

УДК 618.7:618.714:611.018.61

ГЛАДКАЯ МЫШЕЧНАЯ ТКАНЬ МАТКИ В ПЕРИОД РАННЕГО ПУЭРПЕРИЯ: МЕХАНИЗМЫ ИНВОЛЮЦИИ

© 2012 г. О. В. Долгих, Ю. В. Агафонов, А. Л. Зашихин

Северный государственный медицинский университет, г. Архангельск

Гладкая мышечная ткань (ГМТ) в процессе беременности и родов претерпевает существенные изменения. Основными тенденциями во время беременности является процесс пролиферации гладкомышечных клеток (ГМК) на ранней стадии и процесс гипертрофии клеток в поздний период [9, 11, 13, 16]. Послеродовой период (пуэрперий) — процесс структурной инволюции миометрия, сопровождающийся изменением структурных параметров матки к исходным величинам (до беременности). В настоящее время рассматривают следующие внутриклеточные механизмы послеродовой инволюции миометрия: апоптоз, завершающийся элиминацией клеток; клазмацитоз, приводящий к уменьшению размеров клеток, и аутофагоцитоз, который происходит в основном в фибробластах [9, 10]. Однако особенности механизмов процесса инволюции разных отделов матки остаются недостаточно изученными. Целью данной работы являлось исследование структурных преобразований гладкой мышечной ткани рогов и шейки матки крыс в ранний послеродовой период.

Методы

Исследования проведены на 30 белых беспородных половозрелых крысах массой 200–250 г: первую (контрольную) группу составили небеременные крысы ($n = 5$), вторую группу — беременные самки ($n = 25$, по 5 особей на каждый период наблюдения). Экспериментальные исследования проводились в соответствии с «Руководством по содержанию и использованию лабораторных животных» [8], а также с соблюдением правил гуманного обращения с животными (Report of the AVMA Panel on Euthanasia IAVMA, 2001 [15]). Животных выводили из эксперимента под эфирным наркозом. Образцы тканей рогов и шейки матки брали утром на 1, 2, 4, 7-е сутки после родов.

Для морфометрического и цитофотометрического анализа ГМТ отобранные фрагменты фиксировали при $+5^{\circ}\text{C}$ в растворе 10 % формалина на фосфатном буфере при $\text{pH} = 7,4$ в течение 14–20 дней. Для анализа мышечной ткани использован метод прицельной клеточной диссоциации (Патент на изобретение № 2104524 23.05.94) [7], позволяющий точно выделять фрагменты гладкой мускулатуры и осуществлять последующее разделение ГМК. 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 проводили при окраске амидочерным. Препараты сканировали при длине волны 580 нм. Окулярным микрометром измеряли длину и ширину клеток, малый и большой диаметры ядер. Объемы рассчитывали по формуле эллип-

При использовании световой, электронной микроскопии и иммуногистохимических методов изучали трансформацию гладкой мышечной ткани (ГМТ) стенки матки крыс в послеродовой период. Исследования показали, что в процессе инволюции имеет место неодинаковый характер структурно-функциональной перестройки ГМТ разных отделов матки, что обусловлено различной скоростью инволютивных процессов и особенностями функциональной нагрузки. К седьмым суткам после родов происходила полноценная инволюция миометрия рогов матки крыс, а аналогичный процесс в шейке матки протекал значительно медленнее, что проявилось преобладанием в популяции малых клеток. Во время послеродовой инволюции ведущим фактором перестройки популяции ГМТ всех отделов матки становится элиминация больших миоцитов, так как они представляют собой терминальное звено гладкомышечного дифферона и характеризуются низким уровнем адаптации к изменяющимся факторам. Механизм гибели клеток и восстановления структуры популяции может быть обусловлен как апоптозом, так и пролиферацией гладкомышечных клеток.

Ключевые слова: послеродовой период (пуэрперий), гладкая мышечная ткань, иммуногистохимия, электронная микроскопия

соида. Цифровой материал обрабатывали методом вариационной статистики с вычислением среднего арифметического и его стандартной ошибки, коэффициента вариации, асимметрии и эксцесса. Степень вероятности отличий (p) измеряемых величин определяли с помощью t -критерия Стьюдента при $p < 0,05$. Обработка результатов проводилась с помощью программы Statistica 6.0. Для выявления существования взаимосвязей между некоторыми параметрами гладких миоцитов использовали регрессионный анализ.

Для идентификации процесса пролиферации в миоцитах проводили иммуногистохимическое окрашивание срезов с использованием моноклональных антител PCNA (фирма Santa Cruz, США). Перед инкубацией в растворе первичных антител парафиновые срезы на стеклах подвергали депарафинизации в ксилоле, спиртах возрастающей концентрации. Затем обрабатывали 3 % водным раствором перекиси водорода в течение 10 минут и преадсорбировали с 5 % лошадиной сывороткой (фирма Dako, Дания) 30 минут при комнатной температуре. После каждой операции срезы отмывали стандартным раствором фосфатно-солевого буфера (фирма Sigma Immunochemicals, США). В качестве первичных антител использовали ядерный антиген пролиферирующих клеток PCNA. Экспозицию в растворах первичных антител проводили в течение 1 часа при комнатной температуре. Визуализация реакции осуществлялась с помощью вторичных биотинилированных антител с применением диаминобензидина для выявления пролиферации. Препараты подкрашивали квасцовым гематоксилином (с подсинением в щелочной воде).

Для электронно-микроскопического исследования материал фиксировали в 2,5 % растворе глутарового альдегида на 0,1 М фосфатном буфере с pH 7,2–7,4 в течение 2 часов и последующей фиксацией в течение 1 часа в растворе 1 % тетраоксида осмия при температуре 5 °С. Кусочки промывали в буфере, обезвоживали в спиртах с контрастированием в 70° спирте и 1 % уранилацетате в течение 12 часов. Заливали в смесь эпон-аралдита. Для обеспечения прицельного электронно-микроскопического анализа со всех блоков получали серийные полутонкие срезы толщиной 1–2 мкм, которые окрашивали 1 % раствором метиленового синего. После идентификации необходимых объектов блоки затачивали и прицельные ультратонкие срезы готовили на ультратоме LKB-5 (Bromma, Швеция), контрастировали в 2,5 % растворе уранилацетата и 0,3 % растворе цитрата свинца по Рейнольдсу. Просматривали в электронных микроскопах JEM-100 CX (Япония).

Результаты

Анализ характера распределения гладких миоцитов по показателю их объема показал, что в контрольной группе (небеременные крысы) ГМТ представлена тремя типами клеток: малыми, средними и большими, различающимися по морфометрическим показателям. При беременности было выявлено значимое увеличение средних показателей объемов ГМК в рогах ($5\,336 \pm 240$) мкм³ и уменьшение данного показателя в шейке матки ($2\,525 \pm 96$) мкм³ по сравнению с таковыми в контрольной группе рогов и шейки ($2\,722 \pm 138$) и ($4\,193 \pm 252$) мкм³ соответственно ($p < 0,001$). В послеродовом периоде

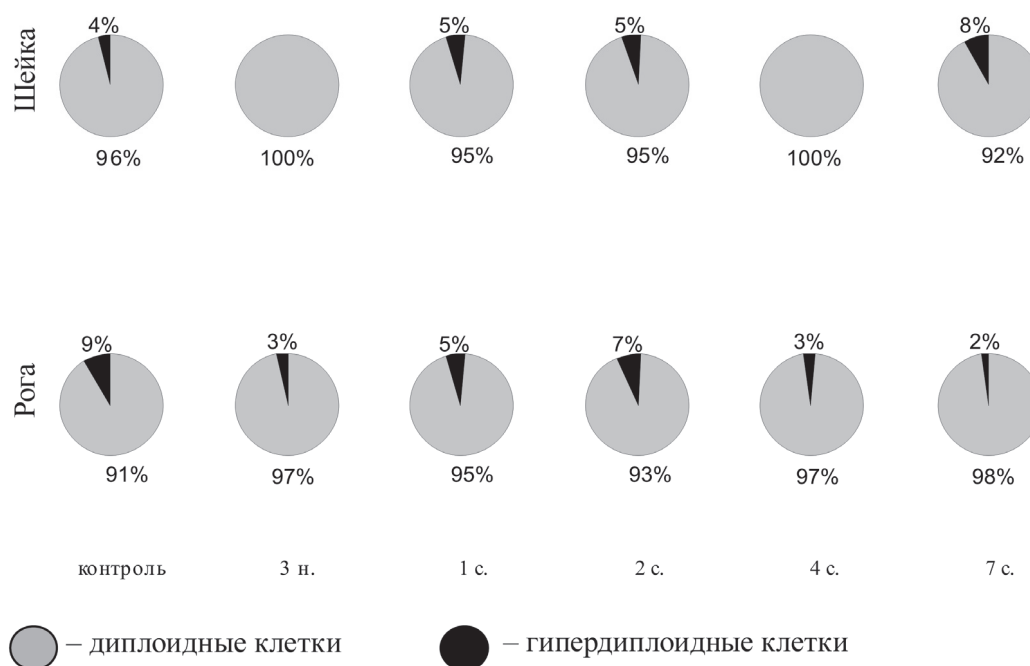


Рис. 1. Изменение структуры плоидности ядер гладких миоцитов рогов и шейки матки крыс после родов (3 н. – 3-я неделя беременности, 1 с., 2 с., 4 с., 7 с. – срок после родов, сутки).

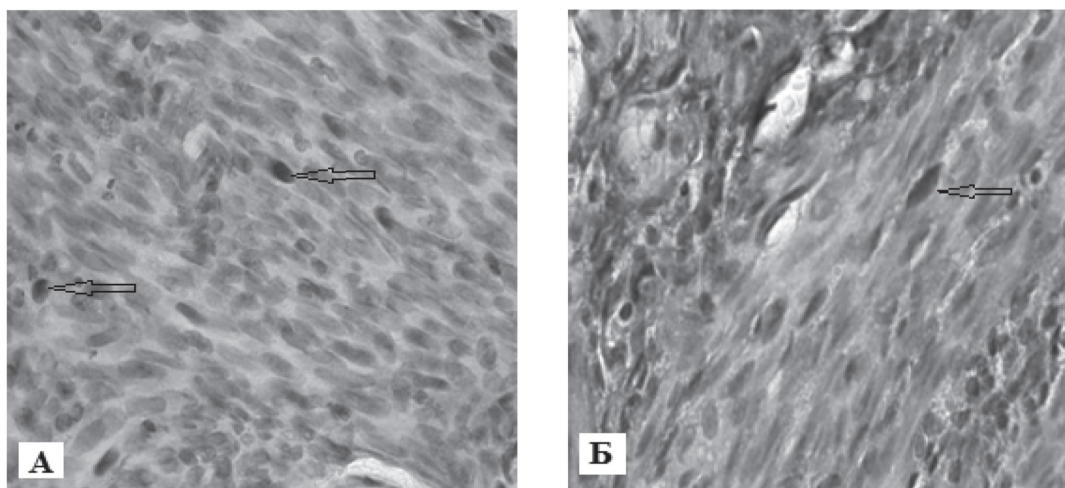


Рис. 2. Позитивная иммуногистохимическая реакция в гладкой мышечной ткани матки крысы: А — реакция на PCNA в рогах матки; Б — реакция на PCNA в шейке матки (об. 40, ок. 10)

в миометрии рогов средний показатель объемов миоцитов уменьшается ($2\,777 \pm 118$) $\mu\text{м}^3$, в миометрии шейки в 1-е сутки после родов данный показатель составляет ($6\,067 \pm 269$) $\mu\text{м}^3$, а на 7-е сутки он значительно уменьшается ($3\,627 \pm 274$) $\mu\text{м}^3$ ($p = 0,029$).

Изменение среднего показателя объема ГМК в процессе послеродовой инволюции GMT отражают изменения структуры клеточной популяции. В GMT рогов матки на 2-е сутки выявлено значимое ($p < 0,001$) увеличение доли малых клеток до 56 %, к 7-м суткам структура популяции имеет параметры, близкие к параметрам контрольной группы. В GMT шейки на 2-е сутки 50 % популяции составляют

большие клетки, к 7-м суткам увеличивается доля малых ГМК до 53 % ($p < 0,001$).

Показатель содержания ДНК в ядрах и доля гиперплоидных клеток достигали наибольшего значения в рогах матки на 2-е сутки пуэрперия ($p = 0,047$), а в шейке — на 7-е сутки ($p < 0,001$) (рис. 1), что подтверждает положительная иммуногистохимическая реакция на ядерный антиген пролиферирующих клеток PCNA (рис. 2).

В период пуэрперия в миометрии рогов матки отмечаются наиболее выраженные изменения ультраструктурной организации ГМК. В ряде клеток были зафиксированы деструкция филаментов, изменение структуры митохондрий, образование крупных перинук-

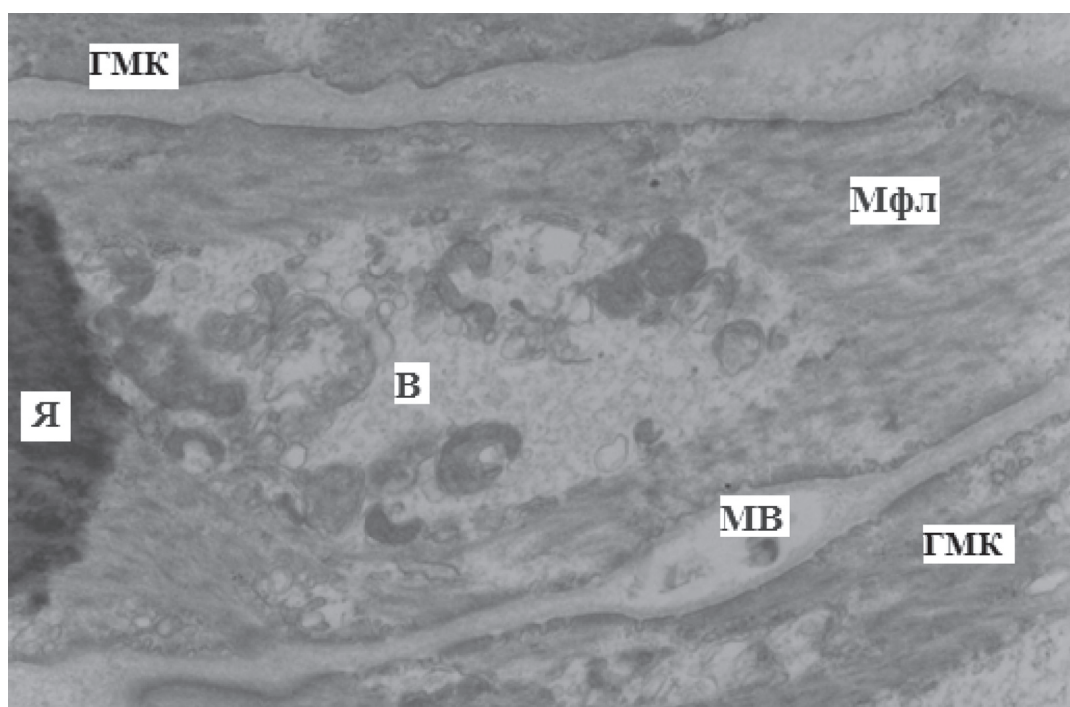


Рис. 3. Ультраструктура гладкой мышечной ткани рогов матки крысы в период ранней послеродовой инволюции: ГМК — гладкие миоциты; Я — ядро; МВ — межклеточное вещество; Мфл — миофиламенты; В — крупная перинуклеарная вакуоль. Ув. $\times 20\,000$.

клеарных вакуолей (рис. 3). В послеродовом периоде в составе гладкомышечных пучков наблюдается разобщение ГМК, нарушение их контактов.

Обсуждение результатов

В процессе послеродовой инволюции характер структурной и функциональной перестройки ГМТ существенно различается в разных отделах матки, что обусловлено различным уровнем функциональной нагрузки [13, 14]. Во время послеродовой инволюции в миометрии рогов на 2-е сутки наблюдается повышение уровня синтеза ДНК, увеличение доли малых миоцитов в структуре популяции ГМТ. Ведущим фактором перестройки популяции ГМТ рогов матки крыс становится элиминация больших миоцитов, так как они представляют собой терминальное звено гладкомышечного дифферона [1–3, 12]. Механизм их исчезновения из популяции связан как с апоптозом, так и с клазмацитозом ГМК [9, 11].

Полученные нами результаты подтверждают литературные данные, свидетельствующие о том, что основным механизмом послеродовой инволюции является апоптоз [9–11, 12]. Факторами, инициирующими механизмы инволюции, являются ухудшающиеся условия трофики и гипоксия миометрия. Под действием повреждающих факторов своеобразной формой реакции является дедифференцировка клеток — упрощение их внутренней структуры, связанное с временной потерей их специализации. Существенным признаком дедифференцировки является приобретение клеткой способности к пролиферации [4]. Полученные нами результаты подтверждают литературные данные, свидетельствующие о том, что в послеродовый период активируются процессы пролиферации, которые имеют адаптивный (резервирующий) характер [10]. Гипоксия является повреждающим фактором, пусковым моментом, в результате действия которого происходит дедифференцировка зрелых ГМК в камбиальные клетки ГМТ миометрия с приобретением способности к пролиферации [6].

К 7-м суткам послеродовой инволюции миометрий рогов имеет популяционные показатели, близкие к параметрам контрольной группы (небеременные животные), что свидетельствует о завершении в ней инволютивных преобразований. В то же время в ГМК шейки матки наблюдается повышение уровня синтеза ДНК, усиление пролиферации, что сопровождается увеличением представительства малых миоцитов в структуре популяции. Результаты настоящего исследования подтверждают данные литературы о том, что инволюция шейки матки после родов происходит значительно медленнее, чем инволюция рогов матки [5].

Список литературы

1. Агафонов Ю. В. Реактивная трансформация гладкой мускулатуры висцеральных органов в условиях различной функциональной нагрузки // Применение современных методов анализа в исследовании структуры и функции

клетки : тез. докл. 2-го междунаро. науч. симпоз. Архангельск, 2000. С. 5–7.

2. Зашихин А. Л., Агафонов Ю. В. Структура популяции гладких миоцитов (аспекты внутриорганной организации гладкой мышечной ткани) // Морфология. 1997. Т. 112, № 4. С. 61–67.

3. Зашихин А. Л., Селин Я. Висцеральная гладкая мышечная ткань. Архангельск ; Умео : Изд-во СГМУ, 2001. 171 с.

4. Клишов А. А. Гистогенез и регенерация тканей. Л. : Медицина, 1984. 232 с.

5. Колпакова Е. В. Прогнозирование темпа послеродовой инволюции матки : автореф. ... дис. канд. мед. наук. Томск, 2007. 26 с.

6. Марфуни Д. Л. О миоме матки // Акушерство и гинекология. 1988. № 11. С. 6–9.

7. Патент 2104524. Рос. Федерация. Способ получения препаратов изолированных клеток / Зашихин А. Л., Агафонов Ю. В., Лисишников Л. В. № 94018751/14; заявл. 23.05.1994, опубл. 10.02.98, Бюл. № 4. С.11–13.

8. Руководство по содержанию и использованию лабораторных животных. National Academy Press, Washington, D. C., 1996. 137 с.

9. Шкурупий В. А., Дубинин Е. В., Дубинина Н. Н. Динамика миоцитов разных типов в миометрии крыс в периоды беременности и ранней послеродовой инволюции // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2008. Прил. № 1. С. 101–104.

10. Шкурупий В. А., Дубинин Е. В., Дубинина Н. Н. Структурные преобразования миоцитов в периоды беременности и ранней послеродовой инволюции матки // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2008. Прил. № 1. С. 97–100.

11. Шкурупий В. А., Обединская К. С., Надеев А. П. Исследование структурных проявлений механизмов инволюции миометрия после многократных беременностей у мышей // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2010. Т. 149, № 5. С. 487–491.

12. Шубникова Е. А., Юрина Н. А., Гусев Н. Б., Балежина О. П., Большакова Г. Б. Мышечные ткани. М. : Медицина, 2001. 240 с.

13. 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. Vol. 178. P. 713–725.

14. Leppert P. C., Yu S. Y. Apoptosis in the cervix of pregnant rats in association with cervical softening // Am. J. Obstet. Gynecol. 1994. Vol. 37. P. 150–154.

15. Report of the AVMA Panel on Euthanasia // JAVMA. 2001. Vol. 218, N. 5, P. 669–696.

16. Shynlova O., Kwong R., Lye S. J. Mechanical stretch regulates hypertrophic phenotype of the myometrium during pregnancy // Reproduction. 2010. Vol. 139, N 10. P. 247–253.

References

1. Agafonov Ju. V. Tezisy dokladov 2-go mezhdnarodnogo nauchnogo simpoziuma. Arkhangelsk, 2000 [Report abstracts of the 2 International Research Symposium, Arkhangelsk, 2000], pp. 5-7. [in Russian]

2. Zashihin A. L., Agafonov Ju. V. Morfologiya [Morphology]. 1997, vol. 112, no. 4, pp. 61-67. [in Russian]

3. Zashihin A. L., Selin Ja. Visceral'naja gladkaja myshechnaja tkan' [Visceral smooth muscular tissue]. Arkhangelsk, Umeo, 2001, 171p. [in Russian]

4. Klishov A. A. Gistogenez i regeneraciya tkanej

[Histogenesis and angenesis]. Leningrad, 1984, 232 p. [in Russian]

5. Kolpakova E. V. *Prognozirovanie tempa poslerodovoj involjucii matki (avtoref. kand. dis.)* [Prediction of the uterus postpartum involution speed (Cand. Dis. Thesis)]. Tomsk, 2007, 26 p. [in Russian]

6. Marfunin D. L. *Akusherstvo i ginekologija* [Obstetrics and Gynecology]. 1988, no. 11, pp. 6-9. [in Russian]

7. Patent 2104524. *Ros. Federacija. Sposob poluchenija preparatov izolirovannyh kletok* [Patent 2104524. Rus. Federation. Method of production of isolated cell preparations]. Zashihin A. L., Agafonov Ju. V., Lisishnikov L. V., no. 94018751/14; zajavl. 23.05.1994, opubl. 10.02.98, bjul. no. 4, pp. 11-13. [in Russian]

8. *Rukovodstvo po sodержaniju i ispol'zovaniju laboratornyh zhivotnyh* [Guide in laboratory animal management and use]. National Academy Press, Washington, D. C., 1996, 137 p. [in Russian]

9. Shkurupij V. A., Dubinin E. V., Dubinina N. N. *Bjulleten' jeksperimental'noj biologii i mediciny* [Bulletin of Experimental Biology and Medicine]. 2008, suppl. no. 1, pp. 101-104. [in Russian]

10. Shkurupij V. A., Dubinin E. V., Dubinina N. N. *Bjulleten' jeksperimental'noj biologii i mediciny* [Bulletin of Experimental Biology and Medicine]. 2008, suppl. no. 1, pp. 97-100. [in Russian]

11. Shkurupij V. A., Obedinskaja K. S., Nadeev A. P. *Bjulleten' jeksperimental'noj biologii i mediciny* [Bulletin of Experimental Biology and Medicine]. 2010, vol. 149, no. 5, pp. 487-491. [in Russian]

12. Shubnikova E. A., Jurina N. A., Gusev N. B., Balezina O. P., Bol'shakova G. B. *Myshechnye tkani* [Muscular tissues]. Moscow, 2001, 240 p. [in Russian]

13. 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, vol. 178, pp. 713-725.

14. Leppert P. C., Yu S. Y. Apoptosis in the cervix of pregnant rats in association with cervical Leppert softening. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 1994, vol. 37, pp. 150-154.

15. Report of the AVMA Panel on Euthanasia. *JAVMA.* 2001, vol. 218, no. 5, pp. 669-696.

16. Shynlova O., Kwong R., Lye S. J. Mechanical stretch regulates hypertrophic phenotype of the myometrium during pregnancy. *Reproduction.* 2010, vol. 139, no. 10, pp. 247-253.

THE UTERUS SMOOTH MUSCULAR TISSUE IN EARLY PUERPERIUM: INVOLUTION MECHANISMS

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

Northern State Medical University, Arkhangelsk, Russia

We have studied transformation of smooth muscular tissue (SMT) of the uterus wall of rats after delivery and used the light and electronic microscopy and the immunohistochemical method. The study of different parts of the uterus in the process of involution has shown different levels of SMT structure functional reorganization. It can be explained by different speed of the involutive processes and peculiarities of the loading functions. The complete involution of the myometrium of the rats' horns was reached in 7 days after delivery. The same process in the cervix took more time, and correlated increased small cells population. We found that disappearance of large cells became the main factor of SMT reconstruction in all the parts of the uterus during the period after the delivery, the large cells were characterized by a low level of adaptation to the changing factors. The mechanism of the cells disappearance and reconstruction of the population structure depended on apoptosis and proliferation of smooth muscular cells.

Keywords: postnatal period (puerperium), smooth muscular tissue, immunohistochemical, electronic microscopy

Контактная информация:

Долгих Ольга Васильевна — аспирант кафедры гистологии, цитологии и эмбриологии ГБОУ ВПО «Северный государственный медицинский университет» Минздрава РФ

Адрес: 163000, г. Архангельск, пр. Троицкий, д. 51

Тел. (8182) 28-59-48

E-mail: olvado@mail.ru