

І.С.Давиденко

КОМП'ЮТЕРНО-ДЕНСИТОМЕТРИЧНІ ПАРАМЕТРИ БІЛКОВОГО КОМПОНЕНТА МІЖВОРСИНКОВОГО ФІБРИНОЇДУ ПЛАЦЕНТИ ТА ЇХ ЗАЛЕЖНІСТЬ ВІД ЕРИТРОЦИТАРНИХ ПОКАЗНИКІВ МАТЕРИНСЬКОЇ КРОВІ

Кафедра патологічної анатомії та судової медицини (зав. – проф. В.С.Прокопчук)
Буковинської державної медичної академії

Резюме. Методами комп'ютерної денситометрії гістологічних зрізів, бінарного та багатомірного (парціального) кореляційного аналізу вивчено 42 плаценти (19 з еритроцитарною гіпохромією, 23 – без неї) 37-40 тижнів вагітності. Показано, що при еритроцитарній гіпохромії у міжворсинковому фібриноїді знижується концентрація білка, особливо в центральній зоні фібриноїдного тіла. Кількісне дослідження білка різних зон міжворсинкового фібриноїду автор рекомендує для морфологічної оцінки гіпохромного стану у вагітної.

Ключові слова: комп'ютерна денситометрія, білок, міжворсинковий фібриноїд, плацента, еритроцитарна гіпохромія.

Вступ. Плацентарний фібриноїд є невід'ємною структурною особливістю плаценти і формується протягом всього її розвитку [3]. Механізм утворення складного за хімічним складом та поліморфного за структурою міжворсинкового фібриноїду (МФ) до кінця не з'ясовано. Згідно сучасних уявлень МФ докорінно відрізняється від фібриноїду сполучної тканини, який утворюється при імунотоксичних хворобах [2]. МФ походить із декількох джерел: трансформованих залишків десквамованого трофобласта та формених елементів материнської крові, головним чином, тромбоцитів і еритроцитів. Має значення також плазмовий компонент материнської крові (високомолекулярні сполуки: білки, ліпопротеїни, глікопротеїни). Значне місце відводять фібриногену. Оскільки еритроцити серед формених елементів крові кількісно переважають, ми вважали першочерговим вивчити вплив саме цих клітин на стан МФ.

Мета дослідження. Встановити кількісну залежність щільності білкового компонента міжворсинкового фібриноїду зрілої плаценти від деяких еритроцитарних показників крові матері.

Матеріал і методи. Для гістохімічного визначення сумарного білка використана відома методика Бонхега з бромфеноловим синім. Гістохімічна реакція проведена на депарафінованих зрізах 37-40 тижневих плацент (фіксація в нейтральному забуференому формаліні за методом Лілі).

Використана оригінальна методика отримання комп'ютерного зображення гістологічних препаратів для кількісних досліджень [1]. Оптичну передачу зображення здійснювали при довжині світлової хвилі 500-560 нм. Дотримувалися всіх необхідних правил щодо стандартизації при кількісних гістохімічних дослідженнях.

Денситометрію МФ та еритроцитів крові матері проводили за допомогою спеціалізованої комп'ютерної програми, яка забезпечує можливість розрізнити 256 градаций оптичної щільності – від 0-ї (абсолютна прозорість) до 255-ї (абсолютна непрозорість). При 100-разовому збільшенні спочатку визначали середню оптичну щільність фону гістологічного препарату, потім - об'єкта, що тестується. Різниця між цими величинами складала реальну оптичну щільність об'єкта – інтегральний денситометричний показник (ІДП), який визначали в денситометричних одиницях (0-255). Слід зазначити, що ІДП вказує на середню концентрацію речовини, а не на її загальну кількість. У використаній комп'ютерній програмі концентрація розраховується в середньому на 1 піксель (мінімальний елемент комп'ютерного зображення).

У середовищі комп'ютерної програми курсором обрисовували контури зображення фібриноідного тіла. Так позначали фігуру неправильної форми, в межах якої усереднено визначали оптичну щільність МФ. Потім використовували можливість програми задати в процентах зменшення розмірів фігури без зміни її форми (пропорцій). Центр фібриноідного тіла відмічали як 33 % від загальної площі його зрізу. Таким чином, стало можливим визначати оптичну щільність МФ не тільки в цілому, а також у центральній та периферичній зонах роздільно.

У крові вагітних із літкової вени визначали такі гематологічні показники: концентрацію еритроцитів ($10^{12}/л$) та гемоглобіну (г/л), кольоровий індекс, середній вміст гемоглобіну в еритроциті (в пікограмах). Для даних досліджень були відібрані аналізи тільки тих жінок, у яких під час вагітності відмічалися звичайні для цього стану поступові закономірні зміни гематологічних показників без флуктуацій.

Всього обстежено 42 жінки та їх плаценти. Групу з еритроцитарною гіпохромією склали 19 жінок, у яких кольоровий індекс був меншим за 0,86, а середній вміст гемоглобіну на еритроцит меншим 27 пікограм. У 23 жінок наведені показники були вищими, тому вони склали групу без еритроцитарної гіпохромії. Гіперхромних етапів не спостерігали. Всі жінки народили дітей нормальної маси та довжини тіла без істотних функціональних відхилень. У новонароджених від матерів з гіпохромією маса тіла в середньому була нижчою, ніж при нормохромному стані, але ці розбіжності не достовірні.

Цифрові дані оброблені статистично з допомогою стандартних методів обрахунків середньої арифметичної та її похибки. Перевірку на нормальність розподілу у виборці проводили за критеріями Вількі-Хана-Шاپіро та Лїлїєфорса, а також з урахуванням величини асиметрії та ексцесу. Відмінності у середніх тенденціях визначали за критеріями Стьюдента та Вїлкоксона. Кореляційні зв'язки вивчали таким чином. Спочатку підбирали з допомогою спеціалізованої комп'ютерної програми форму кореляційного зв'язку за величинами відповідних коефіцієнтів кореляції (прямо- та криволїнійних рїзних типів) та їх похибок. Найбїльша вїдповїдність була знайдена з прямолїнійними та 4-рївневими полїномїальними залежностями. Оскїльки прямолїнійні залежності мають бїльш чїтке тлумачення і для них краще вїдпрацьованї багатомїрні методи статистики, то саме вони були обранї як основні. Це обґрунтувало використання коефіцієнта кореляції Пірсона та лїнійних парціальних коефіцієнтів кореляції. Коефіцієнти кореляції обраховували при зведеннї обох груп дослідження в одну ($n=42$).

Результати дослідження та їх обговорення. Візуально при проведеній гістохімічній реакції на білок у гістологічних зрізах найбільш інтенсивно профарбувалися плодові еритроцити та еритроцити міжворсинкового простору, менш інтенсивно – фібриноїд, ще слабше – синцитій та волокнистий каркас строми хорїальних ворсин (рис. 1, фрагмент А). Основна речовина строми фарбувалася найбільш нїжно .

Середні цифри інтегральних денситометричних показників представлені в таблиці 1. З табличних даних видно, що ІДП білка еритроцитів міжворсинкового простору у жінок з еритроцитарною гіпохромією був значно нижчим, нїж при вїдсутності даної ознаки. Слїд зазначити, що коефіцієнт кореляції Пірсона мїж ІДП білка еритроцитів мїжворсинкового простору та середнїм вмістом гемоглобіну в еритроцитї кровї ваґїтної був дуже високим і склав +0,994 ($p<0,001$). Для порівняння зауважимо, що в наших дослідженнях еритроцитів материнської кровї коефіцієнт кореляції Пірсона склав: мїж концентрацією еритроцитів та концентрацією гемоглобіну – +0,906, мїж концентрацією еритроцитів та кольоровим індексом – +0,634, мїж кольоровим індексом та концентрацією гемоглобіну – +0,684 (в усїх випадках $p<0,001$).

МФ виглядав як окремі або зв'язані з синцитїєм тіла рїзної форми та величини, причому вони мали неоднорїдну інтенсивність забарвлення (рис. 1, фрагмент Б). Інколи в масах МФ можна було побачити еритроцити (рис. 1, фрагмент В). Візуально, незалежно вїд еритроцитарної гіпохромїї, бїльш інтенсивним забарвлення було по периферїї фібриноїдних тїл і вїдповїдно слабкїше – в їх центрах (рис. 1, фрагмент Г). Це пїдтвердили і кїлькїсні данї денситометричного

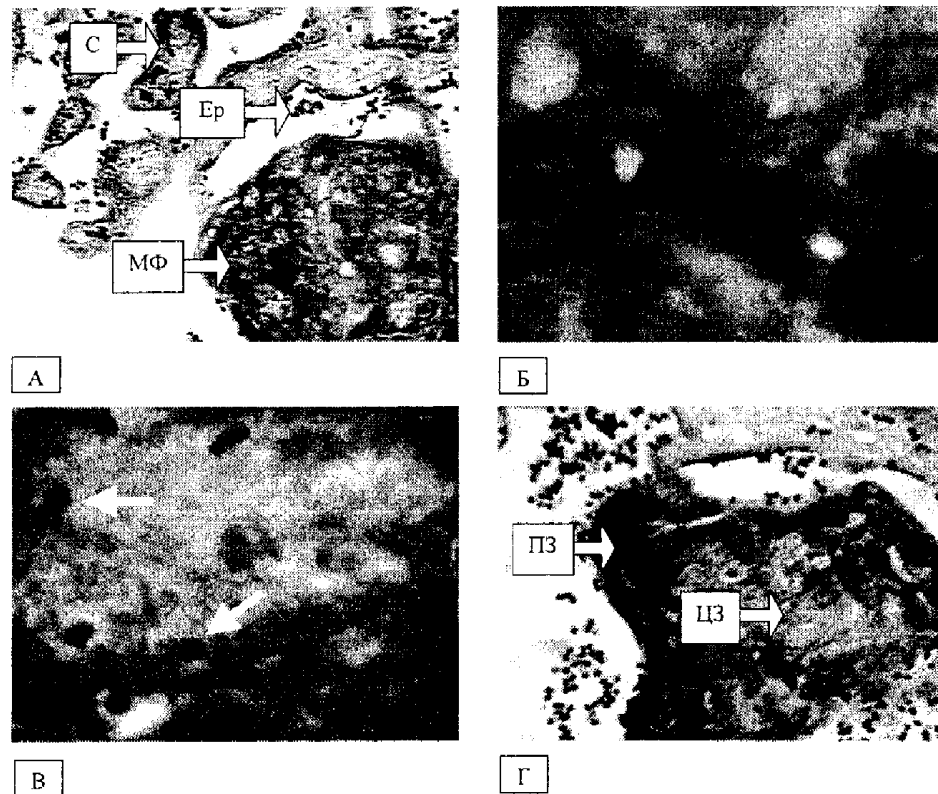


Рис.1. Гістологічні зрізи зрілих плацент. Гістохімічна реакція на білок з бромфеноловим синім за Бонхегом.

- А) 39 тижнів вагітності. С – синцитій, Ер – материнські еритроцити міжворсинкового простору, МФ – міжворсинковий фібриноід. Збільшено у 100 разів.
- Б) 40 тижнів вагітності. Маса фібриноїду з різною концентрацією білка. Збільшено у 900 разів.
- В) 40 тижнів вагітності. Стрілками позначені еритроцити серед мас фібриноїду. Збільшено у 900 разів.
- Г) 38 тижнів вагітності. ПЗ – периферична зона міжворсинкового фібриноїду. ЦЗ – центральна зона міжворсинкового фібриноїду. Збільшено в 160 разів.

аналізу (табл.). Денситометричний аналіз в той же час показав, що ІДП білка МФ як у середньому, так і по зонах був значно нижчим при еритроцитарній гіпохромії. З метою в'ясування, чи міняється при цьому кількісне співвідношення вмісту білка між центральною та периферичною зонами фібриноїдних тіл, нами введено новий показник – відношення між ІДП білка периферичної та центральної зони фібриноїдного тіла (індекс П/Ц). Дані таблиці 1 вказують на те, що при еритроцитарній гіпохромії співвідношення між вмістом білка в зонах фібриноїдного тіла сильно змінюється, а також свідчать, що зниження концентрації білка в центральній зоні є більш значним, ніж у периферичній.

Для встановлення кількісних взаємозв'язків між показниками крові матері та білковим компонентом фібриноїду проведено кореляційний аналіз, який показав значну силу та достовірність зв'язків, що вивчаються. Так, коефіцієнт кореляції Пірсона для ІДП білка еритроцитів міжворсинкового простору склав: з ІДП білка МФ в цілому – +0,964, з ІДП білка МФ центральної зони фібриноїдного тіла – +0,981, з ІДП білка МФ периферичної зони фібриноїдного тіла – +0,908, з індексом П/Ц – -0,998 (в усіх випадках $p < 0,001$). Останній коефіцієнт кореляції має негативний знак, який означає, що більшій концентрації білка еритроцитів міжворсинкового простору відповідає менша величина індексу П/Ц.

Еритроцитарні показники материнської крові та комп'ютерно-денситометричні параметри білкового компонента міжворсинкового фібриноїду плаценти (M±m)

№ п/п	Показники	Групи дослідження	
		Без еритроцитарної гіпохромії (n=23)	З еритроцитарною гіпохромією (n=19)
	Концентрація еритроцитів у крові вагітної ($10^{12}/л$)	3,78±0,06	3,51±0,05 *
	Концентрація гемоглобіну у крові вагітної (г/л)	114,6±2,4	92,6±1,5 *
	Кольоровий індекс крові вагітної	0,88±0,003	0,81±0,003 *
	Середній вміст гемоглобіну в еритроциті (пікограми) крові вагітної	31,2±1,2	26,0±0,8 *
	ІДП білка еритроцитів міжворсинкового простору (денситометричні одиниці 0-255)	174,1±2,4	122,3±1,8 *
	ІДП білка міжворсинкового фібриноїдного тіла (денситометричні одиниці 0-255)	117,8±1,2	89,7±1,5 *
	ІДП білка центральної зони міжворсинкового фібриноїдного тіла (денситометричні одиниці 0-255)	105,4±4,9 #	71,5±3,9 * #
	ІДП білка периферичної зони міжворсинкового фібриноїдного тіла (денситометричні одиниці 0-255)	129,8±2,3 #	108,0±2,1 * #
	Відношення між ІДП білка периферичної та центральної зони міжворсинкового фібриноїдного тіла (індекс П/Ц)	1,23±0,04	1,51±0,06 *

Примітка: * - різниця між групами по показнику достовірна ($P < 0,01$) за двохстороннім критерієм Ст'юдента. # - в межах групи різниця між ІДП білка центральної та периферичної зони міжворсинкового фібриноїдного тіла достовірна ($P < 0,01$).

Слід відмітити, що індекс П/Ц мав негативні кореляційні зв'язки і з ІДП білка міжворсинкового фібриноїду: з ІДП білка МФ в цілому – -0,971, з ІДП білка МФ центральної зони фібриноїдного тіла – -0,986, з ІДП білка МФ периферичної зони фібриноїдного тіла – -0,919 (в усіх випадках $p < 0,001$). У знаках та величинах наведених коефіцієнтів кореляції протиріч немає. Пояснення полягає у тому, що зниження концентрації білка в периферичній зоні фібриноїдного тіла супроводжується ще більшим відносним зменшенням концентрації білка в центральній зоні.

Вивчаючи кореляційні зв'язки з допомогою коефіцієнта кореляції Пірсона потрібно мати на увазі, що величина конкретного коефіцієнта насправді не вказує на сепарований зв'язок змін двох показників. На величину коефіцієнта кореляції Пірсона чинить вплив вся глобальна система існуючих у даний момент зв'язків та впливів як відомих, так і невідомих досліднику. Тому в статистиці для більш

детального вивчення кореляційних зв'язків існує особливий метод моделювання, який дозволяє в багатомірних сукупностях (зв'язок між декількома показниками) математичним шляхом стабілізувати один або декілька показників, серед тих, що аналізуються. Іншими словами, математично виключають вплив одного з факторів. У результаті отримують парціальний коефіцієнт кореляції між парою показників. Далі можна порівняти величини коефіцієнта кореляції Пірсона та парціального коефіцієнта кореляції. Якщо ці коефіцієнти мають дуже близькі величини, то можна дійти висновку, що показник (фактор), який стабілізують, не впливає на взаємозв'язок, що вивчається. Якщо ж величини відповідних коефіцієнтів різняться, це означає, що вплив на взаємозв'язок є. Силу впливу можна оцінити через різницю коефіцієнтів детермінації у відсотках, а те чи він посилює, чи послаблює взаємозв'язок, можна визначити по тому – меншим чи більшим є коефіцієнт парціальної кореляції, ніж відповідний коефіцієнт кореляції Пірсона.

У даному дослідженні математично змодельовано наступну ситуацію. Було допущено, що еритроцити міжворсинкового простору у всіх плацентах мали однакову величину ІДП білка. На моделі з'ясувалося, що парціальні коефіцієнти кореляції між індексом П/Ц та ІДП білка МФ хоча і мали негативний знак (так само як і відповідні коефіцієнти кореляції Пірсона), але величина їх була значно меншою. Вона склала для ІДП білка МФ в цілому – $-0,500$ ($p=0,001$), ІДП білка МФ центральної зони фібриноїдного тіла – $-0,494$ ($p=0,001$), ІДП білка МФ периферичної зони фібриноїдного тіла – $-0,455$ ($p=0,003$). Різниця коефіцієнтів детермінації становила відповідно: 69,3%, 72,8%, 78,9% ($p<0,01$). Наведені парціальні коефіцієнти кореляції вказують на те, що і без впливу концентрації білка материнських еритроцитів міжворсинкового простору між зазначеними показниками є зв'язок помірної сили. Однак великі значення різниці коефіцієнтів детермінації свідчать про те, що концентрація білка еритроцитів на коливання концентрації білка в МФ як в цілому, так і в різних зонах фібриноїдного тіла є домінуючою серед інших факторів.

Висновки

1. Існує високий корелятивний зв'язок між середнім вмістом гемоглобіну на еритроцит крові вагітної та концентрацією білка еритроцитів міжворсинкового простору в гістологічних зрізах.

2. Чим більша концентрація білка в еритроцитах міжворсинкового простору (материнські еритроцити), тим більша вона в міжворсинковому фібриноїді, причому це стосується як центральної, так і периферичної зони фібриноїдного тіла. Концентрація білка в периферичній зоні фібриноїдного тіла міжворсинкового фібриноїду в середньому вища, ніж у центральній зоні. Концентрація білка в еритроцитах материнської крові найбільше впливає на співвідношення між концентрацією білка в периферичній та центральній зонах фібриноїдного тіла.

3. При еритроцитарній гіпохромії у міжворсинковому фібриноїді виникають характерні зміни, які полягають у зниженні концентрації білка, причому особливо в центральній зоні фібриноїдного тіла. Даний факт може бути використаний для морфологічного підтвердження характеру анемії у вагітної.

Література 1. Давиденко І.С. Папівавтоматичний кількісний комп'ютерний аналіз мікроскопічного зображення в гістопатології // Буковинський медичний вісник.- 2000, №2.- С. 165-169.
2. Милованов А.П. Патология системы мать-плацента-плод: Руководство для врачей.- М. Медицина, 1999.- 448 с. 3. Benirschke K., Kaufmann P. Pathology of the Human Placenta.- 3rd ed.- New York: Springer-Verlag, 1995.- 720 p.

**COMPUTER-DENSITOMETRIC PARAMETERS OF THE PROTEIN COMPONENT OF
THE INTERVILLOUS FIBRINOID OF THE PLACENTA AND THEIR DEPENDENCE ON
THE ERYTHROCYTES OF THE MATERNAL BLOOD**

I.S.Davydenko

Abstract. The author used computer densitometry of histologic slides, the binary and multi-dimensional partial correlation analysis for the purpose of studying. 42 patients (19 with the erythrocytic hypochromia, 23 without it) the duration of pregnancy ranging from 37 to 40 weeks. It was demonstrated that with erythrocytic hypochromia there occurred specific quantitative changes in an intervillous fibrinoid and a decrease of the protein concentration. The decrease is especially marked in the central zone of the fibrinoid body. The author suggests a quantitative study of the intervillous fibrinoid protein for the purpose of a morphologic assessment of a gravida's hypochromic state.

Key words: computer densitometry, protein, intervillous fibrinoid, placenta, erythrocyte hypochromia.

Bukovinian State Medical Academy (Chernivtsi)

Надійшла до редакції 9.06.2000 року