



УДК 577.35

ВПЛИВ КАЛІКСАРЕНУ C-90 НА СКОРОТЛИВУ АКТИВНІСТЬ ГЛАДЕНЬКИХ М'ЯЗІВ МІОМЕТРІЯ ЩУРІВ

О. В. Цимбалюк¹, С. О. Костерін²

¹Київський національний університет імені Тараса Шевченка
вул. Володимирська, 64/13, Київ 01601, Україна
e-mail: otsimbal@univ.kiev.ua

²Інститут біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України, вул. Леонтовича, 9, Київ 01601, Україна
e-mail: kinet@biochem.kiev.ua

Відомо, що калікс[4]арен із шифром C-90 селективно та з високою спорідненістю інгібує Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТФазу (кальцієву помпу) препаратів плазматичної мембрани гладеньком'язових клітин. Тому в роботі було здійснено дослідження особливостей впливу каліксарену C-90 (10 мкМ) на спонтанні та викликані (гіперкальєвим розчином і окситоцином) скорочення поздовжніх гладеньких м'язів матки щурів. Скоротливу активність досліджували тензометрично в ізометричному режимі; аналіз кінетичних властивостей скорочень здійснювали з розрахунком нормованих максимальних швидкостей окремо фаз скорочення (V_{nc}) і розслаблення (V_{nr}).

Показано, що каліксарен C-90 змінював спонтанну скоротливу активність, спричиняючи вірогідне зменшення амплітуди і не впливаючи на частоту спонтанних скорочень; при цьому мало місце уповільнення фази розслаблення окремих скоротливих відповідей (зменшення параметра V_{nr}). На фоні дії неселективного інгібітора NO-синтази L-NAME (100 мкМ) каліксарен C-90 не викликав зниження амплітуди спонтанних скорочень, а швидкість фази розслаблення поверталася до контрольного рівня.

Також встановлено, що каліксарен C-90 однаковою мірою спричиняв зниження сили як окситоцин-індукованих (0,1 МО), так і K^{+} -викликаних (80 мМ) скорочень, не впливаючи на характер наростання сили скоротливих відповідей (нормовані максимальні швидкості фази скорочення залишалися на рівні контрольних показників). Швидкість розслаблення гладеньком'язових препаратів зазнавала різноспрямованих змін залежно від характеру стимулювання скоротливих відповідей: у разі окситоцинових скорочень знижувалась, а для K^{+} -викликаних скорочень – зростала.

На фоні дії L-NAME каліксарен C-90 не викликав пригнічення максимальної сили K^{+} - і окситоцин-викликаних скорочень, але спричиняв відносні зміни кінетичних параметрів скоротливих відповідей (в обох випадках – зниження V_{nr}). Таким чином, блокування синтезу NO призводило до усунення інгібування як спонтанних, так і викликаних скорочень гладеньких м'язів міометрія під дією каліксарену C-90.

Одержані результати дають підстави припустити, що зниження сили скорочень гладеньких м'язів міометрія під дією каліксарену С-90 відбувається NO-залежним шляхом, тоді як уповільнення розслаблення (зменшення нормованої максимальної швидкості розслаблення V_{pr}) пов'язане з пригніченням Ca^{2+} -транспортувальної функції кальцієвої помпи плазматичної мембрани.

Ключові слова: гладенькі м'язи, матка, скорочення, кінетичні параметри, каліксарен С-90, кальцієва помпа плазматичної мембрани, оксид азоту.

ВСТУП

Функціонування гладеньких м'язів та їх збудливість залежить від злагодженої роботи іон-транспортуючих систем (систем пасивного транспорту – іонних каналів, а також систем активного транспорту – іонних pomp), які забезпечують наявність динамічної рівноваги трансмембранних концентраційних градієнтів іонів Na^+ , K^+ , Ca^{2+} і Cl^- . Надзвичайно важливою структурою плазматичної мембрани, яка забезпечує підтримання базального рівня (близько 10^{-8} М) Ca^{2+} та залучена до виведення цього катіона за межі міоцита, є Ca^{2+} -помпа плазматичної мембрани (ПМКА) [4, 24]. Ідентифіковано 4 ізоформи ПМКА (1–4), які кодуються різними генами; додаткове різноманіття (понад 20) ізоформ забезпечується альтернативним сплайсингом РНК. У гладеньком'язових клітинах міометрія експресуються 1а-, 4- (сплайс-варіанти а, х та меншою мірою b) і 2b- ізоформи ПМКА [12, 34]. Усі ізоформи Ca^{2+} -помпи плазматичної мембрани регулюються комплексом Ca^{2+} -кальмодулін: у разі їх безпосередньої взаємодії спостерігаються значні активаційні зміни кінетики транспорту іонів ПМКА (зниження K_M до Ca^{2+} в кілька десятків разів і підвищення V_{max} на один порядок) [7].

Численні дослідження останніх років показали, що крім іон-транспортуючої, ПМКА здатна виконувати сигнальну функцію. Так, доведені взаємодії ПМКА з PDZ-вмісними білками (зокрема, С-кінцевий домен формує контакти з нейрональною NO-синтазою (nNOS) і Ca/кальмодулін-залежною сериною протеїнкіназою) [16, 23]. Наприклад, у клітинах серцевого м'яза ПМКА (ізоформа ПМКА 4b) разом з α -1 синтрофіном і nNOS формують тріадний комплекс, таким чином, що перші два білки синергістично спричиняють інгібування синтезу оксиду азоту [36]. Інгібування nNOS кальцієвою помпою кардіоміоцитів головним чином пов'язане із їх безпосередньою міжмолекулярною взаємодією. Важливо, що це інгібування знімається блокуванням ПМКА [9]. Окремі ділянки каталітичного домену ПМКА контактують із Ca^{2+} -залежною фосфатазою кальцієвтрином і ендотеліальною NO-синтазою (eNOS). Таким чином створюються передумови як для передавання внутрішньоклітинного сигналу від позаклітинної частини ПМКА, так і для зворотної модуляції функціонування самої Ca^{2+} -помпи.

Взаємодія ПМКА і NOS має фізіологічно-значущі наслідки. Наприклад, відомо, що підвищення рівня експресії ізоформи ПМКА4b у гладеньких м'язах аорти призводить до посилення скорочень унаслідок пригнічення синтезу NO [29].

Головний масив інформації щодо ролі ПМКА у функціонуванні різних типів клітин і тканин одержано із використанням нокаутних за різними ізоформами Ca^{2+} -помпи тварин [3, 17]. Так, на моделі мишей із порушенням експресії ПМКА4 було

доведено, що цей ензим забезпечує близько 65–70% швидкості розслаблення скоротливих відповідей (тоді як на роботу $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -обмінника припадає 30%) [17, 22]. Нульова мутація за ПМКА1 є летальною, а в гладеньких м'язах гетерозиготних мишей виявляється порушення регуляції Ca^{2+} -гомеостазу; тварини з нокаутом ПМКА2 мають множинні порушення з боку нервової системи [33].

На сьогодні відомо дві групи інгібіторів Ca^{2+} -помпи плазматичної мембрани: по-перше, це речовини, які не мають селективності щодо цього ензиму (ортованадат, карбоксиеозин та іони лантану) та поряд з ПМКА інгібують інші іон-транспортні системи; по-друге, це калоксини – селективні інгібітори ПМКА пептидної природи, які зв'язуються з позаклітинною частиною молекули Ca^{2+} -помпи, унеможливаючи її конформаційні зміни. Калоксини мають відносно невелику спорідненість до ПМКА (константа інгібування ензиму з тіней еритроцитів людини для різних калоксинів варіює від 86 до 1000 мкМ), тому залишається актуальним питання розробки та дослідження сполук-селективних інгібіторів Ca^{2+} -помпи плазматичної мембрани [25, 31].

Перспективними сполуками, які здатні спрямовано і вибірково змінювати активність ензимів та іон-транспортуючих систем клітини, є каліксарени – циклічні олігомери фенолу, функціоналізовані різними хімічними групами [28]. Нещодавні дослідження виявили, що окремі каліксарени мають здатність селективно, не зачіпаючи інші системи активного транспорту іонів через плазматичну мембрану, пригнічувати роботу ПМКА. Найбільш перспективною є сполука з шифром C-90, яка належить до калікс[4]аренів, селективно та з високою спорідненістю інгібує Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТФазу плазматичної мембрани міоцитів матки свиней ($I_{0,5}=34,6\pm 6,4$ мкМ) [2]. Тому важливим було перевірити ефективність дії каліксарену C-90 на багатоклітинних препаратах гладеньких м'язів міометрія.

Метою роботи було провести дослідження закономірностей впливу каліксарену C-90 на спонтанні та викликані скорочення поздовжніх гладеньких м'язів матки щурів.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Експерименти проводили на самках нелінійних білих щурів популяції віварію ННЦ «Інститут біології» Київського національного університету імені Тараса Шевченка. Усі маніпуляції з тваринами проводили згідно з Міжнародною конвенцією роботи з тваринами та Законом України “Про захист тварин від жорстокого поводження”. Умертвіння щурів здійснювали введенням летальної дози пропофолу (Sigma, США), яка становила 0,1 мл 100% препарату.

Скоротливу активність досліджували тензометрично в ізометричному режимі на препаратах поздовжніх м'язів рогів матки (середній розмір – 2×10 мм). Гладеньком'язові смужки (ГМС) розміщували в робочій камері об'ємом 2 мл з проточним розчином Кребса (швидкість протікання – 5 мл/хв), термостатованій при 37°C ; препаратам надавали пасивний натяг (5–10 мН) і залишали на 1 годину. Реєстрацію сигналів проводили, використовуючи електричний потенціометр Н339.

Для дослідів використовували розчин Кребса (мМ): 120,4 NaCl; 5,9 KCl; 15,5 NaHCO_3 ; 1,2 NaH_2PO_4 ; 1,2 MgCl_2 ; 2,5 CaCl_2 ; 11,5 глюкоза; рН розчину становив 7,4. Гіперкалієвий розчин, який містив іони K^+ у концентрації 80 мМ, готували шляхом ізотонічної заміни у вихідному розчині Кребса необхідної частини іонів Na^+ на еквімолярну кількість іонів K^+ . Під час використання окситоцину (виробництва

ЗАТ «Біолек», Харків), його розчиняли в нормальному розчині Кребса до концентрації 0,1 МО.

У роботі було використано неселективний інгібітор NO-синтаз L-NAME (N^G -Nitro-L-arginine methyl ester, виробництва Sigma, США), донор оксиду азоту нітропрусид натрію (Sigma-Aldrich, США).

Каліксарен С-90 було синтезовано в Інституті органічної хімії НАН України (відділ хімії фосфоранів) під керівництвом чл.-кор. НАНУ, професора В.І. Кальченка. У незалежних дослідженнях, виконаних у відділі біохімії м'язів ІБХ НАНУ О.В. Бевзою із використанням методу ММ2 (molecular mechanics 2), було продемонстровано, що молекула цього каліксарену перебуває у стані конформації "конус", а фенольні фрагменти бічних залишків локалізовані дистально щодо трифторметильних залишків. Ці залишки локалізовані майже ортогонально щодо площини макроциклу і простороно є доступними для міжмолекулярних взаємодій.

Каліксарен С-90 попередньо розчиняли в ДМСО і в концентрації 10 мкМ вносили в розчин Кребса (остаточно аліквота розчину органічного розчинника становила 1% від загального об'єму цього розчину) за 30 хв до вивчення механічної активності препаратів. Контрольні скорочення досліджували в розчинах, які містили 1% ДМСО.

Аналіз кінетичних властивостей скорочень здійснювали відповідно до методу, описаного раніше [6]. У процесі аналізу механокінетичних кривих здійснювали лінеаризацію фаз скорочення і розслаблення в координатах $\{ \ln[(f_m - f)/f]; \ln t \}$, де f – миттєва (в момент часу t) сила, f_m – максимальна сила, τ – характеристичний час (чисельно дорівнює часу, в який спостерігається напівмаксимальне значення сили $1/2 f_m$), n – логарифмічний коефіцієнт крутизни механокінетичної кривої. Час, у який досягається f_m , приймали початковою точкою відліку фази розслаблення $t = 0$; поточному значенню часу t відповідало значення миттєвої сили f . За фази розслаблення брали фрагмент скоротливої відповіді після досягнення нею f_m , а фазою скорочення вважали частину механограми від початку зміни сили до f_m .

Даний метод дає змогу розраховувати незалежні від f_m показники – нормовані на значення f_m максимальні швидкості розслаблення та скорочення (враховуючи відсутність принципових відмінностей між характером перебігу фаз скоротливої відповіді м'язів) V_n :

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

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

Експериментальні дані обробляли методами варіаційної статистики з використанням програми OriginPro 8. Перевірку вибірок на їхню приналежність до нормально розподілених генеральних сукупностей здійснювали за допомогою критерію Шапіро-Вілка. Для визначення вірогідних відмінностей між середніми величинами вибірок використовували t -критерій Ст'юдента. В усіх випадках достовірними

вважали результати за умови значення ймовірності p , менше 5% ($p < 0,05$). Результати представлені як середнє арифметичне \pm стандартна похибка середнього ($M \pm m$) і вказано кількість дослідів n .

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ І ЇХНЕ ОБГОВОРЕННЯ

Аналіз спонтанних скорочень гладеньких м'язів міометрія за наявності каліксарену С-90. Початково було досліджено ефект наявності каліксарену С-90 (10 мкМ) на базальний тонус і спонтанну скорочувальну активність поздовжніх гладеньких м'язів матки щурів. Показано, що додавання каліксарену С-90 в омиваючий ГМС розчин спричиняло підвищення базального тонусу препаратів. В окремих випадках спостерігалася початкова активація скоротливої активності, яка за деякий час переходила в тонічне скорочення (рис. 1, А), або мало місце зниження сили скорочень при підвищеному тонусі (рис. 1, Б). Загалом, за дії С-90 амплітуда скорочень знижувалась у середньому на $22,1 \pm 4,7\%$ ($p < 0,05$, $n=9$), тоді як їх частота, хоча і мала тенденції до збільшення, не зазнавала статистично вірогідних змін.

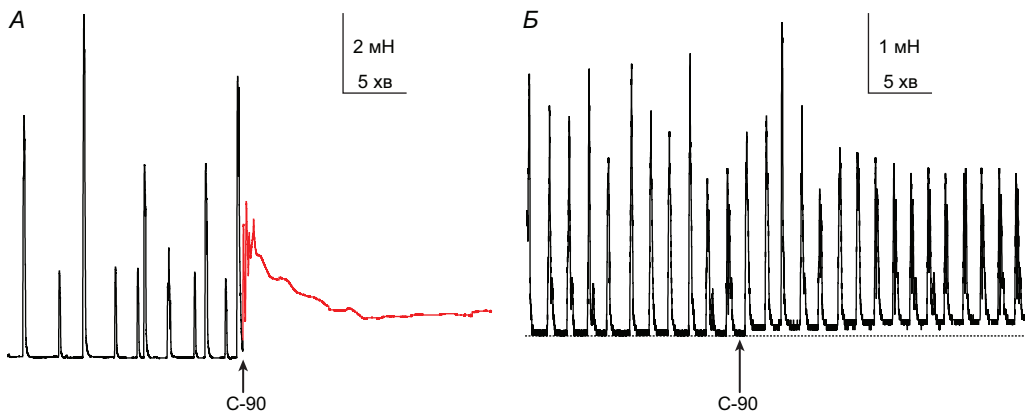


Рис. 1. Вплив каліксарену С-90 (10 мкМ) на спонтанні скорочення та базальне напруження гладеньком'язових препаратів матки щура (А і Б – типові ефекти)

Fig. 1. Effect of calixarene C-90 (10 μ M) on spontaneous contraction and basal tension of rat uterine smooth muscle preparations (A and B – typical effects)

Варто відзначити закономірності зміни характеру розвитку окремих спонтанних скорочень гладеньких м'язів у присутності каліксарену С-90: візуально не змінювалася швидкість наростання сили скорочення, але уповільнювалося розслаблення (рис. 2, А). Розрахунки кінетичних параметрів скорочень відповідно до методу [6] підтвердили, що за наявності каліксарену С-90 не відбувається змін у кінетиці наростання сили: нормована максимальна швидкість фази скорочення V_{nc} не виявляла статистично значущих змін порівняно з контролем (відповідно $14,1 \pm 1,4$ і $15,4 \pm 1,7$ $хв^{-1}$, $n=7$, $p > 0,05$). На противагу цьому, нормована максимальна швидкість фази розслаблення спонтанних скорочень V_{nr} у разі наявності в омиваючому розчині каліксарену С-90 вірогідно знижувалась у середньому на 27% (з $8,5 \pm 0,8$ $хв^{-1}$ у контролі до $6,2 \pm 0,6$ $хв^{-1}$ при дії С-90; $n=7$, $p < 0,05$) (рис. 2, Б).

Можна міркувати про механізми, які залучені у реалізації ефекту каліксарену С-90 на спонтанну скоротливу активність гладеньких м'язів міометрія. Як згадувалося

вище, для цієї сполуки доведена вибіркова (порівняно з іншими системами активного іонного транспорту) здатність інгібувати Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТФазу плазматичної мембрани та, водночас, активувати ензиматичну активність білків скоротливого апарату (так, використана нами концентрація С-90 10 мкМ спричиняє підвищення активності у середньому вдвічі) [2]. Що стосується останнього ефекту, то, ймовірно, наші експерименти на багатоклітинних препаратах гладеньких м'язів вказують на те, що під час дії на інтактні клітини каліксарен С-90 не здатен проникати крізь плазматичну мембрану. Базуючись на даних біохімічного титрування препаратів плазматичних мембран міометрія свині, за використаної нами концентрації відповідна ензиматична активність мала знизитись у середньому на третину [2]. Отже, зміна скоротливої функції гладеньких м'язів міометрія під впливом каліксарену С-90 може бути пов'язана зі здатністю цієї сполуки інгібувати ПМКА.

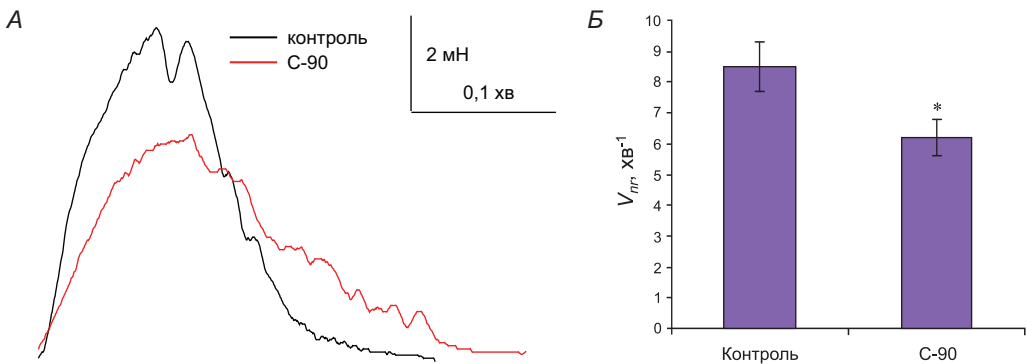


Рис. 2. Вплив каліксарену С-90 (10 мкМ) на кінетику спонтанних скорочень міометрія щурів: А – зіставлення типових скорочень у контролі та за дії каліксарену С-90; Б – усереднені значення нормованих максимальних швидкостей фази розслаблення ($M \pm m$, $n=7$). Механокінетичні параметри розраховували із використанням методу [6]

Fig. 2. Effect of calixarene C-90 (10 μM) on the kinetics of spontaneous contractions in rat myometrium: А – comparison of typical contraction in control and under the action of calixarene C-90; Б – mean values for normalized maximal velocity of phase relaxation ($M \pm m$, $n = 7$). Mechanokinetic parameters were calculated using the method [6]

Одночасно варто брати до уваги дані, одержані на моделях із порушеною експресією окремих ізоформ ПМКА [17, 20, 21]. Як показано у випадку використання моделей нокауту (миші з ПМКА4^{-/-}, ПМКА1^{+/-} та ПМКА1^{+/-}/4^{-/-}), амплітуда і кінетичні характеристики викликаних скорочень гладеньких м'язів сечового міхура зазнавали значних змін у разі порушення експресії окремих ізоформ Ca^{2+} -помпи плазматичної мембрани [20]. Аналогічно, інгібування калоксинами Ca^{2+} -помпи плазматичної мембрани супроводжувались ендотелій-залежним пригніченням скорочень гладеньких м'язів судин [26]. Таким чином, одержане у разі передінкубації гладеньком'язових препаратів міометрія щурів з каліксареном С-90 вірогідне зниження нормованої максимальної швидкості розслаблення V_{nr} може бути пов'язане саме зі спрямованим інгібуванням Ca^{2+} -помпи плазматичної мембрани.

Викачування Ca^{2+} поза межі ГМК здійснюється двома шляхами: крім ПМКА, тут залучений також $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -обмінник (НКО), однак порівняно з ПМКА, НКО має відносно низьку афінність до Ca^{2+} (K_M для Ca^{2+} становить 0,2–0,5 мкМ та 1–10 мкМ відповідно) [4, 24]. До того ж у міометрії співвідношення внеску ПМКА і НКО у транс-

портувальний процес становить у середньому 70 і 30% відповідно [17, 22]. Тож, ймовірно, підвищення базального тонузу гладеньком'язових препаратів під впливом каліксарену C-90 (рис. 1, А і Б) пов'язане зі зростанням внутрішньоклітинної концентрації іонів Ca^{2+} у цитоплазмі ГМК.

Також у сумарний процес зниження $[\text{Ca}^{2+}]$, після збудження ГМК роблять внесок внутрішньоклітинні депо: частина іонів Ca^{2+} закачується, зокрема, до саркоплазматичного ретикулуму (СР) за рахунок роботи SERCA [24]. Ймовірно, що за умови часткового блокування ПМКА каліксареном C-90 має відбуватися збільшення закачування Ca^{2+} у СР; таке підвищене секвестрування катіона має посилювати його спрямований транспорт у примембранну ділянку для подальшого викиду транспортерами плазматичної мембрани [24]. Тобто за дії каліксарену C-90 при зниженні кількості функціональних молекул ПМКА має локально зростати примембранна концентрація Ca^{2+} , що може спричинити активацію Ca^{2+} -активованих іонних каналів. Відомо, що у міометрії щурів експресуються (і відіграють значну роль у регуляції збудливості) Ca^{2+} -активовані K^+ канали, принаймні, малої та великої провідності (SK_{Ca} і BK_{Ca} відповідно) [5, 18, 38]. Тож ми можемо припустити посилення виходу K^+ через SK_{Ca} та BK_{Ca} за дії каліксарену C-90, внаслідок якого, принаймні частково, може виникати пригнічення скорочувальної активності під дією C-90.

Аналіз участі NO в ефектах каліксарену C-90 на спонтанну скорочувальну активність гладеньких м'язів міометрія. Як уже зазначалось, крім іон-транспортувальної ролі, ПМКА залучена до формування кавеоларних сигнальних білкових комплексів, а численні дослідження в різних клітинних системах доводять, що функціонально здатні молекули ПМКА блокують роботу синтаз оксиду азоту (принаймні, конститутивних ізоформ NOS) [24, 30, 36]. Тому нами було здійснено перевірку припущення щодо можливого внеску NO у пригнічення амплітуди спонтанних скорочень гладеньких м'язів міометрія щурів у присутності каліксарену C-90. З цієї метою у роботі було використано неселективний інгібітор NO-синтаз L-NAME.

Інкубація гладеньком'язових препаратів міометрія за наявності L-NAME (20 хв, 100 мкМ) не викликала змін амплітуди їх спонтанних скорочень (рис. 3, А), однак спричиняла вірогідне зменшення нормованої максимальної швидкості фази розслаблення V_{nr} до $6,6 \pm 0,3 \text{ хв}^{-1}$ ($n=4$, $p<0,05$). На фоні блокування NO-синтаз (L-NAME, 100 мкМ) каліксарен C-90 (10 мкМ) не знижував амплітуду спонтанних скорочень (рис. 3, А). Розрахунок кінетичних параметрів показав, що одночасне пригнічення роботи NOS і ПМКА супроводжується поверненням швидкості фази розслаблення до контрольного рівня ($8,2 \pm 0,3 \text{ хв}^{-1}$; $n=4$, $p>0,05$) (рис. 3, Б).

Модуляція фази розслаблення (зменшення нормованої максимальної швидкості V_{nr}) спонтанних скорочень за наявності L-NAME може свідчити про ймовірну участь оксиду азоту в регуляції скоротливої активності гладеньких м'язів матки й узгоджується з даними інших дослідників [8]. Загалом, інформація щодо ролі NO у функціонуванні міометрія варіює: в окремих роботах показано пригнічення скоротливості міометрія донорами NO, тоді як в інших – їх ефекту не виявлено [13, 17]. Загалом, дослідники сходяться на думці, що інгібувальний ефект оксиду азоту в цих м'язах не опосередковується цГМФ, а забезпечується прямою модифікацією клітинних білків [1].

У зв'язку з цим у наступній серії експериментів нами було досліджено вплив NO на механокінетичні параметри спонтанних скорочень гладеньких м'язів міометрія

щурів. Було встановлено, що за умови наявності в омиваючому гладеньком'язові препарати розчині донора NO нітропрусиду натрію (НПН, 100 мкМ) спостерігається вірогідне зниження амплітуди (у середньому на $42,8 \pm 8,5\%$ порівняно з контролем) та частоти спонтанних скорочень (рис. 4, А). За цих умов під дією НПН нормована максимальна швидкість фази розслаблення V_{nr} зростала до $11,4 \pm 1,1$ хв⁻¹ ($n=5$, $p<0,05$) (рис. 4, Б).

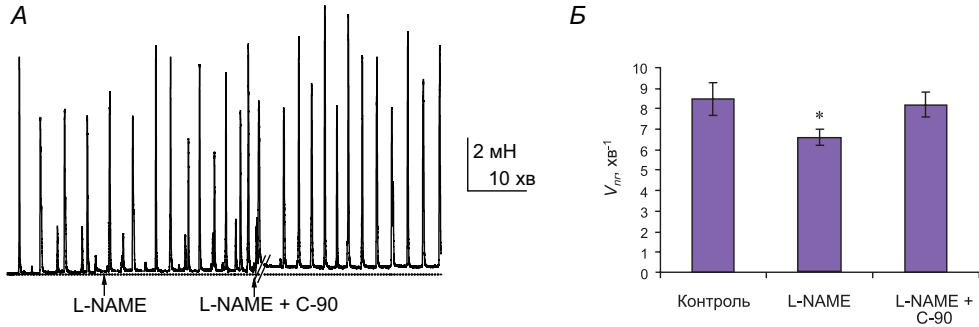


Рис. 3. Встановлення ролі синтезу NO в ефектах дії каліксарену C-90 (10 мкМ) на спонтанні скорочення міометрія щурів: А – порівняння типових скорочень у контролі та за умови попередньої інкубації за наявності неселективного блокатора NO-синтаз L-NAME (100 мкМ) дії; Б – усереднені значення нормованих максимальних швидкостей фази розслаблення в контролі, за наявності L-NAME та за сумісної дії L-NAME і C-90 ($M \pm m$, $n=7$).

Механокінетичні параметри розраховували із використанням методу [6]

Fig. 3. Estimation of the role NO synthesis in the effects of calixarene C-90 (10 μ M) on spontaneous contractions in rat myometrium: А – Comparison of typical contractions in control and pre-incubation with non-selective NO-synthase inhibitor L-NAME (100 μ M); Б – mean values for normalized maximal velocity of phase relaxation in control, in the presence of L-NAME, and under combined action of L-NAME and C-90 ($M \pm m$, $n = 7$).

Mechanokinetical parameters were calculated using the method [6]

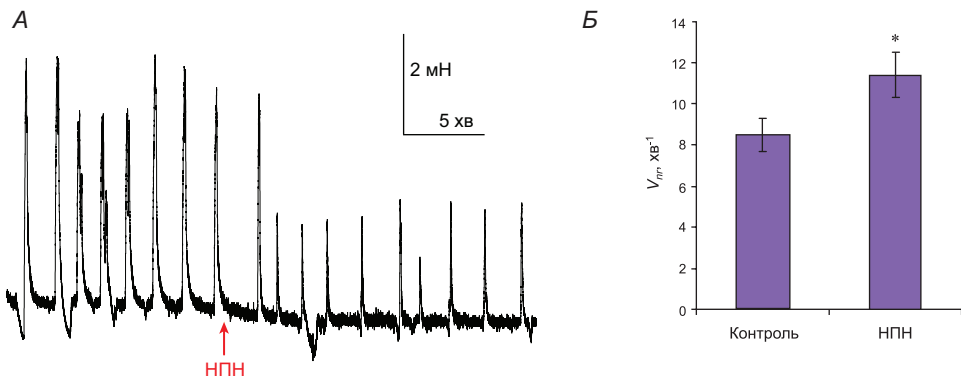


Рис. 4. Вплив донора NO нітропрусиду натрію (НПН, 100 мкМ) на спонтанні скорочення гладеньких м'язів міометрія щурів: А – типовий ефект; Б – усереднені нормовані максимальні швидкості фази розслаблення спонтанних скорочень (дані представлені як $M \pm m$, $n=5$).

Механокінетичні параметри розраховували із використанням методу [6]

Fig. 4. Effect of NO donor sodium nitroprusside (SNP, 100 μ M) on spontaneous contraction of smooth muscles in rat myometrium: А – typical effect; Б – mean value for normalized maximal velocity of phase relaxation of spontaneous contractions (data are presented as $M \pm m$, $n = 5$).

Mechanokinetical parameters were calculated using the method [6]

Аналіз викликаних K^+ -деполяризацією і окситоцином скорочень гладеньких м'язів міометрія за наявності каліксарену С-90. У роботі також було досліджено вплив каліксарену С-90 на викликані скорочення гладеньком'язових препаратів. Як стимулятор скоротливої активності було обрано гіперкалієвий розчин (головним індуктором скорочень є іони Ca^{2+} , які входять до міоцитів із позаклітинного середовища через потенціалкервані Ca^{2+} канали L-типу) і окситоцин (утеротонічний гормон, який активує рецептори у плазматичній мембрані міоцитів, спряжені з G_q -білками).

Як і у разі спонтанної активності, наявність в омиваючому розчині каліксарену С-90 (10 мкМ) супроводжувалася вірогідним пригніченням сили викликаних скорочень (рис. 5). Так, каліксарен С-90 однаковою мірою спричиняв зниження сили як агоніст-індукованих (окситоцин, 0,1 МО), так і викликаних деполяризацією плазматичної мембрани (гіперкалієвий розчин, 80 мМ) скорочень – на $25,7 \pm 5,5\%$ ($p < 0,05$, $n=6$) і $24,4 \pm 5,2\%$ ($p < 0,01$, $n=6$) відповідно. У обох випадках каліксарен С-90 не впливав на характер наростання сили скоротливих відповідей: нормовані максимальні швидкості фази скорочення залишались на рівні контрольних показників (у контролі та за дії С-90, відповідно $1,95 \pm 0,13$ і $2,18 \pm 0,35$, $p > 0,05$, $n=6$).

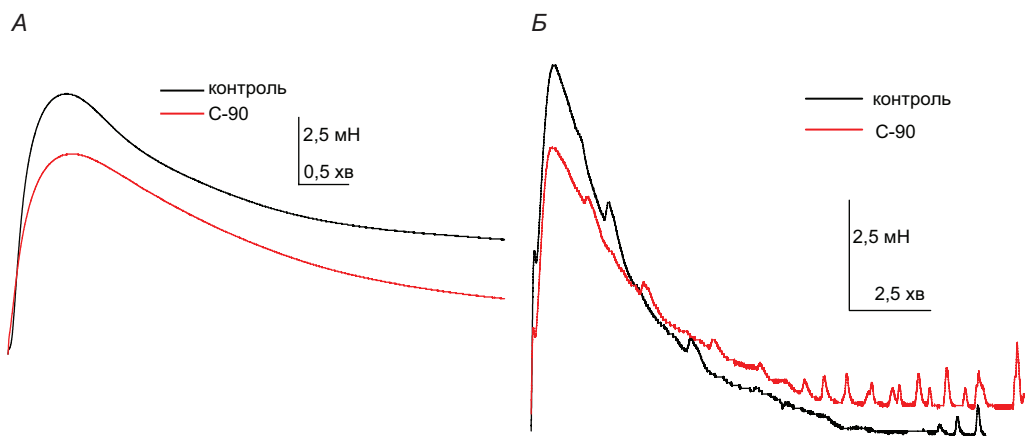


Рис. 5. Зміна кінетики скоротливих відповідей гладеньких м'язів міометрія щурів під дією каліксарену С-90 (10 мкМ): А – гіперкалієві скорочення (80 мМ); Б – окситоцин-викликані скорочення (0,1 МО)

Fig. 5. Change in the kinetics of smooth muscle contractile response of the myometrium of rats under the influence of calixarene С-90 (10 μ M): А – K^+ -contraction (80 mM); Б – oxytocin-caused contraction (0.1 IU)

В інгібування окситоцин- і K^+ -викликаних відповідей гладеньких м'язів міометрія під дією каліксарену С-90, ймовірно, можуть робити внесок декілька складників. По-перше, можливою є активація синтезу оксиду азоту, індукована блокуванням ПМКА. Також за умови підвищення концентрації у примембранній ділянці та поблизу саркоплазматичного ретикулуму ймовірними є активація Ca^{2+} -активованих K^+ -каналів і пригнічення депо-керваного входу Ca^+ внаслідок перевантаження СР.

Швидкість розслаблення гладеньком'язових препаратів була чутливою до дії С-90, однак вона зазнавала різноспрямованих змін залежно від характеру стимулювання скоротливих відповідей. Так, за наявності С-90 нормована максимальна

швидкість фази розслаблення (V_{nr}) окситоцин-викликаних скорочень вірогідно знижувалась у середньому на 19% (з $0,43 \pm 0,06$ хв⁻¹ у контролі до $0,35 \pm 0,04$ при дії С-90; $n=6$, $p<0,05$). За умови, коли скоротливі відповіді активувались гіперкалієвим розчином, каліксарен С-90 спричиняв зростання V_{nr} з $0,36 \pm 0,05$ до $0,43 \pm 0,06$ хв⁻¹ ($p<0,01$, $n=6$).

Ми можемо міркувати про механізми, які лежать в основі різноспрямованого впливу каліксарену С-90 на кінетику розслаблення K^+ - та окситоцин-викликаних скоротливих відповідей м'язових препаратів міометрія. Дані багатьох дослідників, у експериментах щодо блокування ПМКА із використанням неселективних інгібіторів ортованадату натрію і еозину [17, 22, 27, 31, 32], а також селективних інгібіторів калоксинів (тонкий кишечник і трахея [10], ацинарні клітини підшлункової залози [11]) вказують на те, що пригнічення роботи ПМКА супроводжується уповільненням фази зниження інтенсивності агоніст-викликаних Ca^{2+} -сигналів та скорочень. За зміною характеристичного часу затухання агоніст-активованих Ca^{2+} -транзєнтів було визначено внесок ПМКА у процеси зниження концентрації іонів кальцію після стимуляції гладеньких м'язів міометрія щурів на рівні близько 70% [17, 19, 32]; аналогічні дані щодо внеску ПМКА у викачування Ca^{2+} в міоцитах матки мишей було отримано під час дослідження ПМКА 4-нокаутних тварин [22]. Таким чином, індуковане С-90 уповільнення фази розслаблення (зменшення V_{nr}) окситоцин-викликаних скорочень, ймовірно, може бути пояснене безпосередньо пригніченням роботи Ca^{2+} -помпи плазматичної мембрани під дією С-90.

Відомо, що головним джерелом, яке спричиняє надходження Ca^{2+} до гладеньком'язових клітин у разі застосування гіперкалієвого розчину, є активовані внаслідок деполаризації плазматичної мембрани потенціалкеровані Ca^{2+} -канали. За цих умов (на противагу кінетиці фази релаксації спонтанних і викликаних окситоцином скорочень) аплікація каліксарену С-90 супроводжувалася пришвидшенням розслаблення скоротливих відповідей гладеньких м'язів міометрія. Гіпотетичним механізмом такої реакції може бути безпосереднє інгібування Ca^{2+} -каналів, яке спричиняється рядом факторів, зокрема підвищенням внутрішньоклітинної концентрації цих іонів (міометрій щурів) [36, 37], та, можливо, оксидом азоту (але щодо модифікації Ca^{2+} -каналів NO є достатньо різноспрямовані дані [1, 35]).

Закономірності впливу каліксарену С-90 на викликані скорочення гладеньких м'язів міометрія щурів в умовах блокування NO-синтаз. Оскільки каліксарен-індуковане пригнічення сили спонтанних скорочень виявилось чутливим до функціонування NO-синтаз, у роботі було проведено аналіз впливу інгібування синтезу оксиду азоту також і на викликані скорочення міометрія щурів за дії С-90.

Попередня інкубація м'язових смужок за наявності L-NAME (100 мкМ) не змінювала амплітуду окситоцин-викликаних скорочень. Ці результати узгоджуються з даними M. Chaud і колег [8], які показали, що максимальна сила окситоцинових, на відміну від брадикінін-викликаних, скорочень гладеньких м'язів міометрія щурів нечутлива до блокування синтезу оксиду азоту.

За наявності L-NAME вірогідно зростала нормована максимальна швидкість фази скорочення V_{nc} (рис. 6, А). Нормована максимальна швидкість фази розслаблення V_{nr} за даних умов також мала тенденції до збільшення, які, однак, не підтверджувалися статистичним аналізом.

Каліксарен C-90 (10 мкМ) на фоні дії L-NAME не викликав пригнічення максимальної сили окситоцин-викликаних скорочень, але спричиняв відносні зміни кінетичних параметрів скоротливих відповідей. У випадку фази скорочення максимальна швидкість V_{nc} залишалася підвищеною відносно контролю (але порівняно з показником за наявності лише L-NAME мала тенденції до зниження) (рис. 6, А). У цей же час, при блокуванні NO-синтази каліксарен C-90 викликав зниження V_{nr} , яке, втім, було такого ж порядку (близько 25%), як і у випадку застосування лише C-90 (рис. 6, Б).

Варто також відзначити, що за умови попередньої інкубації гладеньком'язових препаратів міометрія за наявності L-NAME каліксарен C-90 не змінював амплітуду, але спричиняв уповільнення фази релаксації (зниження V_{nr}) K^+ -індукованих скорочень. Такі результати свідчать на користь гіпотези щодо активації синтезу NO під дією блокування кальцієвої помпи плазматичної мембрани C-90.

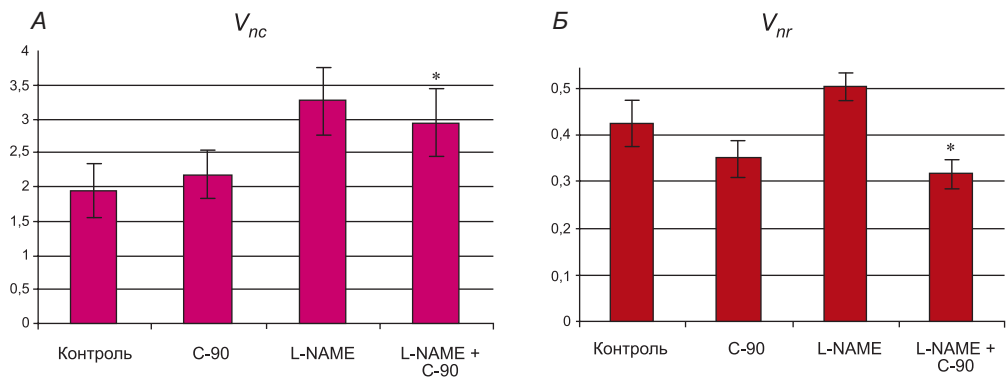


Рис. 6. Нормовані максимальні швидкості фаз скорочення V_{nc} (А) та розслаблення V_{nr} (Б) окситоцин-викликаних (0,1 МО) скорочень у контролі, за умови дії окремо каліксарену C-90 (10 мкМ), L-NAME (0,1 мМ), а також за сумісної дії C-90 і L-NAME. Дані представлені як $M \pm m$ ($n=4-6$). Механокінетичні параметри розраховували із використанням методу [6]

Fig. 6. Normalized maximal velocity of contraction V_{nc} (A) and relaxation V_{nr} (B) of oxytocin-induced (0.1 IU) contractions in control, and under the action of separate calixarene C-90 (10 μ M), L-NAME (100 μ M), as well as the combined action of the C-90 and L-NAME. Data are presented as $M \pm m$ ($n = 4-6$). Mechanokinetic parameters were calculated using the method [6]

Таким чином, блокування синтезу NO призводило до усунення інгібування як спонтанних, так і викликаних скорочень гладеньких м'язів міометрія під дією каліксарену C-90.

Загалом, ґрунтуючись на одержаних нами результатах і даних літератури, можна передбачити, що зниження сили скорочень гладеньких м'язів міометрія під дією каліксарену C-90 відбувається за NO-залежним шляхом, тоді як уповільнення розслаблення (зменшення нормованої максимальної швидкості розслаблення V_{nr}) спричиняється саме пригніченням транспортальної функції ПМКА.

ВИСНОВКИ

Каліксарен С-90 (10 мкМ) змінює спонтанну скоротливу активність, спричиняючи вірогідне зменшення амплітуди і не впливаючи на частоту, при цьому уповільнюючи процес розслаблення окремих скорочень (спричиняє зменшення параметра V_{nr}). На фоні дії неселективного інгібітора NO-синтаз L-NAME (100 мкМ) каліксарен С-90 не змінює амплітуду спонтанних скорочень, а також кінетику фази розслаблення.

Каліксарен С-90 однаковою мірою спричиняє зниження сили як окситоцинових (0,1 МО), так і K^+ -викликаних (80 мМ) скорочень, не впливаючи на характер наростання сили скоротливих відповідей. Швидкість розслаблення гладеньком'язових препаратів за дії С-90 зазнає різноспрямованих змін залежно від характеру стимулювання скоротливих відповідей: у разі окситоцинових скорочень знижується, а для K^+ -викликаних скорочень – зростає.

На фоні дії L-NAME каліксарен С-90 нездатен до пригнічення максимальної сили K^+ - і окситоцин-викликаних скорочень, але спричиняє відносні зміни кінетичних параметрів скоротливих відповідей (зниження V_{nr}).

Таким чином, блокування синтезу NO призводить до усунення інгібування як спонтанних, так і викликаних скорочень гладеньких м'язів міометрія під дією каліксарену С-90.

Автори висловлюють щире подяку член-кореспонденту НАН України, професорові В.І. Кальченку за люб'язно наданий для досліджень каліксарен С-90.

1. Данилович Ю.В. Оксид азоту як регулятор внутрішньоклітинного кальцієвого гомеостазу в міоцитах матки. **Укр. біохім. журнал**, 2012; 84(3): 5–25.
2. Лабинцева Р.Д., Слінченко Н.М., Векліч Т.О. та ін. Порівняльне дослідження впливу каліксаренів на Mg^{2+} -залежні АТФ-гідролазні ферментативні системи гладеньком'язових клітин матки. **Укр. біохім. журнал**, 2007; 79(3): 44–54.
3. Brian O., Paul R.J. Ca^{2+} clearance and contractility in vascular smooth muscle: evidence from gene-altered murine models. **J. Mol. Cell. Cardiol**, 2008; 45(3): 347–362.
4. Brini M., Carafoli E. The plasma membrane Ca^{2+} ATPase and the plasma membrane sodium calcium exchanger cooperate in the regulation of cell calcium. **Cold Spring Harb. Perspect. Biol**, 2011: 1–15.
5. Brown A., Cornwell T., Korniyenko I. et al. Myometrial expression of small conductance Ca^{2+} -activated K^+ channels depresses phasic uterine contraction. **Am. J. Physiol. Cell. Physiol**, 2007; 292: C832–C840.
6. Burdyga Th.V., Kosterin S.A. Kinetic analysis of smooth muscle relaxation. **Gen. Physiol. Biophys**, 1991; 10: 589–598.
7. Carrera C., Proverbio T., Marin R., Proverbio F. Ca-ATPase of human myometrium plasma membranes. **Physiol. Res**, 2000; 49: 331–338.
8. Chaud M., Franchi A.M., Rettori V. et al. Nitric oxide in the contractile action of bradykinin, oxytocin, and prostaglandin $F_{2\alpha}$ in the estrogenized rat uterus. **Proc. Natl. Acad. Sci**, 1997; 94: 11049–11054.
9. Chaudhary J., Walia M., Matharu J. et al. Caloxin: a novel plasma membrane Ca^{2+} pump inhibitor. **Am. J. Physiol. (Cell Physiol.)**, 2001; 280: C1027–C1030.
10. El-Yazbi A.F., Cho W. J., Schulz R., Daniel E.E. Calcium extrusion by plasma membrane calcium pump is impaired in caveolin-1knockout mouse small intestine. **Eur. J. Pharmacol**, 2008; 591: 80–87.
11. Ferdek P.E., Gerasimenko J.V., Peng S. et al. A Novel Role for Bcl-2 in regulation of cellular calcium extrusion. **Cur. Biol**, 2012; 22(13): 1241–1246.

12. Grover A.K., Khan I. Calcium pump isoforms: diversity, selectivity and plasticity. **Cell Calcium**, 1992; 13: 9–17.
13. Hennan J.K., Diamond J. Evidence that spontaneous contractile activity in the rat myometrium is not inhibited by NO-mediated increases in tissue levels of cyclic GMP. **Br. J. Pharm.**, 1998; 123: 959–967.
14. Hering S., Berjukow S., Sokolov S. et al. Molecular determinants of inactivation in voltage-gated Ca^{2+} channels. **J. Physiol**, 2000; 528(2): 237–249.
15. Hoffmann P., Stanke-Labesque F., Fanchin R. et al. Effects of L-arginine and sodium nitroprusside on the spontaneous contractility of human non-pregnant uterus. **Hum. Reprod**, 2003; 18(1): 148–151.
16. Holton M.L., Wang W., Emerson M. et al. Plasma membrane calcium ATPase proteins as novel regulators of signal transduction pathways. **World J. Biol. Chem**, 2010; 1(6): 201–208.
17. Ishida Y., Paul R.J. Ca^{2+} clearance in smooth muscle: lessons from gene-altered mice. **J. Smooth Muscle Res**, 2005; 41(5): 235–245.
18. Khan R.N., Matharoo-Ball B., Arulkumaran S., Ashford M.L.J. Potassium channels in the human myometrium. **Exp. Physiol**, 2001; 86(2): 255–264.
19. Kosterin S.A. Mechanisms of Ca^{2+} transport in myometrium / Chapter 6. Eds. By R.E. Garfield, T.N. **Tabb. CRC Press, Boca Raton, Ann Arbor**, London, Tokyo. 1994.
20. Liu L., Ishida Y., Okunade G. et al. Distinct roles of PMCA isoforms in Ca^{2+} homeostasis of bladder smooth muscle: evidence from PMCA gene-ablated mice. **Am. J. Physiol. Cell. Physiol**, 2007; 292: C423–C431.
21. Liu L., Ishida Y., Okunade G. et al. Role of plasma membrane Ca^{2+} -ATPase in contraction-relaxation processes of the bladder: evidence from PMCA gene-ablated mice. **Am. J. Physiol. Cell Physiol**, 2006; 290: C1239–C1247.
22. Matthew A., Shmygol A., Wray S. Ca^{2+} entry, efflux and release in smooth muscle. **Biol. Res**, 2004; 37: 617–624.
23. Mohamed T.M.A., Oceandy D., Zi M. et al. Plasma membrane calcium pump (PMCA4)-neuronal nitric-oxide synthase complex regulates cardiac contractility through modulation of a compartmentalized cyclic nucleotide microdomain. **J. Biol. Chem**, 2011; 286(48): 41520–41529.
24. Muscle. Fundamental biology and mechanism of disease / Ch. 86: Calcium homeostasis and signaling in smooth muscle. **Elsevier**, 2012, V.II: 1155–1173.
25. Pande J., Grover A.K. Plasma membrane calcium pumps in smooth muscle: from fictional molecules to novel inhibitors. **Can. J. Physiol. Pharmacol**, 2005; 83: 743–754.
26. Pande J., Szweczyk M.M., Grover A.K. Allosteric inhibitors of plasma membrane Ca^{2+} pumps: Invention and applications of caloxins. **World. J. Biol. Chem**, 2011; 2(3): 39–47.
27. Pritchard T.J., Bowman P.S., Jefferson A. et al. $\text{Na}^{+}\text{-K}^{+}$ -ATPase and Ca^{2+} clearance proteins in smooth muscle: a functional unit. **Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol**, 2010; 299: H548–H556.
28. Rodik R.V., Boyko V.I., Kalchenko V.I. Calixarenes in bio-medical researches. **Curr. Med. Chem**, 2009; 16(13): 1630–1655.
29. Schuh K., Quaschnig T., Knauer S. et al. Regulation of vascular tone in animals overexpressing the sarcolemmal calcium pump. **J. Biol. Chem**, 2003; 278: 41246–41252.
30. Schuh K., Uldrijan S., Telkamp M. et al. The plasmamembrane calmodulin-dependent calcium pump: a major regulator of nitric oxide synthase I. **J. Cell Biol**, 2001; 155(2): 201–205.
31. Shmigol A., Eisner D.A., Wray S. Carboxyeosin decreases the rate of decay of the $[\text{Ca}^{2+}]_i$ transient in uterine smooth muscle cells isolated from pregnant rats. **Eur. J. Physiol**, 1998; 437: 158–160.
32. Shmigol A. V., Eisner D. A., Wray S. The role of the sarcoplasmic reticulum as a Ca^{2+} sink in rat uterine smooth muscle cells. **J. Physiol**, 1999; 520(1): 153–163.
33. Strehler E.E., Filoteo A.G., Penniston J.T., Caride A.J. Plasma membrane Ca^{2+} -pumps: structural diversity as basis for functional versatility. **Biochem. Soc. Trans**, 2007; 35(5): 919–922.

34. Strehler E.E., Zacharias D.A. Role of alternative splicing in generating isoform diversity among plasma membrane calcium pumps. **Physiol. Rev.**, 2001; 81(1): 21–50.
35. Summers B.A., Overholt J.L., Prabhakar N.R. Nitric oxide inhibits L-type Ca^{2+} current in glomus cells of the rabbit carotid body via a cGMP-independent mechanism. **J. Neurophysiol.**, 1999; 81: 1449–1457.
36. Williams J.C., Armesilla A.L., Mohamed T.M.A. et al. The sarcolemmal calcium pump, α -1 syntrophin, and neuronal nitric-oxide synthase are parts of a macromolecular protein complex. **J. Biol. Chem.**, 2011; 281(33): 23341–23348.
37. Wray S., Burdyga Th., Noble K. Calcium signalling in smooth muscle. **Cell Calcium**, 2005; 38: 397–407.
38. Wray S., Jones K., Kupittayanant S. et al. Calcium signaling and uterine contractility. **J. Soc. Gynecol. Investig.**, 2003; 10(5): 252–264.
39. Zuhlke R. D., Reuter H. Ca^{2+} -sensitive inactivation of L-type Ca^{2+} channels depends on multiple cytoplasmic amino acid sequences of the α_{1C} subunit. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, 1998; 95: 3287–3294.

INFLUENCE OF CALIXARENE C-90 ON CONTRACTILE ACTIVITY OF RAT MYOMETRIUM SMOOTH MUSCLES

O. V. Tsybalyuk¹, S. O. Kosterin²

¹Kyiv National Taras Shevchenko University, 64/13, Volodymyrska St., Kyiv 01601, Ukraine
e-mail: otsimbal@univ.kiev.ua

²Palladin Institute of Biochemistry, NAS of Ukraine, 9, Leontovych St., Kyiv 01601, Ukraine
e-mail: kinet@biochem.kiev.ua

It is known that calix[4]arene with cipher C-90 selectively and with high affinity inhibits Ca^{2+} , Mg^{2+} -ATPase of smooth muscle cells plasma membrane preparations. The work was devoted to investigation of the influence of calixarene C-90 (10 μM) on spontaneous and induced (high-potassium solution and oxytocin) contractions of rat uterus longitudinal smooth muscles. Contractile activity was studied tensometrically in the isometric mode, analysis of the kinetic properties of contractions was performed by the calculation of the normalized maximal velocity of contraction (V_{nc}) and relaxation (V_{nr}) phases.

Calixarene C-90 changed the spontaneous contractile activity, causing a decrease in amplitude and has no significant effect on the frequency, while slowing down of the relaxation phase of individual contractions (decreasing parameter V_{nr}) occurred. In the presence of non-selective NO-synthase inhibitor L-NAME (100 μM), calixarene C-90 did not cause a reduction of the amplitude of spontaneous contractions and the speed of relaxation phase returned to the control level.

Furthermore, calixarene C-90 was equally contributing factor to reduced force of both oxytocin-induced (0.1 IU) and K^{+} -induced (80 mM) contractions without affecting the nature of the increase in contractile force responses (normalized maximal velocity of contraction phase stayed at control level). The relaxation velocity of caused contractions received opposite changes depending on the nature of the contractile stimulation: in case of oxytocin-evoked contractions – decreased, while for K^{+} -induced contractions – increased.

In the presence of L-NAME calixarene C-90 did not cause inhibition of the maximal force K^{+} - and oxytocin-induced contractions, but evoked changes in the kinetical para-

meters of contractile responses (decrease V_{nr}). Thus, blocking of NO synthesis resulted in the removal of inhibiting both spontaneous and evoked contractions of smooth muscle myometrium under the influence of calixarene C-90.

These results suggest that inhibition force of uterus smooth muscle contractions under the influence of calixarene C-90 is by NO-dependent way, whereas slow relaxation (decrease in normalized maximal velocity V_{nr}) is caused by the inhibition of Ca^{2+} -transport function of the plasma membrane calcium pump.

Keywords: smooth muscle, uterus, contraction, kinetical parameters, calixarene C-90, plasma membrane calcium pump, nitric oxide.

ВЛИЯНИЕ КАЛІКСАРЕНА С-90 НА СОКРАТИТЕЛЬНУЮ АКТИВНОСТЬ ГЛАДКИХ МЫШЦ МИОМЕТРИЯ КРЫС

О. В. Цимбалюк¹, С. О. Костерин²

¹Киевский национальный университет имени Тараса Шевченко
ул. Владимирская, 64/13, Киев 01601, Украина
e-mail: otsimbal@univ.kiev.ua

²Институт биохимии им. О.В. Палладина НАН Украины
ул. Леонтовича, 9, Киев 01601, Украина
e-mail: kinet@biochem.kiev.ua

Известно, что каликс[4]арен с шифром С-90 селективно и с высоким сродством способен ингибировать Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТФазу (кальциевый насос) препаратов плазматической мембраны гладкомышечных клеток. Поэтому в работе было проведено исследование закономерностей влияния каликсарена С-90 (10 мкМ) на спонтанные и вызванные (гиперкалиевым раствором и окситоцином) сокращения продольных гладких мышц матки крыс. Сократительную активность исследовали тензометрически в изометрическом режиме, анализ кинетических свойств сокращений осуществляли с расчетом нормированных максимальных скоростей отдельно фаз сокращения (V_{nc}) и расслабления (V_{nr}).

Каликсарен С-90 изменял спонтанную сократительную активность, вызывая достоверное уменьшение амплитуды и не влияя на частоту, при этом имело место замедление фазы расслабления отдельных сокращений (уменьшение параметра V_{nr}). На фоне действия неселективного ингибитора NO-синтазы L-NAME (100 мкМ) каликсарен С-90 не вызывал снижения амплитуды спонтанных сокращений, а скорость фазы расслабления возвращалась к контрольному уровню.

Скорость расслабления вызванных сокращений гладкомышечных препаратов испытывала разнонаправленные изменения в зависимости от характера стимулирования сократительных ответов: в случае окситоциновых сокращений снижалась, а для K^+ -вызванных сокращений – возрастала.

На фоне действия L-NAME каликсарен С-90 не вызывал подавления максимальной силы K^+ - и окситоцин-индуцированных сокращений, но обуславливал относительные изменения кинетических параметров сократительных ответов (снижение V_{nr}). Таким образом, блокирование синтеза NO приводило к устранению ингибирования как спонтанных, так и вызванных сокращений гладких мышц миометрия под действием каликсарена С-90.

Полученные результаты позволяют предположить, что снижение силы сокращений гладких мышц миометрия под действием каликсарена С-90 происходит NO-зависимым путем, тогда как замедление расслабления (уменьшение нормированной максимальной скорости расслабления V_{nr}) вызывается угнетением Ca^{2+} -транспортной функции кальциевого насоса плазматической мембраны.

Ключевые слова: гладкие мышцы, матка, сокращения, кинетические параметры, каликсарен С-90, кальциевый насос плазматической мембраны, оксид азота.

Одержано: 24.05.2013