

УДК: 618.36:572.7:616.891-036.12
DOI: 10.24061/2413-4260.XII.3.45.2022.9МОРФОЛОГІЧНІ ОСОБЛИВОСТІ
МАРКЕРІВ СТРЕСУ В ПЛАЦЕНТІ**Ю.М. Бондаренко, Т.Д. Задорожна**ДУ «Інститут педіатрії, акушерства і гінекології
імені акад. О.М. Лук'янової НАМН України»
(м. Київ, Україна)**Резюме**

Вступ. Багатоядерний синцитіотрофобласт ворсинок плаценти людини відповідає за транспортні функції між кровообігом матері та плода і є основним місцем синтезу білка та виробництва стероїдів. Він утворюється шляхом злиття розташованих під ним клітин цитотрофобласта. Ядра багатоядерного синцитіотрофобласта є немітотичними, але механізм зупинки клітинного циклу в синцитіотрофобласті не є відомий. У поодиноких публікаціях описано, що злиття клітин викликає старіння клітин, найбільш відоме як компонент реакції на стрес і важливий фактор у запобіганні росту пухлинних клітин. Для синцитіотрофобласта одним із критеріїв його старіння є утворення в ньому так званих синцитіальних вузлів - локальних нагромаджень ядерного матеріалу з вип'ячуванням цих осередків у міжворсинчастий простір.

Мета дослідження. Визначити морфологічні особливості в плацентах жінок при дії хронічного стресу, обумовленого коронавірусним захворюванням та внутрішнім опроміненням, з подальшим формуванням критеріїв діагностики захворювань та оцінки тяжкості уражень у матері та плоду.

Матеріал та методи. Проведено морфологічне дослідження синцитіальних вузлів у ворсинках плаценти груп жінок з хронічним стресом, який обумовлений внутрішнім опроміненням та COVID-19 (класифікованих за тяжкістю захворювання), у порівнянні з фізіологічним перебігом вагітності та пологів. Виконано гістопатологічне та ультраструктурне дослідження плацент з виявленням синцитіальних вузлів з морфометричним аналізом їх ультраструктурних особливостей ядерного компоненту вузликів синцитіотрофобласту та в порівнянні з клінічними групами. Кількість синцитіальних вузлів оцінювали на гістологічних препаратах, які забарвлені гематоксиліном та еозином. Вплив хронічного стресу в жінок був вірогідно ($p < 0,05$) підтверджений підвищенням рівня кортизолу (saliva test). Статистичну обробку отриманих результатів проводили з використанням ліцензійних програм «Microsoft Excel» і «Statistica». Дизайн дослідження та всі методики, які були нами використані в даному дослідженні, розглянуті та схвалені комісією з біоетики ДУ «Інститут педіатрії, акушерства і гінекології імені акад. О.М. Лук'янової НАМН України», м. Київ, Україна.

Результати дослідження. Морфологічне дослідження тканини плаценти породіллі з COVID-19 показало збільшення кількості синцитіальних вузлів у ворсинках, що ми пов'язали з наявністю стресу. Ультраструктурні дослідження виявили зміни в ядрах синцитіальних вузликів в залежності від патології.

Висновок. Встановлено збільшення числа синцитіальних вузлів у структурах хоріона при внутрішньому опроміненні та перенесеному COVID-19 у вагітних жінок, що має значення в якості предикторів плацентарних факторів для здоров'я дитини в майбутньому.

Ключові слова: внутрішнє випромінювання; хронічний стрес; старіння клітин; синцитіотрофобласт.

Вступ

Клітинне старіння, найбільш відоме як відповідь на стрес або пошкодження ДНК в структурах багатоядерного епітелію ворсинок хоріона [1, 2, 3, 4, 5, 6].

Відомо, що плацента є органом, відповідальним за органогенез і підтримку життєдіяльності плода під час вагітності, тому її стан - це провісник здоров'я у майбутньому [7, 8, 9, 10, 11].

За деякими публікаціями [12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24], найбільш поширеним ушкодженням плаценти у вагітних із COVID-19 є тромбоз фетальних судин та міжворсинчастого простору з порушення кровотоку в матково-плацентарному компартменті матері, внаслідок чого утворюються гіпоксичні зони як у плацентарних, так і в фетальних структурах.

Існують поодинокі суперечності, які вказують на переважання різних фаз запального процесу з подальшим фіброзом у хоріальних структурах плаценти з переважанням хоріоамніоніту [24].

Мета і завдання дослідження - визначити вплив хронічного стресу, обумовленого коронавірусним захворюванням та внутрішнім опроміненням на

морфологічні особливості плацент жінок із подальшим формуванням критеріїв діагностики захворювань та оцінки тяжкості уражень у матері та плоду.

Матеріали і методи

Дослідження виконане при морфологічному аналізі 40 плацент: 1 група (10 випадків) - від жінок, які перенесли COVID-19 у першій половині вагітності (до 20 тижнів); 2 група (10 випадків) - від жінок, які перенесли COVID-19 у другій половині вагітності (39-40 тижнів); 3 група (10 випадків) - від жінок з хронічним стресом, обумовленим внутрішнім опроміненням з вмістом радіонуклідів 3-5 Бк/кг і більше; 4 група (контрольна) (10 випадків) - жінки з фізіологічним перебігом вагітності та терміном розродження 39-40 тижнів. Вплив хронічного стресу у жінок був достовірно підтверджений підвищенням рівня кортизолу (saliva test).

Морфологічне дослідження плацент виконували відповідно новітньої класифікації уражень плаценти Amsterdam (2015) та сертифікату плаценти (авторське право 2016) на основі протоколу дослідження плаценти (наказ № 417 затвердженого МОЗ України 2004). Після макроскопічного до-

слідження зразки плацентарної тканини вирізували з парацентральної зони плацентарного диска та фіксували в 10% нейтральному формаліні.

Гістологічне дослідження виконували на парафінових зрізах, забарвлених гематоксиліном та еозином. Кількість синцитіальних вузлів і міжворсинчастих містків оцінювали в термінальних і незрілих проміжних ворсинках у десяти полях зору при об'єктиві мікроскопа x20.

Додатково було проведено електронну мікроскопію. Для цього у плацентах вирізували дрібні шматочки з центру плацентарної тканини (завжди з одного місця), які фіксували в 2,5%-му глютаровому альдегіді на 0,1 М фосфатному буфері, в 1%-му оксиді осмію, зневоднювали в спиртах у 2,5%-му ураніл-ацетаті на 70% етанолі та заливали в епон-аралдит (контрастування за Reynolds).

Радіометричні вимірювання внутрішнього опромінення по інкорпоруванню Cs137 проводились за допомогою γ -спектрометрами фірми «Селена», «Самберга» з сцинтиляційним детектором, «Самберга» детектора колодезного типу та аналізатора ізотопних зразків RC-101.

Ультратонкі зрізи отримали на ультратомі LKB (Швеція), які вивчали на трансмісійному електронному мікроскопі JEM 1230 (Джеол, Токіо, Японія).

Статистичну обробку отриманих результатів проводили з використанням ліцензійних програм «Microsoft Excel» і «Statistica», використали статистичний метод Стюдента. Дизайн дослідження та всі методики, які були нами використані в даному дослідженні, розглянуті та схвалені комісією з біоетики ДУ «Інститут педіатрії, акушерства і гінекології імені акад. О.М. Лук'янової НАМН України», м. Київ, Україна.

Результати дослідження та їх обговорення

Аналіз гістологічних даних у 1 та 2 групах, порівняно з контролем, виявив у будові плаценти більш виражені зміни в структурах синцитіальних вузликів

термінальних та середніх ворсинок, які достовірно виявили збільшення ядерних скупчень у 1 групі з перенесеним COVID-19 у першій половині вагітності (рис.1, табл. 1, граф.1). Слід відмітити наявність збільшення синцитіальних вузликів у ворсинках, які розташовані під децидуальною оболонкою у 1 та 2 групах у вигляді скупчень у порівнянні з групою контролю та 3 групи (рис.2, табл.1, граф.1).

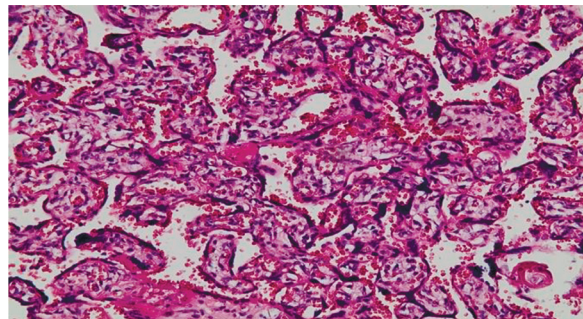


Рис.1. Синцитіальні вузлики у плаценті жінок, які перенесли COVID-19. Забарвлення гематоксиліном і еозином, Об.х10, Ок.х10

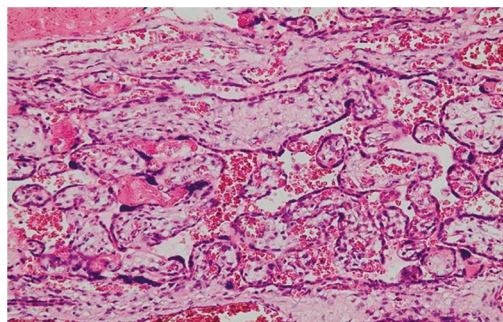


Рис.2. Синцитіальні вузлики у плаценті з внутрішнім опроміненням. Забарвлення гематоксиліном і еозином, Об.х10, Ок.х10

Таблиця 1

Вузлики синцитіотрофобласту, як маркери хронічного стресу

Групи дослідження	Вік жінок, роки	Середня кількість вузликів у десяти полях зору при об'єктиві x20
1 група - плацента від жінок, які перенесли COVID-19 у першій половині вагітності (до 20 тижнів)	24-35	72,04±2,824
2 група - плацента від жінок, які перенесли COVID-19 у другій половині вагітності (39-40 тижнів)	24-37	61,21±2,1214
3 група - плацента від жінок з хронічним стресом внаслідок внутрішнього опромінення з вмістом радіонуклідів 3-5 Бк/кг і більше	28-37	46,79±1,9804
4 група (контроль) - плаценти у жінок з фізіологічною вагітністю без COVID-19, переважно протягом 39-40 тижнів гестації	22-35	9,27±0,8954

Також у 2 групі плацент від жінок із перенесеним COVID-19 у другій половині вагітності відмічалось порушення перфузії судинних процесів материнських структур плаценти. Так, у 3 випадках (12%) виявлено наявність внутрішнього інфаркту у матері, який мав поширений характер у вигляді вогнищ. У 1 випадку (4%) виявлені вогнища некрозу децидуальної оболонки, які супроводжувалися лімфоцитарними та макрофагальними

інфільтратами, потовщенням децидуальної оболонки та набряком. У 8% - виявлені мікровогнища відшарування децидуальної оболонки.

Аналіз отриманих даних крім виявлених нами пошкоджень материнських структур плацентарного бар'єру встановив порушення фетальних структур. При цьому у 2-й групі у 6,7% випадків відмічався тромбоз венозних судинних структур хоріона та пуповини. Часткова перфузія внаслі-

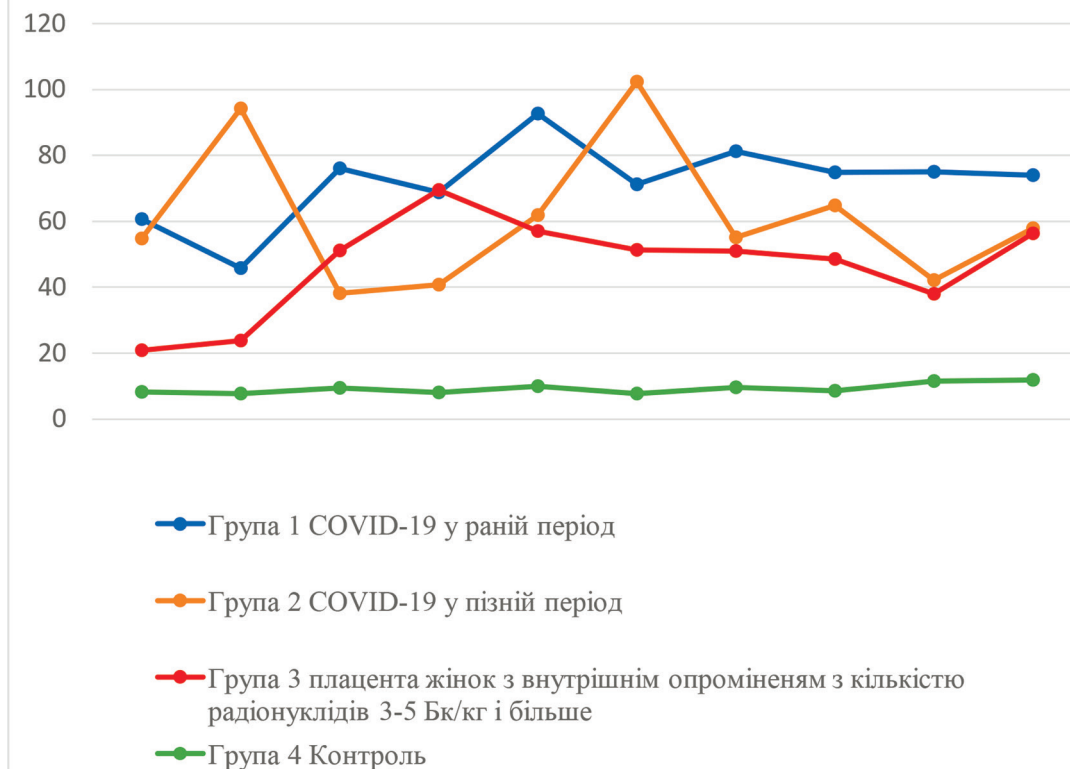
док морфологічних проявів затримки дозрівання плаценти виявлена у 10% випадків.

Гістологічно в 4 групі наявність синцитіотрофобласту з багатоядерним епітелієм було в поодиноких ворсинках з рівномірним розташуванням їх в полях зору.

При дослідженні плацент жінок з коронавірусною хворобою встановлено нерівномірне скупчен-

ня вузликів синцитіотрофобласту з багатоядерним епітелієм (рис.1). Слід відмітити (графік 1) коливання кількості вузликів синцитіотрофобласту.

Гістологічно в плацентах жінок 3 групи з внутрішнім опроміненням виявлені нерівномірно розташовані вузлики синцитіотрофобласту з багатоядерним епітелієм (рис.2) з вогнищами скупчень в середніх та мезенхімальних ворсинах.



Графік 1. Кількість вузликів синцитіотрофобласту, як маркерів хронічного стресу

На ультраструктурному рівні виявлені зміни ультраструктур ядер синцитіальних вузликів (Рис.3), які мають просвітлення матриксу при наявності COVID-19 у плаценті на початку розви-

тку. У дослідженнях плацент 1 і 2 груп виявлено формування складжу та тромбозу в фетальних судинах плаценти та наявність віріону (рис. 4) в плацентарному бар'єрі.

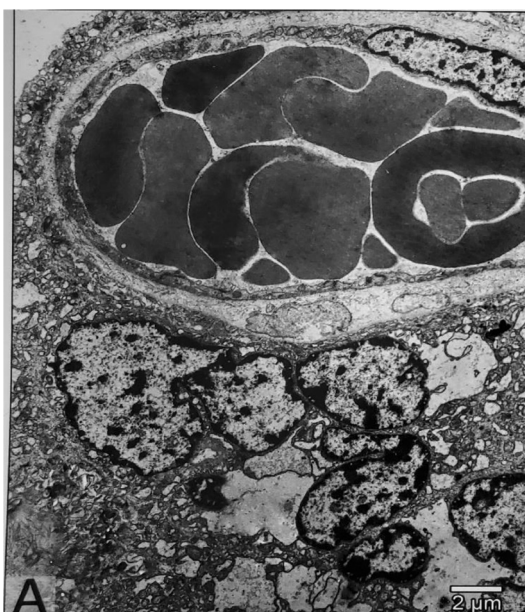


Рис.3. Ультраструктури ядер синцитіальних вузликів при перенесеному COVID-19 у першій половині вагітності. Масштаб зображення вказаний на світліні

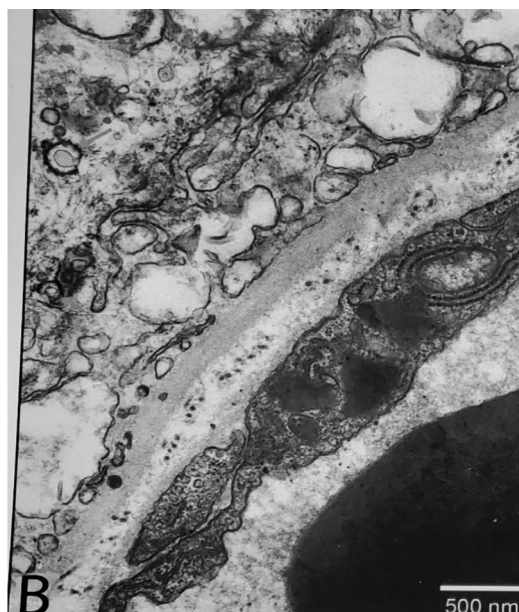


Рис.4. Ультраструктура синцитіотрофобласту ворсинок при перенесеному COVID-19 у першій половині вагітності з наявністю віріону. Масштаб зображення вказаний на світліні

Ультраструктурно ядра синцитіальних вузлів при внутрішньому опроміненні мали виразні зміни хроматину з ущільненням його та пікнозом ядра.

Виявлене достовірне збільшення числа синцитіальних вузлів, особливо у плацентах жінок I групи з перенесеним COVID-19 у першій половині вагітності, що впливає на появу деструкції судин та тромбів у материнській частині плаценти. Це може бути предиктором для діагностики уражень плоду. Оскільки фетальні судини та синцитіокапілярні мембрани є важливим фактором для

переносу від матері до плоду кисню та білку для участі в процесах гестації, виявлення тромбозу цих судин може свідчити про ураження плодових плацентарних судин.

Висновок

Встановлено збільшення числа синцитіальних вузлів у структурах хоріона при внутрішньому опроміненні та перенесеному COVID-19 у вагітних жінок, що має значення в якості предикторів плацентарних факторів для здоров'я дитини в майбутньому.

Література

1. Goldman-Wohl D, Yagel S. United we stand not dividing: the syncytiotrophoblast and cell senescence. *Placenta*. 2014;35(6):341-4. doi: 10.1016/j.placenta.2014.03.012
2. Da Silva-Álvarez S, Picallos-Rabina P, Antelo-Iglesias L, Triana-Martínez F, Barreiro-Iglesias A, Sánchez L, et al. The development of cell senescence. *Exp Gerontol* [Internet]. 2019[cited 2022 Oct 14];128:110742. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0531556519305091?via%3Dihub> doi: 10.1016/j.exger.2019.110742
3. de Magalhães JP, Passos JF. Stress, cell senescence and organismal ageing. *Mech Ageing Dev*. 2018;170:2-9. doi: 10.1016/j.mad.2017.07.001
4. Shmulevich R, Krizhanovsky V. Cell Senescence, DNA Damage, and Metabolism. *Antioxid Redox Signal*. 2021;34(4):324-34. doi: 10.1089/ars.2020.8043
5. Tjempakasari A, Suroto H, Santoso D. Mesenchymal Stem Cell Senescence and Osteogenesis. *Medicina (Kaunas)* [Internet]. 2021[cited 2022 Oct 12];58(1):61. Available from: <https://www.mdpi.com/1648-9144/58/1/61> doi: 10.3390/medicina58010061
6. Khong TY, Mooney EE, Nikkels PGJ, Morgan TK, Gordijn S. *Pathology of the Placenta: A Practical Guide*. (1 ed.) (Eds.) Springer Nature. 2019 <https://doi.org/10.1007/978-3-319-97214-5>
7. Nikkels PG, Evers AC, Schuit E, Brouwers HA, Bruinse HW, Bont L, et al. Placenta Pathology From Term Born Neonates With Normal or Adverse Outcome. *Pediatr Dev Pathol*. 2021;24(2):121-30. doi: 10.1177/1093526620980608
8. Ravishankar S, Redline RW. The placenta. *Handb Clin Neurol*. 2019;162:57-66. doi: 10.1016/B978-0-444-64029-1.00003-5
9. Tong M, Abrahams VM. Immunology of the Placenta. *Obstet Gynecol Clin North Am*. 2020 Mar;47(1):49-63. doi: 10.1016/j.ogc.2019.10.006
10. Turco MY, Moffett A. Development of the human placenta. *Development* [Internet]. 2019 [cited 2022 Oct 10];146(22):dev163428. Available from: <https://journals.biologists.com/dev/article/146/22/dev163428/223131/Development-of-the-human-placenta> doi: 10.1242/dev.163428
11. Resta L, Vimercati A, Cazzato G, Mazzia G, Cicinelli E, Colagrande A, et al. SARS-CoV-2 and Placenta: New Insights and Perspectives. *Viruses* [Internet]. 2021[cited 2022 Oct 18];13(5):723. Available from: <https://www.mdpi.com/1999-4915/13/5/723> doi: 10.3390/v13050723
12. Baergen RN, Heller DS. Placental Pathology in Covid-19 Positive Mothers: Preliminary Findings. *Pediatr Dev Pathol*. 2020;23(3):177-80. doi: 10.1177/1093526620925569
13. Galang RR, Chang K, Strid P, Snead MC, Woodworth KR, House LD, et al. Severe Coronavirus Infections in Pregnancy: A Systematic Review. *Obstet Gynecol*. 2020;136(2):262-72. doi: 10.1097/AOG.0000000000004011
14. Zaigham M, Gisselsson D, Sand A, Wikström AK, von Wöern E, Schwartz DA, et al. Clinical-pathological features in placentas of pregnancies with SARS-CoV-2 infection and adverse outcome: case series with and without congenital transmission. *BJOG*. 2022;129(8):1361-74. doi: 10.1111/1471-0528.17132
15. Rad HS, Röhl J, Stylianou N, Allenby MC, Bazaz SR, Warkiani ME, Guimaraes FSF, Clifton VL, Kulasinghe A. The Effects of COVID-19 on the Placenta During Pregnancy. *Front Immunol* [Internet]. 2021[cited 2022 Oct 18];12:743022. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2021.743022/full> doi: 10.3389/fimmu.2021.743022
16. Menter T, Tzankov A, Bruder E. Impact of SARS-CoV-2/COVID-19 on the placenta. *Pathologie*. 2021;42(6):591-7. doi: 10.1007/s00292-021-00952-7
17. Seymen CM. Being pregnant in the COVID-19 pandemic: Effects on the placenta in all aspects. *J Med Virol*. 2021;93(5):2769-73. doi: 10.1002/jmv.26857
18. Wong YP, Khong TY, Tan GC. The Effects of COVID-19 on Placenta and Pregnancy: What Do We Know So Far? *Diagnostics (Basel)* [Internet]. 2021[cited 2022 Oct 18];11(1):94. Available from: <https://www.mdpi.com/2075-4418/11/1/94/htm> doi: 10.3390/diagnostics11010094
19. Zare S, Sufizadeh N, Rezaghali P. Termination of Pregnancy Due to COVID-19 Induced Damage to the Placenta: A Case Report. *Caspian J Intern Med*. 2022;13(Suppl 3):295-8. doi: 10.22088/cjim.13.0.295
20. Fernandez Z, Lichs GGC, Zubieta CS, Machado AB, Ferreira MA, Valente N, et al. Case Report: SARS-CoV-2 Gamma Isolation From Placenta of a Miscarriage in Midwest, Brazil. *Front Med (Lausanne)* [Internet]. 2022[cited 2022 Oct 18];9:839389. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmed.2022.839389/full> doi: 10.3389/fmed.2022.839389
21. Alouini S, Guinard J, Belin O, Mesnard L, Werner E, Prazuck T, et al. Maternal-Fetal Implications of SARS CoV-2 Infection during Pregnancy, Viral, Serological Analyses of Placenta and Cord Blood. *Int J Environ Res Public Health* [Internet]. 2022[cited 2022 Oct 12];19(4):2105. Available from: <https://www.mdpi.com/1660-4601/19/4/2105/htm> doi: 10.3390/ijerph19042105
22. Beesley MA, Davidson JR, Panariello F, Shibuya S, Scaglioni D, Jones BC, et al. COVID-19 and vertical transmission: assessing the expression of ACE2/TMPRSS2 in the human fetus and placenta to assess the risk of SARS-CoV-2 infection. *BJOG*. 2022;129(2):256-66. doi: 10.1111/1471-0528.16974
23. Fahmi A, Brügger M, Démoulin T, Zumkehr B, Oliveira Esteves BI, et al. SARS-CoV-2 can infect and propagate in human placenta explants. *Cell Rep Med* [Internet]. 2021[cited 2022 Oct 12];2(12):100456. Available from: [https://www.cell.com/cell-reports-medicine/fulltext/S2666-3791\(21\)00324-4?_returnURL=https%3A%2F%2Flinkinghub](https://www.cell.com/cell-reports-medicine/fulltext/S2666-3791(21)00324-4?_returnURL=https%3A%2F%2Flinkinghub).

elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS2666379121003244%3Fshowall%3Dtrue doi: 10.1016/j.xcrm.2021.100456

24. Савчук ТВ, Гичка СГ, Лещенко ІВ. Патоморфологические изменения плаценты при коронавирусной болезни (COVID 19). Патологія. 2021;2(52):128-35. doi: 10.14739/2310-1237.2021.2.231461

MORPHOLOGICAL FEATURES OF STRESS MARKERS IN PLACENTA

Yu.M. Bondarenko, T.D. Zadorozhna

SI «Institute of Pediatrics, Obstetrics and Gynecology named after Academician

O.M. Lukyanova NAMS of Ukraine»

(Kyiv, Ukraine)

Summary

Introduction. The multinucleated syncytiotrophoblast of human placental villi is responsible for transport functions between the maternal and fetal circulation and is the main site of protein synthesis and steroid production. It is formed by the fusion of underlying cytotrophoblast cells. The nuclei of the multinucleated syncytiotrophoblast are nonmitotic, but the mechanism of cell cycle arrest in the syncytiotrophoblast is not known. Single publications have described that cell fusion induces a cellular senescence, best known as a component of the stress response and an important factor in preventing tumor cell growth. For syncytiotrophoblast, one of the criteria of its aging is the formation of so-called syncytial nodes - local accumulations of nuclear material with protrusion of these cells into the interstitial space.

The purpose of the study. To determine the morphological features in women's placentas under the influence of chronic stress caused by coronavirus disease and internal irradiation, with the subsequent formation of criteria for diagnosing diseases and assessing the severity of lesions in the mother and fetus.

Material and methods. A morphological study of syncytial nodules in the villi of the placenta of groups of women with chronic stress due to internal irradiation and COVID-19 (classified by severity of the disease) was performed in comparison with the physiological course of pregnancy and childbirth. Histopathological and ultrastructural examination of placentas was performed with the detection of syncytial nodes with morphometric analysis of their ultrastructural features of the nuclear component of syncytiotrophoblast nodules and their comparison in clinical groups. The number of syncytial nodes was estimated on histological specimens stained with hematoxylin and eosin. The effect of chronic stress in women was significantly ($p < 0.05$) confirmed by increased cortisol levels (saliva test). Statistical processing of the results was carried out using licensed programs «Microsoft Excel» and «Statistica». The design of the study and all methods used in this study were reviewed and approved by the Bioethics Committee of the State Institution «Institute of Pediatrics, Obstetrics and Gynecology named after Academician O.M. Lukyanova of the National Academy of Medical Sciences of Ukraine», Kyiv, Ukraine.

Results of the study. Morphological examination of the placental tissue of parturient women with COVID-19 showed an increase in the number of syncytial nodes in the villi, which we associated with the presence of stress. Ultrastructural studies revealed changes in the nuclei of syncytial nodules depending on the pathology.

Conclusion. An increase in the number of syncytial nodes in the chorionic structures in internal radiation and COVID-19 in pregnant women has been established, which is important as predictors of placental factors for the health of the individual in the future.

Key words: internal radiation; Chronic Stress; Cellular Senescence; Syncytiotrophoblast.

Контактна інформація:

Бондаренко Юрій Михайлович - молодший науковий співробітник відділу патоморфології ДУ «Інститут педіатрії, акушерства і гінекології імені акад. О.М. Лук'янової НАМН України», м. Київ, Україна/

e-mail: urabondarenko151@gmail.com

ORCID ID: <http://orcid.org/0000-0003-0635-3969>

Researcher ID: GNP-2127-2022

Задорожна Тамара Данилівна - член-кореспондент НАМН України, д.мед.н., професор, завідувач відділу патоморфології ДУ «Інститут педіатрії, акушерства і гінекології імені акад. О.М. Лук'янової НАМН України», м. Київ, Україна.

e-mail: zadorozhnatd2018@gmail.com

ORCID ID: <http://orcid.org/0000-0001-8819-8901>

Researcher ID: GPK-4730-2022

Contact Information:

Bondarenko Yuriy Mykhailovych - junior researcher of the Department of Pathomorphology SI «Institute of pediatrics, obstetrics and gynecology named after acad. O.M. Lukyanova of the National Academy of Medical Sciences of Ukraine», Kyiv, Ukraine.

e-mail: urabondarenko151@gmail.com

ORCID ID: <http://orcid.org/0000-0003-0635-3969>

Researcher ID: GNP-2127-2022

Zadorozhna Tamara Danylivna - Corresponding Member, Professor, Head of the Department of Pathomorphology SI "Institute of pediatrics, obstetrics and gynecology named after acad. O.M. Lukyanova of the National Academy of Medical Sciences of Ukraine», Kyiv, Ukraine.

e-mail: zadorozhnatd2018@gmail.com

ORCID ID: <http://orcid.org/0000-0001-8819-8901>

Researcher ID: GPK-4730-2022

© Ю.М. Бондаренко, Т.Д. Задорожна, 2022

© Yu. Bondarenko, T. Zadorozhna, 2022



Надійшло до редакції 06.06.2022 р.
Підписано до друку 23.08.2022 р.