

Ocena ekspresji wybranych czynników pro- i antyapoptotycznych w syncytiotrofoblaście łożysk ludzkich oraz ich zmian pod wpływem suplementacji witaminowej

Evaluation of the expression of selected pro- and anti-apoptotic factors in syncytiotrophoblasts of human placenta and changes observed after vitamin supplementation

Agata Karowicz-Bilińska¹, Urszula Kowalska-Koprek¹, Józef Kobos², Jacek Pasiński¹

¹ Klinika Patologii Ciąży I Katedry Ginekologii i Położnictwa Uniwersytetu Medycznego w Łodzi, Polska

² Zakład Patomorfologii Wieku Rozwojowego Uniwersytetu Medycznego w Łodzi, Polska

Streszczenie

Cel pracy: Celem pracy była ocena ekspresji białek Bcl-2 i Bax w syncytiotrofoblaście łożysk pochodzących z ciąży powikłanych nadciśnieniem tętniczym oraz wpływu zastosowanej suplementacji antyoksydacyjnej na nią.

Materiał i metoda: Badania zostały przeprowadzone w Klinice Patologii Ciąży Uniwersytetu Medycznego w Łodzi w 3 grupach kobiet ciężarnych-I z nadciśnieniem tętniczym, II- nadciśnieniem i suplementacją doustnymi antyoksydantami oraz III- zdrowych ciężarnych. Po zakończeniu ciąży pobierano wycinek łożyska i w preparatach za pomocą reakcji immunohistochemicznej badano charakter, intensywność, powierzchnię wykazującą odczyn oraz ekspresję odczynów Bcl-2 i Bax w syncytiotrofoblaście. Ocenie poddawano 10 losowo wybranych pól w każdym preparacie, w powiększeniu 200x w każdym skrawku, stosując metodę półtłościową.

Wyniki: Najwyższą wartość dla charakteru odczynu Bcl-2 otrzymano w grupie I, najniższą w grupie III – kobiet zdrowych. Najmniejszą intensywność, powierzchnię i ekspresję odczynu stwierdzono w grupie II. Uzyskano najwyższą wartość charakteru i intensywności odczynu Bax w grupie III w odniesieniu do pozostałych grup.

Najniższą średnią powierzchnię syncytiotrofoblastu zajętego odczynem Bax stwierdzono w grupie II. Najwyższą ekspresję odczynu stwierdzono w grupie III względem obu pozostałych grup.

Wnioski:

1. Na podstawie oceny odczynu Bcl-2 w syncytiotrofoblaście nie wykazano wpływu suplementacji antyoksydantami na proces apoptozy w łożysku tą drogą.
2. Wykazano wpływ suplementacji antyoksydantami na obniżenie aktywności Bax w syncytiotrofoblaście, co sugeruje ograniczenie procesu apoptozy, pomimo występowania zmian związanych z nadciśnieniem.

Słowa kluczowe: **ciąża / apoptoza / Bax / Bcl-2 / antyoksydanty /**

Adres do korespondencji:

Agata Karowicz-Bilińska
Klinika Patologii Ciąży I Katedry Ginekologii i Położnictwa Uniwersytetu Medycznego w Łodzi
Wileńska 37, 94-029 Łódź, Polska
agakar@interia.pl

Otrzymano: 03.03.2015
Zaakceptowano do druku: 01.04.2015

Agata Karowicz-Bilińska et al. Ocena ekspresji wybranych czynników pro- i antyapoptotycznych w syncytiotrofoblastie łożysk ludzkich...

Abstract

Aim: The main aim of the study was to estimate expression of Bcl-2 and Bax proteins in syncytiotrophoblast in placenta obtained from pregnancies complicated by hypertension and to compare results with group supplemented by antioxidants.

Material and method: The study was performed in High Risk Department of Medical University Lodz. 3 groups of pregnant women were compared: I-pregnancy complicated by hypertension, II pregnancy complicated by hypertension treated by oral administration of antioxidants – vitamin C and vitamin E. III-rd group consisted of healthy women. After delivery incision from central part of placenta was taken on obtained slides due to immunohistochemical reactions the character, intensity, surface affected by reaction and expression of two proteins involved into process of apoptosis was measured- anti-apoptotic Bcl-2 and pro-apoptotic Bax. In every slide ten of random choosen fields were evaluated in 200x zoom using semi-quantative method.

Results: Highest value of Bcl-2 character was found in I-st group, the lowest in III-rd group- healthy women. The lowest intensity, surface affected and expression of the reaction was found in II group- treated by antioxidants. The highest value of Bax reaction character and intensity was found in III group comparing to others. The lowest mean surface of syncytiotrophoblast affected by Bax reaction was found in II group. In III-rd group expression of reaction was higher than in both other groups.

Conclusions: In the base of Bcl-2 reaction in syncytiotrophoblast no influence of antioxidants supplementation on apoptosis process that occurs by this path was found. Antioxidants supplementation decrease Bax activity in syncytiotrophoblast, that suggests restriction of apoptosis process despite of changes connected to hypertension.

Key words: **pregnancy / apoptosis / Bax / Bcl-2 / antioxidants /**

Wstęp

Zachowanie równowagi między przeciwstawnymi procesami proliferacji i apoptozy stanowi czynnik warunkujący prawidłową strukturę oraz funkcje tkanek i narządów. Podczas ciąży właściwa funkcja łożyska, jako struktury zapewniającej prawidłowy dwustronny transport między matką a rozwijającym się płodem jest najważniejszym czynnikiem warunkującym prawidłowe wewnątrzmaciczne wzrastanie płodu. Zaburzenia funkcji łożyska mogą być przyczyną zahamowania procesu wewnątrzmacicznego wzrastania płodu oraz nadciśnienia tętniczego. Niedotlenione łożysko będąc źródłem wielu substancji presyjnych może powodować wzrost ciśnienia tętniczego z jednoczesnym zwężeniem światła naczyń, co ogranicza możliwości prawidłowego przepływu krwi, prowadząc preeclampsji i hypotrofii [1]. Nasilenie procesu apoptozy – programowanej śmierci komórki w łożysku może spowodować przez zmniejszenie się liczby komórek, zmniejszenie się wymiarów łożyska, a tym samym powierzchni wymiany. Proces proliferacji i migracji syncytiotrofoblastu w głąb doczesnej podstawnej skutkuje pojawieniem się przestrzeni międzykosmkowych powstającego łożyska, w którym syncytiotrofoblast, śródbłonek naczyń włosowatych oraz cytotrofoblast tworzą barierę łożyskową oddzielającą krążenie matczyne od płodowego [2]. Syncytiotrofoblast w III trymestrze ciąży stanowi cienką warstwę na powierzchni kosmka, a znajdujące się tu liczne naczynia włosowate tworzą charakterystyczne rozszerzenia umożliwiające intensywną wymianę metaboliczną między krwią matki i płodu, stąd też zainteresowanie autorów tą częścią łożyska i zmianami w niej zachodzącymi [3,4].

Zmiany apoptotyczne zachodzące w łożysku ludzkim, a szczególnie w obrębie syncytiotrofoblastu w ciążach powikłanych nadciśnieniem tętniczym, mogą być również ważną przyczyną ograniczenia wymiany matczyno-łożyskowo-płodowej prowadzącej do przewlekłego niedotlenienia manifestującego się między innymi ograniczeniem wewnątrzmacicznego wzrastania płodu [5].

Apoptoza komórki trwająca od kilku do kilkunastu godzin daje w efekcie rozpadu komórki ciała apoptotyczne, które są najczęściej usuwane przez komórki żerne na drodze fagocytozy,

dzięki czemu brak jest występowania reakcji zapalnej [6].

Regulujące proces apoptozy drogą mitochondrialną białka to proteiny z rodziny Bcl-2, które nie są jednorodne w swoim działaniu mając własności zarówno pro- jak i antyapoptotyczne.

Bcl-2 jest protoonkogenem hamującym śmierć komórki. Obecność w błonie mitochondrialnej białek Bcl-2 i Bcl-x_L hamuje wypływ cytochromu C do cytoplazmy, blokując w ten sposób proces apoptozy [7, 8]. Białka te również hamować apoptozę poprzez oddziaływanie bezpośrednie z Apaf-1 i kaspazami, kiedy w cytoplazmie uwolniony jest cytochrom C [9]. Przeciwnie działanie proapoptotyczne w rodzinie białek Bcl mają między innymi białka Bax, Bak, Bid, Bcl-2. Bax znajduje się głównie w cytozolu zdrowych komórek, lecz podczas inicjacji procesu apoptozy przemieszcza się na zewnętrzną błonę mitochondrium, co powoduje utratę potencjału błonowego [10].

Zaburzenia homeostazy oksydacyjnej mogą być przyczyną destabilizującą funkcjonowanie komórek i tkanek prowadząc m. in. do uszkodzenia śródbłonna naczyń, wzrostu oporu naczyniowego, a w konsekwencji do nadciśnienia tętniczego w przebiegu ciąży [11]. W obronie antyoksydacyjnej biorą udział zarówno niskocząsteczkowe antyoksydanty, do których należą np. witamina C i E, jak i wielkocząsteczkowe białka enzymatyczne – dysmutaza ponadtlenkowa, katalaza, reduktaza i peroksydaza glutationowa [12, 13]. Za główny czynnik indukujący stres oksydacyjny w komórkach łożyska u kobiet z nadciśnieniem tętniczym uważa się niedotlenienie tkanek łożyska spowodowane nieprawidłową, obniżoną inwazją trofoblastu [14]. Silnym antyoksydantem działającym w środowisku hydrofobowym jest witamina E- działającym ochronnie na błony komórkowe, hamującym peroksydację lipidów. Podczas neutralizacji wolnych rodników witamina E utlenia się, przechodząc w formę rodnika tokoferylowego. Dzięki witaminie C, będącej silnym antyoksydantem hydrofilowym zmiany te ulegają odwróceniu i witamina E może ponownie pełnić swoją rolę [15].

Witamina C dzięki silnym właściwościom redukującym jest zdolna nie tylko do reakcji z wolnymi rodnikami tlenowymi, ale również reagując z formami utlenionymi przeciwutleniaczy, przywraca im właściwości fizjologiczne. Witamina C jest ko-

Agata Karowicz-Bilińska et al. Ocena ekspresji wybranych czynników pro- i antyapoptotycznych w syncytiotrofoblaście łożysk ludzkich...

antyoksydantem α -tokoferolu w LDL. Wspólne działanie tych dwóch niskocząsteczkowych antyoksydantów powinno w sposób znaczący podnosić aktywność antyoksydacyjną ustroju [16].

Cel pracy

Celem pracy była ocena ekspresji białek Bcl-2 i Bax w syncytiotrofoblaście łożysk pochodzących z ciąży powikłanych nadciśnieniem tętniczym płodu oraz wpływu zastosowanej suplementacji antyoksydacyjnej na nią.

Materiał i metoda

Badania przeprowadzono w Klinice Patologii Ciąży I Katedry Ginekologii i Położnictwa Uniwersytetu Medycznego w Łodzi w latach 2008-2013 po uzyskaniu zgody Komisji Bioetyki Uniwersytetu Medycznego w Łodzi RNN/291/08.

Do badania zakwalifikowane zostały ciężarne znajdujące się pod opieką szpitalną lub/i ambulatoryjną między ukończonym 34 tygodniem ciąży a 38 tygodniem ciąży. Wszystkie ciężarne biorące w nich udział wyraziły świadomą i pisemną zgodę. Grupę I stanowiło 36 kobiet ciężarnych z nadciśnieniem tętniczym- stanem przedzucawkowym, leczonych farmakologicznie lekami hypotensyjnymi. Grupa II to 26 kobiet ciężarnych z nadciśnieniem tętniczym- stanem przedzucawkowym, leczonych farmakologicznie, u których dodatkowo włączono suplementację witaminową (witamina C 400mg i E 200mg /doba) trwającą co najmniej 2 tygodnie. Grupę III stanowiło 36 ciężarnych z prawidłowym ciśnieniem tętniczym i eutrofią płodów w tym samym wieku ciążowym.

W preparatach łożysk oceniano ekspresję w syncytiotrofoblaście, za pomocą specyficznych monoklonalnych przeciwciał – proapoptotycznego Bax oraz antyapoptotycznego Bcl-2.

Materiał do badań stanowiły wycinki łożyska pobierane podczas porodu lub cięcia cesarskiego po wydobyciu łożyska. Miejsce pobrania celem uzyskania obiektywizacji wyników znajdowało się w centralnej części łożyska i w odległości ok. 2 cm od przyczepu pępowiny, a wielkość wycinka wynosiła ok. 2x2 cm. Fragment łożyska pobierany był w warunkach sterylnych, umieszczany natychmiast w pojemniku z 10% roztworem zbuforowanej formaliny, a następnie zatopiony w bloczki parafinowe i przekazany do dalszego opracowania i obróbki technicznej.

Skrawki parafinowe o grubości 3-4 mikrometrów uzyskane z bloków parafinowych posłużyły do sporządzenia rutynowych preparatów barwionych hematoksyliną i eozyną (H+E) oraz do badań immunohistochemicznych w systemie detekcyjnym DAKO EnVision według metody immunoperoxydazowej, z użyciem pierwotnych, mysich przeciwciał monoklonalnych skierowanych przeciw: Bax firmy AbD Serotec, Bcl-2 firmy (Novocastra) Leica Microsystems.

Kontrolę negatywną metody stanowiły skrawki, w których zastępowano pierwotne przeciwciała buforem TBS, stosując dalej opisaną procedurę immunohistochemiczną. Kontrolą pozytywną były skrawki dające znaną wcześniej, silnie pozytywną reakcję w kierunku badanego antygeny. We wszystkich reakcjach uzyskiwano brązowe zabarwienie w komórkach zawierających poszukiwane białko.

Komórki wykazujące dodatnią ekspresję badanego antygeny zliczano w 10 losowo wybranych polach w powiększeniu 200x w każdym skrawku, stosując metodę półilościową.

Procedury wykonano w Zakładzie Patomorfologii Wieku Rozwojowego UM w Łodzi. Do oceny preparatów mikroskopowych wykorzystano mikroskop firmy Nikon MicroPhot-FXA zintegrowany z programem komputerowym do oceny morfometrycznej obrazów typu MultiScanBase v.8.08.

Ocenie poddane zostały zmiany zachodzące w nasileniu procesu apoptozy pod wpływem leczenia farmakologicznego oraz wzbogaconego o suplementację witaminową. W metodzie półilościowej zaproponowanej przez M. Volma dodatnia ekspresja o małym nasileniu (1), liczba komórek z dodatnim odczynem <25% wszystkich komórek. Średnie nasilenie (2) dotyczyło przypadków, gdzie dodatnia ekspresja występowała w przedziale pomiędzy 25% a 50% komórek. Jako reakcję silną (3) odnotowywano wtedy, gdy liczba komórek z dodatnim odczynem występowała w ponad połowie ocenianych komórek (115, 116).

Analiza statystyczna

Analizę statystyczną wykonano z zastosowaniem programu Microsoft Excel 2007 oraz STATISTICA PL v. 10. Zmienne ilościowe scharakteryzowano, podając podstawowe statystyki opisowe: liczbę obserwacji, średnią, medianę, wartość najmniejszą (min.), wartość największą (max.), pierwszy i trzeci kwartył (Q25, Q75) oraz odchylenie standardowe (SD). Normalność rozkładu badanych cech zweryfikowano testem Shapiro-Wilka. W przypadku braku normalności użyto nieparametrycznego testu analizy wariancji ANOVA Kruskala-Wallisa. W przypadku zmiennych ilościowych, których rozkład spełniał założenia normalności, w celu weryfikacji istotności różnic między zmiennymi wykorzystano test parametryczny ANOVA z porównaniami post-hoc Tukeya. Do oceny zależności pomiędzy zmiennymi wykorzystano współczynniki korelacji rang Spearmana. Za poziom istotności przyjęto $p < 0,05$.

Wyniki

W tabelach poniżej przedstawiono wyniki charakterystyki odczynu Bcl-2 w syncytiotrofoblaście w badanych grupach uwzględniające: charakter odczynu, jego intensywność, powierzchnię syncytiotrofoblastu zajętego odczynem.

W tabeli I przedstawiono wartości uzyskane w ocenie odczynu Bcl-2 w porównywanych grupach.

Najwyższą wartość dla charakteru odczynu Bcl-2 otrzymano w grupie I z nadciśnieniem tętniczym, a najniższą w grupie III – kobiet zdrowych, jednak zróżnicowanie charakteru odczynu tego markera między badanymi grupami okazało się statystycznie nieistotne.

Następnie ocenie poddano intensywność odczynu Bcl-2 w preparatach. Otrzymane wyniki intensywności odczynu Bcl-2 przedstawiono w tabeli II.

Analizując uzyskane wyniki, nie stwierdzono istotnych różnic w intensywności odczynu Bcl-2 pomiędzy badanymi grupami. Jednak dało się zauważyć, że najmniejszą intensywnością odczynu charakteryzowały się łożyska kobiet z grupy II suplementowane witaminami.

Kolejno oceniono powierzchnię syncytiotrofoblastu zajętego przed odczyn Bcl-2. Wyniki przedstawiono w tabeli III.

W grupach I i III powierzchnia syncytiotrofoblastu zajęta przez odczyn Bcl-2 była podobna i zarazem większa niż w grupie II – suplementowanej witaminami, niemniej jednak różnica ta była nieistotna statystycznie.

Agata Karowicz-Bilińska et al. Ocena ekspresji wybranych czynników pro- i antyapoptotycznych w syncytiotrofoblaście łożysk ludzkich...

Tabela I. Charakter odczynu Bcl-2.

	mediana	Min	max	Q25	Q75
Grupa I	1,25	0,10	2,20	1,00	1,50
Grupa II	1,00	0,10	1,70	0,50	1,30
Grupa III	1,20	0,70	2,00	1,00	1,40

Tabela II. Intensywność odczynu Bcl-2 w syncytiotrofoblaście.

	mediana	min.	max.	Q25	Q75
Grupa I	2,20	1,00	2,90	1,55	2,50
Grupa II	1,55	1,00	2,90	1,50	2,20
Grupa III	2,25	1,50	3,00	1,95	2,50

Tabela III. Powierzchnia syncytiotrofoblastu z odczynem Bcl-2.

	mediana	min.	max.	Q25	Q75
Grupa I	2,70	1,10	3,00	2,25	2,80
Grupa II	2,45	1,10	2,90	1,70	2,70
Grupa III	2,70	2,10	3,00	2,40	2,80

Tabela IV. Ekspresja odczynu Bcl-2 w syncytiotrofoblaście.

	mediana	min	max	Q25	Q75
Grupa I	4,90	2,10	5,80	4,10	5,30
Grupa II	4,10	2,10	5,80	3,20	4,90
Grupa III	4,95	3,90	6,00	4,45	5,20

Tabela V. Ekspresja Bcl-2 w syncytiotrofoblaście z podziałem na niską i wysoką.

	ekspresja niska (%)	ekspresja wysoka (%)
Grupa I	18,7	81,3
Grupa II	35,7	64,3
Grupa III	0,0	100,0

Następnie ocenie poddano ekspresję odczynu Bcl-2 w syncytiotrofoblaście. Ekspresja obliczana była jako suma (a+b) intensywności odczynu (a) i powierzchni syncytiotrofoblastu objętego odczynem (b). Uzyskane wyniki przedstawiono w tabeli IV.

Najniższa średnia ekspresja występowała w grupie nadciśnienia tętniczego suplementowanego witaminami względem obu pozostałych grup, jednak nie była to różnica istotna statystycznie.

Dla oceny ekspresji odczynu, dokonano podziału na: niską (0-3 pkt) oraz wysoką (4-6 pkt.). Uzyskane w ten sposób wyniki dla odczynu Bcl-2 przedstawiono w tabeli V.

Stwierdzono istotne statystycznie zróżnicowanie badanych grup w nasileniu ekspresji Bcl-2 ($p=0,003$). Wszystkie przypadki z grupy III wykazywały wysoką ekspresję tego markera. Natomiast w grupie II suplementowanej witaminami w ponad $\frac{1}{3}$ zbadanych łożysk stwierdzano niską ekspresją Bcl-2.

Drugim ocenianym parametrem był Bax, w tabelach poniżej przedstawiono charakterystykę tego odczynu w porównywanych grupach zawierającą: charakter odczynu, intensywność oraz powierzchnię syncytiotrofoblastu zajętej odczynem.

W tabeli VI przedstawiono uzyskane wartości charakteru odczynu obserwowanego w syncytiotrofoblaście w porównywanych grupach.

Charakter odczynu w grupie III uzyskał istotnie najwyższą wartość mediany w stosunku do dwóch pozostałych grup: I z nadciśnieniem tętniczym ($p<0,001$) oraz II- nadciśnienia suplementowanego witaminami ($p=0,008$).

Następnie oceniono intensywność odczynu Bax w syncytiotrofoblaście, uzyskane wyniki przedstawiono w tabeli VII.

Analizując wyniki przedstawione w tabeli VII, zaobserwowano, że największa intensywność odczynu Bax w syncytiotrofoblaście występowała w grupie III i różniła się względem obu

Agata Karowicz-Bilińska et al. Ocena ekspresji wybranych czynników pro- i antyapoptotycznych w syncytiotrofoblaście łożysk ludzkich...

Tabela VI. Charakter odczynu Bax w syncytiotrofoblaście.

	mediana	min	max	Q25	Q75
Grupa I	0,90	0,40	1,60	0,80	1,00
Grupa II	0,95	0,40	1,60	0,60	1,10
Grupa III	1,20	0,80	2,10	1,00	1,50

Tabela VII. Intensywność odczynu Bax w syncytiotrofoblaście.

	mediana	min.	max.	Q25	Q75
Grupa I	2,00	0,90	2,50	1,70	2,30
Grupa II	1,75	0,90	2,30	1,60	2,10
Grupa III	2,35	1,50	2,80	2,15	2,65

Tabela VIII. Powierzchnia syncytiotrofoblastu z obecnością odczynu Bax>

	mediana	min.	max.	Q25	Q75
Grupa I	2,70	1,70	2,90	2,40	2,70
Grupa II	2,45	1,70	2,80	2,20	2,70
Grupa III	2,70	2,20	3,00	2,60	2,80

Tabela IX. Ekspresja odczynu Bax w syncytiotrofoblaście.

	mediana	min.	max.	Q25	Q75
Grupa I	4,70	2,70	5,40	4,30	4,90
Grupa II	4,35	2,70	4,90	3,80	4,70
Grupa III	5,10	4,00	5,70	4,80	5,45

Tabela X. Ekspresja odczynu Bax w syncytiotrofoblaście.

	ekspresja niska (%)	ekspresja wysoka (%)
Grupa I	9,4	90,6
Grupa II	21,4	78,6
Grupa III	0,0	100,0

pozostałych badanych grup. Różnica ta była statystycznie istotna ($p < 0,001$). Najniższą intensywnością odczynu charakteryzowała się grupa II-suplementowana witaminami, a wyniki w niej uzyskane różnią się istotnie w stosunku do grupy I.

Kolejnym badanym parametrem była ocena wielkości powierzchni syncytiotrofoblastu zajętej przez odczyn Bax. Wyniki przedstawiono w tabeli VIII.

Większą średnią powierzchnią syncytiotrofoblastu zajętego odczynem Bax charakteryzowały się grupy I i III w porównaniu do grupy II suplementowanej witaminami, jednakże istotna okazała się jedynie różnica między grupą II i III ($p = 0,0131$). (Tabela VIII).

W tabeli IX przedstawiono uzyskane wyniki ekspresji Bax w syncytiotrofoblaście. Ekspresja jak poprzednio obliczana była jako suma (a+b) intensywności odczynu (a) i powierzchni syncytiotrofoblastu objętego odczynem (b).

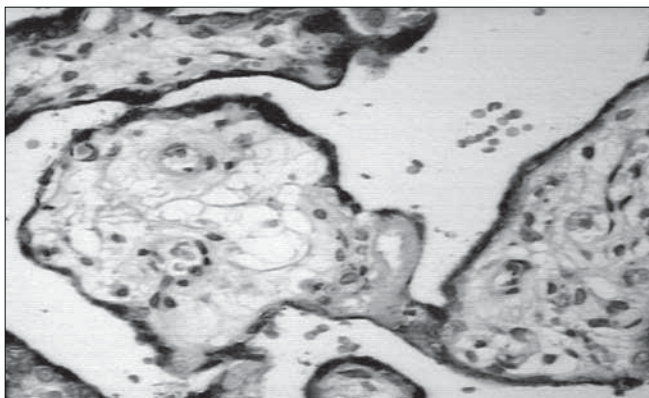
Największą ekspresją Bax charakteryzowała się grupa III względem obu pozostałych grup badanych: I ($p < 0,003$) oraz II ($p < 0,001$). Różnice były istotne statystycznie.

Różnica ekspresji Bax w syncytiotrofoblaście między grupami I i II okazała się nieistotna.

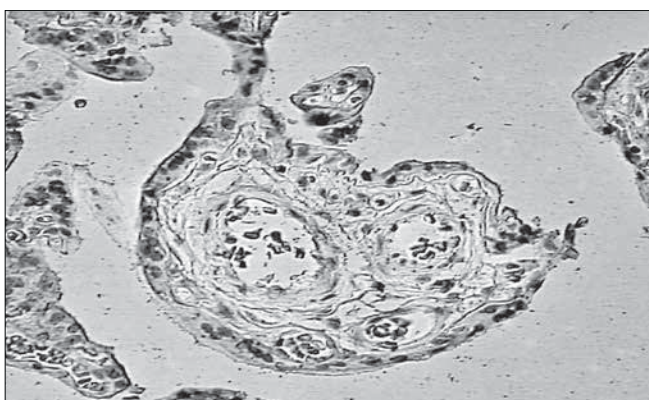
Następnie ocenie poddano ekspresję odczynu Bax w syncytiotrofoblaście z podziałem na niską i wysoką. Uzyskane wyniki przedstawiono w tabeli X.

Stwierdzono, że co piąty przypadek spośród przebadanych łożysk pochodzących z grupy II – suplementowanej witaminami wykazywał niską ekspresję Bax. W grupie I bez suplementacji witaminami już tylko $\frac{1}{10}$ przypadków charakteryzowała się niską ekspresją Bax, a w grupie III- zdrowych nie stwierdzono żadnego przypadku niskiej ekspresji tego markera. Powyższe różnice między badanymi grupami były istotne statystycznie ($p = 0,039$).

Agata Karowicz-Bilińska et al. Ocena ekspresji wybranych czynników pro- i antyapoptotycznych w syncytiotrofoblaście łożysk ludzkich...



Rycina 1. Odczyn immunohistochemiczny z przeciwciałem anti-Bcl-2 w łożysku pacjentki z nadciśnieniem tętniczym i suplementacją witaminami C i E (powiększenie 200 x).



Rycina 2. Odczyn immunohistochemiczny z przeciwciałem anti-Bax w łożysku pacjentki z nadciśnieniem tętniczym w przebiegu ciąży i suplementacją witaminami C i E (powiększenie 200 x).

Dyskusja

W przeprowadzonym badaniu ocena charakterystyki odczynów antyapoptotycznego białka Bcl-2 wskazywała na niższe wartości intensywności, charakteru i zajmowanej przez odczyn powierzchni w grupie kobiet z nadciśnieniem tętniczym suplementowanych antyoksydantami w postaci witaminy C i E. Istotną różnicę stwierdzono oceniając różnice w ekspresji tego parametru, gdy podzielono ją na wysoką i niską zgodnie z metodologią wg. Volma [18]. Najwyższe wartości ekspresji działającego antyapoptotycznie Bcl-2 stwierdzono w grupie kobiet zdrowych, nie wykazując również wpływu suplementacji witaminowej na jego wartości, co sugeruje, że nie można wpłynąć na proces apoptozy łożysku drogą Bcl-2 przez podawanie doustnych antyoksydantów.

Stwierdzenie trendu do obniżania się ekspresji Bcl-2 u kobiet leczonych z powodu nadciśnienia tętniczego po terapii antyoksydantami zgodne jest z obserwacjami innych autorów, którzy stwierdzili, że podawanie witamin C i E hamuje działanie proapoptotyczne innych związków [19]. Również stwierdzony spadek ekspresji antyapoptotycznego białka Bcl-2 w grupie kobiet z nadciśnieniem tętniczym zgodny jest z obserwacjami Ishihara i Zhanga, którzy wykazali spadek ekspresji białka Bcl-2

i jednocześnie nasilenie się procesu apoptozy u kobiet z ciążami powikłanymi nadciśnieniem tętniczym. [10, 20]. Obserwacji tych nie potwierdziły badania Caliego i wsp. którzy stwierdzili brak istotnego zróżnicowania ekspresji Bcl-2 między łożyskami kobiet z ciążą prawidłową a ciążami powikłanymi nadciśnieniem tętniczym, zespołem HELLP, czy zespołem ograniczonego wzrastania płodu [21]. Badania Soni i wsp. wykazały wyższą ekspresję Bcl-2 w syncytiotrofoblaście ciąży w III trymestrze w porównaniu do wyników uzyskanych w pierwszym trymestrze [17].

Uzyskanie najwyższej wartości charakteru, intensywności odczynu Bax w grupie zdrowych ciężarnych przy równoczesnym obniżeniu intensywności w grupie suplementowanej sugeruje wpływ antyoksydantów na proces apoptozy w syncytiotrofoblaście, pomimo występowania zmian związanych z nadciśnieniem [22].

Zmniejszenie powierzchni syncytiotrofoblastu zajętego odczynem Bax oraz jego ekspresji pod wpływem suplementacji antyoksydantami sugeruje ochronną rolę antyoksydantów i możliwość obniżenia ryzyka zmian apoptotycznych w łożysku. Badania innych autorów wskazują jednak na wyższy poziom ekspresji Bax w grupie kobiet z nadciśnieniem tętniczym w porównaniu do grupy zdrowych kobiet. Ten sam zespół badawczy stwierdził również podwyższone wartości Bax u kobiet z cukrzycą ciążową [19]. Odmiennie wyniki opublikowane zostały przez Li i wsp. którzy stwierdzili znaczące zaburzenie proporcji ekspresji Bax do Bcl-2 u kobiet ciężarnych z ciążą powikłaną nadciśnieniem tętniczym. [19]. Wzrost ekspresji Bax i jednoczesny spadek antyapoptotycznego Bcl-2 zaobserwowano w przypadkach nieprawidłowej perfuzji łożyskowej [23, 24].

Brak różnicy zajętej odczynem powierzchni kosmków w porównywanych grupach zgodne są z wynikami Li i wsp. [22, 25]. Podobne wyniki uzyskał Zhang stwierdzając u kobiet z ciążami powikłanymi nadciśnieniem tętniczym wyższe wartości Bax. w stosunku do Bcl-2 [7]. Procesy placentacji, angiogenezy i apoptozy powiązane ze sobą wzajemnie decydują o prawidłowym rozwoju i funkcji łożyska wpływając na wewnątrzmaciczne odżywienie płodu [25, 26].

Wnioski

1. Na podstawie oceny odczynu Bcl-2 w syncytiotrofoblaście nie wykazano wpływu suplementacji antyoksydantami na proces apoptozy w łożysku tą drogą.
2. Wykazano wpływ suplementacji antyoksydantami na obniżenie aktywności Bax w syncytiotrofoblaście, co sugeruje ograniczenie procesu apoptozy, pomimo występowania zmian związanych z nadciśnieniem.

Oświadczenie autorów:

1. Agata Karowicz-Bilińska – autor koncepcji i założeń pracy, analiza i interpretacja wyników, przygotowanie manuskryptu i piśmiennictwa – autor zgłaszający i odpowiedzialny za manuskrypt.
2. Urszula Kowalska-Koprek – współautorka tekstu opracowania, korekta manuskryptu i piśmiennictwa.
3. Józef Kobos – opracowanie metodyki i nadzór nad badaniami.
4. Jacek Pasiński – zebranie materiału, przygotowanie materiału i literatury, współautor opracowania, autor współodpowiedzialny za manuskrypt.

Agata Karowicz-Bilińska et al. Ocena ekspresji wybranych czynników pro- i antyapoptotycznych w syncytiotrofoblastie łożysk ludzkich...

Źródło finansowania:

Badania finansowane z funduszy NCN-NN407242640/503100404.

Konflikt interesów:

Autorzy nie zgłaszają konfliktu interesów oraz nie otrzymali żadnego wynagrodzenia związanego z powstawaniem pracy.

Piśmiennictwo

1. Litwinska E, Litwinska M, Oszukowski P, [et al.]. Biochemical markers in screening for preeclampsia and intrauterine growth restriction. *Ginekol Pol.* 2015, 86, 611-616.
2. Huppertz B. IFPA award in placentology lecture: Biology of the placental syncytiotrophoblast – myths and facts. *Placenta*, 2010, 31, 75-81.
3. Mayhew T, Marwani R, Ohadike C, [et al.]. The placenta in pre-eclampsia and intrauterine growth restriction: Studies on exchange surface areas, diffusion distances and villous membrane diffusive conductances. *Placenta*. 2007, 28, 233-238.
4. Sherer D, Abulafia O. Angiogenesis during implantation and placental and early embryonic development. *Placenta*. 2001, 22, 1-13.
5. Huppertz B, Kadyrov M, Kingdom JC. Apoptosis and its role in the trophoblast. *Am J Obstet Gynecol.* 2006, 195, 29-39.
6. Monier B, Suzanne M. The Morphogenetic Role of Apoptosis. *Curr Top Dev Biol.* 2015, 114, 335-362.
7. Zhang L, Jia L, Cui S, Shi Y, [et al.]. AP-2 -dependent regulation of Bcl-2/Bax expression affects apoptosis in the trophoblast. *J Mol Histol.* 2012, 43, 681-689.
8. Ratts V, Tao X, Webster C, [et al.]. Expression of BCL-2, Bax and Bak in the trophoblast layer of the term human placenta: a unique model of apoptosis within a syncytium. *Placenta*. 2000, 21, 361-366.
9. Sokolov D, Kolobov A, Lesnichija M, [et al.]. Regulatory mechanisms for apoptosis in placental tissue during normal pregnancy and gestosis-complicated pregnancy. *Gene Pathol Pathophysiol.* 2009, 148, 766-770.
10. Zang P, Schmidt M, Cook L. Maternal vasculopathy and histologic diagnosis of preeclampsia: poor correlation of histologic changes and clinical manifestation. *Am J Obstet Gynecol.* 2006, 194, 1050-1056.
11. Kornacki J, Wirstlein P, Skrzypczak J. Ocena stężenia czynników antyangiogennych, triglicerydów, glukozy, insuliny oraz SHBG u kobiet z dwoma postaciami stanu przedrzucawkowego. *Ginekol Pol.* 2013, 84, 770-776.
12. Aris A, Leblanc S, Ouellet A, [et al.]. Detrimental effects of high levels of antioxidant vitamins C and E on placental function: considerations for the vitamins in preeclampsia (VIP) trial. *J Obstet Gynecol Res.* 2008, 34, 504-511.
13. Ananth C, Vintzileos A. Ischemic placental disease: epidemiology and risk factors. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2011, 159, 77-82.
14. Polyzons N, Mauri D, Tsappi M, [et al.]. Combined vitamin C and E supplementation during pregnancy for preeclampsia prevention: a systematic review. *Obstet Gynecol Surv.* 2007, 62, 202-206.
15. Rumbold A, Ota E, Nagata C. [et al.]. Vitamin C supplementation in pregnancy. *Cochrane Database Syst Rev.* 2015, 29, 9.
16. Shikh EV, Makhova AA. Role of ascorbic acid and tocopherol in the prevention and treatment of diseases from the standpoint of evidence-based medicine. *Ter Arkh.* 2015, 87, 98-102.
17. Soni S, Rath G, Prasad CP, [et al.]. Apoptosis and Bcl-2 protein expression in human placenta over the course of normal pregnancy. *Anat Histol Embryol.* 2010, 39, 426-431.
18. Volm M, Koomagi R, Mattern J, [et al.]. Prognostic value of basic fibroblast growth factor and its receptor (FGFR-1) in patients with non-small cell lung carcinomas. *Eur J Cancer.* 1997, 33, 691-693.
19. Cobellis L, De Falco M, Torella M, [et al.]. Modulation of Bax expression in physiological and pathological human placentas throughout pregnancy. *In Vivo.* 2007, 21, 777-783.
20. Ishihara N, Matsuo H, Murakoshi H, [et al.]. Increased apoptosis in the syncytiotrophoblast in human term placentas complicated by either preeclampsia or intrauterine growth retardation. *Am J Obstet Gynecol.* 2002, 186, 158-166.
21. Cali U, Cavkaytar S, Sirvan L, Danisman N. Placental apoptosis in preeclampsia, intrauterine growth retardation, and HELLP syndrome: an immunohistochemical study with caspase-3 and bcl-2. *Clin Exp Obstet Gynecol.* 2013, 40, 45-48.
22. Li C, Hu Z, Cao L. Study on apoptosis and its related genes in pregnancy induced hypertension. *Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi.* 2000, 35, 335-337.
23. Mayhew T. Changes in fetal capillaries during preplacental hypoxia: growth, shape remodelling and villous capillarization in placentae from high-altitude pregnancies. *Placenta.* 2003, 24, 191-198.
24. Youle RJ, Strasser A. The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2008, 9, 47-59.
25. Plaisier M. Decidualisation and angiogenesis. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol.* 2011, 25, 259-271.
26. Nicholson D, Thornberry N. Apoptosis. Life and death decisions. *Science.* 2003, 299, 214-215.



Sekcja Ginekologii Operacyjnej
Polskiego Towarzystwa Ginekologicznego

oraz

Sekcja Endometriozy
Polskiego Towarzystwa Ginekologicznego

zapraszają

Konferencja Naukowa

04.12.2015

w godz. 10:00 – 14:00

Instytut Centrum Zdrowia Matki Polki
ul. Rzgowska 281/289

93-338 Łódź

W programie:

- wykłady
- zebranie sprawozdawczo-wyborcze w/w Sekcji
- wybory Przewodniczących w/w Sekcji

WSTĘP WOLNY

Sprawy organizacyjne i zapisy:

Sekretariat Kliniki Ginekologii Operacyjnej, Endoskopowej
i Ginekologii Onkologicznej
ICZMP

tel. +48 42 271 11 31

e-mail: klinika@laparoscopia.org.pl