

Struktura śródbłonek naczyń krwionośnych i immunohistochemiczne wyznaczniki angiogenezy w kosmkach łożyska ludzkiego

Endothelial cells structure and immunohistochemical analysis of the indices of angiogenesis in human placental villi

© GINEKOLOGIA I POŁOŻNICTWO 4 (10) 2008

Artykuł poglądowy/Review article

ELŻBIETA DUDEK¹, ZYGMUNT MACKIEWICZ², JANUSZ KUBICKI^{3,4},
WOJCIECH GUZIKOWSKI⁵

¹ Zakład Biologii Komórki, Katedra Biotechnologii i Biologii Molekularnej,
Wydział Przyrodniczo-Techniczny, Uniwersytet Opolski
Kierownik: prof. zw. dr hab. Adam Latała

² Instytut Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej, Uniwersytet Wileński, Litwa
Kierownik: prof. Algirdas Venalis

³ Katedra i Zakład Położnictwa, Państwowa Wyższa Medyczna Szkoła Zawodowa
w Opolu

Kierownik: dr hab. n. med. Janusz Kubicki, prof. Politechniki Opolskiej

⁴ Instytut Fizjoterapii, Wydział Wychowania Fizycznego i Fizjoterapii, Politechnika
Opolska

Kierownik: dr hab. n. med. Jan Szczegielniak

⁵ Szpital Ginekologiczno-Położniczy i Noworodków w Opolu

Dyrektor: dr n. med. Wojciech Guzikowski

Adres do korespondencji/Address for correspondence

Elżbieta Dudek

Zakład Biologii Komórki, Katedra Biotechnologii i Biologii Molekularnej

Wydział Przyrodniczo-Techniczny, Uniwersytet Opolski

ul. Kard. B. Kominka 4, 45-035 Opole, Poland

tel.: 077 401 60 50, fax: 077 401 60 51; e-mail: edudek@op.pl

Statystyka/Statistic

Liczba słów/Word count	2117/2074
Tabele/Tables	0
Ryciny/Figures	0
Piśmiennictwo/References	57

Received: 06.04.2008

Accepted: 15.09.2008

Published: 02.12.2008

Streszczenie

Za jedną z cech łożysk z różnych patologii ciąży (hypotrofia płodowa, cukrzyca) uznaje się występowanie zmian w unaczynieniu kosmków. Stałym elementem strukturalnym wszystkich systemów naczyniowych są komórki śródbłonna, a od ich prawidłowej budowy i aktywności zależy funkcjonowanie całego naczynia. W pracy autorzy dokonali opisu ultrastrukturalnej budowy komórek endotelialnych oraz przedstawili aktualne dane dotyczące występowania w łożysku ludzkim markerów aktywności endotelium oraz wyznaczników procesów angiogenezy. Wyniki badań własnych podjętych w aspekcie zmian naczyniowych w łożyskach z wybranych patologii ciąży zostaną przedstawione w kolejnych pracach oryginalnych.

Słowa kluczowe: łożysko, CD34, czynnik von Willebranda (vWF), angiogeneza, endotelialna syntaza tlenu azotu (eNOS).

Summary

Disorders in vascularization of the chorion are considered as one of the features of pathological pregnancy (fetal hypotrophy, diabetes). Endothelial cells are regular elements of all vascular systems and their normal structure and functions condition the function of the vessel. In the presented paper the authors described the ultrastructure of endothelial cells and presented the current data on markers of endothelium activity in human placenta as well as markers of

angiogenesis. The results of authors own study on the changes in placental vasculature in selected pathology of pregnancy will be presented in the following part of the paper.

Key words: placenta, CD34, von Willebrand factor (vWF), angiogenesis, endothelial nitric oxide synthase (eNOS).

WSTĘP

Łożysko ludzkie jest wieloczynnościowym organem tymczasowym, wyspecjalizowanym w przyswajaniu i rozprowadzaniu wielu metabolicznych substratów (glukoza, laktoza, aminokwasy). Narząd ten dostarcza składniki odżywcze dla rozwijającego się płodu oraz odprowadza produkty przemiany materii, pełni funkcje immunologiczną i wewnątrzwydzielniczą, bierze też prawdopodobnie udział w mechanizmie zapoczątkowania porodu. Potrzeby rozwijającego się płodu wymagają wzrostu macicznego i pępowinowego przepływu krwi. Prawidłowy rozwój obszernej sieci naczyniowej w kosmkach łożyska jest niezbędny do rozbudowy tkanek tego narządu i warunkuje sprawne funkcjonowanie organu. Wykazywane w łożyskach terminowych zmiany strukturalne stanowią odzwierciedlenie nieprawidłowości w przebiegu ciąży.

Niska masa łożyska, zmniejszona powierzchnia wymiany na poziomie kosmków końcowych, zredukowane unaczynienie, a także wzrost apoptozy komórek trofoblastu, związane są między innymi z hypotrofią płodu (ograniczeniem wzrostu płodu, IUGR). Wśród licznych przyczyn odpowiedzialnych za zaistnienie hypotrofii płodowej (defekty chromosomowe, palenie tytoniu, preeklampsja, infekcja matki i płodu) etiologia większości przypadków IUGR jest nieznaną [1,2].

UNACZYNIENIE ŁOŻYSKA

Przebiegające na odcinku sznura pępowinowego, w otoczeniu galaretowatej tkanki łącznej (galareta Whartona) naczynia płodowe, oddają w mezenchymalnym zrębie kosmków łożyska liczne odgałęzienia, o coraz to mniejszej średnicy, formując łożyskowy system krążenia krwi. Obie tętnice w swej budowie posiadają grubą błonę wewnętrzną bez elastynowej warstwy sprężystej wewnętrznej oraz błonę środkową z okrężnie ułożonymi miocytami w otoczeniu przeplatających się spiralnych włókien. Żyła pępowinowa zawiera cienką błonę wewnętrzną z elastyczną warstwą podendotelialną i błonę środkową w postaci miocytów układających się podłużnie, okrężnie i skośnie. Każde naczynie pępowinowe otoczone jest wiązkami spiralnych włókien kolagenowych, których krzyżujący się układ tworzy rodzaj przydanki, gdzie nie występują naczynia naczyń. Żyła pępowinowa kieruje do płodu krew utlenowaną i bogatą w substancje odżywcze, tętnice odpro-

INTRODUCTION

Human placenta is a multi-functional organ specialized in assimilating and distributing a great number of metabolic substrates (glucose, lactose, amino acids). Placenta is responsible for transporting the nutrients into growing fetus as well as elimination waste products. It also plays an immunological and endocrinological role and probably takes part in delivery initiation. The growing fetal requirements lead to increase in urethral and placental blood flow. The proper development of vasculature in placental villi is necessary for increasing the placenta mass and guarantees the efficient functions of that organ. The changes observed in terminated placenta are a signs of pathological pregnancy course.

Low placental mass, reduction of exchange surface on the level of terminal villi, reduced vasculature as well as increase of trophoblastic cells apoptosis lead to fetal hypotrophy (IUGR). The etiology of the majority of IUGR cases remains still unknown. However, possible causes were reported – chromosomal abnormalities, smoking, and preeclampsia, fetal and mother infections [1,2].

PLACENTAL VASCULAR SUPPLY

Fetal vessels surrounded by gelatinous substance (Wharton's jelly) run in the umbilical cord. In the mesenchymal stroma of placental villi those vessels branch into many smaller ones formatting the placental blood circulation. Both umbilical arteries consist of thick muscular coat without internal elastic layer and middle coat with circular myocytes surrounded by interlacing spiral fibers. Umbilical vein contains a thin intima with elastic sub-endothelial layer and media with longitudinal, circular and oblique myocytes. Each vessel is surrounded by bunches of spiral collagen fibers forming a kind of adventitia with vasa vasorum. Oxygenated blood is directed into the fetus by umbilical vein, the arteries drive waste products for the fetal circulation into mothers one. The metabolic exchange takes place in sinusoids formed only by endothelial cells lying on basal membrane. Placental microcirculatory system is completed by small arteries, arterioles, precapillary arterioles, capillaries, postcapillary veins, small veins and veins, having 3-layers structure similarly to umbilical vessels. The thickness, proportions and struc-

wadzą z krwi płodu zbędne produkty przemiany materii. Kompleks wymian metabolicznych zachodzi na poziomie zatokowych naczyń włosowatych – sinusoid, uformowanych jedynie z komórek śródbłonka opartych na błonie podstawnej. System mikrocyrkulacji łożyskowej uzupełniają małe tętnice, tętniczki, tętniczki przedwłosowate, kapilary, żyłki pozawłośniczkowe, żyłki i małe żyły, które na wzór naczyń pępowinowych, również wykazują trójwarstwową budowę ścian, przy czym grubość tych warstw, wzajemne ich proporcje oraz różnice w tkankowym składzie ściśle zależą od rodzaju i średnicy naczyń [3].

ŚRÓDBŁONEK NACZYNIOWY – ULTRASTRUKTURA

Naczynia łożyskowe od strony strumienia krwi wyścielają ciągłą monowarstwą płaskich komórek nabłonkowych nazywaną śródbłonkiem naczyniowym (endotelium). Przekroje poprzeczne komórek endotelialnych uwidaczniają cienką warstwę cytoplazmy z typowymi organelami (jądro, mitochondria, siateczka śródplazmatyczna szorstka, aparat Golgiego z licznymi pęcherzykami, rybosomy, lizosomy, ziarna glikogenu) [3]. Wolna powierzchnia błony komórkowej śródbłonek pokryta jest warstwą glikoprotein, glikolipidów i proteoglikanów, formującą wysoko zorganizowany trójwymiarowy **układ glikokaliks**, przytwierdzony do podbłonowej sieci włóknistych białek, tzw. kory komórki. Śródbłonkowy glikokaliks odgrywa rolę molekularnego sita w procesie utrzymywania ciśnienia onkotycznego krwi, funkcjonuje jako bariera oraz modulator interakcji między komórkami krwi a śródbłonkiem [4,5]. Glikokaliksem pokryte są również mikrokosmki – nieregularnie rozmieszczone wypustki cytoplazmy, formowane przez komórki śródbłonek na powierzchni zwróconej w kierunku światła naczynia.

Specyficznymi strukturami, charakterystycznymi dla komórek śródbłonka tętnic i żył są **ciałka Weibel-Palade'a** (WPBs) – pałeczkowate ziarenka wydzielnicze, które magazynują szereg białek uczestniczących w regulacji procesów krzepnięcia krwi (czynnik von Willebranda, czynnik XIIIa) i fibrynolizy (tkankowy aktywator plazminogenu), białka będące mediatorami zapalenia (selektyna P, interleukina 8, eotaksyna, α 1,3-fukozylotransferaza VI), regulujące napięcie ściany naczyniowej (endotelina 1, enzym konwertujący endotelinę, peptyd związany z genem kalcytoniny C-GRP), czynniki angiogenne (angiopoetyna 2) oraz glikoproteinę CD63 [6,7].

Charakterystycznymi, uformowanymi w kształt litery Ω wgłębieniami szczytowej i podstawnej powierzchni błony komórkowej śródbłonka są **kaweole**, które w procesie transcytozy (np. albumin lub insuliny) odrywają się od plazmolemy w głąb cytoplazmy i w postaci licznych pęcherzyków zmierzają w kierunku przeciwległej błony. Przemieszczające się w ten sposób kaweole, za każdym razem pozostawiają swoją wartość poza cytoplazmą komórki. Związane z błonami kaweol specyficzne receptory, białka i kanały jono-

ture of those layers are dependant on the type and diameter of the vessel [3].

VASCULAR ENDOTHELIUM

Endothelium lines the inner wall of the vessels. In a transverse section of endothelial cells thick cytoplasm with typical organelles (nucleus, mitochondria, endoplasmic reticulum, Golgi apparatus with many vesicles, ribosome, lysosomes, and glycogen grains) is seen [3]. The free surface of the endothelial cells is coated with glycoprotein, glycolipids and proteoglycans forming tree-dimensional glycocalyx attached to sub-endothelial network of fibrous proteins – cell cortex. Endothelial glycocalyx plays a role of molecular sieve in process of oncotic presser regulation, it is also a barrier and modulator of cells interactions [4,5]. Microvilli are also coated by glycocalyx.

The specific for endothelial cells of arteries and veins structures are: Weibel-Palade bodies (WPBs) – rode-shaped excretory grains storing some proteins regulating the process of homeostasis (von Willebrand factor, factor XIIIa) and fibrinolysis (tissue plasminogen activator), inflammatory mediators (selectine P, interleukin 8, etaxine, alpha 1,3- fucosyltransferase VI), substances regulating the muscle coat tone (endothelin 1, endothelin converting enzyme, calcitonine related peptide – C-GRP), angiogenic factors (angiopoetine 2) and CD63 glycoprotein [6,7].

Caveols are the Ω like excavations of basal and top endothelial membrane participating in transcytosis of albumins and insulin. Caveols traveling to the opposite cell membrane leaves its contents outside the cytoplasm. Specific receptors, proteins and ion channels on the surface of caveols control the selective permeability of endothelial cells, vasodilatation and angiogenesis [8,9].

we kontrolują selektywną przepuszczalność śródbłonków, rozszerzalność naczyniową, regulują procesy angiogenezy [8,9].

Wewnętrzną architekturę komórek śródbłonka utrzymują filamenty aktynowe, filamenty pośrednie oraz mikrotubule formujące **układ cytoszkieletu**. Dodatkowo liczne białka o funkcji wiążącej, asocjacyjnej lub towarzyszącej poszczególnym filamentom regulują wzajemną organizację i dynamikę włókien [10-12]. System mikrofilamentów przytwierdzony do obwodowych miejsc błony komórkowej za pomocą błonowych białek zakotwiczących – kadheryn, składników glikokaliksu oraz transbłonowych komponentów połączeń komórkowych, tworzy korę komórki i zapobiega nagłym odkształceniom śródbłonków. Filamenty aktynowe tworzą również liczne kompleksy z miozyna, co nadaje komórkom śródbłonka właściwości kurczliwe, niezbędne w trakcie regulacji przepuszczalności endotelium.

Wimentynowe filamenty pośrednie śródbłonków tworzą układ luźnych, faliście rozciągających się poprzez całą cytoplazmę, bardzo sztywnych i wytrzymałych sieci. Filamenty te gęsto otaczają jądro komórkowe, a następnie sięgają do błony komórkowej zakotwicząc się w połączeniach komórkowych. Filamenty pośrednie integrując z pozostałymi komponentami cytoszkieletu, nadają śródbłonom wytrzymałość mechaniczną, utrzymują ich kształt i odpowiadają za usytuowanie struktur komórkowych w przypisanym miejscu.

Kluczowym elementem cytoszkieletu odpowiedzialnym za migrację, mitozę a także transport białek, pęcherzyków i organelli komórkowych są mikrotubule – rurkowate struktury, które rozchodzą się w sposób ukierunkowany od centrosomu ku obwodowi komórki, ulegając dynamicznym procesom polimeryzacji i depolimeryzacji. Dla prawidłowej funkcji cytoszkieletu komórek śródbłonka istotne są strukturalne i funkcjonalne interakcje pomiędzy poszczególnymi filamentami. Koordynowane przez liczne białka łączące oddziaływanie między mikrotubulami a mikrofilamentami są istotne dla regulacji migracji, cytokinezy i polarność komórek śródbłonka. Filamenty pośrednie oraz filamenty aktynowe stanowią podstawowy wewnątrzkomórkowy ligand, zaangażowany w konstrukcję większości połączeń pomiędzy komórkami oraz między komórkami a macierzą zewnątrzkomórkową. Zapewniona tym sposobem wzajemna integracja komórek, również z ich otoczeniem tkankowym, warunkuje utrzymywanie komórek śródbłonka w układzie monowarstwy, stabilność mechaniczną, pozwala na odbiór pozakomórkowych sygnałów.

Sąsiadujące komórki śródbłonka zachodzą wąskim marginesem cytoplazmy na siebie i mogą łączyć się między sobą za pośrednictwem **obwódki zamykających** (*zonula occludens*) tworzących nieprzepuszczalną barierę, **obwódki zwierających** (*zonula adherentes*) zapewniających mechaniczną odporność tkanki oraz

Actin filaments, intermediate filaments and microtubules are responsible for inner architecture of endothelial cells forming cell cytoskeleton [10-12]. Microfilament system attached to peripheral areas of the cellular membrane by membrane proteins – cadherins – glycocalyx and transmembrane components of intracellular junctions forms cell cortex and protects from sudden deformation of endothelia cells. Actin filaments also build complexes with myosin what enable the cell to contract and are necessary in permeability regulation.

Vimentin intermediate filaments construct a loose system of wavy-spreading through the cytoplasm, extremely inflexible and durable networks. Those filaments densely surround the nucleus and then reach the cellular membrane and anchor into cellular junctions. Intermediate filaments cooperate with other cytoskeleton components in shaping endothelium, ensuring mechanical durability and a proper structure.

Microtubules are the crucial element of cytoskeleton responsible for migration, mitosis and protein vesicles and cellular organelles transport. They are a tubular structures radiate from centrosome to the peripheral parts of the cell and polymerizing and depolymerizing dynamically. Interactions between filaments are necessary for normal function of cytoskeleton. Those interactions between microtubules and microfilaments are essential for migration, cytokinesis and polarity of endothelial cells. Intermediate and actin filaments are the main intracellular ligand engaged in forming most of intracellular junctions and junctions between cells and extracellular matrix. Mutual integration of cells provided by that filaments is needed for keeping the cells in monolayer structure and ensuring stability and enabling for extracellular signal reception.

Adjacent cells overlap with narrow cytoplasmic margins and may be joined together by zonula occludens forming impermeable barrier, zonula adherens enabling the mechanical resistance of the cell and nexus enabling the small particles exchange [13]. Nexus connections ensure also the contact of cytoplasmic endings with myocytes. Hemidesmosomes and focal adhesions connect endothelium with extracellular matrix [14]

połączeń jonowo-metabolicznych (*nexus*) umożliwiającą wymianę małych cząsteczek [13]. Połączenia typu **neksus** umożliwiają ponadto kontakt wnikającym w głąb ściany naczynia wypustkom komórek śródbłonkowych z umiejscowionymi tam komórkami mięśniowymi. Połączenia o znaczeniu adhezyjnym i sygnałowym – **hemidesmosomy** oraz **przyczepy ogniskowe** (*focal adhesions*) łączą endotelium z macierzą pozakomórkową [14].

Szczególną formą macierzy pozaśródbłonkowej, zorganizowaną w trójwymiarową strukturę jest **blona podstawna**, widoczna w mikroskopie elektronowym w układzie blaszki rzadkiej i gęstej [15]. Błona podstawna komórek śródbłonka zawiera w swej strukturze głównie sieć kolagenu typu IV, kolagen typu VIII i XV, glikoproteiny (lamininę, fibronektynę, kompleks nido-gen/entaktyne) i proteoglikan haparanosiarczanowy – perlekan [16,17].

Wzajemne proporcje, grubość oraz odmienne warianty składników białkowych i węglowodanowych błon podstawnych są tkankowo specyficzne, a potencjalne zmiany w ich strukturze mają wpływ na procesy adhezji, wzrostu, migracji, proliferacji, różnicowania i apoptozy śródbłonek [18,19]. Błona podstawna przytwierdzając mechanicznie komórki śródbłonka do otoczenia tkankowego wyznacza biegunową polaryzację komórek endotelium, warunkuje prawidłowy przebieg filtracji i dyfuzji przez naczynie, moduluje przechodzenie makrocząsteczek obdarzonych ładunkiem elektrycznym, stanowi barierę dla migracji komórek, bierze ponadto udział w aktywacji krzepnięcia krwi.

Śródbłonek naczyniowy tworzy aktywną barierę pomiędzy otaczającymi go tkankami a strumieniem krwi: reguluje i utrzymuje prawidłowy przepływ krwi (uwalnianie związków wazoaktywnych), odpowiada za procesy hemostazy (koagulacja, antykoagulacja i fibrynoliza), przeprowadza procesy transportu przez ścianę naczynia (dyfuzja, transcytoza), specyficznie oddziałuje z komórkami krwi (adhezja, aktywacja, diapedeza), utrzymuje obukierunkową komunikację sygnałową z otaczającymi tkankami i jest zaangażowany w neowaskularyzację [20].

W przypadku łożysk z ciąży powikłanych, często stwierdza się występowanie w strukturze subkomórkowej śródbłonek oraz w obrębie błony podstawnej zmian, które korelują z zaburzeniami funkcji endotelium [21].

MARKERY ANTYGENOWE ŚRÓDBŁONKA NACZYNIOWEGO

Wykrycie w strukturach komórkowych śródbłonka specyficznych determinant antygenowych daje podstawę fenotypowej oceny endotelium [22]. Komórki śródbłonka naczyń łożyska charakteryzują się obecnością typowych endotelialnych markerów antygenowych: cząsteczki adhezji płytkowo-śródbłonkowej 1 (PECAM-1), vWF, CD34, caveoliny-1, co wykorzystywa-

Basement membrane is a specific form of tree-dimensional structured extraendothelial matrix seen under electronic microscope as lamina densa [115]. The basement membrane is composed mainly by collagen type IV, VIII and XV, glycoproteins (laminine, fibronectine, nidogen/enactine complex) and perlecan [16,17].

The proportions, thickness and variations of protein and carbohydrate contents seen in basement membrane are tissue-specific. All potential changes in that structures might lead to disturbances in adhesion, growth, migration, proliferation, differentiation and apoptosis of endothelial cells [18,19]. Polarization of endothelial cells, physiological course of filtration and diffusion is conditioned by basement membrane attaching mechanically endothelial cells to surrounding tissues. It also modulates polarized macroparticles permeability, forms a barrier for cells migration and takes part in regulation of haemostatic.

Vascular endothelium builds an active barrier between surrounding tissues and blood: regulates the blood flow (releasing vasoactive agents), homeostasis (coagulation, anticoagulation and fibrinolysis), transport (transcytosis, diffusion), specific inter-cellular interactions (adhesion, activation, diapedesis), mutual communication with surrounding tissues and neovascularization [20].

In case of placenta from pathological pregnancies specific changes in sub-cellular structure of endothelial cells and in basement membrane are seen. Those changes correlate with endothelial dysfunctions.

ANTIGENIC MARKERS OF VASCULAR ENDOTHELIUM

Identification of specific clusters of differentiation on endothelial cells constitutes the basis for phenotyping [22]. Vascular endothelial cells of human placenta are characterized by presence of typical endothelial markers: Platelet/endothelial cell adhesion molecule 1 (PECAM-1), vWF, CD34, caveolin-1) what was used for definite identification of endotheliocytes in in situ tissues and in vitro cultures [8,23-25].

ne jest do jednoznacznej identyfikacji endotelioocytów w tkankach *in situ* oraz w hodowlach *in vitro* [8,23-25].

PECAM-1 (cząsteczka adhezji płytkowo-śródbłonkowej 1, CD31) jest cząsteczką występującą na powierzchni m.in. endotelioocytów, płytek krwi, limfocytów. PECAM-1 odgrywa kluczową rolę w kaskadzie oddziaływań adhezyjnych między śródbłonkiem a komórkami zapalnymi, ułatwiając leukocytom migrację, oraz w oddziaływaniach między sąsiednimi endotelioocytami podczas angiogenezy [26]. CD31 jest kluczową cząsteczką lokalizującą w przekrojach tkankowych łożyska śródbłonek naczyń kosmków [27]. Cząsteczka ta licznie występuje na błonie komórkowej śródbłonka od strony światła naczynia, a nadekspresja mRNA PECAM-1 może być wskaźnikiem uszkodzeń naczyniowych w łożyskach ciąży patologicznych [28,29].

Komórki śródbłonka syntezują i magazynują w ziarnistościach Weibel-Palade'a **czynnik von Willebrada** (vWF, czynnik VIII krzepnięcia krwi). Jego ekspresja, poza megakariocytami i płytkami krwi, ograniczona prawie wyłącznie do endotelioocytów, pozwala na wizualizację sieci naczyniowych w przekrojach tkankowych różnych narządów [26]. Endotelioocyty naczyń łożysk terminowych wykazują ekspresję czynnika von Willebrada, stąd vWF wykorzystywany jest również do opisu unaczynienia łożyska [30].

Antygen powierzchni komórkowej **CD34**, znany jako marker komórek macierzystych, wykazuje ekspresję nie tylko na ludzkich komórkach progenitorowych hematopoezy, ale również komórkach niehematopetycznych [31]. Śródbłonek dużych naczyń pępowinowych, endotelium mikronaczyń łożyska, a także komórki macierzyste hematopoezy wykrywane w krążeniu płodowym i pozakosmkowo są CD34-dodatnie [32,33]. Stopień unaczynienia kosmków łożyskowych można zatem określić na podstawie wyznakowania śródbłonkowych epitopów CD34. W porównaniu z preparatami barwionymi rutynowo hematoksyliną i eozyną identyfikacja naczyń krwionośnych CD34-pozytywnych w kosmkach łożyskowych jest wówczas wizualnie łatwiejsza i bardziej precyzyjna.

WASKULO- I ANGIOGENEZA

Kluczową rolę podczas placentacji i rozwoju łożyska odgrywa proces neowaskularyzacji. W celu zapewnienia wzrastających potrzeb rozwijającego się płodu formowanie maczyno-płodowego systemu krążenia krwi dokonuje się poprzez procesy waskulo- i angiogenezy [34].

Podczas **waskulogenezy** (między 21 a 32 dniem rozwoju embrionalnego) prymitywne kapilary naczyń krwionośnych powstają poprzez proliferację i różnicowanie *in situ* angioblastów wywodzących się z pluripotencjalnych mezenchymalnych komórek zarodkowych. Od 32 dnia rozwoju zarodkowego rozpoczyna się **angiogeneza** – migrowanie, proliferacja i różnicowanie usytuowanych w już istniejącym naczyniu komórek progenitorowych śródbłonek do postaci nowych

PECAM – 1 (CD 31) is expressed on the surface of selected cells: endotheliocytes, platelets, lymphocytes. PECAM -1 places a major role in cascade of adhesive interactions between endothelium and inflammatory cells, facilitating the leukocyte migrations as well as between adjunct endotheliocytes during angiogenesis [26]. CD 31 is a key participle used for localization of villi endotheliocytes in cross-sections of the placenta [27]. Those molecules are highly expressed on the luminal wall of the vessels. Overexpression of mRNA for CD31 might be a marker of vascular lesions in placentas from pathological pregnancies.

von Willebrand factor (vWF) is synthesized by and store in Weibel-Palade Bodies of endothelial cells. Its expression, except in macrocytes and platelets, is limited only to endotheliocytes and allows for vascular bed visualization in cross-sections of different organs [26]. Endotheliocytes from terminated placentas show an expression of vWF, what is used in placental vasculature description.

Antigenic marker CD 34, known as a stem cells marker, is expressed not only on human progenitor cells of the hematopoietic line, but on non- hematopoietic cells [31]. Endothelium of large umbilical vessels, placental microvessels as well as hematopoietic stem cells detected in fetal circulation and outside the villi, are CD34 positive [32,33]. The grade of placental villi vascularization might be evaluated by endothelial CD34 epitopes assay. The identification of CD34-positive blood vessels in placental villi is much easier by that assay compared to standard hematoxylin-eosin staining.

VASCULO AND ANGIOGENESIS

Neovascularization plays a key role placentation and placental development. Due to increasing fetal requirements uteroplacental circulatory system has to be formed by vasculo and angiogenesis [34].

During vasculogenesis (between 21 and 32 days' embryonal development) primitive capillaries are formed by *in situ* proliferation and differentiation of angioblasts derived from pluripotent mesenchymal embryonic cells. From the 32nd day of embryonal development angiogenesis starts – migration, proliferation and differentiation of progenitor endothelial cells localized in already existing vessels into new forms of microvessels occurs. The researches confirmed existence of postnatal vasculogenesis when, in adult organism, endothelial progenitor cells (EPCs) and multipotent mesangioblasts derived from bone marrow are incorporated into *de novo* forming vessels [35].

mikronaczyń. Badania potwierdzają istnienie **waskulogenezy postnatalnej**, kiedy w organizmie dorosłym w nowo formowane naczynia włączają się komórki progenitorowe śródbłonek (EPCs), multipotentne mezoangioblasty, pochodzące ze szpiku kostnego [35].

Brak doniesień o istnieniu podobnej neowaskulogenezy w łożysku, jednak biorąc pod uwagę obecność komórek macierzystych krążących we krwi płodowej nie sposób wykluczyć zachodzenia podobnych procesów wzrostu, czy remodelingu naczyń łożyskowych. Sugeruje się zatem, że waskulogeneza i angiogeneza mogą stanowić wzajemnie uzupełniające się mechanizmy zaangażowane w procesy powstawania nowych naczyń krwionośnych w łożysku.

REGULATORY PROCESÓW ANGIOGENNYCH

Formowanie nowych naczyń wymaga szeregu przekształceń substancji międzykomórkowej, migracji i proliferacji komórek śródbłonna, uformowania światła kapilary i uzyskania dojrzałości funkcjonalnej naczynia w celu podjęcia właściwej funkcji [36]. W tworzenie nowych naczyń zaangażowane są cytokiny, chemokiny, czynniki wzrostowe i ich receptory oraz cząsteczki adhezji komórkowej.

Niezbędnym do proliferacji komórek śródbłonkowych i ich progenitorów jest naczyniowo-śródbłonkowy czynnik wzrostu **VEGF** (lub VEGF-A) – stymulator migracji i wzrostu endoteliocytów, wazodylator, czynnik integrujący nowoformowane kapilary i cytoprotektor [37,38]. Rodzina VEGF obok VEGF-A, zawiera VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E, łożyskowy czynnik wzrostu (PIGF) i VEGF-F [39]. W ludzkich tkankach zidentyfikowano sześć izoform VEGF-A: 121, 145, 165, 183, 189, 206 aminokwasów, różniące się między sobą biodostępnością i aktywnością, z czego izoformy 121, 165 i 189 obecne są w strukturach łożyska (trofoblast, mięśnie gładkie naczyń, śródbłonek naczyniowy, komórki Hofbauera) [40]. Śródbłonek naczyniowy kosmków łożyskowych wspólnie z trofoblastem wyróżniają się ekspresją VEGF-C i VEGF-D, sam z kolei trofoblast jest dodatkowo PIGF-pozytywny [41].

Rodzina białek VEGF rozpoznawana jest przez rozmieszczone na różnego typu komórkach śródbłonna receptory: **VEGFR-1** (Flt-1), **VEGFR-2** (Flk-1/KDR) i **VEGFR-3** (Flt-4) o aktywności kinazy tyrozynowej oraz przez neuropiliny (**NRP-1** i **NRP-2**) – receptory dla semaforin [39,42]. Stwierdzono także występowanie rozpuszczalnej formy **sVEGFR-1** (sFlt-1), która hamuje wywołaną przez VEGF mitogenezę i może być negatywnym regulatorem działania naczyniowo-śródbłonkowego czynnika wzrostu. Ekspresja VEGFR-1 i VEGFR-2 dotyczy głównie komórek śródbłonna naczyń krwionośnych a ich nadekspresję stwierdza się w chorobach nowotworowych oraz patologicznych procesach zachodzących w warunkach niedotlenienia tkanek [43].

The similar processes of neovascularization have not been proved in placenta. However, considering the presence of stem cells in fetal circulation, similar growth processes and vascular remodeling of placental vessels can not be excluded. It is thus suggested that vasculogenesis and angiogenesis might be complementary mechanisms engaged in the process of neovascularization in placenta.

ANGIOGENESIS REGULATION

A new vessels forming requires certain processes: matrix remodeling, migration and transformation of endothelial cells, vascular lumen formation and, finally, creating a functional vessels [36]. Cytokines, chemokines, growth factors and their receptors as well as adhesive molecules are engaged in the process of vessels formation.

Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF or VEGF-A) are inevitable in endothelial cells and their progenitors proliferation. VEGF stimulates endothelium migration and growth, integrates new-formed capillaries, has a vasodilatory potential as well as cytoprotective function [37,38]. VEGF family contains, except VEGF-A: VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E, placental growth factor (PIGF) and VEGF-F [39]. 6 isoforms of VEGF-A were identified in human tissues: 121, 145, 165, 183, 189, 206 amino acids, different in bioavailability and activity. Isoforms 121, 165 and 189 were shown in placental structures (trophoblast, vessels myocytes, vascular endothelium, Hofbauer cells) [40]. Endothelial cells of placental villi and the trophoblast are characterized by expression of VEGF-C and VEGF-D; additionally, trophoblast itself in PIGF-positive [41].

VEGF proteins family is recognized by receptors placed on the surface of different cells. Those are: VEGFR-1 (Flt-1), VEGFR-2 (Flk-1/KDR) and VEGFR-3 (Flt-4) with the tyrosine kinase activity as well as neuropilins (NRP-1 i NRP-2) – receptors for semaforins [39,42]. The presence of the soluble form of the receptor - sVEGFR-1 (sFlt-1) was confirmed; it inhibits the mitogenesis mediated by VEGF and might be a negative regulator of VEGF activity. VEGFR-1 and VEGFR-2 are mainly expressed on vessels endothelial cells; overexpression is detected in neoplastic diseases and in case of pathological processes taking place during tissue hypoxia [43].

Głównym regulatorem waskulogenezy i angiogenezy w stanach patofizjologicznych organizmu dojrzałego jest VEGFR-2. Receptor ten obecny jest w komórkach endotelialnych we wszystkich etapach embriologii i organogenezy, podczas proliferacji śródbłonka oraz na etapie formowania naczyń [44]. W łożysku ekspresja VEGFR-2 jest zastrzeżona wyłącznie dla endotelioцитов [45].

Substancje angiogenne odgrywają w łożysku istotną rolę w regulacji powstawania naczyń. Demonstrowane w wielu powikłaniach ciąży (hypotrofii, cukrzyca, preeklampsja) zaburzenia w rozwoju naczyń łożyskowych korelują z dysregulacją ekspresji czynników angiogennych [46,47]. Badania naukowe potwierdzają występowanie oraz zmiany poziomu ekspresji VEGF i jego receptorów w tkankach łożysk z różnych patologii, jednak w przypadku łożysk z patologii hypotrofii płodu uzyskiwane wyniki nie są spójne [48-51].

Obok najważniejszego czynnika proangiogenego, jakim jest VEGF, w procesach angiogenezy oraz w migracji komórek śródbłonka i gojenia ran ma swój niezbędny udział **tlenek azotu** [52]. Tlenek azotu jest jednym z produktów dwuetapowej reakcji utlenienia L-argininy, katalizowanej przez – zidentyfikowane do chwili obecnej – trzy izoformy syntazy tlenu azotu (NOS): NOSI (nNOS/ncNOS, neuronalna konstytutywna syntaza tlenu azotu), NOSII (iNOS, indukowana syntaza tlenu azotu) i NOSIII (eNOS/ecNOS, endotelialna konstytutywna syntaza tlenu azotu) [53]. eNOS jest podstawowym źródłem tlenu azotu w naczyniach krwionośnych, a jego aktywacja (indukowana przez VEGF) prowadzi do zmniejszenia oddziaływań adhezyjnych pomiędzy endotelioцитami, co umożliwia tym komórkom nabycie fenotypu zdolnego do migracji w kierunku czynników proangiogenych. Tlenek azotu oprócz zaangażowania w regulację integralności komórek śródbłonka, reguluje rozszerzalność naczyniową, zapewnia śródbłonkom aktywność przeciwwązkową i przeciwzapalną oraz działa jako inhibitor apoptozy komórek [54]. Występowanie endotelialnej syntazy tlenu azotu (eNOS) w tkankach zdrowych łożysk dotyczy trofoblastu oraz śródbłonek naczyńwycych począwszy od sznura pępowinowego aż do naczyń kosmkowych [55]. Istnieją jednak sprzeczne doniesienia zarówno, co do występowania, jak i poziomu ekspresji eNOS w łożyskach normalnych i patologicznych [56,57].

Z powyższych faktów i istniejących wątpliwości wyniknęła konieczność przeprowadzenia analiz struktury i funkcji śródbłonek naczyń krwionośnych w łożyskach z cięż powikłanych.

VEGFR-2 is a main regulator of vasculogenesis and angiogenesis occurring in adults in pathophysiological conditions. It is detected on endothelial cells on every stage of embryo- and organogenesis, during endothelium proliferation and on vessels formation stage [44]. Endotheliocytes are the only cells in placenta with VEGFR-2 expression [45].

Angiogenic substances in placenta play an important role in regulation of vessels formation. The abnormalities in placental vessels development observed in case of complicated pregnancies (hypotrophy, diabetes, preeclampsia) correlate with angiogenic factors expression dysregulation [46,47]. The results of performed studies confirmed the presence of changes in VEGF and its receptor expression in placental tissues in different pathologies; the results, however, are not equivocal in case of placentas from pregnancies complicated by hypotrophy [48-51].

Nitric oxide (NO), besides VEGF – the most important proangiogenic factors, has also a certain role in angiogenesis and endothelial cells migration as well as wound healing process [52]. NO is a product of two stage L-arginine oxygenation process catalyzed by 3 isoforms of nitric oxide synthase (NOS): nNOS/ncNOS – neuronal constitutive synthase), NOSII (iNOS – inducible synthase) and NOSIII (eNOS/ecNOS – endothelial constitutive synthase) [55]. eNOS is a main source of NO in blood vessels and its activation (mediated by VEGF) leads to reduction of adhesive reactions between endotheliocytes. It enables the transformation to a phenotype capable of migration to proangiogenic factors. NO, besides its role in endothelial cells integrity regulation, controls vasodilatation, mediates anti-coagulatory and anti-inflammatory activity of endothelial cells and works as cell apoptosis inhibitor [54]. The expression of eNOS in healthy placental tissues was observed on trophoblast and vascular endothelium in broad range of vessels from umbilical cord up till vessels in villi [55]. However, inconsistent data on the presence of eNOS as well as level of its expression in normal and pathological placentas [56,57].

Due to a serious inconsistency of the data on the structure and function of vascular endothelium in placentas form complicated pregnancies.

Piśmiennictwo / References:

1. **Haram K, Svendsen E, Myking O.** Growth restriction: etiology, maternal and neonatal outcome. A review. *Current Women's Health Reviews* 2007;3:145-160.
2. **Murthi P, Kee MW, Gude NM et al.** Fetal growth restriction is associated with increased apoptosis in the chorionic trophoblast cells of human fetal membranes. *Placenta* 2005;26:329-338.
3. **Sweeney M, Jones CJ, Greenwood SL et al.** Ultrastructural features of smooth muscle and endothelial cells of isolated isobaric human placental and maternal arteries. *Placenta* 2006;27:635-647.
4. **Chen XY, Liu Y, So RM et al.** Molecular dynamics simulation of a microvillus in a cross flow. *MPLB* 2005;19:1643-1646.
5. **Thi MM, Tarbell JM, Weinbaum S et al.** The role of glycocalyx in reorganization of the actin cytoskeleton under fluid shear stress: a "bumper-car" model. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101:16483-16488.
6. **Harrison-Lavoie KJ, Michaux G, Hewlett L et al.** P-selectin and CD63 use different mechanisms for delivery to Weibel-Palade bodies. *Traffic* 2006;7:647-662.
7. **Lowenstein CJ, Morrell CN, Yamakuchi M.** Regulation of Weibel-Palade body exocytosis. *Trends Cardiovasc Med* 2005;15:302-308.
8. **Byrne S, Ahenkorah J, Hottor B et al.** Immunoelectron microscopic localisation of caveolin 1 in human placenta. *Immunobiology* 2007;212:39-46.
9. **Mehta D, Malik AB.** Signaling mechanisms regulating endothelial permeability. *Physiol Rev* 2006;86:279-367.
10. **Gorovoy M, Niu J, Bernard O et al.** LIM kinase 1 coordinates microtubule stability and actin polymerization in human endothelial cells. *J Biol Chem* 2005;280:26533-26542.
11. **Mirzapioazova T, Kolosova IA, Romer L et al.** The role of caldesmon in the regulation of endothelial cytoskeleton and migration. *J Cell Physiol* 2005;203:520-528.
12. **Lee JSY, Dickson B, Gotlieb AI.** Possible molecular mechanism regulating endothelial repair in unstable fibroinflammatory atheroma. *Int Congr Ser* 2004;1262:597-602.
13. **Harhay NS, Antonetti DA.** Regulation of tight junctions and loss of barrier function in pathophysiology. *Int J Biochem Cell Biol* 2004;36:1206-1237.
14. **Tsuruta D, Jones JCR.** The vimentin cytoskeleton regulates focal contact size and adhesion of endothelial cells subjected to shear stress. *J Cell Sci* 2003;116:4977-4984.
15. **Baluk P, Morokawa S, Haskell A et al.** Abnormalities of basement membrane on blood vessels and endothelial sprouts in tumors. *Am J Pathol* 2003;163:1801-1815.
16. **Korzhevskii DE, Otellin VA, Neokesariiskii AA et al.** Organization and cytochemical features of barrier structures in human placenta. *Morfologija* 2006;129:63-64.
17. **Sund M, Xie L, Kalluri R.** The contribution of vascular basement membranes and extracellular matrix to the mechanics of tumor angiogenesis. *APMIS* 2004;112:450-62.
18. **Monaco S, Sparano V, Gioia M et al.** Enzymatic processing of collagen IV by MMP-2 (gelatinase A) affects neutrophil migration and it is modulated by extracellular domains. *Protein Sci* 2006;15:2805-2815.
19. **Ingber DE.** Mechanical signaling and the cellular response to extracellular matrix in angiogenesis and cardiovascular physiology. *Circ Res* 2002;91:877-887.
20. **Cleaver O, Melton DA.** Endothelial signaling during development. *Nat Med* 2003;9:661-668.
21. **Benirschke K, Kaufmann P, Baergen R.** Pathology of the human placenta. Wyd. 5, New York: Springer-Verlag; 2006.
22. **Dye JF, Jablenska R, Donnelly JL et al.** Phenotype of the endothelium in the human term placenta. *Placenta* 2001;22:32-43.
23. **Herr F, Baal N, Reisinger K et al.** HCG in the regulation of placental angiogenesis. Result of an in vitro study. *Placenta* 2007;28 Suppl A:S85-S93.
24. **Fuchs S, Motta A, Migliaresi C et al.** Outgrowth endothelial cells isolated and expanded from human peripheral blood progenitor cells as a potential source of autologous cells for endothelialization of silk fibroin biomaterials. *Biomaterials* 2006;27:5399-5408.
25. **Zhang ZG, Zhang L, Jiang Q et al.** Bone marrow-derived endothelial progenitor cells participate in cerebral neovascularization after focal cerebral ischemia in the adult mouse. *Circ Res* 2002;90:284-288.
26. **Pusztaszeri MP, Seelentag W, Bosman FT.** Immunohistochemical expression of endothelial markers CD31, CD34, von Willebrand factor, and Flt-1 in normal human tissues. *J Histochem Cytochem* 2006;54:385-395.
27. **Richani K, Romero R, Soto E et al.** Genetic origin and proportion of basal plate surface-lining cells in normal and abnormal pregnancies. *Hum Pathol* 2007;38:269-275.
28. **Mori M.** Ultrahigh-resolution immunofluorescence microscopy using ultrathin cryosections: subcellular distribution of caveolin-1 α and CD31 in human placental endothelial cells. *J Electron Microsc* 2006;55:107-112.
29. **Wang X, Athayde N, Trudinger B.** Microvascular endothelial cell activation is present in the umbilical placental microcirculation in fetal placental vascular disease. *Am J Obstet Gynecol* 2004;190:596-601.
30. **Zhang EG, Burton GJ, Smith SK et al.** Placental vessel adaptation during gestation and to high altitude: changes in diameter and perivascular cell coverage. *Placenta* 2002;23:751-762.
31. **Copland I, Sharma K, Lejeune L et al.** CD34 expression on murine marrow-derived mesenchymal stromal cells: impact on neovascularization. *Exp Hematol* 2008;36:93-103.
32. **Challier JC, Galtier M, Cortez A et al.** Immunocytological evidence for hematopoiesis in the early human placenta. *Placenta* 2005;26:282-288.
33. **Mackiewicz Z, Dudek E, Głab G et al.** CD34⁺ stem cells in normal placenta tissues and in placenta with intrauterine growth retardation. *Acta Medica Lituanica* 2004;11:34-38.
34. **Demir R, Kayisli UA, Cayli S et al.** Sequential steps during vasculogenesis and angiogenesis in the very early human placenta. *Placenta* 2006;27:535-539.
35. **Cleaver O, Melton DA.** Endothelial signaling during development. *Nat Med* 2003;9:661-668.
36. **Li S.** Analysis of endothelial cell migration under flow. *Methods Mol Biol* 2005;294:107-21.
37. **Asahara T, Kawamoto A.** Endothelial progenitor cells for postnatal vasculogenesis. *Am J Physiol Cell Physiol* 2004;287:C572-C579.
38. **Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J.** The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med* 2003;9:669-676.

39. **Zaher K, Makarem JA, Shamseddine AI.** Vascular endothelial growth factor family of ligands and receptors: Review. *Blood Cells Mol Dis* 2007;38:258-268.
40. **Chung JY, Song Y, Wang Y et al.** Differential Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF), endocrine gland derived-VEGF, and VEGF receptors in human placentas from normal and preeclamptic pregnancies. *J Clin Endocrinol Metab* 2004;89:2484-2490.
41. **Gu B, Alexander JS, Gu Y et al.** Expression of lymphatic vascular endothelial hyaluronan receptor-1 (LYVE-1) in the human placenta. *Lymphat Res Biol* 2006;4:11-17.
42. **Witmer AN.** Expression of vascular endothelial growth factor receptors 1, 2, and 3 in quiescent endothelia. *J Histochem Cytochem* 2002;50:767-777.
43. **Michalski B, Zieliński T, Mazurek U i wsp.** Aktywność transkrypcyjna i formy alternatywnego składowania mRNA genów receptorów Flt-1, Flk-1 w ocenie ryzyka progresji zmian śródnowonabłonkowych i raka szyjki macicy. *Współczesna Onkologia* 2003;7:80-88.
44. **Elvert G, Kappel A, Heidenreich R et al.** Cooperative interaction of hypoxia-inducible factor-2 α (HIF-2 α) and Ets-1 in the transcriptional activation of Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-2 (Flk-1). *J Biol Chem* 2003;279:7520-7530.
45. **De Falco M, Cobellis L, Giraldi D et al.** Expression and distribution of notch protein members in human placenta throughout pregnancy. *Placenta* 2007;28:118-126.
46. **Mutter WP, Karumanchi SA.** Molecular mechanisms of preeclampsia. *Microvasc Res* 2008;75:1-8.
47. **Reynolds LP, Borowicz PP, Vonnahme KA et al.** Animal models of placental angiogenesis. *Placenta* 2005;26:689-708.
48. **Wyatt SM, Kraus FT, Roh CR et al.** The correlation between sampling site and gene expression in the term human placenta. *Placenta* 2005;26:372-379.
49. **Tsatsaris V, Goffin F, Munaut C et al.** Overexpression of the soluble vascular endothelial growth factor receptor in preeclamptic patients: pathophysiological consequences. *J Clin Endocrinol Metab* 2003;88:5555-5563.
50. **Helske S, Vuorela P, Carpén O et al.** Expression of vascular endothelial growth factor receptors 1, 2, and 3 in placentas from normal and complicated pregnancies. *Mol Hum Reprod* 2001;7:205-210.
51. **Mai X, Zhuang Y, Lu H.** Vascular endothelial growth factor expression in placenta from intrauterine growth retardation fetus with abnormal umbilical artery flow velocity waveforms. *Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi* 2000;35:606-609.
52. **Scalera F, Martens-Lobenhoffer J, Tager M et al.** Effect of l-arginine on asymmetric dimethylarginine (ADMA) or homocysteine-accelerated endothelial cell aging. *Biochem Biophys Res Commun* 2006;345:1075-1082.
53. **Seidel M, Fiszer D, Kurpisz M.** Endotelialna syntaza tlenku azotu. Cz. I. Struktura genu i produktu białkowego. *Post Biol Kom* 2004;31:465-476.
54. **Haendeler J.** Nitric oxide and endothelial cell aging. *Eur J Clin Pharmacol* 2006;62:137-140.
55. **Clausen HV, Larsen LG, Jørgensen A et al.** The human placenta from heavy smokers: evaluation of vasoactive peptides by immunohistochemistry. *APMIS* 2007;115:22-29.
56. **Corthorn J, Germain AA, Chacün C et al.** Expression of kallikrein, bradykinin b2 receptor, and endothelial nitric oxide synthase in placenta in normal gestation, preeclampsia, and placenta accreta. *Endocrine* 2006;29:491-499.
57. **Kim YJ, Park HS, Lee HY et al.** Reduced L-arginine level and decreased placental eNOS activity in preeclampsia. *Placenta* 2006;27:438-444.