

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ЖИВОТНЫЕ

Все эксперименты проведены на белых беспородных половозрелых крысах самках весом 150-180 г (табл. 1), содержащихся в одинаковых условиях при свободном доступе к воде и пище. За 1 месяц до начала экспериментов все крысы были подвергнуты билатеральной овариэктомии под кетамин-дроперидоловой анестезией.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ МОДЕЛИ

В соответствии с целями и задачами настоящего исследования было сформировано 3 экспериментальных направления: 1) изучение изменений в матке при сочетанном влиянии эстрадиола и факторов, изменяющих уровень пролактина в организме; 2) исследование изменений в матке при совместном действии эстрадиола и стрессов и 3) выяснение роли пролактина в возможных морфологических изменениях в матке, возникающих при сочетанном воздействии эстрадиола и стрессовых факторов.

Перед началом изложения конкретных подходов к решению поставленных задач хотелось бы сформулировать основные принципы в построении экспериментальных моделей. Они заключаются в следующем. Животным делается инъекция эстрадиола, после которой в матке развиваются хорошо известные процессы - гипертрофия и гиперплазия во всех отделах органа. На фоне эстрадиола животные получают какое-либо дополнительное воздействие, и после этого в матке исследуется степень выраженности эффектов эстрогенов в сравнении с контролями, которыми являются матки крыс подвергнутых воздействию только эстрадиола или только с тем же дополнительным воздействием, но без эстрадиола (см. схему 1).

эстрадиол	стандартная морфологическая реакция матки (100%)
эстрадиол+ воздействие X	неизвестная морфологическая реакция матки (X %)
нет эстрадиола	стандартное морфологическое состояние матки (0%)
воздействие X	неизвестная морфологическая реакция матки (X%)

Схема 1. Основные принципы построения экспериментальных моделей.

ГИСТОГЕНЕТИЧЕСКИЙ ПРОЦЕСС В МАТКЕ ПРИ СОЧЕТАННОМ ДЕЙСТВИИ ЭСТРАДИОЛА И ФАКТОРОВ, ИЗМЕНЯЮЩИХ УРОВЕНЬ ПРОЛАКТИНА В ОРГАНИЗМЕ

С целью выяснения морфологической реакции матки на сочетанное введение эстрогенов и факторов, изменяющих уровень пролактина в организме производилось исследование матки крыс в условиях сочетанного введения эстрадиола и гиперпролактинемии, которая создавалась или введением экзогенного пролактина, или введением D2-антагониста дофамина - метоклопрамида, и гипопролактинемии, которая создавалась введением D2-агониста дофамина - бромокriptина.

Для изменения содержания пролактина использовались дофаминергические препараты, так как хорошо известно, что секреция пролактина гипофизом находится под дофаминергическим торможением и при блокаде дофаминовых рецепторов резко усиливается синтез и освобождение пролактина и возникает гиперпролактинемия, а при их стимуляции наблюдается обратная картина [Теппермен Д., Теппермен Х., 1989]. Поэтому, все животные этой серии были разделены на подгруппы в соответствии с последующими воздействиями:

Введение эстрадиола и пролактина (эстрадиол и экзогенная гиперпролактинемия). Овариэктомированные крысы этой группы получали одну инъекцию масляного раствора эстрадиола дипропионата и инъекции пролактина. Первое введение бромокriptина осуществлялось одновременно с эстрадиолом, а последующие - каждые 12 часов.

Введение эстрадиола и D2-антагониста дофамина - метоклопрамида (эстрадиол и эндогенная гиперпролактинемия). Животные данной группы получали одну инъекцию масляного раствора эстрадиола дипропионата и инъекции метоклопрамида, который вводился одновременно с эстрадиолом, а потом - каждые 6 часов.

Введение эстрадиола и D2-агониста дофамина - бромокриптина (эстрадиол и гипопролактинемия). Крысы этой группы получали одну инъекцию масляного раствора эстрадиола дипропионата и инъекции бромокриптина. Первое введение бромокриптина осуществлялось одновременно с эстрадиолом, а последующие - каждые 6 часов.

В качестве контролей использовались группы животных со следующими воздействиями:

Введение эстрадиола и дистиллированной воды. В данной группе крысам выполнялась одна инъекция оливкового масла (растворителя эстрадиола) и инъекции дистиллированной воды, которые делались каждые 6 часов, начиная с момента введения масла.

Введение оливкового масла и пролактина. Животные данной группы получали одну инъекцию оливкового масла и инъекции пролактина, который вводился одновременно с эстрадиолом, а потом - каждые 12 часов.

Введение оливкового масла и метоклопрамида. В этой группе животные получали одну инъекцию оливкового масла и инъекции метоклопрамида, первая инъекция которого выполнялась одновременно с эстрадиолом, а последующие - каждые 6 часов.

Введение оливкового масла и бромокриптина. Крысам данной группы вводилось однократно оливковое масло и вводился бромокриптин через каждые 6 часов от момента инъекции масла.

Введение оливкового масла и дистиллированной воды. Животные получали одну инъекцию масла и инъекции дистиллированной воды каждые 6 часов.

Овариэктомированные крысы без воздействий также использовались в качестве контроля.

ГИСТОГЕНЕТИЧЕСКИЙ ПРОЦЕСС В МАТКЕ ПРИ СОВМЕСТНОМ ВЛИЯНИИ ЭСТРОГЕНОВ И СТРЕССОВ

Зная, что разные стрессы способны вызывать отличные нейро-эндокринные реакции, мы решили предпринять изучение двух видов стресса. В качестве стрессовых моделей были выбраны острый и хронический стрессы, так как именно у этих видов стрессов имеются выраженные отличия в нейро-эндокринных реакциях, особенно в секреции пролактина [Исмаилов Ю.Б., 1991; Milin J et al, 1985; Demarest KT et al, 1985-1,2; Seltzer AM et al, 1986; Kant GJ et al, 1987; Maggi R et al, 1988; Knigge U et al, 1988; Lopez-Calderon A et al, 1989; 1991; Gala RR, 1990; Johansson G et al, 1990; Maric D et al, 1991; Ratner A et al, 1991; Maric D et al, 1991; Tejwani GA et al, 1991; Clough RW et al, 1992; Ceccatelli S et al, 1992; Galzigna L et al, 1992; Stephanou A et al, 1992; Kjaer A et al, 1993].

ОСТРЫЙ СТРЕСС

В качестве модели острого стресса был выбран иммобилизационный стресс, как одно из самых сильных острых стрессовых воздействий для крыс. Для этого животные помещались в тесные пластмассовые камеры на 6 часов. Подопытные животные подвергались действию острого стресса и им делалась одна инъекция эстрадиола дипропионата одновременно с началом иммобилизации. Крысы этой группы получали также инъекции дистиллированной воды с интервалом в 6 часов, начиная от момента введения эстрадиола.

В качестве контролей использовались группы крыс со следующими воздействиями:

Введение эстрадиола и дистиллированной воды выполнялось как описано выше.

Воздействие острого стресса и введение оливкового масла. Крысы данной группы подвергались действию острого стресса, введению оливкового масла и дистиллированной воды. Оливковое масло вводилось однократно, а дистиллированная вода через каждые 6 часов от времени инъекции масла.

Введение оливкового масла и дистиллированной воды производилось как описано выше.

ХРОНИЧЕСКИЙ СТРЕСС

В качестве модели хронического стресса использовалось комбинированное воздействие - плавание в воде и перенаселение. Для этого на 5 день после оvariэктомии крысы подвергали плаванию в воде с температурой 15-18 градусов по 5 минут в день в течение 6 дней. Далее в тот же день после последнего плавания эти же крысы помещались в переполненную клетку, где они содержались 21 день. В каждую клетку размерами 32 x40 x 12(высота) см помещалось по 35 крыс, которые имели свободный доступ к воде и пище, так как в клетках заранее были установлены дополнительные источники питья, а достаточное количество корма насыпалось на дно клетки. Следует отметить, что контрольные крысы содержались в таких же клетках по 6-7 особей.

Подопытные животные подвергались воздействию хронического стресса и введению эстрадиола. Для этого в последний день хронического стрессового воздействия крысы получали по 1 инъекции масляного раствора эстрадиола дипропионата и инъекции дистиллированной воды с интервалом в 6 часов. После выполнения инъекций крысы возвращались в тесненные условия, где они находились вплоть до момента забоя.

Для контролей использовались группы животных со следующими воздействиями:

Введение эстрадиола и дистиллированной воды производилось как описано выше.

Воздействие хронического стресса, введение оливкового масла и дистиллированной воды. В последний день хронического стрессового воздействия животным производилась одна инъекция оливкового масла и делались инъекции дистиллированной воды с интервалом в 6 часов. Сразу после выполнения инъекций крысы возвращались в тесненные условия, где они содержались до момента забоя.

Введение оливкового масла и дистиллированной воды выполнялось как описано выше.

РОЛЬ ПРОЛАКТИНА В МОРФОЛОГИЧЕСКИХ ИЗМЕНЕНИЯХ В МАТКЕ, ОБУСЛОВЛЕННЫХ СОЧЕТАННЫМ ВОЗДЕЙСТВИЕМ ЭСТРАДИОЛА И СТРЕССОВЫХ ФАКТОРОВ

Основываясь на литературных данных об изменениях в секреции пролактина при стрессе, возникло предположение о возможном участии этого гормона в стресс-индуцированных нарушениях в реакциях матки на эстрогены. Поэтому, для проверки этой гипотезы были выполнены следующие эксперименты. В них крысы подвергались действию острого иммобилизационного стресса или хронического стресса, а также введению эстрадиола и воздействиям, направленным на изменение уровня пролактина в организме. Для этого были сформированы следующие группы:

Воздействие острого / хронического стресса, введение эстрадиола и пролактина (экзогенная гиперпролактинемия).

Воздействие острого / хронического стресса, введение эстрадиола и метоклопрамида (эндогенная гиперпролактинемия).

Воздействие острого / хронического стресса, введение эстрадиола и бромокриптина (гипопрولاктинемия).

Для контроля использовались следующие группы:

Воздействие острого / хронического стресса, эстрадиола и дистиллированной воды.

Воздействие острого / хронического стресса, введение оливкового масла и пролактина.

Воздействие острого / хронического стресса, введение оливкового масла и метоклопрамида.

Воздействие острого / хронического стресса, введение оливкового масла и бромокриптина.

Кроме того, в качестве контролей для этой серии использовались данные, полученные от животных, которым вводили все препараты в бесстрессовых условиях.

Стрессовые воздействия, способы и временные характеристики введения всех препаратов были такими же, как описано в предыдущих разделах.

ДОЗЫ И СПОСОБЫ ВВЕДЕНИЯ ПРЕПАРАТОВ

1. Эстрадиола дипропионат масляный раствор (Минмедпром, Россия) вводился внутримышечно в дозе 10 микрограмм на одно животное. Данная доза эстрадиола является общепринятой и используется многими исследователями для изучения эффектов эстрогенов в матке.

2. Пролактин - овечий пролактин (препарат "Лактин", Минмедпром, Россия, Регистрационный № 76.1177.4; Государственная Фармакопея СССР, фармакопейная статья 42-1711-87; молекулярная масса 23000, 198 аминокислот, 3 дисульфидных мостика) вводился внутримышечно в виде раствора на дистиллированной воде. Разовая доза составляла 2.5 МЕ на 1 животное.

3. Метоклопрамид (VEB ARZNEIMITTELWERK, Германия) вводился внутримышечно в разовой дозе 0.5 мг на животное.

4. Бромокриптин (SANDOZ, Швейцария) вводился внутримышечно в дозе 0.25 мг на крысу.

5. Оливковое масло вводилось внутримышечно в объеме 0.1 мл.

6. Дистиллированная вода вводилась в объеме 0.1 мл внутримышечно.

Выбранная кратность введения препаратов основана на их фармакокинетике.

ВРЕМЯ ВЗЯТИЯ МАТЕРИАЛА ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ

Срединные отделы рогов матки извлекались у крыс под глубоким эфирным наркозом через 24, 36 и 48 часов от момента введения эстрадиола или оливкового масла, после чего животные забивались кровопусканием. Данные временные промежутки после введения эстрадиола были выбраны на основании сведений литературы, где указано, что именно в эти часы разворачивается максимальное действие эстрадиола в матке [Елифанова О.И., 1965; Лагучев С.С., 1970]. Были соблюдены все правила по работе с лабораторными животными.

МЕТОДЫ

Немедленно после извлечения срединные отделы рогов матки помещались в фиксатор Карнуа и в жидкость Буэна [Лилли Р., 1969]. Фиксация в растворе Карнуа продолжалась в течение 1.5 часа, а в жидкости Буэна - в течение 1 суток. После чего материал обезжизивался в спиртах и заливался в парафин обычным способом. В дальнейшем изготавливались поперечные срезы органа толщиной 5-7 мкм.

Часть срезов каждого кусочка после фиксации в жидкости Карнуа окрашивалась железным гематоксилином по Вейгерту [Лилли Р., 1969].

Другая часть срезов, фиксированных в фиксаторе Карнуа использовалась для проведения гистохимической реакции для выявления ДНК по Фельгену. Для этого сначала на депарафинированных и доведенных до воды срезах проводился гидролиз ДНК в 1 N соляной кислоте при 600С в течение 7 мин [Лилли Р., 1969; Луппа Х., 1978]. Далее срезы переносились в раствор реактива Шиффа [Лилли Р., 1969] на 20 мин при комнатной температуре в темноте. После этого срезы промывались по 2 мин в трех сменах сернистой воды, сделанной из 5 мл 1 N соляной кислоты, 5 мл 0.5% метабисульфита натрия и 90 мл дистиллированной воды [Лилли Р., 1969; Лейси А., 1992]. Окончательная обработка заключалась в промывке в дистиллированной воде, обезжизивании в

спиртах, просветлении в ксилоле и заключении в бальзам. Следует отметить, что срезы от каждой экспериментальной серии обрабатывались в одном и том же растворе реактива Шиффа одновременно в большой банке.

Срезы матки, полученные из кусочков, фиксированных в жидкости Буэна использовались для проведения иммуноцитохимического выявления ядерного антигена пролиферирующих клеток (PCNA). Для этого сначала проводилась регидратация срезов путем последовательного их помещения в ксилол, 100%, 96% спирты, дистиллированную воду. Далее следовала промывка в трех порциях 0.05 М трис-буфера с добавлением 0.15 М натрия хлорида (TBS) с pH- 7.2-7.6 по 5 минут в каждой порции.

Выявление PCNA проводилось непрямым иммуноцитохимическим методом. Процедура иммуномечения заключалась в инкубации срезов в 1% растворе нормальной козьей сыворотки на TBS в течение 1 часа, далее срезы инкубировались в растворе первых анти-PCNA антител в течение 2 часов при комнатной температуре, после которой следовала промывка в трех порциях TBS по 5 минут в каждой, и инкубация в растворе вторых антител, конъюгированных со щелочной фосфатазой, в течение 1 часа при комнатной температуре. В качестве первых использовались мышинные анти-PCNA антитела (DAKO, M-879) в концентрации 1:50, которые разводились на TBS с добавлением 0.1% тритона X-100 и 1% нормальной козьей сыворотки. Вторыми антителами являлись козы анти-мышинные-иммуноглобулин G антитела, меченные щелочной фосфатазой (Jackson ImmunoResearch Inc.) в разведении 1:50 на TBS. После инкубации во вторых антителах следовала промывка срезов в трех порциях TBS по 5 минут в каждой, и выявление активности щелочной фосфатазы методом азоиндоксильного азосочетания с применением фосфата нафтола AS-BI и гексаметиленаминопарарозанилина [Лейси А., 1992] в течение 12-15 минут при комнатной температуре. Далее срезы промывались в дистиллированной воде и заключались в глицерин-желатину. При данной процедуре продукт реакции окрашивается в красный цвет.

В качестве контроля специфичности иммуноцитохимического окрашивания применялась такая же процедура обработки срезов, но где вместо первых антител использовалась нормальная козья сыворотка в конечной концентрации - 1%. При использовании такой схемы окрашивания ни разу не было получено специфического окрашивания ядер.

ОЦЕНКА МОРФОЛОГИЧЕСКИХ ИЗМЕНЕНИЙ В МАТКЕ

Эстрадиол-индуцируемый гистогенез в матке проявляется главным образом гипертрофией и гиперплазией структурных элементов органа. Поэтому для оценки хода и направленности этого процесса в матке применялись исследование пролиферативной активности маточных структур (по величинам митотического индекса и содержанию ДНК в ядрах), измерение объемов клеток, их ядер и ядрышек. Кроме того, в нескольких сериях экспериментов для анализа пролиферативной активности проводилось выявление ядерного антигена пролиферирующих клеток (PCNA), который выявляется в клетках в G1- и S-фазы клеточного цикла [Rumpel E et al, 1995].

Митотические индексы (количество клеток, находящихся в любой фазе митоза в одной тысячи клеток) определялись отдельно в покровном эпителии, в эпителии желез и в клетках стромы эндометрия с помощью светового микроскопа при увеличении объектива 100x и окуляра 12.5x путем подсчета делящихся клеток среди общего количества просмотренных клеток. В каждой структуре просматривалось не менее 3000 клеток. Митотический индекс вычислялся по формуле: $MI = \text{количество митозов} * 1000 / \text{общее количество просмотренных клеток}$.

Объемы клеток, ядер и ядрышек определяли в покровном эпителии, эпителии желез и в клетках стромы эндометрия, а в миоцитах миометрия определялись соответствующие площади. Для этого производилось измерение размеров этих структур с помощью винтового окулярного микрометра МОВ-1-15x, установленного на световой микроскоп, где использовался объектив 100x.

У клеток покровного и железистого эпителия измеряли высоту (h) и ширину (a), а у клеток стромы и ядер всех клеток - большой (D) и малый (d) диаметры. У ядрышек всех типов клеток измерялся диаметр (D). У гладкомышечных клеток миометрия измерялись диаметры (D) клетки, ядра и ядрышка в поперечно-срезах клеток наружного слоя миометрия. Объемы эпителиальных клеток рассчитывались по формуле объема цилиндра: $V = (\pi * h * a^2) / 4$, объемы клеток стромы и ядер всех клеток рассчитывались по формуле объема эллипсоида: $V = (\pi * D * d^2) / 6$, объемы ядрышек - по формуле объема шара: $V = (\pi * D^3) / 6$. Площади гладких миоцитов, их ядер и ядрышек рассчитывались по формуле площади круга: $S = (\pi * D^2) / 4$. Все величины объемов выражались в кубических микрометрах, а площадей - в квадратных микрометрах. Как минимум по 100 измерений производилось в каждой структуре.

Определение содержания ДНК в ядрах клеток железистого и покровного эпителия, клеток стромы эндометрия осуществлялось в препаратах, обработанных по методу Фельгена путем определения оптической плотности (D) ядер. Фотометрия выполнялась с использованием светового микроскопа с объективом 90 x и микроспектрофотометра ФМЭЛ-1А (ЛОМО, Россия), в котором был установлен ФЭУ-79А, обладающий высокой чувствительностью в красных областях спектра. Показатели с ФМЭЛ-1А выводились на цифровой вольтметр В7-16А.

В процессе фотометрии измерялась интенсивность одинакового по площади и интенсивности светового потока, прошедшего через ядро (F) и прошедшего через любой участок среза без ядра(F0). Оптическая плотность (поглощение света) рассчитывалась по формуле: $D = \lg(F0/F)$.

В дальнейшем показатель оптической плотности умножался на объем ядра и получалась величина, характеризующая содержание ДНК в одном ядре, которая выражалась в условных единицах [Луппа Х., 1978]. В каждой структуре было исследовано как минимум по 100 ядер.

Ядерно-цитоплазматическое и ядрышково-ядерное отношение рассчитывались на основании вычислений объемов структур. Ядерно-цитоплазматическое отношение рассчитывалось по формуле: Я-Ц отношение = объем ядра / (объем клетки - объем ядра).

Ядрышково-ядерное отношение рассчитывалось по формуле: я-Я отношение = объем ядрышка / (объем ядра - объем ядрышка).

В препаратах, обработанных для выявления PCNA, проводилось выявление процента положительно окрашенных клеток в покровном эпителии эндометрия, эпителии желез эндометрия и в клетках стромы эндометрия путем подсчета PCNA-позитивных клеток к общему числу просмотренных клеток. Исследование проводилось с применением светового микроскопа при увеличении объектива 100x. В каждой структуре у каждой крысы просматривалось не менее 3000 клеток. Процент PCNA-позитивных клеток вычислялся по формуле: % PCNA-позитивных клеток = количество позитивных клеток * 100 / количество просмотренных клеток.

СТАТИСТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ

По каждой группе данных рассчитывались средние арифметические значения и их стандартные ошибки [Лакин Г.Ф., 1990].

Кроме того, перед проведением статистических сравнений в каждой группе данных проводилась проверка гипотезы о нормальном распределении путем вычисления показателей асимметрии и эксцесса. Распределение считали нормальным, если показатели асимметрии и эксцесса не превышали своих удвоенных средне-квадратичных отклонений [Лакин Г.Ф., 1990]. Данные расчеты показали, что большинство полученных результатов отвечают критериям нормального распределения. Поэтому достоверность отличий определялась с помощью параметрического t-критерия Стьюдента [Лакин Г.Ф., 1990].

Достоверность влияния примененных воздействий на изучаемые процессы в матке оценивалась с применением двухфакторного дисперсионного анализа [Лакин Г.Ф., 1990]. В качестве одного из факторов всегда принималось время после введения эстрадиола или оливкового масла, а в качестве другого - какое-либо экспериментальное воздействие.