

НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ
ІНСТИТУТ ФІЗІОЛОГІЇ ІМ. О.О. БОГОМОЛЬЦЯ

Насібян Ліліт Седраківна

УДК 612.73:612:618:579:861.2

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

03.00.13 – Фізіологія людини та тварин

АВТОРЕФЕРАТ

дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата біологічних наук

Київ 2021

Дисертацією є рукопис

Роботу виконано у відділі нервово-м'язової фізіології Інституту фізіології ім. О. О. Богомольця НАН України

Науковий керівник: кандидат біологічних наук
Філіппов Ігор Борисович
провідний науковий співробітник
відділу нервово-м'язової фізіології
Інститут фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України

Офіційні опоненти: доктор біологічних наук, професор
Цимбалюк Ольга Володимирівна
професор кафедри молекулярної біотехнології
Київський національний університет імені Тараса
Шевченка, МОН України

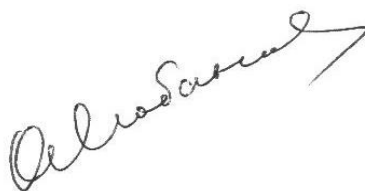
доктор медичних наук, професор
Торянік Еріка Леонідівна
професор кафедри лабораторної діагностики
Національний фармацевтичний університет,
МОЗ України

Захист дисертації відбудеться «27» квітня 2021 р. о 14.00 годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д26.198.01 при Інституті фізіології імені О.О.Богомольця НАН України за адресою: 01024, м. Київ-24, вул. Богомольця, 4.

З дисертацією можна ознайомитися в бібліотеці Інституту фізіології імені О.О. Богомольця НАН України та на сайті інституту:
http://biph.kiev.ua/en/Specialized_Scientific_Council

Автореферат розісланий «25» березня 2021 р.

Вчений секретар
спеціалізованої вченої ради
кандидат біологічних наук



О.П.Любанова

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність. 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. З персистенцією ПГ Золотистого стафілококу (*Staphylococcus aureus*, *S. aureus*) пов'язують розвиток таких патологічних станів вагітності як хоріоамніоніт, преєклампсія, аномалії скоротливості матки та передчасні пологи.

Попри те, що ПГ *S. aureus* складає основну частину бактеріальної стінки, який привертає увагу завдяки деяким властивостям, пов'язаними з його впливом на імунну систему теплокровних тварин і людини, в тому числі і в патогенезі деяких захворювань. 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, з літературних джерел відомо, 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. Однак невідомо, чи взаємодіє ПГ безпосередньо з гладеньклом'язовими клітинами (ГМК) міометрія, адже він розповсюджується кровоплином та може потрапити в усі шари матки. Тим більше, що рецептори, що розпізнають ПГ, експресуються в тому числі в ГМК міометрія.

Крім того нічого невідомо про дію ПГ на жіночі репродуктивні органи поза вагітності. Однак є декілька робіт, де показано кореляцію між жіночою неплідністю та висіванням *S. aureus* з піхви та безсимптомним носійством цього мікроорганізму.

Відомо, що патологічні стани, що супроводжуються порушенням скоротливості міометрія, такі як ендометріоз, ускладнюються безпліддям. Отже, характер маткових скорочень, і їх інтенсивність є ключовими для репродуктивного здоров'я жінок.

Враховуючи відомості про розвиток запальних та аутоімунних процесів, що виникають на тлі тривалої безсимптомної персистенції ПГ *S. aureus* та інших бактерій, в різних органах, та здатністю ПГ викликати стимуляцію маткових скорочень у вагітних дослідних тварин, ми припустили, що ПГ *S. aureus* може бути етіологічним фактором дисфункціональних станів репродуктивної системи у жінок через порушення маткової скоротливості.

Крім того, рецептори вродженої імунної системи TLR-2 та NOD2, що розпізнають ПГ експресовані в жіночій репродуктивній системі, зокрема в міоцитах матки, і можуть реагувати на ПГ та ініціювати запальну реакцію порушуючи скоротливість міометрія. Тому ми вважаємо, що було б доцільно вивчити саме ефект ПГ *S. aureus* 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).

Метою дослідження є вивчення механізму дії ПГ *S. aureus* на скоротливу активність міометрія щурів.

Для досягнення зазначеної мети були поставлені наступні **завдання**:

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 ПГ.
3. Визначити вплив естрогену та прогестерону на ефект ПГ на спонтанні та простагландинвикликані скорочення міометрія.
4. З'ясувати, чи бере участь циклооксигеназа-2 в механізмі 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 дієюна ГМК матки.

Об'єкт дослідження: регуляція скоротливості вісцеральних гладеньких м'язів.

Предмет дослідження: механізми дії пептидоглікану *S. aureus* на скоротливість міометрія щурів

Методи дослідження. Тензометрія на смужках 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 *S. aureus* модулювати скоротливість вагітного і невагітного міометрія за умов відсутності ендометрія, а не тільки опосередковано через прозапальні цитокіни, що секретуються в едометрії або децидуальній тканині, як вважалося раніше. Вперше описано зміни амплітудно-кінетичних параметрів скорочень міометрія вагітних та невагітних щурів на тлі дії ПГ. Також встановлено залежність ефекту ПГ на маткову скоротливість від естрогену та прогестерону. Вперше

з'ясовано роль G_i -білка в механізмі модуляції ПГ *S. aureus* скоротливості міометрія та індуковану ПГ ІФ₃-залежну Ca^{2+} - мобілізацію з кальцієвого депо саркоплазматичного ретикулула (СР) ГМК міометрія. Показано, що для патогенетичного блокування стимуляції ПГ маткової скоротливості під час вагітності можна розглядати не тільки блокатори ЦОГ-2 але й блокатори потенціалкерованих кальцієвих каналів L-типу. Крім того, вперше проведена візуалізація ПГ-індукованого підвищення внутрішньоклітинного рівня Ca^{2+} в ізольованих ГМК міометрія щура.

Теоретичне значення даної роботи полягає в тому, що її результати відкривають певні перспективи для продовження експериментального та теоретичного вивчення механізмів порушення скоротливості міометрія при ураженні *S. aureus* жіночої репродуктивної системи.

Практичне значення одержаних результатів. Одержані в ході роботи експериментальні дані з невагітних щурів, свідчать про індуковане ПГ порушення характеру скоротливості міометрія як одну з можливих причин безпліддя та інших функціональних розладів репродуктивної системи при інфікуванні *S. aureus*, 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 *S. aureus* 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 та може розширити можливості для контролю та корекції індукованих ПГ *S. Aureus* порушень 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 даних та графічне представлення результатів і формульовані висновки разом з керівником роботи.

Апробація результатів дисертації. Результати дослідження були представлені на Всеукраїнській науковій конференції студентів та молодих науковців, Київ 2010; Міжнародній науково-практичній конференції «Високі технології, фундаментальні та прикладні дослідження в біології та медицині» Санкт-Петербург, Росія, 2010; Всеукраїнській науково-практичній конференції за участю молодих вчених та студентів з міжнародною участю, «Сучасні аспекти медицини та фармації-2015», Запоріжжя, 2015; на конференції

Патофізіологія і фармація: шляхи інтеграції ХАРКІВ, Україна 2016; у VII Конгресі українського товариства нейронаук, 2017 Київ., у VII з'їзді Українського біофізичного товариства, 2018 Київ – Луцьк.

Публікації. Результати роботи відображені у 11 наукових працях, з яких 5 статті у фахових наукових журналах та 6 тез доповідей на вітчизняних конференціях і з'їздах.

Структура та обсяг дисертації. Дисертація складається зі вступу, 4 розділів, висновків, списку використаних джерел, 39 рисунків, 4 таблиць. Основний текст роботи викладено на 124 сторінках. Загальний обсяг роботи становить 142 сторінки. Список цитованих джерел включає 150 найменувань.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

Огляд літературних даних складається із семи підрозділів, в яких наведено інформацію щодо структури пептидоглікану, відомості про його патогенний вплив на різні органи та тканини, в тому числі на маткову скоротливість під час вагітності; розпізнавання пептидоглікану рецепторами вродженої імунної системи та процеси, що розвиваються внаслідок цього.

Матеріали та методи досліджень. Експерименти проводилися на смужках гладеньких м'язів (ГМ) та ізольованих ГМК міометрія статевозрілих самиць щурів лінії Wistar вагою до 200-250 г. та вагітних щурах на терміні 8-11 діб гестації при дотримуванні положень Директиви ЄС 2010/63/EU «Стосовно захисту тварин, що використовуються у наукових цілях» і вказівок інститутського біотичного комітету. В кожній групі щурів було по 10 тварин. З кожного рогу матки отримували та досліджували по 3 пари м'язових смужок.

Скоротливу активність міометрія досліджували методом **тензометрії** в ізометричному режимі. Для дослідження параметрів скорочень міометрія всіх дослідних тварин анестезували ефіром та декапітували. Роги матки швидко видаляли і поміщали в нагрітий до 37° С, 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. З 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 поміщали в проточну камеру з одним кінцем зафіксованим нерухомо, а другим – прикріпленим до ємнісного датчика сили з базовим навантаженням 3 мН. Запис скорочувальної активності здійснювали через аналогово-цифровий перетворювач на комп'ютер. Про характер скорочувальної активності гладеньких м'язів матки й впливу на неї ПГ судили по параметрах, вказаних на рис. 1.

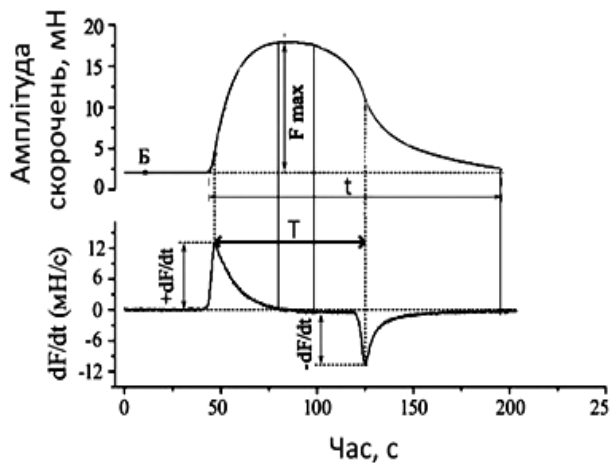


Рис. 1. Визначення амплітудно-кінетичних параметрів поодинокого скорочення гладеньком'язової смужки міометрія щура.

Позначення на верхньому графіку: B – вихідний тонус м'язової смужки, мН; F_{max} – 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). (Shmigol et al., 2005)

Ізолювання гладеньком'язових клітин міометрія вагітних і невагітних щурів здійснювалось ферментативним методом двоциклової обробки тканини. В першому циклі обробка проводилась за участі 1 мг/мл папаїну, 0,5 мг/мл колагенази II типу та інших допоміжних речовин, а в другому циклі – колагенази Ia типу у концентрації 1 мг/мл та трипсину у концентрації 2 мг/мл. Реєстрацію Ca^{2+} -залежної флюоресценції здійснювали за допомогою високо афінного ($k_d = 335$ нМ) кальційчутливого флюоресцентного барвника Fluo-4AM (максимуми абсорбції/емісії = 494 нМ/506 нМ). ГМК завантажували цим барвником шляхом інкубації клітин протягом 40 хвилин в розчині Кребса в присутності мембранопрониклого Fluo-4AM (2 мкМоль/л), попередньо розчиненого в DMSO (обидва від "Molecular Probes", США) протягом 35 хв у темноті при кімнатній температурі. Далі ГМК відмивали у розчині Кребса протягом 40 хвилин при кімнатній температурі. Для **візуалізації змін Ca^{2+}** на субклітинному рівні використовували конфокальний комплекс LSM 5 PASCAL на основі інвертованого мікроскопа Axiovert 200M (Zeiss).

Створювання гормонального фону. Для створення **моделі гіперестрогенії** тваринам вводили препарат 17- β -естрадіолу регос в дозі 1 мкг/тварина 1 раз в день протягом 2 діб (Байер, Німеччина). Для створення **моделі «псевдовагітності»** після попередньої естрогенізації щурів за 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 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.

Ідентифікація участі G-білків в ефектах ПГ. Для цього використовували кашлюковий та холерний токсини. Кашлюковий екзотоксин, ізольований з культури *Bordetella pertussis*, використовується для інактивації *Gi/o*-білків. Субодиноця А холерного токсину, ізольована з *Vibrio cholerae*, викликає АДФ-рибозилування залишку аргініну в α -субодиноці Gs-білка, пригнічуючи ГТФ-азу й зберігаючи цю субодиноцю 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). Для активації β -адренорецепторів поздовжніх м'язів матки використовували неселективний агоніст норадреналін (10 мкмоль/л) та селективний агоніст β_2 -адренорецепторів сальбутамол (1 мкмоль/л), які додавали до розчину Кребса перед аплікацією ПГ. Також використовували мембранопрониклий аналог цАМФ 8-бром-цАМФ (10 мкмоль/л) та блокатор цАМФ-залежних фосфодіестераз папаверин (1 мкмоль/л). Простагландин-F2 α попередньо розчинений в етанолі в базовій концентрації 20 ммоль/л. В розчині Кребса його концентрація була 10 мкмоль/л. ПГ розводили в 0,9 % розчину NaCl в концентрації 2 мг/мл і додавали до розчину Кребса в субмаксимальній концентрації 10⁻³ мг/мл (Філішова та ін., 1996). Всі досліджувані речовини, що використовували в дослідженнях були від фірми "Sigma-Aldrich" (США).

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 Бенферроні.

ОСНОВНІ РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ

1. Вплив пептидоглікану на скоротливість міометрія вагітних та невагітних щурів.

Результати наших досліджень показали, що смужки міометрія незалежно від гормонального фону тварин спонтанно скорочується. Аплікація ПГ на тлі спонтанної скорочувальної активності груп як вагітних, так і невагітних тварин спричинювала модуляцію скорочень (Рис. 2, 3).

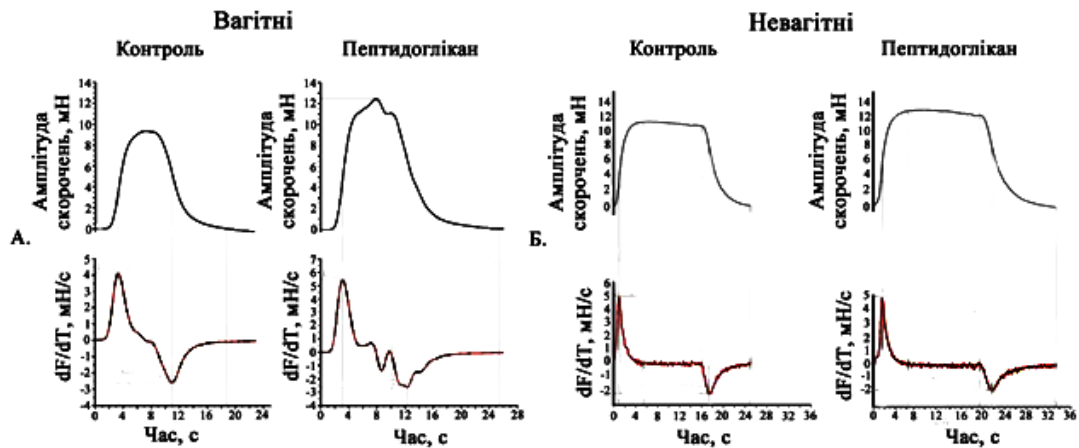


Рис. 2. – Типовий запис поодинокого спонтанного скорочення, що демонструє зміну амплітуди, тривалості фаз скорочення, а також першої похідної скорочення та розслаблення смужки міометрія під дією ПГ. На верхньому графіку – типовий запис поодинокого скорочення в контролі та на тлі ПГ; на нижньому графіку – перша похідна швидкості скорочення та розслаблення в контролі та на тлі дії ПГ. На А – скорочення міометрія вагітних щурів; На Б – скорочення міометрія невагітних щурів.

Було виявлено, що ПГ збільшує тривалість всіх фаз спонтанного скорочення міометрія як вагітних, так і невагітних щурів. В групі вагітних тварин ПГ подовжував переважно фазу розслаблення, а в групі невагітних – тривалість тонічного компоненту та фази розслаблення однаковою мірою. В групі невагітних щурів максимальна швидкість скорочення в контролі та на тлі ПГ однакові, 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 на тлі ПГ на 57,14% менша за контроль. В групі вагітних щурів ПГ спричинив збільшення швидкості скорочення на 31%. А от максимальна швидкість розслаблення скорочення не змінилась. В обох групах щурів під дією ПГ міометрій відносно швидко скорочувався та повільно розслаблювався (Рис.2).

Оцінка амплітудно-кінетичних параметрів скорочень міометрія вагітних та невагітних щурів показала, що пептидоглікан статистично достовірно збільшував амплітуду та тривалість, але зменшував частоту спонтанних скорочень міометрія в обох групах щурів. В групі вагітних щурів більш вираженим було збільшення амплітуди, в той час як в групі невагітних – тривалості спонтанних скорочень (Рис.3).

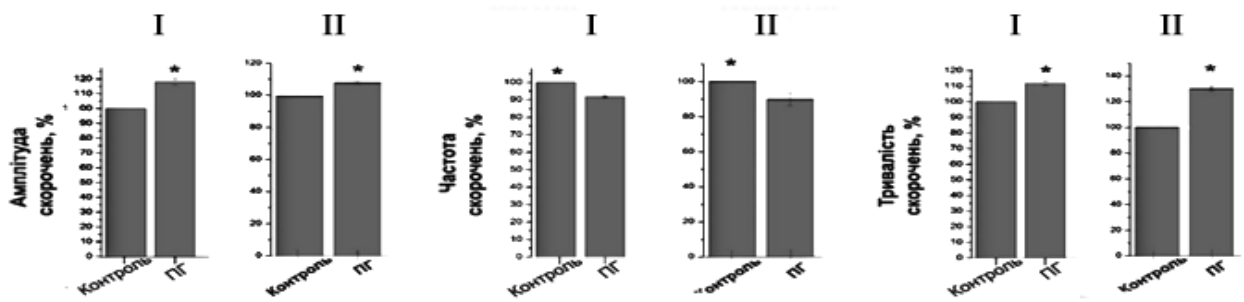


Рис. 3. Діаграми статистично узагальнених даних змін тривалості, частоти та амплітуди спонтанних скорочень міометрія вагітних та невагітних щурів під дією ПГ (10-3 мг/мл) відносно контролю, прийнятого за 100%; n=10, $p \leq 0,05$; I – міометрій невагітних щурів; II – міометрій вагітних щурів вагітних щурів.

2. Залежність ефекту пептидоглікану на скоротливу активність міометрія щурів від естрогену та прогестерону.

Було показано, що естроген та прогестерон модифікують ефект пептидоглікану на скоротливість міометрія. Для вивчення ролі стероїдних гормонів дія пептидоглікану досліджувалась в трьох групах тварин: естрогенізованих, псевдовагітних на 14-й та на 22-й день (Рис.4).

Результати досліджень показали, що в групі естрогенізованих тварин аплікація пептидоглікану призводила до статистично достовірного зменшення частоти спонтанних скорочень міометрія. Зміни амплітуди та тривалості скорочень міометрія в даній групі тварин були статистично недостовірні.

В обох групах псевдовагітних тварин аплікація пептидоглікану сприяла статистично достовірному збільшенню і амплітуди, і тривалості, і частоти спонтанних скорочень міометрія. Причому чим триваліше щури отримували препарат прогестерону, тим більш вираженим був стимулюючий ефект пептидоглікану на параметри спонтанних скорочень міометрія (рис. 4).

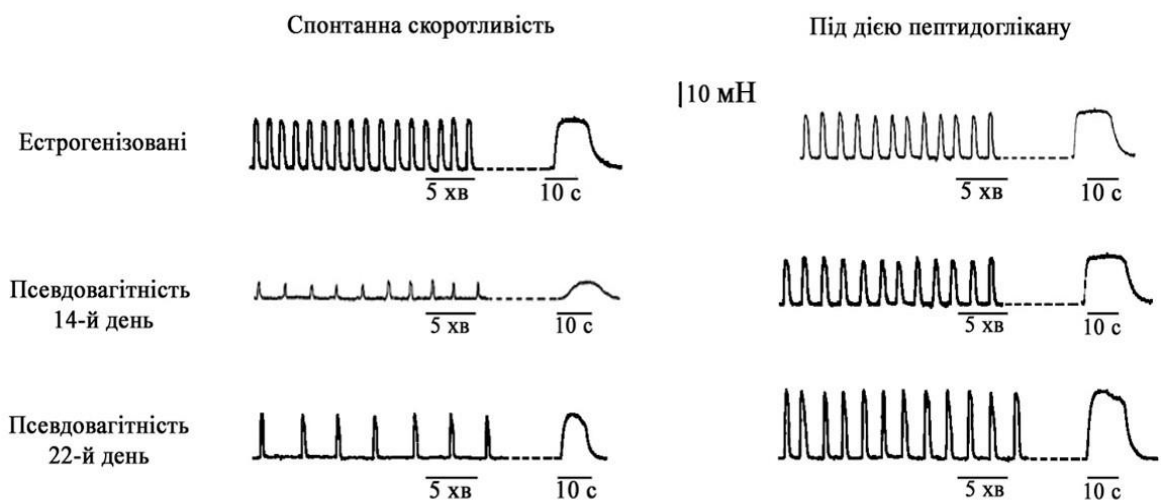


Рис. 4. Типовий запис спонтанних скорочень міометрія естрогенізованих та псевдовагітних щурів на 14-й та 22-й день прийому препарату прогестерону в контролі та під дією пептидоглікану.

3. Вплив пептидоглікану на внутрішньоклітинний вміст Ca^{2+}

Була проведена серія експериментів для дослідження дії пептидоглікану на внутрішньоклітинний вміст Ca^{2+} гладеньких м'язових клітин матки. Аплікація ПГ на свіжоізольовані міоцити міометрія протягом 5 хвилин викликала періодичне збільшення внутрішньоклітинного вмісту Ca^{2+} . Після припинення дії пептидоглікану коливання припинились (рис.5).

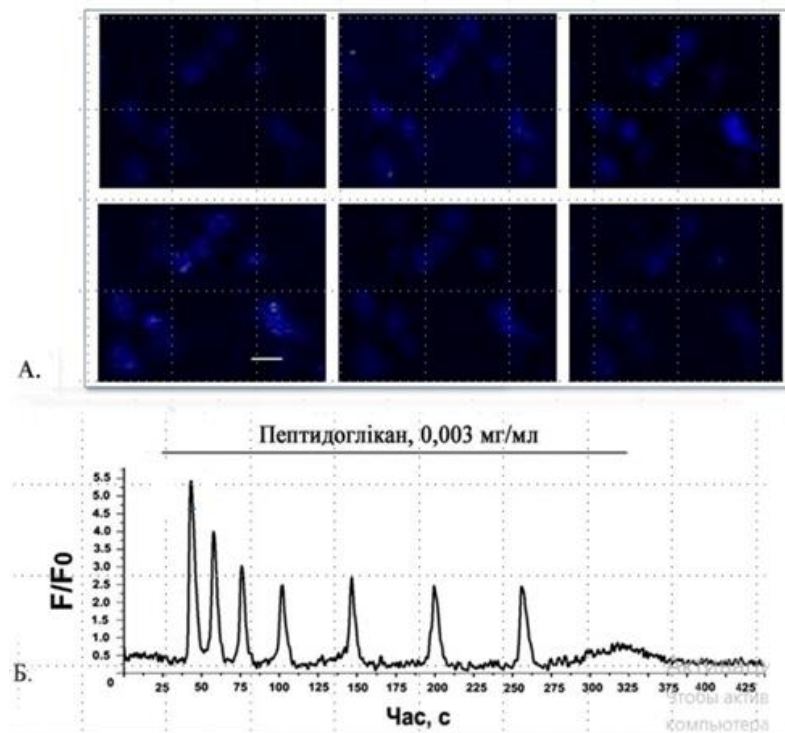


Рис. 5. Аплікація пептидоглікану викликає періодичне підвищення внутрішньоклітинного вмісту кальцію в гладеньком'язових клітинах матки. На А. - Зміна флюоресценції завантаженої Fluo4 ГМК міометрія з 38-ої по 51-у секунду аплікації пептидоглікану, на Б – типовий запис зміни флюоресценції завантаженої Fluo4 ГМК міометрія під дією пептидоглікану протягом 5 хв.

Для визначення джерела кальцію при підвищенні його вмісту при дії пептидоглікану ми провели експерименти на смужках міометрія невагітних щурів. Було показано, що при аплікації пептидоглікану за умов інактивованих ніфедипіном потенціалкерованих кальцієвих каналів пептидоглікан викликає одне фазне скорочення, що вказує на вивільнення іонів кальцію з СР під впливом ПГ. Крім того, коли нормальний розчин Кребса був замінений безкальцієвим та спонтанні скорочення міометрія припинялись, то аплікація ПГ призвела до виникнення двох фазних скорочень протягом 5 хвилин. Після цього скорочення більше не виникали. Блокатор ІФ3-рецепторів 2-АРВ, що аплікувався на тлі регулярних спонтанних скорочень міометрія, нівелював стимулюючу дію ПГ на скоротливість міометрія (рис. 6).

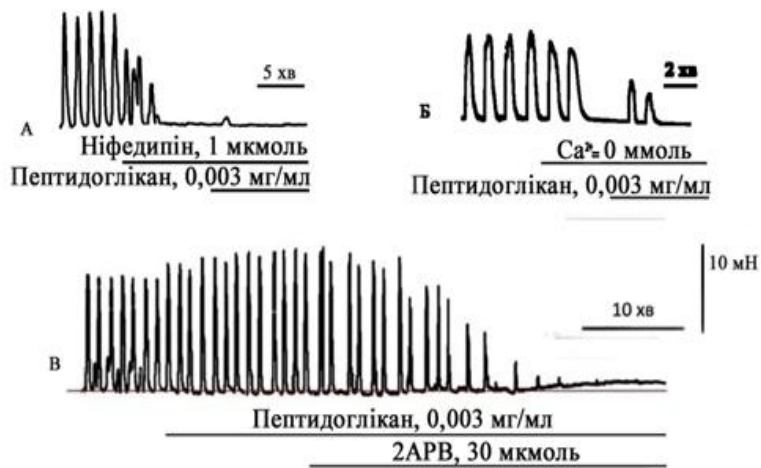


Рис. 6. Вплив пептидоглікану на внутрішньоклітинний вміст кальцію в міометрії невагітних щурів. А. – дія пептидоглікану на тлі ніфедипіну; Б – дія пептидоглікану за умов відсутності іонів кальцію в зовнішньому розчині; В – припинення спонтанних скорочень міометрія, посилених пептидогліканом, під дією 2-АРВ.

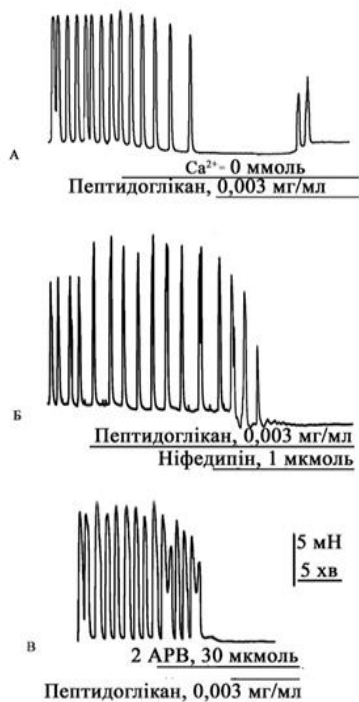


Рис. 7. Вплив пептидоглікану на внутрішньоклітинний вміст кальцію в міометрії вагітних щурів. А. – дія пептидоглікану за умов відсутності іонів кальцію в зовнішньому розчині; Б – ніфедипін призводить до припинення спонтанних скорочень міометрія, посилених пептидогліканом; В – 2-АРВ призводить до припинення спонтанних скорочень міометрія, посилених пептидогліканом.

В експериментах з міометрієм вагітних щурів виявились такі ж результати: при заміні нормального зовнішнього розчину безкальцієвим скорочення припинились. За таких умов аплікація ПГ призводила до виникнення одноразового скорочення міометрія. Коли ж на тлі регулярних спонтанних скорочень за умов кальційвмісного розчину Кребса зовнішній розчин заміняли на безкальцієвий з додаванням ПГ та блокатора потенціалкерованих кальцієвих каналів L-типу ніфедипіну або ІФЗ-рецепторів 2-АРВ, спонтанні скорочення міометрія припинялись (рис. 7). Тобто на тлі дії ніфедипіну або 2-АРВ ПГ не виявляв стимулювальної дії на скоротливість міометрія.

4. Вплив німесуліду на пептидогліканіндуковане скорочення міометрія вагітних та невагітних щурів

Для вивчення, чи здійснюється стимулююча дія на скоротливість міометрія внаслідок активації ЦОГ-2 та подальшим синтезом прозапальних простагландинів в міометрії невагітних щурів так само, як вагітних, була проведена серія експериментів з блокатором ЦОГ-2 німесулідом. Було показано, що на відміну від міометрія вагітних щурів, у невагітних тварин стимулююча дія пептидоглікану не нівелюється німесулідом (рис. 8).

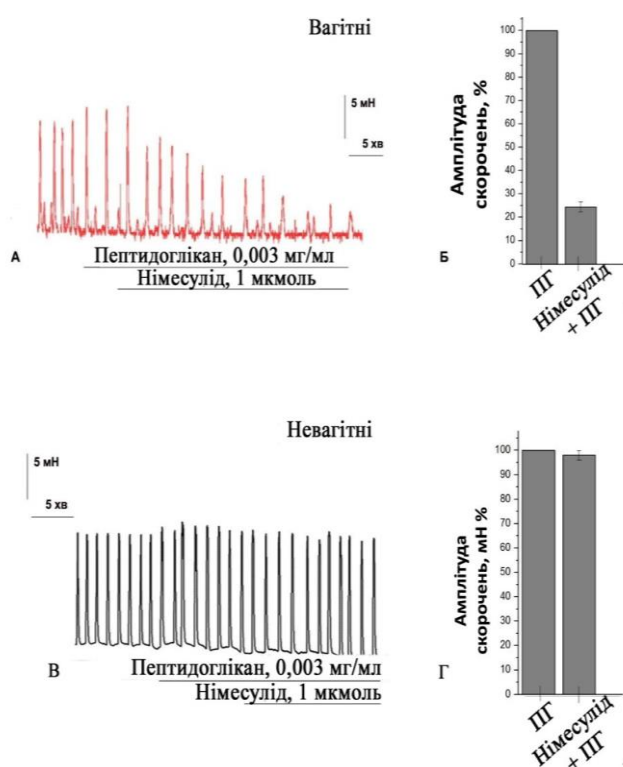


Рис. 8. Дія німесуліду на тлі пептидоглікану на спонтанні скорочення міометрія вагітних (А) та невагітних (В) щурів; Б і Г – діаграми статистично узагальнених даних змін амплітуди спонтанних скорочень міометрія вагітних (Б) та невагітних (Г) щурів під дією німесуліду на тлі дії пептидоглікану (10^{-3} мг/мл) відносно контролю, прийнятого за 100%; $n=10$, $p \leq 0,05$.

5. Вплив підвищеного рівня цАМФ на дію пептидоглікану на скоротливість міометрія

Для створення умов підвищеного внутрішньоклітинного вмісту цАМФ ми аплікували його мембранопроникну форму 8-бром-цАМФ, що викликало пригнічення спонтанної активності міометрія. За таких умов ПГ не впливав ні на спонтанні, ні на простагландинвикликані скорочення (рис. 9).



Рис 9. Типовий запис скорочень міометрія щурів, що демонструє відсутність впливу пептидоглікану на спонтанну (А) та простагландинвикликану (Б) скоротливість на тлі дії 8-бром-цАМФ.

6. Участь Gi/o-білку в реалізації ефекту ПГ

За умов інактивації Gi/o-білка внаслідок інкубування міометрія щурів в кашлюковому токсині спонтанна скоротливість була збережена. Аплікація сальбутамолу, селективного β -адреноміметика, спричинила пригнічення спонтанних та простагландинвикликаних скорочень. Аплікація ПГ за таких умов не змінила характер скорочень в обох випадках (рис. 10).

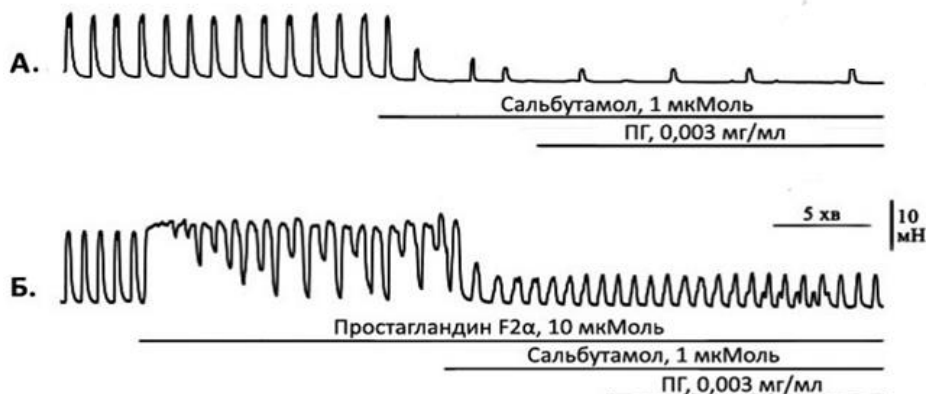


Рис.10. Типові записи, що демонструють відсутність ефекту пептидоглікану на спонтанну(А) та простагландинвикликану (Б) скоротливість міометрія на тлі дії сальбутамолу, за умов попередньої обробки смужок міометрія кашлюковим токсином.

Обговорення результатів

Отримані результати показали, що ПГ взаємодіє безпосередньо з гладенькими м'язами матки, модулює спонтанні скорочення міометрія щурів усіх дослідних груп; вагітних, невагітних інтактних, псевдовагітних на 14-й та 22-й день введення прогестерону. Однак характер змін параметрів скорочень міометрія на пряму залежить від гормонального стану організму. Так в групах і вагітних, і невагітних щурів ПГ збільшував амплітуду та тривалість спонтанних

скорочень міометрія, а частоту - зменшував. Однак, в групі невагітних щурів найбільш вираженим було збільшення тривалості спонтанних скорочень, а в групі вагітних – амплітуди, що може вказувати на різні механізми дій. ПГ впливав також на співвідношення фаз скорочень. В обох випадках скорочення відносно швидко наростали та повільно розслаблялись. Фаза розслаблення під дією ПГ в обох групах збільшувалась на близько 50% відносно контролю.

Також було визначено, що за умов гіперестрогенії пептидоглікан незначно зменшує частоту спонтанних скорочень міометрія, а зміна інших показників статистично недостовірна, тобто естроген спричинював пригнічувальний ефект ПГ на скоротливість міометрія, в той час як прогестерон зумовлював стимулюючий ефект ПГ. Більш того, чим більш тривалим був період, протягом якого щурі отримували прогестерон, тим більш вираженим був стимулювальний ефект ПГ.

Оскільки дія ПГ на спонтанні скорочення міометрія була переважно стимулююча, доцільно було вивчити, яким чином ПГ впливає на внутрішньоклітинний вміст кальцію в міоцитах матки. Отримані результати показали, що аплікація ПГ на свіжоізольовані міоцити матки викликають збільшення внутрішньоклітинного вмісту кальцію. Досліди на м'язових смужках показали, що збільшення внутрішньоклітинного вмісту Ca^{2+} в групах вагітних та невагітних тварин відбувається внаслідок посилення його трансмембранного надходження та вивільнення із внутрішньоклітинного кальцієвого депо ГМК міометрія.

Враховуючи такі результати, наступна серія експериментів була направлена на дослідження того, чи однаковими є механізми регуляції дії ПГ на скорочення в обох групах. З літературних джерел відомо, що під час вагітності ПГ розпізнається мембранним рецептором TLR-2 (одним з декількох пептидоглікан-розпізнавальних рецепторів, що експресуються в міометрії). Їхня взаємодія призводить до активації ЦОГ-2 – ферменту, що каталізує синтез прозапальних простагландинів, які стимулюють маткову скоротливість. Результати наших експериментів показали, що в групі вагітних тварин аплікація блокатору ЦОГ-2 німісулідю очікувано пригнічувало попередньо посилені ПГ спонтанні скорочення міометрія, а в групі невагітних тварин такого ефекту не спостерігали. Отже, у невагітних тварин стимуляція ПГ скоротливості міометрія не є ЦОГ-2 асоційованим.

Тому наступні серії експериментів були проведені на міометрії тільки невагітних тварин. Оскільки одним з основних механізмів регуляції маткового скорочувального акту є цАМФ-залежне розслаблення, ми дослідили роль цАМФ та G-білків, які регулюють активність аденілатциклази, в ефекті ПГ. Показали, що ПГ посередньо G_i/o -білка пригнічує активність аденілатциклази та перешкоджає таким чином утворенню цАМФ.

Висновки

В роботі досліджено дію пептидоглікану стінки *S. aureus* на скоротливу активність міометрія вагітних та невагітних щурів за умов різних гормональних фонів. Визначено характер змін амплітудно-кінетичних показників скорочень міометрія, що спричинює пептидоглікан у кожній групі тварин. Показано взаємозв'язк пептидоглікану з кальцієвою сигналізацією ГМК міометрія та активністю аденілатциклазної системи.

1. Пептидоглікан модулює скоротливу активність міометрія вагітних та невагітних щурів, за рахунок зміни амплітудно-кінетичних параметрів.
2. Модульовальна дія пептидоглікану на скоротливість міометрія як вагітних так і невагітних щурів обумовлена прямою взаємодією з самим міометрієм.
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 – стимульовальну. Чим більш тривалим є період введення прогестерону тварині, тим більш вираженим є стимульовальний ефект ПГ на скоротливість міометрія.
4. У невагітних щурів, на відміну від вагітних, циклооксигеназа-2 не задіяна в механізм модуляції пептидогліканом скоротливості міометрія, тому німесулід не пригнічує посилені пептидогліканом спонтанні скорочення.
5. В умовах інактивованого кашлюковим токсином Gi/o-білка пептидоглікан не стимулює ні спонтанні, ні простагландиніндуковані скорочення міометрія невагітних щурів.
6. Пептидоглікан викликає підвищення цитозольної концентрації кальцію в міоцитах міометрія шляхом вивільнення його з ІФЗ-чутливого кальцієвого депо саркоплазматичного ретикулуму ГМК та посилення трансмембранного входу кальцію через потенціалкеровані кальцієві канали L-типу.
7. Ніфедипін, блокатор потенціалкерованих кальцієвих каналів L-типу, та 2-АРВ, блокатор ІФЗ-рецепторів, пригнічували спонтанні скорочення міометрія вагітних та невагітних щурів, попередньо посилені пептидогліканом.
8. Стимульовальна дія пептидоглікану на ГМК міометрія від вагітних щурів нівелюється не тільки блокатором ЦОГ-2 але й блокаторами ІФЗ-рецепторів та потенціалкерованих кальцієвих каналів L-типу.

НАУКОВІ ПРАЦІ, В ЯКИХ ОПУБЛІКОВАНІ ОСНОВНІ НАУКОВІ РЕЗУЛЬТАТИ ДИСЕРТАЦІЇ:

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. Насибян 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

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 медичних 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 інактивації 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 УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

АЦС — аденілатциклазна система

ГМ — гладенький м'яз

ГМК — гладеньком'язова клітина

ІФЗ — інозитол-1,4,5-трифосфат

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

ЦОГ-1, ЦОГ-2 — циклооксигеназа-1, циклооксигеназа-2

НА — норадреналін

ПГ — пептидоглікан

ПК-А — протеїнкіназа А

СР — саркоплазматичний ретикулум

цАМФ — циклічний аденозинмонофосфат

MNOD2 Нуклеотид-зв'язуючий білок 2, що містить домен олигомеризації (англ. Nucleotide binding oligomerization domain containing 2)

MU — одиниці Монтевідео

PG F2 α — простагландин F2 α

TLR-2 — тол подібний рецептор-2

TNF- α — фактор некрозу пухлин

OU — Олександрійські одиниці

S. aureus — Золотистистий стафілокок (*Staphylococcus aureus*)

2-APB — 2-аміноетоксидифенілборат