

# КОМП'ЮТЕРНО-ДЕНСИТОМЕТРИЧНІ ТА СПЕКТРАЛЬНІ ПАРАМЕТРИ БІЛКОВОГО КОМПОНЕНТА ТРОФОБЛАСТА, ДЕЦИДУОЦИТІВ, МАТЕРИНСЬКИХ І ПЛОДОВИХ ЕРИТРОЦИТІВ ПЛАЦЕНТИ ПРИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНІЙ ГІПОХРОМНІЙ АНЕМІЇ ВАГІТНИХ

Буковинська державна медична академія, Чернівці

Однією з актуальних проблем в акушерстві є плацентарна недостатність, із якою пов'язують різноманітну патологію плода [4; 6]. Плацентарна недостатність часто поєднується з анемією вагітних, що особливо велике значення має при передчасних пологах [5], причому найбільшою мірою — при тривалих змінах еритроцитарних показників [8]. У зв'язку з цим інтерес викликає вивчення патогенетичних особливостей пролонгованої анемії вагітних. Для уточнення механізмів розвитку захворювань у вагітних, зокрема, впливу різних факторів на плід і плаценту, часто використовують експерименти на щурах [10; 12; 14]. Біологічними відмінностями цих тварин є те, що у них, як і у людини, плацента має гемохоріальний тип [9], а вагітність триває 20–26 діб [7], що дозволяє виконувати хронічні експерименти за порівняно короткий проміжок часу.

Серед важливих аспектів оцінки патології плаценти є вивчення параметрів білкового компонента еритроцитів і структурних елементів плаценти [2]. Для цього можна використати високочутливі методи комп'ютерної денситометрії та спектрального аналізу продуктів гістохімічних реакцій [11; 13]. На щурах такі дослідження не проводилися.

Мета даної роботи — з'ясувати комп'ютерно-денситомет-

ричні та спектральні характеристики білка трофобласта, децидуоцитів, материнських та плодкових еритроцитів плаценти при експериментальній хронічній гіпохромній анемії вагітних із встановленням деяких патогенетичних закономірностей недостатності плаценти.

## Матеріали та методи дослідження

Для моделювання анемії використано 28 самок білих безпородних статевозрілих щурів масою тіла 220–240 г на початку експерименту. Моделювання анемії виконували таким чином. Через 2 доби після запліднення розпочали щоденний відбір по 1 мл крові з хвостової вени і проводили його до завершення експерименту. В контрольній групі вагітних тварин (n=9) в аналогічному порядку виконували імітацію взяття крові, для чого вводили ін'єкційну голку у вену, але кров не відбирали. Оцінювали в динаміці в крові концентрацію еритроцитів —  $10^{12}/л$ , вміст гемоглобіну (Hb) — у грамах на літр і середній вміст Hb в одному еритроциті — у пікограмах.

Експеримент проводили з урахуванням біологічних особливостей щурів, в яких у нормі спостерігаються значні сезонні коливання еритроцитарних показників крові. Дослід здійснювали у літній період,

коли середній вміст Hb в одному еритроциті є найвищим [3], тому про анемію судили, порівнюючи величини еритроцитарних показників із віковою нормою.

На 20-ту добу вагітності під тіопенталовим наркозом за стерильних умов здійснювали екстирпацію матки разом із плацентами та плодами, після чого самок залишали живими. Плаценти фіксували у нейтральному забуференому формаліні, парафінові гістологічні зрізи з оглядовою метою забарвлювали гематоксиліном-еозином, а для оцінки стану білка проводили гістохімічну реакцію на білок із бромфеноловим синім. Ця реакція була обрана у зв'язку з її стехіометричністю, яка дозволяє за кількістю барвника в гістологічних структурах судити про кількість білка. Враховували також і те, що для бромфенолового синього добре вивчені спектральні характеристики.

Здійснювали два варіанти гістохімічної реакції. Перший варіант реакції з бромфеноловим синім виконували за Бонхегом — для визначення загального вмісту білка, який забарвлюється в колір від ледь блакитного до темно-синього залежно від концентрації білка. Другий варіант гістохімічної реакції з бромфеноловим синім виконували за Мікель — Кальво. Остання методика дозволяє за кольоровими (спектраль-



ними) характеристиками судити про співвідношення карбонів й аміногруп у білках. При застосуванні методики Мікель — Кальво білок забарвлюється в жовтий, синій та зелений кольори залежно від його властивостей. Інтенсивність реакції на білок оцінювали комп'ютерно-денситометричним методом за умов, описаних в [2] із використанням цифрових копій зображення, отриманих за методикою [1].

Для оцінки сумарного вмісту білка застосовували показник "Saturation" із системи аналізу HSB за шкалою 256 градаций насиченості кольору, а для спектрального аналізу використовували систему комп'ютерного аналізу кольору RGB. Комп'ютерну денситометрію та спектральний аналіз виконували за допомогою оціночної 30-денної копії комп'ютерної програми Jasc® Paint Shop Pro™ (Jasc® Software, Inc., 2000). У середовищі програми NCSS97 (J. Hintze, 1998) проводили статистичні методи аналізу: обраховували середню та її похибку, а також здійснювали оцінку нормальності розподілу у вибірках за критерієм Шапіро — Вілкі. Оскільки в жодному випадку згідно з вказаним критерієм гіпотеза про нормальність розподілу у вибірках не була відхилена, відмінності у середніх тенденціях між групами дослідження виявляли за критерієм Стьюдента. Паралельно, враховуючи малий об'єм вибірок, використовували непараметричний критерій Wilcoxon, який давав величини вірогідності відмінностей близькі до тих, що були обчислені за допомогою критерію Стьюдента.

### Результати дослідження та їх обговорення

У контрольній групі тварин у динаміці вагітності включно до 20-ї доби гестації спостерігалось поступове зниження еритроцитарних показників крові порівняно з вихідним рівнем.

На 20-ту добу вміст Hb становив  $(112,0 \pm 1,6)$  г/л, концентрація еритроцитів —  $(7,10 \pm 0,04) \cdot 10^{12}/\text{л}$ , середній вміст Hb в еритроциті —  $(15,80 \pm 0,48)$  пг. Таким чином, у щурів, як і у людей, у материнському організмі в процесі нормальної вагітності знижуються величини основних еритроцитарних показників, тому наведені цифри слід вважати критерієм норми для періоду гестації 20 тиж.

В основній групі з 8–10-ї доби вагітності у всіх тварин розпочиналося прогресуюче зниження еритроцитарних показників включно до 20-ї доби, причому порівняно з контрольною групою щурів середні величини основної групи були меншими з вірогідністю  $P < 0,001$ . Незважаючи на те, що моделювання анемії в усіх самок проводили стандартними методами, ступінь зниження показників сильно різнився серед тварин, що вказувало на їхню неоднакову чутливість до експериментального впливу. Розподіл величин еритроцитарних показників крові на 20-й день вагітності дозволив виділити три групи тварин з урахуванням ступеня тяжкості анемії:

I ст. ( $n=12$ ): вміст Hb —  $(103,0 \pm 1,9)$  г/л, концентрація еритроцитів —  $(6,70 \pm 0,05) \cdot 10^{12}/\text{л}$ , середній вміст Hb в еритроциті —  $(15,30 \pm 0,14)$  пг;

II ст. ( $n=9$ ): вміст Hb —  $(84,0 \pm 2,4)$  г/л, концентрація еритроцитів —  $(6,10 \pm 0,07) \cdot 10^{12}/\text{л}$ , середній вміст Hb в еритроциті —  $(13,80 \pm 0,18)$  пг;

III ст. ( $n=7$ ): вміст Hb —  $(52,0 \pm 1,3)$  г/л, концентрація еритроцитів —  $(5,20 \pm 0,07) \cdot 10^{12}/\text{л}$ , середній вміст Hb в еритроциті —  $(10,10 \pm 0,21)$  пг.

У крові тварин дослідної групи з наростанням терміну вагітності збільшувалася кількість мікроцитарних форм еритроцитів і мікросфероцитів. Таким чином, у результаті моделювання розвивалася типова хронічна постгеморагічна гіпохромна анемія.

Основні риси гістологічної картини виражалися в такому. У каналах лабіринту плаценти та судинах базальної пластинки морфологічних проявів гемодинамічних порушень не виявили навіть при анемії III ст., тимчасом як у плодових судинах спостерігався помітний сладж плодових еритроцитів при анемії різних ступенів тяжкості. У деяких випадках відмічена гіперплазія плодових капілярів. При анемії III ст., на відміну від менш тяжких станів, сладж еритроцитів поширювався на артеріальні та венозні судини лабіринту, хоріальної пластинки та пуповини.

При забарвленні гістологічних зрізів на білок за Бонхегом візуально найбільшу інтенсивність забарвлення виявляли плодові еритроцити та нуклеоли ядер децидуальних клітин. Меншою мірою забарвлювалися материнські еритроцити, ще меншою — елементи трофобласта лабіринту та цитоплазма децидуальних клітин (рис. 1 і 3).

Результати комп'ютерно-денситометричного аналізу вмісту білка згідно з методикою Бонхега подано у таблиці.

Як видно з табличних даних, загальний вміст білка в материнських еритроцитах значно менший, ніж у контрольній групі, при всіх ступенях тяжкості анемії, що підтверджує гіпохромний характер патології крові.

У трофобласті лабіринту хоча і спостерігалася деяка тенденція до зниження концентрації білка при I ст. та II ст. анемії, лише при анемії III ст. це зменшення мало статистично вірогідний характер. Оскільки трофобласт відіграє важливу роль у забезпеченні плодової крові необхідними для плода компонентами, додатково було проведено спектральний аналіз білкового компонента на основі методики Мікель — Кальво. В нормі у трофобласті лабіринту плаценти щурів у білку домінують



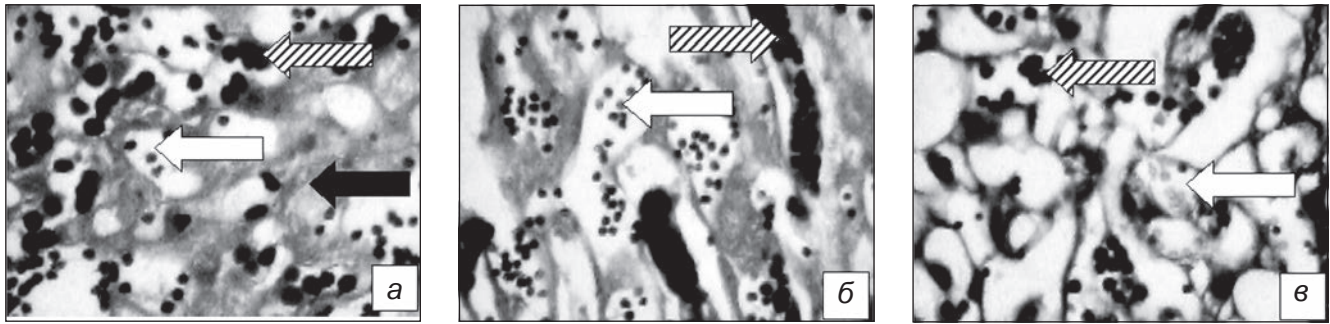


Рис. 1. Гістохімічні препарати (реакція на білок за Бонхеґом) лабіринтної частини плаценти щурів у 20 діб гестації: а — контрольна група тварин; б — анемія II ст.; в — анемія III ст.  $\times 240$ . Білими стрілками вказані материнські еритроцити, штрихованими — плодові еритроцити, чорними — трофобласт

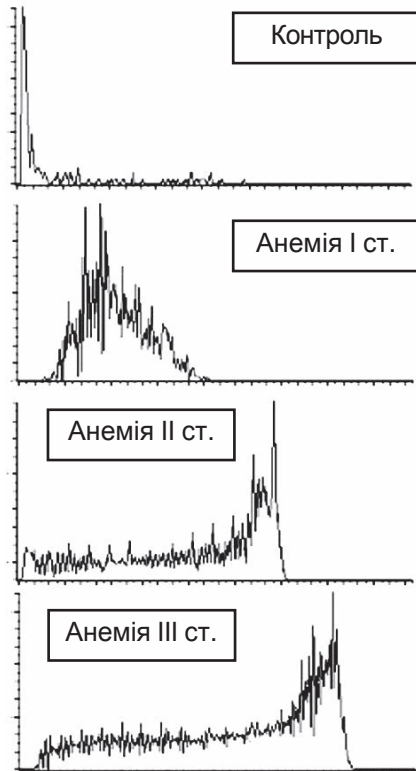


Рис. 2. Гістограми зеленого спектра барвника в трофобласті лабіринту (система RGB)

аміногрупи над карбоновими групами, що доводить переважання синього спектра. З'ясувалося, що вже при анемії I ст. вірогідно ( $P < 0,05$ ) змінюються спектральні характеристики білка зі збільшенням зеленого компонента у забарвленні, що вказує на підвищення у трофобласті концентрації карбонових груп у білках. З наростанням ступеня анемії зміщення спектра в бік зеленого кольору набувало все більших величин (рис. 2).

У децидуальних клітинах за комп'ютерно-денситометричними даними при II та III ст.

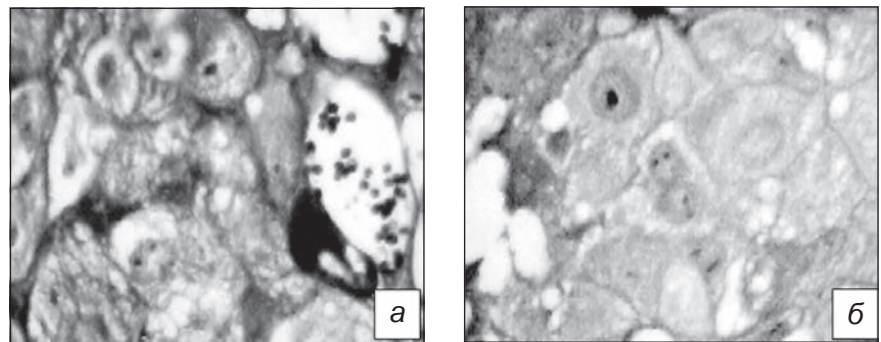


Рис. 3. Гістохімічні препарати (реакція на білок за Бонхеґом) базальної пластинки плаценти щурів у 20 діб гестації: а — контрольна група тварин; б — анемія III ст.  $\times 240$

Таблиця

**Комп'ютерно-денситометричні параметри білкового компонента структурних елементів плаценти щурів залежно від ступеня анемії,  $\bar{X} \pm s\bar{x}$**

Показник "Saturation"	Групи дослідження			
	Контроль, n=9	Анемія I ст., n=12	Анемія II ст., n=9	Анемія III ст., n=7
У плодових еритроцитах	191,0 $\pm$ 5,2	188,0 $\pm$ 3,7 $P_K=0,998$	181,0 $\pm$ 4,8 $P_K=0,192$ $P_1=0,309$	178,0 $\pm$ 5,9 $P_K=0,121$ $P_1=0,178$ $P_2=0,996$
У материнських еритроцитах	85,0 $\pm$ 1,5	79,0 $\pm$ 1,4 $P_K=0,009$	68,0 $\pm$ 1,1 $P_K < 0,001$ $P_1=0,001$	54,0 $\pm$ 1,4 $P_K < 0,001$ $P_1 < 0,001$ $P_2 < 0,001$
У трофобласті лабіринту	35,0 $\pm$ 0,6	34,0 $\pm$ 0,5 $P_K=0,244$	33,0 $\pm$ 0,8 $P_K=0,062$ $P_1=0,391$	33,0 $\pm$ 0,7 $P_K=0,048$ $P_1=0,322$ $P_2=1,000$
У децидуальних клітинах (децидуоцитах)	42,0 $\pm$ 0,8	43,0 $\pm$ 0,7 $P_K=0,493$	40,0 $\pm$ 0,5 $P_K=0,049$ $P_1=0,009$	35,0 $\pm$ 0,9 $P_K=0,002$ $P_1 < 0,001$ $P_2=0,003$

Примітки: 1. Показник "Saturation" поданий в умовних денситометричних одиницях за шкалою 256 градацій (від 0 до 255).

2.  $P_K$  — показник вірогідності розбіжностей порівняно з контролем за двостороннім критерієм Стюдента,  $P_1$  та  $P_2$  — показники вірогідності розбіжностей порівняно з групами дослідження «Анемія I ст.» та «Анемія II ст.» відповідно.



анемії відмічалось зниження концентрації білка (рис. 3), яке не супроводжувалося змінами спектральних характеристик його забарвлення. Аналогічно не відмічалось змін спектральних характеристик забарвлення білка плодових та материнських еритроцитів.

Як видно з табличних даних, загальний вміст білка у плодових еритроцитах мало змінювався при наростанні ступеня анемії. Враховуючи відомий факт тісної залежності стану плодових еритроцитів від стану тканини плаценти, що наявне у людей [3], слід спробувати пояснити, чому у щурів не вдалося в даному експерименті досягти патологічного стану еритроцитів у плодів. Можливо, що це пов'язано з особливостями кровообігу в плаценті щурів порівняно з плацентою людини. Зокрема, на відміну від людини, у якої потоки материнської та плодової крові описуються як багатоворсинкові [9] і тому є значною мірою хаотичними, у щура, як типового представника гризунів, спостерігається протипотоковий механізм руху кров'яних потоків, що є найбільш ефективним серед відомих у тваринницькому світі. Така властивість кровотоку в плаценті щура дозволяє йому мати порівняно невелику плаценту — 1:10 по відношенню до маси плода (у людини це співвідношення становить 1:6) [9].

## Висновки

1. Комп'ютерно-денситометричні та спектральні параметри білкового компонента структурних елементів плаценти є чутливими показниками метаболічної патології плаценти при експериментальній анемії вагітних.

2. Для оцінки стану білкового компонента трофобласта лабіринту плаценти щурів більш ефективним є спектральний аналіз порівняно з оцінкою загального вмісту білка комп'ютерно-денситометричним методом.

Обґрунтовано перспективність подальших розробок щодо застосування комп'ютерної денситометрії для оцінки метаболічної недостатності плаценти.

## ЛІТЕРАТУРА

1. Давиденко І. С. Напівавтома-тичний кількісний комп'ютерний аналіз мікроскопічного зображення в гістопатології // Бук. мед. вісник. — 2000. — Т. 4, № 2. — С. 165-169.

2. Давиденко І. С. Комп'ютерно-денситометричні параметри білкового компонента міжворсинкового фібриноїду плаценти та їх залежність від еритроцитарних показників материнської крові // Там же. — Т. 4, № 4. — С. 134-139.

3. Евсеєнко Д. А., Цирельников Н. И. Роль плаценти в регуляції фетального зритропоеза // Бюл. експерим. биол. и мед. — 2001. — Т. 132, № 11. — С. 519-521.

4. Запорожан В. М., Даниленко А. І., Макулькін Р. Ф. Плацентарна недостатність і її вплив на плід // Одес. мед. журнал. — 1999. — № 4. — С. 82-84.

5. Кравченко О. В., Приходько С. Д. Передчасні пологи як група ризику ускладнень в третьому та післяпологовому періодах // Вісн. наук. досліджень. — 2000. — № 1. — С. 67-68.

6. Милованов А. П. Патология системы мать—плацента—плод: Рук. для врачей. — М.: Медицина, 1999. — 448 с.

7. Міхєєв А. О., Магалаєс В. М., Щербініна А. В. Лабораторні щури. — Чернівці: Рута, 2002. — 66 с.

8. Сенчук А. Я., Задорожная Т. Д., Константинов К. К. Морфофункциональные и ультраструктурные изменения в плаценте при железодефицитной анемии беременных // Вісн. асоц. акуш.-гінек. України. — 1999. — № 4. — С. 25-30.

9. Benirschke K., Kaufmann P. Pathology of the Human Placenta. — 3<sup>rd</sup> ed. — N.Y.: Springer-Verlag, 1995. — 871 p.

10. Berger J. Age-related sensitivity of rats to induction of anaemia // Folia Haematol. — 1987. — Vol. 114. — P. 408-413.

11. Kudo A., Hirano H. The practical side of image processing with the use of a personal computer: Automation of the analyzing processes employing NIH image and Adobe Photoshop<sup>R</sup> with power Macintosh computer // Acta histochem. et cytochem. — 1999. — Vol. 32, N 3. — P. 229-233.

12. Activity and protein localization of multiple glutamate transporters in gestation day 14 vs day 20 rat placenta / J. Matthews, M. J. Beveridge, M. S. Malandro, J. D. Rothstein // Amer. J. Physiol. — 1998. — Vol. 274, N 3, Pt. 1. — P. 603-613.

13. Rizzuto R., Carrington W., Tuft R. A. Digital imaging microscopy of living cells // Trends Cell Biol. — 1998. — Vol. 8, N 7. — P. 288-292.

14. Vascular endothelial growth factor expression in the rat uterus and placenta throughout pregnancy / A. Watanabe, T. Yasumizu, K. Hoshi et al. // Acta histochem. et cytochem. — 1998. — Vol. 31, N 5. — P. 419-426.

УДК 579.61:616-078:579.873.21

П. З. Протченко, О. А. Грузевський, О. В. Філіповський

## ДОСЛІДЖЕННЯ ВИДОСПЕЦИФІЧНОСТІ АНТИГЕНІВ, ЩО МІСТЯТЬСЯ В ЕКСТРАКТАХ ПОВЕРХНЕВИХ КОМПОНЕНТІВ M. AVIUM

Одеський державний медичний університет

Вельми широке розповсюдження туберкульозу відзначається в усьому світі, в Україні він набув характеру епі-

демії [1; 3]. Важливу роль у такому загостренні епідемічної ситуації відіграють атипівні мікобактерії. Значення цих

мікроорганізмів зростає, тим більше що вони є збудниками опортуністичних інфекцій при СНІДі й інших імунодефіцит-

