



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **150482** (13) **U**  
(51) МПК (2022.01)  
**G01N 1/28** (2006.01)  
**G01N 33/53** (2006.01)  
**G01N 21/00**

НАЦІОНАЛЬНИЙ ОРГАН  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ  
ДЕРЖАВНЕ ПІДПРИЄМСТВО  
"УКРАЇНСЬКИЙ ІНСТИТУТ  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ"

## (12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: <b>u 2021 05062</b>	(72) Винахідник(и): <b>Мамонтова Тетяна Василівна (UA), Кайдашев Ігор Петрович (UA), Бережна Варвара Анатоліївна (UA), Зелінка-Хобзей Марта Миколаївна (UA)</b>
(22) Дата подання заявки: <b>08.09.2021</b>	
(24) Дата, з якої є чинними права інтелектуальної власності: <b>24.02.2022</b>	
(46) Публікація відомостей про державну реєстрацію: <b>23.02.2022, Бюл.№ 8</b>	(73) Володілець (володільці): <b>ПОЛТАВСЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ, вул. Шевченка, 23, м. Полтава, 36011 (UA)</b>

## (54) СПОСІБ ВИЗНАЧЕННЯ ЛОКАЛІЗАЦІЇ ТА ПОЛЯРИЗАЦІЇ МАКРОФАГІВ ТА МОНОЦИТІВ У ПЛАЦЕНТІ ІМУНОГІСТОХІМІЧНИМ МЕТОДОМ

### (57) Реферат:

Спосіб визначення локалізації та поляризації макрофагів та моноцитів у плаценті імуногістохімічним методом включає відбір тканинного матеріалу, фіксацію у нейтральному забуференому формаліні, регідратацію гістологічних зрізів і видалення із цих залишків парафіну, демаскування антигена, блокування ендогенної пероксидази, і потім неспецифічної сорбції імуноглобулінів, обробку гістологічних зрізів первинними та вторинними антитілами проявлення пероксидазної активності, фарбування, візуалізацію та оцінку локації клітин за наявністю специфічного забарвлення продукту реакції. При цьому здійснюють забір біоптатів плаценти розміром 2×3 см з центральної, парацентральної і периферичної частини плаценти в глибину з боку амніотичної та децидуальної оболонок, оцінку локалізації M1 протизапального типу макрофагів/моноцитів визначають за цитоплазматичним маркером CD68+, а M2 протизапального типу макрофагів/моноцитів реєструють за мембранною експресією маркера CD163+ в ділянках амніотичної та децидуальної оболонки, в стромі та фібриноїді термінальних ворсин, всередині капілярів термінальних ворсин та у міжворсинковому просторі, визначення зсуву поляризації роблять за розрахунком співвідношення M1/M2 маркерів макрофагів/моноцитів.

UA 150482 U



Корисна модель належить до галузей біології й медицини, та може бути використана в імунології, гістології, морфології та акушерстві.

Унікальне розташування макрофагів у фетоплацентарній тканині та їх паракринні властивості до продукції ряду факторів свідчать про виключну роль у процесах раннього розвитку плаценти, регулюванні імунного захисту та ангиогенезу [The role of decidual immune cells on human pregnancy/S. Liu, L. Diao, C. Huang, Y. Li [et al.] // *J. Reproductive Immunology*. - 2017. - Vol. 124. - P. 44-53]. Вони присутні у різних відділах плаценти, децидуальній оболонці (децидуальні макрофаги), стромі ворсинок хоріону (клітини Кашенко-Гофбауера), фібротичних ділянках, внутрішньосудинному та міжворсинковому просторі (моноцити) протягом усієї вагітності, що визначає їх різну функціональну активність. Різноманітність виконуваних макрофагами функцій відображається гетерогенним профілем фенотипів, який залежить від їх поляризації, тобто стану активації. Виділяють два основних типи макрофагів: класично активований, прозапальний M1 тип (CD68) та альтернативно активований, протизапальний M2 тип (CD163) [The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment/F.O. Martinez, S. Gordon // *F1000Prime Rep.* - 2014. - Vol. 6. - P. 6-13.]. Ці фенотипи мають різні функції, стимули до переключення, профілі генної експресії і, як наслідок, по-різному відповідають на зовнішні впливи.

Розташування макрофагів у складній тканині, такий як плацента, та відсутність відповідних моделей тварин роблять їх дослідження особливо складним. Визначення локалізації макрофагів у різних тканинах досить часто є неможливим без застосування спеціальних методів дослідження. Є суттєві складнощі виявлення локалізації макрофагів гістохімічним методом та методом електронної мікроскопії у різних відділах зрілої плаценти через те, що вони стискаються з розширеними капілярами і щільною стромою, і тим самим суттєво змінюється їх форма. Одним із найбільш зручних підходів для оцінки функціонального стану макрофагів є їх виділення з плаценти людини [Isolation of Hofbauer cells from human term placentas with high yield and purity/Z. Tang, S. Tadesse, E. Norwitz [et al.] // *Am. J. Reprod. Immunol.* - 2011. - Vol. 66. - P. 336-348. Placental macrophages are impaired in chorioamnionitis, an infectious pathology of the placenta /B. A. Amara, L. Gorvel, K. K. Baulan, // *J. Immunol. Baltim. Md.* - 2013. - Vol. 195(191). - P. 5501-5514. A fast and reliable method to isolate human placental macrophages/S. Mezouar, A.B. Amara, C. Chartier [et al.] // *Curr. Protoc. Immunol.* - 2019. - Vol. 125. - P. e77.]. Для цього використовують різні методи: вони різняться у застосуванні ферментів (колагенази, ДНКаз та/або трипсин), типу градієнта щільності (фікол або перкол), виділенні з використанням антитіл до CD68+, CD10+ або CD14+ або адгезивних молекул. Іншим підходом є аналіз перфузії міжворсинкових просторів плаценти материнською кров'ю *ex vivo*, може бути корисним для вивчення плацентарних макрофагів в їх природному мікросередовищі [Integration and validation of the *ex vivo* human placenta perfusion model/S. Conings F. Amant, P. Annaert [et al.] // *J. Pharmacol. Toxicol. Methods.* - 2017. - Vol. 88. - P. 25-31.].

Дослідження плацентарних макрофагів людини також проводять на імуногістохімічних зрізах, що дозволяє оцінити функціональний стан клітин. В основі імуногістохімічного методу лежить реакція антиген-антитіло та стабільність утвореного комплексу пероксидази з хромогеном, що дозволяє виявляти, ідентифікувати і встановлювати локалізацію молекулярних компонентів клітин і тканин [Yamashita S. Heat-induced antigen retrieval: mechanisms and application in histochemistry/S. Yamashita // *Progress Histochem. Cytochem.* - 2007. - Vol. 41. - P. 141-200]. Даний метод є чутливим до збереження структури тканини та нативності виявлюваних в ній антигенів [Лимфоциты: Методы: Пер. с англ./Под ред Дж. Клауса. - М.: Мир. - 1990. - 395 с., ил.], що створює технічні труднощі і впливає на вірну інтерпретацію отриманих результатів. Тому сучасні вимоги до проведення імуногістохімічного аналізу спонукають до пошуку способу визначення локалізації та оцінки поляризації M1/M2 типів макрофагів та моноцитів у різних гістологічних відділах структури плаценти.

Відомі різні способи визначення локалізації макрофагів та моноцитів у структурі плаценти. Є спосіб визначення локалізації моноцитів у плаценті за допомогою методу проточної цитометрії [The influence of maternal obesity on macrophage subsets in the human decidua/A. Laskewitz, K.L. van Benthem, T.E.C. Kieffer [et al.] // *Cellular Immunology*. - 2019. - Vol. 336. - P. 75-82], який передбачає використання лише децидуальної оболонки плаценти, виділення із плаценти моноцитів /макрофагів і аналіз їх фенотипу за наступними маркерами CD45 (маркер клітин пам'яті), CD14 (маркер резидентних макрофагів), CD50 (ICAM3, адгезивна молекула), HLA-DR (активаційний маркер макрофагів), CD163 (маркер M2 макрофагів), що не дозволяє встановити локалізацію цих клітин у інших структурах органу, оцінити локалізацію моноцитів та M1 прозапальний тип макрофагів. Відомий також спосіб визначення локалізації макрофагів у стромі ворсин плаценти на основі імуногістохімічного методу [Obesity in pregnancy stimulates

macrophage accumulation and inflammation in the placenta // J.C. Challier, S. Basu, T. Bintein [et al.] // Placenta. - 2008. - Vol. 29(3). - P. 274-281]. Даний метод включає визначення у стромі ворсин хоріону клітин Кашценко-Гофбауера за оцінкою маркерів CD14 (маркер резидентних макрофагів), CD68 (M1 тип макрофагів), але даний спосіб також не дозволяє встановити локалізацію цих клітин у інших структурах органу, оцінити локалізацію моноцитів та M2 протизапальний тип макрофагів. Є спосіб визначення локалізації макрофагів у децидуальній оболонці плаценти методом проточної цитометрії з виділенням лише децидуальної оболонки плаценти та визначення локалізації макрофагів за CD68 маркером (M1 тип макрофагів) [Pro-inflammatory mediators and signaling proteins in the decidua of pre-eclampsia/K.-Y. Jung, L.P: Uprety, Y.-J. Jang, J.I. Yang // Eur. Rev. Med. Pharm. Sci. - 2020. - Vol. 24. - P. 12016-12024], До недоліків даного методу можна віднести неможливість встановлення локалізації цих клітин у інших структурах органу, оцінити локалізацію моноцитів та M1 прозапальний тип макрофагів.

Найбільш близьким до запропонованої корисної моделі є спосіб імуногістохімічної детекції пептидних комплексів на парафінових гістологічних зрізах тканин, що вибрано як найближчий аналог [Пат. 111230 України, МПК G01N 33/53, G01N 1/06, G01N 21/00. Спосіб імуногістохімічної детекції пептидних комплексів на парафінових гістологічних зрізах тканин/Мамонтова Т.В., Кайдашев І. П., Весніна Л.Е., Гординська І.Л., Боброва Н.О.; заявник та власник патенту ВДНЗУ "УМСА" -№ u201603217; заявл. 28.03.2016; опубл. 10.11.2016, Бюл. № 21/2016.]. Суть способу полягає в наступному: він включає відбір тканинного матеріалу, фіксацію у нейтральному забуференому формаліні, регідратацію гістологічних зрізів і видалення із них залишків парафіну, демаскування антигена, блокування ендогенної пероксидази і потім неспецифічної сорбції імуноглобулінів, обробку гістологічних зрізів первинними та вторинними антитілами проявлення пероксидазної активності з 3-аміно-9-етилкарбазолом (ЕАК), фарбування, візуалізацію та оцінку локації пептидних комплексів в тканинах за наявністю специфічного забарвлення продукту реакції, при чому фіксацію тканин здійснюють у 4 % нейтральному забуференому формаліні впродовж 8 годин, а демаскування антигенної специфічності пептидних комплексів проводять із застосуванням технології мікрохвильової обробки, інкубують гістологічні зрізи з поліклональними антитілами (інактивована сироватка кроля, імунізованого поліпептидами кіркової речовини нирок та стежкових м'язів щурів) з наступною інкубацією їх з вторинними антитілами (кон'югатом пероксидази хрому з моноспецифічними афінно-очищеними антитілами вівці до імуноглобулінів кроля (IgG, IgA та IgM). Недоліками відомого способу є неможливість його застосування для визначення локалізації макрофагів/моноцитів та оцінити поляризацію у бік M1/M2 про чи протизапального типу клітин у різних відділах плаценти.

В основу корисної моделі поставлена задача розробити спосіб, шляхом удосконалення відомого, щоб підвищити можливості виявлення локалізації макрофагів та моноцитів у різних відділах плацентарної тканини, підвищити діагностичну спроможність методу шляхом оцінки локалізації та стану M1/M2 типів клітин за їх специфічними маркерами та розробити методу оцінки зсуву поляризації на основі розрахунку показника співвідношення про- та протизапальних типів, покращити інформативність методу на основі аналізу функціонального стану монітарно-макрофагальної системи в плаценті імуногістохімічним методом.

Поставлену задачу вирішують створенням способу дослідження, що включає відбір матеріалу, фіксацію його у 10 % нейтральному забуференому формаліні, регідратацію гістологічних зрізів і видалення із них залишків парафіну, демаскування антигена, блокування ендогенної пероксидази і потім неспецифічної сорбції імуноглобулінів, обробку гістологічних зрізів первинними поліклональними антитілами, з наступною інкубацією їх з вторинними антитілами, проявку пероксидазної активності з 3'3'-діамінобензидином (ДАБ), забарвлення, візуалізацію та оцінку локалізації моноцитів у міжворсинчастому просторі та внутрішньосудинному просторі стромі плаценти, M1 прозапального типу CD68+ макрофагів та M2 протизапального типу CD163+ макрофагів у децидуальній оболонці, стромі та ділянках фіброзу термінальних ворсин плаценти за наявністю специфічного забарвлення продукту реакції в місцях локалізації комплексу антиген-антитіло.

Спосіб здійснюють наступним чином:

1. На початковому етапі роботи проведено дослідження по підбору оптимального протоколу для отримання необхідних фрагментів біоптатів різних відділів плаценти. Дослідним шляхом встановлено, що оптимально для подальшої верифікації локалізації макрофагів та моноцитів є найкращим забір 4-5 біоптатів розміром 2×3 см з центральної, парацентральної і периферичної частини плаценти в глибину з боку амніотичної та децидуальної оболонок.

2. Фіксацію тканини плаценти здійснювали у 10 % нейтральному забуференому формаліні із максимальним збереженням виявлених антигенів пептидних комплексів для подальшої їх ідентифікації.

3. Препарати тканин плаценти зневоднюють, заливають у парафін, виготовляють парафінові зрізи товщиною 4-5 мкм на адгезивних предметних скельцях.

4. Проводять регідrataцію зрізів тканин і видаляють з них залишки парафіну. Основна мета даного етапу - зневоднення і максимальне видалення парафіну з тканин, так як мінімальні залишки останнього приводять до підвищеного фонового забарвлення. Для цього зрізи поміщають у термостат при температурі 56 °C на 10 хвилин, потім послідовно проводять через 3 порції о-ксилолу, спирт 96° 2 порції, спирт 70°, дистильовану воду по 5 хвилини у кожній порції рідини.

5. Плацента є органом з посиленою васкуляризацією, тому для блокування ендogenous клітинної пероксидази препарати занурюють в 3 % розчин H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> на 15 хвилин, з наступним відмиванням у дистильованій воді протягом 5 хвилин.

6. Блокування неспецифічної сорбції імуноглобулінів досягають шляхом нанесення на зріз блокуючого розчину (Diagnostic BioSystems, США) на 10 хвилин.

7. Демаскування антигена (руйнування формальдегідних місточків, які утворюються в результаті фіксації формаліном) проводять із застосуванням технології мікрохвильової обробки - препарати занурюють у цитратний буфер (pH 6,0) і поміщають у мікрохвильову піч (Мрія MB, Україна). Встановлюють потужність 650-750 Вт та час обробки - 3 рази по 5 хвилин з інтервалом між циклами 1-2 хвилини [Гуревич Л.Е. Использование в иммуногистохимических исследованиях метода восстановления антигенной специфичности воздействием микроволна ткани, фиксированные формалином и заключенные в парафин/Л.Е. Гуревич, В.А. Исаков // Архив патологии. - 1999. - № 2. - С. 48-50]. Дія мікрохвиль дозволяє збільшити чутливість та покращити якість реакції з відповідними антигенами та суттєво покращує дифузію первинних антитіл.

8. Після закінчення обробки препарати охолоджують у цитратному буфері при кімнатній температурі 15-20 хв.

9. Після цього препарати інкубують з первинними мишачими моноклональними антитілами проти анти-CD68 (у розведенні 1:25, клон PG-M1, REF PD M065-S, Diagnostic BioSystems, США) та анти-CD163 (у розведенні 1:100, клон 10D6, REF Mob460-01, Diagnostic BioSystems, США) протягом 24 годин при +4 °C.

10. Потім препарати промивають у розчині фосфатно-сольового буферу (ФСБ, pH=7,2-7,4) 2 рази по 5 хвилин.

11. Препарати інкубують з вторинними антитілами - системи виявлення миші/кроля Poly Vue™ HRP/DAB (Diagnostic BioSystems, США) у вологій камері при 37 °C протягом 1 години.

12. Препарати промивають у розчині ФСБ 2 рази по 5 хвилин.

13. На препарати наносять субстратний розчин ДАБ на 10 хвилин, який утворює коричневе забарвлення на місці знаходження антигена. Реакцію зупиняють відмиванням препаратів у дистильованій воді.

14. Контрастують ядра клітин барвником гематоксиліном протягом 8-10 хвилин, що дозволяє співвіднести виявлені імунопозитивні клітини CD68+ та CD163+ з гістологічною структурою плаценти.

15. Проводять візуальну оцінку за наявністю, інтенсивністю реакції, підрахунком імунопозитивних клітин CD68 + та CD 163 + по всьому полю зору плаценти з великим збільшенням x20, x40.

16. Визначають загальну локалізацію субпопуляцій макрофагів у різних компартментах плаценти: плацентарному амніоні, децидуальній оболонці, стромі, фібротично змінених ділянках та кровоносних судинах термінальних ворсин ворсинкового хоріону, міжворсинковому просторі.

17. M1 прозапальний тип макрофагів/моноцитів виявляють за цитоплазматичною експресією маркера CD68 у макрофагах, які розташовувались в ділянці амніотичної та децидуальної оболонки, в стромі та фібриноїді термінальних ворсин, а також у моноцитах всередині капілярів термінальних ворсин та у міжворсинчастому просторі. M2 протизапальний тип макрофагів/моноцитів реєструють за мембранною експресією маркера CD163 на макрофагах/моноцитах в ділянці амніотичної та децидуальної оболонки, у стромі та фібриноїді термінальних ворсин, а також на моноцитах всередині капілярів термінальних ворсин та у міжворсинковому просторі.

18. На основі підрахованих всіх отриманих кількісних індивідуальних даних клітин з усіх полів зору (3-5) проводять розрахунок середнього значення. Зрізи досліджують під світлооптичним мікроскопом з подальшим фотографуванням (x200, x400; Axio Lab.A1, Zeiss, Німеччина).

19. Для оцінки зсуву поляризації макрофагів у бік прозапального M1 типу чи протизапального M2 типу запропоновано розраховувати показник співвідношення, який визначається наступним чином: загальну кількість імунопозитивних клітин з маркером CD68+ у макрофагах/моноцитах ділять на загальну кількість імунопозитивних клітин з маркером CD163+ у макрофагах/моноцитах. Показник співвідношення  $< 1$  свідчить про зміщення поляризації у бік M2 протизапального типу макрофагів, а показник  $> 1$  - про зміщення поляризації у бік M1 прозапального типу макрофагів у плаценті.

20. Як негативний контроль специфічності зв'язування слугували препарати, де замість первинних моноклональних антитіл інкубацію проводять з неімуною сироваткою тварин - донорів специфічних антитіл (Negative control reagent, DAKO).

21. Для оцінки фонового забарвлення вторинними антитілами використовують вищеописаний метод, але без інкубування препаратів у розчині первинних моноклональних антитіл - інкубацію проводять з фосфатно-сольовим буфером (ФСБ, pH 7,2-7,4) з додаванням бичачого сироваткового антигена (БСА). У цьому випадку також контролюють виявлення неспецифічного забарвлення ендогенної пероксидази. Результати фарбування у цих ділянках мають бути негативними.

22. Як позитивний контроль використовують зрізи тканин лімфатичного вузла. Результати дослідження підтверджують наявність позитивної імуномітки CD68+ та CD163+ макрофагів/моноцитів.

#### Приклад 1

Аналіз тканинних зрізів плаценти дозволив виявити ряд деталей локалізації M1 та M2 макрофагів у амніотичній оболонці плаценти. Аналіз субпопуляційного складу макрофагів у плацентарному амніоні показав (фото 1, 2), що в групі з фізіологічним перебігом вагітності середній рівень експресії CD68+ макрофагів становив  $7,62 \pm 0,69$  %, а середній рівень експресії CD163+ макрофагів -  $6,84 \pm 1,12$  %. Вірогідної відмінності між рівнем експресії M1 та M2 макрофагів не виявлено ( $p=0,57$ ). В даній групі показник співвідношення між популяціями клітин становив 1,11.

Фото 1 - Експресія CD68+ в амніотичній оболонці плаценти жінок з фізіологічною вагітністю, забарвлення гематоксилін, зб. x100.

Фото 2 - Експресія CD163+ в амніотичній оболонці плаценти жінок з фізіологічною вагітністю, забарвлення гематоксилін, зб. x100.

#### Приклад 2

Аналіз тканинних зрізів плаценти дозволив виявити ряд деталей локалізації M1 та M2 макрофагів (децидуальних макрофагів) у децидуальній оболонці плаценти. Аналіз субпопуляційного складу макрофагів у плацентарній децидуальній оболонці показав (фото 3, 4), що в групі з фізіологічним перебігом вагітності середній рівень експресії CD68+ макрофагів складав  $7,96 \pm 0,23$  %, а CD163+ макрофагів -  $3,92 \pm 0,48$  %. Відмічено у даній групі вірогідне переважання профілю CD68+ макрофагів над профілем CD163+ макрофагів ( $p=0,0006$ ). В даній групі показник співвідношення між популяціями клітин становив 2,03.

Фото 3 - Експресія CD68+ в децидуальній оболонці плаценти жінок з фізіологічною вагітністю, забарвлення гематоксилін, зб. x400.

Фото 4 - Експресія CD163+ в децидуальній оболонці плаценти жінок з фізіологічною вагітністю, забарвлення гематоксилін, зб. x400.

#### Приклад 3

Аналіз тканинних зрізів плаценти дозволив виявити ряд деталей локалізації M1 та M2 макрофагів (клітин Кашенко-Гофбауера) у стромі термінальних ворсин хоріону плаценти. Аналіз субпопуляційного складу макрофагів показав (фото 5, 6), що в групі з фізіологічним перебігом вагітності середній рівень експресії CD68+ макрофагів складав  $7,96 \pm 0,41$  %, а CD163+ макрофагів -  $16,24 \pm 0,67$  %. Відмічено вірогідне переважання протизапального профілю CD163+ над прозапальним профілем CD68+ макрофагів ( $p=0,000006$ ). В даній групі показник співвідношення між популяціями клітин становив 0,49.

Фото 5 - Експресія CD68+ в стромі термінальних ворсин плаценти жінок з фізіологічною вагітністю, забарвлення гематоксилін, зб. x400.

Фото 6 - Експресія CD163+ в стромі термінальних ворсин плаценти жінок з фізіологічною вагітністю, забарвлення гематоксилін, зб. x400.

#### Приклад 4.

Аналіз тканинних зрізів плаценти дозволив виявити ряд деталей локалізації моноцитів всередині кровоносних судин ворсинкового хоріону та у міжворсинковому просторі (фото 7, 8).

Аналіз субпопуляційного складу мононуклеарних клітин всередині кровоносних судин ворсинкового хоріону у групі з фізіологічним перебігом вагітності показав, що середній рівень

експресії CD68+ у загальній популяції моноцитів всередині кровоносних судин (фото 7) становить  $9,97 \pm 1,11$  %, а для CD163+ моноцитів -  $3,8 \pm 0,43$  %. Виявлено вірогідно вищий у 2,62 рази рівень експресії M1, ніж M2 моноцитів у даній групі ( $p=0,0006$ ), показник співвідношення між популяціями клітин складає 2,62.

5 Аналіз субпопуляційного складу моноцитів у міжворсинковому просторі показав, що в груш з фізіологічним перебігом вагітності середній рівень експресії CD68+ моноцитів становив  $5,74 \pm 0,86$  %, а середній рівень експресії CD163+ моноцитів (фото 8) складає  $3,31 \pm 0,39$  %. Відзначено вірогідно вищий рівень експресії прозапального профілю M1 моноцитів, ніж протизапального профілю M2 моноцитів у даній групі жінок ( $p=0,02$ ), показник співвідношення між популяціями клітин становив 1,73.

10 Фото 7 - Експресія CD68+ моноцитів всередині кровоносних судин ворсинкового хоріону плаценти жінок з фізіологічною вагітністю, забарвлення гематоксилін, зб. x400.

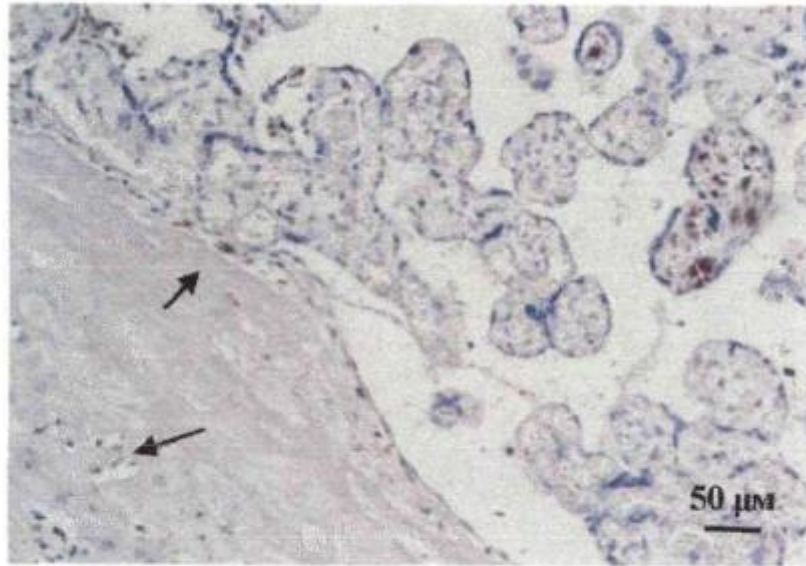
Фото 8 - Експресія CD163+ моноцитів у міжворсинковому просторі плаценти жінок з фізіологічною вагітністю, забарвлення гематоксилін, зб. x400.

15 Представлені результати досліджень, проведені запропонованим методом, дозволяють зробити висновок про високу інформативність виявлення локалізації CD68+ та CD163+ макрофагів/моноцитів в різних відділах плаценти на глибокому структурно-морфологічному рівні. Продемонстровано різний рівень поляризації M1/M2 макрофагів/моноцитів в різних структурних відділах плаценти, проведено оцінку процесу поляризації за фенотипічними CD68+ та CD163+ маркерами клітин. Застосування даного методу дозволяє провести комплексну оцінку локалізації клітин моноцитарно-макрофагального профілю в усій структурі плаценти, що дозволяє здійснити всебічний аналіз участі цих клітин в регуляторних процесах у плаценті. Використання запропонованого показника співвідношення є корисним в оцінці поляризаційного зсуву і визначенні особливостей дисбалансу популяцій імунних клітин. Застосування даного методу може сприяти уточненню клітинної та тканинної локалізації і розкриттю ролі CD68+ та CD163+ макрофагів/моноцитів в імунних механізмах патогенезу в різних відділах плаценти при акушерській патології.

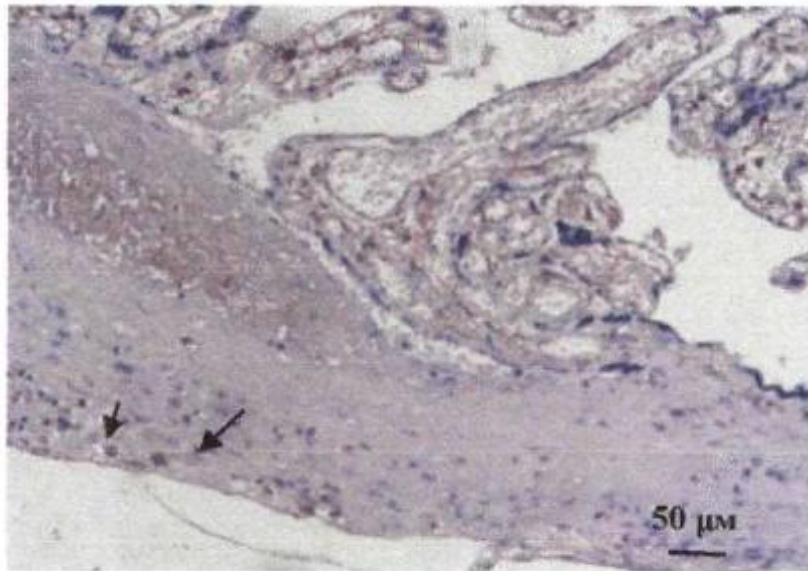
#### 30 ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

Спосіб визначення локалізації та поляризації макрофагів та моноцитів у плаценті імуногістохімічним методом, що включає відбір тканинного матеріалу, фіксацію у нейтральному забуференому формаліні, регідратацію гістологічних зрізів і видалення із цих залишків парафіну, демаскування антигена, блокування ендогенної пероксидази, і потім неспецифічної сорбції імуноглобулінів, обробку гістологічних зрізів первинними та вторинними антитілами проявлення пероксидазної активності, фарбування, візуалізацію та оцінку локації клітин за наявністю специфічного забарвлення продукту реакції, який **відрізняється** тим, що здійснюють забір біоптатів плаценти розміром 2x3 см з центральної, парацентральної і периферичної частини плаценти в глибину з боку амніотичної та децидуальної оболонок, оцінку локалізації M1 протизапального типу макрофагів/моноцитів визначають за цитоплазматичним маркером CD68+, а M2 протизапального типу макрофагів/моноцитів реєструють за мембранною експресією маркера CD163+ в ділянках амніотичної та децидуальної оболонки, в стромі та фібриноїді термінальних ворсин, всередині капілярів термінальних ворсин та у міжворсинковому просторі, визначення зсуву поляризації роблять за розрахунком співвідношення M1/M2 маркерів макрофагів/моноцитів.

45



Φοτο 1

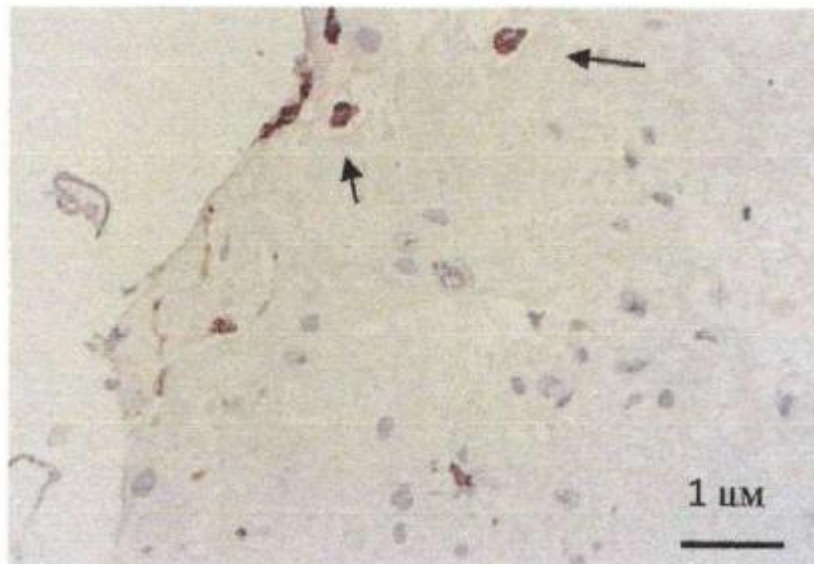


Φοτο 2

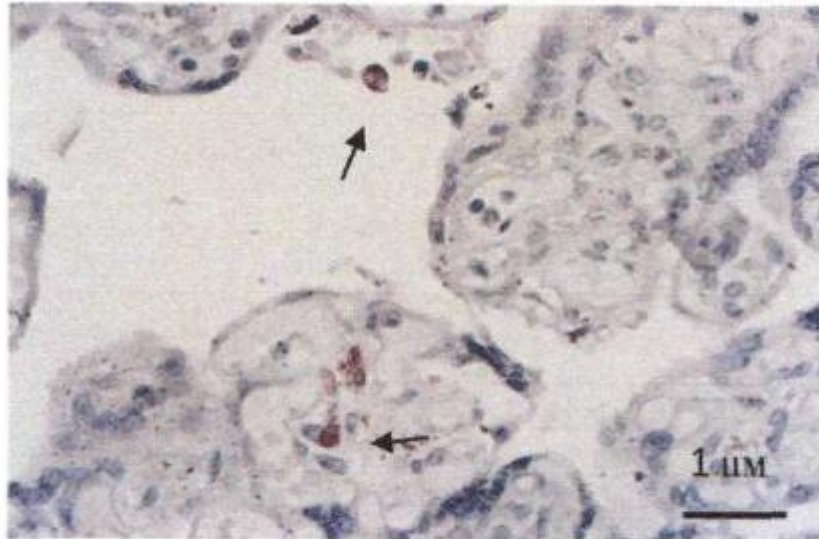




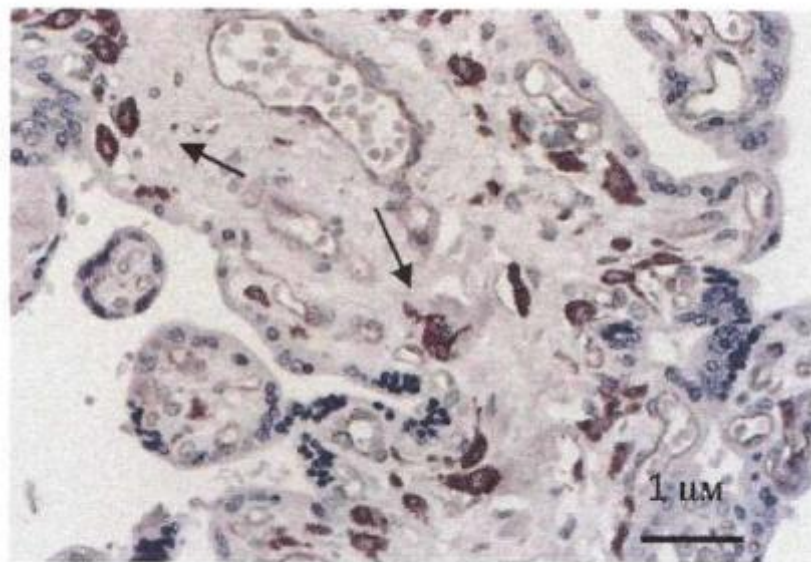
Φοτο 3



Φοτο 4



Φοτο 5



Φοτο 6

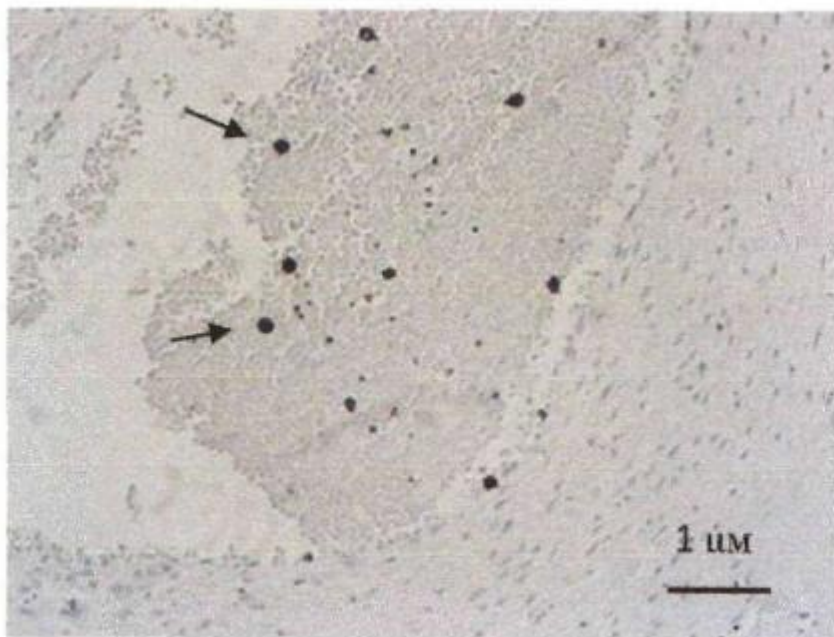


Фото 7

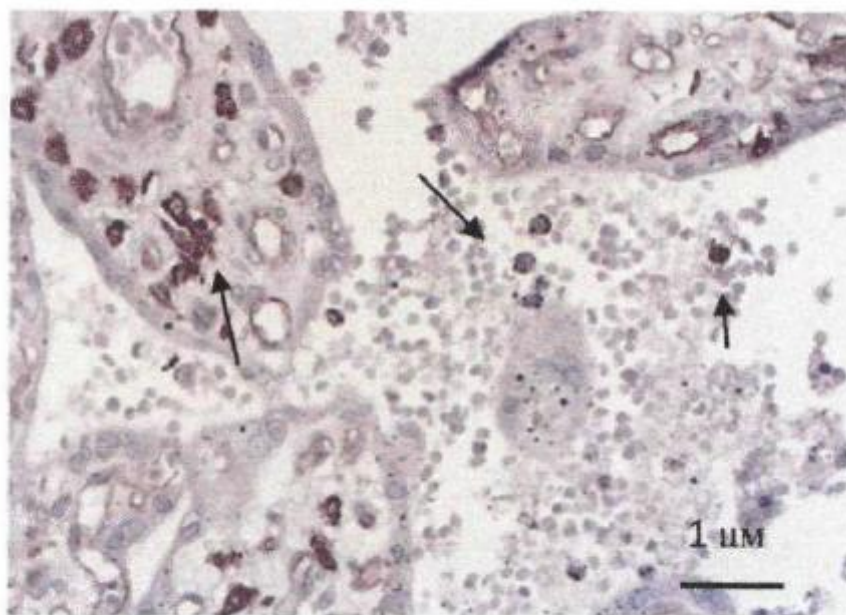


Фото 8