

ІМУНОГІСТОХІМІЧНЕ ДОСЛІДЖЕННЯ ДЕЯКИХ РЕГУЛЯТОРІВ АПОПТОЗУ В ТРОФОБЛАСТІ ХОРІАЛЬНИХ ВОРСИНОК ПРИ КАЛЬЦИНОЗІ ПЛАЦЕНТИ В ЖІНОК ІЗ ЗАЛІЗОДЕФІЦИТНОЮ АНЕМІЄЮ ВАГІТНИХ

А.І. Попович, І.С. Давиденко

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

Ключові слова:

кальциноз плаценти, залізодофіцитна анемія вагітних, апоптоз, протеїн Вах, протеїн Vcl-2.

Буковинський медичний вісник. Т.22, № 3 (87). С. 72-77.

DOI:

10.24061/2413-0737.XXII.3.87.2018.66

E-mail: andriy_porovych@bsmu.edu.ua

Мета дослідження — встановити кількісні параметри імуногістохімічного забарвлення на проапоптотичний білок Вах та протиапоптотичний білок Vcl-2 у трофобласті плацент з кальцинозом у жінок із залізодофіцитною анемією вагітних.

Матеріал і методи. Досліджено 164 плаценти з кальцинозом, при цьому діагноз ЗДАВ (I-II ступінь тяжкості) виставлено у 84 вагітних, решта спостережень кальцинозу плаценти 80 була без анемії. Окрім того, досліджено 30 плацент фізіологічної вагітності. Для постановки імуногістохімічної методики застосовували первинні антитіла проти проапоптотичного білка Вах та протиапоптотичного білка Vcl-2 (ДАКО).

Результати дослідження. При врахуванні можливості вертикального гетероморфізму щодо розподілу інтенсивності імуногістохімічного забарвлення на протеїн Вах виявлено, що оптична густина забарвлення в середньому є найменшою в зоні А, а найбільшою — у зоні С, причому слід вказати на те, що такий гетероморфізм відзначався в усіх групах дослідження. Вивчення вертикального гетероморфізму щодо розподілу інтенсивності протиапоптотичного білка Vcl-2 з'ясовано, що оптична густина забарвлення в середньому є найбільшою в зоні А, а найменшою — у зоні С, це відзначалося в усіх групах дослідження з кальцинозом, а для фізіологічної вагітності виявлені відмінності зони С від зон А та В.

Висновок. Кальциноз плаценти при залізодофіцитній анемії вагітних порівнянно зі спостереженнями без анемії характеризується більшими середніми значеннями оптичної густини забарвлення на протеїн Вах та меншими середніми значеннями оптичної густини забарвлення на протиапоптотичний білок Vcl-2 у трофобласті у всіх зонах плаценти (А, В, С).

Ключевые слова:

кальциноз плаценты, железодофицитная анемия беременных, апоптоз, протеин Вах, протеин Vcl-2.

Буковинский медицинский вестник. Т.22, № 3 (87). С. 72-77.

ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ НЕКОТОРЫХ РЕГУЛЯТОРОВ АПОПТОЗА В ТРОФОБЛАСТЕ ХОРИАЛЬНЫХ ВОРСИНОК ПРИ КАЛЬЦИНОЗЕ ПЛАЦЕНТЫ У ЖЕНЩИН С ЖЕЛЕЗОДЕФИЦИТНОЙ АНЕМИЕЙ БЕРЕМЕННЫХ

А.И. Попович, И.С. Давыденко

Цель исследования — установить количественные параметры иммуногистохимического окрашивания на проапоптотический белок Вах и протиапоптотический белок Vcl-2 в трофобласте плацент с кальцинозом у женщин с железодофицитной анемией беременных.

Материал и методы. Исследовано 164 плаценты с кальцинозом, при этом диагноз железодофицитная анемия беременных (I-II степень тяжести) выставлен 84 беременным, остальные наблюдения кальциноза плаценты 80 были без анемии. Кроме того, исследованы 30 плацент

физиологической беременности. Для постановки иммуногистохимической методики применяли первичные антитела против проапоптотического белка Bax и антиапоптотического белка Bcl-2 (dako).

Результаты исследования. При учете возможности вертикального гетероморфизма по распределению интенсивности иммуногистохимического окрашивания протеином Bax выявлено, что оптическая плотность окрашивания в среднем является наименьшей в зоне А, а наибольшей — в зоне С, причем следует указать на то, что гетероморфизм отмечался во всех группах исследования. При изучении вертикального гетероморфизма по распределению интенсивности окрашивания на антиапоптотический белок Bcl-2 установлено, что оптическая плотность окрашивания в среднем является наибольшей в зоне А, а наименьшей — в зоне С, это отмечалось во всех группах исследования с кальцинозом, а для физиологической беременности выявлены различия зоны С от зон А и В.

Вывод. Кальциноз плаценты при железодефицитной анемии беременных по сравнению с наблюдениями без анемии характеризуется возрастанием средних значений оптической плотности окрашивания протеином Bax и уменьшении средних значений оптической плотности окрашивания на антиапоптотический белок Bcl-2 в трофобласте во всех зонах плаценты (А, В, С).

Keywords: placenta calcinosis, iron deficiency anemia in pregnancy, apoptosis, Bax protein, Bcl-2 protein.

Bukovinian Medical Herald. V.22, № 3 (87). P. 72-77.

IMMUNOGISTOCHEMICAL STUDY OF SEVERAL APOPTOSIS REGULATORS IN THE TROPHOBLAST OF HORIAL VILLI IN CALCINOSIS OF PLACENTA IN WOMEN WITH IRON DEFICIENCY ANEMIA IN PREGNANCY

A.I. Popovych, I.S. Davydenko

Objective. To evaluate quantitative parameters of immunohistochemical staining on the proapoptotic protein Bax and the antiapoptotic protein Bcl-2 in the trophoblast of placenta with calcinosis in women with iron deficiency anemia in pregnancy.

Material and methods. 164 placentas with calcinosis were studied, while the diagnosis of IDAP (I–II severity level) was established in 84 pregnant women, the rest 80 of the placenta's calcinosis observations were without anemia. In addition, 30 placentae of physiological pregnancy were studied. For the immunohistochemical investigation, primary antibodies against the pro-apoptotic Bax protein and the anti-apoptotic protein Bcl-2 (DAKO) were used.

Results of the research. Considering the possibility of vertical heteromorphism for the distribution of the intensity of immunohistochemical staining on the Bax protein, it was found that the optical density of the color in average is the lowest in the zone А, and the highest in the zone С, and it should be pointed out that such heteromorphism was noticed in all study groups. In the study of the vertical heteromorphism accordingly to the distribution of the intensity of the anti-apoptotic protein Bcl-2, it was found that the optical density of the staining is in average the highest in the zone А, and the lowest in the zone С, that was noticed in all groups of the study with calcinosis, and for the physiological pregnancy the differences of the Zone С from zones А and В were revealed.

Conclusion. The calcinosis of placenta in iron deficiency anemia in pregnant women compared to non anemia observations is characterized by higher

Оригінальні дослідження

average values of the optical density of staining on the Bax protein and lower average values of the optical density of staining on the anti-apoptotic protein Bcl-2 in trophoblast in all zones of the placenta (A, B, C).

Вступ. Кальциноз плаценти часто виявляють при залізодефіцитній анемії вагітних (ЗДАВ) [1]. Оскільки обмін заліза та кальцію через різні механізми впливає на процеси апоптозу [5], актуальним є вивчення процесів апоптозу при кальцинозі плаценти у жінок із ЗДАВ.

Слід відзначити, що існують різні механізми регуляції процесів апоптозу в плаценті, але у вільозно-му трофобласті відбувається переважно так званий Вах-залежний апоптоз [2], під час якого проапоптотичний протеїн Вах (Bcl-асоційований X-протеїн), при переході з мономерної форми в гомодимерну чи гомополімерну в клітинних органелах запускає каскад реакцій, що неминуче призводять до переходу подій з органел на територію клітинних ядер з інтенсифікацією процесів ферментних міжнуклеосомальних розривів ДНК. Протидіє проапоптотичному потенціалу протеїну Вах у трофобласті плаценти переважно протиапоптотичний протеїн Bcl-2, який утворює з протеїном Вах гетеродимери, таким чином деактивуючи проапоптотичну функцію протеїну Вах [8].

Кальциноз плаценти розвивається як у структурах хоріального дерева, так і в структурах матково-плацентарної ділянки [6]. Цікавим фактом є те, що у відношенні до розташування депозитів кальцію виявляють так званий вертикальний гетероморфізм — інтенсивність утворення депозитів зростає у напрямку від хоріальної до базальної пластинки [7]. Отже, доцільним є встановлення кількісних параметрів імуногістохімічного забарвлення на протеїни Вах та Bcl-2 в аспекті особливостей вертикального гетероморфізму плаценти.

Мета дослідження. Встановити кількісні параметри імуногістохімічного забарвлення на проапоптотичний білок Вах та протиапоптотичний білок Bcl-2 у трофобласті плацент з кальцинозом у жінок із залізодефіцитною анемією вагітних, порівняти їх зі спостереженнями вагітності без анемії та з фізіологічною вагітністю з урахуванням особливостей вертикального гетероморфізму плаценти.

Матеріал і методи. Досліджено 164 плаценти з кальцинозом, при цьому діагноз ЗДАВ (I-II ступінь тяжкості) виставлено у 84 вагітних, решта спостережень кальцинозу плаценти (80) була без анемії. Окрім того, досліджено 30 плацент фізіологічної вагітності. Кальцієву природу депозитів доводили за серійними зрізами на основі гістохімічної реакції на кальцій з алізариновим червоним. Серії гістологічних зрізів з оглядовою метою також забарвлювали гематоксиліном і еозином.

Шматочки плаценти фіксували 24 години в нейтральному забуференому за Ліллі 10% розчині фор-

маліну. Зневоднювали у висхідній батареї спиртів, заливали в парафін при 580 С. Гістологічні зрізи 5 мкм завтовшки використовували для постановки імуногістохімічної методики із застосуванням первинних антитіл проти проапоптотичного білка Вах та протиапоптотичного білка Bcl-2 (DAKO). Візуалізацію первинних антитіл проводили полімерною системою DAKO із барвником діамінобензидином. Здійснювали всі необхідні позитивні та негативні контролю. Величину оптичної густини імуногістохімічного специфічного забарвлення вимірювали у відносних одиницях оптичної густини (в.од.опт.густ.) методом зондової комп'ютерної мікроденситометрії (у діапазоні від 0 — відсутність забарвлення, тобто абсолютна прозорість; до 1 — максимальне забарвлення, тобто абсолютна непрозорість) за допомогою комп'ютерної програми ImageJ (версія 1.48v, вільна ліцензія, W. Rasband, National Institute of Health, USA, 2015) [3] шляхом логарифмічного перетворення середньої величини яскравості в кожному «зонді» у в.од.опт.густ. Для встановлення вертикального гетероморфізму в плацентах поперечні зрізи плаценти розділяли на три зони: зона А (ворсинки під хоріальною пластинкою), зона В (ворсинки проміжної зони), та зона С (ворсинки під базальною пластинкою).

Для кожного показника у групах дослідження вираховували середню арифметичну та її похибку, порівняння між групами дослідження здійснювали за допомогою двобічного непарного критерію Стьюдента в середовищі комп'ютерної програми PAST 3.20 (вільна ліцензія, Hammer Ø., 2018) [4]. Для обґрунтування використання параметричних методів статистики попередньо виконували перевірку на нормальність розподілу величин у вибірках методом Shapiro-Wilki за допомогою вищевказаної комп'ютерної програми. Статистично значущими вважали розбіжності між групами дослідження на рівні $p \leq 0,05$.

Результати дослідження та їх обговорення. Дослідження плацент показало, що позитивне імуногістохімічне забарвлення на білок Вах носило переважно велико- та середньогранулярний характер у всіх спостереженнях і локалізувалося переважно у синцитіотрофобласті хоріальних ворсинок плаценти. Іншими локалізаціями були клітини Гофбауера, ендотелій фетальних капілярів, інвазивний трофобласт базальної пластинки (як фрагмента матково-плацентарної ділянки), однак, варто зазначити, що в них протеїн Bcl-2 не визначався, тому до аналізу залучали тільки дані щодо синцитіотрофобласта. Імуногістохімічне забарвлення на протеїн Bcl-2 носило виключно дрібногранулярний характер. Інтенсивність забарвлення варіювала серед хоріальних ворсинок у межах однієї

плаценти доволі сильно, хоча вірогідної різниці між різними типами ворсинок не виявлено.

Середнє значення оптичної густини імуногістохімічного забарвлення на білок Вах при фізіологічній вагітності становило $0,264 \pm 0,0012$ в.од.опт.густ., що було нижче ($p < 0,001$), ніж середні показники при спостереженнях кальцинозу плаценти у жінок без анемії — $0,290 \pm 0,0011$ в.од.опт.густ. та при ЗДАВ — $0,308 \pm 0,0013$ в.од.опт.густ. Разом з тим, виявлена розбіжність між середніми показниками спостережень кальцинозу плаценти в жінок із ЗДАВ та без неї ($p < 0,05$), зокрема, у спостереженнях кальцинозу

плаценти в поєднанні із ЗДАВ оптична густина була в середньому більшою, ніж у спостереженнях кальцинозу плаценти без анемії.

При врахуванні можливості вертикального гетероморфізму щодо розподілу інтенсивності імуногістохімічного забарвлення на протейн Вах виявлено, що оптична густина забарвлення в середньому є найменшою в зоні А (під хоріальною пластинкою), а найбільшою — у зоні С (під базальною пластинкою), причому слід вказати на те, що такий гетероморфізм відзначався в усіх групах дослідження (табл. 1).

Таблиця 1
Оптична густина імуногістохімічного забарвлення на проапоптотичний білок Вах у трофобласті хоріальних ворсинок плаценти при її кальцинозі залежно від наявності анемії у вагітних (в.од.опт. густ. $M \pm m$)

Зони дослідження плаценти при вивченні вертикального гетероморфізму	Спостереження фізіологічної вагітності без кальцинозу, n=30	Спостереження кальцинозу плаценти у жінок без анемії протягом вагітності, n=80	Спостереження кальцинозу плаценти при залізодефіцитній анемії вагітних, n=84
Зона А	$0,241 \pm 0,0012$	$0,268 \pm 0,0011$ Рф<0,001	$0,288 \pm 0,0013$ Рф<0,001 Рк<0,001
Зона В	$0,262 \pm 0,0011$	$0,289 \pm 0,0010$ Рф<0,001	$0,298 \pm 0,0012$ Рф<0,001 Рк=0,002
Зона С	$0,289 \pm 0,0012$	$0,314 \pm 0,0011$ Рф<0,001	$0,339 \pm 0,0013$ Рф<0,001 Рк<0,001

Примітка. Рф – розбіжність із середніми показниками фізіологічної вагітності Рк – розбіжність у середніх показниках між групами дослідження з кальцинозом. Порівняння розбіжностей у середніх тенденціях між групами дослідження проведені за допомогою непарного двобічного критерію Стьюдента. У разі недосягнення рівня вірогідності $P < 0,05$ величина Р не подається.

Таблиця 2
Оптична густина імуногістохімічного забарвлення на протиапоптотичний білок Вc1-2 у трофобласті хоріальних ворсинок плаценти при її кальцинозі залежно від наявності анемії у вагітних (в.од.опт.густ. $M \pm m$)

Зони дослідження плаценти при вивченні вертикального гетероморфізму	Спостереження фізіологічної вагітності, n=30	Спостереження кальцинозу плаценти у жінок без анемії протягом вагітності, n=80	Спостереження кальцинозу плаценти при залізодефіцитній анемії вагітних, n=84
Зона А	$0,338 \pm 0,0017$	$0,312 \pm 0,0013$ Рф<0,001	$0,245 \pm 0,0014$ Рф<0,001 Рк<0,001
Зона В	$0,334 \pm 0,0018$	$0,298 \pm 0,0015$ Рф<0,001	$0,222 \pm 0,0014$ Рф<0,001 Рк<0,001
Зона С	$0,306 \pm 0,0017$	$0,264 \pm 0,0014$ Рф<0,001	$0,204 \pm 0,0013$ Рф<0,001 Рк<0,001

Примітка. Рф – розбіжність із середніми показниками фізіологічної вагітності Рк – розбіжність у середніх показниках між групами дослідження з кальцинозом. Порівняння розбіжностей у середніх тенденціях між групами дослідження проведені за допомогою непарного двобічного критерію Стьюдента. У разі недосягнення рівня вірогідності $P < 0,05$ величина Р не подається.

Оригінальні дослідження

Імуногістохімічне дослідження плацентарної лужної фосфатази протеїну Bcl-2 показало, що позитивне забарвлення носило переважно дрібногранулярний характер і локалізувалося виключно в синцитіотрофобласті хоріальних ворсинок плаценти. Не було відзначено залежності інтенсивності забарвлення від типу хоріальних ворсинок, однак, відзначений вертикальний гетероморфізм забарвлення. Середнє значення оптичної густини забарвлення на протеїн Bcl-2 при фізіологічній вагітності становило $0,326 \pm 0,0017$ в.од.опт.густ., що було вище ($p < 0,001$), ніж середні показники при спостереженнях кальцинозу плаценти у жінок без анемії — $0,291 \pm 0,0015$ в.од.опт.густ. та при ЗДАВ — $0,223 \pm 0,0014$ в.од.опт.густ. При цьому, мала місце розбіжність між середніми показниками кальцинозу плаценти в жінок зі ЗДАВ та без неї ($p < 0,001$), а саме — при кальцинозі зі ЗДАВ оптична густина імуногістохімічного забарвлення була в середньому меншою, ніж при кальцинозі без анемії.

При вивченні вертикального гетероморфізму щодо розподілу інтенсивності протиапоптотичний білок Bcl-2 з'ясовано, що оптична густина забарвлення в середньому є найбільшою в зоні А (під хоріальною пластинкою), а найменшою — у зоні С (під базальною пластинкою), це відзначалося в усіх групах дослідження з кальцинозом (табл. 2), а для фізіологічної вагітності виявлені відмінності зони С від зон А та В.

Висновки

1. При кальцинозах плаценти, порівнянно з фізіологічною вагітністю, оптична густина імуногістохімічного забарвлення на проапоптотичний білок Вах у середньому є вищою, а на протиапоптотичний білок Bcl-2 — нижчою.

2. У плаценті відзначається вертикальний гетероморфізм інтенсивності забарвлення на проапоптотичний білок Вах та протиапоптотичний білок Bcl-2 у трофобласті, який проявляє себе збільшенням інтенсивності забарвлення в напрямку від хоріальної пластинки (зона А) до базальної пластинки (зона С) для протеїну Вах, але зменшенням інтенсивності забарвлення в напрямку від хоріальної пластинки (зона А) до базальної пластинки (зона С) для протеїну Bcl-2.

3. Кальциноз плаценти при залізодефіцитній анемії вагітних порівнянно зі спостереженнями без анемії характеризується більшими середніми значеннями оптичної густини забарвлення на протеїн Вах та меншими середніми значеннями оптичної

густини забарвлення на протиапоптотичний білок Bcl-2 у трофобласті в усіх зонах плаценти (А, В, С).

Перспектива подальших досліджень. Надалі перспективним напрямком досліджень вбачаємо визначення кореляційних зв'язків між параметрами оптичної густини забарвлення факторів регуляції апоптозу при кальцинозі плаценти та при залізодефіцитній анемії вагітних.

Список літератури

1. Benirschke K, Burton GJ, Baergen RN. Pathology of the human placenta. 6th ed. New York: Springer; 2012. 974 p.
2. Москаленко РА. Біомінералізація у тканинах людського організму. Актуальні проблеми сучасної медицини. 2017; 17 (1): 308–13.
3. Ferreira T, Rasband W. ImageJ. User Guide. New York: National Institute of Health; 2012. 187 p.
4. Hammer Ø. PAST: Paleontological Statistics, Version 3.20. Reference manual. Oslo: Natural History Museum University of Oslo; 2018. 264 p.
5. Pijnenborg R, Brosens I, Romero R. Placental Bed Disorders. Cambridge: Cambridge University Press; 2010. 301 p.
6. Rohini M, Yogesh AS, Goyal M, Kurrey P. Histological changes in the placenta from severe anaemic mothers. International Journal of Medical and Health Sciences. 2013; 2 (1): 31-35.
7. Soni RB, Nair S. Study of Histological changes in placenta of anaemic mothers. Journal of Dental and Medical Sciences. 2013; 9(3): 42-46.
8. Kos M, Matkovich E. Bcl-2 and bax immunoreactivity in placentas from pregnancies complicated with intrauterine growth restriction and hypertension. Periodicum biologorum. 2014; 116 (2): 167–72.

References

1. Benirschke K, Burton GJ, Baergen RN. Pathology of the human placenta. 6th ed. New York: Springer; 2012. 974 p.
2. Moskalenko RA. Biominalizatsiia u tkanyakh liuds'koho organizmu [Biominalization in the tissues of the human body]. Aktual'ni problemy suchasnoi medytsyny. 2017;17(1):308-13. (in Ukrainian)
3. Ferreira T, Rasband W. ImageJ. User Guide. New York: National Institute of Health; 2012. 187 p.
4. Hammer Ø. PAST: Paleontological Statistics, Version 3.20. Reference manual. Oslo: Natural History Museum University of Oslo; 2018. 264 p.
5. Pijnenborg R, Brosens I, Romero R. Placental Bed Disorders. Cambridge: Cambridge University Press; 2010. 301 p.
6. Rohini M, Yogesh AS, Goyal M, Kurrey P. Histological changes in the placenta from severe anaemic mothers. International Journal of Medical and Health Sciences. 2013;2(1):31-5.
7. Soni RB, Nair S. Study of Histological changes in placenta of anaemic mothers. Journal of Dental and Medical Sciences. 2013;9(3):42-6.
8. Kos M, Matkovich E. Bcl-2 and Bax immunoreactivity in placentas from pregnancies complicated with intrauterine growth restriction and hypertension. Periodicum biologorum. 2014;116(2):167-72.

Відомості про авторів:

Попович Андрій Іванович — асистент кафедри патологічної анатомії Вищого державного навчального закладу України «Буковинський державний медичний університет», м. Чернівці, Україна.

Давиденко Ігор Святославович — доктор медичних наук, професор, завідувач кафедри патологічної анатомії Вищого державного навчального закладу України «Буковинський державний медичний університет», м. Чернівці, Україна.

Сведения об авторах:

Попович Андрей Иванович — ассистент кафедры патологической анатомии Высшего государственного учебного заведения Украины «Буковинский государственный медицинский университет», г. Черновцы, Украина.
Давыденко Игорь Святославович — доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедры патологической анатомии Высшего государственного учебного заведения 3 Украины «Буковинский государственный медицинский университет», г. Черновцы, Украина.

Information about the authors:

Popovych Andriy Ivanovitch — Assistant Professor of the Department of Pathological Anatomy of the Higher State Education Institution of Ukraine «Bukovinian State Medical University», Chernivtsi, Ukraine.
Davydenko Igor Svyatoslavovitch — Doctor of Medicine, Professor, Head of the Department of Pathological Anatomy of the Higher State Education Institution of Ukraine «Bukovinian State Medical University», Chernivtsi, Ukraine.

Надійшла до редакції 04.05.2018

Рецензент — д.мед.н. Цигикало О.В.

© А.І. Попович, І.С. Давиденко, 2018
