

**НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ
ІНСТИТУТ ФІЗІОЛОГІЇ ІМЕНІ О.О. БОГОМОЛЬЦЯ**

Кваліфікаційна наукова
праця на правах рукопису

Насібян Ліліт Седраківна

УДК – 612.73:612:618:579:861.2

Дисертація

**Механізм дії пептидоглікану Золотистого стафілококу на скоротливість
міометрія щурів**

Спеціальність 03.00.13 — фізіологія людини і тварин

Біологічні науки

Подається на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук. Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей, результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело _____ Л.С. Насібян

Науковий керівник: — **Філіппов Ігор Борисович**, кандидат біологічних наук, провідний науковий співробітник відділу нервово-м'язової фізіології Інституту фізіології ім. О.О. Богомольця.

Київ 2020

Анотація

Насібян Л.С. Механізм дії пептидоглікану Золотистого стафілококу на скоротливу активність міометрія щурів. – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.13 «Фізіологія людини і тварин» - Інститут фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України, Київ 2021.

Пептидоглікан (ПГ) – це структурний компонент клітинної стінки грам позитивних та грам негативних бактерій, що оточує зовні клітинну мембрану бактерії. ПГ виділяється в навколишнє середовище, розноситься кровоплином та осідає на тропних клітинах, де з часом ініціює патологічні процеси. Персистенція пептидоглікану в генітальному тракті жінки під час вагітності пов'язана зі стимуляцією маткової скоротливості та передчасним пологами. Вплив пептидоглікану на міометрій поза вагітності достеменно не вивчений, але, відповідно до даних масштабного дослідження в 2014 р. Giashi та співавторів, з генітального тракту жінок з безпліддям найчастіше висівався *S. aureus*, хоча слизові оболонки не мали очевидних ознак запалення. Ми припустили, що ПГ може бути патогенетичним фактором безпліддя, внаслідок порушення характеру скоротливості матки таким чином, що запліднення або імплантація плідного яйця стають неможливими.

Досліджено, чи взаємодіє ПГ безпосередньо з клітинами міометрія вагітних щурів. І якщо взаємодіє, то яким чином та який механізм його дії. Вплив ПГ на скоротливість міометрія щурів, а також механізм його дії досліджувався методами тензометрії та кальцієвої сигналізації.

Встановлено, що ПГ модулює скоротливість смужок міометрія з видаленим шаром ендометрія вагітних та невагітних щурів. Оцінка амплітудно-кінетичних параметрів скорочення міометрія в обох групах тварин на тлі ПГ показала, що змінюється не тільки інтенсивність, але й співвідношення фаз скорочень

міометрія. Проте, характер змін параметрів скорочень міометрія на тлі дії ПГ виявився дещо неоднаковим для них. У невагітних тварин ПГ більшою мірою впливав на тривалість скорочень, в той час як в групі вагітних тварин більш вираженою було збільшення амплітуди. В обох групах щурів після аплікації ПГ тривалість фази скорочення збільшувалась незначно, в той же час фаза розслаблення зростала більше, ніж на 50%. За умов гіперестрогенії ПГ мав дещо пригнічувальну дію на скоротливість міометрія, а підвищений рівень прогестерону сприяв стимулюючому ефекту ПГ. Прикладання блокатора ЦОГ-2 німесулідю пригнічував ПГ-індуковану скоротливість міометрія вагітних щурів, але не мав жодного ефекту в групі невагітних тварин. За умов інактивзації Gi/o-білку кашлюковим токсином ПГ не виявив стимулювальних властивостей. При прикладанні ПГ на свіжоізолювані міоцити міометрія реєструвалось збільшення внутрішньоклітинну вмісту кальцію. Прикладання ПГ після припинення спонтанних скорочень міометрія в безкальцієвому розчині Кребса викликало 1-2 фазних скорочення протягом кількох хвилин в групі вагітних та невагітних тварин. В обох групах блокатор ІФ3-рецепторів 2-АРВ пригнічував ПГ-індуковані скорочення. За умов пригніченої скоротливості міометрія дією блокатора потенціалкерованих каналів L-типу ніфедипіну ПГ викликав одноразове фазне скорочення міометрія у невагітних тварин. За нормальних умов ніфедипін також пригнічував стимульовані ПГ маткові скорочення. Зроблено висновок, що ПГ Золотистого стафілококу модулює скорочувальну активність міометрія вагітних і невагітних щурів, збільшуючи внутрішньоклітинний рівень йонів кальцію внаслідок посилення його надходження зовні та вивільнення із СР.

Ключові слова: пептидоглікан, золотистий стафілокок, міометрій, скоротливість міометрія, ГМК, кальцієва сигналізація, аденілатциклаза.

Summary

Nasibyan LS Mechanism of action of Staphylococcus aureus peptidoglycan on the rat myometrial contractility.

A dissertation to acquire the degree of Candidate of Biological Sciences (PhD) in the specialty 03.00.13 “Human and animal physiology” – Bogomoletz Institute of Physiology, NAS of Ukraine, Kyiv, 2021. – Manuscript.

Peptidoglycan (PG) is a structural component of gram-positive and gram-negative bacteria cell wall. It surrounds the bacterial cell membrane and has pathogenic and immunogenic properties. During the growth, division or destruction of a bacterial cell, PG is released into the environment, spreaded by the bloodstream and adsorbed on tropical cells, where it eventually initiates pathological processes. The presence of PG in a woman's genital tract during pregnancy is associated with stimulation of uterine contractility and premature birth. The effect of PG on the myometrium in non-pregnants has not been well studied, despite Staphylococcus aureus is frequently detected in the genital tract of infertile women even without obvious signs of inflammation. We have hypothesized that PG may be a pathogenetic factor in infertility, due to impairment of uterine contractility in such a way that fertilization or implantation of a fertilized egg becomes impossible.

Thus, the purpose of the study was to determine if PG can directly modulate contractility of myometrial cells of pregnant and non-pregnant rats, and if so what is the mechanism of its action. The effect of PG on the rat myometrial contractility and the mechanisms of its action were studied by tensometry and calcium imaging.

Evaluation of the parameters of myometrial spontaneous contractions in pregnant and non-pregnant rats under the action of PG has shown the changes not only in their amplitude, but also in temporal characteristics. However, the PG-induced changes in the parameters of myometrial contractions within the groups of pregnant and nonpregnant rats were not the same. In non-pregnant rats PG exerted a stronger effect on the duration of contractions, while in the group of pregnant animals the increase in amplitude was

more pronounced. In both groups of rats, the duration of the contraction's onset phase was only slightly increased by PG, whereas the relaxation phase increased by more than 50%. Under hyperestrogenia PG elicited some suppressive effect on the myometrial contractions, while progesterone stimulated the effects of PG. The COX-2 blocker, nimesulide, inhibited the PG-induced myometrial contractility in pregnant rats, but it had no effect in the group of non-pregnant animals.

Inactivation of Gi/o protein by pertussis toxin abrogated stimulating properties of PG. When PG was applied to acutely isolated uterine smooth muscle myocytes, an increase in intracellular calcium content was detected. In myometrial strips from both pregnant and non-pregnant animals, application of PG after cessation of spontaneous myometrial contractions in calcium-free medium was able to activate 1-2 phasic contractions which could be inhibited by the IP3 receptor blocker 2-ARB. In the presence of voltage-gated L-type calcium channels inhibitor, nifedipine, which completely suppressed spontaneous myometrium contractility, PG could still evoke single myometrial contraction in non-pregnant animals. Nifedipine was also able to suppress stimulated uterine contractions. It is concluded that .PG of *S. aureus* modulates myometrial contractility of both pregnant and nonpregnant rats via intracellular calcium level increasing through Ca²⁺ influx as well as Ca²⁺ from the SR.

Key words: peptidoglycan, *Staphylococcus aureus*, myometrium, myometrial contractility, MMC, calcium signaling, adenylate cyclase.

ПЕРЕЛІК ПУБЛІКАЦІЙ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

В яких опубліковані основні наукові результати дисертації:

1. Nasibyan L S, Philyppov IB. Modulation of rat myometrium contractile activity by peptidoclycan of Staphilococcus aureus cell wall. Fiziol Zh. 2014;60(5):62-72.(IF-0.11).
2. Насіб'ян Л.С., І. Б. Філіппов. Вплив пептидоглікану клітинної стінки золотистого стафілокока на механізми регуляції аденілатциклазною сигнальною системою скорочувальної активності міометрія щурів. Фізіологічний журнал. 2016; 62 (1). - С. 25-33 (IF0,15).
3. L.S. Nasibyan, I.B. Philyppov, Y.M. Shuba. Peptidoglycane modulates rat myometrial contractility via Ca²⁺ release from SR. Fiziol. Zh. 2019; 65(4): 66-72.
4. Насіб'ян Л.С., Філіппов І.Б., Шуба Я.М. Вплив пептидоглікану Золотистого стафілококу на спонтанну скоротливу активність міометрія вагітних щурів. Здобутки клінічної і експериментальної медицини. 2020; № 3;138-145.
5. Насіб'ян Л.С., Соткіс Г.В., Цугорко О.М., Філіппов І.Б., Шуба Я.М. Пептидоглікан Золотистого стафілококу змінює скоротливість міометрія невагітних щурів завдяки підвищенню внутрішньоклітинного вмісту кальцію. Фізіологічний журнал. 2020; 62 (6).

Які засвідчують апробацію матеріалів дисертації:

1. Насіб'ян Л.С. Модуляція скорочувальної активності гладеньких м'язів матки естрогенізованих щурів пептидогліканом клітинної стінки *Золотистого стафілококу* Тези доповідей Всеукраїнської наукової конференції студентів та молодих науковців, Київ, 28 -29 жовтня 2010, с.58 -59.
2. Насіб'ян Л.С., Филиппов И.Б. Модуляция сократительной активности гладких мышц маткиэстрогенизированных крыс пептидогликаном золотистого стафилококка (2010). Международная научно-практическая конференции "Высокие технологии, фундаментальные и прикладные

исследования в физиологии и медицине" г. Санкт-Петербург, Россия, 23-26 ноября 2010, с.150 – 155.

3. Насібян Л.С., Філіппов І.Б. Вплив пептидоглікану клітинної стінки Золотистого стафілококу на механічні властивості шийки матки та діаметр цервікального каналу. Патофізіологія і фармація: шляхи інтеграції ХАРКІВ, Україна (5-7th October 2016); с.169.
4. Насібян Л.С. Вплив пептидоглікану клітинної стінки золотистого стафілокока на механізми регуляції аденілатциклазною сигнальною системою скорочувальної активності міометрія. Всеукраїнська науково-практична конференція за участю молодих вчених та студентів з міжнародною участю, «Сучасні аспекти медицини та фармації-2015», Запоріжжя, 2015, с. 30.
5. Насібян Л.С. VII Конгрес українського товариства нейронаук, «Активация TOL-2 рецепторів та модулювання скорочувальної активності міометрія». 22 квітня 2017 г. Київ.
6. VII Конгрес українського товариства нейронаук, «Активация TL-2 рецепторів та модулювання скорочувальної активності міометрія». 22 квітня 2017 г. Київ. Насібян Л.С., Соткіс А.В., Дискіна Ю.Б., Цугорка О.М. Виявлення наявності та вивчення можливої ролі механочутливих каналів в одно- та мультиклітинних препаратах ГМ сечового міхура та матки щура. VII з'їзд Українського біофізичного товариства (29 жовтня- 2 листопада 2018 р. Київ – Луцьк

ЗМІСТ

АНОТАЦІЯ.....	2
ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ.....	6
ВСТУП.....	20
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ	
1.1 Запальні захворювання органів малого тазу та роль бактеріальної мікрофлори у їхньому розвитку.	26
1.2 Золотистий стафілокок. ПГ Золотистого стафілококу	27
1.3 Розпізнавання ПГ	31
1.4 ПГ та маткова скоротливість.....	36
1.5 Скорочувальна активність міометрія та її регуляція	37
1.6 Значення Ca^{2+} для маткових скорочень	39
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ	
2.1 Об'єкт дослідження	46
2.2 Підготовка смужок міометрія і вимірювання скорочення.....	46
2.3 Визначення амплітудно-кінетичних параметрів скорочення смужок міометрія.....	47
2.4 Ізолювання гладеньком'язових клітин (ГМК) міометрія.....	50
2.5 Створення гормонального фону.....	51
2.6 Ідентифікація участі G-білків.....	52
2.7 Речовини.....	54
2.8 Аналіз даних, статистична обробка результатів.....	54
РОЗДІЛ 3. Результати та їх обговорення	

3.1.1 Амплітудно-кінетичні характеристики скорочень матки невагітних щурів в контролі та під впливом ПГ	54
3.1.2 Амплітудно-кінетичні характеристики скорочення матки вагітних щурів в контролі та під впливом пептидоглікану.....	61
3.2.1 Вплив пептидоглікану на кальцієву сигналізацію ГМК міометрія невагітних щурів.....	67
3.2.2 Вплив пептидоглікану на кальцієву сигналізацію ГМК міометрія вагітних щурів.....	
3.3 Блокування циклооксигенази-2.....	79
3.4 Амплітудно-кінетичні параметри скорочень міометрія естрогенізованих та «псевдовагітних» щурів.....	81
3.4.1 Дія ПГ на норадреналінове гальмування спонтанних скорочень міометрія щурів при різних гормональних фонах.....	84
3.5. 3.5. Вплив ПГ клітинної стінки Золотистого стафілококу на механізми регуляції аденілатциклазною сигнальною системою скорочувальної активності міометрія щурів.....	89
3.5.1 Дія пептидоглікану на норадреналінове гальмування скорочень міометрія щурів за різних гормональних станів.....	91
3.5.2 Властивість ПГ усувати розслаблення простагландиніндукованих скорочень міометрія, викликане активаторами аденілатциклазної системи	97
3.5.3 Участь гетеротримерних Gs- та Gi/o-білків у ефектах ПГ пригнічувати активності аденілатциклазної системи міометрія щурів	100
3.5.4 Порівняння впливу ПГ золотистого стафілокока і блокатора аденілатциклаз SQ 22.536 на параметри скорочувальної активності міометрія	105
РОЗДІЛ 4. Узагальнення та аналіз результатів	107

4.1.1. Амплітудно-кінетичні характеристики скорочень матки невагітних щурів в контролі та під впливом пептидогліканом.....	108
4.2 Вплив пептидоглікану на кальцієву сигналізацію ГМК міометрія невагітних щурів.....	111
4.3 4.3 Блокування циклооксигенази-2.....	114
4.4 Амплітудно-кінетичні параметри скорочень міометрія естрогенізованих та «псевдовагітних» щурів під дією пептидоглікану.....	117
3.5.1 4.5. Вплив пептидоглікану клітинної стінки Золотистого стафілококу на механізми регуляції аденілатциклазною сигнальною системою скорочувальної активності міометрія щурів..	118
ВИСНОВКИ.....	122
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	123
ДОДАТОК 1. СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ.....	126

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ

2-APB — 2-аміноетоксидифенілборат

COX-1, COX-2 — циклооксигеназа-1, циклооксигеназа-2

IP3 — інозитол-1,4,5-трифосфат

IP3-рецептори — інозитол-1,4,5-трифосфатні рецептори

MU — одиниці Монтевідео

PG F2 α — простагландин F2 α

TLR-2 — тол подібний рецептор-2

TNF- α — фактор некрозу пухлин

OU — Олександрійські одиниці

АЦС — аденілатциклазна система

ГМК — гладеньком'язова клітина

НА — норадреналін

ПГ — пептидоглікан

ПК-А — протеїнкіназа А

СР — саркоплазматичний ретикулум

цАМФ — циклічний аденозинмонофосфат

ВСТУП

Обґрунтування вибору теми дослідження

Пептидоглікан (ПГ) – це структурний компонент клітинної стінки грам позитивних та грам негативних бактерій, який виділяється в навколишнє середовище при рості, діленні або руйнуванні мікроорганізму, розноситься кровоплином та осідає на тропних клітинах, де з часом проявляє патологічні властивості (1, 2). З дією бактеріального ПГ пов'язують розвиток таких патологічних станів вагітності як хоріоамніоніт, прееклампсія, аномалії скоротливості матки та передчасні пологи (3, 4).

Попри те, що ПГ Золотистого стафілококу складає суттєву частину бактеріальної стінки та має виражені патогенні та імуногенні властивості (5-8), він досі залишається мало дослідженим. Зокрема, щодо своєї дії в жіночих репродуктивних органах, він досліджувався тільки у зв'язку з вагітністю. Але навіть там механізм дії ПГ не до кінця зрозумілий. Наприклад, в літературних джерелах описано, що під час вагітності при взаємодії ПГ з імунокомпетентними клітинами ендометрія та децидуальної тканини розвивається запальна реакція, а прозапальні фактори, що секретуються при цьому спричинюють стимуляцію маткової скоротливості та переривання вагітності (4, 9) . Однак невідомо, чи взаємодіє ПГ безпосередньо з ГМК міометрія, адже він розповсюджується кровоплином та може потрапити в усі шари (1, 2). Тим більше, що рецептори, що розпізнають ПГ, експресуються в тому числі в ГМК міометрія (10, 11).

Крім того нічого невідомо про дію ПГ на жіночі репродуктивні органи поза вагітністю. Однак є декілька робіт, де показано кореляцію між жіночою неплідністю та висіванням Золотистого стафілококу із піхви та безсимптомним носійством цього мікроорганізму (12, 13).

Відомо, що патологічні стани, що супроводжуються порушенням скоротливості міометрія, такі як ендометріоз (14, 15), ускладнюються безпліддям.

А властивість мідьвмісної внутрішньоматкової спіралі змінювати характер скорочень невагітної матки використовується для запобігання небажаної вагітності (16). Отже характер маткових скорочень, так же як і їхня інтенсивність є ключовими для репродуктивного здоров'я жінок .

Враховуючи відомості про розвиток запальних та аутоімунних процесів, що виникають на тлі тривалої безсимптомної персистенції ПГ Золотистого стафілококу та інших бактерій, в інших органах (17), та здатністю ПГ викликати стимуляцію маткових скорочень у вагітних дослідних тварин (18-20), ми припустили, що ПГ Золотистого стафілококу може бути етіологічним фактором дисфункціональних станів репродуктивної системи у жінок через порушення маткової скоротливості.

Крім того, рецептори вродженої імунної системи, що розпізнають ПГ та експресуються в жіночій репродуктивній системі, NOD2 та Тол-2, розташовані в тому числі у міоцитах матки (21-23) та можуть реагувати на ПГ, що циркулює в крові та здатний ініціювати запальну реакцію, і, можливо, порушення скоротливості міометрія. Тому ми вважаємо доцільним дослідження ефекту ПГ на міометрій.

Зв'язок з темами дослідницьких робіт.

Роботу виконано в рамках наукової тематики відділу відділу нервово-м'язової фізіології Інституту фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України: «Фармакологічна модуляція механізмів збудження-гальмування гладеньких м'язів у нормі та патології» (№ держреєстрації 0110U004758) та «клітинні сигнальні системи в нормі та патології» (№ держреєстрації 0113U007273).

Мета і завдання дослідження

Метою дослідження є визначення механізму дії ПГ Золотистого стафілококу на скоротливу активність міометрія щурів.

Завдання дослідження:

1. З'ясувати, чи впливає ПГ на скоротливість міометрія вагітних та невагітних щурів за умов відсутності ендометрія.
2. Визначити амплітудно-кінетичні характеристики скорочень міометрія вагітних та невагітних щурів на тлі дії ПГ.
3. Визначити вплив естрогену та прогестерону на ефект ПГ на спонтанні та викликані простагландином скорочення міометрія.
4. З'ясувати, чи задіяна циклооксигеназа-2 в механізм дії ПГ на скоротливість міометрія невагітних щурів.
5. Визначити вплив ПГ на аденілатциклазну сигнальну систему ГМК невагітних щурів.
6. Встановити механізм впливу ПГ на рівень цитозольного Ca^{2+} в ГМК міометрія щурів (вагітних та невагітних).
7. З'ясувати, чи обумовлений вплив ПГ на скоротливість міометрія саме безпосередньою дією на ГМК матки.

Об'єкт дослідження – механізми регуляції скоротливості вісцеральних гладеньких м'язів.

Предмет дослідження – скорочувальна активність міометрія.

Методи дослідження

Тензометрія смужок міометрія вагітних та невагітних щурів; моделювання гіперестрогенії та «псевдовагітності», ферментативно-механічне ізолювання ГМК міометрія, мічення ГМК міометрія за допомогою ліпофільних флуорофорів, візуалізація внутрішньоклітинного рівня кальцію за допомогою кальційчутливих флуоресцентних барвників.

Наукова новизна отриманих результатів

У роботі вперше запропонована та експериментально обґрунтована гіпотеза про здатність ПГ Золотистого стафілококу модулювати скоротливість вагітного і неміометрія вагітних щурів за умов відсутності ендометрія, а не тільки опосередковано через прозапальні цитокіни, що секретуються в едометрії або децидуальній тканині, як вважалося раніше. Нами вперше описано амплітудно-кінетичні параметри скорочень міометрія вагітних та невагітних щурів на тлі дії ПГ. Також нами встановлено залежність ефекту ПГ на маткову скоротливість від естрогену та прогестерону. Нами вперше з'ясовано роль Gi-білка в механізмі модуляції ПГ Золотистого стафілококу скоротливості міометрія та індуковану ПГ IP₃- залежну Ca²⁺ - мобілізацію із CP ГМК матки. Нами показано, що для патогенетичного блокування стимуляції ПГ маткової скоротливості під час вагітності можна розглядати не тільки блокатори COX-2, але й блокатори потенціалкерованих кальцієвих каналів L-типу. Крім того, нами вперше проведена візуалізація ПГ-індукованого підвищення внутрішньоклітинного рівня Ca²⁺ ГМК матки щура.

Практичне значення одержаних результатів

Одержані в ході роботи експериментальні дані, одержані в експеримантах з невагітними щурами, свідчать про індуковане ПГ порушення характеру скоротливості міометрія як одну з можливих причин безпліддя та інших функціональних розладів репродуктивної системи при інфікуванні Золотистим стафілококом, асимптомним носійством або млявим перебігом неспецифічних запальних захворювань сечостатевої систем. Після підтвердження на рівні функціонування живого організму та клінічних досліджень вони можуть стати підставою для обстеження носіїв Золотистого стафілококу на предмет порушення маткової скоротливості як причини безпліддя.

Крім того, в ході роботи були одержані дані, що свідчать про прямий вплив ПГ Золотистого стафілококу на міометрій вагітних і невагітних щурів та здатність модулювати амплітудно-кінетичні показники маткових скорочень. Наші дані про ГМК матки як мішені для ПГ доповнюють наявні в літературі відомості щодо інших тропних до нього клітин. Запропонований нами механізм дії ПГ на скоротливість міометрія доповнює наявні відомості, а значить, і може розширити можливості контролю та корекції індукованих ПГ Золотистого стафілококу аномалій маткової скоротливості.

Особистий внесок здобувача

Автором проведено критичний аналіз літературних джерел відповідно до сучасних уявлень про пептидоглікан та його патологічну дію на різні органи і тканини. Здобувачем особисто виконано весь обсяг експериментальної роботи. Автор разом з пр.н.с. Філіпповим І.Б. обговорювала та налагоджувала протоколи створювання моделей гіперестрогенії та «псевдовагітності», разом ст.н.с. Соткіс Г.В. та н.с. Цугорко О.М. проводила експерименти з кальцієвої візуалізації. Також автором проведена статистична обробка отриманих даних та графічне представлення результатів і сформульовані висновки разом з керівником роботи.

Апробація матеріалів дисертації

Дисертаційну роботу апробовано на таких конференціях:

- Всеукраїнській науковій конференції студентів та молодих науковців, Київ 2010
- Міжнародна науково-практична конференція «Високі технології, фундаментальні та прикладні дослідження в біології та медицині» Санкт-Петербург, Росія, 2010
- Всеукраїнській науковій конференції студентів та молодих науковців, Київ 2010

- Всеукраїнській науково-практичній конференції за участю молодих вчених та студентів з міжнародною участю, «Сучасні аспекти медицини та фармації-2015», Запоріжжя, 2015
- VII національний конгрес патофізіологів України «Патофізіологія і фармація: шляхи інтеграції», ХАРКІВ, Україна 2016
- VII Конгрес українського товариства нейронаук, «Активація TL-2 рецепторів та модулювання скорочувальної активності міометрія». 2017 Київ.

Структура та обсяг дисертації

Дисертація складається із вступу, 4 розділів, висновків, списку використаних джерел, 1 додатку, 25 рисунків. Основний текст роботи викладено на 108 сторінках. Загальний обсяг роботи становить 138 сторінки.

Публікації

Результати досліджень опубліковано у 11 працях: 5 – статті у наукових фахових виданнях та 6 тез доповідей на конференціях, симпозиумах і з'їздах.

РОЗДІЛ 1

Огляд літератури

1.1 Запальні захворювання органів малого тазу та роль бактеріальної мікрофлори у їхньому розвитку.

Запальні захворювання органів малого тазу є частою причиною безпліддя, хронічних болей та позаматкової вагітності. Вони створюють серйозну медичну, соціальну та економічну проблеми в усьому світі. Найчастіше вони мають інфекційну природу. Діагностика та ведення таких захворювань часто ускладнюється великою різноманітністю або ж стертістю клінічних симптомів, поліетіологічною природою захворювання, резистентністю мікроорганізмів до антибактеріальних препаратів. Задіяною в розвиток запалення може бути як специфічна так і неспецифічна флора. Стрептококи групи В, стафілококи (в тому числі Золотистий стафілокок), кишкова паличка та віруси найчастіше викликають неспецифічне запалення жіночих статевих органів (24, 25).

Не зважаючи на наявність величезного різноманіття антибактеріальних, протизапальних та токолітичних препаратів на сучасному ринку, запальні захворювання жіночих репродуктивних органів бактеріального генезу залишаються причиною 40% передчасних пологів в розвинених країнах (26). Внутрішньоматкове інфікування бактеріальними агентами є найчастішою причиною передчасних пологів та перинатальної смертності немовлят (26-28).

За нормальних умов у порожнині матки та фаллопієвих труб підтримуються асептичні умови. Місцевий імунітет внутрішніх статевих органів швидко розпізнає та знешкоджує мікроорганізми, що можуть потрапити низхідним шляхом. В той же час епітелій, що вистилає внутрішню поверхню матки та фаллопієвих труб, дуже вразливий до висхідної інфекції.

Воротами для інфекції, що спричинюють запальні захворювання жіночої репродуктивної системи у 95% випадків є зовнішні статеві органи (29), значно

рідше вона розповсюджується з екстрагенітальних вогнищ гематогенним або лімфогенним шляхами (30).

1.2 Золотистий стафілокок. ПГ Золотистого стафілококу

Золотистий стафілокок, що колонізує переважно шкіру, носову порожнину та шлунково-кишковий тракт, спричинюючи численні захворювання є також найбільш поширеним мікроорганізмом в жіночому та чоловічому генітальному тракті (12, 13). Дослідження 2014 р. . Ghiasi показало, що Золотистий стафілокок є одним з мікроорганізмів, що найчастіше висіваються із піхви та цервікального каналу жінок з діагностованим безпліддям (12). А от серед вагітних жінок вагінальна колонізація Золотистим стафілококом була виявлена у 17% серед усіх обстежених, в 3% випадків з яких стафілокок був метицилін-резистентним (13).

Раніше вважалось, що неплідність у разі інфікування Золотистим стафілококом обумовлена запаленням в епітеліальному шарі шийки матки та ендометрії, виникненням імунної відповіді, що унеможлиблює запліднення. Проте нещодавні дослідження показали, що морфологічний стан епітелію шийки матки жінок з безпліддям, в генітальному тракті яких висівався Золотистий стафілокок, не дає підстав для такого твердження, а отримані дані не були достатньо інформативними, для того, щоб скласти чітке уявлення про механізм та причину виникнення цієї кореляції (15). Крім того, в усіх дослідженнях щодо зв'язку між інфікуванням Золотистим стафілококом та жіночою неплідністю у центрі уваги був лише епітелій різних ділянок матки.

Інфікування Золотистим стафілококом є причиною ускладнення вагітності хоріоамніонітом стафілококового генезу і, як наслідок, передчасними пологамі. В цьому випадку Золотистий стафілокок, як правило, розповсюджується із зовнішніх статевих органів до порожнини матки кровоплином (31). Отже він потрапляє в усі шари матки та контактує не тільки з епітеліоцитами ендометрію.

Відомо декілька типів екзотоксинів Золотистого стафілококу, такі як ліпотейхоева кислота, токсин синдрому токсичного шоку- 1, ентеротоксини -1 та

-2. Екзотоксини спричинюють патологічні процеси в тропних до них органах та мають доволі специфічну яскраво виражену клінічну картину. Крім того, у стафілокока є ряд специфічних факторів, ефект яких реалізується непрямим шляхом, часто мляво, безсимптомно та протягом тривалого часу (32). Одним з таких факторів є ПГ. Він складає найбульшу частину клітинної стінки, але є найменш дослідженим серед інших факторів патогенності Золотистого стафілококу.

ПГ забезпечує цілісність плазматичної мембрани бактеріальної клітини. Будова і склад гліканових компонентів ПГ майже однакові в усіх грам-позитивних бактерій, які включають N-ацетилглюкозамін та N-ацетилмурамову (ефір N-ацетилглюкозаміну і молочної кислоти) кислоту, з'єднаних β -1,4-глікозидними зв'язками. Залишки N-ацетилмурамової кислоти зшиті між собою за допомогою коротких пептидів. Типовий пептидний ланцюг містить L-аланін, D-глутамінову кислоту, діамінопімелінову кислоту (DAP), L-лізин, D-аланін (33). Важливо, що ці пептидні субодиниці містять DAP та D-ізомери амінокислот, що не характерно для еукаріотів і тому часто є мішенню для вродженого імунітету. Як правило, ПГ у своєму складі не містять розгалужених і ароматичних амінокислот, таких, як цистеїн, метіонін, аргінін, гістидин і пролін. Залежно від амінокислотного складу містків, які зшивають цукропептидні одиниці, ПГ стафілокока поділяють на декілька типів: 1) ліз-глі 25, 26, в якому пента або гексагліциновий зшиваючий місток; 2) ліз-глі 4-5-сер 0,5-1.8. в якому деяка кількість гліцину заміщена серином; 3) ліз-ала-глі -4, в якому гліциновий залишок зв'язується з лізином через аланін. Така тривимірна структура надає клітинній стінці бактерії міцність і захист від осмотичного лізису. Полісахаридні та пептидні компоненти ПГ утворюють впорядковану структуру комірчастої будови, яка оточує бактеріальну клітину, виконуючи роль екзоскелету. ПГ підтримує форму бактерії, осмотичний стан та захищає від дії оточуючого середовища (34, 35).

Тривимірна структура надає клітинній стінці бактерії міцність і захист від осмотичного лізису. Полісахаридні та пептидні компоненти ПГ утворюють впорядковану структуру комірчастої будови, яка оточує бактеріальну клітину, виконуючи роль екзоскелету (Рис. 1.1). ПГ підтримує форму бактерій, осмотичний стан та захищає від дії оточуючого середовища. Крім ПГ, до складу клітинних стінок грампозитивних бактерій входять ковалентно зв'язані з муреїновим матриксом тейхоєвії і ліпотейхоєвії кислот, які служать додатковими елементами її просторової організації і виконують ряд інших важливих функцій.

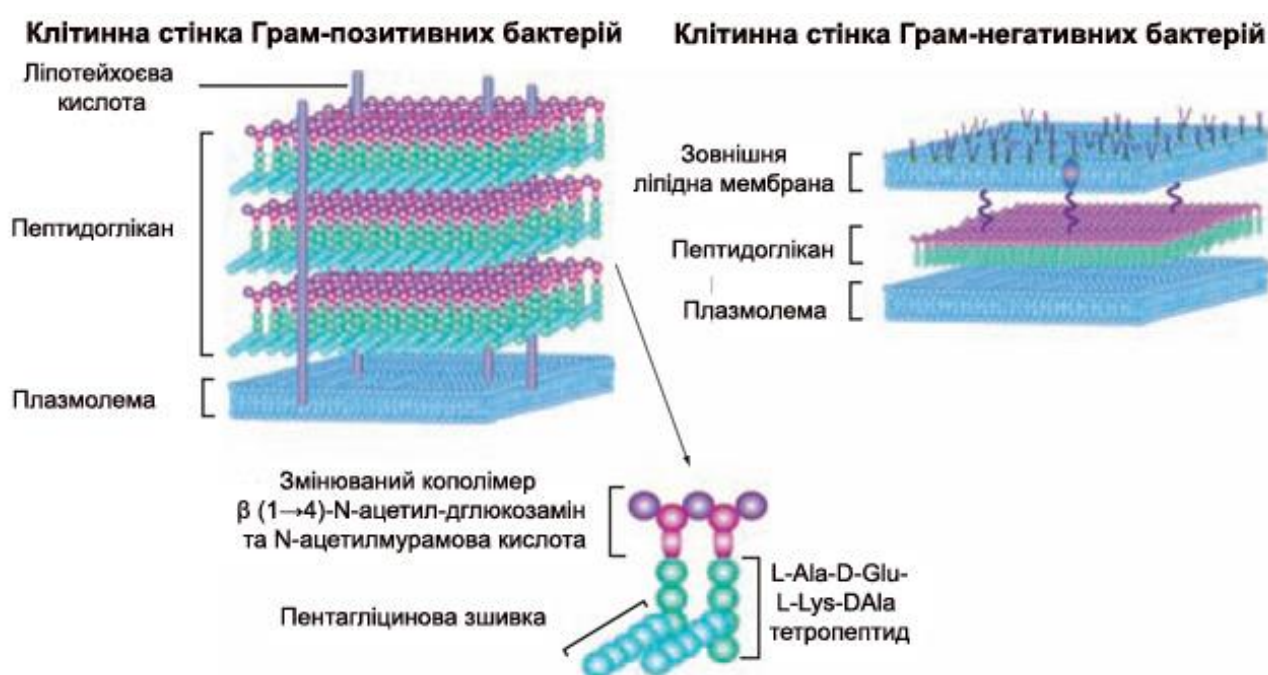


Рис. 1.1. Просторова будова клітинної стінки Грампозитивних та Грамнегативних бактерій (36).

Типовий пептидний ланцюг містить L-аланін, D-глутамінову кислоту, діамінопімелінову кислоту (DAP), L-лізин, D-аланін. Важливо, що ці пептидні субодиниці містять DAP та D-ізомери амінокислот, що не характерно для еукаріотів і тому часто є мішенню для вродженого імунітету. Як правило, ПГ у своєму складі не містять розгалужених і ароматичних амінокислот, таких, як цистеїн, метіонін, аргінін, гістидин і пролін. Залежно від амінокислотного складу містків, які зшивають цукропептидні одиниці, ПГ стафілокока поділяють на

декілька типів: 1) ліз-глі (5-6), в якому пента або гексагліциновий зшиваючий місток; 2) ліз-глі (4-5)-сер (0,5-1.8). в якому деяка кількість гліцину заміщена серином; 3) ліз-ала-глі (4), в якому гліциновий залишок зв'язується з лізином через аланін (34-35).

У Грамнегативних бактерій, в тому числі й Золотистого стафілокока, клітинна стінка складається з двох мембран, відокремлених між собою водним середовищем - периплазмою. Там розташований один шар ПГ. У Грампозитивних бактерій присутня лише одна клітинна мембрана, оточена ПГ. Але ПГ такої клітини може складатися з близько 40 шарів (34, 35).

ПГ постійно модифікується та руйнується під час росту, руйнування, ділення та диференціації бактерії, а також під дією зовнішніх факторів. Протягом життєвого циклу однієї бактерії до 50% всього ПГ її клітинної стінки відокремлюється та потрапляє в навколишнє середовище (35, 37). Далі фрагменти ПГ циркулюють по організму з кров'ю, розповсюджуються та абсорбуються на тропних клітинах організму хазяїна, де в подальшому і відбувається ініціація патологічних процесів (38). При інтраперитонеальному введенні експериментальним тваринам ПГ стимулює вироблення макрофагами прозапальних цитокінів і хемокінів (фактор некрозу пухлин- α , інтерлейкін-1, інтерлейкін-6, інтерлейкін-8), максимальний пік яких при Грам позитивній інфекції спостерігають на 50-75 ту годину після інфікування.

Дія багатьох антибактеріальних препаратів спрямовано саме на пригнічення синтезу ПГ. З іншого боку, здатність ПГ модифікуватись є причиною виникнення резистентності до антибіотиків (35). Тому вкрай важливо розуміти точні механізми клітинної дії ПГ, особливо для блокування патологічного процесу, впливаючи на ланки патогенезу за неможливості боротися саме із збудником.

1.3 Розпізнавання ПГ

Крім патогенної дії, ПГ має ще й імуногенну властивість. Він відноситься до тих структурних компонентів бактеріальної клітини, за якими вроджена імунна система розпізнає чужорідні елементи.

Структурні компоненти бактерій розпізнаються вродженою імунною системою за допомогою великої родини PAMPs - паттерн розпізнавальних рецепторів (39, 40). Вони реагують на певні структурні компоненти мікроорганізмів, так звані патогенасоційовані молекулярні паттерни (pathogen associated molecular pattern, PAMPs) та викликають імунну відповідь. До PAMPs відносяться такі структурні елементи клітини як ліпополісахариди, ліпопротеїни, олігосахариди та ПГ.

У ссавців ПГ розпізнається кількома типами рецепторів, що входять до великої групи PAMPs: 4 типи ПГ-розпізнаючого пептида (PGRP1-4), які в жіночих репродуктивних органах не експресуються, Тол-подібні рецептори 2 та 4 (TLR2, TLR4) та NOD1, NOD2-рецептори. Кожен з цих рецепторів активується при зв'язуванні з певною ділянкою ПГ (7).

У Грампозитивних та Грамнегативних бактерій ПГ дещо відрізняються за своєю структурою. Основною відмінністю між ними є те, що ПГ Грампозитивних бактерій містить лізин у третій позиції пептидного ланцюга замість діамінопімелінової кислоти (DAP) у Грамнегативних. Послідовність різних ділянок ПГ може дещо відрізнятися і й у різних штамів бактерій всередині однієї групи. Саме ця відмінність визначає, який рецептор буде розпізнавати ПГ. Більш того, експресія певного типу рецепторів залежить і від типу самих клітин (41, 42).

ПГ Золотистого стафілокока як і більшості Грампозитивних бактерій, ПГ яких містить лізин, розпізнається мембранними Тол-подібними рецепторами другого типу (41-43) та внутрішньоклітинними NOD2. Хоча Nod2 рецептори можуть розпізнавати PAMPs і незалежно від Тол-подібних рецепторів, на дендритних клітинах було показано, що коstimуляція цих двох типів посилює сигнали кожного з них та обумовлює більш виражену імунну відповідь, ніж

викликала б стимуляція лише одного (44), а стимуляція кератиноцитів миші ПГ Золотистого стафілокока призводить до коактивації TLR2 та NOD2 рецепторів та індукує імунну відповідь в її організмі (43).

NOD2 рецептори знаходяться всередині клітині та зв'язуються із внутрішньоклітинним ПГ. Вони були показані в епітеліоцитах кишківника, дендритних клітинах, тучних клітинах, та в усіх тканинах внутрішніх репродуктивних органів (45). Відомо, що ПГ може опинитись всередині клітини не тільки шляхом дифузії, але й ендоцитозу та активного транспорту внаслідок зв'язування із спеціальним мембранним білком. Потрапивши всередину клітини, він зв'язується з NOD2 рецепторами та активує їх, викликаючи імунну відповідь та спричинюючи запалення.

Розпізнавання ПГ не тільки активує вроджену імунну систему, але й модулює набутий імунітет. Відомо, що при мутації гену NOD2 розвиваються хвороба Крона, виразковий коліт, виразкова хвороба шлунка та ін. (46-48). В жіночій репродуктивній системі рецептори NOD2 залучені у процеси матково-яєчникового циклу та пологів (49, 50).

Тол-подібні рецептори - мембранні білки, зв'язування яких з лігандом опосередковує імунну відповідь. У ссавців відомо близько 11 типів Toll-рецепторів, 10 з яких виявлено в тканинах організму людини (51). Вони причетні до експресії майже усіх генів, що асоційовані з будь-якими патогенами, в тому числі бактеріями, вірусами, грибами (52).

В деяких випадках TLR2 утворюють димери з TLR3 або з TLR6, лігандами яких є інші структурні елементи бактеріальної клітини. Тобто для запуску імунної відповіді необхідна наявність лігандів всіх димерів комплексу. Іноді такі димери складаються з двох однакових TLRs і називаються гомодимерами, як у випадку TLR2. Також TLR2 притаманна кооперація між різними молекулами: TLR1: TLR2, TLR2: TLR6. Гетеродимеризація TLRs дозволяє розширити спектр лігандів для розпізнавання і модулювати (диверсифікувати) відповідь на специфічні

ліганди (53). Після зв'язування з лігандом або лігандами Толл-подібні рецептори зазнають конформаційних змін і формують молекулярний каскад передачі сигналу до ядра клітини, що призводить до транскрипції генів прозапальних цитокінів: ІЛ6, ІЛ8, ІЛ1 β і ФНП- α шляхом активації ядерного фактора $\kappa\beta$. Так відбувається ініціація імунної відповіді (54 - 56). Хоча ще не досить детально описані внутрішньоклітинні процеси, що відбуваються при активації TLR матки, відомо, що ПГ-індукована активація TLR2 при вагітності супроводжується секрецією інтерлейкінів -6 та -8 та активацією циклооксигенази-2, що спричинює подальше утворення простагландинів та стимулює скоротливу активності міометрія (57).

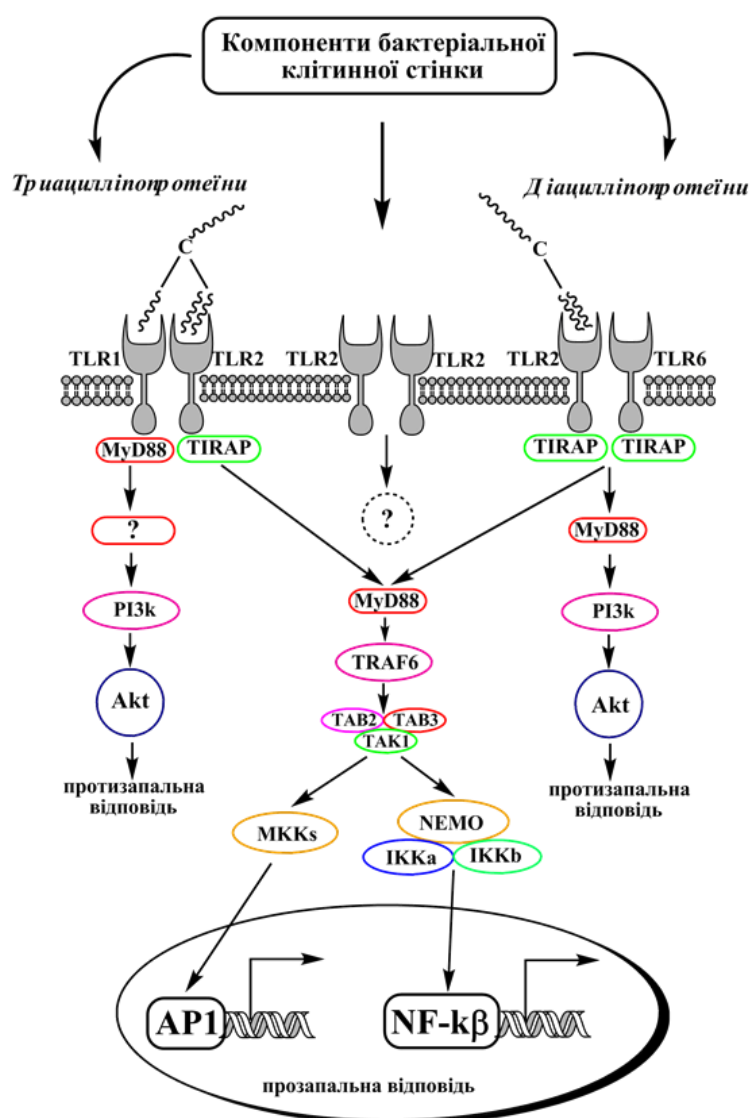


Рис. 1.3 TLR2-залежний сигнальний каскад.

При активації TLR2 специфічними лігандами мікробного походження для поширення сигналу всередину клітини залучені адаптерні білки цитоплазми MyD43, TIRAP /Mal (58). Адаптери активують інші молекули в межах клітини, включаючи певні протеїнкінази (TAK1 і IKK α /b), які посилюють сигнал, що призводить до переміщення до ядра транскрипційних факторів NF- κ B і AP-1, які змінюють (активують або супресують) експресію генів у клітині (59). Крім того, шлях PI3K / Akt також може бути активований, що призводить до вироблення прозапальних цитокінів.

При TLR-сигналінгу активуються тисячі генів, що дозволяє розглядати активацію TLRs як один з найпотужніших засобів модуляції генної експресії. Результатом активації сигнального Toll-залежного каскаду є розвиток запальної імунної відповіді, яка реалізується, в першу чергу, у продукції прозапальних цитокінів, основними з яких є інтерферони (IFN) і фактор некрозу пухлин (TNF- α). (54-57) з подальшою активацією циклооксигенази-2, та синтезом простагландинів (Рис. 1.2).

У жіночій репродуктивній системі TLR2 були виявлені на поверхні епітеліальних клітин маткових труб, ендометрія, шийки матки й піхви, децидуальних клітинах, а також гладеньких м'язових клітинах матки та піхви, клітинах стромы ендометрія та маткових натуральних кілерах (60-61). Причому експресія цих рецепторів на мембрані клітин ендометрія та децидуальної оболонки залежить від гормонального фону організму. Зміна секреції статевих гормонів з різних причин може впливати на стан імунореактивності жіночої репродуктивної системи. Так, було показано, що їхня щільність зростає на клітинах децидуальної оболонки матки, амніону протягом вагітності та під час пологів, як нормальних так і передчасних (52, 62-64).

Протягом вагітності в матці відбувається ряд трансформацій для підготовки до пологів. Ініціація родової діяльності пов'язана з розвитком локалізованого міометрально-децидуального запального процесу (63, 65 - 67). Активація Толл-подібних рецепторів другого типу є одним із чинників, що ініціюють цей асептичний запальний процес.

Численні дослідження показали, що на початку як фізіологічних, так передчасних пологів відбувається інфільтрація міометрія, плаценти та плодових оболонок нейтрофілами, макрофагами, Т-лімфоцитами та натуральними кіллерами (68 - 71), яка спричинює місцеве вироблення хемокінів та прозапальних цитокінів IL-1 β , IL-6, IL-8 та TNF- α (69). Останні, в свою чергу, призводять до синтезу простагландинів в міометрії (70), внаслідок чого відбуваються морфологічні зміни шийки матки, розрив плодового міхура, стимуляція

скорочувальної активності міометрія (71-73). Синтез IL-1 β та TNF, спричинений активацією ядерного фактору $\kappa\beta$ (NF- $\kappa\beta$) ендogenousними або екзогенними факторами (в тому числі агоністами Toll-рецепторів), викликає активацію циклооксигенази-2 (COX-2) - фермента, під дією якого відбувається вироблення простагландинів та посилення скоротливості міоцитів матки (74, 75). Цитокини в децидуальних клітинах виробляються також у відповідь на дію таких чинників як зниження концентрації прогестерону в крові, дію бактерій та структурних компонентів їхньої клітинної стінки (70). Причому подібна картина спостерігається як при неускладнених пологах, так і при наявності діагностованого хоріоамніоніту (65, 26, 69, 76).

Активация тол-подібних рецепторів 2 типу введенням ПГ в зовнішні статеві органи вагітних мишей та щурів спричинювала апоптоз децидуальних клітин матки та передчасні пологи (19, 60, 67). А це вказує на тісний зв'язок між процесом запалення, викликане активацією TLR-2, та стимуляцією скоротливості гладеньких м'язів.

Крім того, було показано, що ПГ залучений у патогенез порушення імплантації плідного яйця та розвитку прееклампсії під час вагітності (27, 28). А пригнічення експресії Toll-2 рецепторів при вагітності викликало затримку початку пологів та зниження секреції прозапальних цитокінів і факторів активації скорочення (77).

Отже, ПГ розпізнається кількома типами рецепторів, які можуть бути як мембранні, так і знаходитись всередині клітини. Тож і клітинні механізми реалізації його ефекту можуть бути різними в залежності від типу клітин.

1.4 ПГ та маткова скоротливість

Відповідно до даних літератури, після зв'язування ПГ з рецептором на епітеліальних або інших імунокомпетентних клітинах внутрішньої оболонки матки запускається каскад внутрішньоклітинних реакцій, наслідком яких стає

запалення. Патогенетично внутрішньоматковий запальний процес призводить до порушення функції органа, ініціює активацію вродженої імунної системи, вироблення цитокінів, циклооксигенази-2 та простагландинів, металопротеїназ, транскрипційного ядерного фактора- $\kappa\beta$ тощо (78). Саме ці процеси лежать в основі активації скоротливості міометрія та розриву плодового міхура, тобто ініціації передчасних пологів. Тобто стимуляція скоротливості міометрія відбувається опосередковано, під впливом біологічно активних речовин, що секретуються ендотелієм або децидуальною оболонкою матки.

Тож наявні на сьогоднішні експериментальні дані свідчать про те, що під дією структурних елементів бактеріальних клітин, в тому числі ПГ, відбувається стимуляція скоротливості вагітної матки внаслідок активації відповідних рецепторів на епітеліальних або дендритних клітинах і послідовному виробленню ними прозапальних факторів. Тобто, викликана ПГ стимуляція маткової скоротливості – це вторинний процес, що слідує за імунною відповіддю.

Попри те, що рецептори, що розпізнають ПГ були показані в тому числі на міоцитах матки, на сьогоднішні не описано, що відбувається саме з м'язовими клітинами, та саме з міометрієм при безпосередньому контакті з ПГ, адже він розповсюджується кров'ю та може розподілятися по всіх шарах матки. До того ж, ПГ-викликане запалення та зміни скоротливості матки описані переважно під час вагітності, пологів або порушення процесу імплантації плідного яйця.

Оскільки є дані про реалізацію патогенного ефекту Золотистого стафілоку через дію ПГ його клітинної стінки на гладенькі міоцити інших вісцеральних органів, наприклад, кишечника (79), ми припустили, що Золотистий стафілокок може змінювати характер скоротливості міометрія невагітної матки таким чином, що створюватиме несприятливі умови для нідації заплідненої яйцеклітини та подальшого розвитку вагітності.

1.5 Скорочувальна активність міометрія та її регуляція

Значення характеру маткових скорочень або маткової перистальтики доволі добре вивчено. Саме характер активності міометрія обумовлює репродуктивну здатність матки, самоочищення її порожнини, нормальний матково-плацентарний кровообіг, перебіг вагітності та пологів, стан плода та новонародженого, трофіку самого міометрія під час вагітності та поза неї, зміщення та розтягнення м'язових шарів матки при розвитку вагітності, а також адекватні структурні зміни усіх її шарів при підготовці до пологів (80). З іншого боку, дискінетичні зміни скоротливості міометрія при ендометріозі, аденоміозі, інтрамуральній лейоміомі, гідросальпінгсі вважається однією з причин безпліддя або спонтанних абортів на ранніх термінах вагітності при цих патологічних станах (14, 31). А здатність мідьвмісних внутрішньоматкових систем змінювати та помітно зменшувати інтенсивність маткових скорочень застосовується для контрацепції (16).

Міометрій, м'язовий шар стінки матки, складається із різнонаправлених м'язових волокон, які утворюють поздовжній та циркулярний шари. Зовнішній та внутрішній шари мають переважно поздовжню направленість, середній шар – кільцевий. Ці шари можуть бути добре відмежовані один від одного або перехід між ними може бути нечітким через переплітання волокон між собою. У шурів, наприклад, поздовжній та циркулярний шари м'язових волокон чітко виражені, оскільки добре відмежовані один від одного сполучною тканиною. А у людини чіткого відмежування між ними нема.

Поздовжній та циркулярний шари міометрія мають різне походження. Циркулярний шар походить від Мюллерових протоків, а поздовжній має мезенхімальне походження. Вони мають також і різні фармакологічні, електрофізіологічні та механічні властивості. Так, спонтанна активність міоцитів циркулярного шару значно нижча, ніж у міоцитів поздовжнього шару. Крім того, ці два шари міометрія відрізняються один від одного популяцією рецепторів, зокрема, адренорецепторів (81).

Відомо, що в поздовжньому шарі переважають β -рецептори, стимуляція яких в міометрії призводить до розслаблення м'язу, в той час як в циркулярному шарі - α -адренорецептори, при стимуляції яких відбувається скорочення. Крім того, кількість та активність α -адренорецепторів в циркулярному шарі зростає із середини до кінця вагітності, в той час як в поздовжньому шарі міоцитів в цьому проміжку кількість β -рецепторів залишається незмінною, однак в момент пологів відбувається різке зниження їхньої чутливості. Отже, кількість та чутливість рецепторів в м'язовому шарі - це не тільки анатомічна особливість, але й гормонзалежне явище (81).

Значення наявності, розташування та особливостей функціонування адренорецепторів полягає в тому, що вони є першою ланкою аденілатциклезної системи, за участі якої відбувається один з важливих механізмів регулювання скоротливої діяльності матки.

Не тільки адренорецептори, а й ферменти циклооксигеназа-1 та циклооксигеназа-2 (COX-1 та COX-2) представлені неоднаково в різних ділянках та шарах матки. COX-1 – конститутивна форма ферменту циклооксигенази, експресується в майже усіх тканинах ссавців, в тому числі й гладеньком'язових клітинах міометрія (77). Він функціонує як під час вагітності, так і поза неї. На прикладі свинячої матки було показано, що в поздовжньому шарі міометрія COX-1 більше експресується в ділянці рогу матки, ніж в тілі та в шийці. А в циркулярному шарі – однаково в усіх ділянках. Залежність щільності COX-2 від відділів матки за умов відсутності запалення в ГМК міометрія не були виявлені (82).

Вищевказані відомості про особливості експресії структурних компонентів ГМК міометрія повинні бути враховані при підборі методик дослідження.

Матка іннервується симпатичною та парасимпатичною нервовою системами. Парасимпатичні нервові волокна відходять від 2-4 крижових корінців, проходять крізь крижове сплетення та надходять в матку у ділянці шийки матки.

Парасимпатичні волокна регулюють скорочення та розслаблення міометрія шляхом виділення ацетилхоліну, що скорочує, та оксиду азоту, що розслабляє. Симпатичні корінці відходять від 10 грудного – 2 поперекового хребців, проходять крізь верхнє підчеревне сплетіння, підчеревний нерв, нижнє підчеревне сплетіння, матково-вагінальне сплетіння та проникають в матку фундо-латерально. Симпатичні нервові волокна виділяють норадреналін, який в матці зв'язується з α - або β -адренорецепторами. В першому випадку відбувається скорочення, а в другому – розслаблення міометрія.

Вважається, що крім автономної, в матці є ще механізми місцевої регуляції скоротливості. Вона здійснюється завдяки інтерстиціальним клітинам Кахаля - спеціальним клітинам з пейсмекерною активністю, що забезпечують ритмічні коливання мембранного потенціалу спокою гладеньких м'язових клітин. Зміни мембранного потенціалу обумовлюють високу чи низьку збудливість міоцитів. В періоди високої збудливості позитивний стимул спричинює збільшення мембранного потенціалу до або вище порогового рівня, виникнення потенціалу дії, який й ініціює скорочення. Різде збільшення внутрішньоклітинної концентрації кальцію в гладеньких м'язових клітинах матки спричинює активацію скоротливого апарату міометрія та ініціацію перистальтики матки. Хоча властивості клітин Кахаля та їхню роль для маткової скоротливості ще не до кінця вивчено, вважається, що простагландини, нейротрансміттери та гормони можуть впливати на їхню активність. Ще відомо, що на мембрані клітин Кахаля, так само, як і міоцитів матки, експресуються естрогенові та прогестеронові рецептори (14).

В міометрії електричний сигнал від одного міоциту до іншого передається через щілинні контакти - ділянки з низьким електричним опором. Ці сполучення двох сусідніх клітин утворені протеїном коннексин-43, які пронизують всю товщу клітинної мембрани та розташовані так, що в місці контакту клітин знаходяться один навпроти іншого, а їхні просвіти - на одній лінії. В утворених таким чином каналів висока провідність для йонів. Через щілинні контакти

здійснюється проходження низькомолекулярних сполук, таких як, наприклад, інозитолтрифосфат, та розповсюдження електричного імпульсу. Зменшення кількості щільних контактів, а отже роз'єднання міоцитів між собою, є одним з механізмів підтримання міометрія в розслабленому стані. А їхня щільність в міометрії гормонзалежна. (14, 83, 84).

Ще одним механізмом регуляції маткових скорочень є гуморальний, що здійснюється за участю гормонів, медіаторів і біологічно активних речовин, дія яких змінюється залежно від терміну вагітності або від фази маткового циклу у невагітній матці. Відомо, що під час фолікулярної фази, коли в сироватці крові визначається високий рівень естрогенів, скорочувальна активність міометрія підвищена та експресія рецепторів до естрогенів, окситоцину, простагландинів F2 α , ендотеліну-1 та брадикініну збільшена. В лютеїнову фазу, завдяки дії прогестерону, рівень якого в сироватці крові переважає, спостерігається зменшення експресії цих рецепторів з послідовним зниженням скорочувальної активності міометрія (85? 86).

Поза вагітністю та пологами у зв'язку з коливанням рівня яєчникових гормонів протягом маткового циклу скорочення міометрія мають різні амплітуду, частоту, тривалість та направленість (87, 88). Під час фолікулярної фази, коли рівень естрогенів в сироватці крові зростає, спостерігається збільшення експресії естрогенових рецепторів на мембрані гладеньких м'язів міометрія, рецепторів до простагландинів F2 α , ендотеліну-1 та брадикініну. Скорочення міометрія стають більшими за амплітудою та тривалістю. І навпаки, під час лютеїнової фази завдяки дії прогестерону відбувається зменшення експресії цих рецепторів та, як наслідок, розслаблення міометрія (89). Крім того визначено, що в ранню фолікулярну фазу скорочення міометрія з високою частотою та амплітудою в стінці матки утворюють хвилі, що розповсюджуються у напрямку від її дна до її шийки (антероградні), а в пізній – навпаки. В перiovуляторний період хвилі мають переважний напрямок від шийки матки до дна (ретроградні), а в секреторну фазу скоротливість дуже низька та хвилі майже відсутні (89 – 91)

Фізіологічне значення такої активності міометрія полягає в наступному: направленість та інтенсивність хвиль має сприяти транспорту сперматозоїдів до маткових труб, направленню зіготи до місця нідації у разі запліднення або вивільненню порожнини матки від менструальної крові та злущеного епітелію в разі, якщо вагітність не настала. Відносний спокій в перивуляторний період потрібний для створення оптимальних умов для імплантації заплідненої яйцеклітини (14).

Під час вагітності порушена скорочувальна активність міометрія може призвести до передчасних пологів, які є найчастішою причиною перинатальної смертності та важких патологій у недоношених дітей (66). Отже нормальна скорочувальна активність міометрія є обов'язковою передумовою репродуктивного здоров'я жінок.

Скорочення міоциту матки, як і м'язових клітин інших органів, починається з деполяризації його мембрани. Для міоциту невагітної матки потенціал спокою складає приблизно -55 мВ. Коли мембранний потенціал зростає до -40 мВ, виникає потенціал дії. В міометрії спряження скорочення і збудження регулюється внутрішньоклітинним рівнем кальцію (92). Виникнення потенціалу дії на мембрані міометрія спричинює відкривання потенціалкерованих кальцієвих каналів та, як наслідок, збільшення внутрішньоклітинної концентрації йонів кальцію. Деполяризація може відбуватися як спонтанно, так і під дією гормонів або інших біологічно активних речовин, що зв'язуються зі своїм рецептором та спричинюють відкриття неспецифічних катіонних каналів.

Головний гормон, що підтримує міометрій в розслабленому стані - це прогестерон. Він забезпечує спокій міометрія, а також регулює материнський імунітет в період вагітності (93, 94). Тривале введення прогестерону або його синтетичного аналогу медроксипрогестерону ацетату щурам наприкінці вагітності приводило до зменшення міграції лейкоцитів в міометрій, пригнічення синтезу цитокінів, розслабленню міометрія та блокуванню початку пологів (93, 95, 96).

Прогестерон є потужним стимулятором утворення цАМФ. Ця сполука активує протеїнкіназу А, яка фосфорилує фосфатази, що пригнічують фосфорилування кінази легких ланцюгів міозину, перешкоджаючи акто-міозиновій взаємодії, та зменшуючи таким чином скоротливу активність міоциту. Крім того, прогестерон стабілізує клітинну мембрану, перешкоджає утворенню щільних контактів між міоцитами, тим самим знижує їхню провідність. модулює щільність окситоцинових рецепторів на мембрані гладеньких міоцитів міометрія, пригнічення естроген-викликаної активації цГМФ-залежної протеїн кінази, та зниження секреції інтерлейкіна-8 в клітинах строми міометрія та шийки матки (97 - 99).

Естрогени викликають збільшення числа окситоцинових та α -адренорецепторів, а також їхньої чутливості. Крім того, стимулюють вироблення окситоцину в матково-плацентарному комплексі. Як наслідок, збільшується кількість каналів, здатних пропускати позаклітинний кальцій. Одночасно пригнічується активність транспортної Ca^{2+} -АТФази, що блокує кальцієвий насос та збільшує вміст внутрішньоклітинного Ca^{2+} . При високому рівні Ca^{2+} в міоциті пригнічується синтез цАМФ та активуються кальцій-залежні ферменти: фосфоліпази А2 та С, а з цього починається каскад арахідонової кислоти та фосфоінозитидний розпад в клітинних мембранах. При дії на стабільну клітинну мембрану фосфоліпази С вона стає функціонально активною та проникною для йонів кальція (100 – 103).

1.7 Значення Ca^{2+} для маткових скорочень

Скорочення міоциту матки, як і м'язових клітин інших органів, починається з деполяризації його мембрани. Для міоциту невагітної матки потенціал спокою складає приблизно -55 мВ. Коли мембранний потенціал зростає до -40 мВ, виникає потенціал дії. В міометрії спряження скорочення і збудження регулюється внутрішньоклітинним рівнем кальцію. Отже основним тригером маткових скорочень є зростання рівня внутрішньоклітинного кальцію (104). Виникнення

потенціалу дії на мембрані міометрія спричинює відкривання потенціалкерованих кальцієвих каналів та внутрішньоклітинна концентрація йонів кальцію росте. Деполяризація може відбуватися як спонтанно, так і під дією гормонів або інших біологічно активних речовин, що зв'язуються зі своїм рецептором та спричинюють відкриття неспецифічних катіонних каналів.

Вхід кальцію всередину міоциту матки може відбуватись і через неспецифічні йонні канали. В міометрії це ємнісний або депо-керований вхід кальцію. При цьому механізмі внаслідок дії певних речовин активуються 1,4,5-інозитолтрифосфат рецептори, це спричинює вивільнення кальцію із внутрішньоклітинного депо, переважно саркоплазматичного ретикулуму, а наступне певне підвищення рівня внутрішньоклітинного кальцію спричинює відкривання депо-керованих йонних каналів (105). Ще в 2000-х роках Tribe показала ємнісний вхід кальцію при спустошенні СРА-чутливого кальцієвого депо в умовах заблокованих потенціалкерованих каналів L-типу (106). Зокрема з таким механізмом пов'язують окситоцин-викликане скорочення міометрія (107).

Рівень внутрішньоклітинного Ca^{2+} в міоциті може зрости або шляхом поступлення всередину клітини із позаклітинного простору через мембранні кальцієві канали, або шляхом вивільнення його із внутрішньоклітинного депо кальцію. Так чи інакше, саме вміст кальцію визначає скоротливість міоциту матки (101, 103-108)

Ще не повністю вивчена роль саркоплазматичного ретикулуму, внутрішньоклітинного депо Ca^{2+} , у фізіології матки. За даними електронної, а згодом і конфокальної мікроскопії він представляє собою систему вузьких трубочок, що розподілені по всьому внутрішньоклітинному простору та займають 5-7% всього об'єму міоциту. Концентрація вільного кальцію в порожнині саркоплазматичного ретикулуму може досягти $500\mu\text{M}$, в той час як в цитоплазмі клітини в стані спокою це значення складає близько 100nM . Вивільнення же кальцію в цитоплазму в гладенькомязових клітинах відбувається через ріанодинові або IP₃-рецептори. Обидва типи каналів експресуються на клітинах

міометрія (108, 109), але найбільше фізіологічне значення для функціонування матки мають IP3 рецептори. При зв'язуванні агоністу зі своїм рецептором на поверхневій мембрані відбувається активація фосфоліпази C, під дією якої відбувається розпад фосфоліпідів мембрани та утворення інозитол-три-фосфата. Останній зв'язується з IP3 рецептором саркоплазматичного ретикулу, активує його і вільний кальцій проникає із клітинного депо в цитоплазму. В міометрії IP3-опосередкований викид кальцію бере участь у окситоцин-, простагландин-, α -адренергічно- та M-холінергічно індукованій кальцієвій сигналізації (100 – 103, 110).

Нині достовірно відомо, що компоненти клітинної стінки золотистого стафілокока можуть впливати на механізми перерозподілу іонів кальцію в клітинах внаслідок впливу на його потенціал- і рецепторкерований шляхи надходження, функціонування внутрішньоклітинного кальцієвого депо, а також модифікувати білки скоротливого апарату гладеньких м'язових клітин шлунково-кишкового тракту(111).

Підсумок

ПГ Золотистого стафілококу є структурним компонентом клітинної стінки, який виділяється в навколишнє середовище під час росту, ділення або руйнування мікроорганізму, розповсюджується кров'ю, абсорбується на тропних клітинах та спричинює патологічні процеси в різних органах. Він розпізнається кількома типами рецепторів вродженої імунної системи. В жіночих репродуктивних органах експресуються TL2, NOD1 та NOD2 рецептори, експресія яких гормонзалежна та асоційована з фізіологічними та патологічними процесами. ПГ-розпізнаючі рецептори в жіночих репродуктивних органах експресуються на епітеліальних, тучних та гладеньких м'язових клітинах (ГМК). Однак особливості їхнього функціонування в жіночій репродуктивній системі досі до кінця не ясні.

Відомо, що в жіночій репродуктивній системі ПГ Золотистого стафілококу задіяний у розвитку ряду ускладнень вагітності, в тому числі виникненні

хоріоамніоніту, порушення маткової скоротливості та передчасному перериванні вагітності. А інфікованість Золотистим стафілоком у невагітних жінок, часто асимптомна та випадково виявлена, корелює з неплідністю у них.

Однак, наразі невідомо, чи реалізуються ефекти ПГ внаслідок прямої взаємодії з міометрієм, або ж їхня дія завжди опосередкована імунокомпетентними клітинами та секретованими ними прозапальними цитокінами, як описується в сучасних літературних джерелах. Крім того, невідомо, як впливає ПГ на ГМК невагітної матки, який механізм дії ПГ на міометрій та як можна цю дію корегувати. Це обґрунтовує мету досліджень, описаних в дисертаційній роботі.

РОЗДІЛ 2

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

2.1 Об'єкт дослідження

Експерименти проводилися на смужках гладеньких м'язів (ГМ) та ізольованих ГМК міометрія статевозрілих самиць щурів лінії Wistar масою до 200-250 г. та вагітних щурах (8 — 11 діб гестації).

Дослідні тварини були розділені на 5 експериментальних груп. Кожна з груп складалась із 10 тварин. Після виділення матки щура, з кожного рогу отримували та досліджували по 3 пари м'язових смужок.

Всі роботи з тваринами виконані при дотримуванні положень Конвенції з біоетики Ради Європи (1997 року), Хельсинської декларації Всесвітньої Медичної Асоціації (1996 року), Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментальних та інших наукових цілей (Страсбург, 1986), загальних етичних принципів наукових досліджень, ухвалених Першим національним конгресом України з біоетики (2001 року), Закону України № 3447-IV «Про захист тварин від жорстокого поводження» (2006), Директиви ЄС 2010/63/EU «Стосовно захисту тварин, що використовуються у наукових цілях» і вказівок інститутського біоетичного комітету.

2.2 Підготовка смужок міометрія і вимірювання скорочення

Скоротливу активність міометрія досліджували методом тензометрії в ізометричному режимі. Метод полягає у вимірюванні сили м'язової смужки в умовах ізометричного скорочення.

Для дослідження параметрів скорочень міометрія всіх дослідних тварин анестезували ефіром та декапітували. Роги матки швидко видаляли і поміщали в нагрітий до 37°C, оксигенований (95% O₂ і 5% CO₂) розчин Кребса: (ммоль/л):

NaCl 120,4, KCl 5,9, CaCl₂ 1,8, MgCl₂ 1,2, NaH₂PO₄ 1,2, NaHCO₃ 15,5, глюкоза 11,5 (рН 7,4).

Роги матки розрізали вздовж, очищали від сполучної тканини та ендометрія, і нарізали повздовжні смужки довжиною 0,7-1,0 см і шириною 0,2-0,3 см.

Із рогів матки вагітних щурів смужки виділяли з ділянок прикріплення плаценти та з ділянок, де плодів не було, і оцінювали, чи однаково тканина з цих ділянок реагували на аплікацію досліджуваних речовин.

Смужки вміщували в проточну камеру; один кінець фіксували нерухомо, а другий прикріплювали до ємнісного датчика сили з базовим навантаженням 3,0 мН. Запис скорочувальної активності здійснювали через аналогово-цифровий перетворювач.

2.3 Визначення амплітудно-кінетичних параметрів скорочення смужок міометрія.

В наших експериментах про характер скорочувальної діяльності гладеньких м'язів матки й впливу на неї ПГ судили по наступних параметрах (див рис. 1):

- середня частота скорочень протягом 10 хв;
- середня амплітуда скорочень;
- середня тривалість скорочення;
- тривалість пауз між скороченнями;
- тривалість маткового циклу (тривалість маткового скорочення та паузи між даним скороченням та наступним);
- площа під кривою скорочення;
- індекс активності скорочень (відношення тривалості скорочень до тривалості пауз між скороченнями);
- коефіцієнт асиметрії (відношення тривалості систоли до тривалості діастоли скорочення);

- скоротлива активності матки в Олександрійських одиницях (OU) - добуток середньої амплітуди скорочень в мН, середньої тривалості скорочень в хв та частоти скорочень за 10 хв. Застосування OU доцільно, коли тривалість циклів маткових скорочень змінюється. (104);
- скорочувальна активність матки в одиницях Монтевідео (MU) - добуток середньої амплітуди скорочень в мН та середньої тривалості скорочень м хв (105);
- максимальна швидкості скорочення (dF/dt_{max}). Позитивний пік першої похідної скорочення характеризує максимально активний стан м'язової смужки, що є наслідком збільшення внутрішньоклітинного вмісту кальцію в гладеньком'язових клітинах (ГМК) та фосфорилування легких ланцюгів міозину;
- максимальна швидкості розслаблення ($-dF/dt_{max}$) . Негативний пік першої похідної скорочення характеризує максимальну деактивацію гладеньком'язової смужки, що є наслідком припинення потенціалу дії в ГМК міометрія та зниженням внутрішньоклітинного рівня кальцію;
- T — час активного скорочення (проміжок часу між максимальними величинами $+dF/dt_{max}$ та $-dF/dt_{max}$). Характеризує тривалість активного стану кальцієвих каналів ГМК міометрія.
- приріст швидкості напруги скорочення (відношення максимальної швидкості скорочення на тлі досліджуваної речовини до цієї ж величині в контролі);
- приріст швидкості напруги розслаблення (відношення максимальної швидкості розслаблення на тлі досліджуваної речовини до цієї ж величині в контролі). За методикою Лаптева Б.І та ін., розраховавши максимальні швидкості скорочення та розслаблення, прирости швидкості скорочення та розслаблення та співвідношення між ними, можна судити про механізм дії речовини на м'яз, а саме: оцінювати вплив досліджуваної речовини на потоки кальцію в міоплазму ГМК міометрія (112);

- С — тривалість фази наростання скорочення м'язу (відстань по осі Х від початку наростання напруження до точки максимальної амплітуди);
- Р — тривалості фази розслаблення м'язу (відстань по осі Х від початку швидкого розслаблення до досягнення кривої рівня базового тону);
- ТК — тривалість тонічного компоненту скорочення (відстань по осі Х між точкою максимальної амплітуди скорочення до початку швидкого розслаблення);

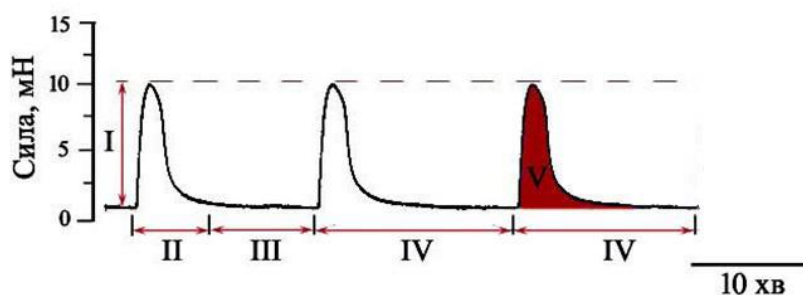


Рис. 2.1 Визначення параметрів спонтанної скорочувальної активності смужок міометрія щурів.

I – амплітуда скорочення, відносно вихідного тону смужки; *II* – тривалість скорочення; *III* – тривалість пауз між скороченнями; *IV* – тривалість маткового циклу; *V* – площа під кривою скорочення.

Одним з об'єктивних показників скорочувальної активності ізольованих м'язів є визначення в експерименті максимальних швидкостей ізометричного скорочення ($+dF/dt$, перша похідна скорочення) та швидкості розслаблення ($-dF/dt$, перша похідна розслаблення) м'язової смужки. За умов наявності режиму диференціювання підсилювачем електричного вхідного сигналу, який надійшов від м'язу на реєстраційний прилад, паралельно з кривою зміни напруження відразу видається крива швидкості його зміни (рис. 2.2).

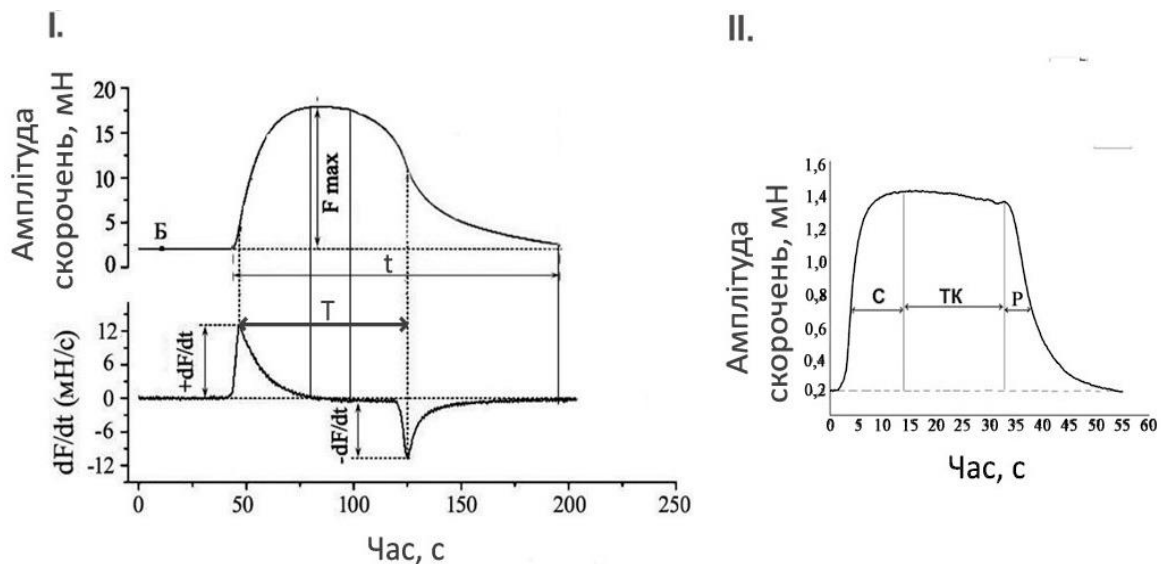


Рис. 2.2 Визначення амплітудно-кінетичних параметрів поодинокого скорочення гладеньком'язової смужки міометрія щура.

I. Позначення на верхньому графіку: Б – вихідний тонус м'язової смужки, мН; Fmax – пік амплітуди скорочення відносно вихідного тонусу м'яза, мН; t – тривалість скорочення, с; T – тривалість активного стану скорочення; На нижньому графіку показано визначення максимальної швидкості скорочення м'язу (+dF/dt, перша похідна скорочення, мН/с) та максимальної швидкості розслаблення м'язу (-dF/dt, перша похідна розслаблення, мН/с).

II. C – фаза наростання скорочення; ТК – тонічний компонент; P – фаза розслаблення скорочення.

2.4 Ізолювання гладеньком'язових клітин (ГМК) міометрія вагітних і невагітних щурів здійснювалось ферментативним методом двоциклової обробки тканини. В першому циклі обробку проводили в присутності 1,0 мг/мл папаїну, 0,5 мг/мл колагенази II типу та інших допоміжних речовин, а в другому циклі — 1,0 мг/мл колагенази Ia типу та трипсину у концентрації 2 мг/мл. Реєстрацію Ca²⁺-залежної флюоресценції здійснювали за допомогою високоафінного (kd = 335 нМ) кальційчутливого флюоресцентного барвника Fluo-4AM (максимуми абсорбції/емісії = 494 нМ/506 нМ). ГМК завантажували цим барвником шляхом інкубації клітин протягом 40 хв в розчині Кребса в присутності

мембранопроникного Fluo-4AM (2,0 мкМ), попередньо розчиненого в DMSO (обидва — від "Molecular Probes", США) протягом 35 хв у темряві при кімнатній температурі. Далі ГМК відмивали у розчині Кребса протягом 40 хв при кімнатній температурі. Для візуалізації змін Ca^{2+} на субклітинному рівні використовували конфокальний комплекс LSM 5 PASCAL на основі інвертованого мікроскопа Axiovert 200M (Zeiss, Німеччина). Для *візуалізації змін Ca^{2+}* на субклітинному рівні використовували конфокальний комплекс LSM 5 PASCAL на основі інвертованого мікроскопа Axiovert 200M (Zeiss).

2.5 Створення гормонального фону

Для створення моделі гіперестрогенії тваринам вводили 17- β -естрадіол (Байер, Німеччина) per os в дозі 1,0 мкг/тварина 1 раз в день протягом 2 діб.

Для створення моделі «псевдовагітності» після попередньої обробки щурів згідно з протоколом естрогенізації щоденно вводили підшкірно медроксипрогестерон в дозі 0,2 мг/тваринну (Пфайзер, Бельгія). Загальна тривалість введення медроксипрогестерону складала 22 доби, що відповідає середній тривалості вагітності у щурів.

В подальшому всі тварини були розділені на три групи: першу групу (10 щурів) складала тварини які отримували тільки 17- β -естрадіол (I, естрогенізовані тварини); щури другої (II) і (III) груп (по 10 тварин) отримували медроксипрогестерон протягом 14 і 22 діб, відповідно. В подальшому всі тварини були розділені на три групи: першу групу (10 щурів) складала тварин які отримували тільки 17- β -естрадіол (I, естрогенізовані тварини); друга (II) і (III) групи тварин (по 10 щурів) отримували медроксипрогестерон протягом 14 і 22 діб, відповідно.

2.6 Ідентифікація участі G-білків в ефектах ПГ використовували кашлюковий та холерний токсини. Кашлюковий екзотоксин, ізольований з культури Bordetella pertussis, використовується для інактивації Gi/o-білків. Субодиниця А холерного токсину, ізольована з Vibrio cholerae, викликає АДФ-

рибозилування залишку аргініну в α -субодиниці Gs-білка, пригнічуючи ГТФ-азу й зберігаючи цю субодиницю в безупинно активованому стані. Останнє збільшує каталітичну активність аденілатциклази, що призводить до значного зростання внутрішньоклітинного рівня вмісту цАМФ, а також зниження її реакції на дію гормонів.

Смужки міометрія щурів до експериментів витримували в нормальному розчині Кребса зі зниженим вмістом Ca^{2+} (1,25 ммоль/л) та Mg^{2+} (0,6 ммоль/л) з додаванням 6 мкг/мл коклюшного або холерного токсинів при 36°C протягом 15-18 годин. Також для активації аденілатциклази використовували форсколін (1, 10 мкмоль/л). Всі досліджувані речовини були від фірми "Sigma-Aldrich" (США). ПП розводили в 0,9% розчині NaCl в концентрації 2 мг/мл та додавали до розчину Кребса із розрахунку 0,003 мг/мл. Простагландин-F2 α попередньо розчинений в етанолі, додавали до розчину Кребса. Концентрація його була 20 ммоль/л та 10 мкмоль/л, відповідно.

Для активації β -адренорецепторів поздовжніх м'язів матки використовували неселективний агоніст норадреналін (10 мкмоль/л) та селективний агоніст до β_2 -адренорецепторів сальбутамол (1 мкмоль/л), які вводили в розчин Кребса перед аплікацією. Також використовували мембранопрониклий аналог цАМФ 8-бром-цАМФ (10 мкмоль/л) та блокатор цАМФ-залежних фосфодіестераз папаверин (1 мкмоль/л).

2.7 Речовини

Всі досліджувані речовини були від фірми "Sigma-Aldrich" (США). ПП розводили в 0,9 % розчину NaCl в концентрації 2 мг/мл і додавали до розчину Кребса в субмаксимальній концентрації 10-3 мг/мл.

Всі досліджувані речовини були від фірми "Sigma-Aldrich" (США). ПП розводили в 0,9 % розчину NaCl в концентрації 2 мг/мл і додавали до розчину Кребса в субмаксимальній концентрації 10-3 мг/мл. Вона було визначена в роботі Філіппова та ін. (1996) з кривої доза-ефект.

Простагландин F2 α розводили в базовій концентрації етанолу 20 ммоль і додавали до розчину Кребса в концентрації 10 мкмоль.

Форсколін – дитерпен лабдана, що має властивість безпосередньо (минути рецептори) активувати аденілатциклазу. Використовували в концентрації 1 мкмоль.

Норадреналін – катехоламін, неселективний агоніст β -адренорецепторів. Використовували в концентрації 10 мкмоль.

Сальбутамол – селективний агоніст α - і β 2-адренорецепторів. Використовували в концентрації 1 мкмоль. Норадреналін та сальбутамол додавали до розчину Кребса безпосередньо перед аплікацією (ex tempore).

SQ 22.536 - селективний блокатор аденілатциклази. Розводили в базовій концентрації в дметилсульфоксиді (DMS) 20 мМоль/л і додавали до розчину Кребса в концентрації 10 мкмоль.

8-бром-цАМФ - мембранопрониклий аналог цАМФ. Використовували в концентрації 10 мкмоль. в базовій концентрації вносили до розчину Кребса перед аплікацією.

Папаверин - блокатор цАМФ-залежних фосфодіестераз (1 мкмоль) в базових концентраціях вносили в розчин Кребса до аплікації.

Ніфедипін - блокатор потенціалкерованих кальцієвих каналів L-типу розводили в базовій концентрації в DMS 20 ммоль і додавали до розчину Кребса в концентрації 1 мкмоль.

2-APB (2-аміноетоксидифенілборат) - блокатор інозитолтрифосфатних рецепторів розводили в базовій концентрації в DMS 20 ммоль і додавали до розчину Кребса в концентрації 30 мкмоль.

Німесулід – селективний блокатор COX-2. Використовували в концентрації 10 мкмоль.

Гіперкалієвий розчин Кребса ($[K^+]_i = 60$ ммоль) використовували для деполяризації мембрани ГМК

Ацетилхолін – неспецифічний М- та Н-холиноміметик. Використовували в концентрації 10 мкмоль.

2.8 Аналіз даних, статистична обробка результатів експериментів та їхнє графічне представлення здійснювалась за допомогою програмного забезпечення Origin 8.5. Для кожної серії експериментів визначались середні значення даних і приводились у вигляді середнє \pm стандартна похибка середнього (спс) з позначенням числа смужок "n", на яких вони отримані. Статистичне порівняння контрольних значень параметрів і значень під впливом досліджуваних речовин проводили за допомогою парного Т-тесту Стьюдента, а між групами за допомогою однофакторного дисперсійного аналізу ANOVA з поправкою Бонферроні.

Розділ 3

Результати та їх обговорення

3.1.1 Амплітудно-кінетичні характеристики скорочень матки невагітних щурів в контролі та під впливом ПГ

Оскільки ми припустили, що ПГ може викликати зміни характеру спонтанних скорочень міометрія не тільки під час вагітності а й поза неї, першою задачею, яку ми поставили в нашій роботі було порівняти амплітудно-кінетичні параметри спонтанних скорочень міометрія невагітних щурів в нормі та під дією ПГ.

Крім того, в літературних джерелах стимуляція скоротливості вагітної матки, спричинена ПГ, описується як опосередкована цитокінами та іншими біологічно активними речовинами, що секретуються енометрієм та децидуальною тканиною при контакті з ПГ. Але нема даних про те, чи реагує саме м'язовий шар на ПГ, адже він розноситься кров'ю і може потрапляти в усі тканини.

Характер механізму скорочувальної активності міометрія визначається нейрогуморальною регуляцією скорочень гладеньких м'язів за участю гормонів, медіаторів та біологічно активних речовин, дія яких послаблюється або підсилюється залежно від терміну вагітності. ПГ, зв'язуючись з рецепторами вродженого імунітету змінюватиме активність регуляторних протеїназ, що в свою чергу призводить до посилення транскрипції прозапальних генів і, ймовірно, що зміна в їх активності впливає на скорочувальну активність ГМ міометрію раніше ніж прозапальні цитокіни і хемокіни. Тим більше, що запальний процес за його участі розвивається доволі повільно.

Для визначення, чи викликає ПГ модуляцію скоротливості матки при взаємодії безпосередньо з міометрієм за умов виключення впливу ендометрія, ми проводили дослідження на смужках міометрія, з видаленим ендометрієм. У випадку виявлення змін характеру скорочень міометрія під впливом ПГ, слід визначити, яким саме чином та чи відрізняються викликані ПГ скорочення за своєю структурою від фізіологічних. Ще одним важливим поставленим питанням

було, чи однаково себе ведуть гладеньком'язові смужки від матки вагітних та невагітних щурів. Це могло б навести на схожість або відмінність механізмів клітинної дії ПГ на скоротливість матки.

Першим нашим завданням було виявити, чи змінює ПГ скоротливість міометрія безпосередньо, без участі ендометрія. Тож ми дослідили амплітудно-кінетичні характеристики спонтанних скорочень м'язової смужки, очищеної від ендометрія, та їхні зміни на тлі аплікації ПГ. У контрольних умовах виділені смужки неміометрія вагітних щурів були спонтанно активними і регулярно скорочувались.

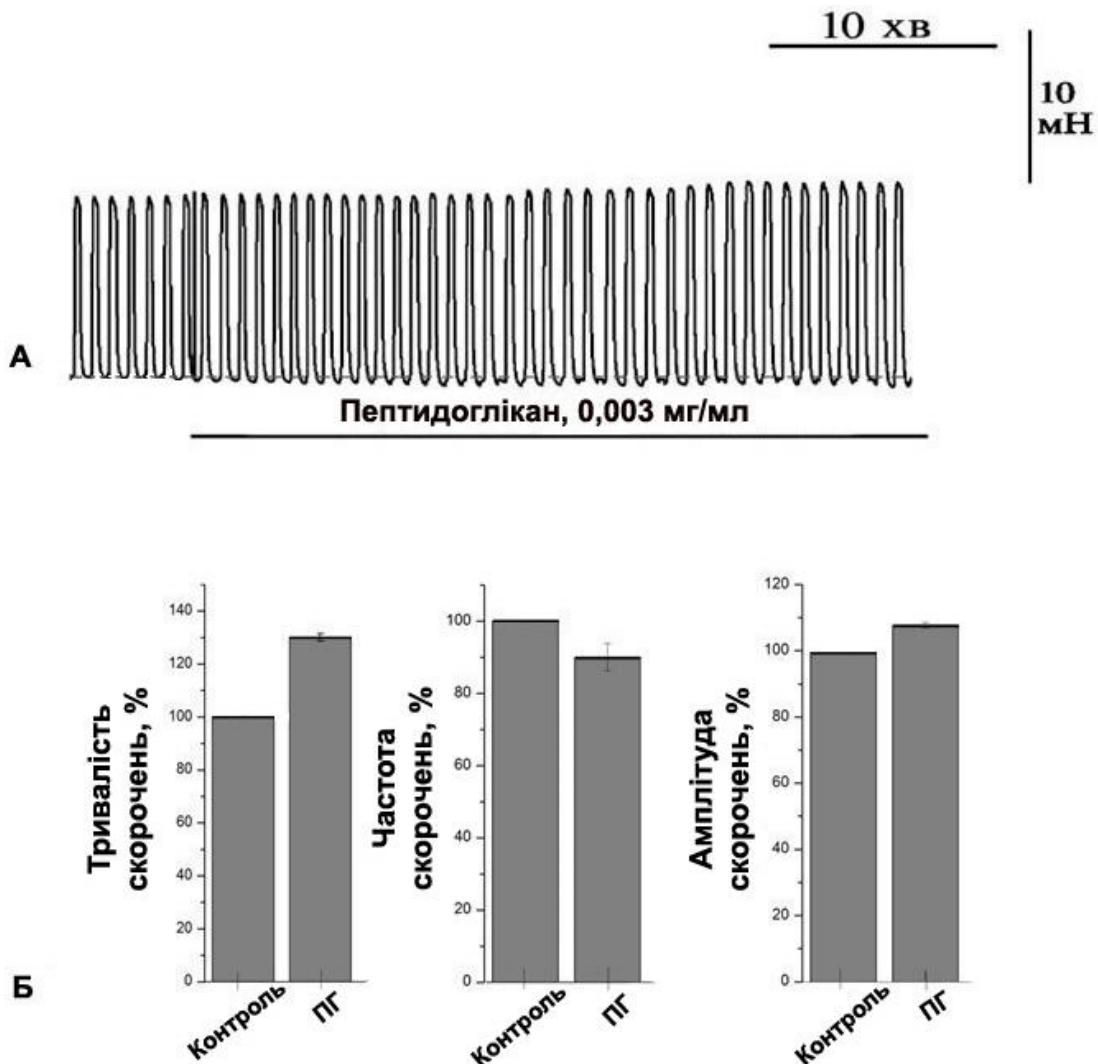


Рис. 3.1.1 Типовий запис, що демонструє дію пептидоглікану на спонтанні скорочення міометрія невагітних щурів. На А. – ПГ збільшує амплітуду та

тривалість спонтанних скорочень міометрія, але дещо знижує базальний тонус; пунктирна лінія позначає базальний тонус; На Б – діаграми статистично узагальнених даних змін тривалості, частоти та амплітуди скорочень під дією ПГ (10^{-3} мг/мл), відносно контролю, прийнятого за 100 %;

Як видно на рис. 3.1.2 А, Б, не дивлячись на відносно незначне зростання амплітуди під дією ПГ, площа під кривою поодинокого спонтанного скорочення збільшилася на $30,0\% \pm 0,26\%$ ($n = 15$, $P < 0,001$) за рахунок зростання амплітуди та тривалості скорочень. ПГ

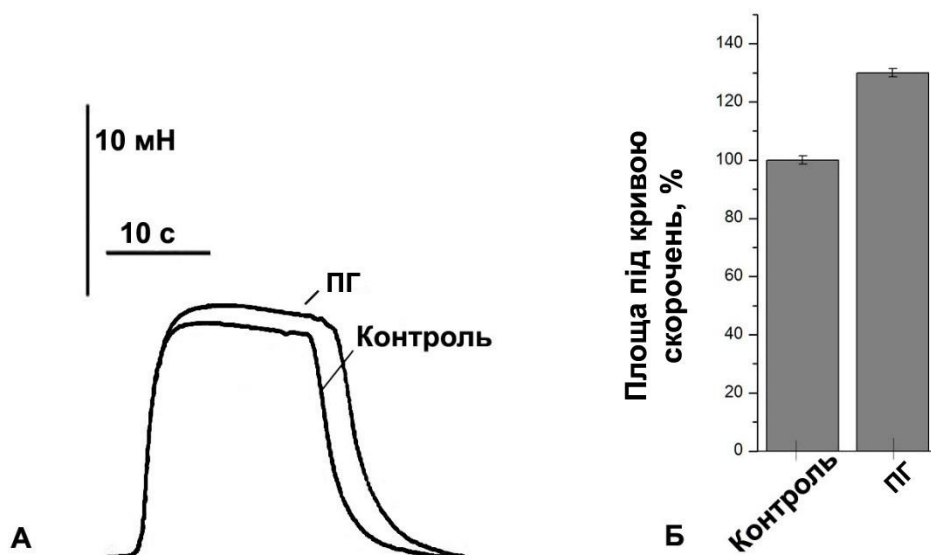


Рис. 3.1.2 А — Типовий запис поодинокого спонтанного скорочення в контролі та під дією ПГ, що демонструє зміну площі під кривою скорочення, за рахунок зростання амплітуди та тривалості; **Б** — діаграма статистично узагальнених даних змін під дією ПГ (10^{-3} мг/мл) відносно контролю, прийнятого за 100 %;

Для порівняння ефективності скоротливості міометрія на тлі дії ПГ з контролем ми дослідили структуру скорочувального акту та оцінили параметри, вказані в Таблиці 3.1.1.

Таблиця 3.1.1

Зміни параметрів спонтанних скорочень міометрія невагітних щурів під дією ПГ Золотистого стафілококу ($M \pm n$).

Показники	контроль	ПГ
Тривалість фази наростання скорочення, с	5,5±0,22	6,11±1,68*
Тривалість фази розслаблення, с	9,0±1,31	14,1±1,48*
Тривалість пауз між скороченнями, с	22,40±1,76	23,17±1,50
Тривалість маткового циклу, с	45,34±1,25	56,74±1,54*
Індекс активності скорочень, ум.од.	1,03±0,062	1,43±0,038
Скорочувальна активність, Олександрійські одиниці	660±11,89	827,589±8,74*
Коефіцієнт асиметрії, ум.од.	0,65 ±0,06	0,45±0,07
Приріст швидкості досягнення максимуму скорочення, ум.од	-	1,240±0,203
Приріст швидкості досягнення максимуму розслаблення, ум.од.	-	1±0,207
Примітка. Приведені середні значення \pm SD., n=10 для кожного випадку *; $P \leq 0,05$ порівняно з контрольним значенням;		

Розрахунок параметрів скоротливості міометрія показали, що збільшення маткового циклу обумовлене як збільшенням тривалості самих скорочень, так і тривалості пауз між ними. Наслідком цього і є зменшення частоти скорочень за 10 хвилин на тлі ПГ відносно контролю. Під дією ПГ змінюється також структура самого скорочення: систола (період від початку скорочення до моменту досягнення максимального напруження) та діастола (період від моменту

закінчення тонічного компоненту скорочення та до повного розслаблення) збільшуються на $10,9\% \pm 1,25\%$ та $56,7\% \pm 1,6\%$, відповідно, відносно контролю. Отже, фаза розслаблення на тлі ПГ стала значно довшою, ніж в контролі. Тонічний компонент маткового скорочення збільшився на $23,8\% \pm 0,65\%$. Отже, збільшення тривалості діастолі скорочення міометрія під дією ПГ значно більш виражене, ніж приріст тривалості систоли. Індекс активності на тлі ПГ збільшився на $38,8\% \pm 0,25\%$. Скорочувальна активність, або ефективність, міометрія, виражена в Олександрійських одиницях, на тлі ПГ збільшилась на $25,4\% \pm 1,265\%$, величина T, проміжок часу між dF/dt_{max} та $-dF/dt_{max}$ збільшилась на 20% (Таб. 1, Рис. 3.1.3). Коефіцієнт асиметрії зменшився на 30,76% відносно контролю, а це свідчить про збільшення потужності скорочень.

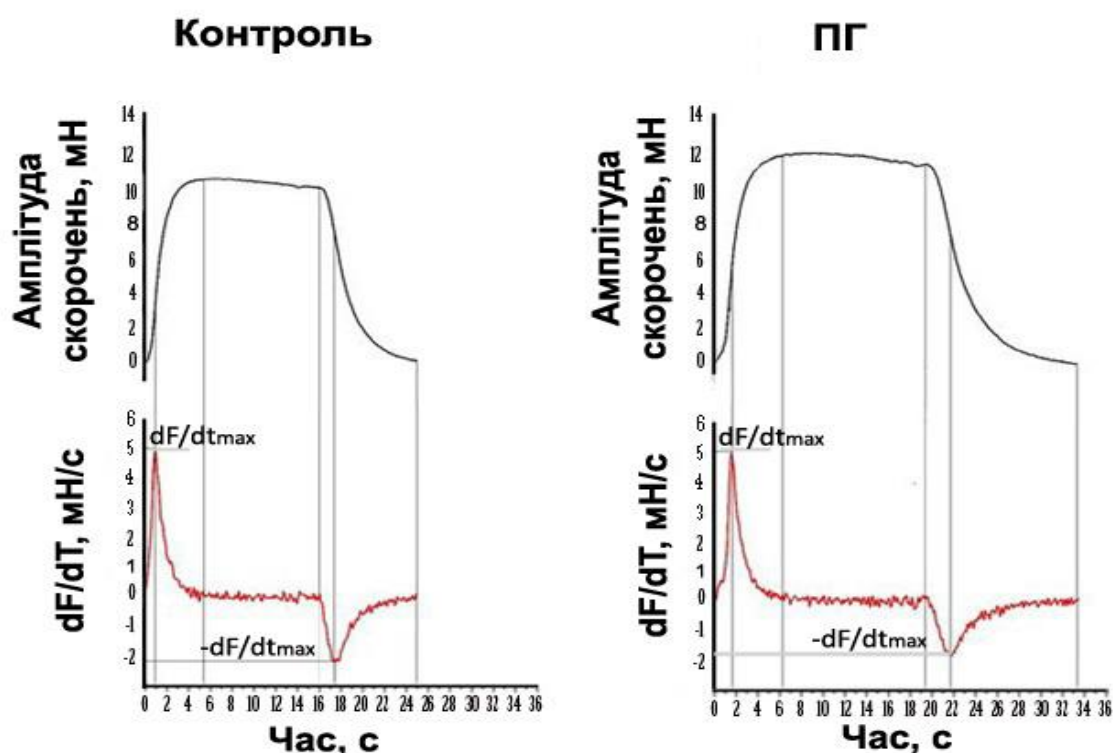


Рис. 3.1.3 Зміна першої похідної скорочення та розслаблення смужки міометрія невагітних щурів.

На верхньому графіку – типовий запис поодинокого скорочення в контролі та на тлі ПГ; на нижньому графіку – перша похідна швидкості скорочення та розслаблення в контролі та на тлі ПГ.

Приріст швидкості досягнення максимуму скорочення, тобто відношення максимальної швидкості скорочення на тлі ПГ до цієї ж величині в контролі, більша за одиницю. Натомість приріст швидкості досягнення максимуму розслаблення менший за 1. Отже значення обох параметрів більше одиниці, а другий параметр більший за перший. А це, відповідно до патенту Б.І. Лаптева та ін. (106), може свідчити про позитивний інотропний ефект ПГ на міометрій, що пов'язаний з активацією входу кальцію в міоплазму через сарколему та вивільненням його із саркоплазматичного ретикулу. Оскільки приріст швидкості досягнення максимуму скорочення більше за приріст швидкості досягнення максимуму розслаблення, можна зробити висновок, що більшою мірою описані зміни обумовлені входом йонів кальцію через плазмолему.

Як показано на рис. 3.1.3, максимальна швидкість скорочення в контролі та на тлі ПГ однакові та складають $50 \text{ мН/с} \pm 035$, проте період часу, за який ця швидкість досягається на тлі аплікації ПГ майже на 60% більша за такий в контролі. І навпаки, максимальна швидкість розслаблення скорочення на тлі ПГ на 57,14% менша за контроль. Крім того, час досягнення максимальної швидкості розслаблення на тлі ПГ в два рази більший за контроль, а тривалість всієї фази розслаблення збільшився на 69,4%.

Як показали результати експериментів, ПГ впливав на всі основні параметри спонтанних скорочень неміометрія вагітних щурів, в тому числі на швидкість скорочення та розслаблення міометрія. Крім того, під впливом ПГ змінилось співвідношення фаз спонтанних скорочень у бік подовження фази розслаблення.

Підсумки:

1. У групі невагітних щурів ПГ модулює скоротливість гладеньком'язових смужок міометрія з видаленим ендометрієм.
2. ПГ впливає на амплітудно-кінетичні характеристики спонтанних скорочень міометрія та на співвідношення фаз поодинокого скорочення.
3. Під дією ПГ збільшується площа під кривою скорочення переважно завдяки подовженню його тривалості.
4. Тривалість маткового циклу під впливом ПГ збільшується завдяки подовженню тривалості спонтанного скорочення та пауз між ними.
5. Під впливом ПГ спонтанні скорочення міометрія невагітних щурів збільшуються тривалість всіх фаз поодинокого скорочення, але найбільше тривалість фази розслаблення.

3.1.2 Амплітудно-кінетичні характеристики скорочення матки вагітних щурів в контролі та під впливом пептидоглікану.

Смужка міометрія вагітного щура, очищена від ендометрія, спонтанно скорочувалась. На відміну від невагітної матки, серед спонтанних скорочень гладеньком'язові смужки міометрія від вагітних щурів спостерігалась значна кількість комбінованих скорочень. Це такі скорочення, при яких в період від початку напруження м'язової смужки до досягнення базального рівня на запису скорочення спостерігається декілька (2 або більше) піків.

Комбінованими (двогорбими або двофазними, англ. coupling, coupled, biphasic) вважають комплекси скорочень, при яких наступне після першого скорочення починається до повного розслаблення попереднього та повернення тону до базального рівня (Рис. 3.1.4 А). Між комплексами комбінованих скорочень, як правило, базальний тонус матки відновлюється. Існує декілька припущень щодо походження двофазних скорочень: 1) два або більше скорочень

виникають майже одночасно, але охоплюють різні ділянки міометрія, через що рефрактерний період між скороченнями відсутній (109); 2) також вважається, що існує чітка залежність між пейсмерною активністю міоцита та ступеню його розтягнення, що прямо пов'язано з підвищенням базального тону розтягнутого міоцита. Була показана здатність розтягнутого міоцита, внаслідок переповнення кров'ю судинного депо матки, генерувати позачергове скорочення на імпульс до розтягнення, який направлений на екстрене спорожнення судинного депо (110)

Такого типу скорочення складали близько 30-40% відсотків як в контролі, так і на тлі ПГ. Тобто ПГ ніяк не впливав на кількість комбінованих скорочень.

Так же, як і в попередній серії експериментів, після встановлення регулярних спонтанних скорочень міометрія ми аплікували ПГ. При обчисленні амплітуди комбінованих скорочень ми враховували значення найвищого піку. Тривалість скорочення обчислювали з моменту його початку і до розслаблення до рівня базального тону незалежно від кількості піків комбінованих скорочень. Як видно на рисунку 3.1.4А, на тлі ПГ скорочення міометрія вагітного щура зазнала певних змін. Середня амплітуда та тривалість скорочень смужки міометрія на тлі ПГ збільшились на $17,54 \pm 2,37\%$ та $12,2 \pm 2,1\%$, відповідно, відносно контролю. Час досягнення максимуму амплітуди на тлі ПГ збільшився на $58\% \pm 0,56$ відносно контролю (Рис. 6). Частота скорочень на тлі ПГ зменшилась в середньому на $9,75 \pm 0,365\%$ відносно контролю (рис. 3.4).

У більшості смужок міометрія від вагітних щурів на тлі ПГ зменшувався також базальний тонус в середньому на $1,8\% \pm 0,65\%$ від середньої амплітуди спонтанних скорочень міометрія вагітних щурів в контролі.

Збільшення амплітуди та тривалості скорочень на тлі дії ПГ призводили до збільшення площі під кривою скорочення на $36 \pm 2,36\%$, відносно контролю (Рис. 3.5).

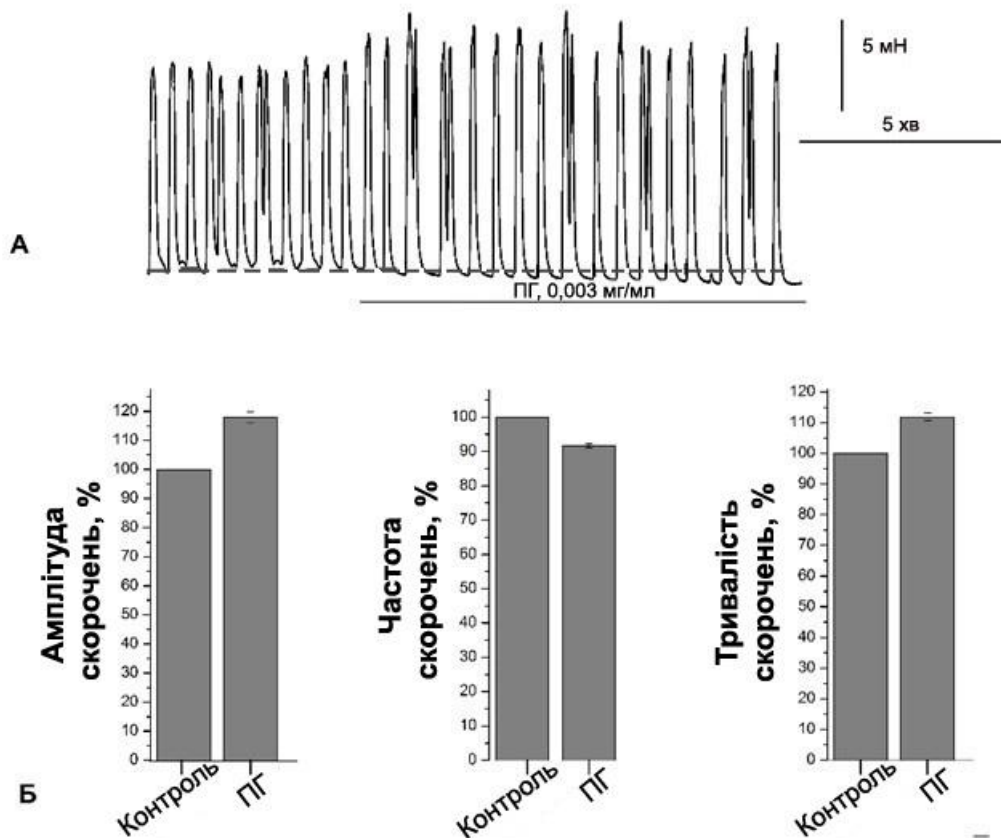


Рис. 3.1.4 Типовий запис, що демонструє дію ПГ на скорочення міометрія вагітних щурів. На А – ПГ збільшує амплітуду та тривалість спонтанних скорочень міометрія, але дещо знижує базальний тонус; На Б – діаграми статистично узагальнених даних змін тривалості, частоти та амплітуди скорочень під дією ПГ (10-3 мг/мл) відносно контролю, прийнятого за 100 %; пунктирна лінія під кривою спонтанного скорочення – базальний тонус; $n=10$, $p \leq 0,05$

Дослідження амплітудно-кінетичних параметрів спонтанних скорочень міометрія вагітних щурів в контролі та на тлі ПГ показали наступне: на тлі ПГ тривалість систоли збільшилась на $11,26 \pm 1,68\%$. Різниця між тривалістю діастоли ПГ-викликаних та контрольних скорочень значно більший та складає $44,34\% \pm 1,2\%$. Тривалість тонічного компоненту на тлі ПГ збільшився на $69,23\% \pm 1,45\%$, відносно контролю. Як видно з рис. 3.1.5 та 3.1.6, на тлі дії ПГ

подовжилась тривалість всіх фаз м'язового скорочення. Тривалість пауз між скороченнями на тлі ПГ збільшилась на $43,2\% \pm 2,245$ відносно контролю, що обумовлює зниження частоти скорочень більшою мірою, ніж збільшення їхньої тривалості. Аплікація ПГ спричинила збільшення тривалості маткового циклу на $19,85\% \pm 1,27\%$ відносно контролю, індекс активності скорочень зменшилась на $3,54\%$ (статистично недостовірно), а скорочувальна активність міометрія вагітних щурів, виражена в Олександрійських одиницях, збільшилась на $56,8\% \pm 2,56\%$ (Таблиці 2). Коефіцієнт асиметрії на тлі ПГ зменшився на $23,88 \pm 0,56\%$.

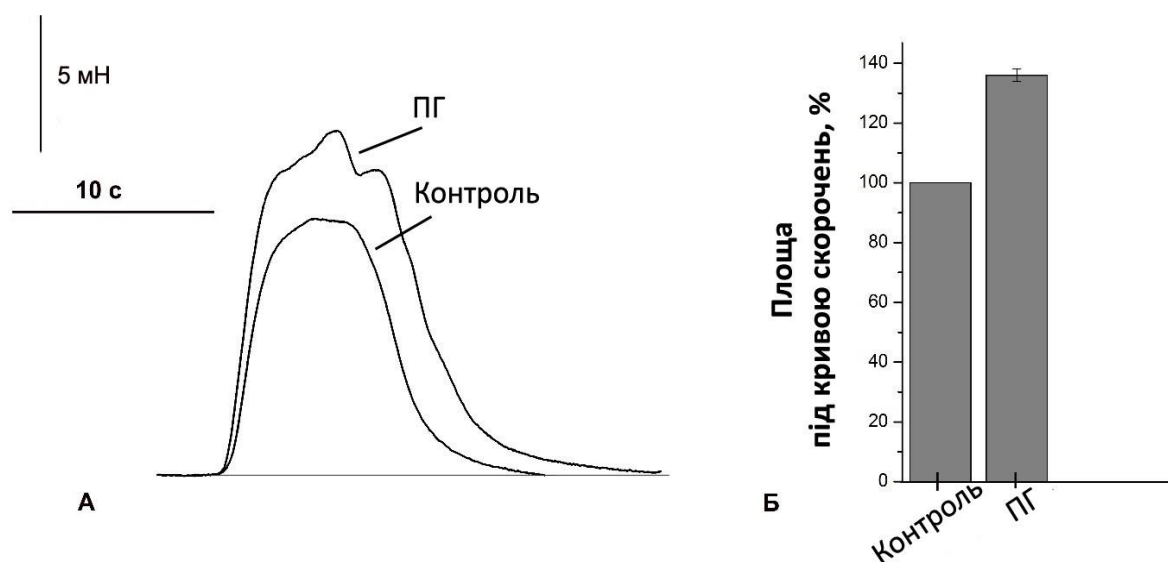


Рис. 3.1.5 А- типовий запис поодинокого спонтанного скорочення смужки міометрія вагітних щурів в контролі та під дією ПГ, що демонструє зміну площі під кривою скорочення, за рахунок зростання амплітуди та тривалості; Б - діаграма статистично узагальнених даних змін площі під кривою під дією пептидоглікану (10^{-3} мг/мл) та в контролі, прийнятого за 100 %; $n=10$;

Таблиця 3.1.2

Зміни амплітудно-кінетичних параметрів спонтанних скорочень міометрія вагітних щурів під дією пептидоглікану Золотистого стафілококу ($M \pm n$).

Показники	контроль	ПГ
Тривалість систоли, с	7,1±1,62	7,9±0,365
Тривалість діастоли, с	10,6±0,38	15,3±0,20*
Тривалість пауз між скороченнями, с	8.36 ±1,76	11.98±1,50*
Тривалість маткового циклу, с	31,06±1,39	37,63±1,27*
Індекс активності скорочень, ум.од.	2,25±1,065	2,171±0,653
Скорочувальна активність, Олександрійські одиниці	32,2±11,89	50,49±2,63*
Коефіцієнт асиметрії, ум.од.	0,67 ±0,06	0,51±0,07*
Приріст швидкості досягнення максимуму скорочення, ум.од	-	1,309±0,203
Приріст швидкості досягнення максимуму розслаблення, ум.од.	-	1±0,207
Примітка. Приведені середні значення ± SD., n=10 для кожного випадку * - P<0,05 порівняно з контрольним значенням;		

Максимальна швидкість скорочення міометрія вагітних щурів складає близько 4,2 мН/с, в той час як на тлі ПГ ця величина складає близько 5,5 мН/с, тобто ПГ спричинив збільшення швидкості скорочення на 31%. Тобто можна сказати, що на тлі ПГ ініціація скорочення гладеньком'язової смужки відбувається більш різко. А от максимальна швидкість розслаблення скорочення на тлі ПГ та в контролі майже однакова і складає $2,5 \pm 0,5$ мН/с. Щоправда досягається така швидкість на тлі ПГ порівняно з контролем на $13,6 \pm 0,65\%$ пізніше. Величина T збільшилась на 25% (рис.3.6).

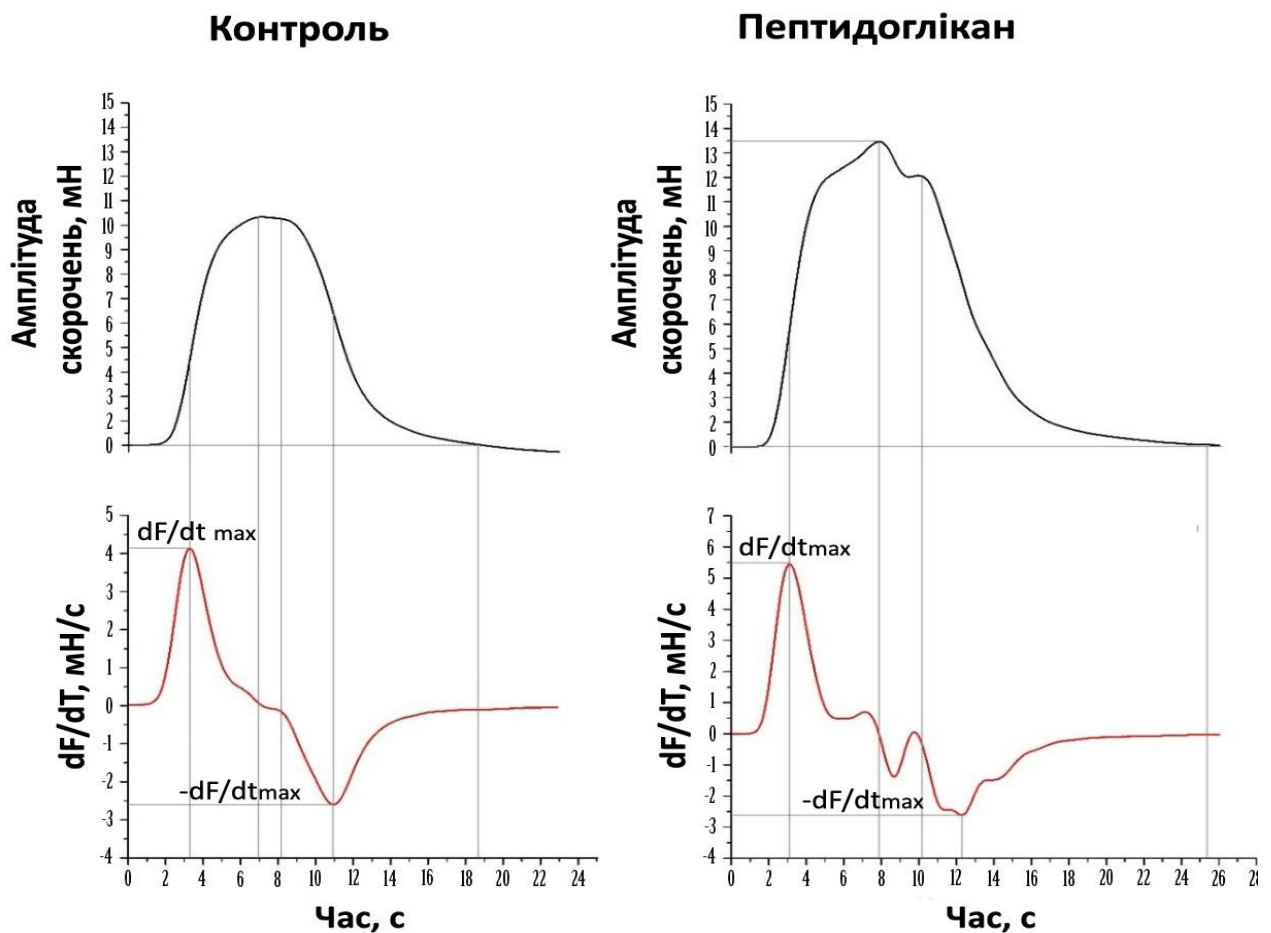


Рис. 3.1.6 Зміни амплітудно-кінетичних параметрів поодинокого спонтанного скорочення смужки вагітної матки під дією ПГ.

Контроль. Верхній графік – типовий запис поодинокого скорочення в контролі та на тлі дії ПГ; на нижньому графіку – швидкості скорочення та розслаблення в контролі та на тлі дії ПГ.

Приріст швидкості досягнення максимуму скорочення, тобто відношення максимальної швидкості скорочення на тлі ПГ до цієї ж величині в контролі, більше одиниці і складає 1,3. Натомість приріст швидкості досягнення максимуму розслаблення дорівнює 1,0. Отже перший параметр більший за другий. А це, відповідно до патенту Б.І. Лаптева та ін. (112), свідчить про позитивний інотропний ефект ПГ на міометрій, що пов'язаний з активацією входу кальцію в міоплазму через сарколему та вивільненням його із саркоплазматичного ретикулу. Оскільки приріст швидкості досягнення максимуму скорочення

більше за приріст швидкості досягнення максимуму розслаблення, можна припустити, що підвищення рівня внутрішньоклітинного кальцію відбувається переважно шляхом трансмембранного кальцієвого входу.

Гладеньком'язові смужки, виділені з ділянок прикріплення плаценти та з ділянок, де плоду не було, демонстрували однакові паттерни скорочень у відповідь на аплікацію ПГ.

У групі вагітних щурів ПГ мав переважно стимулюючу дію на скоротливість міометрія. Однак характер змін властивостей спонтанних скорочень міометрія вагітних щурів, в тому числі співвідношення фаз спонтанних скорочень, на тлі дії ПГ відрізнялись від тих самих параметрів в групі невагітних тварин, що наводить на думку про певні відмінності в механізмі дії ПГ на спонтанну скоротливість міометрія в залежності від гормонального стану тварин.

Підсумки:

1. Пептидоглікан модулює скоротливість ГМ смужки міометрія з видаленим ендометрієм у вагітних щурів.
2. Характеристики спонтанних скорочень міометрія у ділянках видаленої плаценти та між місцями прикріплення плацент однакові.
3. ПГ впливає на амплітудно-кінетичні характеристики спонтанних скорочень міометрія та на співвідношення фаз поодинокого скорочення.
4. Під дією ПГ збільшується площа під кривою скорочень переважно завдяки збільшенню середньої амплітуди.
5. Тривалість маткового циклу під впливом ПГ збільшується завдяки подовженню тривалості спонтанного скорочення та пауз між ними.
6. Під впливом ПГ спонтанні скорочення міометрія вагітних щурів збільшуються тривалість всіх фаз поодинокого скорочення, але найбільше — тривалість фази розслаблення

3.2.1 Вплив пептидоглікану на кальцієву сигналізацію ГМК міометрія невагітних щурів

При дослідженні амплітудно-кінетичних характеристик скорочень міометрія невагітних щурів на тлі ПГ структура та швидкісні характеристики скорочень міометрія зазнали змін, які свідчать про позитивний інотропний ефект ПГ на міометрій, що пов'язаний переважно з активацією входу Ca^{2+} та його вивільнення із внутрішньоклітинного депо, а саме, із саркоплазматичного ретикулуму (106).

Тож розділ присвячений визначенню ролі СР у викликаних ПГ змінах скоротливості міометрія.

Важливим питанням, що варто було б розглянути до початку дослідження механізму підвищення ПГ внутрішньоклітинного рівня Ca^{2+} в ГМК міометрія невагітних щурів, є те, чи обумовлена така дія на скоротливість міометрія (якщо вона є) безпосередньою взаємодією ПГ з самими ГМК міометрія, чи вона опосередкована тими нечисленними імунокомпетентними клітинами іншого походження, що можуть бути у складі міометрія.

На свіжоізольовані клітини ГМК міометрія невагітних щурів, завантажених Fluo-4AM, що знаходились в розчині Кребса, аплікували ПГ в тій же концентрації, що й при роботі з м'язовими смужками – 0,003 мг/мл. У відповідь на аплікацію протягом 5 хв спостерігали періодичне підвищення рівня внутрішньоклітинного кальцію (Рис. 3.2.1 А, Б).

Оскільки скорочення міоциту матки, як і м'язових клітин інших органів, починається з деполяризації його мембрани, а за виникненням потенціалу дії слідує відкривання потенціалкерованих кальцієвих каналів, ми перевірили чи зміниться характер скорочень міометрія у відповідь на аплікацію ПГ за умов попередньої деполяризації мембрани гіперкалієвим розчином.

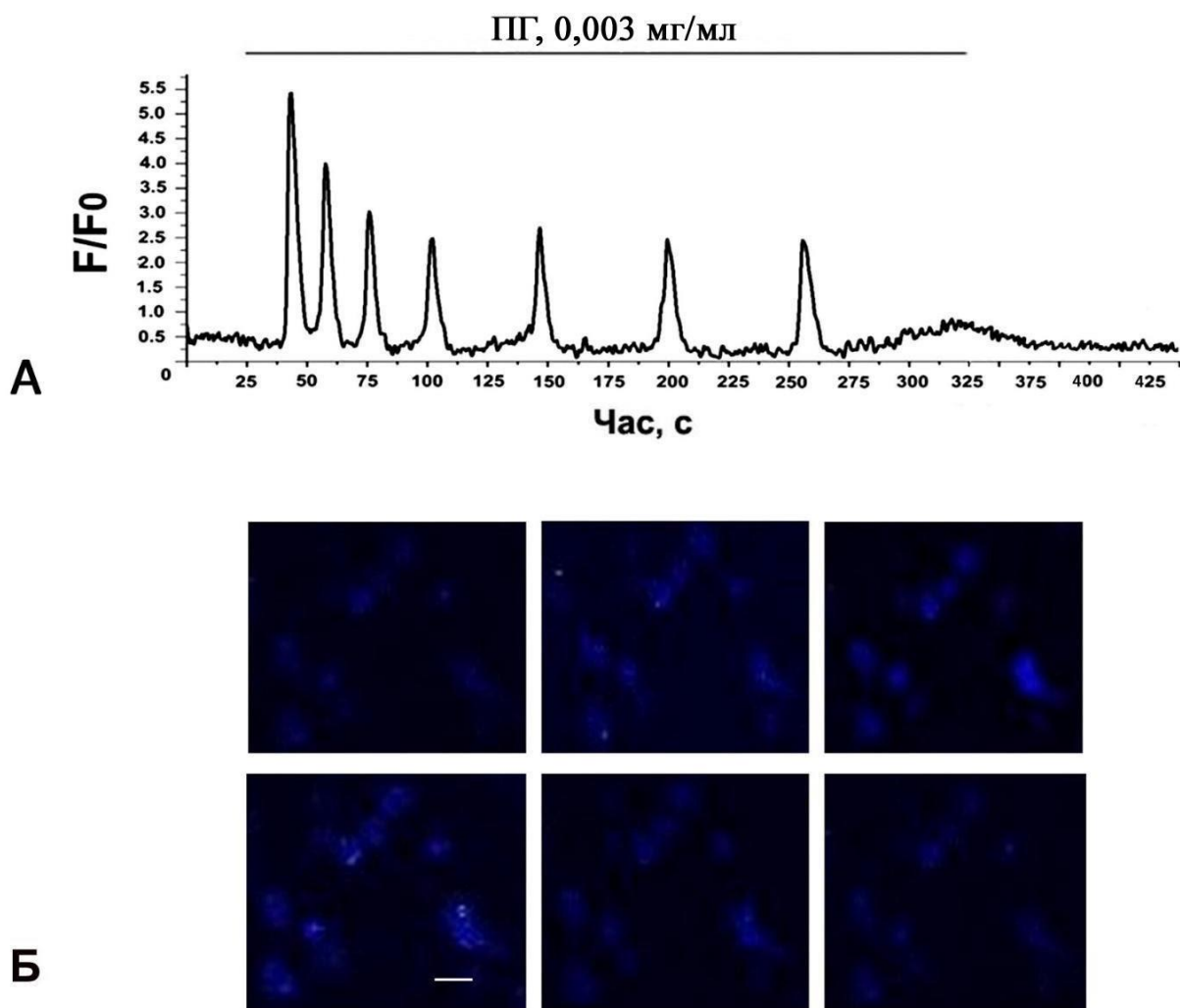


Рис. 3.2.1 На А — Аплікація пептидоглікану спричинює періодичне посилення флюоресценції завантаженої Fлюo4 ГМК міометрія. На Б.— Зміна флюоресценції завантаженої Fлюo4 ГМК міометрія з 38-ої по 51-у секунду аплікації пептидоглікану.

Для того, щоб виключити вплив нервових рецепторів міометрія на дію гіперкалієвого розчину Кребса ($[K^+]_i=60$ мМ), ми аплікували його після попередньої 20-ти хвилинної аплікації фентоломіну, пропранололу та атропіну (Рис. 3.2.2) .

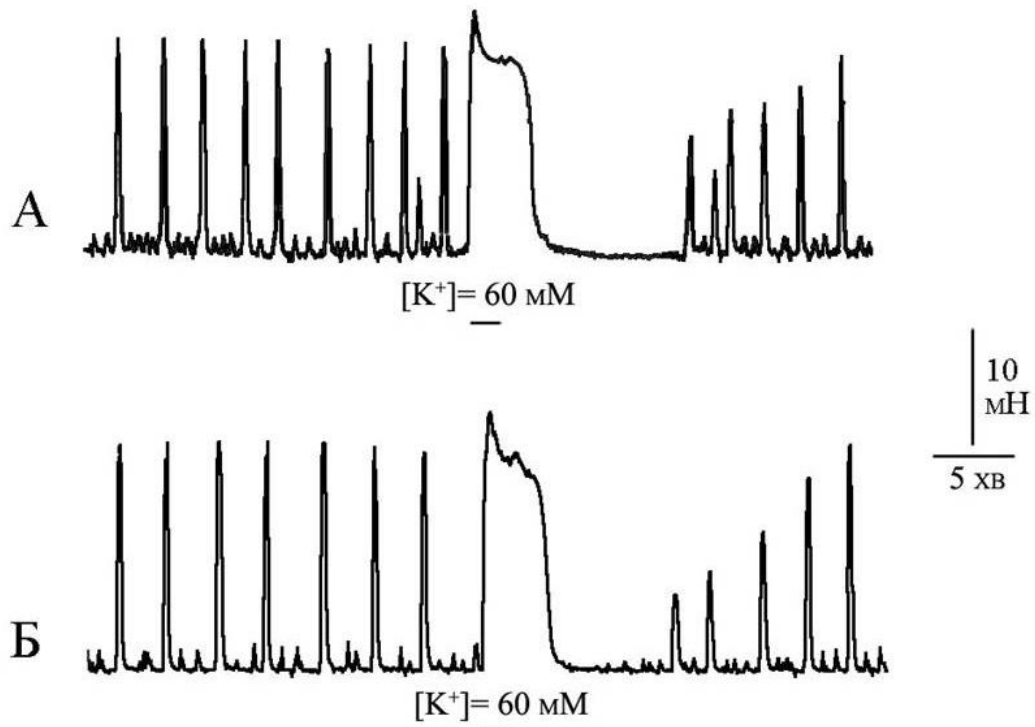


Рис. 3.2.2 Дія пептидоглікану (10^{-3} мг/мл) на фазний і тонічний компоненти індукованого гіперкалієвим розчином Кребса ($[K^+]_i = 60$ ммоль/л) скорочення міометрія щурів. А — скорочення, викликані гіперкалієвим розчином Кребса; Б — скорочення під дією ПГ на тлі гіперкалієвого розчину Кребса.

Аплікація ПГ на тлі гіперкалієвої контрактури призвела до зростання його фазного компонента на $18,0 \% \pm 3,5 \%$ ($n=9$, $P<0,05$) (Рис.3.5.2). Оскільки стимуляція ПГ скорочення міометрія відбулась на тлі вже відкритих потенціал-керованих кальцієвих каналів, ми припустили, що він спричинив вивільнення Ca^{2+} із внутрішньоклітинного кальцієвого депо.

Крім того, експериментальні дані, отримані при дослідженні ролі G-білків у модуляції ПГ скоротливості міометрія вказали на участь Gi-білка в механізмі дії ПГ та викликану останнім модуляцію амплітудно-кінетичних та швидкісних характеристик скорочення міометрія. Тому ми припустили, що викликане пептидогліканом збільшення внутрішньоклітинного рівня Ca^{2+} обумовлено його вивільненням із внутрішньоклітинного депо.

Для підтвердження нашої гіпотези, про те, що ПГ викликає вивільнення Ca^{2+} з внутрішньоклітинного депо, ми перевірили, чи буде ПГ спричинювати стимуляцію скорочень міометрія в умовах відсутності можливості трансмембранного входу кальцію. Після встановлення регулярних скорочень м'язової смужки ми замінили розчин Кребса номінально безкальцієвим розчином. Скорочення поступово зменшувалися. Коли вони повністю припинилися, ми додали ПГ до розчину Кребса без вільного Ca^{2+} . Як результат, через 2 хвилини після прикладання ПГ з'явилося кілька фазних скорочень протягом 3 хвилин (рис. 3.2.3). Базальний тонус не знижувався. Ми припускаємо, що декілька скорочень в безкальцієвому розчині виникли внаслідок спустошення СР, спричиненого ПГ.

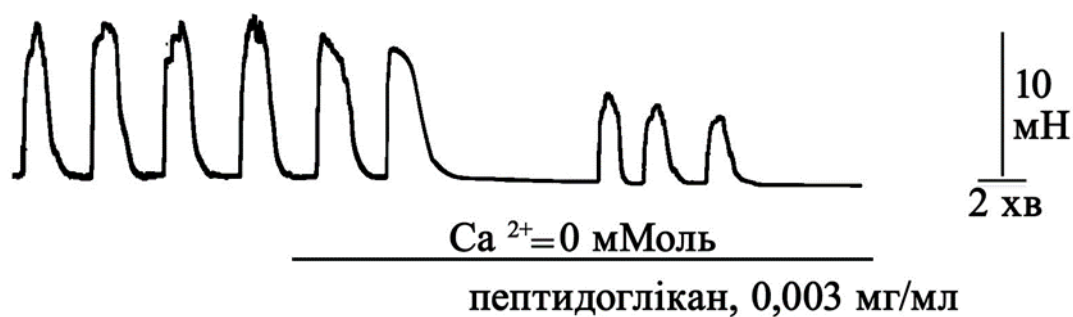


Рис. 3.2.3 Типовий запис, що демонструє здатність ПГ викликати скорочення гладеньких м'язів міометрія щурів у безкальцієвому середовищі.

Розрізняють інозитолтрифосфат-чутливе та ріанодин чутливе внутрішньоклітинне кальцієве депо. Оскільки відомо, що активація ріанодинових рецепторів СР ГМК матки не викликає скорочення міометрія невагітних щурів [15], ми оцінили роль IP3-чутливих рецепторів.

З метою з'ясування питання про можливість безпосереднього впливу ПГ на мобілізацію Ca^{2+} з IP3-чутливого кальцієвого депо СР ГМК міометрія, досліджували його дію у присутності блокатора IP3-чутливих рецепторів 2-АРВ. На тлі 2-АРВ маткові скорочення припинилися, а прикладання ПГ після того не

відновило скоротливість. Такі результати доводять участь саме цієї ланки вивільнення кальцію із внутрішньоклітинного депо при ПГ (Рис. 3.2.4).

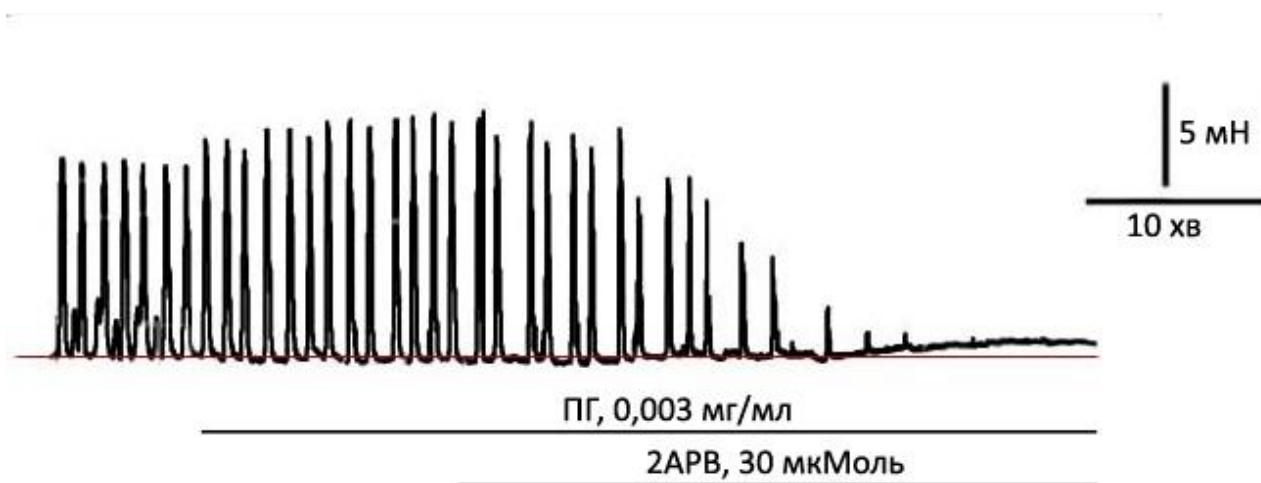


Рис.3.2.4 Блокатор інозитолтрифосфатних рецепторів 2-АРВ пригнічує пептидоглікан – викликані скорочення.

В наступній серії експериментів ми дослідили дію ПГ на тлі карбахоліну, який викликає підвищення внутрішньоклітинного рівня кальцію шляхом вивільнення його із СР (115). На смужках міометрія щурів, в наших експериментах, пептидоглікан статистично достовірно підсилював початкове тонічне скорочення на $30 \pm 5 \%$ ($n=5$, $P<0,05$) і наступні фазні скорочення на $35 \pm 7\%$ ($n=5$, $P<0,05$), викликані дією карбахоліну (Рис. 3.2.5).

Додатковий стимульований ефект пептидоглікану в умовах виснаженого СР карбахоліном вказує, на нашу думку, на те, що він активує надходження позаклітинного кальцію.

Для підтвердження такого припущення була проведена наступна серія експериментів, присвячена вивченню ефекту пептидоглікану на тлі заблокованих потенціалкерованих кальцієвих каналів L-типу. Прикладання блокатора потенціалкерованих кальцієвих каналів L-типу ніфедипіну викликало поступове пригнічення спонтанної скоротливості міометрія до ледь помітних хвиль на міограмі. Прикладання пептидоглікану за таких умов викликало одноразове скорочення за 10 хв.

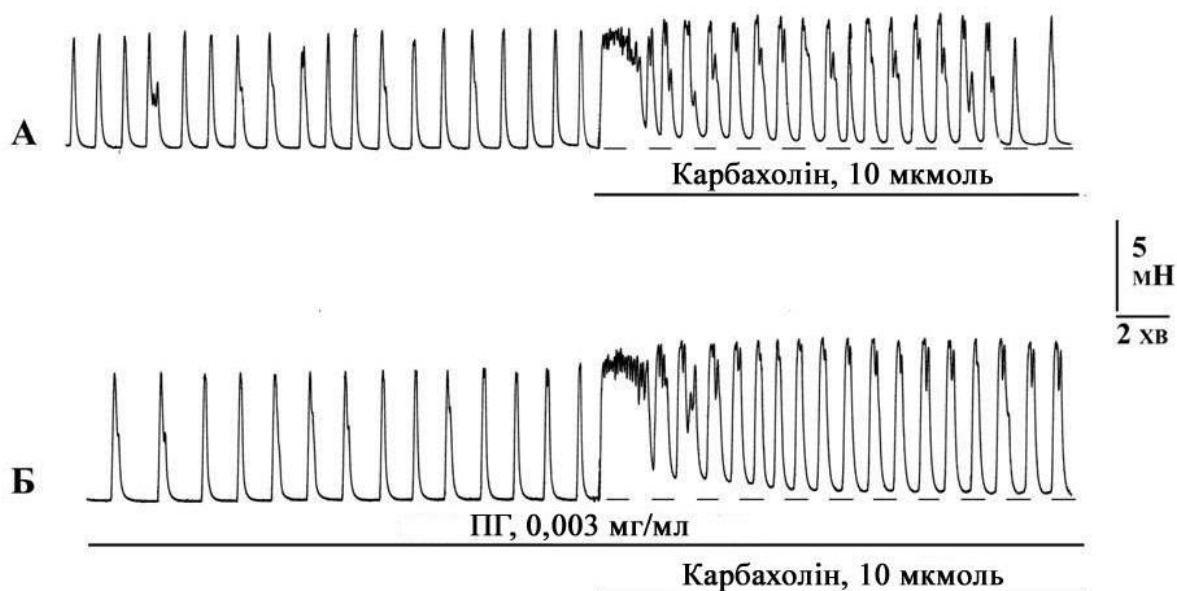


Рис. 3.2.5 Дія пептидоглікану (10^{-3} мг/мл) на посилені карбахоліном (10 мкМоль/л) скорочення гладеньких м'язів міометрія щурів. А- карбахолін викликане скорочення в контролі; Б – карбахолінвикликане скорочення міометрія на 30-й хв. дії пептидоглікану. Пунктирна лінія під кривою скорочення позначає базальний тонус.

Тривалість скорочення, викликаного пептидгліканом, за тривалістю не відрізнялось від контрольних спонтанних скорочень, однак його амплітуда складала в середньому $8 \pm 0,36\%$ ($n=10$, $p \geq 0.05$) середньої амплітуди контрольних спонтанних скорочень (Рис 3.2.6).

Прикладання ніфедипіну на тлі посиленої пептидогліканом спонтанної скоротливості міометрія призводить до поступового пригнічення скорочень міометрія. Базальний тонус м'язової смужки теж зменшився на тлі ніфедипіну (Рис. 3.2.7).

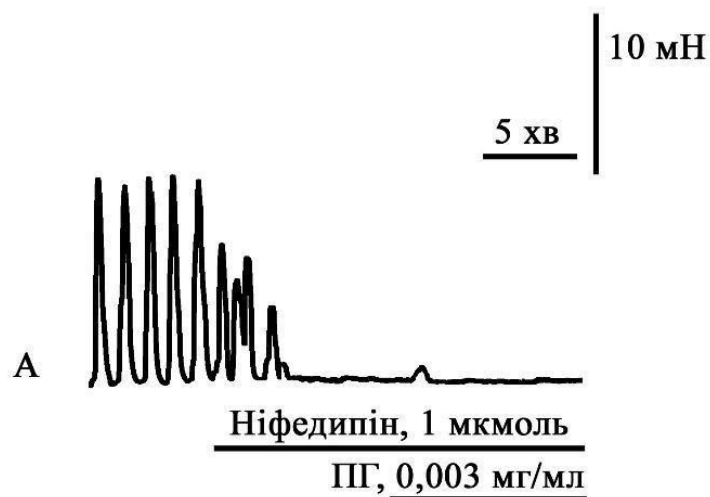


Рис. 3.2.6 Ефект пептидоглікану на тлі дії ніфедипіну. Аплікація пептидоглікану викликає одноразове скорочення міометрія за умов пригніченої ніфедипіном скоротливості.

На нашу думку, одноразове скорочення міометрія за умов пригніченої ніфедипіном скоротливості (рис. 6А) пов'язане з викликаним дією пептидоглікану вивільненням кальцію із внутрішньоклітинного кальцієвого депо, а саме із СР. Проте, відсутність кальцієвого транспорту через потенціалкервані кальцієві каналів L-типу робить неможливим наступні скорочення. Те ж саме доводить рис. 6Б: тривалий стимулювальний ефект ПГ, викликаний, очевидно, вивільненням йонів кальцію із СР, неможливий за умов заблокованих потенціалкерваних кальцієвих каналів L-типу.

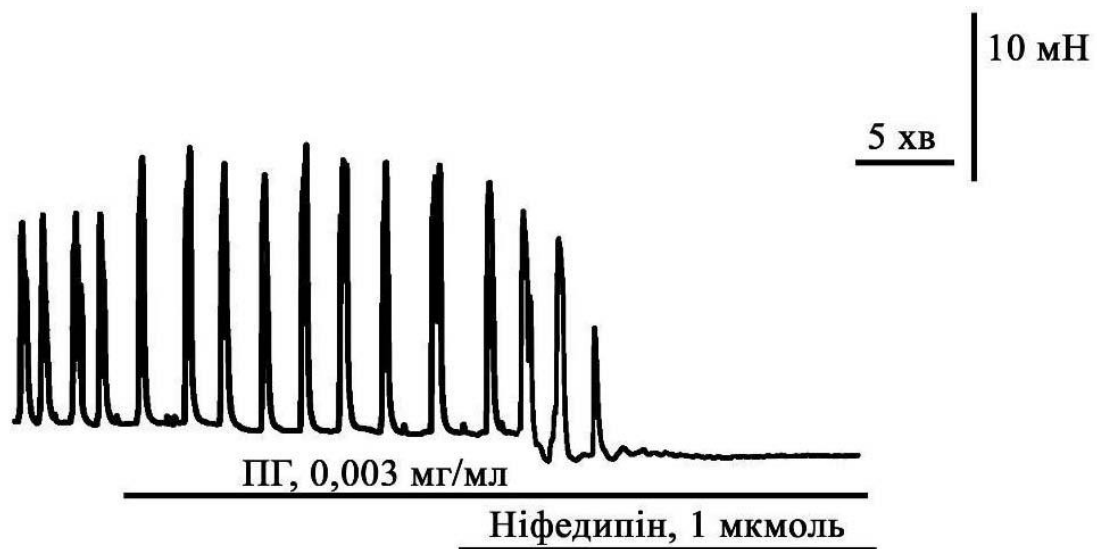


Рис. 3.2.7 Ефект ніфедипіну на тлі дії пептидоглікану.

Ніфедипін пригнічує посилені пептидогліканом скорочення міометрія.

Підсумки:

1. Аплікація ПГ викликає періодичне збільшення внутрішньоклітинного рівня Ca^{2+} у свіжоізолюваних гладеньком'язових клітинах міометрія, завантажених Fluo4 ГМК міометрія
2. ПГ викликає вивільнення Ca^{2+} із СР ГМК міометрія невагітних щурів.
3. Блокатор ІІЗ-рецепторів усуває посилюючу дію пептидоглікану на спонтанні скорочення міометрія невагітних щурів.
4. Пептидоглікан посилює транспорт Ca^{2+} всередину клітини із зовнішнього середовища через потенціалкеровані кальцієві канали L- типу в ГМК міометрія невагітних тварин.
5. Блокатор потенціалкерованих кальцієвих каналів L- типу викликає повне припинення спонтанних скорочень міометрія, посилених аплікацією ПГ невагітних щурів.

3.2.2 Вплив пептидоглікану на кальцієву сигналізацію ГМК міометрія вагітних щурів

Оскільки результати наших досліджень показали, що стимулювальна дія ПГ на скоротливість міометрія обумовлена його безпосередньою взаємодією з ГМК, ми припустили, що її можна усувати не тільки шляхом блокування COX-2, але й вплинувши на внутрішньоклітинний рівень Ca^{2+} міометрія вагітних тварин.

Для того, щоб перевірити, чи індукує ПГ вивільнення кальцію із СР під час вагітності ми повторили дослід з аплікацією ПГ в безкальцієвому розчині Кребса з міометрієм вагітного щура. Як і в попередній раз, після встановлення регулярних скорочень м'язової смужки ми замінили розчин Кребса номінально безкальцієвим розчином. Після того, як скорочення припинились ми додали ПГ до розчину Кребса без вільного Ca^{2+} . Як результат, протягом 4-5 хвилин після початку аплікації ПГ смужка двічі скоротилась і знову повністю розслабилась (рис. 3.2.7).

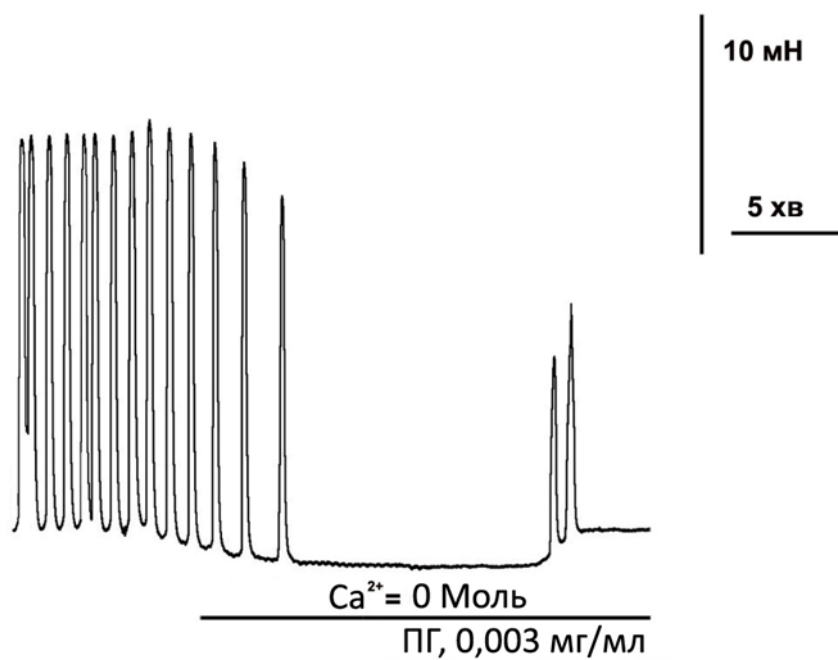


Рис. 3.2.7 Типовий запис, що демонструє здатність пептидоглікану викликати скорочення гладеньких м'язів міометрія вагітних щурів у безкальцієвому середовищі.

Вплив ПГ на інозитолчутливе Ca^{2+} -депо перевірили за тим же протоколом, що й у разі невагітної матки. Після встановлення регулярної спонтанної скоротливості міометрія вагітного щура applікували блокатор IP_3 -рецепторів. На тлі 2-АРВ маткові скорочення припинились, а прикладання ПГ після того не відновило скоротливість (Рис. 3.2.8).

Вхід Ca^{2+} в ГМК міометрія відбувається головним чином через потенціал-керовані кальцієві канали L-типу (24). Оскільки результати наших експериментів показали вплив ПГ на кальцієві потоки в ГМК неміометрія вагітних щурів, ми вирішили дослідити вплив саме цих каналів на механізм дії ПГ на скоротливість міометрія

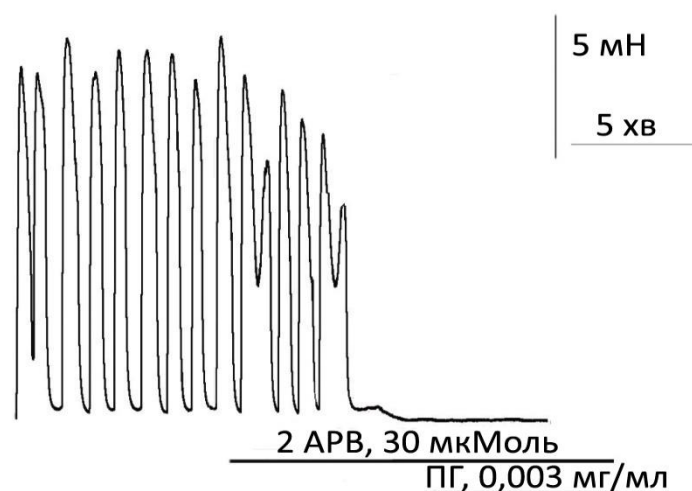


Рис.3.2.8 Блокатор інозитолтрифосфатних рецепторів 2-АРВ пригнічує пептидоглікан викликані скорочення.

При applікації 1 мкМоль ніфедипіну на тлі стимульованих ПГ скорочень було виявлено пригнічення скоротливості міометрія до повного розслаблення (Рис. 3.2.9).

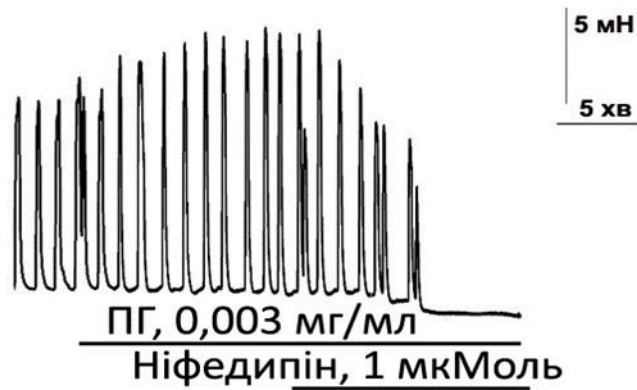


Рис. 3.2.9 Ніфедипін пригнічує стимульовані ПГ скорочення міометрія вагітних щурів.

Підсумки:

1. ПГ викликає вивільнення Ca^{2+} із внутрішньоклітинного депо ГМК міометрія вагітних щурів.
2. Блокатор ПЗ-рецепторів усуває посилюючу дію пептидоглікану на спонтанні скорочення міометрія вагітних щурів.
3. Пептидоглікан посилює транспорт Ca^{2+} всередину клітини із зовнішнього середовища через потенціалкеровані кальцієві канали L- типу в ГМК міометрія вагітних тварин.
4. Блокатор потенціалкерованих кальцієвих каналів L- типу викликає повне припинення спонтанних скорочень міометрія, посилених аплікацією ПГ вагітних щурів.

3.3 Блокування циклооксигенази-2

ПГ, як показали результати наших досліджень, модулює скоротливу активність міометрія щурів і під час вагітності, і поза нею. У викликаних ПГ змінах параметрів маткової скоротливості та структури поодинокого скорочення міометрія вагітних та невагітних щурів існує деяка схожість.

З літературних джерел відомо, що під час вагітності ПГ в тканинах матки розпізнається переважно TL2-рецепторами (41-44).

Ті ж TL2-рецептори експресуються в міоцитах матки й поза вагітності. Але їхня щільність гормонзалежна. Під час вагітності вона більша, ніж до вагітності й зростає тим більше, чим більше термін гестації. Функції, механізм активації та клітинні ефекти TL2-рецепторів для невагітної матки досі не достатньо досліджені.

Проте, крім TL2-рецепторів в м'язовому шарі матки експресуються й інші типи специфічних ПГ-розпізнаючих рецепторів, функція й механізм дії яких мало досліджені, але які можуть бути причетні до описаних змін скоротливості міометрія. Не можна заперечувати і ймовірність неспецифічного зв'язування ПГ з мембранними або цитоплазматичними білками ГМК міометрія та альтернативні клітинні механізми реалізації його ефектів.

Однією з характерних особливостей імуномодуляторів бактеріального походження є здатність ініціювати клітинну відповідь незалежно від TLRs і NOD механізмів. Так, наприклад, мураміддипептид може викликати виражену нейрофармакологічну дію, яка опосередкована прямою активацією серотонінових рецепторів нервової та м'язової тканин. (106-109).

Тому доцільно було б перевірити, чи має місце циклооксигеназний шлях в механізмі модульовального ефекту ПГ для невагітної матки, та чи буде усувати блокування COX-2 стимульовальну дію ПГ. Адже це вказувало б на однакові механізми реалізації ефекту ПГ на скоротливість міометрія за умов вагітності та поза неї.

Для визначення ролі циклооксигенази-2 в патогенетичному шляху ПГ-викликаної модуляції скоротливості міометрія ми дослідили дію блокатора COX-2 німсуліді на ПГ-індуковані скорочення міометрія вагітних та невагітних щурів.

На тлі ПГ-індукованих скорочень міометрія вагітного щура ми аплікували німесулід (1 мкМоль). Амплітуда та частота скорочень поступово почали зменшуватися. Через 30 хвилин аплікації німесуліду амплітуда скорочень зменшилась на 76,4% \pm 1,45%. Частота та тривалість скорочень залишилися незмінними (Рис. 3.3.1 А,Б).

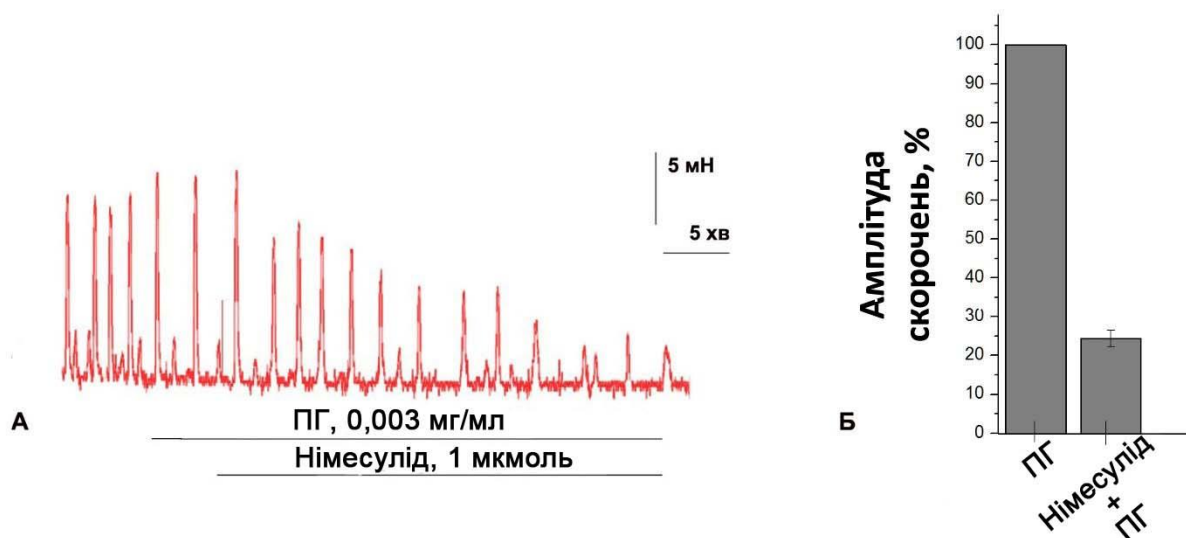


Рис. 3.3.1 Вплив німесуліду на ПГ-індуковані скорочення міометрія вагітних щурів. А. типовий запис спонтанна скоротливість міометрія вагітних щурів стимулюється ПГ. Німесулід усуває ефект ПГ. Б. Діаграма, що демонструє пригнічення німесулідом ПГ-індукованих скорочень.

В разі ж невагітної матки німесулід на тлі дії ПГ не усував посилюючу дію ПГ на скоротливість міометрія (Рис. 3.3.2). Амплітуда ПГ-індукованих скорочень статистично недостовірно зменшилась на 1,4% \pm 1,865%, інші показники залишилися незмінними (Рис. 3.3.2)

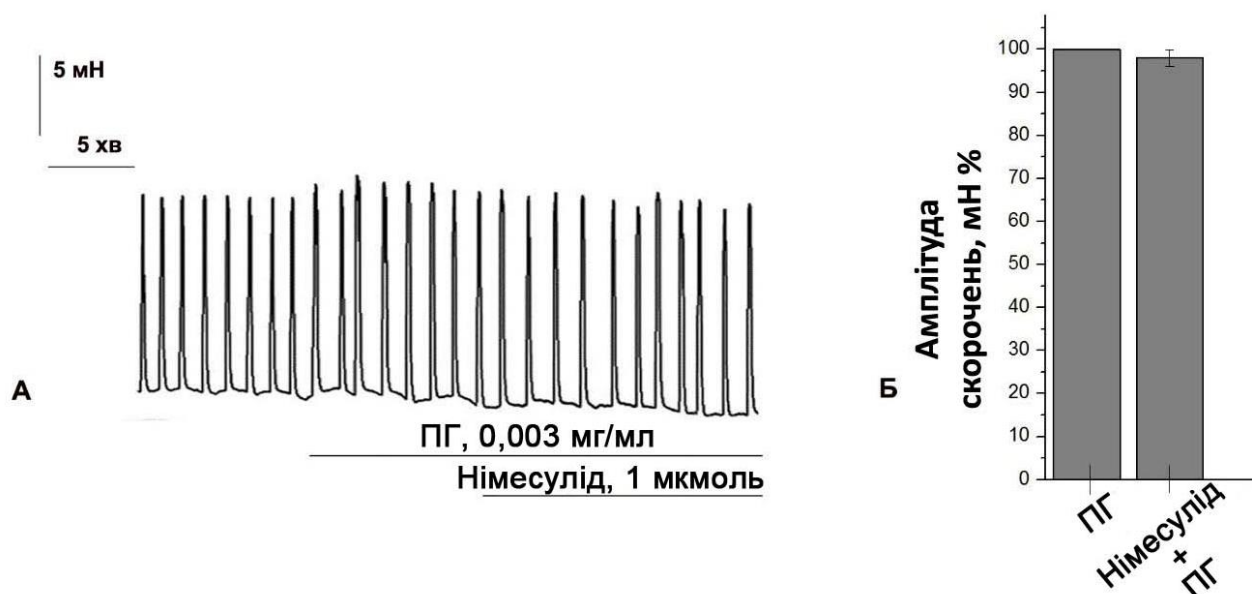


Рис. 3.3.2 Скоротливість міометрія невагітних щурів на тлі ПГ та німесуліду. *А.* типовий запис скорочень міометрія невагітних щурів на тлі дії ПГ та німесуліду. *Б.* Діаграма, що демонструє статистично недостовірне зменшення амплітуди скорочень ПГ-індукованих скорочень після аплікації німесуліду.

Підсумки:

Німесулід усуває посилюючу дію ПГ на скорочувальну активність міометрія у вагітних щурів, але виявляє жодного впливу на дію ПГ на скоротливість міометрія невагітних тварин.

3.4 Амплітудно-кінетичні параметри скорочень міометрія естрогенізованих та «псевдовагітних» щурів

Дослідження дії ПГ на скоротливу активність матки вагітних та невагітних щурів вказало на очевидну гормональну обумовленість його ефектів. Так, наприклад, по-різному змінював ПГ амплітуду та тривалість скорочення: у невагітних щурів на тлі ПГ збільшувалась тривалість скорочень міометрія, а у вагітних – амплітуда. По-різному змінювались швидкісні характеристики

скорочення в цих двох групах: для міометрія в групі вагітних тварин на тлі ПГ було характерне швидке скорочення та повільне, довге розслаблення гладенького м'язу, а міометрій в групі невагітних щурів під дією ПГ майже не змінював швидкість скорочення, але дещо уповільнював фазу розслаблення міометрія. Ці та інші, описані в першому розділі, параметри скоротливості міометрія вказують на відмінні внутрішньоклітинні процеси викликані ПГ, які обумовлені гормонально.

Описаний в літературі механізм дії ПГ на скоротливість міометрія вагітних щурів шляхом активації COX-2 в разі невагітної матки в наших експериментах виявився недієвим, що означає гормональну обумовленість відповіді міометрія на взаємодію з ПГ.

Тож наступним етапом у дослідженні механізму дії ПГ на скоротливість міометрія вагітних щурів стала серія експериментів з тваринами, що попередньо отримували естроген або прогестерон. В усіх групах тварин на тлі регулярної спонтанної активності міометрія ми апікували пептидоглікан та простагландин F_{2α} (PG F_{2α}), механізм стимулювальної дії якого достеменно вивчено.

В групі щурів, які попередньо отримували естроген, апікація пептидоглікану призвела до зменшення середньої амплітуди та частоти спонтанних скорочень, відповідно, на $16\% \pm 1,23\%$ та $13,5\% \pm 0,65\%$ відносно контролю. Тривалість скорочень збільшилась на $8,0\% \pm 0,43\%$. Під дією простагландину F_{2α} середні значення амплітуди, тривалості та частоти спонтанних скорочень міометрія естрогенізованих щурів збільшились, відповідно, на $12,3\% \pm 0,21\%$, $10,5\% \pm 0,24\%$ та $8,0 \pm 0,55\%$ відносно контролю. За контроль приймали спонтанну скоротливість міометрія естрогенізованих щурів.

Крім того, змінились співвідношення фаз одиночного спонтанного скорочення міометрія. Під дією пептидоглікану тривалість фази наростання спонтанного скорочення зменшилась на $21,0\% \pm 1,3\%$ відносно контролю, в той

час як тривалість тонічного компоненту та фази розслаблення збільшилися, відповідно, на $42,2\% \pm 0,36\%$ та $23,6\% \pm 0,34\%$ відносно контролю. Під дією простагландину $F2\alpha$ тривалість фази наростання скорочення та тонічного компоненту викликаного простагландином скорочення зменшилися в середньому, відповідно, на $6,5\% \pm 1,5\%$ та $38,5 \pm 1,15\%$ відносно даних показників спонтанних скорочень, а тривалість фази розслаблення — збільшилась в середньому на $63,5\% \pm 1,6\%$ (Рис. 4.1).

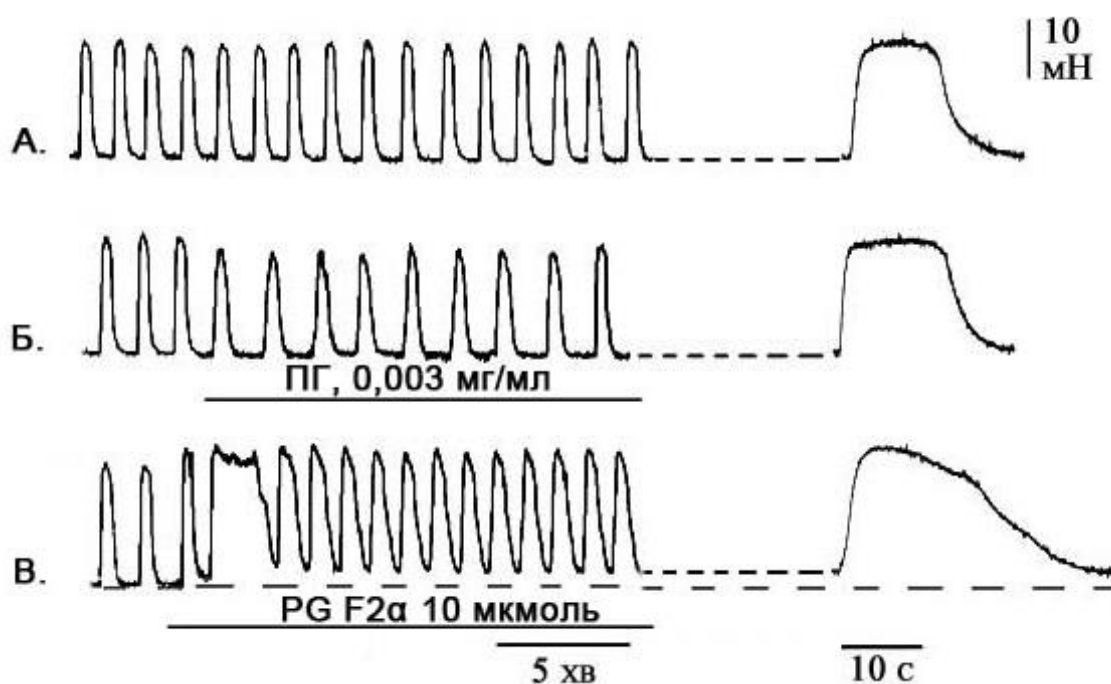


Рис. 3.4.1. Вплив ПГ та простагландину $F2\alpha$ на спонтанну скорочувальну активність міометрія естрогенізованих щурів. Типові записи спонтанної скорочувальної активності міометрія естрогенізованих щурів. А— в контролі; Б— під впливом ПГ; В — під впливом простагландину $F2\alpha$. Пунктирна лінія під кривою скорочення – позначення базального тону.

Отже, в групі естрогенізованих щурів пептидоглікан мав переважно гальмівну дію на спонтанну скоротливість міометрія, зменшуючи амплітуду та

частоту спонтанних скорочень, в той час як простагландин F2 α збільшував усі три вказані параметри. Крім того, обидві речовини змінювали співвідношення фаз скорочень міометрія та їхню тривалість, однак, пептидоглікан викликав зменшення тривалості фази наростання скорочення і зростання тривалості тонічного компоненту й фази розслаблення, в той час як простагландин F2 α спричинював зменшення тривалості тонічного компоненту і подовження фаз наростання скорочення та розслаблення. Найбільш вираженим у випадку аплікації пептидоглікану виявилось збільшення тривалості тонічного компоненту, а простагландин-викликаних скорочень – подовження фази розслаблення поодинокого скорочення.

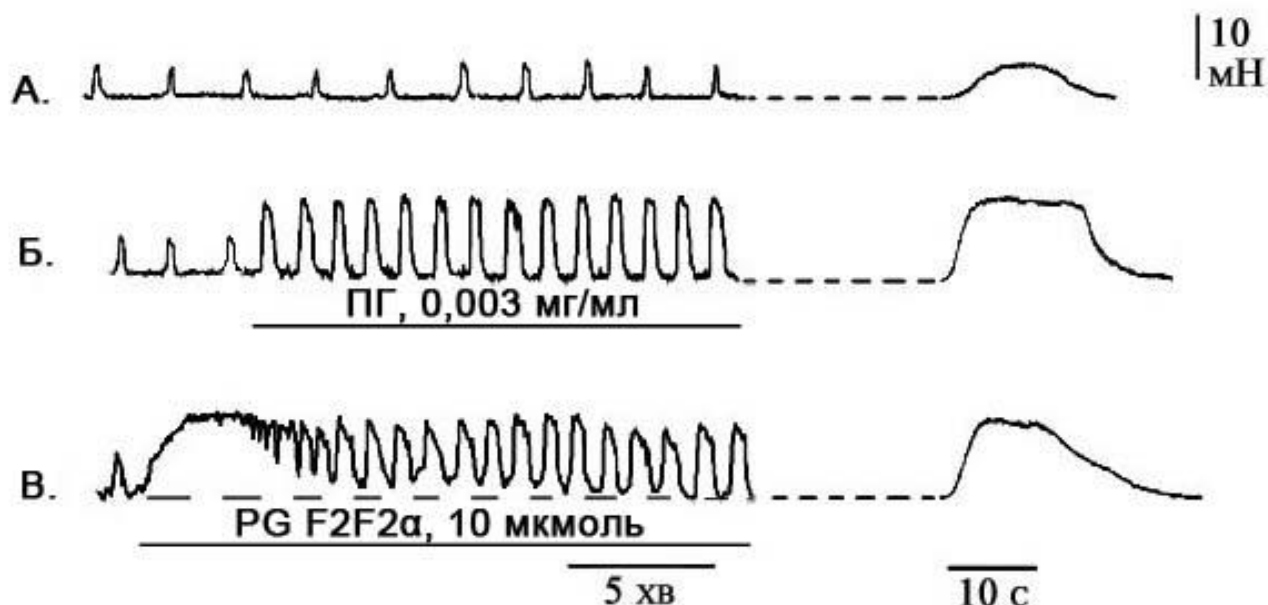
Серед «псевдовагітних» тварин ми виділили дві групи: тих, що після естрогенізації отримували препарат прогестерону протягом чотирнадцяти діб та тих, що отримували його протягом двадцяти двох діб. В обох групах спонтанна скоротливість міометрія була регулярна, проте, менш виражена, ніж у інтактних та у естрогенізованих тварин.

В групі щурів на чотирнадцятий день «псевдовагітності» аплікація як пептидоглікану, так і простагландину F2 α мали стимулювальну дію на спонтанну скоротливість міометрія. Пептидоглікан призводив до збільшення амплітуди, в середньому на 52,3% \pm 0,54%, частоти — на 51,3% \pm 1,3% та тривалості — на 48,5% \pm 0,43% відносно відповідних параметрів спонтанних скорочень міометрія щурів в даній групі. Під дією простагландину F2 α відбулись наступні зміни: амплітуда спонтанних скорочень збільшилась в середньому на 38,5% \pm 1,62%, частота — на 66,2 % \pm 1,3%, тривалість – на 24% \pm 0,65%.

Досліджувані речовини вплинули також на тривалість фаз спонтанних скорочень міометрія та їхнє співвідношення між собою протягом скоротувального акту. Так, під дією пептидоглікану зменшувались тривалість фази наростання скорочення та фази розслаблення в середньому на 68% \pm 1,3% та 36% \pm 0,74%, відповідно, відносно контролю, а тривалість тонічного компоненту зростала в середньому на 200% \pm 1,62%. В той же час під дією простагландину

F2 α тривалість фази наростання скорочення зменшувалась в середньому на 43% \pm 1,3%, тонічний компонент тривав в середньому на 146,3% \pm 2,1% довше, ніж в контролі, а фаза розслаблення подовжилась у 2 рази (Рис. 3.4.2).

Таким чином, у групі «псевдовагітних» щурів на чотирнадцяту добу і пептидоглікан, і простагландин збільшували амплітуду, частоту та тривалість спонтанних скорочень міометрія. В цій групі щурів пептидоглікан спричинював зростання амплітуди спонтанних скорочень на 13,8% більше, ніж простагландин F2 α , натомість, зростання частоти під дією пептидоглікану було менш виражене — на 15,1% менше, ніж під дією простагландину F2 α .



53

Рис. 3.4.2. Вплив ПГ та простагландину F2 α на спонтанну скорочувальну активність міометрія щурів на 14-у добу «псевдовагітності». Типові записи спонтанної скорочувальної активності міометрія: А— в контролі; Б — під впливом ПГ; В — під впливом простагландину F2 α (PG F2 α). Пунктирна лінія під кривою скорочення — позначення базального тону.

Вплив на фази поодинокого скорочення міометрія «псевдовагітних» щурів на чотирнадцятий день прийому прогестерону виявився неоднаковим у пептидоглікана та простагландину. Під дією першого найбільш вираженим було зростання тонічного компонента скорочення, в той час як наростання напруження до максимальної амплітуди та повне розслаблення відбувались відносно швидко. Простагландину F2 α найбільше збільшував тривалість розслаблення міометрія.

У групі щурів на двадцять другу добу «псевдовагітності» аплікація пептидоглікану на тлі регулярної спонтанної скорчувальної активності міометрія спричинила збільшення амплітуди скорочень в середньому на $21,3\% \pm 0,35\%$, частоти — на $16,2\% \pm 0,26\%$ та тривалості — на $10,6\% \pm 0,16\%$ відносно контролю. Тривалість тривалість фази наростання скорочення збільшувалась на $35\% \pm 1,24\%$, тонічного компонента — у 2 рази, фази розслаблення — на $88\% \pm 1,72\%$.

Простагландин F2 α спричинив збільшення амплітуди скорочень на $10,2\% \pm 0,25\%$, тривалості скорочень — на $7,8\% \pm 0,14\%$, а частоти — на $62\% \pm 0,36\%$. Тривалість фази наростання скорочення зростала на $32\% \pm 1,2\%$, зміни в тривалості тонічного компонента на тлі дії простагландину F2 α по відношенню до контролю були статистично недостовірні, а тривалість фази розслаблення зросла на $125\% \pm 1,6\%$, по відношенню до контролю (Рис. 3.4.3).

Таким чином, у групі щурів, що отримували прогестерон протягом двадцяти двох днів, пептидоглікан і простагландин посилювали скорчувальну активність міометрія, впливаючи на амплітуду, частоту та тривалість скорочень та модулюючи співвідношення фаз поодинокого скорочення. Посилююча дія пептидоглікану була більш виражена, ніж у простагландину F2 α . Найбільш значущим серед змін показників параметрів спонтанних скорочень міометрія, спричинених пептидогліканом були зростання амплітуди скорочень та подовження тонічного компонента поодинокого скорочення. Для простагландину F2 α найбільш показовими виявились збільшення частоти спонтанних скорочень та суттєве подовження фази розслаблення поодинокого скорочення.

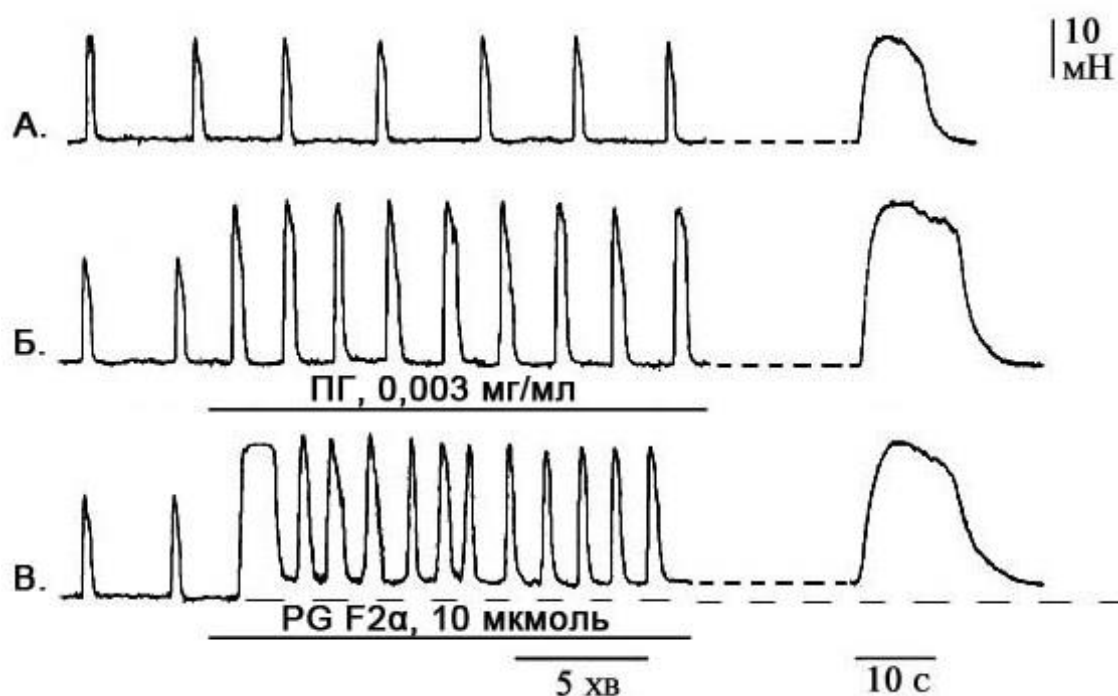


Рис.3.4.3. Вплив ПГ та простагландину $F2\alpha$ на спонтанну скорочувальну активність міометрія щурів на 22-у добу «псевдовагітності». Типові записи спонтанної скорочувальної активності міометрія: А — в контролі; Б — під впливом ПГ; В — під впливом простагландину $F2\alpha$ (PG 2α). Пунктирна лінія під кривою скорочення — позначення базального тону.

З літературних джерел відомо, що стероїдні гормони мають численні геномні та епігеномні ефекти на клітинний метаболізм. В тому числі вони впливають на йонний транспорт в міоцитах матки та визначають їхні скорочувальні властивості. Тому, дослідивши особливості параметрів скорочень міометрія, спричинених ПГ, на тлі переважання естрогенів (естрогенізовані щури) або прогестерону («псевдовагітність»), можна було б дійти до певних висновків стосовно механізму дії ПГ та припустити, які могли б бути особливості його прояву при різних функціональних або патологічних гормональних станах. Важливо було дізнатися, чи має прогестерон кумулятивний ефект на дію ПГ, тобто чи змінюються характеристики скоротливості міометрія на тлі ПГ із збільшенням тривалості попереднього прийому тварин прогестерону.

Проведені експерименти показали, що моделювання «псевдовагітності» призводить до різкої зміни спонтанної скорочувальної активності ГМ міометрія, у порівнянні з ГМ естрогенізованих самиць щурів.

Визначивши, що одні й ті самі речовини по-різному впливають на параметри спонтанних скорочень міометрія в умовах підвищеного рівня естрогену або прогестерону в організмі тварин, для подальшої оцінки впливу пептиоглікану ми порівнювали отримані показники скорочень у групах «псевдовагітних» тварин з такими ж показниками серед естрогенізованих.

У порівнянні з естрогенізованими тваринами сила скорочення міометрія на 14 добу «псевдовагітності» зменшувалася в середньому на 80%. На 20 – 22 добу «псевдовагітності» спонтанна скорочувальна активність мала дещо відмінні ознаки. Досліджувані смужки протягом всього періоду врівноваження генерували періодичні спонтанні скорочення, амплітуди яких були менші в порівнянні від естрогенізованих тварин у середньому на 16 %. Частота скорочень теж зменшувалася: якщо смужки міометрія від естрогенізованих тварин скорочуються в середньому 7 разів за 10 хв, то у «псевдовагітних» тварин II і III груп частота скорочень була меншою в середньому на 30 % і 50%, відповідно. Зниження частоти скорочень ГМ міометрія «псевдовагітних» тварин обумовлено значним збільшенням тривалості маткового циклу. Треба зазначити, що моделювання «псевдовагітності» призводило до різких змін у співвідношенні фаз скорочувального акту: тривалості скорочення до тривалості пауз між скороченнями. Дане співвідношення або індекс активності скорочення для естрогенізованих тварин має значення $0,72 \pm 0,03$ у.о., а для II і III груп тварин - $0,15 \pm 0,01$ у.о. і $0,14 \pm 0,01$ у.о., відповідно. Тобто за умов моделювання «псевдовагітності» його значення зменшується в середньому на 80 %.

Також зменшується і потужність маткових скорочень у тварин цих груп у порівнянні з тваринами I групи, на що вказує збільшення значень коефіцієнта асиметрії (Табл. 3.4.1). Для тварин II і III груп у порівнянні з I групою

скорочувальна активність, виражена в Олександрійських одиницях (ОУ) зменшувалися в середньому на 88% і 42%, відповідно.

У порівнянні з естрогенізованими тваринами сила скорочення міометрія на 14 добу «псевдовагітності» зменшувалася в середньому на 80%. На 20 – 22 добу «псевдовагітності» спонтанна скорочувальна активність мала дещо відмінні ознаки. Досліджувані смужки протягом всього періоду врівноваження генерували періодичні спонтанні скорочення, амплітуди яких були менші в порівнянні з середньою амплітудою скорочень міометрія естрогенізованих тварин у середньому на 16%. Частота скорочень теж зменшувалася: якщо смужки міометрія від естрогенізованих тварин скорочуються в середньому 7 разів за 10 хв., то у «псевдовагітних» тварин II і III груп частота скорочень була меншою в середньому на 30 % і 50 %, відповідно. Зниження частоти скорочень ГМ міометрія «псевдовагітних» тварин обумовлено значним збільшенням тривалості маткового циклу.

Треба зазначити, що моделювання «псевдовагітності» призводить до різких змін структури скоротливого циклу, а саме до змін співвідношень фаз скорочувального акту: тривалості скорочення до тривалості пауз між скороченнями. Дане співвідношення або індекс активності скорочення для естрогенізованих тварин має значення $0,72 \pm 0,03$ у.о., а для II і III груп тварин - $0,15 \pm 0,01$ у.о. і $0,14 \pm 0,01$ у.о., відповідно. Тобто за умов моделювання «псевдовагітності» його значення зменшується в середньому на 80 %. Також зменшується і потужність маткових скорочень у тварин цих груп у порівнянні з тваринами I групи на що вказує збільшення значень коефіцієнта асиметрії (табл. 3.2.1). Різниця в скоротливості матки між трьома групами тварин демонстративно проявляється при зіставленні АУ. Для тварин II і III груп у порівнянні з I групою АУ зменшувалися в середньому на 88 % і 42 %, відповідно.

Таблиця 3.4.1

Скорочувальна активність міометрія щурів, що піддавалася естрогенізації

Показники		Контроль	Простагландин F _{2α}	ПГ
Тривалість систоли, с	I	7,90±0,28	9,28±0,27*	7,00±0,35*,**
	II			
	III	8,50±0,26	15,00±0,03*	7,50±0,00*,**
		9,0±0,12	7,19±0,38 *	6,88±0,53*
Тривалість діастоли, с	I	18,44±0,57	22,49±0,71*	14,40±1,97*,**
	II			
	III	9,00±0,06	21,84±1,48*	11,00±0,84**
		12,10±0,42	11,12±0,87	10,05±0,99
Тривалість скорочення, с	I	25,03±1,53	34,86±4,21*	21,40±1,69*,**
	II			
	III	19,00±1,01	36,17±1,17*	25,71±0,78*,**
		25,10±1,37	23,82±1,28	21,25±1,50
Тривалість пауз між скороченнями,с	I	35,24±5,45	21,38±1,34*	72,50±12,71*,**
	II			
	III	70,90±4,08	47,63±1,77*	52,26±5,36 *,**
		181,00±9,00	49,75±2,46*	72,50±4,29 *,**
Тривалість маткового циклу, с	I	60,27±4,03	56,21±3,17	93,90±6,40*,**
	II			
	III	83,24±4,60	83,80±3,79	77,97±3,55
		196,80±6,55	73,57±2,16*	93,75±5,79*,**
Індекс активності скорочення, у.о	I	0,72±0,03	1,63±0,06*	0,31±0,03*,**
	II			
	III	0,15±0,01	0,76±0,03*	0,85±0,03*,**
		0,14±0,01	0,47±0,03*	0,51±0,03*
Олександрійські одиниці, у.о.	I	3474,48±319,86	6150,24±798,52*	2312,71±228,97*,**
	II			
	III	423,26±21,20	2656,69±102,12*	1681,39±66,82*,**
		453,58±216,11	3814,54±187,46*	3119,58±286,05*,**

та «псевдовагітних» щурів під дією ПГ та простагландину F_{2α}

Примітка. Приведені середні значення ± SD., n=15 для кожного випадку * - P<0,05 порівняно з контрольним значенням; ** - вірогідність щодо ефекту простагландину F_{2α};

Треба зазначити, що ПГ в неоднаковій мірі проявляє моделювальну дію на скорочувальну активність міометрія естрогенізованих і «псевдовагітних» щурів (табл. 3.4.1, рис. 3.4.1). Реєстрація скорочувальної активності міометрія естрогенізованих щурів на тлі аплікації ПГ показала, що на 30 хв дії він сповільнював її функціональну активність: зменшував частоту, амплітуду і тривалість скорочень в середньому на 19%, 4,5%, 15%, відповідно, а тривалість скорочень збільшував у середньому на 110%. Різницю в скорочувальній діяльності матки під дією ПГ і контрольним значенням добре видно при зіставленні показників індексу активності скорочень і скорочувальних індексів. Індекс активності скорочень зменшувався в середньому на 60 %, а AU - на 33 %, відповідно. Зовсім по-іншому ПГ впливає на спонтанну скорочувальну активність міометрія «псевдовагітних» тварин. Характерною рисою дії ПГ на ГМ матки «псевдовагітних» щурів є виражене посилення спонтанної скорочувальної активності. У тварин II і III груп на дію ПГ по відношенню до контрольного значення збільшувалася частота скорочень в середньому на 45% і 58%, тривалість скорочень - на 114% і 38 % та амплітуду скорочень - на 90% і 60 %, відповідно, тоді як тривалість маткового циклу зменшення тільки у тварин III групи в середньому на 48 %. Індекс активності скорочень збільшився в середньому на 5,7 і 3,7 рази, відповідно, тоді як AU – на 297 % і 47 %, відповідно. Для всіх груп тварин зареєстровано значне зростання швидкості досягнення максимуму скорочення, відносно контрольного значення.

Таким чином, приведені результати показують, що чутливість міометрія щурів до ПГ знаходиться в залежності від гормонального статусу тварин. ПГ модифікує спонтанну скоротливу активність матки як естрогенізованих, так і «псевдовагітних» самок щурів без впливу на базальний тонус ГМ. Викликані ним зміни скорочувальної активності ГМ міометрія в трьох групах тварин різні. У естрогенізованих тварин ПГ впливає, в більшій мірі, на тривалість пауз між скороченнями (призводить до зменшення частоти скорочень), ніж на тривалість скорочень (Таб.3.4.1; рис.3.2.1, А,б). Для «псевдовагітних» тварин реакція включає зростання сили, тривалості та частоти скорочень (Таб. 3.4.1; рис. 3.2.1).

В нашій роботі ми порівняли дію ПГ на скорочення гладеньких м'язів міометрія з простагландином F2 α , що є одним з найголовніших факторів, що стимулюють скоротливість міометрія. Відомо, що стимулювальна дія простагландину F2 α полягає в [30] в збільшенні частоти, амплітуди й тривалості скорочень ГМ матки. В наших експериментах простагландин F2 α , у порівнянні з ПГ більш ефективно впливав на частоту і тривалість пауз між скороченнями ГМ міометрія тварин I – III груп: збільшував частоту в середньому на 26%, 110%, 110% та зменшував тривалість пауз між скороченнями в середньому на 40%, 35%, 72%, відповідно контрольного значення. У зв'язку з цим значення скорочувальних індексів на дію простагландину F2 α були дещо більшими у порівнянні з ПГ (табл. 3.4.1). Слід зазначити, що скорочувальні реакції смужок міометрія тварин I – III груп на аплікація простагландину F2 α мають свої особливості, які стосуються, в першу чергу, змін базального тону. У всіх випадках спостерігається поява скорочень на тлі підвищеного тону. На тлі аплікації простагландину F2 α спостерігається виразне і стійке збільшення тону ГМ міометрія тварин I та III груп на 2,29 мН \pm 0,19 мН і 2,54 мН \pm 0,57 мН, відповідно (рис. 3.4.2 А і В, 3). Для ГМ міометрія II групи тварин характерним було збільшення амплітуди скорочень з одночасним поверненням тону до вихідного рівня (рис. 3.4.2 Б, 3).

При аналізі маткових скорочень застосовують коефіцієнт асиметрії (119). Важливість обчислення цього коефіцієнта в тім, що він відображає потужність маткових скорочень: чим менша величина коефіцієнта, тим більша потужність скорочень. З рис. 11 видно, що на дію ПГ і простагландин F2 α його значення у тварин I групи змінювалося статистично не достовірно, відносно контрольного значення (0,43 \pm 0,03 у.о.). Для тварин II і III груп коефіцієнт асиметрії зменшується відносно контрольного значення (0,95 \pm 0,05 у.о. і 0,91 \pm 0,06 у.о, відповідно) в середньому на 27 % (P < 0,001), але не досягає рівня контрольних значень, отриманих для тварин I групи. Тобто, ПГ і простагландин F2 α в однаковій мірі збільшували потужність маткових скорочень у тварин II і III груп.

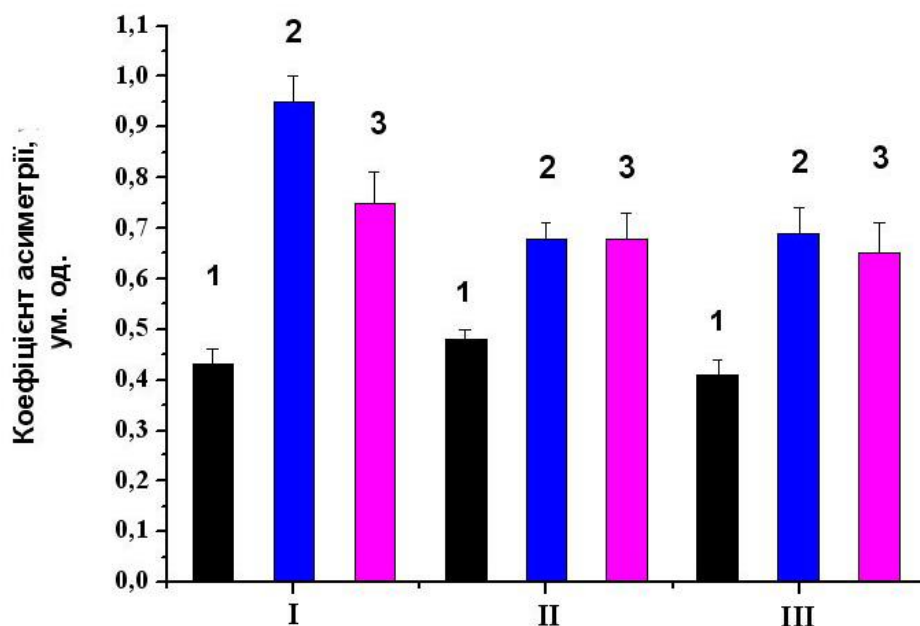


Рис. 3.4.2 Зміни коефіцієнта асиметрії під впливом ПГ та простагландину F2α. I – спонтанна скорочувальна активність у контролі; II – скорочення під впливом ПГ; III – скорочення під впливом простагландину F2α. 1- щури, яким вводили препарат естрогену; 2 і 3 щури на 14-ту та 20-ту добу «псевдовагітності», відповідно. Приведені середні значення \pm SD, $n=15$ для кожного випадку.

Дещо відмінний результат було отримано при аналізі параметра, який характеризує ступінь координації між ГМК в стінці матки під час скорочення: максимальної швидкості скорочення (dF/dt_{max}). На рис. 3.4.3 видно, що в порівнянні з контрольними значеннями для тварин II та III груп ($0,55 \text{ мН/с} \pm 0,01 \text{ мН/с}$ і $0,24 \text{ мН/с} \pm 0,05 \text{ мН/с}$, відповідно) цей показник найбільше зростає під дією ПГ ($1,17 \text{ мН/с} \pm 0,01 \text{ мН/с}$ і $3,88 \text{ мН/с} \pm 0,12 \text{ мН/с}$, відповідно), ніж - простагландину F2α ($0,47 \text{ мН/с} \pm 0,01 \text{ мН/с}$ і $2,99 \text{ мН/с} \pm 0,41 \text{ мН/с}$, відповідно). Слід звернути увагу на той факт, що значення dF/dt_{max} зростає під дією простагландину F2α тільки у тварин III групи. Відмінність значень dF/dt_{max} між ПГ та F2α, можливо, пов'язане не стільки зі здатністю останнього підвищувати базальний тонус, а і впливати на тривалість систоли скорочення.

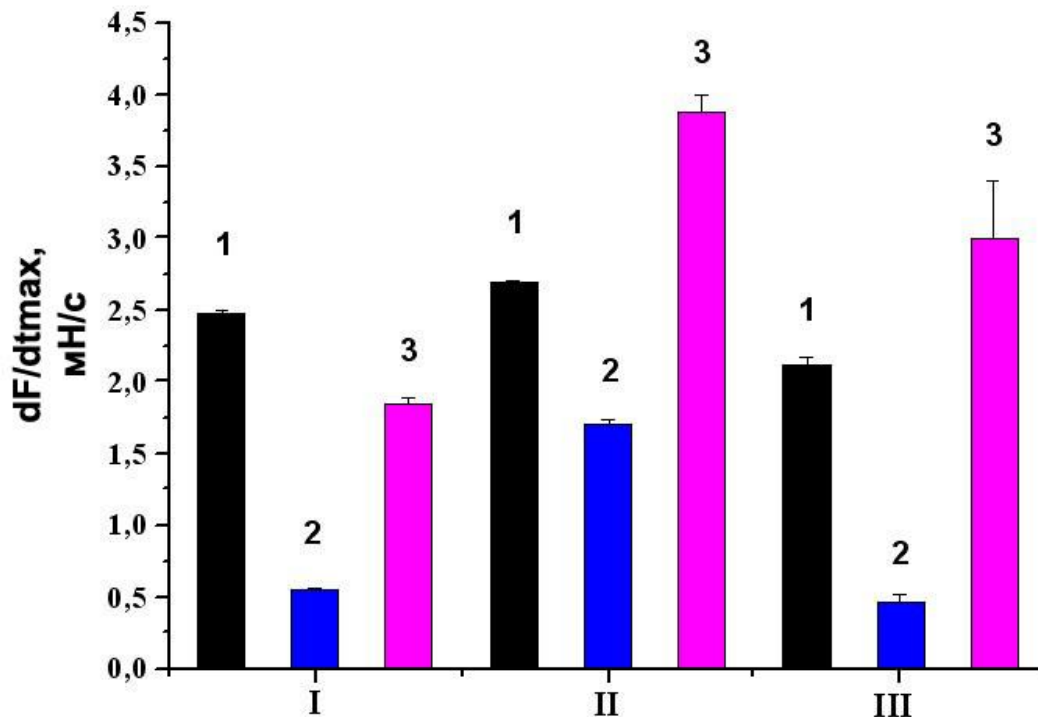


Рис.2.4.3. Зміни середньої швидкості наростання скорочення на тлі дії ПГ (II) і простагландину F2 α (III). 1 – спонтанні скорочення в контролі; 1 – щури, після прийому препарату естрогену; 2 і 3 – щури на 14-ту та 20-ту добу псевдовагітності. Приведені середні значення \pm SD, n=15 для кожного випадку.

Приведені вище результати дають можливість припустити, що ПГ змінює параметри скорочення ГМ міометрія за рахунок модифікації процесів, що беруть участь у регуляції внутрішньоклітинного рівня іонів кальцію в ГМК. Це підтверджується тим, що порівняльний аналіз фазової структури скорочення гладеньких м'язів міометрія під дією ПГ і простагландину F2 α показав, що у тварин II – III груп у більшій мірі, змінювалася швидкість скорочення (dF/dt_{max}), у порівнянні зі швидкістю розслаблення (dF/dt_{min}). Розрахунки приросту швидкості скорочення й розслаблення для тварин I – III груп показали наступне. З рис. 13

видно, що приріст швидкості скорочення у всіх випадках приймає значення більше за 1,0. Для I групи тварин цей показник трохи більше одиниці, тоді як для II і III груп - він збільшується в рази ($P < 0,001$). Приріст швидкості розслаблення під дією ПГ і простагландину F2 α для I групи тварин знаходиться в межах значення 1,0 ($1,09 \pm 0,01$ і $1,16 \pm 0,01$, відповідно), для II групи він менше 1,0 ($0,49 \pm 0,15$ і $0,58 \pm 0,02$, відповідно), і найбільший – для III групи тварин ($1,69 \pm 0,11$ і $1,41 \pm 0,06$, відповідно).

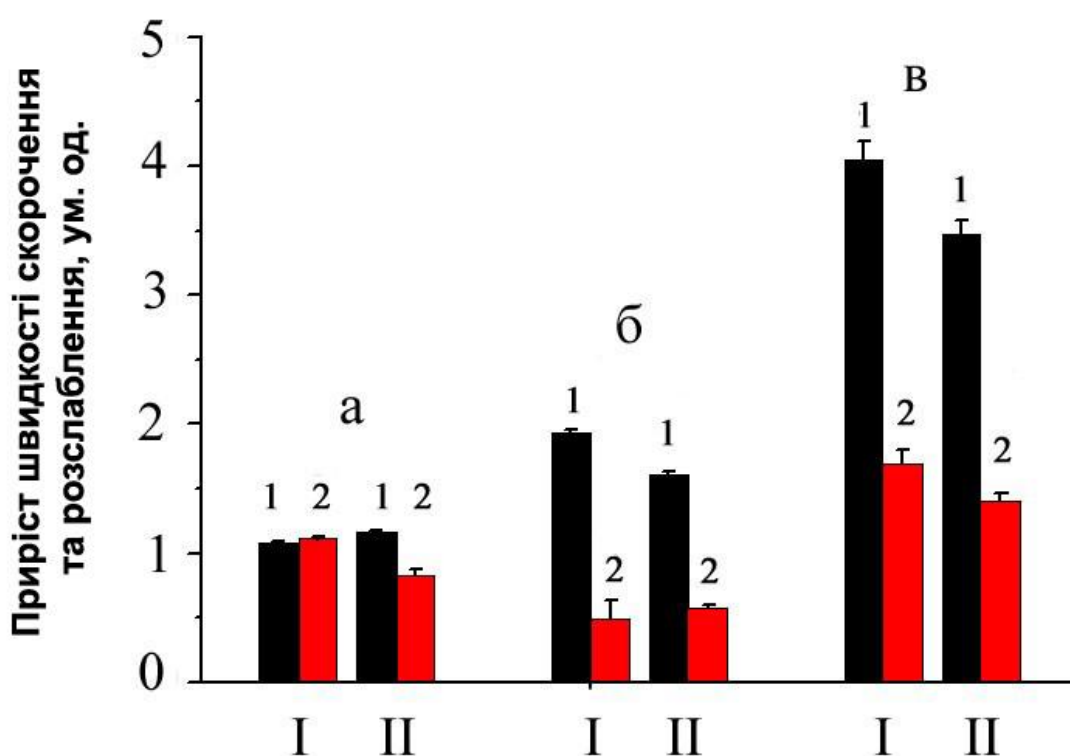


Рис.3.4.4. Зміни приросту швидкості досягнення максимуму скорочення та розслаблення міометрія щурів під дією ПГ (I) та простагландину F2 α (II). а – щури, після прийому препарату естрогену; б і в – щури на 14-ту та 20-ту добу псевдовагітності. 1 – приріст швидкості скорочення; 2 – приріст швидкості розслаблення. Приведені середні значення $\pm SD$., $n=15$ для кожного випадку

Таким чином, можна вважати, що дія ПГ як і простагландин F2 α пов'язана з активацією мобілізації кальцію з саркоплазматичного ретикулула та надходженням позаклітинного кальцію до міоплазми через мембрану ГМК під час маткового скорочення, але в більшій мірі за рахунок мобілізації його з саркоплазматичного ретикулула ГМК. Тільки для тварин II групи активація скорочення пов'язана зі збільшенням мобілізації кальцію з саркоплазматичного ретикулула, при одночасному зменшенні надходження зовнішньоклітинного кальцію до ГМК.

Таким чином, на підставі наведених даних можна зробити висновок, що ПГ, у порівнянні з простагландином F2 α , проявляє більш потужну утеротонічну дію на ГМ міометрія «псевдовагітних» самок щурів і може бути індуктором передчасних пологів.

Підсумки:

1. В групі естрогенізованих щурів ПГ мав переважно гальмівну дію на спонтанну скорочувальну активність міометрія. Він зменшував середню амплітуду та частоту спонтанних скорочень, але дещо збільшував їхню тривалість. Натомість, простагландин F2 α збільшував і амплітуду, і частоту, і тривалість. Під дією ПГ збільшувалась тривалість тривалість тонічного компоненту поодинокого спонтанного скорочення, але зменшувалась тривалість фази наростання скорочення та фази розслаблення в групі естрогенізованих тварин. Тобто м'язова смужка під дією ПГ швидше скорочувалась до максимальної амплітуди, довше трималась в максимально скорочуваному стані та швидше розслаблювалась, ніж в контролі. Натомість під дією простагландину F2 α тривалість фази наростання та тонічного компоненту суттєво не змінювались по відношенню до контролю, а тривалість фази розслаблення збільшилась у 2 рази, внаслідок чого збільшились і матковий цикл, і площа під кривою скорочення.

2. В групі щурів, що попередньо отримували препарат прогестерону протягом чотирнадцяти днів, і ПГ, і простагландин спричинювали збільшення амплітуди, частоти та тривалості спонтанних скорочення міометрія. Проте, у випадку ПГ, найбільш вираженим була зміна середньої амплітуди скорочень, в той час як простагландин F2 α впливав переважно на частоту спонтанних скорочень. ПГ спричинив подовження тонічного компоненту поодинокого спонтанного скорочення, а наростання скорочення до максимальної амплітуди та повне розслаблення гладеньком'язової смужки відбувалися швидше, ніж в контролі. Під дією ж простагландину найбільш вираженим було подовження фази розслаблення поодинокого скорочення.
3. В групі «псевдовагітних» щурів на 22-й день прийому препарату прогестерону і ПГ, і простагландин мали стимулюючу дію на скоротливість міометрія. Під дією ПГ збільшились середня амплітуда, частота і тривалість спонтанних скорочень, найбільш вираженим було збільшення середньої амплітуди — на 5,1% більше, ніж частоти й на 9,6% більше, ніж середньої тривалості. Простагландин F2 α теж спричинив зростання всіх вказаних параметрів спонтанних скорочень, проте найбільш вираженим було збільшення середньої частоти спонтанних скорочень за 10 хвилин — на 30% більше, ніж збільшення середньої амплітуди спонтанних скорочень. Найменших змін під впливом простагландину зазнала тривалість спонтанних скорочень. Під дією ПГ збільшилась тривалість всіх фаз спонтанних скорочень по відношенню до контроль. Найбільш значним було подовження тонічного компоненту — він став у 2 рази довшим, ніж в контролі, а збільшення тривалості фази розслаблення склала на 12% менше, ніж тонічного компоненту. Під дією простагландину F2 α найбільш значущим було подовження фази розслаблення спонтанних скорочень — на 125% по відношенню до контролю.
4. Потужність спонтанних скорочень міометрія, про що судили з індексу асиметрії, збільшувався під дією ПГ та простагландину F2 α в усіх трьох групах тварин. Проте властивість ПГ посилювати потужність спонтанних

скорочень виявилась більш вираженою, ніж у простагландину F2 α в групах I та III, в той час як в II групі їхня різниця була статистично недостовірною.

5. Середня швидкість наростання скорочення під дією ПГ зменшується в усіх групах тварин, а під дією простагландину F2 α — зменшується в групі естрогенізованих тварин, а в обох групах «псевдовагітних» — зростає.

3.5. Вплив ПГ клітинної стінки Золотистого стафілококу на механізми регуляції аденілатциклазною сигнальною системою скорочувальної активності міометрія щурів

3.5.1 Дія пептидоглікану на норадреналінове гальмування скорочень міометрія щурів за різних гормональних станів

Дослідження ролі аденілатциклазного сигнального шляху в механізмі дії ПГ на скоротливу активність міометрія ми почали з адренорецепторів, оскільки при стимуляції адренорецепторів активуються мембранний G- білок та аденілатциклаза. Враховуючи описану в літературних джерелах роль стероїдних гормонів в експресії адренорецепторів та їхньому спряженні з аденілатциклазою, наступну серію експериментів було проведено в групах тварин з підвищеним рівнем естрогену або прогестерону.

Для дослідження впливу рівня естрогену та прогестерону на дію ПГ на норадреналінове (НА) гальмування спонтанної та викликані простагландином F2 α скоротливості міометрія була проведена серія експериментів у трьох групах щурів: самицях щурів, що отримували препарат естрогену (I група) та тварин, що отримували препарат прогестерону 14 діб (II група) і 22 доби (III група).

В першій групі тварин НА викликав зменшення амплітуди спонтанної скорочувальної активності міометрія до $65,11\% \pm 0,81\%$ від початкового рівня. Після припинення аплікації норадреналіну амплітуда скорочень відновилась. В той же час після попередньої тридцятихвилинної аплікації ПГ зниження амплітуди скорочень міометрія, викликаних НА на тлі дії ПГ склав всього $9\% \pm$

0,856%. Після припинення аплікації норадреналіну амплітуда скорочень міометрія естрогенізованих щурів не відновилась (рис. 3.5.1.).

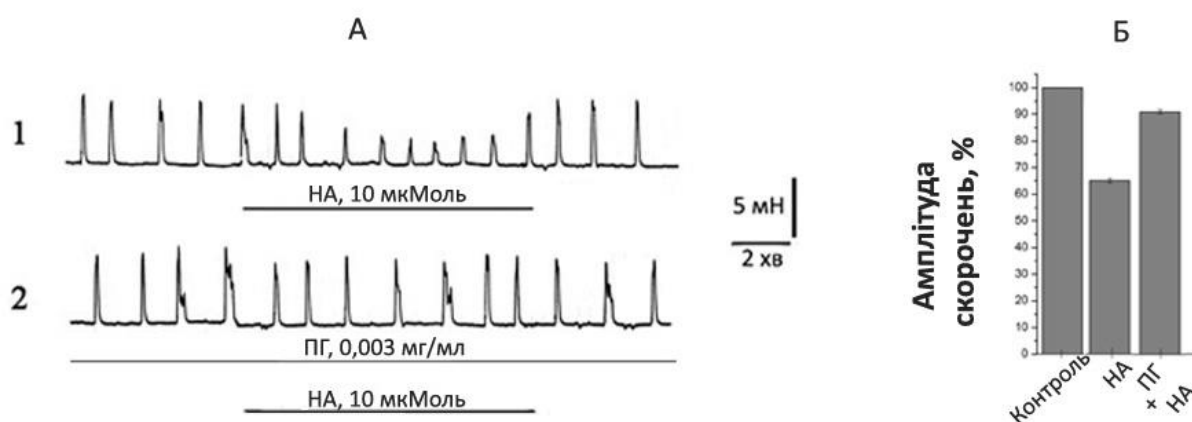


Рис. 3.5.1 Норадреналін різною мірою зменшує амплітуду спонтанних скорочень міометрія естрогенізованих щурів самостійно та на тлі пептидоглікану. А – типові записи скорочень міометрія, що демонструють: 1 - пригнічення спонтанної активності під дією норадреналіну; 2 - дія норадреналіну на 30-й хв аплікації ПГ; Б – діаграма, що демонструє співвідношення амплітуд спонтанних скорочень міометрія в контролі, під дією норадреналіну (НА) та пептидоглікану з норадреналіном (ПГ+НА); за контроль прийнята амплітуда спонтанних скорочень естрогенізованих щурів; $n=15$; $p \leq 0,001$

У «псевдовагітних» на 14-у добу НА зменшив амплітуду спонтанних скорочень на $82,43 \% \pm 0,93 \%$. Після припинення дії НА амплітуда скорочень міометрія відновилась. Після попередньої тридцятихвилинної аплікації ПГ, НА разом з ПГ викликало зменшення амплітуди спонтанних скорочень міометрія на $68,46\% \pm 0,47\%$. Після припинення аплікації НА амплітуда спонтанних скорочень відновилась в обох випадках (рис. 3.5.2).

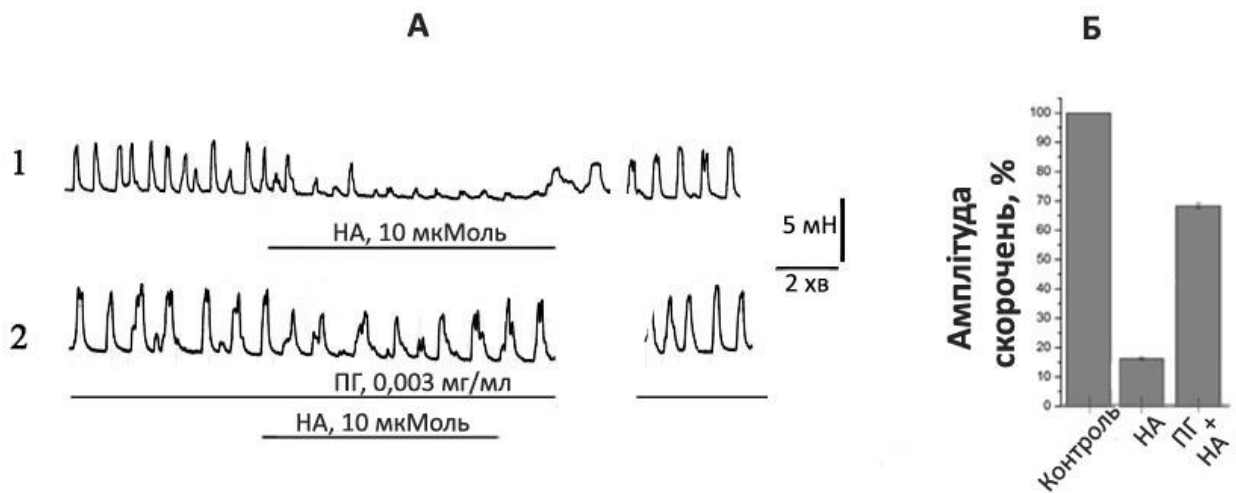


Рис. 3.5.2 Норадреналін різною мірою зменшує амплітуду спонтанних скорочень міометрія щурів, що отримували прогестерон протягом 14 діб самостійно та на тлі пептидоглікану. А – типові записи скорочень міометрія, що демонструють: 1 - пригнічення спонтанної активності під дією норадреналіну; 2 - дія норадреналіну на 30-й хв аплікації ПГ; Б – діаграма, що демонструє співвідношення амплітуд спонтанних скорочень міометрія в контролі, під дією норадреналіну (НА) та пептидоглікану з норадреналіном (ПГ+НА); за контроль прийнята амплітуда спонтанних скорочень щурів, що отримували препарат прогестерону протягом 14 діб; $n=15$; $p \leq 0,001$

На 20-ту добу «псевдовагітності» амплітуда скорочень міометрія під дією НА зменшилась на $45.5\% \pm 1,8\%$, а на тлі дії ПГ НА викликане пригнічення амплітуди скорочень було статистично недостовірним. (Рис. 3.5.3).

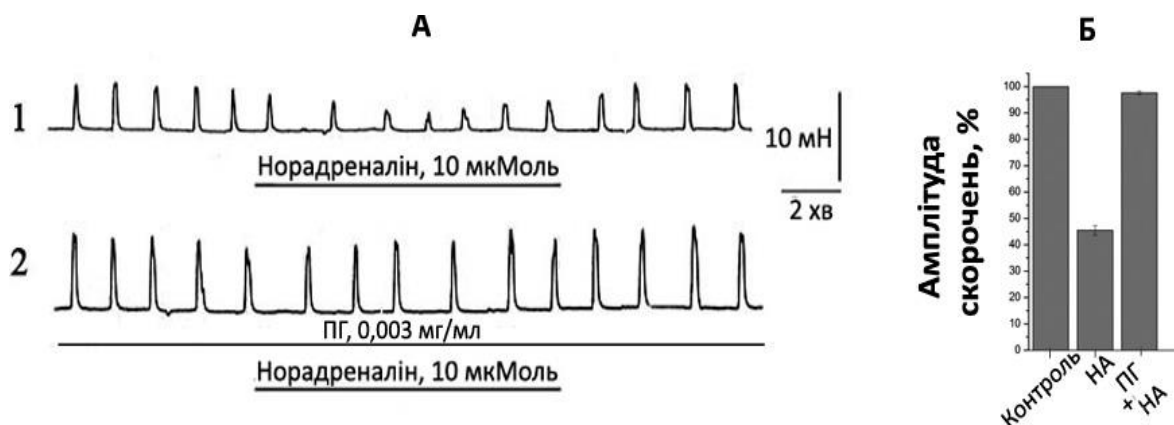


Рис. 3.5.3. Норадреналін різною мірою зменшує амплітуду спонтанних скорочень міометрія щурів, що отримували прогестерон протягом 20 діб самостійно та на тлі пептидоглікану. А – типові записи скорочень міометрія, що демонструють: 1 - пригнічення спонтанної активності під дією норадреналіну; 2 - дія норадреналіну на 30-й хв аплікації ПГ; Б – діаграма, що демонструє співвідношення амплітуд спонтанних скорочень міометрія в контролі, під дією норадреналіну (НА) та пептидоглікану (ПГ) з норадреналіном (ПГ+НА); за контроль прийнята амплітуда спонтанних скорочень щурів, що отримували препарат прогестерону протягом 14 діб; $n=15$; $p \leq 0,001$

Тривалість та частота скорочень міометрія під дією НА не зазнали суттєвих змін в усіх групах.

Різницю у скоротливій активності міометрія щурів між трьома групами тварин під дією ПГ та при його сумісній дії з норадреналіном добре видно при зіставленні показника скоротливого індексу: одиниць Монтевідео (Рис. 3.5.4).

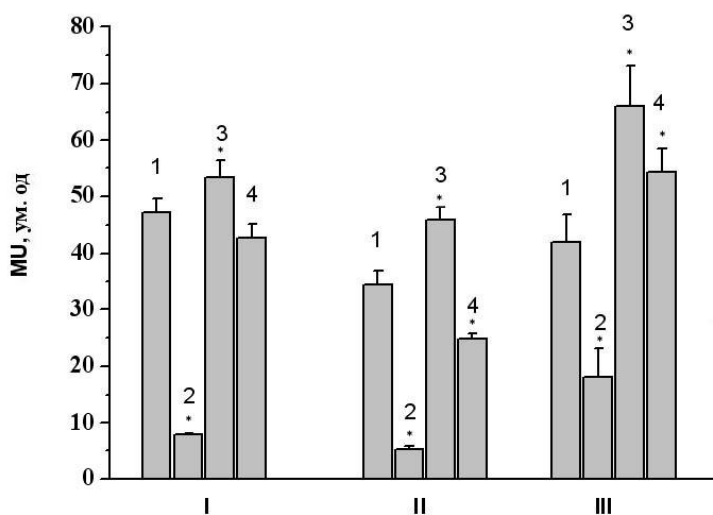


Рис. 3.5.4 Діаграма змін маткової активності щурів під дією норадреналіну та ПГ. I – щури, після прийому препарату естрогену; II і III – щури після прийому препарату прогестерону 14-ту та 20-у добу. Значення одиниць Монтевідео в контролі (1), під дією норадреналіну (2) і ПГ (3) та при сумісній їх дії (4); приведені середні значення $\pm SD$, $n=15$ для кожного випадку; (*) показники є статистично відмінними в порівнянні з контрольними величинами, $p<0.0125$. $n=10$, $p\leq 0,05$

ПГ у трьох групах тварин статистично достовірно збільшував МУ, а саме: у I групі - на $13,23\%\pm 0,73\%$, у II - на $34,58\%\pm 2,63\%$ та у III – на $57,01\%\pm 2,49\%$, по відношенню до контролю. На тлі сумісної дії ПГ та норадреналіну значення МУ для тварин I та II груп зменшувались по відношенню до контролю на $9,53\%\pm 1,22\%$ та $27,06\%\pm 1,55\%$ відповідно. Для III групи тварин значення МУ навпаки перевищувало контрольне на $29,95\%\pm 2,89\%$.

Таким чином, ПГ пригнічує гальмівну дію норадреналіну на спонтанні скорочення міометрія як у естрогенізованих, так і у щурів обох груп, що отримували препарат прогестерону за рахунок підсилення скорочувальної активності.

Більш детально було вивчено вплив ПГ на норадреналінвикликане пригнічення скорочень міометрія щурів, активованих простагландином F2 α (таб. 3.5.1).

Таблиця 3.4.1

Скорочувальна активність міометрія щурів, що піддавалися естрогенізації під дією ПГ, простагландину F2 α та норадреналіну

Приведені середні значення $\pm SD$, $n=10$; *- показники є статистично відмінними в порівнянні з контрольними величинами, $p<0.012$

Показники	Контроль (спонтанна активність)	Простагланди н F _{2α} , (10 мМоль/л)	Простагланд ин F _{2α} + Норадренали н (10 мкМоль/л)	Простагланди н F _{2α} + Норадреналин + Пептидоглика н (10 ⁻³ мг/мл)
Частота скорочень, 10хв ⁻¹	6,33±0,57	11±0,70*	10±0,50*	10,5±0,41*
Амплітуда скорочень, мН	9,45±0,125	8,50±0,26*	5,58±0,44*	9,71±0,25
Базальний тонус, мН	-	1.82±0,45	-	-
Тривалість скорочень, с	20,94±0,912	37,60±0,98*	23,13±0,87	24,52±0,48*
Тривалість пауз між скороченнями, с	50,63±1,54	8,97±0,98*	23,70±2,84*	12,57±1,51*
Тривалість маткового циклу, с	72,34±0,21	46,58±1,96*	46,40±2,25*	37,09±1,99*
Індекс активності скорочення, ум. од.	0,42±0,03	4,66±0,49*	1,05±0,09*	1,98±0,20*
Одиниці Монтевідео, ум. од.	61,55±2,61	93,62±5,09*	56,18±4,16	102,02±6,64*
Олександрійсь кі одиниці, ум. од.	1200,57±106, 23	3514,54±138,3 0*	1296,58±66,9 5	2499,51±113,0 1*

Таким чином, серія експериментів з використанням норадреналіну показали, що дія ПГ на скоротливість міометрія щурів не пов'язана з активацією адренорецепторів.

3.5.2 Властивість ПГ усувати розслаблення простагландиніндукованих скорочень міометрія, викликаних активаторами аденілатциклазної системи.

Оскільки відповідь м'язових смужок матки щурів на використані речовини була подібною і не залежала від гормонального фону, подальші експерименти проводились на міометрії тварин, які попередньо отримували лише препарат естрогену.

Наступні проведені нами експерименти мали за мету виявити, чи реалізується блокувальний ефект ПГ на розслаблення простагландиніндукованих скорочень міометрія його взаємодією з АЦС. Для цього крім неспецифічного агоніста адренорецепторів норадреналіну ми використали також сальбутамол, селективний агоніст β 2-адренорецепторів, та форсколін, прямий активатор аденілатциклаз.

Зазначені речовини було використано в максимальній концентрації 10 мкМоль/л, яку було визначено з графіка доза-ефект їх гальмівної дії на скорочення міометрія в присутності ПГ.

Під дією використаних речовин в усіх випадках спостерігалось зменшення амплітуди і тривалості викликаних скорочень міометрія. Слід зазначити, що крім вказаних змін скорочення мали складну форму (переважно вони були комбінованими) з відсутністю між ними паузами. Однак прикладання ПГ (10^{-3} мг/мл) нівелювало їхню гальмівну дію: скоротливість у більшості випадків відновлювалась майже до вихідного рівня (Рис. 3.5.5).

Таким чином, на тлі викликаних простагландином скорочень міометрія невагітних щурів ПГ усуває пригнічувальну дію норадреналіну (неселективний агоніст адренорецепторів), сальбутамолу (селективний агоніст β 2-адренорецепторів) та форсколіну (прямий активатор аденілатциклаз) та посилює скорочення в усіх трьох випадках.

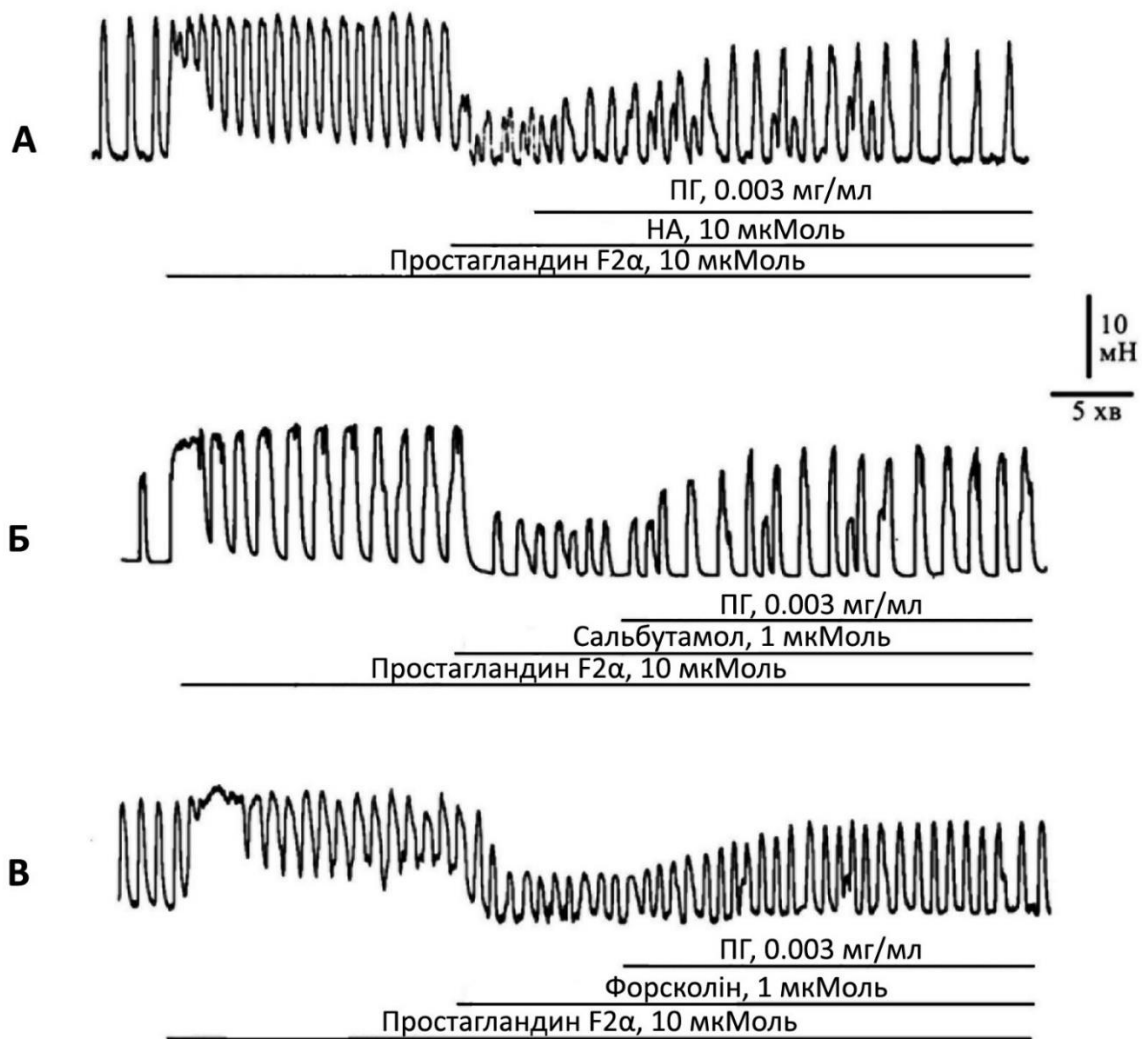


Рис. 3.5.5 Блокування ПГ розслаблення міометрія щурів, викликаного активацією β 2-адренорецепторів або аденіланциклази. Типові реєстрації відновлення ПГ пригнічених норадреналіном (А), сальбутамолом (Б) і форсколіном (В) скоротливих реакцій міометрія щурів, викликаних прикладанням простагландину F2α.

На рис. 3.5.6 приведені криві доза-ефект блокувальної дії ПГ на розслаблення спонтанних і простагландинвикликаних скорочень міометрія естрогенізованих тварин, викликаних прикладанням різних концентрацій форсколіну та сальбутамолу.

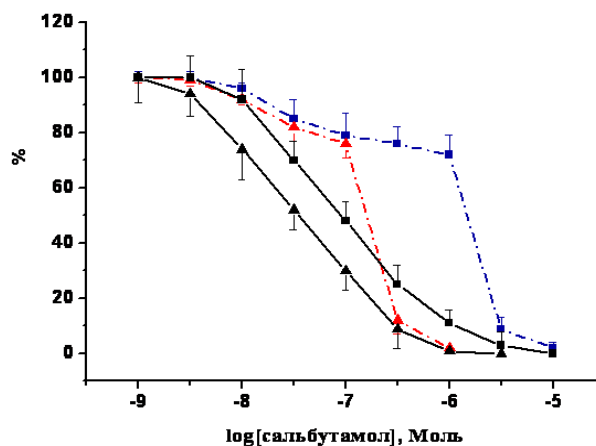


Рис. 3.5.6 Блокування ПГ гальмівної дії селективного агоніста β_2 -адренорецепторів сальбутамолу та активатора аденілатциклазу форсколіну на скорочення міометрія естрогенізованих щурів. На графіках позначено: —▲— гальмування спонтанної скорочувальної активності на тлі дії сальбутамолу або форсколіну; —■— гальмування скорочень сальбутамолом або форсколіном викликаних, прикладанням 10 мкМоль/л простагландину F2 α ; —▲— часткове відновлення спонтанної скорочувальної активності ПГ (0,003 мкг/мл) на тлі дії сальбутамолу та форсколіну; —■— часткове відновлення скорочень ПГ, викликаних прикладанням 10 мкМоль/л простагландину F2 α на тлі дії сальбутамолу та форсколіну.

Як видно з рис.3.5.6. ефективність ПГ гальмувати дію активаторів β_2 -адренорецепторів або аденіланцклази залежить від характеру скорочувальної активності, а саме: спонтанної або агоніствикликанної. Слід зауважити, що ПГ пригнічував дію зазначених речовин у більшому діапазоні концентрацій у випадку простагландинвикликаних скорочень.

3.5.3 Участь гетеротримерних Gs- та Gi/o-білків у ефектах ПГ пригнічувати активності аденілатциклазної системи міометрія щурів

Оскільки бактеріальні патогени можуть впливати безпосередньо на різні ланки проведення сигналу АЦС від рецептора до ефектора, метою наступної серії експериментів було виявити, чи впливає він на активність Gs- та Gi/o-білків, а також чи зберігатиметься його ефект за умов рецептор неопосередкованого підвищеного рівня внутрішньоклітинного цАМФ.

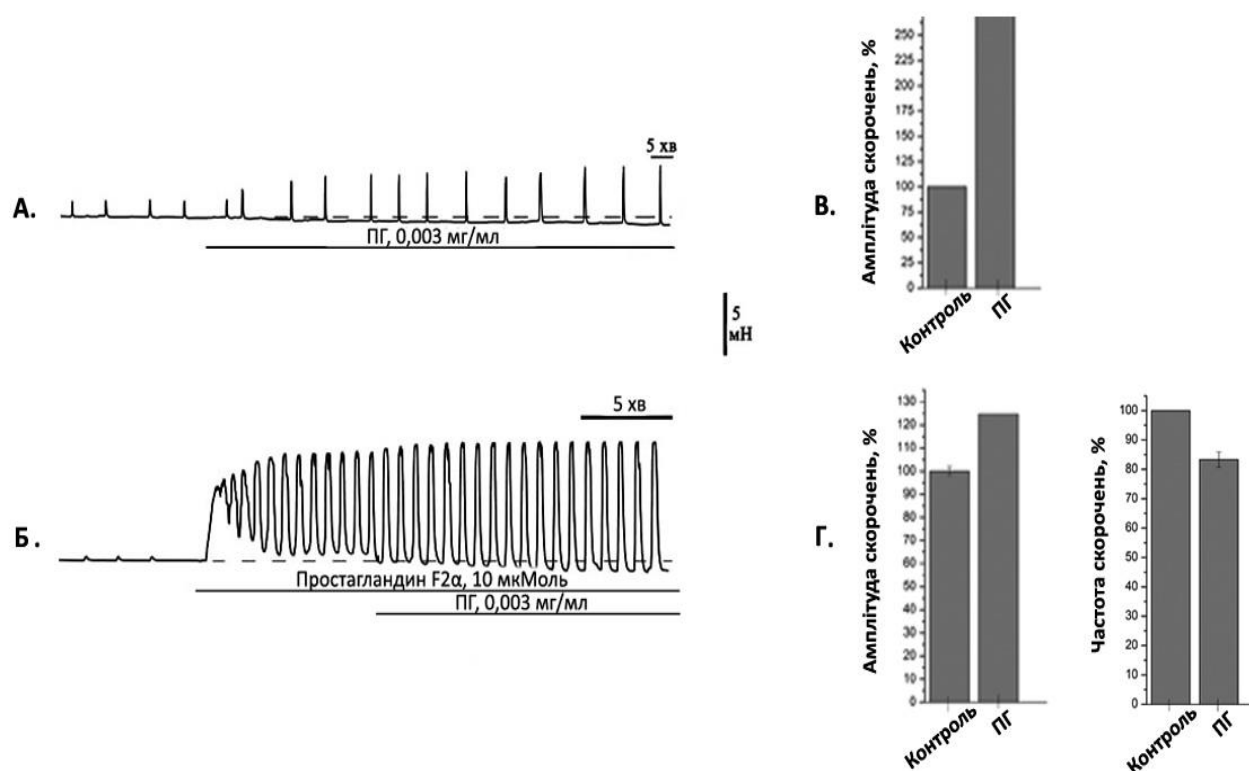


Рис. 3.5.7. Типові записи, що демонструють стимулювальну дію пептидоглікану на скоротливість смужок міометрія, попередньо оброблених холерним токсином; А. – ПГ збільшує амплітуду спонтанних скорочень смужок міометрія; Б – ПГ збільшує амплітуду скорочень, викликаних простагландин F2 α ; В – Діаграма, що демонструє співвідношення амплітуд скорочень в контролі та під дією пептидоглікану. За контроль прийнята амплітуда спонтанних скорочень; Г - Діаграми, що демонструють зміни амплітуди та частоти скорочень в контролі та під дією ПГ з простагландином F2 α ; За контроль прийнята амплітуда простагландин викликаних скорочень; Пунктирною лінією позначений вихідний рівень базального тонуусу смужок; $n=10, p \leq 0.05$

Для з'ясування ролі G-білків в ефектах ПГ експерименти проводились після тривалого витримання смужок міометрія в розчині Кребса з додаванням холерного або кашлюкового токсинів.

У випадку з холерним токсином амплітуда спонтанних скорочень міометрія була дуже малою і складала в середньому 0,5-1 мН. На тлі дії пептидоглікану протягом 30 хв амплітуда спонтанних скорочень зростає у 3 рази (рис. 3.4.7 А).

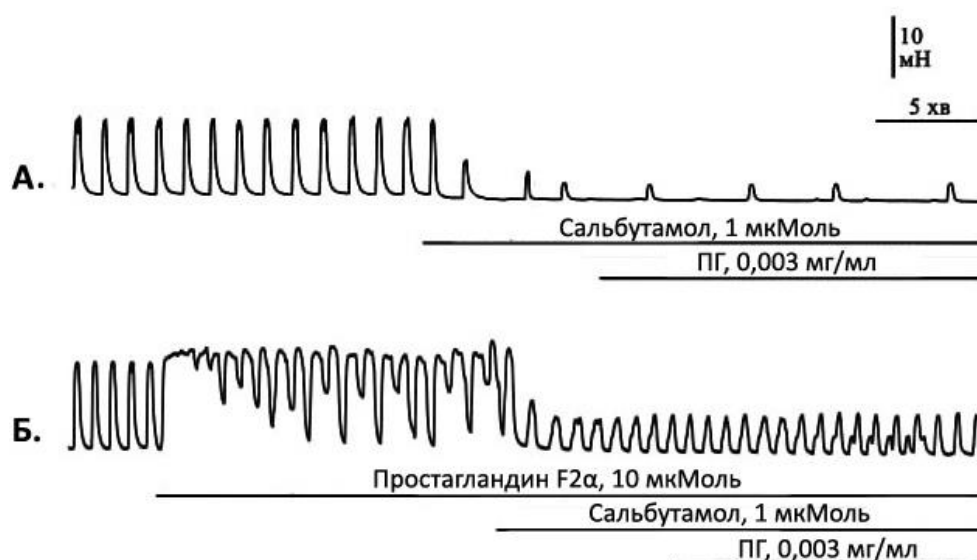


Рис. 3.5.8. Типові записи, що демонструють відсутність ефекту пептидоглікану на тлі дії салбутамолу на спонтанну та простагландин-викликану скоротливість смужок міометрія, що попередньо оброблялись кашлюковим токсином. А- спонтанна скоротливість; Б – простагландин F2 α -викликана скоротливість; $n=10$, $p \leq 0.05$

Тривалість та частота скорочень на тлі дії ПГ не зазнали істотних змін. Значно більш вираженим був утеротонічний ефект простагландину-F2 α . Під його дією амплітуда скорочень смужок, попередньо оброблених холерним токсином, збільшилась у середньому у 8 разів. Аплікація ПГ на тлі дії простагландину викликала збільшення амплітуди скорочень міометрія ще на 24,7% \pm 1,88%. Частота скорочень міометрія після аплікації ПГ зменшилась на 17% \pm 0,685%.

При дослідженні смужок міометрія, оброблених кашлюковим токсином було отримано наступні результати. Інкубація смужок міометрія в кашлюковому

токсині ніяк не вплинула на параметри спонтанних скорочень. Під дією сальбутамолу амплітуда спонтанних скорочень зменшилась на $48,2\% \pm 2,3\%$, а простагландин-викликаних – на $60,7\% \pm 2,3\%$. Наступна аплікація ПГ на тлі дії сальбутамолу не викликала будь-яких змін в скоротливості (Рис. 3.4.8).

Форсколін викликав зменшення амплітуди спонтанних та простагландин викликаних скорочень оброблених кашлюковим токсином смужок міометрія на $83,3\% \pm 1,2\%$ та $71,42\% \pm 2,8\%$, відповідно. Прикладання ПГ на тлі форсколіну, як у випадку спонтанних так і викликаних скорочень, не посилювала скорочувальної активності міометрія (рис. 3.5.9).

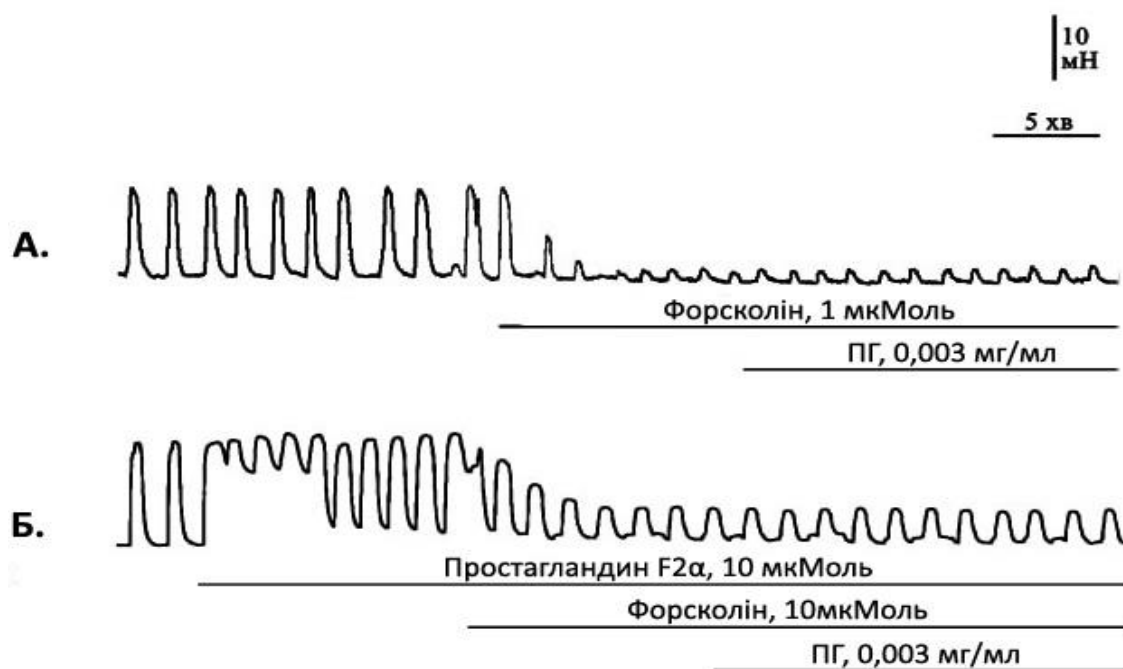


Рис. 3.4.9. Типові записи, що демонструють відсутність ефекту пептидоглікану на тлі дії форсколіну на спонтанну та простагландинвикликану скоротливість смужок міометрія, що попередньо оброблялись кашлюковим токсином. А- спонтанна скоротливість; Б – простагландин F2α-викликана скоротливість.

З метою дослідити дію ПГ на скоротливість міометрія за умов підвищеного внутрішньоклітинного рівня цАМФ у гладеньком'язових клітинах матки, яке не пов'язане з активацією зв'язаної з рецептором аденілатциклази було використано мембранопрониклу форму цАМФ 8-бром-цАМФ та блокатор цАМФ-залежних фосфодіестераз папаверин. На Рис. 3.4.10 видно, що 8-бром-цАМФ пригнічує спонтанну і викликану скоротливу активність, яка після прикладання ПГ залишалася незмінною (рис. 3.5.10).

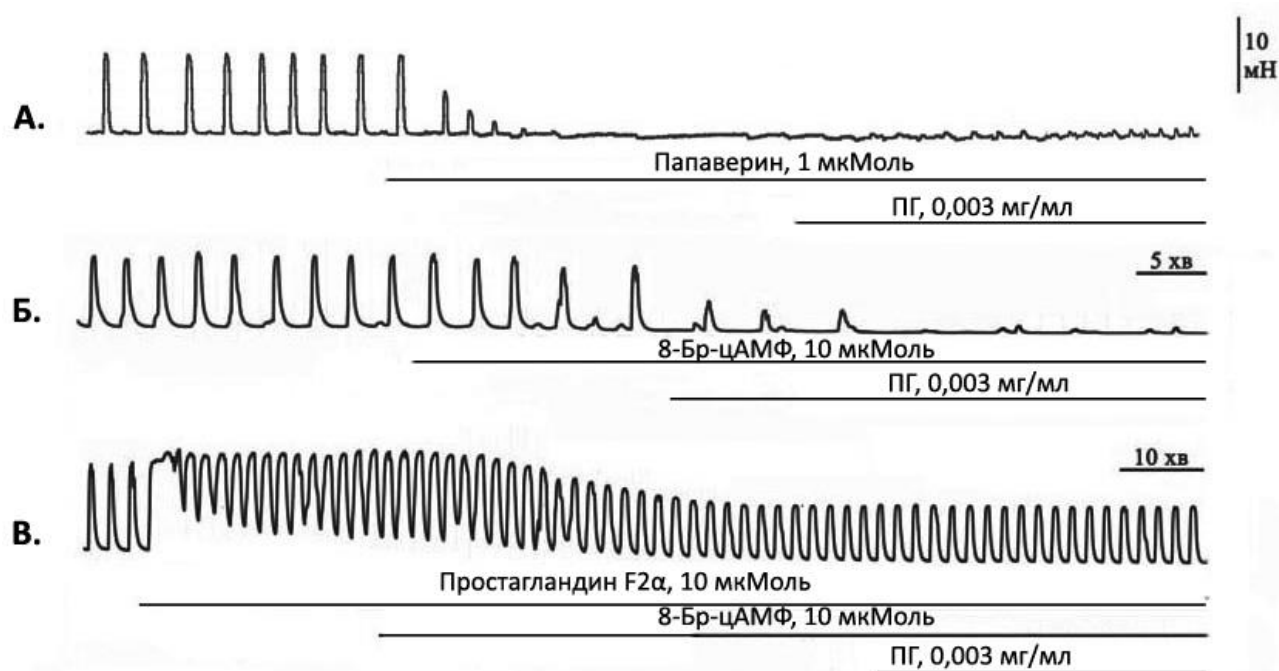


Рис. 3.5.10 Відсутність впливу пептидоглікану на розслаблення міометрія щурів, викликаних дією 8-бром-цАМФ або папаверину. А і Б – спонтанна скорочувальна активність міометрія; В – скорочення міометрія, викликане прикладанням простагландину F2α.

У випадку з блокуванням цАМФ-залежних фосфодіестераз папаверином спостерігали подібну картину (Рис. 3.4.10).

3.5.4 Порівняння впливу ПГ золотистого стафілокока і блокатора аденілатциклаз SQ 22.536 на параметри скорочувальної активності міометрія

На підставі проведених досліджень і зробленого вище висновку в наступній серії експериментів ми порівняли ефекти ПГ (10^{-3} мг/мл) і селективного блокатора аденілатциклаз SQ 22.536 (10 мкМоль/л) на скоротливу активність неміометрія вагітних щурів. Як видно з діаграми представленої на рис. 20 ПГ і блокатор аденілатциклаз в однаковій мірі змінювали параметри скорочувальної активності смужок міометрія.

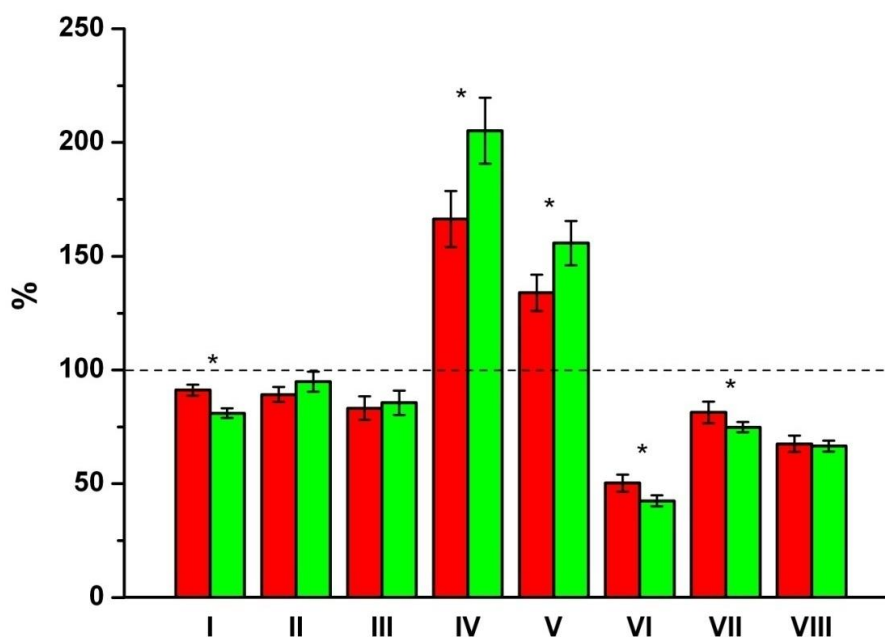


Рис. 3.5.11 Порівняльна діаграма змін параметрів спонтанної скорочувальної активності міометрія невагітних щурів під дією ПГ золотистого стафілококу та блокатора аденілатциклаз SQ 22.536. Позначення на діаграмі: I – частота скорочень; II – амплітуда скорочень; III – тривалість скорочень; IV – тривалість пауз між скороченнями; V – тривалість маткового скорочення; VI – індекс активності скорочень; VII – одиниці Монтевідео; VIII – Олександрійські одиниці; За 100 % прийнято значення досліджуваних параметрів у контролі. SQ 22.536 - червоні стовпчики (n=10, середнє ± SD); ПГ - зелені стовпчики (n=10, середнє ± SD); "*" – статистична достовірність з $P < 0.05$.

Слід зазначити, що деякі показники скорочувальної активності, під дією цих речовин мали статистично достовірні відмінності. Так ПГ в більшій мірі

впливав на частоту скорочень, тривалості пауз між скороченнями і маткового скорочення, індекс активності та одиниці Монтевідео.

Отже, гладенькі м'язи невагітної матки виявилися більш чутливими до дії ПГ, в порівнянні з дією SQ 22.536. Можна припустити, що вплив ПГ на скоротливість міометрія визначається не тільки зниженням активності аденілатциклаз та, можливо, залучення інших механізмів. В попередній главі ми припустили, що ПГ змінює показники скорочення міометрія внаслідок модифікації процесів, що беруть участь у регуляції внутрішньоклітинного вмісту іонів Ca^{2+} в ГМК міометрія.

Підсумки:

1. ПГ усуває пригнічувальну дію НА на спонтанну скорочувальну активність міометрія та посилює її в усіх трьох групах тварин. Найбільше він посилює попередньо пригнічені спонтанні скорочення норадреналіном в третій групі тварин, найменше — в групі естрогенізованих.
2. На тлі викликаних простагландином скорочень міометрія невагітних щурів ПГ усуває пригнічувальну дію норадреналіну (неселективний агоніст адренорецепторів), сальбутамолу (селективний агоніст β_2 -адренорецепторів) та форсколіну (прямий активатор аденілатциклаз) та посилює скорочення в усіх трьох випадках.
3. При активації G-і/o білка шляхом інкубації гладеньком'язових смужок міометрія щурів в розчині з кашлюковим токсином ПГ втрачає свою властивість посилювати спонтанні скорочення міометрія.

РОЗДІЛ 4

Узагальнення та аналіз результатів

У дисертаційній роботі охарактеризовано основні амплітудно-кінетичні параметри скорочень смужки міометрія на тлі дії ПГ Золотистого стафілококу в чотирьох групах щурів: вагітних, невагітних інтактних, естрогенізованих та «псевдовагітних». Також досліджено механізм дії ПГ на скоротливість міометрія вагітних та невагітних щурів і здійснено пошук речовин, що усуватимуть стимулювальну дію ПГ.

ПГ – це структурний компонент клітинної стінки багатьох грам позитивних, зокрема Золотистого стафілококу, та грам негативних бактерій, що оточує клітину зовні від плазмолемі та виконує роль екзоскелету (21-22). ПГ має імуногенні та патогенні властивості. Під час росту, ділення або руйнуванні бактеріальної клітини ПГ виділяється в навколишнє середовище, розноситься кровоплином та осідає на тропних клітинах, де часто ініціює патологічні процеси (2, 3). Раніше було доведено, що ПГ є етіологічним фактором таких патологічних станів, як реактивний артрит, хронічний виразковий коліт та хвороба Крона (16-18). В жіночій репродуктивній системі дія ПГ найкраще досліджена під час вагітності, оскільки відомо, що він задіяний в такі патологічні процеси вагітності як хоріоамніоніт, прееклампсія тощо.

Дослідження 2014 р. . Ghiasi показало, що Золотистий стафілокок є одним з мікроорганізмів, що найчастіше висіваються із піхви та цервікального каналу жінок з діагностованим безпліддям (14). Раніше вважалось, що неплідність у разі інфікування Золотистим стафілококом обумовлена запаленням в епітеліальному шарі шийки матки та ендометрії, виникненням імунної відповіді, що унеможлиблює запліднення. Проте нещодавні дослідження показали, що морфологічний стан епітелію шийки матки жінок з безпліддям, в генітальному тракті яких висівався Золотистий стафілокок, не дає підстав для такого твердження, ознаки запалення не були виявлені, а отримані дані не були

достатньо інформативним, для того, щоб скласти чітке уявлення про причину та механізм розвитку неплідності у них (15). Крім того, в усіх дослідженнях щодо зв'язку між інфікуванням Золотистим стафілококом та жіночою неплідністю у центрі уваги був лише епітелій різних ділянок матки.

Відомо, що тривала безсимптомна персистенція ПГ Золотистого стафілококу та інших бактерій асоційована з розвитком хронічних запальних захворювань суглобів та ЖКТ (16-18), крім того показано, що ПГ викликає модуляцію скоротливості ГМК інших органів, зокрема кишечника (19). Тож ми припустили, що ПГ модулює скоротливість невагітного міометрія. І неплідність жінок – носіїв Золотистого стафілококу, можливо, обумовлена саме порушенням характеру скоротливості матки таким чином, що запліднення або імплантація плідного яйця стають неможливими.

4.1 Амплітудно-кінетичні характеристики скорочень матки невагітних щурів в контролі та під впливом пептидогліканом

Перш за все ми дослідили амплітудно-кінетичні характеристики скорочень міометрія вагітних та невагітних щурів на тлі ПГ та в контролі.

Оскільки досліди проводились на смужках міометрія з попередньо видаленим шаром ендометрія, отримані нами результати вказали на те, що модульовальний ефект ПГ на скоротливість міометрія може бути обумовлена безпосередньою взаємодією ПГ клітинної стінки Золотистого стафілококу саме з елементами міометрія. Тобто ПГ викликає стимулювання скоротливості міометрія може бути не тільки опосередковане цитокінами, що синтезуються в ендометрії у відповідь на контакт з ним, як описувалося раніше.

Вивчення дії ПГ на скорочувальну активність міометрія щурів показало, що він модифікує спонтанну скоротливу активність ГМ міометрія невагітних і вагітних щурів. Він впливав на основні параметри, що характеризують скоротливу активність матки (силу, частоту і тривалість маткового циклу), в тому числі й на базальний тонус. Отже результати наших експериментів показали, що

ПГ модулює скоротливу активність міометрія вагітних та невагітних щурів і його ефект може реалізуватися навіть за умови відсутності ендометрія.

Відповідно до наших результатів ПГ збільшував матковий цикл у вагітних і у невагітних тварин за рахунок тривалості скорочень і пауз між ними. А отже частота скорочень в обох групах тварин на тлі ПГ зменшувалась.

На тлі ПГ зростала площа під кривою скорочення міометрія в обох групах тварин. Зростання відбувалось за рахунок середньої амплітуди, так і тривалості скорочень. Відмінність полягала в тому, що в групі невагітних тварин збільшувалась переважно тривалість скорочень міометрія, а зміна середньої амплітуди була не дуже значною. А в групі вагітних тварин – навпаки: збільшувалась головним чином середня амплітуда маткових скорочень, в той час як їхня тривалість змінювалась менш помітно.

У вагітних та невагітних щурів ПГ неоднаково змінював також фази поодинокого скорочення. У невагітних тварин на тлі дії ПГ тривалість систоли скорочення стала на 10,9% довше, ніж в контролі. А от розслаблення смужки міометрія на відбувалось на 20% повільніше, а тривало на 56,7% довше, ніж в контролі.

Дещо по-іншому ПГ впливає на спонтанну скорочувальну активність міометрія вагітних тварин. Характерною рисою дії ПГ на ГМ матки вагітних щурів є виражене посилення спонтанної скорочувальної активності. Не дивлячись на те, що амплітуда спонтанних скорочень міометрія вагітних щурів в середньому була менша, ніж невагітних, стимулювальний ефект ПГ саме на амплітуду був найбільш вираженим. У вагітних щурів під дією ПГ середня амплітуда скорочень міометрія зросла на 10% більше, ніж у невагітних. Через те, що збільшення середньої тривалості скорочень міометрія на тлі дії ПГ у невагітних щурів була майже в два рази більшою, ніж у вагітних, площа під кривою скорочення міометрія на тлі дії ПГ в обох групах майже не відрізнялась. ПГ збільшив тривалість всіх фаз спонтанного скорочення міометрія як вагітних, так і

невагітних щурів. В обох групах тварин він спричинив значне подовження фази розслаблення по відношенню до систоли скорочення та тонічного компоненту.

Крім того ПГ в обох групах тварин спричинив подовження маткового циклу за рахунок збільшення тривалості скорочень та пауз між ними, зниження частоти скорочень за 10 хв та деяке зниження базального тону.

Відмінним був ефект ПГ на швидкісні характеристики скорочення. У групі невагітних тварин ПГ не впливав на максимальну швидкість скорочення, але дещо зменшував максимальну швидкість розслаблення. Співвідношення приросту швидкості досягнення максимального розслаблення та приросту швидкості досягнення максимального скорочення, відповідно до патенту Б.І. Лаптева та ін.(106), свідчить про позитивний інотропний ефект ПГ на міометрій, що пов'язаний з активацією входу кальцію в міоплазму через сарколему та вивільненням його із СР, але головним чином шляхом трансмембранного входу кальцію. А от в групі вагітних тварин співвідношення приросту швидкостей максимального розслаблення та скорочення свідчить про те, що підвищення рівня внутрішньоклітинного кальцію відбувається переважно шляхом трансмембранного кальцієвого входу.

Таким чином, дослідивши амплітудно-кінетичні характеристики скорочень міометрія вагітних та невагітних щурів, проаналізувавши структурні зміни та швидкісні характеристики скорочень на тлі ПГ та в контролі, ми прийшли до висновку, що ПГ модулює спонтанні скорочення як вагітних, так і невагітних щурів, спричинюючи переважно стимулювальний ефект. На тлі ПГ не тільки підвищується маткова активність та інтенсивність скорочень міометрія, але й змінюється їхня структура. Зокрема, результати експериментів показали, що аплікація ПГ спричинює швидке скорочення та повільне й довге розслаблення гладеньком'язової смужки.

Наступним завданням було з'ясувати, чи має модулювальна дія ПГ на маткову скоротливість міогенну природу, тобто чи вона обумовлена впливом

саме на ГМК міометрія або ж ця дія лише обумовлена з ендотеліоцитами кровоносних судин та тканинними базофілами, що в незначній кількості можуть бути присутні в товщі міометрія. З цією метою було проведено ряд експериментів на свіжоізольованих ГМК міометрія невагітних щурів, що показали транзйентне збільшення внутрішньоклітинного рівня Ca^{2+} в ГМК міометрія у відповідь на аплвкацію ПГ.

Отже на основі даних отриманих в експериментах з гладеньком'язовими смужками ми припустили, що властивість ПГ модулювати скоротливість міометрія обумовлена спричиненою ним зміною внутрішньоклітинного рівня кальцію. Такі результати корелюють з даними літературних, відповідно яким саме підвищення внутрішньоклітинного рівня кальцію є тригером маткових скорочень.

4.2. Вплив пептидоглікану на кальцієву сигналізацію ГМК міометрія невагітних щурів

Результати наших досліджень на свіжоізольованих ГМК показали, що ПГ викликає збільшення внутрішньоклітинного рівня кальцію шляхом взаємодії з самим ГМК, а не тільки опосередковано через вплив на імунокомпетентні клітини, прозапальні цитокіни яких вже модулюють скорочення, як вважалося раніше.

Такі результати корелюють з літературними даними, відповідно яким компоненти клітинної стінки Золотистого стафілококу можуть впливати на механізми перерозподілу іонів кальцію в клітинах внаслідок впливу на його потенціал- і рецепторкерованийий шляхи надходження, функціонування внутрішньоклітинного кальцієвого депо, а також модифікувати білки скоротливого апарату гладеньких м'язових клітин шлунково-кишкового тракту (86).

З'ясувавши міогенну природу впливу ПГ на скоротливість міометрія, ми перевірили, чи буде впливати ПГ на скорочення ГМК, індуковане гіперкалієвим

розчином Кребса. Відомо, що в ГМК міометрія у відповідь на деполяризацію мембрани до -40 мВ виникає потенціал дії та відкриваються потенціал-керовані кальцієві канали та внутрішньоклітинна концентрація йонів кальцію збільшується. Деполяризація може відбуватися як спонтанно, так і під дією гормонів або інших біологічно активних речовин, що зв'язуються зі своїм рецептором та спричинюють відкриття неспецифічних катіонних каналів (132). А основним тригером маткових скорочень є збільшення рівня внутрішньоклітинного кальцію (133).

На тлі гіперкалієвого розчину Кребса ($[K^+]_i = 60$ мМоль/л) ПГ спричинив ще більшу стимуляцію скорочень міометрія і ми припустили, що ПГ міг вплинути на внутрішньоклітинний рівень Ca^{2+} шляхом його вивільнення із внутрішньоклітинного депо.

Серія експериментів з аплікацією ПГ на тлі безкальцієвого розчину Кребса показала, що навіть за умов відсутності позаклітинного кальцію ПГ протягом кількох хвилин викликає фазні скорочення м'язової смужки. Такі результати підтвердили нашу гіпотезу про ПГ-викликане вивільнення кальцію з СР.

Розрізняють інозитолтрифосфат-чутливе та ріанодин чутливе внутрішньоклітинне кальцієве депо. Однак оскільки відомо, що стимуляція ріанодинових рецепторів ГМК міометрія не впливає на скорочення матки (134), ми дослідили тільки інозитолфосфатне.

В наших експериментах прикладання блокатора IP_3 -рецепторів повністю припинило скорочення міометрія, а ПГ не відновило їх. Такі результати підтвердили нашу гіпотезу про активацію ПГ інозитолтрифосфатного шляху викиду Ca^{2+} із внутрішньоклітинного депо.

Інозитолтрифосфатний викид кальцію із СР може ініціювати ємнісний або депо-керований вхід кальцію. При цьому механізмі внаслідок дії певних речовин активуються 1,4,5-інозитолтрифосфат рецептори, це спричинює вивільнення кальцію із внутрішньоклітинного депо, переважно саркоплазматичного ретикулуму, а наступне певне підвищення рівня внутрішньоклітинного кальцію

спричинює відкривання депо-керованих неспецифічних йонних каналів. Ще в 2000-х роках Trife показала ємнісний вхід кальцію при спустошенні СРА-чутливого кальцієвого депо в умовах заблокованих потенціалкерованих кальцієві каналів L-типу (133). Інозитолтрифосфат-опосередковане вивільнення кальцію з саркоплазматичного ретикулуму є основним фактором, що обумовлює такий мембранний потенціал, при якому виникає потенціал дії та відкриваються потенціал-керовані кальцієві канали. Зокрема з таким механізмом пов'язують окситоцин-викликане скорочення міометрія (132).

Інозитолтрифосфат (IP_3) утворюється шляхом розщеплення G-білок спряженою фосфоліпазою C фосфатиділіносітол 4,5-бісфосфату ($PI\ 4,5-P_2$) до гліцеролу та внутрішньоклітинного посередника інозитол-1,4,5-трисфосфату, який, у свою чергу, регулює процес вивільнення Ca^{2+} з СР у цитозоль ГМК [18¹³⁵].

Описаний ще один механізм збільшення внутрішньоклітинного рівня кальцію в міоцитах. Механізм відомий як кальцій чутливий вихід кальцію, при якому збільшення рівня внутрішньоклітинного кальцію сенситизує кальцієві канали СР та спричинює викид кальцію (132) через ріанодинові рецептори. Цей механізм був показаний для маткових скорочень під час вагітності, але виявився незначущим для скоротливості невагітної матки (135).

Для того, щоб перевірити інозитолтрифосфатний шлях вивільнення кальцію із СР ми аплікували блокатор IP_3 -рецептора, під дією якого маткові скорочення припинились, а прикладання ПГ на цьому тлі не відновило скоротливість. Такі результати доводять участь саме цієї ланки вивільнення кальцію із внутрішньоклітинного депо при аплікації ПГ.

Блокатор потенціал-керованих кальцієвих каналів ніфедипін усував індуковані ПГ скорочення неміометрія вагітних щурів.

Таким чином експериментальні дані, одержані нами показали, що в основі модуляції маткової скоротливості ПГ є підвищення внутрішньоклітинного рівня

кальцію шляхом його вивільнення із інозитол-чутливого кальцієвого депо, посилення трансмембранного входу через потенціал-керовані кальцієві канали L-типу та, можливо, через депо-керовані неспецифічні йонні канали. Блокатор IP3 так само, як блокатор потенціал-керованих кальцієвих каналів L-типу усував стимулювальну дію ПГ та повністю розслабив міометрій невагітних щурів.

Виявивши, що механізм стимуляції ПГ маткової скоротливості невагітного щура передбачає збільшення внутрішньоклітинного рівня Ca^{2+} шляхом одночасного посилення трансмембранного Ca^{2+} зовні та вивільнення із ріанодинчутливого СР, ми припустили, що під час вагітності, блокатори IP3-рецепторів та потенціалкерованих каналів L-типу так само усуватимуть дію ПГ, як і в разі невагітної матки. Одержані експериментально результати підтвердили нашу думку. Тким чином, нами було показано, що індуковане ПГ посилення маткової скоротливості під час вагітності можна корегувати не тільки шляхом впливу на циклооксигеназну сигнальну систему, але й через вплив на кальцієвий транспорт в ГМК міометрія.

4.3 Блокування циклооксигенази-2

Відомо, що під час вагітності ефект ПГ реалізується через його зв'язування з TL-2 рецепторами, внаслідок чого збільшується секреція ядерного фактора $\kappa\beta$ та наступна активація циклооксигенази-2 (COX-2). Остання каталізує синтез прозапальних цитокінів та простагландинів E2 та F2 α , внаслідок чого розвивається запальна реакція та стимулюється скоротливість міометрія (20-21).

Крім того, відомо, що естроген та прогестогени мають властивість пригнічувати секрецію ядерного фактора $\kappa\beta$ (22), який в класичному сигнальному шляху активації TLR-2 під час вагітності передуює активації COX-2. Як показали результати серії експериментів з гормональними моделями, ПГ мав дещо пригнічувальну дію на скоротливість міометрія щурів з високими рівнями як естрогенів, так і прогестерону.

Враховуючи вищеописане, ми дослідили, чи задіяний циклооксигеназний шлях у механізмі дії ПГ на скоротливість міометрія вагітних щурів. У відповідь на прикладання блокатора COX-2 петидоглікан-індукована скоротливість міометрія вагітних щурів, як і очікувалось, пригнічувалась. Натомість скорочування міометрія вагітних щурів на тлі ПГ після прикладання німесулід (блокатора COX-2) ніяк не змінились. Це свідчить, вочевидь, про те, що циклооксигеназний шлях не задіяний в механізмі дії ПГ на скоротливість міометрія вагітних щурів.

В наших експериментах блокатор COX-2 німесулід усував стимулювальну дію ПГ на скоротливість міометрія вагітних щурів. Такий результат був очікуванім, оскільки в сучасній науковій літературі широко освітлюється питання дії ПГ на скоротливість міометрія під час вагітності шляхом взаємодії з TLR-2 (41-44). Зв'язування останніх зі своїм лігандом запускає ряд внутрішньоклітинних процесів, ключовим з яких є посилення секреції ядерного фактору- κ B, IL-1 β та TNF та подальшу активацію циклооксигенази-2 (COX-2).

COX-2 в ГМК матки каталізує синтез прозапальних простагландинів з арахідонової кислоти (171), в тому числі простагландину E2 та F2 α , які, власне, й спричинюють активацію маткової скоротливості (95-96).

Підвищення експресії та активація COX-2 асоційовані з розвитком запального процесу (119) та ініціюють проліферацію й ріст клітин та ангіонеогенез (120). В тканинах вагітної матки COX-2 експресується й незалежно від інфекційних агенів. Було показано, що експресія та активність COX2 у вагітній матці тим вище, чим більше термін вагітності (121).

TLR-2 найкраще досліджені під час вагітності оскільки збільшення їхньої експресії та участь в ініціації запального процесу в міометрії тісно пов'язані зі стимуляцією маткового скорочення. Існує пряма залежність між експресією TL-2 рецепторів під час вагітності та терміном гестації. Найбільша щільність цих рецепторів спостерігається безпосередньо перед початком пологів. (81, 63). В

основі пологів, в тому числі передчасних, лежить запальний процес, що охоплює міометрій, плаценту, плодові оболонки (122-124).

Численні дослідження показали, що на початку як фізіологічних, так передчасних пологів, особливо при наявності внутрішньоматкової бактеріальної інфекції, відбувається інфільтрація міометрія, плаценти та плодових оболонок нейтрофілами, макрофагами, Т-лімфоцитами та натуральними кіллерами (67, 69, 70, 29), яка спричинює місцеве вироблення хемокінів та прозапальних цитокінів IL-1 β , IL-6, IL-8 та TNF- α (71). Останні в свою чергу призводять до синтезу простагландинів в міометрії (72, 125), внаслідок чого відбуваються морфологічні зміни шийки матки, розрив плодового міхура, стимуляція скоротувальної активності міометрія (73-74). Синтез IL-1 β та TNF, спричинений активацією ядерного фактору $\kappa\beta$ (NF- $\kappa\beta$) ендogenous або екзогенними факторами (в тому числі агоністами Toll-рецепторів), викликає активацію циклооксигенази-2 (COX-2) - фермента, під дією якого відбувається вироблення простагландинів та посилення скоротливості міоцитів матки (20, 21). Цитокіни в децидуальних клітинах виробляються також у відповідь на дію таких чинників як зниження концентрації прогестерону в крові, дію бактерій та структурних компонентів їхньої клітинної стінки, зокрема, ПГ (18, 10). Причому подібна картина спостерігається як при неускладнених пологах, так і при наявності діагностованого хоріоамніоніту (33, 17, 18, 39,40).

Отже нашою задачею в цьому розділі було визначити, чи однакові клітинні процеси відбуваються при дії ПГ на міометрій вагітних та невагітних щурів та чи усуває COX-2 ефект ПГ на скоротливість міометрія невагітних щурів.

COX-2 експресуються в ГМК невагітної матки (126), проте результати наших експериментів показали, що блокатор COX-2 німесулід не усував стимулювальний ефект ПГ, а це означає, що циклооксигеназний сигнальний каскад не бере участі в механізмі дії ПГ на міометрій невагітних щурів.

Однією з характерних особливостей імуномодуляторів бактеріального походження є здатність ініціювати клітинну відповідь незалежно від TLRs і NOD механізмів. Так, наприклад, мураміддипептид може викликати виражену нейрофармакологічну дію, яка опосередкована прямою активацією серотонінових рецепторів нервової та м'язової тканин. Даний ефект ПГ розглядають як побічну дію. (116-118). Не можна виключати і можливості активації продуктом його деградації мураміддипептидом певних підтипів метаботропних серотонінових рецепторів ГМК міометрія, що призводитиме до змін характеру скорочувальної активності матки естрогенізованих або «псевдовагітних» тварин.

4.4. Амплітудно-кінетичні параметри скорочень міометрія естрогенізованих та «псевдовагітних» щурів під дією пептидоглікану.

Дані, отримані в ході експериментів з різними рівнями естрогену та прогестерону дозволили розширити уявлення про спектр фізіологічної активності ПГ Золотистого стафілококу. Вивчено вплив ПГ на скоротливу активність гладеньких м'язів матки естрогенізованих самок щурів і щурів з модельною «псевдовагітністю». Показано, що ПГ здатний модулювати скоротливу активність гладеньких м'язів міометрія щурів в обох випадках. Однак характер скоротливості буде варіювати в залежності від того, який гормон переважає в організмі тварини. Очевидно, що саме рівень статевих гормонів визначає особливості скорочувальної відповіді міометрія на дію ПГ Золотистого стафілококу та сприяє формуванню того чи іншого варіанту скоротливості.

Результати експериментів показали, що характер впливу ПГ Золотистого стафілококу на скорочувальну активність міометрія щурів знаходиться в залежності від гормонального стану тварин. Так, у естрогенізованих щурів ПГ гальмував спонтанну скоротливу активність ГМ міометрія за рахунок зменшення тривалості скорочення і збільшення тривалості маткового циклу. У протипагу цьому він підсилював скоротливість ГМ міометрія «псевдовагітних» щурів за рахунок зростання частоти і амплітуди скорочень,

зменшення тривалості маткового циклу. Ці зміни в скоротливості ГМК міометрія будуть підсилюватися зі збільшенням терміну «псевдовагітності».

4.5. Вплив пептидоглікану клітинної стінки Золотистого стафілококу на механізми регуляції аденілатциклазною сигнальною системою скорочувальної активності міометрія щурів

В попередніх розділах ми досліджували дію пептидоглікану на скорочувальну активність міометрія при різних гормональних станах щурів. Отримані результати привели нас до висновку про гормональну обумовленість досліджуваного ефекту.

Естрогени, прогестерон та простагландин F_{2α} взаємодіють на клітину - мішень через зв'язування із специфічними рецепторами: естрогенові, прогестеронові або ж простагландинові. Всі вказані рецептори є метаботропними, тобто такими, що здійснюють свою специфічну дію на клітину шляхом впливу на її метаболізм (163).

Функцією метаботропних рецепторів є сприйняття і передача усередину клітини сигналів від різних стимулів, в тому числі й від гормонів й інших біологічно активних речовин, шляхом взаємодії з гетеротримерним сигнальним G-білком (163).

Оскільки дія пептидоглікану на скоротливість міометрія виявилась в прямій залежності від основного гормонального фону, ми вважаємо доцільним дослідити роль сигнального шляху метаботропних рецепторів, тобто G-білок-зв'язаний сигнальний шлях, та роль субодиниць G-білку для механізму дії пептидоглікану на скоротливість міометрія.

При активації G-білку її субодиниці здатні модулювати функції фосфоліпаз, фосфодіестераз, аденілатциклаз та йонних каналів.

Аденілатциклази задіяні в один з механізмів розслаблення міометрія. Їхнє значення полягає в утворенні в міоцитах матки цАМФ - розчинного внутрішньоклітинного вторинного посередника, що регулює кальцієвий

транспорт. Вважається, що цАМФ спричиняє розслаблення міометрія шляхом пригнічення як мобілізації кальцію, так і самого скоротливого апарату міоциту.

Рівень цАМФ в міоцитах матки не постійний. Експресія аденілатциклази в міоцитах міометрія при настанні вагітності збільшується порівняно з ГМК невагітної матки та прогресивно росте із збільшенням терміну гестації. Це є одним із механізмів підтримування матки у розслабленому стані під час вагітності. На 21 день гестації щура кількість внутрішнього пртеїну аденілатциклази різко зменшується та тримається на такому ж рівні наступного дня. Після чого починаються пологи. Тобто зменшення рівня аденілатциклази в ГМК матки є передумовою передпологової активації скоротливості міометрія (164).

Отже гормонально зумовлений рівень цАМФ може бути однією з причин описаних в попередніх розділах відмінностей в параметрах скорочень міометрія на тлі дії пептидоглікану в групах тварин з різним гормональним фоном.

Деякі G-білокспряжені рецептори можуть діяти і не через G-білки, а інші сигнальні молекули (163). Тому в нашій роботі, крім G-білокспряжених рецепторів та субодиниць G-білку, ми дослідили аденілатциклазу за допомогою її прямого активатора для описання механізму дії пептидоглікану на скоротливість міометрія.

Одним з потужних способів порушення функції клітини-хазяїна бактеріальними патогенами є зміна внутрішньоклітинної концентрації цАМФ. Ферменти, що беруть участь у кожному етапі метаболізму цАМФ, у тому числі Gs-, Gi/o-білки, аденілатциклаза та фосфодіестерази є мішенями для різних патогенів [24, 25].

Збільшення внутрішньоклітинного рівня цАМФ аденілатциклазою стимулює активність ПК-А, що приводитиме: 1) до фосфорилування легких ланцюгів міозину, знижуючи спорідненість цього ферменту до комплексу Ca²⁺-кальмодуліну; 2) активації Ca²⁺-задежних K⁺-каналів великої провідності або інактивації потенціалкерованих Ca²⁺-каналів; 3) фосфорилуванню K_{cho}-кінази тощо [3]. Врешті кожна з цих подій призводитиме до розслаблення міометрія. Враховуючи вищесказане, нами були проведені експерименти з метою дослідити

дію пептидоглікану на скоротливість міометрія за умов підвищеного внутрішньоклітинного рівня цАМФ у гладеньком'язових клітинах матки, яке не пов'язане з активацією зв'язаної з рецептором аденілатциклази.

Відповідно до сучасних поглядів [27] активація β -адренорецепторів, спряжених з Gs-білком, призводить до розслаблення міометрія, що обумовлено стимуляцією аденілатциклази та підвищенням внутрішньоклітинного рівня цАМФ. Цей фермент діє як вторинний посередник, здатний активувати протеїнкіназу-А (ПК-А) або ERAC-обмінні білки, що прямо активуються цАМФ. ПК-А відноситься до внутрішньоклітинних ферментів АЦС та каталізує процес фосфорилування по серину або треоніну цитоплазматичні мітогенактивовані протеїнкінази p38 (38 МАПК) або проникає в ядро і фосфорилує цАМФ-залежний транскрипційний фактор CREB (від англ. cAMP response element-binding protein), в той час як білки ERAC-1 і ERAC-2 додатково трансформують сигнали з залученням малих Ras-подібних ГТФаз. У клітинах міометрія підвищення внутрішньоклітинного вмісту цАМФ, в залежності від гормонального статусу тварини, може призводити до МАПК-залежного збільшення експресії циклооксигенази-2 та синтезу простагландинів E2, I2 та F2 α .

АЦС являє собою ферментний каскад, що забезпечує сприйняття, проведення і перетворення гормональних сигналів. Цей сигнальний каскад є основним механізмом дії великої групи гормонів і біологічно активних речовин. До АЦС входить комплекс, що локалізований в плазматичній мембрані клітини. Він складається з функціональних блоків трьох типів: мембранних рецепторів (рецепторний компонент), ГТФ-зв'язуючих білків (G-білків) і власне АЦ (каталітичний компонент), кожен з яких представлений в клітині різними підтипами або ізоформами. Gs, Go та Gi підродини G-білків виступають у якості ланки, яка є сполучником між активованим рецептором і АЦ, відповідальної за зміну концентрації циклічного аденозинмонофосфату (цАМФ) в клітині. Гормональні рецептори, що спряжені з Gs-, Go- та Gi-білками, можуть змінювати аденілатциклазну активність через взаємодію вивільнених α - та $\beta\gamma$ -субодиниць з циклазою. Всі ізоформи АЦ активуються α субодиницею Gs-білка (Gas) і

більшість з них безпосередньо активується дитерпеном форсколіном, але гальмуються α субодиноцею родини $G_{ai/o}$ -білків і $\beta\gamma$ -субодиноцею G-білка ($G\beta\gamma$). Головне призначення АЦС полягає в синтезі цАМФ, який виконує функцію вторинного посередника в реалізації регуляторного впливу гормонів. До внутрішньоклітинних ферментів АЦС також відноситься цАМФ-залежна протеїнкіназа (ПК-А), яка каталізує процес фосфорилування по серину або треоніну широкого кола ефекторних білків у клітині, що призводить до зміни їх функцій. У міометрії активність АЦ індукується ендogenousними агоністами (катехоламіни, простагландини тощо) при активації β_2 -адренорецепторів і рецепторів до простагландина E₂, які спряжені з G_s-білком. Також відомо, що нейропептиди, такі як кальцитонін гензв'язаний пептид, адреномедулін і амелін можуть діяти через пептидний рецептор спряжений з G_s-білком [4].

Відома здатність порушення функції клітини-хазяїна бактеріальними патогенами шляхом зміни внутрішньоклітинної концентрації цАМФ - вторинного месенджера, що проявляє плейотропні властивості та має важливе значення для багатьох клітинних процесів. Ферменти, що беруть участь у кожному етапі метаболізму цАМФ, у тому числі G_s-, G_{i/o}-білки, аденілатциклаза та фосфодіестерази є мішенями для різних патогенів [1, 15].

Одним з механізмів регуляції маткового тону є стимуляція α_2 - та β_2 -адренорецепторів катехоламінами. В матці представлені обидві субпопуляції адренорецепторів, дія яких обумовлена регуляцією активності аденілатциклази. А саме, стимуляція β_2 -адренорецепторів катехоламінами або простагландинових рецепторів – простагландинами. Внаслідок цього активується мембранний G-білок та фермент аденілатциклаза. Останній каталізує перетворення АТФ в АМФ та цАМФ, який, в свою чергу, активує цАМФ- залежну протеїнкіназу А (ПК-А). А вона фосфорилує цитоплазматичні р38 мітогенактивовані протеїнкінази (р38 МАПК) або проникає в ядро і фосфорилує цАМФ-залежний транскрипційний фактор CREB (від англ. cAMP response element-binding protein). Крім того, β_2 -адренорецептори (за високих концентрацій β -агоністів) можуть активувати клітинну відповідь незалежним від G_s-білока шляхом, з залученням членів

невеликої родини білків - β -аррестинів. Ці білки функціонують як перетворювачі сигналу, єднаючи β -адренорецептори до декількох сигнальних ланок, таких як p38 і ERK (кіназа, що регулює внутрішньоклітинні сигнали), МАПК та ядерного фактору- κ B. У клітинах міометрія підвищення внутрішньоклітинного вмісту цАМФ, в залежності від гормонального статусу тварини, може призводити до МАПК-опосередкованого збільшення експресії циклооксигенази-2 та синтезу простагландинів E2, I2 та F2 α (105).

Крім того, протеїнкіназа-A фосфорилує кіназу легкого ланцюга міозину, знижуючи його спорідненість до комплексу кальцій-кальмодулін. Так відбувається пригнічення скоротливого апарату ГМК міометрія, результатом чого є розслаблення міометрія (127). При стимуляції α 2-адренорецепторів пригнічується аденілатциклаза. За умов нестачі розслаблюючого ефекту цАМФ міометрій скорочується. Причому один і той самий стимул при різних гормональних станах може викликати протилежні ефекти. Williams та ін показали, що епігенетичним ефектом прогестерону є значне зменшення щільності α 2-адренорецепторів, в результаті чого домінуючою стає дія β 2-адренорецепторів. Внаслідок цього стимули, які за відсутності прогестеронового ефекту викликали скорочення матки, тепер будуть викликати її розслаблення. А от естроген, навпаки, обумовлює збільшення експресії стимулюючих маткове скорочення α 2-адренорецепторів (128).

Отже, дослідження ролі аденілатциклазного сигнального шляху в механізмі дії ПГ на скоротливу активність міометрія ми почали з адренорецепторів. Враховуючи описану в літературних джерелах роль стероїдних гормонів в експресії адренорецепторів та їхньому спряженні з аденілатциклазою, наступну серію експериментів було проведено в групах тварин з підвищеним рівнем естрогену або прогестерону.

Результати експериментів показали, що ні α -, ні β 2-адренорецептори не беруть участі в механізмі дії ПГ в жодній із гормональних моделей.

В наших дослідженнях ПГ мав не стимулюючий, а навпаки, пригнічуючий вплив на скоротливість міометрія естрогенізованих тварин. Такі дані можна вважати ще одним свідченням того, що α -адренорецептори не задіяні в механізмі модуляції ПГ скоротливості міометрія.

Гетеротримерні регуляторні Gi-білки гальмівного класу теж можуть бути залучені у передачу внутрішньоклітинних сигналів від мікробних подразників. Відомо, що ліпополісахариди здатні прямо активувати G α i-білки (129, 130), а G α i2-білки є важливим негативним регулятором запалення (131). Активація Gi-білка трансформуючим фактором росту- β активує ERK 1/2, яка, блокуючи ядерний фоктор-кВ і p38 сигналізацію, пригнічує ліпополісахаридіндуковану запальну реакцію.

Активація Gs-білка за допомогою холерного токсину не впливала на утеротонічні властивості ПГ. За таких умов слабо виражена спонтанна скорочувальна активність міометрія невагітних щурів під впливом ПГ зростала в середньому у 3 рази, відносно контролю (рис. 3.4.7). Цікаво, що прикладання простагландину F2 α теж призводило до активації скоротливості, яку ПГ дещо підсилював. Такий ефект був обумовлений зниженням базального тонусу міометрія. Відновлення простагландином F2 α скорочувальної активності гладеньких м'язів матки, попередньо оброблених холерним токсином, відбувався, очевидно, за рахунок кальційіндукованого пригнічення активності аденілатциклаз (114) а дія ПГ за цих умов, можливо, обумовлена іншим механізмом.

Навпроти, за умов інактивації Gi/o-білків кашлюковим токсином ПГ втрачав здатність активувати скорочення міометрія на тлі дії сальбутамолу та форсколіну. Отже, за умов інактивації Gi/o-білків кашлюковим токсином ПГ не виявив стимулювальних властивостей. Останнє свідчить про здатність ПГ прямо чи опосередковано активувати саме цей клас G-білків, що призводить до пригнічення активності аденілатциклаз міометрія.

Проведені дослідження показали, що ПГ не впливає на механізми розслаблення гладеньких м'язів матки активованими підвищенням рівня цАМФ в гладеньком'язових клітинах міометрія.

Таким чином, зроблено висновок, що зміни в скоротливій активності смужок міометрія щурів агоністом TLR-2 ПГ клітинної стінки Золотистого стафілокока зумовлені збільшенням функціональної активності Gi-білка.

Отже ми зробили висновок, що стимулювальна дія ПГ на скоротливу активність міометрія обумовлена активацією Gi-білка, яка пригнічує аденілатциклазу. Таким чином, обробка смужок міометрія щурів, що піддавалися естрогенізації, агоністом TLR-2 ПГ клітинної стінки золотистого стафілококу призводить до збільшення функціональної активності Gi-білка.

Висновки

У дисертаційній роботі досліджено дію пептидоглікану на скоротливу активність міометрія вагітних щурів та міометрія щурів за умов різних гормональних фонів. Визначено характер змін амплітудно-кінетичних показників скорочень міометрія, що спричинює пептидоглікан у кожній групі тварин. Показано ефект пептидоглікану на свіжоізольовані ГМК міометрія інтактних щурів. Розглянуто питання щодо взаємозв'язку пептидоглікану з кальцієвою сигналізацією ГМК міометрія та аденілатциклазною системою.

1. Пептидоглікан модулює скоротливу активність міометрія вагітних, та невагітних щурів, впливаючи на всі амплітудно-кінетичні параметри.
2. Модулювальна дія пептидоглікану на скоротливість міометрія як вагітних, так і невагітних щурів може бути обумовлена прямою взаємодією з самим міометрієм, а не тільки опосередкована імунокомпетентними клітинами ендометрія та децидуальної оболонки, як вважалося раніше.
3. Характер змін параметрів скорочень міометрія на тлі пептидоглікану гормонзалежний і відрізняється у тварин з гіперестрогеновим та підвищеним прогестероновим фоном, у інтактних невагітних та вагітних тварин. У естрогенізованих тварин ПГ має пригнічувальну дію на скорочення міометрія, а в інших трьох групах – стимулювальну.
4. У невагітних щурів, на відміну від вагітних, циклооксигеназа-2 не задіяна в механізмі модуляції пептидогліканом скоротливості міометрія.
5. В умовах заблокованого кашлюковим токсином Gi/o-білка пептидоглікан не стимулює ні спонтанні, ні простагландиніндуковані скорочення міометрія невагітних щурів.
6. Пептидоглікан викликає підвищення цитозольної концентрації кальцію і міоцитах міометрія шляхом вивільнення його з IP₃-чутливого кальцієвого депо саркоплазматичного ретикулуму, посилення трансмембранного входу кальцію через потенціал-керовані кальцієві канали L-типу та, можливо, через депо-керовані йонні канали цих клітин.

7. Стимулювальна дія пептидоглікану на ГМК смужки від вагітних щурів усувається не тільки блокатором COX-2, як вважалося раніше, але й блокаторами IФ₃-рецепторів та потенціал-керованих кальцієвих каналів L-типу.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Liyun Shi, Huanhuan Wang and Zhe Lu. "Staphylococcal Infection and Infertility". Submitted: October 5th 2015Reviewed: February 23rd 2016Published: June 29th 2016
2. Sham LT, Butler EK, Lebar MD, Kahne D, Bernhardt TG, Ruiz N. " Bacterial cell wall. MurJ is the flippase of lipid-linked precursors for peptidoglycan biogenesis". *Science* 11.345.(2014): 220-2.
3. Bertsche U, Mayer C, Götz F, Gust AG. "Peptidoglycan perception--sensing bacteria by their common envelope structure". *Int J Med Microbiol.* 305.2 (2014):217-23.
4. Wheeler R, Chevalier G, Eberl G, Gomperts Boneca I. "The biology of bacterial peptidoglycans and their impact on host immunity and physiology". *Cell Microbiol.* 16.7 (2014):1014-23.
5. Thomas B Clarke, Kimberly M Davis, Elena S Lysenko, Alice Y Zhou, Yimin Yu, Jeffrey N Weiser. "Recognition of peptidoglycan from the microbiota by Nod1 enhances systemic innate immunity". *Nat Med* 16 (2010): 228–231
6. Abrahams VM, Potter JA, Bhat G, Peltier MR, Saade G, Menon R. "Bacterial modulation of human fetal membrane Toll-like receptor expression". *Am J Reprod Immunol.* 69 (2013): 33–40.
7. Chen C, Zibiao H, Ming Z, Shiyi C. "Expression pattern of Toll-like receptors (TLRs) in different organs and effects of lipopolysaccharide on the expression of TLR 2 and 4 in reproductive organs". *Dev Comp Immunol.* 46.2 (2014):341-8.
8. Csapo A, Sauvage J. "The evolution of uterine activity during human pregnancy. *Acta Obstet Scand*". 47.2 (1968):181-212.
9. Dasu MR, Riosvelasco AC, Jialal I. "Candesartan inhibits Toll-like receptor expression and activity both in vitro and in vivo". *Atherosclerosis.* 202 (2009): 76–83.
10. Zhao L-Q, Huang J-L, Yu Y, Lu Y, Fu L-J, Wang J-L, et al. "Candesartan inhibits LPS-induced expression increase of toll-like receptor 4 and downstream

inflammatory factors likely via angiotensin II type 1 receptor independent pathway in human renal tubular epithelial cells". *Sheng Li Xue Bao*. 65(2013): 623–30.

11. Lyon D, Cheng C-Y, Howland L, Rattican D, Jallo N, Pickler R, et al. "Integrated review of cytokines in maternal, cord, and newborn blood: part I—associations with preterm birth". *Biol Res Nurs*. 11(2010): 371–376.

12. Ratana Lim, Gillian Barker, Martha Lappas: "The TLR2 Ligand FSL-1 and the TLR5 Ligand Flagellin Mediate Pro-Inflammatory and Pro-Labour Response via MyD88/TRAF6/NF- κ B-Dependent Signalling". *Am J Reprod Immunol*. 71.5(2014):401-17.

13. Ryan S Doster 1, Leslie A Kirk 1, Lauren M Tetz 1, Lisa M Rogers 1, David M Aronoff 1, Jennifer A Gaddy . "Staphylococcus aureus Infection of Human Gestational Membranes Induces Bacterial Biofilm Formation and Host Production of Cytokines". *J Infect Dis*. 15.215.4(2017): 653-657.

14. Ghiasi M, Fazaeli H, Kalhor N, Sheykh-Hasan M, Tabatabaei-Qomi R. "Assessing the prevalence of bacterial vaginosis among infertile women of Qom city". *Iran J Microbiol*. 6(2014):404–408

15. Muhammad Anas, Wayan Arsana Wiyasa et al. "Microorganism spectrum of nonspecific vaginitis in women of infertile couples recognized by s-IgA uterine cervix secretion". *Asian Pacific Journal of Reproduction*. 5.6 (2016):467-70.

16. Sorbara MT, Philpott DJ. "Peptidoglycan: a critical activator of the mammalian immune system during infection and homeostasis". 243.1(2011):40-60.

17. Kusunoki T, Hailman E, Huan TS, Lichenstein HS, Wright SD. "Molecules from Staphylococcus aureus that bind CD14 and stimulate innate immune responses". *J Exp Med*. 1.182.6(2016):1673-82.

18. Watanabe T, Asano N, Murray PJ, Ozato K, Taylor P, et al. "Muramyl dipeptide activation of nucleotide-binding oligomerization domain 2 protects mice from experimental colitis". *J Clin Invest* 118.2(2008) 545–559.

19. Watanabe N, Asano PJ, Murray K, Ozato P. "Muramyl dipeptide activation of nucleotide-binding oligomerization domain 2 protects mice from experimental colitis". *J Clin Invest*. 118.2(2008):545-59.

20. Davidovskaya T., Philyppov I, Tsymbalyuk O., Davidovskaya N, Miroshnichenko M, Shuba M. "Influence of Staphylococcus aureus active substance on the voltage operated Ca²⁺ channels of the smooth muscle cells and on the enzymatic activity on the smooth muscle enzymes". Abstract of the 3rd Meeting of the European Pharmacological Societes. 15.1. (2001):42.
21. Allport VC, Pieber D, Slater DM, Newton R, White JO, Bennett PR. "Human labour is associated with nuclear factor-kappa B activity which mediates cyclooxygenase-2 expression and is involved with the 'functional progesterone withdrawal". Mol Hum Reprod. ;7.6(2001):581-586.
22. Olson DM. "The role of prostaglandins in the initiation of parturition". Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol. 17(2009):717 – 730.
23. Y Chen, H Zhao, X Ren. " Estrogen and progesterone inhibit NF-κB in atherosclerotic tissues of ovariectomized ApoE (-/-) mice". Climacteric. 19.4(2016):357-63.
24. Young RC, Smith LH, McLaren MD. "T-type and L-type calcium currents in freshly dispersed human uterine smooth muscle cells". Am J Obstet Gynecol. 169(2013):785–792.
25. Rudakova EB, Mozhovoj SI, Pilipenko MA. "Chronic endometritis: from improving the diagnostic approach to optimize treatment". Lechaschii vrach. 10(2008):6-10[Russian].
26. Mohan AR, Sooranna SR, Lindstrom TM. "The effect of mechanical stretch on cyclooxygenase type 2 expression and activator protein-1 and nuclear kappa B activity in human amnion cells". Endocrinology. 148 (2007):1850-7.
27. Анкирская А.С., Муравьева В.В. Лабораторная диагностика оппортунистических инфекций влагалища // Consiliummedicum. 7.3(2006):206-210.
28. Jaiswal MK1, Agrawal V, Mallers T, Gilman-Sachs A, Hirsch E, Beaman KD.J Immunol. "Regulation of apoptosis and innate immune stimuli in inflammation-induced preterm labor". Dec 1.191.11(2013):5702-13.

29. Keski –Nisula LT, Aalto ML, Kirkinen PP, Kosma VM, Heinonen ST. "Myometrial inflammation in human delivery and its association with labour and infection. *Am J Clin Pathol*"120.2(2003):217-224.
30. Youssef RE, Ledingham MA, Bollapragada SS, O’Gorman N, Jordan F, Young A, Norman JE: "The role of toll-like receptors (TLR-2 and-4) and triggering receptor expressed on myeloid cells 1 (TREM-1) in human term and preterm labor". *Reprod Sci* 16(2009):843 –856.
31. Patni S, Wynen LP, Seager AL, Morgan G, White JO, Thornton CA: "Expression and activity of toll-like receptors 1-9 in the human term placenta and changes associated with labor at term". *Biol Reprod.* 80(2009):243 – 248.
32. Müller-Anstett MA, Müller P, Albrecht T, Nega M, Wagener J, Gao Q, et al. "Staphylococcal peptidoglycan co-localizes with Nod2 and TLR2 and activates innate immune response via both receptors in primary murine keratinocytes". *PLoS One.* 7.5(2010).
33. Hart KM, Murphy AJ, Barrett KT, Wira CR, Guyre PM, Pioli PA. "Functional expression of pattern recognition receptors in tissues of the human female reproductive tract". *J Reprod Immunol.* 80.1-2(2009):33-40.
34. Nienke Petronella Maria Kuijstersa, Willem Gerardus Methorsta, Madeleine Susanne Quirine Kortenhorsa, Chiara Rabottib, Massimo Mischib, Benedictus Christiaan Schoota, "Uterine peristalsis and fertility: current knowledge and future perspectives: a review and meta-analysis". 35.1(2017): 50–71.
35. Wang H, Hirsch E. "Bacterially-induced preterm labor and regulation of prostaglandin-metabolizing enzyme expression in mice: the role of Toll-like receptor 4". *Biol Reprod.*;69.6(2003):1957-1963.
36. Ilievski V, Lu SJ, Hirsch E: "Activation of toll-like receptors 2 or 3 and preterm d *Biol Reprod*". 835(2010):767-73.
37. Csapo A, Sauvage J. "Synergy between viral and bacterial toll-like receptors leads to amplification of inflammatory responses and preterm labor in the mouse.elivery in the mouse". *Reprod Sci.* 14(2007):315 – 320.

38. Zhang Y, Yang C, Fu S, Chen X, Zhang S, Li Y, Du M, Zhang J "Different expression of NOD2 in decidual stromal cells between normal and unexplained recurrent spontaneous abortion women during first trimester gestation".. *Int J Clin Exp Pathol.* 1.7.12(2014): 8784-90
39. King AE, Horne AW, Hombach-Klonisch S, Mason JI, Critchley HO. "Differential expression and regulation of nuclear oligomerization domain proteins NOD1 and NOD2 in human endometrium: a potential role in innate immune protection and menstruation". *Mol Hum Reprod.* 15.5(2009):311-9.
40. Kim YM, Romero R, Chaiworapongsa T, et al. "Toll-like receptor 2 and 4 in the chorioamniotic membranes in spontaneous labor at term and in preterm parturition that are associated with chorioamnionitis". *Am J Obstet Gynecol.* 191.4(2004):1346-1355.
41. Thota C, Farmer T, Garfield RE, Menon R, Al-Hendy A: "Vitamin D elicits anti-inflammatory response, inhibits contractile-associated proteins, and modulates Toll-like receptors in human myometrial cells". *Reprod Sci.* 20(2013):463 – 475.
42. O'Brien M, Morrison JJ, Smith TJ: "Upregulation of PSCDBP, TLR2, TWIST1, FLJ35382, EDNRB, and RGS12 gene expression in human myometrium at labor". *Reprod Sci.* 15(2008):382 –393.
43. Wang H, Hirsch E. "Bacterially-induced preterm labor and regulation of prostaglandin-metabolizing enzyme expression in mice: the role of Toll-like receptor 4". *Biol Reprod.*69.6(2003):1957-1963.
44. Loudon JA, Sooranna SR, Benett PR, Johnson MR. "Mechanical stretch of human uterine smooth muscle cells increases IL-8 mRNA expression and peptide synthesis". *Mol Hum Reprod.*10.12(2004):895-899.
45. Anchirskaja AS, Muraveva VV. "Laboratory diagnosis of opportunistic infections of the vagina. *Consilium medicum*".2006;7.3(2006):206-10[Russian].
46. Petersen EE, Magnani P. "Efficacy and safety of vitamin C tables in the treatment of non-specific vaginitis. A randomized, doubleblind, placebo-controlled study". *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 10;117.1(2004):70-5.

47. Melenevska NV, Miroshnichenko MS, Filippov IB, Kholodna LS, Shuba MF. "Effects of *Staphylococcus aureus* cell-bound protein A on adenosine triphosphate and nitric oxide inhibitory actions in smooth muscles" *Fiziol Zh.*52.1(2006):22-9[Ukrainian].
48. Mendz G, Kaakoush N, Quinlivan J. "Bacterial aetiological agents of intra-amniotic infections and preterm birth in pregnant women". *Front Cell Infect Microbiol.* 3(2013):58.
49. Blencowe H, Cousens S, Oestergaard MZ et al. "National, regional, and worldwide estimates of preterm birth rates in the year 2010 with time trends since 1990 for selected countries: a systematic analysis and implications". *Lancet.* 379(2012):2162–72.
50. Christiaens I, Zaragoza DB, Guilbert L, Robertson SA, Mitchell BF, Olson DM: "Inflammatory processes in preterm and term parturition". *J Reprod Immunol.* 79(2008):50–57.
51. Sorano S, Goto M, Matsuoka S et al. "Chorioamnionitis caused by *Staphylococcus aureus* with intact membranes in a term pregnancy: a case of maternal and fetal septic shock". *J Infect Chemother.* 22(2016):261–4.
52. Romero R, Mazor M. "Infection and preterm labor". *Clin Obstet Gynecol.* 31(1988):553-84.
53. Mac Dorman MF, Matheus TJ. "behind international rankings of infant mortality^ how the United States compares with Europe". *NCHS Data Brief*; 2009.p.1-8.
54. Shmygol A, Wray S. "Modulation of agonist-induced Ca release by SR Caload: direct SR and cytosolic Ca measurements in rat uterine myocytes". *Cell Calcium* 37(2005):215–23
55. Charlier C, Cretenet M, Even S, Le Loir Y. "Interactions between *Staphylococcus aureus* and lactic acid bacteria: an old story with new perspectives". *Int J Food Microbiol.* 131(2009):30–39.
56. Chen KT, Huard RC, Della-Latta P, Saiman L. "Prevalence of methicillin-sensitive and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in pregnant women". *Obstet Gynecol.*108(2006):482–487.

57. Matthew T. Sorbara Dana J. Philpott. "Peptidoglycan: a critical activator of the mammalian immune system during infection and homeostasis". *Immunological Reviews* 243(2011): 40–60.
58. MacKenzie LW, Cole WC, Garfield RE. "structural and functional studies of myometrial gap junctions". *Acta Physiol Hung.* 65.4(1985):461-72.
59. Schuffler H, Demircioglu DD, Kuhner D, Menz S, Bender A, Aunterieth IB, Bodammer P, Lamprecht G, Gotz F, Frick JS. "NOD2 stimulation by *Staphylococcus aureus*-derived peptidoglycane is boosted by Toll-like receptor 2 costimulation with lipoproteins in dendritic cells". *Infect Immun* 82(2014):4681-4688.
60. Muller-Anstett MA, Muller P, Albrecht T, Nega M, Wagener J, Gao Q, Kaesler S, Schaller M, Biedermann T, Gotz F. " *Staphylococcal* peptidoglycan co-localizes with Nod2 and TLR2 and activates innate immune response via both receptors in primary murine keratinocytes". *PLoS One.* 5(2010):e13153.
61. Hargreaves DC, Medzhitov R. "Innate sensors of microbial infection". *J Clin Immunol.* 2005;25(6):503-510.
62. Armant MA, Fenton MJ. "Toll-like receptors: a family of pattern-recognition receptors in mammals". *Genome Biology.* 3.8.(2002):1-6.
63. Li J. et al."Evolving bacterial envelopes and plasticity of TLR2-dependent responses: Basic research and translational opportunities". *Front Immunol.* 4(2013):347.
64. Santos-Sierra S. et al., 2009. "Mal connects TLR2 to PI3Kinase activation and phagocyte polarization". *EMBO.* 28.14(2009): 2018-2027.
65. Shynlova O, Tsui O, Dorogin A, Iye SJ. "Monocyte chemoattractant Protein-1 (CCL-2) integrates mechanical and endocrine signals that mediates term and preterm labour". *J Immunol.*181.2(2008):1470-1479.
66. Osman I, Young A, Ledingham MA, Thomson AJ, Jordan F, Greer IA. "Leucocyte density and pro-inflammatory cytokine expression in human fetal membranes, decidua, cervix and myometrium before and during labour at term". *Mol Hum Reprod.* 9.1(2003):41-45

67. Thomson AJ, Telfer JF, Young A, Campbell S, Stewart CJ, Cameron IT. "Leucocytes infiltrate the myometrium during human parturition: further evidence that labour is an inflammatory process". *Hum Reprod.* 14.1(1999):229-236.
68. Kelly RW. "Inflammatory mediators and parturition". *Rev Reprod.* 1.2(1996):89-96.
69. Keelan JA, Blumenstein M, Helliwell RJ, Sato TA, Marvin KW, Mitchell MD: "Cytokines, prostaglandins and parturition – a review". *Placenta* 24(2003)33 –46.
70. Keelan JA, Blumenstein M, Helliwell RJ, Sato TA, Marvin KW, Mitchell MD: Cytokines, prostaglandins and parturition—a review. *Placenta* 2003; 24(Suppl A):S33–S46
71. Orsi NM, Tribe RM. "Cytokine networks and the regulation of uterine function in pregnancy and parturition". *J Neuroendocrinol.* 20.40(2008):462-469.
72. Kayisli UA, Mahutte NG, Arici A. Uterine chemokines in reproductive physiology and pathology. *Am J Reprod Immunol.* 2002;47(4):213-221.
73. Keelan JA, Blumenstein M, Helliwell RJ, Sato TA, Marvin KW, Mitchell MD. "Cytokines, prostaglandins and parturition-a review". *Placenta.* 24(2003):33-46.
74. Montalbano AP, Hawgood S, Mendelson CR: "Mice deficient in surfactant protein A (SP-A) and SP-D or in TLR2 manifest delayed parturition and decreased expression of inflammatory and contractile genes". *Endocrinology* 154(2013):483 – 498.
75. Christiaens I, Zaragoza DB, Guilbert L, Robertson SA, Mitchell BF, Olson DM: "Inflammatory processes in preterm and term parturition". *J Reprod Immunol* 79(2008):50 – 57.
76. Y L Dong 1, P R Gangula, L Fang, C Yallampalli."Differential expression of cyclooxygenase-1 and -2 proteins in rat uterus and cervix during the estrous cycle, pregnancy, labor and in myometrial cells". *Prostaglandins.* 52.1(1996):13-34.
77. Jinshan Cao, Munenori Yosida, Takio Kitazawa, Tetsuro Taneike. "Uterine region-dependent differences in responsiveness to prostaglandins in the non-pregnant porcine myometrium". *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 75.1-4(2005):105-22.

78. Renthal NE, Chen CC, Williams KC, Gerard RD, Prange-Kiel J, Mendelson "CR. miR-200 family and targets, ZEB1 and ZEB2, modulate uterine quiescence and contractility during pregnancy and labor". *Proc Natl Acad Sc USA* 107(2010):20828-33.
79. Sakai N, Tabb T, Garfield RE. "Studies of connexin 43 and cell-to-cell coupling in cultured human uterine smooth muscle". *Am J Obstet Gynecol.* 167(1992):1267-77
80. Cicinelli E, Ballini A, Marinaccio M, Poliseo A, Coscia MF, Monno R, et al. "Microbiological findings in endometrial specimen: our experience". *Arch Gynecol Obstet.* 285(2012):1325–9
81. V Pinto, M Matteo, R Tinelli, PC Mitola, D De Ziegler. "Altered uterine contractility in women with chronic endometritis". *Fertil Steril.* 2015 Apr;103.4(2015):1049-52.
82. De Ziegler D, Bulletti C, Fanchin R, Epiney M, Brioschi PA. "Contractility of the nonpregnant uterus: the follicular phase". *Ann NY Acad Sci .* 943(2001):172–84.
83. Noe M, Kunz G, Herbertz M, Mall G, Leyendecker G. "The cyclic pattern of the immunocytochemical expression of oestrogen and progesterone receptors in human myometrial and endometrial layers: characterization of the endometrial-subendometrial unit". *Hum Reprod.* 14(1999):190–7.
84. Janicek F, Franova S, Nosalova G, Visnovsky J. "In vitro contractile response of human myometrium to oxytocin, PGF2alpha, bradykinin and ET-1". *Bratisl Lek Listy.* 108(2007):174 – 8.
85. Van Gestel I, IJland MM, Hoogland HJ, Evers JL. "Endometrial wave-like activity in the non-pregnant uterus". *Hum Reprod Update.* 9(2003):131–8.;
86. Oki T, Douchi T, Maruta K, Nakamura S, Nagata Y. "Changes in endometrial wave-like movements in accordance with the phases of menstrual cycle". *J Obstet Gynaecol Res.* 28(2002):176 – 81.

87. Callaghan WM, MacDorman MF, Rasmussen SA, Qin C, Lackritz EM: "The contribution of preterm birth to infant mortality rates in the United States". *Pediatrics*. 118(2006):1566 – 1573.
88. Thota C, Farmer T, Garfield RE, Menon R, Al-Hendy A: "Vitamin D elicits anti-inflammatory response, inhibits contractile-associated proteins, and modulates Toll-like receptors in human myometrial cells". *Reprod Sci* 2013; 20:463 – 475.
89. Tribe RM, Moriarty P, Dalrymple A, Hassoni AA, Poston L. interleikin-1 beta induces calcium transients and enhances basal and store operated calcium entry in human myometrial smooth muscle. *Biol Reprod*. 2003;68(5):1842-1849.
90. Ou CW, Orsino A, Lye SJ. "Expression of connexin-43 and Connexin-26 in the rat myometrium during pregnancy and labor is differentially regulated by mechanical and hormonal signals". *Endocrinology*. 138.12(1997):5398-2407.
91. Tyson EK, Macintyre DA, Smith R, Chan EC, Read M. "Evidence that a protein kinase A substrate, small heat-shock protein 20, modulates myometrial relaxation in human pregnancy". *Endocrinology* 149(2008):6157-65.
92. Victor P. Fomin, Blair E. Cox, and R. Ann Word. "Effect of progesterone on intracellular Ca²⁺ homeostasis in human myometrial smooth muscle cells". *Am J Physiol*. 276.2(1999):379-85.
93. Rachel M. Tribe. "Regulation of human myometrial contractility during pregnancy and labour: are calcium homeostatic pathways important?". *Experimental Physiology* 86.2(2001): 247–254
94. Bilge Pehlivanoglu , Sibel Bayrak, Murat Doğan "A close look at the contraction and relaxation of the myometrium; the role of calcium". *J Turk Ger Gynecol Assoc*. 14.4(2013):230-234
95. Mioshi H, Yamaoka K, Garifield RE, Ohama K. "Identification of a nonselective cation channel current in myometrial cells isolated from pregnant rats". *Pflugers Arch* 447(2004):457-464.
96. Mioshi H, Yamaoka K, Garifield RE, Ohama K. "Identification of a nonselective cation channel current in myometrial cells isolated from pregnant rats". *Pflugers Arch* 447(2004):457-464.

97. Wray S, Noble K. "Sex hormones and excitation-contraction coupling in the uterus: the effects of oestrus and hormones". *J Neuroendocrin.* 20.4(2008):451-61.
98. Wray S, Shmigol A. "Role of the calcium store in the uterine contractility". *Semin Cell Dev Biol.* 18(2007):315-320.
99. Shmigol A, Wray S. "Modulation of agonist-induced Ca²⁺ release by SR Ca²⁺ load: direct and cytosolic Ca²⁺ measurements in rat uterine myocytes". *Cell Calcium* 37(2005): 215-223
100. Nobble K, Zhang J, Wray S. "Lipid rafts, the sarcoplasmic reticulum and uterine calcium signaling: an integrated approach". *J Physiol* 570.1(2006):29-35.
101. Garfield RE, Somlyo AP. "Structure of smooth muscle. In: Grover AK, Daniel EE, editors. *Calcium and Contractility*. Clifton NJ: Humana Press; 1985. p. 1–36.
102. Cordeaux Y, Missfelder-Lobos H, Charnock-Jones DS, Smith GCS. Stimulation of contractions in human myometrium by is unmasks by smooth muscle relaxants. *Reprod Sci.* 2008 Sep;15(7):727-34.
103. El-Sahwi S., Gaafar A.A., Topozada H.K. A new unit for evaluation of uterine activity // *Am J ObstetGynecol.* – 1967. - № 98. – P. 900-903.
104. Caldeyro-Barcia R., Sica-Blanco Y., Poseiro J.J., Gonzáles Panizza V., Mendez-Bauer C., Fielitz C., Alvarez H., Pose S.V., Hendricks C.H. A quantitative study of the action of synthetic oxytocin on the pregnant human uterus // *J Pharmacol Exp Ther.* - 1957. - № 121. - P 18-31.
105. Лаптев Б.И., Богомаз С.А., Кулагин Е.М., Афанасев С.А., Прокопьева В.Д. Способ определения кардиотропной активности веществ. 1979, SU 1635133 A1, G01N33/15
106. MacKenzie L.W., Cole W.C., Garfield R.E. Structural and functional studies of myometrial gap junctions // *Acta Physiol Hung.* – 1985. – 65, - № 4. – P. 461-72.

107. Opal S.M., Cohen J. Clinical gram-positive sepsis: does it fundamentally differ from gram-negative bacterial sepsis? // *Crit. Care. Med.*- 1999.- 27, 8, - P. 1608-1616.
108. H. S. Cronje, A. van der Westhuizen. Coupling of uterine contractions during labour: a pilot study // *International Journal of Gynecology and Obstetrics*, 1988, V. 27, P. 69-72
109. А.Г. Савицкий, Гипертоническая дисфункция матки в современном акушерстве: вопросы патогенеза, терминологии и идентификации // *Журнал Акушерства и Женских болезней* , 2006. Т. LV, выпуск 2, С. 32-41
110. Я.М.Шуба. Основи молекулярної фізіології. 2010
Biol Reprod. 2000 May;62(5):1422-6. Myometrial adenylyl cyclase protein decreases on the last day of pregnancy in the rat. Lindeman KS1, Forrester DJ, Hirshman CA, Emala CW.
111. Ahuja N, Kumar P, Bhatnagar R. The adenylate cyclase toxins. *Crit Rev Microbiol.* 2004; 2004;30(3):187-96.
112. Caldwell KK, Boyajian CL, Cooper DMF. The effects of Ca²⁺ and calmodulin on adenylyl cyclase activity in plasma membranes derived from neural and nonneural cell. *Cell Calcium.* – 1992; Feb;13(2):107-21.
113. *Br J Pharmacol.* 1984 Feb;81(2):317-26. doi: 10.1111/j.1476-5381.1984.tb10081.x. Contractions of Rat Uterine Smooth Muscle Induced by Acetylcholine and Angiotensin II in Ca²⁺-free Medium C Lalanne, C Mironneau, J Mironneau, J P Savineau PMID: 6704592 PMCID: PMC1986878 DOI: 10.1111/j.1476-5381.1984.tb10081.x
114. Kadles O., Masek K., Gulda O., Ruzicka V., Parant M., Chedid L. Smooth muscle stimulation by an immunomodulatory compound muramil dipeptide6 does in involve serotonergic system? // *Pharmacology.*- 1984.- 29, - № 31.- P. 31-39.
115. Sevcík J, Růicka V, Sláínský J, Masek K. Muramyl dipeptide (MDP) and 5-HT receptors. Neuroimmunomodulatory effects of MDP are probably not mediated through 5-HT₄ or 5-HT_{1A} receptors // *Immunopharmacol. Immunotoxicol.* - 2000. – 24, - № 1. - P. 43-53.

116. Sevcik J., Ruzicka V., Slansky J., Mesek K. MDP and 5-HT receptors. Does MDP interact with 5-HT (7) receptors? // *Int.J. Immunopharmacol.*- 2000. - 22, № 38.- P. 587-595.
119. Cyclooxygenases, prostanoids, and tumor progression. Wang MT, Honn KV, Nie D *Cancer Metastasis Rev.* 2007 Dec; 26(3-4):525-34.
120. The role of cyclooxygenases in inflammation, cancer, and development. Williams CS, Mann M, DuBois RN *Oncogene.* 1999 Dec 20; 18(55):7908-16.
121. Differential cyclooxygenase-1 and -2 gene expression in human myometria from preterm and term deliveries J Zuo, Z M Lei, C V Rao, M Pietrantonio, V D Cook *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, Volume 79, Issue 3, 1 September 1994, Pages 894–899,
122. Kelly RW. Inflammatory mediators and parturition. *Rev Reprod.* 1996;1(2):89-96.
123. Young A, Thomson A, Ledingham M, Jordan F, Greer I, Norman JE. Immunolocalization of pro-inflammatory cytokines in myometrium, cervix and fetal membranes during human parturition at term. *Biol Reprod.* 2002;66(2):445-449.
124. Osman I, Young A, Ledingham MA, et al. Leukocytes density and proinflammatory cytokines expression in human fetal membranes, deciduas, cervix and myometrium before and during labour at term. *Mol Hum Reprod.* 2003;9(1):41-45.
125. Lin Z., Xu J., Jin X., Zhang X., and F. Ge. Modulation of expression of Toll-like receptors in the human endometrium // *American Journal of Reproductive Immunology.*-2009.- 61, № 5.- P. 338–345.
126. Prostaglandins Volume 52, Issue 1, July 1996, Pages 13-34 Prostaglandins
Differential expression of cyclooxygenase-1 and -2 proteins in rat uterus and cervix during the estrous cycle, pregnancy, labor and in myometrial cells. Yuan-Lin Dong M.D., Ph.D. Pandu R.R. Gangula Ph.D. Li Fang M.D. Chandrasekhar Yallampalli DVM.,
127. *BMC Pregnancy Childbirth.* 2007 Jun 1;7 Suppl 1:S10. Cyclic AMP signalling pathways in the regulation of uterine relaxation. Yuan W1, López Bernal A.

128. J Clin Invest. 1977 Oct; 60(4): 815–818. doi: 10.1172/JCI108835 PMID: PMC372429 PMID: 197125 Regulation of rabbit myometrial alpha adrenergic receptors by estrogen and progesterone.

L T Williams and R J Lefkowitz

129. Benovic JL. Novel β 2-adrenergic receptor signaling pathways. J Allergy Clin Immunol. 2002; des; 110(6): S229-S235.

130. Lentschat A, Karahashi H, Michelsen KS, Thomas LS, Zhang W, Vogel SN, Arditi M. Mastoparan, a G protein agonist peptide, differentially modulates TLR4- and TLR2-mediated signaling in human endothelial cells and murine macrophages. J Immunol. 2005 Apr 1; 174(7):4252-61.

131. Fan H, Li P, Zingarelli B, Borg K, Halushka PV, Birnbaumer L, Cook JA. Heterotrimeric G α (i) proteins are regulated by lipopolysaccharide and are anti-inflammatory in endotoxemia and polymicrobial sepsis. Biochim Biophys Acta. 2011 Mar;1813(3):466-72.

132. A close look at the contraction and relaxation of the myometrium; the role of calcium. Bilge Pehlivanoglu, Sibel Bayrak, and Murat Dogan. J Turk Ger Gynecol Assoc. 2013;14(4):230-234

133. Rachel M. Tribe. Regulation of human myometrial contractility during pregnancy and labour: are calcium homeostatic pathways important? Experimental Physiology (2001) 86.2, 247–254

134. Biol Chem. 2018 Apr 27;293(17):6387-6397. doi:10.1074/jbc.RA118.002354. Epub 2018 Mar 13. G protein $\beta\gamma$ subunits directly interact with and activate phospholipase C ϵ . Madukwe JC1,2, Garland-Kuntz EE3, Lyon AM3, Smrcka AV4.

135. Victor P. Fomin, Blair E. Cox, and R. Ann Word

01 FEB 1999 <https://doi.org/10.1152/ajpcell.1999.276.2.C379> Effect of progesterone on intracellular Ca²⁺ homeostasis in human myometrial smooth muscle cells. American Journal of Physiology.

136. Ahuja N, Kumar P, Bhatnagar R. The adenylate cyclase toxins. Crit Rev Microbiol. 2004; 2004;30(3):187-96.

137. Caldwell KK, Boyajian CL, Cooper DMF. The effects of Ca²⁺ and calmodulin on adenylyl cyclase activity in plasma membranes derived from neural and nonneural cell. *Cell Calcium*. – 1992; Feb;13(2):107-21.
138. Br J Pharmacol. Contractions of Rat Uterine Smooth Muscle Induced by Acetylcholine and Angiotensin II in Ca²⁺-free Medium C Lalanne, C Mironneau, J Mironneau, J P Savineau PMID: 6704592 PMCID: PMC1986878 DOI: 10.1111/j.1476-5381.1984.tb10081.x
139. Kadles O., Masek K., Gulda O., Ruzicka V., Parant M., Chedid L. Smooth muscle stimulation by an immunomodulatory compound muramyl dipeptide does it involve serotonergic system? // *Pharmacology*.- 1984.- 29, - № 31.- P. 31-39.
140. Sevcík J, Růčka V, Slánský J, Masek K. Muramyl dipeptide (MDP) and 5-HT receptors. Neuroimmunomodulatory effects of MDP are probably not mediated through 5-HT₄ or 5-HT_{1A} receptors // *Immunopharmacol. Immunotoxicol.* - 2000. – 24, - № 1. - P. 43-53.
141. Li J. et al."Evolving bacterial envelopes and plasticity of TLR2-dependent responses: Basic research and translational opportunities". *Front Immunol.* 4(2013):347.
142. Santos-Sierra S. et al., 2009. "Mal connects TLR2 to PI3Kinase activation and phagocyte polarization". *EMBO*. 28.14(2009): 2018-2027.
143. Shynlova O, Tsui O, Dorogin A, Iye SJ. "Monocyte chemoattractant Protein-1 (CCL-2) integrates mechanical and endocrine signals that mediates term and preterm labour". *J Immunol.*181.2(2008):1470-1479.
144. Osman I, Young A, Ledingham MA, Thomson AJ, Jordan F, Greer IA. "Leucocyte density and pro-inflammatory cytokine expression in human fetal membranes, decidua, cervix and myometrium before and during labour at term". *Mol Hum Reprod.* 9.1(2003):41-45
145. Thomson AJ, Telfer JF, Young A, Campbell S, Stewart CJ, Cameron IT. "Leucocytes infiltrate the myometrium during human parturition: further evidence that labour is an inflammatory process". *Hum Reprod.* 14.1(1999):229-236.
146. Kelly RW. "Inflammatory mediators and parturition". *Rev Reprod.*1.

2(1996):89-96.

147. Keelan JA, Blumenstein M, Helliwell RJ, Sato TA, Marvin KW, Mitchell MD: "Cytokines, prostaglandins and parturition – a review". *Placenta* 24(2003)33 –46.

70. Keelan JA, Blumenstein M, Helliwell RJ, Sato TA, Marvin KW, Mitchell MD: Cytokines, prostaglandins and parturition—a review. *Placenta* 2003; 24(Suppl A):S33–S46

148. Cyclooxygenases, prostanoids, and tumor progression. Wang MT, Honn KV, Nie D *Cancer Metastasis Rev.* 2007 Dec; 26(3-4):525-34.

120. The role of cyclooxygenases in inflammation, cancer, and development. Williams CS, Mann M, DuBois RN *Oncogene.* 1999 Dec 20; 18(55):7908-16.

149. Differential cyclooxygenase-1 and -2 gene expression in human myometria from preterm and term deliveries J Zuo, Z M Lei, C V Rao, M Pietrantonio, V D Cook *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, Volume 79, Issue 3, 1 September 1994, Pages 894–899,

150. Kelly RW. Inflammatory mediators and parturition. *Rev Reprod.*1.2(2006):89-96.

ДОДАТОК 1

Список публікацій

Статті у фахових виданнях:

1. Nasibyan L S, Philypov IB. Modulation of rat myometrium contractile activity by peptidoclycan of Staphilococcus aureus cell wall. Fiziol Zh. 2014;60(5):62-72.(IF-0.11). (Особистий внесок здобувачки: проведення експериментальних досліджень, статистична обробка результатів дослідження, участь у підготовці матеріалів до публікації)
2. Насібян Л.С., І. Б. Філіппов. Вплив пептидоглікану клітинної стінки золотистого стафілокока на механізми регуляції аденілатциклазною сигнальною системою скорочувальної активності міометрія щурів. Фізіологічний журнал. 2016; 62 (1). - С. 25-33 (IF0,15). (Особистий внесок здобувачки: проведення експериментальних досліджень, статистична обробка результатів дослідження, участь у підготовці матеріалів до публікації)
3. L.S. Nasibyan, I.B. Philypov, Y.M. Shuba. Peptidoglycane modulates rat myometrial contractility via Ca²⁺ release from SR. Fiziol. Zh. 2019; 65(4): 66-72. (Особистий внесок здобувачки: проведення експериментальних досліджень, статистична обробка результатів дослідження, участь у підготовці матеріалів до публікації)
4. Насібян Л.С., Філіппов І.Б., Шуба Я.М. Вплив пептидоглікану Золотистого стафілококу на спонтанну скоротливу активність міометрія вагітних щурів. Здобутки клінічної і експериментальної медицини. 2020; № 3;138-145. (Особистий внесок здобувачки: проведення експериментальних досліджень, статистична обробка результатів дослідження, участь у підготовці матеріалів до публікації)
5. Насібян Л.С., Соткіс Г.В., Цугорко О.М., Філіппов І.Б., Шуба Я.М. Пептидоглікан золотистого стафілококу змінює скоротливість міометрія невагітних щурів завдяки підвищенню внутрішньоклітинного вмісту кальцію. Фізіологічний журнал. 2020; 62 (6). (Особистий внесок здобувачки:

проведення експериментальних досліджень, статистична обробка результатів дослідження, участь у підготовці матеріалів до публікації)

Які засвідчують апробацію матеріалів дисертації:

1. Насібян Л.С. Модуляція скорочувальної активності гладеньких м'язів матки естрогенізованих щурів пептидогліканом клітинної стінки золотистого стафілококу. Тези доповідей Всеукраїнської наукової конференції студентів та молодих науковців, Київ, 28 -29 жовтня 2010, с.58 -59.
2. Насібян Л.С., Филиппов И.Б. Модуляция сократительной активности гладких мышц матки эстрогенизированных крыс пептидогликаном золотистого стафилококка (2010). Международная научно-практическая конференции "Высокие технологии, фундаментальные и прикладные исследования в физиологии и медицине" г. Санкт-Петербург, Россия, 23-26 ноября 2010, с.150 – 155.
3. Насібян Л.С., Філіппов І.Б. Вплив пептидоглікану клітинної стінки золотистого стафілококу на механічні властивості шийки матки та діаметр цервікального каналу. Патофізіологія і фармація: шляхи інтеграції ХАРКІВ, Україна (5-7th October 2016); с.169.
4. Насібян Л.С. Вплив пептидоглікану клітинної стінки золотистого стафілокока на механізми регуляції аденілатциклазною сигнальною системою скорочувальної активності міометрія. Всеукраїнська науково-практична конференція за участю молодих вчених та студентів з міжнародною участю, «Сучасні аспекти медицини та фармації-2015», Запоріжжя, 2015, с. 30.
5. Насібян Л.С. VII Конгрес українського товариства нейронаук, «Активізація TOL-2 рецепторів та модулювання скорочувальної активності міометрія». 22 квітня 2017 г. Київ.
6. VII Конгрес українського товариства нейронаук, «Активізація TL-2 рецепторів та модулювання скорочувальної активності міометрія». 22 квітня 2017 г. Київ. Насібян Л.С., Соткіс А.В., Дискіна Ю.Б., Цугорка О.М. Виявлення наявності та вивчення можливої ролі механочутливих каналів в одно- та

мультиклітинних препаратах ГМ сечового міхура та матки щура. VII з'їзд Українського біофізичного товариства (29 жовтня- 2 листопада 2018 р. Київ – Луцьк