

*А.В.Гошовська, С.П.Польова, І.С.Давиденко*

## ІМУНОГІСТОХІМІЧНІ ДОСЛІДЖЕННЯ ПРОТЕЇНУ ВАХ У ДЕЦИДУОЦИТАХ БАЗАЛЬНОЇ ПЛАСТИНКИ ПЛАЦЕНТ ВАГІТНИХ, ІНФІКОВАНИХ МІКОБАКТЕРІЯМИ ТУБЕРКУЛЬОЗУ

Кафедра акушерства і гінекології з курсом дитячої та підліткової гінекології (зав. – доц. С.П.Польова),  
кафедра патологічної анатомії та судової медицини (зав. – проф. І.С.Давиденко)  
Буковинського державного медичного університету, м. Чернівці

**Резюме.** Імуногістохімічними та гістологічними методами вивчено 16 плацент вагітних, інфікованих мікобактеріями туберкульозу (МБТ) і 20 плацент жінок з фізіологічним перебігом вагітності та пологів. Встановлено, що у вагітних, інфікованих мікобактеріями

туберкульозу, має місце активізація процесів ВАХ-залежного апоптозу в децидуоцитах, що слід розцінити як несприятливий чинник для перебігу вагітності.

**Ключові слова:** туберкульоз, плацента, децидуоцити, апоптоз.

**Вступ.** За умов туберкульозу провідну роль в обмеженні поширення мікобактерій туберкульозу та альтерації відіграють макрофагальні клітинні форми. Оскільки запальний процес при туберкульозі плаценти локалізується найчастіше в децидуальній оболонці [3], окрім епітеліоїдних та велетенських багатоядерних клітин Ланганса (які є макрофагами, характерними для туберкульозу), особливий інтерес викликають такі особливі клітинні форми з властивостями макрофагів, як децидуоцити. Ці клітини виникають під час вагітності у зв'язку з впливом низки гормонів на ендометрій та поступово відмирають шляхом апоптозу після пологів [4]. Відомо, що запальний процес може модифікувати процеси апоптозу в різних клітинах, проте при туберкульозному ураженні плаценти дане явище досі не вивчено в клітинах цього органа, зокрема в децидуоцитах. На підтвердження особливого значення вивчення апоптозу саме макрофагів є той факт, що в децидуальних лейкоцитах процеси апоптозу не спостерігаються [6].

Один із провідних механізмів апоптозу в макрофагах є ВАХ-залежний механізм, який включається через особливий протеїн ВАХ [5]. Останній відноситься до протеїнів сімейства Bcl-2, і спочатку отримав назву "Bcl-2 асоційований X протеїн". У даний час його прийнято називати – антиген Вах, протеїн Вах, або ВАХ [1,5,7,8]. Цей протеїн може локалізуватися в цитозолі, мітохондріях та ендоплазматичному ретикулумі [5,7,8]. У цитозолі ВАХ знаходиться у

мономерній формі, а в мембранах мітохондрій та ендоплазматичного ретикулума – у формі ВАХ-ВАХ-гомодимера або гомоолігомера [5]. Вважається, що ВАХ-мономер є неактивною формою апоптозу, тоді як ВАХ-ВАХ-гомодимер та гомоолігомер, вмонтовуючись у мембрани при димеризації, генерує сигнали загибелі, наприклад, через вивільнення з мітохондрій у цитозоль цитохрому С та апоптозіндукуючого фактору (АІФ), які, у свою чергу, викликають активацію подальших молекулярних та морфологічних подій апоптозу [5,7,8]. Вказані варіанти внутрішньоклітинної локалізації ВАХ зумовлюють те, що в імуногістохімічних препаратах хромоген (барвник), який засвідчує позитивну реакцію на цей антиген і відображає його кількість, може розподілятися у вигляді дифузного забарвлення (ВАХ-мономер у цитозолі) або ж у вигляді гранул (ВАХ-ВАХ-гомодимер чи гомоолігомер у мітохондріях та гранулярному ендоплазматичному ретикулумі). Таким чином, імуногістохімічне дослідження реакції на антиген ВАХ у цитоплазмі клітини не повинно обмежуватися тільки визначенням сумарної концентрації чи абсолютної кількості ВАХ у клітинах певного типу. Потрібно ще здійснювати оцінку розподілу хромогену, використовуючи спеціальні кількісні показники, які дозволять визначити співвідношення між активною та неактивною формами ВАХ [1,2].

**Мета дослідження.** Встановити закономірності ВАХ-залежного апоптозу в децидуальних клітинах запальнозміненої базальної пластинки

плаценти у вагітних, інфікованих мікобактеріями туберкульозу.

**Матеріал і методи.** Проведено 16 спостережень інфікування мікобактеріями туберкульозу вагітних та 20 плацент жінок із фізіологічним перебігом вагітності та пологів (всі плаценти терміном гестації 37-41 тиждень). Досліджено основне місце локалізації специфічного та неспецифічного запалення при туберкульозі плаценти – базальну пластинку. Окрім загально-оглядової методики забарвлення гістологічних зрізів гематоксиліном і еозином та методики на кислотоустійкій бактерії за методом Циль-Нільсена, використана імуногістохімічна методика визначення проапоптотичного протеїну BAX у клітинах, які за морфологією та локалізацією ідентифіковані як децидуцити. Для виконання імуногістохімічної методики використані первинні антитіла до протеїну BAX та стрептавідин-біотинову систему візуалізації LSAB2 (пероксидазна мітка + діамінобензидин) виробника DakoCytomation (Denmark-USA). Максимально дотримувалися стандартизації протоколу методики для всіх зрізів. Дофарбування ядер виконували гематоксиліном Майєра. Кількісні дослідження інтенсивності зафарбовування проводили наступним чином. Отримували цифрові копії оптичного зображення фрагментів проміжних зрізів XB при використанні об'єктива мікроскопа x70 (водна імерсія). Далі цифрові копії зображення аналізували за

допомогою ліцензійної копії комп'ютерної програми "Видеотест – Размер 5.0" (ООО Видеотест, Россия) – проводили комп'ютерну мікроденситометрію. Аналіз здійснювали на підставі замірів по всій площі зрізу цитоплазми кожної клітини за двома показниками: "Середня яскравість" (в одиницях яскравості), "Відхилення яскравості" (в одиницях яскравості).

При статистичній обробці даних після процедури прийняття гіпотези про нормальність всіх вибірок за допомогою критерію Хана-Шапіро-Уїлкі обраховували середню арифметичну та її похибку, вірогідність різниці між групами дослідження визначали за допомогою двостороннього непарного критерію Стьюдента. Для вивчення сили впливу ЗДАВ на кількісні показники застосовували параметричний дисперсійний аналіз з визначенням сили впливу за методом Снедекора. Результати вважали вірогідними при  $p \leq 0,05$ .

**Результати дослідження та їх обговорення.** У всіх 16 спостереженнях інфікування мікобактеріями туберкульозу мали місце ознаки запалення в базальній пластинці: у 7 спостереженнях – осередкове специфічне запалення з формуванням казеозного некрозу, оточеного епітеліоїдними клітинами, лімфоцитами та поодинокими клітинами Ланганса, у 9 спостереженнях – неспецифічне запалення осередками нерегулярної форми та розмірів у вигляді лімфоїдно-макрофагальних накопичень. У більшості спостережень у базаль-

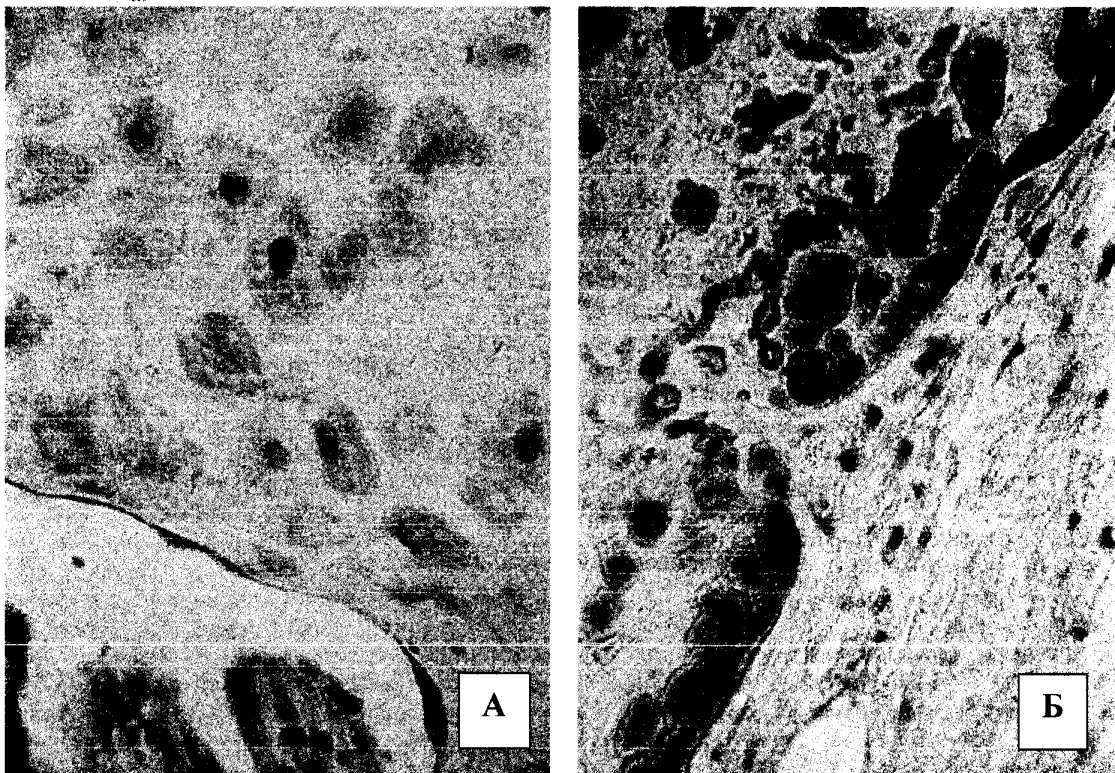


Рис. 1. А. Фрагмент базальної пластинки плаценти жінки при фізіологічній вагітності. Термін гестації 40 тижнів. Б. Фрагмент базальної пластинки плаценти жінки, інфікованої мікобактерією туберкульозу. Термін гестації 39 тижнів. Пояснення в тексті. Імуногістохімічна методика з первинними антитілами проти протеїну BAX та візуалізацією первинних антитіл стрептавідин-біотиновим методом із використанням діамінобензидину. Дофарбування клітинних ядер гематоксиліном Майєра. Мікрофотографія. Об.40<sup>x</sup>. Ок.10<sup>x</sup>

ній пластинці виявлені кислотостійкі бактерії. Відмічено, що навколо ділянок специфічного та неспецифічного запалення концентрація децидуоцитів знижена у 2,4-4,0 разів, а на відстані від запалення - у 1,5-1,8 разів в порівнянні з фізіологічною вагітністю.

На підставі імуногістохімічних досліджень встановлено, що в цитоплазмі децидуоцитів відмічається чітке ВАХ-позитивне забарвлення, яке має комбінований: дифузно-гранулярний характер. При фізіологічній вагітності забарвлення більш гомогенне, за комп'ютерними мікроденситометричними даними оптична щільність забарвлення (яка віддзеркалює концентрацію протеїну ВАХ) становить  $0,128 \pm 0,008$  відносних одиниць, а при інфікуванні мікобактеріями туберкульозу –  $0,244 \pm 0,014$  (за критерієм Стьюдента вірогідність розбіжностей середніх –  $p < 0,001$ ). Слід також зазначити, що при інфікуванні мікобактеріями туберкульозу забарвлення мало гранулярний характер. На це вказували величини відповідного показника. Зокрема, відхилення яскравості становило при фізіологічній вагітності  $4,8 \pm 0,75$  од. яскравості, а при інфікуванні мікобактеріями туберкульозу майже в п'ять разів більше –  $24,0 \pm 1,6$  од. яскравості ( $p < 0,001$ ).

Вказані відмінності ступеня та характеру забарвлення при постановці імуногістохімічної методики на протеїн ВАХ дозволяють обґрунтувати закономірність активізації ВАХ-залежних апоптотичних процесів у децидуоцитах при інфікуванні мікобактеріями туберкульозу. На підтвердження цього припущення при інфікуванні мікобактеріями туберкульозу частіше спостерігали децидуоцити зі зміненими ядрами – менших розмірів та більш конденсованим хроматином, що відповідає каріопікнозу. Описані закономірності проілюстровані на рисунку 1.

#### Висновок

У вагітних, інфікованих мікобактеріями туберкульозу, має місце активізація процесів ВАХ-залежного апоптозу в децидуоцитах, що слід розцінити як несприятливий чинник для перебігу

вагітності з наслідками, характерними для недостатності функції децидуоцитів.

**Перспектива подальших досліджень** пов'язана з вивченням стану інших клітин базальної пластинки плаценти (інвазивного цитотрофобласта, ендотеліоцитів, фібробластів).

#### Література

1. Давиденко І.С. Імуногістохімічний розподіл протеїнів ВАХ та Bcl-2 у клітинах Гофбауера плаценти при залізодефіцитній анемії вагітних // Бук. мед. вісник. - 2005. - Т9, №3. - С.88-91.
2. Давиденко І.С., Пішак В.П., Коломоєць М.Ю. та ін. Апоптоз у клітинах матково-плацентарної ділянки при залізодефіцитній анемії вагітних // Клін. анат. та операт. хірургія. - 2006. - Т.5, №1. - С.13-19.
3. Цинзерлинг В.А., Мельникова В.Ф. Перинатальні інфекції. (Вопросы патогенеза, морфологической диагностики и клинико-морфологических сопоставлений). Практическое руководство. - СПб: Элби СПб, 2002. - 352с.
4. Benirschke K., Kaufmann P., Baergen R. Pathology of the Human Placenta.- 5th ed.- New York: Springer-Verlag, 2006.- 1050p.
5. Burlacu A. Regulation of apoptosis by Bcl-2 family proteins // J. Cell. Mol. Med. - 2003. - V.7, N3. - P.249-257.
6. Pongcharoen S., Bulmer J.N., Searle R.F. No evidence for apoptosis of decidual leucocytes in normal and molar pregnancy: implications for immune privilege // Clin. Exp. Immunolog.- 2004. - V.138. - P.330-336.
7. Wei-Xing Zong, Chi Li, Hatzivassiliou G., Lindsten T., Qian-Chun Yu. Bax and Bak can localize to the endoplasmic reticulum to initiate apoptosis // The J. of Cell Biology.- 2003.- V.162, N1.- P. 59-69.
8. Yi-Te Hsu, Wolter K.G., Youle R.J. Cytosol-to-membrane redistribution of BAX and Bcl-XL during apoptosis // Proc. Natl. Acad. Sci. USA.- 1997.- V. 94.- P. 3668-3672.
9. Myatt L., Cui X. Oxidative stress in the placenta // Histochem. Cell Biol. - 2004. - V.122. - P.369-382.

## ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКИЕ ОБСЛЕДОВАНИЯ ПРОТЕИНА ВАХ В ДЕЦИДУОЦИТАХ БАЗАЛЬНОЙ ПЛАСТИНКИ ПЛАЦЕНТ БЕРЕМЕННЫХ, ИНФИЦИРОВАННЫХ МИКОБАКТЕРИЯМИ ТУБЕРКУЛЕЗА

*А.В.Гошовская, С.П.Полевая, И.С.Давиденко*

**Резюме.** Имуногістохімічними та гистологічними методами изучено 16 плацент беременных, инфицированных микобактериями туберкулеза (МБТ), и 20 плацент женщин с физиологическим течением беременности и родов. Установлено, что у беременных, инфицированных микобактериями туберкулеза, отмечена активизация процессов ВАХ-зависимого апоптоза в децидуоцитах, что расценивается как неблагоприятный показатель течения беременности.

**Ключевые слова:** туберкулез, плацента, децидуоциты, апоптоз.

**IMMUNOHISTOCHEMICAL INVESTIGATION OF BAX-PROTEIN IN DECIDUOCYTES  
OF THE BASAL PLACENTAL PLATE OF GRAVIDAS, INFECTED  
WITH MYCOBACTERIA OF TUBERCULOSIS**

*A.V.Goshovs'ka, S.P.Poliova, I.S.Davydenko*

**Abstract.** By means of immunohistochemical and histological methods 16 placentas of gravidas infected with tuberculosis mycobacteria (TMB) and 20 placentas of women with the physiological course of pregnancy and delivery have been studied. It has been established that an activation of the processes of BAX-dependent apoptosis occurs in the decidualocytes of gravidas infected with tuberculous mycobacteria and that should be evaluated as an unfavourable factor for the course of pregnancy.

**Key words:** tuberculosis, placenta, decidualocytes, apoptosis.

Рецензент – проф. Ю.Є.Роговий

Bukovinian State Medical University (Chernivtsi)

Buk. Med. Herald. – 2007. – Vol.11, №3.- P.23-26

Надійшла до редакції 20.04.2007 року