

УДК 618.11-006.2:618.11-008.61-089-055.26

І. З. Гладчук, д-р мед. наук, проф.,
О. Я. Назаренко, д-р мед. наук

ОСОБЛИВОСТІ ПРОГЕСТЕРОН-СИНТЕТИЧНИХ І АПОПТОТИЧНИХ ПРОЦЕСІВ У СТРУКТУРНИХ ЕЛЕМЕНТАХ ЖОВТОГО ТІЛА ПРИ АПОПЛЕКСІЇ ЯЄЧНИКА

*Одеський національний медичний університет, Одеса, Україна,
Військово-медичний клінічний центр Південного регіону, Одеса, Україна*

УДК 618.11-006.2:618.11-008.61-089-055.26

І. З. Гладчук, О. Я. Назаренко
**ОСОБЛИВОСТІ ПРОГЕСТЕРОН-СИНТЕТИЧНИХ І АПОПТОТИЧНИХ ПРОЦЕСІВ
У СТРУКТУРНИХ ЕЛЕМЕНТАХ ЖОВТОГО ТІЛА ПРИ АПОПЛЕКСІЇ ЯЄЧНИКА**

*Одеський національний медичний університет, Одеса, Україна,
Військово-медичний клінічний центр Південного регіону, Одеса, Україна*

У роботі подані результати імуногістохімічного вивчення прогестерон-синтетичних і апоптотичних процесів, що відбуваються в структурних елементах основного джерела внутрішньочеревної кровотечі оваріальної етіології — жовтого тіла й кісти жовтого тіла яєчника. У вилучених у процесі оперативного втручання макропрепаратах на імуногістохімічному рівні в клітинах стромы, епітелію й капілярів вивчалися особливості експресії проапоптотичного трансмембранного білка — CD95. Прогестерон-синтетичну активність оцінювали шляхом підрахунку відносної кількості клітин-продуцентів прогестерону в епітеліальному компоненті жовтого тіла. Встановлений статистично вірогідний негативний взаємозв'язок між кількістю клітин-продуцентів прогестерону й рівнем експресії CD95. Вірогідно високий рівень експресії фактора апоптозу CD95 і відносно низька кількість прогестерон-синтезуючих гранульозо-тека-лютеоцитів у кістозно-змінених жовтих тілах свідчить про те, що апоплексія яєчника в пацієнок із мінімальним і помірним об'ємом гемоперитонеума розвивається в основному на стадії регресу жовтого тіла й відбувається на тлі хронічної недостатності лютеальної фази менструального циклу. І навпаки, у хворих, де апоплексія яєчника супроводжується більшим об'ємом внутрішньочеревної крововтрати, високий вміст клітин-продуцентів прогестерону й низька апоптотична активність свідчать про те, що в цієї категорії хворих захворювання розвивається на стадії розквіту функціональної активності жовтого тіла і для них не характерна наявність синдрому недостатності лютеїнової фази менструального циклу.

Ключові слова: апоплексія яєчника, апоптоз, CD95, прогестерон, жовте тіло яєчника, імуногістохімія.

UDC 618.11-006.2:618.11-008.61-089-055.26

I. Z. Gladchuk, O. Ya. Nazarenko
**THE PECULIARITIES OF PROGESTERONE-SYNTHETIC AND APOPTOTIC PROCESSES IN
CORPUS LUTEUM STRUCTURAL ELEMENTS IN CASE OF OVARIAN APOPLEXY**

*The Odessa National Medical University, Odessa, Ukraine,
Military-Medical Clinical Centre of South Region, Odessa, Ukraine*

The results of immunohistochemical studies of both progesterone-synthetic and apoptotic processes inside the structural elements of the main source of intra-abdominal bleeding of ovarian etiology, the corpus luteum and its cysts are presented. The peculiarities of proapoptotic transmembrane protein — CD95 expression within stromal and epithelial cells and capillary cells were studied in the extirpated throughout the operative interventions macrosamples. Progesterone-synthetic activity was determined by counting the relative number of progesterone progenitor cells in the corpus luteum epithelial component. A statistically significant negative relationship between the number of progesterone progenitor cells and CD95 expression level was established. A significantly high level of CD95 apoptosis factor expression and a rela-

tively low amount of progesterone-synthesizing granulosa-theca-luteocytes in the cystic-altered corpus luteum indicate that ovarian apoplexy in patients with minimal and moderate hemoperitoneum develops mainly at the stage of corpus luteum regression and occurs on background of chronic failure of the menstrual cycle luteal phase.

Otherwise, in patients where ovarian apoplexy accompanies by a high volume of intraabdominal hemorrhage the big level of progesterone-producing cells and low apoptotic activity indicate that disease develops in these patients at the pick of corpus luteum functional activity isn't characterized by the luteal phase insufficiency syndrome.

Key words: ovarian apoplexy, apoptosis, CD95, progesteron, ovarian corpus luteum, immunohistochemistry.

Апоплексія яєчника (АЯ), яка тривалий час у вітчизняній літературі іменувалася різними термінами (гематома яєчника, кровотеча з яєчника, розрив кісти жовтого тіла (ЖТ), інфаркт яєчника, розрив яєчника), визначається як раптовий крововилив у яєчник, що супроводжується порушенням цілісності його тканини й кровотечею в черевну порожнину [1]. У переважній більшості випадків (від 55 до 90 %) джерелом кровотечі стає ЖТ або його кіста, що, на думку О. К. Хмельницького (1994), є анатомічним варіантом його нормальної будови [2; 3].

Жовте тіло — мінуща ендокринна залоза яєчника, що періодично формується й піддається інволюції, фізіологічна доцільність якої полягає в секреції прогестерону для пролонгування вагітності [6]. З гістологічної точки зору, у формуванні й розвитку ЖТ розрізняють чотири стадії — проліферації й ангиогенезу, залозистого метаморфозу, розквіту і зворотного розвитку [4; 5].

Регрес ЖТ в основному відбувається за рахунок генетично запрограмованої клітинної загибелі — апоптозу, клініко-лабораторним проявом якого є пригнічення прогестерон-синтетичної активності гранулозо-тека-лютеїнових клітин [7; 8]. Fas/APO-1, який також називають CD95 (CD — cluster differentiation), — один з основних генів і клітинних мембранних білків-активаторів апоптотичного процесу. CD95/Fas/APO-1 здатний запускати в клітині апоптоз після взаємодії із його лігандом (FasL) або з агоністичними моноклональними антитілами (МКА) до Fas [9].

У первинних і примордіальних фолікулах тільки овоцити імунопозитивні до CD95/Fas. У вторинних й антральних фолікулах овоцити слабо імунопозитивні. У преовуляторних фолікулах ані гранулозні клітини, ані тека-клітини, ані овоцити не дають позитивну реакцію на CD95/Fas. У ЖТ відзначається підвищення імунопозитивної відповіді під час пізньої лютеїнової фази. Біле тіло не дає забарвлення на CD95/Fas. Отже, саме CD95/Fas-антиген є медіатором апоптозу при регресії ЖТ і фолікулярної атрезії [10; 11].

Мета роботи: оцінити прогестерон-продукуючу активність і ступінь вираженості клітинного

апоптозу за даними визначення відносної кількості клітин-продуцентів прогестерону й експресії CD95 у структурних елементах жовтого тіла й кісти жовтого тіла — джерел патологічної кровотечі у хворих з АЯ при різних клінічних варіантах перебігу захворювання.

Матеріали та методи дослідження

Обстежено 30 (100,0 %) пацієток з АЯ, що виникла внаслідок ушкодження судин ЖТ і кісти ЖТ. Усім пацієткам, у зв'язку з внутрішньочеревною кровотечею яєчникового походження, була виконана лапароскопічна операція в обсязі резекції яєчника з видаленням джерела кровотечі. Досліджувані жінки були поділені на три однакові групи залежно від об'єму інтраабдомінальної кровотечі: до I групи включені жінки з гемоперитонеумом до 200 мл, до II — пацієтки із внутрішньочеревною кровотечею об'ємом 200–500 мл і в III групу — хворі, у яких гемоперитонеум перевищував 500 мл.

Імуногістохімічне дослідження оперативним шляхом вилученого джерела оваріальної кровотечі проводили на парафінових зрізах завтовшки 5–6 мкм непрямим і прямим методами Кунса за методикою Brosman (1979) [12]. Клітини-продуценти прогестерону визначали МКА, міченими флуоресцеїном ізотіоціанатом (ФІТЦ) до прогестерону (Novocastra Laboratories Ltd.), апоптозно змінені клітини — КА CD95 (Novocastra Laboratories Ltd.). Як люмінесцентну мітку використовували F(ab)-2 — фрагменти кролячих антитіл проти імуноглобулінів миші, мічених ФІТЦ. Комп'ютерно-морфометричне дослідження проводили в люмінесцентному мікроскопі "Axioskop 40". Підраховували кількість клітин, що експресують рецептори до CD95, і, перераховуючи на 100 клітин, визначали апоптозний індекс. У полі зору мікроскопа × 400 підраховували кількість клітин-продуцентів прогестерону. Оптичну щільність імунофлуоресценції визначали за методом Г. І. Губіної-Вакулик і співавт. (2009) за допомогою мікроскопа "Axioskop 40" і програмного забезпечення Biostat.exe [13]. Цифрові дані обробляли методами варіаційної статистики. Проводили кореляційно-регресійний аналіз.

Результати дослідження та їх обговорення

У кістозно-зміненому ЖТ яєчників у пацієнток I групи при обробці МКА CD95 візуально відзначалися численні імунофлуоресціюючі апоптозно змінені епітеліальні, стромальні й судинні клітини (рис. 1). Апоптозний індекс становив $(9,20 \pm 0,46)$ ум. од. (табл. 1).

У препаратах I групи, оброблених МКА до прогестерону, виявлялося специфічне світіння нечисленних гранульозо-тека-лютеїнових клітин (рис. 2). Відносна кількість цих клітин становила $(15,1 \pm 0,4)$ ум. од. (див. табл. 1).

Візуальна кількість імунофлуоресціюючих клітин у препаратах II групи, оброблених МКА до CD95, практично відповідала такій у I групі (рис. 3). Проте апоптозний індекс, поданий у табл. 1, — $(8,20 \pm 0,38)$ ум. од. — свідчить про тенденцію до зниження ступеня вираженості апоптозу в клітинних елементах джерел інтраабдомінальних кровотеч яєчникового походження для спостережень II групи порівняно з такими в I групі.

Цікаво, що в препаратах II групи, оброблених МКА до прогестерону, не виявлялися істотні особливості порівняно із препаратами I групи, тому що специфічне світіння визначалося в нечисленній популяції лютеоцитів (рис. 4). Однак морфометричні дані вказують на тенденцію до підвищення відносної кількості цих клітин — $(16,54 \pm 0,47)$ ум. од. (див. табл. 1).

Як і в попередніх групах спостережень, у мікропрепаратах III групи, оброблених МКА до CD95, виявлене специфічне світіння епітеліальних, стромальних і судинних клітин ЖТ яєчника — джерела АЯ (рис. 5). Однак при вивченні апоптозу клітинних елементів ЖТ у спостереженнях цієї групи звертали на себе увагу нечисленні клітини, що експресують рецептори до CD95. Апоптозний індекс у цій групі виявився мінімальним — $(6,20 \pm 0,35)$ ум. од. порівняно з таким в I та II групах (див. табл. 1).

У препаратах III групи, оброблених МКА до прогестерону, візуально відзначалося збільшення відносної кількості клітин, мічених МКА до прогестерону, порівняно з даними I та II груп (рис. 6). Це підтверджується результатами морфометричного дослідження — $(22,50 \pm 0,56)$ ум. од. (див. табл. 1).

У результаті проведеного імуногістохімічного дослідження ЖТ і кісти ЖТ яєчника на визначення відносної кількості клітин-продуцентів прогестерону й ступеня експресії проапоптотичного

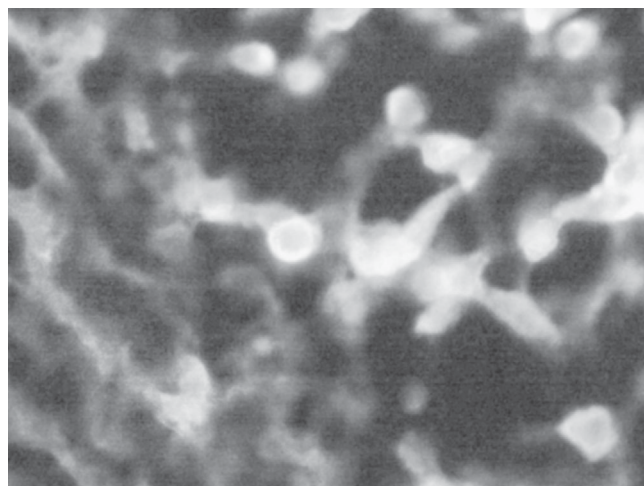


Рис. 1. Численні клітини, що експресують рецептори CD95 у жовтому тілі яєчників. Спостереження I групи. Непрямий метод Кунса із МКА CD95. $\times 400$

Таблиця 1
Оптична щільність імунофлуоресценції CD95 і відносна кількість клітин-продуцентів прогестерону в структурних елементах жовтих тіл при апоплексії яєчника з різним об'ємом гемоперитонеума, $M \pm m$

Група	Апоптозний індекс	Відносна кількість клітин-продуцентів прогестерону
I	$9,20 \pm 0,46^*$	$15,1 \pm 0,4^*$
II	$8,20 \pm 0,38^*$	$16,54 \pm 0,47^*$
III	$6,20 \pm 0,35$	$22,50 \pm 0,56$

Примітка. * — $p < 0,05$ порівняно з показником III групи.

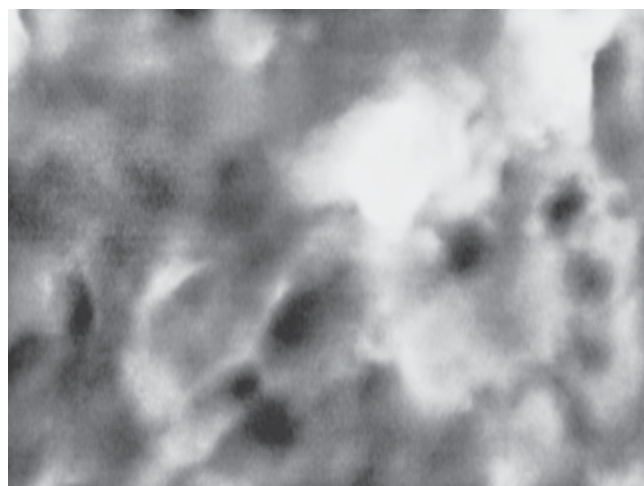


Рис. 2. Клітини-продуценти прогестерону в жовтому тілі яєчника. Спостереження I групи. Прямий метод Кунса із МКА до прогестерону. $\times 400$

фактора — CD95 у хворих з АЯ, залежно від обсягу гемоперитонеума, були виявлені певні особливості. Так, для спостережень I та II груп були характерні однотипні, порівняно з III групою, зміни з боку структурних компонентів ЖТ яєчників. Досить високий показник апоптозного інде-

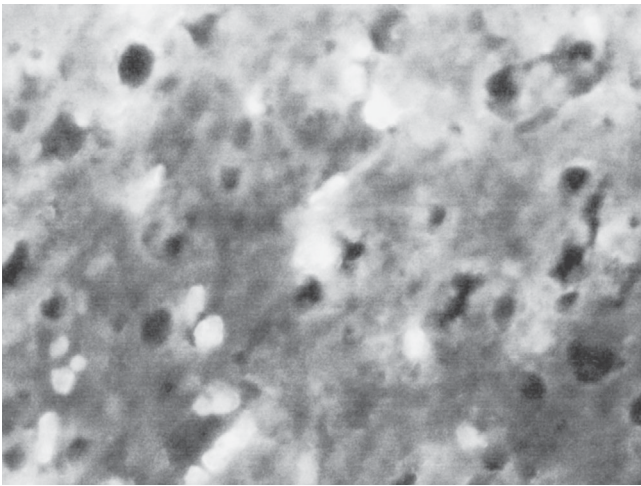


Рис. 3. Клітини, що експресують рецептори CD95 у структурах жовтого тіла. Спостереження II групи. Непрямий метод Кунса із МКА CD95. $\times 400$



Рис. 4. Нерівномірне світіння клітин-продуцентів прогестерону жовтого тіла яєчника. Спостереження II групи. Прямий метод Кунса із МКА до прогестерону. $\times 400$

ксу (порівняно з III групою) свідчить про посилення інволютивних процесів у джерелах АЯ в пацієнок I та II груп. На тлі інволютивних змін знижується прогестерон-продукуюча активність гранульозно-тека-лютеїнових клітин.

Невисокий апоптозний індекс стромальних, судинних і епітеліальних клітин у мікропрепаратах III групи, порівняно з аналогічними даними в I та II групах, вказує на високу морфофункціональну активність жовтого тіла у хворих з АЯ з максимальним об'ємом гемоперитонеума. Щодо епітеліальних клітин це підтверджується високою прогестерон-продукуючою активністю.

Висновки

Таким чином, виявлений у хворих з АЯ вірогідний негативний кореляційний взаємозв'язок

між ступенем вираженості апоптозу й рівнем прогестерон-продукуючої активності в структурних елементах ЖТ яєчника свідчить, що АЯ, супроводжувана мінімальним і помірним гемоперитонеумом, розвивається на пізніх стадіях фізіологічної еволюції менструального ЖТ на тлі посилення апоптотичних процесів. Жовті тіла пацієнок цих груп характеризуються зниженою прогестерон-продукуючою активністю, що супроводжується перманентним прогестерон-дефіцитним станом, характерним для синдрому недостатності лютеїнової фази менструального циклу (НЛФ-синдрому). Тяжкий клінічний перебіг АЯ, супроводжуваний максимальним об'ємом гемоперитонеума, розвивається на ранніх стадіях формування ЖТ. Цим пацієнткам у зв'язку з високим рівнем прогестерон-продукуючих клі-

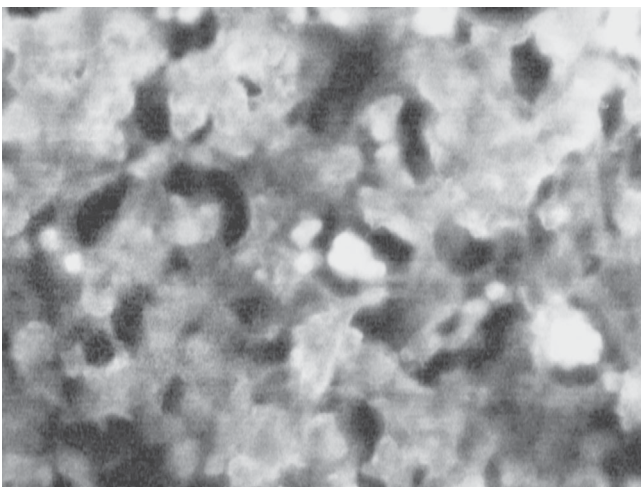


Рис. 5. Нечисленні клітини, що експресують рецептори CD95 у жовтому тілі яєчника. Спостереження III групи. Непрямий метод Кунса із МКА CD95. $\times 400$

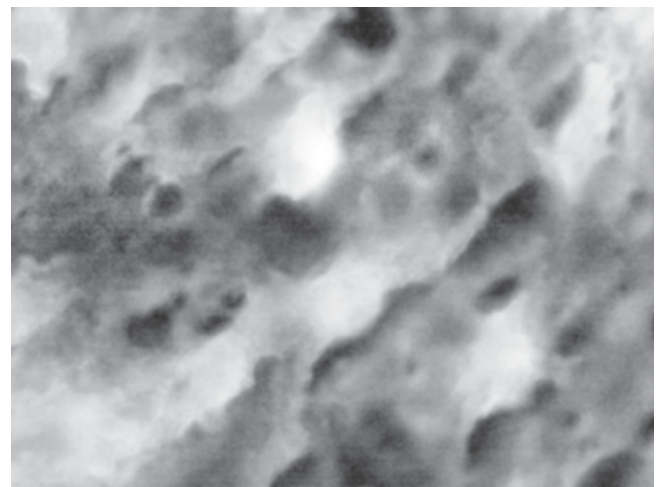


Рис. 6. Яскраве світіння численних клітин-продуцентів прогестерону в жовтому тілі яєчника. Спостереження III групи. Прямий метод Кунса із МКА до прогестерону. $\times 400$

тин не властива наявність прогестерон-дефіцитного стану, характерного для НЛФ-синдрому. Отримані результати відкривають перспективи подальших досліджень, які передбачають розробку адекватної патогенетичної терапії й профілактики АЯ з урахуванням значущості даних прогестерон-синтетичних і апоптотичних процесів у структурних компонентах ЖТ, характерних при тій або іншій клініко-морфологічній формі захворювання.

Ключові слова: апоплексія яєчника, апоптоз, CD95, прогестерон, жовте тіло яєчника, імуногістохімія.

ЛІТЕРАТУРА

1. *Запорожан В. М.* Акушерство і гінекологія : підручник для післядиплом. освіти лікарів, студентів, магістрів, аспірантів вищих мед. навч. закладів III–IV рівнів акредитації, клініч. ординаторів : у 2-х т. / В. М. Запорожан, М. П. Цегельський, Н. М. Рожковська. – Одеса : Одес. держ. мед. ун-т, 2005. – Т. 2 : Гінекологія. – 418 с.
2. *Гладчук І. З.* Апоплексія яєчника в сучасній гінекології / І. З. Гладчук, В. Л. Кожаків, О. В. Якименко // Репродуктивне здоров'я жінки. – 2005. – № 4 (24). – С. 56–58.
3. *Хмельницький О. К.* Патоморфологічна діагностика гінекологічних захворювань. – СПб. : СОТИС, 1994. – 480 с.
4. *Марченко Л. А.* Желтое тело. Механизмы формирования и регресса / Л. А. Марченко // Гинекология. – 2000. – Т. 2, № 5. – С. 14–17.
5. *Морфогенез и гистофизиология желтого тела* / О. В. Волкова, Т. Г. Боровая, М. И. Пекарский, Ю. В. Полинцев

// Архив анатомии, гистологии и эмбриологии. – 1985. – Т. LXXXVIII, № 3. – С. 5–19.

6. *Запорожан В. М.* Гінекологічна патологія. Атлас : навч. посібник / В. М. Запорожан, М. Р. Цегельський. – Одеса : Одес. держ. мед. ун-т, 2002. – 308 с.

7. *Arends M. J.* Apoptosis, the role of the endonuclease / M. J. Arends, R. G. Morris, A. N. Willie // *Am. J. Pathol.* – 1990. – Vol. 136. – P. 593–598.

8. *Arends M. J.* Apoptosis, mechanism and roles in pathology / M. J. Arends, A. H. Wyllie // *Int. Rev. Exp. Pathol.* – 1991. – Vol. 32. – P. 223–254.

9. *Sharabidze N.* Cell adhesion and apoptosis in ovarian stromal hyperplasia and hyperthecosis / N. Sharabidze, G. Burkadze, M. Sabakhtarashvili // *Georgian Med. News.* – 2006. – Feb. – Vol. 131. – P. 33–37.

10. *Дубровина С. О.* Апоптоз в яичниках / С. О. Дубровина // Российский вестник акушера-гинеколога. – 2006. – № 3. – С. 33–37.

11. Immunological evidence for the expression of the Fas antigen in the infant and adult human ovary during follicular regression and atresia / H. Kondo, T. Maruo, X. Peng, M. Mochizuki // *J. Clin. Endocrinol. Metabol.* – 1996. – Vol. 81, N 7. – P. 2702–2710.

12. *Brosman M.* Immunofluorescencne vysetrovanie formalparafinovego materialu / M. Brosman // *Cs. patol.* – 1979. – Vol. 15, N 4. – P. 215–220.

13. *Губіна-Вакулик Г. І., Сорокіна І. В., Марковський В. Д., Купріянова Л. С., Сидоренко Р. В.* Спосіб кількісного визначення вмісту антигену в біологічних тканинах. – Патент на корисну модель № 46489 G01N 33/00, 25.12.2009. – Бюл. № 4.

Надійшла до редакції 09.10.2017

*Рецензент д-р мед. наук, проф. Р. С. Вастьянов,
дата рецензії 12.10.2017*

УДК 616-092.9:616-0.35

І. В. Савицький, д-р мед. наук, проф.,
С. Г. Знамеровський,
Р. Г. Ленік,
О. В. Білаш,
І. В. М'ястківська

ДИНАМІКА АКТИВНОСТІ ФЕРМЕНТІВ АСПАРТАТАМІНОТРАНСФЕРАЗИ І АЛАНІНАМІНОТРАНСФЕРАЗИ В УМОВАХ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ЖОВЧНОГО ПЕРИТОНІТУ

Одеський національний медичний університет, Одеса, Україна

УДК 616-092.9:616-0.35

І. В. Савицький, **С. Г. Знамеровський**, **Р. Г. Ленік**, **О. В. Білаш**, **І. В. М'ястківська**
ДИНАМІКА АКТИВНОСТІ ФЕРМЕНТІВ АСПАРТАТАМІНОТРАНСФЕРАЗИ
І АЛАНІНАМІНОТРАНСФЕРАЗИ В УМОВАХ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО
ЖОВЧНОГО ПЕРИТОНІТУ

Одеський національний медичний університет, Одеса, Україна

Жовчний перитоніт, який є тяжким захворюванням черевної порожнини за ступенем тяжкості, прогнозу і відсотка летальності, залежить від ендогенної інтоксикації. У комплексному лікуванні перитонітів перспективним напрямом вважається пошук нових способів санації черевної порожнини. Дослідження проводили на 180 щурах лінії Вістар. Тварини були розподілені на чотири групи. Запропонований комплексний метод санації черевної порожнини виявив свою ефективність при аналізі ферментів аспартатамінотрансферази (АСТ) і аланінамінотрансферази (АЛТ): у 4-й групі (з про-