

Поротникова Е.В.¹, Надеев А.П.^{1,2}, Агеева Т.А.¹,
Ляшенко С.Л.¹, Логинова А.Б.¹

Экспрессия рецепторов эстрогенов и прогестерона в миометрии мышц линии C57Bl/6 в послеродовом периоде в условиях острого CCl4-индуцированного гепатоза

¹ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет» Минздрава России; ²ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины»

Porotnikova E.V., Nadeev A.P., Ageeva T.A., Lyashenko S.L., Loginova A.B.

Expression of estrogen and progesterone receptors in the myometrium of C57Bl / 6 mice in the postpartum period under conditions of acute CCl4-induced hepatitis

Резюме

Целью исследования явилось изучение экспрессии рецепторов к эстрогенам и прогестерону в миометрии мышцей линии C57Bl/6 в условиях острого CCl4-индуцированного гепатоза.

Материалы и методы. Двухмесячные беременные мыши линии C57Bl/6 были разделены на 2 группы: 1-я – мыши с физиологически развивающейся беременностью, забранные на 1 и 10 сутки после родов и 2-я – беременные мыши, забранные на 1, 3, 5 и 10 сутки после родов.

Результаты. При остром CCl4-индуцированном гепатозе нарушается соотношение ядерной экспрессии рецепторов эстрогенов и прогестерона в миоцитах миометрия, наиболее выраженная экспрессия к исследованным рецепторам была отмечена на 5 сутки после родов, и сопровождалась нарушением послеродовой инволюции матки.

Нарушение метаболизма половых гормонов у мышцей с острым CCl4-индуцированным гепатозом в сторону гиперэстрогемии сопровождается преобладанием в механизмах послеродовой инволюции таких процессов как плазмацитоз и апоптоз

Ключевые слова: рецепторы эстрогенов и прогестерона, миометрий, острый CCl4-индуцированный гепатоз, послеродовая инволюция матки

Summary

The aim of the study was to assess the expression of estrogen and progesterone receptors in the myometrium of C57Bl / 6 mice under conditions of acute CCl4-induced hepatitis.

Materials and methods. Two-month-old pregnant female C57Bl / 6 mice were divided into 2 groups: 1st — mice with a physiologically ongoing pregnancy taken on days 1 and 10 after delivery and 2nd — pregnant mice taken on 1, 3, 5, and 10 day after childbirth.

Results. In acute CCl4-induced hepatitis, the ratio of nuclear expression of estrogen receptors to progesterone in myocytes is violated, the most pronounced expression for the studied receptors was noted on the 5th day after delivery, and was accompanied by a violation of postpartum involution of the uterus. Violation of the metabolism of sex hormones in mice with acute CCl4-induced hepatitis towards hyperestrogenemia is accompanied by the predominance of such processes as plasmacytosis and apoptosis in the mechanisms of postpartum involution

Key words: estrogen and progesterone receptors, myometrium, acute CCl4-induced hepatitis, postpartum uterine involution

Введение

Введение. Матка в процессе беременности, родов и в послеродовом периоде подвергается значительным структурно-функциональным изменениям, которые затрагивают преобразование, как эндометрия, так и ми-

ометрия. Если процессы трансформации эндометрия при беременности и в послеродовый период изучены достаточно подробно [1], то процессы, происходящие в миометрии в послеродовом периоде, до сих пор остаются предметом дискуссии и научного интереса. Известно,

что основными механизмами, осуществляющими увеличение массы матки во время беременности, в первой половине является гиперплазия миоцитов, во второй половине – гипертрофия миоцитов [2]. В послеродовом периоде основными процессами, обеспечивающими инволюцию матки, является клазмацитоз, апоптоз, некроз и аутофагия [2, 3, 4]. Все механизмы преобразования миометрия регулируются и зависят от ряда таких факторов как уровень половых стероидных гормонов, их соотношение, состояние рецепторного аппарата миометрия, развивающаяся гипоксия во время родов при сдавлении сосудов и других [5, 6].

Патология печени у беременных, несмотря на невысокую распространённость по сравнению с экстрагенитальной патологией, акушерскими кровотечениями, презклампсией и эклампсией, остается серьезным состоянием, которое, в конечном счете, может сопровождаться развитием ДВС-синдрома и стать причиной материнской и перинатальной смерти [7, 8, 9].

Известно, что печень является центральным органом гомеостазирования, нарушение её функции влечет за собой ряд изменений, затрагивающих, в том числе, метаболизм половых стероидных гормонов, которые, как общепринято, являются главными регуляторами экспрессии ядерных рецепторов [2, 7]. В этой связи оценка уровня экспрессии рецепторов к эстрогену и прогестерону позволит исследовать состояние рецепторного аппарата миометрия в условиях патологии печени и изучить ее роль в механизмах послеродовой инволюции миометрия.

Цель исследования. Изучить экспрессию рецепторов к эстрогенам и прогестерону в миометрии мышей линии C57Bl/6 в условиях острого CCl₄-индуцированного гепатоза.

Материалы и методы

Эксперимент был выполнен на 60 двухмесячных самках мышей линии C57Bl/6, массой 20-22 г. Животные были получены из лаборатории разведения экспериментальных животных Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук» (г. Новосибирск). Животных помещали в пластмассовые клетки по 5 особей (1 самец и 4 самки), содержали в стандартных условиях, со свободным доступом к пище и воде. Беременность у самок 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 [10].

Животные были разделены на 2 группы: 1-я – мыши контрольной группы с физиологически развивающейся беременностью (20 животных) и 2-я (опытная) – беременные мыши, с индуцированным острым токсическим гепатозом (40 животных). Образцы печени и маток для 1-й (контрольной) группы забирали на 1 и 10

сутки послеродового периода, а для 2-й группы – на 1, 3, 5 и 10 суток послеродового периода

При работе с экспериментальными животными руководствовались принципами Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и иных научных целей (ETS 123, Страсбург, 1986) и директивы Европейского парламента и Совета Европейского Союза (2010/63/EU, Страсбург, 2010). Животных выводили из эксперимента под эфирным наркозом методом дислокации шейных позвонков.

В соответствии с рекомендациями, изложенными в руководствах по иммуногистохимическим исследованиям и рекомендациями фирм-производителей антител, депарафинированные срезы матки окрашивали с использованием антител к Estrogen Receptor (клон SP1, rabbit monoclonal antibody, «Thermo scientific» USA) и Progesterone Receptor (клон PgR 636, mouse monoclonal antibody, «ДАКО» Дания) в аппарате Autostainer Link 48. Для иммунного окрашивания использовали полимерную систему детекции с пероксидазной меткой (En Vision FLEX, «ДАКО» Дания). Последним этапом докрашивали ядра клеток гематоксилином.

Для количественной оценки экспрессии рецепторов к эстрогену и прогестерону определяли положительно окрашенные ядра миоцитов в 100 полях зрения на каждый период наблюдения с подсчетом среднего значения [11].

Полученные срезы обрабатывали с использованием светового микроскопа PrimoStar (Zeiss, Германия), изображения получали с помощью цифровой камеры AxioCam 105 color (Zeiss, Германия).

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). 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 у мышей 2-й группы при гистологическом исследовании в печени наблюдали очаги микронекрозов гепатоцитов, преимущественно гидропическая (вакуольная вплоть до баллонной) дистрофия гепатоцитов, встречалось большое количество двуядерных гепатоцитов. Данные изменения отмечали во все периоды наблюдения.

При иммуногистохимическом исследовании регистрировали положительное ядерное окрашивание рецепторов к эстрогену и прогестерону в миоцитах во всех слоях миометрия различной степени выраженности.

При оценке экспрессии рецепторов к прогестерону на 1-е сутки после родов показатель у мышей 2-й (опытной) группы был большим в 1,3 раза, в сравнении с аналогичным показателем у мышей 1-й (контрольной) группы (таблица, рис. 1) (Примечание редактора: этот и последующие рисунки находятся на цветной вставке).

К 5-м суткам этот показатель у мышей 2-й (опытной) группы достоверно нарастал и незначительно уменьшился на 10-е сутки после родов. При сравнении показателей у мышей 1-й (контрольной) и 2-й (опытной) групп на 10-е сутки после родов было выявлено, что показатель экспрессии рецепторов к прогестерону не различался (табл., рис. 2).

При оценке экспрессии рецепторов к эстрогенам было показано, что на 1-е сутки после родов у мышей 2-й (опытной) группы показатель положительно окрашенных ядер был в 5,5 раз выше, чем в аналогичный период у мышей 1-й (контрольной) группы (рис. 3). К 5-м суткам этот показатель достоверно увеличивался, а затем к 10-м суткам послеродового периода уменьшился. При сравнении показателей у мышей 1-й (контрольной) и 2-й (опытной) групп на 10-е сутки после родов, у мышей 2-й (опытной) группы показатель был больше в 2,8 раз, в сравнении с мышами 1-й (контрольной) группы (табл., рис. 4).

При сравнении соотношения экспрессии рецепторов к эстрогенам и прогестерону на 1-е сутки после родов у животных 1-й (контрольной) группы показано, что выраженность экспрессии рецепторов к прогестерону в 4,3 раз была большей, чем к рецепторам эстрогена. На 10 сутки этот показатель уменьшился: экспрессия рецепторов к прогестерону был в 2,8 раз большей, чем к эстрогенам. У мышей 2-й (опытной) группы на 1-е сутки после родов выраженность экспрессии рецепторов к прогестерону была большей в 4,8 раз, чем к эстрогенам, на 3-и сутки - в 1,1 раза, на 5-е и 10-е сутки после родов соотношение экспрессии рецепторов к прогестерону и эстрогену значительно не отличалось. Таким образом, у мышей 2-й (опытной) группы индекс соотношения экспрессии рецепторов к эстрогену и прогестерону во все сроки наблюдения в послеродовый период указывал на нарастание экспрессии в миометрии рецепторов к эстрогену, что может отражать состояние гиперэстрогемии (табл.).

Обсуждение. Ранее было показано, что процессы послеродовой инволюции миометрия у мышей с острым СС14-индуцированным гепатозом не завершались к 10 суткам послеродового периода, при этом ведущим механизмом послеродовой инволюции явились клазматиоз и апоптоз [12].

Повреждение печени, вероятно, приводит к нарушению инактивации половых стероидных гормонов и повышению их уровня. Как известно, главным физиологическим регулятором экспрессии рецепторов половых гормонов является их уровень в сыворотке крови [13]. Учитывая полученные нами данные, значительное повышение уровня экспрессии ядерных рецепторов к эстрогену, может быть связано с гиперэстрогемией вследствие нарушения функции печени и, тем самым, обуславливать замедление процессов инволюции миометрия [12]. Кроме того, показано увеличение диаметра сосудов миометрия мышей, перенесших острый СС14-индуцированный гепатоз, по сравнению с животными с физиологически развивающейся беременностью [14], что также, вероятно, может являться следствием гиперэстрогемии, поскольку эстрогены обладают сосудорасширяющим действием [15].

Известно, что прогестерон не может усиливать образование собственных рецепторов, более того, высокий уровень прогестерона может подавлять синтез собственных рецепторов, а также синтез рецепторов эстрогенов- α и одновременно увеличивать экспрессию эстрогенов- β [17]. Полученные нами данные показывают, что экспрессия ядерных рецепторов к прогестерону была больше у мышей 2-й (опытной) группы в отличие от мышей 1-й (контрольной) группы на 1-е сутки и нарастала к 5-м суткам, на 10-е сутки показатель незначительно уменьшился. Таким образом, можно предположить, что от 5-х к 10-м суткам при достижении определенного уровня прогестерона в крови реализовался эффект подавления собственных рецепторов.

Таблица 1. Экспрессия рецепторов эстрогена и прогестерона в миометрии мышей линии С57В1/6 в послеродовом периоде в норме и в условиях острого СС14-индуцированного гепатоза ($M \pm m$)

Показатели	Животные 1-й (контрольной) группы		Животные с острым СС14-индуцированным гепатозом (2-я группа)			
	1 сутки после родов	10 сутки после родов	1 сутки после родов	3 сутки после родов	5 сутки после родов	10 сутки после родов
Рецепторы к эстрогенам	0,18 \pm 0,04	2,88 \pm 0,18	0,99 \pm 0,12*	6,31 \pm 0,21*	8,78 \pm 0,26*	8,07 \pm 0,28**
Рецепторы к прогестерону	3,77 \pm 0,18	8,01 \pm 0,29	4,77 \pm 0,17*	7,0 \pm 0,27*	9,02 \pm 0,22*	7,84 \pm 0,28
Индекс соотношения рецепторов	0,05	0,36	0,2	0,9	0,97	1,02

Примечание: «*» - отличия статистически значимы в сравнении с контрольными животными на 1 сутки после родов, $p < 0,05$; «**» - отличия статистически значимы в сравнении с контрольными животными на 10 сутки после родов, $p < 0,05$

Выводы

1. При остром СС14-индуцированном гепатозе нарушается соотношение ядерной экспрессия рецепторов эстрогенов и прогестерона в миоцитах миометрия, наиболее выраженная экспрессия к исследованным рецепторам была отмечена на 5 сутки после родов, и сопровождалась нарушением послеродовой инволюции матки.

2. Нарушение метаболизма половых гормонов у мышей с острым СС14-индуцированным гепатозом в сторону гиперэстрогемии сопровождается преобладание в механизмах послеродовой инволюции таких процессов как клазмацитоз и апоптоз.

Надеев Александр Петрович - д.м.н., профессор, заведующий кафедрой патологической анатомии ФГБОУ ВО Новосибирский государственный медицинский университет Минздрава России, г. Новосибирск, Красный проспект, 52.

ский университет Минздрава России, г. Новосибирска. **Поротникова Екатерина Вячеславовна** - очный аспирант кафедры патологической анатомии ФГБОУ ВО Новосибирский государственный медицинский университет Минздрава России, г. Новосибирска. **Агеева Татьяна Августовна** - д.м.н., профессор кафедры патологической анатомии ФГБОУ ВО Новосибирский государственный медицинский университет Минздрава России, г. Новосибирска. **Ляшенко Светлана Леонидовна** - ординатор кафедры патологической анатомии ФГБОУ ВО Новосибирский государственный медицинский университет Минздрава России. **Логонова Анастасия Борисовна** - студент лечебного факультета ФГБОУ ВО Новосибирский государственный медицинский университет Минздрава России. Автор, ответственный за переписку – Надеев А.П., nadeevngta@mail.ru, 630091, г. Новосибирск, Красный проспект, 52.

Литература:

1. Милованов А.П., Кирсанов Я.Н. Вопросы патогенеза маточных кровотечений при так называемых плацентарных полипах. *Архив патологии.* 2008; 70 (4): 34-37.
2. Шкуруний В.А. Миометрий при беременности и после родов: Механизмы клеточных преобразований. Н.: Наука, 2012.
3. Долгих О.В., Агафонов Ю.В., Зашихин А.Л. Гладкая мышечная ткань матки в период раннего пуэрперия: механизмы инволюции. *Экология человека.* 2012; 12: 31-35.
4. Wang L., Hu H., Morse A.N. et al. Activation of autophagy in human uterine myometrium during labor. *Reprod. Sciences.* 2019; 26: 307 A.
5. Wang Y., Abrahams V.M., Luo G. et al. Progesterone inhibits apoptosis in fetal membranes by altering expression of both pro- and antiapoptotic proteins. *Reprod. sciences.* 2018; 25 (8): 1161-1167.
6. Wu J., Miao C., Lv X. et al. Estrogen regulates forkhead transcription factor 2 to promote apoptosis of human ovarian granulosa-like tumor cells. *The jour. of ster. Biochem. and molec. boil.* 2019; 194: 105418.
7. Надеев А.П., Жукова В.А., Травин М.А., Мозолева С.П. Патология печени и материнская смертность. *Архив патологии.* 2018; 80 (2): 43-47.
8. Надеев А.П., Жукова В.А. Патологическая анатомия акушерских заболеваний. Н.: Наука, 2018.
9. Ma K., Berger D., Reau N. Liver diseases during pregnancy. *Clin. Liv. Dis.* 2019; 23 (2): 345-361.
10. Миронов А.Н., Бунятян Н.Д., Васильев А.Н., Верстакова О.Л., Журавлева М.В., Лехахин В.К. и др. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Ч. 1. М.: Гриф и К, 2012.
11. Автандилов Г.Г. Медицинская морфометрия. Руководство. М.: Медицина, 1990.
12. Поротникова Е.В., Надеев А.П., Костина Л.Ю. Послеродовая инволюция миометрия мышей в условиях острого токсического гепатоза. *Дальневосточный медицинский журнал.* 2019; 4: 37-40.
13. Довжикова И.В., Андриевская И.А. Рецепторы эстрогенов (обзор литературы). Часть 1. *Бюллетень физиологии и патологии дыхания.* 2019; 72: 120-127.
14. Поротникова Е.В., Надеев А.П. Исследование васкуляризации миометрия у мышей в послеродовом периоде при остром СС14-индуцированном гепатозе. *Уральский медицинский журнал.* 2019; 178 (10): 94-98.
15. Hurtado R., Celani M., Geber S. Effect of short-term estrogen therapy on endothelial function: a double-blinded, randomized, controlled trial. *Climacteric.* 2016; 19 (5): 448-451.
16. Довжикова И.В., Андриевская И.А., Петрова К.К. Рецепторы прогестерона: репродуктивная роль. *Бюллетень физиологии и патологии дыхания.* 2018; № 70: 104-112.