

## Биомедицинские приборы и системы

УДК 577.352.5

О.М. Сердюк, Ю.П. Бідзіля, канд. біол. наук, Р.І. Янчій, д-р біол. наук, А.Г. Місюра

### Використання фазно-графічного аналізу для моніторингу функціонального стану міометрію миші протягом гестації

Целью нашей работы было использование фазно-графического анализа для исследования сократительности миометрия мышей на разных сроках гестации, а именно оценка на 5 и 10 дни гестации изменения величин амплитуды сокращения, частоты сокращения, длительности сокращения и расслабления, W50, скорости сокращения и расслабления, а также вычисления индекса сократительности. На 4-5 день гестации наблюдали уменьшение амплитуды сокращения, длительности расслабления, индекса сократительности. На 10-11 день гестации отмечено увеличение амплитуды сокращения, скорости сокращения и расслабления, индекса сократительности.

The aim of the work is to realize phase-plot analysis of myometrium contractility of the mice on the different terms of gestation, namely to estimate on 5 and 10 day of gestation change of amplitude of contraction, frequency of contraction, duration of contraction and relaxation, duration of contraction at half of amplitude, rate of contraction and relaxation, and also calculations of index of contractility.

On 4-5 day of gestation it was observed the decrease of amplitude of contraction, duration of relaxation, contractility index. On 10-11 day of gestation the increase of amplitude of contraction, rate of contraction and relaxation, contractility index were observed.

#### Вступ

Традиційний метод перфузії ізольованого органу залишається одним із найбільш поширених методів дослідження скоротливості міометрію *in vitro*. Аналіз параметрів скорочення, отриманих в експериментах з використанням даного методу, все ще може забезпечувати пояснення механізмів токолітичних чи утеротонічних ефектів. Проте існує проблема уніфікації даних при порівнянні скоротливих відповідей між смужками, отриманими в різних дослідах, оскільки окрім справжніх відмінностей в скоротливості є відмінності і варіабельності у співвідношенні сполучної тканини і гладеньких м'язів в самих об'єктах. Саме тому нормування за площею поперечного перерізу не об'єктивним

і може суттєво впливати на статистичну вірогідність даних.

Недавно показано, що параметри, які характеризують скоротливість міометрію, є прийнятними для оцінки ефектів утеротонічних агентів, а також запропоновано новий параметр, індекс скоротливості, який адекватно відображає зміни скоротливості незалежно від вмісту гладеньких м'язів і сполучної тканини в межах досліджуваного об'єкта [1].

Метою нашої роботи було дослідити з використанням фазно-графічного аналізу скоротливість міометрію мишей на різних строках гестації, а саме оцінити і порівняти на 5 і 10 день зміну величин амплітуди скорочення, його частоти, тривалості скорочення і розслаблення, тривалості скорочення при половинній амплітуді (W50), швидкості скорочення і розслаблення, а також розрахованого індексу скоротливості.

#### Матеріали і методи

Дослідження проведені на не вагітних та вагітних самках мишей лінії СВА (8 тижнів, 16...18 г) з дотриманням усіх вимог щодо роботи з лабораторними тваринами (Міжнародна конвенція, Страсбург, 1986).

Матку у тварин забирали на досліджуваних термінах гестації і поміщали в 4° С розчин Кребса такого складу (ммоль/л): NaCl – 120; KCl – 5,9; NaHCO<sub>3</sub> - 15,5; NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> - 1,2; MgCl<sub>2</sub> - 1,2; CaCl<sub>2</sub> - 2,5; глюкоза - 11,5.

Для реєстрації сили ізометричних скорочень смужку міометрію (1:1:8 мм, вздовж) поміщали в камеру, яку перфузували розчином Кребса - (95 % O<sub>2</sub>/5% CO<sub>2</sub>, 37°С, pH 29).

Сила ізометричних скорочень вимірювали механо-електричним перетворювачем (FT 106) і реєструвалася швидкодіючим самописцем Н3021 - 3. Датчик відкалібровували, його статична характеристика мала невеликий зсув (0...2,0 В) і нахил (0,05...0,1В/мН). Візуальний контроль досліджуваних параметрів здійснювали за допомогою осцилографа С1-83. Рівномірність перфузії розчину здійснювали перистальтичним насосом НП-1М.

Смужки міометрію витримували в розчині Кребса протягом 60...90 хв., переносили до ек-

спериментальної камери і перфузували протягом 30 хв. при температурі 37°C сольовим розчином Кребса для врівноваження скорочень. Смужки, не здатні скорочуватись спонтанно протягом 20-25 хвилин впрацювання, виключалися із експерименту (<5%). Базова активність реєструвалася протягом 30 хвилин.

Зареєстровані скорочення піддавалися статистичному аналізу і графічному представленню пакетом програм Origin 8Pro (OriginLab Corp., North., MA, USA) та Excel.

## Результати

Для кількісної характеристики фазних скорочень були проаналізовані наступні параметри скоротливої активності міометрію: амплітуда скорочення (мН), частота скорочення (кількість за секунду), тривалість скорочення і розслаблення (за сек.), W50 (сек.), швидкість скорочення і розслаблення (мН/с), індекс скоротливості ("IC" індекс скоротливості, як добуток Fmax на CVmax/RVmax, мН) (рис.1).

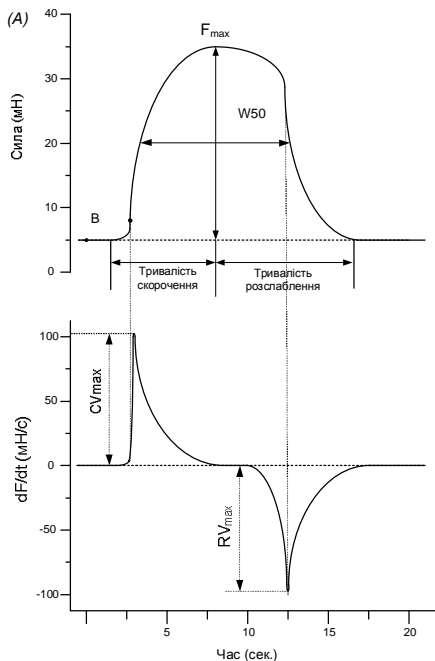


Рис. 1. Типове фазне скорочення (верхня крива) і його перша похідна (нижня крива), отримані при дослідженні смужки міометрію миші, перфузованої розчином Кребса

Параметри скорочення міометрію:

**B** – базальний тонус, мН;

**Fmax** – пік амплітуди скорочення відносно базального тону, мН;

**W50** – тривалість скорочення при 50%- вий амплітуді, сек;

**CVmax** – позитивний пік першої похідної скорочення (максимальна швидкість скорочення), мН/с;

**RVmax** – негативний пік першої похідної скорочення (максимальна швидкість розслаблення), мН/с.

Встановлено, що амплітуда скорочення ізольованих смужок міометрію в інтактних тварин зменшувалась на 4 – 5 день гестації і зростала на 10 – 11 день гестації ( $p < 0,001$ ) і становила, відповідно,  $15,82 \pm 0,93$  мН і  $29,26 \pm 2,16$  мН при  $21,46 \pm 2,67$  мН в контролі; тривалість розслаблення на 4 – 5 день гестації зменшувалася ( $p < 0,01$ ) з  $13,00 \pm 2,10$  сек в контролі до  $9,21 \pm 1,70$  сек, а на 10 – 11 день гестації поверталася до контрольних величин; величини максимальної швидкості скорочення і розслаблення збільшувались тільки на 10 – 11 день гестації ( $p < 0,001$ ) і становили, відповідно,  $121,61 \pm 2,49$  мН/с і  $201,34 \pm 12,52$  мН/с проти  $84,97 \pm 6,60$  мН/с та  $151,30 \pm 16,70$  мН/с в контролі; індекс скоротливості зменшувався на 4-5 день гестації ( $p < 0,01$ ) і зростав на 10 – 11 день гестації ( $p < 0,001$ ) й становив, відповідно,  $9,41 \pm 1,24$  мН та  $17,71 \pm 1,45$  мН порівняно з контролем  $12,15 \pm 2,12$  мН (рис. 2).

Таким чином, на 4-5 день гестації спостерігали зменшення амплітуди скорочення, тривалості розслаблення, скоротливого індексу; тоді як частота скорочення, тривалість скорочення, W50, швидкість скорочення і розслаблення вірогідно не змінювались. На 10-11 день гестації спостерігали збільшення амплітуди скорочення, швидкості скорочення і розслаблення, індексу скоротливості; тоді як частота скорочення, тривалість скорочення і розслаблення, W50 вірогідно не змінювались.

## Обговорення результатів

Добре відомо, що вибір та інтерпретація параметрів, які характеризують скоротливість міометрію, залежить від моделі спряження збудження - скорочення, прийнятої дослідниками. Ранні експерименти, в яких використовували як методику сахарозних мостиків, так і мікроелектродну техніку, показали складної форми потенціали дії, тривалістю до 30-90 сек [2, 3]. Детальні дослідження зразків міометрію людини, отриманого на кінець вагітності, встановили два типи кривих потенціалів дії: тип плато і тип спайку. Обидва типи потенціалів дії викликали внутрішньоклітинний  $Ca^{2+}$  транз'єнт і скорочення, що передбачає синхронну активацію клітин в межах смужки, найбільш ймовірно через електричне спряження через щільні контакти [4].

Важливо, що спонтанні тривалі  $Ca^{2+}$  транз'єнти і скорочення спостерігаються в багатоклітинних препаратах міометрію людини, тоді як ізольовані клітини або нерухомі, або генерують тільки короткі спонтанні  $Ca^{2+}$  осциляції. Вважають, що тривалий потенціал дії в міометрії людини є властивістю багатоклітинної мережі [5].

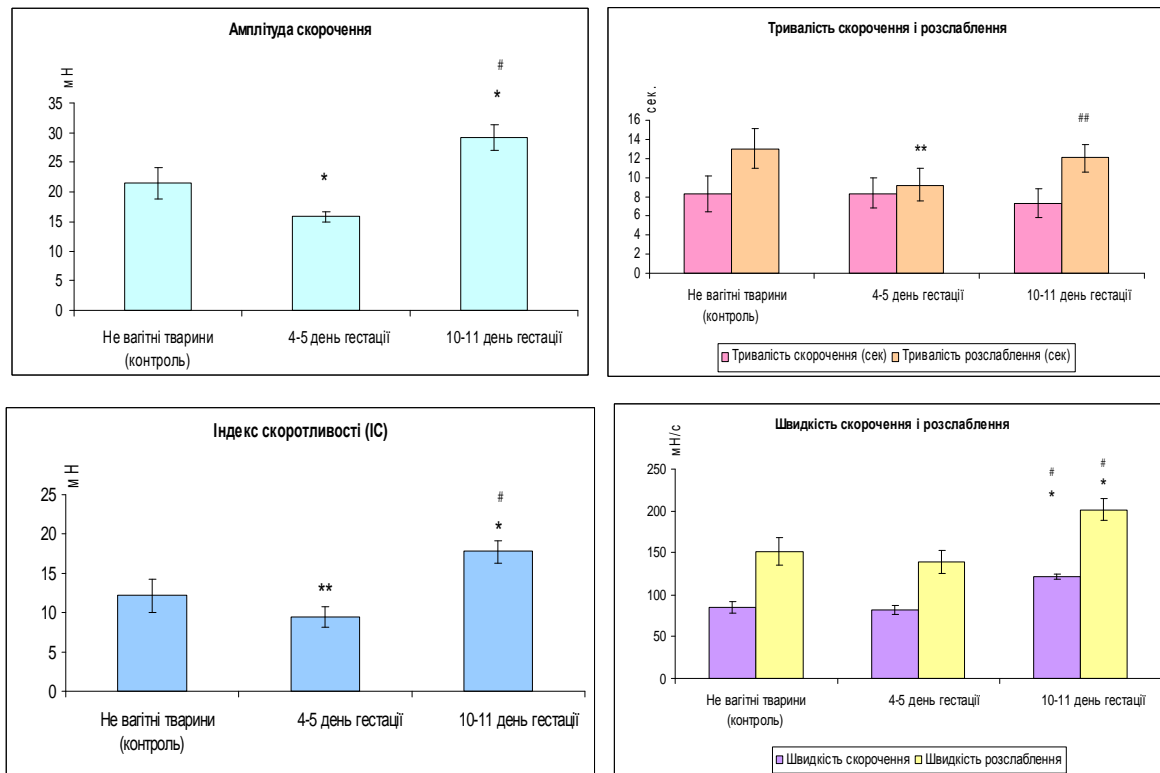


Рис.2. Параметри скоротливої активності міометрію миші за умов гестації

\*  $p < 0,001$ , \*\*  $p < 0,01$  – вірогідність відмінностей величин середніх груп даних відносно таких величин у не вагітних тварин (контроль); #  $p < 0,001$  вірогідність відмінностей величин середніх груп даних відносно таких величин у тварин на 4-5 день гестації

Тому біофізична деталізація математичної моделі спряження збудження-скорочення в міометрії людини повинна б через це враховувати особливості багатоклітинного пучка, а не тільки окремої клітини.

На сьогодні ще не описано детальної математичної моделі скоротливого пучка міометрію людини, хоча модель поодинокі клітини, недавно опублікована Bursztyn та ін., відтворює потенціало-керовані  $Ca^{2+}$  транзєнти, майже ідентичні тим, які спостерігаються в експериментах на міометрії [6].

Математичні моделі скорочення матки, опубліковані в літературі, підтримують ідею поступового залучення клітин в процес скорочення [7, 8]. Так, модель, розроблена Vauge C. та ін., постулює теорію, згідно якої клітини міометрію знаходяться в одному із трьох станів: нерухомому, скорочення чи рефрактерності [7]. В цій моделі сила скорочення визначається залученням клітин в стані скорочення, яка допускає, що кількість активованих клітин повинна збільшуватися і, відповідно, поступово зменшуватися під час одного циклу скорочення-розслаблення. Тоді як конфокальні відображення  $Ca^{2+}$  в шарах міометрію людини забезпечують прямі докази того, що всі клітини в межах міометрального пучка підтримують високий рівень  $Ca^{2+}$  протягом

всієї тривалості фазного скорочення [9]. Разом з тим є дані про різномірність клітин міометрію за експресією іонних каналів [10, 11] і гормональних рецепторів [12].

Ми вважаємо, що поодинокий міоцит в межах міометрального пучка потенціюється за однаковим часовим курсом циклу скорочення-розслаблення. А кінетика розвитку сили в всій тканині детермінується кінетикою розвитку сили в окремих клітинах, які завдяки швидкому поширенню потенціалу дії залучаються до скорочення майже одночасно. Нами вперше показано, що на 4-5 день гестації спостерігається зменшення індексу скоротливості; на 10-11 день гестації спостерігається збільшення індексу скоротливості. Раніше було встановлено, що індекс скоротливості залежить лише від скоротливого стану тканини і відображає зміни скоротливості незалежно від вмісту сполучної тканини в межах досліджуваної смужки [1]. Поки що невідомо, чи зміна індексу скоротливості відображає наявність субпопуляцій клітин або різних стадій їх розвитку у пучку в процесі гестації. Ймовірно, що індекс скоротливості змінюється у зв'язку із зміною функціонального стану міоцитів, який залежить як від функціональних особливостей субклітинних структур (мітохондрій, саркоплазм-

матичного ретикулуму, міофіламентів та ін.), так і від активності клітинних ферментів, стану іонно-транспортних систем тощо. Ініціація та координація цих змін обумовлена комплексом регуляторних чинників, серед яких головними вважають нейрогуморальні (статеві гормони, простагландини), імунні (цитокіни, імунні комплекси), механічні (розтяг). Це призводить до зміни функціонального стану матки, що проявляється як в структурній перебудові міометрію, зокрема гіпертрофії і гіперплазії, так і в зміні скоротливості.

### Висновки

З використанням фазно-графічного аналізу досліджено скоротливість міометрію мишей на різних строках гестації: на 4-5 день спостерігається зменшення індексу скоротливості; на 10-11 день спостерігається збільшення індексу скоротливості. Індекс скоротливості, ймовірно, змінюється у зв'язку із зміною фізіологічних особливостей міоцитів, що можна застосовувати для моніторингу функціонального стану міометрію при дослідженнях за різних експериментальних умов.

### Література

1. *Gullam J.E., Blanks A.M., Thornton S., Shmygol A.* Phase-plot analysis of the oxytocin effect on human myometrial contractility // *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* – 2009. – Vol. 144. – Suppl. 1. – P. 20-4.
2. *Inoue Y., Nakao K., Okabe K. et al.* Some electrical-properties of human pregnant myometrium // *Am J Obstet Gynecol.* – 1990. – Vol. 162(4). – P. 1090–1098.
3. *Nakajima A.* Action potential of human myometrial fibers // *Am J Obstet Gynecol.* – 1971. Vol. 111(2). – P. 266–269.
4. *Nakao K., Inoue Y., Okabe K. et al.* Oxytocin enhances action potentials in pregnant human myometrium—a study with microelectrodes // *Am J Obstet Gynecol.* – 1997. – Vol. 177(1). – P. 222–228
5. *Shmygol A., Blanks A.M., Bru-Mercier G. et al.* Control of uterine Ca<sup>2+</sup> by membrane voltage toward understanding the excitation-contraction coupling in human myometrium // *Ann N Y Acad Sci.* – 2007. - Vol.1101. – P. 97–109.
6. *Bursztyn L., Eytan O., Jaffa A.J. et al.* Mathematical model of excitation-contraction in a uterine smooth muscle cell // *Am J Physiol-Cell Physiol.* – 2007. – Vol. 292(5). – P. 1816–1829.
7. *Vauge C., Carbonne B., Papiernik E. et al.* A mathematical model of uterine dynamics and its application to human parturition // *Acta Biotheor.* – 2000. – Vol. 48(2). – P. 95–105.
8. *Young R.C.* A computer model of uterine contractions based on action potential propagation and intercellular calcium waves // *Obstet Gynecol.* – 1997. – Vol. 89(4). – P. 604–608
9. *Shmygol A., Blanks A., Bru-Mercier G. et al.* Ultra-thin tissue slices—a new approach to study Ca signalling in human myometrium // *J Biomech.* – 2006. – Vol. 39. - Suppl. 1. – P. 341–342.
10. *Blanks A.M., Zhao Z.H., Shmygol A. et al.* Characterization of the molecular and electrophysiological properties of the T-type calcium channel in human myometrium // *J Physiol.* – 2007. - Vol. 581(Pt 3).- P. 915–926.
11. *Jones K., Shmygol A., Kupittayanant S. et al.* Electrophysiological characterization and functional importance of calcium-activated chloride channel in rat uterine myocytes // *Pflugers Arch.* – 2004. – Vol. 448(1). – P. 36–43.
12. *Robinson C., Schumann R., Zhang P.S. et al.* Oxytocin-induced desensitization of the oxytocin receptor // *Am J Obstet Gynecol.* – 2003. - Vol. 188(2). – P. 497–502.