

Вплив NO та мексидолу на скоротливість оваріального і цервікального відділів матки мишей за умов імуноопосередкованого запального процесу

А.П. Литвиненко, Т.Ю. Вознесенська, Р.І. Янчій

Інститут фізіології ім. О.О.Богомольця НАН України, Київ; e-mail: alinaluk17@mail.ru

Досліджували скоротливість оваріального (ОВ) і цервікального (ЦВ) відділів матки у мишей за умов імуноопосередкованого запального процесу, викликаного імунізацією бичачим сироватковим альбуміном (БСА). Встановлено, що у разі активації енергосинтезувальних функцій мітохондрій за допомогою мексидолу зменшується частота скорочень, зростають амплітуда та індекс скоротливості в ОВ та ЦВ міометрія, а також тривалість активного стану в останньому. Дія мексидолу на тлі імунізації БСА спричинює у ОВ зменшення амплітуди в 2,6 раза, індексу скоротливості у 2,2 раза, а у ЦВ – викликає їх зростання. Показано, що особливості скоротливості ОВ і ЦВ матки зумовлені змінами функціонального стану мітохондрій, а також пов'язані із залученням оксиду азоту, пул якого може бути різний у досліджуваних відділах матки.

Ключові слова: скоротливість; оваріальний і цервікальний відділи матки; імунізація бичачим сироватковим альбуміном; оксид азоту.

ВСТУП

Нині активно вивчають функціональну диференціацію різних відділів матки у ссавців. Відмічено фізіологічні відмінності між верхнім і нижнім сегментами матки [1 – 3]. Доведено, що у шурів окремі пейсмеркерні клітини знаходяться у верхньому, оваріальному (ОВ) – розташованому ближче до яєчника, та нижньому, цервікальному (ЦВ) – ближче до шийки матки відділах [2]. Особливості скоротливості верхнього і нижнього сегментів матки недостатньо досліджені. Згідно з сучасними літературними даними, імуноопосередковані запальні процеси впливають на функціонування яєчників, змінюють скоротливість міометрія [4], призводять до порушення імплантації та передчасних пологів [5], зумовлюють безпліддя й нерезультативні спроби при застосуванні допоміжних репродуктивних технологій. Системні васкуліти, які належать до групи імунокомплексних хвороб, можуть бути причиною передчасних

пологів (40 %) і навіть викликають загибель матері і плоду (5–10 % випадків) [6].

Вважається, що оксид азоту (NO) регулює скоротливу активність міометрія через вплив на кальційтранспортувальні системи плазматичної мембрани, саркоплазматичного ретикулума і мітохондрій. Він спричиняє зростання проникності сарколеми для Ca^{2+} , стимулює пасивний транспорт катіона у міоцити крізь дигідропіридинчутливі канали, посилює транспорт протонів із міоцитів та стимулює Na^+ , K^+ -АТФазу [7], змінює функціонування мітохондріальних переносників [8]. Фармацевтичний препарат мексидол, діюча речовина якого етилметилгідроксипіридин сукцинат (ГС), активує енергосинтезувальні функції мітохондрій та в досліджах *in vitro* знижує активність індукбельної NO-синтази [9]. Крім того, мексидол сприяє поліпшенню ендотеліальної функції, стабілізації біологічних мембран, підвищує активність антиоксидантних ферментів [10]. Хоча цей препарат має широке застосуван-

ня в медицині, проте не встановлено його вплив на скоротливість міометрія. Відомо, що аргіназа через гальмування утворення NO може впливати на кровообіг [11]. Контракційна активність міометрія залежить від його кровопостачання. Тому актуальними є дослідження скоротливості різних відділів міометрія за умов імунотоксичних реакцій, зміни функціонального стану мітохондрій та вивчення участі NO за таких експериментальних умов.

Мета нашої роботи – з'ясувати участь NO та мітохондрій в скоротливості ОБ і ЦВ міометрія за умов імунізації мишей бичачим сироватковим альбуміном (БСА).

МЕТОДИКА

Досліди проводили на статевозрілих самцях мишей лінії СВА із дотриманням основних положень Конвенції Ради Європи про охорону хребетних тварин, що використовуються в експериментах та в інших наукових цілях, від 18.03.1986 р., Директиви ЄС №609 від 24.11.1986 р., Наказу МОЗ України №66 від 13.02.2006 р. та Закону України «Про захист тварин від жорстокого поводження» від 21.02.2006 № 3447-IV. Тварин було поділено на 6 груп. До I групи ввійшли тварини, яким вводили фізіологічний розчин, $n=8$; до II – тварини, яких імунізували БСА («Sigma», США) (вводили зростаючі дози антигена раз на тиждень внутрішньовенно протягом 6 тиж за такою схемою: 150 – 300 мг БСА/кг маси миші, $n=8$); до III – миші, які отримували внутрішньоочеревинну ін'єкцію препарату мексидол (100 мг/кг, згідно із схемою імунізації, $n=8$); IV – блокатор аргінази II L-норвалін (внутрішньоочеревинно, 50 мг/кг, $n=4$); V – мексидол за умов імунізації БСА (внутрішньоочеревинно, 100 мг/кг, $n=8$); VI – L-норвалін за умов дії мексидолу при імунізації БСА (внутрішньоочеревинно, в день після введення БСА і ГС, $n=8$).

Методом фазно-графічного аналізу визначали скоротливість ОБ і ЦВ матки. У декапі-

тованих під наркозом тварин відпрепарувували ОБ і ЦВ міометрія і поміщали в холодний розчин Кребса (4°C, pH 7,29) такого складу (ммоль/л): NaCl – 120, KCl – 5,9, NaHCO₃ – 15,5, NaH₂PO₄ – 1,2, MgCl₂ – 1,2, CaCl₂ – 2,5, глюкози – 11,5 («Sigma», США). Смужки міометрія переносили до експериментальної камери. Рівномірну перфузію розчину здійснювали перистальтичним насосом НП-1М. Ізометричну силу скорочень вимірювали механо-електричним перетворювачем (FT 106). Візуальний контроль досліджуваних показників проводили за допомогою осцилографа С1-83. Водночас отримували комп'ютерний запис в програмі IRIS Waveware версії 2.6.1. Базову активність реєстрували протягом 20–30 хв. Для кількісної характеристики фазних скорочень ОБ і ЦВ матки досліджували такі показники: амплітуду скорочень (F_{\max} , мН), частоту скорочень (ЧС, с⁻¹), тривалість активного стану – час між максимальною активацією (CV_{\max}) і дезактивацією (RV_{\max}) скорочення (Т, с), швидкість скорочення і розслаблення (CV_{\max} , RV_{\max} , мН/с), індекс скоротливості (ІС, як добуток F_{\max} на CV_{\max}/RV_{\max} , мН) [12].

Для статистичного аналізу результатів використовували програму GraphPad Prism version 5.00 for Windows (GraphPad Software, San Diego California USA). Результати перевіряли на нормальність розподілу за тестом Колмогорова–Смирнова. Далі використовували однофакторний дисперсійний аналіз ANOVA з порівнянням середніх значень між групами за тестом Ньюмена–Кейлса (Newman–Keuls post hoc test). Результати виражали як $M \pm SD$ (середнє \pm стандартне відхилення). $P < 0,05$ вважалося статистично вірогідним.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

У ОБ матки за умов дії ГС амплітуда зросла в 1,85 раза ($P < 0,05$) та ІС в 2,17 раза ($P < 0,01$), а у ЦВ – в 1,84 та 1,72 раза відповідно ($P < 0,01$) порівняно з контролем. Введення ГС в ОБ викликало зменшення ЧС в 1,86 раза ($P < 0,001$)

і статистично не впливало на тривалість активного стану. У ЦВ тривалість активного стану зросла в 1,41 раза ($P<0,05$), а ЧС зменшилась в 1,31 раза порівняно з контрольними значеннями ($P<0,01$) (рисунок).

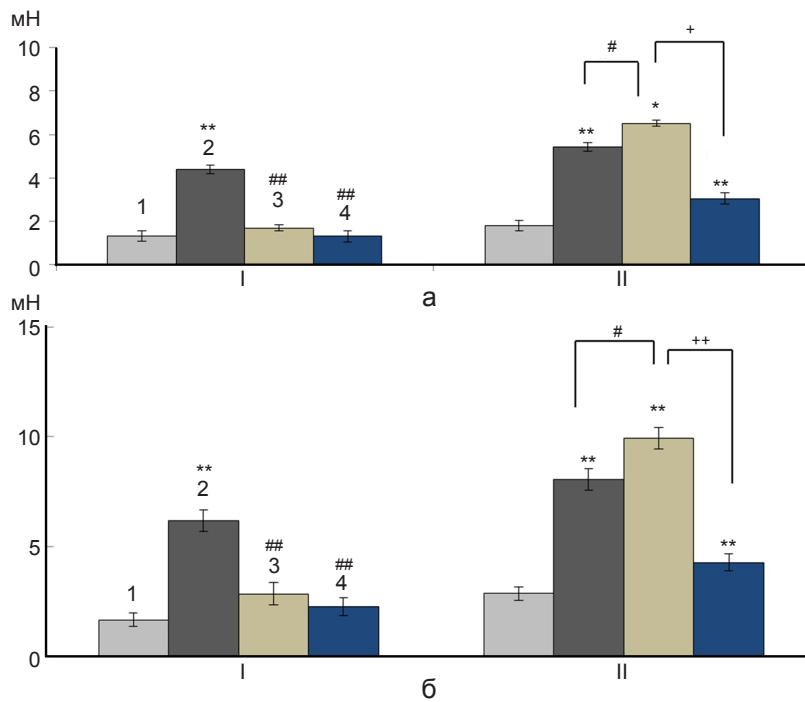
Згідно з даними літератури, введення ГС збільшує середню площу мітохондрій кардіоміоцитів та середню довжину саркомера [13]. Ми припускаємо, що через активацію енергосинтезувальної функції мітохондрій ГС чинить вплив на скоротливість міометрія мишей.

Показано, що введення L-норваліну зменшувало амплітуду у ОВ в 1,78 раза ($P<0,05$), тоді як ІС статистично не змінився. У ЦВ амплітуда скорочень зменшилась в 2,41 раза ($P<0,01$), ІС в 2,50 раза ($P<0,01$) порівняно зі значеннями у контролі. Введення L-норваліну вірогідно не змінювало ЧС та Т як у ОВ, так і в ЦВ матки. Таким чином, L-норвалін зменшував скоротливість обох відділів, проте зміна ІС була різною, що може свідчити про

різний пул NO в ОВ і ЦВ міометрія. Зміни амплітуди та ІС ОВ і ЦВ за умов імунізації мишей БСА і введення мексидолу та L-норваліну представлені на рисунку.

Встановлено, що за умов імунізації БСА після введення мексидолу у ОВ амплітуда зменшилась в 2,6 раза, ІС в 2,2 раза ($P<0,01$), у ЦВ матки амплітуда зросла в 1,2 раза та ІС в 1,3 раза ($P<0,05$) порівняно з відповідними значеннями у імунізованих тварин. У ОВ відбувалося зменшення ЧС в 2,6 раза ($P<0,01$), значення Т статистично не змінилось. У ЦВ встановлено зростання Т в 2,2 раза ($P<0,001$) та зменшення ЧС в 2,0 раза порівняно з такими у імунізованих БСА тварин ($P<0,05$). Застосування ГС сприяло нормалізації ЧС.

Введення блокатора аргінази II за умов дії ГС на тлі імунізації мишей БСА зумовлювало зниження амплітуди та ІС в обох відділах міометрія. Проте ці значення в ОВ наближались до контрольних, а у ЦВ були вищими і прирівнювалися до значень, які спостеріга-



Зміни амплітуди (а) та індексу скоротливості (б) оваріального (I) і цервікального (II) відділів матки за умов імунізації мишей бичачим сироватковим альбуміном і введення мексидолу та L-норваліну: 1 – контроль; 2 – імунізація; 3 – мексидол за умов імунізації; 4 – мексидол і L-норвалін за умов імунізації; * $P<0,01$, ** $P<0,001$ відносно контролю, # $P<0,01$; ## $P<0,001$ відносно імунізованих тварин; + $P<0,01$, ++ $P<0,001$ відносно тварин, яким вводили мексидол при імунізації

ються при дії ГС у інтактних тварин. Отримані результати можуть свідчити про те, що аргіназа II за умов імунізації БСА та активації енергосинтезувальних функцій мітохондрій задіяна в змінах скоротливості ЦВ міометрія. Водночас скоротлива активність ОВ менше залежить від NO, продукованого за аргіназним шляхом.

ВИСНОВКИ

1. При імунізації БСА зміна функціонального стану мітохондрій за допомогою мексидолу призводить до зміни параметрів скоротливості матки: в ОВ – зменшує амплітуду та ІС, а у ЦВ – викликає їх зростання.

2. Блокатор аргінази II L-норвалін зменшує параметри скоротливості в обох відділах міометрія, проте не впливає на ІС у ОВ, що може свідчити про різний пул NO в ОВ і ЦВ матки.

3. За умов імунізації БСА, яка призводить до імуноопосередкованого запального процесу, особливості скоротливості ОВ і ЦВ матки зумовлені змінами функціонального стану мітохондрій, а також пов'язані з залученням NO.

A.P. Lytvynenko, T. Yu. Voznesenska, R.I. Yanchiy

THE ROLE OF NO AND MEXIDOL IN CONTRACTILITY OF OVARIAN AND CERVICAL PARTS OF UTERUS UNDER THE CONDITION OF IMMUNE-MEDIATED INJURY IN MICE

Contractility of ovarian (OP) and cervical parts (CP) of uterus under the condition of immune-mediated injury which was induced by immunization with bovine serum albumin (BSA) was investigated. It was shown that under the activation of energy-synthesizing function of mitochondria with Mexidol the frequency of reductions in both uterine parts decreased, the amplitude and contractility index in the OP and CP as well as the duration of the active state in CP increased. Mexidol under the condition of immunization with BSA leads to the decrease in amplitude in 2,6 time and contractility index in 2,2 time in OP and to the increase of them in CP.

It was shown that contractility features of ovarian and cervical parts of uterine under the condition of BSA- induced immunization were caused by changes of mitochondria

functional state and were associated with nitric oxide.

Key words: contractility, ovarian and cervical uterine parts, BSA-immunization, nitric oxide.

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

A.П. Литвиненко, Т.Ю. Вознесенская, Р.И. Янчий

ВЛИЯНИЕ NO И МЕКСИДОЛА НА СОКРАТИМОСТЬ ОВАРИАЛЬНОГО И ЦЕРВИКАЛЬНОГО ОТДЕЛОВ МАТКИ МЫШЕЙ В УСЛОВИЯХ ИММУНООПОСРЕДОВАННОГО ВОСПАЛИТЕЛЬНОГО ПРОЦЕССА

Исследовали сократимость овариального (ОО) и цервикального (ЦО) отделов матки у мышей в условиях иммуноопосредованного воспалительного процесса, вызванного иммунизацией бычьим сывороточным альбумином (БСА). Установлено, что в условиях активации энергосинтезирующих функций митохондрий с помощью мексидола уменьшается частота сокращений в обоих отделах миометрия, возрастают амплитуда и индекс сократительности, а также продолжительность активного состояния в ЦО. Мексидол в условиях иммунизации БСА приводит в ОО к уменьшению амплитуды в 2,6 и индекса сократимости в 2,2 раза, а в ЦО – вызывает их повышение. Показано, что особенности сократительности ОО и ЦО матки обусловлены изменениями функционального состояния митохондрий, а также связаны с оксидом азота, пул которого может быть различен в исследуемых отделах матки.

Ключевые слова: сократительность; овариальный и цервикальный отделы матки; иммунизация бычьим сывороточным альбумином; оксид азота.

REFERENCES

1. Mosher AA, Rainey KJ, Bolstad SS. Development and validation of primary human myometrial cell culture models to study pregnancy and labour. BMC Pregnancy and Childbirth. 2013; 13 Suppl 1:S7.
2. Kazaryan KV, Hunanyan NG, Melkonyan NN. Effect of Blood Supply on Parameters of Pacemaker Activity of Rat Uterus. J of Evolutionary Biochem. and Physiol. 2013; 49 (1): 60–6.
3. McCloskey C, Rada C, Bailey E. The inwardly rectifying K⁺ channel KIR7.1 controls uterine excitability throughout pregnancy. EMBO Mol Med. 2014; (6): 1161–74.
4. Volkova NO, Yuhta MS, Yurchuk TO, Stepanuk LV, Ivanova OD. Modeling of chronic ovary inflammation. Pathologia. 2014; 1 (30): 100–4. [Ukrainian].
5. Prins JR, Kieffer TE, Scherjon SA. Immunomodulators to treat recurrent miscarriage. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol. 2014; 181:334-7.
6. Gatto M, Iaccarino L, Canova M, Zen M, Nalotto L,

- Ramonda R. et al. Pregnancy and vasculitis: a systematic review of the literature. *Autoimmun Rev.* 2012; 11 (6-7): 447–59.
7. Danylovych YuV. Nitric oxide as the regulator of intracellular homeostasis in the uterus myocytes. *Ukr Biokhim Zh.* 2012; 84 (3): 5-25. [Ukrainian].
8. Kalejnikova ON, Blashkiv TV, Yanchiy IR, Voznesenskaya TYu. Miometrium contraction activity in conditions of mitochondrion functional changes at mice. *Ukr Med Almanac.* 2013; 16 (1): 186-8.
9. Shchulkin AV. Effect of mexidol on the development of the phenomenon of the neuronal excitotoxicity in vitro. *Zh Nevrol Psikhiatr Im SS Korsakova.* 2012;112 (2): 35-9.
10. Yevsegneyeva IV, Dolgushina AI. Administration of Mexidol in treatment of elderly and senile patients with chronic gastrointestinal diseases combined with atherosclerosis in abdominal aorta and age-related macular degeneration. *Effective pharmacotherapy.* 2014, 30 (1): 18-22. [Russian].
11. Lucas R, Fulton D, Caldwell RW, Romero MJ. Arginase in the vascular endothelium: friend or foe? *Front Immunol.* 2014, Nov 17;5:589.
12. Gullam J, Blanks A, Thornton S, Shmygol A. Phase-plot analysis of the oxytocin effect on human myometrial contractility. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2009; 144 (Suppl. 1): 20-4.
13. Bugrova ML, Kharkovskaya EE, Yakovleva EI. The effect of mexidol on atrial natriuretic peptide in langendorf rat heart preparation. *Modern Technologies in Medicine.* 2014, 6 (2): 25-31.[Russian].

Матеріал надійшов до редакції 11. 05. 2015 р.