

УДК618.36 – 06 : 616.155.194] – 056.7 – 07 – 08

**Запорожан В.М., Анчева І.А., Микитенко Д.О., Євдокимова В.В.**

## **ГЕНЕТИЧНА ДЕТЕРМІНАЦІЯ АНГІОГЕНЕЗУ ПРИ ФОРМУВАННІ ДЕЦИДУАЛЬНОЇ ТКАНИНИ У ВАГІТНИХ ІЗ ЗАЛІЗОДЕФІЦИТНОЮ АНЕМІЄЮ**

Одеський національний медичний університет

Клініка репродуктивної медицини «Надія», м. Київ

Військово-медичний клінічний центр південного регіону, м. Одеса

*Метою дослідження була оцінка експресії гену VEGFA у плацентарній тканині жінок, що страждали протягом вагітності на залізодефіцитну анемію. Дослідження проведене на базі пологового будинку №2 (м. Одеса) протягом 2012-2013 рр. Обстежено 100 породіль, були виділені наступні клінічні групи: I група – плаценти від жінок з фізіологічним перебігом вагітності та пологів (n=20); II група – плаценти від жінок з анемією вагітних в анамнезі (n=40); III група – плаценти від жінок з дисфункцією плаценти і анемією в анамнезі (n=40). Показано, що хронічна гіпоксія, яка виникає при залізодефіцитній анемії, негативно впливає на процеси формування децидуальної тканини. Доведено, що експресія гену VEGFA зростає у вагітних з проявами залізодефіцитної анемії у 5,1-10,8 разів. Ці зміни ведуть до нерівномірного збільшення інтенсивності експресії білку VEGFA в стінці судин термінальних ворсин і клітинах периферичного цитотрофобласта.*

Ключові слова: залізодефіцитна анемія, дисфункція плаценти, ангіогенез.

*Виконане дослідження є фрагментом науково-дослідної роботи Одеського національного медичного університету МОЗ України "Молекулярно-генетичні та екологозалежні механізми розвитку пухлин репродуктивної системи: шляхи удосконалення діагностики, лікування і профілактики" (№ держреєстрації 0102U006588).*

Вагітність - фізіологічний процес, під час якого діють особливі механізми, які регулюють взаємовідносини між алогенними організмами. Основні події, що визначають процеси формування і росту плаценти, а також виконання її бар'єрної і трофічної функцій відбуваються в зоні поділу кровотоку матері та плоду - в децидуальній оболонці плаценти [5, 7]. Як показують численні дослідження, порушення процесів активації і диференціювання клітин при формуванні децидуальної тканини сприяє розвитку акушерської та перинатальної патології [5, 6].

Загалом, у формуванні хоріона можна розрізнити три періоди: предворсинчатий (7-8-й день розвитку), період утворення ворсин (13-50-й день) та утворення котиледонів (50-90-й день). У сформованій до 140-го дня вагітності плаценті міститься 10 - 12 великих, 40-50 дрібних і 140-150 рудиментарних котиледонів. З встановленням плодово-плацентарного і матково-плацентарного кровообігу, тобто до кінця I триместру вагітності, завершується період плацентації. Слід мати на увазі, що до цього моменту вже сформовані основні структурні елементи плаценти, але в морфофункціональному відношенні вона ще залишається незрілою [4, 6]. Перетинки (септи) добре помітні починаючи з 12 тижня вагітності. З їх розвитком (на 15-16 тижні вагітності) плацента досягає остаточної товщини (1,5 - 2 см). З цього моменту збільшення її маси відбувається головним чином за рахунок процесу гіпертрофії, а не гіперплазії [4].

При хронічній гіпексії, причиною якої у вагітних нерідко є залізодефіцитна анемія, ризик порушення процесу плацентації значно зростає [1-3]. Відповідно виникають передумови для розвитку дисфункції плаценти у подальші терміни вагітності.

При дефіциті заліза у вагітних виникає не тільки залізодефіцитна анемія, а й інші порушення. Так, внаслідок зниження синтезу міоглобіну розвивається швидка стомлюваність, слабкість, можлива втрата апетиту, задишка і набряки, через порушення активності мієлопероксидази лейкоцитів виникають порушення імунітету. При важкій анемії порушується основна функція еритроцитів - доставка кисню до тканин організму і виникають при анемії патологічні зміни пов'язані перш за все з гіпексією [1, 2]. Одним з таких ускладнень є дисфункція плаценти [3, 5, 6]. Дисфункція плаценти виникає в результаті порушень компенсаторно-приспосовних механізмів у плацентарній системі в поєднанні із змінами в структурі самої плаценти [3-5]. Подібні зміни можуть бути обумовлені порушеннями основних функцій плаценти – трофічної або дихальної [3, 4]. Втім, досі невідомо як саме змінюється експресія генів, які визначають активність процесів неоангіогенезу при формуванні децидуальної тканини у жінок, що страждають на залізодефіцитну анемію.

### **Мета дослідження**

Оцінка експресії гену VEGFA у плацентарній тканині жінок, що страждали протягом вагітності на залізодефіцитну анемію.

### **Матеріал та методи**

Дослідження проведене на базі пологового будинку №2 (м. Одеса) протягом 2012-2013 рр. Обстежено 100 породіль, від яких були одержані зразки плаценти. При цьому були виділені наступні клінічні групи:

I група – плаценти від жінок з фізіологічним перебігом вагітності та пологів (n=20);

II група – плаценти від жінок з анемією вагітних в анамнезі (n=40);

III група – плаценти від жінок з дисфункцією плаценти і анемією в анамнезі (n=40).

Пацієнтки були відібрані залежно від показників кардіотокографії, доплерометрії матково-плацентарного кровотоку. Критеріями виключення були: багатопліддя, прееклампсія, важка екстрагенітальна патологія пацієнток (цукровий діабет, системні захворювання серцево-судинної, дихальної і травної системи), природжені і спадкові захворювання плоду.

Діагностику дисфункції плаценти проводили на підставі клінічних спостережень за перебігом вагітності, ультразвукової фетоплацентометрії, доплерометрії, вивчення гормональної функції плаценти. Визначення гормонів фетоплацентарного комплексу в сироватці крові вагітних - естріолу, прогестерону, плацентарного лактогену, а також специфічних маркерів ферокінетичного статусу – феритину та трансферину, проводили імуноферментним методом з використанням комерційних тест-систем (ІФА, DRG, США; ІФА «Хема», «Алкор-Біо», «Вектор-Бест», Росія). При проведенні доплерометрії на ультразвуковому апараті Toshiba Xaria SSA 660A (Японія) оцінювали матково-плацентарний кровоток з використанням імпульсної доплерометрії і кольорового доплерівського картування.

Виділення РНК проводилось на базі клініки репродуктивної медицини «Надія» зі зразків біоптату плаценти породіль з метою дослідження експресії генів VEGFA (OMIM 192240).

Для цього послідовно проводились наступні процедури: відбір та проведення біопсії плаценти, виділення РНК, проведення зворотної транскрипції та полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) у режимі реального часу.

Проведення біопсії тканини плаценти об'ємом до 1,0 мм<sup>3</sup> здійснювалось конхотомом. Фрагменти плаценти від часу взяття біоматеріалу до проведення дослідження зберігались у 10 еквівалентних об'ємах RN Alater® Solution (Ambion, USA, Cat# AM7024) за температури «-200°С».

Виділення РНК проводилося з використанням набору QIAamp RNA Blood Mini Kit (Qiagen, Німеччина, кат № 52304) у відповідності до протоколу виробника для виділення нуклеїнових кислот з фрагментів тканин. Для цього за рекомендацією виробника проводились наступні дії:

- відмивання біоматеріалу від RN Alater® Solution;
- розтирання шматочків тканини у рідкому азоті;
- гомогенізація розтертих фрагментів за допомогою центрифужних колонок QIAshredder (Qiagen, Німеччина) у лізуючому буфері;
- преципітація еквівалентним об'ємом 70% етанолу;
- сорбція РНК на центрифужних колонках QIAamp spin column (Qiagen, Німеччина) з наступною трикратною відмивкою та просушкою колонок;
- елюція РНК за допомогою вільної від рибонуклеаз води для молекулярних досліджень.

Характеристики виділеної РНК визначали з використанням Nano Drop 1000 Spectrophotometer (Thermo Scientific, США) шляхом визначення показників  $A_{260}/A_{280}$  та  $A_{260}/A_{230}$ .

Отримана РНК зберігалась при температурі «-20°С» та використовувалась для проведення зворотної транскрипції.

Зворотна транскрипція проводилась з використанням набору High-Capacity DNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, USA, Cat# 4368814) відповідно до рекомендацій виробника. Реакційна суміш для проведення зворотної транскрипції містила (з розрахунку на 1 зразок): 2 мкл 10хбуферу для зворотної транскрипції, 0,8 мкл 25х суміші dNTP (по 100 мМ кожного), 2 мкл 10х суміші розсіяних (випадкових) праймерів, 1 мкл зворотної транскриптази Multi Scribe™, 4,2 мкл вільної від нуклеаз води для проведення ПЛР та 10 мкл виділеної РНК. Зворотна транскрипція проводилась з використанням ампліфікатору Applied Biosystems® 2720 Thermal Cycler (Applied Biosystems, USA) з наступними температурними умовами: 1. 10'@25C; 2. 120'@37C; 3. 5'@85C; 4. 4C@∞. Отримана кДНК зберігалась при температурі «4-8° C» та використовувалась для оцінки експресії генів.

Оцінка експресії генів проводилась з використанням пресинтезованих Taq Man® Gene Expression Assay (Applied Biosystems, USA) методом відносної експресії. Використовували тест систему VEGFA (OMIM 192240): Cat# 4453320 – Hs 00900055\_m1, а у якості внутрішнього контролю - GAPDH (OMIM 138400) (Cat# 4331182 – Hs 99999905\_m1).

Кожен 20хTaqMan® Gene Expression Assay містив два немічені праймери (при кінцевому 1х розведенні 900нМ на праймер, при 20х стоковій концентрації 18мкМ на праймер) та один 6-FAM™ мічений Taq Man® MGB зонд (при кінцевому 1х розведенні 250нМ, при 20х стоковій концентрації 5мкМ).

Реакційна суміш містила: 1.0 мкл 20хTaqMan® Gene Expression Assay, 10 мкл 10хTaqMan® Gene Expression Master Mix, 6 мкл вільної від рибонуклеаз води для ПЛР та 3 мкл кДНК, отриманої на попередньому етапі. Ампліфікація та детекція проводилась за використанням ПЛР-системи у реальному часі 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems, США, кат. № 4351105) з програмним забезпеченням SDS 2,0,5 з наступними температурними умовами: 1. 2'@50C; 2. 10'@95C; 3. 60x (15'@95C, 1'@60C). Зчитування даних проводилось приладом на останньому етапі кожного циклу. Аналіз результатів проводився у ручному режимі за методом за  $\Delta\Delta C_t$  (дельта-дельта  $C_t$ ).

Фенотип досліджували шляхом оцінки рівня експресії VEGF непрямим стрептавидін-пероксидазним методом. Після депарафінізації шматочків тканини на скло блокували ендогенну

пероксидази 3% розчином пероксиду водню, обробка предметного скла водою, блокування неспецифічних протеїнових сполук двома краплями 1% BSA, промивка в PBS-буфері нанесення первинних антитіл до антигену VEGF (фірма DAKO, Данія) на одну годину. В подальшому промивають реакційне середовище в PBS - буфері і наносять вторинні антитіла, після чого знову промивають пробу в PBS-буфері, з нанесенням двох крапель комплексу стрептавідин - пероксидази та подальшою інкубацією на протязі 30 хв. Надалі здійснюється промивка і нанесення АЕС – хромоген - розчину з інкубацією від 5 до 20 хвилин, до появи коричневого забарвлення;

Статистична обробка проводилася загальноприйнятими методами варіаційної статистики за допомогою програмного забезпечення Statistica 10.0 (Stat SoftInc., США).

### Результати дослідження

Клінічна картина у групах дослідження була стереотипною. Середній вік пацієток I, II та III групи склав  $28,2 \pm 4,5$ ,  $31,2 \pm 6,8$  й  $27,2 \pm 1,8$  років відповідно ( $p > 0,05$ ). У більшості випадків вагітність була першою, а перинатальні результати – цілком задовільними. Методом вибору анестезії у пологах була перидуральна анестезія, яка прискорює дилатацію шийки матки, дозволяє ефективно знеболити пологи та зменшити рівень психоемоційної напруги, не впливаючи значущо на матково-плацентарний кровоток.

У пацієток II групи визначалися клінічно маніфестовані ознаки залізодефіциту (залізо сироватки крові -  $11,32 \pm 0,44$  мкмоль/л, феритин -  $11,92 \pm 1,57$  нг/мл). У вагітних III групи вагітність перебігала з дисфункцією плаценти I-IIA ступеня, при чому у 8 (20,0%) пацієток гестаційний період ускладнився маловоддям, у 3 (7,5%) - низькою плацентацією, а у 9 (22,5%) породіль виник дистрес плоду у I періоді пологів, який був показанням до оперативного розродження.

При аналізі експресії гену VEGFA були визначені певні відмінності між групами (рис. 1) у вигляді суттєвого зростання показника у II та III клінічній групі.

Достовірне перевищення величини цільового сигналу від амплікону над фоновою флуоресценцією і шумами (рис. 2) дозволяє за графіками наростання флуоресценції, отриманим після вирахування фону і згладжування, встановити деяке порогове значення флуоресценції (RT), однакове для всіх спільно аналізованих проб. Коректне встановлення RT (вище порога детекції, але в межах log-фази) здійснюється вручну або за допомогою програми ампліфікатора (рис. 2).

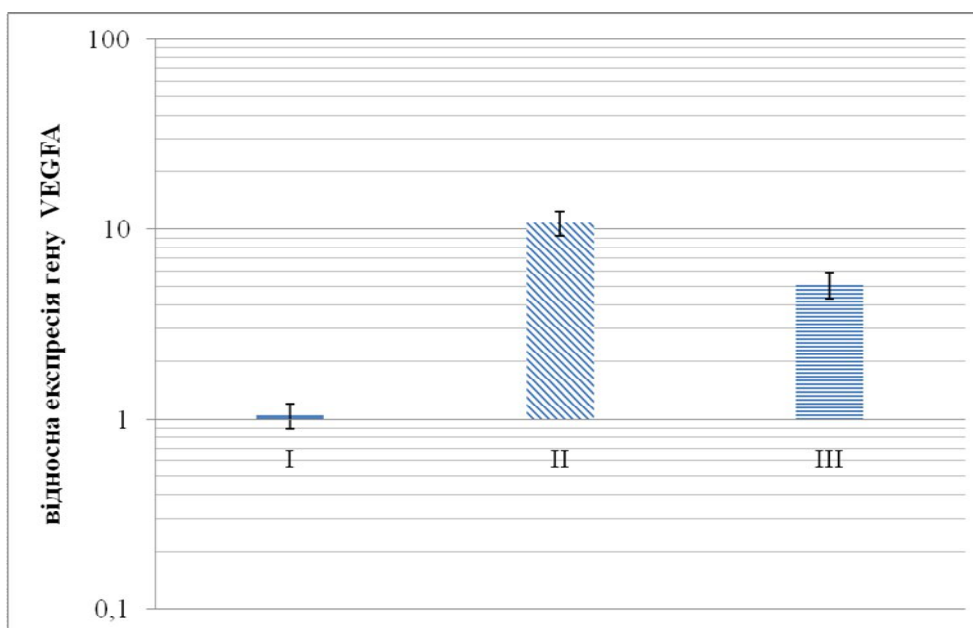


Рис. 1 Експресія гену VEGFA у плацентарній тканині.

Якщо для досліджуваних проб визначити значення порогового циклу (Ct - від англ. *Thresholdcycle* - число раундів ампліфікації, необхідне для досягнення порогового значення), то для будь-якого досліджуваного зразка k при пороговому значенні RT вірна формула:  $RT = A \times X_0 k \times (1 + E_k) C_t k$ , де A - константа (коефіцієнт пропорційності).

З наведеної формули можна дійти висновку, що чим менша стартова кількість копій ДНК-мішені ( $X_0$ ), тим більше число циклів ампліфікації (Ct) необхідно для досягнення порогового значення. Характеристики приладів, які найбільш широко використовуються в клінічній діагностиці для Real-TimePCR, такі, що для детекції поодиноких копій ДНК-мішені в досліджуваній пробі потрібно 35-37 циклів ампліфікації.

Слід зазначити, що зростання експресії гену VEGFA яке спостерігалось у вагітних II та III клінічної групи цілком узгоджується з результатами імуногістохімічного дослідження. Так, у вагітних із залізодефіцитною анемією спостерігалось нерівномірне збільшення інтенсивності експресії білку VEGFA в стінці судин термінальних ворсин і клітинах периферичного цитотрофобласта.

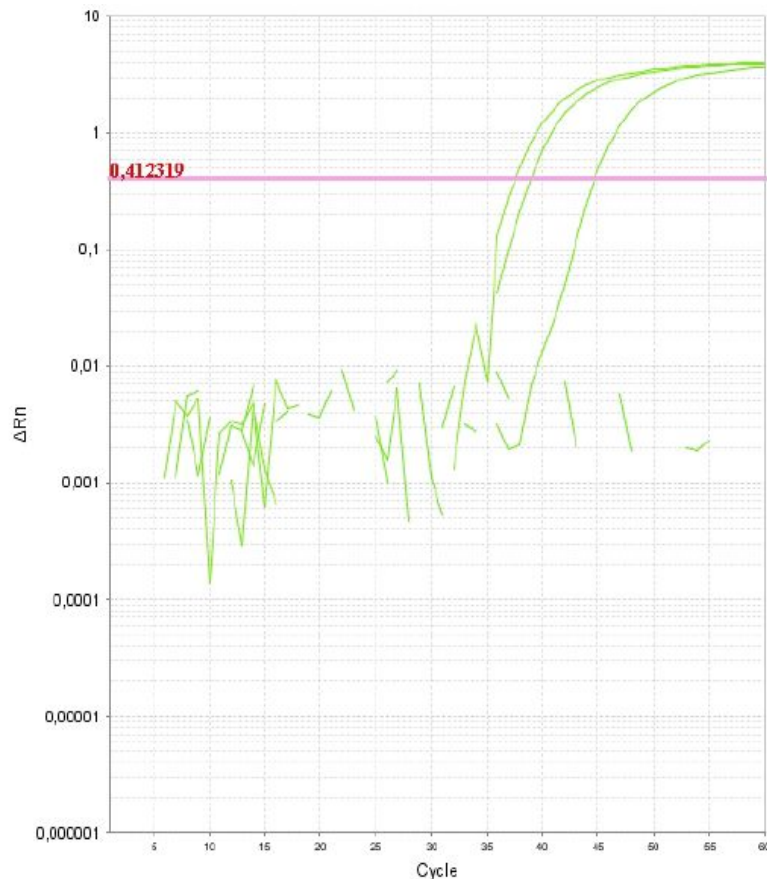


Рис. 2 Графік наростання флуоресценції при дослідженні експресії гену VEGFA у вагітної із залізодефіцитною анемією.

Таким чином, хронічна гіпоксія, що виникає при залізодефіцитній анемії, негативно впливає на процеси формування децидуальної тканини. Зниження інтенсивності ангиогенезу гілчастого типу може стати причиною вираженого дефіциту капілярів ворсин та, зрештою, до дисфункції плаценти, обумовленої недостатнім розвитком судинної мережі плаценти.

### Висновки

1. Експресія гену VEGFA зростає у вагітних з проявами залізодефіцитної анемії у 5,1-10,8 разів
2. Зміни експресії гену VEGFA ведуть до нерівномірного збільшення інтенсивності експресії білка VEGFA в стінці судин термінальних ворсин і клітинах периферичного цитотрофобласта.

Перспективи подальших досліджень можуть бути пов'язані із дослідженням цитокінового профілю при вагітності, ускладненій дисфункцією плаценти на тлі залізодефіцитної анемії.

### Література

1. Анчева І.А. Клінічна епідеміологія анемії вагітності на півдні України: ретроспективне дослідження / І.А. Анчева // Вісник проблем біології і медицини. – 2013. – Т. 2, № 3. – С. 112-114.
2. Малкоч А.В. Железодефицитные состояния и железодефицитная анемия у женщин детородного возраста. / А.В. Малкоч, Л.А. Анастасевич, Н.Н. Филатова // Лечащий врач. – 2013. – № 4. – С. 37.
3. Серов В.Н. Железодефицитная анемия в гинекологической практике: основные принципы лечения / В.Н. Серов, Н.В. Дубровина, А.А. Балущкина // Русский медицинский журнал. – 2011. – Т. 19, № 1. – С. 1-4.
4. Семенова М.В. Состояние плаценты при железодефицитной анемии у беременных / М.В. Семенова, Е.Л. Баженов, Н.М. Канунникова [и др.] // Морфологические ведомости. – 2007. – Т. 1, № 1-2. – С. 218-219.
5. Blackburn S. Maternal, Fetal, & Neonatal Physiology / S. Blackburn PhD RN C N.Y. Saunders, 4 edition, 2012. – 768 p.
6. Chen C.P. Human placental multipotent mesenchymal stromal cells modulate trophoblast migration via Rap 1 activation / C.P. Chen, J.P. Huang, T.Y. Chu [et al.] // Placenta. – 2013. – Vol. 8 (11). – P. 532-541
7. Salomon C. Hypoxia-induced changes in the bioactivity of cytotrophoblast-derived exosomes / C. Salomon, M. Kobayashi, K. Ashman [et al.] // PLoS One. – 2013. – Vol. 8 (11). – P. 79-83.

### Реферат

#### ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ДЕТЕРМИНАЦИЯ АНГИОГЕНЕЗА ПРИ ФОРМИРОВАНИИ ДЕЦИДУАЛЬНОЙ ТКАНИ У БЕРЕМЕННЫХ С ЖЕЛЕЗОДЕФИЦИТНОЙ АНЕМИЕЙ

Запорожан В.М., Анчева И.А., Микитенко Д.О., Евдокимова В.В.

Ключевые слова: железодефицитная анемия, дисфункция плаценты, ангиогенез.

Целью исследования была оценка экспрессии гена VEGFA в плацентарной ткани женщин, страдавших на протяжении беременности железодефицитной анемией. Обследовано 100 рожениц, были выделены следующие клинические группы: I группа - плаценты от женщин с физиологическим течением беременности и родов (n = 20); II группа - плаценты от женщин с анемией беременных в анамнезе (n = 40); III группа - плаценты от женщин с дисфункцией плаценты и анемией в анамнезе (n = 40). Показано, что хроническая гипоксия, возникающая при железодефицитной анемии, негативно влияет на процессы формирования децидуальной ткани. Доказано, что экспрессия гена VEGF Аростету беременных с проявлениями железодефицитной анемии в 5,1-10,8 раз. Эти

изменения ведут к неравномерному увеличению интенсивности экспрессии белка VEGF в стенке сосудов терминальных ворсин и клетках периферического цитотрофо-бласта.

### Summary

GENETIC DETERMINATION OF ANGIOGENESIS DURING DECIDUAL TISSUE FORMATION IN PREGNANT WOMEN WITH IRON DEFICIENCY ANEMIA

Zaporozhan V.M., Ancheva I.A., Mykytenko D.O., Yevdokimova V.V.

Keywords: iron deficiency anemia, placental dysfunction, angiogenesis.

The aim of this study was to evaluate the expression of the VEGFA gene in placental tissue of women who suffered from iron deficiency anemia during pregnancy. 100 pregnant women passed through the clinical examination were divided into three clinical groups: I group included placentae taken from women with physiological pregnancy and childbirth (n = 20); II group included placentae of pregnant women with a history of anemia (n = 40); III group included placentae from women with placental dysfunction and a history of anemia (n = 40). It has been shown that chronic hypoxia that occurs in iron deficiency, affects the processes of formation of decidual tissue. It has been proved that the expression of the VEGF gene in pregnant women with symptoms of iron deficiency anemia is 5,1-10,8 times higher. These changes lead to an uneven increase in the intensity of VEGF protein expression in the vascular wall cells and terminal villi and cells of peripheral cytotrophoblasts.