

Поротникова Е.В., Надеев А.П.

Исследование васкуляризации миометрия у мышей в послеродовом периоде при остром CCL4-индуцированном гепатозе

Новосибирский государственный медицинский университет, г. Новосибирск

Porotnikova E.V., Nadeev A.P.

Study of myometry vascularization in mice in the postpartum period under acute CCL4-induced hepatitis

Резюме

Цель исследования. Изучить морфологические особенности васкуляризации миометрия в процессе послеродовой инволюции у мышей линии C57Bl/6 в условиях острого CCL4-индуцированного гепатоза. Материалы и методы. Двухмесячные беременные мыши-самки линии C57Bl/6 были разделены на 2 группы: 1-я – мыши с физиологически протекавшей беременностью, 2-я – мыши с острым гепатозом, индуцированным тетрахлорметаном на 13-14 день беременности. Периоды наблюдения - 1, 3, 5 и 10 сутки после родов. Результаты. Показатель живорождения у мышей, перенесших острый CCL4-индуцированный гепатоз составил 74,8 %, мертворождения - 25,2 %, в сравнении с мышами контрольной группы, у которых показатель живорожденных составил - 89,7 %, а мертворожденных – 10,3 %. Объемная плотность (Vv) сосудов миометрия у мышей с острым CCL4-индуцированным гепатозом была значительно большей (в 8 раз), в сравнении с аналогичным показателем у мышей с физиологически протекавшей беременностью в 1-е сутки послеродовый период. Объемная плотность (Vv) сосудов миометрия у мышей с острым CCL4-индуцированным гепатозом в послеродовый период от 1-х к 10-м суткам значительно уменьшается, в сравнении с аналогичным показателем у мышей с физиологически протекавшей беременностью, в 1,82 раза. Численная плотность (Nai) сосудов миометрия у мышей контрольной и опытной групп не различались, что свидетельствует об отсутствии влияния повреждения печени на этот показатель.

Ключевые слова: послеродовая инволюция матки, васкуляризация миометрия, острый CCL4-индуцированный гепатоз

Summary

The aim of the study was to study the morphological peculiarities of myometrial vascularization in C57Bl/6 mice in the postpartum period in acute CCL4-induced hepatitis. Materials and methods. Two-month-old pregnant female C57Bl/6 female mice were divided into 2 groups: 1st — mice with a physiological pregnancy, and 2nd — mice with acute hepatitis induced by carbon tetrachloride on days 13-14 of pregnancy. The observation periods are 1, 3, 5, and 10 days after delivery. Results. The rate of live birth in mice that underwent acute CCL4-induced hepatitis was 74.8%, stillbirth - 25.2%, compared with mice in the control group, in which the rate of births was 89.7% and stillbirth was 10.3%. The volume (Vv) of the myometrial vessels in mice with acute CCL4-induced hepatitis was significantly higher (8 times) compared with the same indicator in mice with a physiologically occurring pregnancy on the 1st day of the postpartum period. The volume (Vv) of the vessels of the myometrium in mice with acute CCL4-induced hepatitis in the postpartum period from 1 to 10 days is significantly reduced, compared with the same indicator in mice with a physiologically ongoing pregnancy, by 1.82 times. The number (Nai) of the myometrial vessels in the mice of the control and experimental groups did not differ, which indicates the absence of the effect of liver damage on this indicator.

Key words: postpartum uterine involution, myometrial vascularization, acute CCL4-induced hepatitis.

Введение

Механизмы послеродовых структурных изменений миометрия остаются недостаточно изученными, особенно при экстрагенитальных заболеваниях беременных и акушерской патологии.

В настоящее время наблюдается высокая распро-

страненность заболеваний печени как в целом в популяции, так и у беременных женщин [1, 2, 3]. Это связано с ростом заболеваемости хроническими вирусными гепатитами, повреждением печени в связи с приёмом различных групп лекарственных препаратов, алкогольной интоксикацией и т.д. Беременность нередко является

иницирующим фактором развития различных состояний, сопровождающихся поражением печени, в то же время, как и уже имеющиеся болезни печени отягощают течение беременности. К таким состояниям относятся внутрипеченочный холестаз беременных, острый жировой гепатоз беременных, тяжелая преэклампсия, HELLP-синдром и др. [4, 5, 6, 7]. Эти заболевания могут привести к прерыванию беременности, преждевременным родам, нарушению инволюции матки в послеродовом периоде, что, в конечном счете, обуславливает высокие показатели материнской и перинатальной смертности при данной патологии [2].

Печень является центральным органом гомеостазирования млекопитающих. Она играет ключевую роль в метаболизме большого количества биологически активных веществ и гормонов, в том числе, половых стероидных гормонов. Известно, что эстрогены вырабатываются фолликулами яичников, корой надпочечников, плацентой и другими органами, осуществляя свои эффекты путем воздействия на ткани через α - и β рецепторы эстрогенов. Эти рецепторы определяются в матке, яичниках, влагалище, молочных железах, эндотелиальных клетках, гладкомышечных клетках сосудов и других тканях [8]. Прогестерон синтезируется преимущественно желтым телом. Рецепторы к прогестерону (А и В) находятся в эндометрии, миометрии, желтом теле, эндотелии и других тканях [9].

Эстрогены и прогестерон находятся в четкой взаимосвязи друг с другом. Изменения концентрации и нарушение соотношения этих гормонов приводят к различным эффектам.

Нарушение структурно-функционального состояния печени может повлиять на их уровень и соотношение, тем самым изменить или нарушить течение послеродового периода, и, в частности, инволюции матки.

В настоящее время рассматриваются четыре механизма, обеспечивающих послеродовую инволюцию матки: апоптоз, клазмацитоз, аутофагоцитоз и некроз миоцитов. Одним из важных условий для реализации процессов послеродовой инволюции матки является состояние ее сосудистого русла, от которого зависит гемодинамика и развитие тканевой гипоксии в миометрии, индуцирующей дистрофические и некротические изменения миоцитов и явления апоптоза [10].

Цель исследования. Изучить морфологические особенности васкуляризации миометрия в процессе послеродовой инволюции у мышей линии C57Bl/6 в условиях острого CCl₄-индуцированного гепатоза.

Материалы и методы

Эксперимент выполнен на 60 двухмесячных самках мышей линии C57Bl/6, массой 20-22 г. Животные были получены из лаборатории разведения экспериментальных животных Института цитологии и генетики СО РАН (г. Новосибирск). Животных содержали в пластмассовых клетках по 5 особей (1 самец и 4 самки) в стандартных условиях, со свободным доступом к пище и воде. Беременность у животных определяли со дня обнаружения во влагалище копулятивной пробки.

Острый гепатоз индуцировали на 13-14 сутки беременности, внутрибрюшинным введением 50% раствора тетрахлорметана на оливковом масле, однократно, в дозировке 0,3 мл/кг. Животные были разделены на 2 группы: 1-я – мыши контрольной группы с физиологически протекающей беременностью, 2-я – беременные мыши с острым CCl₄-индуцированным гепатозом. Образцы матки и печени забирали для 1-й группы на 1, 10 сутки послеродового периода; для 2-й группы – на 1, 3, 5, 10 сутки.

Животных выводили из эксперимента под эфирным наркозом методом дислокации шейных позвонков.

Все манипуляции с лабораторными животными проводили, соблюдая «Правила проведения работ с использованием экспериментальных животных» (Страсбург, 1986), принципы гуманности, изложенные в директиве Европейского сообщества (86/609/ЕЕС), «Принципы надлежащей лабораторной практики» (ГОСТ Р 53434-2009 от 01.03. 2010 г идентичен GLPOECD).

Регистрировали общее количество живо- и мертворожденных плодов у мышей в исследованных группах на 1-е сутки после родов.

Образцы печени и матки фиксировали в 10% нейтральном формалине и подвергали стандартной гистологической проводке [11]. Микропрепараты толщиной 3 мкм окрашивали гематоксилином и эозином. Полученные срезы обрабатывали с использованием светового микроскопа PrimoStar (Zeiss, Германия), изображения получали с помощью цифровой камеры AxioCam 105 color (Zeiss, Германия).

Для морфометрии использовали окулярную сетку на 25 точек [12]. На каждый период наблюдения исследовали по 100 полей зрения. Подсчитывали объемную (V_v) и численную (N_{ai}) плотность сосудов миометрия, объемную (V_v) плотность некрозов в печени.

Статистическую обработку данных морфометрического исследования проводили с использованием лицензионного пакета программ прикладной статистики «Microsoft Excel 2010», определяли среднюю величину (M) и стандартную ошибку среднего (m). Характеристики выборки приведены в таблицах как M \pm m. Достоверность статистически значимых различий средних величин рассчитывали по t-критерию Стьюдента для несвязных выборок при p<0,05.

Результаты и обсуждение

При остром CCl₄-индуцированном гепатозе в 1-е сутки послеродового периода в печени у мышей-самок наблюдались очаги некрозов гепатоцитов (рис.1 — *рисунки к статье смотри на специальной цветной вставке журнала — прим. ред.*), преимущественно вакуольную, вплоть до гидропической, дистрофию гепатоцитов. На 10-е сутки послеродового периода у мышей 2-й (опытной) в печени обнаруживали очаги микронекрозов гепатоцитов, преимущественно вакуольную дистрофию гепатоцитов, большое количество двуядерных гепатоцитов, свидетельствующие о регенеративных процессах в печени (рис. 2).

Таблица 1. Результаты исследования объемной плотности (Vv) некрозов в печени мышей линии C57Bl/6 в послеродовом периоде в норме и условиях острого CCl₄-индуцированного гепатоза (M±m)

| Показатель | Контрольные животные (1-я группа) | | Животные с CCl ₄ -индуцированным гепатозом (2-я группа) | | | |
|----------------------------------|-----------------------------------|----------------------|--|---------------------|---------------------|----------------------|
| | 1 сутки после родов | 10 суток после родов | 1 сутки после родов | 3 сутки после родов | 5 суток после родов | 10 суток после родов |
| Объемная плотность некрозов (Vv) | 0,23± 0,05 | 0,23± 0,05 | 4,57± 0,23* | 3,08± 0,21* | 1,92± 0,13* | 0,62± 0,08 |

Примечание: «*» - отличия статистически значимы в сравнении с контрольными животными на 1 сутки после родов, $p < 0,5$

Таблица 2. Результаты морфометрического исследования сосудов миометрия мышей линии C57Bl/6 в процессе послеродовой инволюции в норме и условиях острого CCl₄-индуцированного гепатоза (M±m)

| Показатели | Контрольные животные (1 группа) | | Животные с CCl ₄ -индуцированным гепатозом (2 группа) | | | |
|-----------------------------------|---------------------------------|----------------------|--|---------------------|---------------------|----------------------|
| | 1 сутки после родов | 10 суток после родов | 1 сутки после родов | 3 сутки после родов | 5 суток после родов | 10 суток после родов |
| Объемная плотность сосудов (Vv) | 0,3± 0,05 | 2,55± 0,25 | 2,47± 0,28* | 1,68± 0,22* | 1,4± 0,17* | 1,36± 0,16** |
| Численная плотность сосудов (Nai) | 1,17± 0,2 | 1,45± 0,11 | 0,95± 0,1 | 0,89± 0,09 | 0,88± 0,1 | 1,0± 0,11** |

Примечание: «*» - отличия статистически значимы в сравнении с контрольными животными на 1 сутки после родов, $p < 0,5$; «**» - отличия статистически значимы в сравнении с контрольными животными на 10 суток после родов, $p < 0,5$

Объемная плотность (Vv) некрозов гепатоцитов у мышей 2-й (опытной) группы была значительно больше, чем аналогичный показатель у мышей контрольной 1-й группы. Так, объемная плотность (Vv) некрозов на 1 сутки после родов у мышей 2-й (опытной) группы была в 19,8 раз больше, чем величина аналогичного показателя у мышей 1-й (контрольной) группы, а на 10 суток после родов у мышей 2-й (опытной) группы - в 2,7 раз больше, в сравнении с аналогичным показателем у мышей 1-й (контрольной) группы (табл. 1).

Потомство, полученное от мышей с острым CCl₄-индуцированным гепатозом, значительно отличалось от потомства мышей 1-й (контрольной) группы по некоторым признакам: новорожденные были меньше по размеру, менее подвижны, имели ярко-красную окраску. Показатель живорождённых плодов у мышей 1-й (контрольной) группы составил 89,7 %, а мертворожденных - 10,3 %. Аналогичные показатели у мышей 2-й (опытной) группы составили: живорожденных - 74,8 %, а мертворожденных - 25,2%. Вероятно, что значительно

высокий уровень мертворождаемости плодов у мышей 2-й (опытной) группы, по сравнению с аналогичным показателем у мышей 1-й (контрольной) группы, связан с тем, что тетрахлорметан проникает через плацентарный барьер и оказывает повреждающее действие на организм плодов.

Величины показателей объемной плотности сосудов (Vv) у мышей 2-й (опытной) группы, при увеличении периодов наблюдения послеродового периода, имели тенденцию к уменьшению: на 1-е сутки после родов объемная плотность (Vv) сосудов миометрия была больше в 8,2 раза; на 3 сутки - в 5,6 раз, на 5 суток - в 4,6 раз соответственно, в сравнении с величинами аналогичного показателя у мышей 1-й (контрольной) группы на 1-е сутки после родов. Объемная плотность (Vv) у животных, забранных на 10 суток, имели противоположную тенденцию: у контрольных животных 1-й (контрольной) группы на 10-е сутки показатель был большим в 1,9 раз, в сравнении с аналогичным показателем у мышей 2-й (опытной) группы (рис. 3, табл. 2).

Показатели численной (Nai) плотности сосудов у мышей 1-й (контрольной) и 2-й (опытной) групп не различались, за исключением 10-х суток послеродового периода. На 10-е сутки после родов показатель численной плотности (Nai) сосудов в матке у мышей 1-й (контрольной) группы были большим, чем аналогичный показатель у мышей 2-й (опытной) на 45 %, что обусловлено завершением послеродовой инволюции матки у мышей 1-й (контрольной) группы [10](табл. 2).

Обсуждение. Результаты проведенного исследования показывают, что воздействие тетрахлорметана (CCl₄) приводит к деструктивным изменениям в паренхиме печени беременных мышей-самок линии C57B1/6, что связано с прямым токсическим действием тетрахлорметана на гепатоциты путем преобразования зависимой от цитохрома P-450 монооксигеназной системой в свободные радикалы и электрофильные интермедиаты, ковалентно связывающие биомакромолекулы центролобулярных гепатоцитов [13]. Максимальные показатели были получены в 1 сутки после родов и, с увеличением срока наблюдения послеродового периода, некротические изменения в паренхиме печени имели тенденцию к уменьшению.

Показано, что в гладкомышечных клетках сосудов и эндотелиальных клетках имеются α - и β рецепторы эстрогенов. Эстрадиол влияет на различные функции гладкомышечных клеток, включая их сократимость и пролиферацию. Влияние осуществляется через геном-опосредованную и геном-неопосредованную связь [14, 15]. Таким образом, эстрогены способны оказывать сосудорасширяющее действие как напрямую, действуя на гладкие мышцы и снижая сосудосуживающее действие катехоламинов, так и эндотелий опосредованно, когда эстрогены индуцируют синтез оксида азота (NO), обладающего сосудорасширяющими свойствами [16].

Прогестерон играет важную роль в наступлении беременности и обеспечивает её успешное течение [9, 17]. Однако, необходима не только достаточная концентрация этого гормона, но и наличие рецепторов прогестерона. Известны две изоформы рецепторов прогестерона (РП): А и В. РП-А необходимы для поддержания функции яичников и матки, в то время как РП-В поддерживают пролиферацию и дифференцировку тканей молочной железы [18, 18, 20, 21]. Показано, что прогестерон осуществляет релаксирующее действие на гладкомышечные клетки сосудистой стенки, а также обладает синергическим сосудорасширяющим действием при добавлении к эстрогенам [22, 23].

Некротические изменения в паренхиме печени, обусловленные воздействием тетрахлорметана (CCl₄), более выраженные в 1-е сутки после родов и уменьшающиеся к 10-м суткам, приводят к нарушению нормального метаболизма и инактивации стероидных половых гормонов и, вероятно, их уровень повышается. Объемная плотность (Vv) сосудов в 1-е сутки значительно (в 8,2 раза) превышала данный показатель у мышей 1-й (контрольной) группы, что свидетельствует о реализации эффектов повышенного уровня эстрогенов и прогестерона на сосудистую стенку (вазодилатация). На 3-е, 5-е, и 10-е сутки

послеродового периода объемная плотность (Vv) сосудов миометрия у мышей 2-й (опытной) значительно уменьшалась – в 1,82 раза, что, наряду с уменьшением объемов некроза паренхимы печени, позволяет предположить нормализацию обмена половых гормонов. Сохранение вазодилатации сосудов в ранний послеродовый период может повлиять на послеродовую инволюцию матки, так как одним из важных критериев «подготовки» матки к послеродовой инволюции является состояние тканевой гипоксии, обусловленной относительным снижением васкуляризации миометрия в условиях его гипертрофии, запускающей механизмы апоптоза, клазмацитоза и некроза, являющиеся основными структурными механизмами инволюции матки у мышей [24].

Меньшая объемная плотность (Vv) сосудов в 1-е сутки после родов у мышей 1-й (контрольных) группы указывает на то, что в этом периоде, когда миометрий еще значительно гипертрофирован, сосуды находятся в состоянии спазма, что существенно снижает уровень васкуляризации миометрия, и тем самым, создает предпосылки для реализации механизмов послеродовой инволюции матки, а к 10 суткам показатель значительно увеличивается (в 8,1 раз), т.е. васкуляризация миометрия нормализуется, а процесс послеродовой инволюции завершается [10].

Численная плотность (Nai) сосудов миометрия у мышей 1-й и 2-й групп не различалась, что демонстрирует отсутствия влияния повреждения печени на ангиогенез в миометрии.

Выводы

1. Показатель живорождения у мышей, перенесших острый CCl₄-индуцированный гепатоз составил 74,8 %, мертворождения - 25,2 %, в сравнении с мышами с физиологически протекавшей беременностью, у которых показатель живорожденных составил - 89,7 %, а мертворожденных – 10,3 %.

2. Объемная плотность (Vv) сосудов миометрия у мышей с острым CCl₄-индуцированным гепатозом была значительно большей (в 8 раз), в сравнении с аналогичным показателем у мышей с физиологически протекавшей беременностью в ранний (1 сутки) послеродовый период.

3. Объемная плотность (Vv) сосудов миометрия у мышей с острым CCl₄-индуцированным гепатозом в послеродовый период от 1-х к 10-м суткам значительно уменьшается, в сравнении с аналогичным показателем у мышей с физиологически протекавшей беременностью, в 1,82 раза.

4. Численная плотность (Nai) сосудов миометрия у мышей контрольной и опытной групп не различались, что свидетельствует об отсутствии влияния повреждения печени на этот показатель. ■

Поротникова Е.В., д.м.н., профессор, заведующий кафедрой патологической анатомии НГМУ Надеев А.П., Автор, ответственный за переписку — Надеев А.П., 630091, г. Новосибирск, Красный проспект, 52

Литература:

1. Статистические материалы "Заболеваемость взрослого населения в 2017 году". Available at: <https://www.rosminzdrav.ru/ministry/61/22/stranitsa-979/statisticheskie-i-informatsionnye-materialy/statisticheskiy-sbornik-2017-god>
2. Надеев А.П., Жукова В.А. Патологическая анатомия акушерских заболеваний. Новосибирск: Наука, 2018.
3. Allen A.M., Kim W.R., Larson J.J., et al. Epidemiology of Liver Diseases Unique to Pregnancy in a US Community – a Population-based Study. *Clin. Gastroenterol. Hepatol.* 2016; 14(2): 287–294.
4. Надеев А.П., Жукова В.А., Травин М.А., Мозолева С.П. Патология печени и материнская смертность. *Архив патологии.* 2018;80(2):43-47.
5. García-Romero C.S., Guzman C., Cervantes A., Cerbón M. Liver disease in pregnancy: Medical aspects and their implications for mother and child. *Annals of Hepatology.* 2019; 18: 553–562.
6. Alghamdi S., Fleckenstein J. Liver Disease in Pregnancy and Transplant. *Current Gastroenterology Reports.* 2019; 21:43.
7. Куликов А.В., Шифман Е.М., Спиринов А.В. Острая печеночная патология в акушерстве. *Российский медицинский журнал.* 2014; 20 (2): 37-44.
8. Шимановский Н.Л. Комплексное влияние женских половых стероидных гормонов на сердечно-сосудистую систему: польза и риск. *Кардиология.* 2007; 3: 51-55.
9. Тришина В.Л. Влияние прогестерона и гестагенов на развитие беременности. *Репродуктивное здоровье. Восточная Европа.* 2013; 6 (30): 64-71.
10. Шкуруний В.А. Миометрий при беременности и после родов: Механизмы клеточных преобразований. Новосибирск: Наука, 2012.
11. Коржевский Д.Э., Гиляров А.В. Основы гистологической техники. Спб.: СпецТит, 2010.
12. Автандилов Г.Г. Медицинская морфометрия. Руководство. М.: Медицина, 1990.
13. Миронов А.Н., Бунятян Н.Д., Васильев А.Н., Верстакова О.Л., Журавлева М.В., Лепяхин В.К. и др. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Ч. 1. — М.: Гриф и К, 2012
14. Довжикова И.В., Андриевская И.А. Рецепторы эстрогенов (обзор литературы). Ч. 1. Бюллетень физиологии и патологии дыхания. 2019; 72: 120-127.
15. Kiyama R., Wada-Kiyama Y. Estrogenic endocrine disruptors: Molecular mechanisms of action. *Environ. Int.* 2015 Oct; 83: 11-40.
16. Hurtado R., Celani M., Geber S. Effect of short-term estrogen therapy on endothelial function: a double-blinded, randomized, controlled trial. *Climacteric.* 2016 Oct; 19(5): 448-51.
17. Di Renzo G.C., Giardina I., Clerici G., Brillo E., Gerli S. Progesterone in normal and pathological pregnancy. *Horm. Mol. Biol. Clin. Invest.* 2016; 27(1): 35–48.
18. Довжикова И.В., Андриевская И.А., Петрова К.К. Рецепторы прогестерона: репродуктивная роль. 2018; 70: 104-112.
19. Taraborrelli, S. Physiology, production and action of progesterone. *Acta Obstetrica et Gynecologica Scandinavica.* 2015; 94: 8–16.
20. Wu S.P., DeMayo F.J. Progesterone receptor signaling in uterine myometrial physiology and preterm birth. *Curr. Top Dev. Biol.* 2017;125:171-190.
21. Логинова О.Н., Сонова М.М., Арсланян К.Н. Прогестерон и миома матки. Обзор литературы. *Журнал научных статей здоровье и образование в XXI веке.* 2018; 20 (1): 92-98.
22. Kasap M., Canaz H., Canaz G., Tokmak M., Bingul A., Alatas I. Morphometric Analysis of Dose-dependent Effect of Progesterone on Experimental Vasospasm-induced Rat Femoral Arteries. *Asian J Neurosurg.* 2018; 13(2): 271–6.
23. Simoncini T., Mannella P., Fornari L., Caruso A., Varone G., Genazzani A.R. In vitro effects of progesterone and progestins on vascular cells. *Steroids.* 2003 Nov; 68(10-13): 831-6.
24. Шкуруний В.А., Обединская К.С., Надеев А.П. Исследование структурных изменений в миометрии при многократных беременностях и в процессе инволюции матки у мышей. *Бюлл. эксперим. биол. и медицины.* 2010; 149 (5): 487 – 491.

Поротникова Е.В., Надегов А.П.

Исследование васкуляризации миометрия у мышей в послеродовом периоде при остром CCL4-индуцированном гепатозе

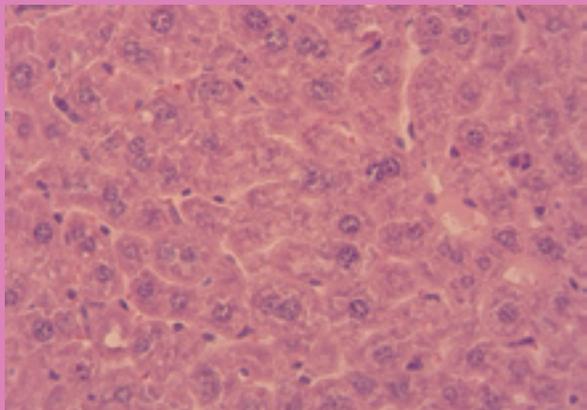


Рисунок 1. Печень мыши-самки линии C57Bl/6 с CCL4-индуцированным гепатозом на 1 сутки после родов: гепатоциты в состоянии вакуольной и гидropической дистрофии, очаги некрозов (в центре рисунка). Окраска гематоксилином и эозином. Увел 400.

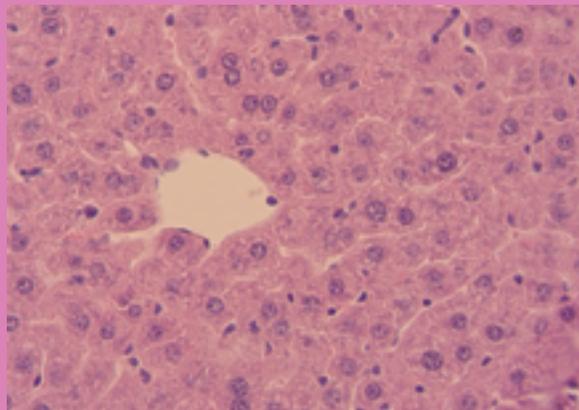


Рисунок 2. Печень мыши-самки линии C57Bl/6 с CCL4-индуцированным гепатозом на 10 сутки после родов: гепатоциты в состоянии вакуольной дистрофии, единичные микронекрозы, большое количество двуядерных гепатоцитов. Увел 400. Окраска гематоксилином и эозином.

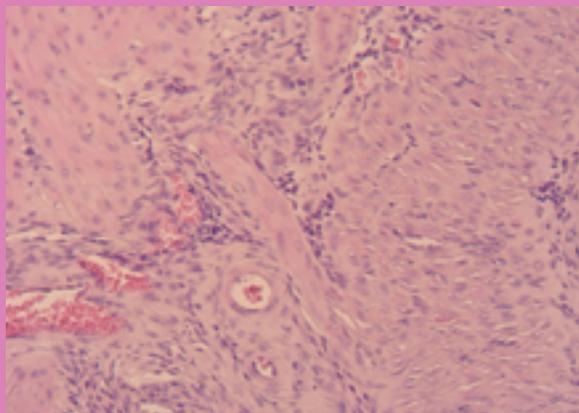


Рисунок 3. Миометрий мыши-самки линии C57Bl/6 с CCL4-индуцированным гепатозом на 1 сутки после родов: полнокровные сосуды, гипертрофия миоцитов. Окраска гематоксилином и эозином. Увел 200.