of Ukraine, Kyiv

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Блашків Т.В., Вознесенська Т.Ю. Митохондриальні переносники і мейотичне дозрівання у мишей // Проблеми репродукції. – 2006. – №6. – С. 35–38.
2. Блашків Т.В., Вознесенська Т.Ю., Шепель А.Н., Янчій Р.І. Експериментальна митохондриальна дисфункція в ооцитах мишей // Там же. – 2008. – №1. – С. 13–17.
3. Сердюк О.М., Бідзіля Ю.П., Янчій Р.І. Фазно-графічний аналіз скоротливості міометрію миші в умовах гестації // Перспективи медицини і біології. – 2010. – №2. – С. 34–39.
4. Casimir M., Rubi B., Frigerio F., Chaffard G., Maechler P. Silencing of the mitochondrial NADH shuttle component aspartate-glutamate carrier AGC1/Aralar1 in INS-1E cells and rat islets // Biochem. J. – 2009. – 424(3). – P. 459–466.
5. Contreras L., Satrustegui J. Calcium signaling in brain mitochondria: interplay of malate aspartate NADH shuttle and calcium uniporter/mitochondrial dehydrogenase pathways // J. Biol. Chem. – 2009. – 284(11). – P. 7091–7099.
6. Daghigh F., Fukuto J., Ash D. Inhibition of rat liver arginase by an intermediate in NO biosynthesis, NG-hydroxy-L-arginine: implications for the regulation of nitric oxide biosynthesis by arginase // Biochem. Biophys. Res. Commun. – 1994. – 202(1). – P.174–180.
7. Dumollard R., Duchon M., Sartet C. Calcium signals and mitochondria at fertilisation // Semin. Cell Dev. Biol. – 2006. – 17(2). – P. 314–323.
8. Fanchin R., Ayoubi J.M. Uterine dynamics: impact on the human reproduction process // Reprod Biomed Online. – 2009. – 18(2). – P. 57–62.
9. Gullam J., Blanks A., Thornton S., Shmygol A. Phase-plot analysis of the oxytocin effect on human myometrial contractility // Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol. – 2009. – 144(1). – P. 20–24.
10. Hirata M., Obayashi S., Sakamoto S., Aso T., Imamura M., Azuma H. Involvement of arginase in regulating myometrial contractions during gestation in the rat // Mol. Hum. Reprod. – 2006. – 12(8). – P. 513–518.
11. Isaeva E., Shirokova N. Metabolic regulation of Ca²⁺ release in permeabilized mammalian skeletal muscle fibres // J. Physiol. – 2003. – 547(2). – P. 453–462.
12. Isaeva E., Shkryl V., Shirokova N. Mitochondrial redox state and Ca²⁺ sparks in permeabilized mammalian skeletal muscle // Ibid. – 2005. – 565(3). – P. 855–872.
13. Palmieri L., Papaleo V., Porcelli V., Scarcia P., Gaita L., Sacco R., Hager J., Rousseau F., Curatolo P., Manzi B., Militerni R., Bravaccio C., Trillo S., Schneider C., Melmed R., Elia M., Lenti C., Saccani M., Pascucci T., Puglisi-Allegra S., Reichelt K.L., Persico A.M. Altered calcium homeostasis in autism-spectrum disorders: evidence from biochemical and genetic studies of the mitochondrial aspartate/glutamate carrier AGC1 // Mol. Psychiatry. – 2010. – 15(1). – P. 38–52.
14. Ralphe J., Bedell K., Segar J., Scholz T. Correlation between myocardial malate/aspartate shuttle activity and EAAT1 protein expression in hyper- and hypothyroidism // Amer. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol. – 2005. – 288(5). – P. 2521–2526.
15. Satrustegui J., Contreras L., Ramos M. Role of aralar, the mitochondrial transporter of aspartate- glutamate, in brain N-Acetylaspartate formation and Ca(2+) signaling in neuronal mitochondria // J. Neurosci. Res. – 2007. – 85(15). – P. 3359–3366.
16. Shkryl V., Martins A., Ullrich N., Nowycky M.C., Niggli E., Shirokova N. Reciprocal amplification of ROS and Ca(2+) signals in stressed mdx dystrophic skeletal muscle fibers // Pflugers. Arch. – 2009. – 458(5). – P. 915–928.
17. Shkryl V., Shirokova N. Transfer and tunneling of Ca²⁺ from sarcoplasmic reticulum to mitochondria in skeletal muscle // J. Biol. Chem. – 2006. – 281(3). – P. 1547–1554.
18. Shynlova O., Tsui P., Jaffer S., Lye S. Integration of endocrine and mechanical signals in the regulation of myometrial functions during pregnancy and labour // Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol. – 2009. – 144(1). – P. 2–10.
19. Wray S., Shmygol A. Role of the calcium store in uterine contractility // Semin. Cell Dev. Biol. – 2007. – 18(3). – P. 315–320.
20. Wu J.L., Wu Q.P., Huang J.M., Chen R., Cai M., Tan J.B. Effects of L-malate on physical stamina and activities of enzymes related to the malate-aspartate shuttle in liver of mice // Physiol. Res. – 2007. – 56(2). – P. 213–220.
21. Zhang X., Lin H.Y., Liu G.Y., Wang H.M., Li Q.L., Zhu C. Expressions and regulation of endothelial and inducible nitric oxide synthases in mouse uterus during the estrous cycle and early pregnancy // Front. Biosci. – 2005. – 1(10). – P. 3172–3282.

Ин-т фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України, Київ
E-mail: voz@biph.kiev.ua

Матеріал надійшов
до редакції 21.01.2013