

О.А.Тюленєва
І.С.Давиденко
В.О.Тюленєва

ЗВО «Буковинський
державний медичний
університет»
Чернівці, Україна

Надійшла: 14.09.2023
Прийнята: 29.09.2023

DOI: <https://doi.org/10.26641/1997-9665.2023.3.125-130>

УДК: 618.214+618.36]-091:616.155.194.8:618.3-06

МОРФОМЕТРИЧНА ТА ГІСТОХІМІЧНА ОЦІНКА ЛЕЙОМІОЦИТІВ У ПРОЕКЦІЇ МАТКОВО-ПЛАЦЕНТАРНОЇ ДІЛЯНКИ ПРИ ЗАЛІЗОДЕФІЦИТНІЙ АНЕМІЇ ВАГІТ- НИХ

Tiulienieva O.A. , Davydenko I.S. , Tiulienieva V.O.  ✉ Morphometric and histochemical evaluation of leiomyocytes in the projection of the utero-placental area in iron-deficiency anemia of pregnancy. **Institution of higher education Bukovinian State Medical University, Chernivtsi, Ukraine.**

ABSTRACT. Background. With iron-deficiency anemia of pregnancy (IDA), the uteroplacental area (UPA) morphologically shows signs of gestational immaturity, there are prerequisites for a violation of hemodynamics in its projection and myometrial tone. **Objective:** to evaluate the morpho-functional state of leiomyocytes in the projection of UPA at IDA by establishing the quantitative characteristics of free radical damage. **Methods.** 74 biopsies of the myometrium in the UPA projection were studied during physiological pregnancy and gestation on the background of I, II and III degrees of IDA. By histochemical methods using the reaction with the chromotrope water-blue according to N.Z.Slinchenko, bromophenol blue for "acidic" and "basic" proteins according to Mikel Calvo and the ninhydrin-Schiff reaction for free amino groups of proteins according to A.Yasuma and T.Ichikava, in combination with computer microspectrophotometry and microdensitometry, quantitative parameters of free radical damage to leiomyocytes were established. **Results.** A significant increase in signs of free-radical damage to proteins was noted with IDA. The values of the studied parameters increased according to the degree of anemia and agreed with each other in the context of the interpretation of the phenomenon: specific volume of leiomyocytes in the state of chromotropophilia ($P<0.001$), indicators of oxidative modification of proteins ($P<0.001$) and limited proteolysis in the cytoplasm of muscle cells ($P<0.001$) significantly exceeded the indicators of the physiological gestation group. **Conclusions.** 1. In cases of pregnancy with iron deficiency anemia, the degree of intensification of the processes of oxidative modification of proteins and limited proteolysis in the cytoplasm of leiomyocytes in the projection of the uteroplacental area correlates with the degree of severity of anemia. 2. Depending on the degree iron-deficiency anemia significantly affects the morpho-functional state of leiomyocytes in the projection of the utero-placental area creating prerequisites for the development of myometrial tone pathology, its contractile dysfunction and loss of myometrial control on the intensity of blood flow in the placental bed of the uterus.


Key words: utero-placental area, leiomyocytes, chromotropophilia, protein oxidative modification, limited proteolysis, iron deficiency anemia of pregnancy.

Citation:

Tiulienieva OA, Davydenko IS, Tiulienieva VO. [Morphometric and histochemical evaluation of leiomyocytes in the projection of the utero-placental area in iron-deficiency anemia of pregnancy]. *Morphologia*. 2023;17(3):125-30. Ukrainian.

DOI: <https://doi.org/10.26641/1997-9665.2023.3.125-130>

 Olena Tiulienieva 0000-0003-2961-4076

 Igor Davydenko 0000-0001-6712-3396

 Viallanta Tiulienieva 0000-0001-7600-2940

✉ tuleneva@bsmu.edu.ua

© Dnipro State Medical University, «Morphologia»

Вступ

Матково-плацентарна ділянка (МПД) або плацентарне ложе формується в місці прикріплення плідного яйця до стінки матки і є осередком гестаційно зміненого ендометрію. Упродовж всього періоду вагітності у МПД та міометрії в її

проекції з різною інтенсивністю відбуваються процеси ангіогенезу та васкулогенезу, які забезпечують постійне оновлення капілярного русла і добудову нових судин матково-плацентарного контуру кровообігу [1].

Залізодефіцитна анемія вагітних (ЗДАВ) –

одна з найактуальніших проблем сучасного акушерства. У попередніх дослідженнях нами встановлено, що при гестації на фоні ЗДАВ, залежно від ступеня залізодефіциту, матково-плацентарна ділянка морфологічно має ознаки гестаційної незрілості [2]; виявлено зростання імуноекспресії віментину та фактору von Willebrand як маркерів посилення ангиогенезу, васкулогенезу, інтенсифікації ендотеліальної дисфункції і процесів тромбоутворення у різних типах кровоносних судин у проекції плацентарного ложа матки [2, 3].

Тонус міометрію багато в чому визначається структурно-функціональними особливостями окремих його волокон, а скоротлива активність міоцитів супроводжується суттєвими змінами ряду спектроскопічних характеристик. В деяких випадках зміни розмірів міоцитів, оцінені із використанням кореляційної спектроскопії, корелюють із даними досліджень скоротливої активності, одержаними іншими методами. Проте при математичному їх аналізі та інтерпретації корелограм виникає низка питань, пов'язаних із високою гетерогенністю клітинної популяції за розмірами та нетривіальною геометрією міоцитів (еліпс, подвійний конус або більш складна форма) [4, 5].

З огляду на викладене, вивчення гістохімічних характеристик лейоміоцитів здатне розширити уявлення щодо їхньої функційної спроможності та з'ясувати можливі морфологічні передумови для розвитку скоротливої дисфункції міометрію при залізодефіцитній анемії вагітних.

Мета дослідження: оцінити морфофункційний стан лейоміоцитів у проекції матково-плацентарної ділянки при залізодефіцитній анемії вагітних шляхом встановлення кількісних характеристик вільнорадикального ушкодження м'язових клітин.

Матеріали та методи

Морфологічні дослідження проводили в період 2016–2021 рр. на кафедрі патологічної анатомії Буковинського державного медичного університету (Чернівці, Україна) на біоматеріалі, отриманому під час операції кесаревого розтину на підставі інформованої добровільної згоди вагітної на забір посліду та МПД. Дослідження виконано з дотриманням Конвенції Ради Європи про охорону хребетних тварин, які використовують у експериментах та інших наукових цілях (від 18.03.1986 р.) «Правил етичних принципів проведення наукових медичних досліджень за участю людини», затверджених Гельсінською декларацією (1964 – 2013 рр.), ICH GCP (1996 р.), відповідно до Директиви ЄС № 609 (від 24.11.1986 р.), наказів МОЗ України № 690 від 23.09.2009 р., № 944 від 14.12.2009 р., № 616 від 03.08.2012 р.

Критерієм ступеня тяжкості ЗДАВ за матеріалами медичної документації була концен-

трація гемоглобіну в крові вагітної: I ступінь ЗДАВ відповідав зниженню концентрації гемоглобіну до 100-91 г/л, II ступінь – 90-71 г/л, III ступінь – нижче 71 г/л. У всіх спостереженнях анемія була гіпохромною. Досліджено 74 біоптати міометрію у проекції МПД спостережень фізіологічної вагітності та гестації на фоні ЗДАВ I, II та III ступенів тяжкості. Термін пологів 37-40 тижнів. Кількість спостережень у конкретних групах дослідження надана у таблиці 1.

Матеріал фіксували у 10% водному нейтральному розчині формаліну 24-48 годин, проводили етанолову дегідратацію та заливку в парафін за стандартною процедурою. На серійних гістологічних зрізах товщиною 5 мкм виконували гістохімічні методики: 1) за Н.З.Слінченко з хромотропом водним блакитним для оцінки хромотропофілії лейоміоцитів; 2) з бромфеноловим синім на «кислі» та «основні» білки за Mikel Calvo для візуалізації окиснювальної модифікації білків; 2) за A.Yasuma та T.Schikava нінгідриново-шифовську реакцію на вільні аміногрупи білків для оцінки ступеня обмеженого протеолізу.

У середовищі комп'ютерної програми ImageJ (1.48, W. Rasband, National Institutes of Health, USA, 2015) у системі оцінки кольору RGB на цифрових копіях зображень визначали коефіцієнт R/B за алгоритмом [6]. Коефіцієнт R/B, як показник співвідношення між аміно- та карбоксильними групами в білках конкретної локалізації, був мірою окиснювальної модифікації білка. Кількісною мірою обмеженого протеолізу служила величина оптичної густини, яку вимірювали у відносних одиницях (в.од.опт. густини) на цифрових копіях монохромного зображення шляхом комп'ютерної мікроденситометрії.

Для кожного показника обраховували середню арифметичну та її похибку, розбіжності у середніх тенденціях перевіряли за допомогою непарного критерію Стьюдента після перевірки вибірки на нормальність розподілу за критерієм Shapiro-Wilk. Для статистичної оцінки вірогідності розбіжностей був застосований однофакторний дисперсійний аналіз та метод множинних порівнянь середніх Ньюмена-Кейлса, оскільки ступені анемії з позиції статистики є градаціями фактора. Основні статистичні характеристики, наведені в описі результатів дослідження, включають: кількість спостережень (n), середню арифметичну (M), стандартну похибку середньої величини (m), рівень статистичної значущості (p). Статистичні розрахунки виконували у середовищі ліцензійної копії комп'ютерної програми Paleontological Statistics (PAST) v4.05. (Hammer Ø. PAST: Paleontological Statistics, Version 4.05. 2021) [7].

Результати та їх обговорення

В гістологічних препаратах м'язову тканину

зазвичай оцінюють, використовуючи ті ж методи фарбування, як і для візуалізації компонентів сполучної тканини – дво- і триколірні методики, при яких контрастно забарвлюються колагенові волокна та м'язові елементи [8]. Наприклад, при використанні методики за Сельє для виявлення змін міоцитів, суть дистрофічних змін заключається в появі у цитоплазмі фуксинофільного субстрату: зміни виникають спочатку поблизу ядра, а далі поширюються на більшу частину м'язового волокна, в результаті чого воно перетворюється на однорідну різко фуксинофільну масу. Фуксинофілія згасає при розвитку некробіотичних змін міоцитів.

У цьому дослідженні для ідентифікації фібрину, волокнистого компонента стромы та лейкоцитів використано методику за Н.З.Слінченко з хромотропом водним блакитним після протравки фосфорно-вольфрамовою кислотою. Отож, аналіз стану м'язових клітин здійснено на підставі оцінки їх хромотропофілії як міри альтерації, зміни властивостей внутрішньоклітинного білка внаслідок інтенсифікації вільнорадикальних процесів в умовах залізодефіциту.

Показники морфометричної та гістохімічної оцінки морфо-функційного стану лейкоцитів у проекції матково-плацентарної ділянки подані у таблиці 1.

Таблиця 1
Морфометрична та гістохімічна оцінка морфо-функційного стану лейкоцитів у проекції матково-плацентарної ділянки при залізодефіцитній анемії вагітних (M±m)

| Показник / одиниці вимірювання | Фізіологічна вагітність (n=20) | Основні групи | | |
|--|--------------------------------|--------------------------|--------------------------------------|---|
| | | ЗДАВ I ст (n=20) | ЗДАВ II ст (n=18) | ЗДАВ III ст (n=16) |
| Питомий об'єм лейкоцитів у стані хромотропофілії при гістохімічному забарвленні за Н.З.Слінченко (%) | 0,8±0,22 | 17,5±0,21 Pф=0,011 | 26,4±0,22 Pф=0,001 PI=0,006 | 32,5±0,22 Pф<0,001 PI<0,001 PII=0,003 |
| Коефіцієнт R/B при гістохімічному забарвленні на «кислі» та «основні» білки за Mikel Calvo | 1,03±0,012 | 1,22±0,013 Pф=0,018 | 1,26±0,012 Pф<0,001 PI=0,005 | 1,36±0,014 Pф<0,001 PI<0,001 PII=0,001 |
| Вільні аміногрупи білків при гістохімічному забарвленні за A.Yasuma та T.Ichikava (в.о.опт.густини) | 0,146±0,0014 | 0,193±0,0012 Pф=0,015 | 0,199±0,0014 Pф<0,001 PI=0,014 | 0,218±0,0012 Pф<0,001 PI<0,001 PII=0,001 |

Примітка. Розбіжності між групами дослідження обраховані за методом множинних порівнянь середніх Ньюмена-Кейлса. Pф – величина вірогідності відмін у порівнянні з фізіологічною вагітністю, PI – із ЗДАВ I ст., PII – із ЗДАВ II ст.

Надзвичайно цікавим виявився підхід до оцінки морфо-функційного стану лейкоцитів в аспекті ЗДАВ шляхом співставлення результатів визначення питомого об'єму лейкоцитів в стані хромотропофілії при гістохімічному забарвленні за Н.З.Слінченко з показниками вільнорадикального ушкодження м'язових клітин – коефіцієнту R/B при гістохімічному забарвленні на «кислі» та «основні» білки за Mikel Calvo та оптичної густини забарвлення на вільні аміногрупи білків за A.Yasuma та T.Ichikava.

При співставленні з показниками фізіологічної гестації у групах спостережень із ЗДАВ відмічене суттєве наростання відсотку питомого об'єму лейкоцитів в стані хромотропофілії (Pф<0,001), коефіцієнту R/B (Pф<0,001) та значень оптичної густини забарвлення на вільні аміногрупи білків в цитоплазмі міоцитів (Pф<0,001).

Типовий вигляд лейкоцитів у стані хромотропофілії у проекції плацентарного ложа матки

при фізіологічній вагітності та гестації при ЗДАВ проілюстровано за допомогою рисунку 1.

В основних групах – випадках вагітності при ЗДАВ значення досліджуваних параметрів збільшувалися відповідно до ступеня анемії та узгоджувалися між собою в контексті тлумачення явища: питомий об'єм лейкоцитів у стані хромотропофілії (Pф<0,001, PI<0,001, PII=0,003), показники окиснювальної модифікації білків (Pф<0,001, PI<0,001, PII=0,001) та обмеженого протеолізу у цитоплазмі м'язових клітин (Pф<0,001, PI<0,001, PII=0,001) суттєво перевищували показники групи фізіологічної гестації.

Особливо примітним було різке зростання питомого об'єму хромотропофільних лейкоцитів при ЗДАВ III ступеня: у 1,9 рази порівняно зі ЗДАВ I ступеня та майже у 40 разів порівняно з фізіологічною вагітністю.

Зображення гістохімічного забарвлення міометрію у проекції матково-плацентарної ділянки на співвідношення «кислих» та «основних»

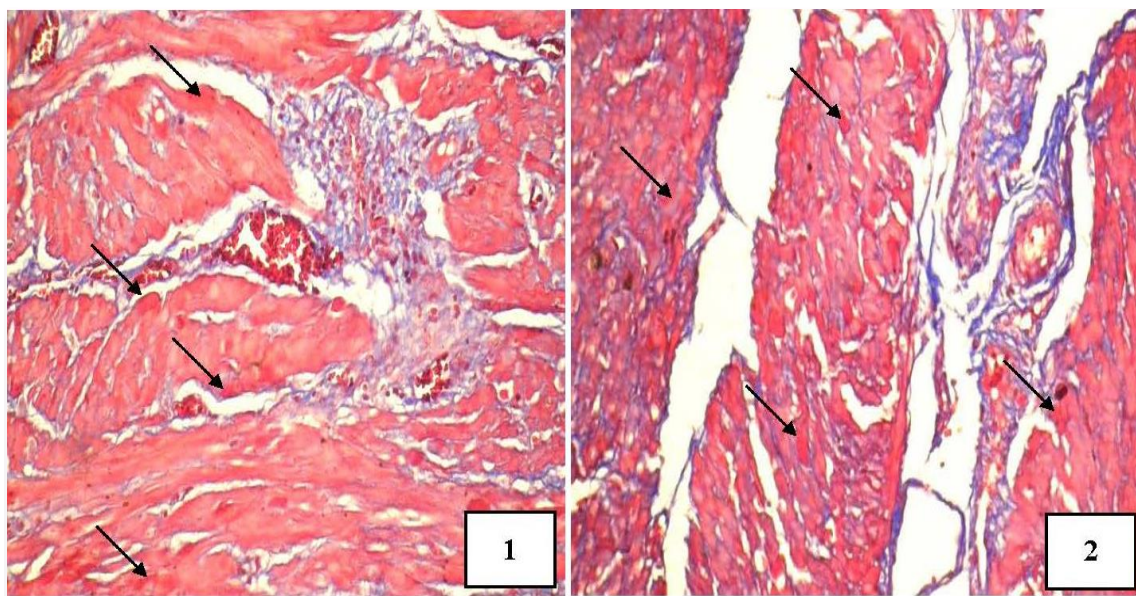


Рис. 1. Міометрій у проекції матково-плацентарної ділянки у 39 – 40 тижнів, лейоміоцити у стані хромотропофілії: 1 – фізіологічна вагітність, 2 – вагітність при ЗДАВ. Забарвлення хромотропом-водним блакитним за Н.З.Слісценко. $\times 100$.

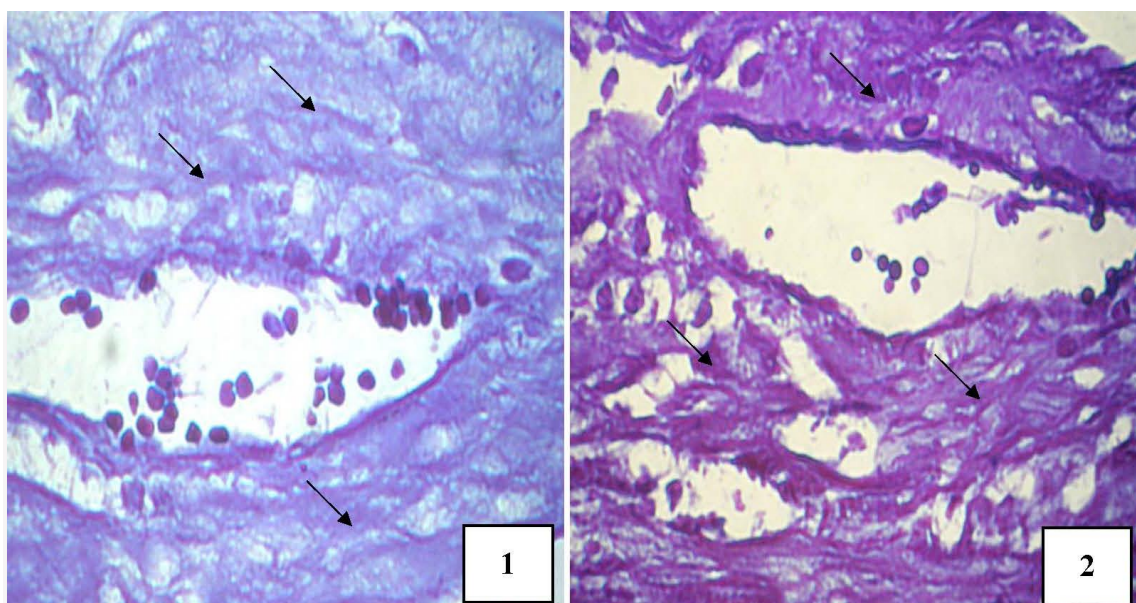


Рис. 2. Міометрій в проекції матково-плацентарної ділянки у 39 – 40 тижнів: 1 – спостереження фізіологічної гестації; 2 – спостереження вагітності при ЗДАВ. Забарвлення на «кислі» та «основні» білки бромфеноловим синім за Mickle Calvo. $\times 600$.

Низкою опублікованих праць з різнопланової патології матково-плацентарної гемодинаміки виявлені прямі кореляційні залежності між доплерометричними показниками артеріального тиску у маткових артеріях, перфузійного тиску в судинах міометрію, інтенсивністю кровотоку в судинах матково-плацентарної ділянки, інтервільозному просторі і величинами тонічної напру-

ги міометрію [9, 10, 11, 12].

Таким чином, у цьому дослідженні описані кількісними параметрами інтенсифікація процесів окиснювальної модифікації білків та обмеженого протеолізу, зміни гістохімічних властивостей білків цитоплазми лейоміоцитів (хромотропофілія) у проекції матково-плацентарної ділянки як ознаки вільнорадикального ушкодження,

дозволяють вважати, що у проекції плацентарного ложа матки в умовах залізодефіциту та гіпоксії наявні морфологічні передумови для розвитку

дисфункції міометрію, яка визначається ступенем анемії.

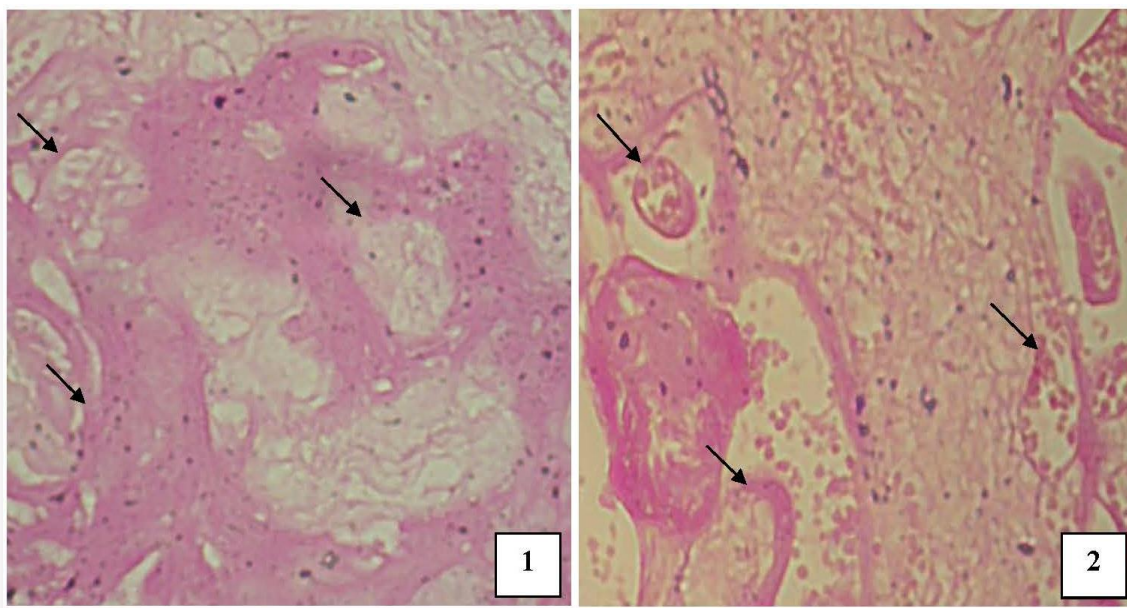


Рис. 3. Міометрій у проекції матково-плацентарної ділянки у 39 – 40 тижнів: 1 – спостереження фізіологічної гестації; 2 – спостереження вагітності при ЗДАВ. Нінгідринно-шифовська гістохімічна реакція на вільні аміногрупи білків за A.Yasuma та T.Ichikava. $\times 400$.

Висновки

1. У випадках гестації при залізодефіцитній анемії ступінь інтенсифікації процесів окиснювальної модифікації білків та обмеженого протеолізу в цитоплазмі лейоміоцитів у проекції матково-плацентарної ділянки корелює зі ступенем тяжкості анемії.

2. Залежно від ступеня, залізодефіцитна анемія суттєво впливає на морфо-функційний стан лейоміоцитів у проекції матково-плацентарної ділянки, створюючи передумови для розвитку патології тону міометрію, його скоротливої дисфункції і втрати міометріального контролю над інтенсивністю кровотоку у плацентарному ложі матки.

Перспективи подальших розробок пов'язані з оцінкою морфо-функційного стану лейоміоцитів у проекції матково-плацентарної ділянки в аспекті морфогенезу матково-плацентарної форми хронічної недостатності посліду залежно від ступеня залізодефіцитної анемії вагітних.

зани з оцінкою морфо-функційного стану лейоміоцитів у проекції матково-плацентарної ділянки в аспекті морфогенезу матково-плацентарної форми хронічної недостатності посліду залежно від ступеня залізодефіцитної анемії вагітних.

Інформація про конфлікт інтересів

Потенційних чи явних конфліктів інтересів, що пов'язані з цим рукописом, на момент публікації не існує та не передбачається.

Джерела фінансування

Дослідження проведено в рамках науково-дослідної теми «Удосконалення патологоанатомічної діагностики різних форм недостатності плаценти» (номер державної реєстрації 0119U101347).

Літературні джерела References

1. Burton GJ, Fowden AL. The placenta: a multifaceted, transient organ. *Philos Trans R Soc Lond Ser B Biol Sci.* 2015;370(1663):20140066. DOI: 10.1098/rstb.2014.0066

2. Tiulienieva OA, Davydenko IS. [Morphological evaluation of gestational changes of the vascular bed of the uterine-placental area in iron deficiency anemia in pregnant women in terms of chronic insufficiency of manure]. *Klinichna anatomiya ta operatyvna khirurgiya.* 2019;4(18):47-53. Ukrainian.

3. Figueiredo ACMG, Gomes-Filho IS, Silva

RB, Pereira PPS, Mata FAFD, Lyrio AO. Maternal Anemia and Low Birth Weight: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Nutrients.* 2018;10(5):601. DOI: 10.3390/nu10050601

4. Jordans IPM, Vissers J, de Leeuw RA, Hehenkamp WJK, Twisk JWR, Groot CJMD, Huirne JAF. Change of the residual myometrial thickness during pregnancy after laparoscopic niche resection in comparison to controls without niche surgery; a prospective comparative cohort study. *American Journal of Obstetrics and Gynecology.*

2022;1:35. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ajog.2022.07.011>

5. Otun HA, Innes BA, Lash GE, Schiessl B, Ball E, Searle RF, Robson SC, Bulmer JN. Quantification of spiral artery remodelling using an Adobe Photoshop-based technique. *Reproduction*. 2019;158(5):389-397. DOI: 10.1530/REP-19-0133

6. Ilika VV. [Chemiluminescent Studying of Nitro-Peroxides in Placental Structures in Chorionamnionitis and Basal Deciduitis in Pregnant Women with Iron Deficiency Anemia]. *Ukrayinskyi zhurnal medytsyny, biolohiyi ta sportu*. 2018;5(14):36-40. Ukrainian. DOI: 10.26693/jmbs03.05.036

7. Hammer Ø, author. PAST: Paleontological Statistics. Version 4.05. Reference Manual. Oslo: Natural History Museum University of Oslo; 2021. 284 p.

8. Bahriy MM, Dibrova VA, Popadynets' OH, Hryshchuk MI, authors. [Metodyky morfolohich-

nykh doslidzhen': monohrafiya]. Vinnytsya: Nova Knyha; 2016. 328 p. Ukrainian.

9. Ernst LM. Maternal vascular malperfusion of the placental bed. *APMIS*. 2018;126(7):551-560. DOI: 10.1111/apm.12833

10. Levytska K, Higgins M, Keating S, Melamed N, Walker M, Sebire NJ, Kingdom JC. Placental Pathology in Relation to Uterine Artery Doppler Findings in Pregnancies with Severe Intrauterine Growth Restriction and Abnormal Umbilical Artery Doppler Changes. *Am J Perinatol*. 2017;34(5):451-457. DOI: 10.1055/s-0036-1592347

11. Tian Y, Yang X. A Review of Roles of Uterine Artery Doppler in Pregnancy Complications. *Front Med (Lausanne)*. 2022;9:813343. DOI: 10.3389/fmed.2022.813343

12. Woo J, Kahn B. Enhanced myometrial vascularity: case presentation and review. *Fertil Steril*. 2021;116(3):912-914. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2021.05.097

Тюленєва О.А., Давиденко І.С., Тюленєва В.О. Морфометрична та гістохімічна оцінка лейоміоцитів у проекції матково-плацентарної ділянки при залізодефіцитній анемії вагітних.

РЕФЕРАТ. Актуальність. При залізодефіцитній анемії вагітних (ЗДАВ) матково-плацентарна ділянка (МПД) морфологічно має ознаки гестаційної незрілості, наявні передумови для порушення гемодинаміки в її проекції і тонуусу міометрію. **Мета** дослідження: оцінити морфо-функційний стан лейоміоцитів у проекції МПД при ЗДАВ шляхом встановлення кількісних характеристик вільнорадикального ушкодження. **Методи.** Досліджено 74 біоптати міометрію у проекції МПД при фізіологічній вагітності та гестації на фоні ЗДАВ I, II та III ступенів тяжкості. Гістохімічними методами за допомогою реакції з хромотропом водним-блакитним за Н.З.Слінченко, бромфеноловим синім на «кислі» та «основні» білки за Mikel Salvo та нінгідриново-шифовської реакції на вільні аміногрупи білків за А. Yasuma та Т. Ichikava, у поєднанні з комп'ютерною мікроспектрофотометрією та мікроденситометрією були встановлені кількісні параметри вільнорадикального ушкодження лейоміоцитів. **Результати.** При ЗДАВ відмічене суттєве наростання ознак вільнорадикального ушкодження білків. Значення досліджуваних параметрів наростали відповідно до ступеня анемії та узгоджувалися між собою в контексті тлумачення явища: питомий об'єм лейоміоцитів у стані хромотропофілії (Рф<0,001, РІ<0,001, РІІ=0,003), показники окиснювальної модифікації білків (Рф<0,001, РІ<0,001, РІІ=0,001) та обмеженого протеолізу у цитоплазмі м'язових клітин (Рф<0,001, РІ<0,001, РІІ=0,001) суттєво перевищували показники групи фізіологічної гестації. **Висновки.** 1. У випадках гестації при залізодефіцитній анемії ступінь інтенсифікації процесів окиснювальної модифікації білків та обмеженого протеолізу в цитоплазмі лейоміоцитів у проекції матково-плацентарної ділянки корелює зі ступенем тяжкості анемії. 2. Залежно від ступеня, залізодефіцитна анемія суттєво впливає на морфо-функційний стан лейоміоцитів у проекції матково-плацентарної ділянки, створюючи передумови для розвитку патології тонуусу міометрію, його скоротливої дисфункції і втрати міометріального контролю над інтенсивністю кровотоку у плацентарному ложі матки.

Ключові слова: матково-плацентарна ділянка, лейоміоцити, хромотропофілія, окиснювальна модифікація білків, обмежений протеоліз, залізодефіцитна анемія вагітних.