

УДК 618.3-091:618.3-08

© I. В. Каліновська, Л. В. Герман, 2001.

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

**I. В. Каліновська, Л. В. Герман***Кафедра акушерства і гінекології з курсом дитячої та підліткової гінекології (зав. кафедри – проф. О. М. Юзько), Буковинський державний медичний університет, м. Чернівці.*

### THE IMMUNOHISTOCHEMICAL INVESTIGATIONS OF HORMONES OF TROPHOBLAST CHORIAL VILLI IN ASPECT OF PLACENTARY INSUFFICIENCY IN EARLY TERMS OF PREGNANCY

**I .V. Kalinovskaja, L.V. German**

#### SUMMARY

The immunohistochemical quantitative investigations of hormones of trophoblast of chorial 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 chorial 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 chorial villi with increasing formation of cytotrophoblast of chorial villi. The second type show itself increasing of concentration of this hormones in the trophoblast and decreasing of processes of formation of cytotrophoblast of chorial villi.

### ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ГОРМОНОВ ТРОФОБЛАСТА ХОРИАЛЬНЫХ ВОРСИН В АСПЕКТЕ ПЛАЦЕНТАРНОЙ НЕДОСТАТОЧНОСТИ В РАННИЕ СРОКИ ГЕСТАЦИИ

**И. В. Калиновская, Л. В. Герман**

#### 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 (виллезной) недостаточности, общими чертами которых есть 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.

**Ключові слова:** хоріонічний гонадотропін, плацентарний лактоген, трофобласт хоріальних ворсин, плацентарна недостатність.

Гормони трофобласта хоріальних ворсин (ХВ) плаценти відіграють значну роль у процесах формування структур та функцій плоду [Заболотна, 2003, Шмагель, Черешнев, 2003, Wooding et al., 2001], і тому їх кількісна оцінка може служити важливим критерієм плацентарної недостатності. Імуногістохімічними методами можна ефективно вивчати такі гормони трофобласта, як хоріонічний гонадотропін (ХГТ) [Benirschke, Kaufmann, 2000, Zygmunt et al., 2005] та плацентарний лактоген (ПЛГ) [Давиденко, Задорожна, 2005, Benirschke, Kaufmann, 2000]. Рівень вказаних гормонів впливає не тільки на антропологічні параметри та функціональний стан у плода [Заболотна, 2003, Каліновська та ін., 2005, Шмагель, Черешнев, 2003], але і відіграє суттєву роль у формуванні структури самої плаценти, зокрема, її ХВ, причому вважається, що ХГТ має більше клінічне значення у ранні терміни гестації, а ПЛГ – у пізні [Benirschke, Kaufmann, 2000]. В аспекті плацентарної недостат-

ності імуногістохімічні дослідження ХГТ та ПЛГ хоріону дотепер не проводилися.

Мета дослідження полягала у кількісному встановленні комп'ютерно-мікроденситометричним та імуногістохімічними методами 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 першого триместру вагітності.

#### МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

Досліджували матеріал довільних викиднів 5-12 тижнів гестації, не пов'язаних із запальним процесом, травмами, генетичними порушеннями у плоду (28 спостережень – основна група). Контролем служив аналогічний за терміном вагітності матеріал абортів від практично здорових жінок за соціальними пока-

заннями (16 випадків). Матеріал фіксували 22 години у 10%-му 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 дофарбовували гематоксиліном Грота, який при експозиції 10 сек. при 20°C зафарбовує 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 ВидеоТест – Размер 5.0 (ООО Видеотест, Санкт-Петербург, Росія) з вимірюванням зондовим методом показника «оптична щільність» (метод комп'ютерної мікроденситометрії) в позитивно забарвлених ділянках цитоплазми трофобласта ХВ [Давиденко, Задорожна, 2005]. Зазначений показник кількісно (об'єктивно) відображає концентрацію певного визначеного гормону, тому застосовували параметричні методи статистики. Зокрема, статистичні порівняння між групами дослідження здійснювали за допомогою непарного двостороннього критерію Стьюдента для рівних та нерівних дисперсій (для виявлення середніх тенденцій) та метода Фішера (для виявлення розбіжності у ступені варіювання), попередньо перевірявши гіпотезу про нормальність розподілу у виборках за допомогою критерію Уїлкі-Хана-Шапіро та оцінивши рівність дисперсій за допомогою критерію Левене. Всі статистичні обрахунки виконані 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 ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Місця вмісту гормонів ХГТ та ПЛГ, за результатами застосування імуногістохімічного методу, ідентифікували за коричневим забарвленням, яке мало дрібно гранулярний 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, віддзеркалює ступінь дозрівання трофобласта від його менш зрілої форми – цитотрофобласта до більш зрілої – синцитіотрофобласта. Загальна інтенсивність забарвлення мала різну виразність як серед різних ХВ в межах кожного спостереження так і в середньому від спостереження до спостереження. Статистична обробка результатів

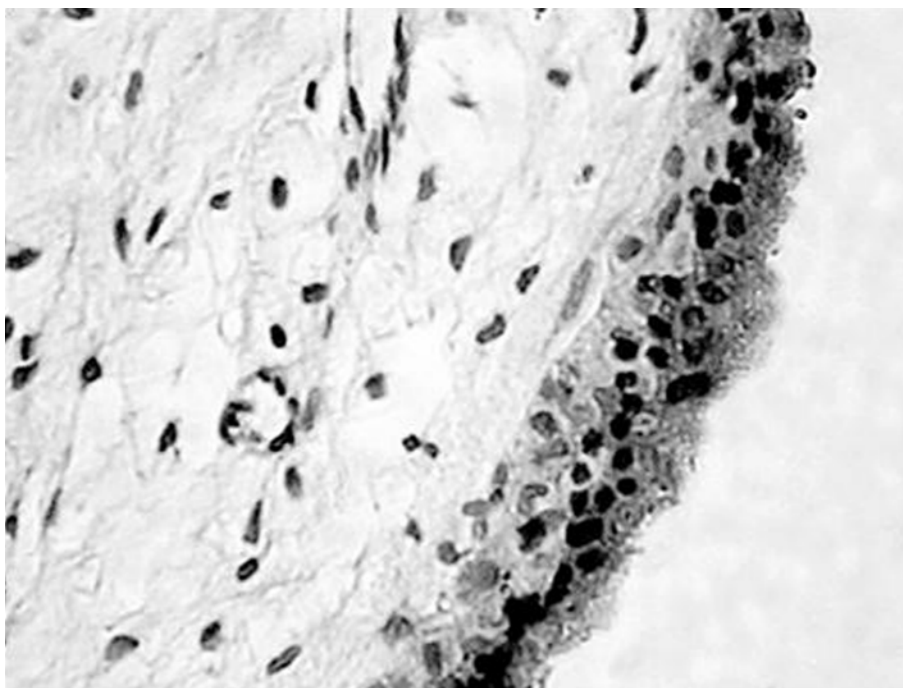
комп'ютерного мікроденситометричного вимірювання показала наступне.

Оптична щільність забарвлення на ХГТ у трофобласті ХВ у контрольній групі становила  $0,2150 \pm 0,0024$  ум.од. з діапазоном  $0,196-0,234$  ум.од. В основній групі оптична щільність забарвлення на ХГТ складала  $0,2130 \pm 0,0119$  ум.од. з діапазоном  $0,087-0,338$  ум.од. Оскільки за критерієм Фішера попередньо встановлене неоднакової сили варіювання у групах дослідження ( $p < 0,001$ ), був застосований критерій Стьюдента 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 як раз і відповідав діапазону контрольної групи. Таким чином, встановлено, що значні коливання показника «оптична щільність» 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 щільність забарвлення на ХГТ становила  $0,1360 \pm 0,0068$  ум.од. з діапазоном  $0,087-0,185$  ум.од., у групі Б –  $0,2910 \pm 0,0061$  ум.од. з діапазоном  $0,244-0,338$  ум.од. Оскільки за критерієм Уїлкі-Хана-Шапіро у основних групах А та Б показний нормальний розподіл даних, а критерій Левене не виявив різниці дисперсій, був застосований критерій Стьюдента для рівних дисперсій, який показав, що як основна група А, так і Б суттєво ( $p < 0,001$ ) відрізняються в середніх тенденціях від контрольної групи.

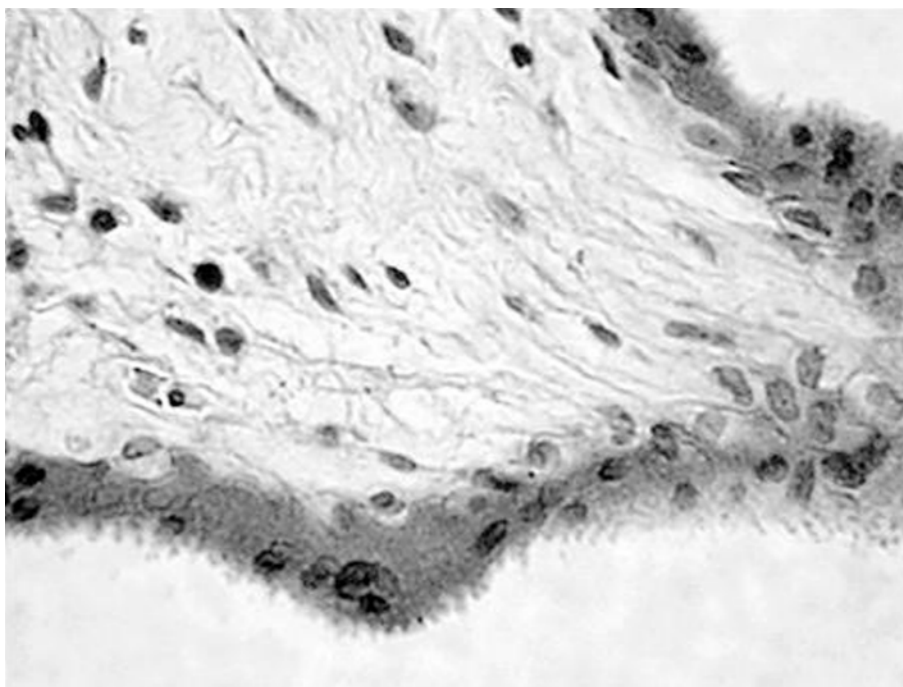
Для ілюстрації наведених кількісних даних наводяться приклади мікрофотографій спостережень щодо ХГТ контрольної групи (рис. 1), основної групи А (рис. 2) та основної групи Б (рис. 3).

Щодо ПЛГ були виявлені 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 щільність забарвлення цитоплазми цитотрофобласта при імуногістохімічному визначенні ПЛГ складала: у контрольній групі  $0,2010 \pm 0,0025$  ум.од. з діапазоном  $0,182-0,220$  ум.од., в основній групі А –  $0,1210 \pm 0,0064$  ум.од. з діапазоном  $0,074-0,167$  ум.од., в основній групі Б –  $0,3150 \pm 0,0085$  ум.од. з діапазоном  $0,249-0,380$  ум.од. Розбіжність основних груп з контрольною за критерієм Стьюдента для рівних дисперсій високо вірогідна –  $p < 0,001$ .

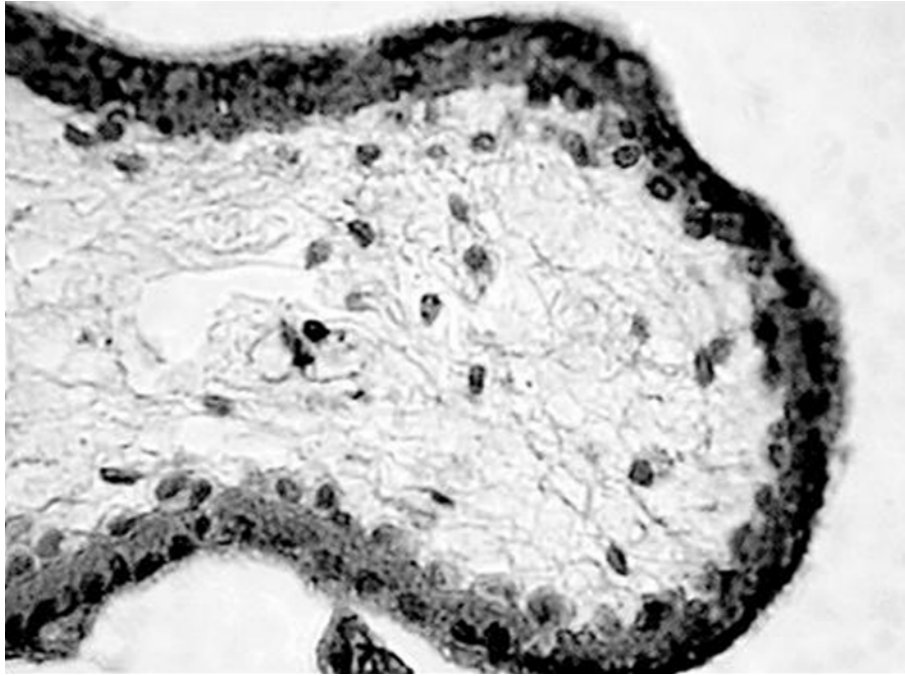
Гістопатологічні дослідження основних груп виявили певні закономірності. Так, у основній групі А (з низькою концентрацією ХГТ та ПЛГ у трофобласті ХВ) відмічалися морфологічні особливості ХВ, які вказували на гальмування процесів їх дозрівання. Зокрема, у порівнянні з контрольними показниками зафіксова-



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



**Рис. 2.** Матеріал викидню у 8 тижнів гестації. Основна група А. Імуногістохімічне визначення хоріонічного гонадотропіну. Дозабарвлення клітинних ядер гематоксиліном Грота. Оптична щільність ділянок позитивного забарвлення – 0,142 умовних одиниці. Об. 40х. Ок. 10х.



**Рис. 3. Матеріал викидню у 8 тижнів гестації. Основна група Б. Імуногістохімічне визначення хоріонічного гонадотропіну. Дозабарвлення клітинних ядер гематоксилином Грота. Оптична щільність ділянок позитивного забарвлення – 0,336 умовних одиниць. Об. 40х. Ок. 10х.**

но знижену середню кількість кровоносних судин на одну ХВ до  $1,20 \pm 0,07$  (у контрольній групі –  $2,10 \pm 0,05$ ;  $p < 0,001$ ), потовщення трофобласта до  $21,20 \pm 0,47$  мкм (у контролі –  $16,60 \pm 0,39$  мкм;  $p < 0,001$ ), більшу середню кількість клітин цитотрофобласта на одну ХВ –  $37,20 \pm 0,83$  (проти  $33,90 \pm 0,97$  у групі контролю;  $p = 0,016$ ). У основній групі Б (з підвищеною концентрацією ХГТ та ПЛГ у трофобласті) також, як і основній групі А зменшена середня кількість кровоносних судин на одну ХВ до  $1,60 \pm 0,08$  ( $p = 0,002$ ), але товщина трофобласта була меншою ( $15,00 \pm 0,32$ ;  $p = 0,012$ ), при цьому і мало місце зниження середньої кількості клітин цитотрофобласта на одну ХВ до  $21,00 \pm 0,85$  ( $p < 0,001$ ). Тоді, коли 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 потребує в подальшому окремого аналізу. Як робочу гіпотезу, на підставі відомих на сьогодні фактів про молекулярні фактори ангіо- та васкулогенезу в плаценті [Charlock-Jones et al., 2004] можна припустити, що низька концентрація ХГТ та ПЛГ призводить до порушення продукції клітинами ХВ васкулярного ендотеліального фактору росту (VEGF) [Islami et al., 2003], що і викликає порушення процесів фізіологічного утворення кровоносних судин ХВ [Carmeliet, Collen, 2000, Ferrara, 2001]. 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 ще 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

1. У ранні терміни гестації (5-12 тижнів) може розвиватися два типа плацентарної (вільозної) недостатності, спільними рисами яких є зниження васкуляризації хоріальних ворсин.

2. Перший тип характеризується зниженням концентрації хоріонічного гонадотропіну та плацентарного лактогену у трофобласті, морфологічними проявами гальмування розвитку хоріальних ворсин з підсиленням утворенням цитотрофобласта хоріальних ворсин.

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

Перспектива подальших досліджень полягає у встановленні кореляцій концентрації хоріонічного 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 із змінами концентрацій вказаних гормонів.

## ЛІТЕРАТУРА

1. Давиденко І. С. Иммуногистохимия плацентарного лактогена с помощью компьютерной микроденситометрии в синцитиотрофобласте плаценты в связи с железодефицитной анемией беременных / І. С. Давиденко, Т. Д. Задорожна // Здоровье женщины. – 2005. – № 2 (22). – С. 35–38.
2. Заболотна М. Л. Пролактин, хоріонічний гонадотропін, кортизол та простагландин Е2 в крові вагітних з галактореєю при недоношуванні вагітних / М. Л. Заболотна // Педіатрія, акушерство і гінекологія. – 2003. – № 1. – С. 89–91.
3. Каліновська І. В. Оцінка ендокринної функції плаценти і фетоплацентарного комплексу / І. В. Каліновська, О. В. Кравченко, Р. М. Нізович // Клінічна анатомія та оперативна хірургія. – 2005. – Т. 4, № 2. – С. 91–95.
4. Шмагель К. В. Плацентарный лактоген: функции, клиническое значение / К. В. Шмагель, В. А. Черешнев // Акушерство и гинекология. – 2003. – № 3. – С. 9–12.
5. A structural and immunological study of chorionic gonadotropin production by trophoblast girdle and cup cells / F. B. P. Wooding, G. Morgan, A. L. Fowden, W. R. Allen // Placenta. – 2001. – Vol. 22. – P. 749–767.
6. Benirschke K. Pathology of the human placenta / K. Benirschke, P. Kaufmann. – [4-th ed.]. – New York: Springer, 2000. – 948 p.
7. Carmeliet P. Molecular basis of angiogenesis: role of VEGF and VE-cadherin / P. Carmeliet, D. Collen // Ann. N.Y. Acad. Sci. – 2000. – Vol. 902, № 1. – P. 249–264.
8. Charlock-Jones D. S. Aspects of human fetoplacental vasculogenesis and angiogenesis. I. Molecular regulation / D. S. Charlock-Jones, P. Kaufmann, T. M. Mayhew // Placenta. – 2004. – Vol. 25. – P. 103–113.
9. Ferrara N. Role of vascular endothelial growth factor in regulation of physiological angiogenesis / N. Ferrara // Am. J. Physiol. Cell. Physiol. – 2001. – Vol. 280, № 6. – P. 1358–1366.
10. Islami D. Modulation of placental vascular endothelial growth factor by leptin and hCG / D. Islami, P. Bischof, D. Chardonens // Mol. Hum. Reprod. – 2003. – Vol. 9, № 7. – P. 395–398.
11. Zygmont M. HCG increases trophoblast migration in vitro via the insulin-like growth factor-II/ mannose-6 phosphate receptor / M. Zygmont, T. McKinnon, F. Herr // Mol. Hum. Reprod. – 2005. – Vol. 11. – P. 261–267.