ՀԱՅԱՍՏԱՆԻ ԳԻՏՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐԻ ԱԶԳԱՅԻՆ ԱԿԱԴԵՄԻԱ
НАЦИОНАЛЬНАЯ АКАДЕМИЯ НАУК АРМЕНИИ
NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF ARMENIA
ДОКЛАДЫ ԶԵԿՈՒՅՑՆԵՐ REPORTS

Հատոր Том Volume 115 2015 № 3

ФИЗИОЛОГИЯ

УДК 612.73+612.468

К. В. Казарян, Н. Г. Унанян, Т. А. Пилипосян

Особенности влияниия окситоцина на спонтанную электрическую активность овариальной зоны миометрия крысы

(Представлено чл.- кор. НАН РА Л.Р.Манвеляном 14/V 2015)

Ключевые слова: *овариальный отдел, спонтанная активность, потенциал действия, ритмогенная зона, миометрий, окситоцин.*

Спонтанная электрическая активность небеременной крысы представляет собой разряды периодически возникающих вспышек потенциалов действия, которые являются результатом циклических деполяризаций мембран клеток [1, 2]. Данный автоматизм, миогенный по своей природе, представлен как в теле самой матки, так и в крайних отделах маточных труб [3-6]. Аналогично другим гладким мышцам in vivo в этом типе ткани параллельно со спонтанной электрической активностью генерируются и соответствующие им сокращения, даже при условии ее изоляции [7]. При беременности и особенно в поздние ее сроки наблюдаются заметные изменения в процессе генерации спонтанной активности во всех ритмогенных зонах органа, стимулирующие его контрактурную деятельность [8]. Известно, что основное функциональное значение данного репродуктивного органа – направленная контрактурная деятельность, обеспечивающая реализацию продвижения плода при родах Изучение особенностей электрофизиологических свойств ритмогенных областей необходимо для выявления механизмов, координирующих синхронизацию всех электрических активностей в этих условиях. Ведущая роль в этом процессе скорее всего обеспечивается спонтанной активностью овариального локуса миометрия [8, 9].

Окситоцин относится к числу физиологически активных соединений, основным свойством которого является регуляция репродуктивных процессов, в частности, стимуляция маточных сокращений. Данный процесс сопровождается деполяризацией мембраны и резким учащением разрядов спонтанной активности [10-12].

Целью настоящей работы является проведение сравнительного анализа параметров спонтанной активности овариальной зоны миометрия при воздействии окситоцина как в норме, так и при изоляции от влияния нижерасположенных активных зон. Решение данного вопроса поможет выявлению процессов синхронизации всех ритмогенных областей миометрия.

Методы исследования. Опыты проводили на небеременных самках крыс массой 200-250 г, наркотизированных нембуталом (50-55 мг/кг внутрибрюшинно). Эксперименты были острыми, и после завершения регистраций животные забивались.

Вскрывалась брюшная полость и обнажался корпус матки с расположенными с двух сторон маточными трубами. Матка денервировалась перерезкой корешков нервов plexus hypogastricus, uterinus, uterovaginalis. Регистрация активности проводилась с поверхности овариальной области левого рога (рис. 1). Спонтанная электрическая активность отводилась биполярным электродом (межэлектродное расстояние соответствовало 2 мм). Исключение взаимосвязи между ритмогенными областями осуществлялось путем перерезки маточного рога в соответствующей зоне (рис. 1, отмечено линией).

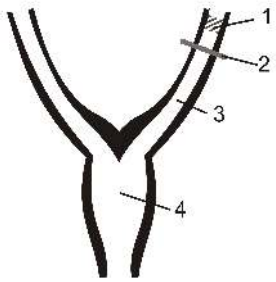

Рис. 1. Схематическое изображение тела матки и маточных труб крысы: 1 – овариальная зона, 2 – область перерезки, 3 – левый рог, 4 – тело матки.

Анализ электрических регистраций проводился путем определения значений следующих параметров спонтанных потенциалов действия: частота, амплитуда, средняя скорость нарастания пика, продолжительность нарастания пика (продолжительность увеличения амплитуды потенциала действия до максимального значения при фазе нарастания), половина ширины (время, за которое формируется верхняя часть пика начиная с уровня мембранной поляризации, соответствующей половине амплитуды потенциала действия при фазе нарастания до этого же уровня потенциала при фазе падения). Все отмеченные показатели определялись путем усреднения этих величин как в пределе одной вспышки, так и всех экспериментов данной серии.

На рисунках как единичные потенциалы действия, так и наложенные друг на друга представляют собой типичные формы усредненных потен-

циалов действия. Усреднение форм потенциалов действия также проводилось как в пределах каждого эксперимента, так и по всем экспериментам.

Спонтанная электрическая активность регистрировалась на 4-канальном приборе, разработанном в Институте физиологии им. Л. А. Орбели НАН РА для оценки электрической активности гладкой мускулатуры [21]. Прибор дает возможность проводить одновременную регистрацию с 4 отделов исследуемой структуры. Отношение сигнал–шум прибора позволяет осуществлять достоверную регистрацию отклонений сигналов с амплитудой до 10 мкВ. Проводилась полосовая фильтрация регистрируемых сигналов в диапазоне 3 – 30 Гц. Коммуникация прибора с ЭВМ осуществлялась с использованием USB порта. Программа, обеспечивающая регистрацию сигналов, разработана с применением пакета программ Lab View. Последующий статистический анализ характера зарегистрированных сигналов проводился с использованием пакетов программ Origin-8.5 и Sigma Plot 11.0. Оценка достоверности изменения полученных данных осуществлялась согласно t-критерию Стьюдента. Приведенные записи отдельных экспериментов представляют картину активности одного из аналогичных эксперниментов, полученных на 14 животных.

Все эксперименты были проведены в соответствии с правилами Ереванского медицинского университета по этике в области ухода и использования лабораторных животных. Эксперименты, а также уход за животными выполнены в соответствии с «Правилами и нормами гуманного обращения с объектами исследования».

Результаты исследования и обсуждение. На рис. 2 приведена запись одного из типичных экспериментов, представляющая собой картину спонтанной электрической активности овариальной зоны маточного рога. Из данной области миометрия, как и из других ритмогенных локусов (цервикальная область и тело матки) регистрируются периодически возникающие вспышки активности, представляющие собой последовательность потенциалов действия, которые постепенно учащаются и далее урежаются и затухают. На рис. 2, А показана одна из этих вспышек как в норме, так и при введении окситоцина. Все изменения параметров потенциалов действия, сопутствующие воздействию окситоцина, наглядно видны при наложении друг на друга развернутых их типичных форм в норме и в присутствии гормона (рис. 2, Б).

Анализ основных параметров потенциалов действия, формирующих вспышки для данного локуса миометрия как в норме, так и при введении окситоцина, выявил определенные различия в их свойствах. Для наглядности выявленных проведенным анализом изменений характеристик электрических активностей результаты представлены в процентном соотношении к норме (рис.2, В). Как видно из рисунка, величины почти всех исследуемых параметров значительно возрастают при введении гормона. При этом наибольшее увеличение претерпевает амплитуда потенциала действия (до 141.1 %), а показатель активности – половина ширины остается без изменений.

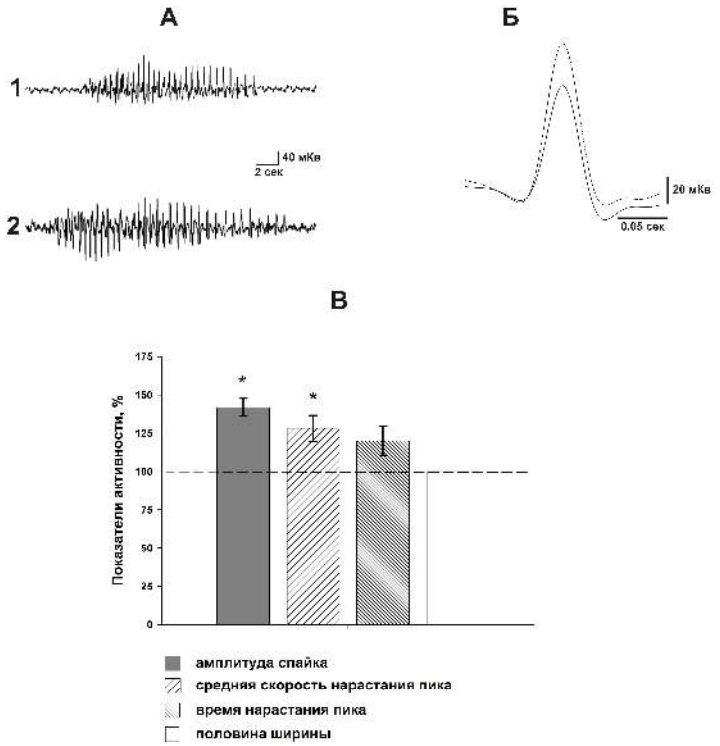

Рис. 2. Влияние окситоцина на спонтанную электрическую активность овариальной зоны миометрия в нормальных условиях. А: 1 – норма, 2 – введение окситоцина; Б – наложение друг на друга единичных потенциалов действия вспышек в норме (сплошной контур), при воздействии окситоцина (штриховой контур) соответственно; В – процентное соотношение показателей потенциалов действия после введения окситоцина по отношению к норме. Штриховой линией показана норма. n = 13. ***P < 0.0001, *P < 0.01.

В следующей серии экспериментов исследовалось влияние окситоцина на активность овариальной зоны, изолированной от влияния нижерасположенных ритмогенных областей. Обособление данного участка проводилось путем перерезки маточной трубы в области, расположенной несколько ниже исследуемого локуса, чтобы исключить возможность повреждения его пейсмекеров (рис. 1). После столь резкого травмирования и нарушения целостности ткани, сопутствующих перерезке, стабилизация активности, как правило, наблюдалась через 5 мин. Регистрация активности начиналась по истечении этого времени и продолжалась в течение 30 мин. И лишь потом вводился окситоцин. В качестве дополнительного контроля для изучения влияния окситоцина анализировались те вспышки активности, которые регистрировались непосредственно за 5-6 мин до введения окситоцина. Как видно из рис. 3,А, *2* и *3*, при перерезке рога наблюдаются некоторые изменения в характере активности, последующее же воздействие окситоцина способствует активации разрядов.

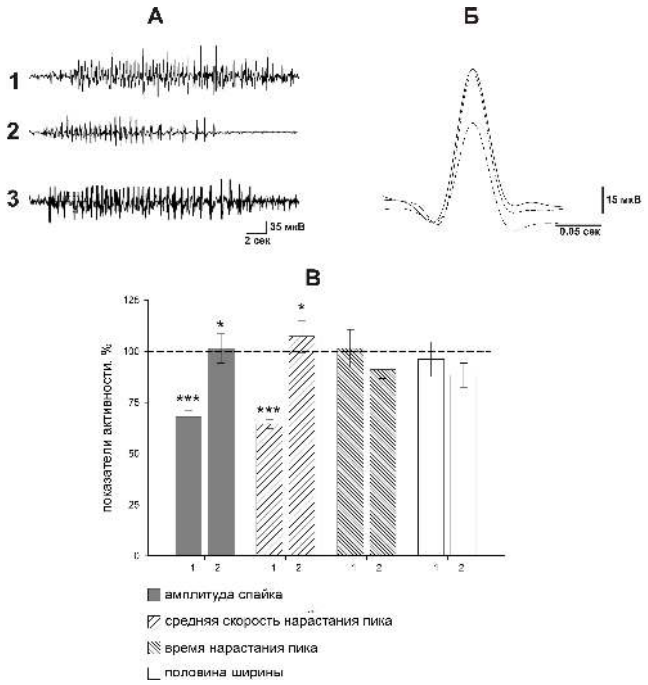

Рис. 3. Влияние окситоцина на спонтанную электрическую активность после перерезки маточной трубы. А: 1 – норма, 2 – после перерезки маточной трубы, 3 – введение окситоцина после перерезки маточной трубы; Б – наложение друг на друга единичных потенциалов действия вспышек в норме (сплошной контур) после перерезки (штрих-пунктирный контур) при воздействии окситоцина (штриховой контур) соответственно. Штриховой линией показана норма. Под столбиками: 1 – норма, 2 – воздействие окситоцина. n = 12. ***P < 0.0001, *P < 0.01.

Представленные справа на рис. 3, Б в развернутом виде наложенные друг на друга типичные формы потенциалов действия в соответствующих условиях свидетельствуют об этих изменениях активности. Сравнительный анализ результатов данной серии экспериментов представлен на рис. 3, В. Если такие показатели активности, как амплитуда и скорость нарастания пика после пересечения рога, уменьшались соответственно на 32 и 36 %, то продолжительность нарастания и половина ширины почти не изменялись. Вместе с тем последующее введение окситоцина способствует восстановлению всех исследуемых параметров активности в основном до таковых, соответствующих норме. Как видно из приведенных выше гистограмм (рис. 2, В и рис. 3, В), влияние окситоцина на амплитуду и скорость ее нарастания в овариальном локусе миометрия при изоляции от других активных зон значительно превосходят изменения показателей для нетронутой ткани (условия in situ). В отношении продолжительности нарастания амплитуды наблюдается противоположный эффект, показатель же активности – половина ширины остается без изменения.

На рис. 4 представлены описанные результаты, при этом за норму для данных по влиянию окситоцина в условиях пересеченного рога приняты показатели потенциалов действия в этих же условиях до введения окситоцина. Наложение друг на друга усредненных форм потенциалов действия, зарегистрированных в соответствующих указанных выше условиях, позволяет наглядно представить все отмеченные выше изменения их параметров (рис. 3, В). Таким образом, при нарушении целостности ткани окситоцин способствует возникновению более высокоамплитудных и быстрых потенциалов действия по сравнению с нетронутой тканью.

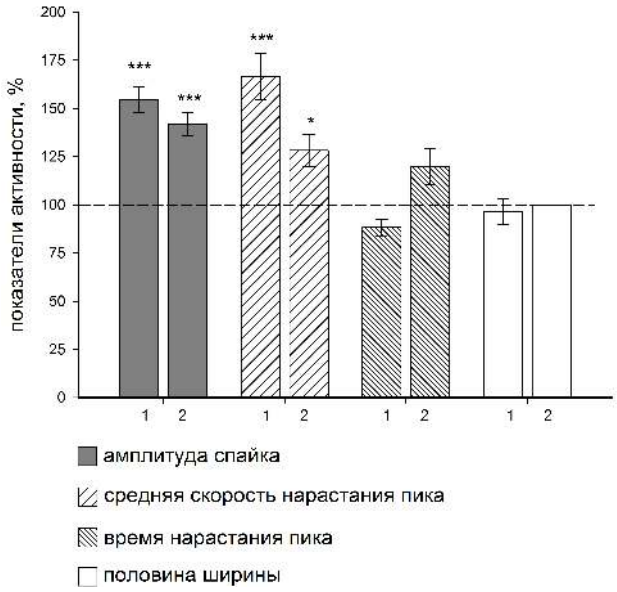

Рис. 4. Величины параметров потенциала действия в норме и после перерезки маточной трубы. Штриховой линией показана норма. Под столбиками: 1 – воздействие окситоцина после перерезки, 2 – воздействие окситоцина в норме. n = 12. ***P < 0.0001, *P < 0.01.

Как уже отмечалось выше, гладкомышечная ткань характеризуется особым реагированием на такой физиологический агент, как экзогенный окситоцин. Миометрий, как правило, относительно спокоен не только у небеременных, но и в начальной стадии у беременных организмов, при этом наблюдаются отдельные единичные нерегулярные контрактуры [2, 12]. Последние впоследствии (при родах) координируются для обеспечения целевой направленной деятельности органа – выталкивания плода [11, 13].

Известно, что возникновение контрактуры и, соответственно, электрической активности миометрия обеспечивается широким спектром ионных мембранных механизмов: Т- и L-типы кальциевых каналов, Na^+- и K^+-ионные каналы, Na^+/Ca^{++}-обменный механизм и т.д. [13-17]. Причем в

активации этих ионных систем в миометрии большая роль отводится уровню мембранного потенциала, который в зависимости от гормонального фона изменяется в достаточно широких пределах – от -75 до -45 МВ [18, 19]. Все эти факторы и определяют значительную вариабельность характеристик потенциалов действия и, соответственно, их форму.

Согласно ранним исследованиям, автономная активность овариальной области миометрия по сравнению с ритмогенезом нижерасположенных зон занимает обособленное положение [12, 20]. Более того, выявлена также регуляторная роль овариальной области в обеспечении максимального направленного воздействия всех взаимосвязанных между собой ритмогенных зон миометрия на тело матки [12]. Данный факт свидетельствует о важном функциональном значении активности овариального локуса миометрия для однонаправленного распространения волны возбудимости. Исходя из этого влияние такого специфического для исследуемой ткани гормона, как окситоцин, поможет выявлению процессов, координирующих активность всех ритмогенных зон миометрия.

Полученные в данной работе результаты показали, что изменения характеристик потенциалов действия при воздействии окситоцина на активность овариального отдела миометрия в условиях in situ отличаютя от наблюдаемых, зарегистрированных после перерезки маточной трубы. Известно также, что конфигурация спонтанно генерируемых спайков в миометриальной ткани зависит от условий, при которых проводится регистрация активности [13]. Так, при выделении ткани из организма (условия in vitro) наблюдается деполяризация мембранного потенциала, которая способствует как активации некоторых ионных каналов, так и инактивации других, в связи с чем соответственно меняется форма регистрирумых потенциалов действия. Так или иначе в каждом из анализируемых в работе результатов, полученных при воздействии окситоцина на овариальную зону миометрия, наблюдается активация возбудимости, выражающаяся увеличением амплитуды потенциала действия и скорости его нарастания.

Институт физиологии им Л. Орбели НАН РА

К. В. Казарян, Н. Г. Унанян, Т. А. Пилипосян

Особенности влияния окситоцина на спонтанную электрическую активность овариальной зоны миометрия крысы

Исследовалась роль окситоцина в возникновении спонтанной электрической активности овариальной зоны миометрия как в условиях сохранения целостности ткани, так и при изоляции данного локуса. Выявлены определенные различия в свойствах основных параметров потенциалов действия, формирующих вспышки активности. Показана активация возбудимости при воздействии окситоцина, выражающаяся увеличением амплитуды потенциалов действия и скорости их нарастания, причем значения последних повышаются при нарушении целостности ткани.

Ք. Վ. Ղազարյան, Ն. Գ. Հունանյան, Թ. Ա. Փիլիպոսյան

Օքսիտոցինի ազդեցության յուրահատկությունները առնետի միոմետրիումի օվարիան շրջանի ինքնաբուխ էլեկտրական ակտիվության վրա

Հետազոտվել է օքսիտոցինի դերը միոմետրիումի օվարիան շրջանի ինքնաբուխ էլեկտրական ակտիվության առաջացման գործում, ինչպես ամբողջական միոմետրիումի, այնպես էլ այդ շրջանի մեկուսացման պայմաններում: Ի հայտ են եկել որոշակի տարբերություններ գործողության պոտենցիալների հիմնական չափանիշներում, որոնք ձևավորում են ակտիվության բռնկումները: Ցույց է տրված գրգռման ակտիվացում, որն արտահայտվում է գործողության պոտենցիալների ամպլիտուդաների և նրանց արագությունների աճման բարձրացումով, ընդ որում վերջիններիս արժեքները մեծանում են ուսումնասիրվող շրջանի մեկուսացման պայմաններում:

K. V. Kazaryan, N. G. Hunanyan, T. A. Piliposyan

Effect of Oxytocin on Spontaneous Electrical Activity of the Ovarian Horn Area in Rat Myometrium

The role of oxytocin in generation of spontaneous electrical activity of the ovarian horn area was studied in conditions of tissue integrity preservation as well as in isolation of the given locus. Some differences were revealed in properties of the main parameters of action potentials constituting the bursting activity. Under the influence of oxytocin the excitability activation expressed by the increase of the rise-rate and amplitude of action potentials was shown. It is important to mention that the rise-rate values increase when the tissue is damaged.

Литература

1. *Blackburn S. T. Materna l-* fetal, & neonatal physiology: a clinical perspective (3rd edit.). 2007. Chapter 4. Saunders Elsevier, St Louis.
2. *Garfield R. E., Maner W. L-* Semin. Cell. Dev. Biol. 2007. V. 18. № 3. P. 289-295.
3. *Казарян К. В., Унанян Н. Г., Акопян Р. Р.* - Рос. физиол. журн. им. И. М. Сеченова. 2010. Т.96. №10. С. 981-987.
4. *Buhimschi C. S., Saade G. R., Buhimschi I. A., Gokdeniz R., Boyle M. B., Garfield R. E.* - Am. J. Obstet. Gynecol. 2000. V.183. № 1. P. 68-75.
5. *Crane L. H., Martin L.* - Reprod. Fertil. Dev. 1991. V. 3. P. 519-527.
6. *Shmygol A., Burdyga T., Duquette R., Mobasheri A., Vaillant C., Wray S.* - University of Cambridge, J. Physiol. 2004. 555P. C167.
7. *Reynolds S. R. M.* - Physiology of the Uterus. 1965. P. 10-19.
8. *Mancinelli R., Guariglia L., Racanicchi C., Bertuzzi A., Salinari S., Vitelli R.* - Quart. J. Exp. Physiol. 1988. V. 73. № 4. P. 459-469.
9. *Казарян К. В., Унанян Н. Г.* - Рос. физиол. журн. им. И. М. Сеченова. 2013. Т. 99. № 10. С. 1191-1199.

10. *Nakao K., MD, DMSc, Inoue Y., MD, DMSc, Okabe K., DDS, DMSc, Kawarabayashi T., MD, DMSc, Kitamura K., DDS, DDSc*- Am. J. Obstet. Gynecol. 1997. V.177. № 1. P. 222–228.
11. *Kimura T., Takemura M., Nomura S., Nobunaga T., Kubota Y., Inoue T.* – Endocrinology. 1996. V. 137. P. 780-785.
12. Maul *H., Maner W. L., Saade G. R., Garfield R. E.* - Clin. Perinatol. 2003. V. 30. P. 665-676.
13. *Parkington H. C., Coleman H. A.* - The Endocrinology of Parturition. 2001. V. 27. P. 179-200.
14. *Coleman H. A., Hart J. D. E., Tonta M. A., Parkington H. C.* - The Journal of Physiology. 2000. V. 523. № 3. P. 785–798.
15. *Shmygol A., Gullam J., Blanks A., Thornton S.* - Acta Pharmacol. Sin. 2006. V.27. № 7. P.827–832.
16. *Young R. C., Smith L. H., McLaren M. D.* – Am. J. Obstet. Gynecol. 1993. V. 169(4). P.785-92.
17. *Young R. C., Herndon-Smith L.* – Am. J. Obstet. Gynecol. 1991. V. 164 (1 Pt 1). P. 175-81.
18. *Parkington H. C., Tonta M. A., Brennecke S. P., Coleman H. A.* – Am. J. Obstet. Gynecol. 1999. V.181(6). P.1445-51.
19. *Sims S. M., Daniel E. E., Garfield R. E.* – J. Gen. Physiol. 1982. V. 80(3). P. 353-75.
20. *Казарян К. В., Унанян Н. Г., Меликсетян И. Б., Акопян Р. Р., Саваян А. А.* – Цитология. 2010. Т. 52. № 12. С. 990-995.