

І.С.Давиденко, В.П.Пішак, М.Ю.Коломосць, І.Й.Сидорчук, О.В.Пішак, І.Ф.Курченко

АПОПТОЗ У СТРОМАЛЬНИХ КЛІТИНАХ ПРОМІЖНИХ ЗРІЛИХ ВОРСИН ПЛАЦЕНТИ ПРИ ЗАЛІЗОДЕФІЦИТНІЙ АНЕМІЇ ВАГІТНИХ

Буковинський державний медичний університет, м.Чернівці

Резюме. Імуногістохімічними (метод *TUNEL*, визначення антигенів *CD95, Bax, Bcl-XS, Bcl-2, Mcl-1, Bcl-XL*) та гістологічними методами досліджено процеси апоптозу в стромальних клітинах проміжних зрілих хоріальних ворсин при залізодефіцитній анемії вагітних. Встановлено, що при цій хворобі знижуються процеси апоптозу в стромальних клітинах проміжних зрілих хоріальних ворсин, що негативно впливає на дозрі-

вання цих ворсин до термінальних хоріальних ворсин. Головним молекулярним механізмом названих порушень є зменшення переходу неактивної цитозольної мономерної форми протеїну *Bax* в активні гомодимерну чи гомоолігомерну форми.

Ключові слова: залізодефіцитна анемія вагітних, плацента, стромальні клітини проміжних зрілих хоріальних ворсин, апоптоз.

Вступ. У попередніх дослідженнях показано, що при залізодефіцитній анемії вагітних (ЗДАВ) часто трапляється порушення дозрівання хоріального дерева [2], причому це реєструється в різні періоди гестації [3]. Найбільш характерним для ЗДАВ є такі варіанти порушення дозрівання плаценти, коли збільшується відсоток проміжних зрілих хоріальних ворсин (ХВ), але зменшується відсоток термінальних ХВ [3]. Дисперсійний аналіз із використанням методу Снедекора для обчислення величини впливу показав, що найбільший вплив ЗДАВ чинить саме на два названі типи ХВ [4]. Враховуючи вищевикладені обставини, а також те, що термінальні ХВ утворюються з проміжних зрілих ХВ [7], причому при цій трансформації найбільших змін зазнає строма ХВ із зменшенням числа її клітин, слід передбачати, що є перспективним вивчення різних аспектів відмирання (апоптозу, некрозу) та виживання стромальних клітин ХВ (фібробластів, міофібробластів, перицитів, клітин Гофбауера). Останні в аспекті апоптозу вже вивчали у ХВ у ситуації, коли вони зберігають свої основні морфологічні риси, і тому можуть бути ідентифіковані [5]. Коли ж апоптотичні та некротичні процеси прогресують, клітини набувають таких змін, які не дозволяють встановити їх генез, то ж є можливим констатувати лише їх локалізацію – стромальну [7]. Принципову ураженість стромальних клітин ХВ при гіпоксії (яка характерна для ЗДАВ) та викликано-

му нею оксидативному стресі показано як *in vivo* [9], так і в експериментах з культурою різних клітин ХВ [6]. Однак проведені дослідження не використовували диференціювання типів ХВ, хоч саме такий підхід потенційно може створити підґрунтя для пояснення порушень дозрівання хоріального дерева.

Мета дослідження. Встановити роль процесів апоптозу стромальних клітин проміжних зрілих ворсин плаценти в порушеннях їх дозрівання при залізодефіцитній анемії вагітних.

Матеріал і методи. Вивчено 64 плаценти при ЗДАВ, а для порівняння – 30 плацент при фізіологічній вагітності. Випадків із ЗДАВ I ст. було 23, II ст. – 21, III ст. – 20. Термін гестації – 32-40 тижнів. Для вивчення експресії проапоптотичного антигену *CD95 (Apo-1, Fas)* за допомогою відповідних антитіл та авідинбіотинової системи візуалізації АВС використовували кріостатні зрізи плацентарної тканини. Решта імуногістохімічних методик та оглядове гістологічне дослідження при забарвленні гематоксиліном і еозинном виконували на парафінових зрізах. Для ідентифікації клітин із характерними для апоптозу розривами ДНК використовували метод *TUNEL* [1,10] із застосуванням тест-системи TACS XL™ (R&D Systems, Inc., USA) з дозбарвленням клітинних ядер (ядерної ДНК) метиловим зеленим. Для імуногістохімічної ідентифікації проапоптотичних (протеїнів *Bax* та *Bcl-XS*) та протиапопто-

тичних (протеїнів *Bcl-2*, *Mcl-1*, *Bcl-XL*) молекулярних факторів використали первинні антитіла до цих антигенів та стрептавідинбіотинову 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. Спочатку отримували цифрові копії оптичного зображення фрагментів проміжних зрілих ХВ при використанні об'єктива мікроскопа $\times 70$ (водна імерсія). Потім цифрові копії зображення аналізували за допомогою ліцензійної копії комп'ютерної програми "Видеотест – Розмер 5.0" (ООО Видеотест, Россия) – проводили комп'ютерну денситометрію. Аналіз здійснювався 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-Уілкі обраховували середню арифметичну та її похибку, а потім 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.

При забарвленні ядер гематоксилін-еозином можна підрахувати кількість елементів з морфологічними ознаками апоптозу – конденсація та маргінація хроматину, відсутність ядерців при заокругленості форми клітини, вільні та фагоцитовані

апоптотичні тільця. Кількість таких елементів становила: при фізіологічній вагітності $2,4 \pm 0,09$ на один поперечний зріз проміжної зрілої ХВ, при ЗДАВ I ст. – $2,1 \pm 0,08$ ($p=0,018$), при ЗДАВ II ст. – $1,9 \pm 0,06$ ($p=0,003$), при ЗДАВ III ст. – $1,6 \pm 0,07$ ($p < 0,001$). Фагоцитовані апоптотичні тільця можна було бачити в клітинах фібробластичного типу та клітинах Гофбауєра. Останні хоч і не характерні для проміжних зрілих ХВ [7], все ж при ЗДАВ часто в них траплялися (рис.1 а, б).

Оскільки для повної ідентифікації апоптотичних клітин необхідно використовувати комплексний підхід, зокрема застосовувати методи виявлення ранніх апоптотичних змін у клітинах [1], застосований метод ідентифікації клітин з міжнуклеосомальними розривами ядерного ДНК – метод *TUNEL*. Згідно з цим методом кількість *TUNEL*-позитивних стромальних структур становила: при фізіологічній вагітності $3,7 \pm 0,08$ на один поперечний зріз проміжної зрілої ХВ, при ЗДАВ I ст. – $3,4 \pm 0,11$ ($p=0,034$), при ЗДАВ II ст. – $2,5 \pm 0,09$ ($p < 0,001$), при ЗДАВ III ст. – $2,1 \pm 0,08$ ($p < 0,001$).

Дисперсійний аналіз за методом Снедекора показав, що величина впливу ЗДАВ на кількість апоптотичних елементів та *TUNEL*-позитивних стромальних структур у стромі проміжних зрілих ХВ була досить високою: 34,1 та 33,9% відповідно. Наведені дані дозволяють дійти висновку, що ЗДАВ зменшує інтенсивність процесів апоптозу в клітинах строми проміжних зрілих ХВ. Це, на нашу думку, дозволяє пояснити порушення утворення з проміжних зрілих ХВ їх похідних – термінальних ХВ.

Однак важливим є не тільки факт зменшення інтенсивності процесів апоптозу певних клітин, але і виявлення молекулярних механізмів цих відхилень, адже їх розуміння дозволить розробляти шляхи корекції порушень дозрівання ХВ

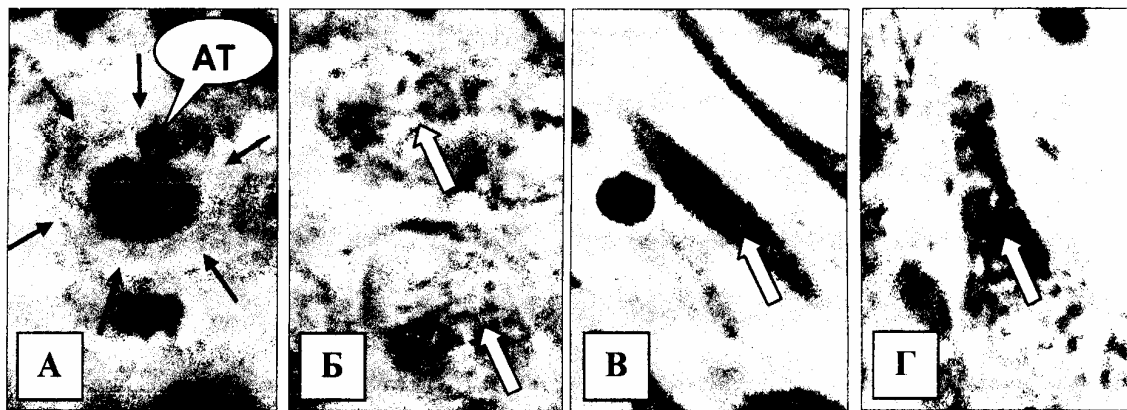


Рис. 1. Ділянки строми проміжних зрілих ворсин. Залізодефіцитна анемія вагітних, терміни гестації: 32-40 тижнів. Імуногістохімічна реакція з первинними антитілами до протеїну *Bax*, стрептавідинбіотинова система візуалізації LSAB2 з діамінобензидином, дозабарвлення ядер гематоксиліном Майєра. Масляна імерсія, $\times 1200$. А) Клітина Гофбауєра. Межі клітини позначені стрілками. Переважно гомогенне забарвлення цитоплазми, ядро клітини велике пухерцеподібне. АТ – два фагоцитованих клітиною Гофбауєра апоптотичних тіл з інтенсивною гранулярною експресією антигену *Bax*; Б) Дві клітини Гофбауєра з лікнотичними ядрами та переважно гранулярним забарвленням цитоплазми (вказано стрілками); В) Стромальна клітина фібробластичного типу з переважно гомогенним забарвленням цитоплазми (вказано стрілкою). Дуже темна кулька з прозорим обідком – неідентифікована загибла стромальна клітина з вираженим каріопіктозом; Г) Стромальна клітина фібробластичного типу з переважно гранулярним забарвленням цитоплазми (вказано стрілкою).

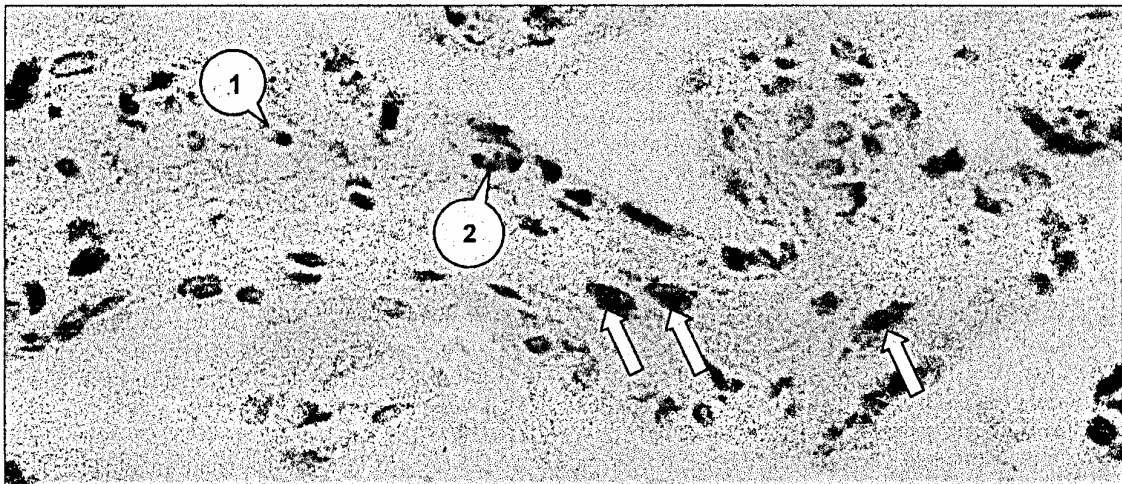


Рис. 2. Фрагмент проміжної зрілої ворсини на продольному зрізі. Залізодефіцитна анемія вагітних. 1) Стромальна клітина (вірогідно фібробластичного типу) з маргінацією ядерного хроматину. 2) Неідентифікована стромальна клітина, в якій ядро розбито на три окремих фрагменти (каріорексис), а в цитоплазмі помітна експресія антигену *Vax*. Стрілками вказані стромальні клітини фібробластичного типу зі значною експресією антигену *Vax*. В інших стромальних клітинах експресія антигену *Vax* є слабкою. Імуногістохімічна реакція з первинними антитілами до протеїну *Vax*, стрептавідинбіотинова система візуалізації LSAB2 з діамінобензидином, дозобарвлення ядер гематоксиліном Майєра. $\times 400$.

плаценти. З цією метою проведено дослідження основних молекулярних механізмів регуляції апоптозу, характерних саме для плаценти [1,5,6,7,9]. Встановлено, що експресія проапоптотичних антигенів *CD95* (рецепторний механізм активації апоптозу) та *Bcl-XS* у стромальних клітинах проміжних зрілих ХВ відсутня, тоді як експресія протеїну *Vax* майже у всіх клітинах, а також в апоптотичних тільцях має місце і при цьому часто є значною (рис. 1, 2). Інтенсивність забарвлення оцінювали згідно з показником "Середня яскравість", більша величина якого вказує на меншу інтенсивність забарвлення, а менша – навпаки. Згідно з цим показником інтенсивність забарвлення, яке засвідчує ступінь експресії протеїну *Vax*, при ЗДАВ не відрізняється від фізіологічної вагітності, хоч є тенденція до ослаблення забарвлення – величина показника "Середня яскравість" у середньому дещо збільшена при всіх ступенях ЗДАВ (таблиця). Однак імуногістохімічне дослідження реакції на антиген *Vax* у цитоплазмі клітини не повинно обмежуватися тільки визначенням сумарної концентрації чи абсолютної кількості *Vax* у клітинах певного типу. Річ у тому, що цей протеїн може локалізува-

тися в цитозолі, мітохондріях та ендоплазматичному ретикулумі [8]. У цитозолі *Vax* знаходиться в мономерній формі, а в мембранах мітохондрій та ендоплазматичного ретикулума – у формі *Vax-Vax* гомодимеру або гомоолігомеру (до 8-10 молекул у комплексі) [8]. Вважається, що *Vax*-мономер є неактивною щодо апоптозу формою, тоді як *Vax-Vax* гомодимери та гомоолігомери, вмонтовуючись у мембрани, генерують сигнали смерті, наприклад, через вивільнення з мітохондрій у цитозоль *цитохрому С*, який, у свою чергу, викликає активацію каспазного каскаду [8,9]. Вказані варіанти внутрішньоклітинної локалізації *Vax* зумовлюють те, що в імуногістохімічних препаратах хромоген, який засвідчує позитивну реакцію на цей антиген і відображає його кількість, може розподілятися у вигляді дифузного забарвлення (*Vax* мономер у цитозолі) або ж у вигляді гранул (*Vax-Vax* гомодимер або гомоолігомер у мітохондріях та гранулярному ендоплазматичному ретикулумі). Таким чином, потрібно оцінити просторовий розподіл хромогену, використовуючи спеціальні кількісні показники, які дозволять визначити співвідношення між активною та неактивною формами *Vax* [5]. Таким був показ-

Таблиця

Комп'ютерна денситометрія цитоплазми (при визначенні протеїну *Vax*) стромальних клітин проміжних зрілих ворсин плаценти при залізодефіцитній анемії вагітних (ЗДАВ)($M \pm m$)

Показник	Фізіологічна вагітність (n=30)	ЗДАВ I ст. (n=23)	ЗДАВ II ст. (n=21)	ЗДАВ III ст. (n=20)
"Середня яскравість" (од.яскравості)	93±3,8	97±4,4	102±4,2	104±4,5
"Відхилення яскравості" (од.яскравості)	89±2,8	74±2,4 p=0,004	56±1,9 p<0,001	42±1,4 p<0,001

Примітка. p – величина вірогідності відмін у порівнянні з фізіологічною вагітністю за непарним двостороннім критерієм Стюдента

ник "Відхилення яскравості", який виявив вірогідні відмінності ЗДАВ від фізіологічної вагітності (таблиця), причому сила впливу ЗДАВ за методом Снедекора на вказаний показник дуже висока – 64,9%. Згідно з наведеними даними можна дійти висновку, що в стромальних клітинах проміжних зрілих ХВ протеїн *Bax* при ЗДАВ менше переходить в активну гомодимерну чи гомоолігомерну форми, ніж при фізіологічній вагітності, і таким чином створюються локальні умови для виживання більшої кількості стромальних клітин.

З іншого боку слід враховувати молекулярні механізми протидії протеїну *Bax*, сутність яких зводиться переважно до конкуруючого утворення в мітохондріях неактивних гетеродимерів *Bax* з протиапоптотичними протеїнами *Bcl-2*, *Mcl-1* та *Bcl-XL* [8]. Встановлено, що стромальні клітини проміжних зрілих ХВ їх не експресують. Така ситуація створює протеїну *Bax* домінуючі можливості щодо регуляції апоптозу стромальних клітин проміжних незрілих ХВ. Таким чином, подальша розробка засобів регуляції апоптотичних процесів, які беруть участь у дозріванні проміжних зрілих ХВ у термінальні ХВ, повинна бути направлена переважно на молекулярний механізм – гомодимеризацію-гомоолігомеризацію протеїну *Bax*.

Висновки

1. При залізодефіцитній анемії вагітних знижуються процеси апоптозу в стромальних клітинах проміжних зрілих хоріальних ворсин, що негативно впливає на дозрівання цих ворсин до термінальних хоріальних ворсин.

2. Головним молекулярним механізмом названих порушень є зменшення переходу неактивної щодо апоптозу цитозольної мономерної форми протеїну *Bax* в активну гомодимерну чи гомоолігомерну форми, які утворюються при транслокації мономера *Bax* із цитозолу в мітохондрії чи ендоплазматичний ретикулум.

Перспектива подальших досліджень пов'язана з експериментом на культурі людських стромальних клітин хоріальних ворсин із направленою корекцією активності (транслокації) протеїну *Bax*.

APOPTOSIS IN STROMAL CELLS OF INTERMEDIATE MATURE VILLI OF PLACENTA IN IRON-DEFICIENCY ANEMIA OF GRAVIDAS

I.S.Davydenko, V.P.Pishak, M.Yu.Kolomoiets, I.Y.Sydorchuk, O.V.Pishak, I.F.Kurchenko

Abstract. By means of immunohistochemical (the TUNEL method, determining of antigens *CD95*, *Bax*, *Bcl-XS*, *Bcl-2*, *Mcl-1*, *Bcl-XL*) and histological methods the processes of apoptosis have been studied in the stromal cells of the intermediate mature chorionic villi in iron-deficiency anemia of gravidas. It has been determined, that the processes of apoptosis in the stromal cells of the intermediate mature chorionic villi decrease in this disease, negatively influencing on the maturing of these villi to the terminal chorionic villi. A reduction of the translocation of the nonactive cytosolic monomeric form of the protein *Bax* to active homodimeric or homooligomeric forms is the main molecular mechanism of the foregoing violations.

Key words: iron-deficiency anemia of gravidas, placenta, stromal cells of intermediate mature chorionic villi, apoptosis.

Bukovinian State Medical University (Chernivtsi)

Buk. Med. Herald. – 2006. – Vol.10, №1. - P.19-22

Надійшла до редакції 14.10.2005 року

Література

1. Бондаренко Г.І., Задорожна Т.Д., Аракова Т.М., Єщенко О.І., Покришка С.М. Порівняльна характеристика методів виявлення апоптозу в плаценті. – Вісн. морфол. - 2002.- №1. - С.43-46.
2. Давиденко І.С. Гістоморфологія порушень дозрівання плаценти при залізодефіцитній анемії вагітних // Вісн. наук. досліджень. - 2002.- №2.- С. 33-35.
3. Давиденко І.С. Мікроскопічна анатомія хоріального дерева в залежності від періода гестації та ступеня тяжкості анемії у вагітних // Клін. анатомія та операт. хірургія.- 2002.- Т.1, №1.- С.13-16.
4. Давиденко І.С. Оцінка сили впливу залізодефіцитної анемії вагітних на структурні елементи ворсин плаценти за методом Снедекора (однофакторний дисперсійний аналіз) // Клін. та експерим. патологія. – 2005.- Т.IV, №2.- С.15-19.
5. Давиденко І.С. Імуногістохімічний розподіл протеїнів *Bax* та *Bcl-2* у клітинах Гофбауера плаценти при залізодефіцитній анемії вагітних // Бук.мед.вісник.- 2005.-Т.9, №3.- С.88-91.
6. 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.
7. Benirschke K., Kaufmann P. Pathology of the human placenta. - 4th ed. - 2000. - New York: Springer. - 974p.
8. Burlacu A. Regulation of apoptosis by *Bcl-2* family proteins // J. Cell. Mol. Med. - 2003. - V.7, N3.- P.249-257.
9. Myatt L., Cui X. Oxidative stress in the placenta // Histochem. Cell Biol. – 2004. – V.122. – P.369–382.
10. 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.