

**ВПЛИВ АКТИВНИХ МЕТАБОЛІТІВ АЗОТУ І КИСНЮ  
НА РІВЕНЬ cGMP В МІОЦИТАХ МАТКИ**

Ю. В. ДАНИЛОВИЧ, В. А. ТУГАЙ

*Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України, Київ;  
e-mail: danylovych@biochem.kiev.ua*

Досліджували рівень cGMP в суспензії міоцитів матки щурів за дії нітропрусида натрію (донатора NO), нітрит-аніону і пероксиду водню в разі оброблення міоцитів прогестероном. Суспензію клітин виділяли у присутності колагенази і соєвого інгібітора трипсину. Визначення кількості cGMP проводили з використанням стандартного тест-набору виробництва фірми «Amersham» (Велика Британія).

Базальний рівень cGMP в неактивованих міоцитах становив  $1,5 \pm 0,17$  пмоль cGMP/мг білка ( $n = 5$ ). Показано, що інкубація міоцитів з  $0,1$  мМ ацетилхоліном упродовж однієї години зумовлює зростання змісту cGMP в суспензії майже вдвічі, яке повністю пригнічується у присутності  $0,1$  мМ метиленового синього, що вказує на наявність активності розчинної гуанілатциклази в міоцитах матки. Одногодинне оброблення клітин  $10$  нМ прогестероном істотно не впливає на вміст cGMP. Водночас, додавання в цих умовах до суспензії  $0,1$  мМ нітропрусида натрію або  $10$  нМ  $H_2O_2$  спричинює підвищення рівня cGMP до  $3,1 \pm 0,6$  і  $6,8 \pm 0,4$  пмоль cGMP/мг білка відповідно. Слабко проникний у клітину  $NO_2^-$  ( $10$  нМ) не впливає на рівень cGMP. Одержані нами результати дозволяють припустити, що тривала дія активних метаболітів азоту і кисню забезпечує підвищення рівня cGMP в міоциті матки.

*Ключові слова:* оксид азоту, пероксид водню, cGMP, міоцитрій.

Результати останніх досліджень переконливо свідчать про універсальну роль активних метаболітів азоту і кисню (оксиду азоту, нітрит-аніонів, пероксиду водню) в регуляції різноманітних фізіологічних функцій, зокрема скоротливої активності м'язів, нейротрансмісії, агрегації тромбоцитів тощо [1,2]. Важливо, що зазначені сполуки метаболічно об'єднані і здатні виявляти односпрямовану біологічну активність [3].

Більшість фізіологічних ефектів NO опосередковується активацією цитозольного гемопротейну розчинної гуанілатциклази (pГЦ) [1–4]. Розчинна гуанілатциклаза є гетеродимерним ферментом, що каталізує перетворення гуанозин 5'-трифосфату (GTP) на циклічний гуанозин 3', 5'-монофосфат (cGMP). Характерною властивістю pГЦ є її активація оксидантами різної природи і інгібування відновлювальними агентами. Фермент активується азидом натрію, гідроксиламіном, нітропрусидом натрію а також вільними радикалами [4–8]. pГЦ із легень, тромбоцитів і клітин селезінки активується під час взаємодії з  $O_2$  повітря [8, 9]. Одержано докази участі в регуляції гуанілатциклазної активності супероксиддисмутази (СОД), яка стимулює частково очищену pГЦ із печінки щурів, тоді як інгібітори СОД пе-

решкоджають цим процесам [8]. Наведені дані свідчать про можливість участі  $H_2O_2$  в активації pГЦ.

Численними дослідженнями доведено істотну роль cGMP в розслабленні гладеньком'язових органів [1,2,8,10]. Ця дія може опосередковуватись фосфорилуванням G-кіназами ключових систем, які регулюють  $Ca^{2+}$ -гомеостаз у міоцитах. Найкраще вивченими є шляхи активації ізоформ саркоплазматичної  $Mg^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ -АТФ-ази та інгібування  $Ca^{2+}$ -каналів сарколеми, зокрема потенціалзалежних. Зазначені процеси призводять до зниження концентрації  $Ca^{2+}$  в міоплазмі.

Передбачається істотна роль cGMP в механізмах розслаблення міоцитрій за дії NO та його похідних. З іншого боку, наводяться дані щодо підвищення рівня cGMP в матці під час вагітності [11–15]. Водночас, систематичні біохімічні дослідження впливу активних метаболітів азоту та кисню, передусім  $H_2O_2$ , на обмін cGMP в міоцитрій обмежені.

Відомо, що стан вагітності характеризується підвищеним рівнем прогестерону у тканинах матки та крові. Встановлено, що прогестерон зумовлює рефрактерність міоцитрій в період виношування плоду, тобто знижену чутливість тканини до стимуляторних чинни-

ків різної природи. Вважають, що гормон при цьому забезпечує тривалу релаксацію матки. Зазначені явища отримали назву “прогестеронової блокади” [11,12,15]. Незважаючи на численні дослідження, їхні біохімічні механізми залишаються і досі нез'ясованими.

У нашій попередній роботі були наведені дані щодо посилення продукування NO ( $\text{NO}_2^-$ ) та  $\text{H}_2\text{O}_2$  в ендометріальній тканині матки за дії прогестерону [16]. Можливо, що окремі ефекти останнього на міометрій опосередковуються саме активними метаболітами азоту та кисню, які утворюються за дії гестагену ендометрієм і здатні легко дифундувати до міометрія. Щоб підтвердити таке припущення, ми дослідили вплив прогестерону і на його фоні дію нітропрусиду натрію (донатора NO),  $\text{NO}_2^-$  та  $\text{H}_2\text{O}_2$  у фізіологічних концентраціях на вміст cGMP у суспензії клітин міометрія.

### Матеріали і методи

Суспензію гладеньком'язових клітин матки невагітних щурів, естрогенізованих за 16 год до забору тканини, одержували з використанням колагенази і соєвого інгібітора трипсину методом П. Молларда, який використовували в деякій модифікації [17]. Естрогенізацію щурів проводили з метою збільшення розмірів матки шляхом внутрішньом'язового введення тваринам 50 мкл 0,1%-го розчину естрадіолу. Під впливом естрогенів у міометрії посилюється синтез актоміозину і збільшується кількість мітозів у клітинах.

З видаленої матки видаляли жир і сполучну тканину, після чого її переносили в розчин Хенкса (розчин А) такого складу (в мМ): NaCl – 136,9, KCl – 5,36,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  – 0,44,  $\text{NaHCO}_3$  – 0,26,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  – 0,26,  $\text{CaCl}_2$  – 1,26,  $\text{MgCl}_2$  – 0,4,  $\text{MgSO}_4$  – 0,4, глюкоза – 5,5, Нерес-КОН (рН 7,4, 37 °С) – 10. Потім тканину подрібнювали ножицями на невеликі шматочки (2 × 2 мм) і відмивали від крові та високих концентрацій іонів Са (тричі по 5 хв) в 5 мл розчину Б (розчин Хенкса вищенаведеного складу, який не містив  $\text{MgCl}_2$  і  $\text{MgSO}_4$ , але містив  $\text{CaCl}_2$  у концентрації 0,03 мМ). Після цього шматочки тканини інкубували протягом 20 хв (37 °С, режим постійного перемішування) у 2 мл середовища диспергування тканин такого складу: колагеназа (0,1%), бичачий сироватковий альбумін (0,1%) і соєвий інгібітор трипсину (0,01%), приготовлений на розчині Б. Через 20 хв середовище для диспергування тканини відбирали, а тканину переносили у розчин Б без ферментного препарату. Для прискорення диспергування клітин тканинний препарат 15–20 разів акуратно піпетували 1–2 хв за

допомогою скляної піпетки. Розчин Б, який містив дисперговані клітини, відбирали, а тканинний препарат знову переносили в нову порцію середовища диспергування клітин, що містило колагеназу та соєвий інгібітор трипсину. Цю процедуру повторювали 5–6 разів. Дві перші порції розчину Б, який використовували для піпетування (не містив колагенази та соєвого інгібітора трипсину) відкидали, оскільки в ньому були фрагменти тканини та пошкоджені клітини. Останні 3–4 порції розчину збирали, об'єднували і центрифугували (10 хв, 80 g). Одержаний осад клітин промивали розчином (8 °С), який містив 25 мМ Нерес-КОН (рН=7,4); 150 мМ NaCl і 0,4% бичачого сироваткового альбуміну, після чого знову центрифугували в зазначеному вище режимі. Клітини до експерименту переносили в середовище зберігання, яке містило 25 мМ Нерес-КОН (рН=7,4; 8 °С), 150 мМ NaCl, і зберігали до аналізу за низької температури (ставили на лід).

В 1 мл суспензії клітин містилося в середньому  $6,58 \cdot 10^6$  міоцитів. Кількість життєздатних клітин, яку визначали фарбуванням клітинного препарату вітальним барвником трипановим синім, становила 90–95%. Підрахунок як загальної кількості клітин так і життєздатних здійснювали в гемоцитометрі (камері Горяєва).

Визначення вмісту cGMP у суспензії міоцитів проводили з використанням стандартних тест-наборів виробництва фірми «Amersham» (Велика Британія). Клітинну суспензію в розчині Хенкса А обробляли 1 год або 15 хв (зазначено в підписах до малюнків та в тексті) наступними речовинами: 0,1 мМ ацетилхоліном, 10 нМ прогестероном («Sigma», США), 0,1 мМ метиленовим синім, 0,1 мМ нітропрусидом натрію, 10 нМ  $\text{NO}_2^-$  (у вигляді  $\text{NaNO}_2$  з відповідним перерахунком) або 10 нМ  $\text{H}_2\text{O}_2$  (наведено кінцеві концентрації речовин). Розчини прогестерону готували перед дослідом розчиненням його в етанолі при помірному нагріванні на водяній бані. Конкретні особливості застосування нами зазначених речовин наведено нижче. Крім мінеральних солей (виробництва «Химлаборреактив»), інші застосовані реактиви виробництва фірми «Sigma» (США).

### Результати і обговорення

Відомо, що ацетилхолін є відносно специфічним активатором гуанілатциклазної системи [8–10].

У наших дослідженнях, проведених на суспензії інтактних міоцитів матки щурів, по-

казано (рис. 1), що ацетилхолін (0,1 мМ) зумовлює підвищення вмісту сGMP у клітинах як за короткого (15 с), так і тривалого впливу (1 год). Тривала стимулювальна дія агоніста пригнічується інгібітором розчинної гуанілатциклази (рГЦ) – метиленовим синім [1,18]. Ці попередні результати свідчать про наявність стимульованої ацетилхоліном активності рГЦ в міоцитах.

Подальші дослідження показали, що прогестерон (10 нМ) за тривалої дії не змінює рівня сGMP у клітинах (рис. 2). Тобто підвищення вмісту сGMP в період вагітності не можна пояснити безпосереднім впливом прогестерону на міометрій. Тому ми дослідили дію NO, NO<sub>2</sub><sup>-</sup> та H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, на цей фермент, які продукуються ендометрієм [16], за присутності прогестерону. В експериментах було виявлено значний ефект активних метаболітів азоту і кисню в міометрії за наявності в середовищі прогестерону, що характерно для періоду вагітності.

Численними дослідженнями різних авторів [12,19–23] встановлено зростання рівня сGMP в міоцитах щурів, морських свинок, людини і в інших об'єктах, за безпосередньої дії активних метаболітів азоту та кисню (за відсутності прогестерону).

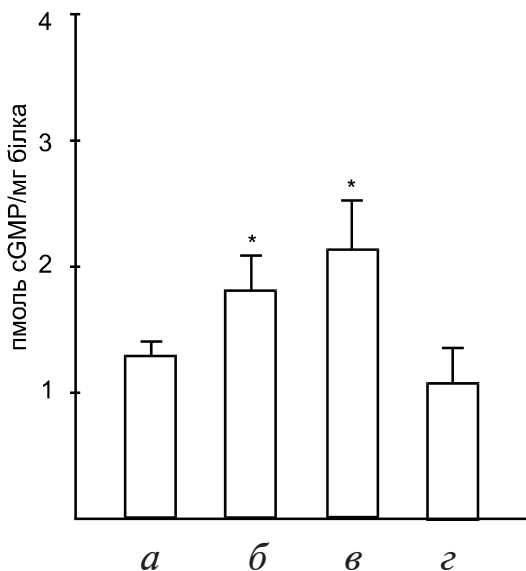


Рис. 1. Рівень сGMP у суспензії міоцитів матки: а – базальний в неактивованих міоцитах; б – за стимуляції 0,1 мМ ацетилхоліном протягом 15 с; в – за стимуляції ацетилхоліном протягом 1 год; г – у разі додавання до розчину 0,1 мМ метиленового синього у варіанту досліду “в”; \* зміни вірогідні ( $p \leq 0,05$ ) відносно варіанту досліду “а”, ( $M \pm m$ ,  $n = 5$ ).

Нами виявлено, що NO в разі тривалого впливу (0,1 мМ нітропрусид натрію) приводить до істотного підвищення рівня сGMP в міоцитах (рис. 2). З літератури відомо, що взаємодія NO із залізом гемової простетичної групи рГЦ зумовлює активацію ферменту, внаслідок чого збільшується рівень внутрішньоклітинного сGMP [1–2]. Вважається, що істинним активатором є нітрозил-гемовий комплекс, який утворюється внаслідок взаємодії NO з гемовою групою рГЦ. При цьому залізо гема виступає із площини порфіринового кільця і структура нітрозил-гемового комплексу наближається до протопорфірину IX – одного з найефективніших активаторів ферменту [2].

Нітрит натрію (10 нМ нітрит-аніони) не впливає на підвищення сGMP у міоцитах, що можна пояснити неможливістю зарядженої сполуки проникнути крізь плазмалему до гема рГЦ в цитозолі, а активність мембранних нітрит-редуктаз не спричинює утворення та-

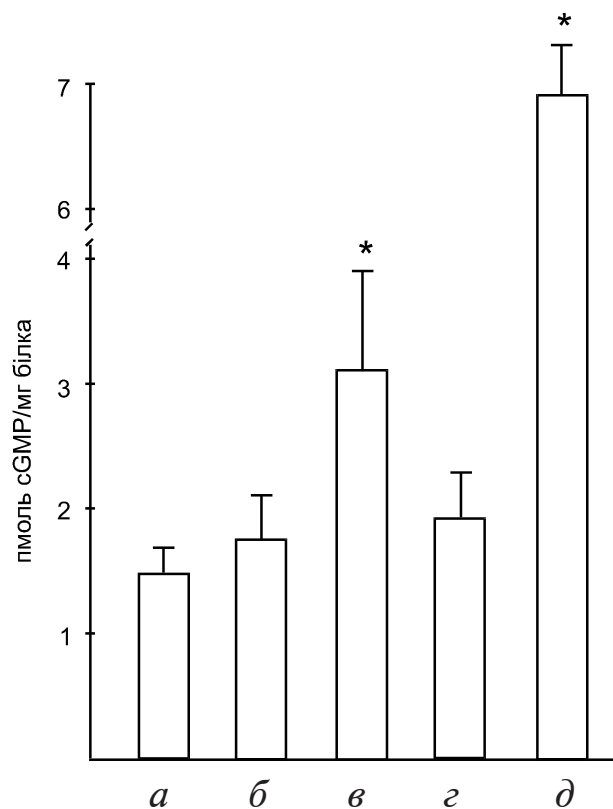


Рис. 2. Рівень сGMP в суспензії міоцитів матки: а – базальний в неактивованих міоцитах; б – при обробленні 10 нМ прогестероном упродовж 1 год; в – інкубація за цих умов з 0,1 мМ нітропрусидом натрію; г – з 10 нМ нітритом натрію; д – з 10 нМ пероксидом водню; \* зміни вірогідні ( $p \leq 0,05$ ) стосовно варіанту досліду “б” ( $M \pm m$ ,  $n = 5$ ).

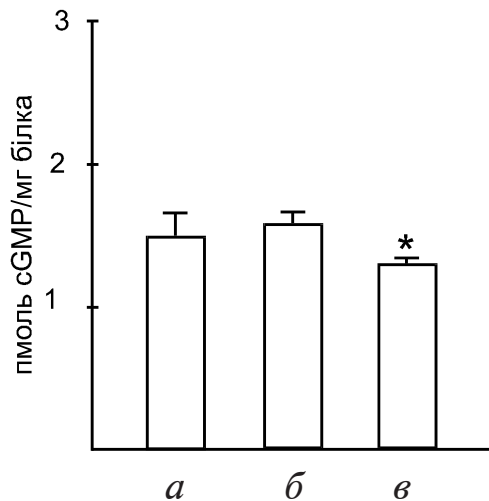


Рис. 3. Вміст cGMP в суспензії міоцитів матки: а – базальний у неактивованих міоцитах; б – після оброблення 10 нМ прогестероном протягом 15 с; в – дія за цих умов 10 нМ пероксиду водню; \* зміни порівняно з обробленням міоцитів прогестероном вірогідні ( $p \leq 0,05$ ;  $M \pm m$ ,  $n = 5$ ).

кої значної кількості NO, як за дії нітропрусиду натрію.

Пероксид водню, згідно з нашими дослідженнями (рис. 2), за тривалого впливу дуже ефективно підвищує рівень cGMP в міоцитах. Вважається, що механізм стимуляції ним рГЦ включає метаболізм  $H_2O_2$  за участю каталази, яка активує фермент через так званий проміжний комплекс I [19,20]. Цей механізм підтверджується непрямими експериментами, в яких вивчали короткочасну дію 10 нМ  $H_2O_2$  на міоцити (15 с). У цьому варіанті дослідження  $H_2O_2$  не тільки не підвищує концентрації cGMP, але, хоча й незначно, зменшує її (рис. 3). Це, ймовірно, можна пояснити окисленням  $Fe^{2+}$  гема рГЦ до  $Fe^{3+}$ , що знижує активність ферменту [1]. Очевидно, стимуляція пероксидом водню утворення комплексу каталази з рГЦ потребує тривалішої дії  $H_2O_2$ .

Одержані нами результати свідчать, що тривалий вплив активних метаболітів азоту та кисню збільшує рівень cGMP в міометрії матки (в наших дослідженнях у присутності прогестерону). Ми припускаємо, що прогестерон стимулює утворення активних метаболітів азоту і кисню ендометрієм [16], які легко дифундують до міометрія [26] і підвищують вміст циклічного нуклеотиду. Ці процеси, вірогідно,

відбуваються під час вагітності і забезпечують релаксацію міометрія. Втім, необхідні подальші дослідження з метою підтвердження цього припущення.

### ВЛИЯНИЕ АКТИВНЫХ МЕТАБОЛИТОВ АЗОТА И КИСЛОРОДА НА УРОВЕНЬ cGMP В МИОЦИТАХ МАТКИ

Ю. В. Данилович, В. А. Тугай

Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна  
НАН України, Київ;  
e-mail: danylovych@biochem.kiev.ua

Исследовали уровень cGMP в суспензии миоцитов матки крыс при действии нитропруссид натрия (донатор NO), нитрит-аниона ( $NO_2^-$ ) и пероксида водорода ( $H_2O_2$ ) в условиях влияния прогестерона на миоциты. Суспензию клеток выделяли с использованием коллагеназы и соевого ингибитора трипсина. Определение количества cGMP проводили с использованием стандартных тест-наборов производства «Amersham» (Великая Британия).

Базальный уровень cGMP в неактивированных миоцитах составляет  $1,5 \pm 0,17$  пмоль cGMP/мг белка ( $n = 5$ ). Показано, что инкубация миоцитов с 0,1 мМ ацетилхолином на протяжении одного часа приводит к увеличению содержания cGMP в суспензии почти в два раза, которое полностью угнетается в присутствии 0,1 мМ метиленового синего, что свидетельствует об активности растворимой гуанилатциклазы в миоцитах матки. Обработка клеток 10 нМ прогестероном на протяжении одного часа не вызывает существенных изменений в содержании cGMP. В то же время добавление в этих условиях к суспензии 0,1 мМ нитропруссид натрия или 10 нМ  $H_2O_2$  приводит к повышению уровня cGMP до  $3,1 \pm 0,6$  и  $6,8 \pm 0,4$  пмоль cGMP/мг белка соответственно. Слабо проникающий в клетку  $NO_2^-$  (10 нМ) не вызывает изменений в уровне cGMP. Полученные нами результаты свидетельствуют, что именно длительное влияние активных метаболитов азота и кислорода на фоне действия прогестерона обеспечивает повышение уровня cGMP в миометрии матки.

Ключевые слова: оксид азота, пероксид водорода, cGMP, миометрий.

**EFFECT OF THE ACTIVE NITROGEN AND OXYGEN METABOLITIES ON THE LEVEL OF cGMP IN UTERUS MYOCYTES**

*Iu. V. Danylovykh, V. A. Tugay*

Palladin Institute of Biochemistry, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv;  
e-mail: danylovykh@biochem.kiev.ua

**S u m m a r y**

The level of cGMP in myocytes of uterus of rats at an action active metabolities of nitrogen and oxygen (NO, NO<sub>2</sub><sup>-</sup> and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) in the conditions of influence of progesteron on myocytes was studied. Cell suspension was selected with the use of collagenase and soy-bean inhibitor of tripsin. Determining the amount of cGMP was conducted with the use of standard kit produced by «Amersham» (Great Britain).

The basal level of cGMP in unactivated myocytes made 1.5 ± 0.17 pmol cGMP/mg of protein (n = 5). It is shown that incubation of myocytes with 0.1 mM acetylcholin during 1 hour resulted in 2 times growth of cGMP content in suspension approximately, this increase is fully suppressed in the presenced 0.1 mM methylene blue, that specifies activity of soluble cGMP in myocytes. Treatment of cells with 10 nM progesteron during 1 hour did not cause substantial changes in the level of cGMP. At the same time addition of 0.1 mM sodium nitroprussid or 10 nM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> to suspension resulted in such conditions in the increase of level of cGMP to 3.1 ± 0.6 and 6.8 ± 0.4 pmol cGMP/mg of protein. Poor penetration of NO<sub>2</sub><sup>-</sup> (10 nM) to the cells did not cause changes in the level of cGMP. The results got by us testify that the long-term influence of active metabolities of nitrogen and oxygen, instead of progesteron, provides the increase of the level of cGMP in the myometrium.

**Key words:** oxide of nitrogen, hydrogen peroxide, cGMP, myometrium.

1. Северина И. С. // Вопр. мед. химии. – 2002. – 48, № 1. – С. 4–30.
2. Серая И. П., Нарциссов Я. Р. // Усп. совр. биол. – 2002. – 122, № 3. – С. 249–258.
3. Данилович Ю. В. // Укр. біохім. журн. – 2001. – 73, № 3. – С. 5–20.
4. Klein C. // Cell signal. – 2002. – 14, N 6. – P. 493–498.
5. Andric S. A., Kostic T. S., Tomic M. // J. Biol. Chem. – 2001. – 276, N 1. – P. 844–849.
6. Iones K. A., Wong G. Y., Iankowski C. J. // Am. J. Physiol. – 1999. – 276, N 1. – L. 35–40.
7. Suzuki T., Suematsu M., Makino R. // FEBS Let. – 2001. – 507, N 1. – P. 49–53.
8. Федоров Н. А., Радудовацкий М. Г., Чехович Г. Е. Циклические нуклеотиды и их аналоги в медицине. – М.: Медицина, 1990. – 176 с.
9. Bohome E., Gerzer R., Grossman G. // Hormones and Cell regulation. – 1983. – 7. – P. 147–161.
10. Кухарь В. П., Луйк А. И., Могилевич С. Е. Химия биорегуляторных процессов. – К.: Наук. думка, 1991. – 368 с.
11. Uterine contractility / Ed. R. E. Garfield. Serono Symposia, USA, Norwill, Massachusetts, 1990. – 388 p.
12. Sladek S. M., Magness R. R., Conrad K. P. // Am. J. Physiol. – 1997. – 272, N 41. – P. 441–463.
13. Yallampalli C., Dong Y. L., Cangula P. R., Fang L. // J. Soc. Gynecol. Investig. – 1998. – 5, N 2. – P. 58–67.
14. Rytlewski K., Zdebski Z. // Ginekol. Pol. – 2001. – 72, N 9. – P. 738–743.
15. Gruber W. F., Tchugguel W., Huber I. C. // Zentralbl. Gynakol. – 1997. – 119, N 2. – P. 12–16.
16. Данилович Ю. В. // Укр. біохім. журн. – 2004. – 76, № 1. – С. 88–96.
17. Шинлова О. П. Транспорт Ca<sup>2+</sup> в суспензии миоцитов и во фракции везикул сарколеммы миометрия / Дис. ... канд. биол. наук. – К., 1992.
18. Марченко С. М., Сагач В. Ф. // Биол. мембр. – 1992. – 9, № 2. – С. 152–157.
19. Buhimschi I., Yallampalli C., Dong Y. L. // Am. J. Obstet. Gynecol. – 1995. – 172, N 5. – P. 1577–1584.
20. Kuenzli K. A., Bradley M. E., Buxton I. L. // Br. J. Pharmacol. – 1996. – 119, N 4. – P. 737–743.
21. Hennan J. K., Diamond J. // Br. J. Pharmacol. – 1998. – 123, N 5. – P. 959–967.
22. Hoffman P., Stanke-Labesque F., Fanchin R. // Human Reproduction. – 2003. – 18, N 1. – P. 148–151.
23. Fujimoto S., Mori M., Tsushima H. // Eur. J. Pharmacol. – 2003. – 459, N 1. – P. 65–72.
24. Groven P. A., Dekubertis F. R., Pratt D. W. // J. Biol. Chem. – 1979. – 254, N 17. – P. 8213–8222.
25. Волин М. С., Дэвидсон К. А., Каменски П. М. // Биохимия. – 1998. – 63, № 7. – С. 958–965.
26. Cameron I. T., Campbell S. // Human Reproduction Update. – 1998. – 4, N 5. – P. 565–569.

Отримано 15.03.2006