

І. А. Анчева¹, Т. Д. Задорожна²

Імуногістохімічні особливості експресії ендотеліальної нітроксидсинтази у плаценті при її дисфункції у жінок на тлі залізодефіцитної анемії

¹Одеський національний медичний університет,² ДУ «Інститут педіатрії, акушерства і гінекології НАМН України», м. Київ**Ключові слова:** ендотеліальна нітроксидсинтаза, дисфункція плаценти, залізодефіцитна анемія, вагітність.

Актуальність дослідження зумовлена значною поширеністю дисфункції плаценти у вагітних, які хворі на анемію. З метою оцінювання імуногістохімічних особливостей експресії ендотеліальної NO-синтази (eNOS) у плаценті при її дисфункції у жінок на тлі анемії дослідили 30 зразків плацентарної тканини із застосуванням імуногістохімічного та мікрометричного методів. Встановлено, що експресія eNOS у пацієнток із залізодефіцитною анемією в цитоплазмі синцитію ворсинок і ендотелію фетальних капілярів, а також судин децидуальної оболонки зменшується. Найбільш виражені зміни експресії eNOS спостерігали при поєднанні дисфункції плаценти та залізодефіцитної анемії у вигляді парадоксального зростання експресії. Це свідчить про необхідність корекції ендотеліальної функції у жінок з анемією вагітних.

Иммуногистохимические особенности экспрессии эндотелиальной нитроксидсинтазы в плаценте при ее дисфункции у женщин на фоне железодефицитной анемии

И. А. Анчева, Т. Д. Задорожная

Актуальность исследования обусловлена значительной распространенностью дисфункции плаценты у беременных, страдающих анемией. С целью оценки иммуногистохимических особенностей экспрессии эндотелиальной NO-синтазы (eNOS) в плаценте при ее дисфункции у женщин на фоне анемии проведено исследование 30 образцов плацентарной ткани с применением иммуногистохимического и микрометрического методов. Установлено, что экспрессия eNOS у пациенток с железодефицитной анемией в цитоплазме синцития ворсинок и эндотелия фетальных капилляров, а также сосудов децидуальной оболочки уменьшается. Наиболее выраженные изменения экспрессии eNOS наблюдаются при сочетании дисфункции плаценты и железодефицитной анемии в виде парадоксального роста экспрессии. Это свидетельствует о необходимости коррекции эндотелиальной функции у женщин с анемией беременных.

Ключевые слова: эндотелиальная нитроксидсинтаза, дисфункция плаценты, железодефицитная анемия, беременность.**Патология.** – 2014. – №2 (31). – С. 42–44

Immunohistochemical properties of the expression of endothelial nitric oxide synthase in placenta in its dysfunction in women with iron deficiency anemia

I. A. Ancheva, T. D. Zadorozhna

Aim. The pertinence of the study is related to a large prevalence of dysfunction of the placenta in pregnant women suffering from anemia. To evaluate the immunohistochemical expression characteristics of endothelial NO-synthase (eNOS) in the placenta during its dysfunction in women against the background of anemia 30 samples of placental tissue were studied with the use of immunohistochemical and micrometer methods.

Materials and results. It was found that the expression of eNOS in patients with iron deficiency anemia in the cytoplasm of syncytium of villi and fetal capillary endothelium as well as decidual vessels decreases, with the most pronounced changes in the expression of eNOS observed in the presence of the combination of placental dysfunction and iron deficiency anemia in the form of paradoxical increase in expression.

Conclusion. This indicates the necessity for correction of endothelial function in women with anemia during pregnancy.

Key words: Endothelial Nitric Oxide Synthase, Placental Insufficiency, Iron-Deficiency Anemia, Pregnancy.**Pathologia.** 2014; №2 (31): 42–44

Дисфункція плаценти є однією з важливих клінічних проблем сучасного акушерства і однією з найбільш частих причин перинатальної захворюваності та смертності. Ця патологія розвивається, як правило, на тлі ускладнень вагітності (загроза переривання вагітності, гестоз) або за наявності у жінки різних екстрагенітальних захворювань, зокрема залізодефіцитна анемія, гіпертонічна і варикозна хвороби [1,2].

У сучасній фаховій літературі є чимало робіт, що присвячені механізмам розвитку дисфункції плаценти при вагітності. Але, за даними ряду авторів, незалежно від

причин, які викликають розвиток дисфункції плаценти, у першу чергу відбувається спазм судин плодово-плацентарного комплексу, що призводить до зниження, а згодом і до порушення матково-плацентарного кровотоку [3,4].

У 1987 р. ідентифіковано основний ендотеліальний фактор релаксації (оксид азоту, NO), синтез якого здійснюється в ендотеліоцитах та експресується нітроксидсинтазою. Утворення NO ендотеліальною синтазою є важливим компонентом регуляції тонуусу кровоносних [5] і лімфатичних судин [6], а також запобігання тромбоутворенню.

Оксид азоту в організмі людини синтезується з амінокислоти L-аргініну під впливом нейрональної, індукбельної та ендотеліальної нітроксидсинтази. Остання (eNOS) відіграє найбільшу роль у регуляції активності нітрергічних механізмів. Оксид азоту викликає розслаблення гладкої мускулатури судин, бере участь у підтримуванні тону судинної стінки, має проліферативні і протизапальні властивості. Під час вагітності відбувається зростання ендотеліальної вазодилатації. Ендотелій бере участь у регуляції судинного тону, проникності судин, адгезії тромбоцитів і лейкоцитів, здійснює бар'єрну функцію та імунну відповідь [7,8].

У нормі у відповідь на різні фактори, такі як викид різних нейрогормонів (катехоламінів, вазопресину, ацетилхоліну, брадикініну тощо) або зміна швидкості кровотоку в судинах, збільшення концентрації холестерину і глюкози, клітини ендотелію реагують посиленням синтезу речовин, що викликають розслаблення гладких клітин судинної стінки і, в першу чергу, ендотеліального фактора релаксації – оксиду азоту. При тривалому впливі різних факторів (гостра або хронічна гіпоксія, інтоксикація, запалення або кровотеча) клітини ендотелію стають «причиною» вазоконстрикції як шляхом зниження продукції NO, так і внаслідок посиленого вироблення речовин із вазоконстрикторним ефектом (ендотеліну-1, тромбоксану A2 тощо) [9]. Досі невідомо, як саме змінюється експресія eNOS у плаценті вагітних, які мають прояви її дисфункції, у тому числі на тлі додаткового патогенетичного обтяження при хронічній гіпоксії, що зумовлена анемічними станами, зокрема на тлі залізодефіцитної анемії.

Мета роботи

Оцінювання імуногістохімічних особливостей експресії ендотеліальної NO-синтази (eNOS) у плаценті при її дисфункції у жінок на тлі залізодефіцитної анемії.

Матеріали і методи дослідження

Дослідження виконали на клінічних базах кафедри акушерства та гінекології №1 ОНМедУ (м. Одеса) та патоморфологічного відділення ДУ «ІПАГ НАМНУ» (м. Київ).

Плаценти поділили на 3 групи по 10 спостережень у кожній:

- 1 – від жінок із фізіологічним перебігом вагітності та пологів;
- 2 – від жінок із залізодефіцитною анемією вагітних в анамнезі;
- 3 – від жінок із дисфункцією плаценти і залізодефіцитною анемією в анамнезі.

Пацієнток для дослідження обирали залежно від показників кардіотокографії та доплерометрії матково-плацентарного кровотоку. Критерій залучення в 2 і 3 групи – наявність проявів залізодефіцитної анемії легкого та середнього ступеня протягом вагітності, до 3 групи додатково – прояви дисфункції плаценти, верифіковані під час ультразвукового дослідження протягом II та III триместрів. Критерії виключення: багатопліддя, прееклампсія, важка екстрагенітальна патологія пацієнток (цукровий діабет, системні захворювання серцево-судинної, дихальної і травної системи), природжені і спадкові захворювання плоду.

Рівень експресії eNOS досліджували за допомогою імуногістохімічного методу. Використали поліклональні антитіла RB-9279-P (135 кДа) виробництва Thermo Scientific (Велика Британія) у розведенні 1:50.

Методика дослідження: фіксовані у формаліні мікропрепарати зразків плацентарної тканини підлягали витримуванию у 10мМ цитратного буфера при pH 6,0 протягом 10–20 хвилин; після цього препарати витримували при кімнатній температурі протягом 20 хвилин. Як стандартні зразки використовували ендотелій капілярів жінок, перебіг вагітності яких був неускладненим (1 група).

Реакцію візуалізували за допомогою набору UltraVision LP Detection System HRP Polymer & DAB Plus Chromogen (Thermo Scientific). Мікропрепарати вивчали під мікроскопом «Olympus BX-51» із подальшим опрацюванням програмою «Olympus DP-soft v.3.2». Інтерпретуючи результати, зважали на локалізацію експресії за структурами синцитію та його судинних елементів.

Інтенсивність експресії оцінювали напівкількісним методом: за відсутності експресії – «-», при сумнівній експресії – «±», при нормальному рівні експресії – «+» (відповідає контрольним значенням), при підвищеній експресії (збільшення щільності позитивних ділянок на 30–50%) – «++», при гіперекспресії (збільшення позитивних ділянок вдвічі) – «+++».

Результати та їх обговорення

Аналіз імуногістохімічного дослідження NOS у порівняльному аспекті показав, що експресію NOS виявили в усіх спостереженнях контрольної групи в цитоплазмі синцитію ворсинок усіх типів, а також нерівномірно в ендотелії фетальних капілярів (рис. 1, кольор. вкладка 2) і в цитоплазмі ендотелію судин децидуальної оболонки (рис. 2, кольор. вкладка 2).

У другій групі експресія у структурах плаценти ідентична до показників, котрі отримали у групі контролю (у 70% випадків – «+», 10% – «±», 20% – негативна експресія), однак у частині ворсинок відзначили нерівномірне зниження експресії в синцитії (рис. 3, кольор. вкладка 2), яку також майже не визначили в ендотелії капілярів фетальних судин, особливо термінальних і середнього калібру ворсинок (рис. 4, кольор. вкладка 2).

Інтерес становлять зміни експресії NOS у 3 групі спостережень, де експресія NOS різко підвищена (у 60% – «+++», у 10% – «++») фокально в синцитії ворсинок (рис. 5, кольор. вкладка 2), відсутня («-» у 10% випадків) чи різко знижена («±» у 20% випадків) (рис. 6, кольор. вкладка 2).

Дані, що наводимо, не повністю відповідають результатам інших дослідників. Так, автори [4,8,9], описуючи закономірності реалізації фенотипу eNOS, не пов'язували зниження експресії eNOS із наявністю дисфункції плаценти. Причинами цих відмінностей є, насамперед, специфіка названих досліджень: Orange S.J. et al. [9] проаналізували особливості експресії енто-

телиальній нітроксидсинтази у жінок із преєклампсією; роботи Kusinski L.C. et al (2012) [4] та Abe H. et al. (2013) [8] є експериментальними, автори вивчили особливості експресії eNOS у плаценті тварин із штучно виключеним (knock-out) геном eNOS і вплив різної інтенсивності експресії eNOS на ангиогенез.

Отже, eNOS відіграє важливу роль у функціонуванні плацентарного бар'єра при фізіологічному перебігу вагітності та пологів, оскільки експресується (як показали наші дослідження) в цитоплазмі синцитію ворсинок і ендотелію фетальних капілярів, а також судин децидуальної оболонки, тобто в найбільш значущих структурах, що беруть участь в обміні речовин між матір'ю і плодом.

Відзначимо, що у роботі Orange S.J. et al. (2003) [9] йдеться про переважну локалізацію eNOS-позитивних ділянок у клітинах синцитіотрофобласту, а також ворсинок і децидуальної оболонки; у клітинах ендотелію термінальних судин ворсинок експресія цього ферменту відсутня. Навіть за наявності преєклампсії рівень експресії eNOS у названих морфологічних елементах не змінювався, на відміну від наших даних – уже при мінімальних проявах дисфункції плаценти на тлі залізодефіцитної анемії легкого та середнього ступенів тяжкості відбувалось значуще збільшення експресії eNOS у плаценті.

Структурні зміни з нерівномірною експресією eNOS у фетальних капілярів і синцитії, які визначили у II і III групах, вказують на виражені структурно-функціональні порушення при дисфункції плаценти на тлі анемії, що призводять до зміни внутрішньоутробного розвитку плода. Слід відзначити, що у III групі експресія eNOS мала певні особливості у порівнянні із II групою. Так, виявили більшу інтенсивність експресії, що, очевидно, пов'язано з вираженою компенсаторною реакцією на синтропію залізодефіцитної анемії та дисфункції плаценти.

Висновки

Експресія eNOS у пацієток, які протягом вагітності страждали на залізодефіцитну анемію легкого та середнього ступенів важкості, в цитоплазмі синцитію ворсинок і ендотелію фетальних капілярів, а також судин децидуальної оболонки зменшується.

Найбільш виражені зміни експресії eNOS спостерігають при поєднанні дисфункції плаценти та залізодефіцитної анемії у вигляді парадоксального зростання експресії.

Перспективи подальших досліджень пов'язані з оцінюванням вираженості ендотеліальної дисфункції у жінок із різним рівнем експресії eNOS у плаценті та вказівками на виникнення дисфункції плаценти, у тому числі на тлі залізодефіцитної анемії.

Список літератури

1. Radomski M.W. Regulation of vascular homeostasis by nitric oxide / M.W. Radomski, S. Moncada // *ThrombHaemost.* – 1993. – Vol. 70(1). – P. 36–41.
2. Nitric oxide production by lymphatic endothelial cells in vitro / L.V. Leak, J.L. Cadet, C.P. Griffin, K. Richardson // *BiochemBiophys Res Commun.* – 1995. – Vol. 217(1). – P. 96–105.
3. Jones T.C. Genetic regulation of endothelial function / T.C. Jones, A.D. Hingorani // *Heart.* – 2005. – Vol. 91. – P. 1275–1277.
4. eNOS knockout mouse as a model of fetal growth restriction with an impaired uterine artery function and placental transport phenotype / L.C. Kusinski, J.L. Stanley, M. Dilworth et al. // *Am J PhysiolRegulIntegr Comp Physiol.* – 2012. – Vol. 303(1). – R86–93
5. Использование L-аргинаина в коррекции эндотелиальной дисфункции при экспериментальной преэклампсии / М.В. Покровский, Т.Г. Покровская, В.В. Гуреев и др. // *Экспериментальная и клиническая фармакология.* – 2012. – № 2. – С. 14–16.
6. Бурлев В.А. Клинико-диагностическое значение определения фактора роста плаценты у беременных / В.А. Бурлев, З.С. Зайдиева, В.Л. Тютюник // *Проблемы репродукции.* – 2011. – № 5. – С. 1–6.
7. Ларина Е.Б. Синдром задержки роста плода: клинико-морфологические аспекты / Е.Б. Ларина, Н.Н. Мамедов, Н.А. Нефедова // *Вопросы гинекологии, акушерства и перинатологии.* – 2013. – Т. 12. – № 1. – С. 22–27.
8. Nitric oxide induces vascular endothelial growth factor expression in the rat placenta in vivo and in vitro / H. Abe, W. Ishikawa, T. Kushima et al. // *Biosci Biotechnol Biochem.* – 2013. – Vol. 77(5). – P. 971–976.
9. Placental endothelial nitric oxide synthase localization and expression in normal human pregnancy and pre-eclampsia / S.J. Orange, D. Painter, J. Horvath et al. // *Clin Exp Pharmacol Physiol.* – 2003. – Vol. 30(5–6). – P. 376–381.
2. Leak, L. V., Cadet, J. L., Griffin, C. P., Richardson, K. (1995) Nitric oxide production by lymphatic endothelial cells in vitro. *Biochem Biophys Res Commun.*, 217(1), 96–105. doi: 10.1006/bbrc.1995.2750.
3. Jones, T. C., & Hingorani, A. D. (2005) Genetic regulation of endothelial function. *Heart*, 91, 1275–1277.
4. Kusinski, L. C., Stanley, J. L., Dilworth, M. R., Hirt, C. J., Andersson, I. J., Renshall, L. J., et al. (2012) eNOS knockout mouse as a model of fetal growth restriction with an impaired uterine artery function and placental transport phenotype. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.*, 303(1), R86–93.
5. Pokrovskij, M. V., Pokrovskaya, T. G., Gureev, V. V., Barsuk, A. A., Proskuryakova, E. V., Korokin, M. V., et al. (2012) Ispol'zovanie L-arginina v korrekcii e'ndotelial'noj disfunkcii pri e'ksperimental'noj pre'e'klampsii [Correction of endothelial dysfunction by L-Arginine under Experimental Pre-Eclampsia Conditions]. *E'ksperimental'naya i klinicheskaya farmakologiya*, 75(2), 14–16. [in Russian].
6. Burlev, V. A., Zajdieva, Z. S., Tyutyunnik, V. L. (2011) Kliniko-diagnosticheskoe znachenie opredeleniya faktora rosta placenty u beremennykh [Clinical diagnostic value of the determination of placental growth factor amongst pregnant females]. *Problemy reprodukcii*, 5, 1–6. [in Russian].
7. Larina, E. B., Mamedov, N. N., Nefedova, N. A., Moskvina, L. V., Andreev, A. I., Panina, O. B., Mal'kov, P. G. (2013) Sindrom zaderzhki rosta ploda: kliniko-morfologicheskie aspekty [Fetal growth retardation syndrome: clinical-morphological aspects]. *Voprosy ginekologii, akusherstva i perinatologii*, 1(12), 22–27. [in Russian].
8. Abe, H., Ishikawa, W., Kushima, T., Nishimura, T., Mori, C., Onuki, A., et al. (2013). Nitric oxide induces vascular endothelial growth factor expression in the rat placenta in vivo and in vitro. *Biosci Biotechnol Biochem*, 77(5), 971–976.
9. Orange, S. J., Painter, D., Horvath, J., Yu, B., Trent, R., Hennessy, A. (2003) Placental endothelial nitric oxide synthase localization and expression in normal human pregnancy and pre-eclampsia. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 30(5–6), 376–381.

References

Відомості про авторів:

Анчева І.А., к. мед. н., асистент каф. акушерства та гінекології №1, Одеський національний медичний університет, E-mail: irina.an-va@rambler.ru.

Задорожна Т. Д., д. мед. н., зав. лабораторії патоморфології, ДУ «Інститут педіатрії, акушерства і гінекології НАМН України».

Надійшла в редакцію 07.06. 2014 р.

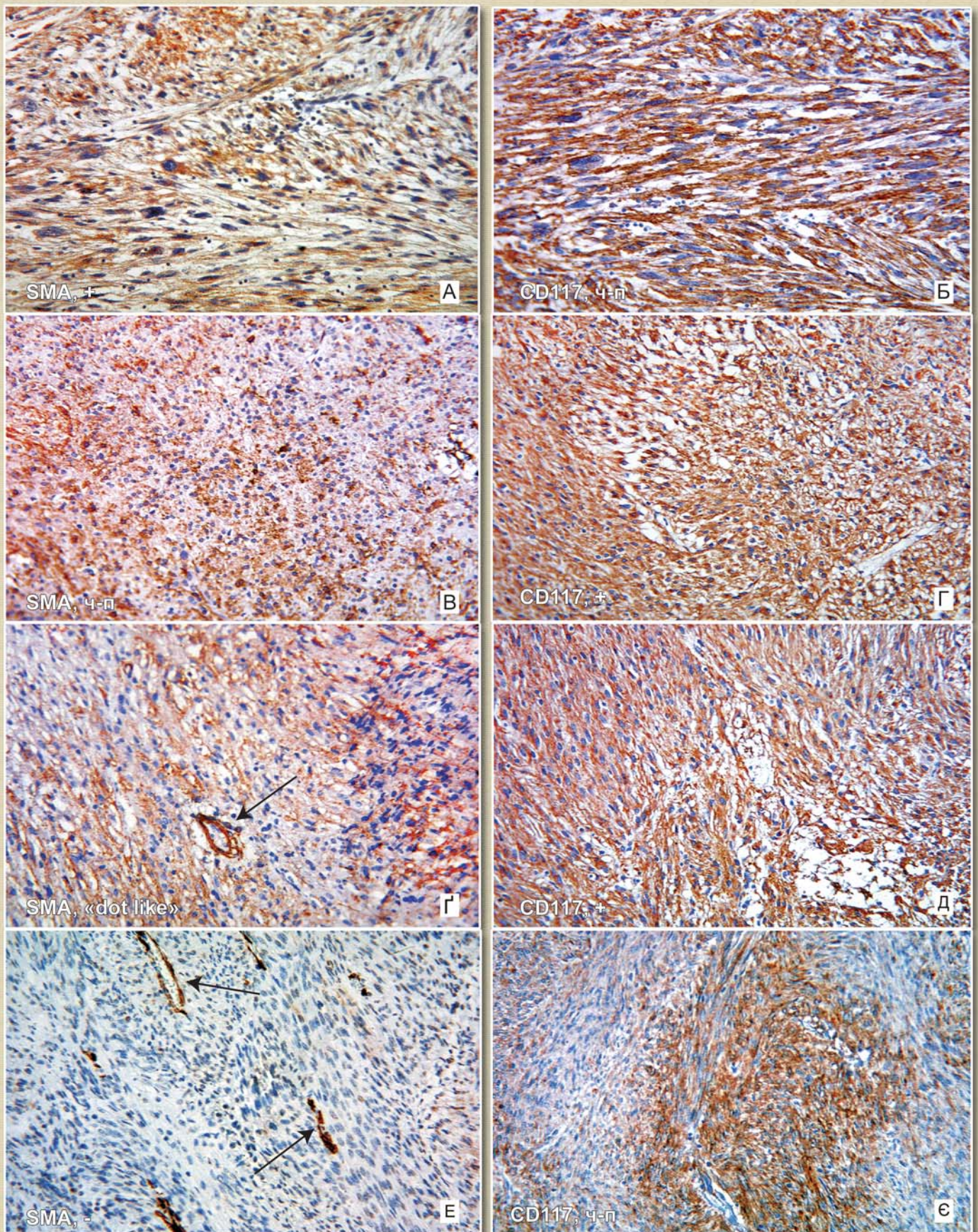


Рис. 1. Гастроінтестинальні стромальні пухлини, 4 випадки. 1й: А. SMA: цитоплазматичне та мембранне забарвлення значної інтенсивності. Б. У частині пухлинних клітин дифузна та фокальна цитоплазматична та мембранна реакція з маркером CD117. 2й: В. У частині пухлинних клітин дифузна, фокальна цитоплазматична та мембранна реакція з маркером SMA. Г. CD117: цитоплазматичне та мембранне забарвлення значної інтенсивності. 3й: Д. Переважно фокальна експресія маркера SMA у мембрані клітин слабкої інтенсивності у порівнянні з інтенсивним забарвленням судин (внутрішній контроль). Е. Відсутнє цитоплазматичне та/чи мембранне забарвлення маркером CD117 у пухлинних клітинах маркером CD117. 4й: З. Фокальне цитоплазматичне та мембранне забарвлення у частині пухлинних клітин маркером SMA. «dot like». 4й: Е. Відсутнє цитоплазматичне та/чи мембранне забарвлення маркером SMA у порівнянні з інтенсивним забарвленням судин (внутрішній контроль). 5й: Г. Фокальне цитоплазматичне та мембранне забарвлення у частині пухлинних клітин маркером CD117. ІГХ метод, додаткове забарвлення гематоксилином Майєра. x400.

(Рис. 1 до статті І. С. Шпоньки, В. Р. Яковенко «Визначення маркерів м'язової диференціації SMA та MSA у CD117-позитивних та CD117-негативних гастроінтестинальних стромальних пухлинах із різним злоякісним потенціалом», с. 38–41)

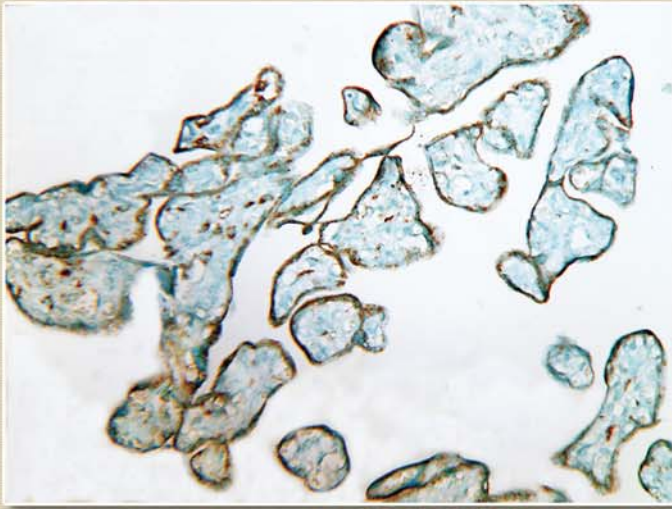


Рис. 1. Експресія NOS у цитоплазмі синцитію ворсинок усіх типів, а також нерівномірно в ендотелії фетальних капілярів плаценти жінок контрольної групи. Непрямий стрептавідин-пероксидазний метод виявлення експресії NOS. Ок.10; Об.10.

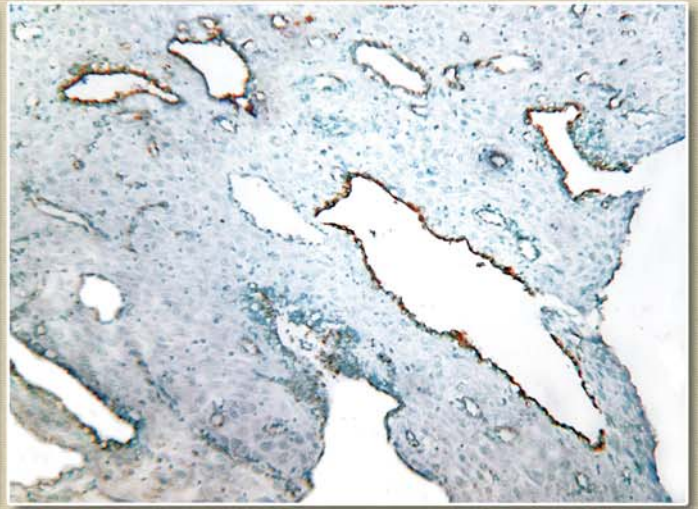


Рис. 2. Експресія NOS у цитоплазмі ендотелію судин децидуальної оболонки плаценти жінок контрольної групи. Непрямий стрептавідин-пероксидазний метод виявлення експресії NOS. Ок.10; Об.10.

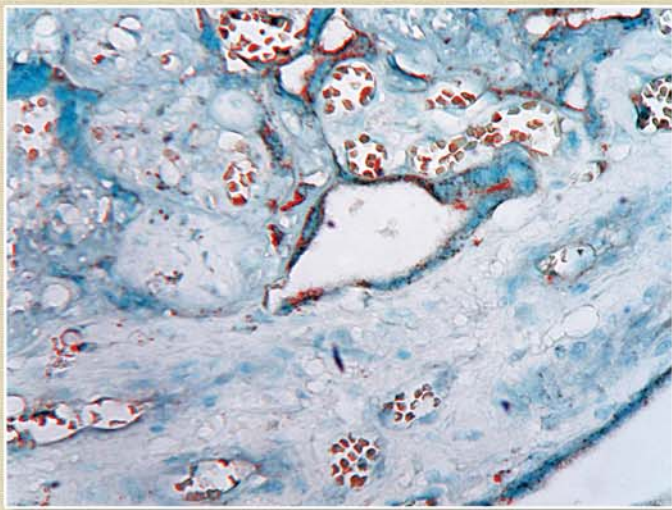


Рис. 3. Нерівномірна експресія NOS у синцитію плаценти жінок 2 групи. Непрямий стрептавідин-пероксидазний метод виявлення експресії NOS. Ок.10; Об.20.

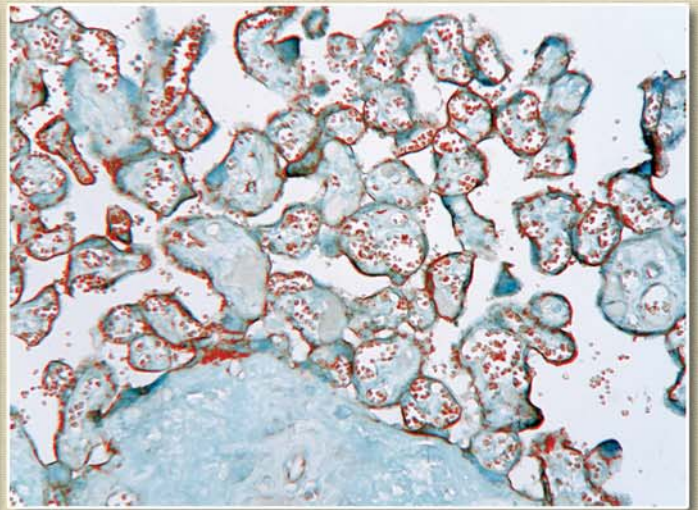


Рис. 4. Відсутність експресії NOS в ендотелії капілярів у термінальних ворсинах і середнього калібру плаценти жінок 2 групи. Непрямий стрептавідин-пероксидазний метод виявлення експресії NOS. Ок.10; Об.10.



Рис. 5. Різко виражена експресія в синцитії ворсинок (фокально) плаценти жінок 3 групи. Непрямий стрептавідин-пероксидазний метод виявлення експресії NOS. Ок.10; Об.20.

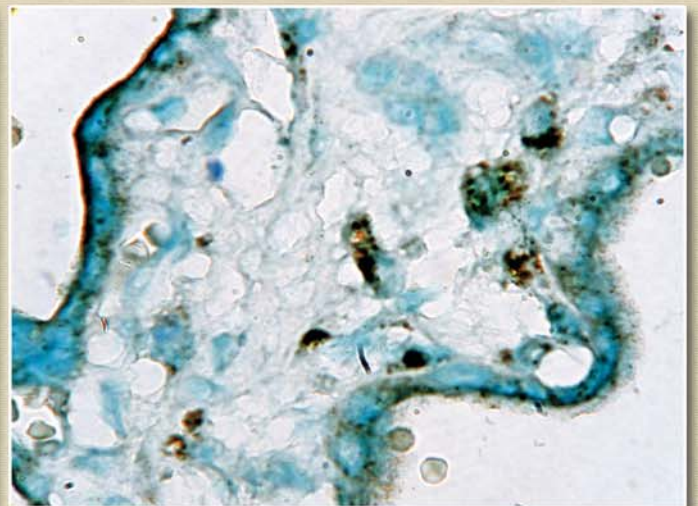


Рис. 6. Зниження рівня експресії NOS до повної відсутності в синцитії ворсинок плаценти жінок 3 групи. Непрямий стрептавідин-пероксидазний метод виявлення експресії NOS. Ок.10; Об.40.

(Рис. 1–6 до статті І. А. Анчевої, Т. Д. Задорожної «Імуногістохімічні особливості експресії ендотеліальної нітроксидсинтази у плаценті при її дисфункції у жінок на тлі залізодефіцитної анемії», с. 42–44)