

РОЛЬ НАРУШЕНИЙ АНГИОГЕНЕЗА В ФОРМИРОВАНИИ ПЛАЦЕНТАРНОЙ НЕДОСТАТОЧНОСТИ И СИНДРОМА ЗАДЕРЖКИ РОСТА ПЛОДА

Щербина Н.А.

Харьковский национальный медицинский университет

Макаренко М.В.

Киевский городской родильный дом №5

Кузьмина И.Ю.

Харьковский национальный медицинский университет

Проведено морфофункциональное изучение плацент с целью выяснения роли ангиогенеза при ассиметричной и симметричной формах синдрома задержки роста плода (СЗРП). Выяснено, что при хронической ПН и симметричной формой СЗРП процессы апоптоза практически не выражены в плаценте. При ПН и ассиметричной форме СЗРП активация иммунокомпетентных клеток приводит к нарушению процессов ангиогенеза в плаценте. При СЗРП ведущим патогенетическим аспектом является повышенная экспрессия антиапоптотических белков, что приводит к нарушению формирования сосудистого русла, гипоксии и изменению функций эндотелиальных клеток.

Ключевые слова: ангиогенез, апоптоз, синдром задержки роста плода, плацентарная недостаточность.

Синдром задержки развития плода (СЗРП) имеет большой удельный вес в структуре причин перинатальной заболеваемости и смертности, а репродуктивные потери и затраты на комплексное лечение детей с СЗРП, причиняют значительный социальный и экономический ущерб [1].

Воздействие различных неблагоприятных факторов на организм матери приводит к формированию хронической плацентарной недостаточности (ПН) и проявляется в виде СЗРП [2].

Ведущую роль в развитии сосудов плаценты отводят семейству фактора роста эндотелия сосудов (vascular endothelial growth factor – VEGF), и плацентарного фактора роста (placenta growth factor – PlGF) [3]. Перечисленные белки действуют на эндотелиальные и другие клетки плаценты через различные рецепторы: Flt-1 (VEGFR-1), KDR (Flk-1 или VEGFR-2), Flt-4 (VEGFR-3) и нейропилины 1 и 2 [4]. VEGF контролирует все стадии ангиогенеза, участвует в формировании первичных эндотелиальных трубок сосудов, а также увеличивает жизнеспособность эндотелиальных клеток, защищая их от апоптоза, индуцированного TNF α [5].

К проангиогенным факторам относят и фактор роста фибробластов (fibroblast growth factors – FGF). Одними из важнейших в отношении ангиогенеза представителей FGF-семейства являются FGF-1 (aFGF) и FGF-2 (bFGF) [6]. bFGF контролирует различные этапы ангиогенеза, способствует выживанию эндотелиальных клеток и их защите от апоптоза, что также связано с усилением экспрессии Bcl-2. FGF стимулирует синтез ДНК и деление различных клеток мезенхимального происхождения, контролирует различные этапы ангиогенеза [7].

Тромбоспондин (Tsp-1) – один из основных ингибиторов ангиогенеза, влияющий на адгезию и рост эндотелиальных клеток [8]. Это гликопротеин внеклеточного матрикса, синтезируемый различными типами клеток, в том числе эндотелиальными клетками и макрофагами. Он играет важную роль в агрегации тромбоцитов и регулирует адгезию и пролиферацию эндотелиальных клеток [9]. Синтез TSP-1 контролируется нормальным p53 белком, а мутации p53 ведут к снижению синтеза тромбоспондина [10].

Большое значение в развитии плаценты человека имеет апоптоз. Вступившие в апоптоз клетки присутствуют в плаценте на протяжении всей беременности. С течением беременности отмечает-

ся нарастание апоптотических изменений в нормально функционирующей плаценте. Еще на ранних этапах роста и развития плаценты в цитотрофобласте запускается апоптотический каскад, который препятствует слиянию клеток в синцитий. Включению этого каскада противодействуют белковые продукты генов-ингибиторов апоптоза. К ним относятся белки Bcl-2: Bcl-2, Bcl-W, Bcl-XL, Bcl-1, Mcl-1 и NR13 [11].

Установлено, что апоптоз может изменять функциональную активность плаценты, регулируя процесс дифференцировки цитотрофобласта в синцитиотрофобласт. Более того, формирование новых сосудов путем ангиогенеза происходит при одновременном участии процессов апоптоза. Таким образом, апоптоз может являться ключевым механизмом, осуществляющим комплексный контроль фетоплацентарного роста и развития. Нарушение регуляции апоптоза приводит к снижению числа клеток синцитиотрофобласта, что влечет за собой уменьшение поступления питательных веществ к плоду и к задержке его внутриутробного развития [12].

Целью настоящего исследования явилось изучение роли про- и антиангиогенных факторов, а также регуляторов апоптоза в формировании плацентарной недостаточности и развитии СЗРП.

Материалы и методы. Проведено морфофункциональное исследование 61 плаценты, которые были получены при срочных родах. Весь материал был разделен на три группы: 1 группа – плаценты с хронической ПН, которым соответствовали дети с ассиметричной формой СЗРП. 2 группа – плаценты с хронической ПН, которым соответствовали дети с симметричной формой СЗРП – 10 наблюдений; 3 группа – плаценты без ПН от здоровых новорожденных (контрольная группа) – 20 наблюдений.

Средний вес новорожденных 1-й и 2-й групп составил 2504,2 $\pm$ 180,0 и 2315,8 $\pm$ 110,5 г соответственно и был ниже, чем в контрольной группе – 3350,1 $\pm$ 109,3 г (p<0,001). Средний вес плацент 1-й группы составил 430,4 $\pm$ 28,2 г, 2-й группы – 365,1 $\pm$ 55,1 г, контрольной группы – 560,5 $\pm$ 39,4 г (p>0,05). Изучение гистоструктуры плаценты проводили стандартизированным методом [13].

Забор материала производили сразу после родов. Образцы тканей фиксировали в 10%-ном нейтральном (pH 7,2) растворе формалина и заливали в парафин. Срезы окрашивали гематоксилином и эозином. Оце-

нивали зрілість плаценти, ступінь вираженості компенсаторно-приспособительних реакцій (КПР) і інволютивно-дистрофічних змін (ІДИ). Для оцінки ступеня вираженості тих або інших ознак використовували полуколичесний метод: позначення в вигляді (+++) свідчувало про високу вираженість ознаки, (++) – про помірну, (+) – про низку. Негативний результат означався мінусом (–).

Вивчення експресії білків проводили імуногістохімічним методом (ІГХ) на препаратах, приготованих з зразків плацент. Для проведення імуногістохімічної реакції з використанням моноклональних мишиних антитіл до VEGF (BD Biosciences Pharmingen, 1:100), bFGF (BD Biosciences Pharmingen, 1:100) і Mcl-1 (Novocastra, 1:100) використовували стандартний одноетапний протокол, а до VEGFR-3 (Novocastra, 1:100), Tsp-1 (Novocastra, 1:100) і p53 (Novocastra, 1:75) – стандартний одноетапний протокол з високотемпературної демаскирувальної антигенів в 0,01 М цитратному буфері (рН 7,6).

Морфометричне дослідження проводили з допомогою системи комп'ютерного аналізу мікроскопічних зображень, що складається з мікроскопа Nikon Eclipse E400, цифрової камери Nikon DXM1200, персонального комп'ютера на базі Intel Pentium 4 і програмного забезпечення «Відео-тест-Морфологія 5.0». В кожному випадку аналізували як мінімум 10 полів зору при збільшенні Ч400. Отримані дані були піддані статистичній обробці з використанням комп'ютерної програми «Statistica 6,0» (StatSoft). Висували середню арифметичну величину (М), середнє квадратичне відхилення (σ) і середню помилку середньої величини (m). Надійність різниць між середніми значеннями параметрів визначали з допомогою t-критерію Стьюдента.

Результати досліджень. В результаті гістологічного дослідження плацент в контрольній групі ознаки ПН відсутні, була висока ступінь компенсаторно-приспособительних реакцій. В той же час в усіх спостереженнях 1-ї і 2-ї груп була виявлена хронічна субкомпенсована ПН. В плацентах 1-ї групи було місце невідповідності зрілості плаценти терміну вагітності з порушенням дозрівання ворсин хориона переважно по дисоційованому типу. Крім зрілих термінальних ворсин в препаратах виявлялися зрілі і незрілі проміжні ворсини. Зустрічалися ділянки з тісно розташованими ворсинами, багато з яких були позбавлені трофобласта з масивними відкладеннями фібриногену. В окремих місцях ворсини були «замуровані» в фібриноід, товщина якого досягала половини діаметра ворсин. В таких спостереженнях синцитіальні вузли знаходилися в нефункціонуючому стані з кристалами кальція. Інволютивно-дистрофічні зміни були помітні, в тому числі і внаслідок дифузної відкладення фібриноїда. Відзначалася зменшена васкуляризація фіброзованих ворсин. Крім того, компенсаторно-приспособительні реакції були виражені в достатній мірі за рахунок проліферативної активності синцитіотрофобласта з утворенням великих і середніх синцитіальних вузлів і гіперплазії капілярів з утолщенням синцитіокапілярних мембран. К особливостям спостережень в плацентах 2-ї групи слід віднести ураження судинного русла з вираженими деструктивними змінами і фіброзом ворсин.

Аналіз результатів імуногістохімічного дослідження показав, що експресія VEGF відзначалася в клітках синцитіо- і цитотрофобласта, в стромальних елементах ворсин – макрофагах і фібробластах, а також в ендотеліоцитах. В 2-ї групі відносна площа експресії VEGF була значно нижче, ніж в 1-ї і контрольній групах. Так, в 2-ї групі відносна площа складала $0,3 \pm 0,1\%$ в периферических відділах плаценти і $0,5 \pm 0,2\%$ – в центральних відділах плаценти, в той же час в 1-ї групі – $1,4 \pm 0,1$ і $1,6 \pm 0,4\%$ відповідно, а в контрольній групі – $1,5 \pm 0,5$ і $1,4 \pm 0,2\%$ відповідно ($p < 0,05$).

Між 1-ї і контрольній групами достовірних відмінностей по відносній площі експресії VEGF не було помічено. Те ж саме можна сказати і про відділах плацент – достовірно в усіх трьох групах показники периферія/центр не відрізнялися. Експресія VEGFR-3 відзначалася в клітках синцитіо- і цитотрофобласта. В 2-ї групі відносна площа експресії VEGFR-3 достовірно нижче, ніж в 1-ї і контрольній групах, – площа складала $1,8 \pm 0,6\%$ в периферических відділах плаценти і $1,1 \pm 0,1\%$ – в центральних відділах плаценти, в той же час в 1-ї групі – $4,3 \pm 0,3$ і $2,3 \pm 0,4\%$ відповідно, а в контрольній групі – $5,9 \pm 0,5$ і $6,1 \pm 0,4\%$ відповідно ($p < 0,05$). Крім того, достовірно відрізняються показники відносній площі експресії VEGFR-3 в центральних відділах плацент 1-ї і контрольній груп: в 1-ї групі відносна площа експресії VEGFR-3 в центральних відділах плацент достовірно нижче, ніж в аналогічних відділах плацент контрольній групи, – $2,3 \pm 0,4$ і $6,1 \pm 0,4\%$ відповідно ($p < 0,05$). Експресія bFGF відзначалася в клітках стромы ворсин – фібробластах і макрофагах, а також в ендотеліоцитах. Площа експресії bFGF достовірно нижче в центральних відділах плацент 1-ї групи ($1,2 \pm 0,5\%$), ніж в контрольній групі ($3,8 \pm 0,5\%$) ($p < 0,05$).

В 2-ї групі площа експресії bFGF була також достовірно нижче, ніж в контрольній групі, і складала $2,1 \pm 0,3\%$ в периферических відділах і $1,8 \pm 0,4\%$ – в центральних відділах ($p < 0,05$). В 1-ї групі відбувалося достовірне зниження відносній площі експресії bFGF в центральних відділах плацент по відношенню до периферії – $1,2 \pm 0,5$ і $3,7 \pm 0,8\%$ відповідно. Експресія Tsp-1 відзначалася переважно в області синцитіокапілярних мембран. Відносна площа експресії Tsp-1 в плацентах 1-ї групи достовірно вище, ніж в контрольній групі: в центральних відділах плаценти – $0,38 \pm 0,08$ і $0,08 \pm 0,01\%$, в периферических відділах – $0,45 \pm 0,02$ і $0,06 \pm 0,02\%$ відповідно ($p < 0,05$). В 2-ї групі відносна площа експресії Tsp-1 також достовірно вище, ніж в контрольній групі: в центральних відділах плаценти – $0,61 \pm 0,15\%$, в периферических відділах – $0,58 \pm 0,2\%$.

Експресія p53 і Mcl-1 виявлялася переважно в клітках синцитіо- і цитотрофобласта. При порівнянні груп між собою встановлено достовірні відмінності по відносній площі експресії білка p53 між 1-ї і контрольній групами: в клітках трофобласта центральних відділів плацент – $1,4 \pm 0,2\%$ в 1-ї групі і $0,4 \pm 0,03\%$ в контрольній групі, периферический відділ плаценти – $1,5 \pm 0,5$ і $0,3 \pm 0,05\%$ відповідно ($p < 0,05$).

В 2-ї групі площа експресії p53 була достовірно нижче, ніж в 1-ї, і складала в клітках трофобласта центральних відділів плацент

0,5±0,04%, периферических отделов – 0,6±0,15%. Достоверные межгрупповые различия по относительной площади экспрессии Mcl-1 выявлены между 1-й и контрольной группами – в трофобласте периферических отделов плацент – 1,5±0,02% в 1-й группе и 3,7±0,6% – в группе контроля, а также между 1-й и 2-й группами: в трофобласте периферических отделов плацент – 1,5±0,02% в 1-й группе и 4,5±0,2% во 2-й группе ($p < 0,05$). Кроме того, во 2-й группе отмечены достоверные различия между центром и периферией: в центральных отделах относительная площадь экспрессии Mcl-1 достоверно ниже, чем в периферических, – 2,8±0,1 и 4,5±0,2% соответственно.

Обсуждение результатов исследования.

Полученные нами данные свидетельствуют о том, что при развитии ассиметричной формы СЗРП не происходит изменений в продукции клетками плаценты VEGF. В плацентах 2-й группы было отмечено снижение продукции клетками плаценты VEGF. Вместе с тем в плацентах 1-й и 2-й групп происходит снижение экспрессии VEGFR-3 и продукции bFGF клетками центральной части плаценты по сравнению с контролем. Нами также отмечено увеличение экспрессии антиангиогенного фактора Tsp-1 в экстрацеллюлярном матриксе плацент 1-й и 2-й групп в сравнении с контролем. Обнаруженное нами отсутствие различия в секреции проангиогенного фактора VEGF клетками плаценты при СЗРП и в контроле связано, по видимому, с тем, что при ПН повышается уровень провоспалительных цитокинов, способных индуцировать продукцию этого фактора эндотелиальными клетками [11]. Снижение продукции VEGF клетками плаценты при хронической ПН при симметричной форме СЗРП свидетельствует о нарушении регуляции процессов ангиогенеза при данной патологии. Нарушение функционального состояния эндотелиальных клеток плаценты и процессов ангиогенеза при хронической ПН подтверждается снижением секреции bFGF и экспрессии VEGFR-3, повышенным содержанием антиангиогенного фактора Tsp-1 в экстрацеллюлярном матриксе, а также наличием в ткани указанных плацент незрелых промежуточных ворсин.

Согласно нашим данным, при ассиметричной форме СЗРП происходит увеличение экспрессии проапоптозного белка p53 при одновременном снижении экспрессии белка Mcl-1 клетками плацент 1-й группы. Морфологически в плацентах с хронической ПН и ассиметричной фор-

ме СЗРП отмечены признаки воспаления, отложения фибриноида, обызвествления, некроза и апоптоза. Активация цитотоксических лимфоцитов и макрофагов сопровождается секрецией провоспалительных цитокинов TNF α , IL-1, IL-6 [14]. TNF α – универсальный провоспалительный цитокин, индуцирующий не только секрецию цитокинов, в том числе VEGF, но и апоптоз клеток-мишеней. Показано, что клетки, экспрессирующие активированный p53, секретируют белковые факторы, подавляющие ангиогенез [14].

Повышенная экспрессия p53 приводит к репрессии транскрипции гена VEGF, а также гена HIF-1. Одновременно p53 активирует ген антиангиогенного фактора тромбоспондина 1 (Tsp-1) – связывая специфические рецепторы на поверхности эндотелиоцитов, он вызывает в них апоптоз, а также гены других ингибиторов ангиогенеза [15]. Таким образом, клетки с активированным p53 хуже переносят недостаток кислорода, перестают секретировать VEGF и начинают секретировать ингибиторы ангиогенеза, что препятствует образованию новых сосудов [16].

В плацентах 2-й группы экспрессия p53 не отличалась от таковой в контроле, тогда как экспрессия белка Mcl-1 была выше, чем в контроле, только на периферии плаценты. Морфологически в плацентах с хронической ПН и симметричной формой СЗРП отмечено поражение сосудистого русла с деструктивными изменениями и фиброзом ворсин.

Выводы. В случае хронической ПН и симметричной форме СЗРП процессы апоптоза практически не выражены в плаценте, что может приводить к нарушению ветвления сосудов плаценты. При ПН и ассиметричной форме СЗРП активация иммунокомпетентных клеток приводит к активации процессов апоптоза и нарушению процессов ангиогенеза в плаценте. В случае хронической ПН и симметричной форме СЗРП ведущим патогенетическим аспектом является нарушение процессов ангиогенеза и недостаточная активность процессов апоптоза, вследствие повышения экспрессии антиапоптотических белков. Это, в свою очередь, приводит к нарушению формирования сосудистого русла, гипоксии и нарушению функций эндотелиальных клеток и развитию СЗРП.

Перспективы дальнейших исследований заключаются в выяснении особенностей развития симметричной и ассиметричной формы СЗРП с учетом формирования ворсинчатого дерева плаценты и роли хронической ПН в данном процессе.

Список литературы:

1. Милованов А.П. Патология системы мать – плацента – плод: Руководство для врачей. М., 1999. – 448 с.
2. Цинзерлинг В.А., Мельникова В.Ф. Перинатальные инфекции: Вопросы патогенеза, морфологической диагностики и клинко-морфологических сопоставлений: Практическое руководство. СПб., 2002. – 352 с.
3. Савельева Г.М., Федорова М.В., Клименко П.А. и др. Плацентарная недостаточность. М., 1991. – 276 с.
4. Глуховец Б.И., Глуховец Н.Г. Патология последа. СПб., 2002. – 448 с.
5. Федорова М.В., Калашникова Е.П. Плацента и ее роль при беременности. М., 1986. – 256 с.
6. Battistelli M., Burattini S., Pomini F. et al. Ultrastructural study on human placenta from intrauterine growth retardation cases // *Microsc. Res. Tech.* 2004. Vol. 65. – P. 150-158.
7. Benirschke K., Kaufmann P. Pathology of the human placenta. 3rd ed. New York, 1995.
8. Greenwood P.L., Bell A.W. Consequences of intra-uterine growth retardation for postnatal growth, metabolism and pathophysiology // *Reprod. Suppl.* 2003. – Vol. 61. – P. 195-206.
9. Тютюнник В.Л. Плацентарная недостаточность при вирусной инфекции (клинко-морфологические параллели) // Актуальные вопросы диагностики, лечения и профилактики гестоза: Матер. междуна. симп. Москва. 1998. 19–20 ноября. М., 1998. – С. 221–222.
10. Regnault T.R.H., Galan H.L., Parkeret T.A. et al. Placental development in normal and compromised pregnancies – a review // *Placenta.* 2002. Vol. 16. Suppl. A. P. S119-S129.
11. Olofsson B., Pajusola K., Kaipainen A. et al. Vascular endothelial growth factor B, a novel growth factor for endothelial cells // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1996. – Vol. 93. – P. 2576–2581.

12. Gluzman-Poltorak Z., Cohen T., Herzog Y. et al. Neuropilin-2 and neuropilin-1 are receptors for the 165-amino acid form of vascular endothelial growth factor (VEGF) and of placenta growth factor-2, but only neuropilin-2 functions as a receptor for the 145-amino acid form of VEGF // J. Biol. Chem. 2000. Vol. 275. – P. 18040-18045.
13. Пальцев М.А., Иванов А.А. Межклеточные взаимодействия. М., 1995. – 224 с.
14. Thomas K.A. Vascular endothelial growth factor, a potent and selective angiogenic agent // Ibid. 1996. – Vol. 271. – P. 603-606.
15. Fong G., Rossant J., Gertsenstein M. et al. Role of the flt-1 receptor tyrosine kinase in regulating the assembly of the vascular endothelium // Nature. 1995. – Vol. 376. – P. 66-70.
16. Shalaby F. Failure of blood-island formation and vasculogenesis in flk-1 deficient mice // Ibid. P. 62-66.

Щербина М.О.

Харківський національний медичний університет

Макаренко М.В.

Київський міський пологовий будинок №5

Кузьміна І.Ю.

Харківський національний медичний університет

РОЛЬ ПОРУШЕНЬ АНГІОГЕНЕЗУ У ФОРМУВАННІ ПЛАЦЕНТАРНОЇ НЕДОСТАТНОСТІ І СИНДРОМУ ЗАТРИМКИ РОСТУ ПЛОДУ

Анотація

Проведено морфологічне вивчення плацент з метою з'ясування ролі ангіогенезу при асиметричній і симетричній формах синдрому затримки росту плода (СЗРП). З'ясовано, що при хронічній ПН і симетричною формою СЗРП процеси апоптозу практично не виражені в плаценті. При ПН і асиметричною формою СЗРП активація імункомпетентних клітин призводить до порушення процесів ангіогенезу в плаценті. При СЗРП провідним патогенетичним аспектом є підвищена експресія протиапоптотичних білків, що призводить до порушення формування судинного русла, гіпоксії і зміни функцій ендотеліальних клітин.

Ключові слова: ангіогенез, апоптоз, синдром затримки росту плода, плацентарна недостатність.

Scherbina N.A.

Kharkov National Medical University

Makarenko M.V.

Kyiv City Maternity Hospital № 5

Kuzmina I.Uy.

Kharkov National Medical University

ROLE OF VIOLATIONS OF ANGIOGENESIS IN FORMING OF PLACENTA INSUFFICIENCY AND SYNDROME OF FETUS RETARDATION OF GROWTH

Summary

The study of morphological placentas is conducted with the purpose of clarification of role of angiogenesis at asymmetric and symmetric forms of syndrome of fetus retardation of growth (SFRG). It is found out that at chronic placental insufficiency (PI) and the symmetric form of SFRG the processes of apoptosis practically are not shown in a placenta. At PI and asymmetric form of SFRG activating of immunocompetency cells results in violation of processes of angiogenesis in a placenta. At SFRG a leading nosotropic aspect is enhanceable expression of ant apoptosis albumens, that results in violation of forming of vascular river-bed, hypoxia and change of functions of endothelial cells.

Keywords: angiogenesis, apoptosis, syndrome of fetus retardation of growth, placenta insufficiency.