

## МАРКЕР ПРОЛИФЕРАТИВНОЙ АКТИВНОСТИ Ki-67 ПЕЧЕНИ ПЛОДОВ И НОВОРОЖДЕННЫХ ОТ МАТЕРЕЙ С ОСЛОЖНЕННОЙ БЕРЕМЕННОСТЬЮ

Харьковский национальный университет им. В. Н. Каразина

(г. Харьков)

\*Харьковский национальный медицинский университет

(г. Харьков)

Данное исследование проведено в рамках научно-исследовательской работы «Патоморфологические особенности формирования плода и новорожденного под влиянием патологии матери», № государственной регистрации 0110U001805.

**Вступление.** Адаптационные возможности новорожденных зависят от морфофункциональной зрелости разных органов и систем к моменту рождения [2]. В последние годы в структуре экстрагенитальных нарушений беременных наиболее часто встречается железодефицитная анемия (ЖДА), преэклампсия (ПЭ) и сахарный диабет (СД). При анемии беременных формируется хроническая фето-плацентарная недостаточность (ФПН) [7, 10, 13], которая приводит к развитию хронической гипоксии и задержке внутриутробного развития (ЗВУР) плода [1, 6, 14]. Новорожденные от матерей с преэклампсией (ПЭ) входят в группу риска, особенно в период постнатальной адаптации [1, 2, 3]. Современные данные литературы свидетельствуют, что ПЭ беременных негативно влияет как на состояние матери, так и ведет к нарушению функционирования органов и систем плода [12].

Сахарный диабет – хроническое экстрагенитальное заболевание, представляющее угрозу возникновения нежелательных последствий во время беременности как для матери, так и для будущего ребенка. Перинатальная смертность при беременности, осложненной СД I типа, остается крайне высокой и составляет от 3 до 15% [14]. При СД I типа возрастает опасность возникновения спонтанных аборт, врожденных пороков развития у плода, диабетического кетоацидоза, тяжелых гипогликемий, диабетической фетопатии и других нарушений со стороны плода [1, 4]. Нарушения в единой системе «плацента-мать-плод» у женщин с сахарным диабетом (СД) негативно влияют как на материнский организм, так и на растущий плод. Сопутствующие СД осложнения, особенно ангиопатии и нефропатии, поздний токсикоз, который плохо поддается терапии и многоводие

приводят к развитию диабетической фетопатии и хронической гипоксии плода, высокой заболеваемости и смертности новорожденных [8, 16].

Результатом указанных изменений является задержка внутриутробного развития плода, поэтому изучение морфометрических показателей плода представляет особый интерес, учитывая, что данные литературы по этому вопросу немногочисленны и противоречивы.

**Целью** настоящего исследования явилось изучение показателей пролиферативной активности паренхимы и стромы печени плодов и новорожденных от матерей с ЖДА, ПЭ и СД.

**Объект и методы исследования.** Для наиболее полного и достоверного исследования тщательно отбирались доношенные плоды и новорожденные от матерей, беременность которых была осложнена ЖДА, ПЭ и СД, срок гестации которых составил 39–40 недель. Во всех случаях исследования причиной смерти плодов и новорожденных явилась асфиксия (анте-, интранатальная или постнатальная), причем, продолжительность жизни во всех случаях исследования не превышала 24 часов. Проведенные исследования полностью соответствуют законодательству Украины и отвечают принципам Хельсинкской декларации прав человека, Конвенции Союза Европы относительно прав человека и биомедицины (подтверждено заключением комиссии по биоэтике, протокол №3, 2006 г).

Работа была проведена в соответствии с требованиями «Инструкции о проведении судебно-медицинской экспертизы» (приказ МОЗ Украины №6 от 17.01.1995), в соответствии с требованиями и нормами, типичным положением по вопросам этики МОЗ Украины №690 от 23.09.2009 г. В зависимости от степени тяжести материнской ЖДА весь исследуемый материал был разделен на следующие исследуемые группы: А<sub>1</sub> – плодов и новорожденные от матерей с ЖДА легкой степени тяжести (26 случаев наблюдения), А<sub>2</sub> – плоды и новорожденные от матерей с

**Показатели массы печени плодов и новорожденных, рожденных от матерей с ЖДА различной степени тяжести и группы контроля,  $M \pm m$**

Показатель	Группы сравнения			
	К	A <sub>1</sub>	A <sub>2</sub>	A <sub>3</sub>
Масса печени, г	140,5 ± 5,12	147,4 ± 0,6*	184,5 ± 1,1**	116,1 ± 0,22**

**Примечание:** \* P < 0,05 по сравнению с аналогичными показателями группы контроля К; ^ P < 0,05 по сравнению с аналогичным показателем группы A<sub>1</sub>; \*\* P < 0,05 по сравнению с аналогичным показателем группы A<sub>2</sub>.

ЖДА средней степени тяжести (23 случая наблюдения), A<sub>3</sub> – плоды и новорожденные от матерей с ЖДА тяжелой степени тяжести (17 случаев наблюдения). В зависимости от степени тяжести материнской ПЭ весь исследуемый материал был разделен на следующие исследуемые группы: G<sub>1</sub> – плоды и новорожденные от матерей с ПЭ легкой степени тяжести (25 случаев наблюдения), G<sub>2</sub> – плоды и новорожденные от матерей с ПЭ средней степени тяжести (25 случаев наблюдения), G<sub>3</sub> – плоды и новорожденные от матерей с ПЭ тяжелой степени тяжести (22 случая наблюдения). В зависимости от степени тяжести материнского СД весь исследуемый материал был разделен на следующие исследуемые группы: D<sub>1</sub> – плоды и новорожденные от матерей с СД легкой степени тяжести (24 случая наблюдения), D<sub>2</sub> – плоды и новорожденные от матерей с СД средней степени тяжести (22 случая наблюдения), D<sub>3</sub> – плоды и новорожденные от матерей с СД тяжелой степени тяжести (26 случаев наблюдения). Группу контроля (К) составили 10 случаев исследования новорожденных от здоровых матерей с физиологически протекавшей беременностью, сроком гестации 39–40 недель. Во всех случаях исследования гибель новорожденных произошла за счет тяжелой родовой черепно-мозговой травмы, а продолжительность жизни в среднем составила 18 часов. Масса печени плодов и новорожденных всех групп исследования измерялась путем взвешивания. Пролиферативную активность гепатоцитов и компонентов стромы изучали непрямым иммунопероксидазным методом на парафиновых срезах, толщиной 5–6 мкм.

В качестве метки использовался фермент (пероксидаза хрона), который взаимодействует с субстратом, а в качестве красителя фермента – хромоген, который взаимодействует с пероксидазой. Таким образом, поэтапно образуется окрашенный конечный продукт реакции. Парафиновые срезы отобранных блоков наносили на специальные адгезивные предметные стекла SuperFrost Plus, депарафинировали в спиртах и инкубировали с 3% раствором перекиси водорода 20 минут (с целью блокирования эндогенной активности пероксидазы). Затем, для проведения тепловой индукции антигена (восстановление антигенных свойств после фиксации), так называемого, HIER (heat induction of epitope retrieval), срезы были размещены в цитратном буфере с pH 6.0 и подогревались в автоклаве при температуре +121°C 8 минут. Далее проводили инкубацию срезов с первичными антителами во влажных камерах при температуре 23 – 25°C в течение 30 минут. В качестве первичных использовались моноклональные антитела к Ki-67 (Dako). Титр антител подбирался индивидуально для каждого маркера с использованием в качестве растворителя специального раствора antibody diluent (DakoCytomation). Следующий шаг – инкубация срезов с полимерами декстранами, содержащие

фермент-метку пероксидазу и вторичные антитела (сверхчувствительная система визуализации UltraVision Quanto, LabVision) во влажных камерах около 30 минут при комнатной температуре. После каждого этапа срезы промывались в ТРИС буфере с pH 7,4 в течение 10 минут. Далее, для идентификации реакции наносился раствор хромогена ДАБ (Quanto, LabVision) под контролем микроскопа в течение от 20 секунд до 3 минут, с проявлением в виде коричневой окраски специфических структур. Для идентификации тканевых структур срезы дополнительно окрашивали гематоксилином Майера течение 1-3 минуты. Последующая дегидратация и помещение в бальзам осуществлялись согласно распространенным методикам. Количественные и качественные показатели экспрессии маркера изучали как минимум на 8-10 случайно выбранных полях зрения микроскопа в гистологических срезах при увеличении × 100, × 200, × 400, и × 1000 (когда это необходимо). Для оценки ИГХ реакции с Ki-67, интенсивность окраски оценивалась следующим образом: (–) – негативная реакция (ни одной окрашенной клетки), (+) – слабая реакция (окрашены единичные разбросанные клетки), (++) – умеренная реакция (большое количество интенсивно окрашенных клеток) и (+++) – чрезмерная реакция (интенсивно окрашены практически все клетки). Цифровой массив данных обрабатывался методами математической статистики с использованием вариационного, альтернативного и корреляционного анализов. При использовании методов альтернативной и вариационной статистики вычисляли среднюю арифметическую, степень дисперсии, среднеквадратическое отклонение, среднюю ошибку разницы, вероятность различия. Вероятность различия между двумя средними при малых выборках определяли по таблице Стьюдента с соблюдением условия (n<sub>1</sub>+n<sub>2</sub>-2). При определении степени вероятности допускали точность p < 0,05, что, как известно, соответствует P > 95,0%.

**Результаты исследований и их обсуждение.**

Показатели массы печени плодов и новорожденных, рожденных от матерей с ЖДА различной степени тяжести и группы контроля представлены в **таблице 1**.

Как видно из **таблицы 1**, при материнской ЖДА легкой и средней степени тяжести документируется достоверное прогрессирующее увеличение массы

Таблиця 2

**Показатели массы печени и массы плодов и новорожденных, рожденных от матерей с ПЭ различной степени тяжести и группы контроля,  $M \pm m$**

Показатель	Группы сравнения			
	K	G <sub>1</sub>	G <sub>2</sub>	G <sub>3</sub>
Масса печени, г	140,5±5,12	149,4±0,3*	195,7±0,14**	108,5±0,01**

**Примечание:** \* P<0,05 по сравнению с аналогичными показателями группы контроля K; ^ P<0,05 по сравнению с аналогичным показателем группы G<sub>1</sub>; \*\* P<0,05 по сравнению с аналогичным показателем группы G<sub>2</sub>.

Таблиця 3

**Показатели массы печени плодов и новорожденных, рожденных от матерей с сахарным диабетом различной степени тяжести и группы контроля,  $M \pm m$**

Показатель	Группы сравнения					
	K	D <sub>1</sub>	D <sub>2</sub>		D <sub>3</sub>	
			D <sub>2A</sub>	D <sub>2B</sub>	D <sub>3A</sub>	D <sub>3B</sub>
Масса печени, г	140,5±5,12	153,2±0,06*	116,7±0,10**	202,34±0,6**	98,4±0,11**	217,5±0,31**

**Примечание:** \* P<0,05 по сравнению с аналогичными показателями группы контроля K; ^ P<0,05 по сравнению с аналогичным показателем группы D<sub>1</sub>; \*\* P<0,05 по сравнению с аналогичным показателем группы D<sub>2</sub>.

печени. При материнской ЖДА тяжелой степени тяжести (группа A<sub>3</sub>), наоборот, регистрируется гипотрофия печени, что указывает на истощение этого органа.

Показатели массы печени плодов и новорожденных, рожденных от матерей с ПЭ различной степени тяжести и группы контроля представлены в **таблице 2**.

Как видно из **таблицы 2**, при материнской ПЭ легкой и средней степени тяжести документируется достоверное увеличение массы печени. При ПЭ тяжелой степени тяжести (группа G<sub>3</sub>), наоборот, регистрируется как гипотрофия печени, что, также как и при материнской ЖДА тяжелой степени тяжести, указывает на истощение этого органа.

Показатели массы печени плодов и новорожденных, рожденных от матерей с СД различной степени тяжести и группы контроля представлены в **таблице 3**.

Поскольку разница в массе тела плодов и новорожденных группы D<sub>2</sub> (материнский СД средней степени тяжести) и группы D<sub>3</sub> (материнский СД тяжелой степени тяжести) имела существенные различия, данные группы были разделены на подгруппы (D<sub>2A</sub>, D<sub>2B</sub>, D<sub>3A</sub> и D<sub>3B</sub>). В подгруппы D<sub>2A</sub> и D<sub>3A</sub> вошли плоды и новорожденные с малой массой тела (микросомы), а в группу D<sub>2B</sub> и D<sub>3B</sub> – с большой массой тела (макросомы). Данное разделение было целесообразным, поскольку, как по сравнению с контролем, так и по сравнению между собой, эти подгруппы документировали существенные отличия.

Как видно из **таблицы 3**, при материнском СД легкой степени тяжести (группа D<sub>1</sub>) документируется достоверное увеличение массы печени. При материнском СД средней и тяжелой степеней тяжести отмечается динамика колебания массы печени плодов и новорожденных. В подгруппах D<sub>2A</sub> и D<sub>3A</sub> отмечается нарастающая гипотрофия печени, а в подгруппах D<sub>2B</sub> и D<sub>3B</sub>, наоборот, регистрируется гипертрофия печени. При материнском СД у плодов и новорожденных причиной микросомии является инсулиновая недостаточность поджелудочной железы плода, развивающаяся в результате истощения β-клеток островков Лангерганса в ответ на постоянно повышенный уровень глюкозы материнской крови, особенно при недостаточной коррекции СД у матери во время вынашивания плода [8, 16]. С другой стороны, причиной макросомии плода является его гиперинсулинемия в ответ на повышение уровня глюкозы материнской крови. Инсулин помимо гипогликемического эффекта имеет анаболический и митогенный эффекты, что и приводит к увеличению массы тела и внутренних органов. Следует добавить, что такой эффект наблюдается при относительно достаточной

коррекции материнского СД во время беременности, однако фазного колебания уровня глюкозы материнской крови недостаточно для истощения островкового аппарата поджелудочной железы, но вполне достаточно для развития гиперинсулинемии в крови плода с последующей его макросомией [11].

Проанализировав органомерметрические показатели массы печени плодов и новорожденных, рожденных от матерей с ЖДА, ПЭ и СД различной степени тяжести внутри каждой группы, мы считаем, что для полного понимания динамики процесса, необходимо выяснить какой из компонентов ткани печени претерпел те или иные изменения, и в какой степени.

Пролиферативная активность любых клеток организма с высокой степенью достоверности на сегодняшний день оценивается по интенсивности окрашивания к маркеру Ki-67, который, как известно, является ядерным протеином, регулирующим клеточный цикл и инициирующим пролиферацию. Ki-67 экспрессируется в G<sub>1</sub>-, S, G<sub>2</sub>- и M-фазах митотического цикла и отсутствует в фазе покоя G<sub>0</sub>, и поэтому фракцию Ki-67-положительных клеток можно считать равной пролиферативному пулу в ткани [9, 15]. В нашей работе мы изучили интенсивность пролиферации гепатоцитов и клеток стромального компонента печени при всех нозологических единицах и всех степенях тяжести. Данные интенсивности окрашивания к маркеру Ki-67 ядер гепатоцитов и ядер клеток стромы печени плодов и новорожденных от матерей с ЖДА, ПЭ и СД представлены в **таблице 4**.

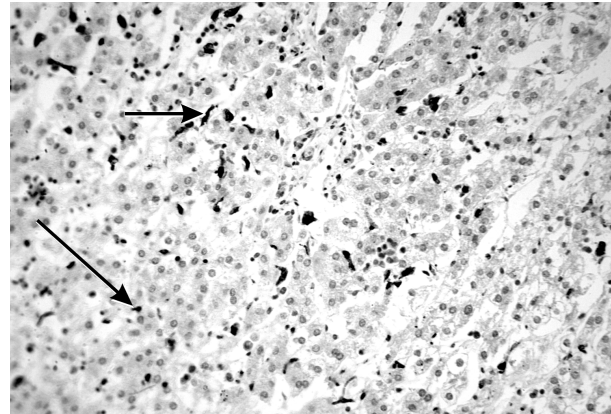
Таблиця 4

**Сравнительная характеристика интенсивности окрашивания к маркеру Ki-67 печени плодов и новорожденных от матерей с железодефицитной анемией, преэклампсией и сахарным диабетом**

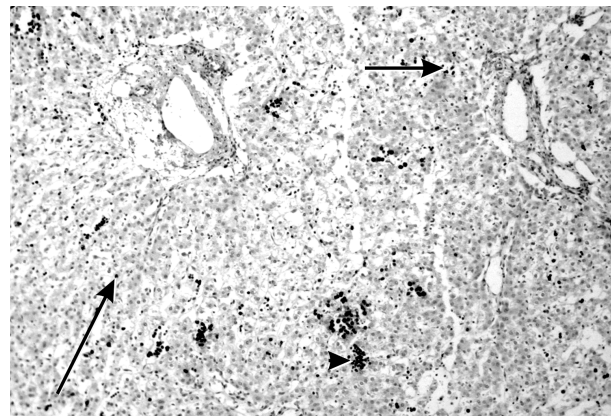
Группа исследования	Ki-67	
	Гепатоциты	Клетки стромы
К	++	+
A <sub>1</sub>	++	+
A <sub>2</sub>	+	++
A <sub>3</sub>	+	+++
G <sub>1</sub>	++	++
G <sub>2</sub>	+	++
G <sub>3</sub>	+	+++
D <sub>1</sub>	++	++
D <sub>2</sub>		
-D <sub>2A</sub> (микросомия)	+	+++
-D <sub>2B</sub> (макросомия)	+++	++
D <sub>3</sub>		
-D <sub>3A</sub> (микросомия)	+	+++
-D <sub>3B</sub> (макросомия)	+	+++

**Примечание:** (-) – негативная реакция (ни одной окрашенной клетки); (+) – слабая реакция (окрашены единичные разбросанные клетки); (++) – умеренная реакция (большое количество интенсивно окрашенных клеток); (+++) – сильная реакция (интенсивно окрашены практически все клетки)

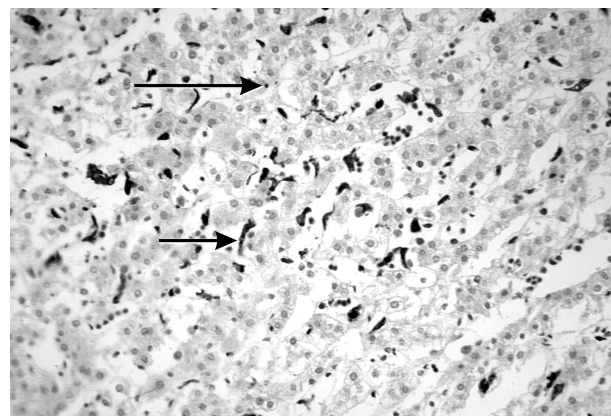
Как видно из **таблицы 4**, пролиферативная активность гепатоцитов в печени плодов и новорожденных от матерей с ЖДА и ПЭ была идентичной – умеренная при ЖДА и ПЭ легкой степени тяжести (группы A<sub>1</sub> и G<sub>1</sub> соответственно) (**рис. 1, 2**) и слабая при ЖДА и ПЭ средней и тяжелой степени тяжести (группы A<sub>2-3</sub> и G<sub>2-3</sub> соответственно) (**рис. 3, 4**). При материнском СД легкой степени тяжести (группа D<sub>1</sub>) пролиферативная активность гепатоцитов была умеренной, а при СД средней степени тяжести имела отличия, которые зависели от массы плода и массы его печени. В подгруппе D<sub>2A</sub> (микросомы), пролиферативная активность гепатоцитов была слабой, а в подгруппе D<sub>2B</sub> (макросомы) – чрезмерной (**рис. 5**). При материнском СД тяжелой степени тяжести (группа D<sub>3</sub>), независимо от массы тела плода и массы его печени, пролиферативная активность гепатоцитов была слабой (**рис. 6**). Таким образом, учитывая данные показателя экспрессии маркера пролиферации Ki-67, с утяжелением степени тяжести всех видов нозологических единиц (исключение составляет подгруппа D<sub>2B</sub> – СД средней степени тяжести у макросомов), наблюдается прогрессирующее снижение пролиферативной активности гепатоцитов. Эти данные свидетельствует о постепенном истощении печенной паренхимы и нарастании печенной недостаточности, особенно при тяжелых степенях материнских ЖДА, ПЭ и СД.



**Рис. 1.** Печень плода группы A<sub>1</sub>. Умеренная экспрессия Ki-67 гепатоцитами (длинная стрелка) и слабая клетками стромы (короткая стрелка). Непрямой иммунопероксидазный метод с антителами к Ki-67. × 200.



**Рис. 2.** Печень плода группы G<sub>1</sub>. Умеренная экспрессия Ki-67 гепатоцитами (длинная стрелка) и клетками стромы (короткая стрелка). Зоны экстрамедуллярного кроветворения (конец стрелки). Непрямой иммунопероксидазный метод с антителами к Ki-67. × 100.



**Рис. 3.** Печень плода группы A<sub>3</sub>. Слабая экспрессия Ki-67 гепатоцитами (длинная стрелка) и сильная клетками стромы (короткая стрелка). Непрямой иммунопероксидазный метод с антителами к Ki-67. × 200.

Как видно из **таблицы 4**, пролиферативная активность клеток стромы в печени плодов и новорожденных от матерей с ЖДА, ПЭ и СД имеет прогрессирующую тенденцию к нарастанию с увеличением степени тяжести нозологии, что в конечном итоге, приводит к разрастанию и склерозу стромы в ткани печени. Однако, эта тенденция внутри каждой нозологии имеет существенные отличия. При материнской ЖДА легкой степени тяжести (группа А<sub>1</sub>) пролиферативная активность стромы расценивается как слабая (**рис. 1**), тогда как при материнских ПЭ и СД этой же степени тяжести (группы G<sub>1</sub> и D<sub>1</sub> соответственно) пролиферативная активность стромы была уже умеренной (**рис. 2**).

При материнской ЖДА средней степени тяжести (группа А<sub>2</sub>) пролиферативная активность стромы расценивалась как умеренная, тогда как при материнских ПЭ и СД этой же степени тяжести (группы G<sub>2</sub> и подгруппа D<sub>2А</sub> (макросомные плоды и новорожденные) соответственно) пролиферативная активность стромы была уже сильной (**рис. 5**).

При материнском СД средней степени тяжести в печени микросомных плодов и новорожденных (подгруппа D<sub>2В</sub>) стромальная пролиферативная активность была умеренной, как и в группе А<sub>2</sub>. При ЖДА, ПЭ и СД тяжелой степени тяжести (группы А<sub>3</sub>, G<sub>3</sub> и обе подгруппы группы D<sub>3</sub> соответственно) пролиферативная активность стромы была сильной (**рис. 3, 4, 6**). Эти данные свидетельствует о прогрессирующей пролиферации и склерозе стромы на фоне, как мы указывали выше, истощении печенной паренхимы, особенно при тяжелых степенях материнских ЖДА, ПЭ и СД.

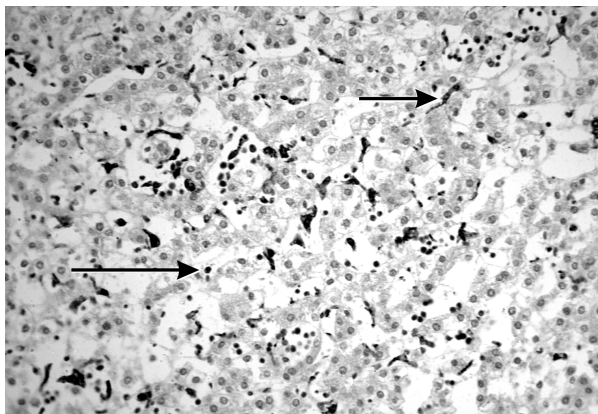
**Выводы.**

1. При материнском СД легкой степени тяжести документируется достоверное увеличение массы печени, при материнском СД средней и тяжелой степеней тяжести отмечается динамика колебания массы печени плодов и новорожденных.

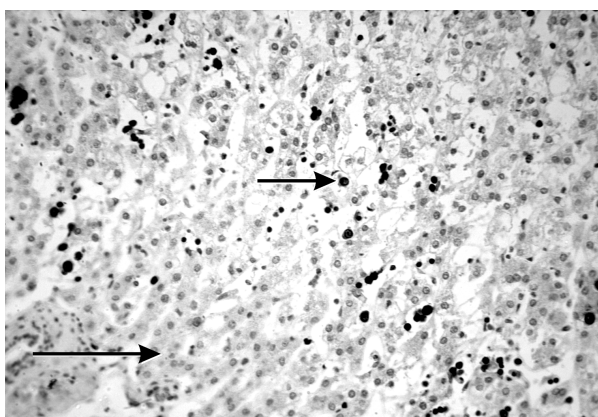
2. При материнском СД легкой степени тяжести пролиферативная активность гепатоцитов была умеренной, а при СД средней степени тяжести имела отличия, которые зависели от массы плода и массы его печени (в подгруппе микросомов, пролиферативная активность гепатоцитов слабая, а в подгруппе макросомов – чрезмерная).

3. Экспрессия маркера пролиферации Ki-67, с утяжелением степени тяжести всех видов нозологических единиц, снижается.

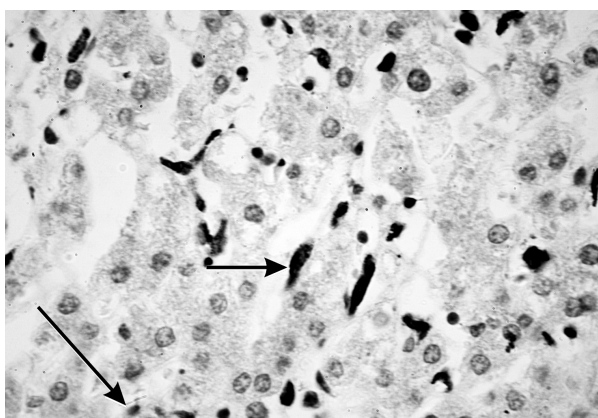
**Перспективы дальнейших исследований.** Показатели качественного состава стромы печени, особенно при ее пролиферации, позволят оценить насколько и за счет каких компонентов пролиферирует ткань стромы. Поэтому, необходимо в дальнейшем провести иммуногистохимическое исследование компонентов стромы и сосудов (коллагенов, эндотелина-1 и фибронектина) печени плодов и новорожденных от матерей с ЖДА, ПЭ и СД всех степеней тяжести.



**Рис. 4.** Печень плода группы G<sub>3</sub>. Слабая экспрессия Ki-67 гепатоцитами (длинная стрелка) и сильная клетками стромы (короткая стрелка). Непрямой иммунопероксидазный метод с антителами к Ki-67. × 200.



**Рис. 5.** Печень плода группы D<sub>2</sub> (подгруппа D<sub>2А</sub>). Слабая экспрессия Ki-67 гепатоцитами (длинная стрелка) и сильная клетками стромы (короткая стрелка). Непрямой иммунопероксидазный метод с антителами к Ki-67. × 200.



**Рис. 6.** Печень плода группы D<sub>3</sub> (подгруппа D<sub>3А</sub>). Слабая экспрессия Ki-67 гепатоцитами (длинная стрелка) и сильная клетками стромы (короткая стрелка). Непрямой иммунопероксидазный метод с антителами к Ki-67. × 400.

### Література

1. Богатирьова Р. В. Ведення вагітності та пологів при пізніх гестозах, їх прогнозування, діагностика, лікування і профілактика [методичні рекомендації] / Р. В. Богатирьова, Б. М. Венцківський, В. Є. Дашкевич. – Київ, 1999. – 42 с.
2. Бурдули Г. М. Репродуктивні втрати / Г. М. Бурдули, О. Г. Фролова. – Москва, 1997. – С. 75-78.
3. Венцківський Б. М. Гестози вагітних [навчальний посібник] / Б. М. Венцківський, В. М. Запарожан, А. Я. Сенчук. – Київ : Аконті, 2002. – 112 с.
4. Давиденко І. С. Комп'ютерно-денситометричні та спектральні параметри білкового компонента трофобласта, децидуоцитів, материнських і плодових еритроцитів плаценти при експериментальній гіпохромній анемії вагітних / І. С. Давиденко, В. П. Піщак, Ю. Е. Роговий // Одеськ. мед. журн. – 2003. – № 6. – С. 26-29.
5. Демидова І. Ю. Сахарный диабет типа 1 и беременность / И. Ю. Демидова, Н. Ю. Арбатская // Consilium medicum. – 2003. – Т. 5, № 9. – С. 494-500.
6. Камінський В. В. Деякі аспекти перебігу вагітності та пологів у жінок з поєднанням анемії вагітних і пізнім гестозом / В. В. Камінський, С. І. Жук, О. О. Проценко // Лікарська справа. – 1999. – № 3. – С. 132-133.
7. Коноводова Е. Н. Диагностика и принципы лечения железодефицитных состояний у беременных / Е. Н. Коноводова // Гинекология. – 2003. – Т. 5, № 6. – С. 258-260.
8. Федорова М. В. Сахарный диабет, беременность и диабетическая фетопатия / М. В. Федорова, В. И. Краснопольский, В. А. Петрухин. – Москва : Медицина. – 2001. – 288 с.
9. Bullwinkel J. Ki-67 protein is associated with ribosomal RNA transcription in quiescent and proliferating cells / J. Bullwinkel, V. Baron-Lühr, A. Lademann [et al.] // J. Cell. Physiol. – 2006. – Vol. 206 (3). – P. 624-635.
10. Haram K. Iron supplementation in pregnancy-evidence and controversies / K. Haram, S. Nilsen, R. Ulvik // Gynecol. Scand. – 2001. – Vol. 80, № 80. – P. 683-688.
11. Jolly M. C. Risk factors for macrosomia and its clinical consequences: a study of 350,311 pregnancies / M. C. Jolly, N. J. Sebire, J. P. Harris [et al.] // Eur. J. Obstet. Gynec. Reprod. Biol. – 2003. – № 111. – P. 9-14.
12. Law C. Body size at birth and blood pressure among children in developing countries / C. Law, P. Egger, O. Dada, H. Delgado // Int. J. Epidemiol. – 2000. – Vol. 29. – P. 52-57.
13. Nynke B. Anaemia and micronutrient deficiencies / B. Nynke // Brit. Med. Bull. – 2003. – Vol. 67. – P. 149-160.
14. Pal D. Neonatal hypoglycaemia in Nepal. Prevalence and risk factors / D. Pal, D. Manadhar, S. Rajbhandari [et al.] // Arch. Dis. Child. Fetal neonatal. – 2000. – Vol. 82. – P. 46-51.
15. Scholzen T. The Ki-67 protein: from the known and the unknown / T. Scholzen, J. Gerdes // J. Cell. Physiol. – 2000. – Vol. 182 (3) – P. 311-322.
16. Sivan E. Impact of fetal reduction on the incidence of gestational diabetes / E. Sivan, E. Maman, C. Homko // Obstet. Gynecol. – 2002. – № 99. – P. 91-94.

УДК 616. 36-053. 1-091. 8-02:[618. 3-06:616. 155. 194. 8]

#### **МАРКЕР ПРОЛІФЕРАТИВНОЇ АКТИВНОСТІ КІ-67 ПЕЧІНКИ ПЛОДІВ І НОВОНАРОДЖЕНИХ ВІД МАТЕРІВ З УСКЛАДНЕНОЮ ВАГІТНІСТЮ**

**Проценко О. С., Ремньова Н. О., Шерстюк С. О., Сорокіна І. В.**

**Резюме.** Дане дослідження побудовано на вивченні показників маси печінки і маркера проліферативної активності Кі-67 гепатоцитів і клітин стромы плодів і новонароджених від матерів з ЗДА, ПЕ і ЦД різного ступеня тяжкості. З наростанням ступеня тяжкості вказаних видів патології матері (виключення складає материнський ЦД середнього ступеня тяжкості у макросом), спостерігається прогресуюче зниження проліферативної активності гепатоцитів, тоді як у стромі печінки коефіцієнт проліферативної активності підвищується в прямій залежності від ступеня тяжкості патології матері.

**Ключові слова:** залізодефіцитна анемія, преекслампсія, цукровий діабет, печінка, новонароджений, плід, екстрагенітальна патологія.

УДК 616. 36-053. 1-091. 8-02:[618. 3-06:616. 155. 194. 8]

#### **МАРКЕР ПРОЛІФЕРАТИВНОЇ АКТИВНОСТІ КІ-67 ПЕЧЕНИ ПЛОДОВ І НОВОРОЖДЕНИХ ОТ МАТЕРЕЙ С ОСЛОЖНЕННОЙ БЕРЕМЕННОСТЬЮ**

**Проценко Е. С., Ремнёва Н. А., С. А. Шерстюк, И. В. Сорокина**

**Резюме.** Настоящее исследование основано на изучении показателей массы печени и маркера пролиферативной активности Кі-67 гепатоцитов и клеток стромы плодов и новорожденных, рожденных от матерей с ЖДА, ПЭ и СД различной степени тяжести. С нарастанием степени тяжести указанных видов патологии матери (исключение составляет материнский СД средней степени тяжести у макросомов), наблюдается прогрессирующее снижение пролиферативной активности гепатоцитов, тогда как в строме печени коэффициент пролиферативной активности повышается в прямой зависимости от степени тяжести патологии матери.

**Ключевые слова:** железодефицитная анемия, преэклампсия, сахарный диабет, печень, новорожденный, плод, экстрагенитальная патология.

UDC 616. 36-053. 1-091. 8-02:[618. 3-06:616. 155. 194. 8]

### **Marker of Proliferative Activity of Ki-67 of Liver of Fetuses and Newborns, Born from Mothers with the Complicated Pregnancy**

**Protsenko E. S., Remnyova N. A., Sherstuk S. A, Sorokina I. B.**

**Abstract.** *Background.* In recent years, in the structure of extragenital disorders of pregnant most commonly encountered iron deficiency anemia, pre-eclampsia and diabetes mellitus.

In case of anaemia in pregnant women the chronic fetoplacental insufficiency evolving, which leads to the development of chronic hypoxia and intrauterine growth retardation (IUGR) of the fetus. Newborns from mothers with preeclampsia are at risk, especially during postnatal adaptation. Modern materials suggest that pre-eclampsia in pregnant adversely affects both the mother's condition, and leads to malfunction of organs and systems of the fetus.

*Objective.* The aim of this study was to explore indicators of proliferative activity of the liver parenchyma and stroma of fetuses and newborns from mothers with the complicated pregnancy.

*Methods.* Proliferative activity of hepatocytes and stromal components was studied by indirect immunoperoxidase method on paraffin sections with a thickness of 5-6 microns. As a mark was used enzyme (Horseradish peroxidase) which interacts with the substrate, and as dye of enzyme was a chromogen which reacts with the peroxidase. Thus, gradually formed a dyed final product of the reaction. Paraffin sections of selected blocks were applied to the special adhesive slides SuperFrost Plus, deparaffinized in alcohols, and incubated with 3% solution of hydrogen peroxide during 20 minutes (to block endogenous peroxidase activity).

Then, for the thermal induction of antigen (renewal of antigen properties after fixing) the so-called HIER (heat induction of epitope retrieval), the sections were placed in a citrate buffer with pH 6.0 and heated in an autoclave at a temperature of +121°C during 8 minutes. Further sections were incubated with primary antibodies in a humidified chamber at the temperature of 23 – 25°C during 30 minutes. As primary were used monoclonal antibodies to Ki-67 (Dako). Quantitative and qualitative indicators of marker expression was studied for at least 8-10 randomly selected fields of view of the microscope in histological sections at magnification of  $\times 100$ ,  $\times 200$ ,  $\times 400$  and  $\times 1000$ .

*Results.* According to our findings, in case of mother's diabetes of mild degree of severity documented a significant increase in liver mass. In maternal diabetes of medium and severe degrees is marked dynamics of fluctuations in mass of livers of fetuses and newborns.

In case of maternal diabetes in fetuses and newborns the cause of microsomia is insulin deficiency of the pancreas of the fetus, which develops as a result of the depletion of  $\beta$ -cells of the islets of Langerhans in response to constantly elevated glucose level in maternal blood, especially in case of insufficient correction of diabetes in the mother during gestation. On the other part, the cause of fetal macrosomia is its hyperinsulinemia in response to increase of glucose level in maternal blood. In case of maternal diabetes of mild degree of severity, proliferative activity of hepatocytes was moderate, and in diabetes of middle degree of severity had differences that depended on the mass of the fetus and the mass of its liver.

In the subgroup of microsomes, proliferative activity of hepatocytes was weak, and in the subgroup of macrosomes – excessive. In case of maternal diabetes of severe degree, regardless of body mass and liver mass of the fetus, proliferative activity of hepatocytes of its liver was weak. Thus, having regard to the findings of indicator of expression of the proliferation marker Ki-67, with complexification of the severity of all types of disease entities, observed the progressive decrease in the proliferative activity of hepatocytes.

In case of maternal IDA of medium degree of severity the proliferative activity of stroma regarded as moderate, whereas in PE and DM of mothers of the same severity of proliferative activity of the stroma was already strong. These data testifies to making progress of proliferation and sclerosis of the stroma in the background, as we pointed out above, the depletion of liver parenchyma, especially in severe degree of maternal iron deficiency anemia, PE and DM.

*Conclusion.* In maternal diabetes of mild degree of severity, documented significant increase in liver mass; maternal diabetes of medium and severe degrees observed dynamics of fluctuations in liver mass in fetuses and newborns.

In case of maternal DM of mild degree of severity proliferative activity of hepatocytes was moderate, and in of medium degree of severity had differences that depended on the mass of the fetus and mass of its liver (in the subgroup of microsomes, proliferative activity of hepatocytes was weak, and in the subgroup of macrosomes – excessive.). Expression of the proliferation marker Ki-67 is reduced with complexification of the severity of all types of disease entities.

**Keywords:** iron deficiency anemia, eclampsia, diabetes mellitus, liver, new-born, fetus extra genital pathology.

*Рецензент – проф. Гасюк А. П.*

*Стаття надійшла 11. 09. 2014 р.*