

Uniwersytet Jagielloński
Collegium Medicum
Wydział Lekarski

lek. med. Dominika Stettner-Kołodziejska

**METABOLIZM ANGIOTENSYN W ŁOŻYSKU W STANIE
PRZEDRZUCAWKOWYM**

Praca doktorska

Promotor: prof. dr hab. n. med. Krzysztof Rytlewski

Pracę wykonano w Katedrze Położnictwa i Ginekologii UJ CM

Kierownik jednostki: prof. dr hab. Kazimierz Pityński,

w Klinice Położnictwa i Perinatologii UJ CM

Kierownik Kliniki dr hab. med. Hubert Huras, prof. UJ

Moim Rodzicom

Składam serdeczne podziękowania mojemu Promotorowi prof. dr hab. Krzysztofowi Rytlewskiemu za wsparcie, pomoc merytoryczną, poświęcony czas i cierpliwość, oraz za zainteresowanie jednostką chorobową, jaką jest stan przedrzucawkowy. Pasja, zaangażowanie i wytrwałość w pracy naukowej Pana Profesora były dla mnie wzorem do naśladowania oraz ogromną motywacją.

Składam podziękowania Panu prof. dr hab. Rafałowi Olszaneckiemu oraz Dr Beacie Bujak-Giżyckiej z Katedry Farmakologii UJ CM, których wskazówki, pomoc przy wykonaniu oznaczeń, interpretacji wyników i wyciąganiu wniosków były nieocenione.

Dziękuję Pani prof. dr hab. Romanie Tomaszewskiej za ocenę histopatologiczną materiału.

Jestem niezmiernie wdzięczna za pomoc i wsparcie przy zbieraniu materiału Koleżankom i Kolegom, oraz całemu Zespołowi z Katedry Ginekologii i Położnictwa.

Szczególnie ciepłe podziękowania dla moich Najbliższych: Rodziców – którzy uczyli mnie wyznaczania nowych celów, pokonywania przeszkód, wspierali we wszystkich decyzjach i inspirowali do pracy naukowej, Męża i Córki (jesteście najlepsi!!!), Teściów i Przyjaciół – za wiarę, dodawanie otuchy i pomoc w organizacji codzienności tak, by ta praca mogła powstać.

SPIS TREŚCI

Wykaz stosowanych skrótów	4
1. Wstęp.....	7
1.1. Układ renina-angiotensyna – ogólne spojrzenie	7
1.2. Układ renina-angiotensyna w ciąży	12
1.3. Stan przedrzucawkowy – w ujęciu klinicznym oraz znane patomechanizmy	14
1.4. Układ renina-angiotensyna w stanie przedrzucawkowym	19
2. Cel pracy	22
3. Materiał i metody	23
3.1. Protokół badań, kryteria włączenia i wykluczenia pacjentek	23
3.2. Przygotowanie materiału tkankowego do badań.....	24
3.3. Ocena metabolizmu Ang I w łożysku	25
3.3.1. Odczynniki i roztwory wykorzystane w badaniu metabolizmu angiotensyny I	25
3.3.2. Konwersja Ang I- eksperyment <i>ex vivo</i>	25
3.3.3. Przygotowanie próbek do LC-MS	26
3.3.4. Analiza metabolizmu Ang I metodą LC-MS	26
3.4. Izolacja, analiza jakościowa i ilościowa RNA.....	30
3.4.1. Reakcja odwrotnej transkrypcji	30
3.4.2. Reakcja Real-Time PCR.....	31
3.5. Ocena histopatologiczna	33
3.5.1. Technika barwienia hematoksyliną i eozyną:	33
3.6. Analiza statystyczna.....	34
4. Wyniki.....	35
4.1. Dane demograficzne	35
4.2. Ocena histopatologiczna	39
4.3. Ocena metabolizmu egzogennej Ang I w tkance łożyska <i>ex vivo</i>	41
4.4. Poziom mRNA w łożysku dla kluczowych elementów RAS	44
5. Dyskusja.....	45
6. Wnioski	51
Bibliografia	52
Streszczenie.....	67
Spis rycin, tabel i zdjęć	71
Suplement	73

WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW

- ACE1 - enzym konwertujący (konwertaza) angiotensynę I /*angiotensin I converting enzyme*/
- ACE2 - enzym konwertujący (konwertaza) angiotensynę II /*angiotensin II converting enzyme*/
- ACE-I - inhibitory konwertazy angiotensyny /*angiotensin-converting-enzyme inhibitors*/
- AGT - angiotensyno gen /*angiotensinogen*/
- Ang I - angiotensyna I /*angiotensin I*/
- Ang II - angiotensyna II /*angiotensin II*/
- Ang III - angiotensyna III /*angiotensin III*/
- Ang IV - angiotensyna IV /*angiotensin IV*/
- Ang V - angiotensyna V /*angiotensin V*/
- Ang-(1-7) - angiotensyna-(1-7) /*angiotensin-(1-7)*/
- Ang-(2-7) - angiotensyna-(2-7) /*angiotensin-(2-7)*/
- Ang-(3-7) - angiotensyna-(3-7) /*angiotensin-(3-7)*/
- Ang-(1-9) - angiotensyna-(1-9) /*angiotensin-(1-9)*/
- Ang-(1-12) - angiotensyna-(1-12) /*angiotensin-(1-12)*/
- APA - aminopeptydaza A /*aminopeptidase A*/
- APB - aminopeptydaza B /*aminopeptidase B*/
- APN - aminopeptydaza N /*aminopeptidase N*/
- AT1R - receptor typu 1 angiotensyny II /*angiotensin II type 1 receptor*/
- AT2R - receptor typu 2 angiotensyny II /*angiotensin II type 2 receptor*/
- AspAP - aminopeptydaza aspartyłowa /*aspartil aminopeptidase*/
- DCs - komórki dendrytyczne /*dendritic cells*/
- IL4 - interleukina 4 /*interleukin 4*/
- IL6 - interleukina 6 /*interleukin 6*/
- IL10 - interleukina 10 /*interleukin 10*/
- IL17 - interleukina 17 /*interleukin 17*/
- IRAP - aminopeptydaza regulowana przez insulinę /*insulin-regulated aminopeptidase*/

IUGR - wewnątrzmaciczne zachamowanie wzrastania płodu /*intrauterine growth restriction*/

LC-MS - chromatografia cieczowa z detekcją masową /*liquid chromatography/mass spectrometry*/

Mas - receptor związany z białkiem G dla Ang-(1-7) /*G-protein-coupled receptor Mas*/

NEP - neutralna endopeptydaza, neprylizyna /*neutral endopeptidase, neprilysin*/

NK - komórki cytotoksyczne “naturalni zabójcy” /*Natural Killer*/

NLN - neurolizyna /*neurolysine*/

NO - tlenek azotu /*nitric oxide*/

NOS - syntaza tlenku azotu /*nitric oxide synthase*/

PE - stan przedrzucawkowy /*preeclampsia*/

PEP - endopeptydaza prolilowa /*prolyl endopeptidase*/

PI UA - wskaźnik pulsacji w tętnicy pępowinowej /*pulsatility index umbilical artery*/

PI MCA - wskaźnik pulsacji w tętnic środkowej mózgu /*pulsatility index middle cerebral artery*/

PIGF - łożyskowy czynnik wzrostu /*placental growth factor*/

PRCP - karboksypeptydaza prolilowa /*prolylcarboxypeptidase*/

RAS, RAAS - układ renina-angiotensyna/renina-angiotensyna-aldosteron /*renin-angiotensin system, renin-angiotensin-aldosterone system*/

ROS - reaktywne formy tlenu /*reactive oxygen species*/

sEng - rozpuszczalna endoglina /*soluble endoglin*/

SFlt-1 - rozpuszczalna fms-podobna kinaza tyrozynowa 1 /*soluble fms-like kinase-1*/

STMB - mikrocząsteczki syncytiotrofoblastu /*syncytiotrophoblast-derived microparticles*/

TNF α - czynnik martwicy nowotworu alfa /*tumor necrosis factor alpha*/

TOP - oligopeptydaza thimet /*thimet oligopeptidase*/

Treg - limfocyty T regulatorowe /*regulatory T cells*/

VEGF - czynnik wzrostu śródbłónka naczyniowego /*vascular endothelial growth factor*/

1. Wstęp

1.1. Układ renina-angiotensyna – ogólne spojrzenie

Biorąc pod uwagę ilość dostępnych informacji mogłoby się wydawać, że układ renina-angiotensyna-aldosteron (układ RAA, RAS), jego składowe i ich funkcje zostały doskonale poznane. Od lat 70. XX wieku wiadomo, że odgrywa on kluczową rolę w regulacji ciśnienia tętniczego i równowagi wodno-elektrolitowej. Zgodnie z klasycznym obrazem działania układu RAA, enzym renina jest syntetyzowana i uwalniana przez komórki ziarniste nerkowych tętniczek doprowadzających w odpowiedzi na niskie ciśnienie krwi, oraz niski poziom chlorku sodu [1]. Renina katalizuje przemianę wytwarzanego głównie przez wątrobę i uwalnianego do krwi angiotensynogenu w decapeptyd angiotensynę I (Ang I), która przy udziale enzymu konwertującego angiotensynę (ACE) przekształca się w aktywną biologicznie angiotensynę II (Ang II). Ang II działa po połączeniu z dwoma typami receptorów – typu I (AT1R) lub typu II (AT2R), wykazując podobne powinowactwo do każdego z nich [2]. Oprócz właściwości kurczenia naczyń, Ang II wykazuje wiele innych aktywności: m.in. stymuluje angiogenezę, powoduje przebudowę mięśniówki gładkiej naczyń, może stymulować wzrost guzów nowotworowych, a nawet przyczyniać się do nasilenia odpowiedzi zapalnej. W klasycznym ujęciu efekty biologiczne pobudzenia układu RAA zależą głównie od systemowego działania Ang II („osoczowy” RAS) na mięśnie gładkie naczyń (skurcz i patologiczna przebudowa przy długotrwałym działaniu) i korę nadnerczy (wytwarzanie aldosteronu) poprzez receptory AT1. W ostatnich latach ten tradycyjny obraz układu RAA ulegał dużym zmianom. Po pierwsze, okazało się, że konwersję angiotensyny I oraz II mogą przeprowadzać także inne niż ACE peptydazy (np. neutralna endopeptydaza – NEP, czy świeżo odkryta izoforma ACE2) sprzyjając powstawaniu „nietypowych” – niezwiązanych z klasycznym szlakiem - produktów (np. angiotensyny-(1-7), czy angiotensyny-(1-9)), posiadających często swoiste receptory i pełniących ważne funkcje biologiczne. Po drugie, wykazano obecność większości komponent (substratu, enzymów, receptorów) układu RAA w wielu tkankach, oraz zwrócono uwagę na ważne, parakryne lub autokryne działanie różnych angiotensyn (często właśnie tych „nietypowych”), które zachodzi lokalnie – w obrębie poszczególnych narządów i tkanek („tkankowe” układy RAA). Wszystkie składowe układu RAA są obecne w takich narządach, jak na przykład mózg, serce, jajniki, czy łożysko [3,4]. Złożoności obrazu układu RAA dopełnia fakt, że istnieją co najmniej

4 typy receptorów dla peptydów angiotensynowych, a większość z nich może działać na więcej niż tylko jeden podtyp receptora [5].

Najlepiej poznane są szlaki konwersji angiotensynogenu oraz rola poszczególnych produktów w układzie krążenia. W osoczu, z angiotensynogenu pod wpływem działania reniny powstaje angiotensyna I, nieczynny biologicznie dekapeptyd. W wyniku dalszych przemian, przy udziale różnych konwertaz, powstaje szereg produktów degradacji angiotensyny I, z których dwa najważniejsze to angiotensyna II oraz angiotensyna-(1-7). W osoczu dominującym produktem przemian angiotensyny I jest angiotensyna II, zaś w tkankach i narządach typowo powstają różne produkty, z dominującymi: angiotensyną-(1-7) oraz angiotensyną II. Ang II to aktywny oktapeptyd powstający z angiotensyny I przy udziale ACE. Działania biologiczne Ang II opisuje bardzo bogata literatura [6-8]. Wiadomo, że jej zwiększone powstawanie odpowiada za szereg patologicznych zmian w układzie krążenia (*remodeling*, aktywacja procesów zakrzepowych i zapalnych, stres oksydacyjny) w czasie rozwoju nadciśnienia, miażdżycy i cukrzycy. Wykazano również, że Ang II nasila wytwarzanie naczynioskurczowej endoteliny I [9-10]. Z kolei Ang-(1-7), która powstaje przede wszystkim w tkankach jako bezpośredni produkt konwersji Ang I pod wpływem neutralnej endopeptydazy (NEP), a także z rozkładu Ang-(1-9) (pod wpływem ACE, NEP), czy Ang II (pod wpływem ACE2), działając przez swoisty receptor Mas wykazuje działanie przeciwstawne do Ang II – naczyniorozszerzające, antyproliferacyjne, przeciwzapalne, oraz antyangiogenne. Działania te w dużej mierze zależą od zdolności Ang-(1-7) do pobudzania komórek śródbłoka naczyń do uwalniania ważnych mediatorów, odpowiadających za utrzymanie homeostazy ściany naczyń, takich jak m.in. tlenek azotu (NO) czy prostacyklina (PGI₂) [11,12]. Warto podkreślić że Ang II zwiększając w ścianie naczyń wytwarzanie reaktywnych form tlenu (ROS) silnie upośledza wytwarzanie i działanie NO i PGI₂ [13].

Konwersja Ang I w Ang II zachodząca głównie przy udziale konwertazy angiotensyny (ACE) (oraz w znacznie mniejszym stopniu innych enzymów) odgrywa istotną rolę w zaburzeniach czynności układu sercowo-naczyniowego. Uważa się, że nadmierna aktywność układu RAA ma udział w patogenezie nadciśnienia, cukrzycy i miażdżycy, bowiem zwiększona aktywność biologiczna Ang II (*via* receptor AT1) odpowiada za upośledzenie perfuzji tkankowej, przebudowę ściany naczyń, aktywację procesów zakrzepowych i zapalnych oraz zwiększony stres oksydacyjny w naczyniach krwionośnych [14]. Istotnie, leki hamujące aktywność ACE (ACE-I) wykazują działanie

przeciwmiażdżycowe, naczynio- i kardioprotekcyjne. Podobne skutki daje zahamowanie wzmożonego działania angiotensyny przez antagonistów receptora AT1 („sartany”) [15].

Obecnie nie budzi już wątpliwości fakt, że poza klasycznym szlakiem ACE/ Ang II/ AT1R, układ renina-angiotensyna posiada fizjologicznie przeciwną oś pod postacią ACE2/ Ang-(1-7)/ receptor Mas [16,17]. Szczególne znaczenie na tej drodze posiada druga izoforma ACE- ACE2, która wykazuje 42% homologii z ACE, jednak charakteryzuje się odmienną aktywnością biologiczną. Posiada wysoką skuteczność katalityczną – bardzo szybko konwertuje Ang I do Ang-(1-9) oraz Ang II do Ang-(1-7). Wydajność katalityczna ACE2 w konwersji Ang I do Ang-(1-9) jest 500 razy wyższa niż oligopeptydazy proliowej (POP), oraz 10 do 600 razy wyższa niż karboksypeptydazy proliowej (PRCP). Co ważne, Ang-(1-9) przez neprylizynę (NEP) oraz ACE przekształcana jest w Ang-(1-7) [18]. Należy również podkreślić, że ACE2 jest niewrażliwa na działanie inhibitorów ACE, takich jak kaptopryl, lizinopryl, czy enalapryl [19,20]. W 2003 roku Santos wraz z zespołem odkrył, że receptor Mas sprzężony z białkiem G jest receptorem Ang-(1-7) i dzięki pobudzeniu właśnie tego receptora obserwujemy jej korzystne właściwości w układzie krążenia antyproliferacyjne, przeciwzapalne, naczyniorozkurczowe oraz hamujące proces włóknienia [21-23].

Udowodniono, że zwiększona aktywność ACE w tych patologich układu krążenia skutkuje nasileniem stresu oksydacyjnego, który zależny jest od indukcji przez angiotensynę II enzymu NADPH oksydazy, a także innych enzymów wytwarzających ROS [14]. Co ciekawe, to właśnie w badaniach nad schorzeniami układu krążenia odkryto biologiczną rolę innych, niż Ang II peptydów angiotensynowych. Wiadomo, że powstająca przy udziale ACE2 i działająca przez receptor Mas Ang-(1-7), działając przeciwnie do Ang II, wywołuje natriurezę, ma działanie rozszerzające na naczynia krwionośne [16,24]. Osoczowe stężenie Ang-(1-7) u ludzi wykazuje negatywną korelację z ciśnieniem krwi. Uważa się, że naczynioprotekcyjna oś ACE2/Ang-(1-7)/Mas stanowi przeciwwagę dla klasycznej osi ACE/Ang II/AT1 w wielu chorobach układu krążenia, a farmakologiczne nasilenie wytwarzania lub naśladowanie działania Ang-(1-7) może mieć znaczenie terapeutyczne. Wykazano, że inhibitory ACE mogą zwiększać powstawanie Ang-(1-7), co może być w części odpowiedzialne za korzystne działania tych leków [5,25,26].

Oprócz Ang II i Ang-(1-7), duże zainteresowanie budzi również inny peptyd - angiotensyna IV. Ang IV działa poprzez receptor AT4/IRAP. Jej rola fizjologiczna nie jest do końca poznana. Wykazano, że może polegać m. innymi na regulacji przepływu krwi (np.

w naczyniach mózgowych), modulowania zjawiska uczenia się i pamięci oraz metabolizmu neuronów w OUN [27].

Należy podkreślić, że o ile w układzie krążenia dominuje aktywność osi ACE/Ang II/AT1, to w wypadku tkankowych układów RAA równie silnie co angiotensyna II zaznaczają się role „nietypowych” peptydów angiotensynowych [28,29]. Najwięcej badań poświęcono działaniu „miejscowego” układu RAA w nerkach, sercu, mózgu i układzie rozrodczym. Jak się okazuje, wszędzie tam istotne funkcje narządów regulowane są przez wzajemną równowagę działań różnych angiotensyn, których stężenia zdeterminowane są lokalnie przez tkankowo-swoisty profil aktywności poszczególnych enzymów konwertujących. Z punktu widzenia aktywności biologicznej, najsilniej zaznaczona jest równowaga pomiędzy działaniem Ang II i Ang-(1-7) [11,26,30].

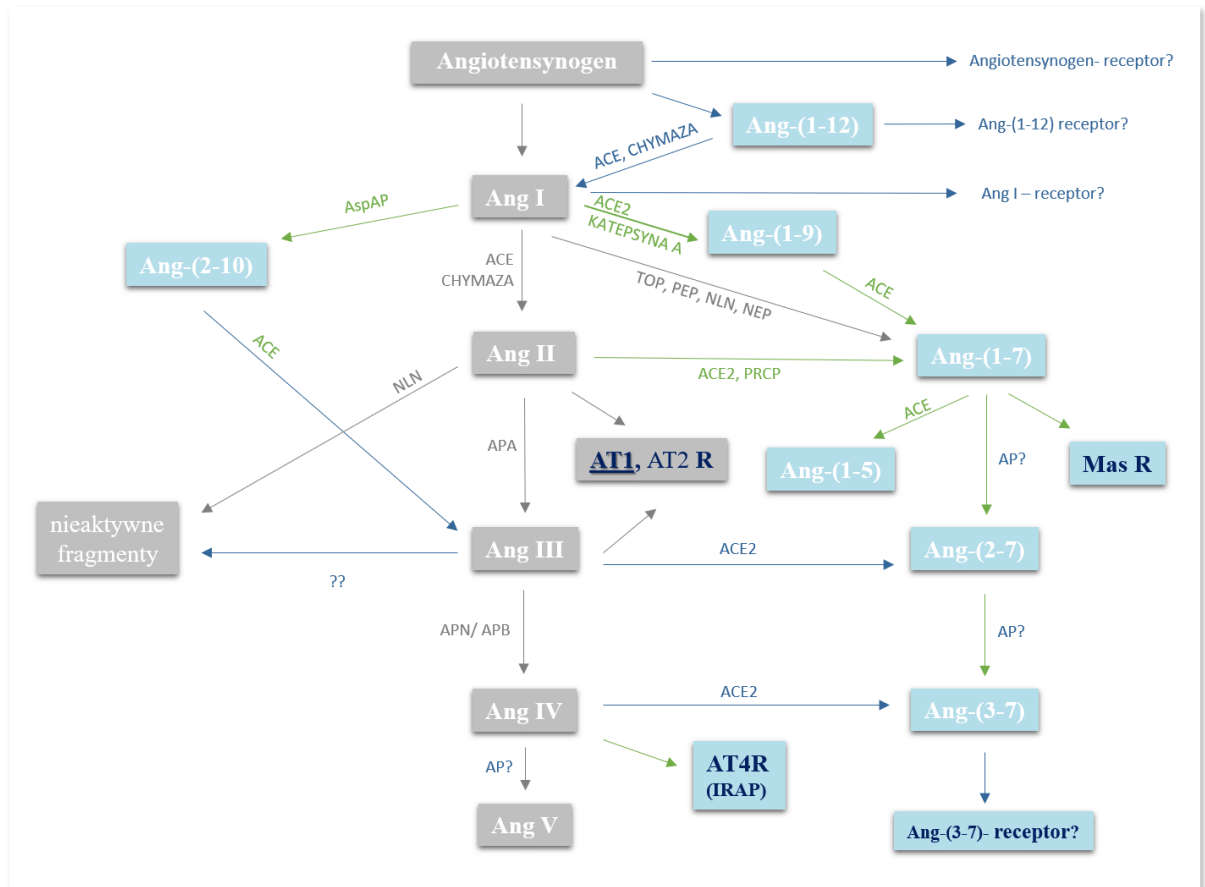
W nerkach równowaga pomiędzy naczynioskurczowym, zatrzymującym sód i wodę oraz nasilającym włóknienie działaniem Ang II, a zwiększającym przepływ krwi, natriuretycznym i zapobiegającym włóknieniu działaniem Ang-(1-7) okazuje się podstawowa dla funkcjonowania tego narządu, zwłaszcza w sytuacji schorzeń układu krążenia [31,32]. W sercu Ang-(1-7) przeciwdziała Ang II hamując przerost kardiomiocytów i włóknienie oraz nasilając angiogenezę [26].

Możliwość zmian szlaków metabolicznych peptydów poprzez zastosowanie odpowiednich inhibitorów konwertaz jest z powodzeniem wykorzystywana przede wszystkim w celu zahamowania konwersji angiotensyny I do angiotensyny II (ACE-I). Wiadomo, że zwłaszcza w tkankowych układach RAA, zastosowanie ACE-I może częściowo „przekierowywać” metabolizm angiotensyn w kierunku powstawania naczynio-protেকcyjnej angiotensyny-(1-7). [24,33-36]

Ang-(1-7) powstaje z Ang I na drodze pośredniej -poprzez konwersję do Ang-(1-9) za pomocą ACE2, a następnie ACE, jak i bezpośrednio za pomocą neprylizyny (NEP), oligopeptydazy thimet (TOP), endopeptydazy prolilowej (PEP), czy neurolizyny (NLN) [37]. Warto przy tym wspomnieć, że ACE2- choć jest homologiem ACE- poprzez „napędzanie” szlaków metabolizmu Ang I hamuje powstawanie Ang II. W przeciwieństwie do ACE, ACE2 nie rozkłada bradykininy [38,39]. Wykazano, że poza ACE2, także karboksypeptydaza prolilowa (w kwaśnym środowisku nerek) posiada zdolność konwersji Ang II do Ang-(1-7). Z kolei chymaza bierze udział w przekształcaniu Ang-(1-12) w Ang I, a także Ang I w Ang II. Alternatywny szlak tworzenia Ang II z udziałem chymazy właśnie może odgrywać

patologiczną rolę w chorobach przebiegających z nadmierną proliferacją naczyń (np. nefropatia cukrzycowa) [40].

Schemat przemian w układzie RAS uwzględniający najważniejsze szlaki metaboliczne przedstawiono na Ryc. 1.



Ryc. 1. Schemat konwersji układu renina-angiotensyna. Kolor czarny – szlak „klasyczny”; kolor zielony – nowe szlaki; kolor niebieski – szlaki i składniki o niepewnym działaniu i roli.

/na podstawie Speth & Giese 2013, zmodyfikowane/

[Ang- angiotensyna; AT1R, AT2R- receptory angiotensyny typu 1 i 2; ACE- enzym konwertujący angiotensynę; NLN – neurolizyna; PEP- endopeptydaza prolilowa; TOP – oligopeptydaza thimet; NEP- neprylizna; PRCP – karboksypeptydaza prolilowa; APA – aminopeptydaza A; APB – aminopeptydaza B, APN – aminopeptydaza N; AP – aminopeptydaza; AspAP – aminopeptydaza aspartylowa; IRAP – aminopeptydaza regulowana przez insulinę, receptor Ang- IV]

1.2. Układ renina-angiotensyna w ciąży

Większość danych z piśmiennictwa wskazuje, że w czasie ciąży wzrasta aktywność RAS zarówno we krwi, jak i w wielu tkankach [41-43]. Dochodzi do zwiększenia produkcji reniny- co ciekawe, głównie na drodze pozanerkowej, przez jajniki oraz doczesną. Stężenie proreniny (prekursora reniny) we krwi osiąga szczyt około 20 dnia po zapłodnieniu i pozostaje na wysokim poziomie aż do porodu. Wzrasta również stężenie aldosteronu zarówno w moczu, jak i w osoczu [44]. Wzrost produkcji estrogenów, niezbędnych do utrzymania ciąży, powoduje zwiększenie syntezy angiotensynogenu w wątrobie, co prowadzi do wzrostu osoczowego stężenia Ang II. Jediną składową, której stężenie we krwi ulega obniżeniu jest ACE [45,46]. Wykazano, że Ang II bierze udział w regulacji maciczno-łożyskowego oporu naczyniowego i przepływu krwi- jej wysokie stężenia zmniejszają przepływ maciczno-łożyskowy, zaś niskie sprzyjają jego zwiększeniu [47-49]. Warto podkreślić, że pomimo wzmożonej ilości Ang II w krążeniu i jej powszechnie znanego, silnego działania obkurczającego naczynia, w fizjologicznej ciąży obserwujemy poszerzenie łożyska naczyniowego. Ciśnienie tętnicze zwłaszcza w pierwszych miesiącach jest zwykle obniżone i podnosi się do wartości prawidłowych w okolicach terminu porodu. Abdul-Karim, Assalin i wsp. prawdopodobnie jako pierwsi zauważyli, że ciąża charakteryzuje się obniżoną wrażliwością naczyń na działanie obkurczające Ang II. Kobiety ciężarne w porównaniu z nie ciężarnymi wymagają co najmniej podwójnej ilości Ang II we wlewie dożylnym w celu uzyskania takiej samej odpowiedzi skurczowej, a tym samym wzrostu ciśnienia krwi [50]. Gant i wsp. fakt „oporności” na działanie Ang II tłumaczyli zwiększoną produkcją progesteronu i prostacykliny w ciąży [51-52]. Obecnie wiemy, że „oporność” może wynikać z odmiennej budowy receptora AT1, którego struktura jest monomeryczna w ciąży fizjologicznej, z kolei u pacjentek nie będących w ciąży- czyli w stanie wrażliwości na Ang II – heterodimeryczna. Wiadomo zaś, że pobudzenie formy monomerycznej przez Ang II skutkuje mniejszą aktywnością fizjologiczną. Co więcej, wykazano że w ciąży fizjologicznej monomeryczne receptory AT1 mogą być łatwiej niż formy dimeryczne, unieczynniane przez reaktywne formy tlenu (ROS) [53].

Bardzo ciekawe wyniki w odniesieniu do funkcji „tkankowych” RAS uzyskano na modelu zwierzęcym. Brosnihan i wsp. w badaniach na szczurach transgenicznym wykazali zmianę w preferencji produkcji peptydów angiotensynowych pod wpływem terapii zastępczej estrogenami – spadek poziomu ACE w nerkach i aorcie, zaś w osoczu zwiększenie wytwarzania Ang-(1-7). Działanie estrogenów chroniące przed nadciśnieniem mogłoby więc

polegać na wzmaganiu naczyniorozszerzających efektów Ang-(1-7), przy jednoczesnej redukcji powstawania oraz naczynioskurczowych efektów Ang II [54]. Wiadomo, że w wielu sytuacjach Ang-(1-7) działa przeciwstawnie do Ang II – przykładowo posiada właściwości naczyniorozszerzające, m.in. poprzez zdolność uwalniania tlenku azotu (NO) i prostacykliny ze śródbłonna; nie stymuluje także wyrzutu aldosteronu z nadnerczy. W wielu modelach zwierzęcych udowodniono związek Ang-(1-7) z obniżeniem ciśnienia i wzrostem wydalania sodu, jako mechanizmami przeciwdziałającymi powszechnie znanym efektem układu RAA [55-58]. Poziom Ang-(1-7) w osoczu wzrasta o ok. 34%, a Ang II o 50% w trzecim trymestrze w stosunku do nieciążarnych [59]. W pomiarach wykonywanych metodami immunoenzymatycznymi, wydalanie z moczem zarówno Ang II, jak i Ang-(1-7) u kobiet w ciąży pojedynczej, fizjologicznej wykazuje progresywny wzrost w czasie jej trwania, osiągając odpowiednio 16- i 25- krotnie wyższy poziom w porównaniu do kobiet miesiączkujących [60,61]. Powyższe dane pozwalają przypuszczać, że Ang-(1-7) odgrywa znaczącą rolę w adaptacji układu krążenia w czasie ciąży, w szczególności w niwelowaniu naczynioskurczowego efektu Ang II, utrzymaniu prawidłowych wartości ciśnienia krwi i równowagi przepływu krwi między matką a płodem.

W ciąży fizjologicznej dochodzi do podwyższenia osoczowej aktywności obu osi RAS, wciąż niewiele jednak wiadomo o równowadze, jaka rozwija się w ciąży w tkankach, a zwłaszcza w narządach bezpośrednio biorących udział w utrzymaniu ciąży. Składowe RAS znajdują się w tkance łożyska, gdzie funkcjonują jako kompletny, lokalny układ [62,63]. W kosmku łożyskowym, przy użyciu metod immunoenzymatycznych, wykazano obecność kluczowych peptydów RAS, jak Ang I, Ang II, Ang-(1-7), a także ACE, ACE2, NEP, receptorów AT1 i Mas [64]. Łożyskowy RAS nie tylko lokalnie (autokrynnie, parakrynnie) oddziałuje na naczynia krwionośne, ale może pełnić ważną funkcję ogólnoustrojową (endokrynną). Liczne badania przeprowadzone na modelach zwierzęcych, oraz *in vitro* na tkance łożyska dowodzą, że stymulacja AT1R w komórkach trofoblastu może prowadzić do uwolnienia wielu substancji, np. estradiolu, endoteliny-1, reaktywnych form tlenu (ROS), czy łożyskowego czynnika wzrostu (PIGF). Wykazano także, że inwazja komórek trofoblastu w tętniczki spiralne (pseudowaskulogeneza) jest częściowo indukowana przez aktywację receptora AT1- przez Ang II z krążenia matczyne [65-68]. W tym kontekście wydaje się, że zaburzenia w miejscowym działaniu RAS mogą odgrywać ważną rolę w schorzeniach, w których dochodzi do patologii łożyska.

1.3. Stan przedrzucawkowy – w ujęciu klinicznym oraz znane patomechanizmy

Stan przedrzucawkowy, zwany dawniej „zatruciem ciążowym” lub „EPH-gestozą” jest chorobą występującą jedynie w ciąży. Schorzenie to definiowane jest jako współistnienie nadciśnienia ($>140/90$ mm Hg), białkomoczu (≥ 300 mg/24 h lub +++ w teście paskowym) i/lub obrzęków, stanowiąc powikłanie 2-10% ciąż na świecie. Ciężki stan przedrzucawkowy pozostaje jedną z wiodących przyczyn śmiertelności matczynej (10-15%) i zwiększa ryzyko porodów przedwczesnych (15%) jako, że jedyną finalnie skuteczną, przyczynową terapią stanu przedrzucawkowego czy rzucawki jest zakończenie ciąży [69-72].

Mimo nieustającego postępu w badaniach naukowych, etiopatogeneza stanu przedrzucawkowego wciąż nie została do końca poznana. Panuje zgoda, że jest to choroba ogólnoustrojowa i wieloukładowa, w której dochodzi do zwiększenia obwodowego oporu naczyniowego, wzmożonej agregacji płytek krwi, oraz dysfunkcji śródbłonka [73]. Wśród czynników, które mogą mieć potencjalny związek z wystąpieniem stanu przedrzucawkowego wymienia się wiek matki, pierwszą ciążę, obecność schorzeń zapalnych u matki, niedostateczną podaż substancji odżywczych (wapń, witaminy), insulinooporność i występowanie zespołu metabolicznego, oraz czynniki genetyczne. Istotną częścią schorzenia są zaburzenia immunologiczne, a w ich konsekwencji również pojawienie się w układzie krążenia stresu oksydacyjnego, nieprawidłowej inwazji trofoblastu i upośledzonej tolerancji maczyno-płodowej [74-77].

Z patofizjologicznego punktu widzenia rozwój stanu przedrzucawkowego odbywa się na dwóch etapach [78]. Pierwszy z nich, zwany łożyskowym, ma miejsce w pierwszych 20 tygodniach ciąży i wiąże się nieprawidłową przebudową (*remodelingiem*) ścian naczyniowych tętniczek spiralnych i upośledzoną inwazją trofoblastu, a w efekcie rozwojem zmian niedokrwienych w łożysku [79]. W ciąży fizjologicznej zmiany zachodzące w układzie krążenia- przykładowo zwiększona akcja serca oraz pojemność minutowa serca - pozwalają na sprawną wymianę składników odżywczych i przemianę materii między matką i dzieckiem właśnie poprzez łożysko, które powstaje w pierwszym trymestrze ciąży. Trofoblast zewnątrzkosmkowy osiąga wówczas doczesną matki. Na tym etapie tętnice spiralne matki w doczesnej przechodzą proces przebudowy (*remodelingu*), zmieniając się z naczyń niskopojemnościowych - wysokooporowych na wysokopojemnościowe - niskooporowe. W stanie przedrzucawkowym mamy do czynienia z upośledzoną inwazją trofoblastu - dochodzi do płytkiej inwazji trofoblastu, a tętnice spiralne nie są poddane

procesowi prawidłowej pseudowaskulogenezy. Trofoblast pozakosmkowy nie zastępuje śródbłonka w tętnicach spiralnych a jego inwazja jest płytka, co powoduje zmniejszenie napływu krwi do przestrzeni międzykosmkowej prowadząc do wytworzenia się łożyska wysokooporowego. Dochodzi do nadmiernej proliferacji mięśniowej warstwy tętnic, pogrubienia ich ściany i powstawania zmian miażdżycopodobnych [80,81]. W efekcie obniżeniu ulega przepływ krwi w łożysku – krążenie jest nadal wysokooporowe. Kolejny etap ma miejsce w drugiej połowie ciąży i jest nazywany układowym. Wzrost ciśnienia w krążeniu maczynym jest próbą kompensacji pogorszenia przepływu krwi przez łożysko. W tym okresie pojawia się również wzmożona maczyna odpowiedź zapalna oraz stres oksydacyjny w krążeniu matki. W konsekwencji dochodzi do uszkodzenia śródbłonka. Czynniki mogące uszkadzać komórki śródbłonka zostały szczegółowo omówione w dalszej części rozdziału. Stan taki ma miejsce, gdy w organizmie matki są obecne czynniki ryzyka wystąpienia schorzeń układu sercowo – naczyniowego. Przy braku tych czynników nieprawidłowa implantacja prowadzi jedynie do wewnątrzmacicznego zahamowania wzrastania płodu (IUGR). U kobiet z wieloma czynnikami ryzyka (ustrojową predyspozycją) nawet niewielkie nasilenie nieprawidłowości w czasie implantacji prowadzi do wystąpienia stanu przedzrzuawkowego, podczas gdy ciężkie zaburzenia implantacji u kobiet z minimalnym ryzykiem spowoduje wystąpienie jedynie IUGR [82].

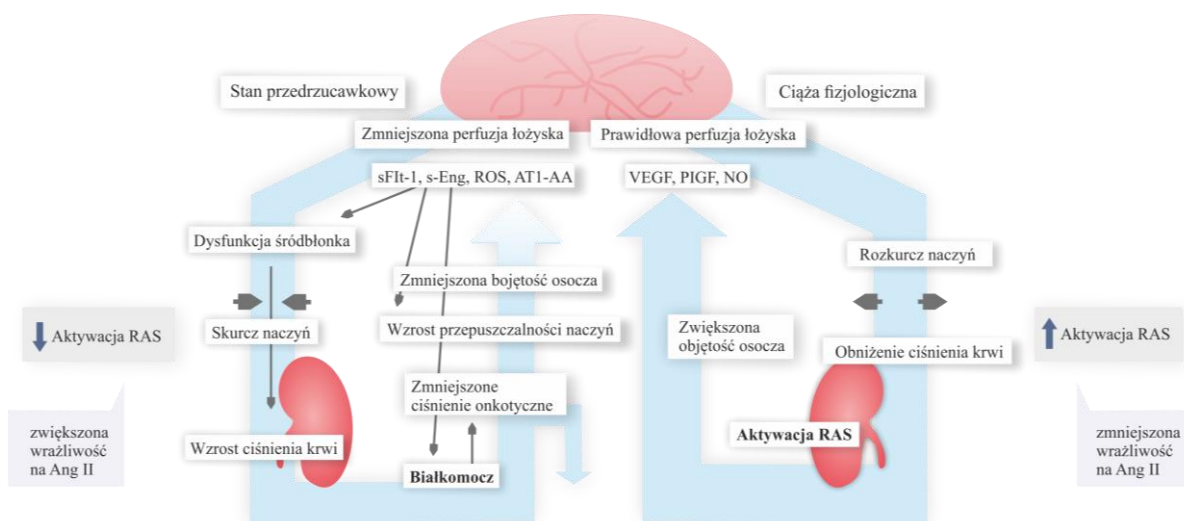
Zaawansowanym elementem choroby jest pojawienie się uszkodzenia nerek i białkomoczu, upośledzenia funkcji wątroby - wystąpienie zespołu HEELP. Niekiedy występują zaburzenia ze strony centralnego układu nerwowego pod postacią napadów drgawek i utraty świadomości, zwanych rzucawką [78,81,83,84].

Wspólnym patofizjologicznym ogniwem dla obu wyżej opisanych etapów choroby są czynniki uwalniane z łożyska działające układowo. Do najlepiej poznanych należą mikrofragmenty syncytiotrofoblastu (STMB- syncytiotrophoblast-derived microvesicles/microparticles) i białka antyangiogenne [85]. W związku z niedostateczną inwazją trofoblastu i ze zmniejszonym przepływem krwi przez łożysko występują w nim okresy niedokrwienia i reperfuzji, prowadzące do niedotlenienia, stresu oksydacyjnego oraz stanu zapalnego. W wielu publikacjach podkreślane jest znaczenie czynników antyangiogennych w wyzwalaniu stanu przedzrzuawkowego. Należy tu wymienić rozpuszczalną fms-podobną kinazę tyrozynową (sFlt-1) oraz rozpuszczalną endoglinę (s-Eng). Cząsteczki te poprzez związanie z pro-angiogennymi białkami, jak czynnik wzrostu śródbłonka naczyniowego (VEGF), czy łożyskowy czynnik wzrostowy (PlGF),

uniemożliwiają im połączenie z ich receptorami na powierzchni śródbłonna, co nasila jego dysfunkcję [86-88]. VEGF odgrywa kluczową rolę w angiogenezie i podtrzymaniu dobrostanu komórek śródbłonna. W modelu zwierzęcym, u ciężarnych szczurów, zastosowanie rekombinowanych białek: sFlt-1 jak i s-Eng, powodowało objawy kliniczne podobne do stanu przedrzucawkowego u ciężarnych. W badaniach *in vitro* stwierdzono, że s-Eng hamuje działanie TGF- β 1 oraz blokuje aktywację syntazy tlenku azotu zależną od TGF- β 1 w komórkach śródbłonna, zaburza proliferację śródbłonna oraz tworzenie naczyń włosowatych [86,89-94]. Podwyższony poziom wspomnianych czynników zaobserwowano około 6-8 tygodni przed wystąpieniem objawów klinicznych stanu przedrzucawkowego, a ich stężenie w surowicy krwi ciężarnych, u których rozwinął się stan przedrzucawkowy, było wprost proporcjonalne do ciężkości choroby [95,96]. Interesujące wyniki przedstawiono w badaniu dotyczącym wpływu niedotlenienia na regulację VEGF, PlGF i sFlt-1 w izolowanych cytotrofoblastach, ludzkich komórkach śródbłonna żyły pępowinowej (HUVECs), oraz w fibroblastach z kosmków łożyska. Wykazano, że w warunkach hipoksji w cytotrofoblastach spada wytwarzanie VEGF i PlGF, zaś wzrasta sFlt-1. Wyjaśnia to nieco perturbacje związane z przebudową (*remodelingiem*) maczynych tętnic spiralnych w stanie przedrzucawkowym, jednak wyjaśnienie, w jaki sposób powyższe zdarzenia pojawiają się i współuczestniczą w indukowaniu upośledzonej inwazji trofoblastu, jego niedokrwienia i reperfuzji, warunków niedotlenienia promujących stres oksydacyjny w łożysku, oraz odpowiedzi zapalnej – wciąż pozostawia wiele pytań i wymaga dalszych badań [97].

W ciąży fizjologicznej dochodzi do wzrostu aktywacji komórek odporności wrodzonej w organizmie matki - jak monocyty czy granulocyty, jednak zmniejszeniu ulega ilość komórek dendrytycznych, (DCs) czy cytotoksycznych komórek NK (Natural Killer). Zarówno komórki NK, dendrytyczne, jak i limfocyty T (także regulatorowe komórki T- T_{reg}) są obecne w doczesnej i potrzebne w procesie prawidłowej inwazji trofoblastu, współdziałając ze sobą w kontrolowanej likwidacji komórek tętnic spiralnych [98-101]. Komórki dendrytyczne uważane są za istotny czynnik przesuwający równowagę odpowiedzi immunologicznej w stronę limfocytów Th2 w łożysku i macicy, sprzyjając tolerancji maczyno-łożyskowej [102]. Komórki T_{reg} hamują proces powstawania limfocytów Th1 z Th0, jak również posiadają zdolność produkcji przeciwzapalnej interleukiny 10 (IL-10). Prowadzi to w ciąży fizjologicznej do zmniejszenia produkcji cytokin prozapalnych, jak IL-6, czy TNF- α [103-106].

W stanie przedrzucawkowym, w przeciwieństwie do ciąży fizjologicznej, mamy do czynienia z nieprawidłową odpowiedzią immunologiczną, czyli aktywacją komórek immunologicznych i cytokin prozapalnych z jednoczesnym zmniejszeniem ilości komórek i cytokin regulatorowych, a w następstwie - do rozwinięcia się przewlekłego stanu zapalnego, podobnie jak w schorzeniach autoimmunologicznych [103,107-109]. Zmniejszona ilość komórek T_{reg} oraz Th2 nie jest w stanie prawidłowo kontrolować procesu zapalnego związanego ze zwiększoną ilością populacji zapalnych limfocytów T (Th1 i Th 17) [110]. Aktywowane Th1 i Th17 promują cytotoksyczną odpowiedź immunologiczną poprzez wydzielanie prozapalnych z natury cytokin, jak TNF- α , IL-6, IL-17, przy jednoczesnym obniżeniu się poziomów cytokin przeciwzapalnych (IL-4 oraz IL-10) [68,111-116]. Zjawisku temu sprzyja stres oksydacyjny, czyli brak równowagi między czynnikami pro- i antyoksydacyjnymi, prowadzący do działania nadmiaru reaktywnych form tlenu (ROS) [13,117-120]. Zwiększenie produkcji TNF- α oraz IL-6 powoduje pobudzenie zapalne komórek śródbłonna poprzez zwiększoną adhezję. Wzrasta również przepuszczalność śródbłonna. TNF- α zmniejsza ekspresję mRNA syntazy tlenu azotu (NOS) i powoduje wzrost ekspresji mRNA preendoeliny-1. Prowadzi to do nasilenia produkcji silnej substancji naczynioskurczowej - endoteliny-1 (ET-1) [111,121]. Poziom ET-1 u pacjentek ze stanem przedrzucawkowym jest 2-3 krotnie wyższy niż u zdrowych, jednak najwyższe stężenia osiąga dopiero pod koniec ciąży, co sugeruje, że endotelina-1 raczej wzmacnia, niż inicjuje nadciśnienie w przebiegu choroby [122,123]. Zmniejszeniu ulega także biodostępność tlenu azotu (NO) – czynnika rozkurczającego mięśniówkę gładką naczyń, a także hamującego adhezję i agregację płytek krwi do śródbłonna. W badaniu na szczurach udowodniono, że przewlekłe blokowanie syntazy NO prowadzi do wzrostu całkowitego obwodowego oporu naczyniowego, upośledzenia perfuzji i w efekcie do nadciśnienia tętniczego oraz możliwego wewnątrzmacicznego zahamowania wzrastania płodów [124]. Należy jednak podkreślić, że rola poszczególnych izoform NOS w rozwoju stanu przedrzucawkowego nie jest jasna (wydaje się, że indukowana izoforma może mieć znaczenie patologiczne, podczas gdy izoforma konstytutywna ochronne) [125,126].



Ryc. 2. Układ naczyniowy i perfuzja łożyska w ciąży powiklanej stanem przedrzucawkowym i fizjologicznej. Uszkodzenie śródbłonna w stanie przedrzucawkowym prowadzi do wzrostu oporu naczyniowego, zwiększenia ciśnienia krwi oraz przepuszczalności naczyniowej, a także spadku ciśnienia onkotycznego, czego konsekwencją jest zmniejszenie objętości krwi krążącej i ukrwienia łożyska. W odpowiedzi na powyższe zmiany łożysko produkuje więcej wazoaktywnych czynników anti-angiogennych, jak sFlt-1, s-Eng, AT1-AA, ROS, powodując swoiste „błędne koło” – dalsze obkurczanie naczyń i pogorszenie perfuzji łożyska.
/na podstawie Verdonk et al. 2014, zmodyfikowane [127]/

1.4. Układ renina-angiotensyna w stanie przedrzucawkowym

Pomimo wielu badań, nasza wiedza o udziale RAS w patogenezie stanu przedrzucawkowego jest wciąż dość ograniczona. W szczególności zaś brakuje informacji o funkcji (lub dysfunkcji) lokalnego, łożyskowego RAS w tym schorzeniu.

W porównaniu do ciąży fizjologicznych, u pacjentek ze stanem przedrzucawkowym obserwuje się dysregulację w osoczym układzie RAS - poziom reniny, aldosteronu, Ang I i Ang II jest niższy. Zmniejsza się także poziom Ang-(1-7) we krwi i moczu w porównaniu z ciążą fizjologiczną [60,61]. Pomimo obniżenia ekspresji składowych RAS, w stanie przedrzucawkowym dochodzi do zwiększonej wrażliwości na Ang II, zaznaczającej się np. poprzez wzmożoną odpowiedź naczynioskurczową na Ang II [128]. Może wiązać się to z budową receptora AT1, posiadającego zdolność tworzenia dimerów – podwójnych kompleksów np. z drugą cząsteczką receptora AT1 (homodimeryzacja) lub z receptorami adrenergicznymi α_{1D} , jak i bradykininowymi B₂ (heterodimeryzacja). Wykazano, że ekspresja receptorów B₂ w stanie przedrzucawkowym jest wyższa w porównaniu z ciążą fizjologiczną, zaś heterodimery receptora AT1 / B₂ silniej reagują z Ang II [53,129,130].

W patogenezie stanu przedrzucawkowego coraz częściej podkreślana jest rola autoprzeciwciał dla receptora Ang II typu I (AT1R). W ciąży fizjologicznej są one niewykrywalne, lub ich poziom jest minimalny. Cytokiny prozapalne, jak TNF- α , IL-6, IL-17 stymulują limfocyty B do produkcji wspomnianych autoprzeciwciał, które działając na receptor mogą go aktywować i prowadzić do zmian w układzie naczyniowym i komórkach trofoblastu, powodując wzmożony skurcz tętnic nerkowych, wzrost ekspresji endoteliny I oraz sFlt-1 [68,131,132].

Od prawie 50 lat wiadomo o funkcjonowaniu lokalnego, tkankowego układu RA w łożysku [133]. Wiele badań potwierdziło obecność wszystkich składowych RAS w łożysku [134-137]. W związku ze zmianą ich stężeń w przebiegu ciąży, jak również w osoczu, czyli „układowym”, ogólnoustrojowym RAS, postulowany jest udział lokalnego układu w patogenezie stanu przedrzucawkowego, czy wewnątrzmacicznego zahamowania wzrastania płodu. Stwierdzono odwrotną korelację między masą urodzeniową, a stężeniem Ang II w żyłce pępowinowej [138,139]. Różnie natomiast przedstawiane są wyniki dotyczące ekspresji poszczególnych składowych RAS w łożysku w stanie przedrzucawkowym i ciąży fizjologicznej. W kilku badaniach stwierdzono zwiększoną ekspresję receptora AT1R [140-142]. Z kolei Herse i wsp. opisali większą ekspresję AT1R w doczesnej i tkance tłuszczowej

pacjentek ze stanem przedrzucawkowym, przy braku zmian w mięśniach i łożysku. Autorzy wykazali również, że ekspresja reniny w PE jest wyższa w tkance doczesnej w porównaniu z łożyskiem. Poziom Ang II w krążeniu pacjentek z PE jest zmniejszony w stosunku do ciąży fizjologicznej przy zwiększonej wrażliwości na Ang II. Na podstawie tych wyników autorzy zasugerowali, że doczesna może być odpowiedzialna za generację Ang II, a łożysko stanowi dla tego peptydu organ docelowy [143]. Podobne obserwacje – brak różnic w ekspresji AT1R w łożysku ze stanu przedrzucawkowego i ciąży fizjologicznej przy zwiększonej ekspresji w doczesnej z PE – mieli Williams i wsp. [144]. Jednocześnie Knock i wsp. opisali obniżenie ekspresji receptora AT1R w łożyskach pochodzących ze stanu przedrzucawkowego [145]. W innym badaniu autorzy badali poziom Ang-(1-7) i ACE2 w łożysku. Stwierdzili podobną ekspresję obydwu składowych RAS zarówno w materiale pochodzącym z ciąży fizjologicznej, jak i stanu przedrzucawkowego [146]. Autorzy uznali, że brak różnic w tkankach pochodzących z ciąży fizjologicznej i stanu przedrzucawkowego nie wyklucza związku przyczynowo - skutkowego między niedoborem Ang-(1-7) / ACE2 w stanie przedrzucawkowym, co wynika z badań opisujących obniżony poziom krążącej Ang-(1-7) w PE. Wydaje się więc, że deficyt układowy nie musi iść w parze z deficytem tkankowym. Ponadto tkanka pochodząca z ciąży donoszonej niekoniecznie odzwierciedla zmiany zachodzące w początkowych etapach ciąży – kluczowych dla rozwoju stanu przedrzucawkowego.

Powyższe wyniki, nie do końca jednoznaczne, wskazują na konieczność prowadzenia dalszych badań, z zastosowaniem innych niż dotychczas metod, w celu wyjaśnienia funkcjonowania lokalnego RAS w łożysku.

Należy podkreślić, że większość prac, w których bezpośrednio dokonywano pomiaru stężeń poszczególnych peptydów układu RAA oparta jest o czułe techniki immunoenzymatyczne, jednak przeciwciała używane w zestawach pomiarowych charakteryzowały się ograniczoną swoistością w stosunku do poszczególnych peptydów, różniących się jednym lub kilkoma aminokwasami. Jedynie w kilku pracach, do pomiarów stężeń angiotensyn w osoczu zastosowano techniki, które w sposób pewny mogą identyfikować poszczególne peptydy, a takie właśnie możliwości stwarza metoda spektrometrii mas sprzężona z chromatografią cieczową (LC-MS) [147,148].

Niestety, należy również dodać, że stężenia endogennych angiotensyn w tkankach są bardzo niskie, zaś same peptydy wykazują wyjątkowo krótki czas półtrwania. Stanowi to istotne ograniczenie zastosowania metod LC-MS w ocenie stężeń endogennych angiotensyn. Innym podejściem do oceny tkankowego układu RAA jest badanie *zdolności tkanki* do

konwersji podstawowego substratu (Ang I) do poszczególnych angiotensyn o aktywności biologicznej. W warunkach *ex vivo*, przy inkubacji tkanki z dużym stężeniem Ang I (nadmiar substratu), już po kilkunastu minutach, w buforze, w którym inkubowana jest tkanka można zmierzyć stężenia całej gamy peptydów angiotensynowych. W takich warunkach każda tkanka wykazuje nieco inny „wzorec” produkcji angiotensyn, zależny od poziomu ekspresji licznych enzymów biorących udział w ich powstawaniu. Wydaje się, że z pewną ostrożnością, na podstawie tego „wzorca” można wnioskować o preferencji w powstawaniu angiotensyn w sytuacji *in vivo*. Tego typu technika została opracowana w Katedrze Farmakologii UJ CM i jest z powodzeniem stosowana w ocenie zdolności do konwersji angiotensyn w wielu tkankach pochodzących z modeli zwierzęcych oraz wybranych komórkach krwi ludzkiej. [35,36,149-151]. Nigdy jednak nie poddano kompleksowej ocenie tą techniką tkanek łożyska pochodzących z ciąż patologicznych (wstępne dane pochodzące z ciąż fizjologicznych ukazały się w 2013 roku), w których, biorąc pod uwagę doniesienia z piśmiennictwa można by spodziewać się występowania zaburzeń w metabolizmie angiotensyn [152].

Analiza różnic działania łożyskowego RAS metodą LC-MS mogłaby poszerzyć dotychczasową wiedzę na temat roli różnych peptydów angiotensynowych w patogenezie stanu przedrzucawkowego i wskazać nowe kierunki zapobiegania/leczenia tego groźnego schorzenia.

2. Cel pracy

Ogólnym celem niniejszej pracy jest jakościowa i ilościowa ocena zdolności do konwersji Ang I do poszczególnych angiotensyn w łożysku przy zastosowaniu modelu pomiaru metabolizmu angiotensyn metodą LC-MS *ex vivo*, która nie była dotychczas stosowana w badaniach tkanki łożyskowej.

Szczegółowe cele niniejszej pracy obejmują odpowiedzi na następujące pytania:

- która droga przemian Ang I dominuje w łożyskach pochodzących z ciąży fizjologicznej
- czy istnieją (i jakie) jakościowe i ilościowe różnice w profilu angiotensyn powstających z Ang I w łożysku pochodzącym z ciąży powikłanej stanem przedrzucawkowym względem ciąży fizjologicznej
- czy zaobserwowane różnice wykazują związek z ważnymi parametrami klinicznymi charakteryzującymi stan przedrzucawkowy

3. Materiał i metody

3.1. Protokół badań, kryteria włączenia i wykluczenia pacjentek

W badaniu wzięło udział 28 kobiet. 14 pacjentek stanowiło grupę badaną (z rozpoznaniem stanu przedrzucawkowego); 14 pacjentek stanowiło grupę porównawczą (ciążę fizjologiczną, o prawidłowym przebiegu, donoszone, bez chorób towarzyszących i powikłań położniczych). Wszystkie pacjentki hospitalizowane były w Oddziale Klinicznym Kliniki Położnictwa i Perinatologii UJ Collegium Medicum w latach 2013-2015. Badanie uzyskało pozytywną opinię Komisji Bioetycznej UJ CM nr KBET/345/B/2012. Wszystkie pacjentki zostały poinformowane o przebiegu badania ustnie oraz w odpowiednim formularzu „Informacja dla pacjentki o badaniu klinicznym”, podpisały także świadomą zgodę na udział w badaniu. Badanie było realizowane w ramach projektu badawczego NCN („PRELUDIUM”) nr 2013/11/N/NZ4/00226.

KRYTERIA WŁĄCZENIA do grupy badanej obejmowały: występowanie nadciśnienia tętniczego po ukończonym 20 tygodniu ciąży o wartościach $> 140/90$ mm Hg wraz ze współistniejącym białkomoczem > 300 mg/dobę lub $\geq 3+$ w teście paskowym (gdy czas przyjęcia do szpitala lub postęp choroby nie pozwalały na wykonanie dobowej zbiórki moczu, przy braku chorób współistniejących, mogących zaburzyć oznaczenia. W grupie porównawczej znalazły się zdrowe ciężarne w ciążach pojedynczych donoszonych, przyjęte do szpitala w celu planowego zakończenia ciąży cięciem cesarskim.

KRYTERIA WYKLUCZENIA z badania obejmowały ciążę mnogą, stwierdzenie wad wrodzonych u płodu, występowanie chorób towarzyszących innych niż nadciśnienie u ciężarnych (m.in. cukrzyca, choroby układu krążenia, nerek, schorzenia immunologiczne), brak zgody na udział w badaniu.

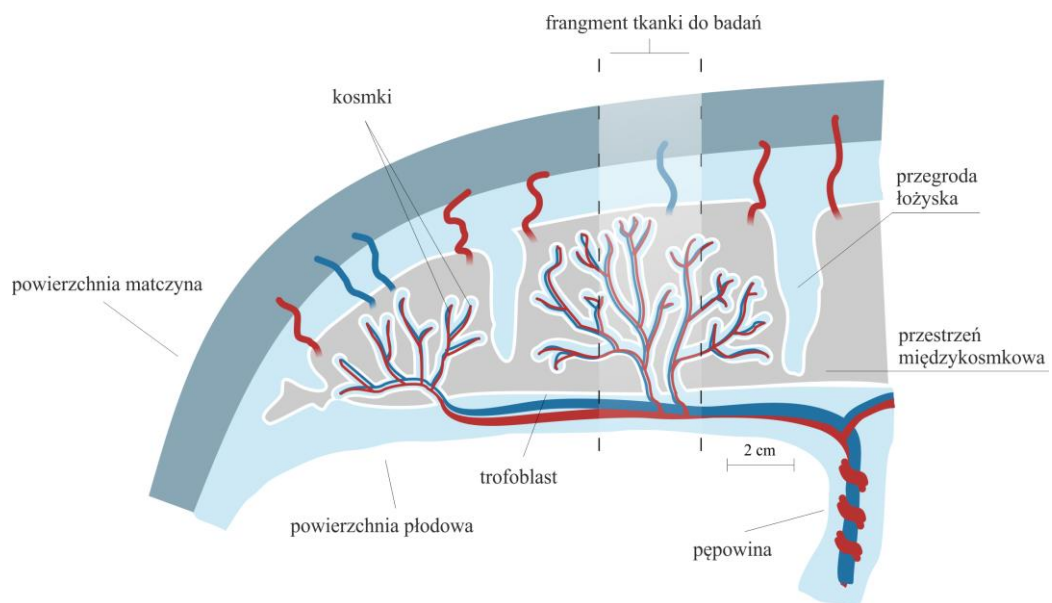
Do analizy (zarówno w grupie badanej i porównawczej) zakwalifikowano pacjentki, u których ciążę zakończono cięciem cesarskim. Wynikało to z faktu, że jest to najczęstsza droga zakończenia ciąży u pacjentek z ciężkim stanem przedrzucawkowym lub zagrażającą rzucawką, z uwagi na zagrożenie życia matki i/lub płodu. W grupie porównawczej wskazania do cięcia stanowiły głównie stany po cięciu cesarskim w poprzedniej ciąży, położenie miednicowe w przypadku pierworódek, lub niewspółmierność matczyno-płodowa. Uznano, że ten sam sposób zakończenia ciąży obu grupach sprzyja homogenności wyników.

3.2. Przygotowanie materiału tkankowego do badań

Materiał do badań stanowiły fragmenty łożyska pobrane tuż po jego wydobyciu w trakcie cięcia cesarskiego. Kawalki łożyska o wymiarach ok. 1 x 1 cm powierzchni oraz ok. 3 cm przez całą grubość łożyska pobierano z okolicy okołopępowinowej za pomocą sterylnego skalpela oraz nożyczek chirurgicznych (Ryc. 3). Region łożyska, z którego najlepiej pobrać materiał, aby uzyskać najlepszy wynik konwersji angiotensyn, został wybrany na podstawie wstępnych badań metabolizmu Ang I w łożysku u 2 zdrowych ciężarnych. (152) Pobraną tkankę łożyska płukano w schłodzonym roztworze 0,9% NaCl, i w sterylnym pojemniku wypełnionym schłodzonym 0,9% NaCl transportowano do Katedry Farmakologii UJ CM, gdzie wykonywano oznaczenia. Czas między pobraniem a dostarczeniem materiału do Katedry Farmakologii UJ CM u żadnej z pacjentek nie przekroczył 60 minut.

Dostarczony do Katedry Farmakologii UJ CM materiał natychmiast był dzielony na trzy części:

- do oceny histopatologicznej (zabezpieczona w 10% buforowanej formalinie, przechowywane w lodówce),
- do badań RT-PCR (zabezpieczona w płynie RNAlater hamującym rozkład mRNA, zamrożone w -80°C),
- do badań LC-MS (umieszczony w buforze Krebsa, natychmiast poddany badaniom).



Ryc. 3. Schemat pobierania materiału z łożyska – fragment wycinany z części okołopępowinowej (do 2 cm od przyczepu pępowiny), przechodzący przez całą grubość łożyska.

3.3. Ocena metabolizmu Ang I w łożysku

3.3.1. Odczynniki i roztwory wykorzystane w badaniu metabolizmu angiotensyny I

- Bufor Krebsa pH 7,4 o składzie KH_2PO_4 , MgSO_4 , NaHCO_3 , NaCl , HCl , CaCl_2 , glukoza, pirogronian sodu (POCh), HEPES, EDTA (Sigma)- świeżo sporządzany w danym dniu
- Roztwory wzorcowe angiotensyn- sporządzono poprzez rozpuszczenie naważek poszczególnych angiotensyn w odpowiedniej objętości wody. Substancje wzorcowe użyte w badaniu: Ang I (Bachem, H-1680), Ang II (Bachem, H-1705), Ang III (Bachem, H-1755), Ang IV (Bachem, H-8125), Ang-(1-9) (Bachem, H-5038), Ang-(1-7) (Sigma, A902) oraz Ang-(1-5) (Bachem, H-2878)
- roztwór wzorcowy perindoprilatu (TRC, P287530)
- roztwory do oczyszczania próbek: kwasu mrówkowego (Fluka), trifluorooctowego-TFA (Fluka) oraz acetonitryl (JT Baker) w wodzie o czystości LC-MS (Merck Millipore)
- Solwenty HPLC- sporządzone z odczynników o czystości LC-MS: woda (Merck Millipore), acetonitryl (JT Baker), kwas mrówkowy (Fluka)

3.3.2. Konwersja Ang I- eksperyment *ex vivo*

Fragmety łożysk oczyszczono z pozostałości skrzeplin, przepłukano solą fizjologiczną a następnie dzielono na mniejsze fragmenty (6 dla każdej pacjentki). Tkanki umieszczano pojedynczo w probówkach z buforem Krebsa, do trzech próbek dodawano inhibitor ACE- perindoprylat (stężenie końcowe 10 μM), zaś do pozostałych trzech nie dodawano żadnego leku. Należy podkreślić, że perindoprylat stosowano jedynie *ex vivo* jako laboratoryjną kontrolę – modelowy inhibitor ACE, w celu potwierdzenia prawidłowo przebiegającego procesu konwersji. Następnie próbki inkubowano w 37°C przez 5 minut, po czym do każdej probówki dodawano roztwór Ang I (stężenie końcowe 3 μM) i inkubowano przez 15 minut. Całkowita objętość roztworu wynosiła 600 μl . Po tym czasie odbierano do czystych probówek po 200 μl inkubatu (drugą porcję zabezpieczano na wypadek konieczności powtórzenia analizy), zaś fragmenty łożyska po inkubacji suszono w 60°C i ważono, celem znormalizowania wyników oznaczeń na mg tkanki. Poziomy peptydów angiotensyn w przeliczeniu na suchą masę fragmentów łożyska uzyskane z próbek bez

perindoprilatu (3 fragmenty) uśredniano dla pojedynczej pacjentki (pojedynczego n biologicznego).

3.3.3. Przygotowanie próbek do LC-MS

Inkubaty przed analizą LC-MS oczyszczano na kolumnach Micro Spin (Harvard Apparatus, USA), stosując opracowaną wcześniej procedurę. [152] Złóża w kolumnach aktywowano 300 μ l 0.1%TFA w 80% acetonitrylu, następnie 300 μ l 0.1% TFA w wodzie. Na aktywne złóża nakładano próbkę (200 μ l inkubatu zakwaszone 20 μ l 10% kwasu mrówkowego), następnie złóża przemywano 0.1% TFA w wodzie. Elucję peptydów angiotensynowych (do czystych probówek) prowadzono za pomocą dwukrotnego nakładania na kolumnę porcji po 150 μ l 0.1% TFA w 40% acetonitrylu. Po każdym kroku wirowano probówki z kolumnami przez 2 min, 3900rpm. Probówki z eluatami następnie umieszczano w liofilizatorze na noc. Suche pozostałości rozpuszczano w 0.1% kwasie mrówkowym, przenoszono do *vialek* chromatograficznych i umieszczano w autosamplerze.

W celu sporządzenia krzywej kalibracyjnej, przygotowane wcześniej mieszaniny wzorców badanych angiotensyn w różnych stężeniach przygotowano w analogiczny sposób, jak próbki badane.

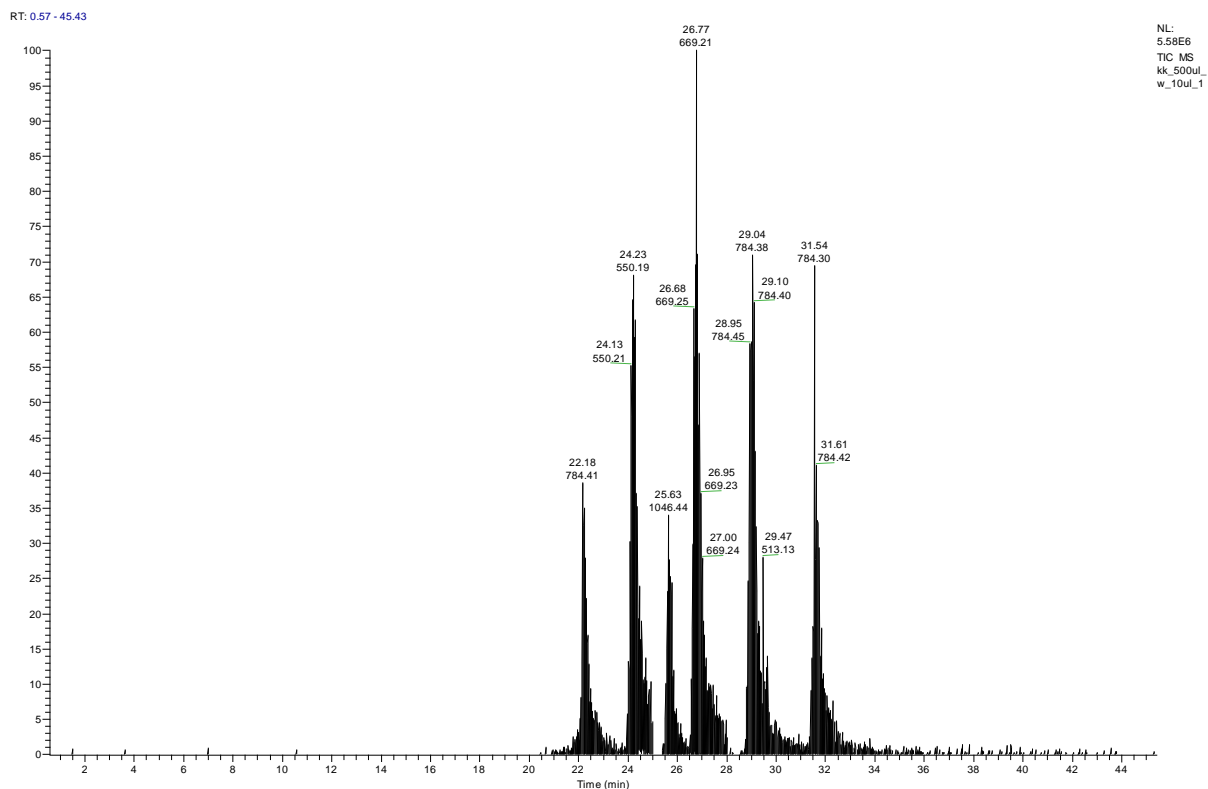
3.3.4. Analiza metabolizmu Ang I metodą LC-MS

Ocenę jakościową i ilościową produktów metabolizmu Ang I w łożysku dokonano z wykorzystaniem techniki chromatografii cieczowej z detekcją masową. Rozdział chromatograficzny analizowanych peptydów angiotensynowych: Ang I, Ang II, Ang III, Ang IV, Ang-(1-5), Ang-(1-7), Ang-(1-9) przeprowadzono za pomocą chromatografu cieczowego UltiMate 3000 (Dionex, Sunnyvale, CA, USA), wyposażonego w pompę z degazerem, autosampler oraz termostat. Próbki nastrzykiwano za pomocą autosamplera w objętości 10 μ l na kolumnę chromatograficzną Acclaim® PepMap 100 C18 (150 mm x 300 μ m, 5 μ m, 100Å), z prekolumną o takim samym wypełnieniu- C18 PepMap 100 (5 mm x 300 μ m). Zastosowano gradientowy system przepływu faz ruchomych: faza A – 0,1% kwas mrówkowy w 2% acetonitrylu, faza B- 0,1% kwas mrówkowy w 80% acetonitrylu. Prędkość przepływu faz ruchomych- 2,5 μ l/min, całkowity czas jednej analizy 60 minut. Kolumna chromatograficzna była termostatowana w 40°C, zaś próbki w autosamplerze były trzymane w 4°C.

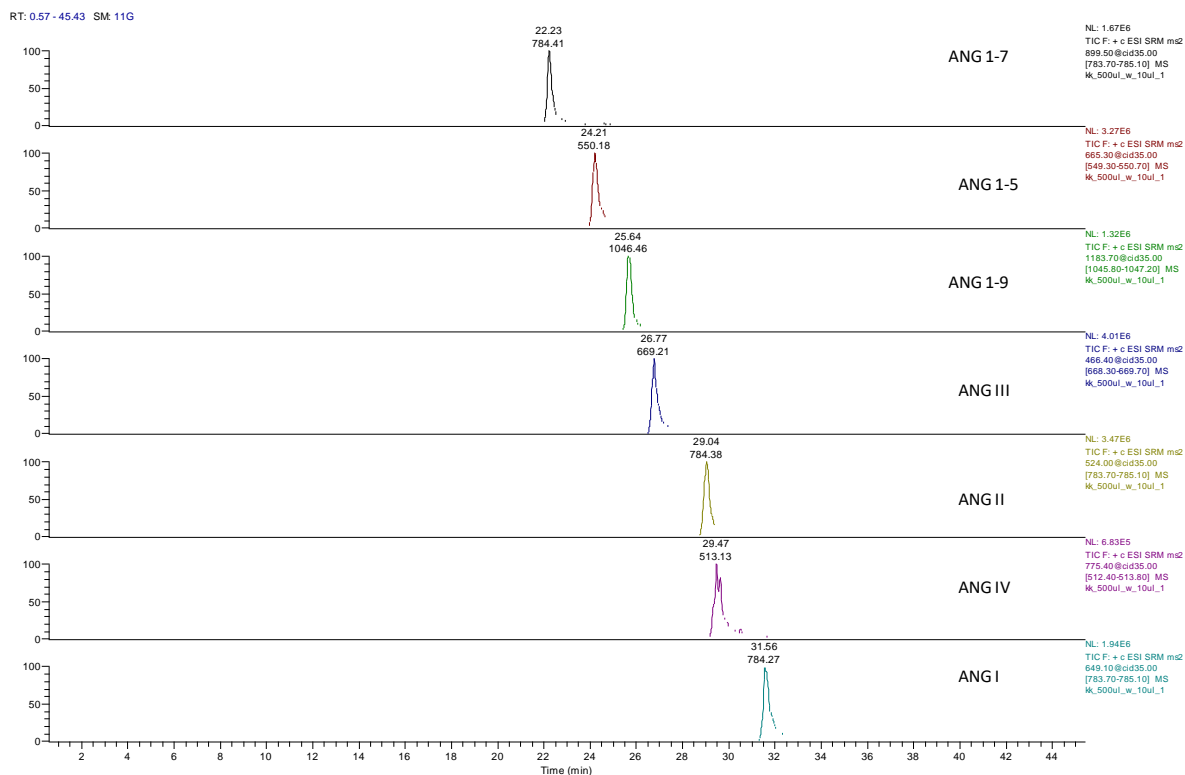
Detekcję rozdzielanych peptydów prowadzono na spektrometrze mas LCQ (Thermo Finnigan, San Jose, CA, USA), ze źródłem jonizacji typu *nano-spray liquid junction*. Analizę prowadzono w trybie jonów dodatnich, wykorzystując metodę tandemowej spektrometrii mas (MS/MS) w opcji SRM (*selected reaction monitoring*). Parametry pracy spektrometru: temperatura kapilary 250°C, napięcie kapilary 1,5kV, energia kolizji 35%, maksymalny czas napełniania pułapki - 100 msec, liczba widm uśrednionych - 2 (2 μ sca), dopuszczalny błąd masy- 1,0 amu. Monitorowane pary jonów dla każdej angiotensyny ustalono we wstępnych badaniach na podstawie analizy natężenia sygnału prądowego dla poszczególnych fragmentacji. Monitorowane pary jonów przedstawiono w tabeli (Tab. 1).

Tab. 1. Monitorowane pary jonów dla poszczególnych peptydów angiotensynowych.

ANGIOTENSYNA	SEKWENCJA AMINOKWASÓW	MASA CZĄSTE-CZKOWA MW [DA]	JON MACIE-RZYSTY (PREKUR-SOR) M/Z	JON POTO-MNY M/Z
Ang I (1-10)	H-Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe-His-Leu-OH	1296,50	649	784
Ang 1-9	H-Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe-His-OH	1183,34	1183	1045
Ang II (1-8)	H-Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe-OH	1046,19	524	784
Ang 1-7	H-Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-OH	899,00	899	784
Ang III (2-8)	H-sp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe-OH	931,11	931	913
Ang IV (3-8)	H-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe-OH	774,92	775	513
Ang 1-5	H-Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-OH	664,76	665	550



Ryc. 4. Przykładowy chromatogram rozdzielu mieszaniny standardów peptydów angiotensynowych.



Ryc. 5. Wyekstrahowane chromatogramy monitorowanych par jonów dla poszczególnych angiotensyn.

Oceny ilościowej produkcji poszczególnych metabolitów ANG I dokonano w oparciu o krzywe kalibracyjne dla mieszanin wzorcowych analizowanych peptydów, sporządzone w zależności liniowej pola powierzchni pod pikiem w funkcji stężenia.

Przeprowadzono również walidację metody LC-MS pod kątem oznaczeń ilościowych wybranych angiotensyn. Określono następujące parametry:

- specyficzność (brak efektów oddziaływania innych substancji obecnych w próbce z oznaczanym peptyd)
- liniowość (krzywa kalibracyjna)
- powtarzalność (precyzja)
- granica wykrywalności (LOD, limit detekcji – najmniejsza ilość substancji, która może być wykryta)
- granica oznaczalności (LOQ, najmniejsza ilość substancji, która może być oznaczona)

3.4. Izolacja, analiza jakościowa i ilościowa RNA

Homogenizację skrawków z 31 łożysk wykonano przy użyciu homogenizatora TissueLyser LT (QIAGEN). W tym celu w 2 ml próbkach typu Eppendorf umieszczono po około 30 mg tkanki, kulkę metalową o średnicy 5 mm oraz 300 μ l buforu lizującego RLT (QIAGEN). Całość wytrząsano przez 3 minuty z częstotliwością 30 Hz. Następnie izolację całkowitego RNA kontynuowano z użyciem zestawu RNeasy Fibrous Tissue Mini Kit (QIAGEN) zgodnie z protokołem producenta. Stężenie i jakość wyizolowanego RNA oceniono poprzez pomiar absorbancji w spektrofotometrze mikroplótkowym Epoch (BioTek), przy długościach fal 260 nm i 280 nm. Wszystkie próbki uzyskały bardzo dobrą czystość, współczynnik absorbancji A_{260/280} mieścił się w zakresie 1,9-2,0 (parametry dobrze wyizolowanego DNA lub RNA oscylują w przedziale 1,8-2,05).

3.4.1. Reakcja odwrotnej transkrypcji

Do przeprowadzenia reakcji odwrotnej transkrypcji (przepisania RNA na cDNA) wykorzystano zestaw High Capacity cDNA Reverse Transcriptase Kit (Applied Biosystems). Zgodnie z protokołem przygotowano mieszaninę reakcyjną składającą się z następujących składników:

MIESZANINA REAKCYJNA	1 REAKCJA
10x RT Buffer	2 μ l
25x DTP Mix (100mM)	0,8 μ l
10x RT Random Primers	2 μ l
RNase Inhibitor	1 μ l
MultiScribe Reverse Transcriptase	1 μ l
Nuclease-free H ₂ O	3,2 μ l
KOŃCOWA OBJĘTOŚĆ	10 μl

Następnie do mieszaniny dodano równą objętość badanej próbki (10 μ l), zawierającą 1 μ g RNA. Całość wymieszano przez delikatne pipetowanie i mieszano wortexem, a następnie wykorzystując termocykler T3 (Biometra) prowadzono reakcję: w 25°C przez 10 minut, w 37°C przez 120 minut, w 85°C przez 5 minut; na końcu schłodzono mieszaninę do 4°C. Do każdego 20 μ l zsyntetyzowanego cDNA dodano 180 μ l H₂O (rozcieńczenie 10x) i energicznie wstrząsnęto (wortexowano). Po zakończeniu procedury próbkę z cDNA przechowywano w temperaturze -20°C.

3.4.2. Reakcja Real-Time PCR

Zmiany poziomu mRNA wybranych genów związanych z układem RAS analizowano za pomocą reakcji łańcuchowej polimerazy w czasie rzeczywistym (Real-Time PCR, RT-PCR). Real-time PCR przeprowadzono na płytках 96-dołkowych w aparacie 7900HT Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems) przy użyciu specyficznych sond MGB Taqman znakowanych fluorochromem FAM (Applied Biosystems):

Tab. 2. Sondy Taqman dla genów poszczególnych składników układu RAS użyte w badaniu.

NAZWA GENU	SYMBOL GENU	SONDA TAQMAN	SEKWENCJA BADANEGO GENU
Angiotensin I Converting Enzyme	ACE	Hs00174179_m1	NM_000789.3
Angiotensin I Converting Enzyme 2	ACE2	Hs01085333_m1	NM_021804.2
Membrane Metallo-Endopeptidase	MME	Hs00153510_m1	NM_000902.3
Angiotensin II Receptor Type 1	AT1R	Hs00258938_m1	NM_000902.3
MAS1 Proto-Oncogene, G Protein-Coupled Receptor	MAS1	Hs00267157_s1	NM_002377.2
Angiotensinogen	AGT	Hs01586213_m1	NM_000029.3
Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase	GAPDH	Hs99999905_m1	NM_002046.4
Hypoxanthine Phosphoribosyltransferase 1	HPRT1	Hs01003267_m1	NM_000194.2

Mieszaninę reakcyjną przygotowano według poniższego protokołu:

MIESZANINA REAKCYJNA	1 REAKCJA
TaqMqn Fast Advanced Master Mix (2x)	10 μ l
TaqMan Gene Expression Assay (20x)	1 μ l
Nuclease-free H ₂ O	7 μ l
cDNA (10x)	2 μ l
KOŃCOWA OBJĘTOŚĆ	20 μl

Każdą próbkę cDNA amplifikowano w trzech powtórzeniach. Pierwszym etapem RT-PCR była 2-minutowa inkubacja UNG w 50°C a następnie 20-sekundowa denaturacja

w temperaturze 95°C, podczas której dochodziło do aktywacji termostabilnej polimerazy. Bezpośrednio po niej, następowała właściwa reakcja PCR obejmująca 40 cykli. Każdy cykl składał się z 1-sekundowej denaturacji w 95°C, po której następowało przyłączenie starterów/wydłużanie (20 sekund, 60°C). Ocenę ekspresji wykonano przy wykorzystaniu oprogramowania Data Assist v.3.01 (Applied Biosystems). Program wykorzystując wartości Ct automatycznie oblicza relatywną ekspresję metodą $\Delta\Delta Ct$.

3.5. Ocena histopatologiczna

W celu potwierdzenia patologii związanych ze stanem przedrzucawkowym na poziomie tkankowym, łożyska z grupy badanej poddano ocenie histopatologicznej.

Wycinki łożysk pobrane z obszaru okołopępowinowego w plastikowych pojemnikach w roztworze 10% formaliny buforowanej dostarczono do pracowni, gdzie zostały opracowane przez lekarza patomorfologa, umieszczone w kasetkach histologicznych i ponownie w formalinie buforowanej na 24h w celu dokładnego utrwalenia materiału. Po upływie tego czasu wycinki zostały umieszczone w procesorze tkankowym próżniowym, w którym zostały poddane automatycznemu procesowi przeprowadzania.

W trakcie 22 godzinnego procesu przeprowadzania wycinki zostały poddane działaniu kolejnych odczynników co miało na celu przygotowanie tkanki do zatopienia w bloczki parafinowe. Proces przeprowadzania przebiegał następująco: po przepłukaniu wycinków w świeżej formalinie a następnie w wodzie wodociągowej wycinki zostały dokładnie odwodnione w szeregu alkoholi o rosnącym stężeniu począwszy od alkoholu 50% skończywszy na alkoholu odwodnionym 99%. Po odwodnieniu wycinki zostały prześwietlone w ksylenie a następnie umieszczone w ciekłej parafinie w temperaturze 62 stopni.

Po przeprowadzeniu wycinki zostały zatopione w bloczki parafinowe, a następnie skrojone na skrawki o grubości 4 μ m. Umieszczone na szkiełkach podstawowych skrawki zabarwione zostały hematoksyliną i eozyną.

3.5.1. Technika barwienia hematoksyliną i eozyną:

1. Odparafinowanie materiału w 3 zmianach ksylenu.
2. Nawodnienie i wypłukaniu ksylenu. Proces ten polegał na przeprowadzeniu preparatów przez trzy kolejne alkohole po 5 min w każdym.
3. Płukanie w wodzie destylowanej.
4. Barwienie hematoksyliną Harrisa - 6 minut
5. Odbarwienie wycinków w 1 % roztworze kwasu solnego w 70 % alkoholu etylowym – 5 sekund.
6. Różnicowanie w wodzie bieżącej przez kilka minut.
7. Barwienie eozyną 15 sekund.
8. Odwodnianie w szeregu alkoholi o rosnącym stężeniu.

9. Prześwietlanie preparatów w 3 zmianach ksylenu.
10. Nakrycie preparatów szkiełkiem nakrywkowym przy użyciu medium.

3.6. Analiza statystyczna

Analizę danych rozpoczęto od opisu statystycznego grup badanej i porównawczej, sprawdzając brak różnic między grupami za pomocą testu *chi-square* w przypadku danych jakościowych i T-studenta przy danych ciągłych, przyjmując za poziom istotności $p < 0,05$. W ten sposób porównano wiek, BMI, pochodzenie, rodność, wcześniejsze poronienia, czas trwania ciąży w momencie porodu i płeć dziecka. Następnie ocenie poddano częstość występowania powikłań i średnie wartości parametrów klinicznych pacjentek, różnicujących obie grupy. W przypadku danych jakościowych zastosowano test *chi-square*, natomiast dla danych ilościowych test T-studenta lub, w przypadku braku spełnienia założeń, nieparametryczny test U-Manna-Whitneya. Dla wszystkich obliczeń istotność statystyczną przyjęto na poziomie $p < 0,05$. Uznawano, że grupy nie różniły się od siebie, gdy test jednorodności wariancji Lavena oraz test T-studenta wskazywały $p > 0,05$. Dla zmiennych jakościowych podobne założenia spełniał test χ^2 . Analizę statystyczną wykonano w programie Statistica v 12.0.

Poziomy metabolitów angiotensyny I wyrażono w pg/mg suchej tkanki, jako wartość średnią z trzech pomiarów \pm SD (SEM). Normalność rozkładu danych oceniano testem Shapiro-Wilka. W większości przypadków dane zarówno w grupie badanej jak i porównawczej nie miały rozkładu normalnego, z tego względu analizę statystyczną przeprowadzono z użyciem nieparametrycznego testu Manna-Whitney'a.

Ocenę korelacji pomiędzy poziomem głównych angiotensyn a ciśnieniem tętniczym skurczowym, rozkurczowym, ekspresją ACE i AT1R przeprowadzono za pomocą nieparametrycznego testu Manna-Whitneya (rozkład danych nie był normalny), oraz w oparciu nieparametryczny współczynnik korelacji Spearmana.

4. Wyniki

4.1. Dane demograficzne

Grupy badana i porównawcza nie różniły się istotnie pod względem wieku, współczynnika BMI, miejsca zamieszkania, czy płci urodzonego dziecka. (Tab. 3, 4)

Zgodnie z charakterystyką choroby, jaką jest ciężki stan przedrzucawkowy, grupy badana i porównawcza różniły się między sobą czasem trwania ciąży i rodności. (Tab. 4) W grupie badanej zdecydowaną większość stanowiły pierworódki (79%), a średni wiek ciążowy w momencie rozwiązania wynosił 33 tygodnie. We wszystkich przypadkach wskazaniem do cięcia cesarskiego w trybie pilnym była zagrażająca rzucawka. U pacjentek z grupy porównawczej przeważały wieloródki (85%), w donoszonych ciążach (mediana 39 tygodni), a wskazaniem do zakończenia ciąży były przyczyny położnicze niezwiązane z jednostką chorobową (głównie stan po cięciu cesarskim - n=8; brak postępu porodu - n=4; rozstęp spojenia łonowego - n=2). W związku z obecnością jednostki chorobowej jaką jest stan przedrzucawkowy w grupie badanej, różnice między grupami dotyczyły także parametrów klinicznych, oraz stanu dziecka po porodzie. W grupie badanej stwierdzono istotnie wyższe ciśnienie tętnicze skurczowe i rozkurczowe (średnio 164/103mmHg versus 109/73mmHg; $p<0,001$), wyższe średnie ciśnienie tętnicze (MAP 123mmHg versus 85 mmHg; $p<0,0001$) oraz częstsze występowanie białkomoczu (test Manna-Whitneya 3,837; $p=0,0001$). (Ryc. 6, 7) Nie zaobserwowano natomiast różnicy w krążeniu u płodu biorąc pod uwagę parametry dopplerowskie – wskaźnik pulsacji w tętnicy pępowinowej i środkowej mózgu (PI UA, PI MCA). Masa ciała i długość noworodka była istotnie większa w grupie porównawczej, podobnie jak stan noworodka oceniany w skali Apgar, co najprawdopodobniej wynika z wcześniejszego zakończenia ciąży w grupie badanej. (Tab. 5, 6, 7)

Wyniki przedstawiono w tabelach 3-7.

Tab. 3. Ogólna charakterystyka grupy badanej i porównawczej – zmienne ilościowe.

CZYNNIK PORÓWNYWANY	GRUPA BADANA (N=14)	GRUPA PORÓWNAWCZA (N=14)	P DLA WARIANCJI (TEST LAVENA)	STATYSTYKA T-ST	P DLA TESTU T-ST
Wiek [lata] [średnia +/- SD (95% PU)]	30,1 +/- 6,7 (26,2 – 34,0)	31,6 +/- 4,8 (28,8 – 34,3)	0,3795	0,679	0,5032
BMI [średnia +/- SD (95% PU)]	28,2 +/- 4,8 (25,4 – 31,0)	27,2 +/- 3,0 (25,5 – 28,9)	0,1616	0,637	0,5291
Czas trwania ciąży (mediana; dolny – górny kwartyl)	33tyg 4 dni; 30tyg 4 dni – 37tyg 0 dni	39tyg 0 dni; 38tyg 4 dni – 39tyg 0 dni	0,0003	4,594	0,0001

Tab. 4. Ogólna charakterystyka grupy badanej i porównawczej – zmienne jakościowe.

CZYNNIK PORÓWNYWANY	GRUPA BADANA (N=14)	GRUPA PORÓWNAWCZA (N=14)	WSP CHI2 PEARSONA	P DLA TESTU CHI2
Zamieszkanie miasto/wieś [n(%)]	5/9 (35,7/64,3)	9/5 (64,3/35,7)	2,286	0,1306
Rodność pierworódki/wieloródki [n(%)]	11/3 (78,6/21,4)	2/12 (14,3/85,7)	11,631	0,0006
Poronienia w przeszłości [n(%)]	6 (42,9%)	5 (35,7%)	0,150	0,6988
Wskazania do zakończenia ciąży nagle/planowe [n(%)]	14/0 (100/0)	3/11 (21,4/78,6)	18,118	<0,0001
Płeć dziecka chłopiec/dziewczynka [n(%)]	5/9 (35,7/64,3)	7/7 (50/50)	0,583	0,4450

Tab. 5. Porównanie zmiennych różnicujących grupę badaną i kontrolną – cechy ilościowe.

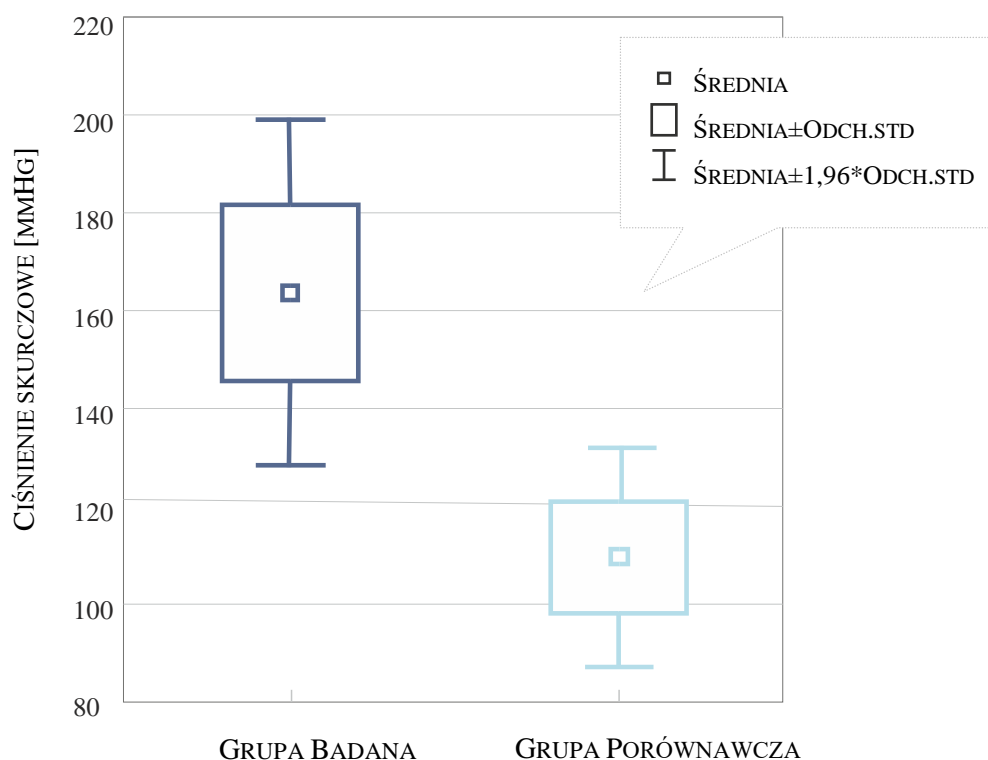
CZNNIK PORÓWNYWANY	GRUPA BADANA (N=14)	GRUPA PORÓWNAWCZA (N=14)	P DLA WARIANCJI (TEST LAVENA)	STATYSTYKA T-ST	P DLA TESTU T-ST
CIŚNIENIE TĘTNICZE					
skurczowe [mmHg] [średnia +/- SD (95% PU)]	164 +/- 17 (153-174)	109 +/- 11 (103-116)	0,2107	9,829	<0,0001
rozkurczowe [mmHg] [średnia +/- SD (95% PU)]	103 +/- 13 (96-111)	73 +/- 10 (67-79)	0,6733	6,930	<0,0001
średnie MAP [mmHg] [średnia +/- SD (95% PU)]	123 +/- 14 (116-131)	85 +/- 9 (80-91)	0,3672	8,713	<0,0001
BIAŁKOMOCZ w badaniu ogólnym moczu [g] [średnia +/- SD (95% PU)]	4,98 +/- 6,04 (1,49-8,47)	0	0,0001	Test MW 3,837	P dla testu MW 0,0001
PRZEPLYWY DOPPLER U PŁODU					
PI w tętnicy pępowinowej [średnia +/- SD (95% PU)]	1,04 +/- 0,21 (0,92-1,16)	1,02 +/- 0,22 (0,89-1,14)	0,7825	0,309	0,7597
PI w tętnicy środkowej mózgu [średnia +/- SD (95% PU)]	1,88 +/- 0,42 (1,63-2,14)	2,00 +/- 0,30 (1,83-2,17)	0,2740	0,854	0,4014
Współczynnik mózgowo-pępowinowy (CPR) [średnia +/- SD (95% PU)]	0,58 +/- 0,18 (0,47-0,69)	0,51 +/- 0,09 (0,46-0,56)	0,1126	1,304	0,2043
MASA NOWORODKA [g] [średnia +/- SD (95% PU)]	1767 +/- 726 (1348-2186)	3363 +/- 511 (3068-3659)	0,2220	6,726	<0,0001
DŁUGOŚĆ CIAŁA NOWORODKA [cm] [średnia +/- SD (95% PU)]	44 +/- 6 (40-47)	53 +/- 3 (51-55)	0,0914	5,321	<0,0001

Tab. 6. Porównanie cech jakościowych między grupami.

CZNNIK PORÓWNYWANY	GRUPA BADANA (N=14)	GRUPA PORÓWNAWCZA (N=14)	WSP CHI2 PEARSONA	P DLA TESTU CHI2
Stan noworodka po porodzie wg skali Agar >8/<=8 [n(%)]	8/6 (57/43)	14/0 (100/0)	7,636	0,0057

Tab. 7. Wartości parametrów biochemicznych w grupie badanej oraz zakresy referencyjne.

CZYNNIK PORÓWNYWANY	GRUPA BADANA (N=14)
AST [U/l] [średnia +/- SD (95% PU)]	55 +/- 53 (21-89)
ALT [U/l] [średnia +/- SD (95% PU)]	72 +/- 77 (23-122)
Bilirubina [umol/l] [średnia +/- SD (95% PU)]	6,86 +/- 2,47 (4,56-9,14)
PLT [tys/l] [średnia +/- SD (95% PU)]	152 +/- 58 (119-185)
Albuminy [g/dl] [średnia +/- SD (95% PU)]	27,3 +/- 3,8 (24,7-29,8)
Białko całkowite [g/dl] [średnia +/- SD (95% PU)]	53,1 +/- 6,2 (48,9-57,3)
D-dimery [ug/ml] [średnia +/- SD (95% PU)]	5,38 +/- 7,99 (-7,34-18,10)
APTT [sek] [średnia +/- SD (95% PU)]	28,5 +/- 5,0 (25,5-31,6)
Mocznik [mmol/l] [średnia +/- SD (95% PU)]	4,5 +/- 1,4 (3,6-5,4)
Kreatynina [mmol/l] [średnia +/- SD (95% PU)]	59 +/- 13 (51-67)



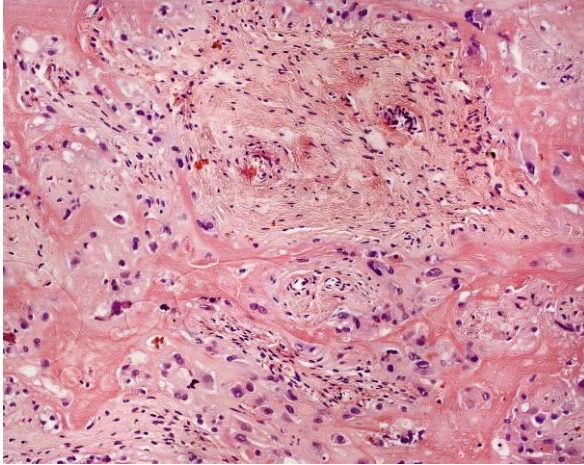
Ryc. 6. Średnie ciśnienie skurczowe w grupie badanej i porównawczej.



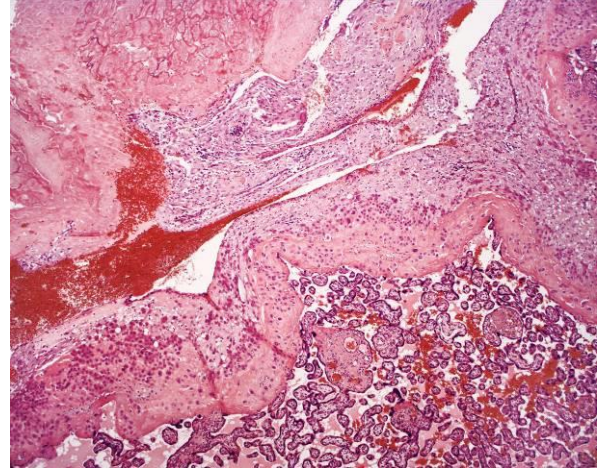
Ryc. 7. Średnie ciśnienie rozkurczowe w grupie badanej i porównawczej.

4.2. Ocena histopatologiczna

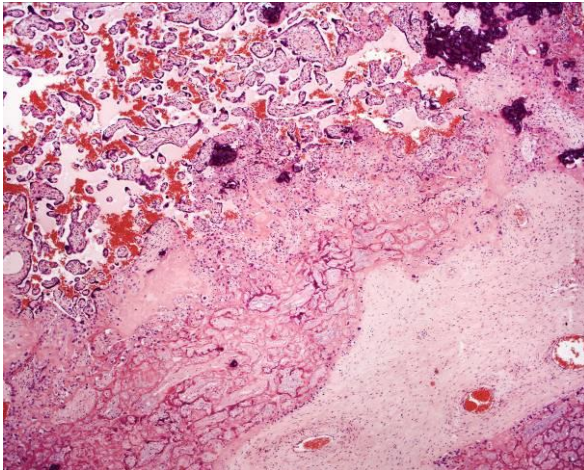
We wszystkich łożyskach pacjentek ze stanem przedrzucawkowym stwierdzano typowe dla tego schorzenia zmiany histopatologiczne, przedstawione przykładowo na zdjęciach 1-6.



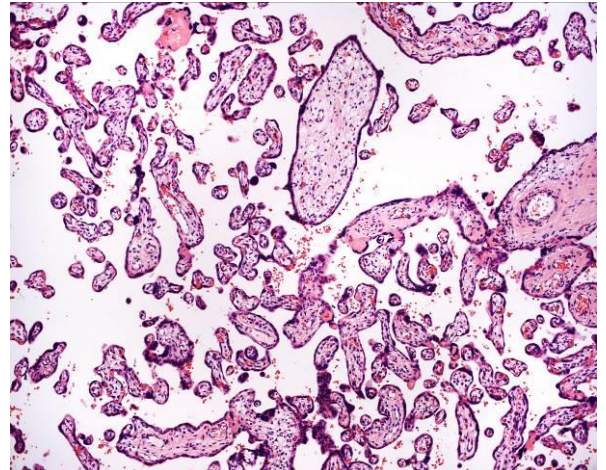
Zdj. 1. Tętnice spiralne doczesnej o znacznie pogrubiałej ścianie i zwężonym świetle wskutek rozrostu elementów ściany naczynia. HE 100x



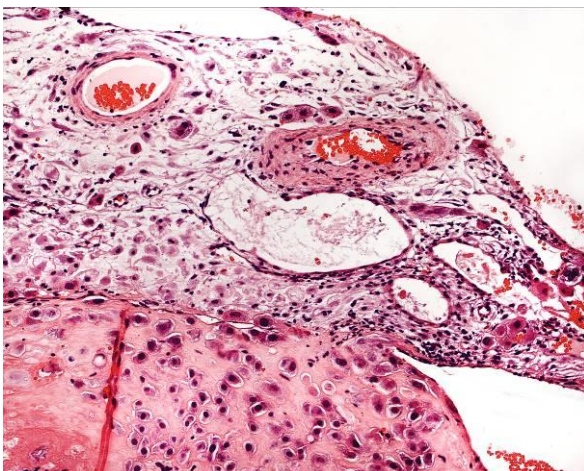
Zdj. 2. Następstwa zmian naczyniowych – zawał łożyska i zakrzep w świetle naczynia. HE 50x



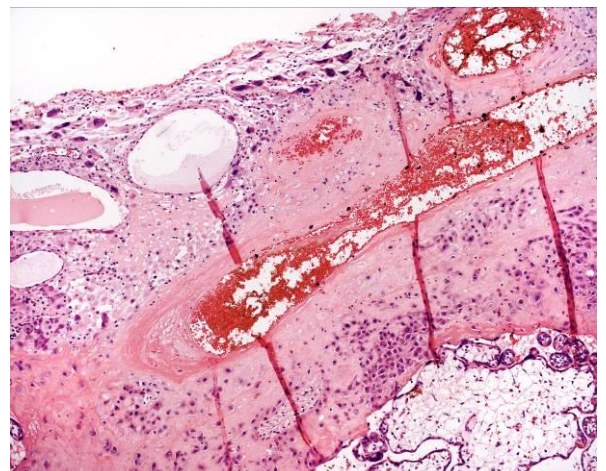
Zdj. 3. Zawał łożyska i zwapnienia. HE 50x



Zdj. 4. Następstwa zmian naczyniowych, tzw. distal villous hypoplasia. HE 50x



Zdj. 5. Rozrost elementów ściany tętnicy spiralnej, znaczne zwężenie światła. HE 100x



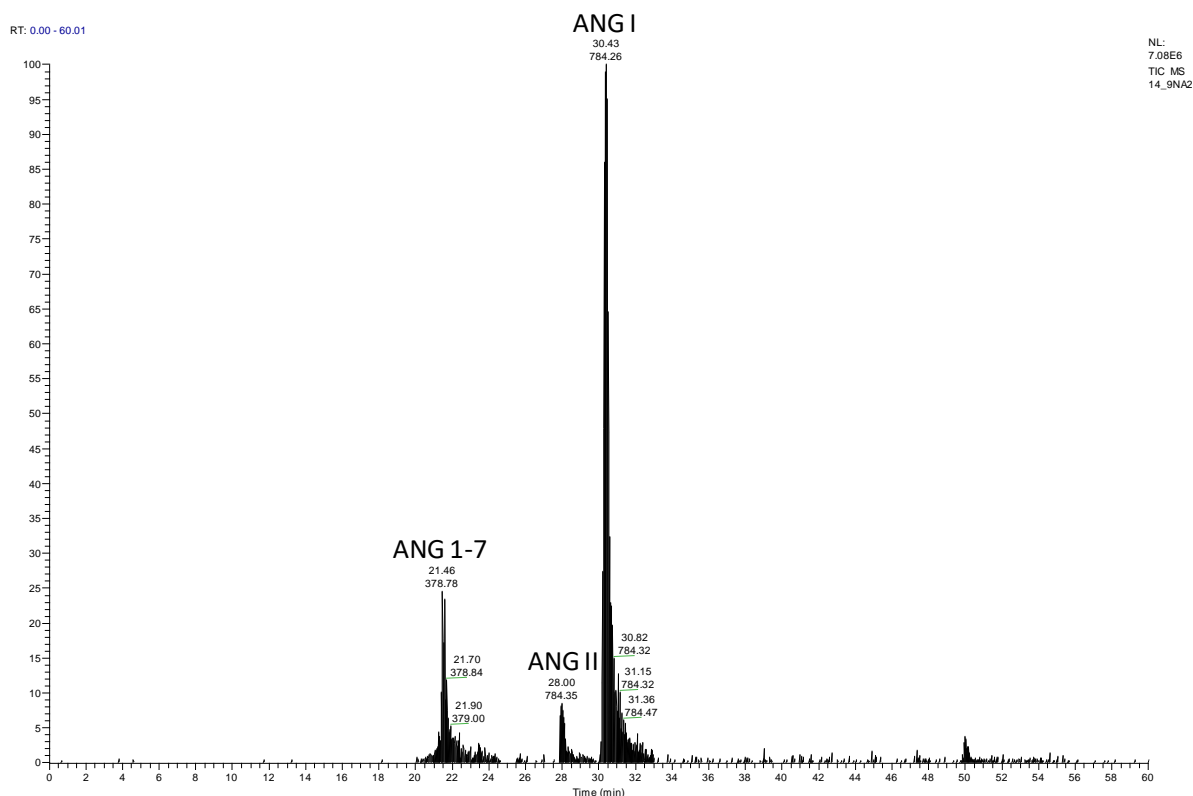
Zdj. 6. Zakrzepy w świetle naczyń. Kosmki łożyska duże, o obrzękłym podścielisku. HE 100x

4.3. Ocena metabolizmu egzogennej Ang I w tkance łożyska ex vivo

Metoda LC-MS pozwala na kompleksową ocenę produktów konwersji Ang I, co potwierdzono we wcześniejszych badaniach [35,36,149,150,152]. Wyznaczone parametry walidacyjne świadczą o jej wysokiej specyficzności i czułości. Zastosowanie opcji SRM umożliwia jednoznaczną i wiarygodną identyfikację poszczególnych peptydów angiotensynowych. Monitorowane pary jonów są charakterystyczne tylko dla jednej substancji.

Metabolizm egzogennej Ang I w tkankach łożyska zachodził bardzo wydajnie, a zastosowana metoda pozwalała na dokładne oszacowanie powstawania poszczególnych peptydów. (Ryc. 8) Zidentyfikowano wszystkie spodziewane metabolity. Ex vivo, głównym produktem rozkładu Ang I w łożysku była Ang-(1-7), pozostałe metabolity (Ang II, Ang III, Ang IV, Ang-(1-9) oraz Ang-(1-5)) formowane były na znacznie niższym poziomie (Ryc. 8, 9). W czasie pomiarów wstępnych zbadano działanie typowego inhibitora ACE podanego do próbówki, w której inkubowano fragmenty łożyska. Zgodnie z oczekiwaniami, preinkubacja z perindoprilatem spowodowała znaczny spadek produkcji Ang II zarówno w grupie badanej jak i porównawczej, średnio o około 90% (grupa badana - 86,02 %, grupa porównawcza - 90,05 %). Wyniki te pośrednio świadczą o przeważającej roli ACE w konwersji Ang I do Ang II w tkance łożyska.

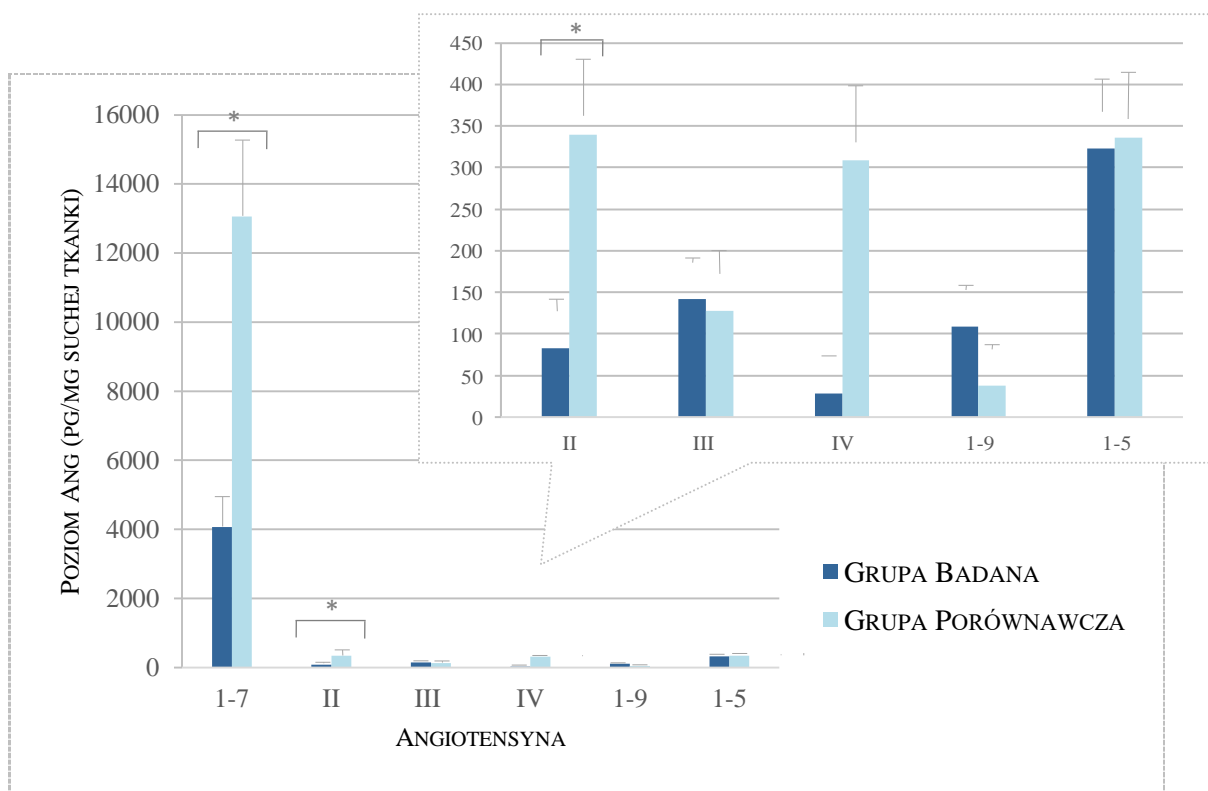
Metabolizm egzogennej Ang I przebiegał w podobny sposób w grupie badanej i porównawczej. Ang-(1-7) była głównym produktem rozkładu Ang I w obu grupach, co świadczy o podobnej aktywności enzymów odpowiedzialnych za konwersję Ang I do Ang-(1-7). (Ryc. 9)



Ryc. 8. Przykładowy chromatogram z inkubatu.

Powstawanie podstawowych metabolitów Ang I, czyli Ang II oraz Ang-(1-7), było znamienne niższe ($p < 0,01$) w łożyskach pacjentek ze stanem przedrzucawkowym, w porównaniu do łożysk pochodzących od pacjentek z grupy porównawczej (Ryc. 9, Tab. 8; wyniki w formie *scatterplot* pokazujące wartości u poszczególnych pacjentek przedstawione zostały w suplemencie). Średni stosunek stężeń Ang-(1-7) do Ang II, dający ogólny obraz o względnej przewadze powstawania poszczególnego metabolitu, był niższy w grupie badanej, jednakże różnica nie osiągnęła znamienności statystycznej (Tab. 8).

Poziomy innych metabolitów Ang I w grupie badanej były również niższe niż w grupie porównawczej, jednak różnice nie osiągnęły znamienności statystycznej (Ryc. 9). Brak znamienności pomimo widocznych na rycinie wyraźnych różnic pomiędzy grupami w średnich poziomach angiotensyn, zwłaszcza w przypadku Ang IV, wynikał z dużych rozrzutów wartości pomiarów u pojedynczych pacjentek, jak również związany był z niską liczebnością grup. Szczegółowe wyniki dla wybranych angiotensyn przedstawiono na wykresach *scatter plot* w suplemencie.



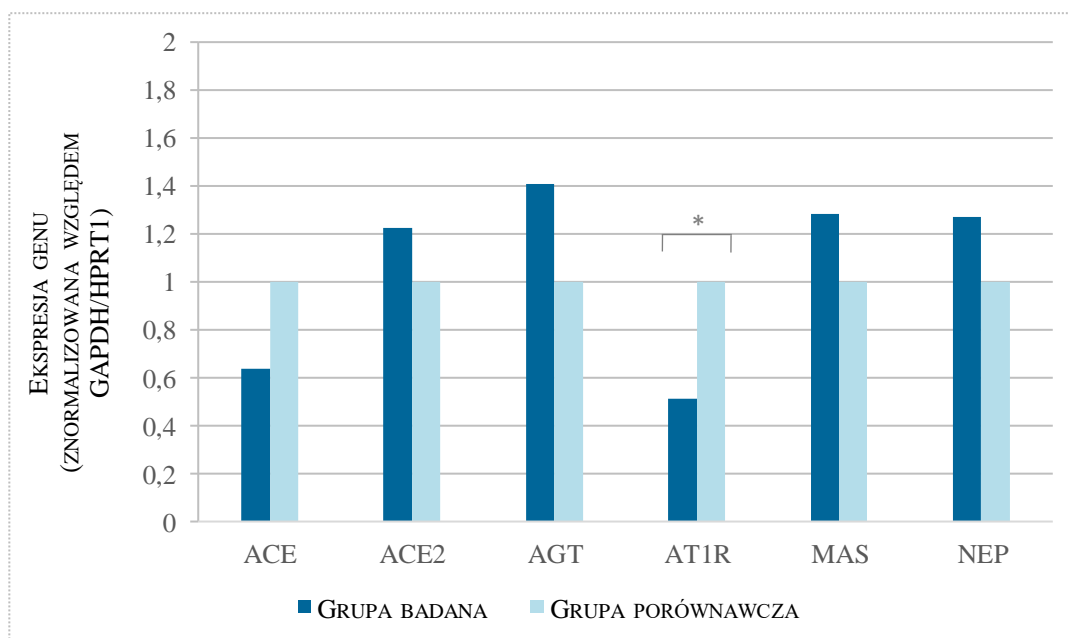
Ryc. 9. Porównanie produkcji metabolitów Ang I w łożysku w grupie badanej i porównawczej-wartości średnie i odchylenia standardowe (pg/mg suchej tkanki). Insert przedstawia powiększony fragment wykresu pozostałych metabolitów- poza Ang-(1-7). Wartości p dla poszczególnych angiotensyn: Ang-(1-7)- 0,0086; Ang II- 0,0086; Ang III- 0,2145; Ang IV-0,7272; Ang-(1-9)-0,1856; Ang-(1-5)- 0,1932
* $p < 0,05$

Tab. 8. Porównanie produkcji głównych metabolitów Ang I w łożysku pomiędzy grupami w pg/mg suchej tkanki.

	GRUPA BADANA	GRUPA PORÓWNAWCZA	TEST MANNA-WHITNEYA
Ang II	96,23 (14,30- 285,23)	405,44 (82,15- 1207,85)	** $p < 0.01$
Ang 1-7	3807,19 (97,23- 14 358,57)	12926,28 (1342,84- 37752,32)	** $p < 0.01$
Ang 1-7/Ang II	38,79 (2,23-128,17)	71,37 (2,29- 287,76)	ns.

4.4. Poziom mRNA w łożysku dla kluczowych elementów RAS

Wyniki uzyskane z pomiarów ekspresji mRNA genów dla poszczególnych składników układu RAS w łożyskach wskazują na mniejszą ekspresję mRNA dla receptora AT1 (różnica istotna statystycznie, do mniej niż 50% ekspresji w łożysku kontrolnym); w tkance łożyska pacjentek ze stanem przedzucawkowym występowało także zmniejszenie ekspresji mRNA dla ACE (do poziomu 60% kontroli), jednak bez znamienności statystycznej. Poziomy mRNA dla elementów alternatywnego szlaku konwersji Ang I (ACE2, NEP, receptor Mas) wykazywały nieco wyższą ekspresję u pacjentek z preeklampsją niż u kontrolnych, jednak różnice nie wykazywały istotności statystycznej (Ryc. 10).



Ryc. 10. Ekspresja genów poszczególnych składników układu RAA w łożyskach grupy badanej i porównawczej.
* $p < 0,05$

Przeprowadzono badania korelacji wartości ciśnienia skurczowego i rozkurczowego krwi z poziomami kluczowych metabolitów Ang I – Ang II oraz Ang-(1-7) – powstającymi *ex vivo*. Zarówno w grupie porównawczej, jak też w grupie pacjentek ze stanem przedzucawkowym nie stwierdzono korelacji poziomów Ang II, Ang-(1-7) ani wartości stosunku Ang-(1-7)/Ang II jak też ekspresji mRNA dla ACE w łożysku z wartościami ciśnienia skurczowego lub rozkurczowego krwi (graficzną prezentację wyników i ich statystyczną analizę przedstawiono w suplemencie).

5. Dyskusja

Od chwili odkrycia istnienia lokalnie działających układów RAS podejmowane są próby opracowania metod wiarygodnego i szybkiego pomiaru wytwarzania poszczególnych angiotensyn *in situ*. W niniejszej pracy, po raz pierwszy do oceny miejscowego działania RAS zastosowano metodę polegającą na zbadaniu *ex vivo* przy użyciu techniki LC-MS zdolności do konwersji Ang I przez fragmenty łożysk uzyskane z ciąż fizjologicznych oraz tych powikłanych rozwojem stanu przedrzucawkowego. W piśmiennictwie obecne są prace podejmujące zagadnienie miejscowego wytwarzania wybranych peptydów angiotensynowych w ciąży fizjologicznej oraz stanie przedrzucawkowym, jednak techniki zastosowane w tych badaniach wykazują kilka istotnych wad. W większości publikacji stosowano techniki immunoenzymatyczne, które przy wysokiej czułości nie zachowują odpowiedniego stopnia swoistości (na skutek krzyżowego wiązania przeciwciał do bardzo podobnych peptydów angiotensynowych), co może fałszować wyniki. Inną niedoskonałością technik immunoenzymatycznych jest to, że są one predefiniowane - zaprojektowane do pomiaru konkretnego peptydu i nie dają całościowego obrazu złożonego spektrum angiotensyn powstających w tkance. Zalety wybiórczości oraz całościowego podejścia wykazuje metoda oparta na frakcjonowaniu peptydów za pomocą chromatografii (LC) oraz ich detekcji metodą spektrometrii mas (MS) oznaczana razem jako LC-MS. Niestety, należy podkreślić, że również ta metoda wykazuje swoje ograniczenia: bardzo niskie stężenia endogennych angiotensyn w tkankach oraz ich wyjątkowo krótki czas półtrwania bardzo utrudnia pomiar stężeń tych peptydów przyżyciowo, w tkance. Z tego powodu w badaniach nad lokalnymi RAS zaproponowano model *ex vivo* tj. badanie *zdolności tkanki* do konwersji podstawowego substratu (egzogennej Ang I) do poszczególnych angiotensyn o aktywności biologicznej. Inkubując fragmenty tkanki z dużym stężeniem Ang I (zgodnie z założeniami kinetyki reakcji enzymatycznych, nadmiar substratu jest kluczowym warunkiem), już po kilku – kilkunastu minutach, w buforze, w którym inkubowana jest tkanka można stosunkowo łatwo zmierzyć stężenia całej gamy peptydów angiotensynowych. W takich warunkach każda tkanka wykazuje nieco inny „wzorzec” produkcji angiotensyn, zależny od poziomu ekspresji licznych enzymów biorących udział w ich powstawaniu. Na podstawie tego „wzorca” można wnioskować o preferencji w powstawania angiotensyn w sytuacji *in vivo*. Tego typu technika była już z powodzeniem stosowana w ocenie zdolności do konwersji angiotensyn w wielu

tkankach pochodzących z modeli zwierzęcych oraz wybranych komórek krwi ludzkiej [35,36,149-151].

W przeprowadzonym badaniu wykazano, że warunkach *ex vivo* tkanki łożyska wydajnie metabolizują egzogenną Ang I do całej gamy peptydów angiotensynowych, co stanowi jeszcze jedno potwierdzenie działania łożyskowego RAS i argument, że powstające tam angiotensyny mogą wywoływać ważne działania biologiczne. Wykazane w niniejszej pracy, niższe poziomy większości peptydów w grupie badanej mogą wskazywać na niższą aktywność RAS w łożysku w stanie przedrzucawkowym. Nasze wyniki wydają się być zgodne z danymi z piśmiennictwa, które wskazują, że w porównaniu do ciąży fizjologicznych, gdzie dochodzi do wzmożonej aktywności RAS zarówno we krwi, jak i w wielu tkankach, u pacjentek ze stanem przedrzucawkowym osoczowe poziomy poszczególnych składowych RAS (reniny, aldosteronu, Ang I i Ang-(1-7)) są niższe. Należy jednak podkreślić, że deficyt układowy nie musi iść w parze z deficytem tkankowym. W przypadku oceny powstawania i działania różnych angiotensyn w łożysku w preeklampsji niestety nie dysponujemy dużą ilością danych z piśmiennictwa. W badaniu, w którym autorzy badali poziom Ang-(1-7) i ACE2 w łożysku, stwierdzono podobną ekspresję obydwu składowych RAS zarówno w materiale pochodzącym z łożysk z ciąży fizjologicznej, jak i stanu przedrzucawkowego [146]. Również Kalenga i wsp. nie wykazali jakościowych i ilościowych zmian aktywności układu RAS (aktywna renina, prorenina, ACE i Ang-II) w łożyskach pochodzących z ciąży fizjologicznej i powikłanej stanem przedrzucawkowym. Z kolei Anton i wsp. wykazali wyższe poziomy Ang II w łożyskach kobiet z preeklampsją [153]. W niedawno opublikowanej pracy Gao i wsp. wykazali również zwiększony względem ciąży fizjologicznej poziom Ang II i podobny poziom Ang-(1-7) we krwi po matczynej stronie łożyska u pacjentek ze stanem przedrzucawkowym [154]. O ile w pierwszej cytowanej pracy autorzy uznali, że brak różnic w tkankach pochodzących z ciąży fizjologicznej i stanu przedrzucawkowego nie wyklucza związku przyczynowo - skutkowego między niedoborem Ang-(1-7) / ACE2 w stanie przedrzucawkowym (na co wskazują inne badania opisujące obniżony poziom krążącej Ang-(1-7) w PE), o tyle w drugiej pracy podnoszono głównie pogorszenie się fizjologicznej odpowiedzi na zwiększoną ilość Ang II (zależne od zmniejszonej ekspresji receptora AT1R) jako główny wykładnik zaburzeń funkcji naczyń łożyskowych w stanie przedrzucawkowym. W kontekście pracy Gao i wsp., wyniki uzyskane w niniejszej pracy przemawiają za głębokim, globalnym upośledzeniu działania RAS u pacjentek ze

stanem przedrzucawkowym. Potwierdzenie tej obserwacji oraz wyjaśnienie znaczenia takiego upośledzenia w patogenezie preeklampsji wymaga dalszych badań.

W piśmiennictwie są jedynie nieliczne prace próbujące odpowiedzieć na pytanie które peptydy angiotensynowe (np. Ang II, czy Ang-(1-7)) wytwarzane są w łożysku w największych ilościach w ciąży fizjologicznej i jak taka produkcja może zmieniać się w czasie rozwoju stanu przedrzucawkowego [60,64,153-156]. Metoda LC-MS umożliwia jednoczesny pomiar wielu peptydów angiotensynowych i bardziej wiarygodne, niż przy zastosowaniu metod immunoenzymatycznych, porównanie ich względnych poziomów. W niniejszym badaniu w obydwu grupach głównym pod względem ilościowym metabolitem Ang I w łożysku okazała się być Ang-(1-7). Jednocześnie przy użyciu naszego modelu *ex vivo* potwierdziliśmy, że za wytwarzanie Ang II w łożysku odpowiada głównie ACE, którego ekspresja wykazuje tendencje do obniżania się u pacjentek z preeklampsją. Względem grupy porównawczej, poziomy ekspresji w łożysku ACE2 i NEP w grupie badanej nie wykazują tendencji do zmian i można spekulować, że to właśnie spadek ekspresji ACE, przy zachowanym szlaku rozkładu Ang I do Ang-(1-7) z udziałem NEP może odpowiadać za względne kumulowanie się Ang-(1-9) i zmniejszenie powstawania Ang-(1-7) w grupie pacjentek z preeklampsją. Należy przy tym zaznaczyć, że w grupie badanej Ang-(1-7) generowana była przez tkanki łożyska wciąż w wielokrotnie większej ilości niż Ang II. Nasze wyniki wydają się być niezgodne z wynikami Anton i wsp., gdzie wykazano dwukrotnie większą ilość Ang II w kosmkach łożysk ze stanu przedrzucawkowego przy braku znaczących różnic (w porównaniu do ciąż fizjologicznych) dotyczących poziomu Ang I czy Ang-(1-7) [64]. Rozbieżność tę można tłumaczyć różnicami w metodologii pomiaru i interpretacji wyników – we wspomnianych pracach autorzy mierzyli poziomy peptydów w homogenatach łożysk metodą radioimmunoenzymatyczną interpretując je jako rzeczywiste *poziomy w tkance*, zaś uzyskane w niniejszym badaniu wyniki należy interpretować jako *wykładnik zdolności tkanki do konwersji Ang I w kierunku poszczególnych produktów*. Wiele prac doświadczalnych prowadzonych na modelach zwierzęcych wskazuje na ważną rolę peptydów układu RAS (zwłaszcza Ang II oraz Ang-(1-7)) w regulacji zarówno wczesnych etapów tworzenia się łożyska, jak i funkcji naczyń w łożysku dojrzałym [157-161]. Wydaje się, że podobne działania będą również miały znaczenie w fizjopatologii łożyska u ludzi. Kontrowersje, co do profilu powstawania poszczególnych produktów Ang I w łożysku ciąży fizjologicznej oraz u pacjentek z zaburzeniami jego budowy/funkcji wskazują na konieczność dalszych badań tego zagadnienia, z użyciem różnych metod i układów eksperymentalnych.

Należy podkreślić, że, niezależnie od użytej metody, ocena lokalnego powstawania angiotensyn stanowi ważny, ale nie jedyny czynnik pozwalający na ocenę aktywności fizjologicznej RAS w łożysku. Bardzo ważna w powyższym kontekście jest ocena cząsteczek efektorowych, przez które działają angiotensyny – przede wszystkim ich receptorów błonowych.

Nasze wyniki wskazują na zmniejszenie się ekspresji mRNA receptora dla Ang II w tkance łożyska u pacjentek z PE. W dostępnej literaturze istnieją sprzeczne doniesienia dotyczące zachowania się ekspresji w łożysku u pacjentek z PE – większość badań podkreśla raczej wzrost poziomu AT1R. Wzrost ekspresji receptora AT1 w stanie przedrzucawkowym, wykazany za pomocą badań immunohistochemicznych, oraz technikami RT-PCR i Western-blot, zaobserwowali Thapa i wsp. oraz Leung i wsp. [140,141]. Wzrost ekspresji receptora AT1 za pomocą autoradiografii w kosmku pacjentek z PE wykazali również Knock i wsp. [145]. W innym, szerszym badaniu, przy użyciu metod immunofluorescencyjnych, i RT-PCR wykazano znacznie podwyższoną ekspresję AT1R w łożysku w porównaniu z doczesną, niezależnie od występowania stanu przedrzucawkowego, tym niemniej w doczesnej pacjentek z ciążą powikłaną PE ekspresja receptora AT1 była aż 5-krotnie wyższa niż u pacjentek z ciążą fizjologiczną (należy jednak podkreślić, że różnic tych nie zaobserwowano w przypadku łożyska!). Autorzy wskazując na wysoką produkcję Ang II w doczesnej postulują wzmożoną doczesną ekspresję AT1R w stanie przedrzucawkowym jako wstępny krok do większej, patologicznej aktywacji RAS. Rozróżnili także tkanki pod względem pochodzenia na poziomie komórkowym – łożysko jako tkankę płodową, a doczesną jako maczyną, jednak zawierającą elementy zarówno od matki (endometrium) oraz płodu (kosmki, cytotrofoblast), i zasugerowali tkanki maczyne jako odpowiedzialne za generację Ang II, a łożysko jako narząd docelowy dla jej działania [143]. Także Anton i wsp. wykazali 3-krotny wzrost regulacji mRNA receptora AT1 w kosmku łożyska pacjentek ze stanem przedrzucawkowym, jednak siła wiązania receptora nie różniła się między grupami badaną i kontrolną [64]. Z kolei Knock i wsp. opisali obniżenie ekspresji receptora AT1R w łożyskach pacjentek z PE [145]. W kontekście przytoczonych wyników, wydaje się konieczne przeprowadzenie dalszych badań dokładnie lokalizujących AT1R na poszczególnych składowych łożyska.

Co ciekawe, po upływie kilku lat od porodu u pacjentek z nadciśnieniem w ciąży lub stanem przedrzucawkowym stale występuje zwiększona wrażliwość na podawaną Ang II. Autorzy sugerują związek ze zwiększoną ekspresją lub aktywnością receptora AT1 pomimo

upływu lat od wystąpienia nadciśnienia w ciąży, jednak nie przedstawiając bezpośrednich dowodów potwierdzających tę hipotezę [162].

Podobnie niejednoznaczne są dane z piśmiennictwa dotyczące zmian ekspresji ACE – enzymu konwertującego angiotensynę związanego z „klasycznym” szlakiem przemiany Ang I do Ang II. W naszym badaniu u pacjentek z PE występowała nieco niższa ekspresja mRNA dla ACE, tymczasem w pracach Herse’a i Kalengi nie stwierdzano różnic w ekspresji ACE (podobnie jak ACE2 i NEP) w łożysku pochodzącym z ciąż fizjologicznych oraz stanu przedrzucawkowego [128,163]. Z kolei inni autorzy postulowali wyższą ekspresję ACE w stanie przedrzucawkowym. Ito i wsp., a także Itakura i Mizutani wykazali, że ACE mRNA jest zlokalizowany głównie we frakcji naczyniowej łożyska, zwłaszcza w śródbłonku żylnym kosmków. Ponadto aktywność ACE w komórkach śródbłonka żylnego pępowiny była wyższa niż w komórkach pochodzenia tętniczego, w związku z czym badacze zasugerowali, że komórki śródbłonka żylnego łożyska oraz pępowiny mogą być głównym miejscem konwersji Ang I do Ang II wpływającej na krążenie płodowo-łożyskowe [155,156,164].

Nasze wyniki nie wskazują na duże zmiany w ekspresji innych niż ACE (NEP, ACE2, Mas) komponent RAS w łożysku u pacjentek z PE. W literaturze nie ma sporej ilości danych dotyczących zmian w poziomie tych „nieklasycznych” składowych w łożysku. Anton i wsp. wykazali, że poziom mRNA receptora Mas jest niższy w kosmku pochodzącym z łożyska pacjentek ze stanem przedrzucawkowym niż z ciąży fizjologicznej (co mogłoby wskazywać na upośledzenie działania Ang-(1-7)). Co ciekawe ci sami autorzy, podobnie jak my, wykazali, że poziom mRNA receptora AT2 był wyjątkowo niski (poniżej progu detekcji) [64]. Wszystkie przytoczone powyżej rozbieżności jasno wskazują na występowanie dużej heterogenności RAS w łożysku, oraz na konieczność dalszych kompleksowych badań funkcjonowania tego ważnego układu w fizjopatologii łożyska.

Ze względu na zastosowanie nowego układu eksperymentalnego i techniki analitycznej nasze badanie ma rys badania wstępnego. Z kolei mocną stroną naszej pracy jest staranne wyselekcjonowanie pacjentek (także pod względem sposobu zakończenia ciąży), tak by stanowiły pod względem klinicznych jak najbardziej homogeną grupę. Różnice pojawiające się między grupami (parametry takie, jak ciśnienie tętnicze, białkomocz, rodność, czas trwania ciąży, masa i długość dziecka) wynikają z naturalnego przebiegu choroby. W grupie badanej wszystkie pacjentki rozwiązano cięciem cesarskim ze wskazań pilnych, tak więc zarówno wiek ciążowy, jak i masa oraz długość dziecka są mniejsze. Brak istotnych różnic w przepływach dopplerowskich w tętnicy pępowinowej i środkowej mózgu można

tłumaczyć faktem, że były wykonywane w ramach standardowej procedury przy przyjęciu do szpitala, przez różnych lekarzy, a nie w momencie pogorszenia stanu klinicznego i decyzji o zakończeniu ciąży – co niestety nie zawsze jest możliwe ze względu na stan kliniczny oraz konieczność pilnego wykonania cięcia cesarskiego. Ponadto mała liczebność grup, oraz brak standaryzacji pomiaru (czyli odpowiednia technika, ustawienia aparatu, przeszkolony ultrasonografista) nie pozwala na wyciągnięcie wniosków odnośnie tych parametrów. Warto przy tym nadmienić, że praca skupia się na ocenie funkcjonowania RAS w łożysku, a nie przydatności technik biofizycznych w ocenie stanu przedrzucawkowego. W przypadku oceny ilościowej poszczególnych składowych RAS opisywane dotychczas różnice na poszczególnych etapach ciąży dotyczą trymestrów, a nie kolejnych tygodni [59]. Jako, że wszystkie pacjentki zarówno w grupie badanej, jak i porównawczej, rozwiązane były w trzecim trymestrze, kilkutygodniowe różnice (średnio 33 tygodnie vs. 39 tygodni) nie powinny znacząco zaburzać uzyskanych wyników.

W badaniach biochemicznych jest powszechnie uznane, że metoda jaką jest chromatografia cieczowa z detekcją masową pozwala na kompleksową ocenę metabolizmu angiotensyn, istotny problem – zwłaszcza przy ocenie lokalnych układów RAS - stanowi jednak czułość i niestabilność mierzonych metabolitów. Tę trudność można częściowo pokonać stosując układ pomiarowy *ex vivo*. Warto nadmienić, że w żadnym z dotychczasowych badań nie stosowano tej techniki w przypadku łożyska. Ze względu na swój wstępny charakter badanie wykazuje też ograniczenia. Skoncentrowano się na analizie łożyskowego układu renina-angiotensyna, nie uwzględniając układowego RAS, co niewątpliwie mogłoby poszerzyć perspektywę badania i wprowadzić dodatkowe punkty odniesienia. W układzie *ex vivo* istnieje możliwość poszerzonej analizy aktywności innych niż ACE proteaz RAS metodami farmako-biochemicznymi (użycie swoistych inhibitorów NEP, ACE2, chymazy itp.), czego tu, ze względu na ograniczenia czasowe, a także materiału badawczego, nie udało się wykonać, a z pewnością mogłoby to rzucić nowe światło na funkcjonowanie łożyskowego RAS w PE. Ciekawych informacji mogłoby także dostarczyć zbadanie osoczowego poziomu autoprzeciwciał przeciw AT1R, odgrywających ważną rolę regulacji ekspresji RAS.

Wyniki naszej pracy, wpisując się w nurt badań nad funkcjonowaniem RAS w łożysku przemawiają za projektowaniem dalszych badań, prowadzonych na większych grupach pacjentek, łączących kilka technik oceny (LC-MS, techniki immunoenzymatyczne, immunofluorescencja, chemiluminescencja, autoradiografia).

6. Wnioski

1. Zastosowanie modelu pomiaru metabolizmu angiotensyn metodą LC-MS *ex vivo* umożliwia uzyskanie wiarygodnych i powtarzalnych wyników w tkance łożyska.
2. W warunkach *ex vivo* tkanki łożyska wydajnie metabolizują egzogenną Ang I do całej gamy peptydów angiotensynowych, zaś ilościowo podstawowym metabolitem w łożysku jest Ang-(1-7).
3. Nie wykazano różnic w profilu powstawania angiotensyn w łożysku u ciężarnych ze stanem przedzucawkowym w odniesieniu do grupy porównawczej – poszczególne metabolity Ang I obecne były w obu w grupach.
4. Ang II oraz Ang-(1-7), jako główne produkty rozkładu Ang I, formowane były w znamiennej niższej ilości w łożyskach ze stanu przedzucawkowego, co świadczy o niższej zdolności metabolizmu Ang I przez łożysko w grupie badanej. Pozostałe metabolity były produkowane również w mniejszej ilości, jednak nie osiągnęły istotności statystycznej. Może to wskazywać na ilościowe upośledzenie aktywności RAS w łożysku w stanie przedzucawkowym, dotyczące w podobny sposób wszystkich szlaków tego układu.
5. Niższa ekspresja receptora dla Ang II wraz z tendencją do niższej ekspresji ACE w łożyskach pochodzących z grupy badanej może sugerować *lokalne* upośledzenie działania osi Ang I / Ang II / AT1R.
6. W grupie porównawczej, jak też w grupie ciężarnych ze stanem przedzucawkowym nie stwierdzono korelacji poziomów Ang II, Ang-(1-7) ani wartości stosunku Ang-(1-7)/Ang II, jak też ekspresji mRNA dla ACE w łożysku z wartościami ciśnienia skurczowego lub rozkurczowego krwi.

BIBLIOGRAFIA

1. Jensen BL, Schmid C, Kurtz A. Prostaglandins stimulate renin secretion and renin mRNA in mouse renal juxtaglomerular cells. *Am J Physiol.* 1996;271(3 Pt 2):F659-669.
2. Pan N, Frome WL, Dart RA, Tewksbury D, Luo J. Expression of the renin-angiotensin system in a human placental cell line. *Clin Med Res.* 2013;11(1):1–6.
3. Hagemann A, Nielsen AH, Poulsen K. The uteroplacental renin-angiotensin system: a review. *Exp Clin Endocrinol.* 1994;102(3):252–61.
4. Poisner AM. The human placental renin-angiotensin system. *Front Neuroendocrinol.* 1998;19(3):232–52.
5. Varagic J, Trask AJ, Jessup JA, Chappell MC, Ferrario CM. New angiotensins. *J Mol Med Berl Ger.* 2008;86(6):663–71.
6. Hunyady L, Catt KJ. Pleiotropic AT1 Receptor Signaling Pathways Mediating Physiological and Pathogenic Actions of Angiotensin II. *Mol Endocrinol.* 2006;20(5):953–70.
7. Baker KM, Booz GW, Dostal DE. Cardiac Actions of Angiotensin II: Role of an Intracardiac Renin-Angiotensin System. *Annu Rev Physiol.* 1992;54(1):227–41.
8. Touyz RM, Schiffrin EL. Signal Transduction Mechanisms Mediating the Physiological and Pathophysiological Actions of Angiotensin II in Vascular Smooth Muscle Cells. *Pharmacol Rev.* 1 2000;52(4):639–72.
9. Barton M, Carmona R, Krieger JE, Göettsch W, Morawietz H, d’Uscio LV, i in. Endothelin regulates angiotensin-converting enzyme in the mouse kidney. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2000;36:S244-247.
10. Schling P, Löffler G. Cross talk between adipose tissue cells: impact on pathophysiology. *News Physiol Sci Int J Physiol Prod Jointly Int Union Physiol Sci Am Physiol Soc.* 2002;17:99–104.
11. Santos RAS, Ferreira AJ, Simões E Silva AC. Recent advances in the angiotensin-converting enzyme 2-angiotensin(1-7)-Mas axis. *Exp Physiol.* 2008;93(5):519–27.
12. Joyner J, Neves L a. A, Stovall K, Ferrario CM, Brosnihan KB. Angiotensin-(1-7) serves as an aquaretic by increasing water intake and diuresis in association with

- downregulation of aquaporin-1 during pregnancy in rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2008;294(3):R1073-1080.
13. Matsubara K, Matsubara Y, Hyodo S, Katayama T, Ito M. Role of nitric oxide and reactive oxygen species in the pathogenesis of preeclampsia. *J Obstet Gynaecol Res*. 2010;36(2):239–47.
 14. Harrison D, Griendling KK, Landmesser U, Hornig B, Drexler H. Role of oxidative stress in atherosclerosis. *Am J Cardiol*. 2003;91(3A):7A–11A.
 15. Ram CVS. Angiotensin receptor blockers: current status and future prospects. *Am J Med*. 2008;121(8):656–63.
 16. Ferreira AJ, Santos R a. S. Cardiovascular actions of angiotensin-(1-7). *Braz J Med Biol Res Rev Bras Pesqui Medicas E Biol*. 2005;38(4):499–507.
 17. Simões e Silva AC, Silveira KD, Ferreira AJ, Teixeira MM. ACE2, angiotensin-(1-7) and Mas receptor axis in inflammation and fibrosis. *Br J Pharmacol*. 2013;169(3):477–92.
 18. Vickers C, Hales P, Kaushik V, Dick L, Gavin J, Tang J, i in. Hydrolysis of biological peptides by human angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase. *J Biol Chem*. 2002;277(17):14838–43.
 19. Donoghue M, Hsieh F, Baronas E, Godbout K, Gosselin M, Stagliano N, i in. A novel angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase (ACE2) converts angiotensin I to angiotensin 1-9. *Circ Res*. 2000;87(5):E1-9.
 20. Tipnis SR, Hooper NM, Hyde R, Karran E, Christie G, Turner AJ. A human homolog of angiotensin-converting enzyme. Cloning and functional expression as a captopril-insensitive carboxypeptidase. *J Biol Chem*. 2000;275(43):33238–43.
 21. Santos RAS, Haibara AS, Campagnole-Santos MJ, Simões e Silva AC, Paula RD, Pinheiro SVB, i in. Characterization of a new selective antagonist for angiotensin-(1-7), D-pro7-angiotensin-(1-7). *Hypertens* 2003;41(3 Pt 2):737–43.
 22. Ferrario CM. ACE2: more of Ang-(1-7) or less Ang II? *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2011;20(1):1–6.
 23. Simões E Silva AC, Flynn JT. The renin-angiotensin-aldosterone system in 2011: role in hypertension and chronic kidney disease. *Pediatr Nephrol Berl Ger*. 2012;27(10):1835–1845.

24. Kucharewicz I, Pawlak R, Matys T, Pawlak D, Buczko W. Antithrombotic effect of captopril and losartan is mediated by angiotensin-(1-7). *Hypertens* 2002;40(5):774–9.
25. Ferrario CM, Chappell MC. Novel angiotensin peptides. *Cell Mol Life Sci CMLS*. 2004;61(21):2720–7.
26. Santos RAS, Ferreira AJ. Angiotensin-(1-7) and the renin-angiotensin system. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2007;16(2):122–8.
27. Haulica I, Bild W, Serban DN. Angiotensin peptides and their pleiotropic actions. *J Renin-Angiotensin-Aldosterone Syst JRAAS*. 2005;6(3):121–31.
28. Kramkowski K, Mogielnicki A, Buczko W. The physiological significance of the alternative pathways of angiotensin II production. *J Physiol Pharmacol Off J Pol Physiol Soc*. 2006;57(4):529–39.
29. Leckie BJ. Targeting the renin-angiotensin system: what's new? *Curr Med Chem Cardiovasc Hematol Agents*. 2005;3(1):23–32.
30. Santos R a. S, Frézard F, Ferreira AJ. Angiotensin-(1-7): blood, heart, and blood vessels. *Curr Med Chem Cardiovasc Hematol Agents*. 2005;3(4):383–91.
31. Wysocki J, González-Pacheco FR, Batlle D. Angiotensin-converting enzyme 2: possible role in hypertension and kidney disease. *Curr Hypertens Rep*. 2008;10(1):70–7.
32. Ye M, Wysocki J, Naaz P, Salabat MR, LaPointe MS, Batlle D. Increased ACE 2 and decreased ACE protein in renal tubules from diabetic mice: a renoprotective combination? *Hypertens* 2004;43(5):1120–5.
33. Anastasopoulos F, Leung R, Kladis A, James GM, Briscoe TA, Gorski TP, i in. Marked difference between angiotensin-converting enzyme and neutral endopeptidase inhibition in vivo by a dual inhibitor of both enzymes. *J Pharmacol Exp Ther*. 1998;284(3):799–805.
34. Campbell DJ, Alexiou T, Xiao HD, Fuchs S, McKinley MJ, Corvol P, i in. Effect of reduced angiotensin-converting enzyme gene expression and angiotensin-converting enzyme inhibition on angiotensin and bradykinin peptide levels in mice. *Hypertens* 2004;43(4):854–9.

35. Olszanecki R, Madej J, Suski M, Gebska A, Bujak-Gizycka B, Korbut R. Angiotensin metabolism in rat stomach wall: prevalence of angiotensin-(1-7) formation. *J Physiol Pharmacol Off J Pol Physiol Soc.* 2009;60(1):191–6.
36. Bujak-Gizycka B, Madej J, Wołkow PP, Olszanecki R, Drabik L, Rutowski J, i in. Measurement of angiotensin metabolites in organ bath and cell culture experiments by liquid chromatography - electrospray ionization - mass spectrometry (LC-ESI-MS). *J Physiol Pharmacol Off J Pol Physiol Soc.* 2007;58(3):529–40.
37. Speth RC, Giese MJ. Update on the Renin-Angiotensin System. *J Pharmacol Clin Toxicol.* 2013 ; 1(1):1004
38. Ferreira SH. A bradykinin-potentiating factor (BPF) present in the venom of bothrops jararaca. *Br J Pharmacol Chemother.* 1965;24:163–9.
39. Soffer RL. Angiotensin-converting enzyme and the regulation of vasoactive peptides. *Annu Rev Biochem.* 1976;45:73–94.
40. Grobe N, Weir NM, Leiva O, Ong FS, Bernstein KE, Schmaier AH, i in. Identification of prolyl carboxypeptidase as an alternative enzyme for processing of renal angiotensin II using mass spectrometry. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2013;304(10):C945-953.
41. Velloso EP, Vieira R, Cabral AC, Kalapothakis E, Santos R a. S. Reduced plasma levels of angiotensin-(1-7) and renin activity in preeclamptic patients are associated with the angiotensin I- converting enzyme deletion/deletion genotype. *Braz J Med Biol Res.* 2007;40(4):583–90.
42. Shah DM. The role of RAS in the pathogenesis of preeclampsia. *Curr Hypertens Rep.* 2006;8(2):144–52.
43. Herr D, Bekes I, Wulff C. Local Renin-Angiotensin system in the reproductive system. *Front Endocrinol.* 2013;4:150.
44. August P, Lenz T, Ales KL, Druzin ML, Edersheim TG, Hutson JM, i in. Longitudinal study of the renin-angiotensin-aldosterone system in hypertensive pregnant women: deviations related to the development of superimposed preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol.* 1990;163:1612–21.
45. Anton L, Brosnihan KB. Systemic and uteroplacental renin--angiotensin system in normal and pre-eclamptic pregnancies. *Ther Adv Cardiovasc Dis.* 2008;2(5):349–62.

46. Brown MA, Wang J, Whitworth JA. The renin-angiotensin-aldosterone system in pre-eclampsia. *Clin Exp Hypertens N Y N* 1993. 1997;19(5–6):713–26.
47. Poston L. The control of blood flow to the placenta. *Exp Physiol*. 1997;82(2):377–87.
48. Speroff L, Haning RV, Levin RM. The effect of angiotensin II and indomethacin on uterine artery blood flow in pregnant monkeys. *Obstet Gynecol*. 1977;50(5):611–4.
49. Naden RP, Rosenfeld CR. Effect of angiotensin II on uterine and systemic vasculature in pregnant sheep. *J Clin Invest*. 1981;68(2):468–74.
50. Abdul-Karim R, Assalin S. Pressor response to angiotensin in pregnant and nonpregnant women. *Am J Obstet Gynecol*. 1961;82:246–51.
51. Gant NF, Daley GL, Chand S, Whalley PJ, MacDonald PC. A study of angiotensin II pressor response throughout primigravid pregnancy. *J Clin Invest*. 1973;52(11):2682–9.
52. Irani RA, Xia Y. Renin angiotensin signaling in normal pregnancy and preeclampsia. *Semin Nephrol*. 2011;31(1):47–58.
53. AbdAlla S, Lothar H, el Massiery A, Quitterer U. Increased AT(1) receptor heterodimers in preeclampsia mediate enhanced angiotensin II responsiveness. *Nat Med*. 2001;7(9):1003–9.
54. Brosnihan KB, Li P, Ganten D, Ferrario CM. Estrogen protects transgenic hypertensive rats by shifting the vasoconstrictor-vasodilator balance of RAS. *Am J Physiol*. 1997;273(6 Pt 2):R1908-1915.
55. Ferrario CM, Chappell MC, Tallant EA, Brosnihan KB, Diz DI. Counterregulatory actions of angiotensin-(1-7). *Hypertens* 1997;30(3 Pt 2):535–41.
56. Brosnihan KB, Li P, Ferrario CM. Angiotensin-(1-7) dilates canine coronary arteries through kinins and nitric oxide. *Hypertens* 1996;27(3 Pt 2):523–8.
57. Osei SY, Ahima RS, Minkes RK, Weaver JP, Khosla MC, Kadowitz PJ. Differential responses to angiotensin-(1-7) in the feline mesenteric and hindquarters vascular beds. *Eur J Pharmacol*. 1993;234(1):35–42.
58. Gorelik G, Carbini LA, Scicli AG. Angiotensin 1-7 induces bradykinin-mediated relaxation in porcine coronary artery. *J Pharmacol Exp Ther*. 1998;286(1):403–10.

59. Brosnihan KB, Neves L a. A, Anton L, Joyner J, Valdes G, Merrill DC. Enhanced expression of Ang-(1-7) during pregnancy. *Braz J Med Biol Res Rev Bras Pesqui Medicas E Biol.* 2004;37(8):1255–62.
60. Merrill DC, Karoly M, Chen K, Ferrario CM, Brosnihan KB. Angiotensin-(1-7) in normal and preeclamptic pregnancy. *Endocrine.* 2002;18(3):239–45.
61. Valdés G, Germain AM, Corthorn J, Berrios C, Foradori AC, Ferrario CM, i in. Urinary vasodilator and vasoconstrictor angiotensins during menstrual cycle, pregnancy, and lactation. *Endocrine.* 2001;16(2):117–22.
62. Morgan T, Craven C, Ward K. Human spiral artery renin-angiotensin system. *Hypertens* 1998;32(4):683–7.
63. Li C, Ansari R, Yu Z, Shah D. Definitive molecular evidence of renin-angiotensin system in human uterine decidual cells. *Hypertens* 2000;36(2):159–64.
64. Anton L, Merrill DC, Neves LAA, Stovall K, Gallagher PE, Diz DI, i in. Activation of local chorionic villi angiotensin II levels but not angiotensin (1-7) in preeclampsia. *Hypertens* 2008;51(4):1066–72.
65. Anton L, Merrill DC, Neves LAA, Gruver C, Moorefield C, Brosnihan KB. Angiotensin II and angiotensin-(1-7) decrease sFlt1 release in normal but not preeclamptic chorionic villi: an in vitro study. *Reprod Biol Endocrinol RBE.* 2010;8:135.
66. Pan P, Fu H, Zhang L, Huang H, Luo F, Wu W, i in. Angiotensin II upregulates the expression of placental growth factor in human vascular endothelial cells and smooth muscle cells. *BMC Cell Biol.* 2010;11:36.
67. Kalenga MK, De Gasparo M, Thomas K, De Hertogh R. Angiotensin-II stimulates estradiol secretion from human placental explants through AT1 receptor activation. *J Clin Endocrinol Metab.* 1995;80(4):1233–7.
68. Zhou CC, Ahmad S, Mi T, Abbasi S, Xia L, Day M-C, i in. Autoantibody from women with preeclampsia induces soluble Fms-like tyrosine kinase-1 production via angiotensin type 1 receptor and calcineurin/nuclear factor of activated T-cells signaling. *Hypertens* 2008;51(4):1010–9.
69. Meis PJ, Goldenberg RL, Mercer BM, Iams JD, Moawad AH, Miodovnik M, i in. The preterm prediction study: risk factors for indicated preterm births. *Maternal-Fetal*

- Medicine Units Network of the National Institute of Child Health and Human Development. *Am J Obstet Gynecol.* 1998;178(3):562–7.
70. Sibai BM. Diagnosis and management of gestational hypertension and preeclampsia. *Obstet Gynecol.* 2003;102(1):181–92.
 71. Walker JJ. Pre-eclampsia. *Lancet Lond Engl.* 2000;356(9237):1260–5.
 72. North RA, McCowan LME, Dekker GA, Poston L, Chan EHY, Stewart AW, i in. Clinical risk prediction for pre-eclampsia in nulliparous women: development of model in international prospective cohort. *BMJ.* 2011;342:d1875.
 73. Poston L. Endothelial dysfunction in pre-eclampsia. *Pharmacol Rep.* 2006;58 Suppl:69–74.
 74. Redman CWG, Sargent IL. Placental stress and pre-eclampsia: a revised view. *Placenta.* 2009;30 Suppl A:S38-42.
 75. Kaufmann P, Black S, Huppertz B. Endovascular trophoblast invasion: implications for the pathogenesis of intrauterine growth retardation and preeclampsia. *Biol Reprod.* 2003;69(1):1–7.
 76. Eskenazi B, Fenster L, Sidney S. A multivariate analysis of risk factors for preeclampsia. *JAMA.* 1991;266(2):237–41.
 77. López-Jaramillo P, García RG, López M. Preventing pregnancy-induced hypertension: are there regional differences for this global problem? *J Hypertens* 2005;23(6):1121–9.
 78. Chaddha V, Viero S, Huppertz B, Kingdom J. Developmental biology of the placenta and the origins of placental insufficiency. *Semin Fetal Neonatal Med.* 2004;9(5):357–69.
 79. Hirano H, Imai Y, Ito H. Spiral artery of placenta: development and pathology-immunohistochemical, microscopical, and electron-microscopic study. *Kobe J Med Sci.* 2002;48(1–2):13–23.
 80. Robillard PY, Hulsey TC, Périanin J, Janky E, Miri EH, Papiernik E. Association of pregnancy-induced hypertension with duration of sexual cohabitation before conception. *Lancet Lond Engl.* 1994;344(8928):973–5.
 81. Redman CWG, Sargent IL. Pre-eclampsia, the placenta and the maternal systemic inflammatory response--a review. *Placenta.* 2003;24 Suppl A:S21-27.
 82. Roberts JM, Gammill HS. Preeclampsia: recent insights. *Hypertens* 2005;46(6):1243–9.

83. Bernardi F, Guolo F, Bortolin T, Petronilho F, Dal-Pizzol F. Oxidative stress and inflammatory markers in normal pregnancy and preeclampsia. *J Obstet Gynaecol Res.* 2008;34(6):948–51.
84. Granger JP, Alexander BT, Llinas MT, Bennett WA, Khalil RA. Pathophysiology of preeclampsia: linking placental ischemia/hypoxia with microvascular dysfunction. *Microcirc.* 2002;9(3):147–60.
85. Levine RJ, Karumanchi SA. Circulating angiogenic factors in preeclampsia. *Clin Obstet Gynecol.* 2005;48(2):372–86.
86. Maynard S, Epstein FH, Karumanchi SA. Preeclampsia and angiogenic imbalance. *Annu Rev Med.* 2008;59:61–78.
87. Wang A, Rana S, Karumanchi SA. Preeclampsia: the role of angiogenic factors in its pathogenesis. *Physiol Bethesda Md.* 2009;24:147–58.
88. Kendall RL, Thomas KA. Inhibition of vascular endothelial cell growth factor activity by an endogenously encoded soluble receptor. *Proc Natl Acad Sci.* 1993;90(22):10705–9.
89. Sato Y, Kanno S, Oda N, Abe M, Ito M, Shitara K, i in. Properties of two VEGF receptors, Flt-1 and KDR, in signal transduction. *Ann N Y Acad Sci.* 2000;902:201-205; discussion 205-207.
90. Luttun A, Tjwa M, Carmeliet P. Placental growth factor (PlGF) and its receptor Flt-1 (VEGFR-1): novel therapeutic targets for angiogenic disorders. *Ann N Y Acad Sci.* 2002;979:80–93.
91. López-Novoa JM. Soluble endoglin is an accurate predictor and a pathogenic molecule in pre-eclampsia. *Nephrol Dial Transplant Off Publ Eur Dial Transpl Assoc - Eur Ren Assoc.* 2007;22(3):712–4.
92. Widmer M, Villar J, Benigni A, Conde-Agudelo A, Karumanchi SA, Lindheimer M. Mapping the theories of preeclampsia and the role of angiogenic factors: a systematic review. *Obstet Gynecol.* 2007;109(1):168–80.
93. Murphy SR, LaMarca BBD, Parrish M, Cockrell K, Granger JP. Control of soluble fms-like tyrosine-1 (sFlt-1) production response to placental ischemia/hypoxia: role of tumor necrosis factor- α . *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2013;304(2):R130-135.

94. Venkatesha S, Toporsian M, Lam C, Hanai J, Mammoto T, Kim YM, i in. Soluble endoglin contributes to the pathogenesis of preeclampsia. *Nat Med.* 2006;12(6):642–9.
95. Levine RJ, Maynard SE, Qian C, Lim K-H, England LJ, Yu KF, i in. Circulating angiogenic factors and the risk of preeclampsia. *N Engl J Med.* 2004;350(7):672–83.
96. Levine RJ, Lam C, Qian C, Yu KF, Maynard SE, Sachs BP, i in. Soluble endoglin and other circulating antiangiogenic factors in preeclampsia. *N Engl J Med.* 2006;355(10):992–1005.
97. Nagamatsu T, Fujii T, Kusumi M, Zou L, Yamashita T, Osuga Y, i in. Cytotrophoblasts up-regulate soluble fms-like tyrosine kinase-1 expression under reduced oxygen: an implication for the placental vascular development and the pathophysiology of preeclampsia. *Endocrinology.* 2004;145(11):4838–45.
98. Herberts C, Melgert B, van der Laan JW, Faas M. New adjuvanted vaccines in pregnancy: what is known about their safety? *Expert Rev Vaccines.* 2010;9(12):1411–22.
99. Lash GE, Robson SC, Bulmer JN. Review: Functional role of uterine natural killer (uNK) cells in human early pregnancy decidua. *Placenta.* 2010;31 Suppl:S87-92.
100. Nagamatsu T, Schust DJ. The immunomodulatory roles of macrophages at the maternal-fetal interface. *Reprod Sci Thousand Oaks Calif.* 2010;17(3):209–18.
101. Silva LM, Coolman M, Steegers EA, Jaddoe VW, Moll HA, Hofman A, i in. Low socioeconomic status is a risk factor for preeclampsia: the Generation R Study. *J Hypertens* 2008;26(6):1200–8.
102. Miyazaki S, Tsuda H, Sakai M, Hori S, Sasaki Y, Futatani T, i in. Predominance of Th2-promoting dendritic cells in early human pregnancy decidua. *J Leukoc Biol.* 2003;74(4):514–22.
103. Prins JR, Boelens HM, Heimweg J, Van der Heide S, Dubois AE, Van Oosterhout AJ, i in. Preeclampsia is associated with lower percentages of regulatory T cells in maternal blood. *Hypertens Pregnancy.* 2009;28(3):300–11.
104. Aluvihare VR, Kallikourdis M, Betz AG. Regulatory T cells mediate maternal tolerance to the fetus. *Nat Immunol.* 2004;5(3):266–71.
105. Sakaguchi S, Yamaguchi T, Nomura T, Ono M. Regulatory T cells and immune tolerance. *Cell.* 2008;133(5):775–87.

106. Sasaki Y, Sakai M, Miyazaki S, Higuma S, Shiozaki A, Saito S. Decidual and peripheral blood CD4+CD25+ regulatory T cells in early pregnancy subjects and spontaneous abortion cases. *Mol Hum Reprod.* 2004;10(5):347–53.
107. LaMarca B, Cornelius D, Wallace K. Elucidating immune mechanisms causing hypertension during pregnancy. *Physiol Bethesda Md.* 2013;28(4):225–33.
108. Santner-Nanan B, Peek MJ, Khanam R, Richarts L, Zhu E, Fazekas de St Groth B, i in. Systemic increase in the ratio between Foxp3+ and IL-17-producing CD4+ T cells in healthy pregnancy but not in preeclampsia. *J Immunol Baltim Md.* 2009;183(11):7023–30.
109. Wallace K, Richards S, Dhillon P, Weimer A, Edholm E, Bengten E, i in. CD4+ T-helper cells stimulated in response to placental ischemia mediate hypertension during pregnancy. *Hypertens* 2011;57(5):949–55.
110. Saito S, Shiozaki A, Sasaki Y, Nakashima A, Shima T, Ito M. Regulatory T cells and regulatory natural killer (NK) cells play important roles in feto-maternal tolerance. *Semin Immunopathol.* 2007;29(2):115–22.
111. LaMarca BBD, Cockrell K, Sullivan E, Bennett W, Granger JP. Role of endothelin in mediating tumor necrosis factor-induced hypertension in pregnant rats. *Hypertens* 2005;46(1):82–6.
112. Formby B. Immunologic response in pregnancy. Its role in endocrine disorders of pregnancy and influence on the course of maternal autoimmune diseases. *Endocrinol Metab Clin North Am.* 1995;24(1):187–205.
113. Gadonski G, LaMarca BBD, Sullivan E, Bennett W, Chandler D, Granger JP. Hypertension produced by reductions in uterine perfusion in the pregnant rat: role of interleukin 6. *Hypertens* 2006;48(4):711–6.
114. Keiser SD, Veillon EW, Parrish MR, Bennett W, Cockrell K, Fournier L, i in. Effects of 17-hydroxyprogesterone on tumor necrosis factor-alpha-induced hypertension during pregnancy. *Am J Hypertens* 2009;22(10):1120–5.
115. Arriaga-Pizano L, Jimenez-Zamudio L, Vadillo-Ortega F, Martinez-Flores A, Herrerias-Canedo T, Hernandez-Guerrero C. The predominant Th1 cytokine profile in maternal plasma of preeclamptic women is not reflected in the choriodecidual and fetal compartments. *J Soc Gynecol Investig.* 2005;12(5):335–42.

116. Hennessy A, Pilmore HL, Simmons LA, Painter DM. A deficiency of placental IL-10 in preeclampsia. *J Immunol Baltim Md 1950*. 1999;163(6):3491–5.
117. Yang X, Guo L, Li H, Chen X, Tong X. Analysis of the original causes of placental oxidative stress in normal pregnancy and pre-eclampsia: a hypothesis. *J Matern-Fetal Neonatal Med Off J Eur Assoc Perinat Med Fed Asia Ocean Perinat Soc Int Soc Perinat Obstet*. 2012;25(7):884–8.
118. Kalyanaraman B. Teaching the basics of redox biology to medical and graduate students: Oxidants, antioxidants and disease mechanisms. *Redox Biol*. 2013;1:244–57.
119. Lappas M, Mitton A, Mition A, Permezel M. In response to oxidative stress, the expression of inflammatory cytokines and antioxidant enzymes are impaired in placenta, but not adipose tissue, of women with gestational diabetes. *J Endocrinol*. 2010;204(1):75–84.
120. Myatt L, Cui X. Oxidative stress in the placenta. *Histochem Cell Biol*. 2004;122(4):369–82.
121. Yoshizumi M, Perrella MA, Burnett JC, Lee ME. Tumor necrosis factor downregulates an endothelial nitric oxide synthase mRNA by shortening its half-life. *Circ Res*. 1993;73(1):205–9.
122. Wilkins FC, Alberola A, Mizelle HL, Opgenorth TJ, Granger JP. Systemic hemodynamics and renal function during long-term pathophysiological increases in circulating endothelin. *Am J Physiol*. 1995;268(2 Pt 2):R375–381.
123. Granger JP, Alexander BT, Llinas MT, Bennett WA, Khalil RA. Pathophysiology of hypertension during preeclampsia linking placental ischemia with endothelial dysfunction. *Hypertens* 2001;38(3 Pt 2):718–22.
124. Neerhof MG, Synowiec S, Khan S, Thaete LG. Pathophysiology of Chronic Nitric Oxide Synthase Inhibition-Induced Fetal Growth Restriction in the Rat. *Hypertens Pregnancy Off J Int Soc Study Hypertens Pregnancy*. 2011;30(1):28–36.
125. Zeng Y, Li M, Chen Y, Wang S. Homocysteine, endothelin-1 and nitric oxide in patients with hypertensive disorders complicating pregnancy. *Int J Clin Exp Pathol*. 2015;8(11):15275–9.

126. Hodžić J, Izetbegović S, Muračević B, Iriškić R, Štimjanin Jović H. Nitric oxide biosynthesis during normal pregnancy and pregnancy complicated by preeclampsia. *Med Glas Off Publ Med Assoc Zenica-Doboj Cant Bosnia Herzeg.* 2017;14(2):211–7.
127. Verdonk K, Visser W, Van Den Meiracker AH, Danser AHJ. The renin-angiotensin-aldosterone system in pre-eclampsia: the delicate balance between good and bad. *Clin Sci Lond Engl.* 2014;126(8):537–44.
128. Herse F, Staff AC, Hering L, Müller DN, Luft FC, Dechend R. AT1-receptor autoantibodies and uteroplacental RAS in pregnancy and pre-eclampsia. *J Mol Med Berl Ger.* 2008;86(6):697–703.
129. Qwitterer U, Lothar H, Abdalla S. AT1 receptor heterodimers and angiotensin II responsiveness in preeclampsia. *Semin Nephrol.* 2004;24(2):115–9.
130. González-Hernández M de L, Godínez-Hernández D, Bobadilla-Lugo RA, López-Sánchez P. Angiotensin-II type 1 receptor (AT1R) and alpha-1D adrenoceptor form a heterodimer during pregnancy-induced hypertension. *Auton Autacoid Pharmacol.* 2010;30(3):167–72.
131. Parrish MR, Murphy SR, Rutland S, Wallace K, Wenzel K, Wallukat G, i in. The effect of immune factors, tumor necrosis factor-alpha, and agonistic autoantibodies to the angiotensin II type I receptor on soluble fms-like tyrosine-1 and soluble endoglin production in response to hypertension during pregnancy. *Am J Hypertens* 2010;23(8):911–6.
132. Parrish MR, Ryan MJ, Glover P, Brewer J, Ray L, Dechend R, i in. Angiotensin II type 1 autoantibody induced hypertension during pregnancy is associated with renal endothelial dysfunction. *Gend Med.* 2011;8(3):184–8.
133. Skinner SL, Lumbers ER, Symonds EM. Renin concentration in human fetal and maternal tissues. *Am J Obstet Gynecol.* 1968;101(4):529–33.
134. Hosokawa T, Howard RB, Maguire MH. Conversion of angiotensin I to angiotensin II in the human foetoplacental vascular bed. *Br J Pharmacol.* 1985;84(1):237–41.
135. Nguyen G, Delarue F, Burcklé C, Bouzahir L, Giller T, Sraer J-D. Pivotal role of the renin/prorenin receptor in angiotensin II production and cellular responses to renin. *J Clin Invest.* 2002;109(11):1417–27.

136. Pringle KG, Zakar T, Yates D, Mitchell CM, Hirst JJ, Lumbers ER. Molecular evidence of a (pro)renin/ (pro)renin receptor system in human intrauterine tissues in pregnancy and its association with PGHS-2. *J Renin-Angiotensin-Aldosterone Syst JRAAS*. 2011;12(3):304–10.
137. Marques FZ, Pringle KG, Conquest A, Hirst JJ, Markus MA, Sarris M, i in. Molecular characterization of renin-angiotensin system components in human intrauterine tissues and fetal membranes from vaginal delivery and cesarean section. *Placenta*. 2011;32(3):214–21.
138. Broughton Pipkin F, Symonds EM. Factors affecting angiotensin II concentrations in the human infant at birth. *Clin Sci Mol Med*. 1977;52(5):449–56.
139. Kingdom JC, McQueen J, Connell JM, Whittle MJ. Fetal angiotensin II levels and vascular (type I) angiotensin receptors in pregnancies complicated by intrauterine growth retardation. *Br J Obstet Gynaecol*. 1993;100(5):476–82.
140. Leung PS, Tsai SJ, Wallukat G, Leung TN, Lau TK. The upregulation of angiotensin II receptor AT(1) in human preeclamptic placenta. *Mol Cell Endocrinol*. 2001;184(1–2):95–102.
141. Thapa L, He CM, Chen HP. Study on the expression of angiotensin II (ANG II) receptor subtype 1 (AT1R) in the placenta of pregnancy-induced hypertension. *Placenta*. 2004;25(7):637–41.
142. Mistry HD, Kurlak LO, Broughton Pipkin F. The placental renin-angiotensin system and oxidative stress in pre-eclampsia. *Placenta*. 2013;34(2):182–6.
143. Herse F, Dechend R, Harsem NK, Wallukat G, Janke J, Qadri F, i in. Dysregulation of the circulating and tissue-based renin-angiotensin system in preeclampsia. *Hypertens* 2007;49(3):604–11.
144. Williams PJ, Mistry HD, Innes BA, Bulmer JN, Broughton Pipkin F. Expression of AT1R, AT2R and AT4R and their roles in extravillous trophoblast invasion in the human. *Placenta*. 2010;31(5):448–55.
145. Knock GA, Sullivan MH, McCarthy A, Elder MG, Polak JM, Wharton J. Angiotensin II (AT1) vascular binding sites in human placentae from normal-term, preeclamptic and growth retarded pregnancies. *J Pharmacol Exp Ther*. 1994;271(2):1007–15.

146. Valdés G, Neves L a. A, Anton L, Corthorn J, Chacón C, Germain AM, i in. Distribution of angiotensin-(1-7) and ACE2 in human placentas of normal and pathological pregnancies. *Placenta*. 2006;27(2-3):200-7.
147. Ramírez-Molina C, Heudi O, Pullen M, Marshall PS. Study of bradykinin metabolism by rat lung tissue membranes and rat kidney brush border membranes by HPLC with inductively coupled plasma-mass spectrometry and orthogonal acceleration time-of-flight mass spectrometry. *J Pept Sci Off Publ Eur Pept Soc*. 2006;12(3):220-6.
148. Li H, Yuan G. Evaluation of binding selectivity of a polyamide probe to single base-pair different DNA in A.T-rich region by electrospray ionization mass spectrometry. *J Am Soc Mass Spectrom*. 2006;17(12):1742-8.
149. Bujak-Gizycka B, Olszanecki R, Suski M, Madek J, Stachowicz A, Korbut R. Angiotensinogen metabolism in rat aorta: robust formation of proangiotensin-12. *J Physiol Pharmacol Off J Pol Physiol Soc*. 2010;61(6):679-82.
150. Olszanecki R, Bujak-Gizycka B, Madej J, Suski M, Wołkow PP, Jawień J, i in. Kaempferol, but not resveratrol inhibits angiotensin converting enzyme. *J Physiol Pharmacol Off J Pol Physiol Soc*. 2008;59(2):387-92.
151. Rutkowska-Zapała M, Suski M, Szatanek R, Lenart M, Węglarczyk K, Olszanecki R, i in. Human monocyte subsets exhibit divergent angiotensin I-converting activity. *Clin Exp Immunol*. 2015;181(1):126-32.
152. Stettner D, Bujak-Gizycka B, Olszanecki R, Rytlewski K, Huras H, Korbut R. Assessment of angiotensin I metabolism in the human placenta using an LC/MS method. *Folia Med Cracov*. 2013;53(1):31-9.
153. Anton L, Merrill DC, Neves LAA, Diz DI, Corthorn J, Valdes G, i in. The uterine placental bed Renin-Angiotensin system in normal and preeclamptic pregnancy. *Endocrinology*. 2009;150(9):4316-25.
154. Gao Q, Tang J, Li N, Zhou X, Li Y, Liu Y, i in. A novel mechanism of angiotensin II-regulated placental vascular tone in the development of hypertension in preeclampsia. *Oncotarget*. 2017;8(19):30734-41.
155. Itakura A, Mizutani S. Involvement of placental peptidases associated with renin-angiotensin systems in preeclampsia. *Biochim Biophys Acta*. 2005;1751(1):68-72.

156. Ito M, Itakura A, Ohno Y, Nomura M, Senga T, Nagasaka T, i in. Possible activation of the renin-angiotensin system in the feto-placental unit in preeclampsia. *J Clin Endocrinol Metab.* 2002;87(4):1871–8.
157. LaMarca B, Amaral LM, Harmon AC, Cornelius DC, Faulkner JL, Cunningham MW. Placental ischemia and resultant phenotype in animal models of preeclampsia. *Curr Hypertens Rep.* 2016;18(5):38.
158. Vaswani K, Chan H-W, Verma P, Dekker Nitert M, Peiris HN, Wood-Bradley RJ, i in. The rat placental renin-angiotensin system - a gestational gene expression study. *Reprod Biol Endocrinol.* 2015; 13:89
159. Valdés G, Corthorn J, Bharadwaj MS, Joyner J, Schneider D, Brosnihan KB. Utero-placental expression of angiotensin-(1–7) and ACE2 in the pregnant guinea-pig. *Reprod Biol Endocrinol.* 2013;11:5.
160. Valdés G, Schneider D, Corthorn J, Ortíz R, Acuña S, Padilla O. Administration of angiotensin II and a bradykinin B2 receptor blocker in midpregnancy impairs gestational outcome in guinea pigs. *Reprod Biol Endocrinol.* 2014;12:49.
161. Furuya M, Ishida J, Aoki I, Fukamizu A. Pathophysiology of placentation abnormalities in pregnancy-induced hypertension. *Vasc Health Risk Manag.* 2008;4(6):1301–13.
162. Saxena AR, Karumanchi SA, Brown NJ, Royle CM, McElrath TF, Seely EW. Increased sensitivity to angiotensin II is present postpartum in women with a history of hypertensive pregnancy. *Hypertens* 2010;55(5):1239–45.
163. Kalenga MK, De Gasparo M, Thomas K, De Hertogh R. Down-regulation of angiotensin AT1 receptor by progesterone in human placenta. *J Clin Endocrinol Metab.* 1996;81(3):998–1002.
164. Broughton Pipkin F, Symonds EM. The renin-angiotensin system in the maternal and fetal circulation in pregnancy hypertension. *Clin Obstet Gynaecol.* 1977;4(3):651–64.

STRESZCZENIE

Układ renina- angiotensyna (RAS) odgrywa istotną rolę w regulacji ciśnienia tętniczego oraz równowagi wodno-elektrolitowej. W czasie trwania ciąży dochodzi do wzmożonej ekspresji wielu składowych RAS, zarówno we krwi, jak i w tkankach. Angiotensyna II (Ang II) osiąga wyższe stężenia w osoczu kobiet ciężarnych, jednocześnie należy podkreślić, że w ciąży fizjologicznej nie skutkuje to wzrostem ciśnienia tętniczego krwi. Wydaje się, że u kobiet ciężarnych istotnym mechanizmem zabezpieczającym przed szkodliwym działaniem nadmiaru Ang II w osoczu jest nasilone wytwarzanie ochronnej angiotensyny-(1-7) – naturalnej „przeciwwagi” dla Ang II. Co ciekawe, udowodniono obecność i aktywność wszystkich komponent RAS w wielu tkankach, w tym także w łożysku. W piśmiennictwie postawiono hipotezę, że ciąża fizjologiczna związana jest ze stanem nadekspresji Ang-(1-7), a w związku z tym obniżenie jej poziomu w stanie przedrzucawkowym (PE) może być elementem odpowiedzialnym za podwyższone wartości ciśnienia tętniczego. Weryfikacja tej hipotezy okazuje się jednak bardzo trudna, ze względu na ograniczenia metodyczne w ocenie tkankowych układów RAS. Nowe możliwości w ocenie lokalnych RAS daje użycie modelu *ex vivo* oraz chromatografii cieczowej z detekcją masową (LC-MS).

Celem pracy było zbadanie w modelu *ex vivo* metabolizmu angiotensyny I (Ang I), jako prekursora kolejnych angiotensyn, porównanie produkcji metabolitów Ang I, a także ocena ekspresji enzymów i receptorów w łożysku w ciąży fizjologicznej oraz powikłanej stanem przedrzucawkowym.

Pacjentki podzielono na 2 grupy (n=14 w każdej z grup): badaną (ciąża powikłana stanem przedrzucawkowym) i porównawczą (ciąża fizjologiczna). W celu ujednolicenia wyników jako sposób zakończenia ciąży wybrano cięcie cesarskie (w ciążach fizjologicznych ze wskazań elektywnych). Fragmenty łożysk (ok. 1x1 cm) pobierano bezpośrednio po odpęgnięciu dziecka i transportowano w celu przygotowania do wykonania badań (LC-MS oraz reakcja RT-PCR z zastosowaniem sond). W celu potwierdzenia stanu przedrzucawkowego na poziomie tkankowym wykonano ocenę histopatologiczną fragmentów łożysk z grupy badanej.

Po raz pierwszy w ocenie zdolności tkanki łożyska do kowersji Ang I wykorzystano metodę LC-MS. Wykazano wydajny metabolizm Ang I do peptydów angiotensynowych,

potwierdzając sprawne funkcjonowanie RAS w łożysku. Stwierdzono niższą aktywność RAS u pacjentek z grupy badanej. Głównym metabolitem Ang I zarówno w grupie badanej, jak i porównawczej, była Ang-(1-7). Potwierdzono także, iż ACE jest enzymem odpowiadającym w największym stopniu za produkcję Ang II. Wykazano zmniejszoną ekspresję ACE w łożyskach pacjentek z PE. Nie zaobserwowano natomiast zmian w ekspresji ACE2 i NEP w grupie badanej, co może wskazywać na rolę szlaku rozkładu Ang I do Ang-(1-7) z udziałem NEP przy niższej ekspresji ACE w zmniejszeniu powstawania Ang-(1-7) u pacjentek z PE. Stwierdzono zmniejszenie ekspresji receptora Ang II (AT1R) w tkance łożyska z grupy badanej, choć w piśmiennictwie większość autorów opisuje wzrost ekspresji AT1R w PE. Poziom mRNA receptora AT2 był bardzo niski – poniżej detekcji. Istnieją jednak doniesienia zarówno o zmniejszeniu, jak i braku różnic w ekspresji AT1R.

Rozbieżności pewnych wyników niniejszego badania w odniesieniu do danych z piśmiennictwa (również niejednoznacznych) mogą wynikać z zastosowania różnych metod badawczych i z pewnością przemawiają za koniecznością prowadzenia dalszych badań w zakresie funkcjonowania RAS w łożysku.

SUMMARY

The renin-angiotensin system (RAS) plays an important role in regulating arterial blood pressure and water and electrolyte balance. During pregnancy, increased expression of many RAS components occurs – both in blood and in tissues. Angiotensin II (Ang II) reaches higher concentrations in the plasma of pregnant women, but it needs to be emphasised that in physiological pregnancy this does not result in increased arterial blood pressure. It seems that in pregnant women, an important protective mechanism from harmful effects of excess Ang II in the plasma is the increased production of protective angiotensin-(1-7) – a natural “counterweight” for Ang II. Interestingly, the presence and activity of all the RAS components in many tissues, including the placenta, has been proven. A hypothesis was formulated in literature that physiological pregnancy is related to a state of overexpression of Ang-(1-7), so the decrease of its level in pre-eclampsia (PE) may be the element responsible for the increased values of arterial blood pressure. However, the verification of this hypothesis turns out to be very difficult due to methodological limitations in the assessment of tissue RAS. The use of an *ex vivo* model and the liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS) technique provides new opportunities in the assessment of local RAS.

The aim of the paper was to examine the metabolism of angiotensin I (Ang I) as a precursor of other angiotensins in an *ex vivo* model, compare the production of Ang I metabolites, and assess the expression of enzymes and receptors in the placenta in physiological pregnancy and in pregnancy complicated by pre-eclampsia.

Patients were divided into 2 groups (n=14 in each group): a study group (pregnancy complicated by pre-eclampsia) and a control (comparative) group (physiological pregnancy). In order to consolidate the results, caesarean section was selected as the manner of delivery (elective in physiological pregnancies). Placental samples (ca. 1x1 cm) were taken directly after omphalotomy and transported in order to be prepared for testing (LC-MS and RT-PCR with the use of probes). To confirm pre-eclampsia at tissue level, histopathological assessment of placental samples from the study group was carried out.

It was the first time the LC-MS technique was used to assess the ability of placental tissue to convert Ang I. Efficient metabolism of Ang I to angiotensin peptides was demonstrated, confirming efficient functioning of RAS in the placenta. Lower RAS activity was found in patients from the study group. The primary metabolite of Ang I, both in the study group and in the control group, was Ang-(1-7). It was also confirmed that ACE is the

enzyme responsible for the production of Ang II to the greatest extent. Decreased expression of ACE in the placentas of patients with PE was demonstrated. No changes in the expression of ACE2 and NEP were observed in the study group, which may indicate the role of the decomposition pathway of Ang I to Ang-(1-7) with the participation of NEP at lower expression of ACE in decreasing the production of Ang-(1-7) in patients with PE. Decreased expression of the Ang II receptor (AT1R) in the placental tissue sampled from the study group was found, although in literature, most authors describe increased expression of AT1R in PE. The level of the AT2 receptor mRNA was very low – below detection level. There are reports, however, both of decreased expression of AT1R and of no differences observed in the expression of AT1R.

The discrepancies in certain results of this study relative to data found in literature (also ambiguous) may stem from the use of different research methods and certainly call for further research on the functioning of RAS in the placenta.

SPIS RYCIN, TABEL I ZDJĘĆ

RYCINY

Ryc. 1.	<i>Schemat konwersji układu renina-angiotensyna.....</i>	11
Ryc. 2.	<i>Układ naczyniowy i perfuzja łożyska w ciąży powikłanej stanem przedrzucawkowym i fizjologicznej.....</i>	18
Ryc. 3.	<i>Schemat pobierania materiału z łożyska – fragment wycinany z części okolopępowinowej (do 2 cm od przyczepu pępowiny), przechodzący przez całą grubość łożyska.....</i>	24
Ryc. 4.	<i>Przykładowy chromatogram rozdziału mieszaniny standardów peptydów angiotensynowych.....</i>	28
Ryc. 5.	<i>Wyekstrahowane chromatogramy monitorowanych par jonów dla poszczególnych angiotensyn.....</i>	28
Ryc. 6.	<i>Średnie ciśnienie skurczowe w grupie badanej i porównawczej.....</i>	38
Ryc. 7.	<i>Średnie ciśnienie rozkurczowe w grupie badanej i porównawczej.....</i>	39
Ryc. 8.	<i>Przykładowy chromatogram.....</i>	42
Ryc. 9.	<i>Porównanie produkcji metabolitów Ang I w łożysku w grupie badanej i porównawczej.....</i>	43
Ryc. 10.	<i>Ekspresja genów poszczególnych składników układu RAA w łożyskach grupy badanej i porównawczej.....</i>	44

TABELE

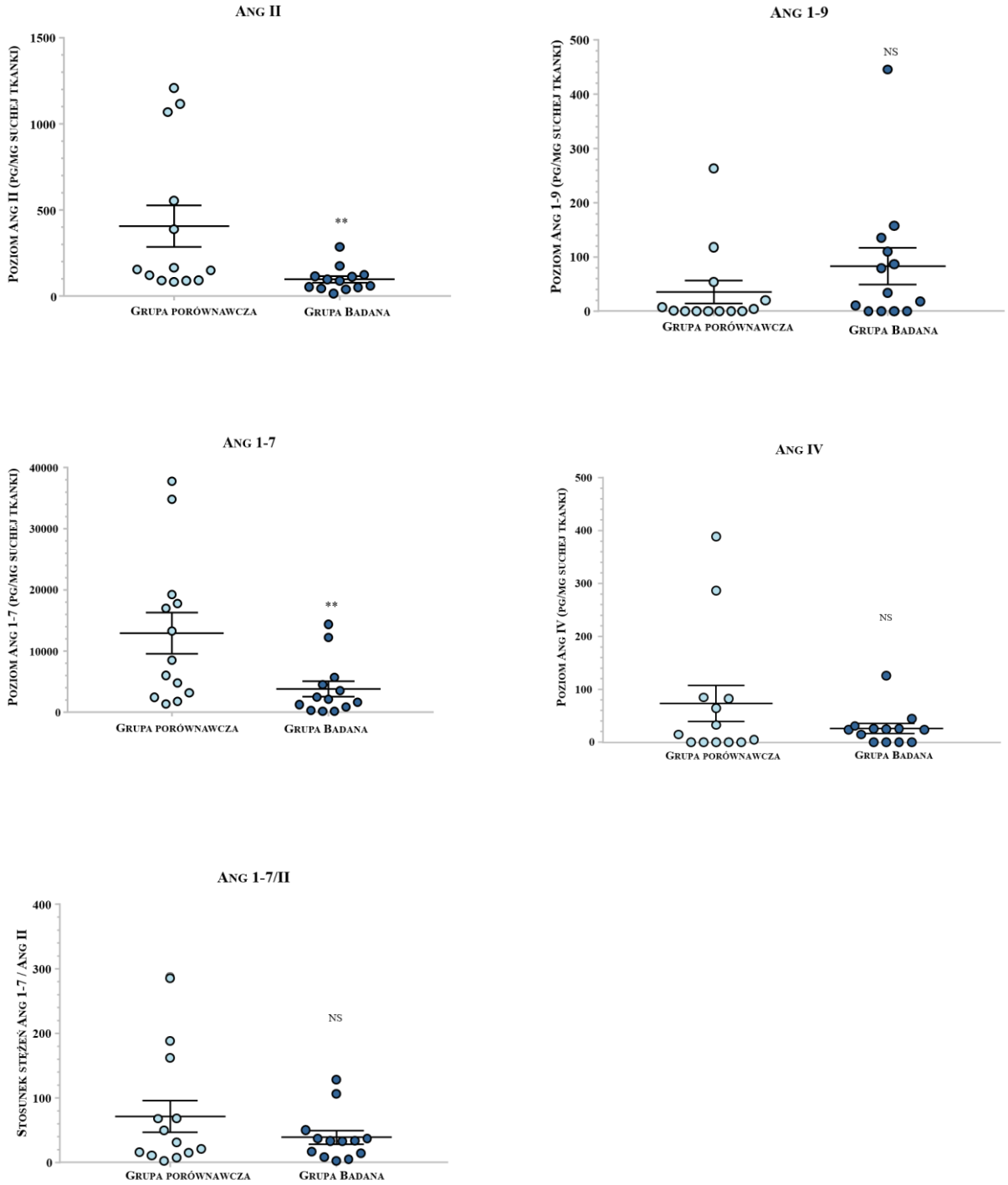
Tab. 1.	<i>Monitorowane pary jonów dla poszczególnych peptydów angiotensynowych.....</i>	27
Tab. 2.	<i>Sondy Taqman dla genów poszczególnych składników układu RAS użyte w badaniu.....</i>	31
Tab. 3.	<i>Ogólna charakterystyka grupy badanej i porównawczej – zmienne ilościowe.....</i>	36
Tab. 4.	<i>Ogólna charakterystyka grupy badanej i porównawczej – zmienne jakościowe.....</i>	36
Tab. 5.	<i>Porównanie zmiennych różnicujących grupę badaną i kontrolną – cechy ilościowe.....</i>	37
Tab. 6.	<i>Porównanie cech jakościowych między grupami.....</i>	37
Tab. 7.	<i>Wartości parametrów biochemicznych w grupie badanej oraz zakresy referencyjne.....</i>	38
Tab. 8.	<i>Porównanie produkcji głównych metabolitów Ang I w łożysku pomiędzy grupami.....</i>	43

ZDJĘCIA

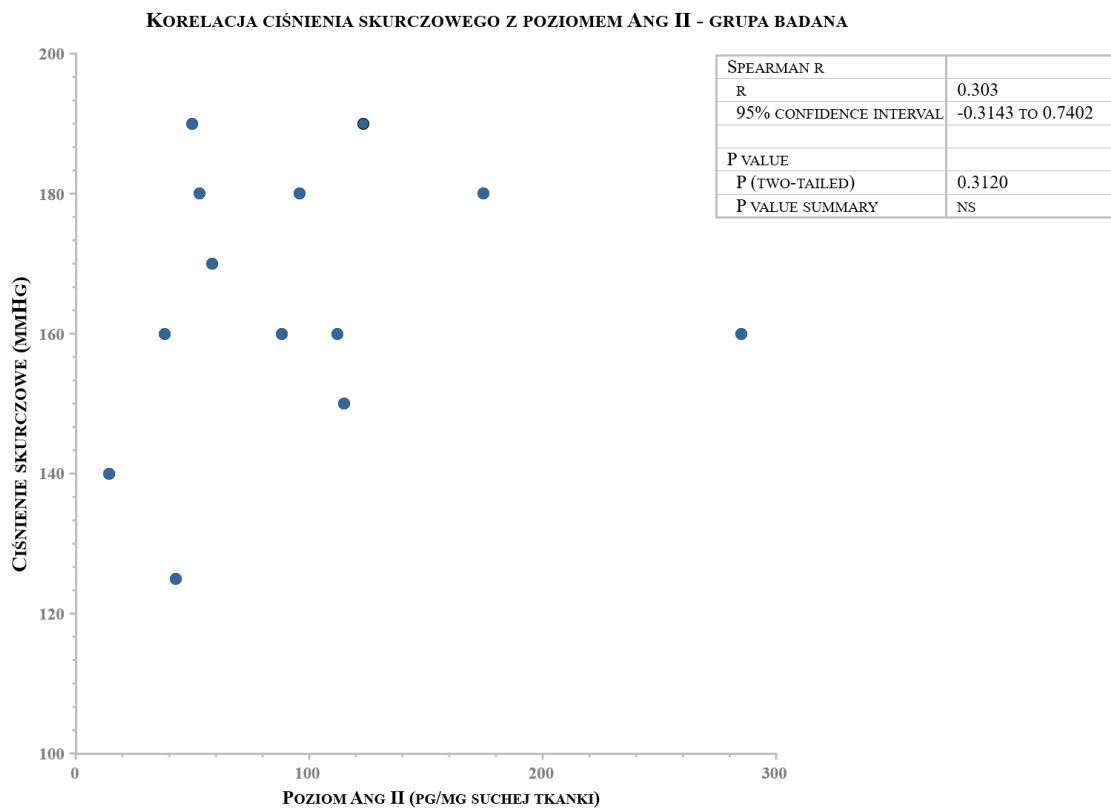
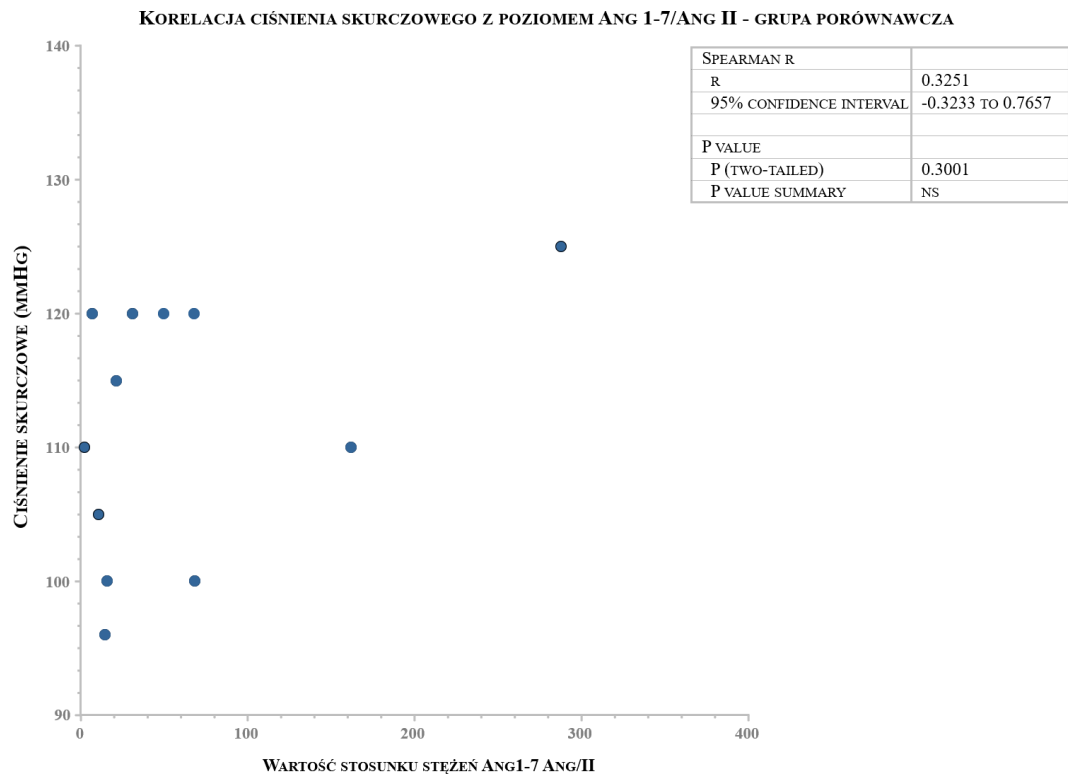
Zdj. 1.	<i>Tętnice spiralne doczesnej o znacznie pogrubiałej ścianie i zwężonym świetle wskutek rozrostu elementów ściany naczynia.....</i>	40
Zdj. 2.	<i>Następstwa zmian naczyniowych – zawał łożyska i zakrzep w świetle naczynia.....</i>	40
Zdj. 3.	<i>Zawał łożyska i zwapnienia.....</i>	40
Zdj. 4.	<i>Następstwa zmian naczyniowych, tzw. distal villous hypoplasia.....</i>	40
Zdj. 5.	<i>Rozrost elementów ściany tętnicy spiralnej, znaczne zwężenie światła.....</i>	40
Zdj. 6.	<i>Zakrzepy w świetle naczyń. Kosmki łożyska duże, o obrzękłym podścielisku...</i>	40

SUPLEMENT

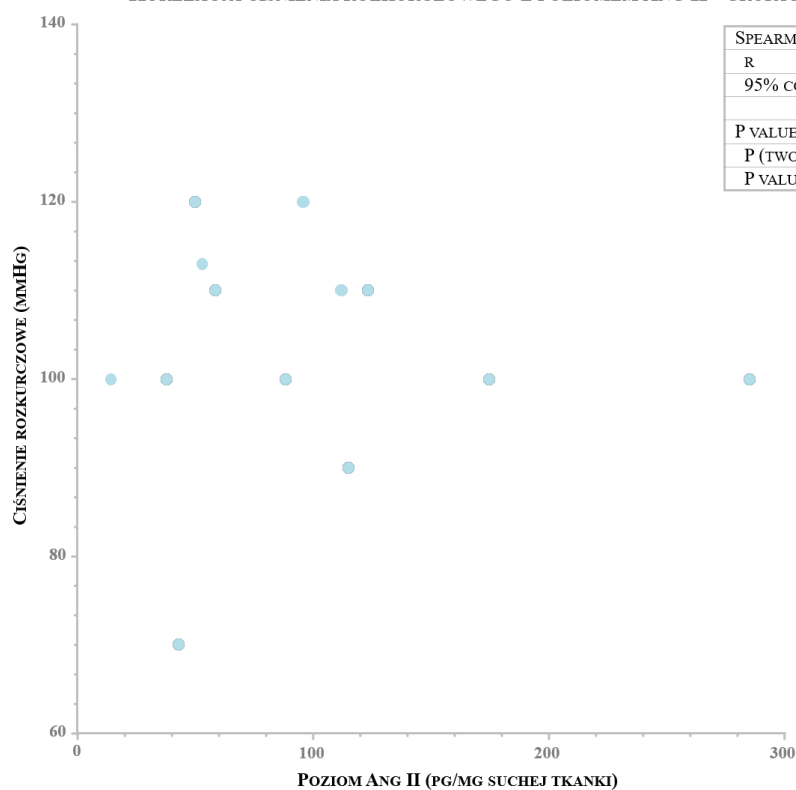
Porównanie poziomów poszczególnych metabolitów Ang I przedstawione w formie *scaterrplot* z zaznaczoną średnią. ******p<0,05



Analiza korelacji pomiędzy wartościami ciśnienia skurczowego i rozkurczowego oraz powstawaniem Ang II i Ang-(1-7), a także stosunkiem poziomów obu metabolitów *ex vivo*.

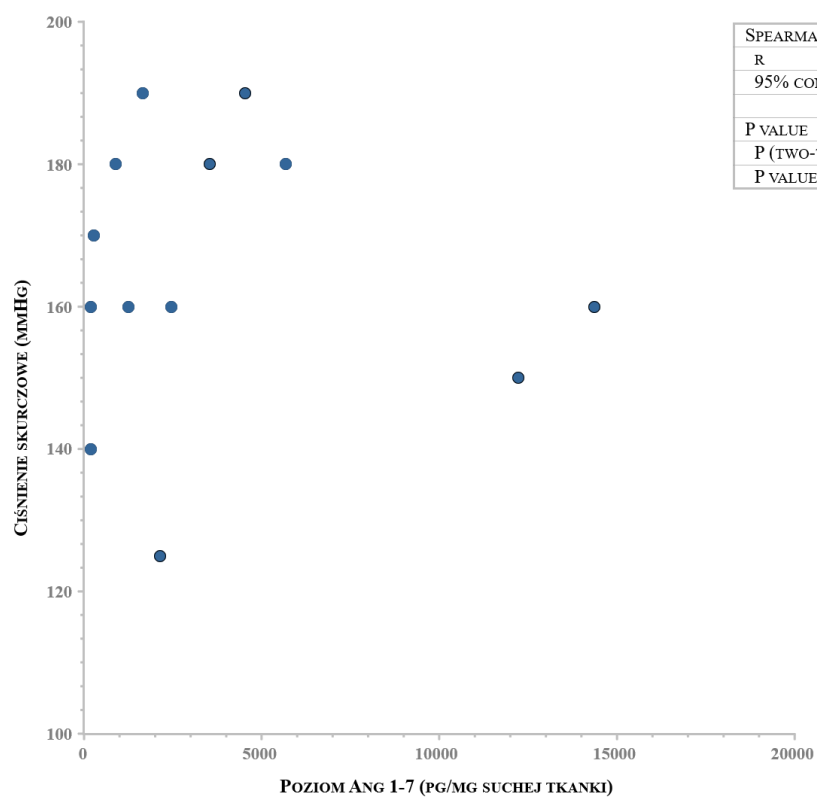


KORELACJA CIŚNIENIA ROZKURCZOWEGO Z POZIOMEM ANG II - GRUPA BADANA



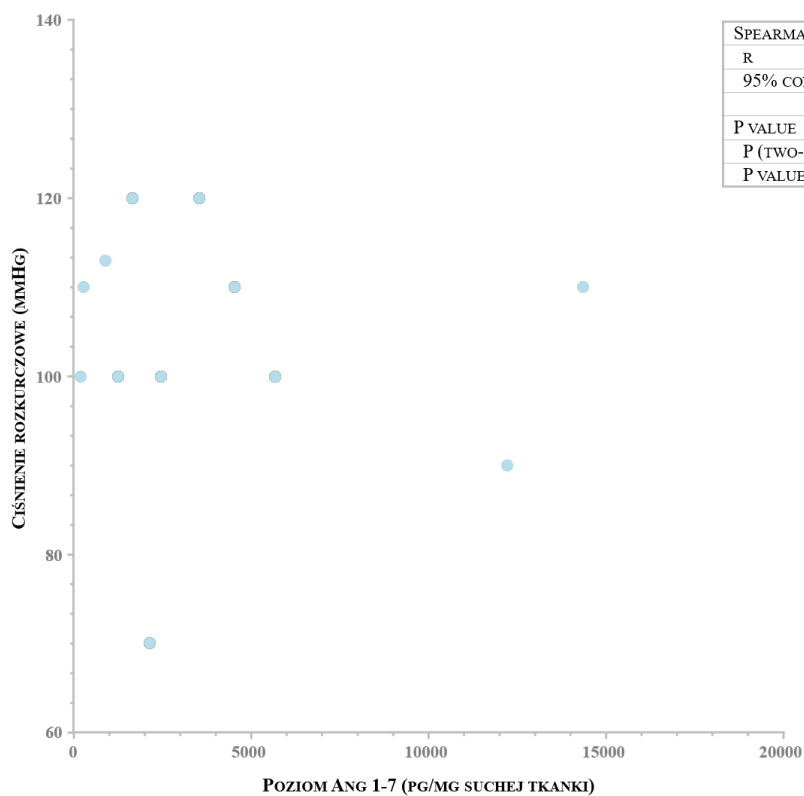
SPEARMAN R	
R	0
95% CONFIDENCE INTERVAL	-0.5636 TO 0.5636
P VALUE	
P (TWO-TAILED)	>0.9999
P VALUE SUMMARY	NS

KORELACJA CIŚNIENIA SKURCZOWEGO Z POZIOMEM ANG 1-7 - GRUPA BADANA

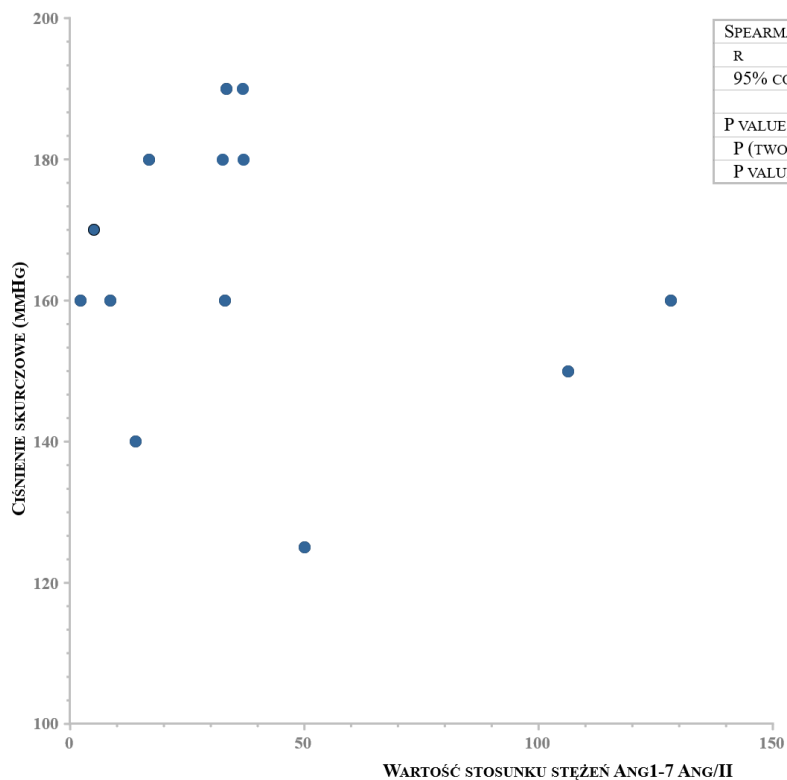


SPEARMAN R	
R	0.1263
95% CONFIDENCE INTERVAL	-0.4709 TO 0.644
P VALUE	
P (TWO-TAILED)	0.6798
P VALUE SUMMARY	NS

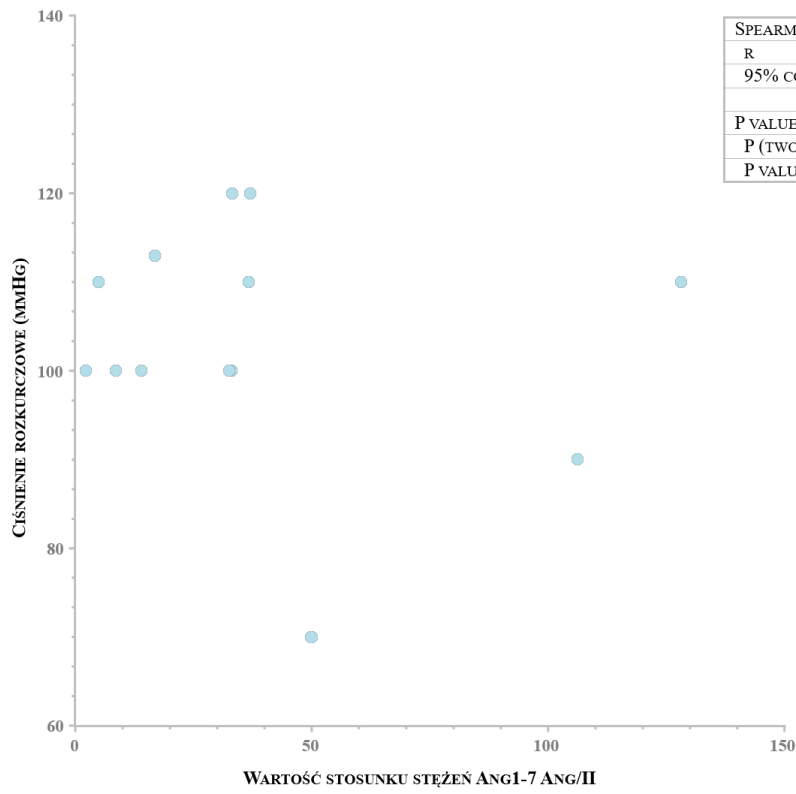
KORELACJA CIŚNIENIA ROZKURCZOWEGO Z POZIOMEM ANG 1-7 - GRUPA BADANA



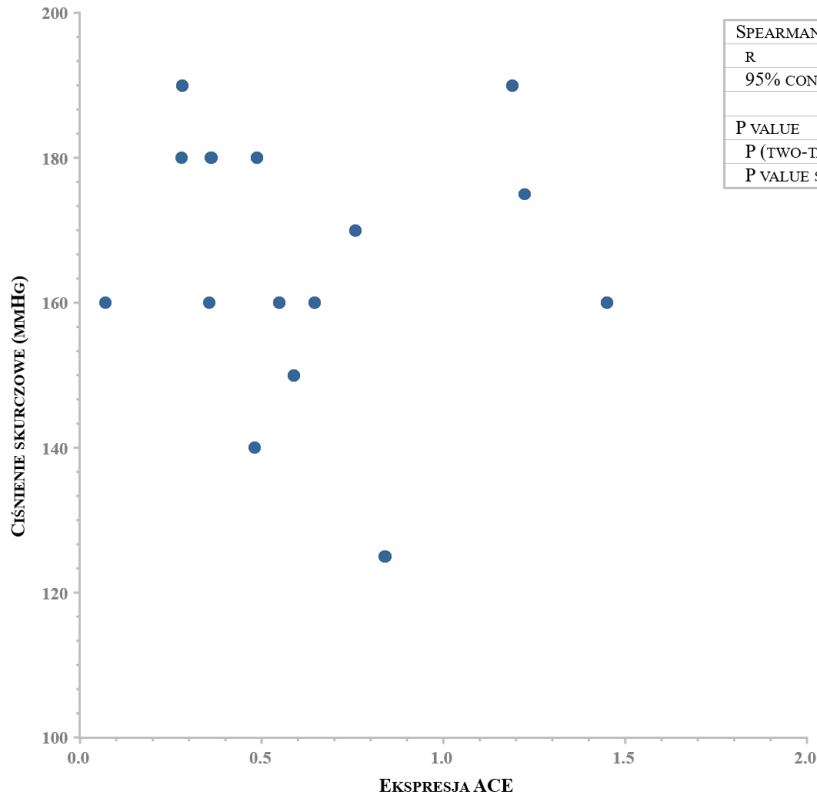
KORELACJA CIŚNIENIA SKURCZOWEGO Z POZIOMEM ANG 1-7/ANG II - GRUPA BADANA



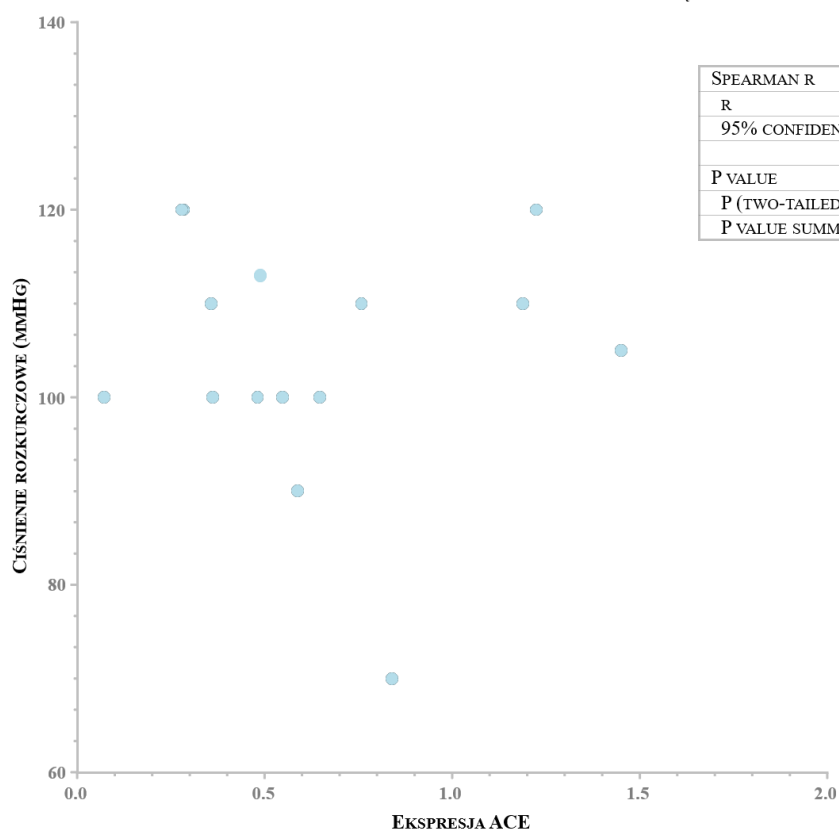
KORELACJA CIŚNIENIA ROZKURCZOWEGO Z POZIOMEM ANG I-7/ANG II - GRUPA BADANA



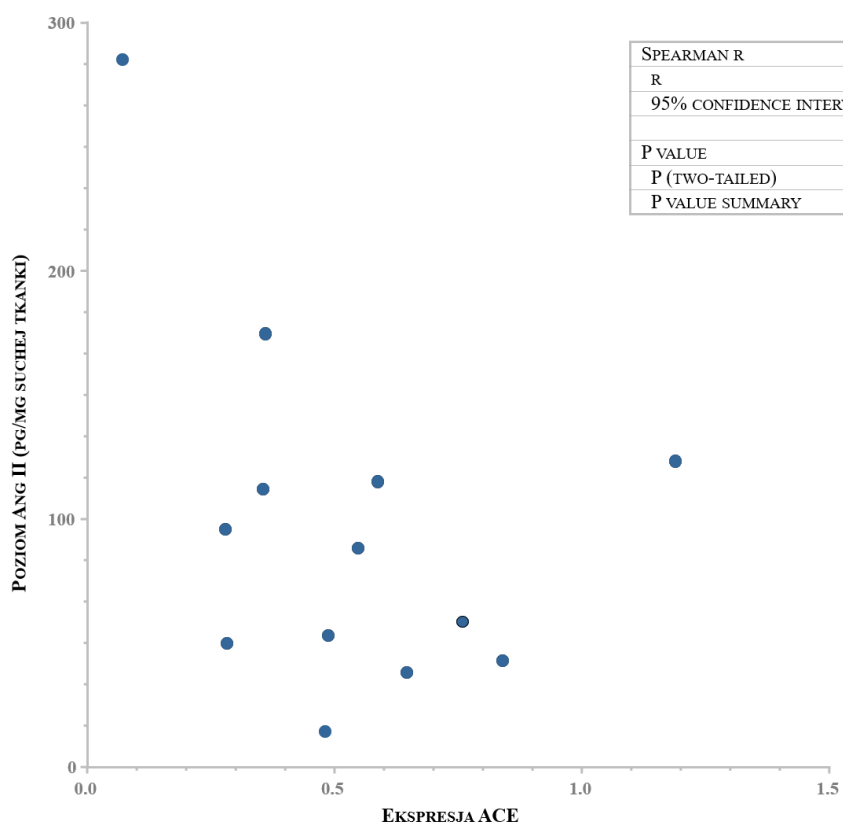
KORELACJA CIŚNIENIA SKURCZOWEGO Z EKSPRESJĄ ACE - GRUPA BADANA



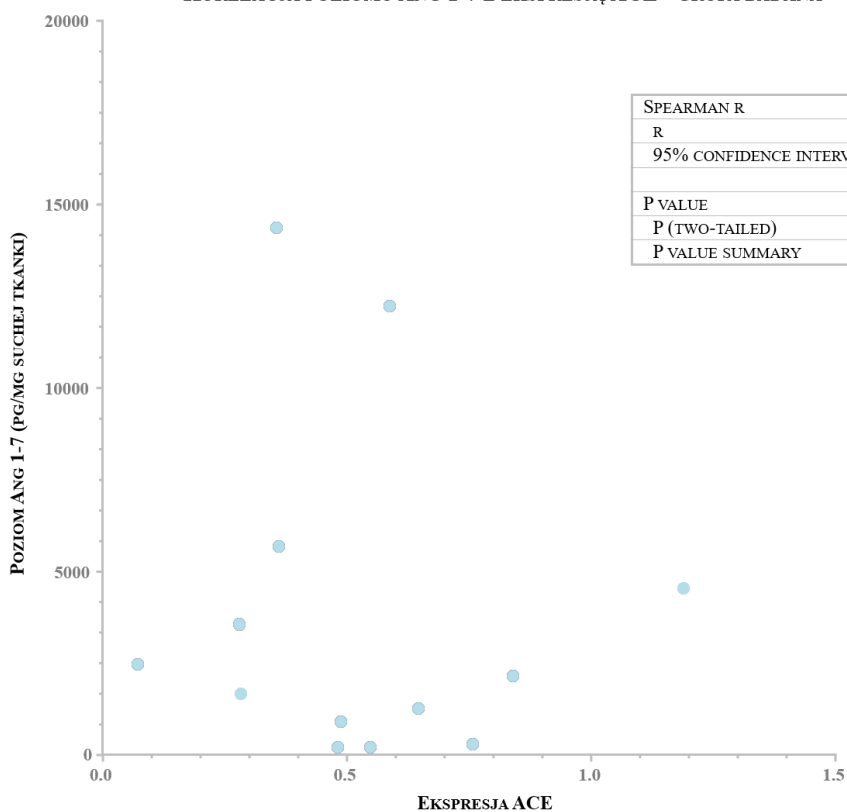
KORELACJA CIŚNIENIA ROZKURCZOWEGO Z EKSPRESJĄ ACE - GRUPA BADANA



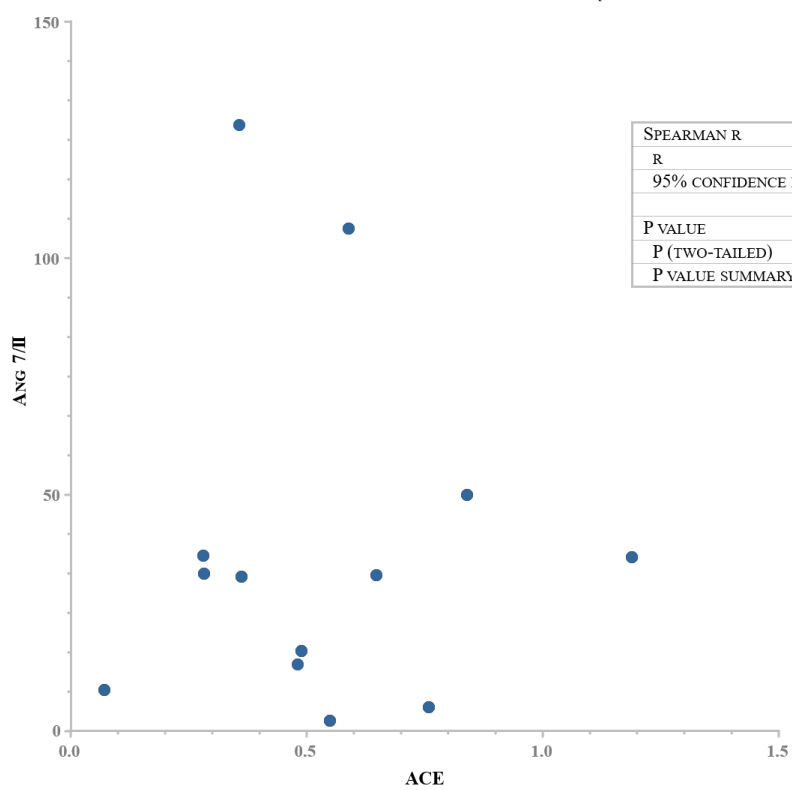
KORELACJA POZIOMU ANG II Z EKSPRESJĄ ACE - GRUPA BADANA



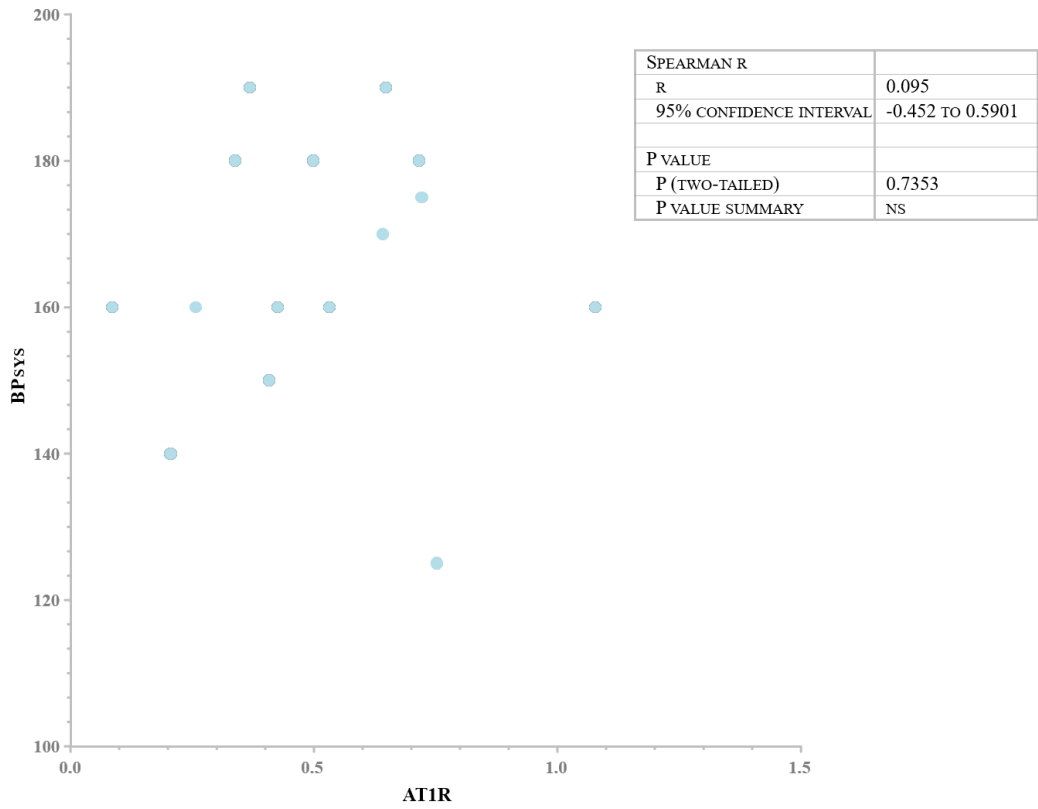
KORELACJA POZIOMU ANG 1-7 Z EKSPRESJĄ ACE - GRUPA BADANA



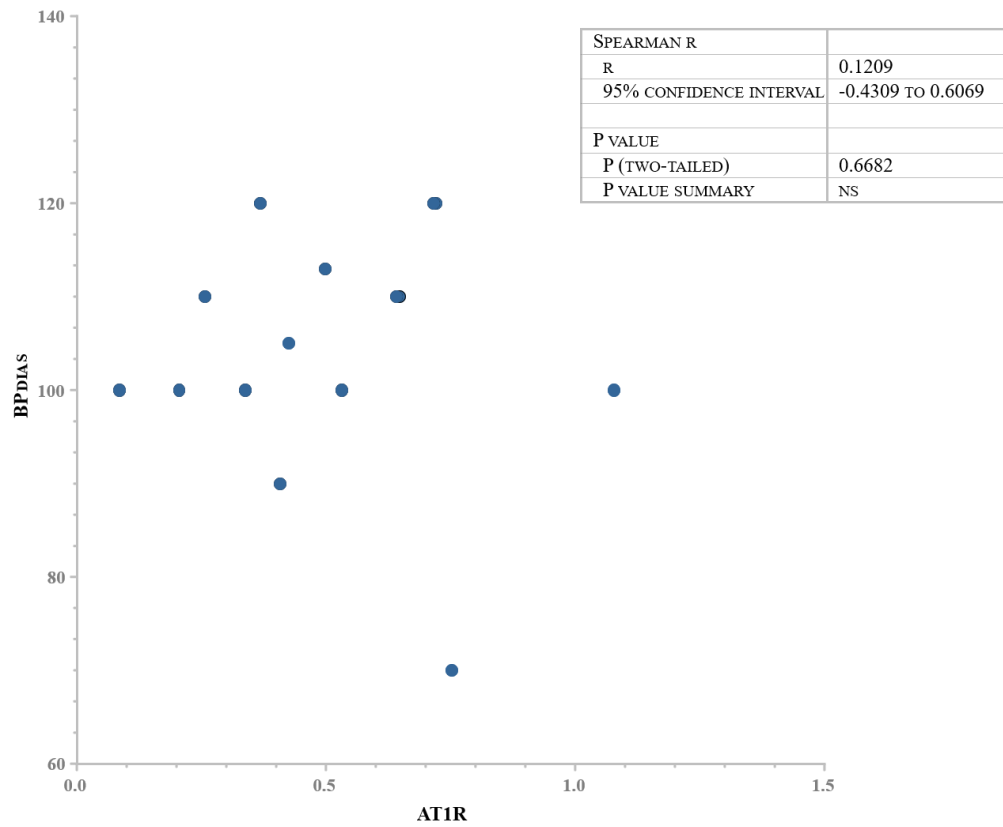
KORELACJA POZIOMU ANG 1-7/ANG II Z EKSPRESJĄ ACE - GRUPA BADANA



KORELACJA CIŚNIENIA SKURCZOWEGO Z EKSPRESJĄ AT1R - GRUPA BADANA



KORELACJA CIŚNIENIA ROZKURCZOWEGO Z EKSPRESJĄ AT1R - GRUPA BADANA



KORELACJA POZIOMU ANG 1-7/ANG II Z EKSPRESJĄ AT1R - GRUPA BADANA

