

Ultrastruktura i immunohistochemiczne wyznaczniki aktywności śródbłonna naczyń krwionośnych w łożysku z ciąży powikłanej hypotrofią płodu

Ultrastructural and immunohistochemical analysis of human placental endothelium from fetus hypotrophy cases

© GinPolMedProject 2 (12) 2009

Artykuł oryginalny/Original article

ELŻBIETA DUDEK¹, ZYGMUNT MACKIEWICZ², JANUSZ KUBICKI^{3,4},
WOJCIECH GUZIKOWSKI⁵, ZBIGNIEW ZIEMBIK¹

¹ 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. PO

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

Dyrektor: dr hab. n. med. Jan Szczegielniak, prof. PO

⁵ Szpital Ginekologiczno-Położniczy i Noworodków w Opolu
Dyrektor: dr n. med. Wojciech Guzikowski

Adres do korespondencji/Address for correspondence
Elżbieta Dudek

Katedra Biotechnologii i Biologii Molekularnej, Uniwersytet Opolski
ul. Kard. B. Kominka 4, 45-035 Opole, Poland
tel. (77) 401 60 50, fax: (77) 401 60 51; e-mail: edudek@op.pl

Statystyka/Statistic

Liczba słów/Word count	1885/2170
Tabele/Tables	3
Ryciny/Figures	4
Piśmiennictwo/References	24

Received: 02.02.2009
Accepted: 10.03.2009
Published: 01.06.2009

Streszczenie

Wstęp. Zmiany naczyniowe w łożysku charakteryzują hypotrofię płodową. Komórki śródbłonna stanowią nieodłączny element strukturalny wszystkich systemów naczyniowych, zatem ich prawidłowa budowa i aktywność wyznacza funkcjonalność naczyń.

Celem pracy była analiza ultrastruktury śródbłonna oraz charakterystyka wyznaczników aktywności śródbłonna w łożyskach prawidłowych oraz z ciąży powikłanych hypotrofią płodu. *Material i metody.* Badaniami objęto 25 łożysk pochodzących z ciąży o przebiegu prawidłowym (n=14), oraz z patologii hypotrofii płodu (n=11). Analizę przeprowadzono metodami elektromikroskopowymi i immunohistochemicznymi.

Wyniki. W łożyskach z hypotrofią płodową obserwowano istotne zmiany w obrazie śródbłonna naczyń kosmków. Stwierdzono znamienne poszerzenie światła siateczki śródplazmatycznej szorstkiej i średnicy mitochondrium, natomiast w błonie podstawnej wykryto zanik blaszki jasnej i wielowarstwową blaszkę ciemną. W łożyskach patologicznych występowanie zakrzepów i wynaczynień było istotnie większe niż w łożyskach prawidłowych. Ponadto w śródbłonnku naczyń kosmków łożyska z hypotrofią płodową wykryto istotnie zmniejszoną ekspresję antygenu CD34.

Słowa kluczowe: ultrastruktura, PECAM-1 - cząsteczka adhezji płytkowo-śródbłonkowej 1, CD34, vWF- czynnik von Willebranda, hypotrofia płodowa

Summary

Introduction. Vascular changes in the placenta are characteristic for fetal hypotrophy. Endothelial cells are an inherent structural element of all vascular systems. Hence, proper structure and activity of endothelium is responsible for blood vessel functionality.

Aim of the study. The aim of the study was to analyze endothelium ultrastructure as well as to describe determinants of endothelium activity in placentas from both normal and complicated with hypotrophy pregnancies.

Materials and methods. The study involved 25 placentas coming from normal (n=14) and hypotrophic (n=11) pregnancies. The analysis was performed using electron microscopy and immunohistochemistry methods.

Results. In placentas obtained from pregnancies complicated with fetal hypotrophy significant changes of villi endothelium were found. The changes involved significant dilation of rough endoplasmic reticulum and increased mitochondrial diameter, while in basement membrane degeneration of lamina lucida and multilayered lamina densa were found. In pathologic placentas blood clots and blood extravasations were significantly more frequent in comparison to normal placentas. Moreover, in placental vessels endothelium from fetal hypotrophy significantly increased expression of CD34 antigen was detected.

Key words: ultrastructure, PECAM-1 - platelet endothelial cell adhesion molecule-1, CD34, vWF- von Willebrand factor, fetal hypotrophy.

WSTĘP

Zmniejszona masa łożyska, nieprawidłowe unaczynienie kosmków końcowych czy zredukowana proliferacja cytotrofoblastu to charakterystyczne cechy łożyska z ciąży powikłanej hypotrofią płodu, określaną również jako wewnątrzmaciczne ograniczenie wzrastania płodu (IUGR - Intrauterine Growth Retardation). Wystąpienie tej patologii w trakcie ciąży niesie ryzyko zaistnienia nie tylko okołoporodowych komplikacji (asfiksja, hypotermia płodu) ale również ma swoje następstwa w życiu dorosłym (nadciśnienie, choroby serca) [1].

Wewnątrzmaciczny wzrost płodu regulowany przez czynniki genetyczne jest jednocześnie uzależniony od prawidłowo przebiegającej wymiany metabolitów pomiędzy krążeniem matki a płodu. W ludzkim łożysku wymiana taka dokonuje się poprzez błonkę naczyniowo-nabłonkową, uformowaną przez trofoblast kosmków oraz śródbłonek płodowych naczyń krwionośnych [2]. Strukturalne modyfikacje w obrębie tych tkanek są obserwowane w łożyskach z ciąż patologicznych [3-6]. Mimo licznych badań nad strukturą śródbłonna naczyń łożyskowych, zmiany w jego morfologii, prowadzące do zaburzeń funkcji naczyń, a w konsekwencji do hypotrofii płodowej są słabo w literaturze opisane.

DETERMINANTY ANTYGENOWE ŚRÓDBŁONKA NACZYNIOWEGO

Determinanty antygenowe umożliwiają fenotypową ocenę komórek. Charakterystycznymi dla śródbłonna naczyniowego determinantami antygenowymi są: PECAM-1 (cząsteczka adhezji płytkowo-śródbłonkowej 1; CD31), vWF (czynnik von Willebranda) i CD34, które wykorzystuje się w rozpoznawaniu komórek śródbłonna *in situ* w tkankach oraz w kulturach komórkowych *in vitro* [7,8].

PECAM-1 występuje głównie na bocznych powierzchniach komórek śródbłonna naczyń krwionośnych.

INTRODUCTION

Reduced placental weight, abnormal vasculature of terminal villi or reduced cytotrophoblast proliferation are characteristic features of placentas from pregnancies complicated by fetal hypotrophy, also called intrauterine growth retardation (IUGR). IUGR is associated with significantly increased perinatal complications (asphyxiation, fetus hypothermia) as well as results in adult life (hypertension, cardiovascular diseases) [1]. Intrauterine growth is regulated by genetic factors, however, simultaneously it depends on normal metabolite exchange between maternal blood and fetus. In human placenta such exchange takes place through vasculo-epithelial membrane, which is formed by villi trophoblast and fetal blood vessels endothelium [2]. Structural modifications within the tissues are observed in placentas from pathologic pregnancies [3-6]. Despite multiple studies concerning placental endothelium structure, the changes in its morphology leading to function disorder and in consequence to fetal hypotrophy are barely described in the literature.

ANTIGEN DETERMINANTS OF ENDOTHELIUM

Antigen determinants of endothelium allow to perform phenotype assessment of the cells. Antigen determinants characteristic for vascular endothelium are the following: PECAM-1 (platelet endothelial cell adhesion molecule-1, CD31), vWF (von Willebrand factor) and CD34. These factors are used to recognize endothelial cells *in situ* in tissues and cell cultures *in vitro* [7,8].

PECAM-1 is located mainly on lateral surfaces of blood vessels endothelial cells. This molecule plays significant role in intercellular interactions and in neutrophil diapedesis through the endothelium during inflammatory response. PECAM-1 is used to identify blood vessels in various organs including human placenta [9].

śnych. Część ta pełni ważną rolę w oddziaływaniach międzykomórkowych oraz w procesach diapedyzy neutrofilii przez śródbłonek w stanach zapalnych. PECAM-1 wykorzystywana jest w identyfikacji naczyń krwionośnych wielu narządów, w tym łożyska ludzkiego [9].

CD34, cząsteczka charakterystyczna dla komórek macierzystych hematopoezy, występuje również na komórkach niehematopoetycznych [10]. Wyznakowane antygeny CD34 na śródbłonku obrazują unaczynienie różnych tkanek. Ostatnie badania sugerują, że analiza ekspresji antygeny CD34 na śródbłonku naczyń w łożysku ludzkim daje podstawę oceny aktywności śródbłonka [11]. Do tej pory brak w literaturze podobnych analiz w odniesieniu do łożysk z ciążą powikłanych hypotrofią płodu.

Występowanie **czynnika von Willebranda** dotyczy głównie komórek śródbłonka, stąd wykorzystywany jest do wizualizacji naczyń krwionośnych wielu narządów [12]. vWF ma istotne znaczenie w procesach krzepnięcia krwi – uszkodzone komórki śródbłonka aktywują czynnik VIII krzepnięcia krwi, który wychwytuje płytki krwi, a powstające skrzepy zamykają ubytki w ścianie naczyń. Możliwość wykrycia przemieszczeń czynnika von Willebranda, uwalnianego przy podrażnieniu lub uszkodzeniu śródbłonka, ustanowiła vWF użytecznym wskaźnikiem dysfunkcji komórek śródbłonka, co może mieć istotne znaczenie kliniczne [13]. Czynniki von Willebranda występuje również w śródbłonku naczyń łożyska, jednak brakuje analiz na temat możliwego uwalniania i przemieszczania vWF poza komórki śródbłonka zarówno w łożysku z ciążą prawidłową, jak i patologiczną.

Powyższe fakty skłoniły nasz zespół do przeprowadzenia ultrastrukturalnych i immunohistochemicznych badań śródbłonka naczyń krwionośnych w łożyskach prawidłowych i z ciążą powikłanych hypotrofią płodową.

MATERIAŁ I METODY

Pacjentki i łożyska

Badaniami objęto 25 łożysk pochodzących z ciąż rozwiązanych pod koniec trzeciego trymestru w Samodzielnym Specjalistycznym Zakładzie Opieki Zdrowotnej nad Matką i Dzieckiem w Opolu. Tydzień ciąży ustalono na podstawie daty ostatniej menstruacji oraz badania ultrasonograficznego przed 16 tygodniem ciąży. Dane dotyczące charakterystyki klinicznej ciąży pochodziły ze szpitalnego rejestru danych. Stan niemowląt określono wg skali Apgar. Masę łożyska ustalono bez usunięcia błon płodowych i pępowiny. Hypotrofię płodu w 11 ciążach zdiagnozowano wg kryterium masy urodzeniowej płodu <10 paracentyli [1]. Grupę kontrolną stanowiło 14 łożysk po ciąży bez powikłań i z prawidłowym rozwojem płodu.

CD34 is a molecule characteristic for haematopoietic stem cells, however, it is also present on non-haematopoietic cells [10]. Labeled CD34 antigen on endothelial cells represent vascularization of various tissues. The latest studies suggest, that CD34 antigen expression on blood vessels endothelium on human placenta analysis becomes the base for endothelium activity assessment [11]. Nevertheless, in scientific literature there are no similar analyses concerning placentas from pregnancies complicated by fetal hypotrophy.

Von Willebrand factor is localized mainly in endothelial cells, hence, it is used to visualize blood vessels in many organs [12]. vWF is important factor in blood clotting processes – damaged endothelial cells activate VIII blood clotting factor, which next “catches” platelets and newly generated blood clots close lesion in vessel wall. The opportunity to detect relocation of von Willebrand factor, released during irritation or damage of endothelium, makes vWF a useful tool for endothelial cells dysfunction indication, what can be of great significance for clinical medicine [13]. vWF is also present in placental endothelium, however there is not enough analyses on a possible release and relocation of vWF outside of endothelial cells both in normal pregnancy placentas and pathological ones.

The above facts led us to perform ultrastructural and immunohistochemical studies of blood vessels endothelium in normal and hypotrophic pregnancy placentas.

MATERIALS AND METHODS

The study involved 25 placentas coming from pregnancies after delivery at the end of the third trimester in specialist Mother and Child Health Care Institution (Samodzielny Specjalistyczny Zakład Opieki Zdrowotnej nad Matką i Dzieckiem) in Opole. Week of gestation was assessed using the date of the last menstruation and ultrasound scan performed before 16th week of gestation. The data concerning clinical characteristics of pregnancies were obtained from hospital data registry. Newborns general state was assessed using Apgar scale. Weight of the placenta was taken without removal of fetal membranes and umbilical cord. In 11 pregnancies fetal hypotrophy was diagnosed basing on the birth weight below 10 percentile criterion [1]. Control group included 14 placentas from normal pregnancies with normal fetal growth.

Electron microscopy samples analysis

The material (1 mm³) was taken from three, randomly chosen localizations of central section of eight placentas, 2 cm from umbilical cord attachment. The biopsies were fixed in 2,5% buffered solution of glutaraldehyde and 1% solution of osmic acid. Next, the samples were dehydrated and embedded in epoxy resin Epon 812. The assessment of samples was performed using transmission electron microscope BC 500 (TESLA, Czech

Analiza preparatów w mikroskopie elektronowym
Materiał (1 mm³) pobrano z trzech losowo wybranych miejsc centralnego przekroju ośmiu łożysk, w odległości 2 cm od przyczepu sznura pępowinowego. Wycinki utrwalono w 2,5% zbuforowanym roztworze aldehydu glutarowego oraz w 1% kwasie osmowym, następnie materiał odwodniono i zatopiono w żywicy epoksydowej Epon 812. Ocenę preparatów przeprowadzono w transmisyjnym mikroskopie elektronowym BS 500 (TESLA, Czechy). Ultrastrukturalne cechy śródbłonek w płytkach nabłonkowo-naczyniowych oceniono na podstawie 27 losowo wybranych obrazów kosmków końcowych każdego łożyska.

Badania immunohistochemiczne

Wycinki do badań (2 cm³) pobrano z 17 łożysk w odległości 2 cm od przyczepu sznura pępowinowego, obejmujące centralny przekrój dysku. Materiał utrwalono w 4% zbuforowanym paraformaldehydzie, odwodniono i zatopiono w parafinie. Parafinowe skrawki łożyska o 5 µm grubości analizowano metodą immunoperoxydazową [14] w obecności przeciwciał (tab.1.). W kontroli negatywnej procesu barwienia pierwszorządowe przeciwciała zastąpiono prawidłowymi immunoglobulinami myszy lub kozy albo buforem. Jądra komórkowe dobarwiono hematoxyliną lub pozostawiono bez podbarwiania.

Reakcję immunohistochemiczną oceniono w mikroskopie świetlnym BX40 (OLYMPUS, Niemcy) przy 40-krotnym powiększeniu obiektywu, zdjęcia wykonano aparatem cyfrowym Camedia 3030 (OLYMPUS, Niemcy). Immunoreaktywność antygenów określono na podstawie brązowo-miodowego zabarwienia dla 10 losowo wybranych miejsc preparatu. Wszystkie badane pola, każde o powierzchni 25600 µm², obrazowały kosmki pośrednie i końcowe z dobrze rozpoznawalną architekturą tkankową.

Analiza morfometryczna kosmków

Do analiz morfometrycznych zastosowano program wizualizacji i obróbki obrazu DP-Soft wersja 3.0 (OLYMPUS, Niemcy). Oceniono liczbę: kosmków, profili naczyniowych, immunoreaktywnych komórek, a także komórkową dystrybucję produktów reakcji immunohistochemicznych, intensywność immunobarwień oraz powierzchnie zajmowane przez struktury śródbłonkowe.

Analiza statystyczna

Analizę statystyczną przeprowadzono z wykorzystaniem MS Excel 2002 oraz w programie statystycznym R (wersja 2.2.1) [15]. Za graniczny poziom istotności przyjęto p≤0,05. Zgodność rozkładów uzyskanych wartości zmiennych z rozkładem Gaussa sprawdzono przy użyciu testu Kołmogorowa-Smirnowa. W celu porównania średnich w badanych grupach łożysk w zależności od istnienia lub braku jednorodności wariancji mierzonej testem F, zastosowano odpowiednio

Republic). Ultrastructural features of endothelia in epithelial-vascular plates were assessed on the basis of 27 randomly chosen images of terminal villi of each placenta.

Immunohistochemistry

Biopsies (2 cm³) were taken from 17 placentas 2 cm from umbilical cord attachment to the placenta, involving central crossing of the disc. The material was fixed in 4% buffered solution of paraformaldehyde, dehydrated and embedded in paraffin. Paraffin slices of placenta, 5 µm thick, were analyzed using immunoperoxidase method [14] in the presence of antibodies (table 1). Replacement of primary antibody with mouse or goat immunoglobulins or buffer were used as negative staining controls. Cell nuclei were counterstained with hematoxyline or left without counterstaining.

Immunochemistry reaction was analyzed using light microscope BX40 (OLYMPUS, Germany), 40x lens magnification. The images were taken with digital camera Camedia 3030 (OLYMPUS, Germany). Immunoreactivity of antigens was estimated basing on brown-honey coloring for 10 randomly chosen places on the slice. All analyzed fields of visions, surface area of 25600 µm², visualized intermediate and terminal villi showing easily visible tissue architecture.

Morphometric analysis of villi

Morphometric analyses were performed using visualizing and image processing software DP-Soft ver. 3.0 (OLYMPUS, Germany). We assessed the numbers of villi, vascular profiles, immunoreactive cells as well as cell distribution of immunohistochemical reaction product, immunostaining intensity and surfaces covered by endothelial structures.

Statistical analysis was performed using MS Excel 2002 and R statistics software (ver. 2.2.1.) [15]. Statistical significance was assumed when p value was ≤0,05. Kolmogorov-Smirnov test was used to test normality of the obtained values distribution (conformity to the Gauss distribution). To compare means in the studied groups in relation to the presence or absence of homogeneity of variances tested with F test, we used student t-test or Welch t-test respectively. In case when obtained results had not normal distribution we used Wilcoxon test. The proportion values (p) for the analyzed blood vessels features, calculated from morphometric measurements, were changed into percentage frequency of the feature according to 100-p rule. To compare two proportions in samples we used Z test.

test t Studenta lub test t Welch'a. W przypadku braku rozkładu normalnego uzyskanych danych zastosowano test sumy rang Wilcoxon. Obliczone na podstawie pomiarów morfometrycznych wartości proporcji (p) dla analizowanych cech naczyń zamieniono na wyrażone w % częstości cechy zgodnie z zasadą $100 \cdot p$. Dla porównania dwóch proporcji w próbach zastosowano test istotności „z”.

WYNIKI

Analiza immunohistochemiczna obecności **PECAM-1** wykazała istotne statystycznie zmniejszenie średniej liczby naczyń w kosmkach w grupie łożysk patologicznych w porównaniu z grupą kontrolną (tab.2.). Analiza cech klinicznych obu grup wykazała, że średni wiek ciążowy w momencie porodu, średnia masa urodzeniowa noworodka i średnia masa łożyska były istotnie niższe w przypadku hypotrofii płodowej. Pod względem takich cech, jak średni wiek matki oraz stan ogólny noworodka analizowane grupy nie różniły się istotnie statystycznie pomiędzy sobą.

Obraz śródbłonek w mikroskopie elektronowym

Obserwowane w mikroskopie elektronowym naczynia płodowo-łożyskowe posiadały szerokie światło, wypełnione elementami morfotycznymi krwi (erytrocyty, leukocyty, trombocyty). Śródbłonek naczyń kosmków w płytkach naczyń nablónkowych był monowarstwowy i oparty na błonie podstawnej. W łożyskach z ograniczonego wzrastania płodu obserwowano istotny zanik blaszki jasnej na dużych fragmentach błony

RESULTS

Immunohistochemical analysis of **PECAM-1** presence showed statistically significant decrease of mean blood vessel number in villi of the pathologic placentas in comparison to controls (table 2). Clinical features analysis performed in both groups showed that mean gestational age at the delivery, mean birth weight of newborn and mean weight of the placenta were significantly lower in fetal hypotrophy group. As far as features like mean mother's age and newborn general state are concerned, the groups did not differ statistically from each other.

The fetoplacental blood vessels observed in electron microscopy had wide inside diameter, filled with blood cells (erythrocytes, leukocytes, platelets). The endothelium of villi vessels in epithelial-vascular plates was monolayer and based on basement membrane. In placentas from pregnancies with intrauterine growth retardation significant decrease in lamina lucida on huge fragments of endothelial cell membrane was observed and dissection and broken continuity of lamina densa (Fig. 1A). In control group both laminas were thin and tight (Fig. 1B).

Tab. 1. Przeciwciała pierwszorzędowe

Przeciwciała skierowane przeciwko:	Postać	Rozcieńczenie robocze	Pochodzenie
PECAM-1	m IgG1 κ	1:60	DakoCytomation
CD34 Type III	m IgG1	1:100	Cymbus Biotechnology Ltd
Czynnik von Willebranda	rb IgF	1:500	DAKO

m IgG1 – mysie immunoglobuliny G1, rb IgF – królicze immunoglobuliny

Tab. 2. Charakterystyka grupy badanej i kontrolnej

	Hypotrofia płodowa (n=11)	Kontrola (n=14)
Wiek matki (lata)	26,82 (±7,11)	30,21 (±6,40)
Wiek ciążowy (tygodnie)	37,27 (±2,33)^a	39,71 (±0,91)
Masa urodzeniowa noworodka (g)	2137,27 (±662,56)^a	3495,71 (±602,71)
Skala Apgar	8,55 (±2,73)	9,43 (±1,09)
Masa łożyska (g)	398,18 (±36,56)^a	610,71 (±65,45)
Liczba naczyń w kosmku	3,6 (±1,04)^a	4,2 (±0,60)

podane wartości są średnimi (± odchylenie standardowe)

^apoziom – $p \leq 0,05$ (pogrubiono)

Tab. 1. Primary antibodies

Antibody	Form	Working dilution	Supplier
PECAM-1	m IgG1 κ	1:60	DakoCytomation
CD34 Type III	m IgG1	1:100	Cymbus Biotechnology Ltd
von Willebrand Factor	rb IgF	1:500	DAKO

m IgG1 – mouse immunoglobulin G1, rb IgF – immunoglobulin fraction of rabbit antiserum

Tab. 2. Patient clinical characteristic

	Fetus hypotrophy (n=11)	Control (n=14)
Maternal age (years)	26,82 (±7,11)	30,21 (±6,40)
Gestational age (weeks)	37,27 (±2,33)^a	39,71 (±0,91)
Fetal weight (grams)	2137,27 (±662,56)^a	3495,71 (±602,71)
Apgar score	8,55 (±2,73)	9,43 (±1,09)
Placental weight (grams)	398,18 (±36,56)^a	610,71 (±65,45)
Number of capillaries per villi	3,6 (±1,04)^a	4,2 (±0,60)

Values are group means (± standard deviation)

^a $p \leq 0,05$ Significant effect versus healthy controls (bold)

komórkowej śródbłonna oraz rozwarstwienia i naruszenia ciągłości blaszki ciemnej błony podstawnej (ryc.1A). W materiale kontrolnym obie blaszki błony podstawnej śródbłonna były cienkie i zwarte (ryc.1B).

W przestrzeni poza śródbłonkiem występowały nie liczne włókienka kolagenowe. Błona komórkowa śródbłonna zawierała wgłębienia - kaweole, oraz zwrócone w kierunku światła naczyń uwypuklenia - mikrokosmki. Analiza elektronmikroskopowa komórek śródbłonna wykazała w cytoplazmie obecność typowych organelli – jądra komórkowego, licznych mitochondriów, siateczki śródplazmatycznej szorstkiej, rybosomów, aparatu Golgiego i endosomów, przy czym w grupie z hypotrofią płodu wykazano znamienne poszerzenie cystern siateczki śródplazmatycznej szorstkiej oraz zwiększenie średnicy mitochondrium (ryc.2A.).

CD34

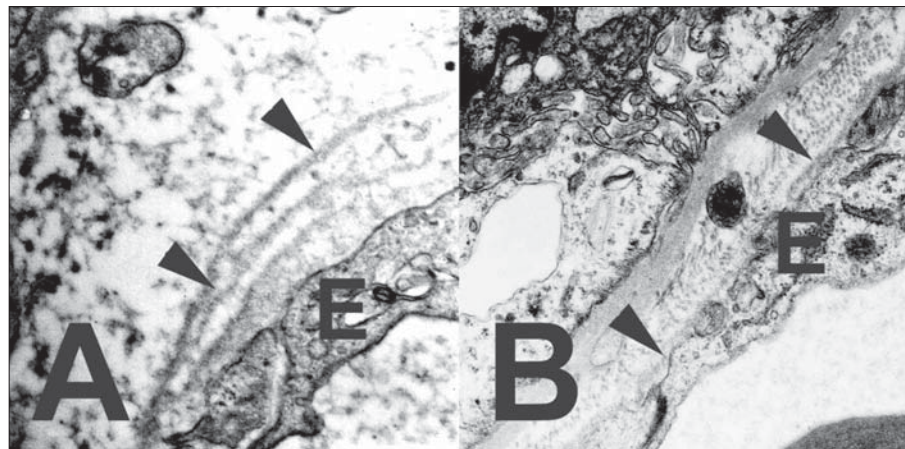
Obecność CD34-pozytywnych komórek śródbłonna wykryto zarówno w naczyniach kosmków łożysk prawidłowych, jak i patologicznych (ryc.3A i 3B.). Analiza morfometryczna wykazała, że w patologii hypotro-

fi w przestrzeni pod błoną śródbłonna były liczne włókienka kolagenowe. Błona komórkowa śródbłonna zawierała wgłębienia - kaweole, oraz zwrócone w kierunku światła naczyń uwypuklenia - mikrokosmki. Analiza elektronmikroskopowa komórek śródbłonna wykazała w cytoplazmie obecność typowych organelli – jądra komórkowego, licznych mitochondriów, siateczki śródplazmatycznej szorstkiej, rybosomów, aparatu Golgiego i endosomów, przy czym w grupie z hypotrofią płodu wykazano znamienne poszerzenie cystern siateczki śródplazmatycznej szorstkiej oraz zwiększenie średnicy mitochondrium (Fig. 2A).

The presence of CD34-positive endothelial cells was shown in both normal and pathologic placenta villi vessels (Fig. 3A and 3B). Morphometric analysis showed that in fetal hypotrophy 80.47% of vascular profiles were CD34-positive. In the group of normal placentas the presence of CD34 antigen was observed in all analyzed vessels.

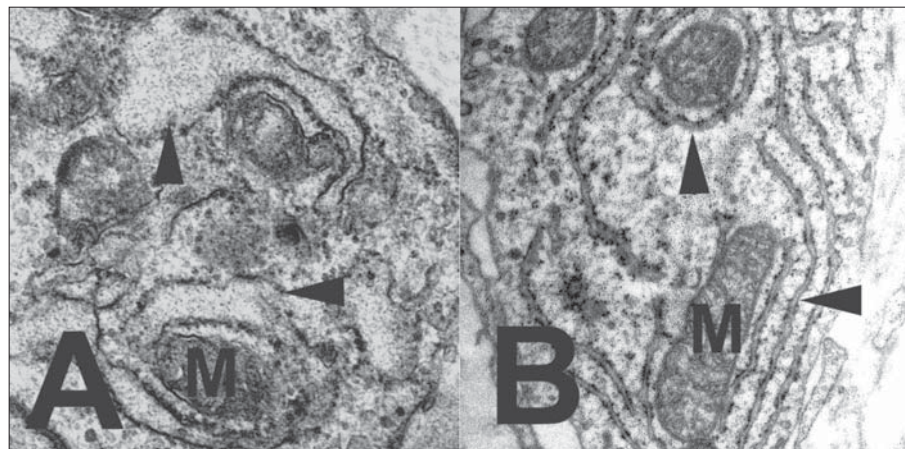
Ryc. 1. Błona podstawna śródbłonna naczyniowego łożyska widoczna w transmisyjnym mikroskopie elektronowym: hypotrofia płodowa (A), kontrola (B); (pow. oryg. x24000). E – śródbłonek; ► – błona podstawna śródbłonna

Fig. 1. Basement membrane of endothelium. The transmission electron micrographs are from fetus hypotrophy (A) and normal (B) placentas; (original magnification, x24,000). E – endothelium; ► – basement membrane of endothelium



Ryc. 2. Siateczka śródplazmatyczna szorstka i mitochondrium w komórce śródbłonna naczyniowego łożyska widoczne w transmisyjnym mikroskopie elektronowym: hypotrofia płodowa (A), (pow. oryg. x32000); kontrola (B), (pow. oryg. x18000). ► – siateczka śródplazmatyczna szorstka, M – mitochondrium

Fig. 2. Rough endoplasmic reticulum and mitochondrion in endothelial cell. The transmission electron micrographs are from fetus hypotrophy (A) (original magnification, x32,000) and normal (B) placentas (original magnification, x18,000). ► – rough endoplasmic reticulum, M – mitochondrion



fii płodu 80,47% profili naczyniowych jest CD34-dodatnich. W grupie łożysk prawidłowych obecność antygenu CD-34 zaobserwowano na każdym analizowanym śródbłonku.

Czynnik von Willebranda

Analiza mikroskopowa naczyń łożyskowych wyznaczonych immunohistochemicznie przez przeciwciała anty-vWF ujawniła w obu grupach badanych łożysk pozaśródbłonkową dystrybucję czynnika von Willebranda w postaci zakrzepów oraz wynaczynień (ryc.4A i 4B.). W grupie hypotrofii płodu wykazano znamienne większą liczbę zmian naczyniowych w porównaniu do grupy kontrolnej (tab.3.).

DYSKUSJA

Na zgromadzonym materiale wyznaczono ultrastrukturalne i immunohistochemiczne cechy śródbłonka na-

Microscopic analysis of immunohistochemically labeled placental vessels using anti-vWF antibodies in both studied groups showed that von Willebrand factor is released into circulation and also leaked to the perivascular. This local vWF release represented by blood clotting and extravasations (Fig. 4A and 4B). In the group of fetal hypotrophy we proved that vascular changes are significantly higher number of vascular changes in comparison to normal pregnancy group (table 3).

DISCUSSION

In the collected material we assessed ultrastructural and immunohistochemical features of placental blood vessels endothelium and analyzed changes in blood vessels. Clinical characteristic shows (table 2) that fetal hypotrophy group was characterized by significantly lower birth weight and placenta weight as well as low-

Tab. 3. Zmiany naczyniowe w łożysku

	Hypotrofia płodowa (n=11)	Kontrola (n=14)
skrzepy [%]	11,97^a	9,49
wynaczynienia [%]	13,99^a	0,80

^apoziom-p≤0,05 (pogrubiono)

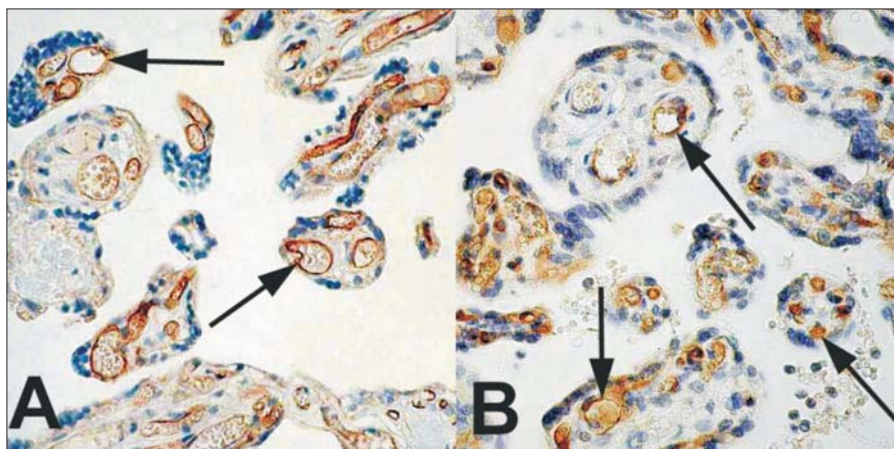
Tab. 3. Changes in the placental capillaries

	Fetus hypotrophy (n=11)	Control (n=14)
blood clots [%]	11,97^a	9,49
extravasation [%]	13,99^a	0,80

^aP≤0,05 Significant effect versus healthy controls (bold)

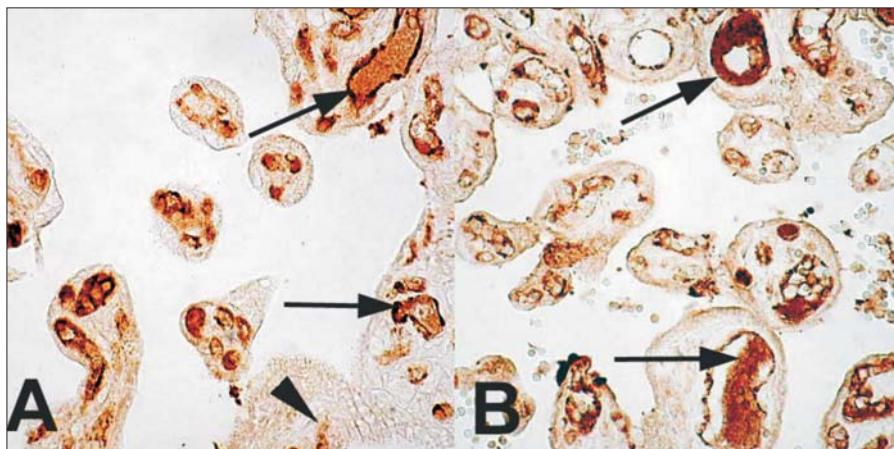
Ryc. 3. Rozmieszczenie antygenu CD34 w kosmkach łożyska ludzkiego widoczne w mikroskopie świetlnym: hypotrofia płodowa (A), kontrola (B); (pow. obiektywu x40). Barwienie immunohistochemiczne. □ - komórki śródbłonka CD34-pozytywne

Fig. 3. The immunohistochemical distribution of CD34 in human placental villi: fetus hypotrophy (A) and control (B); (objective magnification, x40). □ - CD34 positive endothelial cells



Ryc. 4. Rozmieszczenie antygenu vWF w kosmkach łożyska ludzkiego widoczne w mikroskopie świetlnym: hypotrofia płodowa (A), kontrola (B); (pow. obiektywu x40). Barwienie immunohistochemiczne. □ - skrzep, ► - wynaczynienie

Fig. 4. The immunohistochemical distribution of vWF in human placental villi: fetus hypotrophy (A) and control (B); (objective magnification, x40). □ - blood clots



czyń łożyskowych oraz dokonano analizy zmian naczyniowych.

Z charakterystyki klinicznej (tab.2.) wynika, że grupa z hypotrofią płodową, w porównaniu z kontrolą charakteryzowała się znacząco mniejszą masą urodzeniową noworodka i łożyska oraz niskim wiekiem ciążowym w momencie porodu. W łożyskach z ograniczonego wzrastania płodu na poziomie kosmków końcowych zanotowano redukcję unaczynienia. Uzyskane wyniki charakteryzujące grupę badaną zgodne są z literaturowymi danymi [16-18].

Szczegóły budowy ultrastrukturalnej śródbłonnów łożyska w warunkach ciąży prawidłowej oraz powikłanej hypotrofią płodu opisano na podstawie badań elektronimikroskopowych. Przekroje kosmków widoczne w mikroskopie elektronowym obrazują dobrze zachowaną i rozpoznawalną ultrastrukturę. Obserwowana w łożyskach prawidłowych subkomórkowa budowa śródbłonna w płytkach naczyniowo-nabłonkowych odpowiadała wzorcom dobrze już w literaturze udokumentowanym [2,19].

Analizy płytek naczyniowo-nabłonkowych wykazały występowanie znaczących różnic w uformowaniu błony podstawnej śródbłonna w łożyskach z hypotrofii płodu w porównaniu z kontrolą. Wykryte zmiany dotyczyły struktury oraz układu przestrzennego błony podstawnej śródbłonna.

W łożyskach grupy patologicznej zaobserwowano rozwarstwienia blaszki ciemnej formujące układ wieloblaszkowy oraz istotny zanik blaszki jasnej błony podstawnej. Piśmiennictwo donosiło o występowaniu wieloblaszkowej błony podstawnej śródbłonna, lecz w łożysku prawidłowym, niemniej jednak aktualne publikacje, a także obserwacje własne łożysk kontrolnych nie potwierdzają tych danych [20]. Co więcej, występowanie rozwarstwień struktury błon podstawnych śródbłonnów uznano za charakterystyczne dla łożysk z ciąż powikłanych cukrzycą [21]. Ujawniony w naszym materiale ubytek blaszki jasnej może wskazywać na niedobór składników amorficznych odpowiedzialnych za adhezję komórek śródbłonna do rusztowania kolagenu typu IV. W tych warunkach niewystarczająco zespolona ze śródbłonkiem blaszka gęsta błony podstawnej może rozwarstwiać się. W badaniach *in vitro* zwiększenie depozytu kolagenu typu IV notowano w warunkach niedoboru tlenu [22], zatem wzrost liczby blaszek błony podstawnej może wyznaczać hipoksję w łożysku hypotroficznym.

Analiza ultrastruktury komórek śródbłonna wykazała w przypadku hypotrofii płodowej istotne poszerzenie cystern siateczki śródplazmatycznej szorstkiej oraz obrzęk mitochondrium. Opisywane zmiany substrukturalne obserwowane są w łożyskach z niedotlenieniem, a ich występowanie może warunkować reologiczne cechy naczyń płodowo-łożyskowych [23].

Publikowane do tej pory wyniki analiz ultrastrukturalnych uzyskiwane dla łożysk powikłanych hypotrofią płodową ujawniają również szereg zmian w sąsia-

er gestational age at the moment of labor in comparison to control group. In placentas obtained from pregnancies with intrauterine growth retardation we visualized reduction of vascularization at the level of terminal villi. The obtained results are consistent with the data published in scientific literature [16-18].

Details of endothelial ultrastructure in normal and hypotrophic pregnancies are obtained from electron microscopy studies. Sections of villi seen in electron microscopy images presents well preserved and recognizable structure. Subcellular structure of endothelium in epithelial-vascular plates observed in normal placentas well corresponded to standard images documented in literature [2,19].

Analysis of epithelial-vascular plates shown significant differences between structure of endothelial basement membrane in placentas from fetal hypotrophy complicated pregnancies in comparison to controls. The visualized changes concerned structure and spatial arrangement of endothelial basement membrane. In pathologic placentas we observed dissections of lamina densa forming multilayered structures and significant atrophy of lamina lucida. There some reports in the literature observing multilayered basement membrane of the endothelium, however the studies concerned normal placentas. Although actual publications as well as our own observations of control placentas do not support the previous findings [20]. Moreover, dissections of endothelial basement membrane structure is acknowledged being characteristic for placentas from pregnancies complicated with diabetes mellitus [21]. Loss of lamina lucida shown in our material can indicate amorphous components deficiency, which are responsible for endothelial cells adhesion to collagen type IV scaffold. In such conditions, lamina densa insufficiently bound to the endothelium is able to dissect. Increase in collagen type IV deposits was found in *in vitro* studies performed in oxygen deficient environment [22], hence, the basement membrane layers increase can indicate hypoxia in hypotrophic placenta.

Ultrastructure analysis of endothelium in fetal hypotrophy showed significant dilation of rough endoplasmic reticulum cisterns and mitochondrial swelling. The described substructural changes are observed in hypoxic placentas, and their occurrence can be a trigger for rheologic features of fetoplacental blood vessels [23].

dującym ze śródbłonkiem trofoblastie [24]. Dane te sugerują, że obserwowane zmiany w strukturze kosmków mogą zaburzać prawidłową czynność łożyska i przyczynić się do wystąpienia wewnątrzmacicznego zahamowania wzrostu płodu.

Zmiana architektury wewnątrzkomórkowej oraz przebudowa błony podstawnej śródbłonka w łożyskach powikłanych, mogą indukować zmiany ilości różnych antygenów na śródbłonku. Analizę takich zmian oparto na przygotowanym metodą parafinową materiale, w połączeniu z immunohistochemicznymi reakcjami wykrywania antygenów swoistych dla komórek śródbłonka (PECAM-1, vWF, CD34).

Antygen powierzchni komórkowej CD34, jako znacznik śródbłonek naczyń ma zastosowanie w charakterystyce waskularyzacji wielu typów tkanek, w tym łożyska [12]. Zachowana ekspresja antygeny CD34 w naczyniach łożyska ludzkiego odzwierciedla aktywną powierzchnię wymian matczyno-płodowych [11]. Analiza łożysk z hypotrofii płodu wykazała istotne zmniejszenie w kosmkach średniej liczby naczyń CD34-pozytywnych. Zmniejszony zakres ekspresji antygeny CD34 w naczyniach płodowych łożyska badanej patologii wyznacza ograniczenia w zaangażowaniu takiego śródbłonka w wymiany metaboliczne. Skojarzona zatem z funkcjonalnym stanem śródbłonek obecność antygeny CD34 umożliwia wykrycie w łożysku zmian aktywności śródbłonka naczyniowego.

Immunoekspresja czynnika von Willebranda na komórkach śródbłonka ustanowiła go powszechnym znacznikiem struktur naczyniowych wielu narządów [12]. Uwalnianie czynnika von Willebranda przy podrażnieniu lub uszkodzeniu komórek śródbłonka w różnych tkankach sugeruje występowanie podobnych zależności w łożysku. Przeprowadzone badania pozwoliły zaobserwować pozaśródbłonne przemieszczenia czynnika VIII krzepnięcia krwi zarówno w systemie naczyniowym łożyska normalnego, jak i powikłanego hypotrofią płodową, o czym donosimy w literaturze po raz pierwszy. Immunolokalizację czynnika von Willebranda poza obszar śródbłonka określono jako skrzep (czop płytkowy), gdy dotyczyła światła naczyń oraz jako wynaczynienie, gdy vWF dyfundował międzynaczyniowo do tkanki zrębowej kosmka. Zmiany zakrzepowe wykazane w naczyniach łożysk z hypotrofii płodowej dotyczą nieznacznie większego w porównaniu z kontrolą, zakresu naczyń. Można przyjąć, że obecne w naczyniach łożysk terminowych czopy płytkowe są konsekwencją progresji procesów krzepnięcia krwi w tkankach odłączonych od krążenia. Znacznie zwiększona liczba wynaczynień czynnika von Willebranda w przypadku łożysk powikłanych hypotrofią płodu, wskazuje na nadmierne uwalnianie do przestrzeni międzynaczyniowych czynnika VIII krzepnięcia krwi. Możliwość wykrycia przemieszczeń czynnika von Willebranda, stanowi użyteczny wskaźnik w analizie zmian przepuszczalności śródbłonka naczyniowego w łożysku ludzkim.

Ultrastructural analysis results obtained for placentas from pregnancies complicated with fetal hypotrophy published so far show multiple changes in trophoblast surrounding the endothelium [24]. These data suggest, that the changes observed in villi structure can disturb normal placental function and contribute to intrauterine growth retardation.

Intracellular architecture changes as well as restructuring of basement membrane in endothelium seen in pathologic placentas can induce changes in various antigens number on the surface of the endothelium. The analysis of such changes was based on material embedded in paraffin and stained using immunohistochemical reactions to detect specific antigens for endothelial cells (PECAM-1, vWF, CD34).

CD34 surface antigen for endothelium labeling is used to characterize vascularization of various types of tissues, including placenta [12]. Preserved expression of CD34 antigen in placental blood vessels illustrates active surface of mother-fetus exchange processes [11]. The analysis of fetal hypotrophy placentas showed significant decrease in mean number of CD34-positive blood vessels in villi. The decreased range of CD34 antigen expression in placenta fetal blood vessels of the studied pathology indicates limitations of such endothelium activity in metabolic exchange. The presence of CD34 antigen associated with active state of the endothelium allows detection of blood vessel endothelium activity changes in placenta.

As von Willebrand factor is expressed on the endothelial cells it is widely used as vascular structures marker in many organs [12]. Release of von Willebrand factor during irritation or damage of endothelial cells in various tissues suggest occurrence of similar relations in placenta. Performed studies allow us to observe extraendothelial migration of VIII blood clotting factor in both complicated with fetal hypotrophy and normal placentas vascular systems. We are describing this phenomenon for the first time. Immunolocalization of von Willebrand factor and its presence outside the endothelial area has been described as blood clots when it considered vascular lumen or as extravasation when vWF diffused to the perivascular stroma of the villi. Thrombotic changes showed in placentas from fetal hypotrophy complicated pregnancies concern slightly larger range of blood vessels in comparison to controls. We assume, that platelet plugs seen in blood vessels of terminal placentas are generated in consequence of blood clotting processes progression in tissues separated from normal blood circulation. Significantly increased number of von Willebrand factor extravasations in placentas from fetal hypotrophy complicated pregnancies shows excessive release of VIII blood clotting factor to intervascular spaces. Von Willebrand factor relocation is a useful indicator in analysis of human placenta vascular endothelium permeability changes.

WNIOSKI

1. W łożyskach powikłanych hypotrofią płodową zaobserwowano zredukowaną liczbę profili naczyniowych.
2. Śródbłonek naczyniowy w łożyskach po ciąży z hypotrofią płodową eksponuje zmiany strukturalne, obejmujące: uszkodzenie błony podstawnej, poszerzenie światła siateczki śródplazmatycznej szorstkiej i pęcznienie mitochondriów, zwiększoną liczbę zakrzepów i pozanaczyniowych wycieków czynnika von Willebranda.
3. W łożyskach z ograniczonego wzrastania płodu wykazano znamienne zmniejszenie liczby naczyń krwionośnych z obecnością antygenu CD34.

CONCLUSIONS

1. In placentas complicated with fetal hypotrophy reduced number of vessels has been observed.
2. Vascular endothelium in placentas after pregnancies with fetal hypotrophy showed structural changes involving the following: basement membrane lesions, dilation of rough endoplasmic reticulum lumen and mitochondrial swelling, increased number of blood clots and extravascular von Willebrand factor leakages.
3. In placentas from intrauterine growth retardation complicated pregnancies significant decrease of blood vessels with CD34 antigen presence number has been indicated.

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. **Sati L, Seval Y, Demir AY et al.:** Cellular diversity of human placental stem villi: an ultrastructural and immunohistochemical study. *Acta Histochem* 2007;109:468-479.
3. **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.
4. **Jauniaux E, Burton GJ:** Villous histomorphometry and placental bed biopsy investigation in type I diabetic pregnancies. *Placenta* 2006;27:468-474.
5. **Dudek E, Mackiewicz Z, Kubicki J i wsp.:** Struktura śródbłonnów naczyń krwionośnych i immunohistochemiczne wyznaczniki angiogenezy w kosmkach łożyska ludzkiego. *Ginekologia i Położnictwo – medical project* 2008;4:9-18
6. **Benirschke K, Kaufmann P, Baergen R:** Pathology of the human placenta. Wyd. 5, New York: Springer-Verlag; 2006.
7. **Dye JF, Jablenska R, Donnelly JL et al.:** Phenotype of the endothelium in the human term placenta. *Placenta* 2001;22:32-43.
8. **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.
9. **Mori M:** Ultrahigh-resolution immunofluorescence microscopy using ultrathin cryosections: subcellular distribution of caveolin-1alpha and CD31 in human placental endothelial cells. *J Electron Microsc* 2006;55:107-112.
10. **Challier JC, Galtier M, Cortez A et al.:** Immunocytological evidence for hematopoiesis in the early human placenta. *Placenta* 2005;26:282-288.
11. **Resta L, Capobianco C, Marzullo A et al.:** Confocal laser scanning microscope study of terminal villi vessels in normal term and pre-eclamptic placentas. *Placenta* 2006;27:735-739.
12. **Pusztaszeri MP, Seelentag W, Bosman FT:** Immunohistochemical expression of endothelial markers CD31, CD34, von Willebrand factor, and Fli-1 in normal human tissues. *J Histochem Cytochem* 2006;54:385-395.
13. **Kontinen YT, Mackiewicz Z, Ruuttila P et al.:** Vascular damage and lack of angiogenesis in systemic sclerosis skin. *Clin Rheumatol* 2003;22:196-202.
14. **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.
15. (C) R Foundation for Statistical Computing: R Version 2.2.1 (2005-12-20). Dostępny pod adresem URL: <http://www.r-project.org>
16. **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.
17. **Mayhew TM, Manwani 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.
18. **Chen CP, Bajoria R, Aplin JD:** Decreased vascularization and cell proliferation in placentas of intrauterine growth-restricted fetuses with abnormal umbilical artery flow velocity waveforms. *Am J Obstet Gynecol* 2002;187:764-769.
19. **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.
20. **Martinek JJ, Gallagher ML, Essig GF:** An electron microscopic study of fetal capillary basal laminae of "normal" human term placentas. *Am J Obstet Gynecol* 1975;121:17-24.
21. **Pietryga M, Biczysko W, Wender-Ożegowska E i wsp.:** Ocena ultrastrukturalna kosmków końcowych łożyska w ciąży powikłanej cukrzycą. *Gin Pol* 2004;75:111-118.
22. **Chen CP, Aplin JD:** Placental extracellular matrix: gene expression, deposition by placental fibroblasts and the effect of oxygen. *Placenta* 2003;24:316-325.
23. **Bachmaier N, Linnemann K, May K et al.:** Ultrastructure of human placental tissue after 6 h of normoxic and hypoxic dual in vitro placental perfusion. *Placenta* 2007;28:861-867.
24. **Battistelli M, Burattini S, Pomini F et al.:** Ultrastructural study on human placenta from intrauterine growth retardation cases. *Microsc Res Tech* 2004;65:150-158.