

DOI: 10.26693/jmbs03.07.009

УДК 611-013.85:618.39-021.3

Іліка В. В., Давиденко І. С.

ІМУНОГІСТОХІМІЧНЕ ВИВЧЕННЯ ПРОАПОПТОТИЧНОГО ПРОТЕЇНУ Вах В ДЕЦИДУОЦИТАХ БАЗАЛЬНОЇ ПЛАСТИНКИ ПЛАЦЕНТИ ПРИ БАЗАЛЬНОМУ ДЕЦИДУЇТІ В ПОЄДНАННІ З ЗАЛІЗОДЕФІЦИТНОЮ АНЕМІЄЮ ВАГІТНИХ

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

vitaliy.ilika@bsmu.edu.ua

Імуногістохімічним методом із застосуванням первинних антитіл до протеїну Вах із візуалізацією первинних антитіл полімерною системою (ДАКО) із барвником діамінобензидином у поєднанні з мікроденситометрією були встановлені кількісні параметри оптичної густини імуногістохімічного забарвлення проапоптотичного білка Вах в децидуоцитах базальної пластинки плаценти при поєднанні базального децидуїту з залізодефіцитною анемією вагітних. Було встановлено, що залізодефіцитна анемія вагітних призводить до збільшення показників оптичної густини імуногістохімічного забарвлення на проапоптотичний білок Вах в досліджуваних структурах. При порівнянні процесів Вах-залежного апоптозу при гострому та хронічному запаленні децидуальної оболонки з'ясовано, що тільки при хронічному базальному децидуїті інтенсифікуються процеси апоптозу, особливо сильно при коморбідній залізодефіцитній анемії вагітних.

Ключові слова: проапоптотичний білок Вах, запалення посліду, залізодефіцитна анемія вагітних, децидуоцити.

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

Вступ. Зараз вже відомо, що активні форми кисню є важливими фізіологічними агентами в самій клітині. Вони здатні надавати самі різноманітні регуляторні ефекти та опосередковувати загальні адаптаційні реакції клітини, відомі в даний час, як

«окиснювальний стрес». Активні форми кисню приймають участь в стимуляції специфічного, неспецифічного (фагоцитоз, антиінфекційний ефект, регуляція запалення) та антипухлинного імунітету в регенерації [10, 16], діють як внутрішньоклітинні регулятори клітинного ділення, апоптозу в клітині [12, 15], приймають участь в регуляції судинного тонусу [2, 9].

Вільні радикали приймають активну роль при запальних захворюваннях посліду, втручаючись на найрізноманітніших рівнях ініціації, перебігу та регуляції. Під час запалення пряма активація запальних клітин, особливо гранулоцитів, виділяє велику кількість кисневих радикалів і протеаз, які сприяють знищенню бактерій, а також посилюють окиснювальний стрес [13] який в свою чергу є сигналом для клітинної проліферації та апоптозу певних клітинних клонів [5].

Крім цього, активні кисневі метаболіти інтенсивно збільшуються при гіпоксичних станах, які можуть викликати невивіркове пошкодження біологічних молекул, пошкоджувати функцію та приводити до клітинної смерті та розцінюватися як індуктором апоптозу.

Отже, вивчення апоптотичних процесів в клітинах плаценти, є інформативним в аспекті повного розуміння вільнорадикальних процесів при запаленні та залізодефіцитній анемії вагітних (ЗДАВ). А визначення процесу апоптозу, саме в децидуальних клітинах базальної пластинки, є важливим в зв'язку з тим, що вони входять до переліку структур, підвищена гибель яких є ризиком передчасного відшарування плаценти з усіма наступними

негативними наслідками для перебігу вагітності [11].

Мета дослідження. Встановити кількісні параметри оптичної густини імуногістохімічного забарвлення проапоптотичного білка в децидуоцитах базальної пластинки плаценти при поєднанні базального децидуїту з залізодефіцитною анемією вагітних.

Матеріали та методи дослідження. Всього морфологічному дослідженню підлягало 198 плацент, з них було обрано для даного дослідження 113 плацент. У тому числі, з метою порівняння, вивчені плаценти при фізіологічній вагітності та спостереження залізодефіцитної анемії вагітних без запалення посліду. Кількість спостережень у конкретних групах дослідження надані в **таблиці 1 та 2.**

Таблиця 1 – Оптична густина забарвлення в децидуоцитах базальної пластинки плаценти у відн. од. опт. густини (імуногістохімічна методика із застосуванням первинних антитіл до проапоптотичного білка Вах) при фізіологічній вагітності та залізодефіцитній анемії вагітних ($M \pm m$)

Групи дослідження	
Спостереження фізіологічної вагітності (n = 20)	Спостереження залізодефіцитної анемії вагітних без запалення посліду (n = 21)
0,121 ± 0,0012	0,132 ± 0,0014 (p < 0,001)

Примітка: p – вірогідність різниці двох середніх між фізіологічною вагітністю та досліджуваною групою.

Таблиця 2 – Оптична густина забарвлення в децидуоцитах базальної пластинки плаценти у відн. од. опт. густини (імуногістохімічна методика із застосуванням первинних антитіл до проапоптотичного білка Вах) при поєднанні різних форм базального дейидуїту та залізодефіцитної анемії вагітних ($M \pm m$)

Групи дослідження	Спостереження запалення посліду при вагітності без анемії	Спостереження запалення посліду при залізодефіцитній анемії вагітних
Базальний децидуїт гострий	0,125 ± 0,0013 (p ₁ > 0,05) (p ₂ < 0,001) (n = 16)	0,128 ± 0,0016 (p ₃ > 0,05) (p ₄ > 0,05) (n = 15)
Базальний децидуїт хронічний	0,241 ± 0,0014 (p ₁ < 0,001) (p ₂ < 0,001) (n = 21)	0,254 ± 0,0016 (p ₃ < 0,001) (p ₄ < 0,001) (n = 20)

Примітка: p₁ – вірогідність різниці двох середніх між фізіологічною вагітністю та досліджуваною групою; p₂ – вірогідність різниці двох середніх між групою плацент з ЗДАВ та досліджуваною групою; p₃ – вірогідність різниці двох середніх між гострим БД та БД у поєднанні з ЗДАВ; p₄ – вірогідність різниці двох середніх між гострим БД у поєднанні з ЗДАВ та з ЗДАВ без запалення.

Матеріал фіксували 20–22 години у забуференому нейтральному 10% розчині формаліну з наступним зневоднюванням у висхідній батареї спиртів та заливкою у парафін при 56 °С.

Методику виконували на серійних гістологічних зрізах завтовшки 5 мкм (після депарафінізації). Для імуногістохімічної ідентифікації проапоптотичних молекулярних факторів застосовували первинні антитіл до протеїну Вах із візуалізацією первинних антитіл полімерною системою (DAKO) із барвником діамінобензидином. Дофарбовування ядер виконували гематоксиліном Майєра.

Отримували цифрові копії зображення за допомогою мікроскопа Delta Optical Evolution 100 (планахроматичні об'єктиви) та цифрової камери Olympus SP-550UZ. Методом комп'ютерної мікроденситометрії у середовищі комп'ютерної програми ImageJ (1.48, W. Rasband, National Institutes of Health, USA) [14]. *Вимірювали* оптичну густина гістохімічного забарвлення у відносних одиницях оптичної густини (в діапазоні від «0» до «1», на підставі логарифмічних перетворень величини яскравості у градаціях від «0» до «255»).

Обраховували середню арифметичну та її похибку (для оптичної густини) за допомогою комп'ютерної програми PAST 3.16 (вільна ліцензія, O. Hammer, 2017) [8]. Розбіжності у середніх тенденціях здійснювали за допомогою двобічного непарного критерію Стьюдента з попередньою перевіркою нормальності розподілу у статистичних вибірках. Статистично значущими вважали розбіжності при p ≤ 0,05.

Дослідження проведене 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.

При імуногістохімічному дослідженні проапоптотичного білка Вах, найбільш чітке Вах-позитивне забарвлення відмічалось в децидуоцитах базальної пластинки плаценти. При цьому забарвлення носило комбінований, дифузно-гранулярний характер. Спроби кількісного дослідження протеїну Вах в структурах хоріальної пластинки плаценти не увінчались успіхом, оскільки в досліджуваних структурах експресія протеїну Вах була надто слабкою, що не дозволило провести денситометричне обчислення.

Кількісні показники оптичної густини імуногістохімічного забарвлення, отриманих комп'ютерною мікроденситометрією, при фізіологічній вагітності

та в плацентах від породіль з залізодефіцитною анемією вагітних наведені в **таблиці 1**.

Отримані високі показники вірогідності двох середніх між плацентами фізіологічною вагітністю та ЗДАВ за t критерієм Стьюдента ($p < 0,00$) свідчить про суттєве зростання процесів апоптозу в децидуоцитах базальної пластинки плаценти при ЗДАВ. Дані результати узгоджуються з результатами дослідження науковців вивчаючи вплив ЗДАВ на процеси апоптозу в інших структурах плаценти [1, 4] та пояснюється тим, що посилення процесів апоптозу в децидуоцитах при ЗДАВ, викликається недостатнім транспортом кисню, який викликаючи окиснювальний стрес досить швидко виснажує енергетичні системи клітини та запускає механізм її гибелі, як некрозу так і апоптозу [7].

Результати відносних одиниць оптичної густини гістохімічного забарвлення при запаленні базальної пластинки плаценти та у поєднанні з ЗДАВ наведені в **таблиці 2**.

Провівши мікроденситометричні розрахунки оптичної густини інтенсивності забарвлення на проапоптотичний білок Вах в децидуоцитах базальної пластинки плаценти при гострому базальному децидуїті ми отримали помірні коливання показників в сторону більших значень в порівнянні з фізіологічною вагітністю без статистичної розбіжності ($p > 0,05$). Незначне, але все ж таки зростання Вах-залежного процесу апоптозу при гострому запаленні базальної пластинки плаценти можна пов'язати, перш за все, з наявністю лейкоцитів в осередках інфламачії, які здатні за допомогою спеціального трансмембранного дихального ланцюга плазматичної мембрани утворювати супероксиди та бомбардувати ними клітину-мішень, стимулюючи апоптоз, в тому числі через окиснення фосфатидилсерина плазматичної мембрани клітини-мішені [6]. Ми також помітили, що по відношенню до плацент із ЗДАВ без запалення – відн. од. опт. густ. мали навіть тенденцію до зниження. При запаленні з коморбідною ЗДАВ (**рис. 1**) статистично значущих розбіжностей у середніх тенденціях між плацентами з гострим базальним децидуїтом не спостерігалось ($p > 0,05$).

Хронічне запалення призводить до збільшення, з високою вірогідністю, кількісних показників в порівнянні з фізіологічною вагітністю та ЗДАВ без запалення ($p < 0,001$), а коморбідна ЗДАВ (**рис. 2**) інтенсифікує процеси апоптозу, що підтверджується результатами денситометрії оптичної густини імуногістохімічного забарвлення. Така ж тенденція і в порівнянні з фізіологічною вагітністю та ЗДАВ без запалення.

Інтенсифікація процесів апоптозу при хронічному запаленні, головним чином, обумовлена зроста-

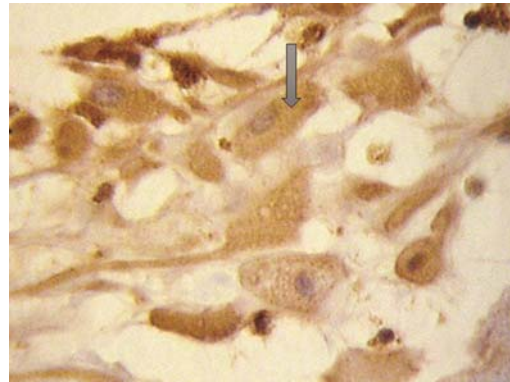


Рис. 1. Спостереження гострого базального децидуїту в поєднанні з ЗДАВ. Базальна пластинка плаценти. Проапоптотичний протеїн Вах у децидуоцитах (↑). Імуногістохімічна методика із застосуванням первинних антитіл до протеїну Вах. Об.40х.Ок.10х

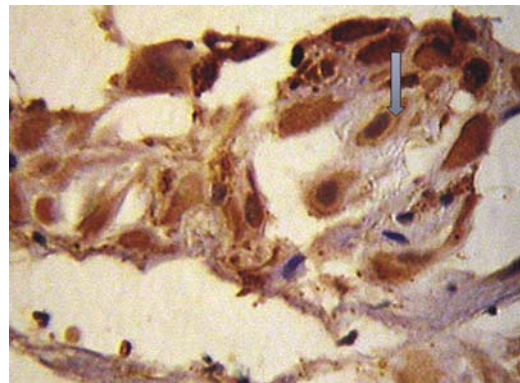


Рис. 2. Спостереження хронічного базального децидуїту у поєднанні з ЗДАВ. Проапоптотичний протеїн Вах у децидуоцитах базальної пластинки плаценти (↑). Імуногістохімічна методика із застосуванням первинних антитіл до протеїну Вах. Об.40х.Ок.10х

ючою важкістю запалення та підвищеною активністю вільнорадикальних процесів, які підтверджуються отриманими нами раніше даними про високий рівень нітропероксидів у децидуоцитах базальної пластинки плаценти при хронічному базальному децидуїті [3], які в свою чергу починають посилено індукувати апоптоз. При цьому супутній вплив залізодефіцитної анемії, з урахуванням ще більшої інтенсивності вільнорадикальних процесів, недостатнім транспортом кисню з виснаженням енергетичних систем клітини, більш інтенсивно запускає механізм апоптозу при хронічному базальному децидуїті.

Висновки

1. Залізодефіцитна анемія вагітних призводить до збільшення показників оптичної густини імуногістохімічного забарвлення на проапоптотичний білок Вах в децидуоцитах базальної пластинки плаценти.

2. При порівнянні процесів Вах-залежного апоптозу при гострому та хронічному запаленні децидуальної оболонки з'ясовано, що тільки при хронічному базальному децидуїті інтенсифікуються процеси апоптозу, особливо сильно при коморбідній залізодефіцитній анемії вагітних.

Перспективи подальших досліджень. Вивчити процеси апоптозу в інших структурах плаценти при запаленні плаценти у поєднанні з залізодефіцитною анемією вагітних.

References

- Ancheva IA. *Disfunktsiya platsenti pri anemii vagitnikh: diagnostika, vedennya vagitnostii profilaktika*: Dis. Dr. Sci. (Med.). Odesa: Odes'kyu nats. med. un-t; 2015. 271 s. [Ukrainian]
- Syrovaya AO, Leont'yeva FS, Novikova IV, Novikova SV. Biologicheskaya rol' svobodnykh radikalov v razvitii patologicheskikh sostoyaniy. *Mezhdunarodnyy meditsinskiy zhurnal*. 2012; 18(3): 98-104. [Russian]
- Ilika VV. Khemilyuminescentne doslidzhennya nitroperoksidiv u strukturakh platsenty pry khorionamnioniti ta bazal'nomu detsiduyiti z zalizodefitsitnoyu anemiyeyu vahitnyh. *Ukrayins'kyy zhurnal medytsyny, biolohiyi ta sportu*. 2018; 5: 36-40. [Ukrainian] <https://doi.org/10.26693/jmbs03.05.036>
- Kostyuk VM. Morfolohichni aspekty vyvchennya apoptozu v ekstravil'oznomu tsitotrofoblasti pry zalizodefitsitniy anemiyi vahitnykh. *AML*. 2008; 14(4): 53-7. [Ukrainian]
- Menshchikova YB, Zenkov NK, Lankin VZ, Bondar' IA, Trufakin VA. Okislitel'nyy stress. Patologicheskiye sostoyaniya i zabolevaniya. *Elektron. tekstovyye dannyye*. Novosibirsk: Sibirskoye universitetskoye izdatel'stvo. [Internet]. 2017. [tsitirovano 2018 veres 15]; 284 s. Available from: <http://www.iprbookshop.ru/65151.html> [Russian]
- Pavlishin GA, Sarapuk IM, Yukhimchuk AT. Suchasni poglyadi na rol' neytrofilov i ikh apoptoz v patogenezhakh zapal'nikh protsessov. *Mezhdunarodnyy zhurnal pediatrii, akusherstva i ginekologii*. 2014; 5(1): 69-81 [Ukrainian]
- Yakovleva YA, Demina OV, Babadzhanyan YN, Yakovenko YA. Platsentarnaya disfunktsiya. *Mizhnarodnyy medichniy zhurnal*. 2017; 23(2)2: 47-51. [Russian]
- Hammer Ø. *PAST: Paleontological Statistics, Version 3.14. Reference manual*. Oslo: Natural History Museum University of Oslo; 2016. 243 p.
- Krause BJ, Hanson MA, Casanello P. Role of nitric oxide in placental vascular development and function. *Placenta*. 2011; 32: 797–805. PMID: 21798594. PMCID: PMC3218217. doi: 10.1016/j.placenta.2011.06.025
- McCallum KC, Garsin DA. The Role of Reactive Oxygen Species in Modulating the *Caenorhabditis elegans* Immune Response. *PLoS pathogens*. 2016; 12(11): e1005923. doi: 10.1371/journal.ppat.1005923
- Aouache R, Biquard L, Vaiman D, Miralles F. Oxidative stress in preeclampsia and placental diseases. *International journal of molecular sciences*. 2018; 19(5): 1496. PMID: 29772777. PMCID: PMC5983711. doi: 10.3390/ijms19051496
- Sinha K, Das J, Pal PB, Sil PC. Oxidative stress: the mitochondria-dependent and mitochondria-independent pathways of apoptosis. *Arch Toxicol*. 2013; 87(7): 1157–80. PMID: 23543009. doi:10.1007/s00204-013-1034-4
- Perrone S, Tataranno ML, Negro S, Longini M, Toti MS, Alagna MG. Placental histological examination and the relationship with oxidative stress in preterm infants. *Placenta*. 2016; 46: 72-8. doi: 10.1016/j.placenta.2016.08.084
- Rasband W, Ferreire T. *ImageJ user guide 1.48 v*. USA: National Institute of Health; 2015. 140 p.
- Tan S-N, Sim S-P, Khoo AS. Potential role of oxidative stress-induced apoptosis in mediating chromosomal rearrangements in nasopharyngeal carcinoma. *Cell & Bioscience*. 2016; 6(1): 35. PMID: 27231526. PMCID: PMC4880972. <http://doi.org/10.1186/s13578-016-0103-9>
- Pinegin B, Vorobjeva N, Pashenkov M, Chernyak B. The role of mitochondrial ROS in antibacterial immunity. *Journal of cellular physiology*. 2018; 233(5): 3745-54. PMID: 28771715. doi: 10.1002/jcp.26117

УДК 611-013.85:618.39-021.3

ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКОЕ ИЗУЧЕНИЯ ПРОАПОПТОТИЧЕСКОГО ПРОТЕИНА ВАХ В ДЕЦИДУОЦИТАХ БАЗАЛЬНОЙ ПЛАСТИНКИ ПЛАЦЕНТЫ ПРИ БАЗАЛЬНОМ ДЕЦИДУИТЕ В СОЧЕТАНИИ С ЖЕЛЕЗОДЕФИЦИТНОЙ АНЕМИЕЙ БЕРЕМЕННЫХ

Илика В. В., Давыденко И. С.

Резюме. Иммуногистохимическим методом с применением первичных антител к протеину Вах с визуализацией первичных антител полимерной системой (ДАКО) с красителем диаминобензидином в сочетании с микроденситометрией были установлены количественные параметры оптической плотности иммуногистохимической окраски проапоптотического белка Вах в децидуоцитах базальной пластинки плаценты при сочетании базального децидуита с железоздефицитной анемией беременных. Было установлено, что железоздефицитная анемия беременных приводит к увеличению показателей оптической плотности иммуногистохимической окраски на проапоптотический белок Вах в исследуемых структурах. При сравнении процессов Вах-зависимого апоптоза при остром и хроническом воспалении децидуальной

оболочки установлено, что только при хроническом базальном децидуите интенсифицируются процессы апоптоза, особенно сильно при коморбидной железодефицитной анемии беременных.

Ключевые слова: проапоптотический белок Вах, воспаление плаценты, железодефицитная анемия беременных, децидуоциты.

UDC 611-013.85:618.39-021.3

Immunohistochemical Study of Proapoptotic Bax-Protein in Deciduocytes of the Basal Placental Plate in Case of Basal Deciduitis Concomitant with Iron Deficiency Anemia in Pregnant Women

Ilika V. V., Davydenko I. S.

Abstract. Free radicals play an active role in the inflammatory diseases of the placenta, interfering at a variety of levels of initiation, course and regulation. During the inflammation, direct activation of inflammatory cells, especially granulocytes, reveals a large amount of oxygen radicals and proteases that contribute to the destruction of bacteria and also exacerbate oxidative stress, which in turn serves as a signal for cellular proliferation and apoptosis of certain cellular clones.

The purpose of the study was to determine quantitative parameters of optical density of immunohistochemical staining of proapoptotic protein in deciduocytes of the basal placental plate in case of basal deciduitis concomitant with iron deficiency anemia in pregnant women.

Material and methods. The study involved 198 placentas. The methodology was performed on 5- μ m-thick serial histological sections (after deparaffinization). Primary antibodies to the Bax-protein were used for immunohistochemical identification of proapoptotic molecular factors, visualizing primary antibodies by means of polymeric system (DAKO) with a diaminobenzidine dye. The nucleus staining was finished by Mayer's hematoxylin.

The digital copies of the image were received. The optical density of the histochemical staining was measured by means of the computer microdensitometry method. The arithmetic mean and its error were calculated. Differences in the average tendencies were carried out with the help of a bilateral odd Student's test.

Results and discussion. In the placentas of physiological pregnancy the intensity of the immunohistochemical staining was 0.121 ± 0.0012 relative units of optical density, and in case of iron deficiency anemia in pregnancy it equaled to 0.132 ± 0.0014 , which indicates a significant increase in the apoptosis processes in deciduocytes of the basal plate of the placenta, where $p < 0.001$.

The study of cases of acute basal deciduitis revealed the relative units of optical density at the level of 0.125 ± 0.0013 , and of comorbid iron deficiency anemia in pregnancy it was 0.128 ± 0.0016 , $p > 0.05$. Regarding the chronic basal deciduitis, the quantitative parameters of immunohistochemical staining for the proapoptotic Bax-protein equaled to 0.241 ± 0.0014 , which is statistically higher than the indices in placental physiological pregnancy ($p < 0.001$), and in comorbid iron deficiency anemia in pregnancy it was 0.254 ± 0.0016 , where $p < 0.001$ in comparison with inflammation without anemia.

Conclusions. Iron deficiency anemia in pregnant women leads to an increase in the optical density of immunohistochemical staining for the proapoptotic Bax-protein in deciduocytes of the basal plate of the placenta. The processes of apoptosis intensify only in chronic basal deciduitis, and even more in case of comorbid iron deficiency anemia in pregnant women.

Keywords: proapoptotic Bax-protein, inflammation of the placenta, iron-deficiency anemia in gravidas, deciduocyt.

The authors of this study confirm that the research and publication of the results were not associated with any conflicts regarding commercial or financial relations, relations with organizations and/or individuals who may have been related to the study, and interrelations of coauthors of the article.

Стаття надійшла 17.09.2018 р.

Рекомендована до друку на засіданні редакційної колегії після рецензування