

О. В. Долгих, Ю. В. Агафонов и А. Л. Зашихин

АДАПТИВНАЯ ТРАНСФОРМАЦИЯ МИОМЕТРИЯ КРЫС ПРИ РАЗВИТИИ БЕРЕМЕННОСТИ И ПОСЛЕ РОДОВ

Кафедра гистологии, цитологии и эмбриологии (зав. — проф. А. Л. Зашихин),
ГБОУ ВПО «Северный государственный медицинский университет», г. Архангельск

Изучен миометрий разных отделов стенки матки 40 белых небеременных крыс на разных стадиях беременности и в течение 7 сут после родов. В работе использованы методы иммуноцитохимии (выявление апоптотических клеток с помощью антител к рецептору фактора некроза опухолей), комплексный морфометрический и цитохимический анализ содержания ДНК в ядрах и суммарного белка в цитоплазме изолированных гладких миоцитов (ГМ). Выявлены закономерности перестройки структуры популяции ГМ стенки матки в различные физиологические периоды. Реализация основных механизмов трансформации миометрия во время беременности — гиперплазия и гипертрофия — различна в разных отделах матки, что обусловлено их специализированной функциональной нагрузкой. В ранние сроки беременности в популяции ГМ всех отделов матки преобладают малые ГМ, отмечается увеличение пролиферативного потенциала. К концу беременности в рогах увеличивается доля больших ГМ, активируются синтетические процессы в цитоплазме, в теле и шейке матки увеличивается представительство средних клеток. На 7-е сутки послеродовой инволюции показатели структуры популяции ГМ рогов близки параметрам миометрия интактных крыс, в теле и шейке матки крыс наблюдается рост числа малых ГМ.

Ключевые слова: миометрий, пролиферация, инволюция, апоптоз, изолированные гладкие миоциты

Цитологические механизмы, развивающиеся во время физиологической адаптивной трансформации матки при развитии беременности, исследованы достаточно полно [8–10, 19]. Инволюционные процессы миометрия изучены в значительно меньшей степени. Матка млекопитающих во время беременности подвергается значительным структурным преобразованиям, так, у человека ее масса в этот период увеличивается в среднем с 60–75 до 1000–1200 г [5]. Гладкая мышечная ткань (ГМТ) матки обладает большой амплитудой физиологической перестройки и фенотипических трансформаций в течение полового цикла и беременности. Изменяются экспрессия актина, активность протеинкиназ, что вызывает изменение сократительных свойств гладких миоцитов (ГМ) и их адаптацию к физиологическим потребностям в разные сроки беременности и после родов [19]. Одновременно меняется организация цитоскелета, межклеточных контактов и связей ГМ с элементами межклеточного вещества [17]. Изменяется интенсивность процессов пролиферации и апоптоза. Существуют разные точки зрения о механизмах увеличения массы матки во время беременности. По результатам исследования В. Н. Бескова [1], в начале беременности у крыс наблюдается гипертрофия ГМ, на 6–10-е сутки — массовое деление, после

15-х суток — максимальное растяжение и дистрофия отдельных ГМ. По данным E. G. Afting и J. S. Elce [12], в первой половине беременности наблюдаются процессы гипертрофии ГМ, во второй ее половине происходит усиление синтеза ДНК. Исследования Е. В. Дубинина [2] показали, что к концу беременности матка крыс набирает максимальную массу в основном за счет процессов гипертрофии ГМ [16]. Другие исследователи показали, что высокая степень гиперплазии характерна для миометрия ранних сроков беременности и происходит в основном в продольном мышечном слое, а во второй половине беременности наблюдается гипертрофия ГМ [13, 19].

Высокая пластичность миометрия в различные физиологические периоды обусловлена интеграцией ГМ и их различной реакцией на изменяющиеся условия. Цель настоящего исследования — сравнительный структурно-метаболический анализ гладкомышечного компонента разных отделов стенки матки у интактных крыс, на разных стадиях беременности и после родов с оценкой структуры популяции ГМ.

Материал и методы. Исследования проведены на 40 белых беспородных половозрелых крысах массой 200–250 г в соответствии с «Руководством по содержанию и использованию лабораторных животных» [7], а также с соблюдением

Сведения об авторах:

Долгих Ольга Васильевна, Агафонов Юрий Витальевич, Зашихин Андрей Леонидович (e-mail: olvado@mail.ru), кафедра гистологии, цитологии и эмбриологии, ГБОУ ВПО «Северный государственный медицинский университет», 163000 Архангельск, пр. Троицкий, 51

правил гуманного обращения с животными (Report of the AVMA Panel on Euthanasia IAVMA, 2001). Стадии эстрального цикла определяли по картине влагалищных мазков. Чтобы получить беременных особей, крыс в эстральный период сажали на ночь в клетку с особями противоположного пола с испытанной плодовитостью. День, когда во влагалище обнаруживали сперму, считали первым днем беременности. Животных умерщвляли путем передозировки паров эфира. Образцы тканей рогов, тела и шейки матки брали утром: у небеременных крыс ($n=5$) на стадии диэструса (контроль), на 4-, 12-е и 20-е сутки беременности и на 1-, 2-, 4-, 7-е сутки после родов (по 5 животных на каждую временную точку).

Для морфометрического и цитофотометрического анализа ГМТ материал фиксировали при 5 °С в растворе 10% формалина на фосфатном буфере при pH 7,4 в течение 14–20 сут. Для анализа мышечной ткани использовали метод прицельной клеточной диссоциации [6], позволяющий точно выделять фрагменты ГМТ и осуществлять последующее разделение ГМ. Выявление ДНК в ядрах клеток проводили по методу Фельгена, с последующей цитоспектрофотометрией на сканирующем цитофотометре МФТХ-2М (ЛОМО, Россия), при длине волны 546 нм. Контролем служили мазки, не подвергшиеся гидролизу в растворе соляной кислоты. Анализ содержания суммарного белка в цитоплазме ГМ проводили при окраске амидочерным. Препараты сканировали при длине волны 580 нм. С помощью окулярного микрометра измеряли длину и ширину ГМ, малый и большой диаметры ядер. Их объемы рассчитывали по формуле эллипсоида. Цифровой материал обрабатывали методом вариационной статистики с вычислением среднего арифметического и его стандартной ошибки, коэффициента вариации, асимметрии и эксцесса. Различия измеряемых величин оценивали по t-критерию Стьюдента и считали значимыми при $P<0,05$. Обработку результатов проводили с помощью программы Statistica 6.0. Для выявления существования взаимосвязей между некоторыми параметрами ГМ использовали регрессионный анализ.

Для идентификации апоптотических изменений в ГМ проводили иммуногистохимическое окрашивание срезов с использованием моноклональных первичных антител к рецептору фактора некроза опухолей (TNF-R1) (Santa Cruz, США). Перед инкубацией в растворе первичных антител парафиновые срезы на стеклах депарафинировали в ксилоле, спиртах возрастающей концентрации. Затем обрабатывали 3% водным раствором перекиси водорода в течение 10 мин и преадсорбировали с 5% лошадиной сывороткой (Дако, Дания) 30 мин при комнатной температуре. После каждой операции срезы отмывали стандартным раствором фосфатно-солевого буфера (Sigma Immunochemicals, США). Экспозиция в растворах первичных антител — в течение 1 ч при комнатной температуре. Визуализацию реакции проводили с помощью вторичных биотинилированных антител с применением диаминобензидина для выявления реакции апоптоза. Препараты докрашивали квасцовым гематоксилином.

Результаты исследования. Статистически подтвержденная неоднородность популяции ГМ по объемным параметрам позволила выделить в ГМТ матки 3 субпопуляции ГМ: малые, средние и большие. Каждая из субпопуляций ГМ отличалась уровнем синтеза ДНК в ядре и белков в цитоплазме. Основу популяции составляли средние ГМ.

При беременности характер изменения структуры популяции ГМ в разных отделах матки оказался различным. В теле и шейке матки отмечалось уменьшение среднего объема ГМ на протяжении всей беременности, что проявилось увеличением представительства малых (от 10 до 48% и от 7 до 25% соответственно) и уменьшением доли больших ГМ (рис. 1). В рогах матки на 1-й неделе беременности наблюдалось резкое уменьшение среднего объема ГМ, что отразилось на структуре популяции и проявилось существенным возрастанием доли малых миоцитов (с 17 до 88%). Со 2-й недели беременности в рогах матки наблюдалось увеличение среднего объема ГМ, который достигал максимальных значений в конце беременности, превосходя показатели у небеременных крыс в 2 раза, что было обусловлено значительным увеличением числа средних и больших ГМ в популяции (до 51 и 44% соответственно). После родов характер изменения структуры популяции ГМ в разных отделах был также различным. В рогах матки с 1-х по 4-е сутки после родов наблюдалось резкое уменьшение среднего объема ГМ, что было связано с ростом доли малых ГМ (с 5 до 56%). В теле и шейке матки в 1-е сутки послеродовой инволюции наблюдался рост показателя среднего объема ГМ, что было обусловлено ростом числа больших миоцитов (до 50%), в последующие сутки наблюдалось уменьшение среднего объема клеток и увеличение доли малых ГМ в популяции. Со 2-х суток послеродовой инволюции миометрия во всех отделах матки отмечено уменьшение объемов ГМ в соответствии с изменениями структуры популяции в сторону увеличения доли малых ГМ (до 56% — в рогах, 16% — в теле, 20% — в шейке) (см. рис. 1). К 7-м суткам структура популяции ГМ в рогах была близка к параметрам в дородовой матке, в теле и шейке преобладали малые ГМ.

На 1-й неделе беременности во всех отделах матки наблюдалось усиление синтеза ДНК в ядрах. Однако в конце срока беременности происходило снижение количества гиперплоидных клеток, что связано с увеличением числа дифференцированных ГМ, в рогах матки в равной степени увеличивалась доля средних и больших ГМ, в теле и шейке возрастало количество средних ГМ в популяции. В 1-е сутки после родов уровень синтеза ДНК незначительно увеличивался во всех отделах матки, но со 2-х суток наблюдалось снижение общего содержания ДНК в миометрии крыс, что привело к увеличению в популяции доли малых ГМ во всех отделах матки.

Содержание белка в цитоплазме ГМ во всех отделах матки во время беременности возрастает

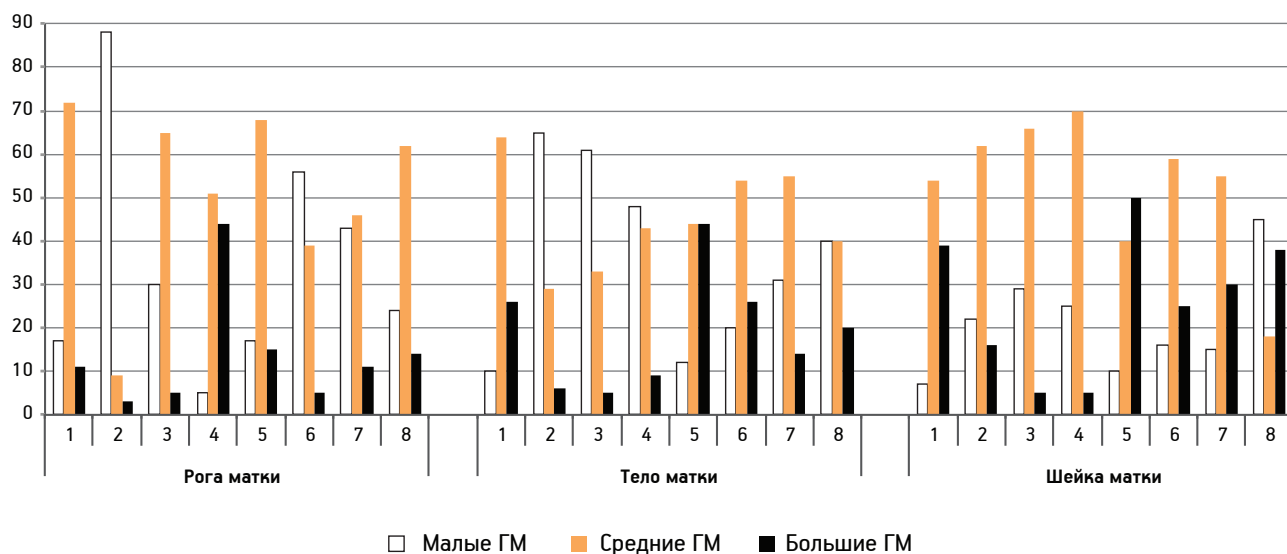


Рис. 1. Структура популяции гладких миоцитов (ГМ) исследованных отделов матки крыс в разные сроки беременности и после родов.

По оси абсцисс: 1 — небеременные животные; 2 — 1-я неделя беременности; 3 — 2-я неделя беременности; 4 — 3-я неделя беременности; 5 — 1-е сутки после родов; 6 — 2-е сутки после родов; 7 — 4-е сутки после родов; 8 — 7-е сутки после родов; по оси ординат — доля ГМ (%).

по сравнению с таковым у небеременных крыс. Максимальное значение этот показатель имел в рогах матки — к концу беременности, а в теле и шейке — в 1-е сутки после родов. К 7-м суткам послеродовой инволюции наблюдалось снижение содержания суммарного белка в ГМ всех отделов миометрия крыс (рис. 2). В ходе иммуноцитохимического исследования нами были получены данные о экспрессии TNF-R1 в ГМ матки в процессе послеродовой инволюции (рис. 3, а, б).

Обсуждение полученных данных. Результаты проведенного исследования подтверждают наличие взаимосвязи величины функциональной нагрузки разных отделов матки при трансформации ГМТ в ходе физиологической беременности, ранней послеродовой инволюции и динамического изменения метаболических параметров, а также структуры клеточных популяций. Поскольку рога матки у крыс являются местом имплантации зародышей, в них наблюда-

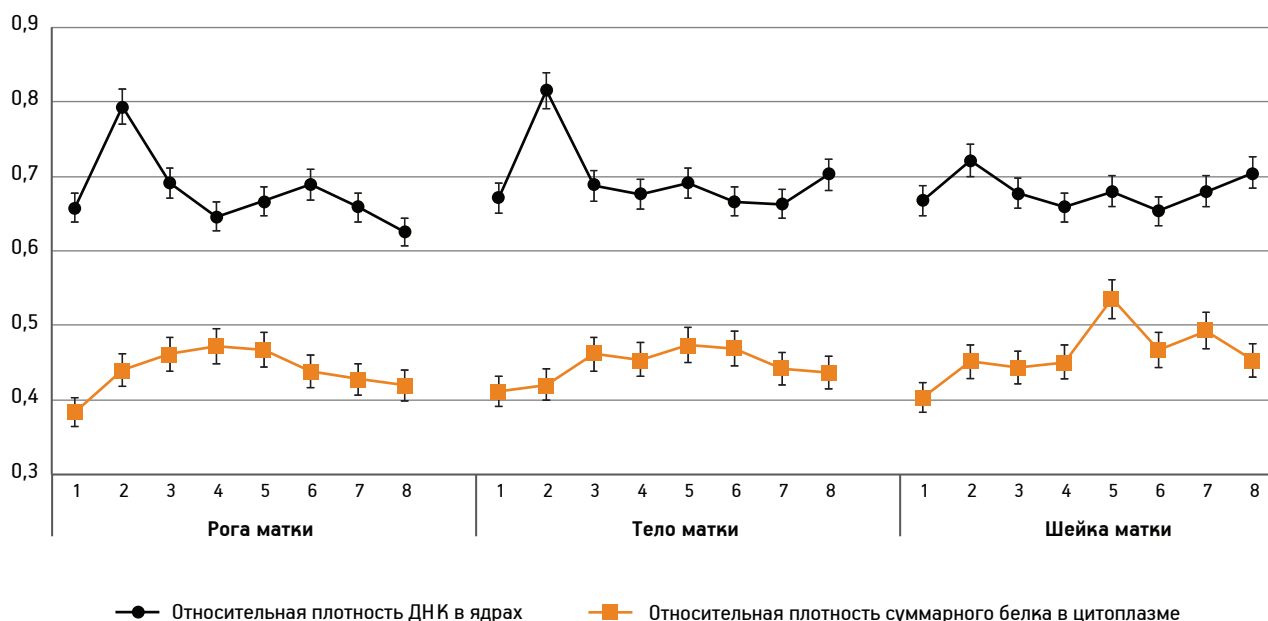


Рис. 2. Относительная плотность ДНК в ядрах и относительная плотность суммарного белка в цитоплазме изолированных гладких миоцитов разных отделов матки крыс.

По оси абсцисс — 1–8 — то же, что на рис. 1; по оси ординат — исследованные показатели (отн. ед.) Вертикальные отрезки — значения стандартной ошибки.

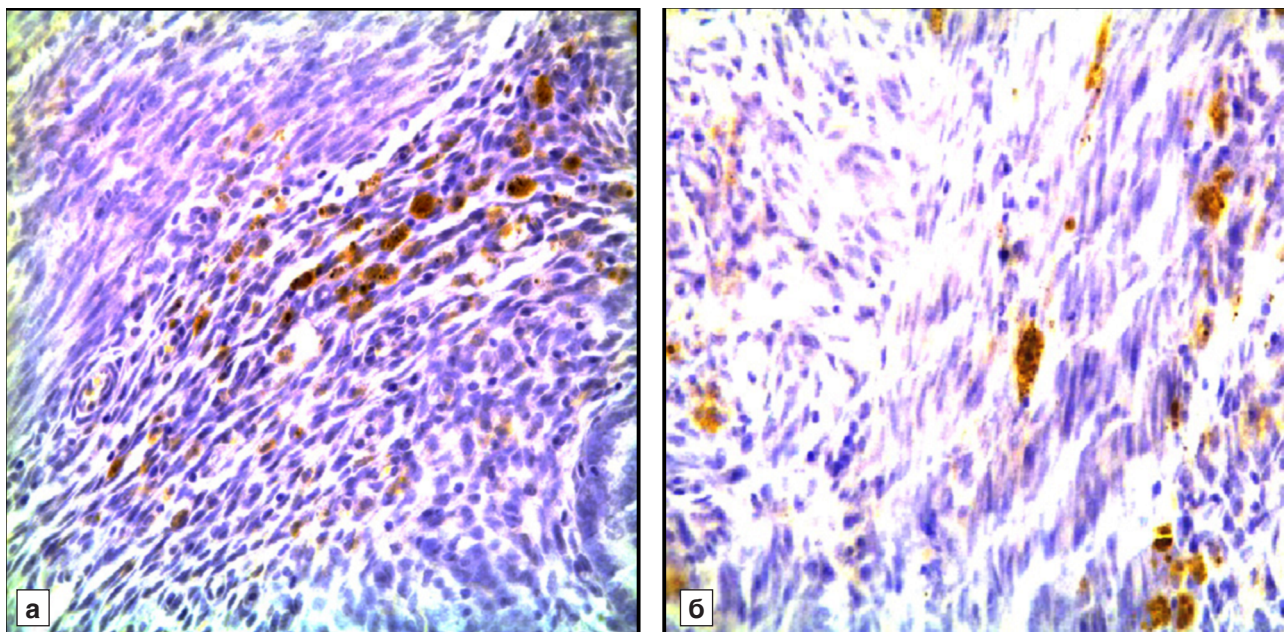


Рис. 3. Экспрессия TNF-R1 в гладких миоцитах мышечной оболочки рогов матки крыс на 4-е сутки после родов. а — проксимальный отдел; б — дистальный отдел. Иммуногистохимическая реакция. а — об. 20, ок. 10; б — об. 40, ок. 10.

ются наиболее значимые изменения структурно-метаболических параметров и перестройки популяции ГМ.

Перестройка структуры популяции ГМ в начале беременности включает увеличение их пролиферативной активности и элиминацию больших и части средних клеток. Об усилении пролиферативной активности ГМ свидетельствует повышение уровня синтеза ДНК. Полученные нами результаты подтверждают данные литературы, свидетельствующие о том, что в ранние сроки беременности во всех слоях миометрия наблюдается супрессию апоптоза вследствие высокой концентрации прогестерона [14]. Таким образом, процессы пролиферации превалируют над процессами элиминации, что обуславливает увеличение количества ГМ в 1-й половине беременности. В результате образуется достаточный пул клеток, которые затем подвергаются гипертрофии [9, 10, 13]. К концу беременности количество деструктивно измененных клеток, подвергающихся апоптозу, значительно превышает количество пролиферирующих ГМ [16].

Во 2-й половине беременности, вследствие повышения функциональной нагрузки, снижается уровень пролиферативной активности ГМ, активируются процессы синтеза, увеличиваются объемные показатели ГМ. Известно, что повышение уровня гамма-актина наблюдается в середине и в конце беременности, когда ГМ миометрия подвергаются гипертрофии [9, 10, 19]. Результаты настоящего исследования являются еще одним свидетельством в пользу этого утверждения, так

как в поздние сроки мы наблюдали рост доли больших ГМ в рогах матки, в теле и шейке — увеличивалось число средних ГМ.

Во время послеродовой инволюции ведущим фактором перестройки популяции клеток в ГМТ становится элиминация больших ГМ, так как они представляют собой терминальное звено гладкомышечного дифферона и характеризуются низким уровнем адаптации к изменяющимся факторам [3, 4]. Снижение общего содержания ДНК в миометрии у крыс ведет к увеличению в популяции доли малых ГМ. Полученные нами результаты подтверждают данные других исследователей [12, 15], которые наблюдали снижение содержания ДНК в миометрии у крыс более чем на 50%. При этом масса миометрия и размеры ГМ оказывались значимо меньшими, чем до беременности. Обнаруженная экспрессия TNF-R1 в ГМ в процессе послеродовой инволюции матки подтверждает данные литературы, свидетельствующие о том, что основная доля структур, подлежащих элиминации, приходится на апоптотически измененные гипертрофированные ГМ [9]. В период ранней послеродовой инволюции матки происходит быстрый возврат массы органа к его состоянию до беременности, которое обеспечивается, с одной стороны, уменьшением размеров ГМ механизмом клазмацитоза, а с другой — массовой элиминацией ГМ посредством апоптоза [9, 10, 18]. Увеличение интенсивности апоптоза связано с ростом числа клеток с признаками их терминальной дифференцировки [11].

К 7-м суткам после родов структура популяции ГМ в рогах матки имеет близкие показатели с таковой в миометрии небеременных крыс. Обнаруженные интенсивные преобразования свидетельствуют о мощных адаптивных возможностях ГМТ матки и существенной скорости биологических процессов в определенные физиологические периоды.

ЛИТЕРАТУРА

- Бесков В. Н. Морфологические и гистохимические изменения миометрия в процессе беременности: Автореф. дис. ... канд. мед. наук. Караганда, 1973.
- Дубинин Е. В. Морфологические преобразования в миометрии крыс во время беременности и в раннем послеродовом периоде: Автореф. дис. ... канд. мед. наук. Новосибирск, 2005.
- Зашихин А. Л. и Агафонов Ю. В. Структура популяции гладких миоцитов (аспекты внутриорганной организации гладкой мышечной ткани). *Морфология*, 1997, т. 112, вып. 4, с. 61–67.
- Зашихин А. Л. и Селин Я. Висцеральная гладкая мышечная ткань. Архангельск, Умео, Изд-во СГМУ, 2001.
- Милованов А. П., Фокина Т. В., Старосветская Н. А. и Назимова С. В. Децидуализация эндометрия как фактор, регулирующий цитотрофобластическую инвазию в течение I триместра беременности. *Арх. пат.*, 2007, т. 69, № 5, с. 31–34.
- Патент РФ №2104524 RU C1. Способ получения препаратов изолированных клеток. А. Л. Зашихин, Ю. В. Агафонов и Л. В. Лисишников. № 94018751/14. Заявка от 23.05.1994. Оpubл. в БИ, 1998, №4, с. 11–13.
- Руководство по содержанию и использованию лабораторных животных. Washington, D. C., Nat. Acad. Press, 1996.
- Савицкий Г. А. и Савицкий А. Г. Миома матки (проблемы патогенеза и патогенетической терапии). Изд. 3-е. СПб., ЭЛБИ-СПб, 2003.
- Шкурупий В. А., Дубинин Е. В. и Дубинина Н. Н. Структурные преобразования миоцитов в периоды беременности и ранней послеродовой инволюции матки. *Бюл. eksper. биол.*, 2008, прил. № 1, с. 97–100.
- Шкурупий В. А., Дубинин Е. В. и Дубинина Н. Н. Динамика миоцитов разных типов в миометрии крыс в периоды беременности и ранней послеродовой инволюции. Там же, с. 101–104.
- Шубникова Е. А., Юрина Н. А., Гусев Н. Б. и др. Мышечные ткани. М., Медицина, 2001.
- Afting E. G. and Elce J. S. DNA in the rat uterus myometrium during pregnancy and postpartum involution. Measurement of DNA in small pieces of mammalian tissue. *Analyt. Biochem.*, 1978, v. 86, № 1, p. 90–99.
- Burroughs K. D., Fuchs-Young R., Davis B. J. and Walker C. L. Altered hormonal responsiveness of proliferation and apoptosis during myometrial maturation and the development of uterine leiomyomas in the rat. *Biol. Reprod.*, 2000, v. 63, № 5, p. 1322–1330.
- Dong X., Shynlova O., Challis J. R. G. and Lye S. J. Identification and characterization of the protein-associated splicing factor as a negative co-regulator of the progesterone receptor. *J. Biol. Chem.*, 2005, v. 280, № 14, p. 13329–13340.
- Helguera G., Eghbali M. and Sforza D. Changes in global gene expression in rat myometrium in transition from late pregnancy to parturition. *J. Physiol. Genomics*. 2009, v. 36, № 2, p. 89–97.
- Leppert P. C. Proliferation and apoptosis of fibroblasts and smooth muscle cells in rat uterine cervix throughout gestation and the effect of the antiprogesterone onapristone. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 1998, v. 178, p. 713–725.
- Lye S. J. Initiation of parturition. *Anim. Reprod. Sci.*, 1996, v. 42, p. 495–503.
- Shynlova O., Oldenhof A., Dorogin A. et al. Myometrial apoptosis: activation of the caspase cascade in the pregnant rat myometrium at midgestation. *Biol. Reprod.*, 2006, v. 74, № 5, p. 839–849.
- Shynlova O., Tsui P., Dorogin A. et al. Expression and localization of alpha-smooth muscle and gamma-actins in the pregnant rat myometrium. *Biol. Reprod.*, 2005, v. 73, № 4, p. 773–780.

Поступила в редакцию 14.04.2012

Получена после доработки 25.08.2012

ADAPTIVE TRANSFORMATION OF RAT MYOMETRIUM WITH THE PROGRESSION OF PREGNANCY AND AFTER PARTURITION

O. V. Dolgikh, Yu. V. Agafonov, and A. L. Zashikhin

The myometrium of various parts of uterine wall was studied in 40 albino rats — non-pregnant animals, rats at different stages of pregnancy and after parturition. The methods of immunocytochemistry (detection of apoptotic cells with the help of antibodies against the tumor necrosis factor receptor), complex morphometric and cytochemical analysis of DNA content in the nuclei and of total protein in the cytoplasm of isolated smooth-myocytes (SM). The regularities of structural reconstruction of SM population in the uterine wall at various physiological periods were detected. The realization of basic mechanisms of myometrial transformation during the pregnancy, such as hyperplasia and hypertrophy are different in various uterine parts because of their specialized functional load. At the early stages of pregnancy, small SM were found to prevail in SM populations of all the uterine part, proliferative potential was increased. By the end of gestation, the fraction of large-sized SM was increased in the horns, the synthetic processes in the cytoplasm were activated, while the fraction of medium-sized SM was increased in the corpus and the cervix. The structure of SM population in the horns on Day 7 of postpartum involution was similar to that of non-pregnant rats, in the corpus and the cervix the increase of small SM number was observed.

Key words: *myometrium, proliferation, involution, apoptosis, isolated smooth myocytes*

Department of Histology, Cytology and Embryology, Northern State Medical University, Arkhangelsk