

## Changes in oxygen concentration may involve angiogenesis changing an expression of VEGF receptors – *in vitro* trophoblast culture study

Zmiany stężenia tlenu mogą wpływać na angiogenezę, modulując ekspresję receptorów dla VEGF – badania w pozaustrojowej hodowli trofoblastu

Изменения концентрации кислорода могут влиять на ангиогенез модулируя выразительность рецепторов для ВЭГФ исследование во внеорганическом культивировании трофобласта

Pracownia Badań nad Łożyskiem przy Katedrze i Zakładzie Patologii Ogólnej i Doświadczalnej Akademii Medycznej w Warszawie. Kierownik Katedry i Zakładu: prof. dr hab. n. med. S. Maśliński

Correspondence to: Katedra i Zakład Patologii Ogólnej i Doświadczalnej Akademii Medycznej w Warszawie, ul. Krakowskie Przedmieście 26/28; 00-927 Warszawa, tel.: (0\*22) 826 81 41, faks: (0\*22) 826 45 85.

Source of financing: Department own sources

### Summary

Angiogenesis is essential for tissue growth, particularly for the development of fetus and placenta, but also plays a crucial role in pathologic phenomena, e.g. retinopathy or tumors. The key mediator involved in the development of new vessels is vascular endothelial growth factor (VEGF), acting by specific receptors – VEGF-R1, VEGF-R2 and VEGF-R3. These receptors are present on the surface of cells of developing trophoblast as an expression of auto- and paracrine proangiogenic activity of trophoblast. **The aim of this study** was to assess the expression of VEGF receptors on cultured trophoblastic cells *in vitro*, in normoxic or hypoxic conditions. **Material and methods:** Placentae (n=12) were collected on the occasion of scheduled cesarean sections terminating normal, full-term pregnancies. After excision of tissue fragments, placental tissue was crumbled and trophoblastic cells were isolated by the Kliman technique. Cells were cultured and randomized into two groups. Culture conditions were as follows: group 1: CO<sub>2</sub> – 5%; O<sub>2</sub> – 20%, N<sub>2</sub> – completed; group 2: CO<sub>2</sub> – 5%, O<sub>2</sub> – 5%, N<sub>2</sub> – completed. After 96 hours' incubation cultures were terminated, supernatant was removed and solid material was fixed in 4% formalin. Immunocytochemical staining for VEGF-R1 and VEGF-R2 was performed. Preparations were evaluated using the morphometric software Quantimet C500+ (Leica). Intensity and surface area of color reaction were analyzed in 20 randomly selected fields of vision (200x). The level of expression of receptors was shown as a product of analyzed parameters and was compared in both groups. **Results:** The level of expression of VEGF-R1 and VEGF-R2 was greater in the group 2 as compared with the group 1 by 113.9% and 83.6% respectively. **Conclusions:** Trophoblast culture in hypoxic conditions leads to a greater expression of VEGF receptors than in normoxemic culture.

**Key words:** trophoblast, VEGF, hypoxia, angiogenesis, morphometry

### Streszczenie

Angiogeneza jest procesem warunkującym wzrost tkanek, zwłaszcza podczas rozwoju płodu i łożyska, ale ma również znaczenie w zjawiskach patologicznych, takich jak retinopatia czy wzrost nowotworów. Istotnym mediatorem uczestniczącym w powstawaniu nowych naczyń jest VEGF działający przez swoiste receptory – VEGF-R1, VEGF-R2, VEGF-R3. Receptory te są obecne także na komórkach rozwijającego się trofoblastu jako wyraz auto- i parakrynej proangiogennej czynności trofoblastu. **Celem** badania była ocena ekspresji receptorów dla VEGF na komórkach trofoblastu w hodowli *in vitro* prowadzonej w warunkach normoksji i hipoksji. **Materiał i metody:** Łożyska (n=12) pobrano po planowych cięciach cesarskich w ciąży donoszonej

o prawidłowym przebiegu. Po wycięciu fragmentów łożysk tkankę łożyskową rozdrobniono i izolowano komórki trofoblastu wg metody Klimana. Następnie zakładano hodowlę komórkową, przy czym losowo przydzielano materiał do jednej z grup. Warunki, w jakich prowadzono hodowlę, to: grupa 1 – 5% CO<sub>2</sub>, 20% O<sub>2</sub>, dopełnione N<sub>2</sub>; grupa 2 – 5% CO<sub>2</sub>, 5% O<sub>2</sub>, dopełnione N<sub>2</sub>. Po 96 godzinach inkubacji zakończono hodowlę, usunięto supernatant i materiał utrwalono w 4% formalinie. Wykonano barwienia immunocytochemiczne na obecność VEGF-R1 i VEGF-R2. Preparaty oceniano przy użyciu programu morfometrycznego Quantimet C500+ (Leica). Analizowano intensywność oraz pole powierzchni reakcji barwnej w 20 losowo wybranych polach widzenia (200x). Poziom ekspresji receptorów oznaczono jako iloczyn analizowanych parametrów i porównywano między grupą 1. a 2. **Wyniki:** Poziom ekspresji VEGF-R1 był większy o 113,9% w grupie 2. w porównaniu z grupą 1., poziom ekspresji VEGF-R2 był większy o 83,6% w grupie 2. **Wnioski:** Hodowla trofoblastu prowadzona w warunkach hipoksji prowadzi do wzrostu ekspresji receptorów dla VEGF w porównaniu z hodowlą w warunkach 20% stężenia tlenu.

**Słowa kluczowe:** trofoblast, VEGF, hipoksja, angiogeneza, morfometria

## Содержание

Ангиогенез является процессом, который обуславливает развитие клеток, особенно во время роста плода и детского места. Имеет однако значение также в патологических явлениях таких как ретинопатия или увеличение новообразований. Существенным посредником, который участвует в образовании новых сосудов, является ВЭГФ, который действует при посредстве своеобразных рецепторов ВЭГФ-Р1, ВЭГФ-Р2, ВЭГФ-Р3. Указанные рецепторы находятся также в клетках развивающегося трофобласта, как отражение самостоятельной и паракриной проангиогенной деятельности трофобласта. **Цель исследования** состояла в том, чтобы оценить выразительность рецепторов для ВЭГФ на клетках трофобласта в культивировании *in vitro* проводимом в условиях нормоксии и гипоксии. **Материал и методика:** Детские места (n=12) взяты после запланированных кесаревых сечений при доношенной беременности с правильным течением. После вырезки частей детского места, ткань места измельчалась а ткани трофобласта изолировались согласно методу Klimana. После этого начиналось клеточное культивирование, при чем материал по жребию предназначался для одной из групп. Условия проведения культивирования были следующие: группа 1 – 5% CO<sub>2</sub>, 20% O<sub>2</sub>, дополнительно N<sub>2</sub>; группа 2 – 5% CO<sub>2</sub>, 5% O<sub>2</sub>, дополнительно N<sub>2</sub>. После 96 часов инкубации культивирование было окончено, надсадочная жидкость (супернатант) устранялась и полученный материал стабилизировался в 4% формалина. Выполнялось иммуноцитохимическое окрашивание для обнаружения присутствия ВЭГФ-Р1 и ВЭГФ-Р2. Preparаты оценивались при использовании морфометрической программы Квантимет К500+ (Лейка). Анализировалась интенсивность и площадь поверхности цветной реакции в 20 избранных по жребию полях видимости (200x). Уровень выразительности рецепторов определялся как производное рассматриваемых параметров и сравнивался между группой 1 и 2. **Результаты:** Уровень выразительности ВЭГФ-Р1 был выше на 113,9% в группе 2 в сравнении с результатом полученным в группе 1. Уровень выразительности ВЭГФ-Р2 в группе 2 был выше на 83,6%. **Выводы:** Культивирование трофобласта проводимое в условиях гипоксии влечет за собой увеличение выразительности рецепторов для ВЭГФ, при сравнении с культивированием в условиях 20% концентрации кислорода.

**Ключевые слова:** трофобласт, ВЭГФ, гипоксия, ангиогенез, морфометрия

## INTRODUCTION

Angiogenesis is recognized as a crucial process for tissues growth, specially in fetal and placental development, as well as in pathological conditions like retinopathy or neoplasms. VEGF (vascular endothelial growth factor) is an important mediator in angiogenesis, acting through specific receptors – VEGF-R1, VEGF-R2, VEGF-R3. These receptors have the tyrosine kinase properties and are stimulated by different VEGF family polypeptides. VEGF-A stimulates receptors VEGF-R1, VEGF-R2, placental growth factor (PIGF) and VEGF-B stimulate VEGF-R1 receptor, VEGF-C and VEGF-D stimulate the receptors like VEGF-R2 and

## WSTĘP

Angiogeneza i waskulogeneza są procesami warunkującymi wzrost tkanek, zwłaszcza podczas rozwoju płodu i łożyska, obserwowane są również w zjawiskach patologicznych, takich jak retinopatia czy wzrost guzów nowotworowych. Jednym z istotnych mediatorów uczestniczących w powstawaniu naczyń jest naczyniowy śródbłonkowy czynnik wzrostu (VEGF) działający przez swoiste receptory – VEGF-R1, VEGF-R2, VEGF-R3. Receptory te mają właściwości kinaz tyrozynowych i są pobudzane przez różne polipeptydy z rodziny VEGF. VEGF-A pobudza receptory VEGF-R1 i VEGF-R2, łożyskowy czynnik wzrostu (*pla-*

VEGF-R3, VEGF-E in turn stimulates the VEGF-R2 receptor only. VEGF-A is characterized with higher affinity to VEGF-R1 receptor, which is responsible for the translocation of wall cells of the vessel during its formation, and for the intensification of vascular wall permeability. The VEGF-R2 receptor participates in the endothelial proliferation during vascular formation, and the VEGF-C/VEGF-R3 pathway is responsible for lymphangiogenesis<sup>(1,2)</sup>.

The receptors for VEGF are present within the tissues of intense angiogenesis like placenta. The quantity of particular VEGF receptors changes during pregnancy; VEGF-R2 is present within placenta during early pregnancy mainly and decreases with gestational age, while the quantity of VEGF-R1 increases with gestational age<sup>(3,4)</sup>. The changes in these receptors quantity responds to the change in their activators concentration – the concentration of VEGF family peptides correlates with VEGF-R2 quantity, and the concentration of PlGF with VEGF-R1 quantity. However, it seems that they control different phenomenon: the action of PlGF through the VEGF-R1 results in the increase of type “non-branching” angiogenesis, where the elongation of vascular loops is observed, while the action of VEGF family peptides through VEGF-R1 and VEGF-R2 increases the type “branching” angiogenesis, which is associated with new vascular loops formation<sup>(5)</sup>. These receptors are present not only on the epithelial cells surface but also on the cells of developing trophoblast as an expression of auto-crine and paracrine function of trophoblast<sup>(6,7)</sup> because activation of these receptors results in VEGF and PlGF synthesis increase in trophoblast cells. Additionally, the VEGF and PlGF trophoblast synthesis depends on oxygen concentration in which the trophoblast cells develop. Hypoxia (1% O<sub>2</sub>) causes the increase of mRNA VEGF expression as well as evident decrease of PlGF synthesis<sup>(8)</sup>. Similarly, in the neoplastic tissue, hypoxia is found to be very strong factor causing the increase of VEGF synthesis within the few hours of exposition<sup>(9)</sup>. It is expected that angiogenesis intensification observed in the process of placenta formation and development is connected not only with the VEGF or PlGF increased synthesis, but also with the increase of quantity of active receptors for these factors.

The purpose of this study was the assessment of VEGF receptors expression on trophoblast cells cultured *in vitro* in different oxygen conditions.

## MATERIAL AND METHODS

Placentae (n=12) were obtained after elective caesarean sections in uncomplicated term pregnancies; the indications to caesarean section were pelvic longitudinal lie (n=9), previous retina ablation (n=2), two previous caesarean sections (n=1). In none of the patients hyperten-

*central growth factor*, PlGF) oraz VEGF-B pobudzają receptor VEGF-R1, VEGF-C oraz VEGF-D pobudzają receptory VEGF-R2 i VEGF-R3, a VEGF-E pobudza jedynie receptor VEGF-R2. VEGF-A jest w większym powinowactwie z receptorem VEGF-R1, który jest odpowiedzialny za proces przemieszczania się komórek ściany naczyń w czasie jego formowania oraz za nasilenie przepuszczalności ściany naczyniowej. Receptor VEGF-R2 uczestniczy w procesie proliferacji endotelium podczas formowania naczyń, a szlak VEGF-C/VEGF-R3 jest odpowiedzialny za powstawanie naczyń limfatycznych<sup>(1,2)</sup>. Receptory dla VEGF są obecne w tkance o znacznie nasilonej angiogenezie, jaką jest łożysko. W czasie ciąży ilość poszczególnych receptorów dla VEGF w łożysku zmienia się – VEGF-R2 jest głównie obecny w łożysku we wczesnej ciąży i jego ilość zmniejsza się wraz ze wzrostem ciąży, podczas gdy ilość VEGF-R1 zwiększa się wraz z wiekiem ciąży<sup>(3,4)</sup>. Zmianom ilości tych receptorów odpowiada zmiana stężenia ich aktywatorów – stężenie peptydów z rodziny VEGF koreluje z ilością VEGF-R2, a stężenie PlGF z ilością VEGF-R1. Wydaje się jednak, że sterują one odmiennymi zjawiskami: działanie PlGF poprzez VEGF-R1 skutkuje nasileniem angiogenezy typu *non-branching*, gdzie obserwuje się wydłużanie istniejących pętli naczyniowych, natomiast działanie peptydów z rodziny VEGF przez VEGF-R1 i VEGF-R2 nasila angiogenezę typu *branching* związaną z powstawaniem nowych pętli naczyniowych<sup>(5)</sup>. Receptory te są obecne nie tylko na powierzchni komórek śródbłonna, ale również na komórkach rozwijającego się trofoblastu, jako wyraz auto- i parakrynej proangiogennej czynności trofoblastu<sup>(6,7)</sup>, ponieważ aktywacja tych receptorów powoduje wzrost syntezy VEGF oraz PlGF przez komórki trofoblastu. Dodatkowo synteza VEGF oraz PlGF przez komórki trofoblastu jest zależna od stężenia tlenu, w którym rozwijają się komórki trofoblastu. Hipoksja (1% O<sub>2</sub>) powoduje wzrost ekspresji mRNA VEGF oraz zdecydowane zmniejszenie syntezy PlGF<sup>(8)</sup>. Podobnie w tkankach guza nowotworowego hipoksja jest bardzo silnym czynnikiem powodującym wzrost syntezy VEGF w ciągu kilku godzin ekspozycji<sup>(9)</sup>. Spodziewane jest, że intensyfikacja angiogenezy obserwowanej m.in. w procesie kształtowania się i rozwoju łożyska jest związana nie tylko ze zwiększoną syntezą VEGF czy też PlGF, lecz także ze zwiększeniem ilości czynnych receptorów dla tych czynników. Celem badania była ocena ekspresji receptorów dla VEGF na powierzchni komórek trofoblastu w hodowli *in vitro* prowadzonej w różnych stężeniach tlenu.

## MATERIAŁ I METODY

Łożyska (n=12) pobrano po planowych cięciach cesarskich w ciąży donoszonej o prawidłowym przebiegu, przy czym wskazaniem do cięcia cesarskiego było położenie miednicowe u pierwiastki (n=9), stan po ablacji siatkówki (n=2) oraz stan po dwóch cięciach

sion, diabetes, premature birth and intrauterine growth retard were observed. The average time to terminate the pregnancies was 40 weeks 2 days (min. 40 weeks 0 days, max 40 weeks 5 days). The average birth weight of the newborns was 3653 g±252 g (SD). Uterine contractions did not start in any of the patients. The placental tissue was excised from the decidual side; regions macroscopically changed or big vessels were avoided. About 50-70 g of tissue were collected every time. After tissue blocks excision, placental tissue was minced separating blood vessels that allowed to obtain tissue samples about 2-5 mm in diameter. Next the trophoblast cells were isolated according to Kliman's method<sup>(10)</sup>. The tissue was digested in 4 sequential trypsin and DNA-ase solutions in the following concentrations: trypsin 0.125% and DNA-ase 0.2 mg/ml. The supernatant was centrifuged in non-continuous Percoll gradient with the densities 30-40%. After trophoblast was isolated, the cell culture was established; then the material was randomized into one of the groups. The immunocytochemical staining with anti-cytokeratine antibodies (Sigma) showed that the trophoblast cells compose more than 95% of all cells contained in the cell culture prepared in the way described above. The conditions of the cell culture were: group 1 – 5% CO<sub>2</sub>, 20% O<sub>2</sub>, completed N<sub>2</sub> (n=7); group 2 – 5% CO<sub>2</sub>, 5% O<sub>2</sub>, completed N<sub>2</sub> (n=5). After 96 hours' incubation the cultures was terminated, the supernatant was removed and the material fixed with 4% formaldehyde. Then the material was dehydrated in 96% alcohol solution, in acetone and xylene; after that it was embedded in paraffin. The paraffin blocks were cut on a microtome, paraffin was removed, internal activity of peroxidase was blocked with hydrogen peroxide, the specimens were rinsed in PBS and incubated with the human serum for 20 minutes. After addition of anti-VEGFR-1 mouse antibodies or anti-VEGFR-2 mouse antibodies (Chemicon, 1:1500) the incubation lasted 30 minutes. Then the secondary biotinylated anti-mouse antibodies and Novostain Super ABC Reagent (Novocastra) were added and incubated for 30 minutes. The specimens were rinsed with PBS, and the peroxidase activity was manifested as a brown sediment due to addition of 3,3'-diaminobenzidine (Immunotech) together with hydrogen peroxide for 3 minutes. The specimens were protected with DPX. In negative control PBS was used instead of anti-VEGFR-1 and anti-VEGFR-2 antibodies. The histological preparations were analyzed with computer image analysis software Leica Quantimet 500C+ (Leica Cambridge Ltd. Cambridge, UK). The system consists of computer with Intel Pentium processor, graphic card Ark Logic 2000 MT and graphic processor connected to video camera JVC TK-1280 E and microscope Leica DMLB. The preparations were analyzed in magnification 200x. The microscope picture was collected by video camera which generated output analogue signal. Next, analogue-digital converter transmitted digital signal to the morphometric

cesarskich (n=1). U żadnej z pacjentek w czasie ciąży nie obserwowano nadciśnienia tętniczego, cukrzycy ciężarnych, zagrażającego porodu przedwczesnego ani wewnątrzmacicznego zahamowania wzrostu płodu. Czas ukończenia ciąży to średnio 40 tyg. 2 dni (min. 40 tyg. 0 dni, maks. 40 tyg. 5 dni). Średnia masa noworodków wynosiła 3653 g±252 g (SD). U żadnej z kobiet nie rozpoczęła się czynność skurczowa. Wycinano tkankę łożyskową od strony doczesnej, unikając miejsc makroskopowo zmienionych oraz dużych naczyń. Za każdym razem pobierano około 50-70 g tkanki. Następnie tkankę łożyskową rozdrobniono, oddzielając w miarę możliwości naczynia krwionośne, uzyskując w ten sposób fragmenty tkanki o średnicy ok. 2-5 mm, odważono 30 g tkanki i poddano enzymatycznemu trawieniu w celu izolacji komórek trofoblastu wg metody Klimana i wsp.<sup>(10)</sup> Tkanek trawiono w 4 kolejnych roztworach trypsyny i DNA-azy o stężeniach: 0,125% trypsyny i 0,2 mg/ml DNA-azy. Supernatant poddawano wirowaniu w nieciągłym gradiencie Percollu o gęstościach od 5% do 70%. Tkanek trofoblastu pobierano z gęstości 30-40%. Po wyizolowaniu trofoblastu zakładano hodowlę komórkową, przy czym losowo przydzielano materiał do jednej z grup. Barwienia immunocytochemiczne z przeciwciałami antycytokeratynowymi (Sigma) wykazały, że w przygotowanej w powyższy sposób hodowli komórki trofoblastu stanowią ponad 95% wszystkich komórek. Warunki, w jakich prowadzono hodowlę, to: grupa 1 – 5% CO<sub>2</sub>, 20% O<sub>2</sub>, dopełnione N<sub>2</sub> (n=7); grupa 2 – 5% CO<sub>2</sub>, 5% O<sub>2</sub>, dopełnione N<sub>2</sub> (n=5). Po 96 godzinach inkubacji zakończono hodowlę, usunięto supernatant i materiał utrwalono w 4% formalinie.

Następnie materiał odwodniono w 96% roztworze alkoholu, acetonie, ksylenie i zatopiono w parafinie. Błoczki parafinowe skrojono mikrotomem, usunięto parafinę oraz zablokowano wewnętrzną aktywność peroksydazy nadtlakiem wodoru, preparaty wypłukano w PBS oraz inkubowano z surowicą ludzką przez 20 minut. Po dodaniu mysich przeciwciał anti-VEGF-R1 lub anti-VEGF-R2 (Chemicon, 1:1500) inkubowano przez 30 minut. Następnie dodano wtórne antymysie biotynylowane przeciwciała oraz Novostain Super ABC Reagent (Novocastra) i inkubowano przez 30 minut. Preparaty przepłukano PBS, a aktywność peroksydazy ujawniła się w postaci brązowego osadu przez dodanie na 3 minuty 3,3'-diaminobenzydyny (Immunotech) wraz z nadtlakiem wodoru. Preparaty zabezpieczono DPX. W kontroli ujemnej użyto PBS zamiast przeciwciał anti-VEGF-R1 i anti-VEGF-R2.

Preparaty histologiczne były analizowane systemem komputerowej analizy obrazu Leica Quantimet 500C+ (Leica Cambridge Ltd. Cambridge, UK). System składa się komputera z procesorem Intel Pentium, z kartą graficzną ARK Logic 2000 MT i procesorem graficznym połączonym z kamerą wideo JVC TK-1280 E i mikroskopem świetlnym Leica DMLB. Preparaty były analizowa-

analysis coding this in HSI system. After graphic conversions the cell surface was separated univocally with the colored reaction responding to VEGF-R1 or VEGF-R2 present on the cell surface. The measurements were performed in blind test without clinical data. 20 fields of vision were selected randomly from each preparation, then analyzed. The area of analyzed field was about 0.14 mm<sup>2</sup>. The intensity (I) and surface area (P) with colored reaction were analyzed. The receptor expression level was determined as a product of analyzed parameters, and was compared between groups 1 and 2. The results were presented as average values  $\pm$  SEM. The obtained differences were assessed with using the U-Mann-Whitney test accepting statistical significance when  $p < 0.05$ .

## RESULTS

The staining intensity (I) was assessed in 0-255 scale used by morphometric program, and was: for VEGF-R1 in group 1 –  $34 \pm 3.8$ , in group 2 –  $38 \pm 3.9$ , ( $p > 0.05$ ), for VEGF-R2 in group 1 –  $35 \pm 4.0$ , in group 2 –  $36 \pm 3.5$ , ( $p > 0.05$ ). P for VEGF-R1 was  $0.035 \text{ mm}^2 \pm 0.0045$  in group 1,  $0.067 \text{ mm}^2 \pm 0.0028$ , ( $p < 0.05$ ) in group 2. P for VEGF-R2 was  $0.042 \text{ mm}^2 \pm 0.0036$  in group 1, and  $0.075 \text{ mm}^2 \pm 0.0034$  in group 2, ( $p < 0.05$ ). The VEGF-R1 expression level was higher by 113.9% in group 2 comparing to group 1, similarly the VEGF-R2 expression level was higher by 83.6% in group 2.

## DISCUSSION

The results of previous studies on the influence of hypoxia on vascular net development emphasize the contribution of transcriptive factor for proteins contributing in the process of forming new vessels – HIF (hypoxia inducible factor). The activity of HIF is directly dependent on oxygen concentration: within the environment of normal oxygen concentration –  $pO_2 > 20 \text{ mm Hg}$  – the HIF ubiquitination process increases which, in turn, is significantly slower in hypoxic conditions. The increased concentration of HIF-1 protein causes the increased synthesis of VEGF and VEGF-R1 in different tissues – lungs, neoplasms, umbilical vein's endothelial cells culture<sup>(9,11,12)</sup>. The observed increase of VEGF-R1 and VEGF-R2 expression in trophoblast cells under the hypoxic conditions is consistent with the expectations. The VEGF receptors present on the trophoblast cells are responsible for autocrine and paracrine trophoblast activation that results in increased proliferation and placental growth<sup>(8)</sup>. In the course of pregnancy the partial oxygen blood pressure in the intervillous spaces changes from the values lower than 20 mm Hg to 8<sup>th</sup> week of gestation even to 60 mm Hg about 16<sup>th</sup> week of gestation<sup>(13)</sup>. It may be supposed that that the change in VEGF-R1 and VEGF-R2 receptors during pregnancy is exactly connected with the oxygen influence on trophoblast cells.

ne pod 200-krotnym powiększeniem. Obraz z mikroskopu był zbierany przez kamerę wideo, która generowała wyjściowy sygnał analogowy. Następnie konwerter analogowo-cyfrowy przekazywał sygnał cyfrowy do analizy morfometrycznej, kodując go w systemie HSI. Po przekształceniach graficznych jednoznacznie wyodrębniano powierzchnie komórek, w których obecna była reakcja barwna odpowiadająca obecności na powierzchni komórki VEGF-R1 lub VEGF-R2. Pomiary były wykonywane w ślepej próbie, bez danych klinicznych. Z każdego preparatu analizowano 20 losowo wybranych pól widzenia. Obszar analizowanego pola widzenia wynosił około 0,14 mm<sup>2</sup>. Analizowano intensywność (I) oraz pole powierzchni (P) z reakcją barwną. Poziom ekspresji receptorów oznaczono jako iloczyn analizowanych parametrów i porównywano pomiędzy grupą 1. i 2. Wyniki podawano jako wartości średnie  $\pm$  SEM. Uzyskane różnice oceniano przy użyciu testu U-Manna-Whitneya, uznając znamienność statystyczną, gdy  $p < 0,05$ .

## WYNIKI

Intensywność barwienia (I) była oceniana w skali 0-255, wykorzystywanej przez program morfometryczny i wynosiła: dla VEGF-R1 w grupie 1. –  $34 \pm 3,8$ , w grupie 2. –  $38 \pm 3,9$ ,  $p > 0,05$ ; dla VEGF-R2 w grupie 1. –  $35 \pm 4,0$ , w grupie 2. –  $36 \pm 3,5$ ,  $p > 0,05$ . P dla VEGF-R1 w grupie 1. wynosiło  $0,035 \text{ mm}^2 \pm 0,0045$ , w grupie 2. –  $0,067 \text{ mm}^2 \pm 0,0028$  ( $p < 0,05$ ); P dla VEGF-R2 w grupie 1. –  $0,042 \text{ mm}^2 \pm 0,0036$  i w grupie 2. –  $0,075 \text{ mm}^2 \pm 0,0034$  ( $p < 0,05$ ). Poziom ekspresji VEGF-R1 był większy o 113,9% w grupie 2. w porównaniu z grupą 1., podobnie poziom ekspresji VEGF-R2 był większy o 83,6% w grupie 2.

## DYSKUSJA

W dotychczasowych badaniach wpływu hipoksji na rozwój sieci naczyniowej podkreśla się udział białka będącego czynnikiem transkrypcyjnym dla białek biorących udział w procesie powstawania nowych naczyń – HIF (*hypoxia inducible factor*). Aktywność HIF jest bezpośrednio zależna od stężenia tlenu: w środowisku normalnego stężenia tlenu –  $pO_2 > 20 \text{ mm Hg}$  – nasila się proces ubiquitytacji HIF, który w warunkach niedoboru tlenu jest znacznie spowolniony. Zwiększone stężenie białka HIF-1 powoduje nasilenie syntezy VEGF i VEGF-R1 w różnych tkankach – płucach, guzach nowotworowych, hodowli komórek śródbłonna żyły pępowinowej<sup>(9,11,12)</sup>. Obserwowany wzrost ekspresji receptora VEGF-R1 oraz VEGF-R2 w komórkach trofoblastu poddanych działaniu hipoksji jest zgodny z oczekiwaniami. Obecne na komórkach trofoblastu receptory dla VEGF odpowiadają za autokrynną i parakrynną aktywację trofoblastu, której obrazem jest m.in. wzmożona proliferacja i wzrost łożyska<sup>(8)</sup>. W przebiegu ciąży ciśnienie parcjalne tlenu we

There are some controversies referring to the effect of hypoxia and HIF on VEGF-R2 receptor synthesis. The studies conducted on mice subjected to hypoxia did not reveal the increase of VEGF-R2 synthesis, while the VEGF-R1 synthesis was significantly intensified. Similarly, in umbilical vein's endothelial cells culture, the VEGF-R2 synthesis was inhibited, probably intensified by HIF-2. However, the stimulating influence of hypoxia on both receptors synthesis was proved in the studies on rat's myocardium and lungs tissue<sup>(14)</sup>. In the papers mentioned above, the differences may result from standard ranges problem: what oxygen concentrations define hypoxia, normoxia or hyperoxia. The cells culture in 20% oxygen concentration responding to oxygen concentration in the atmospheric air seems to be the hyperoxic conditions culture, because in conditions *in vivo* the blood supplying capillaries contains lower oxygen concentration (8-10%). In the investigation mentioned above, the increased expression of VEGF-R2 receptor was obtained in the culture with 5% of oxygen concentration. In the studies where the significant increase of VEGF-R2 expression was obtained, the tissue was subjected to slight oxygen concentration (0-1%), however, the effect of increased VEGF-R2 synthesis was not observed when the tissues were subjected to systemic hypoxia; the oxygen concentration in the blood reaching the tissues was not known then<sup>(15)</sup>. The molecular mechanism of HIF protein ubiquitination allows to suppose that the synthesis of VEGF receptor and VEGF itself will be correlated negatively with the oxygen concentration within the environment of trophoblast cells growth<sup>(16)</sup>.

## CONCLUSIONS

1. The presence of VEGF-R1 and VEGF-R2 receptors on trophoblast surface cells is confirmed in cells *in vitro* culture.
2. The trophoblast cells culture under hypoxic conditions lead to the increase of VEGF receptor expression comparing to cells culture in 20% of oxygen concentration conditions.

## BIBLIOGRAPHY: PIŚMIENNICTWO:

1. Larrivee B., Karsan A.: Signaling pathways induced by vascular endothelial growth factor (review). *Int. J. Mol. Med.* 2000; 5: 447-456.
2. Sawano A., Takahashi T., Yamaguchi S. i wsp.: Flt-1 but not KDR/Flk-1 tyrosine kinase is a receptor for placenta growth factor, which is related to vascular endothelial growth factor. *Cell Growth Differ.* 1996; 7: 213-221.
3. Vuckovic M., Ponting J., Terman B.I. i wsp.: Expression of the vascular endothelial growth factor receptor, KDR, in human placenta. *J. Anat.* 1996; 188: 361-366.
4. Clark D.E., Smith S.K., Sharkey A.M., Charnock-Jones D.S.: Localization of VEGF and expression of its receptors

krwi w przestrzeniach międzykosmkowych zmienia się od wartości mniejszych niż 20 mm Hg do 8. tyg. ciąży do nawet 60 mm Hg około 16. tyg. ciąży<sup>(13)</sup>. Można przypuszczać, że zmiana w ekspresji receptorów dla VEGF: VEGF-R1 i VEGF-R2, w czasie ciąży jest związana właśnie z wpływem tlenu na komórki trofoblastu.

Istnieją pewne kontrowersje na temat wpływu hipoksji oraz HIF na syntezę receptora VEGF-R2. W badaniach na myszach poddanych systemowej hipoksji nie obserwowano wzrostu syntezy VEGF-R2, podczas gdy synteza VEGF-R1 była znacznie zwiększona. Podobnie w hodowli komórek śródbłonna żyły pępowinowej obserwowano zahamowanie syntezy VEGF-R2, prawdopodobnie nasilone przez HIF-2. Natomiast badając tkankę mięśnia sercowego szczurów oraz tkankę płucną, udowodniono stymulujący wpływ hipoksji na syntezę obu receptorów<sup>(14)</sup>. W powyższych pracach różnice mogą wynikać z problemu normatywnego: poniżej jakiego poziomu stężenia tlenu należy definiować hipoksję, a powyżej jakiego normoksję lub też hiperoksję. Hodowla komórek w warunkach 20% stężenia tlenu, odpowiadających stężeniu tlenu w powietrzu atmosferycznym, wydaje się być hodowlą w warunkach hiperoksji, ponieważ w warunkach *in vivo* krew dopływająca do komórek w naczyniach włosowatych zawiera mniejsze stężenia tlenu (8-10%). W powyższym doświadczeniu uzyskano zwiększoną ekspresję receptora VEGF-R2 w hodowli o 5% stężeniu tlenu. W doświadczeniach, w których osiągnano znaczny wzrost ekspresji VEGF-R2 poddawano tkankę działaniu znikomych stężeń tlenu (0-1%), natomiast nie uzyskiwano efektu zwiększonej syntezy VEGF-R2, kiedy na tkanki oddziaływano hipoksją systemową, nieznaną było wówczas stężenie tlenu we krwi docierającej bezpośrednio do tkanek<sup>(15)</sup>. Na podstawie molekularnego mechanizmu ubikwitynacji białka HIF można przypuszczać, że synteza receptorów dla VEGF oraz samego VEGF będzie skorelowana ujemnie ze stężeniem tlenu w środowisku, w którym zachodzi wzrost komórek trofoblastu<sup>(16)</sup>.

## WNIOSKI

1. Potwierdza się obecność receptorów VEGF-R1 i VEGF-R2 na powierzchni komórek trofoblastu w hodowli *in vitro*.
2. Hodowla komórek trofoblastu prowadzona w warunkach hipoksji prowadzi do wzrostu ekspresji receptorów dla VEGF w porównaniu z hodowlą w warunkach 20% stężenia tlenu.

flt-1 and KDR in human placenta throughout pregnancy. *Hum. Reprod.* 1996; 11: 1080-1098.

5. Kurz H., Wilting J., Sandau K., Christ B.: Automated evaluation of angiogenic effects mediated by VEGF and PlGF homo- and heterodimers. *Microvasc. Res.* 1998; 55: 92-102.

6. Ahmed A., Li X.F., Dunk C. i wsp.: Colocalisation of vascular endothelial growth factor and its Flt-1 receptor in human placenta. *Growth Factors* 1995; 12: 235-243.
7. Crescimanno C., Marzioni D., Persico M.G. i wsp.: Expression of bFGF, PlGF and their receptors in the human placenta. *Placenta* 1995; 16: A13.
8. Shore V.H., Wang T.H., Wang C.L. i wsp.: Vascular endothelial growth factor, placenta growth factor and their receptors in isolated human trophoblast. *Placenta* 1997; 18: 657-665.
9. Shweiki D., Itin A., Soffer D., Keshet E.: Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis. *Nature* 1992; 359: 843-845.
10. Kliman H.J., Nestler J.E., Sermasi E. i wsp.: Purification, characterization and in vitro differentiation of cytotrophoblasts from human term placentae. *Endocrinology* 1986; 118: 1567-1582.
11. Pugh C.W., Ratcliffe P.J.: Regulation of angiogenesis by hypoxia: role of the HIF system. *Nat. Med.* 2003; 9: 677-684.
12. Gerber H.P., Condorelli F., Park J., Ferrara N.: Differential transcriptional regulation of the two vascular endothelial growth factor receptor genes. Flt-1, but not Flk-1/KDR, is up-regulated by hypoxia. *J. Biol. Chem.* 1997; 272: 23659-23667.
13. Jauniaux E., Watson A., Burton G.: Evaluation of respiratory gases and acid-base gradients in human fetal fluids and uteroplacental tissue between 7 and 16 weeks gestation. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 2001; 184: 998-1003.
14. Tuder R.M., Flook B.E., Voelkel N.F.: Increased gene expression for VEGF and the VEGF receptors KDR/Flk and Flt in lungs exposed to acute or to chronic hypoxia. Mod-ulation of gene expression by nitric oxide. *J. Clin. Invest.* 1995; 95: 1798-1807.
15. Marti H., Risau W.: Systemic hypoxia changes the organ-specific distribution of vascular endothelial growth factor and its receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1998; 95: 15809-15814.
16. Masson N., Willam C., Maxwell P.H. i wsp.: Independent function of two destruction domains in hypoxia-inducible factor-alpha chains activated by prolyl hydroxylation. *EMBO J.* 2001; 20: 5197-5206.

Mamy przyjemność zaprosić Państwa w dniach **24-25 czerwca 2005 r.** do **Lubina** na organizowane przez Miedziove Centrum Zdrowia w Lubinie oraz Katedrę Onkologii Wydziału Lekarskiego Kształcenia Podyplomowego Akademii Medycznej we Wrocławiu przy współudziale Polskiej Unii Onkologii

## Trzecie Miedziove Wiosenne Warsztaty Onkologiczne

których tematem będą:  
**Nowotwory jajnika – Kontrowersje**

Warsztaty po raz pierwszy będą miały charakter międzynarodowy. Jesteśmy przekonani, że poziom merytoryczny wykładów w pełni Państwa usatysfakcjonuje, a spotkanie towarzyskie pozwoli na miłe chwile relaksu.

**Opłatę zjazdową** – 150 PLN prosimy wpłacać na konto:  
Dolnośląska Fundacja Rozwoju Ochrony Zdrowia we Wrocławiu  
Bank Pekao S.A. I Oddział Wrocław  
Nr 45124019941111000024956839  
Z dopiskiem: darowizna „Cesarz”

Z powodów organizacyjnych prosimy o potwierdzenie przybycia i rezerwacji hotelu, poprzez przesłanie na nasz adres kserokopii dowodu wpłaty wraz z danymi osobistymi do dnia 10 maja 2005 r.

**Organizator:** Oddział Onkologii Klinicznej MCZ S.A. w Lubinie, ul. M. Skłodowskiej-Curie 54, 59-300 Lubin, tel. (0\*76) 846 04 10, faks (0\*76) 846 04 10, e-mail: onkologia@mcz.pl

Przewodniczący Komitetu Organizacyjnego  
dr n. med. Andrzej Kaiser