

МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я УКРАЇНИ
БУКОВИНСЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ

АКТУАЛЬНІ ПИТАННЯ КЛІНІЧНОЇ ТА ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЇ МЕДИЦИНИ

Матеріали 86-ї підсумкової конференції науковців
Буковинського державного медичного університету

Чернівці, БДМУ
2005

І.С. Давиденко, В.П. Пішак, М.Ю. Коломоєць, І.Й. Сидорчук ЕКСПРЕСІЯ ПРОЛІФЕРАТИВНОГО КЛІТИННОГО НУКЛЕАРНОГО АНТИГЕНУ В ЯДРАХ ЕПІТЕЛІЮ ХОРІАЛЬНИХ ВОРСИН ПЛАЦЕНТИ ПРИ ПЕРЕДЧАСНИХ ПОЛОГАХ НА ФОНІ ЗАЛІЗОДЕФІЦИТНОЇ АНЕМІЇ ВАГІТНИХ	104
М.С. Крилюк, І.С. Давиденко ЕКСПРЕСІЯ ПРОЛІФЕРАТИВНОГО КЛІТИННОГО НУКЛЕАРНОГО АНТИГЕНУ В ЯДРАХ ЦИТОТРОФОБЛАСТА ХОРІАЛЬНИХ ВОРСИН ПРИ КАЛЬЦИНОЗІ ПЛАЦЕНТИ	111
Б.Г. Макар, О.Ф. Марчук ТОПОГРАФО-АНАТОМІЧНІ ОСОБЛИВОСТІ СТРАВОХОДУ У ПЕРЕДПЛОДІВ ЛЮДИНИ	116
І.Ю.Олійник НОВИЙ ПОГЛЯД НА ФОРМОУТВОРЕННЯ ЗАГРУДНИННОЇ ЗАЛОЗИ В ПРЕНАТАЛЬНОМУ ОНТОГЕНЕЗІ ЛЮДИНИ.....	120
В.П.Пішак, В.Г.Висоцька, Р.Є.Булик, В.М.Магалаєс, К.Г.Ташук, М.М.Радько РОЛЬ ПОРУШЕННЯ МІКРОЦИРКУЛЯТОРНОГО КРОВООБІГУ В РОЗВИТКУ ПАТОЛОГІЇ НИРОК ЗА УМОВ СУЛЕМОВОЇ НЕФРОПАТІЇ	125
В.П. Пішак, О. І. Сметанюк ФЛОРА ЛІКАРСЬКИХ РОСЛИН БУКОВИНИ	128
В.П. Пішак, Т.В. Хмара КОРЕЛЯТИВНІ ВЗАЄМОВІДНОШЕННЯ ЧОЛОВІЧИХ СТАТЕВИХ ОРГАНІВ У 5-МІСЯЧНОГО ПЛОДА ЛЮДИНИ	135
В.В.Степанчук СТРУКТУРА ХРОНОРИТМІВ ТКАНИННОГО ФІБРИНОЛІЗУ І НЕОБМЕЖЕНОГО ПРОТЕОЛІЗУ В КІРКОВОМУ ШАРІ НИРОК БІЛИХ ЩУРІВ НА ТЛІ ЗМІН ФАЗ ЦИКЛУ МІСЯЦЯ	139
О.А. Тюленєва, І.С. Давиденко МОРФОМЕТРИЧНІ ПАРАМЕТРИ МІКРОЦИРКУЛЯЦІЇ В ТЕРМІНАЛЬНИХ ВОРСИНАХ ПРИ ЕКСТРАХОРІАЛЬНИХ ПЛАЦЕНТАХ.....	143
Н.М. Шумко ОРГАНІЗАЦІЯ ХРОНОРИТМІВ ЕКСКРЕТОРНОЇ ФУНКЦІЇ НИРОК В ІНТАКТНИХ ТВАРИН	147

**ЕКСПРЕСІЯ ПРОЛІФЕРАТИВНОГО КЛІТИННОГО
НУКЛЕАРНОГО АНТИГЕНУ В ЯДРАХ ЕПТЕЛІО
ХОРІАЛЬНИХ ВОРСИН ПЛАЦЕНТИ ПРИ ПЕРЕДЧАСНИХ
ПОЛОГАХ НА ФОНІ ЗАЛІЗОДЕФІЦИТНОЇ АНЕМІЇ
ВАГІТНИХ**

І.С. Давиденко, В.П. Пішак, М.Ю. Коломоєць, І.Й. Сидорчук

Кафедра патологічної анатомії та судової медицини
(зав.- доц. І.С. Давиденко)

Буковинського державного медичного університету

Вступ. Проліферативний клітинний нуклеарний антиген (PCNA – від англ. “Proliferating Cell Nuclear Antigen”) – протеїн, який визначають виключно в клітинних ядрах. Він є кофактором для ДНК-полімерази-дельта в S-фазу та під час синтезу ДНК при її репарації у разі пошкодження. Оскільки період напівжиття PCNA складає 20 годин, він може визначатися в клітинах також у G0-фазі. Таким чином, PCNA не можна асоціювати тільки з мітотичним циклом і проліферацією, тож для правильної оцінки сутності результатів імуногістохімічної реакції на PCNA потрібно враховувати тип клітини, де він визначається, та рівень експресії цього антигену. В плаценті експресія PCNA найбільш виражена у цитотрофобласті (ЦТБ), який, як відомо, характеризується високою мітотичною активністю і є джерелом регенерації синцитіотрофобласта (СТБ) [1,4,12]. Окрім того, експресія PCNA може спостерігатися і в окремих ядрах СТБ [4,9]. Цей факт є особливо цікавим з огляду на те, що ядра СТБ не проліферують [7,9]. Таким чином, експресія PCNA в ядрах СТБ може бути пов’язана тільки із посиленням процесів репарації пошкодженої ДНК. У даний час не викликає сумнівів, що гіпоксія призводить до так званого оксидативного стресу [5,8,10]. Останній через різні механізми може спричинити пошкодження ДНК [6,11], що, відповідно, повинно викликати посилення процесів її репарації. В літературі немає відомостей про дослідження експресії PCNA в

ядрах трофобласта ворсин плаценти за умов залізодефіцитної анемії вагітних (ЗДАВ).

Мета дослідження. Вивчити кількісні параметри експресії проліферативно-клітинного нуклеарного антигену в цитотрофобласті та синцитіотрофобласті плацентарних ворсин різних типів при передчасних пологах залежно від ступеня залізодефіцитної анемії вагітних.

Матеріал і методи. Морфологічному дослідженню підлягали 60 плацент, отриманих від жінок при передчасних пологах у 29-34 тижнів гестації. Всі випадки залежно від гематологічних показників і діагнозу були розподілені в наступні групи дослідження: 1) нормальні показники крові (14); 2) ЗДАВ I ст. (16); 3) ЗДАВ II ст. (18); 4) ЗДАВ III ст. (12). Взяті до уваги тільки випадки з тривалістю ЗДАВ не менше чотирьох тижнів, оскільки тривалість анемії є одним із ключових чинників при даній патології [3].

Свіжий матеріал фіксували впродовж 22 годин у нейтральному забуференому 10% водному розчині формаліна, після чого здійснювали зневоднювання у висхідній батареї етанолу і заливку в парафін. Парафінові зрізи 5 мкм завтовшки монтували на спеціальні неімуногенні предметні скельця SuperFrost®Plus (Німеччина). Після депарафінізації зрізів здійснювали імуногістохімічне визначення PCNA за допомогою первинних антитіл до PCNA та стрептавідин-біотинової системи візуалізації LSAB2 (пероксидазна мітка + діамінобензидин) виробника DakoCytomation (Данія). Дофарбування ядер виконували гематоксиліном Майєра. Вивчалися тільки три типи хоріальних ворсин – проміжні зрілі, термінальні та стовбурові.

Підраховували кількість PCNA-позитивних ядер, ідентифікованих як ЦТБ, та кількість PCNA-позитивних ядер в покривному СТБ. Для процентних співвідношень обраховували загальну кількість ядер ЦТБ та СТБ. Кількісні дослідження інтенсивності зафарбовування ядер проводили наступним чином. Спочатку отримували цифрові копії [2] оптичного зображення хоріальних ворсин при використанні об'єктива мікроскопа x40. Потім цифрові копії зображення аналізували за допомогою ліцензійної копії комп'ютерної програми "ВідеоТест – Розмер 5.0" (ООО Видеотест, Санкт-Петербург, Росія). Аналіз здійснювався на підставі замірів інтенсивності забарвлення по всій площі зріза ядра за двома показниками: "середня оптична щільність" (у відн. од.), "середня яскравість" (у од. яскравості).

При статистичній обробці даних після процедури прийняття гіпотези про нормальність всіх вибірок за допомогою критерію Шапіро-Уїлкі обраховували середню арифметичну та її похибку, а потім вірогідність різниці між групами дослідження визначали за допомогою двостороннього непарного критерію Ст'юдента. Різницю вважали вірогідною при рівні значущості $p \leq 0,05$.

Результати дослідження та їх обговорення. У вагітних з нормальними показниками крові в імуногістохімічних препаратах плацент PCNA-позитивні ядра серед трьох вивчених типів ворсин частіше зустрічалися у проміжних зрілих ворсинах. Найбільш інтенсивне забарвлення відмічалось у ядрах ЦТБ, при цьому середня оптична щільність складала $0,58 \pm 0,014$ відн.од., середня яскравість – $64 \pm 1,8$ од. яскравості. Слід врахувати, що більші величини показника “Середня оптична щільність” (діпазон величин від 0 до 1) відображають більш інтенсивне забарвлення, а показника “Середня яскравість” (діпазон величин від 0 до 255) – навпаки. У всіх вивчених імуногістохімічних препаратах майже не спостерігалось ядер ЦТБ без реакції на PCNA (всі типи ворсин), тому цифри середньої кількості ядер ЦТБ (табл.1) з точністю до четвертого знака після коми співпадають з цифрами PCNA-позитивних ядер ЦТБ і з цієї причини не подаються у табл.2., адже вони дублюються. В ядрах СТБ проміжних зрілих ворсин при нормальних показниках крові у вагітних позитивна реакція на PCNA реєструвалася як дуже рідкісне явище і тому його частота була виражена у проміле (‰) – табл.2. Слід зазначити, що й інтенсивність імуногістохімічного забарвлення була низькою, що видно з величин показника “Середня оптична щільність” ($0,34 \pm 0,012$ відн. од.) та “Середня яскравість” ($119 \pm 4,8$ од.яскравості). При ЗДАВ у проміжних зрілих ворсинах відповідно до ступеня анемії зростає кількість PCNA-позитивних клітин ЦТБ. Факт посилення проліферації ЦТБ у ворсинах плаценти при гіпоксії є відомим, тільки його констатація у плацентах здійснювалася без урахування типу ворсин [4], хоч як ми далі покажемо, це повинно мати місце, адже ворсини різних типів показують неоднакову реакцію. Посилення проліферації ЦТБ в проміжних зрілих ворсинах з наростанням ступеня анемії можна розцінити в першу чергу як регенераторну реакцію трофобласта, що пояснюється знайденими нами різноманітними морфологічними ознаками пошкодження ядер та цитоплазми СТБ.

Таблиця 1

Кількість ядер клітин епітеліального типу в розрахунку на одну ворсину залежно від ступеня залізодефіцитної анемії вагітних

Показник	Нормальні показники крові	Залізодефіцитна анемія I ст.	Залізодефіцитна анемія II ст.	Залізодефіцитна анемія III ст.
ПРОМІЖНІ ЗРІЛІ ВОРСИНИ				
Середня кількість ядер цитотрофобласта на один поперечний зріз ворсини	4,4±0,14	8,9±0,15 <i>P_H<0,001</i>	9,6±0,11 <i>P_H<0,001</i> <i>P_{I/II}=0,007</i>	11,2±0,14 <i>P_H<0,001</i> <i>P_{I/III}<0,001</i> <i>P_{II/III}<0,001</i>
Середня кількість ядер покривного синцитіотрофобласта на один поперечний зріз ворсини	43±1,8	41±1,2 <i>P_H=0,521</i>	40±1,6 <i>P_H=0,248</i> <i>P_{I/II}=0,978</i>	38±1,5 <i>P_H=0,043</i> <i>P_{I/III}=0,209</i> <i>P_{II/III}=0,677</i>
ТЕРМІНАЛЬНІ ВОРСИНИ				
Середня кількість ядер цитотрофобласта на один поперечний зріз ворсини	0,6±0,02	1,6±0,05 <i>P_H<0,001</i>	2,4±0,07 <i>P_H<0,001</i> <i>P_{I/II}<0,001</i>	0,2±0,01 <i>P_H<0,001</i> <i>P_{I/III}<0,001</i> <i>P_{II/III}<0,001</i>
Середня кількість ядер покривного синцитіотрофобласта на один поперечний зріз ворсини	13±0,2	13±0,4 <i>P_H=1</i>	9±0,5 <i>P_H<0,001</i> <i>P_{I/II}<0,001</i>	5±0,2 <i>P_H<0,001</i> <i>P_{I/III}<0,001</i> <i>P_{II/III}<0,001</i>
СТОВБУРОВІ ВОРСИНИ				
Середня кількість ядер цитотрофобласта на один поперечний зріз ворсини	2,2±0,05	3,7±0,09 <i>P_H<0,001</i>	3,0±0,06 <i>P_H<0,001</i> <i>P_{I/II}=0,001</i>	2,0±0,03 <i>P_H=0,009</i> <i>P_{I/III}<0,001</i> <i>P_{II/III}<0,001</i>
Середня кількість ядер покривного синцитіотрофобласта на один поперечний зріз ворсини	128±4,3	125±4,1 <i>P_H=0,996</i>	114±4,4 <i>P_H=0,032</i> <i>P_{I/II}=0,076</i>	99±3,0 <i>P_H=0,002</i> <i>P_{I/III}=0,002</i> <i>P_{II/III}=0,010</i>
n	14	16	18	12

Примітка 1. *P_H*, *P_{I/II}*, *P_{I/III}*, *P_{II/III}* – рівні вірогідності (*P_H*) порівняно з нормою, між анемією I та II ст., I та III ст., II та III ст. відповідно.

Примітка 2. При рівні вірогідності *P*≤0,05 в таблиці здійснене виділення відповідного тексту напівжирним курсивом.

У термінальних ворсинах клітини, які були ідентифіковані як ЦТБ (з урахуванням PCNA-позитивної реакції), зустрічалися з дуже низькою частотою у вагітних з нормальними показниками крові (табл.1), однак разом з наростанням тяжкості ЗДАВ до II ст. відмічалося кількарразове зростання середньої частоти клітин ЦТБ на одну термінальну ворсину. В той же час звертає на себе увагу порівняно низька частота клітин ЦТБ у термінальних ворсинах при ЗДАВ III ст., хоч вона є вищою за показники норми.

Таблиця 2

Середня частка PCNA-позитивних ядер синцитіотрофобласта на одну ворсину залежно від ступеня залізодефіцитної анемії вагітних

Нормальні показники крові	Залізодефіцитна анемія I ст.	Залізодефіцитна анемія II ст.	Залізодефіцитна анемія III ст.
ПРОМІЖНІ ЗРІЛІ ВОРСИНИ			
0,5±0,04 ‰	24,4±2,19 ‰ <i>P_n<0,001</i>	49,5±4,14 ‰ <i>P_n<0,001</i> <i>P_{I/II}<0,001</i>	84,2±3,25 ‰ <i>P_n<0,001</i> <i>P_{I/III}<0,001</i> <i>P_{II/III}=0,001</i>
ТЕРМІНАЛЬНІ ВОРСИНИ			
2,4±0,20 ‰	40,2±2,64 ‰ <i>P_n<0,001</i>	112,1±5,44 ‰ <i>P_n<0,001</i> <i>P_{I/II}<0,001</i>	173,2±5,36 ‰ <i>P_n<0,001</i> <i>P_{I/III}<0,001</i> <i>P_{II/III}<0,001</i>
СТОВБУРОВІ ВОРСИНИ			
8,0±0,29 ‰	12,5±0,40 ‰ <i>P_n<0,001</i>	16,4±0,37 ‰ <i>P_n<0,001</i> <i>P_{I/II}<0,001</i>	23,8±0,55 ‰ <i>P_n<0,001</i> <i>P_{I/III}<0,001</i> <i>P_{II/III}<0,001</i>
14	16	18	12

Примітка 1. P_n , $P_{I/II}$, $P_{I/III}$, $P_{II/III}$ – рівні вірогідності (P_n) порівняно з нормою, між анемією I та II ст., I та III ст., II та III ст. відповідно.

Примітка 2. При рівні вірогідності $P \leq 0,05$ в таблиці здійснене виділення відповідного тексту напівжирним курсивом.

Дуже подібна закономірність спостерігається і для стовбурових ворсин (табл.1), однак можна констатувати і певну відмінність від термінальних ворсин. Зокрема, при III ст. ЗДАВ частота клітин ЦТБ у стовбурових ворсинах є меншою порівняно з частотою цих клітин у вагітних з нормальними показниками крові.

Слід зазначити, що величини показників, які характеризують інтенсивність PCNA-позитивного забарвлення ядер ЦТБ, в середньому не відрізнялися ($p > 0,05$) за групами дослідження.

Оскільки кількість ядер у покривному СТБ різних типів ворсин змінювалася залежно від ступеня ЗДАВ (табл.1), з метою правомірності порівнянь був уведений відносний показник “Середня частка (у проміле – ‰) PCNA-позитивних ядер синцитіотрофобласта на одну ворсину” (табл.2). Згідно встановлених змін величин цього показника відповідно до ступеня ЗДАВ можна вважати, що ядра СТБ всіх вивчених типів ворсин зазнають суттєвих пошкоджень ДНК, на що реагують зростанням процесів репарації ДНК за участю PCNA. Такий висновок підтверджується і вірогідним ($p < 0,05$) зростанням інтенсивності PCNA-позитивного забарвлення ядер СТБ, на що об’єктивно вказували величини показників “Середня оптична щільність” та “Середня яскравість”.

Висновки. 1. Відповідно до ступеня залізодефіцитної анемії вагітних при передчасних пологах має місце суттєва кількісна проліферативна реакція цитотрофобласта ворсин плаценти, причому з певними особливостями залежно від типу ворсин. 2. Для залізодефіцитної анемії вагітних при передчасних пологах характерною є прямопропорційна залежність процесів інтенсивності репарації ДНК у синцитіотрофобласті (згідно до експресії PCNA в ядрах) від ступеня анемії, яка в найбільшій мірі проявляється у проміжних зрілих і термінальних ворсинах і порівняно менше виражена у стовбурових ворсинах. Надалі необхідно вивчити особливості процесів регуляції апоптозу в синцитіотрофобласті ворсин різних типів при залізодефіцитній анемії вагітних з урахуванням даних про особливості експресії PCNA в ядрах синцитіотрофобласта.

Література. 1. Глуховец Б.И., Глуховец Н.Г. Патология последа. – СПб: ГРААЛЬ, 2002. – 448с. 2. Давиденко І.С. Напівавтоматичний кількісний комп’ютерний аналіз мікроскопічного зображення в гістопатології // Бук. мед. вісник. – 2000. – Т.4, №2. – С. 165-169. 3. Сенук А.Я., Задорожная Т.Д., Константинов К.К. Морфо-функциональные и ультраструктурные изменения в плаценте при железodeficitной анемии беременных // Вісник асоціації акушерів-гінекологів України. – 1999. – №4. – С. 25-30. 4. Benirschke K., Kaufmann P. Pathology of the human placenta. – 4th ed. – 2002. – New York:

Springer. – 974 p. 5. Crocker I.P., Tansinda D.M., Baker P.N. Altered cell kinetics in cultured placental villous explants in pregnancies complicated by pre-eclampsia and intrauterine growth restriction // *J. Pathol.* – 2004. – V. 204. – P. 11–18. 6. Hildeman D.A., Mitchell Th., Kappler J., Marrack Ph. T cell apoptosis and reactive oxygen species // *J. Clin. Invest.* – 2003. – V. 111. – P. 575-581. 7. Kilani R.T., Mackova M., Davidge S.T., Guilbert L.J. Effect of oxygen levels in villous trophoblast apoptosis // *Placenta.* – 2003. – V.24. – P.826–834. 8. Kudo Y., Boyd C.A., Sargent I.L., Redman C.W. Hypoxia alters expression and function of syncytin and its receptor during trophoblast cell fusion of human placental BeWo cells: implications for impaired trophoblast syncytialisation in preeclampsia // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2003. – V. 1638. – P. 63-71. 9. Mayhew T.M., Leach L., McGee R. et al. Proliferation, differentiation and apoptosis in villous trophoblast at 13–41 weeks of gestation (including observations on annulate lamellae and nuclear pore complexes) // *Placenta.* – 1999. – V.20. – P.407–422. 10. Myatt L., Cui X. Oxidative stress in the placenta // *Histochem. Cell Biol.* – 2004. – V.122. – P.369–382. 11. Schultz D.R., Harrington W.J. Apoptosis: Programmed cell death at a molecular level // *J. Seminars in Arthritis and Rheumatism.* – V. 32, Is. 6. – 2003. – P. 345-369. 12. Siman C.M., Sibley C.P., Jones C.J., et al. The functional regeneration of syncytiotrophoblast in cultured explants of term placenta // *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* – 2001. – V. 280. – P. 1116–1122.