

Винахід відноситься до галузі медицини, зокрема патологічної анатомії, може бути використаний для прогнозування стану плацентарного бар'єра при індукції апоптозу гіпоксією та радіаційним фактором.

Плацента у своєму розвитку безперервно зазнає процесів саморуйнування і самовідтворення. Ці протилежні за направленням процеси становлять єдність, яка важлива не лише в фізіологічних умовах, а й набуває провідного значення при розвитку патологічних станів, оскільки порушення сталості клітинного складу або у бік проліферації або у бік клітинної смерті призводять до тяжких структурних змін. Тому процеси загибелі разом з диференціацією є важливими станами життєдіяльності клітини, які забезпечують структурний гомеостаз багатоклітинних організмів на усіх етапах їх розвитку у нормі і при патології. При впливові ушкоджуючих чинників на плацентарний бар'єр в останньому виникають альтернативні зміни аж до необоротних. Існують дві основні морфологічні форми клітинної смерті: перший - апоптоз, який є активним процесом саморуйнування клітини, а другий - некроз як прояв руйнування клітини внаслідок її ушкодження. Описані фазність апоптозу і його патогенетичні механізми в різних органах, визначені біохімічні, мікроскопічні та ультраструктурні зміни при цьому процесі (Задорожна Т.Д., Лук'янова І.С. Структурні особливості апоптозу в плаценті //Журнал АМН України. -1997; Zadorozhnaya T. Dinamic of apoptosis changes in early normal pregnancy chorionic villi and decidua // Placenta. -1999; Zadorozhna T.D., Hata T., Lukianova I. Placenta apoptosis immunohistochemistry and incorporated radionuclides in chronic hypoxia of pregnancy //Placenta. -1999; Задорожна Т.Д., Лук'янова І.С., Дашкевич В.Є., Антипкін Ю.Г., Єщенко О.І., Покришко С.М., Хеншоу Д., Хата Т. Особливості проліферативних реакцій структур плаценти при інкорпоруванні радіонуклідів: морфологія та імуногістохімія (огляд літератури та власних досліджень //Журн. АМН України, 1999, Huppertz B. The apoptosis cascade in human placental trophoblast //Placenta. -1999; Lee H.P. Programmed cell death in placentas //Placenta. -1998; Levy R., Nelson D.M. Current topic: to be, or not to be, that is the question. Apoptosis in human placenta //Placenta. -2000, Zadorozhnaya T. Dinamic of apoptosis changes in early normal pregnancy chorionic villi and decidua //Placenta. -1999, Zadorozhna T. Bondarenko G. Proliferative cell nuclear antigen in early normal pregnancy placental tissues //Placenta. -2000, Zadorozhnaya T., Hata T., Lukianova I. Placenta apoptosis immunohistochemistry and incorporated radionuclides in chronic hypoxia of pregnancy //Placenta. -2000, Bondarenko G.I., Лук'янова І.С. Апоптоз в плаценті. Огляд літератури //Перинатологія та педіатрія -2001, Zadorozhnaya T., Antipkin Yu., Study of CEA, p53, PCNA, cytokeratin in thyroid gland of fetuses from women living in radionuclides contaminated areas after Chernobyl accident in different terms of gestation //XXIX International Congress of the International Academy of Pathology. -2002. -Amsterdam, Zadorozhna T., Bondarenko G., Pokryshka S. Antiapoptotic protein Bcl-2 in early human placenta //Placenta. -2001, Задорожна Т.Д., Єщенко О.І., Арчакова Т.М. Порівняльна характеристика методів виявлення апоптозу в плаценті //Вісник морфології. -2002, Zadorozhnaya T., Archakova T., Grebinitchenko A. Morphology and immunohistochemistry of apoptosis in the placenta following intrauterine fetal death //Placenta -2000, Єщенко О.І., Покришко С.М. Морфологічні та імуногістохімічні особливості клітинних популяцій плацентарного бар'єра у жінок при інкорпоруванні радіонуклідів більше 5Бк/кг. //Галицький лікарський вісник -2003, Арчакова Т.М. Особливості апоптозу у ворсинчастому хоріоні при природжених вадах розвитку центральної нервової системи у плода //Галицький лікарський вісник. -2003). Але чимало питань залишаються нез'ясованими: потребують оцінки і детального вивчення суперечливі дані про наявність апоптозу та особливостей взаємодії і впливу його на проліферацію у різних структурах плаценти при патології (екстрагенітальна патологія), а також дії несприятливих факторів навколишнього середовища (радіаційного). Усе це вказує на важливість досліджень процесу апоптозу та виявлення його ознак в клітинних популяціях плацентарного бар'єра при дії гіпоксичного та радіаційного факторів, що необхідно для морфологічної характеристики стану плацентарного бар'єра та розробки профілактичних заходів попередження розвитку ускладнень вагітності та порушень стану новонародженого.

Способу виявлення ознак індукovanого апоптозу в клітинних популяціях плаценти на основі сучасних морфологічних методів дослідження його, у доступній науково медичній та патентній літературі автори не виявили.

В основу винаходу покладено задачу створення способу виявлення ознак індукovanого апоптозу в клітинних популяціях плаценти, у якому використана морфологічна та гістостереометрична оцінка його особливостей апоптозу при дії гіпоксичного (екстрагенітальна патологія) та радіаційного (різна питома масова активність радіонуклідів в плаценті) факторів, що дало можливість розробити критерії ознак індукovanого апоптозу, які дозволять прогнозувати стан плацентарного бар'єра, плоду та новонародженого і сприятимуть зниженню перинатальної смертності.

Поставлена задача способу виявлення ознак індукovanого апоптозу в клітинних популяціях плаценти вирішується тим, що згідно винаходу досліджуються такі показники: - гістологічні ознаки апоптозу; - наявність дезоксирибонуклеїнових гранул в ядрах клітин; - апоптозний індекс; - ступінь експресії реакції TUNEL (мітка ДНК-нуклеотидів, опосередкована кінцевою трансферазою); антиапоптотичного протеїну bcl2; проапоптотичного протеїну p53.

Гістологічні ознаки апоптозу встановлюють за допомогою загальногістологічних методів - забарвлення зрізів гематоксилін-еозином та пікрофуксином по ван-Гізон; наявність ДНК-гранул в ядрах клітин виявляється за допомогою методу Фельгену з наступною обробкою реактивом Шифа; апоптозний індекс - це визначення кількості клітин, в яких є морфологічні ознаки апоптозу, в перерахунку на 100 досліджених клітин з наступним висловленням відсотків, ступінь експресії реакції TUNEL визначають прямим імунопероксидазним методом, за допомогою мітки ДНК-нуклеотидів опосередкованою кінцевою трансферазою; ступінь експресії bcl-2 та p53 визначається за допомогою непрямого імуногістохімічного стрептовідін-пероксидазного методу з використанням Kit моноклональних антитіл, ступінь експресії оцінюється в балах: 0 - немає видимого забарвлення; 1 - слабка ступінь; 2 - помірний ступінь; 3 - виразний ступінь; 4 - дуже виразний ступінь.

Аналіз дослідження плацент з різною питомою масовою активністю радіонуклідів та при гіпоксії, яка викликана екстрагенітальною патологією, показав, що в децидуальних клітинах та клітинах плацентарного бар'єра виявлені зміни, які характеризують різні стадії апоптозного процесу. При цьому виявляються зміни

хроматину ядра, його ущільнення, конденсація навколо мембрани у вигляді кільця або напівмісяця. При дії радіаційного фактору виявлено збільшення або зменшення розмірів ядер, зміна конфігурації. Найбільша кількість таких ядер спостерігалась в ендотелії фетальних судин та епітелії ворсин. Лімфоїдна інфільтрація навколо цих клітин відсутня. В більшості спостережень відмічалась рання (ущільнення хроматину) та проміжна фази (конденсація хроматину навколо мембрани у вигляді кільця) апоптозного каскаду. Клітини на пізній стадії - з утворенням апоптозних тілець, виявлялись в меншій кількості.

Кількість клітин з морфологічними ознаками апоптоза (апоптозний індекс) знаходилась в прямій залежності від питомої масової активності радіонуклідів в плаценті та від ступеню серцевої недостатності. Дослідження показали, що найбільший показник апоптозного індексу відмічався в плацентах з питомою масовою активністю радіонуклідів більше 4,8Бк/кг і в три рази перевищував показник групи контролю ($25,0 \pm 0,75\%$), контроль ($8,0 \pm 0,24\%$); $p < 0,01$. Достовірно більшим цей показник був і в групі досліджень з питомою масовою активністю 1,8-4,8Бк/кг і становив відповідно ($23,0 \pm 0,69\%$), контроль ($8,0 \pm 0,24\%$); $p < 0,01$.

При серцевій недостатності 2 СН, яка обумовлена ревматичними пороками серця показник апоптозного індексу в 2 рази перевищував аналогічний у групі контролю ($18,0 \pm 0,72\%$, контроль $8,0 \pm 0,24\%$; $p < 0,01$), а при гіпертонічній хворобі - в 3 рази ($23,0 \pm 0,69\%$, контроль $8,0 \pm 0,24\%$; $p < 0,01$). Збільшення кількості клітин з ознаками апоптоза вказує на порушення сталості клітинного складу у бік клітинної смерті.

Важливими діагностичними критеріями, які підтверджують наявність клітин з ознаками апоптоза, було виявлення дезоксирибонуклеїнових - гранул у ядрах у вигляді скупчень, а також у апоптозних тілцях та висока і помірна ступінь експресії реакції TUNEL в структурах плацентарного бар'єра і децидуальних клітинах, особливо в групах плацент з питомою масовою активністю радіонуклідів 1,8-4,8Бк/кг і більше (ступінь експресії реакції TUNEL в епітелії ворсин, ендотелії капілярів становив 3 бали, в децидуальних клітинах та фібробластах строми - 4 бали (контроль 1-2 бали), а також при серцевій недостатності 2 СН, яка обумовлена гіпертонічною хворобою та ревматичними пороками серця (ступінь експресії реакції TUNEL в клітинах плацентарного бар'єра та децидуальної оболонки також становила 3-4 бали).

Зменшення експресії протеїну bcl-2 в структурах плацентарного бар'єра (синцитії та строми), в плацентах з питомою масовою активністю радіонуклідів 1,8-4,8Бк/кг і більше та від жінок з екстрагенітальною патологією (відповідно - 0-1 бал, контроль - 1-2 бали), вказує на зниження впливу антиапоптотичних чинників на апоптозний каскад, а збільшення експресії проапоптотичного протеїну p53 (відповідно - 3-4 бали, контроль - 1 бал) на стимуляцію саморуйнування клітин шляхом апоптоза.

Спосіб виконується таким чином. На гістологічних препаратах виготовлених загальногістологічним методом (забарвлення гематоксилінеозином та пікрофуксином по ван-Гізон) виявляють клітини з ознаками апоптозу, визначають їх локалізацію. При гістохімічному дослідженні визначають наявність дезоксирибонуклеїнових - гранул по методу Фельгена. При імуногістохімічному дослідженні препаратів визначають ступінь експресії реакції TUNEL, проапоптотичного протеїну p53, антиапоптотичного протеїну bcl-2 і апоптозний індекс. Отримані результати порівнюють з клінічними даними (стадія недостатності кровообігу), показником питомої масової активності радіонуклідів і морфологічними та гістостереометричними показниками групи контролю і приймають рішення про наявність ознак індукованого апоптоза та його особливості при дії різних індукуючих факторів.

Суть способу виявлення ознак індукованого апоптоза в клітинних популяціях плаценти відображено у таких прикладах:

Приклад №1

Вагітна Пригон Н.А., 22 роки, вагітність 38-39 тижнів, гіпертонічна хвороба СН2. При гістологічному дослідженні виявлені клітини з ознаками апоптоза в епітелії, строми, ендотелії судин та децидуальній оболонці. Апоптозний індекс становив $20,0 \pm 0,60\%$ (контроль $8,0 \pm 0,24\%$), ступінь експресії реакції TUNEL в структурах плацентарного бар'єра - 3 бали, в децидуальних клітинах - 4 бали (контроль 1-2 бали). Ступінь експресії bcl-2 - 0-1 бали у всіх клітинах плаценти (контроль 1-2 бали), p53 - 3 бала в ендотелії судин, епітелії та строми ворсин, в децидуальних клітинах - 4 бали (контроль 1-2). Прогнозується виявлення ознак індукованого гіпоксичним чинником апоптоза в клітинних популяціях плаценти.

Приклад №2

Вагітна Білоус О.В., 20 років, вагітність 38-39 тижнів, фізіологічна, питома масова активність радіонуклідів в плаценті - 13,6Бк/кг. При гістологічному дослідженні клітини з ознаками апоптоза виявлено в епітелії, строми, ендотелії судин та децидуальної оболонки. В більшості клітин ендотелія фетальних судин та епітелія ворсин відмічено збільшення ядер та зміна конфігурації хроматину навколо нього. Лімфоїдна інфільтрація навколо цих клітин відсутня. Апоптозний індекс становив $25,0 \pm 0,75\%$, контроль $8,0 \pm 0,24\%$; $p < 0,01$, що в три рази перевищує показник групи контролю. Ступінь експресії реакції TUNEL в структурах плацентарного бар'єра - 4 бали, в децидуальних клітинах - 3 бали (контроль 1-2 бали). Ступінь експресії bcl-2 - 0-1 бали у всіх клітинах плаценти (контроль 1-2 бали), p53 - 3-4 бала в ендотелії судин, епітелії та строми ворсин, в децидуальних клітинах - 3 бали (контроль 1-2). Прогнозується виявлення ознак індукованого радіаційним чинником апоптоза в клітинних популяціях плаценти.