

УДК 611-013.85:618.39-021.3

**В.В. Іліка,****І.С. Давиденко,****О.М. Давиденко**

Вищий державний навчальний заклад  
України "Буковинський державний  
медичний університет", м. Чернівці

**Ключові слова:** окиснювальна  
модифікація білків, запалення  
посліду, залізодефіцитна анемія  
вагітних, ендотеліоцити.

## ГІСТОХІМІЧНА ОЦІНКА ПРОЦЕСІВ ОКИСНЮВАЛЬНОЇ МОДИФІКАЦІЇ БІЛКІВ В ЕНДОТЕЛІОЦИТАХ КРОВОНОСНИХ СУДИН БАЗАЛЬНОЇ ПЛАСТИНКИ ПЛАЦЕНТИ ПРИ ПОЄДАННІ ЗАПАЛЕННЯ ПОСЛІДУ ТА ЗАЛІЗОДЕФІЦИТНОЇ АНЕМІЇ ВАГІТНИХ

**Резюме.** На підставі проведених досліджень з використанням гістохімічної реакції з бромфеноловим синім на "кислі" та "основні" білки за Mikel Calvo встановлено, що при залізодефіцитній анемії вагітних, коли немає запалення в посліді, відмічається помірне зростання інтенсивності окиснювальної модифікації білків. Усі форми запалення посліду характеризуються суттєвим зростанням інтенсивності окиснювальної модифікації білків, однак фонова залізодефіцитна анемія вагітних при різних формах запалення посліду суттєво не впливає на перебіг процесів окиснювальної модифікації білків за винятком хронічної форми базального децидуїту.

### Вступ

Ендотеліоцити кровоносних судин базальної пластинки плаценти при гістологічному дослідженні виявляють у спіральних артеріях, венах, венулах і капілярах [4, 8]. Стан ендотеліоцитів може суттєво змінюватися при запаленні посліду, що ефективно можна визначити, наприклад, імуногістохімічним методом [3, 5]. Процеси окиснювальної модифікації білків в ендотеліоцитах кровоносних судин базальної пластинки плаценти при запаленні не вивчені, хоча такі дослідження є задалегідь перспективними. Інтерес до процесів окиснювальної модифікації білків (ОМБ) при запаленні пов'язаний із тим, що при запальних реакціях, як правило, підвищується рівень вільних радикалів кисню, які, окиснюючи аміногрупи білків, змінюють властивості цих макромолекул. Це стосується і білків-ферментів, і структурних протеїнів, і рецепторних білків, сигнальних молекул тощо. Інтерес до ОМБ при залізодефіцитній анемії вагітних (ЗДАВ) пов'язаний із тим, що анемічний стан здебільшого супроводжується інтенсифікацією вільнорадикальних процесів у крові та тканинах, а залізодефіцит додатково здатний модифікувати ці процеси, причому наперед точно передбачити, які саме розвиватимуться ефекти, дуже складно.

Сутність ОМБ полягає в тому, що окиснення аміногруп білків призводить до зміни співвідношення між аміно- та карбоксильними групами в них. Це співвідношення можна оцінити не тільки біохімічним методом, але й за допомогою гістохімічної методики на "кислі" та "основні" білки з

бромфеноловим синім за Mikel Calvo, при якій білки забарвлюються в різні кольори, залежно від їхніх властивостей за співвідношенням аміно- та карбоксильних груп [1]. Для прикладу: при явному переважанні аміногруп у білках вони фарбуються в синій колір, а при явному переважанні карбоксильних груп - у червоний. На практиці завжди має місце комбіноване забарвлення з причини присутності в тканинах "суміші" білків, що спонукає застосувати не тільки візуальну, але і кількісну оцінку ступеня ОМБ. Методологічно це здійснюється мікроспектрофотометричним методом на цифрових зображеннях гістологічних зрізів, пофарбованих бромфеноловим синім за Mikel Calvo.

### Мета дослідження

Гістохімічним методом у поєднанні з кількісною оцінкою результатів фарбування засобами комп'ютерної мікроспектрофотометрії встановити особливості окиснювальної модифікації білків в ендотеліоцитах кровоносних судин базальної пластинки плаценти при залізодефіцитній анемії вагітних залежно від форми запалення посліду.

### Матеріал і методи

Вивчалися процеси ОМБ в ендотеліоцитах кровоносних судин базальної пластинки плаценти при гострих і хронічних формах базального децидуїту та хоріонамніоніту. Усього досліджено 198 плацент, у тому числі з метою порівняння вивчені плаценти при фізіологічній вагітності та спостере-

ження ЗДАВ без запалення посліду. Кількість спостережень у конкретних групах дослідження представлені в таблицях 1 та 2.

Матеріал фіксували в 10% водному нейтральному розчині формаліну 24 години, після чого проводили спиртову дегідратацію та заливку в парафін за стандартною процедурою. На серійних гістологічних зрізах 5 мкм завтовшки ставили гістохімічну реакцію з бромфеноловим синім на "кислі" та "основні" білки з бромфеноловим синім за Mikel Calvo, дотримуючись усіх процедур стандартизації [1].

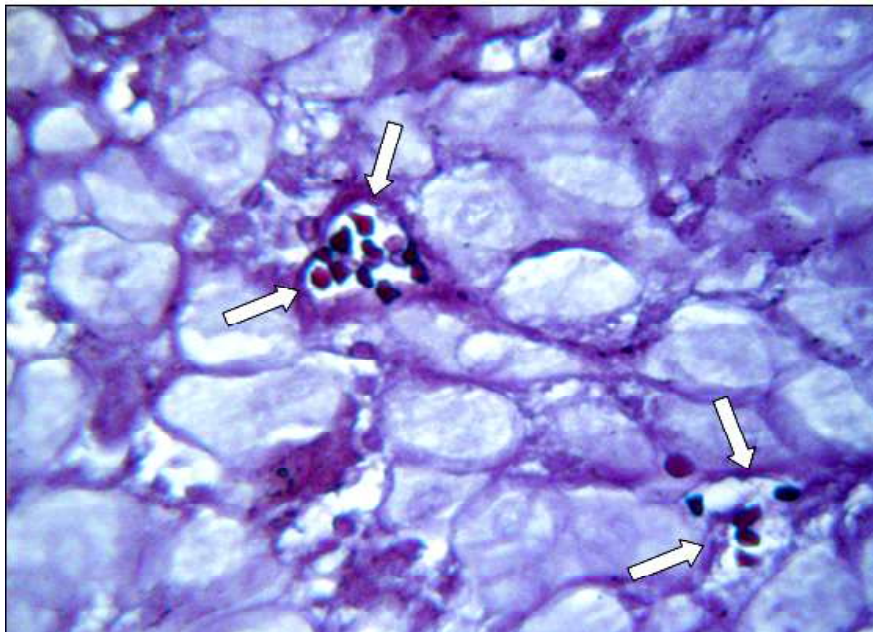
Отримували цифрові копії зображення за допомогою мікроскопа Delta Optical Evolution 100 (планахроматичні об'єктиви) та цифрової камери Olympus SP-550UZ. У середовищі комп'ютерної програми ImageJ (1.48, W.Rasband, National Institutes of Health, USA) у системі оцінки кольору RGB визначали коефіцієнт R/B за алгоритмом [2]. Коефіцієнт R/B служив показником співвідношення між аміно- та карбоксильними групами в білках конкретної локалізації, тобто - був мірою

для ОМБ.

Для коефіцієнта R/B обраховували середню арифметичну та її похибку, розбіжності у середніх тенденціях перевіряли за допомогою непарного критерію Стьюдента після позитивної перевірки вибірки на нормальність розподілу в ній за критерієм Shapiro-Wilk (комп'ютерна програма PAST 3.14, вільна ліцензія, O.Hammer, 2016) [7].

### Обговорення результатів дослідження

Морфологічний опис будови ендотеліоцитів при застосуванні методики з бромфеноловим синім за Mikel Calvo раніше не виконувався. Слід відзначити, що при візуальній оцінці гістохімічних препаратів, які пофарбовано за Mikel Calvo, нами встановлено, що ендотеліоцити доволі чітко профарбовуються, добре розпізнаються завдяки характерній локалізації, тобто придатні для кількісного дослідження (рис). Цитоплазма ендотеліоцитів при методиці Mikel Calvo профарбовується переважно дифузно, хоч іноді можна спостерігати окремі більш темні гранулярні утворен-



ня. Ядра ендотеліоцитів при методиці Mikel Calvo не візуалізуються - зображення ядра клітини зливається з цитоплазмою. Це відрізняє ендотеліоцит від багатьох інших видів клітин. У зв'язку з цим співвідношення "кислих" та "основних" білків в ендотеліоциті гістохімічно не можна вивчити диференційовано для цитоплазми і клітинного ядра, тобто: тільки разом, загально. Іншою особливістю фарбування гістохімічних препаратів при застосуванні методики Mikel Calvo є те, що межа між ендотеліоцитами і базальною мембраною або зовсім не визначається, або визначається нечітко. З цієї причини для забезпечення отримання даних, а саме стосовно ендотеліоцитів, при виконанні зондових замірів слід зробити певний допуск, щоб тестовий зонд не містив даних щодо базальної мембрани, а містив тільки дані, що стосуються ендотеліоциту. Усі вимірювання, які наводяться в цій статті, зроблені відповідно до вищеприписаних установлених нами особливостей фарбування ендотеліоцитів при застосуванні методики Mikel Calvo.

Усереднені дані щодо коефіцієнта R/B в ендотеліоцитах кровоносних судин базальної пластинки плаценти при фізіологічній вагітності та при ЗДАВ наведені у таблиці 1. З наведених даних

Таблиця 1

**Коефіцієнт R/V в ендотеліоцитах кровоносних судин базальної пластинки плаценти (гістохімічна методика на "кислі" та "основні" білки з бромфеноловим синім за Mikel Calvo) при фізіологічній вагітності та залізодефіцитній анемії вагітних (M± m)**

Структури базальної пластинки	Групи дослідження	
	Спостереження фізіологічної вагітності (n=20)	Спостереження залізодефіцитної анемії вагітних без запалення посліду (n=21)
Ендотеліоцити кровоносних судин базальної пластинки	1,05±0,012	1,12±0,009 P=0,003

видно, що при фізіологічній вагітності коефіцієнт R/V у середньому є лише трохи вищим за одиницю, тобто співвідношення між "кислими" та "основними" білками в ендотеліоцитах в нормі приблизно рівне. Разом з тим із даних про величину коефіцієнту R/V в ендотеліоцитах при ЗДАВ змінюється співвідношення між "кислими" та "основними" білками у бік "кислих" білків, що необхідно визначити як зростання інтенсивності ОМБ. Це зростання, з огляду на фактичну різницю між

середніми арифметичними у вибірках, слід оцінити як помірне.

Середні дані про коефіцієнт R/V в ендотеліоцитах кровоносних судин базальної пластинки плаценти при різних формах запалення посліду наведені в таблиці 2.

З наведених даних видно, що при всіх вивчених формах запалення посліду коефіцієнт R/V у середньому суттєво зростає (P<0,05). Найбільше зростання коефіцієнту R/V відзначено при гострій

Таблиця 2

**Коефіцієнт R/V в ендотеліоцитах кровоносних судин базальної пластинки плаценти (гістохімічна методика на "кислі" та "основні" білки з бромфеноловим синім за Mikel Calvo) при поєднанні різних форм запалення посліду та залізодефіцитної анемії вагітних (M± m)**

Групи дослідження	Спостереження запалення посліду при вагітності без анемії	Спостереження запалення посліду при залізодефіцитній анемії вагітних
Базальний децидуїт гострий	1,84±0,026 (n=16)	1,88±0,029 (n=15) P>0,05
Базальний децидуїт хронічний	1,29±0,019 (n=21)	1,46±0,022 (n=20) P=0,002
Хоріонамніоніт гострий	1,39±0,024 (n=23)	1,41±0,026 (n=21) P>0,05
Хоріонамніоніт хронічний	1,40±0,024 (n=20)	1,38±0,027 (n=21) P>0,05

формі базального децидуїту.

Слід зауважити, що поєднання запалення посліду при ЗДАВ дало статистично значуще підвищення коефіцієнта R/V порівняно з запалення посліду без анемії лише для спостережень хронічної форми базального децидуїту. Тобто фонова ЗДАВ при різних формах запалення посліду суттєво не впливає на перебіг процесів ОМБ за винятком хронічної форми базального децидуїту.

### Висновки

1. При залізодефіцитній анемії вагітних, якщо немає запалення в посліді, відмічається помірне зростання інтенсивності окиснювальної модифікації білків.

2. Усі форми запалення посліду характеризуються суттєвим зростанням інтенсивності окиснювальної модифікації білків, однак фонова залізодефіцитна анемія вагітних при різних формах

запалення посліду суттєво не впливає на перебіг процесів окиснювальної модифікації білків за вияткою хронічної форми базального децидуїту.

### Перспективи подальших досліджень

У подальшому, при запаленні посліду, було б перспективно вивчити інші морфологічні прояви ендотеліальної дисфункції, у першу чергу із застосуванням методів імуногістохімії.

**Література.** 1. Давиденко І. С. Заходи стандартизації гістохімічної методики на окиснювальну модифікацію білків / І. С. Давиденко // Укр. мед. альманах. - 2013. - № 3 (додаток). - С. 180-181. 2. Давиденко І. С. Алгоритм одержання показника "R/B" (для вимірювання окиснювальної модифікації білків по гістохімічним та цитохімічним препаратам) за допомогою комп'ютерної програми ImageJ (W. Rasband, National Institute of Health, USA, 2015) / І. С. Давиденко, О. М. Давиденко // Materials of the XII International Scientific and Practical Conference "Science and Civilization - 2016" (30 January - 07 February 2016). - Vol. 15. - Medicine. Biological sciences. Chemistry and chemical technology. - Sheffield: Science and Education LTD, - 2016. - P.47-49. 3. Цинзерлинг В. А. Перинатальные инфекции (Вопросы патогенеза, морфологической диагностики и клинко-морфологических сопоставлений) : Практическое руководство / В. А. Цинзерлинг, В. Ф. Мельникова. - СПб. : Элби СПб, 2002. - 352 с. 4. Benirschke K. Pathology of the human placenta : 6th ed. / K. Benirschke, G. J. Burton, R. N. Baergen - New York : Springer, 2012. - 974 p. 5. Altered placental oxidative stress status in gestational diabetes mellitus / M. T. Coughlan, P. P. Vervaart, M. Permezel [et. al] // Placenta. - 2004. - Vol. 25. - P. 78-84. 6. Ferreira T. ImageJ . User Guide / T. Ferreira, W. Rasband. - New York : National Institute of Health, 2012. - 187 p. 7. Hammer O. PAST: Paleontological Statistics, Version 3.14. Reference manual / O. Hammer. - Oslo: Natural History Museum University of Oslo, 2016. - 243 p. 8. Pijnenborg R. Placental Bed Disorders / R. Pijnenborg, I. Brosens, R. Romero. - Cambridge: Cambridge University Press, 2010. - 301 p.

### ГИСТОХИМИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА ПРОЦЕССОВ ОКИСЛИТЕЛЬНОЙ МОДИФИКАЦИИ БЕЛКОВ В ЭНДОТЕЛИОЦИТАХ БАЗАЛЬНОЙ ПЛАСТИНКИ ПЛАЦЕНТЫ В СОЧЕТАНИИ ВОСПАЛЕНИЯ ПЛАЦЕНТЫ И ЖЕЛЕЗОДЕФИЦИТНОЙ АНЕМИИ БЕРЕМЕННЫХ

*В. В. Илика, И. С. Давыденко, О. Н. Давыденко*

**Резюме.** На основании проведенных исследований с

использованием гистохимической реакции с бромфеноловый синим на "кислые" и "основные" белки по Mikel Calvo установлено, что при железодефицитной анемии беременных, когда нет воспаления в плаценте, отмечается умеренный рост интенсивности окислительной модификации белков. Все формы воспаления плаценты характеризуются существенным ростом интенсивности окислительной модификации белков, однако фоновая железодефицитная анемия беременных при различных формах воспаления плаценты существенно не влияет на ход процессов окислительной модификации белков, за исключением хронической формы базального децидуита.

**Ключевые слова:** окислительная модификация белков, воспаление плаценты, железодефицитная анемия беременных, эндотелиоциты.

### HISTOCHEMICAL EVALUATION OF THE PROCESSES OF PROTEIN OXIDATIVE MODIFICATION IN THE ENDOTHELIOCYTES OF BASAL LAMINA IN PLACENTA COMBINED WITH THE INFLAMMATION IN THE SECUNDINES AND IRON-DEFICIENCY ANEMIA IN GRAVIDAS

*V.V. Ilika, I.S. Davydenko, O.M. Davydenko*

**Abstract.** On the basis of the carried out investigation using histochemical reactions with Bromophenol Blue on "acidic" and "basic" proteins according to Mikel Calvo it has been established that a moderate increase in the intensity of protein oxidative modifications is marked in gravidas with iron-deficiency anemia, without inflammation in the secundines. All forms of inflammatory changes in the secundines are characterized by a considerable growth in the intensity of protein oxidative modifications. However, background iron-deficiency anemia in gravidas with various forms of the inflammation in the secundines does not significantly affect the progress of protein oxidative modifications with the exception of chronic forms of basal decidualitis.

**Keywords:** protein oxidative modification, inflammation in the secundines, iron-deficiency anemia in gravidas, endotheliocytes.

**Higher State Educational Establishment of Ukraine "Bukovinian State Medical University" (Chernivtsi)**

*Clin. and experim. pathol.* - 2016. - Vol. 15, №4 (58). - P.54-57.

*Надійшла до редакції 1.12.2016*

*Рецензент – проф. Р.Є. Булик*

© В.В. Илика, І.С. Давыденко, О.М. Давыденко, 2016