

Abstract

Ancheva I. A. *,
Odessa National Medical
University,
2 Valikhovsky Alley, Odessa, 65082,
Ukraine

STUDY OF ENOS GENE EXPRESSION IN PLACENTAL TISSUE DURING IRON DEFICIENCY ANEMIA

Introduction. One of the most urgent problems of modern obstetrics is the occurrence of iron deficiency in pregnant women. The experts assess its prevalence in 20–30 % of cases in economically developed countries and 50–80 % – in developing countries. In Ukraine in the recent years, the incidence of iron deficiency anemia during pregnancy increased from 15.0 to 22.6 %. The interest of researchers to the problem of IDA due to the fact that in this pathological condition incidence of preeclampsia, preterm labor, polyhydramnios, premature rupture of membranes, weakness of labor forces and other pregnancy complications significantly increased. According to experts, the increase in the amount of blood loss during labor is in 10 % of pregnant women with IDA. This population of pregnant women has also postpartum septic complications and hypogalactia. Iron deficiency significantly worsens overall condition of mother and fetus.

Our aim was to evaluate the gene expression of eNOS in placental tissue of the pregnant women with iron deficiency anemia.

Material and Methods. Research performed at the maternity hospital № 2 (Odessa), Genetic Laboratories "Nadiaya" and pathomorphological department of State Institution "IPOG NAMSU" (Head, Professor, MD Zadorozhna TD, Kyiv). The study involved 100 women in labor; we took placenta samples from them. Thus, the following clinical groups were designed: group 1 – the placenta samples of women with physiological pregnancy and childbirth (n = 20), group 2 – the placenta samples of pregnant women with a history of anemia (n = 40), group 3 – the placenta of women with placental dysfunction and a history of anemia (n = 40). In addition to the general clinical research methods, we used current clinical protocol approved by the order № 782 dated 29.12.2005 "On approval of clinical protocols for obstetric and gynecological care", further research was conducted analysis of immunohistochemical expression of endothelial nitric synthase (eNOS) in placental tissue. Age of pregnant women ranged from 20 to 35 years (28.5 ± 2.8 years).

Discussion. As a result the level of eNOS gene expression increased by 1.4 folds in patients with IDA, while the combination of IDA and placental dysfunction eNOS gene expression level reduced by 10 folds. We discuss the adaptive nature of changes in eNOS gene expression in iron deficiency amongst pregnant women. There were compared genetic and phenotypic characteristics of the enzyme activity of endothelial nitric oxide synthase in decidual tissue. When comparing detected changes of eNOS gene expression with the phenotypic manifestations we found that the expression of endothelial nitric oxide synthase in patients with dysfunction of the placenta in the cytoplasm syncytia villi

and fetal capillary endothelium and vascular decidua reduced, and the presence of a combination of placental dysfunction and iron deficiency anemia occurred with the paradoxical increase expression of the enzyme. Thus, inhibition of *eNOS* gene expression is a reflection of the exhaustion of the adaptive capacity of the organism. This circumstance suggests that routine administration of nitric oxide precursor (L-arginine medication) in women with gestational endoteliopatiyi manifestations may not give the desired effect due to the presence of a genetically determined deficiency of endothelial nitric oxide synthase and its products. Besides, when isolated iron deficiency anemia occurs than changes in *eNOS* gene expression is less evident.

Key words: iron deficiency anemia, pregnancy, nitric oxide synthase, genetics.

Corresponding author: * irina.an-va@rambler.ru

Резюме

Анчева І. А. *,
Одеський національний медичний
університет,
пров. Валіховський, 2, Одеса,
65082, Україна

ВИВЧЕННЯ РІВНЯ ЕКСПРЕСІЇ ГЕНА *eNOS* У ПЛАЦЕНТАРНІЙ ТКАНИНІ ПРИ ЗАЛІЗОДЕФІЦИТНІЙ АНЕМІЇ

Метою дослідження була оцінка експресії гена *eNOS* у плацентарній тканині при залізодефіцитній анемії. Показано, що у пацієток із ЗДА рівень експресії гена *eNOS* більший в 1,4 раза, ніж у здорових вагітних, а при поєднанні ЗДА та дисфункції плаценти рівень експресії гена *eNOS* менший у 10 разів, ніж у здорових вагітних. Обговорюється адаптивний характер змін експресії гена *eNOS* при залізодефіциті у вагітних. Проведене зіставлення генетичних та фенотипічних характеристик активності ферменту ендотеліальної нітроксидази у децидуальній тканині.

Ключові слова: залізодефіцитна анемія, вагітність, нітроксидаза, генетика.

Резюме

Анчева І. А. *,
Одеський національний
медичний університет,
переулок Валіховський, 2, Одеса,
65082, Україна

ИЗУЧЕНИЕ УРОВНЯ ЭКСПРЕССИИ ГЕНА *eNOS* В ПЛАЦЕНТАРНОЙ ТКАНИ ПРИ ЖЕЛЕЗОДЕФИЦИТНОЙ АНЕМИИ

Целью исследования была оценка экспрессии гена *eNOS* в плацентарной ткани при железодефицитной анемии. Показано, что у пациенток с ЖДА уровень экспрессии гена *eNOS* больше в 1,4 раза, чем у здоровых беременных, а при сочетании ЖДА и дисфункции плаценты уровень экспрессии гена *eNOS* меньше в 10 раз, чем у здоровых беременных. Обсуждается адаптивный характер изменений экспрессии гена *eNOS* при железодефиците у беременных. Проведено сопоставление генетических и фенотипических характеристик активности фермента эндотелиальной нитроксидазы в децидуальной ткани.

Ключевые слова: железодефицитная анемия, беременность, нитроксидаза, генетика.

Автор, відповідальний за листування: * irina.an-va@rambler.ru

Вступ

Однією з найбільш актуальних проблем сучасного акушерства є виникнення у вагітних

залізодефіцитних станів, що спостерігається, за оцінкою експертів, у 20–30 % випадків в економічно розвинених країнах світу та 50–80 %

– у країнах, що розвиваються [1, 2]. В Україні останніми роками спостерігається зростання частоти залізодефіцитної анемії (ЗДА) при вагітності з 15,0 до 22,6 % [3].

Інтерес науковців до проблеми ЗДА обумовлений тим, що при даному патологічному стані значно зростає частота гестозу, передчасних пологів, багатоводдя, передчасного вилиття навколоплідних вод, слабкості родових сил та інших ускладнень вагітності. За даними експертів, підвищення обсягів крововтрати при пологах визначається у 10 % вагітних із ЗДА. Частими у цього контингенту вагітних є також післяпологові септичні ускладнення та гіпогалактія [4]. При ЗДА значно погіршується загальний стан матері та плода [5].

Дисрегуляторні зміни, обумовлені порушенням функціонування нитрегергічних систем організму вагітної, є причиною формування ендотеліальної дисфункції та асоційованих із нею патологічних станів. Для підтримання стабільної рівноваги гемодинамічного забезпечення вагітності та оптимальних умов для транскapілярного обміну в мікроциркуляторному руслі необхідні певний рівень перфузійного і гідростатичного тиску в судинах, безперервність кровотоку, відсутність пошкоджень судинної стінки. Зрештою, гестаційна ендотеліопатія є одним з основних моментів патогенезу таких перинатальних патологій: прееклампсії, плацентарної дисфункції, передчасні пологів, внутрішньоутробного страждання плода, затримки внутрішньоутробного росту плода, внутрішньоутробної загибелі плода та інших [6].

Механізм порушення медіації нитрегергічної системи організму вагітної при ЗДА є такими. Гіпоксія, що виникає при ЗДА, впливає на активність гуанілатциклази, яка є акцептором кисню й, водночас, тісно залежить від продукції оксиду азоту (NO) з L-аргініну. Зважаючи на переважну локалізацію eNOS-позитивних ділянок у клітинах синцитіотрофобласта, ворсинок та децидуальної оболонки, стан експресії цього ферменту у плацентарній тканині є визначальним при реалізації негативного впливу хронічної гіпоксії [7, 8]. З іншого боку, фенотипічні прояви цілком залежать від експресії гена eNOS, яка включає транскрипцію – синтез РНК за участі ферменту РНК-полімерази; трансляцію – синтез білка

(ендотеліальної нітроксидсинтази) на матричній рибонуклеїновій кислоті, який відбувається у рибосомах, та посттрансляційну модифікацію білків.

Ген eNOS знаходиться у 7-й (7q35-36) хромосомі (рис. 1) та складається із 26 екзонів [9]. З огляду на важливість ендотеліальної нітроксидсинтази для нормального функціонування фетоплацентарного комплексу дослідження особливостей експресії гена eNOS у плацентарній тканині становить значний науковий інтерес [10, 11]. Проте до цього часу подібні дослідження у породіль, які впродовж вагітності страждали на залізодефіцитну анемію, не проводилися.

Метою дослідження була оцінка експресії гена eNOS у плацентарній тканині при залізодефіцитній анемії.

Матеріали і методи

Дослідження виконане на базі пологового будинку № 2 (м. Одеса), генетичної лабораторії клініки «Надія» та патоморфологічного відділення ДУ «ПАГ НАМНУ» (завідувач професор, д-р мед. наук Задорожна Т. Д., м. Київ).

Обстежено 100 породіль, від яких були одержані зразки плаценти. При цьому були виділені такі клінічні групи:

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

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

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

Поряд із загальноклінічними методами дослідження, регламентованими чинним клінічним протоколом, затвердженим Наказом МОЗ України № 782 від 29.12.2005 «Про затвердження клінічних протоколів з акушерської та гінекологічної допомоги» [11], додатково було проведено імуногістохімічне дослідження експресії ендотеліальної нітроксидсинтази (eNOS) у плацентарній тканині. Вік вагітних коливався від 20 до 35 років (у середньому $28,5 \pm 2,8$ року).

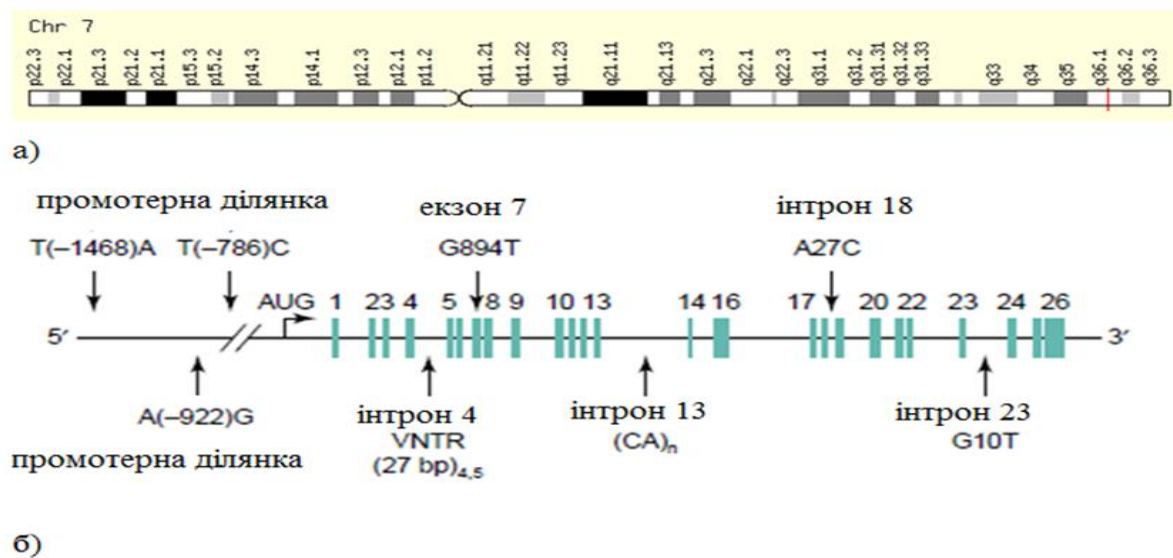


Рис. 1. Локалізація гена eNOS (а) і його структура (б)

Критеріями виключення були: багатоплідність, прееклампсія, тяжка екстрагенітальна патологія пацієнток (цукровий діабет, системні захворювання серцево-судинної, дихальної і травної систем), природжені та спадкові захворювання плода, відмова участі у дослідженні.

Визначення показників феритину та трансферину проводили імуноферментним методом із використанням комерційних тест-систем («Алкор-Біо», «Вектор-Бест», Росія). Рівень сироваткового заліза визначали колориметричним методом із бетафенантроліном із використанням реактивів фірми «Lachema» (Чехія).

Шматочки плацент фіксували у 10 % розчині нейтрального формаліну і після звичайного проведення заливали в парафін. У подальшому, фіксовані у формаліні мікропрепарати зразків плацентарної тканини підлягали витримуванню у 10 мМ цитратного буфера при рН 6,0 упродовж 10–20 хвилин, після чого препарати витримували при кімнатній температурі впродовж 20 хвилин. Як контрольні зразки використовували ендотелій капілярів [11].

Рівень експресії eNOS досліджували за допомогою імуногістохімічного методу. Були використані поліклональні антитіла (135 кДа) виробництва Thermo Scientific (Велика Британія) у розведенні 1:100. Реакція візуалізувалася за допомогою набору UltraVision LP Detection System HRP Polymer & DAB Plus Chromogen (Thermo scientific).

Мікропрепарати вивчали під мікроскопом "Olympus BX-51" з подальшою обробкою програмою "Olympus DP-soft v.3.2".

Виділення РНК проводили на базі клініки репродуктивної медицини «Надія» зі зразків біоптату плаценти породіль із метою дослідження експресії генів HIF1A (OMIM 603348), eNOS (OMIM 163729), VAGFA (OMIM 192240) та PIGF (OMIM 600153).

Виділення РНК проводили з використанням набору QIAamp RNA Blood Mini Kit (Qiagen, Німеччина, кат. № 52304) відповідно до протоколу виробника для виділення нуклеїнових кислот із фрагментів тканин. Для цього за рекомендацією виробника проводилися такі дії:

- відмивання біоматеріалу від RNeasy Lysis Solution;
- розтирання шматочків тканини у рідкому азоті;
- гомогенізація розтертих фрагментів за допомогою центрифугальних колонок QIAshredder (Qiagen, Німеччина) у лізувальному буфері;
- преципітація еквівалентним об'ємом 70 % етанолу;
- сорбція РНК на центрифугальних колонках QIAamp spin column (Qiagen, Німеччина) з подальшим трикратним відмиванням та просушуванням колонок;

– елюція РНК за допомогою вільної від рибонуклеаз води для молекулярних досліджень.

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

Отриману РНК зберігали при температурі $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ та використовувалася для проведення зворотної транскрипції.

Зворотну транскрипцію проводили з використанням набору High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, USA, Cat# 4368814) відповідно до рекомендацій виробника. Реакційна суміш для проведення зворотної транскрипції містила (з розрахунку на 1 зразок): 2 мкл 10x буфера для зворотної транскрипції, 0,8 мкл 25x суміші dNTP (по 100 мМ кожного), 2 мкл 10x суміші розсіяних (випадкових) праймерів, 1 мкл зворотної транскриптази MultiScribe™, 4,2 мкл вільної від нуклеаз води для проведення ПЛР та 10 мкл виділеної РНК. Зворотна транскрипція проводилася з використанням ампліфікатора Applied Biosystems® 2720 Thermal Cycler (Applied Biosystems, USA) за таких температурних умов: 1) $10'\text{@}25\text{C}$; 2) $120'\text{@}37\text{C}$; 3) $5''\text{@}85\text{C}$; 4) $4\text{C@}\infty$. Отримана кДНК зберігалася при температурі $4\text{--}8\text{ }^{\circ}\text{C}$ та використовувалася для оцінки експресії генів.

Оцінку експресії генів здійснювали з використанням пресинтезованих TaqMan® Gene Expression Assay (Applied Biosystems, USA) методом відносної експресії. Використовували тест-систему eNOS (OMIM 163729): Cat#4453320 – Hs01574659_m1 як внутрішній контрольний ген – GAPDH (OMIM 138400) – внутрішній контрольний ген: Cat# 4331182 – Hs99999905_m1.

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

Реакційна суміш містила: 1,0 мкл 20x TaqMan® Gene Expression Assay, 10 мкл 10x TaqMan® Gene Expression Master Mix, 6 мкл вільної від рибонуклеаз води для ПЛР та 3 мкл кДНК, отриманої на попередньому етапі. Ампліфікація та детекція проводилися з

використанням ПЛР-системи у реальному часі 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems, США, кат. № 4351105) із програмним забезпеченням SDS 2,0,5 за таких температурних умов: 1) $2'\text{@}50\text{C}$; 2) $10'\text{@}95\text{C}$; 3) 60x ($15''\text{@}95\text{C}$, $1'\text{@}60\text{C}$). Зчитували дані приладом на останньому етапі кожного циклу. Аналіз результатів здійснювали у ручному режимі за методом за $\Delta\Delta\text{Ct}$ (дельта-дельта Ct).

Статистичну обробку одержаних даних проводили за допомогою програмного середовища R (R Foundation, США) [12].

Результати та їх обговорення

Клінічна картина у групах дослідження була подібною. Середній вік пацієток I, II та III групи становив ($28,2 \pm 4,5$); ($31,2 \pm 6,8$) й ($27,2 \pm 1,8$) року відповідно ($p > 0,05$). У більшості випадків вагітність була першою, а перинатальні результати – цілком задовільними. Втім, у ($20,0\%$) пацієток III групи гестаційний період ускладнився маловоддям, у 3 ($7,5\%$) – низькою плацентацією. Пацієнтки народжували при доношених термінах вагітності, з яких 11 ($27,5\%$) – шляхом операції кесарева розтину. У 9 ($22,5\%$) породіль показанням до операції був дистрес плода у I періоді пологів. Новонароджені після операції кесарева розтину за загальним станом відповідали оцінці за шкалою Апгар 7–7 балів, решта новонароджених мали кращий загальний стан – 8–8 балів за шкалою Апгар.

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

При аналізі експресії гена eNOS були визначені певні відмінності між групами (рис. 2) у вигляді зростання показника в 1,4 раза ($\text{ВШ} = 1,4$ ДІ95 % 1,1–1,8) відносно контролю у II клінічній групі та різкого зниження (у 10 разів – $\text{ВШ} = 10,0$ ДІ95 % 8,8–11,2) порівняно з контролем у III клінічній групі.

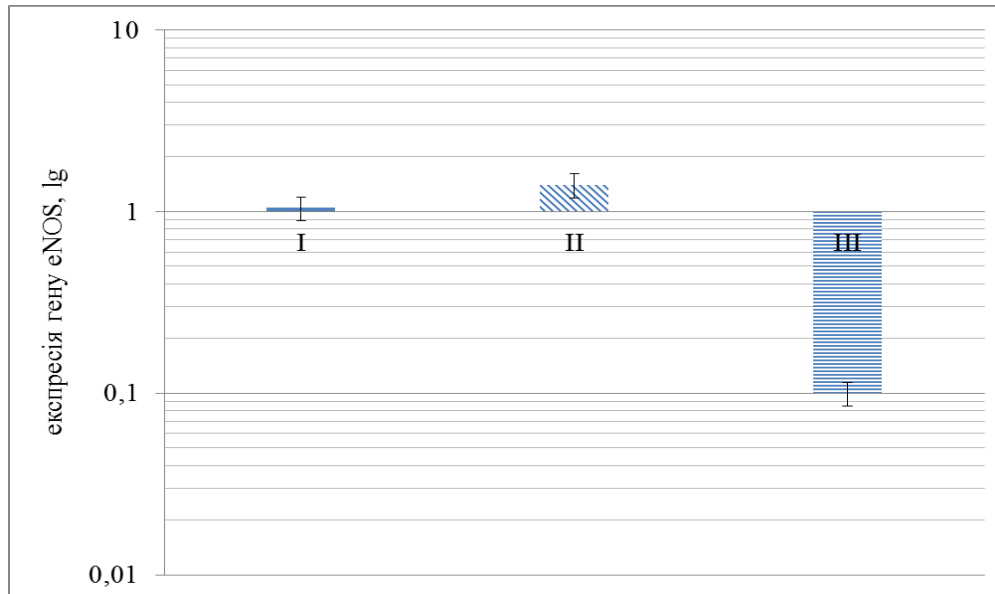


Рис. 2. Експресія гену eNOS у обстежених жінок

При зіставленні виявлених змін експресії гену eNOS із фенотипічними проявами ми встановили, що експресія ендотеліальної нітроксидсинтази у пацієток із дисфункцією плаценти в цитоплазмі синцитію ворсинок і ендотелію фетальних капілярів, а також судин децидуальної оболонки зменшується, а за наявності поєднання дисфункції плаценти та залізодефіцитної анемії відбувається парадоксальне зростання експресії ферменту. Таким чином, пригнічення експресії гену eNOS є відображенням вичерпання адаптаційних можливостей організму.

Наведене свідчить, що рутинне призначення прекурсорів оксиду азоту (препарати L-аргініну) у жінок із проявами гестаційної ендотеліопатії, яке рекомендують деякі автори, може не давати очікуваного ефекту у зв'язку з наявністю генетично детермінованого дефіциту продукції ендотеліальної нітроксидсинтази. З іншого боку, при ізольованій ЗДА зміни експресії гену eNOS є менш вираженими.

Висновки

1. У пацієток із ЗДА рівень експресії гену eNOS зростає в 1,4 раза порівняно з контролем.
2. При поєднанні ЗДА та дисфункції плаценти рівень експресії гену eNOS знижується у 10 разів порівняно з контролем.
3. Зміни експресії гену eNOS при залізодефіциті мають адаптивний характер та узгоджуються з даними

імуногістохімічних досліджень експресії ферменту ендотеліальної нітроксидсинтази у децидуальній тканині.

References (список літератури)

1. Blackburn S. *Maternal, fetal, and neonatal physiology*. 4th ed. NY: Saunders; 2012. 768 p.
2. Salomon C, Kobayashi M, Ashman K, Sobrevia L, Mitchell MD, Rice GE. *Hypoxia-induced changes in the bioactivity of cytotrophoblast-derived exosomes*. *PLoS One*. 2013;8(11):e79636.
3. Ancheva IA. [Clinical epidemiology of anemia during pregnancy in the Southern Ukraine: retrospective study]. *Visnyk Problem Biologii i Medytsyny*. 2013;2(3):112–114.
4. O'Farrill-Santoscoy F, O'Farrill-Cadena M, Fragoso-Morales LE. *Evaluacion del tratamiento a mujeres embarazadas con anemia ferropenica*. *Ginecol Obstet Mex*. 2013;81(7):377–381
5. Goldman-Wohl D, Yagel S. *United we stand not dividing: the syncytiotrophoblast and cell senescence*. *Placenta*. 2014;35(6):341–4.
6. Zaporozhan VM, Konkov DG, Galich SR, Lutsker OL, inventors; M. I. Pirogov Vinnitsa National Medical University. *Sposib neinvazyvnoi diahnostyky funktsionalnoho stanu endoteliiu pry vahitnosti* [The method of non-invasive diagnostics of the functional state of endothelium in the pregnancy].

- Ukrainian patent, no. 77984 (2013) A61V 10/00, 2013.
7. Koskenkorva-Frank TS, Weiss G, Koppenol WH, Burckhardt S. The complex interplay of iron metabolism, reactive oxygen species, and reactive nitrogen species: insights into the potential of various iron therapies to induce oxidative and nitrosative stress. *Free Radic Biol Med.* 2013;65:1174–94.
 8. Petruk AA, Vergara A, Estrin D, Merlino A. Molecular basis of the NO trans influence in quaternary T-state human hemoglobin: a computational study. *FEBS Lett.* 2013;587(15):2393–8.
 9. ENOS gene. Retrieved from: <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=NOS3&search=d04b4425441eb1347cc891141f3462f8>
 10. Kapustin RV, Arzhanova ON, Polyakova VO. [Vascular tropic signaling molecules expression in the placental tissue samples from puerperae with gestational diabetes mellitus]. *Molecular Medicine.* 2012;5:45–49.
 11. Nakaz 782 ot 29.12.2005. *Pro zatverdzhennia klinichnykh protokoliv z akusherskoi ta hihienichoi dopomohy* [Order no. 782 dated On approvement of clinical protocols on the obstetrics and gynecology care]. Kyiv: Ministry of Health Care of Ukraine Publ., 2005.
 12. Yau C. *R tutorial*. Retrived from: <http://www.r-tutor.com/r-introduction>

(received 09.07.2014, published online 16.10.2014)

(отримано 09.07.2014, опубліковано 16.10.2014)