

ОСОБЛИВОСТІ ІМУНОГІСТОХІМІЧНИХ МАРКЕРІВ СТОВБУРОВИХ КЛІТИН CD-117, CD-44 В ПЛАЦЕНТАХ ЖІНОК НА ТЛІ ХРОНІЧНОГО СТРЕСУ

ВСТУП

Перинатальна патологія посідає провідне місце в дитячій смертності. Її причиною у 25–30% до 50% випадків є плацентарні чинники (дисфункція плаценти, відшарування децидуальної оболонки, патологія пуповини, вроджені вади розвитку плаценти та судин пуповини), які зумовлюють плацентарні порушення і призводять до внутрішньоутробної загибелі плода [3–11].

Опубліковано нові дані [12] про роль регенераторних можливостей стовбурових клітин у плаценті, а також клітин, які класифікуються як тотипотентні, плюрипотентні та мультипотентні. Серед них найбільш вивченими фенотипами клітинної поверхні є CD-44, CD-34, CD-105 і C-kit [13–16].

Особливу увагу автори звернули на C-kit (CD-117), що експресується C-kit-кодуювальним тирозинкіназним рецептором III типу. C-kit-cells – це плюрипотентна клітина з нормальним каріотипом, яка є безпосередньою похідною хоріальних структур плаценти та амніотичної рідини і не має поверхневого антигена [17]. Також виявлено, що C-kit (CD-117), як нащадок тотипотентних стовбурових клітин, може давати початок майже всім тканинам і органам [18].

Крім того, встановлено, що важливим у плацентарних тканинах є антиген CD-44. Він унікальний серед ядерних клітин ссавців тим, що мало стимулює галогенну реактивність [18–20].

Наразі стовбурові клітини (мезенхімальні, гемопоетичні) широко обговорюються і застосовуються в ролі регенераторного чинника [21–25] при різних патологічних процесах, але плацентарну тканину використовують без урахування патології вагітної [26].

Лише в поодиноких дослідженнях у вагітних із прееклампсією використано індуковані стовбурові клітини [27], які були синтезовані на структурних ДНК, що відповідають змінам на гіпоксію, пов'язану з дисфункцією плаценти [28].

Тому наші дослідження стовбурових клітин у плаценті важливі для виявлення структурних і молекулярних механізмів їх змін при дії хронічного стресу, пов'язаного з патологією вагітної, особливо з внутрішнім радіаційним опроміненням та перенесеним COVID-19.

Мета дослідження – вивчити особливості імуногістохімічних маркерів плюрипотентних стовбурових клітин C-kit-рецептора CD-117, а також CD-44-антигена у вагітних із хронічним стресом шляхом визначення рівня кортизолу у слині (saliva test) та методом виявлення морфологічних критеріїв синцитіотрофобласта багатоядерного епітелію ворсинок хоріона [29].

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

Досліджено 80 плацент жінок із хронічним стресом у таких групах:

- 1) 20 плацент від жінок із фізіологічним перебігом вагітності та терміном гестації 38–40 тижнів;
- 2) 20 плацент від жінок із невиношуванням вагітності;
- 3) 20 плацент від жінок із хронічним стресом, зумовленим внутрішнім опроміненням $\geq 4,5$ Бк/кг;
- 4) 20 плацент від жінок, які перенесли COVID-19 під час вагітності.

Зазначені плаценти порівнювали з контролем.

Загальногістологічне дослідження проводили за стандартною схемою. Із фіксованої в нейтральному формаліні тканини плаценти через усю товщу вирізали 6 шматочків (два з краю, два з парацентральної частини, два з центральної зони плаценти). Матеріал обробляли в парафіновій заливці, зрізи фарбували:

- а) гематоксилін-еозином;
- б) пікрофуксином за Ван Гізоном (ця методика дає змогу виявити сполучну тканину).

Застосовували імуногістохімічні методи дослідження: метод полімерної детекції виявлення антигенів C-kit CD-117 та CD-44 до стовбурових клітин за допомогою системи детекції UltraVisionQuanto пероксидаза полімер і DAB плюс хромоген. Використовували реагенти фірми Thermo Scientific.

Протокол забарвлення: депарафінувати та зневоднити зріз тканини. Промити фосфатним буфером тричі. Провести високотемпературне демаскування антигена в цитратному буфері при рН 6,0. Промити фосфатним буфером тричі. Для зменшення неспецифічного фонового забарвлення через ендогенну пероксидазу інкубувати скло в Hydrogen Peroxide Block упродовж

Ю.М. БОНДАРЕНКО
молодший науковий співробітник
лабораторії патоморфології ДУ
«Інститут педіатрії, акушерства та
гінекології ім. акад. О.М. Лук'янової
НАМН України», м. Київ
ORCID: 0000-0003-0635-3969

Контакти:
Бондаренко Юрій Михайлович
ДУ «ІПАГ ім. акад. О.М. Лук'янової
НАМН України», лабораторія
патоморфології
04050, Київ, П. Майбороди, 8
Тел.: +38 (044) 483-62-16
Email: urabondarenko151@gmail.com

DOI: <http://dx.doi.org/10.18370/2309-4117.2022.65.71-79>

ВАГІТНІСТЬ ТА ПОЛОГИ

10 хв. Промити фосфатним буфером тричі. Нанести реагент Ultra V block для блокування неспецифічних реакцій фонового забарвлення та інкубувати протягом 5 хв. Промити фосфатним буфером тричі. Нанести первинні антитіла фірми Thermo Scientific та інкубувати 30 хв. Промити фосфатним буфером тричі. Нанести Primary Antibody Amplifier Quanto до C-kit CD-117, до CD-44 і до контролю та інкубувати впродовж 10 хв. Промити фосфатним буфером тричі. Нанести HRP Polymer Quanto та інкубувати протягом 10 хв. Промити фосфатним буфером тричі. Додати 1 краплю DAB Chromogen Quanto до 1 мл DAB Substrate Quanto, перемішати й нанести на зріз, інкубувати впродовж 5 хв., залежно від потрібного ступеня забарвлення. Промити дистильованою водою 4 рази. Провести контрастне забарвлення та помістити в бальзам.

Поширеність та інтенсивність реакції оцінювали напівкількісним методом у балах, від 0 до 3:

а) поширеність:

- 0 – немає забарвлення;
- 1 – менш як 10% позитивно забарвлених клітин;
- 2 – понад 10% і менш як 50% позитивно забарвлених клітин;
- 3 – гомогенне забарвлення понад 50% клітин;

б) інтенсивність реакції:

- 0 – немає видимого забарвлення;
- 1 – слабе забарвлення;
- 2 – помірне забарвлення;
- 3 – виразне забарвлення.

Дослідження плацент проводили згідно з протоколом, затвердженим наказом МОЗ України № 417 від 19.08.2004 (форма 0113), і за класифікацією консенсусного положення Амстердамської робочої групи з питань плаценти (Amsterdam Placental Workshop Group Consensus Statement) від 2016 р. [30].

Дослідження погоджене Комісією з біоетики та деонтології при ДУ «Інститут педіатрії, акушерства і гінекології ім. акад. О.М. Лук'янової НАМН України» від 20.05.2021. Усі учасниці дослідження надали інформовану згоду.

РЕЗУЛЬТАТИ

Аналіз морфологічного дослідження плацент у жінок із хронічним стресом згідно з Амстердамською класифікацією (2016) засвідчив, що в усіх досліджуваних групах є морфологічні загальні зміни (забарвлення гематоксилін-еозином): гістологічні та імуногістохімічні.

Гістологічними маркерами стресу є вузлики синцитіотрофобласта (рис. 1–2) середніх і термінальних ворсин хоріона. Встановлено, що порівняно з контролем при хронічному стресі, зумовленому COVID-19 та внутрішнім опроміненням, достовірно збільшується кількість багатоядерних синцитіальних вузликів, особливо у групах 2 (з невиношуванням вагітності) та 4 (плаценти жінок, які перехворіли на COVID-19).

Також гістологічно були виявлені нерівномірні зміни мікровидшарування децидуальної оболонки вогнищевого характеру в усіх досліджуваних групах порівняно з контролем. Тобто, відповідно до Амстердамської класифікації

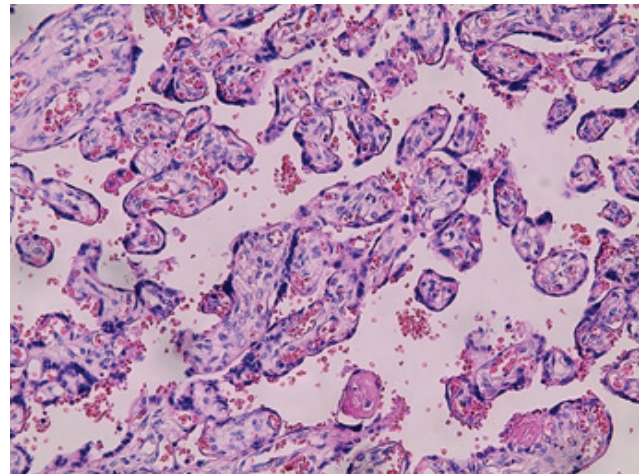


Рисунок 1. Вузлики синцитіотрофобласта в середніх і термінальних ворсинах хоріона контрольної групи
Забарвлення гематоксилін-еозином, збільшення $\times 20$.

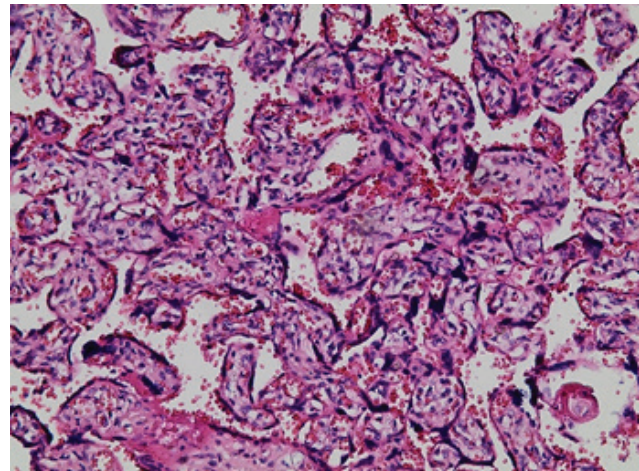


Рисунок 2. Вузлики синцитіотрофобласта в середніх і термінальних ворсинах хоріона постковідної групи
Забарвлення гематоксилін-еозином, збільшення $\times 20$.

(2016), виявлено судинні материнські процеси, які пов'язані з порушенням перфузії. У згаданій класифікації до судинних процесів материнських структур плаценти відносять судини децидуальної оболонки й міжворсинчастий простір.

Аналіз імуногістохімічних маркерів стовбурових клітин CD-117 та CD-44 порівняно з контролем (табл. 1) встановив експресію CD-117 у плаценті досліджуваних груп 2, 3 і 4. Виявлено нерівномірність розташування маркера стовбурових клітин CD-117 (рис. 3) – найбільш достовірно в хоріальних ворсинках та Вартонових структурах третьої групи дослідження. Також зафіксовано нерівномірність експресії CD-44 і вогнищевий характер переважно у групі 3 та меншою мірою у групі 4 (рис. 4). При цьому збільшувалася кількість деяких ворсин. Але у 80% випадків спостерігалось пошкодження у вигляді дистрофії, пікнозу та апоптозу CD-117-позитивних клітин, що вказує на зменшення функціональних особливостей стовбурових клітин. У частині плацентарних структур ворсинок, а також децидуальної оболонки такі скупчення виявлені в групах 3 та 4 (рис. 5, табл. 1).

Слід зазначити нерівномірність експресії маркерів CD-117 і CD-44 у структурах пуповини в групах 3 та 4. У групі

Таблиця 1. Імуногістохімічні маркери стовбурових клітин плаценти жінок із хронічним стресом, бали

Групи	CD-117							
	Децидуальна оболонка		Ворсинки		Оболонки		Пуповина	
	клітини	дистрофія	клітини	дистрофія	клітини	дистрофія	клітини	дистрофія
Група 1 (контроль)	0	0	2	0	0	0	0	0
Група 2 (невиношування)	0	0	3	2	2	2	3	2
Група 3 (внутрішнє опромінення)	2	2	3	3	0	2	2	2
Група 4 (перенесений COVID-19)	2	2	3	2	2	2	2	0

Групи	CD-44							
	Децидуальна оболонка		Ворсинки		Оболонки		Пуповина	
	клітини	дистрофія	клітини	дистрофія	клітини	дистрофія	клітини	дистрофія
Група 1 (контроль)	2	1	3	0	2	0	1	1
Група 2 (невиношування)	3	2	3	1	2	1	0	0
Група 3 (внутрішнє опромінення)	2	2	3	3	1	1	2	2
Група 4 (перенесений COVID-19)	2	2	3	3	2	1	3	3

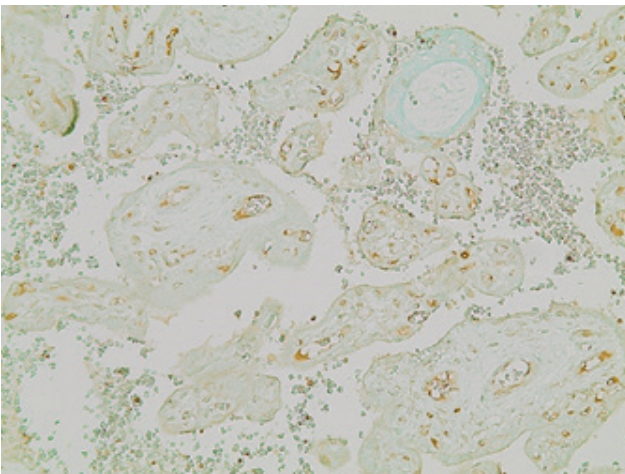


Рисунок 3. Експресія CD-117 у ворсинках хоріона групи з внутрішнім опроміненням $\geq 4,8$ Бк/кг
Імуногістохімічна реакція МКАТ CD-117, збільшення $\times 20$.

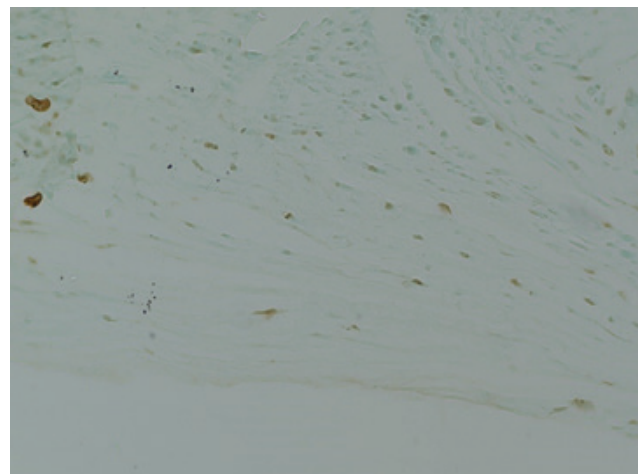


Рисунок 5. Експресія CD-117 у децидуальній оболонці групи з перенесеним COVID-19
Імуногістохімічна реакція МКАТ CD-117, збільшення $\times 40$.

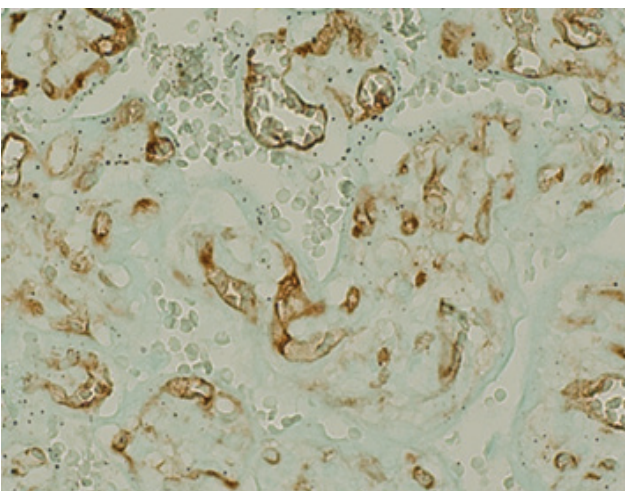


Рисунок 4. Експресія CD-44 у ворсинках хоріона групи з перенесеним COVID-19
Імуногістохімічна реакція МКАТ CD-44, збільшення $\times 63$.

З експресія CD-44 була виразнішою, ніж CD-117, у поодиноких випадках виявлялися скупчення гіперплазованих стовбурових клітин навколо судин із поодинокими клітинами у Вартонових драглях. У групі 4 в більшості випадків наявна дифузна виразна експресія CD-44 і CD-117 у Вартонових драглях, із помірним скупченням негіперплазованих стовбурових клітин біля судин.

Імуногістохімічне дослідження маркера стовбурових клітин CD-44 виявило значне зростання кількості CD-44-позитивних клітин у полях зору (при збільшенні $\times 20$), особливо в хоріальних ворсинах та пуповині в контрольній групі. Зафіксовано посилення експресії в стромі хоріальних ворсин групи 3 (рис. 6).

Аналіз імуногістохімічної експресії CD-44 в групах плацент жінок із хронічним стресом показав, що нерівномірне її збільшення в частині плацент було пов'язане з деструкцією (особливо дистрофією) цих маркерів (рис. 7).

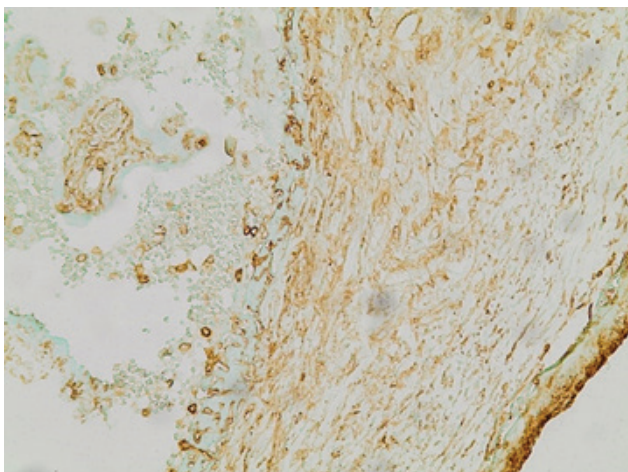


Рисунок 6. Експресія CD-44 у ворсинках хоріона групи з внутрішнім опроміненням $\geq 4,8$ Бк/кг
Імуногістохімічна реакція МКАТ CD-44, збільшення $\times 20$.

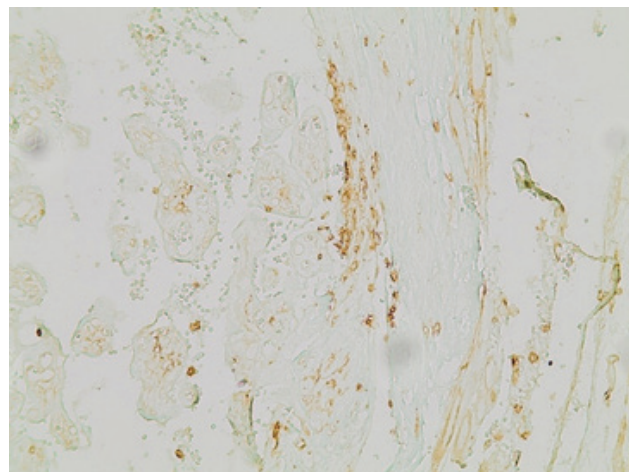


Рисунок 7. Експресія CD-44 виявила вогнища дистрофії стовбурових клітин у групі з внутрішнім опроміненням $\geq 4,8$ Бк/кг
Імуногістохімічна реакція МКАТ CD-44, збільшення $\times 20$.

ОБГОВОРЕННЯ

Встановлені імуногістохімічні особливості стовбурових клітин у структурах плаценти при різній патології важливі з погляду регенераторних можливостей при їх застосуванні з метою лікування.

Збільшення кількості стовбурових клітин у плацентарному бар'єрі є закономірною реакцією на uszkodження. На основі цього можна судити про тяжкість перенесеного стресу і його наслідки для структур плаценти. Оскільки плацента бере участь в органогенезі плода, дуже важливо враховувати її регенераторні можливості при дії найпоширеніших шкідливих чинників – внутрішнього опромінення та перенесеного COVID-19.

Виявлені імуногістохімічні особливості експресії стовбурових клітин при внутрішньому опроміненні та перенесеному COVID-19 свідчать про різну спрямованість цих чинників. Так, при коронавірусній хворобі віріон пригнічує дозрівання ворсинок хоріона та збільшує фіброз строми й материнські інфаркти, порушує перфузію материнських і фетальних структур. Внутрішнє опромінення призводить до структурного пошкодження синцитіотрофобласта та клітин ендотелію судин.

Найвираженішою є дія внутрішнього опромінення (група 3). Дуже важливим є факт, що внутрішнє опромінення уражає і самі стовбурові клітини: хоча їх кількість значно збільшена, однак переважна більшість має значно знижені функціональні можливості.

ВИСНОВКИ

При дії хронічного стресу, зумовленого різними чинниками, відбуваються загальні зміни всіх структур плацентарного бар'єра:

- мікровідшарування децидуальної оболонки (достовірне збільшення кількості випадків у досліджуваних групах);
- порушення перфузії в структурах плацентарного бар'єра (материнські чинники);
- у стовбурових клітинах плацент трьох досліджуваних груп порівняно з контролем виявлено стресогенні маркери.

Встановлено достовірне збільшення поширеності та інтенсивності імуногістохімічних маркерів стовбурових клітин CD-117 і CD-44 на тлі дистрофічно-деструкційних змін у плацентарних структурах трофобласта досліджуваних плацент.

Найвиразніші зміни деструкції стовбурових клітин CD-117 виявлені в плацентах із внутрішнім опроміненням, що підтверджує більш виразна експресія CD-44.

Хронічний стрес, зумовлений різними чинниками, спричиняє однотипні зміни в плацентарних структурах, однак вони мають різний ступінь вираження. При дозах $\geq 4,8$ Бк/кг внутрішнього опромінення ці зміни найбільш виразні.

Конфлікт інтересів

Конфлікт інтересів відсутній.

FEATURES OF IMMUNOHISTOCHEMICAL MARKERS OF STEM CELLS CD-117, CD-44 IN FEMALE PLACENTAS ON THE BACKGROUND OF CHRONIC STRESS

Y.M. BONDARENKO

junior researcher, Laboratory of Pathomorphology, SI "O.M. Lukyanova Institute of Pediatrics, Obstetrics and Gynecology of the NAMS of Ukraine", Kyiv
ORCID: 0000-0003-0635-3969

Contacts:

Yurii M. Bondarenko

SI "O.M. Lukyanova IPOG of the NAMS of Ukraine",
Laboratory of Pathomorphology
04050, Kyiv, Maiborody str., 8
Tel.: +38 (044) 483-62-16
Email: urabondarenko151@gmail.com

INTRODUCTION

Perinatal pathology occupies a leading place in infant mortality. In 25–30% to 50% of cases it is caused by placental factors (placental dysfunction, decidual membrane detachment, umbilical cord pathology, congenital malformations of the placenta and umbilical cord vessels), which cause placental disorders and lead to fetal death [3–11].

New data [12] about the role of stem cells regenerative capacity in the placenta, as well as cells classified as totipotent, pluripotent and multipotent have been published. Among them, the most studied cell surface phenotypes are CD-44, CD-34, CD-105 and C-kit [13–16].

We paid special attention to C-kit (CD-117), which is expressed by C-kit-encoding type III tyrosine kinase receptor. C-kit-cells are pluripotent cells with a normal karyotype, which is a direct derived from the chorionic structures of the placenta and amniotic fluid and has no surface antigen [17]. It has also been found that C-kit (CD-117), as an offspring of totipotent stem cells, can give rise to almost all tissues and organs [18].

We found the importance of CD-44 antigen in placental tissues. It is unique among mammal's nuclear cells, because it stimulates little halogen reactivity [18–20].

Currently, stem cells (mesenchymal, hematopoietic) are widely discussed and used as a regenerative factor [21–25] in various pathological processes, but placental tissue is used without regard to the pathology of the pregnant woman [26].

Very isolated studies have used induced stem cells for treatment pregnant women with pre-eclampsia [27], which were synthesized on structural DNA corresponding to changes in hypoxia associated with placental dysfunction [28].

Therefore, our studies of placental stem cells are important to identify the structural and molecular mechanisms of their changes under the influence of chronic stress associated with the pathology of the pregnant woman, especially with internal irradiation and COVID-19.

Objective of the study was to investigate the features of immunohistochemical markers of pluripotent stem cells of the C-kit receptor CD-117 and CD-44 antigen from pregnant women

with chronic stress by studying the level of cortisol in saliva (saliva test) and by determining morphological criteria for multinuclear chorionic villi epithelium [29].

MATERIALS AND METHODS

80 women placentas with chronic stress were studied in the following groups:

- 1) 20 women placentas with physiological pregnancy and gestation 38-40 weeks;
- 2) 20 women placentas with miscarriage;
- 3) 20 women placentas with chronic stress due to internal irradiation ≥ 4.5 Bq/kg;
- 4) 20 women placentas who had COVID-19 during pregnancy.

These placentas were compared with control group.

General histological examination was performed according to the standard scheme. 6 pieces (two from the edge, two from the paracentral part, 2 from the central zone of the placenta) were cut from the placenta tissue fixed in neutral formalin through the entire thickness. The material was treated in paraffin, the sections were painted:

- a) hematoxylin and eosin;
- b) picrofuxin according to Van Gieson (this technique allows you to detect connective tissue).

Immunohistochemical methods were used: the method of antigens C-kit CD-117 and CD-44 polymer detection to stem cells using the Ultra-VisionQuanto peroxidase polymer and DAB plus chromogen detection system. Thermo Scientific reagents were used for this study.

Staining protocol: dewax and dehydrate the tissue section. Rinse with phosphate buffer three times. Carry out high-temperature unmasking of the antigen in citrate buffer at pH 6.0. Rinse with phosphate buffer three times. To reduce nonspecific background staining due to endogenous peroxidase, incubate the glass in a Hydrogen Peroxide Block for 10 minutes. Rinse with phosphate buffer three times. Apply Ultra V block reagent to block non-specific background staining reactions and incubate for 5 minutes. Rinse with phosphate buffer three times. Apply primary Thermo Scientific antibodies and incubate for 30 minutes. Rinse with phosphate buffer three times. Apply Primary Antibody Amplifier

Quanto to C-kit CD-117, to CD-44 and to control and incubate for 10 minutes. Rinse with phosphate buffer three times. Apply HRP Polymer Quanto and incubate for 10 minutes. Rinse with phosphate buffer three times. Add 1 drop of DAB Chromogen Quanto to 1 ml of DAB Substrate Quanto, mix and apply to the slice, incubate for 5 minutes, depending on the desired degree of staining. Rinse with distilled water 4 times. Contrast color and place in balm.

The prevalence and intensity of the reaction was evaluated by the semi-quantitative method in points from 0 to 3:

a) prevalence:

- 0 – no color;
- 1 – less than 10% of positively stained cells;
- 2 – more than 10% and less than 50% of positively stained cells;
- 3 – homogeneous staining of more than 50% of cells;

b) intensity:

- 0 – no visible color;
- 1 – weak color;
- 2 – moderate color;
- 3 – expressive color.

Placental examinations were performed according to the protocol approved by the order of the Ministry of Health of Ukraine № 417 of 19.08.2004 (form 0113) and according to the classification of the consensus position of the Amsterdam Placental Workshop Group Consensus Statement from 2016 [30].

The study was approved by the Commission on Bioethics and Deontology at the State Institution "O.M. Lukyanova Institute of Pediatrics, Obstetrics and Gynecology of the NAMS of Ukraine" from 20.05.2021. All participants gave informed consent.

RESULTS

Analysis of women placenta with chronic stress morphological examination according to the Amsterdam classification (2016) showed morphological general changes (hematoxylin and eosin staining) in all studied groups: histological and immunohistochemical.

Histological stress markers are syncytiotrophoblast nodules (Fig. 1–2), middle and terminal chorionic villi. A significantly increased number of multinucleated syncytial nodes was found comparing control with chronic stress caused by COVID-19 and internal irradiation, especially in groups 2 (with miscarriage) and 4 (women placentas with COVID-19).

Also histologically uneven changes in the decidual membrane of micro detachment with focal nature were detected in all study groups, compared with the control group. That is, according to the Amsterdam classification (2016), vascular maternal processes associated with perfusion disorders have been identified. Vascular processes of placenta maternal structures in the mentioned classification are presented as: vessels of the decidual membrane and intervillous space.

Analysis of immunohistochemical stem cells markers CD-117 and CD-44 in comparison with the control (Table 1) revealed the expression of CD-117 in the placenta of 2, 3 and 4 study groups. The uneven location of the stem cells marker CD-117 (Fig. 3) – the most significantly in the chorionic villi and Wharton's jelly of the third study group. Uneven CD-44 expression

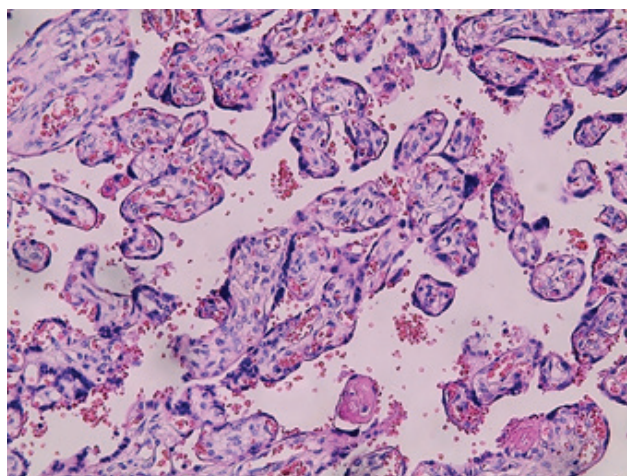


Figure 1. Nodules of syncytiotrophoblast in the chorion middle and terminal villi of the control group
Hematoxylin-eosin staining, magnification $\times 20$.

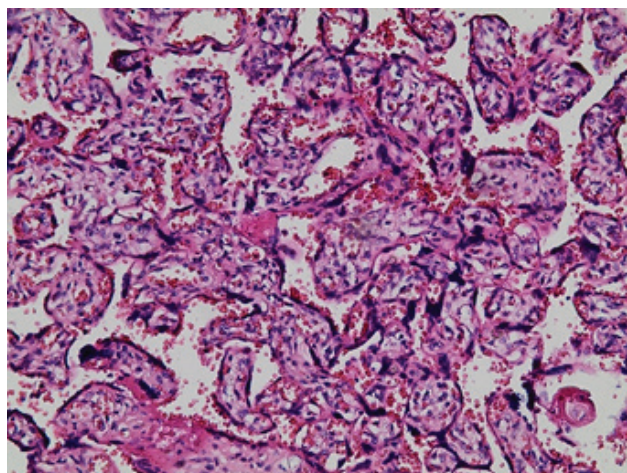


Figure 2. Syncytiotrophoblast nodules in the chorion middle and terminal villi of the group who had COVID-19 during pregnancy
Hematoxylin-eosin staining, magnification $\times 20$.

and focal nature were also observed, mainly in group 3 and to a lesser extent in group 4 (Fig. 4). At the same time, the number of some villi increased. However, damage in the form of dystrophy, pyknosis and apoptosis of CD-117-positive cells was observed in 80% of cases, which indicates a decrease in the stem cells functional characteristics. Such clusters were found in part of the villi placental structures, as well as the decidual membrane in groups 3 and 4 (Fig. 5, Table 1).

Uneven expression of markers CD-117 and CD-44 in umbilical cord structures of groups 3 and 4 should be noted. Expression of CD-44 in group 3 was more pronounced than CD-117, in isolated cases there were clusters of hyperplasia stem cells around single-cell vessels in Wharton's jelly. In group 4, in most cases, there is diffuse expression of CD-44 and CD-117 in Wharton's jelly, with a moderate accumulation of non-hyperplasia stem cells near the vessels.

Immunohistochemical study of the CD-44 stem cell marker revealed a significant increase in the number of CD-44-positive cells in the visual field ($\times 20$), especially in the chorionic villi and umbilical cord in the control group. It was an increase expression in the chorionic villi stroma of group 3 (Fig. 6).

Table 1. Immunohistochemical markers of placental stem cells from women with chronic stress, points

Groups	CD-117							
	Decidual membrane		Villi		Membranes		Umbilical cord	
	cells	dystrophy	cells	dystrophy	cells	dystrophy	cells	dystrophy
Group 1 (control)	0	0	2	0	0	0	0	0
Group 2 (miscarriage)	0	0	3	2	2	2	3	2
Group 3 (internal irradiation)	2	2	3	3	0	2	2	2
Group 4 (coronavirus disease)	2	2	3	2	2	2	2	0

Groups	CD-44							
	Decidual membrane		Villi		Membranes		Umbilical cord	
	cells	dystrophy	cells	dystrophy	cells	dystrophy	cells	dystrophy
Group 1 (control)	2	1	3	0	2	0	1	1
Group 2 (miscarriage)	3	2	3	1	2	1	0	0
Group 3 (internal irradiation)	2	2	3	3	1	1	2	2
Group 4 (coronavirus disease)	2	2	3	3	2	1	3	3

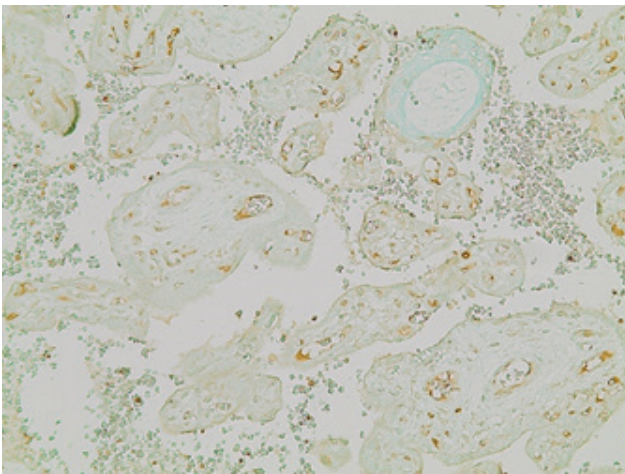


Figure 3. Expression of CD-117 in chorionic villi of the group with internal irradiation ≥ 4.8 Bq/kg
Immunohistochemical reaction of MCAT CD-117, magnification $\times 20$.

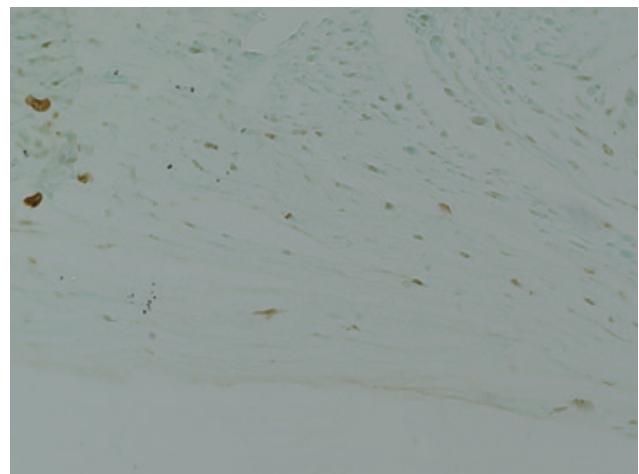


Figure 5. Expression of CD-117 in decidual membrane of the group that had COVID-19 during pregnancy
Immunohistochemical reaction of MCAT CD-117, magnification $\times 40$.

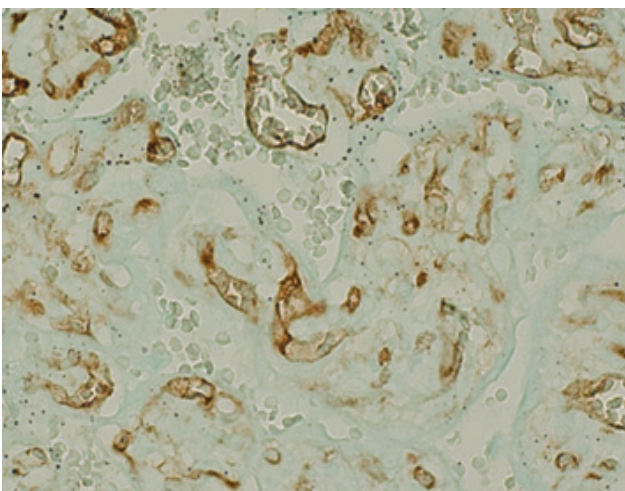


Figure 4. Expression of CD-44 in chorionic villi of the group that had COVID-19 during pregnancy
Immunohistochemical reaction of MCAT CD-44, magnification $\times 63$.

Analysis of immunohistochemical expression of CD-44 in the women placental groups with chronic stress showed that its uneven increase in the placenta was associated with the destruction (especially dystrophy) of these markers (Fig. 7).

DISCUSSION

We have established immunohistochemical features of stem cells in the placenta structures in various pathologies are important in terms of regenerative capabilities in their use for treatment.

An increase in the number of placental barrier stem cells is a natural response to damage. Based on this, we can judge the severity of the stress and its consequences for the placenta structures. Because the placenta is involved in the fetus organogenesis, it is very important to consider its regenerative potential under the influence of the most common harmful factors: internal irradiation and COVID-19.

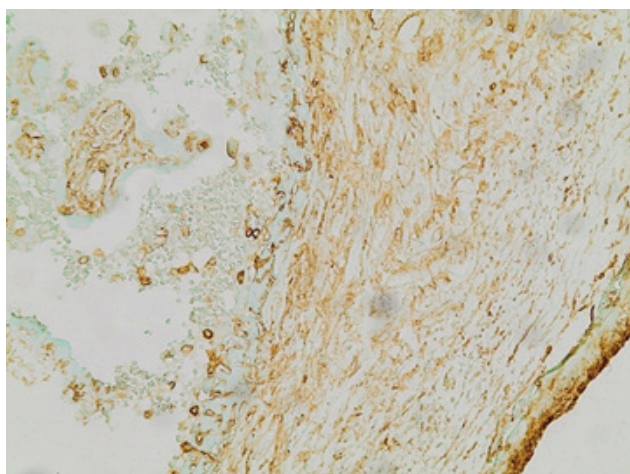


Figure 6. Expression of CD-44 in the chorionic villi of the group with internal irradiation ≥ 4.8 Bq/kg
Immunohistochemical reaction of MCAT CD-44, magnification $\times 20$.

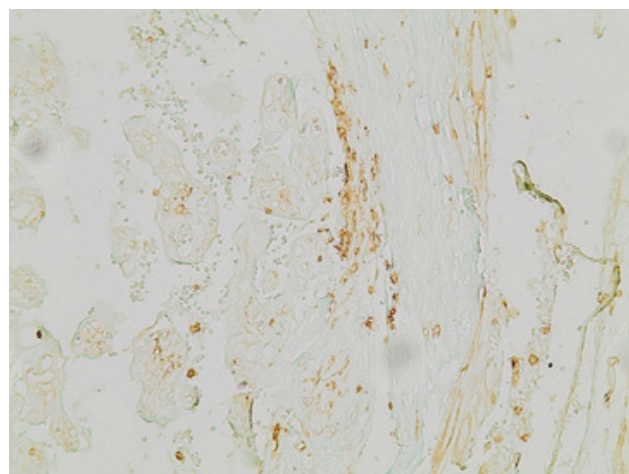


Figure 7. Expression of CD-44 revealed foci of stem cell dystrophy in the group with internal irradiation ≥ 4.8 Bq/kg
Immunohistochemical reaction of MCAT CD-44, magnification $\times 20$.

The identified features of stem cell immunohistochemical expression during internal irradiation and transferred COVID-19 indicate a different direction of these factors. Thus, in coronavirus disease, the virion inhibits the maturation of chorionic villi, as well as increases stromal fibrosis and maternal infarction, disrupts the perfusion of maternal and fetal structures. Internal irradiation leads to structural damage to the syncytiotrophoblast and vascular endothelial cells.

The most expressive is the effect of internal irradiation (group 3). Very important is the fact that internal irradiation also affects the stem cells itself: although their number is significantly increased, most of them have significantly reduced functionality.

CONCLUSIONS

General changes in all placental barrier structures are detected under the impact of chronic stress due to various factors:

- micro detachment of the decidua membrane (significant increase in the study group);

- malperfusion in placental barrier structures (maternal factors);
- in the placenta stem cells of the three study groups in comparison with the control were found stress markers.

It was a significant increase in the prevalence and intensity of stem cells immunohistochemical markers CD-117 and CD-44 on the background of dystrophic destructive changes in the placental trophoblast structures of the studied placentas.

The most expressive changes of CD-117 stem cells destruction were found in placentas with internal irradiation, which is confirmed by the more pronounced expression of CD-44.

Chronic stress due to various factors causes the same type of changes in placental structures, but they have different degrees of expression. At doses ≥ 4.8 Bq/kg of internal irradiation, these changes are most pronounced.

Conflict of interest

There is no conflict of interest.

ЛІТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Mitalipov, S., Wolf, D. "Totipotency, pluripotency and nuclear reprogramming." *Adv Biochem Eng Biotechnol* 114 (2009): 185–99.
2. Koutmani, Y., Karalis, K.P. "Neural stem cells respond to stress hormones: distinguishing beneficial from detrimental stress." *Front Physiol* 6 (2015): 77. DOI: 10.3389/fphys.2015.00077
3. Baergen, R.N. *Manual of Pathology of the Human Placenta: Second Edition* (2011).
4. Антипкин, Ю.Г. Патология плаценты (современные аспекты) / Под ред. Ю.Г. Антипкина, Т.Д. Задорожной, О.И. Парнищкой. – Киев, 2016. – 127 с.
Antypkin, Y.H., Zadorozhna, T.D., Pamytska, O.I. *Placental pathology (modern aspects)*. Kyiv (2016): 127 p.
5. Khong, T. Yee, et al. *Pathology of the Placenta: a Practical Guide* (2019).
6. Pathak, S., Hook, E., Hackett, G., et al. "Cord coiling, umbilical cord insertion and placental shape in an unselected cohort delivering at term: relationship with common obstetric outcomes." *Placenta* 31.11 (2010): 963–68. DOI: 10.1016/j.placenta.2010.08.004
7. Stanek, J. "Membrane microscopic chorionic pseudocysts are associated with increased amount of placental extravillous trophoblasts." *Pathology* 42 (2010): 125–30.
8. Bendon, R.W., Coventry, S.C., Reed, R.C. "Reassessing the clinical significance of chorionic membrane microcysts and linear necrosis." *Pediatr Dev Pathol* 15.3 (2012): 213–6. DOI: 10.2350/11-08-1072-0A.1
9. Reese, J.A., Peck, J.D., Yu, Z., et al. "Platelet sequestration and consumption in the placental intervillous space contribute to lower platelet counts during pregnancy." *Am J Hematol* 94.1 (2019): E8–E11. DOI: 10.1002/ajh.25321
10. Haram, K., Mortensen, J.H., Myking, O., et al. "Early development of the human placenta and pregnancy complications." *J Matern Fetal Neonatal Med* 33.20 (2020): 3538–45. DOI: 10.1080/14767058.2019.1578745
11. McCracken, M.N., George, B.M., Kao, K.S., et al. "Normal and Neoplastic Stem Cells." *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 81 (2016): 1–9. DOI: 10.1101/sqb.2016.81.030965
12. Hara, A., Kato, K., Ishihara, T., et al. "Meflin defines mesenchymal stem cells and/or their early progenitors with multilineage differentiation capacity." *Genes Cells* 26.7 (2021): 495–512. DOI: 10.1111/gtc.12855
13. Witkowska-Zimny, M., Wrobel, E. "Perinatal sources of mesenchymal stem cells: Wharton's jelly, amnion and chorion." *Cell Mol Biol Lett* 16 (2011): 493–514.
14. Summers, M., Helm, K., Majka, S.M. "Enrichment and Characterization of Human and Murine Pulmonary Mesenchymal Progenitor Cells

- (MPC).” *Methods Mol Biol* 2155 (2020): 125–40. DOI: 10.1007/978-1-0716-0655-1_11
15. Nishimura, M., Nguyen, L., Watanabe, N., et al. “Development and characterization of novel clinical grade neonatal porcine bone marrow-derived mesenchymal stem cells.” *Xenotransplantation* 26.3 (2019): e12501. DOI: 10.1111/xen.12501
16. Kay, H.H., Nelson, D.M., Wang, Y. *The Placenta: from Development to Disease*. Wiley-Blackwell, West Sussex, United Kingdom (2011): 346 p.
17. Atala, A. *Amniotic Fluid and Placenta Stem Cells*. In: Bhattacharya, N., Stubblefield, P. (eds) *Regenerative Medicine Using Pregnancy-Specific Biological Substances*. Springer, London (2011).
18. Heazlewood, C., et al. *Exploring the Human Term Placenta as a Novel Source for Stem Cells and Their Application in the Clinic* (2019).
19. Yang, H., Wang, F., Liu, X., et al. “Mesenchymal stem cells from human umbilical cord regulate the expression of major histocompatibility complex in human neural stem cells and their lineages.” *Neurosci Lett* 738 (2020): 135359. DOI: 10.1016/j.neulet.2020.135359
20. Wang, M., Yang, Y., Yang, D., et al. “The immunomodulatory activity of human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells in vitro.” *Immunology* 126 (2009): 220–32.
21. Чайковський, Ю.Б. *Стовбурові клітини: монографія / Ю.Б. Чайковський, О.І. Дельцова, С.Б. Герасченко*. – Івано-Франківськ: Місто НВ, 2014. – 500 с.
- Chaikovskiy, Y.B., Deltsova, O.I., Herashchenko, S.B. *Stem cells: a monograph*. Ivano-Frankivsk: City of NV (2014): 500 p.
22. Angiero, F., Sozzi, D., Seramondi, R., Valente, M.G. “Epithelial-myoepithelial carcinoma of the minor salivary glands: immunohistochemical and morphological features.” *Anticancer Res* 29.11 (2009): 4703–9.
23. Zhao, X., Malhotra, G.K., Band, H., Band, V. “Derivation of myoepithelial progenitor cells from bipotent mammary stem/progenitor cells.” *PLoS One* 7.4 (2012): e35338. DOI: 10.1371/journal.pone.0035338
24. Kretzschmar, K., Weber, C., Driskell, R.R., et al. “Compartmentalized Epidermal Activation of β -Catenin Differentially Affects Lineage Reprogramming and Underlies Tumor Heterogeneity.” *Cell Rep* 14.2 (2016): 269–81. DOI: 10.1016/j.celrep.2015.12.041
25. Schmitt, F., Ricardo, S., Viera, A.F., et al. “Cancer stem cell markers in breast neoplasias: their relevance and distribution in distinct molecular subtypes.” *Virchows Arch* 460.6 (2012): 545–53.
26. Shackleton, M. “Normal stem cells and cancer stem cells: similar and different.” *Semin Cancer Biol* 20.2 (2010): 85–92. DOI: 10.1016/j.semcancer.2010.04.002
27. Hori, M., et al. “Identification of Subtype-Specific Markers for Preeclampsia Using Placental Pathology and RNAseq.” *Reproductive Sciences* (Thousand Oaks, Calif) 28 (2021): 168A.
28. Mangialardi, K., Fanelli, M., Cazzato, G., et al. “Laminar Necrosis and Hypoxic Damage of the Placenta: A Case-Control Study.” *Int J Environ Res Public Health* 19.7 (2022): 3891. DOI: 10.3390/ijerph19073891
29. Задорожна, Т.Д., Бондаренко, Ю.М. Науковий твір «Морфологічні критерії синцитіотрофобласта багатоядерного епітелію ворсинок плаценти у жінок з хронічним стресом». Свідоцтво про реєстрацію авторського права на науковий твір № 112811 від 2022 р.
- Zadorozhna, T.D., Bondarenko, Y.M. Scientific work “Morphological criteria of syncytiotrophoblast of multinucleated epithelium of placental villi in women with chronic stress”. Certificate of copyright registration for the work № 112811 (2022).
30. Khong, T.Y., Mooney, E.E., Ariel, I., et al. “Sampling and definitions of placental lesions: Amsterdam Placental Workshop Group consensus statement.” *Arch Pathol Lab Med* 140.7 (2016): 698–713.

ОСОБЛИВОСТІ ІМУНОГІСТОХІМІЧНИХ МАРКЕРІВ СТОВБУРОВИХ КЛІТИН CD-117, CD-44 В ПЛАЦЕНТАХ ЖІНОК НА ТЛІ ХРОНІЧНОГО СТРЕСУ

Ю.М. Бондаренко, молодший науковий співробітник лабораторії патоморфології ДУ «ПАГ ім. акад. О.М. Лук'янової НАМН України», м. Київ

Обґрунтування. Плацента є предметом інтересу для широкого загалу науковців, оскільки вона багата стовбуровими клітинами та їхніми попередниками. Стовбурова клітина – це клітина, яка має здатність до самооновлення і може диференціюватися на потомство (дочірні клітини) одного або кількох зародкових листків. Останніми роками науковці отримали нові дані про регенераторні можливості стовбурових клітин. Проте наявні лише поодинокі публікації щодо плаценти. Тому дослідження стовбурових клітин у плаценті важливі для виявлення структурних та молекулярних механізмів їх змін при дії хронічного стресу.

Мета дослідження: вивчити особливості імуногістохімічних маркерів плюрипотентних стовбурових клітин та їхні морфологічні особливості.

Матеріали і методи. Було досліджено 80 плацент жінок із хронічним стресом порівняно з контролем за допомогою загальногістологічного та імуногістохімічного методів у таких групах: група 1 – плаценти від жінок із фізіологічним перебігом вагітності та терміном 38–40 тижнів, група 2 – плаценти від жінок із невиношуванням вагітності, група 3 – плаценти від жінок із хронічним стресом, зумовленим внутрішнім опроміненням (4,5 Бк/кг і більше), група 4 – плаценти від жінок, які перенесли COVID-19 під час вагітності.

Результати. Встановлено достовірне збільшення експресії маркерів стовбурових клітин у трьох досліджуваних групах зі значним переважанням у групах 3 та 4. Також було визначено різну спрямованість їхніх чинників.

Висновки. При дії хронічного стресу, зумовленого різними чинниками, відбуваються загальні зміни всіх структур плацентарного бар'єра: мікродішарування децидуальної оболонки (достовірне збільшення кількості випадків у досліджуваних групах); порушення перфузії в структурах материнського плацентарного бар'єра; у стовбурових клітинах плацент трьох досліджуваних груп порівняно з контролем виявлено стресогенні маркери. Отже, хронічний стрес, зумовлений різними чинниками, спричиняє однотипні зміни в плацентарних структурах, однак вони мають різний ступінь вираження – при внутрішньому опроміненні в дозах $\geq 4,8$ Бк/кг ці зміни найбільш виразні.

Ключові слова: плацента, стовбурові клітини, маркери C-kit CD-117, CD-44, хронічний стрес.

FEATURES OF IMMUNOHISTOCHEMICAL MARKERS OF STEM CELLS CD-117, CD-44 IN FEMALE PLACENTAS ON THE BACKGROUND OF CHRONIC STRESS

Y.M. Bondarenko, junior researcher, Laboratory of Pathomorphology, SI "O.M. Lukyanova Institute of Pediatrics, Obstetrics and Gynecology of the NAMS of Ukraine", Kyiv

Background. Placenta is a subject of interest to a wide range of scientists because it is rich in stem cells and their precursors. A stem cell is a cell that has the ability to self-repair and can differentiate into offspring (daughter cells) of one or more germ layers. In recent years, scientists have obtained new data of stem cells regenerative potential. However, only isolated publications about placental stem cells are available. Therefore, our studies about placental stem cells are important for discovery of structural and molecular mechanisms, their changes under the influence of chronic stress.

Objective: to study the features of immunohistochemical markers of pluripotent stem cells and their morphological features.

Materials and methods. We examined 80 women placentas with chronic stress in comparison with control using general histological and immunohistochemical methods in the following groups: group 1 – women placentas with physiological course of pregnancy in term 38–40 weeks, group 2 – women placentas with miscarriage, group 3 – women placentas with chronic stress due to internal irradiation (4.5 Bq/kg and more), group 4 – women placentas which had COVID-19 during pregnancy.

Results. There was a significant increase of stem cell markers expression in the three study groups with a significant predominance in groups 3 and 4. It was also determined the different direction of their active factors.

Conclusions. The general changes of all structures of the placental barrier are detected as a result of chronic stress due to various factors: micro detachment of the decidual membrane (significant increase in cases in the studied groups); malperfusion in the structures of the maternal placental barrier; in the placenta stem cells of the three study groups in comparison with the control were found stress markers. Thus, chronic stress due to various factors causes the same type of changes in placental structures, but they have different degrees of expression – with internal irradiation doses ≥ 4.8 Bq/kg, these changes are most expressive.

Keywords: placenta, stem cells, markers C-kit CD-117, CD-44, chronic stress.