

STUDIUL FORMĂRII IP₃ ÎN CADRUL CONTRACȚIEI INDUSE DE OXITOCINĂ PE MIOMETRU

A.A. Tica*, V.Tica**, V. Cîrlig*, M. Bălașa***, C.Georgescu*, A. Văduva*

REZUMAT

Oxitocina determină contracție prin fixarea pe receptori transmembranari specifici, cuplați cu proteine G. Activarea acestora din urmă determină inițierea altor sisteme de semnalizare intracelulară, dintre care cel dependent de fosfolipaza C este de departe cel mai important. Enzima hidrolizează PIP₂, cu formarea de IP₃ și DAG. Primul se va fixa pe receptori-canale specifici, cu mobilizarea de Ca²⁺ din depozite și cu declanșarea contracției. Mecanismul este comun tuturor compușilor cu efect ocitocic. Noi am studiat importanța formării IP₃ prin blocarea fixării sale pe receptorii specifici, utilizând heparina, inclusă în lipozomi și prin stimularea directă a acestor receptori. Valorile obținute au fost destul de diferite.

CUVINTE CHEIE: inozitol 1,4,5-trifosfat, oxitocină, heparină, lipozomi

ABSTRACT

The study of IP₃ generation in myometrium contraction oxytocin - induced

Oxytocin induces contraction after stimulating specific membranal receptors, coupled with G proteins. The activation of these proteins starts the cell signaling systems, from which, the most important is PLC complex. It hydrolyses PIP₂ to IP₃ and DAG. IP₃ mobilizes calcium from internal stores and contraction begins. This is the common mechanism of contraction for all ocytocic agents used. We studied the role of IP₃ by blocking its fixation on the specific receptors with heparin and by stimulating the receptors with exogen IP₃. The results were different.

Key words: inositol 1,4,5-triphosphate, oxytocin, heparin, liposomes

Material și metodă

S-a lucrat exclusiv pe miometru uman negravid, recoltat în timpul operațiilor de histerectomie, cu acordul pacientelor.

Am preferat miometrul negravid pentru că oscilațiile spontane ale fragmentelor de miometru de sarcină îngreunează mult interpretabilitatea datelor.

După recoltare, mostrele de țesut au fost plasate în soluție Krebs Henseleit la 4°C, cu următoarea compoziție (mM): 118 NaCl; 4,7 KCl; 2,5 CaCl₂; 1,6 MgSO₄; 24,9 HCO₃; glucoză 5,55 și un pH 7,3.

Apoi au fost transportate în laborator și utilizate pentru măsurători de forță, într-un interval maxim de 24 de ore (țesuturile care nu s-au lucrat imediat, au fost păstrate la o temperatură de 4°C).

Din fiecare țesut s-au obținut stripuri cu dimensiuni de 5/2/2mm, care au fost montate în băi de organ, conținând soluție Krebs-Henseleit la 37 °C, gazată continuu cu 100 % O₂.

Fiecare fragment a fost pretensionat la aproximativ 20 mN, iar forța izometrică a fost înregistrată cu ajutorul unui traductor de tip IMF 002.

Preparatul muscular a fost spălat la fiecare 30 min. cu soluție Krebs-Henseleit, timp de 90 de minute, considerându-se că, după această perioadă, s-a obținut echilibrarea fragmentului muscular.

Circa 12% din fragmentele de miometru au început să oscileze spontan.

Pentru a se simplifica evaluarea datelor, nu s-au folosit decât stripurile care nu au prezentat automatism.

Oxitocina reprezintă nu numai un foarte important compus endogen cu efect contractil uterin, dar în același timp constituie principalul agent ocitocic utilizat în practica medicală (Graves.C.R., 1996).

Peptidul se fixează pe receptorii specifici, care fac parte din familia celor cuplați cu proteine G (Zeeman G.G. și col., 1997). Activarea acestora din urmă declanșează un complex de sisteme de semnalizare intracelulară, dintre care de departe cel mai important îl constituie sistemul dependent de fosfolipaza C (PLC) (Berridge M.J., 1993).

Aceasta hidrolizează fosfatidil inozitol (4,5) difosfatul (PIP₂) la inozitol (1,4,5) trifosfat (IP₃) și diacil glicerol (DAG) (Huszar G., 1986).

Ultimul va activa *protein kinaza C* (PKC), enzimă responsabilă de numeroase fosforilări intracelulare (canale ionice, proteine contractile etc.), implicate în modularea contracției uterine (Erneux C. și col., 1995).

Dar mult mai important este IP₃, care, în urma fixării pe receptorii-canale specifici, situați pe membrana depozitelor intracelulare de calciu, va mobiliza acest ion în citosol (Mikoshiha M., 1993). Ulterior, calciul mobilizat va deschide și canalele sensibile la Ca²⁺, situate, de asemenea, pe membrana calciosomilor (Meldolesi J. și col., 1990).

Când există suficient calciu în citosol pentru a induce depolarizarea membranei celulare, are loc deschiderea canalelor de calciu de tip L, urmată de contracție.

Ne-am propus studierea importanței IP₃, generat în timpul stimulării cu oxitocină, prin blocarea fixării sale pe receptorii calciosomici specifici, cu heparină.

*Disciplina de Farmacologie, Facultatea de Medicină, U.M.F. - Craiova,

**Disciplina de Obstetrică și Ginecologie, Facultatea de Medicină, Universitatea din Constanța,

***Clinica I de Obstetrică-Ginecologie, Spitalul N°1 - Craiova.

Pentru că nici heparina și nici IP_3 nu străbat membrana plasmatică, a fost nevoie ca aceste substanțe să fie incluse în lipozomi, care dețin rol de transportori (Crommelin D.J.A. și col., 1997).

Am utilizat lipozomi oligolamelari, rezultați prin tehnica hidratării unui film uscat de fosfatidil colină, după o metodă originală (Brăiloiu E. și col., 1995).

În principiu, pentru fiecare mililitru de emulsie de liposomi, încărcăți cu substanța dorită, s-au folosit 60 mg de fosfatidil colină, provenită din gălbenuș de ou (tip X-E, Sigma).

Fosfatidil colina s-a solubilizat în eter etilic, iar recipientul în care a avut loc dizolvarea, a fost montat la rotavaporizator, cuplat la o pompă de vid.

După evaporarea completă a eterului etilic, s-a obținut un film de fosfatidil colină pe pereții recipientului.

În continuare, a fost introdusă soluția conținând substanța investigată, agitându-se până la detașarea completă și emulsionarea stratului de fosfolipid (circa 20-30min.).

Pentru înlăturarea restului de compus, care nu a fost incorporat în vezicule (astfel încât, în final să existe doar liposomi în soluție Krebs normală), s-a trecut la dializarea preparatului, folosindu-se un „sac“ de dializă Sigma. Mediul de dializă a fost Krebs-Henseleit, în raport volumetric preparat/Krebs-Henseleit = 1/600.

Soluția Krebs-Henseleit a fost schimbată la fiecare jumătate de oră, timp de două ore.

Se consideră că randamentul de incorporare a substanței în liposomi (fiind direct proporțional cu mărimea acestora) variază între 2 și 25%.

Spectrofotometric determinată, în experimentele noastre, valoarea a fost de 8-12%.

De asemenea, diametrul mediu, măsurat prin flow-citometrie, a variat între 0,1-0,5 μ m.

Am utilizat oxitocină sintetică (Syntocinon - 10U.I./ml, aprox. 10^{-4} M), heparină (Terapia - 38,5mg/ml = 5.000U.I, aprox 10^{-2} M) și IP_3 produs de Perstrop Pharma.

După echilibrarea preparatelor, s-a indus o contracție la oxitocină 10^{-7} M, cu valoare de martor.

În continuare, am spălat preparatele cu soluție Krebs, înregistrându-se relaxarea lor.

La 30 și la 60 de minute am reluat spălarea cu același tip de soluție, după care am administrat emulsia de lipozomi, încărcăți cu heparină (4,5 μ g/ml, aprox. 10^{-6} M), în raport volumetric în baie de 1/4.

La 20 minute am readministrat oxitocină 10^{-7} M, contracția comparând-o cu martorul (Tica A.A., 2002).

Pentru cel de-al doilea tip de experimente, după înregistrarea contracției martor la oxitocină 10^{-7} M și spălările cu soluție Krebs, la fel ca mai sus, am introdus în baie lipozomi încărcăți cu IP_3 10^{-4} M, contracția rezultată fiind comparată cu cea inițială (Tica A.A., 2002).

Rezultate

Prima administrare de oxitocină induce apariția unei unde contractile cu o durată de 60-90s, având o amplitudine de $4,2 \pm 2$ mN (Fig.1).

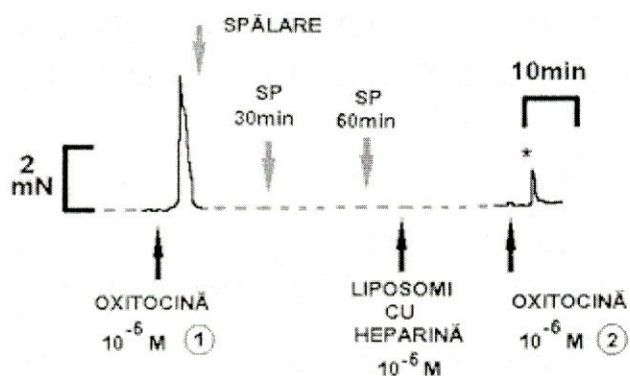


Figura 1. Efectul blocării receptorilor pentru IP_3 , cu heparină inclusă în lipozomi.

După introducerea lipozomilor încărcăți cu heparină, contracția a fost inhibată în proporție de 50-70% (în medie cu 64%).

Contracția rezultată prin stimularea directă a receptorilor specifici cu IP_3 10^{-4} M, a fost de 20-50% din martor (în medie 38%) (Fig.2).

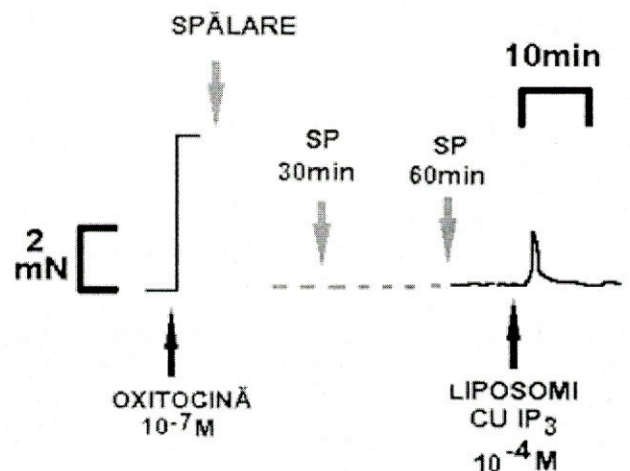


Figura 2. Efectul stimulării receptorilor pentru IP_3 pe miometru negravid.

Se poate constata diferența semnificativă între calcularea rolului IP_3 în cadrul contracției prin blocarea receptorilor săi specifici și prin stimularea acestora.

Discuții și concluzii

Hidroliza PIP_2 sub acțiunea PLC, indusă de oxitocină, pune în libertate IP_3 (alături de DAG).

Acesta, așa cum am mai arătat, se fixează pe receptorii specifici, care sunt canale de calciu, cu localizare pe membrana depozitelor intracelulare, determinând o serie de evenimente, ce culminează cu declanșarea contracției.

Generarea de IP_3 și fixarea ulterioară pe canalele specifice, reprezintă principalul mecanism de acțiune al compuşilor care determină contracție în general, nu numai asupra miometrului (Ferris C.D. și col., 1992).

Oxitocina mai inițiază și alte sisteme de semnalizare, implicate în contracție, implicând: fosfolipaza D, fosfolipaza

A_2 , *ciclooxigenaza* etc. dar cel mai important mecanism rămâne cel legat de activarea PLC.

Interesant este faptul că am obținut două valori foarte diferite pentru ponderea IP_3 : 64% față de 38%.

Explicațiile ar putea fi:

- heparina nu are o acțiune strict selectivă, ea inhibând și o serie de *tirozin kinaze*, implicate și ele în procesul contractil,
- pe de altă parte, este posibil (deși puțin probabil) ca IP_3 din lipozomi să nu stimuleze complet receptorii specifici.

Concluzia ar fi că ponderea IP_3 are, probabil, o valoare intermediară, între 38 și 64%.

BIBLIOGRAFIE

1. Berridge M.J. **Inositol trisphosphate and calcium signaling.** *Nature*, 1993; 361: 315-25.
2. Brăiloiu E., Brănișteanu D.D.D., Brănișteanu D.D. **Method for obtaining oligolamellar liposomes.** Romanian Patent No. 103268.
3. Crommelin D.J.A., Daemen T., Scherphof G.L. et al. **Liposomes: vehicles for the targetet and controlled delovery of peptides and proteins.** *J. Control. Rel.*, 1997; 48: 165-75.
4. Erneux C., Vanweyenberg V., De Smedt F., Communi.

Implication des phosphatidil-inositols et de leur produits d*hidrolyse dans la signalisation cellulaire. *Médecine/Science*, 1995; 11: 240-6.

5. Ferris C.D., Snyder S.H. **Inositol 1,4,5-trisphosphate-activated calcium channels.** *Annu. Rev. Physiol.*, 1992; 54: 469-88.

6. Graves.C.R. **Agents That Cause Contraction or Relaxation of the Uterus.** In: Goodman and Gilman's *The Pharmacological Basis of Therapeutics*, 1996; 940-2.

7. Huszar G. **Cellular regulation of myometrial contractility and essentials of tocolytic therapy.** In: *The Physiology and Biochemistry of The Uterus in Pregnancy and Labor.* Edited by G. Huszar, Boca Raton, FL: CRC, 1986; 107-26.

8. Meldolesi J., Madeddu L., Pozzan T. **Intracellular Ca^{2+} storage organelles in non-muscle cells. Heterogeneity and functional assignment.** *Biochem. Biophys. Acta.* 1990; 1065: 130-40.

9. Mikoshiba M. **Inositol 1,4,5-trisphosphate receptor.** *Trends. Pharmacol. Sci.*, 1993; 14: 86-9.

10. Tica A.A. **Receptorii-canale sensibile la IP_3 .** În: *Studiul semnalizării intracelulare implicate în modularea contracției uterine*, 2002; 199-200 (în press.).

11. Zeeman G.G., Khan-Dawood F.S. and Dawood M.Y. **Oxytocin and its receptors in pregnancy and parturition: current concepts and clinical implications.** *Obstet. Gynecol.*, 1997; 89: 873.