

РОЛЬ ОКСИТОЦИНА В АКТИВАЦИИ СПОНТАННОЙ ЭЛЕКТРИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ТЕЛА И РОГОВ МАТКИ У НЕБЕРЕМЕННЫХ КРЫС

© К. В. Казарян, Н. Г. Унанян, И. Б. Меликсетян, Р. Р. Акопян, А. А. Саваян

*Институт физиологии им. Л. А. Орбели НАН Армении, Ереван;
электронный адрес: lmanvel@neuroscience.am*

В работе исследовали влияние различных концентраций окситоцина (10^{-2} , 10^{-1} , 1 и 10 мкг/кг) на продолжительность разрядов спонтанной электрической активности и частоту спайков разных отделов рогов и тела матки небеременной крысы. Изменения данных параметров для овариального отдела рогов матки в этих условиях имели аналогичный характер в отличие от цервикальной области рогов и средней части тела матки, которые можно сгруппировать вместе в соответствии с изменениями в них. Наибольшая продолжительность генеза электрических разрядов зафиксирована для овариального отдела рогов матки при концентрации окситоцина 10 мкг/кг. Морфологические эксперименты показали, что из всех исследуемых областей овариальные отделы рогов матки характеризуются наибольшим количеством атипичных клеток, имеющих максимально выраженную функциональную активность.

Ключевые слова: матка, миометрий, овариальный отдел, рог матки, спонтанная активность, цервикальный отдел, шейка матки.

Принятые сокращения: ЛР — левый рог матки, ПР — правый рог матки.

Спонтанная электрическая активность гладкомышечной ткани небеременной крысы представляет собой разряды периодически возникающих всплесков потенциалов действия, которые являются результатом циклических деполяризаций мембран клеток (Csapo, 1962; Kuriyama, Suzuki, 1976; Kanda, Kuriyama, 1980; Maul et al., 2003). Исследования *in vitro* показали, что каждая клетка миометрия способна к пейсмекерной активности (Као, 1967). В отличие от матки, любой участок которой способен генерировать спонтанные разряды (Као, 1959), пейсмекерные области рогов матки у крыс располагаются на овариальных и цервикальных концах (Mancinelli et al., 1988; Crane, Martin, 1991).

В литературе весьма скудно представлены данные о механизмах, лежащих в основе возникновения пейсмекерной активности матки. Вместе с тем в спонтанно активных областях гладкомышечных тканей мочевого пузыря, мочеиспускательного канала, а также пиелоретерального соустья мочеточника, обеспечивающего ритмогенез всего органа (Smet et al., 1996; Klemm et al., 1999; Sergeant et al., 2000), были идентифицированы клетки, подобные интерстициальным клеткам Кахалы (возможно, обеспечивающих автоматизм). В недавних исследованиях на свежееотпрепарованных полосках матки беременной крысы также были обнаружены клетки, которые полностью отличались от миоцитов своей морфологией и ультраструктурой. Более того, методом «patch clamp» удалось охарактеризовать свойства этих клеток в сравнении с обычными миоцитами матки (Duquette et al., 2005). Морфологическую картину локализации атипичных клеток в гладкомышечных тканях матки небеременной крысы удобнее выявлять в условиях активации спонтанного автономного ритмогенеза.

Из всего многообразия физиологически активных соединений, изменяющих возбудимость мембраны клеток миометрия, определенный интерес вызывает окситоцин — один из основных регуляторов сократительной деятельности при родах (Edwards et al., 1986). Воздействие окситоцина сопровождается деполяризацией мембраны, приводящей к резкому учащению разрядов спайковой активности и соответственно к контрактуре миометрия (Vuhimschi et al., 2000).

Целью настоящей работы явилось изучение влияния окситоцина на спонтанную электрическую активность различных отделов матки и рога матки у небеременных крыс посредством комбинации электрофизиологических и морфогистохимических исследований.

Материал и методика

Опыты проводили на небеременных самках крыс (250—250 г), наркотизированных внутривенным введением нембутала (50—55 мг/кг), в условиях *in situ*. Эксперименты были острыми, и после завершения регистрации активности животных забивали. Вскрывали брюшную полость и обнажали корпус матки с расположенными с двух сторон маточными рогами. Матку денервировали перерезкой корешков нервов подчревного симпатического сплетения (plexus hypogastricus), маточного сплетения (uterinus) и маточно-влагалищного сплетения (utero vaginalis) (Унанян и др., 2009). Регистрацию активности проводили одновременно с поверхности разных отделов матки — овариальной и цервикальной областей каждого из рогов матки, тела и шейки матки. Активность

шейки матки регистрировали введением монополярного серебряного электрода в указанную область. Спонтанную электрическую активность остальных исследуемых зон фиксировали с помощью биполярных электродов (межэлектродное расстояние составляло 2 мм).

Все типы электрической активности регистрировали на энцефалографе EEG-8 S (Венгрия).

Окситоцин вводили внутривенно по 0.2—0.3 мл (в зависимости от массы животного) в концентрациях 10^{-2} , 10^{-1} , 1 и 10 мкг/кг. В каждом эксперименте исследовали одну концентрацию.

Морфогистохимические исследования проводили методом выявления активности Ca^{2+} -зависимой кислой фосфатазы (Меликсетян, 2007). Полученные этим методом микрофотографии адекватны поставленным задачам работы, обладают большой информативностью и позволяют анализировать определенные звенья метаболизма в исследуемых структурах.

Результаты

Как уже упоминалось, в отличие от тела матки на рогах матки спонтанная электрическая активность способна возникать лишь в крайних отделах (овариальном и цервикальном). В первой серии экспериментов мы рассмотрели некоторые электрофизиологические свойства всех отделов органа у небеременных крыс (рис. 1). Из пяти верхних отделов (рис. 1, области 1—3) в норме были зарегистрированы периодически возникающие всплески спайковой активности с несколько отличающимися друг от друга характеристиками. На шейке матки в этих условиях (рис. 1, область 4) мы регистрировали медленноволновые электрические колебания практически в течение всего эксперимента (Rajntar et al., 2001; Унанян и др., 2009). Все экспериментально наблюдаемые в этой зоне изменения будут рассмотрены далее.

В следующей серии экспериментов мы исследовали быстрые, спайковые процессы. На крайних отделах рогов и теле матки (рис. 1, области 1—3) мы регистрировали длительность генеза электрических разрядов и частоту спайков в пределе всплесков. Данные параметры можно

отнести к числу основных характеристик, определяющих контрактурную деятельность органа (Edwards et al., 1986).

Известно, что нерегулярные всплески спонтанной электрической активности могут наблюдаться и у небеременных крыс (de Lucas et al., 1988; Cavaco-Goncalves et al., 2006; Унанян и др., 2009), причем автоматически возникающие разряды активности, регистрируемые из разных областей органа, имеют различные продолжительность и частоту спайков. В табл. 1 приведены полученные нами данные для верхних отделов матки крысы (рис. 1, области 1—3) в норме. Интересно отметить, что и длительность регистрации активности, и частота генеза спайков для цервикального отдела обоих рогов несколько превосходят таковые показатели для овариальной области. Кроме того, правый рог матки (ПР) менее активен в норме, так как характеризуется значительно более низкими величинами этих параметров по сравнению с левым рогом (ЛР).

Следующую серию экспериментов мы посвятили изучению продолжительности генеза разрядов и частоты спайков крайних зон матки и рогов в зависимости от концентрации окситоцина. Для наглядности все результаты представлены в процентном соотношении к норме. Присутствие окситоцина в любой концентрации вызывает значительное увеличение продолжительности генеза электрических разрядов на обоих отделах рогов матки, а также на самом теле матки (рис. 2). При этом в овариальной области как ПР, так и ЛР (рис. 1, область 1) максимальное увеличение этой величины (почти втрое) отмечалось при 10^{-1} мкг/кг окситоцина, в то время как в противоположных концах рогов (цервикальный отдел), приграничных к телу матки (рис. 1, область 2), а также в самом теле матки (рис. 1, область 3) наибольшую продолжительность электрических всплесков мы наблюдали при концентрации окситоцина 1 мкг/кг. Важно отметить, что последующее увеличение концентрации окситоцина до 10 мкг/кг приводило к укорочению продолжительности регистрации активного состояния, что, тем не менее, все равно существенно превышало значения этого показателя для всех исследуемых областей в норме. Интересно, что спонтанные всплески активности, как правило, не регистрировались в овариальной области ПР в этих условиях.

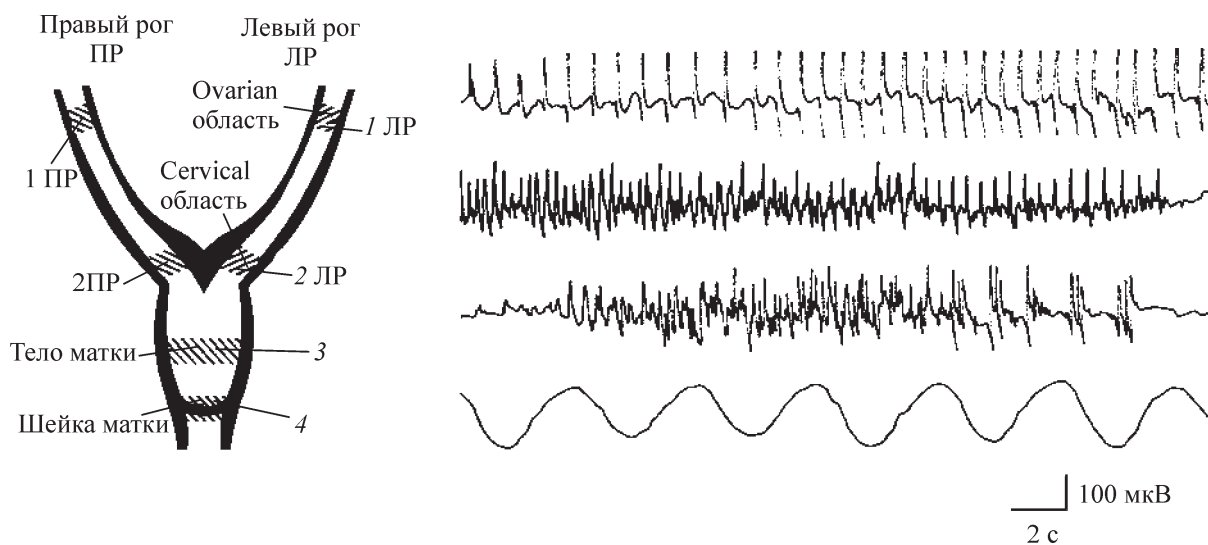


Рис. 1. Схематическое изображение тела и рогов матки с представленными типами спонтанных активностей, зарегистрированных из указанных областей. $n = 12$.

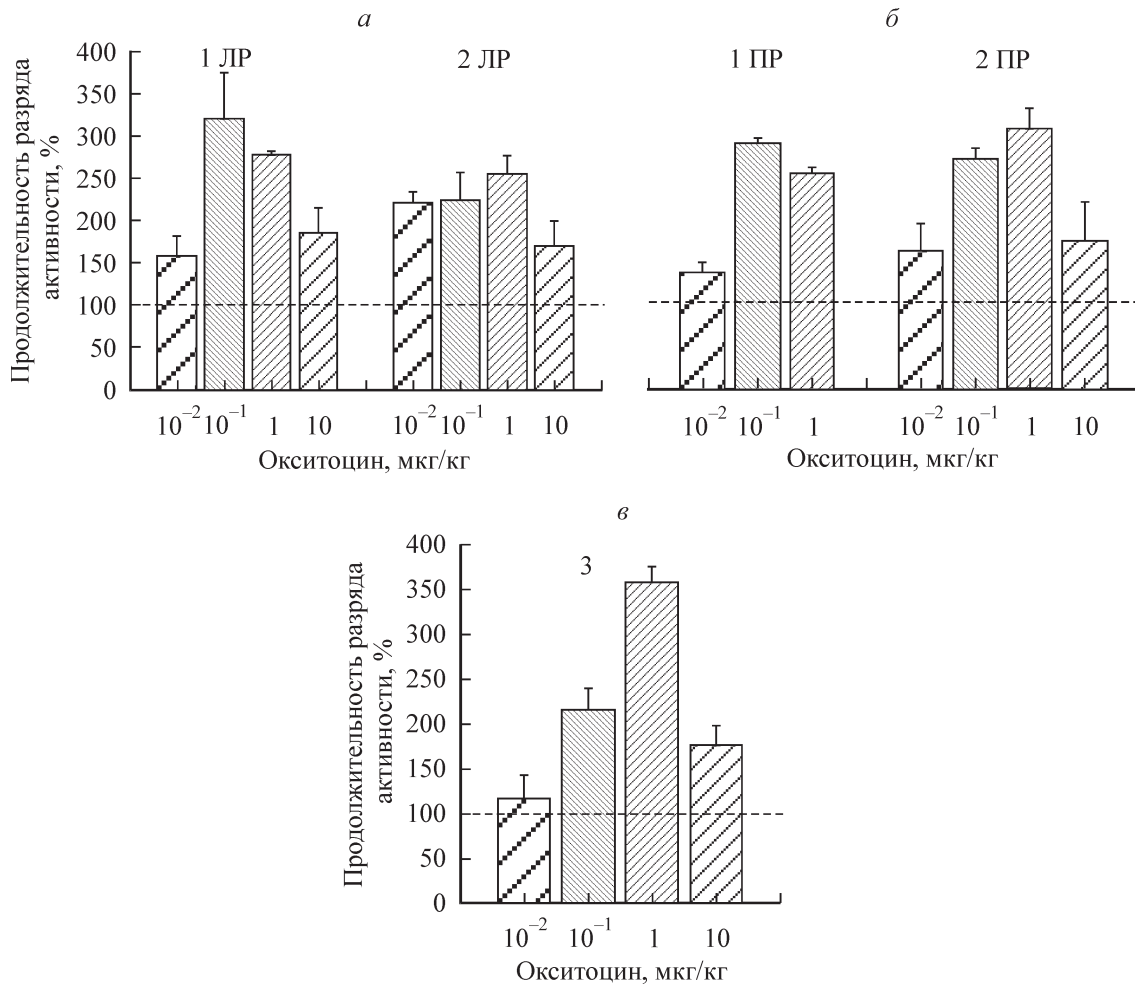


Рис. 2. Влияние окситоцина на продолжительность генеза разрядов спайковой активности для рогов и тела матки.

Над каждой группой столбиков сверху указаны области регистрации спайковой активности, обозначенные, как на рис. 1. Штриховой линией показана норма. $n = 19$. *а* — левый рог, *б* — правый рог, *в* — телометки. Разной штриховкой обозначены концентрации окситоцина.

Таким образом, в результате увеличения концентрации окситоцина в рассматриваемых пределах мы показали значительное возрастание продолжительности активного состояния для всех исследуемых областей.

Несколько иную картину мы наблюдали при исследовании частотных показателей спайкового ритмогенеза. Так, для рогов и тела матки наибольшее увеличение частоты спайков в разрядах отмечалось при концентрации окситоцина 1 мкг/кг (рис. 3). В отличие от продолжительности разрядов активности (рис. 2) присутствие окситоцина в концентрации 10^{-2} мкг/кг вызывало некоторое

уменьшение частоты ритмогенеза спайков в крайних отделах рогов матки. Повышение концентрации окситоцина до 10^{-1} мкг/кг приводило к учащению ритмогенеза спайков. Значительное учащение спайковой активности мы зарегистрировали в овариальном отделе ПР при концентрации окситоцина 1 мкг/кг, в то же время как в цервикальной области каждого рога частотные показатели не претерпевали существенных изменений при увеличении концентрации вводимого окситоцина (рис. 3, *а, б*).

В теле матки мы зафиксировали небольшое учащение спайковой активности в присутствии окситоцина в концентрации от 10^{-2} до 1 мкг/кг (рис. 3, *в*). Однако повышение концентрации окситоцина до 10 мкг/кг приводило к понижению этой активности до уровня чуть меньше нормы. Незначительные различия между значениями частоты спайков в овариальной области ЛР и ПР мы объясняем большими значениями этого показателя в норме (табл. 1). Частота спайкового автоматизма исследуемых областей менее подвержена влиянию окситоцина в отличие от продолжительности генеза разрядов активности.

Шейка матки при воздействии окситоцина ведет себя совершенно обособленно (табл. 2). Концентрация окситоцина 10^{-2} мкг/кг не оказывала никакого влияния на активность этой зоны, и регистрировались лишь медленные волны с частотой, соответствующей таковой в норме

Т а б л и ц а 1

Параметры активности различных отделов маточных труб и матки (норма)

Область регистрации	Продолжительность разряда активности, с	Частота спайков, колеб./мин
1 ЛР	50.80 ± 2.74	73.70 ± 3.78
2 ЛР	55.20 ± 4.88	84.00 ± 4.11
1 ПР	28.30 ± 5.08	59.20 ± 3.41
2 ПР	31.20 ± 3.61	75.70 ± 3.85
3	32.80 ± 2.00	92.10 ± 4.27

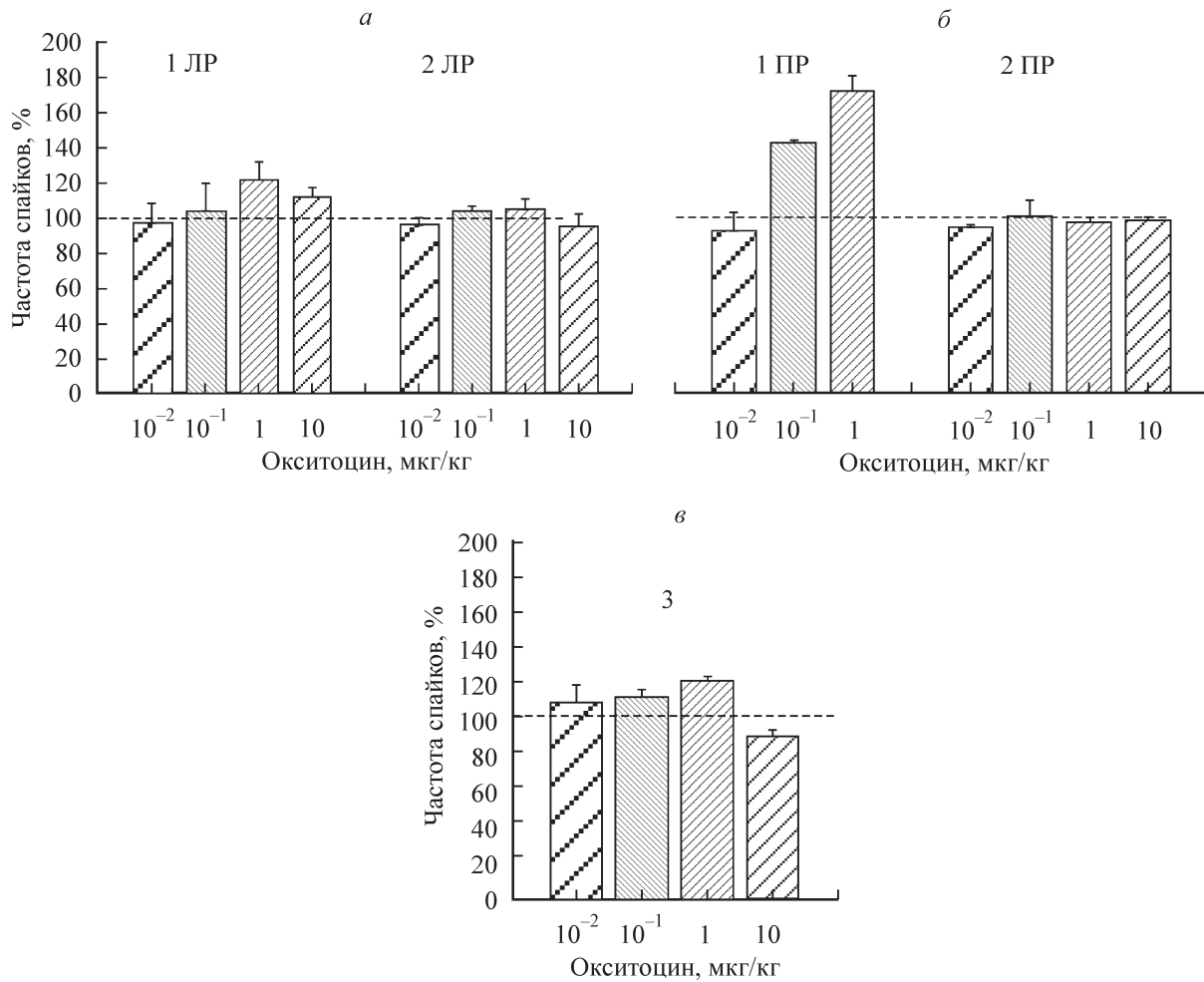


Рис. 3. Влияние окситоцина на частоту спайковой активности для рогов и тела матки.

Над каждой группой столбиков сверху указаны области регистрации спайковой активности, обозначенные, как на рис. 1. Штриховой линией показана норма. $n = 19$. Остальные обозначения те же, что и на рис. 2.

(16.6 ± 1.52 колеб./мин). Увеличение концентрации окситоцина до 10^{-1} мкг/кг приводило к исчезновению волн и появлению спайковой активности в течение определенного промежутка времени. Зависимость показателя продолжительности генерации спайков и их частоты от концентрации окситоцина приведена в табл. 2. Окситоцин в концентрации 10 мкг/кг несколько уменьшал исследуемые параметры шейки матки, что соответствует приведенным данным для остальных областей органа.

Сравнивая влияние окситоцина на продолжительность генеза разрядов и частоту спайковой активности, можно заключить, что цервикальный отдел рогов и тело матки можно сгруппировать вместе в соответствии со сходными изменениями этих показателей при увеличении концентрации окситоцина (рис. 2, 3). Овариальный отдел каждого из маточных рогов имел несколько другой характер изменений этих показателей (рис. 2, 3) в тех же пределах изменений концентрации окситоцина. Поэтому определенный интерес представлял сравнительный анализ морфологических картин всех трех верхних отделов матки (рис. 1).

Морфогистохимические исследования выявили на продольных срезах овариального отдела рога матки интактных крыс круглые или овальные атипичные клетки с высоким уровнем активности Ca^{2+} -зависимой кислой фос-

фатазы (рис. 4, а). Наиболее интенсивно выявляются ядра клеток. На фоне светлой цитоплазмы обнаружены Гомори-положительные круглые овоидные, кокобациллярные, в виде запятой, грануляции. Поскольку довольно часто эти клетки сливаются, на препаратах выявлено много ядер в большой массе цитоплазмы. Важно отметить, что наибольшее скопление таких клеток было в овариальном отделе рога. Такие же клетки мы обнаружили в цервикальном отделе рога матки (рис. 4, в) и в теле матки (рис. 4, д). Ферментная активность кислой фосфатазы у типичных миогенных элементов стенки матки значительно снижена по сравнению с атипичными клетками.

Таблица 2

Параметры спайковой активности области шейки матки		
Концентрация окситоцина, мкг/кг	Продолжительность разряда активности, с	Частота спайков, колеб./мин
10 ⁻²		
10 ⁻¹	50.0 ± 9.0	105.3 ± 18.7
1	66.5 ± 17.5	120.0 ± 12.0
10	25.0 ± 5.8	112.5 ± 16.8

Примечание. Норма — 16.6 ± 1.52 колеб./мин.

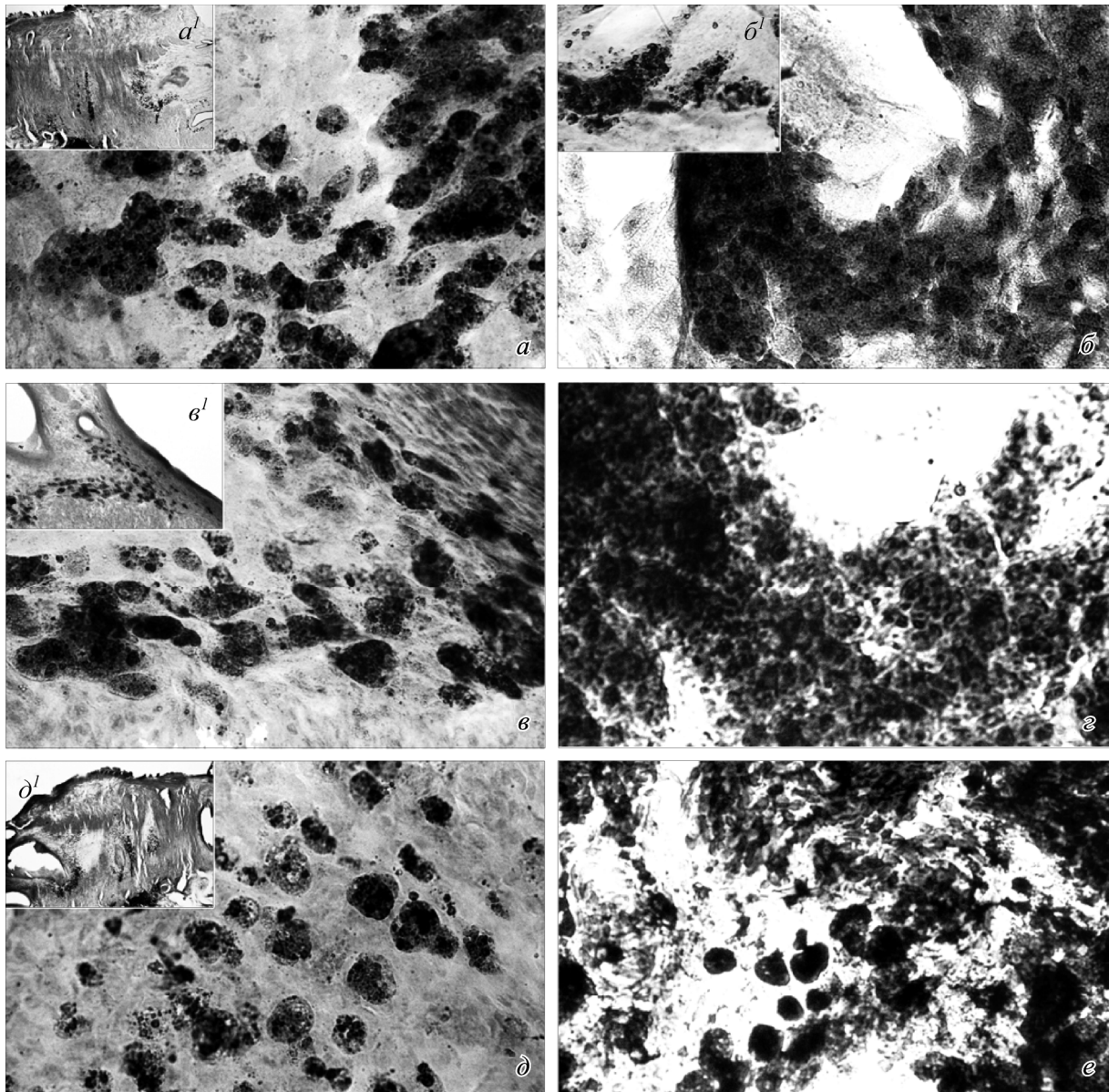


Рис. 4. Микрофотография продольных срезов различных отделов левого рога и тела матки intactных крыс (*а, в, д*) и крыс под действием окситоцина (*б, з, е*).

а, б — овариальный отдел рога; *в, з* — цервикальный отдел рога; *д, е* — тело матки.
Увел.: *а', в', д'* — 25×, *б* — 400× и 1000×.

Воздействие окситоцина приводило к резкому усилению ферментативной активности в цитоплазме атипичных клеток. Местами эти клетки образовывали глыбки, и их форма становилась изменчивой, что усиливало интенсивность окрашивания, придавая месту расположения затемненный вид. В овариальном отделе рога матки эти клетки темно окрашены, и невозможно определить границы между ядром и цитоплазмой (рис. 4, *б*). Интенсивно окрашивались также атипичные клетки тела матки (рис. 4, *е*) и цервикального отдела рога матки (рис. 4, *з*).

Согласно литературным данным, в верхних мочевыводящих путях, в частности в пиелоуретеральном соустье, были обнаружены клетки, подобные интерстициальным клеткам Кахала (Klemm et al., 1999). Они были неправильной формы с овальным ядром, множеством контактирующих отростков и описывались как фибробластоподобные клетки, обеспечивающие пейсмекерную

активность. Однако описанные клетки не являлись иммунореактивными с α -актином гладкомышечных клеток, которые присутствуют в типичных гладкомышечных клетках или С-Kit-позитивных пейсмекерных клетках. Согласно полученным данным, гладкомышечные клетки отличались от обнаруженных атипичных клеток уровнем ферментативной активности кислой фосфатазы. Так, атипичные клетки обладали высокой активностью Ca^{2+} -зависимой кислой фосфатазы, несмотря на то что для определения достоверной природы этих клеток необходимо использовать дополнительные иммуногистохимические маркеры. Тем не менее установлено, что наибольшей ферментативной активностью кислой фосфатазы из всех рассматриваемых отделов обладает овариальный отдел рога матки.

Полученные нами результаты гистохимического исследования полностью подтверждали наличие различных

«физиологических» состояний в исследуемых областях органа. Таким образом, мы наблюдали полное соответствие между данными электрофизиологических и морфологических экспериментов.

Обсуждение

Анализ действия окситоцина на крайние области рогов матки показал, что основным эффектом при воздействии данного гормона выражался в значительном увеличении продолжительности спайковых разрядов. При этом достаточно низкое содержание препарата в крови (10^{-1} мкг/кг) в сравнении с нормой вызывало наибольшее увеличение этого параметра (до 3 раз). Высокая концентрация окситоцина приводила к уменьшению показателей активности матки, что согласуется с литературными данными (Buhimschi et al., 2000). Однако концентрация окситоцина 0,2 нМ достаточна для деполяризации мембраны гладкомышечных клеток миометрия до максимально активного состояния, которое сопровождается учащением спайковой активности, удлинением периода генерации разрядов и соответственно контрактуры. Дальнейшее увеличение концентрации гормона вызывает постепенное ингибирование этих параметров (Edwards et al., 1986), что также согласуется с полученными нами результатами для концентрации окситоцина 10 мкг/кг не только для тела матки, но и для крайних отделов маточных рогов.

Естественно, что для обеспечения контрактурной деятельности матки при родах необходима координация всех пейсмекерных областей, определяющая полярность ее направления. Известно, что ведущая роль в обеспечении продольной контрактуры матки отводится пейсмекерам, находящимся в овариальном отделе рогов матки (Crane, Martin, 1991). Показано также, что продолжительность разрядов электрической активности является определяющим параметром возникновения координированной контрактуры матки (Buhimschi et al., 2000). Согласно представленным нами в данной работе результатам, при активации именно овариального отдела маточной трубы окситоцином отмечается наибольшая продолжительность генеза электрических разрядов. Морфогистохимические исследования также подтверждают этот факт — наибольшее количество атипичных клеток обнаружено именно в этом отделе, который характеризуется наибольшей ферментативной активностью кислой фосфатазы.

Согласно нашим предварительным результатам (данные не представлены), у 15—20-суточных крыс не наблюдается спонтанной электрической активности органа. Морфологические исследования также не выявили присутствия описанных выше атипичных клеток. Мы предполагаем, что в процессе полового созревания развиваются определенные ритмогенные (атипичные) клетки, обеспечивающие электрическую активность исследуемого органа.

Список литературы

- Меликсетян И. Б. 2007. Выявление активности Ca^{2+} -зависимой кислой фосфатазы в клеточных структурах мозга крыс. Морфология. 131(2) : 77—80.
- Унанян Н. Г., Казарян К. В., Тиранян А. С. 2009. Исследование спонтанной электрической активности различных областей матки крысы. В кн.: Материалы Международной научной конференции «Актуальные проблемы интегративной деятельности и пластичности нервной системы». Ереван. 306—311.
- Buhimschi C. S., Saade G. R., Buhimschi I. A., Gokdeniz R., Boyle M. B., Garfield R. E. 2000. Effect of stimulatory and inhibitory drugs on uterine electrical activity measured noninvasively from the abdominal surface of pregnant rats. Amer. J. Obstet. Gynecol. 183 : 68—75.
- Cavaco-Goncalves S., Marques C. C., Horta A. E., Figueiroa J. P. 2006. Increased cervical electrical activity during oestrus in progestagen treated ewes: possible role in sperm transport. Anim. Reprod. Sci. 93 : 360—365.
- Crane L. H., Martin L. 1991. Pace-maker activity in the myometrium of the oestrous rat: *in vivo* studies using video-laparoscopy. Reprod. Fertil. Develop. 3 : 519—527.
- Csapo A. L. 1962. Smooth muscle as a contractile unit. Physiol. Rev. 42 : 7—33.
- De Lucas J. J., Rodriguez C., San Andres M. I., Ballesteros E. 1988. Measurement of spontaneous motility *in vitro* of the cervical ring in sheep. Rev. Esp. Fisiol. 44 : 69—72.
- Duquette R. A., Shmygol A., Vaillant C., Mobasheri A., Pope M., Burdyga T., Wray S. 2005. Vimentin-positive, c-KIT-negative interstitial cells in human and rat uterus: a role in pacemaking? Biol. Reprod. 72 : 276—283.
- Edwards D., Good D. M., Granger S. E., Hollingsworth M., Robson A., Small R. C., Weston A. H. 1986. The spasmogenic action of oxytocin in the rat uterus—comparison with other agents. Br. J. Pharmac. 88 : 899—908.
- Kanda S., Kuriyama H. 1980. Specific features of smooth muscle cells recorded from the placental region of the myometrium of pregnant rats. J. Physiol. London. 299 : 127—144.
- Kao C. Y. 1959. Long-term observations of spontaneous electrical activity of the uterine smooth muscle. Amer. J. Physiol. 196 : 343—350.
- Kao C. Y. 1967. Cellular biology of the uterus. Appleton Century Crafts. New York. 386 p.
- Klemm M. F., Exintaris B., Lang R. J. 1999. Identification of the cells underlying pacemaker activity in the guinea-pig upper urinary tract. J. Physiol. 519 : 867—884.
- Kuriyama H., Suzuki H. 1976. Changes in electrical properties of rat myometrium during gestation and following hormonal treatments. J. Physiol. London. 260 : 325—333.
- Mancinelli R., Guariglia L., Racanicchi C., Bertuzzi A., Salinari S., Vitelli R. 1988. *In vitro* motility of non-pregnant rat uterine horns. Q. J. Exp. Physiol. 73 : 459—469.
- Maul H., Maner W. L., Saade G. R., Garfield R. E. 2003. The physiology of uterine contractions. Clin. Perinatol. 10 : 665—676.
- Pajntar M., Leskosek B., Rudel D., Verdenik I. 2001. Contribution of cervical smooth muscle activity to the duration of latent and active phases of labour. BJOG. 108 : 533—538.
- Sergeant G. P., Hollywood M. A., McCloskey K. D., Thornbury K. D., McHale N. G. 2000. Specialized pacemaking cells in the rabbit urethra. J. Physiol. 526 : 359—366.

EFFECT OF OXYTOCIN ON ACTIVATION OF SPONTANEOUS ELECTRICAL ACTIVITIES REGISTERED FROM UTERINE CORPUS AND UTERINE TUBES IN RATS

*K. V. Kazaryan, N. G. Hunanyan, I. B. Meliksetyan, R. R. Hakobyan, A. A. Savayan*L. A. Orbeli Institute of Physiology, National Academy of Sciences of Republic of Armenia, Yerevan;
e-mail: lmanvel@neuroscience.am

The effects of different concentrations of oxytocin (10^{-2} , 10^{-1} , 1 and 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$) on burst duration and spikes frequency of spontaneous electrical activity in various parts of uterine horns and uterine corpus in non-pregnant rats have been shown. The changes in given parameters for ovarian parts of horns had similar characters unlike cervical parts of horns and middle part of uterine corpus under these conditions, so the last mentioned areas could be grouped together by the reason of similar changes in their parameters. Oxytocin in a concentration of 10^{-1} $\mu\text{g}/\text{kg}$ promoted the longest duration of spike electrical activity genesis in ovarian parts of horns. Morphological experiments showed that ovarian parts of horns had a great amount of atypical cells with strongly expressed functional activities.

Key words: oxytocin, uterine, cervical parts, uterine horn, spontaneous electrical activity.
