

## **ІМУНОГІСТОХІМІЧНЕ ДОСЛІДЖЕННЯ ПРОЦЕСІВ РЕГУЛЯЦІЇ КЛІТИННОЇ МАСИ ВІЛЬОЗНОГО ТРОФОБЛАСТА ПРИ ЗАЛІЗОДЕФІЦИТНІЙ АНЕМІЇ ВАГІТНИХ ТА ПЕРЕДЧАСНОМУ ДОЗРІВАННІ ХОРІАЛЬНОГО ДЕРЕВА ПЛАЦЕНТИ**

**О.В. Гарвасюк**

Вищий державний навчальний заклад України «Буковинський державний медичний університет», м. Чернівці, Україна

### **Ключові слова:**

залізодефіцитна анемія, передчасне дозрівання хоріального дерева плаценти, проліферація, апоптоз, трофобласт.

Буковинський медичний вісник. Т.22, № 3 (87). С. 8-13.

### **DOI:**

10.24061/2413-0737.XXII.3.87.2018.56

**E-mail:** sashagarvasuk@gmail.com,  
olexandra.garvasuk@bsmu.edu.ua

**Вступ.** Дослідження процесів регуляції чисельності клітин необхідне для уточнення механізмів передчасного дозрівання хоріального дерева плаценти та передчасних пологів і проведено вперше при залізодефіцитній анемії вагітних.

**Мета.** На основі імуногістохімічного дослідження встановити кількісні параметри процесів клітинної проліферації та апоптозу у вільозному трофобласті при залізодефіцитній анемії вагітних та передчасному дозріванні хоріального дерева плаценти.

**Матеріал і методи.** Досліджено 182 плаценти. Дизайн дослідження передбачав виділення двох основних груп дослідження та по три групи порівняння. Методом комп'ютерної мікроденситометрії вимірювали оптичну густина імуногістохімічного забарвлення на антигени Vcl-2 та Вах. Кількісну оцінку кількості Ki-67-позитивних ядер здійснювали у проміле.

**Результати.** Імуногістохімічне забарвлення на антигени Vcl-2 та Вах визначалося в цитоплазмі трофобласта хоріальних ворсинок плаценти, а на антиген Ki-67 — в ядрах трофобласта хоріальних ворсинок плаценти. Між групами дослідження виявлені розбіжності в середніх тенденціях по кожному дослідженому антигену, що відзеркалено у висновках статті.

**Висновки.** Залізодефіцитна анемія вагітних та передчасне дозрівання хоріального дерева як окремо, так і в поєднанні призводять до інтенсифікації проліферативних процесів у трофобласті хоріальних ворсинок плаценти.

Поєднання залізодефіцитної анемії вагітних та передчасного дозрівання хоріального дерева призводить до зниження концентрації протипототичного протеїну Vcl-2 у цитоплазмі трофобласта хоріальних ворсинок. Вах-залежний апоптоз у трофобласті хоріальних ворсинок плаценті зростає як при залізодефіцитній анемії вагітних, так і при передчасному дозріванні хоріальних ворсинок плаценти, причому при їхньому поєднанні цей процес є максимально вираженим.

### **Ключевые слова:**

железодефицитная анемия, преждевременное созревание хоріального дерева плаценты, пролиферация, апоптоз, трофобласт.

## **ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ПРОЦЕССОВ РЕГУЛЯЦИИ КЛЕТОЧНОЙ МАССЫ ВИЛЕЗНОГО ТРОФОБЛАСТА ПРИ ЖЕЛЕЗОДЕФИЦИТНОЙ АНЕМИИ БЕРЕМЕННЫХ И ПРЕЖДЕВРЕМЕННОМ СОЗРЕВАНИИ ХОРИАЛЬНОГО ДЕРЕВА ПЛАЦЕНТЫ**

**А.В. Гарвасюк**

**Введение.** Исследование процессов регуляции численности клеток необходимо для уточнения механизмов преждевременного созревания хоріального дерева плаценты и преждевременных родов и проведено впервые при железодефицитной анемии беременных.

Буковинський медичний  
вісник. Т.22, № 3  
(87). С. 8-13.

**Цель.** На основе иммуногистохимического исследования установить количественные параметры процессов клеточной пролиферации и апоптоза в виллезном трофобласте при железодефицитной анемии беременных и преждевременном созревании хориального дерева плаценты.

**Материал и методы.** Исследовано 182 плаценты. Дизайн исследования предусматривал выделение двух основных групп исследования и по три группы сравнения. Методом компьютерной микроденситометрии измеряли оптическую плотность иммуногистохимического окрашивания на антигены Bcl-2 и Вах. Количественную оценку количества Ki-67-положительных ядер осуществляли в промилле.

**Выводы.** Железодефицитная анемия беременных и преждевременное созревание хориального дерева как отдельно, так и в сочетании приводят к интенсификации пролиферативных процессов в трофобласте хориальных ворсинок плаценты. Сочетание железодефицитной анемии беременных и преждевременного созревания хориального дерева приводит к снижению концентрации противоапоптотического протеина Bcl-2 в цитоплазме трофобласта хориальных ворсинок. Вах-зависимый апоптоз в трофобласте хориальных ворсинок плаценты растет как при железодефицитной анемии беременных, так и при преждевременном созревании хориальных ворсинок плаценты, причем при их сочетании этот процесс максимально выражен.

**Keywords:** iron deficiency anemia, preterm maturation of the placental chorionic tree, proliferation, apoptosis, trophoblast.

Bukovinian Medical Herald. V.22, № 3 (87). P. 8-13.

#### **IMMUNOHISTOCHEMICAL EXAMINATION OF THE REGULATION PROCESSES OF THE VILLOUS TROPHOBLAST CELLULAR MASS IN CASE OF IRON DEFICIENCY IN PREGNANCY AND PRETERM MATURATION OF THE PLACENTAL CHORIONIC TREE**

**O.V. Garvasiuk**

**Introduction.** Investigation of the regulation processes concerning the number of cells is essential to specify the mechanisms of preterm maturation of the chorionic placental tree and preterm labor, that was first carried out for the first time in case of iron deficiency anemia of pregnancy.

**Objective:** on the basis of immunohistochemical examination to find quantitative parameters of the cellular proliferation processes and apoptosis in the villous trophoblast in case of iron deficiency anemia of pregnancy and preterm maturation of the placental chorionic tree.

**Material and methods.** 182 placentas were examined. The design of the study assumed distribution of the two main groups and three groups of comparison. Optic density of immunohistochemical staining and the antigens Bcl-2 and BAX were measured by means of computer microdensitometric method. The number of Ki-67-positive nuclei was calculated in per mille.

**Results.** Immunohistochemical staining on the antigens Bcl-2 and BAX was determined in the cytoplasm of the chorionic placental villous trophoblast, and on the antigen Ki-67 in the nuclei of the placental chorionic villous trophoblast. Differences in the average tendencies concerning every examined antigen were determined which was reflected in the conclusions of the article.

**Conclusions.** Iron deficiency anemia of pregnancy and preterm maturation of the chorionic tree both separately and in their combination result in intensification of proliferation processes in the placental chorionic villous trophoblast. Association of iron deficiency anemia of pregnancy and preterm maturation of the chorionic tree results in decrease of the concentration of anti-apoptotic protein Bcl-2 in the cytoplasm of the chorionic villous

## Оригінальні дослідження

*trophoblast. BAX-dependent apoptosis in the trophoblast of the placental chorionic villi increases both in case of iron deficiency anemia of pregnancy and preterm maturation of the placental chorionic villi, and in case of their combination this process becomes maximally pronounced.*

**Вступ.** Процеси регуляції чисельності клітин відіграють важливу роль у формуванні органів у процесі їхнього розвитку [1, 2]. За умов відсутності екстремальних впливів регуляція чисельності клітин здійснюється переважно шляхом регуляції інтенсивності клітинної проліферації та інтенсивності процесів апоптозу (відмирання), які в нормі знаходяться між собою у певному балансі. Дане дослідження присвячене вивченню процесів регуляції чисельності клітинної маси вільозного трофобласта плаценти при передчасному дозріванні хоріального дерева у жінок із залізодефіцитною анемією вагітних (ЗДАВ) у різні терміни гестації. Термін «клітинна маса» по відношенню до вільозного трофобласта застосований тут не випадково, а з тієї причини, що вільозний трофобласт складається не тільки з цитотрофобласта (окремих одно- та двоядерних клітин), але і з синцитіотрофобласта, який по суті є симпластом (коли велика кількість клітинних ядер розташована в суцільній масі цитоплазми) причому з плином вагітності маса вільозного цитотрофобласта зменшується, а маса синцитіотрофобласта зростає. Проліферативні процеси у вільозному трофобласті відзначаються тільки в цитотрофобластичних клітинах [3]. Іноді їх називають камбіальними (поліпотентними) клітинами. За сучасними уявленнями маса синцитіотрофобласта плаценти збільшується за рахунок вливання цитотрофобласта в синцитіотрофобласт [1, 4]. Тобто, процеси зростання клітинної маси трофобласта відбуваються за рахунок проліферації цитотрофобласта. Процеси ж апоптозу можуть відбуватися як у цитотрофобласті, так і в синцитіотрофобласті, причому в останньому вони є значно більш вираженими. Процеси проліферації можна оцінити імуногістохімічним методом, застосовуючи первинні антитіла проти проліферативних антигенів PCNA або Ki-67, які визначаються в клітинних ядрах, причому антиген Ki-67 останнім часом вважається більш надійним маркером клітинної проліферації. З оцінкою процесів апоптозу ситуація набагато складніша, бо у великій кількості існують різні механізми регуляції процесів апоптозу. Щодо вільозного трофобласта, то на сьогодні вважається, що в ньому відбувається переважно так званий Вах-залежний апоптоз [2, 5], коли проапоптотичний протеїн Вах (Bcl-асоційований X-протеїн), переходячи з мономерної форми в гомодимерну чи гомополімерну, в клітинних органелах запускає каскад реакцій, що неминуче призводить до переходу подій з органел на територію клітинних ядер з інтенсифікацією процесів ферментних міжнуклеосомальних розривів ДНК. Протидіє апоптотичному потенціалу протеїну Вах переважно протиапоптотичний протеїн Bcl-2,

який утворює з протеїном Вах гетеродимери, таким чином деактивує проапоптотичну функцію протеїну Вах. Отже, у трофобласті процеси регуляції клітинної маси найбільш доцільно вивчати через оцінку експресії антигенів Ki-67, Bcl-2 та Вах, що ефективно здійснюється імуногістохімічним методом.

**Мета роботи.** На основі імуногістохімічного дослідження встановити кількісні параметри процесів клітинної проліферації та апоптозу у вільозному трофобласті при залізодефіцитній анемії вагітних та передчасному дозріванні хоріального дерева плаценти.

**Матеріал і методи.** Всього досліджено 182 плаценти. Дизайн дослідження передбачав виділення двох основних груп дослідження різних термінів гестації (29–32 та 33–36 тижнів вагітності) та по три групи порівняння окремо на кожен термін гестації. Отже, сформовані такі групи дослідження:

Основна група № 1-спостереження поєднання ЗДАВ і передчасного дозрівання хоріального дерева у 29–32 тижні вагітності.

Група порівняння № 1 А — спостереження передчасного дозрівання хоріального дерева без анемії при пологах у 29–32 тижні вагітності.

Група порівняння № 1 Б — спостереження ЗДАВ у 29–32 тижні вагітності, коли будова хоріального дерева відповідає терміну гестації.

Група порівняння № 1 В — спостереження без будь-якої анемії у 29–32 тижні вагітності, коли будова хоріального дерева відповідає терміну гестації.

Основна група № 2 — спостереження поєднання ЗДАВ і передчасного дозрівання хоріального дерева у 33–36 тижнів вагітності.

Група порівняння № 2 А — спостереження передчасного дозрівання хоріального дерева без будь-якої анемії при пологах у 33–36 тижнів вагітності.

Група порівняння № 2 Б — спостереження ЗДАВ у 33–36 тижнів вагітності, коли будова хоріального дерева відповідає терміну гестації.

Група порівняння № 2 В — спостереження без будь-якої анемії у 33–36 тижнів вагітності, коли будова хоріального дерева відповідає терміну гестації.

Група фізіологічної вагітності — 37–40 тижнів гестації (n=21).

Кількість спостережень по групах дослідження вказана в таблиці.

Відповідність будови хоріального дерева терміну гестації визначали згідно з визначенням кількісного співвідношення між різними типами хоріальних ворсинок плаценти [6].

Шматочки плаценти фіксували 20–22 години в нейтральному забуференому 10% розчині формаліну, з подальшим зневоднюванням у висхідній батареї

спиртів та заливкою в парафін при 580 С. На санному мікромомі робили серійні гістологічні зрізи товщиною 5 мкм. Після депарафінізації гістологічних зрізів виконували імуногістохімічну методику із застосуванням первинних антитіл проти антигенів Ki-67, Bcl-2 та Вах (остаточна візуалізація барвником — діамінобензидином) та полімерної системи детекції (ДАКО) з забарвленням клітинних ядер гематоксилином Майєра.

Для кількісної оцінки результатів імуногістохімічного визначення антигену Ki-67 підраховували кількість Ki-67-позитивних ядер трофобласта хоріальних ворсинок плаценти.

Щодо кількісної оцінки антигенів Bcl-2 та Вах визначали величину оптичної густини імуногістохімічного специфічного забарвлення цитоплазми трофобласта хоріальних ворсинок плаценти, яку вимірювали у відносних одиницях оптичної густини методом зондової комп'ютерної мікроденситометрії за допомогою комп'ютерної програми ImageJ (версія 1.48v, вільна ліцензія, W. Rasband, National Institute of Health, USA, 2015), [7] шляхом логарифмічного перетворення середньої величини яскравості в кожному зонді.

Для кожного показника вираховували середню арифметичну та її похибку, порівняння між групами дослідження здійснювали за допомогою двобічного непарного критерію Ст'юдента в середовищі комп'ютерної програми PAST 3.19 (вільна ліцензія, 2018) [8]. Попередньо виконували перевірку на нормальність у вибірках методом Shapiro-Wilki за допомогою цієї ж комп'ютерної програми. Статистично значущими вважали розбіжності при  $p \leq 0,05$ .

**Результати дослідження та їх обговорення.** Результати застосування імуногістохімічного забарвлення на проліферативний антиген Ki-67 показали, що при фізіологічній вагітності в хоріальних ворсинках Ki-67-позитивні ядра трофобласта трапляються нечасто, у середньому всього в  $3 \pm 0,1$  проміле (табл.). Розташовувалися ці ядра виключно поза територією синцитіотрофобласта, в окремих одно- або двоядерних клітинах, локалізація яких відповідає території вільозного цитотрофобласта. У цій же локалізації знаходили Ki-67-позитивні ядра трофобласта й в інших групах дослідження, але значно частіше. Зокрема, найбільша частота Ki-67-позитивних ядер трофобласта хоріальних ворсинок відзначено серед жінок, які страждали на ЗДАВ, але будова хоріального дерева відповідала терміну гестації. Причому у термін гестації 29–32 тижні відзначалися більш високі показники ( $p < 0,05$ ), ніж у термін 33–36 тижнів, що загалом відповідає відомим даним про темпи проліферативних процесів протягом вагітності, зокрема більш високі темпи проліферації у більш ранні терміни вагітності [9]. Це підтверджується і середніми цифрами кількості Ki-67-позитивних ядер трофобласта хоріальних ворсинок у спостереженнях без анемії, коли будова хоріального дерева відповідала

терміну гестації. Разом з цим, були зафіксовані доволі високі показники частоти Ki-67-позитивних ядер трофобласта хоріальних ворсинок і в обох основних групах дослідження (поєднання ЗДАВ та передчасного дозрівання хоріального дерева), причому і тут зберігалася тенденція щодо більш високих цифр у більш ранні терміни гестації. Цікаво, що при передчасному дозріванні хоріального дерева, коли в жінок не було встановлено змін у крові, які би вказували на анемію, кількість Ki-67-позитивних ядер трофобласта хоріальних ворсинок був понад удвічі меншим, ніж при ЗДАВ у спостереженнях, коли будова хоріального дерева відповідала терміну гестації і при ЗДАВ, коли мало місце передчасне дозрівання хоріального дерева. Отже, і ЗДАВ, і передчасне дозрівання хоріального дерева, як окремо, так і в поєднанні призводять до інтенсифікації проліферативних процесів у трофобласті хоріальних ворсинок плаценти.

Імуногістохімічне дослідження протиапоптотичного протеїну Bcl-2 у цитоплазмі трофобласта хоріальних ворсинок показало, що при фізіологічній вагітності відзначається високий рівень експресії цього антигену, на що вказувала висока інтенсивність забарвлення, яку оцінювали за оптичною густиною. Забарвлення носило відносно рівномірний характер у різних типах хоріальних ворсинок. Із даних таблиці видно, що тільки в основних групах дослідження (поєднання ЗДАВ та передчасного дозрівання хоріального дерева) оптична густина забарвлення на протиапоптотичний протеїн Bcl-2 впала до цифр, у середньому нижчих за фізіологічну вагітність. В усіх інших групах дослідження не знайшли розбіжностей у середніх тенденціях від показників фізіологічної вагітності ( $p > 0,05$ ). Отже, поєднання ЗДАВ та передчасного дозрівання хоріального дерева призводить до зниження концентрації протиапоптотичного протеїну Bcl-2 у цитоплазмі трофобласта хоріальних ворсинок.

Імуногістохімічне дослідження проапоптотичного протеїну Вах у цитоплазмі трофобласта хоріальних ворсинок показало, що навіть при фізіологічній вагітності відзначається чітка експресія цього антигену, тобто процеси Вах-залежного апоптозу трофобласта наявні в хоріальних ворсинках і за фізіологічної вагітності. Щоправда, рівень експресії антигену Вах доволі сильно варіює від ворсинки до ворсинки, та навіть у межах однієї і тієї ж ворсинки. Дані таблиці показують, що оптична густина імуногістохімічного забарвлення на протеїн Вах у середньому не відрізняється від фізіологічної вагітності лише в спостереженнях, коли будова хоріального дерева відповідає терміну гестації, а в жінок не виявлено проявів анемії. При передчасному дозріванні хоріального дерева плаценти, при ЗДАВ оптична густина імуногістохімічного забарвлення на протеїн Вах значно вище, ніж при фізіологічній вагітності, при цьому, при поєднанні ЗДАВ та передчасного дозрівання хоріальних ворсинок плаценти середні показники оптичної густини

## Оригінальні дослідження

забарвлення на протеїн Вах є найвищими серед усіх груп дослідження. Отже, Вах-залежний апоптоз у трофобласті хоріальних ворсинок плаценті зростає як при

ЗДАВ, так і при передчасному дозріванні хоріальних ворсинок плаценти, причому при їхньому поєднанні цей процес є максимально вираженим.

**Таблиця**

**Кількісні показники імуногістохімічного визначення антигенів Ki-67, Vcl-2 та Вах у трофобласті хоріальних ворсинок плаценти**

Групи дослідження	Ki-67- позитивні ядра в трофобласті хоріальних ворсинок (%)	Оптична густина імуногістохімічного забарвлення на протеїн Vcl-2 у цитоплазмі трофобласта хоріальних ворсинок (в.од.опт.густ.)	Оптична густина імуногістохімічного забарвлення на протеїн Вах у цитоплазмі трофобласта хоріальних ворсинок (в.од.опт.густ.)
Фізіологічна вагітність, (n=21)	3±0,1	0,326±0,0016	0,264±0,0015
29-32 тижні гестації			
Основна група №1, (n=18)	68±1,4 p1A<0,001 p1B=0,004 p1B<0,001	0,301±0,0015 p1A<0,001 p1B<0,001 p1B<0,001	0,409±0,0016 p1A<0,001 p1B<0,001 p1B<0,001
Група порівняння №1А, (n=19)	32±1,1	0,322±0,0015	0,329±0,0014
Група порівняння №1Б, (n=20)	75±1,8	0,321±0,0016	0,345±0,0015
Група порівняння №1В, (n=21)	15±0,9	0,324±0,0017	0,267±0,0012
33-36 тижнів гестації			
Основна група №2, (n=20)	54±1,3 p2A<0,001 p2B=0,005 p2B<0,001	0,304±0,0012 p2A<0,001 p2B<0,001 p2B<0,001	0,412±0,0017 p2A<0,001 p2B<0,001 p2B<0,001
Група порівняння №2А, (n=22)	24±1,0	0,328±0,0014	0,351±0,0014
Група порівняння №2Б, (n=20)	62±1,5	0,322±0,0017	0,364±0,0015
Група порівняння №2В, (n=21)	9±0,6	0,327±0,0016	0,268±0,0014

Примітка\*:

- \* 1. p1A – вірогідність розбіжності середніх показників основної групи №1 з групою порівняння №1А.
- \* 2. p1B – вірогідність розбіжності середніх показників основної групи №1 з групою порівняння №1Б.
- \* 3. p1B – вірогідність розбіжності середніх показників основної групи №1 з групою порівняння №1В.
- \* 4. p2A – вірогідність розбіжності середніх показників основної групи №2 з групою порівняння №2А.
- \* 5. p2B – вірогідність розбіжності середніх показників основної групи №2 з групою порівняння №2Б.
- \* 6. p2B – вірогідність розбіжності середніх показників основної групи №2 з групою порівняння №2В.
- \* 7. Якщо вірогідність у таблиці не вказана, то вона була більшою за 0,05.

**Висновки**

1. Залізодефіцитна анемія вагітних та передчасне дозрівання хоріального дерева як окремо, так і в поєднанні призводить до інтенсифікації проліферативних процесів у трофобласті хоріальних ворсинок плаценти.

2. Поєднання залізодефіцитної анемії вагітних та передчасного дозрівання хоріального дерева призводить до зниження концентрації протиапоптотичного протеїну Bcl-2 у цитоплазмі трофобласта хоріальних ворсинок.

3. Вах-залежний апоптоз у трофобласті хоріальних ворсинок плаценти зростає як при залізодефіцитній анемії вагітних, так і при передчасному дозріванні хоріальних ворсинок плаценти, причому при їхньому поєднанні цей процес є максимально вираженим.

**Перспективи подальших досліджень.** У подальших дослідженнях планується вивчати інші регулятори апоптозу при поєднанні передчасного дозрівання хоріального дерева плаценти та залізодефіцитної анемії вагітних у два різні терміни гестації — 29–32 та 33–36 тижнів гестації.

**Список літератури**

1. Benirschke K, Burton GJ, Baergen RN. Pathology of the human placenta. 2th ed. New York: Springer; 2011. 974 p.
2. Sharp AN, Heazell AE, Crocker IP, Mor G. Placental apoptosis in health and disease. *Am J Reprod Immunol.* 2010; 64(3):159–69. doi:10.1111/j.1600-0897.2010.00837.x
3. Burton GJ, Fowden AL. The placenta: a multifaceted, transient organ. *Philos Trans R Soc Lond Ser B Biol Sci* [Internet]. 2015 [cited 2018 Mar 12]; 370(1663):20140066. Available from: <http://rstb.royalsocietypublishing.org/content/370/1663/20140066doi:10.1098/rstb.2014.0066>
4. Burton GJ, Fowden AL, Thornburg KL. Placental origins of chronic disease. *Physiol Rev.* 2016;96(4):1509–65. doi:10.1152/physrev.00029.2015
5. Cuffe JSM, Holland O, Salomon C, Rice GE, Perkins AV. Review: Placental derived biomarkers of pregnancy disorders. *Placenta.* 2017; 54:104–10. doi:10.1016/j.placenta.2017.01.119
6. Давиденко ІС, Тиуленєва ОА. Удосконалення класифікації хоріальних ворсинок плаценти, її обґрунтування методами інформаційного аналізу та практичне застосування, як досягнення науковців кафедри патоморфології Буковинського державного медичного університету. *Клінічна анатомія та оперативна хірургія.* 2014;13(2):108–13.
7. Ferreira T, Rasband W. ImageJ. User Guide. ImageJ/Fiji 1.46 [Internet]. New York: National Institute of Health;

**Відомості про автора:**

Гарвасюк О. В. — асистент кафедри патологічної анатомії Вищого державного навчального закладу України «Буковинський державний медичний університет», м. Чернівці, Україна.

**Сведения об авторе:**

Гарвасюк А. В. — ассистент кафедры патологической анатомии Высшего государственного учебного заведения Украины «Буковинский государственный медицинский университет», г. Черновцы, Украина.

**Information about the author:**

Olexandra Garvasiuk — assistant of the Department of Pathological Anatomy of the Higher State Educational Institution of Ukraine «Bukovinian State Medical University», Chernivtsy, Ukraine.

ResearcherID: B-3672–2017

ORCID ID: 0000–0002–1936–2015

2012 [cited 2018 Mar 12]. 198 p. Available from: <https://imagej.nih.gov/ij/docs/guide/user-guide.pdf>

8. Hammer Ø. PAST: Paleontological Statistics. Version 3.19. Reference Manual. Oslo: Natural History Museum University of Oslo; 2018. 259 p.
9. Давиденко ІС. Проліферативна активність цитотрофобласта в хоріальних ворсинках при залізодефіцитній анемії вагітних у термін гестації 5–27 тижнів. *Запорізький медичний журнал.* 2006;1:37–40.

**References**

1. Benirschke K, Burton GJ, Baergen RN. Pathology of the Human Placenta. 2th ed. New York: Springer; 2011. 974 p.
2. Sharp AN, Heazell AE, Crocker IP, Mor G. Placental apoptosis in health and disease. *Am J Reprod Immunol.* 2010;64(3):159–69. doi:10.1111/j.1600-0897.2010.00837.x.
3. Burton GJ, Fowden AL. The placenta: a multifaceted, transient organ. *Philos Trans R Soc Lond Ser B Biol Sci.* 2015;370(1663):20140066. Available from: <http://rstb.royalsocietypublishing.org/content/370/1663/20140066doi:10.1098/rstb.2014.0066>
4. Burton GJ, Fowden AL, Thornburg KL. Placental origins of chronic disease. *Physiol Rev.* 2016;96(4):1509–65. doi:10.1152/physrev.00029.2015.
5. Cuffe JSM, Holland O, Salomon C, Rice GE, Perkins AV. Review: Placental derived biomarkers of pregnancy disorders. *Placenta.* 2017;54:104–10. doi:10.1016/j.placenta.2017.01.119
6. Davydenko IS, Tiulienieva OA. Udoskonalennia klasyfikatsii khorial'nykh vorsynok platsenty, yii obruntuvannia metodamy informatsiinoho analizu ta praktychne zastosuvannia, yak dosiahnennia naukovtsiv kafedry patomorfolohii Bukovyn'skoho derzhavnoho medychnoho universytetu [Improvement of classification of placental chorall villi, its substantiation by methods of information analysis and practical application, as achievements of scientists of the department of pathomorphology of Bukovinian State Medical University]. *Klinichna anatomii ta operatyvna khirurgiia.* 2014;13(2):108–13. (in Ukrainian).
7. Ferreira T, Rasband W. ImageJ. User Guide. ImageJ/Fiji 1.46 [Internet]. New York: National Institute of Health; 2012 [cited 2018 Mar 12]. 198 p. Available from: <https://imagej.nih.gov/ij/docs/guide/user-guide.pdf>
8. Hammer Ø. PAST: Paleontological Statistics. Version 3.19. Reference Manual. Oslo: Natural History Museum University of Oslo; 2018. 259 p.
9. Davydenko IS. Proliferatyvna aktyvnist' tsytotrofoblasta v khorial'nykh vorsynkakh pry zalizodefitsynii anemii vahitnykh u termin hestatsii 5–27 tyzhniv [Proliferative activity of cytotrophoblast in chorall villi with iron deficiency anemia in pregnant women during gestation period of 5–27 weeks]. *Zaporiz'kyi medychnyi zhurnal.* 2006;1:37–40. (in Ukrainian).

Надійшла до редакції 20.04.2018  
Рецензент — проф. Слободян О.М.  
© О.В. Гарвасюк, 2018