

О. А. Тюленєва, І. С. Давиденко

## ІМУНОГІСТОХІМІЧНІ ДОСЛІДЖЕННЯ ПРОЦЕСІВ РЕГУЛЯЦІЇ ЧИСЕЛЬНОСТІ КЛІТИН У ХОРІАЛЬНИХ ВОРСИНКАХ ЕКСТРАХОРІАЛЬНИХ ПЛАЦЕНТ

Буковинський державний медичний університет, Чернівці

Однією з найпоширеніших аномалій плаценти є так звана екстрахоріальна плацента. Частота цієї патології коливається у межах 6,3–32,1 % [2; 6]. До неї зараховують плацен-

ту, оточену обідком, — *placenta circummarginata* — і плаценту, оточену валиком, — *placenta circumvallata*. Перша характеризується тим, що плодова оболонка прикріплюється

не до краю плаценти, а на певній відстані, у середньому на 1–3 см від краю [6]. Частина тканини плаценти, що перебуває ззовні за межами прикріплення плодових оболонок, є екст-



рахоріальною. *Placenta circumvallata* відрізняється від *placenta circummarginata* тим, що екстрахоріальна частина плацентарної тканини має збільшений вміст фібриногену, за рахунок чого вона виступає над поверхнею органа, що макроскопічно виглядає як валик. Існує думка, що екстрахоріальна частина плаценти виникає у зв'язку з круговим короточасним відшаруванням плаценти по периферії органа з наступною самоліквідацією відшарування [8]. У наших дослідженнях [5] показано, що екстрахоріальні плаценти мають характерні органометричні ознаки, а саме: при збереженні в середньому загального об'єму органа, проте, йстотно зменшується площа його найбільшого перетину, але зростає середня товщина. Такі макроскопічні особливості будови екстрахоріальних плацент спонукають до спроб виявлення морфогенетичних причин їхнього розвитку, для чого в даному дослідженні були застосовані методи вивчення локальної регуляції чисельності клітин, насамперед — процесів клітинної проліферації й апоптозу.

**Мета** даної роботи — імуногістохімічними методами встановити особливості процесів проліферації й апоптозу епітеліальних і стромальних клітин хоріальних ворсинок екстрахоріальних плацент.

#### **Матеріали та методи дослідження**

У синцитіотрофобласті (СТ) та стромальних клітинах (СК) хоріальних ворсинок 14 екстрахоріальних плацент (дослідна група) і 16 плацент типової дископодібної форми при фізіологічній вагітності й пологах (контрольна група) імуногістохімічними методами вивчено відсоток апоптотичних ядер (апоптотичний індекс), вміст і розподіл проапоптотичного цитозольно-мітохондріального протеїну Вах (Bcl-2 асоційований протеїн X) і протиапопто-

тичного мітохондріального протеїну Bcl-2 (oncoprotein B-cell lymphoma-2), які належать до сімейства Bcl-2 протеїнів [7]. Для ідентифікації апоптотичних клітин (з характерними для апоптозу міжнуклеосомальними розривами ДНК) використали метод TUNEL із застосуванням тест-системи TACS XL™ (R&D Systems, Inc., USA) з наступним забарвленням клітинних ядер (ядерної ДНК) метиловим зеленим. Для імуногістохімічної ідентифікації протеїнів Вах і Bcl-2 використали первинні антитіла до цих антигенів і стрептавідинбіотинову систему візуалізації LSAB2 (пероксидазна мітка + діамінобензидин) виробника DakoCytomation (Denmark — USA). До забарвлення ядер виконували гематоксиліном Майєра. Для ідентифікації проліферуючих клітин застосували імуногістохімічний метод виявлення проліферативно-клітинного нуклеарного антигену (PCNA — від англ. "Proliferating Cell Nuclear Antigen") [3].

Максимально дотримувалися стандартизації протоколів методик для всіх гістологічних зрізів. Кількісні дослідження проводили у такий спосіб. Спочатку одержували цифрові копії (з роздільною здатністю 1600x1200 пікселів) оптичного зображення фрагментів хоріальних ворсинок при використанні цифрової камери Olympus C740UZ та об'єктива мікроскопа x70 (водна імерсія). Потім цифрові копії зображення аналізували за допомогою ліцензійної копії комп'ютерної програми «Видеотест — Размер 5.0» (ООО Видеотест, Россия), а саме: проводили комп'ютерну мікроденситометрію місць специфічного забарвлення й підрахунок апоптотичних і PCNA-позитивних клітин. Мікроденситометричний аналіз здійснювали на підставі зондових замірів за площею зрізу цитоплазми за двома показниками:

«середня яскравість» (в умовних одиницях) «відхилення яскравості» (в умовних одиницях) [4]. При виконанні морфометричних досліджень дотримувалися принципу кількісної та якісної репрезентативності структур [1]. Статистичне порівняння середніх величин здійснювали за допомогою непарного критерію Стьюдента з попередньою перевіркою вибірок щодо нормального розподілу за допомогою критерію Уїлкі — Хана — Шапіро.

#### **Результати дослідження та їх обговорення**

У плацентах контрольної групи роздільно досліджували котиледони центрально-парацентральних і периферійних відділів органа. В екстрахоріальних плацентах окремо вивчали котиледони екстрахоріальної (з точки зору локалізації — периферійної) частини органа та котиледони центрально-парацентральних відділів.

У результаті проведених досліджень отримано такі результати. У гістологічних препаратах різних відділів плаценти домінували термінальні, проміжні зрілі та стовбурові хоріальні ворсинки. Проліферативна активність відмічалася майже виключно у цитотрофобласті, що було видно за позитивним забарвленням при імуногістохімічному визначенні антигену PCNA. Дуже рідко PCNA-позитивні ядра визначалися серед ендотеліоцитів, перицитів і фібробластів. Їх незначна кількість не дозволила провести статистичну обробку даних щодо проліферації цих клітин, тому основні результати стосуються проліферативної активності цитотрофобласта. Дані про середню кількість PCNA-позитивних ядер цитотрофобласта в розрахунок на один поперечний зріз ворсинки залежно від типу ворсинки та локалізації котиледону подано у таблиці. З наведених даних видно, що у центрально-парацентральних відділах статис-



Таблиця

**Середня кількість PCNA-позитивних ядер цитотрофобласта на один поперечний зріз ворсинки залежно від типу ворсинки та локалізації котиледону,  $M \pm m$**

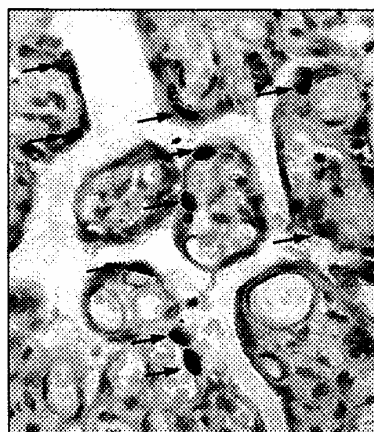
Центрально-парацентральні котиледони плацент контрольної групи, n=16	Центрально-парацентральні котиледони екстрахоріальних плацент, n=14	Периферійні котиледони плацент контрольної групи, n=16	Екстрахоріальні (периферійні) котиледони екстрахоріальних плацент, n=14
Проміжні зрілі ворсинки			
6,40±0,18	6,80±0,19 P=0,144	2,70±0,08	0,90±0,02 P<0,001
Термінальні ворсинки			
2,40±0,19	2,90±0,22 P=0,096	1,60±0,10	0,80±0,13 P=0,003
Стовбурові ворсинки			
2,20±0,14	2,60±0,18 P=0,090	2,00±0,09	0,40±0,05 P<0,001

*Примітка.* Розбіжності між групами дослідження обрховані за критерієм Стьюдента.

тично значущої різниці між екстрахоріальними плацентами і плацентами контрольної групи немає, хоч вірогідності, близькі до  $P=0,1$ , в статистиці прийнято вважати проявом тенденції. Тобто наведені дані дозволяють зробити висновок про тенденцію до збільшення проліферативної активності цитотрофобласта хоріальних ворсинок, які розташовані у центрально-парацентральних відділах екстрахоріальних плацент, порівняно з фізіологічно вагітністю. У периферійних відділах виявлено вже не тенденцію, а високовірогідну відмінність між групами дослідження, яка дозволяє констатувати 2–5-разове (залежно від типу ворсинки) зменшення проліферативної активності цитотрофобласта хоріальних ворсинок в екстрахоріальних плацентах порівняно з плацентами звичайної будови. Описані відмінності ілюструє рис. 1.

Апоптотичний індекс (згідно до методики TUNEL) у СТ центрально-парацентральних котиледонів екстрахоріальних плацент становив:  $(1,10 \pm 0,03)$  (у контролі —  $(1,20 \pm 0,04)$ ;  $P=0,055$ ), периферійних котиледонів —  $(6,4 \pm 0,9)$  (у контролі —  $(2,40 \pm 0,06)$ ;  $P=0,004$ ). Аналогічна закономірність від-

мічалась і щодо СК, зокрема величина апоптотичного індексу в них у центрально-парацентральних котиледонах екстрахоріальних плацент становила  $(2,50 \pm 0,07)$  (у контролі —  $(2,70 \pm 0,09)$ ;  $P=0,089$ ), у периферійних котиледонах —  $(7,0 \pm 1,2)$  (у контролі —  $(3,30 \pm 0,08)$ ;  $P=0,005$ ). Вказані середні цифри стосуються всіх типів хоріальних ворсинок, адже різниці в апоптотичній



а



б

*Рис. 1.* Проліферативна активність у термінальних хоріальних ворсинках: а — контроль (котиледон з периферійного відділу); б — екстрахоріальна плацента (екстрахоріальний котиледон). Стрілками позначені PCNA-позитивні ядра. Імуногістохімічна методика з первинними антитілами до антигену PCNA та візуалізацією первинних антитіл стрептавідин-біотиним методом із використанням діамінобензидину. Дозабарвлення клітинних ядер гематоксиліном Майєра. Мікрофотографії. Об. 70 $\times$  (водна імерсія). Ок. 7 $\times$ .

активності серед різних типів ворсинок не виявлено. Наведені дані свідчать про посилений апоптоз в епітеліальних і стромальних клітинах хоріальних ворсинок у периферійних котиледонах екстрахоріальних плацент порівняно з плацентами звичайної будови, але виявляють і протилежну тенденцію щодо центрально-парацентральних котиледонів.

Аналіз отриманих фактів здійснювали за допомогою імуногістохімічної оцінки вмісту та стану тих про- і протиапоптотичних факторів, яким згідно до сучасних поглядів належить провідна роль у апоптозі клітин хоріальних ворсинок — протеїнів Вах та Bcl-2. Так, при імуногістохімічному виявленні протеїну Вах величина показника «середня яскравість» у цитоплазмі СТ центрально-парацентральних відділів екстрахоріальних плацент становила  $(91,0 \pm 4,9)$  ум.од. (у контролі —  $(104,0 \pm 6,2)$  ум.од.;  $P=0,110$ ), а в периферійних відділах —  $(71,0 \pm 1,9)$  ум.од. (у контролі —  $(102,0 \pm 4,8)$  ум.од.;  $P=0,002$ ). У СК хоріальних ворсинок центрально-парацентральних відділів екстрахорі-

альних плацент величина показника «середня яскравість» дорівнювала (78,0±2,9) ум.од. (у контролі — (86,0±3,9) ум. од.; P=0,112), а у периферійних відділах — (61,0±1,7) ум. од. (у контролі — (82,0±5,3) ум. од.; P=0,007). Оскільки величина показника «середня яскравість» є протилежною інтенсивності забарвлення, наведені цифрові значення вказують на більшу концентрацію протеїну Вах у цитоплазмі СТ і СК у периферійних котиледонах екстрахоріальних плацент порівняно з плацентами звичайної будови. Окрім змін у середньому вмісті протеїну Вах виявлено і морфологічні ознаки його активації (гомоолігомеризації та підсиленої транслокації у органели), про що судили за збільшенням показника «відхилення яскравості» у названих клітинах хоріальних ворсинок периферійних відділів екстрахоріальних плацент порівняно з плацентами звичайної будови. Описані зміни у середньому вмісті та розподілі протеїну Вах у клітинах хоріальних ворсинок подано на рис. 2.

Щодо протиапоптотичного протеїну Bcl-2, то згідно з імуногістохімічними даними його

вміст визначався тільки у СТ. Величина показника «середня яскравість» у СТ хоріальних ворсинок центрально-парацентрального відділів екстрахоріальних плацент становила (108,0±2,6) ум. од. (у контролі — (106,0±4,2) ум. од.; P=0,689), а в периферійних відділах — (157,0±3,1) ум. од. (у контролі — (107,0±2,8) ум. од.; P<0,001). Наведені значення вказують на суттєве зниження концентрації протеїну Bcl-2 у СТ хоріальних ворсинок у периферійних відділах екстрахоріальних плацент порівняно з плацентами звичайної будови.

### Висновки

1. В екстрахоріальних (периферійних) котиледонах екстрахоріальних плацент порівняно з периферійними котиледонами плацент звичайної будови є знижена проліферативна активність цитотрофобласта хоріальних ворсинок, причому вона виражена в різному ступені залежно від їх типу: стовбурові, проміжні зрілі й термінальні ворсинки.

2. В екстрахоріальних котиледонах екстрахоріальних плацент порівняно з периферійними котиледонами плацент звичайної будови вияв-

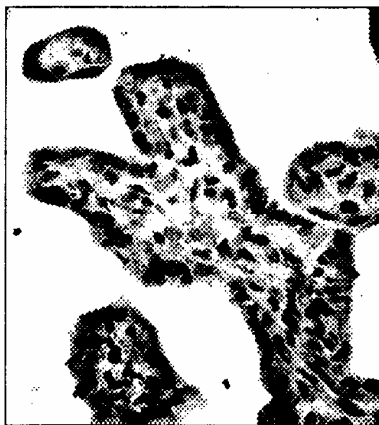
лено підвищений рівень апоптозу синцитіотрофобласта і стромальних клітин хоріальних ворсинок, що пояснюється підвищенням вмістом і зростанням активності проапоптотичного протеїну Вах у синцитіотрофобласті та у стромальних клітинах ворсинок, а також зниженням вмісту протиапоптотичного протеїну Bcl-2 у синцитіотрофобласті.

### Перспектива подальших досліджень

У подальшому, окрім виявленого в даному дослідженні горизонтального гетероморфізму проліферативної та апоптотичної активності клітин хоріальних ворсинок екстрахоріальних плацент, планується дослідити вертикальний гетероморфізм цих процесів.

### ЛІТЕРАТУРА

1. Автандилов Г. Г. Основы количественной патологической анатомии. — М.: Медицина, 2002. — 240 с.
2. Давиденко І. С., Коваль Ю. І. Деякі аспекти індивідуальної мінливості форми плаценти людини в нормі і при анемії вагітних // Вісн. проблем біології і медицини. — 2003. — Вип. 4. — С. 57-59.
3. Давиденко І. С., Задорожна Т. Д. Експресія проліферативно-клітинного нуклеарного антигену в ядрах трофобласта хоріальних ворсин плаценти при залізодефіцитній анемії вагітних // Перинатологія і педіатрія. — 2005. — № 1-2 (23). — С. 22-25.
4. Давиденко І. С. Імуногістохімічний розподіл протеїнів Вах та Bcl-2 у клітинах Гофбауера плаценти при залізодефіцитній анемії вагітних // Буковин. мед. вісник. — 2005. — Т. 9, № 3. — С. 88-91.
5. Тюльсєва О. А., Давиденко І. С., Коваль Ю. І. Органометричні параметри екстрахоріальних плацент при фізіологічній вагітності та при хронічній плацентарній недостатності // Клін. анатомія та опер. хірургія. — 2004. — Т. 3, № 4. — С. 36-40.
6. Benirschke K., Kaufmann P. Pathology of the Human Placenta. — 4<sup>th</sup> ed. — New York: Springer-Verlag, 2000. — 974 p.
7. Burlacu A. Regulation of apoptosis by Bcl-2 family proteins // J. Cell. Mol. Med. — 2003. — Vol. 7, N 3. — P. 249-257.
8. Kraus F. T. Perinatal pathology, the placenta and litigation // Human pathology. — 2003. — Vol. 34, N 6. — P. 517-520.



а



б

Рис. 2. Вміст проапоптотичного протеїну Вах у проміжних зрілих і термінальних ворсинках: а — контроль (котиледон з периферійного відділу); б — екстрахоріальна плацента (екстрахоріальний котиледон). Імуногістохімічна методика з первинними антитілами до протеїну Вах та візуалізацією первинних антитіл стрептавідин-біотинним методом із використанням діамінобензидину. Дозабарвлення клітинних ядер гематоксилином Майєра. Мікрофотографії. Об. 70<sup>х</sup> (водна імерсія). Ок. 7<sup>х</sup>.