

ИЗУЧЕНИЕ МОРФОЛОГИЧЕСКИХ, ГИСТОХИМИЧЕСКИХ, ЭЛЕКТРОННОМИКРОСКОПИЧЕСКИХ ХАРАКТЕРИСТИК МИОЦИТОВ СИЛОВОГО МИОМЕТРИЯ ПЛОДОВ ЧЕЛОВЕКА ПРИ РАЗНЫХ СРОКАХ ГЕСТАЦИИ

Руководитель темы: директор Института перинатологии и педиатрии, д.м.н. Иванов Д.О.

Цель работы: морфофункциональное исследование миометрия в различных возрастных периодах.

Материалы и методы

Гистологическое и гистохимическое исследование

Материалом для морфологического исследования явились забранные на аутопсии матки плодов (18-32 недель гестации, n=20), новорожденных (n=20), женщин репродуктивного возраста (n=10), женщин постменопаузы (n=10); интраоперационные биоптаты нижнего сегмента миометрия женщин в родах (n=20). Забирались и маркировались 2-3 кусочков миометрия по 25x15x4мм; по 1 кусочку нижнего сегмента миометрия (в родах) по 25x10x6мм. Образцы миометрия фиксировались в 10% растворе нейтрального забуференного формалина, обезживались в спиртах восходящей концентрации и заливались в парафин. После заливки образцов ткани в парафин выполнялись серийные срезы ротационным микротомом Leica RM 2125 RT. Парафиновые срезы толщиной 2-3 мкм по 2-3 срезов на 1 предметном стекле окрашивали: гематоксилином-эозином, по ван Гизону с эластикой. Готовые гистологические препараты изучались с помощью обычной световой микроскопии на микроскопе Leica DM 4000 B. Микрофотографии были получены с помощью камеры Leica DFC 490 (Германия).

Иммуногистохимическое исследование и морфометрия

Иммуногистохимические препараты парафиновых срезов миометрия готовились в течение 36 часов с антителами к: Ki-67 (Dako), CD34 (Dako), коллагену I (Santa Cruz), III (BioGenics), V (LSBio), фибулину-5 (Abnova), гладкомышечному актину (SMA; Novocastra), десмину (Novocastra); виментину (Novocastra); матричным металлопротеиназам MMP-1, MMP-9, ингибиторам матричных металлопротеиназ-1,2, фибронектину (Novocastra), ангиотензину и ангиотензиновым рецепторам 1 типа; мускариновым рецепторам 1 и 2 типов; пролактину; эстрогеновым рецепторам α (Novocastra), прогестероновым рецепторам (Novocasrta), коннексину 43 (Cell Signaling Technology), HLA-DR – антигену гистосовместимости II класса (Novocastra), CD-3 (Novocastra).

Морфометрический анализ осуществлялся с помощью анализаторов изображения Leica Application Suite V 4.5.0 и ImageJ 1.48v; выполнялось вычисление: 1) среднего количества миоцитов в 1 поле зрения при x1000, их диаметра и длины, 2) средней относительной площади интерстициума и плотности сосудов, 3) средней площади внутреннего просвета вен, 4) толщины их стенок, 5) среднего количества клеток с экспрессией виментина, десмина, гладкомышечного актина (SMA), 5) средней относительной площади экспрессии коллагена I и III, фибулина-5, фибронектина, эстрогеновых и прогестероновых рецепторов, пролактина, HLA-DR в миометрии, 6) распространенности экспрессии матричных металлопротеиназ 1,9 и тканевых ингибиторов матричных металлопротеиназ 1,2, ангиотензина и ангиотензиновых рецепторов в баллах (1 - в единичных клетках, 2 - в небольших группах, 3 – в больших группах клеток, 4 – тотальная), 7) среднего количества CD3+ Т-лимфоцитов/мм².

Электронная микроскопия и электронная иммуноцитохимия

Для электронной микроскопии и электронной иммуноцитохимии использовались фрагменты миометрия нижнего сегмента матки 5 рожениц с (по 1-2 мм). Образцы были зафиксированы в 2,5%-м растворе глутарового альдегида на 0,1М фосфатном буфере в течение 1ч при комнатной температуре, после чего промыты в 3х сменах фосфатного буфера. Далее была выполнена пост-фиксация кусочков в 1%-м растворе тетроксид

осмия на том же буфере, при той же температуре в течение 1ч. После фиксации объекты были дегидратированы в серии растворов этанола возрастающей концентрации (30%, 50%, 70%, 96%, 100%), пропитаны ацетоном и заключены в эпоксидную смолу Эпон. На ультрамикротоме Leica UC7 были получены ультратонкие срезы толщиной 50-70 нм. Срезы были собраны на медные сетки для электронной микроскопии. Сетки со срезами были отконтрастированы в спиртовом растворе уранил-ацетата и водном растворе цитрата свинца. Электронно-микроскопическое исследование срезов было выполнено в микроскопе JEOL JEM 1011. Электронные микрофотографии были получены с использованием камеры Morada (Digital Imaging Solutions Inc.). Для электронной иммуноцитохимии образцы миомерия были зафиксированы 4%-ным раствором параформальдегида в фосфатном буфере с добавлением 0,2 % глутаральдегида в течение 1 часа. Далее объекты дегидратировали в серии растворов этанола возрастающей концентрации и заключали в акриловую смолу LRWhite (Sigma inc.). Полимеризация смолы проходила в закрытых желатиновых капсулах при температуре +52°C. На ультрамикротоме Leica UC7 были получены ультратонкие срезы изучаемого материала толщиной 50-70 нм. Срезы были собраны на никелевые сетки для электронной микроскопии. С целью блокирования неспецифического связывания антител срезы на сетках обрабатывали 1%-ным раствором бычьего сывороточного альбумина (Sigma inc.) в фосфатном буфере в течение 15 мин при комнатной температуре. Коннексин 43 на ультратонких срезах выявлялся непрямой метод. В качестве первичных антител были использованы те же поликлональные кроличьи антитела против коннексина 43 (Diagnostic BioSystems), что и при иммуногистохимическом исследовании. Сеточки со срезами инкубировали в растворе указанных антител на фосфатном буфере (1:100) в течение часа и отмывали в 0,05%-ном растворе Твина-20 в фосфатном буфере. В качестве вторичных антител использовали антитела козы против иммуноглобулинов кролика, конъюгированные с коллоидным золотом диаметром 10 нм (Sigma; разведение 1:100, инкубация в течение 1 часа). После проведения иммунной реакции сетки со срезами были отконтрастированы в спиртовом растворе уранил-ацетата и водном растворе цитрата свинца. Электронно-микроскопическое исследование срезов выполнялось на микроскопе JEOL JEM 1011. Цифровые электронные микрофотографии были получены с использованием камеры Morada (Digital Imaging Solutions Inc.).

Результаты исследования

1. Гистологическая архитектура миомерия зависит от этапа его развития: 2-слойное строение к моменту рождения за счет дифференцировки мезенхимальных плюрипотентных клеток в ГМК становится однослойным у взрослых женщин.
2. Размеры ГМК с момента рождения до периода менопаузы достоверно не изменяются. В постменопаузе отмечается атрофия миоцитов.
3. Пролиферативная активность ГМК наблюдается во всех возрастных периодах, в т.ч., в постменопаузе. В родах она почти в 3 раза выше, чем у женщин репродуктивного возраста.
4. Относительная площадь интерстициума миомерия с возрастом достоверно не изменяется. Постоянным остается и соотношение площади экспрессии коллагенов I, III и V типов, при котором количество коллагена III типа меньше, чем остальных.
5. В родах отмечается увеличение плотности сосудов миомерия без увеличения относительной площади фиброзной ткани интерстициума, преобладает коллаген I типа, наблюдается максимальный уровень экспрессии MMP-1, MMP-9 и TIMP1.
6. Экспрессия эстрогеновых рецепторов α на гладкомышечных клетках миомерия отмечается только у плодов и в репродуктивном возрасте.
7. В родах максимальная экспрессия ацетилхолиновых рецепторов (1 и 2 типов) и так же ангиотензина II и ангиотензиновых рецепторов 1 типа.

8. У женщин репродуктивного возраста и в постменопаузе нет экспрессии пролактина.
9. В процессе роста матки количество коннексина 43 увеличивается. Его максимальное значение определяется в репродуктивном возрасте и при родах.

Публикации по теме

1. Коновалов П.В., Овсянников Ф.А., Иванов Д.О., Митрофанова Л.Б. Морфологическое исследование миометрия в различные возрастные периоды и ремоделирования матки. Вопросы гинекологии, акушерства и перинатологии. 2014; 13(2): 37-43.
2. Коновалов П.В., Ветров В.В., Митрофанова Л.Б., Овсянников Ф.А. и др. Морфологическое исследование миометрия при пролапсе гениталий у женщин в периоде постменопаузы. Проблемы женского здоровья. 2014; 4(9): 59-66
3. Ovsjannikov P., Konovalov P., Mitrofanova L. Morphological examination of the myometrium in different periods of development and modification of the uterus. The journal of maternal-fetal and neonatal medicine. 2014; 27(1): 307-308.
4. Коновалов П.В., Ветров В.В., Митрофанова Л.Б., Иванов Д.О., Овсянников Ф.А., Штайц А.С. Состояние миометрия при пролапсе гениталий в постменопаузе. Тезисы Общероссийской конференции «Перинатальная медицина: от прегравидарной подготовки к здоровому материнству и детству». – М., 2014. – С.70
5. Коновалов П.В., Ветров В.В., Митрофанова Л.Б., Иванов Д.О., Овсянников Ф.А., Штайц А.С. Состояние вен миометрия при пролапсе гениталий в постменопаузе. Тезисы Общероссийской конференции «Перинатальная медицина: от прегравидарной подготовки к здоровому материнству и детству». – М., 2014. – С.71
6. Коновалов П.В., Горшков А.Н., Митрофанова Л.Б., Овсянников Ф.А., Бещук О.В., Антонова И.В., Иванов Д.О. Морфологическое исследование нижнего сегмента матки в родах у женщин с синдромом соединительнотканной дисплазии.
7. Коновалов П.В., Овсянников Ф.А., Иванов Д.О., Митрофанова Л.Б. Сравнительное морфологическое исследование нейрогуморальной регуляции миометрия в различных возрастных периодах и при родах.