

© О. Я. Назаренко

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

О. Я. Назаренко

ОСОБЕННОСТИ ГЕМОТКАНЕВОГО БАРЬЕРА ЖЕЛТОГО ТЕЛА ПРИ АПОПЛЕКСИИ ЯИЧНИКА ПО ДАННЫМ ЭКСПРЕССИИ CD34 ЭНДОТЕЛИОЦИТАМИ И КОЛЛАГЕНА IV ТИПА БАЗАЛЬНЫМИ МЕМБРАНАМИ КАПИЛЛЯРОВ

Одесский национальный медицинский университет (г. Одесса)

Военно-медицинский клинический центр Южного региона (г. Одесса)

Данная работа является фрагментом комплексной НИР «Оптимізація діагностичних та лікувальних заходів при захворюваннях репродуктивної системи жінки з урахуванням патогенетичних молекулярно-генетичних механізмів», № гос. регистрации 01074011173.

Вступление. Желтое тело – преходящая, перидически формирующаяся и подвергающаяся инволюции структура яичника, физиологическая целесообразность которой заключается в секреции стероидов и пептидов, беременности [1]. В течение первых трех дней после овуляции, наряду с быстрым размножением клеток гранулы, со стороны *thecae internae* в полость постовуляторного фолликула происходит интенсивное врастание образованных *de novo* капилляров. В результате этого между 8-м и 9-м днями после овуляции формируется один из самых высоких уровней кровотока в организме человека [2; 3]. Биологический смысл неоангиогенеза желтого тела – это адекватная выработка стероидов из холестерина (ХС) для адекватной прогестероновой поддержки развивающейся беременности. Иногда врастание микрососудов в первичную полость может привести к кровотечению, что становится причиной острого хирургического вмешательства по поводу апоплексии яичника (АЯ) [4; 5].

CD34 – мембранный белок, молекула межклеточной адгезии, играющая роль в процессе неоангиогенеза, опосредует связывание эндотелиоцитов с внеклеточным матриксом базальных мембран и форменными элементами крови. Служит белковым скаффолдом для присоединения специфичных гликанов, который позволяет лейкоцитам и тромбоцитам прикрепляться к лектинам, экспрессированным клетками эндотелия. Кроме того, высокогликозилированный CD34 предоставляет углеводные лиганды для селектинов. Сегодня CD34 используется во многих научных исследованиях как ключевой маркер ангиогенной и функциональной активности эндотелия [6–8].

Другой изучаемый маркер состояния микрососудистого русла – коллаген IV типа – основной структурный компонент базальной мембраны капилляров. Благодаря коллагену IV типа базальные мембраны обладают механической стабильностью и нерастворимостью [9; 10]. В последние годы активно изучается роль нарушений синтеза этого типа

коллагена в этиопатогенезе как генитальной, так и экстрагенитальной патологии [11; 12]

Цель работы – определить морфологические особенности гемотканевого барьера желтого тела у больных с АЯ при различных клинических вариантах течения заболевания по данным экспрессии CD34 эндотелиоцитами и содержанию коллагена IV типа в базальных мембранах капилляров.

Объект и методы исследования. Было обследовано 30 (100,0%) пациенток с АЯ, возникшей вследствие повреждения сосудов желтого тела и кисты желтого тела. Всем пациенткам, в связи с внутрибрюшным кровотечением яичникового происхождения, была выполнена лапароскопическая операция в объеме резекции яичника с удалением источника кровотечения. Исследуемые женщины были разделены на три равные группы в зависимости от объема интраабдоминального кровотечения. В I группу включены женщины с гемоперитонеумом до 200мл, во II – пациентки с внутрибрюшным кровотечением объемом 200–500 мл, в III группу – больные, у которых гемоперитонеум превышал 500мл.

Иммуногистохимическое исследование удаленного оперативным путем источника овариального кровотечения проводили на парафиновых срезах толщиной 5–6 мкм непрямым и прямым методами Кунса по методике Brosman (1979) [13]. Коллаген IV типа определяли с помощью моноклональных антител (МКА), меченных ФИТЦ к соответствующему типу коллагена, CD34 – МКА, меченными ФИТЦ к CD34 – высокогликозилированному трансмембранному белку типа 1 (сиаломуцин), участвующему в межклеточной адгезии (cell-cell adhesion) и являющемуся маркером эндотелия и предшественников лимфопоэза. В качестве люминесцентной метки использовали F(ab)-2 – фрагменты кроличьих антител против иммуноглобулинов мыши, меченных ФИТЦ. Компьютерно-морфометрическое исследование проводили с помощью люминесцентного микроскопа «Axioskop 40». Оптическую плотность иммунофлюоресценции определяли по методу Г. И. Губиной-Вакулик и соавторов (2009) с помощью микроскопа «Axioskop 40» и программного обеспечения Biostat.exe [14]. Цифровые данные обработаны методами вариационной статистики. Проведен корреляционно-регрессионный анализ.



Рис. 1. Слабое, местами умеренное свечение коллагена IV типа в базальных мембранах сосудов желтого тела – I клиническая группа. Прямой метод Кунса с МКА к коллагену IV типа, x400.

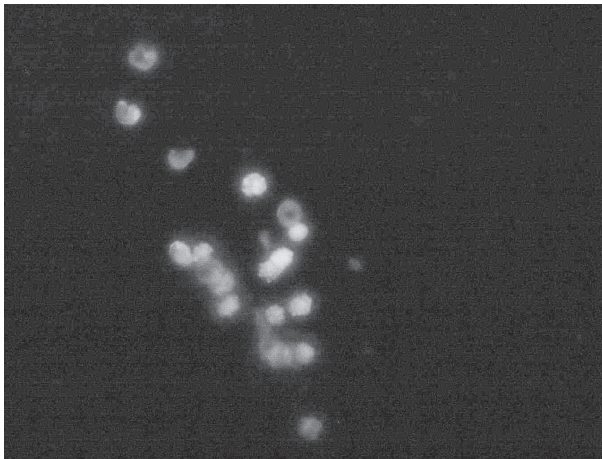


Рис. 2. Ярко светящиеся эндотелиоциты, экспрессирующие рецепторы к CD34 в сосудах желтого тела яичника – наблюдения I группы. Прямой метод Кунса с МКА к CD34, x400.

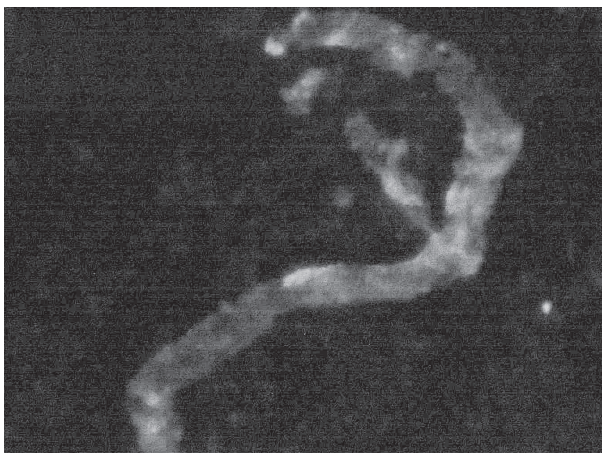


Рис. 3. Неравномерное свечение коллагена IV типа в базальной мембране сосуда желтого тела яичника – наблюдение II группы. Прямой метод Кунса с МКА к коллагену IV типа, x400.

Результаты исследований и их обсуждение.

При иммуногистохимическом исследовании микропрепаратов пациенток I группы, обработанных МКА к коллагену IV типа, обнаружено преимущественно линейное, местами прерывистое специфическое свечение в стенках сосудов желтого тела. Интенсивность иммунофлуоресценции была неоднородной – отмечались зоны как яркого, так и слабого свечения. Преобладало свечение умеренной интенсивности. Оптическая плотность иммунофлуоресценции коллагена IV типа в сосудах желтого тела яичников пациенток с АЯ I группы составила $(0,89 \pm 0,04)$ усл. ед. (**рис. 1**).

В препаратах, обработанных МКА к CD34, свечение выявлялось как в стенке сосудов, что соответствовало локализации эндотелия (последнее определялось при сопоставлении с препаратами, окрашенными гематоксилином и эозином), так и в строме желтого тела, поскольку известно, что рецепторы к CD34 способны экспрессировать не только эндотелиоциты, но также миофибробласты и фибробласты (**рис. 2**). Последние в большом количестве присутствуют в строме яичника, в том числе и желтого тела. Мы определили интенсивность свечения клеток, экспрессирующих рецепторы к CD34, как в стенках сосудов, так и в строме желтого тела.

Как и в I группе наблюдений, иммуногистохимически в микропрепаратах II группы, обработанных МКА к коллагену IV типа, в стенках сосудов желтого тела преобладало линейное свечение, изредка прерывистого характера. Интенсивность иммунофлуоресценции была неоднородной, а по сравнению с I группой – и ярче выраженной (**рис. 3**). Практически не отмечалось зон со слабой иммунофлуоресценцией. Как результат, показатель оптической плотности иммунофлуоресценции коллагена IV типа в сосудах желтого тела яичников во II группе наблюдений превысил таковой в наблюдениях I группы (**табл. 1**).

Аналогично I группе, в препаратах II группы, обработанных МКА к CD34, свечение выявлялось как в стенке сосудов, что соответствовало локализации эндотелия, так и в строме желтого тела (**рис. 4**). Обращало на себя внимание меньшее количество клеток, экспрессирующих эти рецепторы, в первую очередь, в стенке сосудов, тогда как в строме их количество практически не изменилось по сравнению с наблюдениями I группы.

Таблица 1

Оптическая плотность иммунофлуоресценции коллагена IV типа в сосудах желтых тел яичников в зависимости от объема гемоперитонеума, усл. ед., $M \pm m$

Оптическая плотность иммунофлуоресценции	I группа	II группа	III группа
Интенсивность свечения	$0,89 \pm 0,04$	$1,32 \pm 0,04^*$	$1,49 \pm 0,03^{**}$

Примечание: * – $P < 0,05$ по сравнению с показателем I группы;

** – $P < 0,05$ по сравнению с показателем II группы.

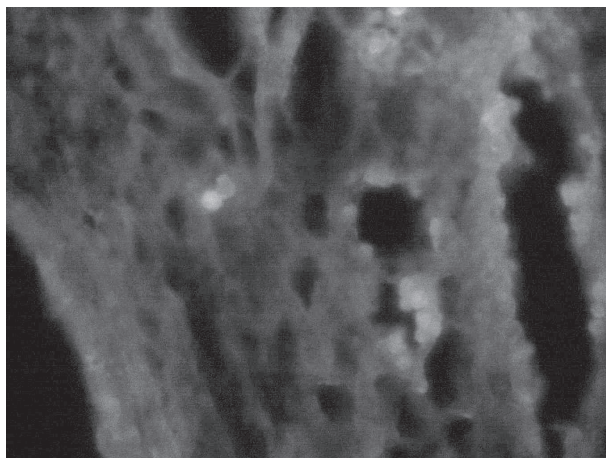


Рис. 4. Немногочисленные умеренно флуоресцирующие эндотелиоциты, экспрессирующие рецепторы к CD34 в сосудах желтого тела яичника – наблюдения II группы. Прямой метод Кунса с МКА к CD34, х400.



Рис. 5. Яркое свечение коллагена IV типа в утолщенной базальной мембране сосуда желтого тела яичника – наблюдения III группы. Прямой метод Кунса с МКА к коллагену IV типа, х400.

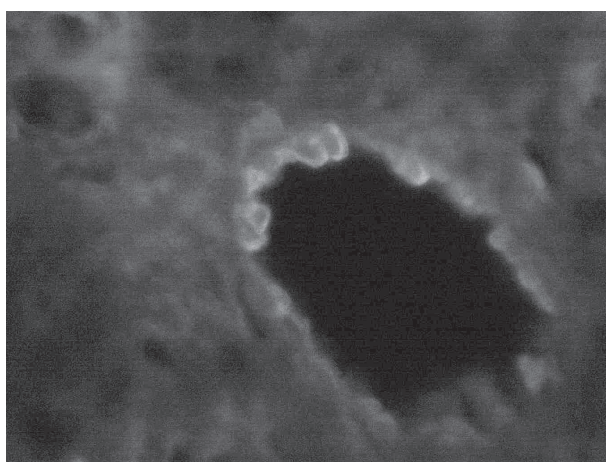


Рис. 6. Слабое свечение немногочисленных эндотелиоцитов, экспрессирующих рецепторы к CD34, – наблюдения III группы. Прямой метод Кунса с МКА к CD34, х 400.

Как следует из **табл. 2**, показатель оптической плотности иммунофлуоресценции эндотелиоцитов в сосудах желтого тела яичников пациенток с АЯ II группы ниже, чем в наблюдениях I группы. В то же время показатели оптической плотности иммунофлуоресценции стромальных элементов желтого тела практически не отличаются.

В микропрепаратах III группы, обработанных МКА к коллагену IV типа, преобладало яркое свечение более или менее выраженной интенсивности, как правило, линейного характера (**рис. 5**). Интенсивность иммунофлуоресценции по сравнению с I группой была ярче выражена, тогда как значительных отличий по сравнению с наблюдениями II группы не обнаружено.

Таблица 2

Оптическая плотность иммунофлуоресценции CD34 в сосудах и строме желтых тел яичников в зависимости от объема гемоперитонеума, усл. ед., $M \pm m$

Оптическая плотность иммунофлуоресценции	I группа	II группа	III группа
Стенка сосудов	$0,61 \pm 0,05$	$0,49 \pm 0,04^*$	$0,43 \pm 0,05^{**}$
Строма	$0,42 \pm 0,08$	$0,43 \pm 0,02$	$0,52 \pm 0,06^{**}$

Примечание: * – $P < 0,05$ по сравнению с показателем I группы;

** – $P < 0,05$ по сравнению с показателем II группы.

В III группе свечение коллагена IV типа в базальных мембранах сосудов желтого тела оказалось максимальным, что может указывать на наличие признаков избыточного склероза в *de novo* образованных в стенках микрососудов желтого тела.

При обработке препаратов III группы наблюдения МКА к CD34 визуально по сравнению с наблюдениями I группы выявлялся выраженный дефицит клеток, экспрессирующих CD34, в первую очередь, в стенке сосудов. В то же время, по сравнению с наблюдениями II группы, зафиксировано увеличение количества клеток, экспрессирующих эти рецепторы (**рис. 6**). Показатель оптической плотности иммунофлуоресценции эндотелиоцитов в сосудах желтого тела яичников у пациенток III группы достоверно ниже, чем в наблюдениях I и II групп, а показатель оптической плотности иммунофлуоресценции стромальных элементов желтого тела достоверно повышен в наблюдениях III группы (**табл. 2**).

В наблюдениях I группы в сосудистых стенках микроциркуляторного русла выявлены умеренное накопление коллагена IV типа в составе базальных мембран и достаточно активная экспрессия эндотелиоцитами CD34. Адгезивные свойства стромальных клеток желтых тел I группы невысоки, что, возможно, связано со склеротическими процессами в интерстиции. Иммуногистохимические

особенности со стороны стромально-сосудистого и эпителиального компонентов желтых тел II группы подобны таковым в наблюдениях I группы. В сосудистых стенках при наблюдениях III группы обнаружены признаки избыточного накопления коллагена IV типа в составе базальных мембран и резкое снижение экспрессии эндотелиоцитами CD34. Между количеством коллагена IV типа в составе сосудистых базальных мембран и интенсивностью экспрессии рецепторов к CD34 имеет место статистически достоверная отрицательная взаимосвязь ($r=-0,7645$).

Выводы. Таким образом, полученные данные свидетельствуют о наличии определенных иммуногистохимических особенностей со стороны стромально-сосудистого и эпителиального компонентов в источнике АЯ, в зависимости от объема внутрибрюшного кровотечения. Адгезивные свойства эндотелиоцитов, зависящие от состояния метаболических процессов в клетках, убывают от I группы, характеризующейся минимальным гемоперитонеумом, к III группе, где объем гемоперитонеума был максимальным. В то же время, адгезивные свойства стромальных элементов желтого тела, отражающие функциональную клеточную активность, практически не отличались в наблюдениях I

и II групп и достоверно повышались в III группе, несмотря на максимальный объем внутрибрюшного кровотечения. Достоверное увеличение количества коллагена IV типа в базальных мембранах сосудов желтого тела препаратов II и III групп может свидетельствовать о наличии избыточных склеротических изменений, повышающих ломкость капиллярной стенки, что становится причиной гемоперитонеума большего объема. В свою очередь, функциональная активность и адгезивные свойства эндотелиоцитов микроциркуляторного русла *de novo* образованных капилляров желтого тела были минимальными в клинических случаях АЯ, сопровождаемых значительным объемом внутрибрюшного кровотечения.

Перспективы дальнейших исследований. Поскольку в последние годы отмечается рост частоты АЯ среди женщин раннего репродуктивного возраста, изучение состояния сосудисто-эндотелиального и стромального компонентов источников внутрибрюшного кровотечения яичниковой этиологии будет способствовать пониманию этиопатогенеза заболевания, что определяет актуальность данной темы и делает необходимым проведение дальнейших исследований.

Список литературы

1. Запорожан В. М. Гінекологічна патологія: Атлас: Навч. посібник / В. М. Запорожан, М. Р. Цегельський. – Одеса: Одес. держ. мед. ун-т, 2002. – 308 С.
2. Марченко Л. А. Желтое тело. Механизмы формирования и регресса / Л. А. Марченко // Гинекология. – 2000. – Т. 2, № 5.
3. Морфогенез и гистофизиология жёлтого 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.
4. Запорожан В. М. Акушерство і гінекологія: підруч. для післядиплом. освіти лікарів, студентів, магістрів, аспірантів вищих мед. навч. закладів III–IV рівнів акредитації, клін. 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.
5. Гладчук І. З. Апоплексія яєчника в сучасній гінекології / І. З. Гладчук, В. Л. Кожаків, О. В. Якименко // Репродуктивное здоровье женщины. – 2005. – № 4 (24). – С. 56–58.
6. CD34: structure, biology, and clinical utility / D. S. Krause, M. J. Fackler, C. I. Civin, W. S. May // Blood. – 2006. – Vol. 87 (1). – P. 1–13.
7. Siemerink M. J. Mechanisms of ocular angiogenesis and its molecular mediators / M. J. Siemerink, A. J. Augustin, R. O. Schlingemann // Dev. Ophthalmol. – 2010. – Vol. 46. – P. 4–20.
8. Expression of the CD34 gene in vascular endothelial cells / L. Fina, H. V. Molgaard, D. Robertson [et al.] // Blood. – 1999. – Vol. 75 (12). – P. 2417–2426.
9. Nikraves M. R. Pattern of collagen IV expression in glomerular and mesangial basementmembrane during fetal and postnatal period of BALB/c mice / M. R. Nikraves, M. Jalali, M. H. Karimfar [et al.] // Journal of Cell and Molecular Research. – 2009. – Vol. 1, N 2. – P. 90–95.
10. Ottani V. Collagen structure and functional implications / V. Ottani, M. Raspanti, A. Ruggeri // Micron. – 2001. – N 32. – P. 251–260.
11. Определение роли коллагена IV типа в патогенезе миомы матки / С. В. Савельев, С. Н. Буянова, Е. Л. Бабунашвили, М. В. Мгелиашвили // Российский вестник акушера-гинеколога. – 2007. – № 5 (21). – С. 51–57.
12. Филоненко Т. Г. Особенности локализации коллагена IV при фиброзно-кавернозном туберкулёзе / Т. Г. Филоненко // Таврический медико-биологический вестник. – 2012. – Т. 15 (1). – С. 272–276.
13. Brosman M. Immunofluorescencne vysetrovane formal-parafinovego materialu / M. Brosman // Cs. patol. – 1979. – Vol. 15, № 4. – P. 215–220.
14. Патент на корисну модель № 46489 G01N 33/00. Спосіб кількісного визначення вмісту антигену в біологічних тканинах / Губіна-Вакулик Г. І., Сорокіна І. В., Марковський В. Д., Купріянова Л. С., Сидоренко Р. В. – 25. 12. 2009. – Бюл. № 4.

УДК 618. 11-006. 2:618. 11-008. 61-089-055. 26

ОСОБЕННОСТИ ГЕМОТКАНЕВОГО БАРЬЕРА ЖЕЛТОГО ТЕЛА ПРИ АПОПЛЕКСИИ ЯИЧНИКА ПО ДАННЫМ ЭКСПРЕССИИ CD34 ЭНДОТЕЛИОЦИТАМИ И КОЛЛАГЕНА IV ТИПА БАЗАЛЬНЫМИ МЕМБРАНАМИ КАПИЛЛЯРОВ

Назаренко О. Я.

Резюме. В работе представлены результаты иммуногистохимического изучения сосудиисто-эндотелиального и стромального компонентов основного источника внутрибрюшного кровотечения овариальной этиологии – жёлтого тела и кисты жёлтого тела яичника. В удалённых в процессе оперативного вмешательства макропрепаратах на иммуногистохимическом уровне изучались особенности экспрессии эндотелием капилляров и клетками стромы желтого тела трансмембранного белка межклеточной адгезии – CD34, а также основного белка базальных мембран капилляров – коллагена IV типа. Установлена статистически достоверная отрицательная взаимосвязь ($r=-0,7645$) между количеством коллагена IV типа в составе сосудистых базальных мембран и интенсивностью экспрессии эндотелиоцитами CD34. Достоверное увеличение количества коллагена IV типа в базальных мембранах сосудов желтого тела может свидетельствовать о наличии избыточных склеротических изменений, повышающих ломкость капиллярной стенки, что становится причиной гемоперитонеума большого объема.

Ключевые слова: апоплексия яичника, молекулы межклеточной адгезии, CD34, коллаген IV типа, желтое тело яичника, иммуногистохимия.

УДК 618. 11-006. 2:618. 11-008. 61-089-055. 26

ОСОБЛИВОСТІ ГЕМОТКАНИННОГО БАР'ЄРУ ЖОВТОГО ТІЛА ПРИ АПОПЛЕКСІЇ ЯЄЧНИКА ЗА ДАНИМИ ЕКСПРЕСІЇ CD34 ЕНДОТЕЛІОЦИТАМИ Й КОЛАГЕНУ IV ТИПУ БАЗАЛЬНИМИ МЕМБРАНАМИ КАПІЛЯРІВ

Назаренко О. Я.

Резюме. У роботі представлені результати імуногістохімічного вивчення судинно-ендотеліального й стромального компонентів основного джерела внутрішньочеревної кровотечі овариальної етіології – жовтого тіла й кисти жовтого тіла яєчника. У вилучених в процесі оперативного втручання макропрепаратах на імуногістохімічному рівні вивчалися особливості експресії ендотелієм капілярів і клітинами строми жовтого тіла трансмембранного білка міжклітинної адгезії – CD34, а також основного білка базальних мембран капілярів – колагену IV типу. Встановлено статистично вірогідний негативний взаємозв'язок ($r=-0,7645$) між кількістю колагену IV типу в складі судинних базальних мембран й інтенсивністю експресії ендотеліоцитами CD34. Вірогідне збільшення кількості колагену IV типу в базальних мембранах судин жовтого тіла може свідчити про наявність надлишкових склеротичних змін, що підвищують ламкість капілярної стінки, що стає причиною гемоперитонеума більшого об'єму.

Ключові слова: апоплексія яєчника, молекули міжклітинної адгезії, CD34, колаген IV типу, жовте тіло яєчника, імуногістохімія.

UDC 618. 11-006. 2:618. 11-008. 61-089-055. 26

The Peculiarities Of The Corpus Luteum Haemo-Tissue Barrier In Case Of Ovarian Apoplexy Using Both Cd34 Endotheliocytes And Iv Collagen Type Expression By Capillary Basal Membranes

Nazarenko O. Ya.

Summary. Immune-histochemical data are presented concerning investigation of both vascular-endothelial and stromal components of intraabdominal bleeding major source – corpus luteum and ovarian corpus luteum cyst. The peculiarities of intercellular adhesion transmembrane protein CD34 together with capillaries base membranes main protein IV collagen type expressions by both capillary endotheliocytes and corpus luteum stromal cells were studied using macrosamples obtained during surgical interventions. The significant negative relation ($r=-0,7645$) was calculated between IV collagen type content inside vascular base membranes and CD34 expressions intensity by endotheliocytes. An important IV collagen type content inside corpus luteum vessels base membranes increase might be in favour of vascular extrasclerotic changes formation that result in capillary wall fragile and possible reason of haemoperitoneum large volume.

Key words: ovarian apoplexy, intercellular adhesion molecules, CD34, IV type of collagen, ovarian corpus luteum, immune-histochemistry.

Стаття надійшла 31. 07. 2012 р.

Рецензент – проф. Громова А. М.