

МОРФОЛОГІЧНИЙ СТАН МАТКИ ТА ПЛАЦЕНТИ ПРИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМУ МОДЕЛЮВАННІ GESTAЦІЙНОГО АНТИФОСФОЛІПІДНОГО СИНДРОМУ НА МИШАХ**Зайченко Г.В., Лар'яновська Ю.Б., Деєва Т.В., Шевченко О.І., Старокожко В.Ю., Кудіна О.В., Сак І.Ю.***Національний фармацевтичний університет (м. Харків)*

Вступ. Акушерський антифосфоліпідний синдром (АФС) є однією з вагомих чинників формування патології гестаційного періоду, зокрема невиношування вагітності (НВ), частота якої на сьогодні складає 10-35% і не має тенденції до зниження [1,2,9,10]. АФС посідає важливу роль в етіопатогенезі звичного невиношування вагітності, яка за частотою випадків (27-42%) випереджає всі інші форми. Однією з причин високих репродуктивних втрат при АФС є порушення імунних механізмів, які забезпечують нормальне запліднення яйцеклітини, імплантацію та плацентацію, інвазію трофобласта та подальше прогресування вагітності. За статистичними даними, загибель ембріона/плода без лікування жінок з АФС складає 80-95%. Це, безумовно, змушує розв'язувати цю актуальну проблему на міждисциплінарному рівні [4,6,7,11].

З огляду на важливість АФС в акушерстві, як значущого фактору гестаційних ускладнень, вивчення патогенетичних та патоморфологічних його проявів у органах-мішенях (матці та плаценті) з метою дослідження механізмів дії нових гравідопротекторів, визначення оптимальних строків проведення профілактичних антенатальних заходів, підвищення ефективності фармакотерапії є актуальним завданням репродуктивної фармакології. Пошук та впровадження нових лікарських засобів для лікування АФС допоможе знизити репродуктивні втрати, покращити демографічні показники [8].

Однією з основних і не до кінця вирішених проблем, які виникають при дослідженні перспективних лікарських засобів для корекції АФС, є відтворення адекватної експериментальної моделі та чітке визначення морфологічних маркерів патології у матці і плаценті як найбільш специфічних та об'єктивних. Є окремі та мало систематизовані публікації з цього напрямку [12,13,14]. З'ясування тонких структурних змін у ендометрії, міометрії, маткових судинах, тканинах плаценти надає можливість встановити ступінь тяжкості патологічного процесу, його наслідки для ембріо-/фетогенезу, прогнозувати результат вагітності та ефективність лікувально-профілактичної фармакотерапії. Враховуючи відсутність систематизованих даних щодо гістоархітекtonіки таргетних органів у експериментальних тварин з АФС, які б дозволяли у подальшому інтерпретувати результати фармакологічних дослідів, нами було проведено комплексне дослідження з цього напрямку. Робота виконана відповідно до плану НДР Національного фармацевтичного університету «Фармакологічні дослідження біологічно активних речовин і лікарських засобів синтетичного та природного походження, їх застосування у медичній практиці» (№ держреєстрації 0103U000478).

Мета дослідження. Експериментальне вивчення показників ембріогенезу, морфологічного стану тканин матки та плаценти у мишей лінії BALB/c при моделюванні гестаційного АФС.

Матеріали та методи. На сьогоднішній день існує декілька підходів до відтворення АФС: моделі, які пов'язані з пасивною імунізацією та моделі активної імунізації. Для експериментального АФС найчастіше застосовують мишей, інколи щурів, плацента яких, як і плацента людини належить до гемохоріального типу [13,14]. Нами була відтворена нова модель гестаційного АФС шляхом активної імунізації мишей кардіоліпіновим антигеном (КЛ) в ад'юванті Фрейнда.

Досліди проводили на самках мишей лінії BALB/c вагою 22-26 г. Самкам групи контрольної патології (n=9) внутрішньом'язово вводили кардіоліпіновий антиген (ЗАТ «Біолік», Україна, м. Харків) у дозі 30 мкг у ад'юванті Фрейнда (75 мкл) [12]. Перша ін'єкція КЛ вводилась у повному ад'юванті Фрейнда, наступні три – у неповному, 1 раз на 2 тижні. Таким чином модель експериментального АФС у самок мишей була відтворена за 2 місяці (через два тижні після останньої ін'єкції).

Після моделювання АФС самок підсаджували до самців (з розрахунку 1 самець на 3 самки). Вагітність фіксували за наявністю у вагіні пробки білого кольору на наступний день після спарювання (метод вагінальних пробок).

Виведення тварин з експерименту проводили на 16-й день гестації. Підраховували кількість жовтих тіл, місць імплантації в матці, кількість живих та резорбованих плодів. На підставі вищезазначених даних визначали показники до- та післяімплантаційної загибелі ембріонів. Також підраховували середню масу плодів та плаценти у двох експериментальних групах.

Зразки плаценти (сагітальні розрізи) та стінки маточного рогу (поздовжні) фіксували у 10% розчині формаліну, дегідрували у спиртах зростаючої концентрації, заливали у целоїдин-парафін. Зрізи забарвлювали гематоксиліном та еозином [5]. Вивчення мікропрепаратів проводили під мікроскопом Mikros 400, фотографування мікроскопічних зображень здійснювали цифровим фотоапаратом Nikon Cool Pix 4500. Фотознімки опрацьовували на комп'ютері Pentium 2,4GHz за допомогою програми Nikon View 5.

Статистичне опрацювання результатів проводили з використанням методів варіаційної статистики (програма «Statistica 5.0»). Задля оцінки вірогідності відмінностей між показниками використовували точний критерій Фішера та критерій Манна-Уїтні [3].

Обговорення результатів дослідження.

Отримані результати свідчать про те, що АФС призводить до зменшення кількості плодів на одну самку та значного підвищення показників до- та післяімплантаційної загибелі. У самок з групи контрольної патології спостерігали дострокове переривання вагітності у 22% випадків, збільшення доімплантаційної загибелі майже у 5 разів, післяімплантаційної – у 3 рази. Погіршувались показники фетогенезу. У плодів самок з АФС, маса тіла

зменшувалася у порівнянні з відповідними показниками здорових мишей у середньому на 28%. Це опосередковано вказувало на розвиток первинної плацентарної дисфункції, недостатності трофічної функції плаценти та синдрому затримки розвитку плоду. Проявом плацентарної дисфункції було також зменшення маси плаценти у групі тварин з АФС (табл.).

Таблиця. Показники перебігу вагітності у самок мишей з антифосфоліпідним синдромом

Досліджувані показники	Тварини групи інтактного контролю	Тварини групи контрольної патології
Кількість плодів, ($\bar{X} \pm S_{\bar{x}}$)	8,33±0,236	4,78±0,278*
Доімплантаційна загибель плодів, %	2,66	12,07
Післяімплантаційна загибель плодів, %	0	34,88
Самки з перерваною вагітністю, %	0	22,22
Маса плодів, ($\bar{X} \pm S_{\bar{x}}$), г	1,09±0,009	0,78±0,020*
Маса плаценти, ($\bar{X} \pm S_{\bar{x}}$), г	0,20±0,003	0,18±0,003*

Примітка. * – відхилення значущі відносно показників тварин групи інтактного контролю, ($p < 0,05$)

Підтвердженням розвитку патології було виявлення значних змін у гістоструктурі органів-мішеней вагітних самок на 16-й день гестації.

Матка. На мікропрепаратах тканин матки здорових тварин, чітко розрізнялися місця імплантації (плацентарне ложе), та міжплацентарні ділянки. На міжплацентарних ділянках слизова оболонка (ендометрій) була представлена шаром епітелію та власною пластинкою (стромою). Епітелій одношаровий призматичний, місцями його характер багаторядний. Апікальний край клітин іноді розпушений. Епітелій утворював широкі, помірні за висотою складки. Маткові залози, що виявлялися, були малочисельні, неглибокі, епітелій, який їх вистеляв, високопризматичний, багаторядний, цитоплазма клітин часто просвітлена. Строма слизової – пухка волокниста тканина з ознаками набряку, лімфостази, з помірною кількістю повнокровних тонкостінних судин (капіляри, венули) та клітинних елементів. Епітелій достатньо чітко відокремлений від підлеглої строми. М'язовий шар (міометрій) складався з жмутків гладеньких м'язових волокон, які йшли у різних напрямках. У сполучнотканинних прошарках міометрію виявлялися кровонесні судини різного калібру, досить повнокровні, судинна стінка в них була не змінена. На ендометрії плацентарного ложа, слизова оболонка була виразно потоншена. Епітелій на поверхні відсутній. Спостерігалися залишки децидуальних клітин (поверхневі шари) та спонгіозний шар, у якому були гладком'язові волокна. Міометрій під ложем був стоншеним (рис. 1).

У мишей групи контрольної патології у матці виявляли наявність місць резорбції. Плацентарне ложе, де були життєздатні плоди гістоархітектоніка ендометрію була доволі типовою для вагітної матки. Втім, у стромі відмічали виразну повнокровність мережі тонкостінних судин (стаз крові, тромбоз), крововиливи, діapedез лейкоцитів. Місцями у стромі ендометрію спостерігалася виразна запальна реакція (рис. 2). У міометрії м'язові волокна були іноді потоншені. У міжм'язовому прошарку виявляли поширення та тромбози судин, в окремих артеріях – вогнищеву проліферацію ендотеліальних клітин, розпушення судинної стінки (рис. 3). У

плацентарному ложі під життєздатними плодами у спонгіозному шарі виявлялися різні за розміром крововиливи, скупчення макрофагальних клітин (рис.4). Поруч з місцями резорбції ендометрій мав нетиповий вигляд: зібраний у дуже тонкі звивисті складки; епітелій, що вистеляв його – сплющений. Власна пластинка була дуже тонкою або зовсім не вираженою, там де вона була присутня, виявляли клітинну насиченість. Виявлялися скупчення макрофагів, що є досить характерним проявом імуннопатологічних процесів, які прогресують при АФС.

Судинна мережа матки була повнокровною, зі стазами крові та тромбозами. Іноді зустрічалися резорбовані плоди, які мали вигляд гомогенної маси з залишками детриту по периферії. Порушення, що виявлялися у стінці маткового рогу самок групи контрольної патології (мозаїчні вогнищеві атрофічні ділянки ендометрію, стаз крові, численні тромбози та крововиливи) можуть призводити до порушення процесу нідації плідного яйця, наслідком чого, можливо, є загибель зародку на ранній стадії гестаційного процесу, яку спостерігали у цих тварин (чисельні місця резорбцій у матці). Крім того, наслідком таких подій може стати неможливим сам процес імплантації, що підтверджується фактами доімплантаційної ембріолетальності у самок з АФС.

Плацента. На препаратах плаценти інтактних мишей виявляється материнська частина з децидуальною тканиною та фетальна, що представлена трофоспонгіумом та лабіринтом синтиціальної структури. Децидуальна оболонка містила переважно дрібні, веретеноподібної форми фіброцити та їх більш великі та зрілі аналоги з базофільною цитоплазмою, а також материнські судини. Виразної межі між децидуа та підлеглим спонгіозним шаром не виявлялося. Гігантські клітини, що занурені у фібриноід, не утворювали безперервного шару, а були розташовані окремими групами. Гігантські клітини відрізнялися поліморфізмом: їх ядра були або світлі, або відносно темні, пухирчастоподібні, сітчасті; форма клітин від витягнутої до багатокутної. Для трофоспонгіума були характерні дрібновідросчаті та «глікогенні» клітини, цитоплазма яких залишалася індіферентною по відношенню до різ-

них барвників. Часто «глікогенні» клітини групувалися у відносно просторі поля («острівці»), їх

округлі ядра найчастіше лежали ексцентрично, деякі були пікнотичні (рис.6).

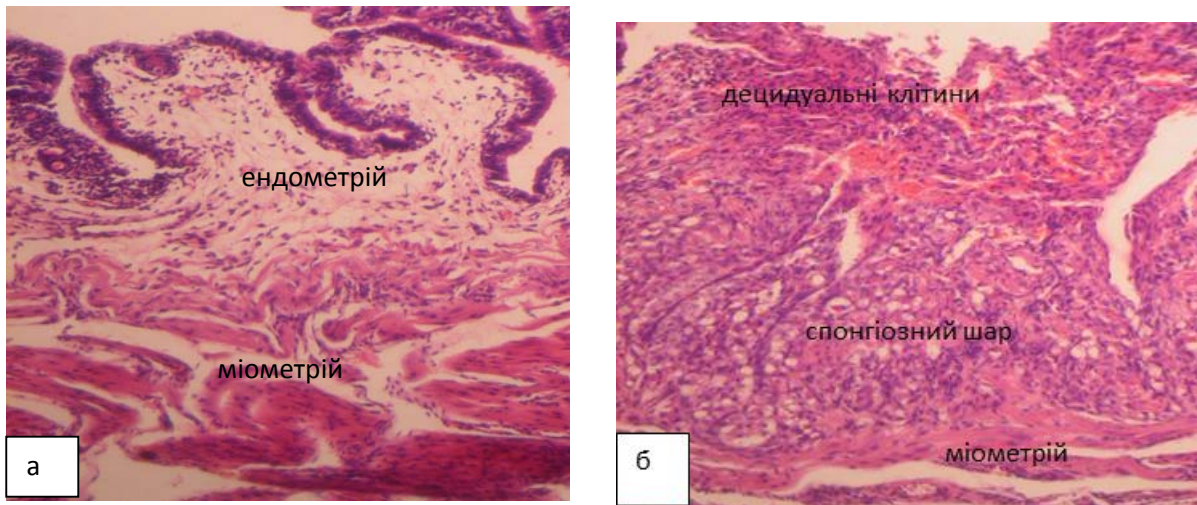


Рисунок 1. Стінка маткового рогу миші групи інтактного контролю. 16-й день гестації: а – міжплацентарна ділянка, б – плацентарне ложе. Гематоксилін-еозин. x100.

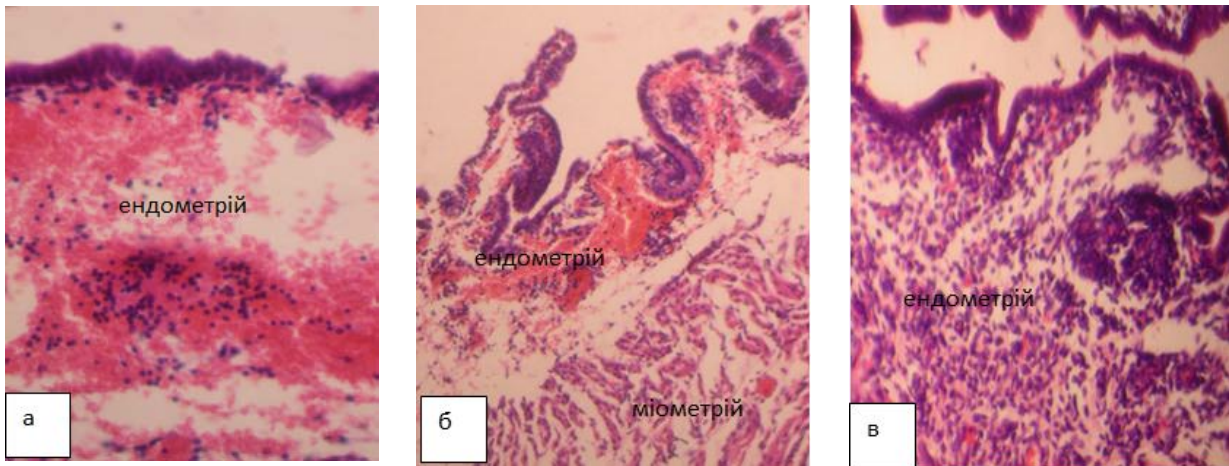


Рисунок 2. Стінка маткового рогу миші групи контрольної патології. 16-й день гестації. Ділянка поруч з живим плодом: а-б – поширені крововиливи у стромі ендометрію, діapedез лейкоцитів, потоншення гладеньком'язових волокон міометрію; в – запальна реакція у стромі ендометрію. Гематоксилін-еозин. x100, 250.

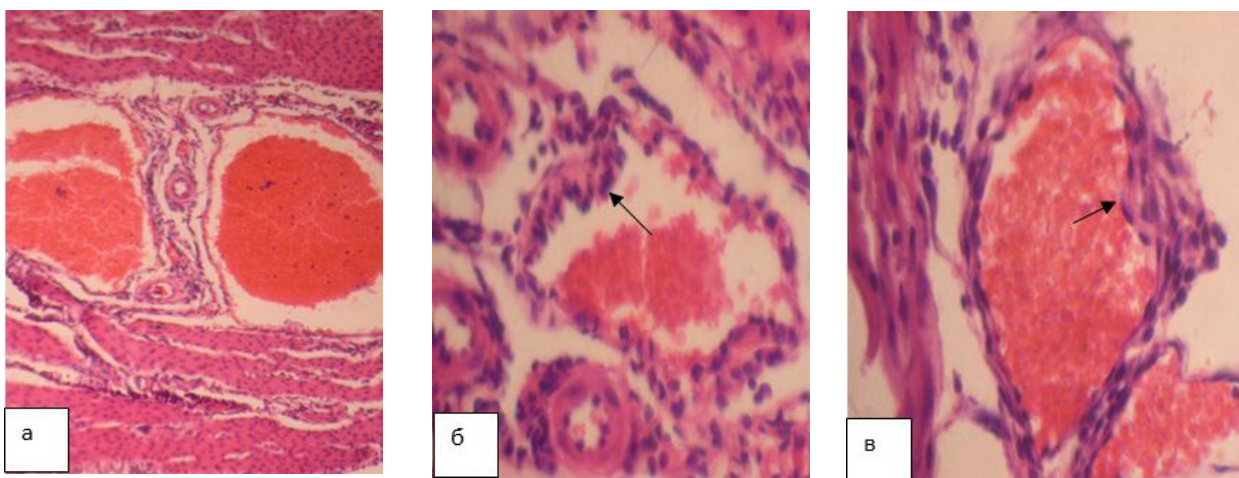


Рисунок 3. Стінка маткового рогу миші групи контрольної патології. 16-й день гестації. Міометрій: а – тромбоз судин; б-в – вогнищева проліферація ендотеліальних клітин у судинах. Гематоксилін-еозин. x100, 400.

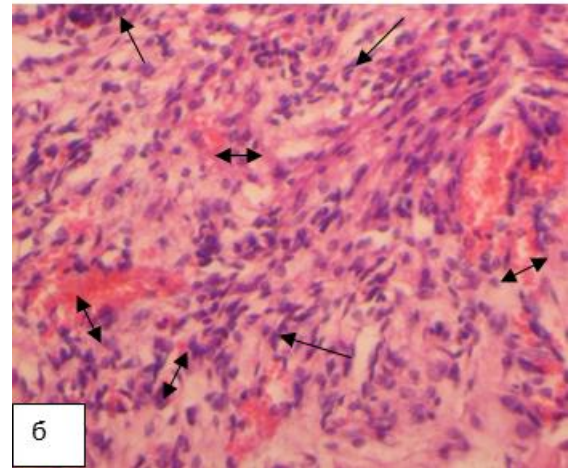
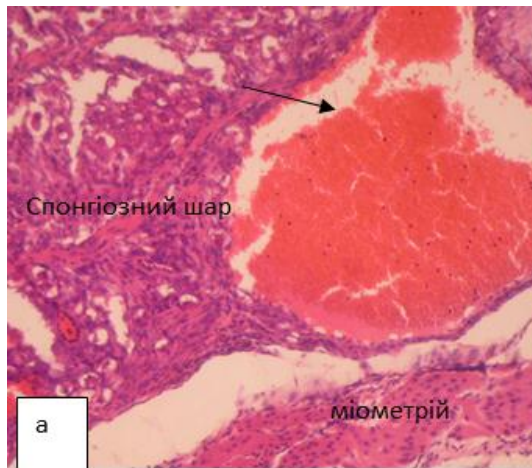


Рисунок 4. Стінка маткового рогу миші групи контрольної патології. 16-й день гестації. Плацентарне ложе під живим плодом: у спонгіозному шарі різні за виразністю крововиливи (а – виразний крововилив; б – дрібні крововиливи та скупчення макрофагів). Гематоксилін-еозин. x100, 250.

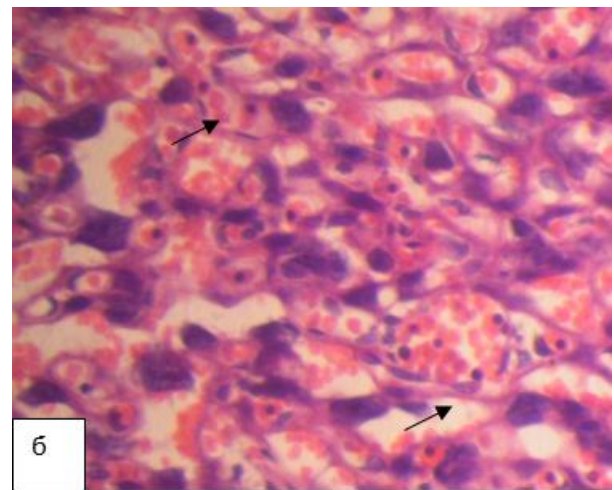
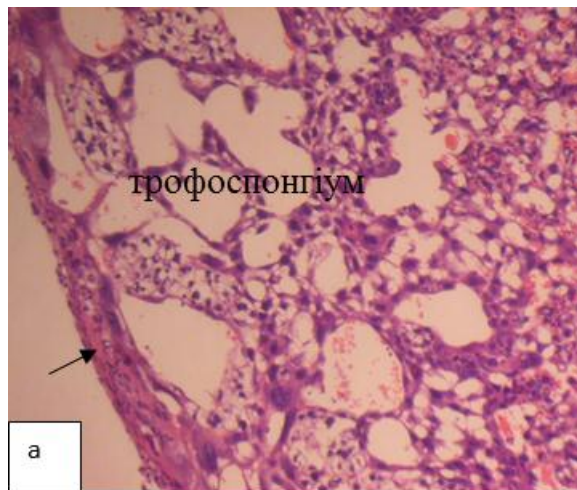


Рисунок 6. Плацента миші групи інтактного контролю. 16-й день гестації: а – ділянка децидуальної оболонки та трофоспонгіума (щільне розміщення клітин, глікогенні острівки, рідкі поліморфні величезні клітини) x 150; б – ділянка лабіринту (багаточисельні фетальні судини в оточенні материнської крові, ендотелій добре простежується). Гематоксилін-еозин. x250.

Основна маса плаценти приходить на розпушену тканину лабіринтної зони. Плацентарний лабіринт складається з великої кількості тонких, анастомозуючих між собою трофобластичних балок, які з усіх боків оточують фетальні капіляри. Для лабіринту інтактної плаценти характерна велика кількість фетальних судин, місцями відокремлених від материнських лакун лише тонкими прошарками трофобластичного синцитію та вкрапленими крупними клітинами трофобласта (рис.6). В порожнинах фетальних судин багато еритроцитів з ядрами, що мають більш крупні, аніж материнські клітини, розміри. Добре простежуються ендотеліальні клітини, що вистилають плодові судини.

У тканинах плаценти мишей групи контрольної патології на 16-й день гестації у 100% спостережень виявлялися морфоструктурні порушення. Відмічені певні зміни архітекτονіки органу: у порівнянні з інтактним контролем візуально збільшилися розміри спонгіозного шару, що можна розглядати як грубе порушення морфофункціонального стану плаценти. Беручи до уваги морфологічну

ідентичність трофоспонгіума гемохоріальної плаценти миші периферичному цитотрофобласту плаценти людини, можна вважати це ознаками плацентарної дисфункції.

Материнські судини децидуа розширені та дуже кровонаповненні (рис. 7а). В товщі трофоспонгіума виявляються достатньо великі фокуси некрозу, що складаються з аморфної безструктурної речовини та клітинного детриту (рис. 7б), на місці глікогенних острівків – крупні пусті порожнини.

Морфоструктура лабіринту плаценти також знавала патологічних змін. Як відомо, нормальне функціонування плаценти можливо лише за наявністю нормального наповнення материнських та плодових балочок кров'ю.

При експериментальному АФС відмічалось нерівномірне кровонаповнення материнських та плодових судин. На одному й тому ж препараті можна було бачити і пусті зіяючі судини, і компенсаторно розширені, кровонаповненні. Тромбовані виявлялися як материнські, так і плодові балочки (рис. 8а). Спостерігали пусті плодові капіляри зі стоншеними стінками (рис. 8б).

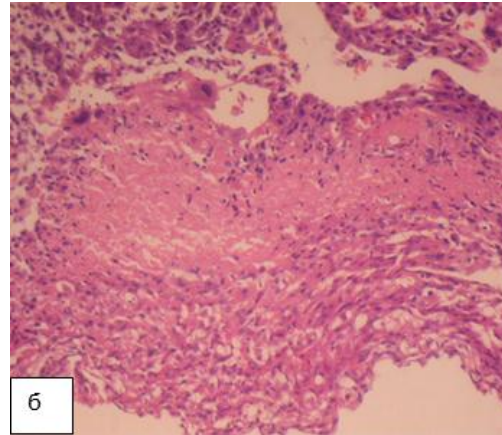
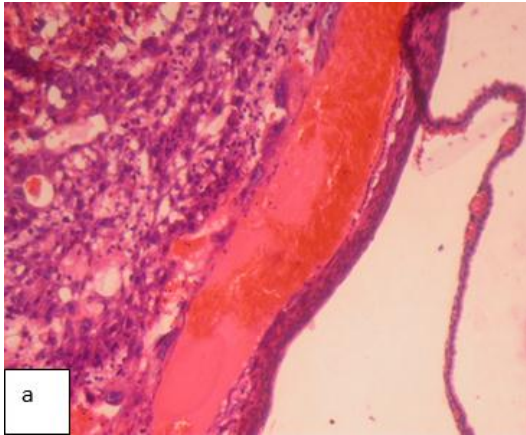


Рисунок 7. Плацента миші групи контрольної патології. 16-й день гестації: а – розширені та кровонаповнені судини децидуальної оболонки; б – фокуси некрозу в спонгіозному шарі. Гематоксилін та еозин. х 150.

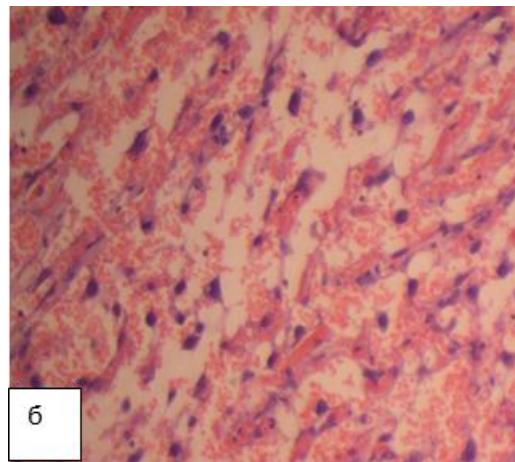
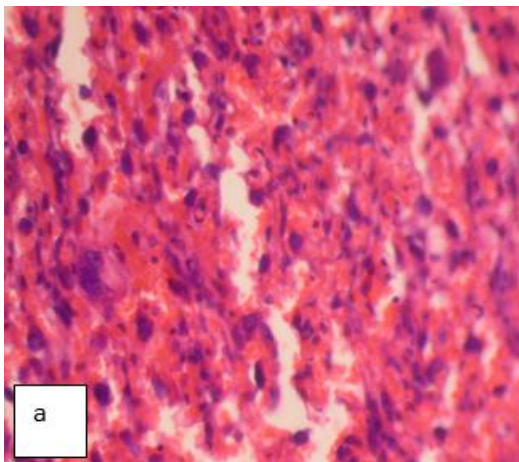


Рисунок 8. Плацента миші групи контрольної патології. 16-й день гестації: а – тромбовані материнські та плодові балочки, ендотелій ледве визначається; б – пусті плодові капіляри зі стоншеними стінками і ендотелієм, що не визначається. Гематоксилін та еозин. х 250.

У тромбованих, а, особливо, у порожніх та розтягнутих плодових капілярах, ледве визначався ендотелій. Це можна пояснити розвитком ендотеліальної дисфункції в судинах плаценти, що виникла внаслідок імунного патологічного процесу.

Враховуючи те, що морфофункціональний стан лабіринту зумовлює якісні та кількісні характеристики обмінних процесів між матір'ю та плодом, такі патологічні прояви мають викликати тяжкі наслідки для фетогенезу. Гістологічні порушення, які спостерігали як в материнській, так і фетальній частинах плаценти у вагітних мишей з АФС можна трактувати як такі, що відповідають декомпенсованій плацентарній дисфункції.

Таким чином, у мишей лінії BALB/c при моделюванні гестаційного АФС, виникають достатньо виражені, характерні морфологічні маркери патології у тканинах мішенях матці та плаценті. Патологічні зміни на тканинному рівні корелюють з клінічними проявами невиношування (втратою) вагітності, затримкою внутрішньоутробного розвитку плодів.

Висновки:

1. Введення мишам лінії BALB/c КЛ дозою 30 мкг в ад'юванті Фрейнда за відповідною схемою призводить до виникнення експериментального гестаційного АФС.
2. Клінічними проявами експериментального АФС є невиношування (втратою) вагітності, високі показники до- та післяімплантаційної ембріолетальності, затримка внутрішньоутробного розвитку плодів.
3. Морфологічними ознаками експериментального гестаційного АФС є порушення архітекtonіки матки та плаценти, зокрема запальні, імунні та деструктивно-дистрофічні процеси, що проявляються різкими порушеннями місцевого кровообігу та ендотеліальною дисфункцією в судинах матки та плаценти, формування плацентарної дисфункції.
4. Отримані дані мають практичне значення, оскільки дозволяють оптимізувати методичні підходи щодо пошуку та доклінічного вивчення нових лікарських засобів, призначених для профілактики та лікуванні акушерського АФС.

ЛИТЕРАТУРА:

1. **Гениевская М.Г.** Антитела к фосфолипидам и невынашивание / М.Г. Гениевская, А.Д. Макацария // Вестн. Рос. асс. акуш-гин. – 2000. – № 1. – С. 44-46.

2. Довідник з питань репродуктивного здоров'я / Відп. ред. **Н.Г. Гойди**. – К.: Вид-во Раєвського, 2004. – 127 с.
3. **Лапач С.Н.** Статистические методы в медико-биологических исследованиях с использованием Excel / С.Н. Лапач, А.В. Чубенко, П.Н. Бабич – К.: МОРИОН, 2000. – 320 с.
4. **Макацария А.Д.** Антифосфолипидный синдром в акушерской практике / Под ред. А.Д. Макацария. – М: РУССО, 2001. – 304 с.
5. **Меркулов Г.А.** Курс патологистологической техники / Г.А. Меркулов. – М.: Медицина, Ленингр. отд-ние, 1969. – 424 с.
6. Репродуктивне та статеве здоров'я підлітків в Україні. Ситуаційний аналіз. / **Н. Березіна [та ін.]** – ФНООН, МОЗ, УАПС, 2005.
7. **Стрижаков А.Н.** Потеря беременности / А.Н. Стрижаков, И.В. Игнатко – М., 2007. – 224 с.
8. **Трифонов В.Ю.** Экспериментальное обоснование возможности прегравидарной профилактики антифосфолипидного синдрома/ В.Ю.Трифонов [и др.]// Таврический медико-биологический вестник. – 2010. – Т.13, № 4 (52). – С. 188-192.
9. **Якубовська І.О.** Антифосфолипидний синдром (синдром Х'юза) в лікарській практиці / І.О. Якубовська, С.І. Генік // Здоровье Украины. – 2008. – №4. – 34-37.
10. **Galli M.** Antiphospholipid antibodies and thrombosis; strength of association / M. Galli, T. Barbui // Hematol. J. – 2003. – 4(3). – P. 180-186.
11. **Miyakis S.** International consensus statement on an update of the classification criteria for definite antiphospholipid syndrome (APS) / S.Miyakis [et all] // J. Thromb Haemost. – 2006. – 4(2). – P. 295-306.
12. **Shanmugan V.** Placental Thrombosis in Experimental Anticardiolipin Antibodies-Mediated Intrauterine Fetal Death / V. Shanmugan, A. Govindaraju, B. Kumbalingam // American Journal of Reproductive Immunology. – 2007. – V. 57. – P. 270-276.
13. **Shoenfeld Y.** Lessons from experimental APS models / Y. Shoenfeld, L. Ziporen // Lupus. – 1998. – № 7, Suppl. 2. – P. S158-S161.
14. **Tincani A.** Animal models of antiphospholipid syndrome, Expression Scientific Publication / A. Tincani [et all] // Rev. Rheum. Engl. Ed. – 1998. – V. 65. – P. 614-618.

Зайченко Г.В., Лар'яновська Ю.Б., Дєєва Т.В., Шевченко О.І., Старокожко В.Ю., Кудіна О.В., Сак І.Ю. Морфологічний стан матки та плаценти при експериментальному моделюванні гестаційного антифосфолипидного синдрому на мишах // Український медичний альманах. – 2011. – Том 14, № 4. – С. 136-141.

В статті наведені результати вивчення гістоструктури матки і плаценти при експериментальному антифосфолипидному синдромі у мишей. Встановлено, що провідними ознаками АФС є запальні, імунні та деструктивно-дистрофічні процеси, які проявляються різкими порушеннями місцевого кровообігу та ендотеліальною дисфункцією в судинах матки та плаценти. Патологічні зміни на тканинному рівні корелюють з клінічними проявами невиношування (втратою) вагітності, формуванням плацентарної дисфункції, затримкою внутрішньоутробного розвитку плодів.

Ключові слова: експериментальний антифосфолипидний синдром, морфоструктура матки та плаценти

Зайченко А.В., Ларьяновская Ю.Б., Деева Т.В., Шевченко О.И., Старокожко В.Ю., Кудина О.В., Сак И.Ю. Морфологическое состояние матки и плаценты при экспериментальном моделировании гестационного антифосфолипидного синдрома на мышах // Український медичний альманах. – 2011. – Том 14, № 4. – С. 136-141.

В статье освещены результаты изучения гистоструктуры матки и плаценты при экспериментальном антифосфолипидном синдроме у мышей. Установлено, что характерными изменениями при АФС являются воспалительные, иммунные и деструктивно-дистрофические процессы, которые проявляются резкими нарушениями локального кровотока, эндотелиальной дисфункцией в сосудах матки и плаценты. Патологические изменения на тканевом уровне сопоставимы с клиническими признаками невынашивания (потери) беременности, формированием плацентарной дисфункции, задержкой внутриутробного развития плодов.

Ключевые слова: экспериментальный антифосфолипидный синдром, морфоструктура матки и плаценты

Zaychenko A.V., Laryanovskaya Yu.B., Deieva T.V., Shevchenko O.I., Starokozhko V.Y., Kudina O.V., Sak I.Y. Morphological status of the uterus and placenta in experimental model of gestational antiphospholipid syndrome on mice // Український медичний альманах. – 2011. – Том 14, № 4. – С. 136-141.

Antiphospholipid syndrome (APS) is a systemic autoimmune disease with a wide spectrum of clinical manifestations that are characterized by high production of antibodies to cell membranes phospholipids. In obstetrics, APS leads to infertility, miscarriage and complication during pregnancy. In this study, the uterus and placenta histostucture in experimental antiphospholipid syndrome on mice Balb/c was investigated. We show that inflammatory, immune and destructive-dystrophic processes are typical features of APS. Pathological processes are characterized by acute failure in local bloodstream and endothelial dysfunction of uterus and placenta vessels. Our results indicate that pathological tissue changes are associated with clinical symptoms manifestation: pregnancy loss, dysfunctional placenta development and intrauterine growth retardation. Taken together, our experimental setup has proven to be functional as a model to study gestational antiphospholipid syndrome (in order to develop new drugs for human patients).

Key words: experimental antiphospholipid syndrome, morphological structure of the uterus and placenta.

Надійшла 07.06.2011 р.
Рецензент: проф. В.І.Лузін