

DOI: 10.26693/jmbs03.03.039

УДК 611-013.85:618.39

Попович А. І.

ІМУНОГІСТОХІМІЧНЕ ДОСЛІДЖЕННЯ ПЛАЦЕНТАРНОГО ЛАКТОГЕНУ ТА ПЛАЦЕНТАРНОЇ ЛУЖНОЇ ФОСФАТАЗИ У ТРОФОБЛАСТІ ХОРІАЛЬНИХ ВОРСИНОК ПРИ КАЛЬЦИНОЗІ ПЛАЦЕНТИ У ЖІНОК ІЗ ЗАЛІЗОДЕФІЦИТНОЮ АНЕМІЄЮ ВАГІТНИХ

Вищий державний навчальний заклад України
«Буковинський державний медичний університет», Чернівці, Україна

andriy_popovych@bsmu.edu.ua

Дане дослідження ґрунтується на робочій гіпотезі про те, що специфічні білки вагітності – плацентарний лактоген та плацентарна лужна фосфатаза відіграють важливу роль у процесах патологічної біомінералізації, зокрема, в розвитку кальцинозу плаценти. Встановили кількісні параметри імуногістохімічного забарвлення на плацентарний лактоген та плацентарну лужну фосфатазу в трофобласті плацент з кальцинозом у жінок із залізодефіцитною анемією вагітних у порівнянні зі спостереженнями вагітності без анемії та з фізіологічною вагітністю з урахуванням особливостей вертикального гетероморфізму плаценти. Оптична густина імуногістохімічного забарвлення на плацентарний лактоген та плацентарну лужну фосфатазу в трофобласті плацент при кальцинозах у середньому є нижчою, ніж при фізіологічній вагітності. У всіх плацентах відмічається вертикальний гетероморфізм інтенсивності забарвлення на плацентарний лактоген та плацентарну лужну фосфатазу в трофобласті, який проявляє себе збільшенням інтенсивності забарвлення в напрямку від хоріальної пластинки до базальної пластинки. Кальциноз плаценти при залізодефіцитній анемії вагітних у порівнянні зі спостереженнями без анемії характеризується меншими середніми значеннями оптичної густини забарвлення на плацентарний лактоген та плацентарну лужну фосфатазу в трофобласті в зонах під базальною пластинкою та проміжній зоні, на відміну від зони під хоріальною пластинкою.

Ключові слова: кальциноз плаценти, залізодефіцитна анемія вагітних, плацентарний лактоген, плацентарна лужна фосфатаза.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Наукова робота проведена у рамках НДР «Морфологічні аспекти патології плаценти при залізодефіцитній анемії вагітних», № державної реєстрації 01140004125.

Вступ. Дане дослідження ґрунтується на робочій гіпотезі про те, що специфічні білки вагітності – плацентарний лактоген, як гормон, який регулює обмін білків та кальцію, а також плацентарна лужна фосфатаза, яка регулює процеси дефосфорилювання, отже, і обмін кальцію, відіграють важливу роль у процесах патологічної біомінералізації, зокрема, в розвитку кальцинозу плаценти [4]. Оскільки, кальциноз плаценти часто реєструють при залізодефіцитній анемії вагітних (ЗДАВ) [8, 9], висувається припущення про те, що обмін кальцію та заліза тісно взаємопов'язані, і цей зв'язок зростає під час вагітності, оскільки у вагітних виникає різного рівня дефіцит заліза та кальцію, причому цей дефіцит, коли він має клінічні прояви, торкається широкого спектру метаболічних розладів, у т.ч. обміну білків. Плацентарний лактоген та плацентарна лужна фосфатаза в нормі імуногістохімічно виявляються в трофобласті плаценти [1, 2, 4, 7], причому найбільша інтенсивність забарвлення відмічається для синцитіотрофобласта хоріальних ворсинок плаценти та інвазивного трофобласта матково-плацентарної ділянки [1, 2]. Кальциноз плаценти розвивається як в структурах хоріального дерева так і в структурах матково-плацентарної ділянки [4, 7]. Цікавим фактом є те, що у відношенні до розташування депозитів кальцію виявляють так званий вертикальний гетероморфізм – відкладання депозитів зростає у напрямку від хоріальної пластинки до базальної пластинки [4, 7]. Таким чином, варто вважати за доцільним вивчити кількісні параметри імуногістохімічного забарвлення на плацентарний лактоген та плацентарну лужну фосфатазу в аспекті особливостей вертикального гетероморфізму плаценти.

Мета дослідження. Встановити кількісні параметри імуногістохімічного забарвлення на плацентарний лактоген та плацентарну лужну фосфатазу в трофобласті плацент з кальцинозом у жінок із залізодефіцитною анемією вагітних у порівнянні зі

спостереженнями вагітності без анемії та з фізіологічною вагітністю з урахуванням особливостей вертикального гетероморфізму плаценти.

Матеріали і методи дослідження. Досліджено 164 плаценти з кальцинозом, при цьому діагноз ЗДАВ виставлено у 84 вагітних, решта спостережень кальцинозу плаценти була без анемії – 80. Окрім того, досліджено 30 плацент фізіологічної вагітності. Кальцієву природу депозитів доводили по серійним зрізам на основі гістохімічної методики на кальцій з алізариновим червоним.

Робота була проведена відповідно до вимог «Інструкції про проведення судово-медичної експертизи» (наказ МОЗ України №6 від 17.01.1995), відповідно до вимог і норм, типовим положенням з питань етики МОЗ України № 690 від 23.09.2009 р.

Шматочки плаценти фіксували 24 години в нейтральному забуференому за Ліллі 10% розчині формаліну, після наступного зневоднювання у висхідній батареї спиртів та заливкою в парафін при 58° С. Гістологічні зрізи 5 мкм завтовшки використовували для постановки імуногістохімічної методики із застосуванням первинних антитіл проти специфічних плацентарних білків – плацентарного лактогену та плацентарної лужної фосфатази (Dako). Візуалізацію первинних антитіл проводили полімерною системою Dako із барвником діамінобензидином. Величину оптичної густини імуногістохімічного специфічного забарвлення вимірювали у відносних одиницях оптичної густини (в.од.опт.густ.) методом зондової комп'ютерної мікроденситометрії (в діапазоні від 0 – відсутність забарвлення, тобто абсолютна прозорість; до 1 – максимальне забарвлення, тобто абсолютна непрозорість) за допомогою комп'ютерної програми ImageJ (версія 1.48v, вільна ліцензія, W. Rasband, National Institute of Health, USA, 2015) [5], шляхом логарифмічного перетворення середньої величини яскравості в кожному «зонді» у відносні одиниці оптичної густини. Для встановлення вертикального гетероморфізму в плацентах, поперечні зрізи плаценти розділяли на три зони: зона А (ворсинки під хоріальною пластинкою), зона В (ворсинки проміжної зони), та зона С (ворсинки під базальною пластинкою).

Для кожного показника у групах дослідження вираховували середню арифметичну та її похибку, порівняння між групами дослідження здійснювали за допомогою двобічного непарного критерію Стьюдента в середовищі комп'ютерної програми PAST 3.17 (вільна ліцензія) [6]. Для обґрунтування використання параметричних методів статистики попередньо виконували перевірку на нормальність розподілу величин у вибірках методом Shapiro-Wilki за допомогою вищевказаної комп'ютерної

програми. Статистично значущими вважали розбіжності між групами дослідження на рівні $p \leq 0,05$.

Результати дослідження та їх обговорення.

Імуногістохімічне дослідження вивчених плацентарний лактоген носило дрібногранулярний характер у всіх спостереженнях і локалізувалося переважно у синцитіотрофобласті хоріальних ворсинок плаценти. Інша локалізація – інвазивний трофобласт базальної пластинки (як фрагмента матково-плацентарної ділянки), однак таких клітин було порівняно небагато, тому їх не залучали до аналізу. В ході дослідження не було відмічено, щоби інтенсивність забарвлення залежала від типу хоріальних ворсинок (тип ворсинок визначали за методикою [3]), однак відмічений вертикальний гетероморфізм забарвлення – різниця між зонами А, В, С. Середнє значення оптичної густини забарвлення на плацентарний лактоген при фізіологічній вагітності становило $0,395 \pm 0,0023$ в.од.опт.густ., що було вище ($p < 0,05$), ніж середні показники при спостереженнях кальцинозу плаценти у жінок без анемії – $0,312 \pm 0,0014$ в.од.опт.густ. та при ЗДАВ – $0,270 \pm 0,0015$ в.од.опт.густ. При цьому мала місце розбіжність між середніми показниками кальцинозу плаценти в жінок зі ЗДАВ та без неї ($p < 0,05$), а саме – при кальцинозі зі ЗДАВ оптична густина була в середньому меншою, ніж при кальцинозі без анемії.

При вивченні вертикального гетероморфізму щодо розподілу інтенсивності імуногістохімічного забарвлення на плацентарний лактоген виявлено, що оптична густина забарвлення у середньому є найменшою в зоні А (під хоріальною пластинкою), а найбільшою – в зоні С (під базальною пластинкою), такий гетероморфізм відмічалось в усіх групах дослідження (**табл. 1**). Разом з тим, помічено, що тоді, коли по зоні А при кальцинозі плаценти між жінками зі ЗДАВ та без неї немає розбіжності в оптичній густині забарвлення на плацентарний лактоген, то по зонам В та С розбіжність має місце з високим рівнем вірогідності – $p < 0,001$ (**табл. 1**).

Імуногістохімічне дослідження щодо плацентарної лужної фосфатази показало, що позитивне забарвлення носило переважно дрібногранулярний характер локалізувалося виключно в синцитіотрофобласті хоріальних ворсинок плаценти. Не було відмічено, щоби інтенсивність забарвлення залежала від типу хоріальних ворсинок, однак, як і для плацентарного лактогену, хоча відмічений вертикальний гетероморфізм забарвлення. Середнє значення оптичної густини забарвлення на плацентарну лужну фосфатазу при фізіологічній вагітності становило $0,289 \pm 0,0027$ в.од.опт.густ., що було вище ($p < 0,05$), ніж середні показники при

Таблиця 1 – Оптична густина імуногістохімічного забарвлення (в.од.опт.густ.) на плацентарний лактоген у трофобласті хоріальних ворсинок плаценти при її кальцинозі залежно від наявності анемії у вагітних ($M \pm m$)

| Зони дослідження плаценти при вивченні вертикального гетероморфізму | Спостереження фізіологічної вагітності без кальцинозу n=30 | Спостереження кальцинозу плаценти у жінок без анемії протягом вагітності n=80 | Спостереження кальцинозу плаценти при залізодефіцитній анемії вагітних (I-II ступінь тяжкості) n=84 |
|---|--|---|---|
| Зона А | 0,347±0,0024 | 0,248±0,0018 Pф<0,001 | 0,244±0,0013 Pф<0,001 |
| Зона В | 0,408±0,0022 | 0,316±0,0015 Pф<0,001 | 0,279±0,0018 Pф<0,001 Pк<0,001 |
| Зона С | 0,429±0,0025 | 0,371±0,0012 Pф<0,001 | 0,288±0,0017 Pф<0,001 Pк<0,001 |

Примітки: Pф – розбіжність із середніми показниками фізіологічної вагітності Pк – розбіжність у середніх показниках між групами дослідження з кальцинозом Порівняння розбіжностей у середніх тенденціях між групами дослідження проведені за допомогою непарного двобічного критерію Стьюдента. У разі недосягнення рівня вірогідності P<0,05 величина P не подається.

спостереженнях кальцинозу плаценти у жінок без анемії – 0,247±0,0015 в.од.опт.густ. та при ЗДАВ – 0,233±0,0014 в.од.опт.густ. При цьому, мала місце розбіжність між середніми показниками кальцинозу плаценти в жінок зі ЗДАВ та без неї (p<0,05), а саме – при кальцинозі зі ЗДАВ оптична густина була у середньому меншою, ніж при кальцинозі без анемії.

При вивченні вертикального гетероморфізму щодо розподілу інтенсивності імуногістохімічного забарвлення на плацентарну лужну фосфатазу була зафіксована картина, яка подібна до вищеписаного розподілу плацентарного лактогену, тобто оптична густина забарвлення в середньому є найменшою в зоні А (під хоріальною пластинкою), а найбільшою – в зоні С (під базальною пластинкою), це відмічалось в усіх групах дослідження (табл. 2). Разом з тим, помічено, що тоді, коли при

кальцинозі плаценти між жінками зі ЗДАВ та без неї немає розбіжності в оптичній густині забарвлення на плацентарний лактоген по зоні А, то по зонам В та С розбіжність має місце з високим рівнем вірогідністю – p<0,001 (табл. 2).

Висновки

1. Оптична густина імуногістохімічного забарвлення на плацентарний лактоген та плацентарну лужну фосфатазу в трофобласті плацент при кальцинозах у середньому є нижчою, ніж при фізіологічній вагітності.
2. У всіх плацентах відмічається вертикальний гетероморфізм інтенсивності забарвлення на плацентарний лактоген та плацентарну лужну фосфатазу в трофобласті, який проявляє себе збільшенням інтенсивності забарвлення в напрямку від хоріальної пластинки (зона А) до базальної пластинки (зона С).

Таблиця 2 – Оптична густина імуногістохімічного забарвлення (в.од.опт.густ.) на плацентарну лужну фосфатазу в трофобласті хоріальних ворсинок плаценти при її кальцинозі залежно від наявності анемії у вагітних ($M \pm m$)

| Зони дослідження плаценти при вивченні вертикального гетероморфізму | Спостереження фізіологічної вагітності n=30 | Спостереження кальцинозу плаценти у жінок без анемії протягом вагітності n=80 | Спостереження кальцинозу плаценти при залізодефіцитній анемії вагітних (I-II ступінь тяжкості) n=84 |
|---|---|---|---|
| Зона А | 0,204±0,0027 | 0,192±0,0013 Pф<0,001 | 0,194±0,0012 Pф<0,001 |
| Зона В | 0,314±0,0028 | 0,252±0,0015 Pф<0,001 | 0,236±0,0014 Pф<0,001 Pк<0,001 |
| Зона С | 0,349±0,0027 | 0,298±0,0016 Pф<0,001 | 0,268±0,0014 Pф<0,001 Pк<0,001 |

Примітки: Pф – розбіжність із середніми показниками фізіологічної вагітності Pк – розбіжність у середніх показниках між групами дослідження з кальцинозом Порівняння розбіжностей у середніх тенденціях між групами дослідження проведені за допомогою непарного двобічного критерію Стьюдента. У разі недосягнення рівня вірогідності P<0,05 величина P не подається.

3. Кальциноз плаценти при залізодефіцитній анемії вагітних у порівнянні зі спостереженнями без анемії характеризується меншими середніми значеннями оптичної густини забарвлення на плацентарний лактоген та плацентарну лужну фосфатазу в трофобласті в зонах під базальною пластинкою (зона С) та проміжній зоні (зона В), на відміну від зони під хоріальною пластинкою (зона А).

Перспективи подальших досліджень. Надалі перспективним напрямком досліджень вбачаємо визначення кореляційних зв'язків між параметрами оптичної густини забарвлення на плацентарний лактоген та плацентарну лужну фосфатазу в трофобласті при кальцинозі плаценти та при залізодефіцитній анемії вагітних.

References

1. Garvasyuk OV, Davydenko IS, Davydenko OM. Placental alkaline phosphatase in trophoblast placenta of pregnant women with iron deficiency anemia in conditions of premature maturation of a choral tree. *Clinical anatomy and operative surgery*. 2017; 16 (1): 11-6. [Ukrainian]
2. Garvasyuk OV, Davydenko IS, Tashchuk KG. Immunohistochemical concentration of placental hormones in the trophoblast of choral villi in pregnant women with iron deficiency anemia at premature ripening of a choral tree. *Bukovinian Medical Herald*. 2017; 21 (1): 34-8. [Ukrainian]
3. Davydenko IS, Tiuleneva OA. Improvement of classification of placental choral villi, its substantiation by methods of information analysis and practical application, as achievements of scientists of the department of Pathomorphology of the Bukovinian State Medical University. *Clinical anatomy and operative surgery*. 2014; 13 (2): 108-13. [Ukrainian]
4. Benirschke K, Burton GJ, Baergen RN. *Pathology of the human placenta*. 6th ed. New York: Springer, 2012; 974 p. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-23941-0>
5. Ferreira T, Rasband W. *Image J user guide 1.48 v*. National Institute of Health, USA, 2015. 187 p.
6. Hammer Ø. PAST: Paleontological Statistics, Version 3.16. *Reference manual*. Oslo: Natural History Museum University of Oslo, 2016. 243 p.
7. Pijnenborg R, Brosens I, Romero R. *Placental Bed Disorders*. Cambridge University Press, 2010. 301 p. <https://doi.org/10.1017/CBO9780511750847>
8. Ritu BS, Shema N. Study of Histological changes in placenta of anaemic mothers. *J of Dental and Medical Sciences*. 2013; 9 (3): 42-6. <https://doi.org/10.9790/0853-0934246>
9. Rohini M, Yogesh AS, Goyal M, Kurrey Praveen. Histological changes in the placenta from severe anaemic mothers. *International Journal of Medical and Health Sciences*. 2013; 2 (1): 31-5.

УДК 611-013.85:618.39

ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ПЛАЦЕНТАРНОГО ЛАКТОГЕНА И ПЛАЦЕНТАРНОЙ ЩЕЛОЧНОЙ ФОСФАТАЗЫ В ТРОФОБЛАСТЕ ХОРИАЛЬНЫХ ВОРСИНОК ПРИ КАЛЬЦИНОЗЕ ПЛАЦЕНТЫ У ЖЕНЩИН С ЖЕЛЕЗОДЕФИЦИТНОЙ АНЕМИЕЙ БЕРЕМЕННЫХ

Попович А. И.

Резюме. Данное исследование основывается на рабочей гипотезе о том, что специфические белки беременности – плацентарный лактоген и плацентарная щелочная фосфатаза, играют важную роль в процессах патологической биоминерализации, в частности, в развитии кальциноза плаценты. Установили количественные параметры иммуногистохимической окраски на плацентарный лактоген и плацентарную щелочную фосфатазу в трофобласте плацент с кальцинозом у беременных женщин с железодефицитной анемией, по сравнению с наблюдениями беременности без анемии, и с физиологической беременностью с учетом особенностей вертикального гетероморфизма плаценты. Оптическая плотность иммуногистохимической окраски на плацентарный лактоген и плацентарную щелочную фосфатазу в трофобласте плацент при кальцинозе в среднем ниже, чем при физиологической беременности. Во всех плацентах отмечается вертикальный гетероморфизм интенсивности окрашивания на плацентарный лактоген и плацентарную щелочную фосфатазу в трофобласте, который проявляет себя увеличением интенсивности окрашивания в направлении от хоральной пластинки до базальной пластинки. Кальциноз плаценты при железодефицитной анемии беременных по сравнению с наблюдениями без анемии характеризуется меньшими средними значениями оптической плотности окрашивания на плацентарный лактоген и плацентарную щелочную фосфатазу в трофобласте в зонах под базальной пластинкой и промежуточной зоне, в отличие от зоны под хоральных пластинкой.

Ключевые слова: кальциноз плаценты, железодефицитная анемия беременных, плацентарный лактоген, плацентарная щелочная фосфатаза.

UDC 611-013.85:618.39

Immunohistochemical Study of Placental Lactogen and Placental Alkaline Phosphatase in the Trophoblast of Chorionic Villi in Placental Calcinosi in Pregnant Women with Iron-deficiency Anemia

Popovych A. I.

Abstract. This study is based on the working hypothesis that specific proteins of pregnancy: placental lactogen, a hormone regulating the exchange of proteins and calcium, and placental alkaline phosphatase, regulating the processes of dephosphorylation and therefore the metabolism of calcium, play an important role in pathological processes of biomineralization, in particular, in the development of placental calcinosis. So far as calcinosis of the placenta is often registered with iron-deficiency anemia in pregnant women, it is suggested that calcium and iron metabolism are closely interconnected, and this relationship increases during pregnancy. It is well-known that pregnant women have different levels of iron and calcium deficiency, and when this deficiency has clinical manifestations, it affects a wide range of metabolic disorders, including exchange of proteins.

The purpose of the study is to evaluate quantitative parameters of immunohistochemical staining of placental lactogen and placental alkaline phosphatase in trophoblast of placenta with calcinosis in pregnant women with iron deficiency anemia in comparison with pregnancy observations without anemia and with physiological pregnancy, taking into account the peculiarities of vertical placental heteromorphism.

Material and methods of research. 164 placentas with calcinosis were studied. The diagnosis of iron deficiency anemia in pregnant women was exhibited in 84 women, the rest of placental calcinosis were without anemia – 80 women. We also studied 30 placentas of physiological pregnancy. Immunohistochemical method was used to determine the optical density of staining on placental lactogen and placental alkaline phosphatase.

Results and discussion. The optical density of immunohistochemical staining on placental lactogen and placental alkaline phosphatase in trophoblast of placenta in calcinosis is on average lower than in physiological pregnancy. In all placentas, the vertical heteromorphism of the intensity of coloration on placental lactogen and placental alkaline phosphatase in the trophoblast was marked. This was manifested by increasing the intensity of the staining in the direction from the choroid plate (zone A) to the basal plate (zone C).

Conclusion. Placenta calcinosis in iron deficiency anemia in pregnant women compared with non anemia is characterized by lower average values of the optical density of coloration on placental lactogen and placental alkaline phosphatase in trophoblast in zones under the basal plate (zone C) and the intermediate zone (zone B), unlike the zone under choroid plate (zone A).

Keywords: placental calcinosis, iron deficiency anemia in pregnant women, placental lactogen, placental alkaline phosphatase.

Стаття надійшла 28.02.2018 р.

Рекомендована до друку на засіданні редакційної колегії після рецензування