

5. Стежковой В.В., Сапелкина И.М., Гусев С.А. Морфологическое обоснование выбора метода оперативного лечения больных с опущением и выпадением внутренних половых органов // Акуш. и гинекол. – 1990. – №8. – С.55-57.
6. Snyder T., Krantz K. Abdominal-retroperitoneal sacral colpopexy for the correction of vaginal prolapse // Amer. College of Obstet. Gynecol. – 1991. – V.77, №6. – P.944-949.

AGE - RELATED PATHOMORPHOLOGICAL CHANGES OF THE VAGINA IN WOMEN WITH UTERINE PROLAPSE IN CONNECTION WITH SURGICAL TREATMENT

A.P.Hryhorenko

Abstract. The author has carried out a pathomorphologic study of removed mucous vagina in case of surgical treatment of uterine prolapse in women of different year classes, with a parallel evaluation of the level of blood estradiol. Marked dystrophic and degenerative changes in the vaginal wall have been established irrespective of the estradiol level. The use of Recutan and Ovestin intravaginally prior to and after the operation prevents any complication.

Key words: uterine prolapse in women, uterine wall pathomorphology, Estradiol, Recutan, Ovestin.

Vinnitsia M.I. Pyrohov National Medical University (Khmel'nyts'kyi)

Buk. Med. Herald. – 2005. – Vol.9, №3. – P.85-88

Надійшла до редакції 16.03.2005 року

УДК 618.3-094:618.3-08:616.154

І.С.Давиденко

ІМУНОГІСТОХІМІЧНИЙ РОЗПОДІЛ ПРОТЕЇНІВ *VAX* ТА *BCL-2* У КЛІТИНАХ ГОФБАУЕРА ПЛАЦЕНТИ ПРИ ЗАЛІЗОДЕФІЦИТНІЙ АНЕМІЇ ВАГІТНИХ

Кафедра патологічної анатомії та судової медицини (зав. – доц. І.С.Давиденко)
Буковинського державного медичного університету

Резюме. Імуногістохімічно вивчено експресію протеїнів *Vax* та *Bcl-2* у 52 плацентах. Встановлено, що при залізодефіцитній анемії вагітних у клітинах Гофбауера в середньому відзначається менш інтенсивна трансформация мономера *Vax* в гомодимер *Vax-Vax*, ніж за відсутності анемії. Це призводить до виживання біль-

шої кількості клітин Гофбауера у ворсинках плаценти і є одним із факторів порушення дозрівання хоріального дерева.

Ключові слова: протеїн *Vax*, протеїн *Bcl-2*, клітини Гофбауера, залізодефіцитна анемія вагітних.

Вступ. Клітини Гофбауера (клітини Кашенко-Гофбауера, макрофаги плацентарних ворсин, плацентарні макрофаги) у ворсинках плаценти представлені в різній кількості відповідно до терміну вагітності та типу ворсин. На ранніх стадіях вагітності клітини Гофбауера (КГ) звичайно виявляють у великій кількості, а в пізні терміни фізіологічної вагітності при нормальній будові плаценти вони майже не спостерігаються [4]. Багато цих клітин можна знайти у васкуляризованих мезенхімальних ворсинках (ембріональних ворсинках – згідно за А.П.Милованов [3]), проміжних незрілих ворсинках і так званих "ранніх" стовбурових ворсинках [2]. Іноді поодинокі КГ можна виявити у проміжних зрілих, сформованих ("пізніх") [2] стовбурових або навіть у термінальних ворсинках [3,4]. Оскільки КГ є унікальними клітинами, які окрім хоріальних ворсин плаценти в інших структурах не трапляються, то зменшення їх кількості протягом вагітності має відбуватися за рахунок механізмів клітинного відмирання, а не, наприклад, механізмів міграції чи трансформації в інші форми макрофагів.

Незважаючи на очевидні успіхи в розкритті різних механізмів регуляції смерті клітин, все ж

доводиться констатувати, що на сьогодні ще не всі аспекти цієї проблеми є зрозумілими [5,8,11,12,14] і тому вони інтенсивно вивчаються. Серед найбільш важливих механізмів смерті клітини є такий, який відбувається через активацію одного з протеїнів сімейства *Bcl-2*, який спочатку отримав назву "*Bcl-2* асоційований X протеїн". У даний час його прийнято називати – антиген *Vax*, протеїн *Vax* або ж просто *Vax* чи *VAX* [5-7,9,10,13,15]. Цей протеїн може локалізуватися в цитозолі, мітохондріях та ендоплазматичному ретикулумі [5-7,13-15]. У цитозолі *Vax* знаходиться в мономерній формі, а в мембранах мітохондрій та ендоплазматичного ретикулума – у формі *Vax-Vax* гомодимеру [5]. Вважається, що *Vax*-мономер є неактивною в аспекті апоптозу формою, тоді як *Vax-Vax* гомодимер, вмонтовується у мембрани при димеризації, генерує сигнали смерті, наприклад, через вивільнення з мітохондрій у цитозоль цитохрому *c*, який, у свою чергу, викликає активацію каспазного каскаду [5,6,12]. Вищевказані 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 у мітохондріях та гранулярному ендоплазматичному ретикулумі). Таким чином, імуногістохімічне дослідження реакції на антиген *Vax* у цитоплазмі клітини не повинно бути обмежено тільки визначенням сумарної концентрації чи абсолютної кількості *Vax* у клітинах певного типу. Потрібно ще робити спроби оцінки розподілу хромогену, використовуючи спеціальні кількісні показники, які дозволять визначити співвідношення між активною та неактивною формами *Vax*. Однак у імуногістохімічних препаратах, де визначають протеїн *Vax*, хромоген може розподілятися у вигляді гранул ще тоді, коли він утворює в мітохондріях гетеродимер *Vax-Vcl-2*. Згідно із сучасними уявленнями, така гетеродимеризація призводить до нейтралізації протеїну *Vax* щодо його проапоптотичної дії [5]. Це зумовлює необхідність паралельного вивчення експресії протеїну *Vcl-2* і проведення відповідних порівняльних досліджень. Викладений підхід є гіпотезою, яку спробували перевірити на КГ. Використання цих клітин як тестової моделі обґрунтовано тим, що КГ можуть служити одним із маркерів незрілості хоріального дерева [3,4], а саме така патологія є частим проявом залізодефіцитної анемії вагітних (ЗДАВ) [1].

Мета дослідження. Оцінити характер розподілу хромогену при імуногістохімічному визначенні протеїну *Vax* у цитоплазмі клітин Гофбауера ворсин плаценти при залізодефіцитній анемії вагітних з урахуванням особливостей експресії протеїну *Vcl-2*.

Матеріал і методи. Дослідженню підлягали 52 плаценти. Всі випадки залежно від гематологічних показників і діагнозу були розподілені в дві групи дослідження: 1) випадки із ЗДАВ (28); випадки без будь-якої анемії (24). Клінічна характеристика груп дослідження подана у розділі "Результати дослідження та їх обговорення".

Свіжий матеріал (шматочки плаценти, обережно вирізані новим лезом для гоління) фіксували протягом 22 годин у нейтральному забуференому 10% водному розчині формаліну, після чого здійснювали зневоднювання у висхідній батареї етанолу і заливку в парафін. Парафінові зрізи 5 мкм завтовшки монтували на спеціальні предметні скельця SuperFrost®Plus (Німеччина) з неімуногенним адгезивним покриттям. Після депарафінізації зрізів здійснювали імуногістохімічне визначення протеїну *Vax* за допомогою первинних антитіл до цього антигену із застосуванням стрептавідин-біотинової системи візуалізації LSAB2 (пероксидазна мітка + діамінобензидин) виробника DakoCytomation (Denmark). Максимально дотримувалися стандартизації протоколу методики для всіх зрізів. Виконували всі необхідні контролю (негативні і позитивні). Дофарбування ядер виконували гематоксиліном Майєра.

Кількісні дослідження інтенсивності зафарбовування цитоплазми проводили наступним чином. Спочатку отримували цифрові копії оптичного зображення фрагментів хоріальних ворсин при використанні об'єктива мікроскопа x90 (масляна імерсія). Потім цифрові копії зображення аналізували за допомогою ліцензійної копії комп'ютерної програми "Видеотест - Размер 5.0" (ООО Видеотест, Санкт-Петербург, Россія). Аналіз здійснювався на підставі замірів по всій площі зрізу цитоплазми кожної клітини Гофбауера за двома показниками: "Середня яскравість" (в одиницях яскравості), "Відхилення яскравості" (в одиницях яскравості).

При статистичній обробці даних після процедури прийняття гіпотези про нормальність всіх виборок за допомогою критерію Хана-Шаніро-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 $P \leq 0,05$. Для кореляційного аналізу був застосований коефіцієнт кореляції знаків, оскільки інші коефіцієнти кореляції застосувати для отриманих даних було неможливо.

Результати дослідження та їх обговорення. Серед 24 плацент від жінок без анемії десять були отримані при передчасних пологах внаслідок гострої патології у термін гестації 32-36 тижнів, а чотирнадцять при термінових пологах у 37-40 тижнів вагітності. Плаценти, отримані для цього дослідження при термінових пологах, були підібрані так, що у всіх них морфологічно був діагностований дисоційований варіант розвитку – коли в одній частині котилідонів плаценти хоріальне дерево зріле (відповідає терміну гестації), а в інших котилідонах у ворсинах присутні ознаки незрілості [3]. Такий підбір плацент був обґрунтований необхідністю набрати матеріал, в якому реально можна було би знайти клітини КГ у кількості, що достатня для статистичного аналізу (не менше 100 клітин Гофбауера в одній плаценті).

Поміж 28 плацент від жінок із ЗДАВ дванадцять були народжені передчасно (32-36 тижнів вагітності), а шістьнадцять – у термін 37-40 тижнів гестації. Так само як і в групі дослідження без анемії термінові пологи були представлені всі без винятку дисоційованим варіантом розвитку котилідонів. ЗДАВ I ст. становила чотири випадки, II ст. – шістьнадцять, III ст. – вісім.

КГ в імуногістохімічних препаратах ідентифікували за локалізацією (як правило, – у "стромальних каналах") та за характерними формою клітин, співвідношенням ядро/цитоплазма і контурами ядра. Багато КГ знаходили у проміжних незрілих ворсинах та в невеликій кількості в проміжних зрілих ворсинах із залишками стромальних каналів, "ранніх" стовбурових ворсинах та іноді в термінальних ворсинах і "пізніх" стовбурових ворсинах. Слід зазначити, що в цитоплазмі КГ завжди відкладався хромоген, який засвідчу-

вав експресію протеїну *Vax*. Частина хромогену відкладалася в гранулярному вигляді, а частина – дифузно профарбовувала цитоплазму КГ. Інтенсивність забарвлення хромогеном (концентрація барвника) та його розподіл були оцінені кількісно за допомогою показників "Середня яскравість" та "Відхилення яскравості". Для правильного тлумачення величин цих показників слід попередньо описати їх характеристики. "Середня яскравість" за допомогою комп'ютерної програми "ВидеоГест – Размер 5.0" вимірюється в одиницях яскравості з 256 градаціями сірої шкали від 0 до 255, причому величині "0" відповідає абсолютно чорний колір об'єкта, а величині "255" відповідно – абсолютно білий. "Відхилення яскравості" інтегрально характеризує розподіл яскравостей у межах кожного вимірювання (у цьому дослідженні – в цитоплазмі окремо взятої клітини Гофбауера). Нульове значення показника відповідає абсолютно однотонному (дифузному, гомогенному) забарвленню. Чим більше величина показника "Відхилення яскравості", тим сильніше нерівномірність забарвлення у цитоплазмі, відповідно й вище гранулярність. Викладений підхід для наглядності проілюстрований на рис.1.

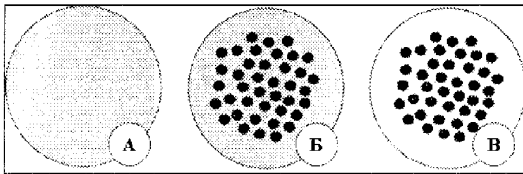


Рис.1. Три тестові взірці для ілюстрації показника "Відхилення яскравості":

- А) "Відхилення яскравості" – 0 од.яскравості (відсутнє варіювання інтенсивності забарвлення, тобто абсолютна гомогенність);
- Б) "Відхилення яскравості" – 83,0 од.яскравості (комбінація гомогенного та гранулярного забарвлення);
- В) "Відхилення яскравості" – 103,8 од.яскравості (тільки гранулярне забарвлення)

Інші пояснення – у тексті

Перед комп'ютерним аналізом зображення КГ була проведена оцінка морфологічного стану їх ядер. Зокрема, було відмічено, що частина ядер КГ мала надто ущільнений ядерний хроматин та (або) маргінацію ядерного хроматину (рис.2). У таких клітинах імунопозитивне забарвлення на протеїн *Vax* візуально було сильнішим, гранули виглядали більш щільними, грубими, збільшених розмірів. Оскільки така морфологія ядер може бути характерною для ранніх морфологічних стадій апоптозу, то зміни щодо розподілу протеїну *Vax* у КГ були проаналізовані з точки зору цього загальнопатологічного процесу, який є однією із форм клітинної смерті. Зокрема, було встановлено, що у КГ відсутня експресія протеїну *Bcl-2*, хоч вона була вираженою в цитоплазмі синцитіотрофобласта ворсин і в лімфоцитах базальної пластинки плаценти. Це дало змогу встановити

зв'язок між змінами ядра КГ і перерозподілом у їх цитоплазмі протеїну *Vax*, що було потім підтверджено і кореляційним аналізом, оскільки коефіцієнт кореляції знаків склав 0,946 ($p < 0,001$, $n=400$ тестових клітин Гофбауера).

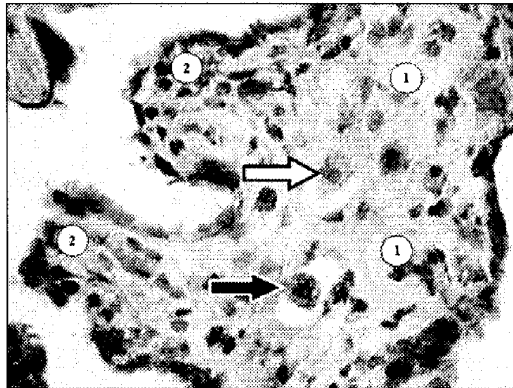


Рис. 2. Фрагмент проміжної ворсини, яка зберігає деякі ознаки незрілості (залишки двох "стромальних каналів" з клітинами Гофбауера), але вже формується як проміжна зріла ворсина (характерна строма – "1" та утворення термінальних гілок – "2")

Стрілками вказані клітини Гофбауера: білою – клітина із світлим пухирцеподібним ядром, чорною – з ознаками маргінації та ущільнення ядерного хроматину. У цитоплазмі обох клітин Гофбауера має місце гранулярний та гомогенний розподіл хромогену, який засвідчує позитивну реакцію на *Vax* і наявність як мономерної форми цього протеїну, так і його димеру.

Імуногістохімічна реакція з первинними антитілами до протеїну *Vax*, дозабарвлення ядер гематоксилином Майєра (x800)

Процент КГ із конденсацією ядерного хроматину та (або) його маргінацією за відсутності анемії становив $34 \pm 2,4\%$, а при ЗДАВ він був значно меншим – $8 \pm 0,6\%$ ($p < 0,001$). При комп'ютерному аналізі зображення результатів імуногістохімічного дослідження протеїну *Vax* були встановлені середні показники "Середньої яскравості" та "Відхилення яскравості". Зокрема, за відсутності анемії "Середня яскравість" становила $134 \pm 3,8$ од.яскравості, а при ЗДАВ – $128 \pm 4,4$ од.яскравості ($p=0,401$), що вказує на несуттєву різницю між середніми величинами. Показник же "Відхилення яскравості" виявив значну відмінність: за відсутності анемії він становив $84 \pm 1,2$ од.яскравості, а при ЗДАВ – $49 \pm 1,0$ од.яскравості ($p < 0,001$). Враховуючи відсутність експресії протеїну *Bcl-2* у цитоплазмі КГ, можна наведені кількісні дані про розподіл протеїну *Vax* у цитоплазмі КГ розцінити як те, що при ЗДАВ має місце менша інтенсивність утворення гомодимерів *Vax-Vax*. Вищевказане при ЗДАВ, на нашу думку, пояснює відповідно менший відсоток КГ з морфологічними ознаками початкового апоптозу (зміни розподілу ядерного хроматину) і свідчить про те, що при ЗДАВ клітини Гофбауера відми-

рають менш інтенсивно, ніж за відсутності анемії. Все це в певній мірі може служити одним із пояснень високої частоти незрілості хоріального дерева при ЗДАВ.

Висновок

При залізодефіцитній анемії вагітних у клітинах Гофбауера в середньому відмічається менш інтенсивний перехід мономеру *Bax* в гомодимер *Bax-Bax* ніж за відсутності анемії. Це призводить до виживання більшої кількості клітин Гофбауера у ворсинах плаценти і є одним із факторів порушення дозрівання хоріального дерева.

Перспектива подальших досліджень пов'язана з подальшим вивченням імуногістохімічних маркерів та електронно-мікроскопічних особливостей апоптозу в клітинах Гофбауера при залізодефіцитній анемії вагітних, а також інших молекулярних регуляторів апоптозу, крім протеїнів *Bax* та *Bcl-2*.

Література

1. Давиденко І.С. Гістоморфологія порушень дозрівання плаценти при залізодефіцитній анемії вагітних // Вісн. наук. досліджень.- 2002.- №2 (додаток).- С.33-35.
2. Давиденко І.С. Робоча класифікація хоріальних ворсин плаценти для цілей інформаційного аналізу // Акт. питання клін. та експерим. мед.: Матер. 85-ї підсумкової наук. конф., присвяченої 60-річчю Буковинської державної медичної академії.- Чернівці: БДМА. 2004.- С.283-286.
3. Милованов А.П. Патология системы мать-плацента-плод: Руководство для врачей. - М.: Медицина, 1999.- 448 с.
4. Benirschke K., Kaufmann P. Pathology of the human placenta.- 4th ed.- 2000.- New York: Springer.- 948 p.
5. Burlacu A. Regulation of apoptosis by Bcl-2 family proteins // J. Cell. Mol. Med. - 2003. - V.7, N3.- P. 249-257.
6. Gross A., Jockel J., Wei M.C., Korsmeyer S.J. Enforced dimerization of BAX results in its translocation, mitochondrial dysfunction and apoptosis // The EMBO J.- 1998.- V.17.- P.3878-3885.
7. Gross A., McDonnell J.M. I, Korsmeyer S.J. BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis // Genes and development .- 1999.- V.13, N.15.- P.1899-1911.
8. Gulbins E., Jekle A., Ferlinz K., Grassmé H. Physiology of apoptosis // Am. J. Physiol. Renal Physiol.-2000.- VI. 279, Issue 4.- P.605-615.
9. Hoijman E., Viegas L.R., Sarmiento M.K., Rosenstein R.E. Involvement of Bax Protein in the Prevention of Glucocorticoid-Induced Thymocytes Apoptosis by Melatonin // Endocrinology. - 2004. - V.145, N1. - P.418-425.
10. Kui Lei, Davis R.J. JNK phosphorylation of Bim-related members of the Bcl2 family induces Bax-dependent apoptosis // PNAS. - 2003. - V.100, N.5.- P.2432-2437.
11. Reed J.C. Mechanisms of Apoptosis // Am. J. of Pathology. - 2000.- V.157.- P.1415-1430.
12. Schultz D.R., Harrington W.J. Apoptosis: Programmed cell death at a molecular level // Seminars in Arthritis and Rheumatism.- 2003.- V.32, Issue 6.- P.345-369.
13. Wei-Xing Zong, Chi Li, Hatzivassiliou G., Lindsten T., Qian-Chun Yu. Bax and Bak can localize to the endoplasmic reticulum to initiate apoptosis // The J. of Cell Biology.- 2003.- V.162, N1.- P. 59-69.
14. Xiaodong Wang. The expanding role of mitochondria in apoptosis // Genes and development.- 2001.- V.15, N.22.- P. 2922-2933.
15. Yi-Te Hsu, Wolter K.G., Youle R.J. Cytosol-to-membrane redistribution of Bax and Bcl-XL during apoptosis // Proc. Natl. Acad. Sci. USA.- 1997.- V. 94.- P. 3668-3672.

IMMUNOHISTOCHEMICAL DISTRIBUTION OF PROTEINS BAX AND BCL-2 IN PLACENTAL HOFFBAUER'S CELLS WITH IRON DEFICIENCY ANEMIA OF GRAVIDAS

I.S.Davydenko

Abstract. The expression of proteins Bax and Bcl-2 was studied in 52 placentas by means of the immunohistochemical method. Less intensive transformation of monomer Bax to homodimer Bax-Bax was established in iron deficiency anemia of gravidas in comparison with the absence of anemia. This results in a survival of a greater number of Hoffbauer's cells in the placental villi and this is one of the factors of disturbed maturation of the chorial tree.

Key words: protein Bax, protein Bcl-2, Hoffbauer's cells, iron deficiency anemia of gravidas.

Bukovinian State Medical University (Chernivtsi)

Buk. Med. Herald. - 2005. - Vol.9, №3.- P.88-91

Надійшла до редакції 31.03.2005 року