

О.В.Трохимович

ГУ «Институт педиатрии, акушерства и гинекологии НАМН Украины»
Киев

Ключевые слова: морфология, иммуногистохимия, эндометрий, хорион, ранние потери беременности.

Надійшла: 24.02.2015
Прийнята: 23.03.2015

УДК: 618.14:61–013.84:618.39-021.3

ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ХОРИОНА И ЭНДОМЕТРИЯ У ЖЕНЩИН С РАННИМИ ПОТЕРЯМИ БЕРЕМЕННОСТИ

Исследование проведено в рамках научно-исследовательской работы «Изучить морфофункциональное состояние органов-мишеней репродуктивной системы у женщин с ранними утратами беременности» (номер государственной регистрации 0111U002057).

Реферат. Проведено гистологическое и иммуногистохимическое исследование 98 образцов abortивного и оперативного материала беременных женщин в сроках 4-10 недель беременности: 48 образцов от женщин с несостоявшимся выкидышем, 20 образцов от женщин со спонтанным выкидышем; 20 образцов от женщин с трубной беременностью; 10 образцов от беременных женщин с одноплодной нормально развивающейся беременностью в сроках 5-9 недель, которым был проведен медицинский аборт по собственному желанию (контрольная группа). При ранних репродуктивных потерях отмечена дезорганизация процессов пролиферации и апоптоза. Установлено, что при трубной беременности в 75% случаев причиной эктопической цитотрофобластической инвазии являются выраженные изменения структуры маточной трубы, прежде всего, за счет воспалительного процесса, на фоне резкого снижения процессов пролиферации в хорионе и явлений базального и париетального децидуита в 65% случаев.

Morphologia. – 2015. – Т. 9, № 1. – С. 58-64.

© О.В.Трохимович, 2015

✉ o.trohimovych@mail.ru

Trohimovych O.V. The immunohistochemical features of chorion and endometrium in women with early pregnancy losses.

ABSTRACT. Background. According to present views proliferation and apoptosis plays an important role in the mechanisms of placenta formation, particularly in process of vasculogenesis that begins on the third week of pregnancy. **Objective:** To investigate the immunohistochemical features of chorion and endometrium in women with early pregnancy losses. **Methods.** 98 samples of abortive and surgical material in pregnant women in terms of 4-10 weeks of pregnancy were analyzed. 48 samples were obtained from women with missed abortion (1st group), 20 samples from women with spontaneous abortion (2nd group); 20 samples from women with tubal pregnancy (3rd group); 10 samples from pregnant women with normal singleton pregnancy, after medical abortion on their own wish (control group). Histological, histochemical and immunohistochemical methods were used. Monoclonal antibodies (MAbs) to Ki-67 and bcl-2 were applied. **Results.** Pathological picture of spontaneous abortion is characterized by the dominance of violation of blood circulation, presence of significant foci of hemorrhage occurring parallel with a pronounced disruption of apoptosis and proliferation in chorionic villi and decidual tissue, leading to the detachment of placenta. **Conclusion.** In 75% of cases of tubal pregnancy ectopic cytotrophoblast invasion is caused by prominent changes in the structure of the fallopian tube. First of all due to the inflammatory process and a sharp reduction of proliferation in the basal chorion and parietal deciduitis in 65% of cases.

Key words: morphology, immunohistochemistry, endometrium, chorion, early pregnancy loss.

Citation:

Trohimovych OV. [The immunohistochemical features of chorion and endometrium in women with early pregnancy losses]. *Morphologia*. 2015;9(1):58-64. Russian.

Введение

На современном этапе иммуногистохимические исследования процессов децидуализации и цитотрофобластической инвазии выполняются разрозненно и фрагментарно, проводятся попытки визуализировать эти взаимосвязанные процессы на уровне клеток и тканей эндометрия при

физиологическом течении беременности. Поскольку понимание этих процессов в условиях нормального развития беременности поможет распознать механизмы ранних репродуктивных потерь [1-3].

На ранних этапах беременности ее физиологическое течение во многом определяется равно-

весею между процессами пролиферации и апоптоза. Согласно современным представлениям, пролиферация и апоптоз играют важную роль в механизмах формирования плаценты, а именно регуляции процесса ее васкулогенеза, который начинается с третьей недели беременности. Адекватная пролиферация и дифференцировка цитотрофобласта, а также васкулогенез в строме ворсин хориона происходит в условиях необходимо обеспечения питательными веществами и кислородом, поступающим из межворсинчатого пространства. В течение гестационного процесса отмечается рост процессов пролиферации и апоптогических изменений до момента нормального функционирования плаценты [4].

Одним из маркеров клеточных пролиферативных процессов, определяемым иммуногистохимическим методом является экспрессия белка Ki-67. Исследование Ki-67, в качестве прогностического маркера пролиферации довольно часто бывает полезной в диагностическом плане. Согласно исследованиям зарубежных авторов, в сроке 6 недель беременности было отмечено наличие фигур митоза и экспрессия Ki-67 в клетках цитотрофобласта, при этом в эндотелиальных клетках они отсутствовали. Отсутствие митотических фигур и экспрессии белка Ki-67 в клетках эндотелия и периваскулярных клетках указывала на прямую зависимость процесса васкуляризации в большей степени от стромальных клеток, чем от трофобласта [4, 5]. На наш взгляд, определение экспрессии данного маркера пролиферации в условиях физиологического и осложненного течения беременности имеет безусловный интерес.

Как показали исследования, при физиологическом течении беременности уровень апоптоза в децидуальной оболочке выше, а в ткани хориона и минимальным, это соответствует адекватным процессам пролиферации и развития хориона в ранние сроки беременности. При замершей беременности и анэмбрионии отмечается достоверное повышение уровня апоптоза по сравнению с прогрессирующей беременностью. Согласно данным литературы одним из основных ингибиторов апоптоза является ген bcl-2, который локализуется на внутриклеточных мембранах (ядерной, митохондриальной, цитоплазматической сетки) различных клеток. Основной функцией этого гена является регуляция апоптотического каскада. Блокировка процесса апоптоза под действием bcl-2 может состояться в любую фазу клеточного цикла, однако ее механизмы остаются еще не изученными [6].

Таким образом, иммуногистохимическое исследование особенностей пролиферативных и апоптогических процессов децидуального эндометрия и хориона при ранних репродуктивных потерях является важным с точки зрения уточнения патогенетических механизмов.

Цель – изучение иммуногистохимических особенностей хориона и эндометрия у женщин с ранними потерями беременности.

Материалы и методы

С целью определения морфологических и иммуногистохимических особенностей эндометрия, хориона и децидуальной ткани при ранних репродуктивных потерях было обследовано 98 образцов abortивного и операционного материала беременных женщин в сроках 4-10 недель беременности: 48 образцов от женщин с несостоявшимся выкидышем (первая группа), 20 образцов от женщин со спонтанным выкидышем (вторая группа); 20 образцов от женщин с трубной беременностью (третья группа); 10 образцов от беременных женщин с одноплодной, нормально развивающейся беременностью в сроках 5-9 недель, которым был проведен медицинский аборт по собственному желанию (контрольная группа). С целью изучения морфологических и иммуногистохимических особенностей хориона, децидуальной ткани у женщин с ранними потерями беременности исследовался материал (децидуальная оболочка и ворсинчатый хорион), который был получен путем операции медицинского аборта.

Сразу после забора материал фиксировали в 10-процентном растворе нейтрального формалина, обезвоживали в спиртах и заливали в парафиновые блоки. Микроскопические исследования осуществляли с помощью светооптического микроскопа «Axioskop 40» (Германия).

Для решения цели в исследовании были используемые следующие методы:

а) гистологический - материал обрабатывали в парафиновой заливке, срезы окрашивали гематоксилин-эозином и пикрофуксином по Ван-Гизону;

б) гистохимический - реакция на ДНК по Фельгену с определением индекса апоптоза, характеризующий относительное количество клеток с признаками апоптоза;

в) количественный метод - определение апоптотического индекса (АИ), который характеризует количество клеток с морфологическими признаками апоптоза в пересчете на 100 исследованных клеток и последующим вычетом процентов:

$$AI = \frac{\text{количество клеток с признаками апоптоза}}{\text{на 100 клеток}} \times 100$$

г) иммуногистохимический:

1) косвенный стрептавидин-пероксидазный метод выявления уровня экспрессии моноклональных антител (МКАТ) к Ki-67, (фирма ДАКО, Дания). Протокол окраски: Депарафинизация кусочков ткани на стекло, блокировки эндогенной пероксидазы 3% раствором перекиси водорода, обработка предметного стекла водой, блокировки неспецифических протеиновых со-

единений двумя каплями 1% BSA, промывка в PBS-буфере, нанесения первичных антител к антигену Ki-67 (фирма DAKO, Дания) на один час. Промывают в PBS - буфере и наносят вторичные антитела. Промывка в PBS-буфере, нанесения двух капель комплекса стрептавидин-пероксидазы и инкубация в течение 30 мин. Промывка и нанесение АЭС - хромоген - раствора и инкубация от 5 до 20 минут, до появления коричневой окраски;

2) косвенный стрептавидин-пероксидазный метод выявления уровня экспрессии антиапоптозного протеина bcl-рецепторов. Данная методика определяет степень экспрессии гена, кодирующего синтез антиапоптозного протеина bcl-2 (по протоколу) (фирма DAKO, Дания).

Результаты и их обсуждение

Анализ полученных данных гистологического исследования материала, полученного у женщин с несостоявшимся выкидышем и спонтанным аборт обнаружил ряд изменений ворсинчатого хориона и децидуальной оболочки по сравнению с контрольной группой.

В материале женщин с несостоявшимся выкидышем морфологические изменения в тканях плаценты и децидуальной оболочки были разнообразными, однако привлекало внимания наличие признаков воспалительного процесса различной степени выраженности почти во всех исследуемых образцах. При этом, в 32 (66,7%) случаях в соскобах доминировали признаки воспаления, которые сопровождалась выраженным париетальным и базальным децидуитом. Следует отметить, что в 14 (29,2%) случаях в исследуемом материале женщин первой группы, наблюдались признаки эндокринных нарушений, что проявлялось недостаточной децидуализацией decidua basalis и decidua parietalis. Наряду с этим, в 8 (16,7%) случаях наблюдались косвенные признаки генетических нарушений, которые заключались в отсутствии эмбриона (анэмбриония), нарушении адекватного развития ворсин при отсутствии в них признаков ангиогенеза.

Анализ результатов патоморфологического исследования материала, полученного от женщин со спонтанным выкидышем (вторая группа) установил, что в децидуальной оболочке, прежде всего, доминировали явления нарушения процессов кровообращения, которые в большей степени отмечались в базальной ее части. При этом наблюдались обширные очаги кровоизлияний, которые могли приводить к отслойке плаценты ранних сроков гестации.

При гистологическом исследовании операционного материала, полученного у женщин третьей группы, было установлено, что в 15 (75%) случаях в тканях маточных труб при микроскопии наблюдались явления хронического воспалительного процесса (хронический сальпингит). При этом, стенка маточных труб была

обильно инфильтрирована лимфоцитами и плазматическими клетками с очагами кровоизлияний и отека. В большинстве сосудов маточной трубы отмечались явления полнокровия, стаза, а иногда и тромбоза (рис. 1).

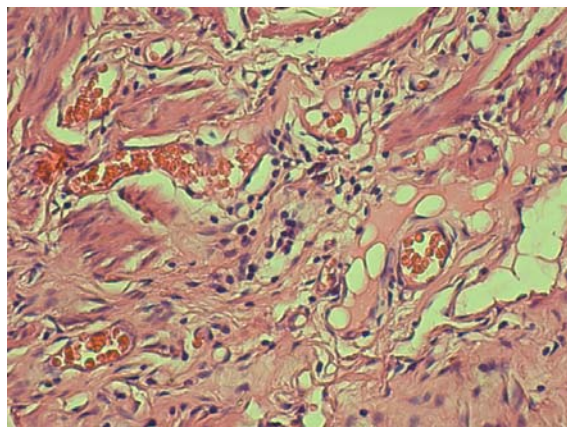


Рис. 1. Стенка маточной трубы с воспалительной инфильтрацией. Трубная беременность. Окраска гематоксилином и эозином. ×200.

Патоморфологическое исследование соскобов из полости матки при трубной беременности установило наличие децидуальной оболочки и спонгиозного слоя эндометрия. В 13 (65%) случаях были констатированы признаки воспалительного процесса, при этом наблюдалась отчетливая инфильтрация тканей лимфоцитами и плазматическими клетками очаги кровоизлияний и отека, явления периваскулярного фиброза (рис. 2).

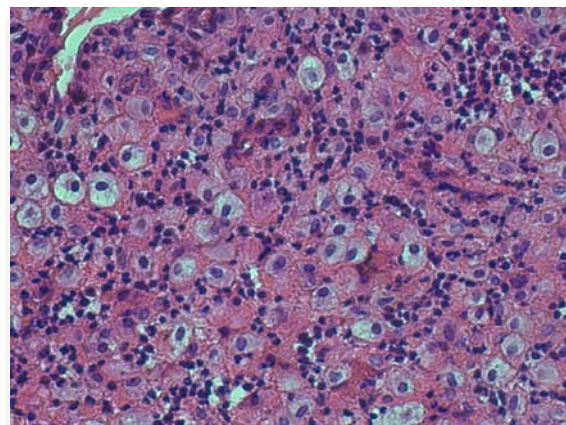


Рис. 2. Выраженная воспалительная инфильтрация децидуальной оболочки. Трубная беременность. Окраска гематоксилином и эозином. ×200.

Особого внимания заслуживали результаты проведенного иммуногистохимического исследования, которые позволили изучить механизмы повреждения ткани хориона и децидуальной оболочки при ранних репродуктивных потерях.

С целью иммуногистохимической оценки

процессов пролиферации на уровне децидуальной ткани и ворсинчатого хориона была исследована экспрессия пролиферативного маркера Ki-67 и интенсивность реакции на ДНК по Фельгену в ядрах синцития и цитотрофобласта.

Как показали зарубежные исследования, на ранних сроках беременности при ее физиологическом течении в клетках цитотрофобласта отмечается достаточная экспрессия Ki-67, а по мере прогрессирования беременности до 12-14 недель гестации в цитотрофобласте ворсин хориона количество Ki-67-позитивных ядер постепенно уменьшается, сохраняясь только в клеточных островках экстравельозного цитотрофобласта [5].

Изучение экспрессии пролиферативного маркера регенерации Ki-67 в децидуальной оболочке установило, что при несостоявшемся выкидыше, а также при спонтанном выкидыше отмечалось ее достоверное снижение по сравнению с контрольной группой (табл. 1, рис. 3, 4).

Следует отметить, что при исследовании экспрессии данного маркера в структурах ворсинок хориона, а именно в ядрах синцития, был обнаружен повышенный процент экспрессии МКАТ к Ki-67 в первой группе, а во второй группе соответствующий процент оставался достаточно низким (табл. 1, рис. 5).

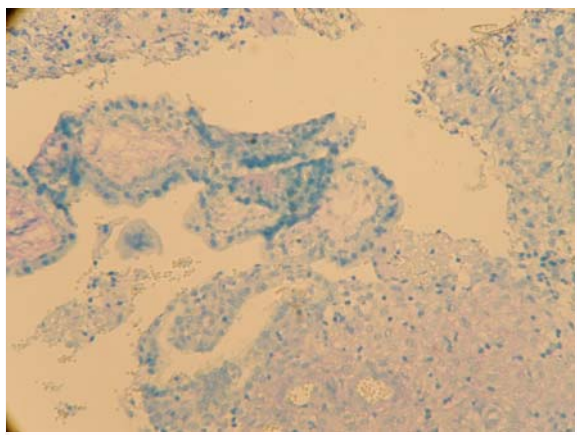


Рис. 3. Несостоявшийся выкидыш в сроке 6 недель. Косвенный стрептавидин-пероксидазный метод выявления интенсивности и распространенности реакции МКАТ к Ki-67 (иммуногистохимическое исследование). Экспрессия МКАТ к Ki-67 отсутствует или снижена в децидуальной оболочке и прилегающих ворсинах. $\times 100$.

Наряду с этим, при спонтанном и несостоявшемся выкидыше отмечалось достоверное повышение апоптозного индекса по сравнению с контрольной группой, особенно в синцитии ворсинок, а также децидуальной оболочке (таблица 1).

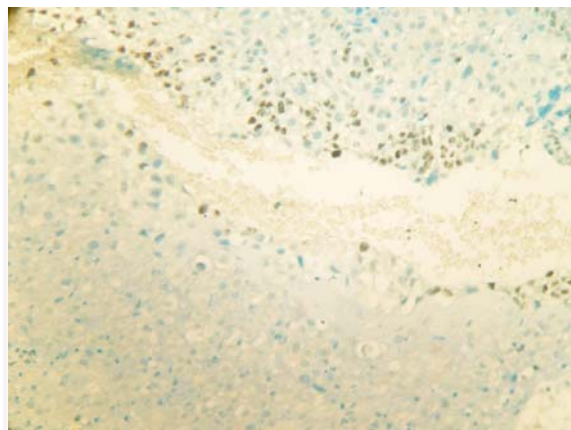


Рис. 4. Беременность 7 недель (контрольная группа). Косвенный стрептавидин-пероксидазный метод выявления интенсивности и распространенности реакции МКАТ к Ki-67 (иммуногистохимическое исследование). Интенсивная экспрессия МКАТ Ki-67 в децидуальных клетках. $\times 100$.

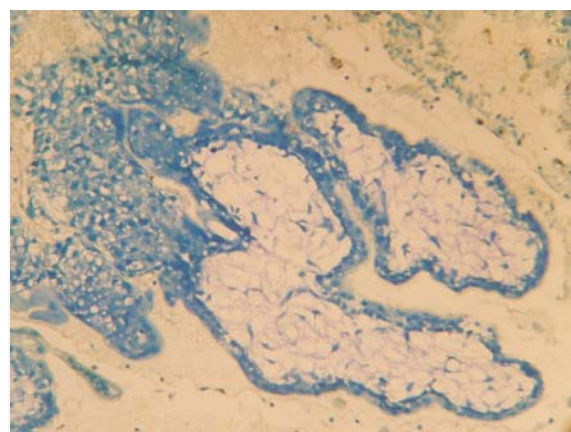


Рис. 5. Спонтанный выкидыш в сроке 7 недель беременности. Косвенный стрептавидин-пероксидазный метод выявления интенсивности и распространенности реакции МКАТ к Ki-67 (иммуногистохимическое исследование). Экспрессия МКАТ к Ki-67 отсутствует или в отдельных ядрах ворсинчатого хориона. $\times 200$.

Таблица 1
Экспрессия иммуногистохимических маркеров и показатель апоптозного индекса в децидуальной оболочке и ворсинах хориона по группам (%)

Группа	Апоптозный индекс		Ki-67	
	Ворсины	Децидуальная оболочка	Ворсины	Децидуальная оболочка
Первая	8-10	6-7	30-40	8-10
Вторая	10-15	8-10	8-10	2-5
Контрольная	2-3	6-7	40-50	10-15

Изучение пролиферативного маркера Ki-67 в различных структурах хориона при трубной беременности по сравнению с контрольной и первой группой, выявило наименьший индекс в ядрах клеток хориальной оболочки и ворсинок хориона (рис. 6).

По данным ряда научных работ, было показано, что объективным маркером интенсивности пролиферативной активности клетки и ее метаболических процессов является определение содержания ДНК клеток [7, 8].

Согласно полученным результатам исследований, при несостоявшемся и спонтанном выкидыше отмечалась неравномерная интенсивность реакции ДНК в ядрах цитотрофобласта по сравнению с контролем, что указывало на нарушение интенсивности обменных процессов в цитоплазме клеток, и являлось свидетельством нарушений пролиферации в материнских и плодовых структурах с изменениями их развития (рисунки 7, 8).

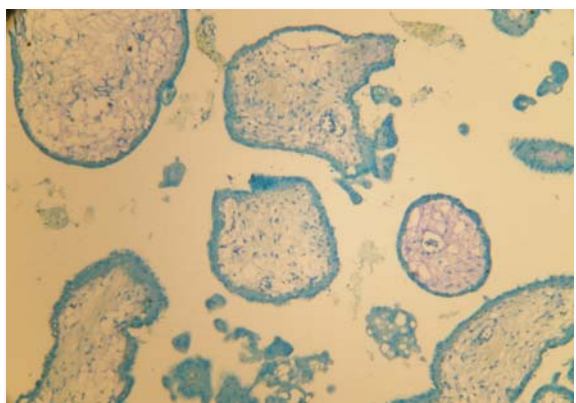


Рис. 6. Прогрессирующая трубная беременность. Непрямой стрептавидин-пероксидазный метод выявления экспрессии МКАТ Ki-67 (иммуногистохимическое исследование). Снижение экспрессии МКАТ к Ki-67 в хориальных структурах. $\times 200$.

При исследовании экспрессии генов антиапоптотического протеина bcl-2 у женщин исследуемых групп были выявлены определенные различия в зависимости от вида репродуктивных потерь.

Установлено, что при физиологическом течении беременности экспрессия антиапоптотического протеина bcl-2 наблюдалась практически во всех клеточных популяциях децидуальной оболочки и ворсинчатого хориона (в децидуальной клетках, эпителии желез и эндотелии сосудов децидуальной оболочке, синцитио- и цитотрофобласта, эндотелии фетальных сосудов и стромальных клетках ворсинчатого хориона). Распространенность экспрессии в децидуальных клетках, эпителии желез, эндотелии децидуальных и фетальных сосудов, клетках стромы ворсин составляла 1 балл, интенсивность 1-2 балла.

Более распространенная экспрессия его отмечалась в клетках эпителия ворсинок хориона - синцитио- и цитотрофобласта – 2 балла.

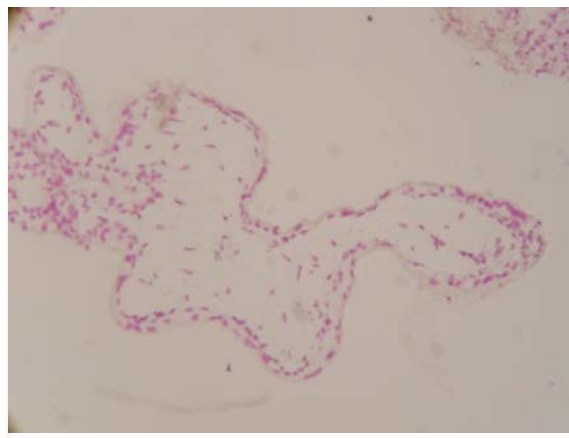


Рис. 7. Самопроизвольный выкидыш в сроке 6 недель. Положительная неравномерная реакция на ДНК по Фельгену в ядрах синцития и цитотрофобласта (гистохимическое исследование). $\times 200$.

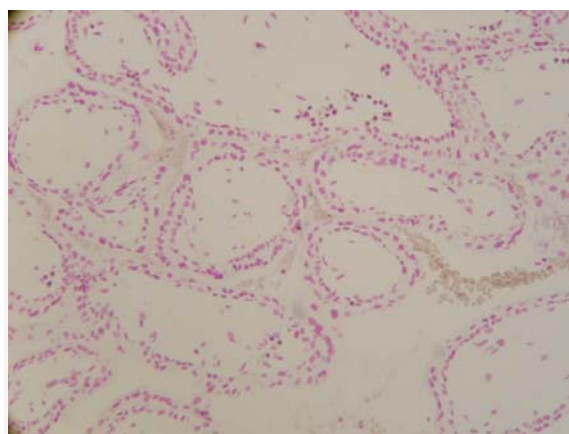


Рис. 8. Беременность 7 недель (контрольная группа). Положительная реакция на ДНК по Фельгену в ядрах синцития и цитотрофобласта (гистохимическое исследование). $\times 200$.

При несостоявшемся выкидыше иммуногистохимическая реакция на bcl-2 в виде мелких гранул и зерен наблюдалась только в цитоплазме отдельных клеток децидуальной оболочки (распространенность 1 балл, интенсивность 1 балл), а также в синцитиотрофобласта ворсин хориона (распространенность 2 балла, интенсивность 2-3 балла), в других клеточных популяциях она отсутствовала.

Исследование abortного материала женщин с самопроизвольным выкидышем показали, что иммуногистохимическая реакция на bcl-2 в виде мелких гранул и зерен наблюдалась только в цитоплазме синцитиотрофобласта ворсин хориона

(распространенность 2 балла, интенсивность 2-3 балла). В других клеточных популяциях она отсутствовала.

Итак, иммуногистохимическое исследование децидуальной оболочки и хориона установило, что при ранних репродуктивных потерях отмечалась дезорганизация процессов пролиферации и апоптоза по сравнению с контрольной группой, которая состояла в подавлении пролиферации на фоне повышенного апоптоза в структурах децидуальной оболочки и ворсинчатого хориона, что особенно выражено при спонтанных выкидышах и имеет безусловное значение в их патогенезе.

Выводы

При несостоявшемся выкидыше установлены морфологические и иммуногистохимические маркеры изменений структур материнской части хориона и децидуальной оболочки, указывающие на нарушение процессов пролиферации и апоптоза, которые проявляются снижением экспрессии пролиферативно-регенераторного маркера Ki-67 и антиапоптотического протеина bcl-2 в децидуальной оболочке, неравномерной интенсивностью реакции ДНК в ядрах цитотрофобла-

ста, что в 66,7% случаев имеет место на фоне выраженных воспалительных изменений эндометрия.

Патоморфологическая картина спонтанного выкидыша характеризуется доминированием явлений нарушения процессов кровообращения, наличием значительных очагов кровоизлияний, возникающих на фоне резко выраженной дезорганизации процессов апоптоза и пролиферации как в ворсинах хориона, так и в децидуальной ткани, что приводит к отслойке плаценты ранних сроков гестации.

Установлено, что при трубной беременности в 75% случаях причиной эктопической цитотрофобластической инвазии, являются выраженные изменения стенки маточной трубы прежде всего, за счет воспалительного процесса, на фоне резкого снижения процессов пролиферации в хорионе и явлений базального и париетального децидуита в 65% случаев.

Перспективы дальнейших исследований связаны с изучением ультраструктурных особенностей хориона и эндометрия у женщин с ранними потерями беременности.

Литературные источники References

1. Milovanov AP, Boltovskaia MN, Fokina TV, Starosvetskaia NA, Nazimova SV. [Non-developing pregnancy: histological and immunohistochemical markers of endocrine disorders in endometrial scrapes]. *Arkh Patol.* 2008 Nov-Dec;70(6):22-5. Russian. PMID: 19227277.

2. Rahnama F, Shafiei F, Gluckman PD, Mitchell MD, Lobie PE. Epigenetic regulation of human trophoblastic cell migration and invasion. *Endocrinology.* 2006 Nov;147(11):5275-83. PMID: 16887905.

3. Bakotina IV, Milovanov AP, Serova OF, Lazarev AP, Marchenko SYu, Yermachenko LV. [Specific features of cytotrophoblast invasion in nonprogressive pregnancy]. *Voprosy ginekologii, akusherstva i perinatologii.* 2005;4(3):69-73. Russian.

4. Gellersen B, Brosens IA, Brosens JJ. Decidualization of the human endometrium: mechanisms, functions, and clinical perspectives. *Semin Reprod Med.* 2007 Nov;25(6):445-53. PMID:

17960529.

5. Scholzen T, Gerdes J. The Ki-67 protein: from the known and the unknown. *J Cell Physiol.* 2000 Mar;182(3):311-22. PMID: 10653597.

6. Bondarenko GI, Zadorozhna TD, Gordienko IJ. [The characteristic expression antyapoptotychnoho protein Bcl -2 in placenta tissues first trimester of physiological current]. *Perinatologii ta pediatriia.* 2002;(2):3-5. Ukrainian.

7. Lysenko ON. [The differential diagnostic role of ploidyometry in different clinical and morphological variants of endometrial hyperplastic processes]. *Rossiiskii vestnik akushera-ginekologa.* 2003; 2:13-6. Russian.

8. Avtandilov GG, Kupriushina NV. [Morphometrical and ploidyometric investigation of proliferative activity of gastric adenoma cells at the stomach biopsy specimens]. *Rossiiskii zhurnal gastroenterologii, gepatologii, kolonoproktologii.* 2007;17(3):24-9. Russian.

Трохимович О.В. Імуногістохімічні особливості хоріону та ендометрія у жінок з ранніми втратами вагітності.

Реферат. Проведено гістологічне та імуногістохімічне дослідження 98 зразків абортного та оперативного матеріалу вагітних жінок в термінах 4-10 тижнів вагітності: 48 зразків від жінок із викиднем, що не відбувся, 20 зразків від жінок зі спонтанним викиднем; 20 зразків від жінок з трубної вагітності; 10 зразків від вагітних жінок з одноплідною вагітністю, що нормально розвивається, в термінах 5-9 тижнів,

яким був проведений медичний аборт за власним бажанням (контрольна група). При ранніх репродуктивних втратах відзначена дезорганізація процесів проліферації та апоптозу, що полягало в пригніченні проліферації на тлі підвищеного апоптозу в структурах децидуальної оболонки і ворсинчастого хоріона, та проявлялося зниженням експресії проліферативно-регенераторного маркера Ki-67 та антиапоптотичного протеїну bcl-2 в децидуальній оболонці, а також нерівномірною інтенсивністю реакції ДНК в ядрах цитотрофобласту, при цьому особливу виразність це набувало при спонтанних викиднях.

Встановлено, що при трубної вагітності в 75% випадках причиною ектопічної цитотрофобластическої інвазії, є виражені зміни структури маткової труби насамперед, за рахунок запального процесу, на тлі різкого зниження процесів проліферації в хоріоні і явищ базального і паріетального децидуїта в 65% випадків.

Ключові слова: морфологія, імуногістохімія, ендометрій, хоріон, ранні втрати вагітності.