

ДИНАМИКА МОРФОМЕТРИЧЕСКИХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИХ РЕГЕНЕРАЦИОННЫХ ПРОЦЕССОВ МАТОЧНОЙ СТЕНКИ КРЫС В ЭСТРАЛЬНОМ ЦИКЛЕ

Тихонова Н.Б., Алексанкина В.В., Болтовская М.Н., Милованов А.П., Алексанкин А.П., Фокина Т.В. (ФГБУ НИИМЧ)

ВВЕДЕНИЕ

Крыс линии Sprague-Dawley (SD) широко применяют в экспериментальных исследованиях патологических состояний женской репродуктивной системы. Однако в связи со значительными отличиями репродуктивного цикла грызунов проблема интерпретации экспериментальных данных и экстраполяции результатов для клинических исследований остается актуальной. Морфологические параметры маточной стенки крысы меняются кардинально в зависимости от фазы эстрального цикла, продолжительность которого у SD, как правило, 5 суток, что значительно короче женского менструального цикла. Одной из ключевых особенностей клеточного состава маточной стенки грызунов является наличие значительного количества лейкоцитов гранулоцитарного ряда и их динамическое распределение в различных слоях стенки в зависимости от фазы цикла, что может осложнить интерпретацию роли клеток воспаления в экспериментальных работах. В литературных источниках нам не удалось найти данные по уровню распределения лейкоцитов и макрофагов в стенке матки SD в разные фазы эстрального цикла, который характеризуется физиологической циклической регенерацией компонентов эндометрия.

ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Морфометрическая характеристика уровня лейкоцитов гранулоцитарного ряда и макрофагов в эндометрии и миометрии стенки матки крыс Sprague-Dawley в различные фазы эстрального цикла

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследование выполнено на 20 самках крыс Sprague-Dawley (n=20; возраст 14-16 недель, вес 220-280 г), по пять животных на каждую исследуемую фазу – проэструс, эструс, метэструс и диэструс. Фазу эструса устанавливали при цитологическом исследовании вагинального мазка, окрашенного с помощью набора реагентов «Диахим-Диф-Квик» (НПФ «Абрис+», кат. №451) и иммуноферментном исследовании содержания эстрадиола и прогестерона в сыворотке крови (НВО «Иммунотех», кат. № ИФ-02-07 и ИФ-02-08).

Срезы с парафиновых блоков окрашивали гематоксилином и эозином (ООО «БиоВитрум», артикул: 07-006) для выявления гранулоцитов — нейтрофилов и эозинофилов. Морфометрические показатели распределения клеток определяли в функциональном слое эндометрия, который прилегает к маточному эпителию (МЭнд), в базальном эндометрии (Энд), вблизи миометрия, во внутреннем слое миометрия (ВнМ) и в сосудистом слое совместно с внешним слоем миометрия (ВнеМ).

Макрофаги выявляли моноклональными антителами (мкАт) к CD68 (#ab31630, Abcam). Микроскопию проводили с помощью микроскопической системы Leica. Клетки подсчитывали в трех полях зрения микроскопа при 1000-кратном увеличении в каждом из трех препаратов от одного животного. Статистическую обработку результатов проводили методами описательной статистики (среднее, ошибка среднего) и непараметрической статистики для оценки различий (критерий Манна-Уитни).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

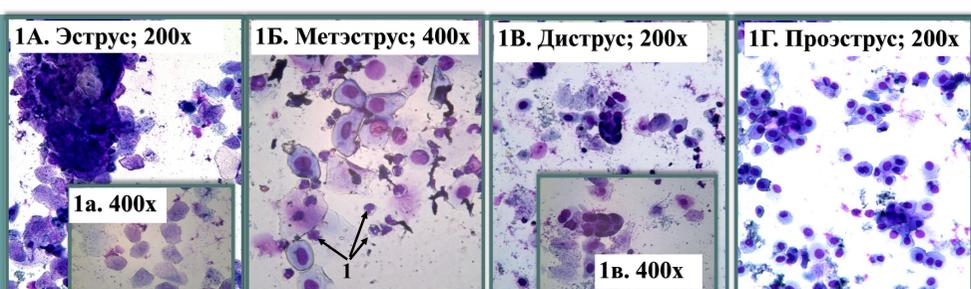


Рисунок 1. Фазы эстрального цикла. Цитологическое исследование вагинального мазка, окрашенного «Диахим-Диф-Квик». А—эструс, безядерные кератинизированные клетки поверхностного слоя эпителия; Б—метэструс, (1) - большое количество нейтрофилов, безядерные и ядерные клетки эпителия разной степени зрелости; В—диэструс, мазок малоклеточный, чаще встречаются незрелые эпителиальные клетки парабазального и промежуточного слоёв, незначительное количество нейтрофилов; Г—проэструс, незрелые клетки поверхностного слоя с хорошо выраженными ядрами, отсутствие нейтрофилов

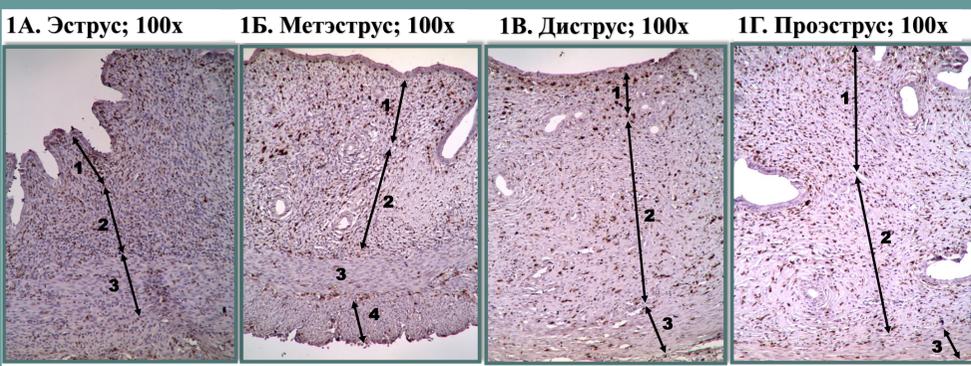


Рисунок 2. Иммуногистохимическое исследование макрофагов CD68+; докрасивание гематоксилином Майера, 100x; Стрелки 1— функциональный эндометрий (МЭнд), 2— базальный эндометрий (Энд), 3— внутренний слой миометрия (ВнМ), 4— внешний слой миометрия (ВнеМ)

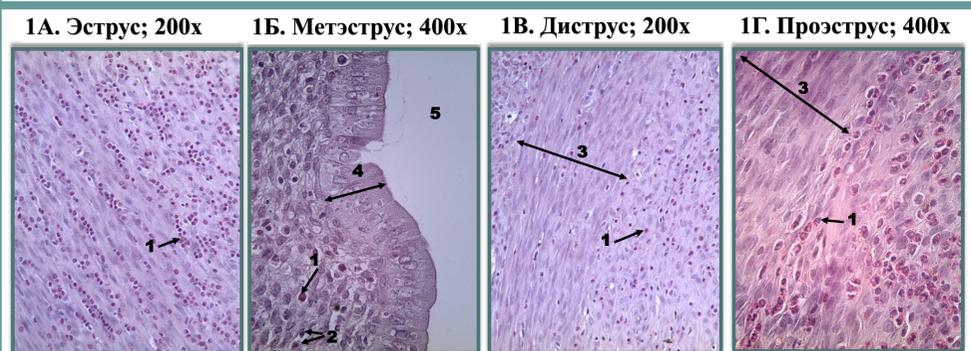
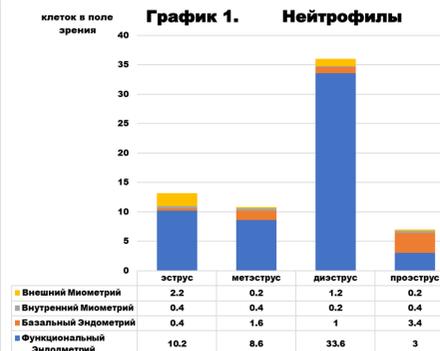


Рисунок 3. Гистологическое исследование; окрашивание гематоксилином и эозином; Стрелки 1— эозинофилы, 2— нейтрофилы, 3— внутренний слой миометрия, 4— маточный эпителий, 5— полость матки



Фаза эструса характеризовалась сужением маточной полости, значительной складчатостью цилиндрического маточного эпителия с выраженными признаками дегенерации и отсутствием фигур митоза.

Фаза метэструса характеризовалась узкой маточной полостью, выстланной преимущественно кубическим маточным эпителием с остаточными признаками дегенерации и появлением редких митотических фигур.

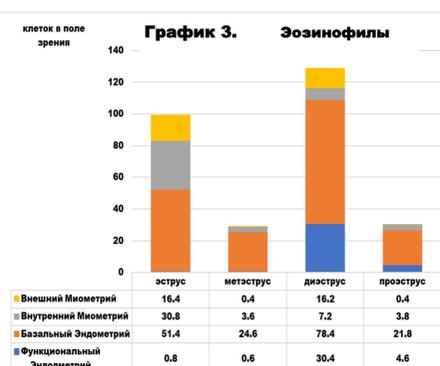
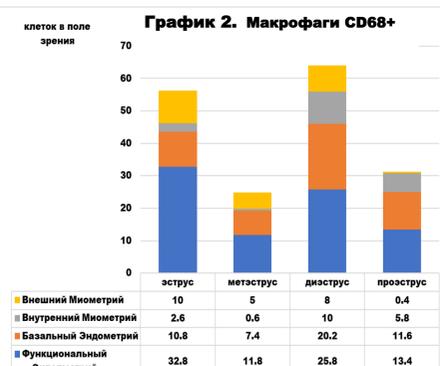
Фаза диэструса характеризовалась узкой маточной полостью, выстланной преимущественно кубическим маточным эпителием с остаточными признаками дегенерации и появлением редких митотических фигур. Эти наблюдения согласовывались с литературными данными (Westwood, 2008).

Фаза проэструса характеризовалась расширенной маточной полостью, заполненной секретом маточных желез, цилиндрическим маточным эпителием без признаков вакуолизации и дегенерации, как и в железистом эпителии, с незначительным количеством фигур митоза.

Распределение в тканях стенки матки эозинофилов, нейтрофилов и макрофагов CD68+ представлено в Таблице 1 и на Графиках 1, 2 и 3.

Таблица 1. Среднее значение количества клеток в поле зрения ± стандартное отклонение

Клетки	ткань	эструс	метэструс	диэструс	проэструс
нейтрофилы	МЭнд	10.2±1.3	8.6±0.5	33.6±3.0	3.0±0.7
	Энд	0.4±0.5	1.6±0.5	1.0±1.0	3.4±0.9
	ВнМ	0.4±0.5	0.4±0.5	0.2±0.4	0.4±0.5
	ВнеМ	2.2±0.8	0.2±0.4	1.2±0.8	0.2±0.4
макрофаги	МЭнд	32.8±1.9	11.8±1.5	25.8±1.5	13.4±0.9
	Энд	10.8±1.6	7.4±1.1	20.2±1.8	11.6±2.1
	ВнМ	2.6±0.5	0.6±0.5	10±1.0	5.8±0.8
	ВнеМ	10.0±1.6	5.0±0.7	8.0±0.7	0.4±0.5
эозинофилы	МЭнд	0.8±0.4	0.6±0.5	30.4±2.1	4.6±0.9
	Энд	51.4±3.4	24.6±4.3	78.4±8.0	21.8±1.5
	ВнМ	30.8±2.9	3.6±0.5	7.2±0.8	3.8±0.8
	ВнеМ	16.4±1.7	0.4±0.5	16.2±1.5	0.4±0.5



Представленные результаты показывают значительную миграцию эозинофилов, нейтрофилов и макрофагов в тканях маточной стенки крыс в зависимости от фазы цикла и гормонального фона. Если увеличение количества нейтрофилов и макрофагов под маточным эпителием в определенные фазы эстрального цикла можно объяснить необходимостью слушивания функциональных слоёв и восстановлением оставшихся тканей, то о причинах циклической миграции эозинофилов в матке грызунов известно очень мало. Однако не вызывает сомнений вовлеченность эозинофилов в ремоделировании маточной стенки грызунов под воздействием гормонального фона.

В данной работе мы выявили особенности распределения нейтрофилов, эозинофилов и макрофагов в стенке матки крысы в зависимости от фазы цикла, что может помочь в адекватной оценке морфометрических показателей в зависимости от эстрального цикла крысы в эксперименте и корректной экстраполяции результатов эксперимента для клинических исследований.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Эстральный цикл у крыс характеризуется достоверно изменяющимися показателями распределения гранулоцитов и макрофагов в слоях маточной стенки, что указывает на важную роль этих клеток в физиологических регенерационных процессах функциональных тканей при изменении гормонального фона в половом цикле. Соотношение гранулоцитов и макрофагов в каждом слое маточной стенки может однозначно указывать на фазу эстрального цикла крысы и служить индикатором тех или иных воздействий в эксперименте.