

DOI: 10.26693/jmbs02.06.034

УДК 611-013.85:618.39

Попович А. І., Давиденко І. С., Давиденко О. М.

## ГІСТОХІМІЧНА ОЦІНКА ПРОЦЕСІВ ОБМЕЖЕНОГО ПРОТЕОЛІЗУ В ФІБРИНОЇДІ ПЛАЦЕНТИ ПРИ ЇЇ КАЛЬЦИНОЗІ У ПОЄДНАННІ ІЗ ЗАЛІЗОДЕФІЦІТНОЮ АНЕМІЄЮ ВАГІТНИХ

Вищий державний навчальний заклад України  
«Буковинський державний медичний університет»

andriy\_popovych@bsmu.edu.ua

Вивчено 164 спостереження кальцинозу плаценти, у т.ч. 84 спостереження залізодефіцитної анемії (ЗДАВ) та 80 спостережень вагітності без анемії. Встановили рівні обмеженого протеолізу в фібриноїді плаценти різної локалізації залежно від варіанту кальцієвих депозитів на підставі нінгідринно-шифововської реакції на «вільні» аміногрупи білків з кількісною оцінкою результатів забарвлення методом комп'ютерної мікроспектрофотометрії. Виявлені відмінності в середніх величинах оптичної густини забарвлення при постановці нінгідринно-шифововської реакції на «вільні» аміногрупи білків, яка є мірою обмеженого протеолізу, у фібриноїді як в зоні хоріального дерева так і в базальній пластинці плаценти по окремих типах депозитів кальцію. Згідно гістохімічного дослідження при залізодефіцитній анемії вагітних у фібриноїді з депозитами кальцію тип II та тип IV (дрібногранулярні депозити) як в зоні хоріального дерева так і в базальній пластинці плаценти різко зростають процеси обмеженого протеолізу в порівнянні зі спостереженнями без анемії.

**Ключові слова:** депозити кальцію, залізодефіцитна анемія вагітних, обмежений протеоліз.

**Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.** Дана робота є фрагментом НДР «Морфологічні аспекти патології плаценти при залізодефіцитній анемії вагітних», № держ. реєстрації 01140004125.

**Вступ.** Кальциноз, вапнування або петрифікація (підсилене відкладання нерозчинних солей кальцію) плаценти є доволі поширеним явищем [3, 4], причому нерідко кальциноз плаценти зустрічають при анемії вагітних [6, 7]. На підставі раніше проведених досліджень [1, 2] було встановлено, що при залізодефіцитній анемії вагітних (ЗДАВ) у порівнянні з плацентами з кальцинозом без анемії (тобто при нормальних показниках крові протягом вагітності) частота розподілу вивчених варіантів депозитів кальцію є різною. Причому, вказані

відмінності стосуються фібриноїду плаценти як в зоні хоріального дерева так і базальної пластинки плаценти. Оскільки і кальцій і залізо суттєво впливають на рівень вільнорадикальних процесів, зокрема, на окиснювальну модифікацію білків, а остання в свою чергу підсилює протеоліз, було сплановано дослідження для з'ясування рівня обмеженого протеолізу в фібриноїді плаценти різної локалізації залежно від варіанту кальцієвих депозитів на підставі нінгідринно-шифововської реакції на «вільні» аміногрупи білків з кількісною оцінкою результатів забарвлення методом комп'ютерної мікроденситометрії.

**Мета дослідження.** Встановити рівні обмеженого протеолізу в фібриноїді плаценти різної локалізації залежно від варіанту кальцієвих депозитів на підставі нінгідринно-шифововської реакції на «вільні» аміногрупи білків з кількісною оцінкою результатів забарвлення методом комп'ютерної мікроденситометрії.

**Об'єкт і методи дослідження.** Загалом досліджено 164 плаценти з кальцинозом, терміном вагітності 29-40 тижнів, при цьому, діагноз ЗДАВ (I-II ступінь тяжкості) виставлено у 84 вагітних (у т.ч. 40 – передчасні пологи, 44 – термінові пологи), решта спостережень вагітності була без анемії – всього 80 (38 – передчасні пологи, 42 – термінові пологи). За кальциноз плаценти вважали тільки ті спостереження, коли при заборі матеріалу з різних котиледонів, депозити кальцію регулярно зустрічалися не менше, ніж у чотирьох котиледонах. Матеріал фіксували у забуференому нейтральному формаліні протягом 24 годин, після зневоднювання у батареї етанолу шматочки плаценти заливали у парафін, на санному мікротомі виготовляли зрізи 5 мкм завтовшки. На депарафінованих гістологічних зрізах виконували нінгідринно-шифововської реакції на «вільні» аміногрупи білків за Ясума та Ітікава з кількісною оцінкою результатів забарвлення методом комп'ютерної мікроденситометрії на цифрових копіях зображення ділянок фібриноїду в середовищі

**Таблиця 1** – Оптична густина забарвлення при нінгідриново-шивововській реакції у фібриноїді в зоні хоріального дерева плаценти залежно від морфологічних варіантів депозитів кальцію

Морфологічний варіант депозитів кальцію	Спостереження залізодефіцитної анемії вагітних (в.од.опт. густини)	Спостереження жінок з нормальними аналізами крові протягом вагітності (в.од.опт. густини)
Депозити в міжворсинчастому фібриноїді – тип II	0,312±0,0028 n=81	0,264±0,0036 n=22 P<0,001
Депозити в міжворсинчастому фібриноїді – тип III	0,268±0,0034 n=38	0,261±0,0030 n=64
Депозити в міжворсинчастому фібриноїді – тип IV	0,304±0,0031 n=70	0,261±0,0032 n=54 P<0,001

комп'ютерної програми ImageJ (1.48v, вільна ліцензія, W. Rasband, National Institute of Health, USA, 2015) [5]. Кінцевим результатом комп'ютерної мікроденситометрії був показник «оптична густина забарвлення» у відносних одиницях оптичної густини (в.о.опт.густини), який служив мірою обмеженого протеолізу. Для кожної групи дослідження розраховували середню арифметичну та її похибку. Нормальність у статистичних вибірках перевіряли за допомогою критерію Shapiro-Wilk, розбіжності у середніх тенденціях оцінювали за допомогою непарного двобічного критерію Student. Всі статистичні розрахунки виконували у комп'ютерній програмі PAST v3.14, вільна ліцензія, O. Hammer, 2016) [4].

Дослідження проведено з дотриманням основних біоетичних положень Конвенції Ради Європи про права людини та біомедицину (від 04.04.1997 р.), Гельсінської декларації Всесвітньої медичної асоціації про етичні принципи проведення наукових медичних досліджень за участю людини (1964–2008 рр.), а також наказу МОЗ України № 690 від 23.09.2009 р.

**Результати дослідження та їх обговорення.**

Загалом було досліджено по сім морфологічних варіантів депозитів кальцію в двох локалізаціях [1]. У зоні хоріального дерева плаценти знайшли відмінності у частоті розподілу залежно від наявності ЗДАВ для типів II, III, IV депозитів кальцію, а в базальній пластинці - для типів II та IV. Тип II – це множинні дрібнозернисті пилоподібні групи депозитів кальцію. Вони можуть бути в різних частинах

фібриноїдних тіл, а також рівномірно «перемішуватися» з фібриноїдом по всьому його об'єму. Підвидом такого різновиду вважаємо окремі дрібнозернисті пилоподібні депозити кальцію, які не формують групи. Такі депозити фарбуються порівняно слабо. Тип III – це великі пластинчасті депозити, які, як правило, профарбовуються не дуже інтенсивно, хоча є й виключення з цього правила. Ці депозити можуть локалізуватися в будь-якій частині фібриноїдного тіла, часто займаючи його основний об'єм. Тип IV – це своєрідна комбінація пластинчастих та дрібнозернистих депозитів, які описані вище. Своєрідність полягає в закономірності їх взаємного розташування – пластинчасті структури завжди розташовуються в центрі, дрібнозернисті – по їх периферії. Такі депозити завжди великих розмірів, займають значний об'єм фібриноїдного тіла. Саме фібриноїд з названими варіантами депозитів кальцію були піддані детальному гістохімічному аналізу на предмет обмеженого протеолізу.

Середні величини оптичної густини забарвлення при нінгідриново-шивововській реакції у фібриноїді в зоні хоріального дерева плаценти залежно від морфологічних варіантів депозитів кальцію надані в **таблиці 1**. Згідно наведених даних, при ЗДАВ в інтервільозному фібриноїді з депозитами кальцію – тип II різко зростають процеси обмеженого протеолізу в порівнянні зі спостереженнями без анемії. Така ж сама закономірність відмічена і для інтервільозного фібриноїду з депозитами кальцію – тип IV. Разом з тим, не було виявлено

**Таблиця 2** – Оптична густина забарвлення при нінгідриново-шивововській реакції у фібриноїді базальної пластинки плаценти залежно від морфологічних варіантів депозитів кальцію

Морфологічний варіант депозитів кальцію	Спостереження залізодефіцитної анемії вагітних (I-II ступінь тяжкості)	Спостереження жінок з нормальними аналізами крові протягом вагітності
Депозити в фібриноїді базальної пластинки – тип II	0,318±0,0027 n=81	0,268±0,0034 n=22 P<0,001
Депозити в фібриноїді базальної пластинки – тип IV	0,302±0,0034 n=70	0,264±0,0036 n=54 P<0,001

статистичної розбіжності у середніх тенденціях для оптичної густини забарвлення в інтервальному фібриноїді з депозитами кальцію – тип III.

Середні величини оптичної густини забарвлення при нінгідринно-шифововській реакції в зоні базальної пластинки плаценти наведені в таблиці 2. З цих даних видно, що при ЗДАВ у фібриноїді базальної пластинки, так само, як і в зоні хоріального дерева у фібриноїді з депозитами кальцію – тип II та тип IV різко зростають процеси обмеженого протеолізу в порівнянні зі спостереженнями без анемії.

Оскільки депозити кальцію тип II та тип IV характеризуються дрібною гранулярністю, а тип III – пластинчастим характером відкладання солей кальцію, можна припустити, що гранулярний характер депозитів кальцію віддзеркалює давність їх

утворення, тобто вказує на те, що ці депозити є порівняно «свіжими», а пластинчасті депозити навпаки – є більш давніми утвореннями. Для визначення конкретних часових проміжків знадобиться окреме дослідження.

**Висновок.** Згідно гістохімічного дослідження при залізодефіцитній анемії вагітних у фібриноїді з депозитами кальцію тип II та тип IV (дрібногранулярні депозити) як в зоні хоріального дерева так і в базальній пластинці плаценти різко зростають процеси обмеженого протеолізу в порівнянні зі спостереженнями без анемії.

**Перспективи подальших досліджень.** Надалі перспективним напрямком досліджень вбачаємо гістохімічну оцінку процесів окиснювальної модифікації білків у вивчених локалізаціях.

## References

1. Popovych AI, Davydenko IS. Distribution of morphological variants of calcium deposits in placenta of gravidas with iron-deficiency anemia. *Clinical Anatomy and Operative Surgery*. 2016; 15 (3): 84-8. [Ukrainian].
2. Popovych AI, Davydenko IS. Principles of the morphological classification of placental calcinosis. *Scientific and practical journal "Ukrainian Medical News"*. 2014; 11 (80-83): 490. [Ukrainian].
3. Benirschke K, Burton GJ, Baergen RN. *Pathology of the human placenta*. 6th ed. New York: Springer, 2012. 974 p.
4. Hammer Ø. *PAST: Paleontological Statistics, Version 3.16. Reference manual*. Oslo: Natural History Museum University of Oslo, 2016. 243p.
5. Rasband W, Ferreira T. *ImageJ user guide 1.48 v*. National Institute of Health, USA, 2015. 140 p.
6. Ritu BS, Shema N. Study of Histological changes in placenta of anaemic mothers. *J of Dental and Medical Sciences*. 2013; 9 (3): 42-6.
7. Rohini M, Yogesh AS, Goyal M, Kurrey Praveen. Histological changes in the placenta from severe anaemic mothers. *International Journal of Medical and Health Sciences*. 2013; 2 (1): 31-5.

УДК 611-013.85:618.39

### ГИСТОХИМИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА ПРОЦЕССА ОГРАНИЧЕННОГО ПРОТЕОЛИЗА В ФИБРИНОИДЕ ПЛАЦЕНТЫ ПРИ ЕЕ КАЛЬЦИНОЗЕ В СОЧЕТАНИИ С ЖЕЛЕЗОДЕФИЦИТНОЙ АНЕМИЕЙ БЕРЕМЕННЫХ

Попович А. И., Давыденко И. С., Давыденко О. Н.

**Резюме.** Изучено 164 случая кальциноза плаценты, в т.ч. 84 случая железодефицитной анемии (ЖДАВ) и 80 случаев беременности без анемии. Установили уровень ограниченного протеолиза в фибриноиде плаценты различной локализации в зависимости от варианта кальциевых депозитов на основании нингидриново-шифововской реакции на «свободные» аминокислоты белков с количественной оценкой результатов окраски методом компьютерной микроспектрофотометрии. Выявленные различия в средних величинах оптической плотности окраски при постановке нингидриново-шифововской реакции на «свободные» аминокислоты белков, которая является мерой ограниченного протеолиза, в фибриноиде как в зоне хоріального дерева, так и в базальной пластинке плаценты по отдельным типам депозитов кальция. Согласно гистохимического исследования при железодефицитной анемии беременных в фибриноиде с депозитами кальция тип II и тип IV (мелкогранулярные депозиты) как в зоне хоріального дерева, так и в базальной пластинке плаценты резко возрастают процессы ограниченного протеолиза по сравнению с наблюдениями без анемии.

**Ключевые слова:** депозиты кальция, железодефицитная анемия беременных, ограниченный протеолиз.

UDC 611-013.85:618.39

### Histochemical Evaluation of the Limited Proteolysis in Fibrinoid Placenta Processes during its Calcification Combined with the Iron Deficiency Anemia in Gravidas

Popovych A., Davydenko I., Davydenko O.

**Abstract.** Since both calcium and iron significantly affect the level of free radical processes the study was elaborated to determine the level of limited proteolysis processes in fibrinoid placenta of different localization areas depending on the calcium deposits versions.

*The purpose of the study* is to determine the levels of limited proteolysis in fibrinoid placenta of different localization areas depending on the version of the calcium deposits based on the ninhydrin-Schiff reaction on "free" amino groups of proteins with quantitative assessment of the staining results by means of computer microspectrophotometry.

*Materials and methods.* In terms of our research 164 observations of placental calcification including 84 observations of iron deficiency anemia (IDAG) and 80 observations of gravidity without anemia were studied. Ninhydrin-Schiff reaction on "free" amino groups of proteins with quantitative assessment of the staining results was conducted by means of computer microspectrophotometry on the digital copy of the image with the fibrinoid areas on the basis of the computer program ImageJ.

*Research results.* Placentas' histological study demonstrated that in case of term labour there was no hypermaturity found, in case of preterm labour there was no preterm maturation of chorionic tree or uterine-placental area found, that could be causes of placental calcinosis. Therefore, etiology of observed calcinosis did not relate to preterm maturation of the placenta.

In histological sections of the placenta calcium deposits were found both in the area of the chorionic tree and basal lamina.

A part of deposits was not associated with placental fibrinoid, while another part was in different ways involved into placental fibrinoid. Calcium deposits were evaluated according to the principles elaborated before.

Those deposits not involved into fibrinoid were either of fine granular or lamellar character, and sometimes they were of a combined character and differed by their localization.

The differences between the average signs of optical density coloration when applying ninhydrin-Schiff reaction on "free" amino groups of protein were discovered both in fibrinoid as the part of the chorial tree and in the basal plate of the placenta in particular types of calcium deposits.

*Conclusions.* According to the histochemical study gravidas with iron deficiency anemia were characterized by fibrinoid with deposits of calcium type II and type IV (fine-granular deposits) both in chorial tree and in the basal plate of the placenta where the limited proteolysis processes increased compared to the observations without anemia.

**Keywords:** calcium deposits, iron deficiency anemia in gravidas, limited proteolysis.

Стаття надійшла 25.09.2017 р.

Рекомендована до друку на засіданні редакційної колегії після рецензування