

УДК 618.1-055.23:611.018.1

І. Б. Вовк
Т. Д. Задорожна
О. А. Андрієць¹
О. І. Пустовалова

Інститут ПАГ АМН України,
1 - Буковинська державна медична
академія, м. Чернівці

ЦИТОЛОГІЧНІ ТА ІМУНОЦИТОХІМІЧНІ ОСОБЛИВОСТІ МАЗКІВ З ВУЛЬВИ ТА ПІХВИ У ДІВЧАТ ПРЕПУБЕРТАТНОГО ПЕРІОДУ БЕЗ ОЗНАК ЗАПАЛЬНОГО ПРОЦЕСУ ЗОВНІШНІХ СТАТЕВИХ ОРГАНІВ

Ключові слова: дівчатка, цитологія, імуноцитохімія, піхва.

Резюме. У роботі охарактеризовано особливості регуляції апоптозу епітеліальних клітин у мазках з піхви та вульви у дівчат препубертатного віку без ознак запального процесу зовнішніх статевих органів та піхви на основі цитологічного, морфометричного та імуноцитохімічного методу виявлення рецептора CD-95 Apo-1/Fas та антиапоптотичного фактору bcl-2.

Вступ

Апоптоз, як природний запрограмований процес, що не пов'язаний із патологією, вперше був описаний майже півстоліття тому, а термін «апоптоз» запропонував У.Кегг та співавт. (1972) [9]. Апоптоз, як фізіологічний процес сприяє підтриманню постійної кількості клітинних елементів в органах та тканинах організму і видалення клітин, які закінчили свій життєвий цикл. На відміну від смерті клітин внаслідок патологічних змін процеси апоптозу відбуваються в ядрі та цитоплазмі при збереженні цілісності клітинної оболонки [2,5]. Відмінною морфологічною особливістю апоптозу є колапс ядра. На початкових етапах апоптозу, на відміну від некрозу, клітина навпаки, зморщується, втрачаючи до 1/3 свого об'єму за кілька хвилин. Всихання добре виражено, як у культурі клітин, так і в тканинних зрізах, де апоптотична клітина відокремлюється від сусідніх клітин [2,5]. Надалі апоптотична клітина перетворюється в сукупність оточених мембраною апоптозних тілець різних за своїм складом, які фагоцитуються макрофагами або сусідніми клітинами. Клітина на цьому етапі ще жива і мабуть саме в цьому і є завдання апоптозу – утилізація ще живих апоптозних тілець, поки вміст клітини не потрапляє у позаклітинне середовище, не викликаючи запальних реакцій. Тобто знищення клітин шляхом апоптозу забезпечує мінімальне пошкодження тканин порівняно з іншими механізмами смерті [3,4].

До апоптозу призводить дія різних факторів. Це можуть бути неспецифічні фактори,

такі, як висока температура, токсичні агенти, оксиданти, вільні радикали, гамма- та УФ – випромінювання, бактеріальні токсини та ін. Насамперед у всіх цих випадках відбувається індуція апоптозу, але при збільшенні дози відповідного агенту розвивається некроз клітин [4].

Оскільки апоптоз є фізіологічним явищем, то відповідно в організмі повинні бути регулятори цього процесу. Вже вивчено протилежну дію в регуляції апоптозу одним і тим же гормоном залежно від стадії диференціювання клітин. Так, естрогени є інгібіторами апоптозу епітелія матки на початку менструального циклу та індукторами апоптозу наприкінці циклу, а інгібітором апоптозу епітелію матки наприкінці циклу є прогестерон [10].

Апоптоз присутній у зрілих соматичних клітинах протягом життя людини при злушуванні епітеліального покриву порожнин, атрезії фолікулів яєчника та ін [7].

Для виявлення апоптозу використовують мікроскопію, гістохімічні та імунохімічні реакції. До регуляторів апоптозу в клітинних популяціях відносяться Fas (Apo-1, CD-95) та FasL (Fas - ліганд), а також - p53, Lewis-Y, bcl-2 та інші [1,4,5].

Апоптоз клітини розпочинається з того моменту, коли відбувається пошкодження ДНК, викликаючи розрив у циклі її репродукції. Якщо не відбувається «ремонт» ДНК, клітини вступають у фазу апоптозної загибелі [6].

Термінальну стадію апоптозу, тобто етап деградації ДНК, контролюють білки класу Bcl-2. Відомо, що білки цього класу відносяться або

до індукторів апоптозу (Bad, Bax, Bik), або ж до інгібіторів (Bcl-2, Bcl-XL) [8].

Fas міститься в багатьох типах клітин, і разом із своїм лігандом FasL утворюють одну систему, в якій Fas виступає в ролі рецептора, а FasL стимулює апоптоз після зв'язування із Fas. Слід відзначити, що для цієї системи не відомі інші функції окрім індукції апоптозу клітин [1,4].

Мета дослідження

Дослідити особливості цитологічної картини та маркери апоптозу слизової оболонки вульви та піхви в дівчат препубертатного віку без ознак запального процесу зовнішніх статевих органів.

Матеріал і методи

Дослідженню підлягало 10 мазків з вульви та піхви дівчат препубертатного віку без ознак запальних процесів зовнішніх статевих органів та піхви.

Для вирішення поставлених завдань у дослідженні були використані наступні методи:

1. Цитологічний метод – забарвлення за Романовським - Гімза.

2. Морфометричний метод:

а) проводили підрахунок клітин з дистрофічними змінами (жирова та гідропічна дистрофія) в перерахунку на 100 клітин;

б) проводили підрахунок клітин, які характеризують запальну інфільтрацію: нейтрофілів, лімфоцитів та макрофагів у перерахунку на 100 клітин.

3. Імуноцитохімічні методи:

а) непрямий стрептавідин-пероксидазний метод виявлення рецептора CD-95 Apo-1/Fas. Дана методика визначає ступінь експресії CD-95 антигена апоптоза Apo-1 або Fas антигену з молекулярною масою 45кД, трансмембранна молекула типу I, відноситься до суперсімейства рецепторів фактора некрозу пухлин (TNF).

Оцінка результатів імуноцитохімічної реакції здійснюється за допомогою методів, прийнятих в імуноцитохімії, з визначенням ступеня експресії (в балах): 0 балів – немає забарвлення; 1 бал – слабе забарвлення; 2 бали – помірне забарвлення; 3 бали – виразне забарвлення; 4 бали – дуже виразне забарвлення.

Аналіз імуноцитохімічних досліджень експресії рецептора CD95, Apo-1/Fas та антиапоптогичного протеїну Bcl-2 був проведений у клітинах епітелію вульви в порівняльному аспекті, оскільки морфологічна структура його є найбільш важливою для визначення патологічних змін.

Обговорення результатів дослідження

У результаті цитологічних досліджень мазків вульви та піхви в дівчат без ознак запального процесу зовнішніх статевих органів та піхви були виявлені незначні дистрофічні зміни епітелію, при цьому жирова дистрофія в цитоплазмі клітин епітелію спостерігалася в $0,4 \pm 0,01\%$. Вона була в основному дрібнокрапельна і розташовувалася по всій цитоплазмі. Ядра в епітеліальних клітинах в усіх відділах досліджених мазків переважно були округлої форми з чітко окресленою ядерною мембраною, дифузно розмішеним хроматином (рис. 1). Гідропічна дистрофія відмічалась $0,9 \pm 0,03\%$ (рис. 1) яка проявлялась прозорістю цитоплазми, незначним зпінням і розташовувалася рівномірно.

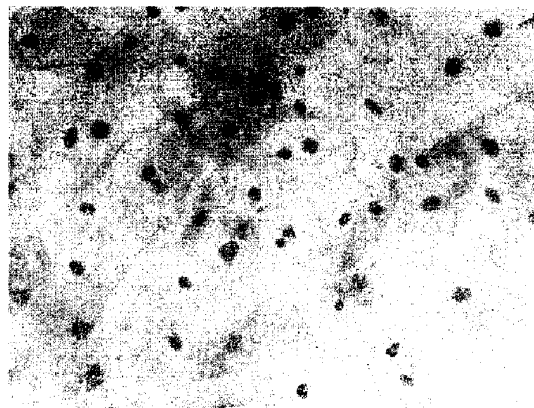


Рис.1. Мікрофото, Мазок з вульви дівчинки 5 років. Шар поверхневих клітин плоского епітелію. Гематогенні клітини відсутні. Незначні дистрофічні зміни в поодиноких клітинах епітелію. Забарвлення за Романовським-Гімза. Ок. x10. Обх40.

Серед гематогенних клітин переважали нейтрофільні гранулоцити та в меншій мірі лімфоцити. В середньому нейтрофільні гранулоцити зустрічалися в $5,1 \pm 0,15\%$, а лімфоцити - $2,0 \pm 0,06\%$ (рис. 2).

У досліджених мазках макрофаги були в незначній кількості ($0,4 \pm 0,01\%$), у вигляді великих клітин з виразною цитоплазмою, в якій знаходились окремі органели інших клітин та мікроорганізми.

Таким чином, у дівчат без ознак запального процесу піхви та вульви зміни епітелію та кількість гематогенних клітин можна віднести до фізіологічних параметрів.

Імуноцитохімічна експресія рецептора апоптозу, яка визначає сигнал індукції апоптозу, була помірна в цитоплазмі епітелію вульви (1 бал), в середньому вона становила $1,3 \pm 0,04$

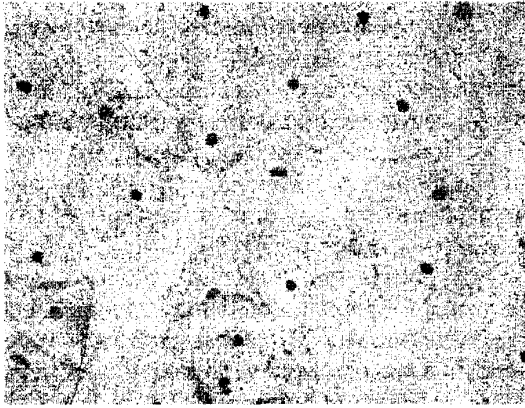


Рис.2. Мікрофото, Мазок з вульви дівчинки 8 років. Шар поверхневих клітин плоского епітелію. Гематогенні клітини відсутні. Забарвлення за Романовським-Гімза. Ок. x10. Обх40.



Рис.3. Мікрофото, Мазок з вульви дівчини 8 років. Шар клітин сплющеного епітелію. Експресія CD95, Apo-1/Fas помірна (1 бал). Імуноцитохімічна реакція. Непрямий стрептавідин-пероксидазний метод виявлення ступеня експресії CD95, Apo-1/Fas. Ок. x10. Обх40.



Рис.4. Мікрофото, Мазок з вульви дівчини 9 років. Шар клітин сплющеного епітелію. Експресія антиапоптозного фактору bcl-2 помірна (1 бал). Імуногістохімічна реакція. Непрямий стрептавідин-пероксидазний метод виявлення ступеня експресії антиапоптозного фактору bcl-2. Ок. x10. Обх40.

бали. У поодиноких групах клітин епітелію експресія збільшувалася до 2 балів (рис.3).

Експресія антиапоптозного фактора Bcl-2 проявлялася помірно (до 1 бала) в цитоплазмі. Виявляючий її хромоген розміщувався в цитоплазмі у вигляді глибок (рис.4). У середньому експресія Bcl-2 була $0,7 \pm 0,02$ бали, що вказує на рівновагу між початковими процесами апоптозного каскаду і його регуляторів (рис.4).

Висновки

1. Стан епітелію та кількість гематогенних клітин у мазках з піхви та вульви у дівчат препубертатного віку можна віднести до фізіологічних параметрів.

2. Імуноцитохімічна експресія рецептора апоптоза CD95, Apo-1/Fas, яка визначає сигнал індукції апоптоза, була помірна в цитоплазмі епітелію вульви.

3. Експресія антиапоптозного фактору Bcl-2 вказує на рівновагу між початковими процесами апоптозного каскаду і його регуляторів.

Перспективи подальших досліджень

Подалше дослідження цитологічних та імуноцитохімічних особливостей мазків з вульви та піхви у дівчат різного віку із вульвогінітами дадуть можливість встановити залежність між проявами апоптозу та важкістю перебігу запального процесу залежно від періоду життя дівчинки.

Література. 1. *Владимирская Е.Б., Масчан А.А., Румянцев А.Г.* Апоптоз и его роль в развитии опухолевого роста // Гематол. и трансфузиол. – 1997. – №5. – С.4-9. 2. *Белушкина И.И., Хасан Хамад Али, Северин С.Е.* Молекулярные основы апоптоза // Вопр. биол. мед. и фармац. химии. – 1998. – №4. – С.15-23. 3. *Маянский А.И., Маянский П.А., Абаджиди М.А., и др.* Апоптоз: начало будущего // Ж. микробиол. – 1997. – №2. – С.88-94. 4. *Новожилова А.П., Плужников Н.Н., Новиков В.С. и др.* Программированная клеточная гибель. – СПб: Наука, 1996. – 276с. 5. *Уманский С.Р.* Апоптоз: молекулярные и клеточные механизмы // Молек. биол. – 1996. – Том 30, Вып.3. – С.487 – 502. 6. *Ярыгин Н.Е., Кораблев А.В.* Значение программированной гибели эндотелия в построении внутриоргана кровеносного русла в эмбриогенезе человека // Арх. патол. – 1995, Т.58, №6. – С.39-44. 7. *Bell C.G.H.* Apoptosis in T and B lymphocytes life cycles // Biochim. Soc. Trans., 1995. – V.23, N.2. – P.214-218. 8. *Diebold J., Baretton G., Felchner M. et al.* Bcl-2 expression, p 53 accumulation, and apoptosis in ovarian carcinomas // Am. J. Clin. Pathol., 1996. – V.105, N 3. – P.341-349. 9. *Karlsson L., Leser G., Ryd W., Horvath G.* Estradiol induces DNA fragmentation in a human endometrial adenocarcinoma with estradiol- inhibited growth phenotype // Anticancer Res. – 1997. – V.17, N5A. – P. 3259 – 3263.

**ЦИТОЛОГИЧЕСКИЕ
И ИММУНОЦИТОХИМИЧЕСКИЕ
ОСОБЕННОСТИ МАЗКОВ ИЗ ВУЛЬВЫ И
ВЛАГАЛИЩА У ДЕВОЧЕК ПРЕПУБЕРТАТНОГО
ПЕРИОДА БЕЗ ПРИЗНАКОВ ВОСПАЛИТЕЛЬНОГО
ПРОЦЕССА НАРУЖНЫХ ПОЛОВЫХ ОРГАНОВ**

*И.Б.Вовк, Т.Д.Задорожная, О.А.Андриец,
О.И.Пустовалова*

Резюме. В работе дана характеристика особенностей апоптоза в мазках из влагалища и вульвы у девочек препубертатного возраста без признаков воспалительного процесса наружных половых органов и влагалища на основании цитологического, морфометрического и иммуноцитохимического методов выявления рецептора CD-95 Apo-1/Fas и антиапоптотического фактора bcl-2.

Ключевые слова: девочки, цитология, иммуноцитохимия, влагалище.

**CYTOLOGIC AND IMMUNOCHEMICAL
PECULIARITIES OF VULVAL AND VAGINAL SMEARS
IN GIRLS OF THE PREPUBERTAL PERIOD WITHOUT
SIGNS OF AN INFLAMMATORY PROCESS OF THE
EXTERNAL GENITAL ORGANS**

I.B.Vovk, T.D.Zadorozhna, O.A.Andriiets', O.I.Pustovalova

Abstract. The paper characterizes the specific features of apoptosis in the vulval and vaginal smears in girls of the prepubertal age without signs of an inflammatory process of the external genital organs and the vagina on the basis of the cytologic, morphometric and immunocytochemical method of detecting receptor CD-95 Apo-1/Fas and antiapoptotic factor bcl-2.

Key words: girls, cytologic, immunocytochemistry, vaginal.

**Institute of Pediatrics, Obstetrics and Gynecology of Ukraine's
AMS (Kyiv)**

Bukovinian State Medical Academy (Chernivtsi)

Clin. and experim. pathol. – 2004. – Vol.3, №4. – P.114–117.

Надійшла до редакції 22.11.2004