

Hypoxia increases invasiveness of isolated term trophoblast cells

Hipoksja zwiększa inwazyjność komórek trofoblastu izolowanych z ciąży donoszonej

Гипоксия увеличивает инвазионность клеток трофобласта изолированных из доношенной беременности

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

Correspondence to: Pracownia Badań nad Łożyskiem, Katedra i Zakład Patologii Ogólnej i Doświadczalnej Akademii Medycznej w Warszawie, ul. Krakowskie Przedmieście 26/28, 00-927 Warszawa

Source of financing: Department own sources

Summary

Introduction: The aim of this study was to determine the influence of hypoxia on invasiveness of the human term trophoblast cultured *in vitro*. **Material and method:** Placental samples, obtained in standardized manner after normal term pregnancies (N=6) were subjected to enzymatic digestion, and the resultant cell suspension was filtrated and centrifuged in 5-70% Percoll. The cell layers between Percoll 40-50% were collected and developed into two trophoblast cultures: normoxic (20% O₂; group I), and hypoxic (2% O₂; group 2). In order to examine trophoblast invasiveness, the Cell Invasion Assay Kit (Chemicon International, USA), equipped with extra cellular matrix proteins-coated permeable polycarbonate membrane, was used. After 48 hours, invasive cells on the bottom surface of the polycarbonate membrane were counted in both groups in calibrated areas, using morphometric software. **Results:** The mean number of identified trophoblastic cells in the group II amounted 184.57±19%±SD of the mean number counted in the Group I. **Conclusions:** The statistically significant (p=0.05) increase of the trophoblast, cultured *in vitro* in hypoxic conditions, when compared with the culture in normoxic conditions, was ascertained. The trophoblast cells in full-term pregnancy preserve the ability to answer for local hypoxia, typical for the first trimester trophoblast.

Key words: hypoxia, trophoblast culture, invasiveness, human placenta

Streszczenie

Wstęp: Celem niniejszej pracy była ocena wpływu hipoksji na inwazyjność trofoblastu ludzkiego w hodowli *in vitro*. **Materiał i metoda:** Pobrane w sposób standardowy wycinki łożysk z ciąży donoszonych o przebiegu fizjologicznym (N=6) poddano enzymatycznemu trawieniu, a powstałą po filtracji zawiesinę – frakcjonowanemu odwirowywaniu w Percollu o stężeniach od 5 do 70%. Warstwę komórek pozyskiwano z przedziału stężeń Percollu 40-50%, tworząc z każdego badanego łożyska dwie hodowle trofoblastu: inkubowaną w warunkach normoksji (20% O₂; grupa I) oraz hodowaną w obecności 2% tlenu (hipoksja; grupa II). Do badania inwazyjności trofoblastu użyto zestawów Cell Invasion Assay Kit firmy Chemicon International (USA) składających się z płytki do hodowli komórkowej zawierającej 12 studzienek, z dnem w postaci przepuszczalnej błony poliwęglanowej, powleczonej od góry cienką warstwą roztworu substancji białkowych odpowiadających macierzy pozakomórkowej. Po 48 godzinach uwidocznione komórki inwazyjne na dolnej powierzchni błony poliwęglanowej zliczano za pomocą komputerowego programu morfometrycznego w polu o stałej kalibracji. **Wyniki:** Średnia liczba komórek trofoblastu zidentyfikowanych na dolnej powierzchni błony poliwęglanowej stanowiła w grupie II 184,57±19%±SD średniej liczby komórek zliczonych w grupie I. **Wnioski:** Stwierdzono istotny statystycznie (p<0,05) wzrost inwazyjności trofoblastu hodowanego *in vitro* w warunkach obniżonego ciśnienia parcjalnego tlenu w porównaniu z hodowlą w warunkach normoksji. Komórki trofoblastu w ciąży donoszonej zachowują zdolność do odpowiedzi na miejscowe niedotlenienie, typową dla trofoblastu z I trymestru ciąży.

Słowa kluczowe: hipoksja, hodowla trofoblastu, inwazyjność, łożysko ludzkie

Содержание

Введение: Цель представленной работы состояла в том, чтобы дать оценку влияния гипоксии на инвазионность человеческого трофобласта при культивации *ин vitro*. **Материал метода:** Взятые стандартным образом вырезки детского места из доношенных беременностей при физиологическом течении ($n=6$) подвергались энзиматическому пищеварению, а суспензия появившаяся после фильтрования подвергалась фракционированному центрифугированию в Перколле при концентрации от 5 до 70%. Слой клеток получался из интервала концентрации Перколлы 40-50%, образуя из каждого исследуемого детского места два культивирования трофобласта: инкубированное в условиях нормоксии (20% O_2 ; группа 1) и культивированное при наличии 2% кислорода (гипоксия; группа 2). Для исследования инвазионности трофобласта применялись составы Целл Инвейжен Ассаи Кит фирмы Кемикон Интернейшеналь (США) состоящих из пластинки для клеточного разведения содержащей 12 колодцев, с дном в виде проницаемой поликарбонатовой пленки, покрытой сверху тонким слоем раствора протеиновых веществ соответствующих внеклеточному ложу. После 48 часов ставшие заметными инвазионные клетки на нижней поверхности поликарбонатовой пленки сосчитывались при помощи компьютерной морфометрической программы на участке при постоянном калибровании. **Результаты:** Среднее количество клеток трофобласта идентифицированное на нижней поверхности поликарбонатовой пленки составило в группе 2 – $184,57 \pm 19\% \pm \text{СД}$ среднего количества клеток идентифицированных в группе 1. **Выводы:** Констатировано существенное статистически ($p < 0,05$) увеличение инвазионности трофобласта культивированного *ин vitro* в условиях сниженного парциального давления кислорода в сравнении с культивацией в условиях нормоксии. Клетки трофобласта при доношенной беременности сохраняют способность реакции на локальный недостаток кислорода, типичную для трофобласта первого триместра беременности.

Ключевые слова: гипоксия, культивирование трофобласта, инвазионность, детское место

INTRODUCTION

The cell's ability for invasive growth presents the characteristic attribute for malignant diseases, and also plays a major role in physiology and pathology of the trophoblast^(1,2). Number of independent investigators share the opinion, that the nature of human's trophoblast cognition (in speculation considerably wider – the early pregnancy immunology cognition), will contribute in decisive level to the effective treatment methods of malignant diseases, based on its specific suppression to the invasive growth^(3,4).

The extrachorionic villus trophoblast cells invade the intravascular within the limits of the spiral uterine artery and stromale, where through the decidua, they reach the skeleton of myometrium (physiologically, trophoblast may invade up to 1/3 of the thickness of myometrium). The acquiring of the invasive properties is connected with the intensified expression of the appropriate genes, or the transpiring of the new genes expression. The actual knowledge about the control operator factors is still unsatisfactory⁽⁵⁾. Significant influences on the environmental infiltration by the trophoblast cells, and its survival, have the growth factors and the mother's origin cytokines^(5,6). The trophoblast invasiveness is connected with the new blood vessels formation as the effect of the two processes: vasculogenesis – the originating *de novo* vascular rete of haemangioblasts and angiogenesis – when the vascular rete expands on the basis of the previous blood vessel⁽⁷⁾. The invasive growth happens through the enzymatic degradation of the extra cellular matrix in the surrounding tissue. This is therefore not a simple mechanic

WSTĘP

Zdolność komórek do wzrostu inwazyjnego stanowi charakterystyczną cechą nowotworów złośliwych, odgrywa również zasadniczą rolę w fizjologii i patofizjologii trofoblastu^(1,2). Wielu niezależnych badaczy podziela pogląd, że poznanie natury ludzkiego trofoblastu (w domyśle znacznie szerzej – poznanie immunologii wczesnej ciąży) przyczyni się w decydującym stopniu do opracowania skutecznych metod leczenia nowotworów złośliwych opartych na swoistym hamowaniu zdolności komórek nowotworowych do wzrostu inwazyjnego^(3,4). Komórki trofoblastu pozakosmkowego dokonują inwazji wewnątrznaczyniowej w obrębie macicznych tętnic spiralnych oraz śródmiąższowej, gdzie poprzez doczesną dochodzą do zrębu miometrium (fizjologicznie trofoblast może naciekać do 1/3 grubości miometrium). Nabywanie właściwości inwazyjnych wiąże się z nasiloną ekspresją odpowiednich genów lub ujawnianiem się ekspresji nowych genów, przy czym obecna wiedza na temat czynników kontrolujących ten proces jest niewystarczająca⁽⁵⁾. Istotny wpływ na infiltrację otoczenia przez komórki trofoblastu i ich przeżycie wywierają czynniki wzrostowe i cytokiny pochodzenia macicznego^(5,6). Inwazyjność trofoblastu wiąże się z wytwarzaniem nowych naczyń krwionośnych w wyniku dwóch procesów: waskulogenezy – czyli powstawania *de novo* sieci naczyń z hemangioblastów i angiogenezy – gdy sieć naczyniowa zostaje rozbudowana na bazie uprzednio istniejącego naczynia krwionośnego⁽⁷⁾. Wzrost inwazyjny odbywa się poprzez enzymatyczną degradację macierzy zewnątrzkomórkowej w otaczającej tkance, nie polega za-

jostling of the infiltrating cells⁽⁸⁾. One of the most important parameters, regulating the local process of angiogenesis is the oxygen concentration. Hypoxia stimulates the endothelial vessel growth factor forming (VEGF), and modulates – in not totally investigated – the activity of the belonging to the same family matter, placental growth factor (PIGF)^(9,10). The local oxygen concentration changes are accompanied with the significant changes of the receptors for VEGF and PIGF expression^(11,12). Some investigators observe, that the physiological process of blastocyst implantation and the invasion of the trophoblast, as the pathological processes, connected with the tumour growth and the metastases, happens with the reduced oxygen pressure (in the condition of local hypoxia)^(13,14).

According to some authors, during the III trimester of pregnancy, when the placenta achieves the maturity, comes to the loss of the ability for answer to hypoxia in this organ, as the increase of the trophoblast invasiveness^(15,16).

OBJECTIVE

The aim of this study was the assessment of the hypoxia influence on the invasiveness of isolated cells of human trophoblast, cultured *in vitro*. The material of the full-term pregnancy was used, to verify the thesis, that the invasiveness of the trophoblast as the answer to hypoxia does not increase, during the III trimester of pregnancy.

MATERIAL AND METHODS

Placental samples, obtained in standardized manner, during the standard cesarean section (N=6; ophthalmic indications, orthopedic or pelvic lie of the fetus in primigravida), in period not longer than 5 minutes from the manual removal of placenta. All pregnancies concerned unigravidas, aged between 25 and 28 years, were unifoeal, full-term (medium age of pregnancy was 38 weeks and 4±7 days and run correctly). Patients, qualified to the placental samples obtaining, signed informed consent. From the mothers surface of each placenta, located about 2.5 to 5 cm from the central attachment of the umbilical cord on the opposite organs surface (fetal surface), 3 placental samples with total weight 10.0±0.5 g, which were the basis for the trophoblast culture. The especial care was taken with the elimination of the placental fields with evidently macroscopic morphology changed, for example: placental infarcts. The placental cell isolation was performed, using the Kliman et al's method⁽¹⁷⁾, according to Esterman et al's modification⁽¹⁸⁾. After the crumbling of the placental samples obtained, they were subjected to enzymatic digestion for 12 hours in the temperature of 4°C, diluted in 50 ml of solution, containing 0.125% of trypsin (Gibco, Merelbeke, Belgium), and 0.2% of deoxyribonuclease I (Sigma, St. Louis,

tem na prostym, mechanicznym „rozpychaniu się” naciekających komórek⁽⁸⁾. Jednym z najważniejszych parametrów regulujących proces miejscowego wytwarzania naczyń jest stężenie tlenu. Hipoksja pobudza wytwarzanie śródbłonkowego czynnika wzrostowego naczyń (VEGF) oraz moduluje, w sposób nie do końca zbadany, aktywność należącego do tej samej rodziny substancji łożyskowego czynnika wzrostowego (PIGF)^(9,10). Zmianom miejscowego stężenia tlenu towarzyszą istotne zmiany ekspresji receptorów dla VEGF i PIGF^(11,12). Część badaczy zauważa, że zarówno fizjologiczne procesy implantacji blastocysty i inwazji trofoblastu, jak i zjawiska patologiczne związane z szerzeniem się nowotworów złośliwych i powstawaniem przerzutów, dokonują się przy obniżonym ciśnieniu parcjalnym tlenu (w warunkach miejscowej hipoksji)^(13,14). Zdaniem niektórych autorów w III trymestrze ciąży, po osiągnięciu dojrzałości przez łożysko, dochodzi do utraty odpowiedzi na hipoksję w tym narządzie pod postacią zwiększenia inwazyjności trofoblastu^(15,16).

CEL PRACY

Celem niniejszej pracy była ocena wpływu hipoksji na inwazyjność izolowanych komórek ludzkiego trofoblastu w warunkach *in vitro*. Użyto materiału z ciąży donoszonej, aby zweryfikować tezę, że inwazyjność komórek trofoblastu w odpowiedzi na hipoksję nie zwiększa się w III trymestrze.

MATERIAŁ I METODY

Wycinki tkanek łożyskowych pobierano w standardowy sposób podczas elektywnych cięć cesarskich (N=6; wskazania okulistyczne, ortopedyczne lub miednicowe położenie płodu u pierwiastki) w czasie nie dłuższym niż 5 min. od wydobycia łożyska. Wszystkie ciąży były u pierwiastek w wieku 25-28 lat, były pojedyncze, donoszone (średni wiek ciążowy wynosił 38 tygodni i 4 dni ±7 dni) i przebiegały prawidłowo. Pacjentki zakwalifikowane do pobrania łożysk użytych w badaniu podpisały oświadczenie świadomej zgody (*informed consent*). Z powierzchni matczynej każdego łożyska znajdującej się w odległości 2,5 do 5 cm od miejsca centralnego przyczepu pępowiny na przeciwległej powierzchni narządu (powierzchnia płodowa) pobierano po 3 wycinki o łącznej masie średnio 10,0±0,5 g, które stanowiły podstawę do hodowli trofoblastu. Zwracano szczególną uwagę na wyeliminowanie obszarów łożyska o ewidentnie zmienionej makroskopowo morfologii, np. zawałów łożyskowych. Izolacji komórek trofoblastu dokonano, stosując metodę Klimana i wsp.⁽¹⁷⁾ w modyfikacji Estermana i wsp.⁽¹⁸⁾ Po rozdrobieniu pobrane tkanki łożyskowe poddawano przez 12 godzin w temperaturze 4°C delikatnemu trawieniu enzymatycznemu w 50 ml roztworu zawierającego 0,125% trypsyny (Gibco, Merelbeke, Belgia) i 0,02% dezoksyrybonukleazy I (Sigma, St. Louis,

MO, USA). During the next day (the second day of the experiment), the 5 mg of deoxyribonuclease I was added, and the mixture was incubated, shaking, for 15 minutes in the temperature of 37°C in the water baths. To suppress the enzymatic digestion, the 10 ml of DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) with low content of D-glucose (Gibco BRL, MD, USA) was added, with 20% supplement of thermally inactivated serum of the veal (Gibco). After the filtration through the three-layers of sterile surgical gauze, the obtained cell suspension was centrifuged (1200 rot./min., for 20 minutes in the room temperature) in 5-70% Percoll (Pharmacia, Piscataway, NJ, USA). The cell layers emerged between Percoll gradient 40-50% (density 1.048-1.062 g/ml) were collected. Afterwards, after the Percoll deletion through the multiple rinse, isolated trophoblast cells were suspended in Medium 199 (Sigma-Aldrich Co., USA), con-

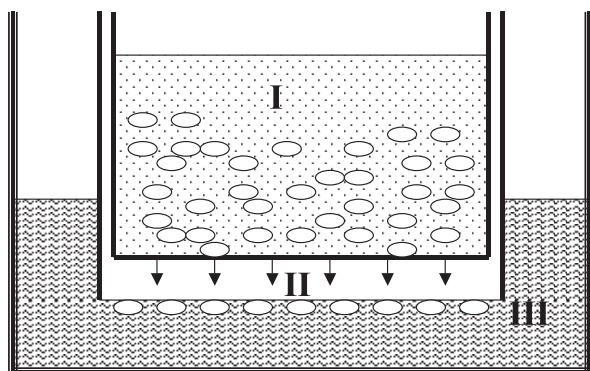


Fig. 1. The diagram for the trophoblast cell invasion examination (Cell Invasion Assay Kit – Chemicon International USA) set. The invasive cells pass through (arrows) from the non-serum base (I), through extra cellular matrix layer (II) proteins-coated polycarbonate membrane to the performing role of chemotactic factor, the 10% basis FBS (III)

Rys. 1. Schemat zestawu do badania inwazyjności komórek trofoblastu (Cell Invasion Assay Kit) firmy Chemicon International (USA). Inwazyjne komórki przechodzą (strzałki) z podłoża niezawierającego surowicy (I), poprzez warstwę białek macierzy pozakomórkowej (II), pokrywającą w postaci żelu błonę poliwęglanową, do pełniącego rolę czynnika chemotaktycznego 10% podłoża FBS (III)

Рис. 1. Схема набора для исследования инвазионности клеток трофобласта Сел Инвейжен Эсеи Кит фирмы Кемикон Интернейшнел (США). Инвазионные клетки проходят (стрелки) из основы, которая не содержит сыворотки (I), через слой белков внеклеточного ложа (II), покрывающего в виде геля поликарбонатную пленку, к исполняющему роль хемотактического фактора 10% основы ФБС (III)

MO, USA). Następnego dnia (drugi dzień eksperymentu) dodawano 5 mg dezoksyrybonukleazy I i mieszaninę inkubowano, wstrząsając, przez 15 min. w temperaturze 37°C w łaźni wodnej. W celu zahamowania trawienia enzymatycznego dodawano 10 ml pożywki DMEM (*Dulbecco's modified Eagle's medium*) o niskiej zawartości D-glukozy (Gibco BRL, MD, USA) z 20% dodatkiem inaktywowanej termicznie surowicy cielęcej (Gibco). Po filtracji przez trzy warstwy sterylnej gazy chirurgicznej uzyskaną zawiesinę komórek poddano frakcjonowanemu odwirowywaniu (1200 obr./min. przez 20 min. w temperaturze pokojowej) w Percollu (Pharmacia, Piscataway, NJ, USA) o stężeniach od 5 do 70%. Pozyskiwano warstwę komórek z przedziału stężeń 40-50% (o gęstości 1,048-1,062 g/ml). Następnie, po usunięciu Percollu za pomocą kilkakrotnego płukania, wyizolowane komórki trofoblastu zostały zawieszono w Medium 199 (Sigma-Aldrich Co., USA) zawierającym 15% płodowej surowicy wołowej (FBS, Sigma) i antybiotyki o szerokim spektrum działania (Gibco). Po tej czynności zawiesinę komórek filtrowano dwustopniowo przez nylonową gazę o średnicy porów 250 i 100 µm. Trofoblast hodowano w naczyniach (płytkach do hodowli komórkowych) o średnicy 50 mm, stosując wyjściowe stężenie w zawieszynie równe 2×10^5 komórek/ml. Barwienia immunofluorescencyjne z przeciwciałami antycytkeratynowymi (Sigma) wykazały, że w przygotowanych w powyższy sposób hodowlach komórki trofoblastu stanowią ponad 95% wszystkich komórek. Materiał uzyskany z każdego łożyska wykorzystano do utworzenia dwóch hodowli trofoblastu: inkubowanej w warunkach normoksji (grupa I; 5% CO₂, 20% O₂) oraz hodowanej w obecności 2% tlenu (grupa II; hipoksja). Hodowle w obu grupach prowadzono w temperaturze 37°C, zmieniając odżywki co 24 godziny i stale zachowując warunki normoksji bądź hipoksji.

W celu zbadania inwazyjności trofoblastu wykorzystano zestaw Cell Invasion Assay Kit firmy Chemicon International (USA). Składa się on z płytki do hodowli komórkowej zawierającej 12 studzienek, których dno stanowi przepuszczalna błona poliwęglanowa o średnicy porów 8 µm, powleczona od góry cienką warstwą roztworu substancji białkowych odpowiadających macierzy pozakomórkowej (ECM; ECMatrix™). Ta specjalna warstwa w postaci stałego żelu została wyizolowana z mysich tkanek nowotworowych (*Engelbreth Holm-Swarm mouse tumour*) i w opisywanym zestawie pełni rolę błony podstawnej. Cząsteczki ECM zamykają pory w błonie poliwęglanowej i blokują przechodzenie przez nią komórek nieinwazyjnych w kierunku czynnika chemotaktycznego (10% FBS) umieszczonego w dolnym naczyniu. Schemat zestawu Cell Invasion Assay Kit przedstawiono na rysunku 1. Użyto po 6 zestawów, odpowiednio do badań w warunkach normoksji (grupa I) i hipoksji (grupa II). Po ich przygotowaniu do każdej studzienki podawano 300 µl zawiesiny $1,0 \times 10^6$ komórek

taining 15% of the fetal bovine serum (FBS, Sigma), and antibiotics with the wide spectrum activity (Gibco). Next, the cell suspension was filtrated in the two steps through the nylon gauze pore diameter 250 and 100 μm . The trophoblast was cultured in laboratory vessels (shallows for the cell culture), in diameter 50 mm, using the concentration in the suspension 2×10^5 cells/ml at starting point. The immunofluorescent stain with anti-cytokeratin antibodies (Sigma), demonstrated, that in prepared in the above way cultures, the trophoblast cells compose over 95% of total cells. The material obtained from each placenta, was used to establish the two trophoblast cultures: normoxic (group I; 5% CO_2 , 20% O_2), and hypoxic (2% O_2 ; group II, hypoxia). Two cultures were performed in the temperature of 37°C, changing the nutrients every 24 hours and preserving the normoxic or hypoxic conditions.

To evaluate the invasiveness of the trophoblast, the Chemicon International (USA) Cell Invasion Assay Kit set was used. This is composed of the plate for the cellular culture, containing 12 manholes, which bottom is composed of the permeable polycarbonate membrane, with pore diameter 8 μm , with extra cellular matrix proteins-coated (ECM; ECMatrix™). This special layer in form of stable gel was isolated of the mouse neoplasm tissues (Engelbreth Holm-Swarm mouse tumour), and in the described set plays the role of the basement membrane. The ECM molecules close the pores in polycarbonate membrane and block the transit of non-invasive cells to the chemotactic factor (10% FBS) located in the low part of the vessel. The scheme of the Cell Invasion Assay Kitset is presented on the figure 1. In each group, 6 sets were used: accordingly for the studies in normoxic conditions (group I), and hypoxic (group II). After its preparation, into each manhole, the suspension of 300 μl 1.0×10^6 cells of the trophoblast in the nutrient without serum was located and incubated for 48 hours in the temperature of 37°C. Afterwards, using the cotton pads, from the center of each manhole, non-invasive cells and the ECM gel-layer were removed. The invasive cells on the bottom surface of the polycarbonate membrane were demonstrated by the 20 minutes immersion of the culture plate in the staining solution (haematoxylin). Next to the rinse and drying of the cells on the open air condition, using the light microscope, the picture bottom surface of the polycarbonate membrane was taken, and, using the morphometric software (Quantimet 500+C, Leica Cambridge Ltd., Cambridge, UK), the trophoblast cells were counted in calibrated view field on the stable surface: 138692 μm^2 (figure 2).

The medium numbers of the trophoblast cells in both groups were compared, using the graphic forms as the difference in percentage. The value of 100% was accepted for group I, cultured in normoxic conditions. The statistical significance was evaluated using the t-Student's test. A p value < 0.05 was considered significant.

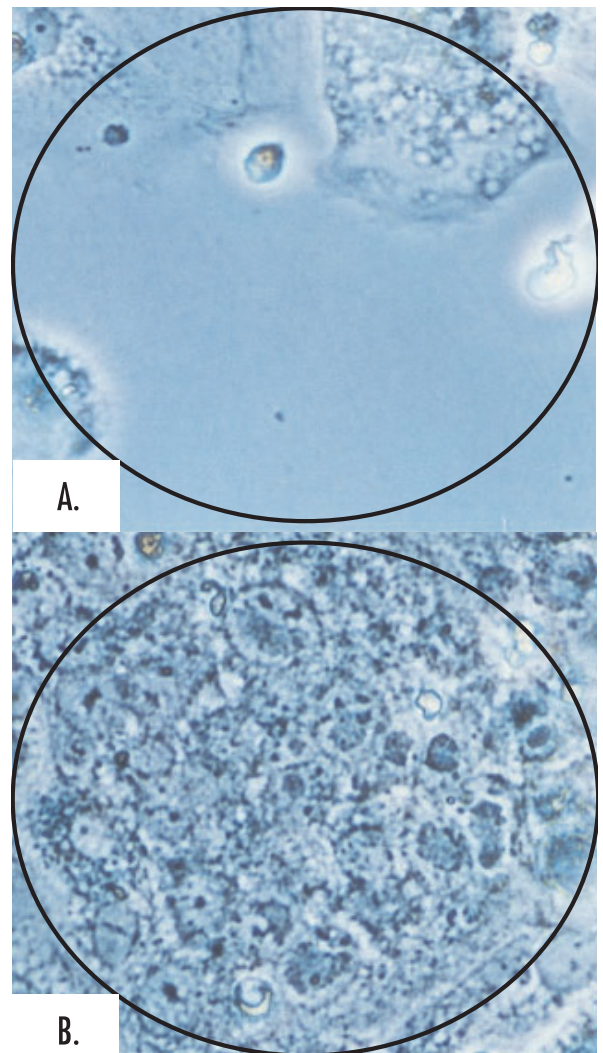


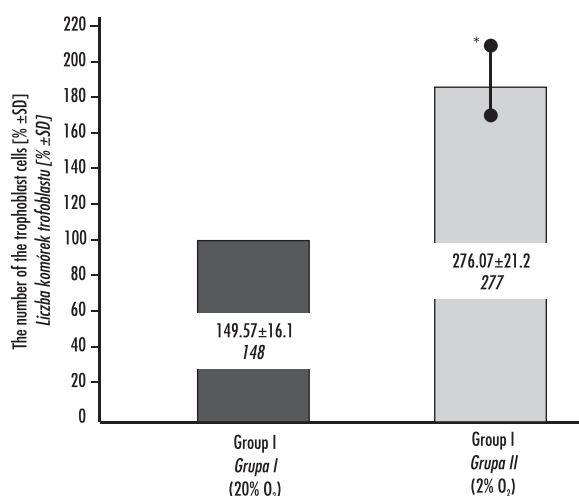
Fig. 2. Invasion of the trophoblast cells – computer generated with morphometric software picture (enlargement 320x) of the bottom surface of polycarbonate membrane of Cell Invasion Assay Kit set. The area inside the circle corresponds with calibrated surface of the trophoblast cells counting by morphometric programme (A – group I; B – group II)

Rys 2. Inwazja komórek trofoblastu – generowany komputerowo obraz z mikroskopu świetlnego (pow. 320x) dolnej powierzchni błony poliwęglanowej zestawu Cell Invasion Assay Kit. Pole we wnętrzu okręgu odpowiada kalibrowanej powierzchni zliczania komórek trofoblastu przez program morfometryczny (A – grupa I; B – grupa II)

Рис. 2. Инвазия клеток трофобласта – генерированная при помощи компьютера картина из светового микроскопа (увеличение 320 раз) нижней поверхности поликарбонатной пленки набора Сел Инвейжен Эсеи Кит. Поле внутри круга соответствует калиброванной поверхности подсчитывания клеток трофобласта при помощи морфометрической программы (А – группа I; Б – группа II)

RESULTS

The statistically significant growth of the trophoblast cultured in hypoxic condition *in vitro*, compared to the culture in normoxic condition was affirmed. The mean number of the trophoblast cells identified on the bottom surface of the polycarbonate membrane of the Cell Invasion Assay Kit set, in the group II constituted $184.57 \pm 19\% \pm SD$ of the medium number of the cells,



* Znamienność statystyczna $p < 0,05$

Fig. 3. Invasiveness of the trophoblast in the culture *in vitro* in normoxic (group I) and hypoxic conditions (group II). Based on the number of the counted cells at the bottom surface of the polycarbonate membrane of the Cell Invasion Assay Kit set. The values are expressed in % $\pm SD$; 100% was admitted for the group I. On the diagram columns, the mean number of trophoblast cells, identified in visual area in each group and median (italics) is illustrated

Rys 3. Inwazyjność trofoblastu z hodowli *in vitro* w warunkach normoksji (grupa I) oraz hipoksji (grupa II). Na podstawie liczby komórek zliczonych na dolnej powierzchni błony poliwęglanowej zestawu Cell Invasion Assay Kit. Wartości wyrażone w % $\pm SD$; 100% przyjęto dla grupy I. Na kolumnach wykresu podano także średnią liczbę komórek trofoblastu zidentyfikowanych w polu widzenia w danej grupie oraz medianę (kursywa)

Рис. 3. Инвазионность трофобласта из культивации *in vitro* в условиях нормоксии (группа I) и гипоксии (группа II). На основании количества клеток подсчитанных в нижней поверхности поликарбонатной пленки набора Сел Инвейжен Эсеи Кит. Величины указаны в % $\pm SD$; 100% принято для первой группы. На колоннах схемы указано также среднее количество клеток трофобласта идентифицированных в поле зрения в данной группе и среднее количество (курсивом)

trofoblastu w odżywe nie zawierającej surowicy i inkubowano ją przez 48 godzin w temperaturze 37°C. Następnie za pomocą bawełnianych wacików z wnętrza każdej studzienki usuwano nieinwazyjne komórki i warstwę żelu ECM. Komórki inwazyjne na dolnej powierzchni błony poliwęglanowej uwidaczano poprzez 20-minutowe zanurzenie płytki hodowlanej w roztworze barwiącym (hematoksylina). Po opłukaniu i wysuszeniu płytek na wolnym powietrzu, fotografowano w mikroskopie świetlnym dolną powierzchnię błony poliwęglanowej i za pomocą komputerowego programu morfometrycznego (Quantimet 500+C, Leica Cambridge Ltd., Cambridge, UK) liczono komórki trofoblastu w skalibrowanym polu widzenia o stałej powierzchni wynoszącej 138692 μm^2 (rys. 2). Porównywano średnie liczby komórek trofoblastu w obu grupach, przedstawiając je w formie graficznej jako różnice procentowe, przy czym wartość 100% przyjęto dla grupy I (hodowanej w warunkach normoksji). Istotność różnic badano testem t-Studenta, przyjmując, że dla $p < 0,05$ są one statystycznie znamienne.

WYNIKI

Stwierdzono istotny statystycznie wzrost inwazyjności trofoblastu hodowanego *in vitro* w warunkach obniżonego ciśnienia parcjalnego tlenu w porównaniu z hodowlą w warunkach normoksji. Średnia liczba komórek trofoblastu zidentyfikowanych na dolnej powierzchni błony poliwęglanowej zestawu Cell Invasion Assay Kit stanowiła w grupie II $184,57 \pm 19\% \pm SD$ średniej liczby komórek zliczonych w grupie I. Różnice te są istotne statystycznie ($p < 0,05$). Powyższe wyniki przedstawiono na rysunku 3, podając oprócz wartości odsetkowych także średnie liczby komórek i mediany w obu grupach.

DYSKUSJA

Fenotyp komórek zdeterminowany jest działaniem czynników genetycznych i mikrośrodowiskowych⁽¹³⁾. Spośród tych ostatnich stężenie tlenu wpływa w dużym stopniu na właściwości trofoblastu. Canning i wsp. wykazali, że hipoksja doprowadza do wzrostu aktywności (stężenia) tzw. metaloproteinaz macierzy zewnątrzkomórkowej (matrix metalloproteinases, MMPs) i w ten sposób, naruszając stan równowagi dynamicznej pomiędzy miejscowym stężeniem MMPs a stężeniem ich inhibitorów tkankowych, zwiększa inwazyjność trofoblastu⁽¹⁹⁾. Naciekanie macierzy zewnątrzkomórkowej przez komórki trofoblastu o różnym stopniu inwazyjności stwierdza się w ciąży fizjologicznej oraz powikłanej. Miejscowej hipoksji przypisuje się działanie korzystne (zwiększające inwazyjność komórek) w procesach implantacji blastocysty i wytwarzania łożyska. Wiadomo jednak, że w niektórych stanach patologicznych w odpowiedzi na hipoksję dochodzi do wzrostu miejscowego wytwarzania czynnika martwicy nowotworów alfa (TNF- α), który

counted in the group I. Differences are statistically significant ($p < 0.05$). The above results are presented on figure 3, where, apart from the percentage values, also the mean number of the cells and medians in both groups are shown.

DISCUSSION

The phenotype of the cell is determined by the genetic and microenvironmental factors⁽¹³⁾. Among these last, the oxygen concentration has important influence on the trophoblast properties. Canning et al. demonstrated, that hypoxia leads to the growth of the activity (concentration), called as metalloproteinases of the extra cellular matrix (matrix metalloproteinases, MMPs), and, in this way, upsetting the balance between the local concentration of the MMPs, and the tissue inhibitors concentration, increases the invasiveness of the trophoblast⁽¹⁹⁾. The infiltration of the extra cellular matrix through the trophoblast cells with different level of invasiveness is affirmed in physiological and complicated pregnancy. To the local hypoxia, the favorable action (increasing the invasiveness of the trophoblast) in the process of the blastocyst implantation and the production of placenta, is attributed. It is a well-known fact, that in some pathological conditions, the increase of local production of the tumour necrosis factor alpha (TNF- α) takes place, which inhibits the invasion of the extrachorionic villus trophoblast cells within the limits of the spiral uterine arteries. The above mentioned fact, according to some authors, presents the fundamental element in the pathomechanism of the pre-eclampsia and eclampsia state^(2,6). Moreover, the other investigators suggest, that the basis for pre-eclampsia and eclampsia state may be also the hypo invasiveness of the trophoblast, among others, as the result of the incorrectly increased local oxygen concentration, during the time of implantation, the consequence is not total infiltration of the spiral uterine arteries. The reason may be disorder of ability of the cytotrophoblast cells to the adhesive molecules expression, unnecessary for the proper spiral arteries reconstruction, what was demonstrated in relation to vitronectin and fibronectin Lash et al.⁽²⁰⁾ Similarly, studying the placental development, pathomechanism in pregnancy complicated with intrauterine fetal growth retardation (IUGR), Khaliq et al. suggest, that the beginning reason, paradoxically, may be hyperoxia, which, through the local inhibition of the trophoblast invasiveness and the local angiogenesis, leads to the chronic fetal anoxaemia⁽²¹⁾. Kingdom and Kaufmann agree with the above thesis partly, considering the existence of the possibility of the two types of the placental vascularization disorders (two vascular phenotypes) in IUGR: first, more popular, developing on the basis of hypoxia, and the second, infrequent, connected with the local hyperoxia⁽²²⁾. In this study, essential is to demonstrate, that the iso-

hamuje inwazję trofoblastu pozakosmkowego w obrębie macicznych tętnic spiralnych. To, zdaniem niektórych autorów, stanowi zasadniczy element w patomechanizmie rozwoju stanu przedrzucawkowego/rzucawki^(2,6). Co więcej, inni badacze sugerują, że podłożem stanu przedrzucawkowego i rzucawki może być również zmniejszona inwazyjność trofoblastu, m.in. wskutek nieprawidłowo podwyższonego miejscowego stężenia tlenu podczas implantacji, co skutkuje niecałkowitym naciekaniami macicznych tętnic spiralnych. Przyczyną może tu być zaburzenie zdolności komórek cytotrofoblastu do ekspresji cząsteczek adhezyjnych niezbędnych do prawidłowej przebudowy tętnic spiralnych, co wykazali w odniesieniu do witronektyny i fibronektyny Lash i wsp.⁽²⁰⁾ Analogicznie, badając patomechanizm rozwoju łożyska w ciąży powikłanej wewnątrzmacicznym opóźnieniem wzrostu płodu (IUGR), Khaliq i wsp. sugerują, że przyczyną wyjściową może paradoksalnie być hiperoksja, którą, hamując inwazyjność trofoblastu oraz miejscową angiogenezę, doprowadza do przewlekłego niedotlenienia płodu⁽²¹⁾. Kingdom i Kaufmann tylko częściowo zgadzają się z powyższym, uważając, że istnieje możliwość występowania dwóch typów zaburzeń unaczynienia (dwóch fenotypów naczyniowych) łożyska w IUGR: pierwszy, stwierdzany częściej – rozwijający się na podłożu hipoksji; drugi, rzadszy – związany z miejscową hiperoksją⁽²²⁾. Istotne jest wykazanie w niniejszym badaniu, że izolowane komórki trofoblastu pochodzącego z ciąży donoszonej reagują na hipoksję w sposób zbliżony do tego, jaki opisuje się, charakteryzując trofoblast pochodzący z I trymestru. Należy zatem podejrzewać, że w warunkach ustrojowych za „starzenie się” łożyska w zakresie natężenia odpowiedzi wywołanej hipoksją odpowiadają głównie zmiany ekspresji receptorów i mikrośrodowiska tkankowego (m.in. zmiany stężeń czynników wzrostowych, chemotaktycznych i wywołujących apoptozę)^(23,24).

WNIOSKI

1. Hipoksja doprowadza do wzrostu inwazyjności izolowanych komórek ludzkiego trofoblastu w hodowli *in vitro*.
2. Komórki trofoblastu izolowane z łożysk w ciąży donoszonej mają zachowaną zdolność odpowiedzi na hipoksję pod postacią zwiększenia inwazyjności.

BIBLIOGRAPHY: PIŚMIENNICTWO:

1. Huppertz B.: Extravillous trophoblast: proliferation and invasion during pregnancy. *Pathologica* 2003; 95: 231-232.
2. Lala P.K., Chakraborty C.: Factors regulating trophoblast migration and invasiveness: possible derangements contributing to pre-eclampsia and fetal injury. *Placenta* 2003; 24: 575-587.

lated human trophoblast cells, originated from the full-term pregnancy respond to hypoxia, in manner, close to described characteristic of the I trimester trophoblast. Therefore, is to be suspected, that in the organism's condition, the receptors expression and the tissue microenvironment changes (among others, the concentration of growth, chaemotactic and apoptic factors changes), are responsible for the placental aging in range of the intensity of answer to hypoxia^(23,24).

CONCLUSIONS

1. Hypoxia leads to the growth of invasiveness of isolated human trophoblast cells, cultured *in vitro*.
2. The trophoblast cells, isolated of the full-term pregnancy placenta, have the ability to answer to hypoxia as the more invasive form.

-
3. Corvinus F.M., Fitzgerald J.S., Fridrich K., Markert U.R.: Evidence for a correlation between trophoblast invasiveness and STAT3 activity. *Am. J. Reprod. Immunol.* 2003; 50: 316-321.
 4. Fitzpatrick T.E., Lash G.E., Yanaihara A. i wsp.: Inhibition of breast carcinoma and trophoblast cell invasiveness by vascular endothelial growth factor. *Exp. Cell. Res.* 2003; 283: 247-255.
 5. Hohn H.P., Denker H.W.: Experimental modulation of cell-cell adhesion, invasiveness and differentiation in trophoblast cells. *Cells Tissues Organs* 2002; 172: 218-236.
 6. Conrad K.P., Benyo D.F.: Placental cytokines and the pathogenesis of preeclampsia. *Am. J. Reprod. Immunol.* 1997; 37: 240-249.
 7. Patan S.: Vasculogenesis and angiogenesis. *Cancer Treat. Res.* 2004; 117: 3-32.
 8. Ino K., Kikkawa F., Suzuki T. i wsp.: Expression of placental leucine aminopeptidase and adipocyte-derived leucine aminopeptidase in human normal and malignant invasive trophoblastic cells. *Lab. Invest.* 2003; 83: 1799-1809.
 9. Torry D.S., Hinrichs M., Torry R.J.: Determinants of placental vascularity. *Am. J. Reprod. Immunol.* 2004; 51: 257-268.
 10. Zygmunt M., Herr F., Munstedt K. i wsp.: Angiogenesis and vasculogenesis in pregnancy. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* 2003; 110 (supl. 1.): S10-18.
 11. Regnault T.L., de Vrijer B., Galan H.L. i wsp.: The relationship between transplacental O₂ diffusion and placental

- expression of PlGF, VEGF and their receptors in a placental insufficiency model of fetal growth restriction. *J. Physiol.* 2003; 550: 641-656.
12. Ahmed A., Dunk C., Ahmad S., Khaliq A.: Regulation of placental vascular endothelial growth factor (VEGF) and placenta growth factor (PlGF) and soluble Flt-1 by oxygen – a review. *Placenta* 2000; 21 (supl. A): S16-24.
 13. Lash G.E., Postovit L.M., Matthews N.E. i wsp.: Oxygen as a regulator of cellular phenotypes in pregnancy and cancer. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 2002; 80: 103-109.
 14. Fukumura D., Xu L., Chen Y. i wsp.: Hypoxia and acidosis independently up-regulate vascular endothelial growth factor transcription in brain tumors in vivo. *Cancer Res.* 2001; 61: 6020-6024.
 15. Poston L., Raijmakers M.T.: Trophoblast oxidative stress, antioxidants and pregnancy outcome – a review. *Placenta* 2004; 25 (supl. A): 72-78.
 16. Graham C.H., Burton G.J.: Oxygen and trophoblast behaviour – a workshop report. *Placenta* 2004; 25 (supl A): 90-92.
 17. 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.
 18. Esterman A.L., Rosenberg C., Brown T., Dancis J.: The effect of zidovudine and 2'3'-dideoxyinsine on human trophoblast in culture. *Pharmacol. Toxicol.* 1995; 76: 89-92.
 19. Canning M.T., Postovit L.M., Clarke S.H., Graham C.H.: Oxygen-mediated regulation of gelatinase and tissue inhibitor of metalloproteinases-1 expression by invasive cells. *Exp. Cell. Res.* 2001; 267: 88-94.
 20. Lash G.E., Fitzpatrick T.E., Graham C.H.: Effect of hypoxia on cellular adhesion to vitronectin and fibronectin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2001; 287: 622-629.
 21. Khaliq A., Dunk C., Jiang J. i wsp.: Hypoxia down-regulates placenta growth factor whereas fetal growth restriction up-regulates placenta growth factor expression: molecular evidence for "placental hyperoxia" in intrauterine growth restriction. *Lab. Invest.* 1999; 79: 151-170.
 22. Kingdom J.C., Kaufmann P.: Oxygen and placental vascular development. *Adv. Exp. Med. Biol.* 1999; 474: 259-275.
 23. Ishihara N., Matsuo H., Murakoshi H. i wsp.: Changes in proliferative potential, apoptosis and Bcl-2 protein expression in cytotrophoblasts and syncytiotrophoblast in human placenta over the course of pregnancy. *Endocr. J.* 2000; 47: 317-327.
 24. Morrish D.W., Dakour J., Li H.: Life and death in the placenta: new peptides and genes regulating human syncytiotrophoblast and extravillous cytotrophoblast lineage formation and renewal. *Curr. Protein Pept. Sci.* 2001; 2: 245-259.