

УДК 615.361:615.451.1:611.89]:57.086.13:612.627.085\*46"

Г.В. Нестерук<sup>1\*</sup>, В.Д. Устиченко<sup>1</sup>, Н.М. Алабедалькарім<sup>1</sup>,  
В.І. Падалко<sup>2</sup>, О.С. Проценко<sup>2</sup>, Є.І. Легач<sup>1</sup>

## Вплив кріоекстракту спінальних гангліїв на гістологічні характеристики та скорочувальну активність матки щурів різного віку

UDC 615.361:615.451.1:611.89]:57.086.13:612.627.085\*46"

G.V. Nesteruk<sup>1\*</sup>, V.D. Ustichenko<sup>1</sup>, N.M. Alabedalkarim<sup>1</sup>,  
V.I. Padalko<sup>2</sup>, O.S. Protsenko<sup>2</sup>, Ye.I. Legach<sup>1</sup>

### Impact of Dorsal Root Ganglia Cryoextract on Histological Steatures in Dices and Contractility of Uterus in Differently Aged Rats

**Реферат:** На сьогодні в світі збільшується кількість жінок, які вперше народжують у пізньому репродуктивному віці, що обумовлює необхідність розробки підходів до нормалізації скорочувальної активності матки. У роботі проведено експериментальне вивчення гістологічних особливостей матки та її скорочувальної активності у щурів різного віку після введення кріоекстракту спінальних гангліїв (КЕСГ). Кріоекстракт отримували зі спінальних гангліїв неонатальних поросят шляхом трикратного заморожування у фізіологічному розчині (ФР) до температури  $-196^{\circ}\text{C}$  і відігрівання за кімнатної температури, гомогенізації та центрифугування. У роботі використовували самиць щурів репродуктивного віку (РВ, 6-місячні) та пізнього репродуктивного віку (ПРВ, 14-місячні). Тваринам обох вікових груп вводили внутрішньочеревно КЕСГ (експериментальні групи) або ФР (контрольні групи) протягом 9 діб по 0,2 мл. Тварин забивали на 28–29 добу після початку введення, забирали фрагменти матки для гістологічного дослідження і для вивчення скорочувальної активності матки (САМ), індукованої окситоцином (ОТ). Встановлено, що у щурів РВ зменшувалася сила ОТ-індукованого ізометричного скорочення матки на 28,6% порівняно зі щурами РВ. Введення КЕСГ щурам ПРВ збільшувало показники САМ: частоту скорочень на 25%, амплітуду скорочень на 9,8%, силу ізометричного скорочення на 30% порівняно з групою того ж віку без введення КЕСГ. Ефект спостерігався на фоні збереження нормальної гістологічної будови матки та незмінної товщини міометрію.

**Ключові слова:** кріоекстракт, спінальні ганглії, нейротрофічні фактори, матка, скорочувальна активність.

**Abstract:** To date, the number of women giving birth to their first child in late reproductive age is increasing around the world. This stipulates a need in designing the new approaches to restore the uterine contractile activity. In this paper, the histological features of uterus and its contractile activity have been experimentally studied in differently aged rats after the dorsal root ganglia cryoextract (DRGCE) administration. The cryoextract was derived from dorsal root ganglia of neonatal piglets by three-fold freezing down to  $-196^{\circ}\text{C}$  in saline, followed by thawing at room temperature, homogenization and centrifugation. Here, we used the female rats of reproductive age (RA, 6-month-old) and those of late reproductive age (LRA, 14-month-old). Animals of both age groups received intraperitoneally either DRGCE (experimental groups) or saline (control groups) for 9 days by 0.2 ml. To days 28–29 after administration beginning the animals were sacrificed and the uterine fragments were taken for histological examination and study of oxytocin (OT)-induced uterine contractile activity (UCA). The strength of OT-induced uterine isometric contraction was found to decrease by 28.6% in LRA rats vs. the RA ones. The DRGCE administration to LRA rats increased the UCA indices, namely the contractile frequency, contractile amplitude and strength of isometric contraction augmented by 25, 9.8 and 30% respectively, as compared with the group of the same age without DRGCE introduction. This effect was observed on the background normal uterine histological structure and unchanged myometrial thickness.

**Key words:** cryoextract, dorsal root ganglia, neurotrophic factors, uterus, contractile activity.

На сьогодні в світі збільшується кількість жінок, які вперше народжують у пізньому репродуктивному віці. У цей період у жінок спостерігається зменшення скорочувальної активності міометрію матки, що приводить до дискоординування пологової діяльності та необхідності оперативного розродження [1, 19, 25]. У зв'язку з цим розробка підходів до нормалізації скорочуваль-

Today, the number of women having their first child at an older age is still increasing worldwide. During this period, women may have a decreased contractile activity of uterine myometrium, likely resulting in labor discoordination and need for operative delivery [15, 19, 25]. Therefore, the development of approaches to restore the uterine contractile activity (UCA) is important for current medicine.

<sup>1</sup>Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, Харків, Україна

<sup>2</sup>Харківський національний університет імені В.Н. Каразіна, Харків, Україна

\*Автор, якому необхідно надсилати кореспонденцію:

вул. Переяславська, 23, м. Харків, Україна 61016;  
тел.: (+38 057) 373-74-35, факс: (+38 057) 373-59-52  
електронна пошта: nesterukhanna@gmail.com

<sup>1</sup>Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkiv, Ukraine

<sup>2</sup>V.N. Karazin Kharkiv National University, Kharkiv, Ukraine

\*To whom correspondence should be addressed:

23, Pereyaslavska str., Kharkiv, Ukraine 61016;  
tel.: +380 57 373 7435, fax: +380 57 373 5952  
e-mail: nesterukhanna@gmail.com

Надійшла 16.07.2020

Прийнята до друку 31.08.2021

Received July, 16, 2020

Accepted August, 31, 2021

© 2021 G.V. Nesteruk, et al. Published by the Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0>), which permits unrestricted reuse, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

ної активності матки (САМ) є важливою для сучасної медицини.

Відомо, що родина нейротрофічних факторів (НФ), яка включає фактор росту нервів (NGF), нейротропний фактор мозку (BDNF), нейротрофін-3 (NT-3), нейротрофін-4/5 (NT-4/5), нейротрофін-6 (NT-6), гліальний нейротрофічний фактор (GDNF), відіграє значну роль у формуванні та підтримці функцій жіночої репродуктивної системи [8, 10]. Симпатична іннервація регулює дозрівання і зростання фолікулів, секрецію статевих стероїдів і овуляцію [11]. Більшість нейронів симпатичної нервової системи, які мають рецептивні поля в матці, експресують рецептори до нейротрофічних факторів TrkA та p75 [22, 24]. Характерно, що вміст мРНК, який кодує рецептор p75, у матці на 52% вище, ніж у мозку [8]. Раніше було встановлено активуючий вплив NGF, BDNF і NT-3 на моторику гладеньких м'язів кишечника [9].

Спинальні ганглії анатомічно складаються з тіл чутливих нейронів, оточених мантійними гліоцитами, мієлінізованих нервових волокон, шванівських клітин. Ганглії мають сполучнотканинну капсулу, містять прошарки ендоневрію з кровоносними судинами. Представники периферійної нейроглії (мантійні гліоцити і шванівські клітини) є основними клітинами гангліїв, які продукують НФ [4, 14, 28]. Таким чином, кріоекстракт спінальних гангліїв (КЕСГ) як джерело НФ [20] може бути використано для регуляції САМ. При цьому ця композиція була здатна збільшувати скорочувальну активність гладеньких м'язів сечового міхура [1].

З урахуванням вищевикладеного ми припустили, що НФ-залежна регуляція може відігравати значну роль у реалізації скорочувальної функції матки, змінюючи параметри активності міометрію з віком.

Мета роботи – вивчення гістологічних особливостей матки та її скорочувальної активності у щурів різного віку після введення кріоекстракту спінальних гангліїв.

### Матеріали та методи

Експерименти проводили відповідно до Закону України «Про захист тварин від жорстокого поводження» (№3447-IV від 21.02.2006) з дотриманням вимог комітету з біоетики Інституту, узгоджених із положеннями «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних та інших наукових цілей» (Страсбург, 1986).

Кріоекстракт отримували зі спінальних гангліїв неонатальних поросят. Ганглії виділяли

It is known that the family of neurotrophic factors (NFs), including the nerve growth factor (NGF), brain-derived neurotrophic factor (BDNF), neurotrophin-3 (NT-3), neurotrophin-4/5 (NT-4/5), neurotrophin-6 (NT-6), glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF), is prominent in forming and maintaining the female reproductive system functions [7, 9]. Sympathetic innervation regulates follicle maturation and growth, secretion of sex steroids and ovulation [10]. Most neurons of sympathetic nervous system, possessing the receptive fields in the uterus express the receptors to neurotrophic factors TrkA and p75 [22, 24]. Specifically that the mRNA content, encoding the p75 receptor is 52% higher in uterus than in brain [7]. Previous research has shown an activating effect of NGF, BDNF and NT-3 on intestinal smooth muscle motility [8].

Dorsal root ganglia anatomically consist of the cell bodies of sensory neurons surrounded by satellite glial cells, myelinated nerve fibers, Schwann cells. Ganglia have the connective tissue capsule, and contain endoneurium with blood vessels. Representatives of peripheral neuroglia (satellite glial cells and Schwann cells) are the main ganglion cells, producing NFs [3, 13, 28]. Hence, the dorsal root ganglia cryoextract (DRGCE) as a source of NFs [20] may be used in UCA regulation. Moreover, this composition showed the ability to increase the contractile activity of the bladder smooth muscles [15].

Hence follows our assumption about a crucial role of NFs-dependent regulation in implementation of uterine contractile function via changing myometrial activity parameters with age.

The research aim was to study the histological features of uterus and its contractile activity in rats of different ages after dorsal root ganglia cryoextract administration.

### Materials and methods

The experiments were performed in accordance with the Law of Ukraine 'On the Protection of Animals Against Cruelty' (№3447-IV of February 21, 2006) in compliance with the requirements of the Bioethics Committee of the Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, agreed with the provisions of the 'European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and Other Scientific Purposes' (Strasbourg, 1986).

Cryoextract was obtained from the dorsal root ganglia of neonatal piglets. The ganglia were isolated and placed into 1 ml of sterile saline in 2 ml cryotubes (BIOplastics, Switzerland). Then the cryotubes were immersed into liquid nitrogen for 10 min,



і поміщали в 1 мл стерильного фізіологічного розчину (ФР) у кріопробірки («Bioplastics», Швейцарія) об'ємом 2 мл. Кріопробірки занурювали у рідкий азот на 10 хв, після чого відігрівали за кімнатної температури. Процедуру повторювали ще двічі, після чого ганглії подрібнювали у скляному гомогенізаторі. Гомогенат переносили у пробірки і центрифугували 10 хв при 300g. Надосад збирали, пропускали через одноразовий шприцевий фільтр із діаметром пор 0,45 мкм («Millipore», США), аліквотували по 1 мл, зберігали при  $-18^{\circ}\text{C}$ . Перед використанням КЕСГ розбавляли удвічі ФР. Кінцева концентрація білка у КЕСГ, яку вимірювали за методом Бредфорд, складала 0,3 мг/мл.

У експериментах використовували 6- та 14-місячних білих безпородних щурів-самиць, що відповідає репродуктивному віку (РВ) та пізньому репродуктивному віку (ПРВ) відповідно у даного виду тварин [23]. Тварин було поділено на групи ( $n = 8$  у кожній): 1 – РВ із введенням ФР; 2 – РВ із введенням КЕСГ; 3 – ПРВ із введенням ФР; 4 – ПРВ із введенням КЕСГ.

Раніше встановлено, що експресія рецепторів до НФ у матці змінюється залежно від естрального циклу [24], тому необхідно було синхронізувати початок введення препаратів. Для цього протягом двох тижнів перед експериментом у тварин брали піхвові мазки. Ін'єкції ФР і КЕСГ починали у фазі еструсу. Препарати вводили кожного дня внутрішньочеревно протягом 9 днів по 0,2 мл. Тварин забивали на 28–29 добу, забирали фрагменти матки для гістологічного дослідження та вивчення її скорочувальної активності.

Для гістологічного аналізу фрагмент рога матки фіксували у 10%-му нейтральному формаліні. Гістологічні зрізи виготовляли за стандартною методикою та досліджували за допомогою світлового мікроскопа «AmScope XYL-403» («AmScope», Китай) з цифровою камерою. Товщину міометрію матки кожної тварини вимірювали у 15-ти полях зору ( $\times 200$ ) 5–6 серійних зрізів із використанням програми «AxioVision Rel. 4.8» («CarlZeiss», Німеччина).

Скорочувальну активність матки вивчали методом органної бані [21]. Ізольовані смужки (ІС) тканини розміром  $8 \times 3$  мм, отримані з рога матки, монтували вертикально у проточному осередку, заповненому розчином Кребса ( $\text{pH} = 7,4$ ), так, щоб один кінець смужки був зв'язаний зі стаціонарним тримачем, а другий – із механо-електричним трансдюсером «Grass FT03C» («Grass Instruments», США). Трансдюсер був з'єднаний з адаптером-мультиметром «OWON B41T» («OWON», Китай). Температуру в осередку підтримували

followed by warming at room temperature. The procedure was repeated twice more, then the ganglia were ground with glass homogenizer. The homogenate was transferred into the tubes and centrifuged for 10 min at 300g. The supernatant was collected, passed through a disposable syringe filter with  $0.45 \mu\text{m}$  pore diameter (Millipore, USA), aliquoted by 1 ml, and stored at  $-18^{\circ}\text{C}$ . The DRGCE was diluted with a saline twice prior to use. The final protein concentration in DRGCE, measured by the Bradford protein assay, was 0.3 mg/ml.

Here, we used the 6- and 14-month-old white outbred female rats, corresponding to reproductive age (RA) and late reproductive age (LRA) in this species, respectively [23]. Animals were divided into following groups ( $n = 8$ , each group): the group 1 comprised the RA animals injected with saline; the group 2 consisted of RA rats received DRGCE; the group 3 was made of LRA animals administered with saline; the group 4 was LRA ones with DRGCE.

Since the dependence of a change in NFs receptor expression in uterus on the estrous cycle has been previously established [24], the onset of drug administration should be synchronized. For this purpose, the vaginal smears were taken from the animals within two weeks prior to experiment. The saline and DRGCE were injected during the estrus phase. The drugs were administered intraperitoneally by 0.2 ml, daily for the next 9 days. To days 28–29, the animals were decapitated with taking uterine fragments for histological examination and study of contractile activity.

For histological analysis, a fragment of uterine horn was fixed in 10% neutral formalin. Histological sections were made according to the standard technique and examined using a light microscope 'AmScope XYL-403' (AmScope, China) with a digital camera. The thickness of uterine myometrium of each animal was measured in 15 fields of view ( $\times 200$ ) of 5–6 serial sections using the 'AxioVision Rel. 4.8' software (CarlZeiss, Germany).

The uterine contractile activity was measured by the organ bath technique [21]. The  $8 \times 3$  mm isolated strips (ISs) of tissue, procured from uterine horn, were mounted vertically in a chamber filled with Krebs solution ( $\text{pH} = 7.4$ ), so that one end of strip was attached to a fixed holder, and the other to mechano-electric transducer 'Grass FT03C' (Grass Instruments, USA). The transducer was connected to 'OWON B41T' multimeter adapter (OWON, China). The temperature in a chamber was maintained at  $37^{\circ}\text{C}$ . Prior to experiment, the ISs were incubated for 60 min under isometric conditions with 1 g load. The oxytocin (OT) at 4 nM final concentration was used to study the induced





на рівні 37°C. Перед експериментом ІС інкубували протягом 60 хв у ізометричних умовах з навантаженням 1 г. Для вивчення індукованої САМ використовували окситоцин (ОТ) у кінцевій концентрації 4 нМ. За кривими скорочення визначали наступні показники САМ: частоту скорочень (ЧС), амплітуду скорочень (АС), силу ізометричного скорочення (СІС).

Частоту скорочень розраховували як середню кількість циклів скорочення-розслаблення ІС за 5 хв, АС – як середню висоту піка на кривій скорочення. Силу ізометричного скорочення ((г × с)/см<sup>2</sup>) визначали за методом J.W. Rhee та співавт. [21] як відношення площі під кривою скорочення ІС, яку реєстрували протягом 10 хв, до площі поперечного перерізу ІС. При цьому площу поперечного перерізу ІС розраховували за формулою:

$$S = m / \rho l,$$

де  $m$  – маса ІС,  $l$  – довжина ІС,  $\rho = 1,05$  г/см<sup>3</sup> відповідно до роботи R. E. Garfield та співавт. [15].

Результати представляли у вигляді  $Me$  (Q1; Q3), де  $Me$  – медіана; Q1, Q3 – 1 та 3-й квартилі відповідно. Статистичну значущість відмінностей між групами оцінювали за допомогою непараметричного критерію Манна-Уїтні. Відмінності вважали значущими при  $p < 0,05$ .

### Результати та обговорення

У щурів усіх експериментальних груп матка мала нормальну гістологічну будову. В ендометрії тварин, яким вводили ФР, визначалися два шари: епітеліальний і власна пластинка, утворена пухкою волокнистою сполучною тканиною, яка містить маткові залози. Залежно від естрального циклу ендометрії було представлено кубічним або циліндричним епітелієм з елементами мітозів у дієструсі та проєструсі (рис. 1, А), яскраво вираженою дегенерацією залозистого епітелію та лейкоцитарною інфільтрацією в еструсі (рис. 1, С), одночасно з явищами мітозів і дегенерацією клітин епітелію в метаєструсі (рис. 1, Е). У міометрії визначалися три шари гладенько-м'язових клітин, розташованих циркулярно, косопоzdовжньо та поздовжньо, відокремлених один від одного прошарками пухкої сполучної тканини.

Гістологічний аналіз будови стінки матки та ендометрію у тварин із введенням КЕСГ та ФР різниці не виявив (рис. 1, В, D, F), як й кількісний аналіз товщини міометрію (таблиця).

Ізольовані стрічки матки щурів усіх груп характеризувалися базальною САМ, яка проявлялася у вигляді рідкісних спонтанних ритмічних

UCA. The UCA indices, namely the contractile frequency (CF) and contractile amplitude (CA), strength of isometric contraction (SIC) were determined by the contraction curves.

The contractile frequency was calculated as the average number of contraction – relaxation cycles of ISs within 5 min, the CA was done as the average peak height on contraction curve. The strength of isometric contraction ((g × s)/cm<sup>2</sup>) was determined by the method of J.W. Rhee *et al.* [21] as the ratio of area under IS contraction curve, recorded within 10 min, to the cross-section area of IS. The cross-section area of IS was herewith calculated by the following formula:

$$S = m / \rho l,$$

where  $m$  is the IS mass,  $l$  is the IS length,  $\rho = 1.05$  g/cm<sup>3</sup> as described by R.E. Garfield *et al.* [15].

The results were presented as  $Me$  (Q1; Q3), where  $Me$  is the median; Q1, Q3 are the 1<sup>st</sup> and 3<sup>rd</sup> quartiles, respectively. The significance of differences between groups was assessed using the nonparametric Mann-Whitney test. The differences were considered significant at  $p < 0.05$ .

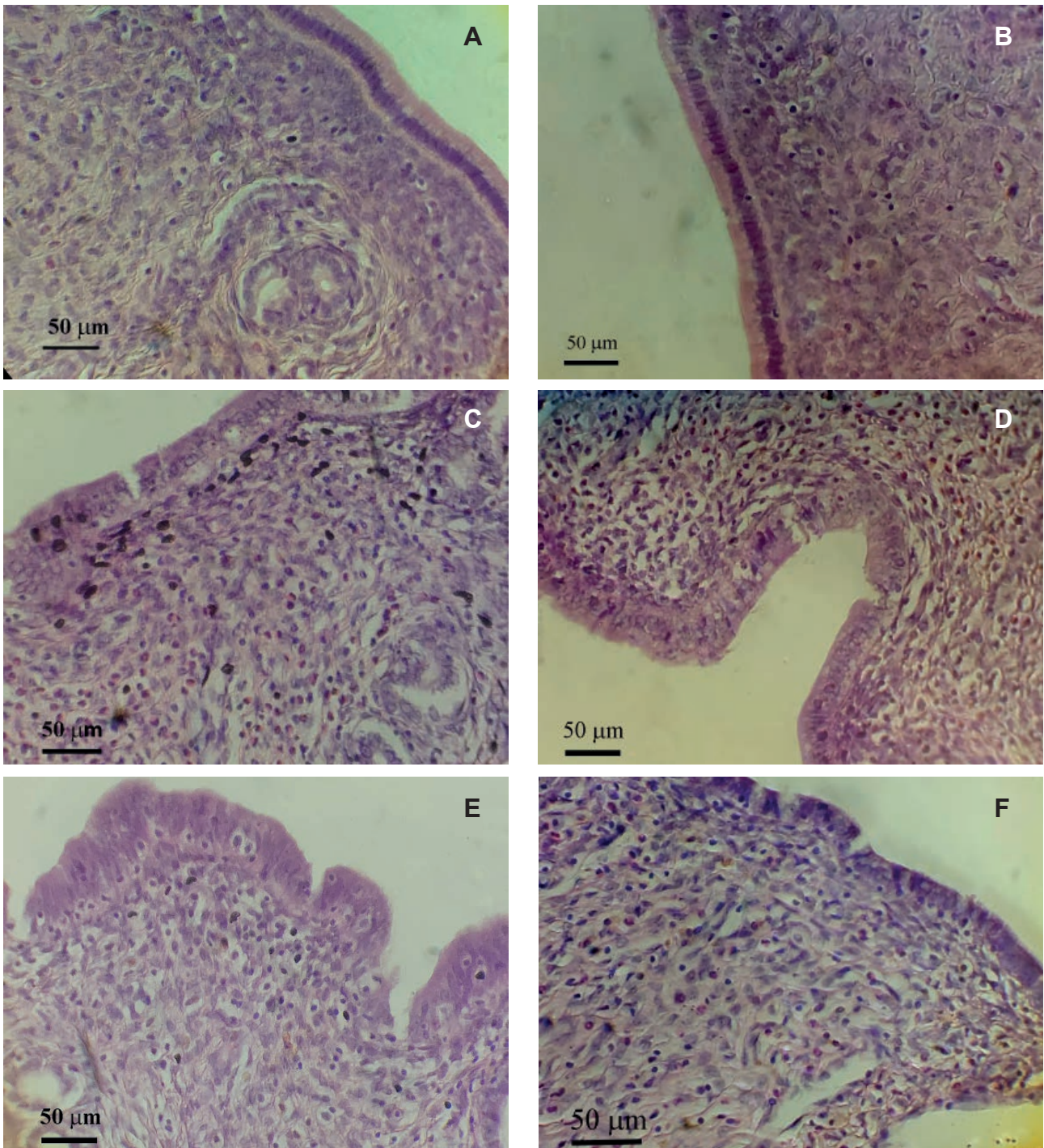
### Results and discussion

The uteri of rats from all experimental groups were of normal histological structure. The endometrium of saline-injected animals showed two layers, namely epithelial and lamina propria, formed by loose fibrous connective tissue, containing uterine glands. Depending on the estrous cycle, the endometrium was represented by either cuboidal or columnar epithelium with mitotic elements during diestrus and proestrus (Fig. 1A), a pronounced degeneration of glandular epithelium and leukocyte infiltration during estrus (Fig. 1C), simultaneously with mitotic signs and degeneration of epithelial cells during metaestrus (Fig. 1E). Three layers of smooth muscle cells arranged circularly, obliquely, and longitudinally, separated by layers of loose connective tissue were seen in myometrium.

Histological analysis of uterine wall and endometrium structure (Fig. 1B, D, F), as well as quantitative analysis of myometrial thickness (Table) displayed no difference in animals received DRGCE and saline.

Isolated uterine strips of rats from all groups were characterized by basal UCA, manifested in rare spontaneous low amplitude rhythmic contractions (Fig. 2). The application of 4 nM OT increased the contractile frequency and amplitude. Herewith, the contraction curve had two pronounced components: tonic and phase ones.





**Рис. 1.** Мікрофотографії гістологічних препаратів ендометрію матки щурів за умов введення ФР (A, C, E) або КЕСГ (B, D, F): A, B – дієструс; C, D – еструс; E, F – метаеструс. Забарвлення гематоксиліном та еозином.

**Fig. 1.** Micrographs of histological preparations of uterine endometrium of rats injected with either saline (A, C, E) or DRGCE (B, D, F): A, B –diestrus; C, D – estrus; E, F – metaestrus. H&E stain.

скорочень невеликої амплітуди (рис. 2). Аплікація ОТ у концентрації 4 нМ приводила до збільшення частоти та амплітуди скорочень. При цьому вид кривої скорочень мав два виражених компоненти – тонічний та фазовий.

Базальна ЧС не відрізнялася між групами щурів різного віку (таблиця). Сила ізометричного скорочення у щурів ПРВ із введенням ФР

There was no difference in basal CF between the rat groups of different ages (Table). The strength of isometric contraction in the saline-injected LRA rats (group 3) was 28.6% ( $p = 0.022$ ) lower vs. the RA rats with saline (group 1).

In RA rats, the UCA indices (basal and OT-induced CF, CA and SIC) did not significantly differ in groups, received either DRGCE or saline (Table).





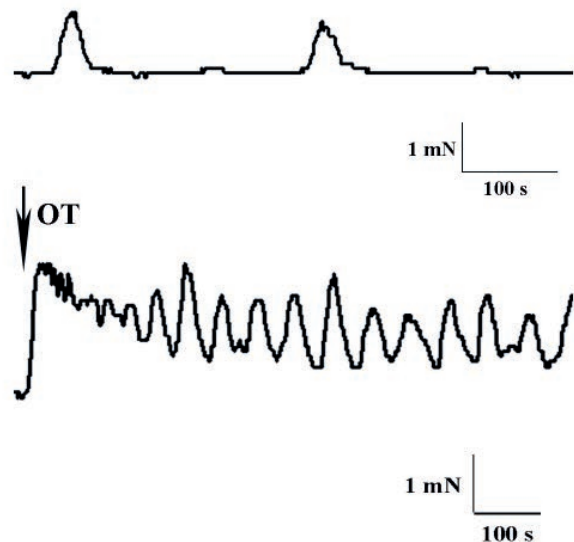
(група 3) була на 28,6% ( $p = 0,022$ ) нижче, ніж у щурів РВ із введенням ФР (група 1).

У щурів РВ показники САМ (базальна та ОТ-індукована ЧС, АС і СІС) значуще не відрізнялися в групах із введенням КЕСГ або ФР (таблиця). У щурів ПРВ після введення КЕСГ спостерігалось значуще збільшення ОТ-індукованої ЧС на 25%, АС – на 9,8% та СІС – на 30% порівняно з групою того ж самого віку тварин, яким вводили ФР.

Наше припущення про те, що КЕСГ і, можливо, розміщені в ньому НФ, можуть впливати на САМ, підтвердилося результатами досліджень. У щурів ПРВ, які отримували КЕСГ протягом 9 діб, значуще підвищилися показники САМ порівняно з тваринами, яким вводили ФР. На користь того, що цей ефект реалізується не за рахунок гіпертрофії або гіперплазії гладеньком'язових міоцитів, свідчать нормальні показники середньої товщини міометрію матки (таблиця).

Отримані дані можна пояснити наступним чином. Периферична іннервація матки представлена чутливими, парасимпатичними та симпатичними нейронами, які регулюють скорочувальну активність гладеньких м'язів, наповнення мікроциркуляторного русла, секрецію залоз і відповідають за передачу інформації у центральну нервову систему. Відомо, що фізіологічні перебудови іннервації матки відбуваються протягом всього репродуктивного періоду життя і, насамперед, під час вагітності [2, 3, 6, 16, 29]. Регуляція денервації і регенерації нервових закінчень у матці знаходяться під контролем естрогенів та НФ [5, 6, 17]. Встановлено, що НФ та НФ-подібні фактори синтезуються безпосередньо в ендометрії й міометрії матки [6, 7]. Крім того, в органі широко експресовані рецептори до НФ [24], а у тварин із генетично-детермінованим дефектом цього пулу рецепторів порушується фізіологічний процес ремоделювання іннервації матки [6]. У дослідженні D. Krizsan-Agbas та співавт. [17] встановлено, що експланти міометрію викликали ріст та розгалуження аксонів клітин нервових гангліїв під час їх сумісного культивування *in vitro*. Якщо нейропластичність матки та реалізація її нормальної скорочувальної функції залежить зокрема, й від НФ, то можна припустити, що отриманий ефект підвищення САМ пов'язаний зі збільшенням рівня НФ за рахунок їх екзогенного введення у складі КЕСГ. Однак слід враховувати той факт, що інші біологічно активні речовини кріоекстракту можуть також викликати цей ефект.

Попередні експериментальні дослідження M. Elmes та співавт. [13] показали, що спонтанна скорочувальна активність міометрію у старих 24-місячних щурів була втричі нижчою, ніж



**Рис. 2.** Репрезентативні криві скорочення ІС матки щурів: верхній трек – спонтанні скорочення; нижній трек – ОТ-індуковані скорочення.

**Fig. 2.** Representative curves of rat uterine IS contractions: upper track is spontaneous contractions; bottom track is OT-induced ones.

The LRA rats after DRGCE introduction displayed a significant increase in OT-induced CF, CA and SIC by 25, 9.8 and 30% respectively, as compared with the saline-injected group of the same age.

These findings confirmed our assumption that DRGCE and, likely NFs within it, could affect the UCA. The LRA rats, received DRGCE for 9 days, showed a significant increase in UCA indices as compared with the saline-injected ones. The fact that neither hypertrophy nor hyperplasia of smooth muscle myocytes can produce such an effect is evidenced by normal average thickness of uterine myometrium (Table).

Our findings may be interpreted in the following way. Peripheral uterine innervation is represented by sensory, parasympathetic and sympathetic neurons, regulating the contractile activity of smooth muscles, microvasculature filling, gland secretion, and being responsible for information transfer to the central nervous system. It is known that physiological rearrangements of uterine innervation occur throughout the reproductive period of life and, above all, during pregnancy [1, 2, 5, 16, 29]. Regulation of denervation and regeneration of nerve endings in the uterus are controlled by estrogen and NFs [4, 5, 17]. The NFs and NF-like factors were found to be directly synthesized in uterine endometrium and myometrium [5, 6]. Furthermore, the NF receptors are widely expressed in a body [24], and a physiological remodeling of uterine innervation is disordered in animals with a genetically



Показники товщини міометрію та скорочувальної активності матки щурів різних груп після введення фізіологічного розчину або кріоекстракту спінальних гангліїв

Indices of uterine myometrial thickness and contractile activity of rats from different groups after either saline or DRGCE administration

Показник Index	Групи 1 та 2 Groups 1 and 2			Групи 3 та 4 Groups 3 and 4		
	ФР Saline	КЕСГ DRGCE	$p$ між групами $p$ between groups	ФР Saline	КЕСГ DRGCE	$p$ між групами $p$ between groups
Товщина міометрію, мкм Myometrial thickness, $\mu\text{m}$	116 (99; 135)	115 (114; 138)	0,601	125 (119; 185)	112 (112; 115)	0,297
Базальна ЧС, скорочень/5 хв Basal CF/5 min	1,0 (1,0; 1,0)	2,0 (1,0; 2,2)	0,296	2,2 (1,7; 2,6)	2,0 (1,0; 2,0)	0,327
ОТ-індукована ЧС, скорочень/5 хв OT-induced CF/5 min	4,0 (2,8; 4,0)	4,5 (4,5; 5,5)	0,094	4,0 (3,3; 4,0)	5,0 (4,5; 5,0)	0,015*
ОТ-індукована АС, мН OT-induced CA, mN	11,25 (11,23; 11,66)	11,98 (10,90; 12,52)	0,676	11,42 (10,73; 11,61)	12,55 (11,96; 12,68)	0,001*
ОТ-індукована СІС, (г × с)/см <sup>2</sup> OT-induced SIC, (g × s)/cm <sup>2</sup>	46,0 (40,7; 69,6)	44,1 (39,6; 49,5)	0,531	32,8 (31,0; 34,5)	42,7 (42,2; 49,1)	0,036*

**Примітка:** \* – показник значуще відрізняється між групами відповідного віку з введенням КЕСГ та ФР,  $p < 0,05$ .

**Note:** \* – index is significantly different between groups of corresponding age, received DRGCE and saline,  $p < 0.05$ .

у молодих 8-місячних. Механізм зниження САМ із віком дотепер детально не вивчено. Раніше було встановлено, що причина не пов'язана з експресією трьох основних білків, асоційованих із САМ: PTGS2, CAV-1 і GJA1 [13]. Відомо, що з віком у матці змінюється експресія генів, які кодують іонний транспорт, метаболізм стероїдних гормонів і рецепторів до утеротоніків [13]. У наших експериментах не спостерігалось значущої різниці базальної скорочувальної активності ІС, отриманих із матки 6- і 14-місячних щурів. Однак сила ОТ-індукованого скорочення ІС у щурів ПРВ була нижчою, ніж у щурів РП.

Окситоцин є нейропептидом-утеротоніком, який регулює САМ не тільки під час пологів, але й протягом всього репродуктивного періоду життя жінки [18, 26]. Встановлено, що фазовий компонент ОТ-індукованої відповіді гладеньких м'язів матки пов'язаний із притоком іонів  $\text{Ca}^{2+}$  через потенціал-залежні кальцієві канали, тоді як його тонічний компонент обумовлений впливом на рецептор-залежні канали [12]. Рецептор до ОТ – це трансмембранний білок, який належить до суперродини рецепторів, асоційованих із G-білком (GPCR) [27]. Під час зв'язування ОТ із рецептором одночасно активуються декілька шляхів, які ведуть до появи САМ. Основним є процес передачі сигналу через систему G-білок –

determined defect of this receptor pool [5]. D. Krizsan-Agbas *et al.* [17] have found the myometrial explants to induce the growth and branching of nerve ganglion cell axons during their co-culture *in vitro*. If the uterine neuroplasticity and implementation of its normal contractile function depend particularly on NFs, the obtained effect of UCA increase may be assumed as associated to a rise of NFs level due to their exogenous introduction within the DRGCE. However, the fact that other biologically active substances of cryoextract may also produce this effect should be taken into account.

Previous experiments of M. Elmes *et al.* [12] showed the spontaneous contractile activity of myometrium in aged 24-month-old rats to be three times lower than in young 8-month-old ones. The mechanism of UCA reduction with age is still not widely understood. The reason of such a decrease was previously shown as not related to the expression of three major UCA-associated proteins: PTGS2, CAV-1 and GJA1 [12]. It is known that the expression of genes, encoding an ion transport, metabolism of steroid hormones and uterotonic receptors, changes in the uterus with age [12]. Our experiments displayed no significant difference in basal contractile activity of ISs, obtained from uterus of 6- and 14-month-old rats. However, the strength of OT-induced re-



фосфоліпаза С – інозитол 1,4,5-трифосфат (InsP3). Крім того, сигнал передається через MAP- та Rho-кінази, що сприяє не тільки скороченню міометрію, але й збільшенню продукції простагландинів. Дослідження М. Elmes та співавторів [13] дозволяють припустити, що вікові зміни САМ стосуються, насамперед, G-білок-асоційованої стимуляції та скорочення.

Результати наших експериментів показали більшу чутливість міометрію щурів ПРВ до введення КЕСГ, оскільки було встановлено підвищення показників ОТ-індукованої САМ. У щурів РВ такого ефекту не спостерігалось. Даний факт узгоджується з результатами роботи М. Elmes та співавторів [13], які встановили більш високу чутливість матки старих щурів до утеротоніків.

Таким чином, нами показано, що КЕСГ проявляє стимулюючу дію на САМ щурів ПРВ без зміни її основних гістологічних характеристик. Оскільки КЕСГ є складною композицією, необхідні подальші дослідження для встановлення складових, які відповідають за описаний біологічний ефект.

### Висновки

У роботі доведено зниження з віком скоротливої активності матки, що пов'язана з рецепторним механізмом скорочення. Про це свідчить падіння на 28,6% сили ОТ-індукованого ізометричного скорочення ізольованих смужок матки 14-місячних щурів у порівнянні з 6-місячними. Введення КЕСГ як біологічно активної композиції, що містить нейротрофічні фактори, сприяє відновленню параметрів скорочення матки у 14-місячних щурів: ЧС – на 25%, АС – на 9,8 %, СІС – на 30% в порівнянні з щурами того ж віку без введення КЕСГ. Даний ефект спостерігається на фоні збереження нормальної гістологічної будови матки та незмінної товщини міометрію.

### Література

1. Глоба ВЮ, Бондаренко ТП, Али СГ, и др. Сократительная активность детрузора крыс с инфравезикальной обструкцией после введения криоэкстракта спинальных ганглиев и биологически активных продуктов культуры мантийных глиоцитов. Проблемы криобиологии і криомедицини. 2019; 29 (2): 164.
2. Arrowsmith S, Robinson H, Noble K, et al. What do we know about what happens to myometrial function as women age. J Muscle Res Cell Motil. 2012; 33 (3-4): 209–17.
3. Barcena de Arellano ML, Oldeweme J, Arnold J, et al. Remodeling of estrogen-dependent sympathetic nerve fibers seems to be disturbed in adenomyosis. Fertil Steril. 2013; 100 (3): 801–9.

duction of IS in LRA rats was lower vs. the RA ones. Oxytocin is the neuropeptide-uterotonic agent, regulating UCA not only during labor but throughout a woman's reproductive life as well [18, 26]. It has been established that the phase component of OT-induced response of uterine smooth muscles is associated with the Ca<sup>2+</sup> ion influx through potential-dependent calcium channels, whereas its tonic component is due to the impact on receptor-dependent channels [11]. The OT receptor is a transmembrane protein, belonging to the superfamily of G-protein-coupled receptors (GPCR) [27]. When OT binds to the receptor, several pathways are simultaneously activated, resulting in the UCA appearance. The main pathway is the signal transmission through the G-protein – phospholipase C – inositol 1,4,5-triphosphate (InsP3) system. In addition, the signal is transmitted through MAP- and Rho kinases, thereby promoting not only the myometrial contraction, but increase in prostaglandin production as well. The study of M. Elmes *et al.* [12] suggests the age-related changes in UCA to be primarily associated with the G-protein-coupled stimulation and contraction.

Our findings displayed a higher sensitivity of LPA rat myometrium to DRGCE introduction, evidenced by an increase in OT-induced UCA. Such an effect was not observed in RA rats. This fact is consistent with the results reported by M. Elmes *et al.* [12], who found a higher sensitivity of aged rat uterus to uterotonic.

Thus, we have shown the DRGCE to have a stimulating effect on UCA in LRA rats without changing its basic histological characteristics. Since DRGCE is a complex composition, further studies are needed to identify the components responsible for the described biological effect.

### Conclusions

In this research a decrease with age in the contractile activity of the uterus, associated with the receptor mechanism of contraction, has been confirmed. This is evidenced by a 28.6% reduction in the strength of the OT-induced isometric contraction of isolated uterine strips in 14-month-old rats compared with 6-month-old rats. The introduction of DRGCE as a biologically active composition containing neurotrophic factors, helps to restore the parameters of uterine contractions in 14-month-old rats: heart rate – by 25%, CA – by 9.8%, SIC – by 30% compared with rats of the same age without introduction of DRGCE. This effect is observed on the background of maintaining the normal histological structure of uterus and constant myometrium thickness.





4. Boyen GB, Steinkamp M, Reinshagen M, et al. Nerve growth factor secretion in cultured enteric glia cells is modulated by proinflammatory cytokines. *J Neuroendocrinol.* 2006; 18 (11): 820–25.
5. Brauer MM. Plasticity in uterine innervation: State of the art. *Curr Protein Pept Sci.* 2017; 18(2): 108–19.
6. Brauer MM, Smith PG. Estrogen and female reproductive tract innervation: cellular and molecular mechanisms of autonomic neuroplasticity. *Auton Neurosci.* 2015; 187: 1–17.
7. Browne AS, Yu J, Huang RP, et al. Proteomic identification of neurotrophins in the eutopic endometrium of women with endometriosis. *Fertil Steril.* 2012; 98 (3): 713–19.
8. Camerino C, Conte E, Cannone M, et al. Nerve growth factor, brain-derived neurotrophic factor and osteocalcin gene relationship in energy regulation, bone homeostasis and reproductive organs analyzed by mRNA quantitative evaluation and linear correlation analysis [Internet]. *Front Physiol*; 2016 [cited 2016 Oct 13]. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fphys.2016.00456/full>.
9. Chai NL, Dong L, Li ZF, et al. Effects of neurotrophins on gastrointestinal myoelectric activities of rats. *World J Gastroenterol.* 2003; 9 (8): 1874–7.
10. Chang HM, Wu HC, Sun ZG, et al. Neurotrophins and glial cell line-derived neurotrophic factor in the ovary: physiological and pathophysiological implications. *Hum Reprod Update.* 2019; 25 (2): 224–42.
11. Cruz G, Fernandois D, Paredes A. Ovarian function and reproductive senescence in the rat: Role of ovarian sympathetic innervation. *Reproduction.* 2017; 153 (2): 157–74.
12. Edwards D, Good DM, Granger SE, et al. The spasmogenic action of oxytocin in the rat uterus—comparison with other agonists. *Br J Pharmacol.* 1986; 88 (4): 899–908.
13. Elmes M, Szyszka A, Pauliat C, et al. Maternal age effects on myometrial expression of contractile proteins, uterine gene expression, and contractile activity during labor in the rat [Internet]. *Physiol Rep*; [cited 2015 April 15]. Available from: <https://physoc.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.14814/phys2.12305>
14. Enes J, Haburčák M, Sona S, et al. Satellite glial cells modulate cholinergic transmission between sympathetic neurons [Internet]. *PLoS ONE*; 2020 [cited 2020 Feb 4]. Available from: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0218643>.
15. Garfield RE, Beir S. Increased myometrial responsiveness to oxytocin during term and preterm labor. *Am J Obstet Gynecol.* 1989; 161: 454–61.
16. Haase EB, Buchman J, Tietz AE, et al. Pregnancy-induced uterine neuronal degeneration in the rat. *Cell Tissue Res.* 1997; 288 (2): 293–306.
17. Krizsan-Agbas D, Pedchenko T, Hasan W, et al. Oestrogen regulates sympathetic neurite outgrowth by modulating brain derived neurotrophic factor synthesis and release by the rodent uterus. *Eur J Neurosci.* 2003; 18 (10): 2760–8.
18. Lippert TH, Mueck AO, Seeger H, et al. Effects of oxytocin outside pregnancy. *Horm Res.* 2003; 60 (6): 262–71.
19. Montan S. Increased risk in the elderly parturient. *Curr Opin Obstet Gynecol.* 2007; 19: 110–12.
20. bata K, Tsujino H, Yamanaka H, et al. Expression of neurotrophic factors in the dorsal root ganglion in a rat model of lumbar disc herniation. *Pain.* 2002; 99 (1–2): 121–32.
21. Rhee JW, Zhang L, Ducsay CA. Suppression of myometrial contractile responses to oxytocin after different durations of chronic hypoxia in the near-term pregnant rat. *Am J Obstet Gynecol.* 1997; 177 (3) 639–44.
22. Richeri A, Bianchimano P, Mármol NM, et al. Plasticity in rat uterine sympathetic nerves: the role of TrkA and p75 nerve growth factor receptors. *J Anat.* 2005; 207 (2) 125–34.
23. Sengupta P. The laboratory rat: Relating its age with human's. *Int J Prev Med.* 2013; 4 (6) 624–30.

## References

1. Arrowsmith S, Robinson H, Noble K, et al. What do we know about what happens to myometrial function as women age. *J Muscle Res Cell Motil.* 2012; 33 (3-4): 209–17.
2. Barcena de Arellano ML, Oldeweme J, Arnold J, et al. Remodeling of estrogen-dependent sympathetic nerve fibers seems to be disturbed in adenomyosis. *Fertil Steril.* 2013; 100 (3): 801–9.
3. Boyen GB, Steinkamp M, Reinshagen M, et al. Nerve growth factor secretion in cultured enteric glia cells is modulated by proinflammatory cytokines. *J Neuroendocrinol.* 2006; 18 (11): 820–25.
4. Brauer MM. Plasticity in uterine innervation: State of the art. *Curr Protein Pept Sci.* 2017; 18(2): 108–19.
5. Brauer MM, Smith PG. Estrogen and female reproductive tract innervation: cellular and molecular mechanisms of autonomic neuroplasticity. *Auton Neurosci.* 2015; 187: 1–17.
6. Browne AS, Yu J, Huang RP, et al. Proteomic identification of neurotrophins in the eutopic endometrium of women with endometriosis. *Fertil Steril.* 2012; 98 (3): 713–19.
7. Camerino C, Conte E, Cannone M, et al. Nerve growth factor, brain-derived neurotrophic factor and osteocalcin gene relationship in energy regulation, bone homeostasis and reproductive organs analyzed by mRNA quantitative evaluation and linear correlation analysis [Internet]. *Front Physiol*; 2016 [cited 2016 Oct 13]. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fphys.2016.00456/full>.
8. Chai NL, Dong L, Li ZF, et al. Effects of neurotrophins on gastrointestinal myoelectric activities of rats. *World J Gastroenterol.* 2003; 9 (8): 1874–7.
9. Chang HM, Wu HC, Sun ZG, et al. Neurotrophins and glial cell line-derived neurotrophic factor in the ovary: physiological and pathophysiological implications. *Hum Reprod Update.* 2019; 25 (2): 224–42.
10. Cruz G, Fernandois D, Paredes A. Ovarian function and reproductive senescence in the rat: Role of ovarian sympathetic innervation. *Reproduction.* 2017; 153 (2): 157–74.
11. Edwards D, Good DM, Granger SE, et al. The spasmogenic action of oxytocin in the rat uterus—comparison with other agonists. *Br J Pharmacol.* 1986; 88 (4): 899–908.
12. Elmes M, Szyszka A, Pauliat C, et al. Maternal age effects on myometrial expression of contractile proteins, uterine gene expression, and contractile activity during labor in the rat. *Physiol Rep.* 2015; 3 (4): e12305.
13. Enes J, Haburčák M, Sona S, et al. Satellite glial cells modulate cholinergic transmission between sympathetic neurons [Internet]. *PLoS ONE*; 2020 [cited 2020 Feb 4]. Available from: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0218643>.
14. Garfield RE, Beir S. Increased myometrial responsiveness to oxytocin during term and preterm labor. *Am J Obstet Gynecol.* 1989; 161: 454–61.
15. Globa VY, Bondarenko TP, Ali SG, et al. Contractile activity of detrusor of rats with infravesical obstruction after introduced cryoextract of spinal ganglia and biologically active products of mantle gliocyte culture. *Probl Cryobiol Cryomed.* 2019; 29 (2): 164.
16. Haase EB, Buchman J, Tietz AE, et al. Pregnancy-induced uterine neuronal degeneration in the rat. *Cell Tissue Res.* 1997; 288 (2): 293–306.
17. Krizsan-Agbas D, Pedchenko T, Hasan W, et al. Oestrogen regulates sympathetic neurite outgrowth by modulating brain derived neurotrophic factor synthesis and release by the rodent uterus. *Eur J Neurosci.* 2003; 18 (10): 2760–8.
18. Lippert TH, Mueck AO, Seeger H, et al. Effects of oxytocin outside pregnancy. *Horm Res.* 2003; 60 (6): 262–71.
19. Montan S. Increased risk in the elderly parturient. *Curr Opin Obstet Gynecol.* 2007; 19: 110–12.
20. Obata K, Tsujino H, Yamanaka H, et al. Expression of neurotrophic factors in the dorsal root ganglion in a rat model of lumbar disc herniation. *Pain.* 2002; 99 (1–2): 121–32.



24. Shi Z, Arai KY, Jin W, et al. Expression of nerve growth factor and its receptors NTRK1 and TNFRSF1B is regulated by estrogen and progesterone in the uteri of golden hamsters. *Biol Reprod.* 2006; 74 (5): 850–6.
25. Smith GSC, Cordeaux Y, White IR, et al. The effect of delaying childbirth on primary cesarean section rates [Internet]. *PLoS Med*; 2008 [cited 2008 July 1]. Available from: <https://journals.plos.org/plosmedicine/article?id=10.1371/journal.pmed.0050144>.
26. Uvnäs-Moberg K, Ekström-Bergström A, Berg M, et al. Maternal plasma levels of oxytocin during physiological childbirth – a systematic review with implications for uterine contractions and central actions of oxytocin. *BMC Pregnancy Childbirth.* 2019; 19: 285.
27. Vrachnis N, Malamas FM, Sifakis S, et al. The oxytocin-oxytocin receptor system and its antagonists as tocolytic agents [Internet]. *Int J Endocrinol*; 2011[cited 2011 Jul 2011]. Available from: <https://downloads.hindawi.com/journals/ije/2011/350546.pdf>.
28. Watabe K, Fukuda T, Tanaka J, et al. Spontaneously immortalized adult mouse Schwann cells secrete autocrine and paracrine growth promoting activities. *J Neurosci Res.* 1995; 41: 279–90.
29. Zoubina EV, Smith PG. Axonal degeneration and regeneration in rat uterus during the estrous cycle. *Auton Neurosci.* 2000; 84 (3): 176–85.
21. Rhee JW, Zhang L, Ducsay CA. Suppression of myometrial contractile responses to oxytocin after different durations of chronic hypoxia in the near-term pregnant rat. *Am J Obstet Gynecol.* 1997; 177 (3) 639–44.
22. Richeri A, Bianchimano P, Marmol NM, et al. Plasticity in rat uterine sympathetic nerves: the role of TrkA and p75 nerve growth factor receptors. *J Anat.* 2005; 207 (2)125–34.
23. Sengupta P. The laboratory rat: Relating its age with human's. *Int J Prev Med.* 2013; 4 (6) 624–30.
24. Shi Z, Arai KY, Jin W, et al. Expression of nerve growth factor and its receptors NTRK1 and TNFRSF1B is regulated by estrogen and progesterone in the uteri of golden hamsters. *Biol Reprod.* 2006; 74 (5): 850–6.
25. Smith GSC, Cordeaux Y, White IR, et al. The effect of delaying childbirth on primary cesarean section rates [Internet]. *PLoS Med*; 2008 [cited 2008 July 1]. Available from: <https://journals.plos.org/plosmedicine/article?id=10.1371/journal.pmed.0050144>.
26. Uvnäs-Moberg K, Ekström-Bergström A, Berg M, et al. Maternal plasma levels of oxytocin during physiological childbirth – a systematic review with implications for uterine contractions and central actions of oxytocin. *BMC Pregnancy Childbirth.* 2019; 19: 285.
27. Vrachnis N, Malamas FM, Sifakis S, et al. The oxytocin-oxytocin receptor system and its antagonists as tocolytic agents [Internet]. *Int J Endocrinol*; 2011[cited 2011 Jul 2011]. Available from: <https://downloads.hindawi.com/journals/ije/2011/350546.pdf>.
28. Watabe K, Fukuda T, Tanaka J, et al. Spontaneously immortalized adult mouse Schwann cells secrete autocrine and paracrine growth promoting activities. *J Neurosci Res.* 1995; 41: 279–90.
29. Zoubina EV, Smith PG. Axonal degeneration and regeneration in rat uterus during the estrous cycle. *Auton Neurosci.* 2000; 84 (3): 176–85.

