

УДК 591.339-826.17:57.053.2

## ЗНАЧЕНИЕ ЭКСТРАКЛЕТОЧНОГО $Ca^{2+}$ В СОКРАТИТЕЛЬНЫХ РЕАКЦИЯХ АМНИОНА КУРИНОГО ЭМБРИОНА<sup>1</sup>

© 2009 г. О. В. Бойко, Б. Н. Манухин

*Институт биологии развития им. Н.К.Кольцова РАН*

*119334 Москва, ул. Вавилова, д. 26*

*E-mail: boikolg@gmail.com; manukhinb@mail.ru*

Поступила в редакцию 02.12.08 г.

Окончательный вариант получен 04.03.09 г.

В процессе развития в амнионе куриного эмбриона – аваскулярной, лишенной иннервации экстраэмбриональной оболочке – формируются рецепторы нейротрансмиттеров. Карбахол через  $M_3$ -холинорецепторы вызывает фазные и тонические сокращения изолированной полоски амниона 11–14-суточного куриного эмбриона. Действие карбахола на сократительную активность амниона исследовали в норме, на фоне калиевой контрактуры, нифедипина и в бескальциевой среде. В развитии сократительной реакции на карбахол участвуют потенциалзависимые и рецепторуправляемые  $Ca^{2+}$ -каналы, а также кальций из внутриклеточных депо. Фазные сокращения амниона активируются главным образом ионами кальция, входящими через потенциалзависимые кальциевые каналы. В реализации тонического сокращения существенную роль играют рецепторуправляемые каналы.  $Ca^{2+}$ -зависимые калиевые каналы могут служить средством отрицательной обратной связи в контроле констрикторных реакций амниона.

*Ключевые слова:* амнион, куриный эмбрион, кальций, карбахол, калиевая контрактура,  $M_3$ -холинорецепторы, нифедипин.

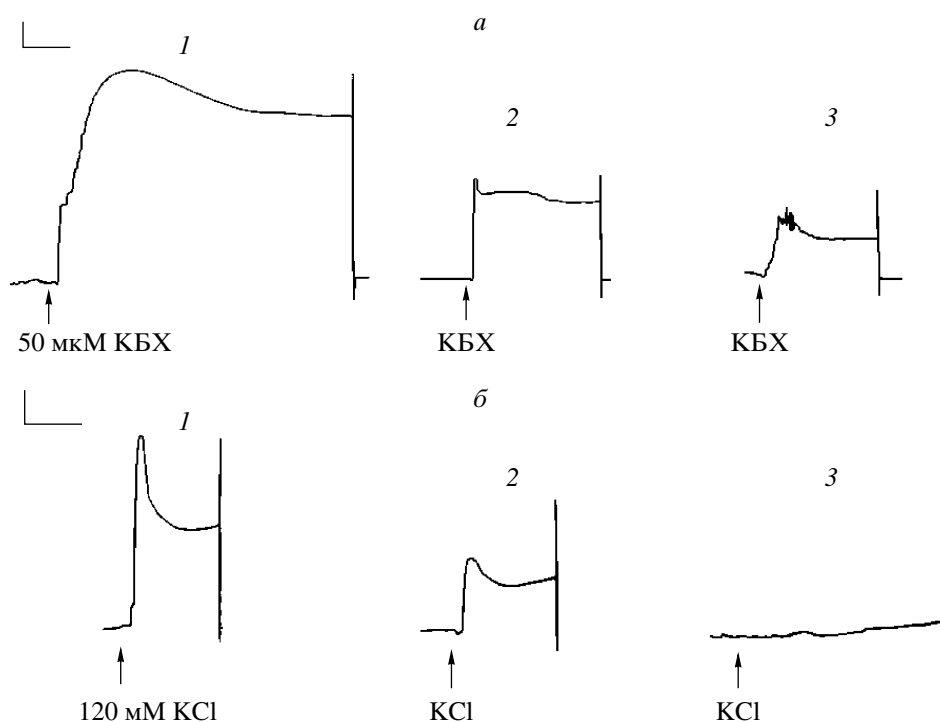
В настоящее время плодные оболочки рассматривают как мощный адаптационный аппарат, обеспечивающий гомеостаз плода и наделенный способностью связывать, синтезировать и высвобождать физиологически активные вещества. Ткани провизорных органов развиваются из тех же зачатков, что и дефинитивные ткани, но дифференцируются значительно быстрее, что обеспечивает раннюю специализацию тканей внезародышевых органов. В процессе развития в амнионе куриного эмбриона – аваскулярной, лишенной иннервации экстраэмбриональной оболочке – формируются рецепторы нейротрансмиттеров. Спонтанная сократительная активность амниона изменяется в тесной связи с содержанием ацетилхолина (АХ) и активностью холинэстеразы в ткани (Бункина, 1963; Полякова, 1970; Бойко, Манухин, 1989а; Cuthbert, 1963). Его мышечные клетки содержат мускариновые холинорецепторы: сократительная реакция интактного амниона и диссоциированных гладкомышечных клеток амниона на карбахол (КБХ) и АХ блокируется атропином (Бойко, Манухин, 1989б; Нечаева, Турпаев, 1995; Bowers, 1989; Dahm, Bowers, 1996). Фармакологический анализ мускариновых

рецепторов амниона показал, что они относятся к  $M_3$ -подтипу (Бойко, Манухин, 2007).

Гистологически амнион представляет собой двухслойную структуру из двух типов клеток – эпителиальных и гладкомышечных, разделенных базальной мембраной (Dahm, Bowers, 1996). Рецепторы большинства гладких мышц исследуют в присутствии нервных терминалей. Холинергические рецепторы мускаринового типа в гладких мышцах могут опосредовать сокращение, расслабление и регулировать выделение АХ. В осуществлении этих реакций участвуют как пре-, так и постсинаптические рецепторы (Eglen, 2005). Отсутствие иннервации в амниотической ткани позволяет анализировать прямые воздействия на рецепторы, участвующие в регуляции его сократительных реакций.

Известно, что сократительные реакции в гладкомышечных клетках сопряжены с уровнем содержания ионов кальция в цитоплазме. Кальций является вторичным посредником передачи внешнего сигнала и универсальным регулятором клеточной активности. В ответ на действие КБХ концентрация кальция в клетках амниона возрастает более чем в 10 раз (Cross et al., 2000). В настоящей работе исследовали роль экстраклеточных ионов кальция в развитии фазных и тонических сокращений амниона, вызванных КБХ.

<sup>1</sup> Работа поддержана Российским фондом фундаментальных исследований (проект № 09-04-00111а).



**Рис. 1.** Сократительные реакции амниона куриного эмбриона на: *а* – карбахол (КБХ, 50 мкМ), *б* – гиперкалиевый раствор (120 мМ) в норме (*1*) и в бескальциевом растворе, содержащем 1 мМ ЭГТА, на 5-й (*а, 2*), 10-й (*б, 2*) и 20-й (*3*) мин его действия. Калибровка здесь и на рис. 2, 3: 1 мин, 50 мВ.

### МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

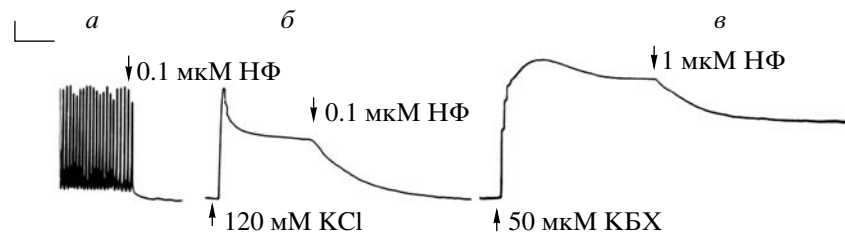
Работа проведена на изолированной полоске неиннервированного амниона 11–14-суточного куриного эмбриона. Регистрацию сокращений проводили с помощью механотронов 6МХ1Б в режиме близком к изометрическому на самописцах Н-339 и Н-399. Параллельно регистрировали сокращения двух фрагментов амниона, помещенных в термостабируемые (38°C) аэрируемые камеры объемом 10 мл каждая с раствором Хенкса следующего состава, мМ: NaCl – 137, KCl – 5.4, CaCl<sub>2</sub> – 1.26, MgSO<sub>4</sub> – 0.41, MgCl<sub>2</sub> – 0.49, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> – 0.34, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> – 0.44, NaHCO<sub>3</sub> – 4.2, глюкоза – 5.6. Исходная нагрузка на препарат составляла 100 мг. Исследуемые вещества объемом 100 мкл вносили в камеру после получасовой преинкубации ткани. Сократительную активность амниона стимулировали с помощью холинергического агониста КБХ. Тестирующая доза КБХ составляла 50 мкМ. Эта концентрация агониста вызывает максимальную реакцию по частоте сокращений и субмаксимальную тоническую реакцию. В работе использовали реактивы фирмы “Sigma”, США. Все соединения растворяли в дистиллированной воде за исключением блокатора потенциалзависимых кальциевых каналов нифедипина, разводимого в спирте. Бескальциевый раствор готовили путем удаления Ca<sup>2+</sup> из раствора Хенкса с добавлением хе-

латора Ca<sup>2+</sup> – 1 мМ ЭГТА. Гиперкалиевые растворы получали введением соответствующего количества KCl в раствор Хенкса.

### РЕЗУЛЬТАТЫ

КБХ (50 мкМ) через M<sub>3</sub>-холинорецепторы вызывает либо только тоническую реакцию амниона 11–14-суточного эмбриона, либо фазные сокращения на фоне повышения тонуса. Полученный эффект хорошо сохраняется во времени. В бескальциевом растворе, содержащем 1 мМ ЭГТА, наблюдается постепенное снижение базального тонуса препарата. Через 5 мин тоническая реакция на КБХ уменьшается по амплитуде на 50% от контрольных значений, а через 20 мин после отмывания бескальциевым раствором – еще на 25% (рис. 1).

Нифедипин – блокатор кальциевых каналов L-типа, полностью подавляющий спонтанные сокращения амниона, в концентрации 0.1–5 мкМ снижает тоническую реакцию на КБХ на 30–60% (рис. 2). При этом он по-разному действует на фазную и тоническую составляющую сокращения. Фазные сокращения на КБХ нифедипин блокирует полностью, тогда как тонический компонент угнетается лишь частично (рис. 2, в); 30% величины тонического сокращения на КБХ сохраняется даже



**Рис. 2.** Действие нифедипина (НФ) на спонтанную сократительную активность амниона куриного эмбриона (а), калиевую контрактуру (б) и сократительную реакцию, вызванную карбахолом (КБХ) (в).

при повышении действующей концентрации нифедипина до 100 мкМ. Следовательно, фазные сокращения амниона активируются главным образом ионами кальция, входящими через потенциалзависимые кальциевые каналы. Тоническое сокращение обеспечивается и потенциалзависимыми, и рецепторуправляемыми каналами. Величина реакции на КБХ зависит от степени деполяризации мембраны.

Повышение концентрации ионов  $K^+$  в наружном растворе (120 мМ КСl) вызывает фазно-тоническое сокращение амниона, обусловленное стойкой деполяризацией клеточной мембраны. В бескальциевом растворе, содержащем 1 мМ ЭГТА, через 10 мин калиевая контрактура уменьшается по амплитуде на 50–60%, сохраняя общий характер развития сократительной реакции, а через 20 мин полностью подавляется (рис. 1, б). Отмывание препарата раствором Хенкса приводит к восстановлению исходного тонуса и сократительной реакции на гиперкалиевый раствор. Нифедипин (0.1 мкМ) полностью угнетает реакцию на КСl (рис. 2, б). Это означает, что калиевая контрактура в амнионе обусловлена входом кальция из внеклеточной среды по медленно инактивирующимся потенциалзависимым кальциевым каналам плазматической мембраны.

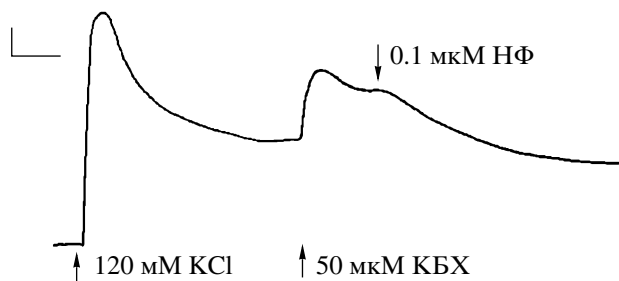
На фоне калиевой контрактуры (120 мМ КСl) КБХ в концентрации 50 мкМ вызывает тоническую реакцию, составляющую по величине до 50% тонического компонента ответа на гиперка-

лиевый раствор и 30% реакции на КБХ в норме. Введение в среду нифедипина (0.1 мкМ) полностью тоническую реакцию не отменяет (рис. 3). Реакция на КБХ на фоне КСl в бескальциевом растворе (10 мин) сохраняется. По-видимому, при активации мускариновых рецепторов амниона ионы кальция поступают в цитоплазму клетки не только экзогенно, но и мобилизуются из внутриклеточных источников.

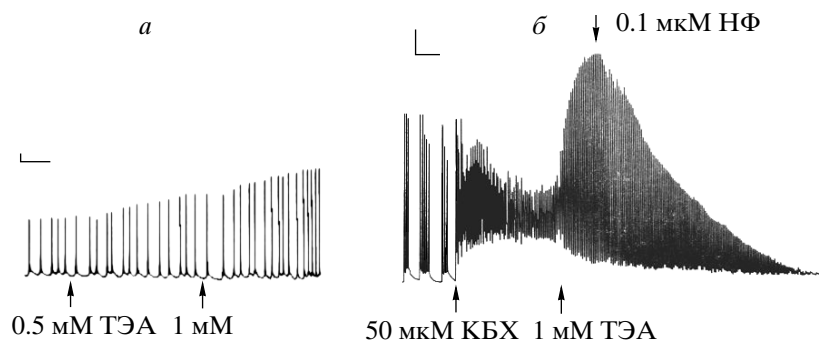
Для исследования роли выходящих калиевых токов использовали блокатор калиевой проводимости мембраны тетраэтиламмоний (ТЭА). Действие ТЭА (0.5–1 мМ), вызывающего дополнительную деполяризацию мембраны, приводит к удвоению частоты спонтанной сократительной активности амниона и усилению амплитуды сокращений на 50–90% (рис. 4, а). На фоне действия КБХ амплитуда сокращений при введении 1 мМ ТЭА возрастает в четыре-шесть раз (рис. 4, б). В этих условиях нифедипин полностью блокирует вызванную фазную сократительную активность. При этом время прекращения фазной сократительной активности амниона под действием нифедипина увеличивается до 8–10 мин, тогда как вызванные КБХ фазные сокращения амниона нифедипин отменяет в течение 2 мин.

## ОБСУЖДЕНИЕ

Потенциал действия в большинстве гладкомышечных клеток имеет кальциевую природу, а их сократительная активность в значительной степени регулируется изменением концентрации цитоплазматического кальция. Ионы кальция, необходимые для активации сокращений гладких мышц, поступают из внеклеточного пространства и внутриклеточных депо. При стимуляции биологически активными веществами вход кальция через плазматическую мембрану осуществляется по двум типам кальциевых каналов: потенциалзависимым, открываемым деполяризацией мембраны, и рецепторуправляемым потенциалнезависимым (Шуба, Кочемасова, 1988; Kuriyama et al., 1998; McFadzean, Gibson, 2002).



**Рис. 3.** Действие карбахола (КБХ) на сократительную реакцию амниона куриного эмбриона в условиях калиевой деполяризации и торможение вызванной тонической реакции нифедипином (НФ).



**Рис. 4.** Влияние тетраэтиламмония (ТЭА) на спонтанную (а) и вызванную карбахолом (КБХ) (б) сократительную активность амниона куриного эмбриона и торможение вызванных сокращений нифедипином (НФ). Калибровка: 1 мин, 25 мВ.

Активация потенциалуправляемых кальциевых каналов происходит при сдвиге потенциала в положительную область. Из шести описанных типов потенциалзависимых кальциевых каналов (L, N, P, Q, R и T) в гладкомышечных клетках млекопитающих наиболее изученным путем входа кальция являются кальциевые каналы L-типа, которые обеспечивают длительный кальциевый ток через мембрану (Karakci et al., 1997). Эти каналы отличаются чувствительностью к дигидропиридинам. Классическим ингибитором потенциалзависимых кальциевых каналов L-типа считается производное 1,4-дигидропиридина нифедипин (Mori et al., 1996). Нифедипинчувствительные кальциевые каналы P/Q-типа фармакологически и с помощью иммуноблоттинга обнаружены в гладких мышцах сосудов крысы и изолированных гладкомышечных клетках пупочной артерии человека (Hansen et al., 2000; Salemme et al., 2007). В некоторых сосудах показано наличие кальциевых каналов T-типа, которые выявляются в условиях повышения экстраклеточного кальция (Perez-Reyes, 2003; Salemme et al., 2007). Предполагают, что T-каналы могут участвовать не только в регуляции миогенного тонуса гладких мышц, но и в контроле клеточной пролиферации (Rodman et al., 2005).

В наших опытах нифедипин (0.1–5 мкМ) блокировал тоническую реакцию на КБХ не более чем на 70%. Неполная блокада реакции амниона на КБХ при действии нифедипина означает, что в осуществлении этой реакции участвуют и потенциалзависимые, и рецепторуправляемые кальциевые каналы гладкомышечных клеток. Кроме того, реакция на КБХ сохраняется и в бескальциевой среде, и в бескальциевой среде на фоне калиевой контрактуры, что предполагает возможность дополнительной мобилизации кальция из внутриклеточных источников. При доминирующем участии экстраклеточного кальция в реализации сокращения реак-

ция легко отменяется на первых минутах действия бескальциевого раствора. Так в бескальциевом растворе сокращения на АХ воротной вены морской свинки не воспроизводятся через 3 мин (Nanjo, 1984). В ободочной кишке крысы реакция на КБХ в бескальциевой среде почти полностью отменяется уже через 1 мин после смены раствора (Takeuchi, 2001).

Быстрые фазные сокращения гладкомышечных клеток сосудов активируются преимущественно теми ионами кальция, которые участвуют в генерации потенциалов действия и входят в гладкомышечные клетки через потенциалзависимые кальциевые каналы мембраны (Шуба, Кочемасова, 1988). На гладких мышцах желудка морской свинки показано участие внутриклеточных источников кальция в развитии фазного компонента сократительной реакции в ответ на высокие концентрации КБХ (Parekh, Brading, 1991). В гладких мышцах кишечника крысы тоническое сокращение на АХ осуществляется за счет входа наружного кальция, а фазные сокращения зависят от высвобождения кальция из внутриклеточных источников (Elorriaga et al., 1996). Фазные сокращения амниона, легко блокирующиеся нифедипином, активируются главным образом ионами кальция, входящими через потенциалзависимые кальциевые каналы. Тоническое сокращение амниона обеспечивается и потенциалзависимыми, и рецепторуправляемыми каналами, т.е. внеклеточный кальций особенно важен для индукции сокращений.

Для выяснения участия рецепторуправляемых кальциевых каналов в активации сокращений амниона, вызванных КБХ, мы исследовали эту реакцию на фоне калиевой деполяризации. Сокращения гладкомышечных клеток, обусловленные высокой концентрацией калия в наружной среде, активируются внеклеточными ионами кальция

(Karaki et al., 1997). В наших опытах сократительная реакция амниона на гиперкалиевый раствор полностью блокировалась в бескальциевом растворе и при действии нифедипина. КБХ давал выраженный сократительный эффект на фоне калиевой деполяризации. Данные, полученные при одновременном измерении концентрации внутриклеточного кальция в гладкомышечных клетках амниона и регистрации его сокращений, установили положительную корреляцию между ними (Cross et al., 2000). Показано, что в ответ на действие 100 мкМ КБХ концентрация кальция в цитоплазме увеличивалась более чем в десять раз по сравнению с исходным уровнем. Латентный период между введением агониста и последующим повышением концентрации кальция в клетке составлял около 0.7 с. В случае прямой деполяризации плазматической мембраны путем повышения концентрации наружного  $K^+$  зарегистрированный латентный период оказался наполовину меньше, однако нарастание концентрации кальция происходило медленней и достигнутая максимальная величина пика была существенно ниже. Таким образом, КБХ мобилизует дополнительные источники кальция, что обеспечивает усиление реакции при его воздействии.

В гладких мышцах холинергические агонисты через  $M_3$ -холинорецепторы активируют фосфоинозитидный путь регуляции уровня внутриклеточного кальция, в котором в качестве вторичных мессенджеров, обеспечивающих последующую мобилизацию кальция, выступают инозитольные полифосфаты. При гидролизе трифосфоинозиотида образуются инозитолтрифосфат и диацилглицерин. Связывание инозитолтрифосфата со своим рецептором на эндоплазматическом ретикулуме приводит к высвобождению  $Ca^{2+}$  из ретикулума в цитоплазму (Ткачук 1998; Caulfield, Birdsall, 1998; Eglen, 2005). Мускариновые рецепторы амниона, опосредующие активацию его сокращений, были идентифицированы тестированием активности селективных антагонистов. В качестве  $M_1$ -антагониста использовали пирензепин,  $M_2$  – метоктрамин,  $M_3$  – 4-DAMP (4-дифенилацетокси-N-метилпиредин метиодид),  $M_4$  – тропикамид. Все антагонисты действовали как конкурентные ингибиторы  $M$ -холинорецепторов. По холинолитической активности в отношении реакции на КБХ ( $-lgIC_{50}$ ) исследованные антагонисты составили следующую последовательность: 4-DAMP (8.29) > тропикамид (6.97) > пирензепин (5.85) > метоктрамин (5.63). Кроме того, форсколин (5 мкМ), активатор аденилатциклазы, действовал однонаправленно с  $\beta$ -адреноагонистами и блокировал вызванную КБХ сократительную ак-

тивность амниона, тогда как фосфолипаза С (1.25 ед. акт/мл) ее активировала (Манухин, Бойко, 2008). Согласно полученным данным, при холинергической активации гладкомышечных клеток амниона происходит стимуляция  $M_3$ -холинорецепторов, которые активируют метаболизм мембранных фосфоинозитидов. Таким образом могут быть задействованы внутриклеточные резервы кальция. Источники и механизм высвобождения кальция из саркоплазматического ретикулума гладкомышечных клеток амниона и степень участия депозависимых каналов кальциевого входа в реакциях амниона на КБХ требуют дальнейших исследований с применением блокаторов, вызывающих опустошение кальциевых депо.

В реализации различных регуляторных воздействий в гладкомышечных клетках большую роль имеет изменение калиевой проводимости мембраны (Шуба, Кочемасова, 1988; Gokina et al., 1996; Telezhkin et al., 2008). Увеличение амплитуды сокращений этих клеток в условиях угнетения калиевой проводимости мембраны с помощью ТЭА, блокатора  $Ca^{2+}$ -зависимых калиевых каналов, связывают с активностью медленных потенциалзависимых кальциевых каналов мембраны (Шуба, Бурый, 1984). На фоне нифедипина ТЭА не вызывает значительной деполяризации в мозговых артериях (Gokina, 1996). Показано, что повышение калиевой проводимости приводит к реполяризации и снижению кальциевого тока и сократительной активности мочевого пузыря морской свинки (Imai et al., 2001). Блокада калиевой проводимости мембраны в амнионе с помощью ТЭА приводит к усилению спонтанной и вызванной сократительной активности. Усиление амплитуды сокращений амниона, вызванных КБХ, при введении ТЭА полностью блокируются нифедипином, однако время, требующееся на ингибирование реакции, существенно возрастает, т.е. для реализации его расслабляющего эффекта при действии КБХ имеет значение состояние  $Ca^{2+}$ -зависимых калиевых каналов.

В гладкомышечных клетках амниона калиевая контрактура обусловлена потенциалзависимым входом ионов кальция. Действие КБХ через  $M_3$ -холинорецепторы в значительной степени зависит от наличия внеклеточного кальция, в развитии сократительной реакции участвуют потенциалзависимые и рецепторуправляемые каналы, а также кальций из внутриклеточных депо. Фазные сокращения амниона активируются главным образом ионами кальция, входящими через потенциалзависимые кальциевые каналы. В реализации тонического сокращения существенную

роль играют рецепторуправляемые каналы. Ca<sup>2+</sup>-зависимые калиевые каналы могут служить средством отрицательной обратной связи в контроле констрикторных реакций амниона.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Бойко О.В., Манухин Б.Н. Холинэстераза амниона развивающегося куриного эмбриона // Онтогенез. 1989а. Т. 20. № 3. С. 258–262.
- Бойко О.В., Манухин Б.Н. Холинергическая реакция амниона куриного эмбриона // Журн. эволюц. биохимии и физиологии. 1989б. Т. 25. № 6. С. 742–748.
- Бойко О.В., Манухин Б.Н. Фармакологическая характеристика мускариновых холинорецепторов в неиннервированном амнионе куриного эмбриона // Докл. АН. 2007. Т. 413. № 1. С. 120–123.
- Бункина Л.С. О роли системы ацетилхолин–холинэстераза в спонтанной ритмической двигательной активности амниона куриного зародыша // Бюл. эксперим. биологии и медицины. 1963. Т. 55. № 1. С. 17–21.
- Манухин Б.Н., Бойко О.В. Мускариновые холинорецепторы амниона куриного эмбриона // Изв. АН. Сер. биол. 2008. № 2. С. 215–222.
- Нечаева М.В., Турпаев Т.М. Особенности сократительной реакции амниона куриного зародыша при действии ацетилхолина на его внутреннюю и внешнюю поверхности // Докл. АН. 1995. Т. 341. № 3. С. 419–421.
- Полякова Л.А. О двух типах колебательных движений куриного эмбриона в амниотической жидкости // Бюл. эксперим. биологии и медицины. 1970. Т. 69. № 5. С. 27–31.
- Ткачук В.А. Гормональная регуляция транспорта Ca<sup>2+</sup> в клетках крови и сосудов // Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова. 1998. Т. 84. № 10. С. 1006–1017.
- Шуба М.Ф., Бурый В.А. Мембранные механизмы возбуждения гладкомышечных клеток // Физиол. журн. 1984. Т. 30. № 5. С. 545–557.
- Шуба М.Ф., Кочемасова Н.Г. Физиология сосудистых гладких мышц. Киев: Наук. думка, 1988. 250 с.
- Bowers C.W. Expression of functional neurotransmitter receptors in an uninnervated tissue: avian amnion // Cell Tiss. Res. 1989. V. 258. С. 409–415.
- Caulfield M.P., Birdsall N.J.M. International union of pharmacology. XVII. Classification of muscarinic acetylcholine receptors // Pharmacol. Rev. 1998. V. 50. № 2. P. 279–290.
- Cross K.M.L., Dahm L.M., Bowers C.W. Simultaneous measures of contraction and intracellular calcium in single, cultured smooth muscle cells // *In vitro* Cell. Devel. Biol. 2000. V. 36. P. 50–57.
- Cuthbert A.W. An acetylcholine-like substance and cholinesterase in the smooth muscle of the chick amnion // J. Physiol. 1963. V. 166. P. 284–295.
- Dahm L.M., Bowers C.W. Substance P responsiveness of smooth muscle cells is regulated by the integrin ligand, thrombospondin // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1996. V. 93. P. 1276–1281.
- Eglen R.M. Muscarinic receptor subtype pharmacology and physiology // Prog. Med. Chem. 2005. V. 43. P. 105–136.
- Elorriaga M., Anselmi E., Hernandez J.M. et al. The sources of Ca<sup>2+</sup> for muscarinic receptor-induced contraction in the rat ileum // J. Pharm. Pharmacol. 1996. V. 48. № 8. P. 817–819.
- Gokina N.I., Wellman T.D., Bevan R.D. et al. Role of Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels in the regulation of membrane potential and tone of smooth muscle in human pial arteries // Circ. Res. 1996. V. 79. P. 881–886.
- Hansen P.B., Jensen B.L., Andreassen D. et al. Vascular smooth muscle cells express the  $\alpha_{1A}$  subunit of a P/Q-type voltage-dependent Ca<sup>2+</sup> channel, and it is functionally important in renal afferent arterioles // Ibid. 2000. V. 87. P. 896–902.
- Imai T., Okamoto T., Yamamoto Y. et al. Effects of different types of K<sup>+</sup> channel modulators on the spontaneous myogenic contraction of guinea-pig urinary bladder smooth muscle // Acta Physiol. Scand. 2001. V. 173. № 3. P. 323–333.
- Karaki H., Ozaki H., Hori M. et al. Calcium movements, distribution, and functions in smooth muscle // Pharmacol. Rev. 1997. V. 49. № 2. P. 157–230.
- Kuriyama H., Kitamura K., Iton T. et al. Physiological features of visceral smooth muscle cells, with special reference to receptors and ion channels // Physiol. Rev. 1998. V. 78. P. 811–920.
- McFadzean I., Gibson A. The developing relationship between receptor-operated and store-operated calcium channels in smooth muscle // Br. J. Pharmacol. 2002. V. 135. P. 1–13.
- Mori Y., Mikala G., Varadi G. et al. Molecular pharmacology of voltage-dependent calcium channels // Jpn. J. Pharmacol. 1996. V. 72. P. 83–109.
- Nanjo T. Effects of noradrenaline and acetylcholine on electromechanical properties of the guinea-pig portal vein // Br. J. Pharmacol. 1984. V. 81. P. 427–440.
- Parekh A.B., Brading A.F. The sources of calcium for carbachol-induced contraction in the circular smooth muscle of guinea-pig stomach // Ibid. 1991. V. 104. P. 412–418.
- Perez-Reyes E. Molecular physiology of low-voltage-activated T-type calcium channels // Physiol. Rev. 2003. V. 83. P. 117–161.
- Rodman D.M., Reese K., Harral J. et al. Low-voltage-activated (T-type) calcium channels control proliferation of human pulmonary artery myocytes // Circ. Res. 2005. V. 96. P. 864–872.
- Salemme S., Rebolledo A., Speroni F. et al. L, P/Q- and T-type Ca<sup>2+</sup> channels in smooth muscle cells from human umbilical artery // Cell Physiol. Biochem. 2007. V. 20. P. 55–64.
- Takeuchi T., Sumiyoshi M., Kitayama M. et al. Origin of Ca<sup>2+</sup> necessary for carbachol-induced contraction in longitudinal muscle of the proximal colon of rats // Jpn. J. Pharmacol. 2001. V. 87. P. 309–317.
- Telezhkin V., Goecks T., Bonev A.D. et al. Decreased function of voltage-gated potassium channels contributes to augmented myogenic tone of uterine arteries in late pregnancy // Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol. 2008. V. 294. № 1. P. 272–284.

## The Significance of Extracellular $\text{Ca}^{2+}$ in Contractile Responses of Chick Amnion

O. V. Boiko and B. N. Manukhin

*Kol'tsov Institute of Developmental Biology, Russian Academy of Sciences, ul. Vavilova 26, Moscow, 119991 Russia  
e-mail: boikolg@gmail.com; manukhinb@mail.ru*

**Abstract**—Neurotransmitter receptors are formed during chick embryo development in the amnion, an avascular extraembryonic membrane devoid of innervation. Carbachol induces phasic and tonic contractions mediated by  $M^3$  cholinergic receptors in an amniotic membrane strip isolated from 11–14-day-old chick embryo. The carbachol effect on the amnion contractile activity was studied in normal physiological salt solution, during depolarization by  $\text{K}^+$ , exposure to nifedipine, and in calcium-free medium. Voltage-dependent and receptor-operated  $\text{Ca}^{2+}$  channels as well as calcium from intracellular stores are involved in the contractile response to carbachol. Phasic contractions of the amnion are mainly induced by calcium ions entering through voltage-dependent calcium channels, while tonic contractions are also maintained by receptor-operated channels.  $\text{Ca}^{2+}$ -activated potassium channels can serve as a negative feedback factor in regulation of the amnion contractile responses.

*Key words:* amnion, chick embryo, calcium, carbachol, potassium contracture,  $M^3$  cholinergic receptors, nifedipine.