

УДК 611-013.84:618.39-021.8

А.В. Гошовська, І.С. Давиденко*, О.М. Давиденко, В.М. Гошовський**

*Кафедра акушерства, гінекології та перинатології (зав. – проф. О.В. Кравченко); *кафедра патологічної анатомії (зав. – проф. І.С. Давиденко); **кафедра інфекційних хвороб та епідеміології (зав. – проф. В.Д. Москалюк) Вищий державний навчальний заклад України “Буковинський державний медичний університет”, м. Чернівці*

ІМУНОГІСТОХІМІЧНЕ ДОСЛІДЖЕННЯ МЕТАЛОПРОТЕЇНАЗИ-2 У ТРОФОБЛАСТІ ПРИ TORCH-ІНФЕКЦІЇ НА МАТЕРІАЛІ АБОРТІВ У ТЕРМІН ГЕСТАЦІЇ 5-6 ТИЖНІВ

Резюме. Дане дослідження є фрагментом серії імуногістохімічних досліджень трофобласта при TORCH-інфекції, які заплановано провести в різні терміни гестації. Ця стаття присвячена результатам досліджень трофобласта в термін гестації 5-6 тижнів. Мета дослідження – імуногістохімічним методом встановити особливості експресії МП-2 у різних типах трофобласта при TORCH-інфекції порівняно зі спостереженнями без інфекційного процесу. Дослідженню підлягав абортний матеріал 5-6 тижнів гестації. Основну групу дослідження становили 16 спостережень TORCH-інфекції, а контрольну – 14 спостережень перерваної вагітності без ознак інфекційного процесу (аборти за соціальними показами). Виконували імуногістохімічну методику на металопротеїназу-2 з первинними антитілами та полімерної системою візуалізації антигену з використанням діамінобензидину виробника DAKO. Методом комп'ютерної мікроденситометрії у спеціалізованій комп'ютерній програмі ImageJ оцінювали оптичну густину забарвлення. Відповідно до результатів імуногістохімічних досліджень з використанням методу комп'ютерної мікроденситометрії в термін гестації 5-6 тижнів, як при TORCH-інфекції, так і без інфекційного процесу, найбільша експресія металопротеїнази-2 відмічається в інвазивному трофобласті, найменша – у синцитіотрофобласті хоріальних ворсинок, а проміжні показники відзначаються 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; інвазивний цитотрофобласт у фрагментах ендометрію), за винятком синцитіотрофобласта хоріальних ворсинок.

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

Дане дослідження є фрагментом серії імуногістохімічних досліджень трофобласта при TORCH-інфекції, які заплановано провести в різні терміни гестації. Ця стаття присвячена результатам досліджень трофобласта в термін гестації 5-6 тижнів. У наведений період вагітності визначаються 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 [1, 2].

Трофобласт різних типів в нормі дає позитивну чітку експресію антигену металопротеїнази-2 (МП-2) [3], що є підставою для імуногістохімічних досліджень МП-2 у трофобласті. Однак на даний час не встановлені особливості експресії МП-2 у різних типах трофобласта при TORCH-інфекції.

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

Матеріал і методи. Дослідженню підлягав абортний матеріал 5-6 тижнів гестації. Основну

© Гошовська А.В., Давиденко І.С., Давиденко О.М., Гошовський В.М., 2016

групу дослідження становили 16 спостережень TORCH-інфекції, а контрольну – 14 спостережень перерваної вагітності без ознак інфекційного процесу (аборти за соціальними показаннями). 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 (планахроматичні об'єктиви) та цифрової камери Olympus SP-550UZ. Цифрові зображення аналізували в спеціалізованій для гістологічних досліджень комп'ютерній програмі ImageJ (1.48v, вільна ліцензія, W.Rasband, National Institute of Health, USA, 2015) [4], зокрема проводили комп'ютерну мікроденситометрію, а саме: оцінювали оптичну густина 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 3.14, вільна ліцензія, O. Hammer, 2016) [5].

Результати дослідження та їх обговорення.

Візуальне дослідження імуногістохімічних препаратів показало, що позитивне (коричневе) забарвлення на МП-2 в цитоплазмі різних типів трофобласта має дрібно- або великогранулярний характер і різний ступінь забарвлення (рис. 1-3). 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 даному 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. 1). Зокрема, синцитіотрофобласт містить майже виключно дрібні гранули, які мають хоч і чітке, але порівняно слабке профарбовування. Слід вказати на те, що насиченість гранулами цитоплазми синцитіотрофобласта висока (їх багато на одиницю площі). У цитотрофобласті хоріальних ворсинок спостерігається інша картина – в цитоплазмі знаходяться

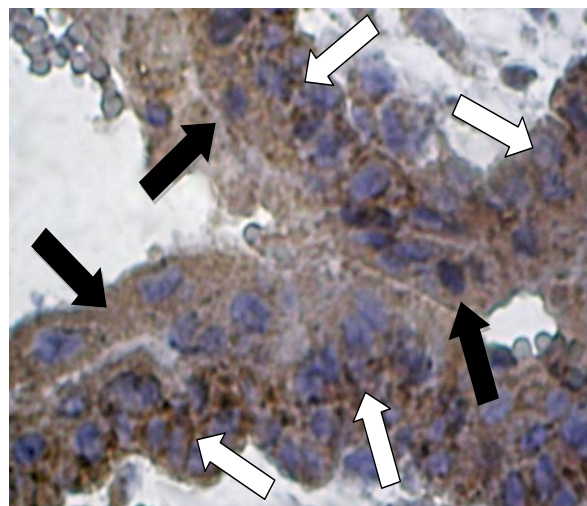


Рис. 1 TORCH-інфекція. Термін гестації 5-6 тижнів. Фрагменти хоріальних ворсинок. Цитотрофобласт хоріальних ворсинок позначений білими стрілками, синцитіотрофобласт – чорними. Імуногістохімічна методика на металопротеїназу-2 (полімерна система детекції антигену, пероксидазна мітка та ДАБ). Об. 40^x. Ок. 10^x

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 [1], який є більш зрілою структурою порівняно із цитотрофобластом.

Як видно з даних таблиці, оптична густина забарвлення синцитіотрофобласта в нормі і при TORCH-інфекції має найнижчі середні показники серед усіх типів трофобласта. Водночас TORCH-інфекція не змінює оптичну густина імуногістохімічного забарвлення на МП-2. У той же час, відмічено, що при TORCH-інфекції суттєво знижується оптична густина забарвлення на МП-2 (див. табл.) – у середньому на 16,58%. Це вказує на зниження експресії МП-2 при TORCH-інфекції.

Щодо цитотрофобласту клітинних колонок (див. рис. 2) слід відмітити, що характер гранул МП-2 і розподіл їх по цитоплазмі у цьому типі трофобласта є дуже подібним до вищеописаних особливостей гранул у цитоплазмі цитотрофобласта хоріальних ворсинок. Водночас і реакція на TORCH-інфекцію є подібною – відзначається зниження ($p < 0,05$) оптичної густини забарвлення на

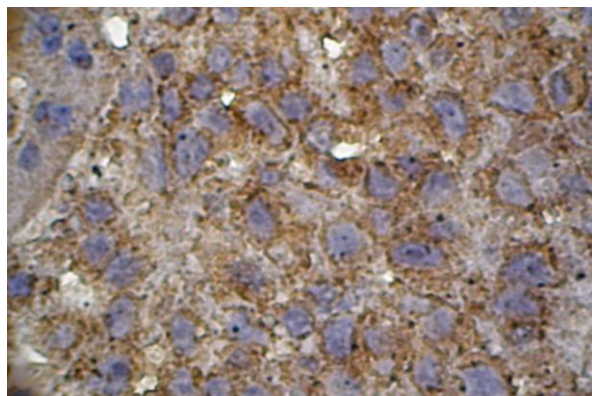


Рис. 2 TORCH-інфекція. Термін гестації 5-6 тижнів. Фрагмент клітинної колонки (у полі зору майже всі клітини відносяться до цитотрофобласту). Імуногістохімічна методика на металопротеїназу-2 (полімерна система детекції антигену, пероксидазна мітка та ДАБ). Об.40^x. Ок.10^x

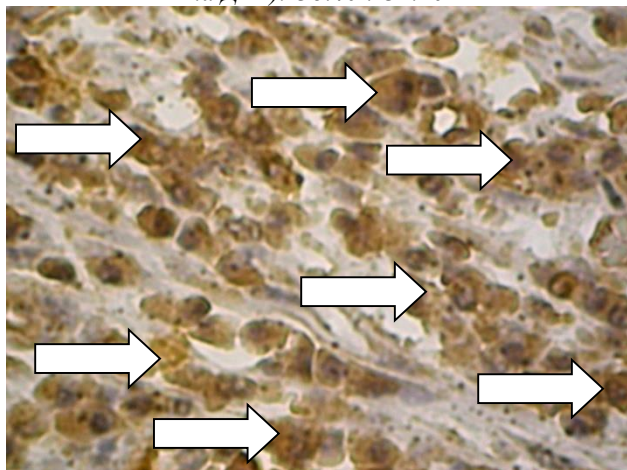


Рис. 3 TORCH-інфекція. Термін гестації 5-6 тижнів. Фрагмент ендометрію з інвазивним трофобластом (інвазивний цитотрофобласт вказано стрілками). Імуногістохімічна методика на металопротеїназу-2 (полімерна система детекції антигену, пероксидазна мітка та ДАБ). Об.20^x. Ок.10^x

МП-2 (див. табл.) – у середньому на 22,26% , тобто має місце зниження експресії МП-2.

Найбільш інтенсивне забарвлення на МП-2 відзначено в цитоплазмі інвазивного цитотрофобласта (див. рис. 3, табл.). Це цілком очікуваний результат, адже процеси інвазії клітин (пухлинних і непухлинних) пов'язують, у першу чергу, саме з цитоплазматичними металопротеїназами. Водночас насиченість гранулами цитоплазми інвазивного цитотрофобласта є найбільш високою серед

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=16	Контрольна група; n=14
Цитотрофобласт хоріальних ворсинок	0,245±0,0019	0,308±0,0017
Синцитіотрофобласт хоріальних ворсинок	0,115±0,0016	0,114±0,0014
Цитотрофобласт клітинних колонок	0,241±0,0022	0,310±0,0018
Інвазивний цитотрофобласт	0,316±0,0021	0,408±0,0024

усіх типів трофобласта в термін гестації 5-6 тижнів. При TORCH-інфекції оптична густина забарвлення на МП-2 знижується в середньому на 22,55% (p<0,05).

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

Висновки. 1. Відповідно до результатів імуногістохімічних досліджень з використанням методу комп'ютерної мікроденситометрії в термін гестації 5-6 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 чотирьох типах трофобласта, за винятком синцитіотрофобласта хоріальних ворсинок.

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

Список використаної літератури

1. Benirschke K. Pathology of the human placenta. / K. Benirschke, G.J. Burton., R.N. Baergen. – 6th ed. – New York: Springer, 2012. – 974 p.
2. Pijnenborg R. Placental Bed Disorders / R. Pijnenborg, I. Brosens, R. Romero. – Cambridge: Cambridge University Press, 2010. – 301 p.
3. Давиденко І.С. Імуногістохімічна концентрація ферменту “металопротеїназу-2” в інвазивному цитотрофобласті та трофобласті хоріальних ворсинок при гіперандрогенії / І.С. Давиденко, А.В. Гошовська // Naukowa przestrzeń Europy –

2014: *materiały X międzynarodowej naukowo-praktycznej konferencji (07-15 kwietnia 2014 roku)*. – Vol. 28. – *Medycyna Przemysł: Nauka i studia*, 2014. – С. 3-6. 4. Ferreira T. *ImageJ. User Guide* / T. Ferreira, W. Rasband. – New York: National Institute of Health, 2012. – 187 p. 5. Hammer Ø. *PAST: Paleontological Statistics, Version 3.14. Reference manual* / Ø. Hammer. – Oslo: Natural History Museum University of Oslo, 2016. – 243 p.

ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ МЕТАЛЛОПРОТЕИНАЗЫ-2 В ТРОФОБЛАСТЕ ПРИ TORCH-ИНФЕКЦИИ НА МАТЕРИАЛЕ АБОРТОВ В СРОК ГЕСТАЦИИ 5-6 НЕДЕЛЬ

Резюме. Данное исследование является фрагментом серии иммуногистохимических исследований трофобласта при TORCH-инфекции, которые запланировано провести в разные сроки гестации. Эта статья посвящена результатам исследований трофобласта в срок гестации 5-6 недель. Целью исследования было иммуногистохимическим методом установить особенности экспрессии МП-2 в разных типах трофобласта при TORCH-инфекции по сравнению с наблюдениями без инфекционного процесса. Исследованию подлежал абортный материал 5-6 недель гестации. Основную группу исследования составили 16 наблюдений TORCH-инфекции, а контрольную – 14 наблюдений прерванной беременности без признаков инфекционного процесса (аборты по социальным показаниям). Выполняли иммуногистохимическая методика на металлопротеиназ-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 результатов иммуногистохимических исследований с использованием метода компьютерной микроденситометрии в срок гестации 5-6 недель, как при TORCH-инфекции и инфекционного процесса, наибольшая 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), за исключением синцитиотрофобласта хориальных ворсинок.

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

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

Abstract. This study is a fragment of a series of immunohistochemical studies of trophoblast in case of TORCH-infections, which are scheduled at different times of gestation. This article focuses on the results of studies of the trophoblast in gestational age 5-6 weeks. The aim of the study was by means of the immunohistochemical method to determine the features of expression of MP-2 in different types of trophoblast with TORCH-infections as compared to observations without an infectious process. Abortion material of 5-6 weeks of gestation was investigated. The main group included 16 observations of TORCH-infections, and the control - 14 observations of interrupted pregnancies with no signs of infection (abortion for social reasons). Immunohistochemical method was applied on metalloproteinases-2 primary antibody and polymer system for visualization of antigen using diaminobenzidine manufactured by DAKO. Using computer microdensitometry in a specialized computer program ImageJ the optical density of color was assessed. According to the results of immunohistochemical studies using the method of microdensitometry at the gestational age of 5-6 weeks, as in TORCH-infections and infectious process, the greatest expression of metalloproteinase-2 is noted in invasive trophoblast, the lowest - in the synthitrophoblast of chorial villi, and intermediate rates are seen in cytotrophoblast chorial villi and cell columns. With TORCH-infections, the expression of metalloproteinase-2 is reduced in all four types of trophoblast (cytotrophoblast chorial villi; cytotrophoblast cell columns; invasive cytotrophoblast in endometrial fragments), with the exception of synthitrophoblast of chorial villi.

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

Higher State Educational Establishment of Ukraine
“Bukovinian State Medical University” (Chernivtsi)

Надійшла 25.10.2016 р.

Рецензент – проф. Юзько О.М. (Чернівці)