

# РЕГЕНЕРАТОРНЫЕ ПОТЕНЦИИ ТКАНЕЙ СФИНКТЕРА ШЕЙКИ МАТКИ У КРЫС В УСЛОВИЯХ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО РАСТЯЖЕНИЯ ЦЕРВИКАЛЬНОГО КАНАЛА

## COMPARATIVE ASPECTS OF REGENERATIVE POTENCY OF SPHINCTER CERVICAL TISSUES IN RATS WITH CANALIS CERVICIS UTERI TRACTION UNDER EXPERIMENTAL CONDITIONS

Григорьева Ю.В.<sup>1</sup>  
Суворова Г.Н.<sup>1</sup>  
Ренц Н.А.<sup>2</sup>  
Бормотов А.В.<sup>2</sup>

Grigoryeva YuV<sup>1</sup>  
Suvorova GN<sup>1</sup>  
Renz NA<sup>2</sup>  
Bormotov AV<sup>2</sup>

<sup>1</sup> ФГБОУ ВО «Самарский государственный  
медицинский университет» Минздрава РФ

<sup>1</sup> Samara State  
Medical University

<sup>2</sup> ГБУЗ СО ТГКБ № 5 г. Тольятти

<sup>2</sup> Clinical Hospital № 5, Togliatti

**Цель** — проследить динамику течения репаративной регенерации в шейке матки крыс при ее повреждении в условиях экспериментального дозированного растяжения.

**Материалы и методы.** Объектом исследования служила шейка матки на уровне сфинктера. Взятие материала осуществляли от 25 половозрелых нерожавших лабораторных крыс, которым под эфирным наркозом выполнено дозированное растяжение шейки матки. Для оценки течения репаративной регенерации забирали материал на 1, 3, 5, 7, 10, 15, 21 и 30 сутки. Проведено комплексное морфологическое исследование с использованием методов световой и электронной трансмиссионной микроскопии, иммуногистохимии.

Иммуногистохимическое исследование тканей шейки матки осуществляли с применением набора моноклональных антител к  $\alpha$ -гладкомышечному актину.

**Результаты.** Установлено, что растяжение шейки матки приводит к появлению участка, где различимы три зоны: зона повреждения, прираневая зона и зона морфологической целостности. При этом зона повреждения максимально соответствует собственно сфинктеру, а прираневая зона — предсфинктерному и постсфинктерному компартментам. В зоне повреждения отдельные миоциты подвергаются некрозу. В прираневой зоне некроза клеток не наблюдается, но заметно нарушение межклеточных контактов за счет изменения морфологии межклеточного вещества. Растяжение провоцирует развитие местного септического воспаления, затрагивающего все оболочки. С наступлением фазы пролиферации запускается синтез компонентов волокнистой соединительной ткани, приводящий к перестройке гистоархитектоники данной части органа и как следствие — к нарушению строения функционального синцития.

**Заключение.** Посттравматическая регенерация осуществляется путем смены фенотипа сохранившихся миоцитов с сократительных на сократительно-синтетические и синтезом волокнистого компонента межклеточного вещества. Также наблюдается неполный митоз отдельных миоцитов, который приводит к образованию двудерных или полиплоидных клеток.

**Ключевые слова:** шейка матки, миометрий, гладкие миоциты, коллаген, восстановление.

**Aim** — to study the reparative regeneration processes after experimental gradual traction of cervix uteri in rats.

**Materials and methods.** The object of the study is the cervix at the sphincter. We performed gradual traction of cervix uteri in 25 rats under aether anesthesia and gathered the samples. We analyzed the course of reparative regeneration and performed sampling after 1, 3, 5, 7, 10, 15, 21 and 30 days. We carried out complex morphological examination with optical and transmission electron microscopy, and immunohistochemistry. The immunohistochemical examination of cervical tissues was performed using a set of monoclonal antibodies to  $\alpha$ -smooth muscle actin.

**Results.** It was determined that cervical traction formed three distinguishable zones: the zone of damage, the periwound zone and the zone of morphological integrity. The zone of damage corresponds to the actual sphincter and the periwound zone — to pre- and postsphincter compartments. Several myocytes undergo necrosis in the damage zone. There is no necrosis in the periwound area, but we found some abnormality of intercellular contacts due to the change of the morphology of intercellular substance. The experimental traction causes the development of local septic inflammation, affecting all the layers. The synthesis of fibrous connective tissue components starts in the proliferative phase. It leads to restructuring of histoarchitecture and disruption of the functional syncytium structure.

**Conclusion.** Post-traumatic regeneration is performed by changing the phenotype of survived myocytes from mantle to mantle-synthetic myocytes with synthesis of the fiber component of the intercellular substance. Also, there is an incomplete mitosis in several myocytes, which leads to the formation of binuclear or polyploid cells.

**Keywords:** cervix of the uterus, myometrium, smooth muscle cells, collagen, regeneration.

## ■ ВВЕДЕНИЕ

В современной морфологии ведущее место продолжает занимать проблема регенерации тканей — как в составе органов, так и их отделов [1, 2].

Нижний отдел матки представляет собой многотканевую систему, где средняя оболочка стенки образует своеобразный сфинктер. По мнению Л.Л. Колесникова (2008), сфинктером следует считать наличие специально организованной мышечной ткани (гладкой или поперечнополосатой), позволяющей регулировать величину и/или длительность сообщения между компартментами (сегментами, частями) полого органа. Компартменты сфинктерного аппарата в свою очередь различаются условиями среды (изменение внутрипросветного давления, изменение pH), периодичностью действия и рядом других структурных особенностей [3].

Повреждения сфинктерной части шейки матки нередко наблюдаются вследствие растяжения, например, при оперативных родах, родах крупным плодом, в случаях родоразрешения при неполном раскрытии маточного зева и т.д. Кроме того, травматические повреждения шейки возникают при насильственном расширении ее канала, в том числе при диагностических операциях и проведении искусственных абортов. Возникшие повреждения нередко приводят к анатомической и функциональной недостаточности цервикса [4-6].

Несмотря на актуальность данной проблемы, работ, посвященных изучению посттравматической регенерации миометрия нижнего отдела матки и его сфинктерного аппарата, нет.

Исходя из сказанного, требуются углубленные фундаментальные знания на субклеточном, клеточном и тканевом уровнях, которые позволили бы максимально эффективно управлять процессами регенерации в шейке матки.

## ■ ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Цель — используя арсенал морфологических методов, проследить динамику течения репаративной регенерации в шейке матки крыс при ее повреждении в условиях экспериментального дозированного растяжения.

## ■ МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Взятие материала осуществляли от 25 лабораторных беспородных крыс. Экспериментальные исследования проводились в соответствии с «Руководством по содержанию и использованию лабораторных животных», а также с соблюдением правил гуманного обращения с животными [7, 8]. Объектом для исследования служила шейка матки. В экспериментальной группе использованы половозрелые нерожавшие крысы, которым под эфирным наркозом выполнено дозированное растяжение шейки матки (патент на полезную модель №151410).

Для оценки течения репаративной регенерации забор материала осуществляли в 1 сутки и на 3, 5, 7, 10, 15,

21 и 30 сутки. Для проведения световой микроскопии материал фиксировали в 10 % забуференном формалине, проводку материала осуществляли в гистологическом процессоре замкнутого типа с вакуумом Leica ASP 300. Заливали материал в парафин «Histomix» фирмы BioOptica. Срезы готовили на роторном микротоме толщиной 4 мкм. Срезы окрашивали гематоксилином и эозином. Иммуногистохимическое исследование тканей шейки матки осуществляли с применением набора моноклональных антител к  $\alpha$ -гладкомышечному актину. Типирование проводили с использованием антител фирмы DACO. Постановку иммуногистохимической реакции проводили с одношаговой системой визуализации BioGenex (QD 630-XAK) SuperSensitive one-step Polymer — HRP Kit/DAB.

В работе также использован метод трансмиссионной электронной микроскопии. Для этого материал подвергали фиксации в 2,5% растворе глутарового альдегида на 0,1М фосфатном буфере с pH -7,4. После фиксации материал помещали в 1% раствор тетраоксида осмия. Промывали раствором фосфатного буфера, затем обезвоживали в спиртах возрастающей концентрации и заливали в эпон-аралдитовую смесь. Контрастирование осуществляли уранилацетатом и цитратом свинца. Для установления прицельного участка исследования сначала готовили полутонкие срезы толщиной 1-2 мкм, далее ультратонкие срезы толщиной 200-500 нм. Ультратонкие срезы просматривали на электронном микроскопе JEOL JEM-1400 PLUS.

## ■ РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

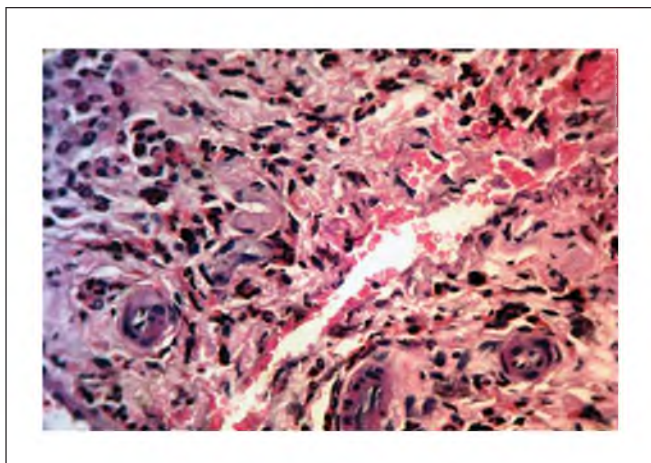
При гистологическом исследовании шейки матки в условиях воздействия повреждающего фактора был выявлен участок альтерации, который можно разделить на три зоны: зона повреждения, прианевая зона и зона морфологической целостности. Сфинктерный аппарат шейки матки — это участок сужения в составе данного трубчатого органа, локализующийся на границах компартментов (зон): предсфинктерного компартмента, собственно системы регуляции (сфинктера) и постсфинктерного участка, который регулирует проведение содержимого далее. Следует отметить, что практическая медицина считает, что зона максимального повреждения соответствует собственно сфинктеру.

К концу первых суток в зоне повреждения видны деструктивные и диапедзные кровоизлияния, расположенные в соединительной ткани эндометрия и заходящие во внутренний слой миометрия, также мелкоочаговые кровоизлияния встречаются и в параметрии (рис.1).

Отмечается спазм артерий и артериол, которые преобладают в шейке матки. В других сосудах микроциркуляторного русла заметен стаз крови. Нарастает интерстициальный отек.

В течение 1-3 суток после растяжения прежде всего гибнут единичные миоциты зоны сфинктера. Светоптически выявляется, что цитоплазма поврежденных клеток окрашивается неравномерно. На ультраструк-





**Рисунок 1.** Участок шейки матки крысы после растяжения через сутки после травмы. Видны деструктивные кровоизлияния и лейкоцитарная инфильтрация. Окраска гематоксилином и эозином. Увел. 200X.

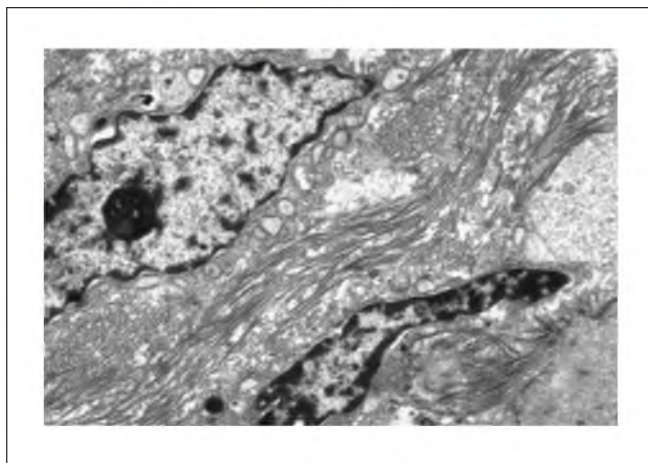
турном уровне в дистрофически измененных лейомиоцитах наблюдаются изменения, последовательно сменяющие друг друга, начинающиеся от пристеночной конденсации хроматина, грубой конденсации и далее — усугубления состояния до пикноза, рексиса и лизиса ядер. Также разрушается кавеоларный аппарат и митохондрии. Разрушению органоидов предшествует распад ядер. Единичные гибнущие миоциты диффузно рассеяны в толще средней оболочки. В ядрах отдельных сохранившихся клеток увеличивается количество инвагинаций кариолеммы и расширение перинуклеарного пространства, цистерны ЭПС также расширены. Такие клетки встречаются как в зоне собственно сфинктера, так и в над- и постсфинктерных зонах, что соответствует прираневой зоне.

На 3 сутки восстановительного процесса в результате отека нарушаются межклеточные взаимодействия, контуры большинства миоцитов разрушаются. Особое значение имеет состояние стенки сосудов, так как миоциты стенки артериол также подвергаются повреждению с исходом в некроз. Это приводит к повышению их проницаемости.

Альтерации подвергаются не только клетки, но и структура межклеточного вещества, которая в основном представлена различной толщины пучками коллагеновых волокон. Последние подвергаются разволокнению, но их деструкции не наблюдается (рис. 2).

Уже с первых суток после травмы в зону повреждения мигрируют гранулярные лейкоциты, количество которых постепенно увеличивается сначала периваскулярно в центре повреждения, а к 3-5 суткам инфильтрация распространяется на весь сфинктерный аппарат. Развивается местное септическое воспаление, которое затрагивает все оболочки цервикса. Воспалительный инфильтрат представлен гранулоцитами с преобладанием эозинофилов (рис. 1).

К 5 суткам необратимые процессы видны и в составе межклеточного вещества, заметны расплавление и фрагментация пучков коллагеновых волокон и их агрегация. Вероятно, это вызвано активацией коллагеназы вследствие воспаления. Сохранившиеся миоциты сдав-



**Рисунок 2.** Участок шейки матки на 3 сутки после травмы. Заметен интерстициальный отек и некроз отдельных клеток. ТЭМ. Увел. 4000X.

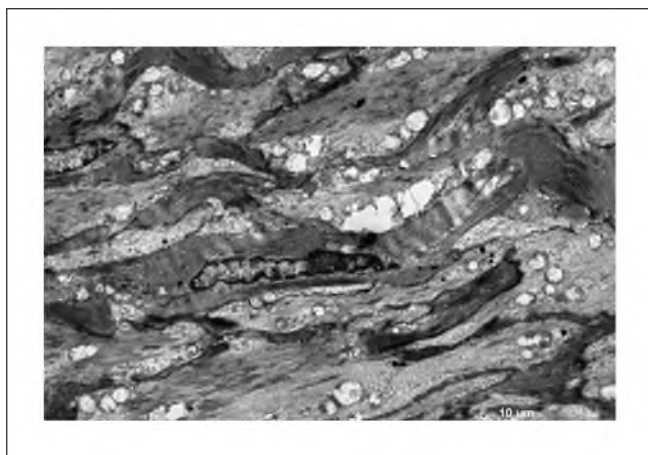
лены межклеточным веществом, в их цитоплазме отмечается разрушение кавеол и митохондрий (рис. 3).

С 7 по 10 сутки после растяжения основные проявления воспаления сохраняются.

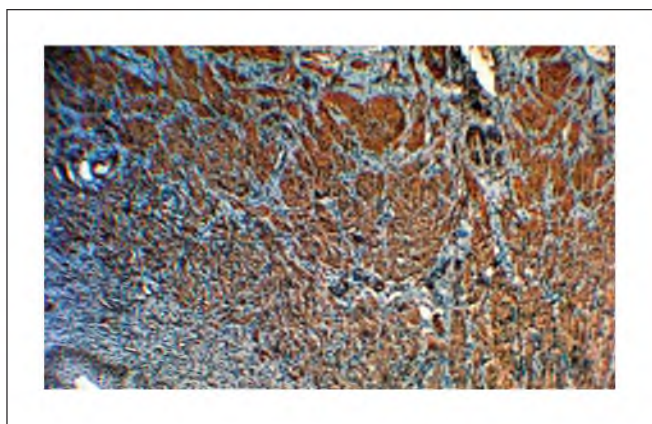
К 10 суткам от начала эксперимента проницаемость сосудистой стенки все еще повышена, сохраняется миграция лейкоцитов, но клеточный состав инфильтрата меняется в сторону лимфоцитов, плазматических клеток и моноцитов. Миграция гранулоцитов также сохраняется. Активно осуществляется фагоцитоз как клетками гемопоэтического ряда, так и самими миоцитами. В цитоплазме последних видны аутофаголизосомы.

В зоне повреждения определяются сохранившиеся миоциты, но все еще встречается некроз отдельных клеток. Среди сохранившихся миоцитов есть как светлые, так и темные; как большие, так и малые. Фигур митотического деления клеток на 7 сутки не наблюдается, но с 10 суток начинают встречаться единичные двоядерные клетки.

В части миоцитов, особенно темных, в цитоплазме становятся заметными изменения в структуре органоидного аппарата. Отмечается уменьшение миофиламентов и, наоборот, обилие свободных рибосом и поли-



**Рисунок 2.** Участок шейки матки на 5 сутки после травмы. Разрушение органоидов клеток и распад фибриллярных структур межклеточного вещества. ТЭМ. Увел. 2000X.



**Рисунок 4.** Шейка матки на 30 сутки регенерации после растяжения. Волокна соединительной ткани в разном направлении, врастающие в сфинктер. ИГХ на гладкомышечный актин. Увел. 100X.

сом за счет развития гранулярной эндоплазматической сети. Это свидетельствует о смене фенотипа миоцитов с сократительных на синтезирующие.

К 15 суткам от начала эксперимента отчетливо заметна смена клеточного состава на лимфоциты и плазмocyты. Это свидетельствует о развернувшейся фазе пролиферации. Заметен рост новообразованных сосудов.

Особым образом ведет себя прираневая зона, в которой много сохранивших структуру миоцитов. Однако клетки оказываются изолированными друг от друга из-за отека и изменения межклеточного вещества. Поскольку сокращение всех отделов матки происходит синхронно за счет мгновенного распространения возбуждения через щелевые контакты (нексусы), которые являются специальным механизмом проведения возбуждения, координирующим активность миллиардов мышечных клеток миометрия, такие изменения в структуре органов дальнейшем приведут к нарушению его функции.

К 21 суткам межклеточные пространства в прираневой зоне заполняются белковыми массами, которые уплотняются, но имеют фибриллярное строение. К концу 3 недели эксперимента увеличивается количество грубой волокнистой соединительной ткани. Следует заметить, что ориентация новообразованных волокон нарушена (в норме волокна располагаются по ходу оси лейомиоцита), что также приводит к нарушению упорядоченности расположения клеток в структуре слоев миометрия.

В темных миоцитах, несмотря на более плотное расположение сократительных филаментов, заметно нарушение их параллельной ориентации. Контуров клеток имеют зубчатый вид. В примембранной части цитоплазмы клеток количество контрактильного аппарата снижено.

Через 30 суток после нанесения повреждения во внутреннем сфинктере митотически делящихся гладкомышечных клеток не обнаруживается, хотя малые миоциты и двоядерные клетки редко, но продолжают встречаться. Клеточные оболочки выравниваются, между сохранными миоцитами вновь устанавливаются межклеточные контакты. В зоне регенерата сфинктер образован пучками миоцитов, разделенными соединительнотканнми прослойками с грубыми коллагеновыми волокнами, которые отчетливо выделяются при иммуногистохимическом окрашивании препарата на гладкомышечный актин (рис. 4).

Но даже в этот срок эксперимента воспаление не заканчивается, и мелкие очаги круглоклеточной инфильтрации продолжают сохраняться во всех зонах.

## ■ ОБСУЖДЕНИЕ

Проведенное исследование показало, что растяжение шейки матки является фактором, способствующим альтерации тканей ее сфинктера. При этом собственно сфинктер оказывается наиболее уязвимым к действию повреждающего фактора. Растяжение приводит к некрозу отдельных мышечных клеток в собственно сфинктере и развитию воспаления, затрагивающего все оболочки шейки матки, как на уровне сфинктера, так и в над- и подсфинктерных компартментах. При растяжении отмечается затянувшаяся стадия пролиферации. Имеет место неполный митоз отдельных миоцитов. По мнению В.Я. Бродского и И.В. Урываевой (1981), в реактивно измененных гладкомышечных клетках миофиламенты не препятствуют вхождению лейомиоцитов в митотический цикл, но блокируют его завершение, что приводит к образованию двоядерных или полиплоидных миоцитов [9]. В полиплоидной клетке возрастает количество РНК и интенсифицируется белковый обмен, т.е. полиплоидизация интенсифицирует потенциал белковосинтетического аппарата клетки [10].

## ■ ВЫВОДЫ

Строгая приуроченность полиплоидизации к определенным этапам гистогенеза говорит о генетической детерминированности этого явления в мышечных тканях шейки матки при репаративной регенерации. В основном посттравматическая регенерация в шейке матки осуществляется путем смены фенотипа миоцитов с сократительных на сократительно-синтетические с последующим синтезом волокон соединительной ткани. Но такой ход регенерации приводит к перестройке гистархитектоники данной части органа и как следствие — к нарушению строения функционального синцития. ■

## ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Суворова Г.Н., Тулаева О.Н. Регенерация внутреннего сфинктера прямой кишки после его механического повреждения. *Национальная Ассоциация Ученых*. 2015. № 9-2 (14):155-157.

- Suvorova GN, Tulaeva ON. Regeneration of the internal sphincter of the rectum after mechanical damage. *Nacional'naja Asociacija Uchenyh*. 2015. № 9-2 (14):155-157. (In Russ.).
2. Бовтунова С.С. Течение регенераторного процесса поперечнополосатой мышечной ткани анального



сфинктера в послеоперационный период. *Аспирантский вестник Поволжья*. 2011. №1-2:180-182.

Bovtunova SS. The course of regenerative process of the striated muscle tissue of anal sphincter during the post operational period. *Aspirantskiy vestnik Povolzh'ja*. 2011. №1-2:180-182. (In Russ.).

3. Колесников Л.Л. Сфинктерология. М.: Гэотар-Медиа, 2008.

Kolesnikov LL. Sfinkterologiya. M.: Gjeotar-Media, 2008. (In Russ.).

4. Сидельникова В.М. Привычная потеря беременности. М.:Триада-X, 2002.

Sidel'nikova VM. Privychnaja poterja beremennosti. M.: Triada-X, 2002 (In Russ.).

5. Allen RH, Goldberg AB. Board of Society of Family Planning. Cervical dilation before first-trimester surgical abortion (<14 weeks' gestation). SFP Guideline 20071. Contraception. 2007 Aug;76(2):139-56. E-pub 2007 Jul 10. PubMed PMID:17656184

6. Mourali M, Gharsa A, Fatnassi A, Binous N, Ben Zineb N. [Cervical incompetence: diagnosis, indications and cerclage outcome]. *TunisMed*. 2012 Apr;90(4):300-5. French. PubMed PMID: 22535344

7. Требования Международного комитета по науке по использованию в экспериментальных исследованиях

лабораторных животных. Бюллетень ИКЛАС.1978(24):4-5.с условиями, изложенными в приказе МЗ РСФСР №754.

Trebovanija Mezhdunarodnogo komiteta po nauke po ispol'zovaniju v jeksperimental'nyh issledovanijah laboratornyh zhivotnyh. Bjulleten' IKLAS.1978 (24): 4-5.s uslovijami. izlozhennymi v prikaze MZRSFSR №754.

8. Международные рекомендации по проведению медико-биологических исследований с использованием животных. Ланималогия.1993(1):29.

Mezhdunarodnye rekomendacii po provedeniju mediko-biologicheskikh issledovanij s ispol'zovaniem zhivotnyh. Lanimalogija.1993(1):29.

9. Бродский В.Я., Урываева И.В. Клеточная полиплоидия. Пролиферация и дифференцировка. М.: Наука, 1981.

Brodskij VJa, Uryvaeva IV. Kletochnaja poliploidija. Proliferacijai differencirovka. M.: Nauka, 1981. (In Russ.).

10. Романова Л.П., Малышев И.И. Роль двуядерных гепатоцитов в регенерации печени после механической травмы в раннем онтогенезе у крыс. *Вестник Чувашского университета*. 2011(3):398-402.

Romanova LP, Malyshev II. The role of binuclear hepatocytes in liver regeneration after a mechanical trauma in early ontogenesis in rats. *Vestnik Chuvashskogo universiteta*. 2011(3):398-402. (In Russ.).

#### ■ Участие авторов:

Сбор, написание текста: Григорьева Ю.В.

Обработка материала: Бормотов А.В.

Редактирование: Суворова Г.Н., Ренц Н.А.

Конфликт интересов отсутствует.

#### СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

**Григорьева Ю.В.** — к.м.н., доцент кафедры гистологии и эмбриологии СамГМУ.  
E-mail: histology@bk.ru

**Суворова Г.Н.** — д.б.н., профессор, заведующая кафедрой гистологии и эмбриологии СамГМУ.  
E-mail: gsuvmed@yandex.ru

**Ренц Н.А.** — к.м.н., главный врач ГБУЗ СО «ТГКБ №5» г. Тольятти.  
E-mail: medvaz@tlt.ru

**Бормотов А.В.** — врач-патологоанатом высшей категории, заведующий патологоанатомическим отделением ГБУЗ СО «ТГКБ №5» г. Тольятти.  
E-mail: zavpao@gmail.com

#### INFORMATION ABOUT AUTHORS

**Grigoryeva YuV** — PhD, associate professor of the Department of Histology and Embryology, Samara State Medical University.  
E-mail: histology@bk.ru

**Suvorova GN** — PhD, professor, head of the Department of Histology and Embryology, Samara State Medical University.  
E-mail: gsuvmed@yandex.ru

**Renz NA** — PhD, the chief physician of Municipal Clinical Hospital № 5, Togliatti.  
E-mail: medvaz@tlt.ru

**Bormotov AV** — pathologist of the highest category, head of the Pathology Department, Municipal Clinical Hospital № 5, Togliatti.  
E-mail: zavpao@gmail.com

#### ■ Контактная информация

**Григорьева Юлия Владимировна**

Адрес: Самарский государственный медицинский университет, ул. Чапаевская, 227, г. Самара, Россия, 443001.

E-mail: histology@bk.ru

Тел.: + 7 (846) 333 36 84

#### ■ Contact information

**Grigoryeva Julia Vladimirovna**

Address: Samara State Medical University, 227 Chapaevskaya st., Samara, Russia, 443001.

E-mail: histology@bk.ru

Phone: + 7 (846) 333 36 84