

УДК 611-013.85:618.39-021.3
DOI: 10.24061/1727-0847.16.1.2017.2

О.В. Гарвасюк, І.С. Давиденко, О.М. Давиденко

Кафедра патологічної анатомії (зав. – І.С. Давиденко) Вищій державній навчальний заклад України “Буковинський державний медичний університет”, м. Чернівці

ПЛАЦЕНТАРНА ЛУЖНА ФОСФАТАЗА В ТРОФОБЛАСТІ ПЛАЦЕНТИ ВАГІТНИХ ІЗ ЗАЛІЗОДЕФІЦИТНОЮ АНЕМІЄЮ ЗА УМОВ ПЕРЕДЧАСНОГО ДОЗРІВАННЯ ХОРІАЛЬНОГО ДЕРЕВА

Резюме. У гістологічних зрізах плаценти різних термінів гестації проведено дослідження плацентарної лужної фосфатази методом імуногістохімії (який дає уявлення про концентрацію ферменту) та методом гістохімії – азосполучення (який дає уявлення про активність ферменту). Встановлено наступне. Як концентрація плацентарної лужної фосфатази, так і її активність при передчасних пологах, незалежно від ступеня дозрівання хоріального дерева та стану крові вагітних, є суттєво нижчими, ніж при фізіологічній вагітності. Водночас, щодо концентрації плацентарної лужної фосфатази в трофобласті хоріальних ворсинок, відзначається однакова закономірність для обох вивчених відрізків гестації (29-32 та 33-36 тижнів). Зокрема, концентрація плацентарної лужної фосфатази завжди нижча при анемії вагітних порівняно зі спостереженнями без анемії, а факт передчасного дозрівання хоріального дерева суттєвого значення не має. Щодо активності плацентарної лужної фосфатази в трофобласті хоріальних ворсинок має місце відмінність у середніх показниках поміж різними відрізками гестації. Зокрема, у відрізок гестації 33-36 тижнів закономірності змін активності плацентарної лужної фосфатази відповідають закономірностям її імуногістохімічної концентрації, а саме: має місце зниження активності ферменту при анемії вагітних. Однак у відрізок гестації 29-32 тижні активність плацентарної лужної фосфатази в трофобласті хоріальних ворсинок не залежить від стану крові вагітної.

Ключові слова: плацентарна лужна фосфатаза, залізодефіцитна анемія, трофобласт.

Оцінка стану плаценти є важливим елементом ефективного надання перинатальної допомоги [1-2]. У попередніх дослідженнях нами встановлено, що за умов передчасного дозрівання хоріального дерева при залізодефіцитній анемії вагітних (ЗДАВ) у термін гестації 29-32 та 33-36 тижнів морфометричні параметри хоріального дерева (відсоткові співвідношення між різними типами ворсинок) не досягають рівня фізіологічної вагітності, у цілому ступінь зрілості хоріальних ворсинок менша, ніж за умов передчасного дозрівання хоріального дерева без анемії, що виражається в зменшенні відсотка термінальних “спеціалізованих” ворсинок [3-4].

Також нами встановлено, що імуногістохімічна концентрація плацентарного лактогену в трофобласті хоріальних ворсинок на тлі передчасного дозрівання хоріального дерева є зниженою, причому в однакові терміни гестації при залізодефіцитній анемії вагітних імуногістохімічна кон-

центрація плацентарного лактогену в трофобласті хоріальних ворсинок завжди знижена порівняно з вагітними без анемії, навіть незважаючи на ступінь морфологічної зрілості хоріального дерева плаценти. Ми вважаємо доцільним вивчення плацентарної лужної фосфатази в якості одного з плацентарних білків для подальшого розуміння процесів передчасного дозрівання хоріального дерева плаценти [5].

Мета дослідження: з’ясувати кількісні параметри концентрації та активності специфічного плацентарного білка “плацентарної лужної фосфатази” у трофобласті хоріальних ворсинок плаценти із передчасним дозріванням хоріального дерева при залізодефіцитній анемії вагітних у два різні відрізки гестації – 29-32 та 33-36 тижнів гестації.

Матеріал і методи. Усього досліджено 182 плаценти. Дизайн дослідження передбачав виділення двох основних груп дослідження різних те-

рмінів гестації (29-32 та 33-36 тижнів вагітності) та по три групи порівняння окремо на кожен термін гестації. Отже, сформовані такі групи дослідження:

Основна група № 1 – спостереження поєднання ЗДАВ і передчасного дозрівання хоріального дерева у 29-32 тижнів вагітності.

Група порівняння № 1А – спостереження передчасного дозрівання хоріального дерева без анемії при пологах у 29-32 тижнів вагітності.

Група порівняння № 1Б – спостереження ЗДАВ у 29-32 тижнів вагітності, коли будова хоріального дерева відповідає терміну гестації.

Група порівняння № 1В – спостереження без будь-якої анемії у 29-32 тижнів вагітності, коли будова хоріального дерева відповідає терміну гестації.

Основна група № 2 – спостереження поєднання ЗДАВ і передчасного дозрівання хоріального дерева у 33-36 тижнів вагітності.

Група порівняння № 2А – спостереження передчасного дозрівання хоріального дерева без будь-якої анемії при пологах у 33-36 тижнів вагітності.

Група порівняння № 2Б – спостереження ЗДАВ у 33-36 тижнів вагітності, коли будова хоріального дерева відповідає терміну гестації.

Група порівняння № 2В – спостереження без будь-якої анемії у 33-36 тижнів вагітності, коли будова хоріального дерева відповідає терміну гестації.

Кількість спостережень у кожній групі дослідження вказана в таблиці.

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 58⁰С. Гістологічні зрізи 5 мкм завтовшки використовували для постановки імуногістохімічної методики із застосуванням первинних антитіл проти специфічного плацентарного білка “плацентарної лужної фосфатази”. Візуалізацію первинних антитіл проводили полімерною системою Dako із барвником діамінобензидином. Про концентрацію плацентарної лужної фосфатази судили на основі величини оптичної густини імуногістохімічного специфічного забарвлення, яку вимірювали у відносних одиницях оптичної густини методом зондової комп’ютерної мікроденситометрії (від 0 – відсутність забарвлення, абсолютна прозорість; до 1 – максимальне забарвлення, абсолютна непрозорість) за допомогою

комп’ютерної програми ImageJ (версія 1.48v, вільна ліцензія, W.Rasband, National Institute of Health, USA, 2015) [6], шляхом логарифмічного перетворення середньої величини яскравості в кожному зонді. Оптичну густину забарвлення використовували як міру імуногістохімічної концентрації. Ферментативну активність плацентарної лужної фосфатази визначали на заморожених зрізах методом азосполучення після термічної обробки зрізів у термостаті при 58⁰С. Попередня термічна обробка гістологічних зрізів є способом віддиференціювати плацентарну лужну фосфатазу (яка є термостабільним білком) від інших фосфатаз у структурах плаценти. Інтенсивність гістохімічного забарвлення оцінювали вищеписаним методом зондової комп’ютерної мікроденситометрії у відносних одиницях оптичної густини.

Для кожного показника вираховували середню арифметичну та її похибку, порівняння між групами дослідження здійснювали за допомогою двобічного непарного критерію Стьюдента в середовищі комп’ютерної програми PAST 3.14 (вільна ліцензія) [7]. Попередньо виконували перевірку на нормальність у вибірках методом Shapiro-Wilki за допомогою цієї ж комп’ютерної програми. Статистично значущими вважали розбіжності при $p \leq 0,05$.

Результати дослідження та їх обговорення. Плацентарна лужна фосфатаза як імуногістохімічними методом, так і гістохімічним методом визначалася виключно у трофобласті хоріальних ворсинок. Підґрунтям для проведення даного дослідження послужила інформація про те, що лужна фосфатаза – це групове поняття і містить ферментні молекули з різною хімічною будовою, спільною ознакою яких є здатність відщеплювати фосфат від багатьох типів молекул, при цьому ці ферменти проявляють найбільшу активність у лужному середовищі. Плацентарна лужна фосфатаза є водночас і ферментом, але і одним із специфічних білків трофобласта й відіграє важливу роль у функціональній здатності плаценти. Уявлення про її концентрацію можна отримати за допомогою імуногістохімічного методу, а про ферментну активність – завдяки тому, що плацентарна лужна фосфатаза є термостабільним ферментом, тобто її ферментні властивості, на відміну від інших лужних фосфатаз, зберігаються навіть після термічної обробки при 58⁰С.

Імуногістохімічне забарвлення на плацентарну лужну фосфатазу в трофобласті хоріальних

Таблиця 1

Оптична густина забарвлення цитоплазми трофобласту хоріальних ворсинок при імуногістохімічному визначенні плацентарної лужної фосфатази ($M \pm m$)

Групи дослідження	Кількість досліджуваних плацент	Оптична густина забарвлення (в.о.оптичної густини)
Фізіологічній вагітності	21	0,348±0,0016
29-32 тижні гестації		
Основна група № 1 – спостереження поєднання ЗДАВ і передчасного дозрівання хоріального дерева	18	0,164±0,0015 p 1A<0,001 p 1B<0,001
Група порівняння № 1А – спостереження передчасного дозрівання хоріального дерева без анемії	19	0,186±0,0015
Група порівняння № 1Б – спостереження ЗДАВ, коли будова хоріального дерева відповідає терміну гестації	20	0,162±0,0014
Група порівняння № 1В – спостереження без будь-якої анемії, коли будова хоріального дерева відповідає терміну гестації	21	0,185±0,0011
33-36 тижнів гестації		
Основна група № 2 – спостереження поєднання ЗДАВ і передчасного дозрівання хоріального дерева	20	0,190±0,0014 p 2A<0,001 p 2B<0,001
Група порівняння № 2А – спостереження передчасного дозрівання хоріального дерева без будь-якої анемії	22	0,204±0,0016
Група порівняння № 2Б – спостереження ЗДАВ, коли будова хоріального дерева відповідає терміну гестації	20	0,192±0,0015
Група порівняння № 2В – спостереження без будь-якої анемії, коли будова хоріального дерева відповідає терміну гестації	21	0,208±0,0012

Примітка 1. p1A – вірогідність розбіжності середніх показників основної групи № 1 з групою порівняння № 1А.

Примітка 2. p1B – вірогідність розбіжності середніх показників основної групи № 1 з групою порівняння № 1В.

Примітка 3. p2A – вірогідність розбіжності середніх показників основної групи № 2 з групою порівняння № 2А.

Примітка 4. p2B – вірогідність розбіжності середніх показників основної групи № 2 з групою порівняння № 2В.

Примітка 5. Якщо вірогідність в таблиці не вказана, то вона була більшою за 0,05

ворсинок мало дрібногранулярний характер з доволі рівномірним розташуванням у цитоплазмі трофобласта (рис. 1), тому вимірювання оптичної густини забарвлення за допомогою зондового методу були найбільш придатними. Дані про оптичну густина імуногістохімічного забарвлення на плацентарну лужну фосфатазу наведені в таблиці 1.

Відповідно до наведених у таблиці даних видно, що при фізіологічній вагітності оптична густина імуногістохімічного забарвлення на плацентарну лужну фосфатазу в трофобласті хоріальних ворсинок є значно більшою, ніж при передчасних пологах, незалежно від рівня дозрівання хоріаль-

ного дерева. Разом з тим, якщо порівняти між собою два відрізки гестації (29-32 та 33-36 тижнів), то можна відмітити, що в цілому є тенденція до зростання оптичної густини імуногістохімічного забарвлення в трофобласті хоріальних ворсинок з наростанням терміну гестації, тобто концентрація плацентарної лужної фосфатази вільозного трофобласта віддзеркалює ступінь дозрівання хоріального дерева. Це підтверджується і даними щодо передчасного дозрівання хоріального дерева у спостереженнях вагітності без анемії. Водночас, з наведених у таблиці 1 даних, видно ще одну закономірність – при ЗДАВ суттєво знижується імуногістохімічна концентрація плацентарної лужної

Оптична густина забарвлення цитоплазми трофобласту хоріальних ворсинок при визначенні ферментативної активності плацентарної лужної фосфатази методом азосполучення (M±m)

Групи дослідження	Кількість досліджуваних плацент	Оптична густина забарвлення (в.о. оптичної густини)
Фізіологічна вагітність (n=21)	21	0,234±0,0013
29-32 тижні гестації		
Основна група № 1 – спостереження поєднання ЗДАВ і передчасного дозрівання хоріального дерева	18	0,124±0,0011
Група порівняння № 1А – спостереження передчасного дозрівання хоріального дерева без анемії при пологах	19	0,125±0,0014
Група порівняння № 1Б – спостереження ЗДАВ, коли будова хоріального дерева відповідає терміну гестації	20	0,123±0,0014
Група порівняння № 1В – спостереження без будь-якої анемії, коли будова хоріального дерева відповідає терміну гестації	21	0,121±0,0013
33-36 тижнів гестації		
Основна група № 2 – спостереження поєднання ЗДАВ і передчасного дозрівання хоріального дерева	20	0,148±0,0012 p 2A<0,001 p 2B<0,001
Група порівняння № 2А – спостереження передчасного дозрівання хоріального дерева без будь-якої анемії при пологах	22	0,178±0,0011
Група порівняння № 2Б – спостереження ЗДАВ, коли будова хоріального дерева відповідає терміну гестації	20	0,142±0,0014
Група порівняння № 2В – спостереження без будь-якої анемії, коли будова хоріального дерева відповідає терміну гестації	21	0,174±0,0012

Примітка 1. p2A – вірогідність розбіжності середніх показників основної групи № 2 з групою порівняння № 2А.

Примітка 2. p2B – вірогідність розбіжності середніх показників основної групи № 2 з групою порівняння № 2В.

Примітка 3. Якщо вірогідність в таблиці не вказана, то вона була більшою за 0,05

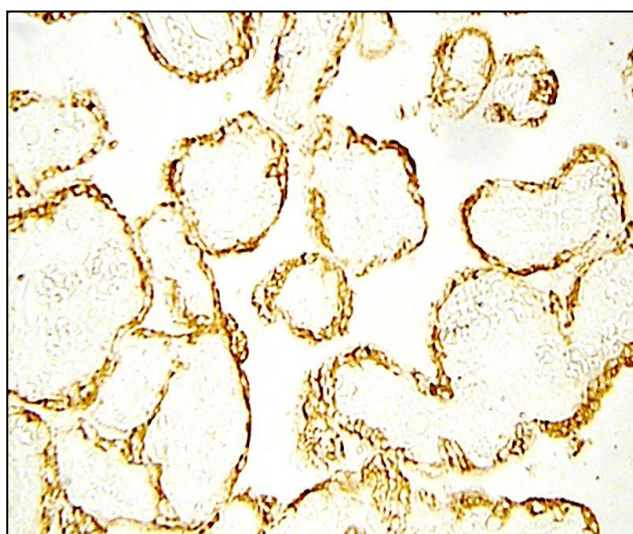


Рис. 1. Фрагмент хоріального дерева плаценти при фізіологічній вагітності у 39 тижнів гестації. Імуногістохімічне визначення плацентарної лужної фосфатази з барвником діамінобензидином. Об.20^x. Ок.10^x

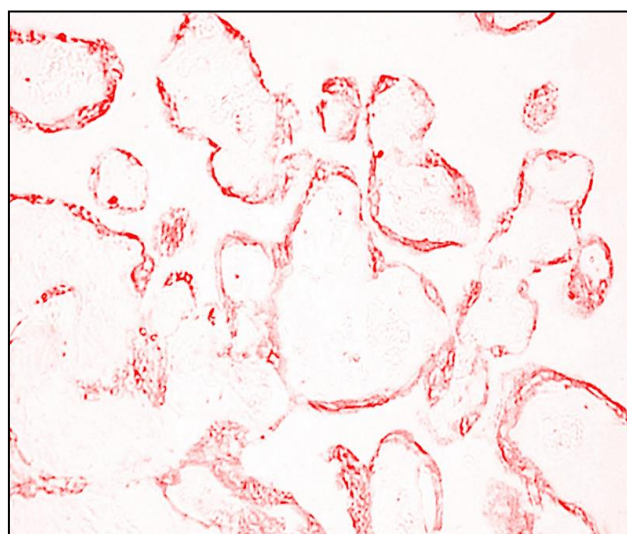


Рис. 2. Фрагмент хоріального дерева плаценти при фізіологічній вагітності у 40 тижнів гестації. Гістохімічне визначення активності плацентарної лужної фосфатази методом азосполучення. Об.20^x. Ок.10^x

фосфатази, причому це стосується і спостережень передчасного дозрівання хоріального дерева.

Вказане явище є характерним для обох вивчених відрізків гестації (29-32 та 33-36 тижнів).

Забарвлення цитоплазми вільозного цитотрофобласта при визначенні активності плацентарної лужної фосфатази із застосуванням гістохімічного методу азосполучення (рис. 2) мало характер, близький до імуногістохімічного забарвлення на плацентарну лужну фосфатазу.

Дані про оптичну густину забарвлення цитоплазми трофобласту хоріальних ворсинок при визначенні ферментативної активності плацентарної лужної фосфатази методом азосполучення наведені у таблиці 2. З наведених даних видно, що найбільша оптична густина забарвлення при визначенні ферментативної активності плацентарної лужної фосфатази відзначається при фізіологічній вагітності. Причому активність плацентарної лужної фосфатази зростає з терміном гестації. Водночас, у відрізку гестації 33-36 тижнів закономірності змін активності плацентарної лужної фосфатази відповідають закономірностям її імуногістохімічної концентрації, а саме – має місце зниження активності ферменту при анемії вагітних. Однак, у відрізок гестації 29-32 тижні активність плацентарної лужної фосфатази в трофобласті хоріальних ворсинок не залежить від стану крові вагітної. Наведений факт на даний час не має пояснення, можливо припустити, що протеїн “плацентарна лужна фосфатаза” з плином вагітності змінює свою будову, не змінюючи антигенні властивості, що впливає на її фосфатазну активність.

Висновки. 1. Як імуногістохімічна концентрація плацентарної лужної фосфатази так і її ак-

тивність, яка визначена методом азосполучення, при передчасних пологах, незалежно від ступеня дозрівання хоріального дерева та стану крові вагітних, є суттєво нижчими, ніж при фізіологічній вагітності. 2. Щодо концентрації плацентарної лужної фосфатази в трофобласті хоріальних ворсинок відзначається однакова закономірність для обох вивчених відрізків гестації (29-32 та 33-36 тижнів). Зокрема, концентрація плацентарної лужної фосфатази завжди нижча при анемії вагітних порівняно зі спостереженнями без анемії. Водночас, факт передчасного дозрівання хоріального дерева суттєвого значення не має. 3. Щодо активності плацентарної лужної фосфатази в трофобласті хоріальних ворсинок має місце відмінність у середніх показниках поміж різними відрізками гестації. Зокрема, у відрізок гестації 33-36 тижнів закономірності змін активності плацентарної лужної фосфатази відповідають закономірностям її імуногістохімічної концентрації, а саме – має місце зниження активності ферменту при анемії вагітних. Однак, у відрізок гестації 29-32 тижні активність плацентарної лужної фосфатази в трофобласті хоріальних ворсинок не залежить від стану крові вагітної.

Перспектива подальших досліджень. Наведені результати досліджень ставлять питання про необхідність з'ясування причин того, чому активність плацентарної лужної фосфатази в трофобласті хоріальних ворсинок у період гестації 29-32 тижні не відповідає концентрації цього ферменту. Можливо, протеїн “плацентарна лужна фосфатаза” з плином вагітності змінює свою будову, не змінюючи антигенні властивості, що впливає на її фосфатазну активність.

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. Breymann C. *Iron deficiency and anaemia in pregnancy: modern aspects of diagnosis and therapy* / C. Breymann // *Bld. Cel. Molecul. Dis.* – 2002. – V. 29, N. 3. – P. 506-516.
3. Гарвасюк О.В. Морфометричні параметри передчасного дозрівання хоріального дерева плаценти при залізодефіцитній анемії вагітних у гестаційному аспекті / О.В. Гарвасюк, І.С. Давиденко // *Неонатолог., хірург. та перинатальна мед.* – 2015. – Т. V, № 4(18). – С. 90-95.
4. Давиденко І.С. Гістологічні критерії зрілості хоріального дерева для діагностики передчасного та уповільненого дозрівання плаценти людини / І.С. Давиденко, О.А. Тюленева, А.В. Гошовська // *Бук. мед. вісн.* – 2011. – Т. 15, № 1(57). – С. 127-130.
5. Шендерюк О.П. Ферментна активність та концентрація плацентарної лужної фосфатази у трофобласті хоріальних ворсинок плаценти при запаленні посліду (гістохімічне та імуногістохімічне дослідження) / О.П. Шендерюк // *Бук. мед. вісн.* – 2013. – Т. 17, № 1. – С. 144-146.
6. Ferreira T. *ImageJ. User Guide* / T. Ferreira, W. Rasband. – New York: National Institute of Health, 2012. – 187 p.
7. Hammer Ø. *PAST: Paleontological Statistics, Version 3.0. Reference manual* / Ø. Hammer. – Oslo: Natural History Museum University of Oslo, 2013. – 221 p.

ПЛАЦЕНТАРНАЯ ЩЕЛОЧНАЯ ФОСФАТАЗА В ТРОФОБЛАСТЕ ПЛАЦЕНТЫ БЕРЕМЕННЫХ С ЖЕЛЕЗОДЕФИЦИТНОЙ АНЕМИЕЙ ПРИ ПРЕЖДЕВРЕМЕННОМ СОЗРЕВАНИИ ХОРИАЛЬНОГО ДЕРЕВА

Резюме. В гистологических срезах плаценты различных сроков гестации проведено исследование плацентарной щелочной фосфатазы методом иммуногистохимии (который дает представление о концентрации фермента) и гистохимическим методом азосочетания (который дает представление об активности фермента). Установлено следующее: как концентрация плацентарной щелочной фосфатазы так и ее активность при преждевременных родах, независимо от степени созревания хориального дерева и состояния крови беременных, существенно ниже, чем при физиологической беременности. При этом, по отношению к концентрации плацентарной щелочной фосфатазы в трофобласте хориальных ворсинок отмечается одинаковая закономерность для обеих изученных отрезков гестации (29-32 и 33-36 недель). В частности, концентрация плацентарной щелочной фосфатазы всегда ниже при анемии беременных, по сравнению с наблюдениями без анемии, а факт преждевременного созревания хориального дерева существенного значения не имеет. По отношению к активности плацентарной щелочной фосфатазы в трофобласте хориальных ворсинок имеет место разница в средних показателях между различными отрезками гестации. В частности, в отрезок гестации 33-36 недель закономерности изменений активности плацентарной щелочной фосфатазы соответствуют закономерностям ее иммуногистохимической концентрации, а именно – имеет место снижение активности фермента при анемии беременных. Однако, в отрезок гестации 29-32 недели активность плацентарной щелочной фосфатазы в трофобласте хориальных ворсинок не зависит от состояния крови беременной.

Ключевые слова: плацентарная щелочная фосфатаза, железодефицитная анемия, трофобласт.

PLACENTAL ALKALINE PHOSPHATASE IN TROPHOBLAST OF THE PLACENTA IN GRAVIDAS WITH IRON DEFICIENCY ANEMIA IN TERMS OF THE CHORIAL TREE PREMATURATION

Abstract. Placental alkaline phosphatase was studied by means of immunohistochemistry (which gives an idea of the enzyme concentration) and by azocoupling (which gives an idea of the enzyme activity) in histological sections of various placental gestational periods. The following was found: the concentration of placental alkaline phosphatase and its activity in preterm labor regardless of the maturation degree in the chorial placental tree and of the blood state of gravidas is significantly lower as compared to that of the physiological gravidity. At the same time, a similar pattern is observed in both segments under study (gestational periods of 29-32 and 33-36 weeks) in terms of the concentrations of placental alkaline phosphatase in the chorial villi trophoblast. The concentration of placental alkaline phosphatase, in particular, is always lower in case of anemia of gravidas as compared to the observations without anemia, and the fact of the chorial placental tree prematuration is not of a significant importance. There is a difference in average indicators between the different segments of gestation concerning the placental alkaline phosphatase activity in trophoblast of the chorial villi. The gestational period of 33-36 weeks is characterized by the regularities of change patterns of the placental alkaline phosphatase activity to the patterns of its immunohistochemical concentration and namely there is a decrease in the enzyme activity in the gravidas with iron deficiency anemia. However, in the gestational period of 29-32 weeks placental alkaline phosphatase activity in trophoblast of the chorial villi does not depend on the blood state of gravidas.

Key words: placental alkaline phosphatase, iron deficiency anemia, trophoblast.

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

Надійшла 12.12.2016 р.
Рецензент – проф. Юзько О.М. (Чернівці)