

ІМУНОГІСТОХІМІЧНІ ДОСЛІДЖЕННЯ ГОРМОНІВ ТРОФОБЛАСТА ХОРІАЛЬНИХ ВОРСИН В АСПЕКТІ ПЛАЦЕНТАРНОЇ НЕДОСТАТНОСТІ У РАННІ ТЕРМІНИ ГЕСТАЦІЇ

І.В. КАЛІНОВСЬКА, І.С. ДАВИДЕНКО

Буковинський державний медичний університет, м. Чернівці

Резюме. Проведены иммуногистохимические количественные исследования гормонов трофобласта хориальных ворсин в ранние сроки гестации (5–12 недель). Установлено, что в принципе может развиваться два типа плацентарной недостаточности, общими чертами которых является снижение васкуляризации хориальных ворсин. Первый тип характеризуется снижением концентрации хорионического гонадотропина и плацентарного лактогена в трофобласте, морфологическими проявлениями торможения развития хориальных ворсин с усиленным образованием цитотрофобласта хориальных ворсин. Второй тип проявляется возрастанием концентрации указанных гормонов в трофобласте и снижением процессов образования цитотрофобласта хориальных ворсин.

Ключевые слова: хорионический гонадотропин, плацентарный лактоген, трофобласт хориальных ворсин, плацентарная недостаточность.

Summary. The immunohistochemical quantitative investigations of hormones of trophoblast of chorionic villi were made at early stages of pregnancy (5–12 weeks). It was established that in principle may developed two types of placental (villous) insufficiency, and the common sings of its are decreased of vascularization of chorionic villi. The first type is described as decreased concentration of chorionic gonadotropin and placental lactogen in the trophoblast, morphological sings of slowdown of development of chorionic villi with increasing formation of cytotrophoblast of chorionic villi. The second type show itself increasing of concentration of this hormones in the trophoblast and decreasing of processes of formation of cytotrophoblast of chorionic villi.

Keywords: chorionic gonadotropin, placental lactogen, trophoblast of chorionic villi, placental insufficiency.

ГОРМОНИ трофобласта хоріальних ворсин (ХВ) плаценти відіграють значну роль у процесах формування структур та функцій плода [2, 4, 11] і тому їх кількісна оцінка може служити важливим критерієм плацентарної недостатності. Імуногістохімічними методами можна ефективно вивчати такі гормони трофобласта, як хоріонічний гонадотропін (ХГТ) [5, 10] та плацентарний лактоген (ПЛГ) [1, 5]. Рівень вказаних гормонів впливає не тільки на антропологічні параметри та функціональний стан плода [2–4], але й відіграє суттєву роль у

формуванні структур самої плаценти, зокрема, її ХВ, причому вважається, що ХГТ має більше клінічне значення у ранні терміни гестації, а ПЛГ – у пізні [5]. В аспекті плацентарної недостатності імуногістохімічні дослідження ХГТ та ПЛГ хоріона дотепер не проводилися.

Мета дослідження полягала у кількісному встановленні комп'ютерно-мікроденситометричним та імуногістохімічним методом концентрації хоріонічного гонадотропіну та плацентарного лактогену у трофобласті хоріальних ворсин плаценти в ранні терміни гестації з оцінкою

перспективи використання результатів таких вимірювань в розумінні патогенезу плацентарної недостатності I триместру вагітності.

Матеріали та методи

Досліджували матеріал самовільних викиднів 5–12 тижнів гестації, не пов'язаних із запальним процесом, травмами, генетичними порушеннями у плода (28 спостережень – основна група). Контролем був аналогічний за терміном вагітності матеріал абортів від практично здорових жінок за соціальними показаннями (16 випадків). Матеріал фіксували протягом 22 годин у 10%-вому розчині нейтрального забуференого формаліну, який після зневоднювання у висхідній батареї етанолу заливали в парафін. На парафінованих зрізах стандартної товщини (5 мкм) ставили імуногістохімічні реакції з первинними антитілами виробника DakoCytomation (Denmark-USA) проти двох гормонів плаценти – ХГТ та ПЛГ. Для візуалізації первинних антитіл, які приєдналися у гістологічних зрізах до відповідних антигенів на структурах плаценти, застосовували стрептавідин-біотинову систему візуалізації LSAB2 з діамінобензидином вищевказаного виробника. Клітинні ядра забарвлювали гематоксиліном Грота, який при експозиції 10 с при 20°C забарлює тільки ядерний хроматин.

За допомогою мікроскопа ЛЮМАМ-Р8 та цифрової камери Olympus C740UZ оптичні зображення ХВ переводили у цифрові (формат комп'ютерного графічного файлу TIFF без компресії), а останні аналізували за допомогою ліцензійної копії комп'ютерної програми ВідеоТест – розмір 5.0 (ООО Видеотест, Санкт-Петербург, Росія) з вимірюванням зондовим методом показника оптичної густини (метод комп'ютерної мікроденситометрії) в позитивно забарвлених ділянках цитоплазми трофобласта ХВ [1]. Зазначений показник кількісно (об'єктивно) відображає концентрацію певного визначеного гормону, тому застосовували параметричні методи статистики. Зокрема, статистичні зіставлення між групами дослідження здійснювали за допомогою непарного двостороннього критерію Ст'юдента для рівних та нерівних дисперсій (для виявлення середніх тенденцій) та методу Фішера (для виявлення розбіжності у ступені варіювання), попередньо перевірявши гіпотезу про нормальність розподілу у виборках за допомогою критерію Уїлки-Хана-Шапіро та оцінивши рівність дисперсій за допомогою критерію Левене. Всі статистичні обрахунки виконано за допомогою ліцензійної копії комп'ютерної програми Statistica® (StatSoft, Inc., Release 5.1, 1996).

З оглядовою метою додаткові гістологічні зрізи забарвлювали гематоксиліном і еозином.

Результати досліджень та їх обговорення

Місця вмісту гормонів ХГТ та ПЛГ за результатами застосування імуногістохімічного методу ідентифікували за коричневим забарвленням, яке мало дрібногранулярний характер та

поміж всіх структур ХВ виявлялося виключно в цитотрофобласті та синцитіотрофобласті. Гранули у цитотрофобласті мали приблизно вдвічі слабше забарвлення, ніж у синцитіотрофобласті, що, напевно, відображає ступінь дозрівання трофобласта від його менш зрілої форми – цитотрофобласта до більш зрілої – синцитіотрофобласта. Загальна інтенсивність забарвлення мала різну вираженість як серед різних ХВ в межах кожного спостереження, так і в середньому від спостереження до спостереження.

Оптична густина забарвлення на ХГТ у трофобласті ХВ у контрольній групі становила $0,215 \pm 0,0024$ ум. од. з діапазоном $0,196-0,234$ ум. од. В основній групі оптична густина забарвлення на ХГТ складала $0,213 \pm 0,0119$ ум. од. з діапазоном $0,087-0,338$ ум. од. Оскільки за критерієм Фішера попередньо встановлено неоднакової сили варіювання у групах дослідження ($p < 0,001$), було застосовано критерій Ст'юдента для нерівних дисперсій, який не виявив статистичної різниці у середніх тенденціях ($p > 0,05$). Аналіз гістограм в основній групі виявив двогорбий розподіл даних з великим провалом у центрі, який саме і відповідав діапазону контрольної групи. Таким чином, встановлено, що значні коливання показника «оптична густина» щодо вмісту ХГТ у трофобласті ХВ в основній групі насправді зумовлені двома різновидами патології, одна з яких супроводжується зменшенням концентрації ХГТ (13 спостережень – основна група А), а інша – навпаки, її зростанням (15 спостережень – основна група Б). Зокрема, у групі А оптична густина забарвлення на ХГТ становила $0,136 \pm 0,0068$ ум. од. з діапазоном $0,087-0,185$ ум. од., у групі Б – $0,291 \pm 0,0061$ ум. од. з діапазоном $0,244-0,338$ ум. од. Оскільки за критерієм Уїлки-Хана-Шапіро у основних групах А та Б показаний нормальний розподіл даних, а критерій Левене не виявив різниці дисперсій, було застосовано критерій Ст'юдента для рівних дисперсій, який показав, що як основна група А, так і Б суттєво ($p < 0,001$) відрізняються в середніх тенденціях від контрольної групи.

Для ілюстрації кількісних даних наводимо приклади мікрофотографій спостережень щодо ХГТ контрольної групи (рис. 1), основної групи А (рис. 2) та основної групи Б (рис. 3).

Щодо ПЛГ було виявлено такі ж закономірності, як і для ХГТ, причому відмічалася абсолютна позитивна кореляція між вмістом обох гормонів, тобто всі спостереження вмісту ХГТ нижче норми (контролю) відповідали вмісту нижче норми ПЛГ і навпаки. Зокрема, оптична густина забарвлення цитоплазми цитотрофобласта за імуногістохімічного визначення ПЛГ складала: у контрольній групі – $0,201 \pm 0,0025$ ум. од. з діапазоном $0,182-0,220$ ум. од., в основній групі А – $0,121 \pm 0,0064$ ум. од. з діапазоном $0,074-0,167$ ум. од., в основній групі Б – $0,315 \pm 0,0085$ ум. од. з діапазоном $0,249-0,380$ ум. од. Розбіжність показників основних груп з

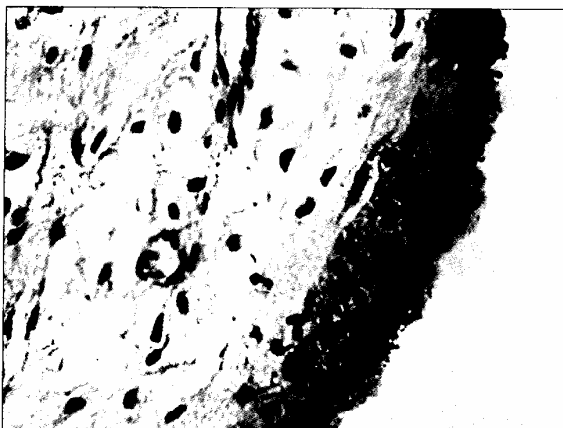


Рис. 1. Контроль. Аборт за соціальними показаннями, матеріал 8 тижнів гестації. Імуногістохімічне визначення хоріонічного гонадотропіну. Дозабарвлення клітинних ядер гематоксилином Грота. Оптична густина позитивного забарвлення – 0,214 ум. од. Об. 40х. Ок. 10х



Рис. 2. Матеріал викидня у 8 тижнів гестації. Основна група А. Імуногістохімічне визначення хоріонічного гонадотропіну. Дозабарвлення клітинних ядер гематоксилином Грота. Оптична густина ділянок позитивного забарвлення – 0,142 ум. од. Об. 40х. Ок. 10х

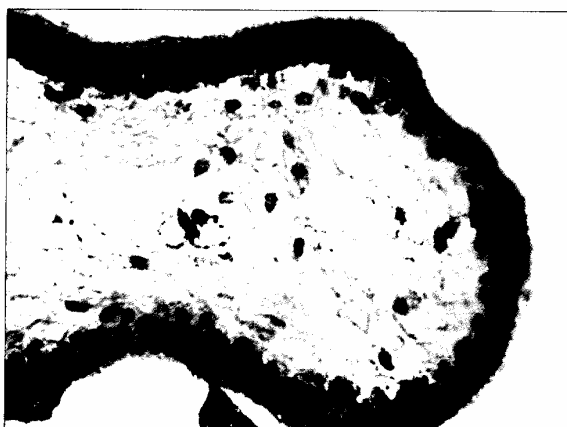


Рис. 3. Матеріал викидня у 8 тижнів гестації. Основна група Б. Імуногістохімічне визначення хоріонічного гонадотропіну. Дозабарвлення клітинних ядер гематоксилином Грота. Оптична густина ділянок позитивного забарвлення – 0,336 ум. од. Об. 40х. Ок. 10х

контрольною за критерієм Ст'юдента для рівних дисперсій високодостовірна ($p < 0,001$).

Гістопатологічні дослідження в основних групах виявили певні закономірності. Так, у основній групі А (з низькою концентрацією ХГТ та ПЛГ у трофобласті ХВ) відмічалися морфологічні особливості ХВ, які вказували на гальмування процесів їх дозрівання. Зокрема, порівняно з контрольними показниками зафіксовано знижену середню кількість кровоносних судин на одну ХВ до $1,2 \pm 0,07$ (у контрольній групі – $2,1 \pm 0,05$; $p < 0,001$), потовщення трофобласта до $21,2 \pm 0,47$ мкм (у контролі – $16,6 \pm 0,39$ мкм; $p < 0,001$), більшу середню кількість клітин цитотрофобласта на одну ХВ – $37,2 \pm 0,83$ (проти $33,9 \pm 0,97$ у групі контролю; $p = 0,016$). У основній групі Б (з підвищеною концентрацією ХГТ та ПЛГ у трофобласті), як і основній групі А, середня кількість кровоносних судин на одну ХВ була зменшена до $1,6 \pm 0,08$ ($p = 0,002$), але товщина трофобласта була меншою ($15,0 \pm 0,32$; $p = 0,012$), при цьому мало місце зниження середньої кількості клітин цитотрофобласта на одну ХВ до $21 \pm 0,85$ ($p < 0,001$). Якщо зниження загальної товщини трофобласта легко пояснити зниженням середньої кількості клітин цитотрофобласта на одну ХВ, то зменшення числа кровоносних судин у ХВ в обох основних групах дослідження вимагає в подальшому окремого аналізу. Як робочу гіпотезу, на підставі відомих на сьогодні фактів про молекулярні фактори ангіо- та васкулогенезу в плаценті [7], можна припустити, що низька концентрація ХГТ та ПЛГ призводить до порушення продукції клітинами ХВ васкулярного ендотеліального фактора росту (VEGF) [9], що і викликає порушення процесів фізіологічного утворення кровоносних судин ХВ [6, 8]. Щодо спостережень збільшеної концентрації ХГТ та ПЛГ у трофобласті ХВ можна припустити, що для нормального перебігу процесів ангіо- та васкулогенезу в ХВ потрібен не тільки VEGF, а й інші молекулярні фактори, які виробляються цитотрофобластом ХВ в недостатній кількості, що відбувається, можливо, з причини простого зменшення числа названих клітин. Обидва варіанти описаної патології щодо ХГТ та ПЛГ (менша та більша їх концентрація у трофобласті ХВ) у поєднанні з певною морфологічною картиною, на нашу думку, є молекулярно-структурною основою відповідно двох типів плацентарної (вільозної) недостатності у ранні терміни гестації.

Висновки

У ранні терміни гестації (5–12 тижнів) може розвиватися два типи плацентарної (вільозної) недостатності, спільними рисами яких є зниження васкуляризації хоріальних ворсин. Перший тип характеризується зниженням концентрації хоріонічного гонадотропіну та плацентарного лактогену у трофобласті, морфологічними проявами гальмування розвитку хоріальних ворсин з підсиленням утворенням цитотро-

фобласта хоріальних ворсин. Другий тип проявляється зростанням концентрації вказаних гормонів та зниженням процесів утворення цитотрофобласта хоріальних ворсин.

Перспектива подальших досліджень полягає у встановленні кореляцій концентрації хоріоніч-

ного гонадотропіну та плацентарного лактогену у трофобласті хоріальних ворсин із вмістом цих гормонів у крові вагітних, а також у дослідженнях молекулярних механізмів порушеного ангіо- та васкулогенезу хоріальних ворсин в зв'язку зі змінами концентрацій вказаних гормонів.

Список літератури

1. Давиденко І.С., Задорожня Т.Д. Иммуногистохимия плацентарного лактогена с помощью компьютерной микроденситометрии в синцитиотрофобласте плаценты в связи с железодефицитной анемией беременных. *Здоровье женщины* 2005; 2 (22): 35–38.
2. Заболотна М.Л. Пролактин, хоріонічний гонадотропін, кортизол та простагландин Е2 в крові вагітних з галактореєю при недоношуванні вагітних. *Педіатрія, акушерство та гінекологія* 2003; 1: 89–91.
3. Каліновська І.В., Кравченко О.В., Ніцович Р.М. Оцінка ендокринної функції плаценти і фетоплацентарного комплексу. *Клінічна анатомія та оперативна хірургія* 2005; 4 (2): 91–95.
4. Шмагель К.В., Черешнев В.А. Плацентарный лактоген: функции, клиническое значение. *Акушерство и гинекология* 2003; 3: 9–12.
5. Benirschke K., Kaufmann P. *Pathology of the human placenta*. 4th ed. New York: Springer; 2000.
6. Carmeliet P., Collen D. Molecular basis of angiogenesis: role of VEGF and VE-cadherin. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 2000; 902 (1): 249–264.
7. Charlock-Jones D.S., Kaufmann P., Mayhew T.M. Aspects of human fetoplacental vasculogenesis and angiogenesis. I. Molecular regulation. *Placenta* 2004; 25: 103–113.
8. Ferrara N. Role of vascular endothelial growth factor in regulation of physiological angiogenesis. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* 2001; 280 (6): 1358–1366.
9. Islami D., Bischof P., Chardonnens D. Modulation of placental vascular endothelial growth factor by leptin and hCG. *Mol. Hum. Reprod.* 2003; 9 (7): 395–398.
10. Zygmunt M., McKinnon T., Herr F. HCG increases trophoblast migration in vitro via the insulin-like growth factor-II/mannose-6 phosphate receptor. *Mol. Hum. Reprod.* 2005; 11: 261–267.
11. Wooding F.B.P., Morgan G., Fowden A.L., Allen W.R. A structural and immunological study of chorionic gonadotropin production by trophoblast girdle and cup cells. *Placenta* 2001; 22: 749–767.