

УДК 618.2-092.9:611.664

КЛЕТочНЫЕ МЕХАНИЗМЫ ТРАНСФОРМАЦИИ ГЛАДКОЙ МУСКУЛАТУРЫ РАЗНЫХ ОТДЕЛОВ МАТКИ КРЫС ПРИ РАЗВИТИИ БЕРЕМЕННОСТИ

©2010 г. **О. В. Долгих, Ю. В. Агафонов, А. Л. Зашихин,
Е. Н. Башилова**

Северный государственный медицинский университет, г. Архангельск

Целью работы явилось изучение перестройки структуры популяции гладкомышечного дифферона. Для достижения ее проведен комплексный морфометрический и цитохимический анализ содержания в ядрах ДНК и суммарного белка цитоплазмы в изолированных гладких мышечных клетках (ГМК), выделенных методом прицельной клеточной диссоциации, разных отделов стенки матки intactных крыс, а также на разных стадиях беременности и после родов. Физиологический рост матки во время беременности обеспечивается двумя механизмами: гиперплазией и гипертрофией. Увеличение уровня синтеза ДНК на ранних сроках беременности реализуется усилением пролиферации и увеличением доли малых миоцитов. С середины беременности снижается уровень пролиферативной активности, растет количество белка в цитоплазме, ГМК миометрия подвергаются гипертрофии. В результате наблюдается рост доли больших миоцитов. В период послеродовой инволюции миометрия во всех отделах матки резко уменьшаются объемы лейомиоцитов, что вызывает изменение структуры популяции в сторону увеличения (до 90 %) доли малых ГМК. Это сопровождается незначительным ростом уровня синтеза ДНК.

Ключевые слова: миометрий, гладкие миоциты, беременность, послеродовая инволюция.

В настоящее время достаточно полно исследованы цитологические механизмы, развивающиеся в гладкой мускулатуре матки при развитии беременности [5, 6, 8]. Известно, что в отличие от всех других полых органов матка обладает уникальной способностью к гипертрофии — мышечные клетки миометрия увеличивают свою длину в 8–10 раз, ширину в 2–5 раз, а масса органа на протяжении беременности увеличивается в 20–30 раз [4, 6]. Гладкая мышечная ткань (ГМТ) матки обладает большой амплитудой физиологической перестройки и фенотипических трансформаций в течение эстрального цикла и беременности. Меняется экспрессия актина, активность протеинкиназ, что вызывает изменение сократительных свойств миоцитов и их адаптацию к физиологическим потребностям в разные сроки беременности и после родов. Одновременно меняется организация цитоскелета, межклеточных контактов и связей гладкомышечных клеток (ГМК) с элементами межклеточного матрикса. Меняется интенсивность пролиферации и апоптоза [7, 9].

Поскольку гладкая мышца является доминирующим тканевым компонентом стенки матки, характер ее изменений приобретает ведущее значение в процессах трансформации данного органа во время беременности и после родов. Анализируя литературные источники, мы отметили, что следует учитывать особенности трансформации разных отделов матки. В ходе настоящего исследования был проведен сравнительный структурно-метаболический анализ гладкомышечного компонента с целью изучения структуры популяции гладкомышечного дифферона разных отделов стенки матки intactных крыс, а также на разных стадиях беременности и после родов.

Методы

Экспериментальные исследования проведены на 25 белых беспородных половозрелых крысах массой 200–250 г в соответствии с «Руководством по содержанию и использованию лабораторных животных» (1996) и с соблюдением 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 предменструальный период сажали на ночь в клетку с особями противоположного пола с испытанной плодовитостью. День, когда во влагалище обнаруживали сперму, считался первым днем беременности. Образцы тканей рогов, тела и шейки матки брали утром: в норме (на стадии диэструса), в течение беременности (4, 12 и 20-й день) и в период послеродовой инволюции (4-й день). Для морфометрического и цитотометрического анализа гладкой мышечной ткани отобранные фрагменты фиксировали при +5

°С в растворе 10 % формалина на фосфатном буфере при $pH = 7,4$ в течение 14–20 дней. Для анализа мышечной ткани использован метод прицельной клеточной диссоциации (патент на изобретение № 2104524 23.05.94), 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, 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 эллипсоида. Цифровой материал обрабатывали методом вариационной статистики с вычислением среднего арифметического ($\bar{X}$) и его стандартной ошибки (sx), 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.

Результаты

Проведенные нами исследования структурно-метаболических параметров ГМК и структуры популяции мышечной ткани матки крыс показали неоднородность популяции по объемным показателям лейомиоцитов, что позволило выделить в ГМК всех отделов матки крыс три субпопуляции клеток: малые, средние и большие миоциты. Основу популяции составляют средние миоциты. Каждая субпопуляция миоцитов вместе с тем отличается уровнем синтеза ДНК и белков в цитоплазме.

При беременности характер изменения структуры популяции ГМК в разных отделах матки оказался различным. В теле и шейке матки отмечалось уменьшение среднего объема ГМК, что проявилось увеличением представительства малых и снижением доли больших ГМК. В рогах матки на первой неделе беременности наблюдалось резкое уменьшение среднего объема ГМК (рис. 1), что отразилось на структуре популяции и проявилось ростом (с 17 до 92 %) доли малых миоцитов. Со второй недели беременности средний объем ГМК возрастал, что было обусловлено значительным увеличением (до 45 %) числа больших миоцитов в популяции. Послеродовая инволюция миометрия во всех отделах матки реализуется путем резкого изменения структуры популяции в сторону увеличения (до 90 % во всех отделах) доли малых ГМК (рис. 4).

На первой неделе беременности наблюдается увеличение уровня синтеза ДНК в ядрах, но в конце

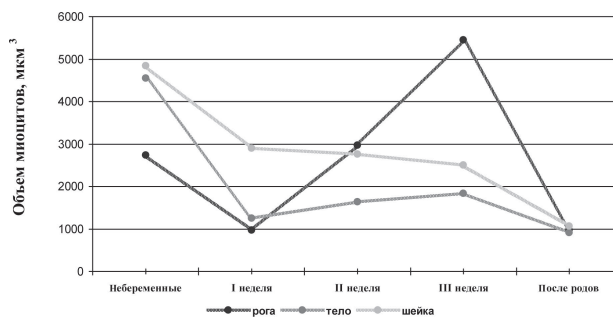


Рис. 1. Изменение средних объемов гладких мышечных клеток матки при беременности

срока беременности количество гиперплоидных клеток снижается, что связано с ростом числа дифференцированных миоцитов. После родов уровень синтеза ДНК снова возрастает, что ведет к увеличению в популяции доли малых миоцитов (рис. 2). Особенно ярко эти изменения наблюдаются в рогах и теле матки крыс.

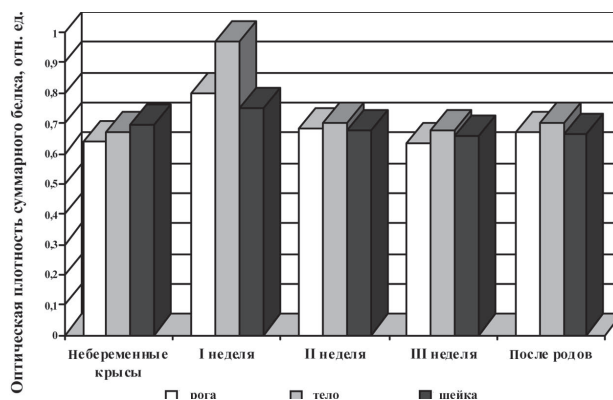


Рис. 2. Содержание ДНК в гладких миоцитах матки

Содержание белка в цитоплазме ГМК всех отделов матки во время беременности возрастает по сравнению с нормой и достигает своего максимума к середине беременности. В конце беременности наблюдается тенденция к незначительному снижению данного показателя. После родов содержание белка снова незначительно увеличивается (рис. 3).

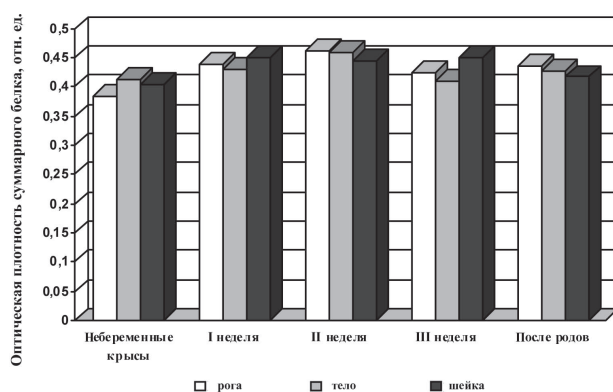


Рис. 3. Изменение содержания суммарного белка в гладких мышечных клетках матки

В период послеродовой инволюции миометрия во всех отделах матки наблюдается резкое уменьшение

объемов лейомиоцитов, что отражается на изменении структуры популяции в сторону увеличения доли малых ГМК (до 90 %). Это сопровождается увеличением содержания белка в цитоплазме и незначительным ростом уровня синтеза ДНК.

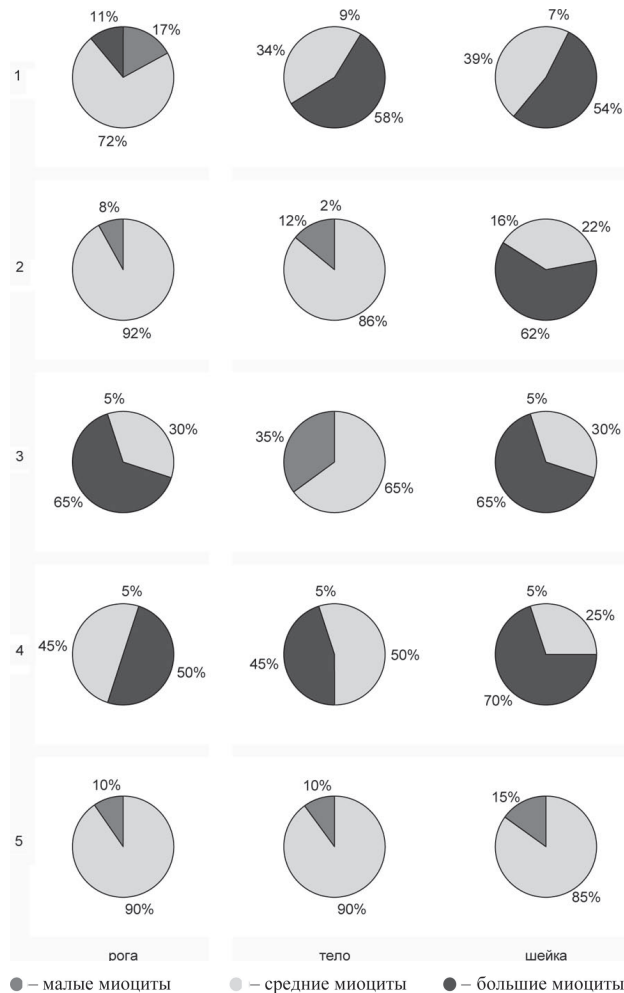


Рис. 4. Структура популяции гладких мышечных клеток отделов матки в разные сроки беременности. Группы сравнения: 1 — интактные животные, 2 — I неделя беременности, 3 — II неделя беременности, 4 — III неделя беременности, 5 — после родов

Обсуждение результатов

Особенности перестройки гладкой мускулатуры в разных отделах матки объясняются их функциональными отличиями. Поскольку рога матки у крыс являются местом имплантации зародыша, здесь наблюдаются наиболее значимые изменения структурно-метаболических параметров и перестройки популяции гладких миоцитов.

В начале беременности наблюдается повышение уровня синтеза ДНК, что реализуется усилением пролиферации и увеличением доли малых миоцитов в структуре популяции гладкой мышечной ткани.

Полученные нами результаты подтверждают литературные данные, свидетельствующие о том, что пролиферативная фаза роста миометрия на ранних сроках беременности создаёт достаточный пул кле-

ток, которые затем подвергаются гипертрофии при надлежащих условиях [7].

В середине беременности снижается уровень пролиферативной активности ГМК, увеличивается количество белка в цитоплазме. Известно, что повышение уровня гамма-актина наблюдается в середине и в конце беременности, когда гладкомышечные клетки миометрия подвергаются гипертрофии [8]. Результаты настоящего исследования являются еще одним свидетельством в пользу этого утверждения, так как на поздних сроках мы наблюдали рост доли больших миоцитов в структуре популяции.

Во время послеродовой инволюции ведущим фактором перестройки популяции гладкой мышечной ткани становится элиминация больших миоцитов, так как они представляют собой терминальное звено гладкомышечного дифферона и характеризуются низким уровнем адаптации к изменяющимся факторам [1, 2, 3]. Механизм их исчезновения может быть связан как с апоптозом, так и с пролиферацией гладкомышечных клеток.

Список литературы

1. Агафонов Ю. В. Реактивная трансформация гладкой мускулатуры висцеральных органов в условиях различной функциональной нагрузки / Ю. В. Агафонов // Применение современных методов анализа в исследовании структуры и функции клетки : тез. докл. 2 Международ. науч. симпозиума. — Архангельск, 2000. — С. 5–7.
2. Зашихин А. Л. Висцеральная гладкая мышечная ткань / А. Л. Зашихин, Я. Селин // Архангельск — Умео : Изд-во СГМУ, 2001. — 171 с.
3. Зашихин А. Л. Структура популяции гладких миоцитов (аспекты внутриорганной организации гладкой мышечной ткани) / А. Л. Зашихин, Ю. В. Агафонов // Морфология. — 1997. — Т. 112, № 4. — С. 61–67.
4. Кауфман О. Я. Гладкая мышечная ткань / О. Я. Кауфман // Структурные основы адаптации и компенсации нарушенных функций / под ред. Д. С. Саркисова. — М. : Медицина, 1987. — С. 131–153.
5. Савицкий Г. А. Миома матки (проблемы патогенеза и патогенетической терапии) / Г. А. Савицкий, А. Г. Савицкий. — изд. 3-е. — СПб. : ЭЛБИ, 2003. — 236 с.
6. Савицкий Г. А. Растяжение и гипертрофия гладкомышечных элементов миометрия во время беременности / Г. А. Савицкий // Вопросы охраны материнства и детства. — 1987. — № 6. — С. 48–49.
7. Burroughs K. D. Altered hormonal responsiveness of proliferation and apoptosis during myometrial maturation and the development of uterine leiomyomas in the rat / K. D. Burroughs, R. Fuchs-Young, B. J. Davis, C. L. Walker // Biology of reproduction. — 2000. — Vol. 63(5). — P. 1322–1330.
8. Shynlova O. Expression and localization of alpha-smooth muscle and gamma-actins in the pregnant rat myometrium. / O. Shynlova, P. Tsui, A. Dorogin, et al. // Biology of reproduction. — 2005. — Vol. 73(4). — P. 773–780.
9. Shynlova O. Myometrial Apoptosis: Activation of the Caspase Cascade in the Pregnant Rat Myometrium at Midgestation / O. Shynlova, A. Oldenhof, A. Dorogin, Q. Xu, et al. // Biology of reproduction. — 2006. — Vol. 74(5). — P. 839–849.

CELLULAR MECHANISMS OF TRANSFORMATION OF SMOOTH MUSCULATURE OF RATS UTERUS DIFFERENT SEGMENTS OF DURING THE DEVELOPMENT OF PREGNANCY**O. V. Dolgih, Ju. V. Agaphonov, A. L. Zashikhin, E. N. Bashilova***Northern State Medical University, Arkhangelsk*

The purpose of this research is to examine the rearrangement of population structure of smooth-muscle differon. To achieve this goal comprehensive morphometric and cytochemical analyses were carried out. These analyses were focused on revealing DNA content and total protein in the cytoplasm in the nuclei of separated smooth muscle cells; the latter have been isolated by method of sighting cell dissociation in different parts of the uterine wall of intact rats, as well as at different stages of their pregnancy and after childbirth.

Physiological growth of the uterus during pregnancy is ensured by two mechanisms: hyperplasia and hypertrophy. Increase of the DNA synthesis rate in early pregnancy is realized by intensified proliferation and increase in proportion of the small myocytes. From mid-pregnancy the level of

proliferative activity reduces, amount of protein in the cytoplasm increases, myometrial smooth muscle cells are being exposed to hypertrophy. Consequently, an increase in the proportion of large myocytes can be observed. Over the period of myometrium postpartum involution in every segment of the uterus, a sharp decrease in the volume of leiomyocytus is observed. This results in structure changes of the population such as expansion of small smooth muscle cells (up to 90 %). This is accompanied by a slight increase in level of the DNA synthesis.

Key words: myometrium, smooth myocytes, pregnancy, postpartum involution.

Контактная информация:

Долгих Ольга Васильевна — аспирант кафедры гистологии, цитологии и эмбриологии Северного государственного медицинского университета

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

Тел. (8182) 28-59-48

E-mail: olvado@mail.ru

Статья поступила 16.12.2009 г.