

Т.Д. Задорожная, В.В. Подольский, О.И. Ещенко, Т.Н. Арчакова, С.М. Килихевич, О.И. Парницкая, Ю.В. Давыдова, А.А. Гребиниченко, Е.А. Пасечник

## Морфологические и иммуногистохимические особенности онкомаркеров в плацентарном барьере

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

**Ключевые слова:** плацента, онкомаркеры.

Гистологически и электронномикроскопически в 47% наблюдений выявлено нарушение микроциркуляции с кровоизлияниями и избыточным отложением вневорсинчатого фибриноида с наличием пикноза и полиморфизма ядер. В 1 группе исследований в I триместре в структурах плацентарного барьера отмечена выраженная экспрессия маркера пролиферации (Ki-67), протеина p53 и снижение этих маркеров в III триместре, что подтверждается показателями индекса пролиферации и обусловлено регулирующим влиянием данных факторов на процессы роста, развития, дифференцировки и клеточной смерти в структурах плацентарного барьера в динамике беременности. Во 2 группе выраженная экспрессия Ki-67 отмечена в ядрах цитотрофобласта и менее выраженная – в клетках стромы и эндотелия сосудов, что подтверждается достоверным увеличением пролиферативного индекса, экспрессия протеина p53 носила очаговый характер в ядрах вневорсинчатого трофобласта и ворсинчатого трофобласта по сравнению с негативной в группе контроля. Отмечено, что СЕА в 1 группе исследований выявил следовую реакцию в цитотрофобласте в ранние сроки гестации (I триместр) и не определялся в III триместре беременности, во 2 группе в III триместре отмечена выраженная иммунореактивность СЕА в цитоплазме стромальных клеточных элементов (клеток Кащенко-Гофбауэра, фибробластов).

### Морфологічні й імуногістохімічні особливості онкомаркерів у плацентарному бар'єрі

Т.Д. Задорожна, В.В. Подольський, О.І. Єщенко, Т.М. Арчакова, С.М. Килихевич, О.І. Парницька, Ю.В. Давидова, А.А. Гребиниченко, О.А. Пасечник

Гістологічно й електронномікроскопічно в 47% спостережень відзначено розлади мікроциркуляції з крововиливами і надмірним відкладанням позаворсинчатого фібриноїду з наявністю пікнозу й поліморфізму ядер. У 1 групі досліджень у I триместрі в структурах плацентарного бар'єра відзначено виразну експресію маркера проліферації (Ki-67), протеїна p53 і зменшення цих маркерів у III триместрі, що підтверджується показниками індексу проліферації та зумовлено регулюючим впливом цих факторів на процеси росту, розвитку, диференціювання і клітинної смерті в структурах плацентарного бар'єра в динаміці вагітності. У 2 групі виразну експресію Ki-67 відзначено в ядрах цитотрофобласта, менш виразну – в клітинах стромі й ендотелію, що підтверджується достовірним збільшенням проліферативного індексу, експресія p53 мала вогнищевий характер у ядрах позаворсинчатого і ворсинчатого трофобласта у порівнянні з негативною у групі контролю. Спостережено, що СЕА в 1 групі дослідження виявив слідову реакцію в цитотрофобласті в ранні терміни гестації (I триместр) і не виявлявся в III триместрі вагітності; в 2 групі в III триместрі спостережено виразну імунореактивність СЕА в цитоплазмі стромальних клітинних елементів (клітинах Кащенко-Гофбауєра, фібробластах).

**Ключові слова:** плацента, онкомаркери.

**Патологія.** – 2012. – №1 (24). – С. 38–41

### Morphological and immunohistochemical peculiarities of oncomarkers in placental barrier

T.D. Zadorozhnaya, V.V. Podolsky, O.I. Eshchenko, T.N. Archakova, S.M. Kiliikheovich, O.I. Parnitskaya, Yu.V. Davydova, A.A. Grebinichenko, E.A. Pasechnik

Histological and electron microscopy investigations in 47% cases showed disorders of microcirculation with haemorrhage and excessive deposits of extravillous fibrinoid with presence of pycnosis and nucleus polymorphism. In 1st investigation group in I pregnancy trimester in placental barrier structures there were pronounced expression of proliferative marker (Ki-67), protein p53 and decrease of these markers in III trimester that is proved by indexes of proliferation and it is caused by regulating influence of these factors on the processes of growth, development, differentiation and cell death in placental barrier structures in pregnancy course. In 2nd group pronounced Ki-67 expression in noted in cytotrophoblast nuclei and less pronounced - in stromal cells and endothelium of vessels that is confirmed by significant increase of proliferative index. Expression of protein 53 was focal in nuclei of extravillous trophoblast as compared with negative one in control group. It was noted that oncofetal antigen in 1st group showed trace reaction in cytotrophoblast in early terms of gestation (I trimester) and it was not determined in III trimester of pregnancy. In 2nd group in III trimester pronounced immunoreactivity of oncofetal antigen in cytoplasm of stroma cellular elements (Hofbauer cells, fibroblasts) was noted. Pronounced expression of fundamental marker of cell differentiation of cytokeratin in cyto- and syncytiotrophoblast in pregnancy course shows that differentiation processes in placental barrier take place before term labor.

**Key words:** placenta, oncomarkers.

**Pathologia.** 2012; №1 (24): 38–41

**П**роблема взаимоотношений беременности и роста злокачественных новообразований привлекает к себе внимание исследователей и занимает особенное место в современной онкологии. Следует подчеркнуть, что большинство онкомаркеров выявляются на определенных стадиях развития эмбриона. Поэтому изучение взаимоотношений между эмбрио- и онкогенезом открывает уникальные перспективы исследования одного процесса через понимание механизмов регуляции другого. Проблема взаимоотношений беременности и злокачественного роста интересна не только с позиции выявления общих биологических закономерностей, но имеет еще один важный клинический аспект – когда злокачественная опухоль развивается на фоне беременности [1–3].

В последние годы установлено, что плацента проницаема для метастазов при опухолях, возникших во время беременности. Показано и проиллюстрировано, что наиболее часто метастазы возникают при злокачественных меланомах с возможным метастазированием к плоду [4,5].

#### **Цель работы**

Изучение морфологических и иммуногистохимических особенностей онкомаркеров в плацентарном барьере при физиологическом течении беременности в разные сроки гестации и у женщин, прооперированных по поводу папиллярной карциномы щитовидной железы при срочных родах.

#### **Материалы и методы исследования**

Изучены плаценты женщин с физиологическим течением беременности и родов в динамике гестации I и III триместры – 1 группа (200 наблюдений); возраст беременных женщин – от 18 до 25 лет. Исследования проведены в рамках инициативной темы: «Изучить особенности онкомаркеров в плацентарном барьере при физиологической беременности», № госрегистрации 0108U001046).

В связи с тем, что в результате аварии на ЧАЭС в Украине в 2,5 раза достоверно возросли опухоли щитовидной железы, мы обратили внимание на беременных, которые перенесли операции по поводу рака щитовидной железы. Исследованы плаценты женщин (2 группа – 17 наблюдений), которые прооперированы по поводу папиллярной карциномы (инкапсулированной), T1N0M0, из них 1 наблюдение – с инвазированным ростом в капсулу щитовидной железы. Верификация диагноза проведена в лаборатории морфологии Института эндокринологии НАМНУ, руководитель – профессор Т.И. Богданова; параллельно проведена верификация международными экспертами по банку данных рака щитовидной железы. Возраст исследуемых женщин – от 18 до 25 лет (идентичен контрольной группе). В исследуемой группе перинатальных потерь не было, 74,8% детей родились доношенными в сроке гестации 37–38 недель, 25,2% – преждевременные роды в сроке гестации 34–36 недель. У женщин отмечены проявления субклинического гипотериоза (согласно данным эндокринологических исследований). Исследования проводятся в

рамках инициативной темы, утвержденной в 2011 году: «Изучить морфологические и иммуногистохимические особенности онкомаркеров в плацентарном барьере у женщин из групп риска по опухолеобразованию».

Плаценты изучали на основании протокола, который включает данные органометрических, макроскопических и микроскопических исследований (Форма № 013-2/0), утвержден приказом МЗ Украины №417 от 19.08.04.

Использованы гистологические методы: окрашивание гематоксилин-эозином и по Ван-Гизон; иммуногистохимический: непрямой стрептавидин-пероксидазный метод выявления экспрессии маркеров пролиферации PCNA – Anti-Rat Proliferating Cell Nuclear Antigen, Clon PC10 (Dako); Anti Human Ki67 Clon MIB-1 (Dako), маркеров апоптоза: тест TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase mediated dUTP nick-end labeling); Anti Human Bax proapoptotic gene (Dako); Anti Human Bcl-2 oncoprotein Clon 124 (Dako); Anti Human p53 Protein Clon: DO-7 (Dako); Anti Human CEA Carcinoembryonic Antigen (Dako); маркера клеточной дифференцировки Cytokeratins AE1/AE3 (Emergo Europe) и мезенхимального фактора Mouse Anti-Swine Vimentin Clone: v9 (Dako). Иммуногистохимические исследования проводили на парафиновых срезах. Распространенность и интенсивность реакции оценивали в баллах, от 0 до 3. Также использован количественный метод определения пролиферативного индекса на основании подсчета Ki-67-позитивных клеток.

Проводили электронномикроскопические исследования, материал фиксировали в 2,5% растворе глутаральдегида и 1% растворе четырехоксида осмия, с последующим размещением в эпоксидной смоле и исследованием на просвечивающем электронном микроскопе высокого разрешения с компьютерным управлением ПЭМ-125K (Selmi).

Выявленные критерии изменений структур плацентарного барьера будут внесены в опубликованный ранее «Сертификат плаценты» («Сертификат плаценты» легализован и включен МЗ Украины в 1991 году в перечень заболеваний, связанных с аварией на Чернобыльской АЭС).

#### **Результаты и их обсуждение**

Гистологически в хорионе I триместра (1 группа) обнаружены эмбриональные незрелые промежуточные и опорные ворсины. Большинство ворсин имеет стромальные каналы, которые содержат клетки Кашенко-Гофбауэра. Фетальные сосуды расположены как в центре, так и субэпителиально.

Органометрические, макроскопические, гистологические, электронномикроскопические изменения в плацентарном барьере при физиологической беременности имели четко выраженную динамику изменения в зависимости от срока гестации и совпадали с общепринятой гистологической нормой плаценты в I и III триместрах и данными наших предыдущих наблюдений [6,7].

Иммуногистохимическое исследование в I группе (I триместр) маркера пролиферации Ki-67 показало, что выраженная иммунореактивность отмечена в ядрах

цитотрофобласта и менее интенсивная – в клетках эндотелия сосудов и стромы, пролиферативный индекс в 9–10 недель гестации составил  $8,33 \pm 1,36\%$ ; в III триместре иммунореактивность пролиферативного маркера снижалась до слабо выраженной, пролиферативный индекс составлял  $0,77 \pm 0,28\%$ . Иммуногистохимическая реакция на Ki-67 в клетках синцитиотрофобласта отрицательна.

Особенность иммунореактивности p53 в I триместре беременности (1 группа) аналогична Ki-67. В III триместре экспрессия p53 негативна.

При иммуногистохимическом исследовании карциноэмбрионального антигена (СЕА) обнаружена следовая реакция в цитотрофобласте в ранние сроки гестации (I триместр) и негативную реакцию в III триместре.

Положительная экспрессия маркера клеточной дифференцировки – цитокератина – выявлена в синцитии ворсинок как в I, так и в III триместрах беременности (рис. 1, цв. вкладка 1), в остальных структурах плацентарного барьера данный маркер не определен.

Экспрессия мезенхимального фактора Vimentin в III триместре умеренна в клетках эндотелия и стромы (рис. 2, цв. вкладка 1).

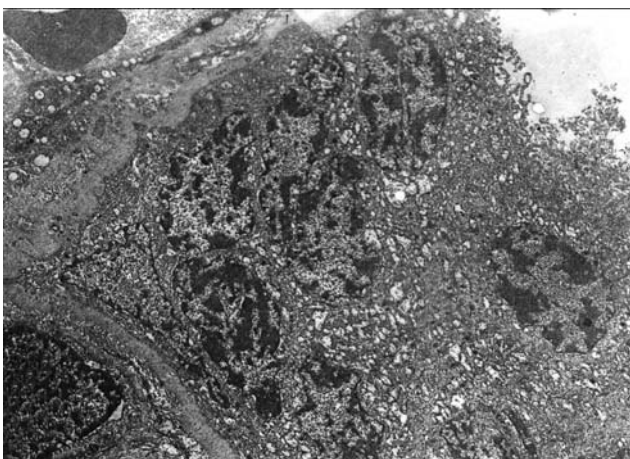


Рис. 3. Плацента женщины 2 группы. Пролiferация синцитиотрофобласта. Конденсация хроматина, выраженная неравномерно, у ядерной мембраны. Электроннограмма. Ув.12000.

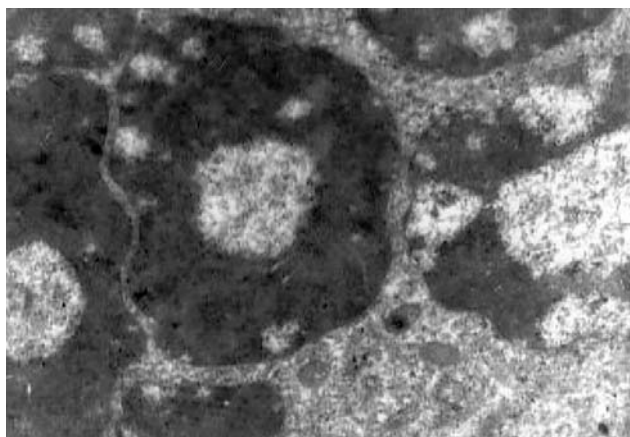


Рис.4. Плацента женщины 2 группы. Конденсация хроматина и пикноз апоптотически измененных ядер синцития. Электроннограмма. Ув.20000.

При исследовании плацент от женщин 2 группы выявлено, что макроскопически плаценты не отличались от группы контроля. Гистологически и электронномикроскопически в 47% наблюдений выявлено нарушение микроциркуляции с кровоизлияниями и избыточным отложением вневорсинчатого фибриноида с наличием пикноза и полиморфизма ядер (рис. 3, рис. 4).

При иммуногистохимическом исследовании маркера пролиферации Ki-67 выраженная реакция 3 балла отмечена в ядрах цитотрофобласта клеток стромы и эндотелия сосудов, что подтверждается достоверным увеличением пролиферативного индекса, который в 3 раза превышает показатель группы контроля (рис. 5,6, цв. вкладка 1).

В 25% наблюдений обнаружена выраженная иммунореактивность маркера опухолевого роста СЕА в цитоплазме стромальных клеточных элементов (клетки Кашенко-Гофбауэра, фибробласты). В контроле реакция СЕА негативна.

Экспрессия протеина p53 носила очаговый характер в ядрах вневорсинчатого трофобласта (рис. 7, цв. вкладка 2) и ворсинчатого трофобласта по сравнению с распространенной реакцией в группе контроля.

Маркер клеточной дифференцировки цитокератин имел выраженную экспрессию в эпителиальных структурах с нарушенной архитектурой (рис. 8, цв. вкладка 2).

Следует отметить, что во 2 группе исследований отмечены очаги метаплазии с выраженной иммунореактивностью маркера пролиферации Ki-67 в ядрах клеток стромы и цитотрофобласта (рис. 9 а,б, цв. вкладка 2).

Необходимо обратить внимание на одно наблюдение, когда папиллярная карцинома выявлена и прооперирована у женщины во время беременности. В плаценте при этом обнаружен очаг, который располагался в межворсинчатом пространстве и состоял из эпителиальных клеточных структур: его расценили как метастаз (рис. 10, цв. вкладка 2). К сожалению, иммуногистохимические исследования не проведены в связи с тем, что в последующих срезах этот очаг не обнаружен. Поэтому данная находка требует дальнейшего изучения на иммуногистохимическом уровне.

#### Выводы

Органометрические, макроскопические, гистологические и электронномикроскопические особенности структур плаценты в I и III триместрах беременности совпадают с общепринятой нормой.

Гистологически и электронномикроскопически в 47% наблюдений выявлено нарушение микроциркуляции с кровоизлияниями и избыточным отложением вневорсинчатого фибриноида с наличием пикноза и полиморфизма ядер.

В I группе исследований в первом триместре в структурах плацентарного барьера отмечена выраженная экспрессия маркера пролиферации (Ki-67), протеина p53 и снижение этих маркеров в III триместре, что подтверждается показателями индекса пролиферации и обусловлено регулирующим влиянием данных факторов на процессы роста, развития, дифференцировки и

клеточной смерти в структурах плацентарного барьера в динамике беременности. Во 2 группе выраженная экспрессия Ki-67 отмечена в ядрах цитотрофобласта и менее выраженная – в клетках стромы и эндотелия сосудов, что подтверждается достоверным увеличением пролиферативного индекса, экспрессия протеина p53 носила очаговый характер в ядрах вневорсинчатого трофобласта и ворсинчатого трофобласта по сравнению с негативной в группе контроля.

Отмечено, что СЕА в 1 группе исследований выявил следовую реакцию в цитотрофобласте в ранние сроки гестации (I триместр) и не определялся в III триместре беременности, во 2 группе в III триместре отмечена выраженная иммунореактивность СЕА в цитоплазме стромальных клеточных элементов (клеток Кашценко-Гофбауэра, фибробластов).

Выраженная экспрессия фундаментального маркера клеточной дифференцировки цитокератина в цито- и синцитиотрофобласте в динамике беременности указывает на то, что процессы дифференцировки в клетках плацентарного барьера происходят до срочных родов.

#### Список литературы

1. *Rebeca N. Baergen Manual of Pathology of the Human Placenta / Rebeca N. Baergen.* – NY: Springer, 2005. – 520 p.
2. *Benirschke K. Pathology of the Human Placenta / Kurt Benirschke, Peter Kaufmann, Rebecca N. Baergen.* – Springer-Verlag New York Inc., 2006. – 1070 p.
3. *Аничков Н.М. Биология опухолевого роста (молекулярно-медицинские аспекты) / Аничков Н.М., Кветной И.М., Коновалов С.* – СПб.: Прайм-Еврознак, 2004. – 224 с.
4. *Биология маркеров рака и беременность / Винницкий В.Б., Мосиенко М.Д., Глинський Г.В. и др.* – Киев: Наук. думка, 1990. – 259 с.
5. *Владимирская К.Б. Апоптоз и его роль в развитии опухолевого роста / Владимирская К.Б., Масчан А.А., Румянцев А.Г. // Гематол. и трансфузиология.* – 1997. – №5. – С. 4–9.
6. *Archakova T. Cytokeratin and CEA expression in villous chorion / Archakova T., Zadorozhna T. // Placenta.* – 2009. – V. 30. – А.1–А.111.
7. *Podolsky V. Immunohistochemical peculiarities of placental barrier by physiological pregnancy / V. Podolsky, T. Zadorozhna, O. Eshenko, T. Archakova // Experimental oncology.* – 2010. – V. 32. – P. 101–108.

#### Сведения об авторах:

Задорожная Т.Д., д. мед. н., профессор, зав. лабораторией патоморфологии ГУ «ИПАГНАМНУ».

Подольский В.В., д. мед. н., профессор, зам. директора ГУ «ИПАГНАМНУ».

Ещенко О.И., к. мед. н., ст. научный сотрудник лаборатории патоморфологии ГУ «ИПАГНАМНУ».

Килихевич С.Н., к. мед. н., н. сотрудник лаборатории патоморфологии ГУ «ИПАГНАМНУ».

Арчакова Т.Н., к. мед. н., ст. научный сотрудник лаборатории патоморфологии ГУ «ИПАГНАМНУ».

Парницкая О.И., к. мед. н., ст. научный сотрудник лаборатории патоморфологии ГУ «ИПАГНАМНУ».

Давыдова Ю.В., д. мед. н., зав. отделением акушерских проблем экстрагенитальной патологии ГУ «ИПАГНАМНУ».

Гребиниченко А.А., к. мед. н., ст. научный сотрудник отделения медицины плода ГУ «ИПАГНАМНУ».

Пасечник Е.А., врач кабинета электронной микроскопии лаборатории патоморфологии ГУ «ИПАГНАМНУ».

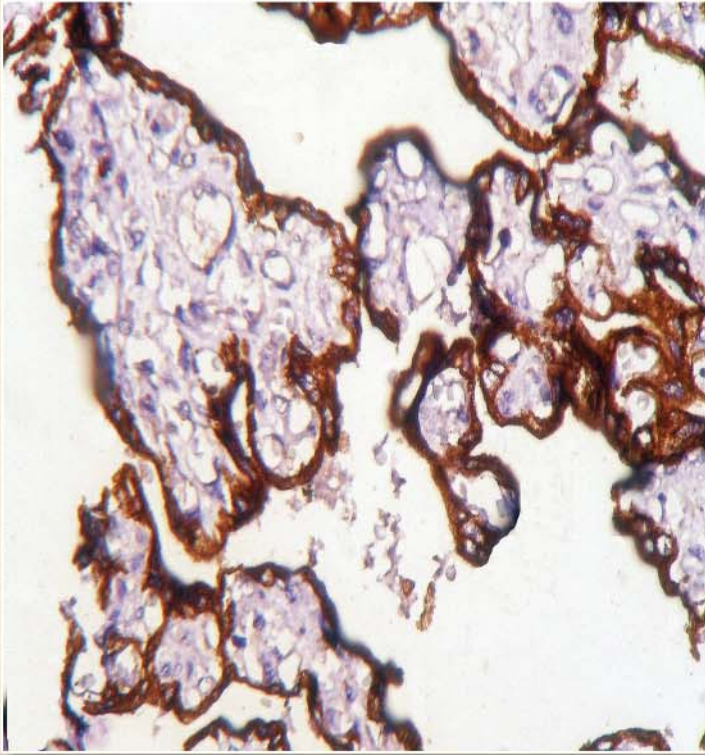
#### Адрес для переписки:

Ещенко Ольга Ивановна. 04050, г. Киев, ул. П. Майбороды, 8, ГУ «ИПАГНАМНУ».

Тел.: (044) 483 92 31.

E-mail: olga@eschenko.com.ua

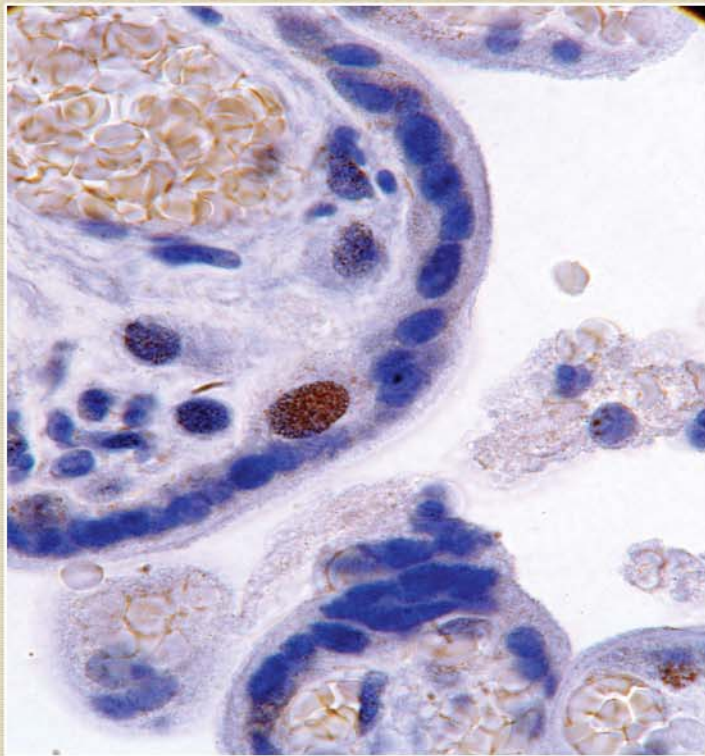
Надійшла в редакцію 13.03.2012 р.



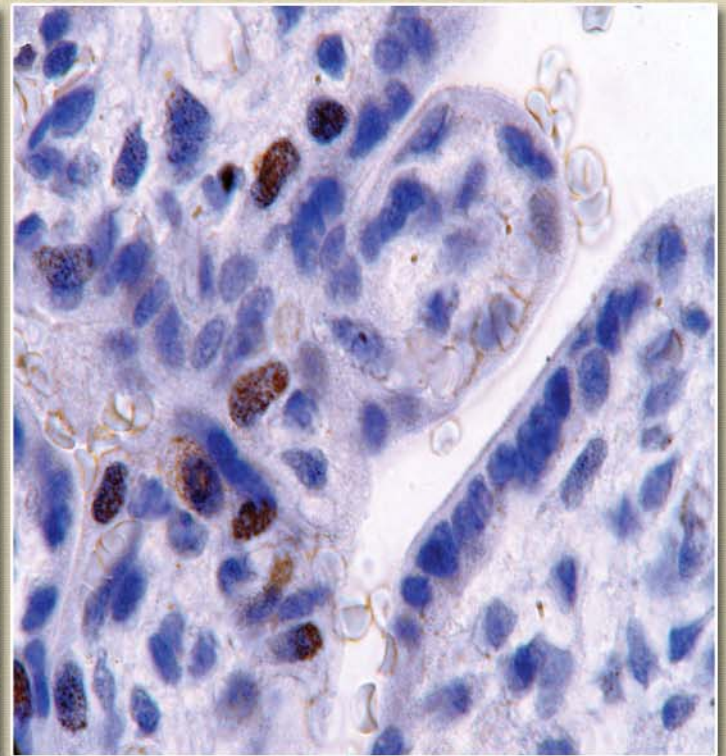
*Рис. 1.* Плацента женщины 1 группы исследований, 3 триместр беременности. Положительная экспрессия маркера клеточной дифференцировки цитокератина в синцитии ворсинок. Непрямой стрептавидин-пероксидазный метод. Микрофотография. Ок. 10 Об.10.



*Рис. 2.* Плацента женщины 1 группы исследований, 3 триместр беременности. Умеренно выраженная иммунореактивность мезенхимального фактора Vimentin в клетках эндотелия и стромы. Непрямой стрептавидин-пероксидазный метод. Микрофотография. Ок. 10 Об.10.

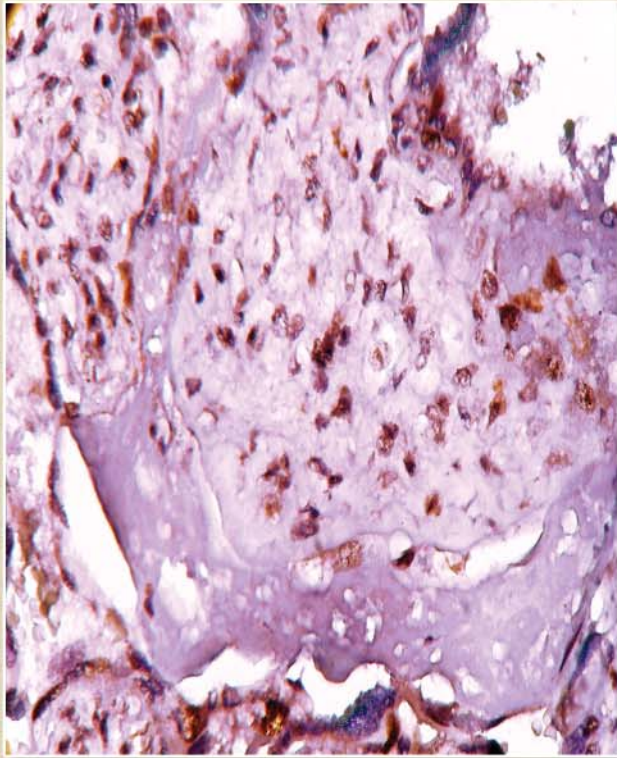


*Рис. 5.* Плацента женщины, 2 группа исследований. Выраженная иммунореактивность Ki-67 в ядрах цитотрофобласта. Непрямой стрептавидин-пероксидазный метод. Микрофотография. Ок. 10 Об.40.

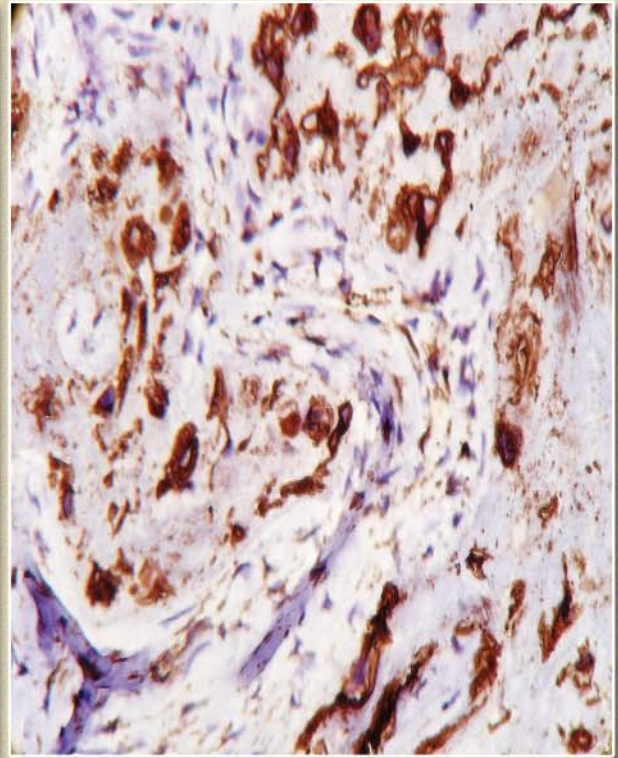


*Рис. 6.* Плацента женщины, 2 группа. Выраженная экспрессия Ki-67 в ядрах клеток стромы. Непрямой стрептавидин-пероксидазный метод. Микрофотография. Ок. 10 Об. 40.

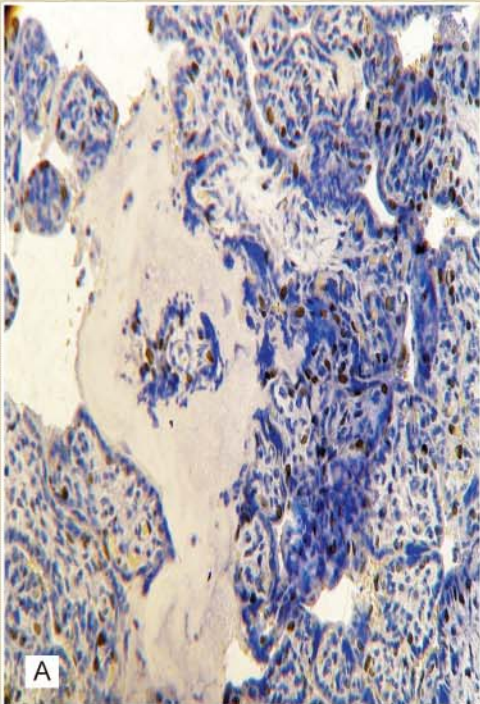
**(Рис. 1, 2, 5, 6 к статье Т.Д. Задорожной, В.В. Подольского, О.И. Ещенко, Т.Н. Арчаковой, С.М. Килихевич, О.И. Парницкой, Ю.В. Давыдовой, А.А. Гребиниченко, Е.А. Пасечник «Морфологические и иммуногистохимические особенности онкомаркеров в плацентарном барьере», с. 38–41)**



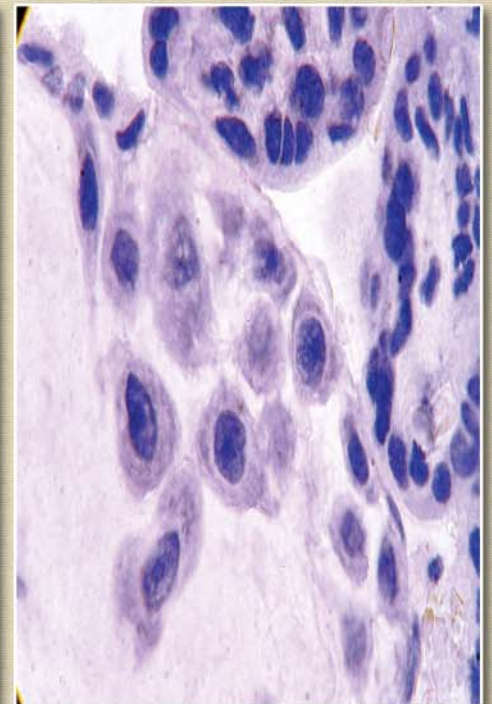
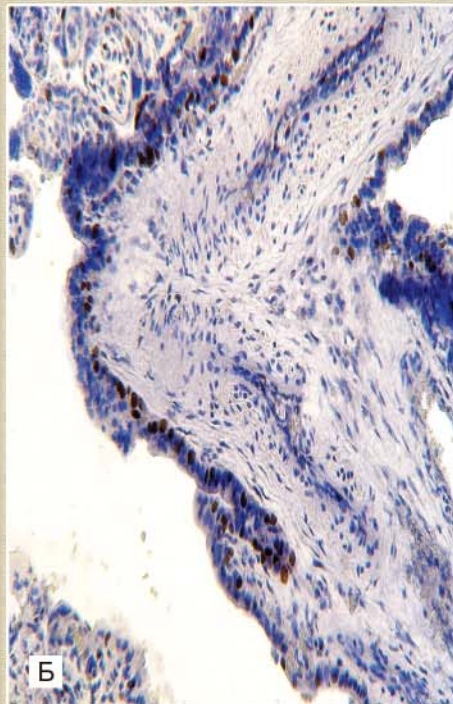
*Рис. 7.* Плацента женщины, 2 группа. Умеренная иммунореактивность p53 в ядрах клеток вневорсинчатого цитотрофобласта, очагового характера. Непрямой стрептавидинпероксидазный метод. Микрофотография. Ок 10 Об.20.



*Рис. 8.* Плацента женщины, 2 группа. Выраженная экспрессия маркера клеточной дифференцировки цитокератина в эпителиальных структурах с нарушенной архитектоникой. Непрямой стрептавидинпероксидазный метод. Микрофотография. Ок 10 Об.20.



*Рис. 9 А, 9Б.* Плацента женщины, 2 группа. Очаги метаплазии с выраженной экспрессией Ki-67 в ядрах клеток стромы и цитотрофобласта. Непрямой стрептавидин-пероксидазный метод. Микрофотография. Ок 10 Об.10.



*Рис. 10.* Беременная 21 год, обнаружена папиллярная карцинома щитовидной железы во время беременности. Была прооперирована. Очаг в межворсинчатом пространстве, состоящий из эпителиальных клеточных структур.

*(Рис. 7, 8, 9А, 9Б, 10 к статье Т.Д. Задорожной, В.В. Подольского, О.И. Ещенко, Т.Н. Арчаковой, С.М. Килихевич, О.И. Парницкой, Ю.В. Давыдовой, А.А. Гребиниченко, Е.А. Пасечник «Морфологические и иммуногистохимические особенности онкомаркеров в плацентарном барьере», с. 38–41)*