

УДК 618.344-02:616-022.7/9:618.39
DOI: 10.24061/1727-0847.18.3.2019.9

А.В. Гошовська, В.М. Гошовський*, С.М. Ясніковська

*Вищий державний навчальний заклад України «Буковинський державний медичний університет», м. Чернівці; *Комунальне некомерційне підприємство «Міський клінічний пологовий будинок № 1», м. Чернівці*

ДОСЛІДЖЕННЯ ТРОФОБЛАСТА ПРИ TORCH-ІНФЕКЦІЇ НА МАТЕРІАЛІ АБОРТІВ У ПЕРШОМУ ТРИМЕСТРІ ВАГІТНОСТІ

Резюме. Дослідження є фрагментом серії імуногістохімічних досліджень трофобласта при TORCH-інфекції, які заплановано провести в різні терміни гестації. Стаття присвячена результатам досліджень трофобласта в термін гестації 7-8 тижнів. Дослідженню підлягав абортний матеріал 7-8 тижнів гестації. Основну групу дослідження становили 18 спостережень TORCH-інфекції, а контрольну – 17 спостережень перерваної вагітності без ознак інфекційного процесу (аборти за соціальними показами). Виконували імуногістохімічну методику на металопротеїназу-2 з первинними антитілами та полімерною системою візуалізації антигену з використанням діамінобензидину виробника DAKO. Методом комп'ютерної мікроденситометрії у спеціалізованій комп'ютерній програмі ImageJ оцінювали оптичну густину забарвлення. Згідно з результатами імуногістохімічних досліджень з використанням методу комп'ютерної мікроденситометрії в термін гестації 7-8 тижнів, як при TORCH-інфекції так і без інфекційного процесу, найбільша експресія металопротеїнази-2 відмічається в інвазивномутрофобласті, найменша – в синцитіотрофобласті хоріальних ворсинок, а проміжні показники відмічаються в цитотрофобласті хоріальних ворсинок та цитотрофобласті клітинних колонок. При TORCH-інфекції експресія металопротеїнази-2 знижується у всіх чотирьох типах трофобласта (цитотрофобласт хоріальних ворсинок; цитотрофобласт клітинних колонок; інвазивнийцитотрофобласт у фрагментах ендометрію), за винятком синцитіотрофобластахоріальних ворсинок.

Ключові слова: TORCH-інфекція, трофобласт, металопротеїназа-2.

Для завершення вагітності вагоме значення має матково-плодово-плацентарна взаємодія [1-4]. Ця стаття присвячена результатам досліджень трофобласта в термін гестації 7-8 тижнів. У наведений період вагітності визначаються наступні типи трофобласта, які доступні для масових досліджень: 1) цитотрофобласт хоріальних ворсинок; 2) синцитіотрофобласт (симпластотрофобласт) хоріальних ворсинок; 3) цитотрофобласт клітинних колонок (розташовується між хоріальними ворсинками у вигляді нерегулярних груп клітин – осередків різної форми та розмірів); 4) інвазивний цитотрофобласт у фрагментах ендометрію [5]. Трофобласт різних типів у нормі дає позитивну чітку експресію антигену металопротеїнази-2 (МП-2) [6, 7], що є підставою для імуногістохімічних досліджень МП-2 у трофобласті. На сьогодні не встановлені особливості експресії МП-2 у різних типах трофобласта при TORCH-інфекції. Важливість досліджень інвазивного цитотрофобласта пов'язана із його значенням для формування матково-плацентарного кровообігу [4, 8, 9]. Зміни, які відбуваються у трофобласті в ранні те-

рміни гестації, можуть бути навіть без розвитку типового запального процесу [10].

Мета дослідження: встановити особливості експресії МП-2 у різних типах трофобласта при TORCH-інфекції імуногістохімічним методом порівняно зі спостереженнями без інфекційного процесу.

Матеріал і методи. Дослідженню підлягав абортний матеріал 7-8 тижнів гестації. Основну групу дослідження становили 18 спостережень TORCH-інфекції, а контрольну – 17 спостережень перерваної вагітності без ознак інфекційного процесу (аборти за соціальними показами). Матеріал фіксували 22-24 години у 10 % нейтральному забуференому розчині формаліну, проводили етанолову дегідратацію та заливку в парафін. На серійних гістологічних зрізах 5 мкм завтовшки виконували імуногістохімічну методику на МП-2 з первинними антитілами та полімерною системою візуалізації антигену з використанням діамінобензидину виробника DAKO.

Отримували цифрові копії зображення за допомогою мікроскопа Delta Optical Evolution 100

© Гошовська А.В., Гошовський В.М., Ясніковська С.М., 2019

(планахроматичні об'єктиви) та цифрової камери Olympus SP-550UZ. Цифрові зображення аналізували у спеціалізованій для гістологічних досліджень комп'ютерній програмі ImageJ (1.48v, вільна ліцензія, W. Rasband, National Institute of Health, USA, 2015) [11], зокрема, проводили комп'ютерну мікроденситометрію, а саме: оцінювали оптичну густину забарвлення (у діапазоні від «0» до «1») на підставі логарифмічних перетворень величини яскравості (у градаціях від «0» до «255»). Для оптичної густини обраховували середню арифметичну та її похибку, порівняння між групами дослідження здійснювали непараметричним методом Mann-Whitney (комп'ютерна програма PAST 3.25, вільна ліцензія, O. Hammer, 2019) [12].

Результати дослідження та їх обговорення.

Візуальне дослідження імуногістохімічних препаратів показало, що позитивне (коричневе) забарвлення на МП-2 в цитоплазмі різних типів трофобласта носить дрібно- або великогранулярний характер і різний ступінь забарвлення (рисунок).

Насиченість гранулами має певну закономірність залежно від типу трофобластичних клітин. Різний ступінь забарвлення і різна насиченість гранулами цитоплазми трофобласта є об'єктивним підґрунтям для проведення кількісних досліджень, наприклад, комп'ютерної мікроденситометрії, яка і була виконана в цьому дослідженні. Різницю в характері розподілу гранул, які позитивно профарбовуються на МП-2, особливо добре видно на прикладі трофобласта, який вкриває поверхню хоріальних ворсинок (див. рис.).

Зокрема, синцитіотрофобласт містить майже виключно дрібні гранули, які мають хоч і чітке, але порівняно слабке профарбовування. Слід

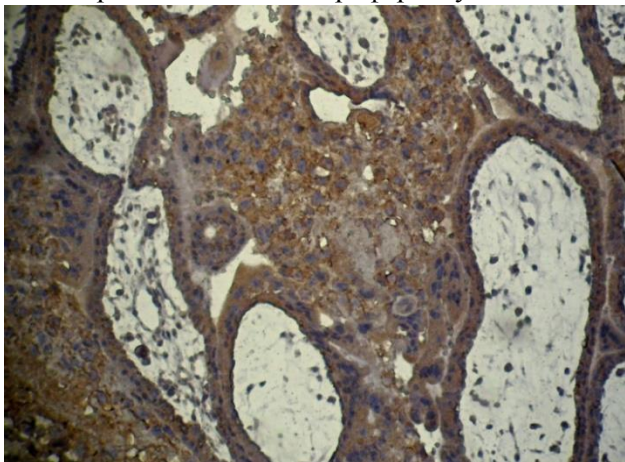


Рисунок. Термін гестації 8 тижнів. TORCH-інфекція. Фрагменти хоріальних ворсинок. Імуногістохімічна методика на металопротеїназу-2 (полімерна система детекції антигену, пероксидазна мітка та ДАБ). Об.20^x. Ок.10^x

вказати на те, що насиченість гранулами цитоплазми синцитіотрофобласта висока (їх багато на одиницю площі). У цитотрофобласті хоріальних ворсинок спостерігаємо іншу картину: у цитоплазмі знаходяться приблизно в рівному співвідношенні сильно профарбовані гранули (вони, як правило, мають найбільші або середні розміри) та світлі дрібні гранули. Обидва види гранул у цитотрофобласті хоріальних ворсинок розподіляються по цитоплазмі доволі рівномірно. Вищеописаний характер розподілу різних видів гранул МП-2 по цитоплазмі трофобласта хоріальних ворсинок, напевно, віддзеркалює процеси дозрівання вільозного трофобласта, адже відомо, що цитотрофобласт хоріальних ворсинок з часом «вливається» в синцитіотрофобласт [5], який є більш зрілою структурою порівняно із цитотрофобластом.

Таблиця

Оптична густина забарвлення (в.од.опт.густ.) цитоплазми різних типів трофобласта при застосуванні імуногістохімічної методики на металопротеїназу-2 при TORCH-інфекції (M±m)

| Типи трофобласта | Основна група (TORCH-інфекція) n=18 | Контрольна група n=17 |
|--|-------------------------------------|-----------------------|
| Цитотрофобласт хоріальних ворсинок | 0,242±0,0018 P=0,003 | 0,307±0,0014 |
| Синцитіотрофобласт хоріальних ворсинок | 0,116±0,0012 P>0,05 | 0,117±0,0013 |
| Цитотрофобласт клітинних колонок | 0,244±0,0020 P=0,002 | 0,319±0,0015 |
| Інвазивний цитотрофобласт | 0,319±0,0023 P<0,001 | 0,415±0,0022 |

Як видно з даних таблиці, оптична густина забарвлення синцитіотрофобласта в нормі і при TORCH-інфекції має найнижчі середні показники серед усіх типів трофобласта. При цьому TORCH-інфекція не змінює оптичну густину імуногістохімічного забарвлення на МП-2. Тоді як, відзначено, що при TORCH-інфекції суттєво знижується оптична густина забарвлення на МП-2 (таблиця) – у середньому на 18,64 %. Це вказує на зниження експресії МП-2 при TORCH-інфекції.

Це цілком очікуваний результат, адже процеси інвазії клітин (пухлинних і непухлинних) пов'язують, у першу чергу, саме з цитоплазматичними

металопротеїназами. При цьому насиченість гранулами цитоплазми інвазивного цитотрофобласта є найбільш високою серед усіх типів трофобласта в термін гестації 7-8 тижнів. При TORCH-інфекції оптична густина забарвлення на МП-2 знижується в середньому на 23,14 % ($p < 0,05$).

Отже, при TORCH-інфекції експресія МП-2 знижується у всіх типах трофобласта, за винятком синцитіотрофобласта хоріальних ворсинок.

Висновки. 1. Згідно з результатами імуногістохімічних досліджень з використанням методу комп'ютерної мікроденситометрії у термін гестації 7-8 тижнів, як при TORCH-інфекції так і без

інфекційного процесу, найбільша експресія металопротеїнази-2 відзначається в інвазивному трофобласті, найменша – в синцитіотрофобласті хоріальних ворсинок, а проміжні показники відзначаються в цитотрофобласті хоріальних ворсинок та цитотрофобласті клітинних колонок. 2. При TORCH-інфекції експресія металопротеїнази-2 знижується у всіх типах трофобласта, за винятком синцитіотрофобласта хоріальних ворсинок.

Перспектива подальших досліджень. Перспектива полягає в дослідженні експресії металопротеїнази-2 при TORCH-інфекції в інші терміни гестації з подальшим узагальненням інформації.

Список використаної літератури

1. Gendie EL, Danièle E-B. *Maternal-Fetal-Placental Communication and Pregnancy Outcome. Placenta.* 2015;36(1):S1-S66. режим доступу: <https://www.sciencedirect.com/journal/placenta/vol/36/suppl/S1>.
2. Masayoshi A. *Placental findings as cause of neonatal deaths. Placenta.* 2019;87:74-80. режим доступу: <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2019.08.067>.
3. Masayoshi A, Tomio F. *How examination of the placenta in pregnancy loss can help with future outcomes. Placenta.* 2019;87:74-8. режим доступу: <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2019.08.068>.
4. Pijnenborg R, Brosens I, Romero R. *Placental Bed Disorders.* Cambridge: Cambridge University Press, 2010. 301 p. режим доступу: <https://doi.org/10.1017/CBO9780511750847>.
5. Benirschke K, Burton GJ, Vaergen RN. *Pathology of the human placenta: [6th ed].* New York: Springer, 2012. 974 p. режим доступу: <https://doi.org/10.1007/b137920>.
6. Гошовська АВ, Давиденко ІС, Давиденко ОМ, Гошовський ВМ. *Імуногістохімічне дослідження металопротеїнази-2 у трофобласті при TORCH-інфекції на матеріалі абортів у термін гестації 5-6 тижнів. Клінічна анатомія та оперативна хірургія.* 2016;15(4):70-3. режим доступу: <http://kaos.bsmu.edu.ua/article/view/1727-0847.15.4.2016.101>.
7. Kazumasa T, Sakurako M, Akiko O, Jota M, Shoko T, Takashi M, Eriko E, et al. *EG-VEGF enhances the trophoblast invasion through activation of MMP-2 and MMP-9 via PROKR2 in the human trophoblast cell lines. Placenta.* 2019;87:66-74. режим доступу: <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2019.08.037>.
8. Aghwane R, Schaa C, Hutchinson JC, Virasamic A, Zuluaga MA, Sebire N, Arthurs OJ, et al. *Micro-CT and histological investigation of the spatial pattern of feto-placental vascular density. Placenta.* 2019;88:36-43. режим доступу: <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2019.09.014>.
9. Rie O, Yuri S, Chizuko I, Miyuki T, Hanae K, Shinya H, Gen H, et al. *Image analysis and pathological diagnosis of placental slow blood flow region. Placenta.* 2019;87:70-1. режим доступу: <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2019.08.055>.
10. Nobuko M, Takeshi N, Kazuki M, Ayumi T, Keiichi K, Takayuki I, Yutaka O, et al. *Impact of human cytomegalovirus infection on trophoblast transcriptome. Placenta.* 2019;87:61-5. режим доступу: <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2019.08.016>.
11. Ferreira T, Rasband W. *Image J. User Guide.* New York: National Institute of Health. 2019. 187 p. режим доступу: <https://imagej.nih.gov/ij/docs/guide/146.html>.
12. Hammer Ø. *PAST: Paleontological Statistics, Version 3.25. Reference manual.* Oslo: Natural History Museum University of Oslo, 2019. 275 p. режим доступу: <https://folk.uio.no/ohammer/past/past3manual.pdf>.

References

1. Gendie EL, Danièle E-B. *Maternal-Fetal-Placental Communication and Pregnancy Outcome. Placenta.* 2015;36(1):S1-S66. Available from: <https://www.sciencedirect.com/journal/placenta/vol/36/suppl/S1>.
2. Masayoshi A. *Placental findings as cause of neonatal deaths. Placenta.* 2019;87:74-80. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2019.08.067>.
3. Masayoshi A, Tomio F. *How examination of the placenta in pregnancy loss can help with future outcomes. Placenta.* 2019;87:74-8. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2019.08.068>.
4. Pijnenborg R, Brosens I, Romero R. *Placental Bed Disorders.* Cambridge: Cambridge University Press; 2010. 301 p. Available from: <https://doi.org/10.1017/CBO9780511750847>.

5. Benirschke K, Burton GJ, Baergen RN. *Pathology of the human placenta: [6th ed]. New York: Springer; 2012. 974 p. Available from: <https://doi.org/10.1007/b137920>.*
6. Hoshovska AV, Davydenko IS, Davydenko OM, Hoshovskyi VM. *Imunohistokhimichne doslidzhennya metaloproteyinyazy-2 u trofoblasti pry TORCH-infektsiyi na materialy abortiv u termin hestatsiyi 5-6 tyzhniv [Immunohistochemical study of metalloproteinases-2 in the trophoblast in case of torch-infections on the material of abortions at the gestational term of 5-6 weeks]. Clinical Anatomy and Surgery. 2016;15(4):70-3. DOI: <https://doi.org/10.24061/1727-0847.15.4.2016.101> (in Ukrainian).*
7. Kazumasa T, Sakurako M, Akiko O, Jota M, Shoko T, Takashi M, et al. *EG-VEGF enhances the trophoblast invasion through activation of MMP-2 and MMP-9 via PROKR2 in the human trophoblast cell lines. Placenta. 2019;87:66-74. DOI:10.1016/j.placenta.2019.08.037.*
8. Aghwane R, Schaa C, Hutchinson JC, Virasamic A, Zuluaga MA, Sebire N, et al. *Micro-CT and histological investigation of the spatial pattern of feto-placental vascular density. Placenta. 2019;88:36-43. doi: 10.1016/j.placenta.2019.09.014*
9. Rie O, Yuri S, Chizuko I, Miyuki T, Hanae K, Shinya H, et al. *Image analysis and pathological diagnosis of placental slow blood flow region. Placenta. 2019;87:70-1. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2019.08.055>.*
10. Nobuko M, Takeshi N, Kazuki M, Ayumi T, Keiichi K, Takayuki I, et al. *Impact of human cytomegalovirus infection on trophoblast transcriptome. Placenta. 2019;87:61-5. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2019.08.016>.*
11. Ferreira T, Rasband W. *Image J. User Guide. New York: National Institute of Health. 2019. 187 p. Available from: <https://imagej.nih.gov/ij/docs/guide/146.html>.*
12. Hammer Ø. *PAST: Paleontological Statistics, Version 3.25. Reference manual. Oslo: Natural History Museum University of Oslo, 2019. 275 p. Available from: <https://folk.uio.no/ohammer/past/past3manual.pdf>.*

ИССЛЕДОВАНИЕ ТРОФОБЛАСТА ПРИ TORCH-ИНФЕКЦИИ НА МАТЕРИАЛЕ АБОРТОВ В ПЕРВОМ ТРИМЕСТРЕ БЕРЕМЕННОСТИ

Резюме. Исследование является фрагментом серии иммуногистохимических исследований трофобласта при TORCH-инфекции, которые запланировано провести в различные сроки гестации. Эта статья посвящена результатам исследований трофобласта в срок гестации 7-8 недель. Исследованию подвергался абортный материал 7-8 недель гестации. Основную группу исследования составили 18 наблюдений TORCH-инфекции, а контрольную – 17 наблюдений прерванной беременности без признаков инфекционного процесса (аборты по социальным показаниям). Выполняли иммуногистохимическую методику на металлопротеиназы-2 с первичными антителами и полимерной системой визуализации антигена с использованием диаминобензидину производителя DAKO. Методом компьютерной микроденситометрии в специализированной компьютерной программе ImageJ оценивали оптическую плотность окраски. Согласно результатам иммуногистохимических исследований с использованием метода компьютерной микроденситометрии в срок гестации 7-8 недель, как при TORCH-инфекции так и без инфекционного процесса, самая экспрессия металлопротеиназы-2 отмечается в инвазивном трофобласте, наименьшая – в синцитиотрофобласте хориальных ворсинок, а промежуточные показатели отмечаются в цитотрофобласте хориальных ворсинок и цитотрофобласте клеточных колонок. При TORCH-инфекции экспрессия металлопротеиназы-2 снижается во всех четырех типах трофобласта (цитотрофобласт хориальных ворсинок; цитотрофобласт клеточных колонок; инвазивный цитотрофобласт в фрагментах эндометрия), кроме синцитиотрофобласта хориальных ворсинок.

Ключевые слова: TORCH-инфекция, трофобласт, металлопротеиназы-2.

INVESTIGATION OF TROPHOBLAST IN TORCH INFECTION ON ABORTION MATERIAL IN THE FIRST TRIMESTER OF PREGNANCY

Abstract. This study is a fragment of a series of immunohistochemical studies of trophoblast with TORCH infection, which are scheduled to be carried out at different gestational dates. This article deals with the results of trophoblast studies at the gestational age of 7-8 weeks. The study examined abortion material 7-8 weeks of gestation. The main group of the study consisted of 18 observations of TORCH infection, and the control group consisted of 17 observations of an aborted pregnancy without signs of an infectious process (abortion for social reasons). An immunohistochemical procedure was performed on metalloproteinases-2 with primary antibodies and polymer antigen imaging system using DAKO diaminobenzidine. The method of computer microdensitometry in a specialized computer program ImageJ evaluated the optical density of the color. According to the results of immunohistochemical studies using computer microdensitometry at the gestational age of 7-8 weeks, both with TORCH infection and without it an infectious process, strong expression of

metalloproteinase-2 is observed in the invasive trophoblast, the smallest – in the syncytiotrophoblast of the chorionic villi, and intermediate values are noted in chorionic villus cytotrophoblast and cell column cytotrophoblast. With TORCH infection the expression of metalloproteinase-2 decreases in all the four types of trophoblast (cytotrophoblast of chorionic villi; cytotrophoblast of cell columns; invasive cytotrophoblast in endometrial fragments), except for syncytiotrophoblast of chorionic villi was found.

Key words: TORCH infection, trophoblast, metalloproteinases-2.

Відомості про авторів:

Гошовська Аліса Володимирівна – кандидат медичних наук, асистент кафедри акушерства, гінекології та перинатології Вищого державного навчального закладу України «Буковинський державний медичний університет», м. Чернівці;

Гошовський Владислав Михайлович – заступник Головного лікаря Комунального некомерційного підприємства «Міський клінічний пологовий будинок № 1», м. Чернівці;

Ясніковська Світлана Михайлівна – кандидат медичних наук, доцент кафедри акушерства, гінекології та перинатології Вищого державного навчального закладу України «Буковинський державний медичний університет», м. Чернівці.

Information about authors:

Goshovskaya Alisa V. – Candidate of Medical Sciences, Assistant of the Department of Obstetrics, Gynecology and Perinatology of the HSEI of Ukraine «Bukovinian State Medical University», Chernivtsi;

Goshovsky Vladyslav M. – Deputy Head Doctor of the Communal Non-Profit Enterprise «City Clinical Maternity Hospital № 1», Chernivtsi;

Yasnikovska Svitlana M. – Candidate of Medical Sciences, Associate Professor, Department of Obstetrics, Gynecology and Perinatology, HSEI of Ukraine «Bukovinian State Medical University», Chernivtsi.

Надійшла 11.09.2019 р.

Рецензент – проф. Давиденко І.С. (Чернівці)