

АКТУАЛЬНЫЕ ПРОБЛЕМЫ ЗДРАВООХРАНЕНИЯ



© Э.К. Айламазян,
Е.А. Лапина, И.М. Кветной

НИИ акушерства и гинекологии
им. Д.О. Отта РАМН,
Санкт-Петербург

ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКИЕ КРИТЕРИИ ОЦЕНКИ ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ ЗРЕЛОСТИ ПЛАЦЕНТЫ

■ Впервые получены данные по оценке степени экспрессии гормонов и сигнальных молекул в плацентах у женщин разных возрастных групп, а также при доношенной и переношенной беременности. Установлено влияние возраста беременной женщины на экспрессию гормонов пролактина, мелатонина, а также сигнальных молекул: CD34, NO-сигназы, HLA-DR, CD35, p53, Mcl-1 в ворсинчатом хорионе зрелой плаценты человека. При проведении количественного и качественного анализа экспрессии пролактина, мелатонина, CD34, NO-сигназы, CD35, p53 и Mcl-1 не выявлено отличий в степени экспрессии этих гормонов в ворсинчатом хорионе при доношенной и переношенной беременности, что свидетельствует о функциональной зрелости, а не «старении» плаценты.

■ Ключевые слова: плацента; ворсинчатый хорион; сигнальные молекулы; гормоны; иммуногистохимия

Введение

Здоровье новорожденного ребенка в значительной степени определяется течением антенатального периода. Нарушение функций плаценты — одна из основных причин перинатальной заболеваемости и смертности [3]. Еще в середине XX века известный классик отечественной плацентологии А.И.Брусиловский писал: «...мы постепенно приближаемся к прочтению плаценты как визитной карточки плода...» [2].

Важнейшей функцией плаценты является синтез и секреция широкого спектра биологически активных веществ. Многочисленные плацентарные пептиды (их верифицировано уже более 100) выполняют роль гормонов, ферментов, проферментов, ингибиторов, рецепторов, факторов роста, иммунорегуляторных агентов, транспортных и связывающих белков. Уникальность этого органа в плане механизмов интеграции выполняемых функций и присутствия в нем основных регуляторных нейропептидов позволяют считать плаценту одним из важных отделов диффузной нейроэндокринной системы, впервые описанной А.С. Pearse в конце 60-х годов XX века [7].

Объектом нашего исследования был выбран ворсинчатый хорион, так как в силу особенностей строения он играет наиболее важную роль в осуществлении обменных процессов между кровью матери и плода. Доказано, что наиболее активной тканью плаценты в метаболическом и функциональном плане является эпителий ворсинчатого хориона.

Широкие возможности в изучении гормонального статуса плаценты связаны с появлением методов, позволяющих не только изучить особенности гистологического строения и состояния обменных процессов, но и количественно оценить функциональное состояние различных структурных компонентов плаценты.

Расширению знаний способствует бурное развитие молекулярной микроскопии с помощью иммуноморфологических реакций на срезах на тканевом, клеточном и ультраструктурном уровнях исследования, позволяющих визуализировать макромолекулы гормонов, отдельных ферментов, рецепторов, коллагенов различных типов и т.п. Среди иммуногистохимических методов, широко применяемых как в клинической практике, так и в научно-исследовательской работе, одним из наиболее перспективных и высокочувствительных является avidin (или стрептавидин)-биотиновый (ABC) иммунопероксидазный метод.

Анализ современной литературы показал, что большинство исследователей изучали развитие адаптационных механизмов при патологическом состоянии плаценты. Вместе с тем, необходимо отметить

недостаточное внимание к вопросам развития компенсаторно-приспособительных реакций, степени их мобилизации в плацентах у женщин с нормальной физиологической беременностью в зависимости от их возраста. Имеются сведения, касающиеся степени структурных и функциональных сдвигов в плацентах у женщин различного возраста с нормальной физиологической беременностью [4, 5], тогда как исследование нормальной плаценты ограничивалось лишь констатацией процессов, свидетельствующих о функциональном старении органа. Между тем, от степени выраженности этих изменений зависит выключение больших или меньших участков из обменной поверхности плацентарной ткани.

Плацента уникальна и как объект для геронтологических исследований, поскольку ее онтогенез четко очерчен по времени гестации, а плацентарная ткань удобна для поиска четких, согласованных критериев старения на органном, тканевом, клеточном и субклеточном уровнях. В настоящее время убедительные морфологические доказательства истинного старения плаценты отсутствуют, и вопрос «старения» плаценты остается дискуссионным. В литературе нами не найдено работ, касающихся изучения гормональной функции плаценты в связи со старением этого органа.

В основу клинической концепции «старения» плаценты положены исследования переношенной беременности. В связи с этим исследование экспрессии гормонов при доношенной и переношенной беременности также представляется актуальной темой для исследования.

Материалы и методы

Объектом для морфо-функционального исследования был избран ворсинчатый хорион 57 доношенных и 14 переношенных плацент, полученных при родах в родильном отделении НИИ акушерства и гинекологии им. Д.О. Отта РАМН. При анализе морфо-функционального состояния исследуемых плацент использованы заключения патогистологи-

ческих исследований последов, проведенных в лаборатории патоморфологии института.

Изучение функциональной активности ворсинчатого хориона в зависимости от возраста беременной проводили на иммуногистохимических препаратах, приготовленных из образцов доношенных плацент женщин различного возраста. Были отобраны плаценты первородящих женщин со срочными родами без осложнений. В ходе проведения исследования материал был распределен на 5 групп в зависимости от возраста женщин (табл.). В качестве группы сравнения нами была выбрана группа 2 — плаценты женщин нормального репродуктивного возраста (от 18 до 28 лет).

Для оценки функциональной активности плацент были использованы антитела к следующим иммуногистохимическим маркерам:

- мелатонину и пролактину — для оценки гормонального статуса плаценты;
- CD34-маркеру эндотелия — для оценки степени васкуляризации ворсин;
- эндотелиальной NO-синтазе как антиоксиданту и регулятору сосудистого тонуса, кровотока и артериального давления;
- HLA-DR и CD35 — для оценки иммунологического статуса плаценты;
- Mcl-1 (антиапоптозному) и p53 (апоптозному) маркерам — для оценки пролиферативной активности плаценты.

Кусочки плаценты объемом 1 см³ фиксировали в 10% нейтральном забуференном формалине (рН 7,2), обезвоживали и заливали в парафин согласно общепринятой схеме. Для обзорной окраски использовали гематоксилин и эозин.

Иммуногистохимическое исследование проводили с использованием моноклональных мышиных антител к пролактину человека (1:200, Novocastra), эндотелиальной NO-синтазе (1:150, Novocastra), маркеру дендритных клеток CD35 (1:100, Novocastra), антигену главного комплекса гистосовместимости II класса HLA-DR (1:100, Novocastra), маркеру эндотелиальных клеток CD34 (1:100, Novocastra) человека, антиапоптозному белку Mcl-1 (1:100, Novocastra), проапоптозному белку p53 (1:75, Novocastra). Для визуализации экс-

Таблица

Распределение плацент по группам в зависимости от возраста женщин

№ группы	Возраст женщин, лет	Число обследованных женщин	Процент от числа обследованных женщин в каждой группе
I группа	до 18	8	14
II группа	18–28	22	38,5
III группа	29–35	13	22,5
IV группа	36–40	9	16
V группа	Старше 40	5	9

прессии мелатонина использовали ультраспецифичные кроличьи антитела к мелатонину (1:100, CIDtech Res. Comp.) В качестве вторых антител использовали универсальный набор, содержащий биотинилированные антимышечные и антикроличьи иммуноглобулины. Визуализацию окрасок проводили с применением комплекса авидина с биотинилированной пероксидазой (ABC-kit), с последующим проявлением пероксидазы хрена диаминобензидином (все реагенты от Novocastra).

Морфометрическое исследование проводили с использованием системы компьютерного анализа микроскопических изображений, состоящей из микроскопа Nikon Eclipse E400, цифровой камеры Nikon DXM1200, ПК на базе Intel Pentium 4 и программного обеспечения «Видеотест-Морфология 4.0». В каждом случае измерение проводили в 10 полях зрения при 400-кратном увеличении. Оптическую плотность экспрессии выявленных продуктов измеряли в условных единицах. Также определяли площадь их экспрессии (которая представляла собой отношение площади, занимаемой имmunопозитивными клетками, к общей площади клеток в поле зрения), выражаемую в процентах. Указанные параметры отражают интенсивность синтеза или накопления исследуемых гормонов и сигнальных молекул.

Результаты исследований обрабатывали с помощью компьютерных программ Excel и Statistica 5.0 (Statsoft).

Результаты исследования

Иммуногистохимическое исследование доношенных плацент

На всех иммуногистохимических препаратах была отмечена выраженная экспрессия исследуемых маркеров: мелатонина, пролактина, CD34, NO-синтазы, HLA-DR, CD35, Mcl-1, p53.

Экспрессия мелатонина была выявлена во всех структурных элементах ворсинчатого хориона: синцитиотрофобласте, синцитиокапиллярных мембранах, синцитиальных почках и узлах, единичных клетках стромы и эндотелии сосудов.

Площадь экспрессии мелатонина в 1, 3, 4 и 5-й группах была достоверно меньше, чем в группе 2 — группе сравнения ($p < 0,05$) (рис. 1). Между возрастом матери и значениями площади экспрессии мелатонина выявлена положительная корреляция ($k = 0,06$).

Оптическая плотность мелатонина достигает максимального значения во 2-й группе ($0,34 \pm 0,01$ у.е.), у женщин старше 36 лет (4 и 5-я группы) наблюдается достоверное снижение этого показателя ($p < 0,05$) (рис. 2).

Пролактин-иммунопозитивные клетки обнаружены в синцитиотрофобласте, в том числе и в синцитиокапиллярных мембранах, а также в эндотелии сосудов. Оптическая плотность в 1, 2, 3 и 4-й группах достоверно не отличается; достоверно меньшая величина оптической плотности наблюдалась в плацентах у женщин старше 40 лет ($p < 0,05$) (рис. 3). Площадь экспрессии пролактина в плаценте у женщин старше 29 лет достоверно уменьшается ($p < 0,05$) (рис. 4), что свидетельствует о сокращении числа иммунопозитивных клеток к пролактину.

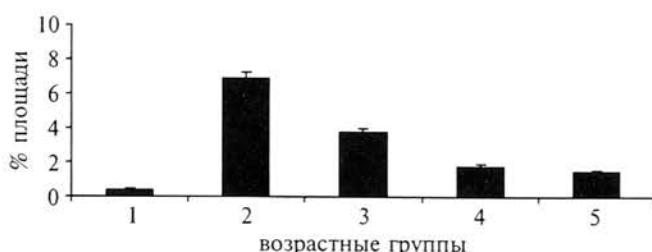


Рис. 1. Площадь экспрессии мелатонина в плацентах беременных различных возрастных групп

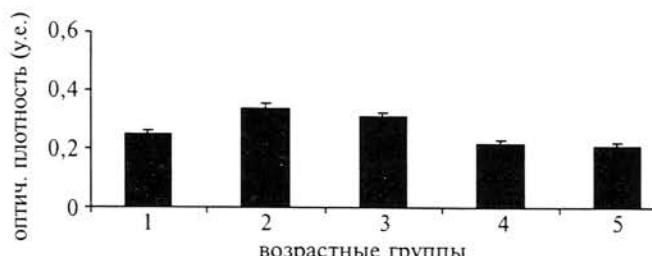


Рис. 2. Оптическая плотность экспрессии мелатонина в плацентах беременных различных возрастных групп

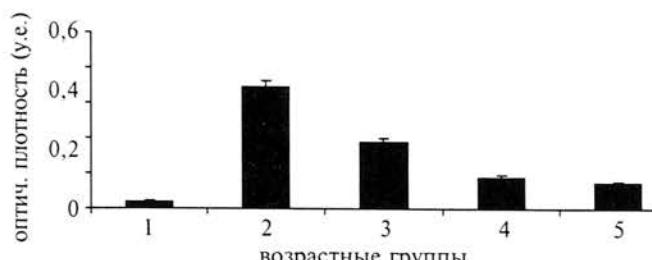


Рис. 3. Оптическая плотность экспрессии пролактина в плацентах беременных различных возрастных групп

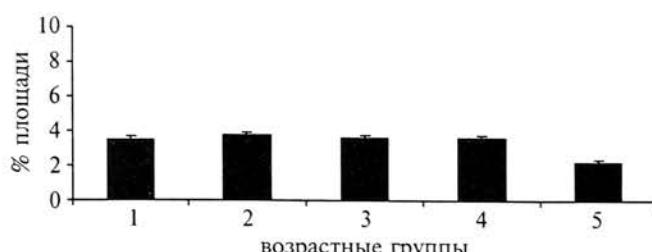


Рис. 4. Площадь экспрессии пролактина в плацентах беременных различных возрастных групп

Полученные данные свидетельствуют о снижении гормональной активности в плодовой части плаценты с увеличением возраста беременной.

Положительная иммуногистохимическая реакция с антителами к CD34 наблюдалась на всех препаратах в эндотелии капилляров ворсин хориона. Степень экспрессии CD34 у женщин нормального репродуктивного возраста (2-я группа) значительно превышает уровень экспрессии этого маркера в остальных возрастных группах как по площади экспрессии, так и по показателям оптической плотности (рис. 5, 6). Между показате-

лями оптической плотности и возрастом женщин выявлена корреляционная связь ($k = 0,23$).

Полученные результаты свидетельствуют о прямом влиянии возраста матери на степень васкуляризации ворсинчатого хориона.

Среди местных плацентарных вазодилататоров наибольшая роль отводится эндотелиальной NO-синтазе. Проведенные иммуно-гистохимические исследования показали, что синцитиотрофобласт, синцитиокапиллярные мембранны, эндотелий капилляров ворсин давали имmunопозитивную реакцию с антителами к эндотелиальной NO-синтазе. Оптическая плотность и площадь экспрессии eNOS достоверно меньше у женщин моложе 18 и старше 28 лет ($p < 0,05$) (рис. 7, 8).

Для оценки состояния иммунной системы плаценты в связи с различным возрастом беременных использовали маркер фолликулярных дендритных клеток CD35 и антиген II класса главного комплекса гистосовместимости HLA-DR.

Единичные CD35-содержащие клетки локализуются преимущественно в строме стволовых и промежуточных ворсин, а также в просветах стромальных каналов. При оценке площади экспрессии данного маркера выявлены достоверные отличия между 4 и 2, а также 5 и 2 группами ($p < 0,05$) (рис. 10), в то время как в значениях оптической плотности не найдено статистически достоверных отличий между группами (рис. 9). Проведенный анализ показал наличие корреляции между возрастом беременных и значениями площади экспрессии CD35 ($k = 0,37$), что указывает на увеличение активности CD35-презенти-

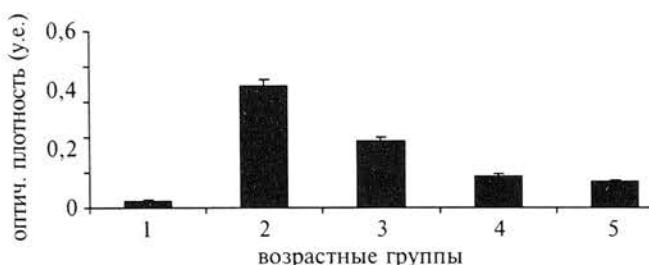


Рис. 5. Оптическая плотность экспрессии CD34 в плацентах беременных различных возрастных групп

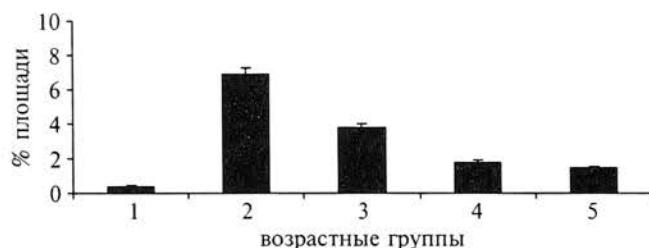


Рис. 6. Площадь экспрессии CD34 в плацентах беременных различных возрастных групп

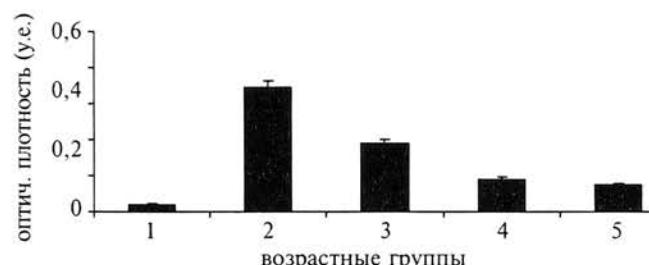


Рис. 7. Оптическая плотность экспрессии NO-синтазы в плацентах беременных различных возрастных групп

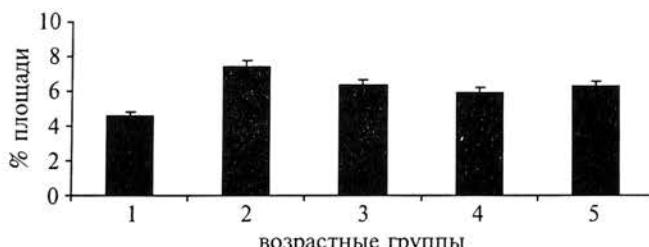


Рис. 8. Площадь экспрессии NO-синтазы в плацентах беременных различных возрастных групп

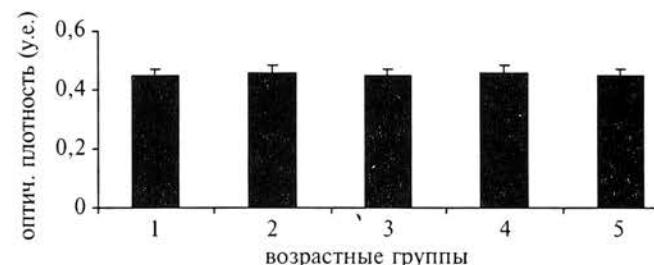


Рис. 9. Оптическая плотность экспрессии CD35 в плацентах беременных различных возрастных групп

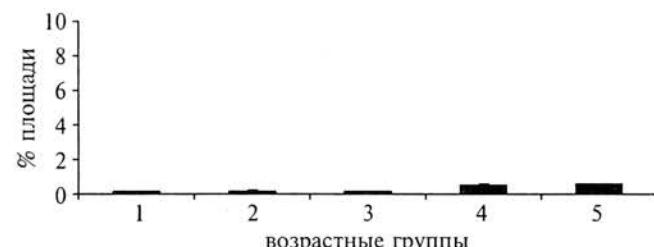


Рис. 10. Площадь экспрессии CD35 в плацентах беременных различных возрастных групп

рующих клеток в связи с возрастом беременной женщины.

Экспрессия антигена главного комплекса гистосовместимости II класса HLA-DR наблюдалась в строме, капиллярах ворсин, а также в синцитии. Обнаружена положительная корреляция между значениями площади экспрессии HLA-DR и возрастом беременных ($k = 0,39$) (рис. 12). Достоверных отличий в значениях оптической плотности не было обнаружено (рис. 11).

Таким образом, нами выявлены неоднозначные отличия в экспрессии иммунокомпетентных антиген-презентирующих молекул в плацентах у женщин разного возраста. Обнаружена тенденция к увеличению экспрессии CD35 и уменьшению экспрессии HLA-DR с увеличением возраста беременной.

Иммунопозитивное окрашивание к Mcl-1 наблюдалось практически во всех структурах ворсинчатого хориона: синцитиальном трофобласте, синцитиокапиллярных мембранах, клетках стромы, эндотелии сосудов, что свидетельствует о высокой пролиферативной активности этих элементов даже на поздних сроках беременности.

Межгрупповых различий в значениях оптической плотности Mcl-1 нами не выявлено (рис. 13), однако была показана положительная корреляция между значениями оптической плотности и возрастом беременных ($k = 0,27$).

Площадь экспрессии Mcl-1 максимальна в плацентах женщин нормального репродуктивного возраста ($7,81 \pm 0,07\%$). У женщин 1 группы площадь экспрессии составляет $6,9 \pm 0,03\%$, между этими величинами обнаружены достоверные отличия ($p < 0,05$). Площадь иммунопозитивно окрашенных клеток в 3, 4 и 5-й группах достоверно ниже, чем в группе 2 (рис. 14).

Единичные клетки, вступившие в апоптоз и экспрессирующие протеин p53, встречаются в синцитиотрофобласте и в строме ворсин хориона.

Значения оптической плотности и площади экспрессии этого белка прогрессивно увеличиваются с возрастом беременной (рис. 15, 16). Возраст беременной положительно коррелирует с площадью экспрессии белка p53 ($k = 0,43$) и оптической плотностью ($k = 0,25$).

Полученные результаты позволяют сделать вывод о снижении пролиферативной активности плаценты и увеличении числа клеток, вступивших в апоптоз в связи с увеличением возраста беременной.

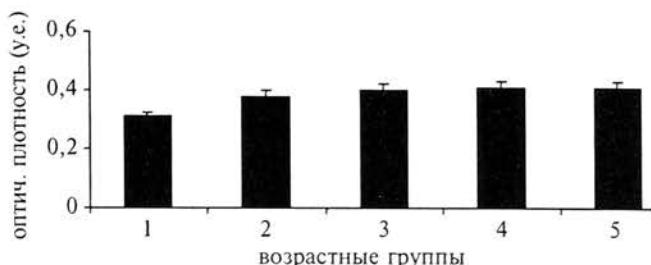


Рис. 11. Оптическая плотность экспрессии HLA-DR в плацентах беременных различных возрастных групп

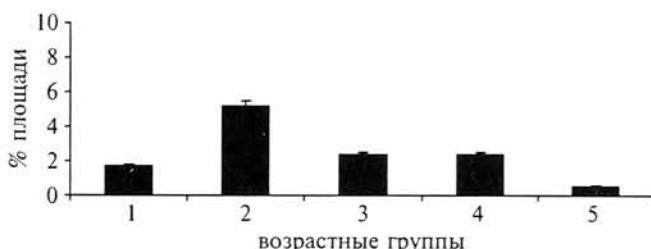


Рис. 12. Площадь экспрессии HLA-DR в плацентах беременных различных возрастных групп

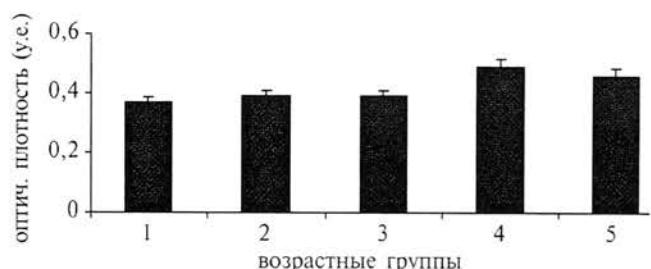


Рис. 13. Оптическая плотность экспрессии Mcl-1 в плацентах беременных различных возрастных групп

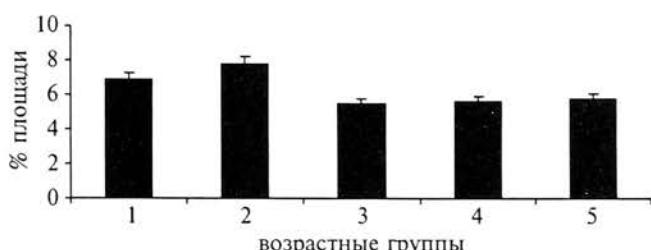


Рис. 14. Площадь экспрессии Mcl-1 в плацентах беременных различных возрастных групп

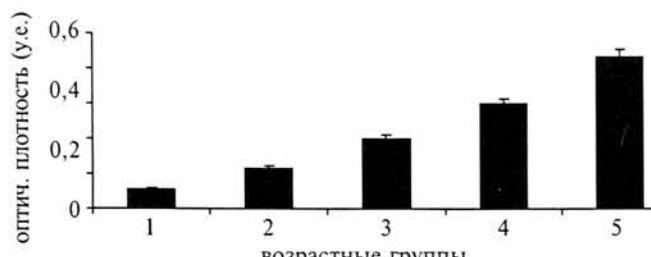


Рис. 15. Площадь экспрессии p53 в плацентах женщин различных возрастных групп

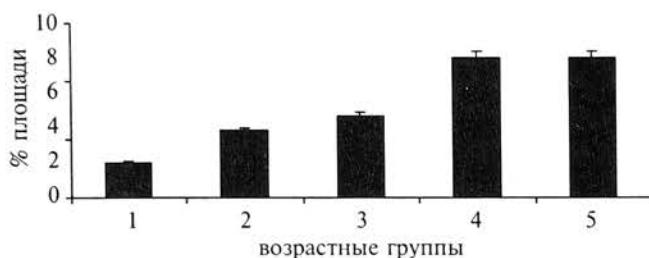


Рис. 16. Оптическая плотность экспрессии p53 в плацентах беременных различных возрастных групп

Иммуногистохимическое исследование «старения» плаценты

В основу клинической концепции «старения» плаценты положены исследования переношенной беременности [6]. В связи с этим для изучения феномена «старения» плаценты были исследованы 14 плацент, полученных при переношенной беременности у женщин 18–28 лет и проведен сравнительный анализ экспрессии исследуемых маркеров в зрелой и переношенной плаценте.

Экспрессия пролактина, мелатонина, CD34, NO-синтазы, CD35, Mcl-1 и p53 были выявлена на всех препаратах при переношенной беременности.

Все исследуемые маркеры были визуализированы в плаценте при переношенной беременности в тех же структурах ворсинчатого хориона, что и при срочной беременности. Статистический анализ данных не выявил значимых отличий в показателях оптической плотности и площади экспрессии всех иммуногистохимических маркеров в плацентах при доношенной и переношенной беременности.

Обсуждение результатов

Исследование гормональной активности ворсинчатого хориона на поздних сроках беременности показало, что все структурные элементы ворсинчатого хориона принимают активное участие в синтезе, депонировании и секреции гормонов и биологически активных веществ.

Анализ макро- и микроскопического строения плацент выявил структурно-функциональные изменения этого органа в связи с возрастом беременной — чем старше женщина, тем выше степень повреждения плаценты. Если в возрасте 18–23 лет межворсинчатое пространство почти свободно от крови, тромбов и фибринова, то уже в возрасте 24–29 лет появляются нарушения фетального и материнского кровообращения. В межворсинчатом пространстве выявляются обширные кровоизлияния, выпадение фибрина и образование фибринолиза. В строме конечных

ворсин отмечаются дистрофические процессы в виде отека, который чаще встречается и в большей степени выражен (иногда — с образованием конечных полостей и отслойкой симпласта) у женщин до 30 лет. В строме ряда ворсин обнаруживаются некротические изменения [1].

Таким образом, возрастные процессы в плаценте проявляются комплексом изменений, захватывающих все структурные единицы плаценты: соединительную ткань и трофобласт, клеточные мембранны и систему кровообращения. Важнейшую роль в развитии возрастных изменений играет недостаточная васкуляризация [2].

Результаты данного исследования свидетельствуют о сохранении функциональной зрелости плаценты при переношенной беременности. По-видимому, «старение» плаценты обусловлено в большей степени общим состоянием организма беременной, нежели сроком гестации, иными словами, «старение» плаценты, как и любого органа в организме беременной женщины, происходит соответственно ее биологическому возрасту.

Литература

- Багдасарян А.А. Морфо-функциональные изменения в плаценте и адаптационные ее возможности при нормальной и осложненной беременности: автореф. дис. ... канд. мед. наук. — Тбилиси, 1982. — 33 с.
- Брусиловский А.И. Функциональная морфология плацентарного барьера человека. — Киев: Здоровье, 1976. — 129 с.
- Савельева Г.М., Федорова М.В., Клименко П.А., Сичинава Л.Г. Плацентарная недостаточность. — М.: Медицина, 1991. — 276 с.
- Степанов С.А. и др. Введение в клиническую морфологию плаценты человека. — Саратов, 1991. — 168 с.
- Шоргунян А.П. / Акт. вопр. практ. здравоохран. — Ставрополь, 1984. — С. 43–44.
- Fox H. Pathology of the placenta. // London, Philadelphia, Toronto, 1978. — 109 р.
- Pearse A. G. // Med. Biol. — 1977. — Vol. 55, N 3. — P. 115–125.

IMMUNOHISTOCHEMICAL CRITERIA OF THE FUNCTIONAL PLACENTAL MATURITY ESTIMATION

Aylamazyan E.K., Lapina E.A., Kvetnoy I.M.

Summary: Placental tissue produces more than 100 biologically active molecules: hormones, cytokines, growth factors, enzymes, and others. The correlations between pregnant women age and expression of melatonin, prolactin, CD34, NO-synthase, HLA-DR, CD35, Mcl-1, p53 expression in villous chorion of human mature placenta have been shown. Computer image analysis is not recognized the differences in optical density and expression square values of above immunohistochemical markers either in mature and overmature pregnancy. These data demonstrate high functional activity of overmature placenta. Thus, it may be postulated that the «aging» of placenta is not connected with pregnancy duration but it is determined by the biological age of pregnant women.

Key words: placenta; villous chorion; signaling molecules; hormones; immunohistochemistry