



препаратах-відбитках і заморожених зрізах. Модифікація не є складною, а при застосуванні її на гістологічних парафінових зрізах навіть значно спрощує виконання всіх процедур у порівнянні з оригінальним прописом Mikel Calvo.

Давиденко І.С.

ТЛУМАЧЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ГІСТОХІМІЧНОЇ МЕТОДИКИ НА «КИСЛІ» ТА «ОСНОВНІ» БІЛКИ ЗА MIKEL CALVO (УЗАГАЛЬНЕННЯ ПОПЕРЕДНІХ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ПЕРСПЕКТИВИ)

Кафедра патологічної анатомії

Вищий державний навчальний заклад України

«Буковинський державний медичний університет»

Опис гістохімічної методики на «кислі» та «основні» білки з бромфеноловим синім за Mikel Calvo (Мікель Кальво) можна знайти в книзі українського видавництва «Кононський А.І. Гістохимия. - Киев: Вища школа, 1976. - 278 с.» Методика виконується або на фіксованих заморожених зрізах, або на парафінових чи целоїдинових зрізах після попередньої фіксації в 10% нейтральному забуференому розчині формаліну чи в рідині Карнуа. Нами розроблена модифікація на «кислі» та «основні» білки за Mikel Calvo, яка придатна для виконання окрім на фіксованих заморожених зрізах, або на парафінових чи целоїдинових зрізах також і на мазках, препаратах-відбитках (нефіксованих чи фіксованих), а також на нефіксованій тканині заморожених зрізів (вироблених у мікротомі-кріостаті).

Сутність методики полягає в тому, що бромфеноловий синій при дотриманні певних процедур фарбування диференційовано забарвлює «кислі» та «основні» білки. Зокрема, «основні» білки забарвлюються в блакитні та сині тони, «кислі» білки – в червоний, жовтий і зелений кольори. Зазначена характеристика забарвлення підходить для візуальної оцінки, а для кількісної оцінки методом комп'ютерної мікроспектрофотометрії найбільш придатне визначення співвідношення між величинами червоного та синього спектрів забарвлення шляхом обрахування коефіцієнту R/B (від англ. "Red" / "Blue").

Згідно до оригінального тлумачення Mikel Calvo (1957), «кислі» білки, це ті білки в яких переважають карбоксильні групи над аміногрупами, а «основні» білки, це ті білки, в яких переважають аміногрупи над карбоксильними групами.

Перше, що слід враховувати при тлумаченні результатів методики Mikel Calvo це те, що в реальних об'єктах тканин білки зустрічаються, як правило, у складі «сумішей». Тому, при виконанні методики Mikel Calvo забарвлення завжди має плавні переходи і за спектральними характеристиками, і за інтенсивністю. Це є підставою для застосування кількісних досліджень.

Зміни в співвідношенні між «кислими» та «основними» білками можуть з'являтися при інтенсифікації процесів окиснювальної модифікації білків. Ці процеси, як відомо, характеризуються окисненням аміногруп амінокислот білків, що призводить до порушення співвідношення між вказаними функціональними групами на користь карбоксильних груп і при застосуванні методики Mikel Calvo буде відзначатися переважанням червоного компонента спектру, що видно буде по зростанню величини коефіцієнту R/B, який в рамках даного тлумачення буде мірою окиснювальної модифікації білків. На користь такого тлумачення нами в попередніх дослідженнях (починаючи з 2003 року) отримано багато доказів, які ґрунтуються як на встановлених фактах зростання інтенсивності вільнорадикальних процесів (особливо цінна інформація була отримана при застосуванні методу хемілюмінесценції з люмінолом на нітропероксидази в конкретних мікроскопічних об'єктах – клінічні дослідження) так і на експериментах, коли в печінці проводили паралельне дослідження окиснювальної модифікації білків біохімічним методом (в гомогенатах печінки). Даний метод добре себе показав в ситуаціях, коли має місце зростання інтенсивності вільнорадикальних процесів – при запаленні, гіпоксії, експериментальних отруєннях (дослідження Давиденко І., Мешішен І., Шендерюк О., Ленга Е., Давиденко О., Дікал М., Іліка В. – 2003-2016).

Однак, до змін у співвідношенні між «кислими» та «основними» білками може призвести не тільки інтенсифікація процесів окиснювальної модифікації білків, але й інші процеси.

Зокрема, такі процеси, як неферментативне та ферментативне глікозування (глікування) протеїнів вже на ранніх етапах спричиняє в першу чергу перетворення аміногруп білків, що призводить, так само як і при окиснювальній модифікації білків, до переважання «кислих» білків над «основними» білками. Це показано як на різному матеріалі клінічних досліджень (Пашковська Н., Давиденко І., Федів О., Оліник О., Сіуїнська І. – 2008-2016), так і особливо переконливо – на матеріалі спеціально планових для цих цілей експериментальних досліджень по стептозотациніндукованому цукровому діабету (Бойчук Т., Гришок М., Давиденко І. – 2013-2016).

Якщо дослідник має справу з матеріалом, коли порушений геном клітини (пухлинні клітини, клітини при тегаурисмозах-протеїнозах), то клітини з порушеним геномом гіпотетично можуть продукувати білки зі змінним співвідношенням між «кислими» та «основними» білками, причому співвідношення може мінятися в будь-який бік, залежно від конкретних особливостей порушень у геномі. Зокрема, такі дослідження проведені на клінічному матеріалі (Пересунько О., Давиденко І., Бозан Адель Бакко, Зелінська П., Мойсюк Т., Лазарук О. – 2009-2016), а для експериментального матеріалу перспектива таких досліджень знаходиться у стадії обговорення (Івашук О., Бодяка В., Давиденко І., Гушул І. – 2016). Щодо тегаурисмозів-протеїнозів, то на даний момент у нас не було можливості отримати придатний для застосування методики клінічний чи експериментальний матеріал.



І нарешті, в останній час з'явився ще один напрямок тлумачення результатів методики Mikel Calvo на «кислі» та «основні» білки. Нами було відмічено, що колагенові волокна при фарбуванні бромфеноловим синім за Mikel Calvo, по-перше, інтенсивно фарбуються, а по-друге, чим більш зрілі колагенові волокна – тим вони візуально більш червоні, отже, характеризуються високими величинами коефіцієнту R/B. Зазначена паралель дозволяє нам припустити, що такі зміни забарвлення колагенових волокон у процесі їх дозрівання вказують на те, що перегин у червоний спектр забарвлення в таких випадках зумовлений не карбоксильними групами, а гідроксильними групами, кількість яких зростає при гідроксилюванні залишків проліну та лізину, на які природно багаті колагенові волокна (колаген).

Давиденко І.С., Майкан А.І.

ІМУНОГІСТОХІМІЧНА КОНЦЕНТРАЦІЯ ВІМЕНТИНУ В ЕНДОТЕЛІЇ АРТЕРІЙ ТА ВЕН СТОВБУРОВИХ ХОРІАЛЬНИХ ВОРСИНОК ПРИ ЗАЛІЗОДЕФІЦИТНІЙ АНЕМІЇ ВАГІТНИХ

Кафедра патологічної анатомії

Вищий державний навчальний заклад України

«Буковинський державний медичний університет»

Досліджено 34 плаценти при залізодефіцитній анемії вагітних та 30 плацент при фізіологічній вагітності. Термін пологів 37-40 тижнів. Неускладнений перебіг пологів.

Матеріал фіксували в 10% забуференому нейтральному розчині формаліну протягом 24 годин, потім зневоднювали у висхідній батареї спиртів та заливали у парафін. На гістологічних зрізах стандартної товщини 5 мкм після депарафінізації виконували імуногістохімічну методику з первинними антитілами проти віментину, візуалізація результатів методики проводилася за допомогою пероксидазної мітки та діамінобензидину. Ядра клітин забарвлювали гематоксилином Грота.

Отримували цифрові копії зображення за допомогою мікроскопа Delta Optical Evolution 100 (планахроматичні об'єктиви) та цифрової камери Olympus SP-550UZ. Цифрові зображення аналізували у спеціалізованій для гістологічних досліджень комп'ютерній програмі ImageJ (1.48v, вільна ліцензія, W.Rasband, National Institute of Health, USA, 2015), зокрема, оцінювали оптичну густину забарвлення (у діапазоні від «0» до «1») на підставі логарифмічних перетворень величини яскравості (у градаціях від «0» до «255»). Оптична густина слугувала мірою імуногістохімічної концентрації віментину. Для оптичної густини обраховували середню арифметичну та її похибку, у вибірках здійснювали перевірку на нормальність розподілу за критерієм Shapiro-Wilk, порівняння між групами дослідження здійснювали за непарним двобічним критерієм Стюдента (комп'ютерна програма PAST 3.06, вільна ліцензія, O.Hammer, 2015). Стовбурові ворсинки ідентифікували за наявністю в них артерій та вен, що відрізняє ці ворсинки від усіх інших хоріальних ворсинок.

При візуальному дослідженні стовбурових хоріальних ворсинок відмічено, що специфічне забарвлення на віментин мало місце як в ендотелії артерій, так і в ендотелії вен. При фізіологічній вагітності оптична густина забарвлення на віментин в ендотелії становила: в артеріях - $0,380 \pm 0,0024$ в.од.опт.густини, у венах - $0,328 \pm 0,0021$ в.од.опт.густини (вірогідність розбіжності між ендотелієм артерій і вен – $P < 0,001$).

При залізодефіцитній анемії вагітних оптична густина забарвлення на віментин в ендотелії становила: в артеріях - $0,287 \pm 0,0029$ в.од.опт.густини, у венах - $0,282 \pm 0,0026$ в.од.опт.густини (вірогідність розбіжності між ендотелієм артерій і вен $P > 0,05$, вірогідність розбіжності з аналогічними показниками при фізіологічній вагітності - $P < 0,001$).

Давиденко І.С., Майкан А.І.

ІМУНОГІСТОХІМІЧНА КОНЦЕНТРАЦІЯ ПЛАЦЕНТАРНОГО ЛАКТОГЕНУ В СТОВБУРОВИХ ХОРИАЛЬНИХ ВОРСИНКАХ ПРИ ЗАЛІЗОДЕФІЦИТНІЙ АНЕМІЇ ВАГІТНИХ

Кафедра патологічної анатомії

Вищий державний навчальний заклад України

«Буковинський державний медичний університет»

Досліджено 34 плаценти при залізодефіцитній анемії вагітних (ЗДАВ) та 30 плацент при фізіологічній вагітності. Термін пологів 37-40 тижнів. Неускладнений перебіг пологів.

Матеріал фіксували в 10% забуференому нейтральному розчині формаліну протягом 24 годин, потім зневоднювали у висхідній батареї спиртів та заливали у парафін. На гістологічних зрізах стандартної товщини 5 мкм після депарафінізації виконували імуногістохімічну методику з первинними антитілами проти гормону плацентарного лактогену, візуалізація результатів методики проводилася за допомогою пероксидазної мітки та діамінобензидину. Ядра клітин забарвлювали гематоксилином Грота.

Отримували цифрові копії зображення за допомогою мікроскопа Delta Optical Evolution 100 (планахроматичні об'єктиви) та цифрової камери Olympus SP-550UZ. Цифрові зображення аналізували у спеціалізованій для гістологічних досліджень комп'ютерній програмі ImageJ (1.48v, вільна ліцензія, W.Rasband, National Institute of Health, USA, 2015), зокрема, оцінювали оптичну густину забарвлення (у діапазоні від «0» до «1») на підставі логарифмічних перетворень величини яскравості (у градаціях від «0» до «255»). Оптична густина слугувала мірою імуногістохімічної концентрації плацентарного лактогену. Для оптичної густини обраховували середню арифметичну та її похибку, у вибірках здійснювали перевірку на нормальність розподілу за критерієм Shapiro-Wilk, порівняння між групами дослідження здійснювали за непарним двобічним критерієм