

ЕКСПРЕСІЯ ПРОЛІФЕРАТИВНО-КЛІТИННОГО НУКЛЕАРНОГО АНТИГЕНУ В ЯДРАХ ТРОФОБЛАСТА ХОРІАЛЬНИХ ВОРСИН ПЛАЦЕНТИ ПРИ ЗАЛІЗОДЕФІЦІТНІЙ АНЕМІЇ ВАГІТНИХ

І.С. Давиденко, Т.Д. Задорожна

*Буковинська державна медична академія, м.Чернівці,
Інститут педіатрії, акушерства і гінекології АМН України, м. Київ*

Резюме. Імуногістохімічним методом досліджена експресія ядерного антигену кліткової проліферації (PCNA) у цитотрофобласті та синцитіотрофобласті проміжних зрілих, термінальних і стлових ворсин. Встановлено, що відповідно до ступеню залізодефіцитної анемії вагітних спостерігається значна кількісна проліферативна реакція цитотрофобласту ворсин плаценти, причому із певними особливостями залежно від типу ворсин. Для залізо-

дефіцитної анемії вагітних характерною є прямопорційна залежність процесів інтенсивності репарації ДНК в синцитіотрофобласті (згідно даних щодо експресії PCNA у ядрах) від ступеню анемії, що найбільш проявляється у проміжних зрілих та термінальних ворсинах і значно менше виражено у стлових ворсинах.

Ключові слова: PCNA, трофобласт, залізодефіцитна анемія вагітних.

Вступ

Проліферативно-клітинний ядерний антиген (PCNA – від англ. «Proliferating Cell Nuclear Antigen») – це протеїн масою 36 kD, який імуногістохімічними методами визначається в клітинних ядрах. Він є кофактором для ДНК-полімерази дельта в S-фазу та під час синтезу ДНК при її репарації в 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. Отже 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, 9, 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, повинні викликати посилення процесів її репарації. В літературі немає відомостей про кількісні дослідження експресії PCNA в ядрах трофобласта ворсин плаценти за умови залізодефіцитної анемії вагітних (ЗДАВ).

Метою нашого дослідження було вивчити кількісні параметри експресії PCNA в ЦТБ та СТБ плацентарних ворсин різних типів залежно від ступеня ЗДАВ.

Матеріал та методи дослідження

Морфологічному дослідженню підлягали 80 плацент, отриманих від жінок при пологах у 37–40 тижнів гестації. Усі випадки, залежно від гематологічних показників і діагнозу, були поділені на три групи для подальшого дослідження: 1) фізіологічна вагітність (20); 2) ЗДАВ I ступеня (21); 3) ЗДАВ II ступеня (23); 4) ЗДАВ III ступеня (16). Перебіг вагітності і пологів при ЗДАВ був різноманітним і не завжди узгоджувався з тяжкістю ЗДАВ, але у всіх випадках клінічно та морфологічно була діагностована та чи інша форма хронічної плацентарної недостатності; до уваги взяті тільки випадки з тривалістю ЗДАВ не менше чотирьох тижнів, оскільки тривалість анемії є одним із найбільш важливих факторів впливу при даній патології [3].

Свіжий матеріал (шматочки плаценти, обережно вирізані новим лезом для гоління) фіксували протягом 22-х годин у нейтральному забуференому 10 % водному розчині формаліну. Після депарафінізації зрізів імуногістохімічне визначення PCNA здійснювали за допомогою первинних антитіл до PCNA та стрептавідин-біотинової системи візуалізації LSAB-2 (пероксидазна мітка + діамінобензидин) виробника DakoCytomation (Данія). 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 (формат цифрової інформації – «Tagged Image File Format» без стискування) оптичного зображення хоріальних ворсин при використанні об'єктиву мікроскопа Х40 [2]. Потім цифрові копії зображення аналізували за допомогою ліцензійної копії комп'ютерної програми «ВидеоТест – Размер 5.0» (ООО Видеотест, Санкт-Петербург, Росія). Аналіз здійснювався на підставі замірів інтенсивності забарвлення по всій площі зрізу ядра за двома показниками: середня оптична

щільність (у відносних одиницях) і середня яскравість (у одиницях яскравості).

При статистичній обробці даних після процедури прийняття гіпотези про нормальність усіх виборок за допомогою критерію Хана-Шапіро-Уїлкі обраховували середню арифметичну та її похибку, а потім вірогідність різниці між групами дослідження визначали за допомогою двостороннього непарного критерію Стьюдента. Різницю вважали вірогідною при рівні значущості $P \geq 0,05$.

Результати досліджень та їх обговорення

Таблиця 1

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

Показник	Фізіологічна вагітність	Залізодефіцитна анемія I ст.	Залізодефіцитна анемія II ст.	Залізодефіцитна анемія III ст.
<i>Проміжні зрілі ворсини</i>				
Середня кількість ядер цитотрофобласта на один поперечний зріз ворсини	2,1 ± 0,11	2,9 ± 0,13 $P_H = 0,003$	4,1 ± 0,10 $P_H < 0,001$ $P_{I/II} < 0,001$	4,8 ± 0,13 $P_H < 0,001$ $P_{I/III} < 0,001$ $P_{II/III} = 0,004$
Середня кількість ядер покривного синцитіотрофобласта на один поперечний зріз ворсини	48 ± 1,6	46 ± 1,5 $P_H = 0,528$	44 ± 1,5 $P_H = 0,075$ $P_{I/II} = 0,488$	41 ± 1,4 $P_H = 0,011$ $P_{I/III} = 0,020$ $P_{II/III} = 0,158$
<i>Термінальні ворсини</i>				
Середня кількість ядер цитотрофобласта на один поперечний зріз ворсини	0,4 ± 0,02	1,2 ± 0,05 $P_H < 0,001$	2,0 ± 0,08 $P_H < 0,001$ $P_{I/II} < 0,001$	0,6 ± 0,02 $P_H < 0,001$ $P_{I/III} < 0,001$ $P_{II/III} < 0,001$
Середня кількість ядер покривного синцитіотрофобласта на один поперечний зріз ворсини	14 ± 0,2	14 ± 0,3 $P_H = 1$	10 ± 0,4 $P_H < 0,001$ $P_{I/II} < 0,001$	6 ± 0,3 $P_H = 0,001$ $P_{I/III} < 0,001$ $P_{II/III} < 0,001$
<i>Стовбурові ворсини</i>				
Середня кількість ядер цитотрофобласта на один поперечний зріз ворсини	2,2 ± 0,06	3,6 ± 0,08 $P_H < 0,001$	3,0 ± 0,05 $P_H < 0,001$ $P_{I/II} = 0,001$	2,0 ± 0,05 $P_H = 0,015$ $P_{I/III} < 0,001$ $P_{II/III} < 0,001$
Середня кількість ядер покривного синцитіотрофобласта на один поперечний зріз ворсини	124 ± 4,8	122 ± 4,6 $P_H = 0,994$	111 ± 3,9 $P_H = 0,042$ $P_{I/II} = 0,075$	98 ± 2,8 $P_H = 0,003$ $P_{I/III} = 0,004$ $P_{II/III} = 0,012$
n	20	21	23	16

Примітка. P_H , $P_{I/II}$, $P_{I/III}$, $P_{II/III}$ – рівні вірогідності (P) у порівнянні з нормою, між анемією I та II ст., I та III ст., II та III ст. відповідно; при рівні вірогідності $P \leq 0,05$ у таблиці зроблене виділення відповідного тексту курсивом.

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 $0,53 \pm 0,012$ в. од., середня яскравість – $78 \pm 1,4$ од. Яскравості. Слід врахувати, що більші величини показника середньої оптичної щільності (діапазон величин від 0 до 1) відображають більш інтенсивне забарвлення,

а показника середньої яскравості (діапазон 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.

У ядрах СТБ проміжних зрілих ворсин при нормальних показниках крові у вагітних позитивна ре-

Таблиця 2

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

Фізіологічна вагітність	Залізодефіцитна анемія I ст.	Залізодефіцитна анемія II ст.	Залізодефіцитна анемія III ст.
<i>Проміжні зрілі ворсини</i>			
0,8 ± 0,07	30,7 ± 2,11 <i>P_H < 0,001</i>	64,5 ± 3,48 <i>P_H < 0,001</i> <i>P_{I/II} < 0,001</i>	97,6 ± 4,24 <i>P_H < 0,001</i> <i>P_{I/III} < 0,001</i> <i>P_{II/III} = 0,001</i>
<i>Термінальні ворсини</i>			
3,6 ± 0,23	34,3 ± 2,67 <i>P_M < 0,001</i>	102,0 ± 5,01 <i>P_H < 0,001</i> <i>P_{I/II} < 0,001</i>	180,0 ± 5,16 <i>P_H < 0,001</i> <i>P_{I/III} < 0,001</i> <i>P_{II/III} < 0,001</i>
<i>Стовбурові ворсини</i>			
7,3 ± 0,33	11,5 ± 0,34 % <i>P_H < 0,001</i>	13,5 ± 0,40 <i>P_H < 0,001</i> <i>P_{I/II} = 0,006</i>	20,4 ± 0,64 <i>P_H < 0,001</i> <i>P_{I/III} < 0,001</i> <i>P_{II/III} < 0,001</i>
n = 20	n = 21	n = 23	n = 16

Примітка. Див. табл. 1.

акція на PCNA реєструвалася як дуже рідкісне явище, тому його частота була виражена у проміле (‰) (див. табл. 2). Слід зазначити, інтенсивність імуногістохімічного забарвлення була також низькою, що видно із величин показників середньої оптичної щільності (0,35 ± 0,011 в. од.) та середньої яскравості (114 ± 2,8 од. яскравості). При ЗДАВ у проміжних зрілих ворсинах відповідно до ступеня анемії зростає кількість PCNA-позитивних клітин ЦТБ. Посилення проліферації ЦТБ у ворсинах плаценти при гіпоксії є відомим фактом, 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 у проміжних зрілих ворсинах із наростанням ступеня анемії можна розцінити, в першу чергу, як регенераторну реакцію трофобласта, що пояснюється знай-

деними нами різноманітними морфологічними ознаками пошкодження ядер та цитоплазми СТБ.

У термінальних ворсинах клітини, що 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 ступеня відмічалася кількаразове зростання середньої частоти клітин ЦТБ на одну термінальну ворсину. В той же час, звертає на себе увагу порівняно низька кількість клітин ЦТБ в термінальних ворсинах при ЗДАВ III ступеня, хоч вона є вищою за показники норми.

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

Слід зазначити, що величини показників, що характеризують інтенсивність PCNA-позитивного забарвлення ядер ЦТБ в середньому не відрізнялися ($P > 0,05$) у групах дослідження.

Оскільки кількість ядер у покривному СТБ різних типів ворсин змінювалося залежно від ступеня ЗДАВ (табл. 1), з метою правомірності порівнянь був введений відносний показник «Середня частка PCNA-позитивних ядер синцитіотрофобласта на одну ворсину», що вимірювався у ‰ (табл. 2). Згідно до встановлених змін величин цього показника відповідно до ступеня ЗДАВ можна вважати, що ядра СТБ усіх 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 середньої оптичної щільності та середньої яскравості.

Перспектива подальших досліджень полягає у вивченні процесів регуляції апоптозу у синцитіотрофобласті ворсин різних типів при залізодефіцитній анемії вагітних з урахуванням даних про особливості експресії PCNA в ядрах синцитіотрофобласта.

Висновки

1. Відповідно до ступеня залізодефіцитної анемії вагітних спостерігається суттєва кількісна проліферативна реакція цитотрофобласта ворсин плаценти, причому з певними особливостями залежно від типу ворсин.

2. Для залізодефіцитної анемії вагітних характерною є прямопропорційна залежність процесів інтенсивності репарації ДНК в синцитіотрофобласті (згідно до експресії PCNA в ядрах) від ступеня анемії, яка в найбільшій мірі проявляється у проміжних зрілих та термінальних ворсинах і порівняно менше виражена у стовбурових ворсинах.

ЛІТЕРАТУРА

1. Глуховец Б.И., Глуховец Н.Г. Патология последа. – СПб.: ГРААЛЬ, 2002. – 448 с.
2. Давиденко І.С. Напівавтоматичний кількісний комп'ютерний аналіз мікроскопічного зображення в гістопатології // Буковинський мед. вісн. – 2000. – Т. 4, № 2. – С. 165–169.
3. Сенчук А.Я., Задорожная Т.Д., Константинов К.К. Морфофункциональные и ультраструктурные изменения в плаценте при железодефицитной анемии беременных // Вісн. асоціації акушерів-гінекологів України. – 1999. – № 4. – С. 25–30.
4. Benirschke K., Kaufmann P. Pathology of the human placenta. – 3th ed. – 1995. – New York: Springer. – 871 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. – 2003. – V. 32, Is. 6. – P. 345–369.
12. Siman C.M., Sibley C.P., Jones C.J., Turner M.A., Greenwood S.L. The functional regeneration of syncytiotrophoblast in cultured explants of term placenta // Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol. – 2001. – V. 280. – P. 1116–1122.

ЭКСПРЕССИЯ ПРОЛИФЕРАТИВНО-КЛЕТОЧНОГО НУКЛЕАНОГО АНТИГЕНА В ЯДРАХ ТРОФОБЛАСТА ХОРИАЛЬНЫХ ВОРСИН ПЛАЦЕНТЫ ПРИ ЖЕЛЕЗОДЕФИЦИТНОЙ АНЕМИИ БЕРЕМЕННЫХ

І.С. Давыденко, Т.Д. Задорожная

Резюме. Иммуногистохимическим методом исследована экспрессия пролиферативно-клеточного нуклеаного антигена (PCNA) в цитотрофобласте и синцитиотрофобласте промежуточных зрелых, терминальных и стволовых ворсин. Установлено, что соответственно степени железодефицитной анемии беременных наблюдается существенная количественная пролиферативная реакция цитотрофобласта ворсин плаценты, причем с определенными особенностями в зависимости от типа ворсин. Для железодефицитной анемии беременных характерной является прямопропорциональная зависимость процессов интенсивности репарации ДНК в синцитиотрофобласте (согласно данным об экспрессии PCNA в ядрах) от степени анемии, что в наибольшей мере проявляет себя в промежуточных зрелых и терминальных ворсинах и сравнительно меньше выражено в стволовых ворсинах.

Ключевые слова: PCNA, трофобласт, хориальные ворсины, железодефицитная анемия беременных.

EXPRESSION OF PROLIFERATING CELL NUCLEAR ANTIGEN IN NUCLEI OF CHORIAL VILLI TROPHOBLAST OF PLACENTA AT IRON DEFICIENCY ANEMIA OF THE PREGNANT WOMEN

I.S. Davydenko, T.D. Zadorozhnaya

Summary. By immunohistochemical method were investigate the expression of a proliferating cell nuclear antigen (PCNA) in cytotrophoblast and syncytiotrophoblast of intermediate mature, terminal and stem villi. Fixed, that according to a degree of an iron deficiency anemia of the pregnant women, the essential quantitative proliferative response of cytotrophoblast of placental villi, and with the defined singularities in dependence on a type of villi takes place. For an iron deficiency anemia of the pregnant women characteristic the directly proportional dependence of processes of intensity of DNA repair in a syntrophoblast is (agrees given about expression of PCNA in nuclei) from a degree of anemia, that in the greatest measure shows itself in intermediate mature and terminal villi and rather is less expressed in stem villi.

Key words: proliferating cell nuclear antigen, trophoblast, chorial villi, iron deficiency anemia of the pregnant women.